

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-503217

(P2004-503217A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 39/00
A61K 39/395
A61K 45/00

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 39/00
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00

1 O 1

テーマコード(参考)

A 4 B 02 4
H 4 B 06 5
D 4 C 08 4
N 4 C 08 5
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-500917(P2002-500917)
(86) (22) 出願日 平成13年5月30日(2001.5.30)
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月2日(2002.12.2)
(86) 國際出願番号 PCT/US2001/017454
(87) 國際公開番号 WO2001/092306
(87) 國際公開日 平成13年12月6日(2001.12.6)
(31) 優先権主張番号 60/209,388
(32) 優先日 平成12年5月31日(2000.5.31)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/257,007
(32) 優先日 平成12年12月20日(2000.12.20)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 391018536
ジェンザイム・コーポレーション
GENZYME CORPORATION
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02
139, ケムブリッジ, ワン・ケンドール
・スクエア (番地なし)
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100108774
弁理士 橋本 一憲
(72) 発明者 ニコレット チャールズ エイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 フ
レーミングハム ミル ストリート 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】卵巣癌のための治療化合物

(57) 【要約】

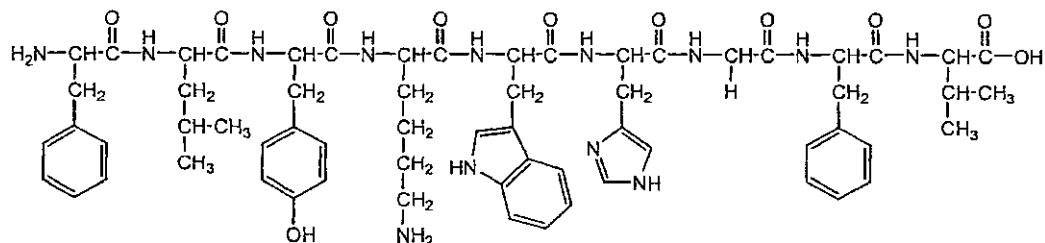
本発明は、合成化合物を認識して結合する、天然のヒト癌抗原 A T F 4 / C R E B - 2 抗体に基づく該合成化合物、これらの化合物をコードするポリヌクレオチド、およびこれらのエピトープの提示に反応して產生される免疫エフェクター細胞を提供する。本発明はさらに、本発明の組成物を送達することによって、被験者に免疫応答を誘導し、免疫治療を施す方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の構造を有する化合物：

【化 1】

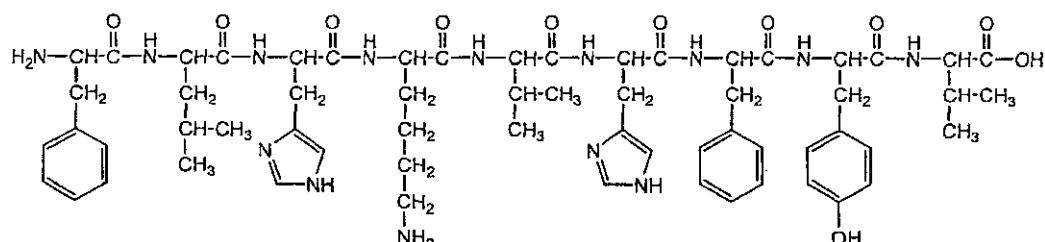


10

【請求項 2】

以下の構造を有する化合物：

【化 2】

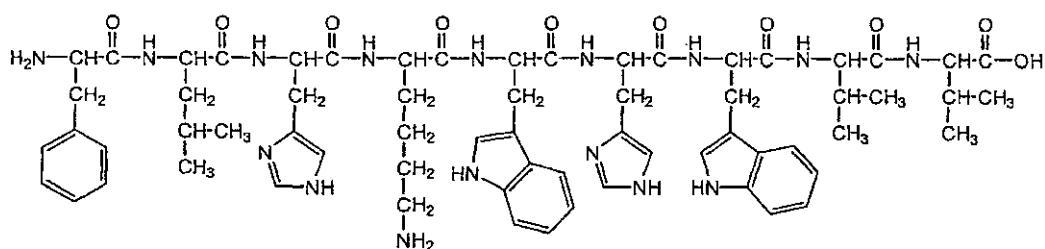


20

【請求項 3】

以下の構造を有する化合物：

【化 3】

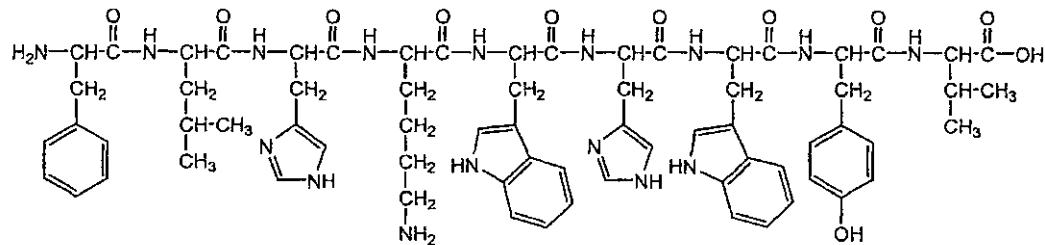


30

【請求項 4】

以下の構造を有する化合物：

【化 4】

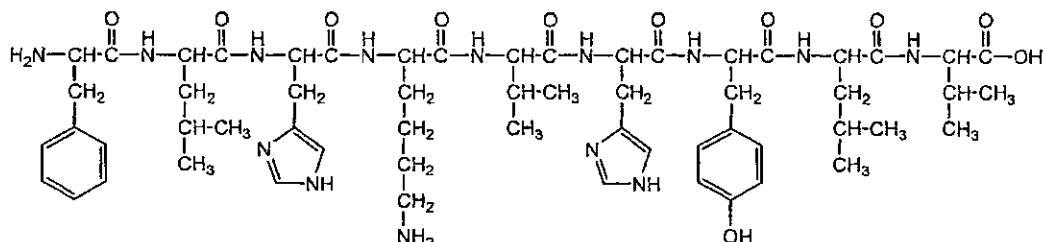


40

【請求項 5】

以下の構造を有する化合物：

【化5】

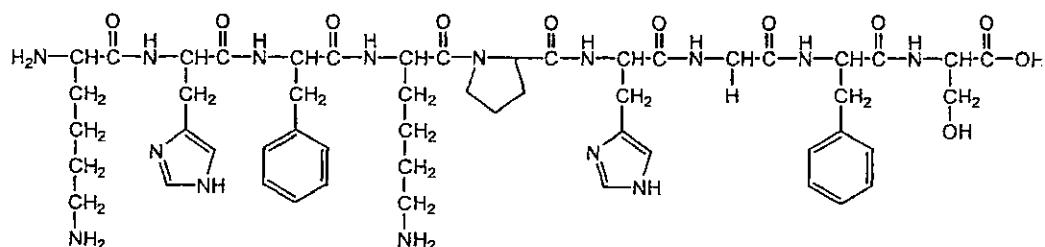


【請求項6】

10

以下の構造を有する化合物：

【化6】



20

【請求項7】

アミノ酸の42、43、44、46、および50位が、それぞれF、L、Y、WおよびVである、配列番号：2のアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項8】

アミノ酸の42、43、44、46、48、49および50位が、それぞれF、L、H、V、F、YおよびVである、配列番号：2のアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項9】

アミノ酸の42、43、44、46、48、49および50位が、それぞれF、L、H、W、W、VおよびVである、配列番号：2のアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項10】

30

アミノ酸の42、43、44、46、48、49および50位が、それぞれF、L、H、W、W、YおよびVである、配列番号：2のアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項11】

アミノ酸の42、43、44、46、48、49および50位が、それぞれF、L、H、V、Y、LおよびVである、配列番号：2のアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項12】

配列番号：2のアミノ酸の42～50位からなるペプチド。

【請求項13】

ペプチドに結合した生物活性免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む、請求項7～12のいずれか一項記載のペプチド。

40

【請求項14】

ペプチドに共有結合した作用物質(agent)をさらに含み、該作用物質がペプチドを抗原提示細胞に標的指向させる(target)ことができる、請求項7～12のいずれか一項記載のペプチド。

【請求項15】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項14記載のペプチド。

【請求項16】

MHCクラスII結合ヘルパーペプチドをさらに含む、請求項7～12のいずれか一項記載のペプチド。

【請求項17】

50

配列番号：3のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 1 8】

配列番号：5のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 1 9】

配列番号：7のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 0】

配列番号：9のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 1】

配列番号：11のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 2】

配列番号：13のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

請求項7～12のいずれか一項記載のペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 4】

請求項1～6のいずれか一項記載の化合物を特異的に認識し、かつ結合する抗体。

【請求項 2 5】

請求項1～6のいずれか一項記載の化合物の有効量を、被験者に送達する段階を含む、被験者における免疫応答を誘導する方法。

【請求項 2 6】

化合物がMHC分子と共に(in the context of an MHC molecule)送達される、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

MHC分子が抗原提示細胞の表面上に化合物を提示する、請求項26記載の方法。

【請求項 2 8】

化合物が該化合物をコードするポリヌクレオチドとして送達される、請求項25記載の方法。

【請求項 2 9】

請求項24記載の抗体の有効量を、被験者に投与する段階を含む、免疫治療方法。

【請求項 3 0】

MHC分子と共に請求項1～6のいずれか一項記載の化合物を提示する抗原提示細胞の存在下で、該抗原提示細胞を犠牲にして、インビトロまたはインビボで産生される、免疫エフェクター細胞。

【請求項 3 1】

請求項30記載の免疫エフェクター細胞の有効量を投与する段階を含む、養子免疫治療の方法。

【請求項 3 2】

少なくとも二つの免疫原性リガンドを含む組成物であって、該免疫原性リガンド、同じ天然のリガンドに対して免疫応答を誘発できることを個々に特徴とし、かつ該免疫原性リガンドは、

FLYKWHGFV(配列番号:3),

FLHKVHFYV(配列番号:5), FLHKWHWVV(配列番号:7), FLHKWHWYV

(配列番号:9), FLHKVHYLV(配列番号:11)およびKHFPHGFS(配列番号:13)

からなる群より選択される、化合物。

【請求項 3 3】

免疫原性リガンドに結合した生物活性免疫グロブリンの可変ドメインをさらに含む、請求項32記載の組成物。

【請求項 3 4】

免疫原性リガンドに結合したMHC分子をさらに含む、請求項32記載の組成物。

【請求項 3 5】

10

30

40

50

免疫原性リガンドが共有結合する、請求項32記載の組成物。

【請求項36】

免疫原性リガンドに共有結合した作用物質をさらに含み、該作用物質が抗原提示細胞に該免疫原性リガンドを標的指向させることができる、請求項32記載の組成物。

【請求項37】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項36記載の組成物。

【請求項38】

MHCクラスII結合ヘルパーペプチドをさらに含む、請求項32記載の組成物。

【請求項39】

担体をさらに含む、請求項32～38のいずれか一項記載の組成物。

10

【請求項40】

担体が薬学的に許容される担体である、請求項39記載の組成物。

【請求項41】

少なくとも二つの免疫原性リガンドを含む宿主細胞であって、該免疫原性リガンドは、同じ天然のリガンドに対して免疫応答を誘発できることを個々に特徴とし、かつ該免疫原性リガンドは

FLYKWHGFV(配列番号:3),

FLHKVHFYV(配列番号:5), FLHKWHWVV(配列番号:7), FLHKWHWYV

(配列番号:9), FLHKVHQLV(配列番号:11)およびKHFKPHGFS(配列番号:13)

20

からなる群より選択される、宿主細胞。

【請求項42】

宿主細胞が抗原提示細胞であって、かつ免疫原性リガンドが該細胞の表面に提示される、請求項41記載の宿主細胞。

【請求項43】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項42記載の宿主細胞。

【請求項44】

請求項41～43のいずれか一項記載の宿主細胞を含む、組成物。

30

【請求項45】

担体が薬学的に許容される担体である、請求項44記載の組成物。

【請求項46】

二つまたはそれ以上の免疫原性リガンドの有効量を含む組成物を、被験者に送達する段階を含む、被験者において免疫応答を誘導する方法であって、該免疫原性リガンドのそれが、同じ天然のリガンドに対して免疫応答を誘発できることを個々に特徴とし、かつ該免疫原性リガンドが

FLYKWHGFV(配列番号:3), FLHKVHFYV(配列番号:5), FLHKWHWVV

(配列番号:7), FLHKWHWYV(配列番号:9), FLHKVHQLV(配列番号:11)

およびKHFKPHGFS(配列番号:13)

40

からなる群より選択される方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2000年3月31日および2000年12月20日にそれぞれ提出された、米国仮特許出願第60/209,388号、および第60/257,007号に対する、米国特許法第119項(e)の下で優先権を主張する。これらの出願の内容は参考として本開示に組み入れられる。

【0002】

50

技術分野

本発明は、ヒト卵巣癌に対して有用な治療化合物の分野に関する。

【 0 0 0 3 】発明の背景

主要組織適合抗原複合体（MHC）分子によって提示される抗原エピトープの認識は、哺乳類の免疫応答の確立、維持、および実行において中心的な役割を果たしている。体細胞および抗原提示白血球によって発現される細胞表面のMHC分子によって提示されるペプチド抗原のT細胞による探査および認識は、ウイルス、細菌、および寄生虫のような感染性微生物による侵入を制御するように機能する。さらに今では、抗原特異的細胞障害性Tリンパ球（CTL）は特定の癌細胞抗原を認識して、これらの抗原を発現する細胞を攻撃することができることが証明されている。このT細胞活性は、抗癌ワクチンの新しい戦略を開発するための基礎となる。さらに、不適当なT細胞活性化は、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、および喘息のような特定の衰弱性の自己免疫疾患において中心的な役割を果たす。このように、MHC分子によって提示される抗原エピトープの提示および認識は、多数の病態における免疫応答の調節において中心的な役割を果たす。

10

【 0 0 0 4 】

癌患者に由来する腫瘍特異的T細胞は、腫瘍細胞に結合して溶解する。この特異性は、MHCクラスIおよびいくつかの細胞種においてはクラスII分子が、腫瘍細胞表面に提示される短いアミノ酸配列（エピトープ）を認識できることに基づいている。これらのエピトープは、腫瘍または癌細胞において独自にまたは異常に発現されている遺伝子によってコードされる腫瘍抗原と呼ばれる細胞内タンパク質のタンパク質溶解による分解に由来する。

20

【 0 0 0 5 】

特異的抗腫瘍T細胞を利用できれば、腫瘍抗原を同定することができ、それによって抗腫瘍免疫応答を誘発するように設計された癌ワクチンを产生することができる。抗腫瘍T細胞は、血液（そこで、細胞は末梢血単核球細胞分画に認められる）、一次および二次リノバ様組織、例えば脾臓、卵巣癌患者における腹水（腫瘍関連リンパ球もしくはTALs）、または腫瘍そのものの内部（腫瘍浸潤リンパ球もしくはTIL）を含む、癌患者の体内に存在する。これらの中で、TILは、T細胞によって認識される腫瘍抗原および腫瘍抗原由来ペプチドの同定において最も有用であった。

30

【 0 0 0 6 】

TILを作製する従来の方法は、腫瘍生検組織を細切して、T細胞増殖因子であるインターロイキン-2（IL-2）の存在下でインビトロで細胞浮遊液を培養することを含む。数日間のあいだに、腫瘍細胞とIL-2との混合物は、腫瘍細胞を犠牲にして腫瘍特異的T細胞の増殖を刺激することができる。このようにして、T細胞集団を増殖させる。初回増殖に由来するT細胞をその後、マイトイシンC処理または放射線照射腫瘍細胞のいずれかと混合して、インビトロでIL-2と共に培養して、腫瘍反応性T細胞のさらなる増殖および濃縮を促進する。インビトロ増殖を数回行った後、強力な抗腫瘍T細胞集団を回収して、これを用いて従来の、しかし単調な発現クローニング技術によって腫瘍抗原を同定することができる。カワカニラ（Kawakani, Y., (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(9) : 3515~3519）。

40

【 0 0 0 7 】

腫瘍特異的T細胞をインビトロで產生するために現在用いられている方法論は、信頼性に乏しく、この方法によって同定された抗原は必ずしも抗腫瘍免疫応答を誘導しない。抗原が成熟T細胞に出合うと、無視、アネルギー、または物理的欠乏のためにしばしば免疫寛容が誘導されることが多数の実験によって証明されている。パードル（Pardoll, (1998) Nature Med. 4(5) : 525~531）。

【 0 0 0 8 】

特定のペプチドがT細胞エピトープとして機能するか否かは、それらがMHC分子の抗原提示ドメインに有効に結合すること、しかもT細胞受容体分子によって特異的に認識され

50

うる適當なセットのアミノ酸を示す必要がある。抗原性ペプチドに由来する天然のT細胞エピトープを同定することは可能であるが、これらのペプチドは特定の免疫応答を誘導するために最適な抗原を必ずしも提示しない。実際に、その配列を変化させることまたは多数のアミノ酸置換体を導入することによって天然のエピトープの有効性を改善することが可能であることが示されている(バルモリ(Valmori)ら、(2000)、J. Immunol. 164(2): 1125~1131)。このように、注意深く最適にした合成ペプチドエピトープを送達すれば、有用な免疫応答を誘導するための改善された方法を提供する可能性がある。

【0009】

抗原を動物に導入することは、多様な目的のために、抗原に対する免疫応答またはその欠損を調節する目的のために、広く用いられている。これらには、病原体に対するワクチン接種、癌様細胞に対する免疫応答の誘導、アレルギー反応の減少、自己免疫障害の結果として起こる、自己抗原に対する免疫応答の減少、同種異系移植片拒絶の減少、および避妊目的の自己抗原に対する免疫応答の誘導が含まれる。

【0010】

癌の治療において、腫瘍細胞を特異的に認識して溶解する細胞障害性Tリンパ球集団を作製するために、多様な免疫治療的アプローチが用いられている。これらのアプローチの多くは、腫瘍特異的抗原の同定および特徴付けに一部依存している。

【0011】

近年、特定の病原体および腫瘍関連タンパク質が、そのアミノ酸配列が病原体または腫瘍関連タンパク質の抗原決定基ドメインのアミノ酸配列に対応する合成ペプチドによって免疫学的に模倣されている。これらの進歩にもかかわらず、天然の配列に基づくペプチド免疫原は、一般的に免疫応答の誘導に関して最適とは言えない。このように、免疫調節特性が増強した改変された合成ペプチドエピトープが必要である。本発明は、この必要性を満足して、関連する長所も同様に提供する。

【0012】

発明の開示

本発明は、新規合成治療化合物を提供する。これらの化合物は、MHC分子との結合を増強し、その天然での相対物と比較して免疫調節特性を増強するように設計される。本発明の合成化合物は、合成および天然の化合物に対する免疫応答を調節するために有用である。

【0013】

本発明の化合物をコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含む遺伝子送達媒体、およびこれらのポリヌクレオチドを含む宿主細胞がさらに提供される。

【0014】

さらに、本発明は、本発明の化合物および組成物を送達すること、ならびにこれらをMHC分子に結合させて送達することによって、被験者における免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0015】

本発明の化合物はまた、これらの化合物を特異的に認識して結合する抗体を作製するためにも有用である。これらの抗体は、被験者に投与すると免疫治療にとってさらに有用である。

【0016】

本発明はまた、MHC分子に結合した本発明のペプチド組成物を提示する抗原提示細胞の存在下で、そして抗原提示細胞を犠牲にしてインビボまたはインビトロで產生した免疫エフェクター細胞を提供し、およびこれらの免疫エフェクター細胞の有効量を被験者に投与することを含む養子免疫治療の方法を提供する。

【0017】

本発明はさらに、免疫原性リガンドが天然の同じリガンドに対して免疫応答を誘発できることを個々に特徴とし、免疫原性リガンドが

10

20

30

40

50

FLYKWHGFV (配列番号:3),
 FLHKVHFYV (配列番号:5), FLHKWHWVV (配列番号:7),
 FLHKWHWYV (配列番号:9), FLHKVHYLV (配列番号:11) および
 KHFKPHGFS (配列番号:13).

からなる群より選択される、少なくとも二つの免疫原性リガンドを含む組成物を提供する。
 リガンドは薬学的に許容される担体のような担体中に存在しうる。

【0018】

同様に、本発明は、免疫原性リガンドが天然の同じリガンドに対して免疫応答を誘発できることを特徴とし、免疫原性リガンドが 10

FLYKWHGFV (配列番号:3),
 FLHKVHFYV (配列番号:5), FLHKWHWVV (配列番号:7),
 FLHKWHWYV (配列番号:9), FLHKVHYLV (配列番号:11) および
 KHFKPHGFS (配列番号:13).

からなる群より選択される、少なくとも二つの免疫原性リガンドを含む宿主細胞も提供する。一つの局面において、宿主細胞は、抗原提示細胞であり、免疫原性リガンドは細胞表面に提示される。さらなる局面において、抗原提示細胞は樹状細胞である。宿主細胞は、
 薬学的に許容される担体のような担体中に存在しうる。 20

【0019】

なお本発明はさらに、免疫原性リガンドのそれぞれが天然の同じリガンドに対して免疫応答を誘発できることを特徴として、免疫原性リガンドが

FLYKWHGFV (配列番号:3), FLHKVHFYV (配列番号:5),
 FLHKWHWVV (配列番号:7), FLHKWHWYV (配列番号:9), FLHKVHYLV
 (配列番号:11) および KHFKPHGFS (配列番号:13).

からなる群より選択される、二つまたはそれ以上の有効量の免疫原性リガンドを含む組成物を、被験者に送達することによって、被験者において免疫応答を誘導する方法を提供する。 30

【0020】

配列表の説明

配列番号：1

ヒト癌抗原A T F 4 / C R E B - 2 をコードするc D N A の完全なヌクレオチド配列である。コード領域は、ヌクレオチド882位～ヌクレオチド1937位に及ぶ。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列も同様に、G e n B a n k アクセッション番号第N M 0 0 1 6 7 5号において利用できる。

配列番号：2

天然のヒト癌抗原A T F 4 / C R E B - 2 のアミノ酸配列である。本発明の化合物は、天然のペプチド42～50に基づく変種である。 40

配列番号：3

化合物1のアミノ酸配列である。

配列番号：4

化合物1をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：5

化合物2のアミノ酸配列である。

配列番号：6

化合物2をコードするポリヌクレオチド配列である。 50

配列番号：7

化合物3のアミノ酸配列である。

配列番号：8

化合物3をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：9

化合物4のアミノ酸配列である。

配列番号：10

化合物4をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：11

化合物5のアミノ酸配列である。

配列番号：12

化合物5をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：13

ヒト癌抗原ATF4/CREB-2の天然のエピトープ。

配列番号：14

ヒト癌抗原ATF/CREB-2をコードするポリヌクレオチド配列である。

【0021】

本発明を実施する様式

本開示を通して、様々な刊行物、特許および公開された特許明細書は、識別する引用文によって参照される。これらの刊行物、特許および公開された特許明細書の開示は、本発明が属する技術分野の現状をより詳しく説明するために、本開示に参照として本明細書に組み入れられる。

【0022】

本発明の実施は、特に明記していなければ、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来の技術を用い、それらは当業者の範囲内である。そのような技術は文献に詳しく説明されている。これらの方法は、以下の刊行物に記述されている。例えば、サムブルック(Sambrook)ら、「分子のクローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第二版(1989)；「分子生物学の現行プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」(Ausubel F. M. ら編、(1987))；「酵素学実験法シリーズ(the series Methods in Enzymology)」、(アカデミック出版社)；「PCR：実践アプローチ(PCR: A Practical Approach)」、(M. マクファーソン(MacPherson)ら、IRL出版、オックスフォード大学出版(1991))；「PCR 2：実践アプローチ(PCR 2: A Practical Approach)」、(マクファーソン、ハームスおよびティラー(M. J. MacPherson, B. D. Hames, およびG. R. Taylor)編、(1995))；「抗体：実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」、(ハーロウおよびレーン(HarlowおよびLane)編、(1988))；および「動物細胞培養(Animal Cell Culture)」、R. I. フレッシュニー(Freshney)ら編、(1987))を参照のこと。

【0023】

定義

本明細書において用いられるように、特定の用語は以下に定義された意味を有する。

【0024】

本明細書および請求の範囲において用いられるように、単数形「一つの(a)」、「一つの(an)」、および「その」には、特に文脈で明らかに明記しない限り、複数形が含まれる。例えば、「細胞」という用語には、その混合物を含む複数の細胞が含まれる。

【0025】

本明細書において用いられるように、「含む」という用語は、組成物および方法に引用さ

10

20

30

40

50

れた要素が含まれるが、他の要素を除外しないことを意味すると解釈される。「本質的につからなる」とは、組成物および方法を定義するために用いる場合、組み合わせに対して本質的な重要性を有する、他の任意の要素を除外することを含むことを意味する。このように、本明細書に定義する要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法からの微量の混入物およびリン酸緩衝生理食塩液、保存剤等のような薬学的に許容される担体を除外しないと考えられる。「つからなる」とは、他の成分の微量以上の要素を除外して、本発明の組成物を投与するための実質的な方法段階を含むことを意味する。これらの移行用語のそれぞれによって定義される態様は本発明の範囲に含まれる。

【0026】

「天然の」または「自然の」抗原とは、自然の生物起源から単離され、被験者において抗原受容体、特にT細胞抗原受容体（TCR）に特異的に結合することができるエピトープを含むポリペプチド、タンパク質または断片である。10

【0027】

「抗原」という用語は、当技術分野において十分に理解されており、これには免疫原性である物質、すなわち免疫原、および免疫学的無反応性、またはアネルギーを誘導する物質、すなわちアネルゲンが含まれる。

【0028】

「改変された抗原」とは、対応する野生型抗原とは異なる一次配列を有する抗原である。改変抗原は、合成または組換え法によって作製することができ、これには例えればリン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質溶解的分解、抗体分子、膜分子または他のリガンドとの結合によって、翻訳時または翻訳後に異なるように改変される抗原性ペプチドが含まれるがこれらに限定されない。（ファーガソン（Ferguson）ら、（1988）、Ann. Rev. Biochem. 57：285～320）。本発明の合成または改変抗原は、天然のエピトープと同じTCRに結合すると解釈される。20

【0029】

本明細書において天然の抗原または野生型抗原とも呼ばれる「自己抗原」はまた、抗原に対する自己寛容により被験者において免疫応答をほとんど、または全く誘導しない抗原性ペプチドである。自己抗原の例は、黒色腫特異抗原gp100である。

【0030】

「腫瘍関連抗原」または「TAA」という用語は、腫瘍に関連するまたは腫瘍に特異的な抗原を意味する。既知のTAAの例には、gp100、MARTおよびMAGEが含まれる。30

【0031】

「主要組織適合抗原複合体」または「MHC」という用語は、T細胞に抗原を提示するために必要な、および急性の移植片拒絶のために必要な細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を意味する。ヒトでは、MHCは「ヒト白血球抗原」または「HLA」複合体としても知られる。MHCによってコードされるタンパク質は、「MHC分子」として知られ、クラスIおよびクラスII MHC分子に分類される。クラスI MHC分子には、2-ミクログロブリンと非共有結合したMHCにおいてコードされる鎖で構成される膜ヘテロ二量体タンパク質が含まれる。クラスI MHC分子は、ほぼ全ての有核細胞によって発現され、CD8⁺ T細胞に対する抗原提示において機能することが示されている。クラスI分子には、ヒトにおけるHLA-A、B、およびCが含まれる。クラスII MHC分子には、非共有結合によって結合したおよび鎖からなる膜ヘテロ二量体タンパク質が含まれる。クラスII MHC分子は、CD4⁺ T細胞において機能することが知られており、ヒトにおいて、HLA-DP、-DQ、およびDRが含まれる。好ましい態様において、本発明の組成物およびリガンドは、任意のHLA型のMHC分子と複合体を形成することができる。当業者は、HLAの血清型および遺伝子型を周知している。例えば、<http://bimaps.ncbi.gov/cgi-bin/molbio/hla>の共通閲覧頁を参照のこと。ラメンシー、バックマン、およびステバノビッチ（Rammensee, H.G., Bachman, J.、およびStevanov

10

20

30

40

50

i c , S . 、「M H C リガンドとペプチドモチーフ (M H C L i g a n d s a n d P e p t i d e M o t i f s) 」、(1 9 9 7) 、チャップマン・アンド・ホール出版社) ; シュリューダー (S c h r e u d e r) G . M . T h ら、「 H L A 辞書 (T h e H L A D i c t i o n a r y) 」、(1 9 9 9) T i s s u e A n t i g e n s 5 4 : 4 0 9 ~ 4 3 7) 。

【 0 0 3 2 】

「抗原提示マトリクス」という用語は、本明細書において用いられるように、抗原が T 細胞表面上で T 細胞抗原受容体に結合することができるよう抗原を提示することができる分子または複数の分子を意味する。抗原提示マトリクスは、抗原提示細胞 (A P C) の表面、または A P C の小胞調製物に存在することができ、またはビーズもしくはプレートのような固相支持体上の合成マトリクスの形となりうる。合成抗原提示マトリクスの例は、固相支持体に結合した、 2 - ミクログロブリンと複合体を形成した精製 M H C クラス I 分子、そのような精製 M H C クラス I 分子の多量体、精製 M H C クラス I I 分子、またはその機能的部分である。

【 0 0 3 3 】

「抗原提示細胞 (A P C) 」とは、免疫系の特異的エフェクター細胞によって認識可能な抗原 M H C 複合体の形で一つまたは複数の抗原を提示することができ、それによって提示される抗原または複数の抗原に対して有効な細胞免疫応答を誘導することができる細胞のクラスを意味する。多くの種類の細胞が、 T 細胞が認識できるようにその細胞表面上に抗原を提示できる可能性があるが、有効な量で抗原を提示でき、細胞障害性 T リンパ球 (C T L) 反応に関して T 細胞をさらに活性化する能力を有するのは、専門的な A P C に限られる。 A P C は、マクロファージ、 B - 細胞および樹状細胞のような無傷の完全な細胞；または 2 - ミクログロブリンと複合体を形成した精製 M H C クラス I 分子のような天然もしくは合成の他の分子となりうる。

【 0 0 3 4 】

「樹状細胞 (D C) 」という用語は、多様なリンパ様および非リンパ様組織において認められた形態学的に類似の細胞型の多様な集団を意味する (斯泰因マン (S t e i n m a n) (1 9 9 1) 、 A n n . R e v . I m m u n o l . 9 : 2 7 1 ~ 2 9 6) 。樹状細胞は、生物において最も強力な好ましい A P C を構成する。樹状細胞の全てではないがサブセットは骨髄前駆細胞に由来して、少数が末梢血を循環して、未成熟なランゲルハンス島細胞または最終的に分化した成熟細胞のいずれかとして現れる。樹状細胞は単球から分化することができるが、それらは異なる表現型を有する。例えば、特定の分化マーカーである C D 1 4 抗原は、樹状細胞には存在しないが単球には存在する。同様に、成熟樹状細胞は貪食性ではないが、単球は強力な貪食細胞である。 D C は、 T 細胞活性化と増殖にとって必要な全てのシグナルを提供することが示されている。

【 0 0 3 5 】

「抗原提示細胞動員因子」、または「 A P C 動員因子」という用語には、無傷の細胞全体と共に、抗原提示細胞を動員することができる他の分子が含まれる。適した A P C 動員因子の例には、インターロイキン 4 (I L - 4) 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 、セプラゲルおよびマクロファージ炎症タンパク質 3 (M I P 3) のような分子が含まれる。これらは、イムネックス社、シェリングプラウ社および R & D システムズ社 (ミネアポリス、ミネソタ州) から入手できる。それらはまた、「分子生物学の現行プロトコール (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) 」 F . M . アウスユベル (A u s u b e l) ら編、(1 9 8 7) に開示される方法を用いて、組換えによって產生することができる。上記の因子と同じ生物活性を有するペプチド、タンパク質、および化合物は、本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 3 6 】

「免疫エフェクター細胞」という用語は、抗原に結合することができ、免疫応答を媒介する細胞を意味する。これらの細胞には、 T 細胞、 B 細胞、単球、マクロファージ、 N K 細胞、ならびに細胞障害性 T リンパ球 (C T L) 、例えば C T L 細胞株、 C T L クローン、

10

20

30

40

50

および腫瘍、炎症、または他の浸潤物からの C T L が含まれるがこれらに限定されない。特定の疾患を有する組織は、特異的抗原を発現して、これらの抗原に対して特異的な C T L が同定されている。例えば、黒色腫の約 80 % が G P - 100 として知られる抗原を発現する。

【 0 0 3 7 】

本明細書において用いられる「免疫エフェクター分子」という用語は、抗原特異的に結合することができる分子を意味し、これには抗体、T-細胞抗原受容体、ならびに MHC クラス I およびクラス II 分子が含まれる。

【 0 0 3 8 】

「未経験の」免疫エフェクター細胞は、その細胞を活性化することができる抗原にこれまで曝露されていない免疫エフェクター細胞である。未経験の免疫エフェクター細胞の活性化には、増殖して抗原特異性を備えるエフェクター T 細胞に分化するために、ペプチド : MHC 複合体の認識および専門的 A P C による共刺激シグナルの同時送達の双方を必要とする。

【 0 0 3 9 】

「免疫応答」は、広い意味において、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的反応を意味する。免疫応答を誘発することができる如何なる物質も「免疫原性」であり、「免疫原」であると呼ばれる。免疫原は全て抗原であるが、必ずしも全ての抗原が免疫原性であるわけではない。本発明の免疫応答は、液性（抗体活性を通して）または細胞性（T 細胞活性化を通して）となりうる。

【 0 0 4 0 】

本明細書において用いられるように、「リガンド」という用語は、もう一つの分子上の特異的部位に結合する如何なる分子も意味する。言い換えれば、リガンドは、免疫エフェクター細胞との反応においてタンパク質の特異性を付与する。免疫エフェクター細胞上の相補的結合部位と直接複合体を形成するのはタンパク質内のリガンド部位である。

【 0 0 4 1 】

好みの態様において、本発明のリガンドは、抗体または T 細胞受容体 (T C R) のような免疫エフェクター細胞上の抗原決定基またはエピトープに結合する。リガンドは、本発明の抗原、ペプチド、タンパク質、またはエピトープであってもよい。

【 0 0 4 2 】

本発明のリガンドは、抗体上の受容体に結合してもよい。一つの態様において、本発明のリガンドは長さがアミノ酸約 4 ~ 約 8 個である。

【 0 0 4 3 】

本発明のリガンドは MHC クラス I 分子上の受容体に結合してもよい。一つの態様において、本発明のリガンドは長さがアミノ酸約 7 ~ 約 11 個である。

【 0 0 4 4 】

本発明のリガンドは、MHC クラス II 分子上の受容体に結合してもよい。一つの態様において、本発明のリガンドは長さがアミノ酸約 10 ~ 約 20 個である。

【 0 0 4 5 】

本明細書において用いられるように、「感作された (e d u c a t e d) 抗原特異的免疫エフェクター細胞」という用語は、抗原にこれまでに出会ったことがある上記の免疫エフェクター細胞である。その未経験の相対物とは対照的に、感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞の活性化は、共刺激シグナルを必要としない。ペプチド : MHC 複合体の認識で十分である。

【 0 0 4 6 】

T 細胞に関して用いる場合、「活性化された」とは、細胞が、G₀ 期を出て、一つまたは複数のサイトトキシン、サイトカイン、および細胞種（例えば、CD8⁺ または CD4⁺ ）に特徴的な他の関連する膜結合型タンパク質を產生し始め、その表面上に特定の抗原を示す任意の標的細胞を認識して結合することができ、そのエフェクター分子を放出することができることを意味する。

10

20

30

40

50

【0047】

本発明の意味において、「認識される」という用語は、一つまたは複数のリガンドを含む本発明の組成物が、そのような結合が有効な免疫応答を開始する、免疫エフェクター細胞によって認識および結合されることを意味する。リガンドが免疫エフェクター細胞によって認識されるか否かを決定するアッセイは、当技術分野で既知であり、本明細書に記載される。

【0048】

「選択的に認識される」という用語は、本発明の組成物またはリガンドの特異性が、天然のリガンドを認識して結合する免疫エフェクター細胞に限定されることを意味する。

【0049】

「交叉反応する」という用語は、機能的に重なり合う本発明の化合物を記載するために用いられる。より詳しく述べると、天然のリガンドおよび／またはそれによって活性化される免疫エフェクター細胞の免疫原性特性は、改変されたリガンドが天然のリガンドおよび／またはそれによって活性化される免疫エフェクター細胞と「交叉反応」するように、改変リガンドによってある程度共有される。本発明の目的に関して、交叉反応性は、多数のレベルで現れる：(i) リガンドレベルで、例えば、改変リガンドは天然のリガンド C T L の T C R に結合して天然のリガンド C T L を活性化することができる；(ii) T 細胞レベルで、すなわち本発明の改変リガンドは、T 細胞の T C R に結合して、天然のリガンドを示す細胞を有効に標的としてこれを溶解することができる T 細胞のある集団（天然のリガンド C T L の集団とは異なる）を活性化する；および(iii) 抗体レベルで、例えば、「抗」改変リガンド抗体は、天然のリガンドを検出、認識して、免疫応答においてエフェクター機構を開始させることができ、最終的に宿主から天然のリガンドが消失する。

10

20

30

【0050】

本明細書において記載されるように、「被験者において免疫応答を誘導する」という用語は、当技術分野において周知の用語であり、被験者に抗原（またはエピトープ）を導入する前の免疫応答（もしあれば）と比較して、被験者に抗原（またはエピトープ）を導入した後に、抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答の少なくとも約 2 倍、より好ましくは少なくとも約 5 倍、より好ましくは少なくとも約 10 倍、より好ましくは少なくとも約 100 倍、さらにより好ましくは少なくとも約 500 倍、なおより好ましくは少なくとも約 1000 倍またはそれ以上の増加を、検出または測定することができることを意味する。抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答には、抗原特異的（またはエピトープ特異的）抗体の產生、抗原（またはエピトープ）に特異的に結合する分子をその表面上に発現する免疫細胞の產生が含まれるがこれらに限定されない。所定の抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答が誘導されるか否かを決定する方法は当技術分野で周知である。例えば、抗原特異的抗体は、固定された抗原（またはエピトープ）に対する試料中の抗体の結合が、検出可能に標識した第二抗体（例えば、酵素標識マウス抗ヒト IgG 抗体）によって検出される、ELISA を含むがこれらに限定されない当技術分野で既知の多様な任意のイムノアッセイを用いて検出することができる。

30

40

【0051】

「共刺激分子」は、抗原提示細胞と T 細胞の表面上に発現される受容体 - リガンド対の相互作用に関係している。過去数年間に蓄積された研究によって、休止期の T 細胞が、サイトカイン遺伝子発現を誘導して増殖するために、少なくとも二つのシグナルを必要とすることが確実に証明されている（シュワルツ（S ch w a r t z ）R . H . (1 9 9 0)、Science 248 : 1349 ~ 1356 ; およびジェンキンス（J enk i n s ）M . K . (1 9 9 2)、Immunol . Today 13 : 69 ~ 73 ）。特異性を付与する一つのシグナルは、適当な MHC / ペプチド複合体と T C R / C D 3 複合体との相互作用によって產生することができる。第二のシグナルは抗原特異的ではなく、「共刺激」シグナルと呼ばれる。このシグナルは、マクロファージおよび樹状細胞、いわゆる「専門的」A P C のような骨髓由来補助細胞によって提供される活性として当初定義された。いくつかの分子が共刺激活性を増強することが示されている。これらは熱安定抗原（H S

50

A) (リウ(L i u) Y . ら(1992)、 J . E x p . M e d . 175 : 437 ~ 445)、 コンドロイチン硫酸改変MHC不变鎖(I i - C S) (ノージョカス(N a u j o k a s) M . F . ら、 (1993)、 C e l l 74 : 257 ~ 268)、 細胞内接着分子1(I C A M - 1) (ファンセベンター(V a n S e v e n t e r) G . A . 、 (1990)、 J . I mm u n o l . 144 : 4579 ~ 4586)、 B7-1およびB7-2/B70 (シュワルツ(S c h w a r t z) R . H . (1992)、 C e l l 71 : 1065 ~ 1068)である。これらの分子は、それぞれT細胞上でその同種のリガンドと相互作用することによって共刺激を補助すると考えられる。共刺激分子は、正常な生理的条件で、未経験のT細胞を十分に活性化するために必要な共刺激シグナルを媒介する。例としての受容体-リガンド対は、A P C表面上のB7共刺激分子およびT細胞上のその相対物受容体CD28またはC T L A - 4である(フリーマン(F r e e m a n)ら、 (1993) S c i e n c e 262 : 909 ~ 911 ; ヤング(Y o u n g)ら、 (1992)、 J . C l i n . I n v e s t . 90 : 229 およびナバビ(N a b a v i)ら、 (1992)、 N a t u r e 360 : 266 ~ 268)。その他の重要な共刺激分子は、CD40、CD54、CD80、およびCD86である。「共刺激分子」という用語は、T細胞表面上のT C Rに結合したペプチド/MHC複合体と共に作用すると、ペプチドに結合するT細胞の活性化を得る共刺激作用を提供する、任意の単一分子または分子の組み合わせも含む。この用語はこのように、B7、またはペプチド/MHC複合体と共に、同種のリガンドに結合して、T細胞の表面上のT C Rがペプチドに特異的に結合すればT細胞を活性化する、A P C、その断片(単独、他の分子と複合体を形成して、もしくは融合タンパク質の一部として)のような抗原提示マトリクス上の他の共刺激分子を含む。共刺激分子は、例えば、ベックマンコールターインク(フュラートン、カリフォルニア州)を含む多様な販売元から市販されている。必ずしも明示されていないが、野生型と類似の生物活性を有する分子、または精製された共刺激分子(例えば、組換えによって產生されたまたはその変異タンパク質)は、本発明の趣旨および範囲において用いられると解釈される。

【 0 0 5 2 】

本明細書において用いられるように、「固相支持体」または「固体支持体」は、互換的に用いられ、特定の種類の支持体に限定されない。むしろ多数の支持体が利用でき、当技術分野で既知である。固相支持体には、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスピーズ、ワタ、プラスチックピーズ、アルミナゲルが含まれる。本明細書において用いられるように、「固相支持体」には、合成抗原提示マトリクス、細胞、およびリポソームが含まれる。適した固相支持体は、様々なプロトコールに関して所望の目的の用途および適切性に基づいて選択してもよい。例えば、ペプチド合成に関して、固相支持体はポリスチレン(例えば、バケム社、ベニンスララボラトリーズ社等から得られる P A M - 樹脂)、ポリハイド(登録商標)樹脂(アミノテック社、カナダから得られる)、ポリアミド樹脂(ベニンスララボラトリーズ社から得られる)、ポリスチレングリコールを接合したポリスチレン樹脂(テンタゲル(登録商標)、ラップポリマー、チュービング、ドイツ)、またはポリジメチルアクリルアミドゲル(ミリゲン /バイオサーチ社、カリфорニア州から得られる)のような樹脂を適用してもよい。

【 0 0 5 3 】

本明細書において用いられるように「免疫調節物質」という用語は、分子、高分子複合体、または免疫応答を調節する細胞であり、単独または本明細書に記載の多様な処方の任意のものと組み合わせた本発明の合成抗原性ペプチド；本発明の合成抗原性ペプチドを含むポリペプチド；本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；A P C、および合成抗原提示マトリクス(共刺激分子の存在下または非存在下で)を含む抗原提示マトリクス上のクラスIまたはクラスII M H C 分子に結合した本発明の合成抗原性ペプチド；もう一つの分子または高分子構造と共有結合または非共有結合によって複合体を形成した本発明の合成抗原性ペプチド；ならびに本発明のペプチドに対して特異的な感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0054】

「免疫応答を調節する」という用語には、免疫応答を誘導（増加、誘発）する、および免疫応答を減少（抑制）することが含まれる。免疫調節法（またはプロトコール）は、被験者における免疫応答を調節する方法である。

【0055】

本明細書において用いられるように、「サイトカイン」という用語は、細胞に多様な作用を及ぼす、例えば成長または増殖（proliferation）を誘導する多数の任意の要因の一つを意味する。本発明の実施において単独または組み合わせて用いてもよいサイトカインの非制限的な実施例には、インターロイキン-2 (IL-2)、幹細胞因子 (SCF)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-12 (IL-12)、G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-11 (IL-11)、MIP-1 α 、白血球抑制因子 (LIF)、c-kitリガンド、トロンボポエチン (TPO)、およびflt3リガンドが含まれる。本発明にはまた、一つまたは複数のサイトカインが培地から特異的に除外される培養条件が含まれる。サイトカインは、例えばゲンザイム社（フラミンガム、マサチューセッツ州）、ジェネンテック社（サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州）、アムジェン社（サウザンドオーパス、カリフォルニア州）、R&Dシステムズ（ミネアポリス、ミネソタ州）、およびイムネックス社（シアトル、ワシントン州）のようないくつかの発売元から市販されている。必ずしも明示されていないが、野生型と類似の生物活性を有するまたは精製サイトカイン（例えば、組換えによって產生されたまたはその変異体）は、本発明の精神および範囲内で用いられると解釈される。10
20

【0056】

「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、任意の長さのヌクレオチドの重合型を互換的に意味するために用いられる。ポリヌクレオチドは、デオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド、および／またはその類似体を含んでもよい。ヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してもよく、既知または未知の任意の機能を行ってもよい。「ポリヌクレオチド」という用語には、例えば、一本鎖、二本鎖、および三重らせん分子、遺伝子または遺伝子断片、エキソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマーが含まれる。核酸分子は、また改変された核酸分子を含んでもよい。30

【0057】

「ペプチド」という用語は、その最も広い意味において、二つまたはそれ以上のサブユニットのアミノ酸の化合物、アミノ酸類似体、またはペプチド模倣体を意味する。サブユニットはペプチド結合によって結合してもよい。もう一つの態様において、サブユニットは他の結合、例えば、エステル、エーテル等によって結合してもよい。本明細書において用いられるように、「アミノ酸」という用語は、グリシンおよびDまたはL光学異性体、アミノ酸類似体およびペプチド模倣体を含む天然および／または非天然または合成アミノ酸のいずれかを意味する。三つまたはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドは、ペプチド鎖が短ければ一般的にオリゴペプチドと呼ばれる。ペプチド鎖が長ければペプチドは一般的にポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。40

【0058】

「遺伝子改変された」という用語は、外来遺伝子または核酸配列を含むおよび／または発現して、それによって細胞またはその子孫の遺伝子型または表現型を改変することを意味する。言い換えれば、これは細胞の内因性のヌクレオチドに対する任意の付加、欠失、または破壊を意味する。

【0059】

本明細書において用いられるように、「発現」とは、それによってポリヌクレオチドがmRNAに転写されて、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳される過程を意50

味する。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、適当な真核宿主を選択すれば、発現にはmRNAのスプライシングが含まれてもよい。発現のために必要な調節エレメントには、RNAポリメラーゼに結合するプロモーター配列およびリボソーム結合のための転写開始配列が含まれる。例えば、細菌の発現ベクターには、lacプロモーターのようなプロモーターおよび転写開始のためのシャイン・ダルガルノ配列および開始コドンAUG(サムブルック(Sambrook)ら、(1989)、上記)が含まれる。同様に、真核細胞発現ベクターには、RNAポリメラーゼIIのための異種または同種プロモーター、下流のポリアデニル化シグナル、開始コドンAUG、およびリボソームを脱離させるための停止コドンが含まれる。そのようなベクターは、市販されているか、または当技術分野で周知の方法に記載の配列、例えば一般的なベクターを構築するために下記に記載される方法に記載の配列によって構築することができる。

10

【0060】

「転写制御下」とは、当技術分野で十分に理解されている用語であり、ポリヌクレオチド配列、通常はDNA配列の転写が、転写の開始に関与するかまたは転写を促進するエレメントに、機能的に結合していることに依存することを示す。「機能的に結合した」とは、エレメントがそれらが機能するように配置されている近接位置を意味する。

【0061】

「遺伝子送達媒体」とは、宿主細胞に挿入されたポリヌクレオチドを運ぶことができる任意の分子として定義される。遺伝子送達媒体の例は、リポソーム；天然ポリマーおよび合成ポリマーを含む生体適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖類；リポ多糖類；人工ウイルスエンベロープ；金属粒子、ならびに細菌、またはバキュロウイルス、アデノウイルス、およびレトロウイルスのようなウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクターならびに多様な真核および原核宿主において発現させるために記載されており、単にタンパク質発現のためのみならず、遺伝子治療のために用いてもよい、当技術分野で典型的に用いられる他の組換え媒体である。

20

【0062】

本明細書において用いられる「遺伝子送達」「遺伝子移入」等は、用いる導入方法にかかわらず、宿主細胞に外因性のポリヌクレオチド(時に、「導入遺伝子」と呼ばれる)を導入することを意味する用語である。そのような方法には、ベクター媒介遺伝子移入(例えば、ウイルス感染/トランسفェクション、または様々なタンパク質に基づくまたは脂質に基づく遺伝子送達複合体による)と共に「裸の」ポリヌクレオチドの送達を促進する技術(エレクトロポレーション、「遺伝子銃」送達およびポリヌクレオチドを導入するために用いられる様々な他の技術)のような、多様な周知の技術が含まれる。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞において安定または一過性に維持されてもよい。安定な維持は典型的に、導入されたポリヌクレオチドが、宿主細胞と適合性の複製開始点を含むか、または染色体外レプリコン(例えば、プラスミド)または核もしくはミトコンドリア染色体のような宿主細胞のレプリコンに組み入れられることを必要とする。当技術分野で既知であり、本明細書に記載されるように、多くのウイルスベクターが哺乳類細胞への遺伝子の移入を媒介できることが知られている。

30

【0063】

「ウイルスベクター」は、インビボ、エキソビボ、またはインビトロのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む組換え的に產生されたウイルスまたはウイルス粒子として定義される。ウイルスベクターの例には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター等が含まれる。セムリキ森林熱ウイルスに基づくベクター、およびシンドビスウイルスに基づくベクターのようなアルファウイルスベクターも同様に、遺伝子治療および免疫治療において用いるために開発されている。シュレジンガーおよびデュベンスキーニー(SchlesingerおよびDubensky)(1999)、Curr. Opin. Biotechnol. 5:434~439、およびザクス(Zaks)ら(1999)、Nat. Med. 7:823~827を参照のこと。遺伝子移入がレトロウイルスベクターによって媒介

40

50

される局面において、ベクター構築物は、レトロウイルスゲノムまたはその一部と、治療遺伝子とを含むポリヌクレオチドを意味する。本明細書において用いられるように、「レトロウイルス媒介遺伝子移入」または「レトロウイルス形質導入」は、同じ意味を有し、ウイルスが細胞内に入り、そのゲノムを宿主細胞ゲノムに組み入れるために、それによって遺伝子または核酸配列が宿主細胞に安定に移入される過程を意味する。ウイルスは、その通常の感染機構によって宿主細胞に入ることができ、またはそれが異なる宿主細胞表面受容体もしくはリガンドに結合して細胞に入るよう改変することができる。本明細書において用いられるように、レトロウイルスベクターは、ウイルスまたはウイルス様の侵入機構によって細胞に外因性の核酸を導入することができるウイルス粒子を意味する。

【0064】

10

レトロウイルスは、RNAの形で遺伝子情報を有する；しかし、ウイルスが細胞に感染すると、RNAをDNA型に逆転写させて、これが感染細胞のゲノムDNAに組み入れられる。組み入れられたDNA型をプロウイルスと呼ぶ。

【0065】

20

遺伝子移入がアデノウイルス(Ad)またはアデノ随伴ウイルス(AAV)のようなDNAウイルスベクターによって媒介される局面において、ベクター構築物は、ウイルスゲノムまたはその一部と導入遺伝子とを含むポリヌクレオチドを意味する。アデノウイルス(Ad5)は、比較的十分に特徴が調べられ、50血清型以上を含む均一なウイルスの群である。例えば、国際公開公報第95/27071号を参照のこと。アデノウイルスは容易に増殖して宿主細胞ゲノムに組み入れられる必要がない。組換えアデノウイルス由来ベクター、特に野生型ウイルスの組換えおよび増殖能を低下させたベクターも同様に構築されている。国際公開公報第95/00655号および国際公開公報第95/11984号を参考のこと。野生型AAVは、宿主細胞ゲノムに組み入れられる高い感染性と特異性とを有する。ハーモナトおよびムジクツカ(HermonatおよびMuzychuk)(1984)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466~6470、ならびにレブコウスキ(Lebkowski)ら(1988)、Mol. Cell. Biol. 8:3988~3996を参考のこと。

20

【0066】

30

ポリヌクレオチドが機能的に結合しているプロモーターとクローニング部位とをその中に含むベクターは、当技術分野で周知である。そのようなベクターは、インビトロまたはインビボでRNAを転写することができ、ストラタジーン社(ラホヤ、カリフォルニア州)およびプロメガバイオテック社(マディソン、ウィスコンシン州)から販売されている。発現および/またはインビトロ転写を最適にするために、余分のおそらく不適当なもう一つの翻訳開始コドン、または転写もしくは翻訳レベルで発現を妨害もしくは減少させる可能性がある他の配列を除去するために、クローンの5'および/または3'非翻訳部分を除去、付加、または変化させる必要がある可能性がある。または、発現を増強するために、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンのすぐ5'に挿入することができる。

【0067】

40

遺伝子送達媒体にはまた、DNA/リポソーム複合体、標的化ウイルスタンパク質-DNA複合体を含むいくつかの非ウイルスベクターが含まれる。同様に標的指向抗体またはその断片も含むリポソームを本発明の方法において用いることができる。細胞への送達を増強するために、本発明の核酸またはタンパク質を細胞表面抗原、例えばTCR、CD3、またはCD4に結合する抗体またはその結合断片に結合させることができる。

【0068】

50

「ハイブリダイゼーション」とは、一つまたは複数のポリヌクレオチドがヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成するように反応する反応である。水素結合は、ワトソン-クリックの塩基対形成、フーゲスティーン(Hoogsteen)結合によって起こってもよく、または任意の他の配列特異的に起こってもよい。複合体は、二本鎖構造を形成する二つの鎖を含んでもよく、多重鎖複合体を形成する三つもしくはそれ以上の鎖、自己ハイブリダイズ鎖、またはこれらの組み合わせを含んでもよい。

ハイブリダイゼーション反応は、P C R 反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断のようなより広範囲の過程における一段階を構成してもよい。

【 0 0 6 9 】

ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の例には：インキュベーション温度約 25 ~ 約 37 ; ハイブリダイゼーション緩衝液濃度約 6 × S S C ~ 約 10 × S S C ; ホルムアミド濃度約 0 % ~ 約 25 % ; および洗浄溶液約 6 × S S C が含まれる。中等度のハイブリダイゼーション条件の例には：インキュベーション温度約 40 ~ 約 50 ; 緩衝液濃度約 9 × S S C ~ 約 2 × S S C ; ホルムアミド濃度約 30 % ~ 約 50 % ; および洗浄溶液約 5 × S S C ~ 約 2 × S S C が含まれる。高ストリンジエンシー条件の例には：インキュベーション温度約 55 ~ 約 68 ; 緩衝液濃度約 1 × S S C ~ 約 0 . 1 × S S C ; ホルムアミド濃度約 55 % ~ 約 75 % ; および洗浄溶液約 1 × S S C 、約 0 . 1 × S S C 、または脱イオン水が含まれる。一般的に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は、5 分 ~ 24 時間であり、1、2、またはそれ以上の洗浄段階を行い、洗浄インキュベーション時間は約 1、2 または 15 分である。S S C は 0 . 15 M N a C l および 15 m M クエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を用いる S S C の同等物を用いることができると理解される。10

【 0 0 7 0 】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、もう一つの配列と「配列同一性」に関して特定の百分率（例えば、80%、85%、90%、または95%）を有し、これは並置して二つの配列を比較する場合に塩基（またはアミノ酸）の百分率が同じであることを意味する。このアラインメントおよび相同性%または配列同一性は、例えば「分子生物学の現行プロトコール（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 ）」ausubel (F . M . A u s u b e l) ら編、(1987) 、補則 30 、第 7 . 7 . 18 章、表 7 . 7 . 1 に記載されるプログラムのような、当技術分野で既知のソフトウェアプログラムを用いて決定することができる。好ましくは、アラインメントのためにデフォルトパラメータを用いる。好ましいアラインメントプログラムは、デフォルトパラメータを用いる B L A S T である。特に、好ましいプログラムは、以下のデフォルトパラメータを用いる B L A S T N および B L A S T P である：遺伝子コード = 標準；フィルター = なし；鎖 = 両方；カットオフ = 60 ；予測値 = 10 ；行列 = B L O S U M 62 ；表示 = 50 配列；選別 = ハイスコア；データベース = 非重複、G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B + G e n B a n k C D S 翻訳 + スイスプロテイン + S P アップデート + P I R 。これらのプログラムの詳細は以下のインターネットアドレスで見ることができる：h t t p : / / w w w . n c b i / n i h . g o v / c g i - b i n / B L A S T 。2030

【 0 0 7 1 】

本明細書において用いられるように、「インビボ」遺伝子送達、遺伝子移入、遺伝子治療等は、ヒトまたはヒト以外の哺乳類のような生物の体内に直接外因性ポリヌクレオチドを含むベクターを導入して、それによって外因性のポリヌクレオチドがそのような生物の細胞にインビボで導入されることを意味する用語である。

【 0 0 7 2 】

「単離された」という用語は、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片が天然において通常結合する、構成成分、細胞およびその他から分離されることを意味する。例えば、ポリヌクレオチドに関して、単離されたポリヌクレオチドは、染色体において通常結合している 5' および 3' 配列から分離されているポリヌクレオチドである。当業者に明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、それを天然に存在するその相対物と区別するために「単離」を必要としない。さらに、「濃縮された」、「分離された」、または「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、容積あたりの分子の濃度または数が、その天然に存在する相対物より「大きく濃縮されている」または「あまり分離されていない」という点にお4050

いて、その天然に存在する相対物と識別することができる。その一次配列、または例えばそのグリコシル化パターンによって天然に存在する相対物とは異なるポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、それがその一次配列によって、またはグリコシル化パターンのようなもう一つの特徴によって天然に存在する相対物とは区別できることから、単離型で存在する必要はない。本明細書に開示される本発明のそれぞれについて明示していないが、下記に開示され、適当な条件での組成物のそれぞれに関する上記の態様の全てが本発明によって提供されると理解される。このように、天然に存在しないポリヌクレオチドは、単離された天然に存在するポリヌクレオチドとは異なる態様として提供される。細菌細胞において産生されたタンパク質は、本来産生される真核細胞から単離された天然に存在するタンパク質とは異なる態様として提供される。

10

【0073】

「宿主細胞」、「標的細胞」または「レシピエント細胞」は、ベクターのための、または外因性核酸分子、ポリヌクレオチド、および/またはタンパク質を組み入れるためのレシピエントとなりうる、またはレシピエントである任意の個々の細胞または細胞培養も含まれると解釈される。同様に、これには単一の細胞の子孫が含まれると解釈され、子孫は、天然、偶発的、または意図した変異のために、当初の親細胞と必ずしも完全に同一である（形態またはゲノムもしくは総DNA相補体において）必要はない。細胞は、原核細胞または真核細胞であってもよく、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、および哺乳類細胞、例えばマウス、ラット、サル、またはヒト細胞が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0074】

「被験者」は脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトである。哺乳類には、マウス、サル、ヒト、家畜動物、競技動物、およびペットが含まれるがこれらに限定されない。

【0075】

「対照」は、比較目的のために実験において用いられるもう一つの被験者または試料である。対照は、「陽性」または「陰性」となりうる。例えば、実験の目的が特定の種類の癌と遺伝子の発現レベルの変化との相関を調べることである場合、陽性対照（そのような変化を有し、その疾患の特徴である症候群を示す被験者、または被験者からの試料）および陰性対照（発現の変化およびその疾患の臨床症状を示さない被験者または被験者からの試料）を用いることが一般的に好ましい。

30

【0076】

「癌」、「新生物」、および「腫瘍」という用語は互換的に用いられ、単数形または複数形で用いられ、それらが宿主細胞に対して病原性となるような悪性の形質転換を受ける細胞を意味する。原発性癌細胞（すなわち、悪性の形質転換部位の近傍から得られた細胞）は、十分に確立された技術、特に組織学的検査によって非癌細胞から容易に区別することができる。本明細書において用いられるように癌細胞の定義には、原発性癌細胞のみならず、癌細胞の祖先に由来する任意の細胞も含まれる。これには、転移癌細胞、ならびにインビトロ培養および癌細胞に由来する細胞株が含まれる。通常固形癌として認められる種類の癌について言及する場合、「臨床的に検出可能な」腫瘍は；例えば、CATスキャン、磁気共鳴造影（MRI）、X-線、超音波、または触診のような技法によって腫瘍塊に基づいて検出可能である。生化学または免疫学的知見のみでは、この定義を満たすには不十分である可能性がある。

40

【0077】

腫瘍の増殖の「抑制」は、本明細書に記載の感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞と接触しない場合の増殖と比較して増殖が減少した状態を示す。腫瘍細胞の増殖は、腫瘍の大きさを測定すること、³H-チミジン取り込みアッセイを用いてまたは腫瘍細胞の計数によって腫瘍細胞が増殖するか否かを決定すること、を含むがこれらに限定されない、当技術分野で既知の任意の手段によって評価することができる。腫瘍細胞増殖の「抑制」は、以下の状態のいずれかまたは全てを意味する：腫瘍の増殖の遅れ、遅延、および「抑制」は、腫瘍の縮小と共に、腫瘍の増殖が停止した際に増殖が抑制された状態を示す。

50

【0078】

「培養」という用語は、様々な種類の培地における細胞または生物のインビトロ増殖を意味する。培養において増殖させた細胞の子孫は親細胞に対して完全に同一（形態学的、遺伝学的、または表現型として）ではなくてもよいと理解される。「細胞数の拡大」とは、細胞の任意の増殖または分裂を意味する。

【0079】

「組成物」とは、活性物質と、アジュバントのような不活性な（例えば検出物質または標識）または活性な、もう一つの化合物または組成物との組み合わせを意味すると解釈される。

【0080】

「薬学的組成物」は、組成物をインビトロ、インビボ、またはエキソビボで診断または治療的に用いるために適するようにする、活性物質と不活性なまたは活性な担体との組み合わせが含まれると解釈される。

【0081】

本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝生理食塩液、水、油／水または水／油乳剤のような乳剤、および様々な種類の湿潤剤のような、標準的な任意の薬学的担体を含む。組成物はまた、安定化剤および保存剤を含みうる。担体、安定化剤、およびアジュバントの例として、マーチン（Martin）の「レミントンの製薬科学（Remington's Pharm. Sci.）」第15版（マックパブリッシング社、イーストン（1975））を参照のこと。

10

20

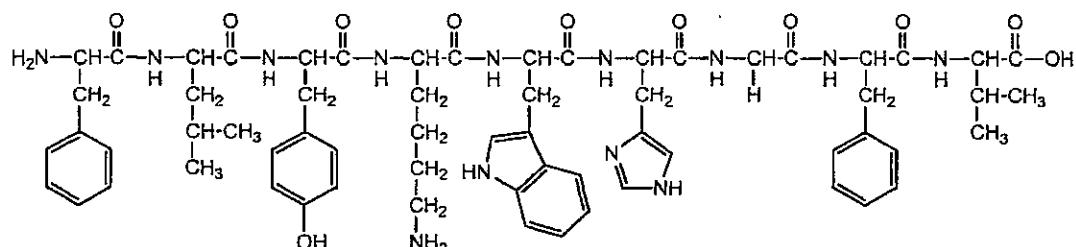
30

【0082】

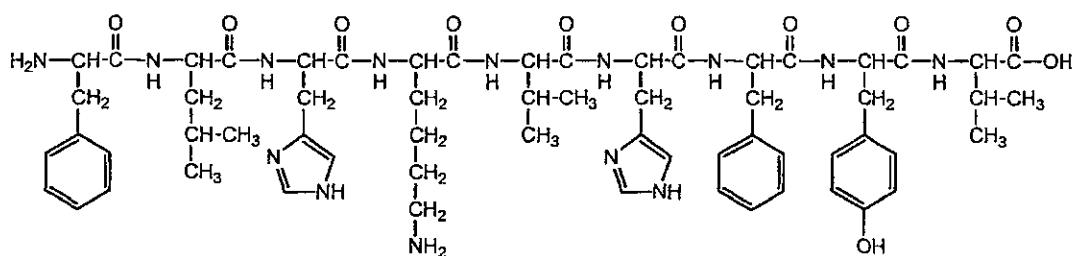
「有効量」は、有用な、または所望の結果を得るために十分な量である。有効量は一つまたは複数の投与、適用、または用量において投与することができる。本発明は、以下の構造を有する化合物を提供する：

【化7】

配列番号:3
FLYKWHGFV



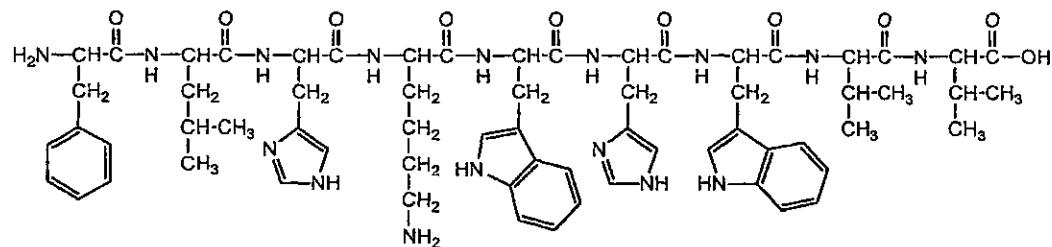
配列番号:5
FLHKVHFYV



【化8】

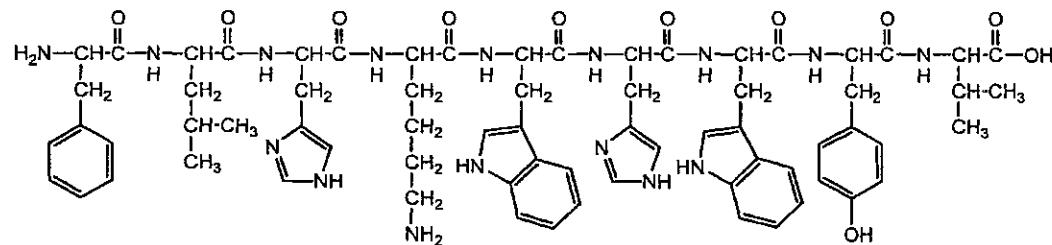
40

配列番号:7
FLHKWHWVV



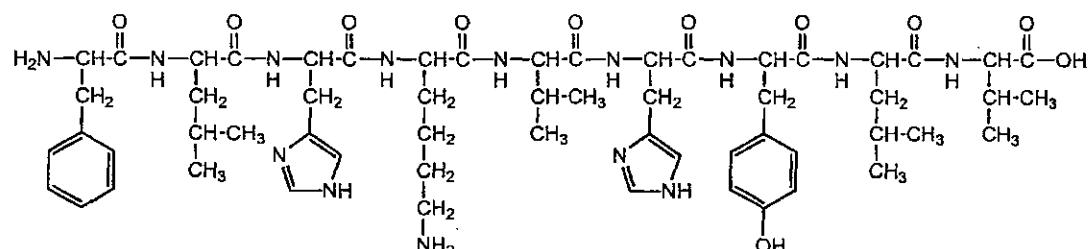
10

配列番号:9
FLHKWHWYV



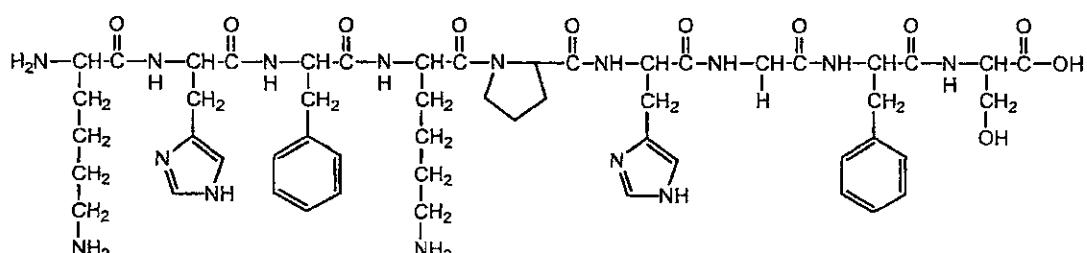
20

配列番号:11
FLHKVHYLV



30

配列番号:13
KHFKPHGFS



40

【 0 0 8 3 】

本発明はまた、MHC分子への結合の増強を示し、同種の天然のリガンドおよびその対応する天然のタンパク質に対する免疫応答を調節するために有用である、組成物も提供する。

【 0 0 8 4 】

本発明はさらに、抗癌ワクチンの成分として有用な、およびヒト癌抗原ATF4/CREB-2の発現を特徴とする癌に対して、特異的な免疫エフェクター細胞を増殖させるために有用な組成物を提供する。この種類の癌の例は卵巣癌である。

【 0 0 8 5 】

一つの態様において、本発明の改変リガンドは、天然のリガンドと同等のMHC結合親和性を有する。ペプチド：MHCクラスI結合特性は、免疫原性と相關することが証明され

50

ている（セッテ（S e t t e）A. ら（1994）Immunol. 153: 5586；ファンデルバーグ（v a n d e r B u r g）S. H. ら（1996）、J. Immunol. 156: 3308）。好ましい態様において、本発明の改変リガンドは「自然の」リガンドより高い親和性で T C R に結合する。天然のリガンドと改変リガンドとが M H C クラス I 分子に対して同等に結合するか否かは、当技術分野で既知の方法によって測定することができ、これには、アルゴリズムに基づく親和性の計算（例えば、パークー（P a r k e r）ら（1992）、J. Immunol. 149: 3580 ~ 3587）、および実験による結合親和性の計算（例えば、タン（T a n）ら、（1997）、J. Immunol. Meth. 209(1): 25 ~ 36）が含まれるが、これらに限定されない。例えば、クラス I 分子に対するペプチドの相対的結合は、様々な濃度の被験ペプチド（例えば、100 mM ~ 1 nM の範囲）を用いて、洗浄剤によって可溶化した M H C 分子に対する放射標識標準ペプチドの結合に基づいて結合することができる。M H C クラス I 重鎖および 2 - ミクログロブリンは、固定濃度（例えば、5 nM）の放射標識標準（対照）ペプチド、および様々な濃度の被験ペプチドと共に、室温でプロテアーゼ阻害剤混合物の存在下で適した期間（例えば、2 時間 ~ 72 時間）、共インキュベートする。対照試験管は、標準ペプチドと M H C 分子とを含むが、被験ペプチドを含まない。M H C 結合放射活性% はゲルfiltration によって決定する。I C₅₀（対照ペプチド結合の 50 % 阻害が起こる被験ペプチドの濃度）を、各ペプチドについて計算する。T C R に対する結合親和性を決定するさらなる方法は、当技術分野で既知であり、これらには、アルラマディ（a l - R a m a d i）ら（1992）、J. Immunol. 155(2): 662 ~ 673；およびズーゲル（Z u e g e l）ら（1998）、J. Immunol. 161(4): 1705 ~ 1709 に記載される方法が含まれるが、これらに限定されない。
10
20
20

【0086】

もう一つの態様において、本発明の改変リガンドは、天然のリガンド相対物と同等の抗原特異的な T 細胞の活性化を誘発する。好ましい態様において、本発明の改変リガンドは、天然のリガンド相対物と比較して、より強い抗原特異的な T 細胞の活性化を誘発する。本発明のリガンドの免疫原性を決定する方法は当技術分野で既知であり、本明細書にさらに記載される。

【0087】

一つの態様において、本発明の組成物は、本発明の免疫原性リガンドを二つまたはそれ以上含む。一つの局面において、そのような組成物は、単一のリガンドの二つまたはそれ以上のコピーを含んでもよい。もう一つの局面において、そのような組成物は、上記の二つまたはそれ以上のリガンドのそれぞれのリガンドが、上記の組成物における他の全てのリガンドとは異なる、二つまたはそれ以上のリガンドを含んでもよい。一つの態様において、二つまたはそれ以上の免疫原性リガンドは共有結合している。
30

【0088】

本発明はまた、M H C 分子に対する結合を増強するように設計され、合成ペプチドエピトープ、およびそれらが由来する対応する天然のペプチドに対する免疫応答を調節するため有用である、新規合成抗原性ペプチドを提供する。本発明の合成抗原性ペプチドエピトープ配列は、それらが、M H C クラス I 結合ドメインにおいて、天然の配列と比較して M H C へのより強固な結合を付与するように設計される、アミノ酸配列の変化を含むという点において、その天然の相対物とは異なる。それらはさらに、推定の T 細胞受容体結合ドメインにおいて、T 細胞抗原受容体に対する親和性を増加するように設計された変異を含む。天然の配列とのこれらの差は、本発明の合成抗原性ペプチドエピトープが増強された免疫調節特性を有するという点において、天然の配列と比較して本発明の方法に長所を付与するように設計される。
40

【0089】

本発明は、抗癌ワクチンの成分として有用であり、かつヒト癌抗原 A T F 4 / C R E B - 2 の発現を特徴とする癌に対して、特異的な免疫エフェクター細胞を増殖させるために有
50

用である、新規合成抗原性ペプチド配列を提供する。ペプチド
FLYKWHGFV (配列番号:3), **FLHKVHFYV** (配列番号:5),
FLHKWHWVV (配列番号:7), **FLHKWHWYV** (配列番号:9), および
FLHKVHYLV (配列番号:11)

は、それらが推定の H L A - A 2 結合ドメイン（アミノ酸 1、2、および 9）および T 細胞受容体結合（T C R）ドメイン（アミノ酸残基 3 ~ 8）において変異を含み、それぞれ M H C および T C R へのより強固な結合を付与するという点において、自然のエピトープ
KHFKPHGFS (配列番号:13) 10

とは異なる。本発明の合成抗原性ペプチドの M H C クラス I 分子に対する結合は、当技術分野で既知の方法によって測定することができ、これらには、アルゴリズムに基づく親和性の計算（例えば、パークー（P a r k e r）ら（1992）、J . Immunol . 149 : 3580 ~ 3587）、および実験による結合親和性の計算（例えば、タン（T a n）ら、（1997）、J . Immunol . Meth . 209 (1) : 25 ~ 36）が含まれるが、これらに限定されない。例えば、クラス I 分子に対するペプチドの相対的結合は、洗浄剤によって可溶化した M H C 分子に対する、放射標識標準ペプチドの結合に基づいて測定することができる。例えば、クラス I 分子に対するペプチドの相対的結合は、様々な濃度の被験ペプチド（例えば、100 mM ~ 1 nM の範囲）を用いて、洗浄剤で可溶化した M H C 分子に対する放射標識標準ペプチドの結合に基づいて、測定することができる。M H C クラス I 重鎖および 2 - ミクログロブリンは、固定濃度（例えば、5 nM）の放射標識標準（対照）ペプチド、および様々な濃度の被験ペプチドと共に、室温でプロテアーゼ阻害剤混合物の存在下で適した期間（例えば、2 時間 ~ 72 時間）、共インキュベートする。対照試験管は、標準ペプチドと M H C 分子とを含むが、被験ペプチドを含まない。M H C 結合放射活性 % はゲルfiltration によって決定する。I C₅₀（対照ペプチド結合の 50 % 阻害が起こる被験ペプチドの濃度）を、各ペプチドについて計算する。
 20

【 0 0 9 0 】

本発明の合成ペプチドは、「自然の」配列のペプチドより高い親和性で T C R に結合するように設計される。T C R に対する結合親和性を決定するさらなる方法は、当技術分野で既知であり、これらにはアルラマディ（a l - R a m a d i）ら（1992）、J . Immunol . 155 (2) : 662 ~ 673；およびズーゲル（Z u e g e l）ら（1998）、J . Immunol . 161 (4) : 1705 ~ 1709 に記載される方法が含まれるが、これらに限定されない。
 30

【 0 0 9 1 】

さらに「合成抗原性ペプチド」という用語には、選択的に、配列
FLYKWHGFV (配列番号:3), **FLHKVHFYV** (配列番号:5), **FLHKWHWVV**

(配列番号:7), **FLHKWHWYV** (配列番号:9), **FLHKVHYLV** (配列番号:11) 40

および **KHFKPHGFS** (配列番号:13)

を含むポリペプチドと共に、介在アミノ酸配列を含む本発明の合成抗原性ペプチドの多量体（コンカテマー）が含まれる。本発明はまた、ポリペプチドがヒト癌抗原 A T F 4 / C R E B - 2 細胞障害性 T リンパ球によって選択的に認識される、これらの配列を含むポリペプチドを提供する。

【 0 0 9 2 】

本発明のペプチド配列を含むポリペプチドは、天然のヒト癌抗原 A T F 4 / C R E B - 2 ポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの配列を変化させることによって、調製することができる。これは、当技術分野で周知の組換え D N A 技術を用いることによって
 50

行われる。例えば、改変ポリヌクレオチドが本発明のペプチドをコードするように、ポリヌクレオチド配列に変化を導入するために、天然のヒト癌抗原 A T F 4 / C R E B - 2 配列をコードする組換えポリヌクレオチドに、部位特異的変異誘発を行ってもよい。

【 0 0 9 3 】

本発明のタンパク質およびポリペプチドは、アメリカ、カリフォルニア州フォスター・シティのパーキン・エルマー／アプライドバイオシステムズ・インクによって製造された、モデル 430A または 431A のような市販の自動ペプチド合成機を用いて、化学合成によって得ることができる。合成されたタンパク質またはポリペプチドを沈殿させて、例えば、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によってさらに精製することができる。したがって、本発明はまた、アミノ酸および酵素のようなタンパク質および試薬の配列を提供する段階、ならびにアミノ酸配列を適当な方向および直線的な配列に結合させる段階によって、本発明のタンパク質を化学合成するための過程を提供する。

10

【 0 0 9 4 】

または、タンパク質およびポリペプチドは、下記の宿主系およびベクター系を用いて、本明細書に記載の周知の組換え法法を用いて得ることができる。

【 0 0 9 5 】

ペプチド類似体

本発明のペプチドに変化した特性を提供するために、改変を行うことは当業者に周知である。本明細書に記載するように、「アミノ酸」という用語は、グリシンおよび D または L 光学異性体の双方、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣体を含む、自然および / または人為的なまたは合成アミノ酸のいずれかを意味する。三つまたはそれ以上のアミノ酸からなるペプチドは一般的に、ペプチド鎖が短ければオリゴペプチドと呼ばれる。ペプチド鎖が長ければ、ペプチドは一般的に、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。

20

【 0 0 9 6 】

本発明のペプチドは、非天然アミノ酸を含むように改変することができる。このように、ペプチドはペプチドに特殊な特性を付与するように、D - アミノ酸、D - および L - アミノ酸の複合体、ならびに様々な「デザイナー」アミノ酸（例えば、- メチルアミノ酸、C - - メチルアミノ酸、N - - メチルアミノ酸等）を含んでもよい。さらに、特定のカップリング段階に特異的アミノ酸を割付することによって、- ヘリックス、ターン、シート、- ターン、および環状ペプチドを含むペプチドを作製することができる。一般的に - ヘリックス二次構造またはランダム二次構造が好ましいと考えられている。

30

【 0 0 9 7 】

さらなる態様において、有用な化学的および構造的特性を付与するペプチドのサブユニットを選択する。例えば、D - アミノ酸を含むペプチドは、インビボで L - アミノ酸特異的プロテアーゼに対して耐性であると考えられる。D - アミノ酸を有する改変化合物は、レトロ - インバーソ (retro - in verso) ペプチドとして本発明のペプチドを產生するために、逆の順序に配置したアミノ酸を用いて合成してもよい。さらに本発明は、新規特性を有するペプチドを調製するために、より明確な構造的特性を有するペプチドを調製する段階、ペプチド模倣体を用いる段階、およびエステル結合のようなペプチド模倣体結合を用いる段階を想定する。もう一つの態様において、還元されたペプチド結合、すなわち R₁ および R₂ がアミノ酸残基または配列である、R₁ - CH₂ NH - R₂ を組み入れるペプチドを作製してもよい。還元型ペプチドは、ジペプチドサブユニットとして導入してもよい。そのような分子は、ペプチド結合の加水分解、例えばプロテアーゼ活性に対して耐性であると考えられる。そのような分子は、代謝的分解またはプロテアーゼ活性に対する耐性のために、インビボでの半減期の増加のような、固有の機能および活性を有するリガンドを提供すると考えられる。さらに、特定の系において束縛された (constrained) ペプチドが増強された機能的活性を示すことは周知である（ルビー (Ruby) (1982)、Life Sciences 31 : 189 ~ 199 およびルビー (Ruby) ら (1990)、Biochem. J. 268 : 249 ~ 262）；

40

50

本発明は、他の全ての位置で無作為な配列を組み入れる、束縛されたペプチドを產生する方法を提供する。

【0098】

立体配座の束縛を誘導する非古典的アミノ酸

特定の立体配座モチーフを導入するために、以下の非古典的アミノ酸を本発明のペプチドに組み入れてもよい：1，2，3，4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボキシレート（カズルニエルスキ（Kazrnierski）ら（1991）、J. Am. Chem. Soc. 113: 2275 ~ 2283）；（2S, 3S）-メチル - フェニルアラニン、（2S, 3R）-メチルフェニルアラニン、（2R, 3S）-メチル - フェニルアラニン、および（2R, 3R）-メチル - フェニルアラニン（カズルニエルスキおよびルビー（Kazrnierski および Hruby）、（1991）、Tetrahedron Lett. 32(41): 5769 ~ 5772）；2 - アミノテトラヒドロナフタレン - 2 - カルボン酸（ランディス（Landis）（1989）、アリゾナ大学博士論文）；ヒドロキシ - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボキシレート（ミヤケ（Miyake）ら（1989）、J. Takeda Res. Labs. 43: 53 ~ 76）；ヒスチジンイソキノリンカルボン酸（ゼケル（Zechel）ら（1991）、Int. J. Pep. Protein Res. 38(2): 131 ~ 138）；およびHIC（ヒスチジン環状尿素）、（ダラニプラガダ（Dharanipragada）ら（1993）、Int. J. Pep. Protein Res. 42(1): 68 ~ 77）および（（1992）Acta Cryst. Crystallogr. Commun. 48(IV): 1239 ~ 1241）。 10 20 20

【0099】

以下のアミノ酸類似体およびペプチド模倣体を、特定の二次構造を誘導するために、またはそれらにとって有利であるように組み入れてもよい：LL - Acp (LL - 3 - アミノ - 2 - プロペニドン - 6 - カルボン酸)、 - ターン誘導ジペプチド類似体（ケンブ（Kemp）ら（1985）、J. Org. Chem. 50: 5834 ~ 5838）； - シート誘導類似体（ケンブ（Kemp）ら（1988）、Tetrahedron Lett. 29: 5081 ~ 5082）； - ターン誘導類似体（ケンブ（Kemp）ら（1988）、Tetrahedron Lett. 29: 5057 ~ 5060）； - ヘリックス誘導類似体（ケンブ（Kemp）ら（1988）、Tetrahedron Lett. 29: 4935 ~ 4938）； - ターン（ケンブ（Kemp）ら（1989）、J. Org. Chem. 54: 109 ~ 115）；以下の参考文献によって提供される類似体：ナガイおよびサトウ（Nagai および Sato）（1985）、Tetrahedron Lett. 26: 647 ~ 650；およびディメイオ（DiMai o）ら（1989）、J. Chem. Soc. Perkin Trans. p. 1687；Gly - Alaターン類似体（カーン（Kahn）ら（1989）、Tetrahedron Lett. 30: 2317）；アミド結合同配体（クローンズ（Clones）ら（1985）、Tetrahedron Lett. 29: 3853 ~ 3856）；テトラゾル（ザブロック（Zabrocki）ら（1988）、J. Am. Chem. Soc. 110: 5875 ~ 5880）；DTC（サマネン（Samanen）ら、（1990）、Int. J. Protein Pep. Res. 35: 501 ~ 509）；ならびにオルソン（Olson）ら（1990）、J. Am. Chem. Sci. 112: 323 ~ 333 およびガーベイ（Garvey）ら（1990）J. Org. Chem. 56: 436において教示される類似体。 ターンおよび バルジ（bulge）の立体配座束縛模倣体、ならびにそれらを含むペプチドは、1995年8月8日にカーン（Kahn）に発行された、米国特許第5,440,013号に記載されている。 30 40

【0100】

本発明の合成抗原性ペプチドエピトープは、意図する用途に応じて変更しうる、多様な製剤において用いることができる。

【0101】

本発明の合成抗原性ペプチドエピトープは、様々な他の分子に共有結合、または非共有結合（複合体を形成した）することができ、その本質は特定の目的に応じて変化する可能性がある。例えば、本発明のペプチドは、天然および合成ポリマー、タンパク質、多糖類、ポリペプチド（アミノ酸）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、および脂質を含むがこれらに限定されない高分子担体と共有結合または非共有結合によって複合体を形成することができる。ペプチドはリポソームに導入するために脂肪酸に結合することができる。米国特許第5,837,249号。本発明の合成ペプチドは、その多様なものが当技術分野で既知である、固相支持体と共有結合または非共有結合によって複合体を形成することができる。本発明の合成抗原性ペプチドエピトープは、下記により詳細に説明するように、共刺激分子の存在下または非存在下で、抗原提示マトリクスと結合することができる。

10

【0102】

タンパク質担体の例には、超抗原、血清アルブミン、破傷風毒素、卵白アルブミン、サイログロブリン、ミオグロブリン、および免疫グロブリンが含まれるがこれらに限定されない。

【0103】

ペプチドタンパク質担体ポリマーは、カルボジイミドのような従来の架橋剤を用いて形成してもよい。カルボジイミドの例は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルフォリニル-(4-エチル)カルボジイミド(CMC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、および1-エチル-3-(4-アゾニア-44-ジメチルペンチル)カルボジイミドである。

20

【0104】

他の適した架橋剤の例は、臭化シアン、グルタルアルデヒドおよび無水コハク酸である。一般的に、ホモ二官能アルデヒド、ホモ二官能エポキシド、ホモ二官能イミドエステル、ホモ二官能N-ヒドロキシスクシニミドエステル、ホモ二官能マレイミド、ホモ二官能ハロゲン化アルキル、ホモ二官能二硫化ピリジル、ホモ二官能ハロゲン化アリール、ホモ二官能ヒドラジド、ホモ二官能ジアゾニウム誘導体、およびホモ二官能光反応性化合物を含む、多くのホモ二官能物質のいずれかを用いてもよい。同様に、ヘテロ二官能化合物、例えば、アミン反応基とスルフヒドリル反応基とを有する化合物、アミン反応基と光反応基とを有する化合物、およびカルボニル反応基とスルフヒドリル反応基とを有する化合物も含まれる。

30

【0105】

そのようなホモ二官能架橋剤の特定の例には、二官能N-ヒドロキシスクシニミドエステルジチオビス(スクシニミジルプロピオネート)、ジスクシニミジルスペレート、およびジスクシニミジルタータレート；二官能イミドエステルジメチルアジピミデート、ジメチルピメリミデート、およびジメチルスベリミデート；二官能スルフヒドリル反応性架橋剤1,4-ジ-[3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン、ビスマレイミドヘキサン、およびビス-N-マレイミド-1,8-オクタン；二官能ハロゲン化アリール1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンおよび4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホネート；ビス[b-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィドのような二官能光反応性物質；二官能アルデヒドホルムアルデヒド、マロンジアルデヒド、スクシンアルデヒド、グルタルアルデヒド、およびアジパルデヒド；1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルのような二官能エポキシド；二官能ヒドラジドアジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、およびコハク酸ジヒドラジド；二官能ジアゾニウムo-トリジン、シアゾ化およびビスシアゾ化ベンジジン；二官能ハロゲン化アルキルN1N'-エチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、N1N'-ヘキサメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、N1N'-ウンデカメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)と共に、a1a'-ジヨード-p-キシレンスルホン酸およびトリ(2-クロロエチル)アミンのような、ハロゲン化ベンジルおよびハロマスターがそれぞれ含まれる。

40

50

【0106】

タンパク質をペプチドに結合させるために用いてもよい一般的なヘテロ二官能架橋剤の例には、SMCC(スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル)、SIB(N-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート)、SMPB(スクシニミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート)、GMB S(N-(2-マレイミドブチリルオキシ)スクシニミドエステル)、MPBH(4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド)、M2C2H(4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル-ヒドラジド)、SMPPT(スクシニミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン)、およびSPPD P(N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)が含まれるが、これらに限定されない。10

【0107】

架橋剤は、還元的アミノ化によって、アミン基またはヒドラジド基にカルボニル基をカップリングさせることによって行ってもよい。

【0108】

本発明のペプチドはまた、イオン性、吸着性、または生体特異性相互作用による、単量体の非共有結合として処方してもよい。高度に陽性または陰性に荷電した分子を有するペプチドの複合体は、脱イオン水のような低イオン強度の環境下での塩橋形成によって作製されうる。大きな複合体は、多数の陰性および陽性荷電をそれぞれ含むポリ-(L-グルタミン酸)またはポリ-(L-リジン)のような、荷電ポリマーを用いて作製することができる。ペプチドの吸着は、微粒子ラテックスビーズまたは他の疎水性ポリマーのような表面に対して行ってもよく、架橋した、または化学的に重合したタンパク質を有效地に模倣する非共有結合によって結合した、ペプチド超抗原複合体を形成する。最後にペプチドは、他の分子間の生体特異的相互作用を用いて、非共有結合によって結合してもよい。例えば、アビジンまたはストレプトアビジンのようなタンパク質に対する、ビオチンの強い親和性を利用して、ペプチド複合体を形成することができる。これらのビオチン結合タンパク質は、溶液中でビオチンと相互作用することができるか、またはもう一つの分子と共有結合することができる四つの結合部位を含む。ウィルチェック(Wilchek)(1988)、Anal. Biochem. 171:1~32。ペプチドは、タンパク質上で利用可能なアミン基と反応する、D-ビオチン(NHS-ビオチン)のN-ヒドロキシスクシニミジルエステルのような一般的なビオチン化試薬を用いて、ビオチン基を有するように改変することができる。次に、ビオチン結合ペプチドをアビジンまたはストレプトアビジンと共にインキュベートして、大きな複合体を形成することができる。そのようなポリマーの分子量は、アビジンまたはストレプトアビジンに対するビオチン結合ペプチドのモル比を注意深く制御することによって、調節することができる。2030

【0109】

同様に、診断方法において用いるために、検出可能な試薬と結合させた本明細書に開示のペプチドおよびポリペプチドが、本出願によって提供される。例えば、検出可能に標識したペプチドおよびポリペプチドをカラムに結合させて、抗体の検出および精製のために用いることができる。それらはまた、下記のように抗体を産生するための免疫原としても有用である。40

【0110】

本発明のペプチドはまた、滅菌溶液または水溶液のような、様々な液相担体、薬学的に許容される担体、懸濁液、および乳液と組み合わせることができる。非水性溶媒の例には、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコール、および植物油が含まれる。抗体を調製するために用いる場合、担体にはまた、特異的免疫応答を非特異的に増強するために有用であるアジュバントが含まれうる。当業者は、アジュバントが必要であるか否かを容易に決定して、それを選択することができる。しかし、説明する目的のみのために、適したアジュバントにはフロイントの完全および不完全アジュバント、無機塩、ならびにポ50

リヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0111】

本発明はさらに、配列

FLYKWHGFV (配列番号:3), FLHKVHFYV (配列

番号:5), FLHKWHWVV (配列番号:7), FLHKWHWYV (配列番号:9),

FLHKVHYLV (配列番号:11) および KHFPHGFS (配列番号: 13)

を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびこれらのポリヌクレオチドの相補物を提供する。本明細書において用いられるように、「ポリヌクレオチド」という用語は、DNA、RNA、および核酸模倣体を含む。上記の配列およびその相補体の他に、本発明はまたアンチセンスポリヌクレオチド鎖、例えばこれらの配列またはその相補鎖に対するアンチセンスRNAを提供する。配列番号：4、6、8、10、12、および14に提供される配列、およびファンデルクロール(van der Krool)ら(1988)、Biotechniques 6:958に記載された方法論を用いて、アンチセンスRNAを得ることが可能である。10

【0112】

本発明のポリヌクレオチドは、PCRを用いて複製することができる。PCR技術は、米国特許第4,683,195号；第4,800,159号；第4,754,065号；および第4,683,202号の主題であり、「PCR：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR：The Polymerase Chain Reaction）」、(マリス(Mullis)ら編、バークハウザー出版、ボストン(1994))およびそこに引用されている文献に記載されている。20

【0113】

または当業者は、DNAを複製するために本明細書に記載の配列および市販のDNA合成機を用いることができる。したがって本発明は、ポリヌクレオチドの直線配列、適当なプライマー分子、酵素のような化学物質、および複製のための指示を提供する段階、ならびにヌクレオチドを化学的に複製または適当な方向に連結することによって、ポリヌクレオチドを得る段階により、本発明のポリヌクレオチドを得る方法を提供する。異なる態様において、これらのポリヌクレオチドはさらに単離される。なおさらに、当業者は適した複製ベクターにポリヌクレオチドを挿入して、複製および増幅のためにベクターを適した宿主細胞(原核細胞または真核細胞)に挿入することができる。そのように増幅されたDNAは、当業者に周知の方法によって細胞から単離することができる。この方法によってポリヌクレオチドを得る過程は、そのように得られたポリヌクレオチドと共に本明細書においてさらに提供される。30

【0114】

RNAは、適した宿主細胞においてDNAポリヌクレオチドをまず挿入することによって得ることができる。DNAは、任意の適当な方法によって、例えば適当な遺伝子送達媒体(例えば、リポソーム、プラスミド、またはベクター)を用いることによって、またはエレクトロポレーションによって挿入することもできる。細胞が複製して、DNAがRNAに転写されると、RNAは例えば、上記のサムブルック(Sambrook)ら(1989)に記載されるように、当業者に周知の方法を用いて単離することができる。例えば、mRNAは上記のサムブルック(Sambrook)ら(1989)に記載される技法に従って様々な溶解性の酵素または化学溶液を用いて単離するか、または製造業者によって提供される添付の説明書に従って、核酸結合樹脂によって抽出することができる。40

【0115】

少なくとも4個の連続するヌクレオチド、より好ましくは少なくとも5個または6個の連続するヌクレオチド、および最も好ましくは少なくとも10個の連続するヌクレオチドを有し、かつ配列番号：3、5、7、9、11および13(例えば、配列番号：4、6、8、10、12、または14)に示すアミノ酸をコードする配列に、配列相補性または相同50

性を示すポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブとして有用性を有する。

【0116】

「完全にマッチした」プローブは、特異的ハイブリダイゼーションにとって必要ではないことは当技術分野において既知である。少数の塩基の置換、欠失、または挿入によって得られるプローブ配列におけるわずかな変化は、ハイブリダイゼーション特異性に影響を及ぼさない。一般的に、20%程度の塩基対ミスマッチ（選択的に整列した場合）が容認されうる。好ましくは、上記のmRNAを検出するために有用なプローブは、これまでに特徴づけされた遺伝子に対応するこれまでに同定された配列（上記のように同定された）、または配列番号：1、4、6、8、10、12もしくは14に含まれる同等の大きさの相同意領域と少なくとも約80%同一である。より好ましくは、プローブは相同意領域のアライメント後に、対応する遺伝子配列と85%同一である；さらにより好ましくは90%の同一性を示す。

【0117】

これらのプローブは、これらの細胞を含む様々な細胞または組織を検出またはモニターするためのラジオアッセイ（例えば、サザンおよびノザンプロット分析）において用いることができる。プローブはまた、本発明の一つまたは複数のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出するための高処理能スクリーニングアッセイにおいて用いられるチップのような固相支持体またはアレイに結合することができる。したがって、本発明は、高処理能スクリーニングにおいて用いるために固相支持体に結合した、配列番号：4、6、8、10、12もしくは14、またはこれらの配列の一つの相補体として同定される少なくとも一つのプローブを提供する。

【0118】

本発明のポリヌクレオチドはまた、例えば、宿主細胞へのポリヌクレオチドの形質導入を確認するために、APCにおいて発現された遺伝子または遺伝子転写物を検出するためのプライマーとして役立つ。この文脈において、增幅は妥当な信頼性で標的配列を複製することができるプライマー依存的ポリメラーゼを用いる任意の方法を意味する。増幅は、T7DNAポリメラーゼのような天然または組換えDNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素によって行ってもよい。プライマーの好ましい長さは、上記のプローブに関して同定されたものと同じである。

【0119】

本発明はさらに、RNA転写のプロモーターに機能的に結合した単離されたポリヌクレオチドと同様に、DNAまたはRNAの複製および/または一過性または安定な発現のための他の調節配列をさらに提供する。本明細書において用いられるように、「機能的に結合した」という用語は、プロモーターがDNA分子から離れて、RNAの転写を指示するように位置することを意味する。そのようなプロモーターの例は、SP6、T4およびT7である。特定の態様において、細胞特異的プロモーターは、挿入されたポリヌクレオチドの細胞特異的発現のために用いられる。停止コドンおよび選択マーカー配列を有し、プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーと同様に、DNAの挿入片がそのプロモーターに機能的に結合することができるクローニング部位を含むベクターは、当技術分野で周知であり、市販されている。一般的な方法論およびクローニング戦略に関しては、様々な適したベクターに関するマップ、機能的特性、販売元およびGene Expression Technology」ゴエッデル（Goeddel）ら、アカデミック出版社（1991）、およびその中に含まれる引用文献、ならびに「ベクター：本質的なデータシリーズ（Vectors: Essential Data Series）」ガセサおよびラムジ（GacesaおよびRamji）、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、ニューヨーク州（1994）を参照のこと。好ましくは、これらのベクターはインビトロまたはインビボでRNAを転写することができる。

【0120】

これらの核酸を含む発現ベクターは、タンパク質およびポリペプチドを産生するための宿

10

20

30

40

50

主ベクター系を得るために有用である。これらの発現ベクターは、エピソームとしてまたは染色体DNAの一体化された一部として宿主細胞において複製可能でなければならないという意味である。適した発現ベクターには、プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、コスマニド等を含むウイルスベクターが含まれる。アデノウイルスベクターは、インビトロおよびインビボの双方でその高レベル発現および細胞の効率的な形質転換のために、インビボで組織に遺伝子を導入するために特に有用である。核酸を、適した宿主細胞、例えば原核細胞または真核細胞に挿入して、宿主細胞が複製すると、タンパク質を組換え的に産生することができる。適した宿主細胞には、ベクターに依存して、周知の方法を用いて構築された哺乳類細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞が含まれる。上記のサムブルック (Sambrook) ら (1989) を参照のこと。外因性の核酸を細胞に挿入するためにウイルスベクターを用いることの他に、細菌細胞の形質転換；哺乳類細胞の場合にはリン酸カルシウム沈殿を用いるトランスフェクション；DEAEデキストラン；エレクトロポレーション；またはマイクロインジェクションのような当技術分野で周知の方法によって、核酸を宿主細胞に挿入することができる。この方法論に関しては、上記のサムブルック (Sambrook) ら (1989) を参照のこと。このように、本発明は宿主細胞、例えば、タンパク質、ポリペプチド、または抗体をコードするポリヌクレオチドを含む哺乳類細胞、動物細胞（ラットまたはマウス）、ヒト細胞、または細菌細胞のような原核細胞も同様に提供する。

10

20

30

40

50

【0121】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを細胞に送達するために（インビボ、エキソビボ、またはインビトロ）適した送達媒体を提供する。本発明のポリヌクレオチドはクローニングまたは発現ベクター内に含まれる。これらのベクター（特に発現ベクター）を次に、例えば細胞への送達を促進する、および／または細胞への流入を促進しうる、多くの任意の形態を想定して操作することができる。

【0122】

ベクターをインビボまたはエキソビボで遺伝子治療のために用いる場合、複製能のないレトロウイルスまたはアデノウイルスベクターのような薬学的に許容されるベクターが好ましい。本発明の核酸を含む薬学的に許容されるベクターは、挿入されたポリヌクレオチドの一過性または安定な発現のためにさらに改変することができる。本明細書において用いられるように、「薬学的に許容されるベクター」という用語には、分裂する細胞への核酸の選択的な標的指向能および核酸の導入能を有するベクターまたは送達媒体が含まれるがこれらに限定されない。そのようなベクターの例は、ウイルスタンパク質を産生できない点により定義され、感染宿主細胞でのベクターの核酸を妨げる、「複製能のない」ベクターである。複製能のないレトロウイルスベクターの例は、LN L 6 (ミラー (Miller, A. D.) ら (1989)、Biotechniques 7 : 980 ~ 990) である。遺伝子マーカーのレトロウイルス媒介遺伝子移入のために複製能のないレトロウイルスを用いる方法論は、十分に確立されている（コレル (Correll) ら、(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 8912；ボーディノン (Bordignon) (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 8912 ~ 52；カルバー (Culver) K. (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 3155；およびリル (Rill) D. R. (1991)、Blood 79 (10) : 2694 ~ 2700）。

【0123】

本発明のポリヌクレオチドを含むこれらの単離された宿主細胞は、ポリヌクレオチドの組換え的複製のために、かつペプチドの組換え的産生のために有用である。または、細胞は、本明細書に記載の方法において被験者における免疫応答を誘導するために用いてよい。宿主細胞が抗原提示細胞である場合、それらは、腫瘍浸潤リンパ球のような免疫エフェクター細胞の集団を増殖させるために用いることができ、次に養子免疫治療において有用となる。

【0124】

本発明のポリペプチドと複合体を特異的に形成することができる抗体も同様に本発明によって提供される。「抗体」という用語には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体には、マウス、ラット、およびウサギ、またはヒト抗体が含まれるがこれらに限定されない。抗体は、ポリペプチドおよびポリペプチドを発現するA P Cを同定および精製するために有用である。

【0125】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を产生する実験方法は、対応する核酸配列を推定する方法と共に、当技術分野で既知であり、ハーロウおよびレーン (H a r l o w およびL a n e)、(1988)、上記、およびサムブルック (S a m b r o o k) ら、(1989) 上記を参考のこと。本発明のモノクローナル抗体は、動物、例えばマウスまたはウサギにタンパク質またはその断片を導入することによって生物学的に产生することができる。動物における抗体産生細胞を単離して骨髄腫細胞またはヘテロ骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリッド細胞またはハイブリドーマを作製する。したがって、本発明のモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマも同様に提供される。

【0126】

このように、タンパク質またはその断片、および周知の方法を用いて、当業者は、本発明のハイブリドーマ細胞および抗体を产生して、タンパク質またはポリペプチドに対する結合能を有する抗体に関してスクリーニングすることができる。

【0127】

検査するモノクローナル抗体がタンパク質またはポリペプチドに結合すれば、検査する抗体と本発明のハイブリドーマによって提供された抗体とは同等である。同様に、過度の実験を行うことなく、それに対してモノクローナル抗体が正常に反応するタンパク質またはポリペプチドと本発明のモノクローナル抗体の結合を、検査する抗体が妨害するか否かの判定によって、その抗体が本発明のモノクローナル抗体と同じ特異性を有するか否かを判定することも可能である。検査する抗体が、本発明のモノクローナル抗体による結合の減少によって示されるように、本発明のモノクローナル抗体と競合すれば、二つの抗体は同じまたは密接に関連したエピトープに結合する可能性がある。または、それが正常に反応するタンパク質と共に本発明のモノクローナル抗体を予めインキュベートして、検査するモノクローナル抗体の抗原との結合能が阻害されているか否かを判定することができる。検査するモノクローナル抗体が阻害されれば、それはおそらく本発明のモノクローナル抗体と同じ、または密接に関連したエピトープ特異性を有する。

【0128】

「抗体」という用語にはまた、全てのイソ型の抗体が含まれると解釈される。モノクローナル抗体の特定のイソ型は、最初の融合体から直接選択することによって調製することができ、またはステプリュースキー (S t e p l e w s k i) ら (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 8653、もしくはスパイラ (S p i r a) ら (1984)、J. Immunol. Meth. 74 : 307に記載される方法を用いて、クラススイッチ変種を単離するための関連する選択技術を用いて、異なるイソ型のモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製することもできる。

【0129】

本発明はまた、上記のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の生物活性断片を提供する。これらの「抗体断片」は、その抗原または免疫原との何らかの選択的結合能を保持する。そのような抗体断片には以下が含まれるがこれらに限定されない：

- (1) F a b、
- (2) F a b'、
- (3) F (a b')₂、
- (4) F v、および
- (5) S C A。

10

20

30

40

50

【0130】

「生物活性抗体断片」の具体例は、抗体の C D R 領域である。これらの断片を作製する方法は当技術分野で既知であり、例えばハーロウおよびレーン (Har low および Lane) (1988) 上記を参照のこと。

【0131】

本発明の抗体はまた、キメラ抗体およびヒト化抗体を作製するために改変することができる（オイ（ O i ）ら（ 1986 ）、 Bi o T e c h n i q u e s 4 (3) : 214 ）。キメラ抗体は、抗体の重鎖と軽鎖の様々なドメインが一つ以上の種からの D N A によってコードされる抗体である。

【0132】

本発明のモノクローナル抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を分泌する他のハイブリドーマの単離もまた、抗イディオタイプ抗体を作製することによって、当業者は行うことができる（ヘイリン（ H e y l y n ）ら、（ 1986 ）、 S c i e n c e 232 : 100 ）。抗イディオタイプ抗体は、関係するハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体上に存在する独自の決定基を認識する抗体である。

【0133】

二つのハイブリドーマのモノクローナル抗体間のイディオタイプ同一性は、二つのモノクローナル抗体が同じエピトープ決定基の認識に関して同じであることを示す。このように、モノクローナル抗体上のエピトープ決定基に対する抗体を用いて、同じエピトープ特異性のモノクローナル抗体を発現する他のハイブリドーマを同定することが可能である。

【0134】

同様に、エピトープを模倣するモノクローナル抗体を產生するために抗イディオタイプ技術を用いることも可能である。例えば、第一のモノクローナル抗体に対して作製された抗イディオタイプモノクローナル抗体は、第一のモノクローナル抗体が結合するエピトープの鏡像である結合ドメインを、超可変領域に有すると考えられる。したがってこの場合、抗イディオタイプモノクローナル抗体は、これらの抗体を產生するための免疫に用いることができると考えられる。

【0135】

本発明において用いられるように、「エピトープ」という用語は、本発明のモノクローナル抗体に対する特異的親和性を有する任意の決定基が含まれることを意味する。エピトープ決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖のような分子の化学活性表面群からなり、特異的荷電特徴と共に特定の三次元構造特徴を有する。

【0136】

本発明の抗体は、検出可能な物質または標識に結合することができる。当業者に既知の多くの異なる標識および標識方法がある。

【0137】

抗体を低分子量ハプテンにカップリングさせることは、アッセイの感度を増加させうる。次に、ハプテンを第二の反応によって特異的に検出することができる。例えば、ビオチンのような、特異的抗ハプテン抗体と反応することができるアビジン、ジニトロフェリル、ピリドキサル、およびフルオレセインに反応するハプテンを用いることが一般的である。ハーロウおよびレーン (Har low および Lane) (1988) 上記を参照のこと。

【0138】

本発明のモノクローナル抗体はまた、多くの異なる担体に結合させることができる。このように、本発明はまた、抗体と活性または不活性なもう一つの物質とを含む組成物を提供する。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱が含まれる。担体の特性は本発明の目的にとって可溶性または不溶性となりうる。当業者は、モノクローナル抗体を結合するための他の適した担体を承知しており、または日常的な実験を行ってそれを確認することができると考えられる。

【0139】

10

20

30

40

50

抗体、その断片または抗体を產生する細胞株を含む組成物は、本発明に含まれる。これらの組成物を薬学的に用いる場合、それらは薬学的に許容される担体と組み合わせる。

【0140】

もう一つの態様において、本発明は、MHC分子に結合した本発明の化合物および組成物を送達することを含む免疫応答を誘導する方法を提供する。このように、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の方法を用いて抗原提示細胞にパルスすることができる。抗原提示細胞には、樹状細胞(DC)、単球/マクロファージ、Bリンパ球、または必要なMHC/共刺激分子を発現する他の細胞種が含まれるがこれらに限定されない。下記の方法は、最も強力であるDC、好ましくはAPCに対して主に重点を置いている。ポリペプチドまたはタンパク質を含むこれらの宿主細胞をさらに提供する。

10

【0141】

MHC分子に結合した本発明のポリペプチドを提示する単離された宿主細胞は、感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞の集団を拡大および単離するためにさらに有用である。免疫エフェクター細胞、例えば、細胞障害性Tリンパ球は、APCの表面上のMHC分子に結合したポリペプチドを提示する抗原提示細胞と共に天然の免疫エフェクター細胞を培養することによって得られる。集団は当技術分野で既知の方法、例えばFACS分析またはフィコール勾配を用いて精製することができる。免疫エフェクター細胞と共にそれによって産生される集団を作製して培養する方法にも、同様に本発明者らが貢献しており、本発明である。細胞と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物は、養子免疫治療において有用である。インビボで投与する前に、免疫エフェクター細胞を、ヒト癌抗原ATF4/CREB-2を発現する腫瘍細胞、例えば卵巣癌の溶解能に関してインビトロでスクリーニングする。

20

【0142】

一つの態様において、免疫エフェクター細胞および/またはAPCは遺伝子改変される。標準的な遺伝子移入を用いて、共刺激分子および/または刺激性サイトカインをコードする遺伝子を、免疫エフェクター細胞を拡大する前、同時、または後に挿入することができる。

30

【0143】

本発明はまた、ポリペプチドに対する免疫応答を誘導する条件で、上記のポリペプチドの有効量を被験者に投与することを含む、被験者における免疫応答を誘導する方法を提供する。ポリペプチドは、組成物において、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとして投与することができる。ポリヌクレオチドは、遺伝子送達媒体において、または宿主細胞に挿入することによって投与することができ、次にコードされたポリペプチドを組み換えることによって転写、翻訳およびプロセシングする。したがって、薬学的に許容される担体において本発明のポリヌクレオチドを含む単離された宿主細胞は、有効なワクチンレジメのためにアジュバント、サイトカイン、または共刺激分子の適当な有効量と共に組み合わせることができる。一つの態様において、宿主細胞は、樹状細胞のようなAPCである。宿主細胞は、サイトカインおよび/または共刺激分子のいずれかまたは双方の有効量をコードするポリヌクレオチドを挿入することによってさらに改変することができる。

40

【0144】

本発明の方法は、被験者にサイトカインまたは共刺激分子の有効量を同時投与することによってさらに改変することができる。

【0145】

本発明はまた、任意の上記のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、抗体、およびその断片と、許容される固体または液体担体とを含む組成物を提供する。組成物が薬学的に用いられる場合、それらは診断的および治療的用途のために「薬学的に許容される担体」と組み合わせる。これらの組成物はまた、癌のような疾患の診断および治療のための薬剤を調製するために用いることができる。

【0146】

以下の材料および方法は、本発明、上記の本発明を作製する方法および利用する方法を説

50

明するためであって、これらに制限されない。

【0147】

材料および方法

本発明のポリペプチドの產生

最も好ましくは、本発明の単離されたペプチドは、適当な固相合成技法を用いて合成することができる。ステワードおよびヤング (S t e w a r d および Y o u n g) 「固相ペプチド合成 (S o l i d P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s)」、フリーマントル、サンフランシスコ、カリフォルニア州 (1968)。好ましい方法は、メリフィールド法である。メリフィールド (M e r r i f i e l d, (1967)、Recent Progress in Hormone Res. 23: 451) を参照のこと。これらのペプチドの抗原性は、例えば、本明細書に記載のアッセイを用いて簡便に調べてもよい。

10

20

30

40

50

【0148】

本発明の単離されたペプチドが得られれば、これをクロマトグラフィー (例えば、イオン交換、アフィニティ、およびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心、示差溶解度、またはタンパク質精製に関する他の任意の標準的な技術を含む標準的な方法によって精製してもよい。免疫アフィニティクロマトグラフィーの場合、本発明のペプチド、または関連するペプチドに対して作製して、静止相に固定した抗体を含むアフィニティカラムにそれを結合させることによって、エピトープを単離してもよい。

【0149】

または、ヘキサ-H i s (インビトロジエン社)、マルトース結合ドメイン (ニューイングランドバイオラブス社)、インフルエンザコート配列 (コロジエジ (K o l o d z i e j) ら、(1991)、M e t h . E n z y m o l . 194: 508 ~ 509) およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼのようなアフィニティタグを本発明のペプチドに結合させて、適当なアフィニティカラムを通過させることによって容易に精製することができる。単離したペプチドはまた、タンパク質溶解、核磁気共鳴、およびX線結晶学のような技術を用いて物理的に特徴を調べることができる。

【0150】

例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質溶解による切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドとの結合によって、翻訳の際または翻訳後に異なるように改変された抗原性ペプチドも同様に本発明の範囲に含まれる (ファーガソン (F e r g u s o n) ら (1988)、A nn . R e v . B i o c h e m . 57: 285 ~ 320)。

【0151】

樹状細胞を含むA P Cの単離、培養、および増殖

以下は、A P Cを単離するための二つの基本的なアプローチの簡単な説明である。これらのアプローチには、(1) 血液から骨髄前駆細胞 (C D 3 4⁺) を単離して、それらを刺激してA P Cに分化させること; または(2) 末梢血からA P C前駆細胞を回収することを含む。第一のアプローチにおいて、末梢血における循環中のC D 3 4⁺幹細胞の数を増加させるために、患者を、G M - C S F のようなサイトカインによって処置しなければならない。

【0152】

A P Cを単離する第二のアプローチは、血液中に既に循環している比較的多数のA P C前駆細胞を回収することである。ヒト末梢血からA P C前駆細胞を単離するこれまでの技法は、メトリザミド勾配および接着/非接着段階 (フロイデンサール (F r e u d e n t h a l , P . S .) ら (1990)、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 87: 7698 ~ 7702); パーコール勾配分離 (メータ-ダマニ (M e h t a - D a m a n i) ら (1994)、J . I m m u n o l . 153: 996 ~ 1003); および蛍光活性化細胞選別技術 (トーマス (T h o m a s , R .) ら (1993)、J . I m m u n o l . 151: 6840 ~ 6852) のような物理的技法の組み合わせを

含む。

【0153】

多数の細胞を互いに分離する技術の一つとして、対向流遠心エラトリエーション（CCE）が知られる。この技術では、細胞を同時に遠心して、絶えず流速が増加している緩衝液の洗浄の流れに置く。緩衝液による絶えず増加している対向流によって、ほぼ細胞の大きさに基づく細胞の分画が分離される。

【0154】

本発明の一つの局面において、APCはマウス、サル、またはヒトのような哺乳類の白血球細胞分画から単離することができる全委任（precommitted）樹状細胞または成熟樹状細胞である（例えば、国際公開公報第96/23060号を参照のこと）。白血球細胞分画は、哺乳類の末梢血から単離することができる。この方法には以下の段階が含まれる：（a）ロイコフォレーシスのような当技術分野で既知の方法によって哺乳類起源から得られた白血球細胞分画を提供する段階；（b）段階（a）の白血球分画を対向流遠心エラトリエーションによって四つまたはそれ以上の小分画に分離する段階；（c）細胞をカルシウムイオノフォア、GM-CSFとIL-13、またはGM-CSFとIL-4に接触させることによって、段階（b）からの一つまたは複数の分画における単球の樹状細胞への変換を刺激する段階、（d）段階（c）からの樹状細胞に富む分画を同定する段階；および（e）段階（d）の濃縮分画を好みしくは約4で回収する段階。樹状細胞濃縮分画を同定する一つの方法は、蛍光活性化細胞選別である。白血球分画を、組換え（r h）r h IL-12、r h GM-CSF、またはr h IL-4のような他のサイトカインの存在下でカルシウムイオノフォアによって処置することができる。白血球分画の細胞を緩衝液において洗浄して、Ca⁺⁺/Mg⁺⁺不含培地に浮遊させてから分離段階を行う。白血球分画はロイコフォレーシスによって得ることができる。樹状細胞は、以下のマーカー：HLA-DR、HLA-DQ、またはB7.2の少なくとも一つが存在することと、以下のマーカー：CD3、CD14、CD16、56、57、およびCD19、20が同時に存在しないことによって同定することができる。これらの細胞表面マーカーに対する特異的なモノクローナル抗体は市販されている。

【0155】

より具体的には、本方法では、ロイコフェレーシスから白血球と血小板に富む分画を回収して、これを対向流遠心エラトリエーション（CCE）によってさらに分画する必要がある（アブラハムセン（Abrahamsen）T.G.ら、（1991）、J.Clin. Apheresis. 6:48~53）。細胞試料を特殊なエラトリエーションローターに入れる。次に、ローターを例えば3000 rpmの一定速度で遠心する。ローターが所望の速度に達すれば、加圧空気を用いて細胞の流速を制御する。エラトリエーターにおける細胞は、同時遠心と絶えず流速が増加する緩衝液の洗浄の流れとを受ける。これによって、細胞の大きさの差に基づく、しかしそれのみではない分画細胞分離が得られる。

【0156】

APCの質の制御、より詳しくはDC回収と培養におけるその活性化の成否の確認は、単球、および樹状細胞亜集団の双方のみならず可能性がある混入Tリンパ球をモニターする同時多色FACS分析技術に依存する。これは、DCが以下のマーカーを発現しないという事実に基づく：CD3（T細胞）；CD14（単球）；CD16、56、57（NK/LAK細胞）；CD19、20（B細胞）。同時に、DCは血液中を循環する際に、大量のHLA-DR、有意なHLA-DQおよびB7.2（しかしB7.1はほとんどまたは全く発現しない）を発現する（それらは他にLeu M7およびM9、単球および好中球によっても同様に発現される骨髄マーカーを発現する）。

【0157】

死細胞を分析するための第三の発色試薬、ヨウ化プロピジウム（PI）と組み合わせると、全ての細胞亜集団の陽性同定が可能となる（表1を参照のこと）。

【0158】

10

20

30

40

50

【表1】新鮮な末梢細胞亜集団のFACS分析

	<u>色 #1</u> カクテル 3/14/16/19/20/56/57	<u>色 #2</u> HLA-DR	<u>色 #3</u> PI
生存樹状細胞	陰性	陽性	陰性
生存単球	陽性	陽性	陰性
生存好中球	陰性	陰性	陰性
死細胞	可変	可変	陽性

10

さらに分析するために追加のマーカーを代用することができる：

色#1：CD3のみ、CD14のみ等；LeuM7またはLeuM9；抗クラスI等。
 色#2：HLA-DQ、B7.1、B7.2、CD25(IL2r)、ICAM、LFA-3等。

【0159】

回収時のFACS分析の目標は、DCが予想される分画中で濃縮されることを確認すること、好中球の混入をモニターすること、および適当なマーカーが発現されることを確認することである。ヒト末梢血から、臨床応用に適した濃縮DCをこのように迅速に大量に回収することは、品質管理に関して先に記述した分析的FACS技術に完全に依存する。必要であれば、成熟DCを「カクテル陰性」細胞に関する蛍光選別によって、この時点で単球から直ちに分離することができる。下記に詳細に説明するように、単球自身は培養においてDCまたは機能的DC様細胞になおも分化することができるため、DCを単球から日常的に分離する必要はない可能性がある。

20

【0160】

回収すれば、DC濃縮／単球APC分画（通常150～190）をプールして、今後使用するために凍結保存することができるか、または直ちに短期間培養に入れることができる。

30

【0161】

または、樹状細胞を上方制御（活性化する）して、単球を活性化樹状細胞表現型に変換する方法が報告されている。この方法は、単球を活性化樹状細胞に変換するために、培養培地へのカルシウムイオノフォアの添加を伴う。カルシウムイオノフォアA23187を例えば24～48時間の培養期間の最初に加えると、均一な活性化が起こり、プールされた「単球プラスDC」分画が樹状細胞表現型に変換された：特徴的に、活性化集団は、等しくCD14(LeuM3)陰性となり、HLA-DR、HLA-DQ、ICAM-1、B7.1およびB7.2を上方制御する。さらに、この活性化バルク集団は、さらに精製される少数の基礎としても機能する。

40

【0162】

サイトカインの特定の組み合わせは、カルシウムイオノフォアによって得られる活性化／変換を首尾よく增幅（または部分的に置換）するために用いられている：これらのサイトカインには、精製または組換え（「rh」）rhGM-CSF、rhIL-2、およびrhIL-4が含まれるがこれらに限定されない。それぞれのサイトカインは、単独で投与すると最適な上方制御には不適当である。

【0163】

APCに対する抗原の提示

免役する目的のために、抗原性ペプチド（3、5、7、9、11、および13）は、タンパク質／ペプチドとして、またはタンパク質／ペプチドをコードするcDNAの形で抗原

50

提示細胞に送達することができる。抗原提示細胞（A P C）は、樹状細胞（D C）、単球／マクロファージ、Bリンパ球、または必要なM H C／共刺激分子を発現する他の細胞種からなりうる。下記の方法は、最も強力なD C、好ましくはA P Cに主に焦点を当てる。

【0164】

パルスは、A P Cを、本発明の抗原性タンパク質またはペプチドに曝露することによって、インビトロ／エキソビオで行われる。タンパク質またはペプチドは1～10 μmの濃度で約3時間A P Cに加える。次に、パルスしたA P Cを静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内投与経路を通して宿主に投与することができる。

【0165】

タンパク質／ペプチド抗原はまた、静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内投与経路を通してアジュvantと共にインビオで送達することができる。

【0166】

パグリア（P a g l i a）ら（1996、J. Exp. Med. 183: 317～322）は、インビトロでタンパク質全体と共にインキュベートしたA P Cが、M H CクラスI拘束（r e s t r i c t e d）C T Lによって認識されること、およびこれらのA P Cで動物を免疫すると、インビオで抗原特異的C T Lが産生されることを示した。さらに、D CのようなA P Cのサイトゾルにおいて抗原を発現させる、いくつかの異なる技術が説明されている。これらには、（1）腫瘍から単離されたR N AのA P Cへの導入、（2）抗原の内因性発現を誘導するための組換えベクターによるA P Cの感染、および（3）リポソームを用いた、腫瘍抗原のD Cサイトゾルへの導入が含まれる。（ボクズコウスキー（B o c z k o w s k i, D.）ら、（1996）、J. Exp. Med. 184: 465～472；ロウス（R o u s e）ら（1994）、J. Virol. 68: 5685～5689；およびネイア（N a i r）ら（1992）、J. Exp. Med. 175: 609～612を参照のこと）。

【0167】

フォスター抗原提示細胞

フォスター抗原提示細胞は標的細胞として特に有用である。フォスターA P Cは、細胞表面M H CクラスI分子と内因性ペプチドとの結合を制限する抗原プロセシング経路に変異を含む、T 2と呼ばれるヒト細胞株174×CE M . T 2に由来する（ツウェリンク（Z weerink）ら（1993）、J. Immunol. 150: 1763～1771）。これは、M H CクラスI拘束C D 8⁺ C T Lに抗原を提示するために必要な、遺伝子T A P 1、T A P 2、L M P 1、およびL M P 2を含む、M H CクラスII領域における大きなホモ接合欠失のためである。実質的に、「空の」M H CクラスI分子のみがこれらの細胞の表面に提示される。培養培地に加えられた外因性ペプチドは、ペプチドが対立遺伝子特異的結合モチーフを含むならば、これらのM H C分子に結合する。これらのT 2細胞は、本明細書において「フォスター」A P Cと呼ぶ。それらは、抗原を提示するために本発明と組み合わせて用いることができる。

【0168】

T 2細胞に特異的な組換えM H C対立遺伝子を形質導入すると、M H C拘束プロフィールの再指示が可能になる。組換え対立遺伝子に合わせて作製されたライブラリーは、結合残基が内因性対立遺伝子との有効な結合を妨げるため、それらによって選択的に提示されると考えられる。

【0169】

M H C分子の高レベル発現によって、A P CはC T Lに対してより目立つようになる。強力な転写プロモーターを用いたT 2細胞における、関係するM H C対立遺伝子の発現によって、より反応性のA P Cが得られる（細胞表面上でのより高い濃度の反応性M H C-ペプチド複合体による可能性が最も高い）。

【0170】

免疫原性アッセイ

本発明のリガンドの免疫原性は、下記に例示するものを含むがこれらに限定されない、周

10

20

30

40

50

知の方法論によって決定することができる。一つの態様において、そのような方法論は、対応する天然のリガンドと本発明の改変リガンドとを比較するために用いてもよい。例えば改変リガンドは、以下のアッセイのいずれか一つにおいて天然のリガンドの活性と同程度であれば、「より活性である」と見なされると考えられる。いくつかの目的に関して、すなわち、治療および／または診断目的のために、当業者はもう一つの免疫原性リガンドより高い活性を示す、免疫原性リガンドを選択すると考えられる。しかし適応によっては、天然のリガンドと同等である免疫原性リガンドを用いることが適している。他の状況では、より活性が弱い免疫原性リガンドを利用することが望ましいかも知れない。そのような活性レベルは、免疫原性レベルと正の相関をすることが示唆されている。

10

【0171】

1. ⁵₁ Cr - 放出溶解アッセイ

ペプチドパルス⁵₁ Cr - 標識標的の抗原特異的T細胞による溶解を、天然のまたは改変リガンドのいずれかによってパルスした、標的細胞に関して比較することができる。機能的に増強されたリガンドは、時間の関数としてより大きな標的溶解を示すと考えられる。溶解の速度論と共に、固定時間（例えば、4時間）での全標的溶解を用いて、リガンドの性能を評価してもよい（ウェア（Ware）C. F. ら（1983）、J. Immunol. 131: 1312）。

20

【0172】

2. サイトカイン放出アッセイ

リガンドパルス標的と接触させた場合にT細胞によって分泌されるサイトカインの種類および量の分析は、機能的活性の測定となりうる。サイトカインは、サイトカイン産生の速度および全量を決定するためにELISAまたはELISPOTアッセイによって測定することができる（フジハシ（Fujihashi）K. ら、（1993）、J. Immunol. Meth. 160: 181；タンケイおよびキリオン（Tanquay, S. および Killion, J. J.）、（1994）、Lymphokine Cytokine Res. 13: 259）。

20

【0173】

3. インビトロT細胞学習

本発明のリガンドは、正常なドナーまたは患者に由来するPBMЦからのリガンド反応性T細胞集団の誘発能について、対応する天然のリガンドと比較することができる。この系において、誘発されたT細胞は、溶解活性、サイトカイン放出、ポリクローニ性、および天然のリガンドに対する交叉反応性について調べることができる（パークハースト（Parkhurst）M. R. ら、（1996）、J. Immunol. 157: 2539）。

30

【0174】

4. トランスジェニック動物モデル

本発明のリガンドまたは天然のリガンドのいずれかをHLAトランスジェニックマウスにワクチン接種して、誘導された免疫応答の性質および程度を決定することによって、免疫原性をインピボで評価することができる。または、hu-PBL-SCIDマウスマodelは、ヒトPBLの養子移入によってマウスにおけるヒト免疫系の再構築を可能にする。これらの動物は、リガンドをワクチン接種して、先に述べたように免疫応答について分析してもよい（シライ（Shirai）M. ら（1995）、J. Immunol. 154: 2733；モシエ（Mosier）D. E. ら（1993）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2443）。

40

【0175】

5. 増殖

T細胞は、反応性リガンドに反応して増殖すると考えられる。増殖は、例えば³H-チミジンの取り込みを測定することによって、定量的にモニターすることができる（カルソ（Caruso）A. ら、（1997）、Cytometry 27: 71）。

50

【0176】

6. 四量体染色

MHC四量体は、個々のリガンドをローディングして、適当なエフェクターT細胞集団との相対的結合能に関して調べることができる(アルトマン(Altman)J.D.ら(1996)、Science 274:5284)。

【0177】

7. MHC安定化

T2細胞のような特定の細胞株をHLA結合リガンドに曝露すると、細胞表面上のMHC複合体の安定化が起こる。細胞表面上のMHC複合体の定量は、安定化されるHLA対立遺伝子に関するリガンドの親和性と相關している。このように、この技術は、リガンドエピトープの相対的HLA親和性を決定することができる(スツバー(Stuber)G.ら(1995)、Int. Immunol. 7:653)。

【0178】

8. MHC競合

参照リガンドおよびその同種のT細胞エフェクターの機能的活性をリガンドが妨害する能力は、リガンドがどれほどMHC結合に関して競合できるかの尺度である。阻害の相対レベルの測定は、MHC親和性の指標である(フェルトカンプ(Felトkamp)M.C.ら(1995)、Immunol. Lett. 47:1)。

【0179】

9. 灵長類モデル

最近記載されたヒト以外の灵長類(チンパンジー)モデル系は、HLA拘束リガンドのインビオ免疫原性をモニターするために利用することができる。チンパンジーは、ヒトMHC分子と重なり合うMHCリガンド特異性を共有し、このため相対的インビオ免疫原性に関して、HLA拘束リガンドを調べることができる(ベルトーニ(Bertoni)R.ら(1998)、J. Immunol. 161:4447)。

【0180】

10. TCRシグナル伝達事象のモニタリング

いくつかの細胞内シグナル伝達事象(例えば、リン酸化)は、MHCリガンド複合体によるTCR関与の成功に関係している。これらの事象の定量的および定性的分析は、リガンドがTCR関与を通してエフェクター細胞を活性化する相対的な能力に相關している(サラザー(Salazar)E.ら(2000)、Int. J. Cancer 85:829;イサコフ(Isakov)N.ら(1995)、J. Exp. Med. 181:375)。

【0181】

免疫エフェクター細胞の増殖

本発明は、これらのAPCを利用して抗原特異的免疫エフェクター細胞の濃縮集団の産生を刺激する。抗原特異的免疫エフェクター細胞は、APCを犠牲にして増殖し、APCは培養において死滅する。未経験の免疫エフェクター細胞が他の細胞によって感作される過程は、クーリー(Coulier)((1997)、Mol. Med. Today 3:261~268)に本質的に記載されている。

【0182】

上記のように調製したAPCを未経験の免疫エフェクター細胞と混合する。好ましくは、細胞をサイトカイン、例えばIL-2の存在下で培養してもよい。樹状細胞はIL-12のような強力な免疫刺激サイトカインを分泌するため、増大の最初およびその後の回のあいだに追加のサイトカインを加える必要はないかも知れない。いずれにせよ、培養条件は、抗原特異的免疫エフェクター細胞が、APCよりかなり速い速度で増大する(すなわち増殖する)条件である。抗原特異的細胞の集団をさらに増殖させるために、APCと選択的サイトカインの多数回の注入を行うことができる。

【0183】

一つの態様において、免疫エフェクター細胞はT細胞である。異なる態様において、免疫エフェクター細胞は、例えば、IL-2、IL-11、またはIL-13をコードする導

10

20

30

40

50

入遺伝子の形質導入によって遺伝子改変することができる。導入遺伝子をインビトロ、エキソビボ、およびインビボで導入する方法は、当技術分野で周知である。サムブルック (Sambrook) ら (1989) 上記を参照のこと。

【0184】

遺伝子改変において有用なベクター

一般的に、本発明において用いられる細胞の遺伝子改変は、異種または改変抗原をコードする、ポリペプチドまたは導入遺伝子を含むベクターを導入することによって得られる。非ウイルス系と共にウイルス系を含む、多様な異なる遺伝子移入ベクターを用いることができる。本発明の遺伝子改変において有用なウイルスベクターには、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターおよびアデノ・レトロウイルスキメラベクターが含まれるが、これらに限定されない。APCおよび免疫エフェクター細胞は、下記の方法を用いて、または当技術分野で既知の他の任意の適当な方法によって、改変することができる。

【0185】

組換えアデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターの構築

本発明の遺伝子改変において有用なアデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクターは、当技術分野で既に教示された方法に従って產生してもよい。例えば、カールソンら (Karlsson) (1992)、EMBO J. 5: 2377; カーター (Cartier) (1992)、Curr. Op. Biotechnol. 3: 533~539; ムジズカ (Muzyczka) (1992)、Current Top. Microbiol. Immunol. 158: 97~129; 「遺伝子のターゲティング：実践アプローチ (Gene Targeting: A Practical Approach)」(1992)、A.L. ジョイナー (Joyner) 編、オックスフォード大学出版、ニューヨーク州) を参照のこと。いくつかの異なるアプローチが実施可能である。ヘルパー非依存性複製欠損ヒトアデノウイルス系が好ましい。

【0186】

ヒトアデノウイルス5に基づく組換えアデノウイルスベクター (Virology 163: 614~617 (1988)) は、アデノウイルスゲノムから必須の初期遺伝子（通常、E1A / E1B）が欠失しており、したがって、イントランスで欠失している遺伝子産物を提供する、許容性の細胞株において増殖させなければ複製することができない。欠失しているアデノウイルスゲノム配列の代わりに、関係する導入遺伝子を、複製欠損アデノウイルスに感染した細胞においてクローニングおよび発現することができる。アデノウイルスに基づく遺伝子移入では、宿主ゲノムへの導入遺伝子の組み込みが起こらず（宿主DNAに導入遺伝子が組み込まれるのは、アデノウイルス媒介トランスフェクションの0.1%未満である）、したがって、安定ではないが、アデノウイルスベクターはより高い力値で増殖して、非複製細胞をトランスフェクトすることができる。アデノウイルスE1A / E1B遺伝子によって形質転換した、ヒト胎児腎細胞であるヒト293細胞は、有用な許容性細胞株の典型である。しかし、複製欠損アデノウイルスベクターがその中で増殖することができる、HeLa細胞を含む他の細胞株を用いることができる。

【0187】

本発明の方法において用いることができるアデノウイルスベクターおよび他のウイルスベクターを記載するさらなる引用文献には、以下が含まれる：ホルビツ (Horwitz, M.S.)、「アデノウイルス科とその複製 (Adenoviridae And Their Replication)」、フィールズ (Fields) B. ら編、Virology 第2巻、レイブン出版、ニューヨーク州、1679~1721頁 (1990); グラハム (Graham) B. ら、「分子生物学の方法 (Methods in Molecular Biology)」、第7巻、「遺伝子移入と発現プロトコール (Gene Transfer and Expression Protocols)」、ミュレイ (Murray, E.) 編、ヒュマナ出版、クリフトン、ニュージャージー州 (1991) の109~128頁；ミラー (Miller) N. ら、(1995) FASEB J.

10

20

30

40

50

9 : 190 ~ 199) ; シュレイアー (Schreier, H.、(1994)、Pharmaceutica Acta Helvetica 68 : 145 ~ 159 ; シュナイダーおよびフレンチ (SchneiderおよびFrench、(1993)、Circulation 88 : 1937 ~ 1942) ; キュリエル (Curie1) D.T. ら、(1992)、Hum. Gene Ther. 3 : 147 ~ 154 ; グラハム (Graham) F.L. ら、国際公開公報第95/00655号(1995年1月5日) ; ファルク - ペダーセン (Falck-Pedersen) E.S. ら、国際公開公報第95/16772号(1995年6月22日) ; デネフル (Deneffle) P. ら、国際公開公報第95/23867号(1995年9月8日) ; ハッダダ (Haddada) H. ら、国際公開公報第94/26914号(1994年11月24日) ; ペリカウデ (Perricaudet) M. ら、国際公開公報第95/02697号(1995年1月26日) ; ザン (Zhang) W. ら、国際公開公報第95/25071号(1995年10月12日)。多様なアデノウイルスプラスミドも同様に例えば、オンタリオ州トロントのマイクロビクスバイオシステムズ社(例えば、マイクロビクス製品情報シート:アデノウイルスベクター構築のためのプラスミド、1996年を参照のこと)を含む販売元から入手できる。同様に、遺伝子改変のために用いることができるアデノ・レトロウイルスキメラベクターの構築および使用に関して記述している、バイル (Ville) ら、(1997)、Nature Biotechnology 15 : 840 ~ 841) ; およびフェングら (Feng、(1997)、Nature Biotechnology 15 : 866 ~ 870) による論文を参考のこと。
10
20

【0188】

本発明の方法において用いることができるAAVベクターを記述するさらなる参考文献には、以下が含まれる: カーター (Carter) B.、「パルボウイルスハンドブック (Handbook Of Parvoviruses)」、第I巻 169 ~ 228 頁、1990; バーンズ (Berns、「ウイルス学 (Virology)」、1743 ~ 1764 頁(レイブン出版、1990); カーター (Carter) B.、(1992)、Current Opin. Biotechnol. 3 : 533 ~ 539; ムジズカ (Muzyczka)、(1992)、Current Topics in Micro. and Immunol. 158 : 92 ~ 129; フロッテ (Flotte) T.R. ら、(1992)、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7 : 349 ~ 356; チャタリー (Chatterjee) ら、(1995)、Ann. NY Acad. Sci. 770 : 79 ~ 90; フロッテ (Flotte) T.R. ら、国際公開公報第95/13365号(1995年5月18日); トレンペ (Trempe) J.P. ら、国際公開公報第95/13392号(1995年5月18日); コチン (Kotin) R.、(1994) Hum. Gene Ther. 5 : 793 ~ 801; フロッテ (Flotte) T.R. ら、(1995)、Gene Therapy 2 : 357 ~ 362; アレン (Allen) J.M.、国際公開公報第96/17947号(1996年6月13日); およびデュ (Du) ら(1996)、Gene Therapy 3 : 254 ~ 261。
30
40

【0189】

APCは、関連するポリペプチドをコードするウイルスベクターによって形質導入することができる。最も一般的なウイルスベクターには、ワクシニアおよび鶏痘ウイルス(ブロンテ (Bronte) ら、(1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 3183 ~ 3188; キム (Kim) ら、(1997)、J. Immunother. 20 : 276 ~ 286)のような組換えポックスウイルスが含まれ、好ましくはアデノウイルス(アーサー (Arthur) ら、(1997)、J. Immunol. 159 : 1393 ~ 1403; ワン (Wang) ら(1997)、Human Gene Therapy 8 : 1355 ~ 1363; ヒュアン (Huang) ら、(1995)、J. Virol. 69 : 2257 ~ 2263)が含まれる。ヒトAPCの形質導入のためにレトロウイルスも同様に用いてよい(マリン (Marin) ら(1996) 50

、 J . V i r o l . 7 0 : 2 9 5 7 ~ 2 9 6 2) 。

【 0 1 9 0 】

インビトロ / エキソビオでヒト D C を、最少量の血清不含培地において感染多重度 (M O I) 5 0 0 で、アデノウイルス (Ad) ベクターに 1 6 ~ 2 4 時間曝露すると、 D C の 9 0 ~ 1 0 0 % で導入遺伝子の発現を確実に生じる。 D C または他の A P C の形質導入効率は、発現される腫瘍抗原に対して特異的な蛍光抗体を用いて、免疫蛍光によって評価することができる (キム (K i m) ら、 (1 9 9 7) 、 J . I mmunothe r . 2 0 : 2 7 6 ~ 2 8 6) 。または抗体は、基質と反応すると着色産物を生じる酵素 (例えは、 H R P) と結合させることができる。 A P C によって発現される抗原性ポリペプチドの実際の量は、 E L I S A によって評価することができる。

10

【 0 1 9 1 】

形質導入した A P C は、その後静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内送達経路によって宿主に投与することができる。

【 0 1 9 2 】

D C または他の A P C のインビオ形質導入は、静脈内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、または皮下送達を含む異なる経路によって、 Ad (または他のウイルスベクター) の投与によって行うことができる。好ましい方法は、総量約 $1 \times 1 0^{10} \sim 1 \times 1 0^{12}$ i . u . を用いる多数の部位での Ad ベクターの皮下送達である。インビオ形質導入レベルは、発現される A P C マーカーと T A A に対する抗体による共染色によっておおよそ評価することができる。染色技法は、投与部位からの生検試料、または A P C (特に D C) が遊走している可能性がある、排液リンパ節もしくは他の臓器からの細胞について行うことができる (コンドン (C ondon) ら (1 9 9 6) 、 N ature Med . 2 : 1 1 2 2 ~ 1 1 2 8 およびワン (W an) ら、 (1 9 9 7) 、 H um . G ene Ther . 8 : 1 3 5 5 ~ 1 3 6 3) 。注射部位または形質導入された A P C が遊走する可能性がある他の臓器において発現される抗原の量は、組織ホモジネートに対する E L I S A によって評価することができる。

20

【 0 1 9 3 】

ウイルス遺伝子送達はより効率的であるが、 D C はまた、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、または陽イオン脂質 / プラスミド D N A 複合体のような、非ウイルス遺伝子送達法によって、インビトロ / エキソビオで形質導入することができる (アーサー (A r t h u r) ら、 (1 9 9 7) 、 C ancer G ene Ther . 4 : 1 7 ~ 2 5) 。次に、形質導入された A P C は、静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内送達経路によって宿主に投与することができる。

30

【 0 1 9 4 】

D C または他の A P C のインビオ形質転換は、静脈内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、または皮下投与経路によって送達される、陽イオン脂質 / プラスミド D N A 複合体の投与によって、おそらく行うことができる。遺伝子銃送達または裸のプラスミド D N A の皮膚への注入によっても、 D C が形質転換される (コンドン (C ondon) ら (1 9 9 6) 、 N ature Med . 2 : 1 1 2 2 ~ 1 1 2 8 ; ラズ (R az) ら、 (1 9 9 4) 、 P ro c . Natl . Acad . Sci . U S A 9 1 : 9 5 1 9 ~ 9 5 2 3) 。プラスミド D N A の筋肉内送達はまた、免疫のために用いてもよい (ロサト (R osato) ら、 (1 9 9 7) 、 H um . G ene Ther . 8 : 1 4 5 1 ~ 1 4 5 8) 。

40

【 0 1 9 5 】

形質転換効率および導入遺伝子発現レベルは、ウイルスベクターに関して上記のように評価することができる。

【 0 1 9 6 】

養子免疫治療とワクチン

本発明の抗原特異的免疫エフェクター細胞の増殖集団も同様に、養子免疫治療法において、およびワクチンとして用いられる。

【 0 1 9 7 】

50

養子免疫治療は、一つの局面において、未経験の免疫エフェクター細胞を上記のように A P C と共に培養することによって、感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞の実質的に純粋な集団を、被験者に投与する段階を含む。好ましくは、A P C は樹状細胞である。

【 0 1 9 8 】

一つの態様において、本明細書に記載の養子免疫治療方法は自己由来である。この場合、A P C は一人の被験者から単離した親細胞を用いて作製する。増殖した集団はまた、その被験者から単離された T 細胞を用いる。最後に、抗原特異的細胞の増殖集団を同じ患者に投与する。

【 0 1 9 9 】

さらなる態様において、A P C または免疫エフェクター細胞は、I L - 2 または共刺激分子のような、刺激性サイトカインの有効量と共に投与する。 10

【 0 2 0 0 】

本明細書において、その意図する目的に関して有効であると同定された作用物質は、ヒト癌腫瘍抗原 A T F 4 / C R E B - 2 を発現する腫瘍を有する被験者と同様に、そのような腫瘍に感受性があるかまたは発症する危険性を有する個体に投与することができる。物質をマウス、ラット、またはヒト患者のような被験者に投与する場合、物質を薬学的に許容される担体に加えて、全身または局所的に被験者に投与することができる。治療から利益が得られる患者を決定するために、腫瘍の退縮をアッセイすることができる。治療量は経験的に決定して、治療すべき病態、治療すべき被験者、ならびに治療の有効性および毒性に応じて変化すると考えられる。 20

【 0 2 0 1 】

インビポでの投与は、1回の投与で、治療の過程を通して連続的に、または間欠的に行うことができる。最も有効な手段および投与用量を決定する方法は、当業者に周知であり、治療に用いられる組成物、治療の目的、治療される標的細胞、および治療される被験者に応じて変化すると考えられる。1回または多数回の投与を、治療する医師によって選択された用量レベルおよび様式で行うことができる。適した用量製剤および物質を投与する方法は下記に見出されうる。

【 0 2 0 2 】

本発明の作用物質および組成物は、薬学的組成物における活性成分のように、従来の方法に従って投与することによって、医薬品の製造ならびにヒトおよび他の動物の治療のために用いることができる。 30

【 0 2 0 3 】

より詳細には、本明細書において活性成分であると呼ばれる本発明の作用物質はまた、鼻腔内、局所（経皮、エアロゾル、口腔内、舌下を含む）、非経口（皮下、筋肉内、静脈内、および皮内を含む）ならびに肺内経路を含む、任意の適した経路によって治療のために投与してもよい。同様に、好ましい経路はレシピエントの状態および年齢、ならびに治療される疾患に応じて変化すると考えられる。

【 0 2 0 4 】

先の説明および実施例は、当技術分野の单なる説明と解釈される。当業者に明らかであるように、様々な変更を上記に行ってもよく、それらも本発明の趣旨および範囲に含まれうる。 40

【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
6 December 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/92306 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C09K 14/00 (81) Designated States (*initials*): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LCA, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, DL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/17454
- (22) International Filing Date: 30 May 2001 (30.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/209,388 31 May 2000 (31.05.2000) US
60/257,007 20 December 2000 (20.12.2000) US

- (71) Applicant (*for all designated States except US*): ZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 02139 (US).

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

- (72) Inventor: and

- (75) Inventor/Applicant (*for US only*): NICOLETTE, Charles, A. [US/US]; 4 Mill Street, Framingham, MA 01701 (US).

- (74) Agent: KONSKI, Antoinette, E., McCutchan Doyle Brown & Everson LLP, Three Embarcadero Center, Suite 1800, San Francisco, CA 94111-4067 (US).

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

WO 01/92306 A2

(54) Title: THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR OVARIAN CANCER

(55) Abstract: The present invention provides synthetic compounds, antibodies that recognize and bind to these compounds, polynucleotides that encode these compounds, and immune effector cells raised in response to presentation of these epitopes. The invention further provides methods for inducing an immune response and administering immunotherapy to a subject by delivering the compositions of the invention.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR OVARIAN CANCER

5

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority under 35 U.S.C. § 119 (e) to U.S. Provisional Application Serial Nos. 60/209,388 and 60/257,007, filed May 31, 2000 and December 20, 2000, respectively. The contents of these applications are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

TECHNICAL FIELD

The invention relates to the field of therapeutic compounds useful against human ovarian cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The recognition of antigenic epitopes presented by molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC) plays a central role in the establishment, maintenance and execution of mammalian immune responses. T cell surveillance and recognition of peptide antigens presented by cell surface MHC molecules expressed by somatic cells and antigen presenting leukocytes functions to control invasion by infectious organisms such as viruses, bacteria, and parasites. In addition it has now been demonstrated that antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) can recognize certain cancer cell antigens and attack cells expressing these antigens. This T cell activity provides a basis for developing novel strategies for anti-cancer vaccines. Furthermore, inappropriate T cell activation plays a central role in certain debilitating autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and asthma. Thus presentation and recognition of antigenic epitopes presented by MHC molecules play a central role in mediating immune responses in multiple pathological conditions.

Tumor specific T cells, derived from cancer patients, will bind and lyse tumor cells. This specificity is based on their ability to recognize short amino acid sequences (epitopes) presented on the surface of the tumor cells by MHC class I and, in some cell

WO 01/92306

PCT/US01/17454

types, class II molecules. These epitopes are derived from the proteolytic degradation of intracellular proteins called tumor antigens encoded by genes that are either uniquely or aberrantly expressed in tumor or cancer cells.

The availability of specific anti-tumor T cells has enabled the identification of tumor antigens and subsequently the generation of cancer vaccines designed to provoke an anti-tumor immune response. Anti-tumor T cells are localized within cancer patients, including in the blood (where they can be found in the peripheral blood mononuclear cell fraction), in primary and secondary lymphoid tissue, e.g., the spleen, in ascites fluid in ovarian cancer patients (tumor associated lymphocytes or TALs) or within the tumor itself (tumor infiltrating lymphocytes or TILs). Of these, TILs have been the most useful in the identification of tumor antigens and tumor antigen-derived peptides recognized by T cells.

Conventional methods to generate TILs involve mincing tumor biopsy tissue and culturing the cell suspension *in vitro* in the presence of the T cell growth factor interleukin-2 (IL-2). Over a period of several days, the combination of the tumor cells and IL-2 can stimulate the proliferation of tumor specific T cells at the expense of tumor cells. In this way, the T cell population is expanded. The T cells derived from the first expansion are subsequently mixed with either mitomycin C-treated or irradiated tumor cells and cultured *in vitro* with IL-2 to promote further proliferation and enrichment of tumor reactive T cells. After several rounds of *in vitro* expansion, a potent anti-tumor T cell population can be recovered and used to identify tumor antigens via conventional but tedious expression cloning methodology. Kawakami Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(9):3515-3519.

This currently employed methodology used to generate tumor specific T cells *in vitro* is unreliable and the antigens identified by this method do not necessarily induce an anti-tumor immune response. Numerous experiments demonstrate that the encounter of antigens by mature T cells often results in the induction of tolerance because of ignorance, anergy or physical deletion. Pardoll (1998) Nature Med. 4(5):525-531.

The ability of a particular peptide to function as a T cell epitope requires that it bind effectively to the antigen presenting domain of an MHC molecule and also that it display an appropriate set of amino acids that can be specifically recognized by a T cell receptor molecule. While it is possible to identify natural T cell epitopes derived from

WO 01/92306

PCT/US01/17454

antigenic polypeptides, these peptide epitopes do not necessarily represent antigens that are optimized for inducing a particular immune response. In fact, it has been shown that it is possible to improve the effectiveness of natural epitopes by introducing single amino or multiple acids substitutions that alter their sequence (Valmori et al. (2000) J. 5 Immunol 164(2):1125-1131). Thus, delivery of carefully optimized synthetic peptide epitopes has the potential to provide an improved method to induce a useful immune response.

The introduction into an animal of an antigen has been widely used for the purposes of modulating the immune response, or lack thereof, to the antigen for a 10 variety of purposes. These include vaccination against pathogens, induction of an immune response to a cancerous cell, reduction of an allergic response, reduction of an immune response to a self antigen that occurs as a result of an autoimmune disorder, reduction of allograft rejection, and induction of an immune response to a self antigen for the purpose of contraception.

15 In the treatment of cancer, a variety of immunotherapeutic approaches have been taken to generate populations of cytotoxic T lymphocytes which specifically recognize and lyse tumor cells. Many of these approaches depend in part on identifying and characterizing tumor-specific antigens.

More recently, certain pathogen- and tumor-related proteins have been 20 immunologically mimicked with synthetic peptides whose amino acid sequence corresponds to that of an antigenic determinant domain of the pathogen- or tumor-related protein. Despite those advances, peptide immunogens based on native sequences generally perform less than optimally with respect to inducing an immune response. Thus, a need exists for modified synthetic antigenic peptide epitopes with 25 enhanced immunomodulatory properties. This invention satisfies this need and provides related advantages as well.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

DISCLOSURE OF THE INVENTION

The present invention provides novel synthetic therapeutic compounds. These compounds are designed to enhance binding to MHC molecules and to enhance immunoregulatory properties relative to their natural counterparts. The synthetic compounds of the invention are useful to modulate an immune response to the synthetic and naturally occurring compounds.

Further provided are polynucleotides encoding the compounds of the invention, gene delivery vehicles comprising these polynucleotides and host cells comprising these polynucleotides.

In addition, the invention provides methods for inducing an immune response in a subject by delivering the compounds and compositions of the invention, and delivering these in the context of an MHC molecule.

The compounds of the invention are also useful to generate antibodies that specifically recognize and bind to these molecules. Those antibodies are further useful for immunotherapy when administered to a subject.

The invention also provides immune effector cells raised *in vivo* or *in vitro* in the presence and at the expense of an antigen presenting cell that presents the peptide compositions of the invention in the context of an MHC molecule and a method of adoptive immunotherapy comprising administering an effective amount of these immune effector cells to a subject.

Further provided by this invention is a composition comprising at least two immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of RLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYVV (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11) and KIIFKPHGFS (SEQ ID NO:13). The ligands can be present in a carrier such as a pharmaceutically acceptable carrier.

Also provided by this invention is a host cell comprising at least two immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein

WO 01/92306

PCT/US01/17454

said immunogenic ligand is selected from the group consisting of FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYV (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11) and KHFKPHGFS (SEQ ID NO: 13). In one aspect, the host cell is an antigen presenting cell and the 5 immunogenic ligands are presented on the surface of the cell. In a further aspect, the antigen presenting cell is a dendritic cell. The host cells can be present in a carrier, such as a pharmaceutically acceptable carrier.

Still further provided by this invention is a method for inducing an immune response in a subject, by delivering to the subject a composition comprising an effective 10 amount of two or more immunogenic ligands, wherein each of said immunogenic ligands is characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYV (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV 15 (SEQ ID NO:11) and KHFKPHGFS (SEQ ID NO: 13).

DESCRIPTION OF THE SEQUENCE LISTINGS

SEQ ID NO:1. The complete nucleotide sequence of a cDNA encoding the human cancer antigen ATF4/CREB-2. The coding region extends from nucleotide 882 through 20 nucleotide 1937. The nucleotide and amino acid sequence also are available in GenBank under Accession No. NM 001675.
SEQ ID NO:2. The amino acid sequence of the native human cancer antigen ATF4/CREB-2. The compounds of the invention are variations based on native peptide 42-50.
25 SEQ ID NO:3. The amino acid sequence of compound 1.
SEQ ID NO:4. The polynucleotide sequence encoding compound 1.
SEQ ID NO:5. The amino acid sequence of compound 2.
SEQ ID NO:6. The polynucleotide sequence encoding compound 2.
SEQ ID NO:7. The amino acid sequence of compound 3.
30 SEQ ID NO:8. The polynucleotide sequence encoding compound 3.
SEQ ID NO:9. The amino acid sequence of compound 4.
SEQ ID NO:10. The polynucleotide sequence encoding compound 4.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

- SEQ ID NO:11: The amino acid sequence of compound 5.
SEQ ID NO:12: The polynucleotide sequence encoding compound 5.
SEQ ID NO:13: The natural epitope of human cancer antigen ATF4/CREB-2.
SEQ ID NO:14: The polynucleotide sequence encoding the human cancer antigen
5 ATF4/CREB-2.

MODES OF CARRYING OUT THE INVENTION

Throughout this disclosure, various publications, patents and published patent specifications are referenced by an identifying citation. The disclosures of these 10 publications, patents and published patent specifications are hereby incorporated by reference into the present disclosure to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), 15 microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. These methods are described in the following publications. See, e.g., Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds. (1987)); the 20 series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson et al. IRL Press at Oxford University Press (1991)); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow and Lane eds. (1988)); and ANIMAL CELL CULTURE (R.L. Freshney ed. (1987)).

25 Definitions

As used herein, certain terms may have the following defined meanings.

As used in the specification and claims, the singular form "a," "an" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. For example, the term "a cell" includes a plurality of cells, including mixtures thereof.

30 As used herein, the term "comprising" is intended to mean that the compositions and methods include the recited elements, but not excluding others. "Consisting

WO 01/92306

PCT/US01/17454

- essentially of" when used to define compositions and methods, shall mean excluding other elements of any essential significance to the combination. Thus, a composition consisting essentially of the elements as defined herein would not exclude trace contaminants from the isolation and purification method and pharmaceutically acceptable carriers, such as phosphate buffered saline, preservatives, and the like.
- "Consisting of" shall mean excluding more than trace elements of other ingredients and substantial method steps for administering the compositions of this invention.
- Embodiments defined by each of these transition terms are within the scope of this invention.
- 10 A "native" or "natural" antigen is a polypeptide, protein or a fragment which contains an epitope, which has been isolated from a natural biological source, and which can specifically bind to an antigen receptor, in particular a T cell antigen receptor (TCR), in a subject.
- The term "antigen" is well understood in the art and includes substances which
- 15 are immunogenic, *i.e.*, immunogens, as well as substances which induce immunological unresponsiveness, or anergy, *i.e.*, anergens.
- An "altered antigen" is one having a primary sequence that is different from that of the corresponding wild-type antigen. Altered antigens can be made by synthetic or recombinant methods and include, but are not limited to, antigenic peptides that are
- 20 differentially modified during or after translation, *e.g.*, by phosphorylation, glycosylation, cross-linking, acylation, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule, membrane molecule or other ligand. (Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320). A synthetic or altered antigen of the invention is intended to bind to the same TCR as the natural epitope.
- 25 A "self-antigen" also referred to herein as a native or wild-type antigen is an antigenic peptide that induces little or no immune response in the subject due to self-tolerance to the antigen. An example of a self-antigen is the melanoma specific antigen gp100.
- The term "tumor associated antigen" or "TAA" refers to an antigen that is
- 30 associated with or specific to a tumor. Examples of known TAAs include gp100, MART and MAGE.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

The terms "major histocompatibility complex" or "MHC" refers to a complex of genes encoding cell-surface molecules that are required for antigen presentation to T cells and for rapid graft rejection. In humans, the MHC is also known as the "human leukocyte antigen" or "HLA" complex. The proteins encoded by the MHC are known 5 as "MHC molecules" and are classified into class I and class II MHC molecules. Class I MHC includes membrane heterodimeric proteins made up of an α chain encoded in the MHC noncovalently linked with the $\beta 2$ -microglobulin. Class I MHC molecules are expressed by nearly all nucleated cells and have been shown to function in antigen presentation to CD8 $^+$ T cells. Class I molecules include HLA-A, B, and C in humans.

10 Class II MHC molecules also include membrane heterodimeric proteins consisting of noncovalently associated α and β chains. Class II MHC molecules are known to function in CD4 $^+$ T cells and, in humans, include HLA-DP, -DQ, and DR. In a preferred embodiment, invention compositions and ligands can complex with MHC molecules of any HLA type. Those of skill in the art are familiar with the serotypes and 15 genotypes of the HLA. See: http://bimas.dcr.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_coefficient_viewing_page. Ranunensee H.G., Bachmann J., and Stevanovic S. MHC Ligands and Peptide Motifs (1997) Chapman & Hall Publishers; Schreuder G.M. Th. et al. The HLA dictionary (1999) *Tissue Antigens* 54:409-437.

The term "antigen-presenting matrix", as used herein, intends a molecule or 20 molecules which can present antigen in such a way that the antigen can be bound by a T-cell antigen receptor on the surface of a T cell. An antigen-presenting matrix can be on the surface of an antigen-presenting cell (APC), on a vesicle preparation of an APC, or can be in the form of a synthetic matrix on a solid support such as a bead or a plate. An example of a synthetic antigen-presenting matrix is purified MHC class I molecules 25 complexed to $\beta 2$ -microglobulin, multimers of such purified MHC class I molecules, purified MHC Class II molecules, or functional portions thereof, attached to a solid support.

The term "antigen presenting cells (APC)" refers to a class of cells capable of 30 presenting one or more antigens in the form of antigen-MHC complex recognizable by specific effector cells of the immune system, and thereby inducing an effective cellular immune response against the antigen or antigens being presented. While many types of cells may be capable of presenting antigens on their cell surface for T-cell recognition,

WO 01/92306

PCT/US01/17454

only professional APCs have the capacity to present antigens in an efficient amount and further to activate T-cells for cytotoxic T-lymphocytic (CTL) responses. APCs can be intact whole cells such as macrophages, B-cells and dendritic cells; or other molecules, naturally occurring or synthetic, such as purified MHC class I molecules complexed to

5 β 2-microglobulin.

The term "dendritic cells (DC)" refers to a diverse population of morphologically similar cell types found in a variety of lymphoid and non-lymphoid tissues (Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271-296). Dendritic cells constitute the most potent and preferred APCs in the organism. A subset, if not all, of dendritic cells 10 are derived from bone marrow progenitor cells, circulate in small numbers in the peripheral blood and appear either as immature Langerhans' cells or terminally differentiated mature cells. While the dendritic cells can be differentiated from monocytes, they possess distinct phenotypes. For example, a particular differentiating marker, CD14 antigen, is not found in dendritic cells but is possessed by monocytes.

15 Also, mature dendritic cells are not phagocytic, whereas the monocytes are strongly phagocytosing cells. It has been shown that DCs provide all the signals necessary for T cell activation and proliferation.

The term "antigen presenting cell recruitment factors" or "APC recruitment factors" include both intact, whole cells as well as other molecules that are capable of 20 recruiting antigen presenting cells. Examples of suitable APC recruitment factors include molecules such as interleukin 4 (IL4), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Serrapal and macrophage inflammatory protein 3 alpha (MIP3 α). These are available from Immunex, Schering-Plough and R&D Systems (Minneapolis, MN). They also can be recombinantly produced using the methods 25 disclosed in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel et al., eds. (1987)). Peptides, proteins and compounds having the same biological activity as the above-noted factors are included within the scope of this invention.

The term "immune effector cells" refers to cells capable of binding an antigen and which mediate an immune response. These cells include, but are not limited to, T 30 cells, B cells, monocytes, macrophages, NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTLs), for example CTL lines, CTL clones, and CTLs from tumor, inflammatory, or other infiltrates. Certain diseased tissue expresses specific antigens and CTLs specific for

WO 01/92306

PCT/US01/17454

these antigens have been identified. For example, approximately 80% of melanomas express the antigen known as GP-100.

The term "immune effector molecule" as used herein, refers to molecules capable of antigen-specific binding, and includes antibodies, T cell antigen receptors, 5 and MHC Class I and Class II molecules.

A "naïve" immune effector cell is an immune effector cell that has never been exposed to an antigen capable of activating that cell. Activation of naïve immune effector cells requires both recognition of the peptide:MHC complex and the simultaneous delivery of a costimulatory signal by a professional APC in order to 10 proliferate and differentiate into antigen-specific armed effector T cells.

"Immune response" broadly refers to the antigen-specific responses of lymphocytes to foreign substances. Any substance that can elicit an immune response is said to be "immunogenic" and is referred to as an "immunogen". All immunogens are antigens, however, not all antigens are immunogenic. An immune response of this 15 invention can be humoral (via antibody activity) or cell-mediated (via T cell activation).

The term "ligand" as used herein refers to any molecule that binds to a specific site on another molecule. In other words, the ligand confers the specificity of the protein in a reaction with an immune effector cell. It is the ligand site within the protein that combines directly with the complementary binding site on the immune effector cell].

20 In a preferred embodiment, a ligand of the invention binds to an antigenic determinant or epitope on an immune effector cell, such as an antibody or a T cell receptor (TCR). A ligand may be an antigen, peptide, protein or epitope of the invention.

Invention ligands may bind to a receptor on an antibody. In one embodiment, 25 the ligand of the invention is about 4 to about 8 amino acids in length.

Invention ligands may bind to a receptor on an MHC class I molecule. In one embodiment, the ligand of the invention is about 7 to about 11 amino acids in length.

Invention ligands may bind to a receptor on an MHC class II molecule. In one embodiment, the ligand of the invention is about 10 to about 20 amino acids long.

30 As used herein, the term "educated, antigen-specific immune effector cell", is an immune effector cell as defined above, which has previously encountered an antigen. In contrast with its naïve counterpart, activation of an educated, antigen-specific

WO 01/92306

PCT/US01/17454

immune effector cell does not require a costimulatory signal. Recognition of the peptide:MHC complex is sufficient.

"Activated", when used in reference to a T cell, implies that the cell is no longer in G₀ phase, and begins to produce one or more of cytotoxins, cytokines, and other 5 related membrane-associated proteins characteristic of the cell type (e.g., CD8⁺ or CD4⁺), is capable of recognizing and binding any target cell that displays the particular antigen on its surface, and releasing its effector molecules.

In the context of the present invention, the term "recognized" intends that a 10 composition of the invention, comprising one or more ligands, is recognized and bound by an immune effector cell wherein such binding initiates an effective immune response. Assays for determining whether a ligand is recognized by an immune effector cell are known in the art and are described herein.

The term "preferentially recognized" intends that the specificity of a 15 composition or ligand of the invention is restricted to immune effector cells that recognize and bind the native ligand.

The term "cross-reactive" is used to describe compounds of the invention which are functionally overlapping. More particularly, the immunogenic properties of a native ligand and/or immune effector cells activated thereby are shared to a certain extent by the altered ligand such that the altered ligand is "cross-reactive" with the native ligand 20 and/or the immune effector cells activated thereby. For purposes of this invention, cross-reactivity is manifested at multiple levels: (i) at the ligand level, e.g., the altered ligands can bind the TCR of and activate native ligand CTLs; (ii) at the T cell level, i.e., altered ligands of the invention bind the TCR of and activate a population of T cells (distinct from the population of native ligand CTLs) which can effectively target and 25 lyse cells displaying the native ligand; and (iii) at the antibody level, e.g., "anti"-altered ligand antibodies can detect, recognize and bind the native ligand and initiate effector mechanisms in an immune response which ultimately result in elimination of the native ligand from the host.

As used herein, the term "inducing an immune response in a subject" is a term 30 well understood in the art and intends that an increase of at least about 2-fold, more preferably at least about 5-fold, more preferably at least about 10-fold, more preferably at least about 100-fold, even more preferably at least about 500-fold, even more

WO 01/92306

PCT/US01/17454

preferably at least about 1000-fold or more in an immune response to an antigen (or epitope) can be detected or measured, after introducing the antigen (or epitope) into the subject, relative to the immune response (if any) before introduction of the antigen (or epitope) into the subject. An immune response to an antigen (or epitope), includes, but 5 is not limited to, production of an antigen-specific (or epitope-specific) antibody, and production of an immune cell expressing on its surface a molecule which specifically binds to an antigen (or epitope). Methods of determining whether an immune response to a given antigen (or epitope) has been induced are well known in the art. For example, antigen-specific antibody can be detected using any of a variety of 10 immunoassays known in the art, including, but not limited to, ELISA, wherein, for example, binding of an antibody in a sample to an immobilized antigen (or epitope) is detected with a detectably-labeled second antibody (e.g., enzyme-labeled mouse anti-human Ig antibody).

"Co-stimulatory molecules" are involved in the interaction between receptor-ligand pairs expressed on the surface of antigen presenting cells and T cells. Research accumulated over the past several years has demonstrated convincingly that resting T cells require at least two signals for induction of cytokine gene expression and proliferation (Schwartz R.H. (1990) *Science* 248:1349-1356 and Jenkins M.K. (1992) *Immunol. Today* 13:69-73). One signal, the one that confers specificity, can be 15 produced by interaction of the TCR/CD3 complex with an appropriate MHC/peptide complex. The second signal is not antigen specific and is termed the "co-stimulatory" signal. This signal was originally defined as an activity provided by bone-marrow-derived accessory cells such as macrophages and dendritic cells, the so called "professional" APCs. Several molecules have been shown to enhance co-stimulatory 20 activity. These are heat stable antigen (HSA) (Liu Y. et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175:437-445), chondroitin sulfate-modified MHC invariant chain (Ii-CS) (Naujokas M.F. et al. (1993) *Cell* 74:257-268), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (Van Seventer G.A. (1990) *J. Immunol.* 144:4579-4586), B7-1, and B7-2/B70 (Schwartz R.H. (1992) *Cell* 71:1065-1068). These molecules each appear to assist co-stimulation 25 by interacting with their cognate ligands on the T cells. Co-stimulatory molecules mediate co-stimulatory signal(s), which are necessary, under normal physiological conditions, to achieve full activation of naïve T cells. One exemplary receptor-ligand 30

WO 01/92306

PCT/US01/17454

pair is the B7 co-stimulatory molecule on the surface of APCs and its counter-receptor CD28 or CTLA-4 on T cells (Freeman et al. (1993) *Science* 262:909-911; Young et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90:229 and Nabavi et al. (1992) *Nature* 360:266-268). Other important co-stimulatory molecules are CD40, CD54, CD80, and CD86. The term "co-stimulatory molecule" encompasses any single molecule or combination of molecules which, when acting together with a peptide/MHC complex bound by a TCR on the surface of a T cell, provides a co-stimulatory effect which achieves activation of the T cell that binds the peptide. The term thus encompasses B7, or other co-stimulatory molecule(s) on an antigen-presenting matrix such as an APC, fragments thereof (alone, 5 complexed with another molecule(s), or as part of a fusion protein) which, together with peptide/MHC complex, binds to a cognate ligand and results in activation of the T cell when the TCR on the surface of the T cell specifically binds the peptide. Co-stimulatory molecules are commercially available from a variety of sources, including, 10 for example, Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA). It is intended, although not always explicitly stated, that molecules having similar biological activity as wild-type or 15 purified co-stimulatory molecules (e.g., recombinantly produced or mutants thereof) are intended to be used within the spirit and scope of the invention.

As used herein, "solid phase support" or "solid support", used interchangeably, 20 is not limited to a specific type of support. Rather a large number of supports are available and are known to one of ordinary skill in the art. Solid phase supports include silica gels, resins, derivatized plastic films, glass beads, cotton, plastic beads, alumina gels. As used herein, "solid support" also includes synthetic antigen-presenting 25 matrices, cells, and liposomes. A suitable solid phase support may be selected on the basis of desired end use and suitability for various protocols. For example, for peptide synthesis, solid phase support may refer to resins such as polystyrene (e.g., PAM-resin obtained from Bachem Inc., Peninsula Laboratories, etc.), POLYHIPS® resin (obtained from Aminotech, Canada), polyamide resin (obtained from Peninsula Laboratories), polystyrene resin grafted with polyethylene glycol (TentaGel®, Rapp Polymers, 30 Tübingen, Germany) or polydimethylacrylamide resin (obtained from Milligen/Bioscarch, California).

The term "immunomodulatory agent", as used herein, is a molecule, a macromolecular complex, or a cell that modulates an immune response and

WO 01/92306

PCT/US01/17454

- encompasses a synthetic antigenic peptide of the invention alone or in any of a variety of formulations described herein; a polypeptide comprising a synthetic antigenic peptide of the invention; a polynucleotide encoding a peptide or polypeptide of the invention; a synthetic antigenic peptide of the invention bound to a Class I or a Class II MHC molecule on an antigen-presenting matrix, including an APC and a synthetic antigen-presenting matrix (in the presence or absence of co-stimulatory molecule(s)); a synthetic antigenic peptide of the invention covalently or non-covalently complexed to another molecule(s) or macromolecular structure; and an educated, antigen-specific immune effector cell which is specific for a peptide of the invention.
- 10 The term "modulate an immune response" includes inducing (increasing, eliciting) an immune response; and reducing (suppressing) an immune response. An immunomodulatory method (or protocol) is one that modulates an immune response in a subject.
- 15 As used herein, the term "cytokine" refers to any one of the numerous factors that exert a variety of effects on cells, for example, inducing growth or proliferation. Non-limiting examples of cytokines which may be used alone or in combination in the practice of the present invention include, interleukin-2 (IL-2), stem cell factor (SCF), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), G-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-1 alpha (IL-1 α), interleukin-11 (IL-11), MIP-11, leukemia inhibitory factor (LIF), c-kit ligand, thrombopoietin (TPO) and flt3 ligand. The present invention also includes culture conditions in which one or more cytokine is specifically excluded from the medium. Cytokines are commercially available from several vendors such as, for example, Genzyme (Framingham, MA), Genentech (South San Francisco, CA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN) and Immunex (Seattle, WA). It is intended, although not always explicitly stated, that molecules having similar biological activity as wild-type or purified cytokines (e.g., recombinantly produced or mutants thereof) are intended to be used within the spirit and scope of the invention.
- 20 The terms "polynucleotide" and "nucleic acid molecule" are used interchangeably to refer to polymeric forms of nucleotides of any length. The polynucleotides may contain deoxyribonucleotides, ribonucleotides, and/or their analogs. Nucleotides may have any three-dimensional structure, and may perform any
- 25

WO 01/92306

PCT/US01/17454

function, known or unknown. The term "polynucleotide" includes, for example, single-stranded, double-stranded and triple helical molecules, a gene or gene fragment, exons, introns, mRNA, tRNA, rRNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides, branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence, nucleic acid probes, and primers. A nucleic acid molecule may also comprise modified nucleic acid molecules.

5 The term "peptide" is used in its broadest sense to refer to a compound of two or more subunit amino acids, amino acid analogs, or peptidomimetics. The subunits may be linked by peptide bonds. In another embodiment, the subunit may be linked by other bonds, e.g. ester, ether, etc. As used herein the term "amino acid" refers to either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and amino acid analogs and peptidomimetics. A peptide of three or more amino acids is commonly called an oligopeptide if the peptide chain is short. If the peptide chain is long, the peptide is commonly called a polypeptide or a protein.

10 15 The term "genetically modified" means containing and/or expressing a foreign gene or nucleic acid sequence which in turn, modifies the genotype or phenotype of the cell or its progeny. In other words, it refers to any addition, deletion or disruption to a cell's endogenous nucleotides.

As used herein, "expression" refers to the process by which polynucleotides are transcribed into mRNA and translated into peptides, polypeptides, or proteins. If the 20 polynucleotide is derived from genomic DNA, expression may include splicing of the mRNA, if an appropriate eukaryotic host is selected. Regulatory elements required for expression include promoter sequences to bind RNA polymerase and transcription initiation sequences for ribosome binding. For example, a bacterial expression vector includes a promoter such as the *lac* promoter and for transcription initiation the Shine-Dalgarno sequence and the start codon AUG (Sambrook et al. (1989) *supra*). Similarly, 25 an eukaryotic expression vector includes a heterologous or homologous promoter for RNA polymerase II, a downstream polyadenylation signal, the start codon AUG, and a termination codon for detachment of the ribosome. Such vectors can be obtained commercially or assembled by the sequences described in methods well known in the art, for example, the methods described below for constructing vectors in general.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

"Under transcriptional control" is a term well understood in the art and indicates that transcription of a polynucleotide sequence, usually a DNA sequence, depends on its being operatively linked to an element which contributes to the initiation of, or promotes, transcription. "Operatively linked" refers to a juxtaposition wherein the elements are in an arrangement allowing them to function.

A "gene delivery vehicle" is defined as any molecule that can carry inserted polynucleotides into a host cell. Examples of gene delivery vehicles are liposomes, biocompatible polymers, including natural polymers and synthetic polymers; lipoproteins; polypeptides; polysaccharides; lipopolysaccharides; artificial viral envelopes; metal particles; and bacteria, or viruses, such as baculovirus, adenovirus and retrovirus, bacteriophage, cosmid, plasmid, fungal vectors and other recombination vehicles typically used in the art which have been described for expression in a variety of eukaryotic and prokaryotic hosts, and may be used for gene therapy as well as for simple protein expression.

"Gene delivery," "gene transfer," and the like as used herein, are terms referring to the introduction of an exogenous polynucleotide (sometimes referred to as a "transgene") into a host cell, irrespective of the method used for the introduction. Such methods include a variety of well-known techniques such as vector-mediated gene transfer (by, e.g., viral infection/transfection, or various other protein-based or lipid-based gene delivery complexes) as well as techniques facilitating the delivery of "naked" polynucleotides (such as electroporation, "gene gun" delivery and various other techniques used for the introduction of polynucleotides). The introduced polynucleotide may be stably or transiently maintained in the host cell. Stable maintenance typically requires that the introduced polynucleotide either contains an origin of replication compatible with the host cell or integrates into a replicon of the host cell such as an extrachromosomal replicon (e.g., a plasmid) or a nuclear or mitochondrial chromosome. A number of vectors are known to be capable of mediating transfer of genes to mammalian cells, as is known in the art and described herein.

A "viral vector" is defined as a recombinantly produced virus or viral particle that comprises a polynucleotide to be delivered into a host cell, either *in vivo*, *ex vivo* or *in vitro*. Examples of viral vectors include retroviral vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, alphavirus vectors and the like. Alphavirus vectors,

WO 01/92306

PCT/US01/17454

such as Semliki Forest virus-based vectors and Sindbis virus-based vectors, have also been developed for use in gene therapy and immunotherapy. See, Schlesinger and Dubensky (1999) *Curr Opin Biotechnol.* **5**:434-439 and Zaks et al. (1999) *Nat. Med.* **7**:823-827. In aspects where gene transfer is mediated by a retroviral vector, a vector construct refers to the polynucleotide comprising the retroviral genome or part thereof, and a therapeutic gene. As used herein, "retroviral mediated gene transfer" or "retroviral transduction" carries the same meaning and refers to the process by which a gene or nucleic acid sequences are stably transferred into the host cell by virtue of the virus entering the cell and integrating its genome into the host cell genome. The virus **10** can enter the host cell via its normal mechanism of infection or be modified such that it binds to a different host cell surface receptor or ligand to enter the cell. As used herein, retroviral vector refers to a viral particle capable of introducing exogenous nucleic acid into a cell through a viral or viral-like entry mechanism.

Retroviruses carry their genetic information in the form of RNA; however, once **15** the virus infects a cell, the RNA is reverse-transcribed into the DNA form which integrates into the genomic DNA of the infected cell. The integrated DNA form is called a provirus.

In aspects where gene transfer is mediated by a DNA viral vector, such as an adenovirus (Ad) or adeno-associated virus (AAV), a vector construct refers to the **20** polynucleotide comprising the viral genome or part thereof, and a transgene. Adenoviruses (Ads) are a relatively well characterized, homogenous group of viruses, including over 50 serotypes. See, e.g., WO 95/27071. Ads are easy to grow and do not require integration into the host cell genome. Recombinant Ad-derived vectors, particularly those that reduce the potential for recombination and generation of wild-**25** type virus, have also been constructed. See, WO 95/00655 and WO 95/11984. Wild-type AAV has high infectivity and specificity integrating into the host cell's genome. See, Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6466-6470 and Lebkowski et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**:3988-3996.

Vectors that contain both a promoter and a cloning site into which a **30** polynucleotide can be operatively linked are well known in the art. Such vectors are capable of transcribing RNA *in vitro* or *in vivo*, and are commercially available from sources such as Stratagene (La Jolla, CA) and Promega Biotech (Madison, WI). In

WO 01/92306

PCT/US01/17454

order to optimize expression and/or *in vitro* transcription, it may be necessary to remove, add or alter 5' and/or 3' untranslated portions of the clones to eliminate extra, potential inappropriate alternative translation initiation codons or other sequences that may interfere with or reduce expression, either at the level of transcription or 5 translation. Alternatively, consensus ribosome binding sites can be inserted immediately 5' of the start codon to enhance expression.

Gene delivery vehicles also include several non-viral vectors, including DNA/liposome complexes, and targeted viral protein-DNA complexes. Liposomes that also comprise a targeting antibody or fragment thereof can be used in the methods of 10 this invention. To enhance delivery to a cell, the nucleic acid or proteins of this invention can be conjugated to antibodies or binding fragments thereof which bind cell surface antigens, e.g., TCR, CD3 or CD4.

"Hybridization" refers to a reaction in which one or more polynucleotides react to form a complex that is stabilized via hydrogen bonding between the bases of the 15 nucleotide residues. The hydrogen bonding may occur by Watson-Crick base pairing, Hoogstein binding, or in any other sequence-specific manner. The complex may comprise two strands forming a duplex structure, three or more strands forming a multi-stranded complex, a single self-hybridizing strand, or any combination of these. A hybridization reaction may constitute a step in a more extensive process, such as the 20 initiation of a PCR reaction, or the enzymatic cleavage of a polynucleotide by a ribozyme.

Examples of stringent hybridization conditions include: incubation temperatures of about 25°C to about 37°C; hybridization buffer concentrations of about 6 X SSC to about 10 X SSC; formamide concentrations of about 0% to about 25%; and wash 25 solutions of about 6 X SSC. Examples of moderate hybridization conditions include: incubation temperatures of about 40°C to about 50°C; buffer concentrations of about 9 X SSC to about 2 X SSC; formamide concentrations of about 30% to about 50%; and wash solutions of about 5 X SSC to about 2 X SSC. Examples of high stringency 30 conditions include: incubation temperatures of about 55°C to about 68°C; buffer concentrations of about 1 X SSC to about 0.1 X SSC; formamide concentrations of about 55% to about 75%; and wash solutions of about 1 X SSC, 0.1 X SSC, or deionized water. In general, hybridization incubation times are from 5 minutes to 24

WO 01/92306

PCT/US01/17454

hours, with 1, 2, or more washing steps, and wash incubation times are about 1, 2, or 15 minutes. SSC is 0.15 M NaCl and 15 mM citrate buffer. It is understood that equivalents of SSC using other buffer systems can be employed.

A polynucleotide or polynucleotide region (or a polypeptide or polypeptide region) has a certain percentage (for example, 80%, 85%, 90%, or 95%) of "sequence identity" to another sequence means that, when aligned, that percentage of bases (or amino acids) are the same in comparing the two sequences. This alignment and the percent homology or sequence identity can be determined using software programs known in the art, for example those described in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1. Preferably, default parameters are used for alignment. A preferred alignment program is BLAST, using default parameters. In particular, preferred programs are BLASTN and BLASTP, using the following default parameters: Genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProt + SPupdate + PIR. Details of these programs can be found at the following Internet address:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

"*In vivo*" gene delivery, gene transfer, gene therapy and the like as used herein, 20 are terms referring to the introduction of a vector comprising an exogenous polynucleotide directly into the body of an organism, such as a human or non-human mammal, whereby the exogenous polynucleotide is introduced to a cell of such organism *in vivo*.

The term "isolated" means separated from constituents, cellular and otherwise, 25 in which the polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, are normally associated with in nature. For example, with respect to a polynucleotide, an isolated polynucleotide is one that is separated from the 5' and 3' sequences with which it is normally associated in the chromosome. As is apparent to those of skill in the art, a non-naturally occurring polynucleotide, peptide, polypeptide, 30 protein, antibody, or fragments thereof, does not require "isolation" to distinguish it from its naturally occurring counterpart. In addition, a "concentrated", "separated" or "diluted" polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof,

WO 01/92306

PCT/US01/17454

is distinguishable from its naturally occurring counterpart in that the concentration or number of molecules per volume is greater than "concentrated" or less than "separated" than that of its naturally occurring counterpart. A polynucleotide, peptidic, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, which differs from the naturally occurring 5 counterpart in its primary sequence or for example, by its glycosylation pattern, need not be present in its isolated form since it is distinguishable from its naturally occurring counterpart by its primary sequence, or alternatively, by another characteristic such as glycosylation pattern. Although not explicitly stated for each of the inventions disclosed herein, it is to be understood that all of the above embodiments for each of the 10 compositions disclosed below and under the appropriate conditions, are provided by this invention. Thus, a non-naturally occurring polynucleotide is provided as a separate embodiment from the isolated naturally occurring polynucleotide. A protein produced in a bacterial cell is provided as a separate embodiment from the naturally occurring protein isolated from a eucaryotic cell in which it is produced in nature.

15 "Host cell," "target cell" or "recipient cell" are intended to include any individual cell or cell culture which can be or have been recipients for vectors or the incorporation of exogenous nucleic acid molecules, polynucleotides and/or proteins. It also is intended to include progeny of a single cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic or total DNA complement) to the 20 original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. The cells may be prokaryotic or eucaryotic, and include but are not limited to bacterial cells, yeast cells, animal cells, and mammalian cells, e.g., murine, rat, simian or human.

A "subject" is a vertebrate, preferably a mammal, more preferably a human. Mammals include, but are not limited to, murines, simians, humans, farm animals, sport 25 animals, and pets.

A "control" is an alternative subject or sample used in an experiment for comparison purpose. A control can be "positive" or "negative". For example, where the purpose of the experiment is to determine a correlation of an altered expression level 30 of a gene with a particular type of cancer, it is generally preferable to use a positive control (a subject or a sample from a subject, carrying such alteration and exhibiting syndromes characteristic of that disease), and a negative control (a subject or a sample from a subject lacking the altered expression and clinical syndrome of that disease).

WO 01/92306

PCT/US01/17454

The terms "cancer," "neoplasm," and "tumor," used interchangeably and in either the singular or plural form, refer to cells that have undergone a malignant transformation that makes them pathological to the host organism. Primary cancer cells (that is, cells obtained from near the site of malignant transformation) can be readily distinguished from non-cancerous cells by well-established techniques, particularly histological examination. The definition of a cancer cell, as used herein, includes not only a primary cancer cell, but also any cell derived from a cancer cell ancestor. This includes metastasized cancer cells, and *in vitro* cultures and cell lines derived from cancer cells. When referring to a type of cancer that normally manifests as a solid tumor, a "clinically detectable" tumor is one that is detectable on the basis of tumor mass; e.g., by such procedures as CAT scan, magnetic resonance imaging (MRI), X-ray, ultrasound or palpation. Biochemical or immunologic findings alone may be insufficient to meet this definition.

"Suppressing" tumor growth indicates a growth state that is curtailed compared to growth without contact with educated, antigen-specific immune effector cells described herein. Tumor cell growth can be assessed by any means known in the art, including, but not limited to, measuring tumor size, determining whether tumor cells are proliferating using a ^{3}H -thymidine incorporation assay, or counting tumor cells.

"Suppressing" tumor cell growth means any or all of the following states: slowing, delaying, and "suppressing" tumor growth indicates a growth state that is curtailed when stopping tumor growth, as well as tumor shrinkage.

The term "culturing" refers to the *in vitro* propagation of cells or organisms on or in media of various kinds. It is understood that the descendants of a cell grown in culture may not be completely identical (morphologically, genetically, or phenotypically) to the parent cell. By "expanded" is meant any proliferation or division of cells.

A "composition" is intended to mean a combination of active agent and another compound or composition, inert (for example, a detectable agent or label) or active, such as an adjuvant.

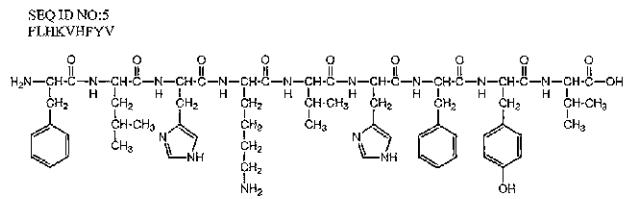
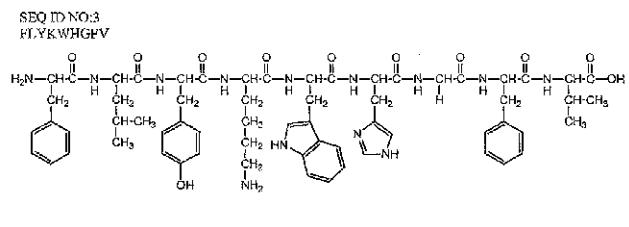
30 A "pharmaceutical composition" is intended to include the combination of an active agent with a carrier, inert or active, making the composition suitable for diagnostic or therapeutic use *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

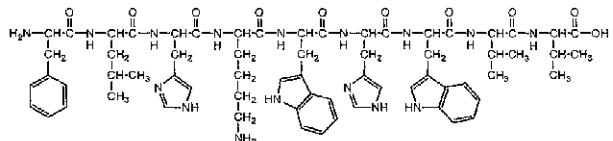
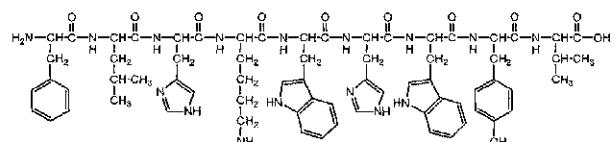
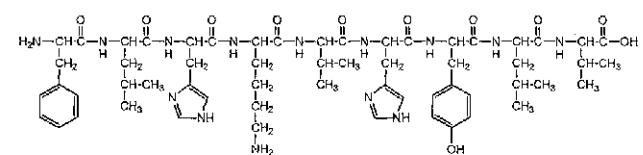
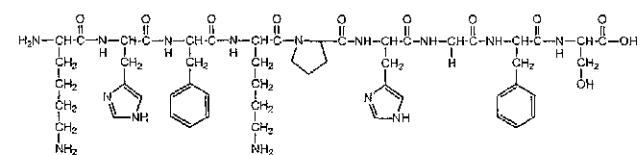
As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water, and emulsions, such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents. The compositions also can include stabilizers and preservatives. For examples of carriers, stabilizers and adjuvants, see Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

An "effective amount" is an amount sufficient to effect beneficial or desired results. An effective amount can be administered in one or more administrations, applications or dosages. The present invention provides compounds having the following structures:



WO 01/92306

PCT/US01/17454

SEQ ID:7
FLHKWHWWVVSEQ ID:9
FLIWKWIKWYVSEQ ID:11
FLHKVIIYLVSEQ ID:13
KHFKPHGFS

WO 01/92306

PCT/US01/17454

The present invention also provides compositions that exhibit enhancing binding to MHC molecules and are cross-reactive with and useful for modulating immune responses to the cognate native ligands and their corresponding native proteins.

5 This invention further provides compositions which are useful as components of anti-cancer vaccines and to expand immune effector cells that are specific for cancers characterized by expression of the human cancer antigen ATF4/CREB-2. An example of this type of cancer is ovarian cancer.

In one embodiment, the altered ligands of the invention have comparable affinity for MHC binding as the native ligand. It has been demonstrated that peptide:MHC class I binding properties correlate with immunogenicity (Sette A. et al. (1994) *Immunol.* **153**:5586; van der Burg S.H. et al. (1996) *J. Immunol.* **156**:3308). In a preferred embodiment, altered ligands of the invention bind to a TCR with a higher affinity than of that the "natural" ligand. Comparative binding of the native and altered ligands of the invention to an MHC class I molecule can be measured by methods that are known in the art and include, but are not limited to, calculating the affinity based on an algorithm (see, for example, Parker et al. (1992) *J. Immunol.* **149**:3580-3587) and experimentally determining binding affinity (see, for example, Tan et al. (1997) *J. Immunol. Meth.* **209**(1):25-36). For example, the relative binding of a peptide to a class I molecule can be measured on the basis of binding of a radiolabeled standard peptide to detergent-solubilized MHC molecules, using various concentrations of test peptides (e.g., ranging from 100 nM to 1nM). MHC class I heavy chain and β 2-microglobulin are coincubated with a fixed concentration (e.g., 5 nM) radiolabeled standard (control) peptide and various concentrations of a test peptide for a suitable period of time (e.g., 2 hours to 72 hours) at room temperature in the presence of a mixture of protease inhibitors. A control tube contains standard peptide and MHC molecules, but no test peptide. The percent MHC-bound radioactivity is determined by gel filtration. The IC₅₀ (concentration of test peptide which results in 50% inhibition of binding of control peptide) is calculated for each peptide. Additional methods for determining binding affinity to a TCR are known in the art and include, but are not limited to, those described in al-Ramadi et al. (1992) *J. Immunol.* **155**(2):662-673; and Zuegel et al. (1998) *J. Immunol.* **161**(4):1705-1709.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

In another embodiment, the altered ligands of the invention elicit comparable antigen-specific T cell activation relative to their native ligand counterpart. In a preferred embodiment, altered ligands of the invention elicit a stronger antigen-specific T cell activation relative to their native ligand counterpart. Methods for determining immunogenicity of invention ligands are known in the art and are further described herein.

In one embodiment, compositions of the invention comprise two or more immunogenic ligands of the invention. In one aspect, such compositions may comprise two or more copies of a single ligand. In another aspect, such compositions may 10 comprise two or more ligands, wherein each ligand of said two or more ligands is distinct from all other ligands in said composition. In one embodiment, the two or more immunogenic ligands are covalently linked.

The present invention also provides novel synthetic antigenic peptides designed for enhancing binding to MHC molecules and useful for modulating immune responses 15 to the synthetic peptide epitope and the corresponding native peptides from which they are derived. The synthetic antigenic peptide epitope sequences of the present invention differ from their natural counterparts in that they contain alterations in amino acid sequence, relative to the native sequence, in the MHC Class I binding domain which is designed to confer tighter binding to the MHC. They further contain mutations in the 20 putative T cell receptor-binding domain designed to increase affinity for the T cell antigen receptor. These differences from the native sequence are designed to confer advantages in the methods of the present invention over the native sequence, in that the synthetic antigenic peptide epitopes of the invention will have enhanced immunomodulatory properties.

This invention provides novel, synthetic antigenic peptide sequences, which are 25 useful as components of anti-cancer vaccines and to expand immune effector cells that are specific for cancers characterized by expression of the human cancer antigen ATF4/CREB-2. The peptides, FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYV (SEQ ID NO:9), and 30 FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11) differ from the natural epitope KHFKPIIGFS (SEQ ID NO:13) in that they contain mutations in the putative HLA-A2 binding domain (amino acids 1, 2 and 9) and T cell receptor binding (TCR) domain (amino acid residues

WO 01/92306

PCT/US01/17454

3-8) conferring tighter binding to the MHC and TCR respectively. Binding of synthetic antigenic peptide of the invention to an MHC Class I molecule can be measured by methods that are known in the art and include, but are not limited to, calculating the affinity based on an algorithm (see, for example, Parker et al. (1992) *J. Immunol.* **149**:3580-3587); and experimentally determining binding affinity (see, for example, Tan et al. (1997) *J. Immunol. Meth.* **209**(1):25-36). For example, the relative binding of a peptide to a Class I molecule can be measured on the basis of binding of a radiolabeled standard peptide to detergent-solubilized MHC molecules, using various concentrations of test peptides (e.g., ranging from 100 nM to 1nM). MHC Class I heavy chain and β2-microglobulin are coincubated with a fixed concentration (e.g., 5 nM) radiolabeled standard (control) peptide and various concentrations of a test peptide for a suitable period of time (e.g., 2 hours to 72 hours) at room temperature in the presence of a mixture of protease inhibitors. A control tube contains standard peptide and MHC molecules, but no test peptide. The percent MHC-bound radioactivity is determined by gel filtration. The IC₅₀ (concentration of test peptide which results in 50% inhibition of binding of control peptide) is calculated for each peptide.

Synthetic peptides of the invention are designed to bind to a TCR with a higher affinity than of that the "natural" sequence. Methods for determining binding affinity to a TCR are known in the art and include, but are not limited to, those described in al-Ramadi et al. (1992) *J. Immunol.* **155**(2):662-673; and Zuegel et al. (1998) *J. Immunol.* **161**(4):1705-1709.

Further encompassed by the term "synthetic antigenic peptide" are multimers (concatemers) of a synthetic antigenic peptide of the invention, optionally including intervening amino acid sequences as well as polypeptides comprising the sequences FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYV (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11) and KHFKPHGFS (SEQ ID NO:13). The invention also provides polypeptides comprising these sequences wherein the polypeptides are preferentially recognized by human cancer antigen ATF4/CREB-2 cytotoxic T lymphocytes.

Polypeptides comprising the peptide sequences of the invention can be prepared by altering the sequence of polynucleotides that encode the native human cancer antigen ATF4/CREB-2 polypeptide sequence. This is accomplished by methods of

WO 01/92306

PCT/US01/17454

recombinant DNA technology well known to those skilled in the art. For example, site directed mutagenesis may be performed on recombinant polynucleotides encoding the native human cancer antigen ATF4/CREB-2 sequence to introduce changes in the polynucleotide sequence so that the altered polynucleotide encodes the peptides of the invention.

The proteins and polypeptides of this invention can be obtained by chemical synthesis using a commercially available automated peptide synthesizer such as those manufactured by Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430A or 431A, Foster City, CA, USA. The synthesized protein or polypeptide can be precipitated and further purified, for example by high performance liquid chromatography (HPLC).

Accordingly, this invention also provides a process for chemically synthesizing the proteins of this invention by providing the sequence of the protein and reagents, such as amino acids and enzymes and linking together the amino acids in the proper orientation and linear sequence.

15 Alternatively, the proteins and polypeptides can be obtained by well-known recombinant methods as described herein using the host cell and vector systems described below.

Peptide analogues

It is well known to those skilled in the art that modifications can be made to the peptides of the invention to provide them with altered properties. As used herein the term "amino acid" refers to either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and amino acid analogs and peptidomimetics. A peptide of three or more amino acids is commonly called an oligopeptide if the peptide chain is short. If the peptide chain is long, the peptide is commonly called a polypeptide or a protein.

Peptides of the invention can be modified to include unnatural amino acids. Thus, the peptides may comprise D-amino acids, a combination of D- and L-amino acids, and various "designer" amino acids (e.g., β -methyl amino acids, C- α -methyl amino acids, and N- α -methyl amino acids, etc.) to convey special properties to peptides.

30 Additionally, by assigning specific amino acids at specific coupling steps, peptides with α -helices, β turns, β sheets, γ -turns, and cyclic peptides can be generated. Generally, it

WO 01/92306

PCT/US01/17454

is believed that α -helical secondary structure or random secondary structure is preferred.

In a further embodiment, subunits of peptides that confer useful chemical and structural properties will be chosen. For example, peptides comprising D-amino acids 5 will be resistant to L-amino acid-specific proteases *in vivo*. Modified compounds with D-amino acids may be synthesized with the amino acids aligned in reverse order to produce the peptides of the invention as retro-inverso peptides. In addition, the present invention envisions preparing peptides that have better defined structural properties, and the use of peptidomimetics, and peptidomimetic bonds, such as ester bonds, to prepare 10 peptides with novel properties. In another embodiment, a peptide may be generated that incorporates a reduced peptide bond, *i.e.*, R₁-CH₂NH-R₂, where R₁, and R₂ are amino acid residues or sequences. A reduced peptide bond may be introduced as a dipeptide subunit. Such a molecule would be resistant to peptide bond hydrolysis, *e.g.*, protease activity. Such molecules would provide ligands with unique function and activity, such 15 as extended half-lives *in vivo* due to resistance to metabolic breakdown, or protease activity. Furthermore, it is well known that in certain systems constrained peptides show enhanced functional activity (Hruby (1982) *Life Sciences* 31:189-199 and Hruby et al. (1990) *Biochem J.* 268:249-262), the present invention provides a method to produce a constrained peptide that incorporates random sequences at all other positions.

20 *Non-classical amino acids that induce conformational constraints.*

The following non classical amino acids may be incorporated in the peptides of the invention in order to introduce particular conformational motifs: 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylate (Kazmierski et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:2275-2283); (2S,3S)-methyl-phenylalanine, (2S,3R)-methyl-phenylalanine, 25 (2R,3S)-methyl-phenylalanine and (2R,3R)-methyl-phenylalanine (Kazmierski and Hruby (1991) *Tetrahedron Lett.* 32(41):5769-5772); 2-aminotetrahydronaphthalene-2-carboxylic acid (Landis (1989) Ph.D. Thesis, University of Arizona); hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylate (Miyake et al. (1989) *J. Takeda Res. Labs.* 43:53-76) histidine isoquinoline carboxylic acid (Zechel et al. (1991) *Int. J. Pep. Protein Res.* 38(2):131-138); and HIC (histidine cyclic urea), (Dharanipragada et al. (1993) *Int. J.* 30

WO 01/92306

PCT/US01/17454

Pep. Protein Res. 42(1):68-77) and ((1992) Acta. Cryst., Crystal Struc. Comm. 48(IV):1239-1241).

The following amino acid analogs and peptidomimetics may be incorporated into a peptide to induce or favor specific secondary structures: LL-Acp (LL-3-amino-2-propanide-6-carboxylic acid), a β -turn inducing dipeptide analog (Kemp et al. (1985) J. Org. Chem. 50:5834-5838); β -sheet inducing analogs (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:5081-5082); β -turn inducing analogs (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:5057-5060); α -helix inducing analogs (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:4935-4938); γ -turn inducing analogs (Kemp et al. (1989) J. Org. Chem. 54:109-115); analogs provided by the following references: Nagai and Sato (1985) Tetrahedron Lett. 26:647-650; and DiMaio et al. (1989) J. Chem. Soc. Perkin Trans. p. 1687; a Gly-Ala turn analog (Kahn et al. (1989) Tetrahedron Lett. 30:2317); amide bond isostere (Clones et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:38S3-38S6); tetrazol (Zabrocki et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:5878-5880); DTC (Samanez et al. (1990) Int. J. Protein Pep. Res. 35:501:509); and analogs taught in Olson et al. (1990) J. Am. Chem. Sci. 112:323-333 and Garvey et al. (1990) J. Org. Chem. 56:436.

Conformationally restricted mimetics of beta turns and beta bulges, and peptides containing them, are described in U.S. Patent No. 5,440,013, issued August 8, 1995 to Kahn.

A synthetic antigenic peptide epitope of the invention can be used in a variety of formulations, which may vary depending on the intended use.

A synthetic antigenic peptide epitope of the invention can be covalently or non-covalently linked (complexed) to various other molecules, the nature of which may vary depending on the particular purpose. For example, a peptide of the invention can be covalently or non-covalently complexed to a macromolecular carrier, including, but not limited to, natural and synthetic polymers, proteins, polysaccharides, polypeptides (amino acids), polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, and lipids. A peptide can be conjugated to a fatty acid, for introduction into a liposome. U.S. Patent No. 5,837,249. A synthetic peptide of the invention can be complexed covalently or non-covalently with a solid support, a variety of which are known in the art. A synthetic antigenic peptide epitope of the invention can be associated with an antigen-presenting matrix with or without co-stimulatory molecules, as described in more detail below.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

Examples of protein carriers include, but are not limited to, superantigens, serum albumin, tetanus toxoid, ovalbumin, thyroglobulin, myoglobin, and immunoglobulin.

Peptide-protein carrier polymers may be formed using conventional cross-linking agents such as carbodimidcs. Examples of carbodimidcs are 1-cyclohexyl-3-(2-morpholiny1-4-ethyl) carbodiimide (CMC), 1-ethyl-3-(3-dimethyaminopropyl) carbodiimide (EDC) and 1-ethyl-3-(4-azonia-44-dimethylpentyl) carbodiimide.

Examples of other suitable cross-linking agents are cyanogen bromide, glutaraldehyde and succinic anhydride. In general, any of a number of homo-bifunctional agents including a homo-bifunctional aldehydc, a homo-bifunctional epoxide, a homo-bifunctional imido-ester, a homo-bifunctional N-hydroxysuccinimide ester, a homo-bifunctional maleimide, a homo-bifunctional alkyl halide, a homo-bifunctional pyridyl disulfide, a homo-bifunctional acyl halide, a homo-bifunctional hydrazide, a homo-bifunctional diazonium derivative and a homo-bifunctional photoreactive compound may be used. Also included are hetero-bifunctional compounds, for example, compounds having an amine-reactive and a sulphydryl-reactive group, compounds with an amine-reactive and a photoreactive group and compounds with a carbonyl-reactive and a sulphydryl-reactive group.

Specific examples of such homo-bifunctional cross-linking agents include the bifunctional N-hydroxysuccinimide esters diisobis(succinimidyl)propionate, disuccinimidyl suberate, and disuccinimidyl tartrate; the bifunctional imido-esters dimethyl adipimidate, dimethyl pimelimidate, and dimethyl suberimidate; the bifunctional sulphydryl-reactive crosslinkers 1,4-di-[3'-(2'-pyridyl)thio] propionamido]butane, bismaleimidohexane, and bis-N-maleimido-1, 8-octane; the bifunctional aryl halides 1,5-disluoro-2,4-dinitrobenzene and 4,4'-disluoro-3,3'-dinitrophenylsulfone; bifunctional photoreactive agents such as bis-[b-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide; the bifunctional aldehydes formaldehyde, malondialdehyde, succinaldehyde, glutaraldehyde, and adipaldehyde; a bifunctional epoxide such as 1,4-butanediol diglycidyl ether; the bifunctional hydrazides adipic acid dihydrazide, carbohydrazide, and succinic acid dihydrazide; the bifunctional diazoniums o-tolidine, diazotized and bis-diazotized benzidine; the bifunctional alkylhalides N1N'-ethylene-bis(iodoacetamide), N1N'-hexamethylene-bis(iodoacetamide), N1N'-undecamethylene-bis(iodoacetamide), as well as

WO 01/92306

PCT/US01/17454

benzylhalides and halomustards, such as ala'-diiodo-p-xylene sulfonic acid and tri(2-chloroethyl)amine, respectively.

- Examples of common hetero-bifunctional cross-linking agents that may be used to effect the conjugation of proteins to peptides include, but are not limited to, SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester), SIAB (N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate), SMPB (succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate), GMBS (N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimide ester), MPBH (4-(4-N-maleimidophenyl) butyric acid hydrazide), M2C2H (4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxyl-hydrazide), SMPT (succinimidoxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyl)dithio)toluene), and SPD^P (N-succinimidyl 3-(2-pyridyl)dithio)propionate).

Cross-linking may be accomplished by coupling a carbonyl group to an amine group or to a hydrazide group by reductive amination.

- Peptides of the invention also may be formulated as non-covalent attachment of monomers through ionic, adsorptive, or biospecific interactions. Complexes of peptides with highly positively or negatively charged molecules may be done through salt bridge formation under low ionic strength environments, such as in deionized water. Large complexes can be created using charged polymers such as poly-(L-glutamic acid) or poly-(L-lysine) which contain numerous negative and positive charges, respectively.
- Adsorption of peptides may be done to surfaces such as microparticle latex beads or to other hydrophobic polymers, forming non-covalently associated peptide-superantigen complexes effectively mimicking cross-linked or chemically polymerized protein. Finally, peptides may be non-covalently linked through the use of biospecific interactions between other molecules. For instance, utilization of the strong affinity of biotin for proteins such as avidin or streptavidin or their derivatives could be used to form peptide complexes. These biotin-binding proteins contain four binding sites that can interact with biotin in solution or be covalently attached to another molecule. Wilchek (1988) Anal. Biochem. 171:1-32. Peptides can be modified to possess biotin groups using common biotinylation reagents such as the N-hydroxysuccinimide ester of D-biotin (NHS-biotin) which reacts with available amine groups on the protein. Biotinylated peptides then can be incubated with avidin or streptavidin to create large

WO 01/92306

PCT/US01/17454

complexes. The molecular mass of such polymers can be regulated through careful control of the molar ratio of biotinylated peptide to avidin or streptavidin.

Also provided by this application are the peptides and polypeptides described herein conjugated to a detectable agent for use in the diagnostic methods. For example, 5 detectably labeled peptides and polypeptides can be bound to a column and used for the detection and purification of antibodies. They also are useful as immunogens for the production of antibodies, as described below.

The peptides of this invention also can be combined with various liquid phase carriers, such as sterile or aqueous solutions, pharmaceutically acceptable carriers, 10 suspensions and emulsions. Examples of non-aqueous solvents include propyl ethylene glycol, polyethylene glycol and vegetable oils. When used to prepare antibodies, the carriers also can include an adjuvant that is useful to non-specifically augment a specific immune response. A skilled artisan can easily determine whether an adjuvant is required and select one. However, for the purpose of illustration only, suitable 15 adjuvants include, but are not limited to, Freund's Complete and Incomplete, mineral salts and polynucleotides.

This invention further provides polynucleotides encoding polypeptides comprising the sequences FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYVV (SEQ ID NO:5), FLIUKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLEHKWHWYVV (SEQ ID NO:9), 20 FLHIKVHYLV (SEQ ID NO:11) and KHFKP HGFS (SEQ ID NO: 13) and the complements of these polynucleotides. As used herein, the term "polynucleotide" encompasses DNA, RNA and nucleic acid mimetics. In addition to the sequences identified above or their complements, this invention also provides the anti-sense polynucleotide stand, e.g. antisense RNA to these sequences or their complements. One 25 can obtain an antisense RNA using the sequences provided in Seq. ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12 and 14 and the methodology described in Van der Krol, et al. (1988) BioTechniques 6:958.

The polynucleotides of this invention can be replicated using PCR. PCR technology is the subject matter of United States Patent Nos. 4,683,195; 4,800,159; 30 4,754,065; and 4,683,202 and described in PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION (Mullis et al. eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) and references cited therein.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

Alternatively, one of skill in the art can use the sequences provided herein and a commercial DNA synthesizer to replicate the DNA. Accordingly, this invention also provides a process for obtaining the polynucleotides of this invention by providing the linear sequence of the polynucleotide, appropriate primer molecules, chemicals such as enzymes and instructions for their replication and chemically replicating or linking the nucleotides in the proper orientation to obtain the polynucleotides. In a separate embodiment, these polynucleotides are further isolated. Still further, one of skill in the art can insert the polynucleotide into a suitable replication vector and insert the vector into a suitable host cell (procaryotic or eucaryotic) for replication and amplification.

10 The DNA so amplified can be isolated from the cell by methods well known to those of skill in the art. A process for obtaining polynucleotides by this method is further provided herein as well as the polynucleotides so obtained.

RNA can be obtained by first inserting a DNA polynucleotide into a suitable host cell. The DNA can be inserted by any appropriate method, e.g., by the use of an appropriate gene delivery vehicle (e.g., liposome, plasmid or vector) or by electroporation. When the cell replicates and the DNA is transcribed into RNA; the RNA can then be isolated using methods well known to those of skill in the art, for example, as set forth in Sambrook et al. (1989) *supra*. For instance, mRNA can be isolated using various lytic enzymes or chemical solutions according to the procedures set forth in Sambrook, et al. (1989) *supra* or extracted by nucleic-acid-binding resins following the accompanying instructions provided by manufacturers.

25 Polynucleotides having at least 4 contiguous nucleotides, and more preferably at least 5 or 6 contiguous nucleotides and most preferably at least 10 contiguous nucleotides, and exhibiting sequence complementarity or homology to the sequences encoding the amino acids shown in SEQ ID NOS. 3, 5, 7, 9, 11 and 13, (e.g., SEQ ID NOS. 4, 6, 8, 10, 12, or 14) find utility as hybridization probes.

It is known in the art that a "perfectly matched" probe is not needed for a specific hybridization. Minor changes in probe sequence achieved by substitution, deletion or insertion of a small number of bases do not affect the hybridization specificity. In general, as much as 20% base-pair mismatch (when optimally aligned) can be tolerated. Preferably, a probe useful for detecting the aforementioned mRNA is at least about 80% identical to the homologous region of comparable size contained in

WO 01/92306

PCT/US01/17454

the previously identified sequences (identified above) which correspond to previously characterized genes or in Seq. ID Nos. 1, 4, 6, 8, 10, 12 or 14. More preferably, the probe is 85% identical to the corresponding gene sequence after alignment of the homologous region; even more preferably, it exhibits 90% identity.

- 5 These probes can be used in radioassays (e.g. Southern and Northern blot analysis) to detect or monitor various cells or tissue containing these cells. The probes also can be attached to a solid support or an array such as a chip for use in high throughput screening assays for the detection of expression of the gene corresponding to one or more polynucleotide(s) of this invention. Accordingly, this invention also
10 provides at least one probe identified as SEQ ID NOS. 4, 6, 8, 10, 12 or 14, or the complement of one of these sequences, attached to a solid support for use in high throughput screens.

- The polynucleotides of the present invention also can serve as primers for the detection of genes or gene transcripts that are expressed in APC, for example, to
15 confirm transduction of the polynucleotides into host cells. In this context, amplification means any method employing a primer-dependent polymerase capable of replicating a target sequence with reasonable fidelity. Amplification may be carried out by natural or recombinant DNA-polymerases such as T7 DNA polymerase, Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase, and reverse transcriptase. A preferred length of
20 the primer is the same as that identified for probes, above.

- The invention further provides the isolated polynucleotide operatively linked to a promoter of RNA transcription, as well as other regulatory sequences for replication and/or transient or stable expression of the DNA or RNA. As used herein, the term "operatively linked" means positioned in such a manner that the promoter will direct
25 transcription of RNA off the DNA molecule. Examples of such promoters are SP6, T4 and T7. In certain embodiments, cell-specific promoters are used for cell-specific expression of the inserted polynucleotide. Vectors which contain a promoter or a promoter/enhancer, with termination codons and selectable marker sequences, as well as a cloning site into which an inserted piece of DNA can be operatively linked to that
30 promoter are well known in the art and commercially available. For general methodology and cloning strategies, see GENE EXPRESSION TECHNOLOGY (Goeddel ed., Academic Press, Inc. (1991)) and references cited therein and VECTORS: ESSENTIAL

WO 01/92306

PCT/US01/17454

DATA SERIES (Gacesa and Ramji, eds., John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), which contains maps, functional properties, commercial suppliers and a reference to GenEMBL accession numbers for various suitable vectors. Preferably, these vectors are capable of transcribing RNA *in vitro* or *in vivo*.

- 5 Expression vectors containing these nucleic acids are useful to obtain host vector systems to produce proteins and polypeptides. It is implied that these expression vectors must be replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include plasmids, viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids, etc.
- 10 Adenoviral vectors are particularly useful for introducing genes into tissues *in vivo* because of their high levels of expression and efficient transformation of cells both *in vitro* and *in vivo*. When a nucleic acid is inserted into a suitable host cell, e.g., a prokaryotic or a eukaryotic cell and the host cell replicates, the protein can be recombinantly produced. Suitable host cells will depend on the vector and can include
- 15 mammalian cells, animal cells, human cells, simian cells, insect cells, yeast cells, and bacterial cells constructed using well known methods. See Sambrook, et al. (1989) *supra*. In addition to the use of viral vector for insertion of exogenous nucleic acid into cells, the nucleic acid can be inserted into the host cell by methods well known in the art such as transformation for bacterial cells, transfection using calcium phosphate
- 20 precipitation for mammalian cells; DEAE-dextran; electroporation; or microinjection. See Sambrook et al. (1989) *supra* for this methodology. Thus, this invention also provides a host cell, e.g. a mammalian cell, an animal cell (rat or mouse), a human cell, or a prokaryotic cell such as a bacterial cell, containing a polynucleotide encoding a protein or polypeptide or antibody.
- 25 The present invention also provides delivery vehicles suitable for delivery of a polynucleotide of the invention into cells (whether *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro*). A polynucleotide of the invention can be contained within a cloning or expression vector. These vectors (especially expression vectors) can in turn be manipulated to assume any of a number of forms which may, for example, facilitate delivery to and/or entry into a
- 30 cell.

When the vectors are used for gene therapy *in vivo* or *ex vivo*, a pharmaceutically acceptable vector is preferred, such as a replication-incompetent

WO 01/92306

PCT/US01/17454

retroviral or adenoviral vector. Pharmaceutically acceptable vectors containing the nucleic acids of this invention can be further modified for transient or stable expression of the inserted polynucleotide. As used herein, the term "pharmaceutically acceptable vector" includes, but is not limited to, a vector or delivery vehicle having the ability to selectively target and introduce the nucleic acid into dividing cells. An example of such a vector is a "replication-incompetent" vector defined by its inability to produce viral proteins, precluding spread of the vector in the infected host cell. An example of a replication-incompetent retroviral vector is LNL6 (Miller A.D. et al. (1989) *BioTechniques* 7:980-990). The methodology of using replication-incompetent retroviruses for retroviral-mediated gene transfer of gene markers is well established (Correll et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8912; Bordignon (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8912-52; Culver K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3155; and Rill D.R. (1991) *Blood* 79(10):2694-2700).

These isolated host cells containing the polynucleotides of this invention are useful for the recombinant replication of the polynucleotides and for the recombinant production of peptides. Alternatively, the cells may be used to induce an immune response in a subject in the methods described herein. When the host cells are antigen presenting cells, they can be used to expand a population of immune effector cells such as tumor infiltrating lymphocytes which in turn are useful in adoptive immunotherapies.

Also provided by this invention is an antibody capable of specifically forming a complex with the polypeptides of this invention. The term "antibody" includes polyclonal antibodies and monoclonal antibodies. The antibodies include, but are not limited to mouse, rat, and rabbit or human antibodies. The antibodies are useful to identify and purify polypeptides and APCs expressing the polypeptides.

Laboratory methods for producing polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, as well as deducing their corresponding nucleic acid sequences, are known in the art, see Harlow and Lane (1988) *supra* and Sambrook et al. (1989) *supra*. The monoclonal antibodies of this invention can be biologically produced by introducing protein or a fragment thereof into an animal, e.g., a mouse or a rabbit. The antibody producing cells in the animal are isolated and fused with myeloma cells or hetero-myeloma cells to produce hybrid cells or hybridomas. Accordingly, the hybridoma cells producing the monoclonal antibodies of this invention also are provided.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

Thus, using the protein or fragment thereof, and well known methods, one of skill in the art can produce and screen the hybridoma cells and antibodies of this invention for antibodies having the ability to bind the proteins or polypeptides.

If a monoclonal antibody being tested binds with the protein or polypeptide, then the antibody being tested and the antibodies provided by the hybridomas of this invention are equivalent. It also is possible to determine without undue experimentation, whether an antibody has the same specificity as the monoclonal antibody of this invention by determining whether the antibody being tested prevents a monoclonal antibody of this invention from binding the protein or polypeptide with which the monoclonal antibody is normally reactive. If the antibody being tested competes with the monoclonal antibody of the invention as shown by a decrease in binding by the monoclonal antibody of this invention, then it is likely that the two antibodies bind to the same or a closely related epitope. Alternatively, one can pre-incubate the monoclonal antibody of this invention with a protein with which it is normally reactive, and determine if the monoclonal antibody being tested is inhibited in its ability to bind the antigen. If the monoclonal antibody being tested is inhibited then, in all likelihood, it has the same, or a closely related, epitopic specificity as the monoclonal antibody of this invention.

The term "antibody" also is intended to include antibodies of all isotypes. Particular isotypes of a monoclonal antibody can be prepared either directly by selecting from the initial fusion, or prepared secondarily, from a parental hybridoma secreting a monoclonal antibody of different isotype by using the sib selection technique to isolate class switch variants using the procedure described in Steplewski et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653 or Spira et al. (1984) J. Immunol. Meth. 74:307.

This invention also provides biological active fragments of the polyclonal and monoclonal antibodies described above. These "antibody fragments" retain some ability to selectively bind with its antigen or immunogen. Such antibody fragments can include, but are not limited to:

- (1) Fab,
- (2) Fab',
- (3) F(ab')₂,
- (4) Fv, and

WO 01/92306

PCT/US01/17454

(5) SCA

A specific example of "a biologically active antibody fragment" is a CDR region of the antibody. Methods of making these fragments are known in the art, see for example, Harlow and Lane (1988) *supra*.

5 The antibodies of this invention also can be modified to create chimeric antibodies and humanized antibodies (Qi et al. (1986) *BioTechniques* 4(3):214). Chimeric antibodies are those in which the various domains of the antibodies' heavy and light chains are coded for by DNA from more than one species.

The isolation of other hybridomas secreting monoclonal antibodies with the 10 specificity of the monoclonal antibodies of the invention can also be accomplished by one of ordinary skill in the art by producing anti-idiotypic antibodies (Herlyn et al. (1986) *Science* 232:100). An anti-idiotypic antibody is an antibody which recognizes unique determinants present on the monoclonal antibody produced by the hybridoma of interest.

15 Idiotypic identity between monoclonal antibodies of two hybridomas demonstrates that the two monoclonal antibodies are the same with respect to their recognition of the same epitopic determinant. Thus, by using antibodies to the epitopic determinants on a monoclonal antibody it is possible to identify other hybridomas expressing monoclonal antibodies of the same epitopic specificity.

20 It is also possible to use the anti-idiotype technology to produce monoclonal antibodies which mimic an epitope. For example, an anti-idiotypic monoclonal antibody made to a first monoclonal antibody will have a binding domain in the hypervariable region which is the mirror image of the epitope bound by the first monoclonal antibody. Thus, in this instance, the anti-idiotypic monoclonal antibody 25 could be used for immunization for production of these antibodies.

As used in this invention, the term "epitope" is meant to include any determinant having specific affinity for the monoclonal antibodies of the invention. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional 30 structural characteristics, as well as specific charge characteristics.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

The antibodies of this invention can be linked to a detectable agent or label. There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art.

The coupling of antibodies to low molecular weight haptens can increase the sensitivity of the assay. The haptens can then be specifically detected by means of a second reaction. For example, it is common to use haptens such as biotin, which reacts avidly, or dinitrophenyl, pyridoxal, and fluorescein, which can react with specific anti-hapten antibodies. See Harlow and Lane (1988) *supra*.

The monoclonal antibodies of the invention also can be bound to many different carriers. Thus, this invention also provides compositions containing the antibodies and another substance, active or inert. Examples of well-known carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amyloses, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble or insoluble for purposes of the invention. Those skilled in the art will know of other suitable carriers for binding monoclonal antibodies, or will be able to ascertain such, using routine experimentation.

Compositions containing the antibodies, fragments thereof or cell lines which produce the antibodies, are encompassed by this invention. When these compositions are to be used pharmaceutically, they are combined with a pharmaceutically acceptable carrier.

In another embodiment the present invention provides a method of inducing an immune response comprising delivering the compounds and compositions of the invention in the context of an MHC molecule. Thus, the polypeptides of this invention can be pulsed into antigen presenting cells using the methods described herein.

Antigen-presenting cells, include, but are not limited to dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, B lymphocytes or other cell type(s) expressing the necessary MHC/co-stimulatory molecules. The methods described below focus primarily on DCs which are the most potent, preferred APCs. These host cells containing the polypeptides or proteins are further provided.

Isolated host cells which present the polypeptides of this invention in the context of MHC molecules are further useful to expand and isolate a population of educated, antigen-specific immune effector cells. The immune effector cells, e.g., cytotoxic T

WO 01/92306

PCT/US01/17454

lymphocytes, are produced by culturing naïve immune effector cells with antigen-presenting cells which present the polypeptides in the context of MHC molecules on the surface of the APCs. The population can be purified using methods known in the art, e.g., FACS analysis or ficoll gradient. The methods to generate and culture the immune effector cells as well as the populations produced thereby also are the inventor's contribution and invention. Pharmaceutical compositions comprising the cells and pharmaceutically acceptable carriers are useful in adoptive immunotherapy. Prior to administration *in vivo*, the immune effector cells are screened *in vitro* for their ability to lyse tumor cells expressing the human cancer antigen ATF4/CREB-2, e.g., ovarian cancer.

In one embodiment, the immune effector cells and/or the APCs are genetically modified. Using standard gene transfer, genes coding for co-stimulatory molecules and/or stimulatory cytokines can be inserted prior to, concurrent to or subsequent to expansion of the immune effector cells.

This invention also provides methods of inducing an immune response in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of the polypeptides described above under the conditions that induce an immune response to the polypeptide. The polypeptides can be administered in formulations or as polynucleotides encoding the polypeptides. The polynucleotides can be administered in a gene delivery vehicle or by inserting into a host cell which in turn recombinantly transcribes, translates and processes the encoded polypeptide. Isolated host cells containing the polynucleotides of this invention in a pharmaceutically acceptable carrier can therefore be combined with appropriate and effective amount of an adjuvant, cytokine or co-stimulatory molecule for an effective vaccine regimen. In one embodiment, the host cell is an APC such as a dendritic cell. The host cell can be further modified by inserting of a polynucleotide coding for an effective amount of either or both a cytokine and/or a co-stimulatory molecule.

The methods of this invention can be further modified by co-administering an effective amount of a cytokine or co-stimulatory molecule to the subject.

This invention also provides compositions containing any of the above-mentioned proteins, polypeptides, polynucleotides, vectors, cells, antibodies and fragments thereof, and an acceptable solid or liquid carrier. When the compositions are

WO 01/92306

PCT/US01/17454

used pharmaceutically, they are combined with a "pharmaceutically acceptable carrier" for diagnostic and therapeutic use. These compositions also can be used for the preparation of medicaments for the diagnosis and treatment of diseases such as cancer.

The following materials and methods are intended to illustrate, but not limit this invention and to illustrate how to make and use the inventions described above.

Materials and Methods

Production of the Polypeptides of the Invention

Most preferably, isolated peptides of the present invention can be synthesized 10 using an appropriate solid state synthetic procedure. Steward and Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Fremantle, San Francisco, Calif. (1968). A preferred method is the Merrifield process. See, Merrifield (1967) Recent Progress in Hormone Res. 23:451. The antigenic activity of these peptides may conveniently be tested using, for example, the assays as described herein.

15 Once an isolated peptide of the invention is obtained, it may be purified by standard methods including chromatography (e.g., ion exchange, affinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for protein purification. For immuno-affinity chromatography, an epitope may be isolated by binding it to an affinity column comprising antibodies that 20 were raised against that peptide, or a related peptide of the invention, and were affixed to a stationary support.

Alternatively, affinity tags such as hexa-His (Invitrogen), Maltose binding domain (New England Biolabs), influenza coat sequence (Kolodziej et al. (1991) Meth. Enzymol. 194:508-509), and glutathione-S-transferase can be attached to the peptides of 25 the invention to allow easy purification by passage over an appropriate affinity column. Isolated peptides can also be physically characterized using such techniques as proteolysis, nuclear magnetic resonance, and x-ray crystallography.

Also included within the scope of the invention are antigenic peptides that are differentially modified during or after translation, e.g., by phosphorylation, 30 glycosylation, cross-linking, acylation, proteolytic cleavage, linkage to an antibody

WO 01/92306

PCT/US01/17454

molecule, membrane molecule or other ligand, (Ferguson et al. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**:285-320).

Isolation, Culturing and Expansion of APCs, Including Dendritic Cells

- The following is a brief description of two fundamental approaches for the isolation of APC. These approaches involve (1) isolating bone marrow precursor cells (CD34⁺) from blood and stimulating them to differentiate into APC; or (2) collecting the precommitted APCs from peripheral blood. In the first approach, the patient must be treated with cytokines such as GM-CSF to boost the number of circulating CD34⁺ stem cells in the peripheral blood.
- 10 The second approach for isolating APCs is to collect the relatively large numbers of precommitted APCs already circulating in the blood. Previous techniques for isolating committed APCs from human peripheral blood have involved combinations of physical procedures such as mefrizamide gradients and adherence/non-adherence steps (Freudenthal P.S. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:7698-7702); Percoll gradient separations (Mehta-Damani et al. (1994) *J. Immunol.* **153**:996-1003); and fluorescence activated cell sorting techniques (Thomas R. et al. (1993) *J. Immunol.* **151**:6840-6852).

One technique for separating large numbers of cells from one another is known as countercurrent centrifugal elutriation (CCE). In this technique, cells are subject to simultaneous centrifugation and a washout stream of buffer that is constantly increasing in flow rate. The constantly increasing countercurrent flow of buffer leads to fractional cell separations that are largely based on cell size.

In one aspect of the invention, the APC are precommitted or mature dendritic cells which can be isolated from the white blood cell fraction of a mammal, such as a murine, simian or a human (See, e.g., WO 96/23060). The white blood cell fraction can be from the peripheral blood of the mammal. This method includes the following steps: (a) providing a white blood cell fraction obtained from a mammalian source by methods known in the art such as leukapheresis; (b) separating the white blood cell fraction of step (a) into four or more subfractions by countercurrent centrifugal elutriation; (c) stimulating conversion of monocytes in one or more fractions from step (b) to dendritic cells by contacting the cells with calcium ionophore, GM-CSF and IL-13 or GM-CSF

WO 01/92306

PCT/US01/17454

and IL-4, (d) identifying the dendritic cell-enriched fraction from step (c); and (e) collecting the enriched fraction of step (d), preferably at about 4°C. One way to identify the dendritic cell-enriched fraction is by fluorescence-activated cell sorting. The white blood cell fraction can be treated with calcium ionophore in the presence of other 5 cytokines, such as recombinant (rh) rhIL-12, rhGM-CSF, or rhIL-4. The cells of the white blood cell fraction can be washed in buffer and suspended in Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ free media prior to the separating step. The white blood cell fraction can be obtained by leukapheresis. The dendritic cells can be identified by the presence of at least one of the following markers: HLA-DR, HLA-DQ, or B7.2, and the simultaneous absence of 10 the following markers: CD3, CD14, CD16, 56, 57, and CD 19, 20. Monoclonal antibodies specific to these cell surface markers are commercially available.

More specifically, the method requires collecting an enriched collection of white cells and platelets from leukapheresis that is then further fractionated by countercurrent centrifugal elutriation (CCE) (Abrahamsen T.G. et al. (1991) J. Clin. Apheresis. 6:48-15 53). Cell samples are placed in a special elutriator rotor. The rotor is then spun at a constant speed of, for example, 3000 rpm. Once the rotor has reached the desired speed, pressurized air is used to control the flow rate of cells. Cells in the elutriator are subjected to simultaneous centrifugation and a washout stream of buffer that is 20 constantly increasing in flow rate. This results in fractional cell separations based largely but not exclusively on cell size.

Quality control of APC and more specifically DC collection and confirmation of their successful activation in culture is dependent upon a simultaneous multi-color FACS analysis technique which monitors both monocytes and the dendritic cell 25 subpopulation as well as possible contaminant T lymphocytes. It is based upon the fact that DCs do not express the following markers: CD3 (T cell); CD14 (monocytic); CD16, 56, 57 (NK/LAK cells); CD19, 20 (B cells). At the same time, DCs do express large quantities of HLA-DR, significant HLA-DQ and B7.2 (but little or no B7.1) at the time they are circulating in the blood (in addition they express Lce M7 and M9, myeloid markers which are also expressed by monocytes and neutrophils).

When combined with a third color reagent for analysis of dead cells, propidium 30 iodide (PI), it is possible to make positive identification of all cell subpopulations (see Table 1):

TABLE I
FACS analysis of fresh peripheral cell subpopulations

	<u>Color #1</u>	<u>Color #2</u>	<u>Color #3</u>
	<u>Cocktail</u> 3/14/16/19/20/56/57	<u>HLA-DR</u>	<u>PI</u>
Live Dendritic cells	Negative	Positive	Negative
Live Monocytes	Positive	Positive	Negative
Live Neutrophils	Negative	Negative	Negative
Dead Cells	Variable	Variable	Positive

Additional markers can be substituted for additional analysis:

Color #1: CD3 alone, CD14 alone, etc.; Leu M7 or Leu M9; anti-Class I, etc.

5 Color #2: HLA-DQ, B7.1, B7.2, CD25 (IL2r), ICAM, LFA-3, etc.

The goal of FACS analysis at the time of collection is to confirm that the DCs are enriched in the expected fractions, to monitor neutrophil contamination, and to make sure that appropriate markers are expressed. This rapid bulk collection of enriched DCs from human peripheral blood, suitable for clinical applications, is absolutely dependent
10 on the analytic FACS technique described above for quality control. If need be, mature DCs can be immediately separated from monocytes at this point by fluorescent sorting for "cocktail negative" cells. It may not be necessary to routinely separate DCs from monocytes because, as will be detailed below, the monocytes themselves are still capable of differentiating into DCs or functional DC-like cells in culture.

15 Once collected, the DC rich/monocyte APC fractions (usually 150 through 190) can be pooled and cryopreserved for future use, or immediately placed in short term culture.

Alternatively, others have reported a method for upregulating (activating) dendritic cells and converting monocytes to an activated dendritic cell phenotype. This
20 method involves the addition of calcium ionophore to the culture media convert

WO 01/92306

PCT/US01/17454

monocytes into activated dendritic cells. Adding the calcium ionophore A23187, for example, at the beginning of a 24-48 hour culture period resulted in uniform activation and dendritic cell phenotypic conversion of the pooled "monocyte plus DC" fractions; characteristically, the activated population becomes uniformly CD14 (Leu M3) 5 negative, and upregulates HLA-DR, HLA-DQ, ICAM-1, B7.1, and B7.2. Furthermore, this activated bulk population functions as well on a small numbers basis as a further purified.

Specific combination(s) of cytokines have been used successfully to amplify (or partially substitute) for the activation/conversion achieved with calcium ionophore: 10 these cytokines include but are not limited to purified or recombinant ("rh") rhGM-CSF, rhIL-2, and rhIL-4. Each cytokine when given alone is inadequate for optimal upregulation.

Presentation of Antigen to the APC

For purposes of immunization, the antigenic peptides (Nos. 3, 5, 7, 9, 11 and 13) 15 can be delivered to antigen-presenting cells as protein/peptide or in the form of cDNA encoding the protein/peptide. Antigen-presenting cells (APCs) can consist of dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, B lymphocytes or other cell type(s) expressing the necessary MHC/co-stimulatory molecules. The methods described below focus primarily on DCs which are the most potent, preferred APCs. 20 Pulsing is accomplished *in vitro/ex vivo* by exposing APCs to the antigenic protein or peptide(s) of this invention. The protein or peptide(s) are added to APCs at a concentration of 1-10 µm for approximately 3 hours. Pulsed APCs can subsequently be administered to the host via an intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

25 Protein/peptide antigen can also be delivered *in vivo* with adjuvant via the intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery. Paglia et al. (1996) *J. Exp. Med.* 183:317-322 has shown that APC incubated with whole protein *in vitro* were recognized by MHC class I-restricted CTLs, and that 30 immunization of animals with these APCs led to the development of antigen-specific CTLs *in vivo*. In addition, several different techniques have been described which lead to the expression of antigen in the cytosol of APCs, such as DCs. These include (1) the

WO 01/92306

PCT/US01/17454

introduction into the APCs of RNA isolated from tumor cells, (2) infection of APCs with recombinant vectors to induce endogenous expression of antigen, and (3) introduction of tumor antigen into the DC cytosol using liposomes. (See Boczkowski D. et al. (1996) J. Exp. Med. 184:465-472; Rouse et al. (1994) J. Virol. 68:5685-5689; 5 and Nair et al. (1992) J. Exp. Med. 175:609-612).

Foster Antigen Presenting Cells

Foster antigen presenting cells are particularly useful as target cells. Foster APCs are derived from the human cell line 174xCEM.T2, referred to as T2, which contains a mutation in its antigen processing pathway that restricts the association of 10 endogenous peptides with cell surface MHC class I molecules (Zweerink et al. (1993) J. Immunol. 150:1763-1771). This is due to a large homozygous deletion in the MHC class II region encompassing the genes TAP1, TAP2, LMP1, and LMP2, which are required for antigen presentation to MHC class 1-restricted CD8⁺ CTLs. In effect, only 15 "empty" MHC class I molecules are presented on the surface of these cells. Exogenous peptide added to the culture medium binds to those MHC molecules provided that the peptide contains the allele-specific binding motif. These T2 cells are referred to herein as "foster" APCs. They can be used in conjunction with this invention to present antigen(s).

Transduction of T2 cells with specific recombinant MHC alleles allows for 20 redirection of the MHC restriction profile. Libraries tailored to the recombinant allele will be preferentially presented by them because the anchor residues will prevent efficient binding to the endogenous allele.

High level expression of MHC molecules makes the APC more visible to the 25 CTLs. Expressing the MHC allele of interest in T2 cells using a powerful transcriptional promoter (e.g., the CMV promoter) results in a more reactive APC (most likely due to a higher concentration of reactive MHC-peptide complexes on the cell surface).

Immunogenicity Assays.

The immunogenicity of invention ligands can be determined by well known 30 methodologies including, but not limited to those exemplified below. In one

WO 01/92306

PCT/US01/17454

embodiment, such methodology may be employed to compare an altered ligand of the invention with the corresponding native ligand. For example, an altered ligand may be considered "more active" if it compares favorably with the activity of the native ligand in any one of the following assays. For some purposes, one skilled in the art will select 5 an immunogenic ligand which displays more activity than another immunogenic ligand, i.e., for treatment and/or diagnostic purposes. However, for some applications, the use of an immunogenic ligand which is comparable with the native ligand will be suitable. In other situations, it may be desirable to utilize an immunogenic ligand which is less active. It has been suggested that such levels of activity positively correlate with the 10 level of immunogenicity.

1. **⁵¹Cr-release lysis assay.** Lysis of peptide-pulsed ⁵¹Cr-labeled targets by antigen-specific T cells can be compared for target cells pulsed with either the native or altered ligands. Functionally enhanced ligands will show greater lysis of targets as a function of time. The kinetics of lysis as well as overall target 15 lysis at a fixed timepoint (e.g., 4 hours) may be used to evaluate ligand performance. (Ware C.F. et al. (1983) J. Immunol. 131:1312).
2. **Cytokine-release assay.** Analysis of the types and quantities of cytokines secreted by T cells upon contacting ligand-pulsed targets can be a measure of functional activity. Cytokines can be measured by ELISA or ELISPOT assays to determine the rate and total amount of cytokine production. (Fujihashi K. et al. 20 (1993) J. Immunol. Meth. 160:181; Tanquay S. and Killion J.J. (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259).
3. **In vitro T cell education.** The ligands of the invention can be compared to the corresponding native ligand for the ability to elicit ligand-reactive T cell 25 populations from normal donor or patient-derived PBMC. In this system, elicited T cells can be tested for lytic activity, cytokine-release, polyclonality, and cross-reactivity to the native ligand. (Parkhurst M.R. et al. (1996) J. Immunol. 157:2539).
4. **Transgenic animal models.** Immunogenicity can be assessed *in vivo* by 30 vaccinating HLA transgenic mice with either the ligands of the invention or the native ligand and determining the nature and magnitude of the induced immune

WO 01/92306

PCT/US01/17454

- response. Alternatively, the hu-PBL-SCID mouse model allows reconstitution of a human immune system in a mouse by adoptive transfer of human PBL. These animals may be vaccinated with the ligands and analyzed for immune response as previously mentioned. (Shirai M. et al. (1995) *J. Immunol.* 154:2733; Mosier D.E. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2443).
5. **Proliferation.** T cells will proliferate in response to reactive ligands. Proliferation can be monitored quantitatively by measuring, for example, ^3H -thymidine uptake. (Caruso A. et al. (1997) *Cytometry* 27:71).
6. **Tetramer staining.** MHC tetramers can be loaded with individual ligands and tested for their relative abilities to bind to appropriate effector T cell populations. (Altman J.D. et al. (1996) *Science* 274:5284).
10. 7. **MHC Stabilization.** Exposure of certain cell lines such as T2 cells to HLA-binding ligands results in the stabilization of MHC complexes on the cell surface. Quantitation of MHC complexes on the cell surface has been correlated with the affinity of the ligand for the HLA allele that is stabilized. Thus, this technique can determine the relative HLA affinity of ligand epitopes. (Stuber G. et al. (1995) *Int. Immunol.* 7:653).
15. 8. **MHC competition.** The ability of a ligand to interfere with the functional activity of a reference ligand and its cognate T cell effectors is a measure of how well a ligand can compete for MHC binding. Measuring the relative levels of inhibition is an indicator of MHC affinity. (Feltkamp M.C. et al. (1995) *Immunol. Lett.* 47:1).
20. 9. **Primate models.** A recently described non-human primate (chimpanzee) model system can be utilized to monitor *in vivo* immunogenicities of HLA-restricted ligands. It has been demonstrated that chimpanzees share overlapping MHC-ligand specificities with human MHC molecules thus allowing one to test HLA-restricted ligands for relative *in vivo* immunogenicity. (Bertoni R. et al. (1998) *J. Immunol.* 161:4447).
25. 10. **Monitoring TCR Signal Transduction Events.** Several intracellular signal transduction events (e.g., phosphorylation) are associated with successful TCR engagement by MHC-ligand complexes. The qualitative and quantitative analysis of these events have been correlated with the relative abilities of ligands

WO 01/92306

PCT/US01/17454

to activate effector cells through TCR engagement. (Salazar E. et al. (2000) Int. J. Cancer 85:829; Isakov N. et al. (1995) J. Exp. Med. 181:375).

Expansion of Immune Effector Cells

- 5 The present invention makes use of these APCs to stimulate production of an enriched population of antigen-specific immune effector cells. The antigen-specific immune effector cells are expanded at the expense of the APCs, which die in the culture. The process by which naïve immune effector cells become educated by other cells is described essentially in Coulic (1997) Molec. Med. Today 3:261-268.
- 10 The APCs prepared as described above are mixed with naïve immune effector cells. Preferably, the cells may be cultured in the presence of a cytokine, for example IL2. Because dendritic cells secrete potent immunostimulatory cytokines, such as IL12, it may not be necessary to add supplemental cytokines during the first and successive rounds of expansion. In any event, the culture conditions are such that the antigen-specific immune effector cells expand (*i.e.*, proliferate) at a much higher rate than the APCs. Multiple infusions of APCs and optional cytokines can be performed to further expand the population of antigen-specific cells.

In one embodiment, the immune effector cells are T cells. In a separate embodiment, the immune effector cells can be genetically modified by transduction 20 with a transgene coding for example, IL-2, IL-11 or IL-13. Methods for introducing transgenes *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* are well known in the art. See Sambrook et al. (1989) *supra*.

Vectors Useful in Genetic Modifications

- In general, genetic modifications of cells employed in the present invention are 25 accomplished by introducing a vector containing a polypeptide or transgene encoding a heterologous or an altered antigen. A variety of different gene transfer vectors, including viral as well as non-viral systems can be used. Viral vectors useful in the genetic modifications of this invention include, but are not limited to adenovirus, adeno-associated virus vectors, retroviral vectors and adeno-retroviral chimeric vectors. APC 30 and immune effector cells can be modified using the methods described below or by any other appropriate method known in the art.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

Construction of Recombinant Adenoviral Vectors or Adeno-Associated Virus Vectors

Adenovirus and adeno-associated virus vectors useful in the genetic modifications of this invention may be produced according to methods already taught in the art. See, e.g., Karlsson et al. (1986) EMBO J. 5:2377; Carter (1992) Curr. Op. Biotechnol. 3:533-539; Muzyczka (1992) Current Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129; GENE TARGETING: A PRACTICAL APPROACH (1992) ed. A. L. Joyner, Oxford University Press, NY). Several different approaches are feasible. Preferred is the helper-independent replication deficient human adenovirus system.

The recombinant adenoviral vectors based on the human adenovirus 5 (Virology 163:614-617 (1988)) are missing essential early genes from the adenoviral genome (usually E1A/E1B), and are therefore unable to replicate unless grown in permissive cell lines that provide the missing gene products *in trans*. In place of the missing adenoviral genomic sequences, a transgene of interest can be cloned and expressed in cells infected with the replication deficient adenovirus. Although adenovirus-based gene transfer does not result in integration of the transgene into the host genome (less than 0.1% adenovirus-mediated transfactions result in transgene incorporation into host DNA), and therefore is not stable, adenoviral vectors can be propagated in high titer and transfect non-replicating cells. Human 293 cells, which are human embryonic kidney cells transformed with adenovirus E1A/E1B genes, typify useful permissive cell lines. However, other cell lines which allow replication-deficient adenoviral vectors to propagate therein can be used, including HeLa cells.

Additional references describing adenovirus vectors and other viral vectors which could be used in the methods of the present invention include the following:

Horwitz M.S. ADENOVIRIDAE AND THEIR REPLICATION, in Fields B. et al. (eds.) VIROLOGY, Vol. 2, Raven Press New York, pp. 1679-1721 (1990); Graham F. et al. pp. 109-128 in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 7: GENE TRANSFER AND EXPRESSION PROTOCOLS, Murray E. (ed.) Humana Press, Clifton, N.J. (1991); Miller N. et al. (1995) FASEB J. 9:190-199; Schreier H. (1994) Pharmaceutica Acta Helvetica 68:145-159; Schneider and French (1993) Circulation 88:1937-1942; Curiel D.T. et al. (1992) Hum. Gene Ther. 3:147-154; Graham F.L. et al. WO 95/00655 (5 January 1995); Palck-Pedersen E.S. WO 95/16772 (22 June 1995); Deneffe P. et al. WO

WO 01/92306

PCT/US01/17454

95/23867 (8 September 1995); Haddada H. et al. WO 94/26914 (24 November 1994); Perricaudet M. et al. WO 95/02697 (26 January 1995); Zhang W. et al. WO 95/25071 (12 October 1995). A variety of adenovirus plasmids are also available from commercial sources, including, e.g., Microbix Biosystems of Toronto, Ontario (see, e.g., Microbix

5 Product Information Sheet: Plasmids for Adenovirus Vector Construction, 1996). See also, the papers by Vile et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:840-841; and Feng et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:866-870, describing the construction and use of adenoviral chimeric vectors that can be employed for genetic modifications.

Additional references describing AAV vectors that could be used in the methods
10 of the present invention include the following: Carter B. *HANDBOOK OF PARVOVIRUSES*, Vol. I, pp. 169-228, 1990; Berns, *VIROLOGY*, pp. 1743-1764 (Raven Press 1990); Carter B. (1992) *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:533-539; Muzychka N. (1992) *Current Topics in Micro. and Immunol.*, 158:92-129; Flotte T.R. et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:349-356; Chatterjee et al. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 15 770:79-90; Flotte T.R. et al. WO 95/13365 (18 May 1995); Trempe J.P. et al., WO 95/13392 (18 May 1995); Kotin R. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5:793-801; Flotte T.R. et al. (1995) *Gene Therapy* 2:357-362; Allen J.M. WO 96/17947 (13 June 1996); and Du et al. (1996) *Gene Therapy* 3:254-261.

APCs can be transduced with viral vectors encoding a relevant polypeptides.
20 The most common viral vectors include recombinant poxviruses such as vaccinia and fowlpox virus (Bronte et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3183-3188; Kim et al. (1997) *J. Immunother.* 20:276-286) and, preferentially, adenovirus (Arthur et al. (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Wan et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8:1355-1363; Huang et al. (1995) *J. Virol.* 69:2257-2263). Retrovirus also may be used for
25 transduction of human APCs (Marin et al. (1996) *J. Virol.* 70:2957-2962).

In vitro/in vivo, exposure of human DCs to adenovirus (Ad) vector at a multiplicity of infection (MOI) of 500 for 16-24 h in a minimal volume of serum-free medium reliably gives rise to transgene expression in 90-100% of DCs. The efficiency of transduction of DCs or other APCs can be assessed by immunofluorescence using
30 fluorescent antibodies specific for the tumor antigen being expressed (Kim et al. (1997) *J. Immunother.* 20:276-286). Alternatively, the antibodies can be conjugated to an enzyme (e.g., HRP) giving rise to a colored product upon reaction with the substrate.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

The actual amount of antigenic polypeptides being expressed by the APCs can be evaluated by ELISA.

Transduced APCs can subsequently be administered to the host via an intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

- 5 *In vivo* transduction of DCs, or other APCs, can be accomplished by administration of Ad (or other viral vectors) via different routes including intravenous, intramuscular, intranasal, intraperitoneal or cutaneous delivery. The preferred method is cutaneous delivery of Ad vector at multiple sites using a total dose of approximately 1×10^{10} - 1×10^{12} i.u. Levels of *in vivo* transduction can be roughly assessed by co-
- 10 staining with antibodies directed against APC marker(s) and the TAA being expressed. The staining procedure can be carried out on biopsy samples from the site of administration or on cells from draining lymph nodes or other organs where APCs (in particular DCs) may have migrated (Condon et al. (1996) *Nature Med.* 2:1122-1128 and Wan et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 8:1355-1363). The amount of antigen being
- 15 expressed at the site of injection or in other organs where transduced APCs may have migrated can be evaluated by ELISA on tissue homogenates.
- Although viral gene delivery is more efficient, DCs can also be transduced *in vitro/ex vivo* by non-viral gene delivery methods such as electroporation, calcium phosphate precipitation or cationic lipid/plasmid DNA complexes (Arthur et al. (1997) *Cancer Gene Ther.* 4:17-25). Transduced APCs can subsequently be administered to the host via an intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.
- 20 *In vivo* transduction of DCs, or other APCs, can potentially be accomplished by administration of cationic lipid/plasmid DNA complexes delivered via the intravenous, intramuscular, intranasal, intraperitoneal or cutaneous route of administration. Gene gun delivery or injection of naked plasmid DNA into the skin also leads to transduction of DCs (Condon et al. (1996) *Nature Med.* 2:1122-1128; Raz et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519-9523). Intramuscular delivery of plasmid DNA may also be used for immunization (Rosato et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 8:1451-1458.)
- 25 The transduction efficiency and levels of transgene expression can be assessed as described above for viral vectors.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

Adoptive Immunotherapy and Vaccines

The expanded populations of antigen-specific immune effector cells of the present invention also find use in adoptive immunotherapy regimes and as vaccines.

Adoptive immunotherapy methods involve, in one aspect, administering to a subject a substantially pure population of educated, antigen-specific immune effector cells made by culturing naïve immune effector cells with APCs as described above. Preferably, the APCs are dendritic cells.

In one embodiment, the adoptive immunotherapy methods described herein are autologous. In this case, the APCs are made using parental cells isolated from a single subject. The expanded population also employs T cells isolated from that subject. Finally, the expanded population of antigen-specific cells is administered to the same patient.

In a further embodiment, APCs or immune effector cells are administered with an effective amount of a stimulatory cytokine, such as IL-2 or a co-stimulatory molecule.

The agents identified herein as effective for their intended purpose can be administered to subjects having tumors expressing human cancer tumor antigen ATF4/CREB-2 as well as or in addition to individuals susceptible to or at risk of developing such tumors. When the agent is administered to a subject such as a mouse, a rat or a human patient, the agent can be added to a pharmaceutically acceptable carrier and systemically or topically administered to the subject. To determine patients that can be beneficially treated, a tumor regression can be assayed. Therapeutic amounts can be empirically determined and will vary with the pathology being treated, the subject being treated and the efficacy and toxicity of the therapy.

Administration *in vivo* can be effected in one dose, continuously or intermittently throughout the course of treatment. Methods of determining the most effective means and dosage of administration are well known to those of skill in the art and will vary with the composition used for therapy, the purpose of the therapy, the target cell being treated, and the subject being treated. Single or multiple administrations can be carried out with the dose level and pattern being selected by the treating physician. Suitable dosage formulations and methods of administering the agents can be found below.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

The agents and compositions of the present invention can be used in the manufacture of medicaments and for the treatment of humans and other animals by administration in accordance with conventional procedures, such as an active ingredient in pharmaceutical compositions.

5 More particularly, an agent of the present invention also referred to herein as the active ingredient, may be administered for therapy by any suitable route including nasal, topical (including transdermal, aerosol, buccal and sublingual), parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal) and pulmonary. It will also be appreciated that the preferred route will vary with the condition and age of the
10 recipient, and the disease being treated.

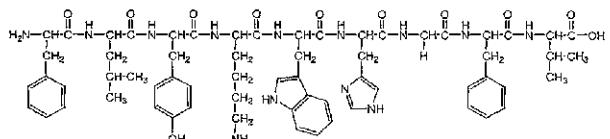
The preceding discussion and examples are intended merely to illustrate the art. As is apparent to one of skill in the art, various modifications can be made to the above without departing from the spirit and scope of this invention.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

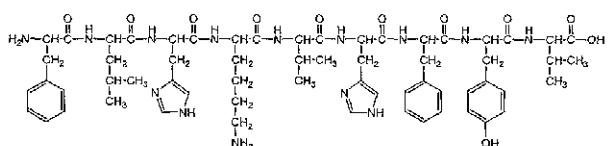
What is claimed is:

- 5 1. A compound having the structure:

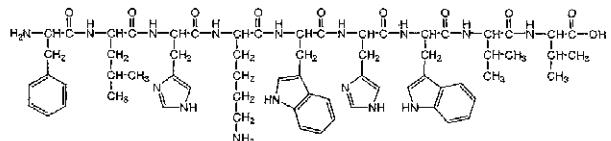


2. A compound having the structure:

10



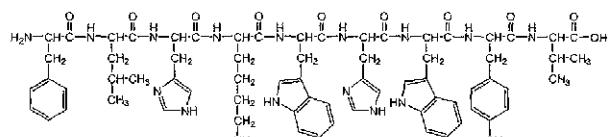
3. A compound having the structure:



WO 01/92306

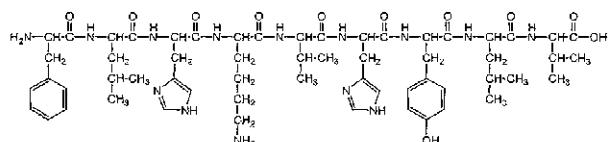
PCT/US01/17454

4. A compound having the structure:



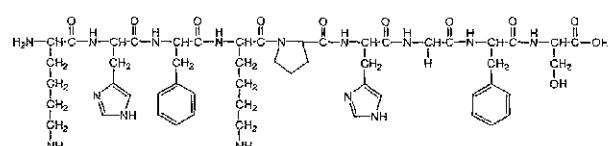
5

5. A compound having the structure:



10

6. A compound having the structure:



WO 01/92306

PCT/US01/17454

7. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 wherein amino acids 42, 43, 44, 46, and 50 are F, L, Y, W and V respectively.
8. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 wherein amino acids 42, 43, 44, 46, 48, 49 and 50 are F, L, H, V, F, Y and V respectively.
9. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 wherein amino acids 42, 43, 44, 46, 48, 49 and 50 are F, L, H, W, W, V and V respectively.
10. 10. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 wherein amino acids 42, 43, 44, 46, 48, 49 and 50 are F, L, H, W, W, Y and V respectively.
11. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 wherein amino acids 42, 43, 44, 46, 48, 49 and 50 are F, L, H, V, Y, L and V respectively.
12. A peptide consisting of amino acids 42 through 50 of SEQ ID NO: 2.
13. A peptide of any of claims 7 to 12, further comprising a biologically active immunoglobulin variable domain bound to said peptide.
15. 14. A peptide of any of claims 7 to 12, further comprising an agent covalently linked to said peptide, wherein said agent is capable of targeting said peptide to an antigen presenting cell.
20. 15. The peptide of claim 14, wherein said antigen presenting cell is a dendritic cell.
16. A peptide of any of claims 7 to 12, further comprising an MHC class II binding helper peptide.
25. 17. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:3.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

18. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:5.
19. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:7.
20. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:9.
- 10 21. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:11.
22. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:13.
- 15 23. A polynucleotide that encodes a peptide of any of claims 7 to 12.
24. An antibody that specifically recognizes and binds a compound of any of claims 1 to 6.
- 20 25. A method for inducing an immune response in a subject, comprising delivering an effective amount of a compound of any of claims 1 to 6 to the subject.
26. The method of claim 25, wherein the compound is delivered in the context of an MHC molecule.
- 25 27. The method of claim 26, wherein the MHC molecule presents the compound on the surface of an antigen presenting cell.
- 30 28. The method of claim 25, wherein the compound is delivered as a polynucleotide that encodes the compound.

WO 01/92306

PCT/US01/17454

29. A method of immunotherapy, comprising administering to a subject an effective amount of an antibody of claim 24.
30. An immune effector cell that has been raised *in vitro* or *in vivo* in the presence and at the expense of an antigen presenting cell that presents the compound of any of claims 1 to 6 in the context of an MHC molecule.
5
31. A method of adoptive immunotherapy, comprising administering an effective amount of the immune effector cell of claim 30.
10
32. A composition comprising at least two immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of TLYKWHGFV (SEQ ID NO:3),
15 FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYV (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11) and KHFKPHGFS (SEQ ID NO:13).
32. The composition of claim 32, further comprising a biologically active immunoglobulin variable domain bound to said immunogenic ligands.
20
34. The composition of claim 32, further comprising an MHC molecule bound to said immunogenic ligands.
25
35. The composition of claim 32, wherein said immunogenic ligands are linked covalently.
30
36. The composition of claim 32, further comprising an agent covalently linked to said immunogenic ligands, wherein said agent is capable of targeting said immunogenic ligands to an antigen presenting cell.
37. The composition of claim 36, wherein said antigen presenting cell is a dendritic cell.
30

WO 01/92306

PCT/US01/17454

38. The composition of claim 32, further comprising an MHC class II binding helper peptide.

5 39. The composition of any of claims 32 to 38, further comprising a carrier.

40. The composition of claim 39, wherein the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

10 41. A host cell comprising at least two immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFYV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV (SEQ ID NO:7), FLHKWHWYV
15 (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11) and KHFPHGFS (SEQ ID NO:13).

42. The host cell of claim 41, wherein the host cell is an antigen presenting cell and the immunogenic ligands are presented on the surface of the cell.

20 43. The host cell of claim 42, wherein the antigen presenting cell is a dendritic cell.

44. A composition comprising the host cell of any of claims 41 to 43 and a carrier.

25 45. The composition of claim 44, wherein the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

46. A method for inducing an immune response in a subject, comprising delivering to the subject a composition comprising an effective amount of two or more immunogenic ligands, wherein each of said immunogenic ligands is characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of
30

WO 01/92306

PCT/US01/17454

FLYKWHGFV (SEQ ID NO:3), FLHKVHFVV (SEQ ID NO:5), FLHKWHWVV
(SEQ ID NO:7), FLIJKWHWYV (SEQ ID NO:9), FLHKVHYLV (SEQ ID NO:11)
and KHFKPHGFS (SEQ ID NO: 13).

WO 01/92306

PCT/US01/17454

SEQUENCE LISTING

<110> Charles Nicolette

<120> THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR OVARIAN CANCER

<130> 68126881209940

<140> Unassigned

<141> 2001-05-30

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2015

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gttttctact	ttggcccgcc	acatgttag	tttctctgc	gcgtgtgtcgt	tttcctctct	60
ccccggccct	cagggttcac	gtccaccatg	cggttattgg	ggcagcgatgt	cttcggccag	120
cattggccct	ttgcacggccg	gcacgcacat	cagggttgcgt	acgcgcmaac	ccacgcgtct	180
taaggccatgg	cgtgtatccc	ggggcggggt	gttcgtgtgt	gttcgtgtgt	ccggcgccgg	240
ttttggatgt	ttgggggtcg	gcgtggggcc	aggggcggtgc	cccaaaagggg	gaagcgattt	300
aacggacgc	cgggacacgt	gtgttttgtgt	tggtgtgtcc	cgacacgttc	gtgtgtctgg	360
gtatccggaa	cggtgtatgg	gtacccggac	tccttcccca	ggagccctac	agcccttcgg	420
cocccagcc	cgcaacgttd	caagggttctt	gggtgtgtgc	ccacgaaacg	tccaggaaacc	480
aatgtggccg	cggcaggccg	ggggcgggggg	cggtgtgtca	gggggggggg	ttggccggggc	540
gggtgtgtgt	gtgtgtatgg	gacgtgtgggg	cggtgtgttt	tccttttggc	ggccgggtgg	600
agaaatcccc	gggttccgtt	acgcgtccatt	ttagttggacc	tgatgtca	gcaggagggg	660
gtcaatcacac	ctggccctgtt	ccggatcttc	tagatggccg	abctagagaa	gttcccgccct	720
ataatgtgg	ggatggaaattt	ctcagacacat	ctaaacctta	atggggatgt	gtttttgtatt	780
ctcaattcagg	cttttcacccg	cattcagcag	cacgtgttgt	gttacccaca	magacacett	840
cgttaatcgc	atccatcccg	atccacccat	agacccgtca	catggccgaa	atgtgttcc	900
tgacgcggca	gtgtgtgtgt	ggggacttta	ttttcccccott	cgaccgtcg	ggttttgggg	960
ctgtggaaag	cattgggttctt	ttagatgttt	acgttgggtt	ggccaaacac	tccaaacctc	1020
atgggttttc	cggggacaaag	gtttttgggg	gttttttttt	atgggttgcgt	gtggatgggt	1080
tggttgcgtt	ctcccaaaaa	atgggggggg	atggcccttc	cgggatcgt	ttggatgttt	1140
agaaaaatgtt	tttgggggggg	tttgcgttttt	tttttttttt	gggttttttt	tttttttttt	1200
ccatggccat	tgacccatcg	tttgcgtttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1260
tccaggccat	taataaaggcg	ccctcccgaa	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1320
gttttttttttt	atccggccat	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1380
cggggccat	gttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1440
atataactgtt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1500
gcataaaagg	ggaagacacc	ctttccatgtt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1560
cttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1620
atatccatgtt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1680
atgttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1740
atgttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1800
aaaacaaaggat	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1860
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1920
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1980
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2015

WO 01/92306

PCT/US01/17454

<210> 2
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Thr Glu Met Ser Phe Leu Ser Ser Glu Val Leu Val Gly Asp Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Pro Phe Asp Pro Ser Gly Leu Gly Ala Glu Glu Ser Leu Gly
 20 25 30
 Leu Leu Asp Asp Tyr Leu Glu Val Ala Lys His Phe Lys Pro His GLY
 35 40 45
 Phe Ser Ser Asp Lys Ala Lys Ala Gly Ser Ser Glu Trp Leu Ala Val
 50 55 60
 Asp Gly Leu Val Ser Pro Ser Asn Asn Ser Lys Glu Asp Ala Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Thr Asp Trp Met Leu Glu Lys Met Asp Leu Lys Glu Phe Asp Leu
 85 90 95
 Asp Ala Leu Leu Gly Ile Asp Asp Leu Glu Thr Met Pro Asp Asp Leu
 100 105 110
 Leu Thr Thr Leu Asp Asp Thr Cys Asp Leu Phe Ala Pro Leu Val Glu
 115 120 125
 Glu Thr Asn Lys Gln Pro Pro Gln Thr Val Asn Pro Ile Gly His Leu
 130 135 140
 Pro Glu Ser Leu Thr Lys Pro Asp Gln Val Ala Pro Phe Thr Phe Leu
 145 150 155 160
 Glu Pro Leu Pro Leu Ser Pro Gly Val Leu Ser Ser Thr Pro Asp His
 165 170 175
 Ser Phe Ser Leu' Glu Leu Gly Ser Glu Val Asp Ile Thr Glu Gly Asp
 180 185 190
 Arg Lys Pro Asp Tyr Thr Ala Tyr Val Ala Met Ile Pro Glu Cys Ile
 195 200 205
 Lys Glu Glu Asp Thr Pro Ser Asp Asn Asp Ser Gly Ile Cys Met Ser
 210 215 220
 Pro Glu Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Gln His Ser Pro Ser Thr Arg Gly
 225 230 235 240
 Ser Pro Asn Arg Ser Leu Pro Ser Pro Gly Val Leu Cys Gly Ser Ala
 245 250 255
 Arg Pro Lys Pro Tyr Asp Pro Pro Gly Glu Lys Met Val Ala Ala Lys
 260 265 270
 Val Lys Gly Glu Lys Leu Asp Lys Lys Leu Lys Met Glu Gln Asn
 275 280 285
 Lys Thr Ala Ala Thr Arg Tyr Arg Gln Lys Lys Arg Ala Glu Gln Glu
 290 295 300
 Ala Leu Thr Gly Glu Cys Iys Glu Leu Glu Lys Lys Asn Glu Ala Leu
 305 310 315 320
 Lys Glu Arg Ala Asp Ser Leu Ala Lys Glu Ile Gln Tyr Leu Lys Asp
 325 330 335
 Leu Ile Glu Glu Val Arg Lys Ala Arg Gly Lys Lys Arg Val Pro
 340 345 350

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

WO 01/92306

PCT/US01/17454

```

<223> ATF4/CREB-2
<400> 3
Phe Leu Tyr Lys Tyr His Gly Phe Val
1           5

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<233> ATF4/CREB-2

<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n is A, C, G or T

<400> 4
tttccatataa artggcaygg nttygtt
27

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<233> ATF4/CREB-2

<400> 5
Phe Leu His Lys Val His Phe Tyr Val
1           5

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<233> ATF4/CREB-2

<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n is A, C, G or T

```

WO 01/92306

PCT/US01/17454

```

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n is A, C, G or T

<400> 6
tttgcgtcayta argtncayttt tctatgtt

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ATF4/CREB-2

<400> 7
Phe Leu His Lys Trp His Trp Val Val
1                               5

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ATF4/CREB-2

<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n is A, C, G or T

<400> 8
tttgcgtcayta argtggcaytg ggttgtt

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ATF4/CREB-2

<400> 9
Phe Leu His Lys Trp His Trp Tyr Val
1                               5

<210> 10
<211> 27
<212> DNA

```

WO 01/92306

PCT/US01/17454

```
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ATF4/CREB-2
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n is A, C, G or T
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n is A, C, G or T
<400> 10
tttytncaya artsgcaytg staygta
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ATF4/CREB-2
<400> 11
Phe Leu His Lys Val His Tyr Leu Val
1 . 5 .
<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ATF4/CREB-2
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n is A, C, G or T
<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n is A, C, G or T
<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> n is A, C, G or T
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n is A, C, G or T
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n is A, C, G or T
<400> 12
```

WO 01/92306

PCT/US01/17454

ttyytncaya argtncayta yntngtn
<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> ATF4/CREB-2

<400> 13
Lys His Phe Lys Pro His Gly Phe Ser
1 5

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ATF4/CREB-2

<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> n is A, C, G or T

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n is A, C, G or T

<400> 14
sarcayttrya arocncaygg nttywsn

27

【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
6 December 2001 (06.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/092306 A3

(51) International Patent Classification*: C07K 14/47, A61K 39/00, 39/395, C12N 50/6, 15/12, C07K 16/18

(21) International Application Number: PCT/US01/17454

(22) International Filing Date: 30 May 2001 (30.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/209,388 31 May 2000 (31.05.2000) US
60/257,007 20 December 2000 (20.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 01139 (US).

(72) Inventor: and
(73) Inventor/Applicant (for US only): NICOLETTE, Charles, A. [US/US]; 4 Mel Street, Framingham, MA 01701 (US).

(74) Agent: KONSKI, Antoinette, E. McCutchen Doyle Brown & Enersen LLP, Three Embarcadero Center, Suite 1800, San Francisco, CA 94111-1067 (US).

(81) Designated States (notional): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SL, SG, SI, SK, SL,
TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, EL, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
8 August 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide
to Patent Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/092306 A3

(54) Title: THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR OVARIAN CANCER

(57) Abstract: The present invention provides synthetic compounds based on the native human cancer antigen A133/CR133-2 antibodies that recognize and bind to these compounds polynucleotides that encode these compounds, and immun effector cells raised in response to the presentation of these epitopes. The invention further provides methods for inducing an immune response and administering immunotherapy to a subject by delivering the compositions of the invention.

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/17454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC 7 C07K14/47	A61K39/00 A61K39/395 C12N5/16 C12N15/12
C07K16/18	

According to International Patent Classification (IPC) or in both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

National documentation examined (specification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, CHEM ABS Data, EMBL, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TSUJIMOTO A ET AL.: "Isolation of cDNA-Binding Proteins Which Specifically Bind to a Tax-Responsive Enhancer Element in the Long Terminal Repeat of Human T-Cell Leukemia Virus Type I" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 65, no. 3, March 1991 (1991-03), pages 1420-1426, XP008001485 figure 2, aa 42-50 -/-	22

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E earlier document not published on or after the international filing date
- *U document which may throw doubt on novelty, claim(s) or which is used to establish the publication date of another invention or other special reason (as specified)
- *D 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

*A: after document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but which is made stand the principle or theory underlying the invention

*U: document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the invention is taken alone

*Y: document which may throw doubt on novelty, claim(s) or which is used to establish the publication date of another invention or other special reason (as specified); 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

*D: document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

19 April 2002

10/05/2002

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

European Patent Office, P.O. Box 5010 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (31-70) 310-2040, Fax: (31-70) 310-3046

Schmidt, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No	
PCT/US 01/17454	

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KARPINSKI BA ET AL.: "Molecular cloning of human CREB-2: An ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE USA, vol. 89, June 1992 (1992-06), pages 4820-4824, XP002196774 abstract	22
X	& DATABASE EMBL 'Online' Accession no. M86842, 4 March 2000 (2000-03-04)	22
A	US 5 688 657 A (TSANG ET AL.) 18 November 1997 (1997-11-18) column 3, line 24 – line 50; claim 1 -----	

Form PCT/ISA2.10 (continuation of record sheet) (Rev. 1/92)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/17454

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5686657	A	18-11-1997	AU 3587095 A		29-03-1996
			CA 2199740 A1		21-03-1996
			EP 0777690 A1		11-06-1997
			JP 10505749 T		09-06-1998
			WO 9608514 A1		21-03-1996
			ZA 9507634 A		27-05-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/74	C 0 7 K 14/74	
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/44	C 0 7 K 16/44	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 N 5/10	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,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA05 CA06 CA07 DA03 EA04 GA11 GA18 HA03
 HA08 HA12 HA14
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA13 AA14 NA10 ZB262
 4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB41 BB43 CC02 CC32 DD62 DD63
 DD88 GG02 GG03 GG04 GG05
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15 BA41 CA41 DA50 DA75 DA86
 EA28 FA72 FA74 GA22 GA23 GA26