



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 383 T2 2007.11.15**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 165 778 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 383.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/02048**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 910 793.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/053748**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.03.2000**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **14.09.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **18.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

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

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9905607 11.03.1999 GB

9920590 01.09.1999 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rixensart, BE

(72) Erfinder:

BRUCK, Claudine Elvire Marie, 1330 Rixensart,

BE; CASSART, Jean-Pol, 1330 Rixensart, BE;

COCHE, Thierry, 1330 Rixensart, BE; VINALS Y DE

BASSOLS, Carlota, 1330 Rixensart, BE

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITL, 81925 München

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON CASB618 POLYNUCLEOTIDE UND POLYPEPTIDE**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verwendungen von Polynukleotiden, hier als CASB618-Polynukleotide bezeichnet, oder die Verwendungen von Polypeptiden, die dadurch codiert werden (hier als CASB618-Polypeptide bezeichnet), zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs und ein Verfahren zum Diagnostizieren von Darmkrebs. Polypeptide und Polynukleotide in der vorliegenden Erfindung sind wichtige Immunogene für spezifische prophylaktische oder therapeutische Immunisierungen gegen Tumore, da sie, verglichen mit normalen Zellen, spezifisch exprimiert oder in Tumoren stark überexprimiert werden und durch antigenspezifische Immunmechanismen ins Ziel genommen werden können, welche zur Zerstörung der Tumorzelle führen. Sie können auch verwendet werden, um das Auftreten von Tumorzellen zu diagnostizieren. Des Weiteren kann ihre ungewünschte Expression unter einigen Umständen die Induktion ungewünschter Autoimmunantworten verursachen, die durch eine passende Impfung unter Verwendung der gleichen Polypeptide oder Polynukleotide korrigiert werden kann. In dieser Hinsicht sind die wichtigsten biologischen Eigenschaften die antigenen und immunogenen Wirkungen der Polypeptide, die hier beschrieben werden. Ein hier beschriebenes Polypeptid kann auch mindestens eine andere biologische Wirkung eines CASB618-Polypeptids aufweisen, welche es als Ziel für die therapeutische oder prophylaktische Intervention qualifiziert, die von der verschieden ist, die seine Verwendung als Immuntherapeutikum betrifft.

[0002] Funktionale Gentechnik beruht stark auf Hoch-Durchsatz-DNA-Sequenzieretechniken und den verschiedenen Werkzeugen der Bioinformatik, um Gensequenzen von potenziellem Interesse aus den vielen jetzt verfügbaren molekularbiologischen Datenbanken zu identifizieren. Es können cDNA-Bibliotheken, die mit Genen von Relevanz für eine bestimmtes Gewebe oder eine physiologische Situation angereichert sind, unter Verwendung kürzlich entwickelter Subtraktionsklonierungsstrategien konstruiert werden. Des Weiteren können cDNAs, die in Bibliotheken einiger Gewebe, aber nicht in anderen gefunden werden, unter Verwendung geeigneter elektronischer Durchmusterungsverfahren identifiziert werden.

[0003] Hoch-Durchsatz-Genom- oder auf Genen beruhende Biologie ermöglicht neue Ansätze zur Identifizierung und Klonierung von Zielgenen für nützliche Immunreaktionen zur Prävention und Impftherapie gegen Erkrankungen wie Krebs und Autoimmunität.

[0004] In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendungen von CASB618-Polypeptiden. Solche Peptide schließen isolierte Polypeptide ein, die eine Aminosäuresequenz umfassen, die mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 95 % Identität, am meisten bevorzugt mindestens 97–99 % Identität mit der in SEQ ID NO:2, über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2, hat. Solche Polypeptide schließen solche ein, die die Aminosäure von SEQ ID NO:2 umfassen.

[0005] Weitere hier beschriebene Peptide schließen isolierte Polypeptide ein, in denen die Aminosäuresequenz mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 95 % Identität, am meisten bevorzugt mindestens 97–99 % Identität zur Aminosäuresequenz in SEQ ID NO:2 über die Gesamtlänge der SEQ ID NO:2, hat. Solche Polypeptide schließen das Polypeptid der SEQ ID NO:2 ein.

[0006] Weitere hier beschriebene Peptide schließen isolierte Polypeptide ein, die durch ein Polynukleotid codiert werden, welche die Sequenz umfassen, die in SEQ ID NO:1 enthalten ist.

[0007] Die Erfindung stellt auch die Verwendungen eines immunogenen Fragments eines CASB618-Polypeptids bereit, welches ein durchgehender Teil des CASB618-Polypeptids ist, welches die gleichen oder ähnliche immunogene Eigenschaften wie das Polypeptid hat, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:2 umfasst. Das heißt, dass das Fragment (falls notwendig, wenn es an einen Träger gebunden ist) in der Lage ist, eine Immunreaktion auszulösen, die das CASB618-Polypeptid erkennt. Ein solches immunogenes Fragment kann beispielsweise das CASB618-Polypeptid umfassen, dem die N-terminale Leadersequenz fehlt, eine Transmembrandomäne oder die C-terminale Ankerdomäne. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße CASB618 im wesentlichen die gesamte extrazelluläre Domäne eines Polypeptids, welches mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 95 % Identität, am meisten bevorzugt mindestens 97–99 % Identität mit der in SEQ ID NO:2 über die Gesamtlänge der SEQ ID NO:2 hat.

[0008] Peptidfragmente, die ein Epitop von CASB618 einschließen, umfassen typischerweise mindestens 7, bevorzugt 9 oder 10 durchgehende Aminosäuren der SEQ ID NO:2. Bevorzugte Epitope sind in den SEQ ID

NO:5 bis SEQ ID NO:77 gezeigt.

[0009] Verwendungen von Peptiden, die diese Epitope einschließen, bilden einen bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung. Mimotope, die die gleichen Eigenschaften haben wie diese Epitope, und Immunogene, die solche Mimotope umfassen, welche eine Immunreaktion erzeugen, die mit einem Epitop im Kontext des CASB618-Moleküls kreuzreagiert, bilden ebenfalls einen Teil der vorliegenden Erfindung.

[0010] Die vorliegende Erfindung schließt daher die Verwendungen isolierter Peptide ein, die diese Epitope selbst umfassen, und jedes Mimotop davon. Die Bedeutung eines Mimotops wird als eine Entität definiert, die hinreichend ähnlich zum nativen CASB618-Epitop ist, so dass sie in der Lage ist, durch Antikörper erkannt zu werden, die das native Molekül erkennen (Gheysen, H.M., et al., 1986, Synthetic peptides as antigens. Wiley, Chichester, Ciba foundation symposium 119, Seiten 130–149; Gheysen, H.M., 1986, Molecular Immunology, 23,7,709–715); oder die in der Lage sind, Antikörper hervorzurufen, wenn sie an geeignete Träger gebunden werden, wobei die Antikörper mit dem nativen Molekül kreuzreagieren.

[0011] Peptid-Mimotope der oben identifizierten Epitope können für einen besonderen Zweck durch Addition, Deletion oder Substitution ausgewählter Aminosäuren entworfen werden. So können die erfindungsgemäßen Peptide für die Zwecke der Erleichterung der Konjugierung an einen Proteinträger modifiziert werden. Es kann beispielsweise für einige chemische Konjugierungsverfahren wünschenswert sein, ein terminales Cystein am Epitop einzuschließen. Zusätzlich kann es für Peptide wünschenswert sein, die an einen Proteinträger gebunden sind, einen hydrophoben Terminus distal vom konjugierten Terminus des Peptids einzuschließen, so dass das freie, nichtkonjugierte Ende des Peptids mit der Oberfläche des Trägerproteins assoziiert bleibt. Das reduziert die Konformationsfreiheitsgrade des Peptids und erhöht daher die Wahrscheinlichkeit, dass das Peptid in einer Konformation präsentiert wird, die am ehesten dem Peptid ähnelt, das im Kontext des gesamten Moleküls gefunden wird. Die Peptide können beispielsweise so verändert werden, dass sie ein N-terminales Cystein und einen C-terminalen hydrophoben amidierten Anhang besitzen. Alternativ dazu kann die Addition oder Substitution einer D-Stereoisomerform einer oder mehrerer der Aminosäuren durchgeführt werden, um ein günstiges Derivat zu erzeugen, z.B. um die Stabilität des Peptids zu steigern. Fachleute im Gebiet werden erkennen, dass solche modifizierten Peptide oder Mimotope vollständig oder teilweise Nicht-Peptid-Mimotope sein können, wobei die konstituierenden Reste nicht notwendigerweise auf die 20 natürlich auftretenden Aminosäuren beschränkt sind. Zusätzlich können sie durch im Stand der Technik bekannte Techniken cyclisiert werden, um das Peptid in einer Konformation zu halten, das seiner Form stark ähnelt, wenn die Peptidsequenz im Kontext des Gesamtmoleküls ist. Ein bevorzugtes Verfahren zur Cyclisierung eines Peptids umfasst die Addition eines Paares aus Cysteinresten, um die Bildung einer Disulfidbrücke zu ermöglichen.

[0012] Weiter werden Fachleute auf dem Gebiet erkennen, dass Mimotope oder Immunogene der vorliegenden Erfindung größer als die oben identifizierten Epitope sein können, und als solche die hier offenbarten Sequenzen umfassen können. Daher können die erfindungsgemäßen Mimotope aus der Addition von N- und/oder C-terminalen Verlängerungen einer Anzahl anderer natürlicher Reste an einem oder beiden Enden bestehen. Die Peptid-Mimotope können ebenfalls Retrosequenzen natürlicher Sequenzen sein, indem die Sequenzorientierung umgedreht ist; oder alternativ können die Sequenzen vollständig oder mindestens zum Teil aus D-Stereoisomeraminosäuren umfasst sein (Inversosequenzen). Die Peptidsequenzen können ebenfalls retro-invers in ihrer Eigenschaft sein, in der Hinsicht, dass die Sequenzorientierung revertiert ist, und die Aminosäuren von D-Stereoisomerform sind. Solche Retro- oder Retro-Inversopeptide haben den Vorteil, nicht-selbst zu sein, und als solche können sie die Probleme der Selbsttoleranz des Immunsystems überwinden.

[0013] Alternativ dazu können Peptid-Mimotope unter Verwendung von Antikörpern identifiziert werden, die selbst in der Lage sind, an die erfindungsgemäßen Epitope zu binden, indem Techniken, die die Phagendisplaytechnologie (EP 0 552 267 B1) verwendet werden. Diese Technik erzeugt eine große Anzahl an Peptidsequenzen, die die Struktur der nativen Peptide nachahmen und daher in der Lage sind, an anti-native Peptidantikörper zu binden, aber sie brauchen nicht notwendigerweise selbst signifikante Sequenzhomologie mit dem nativen Peptid teilen. Dieser Ansatz kann signifikante Vorteile haben, indem er die Möglichkeit der Identifizierung eines Peptids mit verstärkten immunogenen Eigenschaften ermöglicht, oder kann jegliche potenzielle Selbst-Antigen-Toleranzprobleme überwinden, die mit der Verwendung einer nativen Peptidsequenz assoziiert sind. Zusätzlich ermöglicht diese Technik die Identifizierung eines Erkennungsmusters für jedes native Peptid im Hinblick auf seine mit erkannten Mimotopsequenzen geteilten chemischen Eigenschaften.

[0014] Die kovalente Bindung des Peptids an den immunogenen Träger kann in einer Weise durchgeführt werden, die im Stand der Technik gut bekannt ist. So kann es beispielsweise für die direkte kovalente Bindung

möglich sein, ein Carbodiimid, Glutaraldehyd oder (N-[γ -Maleimidobutyryloxy]succinimidester zu verwenden, indem gewöhnliche, kommerziell erhältliche heterobifunktionale Linker, wie CDAP und SPDP (unter Verwendung der Instruktionen der Hersteller) verwendet werden. Nach der Bindungsreaktion kann das Immunogen leicht mit Hilfe eines Dialyseverfahrens, eines Gelfiltrationsverfahrens, eines Fraktionsverfahrens etc. isoliert und gereinigt werden.

[0015] Die Arten von Trägern, die in dem Immunogenen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, werden dem Fachmann auf dem Gebiet leicht erkennbar sein. Die Funktion des Trägers liegt darin, Cytokinhilfe bereitzustellen, um zu helfen, eine Immunreaktion gegen das Peptid auszulösen. Eine nicht erschöpfende Liste von Trägern, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließt ein: Keyhole limpet Häemocyanin (KLH), Serumalbumine, wie Rinderserumalbumin (BSA), inaktivierte Bakterientoxine, wie Tetanus- oder Diphtherietoxine (TT und DT) oder rekombinante Fragmente davon (z.B. Domäne 1 des Fragments C von TT, oder die Translokationsdomäne von DT) oder das gereinigte Proteinderivat von Tuberculin (PPD). Alternativ dazu können die Mimotope oder Epitope direkt an Liposomenträger konjugiert werden, die zusätzlich Immunogene umfassen können, die in der Lage sind, T-Zell-Hilfe bereitzustellen. Bevorzugterweise ist das Verhältnis von Mimotopen zum Träger in einer Größenordnung von 1:1 bis 20:1 und bevorzugt sollte jeder Träger zwischen 3–15 Peptide tragen.

[0016] In einer Ausführungsform der Erfindung ist ein bevorzugter Träger das Protein D von Haemophilus influenzae (EP 0 594 610 B1). Das Protein D ist ein IgD-bindendes Protein von Haemophilus influenzae und ist von Forsgren patentiert worden (WO 91/18926, erteilt EP 0 594 610 B1). Unter einigen Umständen, beispielsweise in rekombinanten Immunogen-Expressionssystemen, kann es wünschenswert sein, Fragmente von Protein D zu verwenden, z.B. Protein D 1/3rd (umfassend die N-terminalen 100–110 Aminosäuren des Proteins D (GB 9717953.5)).

[0017] Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zum Präsentieren der hier beschriebenen Peptide liegt im Kontext eines rekombinanten Fusionsmoleküls. Beispielsweise beschreibt EP 0 421 635 B die Verwendung chimärer Hepadnavirus-Kernantigenpartikel, um Fremd-Peptidsequenzen in einem virusartigen Partikel zu präsentieren. Als solche können Immunogene der vorliegenden Erfindung Peptide umfassen, die in chimären Partikeln, die aus dem Hepatitis B-Kernantigen bestehen, präsentiert werden. Zusätzlich können die rekombinanten Fusionsproteine die Mimotope der vorliegenden Erfindung und ein Trägerprotein, wie NS1 des Influenzavirus umfassen. Für jedes rekombinant exprimierte Protein, das einen Teil der Erfindung bildet, bildet auch die Nukleinsäure, welche dieses Immunogen codiert, einen Aspekt der Erfindung.

[0018] Erfindungsgemäß verwendete Peptide können leicht durch Festphasenverfahren synthetisiert werden, die im Fachgebiet gut bekannt sind. Geeignete Synthesen können durchgeführt werden, indem "T-boc"- oder "F-moc"-Verfahren durchgeführt werden. Cyclische Peptide können durch das Festphasenverfahren unter Verwendung des gut bekannten "F-moc"-Verfahrens und eines Polyamidharzes in vollständig automatisierten Apparaten synthetisiert werden. Alternativ dazu werden Fachleute auf dem Gebiet die notwendigen Laborverfahren kennen, um das Verfahren manuell durchzuführen. Techniken und Verfahren für die Festphasensynthese sind beschrieben in "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" von E. Atherton und R.C. Sheppard, veröffentlicht von IRL der Oxford University Press (1989). Alternativ dazu können die Peptide durch rekombinante Verfahren hergestellt werden, einschließlich des Exprimierens von Nukleinsäuremolekülen, die die Mimotope codieren, in einer bakteriellen oder Säugerzelllinie, gefolgt von der Reinigung des exprimierten Mimotops. Techniken für die rekombinante Expression von Peptiden und Proteinen sind im Fachgebiet bekannt, und werden in Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2. Ausgabe; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) beschrieben.

[0019] Die hier beschriebenen Polypeptide oder immunogenen Fragmente können in der Form des "reifen" Proteins vorliegen, oder können ein Teil eines größeren Proteins, wie eines Vorläufers oder eines Fusionsproteins sein. Es ist häufig vorteilhaft, eine zusätzliche Aminosäuresequenz einzuschließen, die sekretorische oder Leadersequenzen enthält, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die bei der Reinigung helfen, wie mehrere Histidinreste, oder zusätzliche Sequenzen zur Stabilität während der rekombinanten Produktion. Außerdem wird die Addition eines exogenen Polypeptids oder eine Lipidanhangs oder von Polynukleotidsequenzen zur Erhöhung des immunogenen Potenzials des endgültigen Moleküls ebenfalls in Betracht gezogen.

[0020] In einem Aspekt betrifft die Erfindung Verwendungen genetisch erzeugter löslicher Fusionsproteine, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung umfassen, oder ein Fragment davon, und verschiedene Portionen der konstanten Regionen der schweren oder leichten Ketten von Immunoglobulinen von verschiedenen Subklassen (IgG, IgM, IgA, IgE). Bevorzugt als Immunoglobulin ist der konstante Teil der schweren Kette des

menschlichen IgG, besonders IgG1, wobei die Fusion in der Scharnierregion stattfindet. In einer besonderen Ausführungsform kann der Fc-Teil einfach durch Einschließen einer Spaltungssequenz entfernt werden, die mit dem Blutgerinnungsfaktor Xa gespalten werden kann. Außerdem betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Fusionsproteine durch Gendesign, und die Verwendung davon für das Medikamentenscreening, die Diagnose und Therapie. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft auch die Verwendungen der Polynukleotide, die solche Fusionsproteine codieren. Beispiele für Fusionsproteintechnologie können in den internationalen Patentanmeldungen mit den Nummern WO94/29458 und WO94/22914 gefunden werden.

[0021] Die Proteine können chemisch konjugiert werden, oder als rekombinante Fusionsproteine exprimiert werden, welche ermöglichen, dass in einem Expressionssystem erhöhte Niveaus produziert werden, verglichen mit einem Nicht-Fusionsprotein. Der Fusionspartner kann dabei helfen, T-Helfer-Epitope bereitzustellen (immunologische Fusionspartner), bevorzugt T-Helfer-Epitope, die von Menschen erkannt werden, oder dabei helfen, das Protein in höheren Mengen als das native rekombinante Protein zu exprimieren (Expressionsverstärker). Bevorzugt wird der Fusionspartner sowohl ein immunologischer Fusionspartner und ein Expressionssteigerungspartner sein.

[0022] Fusionspartner schließen Protein D von Haemophilus influenza B und das Nicht-Strukturprotein von Influenzavirus, NS1 (Hämagglutinin), ein. Ein weiterer immunologischer Fusionspartner ist das Protein, das als LYTA bekannt ist. Bevorzugt wird der C-terminale Teil des Moleküls verwendet. Lyta stammt aus Streptococcus pneumoniae, welches eine N-Acetyl-L-alanin-amidase, Amidase LYTA, synthetisiert (codiert durch das lytA-Gen {Gene, 43 (1986) Seiten 265–272} ein Autolysin, das spezifisch bestimmte Bindungen in dem Peptidoglycangerüst degradiert. Die C-terminale Domäne des LYTA-Proteins ist für die Affinität an Cholin oder an einige Cholinanaloga, wie DEAE, verantwortlich. Diese Eigenschaft ist für die Entwicklung von E. coli C-LYTA-Expressionsplasmiden ausgenutzt worden, die für die Expression von Fusionsproteinen nützlich sind. Die Reinigung von Hybridproteinen, die das C-LYTA-Fragment an ihrem Aminoterminus enthalten, ist beschrieben worden (Biotechnology: 10, (1992) Seiten 795–798). Es ist möglich, den wiederholten Teil des Lyta-Moleküls zu verwenden, der im C-terminalen Ende gefunden wird, und beim Rest 178 beginnt, z.B. die Reste 188–305.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verwendungen von Varianten der zuvor erwähnten Polypeptide, d.h. Polypeptide, die von den angegebenen, durch konservative Aminosäuresubstitutionen variieren, wobei ein Rest durch einen anderen mit ähnlichen Charakteristiken substituiert wurde. Typisch sind solche Substitutionen zwischen Ala, Val, Leu und Ile; und zwischen Ser und Thr, zwischen den sauren Resten Asp und Glu; zwischen Asn und Gln; und zwischen den basischen Resten Lys und Arg; oder den aromatischen Resten Phe und Tyr. Besonders bevorzugt sind Varianten, in denen mehrere, 5–10, 1–5, 1–3, 1–2 oder 1 Aminosäure substituiert, deletiert oder in irgendeiner Form hinzugefügt sind.

[0024] Die hier beschriebenen Polypeptide können auf jede geeignete Weise hergestellt werden. Solche Polypeptide schließen isolierte, natürlich auftretende Polypeptide ein, rekombinant produzierte Polypeptide, synthetische produzierte Polypeptide oder Polypeptide, die durch eine Kombination dieser Methoden hergestellt wurden. Mittel zum Herstellen solcher Polypeptide sind im Fachgebiet wohlverstanden.

[0025] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verwendungen der CASB618-Polynukleotide. Solche Polynukleotide schließen isolierte Polynukleotide ein, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die ein Polypeptid codieren, welches mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr vorzuziehen mindestens 95 % Identität mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 über die gesamte Länge der SEQ ID NO:2 haben. In dieser Hinsicht werden Polypeptide, die mindestens 97 % Identität haben, stark bevorzugt, während solche, mit mindestens 98–99 % Identität noch mehr bevorzugt sind, und solche mit mindestens 99 % Identität am stärksten bevorzugt werden. Solche Polynukleotide schließen ein Polynukleotid ein, das die Nukleotidsequenz umfasst, die in SEQ ID NO:1 enthalten ist, welche das Polypeptid SEQ ID NO:2 codiert.

[0026] Weitere Polynukleotide, die hier beschrieben werden, schließen isolierte Polynukleotide ein, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die über den gesamten codierenden Bereich mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 95 % Identität mit einer Nukleotidsequenz hat, die ein Polypeptid mit der SEQ ID NO:2 codiert. In dieser Hinsicht sind Polynukleotide, die mindestens 97 % Identität haben, stark bevorzugt, während solche mit mindestens 98–99 % Identität stärker bevorzugt sind, und solche mit mindestens 99 % Identität am meisten bevorzugt sind.

[0027] Weitere Polynukleotide, die hier beschrieben sind, schließen isolierte Polynukleotide ein, die eine Nu-

kleotidsequenz umfassen, die mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 95 % Identität mit SEQ ID NO:1 über die Gesamtlänge der SEQ ID NO:1 haben. In dieser Hinsicht sind Polynukleotide, die mindestens 97 % Identität haben, stark bevorzugt, während solche mit mindestens 98–99 % Identität am stärksten bevorzugt sind und solche mit mindestens 99 % Identität am stärksten bevorzugt sind. Solche Polynukleotide schließen ein Polynukleotid ein, das das Polynukleotid der SEQ ID NO:1 umfasst, wie auch das Polynukleotid der SEQ ID NO:1. Dieses Polynukleotid kann in ein geeignetes Plasmid oder in einen rekombinanten Mikroorganismusvektor eingebaut werden und für die Immunisierung verwendet werden (siehe z.B. Wolff et. al., *Science* 247:1465–1468 (1990); Corr et. al., *J. Exp. Med.* 184:1555–1560 (1996); Doe et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8578–8583 (1996)). Ebenfalls offenbart sind Polynukleotide, die komplementär zu allen oben beschriebenen Polynukleotiden sind.

[0028] Die Erfindung stellt auch die Verwendung eines Fragments eines CASB618-Polynukleotids zur Herstellung eines Medikaments bereit, welches, wenn es einem Individuum verabreicht wird, die gleichen immunogenen Eigenschaften hat, wie das Polynukleotid der SEQ ID NO:1.

[0029] Die Erfindung stellt auch die Verwendung eines Polynukleotids bereit, das ein immunologisches Fragment des CASB618-Polypeptids codiert, das zuvor definiert wurde.

[0030] Die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 zeigt Homologien mit dem Homo sapiens-Chromosom 15 Klon 163_P_10 map 15 (Zugang GB_HTG4:A0009700). Die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 ist eine cDNA-Sequenz und umfasst eine ein Polypeptid codierende Sequenz (Nukleotide 259 bis 1219), welche ein Polypeptid von 320 Aminosäuren codiert, das Polypeptid der SEQ ID NO:2. Die Nukleotidsequenz, die das Polypeptid der SEQ ID NO:2 codiert, kann mit der Polypeptid codierenden Sequenz identisch sein, die in SEQ ID NO:1 enthalten ist, oder sie kann eine Sequenz sein, die anders ist als die, die in SEQ ID NO:1 enthalten ist, welche aufgrund der Redundanz (Degeneriertheit) des genetischen Codes auch das Polypeptid der SEQ ID NO:2 codiert. Das Polypeptid der SEQ ID NO:2 ist mit keinem anderen Protein bekannter Funktion verwandt, außer mit dem hypothetischen 42,1 kd-Protein c06e1.3 (Zugang P34298) aus *Caenorhabditis elegans*.

[0031] Bevorzugte Polypeptide und Polynukleotide für die erfindungsgemäßen Verwendungen haben erwartungsgemäß unter anderem ähnliche biologische Funktionen/Eigenschaften mit ihren homologen Polypeptiden und Polynukleotiden. Weiter haben bevorzugte Polypeptide, immunologische Fragmente und Polynukleotide für die erfindungsgemäßen Verwendungen mindestens eine Aktivität von entweder SEQ ID NO:1 bzw. SEQ ID NO:2.

[0032] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verwendungen von Teil- oder unvollständigen Polynukleotiden und von Polypeptidsequenzen, die zuerst vor der Bestimmung der entsprechenden Sequenzen vollständiger Länge in SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 identifiziert wurden.

[0033] Daher stellt die vorliegende Erfindung in einem weiteren Aspekt Verwendungen eines isolierten Polynukleotids bereit, welches:

- (a) eine Nukleotidsequenz umfasst, die über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:3 mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr vorzuziehen mindestens 95 % Identität, noch mehr vorzuziehen mindestens 97–99 % Identität mit SEQ ID NO:3 hat;
- (b) eine Nukleotidsequenz hat, die über die Gesamtlänge der SEQ ID NO:3 mindestens 70 % Identität, bevorzugt mindestens 80 % Identität, mehr bevorzugt mindestens 90 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 95 % Identität, noch mehr bevorzugt mindestens 97–99 % Identität mit SEQ ID NO:1 hat;
- (c) das Polynukleotid der SEQ ID NO:3.

[0034] Die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:3 stammt von EST-Sequenzen (Expressed Sequence Tag). Es ist von Fachleuten anerkannt, dass es unweigerlich einige Nukleotidsequenz-Lesefehler in EST-Sequenzen geben wird (siehe Adams, M. D. et al, *Nature* 377 (supp) 3, 1995). Daher ist die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:3 den gleichen inhärenten Beschränkungen der Sequenzgenauigkeit unterworfen.

[0035] Hier beschriebene Polynukleotide können unter Verwendung von Standard-Klonierungs- und Screeningtechniken aus einer cDNA-Bibliothek, die von der mRNA in Zellen eines menschlichen Darmkrebs, Lungenkrebs, Gebärmutterkrebs und fötaler Gewebe stammt (z.B. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), gewonnen werden. Polynukleotide der Erfindung können ebenfalls aus natürlichen Quellen, wie genomischen DNA-Bibliotheken gewonnen werden oder können unter Verwendung gut bekannter und kommerziell erhältlicher Tech-

niken synthetisiert werden.

[0036] Wenn Polynukleotide, die hier beschrieben sind, für die rekombinante Produktion von Polypeptiden, die hier beschrieben sind, verwendet werden, kann das Polynukleotid die codierende Sequenz des reifen Polypeptids selbst einschließen; oder die codierende Sequenz für das reife Polypeptid in einem Leseraster mit anderen codierenden Sequenzen, wie solchen, die eine Leader- oder Sekretionssequenz, eine prä-, oder pro- oder präpro-Proteinsequenz codieren, oder andere Fusionsbestandteile. Beispielsweise kann eine Markersequenz, die die Reinigung des fusionierten Polypeptids erleichtert, codiert sein. In einigen bevorzugten Ausführungsformen dieses Aspekts der Erfindung ist die Markersequenz ein Hexa-Histidinpeptid, wie im pQE-Vektor (Qiagen, Inc.) bereitgestellt und beschrieben in Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821–824, oder sie ist ein HA tag. Das Polynukleotid kann auch nicht-codierende 5'- und 3'-Sequenzen enthalten, beispielsweise transkribierte, nicht-translatierte Sequenzen, Splicing- und Polyadenylierungssignale, Ribosomenbindungsstellen und Sequenzen, die mRNA stabilisieren.

[0037] Weitere hier beschriebene Ausführungsformen schließen Polynukleotide ein, die Polypeptidvarianten codieren, welche die Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 umfassen, und in denen mehrere, beispielsweise von 5 bis 10, 1 bis 5, 1 bis 3, 1 bis 2 oder 1 Aminosäurereste substituiert, deletiert oder addiert werden, und jede Kombination daraus.

[0038] Polynukleotide, die identisch oder ausreichend identisch mit einer Nukleotidsequenz sind, die in SEQ ID NO:1 enthalten ist, können als Hybridisierungs sonden für cDNA und genomische DNA oder als Primer für die Nukleinsäureamplifizierungsreaktion (PCR-Reaktion) verwendet werden, um cDNAs voller Länge zu isolieren, und genomische Klone, die Polypeptide der vorliegenden Erfindung codieren und um cDNA und genomische Klone anderer Gene zu isolieren (einschließlich Gene, die Paraloga aus menschlichen Quellen und Orthologa und Paraloga aus anderen Arten als dem Menschen), welche eine große Sequenzähnlichkeit mit SEQ ID NO:1 haben. Typischerweise sind diese Nukleotidsequenzen 70 % identisch, bevorzugt 80 % identisch, mehr bevorzugt 90 % identisch, am meisten bevorzugt 95 % identisch zu der Referenz. Die Sonden oder Primer umfassen im allgemeinen mindestens 15 Nukleotide, bevorzugt mindestens 30 Nukleotide und können mindestens 50 Nukleotide haben. Besonders bevorzugte Sonden haben zwischen 30 und 50 Nukleotide. Besonders bevorzugte Primer haben zwischen 20 und 25 Nukleotide. Insbesondere können Polypeptide oder Polynukleotide, die von Sequenzen von homologem Tierursprung sind, als Immunogen verwendet werden, um eine kreuzreaktive Immunreaktion gegen das menschliche Gen zu erreichen.

[0039] Ein Polynukleotid, das ein hier beschriebenes Polypeptid codiert, einschließlich Homologe anderer Arten als dem Menschen, kann durch ein Verfahren gewonnen werden, welches die Schritte des Durchmusterens einer geeigneten Bibliothek unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einer markierten Sonde mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder ein Fragment davon umfasst; und das Isolieren der cDNA vollständiger Länge und der genomischen Klone, die diese Polynukleotidsequenz enthalten. Solche Hybridisierungstechniken sind dem gelehrten Fachmann gut bekannt. Bevorzugte stringente Hybridisierungsbedingungen schließen eine Über-Nacht-Inkubierung bei 42°C in einer Lösung ein, die umfasst: 50 % Formamid, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Trisodiumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5x Denhardt-Lösung, 10 % Dextransulfat und 20 Mikrogramm/ml denaturierte, gescherte Lachssperma-DNA; gefolgt vom Waschen der Filter in 0,1xSSC bei ungefähr 65°C. Daher schließt die vorliegende Erfindung auch Polynukleotide ein, die durch das Durchmusteren einer geeigneten Bibliothek unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit einer markierten Sonde mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder einem Fragment davon gewonnen werden.

[0040] Der Fachmann wird in Betracht ziehen, dass eine isolierte cDNA-Sequenz in vielen Fällen unvollständig ist, da die Region, die für das Polypeptid codiert, am 5'-Ende der cDNA verkürzt ist.

[0041] Es gibt mehrere Verfahren, die cDNAs vollständiger Länge, oder kurze cDNAs zu verlängern, die Fachleuten im Fachgebiet verfügbar sind und als solche in der Art bekannt sind, beispielsweise solche, die auf dem Verfahren der Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) beruhen (siehe beispielsweise Frohman et al., PNAS USA 85, 8998–9002, 1988). Kürzlich durchgeführte Modifizierungen der Technik, beispielhaft dargestellt durch die MarathonTM-Technologie (Clontech Laboratories Inc.) haben beispielsweise die Suche nach längeren cDNAs signifikant vereinfacht. Bei der MarathonTM-Technologie sind cDNAs aus mRNA hergestellt worden, die aus einem ausgewählten Gewebe extrahiert wurde, und eine Adaptorsequenz wurde an jedes Ende ligiert. Dann wird eine Nukleinsäureamplifizierung (PCR) durchgeführt, um die "fehlenden" 5'-Enden der cDNA zu amplifizieren, indem eine Kombination aus genspezifischen und adaptorspezifischen Oligonukleotidprimern verwendet wird. Die PCR-Reaktion wird dann unter Verwendung von "nested" Primern wiederholt, d.h. Primern, die so entworfen wurden, dass sie innerhalb des amplifizierten Produktes anlagern (typischerweise ein adap-

torspezifischer Primer, der sich weiter 3' in der Adaptorsequenz anlagert, und ein genspezifischer Primer, der sich weiter 5' in der bekannten Gensequenz anlagert). Die Produkte dieser Reaktion können dann durch DNA-Sequenzierung analysiert werden, und eine cDNA vollständiger Länge, die entweder durch Verbinden des Produktes direkt an die existierende cDNA, um eine vollständige Sequenz zu ergeben, konstruiert werden, oder durch Durchführen einer getrennten PCR vollständiger Länge, unter Verwendung dieser neuen Sequenzinformation, um den 5'-Primer zu entwerfen.

[0042] Rekombinante Polypeptide, die hier beschrieben sind, können durch Verfahren, die im Fachgebiet gut bekannt sind, aus genetisch manipulierten Wirtszellen, umfassend Expressionssysteme, hergestellt werden.

[0043] Für die rekombinante Produktion können Wirtszellen genetisch manipuliert werden, um Expressionssysteme oder Teile davon für die hier beschriebenen Polynukleotide einzuschließen. Ein Einschleusen von Polynukleotiden in Wirtszellen kann durch Verfahren durchgeführt werden, die in vielen Standard-Laborhandbüchern beschrieben sind, wie beispielsweise Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) und Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Bevorzugte derartige Verfahren schließen beispielsweise Calciumphosphattransfektion, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Transfektion, Mikroinjektion, kationische Lipid-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Transduktion, scrape loading, ballistische Einschleusung oder Infektion ein.

[0044] Bevorzugterweise werden die hier beschriebenen Proteine mit Thioredoxin in trans (TIT) coexprimiert. Die Coexpression von Thioredoxin in trans gegenüber in cis ist bevorzugt, um das Antigen von Thioredoxin ohne Notwendigkeit einer Protease freizuhalten. Die Thioredoxin-Coexpression erleichtert die Löslichkeit der erfindungsgemäßen Proteine. Thioredoxin-Coexpression hat auch eine signifikante Auswirkung auf die Ausbeute bei der Proteinreinigung, auf die Löslichkeit und Qualität des gereinigten Proteins.

[0045] Repräsentative Beispiele geeigneter Wirte schließen bakterielle Zellen ein, wie beispielsweise Streptococci-, Staphylococci-, E. coli-, Streptomyces- und Bacillus subtilis-Zellen; Pilzzellen, wie Hefezellen und Aspergilluszellen; Insektenzellen, wie Drosophila S2- und Spodoptera Sf9-Zellen; Tierzellen, wie CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 und Bowes Melanomzellen; und Pflanzenzellen.

[0046] Es kann eine große Vielzahl an Expressionssystemen verwendet werden, z.B. chromosomale, episodale und Virus-Derivat-Systeme, z.B. Vektoren, die von bakteriellen Plasmiden abstammen, von Bakteriophagen, von Transposons, von Hefeepisomen, von Insertionselementen, von Hefe-Chromosom-Elementen, von Viren, wie Baculoviren, Papovaviren, such SV40, Vacciniaviren, Adenoviren, Geflügelpocken-Viren, Pseudorabiesviren und Retroviren und Vektoren, die von Kombinationen daraus stammen, wie solche, die von Plasmid- und Bakteriophagen-Genelementen stammen, wie Cosmide und Phagemide. Die Expressionssysteme können Kontrollregionen enthalten, die ebenfalls regulieren, wie auch die Expression beinhalten. Im allgemeinen kann jedes System oder Vektor, welcher in der Lage ist, ein Polynukleotid zu bewahren, zu propergieren oder zu exprimieren, um ein Polypeptid in einen Wirt zu produzieren, verwendet werden. Die geeignete Nukleotidsequenz kann in ein Expressionssystem durch eine Vielzahl an gut bekannten und Routinetechniken inseriert werden, wie beispielsweise durch solche, die in Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (supra) ausgeführt sind. Geeignete Sekretionssignale können in das gewünschte Polypeptid eingeschlossen werden, um die Sekretion des translatierten Proteins in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, den Periplasmaraum oder die extrazelluläre Umgebung zu ermöglichen. Diese Signale können endogen für das Polypeptid sein oder sie können heterologe Signale sein.

[0047] Das Expressionssystem kann auch ein rekombinanter lebender Mikroorganismus sein, wie ein Virus oder Bakterium. Das Gen von Interesse kann in das Genom eines lebenden rekombinanten Virus oder Bakterium inseriert werden. Die Inokulierung und in vivo-Infektion mit diesem lebenden Vektor führt zur in vivo-Expression des Antigens und der Induktion von Immunreaktionen. Viren und Bakterien, die für diese Zwecke verwendet werden, sind beispielsweise: Pockenviren (z.B. Vaccinia, Geflügelpocken, Kanarienviren), Alphaviren (Sindbis-Virus, Semliki Forest-Virus, Venezuela-Pferde-Encephalitis-Virus), Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Picornaviren (Poliovirus, Thinovirus), Herpesviren (Varicella-Zoster-Virus etc.), Listerien, Salmonellen, Shigellen, BCG. Diese Viren und Bakterien können virulent sein oder auf verschiedene Weisen attenuiert sein, um Lebendvaccine zu erhalten. Solche Lebendvaccine bilden ebenfalls einen Teil der Erfindung.

[0048] Die hier beschriebenen Polypeptide können aus rekombinanten Zellkulturen durch bekannte Verfahren gewonnen und gereinigt werden, einschließlich Ammoniumsulfat- oder Ethanol-Präzipitation, Säureextraktion, Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie, Phosphocellulosechromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie, Affinitätschromatographie, Hydroxyapatitchromatographie und Lectinchromato-

graphie. Am meisten bevorzugt wird Ionenmetallaffinitätschromatographie (IMAC) für die Reinigung verwendet. Allgemein bekannte Verfahren für das Rückfalten von Proteinen können verwendet werden, um die aktive Konformation zu regenerieren, wenn das Polypeptid während der intrazellulären Synthese, Isolierung und/oder Reinigung denaturiert wurde.

[0049] Ein weiterer wichtiger Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen eines Medikaments zum Induzieren, wieder in Gang setzen oder Modulieren einer immunologischen Reaktion in einem Säuger, welche das Inokulieren des Säugers mit einem Fragment oder dem gesamten Polypeptid oder Polynukleotid, das hier beschrieben ist, umfasst, und passend ist, um Antikörper und/oder T-Zell-Immunreaktionen zur Prophylaxe oder zur therapeutischen Behandlung von Krebs und aus Immunerkrankungen und verwandten Bedingungen zu produzieren. Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zum Induzieren, wieder in Gang setzen oder Modulieren einer immunologischen Reaktion in einem Säuger, welches umfasst, das Verabreichen eines Polypeptids, das hier beschrieben wird, über einen Vektor oder eine Zelle, die die Expression des Polynukleotids dirigiert, und für das Polypeptid in vivo codiert, um eine solche immunologische Reaktion auszulösen, um Immunreaktionen für die Prophylaxe oder Behandlung dieses Tiers bei Erkrankungen hervorzuführen.

[0050] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer immunologischen/Impfstoffformulierung (Zusammensetzung), welche, wenn sie in einen Säugerwirt eingeschleust wird, eine immunologische Reaktion in diesem Säuger gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid induziert, wieder in Gang setzt oder moduliert, wobei die Zusammensetzung ein Polypeptid oder Polynukleotid der Erfindung umfasst, oder ein immunologisches Fragment davon, das wie zuvor definiert ist. Die Impfstoffformulierung kann weiter einen geeigneten Träger umfasst. Da ein Polypeptid im Magen abgebaut werden kann, wird es bevorzugt parenteral verabreicht (z.B. durch subkutane, intramuskuläre, intravenöse oder intradermale Injektion). Formulierungen, die für die parenterale Verabreichung geeignet sind, schließen wässrige und nicht-wässrige sterile Injektionslösungen ein, die Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatika und gelöste Stoffe enthalten, welche die Formulierung isotonisch mit dem Blut des Empfängers machen; eine wässrige und nichtwässrige sterile Suspension, die Suspendiermittel oder Verdickungsmittel einschließen können. Die Formulierungen können in Einheitsdosen oder Mehrfachdosenbehältern angeboten werden, z.B. als versiegelte Ampullen und Phiolen, und sie können in gefriergetrocknetem Zustand gelagert werden, was nur die Zugabe des sterilen flüssigen Trägers direkt vor der Verwendung notwendig macht.

[0051] Ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt betrifft die in vitro-Induktion von Immunreaktionen gegen ein Fragment oder das gesamte Polypeptid oder das hier beschriebene Polynukleotid oder ein Molekül, das das Polypeptid oder Polynukleotid, das hier beschrieben wird, umfasst, indem Zellen des Immunsystems eines Säugers verwendet werden, und indem diese aktivierten Immunzellen des Säugers zur Behandlung einer Erkrankung reinfundiert werden. Die Aktivierung der Zellen aus dem Immunsystem wird durch in vitro-Inkubation mit dem gesamten Polypeptid oder dem Polynukleotid, das hier beschrieben ist, oder einem Molekül, das das hierin beschriebene Polypeptid oder Polynukleotid umfasst, in Gegenwart oder Abwesenheit zahlreicher immunmodulierender Moleküle erreicht. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Immunisierung eines Säugers durch Verabreichung von Antigen präsentierenden Zellen, die in vitro durch Beladung mit einem Teil oder dem gesamten hier beschriebenen Polypeptid oder einem Molekül, welche durch das Polypeptid, das hier beschrieben wurde, modifiziert worden sind, und in vivo in einer immunogenen Weise verabreicht werden. Alternativ dazu können Antigen präsentierende Zellen in vitro mit einem Vektor transfiziert werden, der ein Fragment oder das gesamte, hier beschriebene Polynukleotid enthält, oder ein Molekül, das das hier beschriebene Polynukleotid umfasst, um das entsprechende Polypeptid zu exprimieren, und in vivo in einer immunogenen Weise verabreicht wird.

[0052] Die erfindungsgemäße Impfstoffformulierung kann auch Adjuvanssysteme zur Steigerung der Immunogenizität der Formulierung enthalten. Vorzugsweise löst das Adjuvanssystem bevorzugt eine TH1-artige Reaktion aus.

[0053] Eine Immunreaktion kann grob in zwei extreme Kategorien unterschieden werden, welche eine humorale oder eine zellvermittelte Immunreaktion sind (traditionell gekennzeichnet durch Antikörper bzw. zelluläre Effektorschutzmechanismen). Diese Kategorien von Reaktionen sind als TH1-artige Reaktion (zellvermittelte Reaktion), und TH2-artige Immunreaktion (humorale Reaktion) bezeichnet worden.

[0054] Extreme TH1-artige Immunreaktionen können durch die Erzeugung antigenspezifischer, Haplotyp-restringierter cytotoxischer T Lymphozyten und durch Reaktion natürlicher Killerzellen gekennzeichnet werden. In Mäusen werden TH1-artige Reaktionen häufig durch die Erzeugung von Antikörpern vom IgG2a-Subtyp ge-

kennzeichnet, während diese beim Menschen dem IgG1-Antikörper-Typ entsprechen. TH2-artige Immunreaktionen werden durch die Erzeugung eines breiten Spektrums an Immunglobulin-Isotypen gekennzeichnet, einschließlich IgG1, IgA und IgM in Mäusen.

[0055] Es kann davon ausgegangen werden, dass die Antriebskraft hinter der Entwicklung dieser zwei Arten von Immunreaktionen Cytokine sind. Hohe Mengen an TH1-artigen Cytokinen neigen dazu, die zellvermittelte Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen auszulösen, während hohe Niveaus an TH2-artigen Cytokinen dazu neigen, die Induktion einer humoralen Immunreaktion gegen das Antigen zu begünstigen.

[0056] Die Trennung zwischen TH1- und TH2-artigen Immunreaktionen ist nicht absolut. In der Realität unterstützt ein Individuum eine Immunreaktion, welche als hauptsächlich TH1 oder hauptsächlich TH2 beschrieben wird. Jedoch ist es häufig günstig, die Cytokinfamilie im Hinblick auf die beim murinen CD4+ T-Zellklon durch Mosmann und Coffman (Mosmann, T.R. und Coffman, R.L. (1989) TH1 und TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, Seiten 145–173) beschriebenen, zu bezeichnen. Traditionellerweise sind TH1-artige Reaktionen mit der Produktion der INF- γ und IL-2-Cytokine durch T-Lymphozyten assoziiert. Andere Cytokine, die häufig direkt mit der Induktion von TH1-artigen Immunreaktionen assoziiert sind, werden nicht von T-Zellen produziert, wie beispielsweise IL-12. Im Gegensatz dazu sind TH2-artige Reaktionen mit der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 assoziiert.

[0057] Es ist bekannt, dass einige Impfstoffadjuvantien besonders für die Stimulierung entweder von TH1- oder TH2-artigen Cytokinreaktionen geeignet sind. Traditionellerweise sind die besten Indikatoren der TH1:TH2-Balance der Immunreaktion nach der Impfung oder Infektion einschließlich der direkten Messung der Produktion der TH1- oder TH2- Cytokine von T-Lymphozyten in vitro nach Restimulierung mit Antigen und/oder die Messung der IgG1:IgG2a-Verhältnisse der antigenspezifischen Antikörperreaktionen.

[0058] Daher ist ein TH1-artiges Adjuvans eins, das bevorzugt isolierte T-Zellpopulationen dazu anregt, hohe Mengen an TH1-artigen Cytokinen zu produzieren, wenn sie mit Antigen in vitro restimuliert werden, und die Entwicklung sowohl von CD8-positiven cytotoxischen T-Lymphozyten und antigenspezifischen Immunglobulinreaktionen, die mit dem TH1-artigen Isotyp assoziiert sind, fördern.

[0059] Adjuvantien, die zu einer bevorzugten Stimulierung der TH1-Zellreaktion in der Lage sind, sind in der internationalen Patentanmeldung Nr.

[0060] WO 94/00153 und WO 95/17209 beschrieben.

[0061] 3 De-O-acyliertes Monophosphoryllipid A (3D-MPL) ist ein solches Adjuvans. Es ist aus GB 2220211 (Ribi) bekannt. Chemisch ist es ein Gemisch aus 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A mit 4, 5 oder 6 acylierten Ketten und wird von Ribi Immunochem, Montana, hergestellt. Eine bevorzugte Form von 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A ist in dem europäischen Patent 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) offenbart.

[0062] Vorzugsweise sind die 3D-MPL-Partikel klein genug, um durch eine 0,22 μm -Membran steril filtriert zu werden (europäisches Patent Nr. 0 689 454). 3D-MPL ist in einem Bereich von 10 μg bis 100 μg , bevorzugt 25 bis 50 μg pro Dosis vorhanden, wobei das Antigen typischerweise in einem Bereich von 2 bis 50 μg pro Dosis vorliegt.

[0063] Ein weiteres bevorzugtes Adjuvans umfasst QS21, eine HPLC-gereinigte, nicht-toxische Fraktion, die aus der Rinde von Quillaja Saponaria Molina stammt. Gegebenenfalls kann diese mit 3 De-O-acyliertem Monophosphoryllipid A (3D-MPL) gemischt werden, gegebenenfalls zusammen mit einem Träger.

[0064] Das Herstellungsverfahren für QS21 ist im US-Patent Nr. 5,057,540 offenbart.

[0065] Nicht-reaktogene Adjuvansformulierungen, die QS21 enthalten, sind zuvor beschrieben worden (WO 96/33739). Formulierungen, die QS21 und Cholesterin umfassen, haben sich als erfolgreiche TH1-stimulierende Adjuvantien herausgestellt, wenn sie zusammen mit dem Antigen formuliert werden.

[0066] Weitere Adjuvantien, die bevorzugte Stimulatoren einer TH1-Zellreaktion sind, schließen immunmodulierende Oligonukleotide ein, z.B. nichtmethylierte CpG-Sequenzen, wie in WO 96/02555 offenbart.

[0067] Kombinationen verschiedener TH1-stimulierender Adjuvantien, wie die, die oben erwähnt worden sind, werden ebenfalls als ein Adjuvans bereitstellend in Erwägung gezogen, welches ein bevorzugter Stimulator einer TH1-Zellreaktion ist. Beispielsweise kann QS21 zusammen mit 3D-MPL formuliert werden. Das Verhältnis von QS21:3D-MPL liegt typischerweise in einer Größenordnung von 1:10 bis 10:1; bevorzugt 1:5 bis 5:1 und häufig im wesentlichen 1:1. Der bevorzugte Bereich für die optimale Synergie beträgt 2,5:1 bis 1:1 3D-MPL:QS21.

[0068] Vorzugsweise ist auch ein Träger in der Impfstoffzusammensetzung gemäß der Erfindung vorhanden. Der Träger kann eine Öl-in-Wasser-Emulsion oder ein Aluminiumsalz sein, wie ein Aluminiumphosphat oder Aluminiumhydroxid.

[0069] Eine bevorzugte Öl-in-Wasser-Emulsion umfasst ein metabolisierbares Öl wie Squalen, α -Tocopherol und Tween 80. In einem besonders bevorzugten Aspekt sind die Antigene in der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzung mit QS21 und 3D-MPL in einer solchen Emulsion kombiniert. Zusätzlich kann die Öl-in-Wasser-Emulsion Span 85 und/oder Lecithin und/oder Tricaprylin enthalten.

[0070] Typisch für die Verabreichung an den Menschen ist, wenn QS21 und 3D-MPL in einem Impfstoff in einem Bereich von 1 μ g bis 200 μ g, wie 10 bis 100 μ g, bevorzugt 10 μ g bis 50 μ g je Dosis vorhanden ist. Typischerweise wird das Öl-in-Wasser 2 bis 10 % Squalen, 2 bis 10 % α -Tocopherol und 0,3 bis 3 % Tween 80 umfassen. Bevorzugt ist das Verhältnis von Squalen: α -Tocopherol gleich oder weniger als 1, da dies eine stabilere Emulsion ermöglicht. Span 85 kann auch in einer Konzentration von 1 % vorliegen. In einigen Fällen kann es vorteilhaft sein, dass die Impfstoffe der vorliegenden Erfindung außerdem einen Stabilisator enthalten, Nicht-toxische Öl-in-Wasser-Emulsionen enthalten vorzugsweise ein nicht-toxisches Öl, z.B. Squalen oder Squalen, einen Emulgator, z.B. Tween 80, in einem wässrigen Träger. Der wässrige Träger kann beispielweise phosphatgepufferte Salzlösung sein.

[0071] Eine besonders potente Adjuvansformulierung, die QS21, 3D-MPL und Tocopherol in einer Öl-in-Wasser-Emulsion einschließt, wird in WO 95/17210 beschrieben.

[0072] Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung polyvalenter Impfstoffzusammensetzungen bereit, die eine Impfstoffformulierung der Erfindung in Kombination mit anderen Antigenen umfassen, insbesondere Antigene, die für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krebs, Autoimmunerkrankungen und ähnlichen Bedingungen nützlich sind. Eine solche polyvalente Impfstoffzusammensetzung kann ein TH-1-induzierendes Adjuvans einschließen, das zuvor beschrieben worden ist.

[0073] Diese Erfindung betrifft auch die Verwendung von Polynukleotiden in Form von Primern, die von den erfindungsgemäßen Polynukleotiden abstammen, und von Polypeptiden in Form von Antikörpern oder Reagenzien, die spezifisch für das erfindungsgemäße Polypeptid sind, als diagnostische Mittel.

[0074] Die Identifizierung genetischer oder biochemischer Marker im Blut oder Gewebe, die den Nachweis sehr früher Veränderungen während des Karzinogenesewegs ermöglicht, wird beim Bestimmen der besten Behandlung für den Patienten helfen. Surrogat-Tumormarker, wie die Polynukleotidexpression können verwendet werden, um verschiedene Formen und Stadien des Krebses zu diagnostizieren. Die Identifizierung der Expressionsniveaus der erfindungsgemäßen Polynukleotide wird sowohl beim Einteilen des Stadiums der Krebserkrankung und bei der Einteilung der Art des kanzerösen Gewebes nützlich sein. Das Stadium-Verfahren überwacht das Voranschreiten des Krebses und wird durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit bösartigen Gewebes in den biopsierten Bereichen bestimmt. Die erfindungsgemäßen Polynukleotide können helfen, den Stadiumseinteilungsprozess durch Identifizieren von Markern der Aggressivität eines Krebses zu perfektionieren, beispielsweise das Vorhandensein in verschiedenen Körperbereichen. Die Einteilung des Krebses beschreibt, wie nahe ein Tumor normalem Gewebe seines gleichen Typs ähnelt, und wird durch die Zellmorphologie und anderer Differenzierungsmarker untersucht. Die hier beschriebenen Polynukleotide können bei der Bestimmung des Tumorgrads nützlich sein, da sie bei der Bestimmung des Differenzierungsstatus der Zellen eines Tumors helfen können.

[0075] Die diagnostischen Assays bieten ein Verfahren zum Diagnostizieren oder Bestimmen einer Empfindlichkeit für Krebs, Autoimmunerkrankungen und ähnliche Bedingungen durch die Diagnose mit Verfahren, die das Bestimmen einer von einem Individuum stammenden Probe auf unnatürlich verringerte oder erhöhte Polypeptid- oder mRNA-Niveaus umfassen. Dieses Diagnoseverfahren ist als differenzielle Expression bekannt. Die Expression eines bestimmten Gens wird zwischen einem erkrankten Gewebe und einem normalen Gewebe verglichen. Ein Unterschied zwischen dem Polynukleotid-verwandten Gen, der mRNA oder dem Protein in

den zwei Geweben, wird verglichen, beispielsweise hinsichtlich des Molekulargewichts, der Aminosäure- oder Nukleotidsequenz, oder der relativen Häufigkeit und zeigt eine Änderung des Gens oder eines Gens, das es reguliert, im Gewebe des Menschen an, der in Verdacht steht, erkrankt zu sein.

[0076] Die verminderte oder erhöhte Expression kann auf RNA-Niveau gemessen werden. PolyA-RNA wird zuerst aus zwei Geweben isoliert und die Detektion von mRNA, welche durch ein Gen, das einem differenziell exprimierten, hier beschriebenen Polynukleotid entspricht, kann beispielsweise durch in situ-Hybridisierung in Gewebeschnitten, Reverse Transkriptase-PCR, unter Verwendung von Northern Blots, die Poly A+mRNA enthalten oder jedes andere direkte oder indirekte RNA-Detektionsverfahren nachgewiesen werden. Die erhöhte oder verminderte Expression einer gegebenen RNA in einem erkrankten Gewebe, verglichen mit einem normalen Gewebe, läßt vermuten, dass das Transkript und/oder das exprimierte Protein eine Rolle in der Erkrankung spielt. So ist der Nachweis eines höheren oder niedrigeren Niveaus einer mRNA, die der SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 entspricht, bezogen auf das normale Niveau, ein Hinweis auf das Vorliegen von Krebs beim Patienten.

[0077] Die mRNA-Expressionsniveaus in einer Probe können durch Erzeugen einer expressed sequence tags (ESTs)-Bibliothek aus der Probe bestimmt werden. Die relative Repräsentation an ESTs in der Bibliothek kann verwendet werden, um die relative Repräsentierung des Gentranskripts im der Ausgangsprobe zu untersuchen. Die EST-Analyse des Tests kann mit der EST-Analyse einer Referenzprobe verglichen werden, um die relativen Expressionsniveaus des Polynukleotids von Interesse zu bestimmen.

[0078] Weitere mRNA-Analysen können unter Verwendung serieller Analysen der Genexpression-Methodik (SAGE) durchgeführt werden (Velculescu et. al., Science (1995) 270:484), durch differenzielle Display-Methodik (z.B. US-Patent Nr. 5,776,683) oder durch Hybridisierungsanalyse, welche auf der Spezifität der Nukleotidinteraktionen beruht.

[0079] Alternativ dazu kann der Vergleich auf Proteinniveau durchgeführt werden. Die Prgteingrößen in den zwei Geweben können unter Verwendung von Antikörpern verglichen werden, die in Western Blots von Proteinextrakten der zwei Gewebe Polypeptide nachweisen. Die Expressionsniveaus und die subzelluläre Lokalisierung kann ebenfalls immunologisch unter Verwendung von Antikörpern gegen das entsprechende Protein detektiert werden. Weitere Untersuchungstechniken, die verwendet werden können, um die Proteinniveaus in einer Probe, die aus einem Wirt stammt zu bestimmen, wie eines Polypeptids der Erfindung, sind Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt. Ein erhöhtes oder verringertes Polypeptidexpressionsniveau in dem erkrankten Gewebe, verglichen mit dem gleichen Proteinexpressionsniveau in dem normalen Gewebe zeigt an, dass das exprimierte Protein an der Krankheit beteiligt sein kann.

[0080] In den erfindungsgemäßen Assays kann die Diagnose durch Nachweis der Expressionsniveaus des Genprodukts, die durch mindestens eine Sequenz, die in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 ausgeführt ist, bestimmt werden. Ein Vergleich der mRNA oder der Proteinniveaus in einem erkrankten gegenüber einem normalen Gewebe kann auch verwendet werden, um das Voranschreiten oder die Remission einer Erkrankung zu verfolgen.

[0081] Eine große Zahl an Polynukleotidsequenzen in einer Probe kann unter Verwendung von Polynukleotidarrays untersucht werden. Diese können verwendet werden, um die differenzielle Expression von Genen zu untersuchen, und um die Genfunktion zu bestimmen. Beispielsweise können Arrays der Polynukleotidsequenzen SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 verwendet werden, um zu bestimmen, ob irgendeines der Polynukleotide zwischen einer normalen und Krebszelle differenziell exprimiert wird. In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform kann ein Array der Oligonukleotidsonden, die die SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:3 Nukleotidsequenz oder Fragmente davon umfassen, hergestellt werden, um ein wirkungsvolles Screening durchzuführen, beispielsweise von genetischen Mutationen. Die Array-Technologieverfahren sind wohlbekannt und haben eine allgemeine Anwendbarkeit und können verwendet werden, um eine Vielzahl von Fragen in der Molekulargenetik anzugehen, einschließlich der Genexpression, genetischer Verbindungen und der genetischen Variabilität (siehe z.B. M. Chee et al., Science, Band 274, Seiten 610–613 (1996)).

[0082] "Diagnose" schließt, so wie es hier verwendet wird, die Bestimmung einer Empfindlichkeit eines Individuums gegenüber einer Erkrankung ein, die Bestimmung, ob ein Individuum gegenwärtig die Erkrankung hat und auch die Prognose eines Individuums, das durch die Erkrankung betroffen ist.

[0083] Die hier beschriebenen Nukleotidsequenzen sind auch wertvoll für die chromosomale Lokalisierung. Die Sequenz wird spezifisch ins Ziel genommen und kann mit einem bestimmten Locus eines individuellen

menschlichen Chromosom hybridisieren. Die Kartierung relevanter Sequenzen auf Chromosomen gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein wichtiger erster Schritt bei der Korrelierung dieser Sequenzen mit der Gen-assoziierten Erkrankung. Sobald eine Sequenz an einem präzisen chromosomalen Ort kartiert worden ist, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit Daten aus einer genetischen Karte korreliert werden. Solche Daten werden beispielsweise gefunden in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (verfügbar online durch die Johns Hopkins University Welch Medical Library). Die Beziehung zwischen den Genen und Erkrankungen, die auf die gleiche chromosomale Region kartiert worden sind, wird dann durch eine Linkageanalyse identifiziert (gemeinsame Vererbung physikalisch benachbarter Gene). Die Unterschiede in der cDNA oder den genomischen Sequenzen zwischen betroffenen und nicht betroffenen Individuen können ebenfalls bestimmt werden.

[0084] Die hier beschriebenen Polypeptide oder ihre Fragmente oder Analoga davon, oder Zellen, die diese exprimieren, können ebenfalls als Immunogene verwendet werden, um Antikörper zu produzieren, die immun-spezifisch für Polypeptide der vorliegenden Erfindung sind. Der Begriff "immunspezifisch" bedeutet, dass die Antikörper im wesentlichen eine größere Affinität für die Polypeptide der Erfindung haben, als ihre Affinität für andere verwandte Polypeptide im Stand der Technik.

[0085] Ebenfalls beschrieben wird ein Antikörper, der immunspezifisch für ein Polypeptid ist, das hier beschrieben wird, oder für ein immunologisches Fragment davon, das zuvor definiert worden ist. Vorzugsweise ist der Antikörper ein monoklonaler Antikörper.

[0086] Antikörper, die gegen Polypeptide, die hier beschrieben sind, generiert werden, können durch die Verabreichung des Polypeptids oder eines Epitop-tragenden Fragments, von Analoga oder Zellen, an ein Tier, bevorzugt ein nicht-menschliches Tier, unter Verwendung von Routineprotokollen gewonnen werden. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper kann jede Technik, die Antikörper bereitstellt, die von kontinuierlichen Zelllinienkulturen hergestellt werden, verwendet werden. Beispiele schließen die Hybridomtechnik (Kohler, G. und Milstein, C., Nature (1975) 256:495–497), die Triomtechnik, die menschliche B-Zell-Hybridomtechnik (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) und die EBV-Hybridom-Technik (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77–96, Alan R Liss, Inc., 1985) ein.

[0087] Techniken zur Herstellung einzelkettiger Antikörper, wie jene, die in dem US-Patent Nr. 4,946,778 beschrieben sind, können ebenfalls angepasst werden, um einzelkettige Antikörper gegen Polypeptide der Erfindung herzustellen.

[0088] Die oben beschriebenen Antikörper gegen benutzt werden, um Klone, die das Polypeptid exprimieren, zu isolieren oder zu identifizieren, oder um die Polypeptide durch Affinitätschromatographie zu reinigen. Die erfindungsgemäßen Antikörper können ebenfalls benutzt werden, um Krebs zu verhindern oder zu behandeln, insbesondere Ovar- und Darmkrebs, Autoimmunerkrankungen und verwandte Bedingungen.

[0089] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zum Induzieren oder Modulieren einer immunologischen Reaktion in einem Säuger, welches das Inokulieren mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid in den Säuger umfasst, das ausreicht, um Antikörper und/oder T-Zell-Immunreaktion hervorzurufen, um die Symptome oder das Voranschreiten der Erkrankung zu verbessern oder zu schützen. Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zum Induzieren oder Modulieren immunologischer Reaktionen in einem Säuger, welches umfasst, dass ein hier beschriebenes Polypeptid über einen Vektor, der die Expression des Polynukleotids dirigiert und für das Polypeptid codiert, in vivo verabreicht wird, um eine solche immunologische Reaktion auszulösen, um Antikörper herzustellen, um dieses Tier gegen Erkrankungen zu schützen.

[0090] Es wird begrüßt, dass die vorliegende Erfindung daher Verwendungen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung abnormer Bedingungen, wie beispielsweise Darmkrebs bereitstellt, die entweder mit der Gegenwart von, einem Überschuss an oder einer Unterexpression von CASB618 Polypeptidaktivität in Beziehung stehen.

[0091] Das hier beschriebene Polypeptid kann verwendet werden, um membrangebundene oder lösliche Rezeptoren zu identifizieren, falls es sie gibt, durch Standard-Rezeptorbindungstechniken, die in dem Gebiet bekannt sind. Gut bekannte Screeningverfahren können ebenfalls verwendet werden, um Agonisten und Antagonisten des hier beschriebenen Polypeptids zu identifizieren, die mit der Bindung des Polypeptids, das hier beschrieben wird, an seine Rezeptoren, falls es diese gibt, in Konkurrenz stehen.

[0092] Vom Fachmann wird leicht erkannt, dass ein hier beschriebenes Polypeptid auch in einem Verfahren zum strukturbasierten Design eines Agonisten, Antagonisten oder Inhibitors des Polypeptids verwendet werden kann, durch:

- (a) Bestimmen in einem ersten Schritt der dreidimensionalen Struktur des Polypeptids;
- (b) Ableiten der dreidimensionalen Struktur für die wahrscheinliche, reaktive oder Bindungsstelle(n) des Agonisten, Antagonisten oder Inhibitors;
- (c) Synthetisieren von Kandidatenverbindungen, von denen vorhergesagt wird, dass sie mit der abgeleiteten Bindung oder reaktiven Stelle binden oder reagieren; und
- (d) Testen, ob die Kandidatenverbindungen tatsächlich Agonisten, Antagonisten oder Inhibitoren sind.

[0093] Auch die Gentherapie kann benutzt werden, um die endogene Produktion von CASB618-Polypeptid durch die relevanten Zellen des Individuums zu bewirken. für eine Übersicht der Gentherapie siehe Kapitel 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (und die hierin zitierten Referenzen) in Human Molecular Genetics, T Strachan und A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd. (1996).

[0094] Die Impfstoffherstellung wird allgemein in Pharmaceutical Biotechnology, Ausgabe 61, Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, herausgegeben von Powell und Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, herausgegeben von Voller et al., University Park Press, Baltimore, Md., U.S.A. 1978. Die Verkapselung mit Liposomen wird beispielsweise beschrieben in Fullerton, US-Patent Nr. 4,235,877. Die Konjugierung von Proteinen an Makromoleküle wird beispielsweise offenbart in Likhite, US-Patent Nr. 4,372,945 und in Armor et al., US-Patent Nr. 4,474,757.

[0095] Die Proteinmenge in jeder Impfstoffdosis wird als die Menge ausgewählt, die eine immunschützende Reaktion ohne signifikante Nebenwirkungen typischer Impfstoffe auslöst. Eine solche Menge wird in Abhängigkeit davon variieren, welches spezifische Immunogen benutzt wird. Im allgemeinen wird erwartet, dass jede Dosis 1 bis 1.000 µg Protein umfasst, bevorzugt 2 bis 100 µg, am meisten bevorzugt 4 bis 40 µg. Eine optimale Menge eines bestimmten Impfstoffs kann durch Standarduntersuchungen festgelegt werden, die die Beobachtung der Antikörpertiter und anderer Reaktionen in den Individuen einschließen. Nach einer ersten Impfung können die Individuen einen Boost nach ungefähr 4 Wochen enthalten.

[0096] "Isoliert" bedeutet geändert "durch den Einfluss des Menschen" gegenüber dem natürlichen Zustand. Wenn eine "isolierte" Zusammensetzung oder Substanz in der Natur auftritt, ist sie verändert worden, oder aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt worden, oder beides. Beispielsweise ist ein Polynukleotid oder ein Polypeptid, das natürlicherweise in einem lebenden Tier vorhanden ist, nicht "isoliert", aber das gleiche Polynukleotid oder Polypeptid, das von den mit vorhandenen Materialien in seinem natürlichen Zustand getrennt ist, ist "isoliert", gemäß dem hier benutzten Terminus.

[0097] "Polynukleotid" bezieht sich im allgemeinen auf jedes Polyribonukleotid oder Polydeoxyribonukleotid, welches nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA sein kann, einschließlich einzel- und doppelsträngiger Bereiche.

[0098] "Variante" bezieht sich auf ein Polynukleotid oder Polypeptid, die sich von Referenz-Polynukleotiden oder Polypeptiden unterscheiden, aber die wesentlichen Eigenschaften bewahren. Eine typische Variante eines Polynukleotids unterscheidet sich in der Nukleotidsequenz von einem anderen Referenz-Polynukleotid. Veränderungen der Nukleotidsequenz der Variante können die Aminosäuresequenz eines durch das Referenz-Polynukleotid codierten Polypeptids ändern oder nicht. Nukleotidänderungen können zu Aminosäuresubstitutionen, Additionen, Deletionen, Fusionen und Verkürzungen des durch die Referenzsequenz codierten Polypeptids führen, wie unten diskutiert wird. Eine typische Variante eines Polypeptids unterscheidet sich in der Aminosäuresequenz von einem anderen Referenz-Polypeptid. Im allgemeinen sind die Unterschiede begrenzt, so dass die Sequenzen des Referenz-Polypeptids und der Variante insgesamt ziemlich ähnlich sind, und in vielen Bereichen identisch sind. Eine Variante und ein Referenz-Polypeptid können in der Aminosäuresequenz durch eine oder mehrere Substitutionen, Additionen, Deletionen in irgendeiner Kombination verschieden sein. Ein substituierter oder inserierter Aminosäurerest kann durch den genetischen Code codiert sein oder nicht. Eine Variante eines Polynukleotids oder Polypeptids kann natürlich auftreten, wie als allele Variante, oder es kann eine Variante sein, die nicht dafür bekannt ist, natürlich aufzutreten. Nicht natürlich auftretende Varianten von Polynukleotiden und Polypeptiden können durch Mutagenesetechniken oder durch direkte Synthese hergestellt werden.

[0099] "Identität" ist, wie im Fachgebiet bekannt ist, die Beziehung zwischen zwei oder mehr Polypeptidsequenzen oder zwei oder mehr Polynukleotidsequenzen, die durch Vergleichen der Sequenzen bestimmt wird.

Im Fachgebiet bedeutet "Identität" auch den Grad der Sequenzverwandtschaft zwischen Polypeptid- oder Polynukleotidsequenzen, je nachdem, wie es durch ein Übereinstimmen zwischen Strängen solcher Sequenzen bestimmt wird. "Identität" und "Ähnlichkeit" können durch bekannte Verfahren leicht berechnet werden, einschließlich aber nicht beschränkt auf solche, die beschrieben sind in (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., Hrsg., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., Hrsg., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. und Griffin, H. G., Hrsg., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; und Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. und Devereux, J., Hrsg., M Stockton Press, New York, 1991; und Carillo, H., und Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Bevorzugte Verfahren zum Bestimmen der Identität werden so entworfen, dass sie die größte Überlappung zwischen den getesteten Sequenzen ergeben. Verfahren zum Bestimmen der Identität und Ähnlichkeit werden in öffentlich zugänglichen Computerprogrammen codifiziert. Bevorzugte Computerprogrammverfahren, um die Identität und Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen zu bestimmen, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, das GCG-Programmpaket (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN und FASTA (Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403–410 (1990)). Das BLASTX-Programm ist öffentlich zugänglich über das NCBI und andere Quellen (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403–410 (1990)). Der gut bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann ebenfalls verwendet werden, um die Identität zu bestimmen.

[0100] Der bevorzugte Algorithmus, der verwendet wird, ist FASTA. Die bevorzugten Parameter für Polypeptid- oder Polynukleotidsequenzvergleiche unter Verwendung dieses Algorithmus schließen folgende ein:

Gap Penalty: 12

Gap extension penalty: 4

Word size: 2, max 6.

[0101] Bevorzugte Parameter für Polypeptidsequenzvergleiche mit anderen Verfahren schließen die folgenden ein:

1) Algorithmus: Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443–453 (1970)

Vergleichsmatrix: BLOSSUM62 von Hentikoff und Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915–10919 (1992)

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4.

[0102] Ein nützliches Programm mit diesen Parametern ist öffentlich zugänglich als das "Gap"-Programm von Genetics Computer Group, Madison WI. Die oben erwähnten Parameter sind die Standardparameter für Polypeptidvergleiche (gemeinsam mit keinen Penalty für end gaps).

[0103] Bevorzugte Parameter für Polynukleotidvergleiche schließen die folgenden ein:

1) Algorithmus: Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443–453 (1970)

Vergleichsmatrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3.

[0104] Ein nützliches Programm mit diesen Parametern ist öffentlich zugänglich als das "Gap"-Programm von Genetics Computer Group, Madison WI. Die oben erwähnten Parameter sind die Standardparameter für Polypeptidvergleiche (gemeinsam mit keinen Penalty für end gaps).

[0105] Beispielhaft dargestellt kann eine hier beschriebene Polynukleotidsequenz identisch mit der Referenzsequenz SEQ ID NO:1 sein, d.h. 100 % identisch sein, oder sie kann bis zu einer bestimmten, ganzzahligen Zahl Nukleotidänderungen, verglichen mit der Referenzsequenz, haben. Solche Änderungen werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus mindestens einer Nukleotiddeletion, Substitution, einschließlich Transition und Transversion, oder Insertion und wobei die Veränderungen am 5'- oder 3'-terminalen Positionen der Referenz-Nukleotidsequenz auftreten können, oder irgendwo zwischen diesen terminalen Positionen, verstreut entweder individuell entlang der Nukleotide in der Referenzsequenz oder in einer oder mehreren zusammenhängenden Gruppen innerhalb der Referenzsequenz. Die Anzahl von Nukleotidveränderungen wird das Multiplizieren der Gesamtzahl der Nukleotide in SEQ ID NO:1 mal dem numerischen Prozentsatz der entsprechenden prozentualen Identität (geteilt durch 100) und das Abziehen des Produkts von der Gesamtanzahl der Nukleotide in SEQ ID NO:1 bestimmt, oder:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

worin n_n die Anzahl von Nukleotidveränderungen ist, x_n die Gesamtzahl der Nukleotide in SEQ ID NO:1 ist und y beispielsweise 0,70 für 70 %, 0,80 für 80 %, 0,85 für 85 %, 0,90 für 90 %, 0,95 für 95 % etc. ist, und wobei irgendein nicht ganzzahliges Produkt von x_n und y abgerundet wird auf die nächstliegende ganze Zahl, bevor sie von x_n abgezogen wird. Veränderungen einer Polynukleotidsequenz, die das Polypeptid von SEQ ID NO:2 codiert, können Nonsens-, Missens- oder Rahmenwechselformationen in dieser codierenden Sequenz erzeugen, und dadurch das durch das Polynukleotid nach solchen Änderungen codierte Polypeptid ändern.

[0106] Ähnlich kann die hier beschriebene Polypeptidsequenz identisch zu der Referenzsequenz SEQ ID NO:2 sein, d.h. 100 % identisch sein, oder sie kann bis zu einer bestimmten ganzzahligen Anzahl an Aminosäureveränderungen, verglichen mit der Referenzsequenz, einschließen, so dass die prozentuale Identität weniger als 100 % ist. Solche Änderungen werden ausgewählt aus der Gruppe, die aus mindestens einer Aminosäuredeletion, Substitution einschließlich konservativer und nicht-konservativer Substitution, oder Insertion bestehen, und wobei diese Veränderungen an den Amino- oder Carboxyterminalen Positionen der Referenz-Polypeptidsequenz auftreten oder irgendwo zwischen diesen terminalen Positionen, entweder individuell entlang der Aminosäuren in der Referenzsequenz verstreut, oder in einer oder mehreren zusammenhängenden Gruppen innerhalb der Referenzsequenz. Die Anzahl an Aminosäureveränderungen bei einer gegebenen prozentualen Identität wird durch das Multiplizieren der Gesamtzahl der Aminosäuren in SEQ ID NO:2 durch den numerischen Prozentsatz der entsprechenden prozentualen Identität (geteilt durch 100) und dann durch das Subtrahieren des Produktes von dieser gesamten Aminosäureanzahl in SEQ ID NO:2 bestimmt werden, oder:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

[0107] wobei n_a die Anzahl der Aminosäureänderungen ist, x_a die Gesamtanzahl der Aminosäuren in SEQ ID NO:2 ist und y beispielsweise 0,70 für 70 %, 0,80 für 80 %, 0,85 für 85 % etc. ist, und wobei ein nicht ganzzahliges Produkt von x_a und y abgerundet wird auf die nächstliegende ganze Zahl, bevor diese von x_a abgezogen wird.

[0108] "Homolog" ist ein generischer Begriff, der im Gebiet verwendet wird, um eine Polynukleotid- oder Polypeptidsequenz anzugeben, die einen hohen Grad an Sequenzverwandtschaft mit einer untersuchten Sequenz hat. Eine solche Verwandtschaft kann durch die Bestimmung des Identitätsgrades und/oder die Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen quantifiziert werden, wenn sie miteinander, wie oben beschrieben, verglichen werden. In diesem generischen Begriff fallen die Begriffe "Ortholog", welche ein Polynukleotid oder ein Polypeptid kennzeichnen, das ein funktionales Äquivalent eines Polynukleotids oder Polypeptids in einer anderen Art ist, und ein "Paralog", welches eine funktionell ähnliche Sequenz bezeichnet, wenn sie innerhalb der gleichen Spezies in Betracht gezogen wird.

FIGURENLEGENDEN

[Fig. 1](#)

[0109] [Fig. 1](#) zeigt die Expressionsniveaus von CASB618 in übereinstimmenden normalen Darm- und Tumorbproben. Die Werte werden als Äquivalente des Actinniveaus angegeben. N betrifft den normalen Darm, T betrifft den Darmkrebs.

[Fig. 2](#)

[0110] [Fig. 2A](#), [Fig. 2B](#), [Fig. 2C](#) und [Fig. 2D](#) zeigen die real-time PCR-Daten der CASB618-Expression in normalen Geweben. Die Abkürzungen stehen für:

[0111] [Fig. 2A](#): Co: Darm; Ce: Cervix; Bra: Gehirn; Bo_Ma: Knochenmark; B1: Blase; Ao: Aorta; Ad_Gl: Nebenniere.

[0112] [Fig. 2B](#): Ov: Eierstock; Oe: Ösophagus; Ly_No: Lymphknoten; Lu: Lunge; Li: Leber; Ki: Niere; Il: Ileum; He: Herz; Fa_Tu: Eileiter.

[0113] [Fig. 2C](#): Sp: Milz; Sm_In: Dünndarm; Sk_Mu: Skelettmuskel; Sk: Haut; Re: Rektum; Pr: Prostata; Pl: Plazenta; Pa_Thy: Paraschilddrüse.

[0114] [Fig. 2D](#): Tr: Luftröhre; Thy: Schilddrüse; Te: Testis; St: Magen; Spl: Milz.

[Fig. 3](#)

[0115] [Fig. 3](#) zeigt ein SDS-PAGE-Gel (12,5 %) des E. coli AR120/pRIT15081-Extrakts, mit oder ohne Induktion mit Nalidixinsäure; sichtbar gemacht mit monoklonalem Antikörper Anti-NS1. Spur 1 ist der Molekulargewichtsmarker; Spur 2 zeigt E. coli AR120/pRIT15081 3 Stunden keine Induktion; Spur 3 zeigt E. coli AR120/pRIT15081 3 Stunden induziert; Spur 4 zeigt E. coli AR120/pRIT15081 4 Stunden, 30 Minuten keine Induktion; Spur 5 zeigt E. coli AR120/pRIT15081 4 Stunden, 30 Minuten induziert.

[Fig. 4](#)

[0116] [Fig. 4](#) zeigt SDS-PAGE-Gele von gereinigtem CASB618. Spuren 1 und 8 zeigen die Molekulargewichtsmarker; Spur 2 zeigt das lysierte Zellpellet; Spur 3 zeigt das 3 gereinigte Protein vor Dialyse; Spur 4 zeigt das gereinigte, dialysierte Protein; Spur 6 zeigt das gereinigte, dialysierte Protein 0,22 µm.

BEISPIELE

Beispiel 1

Real-Time RT-PCR Analyse

[0117] Die Real-time RT-PCR (U. Gibson. 1996. Genome Research: 6,996) wird verwendet, um mRNA-Transkripthäufigkeit eines Kandidatenantigens in abgeglichenen Tumor- und normalen Darmgeweben mehrerer Patienten zu vergleichen. Zusätzlich werden die mRNA-Niveaus des Kandidatengens in einer Reihe normaler Gewebe durch diesen Ansatz untersucht.

[0118] Gesamt-RNA aus normalem und Tumordarm wird aus sofort eingefrorenen Biopsaten unter Verwendung des TriPure-Reagenz (Boehringer) extrahiert. Gesamt-RNA aus normalen Geweben wird von InVitrogen bezogen oder wird aus sofort eingefrorenen Biopsaten unter Verwendung des TriPure-Reagenz extrahiert. Poly-A⁺ mRNA wird aus Gesamt-RNA nach DNAase-Behandlung unter Verwendung der oligo-dT-Magnetkügelchen (Dyna) gereinigt. Die Quantifizierung der mRNA wird durch Spektrofluorimetrie (VersaFluor, BioRad) unter Verwendung von SybrII-Farbstoff (Molecular Probes) durchgeführt. Primer für die real-time PCR-Amplifizierung werden mit Hilfe der Perkin-Elmer Primer-Expressoftware unter Verwendung von Standardoptionen für TagMan-Amplifikationsbedingungen entworfen.

[0119] Real-time-Reaktiven werden gemäß Standard-PCR-Protokollen zusammengegeben, indem 2 ng gereinigter mRNA für jede Reaktion verwendet wird. SybrI-Farbstoff (Molecular Probes) wird mit einer endgültigen Verdünnung von 1/75.000 für die real-time-Detektion hinzugegeben. Die Amplifizierung (40 Zyklen) und die real-time-Detektion wird in einem Perkin-Elmer Biosystems PE7700-System unter Verwendung konventioneller Instrumenteneinstellungen durchgeführt. Die Ct-Werte werden unter Verwendung der PE7700-Sequenz-Detektor-Software berechnet. Zwei Ct-Werte werden für jede Patientenprobe erhalten: Die Tumor-Ct (CtT) und die passende normale Darm-Ct (CtN). Durch die real-time-PCR erhaltene Ct-Werte sind logarithmisch linear mit der Kopienanzahl der Zielmatrize verwandt. Da die Wirksamkeit der PCR-Amplifizierung unter den vorherrschenden experimentellen Bedingungen nahe der theoretischen Amplifikationseffizienz ist, ist $2^{(CtN-CtT)}$ eine Abschätzung der relativen Transkriptniveaus in den zwei Geweben (d.h. die vierfache mRNA-Überexpression im Tumor). Die Real-time PCR-Reaktionen werden an Biopsaten von 23 Patienten durchgeführt. Einige Patientenproben wurden zweimal gemessen. Das Niveau der mRNA-Überexpression wird, wie beschrieben, für jeden Patienten berechnet. Das durchschnittliche Niveau der mRNA-Überexpression für das Kandidatenantigen und der Anteil der Patienten, die das Kandidatenantigen überexprimieren, wird dann aus diesem Datensatz berechnet. Die individuellen Werte werden im Hinblick auf Actin in der gleichen Probe standardisiert (Verhältnis) und sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Ein Wert von 1 entspricht daher dem gleichen Niveau wie die Actin-Expression. Die gezeigten Ergebnisse sind in logarithmischem Maßstab.

[0120] Insgesamt wurden 81 normale Gewebeproben, die 28 verschiedene Gewebe darstellen, ebenfalls durch das gleiche Verfahren getestet. Die Ct-Werte des Kandidatenantigens wurden mit solche von Actin verglichen, welche in der gleichen Gewebeprobe enthalten waren. Standardisierte Werte werden in den [Fig. 2A–D](#) gezeigt.

Real-Time PCR-Ergebnisse bei Darmkrebs/normalen Darmroben Zusammenfassung

Patienten, die CASB618 in Darmtumoren überexprimieren (%)	Durchschnittliches Niveau der Überexpression in Darmtumoren (x-fach)
18/23 (78 %)	125

[0121] Schlussfolgerung: CASB618 ist in einem hohen Anteil von Tumoren im Hinblick auf das normale benachbarte Darmgewebe überexprimiert. Es wird nur geringfügig durch andere Gewebe exprimiert, insbesondere in einer Prostataprobe.

Beispiel 2

DNA-Microarrays

[0122] DNA-Microarrays werden verwendet, um die mRNA-Expressionsprofile einer großen Anzahl von Genen in mehreren Proben zu untersuchen. Diese Information wird verwendet, um die Daten, die durch real-time PCR gewonnen werden, zu komplementieren, und stellt einen unabhängigen Maßstab der Genexpressionsniveaus in Tumoren und normalen Geweben dar.

[0123] Beispiele der gewöhnlichen Technologien zur Herstellung von DNA-Microarrays schließen ein 1) die Affymetrix "GeneChip"-Arrays, in denen Oligonukleotide auf die Oberfläche des Chips durch Festphasen-chemische Synthese unter Verwendung eines fotolithografischen Verfahrens synthetisiert sind, 2) DNA-Spotting-Technologie, bei denen geringe Volumina einer DNA-Lösung mit Robotern aufgetragen werden, und dann auf die Oberfläche einer Festphase (z.B. Glas) immobilisiert sind. In beiden Fällen werden die Chips mit cDNA oder cRNA hybridisiert, die aus dem Gewebe von Interesse extrahiert worden ist (z.B. normales Gewebe, Tumor etc.) und mit Radioaktivität oder mit einem fluoreszierenden Reportermolekül markiert. Das markierte Material wird mit dem Chip hybridisiert und die Menge der an jede Sequenz auf dem Chip gebundenen Sonde wird unter Verwendung eines spezialisierten Scanners bestimmt. Das Experiment kann mit einem einzelnen Fluoreszenzreporter (oder Radioaktivität) angesetzt werden, oder alternativ dazu kann es unter Verwendung von zwei fluoreszierenden Reportern durchgeführt werden. In diesem letztgenannten Fall wird jede der zwei Proben mit einem der Reportermoleküle markiert. Die zwei markierten Proben werden dann kompetitiv mit den Sequenzen auf dem DNA-Chip hybridisiert. Das Verhältnis der zwei Fluoreszenzsignale wird für jede Sequenz auf dem Chip bestimmt. Dieses Verhältnis wird verwendet, um die relative Häufigkeit des Transkripts in zwei Proben zu berechnen. Detaillierte Protokolle sind aus einer Vielzahl an Quellen verfügbar, einschließlich "DNA Microarrays: A practical approach. Schena M. Oxford University Press 1999" und dem World Wide Web (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/index.html>), <http://arrayit.com/DNA-Microarray-Protocols/>) und spezialisierter Vertreiber (z.B. Affymetrix).

Beispiel 3

EST-Profil

[0124] Ein komplementärer Ansatz zum experimentellen Antigen-Gewebeexpressionscharakterisieren ist derjenige, die Menschen-"Expressed Sequence Tags" (ESTs)-Datenbank auszunutzen. ESTs sind kleine Fragmente aus cDNA, die aus einer Kollektion von mRNA hergestellt wird, die aus einem bestimmten Gewebe oder einer Zelllinie extrahiert wird. Solche Datenbanken stellen gegenwärtig eine massive Menge an ESTs (106) aus mehreren hundert cDNA-Gewebebibliotheken bereit, einschließlich von Tumorgeweben verschiedener Arten und Stadien von Erkrankungen. Mit Hilfe von informationstechnologischen Werkzeugen (Blast) kann eine Vergleichsrecherche der CASB616-Sequenz durchgeführt werden, um weitere Einsicht in die Gewebsexpression zu erlangen.

EST-Verteilung von CASB618

DbEST-Zugangsnummer	ATG lib ID	Beschreibung	Kategorie
NCBI: 1113567	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 1224225	937	NCI_CGAP_Co2	TC
NCBI: 1271870	988	NCI_CGAP_Co12	TC
NCBI: 1316079	889	NCI_CGAP_Thy1	TA
NCBI: 2035497	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2048268	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2054603	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2081390	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2129969	1079	NCI_CGAP_Co8	TC
NCBI: 2489139	1728	Soares_Dieckgraefe-	Dc
NCBI: 2489206	1728	Soares_Dieckgraefe-	Dc
NCBI: 2600163	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 2641414	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 2831741	937	NCI_CGAP_Co2	TC
NCBI: 2914582	910	NCI_CGAP_Pr22	NP
NCBI: 3111692	1728	Soares_Dieckgraefe_	Dc
NCBI: 3112040	1728	Soares_Dieckgraefe-	Dc
NCBI: 3043263	1460	NCI_CGAP_Pan1	Tep
NCBI: 3119272	1728	Soares_Dieckgraefe-	Dc
NCBI: 3138950	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 3181303	1728	Soares_Dieckgraefe-	Dc
NCBI: 2908798	882	NCI_CGAP_Co3	TC
NCBI: 2909226	937	NCI_CGAP_Co2	TC

TC: Darmtumor; Dc: kranker Darm; NP; normale Prostata; Tep: epithelialer Tumor; Ta: eine weitere Tumorart.

[0125] Der hohe Anteil an Darmkrebs ESTs lässt daher klar vermuten, dass eine Überexpression dieses Gens im Darmkrebs auftritt. Zusätzlich können andere Tumoren (Pankreas, Schilddrüse) ebenfalls das Gen exprimieren.

Beispiel 4

Northern-Southern-Blot-Analyse

[0126] Beschränkte Mengen gemischter Tumor- und passender normaler DarmcDNAs werden durch Advantage PCR (siehe oben) amplifiziert. Messenger RNA aus mehreren normalen Geweben wird ebenfalls unter Verwendung des gleichen Verfahrens amplifiziert. Die amplifizierte cDNA (1 µg) wird auf einem 1,2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wird hybridisiert (ALkPhos Direct System) mit einer Sonde, die hergestellt worden ist, indem ein Fragment der TAA-Kandidaten-cDNA verwendet wird. Northern-Southern-Analyse stellt Informationen über die Transkriptgröße, das Vorhandensein von Splice-Varianten und die Häufigkeit des Transkripts in Tumoren und normalen Geweben bereit.

Beispiel 5

Northern Blot-Analyse

[0127] Northern Blots werden nach Standardprotokollen unter Verwendung von 1 µg Poly A+ mRNA durchgeführt. Radioaktive Sonden werden unter Verwendung des Ready-to-Go-Systems (Pharmacia) hergestellt.

Beispiel 6

Identifizierung der cDNA-Sequenz vollständiger Länge

[0128] Darmtumor-cDNA-Bibliotheken werden unter Verwendung des Lambda Zap II-Systems (Stratagene) auf 5 µg PolyA+ mRNA konstruiert. Das gelieferte Protokoll wird befolgt, außer dass SuperscriptII (Life Technologies) für den reversen Transkriptionsschritt verwendet wird. Oligo dT-geprimte und zufallsgeprimte Bibliotheken werden konstruiert. Ungefähr $1,5 \times 10^6$ unabhängige Phagen werden für jedes Screening der Bibliothek ausquartiert. Phagenplaques werden auf Nylonfilter transferiert und unter Verwendung einer cDNA-Sonde hybridisiert, die mit AlkPhos Direct markiert ist. Positive Phagen werden durch Chemilumineszenz detektiert. Positive Phagen werden aus der Agarplatte ausgeschnitten, in 500 µl SM-Puffer eluiert und durch genspezifische PCR bestätigt. Eluierte Phagen werden in einzelsträngige M13-Bakteriophagen durch in vivo-Exzision umgewandelt. Der Bakteriophage wird dann in eine doppelsträngige Plasmid-DNA durch Infektion von E. coli umgewandelt. Infizierte Bakterien werden ausplattiert und einer zweiten Screeningrunde mit der cDNA-Sonde unterworfen. Plasmid-DNA wird aus positiven bakteriellen Klonen gereinigt und beide Stränge sequenziert. Wenn die das Gen vollständiger Länge nicht direkt aus der cDNA-Bibliothek gewonnen werden kann, kann die fehlende Sequenz unter Verwendung der RACE-Technik (Marathon Kit, ClonTech.) isoliert werden. Dieser Ansatz beruht auf der reversen Transkription von mRNA in doppelsträngige cDNA, der Ligierung von Linkern an die Enden der cDNA und der Amplifizierung der gewünschten Extremitäten der cDNA unter Verwendung eines genspezifischen Primers und eines für die Linker-Oligonukleotide. Die Marathon PCR-Produkte werden in ein Plasmid (pCRII-TOPO, InVitrogen) kloniert und sequenziert.

[0129] Die erhaltene Sequenz (SEQ ID NO:1) hat ein vermutetes offenes Leseraster von 259 Aminosäuren (SEQ ID NO:2). Die abgeleitete Proteinsequenz wurde für vermutete Algorithmen für die zelluläre Lokalisierung (PSORT: <http://psort.nibb.ac.jp/> und TopPred: http://www.biokemi.su.se/-Server/toppred2/toppred_source.html) übermittelt. Es wird vorhergesagt, dass sie 4 bis 5 Transmembransegmente hat; nur eines der zwei Verfahren, das verwendet wurde, sagt eine Signalsequenz voraus. Es gibt ein potenzielles Leucin-Zipper-Motiv, das mit einem der vorhergesagten Transmembransegmente überlappt. Es gibt 3 potenzielle N-Glycosylierungsstellen. Die subzelluläre Lokalisierung ist unklar, die Plasmamembran ist am wahrscheinlichsten.

Beispiel 7:

7.1 Expression und Reinigung tumorspezifischer Antigene

[0130] Die Expression in mikrobiellen Wirten, oder alternativ dazu die in vitro-Transkription/Translation wird verwendet, um das erfindungsgemäße Antigen für Impfstoffzwecke herzustellen, und um Proteinfragmente oder Gesamtprotein für die schnelle Reinigung und Erzeugung von Antikörpern herzustellen, die für die Charakterisierung des natürlich exprimierten Proteins mittels Immunhistochemie oder für die folgende Reinigung benötigt werden.

[0131] Rekombinante Proteine können in zwei mikrobiellen Wirten exprimiert werden, E. coli und in Hefe (wie beispielsweise Saccharomyces cerevisiae oder Pichia pastoris) Pichia. Dies ermöglicht die Selektion des Expressionssystems mit den besten Merkmalen dieser bestimmten Antigenproduktion. Im allgemeinen wird das rekombinante Antigen in E. coli exprimiert, und das Reagenzprotein in Hefe exprimiert.

[0132] Die Expressionsstrategie schließt zuerst das Entwerfen der Primärstruktur des rekombinanten Antigens ein. Im allgemeinen wird ein Expressionsfusionspartner (EFP) an die N-terminale Extremität platziert, um die Expressionsniveaus zu verbessern, die ebenfalls eine Region einschließen können, die zur Modulierung der immunogenen Eigenschaften des Antigens, eines Immunfusionspartners (IFP) nützlich sind. Zusätzlich wird ein Affinitätsfusionspartner (AFP), der für die Erleichterung einer weiteren Aufreinigung nützlich ist, am C-terminalen Ende eingeschlossen.

[0133] Wenn rekombinante Stämme verfügbar sind, wird das rekombinante Produkt durch die Untersuchung des Expressionsniveaus und der Vorhersage der weiteren Löslichkeit des Proteins durch Analyse des Verhaltens im Rohextrakt gekennzeichnet.

[0134] Nach dem Wachstum auf geeignetem Kulturmedium und der Induktion der rekombinanten Proteinexpression werden die Gesamtextrakte mittels SDS-PAGE analysiert. Die rekombinanten Proteine werden in gefärbten Gelen visualisiert und durch Western Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper identifiziert.

[0135] Eine vergleichende Untersuchung der verschiedenen Versionen des exprimierten Antigens wird die Selektion des vielversprechendsten Kandidaten ermöglichen, welcher für die weitere Reinigung und immunologische Untersuchung verwendet wird.

Expression in E. coli AR120

[0136] Das folgende Konstrukt wurde entworfen und hergestellt: das Gen CASB618, das Deletion am N-Terminus und C-Terminus trägt (Δ 1–74; Δ 247–320 aa) wurde in den Vektor pMG81 (pr PL long) kloniert, mit der Addition eines IFP (NS1 DNA-Sequenz, codierend die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 81 des NS1-Proteins vom Influenzavirus) am N-Terminus, und einem C-terminalen Histidinanhang (SEQ ID NO:4).

NS1- Met Thr Met C 61-8 Thr Ser Gly 6xHIS
75 246

[0137] Das erhaltene Plasmid wird als pRIT 15081 bezeichnet. Die Nalidixinsäure-induzierbare Wirtszelle E. coli AR120 wird verwendet. Die Induktion von drei Litern E. coli-Kulturen in LB-Medium + Kannamycin wurde durch Zugabe von Nalidixinsäure bis zu einer Endkonzentration von 60 ng/ml erreicht. Die Kulturen wurden 4 Stunden, 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

[0138] Das erhaltene Pellet nach der Zentrifugation der induzierten Kulturen wurde in 60 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend unter Verwendung einer French press lysiert. Das Lysat wurde dann für 20 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert. Wir haben das exprimierte Protein im Pellet gefunden ([Fig. 3](#)).

[0139] Das Reinigungsschema folgt einem klassischen Ansatz, der auf dem Vorhandensein eines His-Affinitätsanhangs in dem rekombinanten Protein beruht. In einem typischen Experiment werden die zerstörten Zellen filtriert und die a-zellulären Extrakte auf eine Ionen-Metall-Affinitätschromatographie (IMAC; Ni⁺⁺ NTA von Qiagen) geladen, die spezifisch das rekombinante Protein zurückhält. Die zurückgehaltenen Proteine werden durch 0 bis 500 mM Imidazolgradient (gegebenenfalls in Gegenwart eines Detergens) in einem Phosphatpuffer eluiert.

[0140] Das Reinigungsschema wird unten detailliert dargestellt.

mega) kloniert, einen Vektor, der die in vitro-Transkription ermöglicht. Die in vitro-Expression unter Verwendung von TNT T7-gekoppeltem Retikulozytenlysats (Promega Kat. Nr. L4611) unter Einschluss von S35-Methionin zeigt ein Produkt von 35 Kd, welches in Gegenwart von mikrosomalen Hunde-Pankreasmembranen (Promega Kat. Nr. Y4041) reduziert wird auf 30 Kd. Dieses Ergebnis läßt eine Prozessierung des Signalpeptids gemäß der Vorhersage des Signalpeptids von 47 Aminosäuren vermuten (und legt nahe, dass das Protein in vivo membranverankert ist oder sezerniert wird. Für diese Experimente wurde den von Promega empfohlenen Protokollen gefolgt.

7.2 Antikörperproduktion und Immunhistochemie

[0143] Geringe Mengen relativ gereinigten Proteins können verwendet werden, um immunologische Werkzeuge zu erzeugen, um

- a) die Expression durch Immunhistochemie in normalen oder Krebsgewebeschnitten nachzuweisen;
- b) die Expression nachzuweisen und das Protein während des Aufreinigungsverfahrens (ELISA/Western Blot) zu verfolgen; oder
- c) das gereinigte Protein zu charakterisieren/quantifizieren (ELISA).

7.2.1 Polyklonale Antikörper:

Immunisierung

[0144] 2 bis 3 Kaninchen werden immunisiert, intramuskulär (I.M.), 3mal in 3wöchigen Intervallen mit 100 µg Protein, formuliert im Adjuvans 3D-MPL/QS21. Drei Wochen nach der Immunisierung wird eine Blutprobe abgenommen und der Antikörper im Serum durch einen ELISA unter Verwendung des Proteins als Coating-Antigen nach einem Standardprotokoll abzuschätzen.

ELISA

[0145] Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (maxisorb Nunc) werden mit 5 µg des Proteins über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach 1 Stunde Sättigung bei 37°C mit PBS NCS 1 %, wird eine serielle Verdünnung der Kaninchenserum für 1 Stunde, 30 Minuten bei 37°C hinzugegeben (Beginnt bei 1/10). Nach 3 Waschschrritten in PBS Tween wird Anti-Kaninchen-biotinyliertes Antiserum (Amersham) hinzugegeben (1/5000). Die Platten werden gewaschen und Peroxydase-gekoppeltes Streptavidin (1/5000) wird für 30 Minuten bei 37°C hinzugegeben. Nach dem Waschen werden 50 µl TMB (BioRad) für 7 Minuten hinzugegeben, und die Reaktion wird mit H₂SO₄ 0,2 M gestoppt. Die OD kann bei 450 nm gemessen werden und mittlere Verdünnungen können durch SoftmaxPro berechnet werden.

7.2.2 Monoklonale Antikörper:

Immunisierung

[0146] 5 BALB/c-Mäuse werden 3mal in 3wöchigen Intervallen mit 5 µg gereinigten Proteins immunisiert. Blutabnahmen werden 14 Tage post II und 1 Woche post 3 durchgeführt. Die Seren werden mittels ELISA auf gereinigtem Protein, das als Beschichtungsantigen verwendet wird, getestet. Auf Grundlage dieser Ergebnisse (mittlere Verdünnung > 10.000) wird eine Maus für die Fusion ausgewählt.

Fusion/HAT-Selektion

[0147] Milzzellen werden mit den SP2/0-Myelomen gemäß einem Standardprotokoll unter Verwendung von PEG 40 % und DMSO 5 % fusioniert. Die Zellen werden dann in Platten mit 96 Vertiefungen zu 2,5 × 10⁴ bis 10⁵ Zellen/Vertiefung ausgewählt und die resistenten Klone werden in HAT-Medium selektiert. Der Überstand dieser Hybridome wird für ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern getestet, und falls sie positiv sind, wird er 2 Zyklen limitierender Verdünnungen unterworfen. Nach 2 Runden des Screenings werden 3 Hybridome für die Aszitesproduktion ausgewählt.

7.2.3 Immunhistochemie

[0148] Wenn Antikörper verfügbar sind, wird eine Immunfärbung auf normalen oder Krebsgewebeschnitten durchgeführt, um zu bestimmen:

- das Niveau der Expression des Antigens der Erfindung in Krebs, bezogen auf normales Gewebe oder

- den Anteil des Krebses einer bestimmten Art, der das Antigen exprimiert,
- auf andere Krebsarten auf das Antigen exprimieren
- den Anteil an den Zellen, die das Antigen im Krebsgewebe exprimieren.

Gewebeprobe-Herstellung

[0149] Nach der Dissektion werden Gewebeprobe auf eine Korkscheibe in OCT-Verbindung aufgeblockt und schnell in Isopentan eingefroren, was zuvor in Flüssigstickstoff tief abgekühlt wurde (-160°C). Der Block wird dann bei -70°C bis zur Verwendung konserviert. 7 bis 10 μm Schnitte werden in einer Cryostat-Kammer ($-20, -30^{\circ}\text{C}$) durchgeführt.

Färbung

[0150] Gewebeschnitte werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, in Aceton fixiert für 10 Minuten bei RT, wieder getrocknet und mit PBS 0,5 % BSA, 5 % Serum gesättigt. Nach 30 Minuten bei RT wird entweder eine direkte oder indirekte Färbung durchgeführt, indem antigenspezifische Antikörper verwendet werden. Eine direkte Färbung führt zu einer besseren Spezifität, aber einer weniger starken Färbung, während eine indirekte Färbung zu einer intensiveren, aber weniger spezifischen Färbung führt.

7.3 Analyse humaner, zellulärer Immunreaktionen gegen das Antigen der Erfindung

[0151] Die immunologische Relevanz des Antigens der Erfindung kann in vitro durch Primen von menschlichen T-Zellen untersucht werden. Alle T-Zell-Lymphozytenlinien und dendritischen Zellen stammen aus PBMCs (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut) gesunder Donoren (bevorzugt vom HLA-A2-Subtyp). Eine HLA-A2.1/ K^b -transgene Maus wird ebenfalls zum Durchmustern der HLA-A2.1-Peptide verwendet.

[0152] Neu entdeckte antigenspezifische CD8+ T-Zelllinien werden erzeugt und wöchentlich durch in vitro-Stimulierung bewahrt. Die lytische Aktivität und die γ -IFN-Produktion der CD8-Linien in Reaktion auf das Antigen oder Antigenderivatpeptide wird unter Verwendung von Standardverfahren getestet.

[0153] Zwei Strategien zum Erzeugen von CD8+ T-Zelllinien werden verwendet: ein auf Peptiden beruhender Ansatz und ein auf dem Gesamtgen basierender Ansatz. Beide Ansätze benötigen die cDNA voller Länge des neu entdeckten Antigens in einem korrekten Leseraster, um entweder in ein geeignetes Verabreichungssystem kloniert zu werden, oder um verwendet zu werden, um die Sequenz der HLA bindenden Peptide vorherzusagen.

Der auf Peptid basierende Ansatz

[0154] Die HLA-A2 bindenden Peptidsequenzen werden entweder durch Parker's Algorithmus (Parker, K. C., M. A. Bednarek und J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J. Immunol. 152:163 und http://bimas.dcrf.nih.gov/mol-bio/hla_bind/) oder das Rammensee-Verfahren (Rammensee, Friede, Stevanovic, MHC ligands und peptide motifs: 1st listing, Immunogenetics 41, 178–228, 1995; Rammensee, Bachmann, Stevanovic: MHC ligands und peptide motifs. Landes Bioscience 1997, and <http://134.2.96.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>) vorhergesagt. Die Peptide werden dann in HLA-A2.1/ K^b -transgenem Mausmodell (Vitiello et al.) durchmustert. Die verwendete Sequenz, um die Vorhersage durchzuführen, ist EPHB2v, da sie identisch mit EPHB2 mit einer zusätzlichen C-terminalen Sequenzverlängerung ist.

a) Vorhergesagte Epitope, die an das HLA_A0201 Allel binden:

a.1) HLA-A*0201 Nonamere

Position	1 2 3 4 5 6 7 8 9	Rammensee Grad	Parker Grad°	SEQ ID NO:
262	F L G G A V V S L	31	226,014	5
24	L L I V I L V F L	30	459,398	6
253	T L A T G V L C L	29		7
203	P L Y G G L A L L	28		8
149	G L P D P V L Y L	28	1107,961	9
100	G L L V G L E G I	28		10
53	W L V R V L L S L	27	226,014	11
62	F I G A E L V A V	26	101,181	12
260	C L F L G G A V V	25	105,510	13
196	V L L S T P A P L	25	134,369	14
60	S L F I G A E I V	25		15
210	L L T T G A F A L	24	210,633	16
104	G L E G I N I T L	24		17
34	L A A S F L L I L	24		18
222	F A L A S I S S V	23		19
216	F A L F G V F A L	23		20
192	L L S N V L L S T	23		21
138	Y A A E Y A N A L	23		22
33	A L A A S F L L I	23		23
31	F L A L A A S F L	23	540,469	24
21	S V P L L I V I L	23		25

174	H L A G H Y A S A	22		26
112	L T G T P V H Q L	22		27
97	A R V G L L V G L	22		28
91	S A A R V T A R V	22		29
73	S A E W F V G T V	22		30
27	V I L V F L A L A	22		31
308	A A L P D L K C I	21		32
299	I L G D P L H K Q	21		33
258	V L C L F L G G A	21		34
217	A L F G V F A L A	21		35
207	G L A L L T T G A	21		36
40	L I L P G I R G H	21		37
16	H A A G F S V P L	21		38
312	D L K C L T T N L	20		39
234	P L R L G S S A L	20		40
209	A L L T T G A F A	20	101,099	41
26	L V I L V F L A L	20		42
17	A A G F S V P L L	20		43
154	V L Y L A E K F T		222,964	44
244	T Q Y G A A F W W		719,848	45
185	W V A F C F W L L		122,527	46

° Abschätzung der Halbwertszeit der Dissoziierung eines Moleküls, das diese Subsequenz enthält.

a.2) HLA A02_01 Decamere

Position	Sequenz	Rammensee Grad*	Parker Grad°	SEQ ID NO:
33	A L A A S F L L L L	29		47
223	A L A S I S S V P L	26		48
111	T L T G T P V H Q L	26		49
209	A L L T T G A F A L	25	458,437	50
23	P L L I V I L V F L	25		51
272	Y V R P S A L R T L	24		52
261	L F L G G A V V S L	24		53
226	S I S S V P L C P L	24		54
58	L L S L F I G A E I	24		55
191	W L L S N V L L S T	23	291,716	56
61	L F L G A E I V A V	23		57
31	F L A L A A S F L L	23	569,949	58
16	H A A G F S V P L L	23		59
269	S L Q Y V R P S A L	22		60
258	V L C L F L G G A V	22		61

252	V T L A T G V L C L	22		62
101	L L V G L E G I N I	22		63
25	L I V I L V F L A L	22		64
24	L L I V I L V F L A	22	112,664	65
298	L I L G D P L H K Q	21		66
183	T L W V A F C F W L	21	21493,266	67
149	G L P D P V L Y L A	21		68
145	A L E K G L P D P V	21		69
96	T A R V G L L V G L	21		70
72	F S A E W F V G T V	21		71
175	L A G H Y A S A T L	20		72
148	K G L P D P V L Y L	20		73
104	G L E G I N I T L T	20		74
52	F W L V R V L L S L	20		75
21	S V P L L I V I L V	20		76
69	A V H F S A E W F V		251,039	77

° Abschätzung der Halbwertszeit der Dissoziation eines Moleküls, das diese Subsequenz enthält.

[0155] Kurz gefasst wurden transgene Mäuse mit HLA-A2-Peptiden in Adjuvans immunisiert, wobei die, die nicht in der Lage waren, eine CD8-Antwort zu induzieren (wie durch eine wirksame Lyse peptid-beladener autologer Milzzellen definiert wurde) werden in dem Menschen-System weiter analysiert. Menschliche, dendritische Zellen (kultiviert gemäß Romani et al.) werden mit Peptiden beladen und verwendet, um CD8-gereinigte T-Zellen (durch Facs) zu stimulieren. Nach mehreren wöchentlichen Stimulierungen werden die CD8-Linien zuerst auf peptid-beladenen autologen BLCL getestet (EBV-B-transformierte Zelllinien). Um zu überprüfen, ob eine richtige in vivo-Prozessierung des Peptids stattgefunden hat, werden die CD8-Linien auf cDNA-transfizierten Tumorzellen getestet (HLA-A2-transfizierte LnCaP-, Skov3- oder CAMA-Tumorzellen).

Der auf dem gesamten Gen beruhende Ansatz

[0156] Die CD8+ T-Zelllinien werden entweder mit "gene-gun" transfizierten dendritischen Zellen, retroviral transduzierten B7.1-transfizierten Fibroblasten, rekombinanten Pockenviren (Kim et al.) oder Adenovirus (Butterfield et al.) infizierten dendritischen Zellen geprimt und stimuliert. Virusinfizierte Zellen sind sehr effizient darin, antigene Peptide zu präsentieren, da das Antigen auf hohem Niveau exprimiert wird, aber es kann nur einmal verwendet werden, um das Überwachsen mit viralen T-Zelllinien zu vermeiden.

[0157] Nach alternierenden Stimulierungen werden die CD8+-Linien auf cDNA-transfizierten Tumorzellen, wie oben angegeben, getestet. Die Peptidspezifität und Identität wird bestimmt, um die immunologische Validierung zu bestätigen.

REFERENZEN

Vitiello et al. (L. Sherman), J. Exp. Med., J. Exp. Med, 1991, 173:1007–1015.
 Romani et al., J. Exp. Med., 1994, 180:83–93.
 Kim et al., J. Immunother., 1997, 20:276–286.
 Butterfield et al., J. Immunol., 1998, 161:5607–5613.

[0158] SEQUENZLISTE

<110> Vinals-Bassols, Carlotta
 Bruck, Claudine
 Cassart, Jean-Pol
 Coche, Thierry

<120> Neue Verbindungen

<130> BC45225

<160> 77

<170> FastSEQ für Windows Version 3.0

<210> 1
 <211> 1441
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 1

```

aaagtaacgg ctacagacag tgagaaatag tttcgcctgc cggctagaaa aactctgtcg      60
gtaccaaccc cagagcgttg agagcagccc acctccacgc ttccttaacg gagaggtgca      120
ggactcagac ttcaccagcc cactcgggcc cagccttgta cgcaaagaga cgccaaggac      180
gcgctctccc gcgtccaggc agccccagct tgctggcttg cctgcccgcc tgcgtgcagc      240
actcggccgg cgtgcagcat gacctgtgg aacggcgtac tgccttttta cccccagccc      300
cggcatgccg caggettccag cgttccactg ctcatcgtta ttctagtgtt tttggctcta      360
gcagcaagct tcttgetcat cttgccgggg atccgtggcc actcgcgctg gttttggttg      420
gtgagagttc ttctcagtct gttcataggc gcagaaatg tggctgtgca cttcagtgca      480
gaatggttcg tgggtacagt gaacaccaac acatcctaca aagccttcag cgcagcgcgc      540
gttacagccc gtgtcgggtc gctcgtgggc ctggagggca ttaatattac actcacaggg      600
accccagtgc atcagctgaa cgagaccatt gactacaacg agcagttcac ctggcgtctg      660
aaagagaatt acgccgcgga gtacgcgaac gcactggaga aggggctgcc ggaccagtg      720
ctctacctgg cggagaagtt cacaccgagt agcccttgcg gctgtacca ccagtaccac      780
ctggcgggac actacgcctc ggccacgcta tgggtggcgt tctgcttctg gctcctctcc      840
aacgtgctgc tctccacgcc ggccccgctc tacggaggcc tggcactgct gaccaccgga      900
gccttcgcgc tcttcggggg cttcgccttg gctcctctc ctacgctgcc gctctgcccg      960
ctccgcctag gctcctccgc gctcaccact cagtacggcg ccgcttctg ggtcacgctg     1020
gcaaccggcg tctgtgcct cttcctcggg ggggccgtgg tgagtctcca gtatgttcgg     1080
cccagcgtc ttcgcaccct tctggaccaa agcgcgaagg actgcagcca ggagagaggg     1140
ggctcacctc ttatcctcgg cgacccactg cacaagcagg ccgctctccc agacttaaaa     1200
tgtatcacca ctaacctgtg aggggggacc aatctggact ccttccccgc cttgggacat     1260
cgcaggccgg gaagcagtgc ccgccaggcc tgggccagga gagctccagg aagggcactg     1320
agcgtgctg gcgcgaggcc tcggacatcc gcaggcacca gggaaagtct cctggggcga     1380
tctgtaaata aacctttttt tcttttgttt tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1440
a
    
```

<210> 2
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 2

```

Met Thr Leu Trp Asn Gly Val Leu Pro Phe Tyr Pro Gln Pro Arg His
 1           5           10          15
Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
    
```


Met Asp Pro Asn Thr Val Ser Ser Phe Gln Val Asp Cys Phe Leu Trp
 1 5 10 15
 His Val Arg Lys Arg Val Ala Asp Gln Glu Leu Gly Asp Ala Pro Phe
 20 25 30
 Leu Asp Arg Leu Arg Arg Asp Gln Lys Ser Leu Arg Gly Arg Gly Ser
 35 40 45
 Thr Leu Gly Leu Asp Ile Glu Thr Ala Thr Arg Ala Gly Lys Gln Ile
 50 55 60
 Val Glu Arg Ile Leu Lys Glu Glu Ser Asp Glu Ala Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80
 Met Glu Trp Phe Val Gly Thr Val Asn Thr Asn Thr Ser Tyr Lys Ala
 85 90 95
 Phe Ser Ala Ala Arg Val Thr Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
 100 105 110
 Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu Asn
 115 120 125
 Glu Thr Ile Asp Tyr Asn Glu Gln Phe Thr Trp Arg Leu Lys Glu Asn
 130 135 140
 Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Asn Ala Leu Glu Lys Gly Leu Pro Asp Pro
 145 150 155 160
 Val Leu Tyr Leu Ala Glu Lys Phe Thr Pro Ser Ser Pro Cys Gly Leu
 165 170 175
 Tyr His Gln Tyr His Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala Thr Leu Trp
 180 185 190
 Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr Pro
 195 200 205
 Ala Pro Leu Tyr Gly Gly Leu Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala
 210 215 220
 Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu Cys
 225 230 235 240
 Pro Leu Arg Leu Gly Ser Ser Ala Leu Thr Thr Gln Tyr Thr Ser Gly
 245 250 255
 His His His His His His
 260

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 5

Phe Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Leu
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 6

Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 7
 Thr Leu Ala Thr Gly Val Leu Cys Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 8
 Pro Leu Tyr Gly Gly Leu Ala Leu Leu
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 9
 Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 10
 Gly Leu Leu Val Gly Leu Glu Gly Ile
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 11
 Trp Leu Val Arg Val Leu Leu Ser Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 12
 Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val Ala Val
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 13
 Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val Val
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Human
 <400> 14
 Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Pro Leu
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 15
 Ser Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 16
 Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala Leu
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 17
 Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 18
 Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile Leu
 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 19
 Phe Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 20
 Phe Ala Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu
 1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 21
Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 22
Tyr Ala Ala Glu Tyr Ala Asn Ala Leu
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 23
Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 24
Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 25
Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 26
His Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 27
Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 28
Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 29
Ser Ala Ala Arg Val Thr Ala Arg Val
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 30
Ser Ala Glu Trp Phe Val Gly Thr Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 31
Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu Ala
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 32
Ala Ala Leu Pro Asp Leu Lys Cys Ile
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 33
Ile Leu Gly Asp Pro Leu His Lys Gln
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 34
Val Leu Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 35
Ala Leu Phe Gly Val Phe Ala Leu Ala
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 36
Gly Leu Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 37
Leu Ile Leu Pro Gly Ile Arg Gly His
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 38
His Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 39
Asp Leu Lys Cys Ile Thr Thr Asn Leu
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 40
Pro Leu Arg Leu Gly Ser Ser Ala Leu
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 41
Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 42
Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu
1 5

<210> 43
<211> 9
<213> Human

<400> 43
Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 44
Val Leu Tyr Leu Ala Glu Lys Phe Thr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 45
Thr Gln Tyr Gly Ala Ala Phe Trp Trp
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 46
Trp Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu Leu
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
>213> Human

<400> 47
 Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu Ile Leu
 1 5 10

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 48
 Ala Leu Ala Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu
 1 5 10

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 49
 Thr Leu Thr Gly Thr Pro Val His Gln Leu
 1 5 10

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 50
 Ala Leu Leu Thr Thr Gly Ala Phe Ala Leu
 1 5 10

<210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 51
 Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu
 1 5 10

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 52
 Tyr Val Arg Pro Ser Ala Leu Arg Thr Leu
 1 5 10

<210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 53
 Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Leu
 1 5 10

<210> 54
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Human

 <400> 54
 Ser Ile Ser Ser Val Pro Leu Cys Pro Leu
 1 5 10

 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 55
 Leu Leu Ser Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile
 1 5 10

 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 56
 Trp Leu Leu Ser Asn Val Leu Leu Ser Thr
 1 5 10

 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 57
 Leu Phe Ile Gly Ala Glu Ile Val Ala Val
 1 5 10

 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 58
 Phe Leu Ala Leu Ala Ala Ser Phe Leu Leu
 1 5 10

 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 59
 His Ala Ala Gly Phe Ser Val Pro Leu Leu
 1 5 10

 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 60
 Ser Leu Gln Tyr Val Arg Pro Ser Ala Leu
 1 5 10

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 61
 Val Leu Cys Leu Phe Leu Gly Gly Ala Val
 1 5 10

 <210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 62
 Val Thr Leu Ala Thr Gly Val Leu Cys Leu
 1 5 10

 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 63
 Leu Leu Val Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile
 1 5 10

 <210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 64
 Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala Leu
 1 5 10

 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 65
 Leu Leu Ile Val Ile Leu Val Phe Leu Ala
 1 5 10

 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

 <400> 66
 Leu Ile Leu Gly Asp Pro Leu His Lys Gln
 1 5 10

 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 67
 Thr Leu Trp Val Ala Phe Cys Phe Trp Leu
 1 5 10

<210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 68
 Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 69
 Ala Leu Glu Lys Gly Leu Pro Asp Pro Val
 1 5 10

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 70
 Thr Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Gly Leu
 1 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 71
 Phe Ser Ala Glu Trp Phe Val Gly Thr Val
 1 5 10

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 72
 Leu Ala Gly His Tyr Ala Ser Ala Thr Leu
 1 5 10

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 73
 Lys Gly Leu Pro Asp Pro Val Leu Tyr Leu
 1 5 10

```

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 74
Gly Leu Glu Gly Ile Asn Ile Thr Leu Thr
 1             5             10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 75
Phe Trp Leu Val Arg Val Leu Leu Ser Leu
 1             5             10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 76
Ser Val Pro Leu Leu Ile Val Ile Leu Val
 1             5             10

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 77
Ala Val His Phe Ser Ala Glu Trp Phe Val
 1             5             10

```

Patentansprüche

1. Impfstoff, umfassend eine wirksame Menge Antigen-präsentierender Zellen, modifiziert durch die Beladung in vitro mit einem Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz, die über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz in SEQ ID NO:2 hat, oder in vitro genetisch modifiziert sind, um dieses Polypeptid zu exprimieren, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

2. Impfstoff, umfassend eine wirksame Menge Antigen-präsentierender Zellen, modifiziert durch die Beladung in vitro mit einem immunogenen Fragment eines Polypeptids, wobei das Polypeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz in SEQ ID NO:2 hat, und das immunogene Fragment dazu in der Lage ist, eine Immunantwort auszulösen, die SEQ ID NO:2 erkennt, oder in vitro genetisch modifiziert sind, um dieses immunogene Fragment zu exprimieren, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

3. Verwendung eines Polypeptids umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 hat zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs.

4. Verwendung eines immunogenen Fragments eines Polypeptids, wobei das Polypeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz in SEQ ID NO:2 hat, und wobei das immunogene Fragment dazu in der Lage ist, eine Immunantwort auszulösen, die SEQ ID NO:2 erkennt, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs.

5. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei das Polypeptid Teil eines größeren Fusionsproteins ist.

6. Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei das Polypeptid chemisch an ein Trägerprotein konjugiert ist.

7. Verwendung eines Polynukleotids, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die ein Polynukleotid codiert, das mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 über die gesamte Länge der SEQ ID NO:2 hat, oder eine Nukleotidsequenz, die zu diesem Polynukleotid komplementär ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs.

8. Verwendung eines Polynukleotids, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die über die gesamte Länge der SEQ ID NO:1 mindestens 70% Identität mit SEQ ID NO:1 hat, oder ein Nukleotid, das zu diesem Polynukleotid komplementär ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs.

9. Verwendung einer Immunzelle zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs, wobei die Immunzelle in vitro mit einem Polypeptid inkubiert wird, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die über die gesamte Länge der SEQ ID NO:2 mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 hat, oder mit einem Polynukleotid, wobei das Polypeptid eine Nucleotidsequenz umfasst, die über die Gesamtlänge der SEQ ID NO:1 mindestens 70% Identität mit der in SEQ ID NO:1 hat.

10. Verwendung einer Immunzelle zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs, wobei die Immunzelle in vitro mit einem immunogenen Fragment eines Polypeptids inkubiert wird, wobei das Polypeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, die über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz in SEQ ID NO:2 hat, und wobei das immunogene Fragment dazu in der Lage ist, eine Immunantwort auszulösen, die SEQ ID NO:2 erkennt.

11. Verfahren zum Diagnostizieren von Darmkrebs in einem Individuum, umfassend das Analysieren des Vorhandensein oder der Menge eines Polypeptids, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 hat, in einer Probe, die von dem Individuum stammt.

12. Verfahren zum Diagnostizieren von Darmkrebs in einem Individuum, umfassend das Analysieren des Vorhandensein oder der Menge eines Polynukleotids, das eine Nukleotidsequenz umfasst die über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:1 mindestens 70% Identität mit SEQ ID NO:1 hat, oder ein Nukleotid, das zu diesem Polynukleotid komplementär ist in einer Probe, die von dem Individuum stammt.

13. Verwendung eines Antikörpers, der für ein Polypeptid oder ein immunologisches Fragment des Polypeptids spezifisch ist, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 70% Identität mit der Aminosäuresequenz in SEQ ID NO:2 über die Gesamtlänge von SEQ ID NO:2 hat, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Darmkrebs.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figure 1: Expression levels of CASB618 in matched colon normal and tumoral samples.

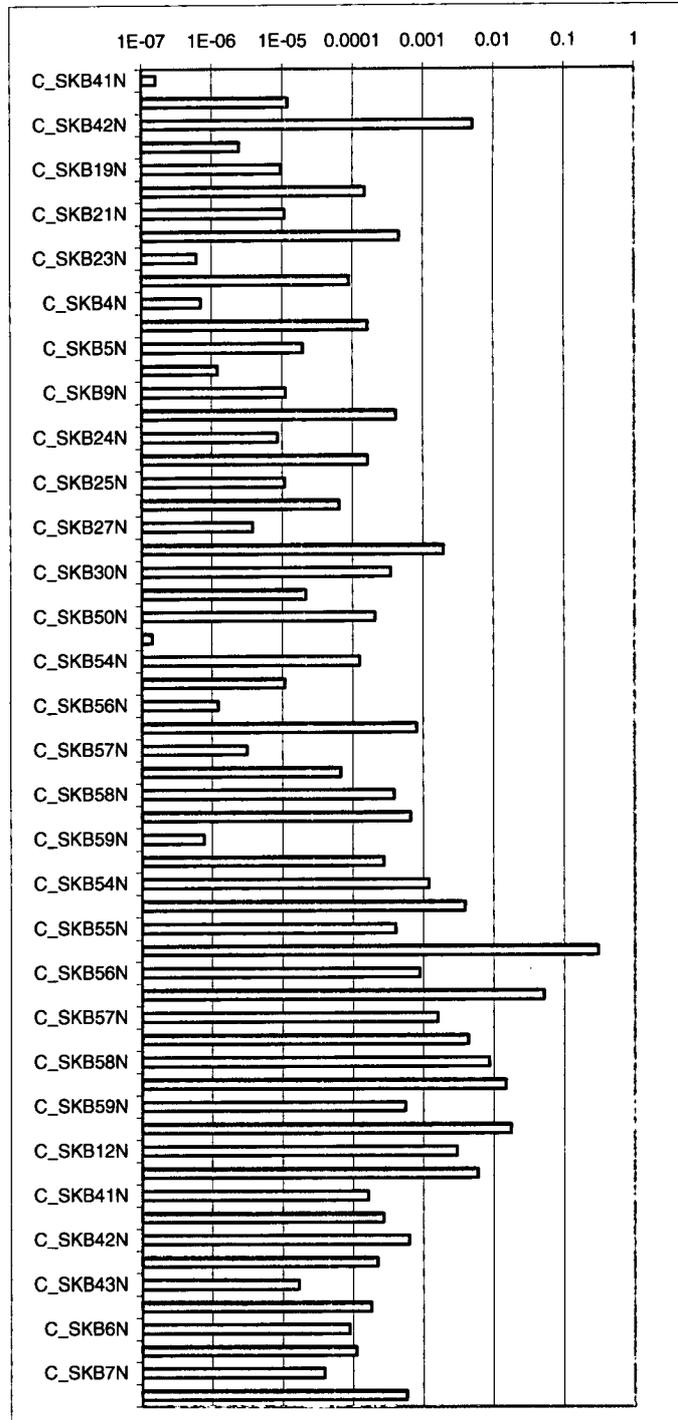


Figure 2A: Expression of CASB618 in normal tissues: Real-time PCR results

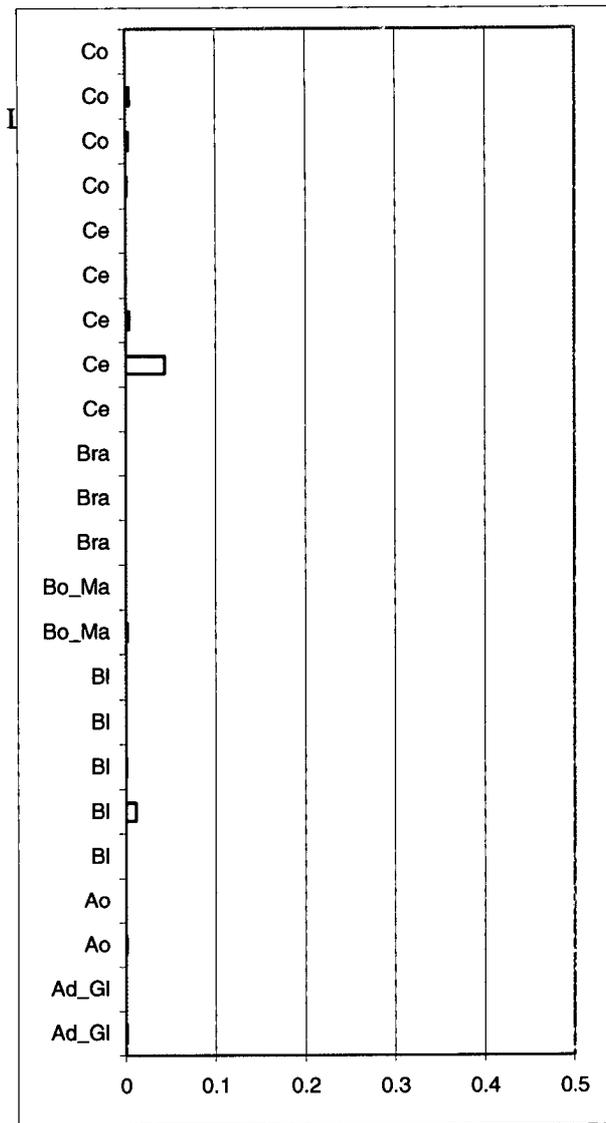


Figure 2B: Real-time PCR data of CASB618 expression in normal tissues (continued)

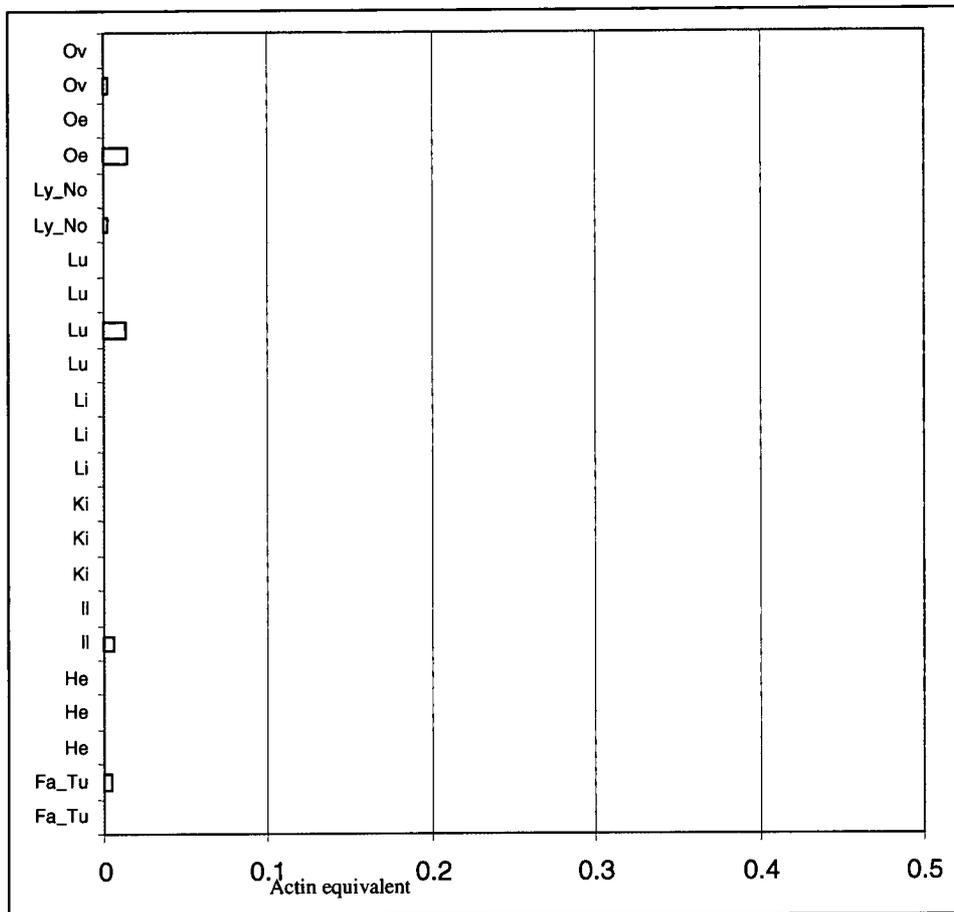


Figure 2C: Real-time PCR data of CASB618 expression in normal tissues (continued)

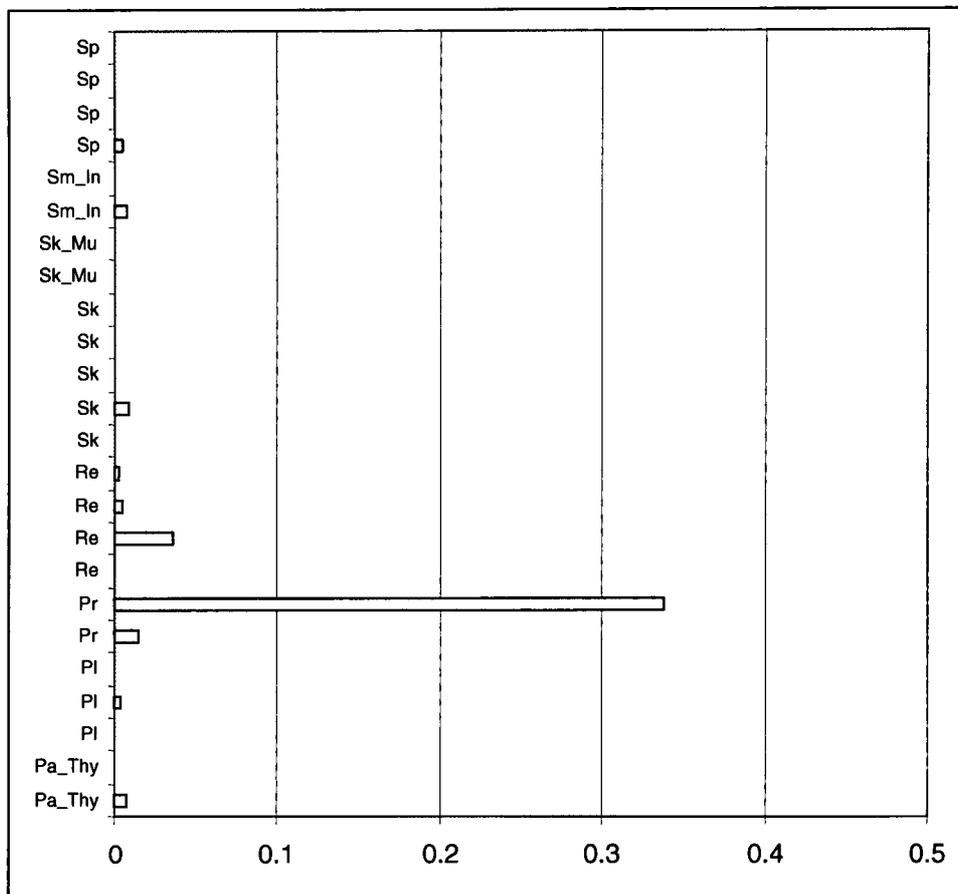


Figure 2D: Real-time PCR data of CASB618 expression in normal tissues (continued)

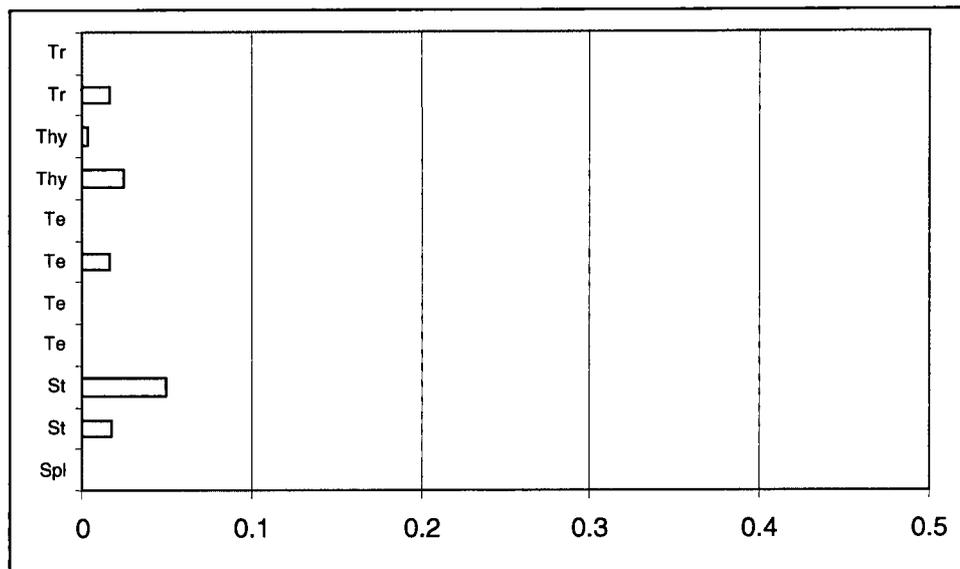


Figure 3: SDS-PAGE gel (12,5 %) of the *E. coli* AR120/pRIT15081 extract.

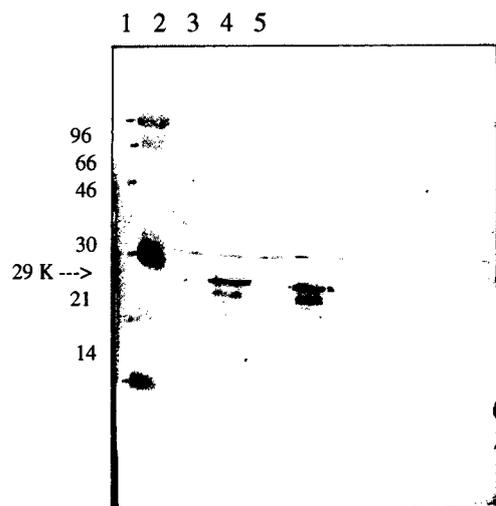
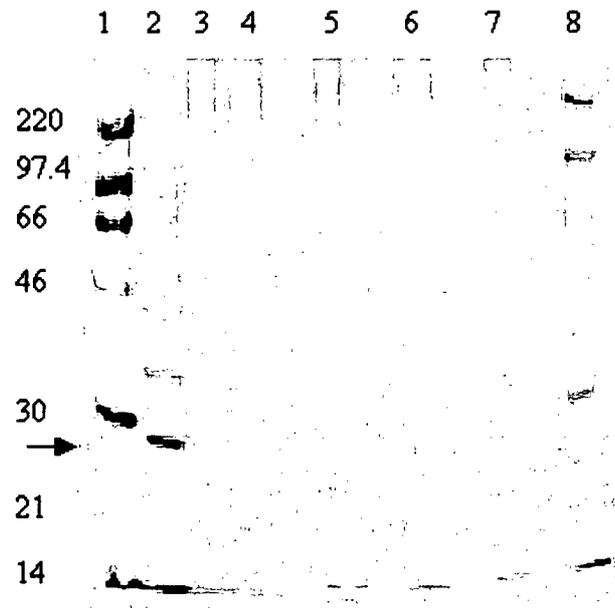
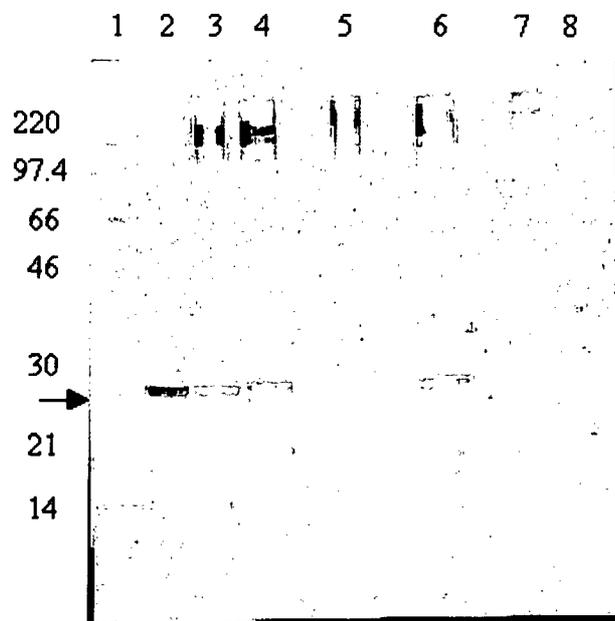


Figure 4: SDS-PAGE gels of purified CASB618



Coomassie 12%



WB revealed with Mab anti NS1