



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 18 146 T2** 2005.07.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 117 421 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 18 146.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK99/00525**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 945 967.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/20027**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **13.04.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.07.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 38/17**

**A61K 38/18, C07K 14/50, C07K 14/705,
C07K 14/71, C12N 15/63, C12N 5/16,
C12N 15/12**

(30) Unionspriorität:

126198	05.10.1998	DK
105011 P	20.10.1998	US

(73) Patentinhaber:

Pharmexa A/S, Horsholm, DK

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**STEINAA, Lucilla, DK-1655 K benhavn V, DK;
MOURITSEN, Soren, DK-3460 Birkerod, DK;
NIELSEN, Gregorius, Klaus, DK-2860 S borg, DK;
HAANING, Jesper, DK-3460 Birker d, DK; LEACH,
Dana, DK-2100 Copenhagen O, DK; DALUM, Iben,
DK-2970 H rsholm, DK; GAUTAM, Anand, DK-2990
Niva, DK; RASMUSSEN BIRK, Peter, DK-2000
Frederiksberg, DK; KARLSSON, Gunilla, DK-2100
K benhavn, DK**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR THERAPEUTISCHEN IMPFUNG**

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**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Verfahren zur Bekämpfung von Krankheiten, wie Krebs, welche durch das Vorhandensein von Zell-gebundenen Genexpressionsprodukten, welche nicht-immunogen oder schwach immunogen sind, gekennzeichnet sind. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Verfahren zum Induzieren einer Immunantwort, die durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) ausgeführt wird, wobei Zellen, die Epitope von den Genexpressionsprodukten tragen, von den CTLs angegriffen und getötet werden. Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Verfahren zur Herstellung immunogener, modifizierter Polypeptid-Antigene, welche von schwach immunogenen Antigenen abgeleitet sind.

[0002] Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf eine Reihe von Anwendungen der AutoVac-Technologie der Anmelder (welche der Gegenstand der WO 95/05849 ist) auf dem Gebiet der therapeutischen Impfung gegen Krebs.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Die Idee der Impfung gegen Krebs existiert seit über 100 Jahren und hat wiederholte Ausbrüche der Aktivität erfahren, insbesondere seit der letzten Jahrhundertwende.

[0004] Jedoch hat sich das Verständnis der grundlegenden molekularen Mechanismen der Immunantwort während der letzten 10 Jahre wesentlich verbessert. Unter den wichtigsten Meilensteinen, die während dieser Phase erreicht wurden, fanden sich auch die Entdeckung der noch immer wachsenden Liste der Cytokine und Wachstumsfaktoren, das Verstehen des Mechanismus der Interaktion zwischen T- und B-Zellen sowie die Feststellung der zellulären Antigen-Prozessierungswege, einschließlich der Rolle und Struktur der MHC-Klasse I- und II-Moleküle bei der Antigenpräsentation. Wichtige Entdeckungen in Bezug auf die Krebsimmunologie – obwohl diese noch immer nicht vollständig verstanden ist – betrafen auch die Erklärung der Mechanismen, die der Induktion der immunologischen Toleranz in einem Wirt zugrunde liegen. Alle diese Forschungsunternehmen haben zu einer großen Anzahl von Versuchen geführt, neue Behandlungen für humanen Krebs zu entwickeln.

[0005] Abhängig davon, wie Tumorimmunität beim Patienten erreicht wird, können Immuntherapiebehandlungen entweder als passive oder aktive Behandlungen kategorisiert werden. Bei passiven Immuntherapiebehandlungen erhält der Patient passiv Immunkomponenten, wie Cytokine, Antikörper, cytotoxische T-Zellen oder aktivierte Killer-Lymphozytenzellen (LAK). Im Gegensatz dazu umfassen aktive spezifische Immuntherapie-Protokolle das Induzieren der Tumorimmunität durch Vakzinieren/Impfung mit der Tumorzelle oder seinen antigenischen Komponenten. Letztere Form der Behandlung ist bevorzugt, da die Immunität länger anhaltend ist.

[0006] Passive und aktive Krebs-Impfstoffe konzentrierten sich entweder auf das Induzieren von humoralen oder zellulären Immunantworten. In Bezug auf aktive Impfstoffe besteht die wohletablierte Meinung, dass die Induktion von CD4-positiven T-Helferzellen notwendig ist um sekundär entweder Antikörper oder cytotoxische CD8-positive T-Zellen zu induzieren.

Passive Vakzinierung mit Antikörpern

[0007] Seit der Entdeckung der monoklonalen Antikörper-Technologie in der Mitte der siebziger Jahre ist eine große Anzahl therapeutischer monoklonaler Antikörper entwickelt worden, die gegen Tumor-spezifische oder Tumor-gebundene Antigene gerichtet sind. Die monoklonale Antikörpertherapie verursacht jedoch mehrere schwere Probleme:

- Die Injektion dieser fremden Substanzen induziert eine Immunantwort in dem Patienten gegen die injizierten Antikörper, welche zu einer weniger effizienten Behandlung sowie zu schweren allergischen Nebenwirkungen bei den Patienten führen kann.
- Monoklonale Antikörper müssen für gewöhnlich in großen Mengen verabreicht werden. Dies ist ein Problem, da die Produktionskosten für monoklonale Antikörper gewaltig sind.
- Monoklonale Antikörper müssen über den parenteralen Weg verabreicht werden und aufgrund der relativ großen erforderlichen Mengen müssen die Patienten häufig während der Behandlung ins Krankenhaus eingewiesen werden.
- Die Injektionen von monoklonalen Antikörpern müssen innerhalb relativ kurzer Intervalle (Wochen) wie-

derholt werden um eine therapeutische Wirkung aufrecht zu erhalten.

– Monoklonale Antikörper sind für gewöhnlich nicht in der Lage, sekundäre Effektorsysteme, wie beispielsweise das Abtöten von Tumorzellen durch Komplement, NK-Zellen oder Makrophagen, zu aktivieren.

[0008] Der letztgenannte Nachteil ist bei der Krebstherapie von besonderer Wichtigkeit und kann ein wichtiger Grund sein, warum die monoklonale Antikörpertherapie von Krebs in zahlreichen Fällen nicht besonders erfolgreich war. Die sogenannten humanisierten monoklonalen Antikörper, die jetzt von vielen Unternehmen verwendet werden, sind weniger immunogen, aber leider sind sie noch weniger in der Lage, die sekundären Immuneffektorsysteme zu aktivieren. Außerdem wurden Beispiele für sekundäres Wachstum von Tumoren, denen das ursprüngliche Tumor-Antigen fehlt, beobachtet, da diese Antikörper keine Wirkungen auf "unschuldige Zuschauer" ("innocent bystander" effects) auf Tumorzellen, die das Tumor-Antigen nicht tragen, ausüben.

[0009] Die nur schwache Effektor-Befähigung der monoklonalen Antikörper hat zur Entwicklung monoklonaler Antikörper, die chemisch mit verschiedenen Toxinen und Radioisotopen verbunden sind, geführt. Z.B. Pharmacia Upjohn AB hat eine Verknüpfung von einem monoklonalen, Tumor-spezifischen Antikörper und dem Staphylococcus aureus-Toxin A mit dem Zweck entwickelt, T-Zellen im Tumor zu aktivieren. Medarex Inc. hat bispezifische monoklonale Antikörper entwickelt, die ein Tumor-spezifisches Fab-Fragment sowie ein spezifisches Fc-Rezeptor-Antikörperfragment enthalten, mit dem Zweck entwickelt, das Töten von Tumorzellen durch Makrophagen zu aktivieren. Beide Konstrukte sind effektiver als der monoklonale Antikörper alleine, aber sie sind auch teurer und stärker immunogen. Antikörper, die mit Radioisotopen verbunden sind, sind ebenfalls sowohl teuer als auch immunogen, und es werden andere allgemeine toxische Nebenwirkungen beobachtet.

[0010] Das Erscheinen der monoklonalen Antikörpertechnologie war ein großer Schritt vorwärts, welcher die Herstellung von wohldefinierten Bindemolekülen mit hoher Affinität ermöglichte. Da diese Antikörper jedoch monoklonal sind, reagieren sie nur mit einem einzelnen Epitop-Typus auf einem Tumor-Antigen. Dies ist der hauptsächliche Grund dafür, dass sie für gewöhnlich nicht in der Lage sind, das Komplementsystem zu aktivieren oder an die Fc-Rezeptoren von NK-Zellen und Makrophagen zu binden. Diese sehr wirkungsvollen Effektorsysteme erfordern für gewöhnlich die gleichzeitige Lokalisierung multipler Fc-Antikörperfragmente, die aus dem Antigen herausragen.

[0011] Andere Forscher haben daher versucht, zwei monoklonale Antikörper in Kombination zu verwenden, und dies hat zu einer verbesserten Wirkung geführt. Statt dessen scheint es sehr sinnvoll zu sein, Tumorzellen mit hochspezifischen polyklonalen Antikörpern, die gegen ein Tumor-spezifisches oder gegen (überexprimierte) Tumor-assoziierte Antigene oder Wachstumsfaktorrezeptoren gerichtet sind, anzugreifen. Solche Antikörper wären vollständig in der Lage, die sekundären Effektorsysteme, die oben genannt sind, zu aktivieren. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die lokale Entzündungsreaktion, die von diesen Effektorsystemen induziert wird, zu sekundären Wirkungen auf Zellen, die sogenannte "unschuldige Zuschauer" sind und das fragliche Tumor-Antigen nicht exprimieren, führt, sowie zur Aktivierung von Tumor-spezifischen TILs (Tumor-infiltrierenden Lymphozyten) im Tumorgewebe. Solche Wirkungen wurden von Medarex Inc. bei der Verwendung ihrer bispezifischen monoklonalen Antikörperkonjugate beobachtet.

[0012] Seit der Entdeckung der monoklonalen Antikörpertechnologie wurde die mögliche Verwendung von polyklonalen Antikörpern zur Krebstherapie nicht sehr stark untersucht (mit der Ausnahme der unten beschriebenen Antigene). Einer der Hauptgründe ist der, dass wohldefinierte Tumor-spezifische oder Tumor-assoziierte Oberflächenantigene erst in den letzten Jahren charakterisiert worden sind, wobei sich aber – was noch wichtiger ist – viele von diesen als Selbstantigene, und daher als nicht-immunogen entpuppt haben. Dementsprechend hätten xenogenische polyklonale Antikörper verwendet werden müssen um diese Wirkungen zu untersuchen. Solche Antikörper induzieren jedoch eine energische Immunantwort gegen die injizierten fremden polyklonalen Antikörper, welche die therapeutischen Wirkungen schnell zerstört.

Aktive Impfung zur Induktion von Antikörpern

[0013] Jüngste Versuche, therapeutische polyklonale Autoantikörper bei Krebspatienten durch aktive Impfung/Vakzinierung zu induzieren, waren erfolgreich. Es wurden Vakzine/Impfstoffe gegen Membran-gebundene Kohlenhydrat-Selbstantigene (wie die O-gebundenen, fehlexprimierten Tn- und sTn-Antigene und die Gangliosidliposaccharide GM2 und GD3) entwickelt. Diese kleinen Kohlenhydratstrukturen sind jedoch sehr schwache Antigene, so dass Konjugate dieser Moleküle mit Trägermolekülen, wie dem Napfschneckenhaemocyanin ("keyhole limpet haemocyanin, KLH) oder Schafmucinen (die Tn- und sTn enthalten) verwendet werden müssen. Bei Melanom-Patienten ging die Induktion von Anti-GM2-Antikörpern nach einer Mindestnachfol-

getherapie von 51 Monaten mit einem längeren krankheitsfreien Zeitraum und längerer Gesamtüberlebensrate einher. Es wurden auch randomisierte Phase-II-Studien bei Brustkrebs-Patientinnen durchgeführt, bei denen ein Konjugat von sTn und KLH in DETOX-B-Adjuvans (BIOMIRA Inc.) verwendet wurde, die zeigten, dass sTn-immune Patienten eine signifikant längere mittlere Überlebensrate im Vergleich mit Kontrollen besaßen. Ein weiteres Beispiel der aktiven Induktion von polyklonalen Antikörpern bei Krebs ist die Verwendung von Idiotyp-spezifischer Impfung gegen B-Zell-Lymphome, welche – obwohl sie sehr vielversprechend war – auf diese Krebsart beschränkt ist.

[0014] Schließlich hat das US-Unternehmen Aphton Inc. aktive Konjugat-Impfstoffe gegen Gonadotropin-Freisetzungshormon (GnRH) und Gastrin entwickelt. Es wurde gezeigt, dass dieser Impfstoff in der Lage ist, die biologische Aktivität dieser Hormone zu kontrollieren, welche ebenfalls als autokrine Wachstumsfaktoren für gewisse Tumorzellen dienen können. Erfolgreiche klinische Phase-II-Studien wurden bei Magen-Darm-Krebs-Patienten durchgeführt, und klinische Phase-III-Studien laufen noch.

Cytotoxische T-Zellen

[0015] Es wurde von mehreren Gruppen eindeutig gezeigt, dass Tumor-spezifische, cytotoxische T-Zellen (CTLs) bei vielen Tumoren vorhanden sind. Diese CTLs werden Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) genannt. Jedoch werden diese Zellen mittels mehrerer verschiedener möglicher Mechanismen, einschließlich der Sezernierung immunsuppressiver Cytokine durch die Tumorzellen, Mangel bzw. Fehlen von co-stimulatorischen Signalen, negative Regulation von MHC-Klasse I-Molekülen, etc., nicht-reaktiv oder anerg.

[0016] Es wurden viele Versuche unternommen, die Tumor-spezifischen HLA-Klasse I-gebundenen Peptide, die von TILs erkannt werden, zu isolieren, und in einigen Fällen war dies auch erfolgreich (z.B. Peptide der Melanom-assoziierten Antigene). Solche Peptide wurden verwendet um eine Tumor-spezifische Immunantwort bei dem Wirt zu induzieren, aber die praktische Verwendung von Tumor-spezifischen Peptiden in Impfstoffen ist aufgrund der engen Spezifität der HLA-Klasse I-Bindung der Peptide auf einen eingeschränkten Teil der Bevölkerung beschränkt. Außerdem ist es für gewöhnlich relativ schwierig, eine CTL-Antwort in vivo unter Verwendung synthetischer Peptide hervorzurufen, und zwar aufgrund der niedrigen biologischen Halbwertszeit dieser Substanzen sowie aufgrund der Schwierigkeiten der exogenen Aktivierung bzw. des Primings von MHC-Klasse I-Molekülen.

[0017] Viele andere Ansätze wurden ausprobiert, mit dem Ziel, eine Tumor-spezifische CTL-Antwort hervorzurufen, einschließlich der Verwendung von Cytokinen (z.B. IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-10 oder GM-CSF) oder co-stimulatorischer Moleküle (B7), entweder in löslicher Form oder exprimiert von der transfizierten Tumorzelle. Außerdem wurden Immunisierungen mit allogenen oder autologen vollständigen Zellen oder mit Tumor-Antigenen, die in spezialisierten Adjuvantien präpariert wurden, die so gestaltet waren, dass das Antigen über den MHC-Klasse I-Antigen-Präsentationsweg präsentiert wurde, oder mit Tumor-Antigenen, die z.B. in Vaccinia-Vektoren exprimiert wurden, etc., mit wechselndem Erfolg verwendet. Die allgemeine Meinung unter Tumorimmunologen ist daher noch immer, dass einer der besten Wege, Tumoren zu eliminieren, der ist, eine starke spezifische Antitumor-CTL-Antwort zu induzieren.

[0018] Ungeachtet der Tatsache, dass diese Behandlungen für gewöhnlich sehr teuer und schwierig zu wiederholen sind, hat es sich auch herausgestellt, dass es schwierig ist, eine gute Immunantwort gegen den Tumor hervorzurufen, da viele der Tumor-assoziierten Antigene echte Selbstproteine sind, gegenüber welchen die meistens T-Zellen tolerant zu sein scheinen. Daher scheint es notwendig, eine kontrollierte zelluläre Autoimmun-Situation im Patienten hervorzurufen.

AUFGABE DER ERFINDUNG

[0019] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, verbesserte Verfahren und Mittel zum Induzieren von Immunantworten in Wirtsorganismen gegen unerwünschte Antigene, z.B. Tumor-Antigene, zu induzieren. Es ist eine weitere Aufgabe, ein Verfahren zum Herstellen von Polypeptid-Analoga solcher unerwünschter Antigene bereitzustellen, und zwar von Analoga, welche in der Lage sind, eine effektive Immunantwort gegen das unerwünschte Antigen hervorzurufen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0020] Die Präsentation von Antigenen wurde dogmatisch in zwei unabhängigen Wegen betrachtet, einem exogenen Klasse II-Weg und einem endogenen Klasse I-Weg.

[0021] Kurz, ein fremdes Protein außerhalb der Zelle oder von der Zellmembran wird von der APC als Endosom aufgenommen, welches mit einem intrazellulären Kompartiment fusioniert, welches proteolytische Enzyme und MHC-Klasse II-Moleküle enthält. Einige der produzierten Peptide binden an Klasse II, welche dann zur Zellmembran verbracht werden.

[0022] Der endogene Klasse I-Weg ist durch die vorherrschende Präsentation cytosolischer Proteine gekennzeichnet. Es wird vermutet, dass diese über Proteasomen-vermittelten Verdau, gefolgt vom Transport der Peptide in das endoplasmatische Retikulum (ER) über TAP-Moleküle, die sich in der Membran des ER befinden, geschieht. Im ER binden die Peptide an Klasse I, gefolgt vom Transport zur Plasmamembran.

[0023] Diese zwei Wege sind jedoch nicht vollständig unabhängig. Es ist z.B. bekannt, dass dendritische Zellen, und in gewissem Ausmaß auch Makrophagen, in der Lage sind, extrazelluläre Proteine durch Endocytose (Pinocytose) aufzunehmen und anschließend in Verbindung mit MHC-Klasse I zu präsentieren. Es wurde ebenfalls zuvor gezeigt, dass exogene Antigene bei der Verwendung von spezialisierten Verabreichungswegen, z.B. durch Koppeln an Eisenoxidkügelchen, in der Lage sind, in den Klasse I-Weg einzutreten (Rock, 1996). Aufgrund der Wichtigkeit einer gleichzeitigen Expression von sowohl Klasse I als auch Klasse II auf derselben APC zum Hervorbringen eines Clusters des Drei-Zell-Typs, scheint dieser Mechanismus zentral zu sein. Dieser Wechselwirkungs-Cluster vom Drei-Zell-Typ wurde von Mitchison (1987) und später von anderen Autoren vorhergesagt. Sie zeigten die Wichtigkeit der gleichzeitigen Präsentation von Klasse I- und Klasse II-Epitopen auf derselben APC. Entsprechend dem kürzlich beschriebenen Mechanismus der CTL-Aktivierung (vgl. Lanzavecchia, 1998, Nature 393: 413, Matzinger, 1999, Nature Med. 5: 616, Ridge et al., 1998, Nature 393: 474, Bennett et al., 1998, Nature 393: 478, Schoenberger et al., 1998, Nature 393: 480, Ossendrop et al., 1998, J. Exp. Med 187: 693, und Mackey et al., 1998, J. Immunol 161: 2094) werden professionelle APCs, die Antigen auf MHC-Klasse II präsentieren, von T-Helferzellen erkannt. Dies führt zu einer Aktivierung der APC (vermittelt durch Wechselwirkung von CD40L auf der T-Helferzelle und CD40 auf der APC). Dies ermöglicht es der APC, CTLs direkt zu stimulieren, welche dadurch aktiviert werden. Vgl. auch [Fig. 2](#).

[0024] Es wurde zuvor gezeigt, dass die Insertion eines Fremd-MHC-Klasse II-restringierten T-Helferzell-Epitops in ein Selbst-Antigen zur Bereitstellung eines Antigens führt, das in der Lage ist, eine starke kreuzreaktive Antikörperreaktion zu induzieren, die gegen das nicht-modifizierte Selbst-Antigen gerichtet ist (vgl. WO 95/05849, ebenfalls vom Anmelder). Es wurde gezeigt, dass die Autoantikörperinduktion mittels spezifischer T-Zell-Hilfe verursacht wird, die durch das insertierte Fremdpeptid induziert wird.

[0025] In Dalum et al., 1997, Molecular Immunology 34, 16-17, S. 1113-1120, wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Autoantikörper-Induktion durch ein insertiertes Fremdpeptid induziert werden konnte, und es wurde gezeigt, dass die Feinspezifität und möglicherweise der Isotyp der Antikörper als Folge der Position des insertierten Epitops manipuliert werden kann.

[0026] Wir sind jedoch zu der Schlussfolgerung gelangt, dass modifizierte Selbst-Antigene – mit der Hilfe geeigneter Adjuvantien – ebenfalls in der Lage sein sollten, starke CTL-Reaktionen gegen MHC-Klasse I-restringierte Selbst-Epitope hervorzurufen, und daher kann die in der WO 95/05849 beschriebene Technologie ebenfalls so angepasst werden, dass eine Vakzinierung gegen intrazelluläre und andere Zell-gebundene Antigene, welche Epitope aufweisen, die in Verbindung mit MHC-Klasse I präsentiert werden, bereitzustellen.

[0027] Die in der WO 95/05849 beschriebene Autovakzin-Technologie bewirkt, dass spezifische T-Zell-Hilfe für selbst-reaktive B-Zellen bereitgestellt wird, wenn ein modifiziertes Selbst-Antigen zur Aufnahme in den MHC-Klasse II-Antigen-Prozessierungsweg verabreicht wird (vgl. [Fig. 1](#), und Dalum I et al., 1996, J. Immunol. 157: 4796-4804, als auch Dalum I et al., 1999, Nature Biotechnol. 17: 666-669). Es wurde gezeigt, dass potentiell selbst-reaktive B-Lymphozyten, die Selbst-Proteine erkennen, physiologisch bei normalen Individuen vorkommen. Damit jedoch diese B-Lymphozyten induziert werden, tatsächlich Antikörper zu produzieren, welche mit den relevanten Selbst-Proteinen reagieren, ist die Mithilfe von Cytokin-produzierenden T-Helferzellen (T_H -Zellen oder T_H -Lymphozyten) erforderlich. Normalerweise wird diese Mithilfe nicht bereitgestellt, da T-Lymphozyten im Allgemeinen keine T-Zell-Epitope erkennen, die von Selbst-Proteinen abgeleitet sind, wenn sie von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert werden. Indem jedoch ein Element der "Fremdartigkeit" in einem Selbst-Protein zur Verfügung gestellt wird (d.h. durch Einführen einer immunologisch signifikanten Modifikation), werden T-Zellen, die das fremde Element erkennen, auf das Erkennen des fremden Epitops auf einer APC (wie beispielsweise, anfänglich, einer mononukleären Zelle) aktiviert. Polyklonale B-Lymphozyten (welche T-Zell-Epitope präsentieren), die in der Lage sind, Selbst-Epitope auf dem modifizierten Selbst-Protein zu erkennen, nehmen das Antigen ebenfalls auf und präsentieren anschließend deren fremde T-Zell-Epitope bzw. deren fremdes T-Zell-Epitop, und die aktivierten T-Lymphozyten stellen daraufhin diesen

selbstreaktiven polyklonalen B-Lymphozyten Cytokin-Hilfe zur Verfügung. Da die Antikörper, die von diesen polyklonalen B-Lymphozyten produziert werden, mit verschiedenen Epitopen auf dem modifizierten Polypeptid reagieren, schließen sie jene mit ein, welche auch im nativen Polypeptid vorkommen, es wird ein Antikörper induziert, der mit dem nicht-modifizierten Selbst-Protein kreuzreaktiv ist. Im Ergebnis können die T-Lymphozyten dazu verleitet werden, so zu agieren, als ob die Population der polyklonalen B-Lymphozyten ein gänzlich fremdes Antigen erkannt hätten, wobei tatsächlich nur das eingefügte Epitop bzw. die eingefügten Epitope für den Wirt fremd ist bzw. sind. Auf diese Weise werden Antikörper induziert, die in der Lage sind, mit nicht-modifizierten Selbst-Antigenen eine Kreuzreaktion einzugehen.

[0028] Wie oben erwähnt, benötigen auch CTLs spezifische T-Zell-Hilfe, obwohl der Mechanismus für diese noch nicht klar ist. Wir haben die vorliegende Erfindung auf unsere neue Theorie aufgebaut, dass die Selbst-Proteine, die fremde MHC-Klasse II-Epitope enthalten, nach exogener Aufnahme, Zugang zu dem Prozessierungsweg für das MHC-Klasse I-Antigen von z.B. Makrophagen und dendritischen Zellen erlangen können. Auf diese Weise könnte eine starke CTL-Antwort gegen subdominante Epitope in dem Selbst-Protein induziert werden. Alternativ dazu könnten Gene, die für modifizierte Tumor-Antigene codieren, als Nukleinsäurevakzine verabreicht werden, die gegebenenfalls auch sowohl zu MHC-Klasse II, als auch zu MHC-Klasse I-vermittelten Immunantworten führen.

[0029] Tumorzellen sind sehr schwache Antigen-präsentierende Zellen, und zwar aufgrund ungenügender MHC-Klasse I-Expression, Mangel an co-stimulatorischen Molekülen oder der Sekretion von immunsuppressiven Cytokinen, etc. Unter Verwendung der Autovakzin-Konstrukte und der Vakzinierungsprotokolle, die oben erwähnt sind, könnte das modifizierte Tumor-Antigen sowohl mittels MHC-Klasse I-, als auch durch MHC-Klasse II-Moleküle, auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert werden. Die Co-Präsentation subdominanter Selbst-Epitope auf MHC-Klasse I-Molekülen und immundominanter Fremd-Epitope auf MHC-Klasse II-Molekülen würde eine direkte Cytokin-Hilfe von aktivierten MHC-Klasse II-restringierten T-Helferzellen für MHC-Klasse I-restringierte CTLs vermitteln ([Fig. 2](#)). Dies wird unserer Meinung nach zu einem spezifischen Durchbrechen der T-Zell-Autotoleranz gegenüber dem Tumor-Antigen führen, und dies ist exakt das, was bei der Krebs-Immuntherapie gewünscht ist.

[0030] Im Ergebnis wird ein Vakzin, das unter Verwendung der oben dargestellten Technologie konstruiert wird, eine humorale Autoantikörper-Antwort mit sekundärer Aktivierung von Komplement und Antikörper-abhängiger zellulärer Cytotoxizitäts-Aktivität (ADCC) induzieren. Es wird außerdem erwartet, dass dies eine cytotoxische T-Zell-Antwort, die gegen z.B. ein Tumor-spezifisches Membran-Antigen gerichtet ist, induzieren wird.

[0031] Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung in ihrem breitesten und allgemeinsten Umfang auf die Verwendung von

1) mindestens einem CTL-Epitop, das von einem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, das in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, und 2) mindestens einem ersten T-Helfer-Lymphozyten (T_H)-Epitop, welches für das Tier fremd ist, oder von 1) mindestens einem Nukleinsäurefragment, das für ein CTL-Epitop, das von einem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen, das in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, abgeleitet ist, und 2) mindestens einem ersten Nukleinsäurefragment, das für ein T-Helfer-Lymphozyten (T_H)-Epitop codiert, welches für das Tier fremd ist, oder von einem nicht-pathogenen Mikroorganismus oder Virus, welches ein Nukleinsäurefragment trägt, welches für 1) mindestens ein CTL-Epitop, das von einem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, das in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, und 2) mindestens ein erstes T-Helfer-Lymphozyten (T_H)-Epitop, welches für das Tier fremd ist, codiert und diese exprimiert, zur Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung zur Behandlung eines pathologischen Prozesses, ausgewählt aus einem Tumor, einer viralen Infektion und einer Infektion, die durch einen intrazellulären Parasiten oder ein Bakterium verursacht wird, indem in dem Tier die simultane Präsentation von dem mindestens einen CTL-Epitop und dem mindestens einen ersten T_H -Epitop auf einer geeigneten Antigen-präsentierenden Zelle (APC) bewirkt wird und dabei eine spezifische cytotoxische T-Lymphozyten (CTL)-Reaktion in dem Tier gegen Zellen induziert wird, die das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen oder das Zell-gebundene Antigen in ihrem intrazellulären Compartment beherbergen, wobei das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen ausgewählt ist aus einem Tumor-gebundenen Polypeptid-Antigen, einem Selbst-Protein, einem viralen Polypeptid-Antigen und einem Polypeptid-Antigen, das von einem intrazellulären Parasiten oder Bakterium abgeleitet ist.

[0032] Ebenso ist die neue Strategie zur Herstellung eines immunogenen Mittels Teil der Erfindung. Diese neue Strategie umfasst die Selektion und Produktion von Analoga von schwachen Zell-gebundenen Antigenen, wobei das Bewahren eines wesentlichen Teils der bekannten und vorhergesagten CTL-Epitope ange-

strebt wird, während gleichzeitig mindestens ein fremdes T_H-Epitop eingefügt wird.

[0033] Außerdem bezieht sich die Erfindung auf bestimmte spezifische immunogene Konstrukte, die auf bekannten Tumor-assoziierten Antigenen basieren, sowie auf Zusammensetzungen, die diese Konstrukte enthalten. Letztlich bezieht sich die Erfindung auf Nukleinsäurefragmente, Vektoren, transformierte Zellen und andere Werkzeuge, die bei molekularbiologischen Verfahren zur Herstellung der Analoga der Tumor-assoziierten Antigene nützlich sind.

ERKLÄRUNG DER FIGUREN

[0034] **Fig. 1:** Das traditionelle AutoVac-Konzept. A: Tolerodominante Selbst-Epitope, die auf MHC-Klasse II auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden, werden aufgrund der Depletion des T-Helfer-Zell (T_H)-Repertoires ignoriert (T-Helferzelle mit gepunkteten Linien angedeutet). Eingefügte fremde, immundominante T-Zell-Epitope, die auf MHC-Klasse II präsentiert werden, aktivieren T-Helferzellen, und B-Zellen (B), die spezifisch für native Teile des Selbst-Proteins sind und die fremde immundominante T-Zell-Epitope auf MHC-Klasse II präsentieren, werden durch die Cytokin-Hilfe, die von der T-Helferzelle bereitgestellt wird, aktiviert.

[0035] **Fig. 2:** Das AutoVac-Konzept zur Induzierung einer CTL-Antwort. Eingefügte, fremde, immundominante T-Zell-Epitope, die auf MHC-Klasse II präsentiert werden, aktivieren T-Helferzellen. CTLs, die subdominante Selbst-Epitope erkennen, die auf MHC-Klasse I präsentiert werden, werden von den benachbarten aktivierten T-Helferzellen aktiviert.

[0036] **Fig. 3:** Eine schematische Wiedergabe des Her2-Polypeptids mit Angaben der Epitop-Regionen und N-Glykosylierungsstellen. Die 4 extrazellulären Domänen, die Transmembran (TM)-Domäne und die 2 intrazellulären Domänen sind mit den Angaben der Stellen mit unterschiedlichen Graden an Homologie und der Stellen, die vermutete/bestimmte CTL-Epitope enthalten, dargestellt.

[0037] **Fig. 4:** Eine schematische Darstellung des humanen PSM-Polypeptids mit Angaben der Insertionsregionen für die P2- und P30-Epitope.

[0038] **Fig. 5:** Die FGF-Gene und -Proteine. A: Exon-Intron-Struktur der humanen und der Maus-FGF8-Gene. Darunter sind die acht unterschiedlichen Splice-Formen dargestellt (nach Gemel 1996). B: Aminosäuresequenz der unterschiedlichen FGF8-Isoformen. Die Polypeptidketten, die jeweils auf FGF8b, FGF8f und FGF8e beschränkt sind, sind durch fette und kursive oder unterstrichene Typen angedeutet. FGF8a ist die kürzeste Variante, die keine dieser hervorgehobenen Sequenzen enthält. Man erwartet, dass das Signalpeptid am C-Terminus von Ala22 abgeschnitten wird. Die zwei Cystein-Reste, die man beim reifen FGF8 (bei allen Isoformen) findet, sind durch eine dicke Unterstreichung hervorgehoben. Die zwei möglichen N-Glykosylierungsstellen von FGF8b sind durch Ñ angezeigt. Die Nummerierung entspricht FGF8b.

[0039] **Fig. 6:** Darstellung der vier unterschiedlichen Varianten von FGF8b, die zur Autovakzinierung gestaltet wurden. Oberes Feld: Theoretische Modelle der Insertionspunkte der Epitope unter Verwendung der FGF2-Kristallstruktur als Vorlage. Unteres Feld: Aminosäuresequenzen des Wildtyps-FGF8b (WT) und der vier Varianten F30N, F2I, F30I und F2C. Das Signalpeptid ist mit einer einzelnen Unterstreichung markiert. Die eingefügten Peptide sind mit doppelter Unterstreichung markiert. Die N-terminale Sequenz (MetAla) aller Varianten liegt in der Erzeugung einer Kozak-Sequenz (Kozak 1991) zur besseren Translation in eukaryotischen Systemen begründet.

DETAILLIERTE OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Definitionen

[0040] Im Folgenden wird eine Reihe von Begriffen, die in der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen verwendet werden, definiert und im Detail erläutert um Maß und Ziel der Erfindung klarzustellen.

[0041] Es ist beabsichtigt, dass ein "Zell-gebundenes Polypeptid-Antigen" in der vorliegenden Beschreibung und in den Ansprüchen ein Polypeptid bezeichnet, welches an eine Zelle gebunden ist, welche in irgendeiner Weise mit einem pathologischen Prozess in Verbindung steht. Des weiteren präsentiert die Zelle CTL-Epitope des Polypeptid-Antigens, gebunden an MHC-Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Zell-gebundene Polypeptid-Antigene können daher echte intrazelluläre Antigene sein (und damit für eine humorale Immunantwort un-

erreichbar), oder Antigene, die an die Oberfläche der Zellen gebunden sind. Das Zell-gebundene Antigen kann das Produkt der zelleigenen Genexpression sein, das eines intrazellulären Parasiten, eines Virus oder einer anderen Zelle. Im letzten Fall wird das Polypeptid-Antigen anschließend mit der Zelle, welche in den pathologischen Prozess involviert ist, in Verbindung gebracht bzw. daran gebunden.

[0042] Die Begriffe "T-Lymphozyt" und "T-Zelle" werden austauschbar für Lymphozyten verwendet, deren Ursprung im Thymus liegt, welche für verschiedene Zell-vermittelte Immunantworten sowie für Effektorfunktionen, wie Helfer-Aktivität in der humoralen Immunantwort, verantwortlich sind. Ebenso werden die Ausdrücke "B-Lymphozyten" und "B-Zelle" austauschbar für Antikörper-produzierende Lymphozyt verwendet.

[0043] Eine "Antigen-präsentierende Zelle" (APC) ist eine Zelle, welche Epitope gegenüber T-Zellen präsentiert. Typische Antigen-präsentierende Zellen sind Makrophagen, dendritische Zellen und andere phagozytierende und pinozytierende Zellen. Es sollte erwähnt werden, dass B-Zellen ebenfalls als APCs fungieren, indem sie T_H-Epitope gebunden an MHC-Klasse II-Moleküle gegenüber T_H-Zellen präsentieren, aber wenn der Ausdruck APC im Allgemeinen in der vorliegenden Beschreibung und in den Ansprüchen verwendet wird, wird beabsichtigt, sich auf die oben erwähnten phagozytierenden und pinozytierenden Zellen zu beziehen.

[0044] "Helfer-T-Lymphozyten" oder "T_H-Zellen" bezeichnen CD4-positive T-Zellen, welche B-Zellen und cytotoxischen T-Zellen über die Erkennung von T_H-Epitopen, die an MHC-Klasse II-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen gebunden sind, Hilfe bereitstellen.

[0045] Der Ausdruck "cytotoxischer T-Lymphozyt" (CTL) wird für CD8-positive T-Zellen verwendet, welche die Mithilfe von T_H-Zellen benötigen um aktiviert zu werden.

[0046] Es ist beabsichtigt, dass eine "spezifische" Immunantwort im vorliegenden Zusammenhang eine polyclonale Immunantwort bezeichnet, die sich vornehmlich gegen ein Molekül oder eine Gruppe von quasi identischen Molekülen oder, alternativ dazu, gegen Zellen richtet, welche CTL-Epitope des Moleküls oder der Gruppe von quasi identischen Molekülen präsentieren.

[0047] Es ist beabsichtigt, dass "schwaches oder nicht-immunogenes Polypeptid-Antigen" Polypeptide bezeichnet, die die Aminosäuresequenz des schwachen Zell-gebundenen Protein-Antigens, das sich von dem fraglichen Tier (z.B. einem Menschen) ableitet, aufweisen, aber ebenso sind Polypeptide von dem Ausdruck umfasst, die die Aminosäuresequenz aufweisen, die identisch zu Analoga solcher Proteine, die von anderen Arten isoliert worden sind, identisch sind. Ebenso sind Formen der Polypeptide, die aufgrund ihrer Herstellung in heterologen Systemen (z.B. Hefen oder anderen eukaryontischen Nicht-Säuger-Expressionssystemen oder sogar prokaryotischen Systemen) andere Glykosylierungsmuster aufweisen, von den Grenzen des Ausdrucks umfasst. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass, wenn der Ausdruck verwendet wird, es beabsichtigt ist, dass das fragliche Polypeptid normalerweise nicht-immunogen oder nur schwach immunogen, jeweils in seiner natürlichen Umgebung in dem zu behandelnden Tier, ist.

[0048] Der Ausdruck "Polypeptid" soll im vorliegenden Zusammenhang sowohl kurze Peptide von 2 bis 10 Aminosäureresten Länge, Oligopeptide von 11 bis 100 Aminosäureresten Länge und Polypeptide von mehr als 100 Aminosäureresten Länge umfassen. Außerdem ist beabsichtigt, dass der Ausdruck Proteine umfasst, d.h. funktionelle Biomoleküle, die mindestens ein Polypeptid umfassen; wenn diese mindestens zwei Polypeptide umfassen, können sie Komplexe bilden, kovalent verbunden sein, oder nicht-kovalent verbunden sein. Das Polypeptid bzw. die Polypeptide in einem Protein kann/können glykosyliert und/oder an Lipide gebunden sein und/oder prosthetische Gruppen umfassen.

[0049] Der Ausdruck "Untersequenz" meint eine fortlaufende Kette von mindestens 3 Aminosäuren oder, wenn dies passend ist, von mindestens 3 Nukleotiden, die direkt von einer natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz bzw. Nukleinsäuresequenz abgeleitet sind.

[0050] Der Ausdruck "Tier" soll in dem vorliegenden Zusammenhang im Allgemeinen eine Tierart (bevorzugt Säugerart) bezeichnen, wie beispielsweise Homo sapiens, Canis domesticus, etc., und nicht nur ein einzelnes Tier. Der Ausdruck bezeichnet jedoch auch eine Population von solch einer Tierart, da es wichtig ist, dass die Individuen, die erfindungsgemäß immunisiert werden, alle im Wesentlichen dasselbe schwache Zell-gebundene Polypeptid-Antigen beherbergen, was die Immunisierung der Tiere mit demselben Immunogen bzw. denselben Immunogenen erlaubt. Wenn z.B. genetische Varianten der Polypeptide in unterschiedlichen humanen Populationen existieren, kann es nötig sein, unterschiedliche Immunogene in diesen unterschiedlichen Populationen zu verwenden um in der Lage zu sein, die Autotoleranz gegen das schwache Zell-gebundene Poly-

peptid-Antigen in jeder Population zu durchbrechen.

[0051] Mit dem Ausdruck "Herabregulierung eines Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens" ist hierin eine Verminderung der Menge und/oder Aktivität des fraglichen Antigens im lebenden Organismus gemeint. Die Herabregulierung kann mittels verschiedener Mechanismen erreicht werden. Von diesen ist die einfache Störung der aktiven Stelle des Antigens durch Antikörperbindung die einfachste. Es liegt jedoch ebenso im Umfang der vorliegenden Erfindung, dass die Antikörperbindung zum Entfernen des Polypeptids durch Fresszellen (wie beispielsweise Makrophagen und andere phagozytierende Zellen) führt, und sogar noch wichtiger, dass Zellen, die das Antigen tragen oder beherbergen, von CTLs im Tier getötet werden.

[0052] Der Ausdruck "Bewirken der simultanen Präsentation durch eine geeignete APC" soll ausdrücken, dass das Immunsystem des Tieres auf kontrollierte Weise einer immunogenen Herausforderung ausgesetzt wird, welche zur simultanen Präsentation der fraglichen Epitope durch APCs führt. Solch eine Herausforderung des Immunsystems kann, wie aus der untenstehenden Offenbarung hervorgehen wird, auf eine Vielzahl von Wegen bewirkt werden, von denen die wichtigsten die Vakzinierung mit Polypeptiden, die "Pharmaccine" enthalten (d.h. einem Vakzin, welches verabreicht wird um eine andauernde Krankheit zu behandeln oder zu verbessern), oder die Nukleinsäure-"Pharmaccin"-Vakzinierung sind. Die dabei wichtige zu erreichende Folge ist, dass immun-kompetente Zellen im Tier mit APCs konfrontiert werden, die die relevanten Epitope auf immunologisch wirksame Weise aufzeigen.

[0053] Der Ausdruck "immunologisch wirksame Menge" hat dabei seine im Stand der Technik übliche Bedeutung, d.h. eine Menge an Immunogen, welche in der Lage ist, eine Immunantwort zu induzieren, welche pathogene Agentien, welche immunologische Eigenschaften mit dem Immunogen gemein haben, signifikant erfasst.

[0054] Bei der Verwendung des Ausdrucks, dass die schwachen Zell-gebundenen Polypeptid-Antigene einer "Modifikation" unterzogen wurden, ist hierin eine chemische Modifikation des Polypeptids gemeint, welches das Rückgrat des fraglichen Polypeptids darstellt. Solch eine Modifikation kann z.B. eine Derivatisierung (z.B. Alkylierung) der Aminosäurereste in der Aminosäuresequenz sein, aber die bevorzugten Modifikationen umfassen Veränderungen der Primärstruktur der Aminosäuresequenz, wie aufgrund der untenstehenden Offenbarung zugestanden werden wird.

[0055] Bei der Diskussion von "Toleranz" und "Autotoleranz" versteht es sich, dass normale Individuen in der Population keine Immunantwort gegen das Polypeptid aufbauen, da die Polypeptide, welche die Ziele des vorliegenden erfinderischen Verfahrens sind, Selbst-Proteine in der zu vakzinierenden Population oder Proteine, welche nicht zu Induktion einer effektiven Immunantwort führen, sind. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass gelegentlich Individuen in einer Tierpopulation in der Lage sein können, Antikörper gegen das native Polypeptid-Antigen herzustellen, z.B. als Teil einer Autoimmunerkrankung. In jedem Fall wird ein Tier normalerweise gegen seine eigenen Polypeptid-Antigene autotolerant sein, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Analoga, die von einer anderen Tierart oder von einer Population mit einem anderen Phentyp abgeleitet sind, ebenfalls von diesem Tier toleriert werden würden.

[0056] Ein "fremdes T-Zell-Epitop" ist ein Peptid, welches in der Lage ist, an ein MHC-Molekül zu binden und T-Zellen in einer Tierart zu stimulieren. Bevorzugte Fremdepitope sind "gemischte" Epitope, d.h. Epitope, welche an einen wesentlichen Teil von MHC-Klasse II-Molekülen in einer Tierart oder -population binden. Nur eine sehr beschränkte Anzahl solcher gemischter T-Zell-Epitope ist bekannt, und diese werden im Detail unten diskutiert. Es sollte erwähnt werden, dass es nötig sein kann, 1) mehrere fremde T-Zell-Epitope in dasselbe Analogon einzufügen, oder 2) verschiedene Analoga herzustellen, bei denen in jedes Analogon ein anderes gemischtes Epitop eingefügt wurde, damit die Immunogene, welche erfindungsgemäß verwendet werden, in einer möglichst großen Fraktion einer Tierpopulation wirksam sind. Es sollte erwähnt werden, dass das Konzept der fremden T-Zell-Epitope ebenfalls die Verwendung kryptischer T-Zell-Epitope umfasst, d.h. von Epitopen, welche von einem Selbst-Protein abgeleitet sind und welche nur ein immunogenes Verhalten entwickeln, wenn sie in isolierter Form vorliegen, ohne ein Teil des fraglichen Selbst-Proteins zu sein.

[0057] Ein "fremdes T-Helfer-Lymphozyten-Epitop" (ein fremdes T_H-Epitop) ist ein fremdes T-Zell-Epitop, welches an ein MHC-Klasse II-Molekül bindet und auf der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC), gebunden an das MHC-Klasse II-Molekül, präsentiert werden kann.

[0058] Ein "CTL"-Epitop ist ein Peptid, welches in der Lage ist, an ein MHC-Klasse I-Molekül zu binden.

[0059] Ein "funktioneller Teil" eines (Bio-)Moleküls soll im vorliegenden Zusammenhang den Teil des Moleküls bezeichnen, welcher für mindestens eine der biochemischen oder physiologischen Wirkungen, die von dem Molekül bewirkt werden, verantwortlich ist. Es ist wohl bekannt im Stand der Technik, dass viele Enzyme und andere Effektormoleküle eine aktive Stelle aufweisen, welche für die Wirkungen, die von dem fraglichen Molekül ausgeübt werden, verantwortlich ist. Andere Teile des Moleküls können einem stabilisierenden oder Löslichkeitverstärkenden Zweck dienen und daher ausgelassen werden, wenn diese Zwecke im Zusammenhang mit einer bestimmten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nicht von Bedeutung sind. Z.B. ist es möglich, bestimmte Cytokine als eine modifizierende Gruppierung im Analogon zu verwenden (vgl. die detaillierte unterstehende Diskussion), und in einem solchen Fall kann der Punkt der Stabilität irrelevant sein, da die Koppelung an das Analogon die notwendige Stabilität bereitstellt.

[0060] Der Ausdruck "Adjuvans" besitzt seine übliche Bedeutung im Stand der Technik der Vakzinierungstechnologie, d.h. eine Substanz oder eine Zusammensetzung, welche 1) nicht selbst in der Lage ist, eine spezifische Immunantwort gegen das Immunogen des Vakzins hervorzurufen, aber welche 2) nichtsdestotrotz in der Lage ist, die Immunantwort gegen das Immunogen zu verstärken. Oder, in anderen Worten, die Vakzinierung mit dem Adjuvans alleine bewirkt keine Immunantwort gegen das Immunogen, die Vakzinierung mit dem Immunogen kann eine Immunantwort gegen das Immunogen hervorrufen oder nicht, aber die kombinierte Vakzinierung mit Immunogen und Adjuvans induziert eine Immunantwort gegen das Immunogen, welche stärker ist als die, die von dem Immunogen alleine induziert wird.

[0061] "Targeting" eines Moleküls soll im vorliegenden Zusammenhang die Situation bezeichnen, in der ein Molekül nach dem Einführen in das Tier bevorzugt in einem bestimmten Gewebe bzw. in bestimmten Geweben auftauchen wird oder bevorzugt mit bestimmten Zellen oder Zelltypen assoziiert sein wird. Die Wirkung kann auf einer Vielzahl von Wegen erreicht werden, einschließlich der Formulierung des Moleküls in einer Zusammensetzung, die das Targeting erleichtert, oder durch die Einführung von Gruppen in das Molekül, welche das Targeting erleichtern. Diese Punkte werden im Detail unten diskutiert.

[0062] "Stimulation des Immunsystems" bedeutet, dass eine Substanz oder eine Zusammensetzung eine allgemeine, nicht-spezifische immunstimulatorische Wirkung zeigt. Eine Vielzahl von Adjuvantien und vermutlichen Adjuvantien (wie beispielsweise bestimmte Cytokine) besitzen die Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren. Das Ergebnis der Verwendung eines immunstimulatorischen Mittels ist ein erhöhter "Alarmzustand" des Immunsystems, was bedeutet, dass die simultane oder darauffolgende Immunisierung mit einem Immunogen eine signifikant effektivere Immunantwort im Vergleich zur isolierten Verwendung des Immunogens induziert.

Bevorzugte Ausführungsformen

[0063] Um eine CTL-Antwort gegen eine Zelle zu induzieren, welche auf ihrer Oberfläche Epitope präsentiert, die von dem Polypeptid-Antigen abgeleitet sind, ist es normalerweise notwendig, dass mindestens ein CTL-Epitop mit einem MHC-Klasse I-Molekül auf der Oberfläche der APC assoziiert ist, wenn es präsentiert wird. Weiterhin ist es bevorzugt, dass das mindestens eine erste fremde T_H-Epitop mit einem MHC-Klasse II-Molekül auf der Oberfläche der APC gebunden ist, wenn es präsentiert wird.

[0064] Bevorzugte APCs, die die Epitope präsentieren, sind dendritische Zellen und Makrophagen, aber jede pino- oder phagozytierende APC, welche in der Lage ist, simultan 1) CTL-Epitope, gebunden an MHC-Klasse I-Moleküle, und 2) T_H-Epitope, gebunden an MHC-Klasse II-Moleküle, zu präsentieren, ist eine bevorzugte APC entsprechend der Erfindung.

[0065] Erfindungsgemäß wird das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen aus Tumor-gebundenen Antigenen und anderen Selbst-Proteinen, welche mit pathologischen Prozessen in Verbindung stehen, ausgewählt, aber auch aus viralen Antigenen und Antigenen, die von einem intrazellulären Parasiten oder einem Bakterium abgeleitet sind. Es ist wohl bekannt im Stand der Technik, dass solche Pathogen-gebundenen Antigene oft relativ schwache Immunogene sind (z.B. Antigene von Mycobakterien, wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, aber auch von Protozoen, wie *Plasmodium* spp.). Es wird davon ausgegangen, dass die Erfindung, unabhängig davon, dass sie die Produktion von Antikörper- und CTL-Antworten gegen echte Selbst-Protein-Antigene ermöglicht, in der Lage ist, die oft unzureichende Immunantwort, die von dem Organismus gegen solche intrazellulären Antigene hervorgerufen wird, zu verstärken.

[0066] Normalerweise wird es vorteilhaft sein, das Immunsystem mit einer großen Fraktion der Aminosäuresequenz des Polypeptid-Antigens, welches das Vakzinierungsziel ist, zu konfrontieren. Daher wird die Präsentation des CTL-Epitops und des ersten fremden T_H-Epitops durch die APC in einer bevorzugten Ausführungs-

form bewirkt, indem dem Immunsystem des Tieres mindestens ein erstes Analogon des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens präsentiert wird, wobei dieses erste Analogon eine Variation der Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens umfasst, wobei diese Variation mindestens das CTL-Epitop und das erste fremde T_H-Epitop enthält. Dies ist ein Gegensatz z.B. zu einer DNA-Vakzinierungs-Strategie, bei der die CTL- und T_H-Epitope von derselben Zelle exprimiert werden, aber als Teile von getrennten Polypeptiden; solch eine DNA-Vakzinierungs-Strategie ist ebenfalls eine Ausführungsform der Erfindung, aber es wird davon ausgegangen, dass das Vorliegen der zwei Epitope als Teil desselben Polypeptids normalerweise die Immunantwort verstärken wird, und in jedem Fall wird nur die Bereitstellung eines Expressionsproduktes notwendig sein.

[0067] Um die Chancen des Auslösens einer effektiven Immunantwort zu maximieren, ist es bevorzugt, dass das oben erwähnte erste Analogon einen wesentlichen Teil von bekannten und vorhergesagten CTL-Epitopen des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens enthält, d.h., einen Teil der bekannten und vorhergesagten CTL-Epitope, welche an einen ausreichenden Teil von MHC-Klasse I-Molekülen in einer Population binden. Es ist z.B. bevorzugt, dass der wesentliche Teil von bekannten und vorhergesagten CTL-Epitopen in der Aminosäuresequenz des Analogons von mindestens 50% der MHC-I-Haplotypen erkannt wird, welche alle bekannten und vorhergesagten CTL-Epitope im Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen erkennen, aber höhere Prozentzahlen sind bevorzugt, wie beispielsweise mindestens 60, mindestens 70, mindestens 80 und mindestens 90%. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Analoga, welche sicherstellt, dass im Wesentlichen alle bekannten CTL-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens im Analogon vorhanden sind, d.h. nahezu 100% der bekannten CTL-Epitope. Dementsprechend ist es ebenfalls besonders bevorzugt, dass im Wesentlichen alle vorhergesagten CTL-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens zumindest in dem ersten Analogon vorhanden sind.

[0068] Verfahren zur Vorhersage der Anwesenheit von CTL-Epitopen sind im Stand der Technik wohlbekannt, vgl. z.B. Rothbard et al., EMBO J. 7: 93-100 (1988).

[0069] Wie aus der vorliegenden Beschreibung und aus den Ansprüchen hervorgeht, wird erwartet, dass das hierin beschriebene erfinderische Verfahren die effektive Induzierung von CTL-Antworten gegen Zell-gebundene Polypeptid-Antigene möglich machen wird.

[0070] In solchen Fällen, in denen das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen ein echtes intrazelluläres Antigen ist, ist die Induzierung einer CTL-Antwort gegen Zellen, die das Antigen beherbergen, der einzige Weg, seine Herabregulierung durch spezifische immunologische Mittel zu erreichen. Im Falle von Membran-gebundenen Antigenen ist es jedoch vorteilhaft, eine Antikörper-Antwort gegen das schwache Zell-gebundene Polypeptid-Antigen zu induzieren. Wenn eine humorale Immunantwort gegen ein schwaches Zell-gebundenes Antigen hervorgerufen wird, ist es jedoch bevorzugt, die Antikörper-Antwort im Wesentlichen auf die Wechselwirkung mit den Teilen des Antigens zu beschränken, welche normalerweise zur möglichen Wechselwirkung mit Antikörpern exponiert vorliegen. Ansonsten wäre das Ergebnis höchstwahrscheinlich die Induktion einer Antikörper-Antwort gegen Teile des Antigens, welche normalerweise nicht das humorale Immunsystem erfassen, und dieses wird umgekehrt das Risiko der Induzierung einer Kreuzreaktivität mit Antigenen erhöhen, die zu keiner pathologischen Situation eine Beziehung aufweisen. Ein eleganter Weg, diese Beschränkung zu erreichen, ist es, eine Nukleinsäure-Vakzinierung mit einem Analogon des schwachen Zell-gebundenen Antigens durchzuführen, wobei dessen extrazellulärer Teil entweder unverändert ist oder ein T_H-Epitop umfasst, welches die 3D-Struktur des extrazellulären Teils des Antigens nicht wesentlich verändert. Als eine mögliche Alternative kann eine Immunisierung, sowohl mit einem CTL-gerichteten Immunogen als auch mit einem B-Zell-gerichteten Immunogen, durchgeführt werden, wobei das B-Zell-gerichtete Immunogen im Wesentlichen unfähig ist, eine Immunisierung gegen den intrazellulären Teil des Ziel-Antigens zu bewirken (das B-Zell-gerichtete Immunogen könnte z.B. keinerlei nicht-extrazelluläres Material des Antigens aufweisen).

[0071] Die Induzierung von Antikörper-Antworten kann auf eine Vielzahl von Wegen erreicht werden, die dem Fachmann bekannt sind, z.B. kann das mindestens eine erste Analogon einen Teil umfassen, der aus einer Modifikation der Struktur des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen besteht, wobei die Modifikation zur Folge hat, dass die Immunisierung des Tieres mit dem ersten Analogon die Herstellung von Antikörpern in dem Tier gegen das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen induziert – diese Variante eignet sich, wie oben erwähnt, insbesondere zur Nukleinsäure-Vakzinierung. Alternativ dazu kann das erfindungsgemäße Verfahren es umfassen, die Präsentation einer immunogenisch wirksamen Menge von mindestens einem zweiten Analogon des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, welches solch eine Modifikation enthält, gegenüber dem Immunsystem des Tieres zu bewirken. Ein bequemer Weg zum Erreichen, dass die Modifikation den gewünschten Antikörper-induzierenden Effekt besitzt, ist es, mindestens ein zweites fremdes T_H-Epitop in das zweite Analogon mit einzuschließen, d.h. eine Strategie, die der ähnlich ist, die für das erste Analogon verwendet wurde.

[0072] In den Fällen, in denen es erwünscht ist, auch eine wirksame humorale Immunantwort hervorzurufen, ist es vorteilhaft, dass das erste und/oder das zweite Analogon einen wesentlichen Teil der B-Zell-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens umfasst bzw. umfassen, insbesondere einen wesentlichen Teil solcher B-Zell-Epitope, welche in der natürlich vorkommenden Form des Antigens in dem jeweiligen Tier extrazellulär vorliegen.

[0073] Die oben diskutierten Variationen und Modifikationen des schwachen, Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens können verschiedene Formen einnehmen. Es ist bevorzugt, dass die Variation und/oder Modifikation Aminosäuresubstitution und/oder -deletion und/oder -insertion und/oder -addition umfasst. Diese grundlegenden Operationen, die sich auf die Manipulation einer Aminosäuresequenz beziehen, sollen sowohl einzelne Aminosäureaustausche als auch Operationen abdecken, die Ketten von Aminosäuren umfassen (u.a. das Austauschen von Aminosäureketten innerhalb des Polypeptid-Antigens; dies ist besonders interessant, wenn das Antigen ein echtes intrazelluläres Antigen ist, da nur Erwägungen, die das Bewahren von CTL-Epitopen betreffen, relevant sind). Es versteht sich, dass die Einführung von z.B. einer einzelnen Aminosäureinsertion oder -deletion das Auftreten eines fremden T_H-Epitops in der Sequenz des Analogons hervorrufen kann, d.h. das Auftreten einer MHC-Klasse II-Molekül-bindenden Sequenz. In den meisten Situationen ist es jedoch bevorzugt (und sogar notwendig), ein bekanntes fremdes T_H-Epitop einzufügen, und solch eine Operation wird die Säuresubstitution und/oder -insertion (oder manchmal der Addition in Form einer Konjugation mit einem Trägerprotein oder der Bereitstellung eines Fusions-Polypeptids mittels molekularbiologischer Verfahren) erfordern wird. Es ist bevorzugt, dass die Anzahl der Aminosäureinsertionen, -deletionen, -substitutionen oder -additionen mindestens 2 ist, wie beispielsweise 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 und 25 Insertionen, Substitutionen, Additionen oder Deletionen. Es ist außerdem bevorzugt, dass die Anzahl an Aminosäuresubstitutionen 150 nicht übersteigt, wie beispielsweise höchstens 100, höchstens 90, höchstens 80 und höchstens 70. Es ist besonders bevorzugt, dass die Anzahl der Substitutionen, Insertionen, Deletionen oder Additionen 60 nicht überschreitet, und insbesondere sollte die Anzahl 50 oder sogar 40 nicht überschreiten. Besonders bevorzugt ist eine Anzahl von nicht mehr als 30.

[0074] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung umfassen die Modifikationen durch Einführen von mindestens einem fremden immundominanten T_H-Epitop. Es versteht sich, dass die Frage der Immundominanz eines T-Zell-Epitops von der fraglichen Tierart abhängt. Wie hier verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Immundominanz" einfach auf Epitope, welche in dem vakzinierten Tier/der Population eine signifikante Immunantwort hervorrufen, aber es ist eine wohlbekannte Tatsache, dass ein T-Zell-Epitop, welches immundominant in einem Individuum ist, nicht notwendigerweise immundominant in anderen Individuen derselben Art ist, sogar obwohl es in der Lage sein könnte, MHC-II-Moleküle in letzterem Individuum zu binden. Echte immundominante T_H-Epitope sind jene, welche unabhängig von dem Polypeptid, in dem sie eine Untersequenz bilden, die Aktivierung von T_H-Zellen hervorrufen – in anderen Worten, einige T_H-Epitope besitzen als intrinsische Eigenschaft den Charakter, im Wesentlichen niemals kryptisch zu sein, da sie im Wesentlichen immer von APCs prozessiert und in der Umgebung eines MHC-II-Moleküls auf der Oberfläche der APC präsentiert werden.

[0075] Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage der MHC-Restriktion von T-Zell-Epitopen. Im Allgemeinen sind natürlich vorkommende T-Zell-Epitope MHC-restringiert, d.h., ein bestimmtes Peptid, das ein T-Zell-Epitop darstellt, wird lediglich an eine Untergruppe von MHC-Klasse II-Molekülen effektiv binden. Dies hat umgekehrt zur Folge, dass in den meisten Fällen die Verwendung von einem bestimmten spezifischen T-Zell-Epitop zu einer Vakzin-Komponente führt, welche lediglich in einem Teil der Population wirksam ist, und abhängig von der Größe dieses Teils kann es notwendig sein, mehr T-Zell-Epitope in dasselbe Molekül einzubauen, oder alternativ dazu ein Multi-Komponenten-Vakzin herzustellen, in dem die Komponenten Varianten des Antigens sind, welche sich von den anderen durch die Natur des eingefügten T-Zell-Epitops unterscheiden.

[0076] Wenn die MHC-Restriktion der verwendeten T-Zellen vollständig unbekannt ist (z.B. in einer Situation, in der das vakzinierte Tier eine kaum definierte MHC-Zusammensetzung aufweist), kann der Anteil der Population, der von einer spezifischen Vakzin-Zusammensetzung abgedeckt wird, mittels der folgenden Formel bestimmt werden

$$f_{\text{population}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (\text{II})$$

– wobei p_i die Häufigkeit von reagierenden Individuen bzw. Respondern in der Population gegen das i-te Fremd-T-Zell-Epitop, das in der Vakzinzusammensetzung vorhanden ist, und n die Gesamtzahl fremder T-Zell-Epitope in der Vakzinzusammensetzung ist. Somit würde eine Vakzinzusammensetzung, die drei

fremde T-Zell-Epitope mit Reaktionshäufigkeiten in der Population von 0,8 bzw. 0,7 bzw. 0,6 enthält,

$$1 - 0,2 \times 0,3 \times 0,4 = 0,976$$

ergeben,

– d.h. 97,6% der Population werden statistisch gesehen eine MHC-II-vermittelte Antwort auf das Vakzin entwickeln.

[0077] Die obige Formel ist in Situationen nicht anwendbar, in denen ein mehr oder weniger präzises MHC-Restriktionsmuster der verwendeten Peptide bekannt ist. Wenn z.B. ein bestimmtes Peptid nur an die humanen MHC-II-Moleküle bindet, das von den HLA-DR-Allelen DR1, DR3, DR5 und DR7 codiert wird, dann wird die Verwendung dieses Peptids zusammen mit anderen Peptiden, welche an die übrigen MHC-II-Moleküle, die von HLA-DR-Allelen codiert werden, binden, 100% Abdeckung in der fraglichen Population erreichen. Wenn das zweite Peptid gleichermaßen nur DR3 und DR5 bindet, wird die Zugabe dieses Peptids die Abdeckung überhaupt nicht erhöhen. Wenn man die Berechnung der Populationsantwort lediglich auf die MHC-Restriktion von T-Zell-Epitopen im Vakzin beschränkt, kann der Anteil der Population, der von einer spezifischen Vakzinzusammensetzung abgedeckt wird, mittels der folgenden Formel bestimmt werden

$$f_{\text{population}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 \quad (\text{III})$$

– wobei φ_j die Summe der Häufigkeiten in der Population von allelischen Haplotypen ist, die für MHC-Moleküle codieren, welche irgendeines der T-Zell-Epitope im Vakzin binden und welche zum j-ten der drei bekannten HLA-Loci (DP, DR und DQ) gehören; in der Praxis wird zuerst bestimmt, welche MHC-Moleküle jedes T-Zell-Epitop im Vakzin erkennen, und danach werden diese mittels des Typus (DP, DR und DQ) aufgelistet – dann werden die individuellen Häufigkeiten der unterschiedlichen aufgelisteten allelischen Haplotypen für jeden Typus summiert, wodurch man φ_1 , φ_2 und φ_3 erhält.

[0078] Es kann vorkommen, dass der Wert p_i in der Formel II den entsprechenden theoretischen Wert π_i übersteigt:

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - v_j)^2 \quad (\text{IV})$$

– wobei v_j die Summe der Häufigkeiten in der Population des allelischen Haplotyps ist, der für MHC-Moleküle codiert, welche das i-te T-Zell-Epitop im Vakzin binden und welche zu dem j-ten der drei bekannten HLA-Loci (DP, DR und DQ) gehören. Dies bedeutet, dass π_i der Population eine Häufigkeit von Respondern von $f_{\text{residual}_i} = (p_i - \pi_i) / (1 - \pi_i)$ ist. Daher kann Formel III unter Erhalt der Formel V angepasst werden:

$$f_{\text{population}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^n (1 - f_{\text{residual}_i}) \right) \quad (\text{V})$$

– wobei der Ausdruck $1 - f_{\text{residual}_i}$ auf 0 gesetzt wird, wenn er negativ ist. Es sollte erwähnt werden, dass Formel V es erfordert, dass alle Epitope gegen identische Haplotyp-Sätze kartiert wurden.

[0079] Wenn man daher T-Zell-Epitope auswählt, die in das Analogon eingefügt werden sollen, ist es wichtig, alles Wissen über die Epitope, welches verfügbar ist, mit einzubringen: 1) die Häufigkeit von Respondern in der Population gegenüber jedem Epitop, 2) die MHC-Restriktionsdaten, und 3) die Häufigkeit der relevanten Haplotypen in der Population.

[0080] Es existiert eine Reihe von natürlich vorkommenden "gemischten" T-Zell-Epitopen, welche in einem großen Teil der Individuen einer Tierart oder einer Tierpopulation aktiv sind, und diese werden bevorzugt in das Vakzin eingefügt, wobei das Erfordernis einer großen Anzahl unterschiedlicher Analoga in demselben Vakzin verringert wird.

[0081] Das gemischte Epitop kann erfindungsgemäße ein natürlich vorkommendes humanes T-Zell-Epitop sein, wie beispielsweise Epitope von Tetanustoxoid (z.B. die P2- und P30-Epitope), Diphtherietoxoid, Grippevirus-Hämagglutinin (HA) und P. falciparum CS-Antigen.

[0082] Über die Jahre wurde eine große Anzahl anderer gemischter T-Zell-Epitope identifiziert. Insbesondere

Peptide, die in der Lage sind, eine große Anzahl von HLA-DR-Molekülen, die von den unterschiedlichen HLA-DR-Allelen codiert werden, wurde identifiziert, und diese sind alle mögliche T-Zell-Epitope, die in Analoga eingefügt werden können, die erfindungsgemäß verwendet werden. Vgl. ebenfalls die Epitope, die in den folgenden Zitatstellen diskutiert werden: WO 98/23635 (Frazer IH et al., The University of Queensland); Southwood S et al., 1998, J. Immunol. 160: 3363-3373; Sinigaglia F et al., 1988, Nature 336: 778-780; Ramnensee HG et al., 1995, Immunogenetics 41: 4 178-228; Chicz RM et al., 1993, J. Exp. Med 178: 27-47; Hammer J et al., 1993, Cell 74: 197-203; und Falk K et al., 1994, Immunogenetics 39: 230-242. Die letzte Bezugsstelle beschäftigt sich auch mit HLA-DQ- und -DP-Liganden. Alle in diesen 5 Bezugsstellen aufgelisteten Epitope sind als Kandidaten für natürliche Epitope, die in der vorliegenden Erfindung zu verwenden sind, relevant, da sie Epitope sind, welche gemeinsame Motive aufweisen.

[0083] Alternativ dazu kann das Epitop jedes künstliche T-Zell-Epitop sein, welches in der Lage ist, einen großen Anteil von Haplotypen zu binden. In diesem Zusammenhang sind die pan-DR-Epitop-Peptide ("PADRE"), die in der WO 95/07707 und in dem dazugehörigen wissenschaftlichen Artikel Alexander J et al., 1994, Immunity 1: 751-761, beschrieben sind, interessante Kandidaten für Epitope, die erfindungsgemäß zu verwenden sind. Es sollte erwähnt werden, dass die effektivsten PADRE-Peptide, die in diesen Artikeln veröffentlicht sind, D-Aminosäuren an den C- und N-Termini tragen um die Stabilität zu erhöhen, wenn diese verabreicht werden. Die vorliegende Erfindung zielt jedoch in erster Linie darauf ab, die relevanten Epitope als Teil des modifizierten Antigens einzubauen, welches dann anschließend innerhalb des lysosomalen Kompartiments der APCs enzymatisch abgebaut wird um die anschließende Präsentation im Zusammenhang mit einem MHC-II-Molekül zu ermöglichen, und daher ist es nicht zwingend erforderlich, D-Aminosäuren in die Epitope einzubauen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0084] Ein besonders bevorzugtes PADRE-Peptid ist das, das die Aminosäuresequenz AKFVAAWTLKAAA besitzt, oder eine immunologisch wirksame Untersequenz davon. Dieses, und andere Epitope, die ebenfalls keine MHC-Restriktion aufweisen, sind bevorzugte T-Zell-Epitope, welche in dem Analogon, das in dem erfindnerischen Verfahren verwendet wird, vorhanden sein sollten. Solche super-gemischten Epitope werden die einfachsten Ausführungsformen der Erfindung ermöglichen, wobei nur ein einzelnes aller Analogon dem Immunsystem des vakzinieren Tiers präsentiert wird.

[0085] Das Wesen der oben beschriebenen Variation/Modifikation umfasst im Wesentlichen, dass

- mindestens eine erste Gruppierung in dem ersten und/oder zweiten Analogon umfasst ist, wobei die Gruppierung das Targeting des Analogons an eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) bewirkt, und/oder
- mindestens eine zweite Gruppierung in das erste und/oder das zweite Analogon eingefügt wird, wobei die zweite Gruppierung das Immunsystem stimuliert, und/oder
- mindestens eine dritte Gruppierung in das erste und/oder das zweite Analogon eingefügt wird, wobei diese dritte Gruppierung die Präsentation des Analogons gegenüber dem Immunsystem optimiert.

[0086] Die funktionellen und strukturellen Eigenschaften, die zu diesen ersten, zweiten und dritten Gruppierungen gehören, werden im Folgenden diskutiert:

Sie können in Form von Seitengruppen vorliegen, die kovalent oder nicht-kovalent an geeignete chemische Gruppen in der Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens oder einer Untersequenz davon angehängt werden. Dies soll bedeuten, dass Ketten von Aminosäureresten, die sich von dem Polypeptid-Antigen ableiten, derivatisiert werden, ohne die primäre Aminosäuresequenz zu verändern, oder zumindest ohne Veränderungen in den Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren in der Kette einzuführen.

[0087] Die Gruppierungen können auch in Form von Fusionspartnern mit der Aminosäuresequenz, die von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, vorliegen. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass beide Möglichkeiten die Option umfassen, die Aminosäuresequenz an einen Träger zu binden, vgl. die unterstehende Diskussion von diesen. In anderen Worten, in dem vorliegenden Zusammenhang ist der Ausdruck "Fusionsprotein" nicht nur auf ein Fusionskonstrukt beschränkt, das mittels der Expression eines DNA-Fragments hergestellt wird, welches das Konstrukt codiert, sondern er umfasst auch eine Verbindung von zwei Proteinen, welche mittels einer Peptidbindung in einer anschließenden chemischen Reaktion verbunden werden.

[0088] Wie oben erwähnt, kann das Analogon auch das Einfügen einer ersten Gruppierung umfassen, welche das Analogon zielgerichtet zu einer APC oder zu einem B-Lymphozyten leitet. Zum Beispiel kann die erste Gruppierung ein spezifischer Bindungspartner für ein B-Lymphozyten-spezifisches Oberflächen-Antigen oder für ein APC-spezifisches Oberflächen-Antigen sein. Viele solcher spezifischen Oberflächen-Antigene sind im Stand der Technik bekannt. Z.B. kann die Gruppierung ein Kohlenhydrat sein, für das ein Rezeptor auf dem

B-Lymphozyten oder der APC existiert (z.B. Mannan oder Mannose). Alternativ dazu kann die zweite Gruppierung ein Hapten sein. Auch ein Antikörperfragment, welches spezifisch ein Oberflächenmolekül auf APCs oder Lymphozyten erkennt, kann als erste Gruppierung verwendet werden (das Oberflächenmolekül kann z.B. ein FC γ -Rezeptor von Makrophagen und Monozyten sein, wie beispielsweise FC γ RI oder, alternativ dazu, jeder andere spezifische Oberflächenmarker, wie beispielsweise CD40 oder CTLA-4). Es sollte erwähnt werden, dass alle diese beispielhaften Targeting-Moleküle als Teil eines Adjuvans verwendet werden können, vgl. unten. CD40-Ligand, Antikörper gegen CD40 oder Varianten davon, welche CD40 binden, werden das Analogon zielgerichtet zu dendritischen Zellen leiten. Gleichzeitig haben jüngste Ergebnisse gezeigt, dass die Wechselwirkung mit dem CD40-Molekül das essentielle Vorhandensein von T_H-Zellen zum Erhalten einer CTL-Antwort beseitigt. Es wird somit vorgeschlagen, dass die allgemeine Verwendung von CD40-bindenden Molekülen als erste Gruppierung (oder als Adjuvantien, vgl. unten) die CTL-Antwort beachtlich erhöhen wird; tatsächlich wird die Verwendung solcher CD40-bindenden Moleküle als Adjuvantien und "erste Gruppierungen" im Sinne der vorliegenden Erfindung als eigenständig erfinderisch erachtet.

[0089] Als Alternative oder Ersatz zum Targeting der Analoga zu einem bestimmten Zelltypus zum Erzielen einer erhöhten Immunantwort ist es möglich, den Grad der Reaktivität des Immunsystems zu erhöhen, indem die oben beschriebene zweite Gruppierung eingefügt wird, welche das Immunsystem stimuliert. Typische Beispiele solcher zweiten Gruppierungen sind Cytokine, Hitzeschock-Proteine und Hormone, sowie deren wirksame Teile.

[0090] Geeignete Cytokine, die erfindungsgemäß zu verwenden sind, sind jene, welche normalerweise auch als Adjuvantien in einer Vakzinzusammensetzung fungieren, z.B. Interferon γ (IFN γ), Flt3-Ligand (Flt3L), Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 13 (IL-13), Interleukin 15 (IL-15), und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF); alternativ dazu kann der funktionelle Teil des Cytokinmoleküls als zweite Gruppierung ausreichend sein. Im Hinblick auf die Verwendung solcher Cytokine als Adjuvans-Substanzen vgl. die untenstehende Diskussion.

[0091] Alternativ dazu kann die zweite Gruppierung ein Toxin sein, wie beispielsweise Listeriolysin (LLO), Lipid A und Hitze-labiles Enterotoxin. Eine Reihe von mycobakteriellen Derivaten, wie MDP (Muramyl-dipeptid), CFA (vollständiges Freund'sches Adjuvans) und die Trehalose-Diester TDM und TDE, sind ebenfalls interessante Möglichkeiten.

[0092] Geeignete erfindungsgemäße Hitzeschock-Proteine, die als zweite Gruppierung verwendet werden können, können HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 und Calreticulin (CRT) sein.

[0093] Auch die Möglichkeit der Einführung einer dritten Gruppierung, welche die Präsentation des Analogs gegenüber dem Immunsystem verstärkt, ist eine wichtige Ausführungsform der Erfindung. Der Stand der Technik hat mehrere Beispiele dieses Prinzips aufgezeigt. Es ist z.B. bekannt, dass der Palmitoyl-Lipidanker in dem OspA-Protein von *Borrelia burgdorferi* verwendet werden kann um Polypeptide bereitzustellen, die sich selbst als Adjuvans dienen (vgl. z.B. WO 96/40718). Es scheint, dass die Lipidproteine Micellen-ähnliche Strukturen ausbilden, mit einem Kern, der aus den Lipidankerteilen der Polypeptide besteht, wobei die übrigen Teile des Moleküls daraus hervorragen, was zu multiplen Präsentationen der antigenischen Determinanten führt. Die Anwendung von diesem und von verwandten Ansätzen unter Verwendung unterschiedlicher Lipidanker (z.B. einer Myristylgruppe, einer Farnesylgruppe, einer Geranyl-Geranyl-Gruppe, eines GPI-Ankers und einer N-Acyldiglyceridgruppe) stellt daher bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung dar, insbesondere da die Bereitstellung eines solchen Lipidankers in einem rekombinant hergestellten Protein sehr einfach ist und lediglich die Verwendung z.B. einer natürlich vorkommenden Signalsequenz als Fusionspartner für das Analogon erfordert. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung des C3d-Fragmentes des Komplementfaktors C3 oder von C3 selbst (vgl. Dempsey et al., 1996, Science 271, 348-350, und Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458-462).

[0094] Es ist wichtig zu erwähnen, dass es insbesondere bevorzugt ist, dass das erste und/oder zweite Analogon im Wesentlichen die vollständige Tertiärstruktur des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens aufweist bzw. aufweisen, wenn versucht wird, das erfindungsgemäße Verfahren z.B. gegen Membran-gebundene Polypeptid-Antigene zu verwenden, welche dem extrazellulären Kompartiment ausgesetzt sind. In der vorliegenden Beschreibung und in den Ansprüchen soll dies bedeuten, dass die Gesamttertiärstruktur des Polypeptid-Antigens, welches extrazellulär exponiert ist, bewahrt bleibt, da, wie oben erwähnt, die Tertiärstruktur der obligat intrazellulären Polypeptide das humorale Immunsystem nicht mit einbezieht. Tatsächlich ist es als Teil der Vakzinierungsstrategie oft erwünscht, das Aussetzen von putativen B-Zell-Epitopen, die von dem intrazellulären Teil des Polypeptid-Antigens abgeleitet sind, gegenüber dem extrazellulären Kompartiment zu vermeiden; auf

diese Weise können potentiell nachteilige Wirkungen, die durch eine Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen verursacht werden, minimiert werden.

[0095] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung reicht es jedoch aus, wenn die Variation/Modifikation (sei es eine Insertion, Addition, Deletion oder Substitution) ein fremdes T-Zell-Epitop hervorbringt und gleichzeitig eine wesentliche Anzahl der CTL-Epitope in dem Polypeptid-Antigen bewahrt (und manchmal ebenfalls eine wesentliche Anzahl von B-Zell-Epitopen).

[0096] Die folgende Formel beschreibt die Konstrukte, die im Allgemeinen von der Erfindung umfasst sind:

$$(\text{MOD}_1)_{s1}(\text{PAG}_{e1})_{n1}(\text{MOD}_2)_{s2}(\text{PAG}_{e2})_{n2} \dots (\text{MOD}_x)_{sx}(\text{PAG}_{ex})_{nx} \quad (\text{I})$$

– wobei PAG_{e1} - PAG_{ex} x CTL- und/oder B-Zell-Epitope sind, die Untersequenzen des relevanten Polypeptid-Antigens enthalten, welche unabhängig voneinander identisch oder nicht-identisch sind, und welche fremde Seitengruppen enthalten können oder nicht, x eine ganze Zahl ≥ 3 ist, $n1$ - nx x ganze Zahlen ≥ 0 sind (mindestens eine ist ≥ 1), MOD_1 - MOD_x x Modifikationen sind, die in den bewahrten Epitopen eingefügt sind, und $s1$ - sx x ganze Zahlen ≥ 0 sind (mindestens eine ist ≥ 1 , wenn keine Seitengruppen in die Sequenzen eingefügt sind). Daher erlaubt die Erfindung bei den gegebenen allgemeinen funktionellen Beschränkungen der Immunogenität der Konstrukte, alle Arten von Permutationen der Original-Antigensequenz, und alle Arten von Modifikationen darin. Somit sind von der Erfindung Analoga erfasst, die durch Auslassen von Teilen der Polypeptid-Antigensequenz erhalten werden, welche z.B. in vivo nachteilige Wirkungen aufweisen, oder die Auslassung von Teilen, welche normalerweise intrazellulär vorliegen und daher unerwünschte immunologische Reaktionen hervorrufen könnten, vgl. die detaillierte Diskussion unten.

[0097] Eine weitere Ausarbeitung der obigen Prinzipien umfasst die Verwendung von CTL- und/oder B-Zell-Epitopen von mehr als einem Antigen mit pathologischem Bezug. Z.B. gibt es mehrere Krebs-bezogene Antigene, die ihre onkogenen Wirkungen nur ausüben, wenn sie in mutierter Form vorliegen – Beispiele sind mutiertes k-ras und P53, welche beide bei der normalen Zellzyklusregulation notwendige Proteine sind und welche beide in den meisten normalen Zellen Expressionsprodukte sind. In einigen Fällen wurde gezeigt, dass CTLs mutierte Peptide von diesen Antigenen erkennen. Es ist daher wichtig, dass das Immunsystem nur auf die mutierten Peptide reagiert und nicht auf die unmutierten Teile, wenn eine Antigen-spezifische Immuntherapie in Gang gesetzt wird.

[0098] Wir haben eine Strategie entworfen, bei der Sequenzen von 8-25 Aminosäuren solcher Krankheits-bezogenen Proteine als weitere Epitope in einem AutoVac-Konstrukt verwendet werden können – in bevorzugten Ausführungsformen würden die eingefügten Epitope gleichzeitig für das Auftreten von T_H -Epitopen im Endkonstrukt sorgen, vgl. die obige Diskussion. Die Epitope, die für diesen Zweck verwendet werden, würden jene sein, welche die mutierte Region des Krankheits-bezogenen Proteins umfassen. Indem solch ein Ansatz angewandt wird, wäre es möglich, CTLs (und wo dies möglich ist möglicherweise Antikörper) zu erzeugen, und zwar nur gegen die mutierte Form des Krankheits-bezogenen Antigens. In den Fällen, in denen das Krankheits-bezogene Antigen für das Auftreten eines T_H -Epitops sorgt, könnte die Verwendung eines echten fremden T_H -Epitops vollständig ausgelassen werden. Eine Ausführungsform dieses Prinzips könnte z.B. die Vakzinierung mit einem Nukleinsäure-Vakzin sein, welches für ein Analogon eines Polypeptid-Antigens (z.B. Her2 oder PSM) codiert, in das mindestens ein T_H -Epitop und mindestens ein Peptid, das von einem anderen Krankheits-bezogenen Antigen (z.B. einem Peptid von dem mutierten Teil eines onkogenischen Proteins eingefügt wurden). In einer bevorzugten Ausführungsform wird das mindestens eine T_H -Epitop als Folge des Einfügens des Peptids eingefügt.

[0099] Es ist außerdem bevorzugt, dass die Variation und/oder Modifikation, wenn dies anwendbar ist, eine Duplikation des mindestens einen B-Zell-Epitops, oder des mindestens einen CTL-Epitops des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens umfasst. Diese Strategie führt zu dem Ergebnis, dass multiple Kopien bevorzugter Epitop-Regionen dem Immunsystem präsentiert werden und daher die Wahrscheinlichkeit einer effektiven Immunantwort maximieren. Daher macht sich diese Ausführungsform der Erfindung multiple Präsentationen der Epitope, die von dem Polypeptid-Antigen abgeleitet sind, zunutze (d.h. Formel I, bei der mindestens ein B-Zell-Epitop an zwei Positionen vorhanden ist).

[0100] Diese Wirkung kann auf verschiedene Weisen erreicht werden, z.B. indem einfach Fusions-Polypeptide präpariert werden, die die Struktur $(\text{PAG})_m$ umfassen, wobei m eine ganze Zahl ≥ 2 ist, und dann die hierin diskutierten Modifikationen in mindestens einer der Polypeptid-Antigen-Sequenzen eingefügt werden.

[0101] Eine alternative Ausführungsform der Erfindung, welche ebenfalls zu der bevorzugten Präsentation von multiplen (z.B. mindestens zwei) Kopien der wichtigen Epitop-Regionen des Antigens gegenüber dem Immunsystem führt, ist das kovalente Koppeln des Antigens, einer Untersequenz oder Varianten davon mit bestimmten Molekülen. Es können z.B. Polymere verwendet werden, z.B. Kohlenhydrate, wie Dextran, vgl. z.B. Lees A et al., 1994, Vaccine 12: 1160-1166; Lees A et al., 1990, J Immunol. 145: 3594-3600, aber ebenso sind Mannose und Mannan nützliche Alternativen. Integrale Membranproteine, z.B. von E. coli und anderen Bakterien, sind ebenfalls nützliche Konjugationspartner. Die traditionellen Trägermoleküle wie Napfschnecken-Hämocyanin (KLH, "keyhole limpet haemocyanin"), Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid und Rinderserumalbumin (BSA) sind ebenfalls bevorzugte und nützliche Konjugationspartner.

[0102] Die Aufrechterhaltung der manchmal vorteilhaften wesentlichen Fraktion der B-Zell-Epitope oder sogar der gesamten Tertiärstruktur eines Proteins, welches einer wie hierin beschriebenen Modifikation unterworfen wurde, kann auf verschiedene Weise erreicht werden. Eine ist es, einfach ein polyklonales Antiserum, das gegen das Polypeptid-Antigen gerichtet ist (z.B. ein Antiserum, das in einem Kaninchen präpariert wurde) zu präparieren, und danach dieses Antiserum als Testreagens (z.B. in einem kompetitiven ELISA) gegen die modifizierten Proteine, welche produziert werden, zu verwenden. Modifizierte Versionen (Analoge), welche in demselben Ausmaß mit dem Antiserum reagieren, wie das Polypeptid-Antigen, müssen als solche angesehen werden, die dieselbe Gesamttertiärstruktur, wie das Polypeptid-Antigen aufweisen, während Analoga, die eine begrenzte (aber noch immer signifikante und spezifische) Reaktivität mit solch einem Antiserum zeigen, als solche angesehen werden, die einen wesentlichen Teil der Original-B-Zell-Epitope behalten haben.

[0103] Alternativ dazu kann eine Auswahl monoklonaler Antikörper, die mit unterschiedlichen Epitopen auf dem Polypeptid-Antigen reagieren, präpariert werden und als Testreihe verwendet werden. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass er 1) eine Epitop-Kartierung des fraglichen Polypeptid-Antigens erlaubt, und 2) eine Kartierung der Epitope, welche in den präparierten Analoga aufrecht erhalten werden, erlaubt.

[0104] Natürlich wäre ein dritter Ansatz, die 3-dimensionale Struktur des Polypeptid-Antigens oder eines biologisch aktiven Teils davon (vgl. oben) aufzulösen, und diese mit der aufgelösten 3-dimensionalen Struktur der präparierten Analoga zu vergleichen. Eine dreidimensionale Struktur kann mit der Hilfe von Röntgenbeugungsuntersuchungen und der NMR-Spektroskopie aufgelöst werden. Weitere Informationen, die sich auf die Tertiärstruktur beziehen, können zu einem gewissen Ausmaß aus Zirkulardichroismus-Studien erhalten werden, welche den Vorteil haben, dass sie lediglich die Polypeptide in reiner Form erfordern (während die Röntgenbeugung die Bereitstellung von kristallisierten Polypeptiden erfordert und NMR die Bereitstellung von Isotopvarianten des Polypeptids erfordert) um nützliche Informationen über die Tertiärstruktur eines gegebenen Moleküls bereitzustellen. Letztlich sind jedoch Röntgenbeugung und/oder NMR erforderlich um abschließende Daten zu erhalten, da der Zirkulardichroismus lediglich einen indirekten Beweis für eine korrekte 3-dimensionale Struktur ermöglicht, und zwar über Informationen über Sekundärstrukturelemente.

[0105] Im Wesentlichen gibt es zur Zeit drei ausführbare Wege, die Präsentation der relevanten Epitope gegenüber dem Immunsystem zu erreichen: Traditionelle Untereinheiten-Vakzinierung mit Polypeptid-Antigenen, die Verabreichung von genetisch modifizierten Lebendvakzinen und die Nukleinsäure-Vakzinierung. Diese drei Möglichkeiten werden getrennt im Folgenden diskutiert:

Polypeptid-Vakzinierung

[0106] Diese bringt die Verabreichung einer immunogen wirksamen Menge des mindestens einen ersten Analogons, und, wenn dies relevant ist, die Verabreichung einer immunologisch wirksamen Menge des mindestens einen zweiten Analogons, an das fragliche Tier mit sich. Bevorzugt wird/werden das mindestens eine erste und/oder zweite Analogon mit einem pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger und/oder Vehikel und wahlweise mit einem Adjuvans formuliert.

[0107] Wenn die Präsentation des Analogons gegenüber dem Immunsystem eines Tieres mittels dessen Verabreichung an das Tier bewirkt wird, folgt die Formulierung des Polypeptids den im Stand der Technik allgemein anerkannten Prinzipien.

[0108] Die Herstellung von Vakzinen, welche Peptidsequenzen als aktive Inhaltsstoffe enthalten, ist im Stand der Technik wohl bekannt, wie in den US-Patenten 4 608 251; 4 601 903; 4 599 231; 4 599 230; 4 596 792; und 4 578 770 beispielhaft dargestellt. Typischerweise werden solche Vakzine entweder als Injektionen, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen, hergestellt; feste Formen, die sich zur Lösung in oder zur Suspension in Flüssigkeit vor der Injektion eignen, können ebenfalls hergestellt werden. Die Präparation kann außer-

dem emulgiert werden. Der aktive immunogene Inhaltsstoff wird oft mit Exzipientien gemischt, welche pharmazeutisch annehmbar sind, und mit dem aktiven Inhaltsstoff kompatibel. Solche Exzipientien sind z.B. Wasser, Kochsalzlösung, Dextrose, Glycerin, Ethanol oder ähnliches, und Kombinationen davon. Zusätzlich kann das Vakzin, wenn dies erwünscht ist, geringe Mengen von Hilfssubstanzen, wie Benetzungsmittel oder Emulgatoren, pH-Puffer oder Adjuvantien, welche die Wirksamkeit der Vakzine erhöhen, enthalten; vgl. die detaillierte Diskussion von Adjuvantien unten.

[0109] Die Vakzine werden konventionell parenteral verabreicht, beispielsweise durch Injektion, entweder subkutan, intradermal, subdermal oder intramuskulär. Zusätzliche Formulierungen, welche für andere Arten der Verabreichung geeignet sind, umfassen Zäpfchen und in einigen Fällen orale, bukkale, sublinguale, intraperitoneale, intravaginale, anale und intrakraniale Formulierungen. Für Zäpfchen können traditionelle Bindemittel und Trägerstoffe, z.B. Polyalkalenglykole oder Triglyceride, umfassen; solche Zäpfchen können aus Gemischen gebildet sein, die den Inhaltsstoff im Bereich von 0,5% bis 10%, bevorzugt 1-2%, enthalten. Orale Formulierungen umfassen solche normalerweise verwendeten Exzipientien, wie beispielsweise pharmazeutische Grade Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und ähnliche. Diese Zusammensetzungen haben die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Retardpräparaten oder Pudern, und enthalten 10-95% des aktiven Inhaltsstoffes, bevorzugt 25-70%. Für orale Formulierungen ist Cholera-toxin ein interessanter Formulierungspartner (und ebenso ein möglicher Konjugationspartner).

[0110] Die Polypeptide können neutral oder in den Salzformen in dem Vakzin formuliert werden. Pharmazeutisch annehmbare Salze umfassen Säureadditionssalze (gebildet mit den freien Aminogruppen des Peptids), welche mit anorganischen Säuren gebildet werden, wie beispielsweise Salz- oder Phosphorsäuren, oder beispielsweise organischen Säuren, wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Mandelsäure und ähnlichen. Salze, die mit den freien Carboxylgruppen gebildet werden, können ebenso von anorganischen Basen, wie beispielsweise Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisenhydroxiden, abgeleitet werden, und von solchen organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und ähnlichen.

[0111] Die Vakzine werden auf eine Weise verabreicht, welche mit der Dosisformulierung kompatibel ist, und in einer solchen Menge, wie sie therapeutisch wirksam und immunogen sein wird. Die zu verabreichende Menge hängt von dem zu behandelnden Patienten ab, einschließlich z.B. des Zustandes des Immunsystems des Individuums, das eine Immunantwort hervorbringen soll, und des Grades an Schutz, der erwünscht ist. Geeignete Dosierungsbereiche liegen im Bereich von mehreren hundert Mikrogramm aktiver Inhaltsstoff pro Vakzinierung, mit einem bevorzugten Bereich von ungefähr 0,1 µg bis 2000 µg (obwohl sogar höhere Mengen im Bereich von 1 bis 10 mg vorgeschlagen werden), beispielsweise im Bereich von ungefähr 0,5 µg bis 1000 µg, bevorzugt im Bereich von 1 µg bis 500 µg, und insbesondere im Bereich von ungefähr 10 µg bis 100 µg. Geeignete Dosierungskurven zur anfänglichen Verabreichung und Booster sind ebenfalls variabel, aber sie werden beispielhaft durch eine anfängliche Verabreichung, gefolgt von nachfolgenden Impfungen oder anderen Verabreichungen, vertreten.

[0112] Die Art der Anwendung kann in weiten Grenzen variieren. Jede der konventionellen Verfahren zur Verabreichung eines Vakzins ist anwendbar. Diese umfassen die orale Anwendung auf einer festen, physiologisch annehmbaren Basis oder in einer physiologisch annehmbaren Dispersion, parenteral, durch Injektion oder ähnlich. Die Dosierung des Vakzins hängt vom Wege der Verabreichung ab und variiert je nach Alter der zu vakzinierenden Person und der Formulierung des Antigens.

[0113] Einige der Polypeptide des Vakzins sind in einem Vakzin ausreichend immunogen, aber für einige der anderen wird die Immunantwort erhöht, wenn das Vakzin außerdem eine Adjuvanssubstanz umfasst. Es ist besonders bevorzugt, ein Adjuvans zu verwenden, von dem gezeigt werden kann, dass es die Durchbrechung der Autotoleranz gegen Autoantigene erleichtert.

[0114] Verschiedene Verfahren zum Erreichen einer Adjuvanswirkung für das Vakzin sind bekannt. Allgemeine Prinzipien und Verfahren sind in "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (Hrsg.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, und ebenso in "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G et al. (Hrsg.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, beispielhaft dargestellt.

[0115] Bevorzugte Adjuvantien erleichtern die Aufnahme der Vakzinmoleküle durch APCs, wie beispielsweise dendritische Zellen, und aktivieren diese. Nicht-beschränkende Beispiele werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Immuntargeting-Adjuvans, einem immunmodulierenden Adjuvans, wie beispielsweise

einem Toxin, einem Cytokin und einem mycobakteriellen Derivat; einer Ölformulierung; einem Polymer; einem Micellen-bildenden Adjuvans; einem Saponin; einer immunstimulierenden Komplexmatrix (ISCOM-Matrix); einem Partikel; DDA; Aluminium-Adjuvantien; DNA-Adjuvantien; γ -Inulin; und einem einkapselnden Adjuvans. Im Allgemeinen sollte erwähnt werden, dass die obigen Offenbarungen, welche sich auf Verbindungen und Agentien beziehen, welche als erste, zweite und dritte Gruppierung in den Analoga nützlich sind, sich ebenso mutatis mutandis auf deren Verwendung im Adjuvans eines Vakzins der Erfindung beziehen.

[0116] Die Anwendung von Adjuvantien umfasst die Verwendung von Agentien, wie beispielsweise Aluminiumhydroxid oder -phosphat (Alum), welches für gewöhnlich als 0,05 bis 0,1%ige Lösung in gepufferter Kochsalzlösung verwendet wird, als Gemisch mit synthetischen Polymeren von Zuckern (z.B. Carbopol®, das als 0,25%ige Lösung verwendet wird, die Verwendung einer Aggregation des Proteins in dem Vakzin durch Hitzebehandlung mit Temperaturen im Bereich zwischen 70° und 101°C für 30 Sekunden bis zu 2 Minuten, und auch die Aggregation mittels verknüpfender Agentien ist möglich. Die Aggregation durch Reaktivierung mit Pepsin-behandelten Antikörpern (Fab-Fragmente) mit Albumin, das Mischen mit bakteriellen Zellen, wie *C. parvum* oder Endotoxinen oder Lipopolysaccharid-Komponenten von gramnegativen Bakterien, eine Emulsion in physiologisch annehmbaren Öl-Vehikeln, wie Mannit-Mono-Oleat (Aracel A) oder die Emulsion mit einer 20%igen Lösung Perfluorcarbon (Fluosol-DA), welche als Blocksstitut verwendet wird, kann ebenso verwendet werden. Die Mischung mit Ölen, wie Squalen und IFA ist ebenso bevorzugt.

[0117] Entsprechend der Erfindung ist DDA (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) ein interessanter Kandidat für ein Adjuvans, genauso wie DNA und γ -Inulin, aber auch Freund'sches vollständiges und unvollständiges Adjuvans, sowie Quillajasaponine, wie QuilA und QS21, sind interessant. Weitere Möglichkeiten sind Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und die oben erwähnten C3 und C3d.

[0118] Von Liposom-Formulierungen ist ebenfalls bekannt, dass sie Adjuvans-Wirkungen ausüben, und daher sind erfindungsgemäße Liposom-Adjuvantien bevorzugt.

[0119] Ebenso sind Adjuvantien vom immunstimulatorischen Komplexmatrix-Typ (ISCOM®-Matrix) bevorzugte Auswahlen entsprechend der Erfindung, insbesondere da es gezeigt wurde, dass dieser Typ von Adjuvantien in der Lage ist, die MHC-Klasse II-Expression bei APCs hochzuregulieren. Eine ISCOM®-Matrix besteht aus (wahlweise fraktionierten) Saponinen (Triterpenoiden) von *Quillaja saponaria*, Cholesterin und Phospholipid. Gemischt mit dem immunogenen Protein ist die daraus hervorgehende partikuläre Formulierung das, was als ISCOM-Partikel bekannt ist, wobei das Saponin 60-70% Gew./Gew., das Cholesterin und Phospholipid 10-15% Gew./Gew., und das Protein 10-15% Gew./Gew. ausmacht. Details, die sich auf die Zusammensetzung und die Verwendung von immunstimulatorischen Komplexen beziehen, findet man z.B. in den oben erwähnten Lehrbüchern, die Adjuvantien behandeln, aber auch bei Marein B et al., 1995, Clin. Immunother. 3: 461-475, sowie bei Barr IG und Mitchell GF, 1995, Immunol. and Cell Biol. 74: 8-25, welche nützliche Anleitungen für die Herstellung von vollständigen immunstimulatorischen Komplexen bereitstellen.

[0120] Eine andere hochinteressante (und daher bevorzugte) Möglichkeit zum Erreichen einer Adjuvanswirkung ist es, die Technik zu verwenden, die in Gosselin et al., 1992, beschrieben ist. Kurz, die Präsentation von relevanten Antigenen, wie einem erfindungsgemäßen Antigen kann verstärkt werden, indem das Antigen an Antikörper konjugiert wird (oder an Antigen-bindende Antikörperfragmente), und zwar gegen die Fc γ -Rezeptoren auf Monozyten/Makrophagen. Insbesondere Konjugate von Antigen und anti-Fc γ RI zeigten, dass sie die Immunogenität zum Zwecke der Vakzinierung erhöhen.

[0121] Andere Möglichkeiten umfassen die Verwendung von Targeting- und immunmodulierenden Substanzen (unter anderem Cytokinen), die oben als Kandidaten für die ersten und zweiten Gruppierungen in den modifizierten Analoga erwähnt sind. In diesem Zusammenhang sind auch synthetische Induktoren von Cytokinen, wie Poly-I:C eine Möglichkeit.

[0122] Geeignete mycobakterielle Derivate werden aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Muramyldipeptid, vollständigem Freund'schem Adjuvans, RIBI und einem Diester aus Trehalose, wie TDM und TDE.

[0123] Geeignete Immuntargeting-Adjuvantien werden aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus CD40-Ligand und CD40-Antikörpern oder deren spezifisch bindenden Fragmenten (vgl. die obige Diskussion), Mannose, einem Fab-Fragment und CTLA-4.

[0124] Geeignete Polymer-Adjuvantien werden aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Kohlenhydraten, wie Dextran, PEG, Stärke, Mannan und Mannose; einem Kunststoffpolymer; und Latex, wie beispielsweise La-

texkugelnchen.

[0125] Noch ein weiterer interessanter Weg zum Modulieren einer Immunantwort ist es, das Immunogen (wahlweise zusammen mit den Adjuvantien und pharmazeutisch annehmbaren Trägern und Vehikeln) in einen "virtuellen Lymphknoten" ("virtual lymph node", VLN) einzuschließen (ein geschütztes medizinisches Gerät, das von ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501, entwickelt wurde). Der VLN (ein dünnes röhrenartiges Gerät) ahmt die Struktur und Funktion eines Lymphknotens nach. Das Einbringen eines VLN unter die Haut ruft eine Stelle einer sterilen Entzündung mit einem Anstieg von Cytokinen und Chemokinen hervor. T- und B-Zellen sowie APCs reagieren sehr schnell auf die Gefahrensignale, wandern in die entzündete Stelle ein und reichern sich innerhalb der porösen Matrix des VLN an. Es wurde gezeigt, dass die Antigendosis, die notwendig ist um eine Immunantwort gegen ein Antigen hervorzurufen, vermindert ist, wenn der VLN verwendet wird, und dass der Immunschutz, der durch Vakzinierung unter Verwendung eines VLN verliehen wird, konventionelle Immunisierung unter Verwendung von RIBI als Adjuvans übertrifft. Die Technologie ist unter anderem kurz in Gelber C et al., 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", in: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 12.-15. Oktober 1998, Seascape Resort, Aptos, California" beschreiben.

[0126] Jüngste Ergebnisse haben gezeigt, dass die gleichzeitige Verabreichung von H2-Agonisten das Überleben von natürlichen Killerzellen und CTLs innerhalb des Tumors erhöht. Daher wird auch vorgeschlagen, H2-Agonisten als Adjuvantien in die erfindungsgemäßen Verfahren einzuführen.

[0127] Es wird erwartet, dass das Vakzin mindestens einmal pro Jahr verabreicht werden sollte, wie beispielsweise mindestens 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 12 Mal pro Jahr. Insbesondere 1-12 Mal pro Jahr wird erwartet, wie beispielsweise 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 oder 12 Mal pro Jahr, an ein Individuum, das dies benötigt. Es wurde zuvor gezeigt, dass die Gedächtnisimmunität, die durch Verwendung der bevorzugten erfindungsgemäßen Autovakzine induziert wird, nicht bleibend ist, und daher muss das Immunsystem periodisch mit den Analoga konfrontiert werden.

[0128] Aufgrund der genetischen Variation können Individuen mit Immunantworten unterschiedlicher Stärke auf dasselbe Polypeptid reagieren. Daher kann das erfindungsgemäße Vakzin mehrere unterschiedliche Polypeptide umfassen um die Immunantwort zu erhöhen, vgl. ebenso die obige Diskussion, die die Auswahl der Einführungen fremder T-Zell-Epitope betrifft. Das Vakzin kann zwei oder mehr Polypeptide umfassen, wobei alle dieser Polypeptide solche sind, wie sie oben beschrieben sind.

[0129] Das Vakzin kann dementsprechend 3-20 unterschiedliche modifizierte oder unmodifizierte Polypeptide umfassen, wie 3-10 unterschiedliche Polypeptide. Jedoch wird normalerweise versucht, die Anzahl der Peptide auf einem Minimum zu halten, wie 1 oder 2 Peptide.

Lebend-Vakzine

[0130] Die zweite Alternative zum Bewirken der Präsentation gegenüber dem Immunsystem ist die Anwendung der Lebend-Vakzintechnologie. Bei der Lebend-Vakzinierung wird die Präsentation gegenüber dem Immunsystem bewirkt, indem dem Tier ein nicht-pathogener Mikroorganismus verabreicht wird, welcher mit einem Nukleinsäurefragment transformiert wurde, das die notwendigen Epitop-Regionen oder ein vollständiges erstes und/oder zweites Analogon codiert. Alternativ dazu wird der Mikroorganismus mit einem Vektor transformiert, der ein solches Nukleinsäurefragment umfasst. Der nicht-pathogene Mikroorganismus kann jeder geeignete attenuierte Bakterienstamm sein (attenuiert mittels der Passagierung oder mittels des Entfernens pathogener Expressionsprodukte durch rekombinante DNA-Technologie), z.B. Mycobacterium bovis BCG., nicht-pathogene Streptococcus spp., E. coli, Salmonella spp., Vibrio cholerae, Shigella, etc. Übersichtsartikel, die die Herstellung von Lebend-Vakzinen des Standes der Technik behandeln, findet man z.B. in Saliou P, 1995, Rev. Prat. 45: 1492-1496, und Walker PD, 1992, Vaccine 10: 977-990. Für Details über die Nukleinsäurefragmente und Vektoren, die in solchen Lebend-Vakzinen verwendet werden, vgl. die entstehende Diskussion.

[0131] Wie bei dem Polypeptid-Vakzin kann das T_H-Epitop und/oder das erste und/oder die erste und/oder zweite und/oder dritte Gruppierungen, wenn sie vorhanden sind, in Form von Fusionspartnern an die Aminosäuresequenz, die sich von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen ableitet, vorliegen.

[0132] Als Alternative zu bakteriellen Lebend-Vakzinen kann das unten diskutierte erfindungsgemäße Nukle-

insäurefragment in einen nicht-virulenten viralen Vakzinvektor eingebaut sein. Eine Möglichkeit ist ein Pockenvirus, wie beispielsweise ein Vaccinia-Virus, MVA (modifizierter Vaccinia-Virus), Kanarienvackenvirus, Vogel-pockenvirus und Hühnerpockenvirus, etc. Alternativ dazu kann eine Herpes simplex-Virus-Variante verwendet werden.

[0133] Normalerweise wird der nicht-pathogene Mikroorganismus oder Virus lediglich einmal an das Tier verabreicht, aber in einigen Fällen kann es notwendig sein, den Mikroorganismus mehr als einmal in einer Lebensdauer zu verabreichen.

[0134] Der Mikroorganismus kann auch mit einer Nukleinsäure bzw. mit Nukleinsäuren transformiert sein, die Regionen enthält bzw. enthalten, die für die 1., 2. und/oder 3. Gruppierungen) codiert/codieren, z.B. in Form der oben beschriebenen immunmodulierenden Substanzen, wie den Cytokinen, die als nützliche Adjuvantien diskutiert wurden. Eine bevorzugte Version dieser Ausführungsform umfasst das Vorhandensein der codierenden Region für das Analogon und der codierenden Region für den Immunmodulator in unterschiedlichen offenen Leserahmen oder zumindest unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren. Dadurch wird es vermieden, dass das Analogon oder die Epitope als Fusionspartner mit dem Immunmodulator hergestellt werden. Alternativ dazu können zwei unterschiedliche Nukleotidfragmente als transformierende Agentien verwendet werden.

Nukleinsäure-Vakzinierung

[0135] Als Alternative zur klassischen Verabreichung eines Peptid-basierten Vakzins bietet die Technologie der Nukleinsäure-Vakzinierung (auch als "Nukleinsäure-Immunisierung", "genetische Immunisierung", "Gen-Immunisierung" und "DNA-Vakzinierung" bekannt) eine Vielzahl attraktiver Eigenschaften.

[0136] Als erstes erfordert die Nukleinsäure-Vakzinierung, im Gegensatz zum traditionellen Vakzinierungsansatz, keine Rohstoff verbrauchende Produktion des immunogenen Mittels im großen Maßstab (z.B. in Form der industriellen Fermentation von Mikroorganismen, die die Analoga produzieren, was bei der Polypeptid-Vakzinierung erforderlich ist). Außerdem besteht kein Erfordernis, Reinigungs- und Faltungs-Schemata für das Immunogen zu entwickeln. Und da schließlich die Nukleinsäure-Vakzinierung auf dem biochemischen Apparat des vakzinieren Individuums beruht um das Expressionsprodukt der eingeführten Nukleinsäure zu produzieren, wird erwartet, dass eine optimale posttranslationale Prozessierung des Expressionsprodukts geschieht; dies ist besonders wichtig im Falle der Autovakzinierung, da, wie oben erwähnt, ein signifikanter Teil der Original-B-Zell-Epitope in den Analoga bewahrt werden soll, die sich von extrazellulär ausgesetzten Polypeptidsequenzen ableiten, und da B-Zell-Epitope sich im Prinzip aus Teilen von irgendwelchen (Bio-)Molekülen (z.B. Kohlenhydraten, Lipid, Protein, etc.) zusammensetzen können. Daher können native Glykosylierungs- und Lipidmuster des Immunogens sehr wohl für die Gesamtimmunogenität von Bedeutung sein, und diese werden am besten sichergestellt, indem man den Wirt dazu veranlasst, das Immunogen herzustellen.

[0137] Daher umfasst es eine wichtige Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, dass die Präsentation bewirkt wird, indem in vivo mindestens ein Nukleinsäurefragment, welches für das mindestens eine CTL-Epitop und/oder das mindestens eine B-Zell-Epitop und das mindestens eine erste fremde T_H -Epitop codiert und diese exprimiert, in die APC eingeführt wird (eine Alternative umfasst die Verabreichung von mindestens zwei unterschiedlichen Nukleinsäurefragmenten, wobei eine für das mindestens eine CTL-Epitop und das andere für das mindestens eine fremde T_H -Epitop codiert). Bevorzugt wird dies unternommen, indem ein Nukleinsäurefragment verwendet wird, welches das oben diskutierte erste Analogon codiert. Wenn das erste Analogon mit den oben detailliert ausgeführten T_H -Epitopen und/oder ersten und/oder zweiten und/oder dritten Gruppierungen ausgestattet ist, dann liegen diese in Form von Fusionspartnern mit der Aminosäuresequenz vor, die sich von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen ableitet, wobei das Fusionskonstrukt von dem Nukleinsäurefragment codiert wird.

[0138] Wie bei dem traditionellen Vakzinierungsansatz kann die Nukleinsäure-Vakzinierung mit der Einführung in vivo von mindestens einem Nukleinsäurefragment, das das zweite Analogon codiert und exprimiert in die APC, kombiniert werden. Die Überlegungen, die die ersten, zweiten und dritten Gruppierungen und T_H -Epitope betreffen, treffen hier ebenfalls zu.

[0139] In dieser Ausführungsform ist die eingeführte Nukleinsäure bevorzugt DNA, welche in Form von nackter DNA, DNA formuliert mit geladenen oder ungeladenen Lipiden, DNA formuliert in Liposomen, DNA umfasst von einem viralen Vektor, DNA formuliert mit einem Transfektions-erleichternden Protein oder Polypeptid, DNA formuliert mit einem Targeting-Protein oder -Polypeptid, DNA formuliert mit Calcium-präzipitierenden Agentien,

DNA gekoppelt an ein inertes Trägermolekül und DNA formuliert mit einem Adjuvans vorliegen kann. In diesem Zusammenhang wird festgestellt, dass praktisch alle Überlegungen, die die Verwendung von Adjuvantien in traditionellen Vakzinformulierungen betreffen, für die Formulierung von DNA-Vakzinen zutreffen. Daher treffen alle hierin vorhandenen Offenbarungen, welche die Verwendung von Adjuvantien im Zusammenhang mit Polypeptid-basierten Vakzinen betreffen, mutatis mutandis auf deren Verwendung bei der Nukleinsäure-Vakzinierungstechnologie zu. Gleiches gilt für andere Überlegungen, die sich auf die Formulierung und die Art und den Weg der Verabreichung beziehen, und daher treffen auch diese Überlegungen, die im Zusammenhang mit einem traditionellen Vakzin oben diskutiert werden, mutatis mutandis auf deren Verwendung bei der Nukleinsäure-Vakzinierungstechnologie zu.

[0140] Eine besonders bevorzugte Art der Formulierung von Nukleinsäure-Vakzinen sind Mikropartikel, die die DNA enthalten. Geeignete Mikropartikel sind z.B. in der WO 98/31398 beschrieben.

[0141] Außerdem kann bzw. können die Nukleinsäure(n), die als Immunisierungsmittel verwendet wird/werden, Regionen enthalten, die für die ersten, zweiten und/oder dritten Gruppierungen codieren, z.B. in Form der immunmodulierenden Substanzen, die oben beschrieben sind, wie die Cytokine, die als nützliche Adjuvantien diskutiert werden. Eine bevorzugte Version dieser Ausführungsform umfasst es, dass die codierende Region für das Analogon und die codierende Region für den Immunmodulator in unterschiedlichen offenen Leserahmen oder zumindest unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren enthalten sind. Dabei wird es vermieden, dass das Analogon oder Epitop als Fusionspartner des Immunmodulators hergestellt wird. Alternativ dazu können zwei unterschiedliche Nukleotidfragmente verwendet werden, aber dieses ist aufgrund des Vorteils der sicheren Co-Expression, wenn beide codierenden Regionen umfasst von demselben Molekül vorliegen, weniger bevorzugt.

[0142] Unter normalen Umständen wird die Nukleinsäure des Vakzins in Form eines Vektors eingeführt, wobei die Expression unter der Kontrolle eines viralen Promotors steht. Für eine detailliertere Diskussion der erfindungsgemäßen Vektoren vgl. die entstehende Diskussion. Ebenso sind detaillierte Offenbarungen in Bezug auf die Formulierung und Verwendung von Nukleinsäure-Vakzinen verfügbar, vgl. Donnelly JJ et al., 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 617-648, und Donnelly JJ et al., 1997, Life Sciences 60: 163-172. Auf diese beiden Bezugsstellen wird expressis verbis Bezug genommen.

[0143] Ein wichtiger Teil der Erfindung betrifft ein neues Verfahren zum Selektieren eines geeigneten immunogenen Analogons eines Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, welches in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, wobei dieses immunogene Analogon in der Lage ist, eine CTL-Antwort in dem Tier gegen Zellen zu induzieren, die ein Epitop, das von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, gebunden an ein MHC-Klasse I-Molekül aufweisen. Dieses Verfahren umfasst die Schritte

- a) Identifizieren von mindestens einer Untersequenz der Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, welches keine bekannten oder vorhergesagten CTL-Epitope enthält,
- b) Herstellen von mindestens einem mutmaßlich immunogenen Analogon des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, indem in die Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens mindestens ein T_H-Epitop, das für das Tier fremd ist, an einer Position innerhalb der mindestens einen in Schritt a) identifizierten Untersequenz eingefügt wird, und
- c) Auswahl des Analogons/der Analoga, die in Schritt b) hergestellt wurden, welche verifizierbar in der Lage sind, eine CTL-Reaktion in dem Tier zu induzieren.

[0144] Alternativ dazu umfasst das Auswahlverfahren die Herstellung eines Nukleinsäurefragments zum Zwecke der Nukleinsäurevakzinierung. In dieser Situation ist es erforderlich, dass das codierte Peptid mindestens ein T_H-Epitop umfasst.

[0145] Wenn das Analogon von einem Antigen abgeleitet ist, welches dem Extrazellulärraum ausgesetzt ist, ist es bevorzugt, dass die in Schritt a) identifizierte Untersequenz außerdem keine Cystein-Reste enthält, oder, alternativ dazu, dass das T_H-Epitop, das in Schritt b) eingefügt wird, das Muster der Cystein-Reste nicht wesentlich verändert. Dieser Ansatz erleichtert das Bewahren von Teil-B-Zell-Epitopen in dem daraus hervorgehenden Konstrukt, welche den B-Zell-Epitopen in dem schwachen, Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen ähnlich sind.

[0146] Aus denselben Gründen ist es bevorzugt, dass die in Schritt a) identifizierte Untersequenz außerdem keine bekannten oder vorhergesagten Glykosylierungsstellen enthält, oder, alternativ dazu, eine Ausführungsform, in der das T_H-Epitop, das in Schritt b) eingefügt wird, im Wesentlichen das Glykosylierungsmuster nicht verändert.

[0147] Einige der schwachen, Zell-gebundenen Polypeptid-Antigene üben ungewünschte Wirkungen aus, indem sie eine pathophysiologische Rolle spielen. Es ist wünschenswert, dass diese Wirkungen von den Vakzinierungskonstrukten nicht ausgeübt werden, und daher ist es bevorzugt, dass die in Schritt a) identifizierte Untersequenz signifikant zu einer pathophysiologischen Wirkung beiträgt, die von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen ausgeübt wird, und dass die Einführung des fremden T_H-Epitops in Schritt b) diese pathophysiologische Wirkung reduziert oder ausschaltet. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist es, die aktive Stelle in einem Enzym, Hormon oder Cytokin zu entfernen und diese gegen das fremde T_H-Epitop auszutauschen.

[0148] Eine andere wichtige Überlegung betrifft die Frage der immunologischen Kreuzreaktivität des Polypeptidprodukts des Vakzins mit anderen Selbst-Proteinen, welche mit pathologischen Prozessen nicht in Verbindung stehen. Solch eine Kreuzreaktivität sollte bevorzugt vermieden werden, und daher ist eine wichtige Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens eine solche, bei der die Untersequenz, die in Schritt a) identifiziert wird, zu einer Aminosäuresequenz eines anderen Protein-Antigens des Tieres homolog ist, und bei der die Einführung des T_H-Epitops in Schritt b) im Wesentlichen die Homologie entfernt.

[0149] Diese Ausführungsform ist einer Ausführungsform ähnlich, bei der jedwede Aminosäuresequenzen, welche 1) der extrazellulären Phase nicht ausgesetzt sind, und 2) welche B-Zell-Epitope des schwachen, Zell-assoziierten Polypeptid-Antigens darstellen könnten, nicht bewahrt werden. Dies kann erreicht werden, indem solche Aminosäuresequenzen mit T_H-Epitopen, welche keine B-Zell-Epitope darstellen, ausgetauscht werden, indem man sie vollständig entfernt, oder indem man sie teilweise entfernt.

[0150] Andererseits ist es bevorzugt, dass alle "echten" B-Zell-Epitope des schwachen Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens zu einem hohen Grad bewahrt werden, und daher umfasst eine wichtige Ausführungsform des erfindungsgemäßen Auswahlverfahrens, das das Einführen des fremden T_H-Epitops in Schritt B zu dem Erhalt eines wesentlichen Teils der B-Zell-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens führt. Es ist insbesondere bevorzugt, dass das Analogon die Gesamttertiärstruktur des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens behält.

[0151] Die Präparation in Schritt b) wird bevorzugt durch molekularbiologische Methoden oder mittels Festphasen- oder Flüssigphasen-Peptidsynthese erreicht. Kurze Peptide werden bevorzugt mittels der wohlbekannten Techniken der Festphasen- oder Flüssigphasen-Peptidsynthese präpariert. Jüngste Fortschritte in dieser Technologie haben jedoch die Herstellung von Vollängen-Polypeptiden und Proteinen mittels dieser Verfahren möglich gemacht, und daher liegt es ebenso im Umfang der vorliegenden Erfindung, die langen Konstrukte durch synthetische Verfahren herzustellen.

[0152] Nachdem die nützlichen Analoga entsprechend dem oben diskutierten Verfahren identifiziert wurden, ist es notwendig, die Analoga in größerem Maßstab herzustellen. Die Polypeptide werden nach Verfahren hergestellt, die im Stand der Technik wohlbekannt sind.

[0153] Dies kann durch molekularbiologische Verfahren erreicht werden, die es in einem ersten Schritt umfassen, eine transformierte Zelle zu präparieren, indem eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Analogon codiert, welches entsprechend dem Verfahren ausgewählt wurde, in einen Vektor eingefügt wird, und indem ein geeigneter Wirt mit dem Vektor transformiert wird. Der nächste Schritt ist es, die transformierte Zelle unter Bedingungen zu kultivieren, welche die Expression des Nukleinsäurefragments, das für das Analogon des Zell-gebundenen Antigens codiert, erleichtern, und anschließend das Analogon aus dem Kulturüberstand oder direkt aus den Zellen wiederzugewinnen, z.B. in Form eines Lysats. Alternativ dazu kann das Analogon im großen Maßstab mittels Festphasen- oder Flüssigphasen-Peptidsynthese hergestellt werden, vgl. oben.

[0154] Letztlich kann das Produkt, abhängig von der als Wirt ausgesuchten Zelle oder dem verwendeten Syntheseverfahren, künstlichen posttranslationalen Modifikationen unterzogen werden. Diese können Rückfaltungsschemata sein, die im Stand der Technik bekannt sind, Behandlung mit Enzymen (um die Glykosylierung zu erreichen oder ungewünschte Fusionspartner zu entfernen), chemische Modifikationen (wiederum ist Glykosylierung eine Möglichkeit) und Konjugation, z.B. an traditionelle Trägermoleküle.

[0155] Es sollte erwähnt werden, dass erfindungsgemäß bevorzugte Analoga (und auch die relevanten Analoga, die in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden), Modifikationen umfassen, welche zu einem Polypeptid führen, das eine Sequenzidentität von mindestens 70% mit dem Polypeptid-Antigen oder mit einer Teilsequenz davon von mindestens 10 Aminosäuren Länge aufweist. Höhere Sequenzidentitäten sind bevorzugt, z.B. mindestens 75% oder sogar mindestens 80% oder 85%. Die Sequenzidentität für Proteine und Nukleinsäuren können errechnet werden als $(N_{\text{ref}} - (N_{\text{dif}}) \cdot 100 / N_{\text{ref}}$, wobei N_{dif} die Gesamtanzahl der nicht-identischen

Reste in den zwei Sequenzen ist, wenn sie aneinander angelagert werden, und wobei N_{ref} die Anzahl der Reste in einer der Sequenzen ist. Somit wird die DNA-Sequenz AGTCAGTC eine Sequenzidentität von 75% mit der Sequenz AATCAATC aufweisen ($N_{\text{dif}} = 2$ und $N_{\text{ref}} = 8$).

Spezifische beispielhafte Zielobjekte für die Erfindung

[0156] Wie oben diskutiert, sind bevorzugte schwache, Zell-gebundene Polypeptid-Antigene Tumor-assozierte Antigene. Eine nicht-einschränkende Liste von diesen ist in der folgenden Tabelle angegeben.

Antigen	Literaturstelle
5 alpha reductase	Délos 5, Carsol JL, Fina F, Raynaud JP, Martin PM. 5alpha-reductase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in epithelial cells from hyperplastic and malignant human prostate. <i>Int J Cancer</i> 1998 Mar 16 75:6 890-6
α -fetoprotein	Esteban C, Terrier P, Frayssinet C, Uriel J. Expression of the alpha-fetoprotein gene in human breast cancer. <i>Tumour Biol</i> 1996 17:5 299-305
AM-1	Harada Y, Ohuchi N, Masuko T, Funaki Y, Mori S, Satomi S, Hashimoto Y. Characterization of a new breast cancer-associated antigen and its relationship to MUC1 and TAG-72 antigens. <i>Tohoku J Exp Med</i> 1996 Nov 180:3 273-88
APC	Dihlmann S, Amler LC, Schwab M, Wenzel A. Variations in the expression of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human cancer cell lines of different tissue origin. <i>Oncol Res</i> 1997 9:3 119-27
APRIL	LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. <i>J Exp Med</i> 1998 Sep 21 188:6 1185-90
BAGE	Böel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renaud J-C, Coulie P, Hoon T, and Van der Huggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic lymphocytes. <i>Immunity</i> 1995, 2: 167-175.
β -catenin	Hugh TJ, Dillon SA, O'Dowd G, Getty B, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. <i>Int J Cancer</i> 1999 Aug 12 82:4 509-11
Bcl2	Koty PP, Zhang N, Levitt ML. Antisense bcl-2 treatment increases programmed cell death in non-small cell lung cancer cell lines. <i>Lung Cancer</i> 1999 Feb 23:2 115-27
bcr-abl (b3a2)	Verfaillie CM, Bhatia R, Miller W, Mortari F, Roy V, Burger S, McCullough J, Stieglbauer K, Dewald G, Heimfeld S, Miller JS, McGlave PH. BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from the marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. <i>Blood</i> 1996 Jun 1 87:11 9770-9

Antigen	Literaturstelle
CA-125	Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: the past and the future. <i>Int J Biol Markers</i> 1998 Oct-Dec 13:4 179-87
CASP-8/FLICE	Mandruzzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. <i>J Exp Med</i> 1997 Aug 29 186:5 785-93.
Cathepsins	Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L, Oppelt P, Pache L, Dettmar P, Jänicke F, Graeff H. Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. <i>Clin Cancer Res</i> 1995 Jul 1:7 791-6
CD19	Scheuermann RH, Racila F. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. <i>Leuk Lymphoma</i> 1995 Aug 18:5-6 385-97
CD20	Knox SJ, Goris ML, Trisler K, Negrin R, Davis T, Liles TM, Grillo-López A, Chinn P, Varns C, Ning SC, Fowler S, Deb N, Becker M, Marquez C, Levy R. Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. <i>Clin Cancer Res</i> 1996 Mar 2:3 957-70
CD21	Shubinsky G, Schlesinger M, Polliack A, Rabinowitz R. Pathways controlling the expression of surface CD21 (CR2) and CD23 (Fc(epsilon)IIR) proteins in human malignant B cells. <i>Leuk Lymphoma</i> 1997 May 25:5-6 521-30
CD23	Shubinsky G, Schlesinger M, Polliack A, Rabinowitz R. Pathways controlling the expression of surface CD21 (CR2) and CD23 (Fc(epsilon)IIR) proteins in human malignant B cells. <i>Leuk Lymphoma</i> 1997 May 25: 5-6 521-30
CD22	French RR, Penney CA, Browning AC, Stirpe F, George AJ, Glennie MJ. Delivery of the ribosome-inactivating protein, gelonin, to lymphoma cells via CD22 and CD38 using bispecific antibodies. <i>Br J Cancer</i> 1995 May 71:5 986-94
CD33	Nakase K, Kita K, Shiku N, Tanaka I, Nasu K, Dohy N, Kyo T, Tsutani H, Kamada N. Myeloid antigen, CD13, CD19, and/or CD33 expression is restricted to certain lymphoid neoplasms. <i>Am J Clin Pathol</i> 1996 Jun 105:6 761-8
CD35	Yamakawa M, Yamada K, Tsuge T, Ohnishi H, Ogata T, Dobashi M, Imai Y. Protection of thyroid cancer cells by complement-regulatory factors. <i>Cancer</i> 1994 Jun 1 73:11 2808-17

Antigen	Literaturstelle
CD44	Naot D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. <i>Adv Cancer Res</i> 1997 71: 241-319
CD45	Buzzi M, Lu L, Lombardi AJ Jr, Posner MR, Brautigan DL, Fast LD, Frackelton AR Jr. Differentiation-induced changes in protein-tyrosine phosphatase activity and commensurate expression of CD45 in human leukemia cell lines. <i>Cancer Res</i> 1992 Jul 15 52:19 4027-35
CD46	Yamakawa M, Yamada K, Tsuge T, Ohnui H, Ogata T, Dobashi M, Imai Y. Protection of thyroid cancer cells by complement-regulatory factors. <i>Cancer</i> 1999 Jun 1 73:11 2808-17
CD5	Stein R, Witz IP, Ovadia J, Goldenberg DM, Yron I. CD5+ B cells and naturally occurring autoantibodies in cancer patients. <i>Clin Exp Immunol</i> 1991 Sep 85:3 418-23
CD52	Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJ, Catovsky D. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. <i>Leuk Res</i> 1998 Feb 22:2 185-91
CD55 (791Tgp72)	Spendlove, I, L. Li, J. Carmichael, & L. G. Durrant. Decay accelerating factor (CD55): A target for cancer vaccine? (1999) <i>Cancer Research</i> 59: 2282-2286.
CD59	Jarvis GA, Li J, Hakulinen J, Brady KA, Nordling S, Dahiya R, Meri S. Expression and function of the complement membrane attack complex inhibitor protectin (CD59) in human prostate cancer. <i>Int J Cancer</i> 1997 Jun 11 71: 6 1049-55
CDC27	Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. <i>Science</i> 1999 May 21 289: 5918 1351-9
CDK4	Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M, Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., de Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K, and Beach, D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. <i>Science</i> 1995 Sep 1 269: 5228 1281-9
CEA	Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. <i>Cancer Res</i> 1999 Feb 1 59: 3 676-83
c-myc	Watson PH, Pon RT, Shiu RP. Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. <i>Cancer Res</i> 1991 Aug 1 51: 15 3996-9000

Antigen	Literaturstelle
Cox-2	Tsujii M et al, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. <i>Cell</i> 1998; 93: 705-716
DCC	Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J, Walsh MD, Bates P, Simmons DL, Antalis TM. The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. <i>Oncogene</i> 1996 Aug 15 13: 9 787-95
DcR3	Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. Pitti R et al, <i>Nature</i> 396, 699-703. 1998.
E6/E7	Steller MA, Zou Z, Schiller JT, Baserga R. Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor. <i>Cancer Res</i> 1996 Nov 1 56: 21 5087-91
EGFR	Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG, Jakobovits A: Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. <i>Cancer Res</i> 1999, 59(6): 1236-43.
EMBP	Clinical study on estramustine binding protein (EMBP) in human prostate. Shiina H, Igawa M, Ishibe T. <i>Prostate</i> 1996 Sep 29: 3 169-76.
Ena78	D.A. Arenberg et. al., Epithelial-neutrophil activating peptide (FNA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. <i>J. Clin. Invest.</i> (1998) 102; 965-472.
farsyl transferase FGF8b and FGF8a	Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Bjartell A, Neal DE, Leung HY. FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. <i>Oncogene</i> 1999 Apr 29 18: 17 2755-61
FLK-1/KDR	T. Annie T. Fong et al, SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization and growth of multiple tumor type. <i>Cancer Res</i> , 59, 99-106, 1999
Folic Acid Receptor	Dixon KH, Mulligan T, Chung KN, Elwood PC, Cowan KH. Effects of folate receptor expression following stable transfection into wild type and methotrexate transportdeficient ZR-75-1 human breast cancer cells. <i>J Biol Chem</i> 1992 Nov 25 267:33 29140-7

Antigen G250	Literaturstelle Divgi CR, Bander NH, Scott AM, O'Donoghue JA, Sgouros G, Welt S, Finn RD, Morrissey F, Capitelli P, Williams JM, Deland D, Nakhre A, Oosterwijk E, Gulec S, Graham MC, Larson SM, Old LJ. Phase I/II radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled monoclonal antibody G250 in metastatic renal cell carcinoma. <i>Clin Cancer Res</i> 1998 Nov 4:11 2729-39
GAGE-Family	De Backer O, 10 others, Boon T, van der Huggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. <i>Cancer Res</i> 1999 Jul 1;59(13): 3157-3165.
gastrin 17	Watson SA, Michaeli D, Grimes S, Morris TM, Crosby D, Wilkinson M, Robinson G, Robertson JF, Steele RJ, Hardcastle JD. Anti-gastrin antibodies raised by gastrin immune inhibit growth of the human colorectal tumour AP5. <i>Int J Cancer</i> 1995 Apr 10 61:2 233-40
Gastrin-releasing hormone (Bombesin)	Wang QJ, Knezetic JA, Schally AV, Pour PM, Adrian TE. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. <i>Int J Cancer</i> 1996 Nov 15 68: 9 528-34
GD2/GD3/GM2	Wiesner DA, Sweeley CC. Circulating gangliosides of breast-cancer patients. <i>Int J Cancer</i> 1995 Jan 27 60:3 294-9
GnRH	Bahk JY, Hyun JS, Lee H, Kirn MO, Cho GJ, Lee BH, Choi WS. Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor mRNA in prostate cancer cells and effect of GnRH on the proliferation of prostate cancer cells. <i>Urol Res</i> 1998 26: 4 259-69
GnTV	Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. <i>Recent Results Cancer Res</i> 1998 154: 47-85
GP1 gp100/Pmel 17	Wagner SN, Wagner C, Schultewolter T, Goos M. Analysis of Pmel17/gp100 expression in primary human tissue specimens: implications for melanoma immuno- and gene therapy. <i>Cancer Immunol Immunother</i> 1997 Jun 44: 4 239-47
gp-100-in4	Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. <i>APMIS</i> 1998 Jul 106:7 665-79

Antigen gp15	Literaturstelle Maeurer MJ, et al. New treatment options for patients with melanoma: review of melanoma-derived T-cell epitope-based peptide vaccines. <i>Melanoma Res.</i> 1996 Feb; 6(1): 11-24.
gp75/TRP-1	Lewis JJ, Houghton AN. Definition of tumor antigens suitable for vaccine construction. <i>Semin Cancer Biol</i> 1995 Dec 6:6 321-7
hCG	Hoermann R, Gerbes AL, Spoettl G, Jüüngst D, Mann K. Immunoreactive human chorionic gonadotropin and its free beta subunit in serum and ascites of patients with malignant tumors. <i>Cancer Res</i> 1992 Mar 15 52:6 1520-4
Heparanase	Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis [see comments]. <i>Nat Med</i> 1999 Jul 5:7 793-802
Her2/neu	Lewis JJ, Houghton AN. Definition of tumor antigens suitable for vaccine construction. <i>Semin Cancer Biol</i> 1995 Dec 6:6 321-7
HMTV	Kahl LP, Carroll AR, Rhodes P, Wood J, Read NG. An evaluation of the putative human mammary tumour retrovirus associated with peripheral blood monocytes. <i>Br J Cancer</i> 1991 Apr 63: 4 534-40
Hsp70	Jaattela M, et al. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. <i>EMBO J.</i> 1998 Nov 2; 17(21): 6124-34.
hTERT (telomerase)	Vonderheide RH, Hahn W.C, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. <i>Immunity</i> June; 10: 673-679. 1999.
IGFR1	M.J. Ellis et. al., Insulin-like growth factors in human breast cancer. <i>Breast Cancer Res. Treat.</i> (1998) 52; 175-184.
IL-13R	Murata T, Obiri NI, Debinski W, Puri RK. Structure of IL-13 receptor: analysis of subunit composition in cancer and immune cells. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 1997 Sep 8 238:1 90-4
iNOS	Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. <i>Cancer</i> 1998 May 15 82: 10 1897-903
Ki 67	Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke, and H. Stein. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. <i>Int J Cancer</i> 31, 13-20, 1983

Antigen KIAA0205	Literaturstelle Gueguen M, Patard JJ, Gaugler B, Hrasseur F, Ren- auld JC, Van Cangh PJ, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigen recognized by autologous CTLs on a hu- man bladder carcinoma. J Immunol 1998 Jun 15 160:12 6188-94
K-ras, H-ras, N-ras	Abrams SI, Hand PH, Tsang KY, Schlom J. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. Semin Oncol 1996 Feb 23:1 118-34
KSA (C017-1A)	Zhang S, Zhang HS, Reuter VE, Slovin SF, Scher HI, Livingston PO. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prosta- te cancers. Clin Cancer Res 1998 Feb 4:2 295-302
LDLR-FUT	Caruso MG, Osella AR, Notarnicola M, Berloco P, Leo S, Bonfiglio C, Di Leo A. Prognostic value of low den- sity lipoprotein receptor expression in colorectal car- cinoma. Oncol Rep 1998 Jul-Aug 5:4 927-30
MAGE Family (MAGE1, MAGE3)	Marchand M, et al., Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and pre- sented by HLA-A1. Int J Cancer 1999 Jan 18;80(2): 219-30.
Mammaglobin	Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP, Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. Cancer Res 1999 Jul 1 59:13 3028-31.
MAP17	Kocher O, Cheresh P, Lee SW. Identification and par- tial characterization of a novel membrane-associated protein (MAP17) up-regulated in human carcinomas and modulating cell replication and tumor growth. Am J Pathol 1996 Aug 149:2 493-500
Melan-A/MART-1	Lewis JJ, Houghton AN. Definition of tumor antigens suitable for vaccine construction. Semin Cancer Biol 1995 Dec 6:6 321-7
mesothelin	Chang K, et al. Molecular cloning of mesothelin, a dif- ferentiation antigen present on mesothelium, meso- theliomas, and ovarian cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1): 136-40
MIC A/B	Groh V, Steinle A, Bauer S, and Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epi- thelial gamma delta T cells. Science 1998, 279: 1737-1740.
MT-MMP's, such as MMP2, MMP3, MMP7, and MMP9	Sato H and Seiki M., Membrane-type matrix metallo- proteinases (MT-MMPs) in tumormetastasis., J Bio- chem (Tokyo) 1996 Feb; 119(2): 209-15
Mox1	Candia AF, Hu J, Crosby J, Lalley PA, Noden D, Na- deau JH, Wright CV. Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially ex- pressed during early mesodermal patterning in mouse embryos. Development 1992 Dec 116:9 1123-36

Antigen	Literaturstelle
Mucin, such as MUC-1, MUC-2, MUC-3, and MUC-9	Lewis JJ, Houghton AN. Definition of tumor antigens suitable for vaccine construction. <i>Semin Cancer Biol</i> 1995 Dec 6:6 321-7
MUM-1	Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. <i>APMIS</i> 1998 Jul 106:7 665-79
NY-ESO-1	Jager, E. et. al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. <i>J. Exp. Med.</i> 1998, 187: 265-270.
Osteonectin	Graham JD, Balleine RL, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. Expression of osteonectin mRNA in human breast tumours is inversely correlated with oestrogen receptor content. <i>Eur J Cancer</i> 1997 Sep 33:10 1659-60
p15	Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, Hanai S, Suzuki H, Hori M, Fukao K, Miwa M, Uchida K. Mutations of p16Ink4/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers. <i>Cancer Res</i> 1995 Jul 1 55:13 2756-60
P170/MDR1	Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. <i>J Natl Cancer Inst</i> 1997 Jul 2 89:13 917-31
p53	Roth J, Dittmer D, Rea D, Tartaglia J, Paoletti E, Levine AJ. p53 as a target for cancer vaccines: recombinant canarypox virus vectors expressing p53 protect mice against lethal tumor cell challenge. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1996 May 19 93:10 4781-6.
p97/melanotrans-ferrin	Furukawa KS, Furukawa K, Real FX, Old LJ, Lloyd KO. A unique antigenic epitope of human melanoma is carried on the common melanoma glycoprotein gp95/p97. <i>J Exp Med</i> 1989 Feb 1 169:2 585-90
PAI-1	Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Br��nner N, Mouridsen HT, Dan�� K, Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. <i>Cancer Res</i> 1993 Jun 1 53:11 2513-21
PDGF	Vassbotn FS, Andersson M, Westermarck H, Heldin CH, Ostman A. Reversion of autocrine transformation by a dominant negative platelet-derived growth factor mutant. <i>Mol Cell Bio</i> 1993 Jul 13:7 9066-76

Antigen	Literaturstelle
Plasminogen (uPA)	Naitoh H, Eguchi Y, Ueyama H, Kodama M, Hattori T. Localization of urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, 2 and plasminogen in colon cancer. <i>Jpn J Cancer Res</i> 1995 Jan 86:1 98-56
PRAME	Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. <i>APMIS</i> 1998 Jul 106:7 665-79
Probasin	Matuo Y, Nishi N, Muguruma Y, Yoshitake Y, Kurata N, Wada F. Localization of prostatic basic protein ("probasin") in the rat prostates by use of monoclonal antibody. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 1985 Jul 16 130:1 293-300
Progenipoietin PSA	Sanda MG, Smith DC, Charles LG, Hwang C, Pienta KJ, Schlom J, Milenic D, Panicali D, Montie JE. Recombinant vaccinia-PSA (PROSTVAC) can induce a prostate-specific immune response in androgen-modulated human prostate cancer. <i>Urology</i> 1999 Feb 53:2 260-6.
PSM	Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. <i>Cancer Res</i> 1997 Jun 15 57:12 2321-4
RAGE-1	Gaugler B, 7 others, Van den Eynde BJ. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. <i>Immunogenetics</i> 1996; 99(5): 323-330.
Rb	Dosaka-Akita H, Hu SX, Fujino M, Harada M, Kinoshita I, Xu HJ, Kuzumaki N, Kawakami Y, Benedict WF. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. <i>Cancer</i> 1997 Apr 1 79:7 1329-37
RCAS1	Sonoda K, Nakashima M, Kaku T, Kamura T, Nakano N, Watanabe T. A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. <i>Cancer</i> 1996 Apr 15; 77(8): 1501-1509.
SART-1	Kikuchi M, Nakao M, Inoue Y, Matsunaga K, Shichijo S, Yamana H, Itoh K. Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. <i>Int J Cancer</i> 1999 May 5 81:3 459-66
SSX gene family	Gure AO, Tüüreci O, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jäger E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT. SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. <i>Int J Cancer</i> 1997 Sep 17 72:6 965-71

Antigen	Literaturstelle
STAT3	Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. <i>Cell</i> 1999 Aug 6;98(3): 295-303
STn (mucin assoc.)	Sandmaier BM, Oparin DV, Holmberg LA, Reddish MA, MacLean GD, Longenecker BM. Evidence of a cellular immune response against sialyl-Tn in breast and ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy, stem cell rescue, and immunization with Theratope STn-KLH cancer vaccine. <i>J Immunother</i> 1999 Jan 22;1 59-66
TAG-72	Kuroki M, Fernsten PD, Wunderlich D, Colcher D, Simpson JF, Poole DJ, Schlom J. Serological mapping of the TAG-72 tumor-associated antigen using 19 distinct monoclonal antibodies. <i>Cancer Res</i> 1990 Aug 15 50:16 9872-9
TGF- α	Imanishi K, Yamaguchi K, Suzuki M, Honda S, Yanai-hara N, Abe K. Production of transforming growth factor-alpha in human tumour cell lines. <i>Br J Cancer</i> 1989 May 59:5 761-5
TGF- β	Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman F. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor betal. <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev</i> 1998 Jun 7:6 997-504
Thymosin β 15	Bao, L., Loda, M., Janmey, P. A., Stewart, R., Anand-Apte, B., and Zetter, B. R. Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. <i>Nature Medicine</i> . 2 (12), 1322-1328. 1996
TNF- α	Moradi MM, Carson LF, Weinberg B, Haney AF, Twiggs LB, Ramakrishnan S. Serum and ascitic fluid levels of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in patients with ovarian epithelial cancer. <i>Cancer</i> 1993 Oct 15 72:8 2933-40
TPA	Maulard C, Toubert ME, Chretien Y, Delanian S, Dufour B, Housset M. Serum tissue polypeptide antigen (S-TPA) in bladder cancer as a tumor marker. A prospective study. <i>Cancer</i> 1994 Jan 15 73:2 394-8
TPI	Nishida Y, Sumi H, Mihara H. A thiol protease inhibitor released from cultured human malignant melanoma cells. <i>Cancer Res</i> 1989 Aug 44:8 3329-9
TRP-2	Parkhurst MR, Fitzgerald EB, Southwood S, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y. Identification of a shared HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). <i>Cancer Res</i> 1998 Nov 1 58:21 4895-901

Antigen	Literaturstelle
Tyrosinase	Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. <i>APMIS</i> 1998 Jul 106:7 665-79
VEGF	Hyodo I, Doi T, Endo H, Hosokawa Y, Nishikawa Y, Tanimizu M, Jinno K, Kotani Y. Clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor in gastrointestinal cancer. <i>Eur J Cancer</i> 1998 Dec 39:13 2041-5
ZAG	Sanchez LM, Chirino AJ, Bjorkman PJ. 1999, Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules. <i>Science</i> 19;283(5409): 1914-9
p16INK4	Quelle DE, Ashmun RA, Hannon GJ, Rehberger PA, Trono D, Richter KH, Walker C, Beach D, Sherr CJ, Serrano M. Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. <i>Oncogene</i> 1995 Aug 17;11(4): 635-95
Glutathione S-transferase	Hengstler JG, Arand M, Herrero ME, Oesch F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. <i>Recent Results Cancer Res</i> 1998 154: 47-85

[0157] Im Folgenden wird eine Reihe von spezifischen Tumor-assoziierten Antigenen im Detail diskutiert.

Prostata-spezifisches Membran Antigen (PSM)

[0158] In den USA ist Prostata-Krebs die zweithäufigste Ursache für Krebstod (ungefähr 40.000 pro Jahr), und 200.000 Patienten pro Jahr werden untersucht (Boring 1993). Ungefähr 1 von 11 Männern wird eventuell einen Prostata-Krebs entwickeln. Außerdem entwickeln ungefähr 40-60% der Prostata-Krebs-Patienten Ausweitungen von dieser Erkrankung außerhalb der Prostata (Babaian 1994). Die Hauptstrategie der vorliegenden Erfindung ist es, ein therapeutisches Vakzin als zusätzliche Therapie zur Prostatektomie zu verwenden um restliches Tumorgewebe und Metastasen auszumerzen.

[0159] Mehrere pathologische Zustände werden der Prostata-drüse zugeordnet, einschließlich des gutartigen Wachstums (BPH), der Infektion (Prostatitis) und der Neoplasie (Prostata-Krebs).

[0160] Die biologische Aggressivität von Prostata-Krebs ist unterschiedlich. In einigen Patienten bleibt der aufgespürte Tumor ein latenter histologischer Tumor und wird niemals klinisch signifikant. In anderen Patienten schreitet das Tumorstadium schnell vorwärts, der Tumor metastasiert und tötet den Patienten in einer relativ kurzen Zeitspanne (2-5 Jahren).

[0161] Die gängige primäre Behandlung von Prostata-Krebs ist die Prostatektomie. Aufgrund der starken Ausbreitung von Prostata-Krebszellen werden die meisten Patienten durch lokale chirurgische Behandlung jedoch nicht geheilt. Patienten mit nicht beendeter Erkrankung erhalten gegebenenfalls eine systemische Androgen-Herabsetzungstherapie, aber die jährliche Todesrate von Prostata-Krebs wurde über die letzten 50 Jahre, seit Androgen-Herabsetzungstherapie eine Standardtherapie für metastasierende Erkrankungen wurde, überhaupt nicht herabgesetzt.

[0162] PSM ist ein Membranprotein, welches für Prostata-gewebe hochspezifisch ist, sowohl für gutartige als auch bösartige, obwohl auch die Expression von PSM in anderen Geweben, wie Nierengewebe und Nierentumor, Dünndarm, Gehirn und Tumor-Gefäßneuwachstum, beobachtet wurde. Wenn eine Operation erfolgreich war, sollten daher Krebs-Patienten, die eine Prostatektomie durchgemacht haben, theoretisch PSM auf zurückbleibenden bösartigen Prostata-tumorgeweben oder Metastasen, die von dem Tumor herrühren, exprimieren. Indem eine starke CTL-Reaktion und/oder eine starke polyklonale Antikörperantwort gegen PSM induziert wird, wird erwartet, dass das restliche Tumorgewebe entfernt werden kann.

[0163] Interessanterweise wird eine Hochregulierung der PSM-Expression infolge der Androgen-Mangel-Therapie von Prostata-Krebs-Patienten beobachtet (Wright 1996). Dieses würde eine PSM-gerichtete Behandlung als Folgebehandlung für die traditionelle Androgen-Mangel-Therapie äußerst geeignet machen.

[0164] PSM wurde zuerst 1987 identifiziert, und zwar als Ergebnis der Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers, 7E11-C5.3, der gegen eine isolierte humane Prostata-Krebszelle, LNCaP (Horoszewicz 1987) gezo-gen wurde. Der Antikörper erkennt sowohl normales als auch bösartiges Prostataepithel, und er wurde 1993 verwendet um das PSM-Protein zu reinigen und dessen Aminosäuresequenz zu bestimmen und schließlich das Gen zu klonen (Israeli 1993).

[0165] PSM ist ein Typ II-Transmembran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 84 kD, vorhergesagt aus der Nukleinsäuresequenz, wobei die glykosylierte Version ein beobachtetes Molekulargewicht von 100-120 kD aufweist. Die Sequenzierung des Gens, das für PSM codiert, deckte eine mutmaßliche Membran-überspannende Region in Verbindung mit drei cytosolischen Arginin-Ankerresten auf. Der extrazelluläre Teil von PSM macht 707 der insgesamt 750 Aminosäuren des Proteins aus, während für die cytoplasmatische Domäne vorhergesagt wird, dass sie 19 Aminosäuren lang ist (Israeli 1993). PSM-spezifische mRNA wurde in Prostata-Tumorgewebe detektiert (Israeli 1994), was anzeigt, dass das Tumorantigen kein falsch glykosyliertes Protein ist, was z.B. bei den Tn- oder sTn-Tumor-Antigenen der Fall ist.

[0166] Die Vollängen-PSM-cDNA wurde in eine PSM-negative humane Prostata-Krebs-Zelllinie transfiziert und darin exprimiert, und zwar in PC-3 (Kahn 1994). Außerdem wurde die Vollängen-cDNA (2,65 Kilobasen) in vitro transkribiert und translatiert (Kahn 1994).

[0167] Es wurde kürzlich gezeigt, dass PSM hydrolytische Aktivität besitzt, die der N-acetylierten α -gebundenen sauren Dipeptidase (NAALADase) ähnelt – tatsächlich wurde gezeigt, dass die zwei Proteine identisch sind. NAALADase ist eine Membran-gebundene Hydrolase des Nervensystems, welche das Neuropeptid N-Acetylaspartylglutamat (NAAG) verstoffwechselt um glutamatergische Signalprozesse zu beeinflussen. Es ist noch immer nicht bekannt, ob diese Aktivität von PSM irgendeine relevante biologische Funktion hat.

[0168] Es ist von gewisser Wichtigkeit, vorherzusagen, ob ungewünschte Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen, die für CTLs oder Antikörper zugänglich sind, infolge der Behandlung mit einem Autovakzin, das eine PSM-spezifische Immunantwort hervorruft, zu erwarten wäre. Es wurde gezeigt, dass ein Teil der codierenden Region des PSM-Gens (Aminosäure-Positionen 418–567) 54% Homologie zum humanen Transferinrezeptor aufweist (Israeli 1993). Ebenso wurde die vollständige Sequenzidentität mit dem NAALADase-Enzym aufgefunden, vgl. oben. Keine Identifizierung von funktionell relevanten Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Peptidasen konnte erfolgen.

[0169] Die Homologie mit dem Transferinrezeptor ist sehr niedrig und wird bevorzugt in einigen der erfindungsgemäßen Konstrukte zerstört. Von der beobachteten Sequenzidentität mit der humanen NAALADase wird nicht erwartet, dass sie ein Hindernis für ein PSM-Vakzin ist, teilweise aufgrund der geringen Eignung von Antikörpern und CTLs zum Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke.

[0170] Insgesamt wird auch mit dem PSM-ähnlichen Konstrukt nicht erwartet, dass hinderliche Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen in den Patienten auftritt.

[0171] Aus früheren Studien ist klar, dass PSM in den meisten Prostatakrebs-Zellen und aus der Prostata herrührenden Metastasen, die getestet wurden, exprimiert wird. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die meisten anderen Krebsarten, wie Karzinome, Sarkome und Melanome unterschiedlicher Gewebe, sowie eine ganze Reihe von humanen Nicht-Prostatakrebszelllinien PSM-negativ sind.

[0172] Zusätzlich dazu hat man herausgefunden, dass eine große Anzahl anderer Gewebe PSM-negativ ist. Diese umfassen den Darm, die Brust, die Lunge, die Eierstöcke, die Leber, die Blase, den Uterus, die Bronchien, die Milz, den Pankreas, die Zunge, die Speiseröhre, den Magen, den Thymus, den Parathymus, Nieren, Lymphknoten, die Aorta, die Vena cava, die Haut, Milchdrüsen und die Placenta. RT-PCR hat jedoch die Existenz von PSM-mRNA in einigen dieser Gewebe aufgedeckt.

[0173] Obwohl PSM vornehmlich als Membran-gebundenes Molekül auf Prostatagewebe gefunden wird, können geringe Mengen PSM auch im Serum von normalen Individuen und mit erhöhten Spiegeln bei Prostatakrebs-Patienten aufgefunden werden (Rochon 1994, Murphy 1995). Der Spiegel an zirkulierendem PSM in diesen Patienten erlaubt daher eine serologische Beobachtung der Wirksamkeit eines PSM-Vakzins.

[0174] Im Ergebnis, basierend auf dem vollständigen Umfang der zur Zeit verfügbaren Daten, ist PSM ein Antigen mit einer hohen Spezifität für humane Prostatagewebe und Tumore, die aus diesen herrühren. Dies deutet, dass bei Patienten, die eine Prostatektomie durchgemacht haben, PSM ein für den Tumor quasi-spe-

zifisches Selbst-Antigen ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass ein effektives PSM-Vakzin hauptsächlich auf Prostatagewebe oder von der Prostata herrührendes Metastasengewebe abzielen wird.

[0175] Wie aus Beispiel 1 deutlich werden wird, umfasst die Erfindung bevorzugt, dass ein fremdes T_H-Zell-Epitop in einen Teil der PSM-Aminosäuresequenz eingefügt wird, der in der SEQ ID NO:2 durch Positionen 16-52 und/oder 87-108 und/oder 210-230 und/oder 269-289 und/oder 298-324 und/oder 442-465 und/oder 488-514 und/oder 598-630 und/oder 643-662 und/oder 672-699 definiert ist. Außerdem ist ein modifiziertes PSM-Molekül, in das an diesen Positionen ein fremdes T_H-Epitop eingefügt wurde, ebenso ein Teil der Erfindung.

[0176] Dementsprechend betrifft die Erfindung auch ein Analogon von humanem PSM, welches in Menschen immunogen ist, wobei das Analogon einen wesentlichen Teil aller bekannten und vorhergesagten CTL- und B-Zell-Epitope von PSM umfasst, und mindestens ein fremdes T_H-Epitop umfasst, wie hierin diskutiert. Bevorzugte PSM-Analoga sind jene, bei denen das mindestens eine fremde T_H-Epitop als Insertion in die PSM-Aminosäuresequenz oder als Substitution eines Teils der PSM-Aminosäuresequenz oder als Ergebnis der Deletion eines Teils der PSM-Aminosäuresequenz vorliegt, und die am meisten bevorzugten Analoga sind jene, in denen ein fremdes T_H-Zell-Epitop in einen Teil der PSM-Aminosäuresequenz eingefügt ist, der durch SEQ ID NO:2 an den Positionen 16-52 und/oder 87-108 und/oder 210-230 und/oder 269-289 und/oder 298-324 und/oder 442-465 und/oder 488-514 und/oder 598-630 und/oder 643-662 und/oder 672-699 definiert wird.

Humanes Chorion-Gonadotropin (HCG)

[0177] Der Zusammenhang zwischen embryonalen Markern und bösartigen Phänotypen wird schon über viele Jahrzehnte diskutiert. Eine wachsende Menge an Daten legt nahe, dass mindestens ein solcher Marker, humanes Chorion-Gonadotropin Beta (HCG β) regelmäßig auf Krebszellen vieler unterschiedlicher histologischer Herkunft detektiert wird, und dass die Expression dieses Proteins oft mit erhöhten metastasierenden Eigenschaften korreliert. Eine humorale Immunantwort, die gegen dieses lösliche Protein gerichtet ist, könnte die Chancen eines Tumors, sich auszubreiten, reduzieren und/oder das Wiederauftreten von neuen primären Wachstumsschüben nach der chirurgischen Behandlung hemmen.

[0178] Humanes Chorion-Gonadotropin gehört zu einer Familie von Glykoproteinhormonen, die das Follikel-stimulierende Hormon (FSH), Thymus-stimulierende Hormon (TSH) und luteinisierendes Hormon (LH) umfasst, wobei alle diese wichtige Regulatoren der reproduktiven Expression und des fötalen Überlebens sind. Die Mitglieder dieser Familie von Hormonen sind Heterodimere, welche eine gemeinsame α -Kette gemein haben. Die β -Kette ist für jedes Hormon einzigartig und stellt die Spezifität zur Verfügung, wobei die β -Kette von LH die stärkste Sequenzhomologie mit hCG β aufweist (ungefähr 80%). Das apparente Molekulargewicht von hCG-Holo ist 37 kD, zu dem ein Drittel durch Kohlenhydrate beigetragen wird. Die posttranslationalen Zuckermodifikationen umfassen sowohl N-gebundene als auch O-gebundene Kohlenhydrate. Sialylsäurereste sind zahlreich vorhanden und verleihen dem Protein eine große negative Ladung. Die Kristallstruktur von hCG-Holo wurde aufgelöst (Lapthorn et al., 1994).

[0179] Ausgehend von der Kristallstruktur hat man herausgefunden, dass hCG eine Homologie mit einer Familie von Wachstumsfaktoren aufweist, einschließlich PDGF und TGF β (Lapthorn et al., 1994). Dies legt nahe, dass hCG-Expression bei der Regulation des Krebszellwachstums helfen könnte.

[0180] Humanes Chorion-Gonadotropin ist ein Glykoproteinhormon, welches von den placentalen Syncytiotrophoblasten kurz nach der Empfängnis hergestellt wird, und es ist für die erfolgreiche Schwangerschaft der schwangeren Frau essentiell.

[0181] Die pathophysiologische Rolle von embryonalen Markern für die Entwicklung oder die Aufrechterhaltung einer Krebsmasse ist nicht bekannt. Es ist jedoch von Interesse; zu bemerken, dass Trophoblasten (in denen diese Proteine normalerweise hergestellt werden) sowohl angiogenische als auch invasive Eigenschaften aufweisen, welche beide ebenso notwendige Eigenschaften einer Krebszelle sind. Außerdem wurde vorgeschlagen, dass hCG (oder seine Untereinheiten) die maternale zelluläre Immunantwort gegen das fötale Gewebe inhibieren. Studien haben z.B. gezeigt, dass hCG direkt T-Zell-Antworten supprimiert (Jacoby et al., 1984), und es wurde vorgeschlagen, dass eine geeignetere Umgebung zum Etablieren von metastasierenden Tumoren resultieren könnte, weil die Lymphknoten, die (in diesem Fall) einen primären Melanomtumor herausfiltern (sollten), immunsupprimiert sind. Im Ergebnis kann die Expression von hCG β Krebszellen helfen, sich in die sekundären Lymphorgane auszubreiten. Schließlich wurde, wie oben erwähnt, eine Strukturhomologie zwischen hCG und einer Reihe von Wachstumsfaktoren gezeigt. Eine andere Möglichkeit ist es daher, dass

das Sezernieren von hCG durch Krebszellen dem Tumor einen Wachstumsvorteil geben könnte.

[0182] Die Expression von hCG β wurde in vielen unterschiedlichen Arten von Krebs gezeigt, beispielsweise: a) Prostata-Adenokarzinom: ein positiver Nachweis für hCG β in Gewebesektionen wurde bei Patienten mit schwacher Prognose beobachtet, unabhängig von dem histologischen Grad des Tumors (Sheaff et al., 1996), b) unterschiedliche Arten von Lungen-Karzinomen; Plattenepithel (SQCC), Adenokarzinom (AC) und großzelliges Karzinom (LCC) zeigten alle einen hohen Prozentsatz an Reaktivität für hCG β an (Boucher et al., 1995), c) Pankreas-Adenokarzinom (Syrigos et al., 1998), d) Neuroblastome, Hirnkrebsarten und Retinoblastome (Acevedo et al., 1997), e) malignes Melanom (Doi et al., 1996), f) Blasen-Karzinome (Lazar et al., 1995). Eine neuere Veröffentlichung beschreibt einen DNA-Ansatz, bei dem Mäuse mit einem hCG β -Expressionskonstrukt immunisiert wurden (Geissler et al., 1997). Bei diesem in vivo-Modell stand die Inhibierung des Tumorstwachstums in starker Beziehung zu der CTL-Aktivität, es wurden jedoch auch höhere Titer von Antikörpern (welche die biologische Wirkung von intaktem hCG auf seinem zellulären Rezeptor neutralisieren) detektiert.

[0183] Die Verwendung von hCG als Immunogen wurde in mehreren Veröffentlichungen beschrieben, welche sich auf ihre Verwendung als Empfängnis-verhütendes Vakzin konzentrieren (Talwar et al., 1976, und Talwar et al., 1994). Ein hoher Grad der Wirksamkeit und Sicherheit wurde beobachtet bei einer klinischen Studie zur Antifertilität, die ein Vakzin gegen hCG-Holo verwendete (Talwar et al., 1994). Klinische Studien der Phase I bei Krebs-Patienten mit einem Vakzin gegen ein synthetisches C-terminales Peptid von hCG β , das mit Diphtherietoxoid konjugiert war, wurden ebenfalls durchgeführt (Triozi et al., 1994), und klinische Studien der Phase II dauern noch an. Ungeachtet der Tatsache, dass die Idee, hCG β als Krebs-Vakzin-Zielobjekt zu verwenden, für einige Zeit die Runde macht, wurde es nicht in Verbindung mit der AutoVac-Technologie untersucht.

[0184] Es ist bekannt, dass Zellen nicht-embryonischer Gewebe oder gutartige Neoplasmen kein hCG β exprimieren. Daher sollten keine möglichen Nebenwirkungen aus der Vakzinierung gegen dieses Molekül (neben der Wirkung auf die Schwangerschaft) entstehen. Da es auf so vielen unterschiedlichen Arten von Krebs exprimiert wird, wurde dieses Molekül als "definitiver Krebs-Biomarker" vorgeschlagen (Acevedo et al., 1995, und Regelson W., 1995) und wäre als solches ein attraktives Zielobjekt, dem man nachgehen sollte.

[0185] Geeignete Tiermodelle für weitere Studien der Wirksamkeit eines hCG-basierten Vakzins findet man bei Acevedo et al., Cancer Det. and Prev. Suppl. (1987) 1: 477-486, und in Kellen et al., Cancer Immunol. Immun. Ther. (1982) 13: 2-4.

Her2

[0186] Man glaubt, dass die Tyrosinkinase-Rezeptoren Her2 und EGFr eine wesentliche Rolle bei der malignen Transformation von normalen Zellen und bei dem andauernden Wachstum von Krebszellen spielen. Eine Überexpression ist für gewöhnlich mit einer sehr schwachen Prognose verknüpft. Während der letzten Jahre gab es viele Berichte, die die Verwendung von Antikörpern gegen diese Rezeptoren als Therapie gegen Krebsarten, die entweder einen oder beide Rezeptoren überexprimieren, betrafen. Genentech Inc. hat mehrere erfolgreiche klinische Studien bei Brustkrebs-Patientinnen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Her2 beendet und hat vor kurzem eine FDA-Zulassung für die Vermarktung der Präparation des monoklonalen Antikörpers anti-Her2, Herceptin®, erhalten.

[0187] Die Autovakzinierungs-Technologie, die hierin offenbart wird, würde angewandt auf das Her2-Molekül polyklonale Antikörper bewirken, die vornehmlich mit Her2 reagieren würden. Man erwartet, dass solche Antikörper Tumorzellen angreifen und eliminieren, sowie dass sie Metastasenzellen daran hindern, sich zu Metastasen zu entwickeln. Der Wirkmechanismus dieser Anti-Tumor-Wirkung würde über Komplement und Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität vermittelt.

[0188] Abhängig von der Auswahl der Konstrukte könnten die induzierten Autoantikörper auch Krebszellwachstum inhibieren, und zwar über die Inhibierung der Wachstumsfaktor-abhängigen Oligo-Dimerisierung und Internalisierung der Rezeptoren. Und, was am wichtigsten ist, man erwartet, dass die Her2-Analoga in der Lage sind, CTL-Antworten direkt gegen bekannte und/oder vorhergesagte Her2-Epitope, die von den Tumorzellen angezeigt werden, zu induzieren.

[0189] Her2 ist ein Mitglied der Familie der Epidermis-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (c-erbB), welche derzeit aus vier unterschiedlichen Rezeptoren besteht: c-erbB-1 (EGFr), c-erbB-2 (Her2, c-Neu), c-erbB-3 und c-erbB-4 (Salomon et al., 1995). C-erbB-3 und c-erbB-4 sind weniger gut charakterisiert als EGFr und Her2. Her2 ist ein integrales Glykoprotein. Das reife Protein besitzt ein Molekulargewicht von 185 kD mit strukturellen

Eigenschaften, die sehr stark dem EGFr-Rezeptor ähneln (Prigent et al., 1992). EGFr ist auch ein integraler Membranrezeptor, der aus einer Untereinheit besteht. Er besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 170 kD, und er besteht aus einer Liganden-bindenden Oberflächendomäne von 621 Aminosäuren, einer einzelnen hydrophoben Transmembrandomäne aus 23 Aminosäuren und einer hoch-konservierten cytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne aus 542 Aminosäuren. Das Protein ist N-glykosyliert (Prigent et al., 1994).

[0190] Alle Proteine in dieser Familie sind Tyrosinkinasen. Die Interaktion mit dem Liganden führt zur Rezeptordimerisierung, welche die katalytische Wirkung der Tyrosinkinase erhöht (Bernard 1995, Chantray 1995). Die Proteine innerhalb der Familie sind in der Lage, zu homo- und zu heterodimerisieren, was für ihre Aktivität wichtig ist. Der EGFr vermittelt Wachstumsverstärkende Wirkungen und stimuliert die Aufnahme von Glucose und Aminosäuren durch Zellen (Prigent et al., 1992). Her2 vermittelt ebenso Wachstums-verstärkende Signale. Nur EGFr bindet EGF und TGF- α . Diese Liganden binden nicht an die anderen Rezeptoren in der Familie (Prigent et al., 1992). Die Liganden für Her2 sind nicht vollständig bestimmt. Es wurde jedoch gezeigt, dass Heregulin die Phosphorylierung durch Aktivierung von Her2 induziert. Dies scheint nicht in einer direkten Bindung an den Rezeptor begründet zu sein, aber man glaubt, dass Heregulin ein Ligand für erbB-3 und erbB-4 ist, welches dann Her2 durch Oligo-Dimerisierung aktiviert (Solomon et al., 1995).

[0191] Die Homologie zwischen den Proteinen der EGF-Rezeptor-Familie ist in der Tyrosinkinase-Domäne am cytoplasmatischen Teil des Moleküls am deutlichsten (82% zwischen EGFr und Her2). Die Homologie ist im extrazellulären Teil geringer – von 41% bis 46% in unterschiedlichen Domänen (Prigent et al., 1992).

[0192] Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor wird auf normalen Geweben in geringen Mengen exprimiert, aber er ist in vielen Krebsarten überexprimiert. EGFr ist in Brustkrebs-Arten überexprimiert (Earp et al., 1993, Eppenberger 1994), in Glioma (Schlegel et al., 1994), in Magen-Krebs (Tkunaga et al., 1995), in Plattenepithel-Karzinom (Fujii 1995), in Eierstock-Krebs (van Dam et al., 1994), und anderen. Her2 ist ebenfalls auf wenigen normalen humanen Geweben in geringen Mengen exprimiert, am charakteristischsten auf sekretorischen Epithelien. Die Überexpression von Her2 tritt bei ungefähr 30% der Brustkrebs-, Magenkrebs-, Pankreaskrebs-, Blasenkrebs- und Eierstockkrebs-Arten auf.

[0193] Die Expression dieser Rezeptoren variiert in Abhängigkeit von dem Grad der Differenzierung des Tumors und des Krebstyps, z.B. bei Brustkrebs überexprimieren primäre Tumoren beide Rezeptoren, während bei Magenkrebs die Überexpression zu einem späteren Stadium in metastasierenden Tumoren auftritt (Solomon et al., 1995). Die Anzahl an überexprimierten Rezeptoren auf Karzinomzellen ist größer als 10^6 /Zelle bei verschiedenen Kopf- und Nacken-Krebsarten, bei Vulva-, Brust- und Eierstock-Krebslinien, die von Patientinnen isoliert wurden (Dean et al., 1994).

[0194] Es gibt mehrere Gründe, warum die EGFr-Familie von Rezeptoren geeignete Zielobjekte für die Tumor-Immuntherapie darstellt. Zuerst sind sie in vielen Arten von Krebs überexprimiert, was die Immunantwort auf den Tumor ausrichten sollte: Zweitens exprimieren oder überexprimieren die Tumoren häufig die Liganden für diese Familie von Rezeptoren, und einige sind hypersensitiv gegenüber der proliferativen Wirkung, die von den Liganden vermittelt wird, drittens haben Patienten mit Tumoren, die Wachstumsfaktor-Rezeptoren überexprimieren, oft schlechte Aussichten. Die Überexpression wurde insbesondere bei Brustkrebs, Lungenkrebs und Blasenkrebs (2) stark mit der schlechten Prognose in Verbindung gebracht und geht anscheinend mit invasiven/metastasierenden Phenotypen einher, welche gegenüber konventionellen Therapien recht unsensitiv sind (Eccles et al., 1994).

[0195] Die Überexpression von Her2 ist in einigen Fällen ein Ergebnis der Amplifikation des Gens, und in anderen Fällen ein Ergebnis erhöhter Transkription und Translation. Die Überexpression von Her2 geht mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebs, Eierstockkrebs, Magenkrebs, Blasenkrebs und möglicherweise Lungenkrebs-Arten mit nicht-kleinen Zellen einher (Solomon et al., 1995).

[0196] Klinische Phase I-Studien wurden mit einem bispezifischen Antikörper bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Brust- und Eierstockkrebs durchgeführt. Der Antikörper war bispezifisch für Her2 und Fc γ RI (Weiner et al., 1995). Eine effiziente Lysis von Her2-überexprimierenden Tumorzellen wurde bei einem bispezifischen Antikörper gegen Her2 und CD3 beobachtet (Zhu et al., 1995).

[0197] Die Behandlung von SCID-Mäusen, auf die ein humaner Magenkrebs durch Xenotransplantation übertragen wurde mit einem monoklonalen anti-Her2-Antikörper, verlängerte die Überlebensrate der Mäuse (Ohniski et al., 1995). Die Anti-Tumor-Aktivitäten von monoklonalen Antikörpern gegen Her2, in vitro und in vivo, beruhen nicht auf einem identischen Mechanismus; diese können als unvollständige Liganden-Agonisten wir-

ken, Her2-Rezeptor-Umsetzung und deren Phosphorylierung verändern oder die Dimerisierung beeinflussen (Lupu et al., 1995).

[0198] Ganz ähnlich wurde gezeigt, dass Antikörper gegen EGFr auch Wachstumsfaktor-Wechselwirkungen stören können (Baselga et al., 1994, Modjahedi et al., 1993a, Wu et al., 1995, Modjahedi et al., 1993b, Tosi et al., 1995, Dean et al., 1994, Bier et al., 1995, Modjahedi et al., 1996, Valone 1995).

[0199] Daher ist eine wichtige Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren eine solche, bei der das fremde T-Zell-Epitop in einen Teil der Her2-Aminosäuresequenz eingefügt wird, der durch die Aminosäure-Nummerierung in SEQ ID NO:3 durch die Positionen 5-25 und/oder 59-73 und/oder 103-117 und/oder 149-163 und/oder 210-224 und/oder 250-264 und/oder 325-339 und/oder 369-383 und/oder 465-479 und/oder 579-593 und/oder 632-652 und/oder 653-667 und/oder 661-675 und/oder 695-709 und/oder 710-730 definiert wird, vgl. die Beispiele.

[0200] Dementsprechend bezieht sich die Erfindung auch auf ein Analogon von humanem Her2, welches in Menschen immunogen ist, wobei das Analogon einen wesentlichen Teil aller bekannten und vorhergesagten CTL- und B-Zell-Epitope von Her2 umfasst, und mindestens ein fremdes T_H-Epitop umfasst, wie hierin diskutiert ist. Es ist bevorzugt, dass das mindestens eine fremde T_H-Epitop als Insertion in der Her2-Aminosäuresequenz oder als Substitution eines Teils der Her2-Aminosäuresequenz oder als Ergebnis einer Deletion eines Teils der Her2-Aminosäuresequenz vorliegt. Insbesondere bevorzugte Analoga sind jene oben definierten, d.h. jene, in denen das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der Her2-Aminosäuresequenz eingefügt ist, der durch die Positionen in SEQ ID NO:3 5-25 und/oder 59-73 und/oder 103-117 und/oder 149-163 und/oder 210-224 und/oder 250-264 und/oder 325-339 und/oder 369-383 und/oder 465-479 und/oder 579-593 und/oder 632-652 und/oder 653-667 und/oder 661-675 und/oder 695-709 und/oder 710-730 definiert wird.

FGF8b

[0201] Es wurde von mehreren Forschern gezeigt, dass FGF8b die Proliferation, Transformation, Differenzierung von Säugerzellen und -geweben induziert, und in einigen Fällen die Tumorigenizität derselben stark erhöht (Tanaka 1992, Kouhara 1994, Lorenzi 1995, MacArthur 1995a, Crossley 1996a, 1996b, Ghosh 1996, Ohuchi 1997a, Rudra-Ganguly 1998). Diese Wirkungen werden vornehmlich durch die Bindung von FGF8b an Mitglieder der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren FGFR2, FGFR3 und FGFR4 vermittelt (MacArthur 1995b, Blunt 1997, Tanaka 1998). Daher wurde gezeigt, dass Zellen, die einen dieser Rezeptoren und FGF8(b) exprimieren, eine autokrine Wachstums-Signalkaskade bereitstellen, die zur Proliferation führt.

[0202] Die biologische Wirkung von FGF8b wird höchstwahrscheinlich zum Teil über den JAK/STAT3-Weg vermittelt, da wir und andere beobachtet haben, dass die Zugabe von FGF8b zum Wachstumsmedium bestimmter Zellen die Phosphorylierung von STAT3 fördert, ein Merkmal, von dem man vermutet, dass es Zellen resistent gegenüber der Apoptose macht (Catlett-Falcone 1999).

[0203] Zusätzlich zu den Beobachtungen in vitro, die oben erwähnt sind, wurde kürzlich gezeigt, dass die Expression von FGF8(b) in sowohl Prostata- als auch Brustkrebs-Arten hochreguliert ist (Marsh 1999, Dorkin 1999). Wir glauben daher, dass ein Autovakzin gegen FGF8(b) eine sehr effiziente Methode der Behandlung einer Reihe von FGF8-exprimierenden Tumoren ist, oder vielleicht deren Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Mitteln erhöht.

Prostatakrebs

[0204] Die biologische Aggressivität von Prostatakrebs variiert. In einigen Patienten bleibt der Tumor ein latenter histologischer Tumor und wird klinisch niemals signifikant. In anderen Patienten schreitet das Tumorstadium schnell fort, der Tumor metastasiert und tötet den Patienten in einer relativ kurzen Zeit (2-5 Jahre).

[0205] Zum Zwecke der Diagnose und um die Reaktion auf eine Prostatakrebs-Therapie zu verfolgen, wurde vornehmlich die Bestimmung des Spiegels im Blutkreislauf von zwei Proteinen verwendet: PAP ("prostatic acid phosphatase") und PSA ("prostate specific antigen") (Nguyen, 1990, Henttu 1989). Aufgrund der Zerstörung der normalen Architektur der Prostata Drüse in Reaktion auf die Krebsentwicklung werden diese Proteine in den Blutkreislauf freigesetzt, wo sie als Marker, z.B. für metastatische Ausbreitung, detektiert werden können.

[0206] Die derzeitige primäre Behandlung von Prostatakrebs ist die Prostatektomie. Aufgrund der starken Ausbreitung von Prostatakrebszellen wird die Mehrheit der Prostatakrebs-Patienten durch die lokale chirurgi-

sche Behandlung nicht geheilt. Patienten mit einer nicht-beendeten Erkrankung erhalten eine systemische Androgen-Herabsetzungstherapie, aber die jährliche Todesrate von Prostatakrebs hat sich über die 50 Jahre, seit die Androgen-Herabsetzung die Standardtherapie für metastatische Erkrankungen wurde, überhaupt nicht verringert.

[0207] RT-PCR-Analyse hat gezeigt, dass FGF8-mRNA von den humanen Prostataepithel-Tumorzelllinien LNCaP, PC-3, ALVA-31 und DU145 produziert wird, wobei FGF8b die am meisten vorherrschende Isoform ist (Tanaka 1995, Ghosh 1996). Das Wachstum der Androgenreaktiven LNCaP-Zellen wird durch Zugabe von rekombinantem FGF8b stimuliert (Tanaka 1995), während DU145-Zellen durch die Transfektion mit Viren, die Anti-Sense FGF8b exprimieren, im Wachstum inhibiert werden konnten (Rudra-Ganguly 1998). Dieses, zusammen mit den unten diskutierten Hinweisen aus Entwicklungsstudien, deutet auf eine Rolle für FGF8b bei der Aufrechterhaltung des Krebsstatus dieser Zelllinien.

[0208] Unter Verwendung von FGF8a-cDNA für in situ-Hybridisierungs-Experimente haben Leung und Mitarbeiter gezeigt, dass ein hoher Anteil (80% (n = 106) und 71% (n = 31)) an Prostatakrebs FGF8-mRNA produziert und dass die Menge von FGF8-mRNA mit der Schwere der Tumoren korreliert ($P < 0,0016$ bzw. $P < 0,05$) (Leung 1996, Dorkin 1999). Unter Verwendung eines monoklonalen anti-FGF8b-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass diese Isoform für die Überexpression von FGF8b verantwortlich ist (Dorkin 1999). Zusätzlich zeigen Männer mit Tumoren, welche hohe Spiegel an FGF8 exprimieren, eine schlechtere Überlebensrate ($P = 0,034$), und die FGF8-Expression dauert in Androgen-unabhängigen Prostatakrebsarten an (Dorkin 1999). Entsprechend der Daten, die von Dorkin und Mitarbeitern dargestellt werden, kann die Expression von FGF8b bei Prostatakrebs das Überleben des Patienten vorhersagen.

[0209] Immunhistochemische Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen FGF8 hat das Protein in 93% (n = 43) von humanen Prostatakrebsarten detektiert (Tanaka 1998). Normales Prostatage-webe oder gutartige Prostatahyperplasie bringt niedrige Spiegel an FGF8-mRNA hervor und enthält keine detektierbaren Mengen von FGF8-Protein (Leung 1996, Yoshimura 1996, Ghosh 1996, Tanaka 1998, Dorkin 1999).

[0210] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Autovakzin gegen FGF8(b) gegen Prostatakrebsgewebe reagieren würde und daher äußerst wertvoll bei der Behandlung von Prostatakrebs wäre.

Brustkrebs

[0211] Die derzeitige Behandlung von Brustkrebs ist die chirurgische Operation. Aufgrund der starken Ausbreitung von Brustkrebszellen wird ein großer Teil der Brustkrebs-Patientinnen durch die lokale chirurgische Behandlung nicht geheilt. Patientinnen mit nicht-beendeter Krankheit erhalten gegebenenfalls eine Androgen-Herabsetzungstherapie, eine Chemotherapie oder eine Strahlungstherapie. Die jährliche Todesrate von Brustkrebs ist jedoch immer noch relativ hoch.

[0212] FGF8 wurde ursprünglich aus einer Maus-Mammakarzinom-Zelllinie (SC-3) isoliert, bei der die Expression durch Zugabe von Androgen zum Medium induziert werden konnte (Nonomura 1990). Von dem Protein ist auch bekannt, dass es die Proliferation von diesen sowie von anderen Säugerzellen induziert. Jüngst wurde gezeigt, dass FGF8b-mRNA in acht (n = 8) humanen Brustkrebs-Zelllinien vorhanden ist (MDA-MB-231, MDA-MB-415, ZR 75-1, T-47-D, SK-BR-III, PMC-42, HBL-100 und MCF-7) (Tanaka 1995, Payson 1996, Wu 1997, Marsh 1998).

[0213] Wnt-1-transgenische Mäuse, die mit einem Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV) infiziert wurden, entwickeln Mammatumoren. FGF8-Transkription wird in 50% dieser Tumoren aktiviert (MacArthur 1995c, Kapoun 1997).

[0214] Transgenische Mäuse, die die FGF8b-cDNA unter Kontrolle des sehr spezifischen MMTV-Promotors tragen, entwickeln spontan FGF8b-exprimierende Mammatumoren (Coombes, persönliche Mitteilung).

[0215] Jüngste Daten zeigen, dass FGF8(b)-Expression in Brustkrebs hochreguliert ist (Tanaka 1998, Marsh 1999). Tanaka und Mitarbeiter verwendeten einen neuen monoklonalen FGF8-Antikörper in immunhistochemischen Untersuchungen. Sie zeigten, dass FGF8 in 67% (n = 12) der Brustkrebs-Arten vorhanden war, und dass Androgen-Rezeptoren in 89% von FGF8-positiven Brustkrebsarten vorhanden waren (Hyperplasie, Fibroadenom, intraduktale Papillome und Krebsarten), was es ermöglichen würde, dass die autokrine Wachstumsfördernde Schleife in das Fortschreiten von Brustkrebs-Arten verwickelt wäre (Tanaka 1998). Unter

Verwendung eines semi-quantitativen RT-PCR-Verfahrens wurde gezeigt, dass erhöhte Spiegel an FGF8-mRNA in malignen Brustgeweben aufgefunden wurden, verglichen mit nicht-malignen Brustgeweben. Signifikant mehr maligne Gewebe exprimierten FGF8 ($p = 0,019$) mit signifikant höheren Spiegeln ($p = 0,031$) (68 Brustkrebs-Arten und 24 nicht-maligne Brustgewebe) (Marsh 1999).

[0216] Es wurde noch nicht vollständig dargelegt, dass FGF8(b) als autokriner Wachstumsfaktor fungiert. Die Tatsache, dass eine große Anzahl von Tumoren FGF8b überexprimiert, spricht jedoch stark dafür, dass ein Autovakzin gegen FGF8b wirksam gegen eine große Prozentzahl von Brust- und Prostatakrebs-Arten sein könnte. Die Daten, über die Marsh, Dorkin und Tanaka berichten, deuten darauf hin, dass ein Autovakzin gegen FGF8(b) für die Behandlung von sowohl Brust- als auch Prostatakrebs-Arten nützlich sein könnte, und die recht ungenauen Daten, die von Dorkin et al. dargestellt werden, sind eine weitere Stütze für die Ansicht, dass FGF8 in die Proliferation von humanen Krebszellen verwickelt ist.

Beschreibung von FGF8b

[0217] FGF8 gehört zu der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs). Diese Wachstumsregulierenden Proteine sind kleine 200 Aminosäurereste lange Proteine, die alle in die Induktion der Proliferation und der Differenzierung einer großen Spanne von Zellen involviert sind. Für einen jüngeren Übersichtsartikel über die Verstrickung der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in die Entwicklung von Gliedern bei Vertebraten siehe Johnson 1997. Die FGF-Familienmitglieder sind evolutionär verwandt und weisen eine Aminosäure-Sequenzidentität von 20-50% auf.

[0218] FGF8b ist eine Splice-Variante von FGF8, die ursprünglich als Androgen-induzierender Wachstumsfaktor (AIGF) bezeichnet wurde. AIGF wurde als erstes als ein Protein identifiziert, das von einer Zelllinie, die von einem Maus-Mamma-Karzinom abgeleitet ist (SC-3), nach Stimulation mit Androgen sezerniert wird (Nonomura 1990). Das Maus-FGF8-Gen enthält 6 Exons, die potentiell für 8 unterschiedliche FGF8-Isoformen (FGF8a-h) codieren, welche sich nur im N-terminalen Teil der Moleküle unterscheiden (Crossley 1995, MacArthur 1995b). Humanes FGF8 besitzt dieselbe Genstruktur wie das Maus-Gen. Aufgrund eines Stop-Kodons im Exon 1B kann humanes FGF8 nur in vier unterschiedlichen Isoformen vorliegen, nämlich FGF8a, FGF8b, FGF8e und FGF8f (Gemel 1996). Die Genstrukturen und die Aminosäuresequenzen der vier humanen Isoformen sind in **Fig. 5** dargestellt.

[0219] Reifes FGF8b enthält 193 Aminosäure-Reste und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 22,5 kDa. Das stark basische Protein enthält 21 Arginin- und 14 Lysin-Reste, was zu einem errechneten isoelektrischen Punkt von 10,84 und einer errechneten positiven Ladung von 19,8 bei pH 7,0 führt. Es enthält zwei Cystein-Reste und zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen. Aufgrund der Eigenheiten der durchgeführten Untersuchungen, die FGF8b einbeziehen, ist sehr wenig über die FGF8b-Proteingruppierung bekannt. Es wurde jedoch heterolog in Bakterien exprimiert, unter Verwendung eines C-terminalen Hexa-Histidin-Tags gereinigt und in vitro bis zu einem löslichen und biologisch aktiven Stadium rückgefaltet (MacArthur 1995a, Blunt 1997).

Biologische Aktivität von FGF8b

[0220] Wie oben erwähnt, wurde FGF8(b) zuerst als ein Faktor isoliert, der von einer Androgen-abhängigen Maus-Mammatumorzelllinie ausgeschüttet wurde, und es wurde gezeigt, dass dieses Protein die Proliferation dieser Zellen induzieren kann. Die morphologischen Veränderungen ähneln jenen, die durch Testosteron induziert werden, von dem auch bekannt ist, dass es die Synthese von FGF8(b)-mRNA induziert (Tanaka 1992). Die Proliferation kann durch FGF8(b)-Antisense-Oligos inhibiert werden (Nonomura 1990, Tanaka 1992 und Yamanishi 1994). Tatsächlich konnte eine humane Prostatakrebs-Zelllinie DU145 durch Transfektion mit Viren, die Anti-Sense-FGF8b exprimieren, im Wachstum behindert werden (Rudra-Ganguly 1998). Jüngste Daten zeigen, dass FGF8b die Phosphorylierung von STAT3 induziert – einem Protein, von dem man vermutet, dass es in die Resistenz gegen Apoptose verwickelt ist (Catlett-Falcone 1999, Johnston, C.L., unveröffentlichte Ergebnisse).

[0221] Es wurde von mehreren Forschern gezeigt, dass FGF8b sehr effizient beim Induzieren der Transformation von NIH3T3- oder SC115-Zellen ist (Miyashita 1994, Kouhara 1994, Lorenzi 1995, MacArthur 1995a). Indem rekombinant exprimierte Proteine verwendet wurden, wurde auch gezeigt, dass diese Induktion von morphologischen Veränderungen sehr viel effizienter mit FGF8b ist, im Gegensatz zur Verwendung von FGF8a oder FGF8c (MacArthur 1995a, Ghosh 1996). Interessanterweise wurde gezeigt, dass die N-terminale Hälfte des FGF8b-Moleküls alleine zur Transformation von NIH3T3-Zellen ausreicht, und sogar das kleine FGF8b-spezifische Peptid (QVTVQSSPNFT) konnte es den Zellen ermöglichen, 2-3 Mal länger als normal in

0,1% Serum zu wachsen (Rudra-Ganguly 1998). Außerdem wurde berichtet, dass NIH3T3-Zellen, die stabil mit einem Expressionsvektor, der für FGF8b codiert, transfiziert waren, sehr tumorigen waren, wenn sie intra-okular in Nacktmäuse injiziert wurden (Kouhara 1994, Ghosh 1996).

[0222] Es ist bekannt, dass FGF8b in vivo in bestimmten Stadien der Entwicklung in Vertebraten exprimiert wird. Eine Zusammenfassung der biologischen Rollen, die FGF8(b) zugeschrieben werden, ist in Tabelle 1 gezeigt. Für Übersichtsartikel über die Beteiligung von FGFB bei der Vertebraten-Entwicklung siehe Goldfarb 1999, Johnson 1997.

Tabelle: Verschiedene Stellen/Gewebe, die bekannt sind, FGF8 herzustellen, und die vorgeschlagene biologische Rolle(n).

Wirkung/Mechanismus/Vorhandensein (Art)	Literaturstellen
Vorhanden bei der Entwicklung von Extremitätenanlagen (Maus)	Heikinheimo 1994, Ohuchi 1994
Wachstum von Extremitätenanlagen (Huhn)	Kuwana 1997, Xu 1990
Induktion der ektopischen Gliedmaßenbildung aus dem Mesoderm (Huhn)	Crossley 1996b
Induktion der Mittelhirnbildung aus dem caudalen Diencephalon (Huhn)	Crossley 1996a
Initiation des Flügelwachstums bei einer flügellosen Mutante (Huhn)	Ohuchi 1997a
Rolle bei der dorsoventralen Musterung der Gastrula (Zebrafisch)	Fürthauer 1997
Erforderlich während der Gastrulation, der Herz-, craniofacialen, Vorderhin-, Mittelhirn- und Cerebellum-Entwicklung (Gewebe-spezifische knock-out-Mäuse)	Meyers 1998
Rolle bei der Zahnmorphogenese (Maus)	Kettunen 1998

[0223] Man glaubt, dass FGF8(b) seine Wirkung über die Bindung an die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFRs) vermittelt. Es ist bekannt, dass FGF8b in der Lage ist, spezifisch FGFR2c, FGFR3c, FGFR4c und in gewissem Ausmaß auch FGFR1c zu aktivieren, aber nicht FGFR1b, -2b oder -3b (MacArthur 1995b, Blunt 1997). Im Falle der Induktion des Wachstums von ektopischen Huhn-Gliedmaßen ist impliziert, dass FGF10, FGFR2 und FGF8 interagieren, und dass dies für das Auswachsen ausreichend sein könnte (Kuwana 1997, Xu 1998).

[0224] Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass FGF8(b) auf auto- und parakrine Weise wirken kann, was zum normalen Wachsen und der normalen Musterbildung bei mehreren anatomischen Strukturen während der Vertebraten-Entwicklung führt. Es ist wichtig, dass FGF8 "total-knock-out"-Mäuse nicht überleben, höchstwahrscheinlich aufgrund der umfangreichen Beteiligung des Proteins bei der Entwicklung des Embryos.

Homologie zu anderen Proteinen

[0225] Es ist von erhöhter Wichtigkeit vorherzusagen, ob unerwünschte Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen, die für Antikörper zugänglich sind, nach der Behandlung mit einem Autovakzin, das spezifische Autoantikörper gegen FGF8b induziert, zu erwarten wäre. Aufgrund des hohen Grades der Sequenzidentität zwischen FGF8b und den anderen FGF8-Molekülen wird erwartet, dass ein Autovakzin mit diesen Proteinen kreuzreagieren würde. Dies wird jedoch vermutlich vorteilhaft sein, da von keinem dieser Proteine berichtet wird, dass sie in Geweben oder von Zelllinien exprimiert werden, die nicht schon FGF8b exprimieren.

[0226] Die Aminosäure-Reste 55-175 von FGF8b zeigen ein relativ niedriges Ausmaß, aber signifikantes Ausmaß an Sequenzidentität mit den anderen FGFs. Es ist allgemein anerkannt (und mehrere Male bewiesen), dass ein signifikanter Grad der Sequenzidentität zwischen zwei Proteindomänen sich ebenfalls in einem hohen Ausmaß an Tertiärstruktur-Ähnlichkeit niederschlägt. Daher wird erwartet, dass die FGF-Familienmitglieder im Allgemeinen strukturell ähnlich sind. Die 3-dimensionale Struktur von FGF2 wurde von Kristallen sowie in Lösung aufgelöst (Ago 1991, Zhang 1991, Zhu 1991, Eriksson 1993, Blaber 1996, Moy 1996). FGF2 setzt sich insgesamt aus einer Beta-Faltblatt-Struktur zusammen, die eine dreifache Wiederholung eines viersträngigen, antiparallelen Beta-Meanders umfasst. Diese beta-Fass-Struktur ist vollständig konserviert bei In-

terleukin 1, FGF2 (oder basischem FGF), und FGF1 (oder saurem FGF). Kernspinresonanzanalysen von FGF2 in Lösung haben gezeigt, dass der N-terminale Teil des Moleküls eine relativ flexible Struktur bildet. Der übrige Teil von FGF8b (Aminosäure-Reste 1-54 und 176-215) zeigt nur ein geringes Ausmaß an Sequenzidentität mit bekannten Proteinen.

[0227] Ausgehend von den strukturellen und Anlagerungsdaten wird allgemein angenommen, dass der dreidimensionale strukturelle Kern der anderen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren jenem von FGF1 und FGF2 sehr stark ähnelt. Diese strukturellen Abwägungen sind wichtige Faktoren bei unserer Gestaltung der mutierten FGF8b-Autovakzin-Moleküle.

[0228] Es ist äußerst wichtig, dass aufgrund des relativ niedrigen Grads der Sequenzidentität zwischen FGF8 und irgendwelchen anderen Mitgliedern der FGF-Familie die Oberfläche von FGF8 sich von der anderer FGFs sehr stark unterscheidet, was die Kreuzreaktivität von Antikörpern, die durch ein FGF8b-Autovakzin hervorgerufen werden, mit anderen FGF-Familienmitgliedern minimiert. Aufgrund des sehr niedrigen Grads der Homologie zu anderen Proteinen als den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren erwarten wir nicht, dass ein Autovakzin gegen FGF8b mit irgendwelchen anderen Proteinen kreuzreagiert.

[0229] Es sollte jedoch betont werden, dass ein Autovakzin gegen FGF8b vermutlich mit allen Isoformen von FGF8 kreuzreagieren würde. Dies wird jedoch vermutlich kein Problem sein, da man von keiner der FGF8-Isoformen erwartet, dass sie in signifikantem Ausmaß in dem Erwachsenen exprimiert wird. Es ist sogar möglich, dass diese Kreuzreaktivität bei der Behandlung von Krebs vorteilhaft ist, da gezeigt wurde, dass mindestens einige Krebs-Zelllinien andere Isoformen zusätzlich zu FGF8b exprimieren.

Gewebeverteilung von FGF8b

[0230] Idealerweise sollten die induzierten Autoantikörper und die nachfolgenden Wirkmechanismen sowie die erwartete CTL-Reaktion, die durch die Autovakzinierung hervorgerufen wird, nur gegen Gewebe gerichtet sein, die aus dem Patienten zu eliminieren sind. Daher ist die Gewebeverteilung des Antigens, welches von einem Autovakzin anvisiert wird, eine Frage von sehr hoher Wichtigkeit in Bezug auf die Sicherheit des Vaksins.

Tabelle: Expression von FGF8b in verschiedenen Geweben und Zellen

Mensch

Brustkrebs-Zelllinien (MDA-MB-231, MDA-MB-415, ZR 75-1, T-47-D, SK-BR-III, PMC-42, HBL-100 und MCF-7)	((RT-PCR) Tanaka 1995, Payson 1996, Wu 1997, Marsh 1999)
Brusttumoren	((mAb) Tanaka 1998, (RT-PCR) Marsh 1999)
Normales Brustgewebe	((RT-PCR) Wu 1997, Marsh 1999 (mAb) Tanaka 1998)
Prostatakrebs (93%)	((in situ hyb.) Leung 1996, Dorkin 1999, (mAb) Tana- ka (1998)
Brusterkrankungen	((mAb) Tanaka (1998)
Prostata-Tumorzellen (LNCaP, PC-3, DU145 und ALVA-31)	((RT-PCR) Tanaka 1995, Ghosh 1996, Schmitt 1996)
fötale Niere	((Northern blot) Ghosh 1996)
Adulte Prostata, Hoden, Nieren, Neuronen	((RT-PCR) Ghosh 1996, Wu 1997, Dorkin 1999)
Teratokarzinomzellen (Tera-2)	((RT-PCR) Wu 1997)

Maus

Brustkrebs-Zelllinien (SC-115, RENCA)	((RT-PCR) Yoshimura 1996)
Hypothalamus, Hoden	((RT-PCR) Yoshimura 1996)
Mammatumoren (Wnt-1-Transgen)	((Northern blot) MacArthur 1995c)
Embryonales Gehirn	((in situ hyb.) Crossley 1995, Heikinheimo 1994, Ohuchi 1994, Shimamura 1997, (RT-PCR) Blunt 1997)
Eierstöcke, Hoden	((Northern blot) Valve 1997)
Das sich entwickelnde Gesicht und Extremitätenanlagen	((pAb) MacArthur 1995b (in situ hyb.) Heikinheimo 1994, Ohuchi 1994, Crossley 1995)
Gastrula	((in situ hyb.) Crossley 1995)

Huhn

Embryonales Gehirn	((in situ hyb.) Crossley 1996a)
Sich entwickelnde Extremitätenanlagen	((in situ hyb.) Ohuchi 1997a,b)

Ratte

Prostata und Hoden	(RT-PCR) Scmitt 1996
--------------------	----------------------

[0231] Die obige Tabelle zeigt eine breite Auswahl der Gewebeverteilung und Zelllinien-Daten der FGF8b-Expression. Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurden die meisten Daten, die die Gewebeverteilung betreffen, unter Verwendung der sensitiven RT-PCR-Methode erzeugt. Dies liegt daran, dass Northern-Blot-Analyse nicht jede FGF8b-mRNA in allen normalen Geweben detektiert, mit der Ausnahme von der fötalen Niere. Aus diesen Daten wird im Allgemeinen angenommen, dass die Expression von FGF8b-mRNA im Erwachsenen sehr beschränkt ist und daher ein Autovakzin gegen FGF8b vermutlich nicht gegen normale Gewebe reagieren würde. Aufgrund der Tatsache, dass geringe Mengen von FGF8b mit unbekannten Systemen im Erwachsenen Wechselwirken könnten, erfordert die Gewebeverteilung des Proteins eine weitere Analyse. Es gibt jedoch unserer Meinung nach keine Anzeichen dafür, dass ein Autovakzin gegen FGF8b zu ernsthaften ungewollten Wirkungen bei den Patienten führen würde.

Wirkungen von Antikörpern gegen FGF8b

[0232] Bisher wurden keine Versuche publiziert, Prostatakrebs unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern zu behandeln. Klinische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern in Brustkrebs-Therapie-Studien dauern jedoch an. Antikörper gegen FGF8b werden vermutlich die Wechselwirkung zwischen FGF8b und seinen Rezeptoren blockieren, was das Ausdehnen der Zellmembran und die Zellproliferation inhibieren wird, und sehr wahrscheinlich die Beweglichkeit und die invasiven Eigenschaften der Krebszellen herabsetzen wird.

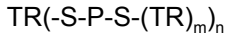
[0233] Daher bezieht sich die Erfindung auch auf Ausführungsformen der hierin beschriebenen Verfahren, in denen das fremde T-Zell-Epitop in einen Teil der FGF8b-Aminosäuresequenz der in SEQ ID NO:6, der durch die Positionen 1-54 und/oder 178-215 und/oder 55-58 und/oder 63-68 und/oder 72-76 und/oder 85-91 und/oder 95-102 und/oder 106-111 und/oder 115-120 und/oder 128-134 und/oder 138-144 und/oder 149-154 und/oder 158-162 und/oder 173-177 definiert wird, eingefügt wird. Es sollte erwähnt werden, dass es insbesondere bevorzugt ist, keine Variationen oder Modifikationen an den Positionen 26-45 und im C-Terminus beginnend von Aminosäuren 186-215 einzufügen, da diese Bereiche zumindest eine Homologie mit einem jüngst entdeckten Protein, FGF18, welches in einer Vielzahl von Nicht-Tumorgeweben zu exprimiert sein scheint, aufweisen.

[0234] Dementsprechend betrifft die Erfindung auch ein Analogon von humanem/Maus-FGF8b, welches in Menschen immunogen ist, wobei das Analogon einen wesentlichen Teil aller bekannten und vorhergesagten CTL- und B-Zell-Epitope von FGF8b umfasst und mindestens ein fremdes T_H-Epitop umfasst, wie hierin diskutiert. Es ist bevorzugt, dass das mindestens eine fremde T_H-Epitop als Insertion in die FGF8b-Aminosäuresequenz oder als Substitution eines Teils der FGF8b-Aminosäuresequenz oder als Ergebnis der Deletion eines Teils der FGF8b-Aminosäuresequenz vorliegt. Die insbesondere bevorzugten Analoga dieser Ausführungsform sind jene, bei denen das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der FGF8b-Aminosäuresequenz eingefügt ist, der durch die SEQ ID NO:6-Positionen 1-54 und/oder 178-215 und/oder 55-58 und/oder 63-68 und/oder 72-76 und/oder 85-91 und/oder 95-102 und/oder 106-111 und/oder 115-120 und/oder 128-134 und/oder 138-144

und/oder 149-154 und/oder 158-162 und/oder 173-177 definiert ist.

Mucine

[0235] Die Erfindung betrifft auch erfindungsgemäße Verfahren, die spezifisch modifizierte Versionen der humanen Mucine verwenden, insbesondere irgendeines der Mucine MUC-1 bis MUC-4, bevorzugt MUC-1. Die Analoga umfassen die folgende Struktur



– wobei TR ein Tandem-Repeat ist, der von dem natürlich vorkommenden Mucin abgeleitet ist, P ein fremdes T_H-Epitop ist, wie hierin diskutiert, S ein inertes Platzhalter-Peptid ist, das 0 bis 15 Aminosäure-Reste aufweist, bevorzugt zwischen 0 und 10 Aminosäure-Resten, und n eine ganze Zahl von 1 bis 30 ist und m eine ganze Zahl von 1 bis 10, bevorzugt von 3 bis 5, ist.

[0236] Wenn solch ein Mucin-Analogon z.B. in einer humanen Zelllinie oder durch Aufreinigung aus einem Gewebe produziert wird, wird das direkte Ergebnis normalerweise nicht das gewünschte Glykosylierungsmuster aufweisen, d.h. ein falsches Glykosylierungsmuster, das jenes eines Tumor-abgeleiteten Mucins widerspiegelt. Es ist jedoch möglich, das Analogon rekombinant, z.B. in E. coli, oder mittels synthetischer Verfahren herzustellen und anschließend das Produkt enzymatisch zu glykosylieren, so dass ein Tn- oder S-Tn-Glykosylierungsmuster erreicht wird, das spezifisch für MUC-1 ist, welches in Tumoren exprimiert wird. Alternativ dazu kann das Polypeptid in einer Säuger-Zelllinie oder in einer Insekten-Zelllinie präpariert werden, z.B. in Drosophila-Zellen, welchen das relevante Enzym fehlt, oder indem das Protein intrazellulär exprimiert wird (indem ein Sezernierungs-Signalpeptid ausgelassen wird), wobei eine Glykosylierung nicht auftritt.

Erfindungsgemäße Nukleinsäurefragmente und Vektoren

[0237] Es ist aus der obigen Offenbarung anzunehmen, dass die Analoga mittels rekombinanter Gentechnologie, aber auch mittels chemischer Synthese oder Semisynthese, präpariert werden können; die letzten zwei Optionen sind besonders relevant, wenn die Modifikation aus der Kopplung an Protein-Trägerstoffe besteht (wie beispielsweise KLH, Diphtherietoxoid, Tetanustoxoid und BSA), und nicht-proteinöse Moleküle, wie Kohlenhydratpolymere, und natürlich auch, wenn die Modifikation die Addition von Seitenketten oder Seitengruppen an eine Polypeptid-abgeleitete Peptidkette umfasst.

[0238] Zum Zwecke der rekombinanten Gentechnologie, und natürlich auch zum Zwecke der Nukleinsäure-Immunisierung, sind Nukleinsäurefragmente, die die notwendigen Epitop-Regionen und Analoga codieren, wichtige chemische Produkte. Ein wichtiger Teil der Erfindung betrifft daher ein Nukleinsäurefragment, welches ein oben beschriebenes Analogon von irgendeinem der relevanten Tumor-spezifischen Polypeptide codiert, bevorzugt ein Polypeptid, in das ein fremdes T_H-Zell-Epitop mittels der Insertion und/oder Addition, bevorzugt mittels einer Substitution und/oder Deletion, eingefügt wurde. Die Nukleinsäurefragmente der vorliegenden Erfindung sind entweder DNA- oder RNA-Fragmente.

[0239] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente werden normalerweise in geeignete Vektoren eingefügt um Klonierungs- oder Expressions-Vektoren zu bilden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente tragen; solche neuen Vektoren sind ebenfalls Teil der Erfindung. Details, die die Konstruktion dieser erfindungsgemäßen Vektoren betreffen, werden im Zusammenhang mit transformierten Zellen und Mikroorganismen unten diskutiert. Die Vektoren können, abhängig von Zweck und Art der Anwendung, in Form von Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Minichromosomen oder Viren vorliegen, aber auch nackte DNA, welche nur transient in bestimmten Zellen exprimiert wird, ist ein wichtiger Vektor. Bevorzugte erfindungsgemäße Klonierungs- und Expressions-Vektoren sind in der Lage, autonom zu replizieren, dabei hohe Kopienzahlen zum Zwecke der Expression im großen Umfang oder Replikation im großen Umfang für anschließende Klonierung zu ermöglichen.

[0240] Die allgemeine Beschreibung eines erfindungsgemäßen Vektors umfasst die folgenden Eigenschaften in 5'→3'-Richtung und funktionell verknüpft: einen Promotor zum Betreiben der Expression des erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragments, wahlweise eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Leitpeptid codiert, was die Sekretion des Polypeptidfragments oder dessen Integration in die Membran ermöglicht, das erfindungsgemäße Nukleinsäurefragment und eine Nukleinsäuresequenz, die für einen Terminator codiert. Wenn mit Expressions-Vektoren in Produktionsstämmen oder -Zelllinien gearbeitet wird, ist es zum Zwecke der genetischen Stabilität der transformierten Zellen bevorzugt, dass der Vektor, wenn er in eine Wirtszelle eingebracht wird, in

das Wirtszellgenom integriert wird. Im Gegensatz dazu, wenn mit Vektoren gearbeitet wird, die verwendet werden um die Expression in vivo in einem Tier zu bewirken, ist es (d.h., wenn der Vektor bei der DNA-Vakzinierung verwendet wird) aus Gründen der Sicherheit bevorzugt, dass der Vektor nicht in der Lage ist, in ein Wirtszellgenom integriert zu werden; typischerweise werden nackte DNA oder nicht-integrierende virale Vektoren verwendet, deren Auswahl dem Fachmann wohlbekannt ist.

[0241] Die erfindungsgemäßen Vektoren werden verwendet um Wirtszellen zu transformieren um das erfindungsgemäße Analogon zu produzieren. Solche transformierten Zellen, welche ebenfalls Teil der Erfindung sind, können kultivierte Zellen oder Zelllinien sein, die für die Vermehrung der Nukleinsäurefragmente und -Vektoren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, oder sie können zur rekombinanten Produktion des erfindungsgemäßen Analogons verwendet werden. Alternativ dazu können die transformierten Zellen geeignete Lebend-Vakzin-Stämme sein, bei denen das Nukleinsäurefragment (eine einzelne oder multiple Kopien) so eingefügt wurden, dass sie die Sezernierung des Analogons oder dessen Integration in die bakterielle Membran oder Zellwand bewirken.

[0242] Bevorzugte transformierte erfindungsgemäße Zellen sind Mikroorganismen, wie Bakterien (wie die Arten *Escherichia* [z.B. *E. coli*], *Bacillus* [z.B. *Bacillus subtilis*], *Salmonella* oder *Mycobakterium* [bevorzugt nicht-pathogene, z.B. *M. bovis* BCG]), Hefen (wie *Saccharomyces cerevisiae*), und Protozoen. Alternativ dazu sind die transformierten Zellen von einem multizellulären Organismus, wie einem Pilz, einer Insektenzelle, einer Pflanzenzelle oder einer Säugerzelle abgeleitet. Besonders bevorzugt sind Zellen, die von einem Menschen abgeleitet sind, vgl. die Diskussion von Zelllinien und Vektoren unten.

[0243] Zum Zwecke der Klonierung und/oder optimierten Expression ist es bevorzugt, dass die transformierte Zelle in der Lage ist, das erfindungsgemäße Nukleinsäurefragment zu replizieren. Zellen, die das Nukleinsäurefragment exprimieren, sind bevorzugte nützliche Ausführungsformen der Erfindung; sie können zur Präparation des Analogons in kleinem oder großem Maßstab verwendet werden, oder, im Falle nicht-pathogener Bakterien, als Vakzin-Bestandteile in einem Lebend-Vakzin.

[0244] Bei der Herstellung des erfindungsgemäßen Analogons mittels transformierter Zellen ist es üblich, wenn auch in keinem Fall wesentlich, dass das Expressionsprodukt entweder in das Kulturmedium hinausexportiert wird oder auf der Oberfläche der transformierten Zellen getragen wird.

[0245] Wenn eine effektive Produktionszelle identifiziert wurde, ist es bevorzugt, auf dieser Basis eine stabile Zelllinie zu etablieren, welche den erfindungsgemäßen Vektor trägt und welche das Nukleinsäurefragment, das für das Analogon codiert, exprimiert. Bevorzugt sezerniert diese stabile Zelllinie das erfindungsgemäße Analogon oder trägt dieses Analogon, was dessen Reinigung erleichtert.

[0246] Im Allgemeinen werden Plasmid-Vektoren, die ein Replikon und Kontrollsequenzen enthalten, welche von Arten abgeleitet sind, die mit der Wirtszelle kompatibel sind, in Zusammenhang mit den Wirten verwendet. Der Vektor besitzt für gewöhnlich eine Replikationsstelle sowie Markersequenzen, welche in der Lage sind, eine phenotypische Selektion in transformierten Zellen zu ermöglichen. Z.B. wird *E. coli* typischerweise unter Verwendung von pBR322 transformiert, einem Plasmid, das von einer *E. coli*-Art abgeleitet ist (siehe z.B. Bolivar et al., 1977). Das pBR322-Plasmid enthält Gene für Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz und stellt daher einfache Mittel zur Identifikation von transformierten Zellen bereit. Das pBR-Plasmid, oder ein anderes mikrobielles Plasmid oder ein Phage, muss auch Promotoren enthalten oder so modifiziert sein, dass es Promotoren enthält, welche von dem prokaryotischen Mikroorganismus zur Expression verwendet werden können.

[0247] Jene Promotoren, die für gewöhnlich bei der Konstruktion rekombinanter DNA verwendet werden, umfassen die B-Lactamase (Penicillinase)- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., 1978; Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979) und ein Tryptophan (trp)-Promotorsystem (Goeddel et al., 1979; EP-A-0 036 776). Während diese die am meisten verwendeten sind, wurden andere mikrobielle Promotoren diskutiert und verwendet, und Details, die deren Nukleotidsequenzen betreffen, wurden veröffentlicht, was es einem Fachmann ermöglicht, sie funktionell mit Plasmid-Vektoren zu ligieren (Siebwenlist et al., 1980). Bestimmte Gene von Prokaryonten können effizient in *E. coli* von ihren eigenen Promotorsequenzen exprimiert werden, was das Erfordernis der künstlichen Zugabe eines anderen Promotors ausschließt.

[0248] Zusätzlich zu Prokaryonten können auch eukaryontische Mikroben, wie Hefekulturen, verwendet werden, und hier sollte der Promotor in der Lage sein, die Expression anzutreiben. *Saccharomyces cerevisiae*, oder die gewöhnliche Bäckerhefe, ist unter den eukaryontischen Mikroorganismen der am allgemeinsten verwendete, obwohl eine Vielzahl anderer Stämme allgemein verfügbar ist, wie beispielsweise *Pichia pastoris*. Zur

Expression in *Saccharomyces* wird für gewöhnlich z.B. das Plasmid YRp7 verwendet (Stinchcomb et al., 1979; Kingsman et al., 1979; Tschemper et al., 1980). Dieses Plasmid enthält schon das *trp1*-Gen, welches einen Selektionsmarker für einen mutierten Hefestamm bereitstellt, dem die Fähigkeit, auf Tryptophan zu wachsen, fehlt, beispielsweise ATCC No. 44076 oder PEP4-1 (Jones, 1977). Das Vorhandensein der *trp1*-Läsion als Charakteristikum des Hefezell-Genoms bietet dann eine wirksame Umgebung zum Detektieren der Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan.

[0249] Geeignete Promotorsequenzen in Hefe-Vektoren umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzman et al., 1980) oder andere glykolytische Enzyme (Hess et al., 1968; Holland et al., 1978), wie beispielsweise Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphat-Isomerase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Pyruvatkinase, Triosephosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und Glucokinase. Bei der Konstruktion geeigneter Expressionsplasmide werden die Terminationssequenzen, die diesen Genen zugeordnet sind, ebenfalls 3' von der gewünschten Sequenz gelegen, die exprimiert werden soll, in den Expressions-Vektor ligiert um die Polyadenylierung der mRNA und dessen Termination sicherzustellen.

[0250] Andere Promotoren, welche den zusätzlichen Vorteil der kontrollierten Transkription durch Wachstumsbedingungen aufweisen, sind die Promotorregion für Alkohol-Dehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, degradierende Enzyme, die mit dem Stickstoffstoffwechsel in Verbindung stehen, und die zuvor genannte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, und Enzyme, die für Maltose- und Galactose-Nutzung verantwortlich sind. Jeder Plasmid-Vektor, der einen Hefe-kompatiblen Promotor, einen Replikationsursprung und Terminationssequenzen enthält, ist geeignet.

[0251] Zusätzlich zu Mikroorganismen können auch Kulturen von Zellen als Wirte verwendet werden, die von multizellulären Organismen abgeleitet sind. Im Prinzip kann jede solche Zellkultur verwendet werden, ob sie nun von Vertebraten- oder Invertebraten-Kultur stammt. Das Interesse war jedoch am größten bei Vertebratenzellen, und die Vermehrung von Vertebratenzellen in Kultur (Gewebekultur) wurde ein Routineverfahren in den jüngsten Jahren (Gewebekultur, 1973). Beispiele solcher nützlichen Wirtszelllinien sind VERO und He-La-Zellen, CHO ("Chinese hamster ovary")-Zelllinien und W138-, BHK-, COS-7-, 293- und MDCK-Zelllinien.

[0252] Expressions-Vektoren für solche Zellen umfassen für gewöhnlich (wenn dies notwendig ist) einen Replikationsursprung, einen Promotor, der sich vor dem zu exprimierenden Gen befindet, zusammen mit irgendwelchen notwendigen Ribosomen-Bindestellen, RNA-Splice Stellen, Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminatorsequenzen.

[0253] Zur Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen auf den Expressions-Vektoren oft von viralem Material bereitgestellt. Allgemein verwendete Promotoren sind z.B. von Polyoma-, Adenovirus 2 und am häufigsten Affenvirus 40 ("Simian Virus 40", SV40) abgeleitet. Die frühen und späten Promotoren des SV40-Virus sind besonders nützlich, da beide recht einfach als Fragment aus dem Virus gewonnen werden können, welches auch den viralen Replikationsursprung von SV40 enthält (Fiers et al., 1978). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt, die ungefähr 250 by lange Sequenz, die sich von der HindIII-Schnittstelle bis zur BglI-Schnittstelle erstreckt, die im viralen Replikationsursprung liegt, ist davon umfasst. Weiterhin ist es auch möglich, und oft wünschenswert, Promotor- oder Kontrollsequenzen zu verwenden, die normalerweise der gewünschten Gensequenz zugeordnet sind, vorausgesetzt solche Kontrollsequenzen sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel.

[0254] Ein Replikationsursprung kann bereitgestellt werden entweder, indem der Vektor so konstruiert ist, dass er einen exogenen Replikationsursprung enthält, wie er von SV40 oder anderen Viren abgeleitet sein kann (z.B. Polyoma, Adeno, VSV, BPV), oder er kann von dem chromosomalen Replikationsmechanismus der Wirtszelle bereitgestellt werden. Wenn der Vektor in das Wirtszellchromosom integriert wird, ist Letzteres oft ausreichend.

Zusammensetzungen der Erfindung

[0255] Die Erfindung bezieht sich auch auf eine immunogene Zusammensetzung, welche als wirksames immunogenes Mittel mindestens eines der hierin beschriebenen Analoga umfasst, im Gemisch mit einem pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger, Vehikel, Lösungsmittel oder Exzipiens, und wahlweise einem Adjuvans, vgl. auch die Diskussion dieser Dinge in der obigen Beschreibung der Erfindung.

[0256] Außerdem bezieht sich die Erfindung auch auf eine Zusammensetzung zum Induzieren der Produktion

von Antikörpern gegen irgendeines der oben diskutierten Tumorantigene, wobei die Zusammensetzung

- ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurefragment oder einen erfindungsgemäßen Vektor und
- ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Lösungsmittel und/oder Vehikle und/oder Trägerstoff und/oder Exzipiens und/oder Adjuvans

umfasst.

[0257] Die Formulierung und andere spezifische Einzelheiten, die solche Zusammensetzungen betreffen, sind in dem relevanten Teil oben diskutiert, der die Nukleinsäure-Immunisierung betrifft.

BEISPIEL 1

Vakzinierung gegen PSM

[0258] Im Folgenden wird beschrieben, wie ein humanes Autovakzin gegen PSM durch Modifikation des Moleküls durch Insertion von einer oder mehreren gemischten fremden T-Zell-Epitopen entwickelt werden kann um eine Reihe von immunogenisierten PSM-Molekülen hervorzubringen.

[0259] Die Konstrukte werden auf ihre Fähigkeit getestet, spezifische CTL-Antworten gegen PSM-enhaltende Tumorzellen zu induzieren. Außerdem werden die Konstrukte auf ihre Fähigkeit getestet, Antikörper zu induzieren, welche mit den nativen Teilen des PSM-Moleküls kreuzreagieren. Anschließend wird in mehreren in vitro-Assays und in vivo-Tiermodellen die Wirksamkeit der unterschiedlichen Konstrukte ermittelt. Die induzierten Antikörper werden auf ihre Fähigkeit getestet, Komplement über den klassischen Weg zu induzieren und ADCC über Fc-Rezeptoren zu initiieren. Schließlich werden die unterschiedlichen Moleküle in Tiermodellen für humanen Prostatakrebs getestet.

Strategie beim Gestalten eines PSM-Autovakzins

[0260] Kurz, der PSM-Vakzinierungsplan umfasst die folgenden experimentellen Aufgaben

Gestaltung und Herstellung einer Reihe von humanen PSM-Mutanten

- Klonierung der PSM-Sequenzen aus Menschen und Ratten/Mäusen.
- Mutationsarbeit zum Erzeugen immunogenisierter hPSM-Moleküle.
- Expression von Wildtyp- und immunogenisierten hPSM-Molekülen in E. coli und/oder Pichia pastoris und/oder Säugerzellen und/oder Insektenzellen (wie der S₂-Zelllinie).
- Reinigung, Rückfaltung und Charakterisierung der immunogenisierten hPSM-Moleküle.

DNA-Vakzinierung gegen PSM

- Erzeugung von hPSM-DNA-Vakzinierungs-Vektoren, die für immunogenisierte hPSM-Moleküle codieren.
- Testen der hPSM-Vakzinierungs-Vektoren in in vitro- und in vivo-Experimenten.

Auswahl von hPSM-Kandidaten

- Immunisierung von Mäusen/Kaninchen.
- ELISA.
- FACS-Analyse.
- Im Falle einer Antikörper-Antwort: Tumorzell-Proliferations-Assay.
- T-Zell-Assays.

Testen der hPSM-Mutanten in vivo

- Tumor/Metastasen-Modell in Mäusen

Konzeptstudie: CTL-Induktion durch Autovakzinierung

- Konstruktion von immunogenisierten Mäusen-/Ratten-PSM, entsprechend den ausgewählten hPSM-Kandidaten (z.B. in Form von DNA-Vakzinen).
- Testen der Immunantwort, die bei Mäusen/Ratten-PSM-Mutanten in in vitro-Assays hervorgerufen wird:

Immunchemische Assays, ELISA, FACS-Analyse, zelluläre Assays, Komplementlyse von PSM-tragenden Zellen, ADCC-Assay, CTL-Aktivitäts-Assay, Tumorzell-Proliferations-Assay, T-Zell-Präsentations-Assays.
– Testen der mPSM-Mutanten in vivo in einem Tumor/Metastase-Modell in Mäusen.

Nomenklatur der hPSM-Konstrukte

[0261] PSM ist ein Typ II-Membranprotein von 750 Aminosäuren Länge, vgl. SEQ ID NO:2, welches die Wildtyp-Sequenz wiedergibt, mit der Ausnahme, dass Trp an Position 2 aufgrund der Einführung einer NcoI-Schnittstelle und einer Kozak-Sequenz in SEQ ID NO:1 durch Gly ersetzt ist, wobei tgg an Positionen 4-6 durch ggt ersetzt ist. Natives PSM (d.h. PSM mit einem Trp an Position 2) wurde jedoch ebenfalls für einige humane PSM-basierte Autovakzin-Konstrukte verwendet.

[0262] In PSM macht der extrazelluläre Teil die 707 C-terminalen Aminosäuren aus, während vorausgesagt ist, dass die cytoplasmatische Domäne 19 Aminosäuren lang ist und der Transmembranteil des Proteins aus 24 Aminosäuren besteht (As 20-43).

[0263] Als Ausgangspunkt für die Konstrukte wurde die Splicevariante PSM' verwendet. Unsere Version dieser Splicevariante besitzt die Aminosäuresequenz, die den Resten 58-750 in SEQ ID NO:2 entspricht. Zur Erleichterung der Nomenklatur wurden die Regionen in PSM' entsprechend der Nummerierung in PSM nummeriert (was bedeutet, das z.B. Region 2 aus Aminosäuren 87-108 in PSM und Aminosäuren 30-51 in PSM' besteht), vgl. auch die untenstehende Diskussion der Regionen.

[0264] Alle genetischen Konstrukte von humanem PSM sind als hPSM__ bezeichnet (oder hPSM'__, wenn PSM' als Ausgangspunkt verwendet wurde), wobei der erste _ die Insertionsregion ist, die zur Insertion von P2 verwendet wurde, und der zweite _ die Insertionsregion ist, die für P30 verwendet wurde. Wenn P2 oder P30 nicht im Protein vorhanden sind, ist die Zahl 0 (null) angegeben. Der Volllängen-Wildtyp von hPSM wird als hPSM0.0 bezeichnet, und das Wildtyp-hPSM, dem die cytoplasmatischen und Transmembran-Teile fehlen, wird hPSM±0.0 bezeichnet. Die 13 geplanten immunogenisierten hPSM-Gene, welche alle ein P2-Epitop und ein P30-Epitop enthalten, werden hPSM1.1, hPSM6.1, hPSM8.1, hPSM10.1, hPSM1.6, hPSM1.8, hPSM1.10, hPSM1.2, hPSM1.3, hPSM1.5, hPSM2.1, hPSM3.1, hPSM10.3, hPSM6.3, hPSM'10.3, hPSM'6.3, hPSM8.3, hPSM'8.3 und hPSM5.1 genannt, vgl. die untenstehenden Details.

[0265] In hPSM1.1 sind beide Epitope, P2 und P30, aufeinanderfolgend in der Insertionsregion No. 1 (der Membran-überspannenden Region) eingefügt. Theoretisch kann diese Mutante, hPSM1.1, als ein sehr attraktiver Vakzin-Kandidat zur Induktion der Antikörperproduktion angesehen werden, da die vollständige extrazelluläre Domäne dieses Moleküls intakt ist. Zur Induktion von CTL-Antworten unter Verwendung der Nukleinsäure-Immunisierung werden Konstrukte, wie hPSM10.3 und hPSM6.3 für nützlich gehalten.

[0266] Um die Klonierungs- und Mutagenese-Verfahren zu erleichtern, wird viel von der molekularen Konstruktionsarbeit durchgeführt, indem entweder der N-terminale (Aminosäuren 1-436) oder der C-terminale (Aminosäuren 437-750) Teil des hPSM-Gens als Ausgangsmaterial verwendet wird. Diese zwei Teile des hPSM-Gens werden hPSMI__ und hPSMII__ genannt, wobei der erste _ die Insertionsregion ist, die für P2 verwendet wurde, und der zweite _ die Insertionsregion ist, die für P30 verwendet wurde. Wiederum ist, wenn P2 oder P30 nicht im Protein vorhanden sind, die Nummer 0 (null) angegeben, und die Wildtypen werden hPSMI0.0 und hPSMII0.0 genannt. Eine besondere Variante von hPSMI0.0 ohne den cytoplasmatischen Teil von hPSM wird hPSMI±0.0 genannt.

[0267] In der Praxis wird die meiste Mutagenesearbeit durchgeführt, indem hPSMI0.0 und hPSMII0.0 als Ausgangsmaterial verwendet werden.

[0268] Die exprimierten mutierten hPSM-Proteine werden PROS__ genannt, wobei der erste _ die Insertionsregion ist, die für die Insertion von P2 verwendet wurde, und der zweite _ die Insertionsregion ist, die für P30 verwendet wurde. Wenn P2 oder P30 nicht in dem Protein vorkommen, ist die Nummer 0 (null) angegeben. Das Wildtyp-hPSM wird PROS0.0 genannt.

[0269] PROSII0.0 ist das Proteinprodukt mit den hPSM-Aminosäuren 437-750. HIS-getaggte Proteine werden HIS-PROS__ genannt. Als HIS-tags wurden SEQ ID NO:21 zur Expression in Hefen und Bakterien verwendet, während SEQ ID NO:23 zur Expression in Säugerzellen verwendet wurde.

Klonierung der humanen PSM-Sequenz

[0270] Die LNCaP-Zelllinie, welche von einer metastatischen Läsion eines humanen Prostata-Adenokarzinoms stammt, wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. mRNA wurde von dieser Zelllinie isoliert und unter Verwendung eines Standard-Kits revers transkribiert um eine cDNA zu erhalten, die die humane PSM-Sequenz codiert. Unter Verwendung von unterschiedlichen Sätzen von hPSM-spezifischen Primern wurden PCR-Produkte, die für PSM (437-750) codieren, erhalten, und weiter in pUC19 kloniert (Plasmid Nummer pMR300), und durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Dieser C-terminale Teil des Wildtyps-PSM wird hPSM Teil II (hPSMII0.0) genannt. Ganz ähnlich wurde der Wildtyp-hPSM-Teil I (hPSMI0.0) in pUC19 kloniert, und zwar unter Verwendung von Primern zur Amplifikation von Teil I, sowohl mit (hPSMI0.0) und ohne (hPSMI÷0.0), die Transmembran und cytoplasmatische Domänen. Die Klone wurden zur Kontrolle sequenziert und hPSMI0.0 und hPSMII0.0 wurden unter Verwendung der Ligation an der EcoRI-Schnittstelle fusioniert. Die daraus hervorgehenden Klone von hPSM0.0 (SEQ ID NO:2) und hPSM÷0.0 wurden in eine Reihe von pro- und eukaryontischen Expressions-Vektoren subkloniert und wiederum die Sequenz verifiziert. Die intrazellulär exprimierte Form von humanem PSM (als hPSM' bezeichnet – Aminosäuren 58-750 von SEQ ID NO:2) wurde ebenfalls konstruiert, indem die cDNA als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Diese Sequenz wurde ebenfalls in Säuger-Expressions-Vektoren subkloniert und wurde als Ausgangsmaterial für einige hPSM-Autovakzin-Konstrukte verwendet, z.B. hPSM'10.3 und hPSM'6.3.

Klonierung der Ratten- und Maus-PSM-Sequenzen

[0271] Zwei EST ("expressed sequence tag")-Klone, die Maus-PSM-cDNA-Sequenzen (aus fötaler Mäuse-niere bzw. Maus-Makrophagen) enthielten, wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Zusammen deckten diese ESTs die Maus-PSM-cDNA-Sequenz ab, und daher wurden sowohl Voll-längen-Maus-PSM (SEQ ID NO:7 und 8) als auch Maus-PSM' (SEQ ID NO:9 und 10) in bakterielle Vektoren und Säuger-Expressions-Vektoren subkloniert. Maus-PSM-AutoVac-Konstrukte wurden ebenfalls durch Insertion von P30 in die Maus-PSM-cDNA erzeugt.

Expression von Wildtyp-hPSM in E. coli

[0272] Der C-terminale Teil (Aminosäuren 437-750) von hPSM, hPSMII0.0, wurde in den bakteriellen Expressions-Vektor pET28b kloniert um ein Produkt mit einem N-terminalen Poly-Histidin (HIS)-Schwanz zu erhalten, welcher eine einfache Reinigung in großem Maßstab und die Identifikation mit anti-Poly-HIS-Antikörpern erleichtert. Das Proteinprodukt von Poly-HISgetagtem hPSMII0.0 (das Proteinprodukt wurde als HIS-PROSII0.0 bezeichnet) wurde in E. coli exprimiert.

[0273] Die DNA, die für das verkürzte humane Wildtyp-PSM hPSM÷cyt0.0 codiert, wurde ebenfalls von pET28b im E. coli-Stamm BL21 (DE3) exprimiert, wobei das Expressionsprodukt sich in Einschlusskörperchen befindet. Die SDS-PAGE-Analyse von bakteriellem Lysat zeigte ein Produkt mit der erwarteten Wanderung und die Western-Blot-Analyse mit Kaninchen-anti-HIS-PROSII0.0 ergab ebenfalls die erwartete Bande. Außerdem ergab die N-terminale Sequenzierung von fünf Aminosäuren dieses Produktes, welches aus einem SDS-PAGE-Gel eluiert wurde, die erwartete Aminosäuresequenz.

[0274] Die Wildtyp-hPSM-Konstrukte hPSM0.0, hPSM÷0.0 (sowie zwei hPSM-Mutanten, hPSM1.1 und hPSM6.1, siehe unten) wurden in verschiedene E. coli-Expressions-Vektoren kloniert um eine möglichst effiziente Expression und zu gewissem Ausmaß die Faltung der rekombinanten Proteine in E. coli zu ermöglichen. Die ausgewählten Expressionssysteme sind:

pMCT6, welches N-terminal His-getaggte Versionen der exprimierten rekombinanten Proteine erzeugt, pGH433, welches die rekombinanten Proteine in Verbindung mit einer 22 Aminosäuren langen pe1B-Leitsequenz exprimiert, welche das Protein in den periplasmatischen Raum der E. coli-Bakterien leiten soll, und pMa1-p2, in dem rekombinante Proteine als C-terminale Fusionen mit Maltosebindendem Protein (MBP) exprimiert werden, die die natürliche periplasmatische MBP-Leitsequenz enthalten. Antikörper gegen MBP können zur Detektion der Fusionsproteine verwendet werden, und eine Kohlenhydrat-gekoppelte Säule kann zur Affinitätsaufreinigung des Produkts verwendet werden.

[0275] Die E. coli-Expressionsexperimente der Wildtyp-hPSM-Proteine von diesen Vektoren zeigten jedoch nur einen geeigneten Expressionslevel bei pMCT6. Die Probleme bei dem Erhalten einer periplasmatischen Expression der Wildtyp-hPSM-Proteine sind derzeit noch immer nicht gelöst.

Expression von Wildtyp-hPSM in *Pichia pastoris*

[0276] Aufgrund des relativ hohen Molekulargewichts des PSM-Proteins und seinem relativ hohen Grad der Glykosylierung (ungefähr 16% des Molekulargewichts), und um die Reinigung durch Auslassen des Rückfaltungsschritts zu erleichtern, wurde entschieden, eine alternative Technologie zur eukaryontischen Expression der rekombinanten Proteine zu entwickeln. Mehrere gut charakterisierte eukaryontische Expressionssysteme wurden untersucht, und für das anfängliche Screening von hPSM-Mutanten wurde die Hefe *Pichia pastoris* als Alternative zur *E. coli*-Expression ausgewählt.

[0277] Ein Expressionssystem, das auf der Hefe *Pichia pastoris* basiert, wurde an die PSM-Konstrukte angepasst. Das Glykosylierungsmuster von rekombinanten Proteinen, die in diesem Organismus exprimiert werden, spiegelt der Erwartung nach das Säuger-Glykosylierungsmuster besser als z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* wider, und zwar aufgrund einer geringeren verzweigten Mannosylierung des rekombinanten Proteins. Es wurde gezeigt, dass die Mannose-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigenen durch dendritische Zellen zu einer ungefähr 100fach effizienteren Präsentation gegenüber T-Zellen führt, verglichen mit der Endozytose-Aufnahme aus der Flüssigphase. Daher kann die Mannosylierung eine Rolle bei der Antigenizität der hPSM-Mutanten und anderer Antigene, gegen welche eine CTL-Antwort erwünscht ist (und insbesondere in Bezug auf die Fähigkeit, eine CTL-Antwort zu induzieren) spielen.

[0278] Ein Stamm von *Pichia pastoris* sowie zwei unterschiedliche Expressions-Vektoren wurden von Invitrogen bezogen. Der Vektor pPICZαA trägt einen Methanol-induzierbaren Promotor stromaufwärts der Polyklonierungsstelle, während der pGAPZαA-Vektor Proteine konstitutiv exprimiert. Beide Vektoren codieren für das Sekretionssignal des α-Faktors um die rekombinanten Proteine in das Medium zu exportieren. Das Selektionssystem dieser Vektoren ist Zeozin-Resistenz. Die Sequenzen, die für hPSM0.0 und hPSM±0.0 (sowie eine hPSM-Mutante, hPSM1.1, vgl. unten) codieren, wurden in diese Vektoren subkloniert (im Leserahmen mit einem C-terminalen c-myc-Epitop zur Identifikation, SEQ ID NO:27).

[0279] Vier *Pichia pastoris*-Stämme (X-33, SMD1168, GS115 und KM71), die z.B. im Hinblick auf ihre Wachstumserfordernisse unterschiedlich sind, wurden mit jedem von diesen (linearisierten) Plasmiden unter Verwendung der Elektroporation transformiert. Das Transformationsverfahren wurde mehrere Male wiederholt mit geringen Veränderungen um eine große Anzahl von Zeozin-resistenten Klonen zu erhalten. Es wurde die Expression von Wildtyp-hPSM±0.0 (sowie von hPSM1.1, siehe unten) in dem *Pichia pastoris*-System erreicht. Die exprimierten Produkte konnten in Western-Blots von Lysaten von *Pichia pastoris*-Transformanten detektiert werden, sowohl unter Verwendung eines monoklonalen anti-hPSM-Antikörpers als auch eines monoklonalen anti-c-myc-Antikörpers als primärem Antikörper. Die rekombinanten Produkte wurden jedoch intrazellulär detektiert.

Expression von Wildtyp-hPSM in Säugerzellen

[0280] Ein Expressionssystem unter Verwendung von CHO ("chinese hamster ovary")-Zellen wird ebenfalls für das finale Testen und die Produktion ausgewählter Moleküle implementiert.

[0281] Bisher wurden CHO-Zellen mit Wildtyp-hPSM und hPSM1.1 mit/ohne im Leserahmen gelegene Leitsequenz im Säuger-Expressions-Vektor pcDNA3.1 transfiziert. Geneticin-resistente Zellen wurden erhalten. In COS-Zellen, die transient mit denselben Konstrukten transfiziert wurden, wurde sowohl hPSM0.0 als auch hPSM1.1 im Western-Blot von Zellpellets detektiert, und zwar unter Verwendung von monoklonalem anti-hPSM-Antikörper.

Gewebeverteilung von hPSM

[0282] Ein kommerzieller Kit wurde bezogen um zu bestimmen, ob die hPSM-Expression in verschiedenen humanen Geweben detektiert werden kann, einschließlich Prostata, Blut und Gehirn. Dieses Verfahren basiert auf einer dot-blot-Detektion von polyA-enthaltender mRNA, die aus 50 unterschiedlichen humanen Geweben extrahiert wurde. Vorläufige Ergebnisse zeigen keine Hyperexpression von hPSM in Geweben, wie Blut oder Gehirn, an. Nach dem Prioritätstag der vorliegenden Anmeldung haben andere jedoch die Anwesenheit von PSM in anderen Geweben nachgewiesen, vgl. oben.

Gestaltung der hPSM-Mutanten

[0283] Beim Gestalten der Mutationsarbeit von PSM ist es wichtig, einige Regionen des Proteins in den mo-

difizierten Konstrukten zu erhalten, z.B. potentielle und identifizierte T-Zell-Epitope, B-Zell-Epitope und Disulfidbrücken-Cystein-Reste. Daher wurden solche "verbotenen" Regionen innerhalb der PSM-Sequenz identifiziert, was eine begrenzte Anzahl von "offenen" Regionen von 20 Aminosäuren oder mehr übriglässt, die zum Austausch mit den fremden T-Helfer-Epitopen P2 und/oder P30 zur Verfügung stellen. Per definitionem wird die Transmembranregion ebenfalls als "offene" Region angesehen, da Autoantikörper, die gegen diese Region gerichtet sind, irrelevant sind, und man glaubt, dass das Entfernen dieser Sequenz die Löslichkeit der mutierten PSM-Proteine erhöht, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Region wichtige CTL-Epitope enthält, daher das Bewahren der Transmembranregion, z.B. in hPSM10.3.

[0284] Entsprechend unserer Erwartung, dass das Autovakzin eine CTL-Antwort hervorrufen wird, wäre es wichtig, möglicherweise subdominante CTL-Epitope in den Konstrukten zu identifizieren und zu bewahren. Zwei solcher Epitope sind schon aus der Literatur bekannt: 1) das Peptid, das die PSM-Aminosäuren 4-12 (LLHETDSAV) umfasst, kann auf dem humanen MHC-Klasse I-Molekül HLA-A2.1 präsentiert werden (Tjoa 1996) und 2) das PSM (711719) (ALFDIESKV) bindet ebenfalls an HLA-A2.1 (Ref. 25). Wir haben auch die PSM-Aminosäuresequenz durchgesucht um primäre Ankersequenzen von HLA-Klasse I-Bindemotiven zu identifizieren, wie von Rammensee et al. (Rammensee, 1995) für die häufigsten HLA-Klasse I-Typen beschrieben (HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A23, HLA-A24 und HLA-A28), die zusammen 80% der HLA-A-Typen der humanen Population ausmachen. Gleichmaßen wurden potentielle HLA-B- und HLA-C-Epitope identifiziert und als "verbotene" Bereiche ausgezeichnet.

[0285] Die anfängliche Intention war es, C57/black x SJL F1-Hybridmäuse in dem Falle zu benutzen, dass entschieden wurde, transgenische Mäuse zum Testen der PSM-Autovakzin-Konstrukte zu benutzen. Aufgrund dieser Intention wurden bestimmte potentielle Maus-H-2^b- und H-2^s-T-Helfer-Epitope identifiziert und als "verbotene" Regionen angesehen (Rammensee 1995). Es ist auch wichtig, bestimmte Antikörper-Binde-Regionen in dem PSM-Molekül zu bewahren, da sie bei der Induktion spezifischer Anti-PSM-Autoantikörper wichtig sein könnten. Fünf solcher Regionen wurden schon beschrieben: PSM(63-68), PSM(132-137), PSM(482-487) (WO 94/09820), PSM(716-723) und PSM(1-7) (Murphy, 1996). Unter Verwendung des Computer-basierten Verfahrens von Hopp und Woods für die Vorhersage von Antigen-Determinanten wurden fünf Regionen vorhergesagt: PSM(63-69), PSM(183-191), PSM(404-414), PSM(479-486) und PSM(716-723) (Hopp 1983), wobei einige von diesen mit den experimentell gefundenen B-Zell-Epitopen überlappen. Diese Regionen werden ebenfalls in den PSM-Vakzin-Kandidatenmolekülen bewahrt.

[0286] Das PSM-Protein enthält 4 Cystein-Reste (Aminosäure-Positionen 22, 196, 466 und 597), welche in den immunogenisierten Konstrukten aufgrund ihrer potentiellen Wichtigkeit bei der Bildung von Disulfidbrücken bewahrt werden.

[0287] Basierend auf den oben erwähnten "verbotenen" und "offenen" Regionen in dem hPSM-Protein wurden 10 Regionen identifiziert, die sich zur Insertion fremder T-Helfer-Epitope eignen:

Insertionsregionen in hPSMI (von der Initiationsstelle bis zur EcoRI-Schnittstelle, As. 1-437):

Region 1: As. 16-52 in PSM (4 As. vor TM, TM (24 As.) und 9 As. nach TM = 37 As.)

Region 2: As. 87-108 in PSM, As. 30-51 in PSM' (22 As.)

Region 3: As. 210-230 in PSM, As. 153-173 in PSM' (21 As.)

Region 4: As. 269-289 in PSM, As. 212-232 in PSM' (21 As.)

Region 5: As. 298-324 in PSM, As. 241-267 in PSM' (27 As.)

[0288] Insertionsregionen in hPSMII (von der EcoRI-Schnittstelle bis zur Terminationsstelle, As. 437-750):

Region 6: As. 442-465 in PSM, As. 385-408 in PSM' (24 As.)

Region 7: As. 488-514 in PSM, As. 431-457 in PSM' (27 As.)

Region 8: As. 598-630 in PSM, As. 541-573 in PSM' (33 As.)

Region 9: As. 643-662 in PSM, As. 586-605 in PSM' (20 As.)

Region 10: As. 672-699 in PSM, As. 615-642 in PSM' (28 As.)

[0289] Die Insertionsregionen sowie die "verbotenen" Regionen sind graphisch in [Fig. 4](#) wiedergegeben.

[0290] Eine Reihe unterschiedlicher immunogenisierter PSM-Konstrukte wird durch Substitution eines Segmentes von Aminosäuren aus zwei der oben aufgeführten Insertionsregionen durch P2 oder P30 hergestellt. Jedes mutierte Protein wird daher sowohl P2 als auch P30 enthalten, obwohl solche Konstruktionen nur beispielhaft wiedergegeben sind – einzelne Mutanten liegen ebenso im Umfang der vorliegenden Erfindung. Experimentell werden die Mutationen in Klonen von hPSMI- bzw. hPSMII-cDNA vorgenommen, und die zwei mutierten Teile werden anschließend durch Ligation kombiniert (an der EcoRI-Schnittstelle). Die P2- und P30-Epi-

tope wurden zuvor in die Insertionsregionen 1, 2, 3, 5, 6, 8 und 10 inseriert um diese Mutanten zu kreieren.

[0291] Die Sequenzen von P2 und P30 sind:

P2: QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:12, 15 As.), in diesem Fall codiert von der Nukleotidsequenz

cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc **gag ctg**

(SEQ ID NO:11, 45 Nukleotide), wobei die fettgedruckte Sequenz eine SacI-Schnittstelle ist. Es kann auch eine andere Kodonauswahl auftreten, abhängig von der Wahl des Klonierungsvektors und des Expressionssystems.

P30: FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO:14, 21 As.), in diesem Fall codiert von der Nukleotidsequenz

ttc aac aac ttc acc gta **agc ttc** tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc **gCT AGC**

cac ctg gaa

(SEQ ID NO:13, 63 Nukleotide), wobei Fettdruck eine HindIII-Schnittstelle, einzelne Unterstreichung eine Eco47III-Schnittstelle, Großbuchstaben eine BstNI-Schnittstelle anzeigen, und die doppelte Unterstreichung eine NheI-Schnittstelle anzeigt.

[0292] Die folgende Tabelle fasst die humanen PSM-Konstrukte, die hierin verwendet wurden, zusammen:

Konstrukt	P2-Position in Protein	P30-Position in Protein
hPSM0.0	÷	÷
hPSM÷0.0	÷	÷
hPSM'0.0	÷	÷
hPSM1.1	17-31	32-52
hPSM6.1	448-462	21-41
hPSM8.1	606-620	21-41
hPSM10.1	674-688	21-41
hPSM1.6	24-38	443-463
hPSM1.8	24-38	607-627
hPSM1.10	24-38	673-693
hPSM1.2	24-38	87-107
hPSM1.3	24-38	210-230
hPSM1.5	24-38	301-321
hPSM2.1	91-105	21-41
hPSM3.1	213-227	21-41
hPSM5.1	305-319	21-41
hPSM8.0	606-620	÷
hPSM10.0	674-688	÷
hPSM0.1	÷	21-41
hPSM1.0	24-38	÷
hPSM6.3	448-462	210-230
hPSM8.3	606-620	210-230
hPSM10.3	674-688	210-230
hPSM'6.3	391-405	153-173
hPSM'8.3	549-563	153-173
hPSM'10.3	617-631	153-173

Molekulare Konstruktionen der hPSM-Mutanten

[0293] Mutationen zum Einfügen der codierenden Sequenzen von P2 und P30 wurden vorgenommen, indem sowohl hPSMI0.0 als auch hPSMII0.0 als Ausgangsmaterial verwendet wurden.

[0294] Um die Mehrheit der hPSM-Mutanten zu erzeugen, wurden P2 und P30 anfänglich in hPSMI0.0 an der Insertionsposition 1 eingefügt. Das daraus hervorgehende Material (hPSMI1.0 und hPSMI0.1) wurde anschließend als Ausgangsmaterial für die Mutagenese zum Einfügen von P2 und P30 an Positionen 2, 3 und 5 und zur Ligation mit dem Epitop-mutierten hPSMII verwendet. hPSMI1.0 wurde konstruiert, indem SOE ("single overlap extension")-PCR verwendet wurde und anschließend die Sequenz verifiziert wurde. hPSMI0.1 wurde konstruiert, indem die "Quick Change"-Technik verwendet wurde, und die Sequenz anschließend verifiziert wurde.

[0295] Das P2-Epitop wurde an Positionen 2, 3 und 5 von hPSMI1.0 unter Verwendung von SOE-PCR zum Kreieren von hPSMI1.2, hPSMI1.3 und hPSMI1.5 insertiert. Diese Konstruktionen wurden mit hPSMII0.0 zum Kreieren von hPSM1.2, hPSM1.3 und hPSM1.5 kombiniert.

[0296] hPSMI2.1, hPSMI3.1 und hPSMI5.1 wurden durch SOE-PCR unter Verwendung von hPSMI0.1 als Ausgangsmaterial konstruiert. Dieses Material wurde durch Ligation an der Eco-RI-Schnittstelle mit hPSMII0.0 zusammengesetzt um die Volllängen-Mutanten hPSM2.1, hPSM3.1 und hPSM5.1 zu kreieren.

[0297] Das P2-Epitop wurde an drei unterschiedlichen Positionen von hPSMII0.0 insertiert um hPSMII6.0, hPSMII8.0 und hPSMII10.0 zu kreieren, und zwar unter Verwendung der "Quick Change"-Technik, und die Sequenz dieser Klone wurde anschließend verifiziert.

[0298] Anschließend wurde hPSMI0.1 mit hPSMII6.0, hPSMII8.0, hPSMII10.0 unter Erhalt von hPSM6.1, hPSM8.1 und hPSM10.1 ligiert, und die Sequenz der Klone wurde verifiziert.

[0299] Die Insertion des P30-Epitops in hPSMII wird derzeit vorgenommen um hPSMII0.6, hPSMII0.8 und hPSMII0.10 unter Verwendung der SOE-PCR zu erzeugen.

[0300] hPSM1.1 wurde konstruiert, indem zwei Zwei-Schritt-PCR-Mutationen verwendet wurden, gefolgt von der Ligation an einer HindIII-Schnittstelle innerhalb der Epitopsequenz. Die Sequenz des Volllängenkonstrukts wurde verifiziert.

[0301] hPSM10.3, hPSM'10.3 und hPSM6.3 wurden konstruiert unter Verwendung der SOE-PCR. Mehrere andere hPSM-Varianten mit sowohl P2 als auch P30, die im extrazellulären Teil von hPSM eingefügt wurden, werden derzeit konstruiert (hPSM'6.3, hPSM8.3, hPSM'8.3).

[0302] Zusätzlich zu den ursprünglich angedachten Mutanten, von denen jede sowohl P2 als auch P30 enthält, wurden vier Mutanten konstruiert, welche lediglich ein einzelnes fremdes Epitop enthalten, und deren Sequenz wurde verifiziert: hPSM1.0, hPSM8.0, hPSM10.0 und hPSM0.1.

Expression von hPSM-Mutanten in E. coli

[0303] In Experimenten im kleinen Maßstab wurden sieben hPSM-Mutanten, hPSM1.1, hPSM6.1, hPSM8.1, hPSM10.1, hPSM2.1, hPSM3.1 und hPSM5.1 von pET28b in dem E. coli-Stamm BL21(DE3) exprimiert, und IPTG-induzierbare Produkte der erwarteten Größe wurden in Coomassie Blau-gefärbten SDS-PAGE-Gelen identifiziert. Ein Produkt von hPSM1.1 war jedoch nicht detektierbar. Die Expressionsspiegel dieser hPSM-Mutanten waren, verglichen mit dem Produkt des Wildtyp-Konstruktes hPSM÷0.0, sehr gering. An dieser Stelle scheint ein vernünftiger Grad an Expression der hPSM-Mutanten unter Verwendung des pET-Systems in E. coli unmöglich zu sein, und die Verwendung von anderen E. coli-Expressionssystemen und/oder anderen Wirtsorganismen ist daher notwendig.

[0304] Wie oben erwähnt, wurden hPSM6.1 und hPSM1.1 in unterschiedliche E. coli-Expressions-Vektoren subkloniert um Folgendes zu erzeugen:

- N-terminal His-getaggte Versionen der exprimierten rekombinanten Proteine unter Verwendung des Vektors pMCT6,
- Versionen der Proteine, die mit der pelB-Leitsequenz zusammen exprimiert werden, welche das Protein in den periplasmatischen Raum der E. coli-Bakterien leitet, und zwar unter Verwendung des Vektors

pGH433, und

– Versionen der rekombinanten Proteine, die als C-terminales Fusionsprotein mit Maltose-Bindungsprotein (MBP) exprimiert werden, und zwar unter Verwendung des Vektors pMal-p2.

[0305] Bisher wurde kein ausreichender Expressionsspiegel von irgendeinem dieser Konstrukte erreicht.

[0306] Da hPSM0.0 einigermaßen in *E. coli* exprimiert wird, während ein ähnlicher Expressionsspiegel des Volllängen-hPSM0.0 oder der hPSM-Mutanten nicht beobachtet wurden, ist es möglich, dass die Anwesenheit des cytoplasmatischen Teils des hPSM-Moleküls die Expression der Volllängen-hPSM-Konstrukte in *E. coli* irgendwie "inhibiert". Um diese Hypothese zu testen, haben wir zunächst zwei genetische Konstrukte von hPSM1.1 und hPSM6.1 ohne cytoplasmatische Domänen erstellt. In *E. coli*-Expressionsexperimenten ergab sich jedoch lediglich eine schwache Expression dieser +cyt-Genprodukte.

Expression von hPSM-Mutanten in *Pichia pastoris*

[0307] Um das mutierte hPSM1.1-Protein in der Hefe *Pichia pastoris* zu exprimieren, wurde die hPSM1.1-Sequenz (im Leserahmen mit einem C-terminalen c-myc-Identifikations-Epitop, SEQ ID NO:27) in die zwei unterschiedlichen Expressionsvektoren pPICZαA und pGAPZαA subkloniert, und deren Sequenzen wurden verifiziert. hPSM1.1-Expression (sowie die von hPSM±0.0, siehe oben) wurde intrazellulär in den *Pichia pastoris*-Transformanten detektiert.

Expression von hPSM-Mutanten in Säugerzellen

[0308] Wie oben erwähnt, wurde hPSM1.1 in die Säuger-Expressions-Vektoren pcDNA3.1(+) und pZeoSV2 subkloniert, und diese Konstrukte (und andere) können für die Expression in z.B. CHO-Zellen verwendet werden. Die transiente Expression von hPSM1.1 sowie hPSM0.0 wurde in COS-Zellen erreicht, verifiziert durch Western-Blot.

DNA-Vakzinierung

[0309] Die DNA-Vakzinierung wäre, wenn sie wirksam ist, für das PSM-Autovakzin sehr geeignet – insbesondere, da gezeigt wurde, dass diese Verabreichungsform sowohl CTL-vermittelte Immunantwort als auch Antikörperproduktion fördert. Daher bestand die Absicht, eine Parallelstudie mit dem Ziel durchzuführen, die Auswirkung der DNA-Vakzinierung von Mäusen mit geeigneten Vektoren, die für immunogenisiertes Maus-Ubiquitin und/oder Maus-TNFα codieren, zu untersuchen. Die DNA-Vakzinierung mit nackter DNA, die hPSM (und/oder Mutanten) codiert, wird ebenfalls durchgeführt.

Machbarkeits-Studie unter Verwendung von immunogenisiertem Ubiquitin zur DNA-Vakzinierung

[0310] Eine Machbarkeits-Studie, die die Auswirkung der DNA-Vakzinierung mit einem immunogenisierten Selbst-Protein feststellt, wurde unter Verwendung von Ubiquitin mit einem eingefügten T-Helfer-Epitop von Ovalbumin (UbiOVA) als Modellprotein durchgeführt. Die Sequenzen, die für UbiOVA sowie für Wildtyp-Ubiquitin codieren, wurden in den Mäuse-Expressions-Vektor pcDNA3.1(-) subkloniert.

[0311] Gruppen von 5 BALB/c-Mäusen wurden mit 40 µg pcDNA-UbiOVA oder pcDNA-Ubiquitin-Konstrukten, entweder intramuskulär in den Quadrizepsmuskel oder intradermal, immunisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt UbiOVA-Protein in vollständigem Freund'schem Adjuvans. Drei und sechs Wochen später wurden die Immunisierungen wiederholt, mit dem einzigen Unterschied, dass das UbiOVA-Protein in unvollständigem Freund'schem Adjuvans emulgiert war.

[0312] Den Mäusen wurde gewöhnlich Blut entnommen und die Titer von Anti-Ubiquitin-Antikörper wurden bestimmt. In den DNA-vakzinieren UbiOVA-Gruppen wurden nur sehr schwache Anti-Ubiquitin-Antikörpertiter erzielt. Anschließend wurden allen Gruppen Booster-Impfungen mit UbiOVA-Protein in unvollständigem Freund'schem Adjuvans verabreicht, und es wurde Blut entnommen um zu bestimmen, ob die DNA-Vakzinierung mit UbiOVA (und nicht Ubiquitin) die Antikörperantwort gegen das UbiOVA-Protein verstärken konnte. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den UbiOVA-Gruppen und den Kontrollgruppen gab, alle Mäuse entwickelten nach diesem einzelnen UbiOVA/FIA-Boost starke Anti-Ubiquitin-Antikörper.

DNA-Vakzinierung unter Verwendung von hPSM-Konstrukten

[0313] Derzeit laufen verschiedene DNA-Vakzinierungsexperimente unter Verwendung von hPSM-Konstrukten. Verschiedene humane PSM-Wildtyp- und -AutoVac-Konstrukte (wie beispielsweise hPSM0.0, hPSM±0.0, hPSM'0.0, hPSM1.1, hPSM10.3) wurden in DNA-Vakzinierungsvektoren subkloniert (wie beispielsweise pcDNA3.1(+), pcDNA3.1(-), pVAX und pZeoSV2). Bei einigen dieser Konstrukte wurden andere Leitsequenzen (wie die CD11a-, tPA- und IL-5-Leitsequenzen; SEQ ID NO:29, 25 bzw. 31) direkt N-terminal gelegen und innerhalb des Leserahmens eingefügt um die Sezernierung der exprimierten hPSM-Proteine in vivo zu ermöglichen. Alle Konstruktionen in DNA-Vakzinierungs-Vektoren wurden mittels DNA-Sequenzierung und in vitro-Translation verifiziert.

[0314] Mäusen unterschiedlicher Stämme (wie Balb/cA, Balb/cJ, DBA/2 und A/J) wurden die oben beschriebenen hPSM-DNA-Vakzine entweder intradermal oder intramuskulär injiziert, und ihnen wurden mehrere Male unter Verwendung derselben Konstrukte Booster-Impfungen verabreicht.

[0315] Es wurden Serumproben während der Immunisierungsphase entnommen und bei -20°C gelagert. Diese Proben werden auf Anwesenheit von Antikörpern, die mit dem Wildtyp-hPSM reagieren, analysiert.

[0316] Ebenso werden Assays etabliert um bei diesen Mäusen proliferative CTL- und T-Helfer-Reaktionen zu beobachten.

[0317] Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion von sowohl CTL- als auch Antikörper-Antworten gegen PSM erreicht werden kann.

Reinigung/Charakterisierung von HIS-getaggttem hPSM(437-750) (HIS--PROSII0.0)

[0318] HIS-getaggttes Wildtyp-hPSMII (HIS-PROSII0.0) wurde von pET28b exprimiert, und löslich gemachte Einschlusskörperchen wurden auf eine Gelfiltrations-FPLC-Säule aufgebracht und in einem Puffer eluiert, der 8 M Harnstoff enthielt. Die Fraktionen, die vornehmlich hPSMII enthielten, wurden verschiedenen Rückfaltungs-Bedingungen unterworfen um das Verfahren zu optimieren. Das löslich gemachte Produkt, das gegen Tris-Puffer dialysiert wurde, schätzte man auf mehr als 90% rein, und zwar unter Verwendung von Silber-gefärbtem SDS-PAGE.

[0319] Kaninchen wurden mit dem gereinigten HIS-PROSII0.0 immunisiert um das daraus hervorgehende Antiserum zur späteren Detektion und möglicherweise Affinitätsaufreinigung der hPSM-Mutanten zu verwenden.

Reinigung/Charakterisierung von löslichem hPSM (PROS±0.0)

[0320] Wildtyp-hPSM, dem die cytoplasmatischen und Transmembran-Teile fehlen, PROS±0.0, wurde in dem E. coli-Stamm BL21(DE3) nach der Induktion mit IPTG exprimiert und konnte in Einschlusskörperchen detektiert werden. SDS-PAGE dieses bakteriellen Lysats, gefolgt von Western-Blot mit einem Kaninchen-anti-HIS-PROSII0.0-Antikörper, zeigte ein Produkt mit den erwarteten Wanderungseigenschaften. Die N-terminale Sequenzierung der ersten fünf Aminosäuren dieses Produkts, das aus einem SDS-PAGE-Gel eluiert wurde, zeigte die erwartete Sequenz, die humanem PSM entspricht. Das Produkt wurde einer großen Reihe von Lösungs- und Rückfaltungs-Experimenten unterworfen. Ein Produkt, das in Lösung bleibt, kann in einem Tris-Puffer ohne denaturierende oder reduzierende Mittel erhalten werden, aber eine SDS-PAGE-Analyse zeigt, dass das Material vermutlich große Aggregate bildet. Mäuse und Kaninchen wurden mit diesem Material immunisiert um Antikörper gegen hPSM, z.B. zu analytischen Zwecken, zu erhalten – die Antiseren reagierten nicht mit LNCap-hPSM.

[0321] Eine Charge gewaschener E. coli-Einschlusskörperchen von PROS±0.0 wurde zur Immunisierung von Kaninchen zum Erzeugen eines polyklonalen Antiserums gegen PSM präpariert. Ungefähr 50% des Proteingehalts im nassen, pelletierten Material war PROS±0.0. Die Antiseren reagierten nicht mit LNCap-hPSM im Western-Blot.

Präparation von KLH-konjugierten hPSM-Peptiden zur Immunisierung

[0322] Drei 15mer-Peptide wurden synthetisiert um ein immunogenes Konjugat bekannter hPSM-B-Zell-Epitope mit einem Trägermolekül herzustellen um ein polyklonales Antiserum zu erhalten, welches in der Lage ist,

hPSM zu erkennen. Diese Peptide enthalten das PSM-B-Zell-Epitop plus 5-6 flankierende PSM-Aminosäuren an jedem Ende.

[0323] Die Peptide wurden mittels automatischer Synthese hergestellt, HPLC-gereinigt und unter Verwendung des Edman-Abbaus zur Kontrolle sequenziert.

[0324] Ein chemisch verknüpftes Konjugat wurde durch Kreuzvernetzen des B-Zell-Epitops, das hPSM-Peptid enthält, mit dem KLH präpariert, und zwar unter Verwendung eines standardmäßigen Ein-Schritt-Verfahrens mit Glutaraldehyd als Kreuzvernetzungsmittel.

Synthese von P2- und P30-Peptiden mit flankierenden hPSM-Sequenzen

[0325] Es wurden sechs Peptide gestaltet, welche den P2- und P30-Epitopen mit 5 flankierenden hPSM-Aminosäuren an jedem Ende entsprachen. Die flankierenden Aminosäuren entsprachen den Epitop-Insertionsstellen 6, 8 und 10. Die Peptide werden z.B. in T-Zell-Proliferations-Assays verwendet, aber auch für andere Zwecke, wie ELISA oder andere in vitro-Assays. Die Peptidsequenzen sind:

PSMpep007	P2, insertiert an der hPSM-Insertionsposition 6 <u>Q</u> ERG <u>VQYIKANSKFIGITEL</u> RVDCT (SEQ ID NO:15)
PSMpep008	P2, insertiert an der hPSM-Insertionsposition 8 A <u>VVLRQYIKANSKFIGITE</u> LEMKTY (SEQ ID NO:16)
PSMpep009	P2, insertiert an der hPSM-Insertionsposition 10 M <u>FLERQYIKANSKFIGITEL</u> HVTYA (SEQ ID NO:17)
PSMpep010	P30, insertiert an der hPSM-Insertionsposition 6 N <u>SRLLFNNFTVSFWLRVPKVS</u> ASHLEVDCTP (SEQ ID NO:18)
PSMpep011	P30, insertiert an der hPSM-Insertionsposition 8 V <u>VLRKFNNFTVSFWLRVPKVS</u> ASHLESFDSL (SEQ ID NO:19)
PSMpep012	P30, insertiert an der hPSM-Insertionsposition 10 L <u>MFLEFNNFTVSFWLRVPKVS</u> ASHLEPSSHN (SEQ ID NO:20)

[0326] Die P2- und P30-Epitope sind unterstrichen. Die Peptide wurden durch automatische Synthese hergestellt und dem Verfahren der HPLC-Reinigung, gefolgt von einer Kontrollsequenzierung unter Verwendung des Edman-Abbaus, unterzogen.

Immunogenizitäts-Assays

[0327] Unterschiedliche Experimentelle Aufbauten wurden begonnen um Material herzustellen und die Immunogenizitäts-Assays für zukünftige Tests und Auswahl der mutierten PSM-Konstrukte zu etablieren.

Erzeugung polyklonaler Anti-HIS-PRO5II0.0- und Anti-KLH-PSM-Peptid-Konjugat-Antisera

[0328] Zwei Kaninchen wurden mit gereinigtem HIS-PRO5II0.0, dem HIS-getaggtten C-terminalen Teil des hPSM-Proteins (Aminosäuren 437-750), emulgiert 1:1 in vollständigem Freund'schem Adjuvans, immunisiert und mit demselben Antigen, emulgiert in unvollständigem Freund'schem Adjuvans, zweimal eine Booster-Impfung (an Tagen 28 und 55) vorgenommen.

[0329] Zwei Kaninchen wurden mit einem Cocktail, der aus dem KLH-PSM-Peptid-Konjugat plus jedes der drei freien Peptide bestand, immunisiert. Diese drei Peptide enthalten jeweils ein zuvor definiertes B-Zell-Epitop von hPSM. Der Cocktail wurde in vollständigem Freund'schem Adjuvans 1:1 emulgiert. Den Kaninchen wurde zweimal (an Tagen 28 und 55) mit demselben Antigen, emulgiert in unvollständigem Freund'schem Adjuvans, Booster-Impfungen verabreicht.

[0330] Die Kreuzreaktivität zwischen Anti-HIS-PRO5II0.0 und PSMpep005 einerseits und die Kreuzreaktivität zwischen Anti-KLH-PSM-Peptid-Konjugat plus Peptide und HIS-PRO5II0.0 andererseits wurden in ELISA-Assays gezeigt.

[0331] Der Anti-HIS-PROSII0.0-Antikörper hat die Fähigkeit, natives hPSM in Lysaten von LNCaP-Zellen in Western-Blots zu erkennen.

Immunisierung von Mäusen mit retroviral exprimiertem hPSM0.0

[0332] In diesem Stadium des PSM-Projekts ist ein großes Hindernis noch immer der Mangel an Antikörpern, welche in der Lage sind, korrekt gefaltetes natives hPSM zu erkennen. Daher wurde ein Immunisierungsexperiment unter Verwendung von retroviral exprimiertem hPSM0.0 durchgeführt.

[0333] Sechs Gruppen von Balb/c-Mäusen wurden jeweils immunisiert mit: 1) Mitomycin-C-behandelten BALB/c-Fibrosarkomzellen (79.24.H8), transduziert mit hPSM0.0-cDNA (CMV-Koz-hPSM), 2) Mitomycin-C-behandelten BALB/c-Fibrosarkomzellen (79.24.H8), transduziert mit leerem Vektor (CMVBipep), 3) Verpackungszellen (BOSC), transfiziert mit hPSM0.0-cDNA (CMV-Koz-hPSM), 4) Verpackungszellen (BOSC), transfiziert mit leerem Vektor (CMVBipep), 5) Retrovirenstamm, der hPSM0.0-cDNA exprimiert (CMV-Koz-hPSM), oder 6) Retrovirenstamm, leerer Vektor (CMVBipep).

[0334] Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde den Mäusen Blut entnommen, und die erhaltenen Seren wurden im Hinblick auf die Reaktivität im ELISA auf Reaktivität gegen HIS-PROSII0.0 getestet. Leider entwickelte keine der Mäuse Antikörper, die spezifisch die HIS-PROSII0.0-Präparation erkennen.

Etablieren eines Anti-hPSM-ELISA

[0335] Gereinigtes HIS-PROSII0.0 wurde zum Beschichten von Polystyrol-Mikrotiterplatten (Maxisorp) zum Zwecke des Etablierens eines ELISA-Assays verwendet, und zwar zum Testen von z.B. Hybridom-Überständen oder Maus- und Kaninchen-Antiseren. Seren von BALB/c-Mäusen, die mit derselben Präparation von HIS-PROSII0.0 immunisiert worden waren, zeigten Reaktivität gegen das immobilisierte HIS-PROSII0.0 bei 0,5 µg pro Vertiefung, unter Verwendung eines mit Meerrettich-Peroxidase markierten Kaninchen-anti-Maus-Ig als sekundärem Antikörper.

[0336] Wie oben erwähnt, wurde die Fähigkeit eines Antiserums, das in Kaninchen gegen KLH-PSMpep004-PSMpep005-PSMpep006-Konjugats, gemischt mit den freien Peptiden, gezogen wurde, mit immobilisierten HIS-PROSII0.0 zu reagieren, unter Verwendung dieses ELISA-Assays gezeigt.

[0337] Unter Verwendung von AquaBind®-Mikrotiterplatten (vgl. die Offenbarung in WO 94/03530, die unter anderem Mikrotiteroberflächen beschreibt, die mit Tresyl-aktiviertem Dextran beschichtet sind, welche nun unter der registrierten Marke AquaBind vermarktet werden) wurde ein ELISA entwickelt, der immobilisierte PSM-Peptide (PSMpep004, PSMpep005, PSMpep006) verwendet.

[0338] AquaBind®-Platten, die mit diesen Peptiden beschichtet sind, können ein Kaninchen-Antiserum, das gegen dieselbe Präparation von Antigen gezogen wurde, erkennen. Wie oben erwähnt, konnte Kaninchen-anti-HIS-PROSII0.0 auf AquaBind®-Platten, die mit PSMpep005 beschichtet waren, detektiert werden.

Etablieren eines Anti-hPSM-Western-Blots unter Verwendung von LNCaP-Zellen und dem monoklonalen Antikörper 7E11C5

[0339] 7E11C5-B-Zell-Hybridome, welche monoklonalen Maus-IgG2a-Antikörper gegen ein intrazelluläres Epitop von humanem PSM sezernieren, wurden von ATCC bezogen. Kulturüberstände von zu ungefähr 90% toten Zellen wurden gesammelt und im Western-Blot zur Detektion von humanem PSM in sowohl Membran-angereicherten Präparationen von LNCaP-Zellen als auch in LNCaP-Zelllysaten verwendet. Dieser Antikörper wurde unter Verwendung von Protein-G-Säulen gereinigt, und seine Reaktivität mit LNCaP in Western-Blots verifiziert.

Etablieren einer FACS-Methode zum Detektieren von hPSM auf LNCaP-Zellen

[0340] Wir haben zwei voneinander unabhängige FACS-Methoden zum Detektieren von hPSM auf LNCaP-Zellen etabliert. Mehrere Probleme werden angesprochen: Die LNCaP-Zellen wachsen sehr langsam und in unregelmäßigen Klumpen, und daher sollte das Verfahren, Einzelzellsuspensionen herzustellen, optimiert werden. Zweitens wurde in der Literatur definiert, dass das Epitop, das von dem mAb 7E11C5 erkannt wird, sich in der cytoplasmatischen Domäne von hPSM befindet. Daher wurde das Verfahren entwickelt um die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren. Zu diesem Zweck wurde Protein-G-gereinigter 7E11C5-Antikörper

FITC-konjugiert, und dieser konnte daher ohne sekundären Antikörper in der FACS-Analyse verwendet werden.

[0341] Ebenso wurde ein FACS-Verfahren etabliert, das den monoklonalen Anti-hPSM-Antikörper J591 verwendet, welcher ein Epitop auf dem extrazellulären Teil von hPSM erkennt. Der Antikörper wurde von BZL Biologicals bezogen und mit FITC konjugiert und anschließend zur FACS-Analyse und -Sortierung von z.B. LN-CaP-Zellen und hPSM-Transfektanden verwendet (siehe unten).

Etablieren eines Cytotoxizitäts-Assays

[0342] Ein Verfahren zum Reinigen von dendritischen Zellen aus Maus-Knochenmark wurde implementiert. Unter Verwendung von Modellproteinen wurde die Immunisierung von Mäusen mit dendritischen Zellen optimiert, welche in einem Pulsverfahren mit Modell Klasse-I-Peptiden und -Protein konfrontiert wurden. Mäuse wurden auch mit einem Modell-Protein (β -Galactosidase), das in der Form von ISCOMS formuliert war, immunisiert. T-Zellen, die aus immunisierten Mäusen gereinigt wurden, wurden in vitro mit unterschiedlichen Formen des entsprechenden Antigens restimuliert. Die Fähigkeit dieser restimulierten CTLs zum Lysieren unterschiedlicher Arten von Zielzellen (einschließlich der Puls-markierten dendritischen Zellen, sowie Transfektanden, die retroviral-exprimiertes, cytosolisches Klasse-I-Peptid exprimierten) wurde anschließend gemessen. Zwei unterschiedliche in vitro-Assays, die CTL-Aktivität messen, wurden etabliert, entweder unter Verwendung der Chrom-Ausschüttung oder/und der DNA-Fragmentierung (JAM-Verfahren) als Maßstab der Cytotoxizität. Sehr schöne Ergebnisse erhielt man mit dem β -Galactosidase-Modellprotein und mit verschiedenen Kombinationen von MHC-Klasse I und -Klasse II-bindenden Modellpeptiden.

Etablierung von Werkzeugen zum Studieren des Durchbrechens der Autotoleranz gegen Maus-PSM in Mäusen

[0343] Es besteht die Absicht, zu untersuchen, ob die Autotoleranz gegen Maus-PSM in Mäusen durch Immunisierung und/oder DNA-Vakzinierung gegen Maus-PSM unter Verwendung von Maus-PSM-AutoVac-Molekülen durchbrochen werden kann.

[0344] Wie oben erwähnt, wurde eine cDNA, die für Maus-PSM (mPSM) codiert, erhalten und dessen DNA sequenziert. Es werden vier mPSM-Varianten-Moleküle durch Insertion von P30 an wohldefinierten Stellen, entweder im Volllängen-mPSM oder mPSM', erzeugt. Die Konstrukte sind die folgenden:

	mPSM-Aminosäuren, substituiert mit P30	Länge des Moleküls (Anzahl an Aminosäuren)
mPSM0.0	÷	752
mPSM'0.0	÷	694
mPSMX	255-271 (von SEQ ID NO:8)	756
mPSMY	689-700 (von SEQ ID NO:8)	760
mPSM'X	197-213 (von SEQ ID NO:10)	698
mPSM'Y	631-642 (von SEQ ID NO:10)	702

[0345] Zunächst werden die mPSM-Wildtyp- und -Analogon-Moleküle in DNA-Vakzinierungs-Vektoren subkloniert und zur DNA-Vakzinierung von Mäusen verwendet.

[0346] Es ist beabsichtigt, die Immunantworten, wie CTL-Reaktionen und Tumorelimination, in den Mäusen zu untersuchen. Dazu werden Maus-Tumorzelllinien mit Wildtyp-Maus-PSM (im Leserahmen fusioniert mit einem Identifikations-tag, z.B. dem c-myc-Epitop, SEQ ID NO:27, zu Detektionszwecken) transfiziert.

in vivo-PSM-Tumormodelle

Maus-T-Zell-Proliferations-Assay mit P2 und P30

[0347] Eine Reihe von T-Zell-Proliferationsexperimenten wurde durchgeführt um die T-Zell-Immunogenität von P2- und P30-Peptiden in verschiedenen Maus-Stämmen (BALB/cA (H-2^d), C3H/Hen (H-2^k), DBA/1 (H-2^q) und C57BL/6 (H-2^b)) festzustellen. Es ist wohlbekannt, dass diese Epitope in Menschen gemischte Epitope sind, aber der gemischte Charakter der T-Zelle musste auch in Mäusen unter Verwendung von einem experimentellen Aufbau von M&Es bestätigt werden. Es wurde daher gezeigt, dass P30 T-Zell-immunogen in den BALB/cA- und C57BL/6-Stämmen ist, während weder P2 noch P30 T-Zell-immunogen in dem

C3H/Hen-Stamm ist. In DBA/1 konnten T-Zellen gegen P2 vermehrt werden.

Erzeugung von hPSM-exprimierenden Maus-Tumorzellen

[0348] Zur Anwendung in einem hPSM-spezifischen Tumormodell in Mäusen sowie zur Anwendung in Tumorzell-Proliferations-Assays wurde eine Reihe von hPSM-exprimierenden Maus-Tumorzellen etabliert. Ein Ansatz ist es, diese Zelllinien zu erzeugen, indem die Maus-Tumorzelllinien mit retroviralen Vektoren transduziert werden, die die Vollängen-Wildtyp-hPSM0.0-cDNA codieren.

[0349] Drei unterschiedliche Konstrukte wurden konstruiert, die die Vollängen-Wildtyp-cDNA, die humanes PSM eingefügt in die Polyklonierungsstelle des retroviralen Vektors CMVBipep codieren, wobei zwei von diesen eine kurze Kozak-Sequenz, stromaufwärts vom Startkodon gelegen, enthalten.

[0350] Diese Konstrukte wurden in drei unterschiedliche Maus-Tumorzelllinien transduziert: P815 (Mastocytom, H-2^d), B16-F10 (Melanom, H-2^b) und 79.24.H8 (Fibrosarkom, H-2^d), und zwar unter Verwendung der BOSC-Verpackungs-Zelllinie. Man erhielt Geneticin-resistente Klone bei allen drei Zelltypen, und es wurde in einer PCR-Analyse auf genomischer DNA bestätigt, dass die retroviralen Konstrukte in die Wirtszellen integriert waren. Es war noch nicht möglich, ein exprimiertes PSM-Genprodukt im Western-Blot oder in der FACS-Analyse unter der Verwendung des monoklonalen 7E11C5-Antikörpers zu detektieren.

[0351] Zwei stabile Maus-Tumorzelllinien, die Membran-gebundenes humanes Wildtyp-PSM enthalten, wurden durch Transfektion etabliert. Dies wurde erreicht, indem hPSM0.0-cDNA in den Säuger-Expressionsvektor pcDNA3.1(+) unter der Kontrolle des CMV-Promotors und mit einer Kozak-Sequenz stromaufwärts des Startkodons gelegen subkloniert wurde.

[0352] Das daraus hervorgehende Plasmid wurde in zwei unterschiedliche Maus-Tumorzelllinien transfiziert: 79.24.H8 (Fibrosarkom, Balb/c-abgeleitet) und Sa1N (Fibrosarkom, A/J-abgeleitet). Geneticin-resistente Kulturen wurden erhalten und einer Western-Blot- und FACS-Analyse unterzogen, und zwar unter Verwendung der monoklonalen J591- und 7E11C5-anti-hPSM-Antikörper. Unter Verwendung des J591-Antikörpers wurden die Zellen über mehrere Runden FACS-sortiert, bis eine hPSM-positive Population erhalten wurde. Die hPSM-Expression wurde wiederum mittels intrazellulärer FACS-Färbung unter Verwendung des 7E11C5-Antikörpers verifiziert. Es wurde auch mittels FACS-Analyse überprüft, dass die MHC-Klasse I-Expressionsspiegel dieselben Spiegel waren wie die Spiegel der parentalen Zelllinien.

[0353] Kulturen von 79.24.H8 und Sa1N-Zelllinien, die hPSM exprimieren, wurden durch limitierende Verdünnung kloniert. Mehrere Klone wurden erhalten und mittels FACS-Analyse unter Verwendung des monoklonalen Anti-hPSM-Antikörpers J591 auf unterschiedliche Expressionslevel von hPSM getestet.

[0354] 79.24.H8-Zellen, die hPSM exprimieren, wurden mit dem Gen, das für B7.1 codiert, zur Verwendung z.B. in in vitro-Assays zum Beobachten der hPSM-spezifischen CTL-Antworten und/oder der Interferon-gamma-Ausschüttung transfiziert. Die Zellen wurden einmal unter Verwendung eines Anti-B7.1-Antiserums mittels FACS sortiert.

Etablieren eines hPSM-spezifischen Tumormodells in Mäusen

[0355] Es wurde der Entschluss gefasst, mindestens zwei in vivo-Tumormodelle in immunkompetenten Mäusen zu etablieren um die Anti-Tumor-Wirkung von Antikörpern zu bestimmen, die in Mäusen gegen die immunogenisierten hPSM-Moleküle gezogen wurden. Dies wird hoffentlich durch Injizieren in syngeneische Maus-Tumorzelllinien geschehen, die so modifiziert wurden, dass Wildtyp-hPSM auf der Oberflächenmembran exprimiert wird. Es werden Zellen verwendet werden, welche feste Tumoren bilden, und/oder Zellen, von denen bekannt ist, dass sie metastasieren. Es werden Zelllinien in diesem Modell verwendet, welche in syngeneische Mäuse implantiert werden können, ohne aufgrund der Anwesenheit des fremden hPSM-Moleküls abgestoßen zu werden. Die Fähigkeit der hPSM-Vakzine, solche Tumorzellen zu eliminieren, wird für die Auswahl der hPSM-Vakzin-Kandidaten verwendet werden.

[0356] Um das Wachstum von Sa1N-Zellen, die mit dem humanen Vollängen-PSM transfiziert waren, zu ermitteln, wurden unterschiedliche Dosen (2×10^6 und 5×10^6) der mit hPSM transfizierten Sa1N-Zellen (S-PSM, 5 Mal sortiert) subkutan an der rechten unteren Flanke von Gruppen von A/J-Mäusen injiziert. Es entwickelten sich jedoch keine festen Tumoren. Anschließend wurden drei Klone von S-PSM-Zellen mit unterschiedlichen Expressionsleveln von hPSM subkutan in drei Gruppen von A/J-Mäusen mit einer Dosis von 10^7 Zellen/Maus

injiziert. Die Größen der etablierten Tumore wurden mittels einer Kaliberlehre gemessen, wobei zwei unterschiedliche Durchmesser gemessen wurden, die multipliziert wurden um die Tumorgroße in mm² zu ergeben. Diese Werte wurden bei den drei Gruppen verglichen. Innerhalb von 3-6 Tagen entwickelten alle Mäuse eine feste Tumor-ähnliche Struktur, welche ungefähr am Tag 15 wieder verschwand. Dies liegt wahrscheinlich in der Anwesenheit von humanem hPSM auf den Tumorzell-Oberflächen begründet, obwohl es nicht verifiziert wurde. SalN-Zellen, die nur mit dem pcDNA3.1-Vektor transfiziert waren, setzten ihr Wachstum als fester Tumor in Mäusen fort.

[0357] Ein ähnliches Bild wurde bei Mäusen beobachtet, denen 10⁶, 5 × 10⁶ oder 10⁷ 79.24.H8-Zellen injiziert wurden, welche mit hPSM transfiziert und über mehrere Runden im Hinblick auf hPSM-Expression sortiert worden waren. Diese Zellen (79-PSM genannt) etablierten sich ebenfalls nicht als Tumore in Balb/c- oder DBA/2-Mäusen. Wenn jedoch ein Klon hPSM-transfizierte 79.24.H8-Zellen, 79-PSM.3, in Balb/c- oder DBA/2-Mäuse injiziert wurde, entwickelten die Mäuse feste Tumor-ähnliche Strukturen, welche wiederum um Tag 10-20 herum verschwanden. Lediglich mit Vektor transfizierte 79.24.H8 setzten ihr Wachstum in Balb/c-Mäusen fort.

[0358] Es muss noch immer bestimmt werden, ob diese "Tumore" behandelbar sind, oder ob ein besseres Tumormodell, basierend auf den beschriebenen S-PSM- und 79-PSM-Zelllinien und -Klonen etabliert werden kann.

Schlussfolgerungen

[0359] Bei der molekularen Konstruktionsarbeit waren wir erfolgreich bei der Klonierung des humanen PSM-Gens und beim Erhalten der Maus-PSM-cDNA. Eine Reihe von vollständig sequenzierten, immunogenisierten hPSM-Autovakzin-Konstrukten wurde hervorgebracht. Die hPSM-Mutanten sowie unterschiedliche Wildtyp-hPSM-Moleküle wurden in *E. coli* exprimiert, und man fand heraus und verifizierte, dass die Expressionslevel in *E. coli* sehr niedrig sind. Polyklonale Antikörper gegen die C-terminale Hälfte von hPSM wurden in Kaninchen induziert. Es wurden Anstrengungen unternommen, unterschiedliche Expressions-tags (HIS-tag und Maltose-Bindeprotein-Fusion) sowie Expressionssysteme alternativ zu *E. coli*-Einschlusskörperchen zu implementieren. Rekombinantes Wildtyp- und/oder Autovakzin-hPSM wurde in transfiziertem *Pichia pastoris* und in Säugerzellen detektiert. Nützliche Erwägungen, die die DNA-Vakzintechnologie betreffen, wurden vorgenommen, und eine vorläufige Machbarkeitsstudie wurde durchgeführt. DNA-Vakzinierungsexperimente mit hPSM-Autovakzin-Molekülen dauern an und zeigen vielversprechende vorläufige Ergebnisse. Unterschiedliche in vitro-Assays, die zum Testen und zur Auswahl der mutierten PSM-Konstrukte nützlich sind, sind etabliert, einschließlich immunchemischer Assays und der FACS-Analyse. Maus-Tumorzellen wurden stabil mit Vollängen-Wildtyp-hPSM transfiziert und mittels FACS im Hinblick auf hPSM-Oberflächenexpression sortiert. Man hat Klone dieser Zelllinien erhalten. Xenogenische in vivo-Tumor-Modelle in Mäusen werden derzeit untersucht unter Verwendung dieser hPSM-enthaltenden syngenischen Maus-Tumorzellen. Eine Reihe von T-Zell-Proliferations-Assays wurde durchgeführt um die Maus-Stämme für die Tumormodelle zu selektieren. CTL-Assays werden optimiert, und überzeugende Ergebnisse mit Modell-Antigenen wurden erhalten, indem unterschiedliche Immunisierungsmethoden und Assay-Bedingungen verwendet wurden. Außerdem werden Werkzeuge etabliert, die notwendig sind um das Durchbrechen der Toleranz gegen Maus-PSM durch Immunisierung gegen Maus-PSM-Autovakzine zu untersuchen.

BEISPIEL 2

Herstellung eines Her2 Autovakzins

[0360] Ein humanes Autovakzin gegen Her2 kann durch Modifikation des Moleküls durch Insertion von einem oder mehreren gemischten, fremden T-Zell-Epitopen unter Hervorbringen einer Reihe von immunogenisierten Her2-Molekülen entwickelt werden. Diese modifizierten Proteine werden auf ihre Fähigkeit hin getestet, Antikörper zu induzieren, welche mit den nativen Teilen des Her2-Moleküls kreuzreagieren. Anschließend wird in mehreren in vitro-Assays und in vivo-Tiermodellen die Wirksamkeit der unterschiedlichen Konstrukte (wie das im Falle der DNA-Vakzinierung der Fall sein kann) und der modifizierten Proteine ermittelt. Die Induktion von spezifischen CTL-Antworten gegen Her2-enthaltende Tumorzellen wird analysiert. Die induzierten Antikörper werden auch auf ihre Fähigkeit hin getestet, Komplement über den klassischen Weg zu aktivieren und eine ADCC über Fc-Rezeptoren zu initiieren. Schließlich werden die unterschiedlichen modifizierten Moleküle in Tiermodellen von humanem Brustkrebs getestet um ihre Wirkungen bei der Behandlung von Tumoren zu untersuchen.

[0361] Immunogenische Ratten und humane Moleküle werden mit gemischten T-Zell-Epitopen an unterschiedlichen Positionen in dem Molekül konstruiert.

[0362] Während der Vakzinierung gegen die gesamte extrazelluläre Domäne von Her2 besteht eine Möglichkeit eines gewissen Grades an Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen EGFr-Rezeptoren, da einige dieser Rezeptoren mit bis zu 40-46% in den extrazellulären Domänen homolog sind. Daher ist es geplant, dass die konservierten Regionen von Her2 durch Einfügen von fremden T-Zell-Epitopen mindestens in einigen der modifizierten Proteine zerstört sind (siehe unten für Details).

[0363] Regionen von Her2, die möglicherweise CTL- oder B-Zell-Epitope sein können, werden beim Gestalten von Konstrukten vermieden, wie in [Fig. 3](#) ersichtlich. Die Richtschnur zur Verwendung dieser Positionen ist die folgende:

Die humane Her2-Sequenz kann in eine Reihe von Domänen geteilt werden, was vollständig auf der Primärstruktur des Proteins basiert.

Extrazellulärer (Rezeptor-) Teil:

1-173: Domäne I (N-terminale Domäne des reifen Polypeptids).
 174-323: Domäne II (Cystein-reiche Domäne, 24 Cystein-Reste).
 324-483: Domäne III (Liganden-bindende Domäne i des homologen EGF-Rezeptors).
 484-623: Domäne IV (Cystein-reiche Domäne, 20 Cystein-Reste).
 624-654: Transmembran-Domäne (TM-Reste von 654-675).

Intrazellulärer (Kinase-Teil:

655-1010: Tyrosinkinase-Domäne (Kern-TK-Domäne von 725-992).
 1011-1235: C-terminale Domäne.

[0364] Die Selektion der zu ersetzenden Stellen in der Aminosäuresequenz von Her2 durch entweder die humane P2- oder die P30-T-Helfer-Epitope wurde unter Beachtung der folgenden Parameter vorgenommen (schwach priorisiert):

1. Bekannt und vorhergesagte CTL-Epitope
2. Homologie gegenüber verwandten Rezeptoren (EGFR insbesondere)
3. Konservierung von Cystein-Resten.
4. Vorhergesagte Haarnadel, α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen
5. Potentielle N-Glykosylierungsstellen
6. Vorhersage exponierter und verborgener Aminosäurereste
7. Domänenorganisation

[0365] Die CTL-Epitope scheinen in Domäne I, Domäne III, der TM-Domäne und in zwei oder drei "hot spots" in der TK-Domäne im Cluster vorzuliegen. Entsprechend der Erfindung sollten diese weitestgehend konserviert werden.

[0366] Regionen mit einem hohen Grad an Homologie mit anderen Rezeptoren sind sehr wahrscheinlich strukturell wichtig für die "Gesamt"tertiärstruktur von Her2, und daher für die Antikörpererkennung, während Regionen mit niedriger Homologie möglicherweise ausgetauscht werden können, mit der Folge von lediglich lokalen Änderungen der Struktur.

[0367] Cystein-Reste sind häufig in intramolekulare Disulfidbrücken-Bildung involviert und daher kritisch für die Tertiärstruktur, und sie sollten nicht verändert werden.

[0368] Regionen, von denen vorhergesagt wurde, dass sie α -Helix- oder β -Faltblatt-Strukturen bilden, sollten bevorzugt als Insertionspunkte fremder Epitope vermieden werden, da diese Regionen vermutlich für die Faltung des Proteins wichtig sind.

[0369] Potentielle N-Glykosylierungsstellen sollten bevorzugt auch konserviert werden, weil eine Mannosylierung des Proteins (beispielsweise durch Expression in Hefe) erwünscht ist, vgl. die Anwesenheit von Mannose-Rezeptoren auf APCs.

[0370] Regionen, von denen vorhergesagt ist (aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften), dass sie im Inne-

ren des Moleküls vorliegen, sollten konserviert werden, da diese in die Faltung involviert sein könnten. Im Gegensatz dazu können Regionen, die dem Lösungsmittel ausgesetzt sind, als Kandidaten-Positionen zur Insertion der Modell-T_H-Epitope P2 und P30 dienen.

[0371] Schließlich wurde auch die Domänenorganisation des Proteins aufgrund ihrer Relevanz für Protein-Struktur und -Funktion in Erwägung gezogen.

[0372] Der Hauptpunkt der Strategie war es, die Struktur des extrazellulären Teils von Her2 soviel wie möglich zu konservieren, weil dies der Teil des Proteins ist, welcher als Zielobjekt für neutralisierende Antikörper relevant ist. Im Gegensatz dazu ist der intrazelluläre Teil von nativem Membran-gebundenen Her2 auf der Oberfläche von Krebszellen für das humorale Immunsystem unzugänglich.

[0373] Daher gibt lediglich das Vorhandensein von CTL-Epitopen Grund dazu, diesen Teil in ein Vakzin mit einzubeziehen. Es ist daher offensichtlich, hier ein oder mehrere Epitope zu plazieren. Wenn sich herausstellt, dass es unmöglich ist, das Volllängen-Her2-Molekül in *E. coli* oder in Hefe zu exprimieren, könnte der intrazelluläre Teil nach dem ersten CTL-Epitop-"hot spot" (um Position 800 herum) verkürzt werden. Zusätzliche CTL-Epitope können danach an das C-terminale Ende des verkürzten Moleküls angefügt werden.

[0374] Die Transmembran-Region ist vermutlich eine unabhängige Faltungseinheit, und das Ersetzen von dieser durch T_H-Epitope, wie P2 oder P30, wird vermutlich die HER2-Struktur und -Faltung nicht beeinflussen. Zusätzlich könnte die TM-Domäne größere Probleme für die Expression in Hefe und *E. coli* verursachen und sollte in jedem Fall ersetzt werden. Daher sollte ein Epitop in allen Konstruktionen bevorzugt in dieser Domäne plaziert werden (wobei sie vielleicht in einer Konstruktion intakt belassen wird, da sie mehrere CTL-Epitope enthält und weil sie manchmal irgendwie bei der Transmission von Signalen nach Liganden-Bindung involviert ist).

[0375] Die extrazelluläre Domäne könnte im Prinzip intakt belassen werden, indem man P2 und P30 in der intrazellulären und der Transmembran-Domäne plaziert, wodurch die Anzahl möglicher B-Zell-Epitope maximiert wird und die Struktur so wenig wie möglich gestört wird. Der hohe Grad an Homologie mit EGFR und Her-3 und Her-4 erzeugt ein Risiko der Kreuzreaktivität mit diesen Rezeptoren, welches unerwünscht sein kann (oder auch nicht). Zusätzlich wurden einige monoklonale Antikörper beschrieben, welche als Agonisten für den Rezeptor fungieren (vielleicht durch Stimulieren der Heterodimerisierung oder der Liganden-Bindung) und welche die Tumorgroße, *in vivo*, erhöhen. Positionen in der extrazellulären Domäne wurden daher ausgewählt, welche diese Risiken hoffentlich dadurch reduzieren werden.

[0376] Diese Auswahl hat alle der zuvor genannten Parameter mit einbezogen, und sie wurde auf zwei unterschiedlichen Annahmen gefußt: (i) Eine Insertion in nicht-konservierte (im Hinblick auf verwandte Rezeptoren) Regionen hilft dabei, die Tertiärstruktur aufrecht zu erhalten und könnte ungewollte Aktivierung durch Antikörper reduzieren. (ii) Die Insertion in die wohl-konservierten Regionen könnte die Struktur ändern, aber könnte gleichzeitig das Risiko der Kreuzreaktivität verringern, indem die am stärksten verwandten Sequenzen zerstört werden. Beide Annahmen sind spekulativ, aber da es sehr schwierig ist, die Wirkung der Platzierung eines Epitops in jeder Position des Proteins vorherzusagen, wurden einige dieser Positionen in die Konstruktionen mit einbezogen.

[0377] Es wurde spekuliert, dass es ein Vorteil sein könnte, die zwei Cystein-reichen Domänen vollständig zu entfernen. Von diesen ist vorhergesagt, dass sie lösliche, exponierte Schleifenstrukturen bilden und unabhängige Faltungseinheiten bilden können, die vielleicht in die Dimerisierung involviert sind (angedeutet durch die vielen Cysteine, die dazu dienen könnten, eine feste Struktur aufrecht zu erhalten, die für eine Dimerisierungs-Domäne notwendig ist). Das Zerstören dieser Strukturen könnte daher das Risiko der Aktivierung durch Antikörper ausschalten sowie die Anzahl kreuzreagierender Antikörper reduzieren, da diese Domänen die am besten konservierten Domänen des extrazellulären Teils des Proteins sind. Zusätzlich könnte es problematisch sein, solche Cystein-reichen Domänen in *E. coli* oder Hefezellen herzustellen.

[0378] Die Details der Konstrukte sind die folgenden, unter Verwendung der P2- und P30-Epitope als nicht-einschränkende Beispiele: das P2-Epitop wird in erster Linie in der extrazellulären Domäne von Her2 plaziert, in Kombination mit dem P30-Epitop, das einen Teil von der oder die gesamte Membran-überspannende Region ersetzt. Das P2-Epitop wird, basierend auf den oben diskutierten Kriterien, in den Regionen plaziert. Die bevorzugten Konstrukte besitzen die folgenden Strukturen:

Konstruktnamen	Position von P2	Position von P30	Länge
hHER2MA2-1A	59-73	632-652	795
hHER2MA2-2A	103-117	632-652	795
hHER2MA2-3A	149-163	632-652	795
hHER2MA2-4A	210-224	632-652	795
hHER2MA2-5A	250-264	632-652	795
hHER2MA2-6A	325-339	632-652	795
hHER2MA2-7A	369-383	632-652	795
hHER2MA2-8A	465-479	632-652	795
hHER2MA2-9A	579-593	632-652	795
hHER2MA2-1B	59-73	661-675	795
hHER2MA2-2B	103-117	661-675	795
hHER2MA2-3B	149-163	661-675	795
hHER2MA2-4B	210-224	661-675	795
hHER2MA2-5B	250-264	661-675	795
hHER2MA2-6B	325-339	661-675	795
hHER2MA2-7B	369-383	661-675	795
hHER2MA2-8B	465-479	661-675	795
hHER2MA2-9B	579-593	661-675	795
hHER2MA2-1Y	59-73	710-730	795
hHER2MA2-2Y	103-117	710-730	795
hHER2MA2-3Y	149-163	710-730	795
hHER2MA2-4Y	210-224	710-730	795
hHER2MA2-5Y	250-264	710-730	795
hHER2MA2-6Y	325-339	710-730	795
hHER2MA2-7Y	369-383	710-730	795
hHER2MA2-8Y	465-479	710-730	795
hHER2MA2-9Y	579-593	710-730	795
hHER2MA2-Z	695-709	710-730	795
hHER2MA2-C	653-667	632-652	795
hHER2MA2-BX	695-709	661-675	795
hHER2MA2-AX	695-709	632-652	795
hHER2MA2-4E	210-224	5-25	795
hHER2MA2-6E	325-339	5-25	795
hHER2MA2-8E	465-479	5-25	795
hHER2MA5-4D	210-224	632-652*	666
hHER2MA5-6D	325-339	632-652*	666
hHER2MA5-8D	465-479	632-652*	666
hHER2MA6-C	653-667	632-652	702

[0379] Die Position des Epitops zeigt die erste und die letzte Aminosäure-Position des Epitops in Bezug auf den Startpunkt des reifen Her2 an. Die Länge ist die Länge in Aminosäuren von dem vollständigen Konstrukt. In allen Konstrukten, mit Ausnahme jener, in denen die Position mit einem * angegeben ist, ersetzt das Epitop einen Aminosäurestrang derselben Länge. "*" deutet darauf hin, dass das Epitop in Her2 eingefügt wird und nicht substituiert. Alle oben aufgelisteten Konstrukte sind daher Verkürzungen des reifen Her2, wobei der ausgelassene Teil vom C-Terminus stammt.

[0380] Die meisten Konstruktionen liegen in unterschiedlichen Versionen vor, z.B. in einem pcDNA3.1+-Vektor, in Fusion mit der natürlichen HER2-Signal-Peptidsequenz, in dem Vektor pMT/BiP/VS-His-A als Fusion mit dem BiP-Leitpeptid zur Expression in Drosophilazellen, und ohne Leitsequenz in dem pET28b-Vektor zur Expression in E. coli-Zellen.

[0381] Unten sind die Modelle beschrieben, die zur Verwendung beim Screening und der Selektion modifizierter Her2-Proteine vorgesehen sind.

1. Die Induktion von Antikörpern gegen Maus-Her2 in transgenischen Ratten, und in Kaninchen gegen Ratten- und humanes Her2 wird mittels konventioneller ELISA-Technologie nach mindestens drei Immunisierungen untersucht. Kommerziell erhältliche Antikörper gegen menschliches und Ratten-Her2 werden als Positivkontrollen verwendet.
2. Diese Kaninchen-Antikörper werden verwendet um die vermutete Inhibierung des Wachstums von humanen und transgenischen Maus-Tumorzellen, die Her2 überexprimieren, in einem in vitro-Modell zu untersuchen.
3. Die T-Zell-Proliferation von PBL von Tetanus-immunisierten Patienten gegen ausgewählte humane Her2-Moleküle wird mittels herkömmlicher Verfahren untersucht.
4. Die Fähigkeit von modifizierten Ratten-Her2-Molekülen, CTL-Antworten in Ratten-Her2-transgenischen Mäusen zu induzieren, wird unter Verwendung von Tumoren aus diesen Mäusen als Zielobjekten untersucht.
5. Es ist beabsichtigt, eine ausgewählte Reihe von Peptiden in der Transmembranregion von humanem Her2 zu synthetisieren, die P2- und P30-Epitope umfassen. Diese Peptide werden auf Proliferation von PBL von Menschen, die zuvor mit Tetanus-Toxoid immunisiert wurden, getestet um zu bestimmen, ob P2- und P30-Epitope aus den Her2-Sequenzen effizient herausprozessiert werden können und gegenüber T-Zellen präsentiert werden können.
6. Es ist recht gut möglich, dass ausgewählte humane, modifizierte Her2-Proteine auf die Bildung neutralisierender Antikörper in einer Maus getestet werden, welche genetisch so konstruiert wurde, dass sie nur humane VDJ-Gene exprimiert. Solch eine Maus ist von Abgenix, Fremont, CA, USA, in Zusammenarbeit erhältlich.

[0382] Vier gut charakterisierte transgenische Maus-Modelle für Brustkrebs wurden beschrieben, die ein Ratten-Her2-Onkogen enthalten. Die ersten drei transgenischen Mäuse exprimiert aktiviertes Her2-Onkogen, während das vierte Modell ein inaktiviertes Her2 verwendet. Alle Modelle verwenden einen MMTV-Promotor um die Expression in Milchdrüsen anzutreiben.

[0383] Wir haben entschieden, zwei transgenische Maus-Modelle zu verwenden: 1) ein aggressiveres Tumormodell, das von Muller et al. beschrieben wurde, das aktiviertes Her2-Onkogen verwendet (Muller et al., 1989), und 2) ein weniger aggressives Tumormodell, bei dem inaktiviertes Her2 verwendet wird um fokale Mammatumoren mit einer langen Latenzzeit zu bilden (Guy et al., 1992). Beide transgenischen Mäuse werden von Jackson und/oder Charles Rivers Laboratories bezogen.

[0384] In den anfänglichen Experimenten wird es diesen Mäusen ermöglicht, Antikörper und CTL-Antworten hervorzubringen, und zwar indem mit modifizierten Ratten-Her2-Proteinen immunisiert wird und Booster-Immunisierungen verabreicht werden. Das Auftreten von Tumoren wird dann, wie von anderen beschrieben, untersucht (Muller et al., 1998; Guy et al., 1992; Katsumata et al., 1995). Die Antikörper-Spiegel werden mittels eines ELISA-Assays gemessen. Die CTL-Aktivität wurde bestimmt, indem Zielzellen erzeugt werden, die Ratten-Her2 exprimieren, wie oben erwähnt.

[0385] Alternativ dazu kann das Nacktmäuse-Xenotransplantation-Karzinom-Modell für passive Vakzinierungsexperimente verwendet werden. Nacktmäuse können mit humanen Tumoren transplantiert werden, und die Inhibierung von Tumoren könnte durch passiven Transfer von Serum von normalen oder humanisierten Mäusen, die mit modifizierten Her2-Proteinen immunisiert werden, erreicht werden. Während dies nützlich wäre um die Rolle von Antikörpern bei der Unterdrückung von Tumoren zu untersuchen, kann die CTL-Aktivität nicht direkt in diesem System gemessen werden.

[0386] In dem zweiten in vivo-Modell würden auch Tumoren in Mäusen erzeugt, indem Zelllinien von Tumoren transgenischer Mäuse, die oben beschrieben sind, transplantiert würden. Zelllinien, die aus diesen Mäusen erzeugt würden, würden in relevante Maus-Stämme übertragen, und deren Lokalisation würde unter Verwendung von Standardprotokollen festgestellt.

[0387] Die Übertragung von Maus-Tumorzellen, die Ratten-Her2 überexprimieren: In diesem System werden Zellen mit Rattengenomen transfiziert und in MHC-kompatible Mäuse übertragen. Die Inhibition des Tumorstwachstums würde erreicht, indem Anti-Her2-Antworten erzeugt würden.

[0388] In diesen Systemen würden modifizierte Her2-Proteine als Vakzin in Adjuvantien zum Erzeugen von Antikörpern und CTL-Reaktionen verwendet.

[0389] Die DNA-Vakzinierung wurde erfolgreich in mehreren Systemen zum Hervorrufen einer wirksamen Im-

munantwort verwendet. Wir untersuchen derzeit Mittel der DNA-Übertragung unter Verwendung von modifizierten Selbst-Proteinen. Es ist unsere Absicht, den DNA-Vakzinierungs-Ansatz zu benutzen um die Wirkungen von modifizierten Her2-Konstrukten bei der Inhibierung von Tumoren in transgenischen Maus-Modellen für Brustkrebs zu bestimmen. Ein ähnlicher Ansatz kann dann möglicherweise in Menschen für die Behandlung dieser Krankheit angewandt werden.

BEISPIEL 3

Herstellung eines Anti-FGF8b-Vakzins

[0390] Im Folgenden wird beschrieben, wie ein humanes Autovakzin gegen FGF8b über die Modifikation des Moleküls durch Insertion von einem oder mehreren gemischten fremden T-Zell-Epitopen entwickelt werden könnte um eine Reihe immunogenisierter "FGF8b"-Moleküle hervorzubringen. Die Konstrukte werden auf ihre Fähigkeit getestet, Antikörper zu induzieren, die mit den authentischen Teilen des FGF8b-Moleküls kreuzreagieren. Anschließend wird in mehreren in vitro-Assays und in vivo-Tiermodellen die Wirksamkeit der unterschiedlichen Konstrukte ermittelt. Die induzierten Antikörper werden auf ihre Fähigkeit getestet, Komplement über den klassischen Weg zu aktivieren und ADCC über Fc-Rezeptoren zu initiieren. Schließlich werden die unterschiedlichen Moleküle in Tiermodellen für humanen Prostata- und Brustkrebs getestet.

Konstruktion eines Autovakzins gegen FGF8b

[0391] Aufgrund der vollständigen Identität der Maus- und Mensch-FGF8b-Polypeptide können alle Konstrukte für Experimente in sowohl Menschen als auch Mäusen verwendet werden.

[0392] Die gemischten Tetanus-Toxoid-T-Helfer-Zell-Epitope P2 und P30, die erfolgreich in dem humanen TNFa-Vakzin verwendet wurden, werden in das FGF8b-Polypeptid eingefügt. Aufgrund der geringen Größe von FGF8b werden Konstrukte hergestellt mit einem Epitop pro Molekül. Andere gemischte T-Helfer-Zell-Epitope, wie das Influenza-Haemagglutinin-Epitop HA(307-319) und andere T-Zell-Epitope, die hierin diskutiert werden, könnten ebenfalls in Erwägung gezogen werden (O'Sullivan 1991).

[0393] 4 unterschiedliche immunogenisierte FGF8b-Konstrukte wurden hergestellt, wobei die Epitope über das Molekül verteilt waren. Diese vier Konstrukte werden auf der Basis multipler und paarweiser Aneinanderanlagerungen der FGF-Familie von Proteinen erstellt. Eine paarweise Gegenüberstellung von FGF2 und FGF8b wird als Grundlage zur Analyse der vermuteten Sekundärstruktur entlang des FGF8b-Moleküls (d.h. der beta-Faltblatt-Verteilung) verwendet. Die Reste, die bei FGF2 und FGF8b konserviert sind, bilden nirgendwo auf der dreidimensionalen Struktur Cluster, was anzeigt, dass es keine bestimmten Regionen des Moleküls gibt, die nicht ersetzt werden könnten, ohne zerstörerische Wirkungen auf die Faltungsfähigkeiten zu haben. Die Aminosäure-Reste in FGF2, die den Cystein-Resten in FGF8b gegenüberstehen, liegen dreidimensional sehr nah beieinander, was anzeigt, dass sie in FGF8b eine Disulfidbrücke bilden, und dass die Gegenüberstellung korrekt ist. Die Flexibilität des N-terminalen Teils von FGF2 wurde ebenfalls beachtet.

[0394] Die Variante von FGF8b mit dem P30-Epitop am N-Terminus (F30N) wurde auf Grundlage einer lückenlosen Gegenüberstellung der Aminosäure-Reste des FGF8b-Proteins und des P30-Epitops (SEQ ID NO:14) gestaltet, und indem den unterschiedlichen Positionen im Hinblick auf ihre chemischen Eigenschaften jedes Aminosäure-Restes Werte zugewiesen wurden. Nur die N-terminal der vorhergesagten beta-Fass-Struktur gelegene Region wurde in Erwägung gezogen. Im Falle von F30N gibt es 9 ähnliche von 21 Resten. Unter Verwendung dieses Pseudo-Algorithmus erwartet man, dass die Substitutionen zu minimalen Gesamt-Strukturveränderungen führen. Die Sequenzen der vier unterschiedlichen Konstrukte, sowie dreidimensionale Darstellungen der ersetzten Aminosäuren, sind in [Fig. 6](#) gezeigt.

[0395] Die Variante von FGF8b mit dem P2-Epitop (SEQ ID NO:12) am C-Terminus (F2C) wurde ursprünglich wie F30N gestaltet. Es wird jedoch ein gutes Kd-Epitop an Positionen 195-203 vorhergesagt. Daher ist das P2-Epitop genau C-terminal von diesem Epitop eingefügt. Wiederum wurde die Region C-terminal vom vorhergesagten Beta-Fass betrachtet.

[0396] Die internen Varianten von FGF8b (F30I und F2I) wurden konstruiert, indem externe Schleifen in der FGF2-Struktur mit den Epitopen P2 bzw. P30 ersetzt wurden, wobei das Rückgrat der Beta-Fass-Struktur der FGF-Struktur wahrscheinlich unverändert bleibt. Die immunogenisierten FGF8b-Moleküle wurden in *Escherichia coli* exprimiert, was die Herstellung dieser Proteine bei minimalen Kosten im großen Maßstab erleichtert. Obwohl FGF8b zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn31 und Asn177) enthält, wurde gezeigt, dass

bakteriell exprimiertes, rekombinantes FGF8b biologisch aktiv ist (MacArthur 1995a, Blunt 1997). Um die Reinigung und Rückfaltung zu erleichtern, wurden die FGF8b-Varianten in einer His-getaggt Version hergestellt, was gleichzeitig das Koppeln an Nickel-beladene Säulen ermöglicht.

[0397] Die Reinigung der Moleküle wurde unter Ausnutzung der hohen positiven Ladung der Proteinmoleküle oder des His-tags durchgeführt, und die Rückfaltung wird unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt, wobei die Bildung der Disulfidbrücke beachtet wird.

[0398] Die vier immunogenisierten Moleküle wurden auch zusammen mit der Wildtyp-FGF8b-cDNA in DNA-Vakzinierungsvektoren inseriert.

Screening und Auswahl der modifizierten FGF8b-Moleküle

[0399] Die vier immunogenisierten FGF8b-Moleküle wurden in Bakterien exprimiert und anschließend aus Einschlusskörperchen aufgereinigt. Parallel werden die Konstrukte als DNA-Vakzine verwendet. Die unterschiedlichen Konstrukte werden dann im Hinblick auf ihre Fähigkeit, verschiedene Wirkungen zu induzieren, verglichen, welche bei der Behandlung von Prostata- und Brustkrebs-Patienten erwünscht sind. Solche Untersuchungen werden unter Verwendung von mehreren verschiedenen in vitro- und in vivo-Assays durchgeführt. Schließlich bilden die Ergebnisse der Experimente die Basis für die Endauswahl von ein oder zwei Kandidaten für ein FGF8b-Vakzin in Menschen.

in vitro-ModeUe Analysen im Maussystem

[0400] Mäuse unterschiedlicher Haplo-Typen sowie Kaninchen werden mit den unterschiedlichen FGF8b-Konstrukten in vollständigem Freund'schem Adjuvans immunisiert und anschließend eine Boost-Immunisierung mindestens zweimal mit denselben Antigenen, emulgiert in unvollständigem Freund'schem Adjuvans, durchgeführt. So kann die Fähigkeit unterschiedlicher Konstrukte, die B-Zell-Toleranz zu durchbrechen, verglichen werden. Die DNA-Vakzinierung wird bei anderen Tieren durchgeführt, indem gereinigte DNA in vollständigem Freund'schem Adjuvans/unvollständigem Freund'schem Adjuvans intramuskulär innerhalb von 14-tägigen Intervallen injiziert wird.

[0401] Serumproben erhält man zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Immunisierungsplans, und die Fähigkeit der verschiedenen Konstrukte, FGF8b-spezifische Antikörper zu induzieren, wird unter Verwendung eines konventionellen ELISA-Verfahrens bestimmt (Rochon 1994). Ein kommerzielles polyklonales Antiserum, sowie ein kommerzieller monoklonaler Antikörper, der gegen FGF8b gezogen wurde (R&D), werden für Positivkontrollen verwendet. Das FGF8b-Protein ist kommerziell erhältlich (R&D), aber er wird auch produziert werden zusammen mit den anderen FGF8b-Konstrukten, und anschließend gereinigt/rückgefaltet. Dieses Produkt kann dann zur Beschichtung von Platten in einem direkten ELISA zum Testen der Seren von Mäusen/Kaninchen verwendet werden, die mit FGF8b-Varianten-Proteinen immunisiert wurden.

[0402] Ein wertvolles Werkzeug zum Untersuchen der Auswirkungen der Vakzinierung gegen FGF8b wird eine FGF8b-abhängige Krebszelllinie sein. Mehrere FGF8b-positive Krebszelllinien, z.B. MCF-7 oder SC-3, sind in der Literatur beschrieben. Solch eine FGF8b-abhängige Maus-Krebszelllinie wird identifiziert, indem eine quantitative RT-PCR, Zellproliferationsexperimente und STAT-3-Phosphorylierungs-Assays verwendet werden.

[0403] Die Anwesenheit von FGF8b, ligiert an einen FGF-Rezeptor auf der Zelloberfläche, wird mit FGF8b-spezifischen Antikörpern in einer FACS- oder ELISA-Analyse detektiert. Antikörper, die gegen mehrere der unterschiedlichen FGF-Rezeptoren gerichtet sind, sind kommerziell erhältlich (R&D).

[0404] Die Konstrukte werden im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Antikörper zu induzieren, die in der Lage sind, die Komplement-Lyse von FGF8b-produzierenden/-enthaltenden Zellen zu induzieren, verglichen. Dies kann mit einer der Maus-Tumorzelllinien, die FGF8b exprimieren, die zuvor beschrieben wurden, oder alternativ dazu unter Verwendung osmotischer FGF8b-beladener Zellen bestimmt werden. Seren von normalen oder transgenischen Mäusen (siehe unten), die mit den humanen FGF8b-Konstrukten immunisiert wurden, werden mit der Zelllinie inkubiert und anschließend mit frischem Meerschweinchen-Komplement inkubiert. Die Antikörpervermittelte Komplement-Lyse der Zellen kann durch Standardverfahren bestimmt werden.

[0405] Die Fähigkeit der induzierten Antikörper, eine ADCC zu vermitteln, kann untersucht werden, indem die ⁵¹Cr-Ausschüttung aus markierten FGF8b-exprimierenden Zellen gemessen wird. Die Effektorzellen werden

PBMC von syngenischen Mäusen sein. Zum Etablieren des Assays kann es geeignet sein, eine Maus-Zelllinie zu verwenden, die in der Lage ist, ADCC zu vermitteln (positiv für Fc(-Rezeptoren) als Effektorzelle mit einem Antikörper gegen humanes FGF8b.

[0406] Um zu zeigen, dass die FGF8b-Kandidaten-Vakzine nicht irgendwie Autoantikörperinduziertes Tumorstromwachstum fördern, werden wir auch einen Tumor-Proliferations-Assay durchgeföhren. Serumproben von immunisierten Mäusen werden mit FGF8b-exprimierenden Tumorzellen inkubiert. Die Proliferation der Tumorzellen kann dann aufgrund ihrer Fähigkeit, 3H-Thymidin einzubauen, welches anschließend zu den Zellen gegeben wird, detektiert werden.

[0407] Da von FGF8b bekannt ist, dass es die Proliferation einer Reihe von Säugerzellen induziert, wird es auch notwendig sein, die Wachstums-fördernden Wirkungen der Varianten-Proteine zu untersuchen. Dies kann vorgenommen werden, indem Zellproliferations-Assays verwendet werden, wie der von Marsh 1999 verwendete.

[0408] Die biologische Wirkung von FGF8b auf Säugerzellen sollte durch die Autoantikörper neutralisiert werden. Dies kann gezeigt werden, indem rekombinantes FGF8b und z.B. NIH3T3 in Zellproliferations- (und Morphologieveränderungs-) Studien verwendet werden. Die Zugabe der Autoantikörper sollte die transformierende Aktivität von FGF8b aufheben.

Immunisierungsprotokoll

[0409] Die Anzahl von Tieren, die in ein FGF8b-AutoVac-Immunisierungsexperiment eingehen müssen, hängt von der erwarteten Penetranz der Erkrankung in dem Modell ab, und daher von den Anzahlen, die notwendig sind um statistisch signifikante Informationen zu erhalten. Das Immunisierungsprotokoll muss auf der Erfahrung beruhen, die wir aus dem TNFa-AutoVac-Projekt gezogen haben. Verschiedene Immunisierungsprotokolle wurden zur Immunisierung von Mäusen mit den unterschiedlichen TNFa-Analoga für spezifische Zwecke verwendet, aber die meisten Experimente wurden unter Verwendung des folgenden Protokolls durchgeführt:

1. Die Mäuse sollten entweder mittels Ohrmarken oder Transpondern individuell markiert werden, 10 Tiere in jedem Käfig. Vermutlich müssen Männchen und Weibchen getrennt untersucht werden, aber in jedem Fall sollten nicht beide Geschlechter in demselben Käfig vorkommen. Den Tieren sollten mindestens 3 Tage nach Transport und Markierung Ruhe zukommen.
2. Antigen (1 mg/ml in PBS-Puffer) wurde mit einem entsprechenden Volumen Freund'schem vollständigen Antigen (CFA) (Difco oder Sigma) emulgiert. Die Emulsion wird überprüft, indem ein Tropfen der Emulsion auf einer Wasseroberfläche plaziert wird und beobachtet wird, ob der Tropfen zusammenhält oder dispergiert. Die Mischung wird fortgesetzt, bis der Tropfen nicht mehr dispergiert.
3. Die Standard-Immunisierungsdosis ist 100 µg Antigen in 100 µl Volumen + 100 µl Adjuvans. Daher beträgt das Gesamt-Immunisierungsvolumen 200 µl, verabreicht s.c. (subcutan) über den Rücken des Tieres.
4. Booster-Immunisierungen werden 2-3 Wochen nach der primären Immunisierung vorgenommen und anschließend mit 2-3-wöchigen Intervallen. Das Booster-/Immunisierungsmaterial wird genauso präpariert und verabreicht wie das Immunisierungsmaterial, aber es wird Freund'sches unvollständiges Adjuvans verwendet. Drei Booster-Immunisierungen werden vermutlich den maximalen Titer induzieren. Daher werden die höchsten Titer 6-9 Wochen nach der ersten Immunisierung erzielt.
5. Die Blutentnahme ist eine orbitale Blutentnahme von 50-100 µl, die gewöhnlich vor der ersten Immunisierung und eine Woche nach der Booster-Immunisierung entnommen wird. Es können auch Schwanzblutungen verwendet werden, und 10-20 µl können zur Bestimmung des Titers ausreichend sein.

[0410] Der Initiationspunkt des Immunisierungsprogramms hängt von der Entwicklung der Krankheit ab und der Strategie, der wir folgen wollen. Wir schlagen vor, dass anfänglich versucht wird, die maximale Immunität so bald wie möglich zu erzeugen, aber es ist schwierig, die Immunisierungen eher als bei einem Alter von 5 Wochen zu beginnen. Danach sollten hohe Titer aufrecht erhalten werden, indem in 6-8-wöchigen Intervallen nach den drei anfänglichen Booster-Impfungen Booster-Impfungen verabreicht werden. Es gibt ein potentiell Problem, wenn FGF8b für die normale Entwicklung der jungen Mäuse notwendig ist, und man könnte daher dafürsprechen, die Immunisierung später in der adulten Maus zu beginnen.

Analysen im humanen System

[0411] Bei der Selektion der unterschiedlichen FGF8b-Konstrukte wird die Fähigkeit von humanen Antigen-präsentierenden Zellen untersucht, die eingefügten immunogenen T-Zell-Epitope humanen T-Zellen zu

präsentieren. Dies wird vorgenommen, indem dieselben in vitro-Prozessierungs-Assays für die P2- und P30-Präsentation verwendet werden, die für die TNFa-Vakzine verwendet wurden. Humane T-Zelllinien, welche für P2 und P30 spezifisch sind, werden von Donoren etabliert, die gegen Tetanus geimpft sind. Antigen-präsentierende Zellen (PBMCs) von denselben Donoren werden mit den unterschiedlichen Konstrukten inkubiert, und T-Zelllinien werden hinzugefügt. Der Spiegel der Präsentation der eingefügten T-Zell-Epitope kann dann verglichen werden, indem die Stimulation der T-Zelllinien gemessen wird.

in vivo-Tiermodelle

[0412] Mindestens drei unterschiedliche Systeme können verwendet werden um zu überwachen, ob die induzierten FGF8b-Antikörper in der Lage sind, eine FGF8b-abhängige in vivo-Wirkung zu kontrollieren.

[0413] Mäuse werden mit Maus-Tumorzellen, die FGF8 exprimieren, transplantiert, und die Inhibition des Fortschreitens des Tumors wird mit der Autovakzinierung zusammen untersucht, indem die modifizierten FGF8b-Proteine oder FGF8b-DNA-Vakzine verwendet werden. Das ideale System umfasst die Verwendung von Zellen, die von Maus-Tumoren isoliert wurden. Alternativ dazu werden wir andere Maus-Zelllinien (z.B. Balb/3T3) verwenden, die stabil mit der FGF8b-cDNA in einem Expressions-Vektor transfiziert sind.

[0414] Das Maus-Xenotransplantations-Karzinom-Modell wird für passive Vakzinierungsexperimente verwendet. Nacktmäuse werden mit humanen Tumoren transplantiert, und die Inhibition der Tumoren würde mit der Übertragung von Serum von normalen oder humanisierten Mäusen, die mit modifizierten FGF8b-Proteinen oder FGF8b-DNA-Vakzinen immunisiert wurden, versucht. Dies wäre sehr nützlich zum Untersuchen der Fähigkeit der gebildeten Antikörper, Tumoren zu unterdrücken.

[0415] Ein weiterer Ansatz um einen Beweis für das Konzept zu erhalten, umfasst die Verwendung von Mäusen, die für FGF8b transgen sind. Diese Mäuse, die die FGF8b-cDNA unter der Kontrolle des sehr spezifischen Mäuse-Mammatumor-Virus (MMTV)-Promotors tragen, entwickeln nachgewiesenerweise spontan FGF8b-exprimierende Mammatumoren (Coombes, persönliche Mitteilung). Die Autovakzinierung dieser Mäuse mit den FGF8b-Varianten-Proteinen oder FGF8b-DNA-Vakzinen würde uns in die Lage versetzen, zu zeigen, ob die Autovakzine es den Mäusen ermöglichen, die Tumoren zu unterdrücken oder abzustoßen.

[0416] Ein möglicher Ansatz um einen Beweis des Konzepts zu erhalten, wäre die Verwendung der transgenischen Wnt-1-Mäuse (MacArthur 1995c). Von der Induktion von Brustkrebs-Arten durch MMTV-Virus wird berichtet, dass sie die FGF8-Expression in mehr als der Hälfte der Mäuse aktivieren, die Tumoren entwickeln. Die FGF8b-Abhängigkeit der Tumoren könnte bestätigt werden, wenn unser Autovakzin/unsere Autovakzine das Auftreten oder die Wachstumsrate der Tumoren unterdrücken könnten.

[0417] Die Tatsache, dass transgenische Mäuse oft nicht-physiologische immunologische Toleranz-Muster zeigen, wird dieses Projekt sehr wahrscheinlich nicht beeinflussen, da die FGF8b-Polypeptide bei Mensch und Maus identisch sind.

[0418] Wenn eine hilfreiche Wirkung der FGF8b-Immunisierungen tatsächlich im Maus-Modell gezeigt wurde und geeignete humane Vakzin-Kandidaten ausgewählt wurden, wird es möglich sein, eine begrenzte Anzahl toxikologischer Studien durchzuführen. Anschließend können Vakzin-Studien bei Brust- und Prostatakrebs-Patienten durchgeführt werden um einen endgültigen Beweis des Konzepts zu erhalten.

[0419] Es ist wichtig, dass mehr Mutanten auf der Basis der verfügbaren Daten konstruiert werden, wenn die Experimente unter Verwendung von in vivo-Modellen ein positives Ergebnis haben.

BEISPIEL 4

Herstellung eines MUC-1-Analogons

[0420] Es wurde nur ein MUC-1-AutoVac-Molekül hergestellt. Dieses umfasst insgesamt neun Mucin-Repeats, von denen jedes die Sequenz SEQ ID NO:33 besitzt. Die Konstruktion beginnt mit drei solcher Sequenzen, gefolgt von einem P2-Epitop, gefolgt von drei weiteren Mucin-Sequenzen, gefolgt von einem P30-Epitop, und schließlich von drei Mucin-Sequenzen.

[0421] Die Konstruktion wurde mit und ohne ein N-terminales UNI-his-tag erstellt (SEQ ID NO:23). Beide Varianten wurden in E. coli exprimiert. Die Identität des exprimierten Proteins wurde sowohl durch Western-Blot

als auch N-terminale Sequenzierung bestätigt. Das Protein wird in löslicher Form exprimiert, aber als Dimer, was einigermaßen überraschend ist.

[0422] Die HIS-getaggten MUC-1-Moleküle wurden mittels Metall-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die Menge an reinem Protein und die Reinheit ist derzeit unbekannt.

BEISPIEL 5

Durchbrechen der Autotoleranz in einem Maus-Modellsystem

[0423] CTL-Experimente, in denen Mäuse mit dendritischen Zellen immunisiert wurden, die sowohl mit einem Klasse I- als auch einem Klasse II-Epitop pulsmarkiert wurden, haben zuvor eine verstärkte CTL-Induktion aufgezeigt, wenn sowohl die Immunisierung als auch die Restimulierung in vitro mit sowohl einem Klasse I- als auch einem Klasse II-Peptid durchgeführt wurden, im Gegensatz zu einer Immunisierung und Restimulierung lediglich mit einem Klasse I-Epitop. Diese Situation ist vergleichbar mit der Immunisierung mit einem Autovakzin, bei der ein fremdes Klasse II-Epitop in einem Selbst-Protein eingefügt ist. Die Aufnahme und Prozessierung dieser Moleküle mittels professioneller Antigen-präsentierender Zellen, wie dendritischen Zellen, führt zur Präsentation des fremden Klasse II-Epitops zusammen mit einigen Selbst-Klasse I-Epitopen. Es ist bekannt, dass es möglich ist, autoreaktive CTLs hervorzubringen, aber die Anwesenheit eines fremden Klasse II-Helfer-Epitops sollte diese CTL-Induktion sehr wahrscheinlich verstärken.

[0424] Der potentielle Vorteil der vorliegenden Erfindung zur Induktion von selbstreaktiven CTLs wird derzeit in Ovalbumin-transgenen Mäusen untersucht. Es existieren vier unterschiedliche transgenische Linien mit unterschiedlichen Ovalbumin-Expressionsleveln und Toleranzzuständen, vgl. Kurts C et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 239-245, die die RIP-mOVA-transgenischen Mäuse offenbaren (die Ovalbumin in Pankreas, Niere und Thymus exprimieren und einen hohen Grad der Toleranz aufweisen), und Kurts C et al., 1998, J. Exp. Med. 188: 409-414, welche die RIP-OVA^{low}- und RIP-OVA^{high}-transgenischen Mäuse offenbaren, welche niedrige und hohe Expressionsspiegel von Ovalbumin aufweisen. Die letzte Linie, RIP-OVA^{int}, welche Ovalbumin mit einem mittleren Spiegel exprimiert, wurde von Dr. William R. Heath erhalten, einem Co-Autor der zwei oben erwähnten Literaturstellen.

[0425] Im Körper gibt es verschiedene Stufen der Toleranz gegen unterschiedliche Antigene. Die mindeste Toleranzstufe findet man bei zirkulierenden Antigenen in großen Mengen. Diese Antigene treten alle in den Thymus ein, wo selbst-reaktive T-Zellen zerstört werden. Diese Antigene stehen unter "zentraler Toleranz". Gewebe-spezifische Antigene treten andererseits nicht direkt in den Thymus ein, und sie stehen im Allgemeinen unter "peripherer Toleranz", die z.B. durch T-Zell-Anergie ausgeübt wird.

[0426] Es wurden zwei Ovalbumin-AutoVac-Konstrukte produziert. Beide beziehen sich auf die Sequenz mit der Zugangs-Nr.: J00845 bei EMBL, in die die Sequenz von P30 (SEQ ID NO:14) an zwei verschiedenen Stellen eingefügt wurde.

[0427] In dem Konstrukt "OVA 3.1" ist P30 an der Position eingefügt, die Aminosäuren 272-292 im Ovalbumin entspricht. In dem Konstrukt "OVA 3.2" ist P30 an der Position eingefügt, die Aminosäuren 321-341 im Ovalbumin entspricht. Diese Konstrukte wurden in den Vektor pVax1 eingefügt und zur DNA-Immunisierung verwendet.

[0428] Die Mäuse wurden intradermal einmal mit 100 µg von jeder DNA immunisiert. Drei Wochen nach dieser Immunisierung wurden die Milzen entfernt und ein CTL-Assay unter Verwendung von Zielzellen, die das dominante Ovalbumin-Epitop SIINFEKL und das zusammengewürfelte FILKSINE-Peptid als Kontrolle exprimierten. Die Immunisierung führte zu einer klaren CTL-Induktion in Wildtyp-C57BL/6-Mäusen – wie erwartet, da sowohl Ovalbumin als auch P30 in diesen Mäusen fremd ist.

[0429] Wir beabsichtigen nun, die 4 Linien der Ovalbumin-transgenen Mäuse mit diesen AutoVac-Konstrukten zu immunisieren. RIP-OVA^{low}, RIP-OVA^{int} und RIP-OVA^{high} exprimieren ansteigende Mengen von Ovalbumin und besitzen unterschiedliche Stufen der Toleranz, und, wie oben erwähnt, auch RIP-mOVA besitzt einen hohen Grad an Toleranz.

[0430] In diesen 4 Linien der transgenen Mäuse wird nur das P30 fremd sein. Ovalbumin ist ein Selbst-Antigen in diesen Mäusen, und diese Situation stellt daher eine echte Autovakzinierung für die CTL-Induktion gegen Ovalbumin dar.

[0431] Vorläufige Ergebnisse, die in RIP-OVA^{low}-Mäusen erhalten wurden, welche den niedrigsten Grad an "peripherer Toleranz" gegen Ovalbumin besitzen, zeigten, dass sowohl das Ovalbumin mit dem eingefügten P30 als auch die natürlich vorkommenden Ovalbumin-Moleküle in der Lage waren, CTL-Antworten hervorzurufen – es wird erwartet, dass transgenische Mäuse mit einem höheren Grad der Toleranz lediglich in der Lage sein werden, eine CTL-Antwort gegen die modifizierten Ovalbumin-Moleküle hervorzurufen, und nicht gegen die natürlich vorkommende Form.

Liste der Literaturstellen

- Ago H et al., (1991). J Biochem (Tokyo), 110, 360-3.
 Abdel-Nabi H et al. (1992). Sem. Urol. 10, 45-54.
 Acevedo et al. (1995), Cancer 76; 1467-1475.
 Acevedo et al. (1997), Cancer Detect. Prev. 21; 295-303.
 Adelstein S et al. (1991), Science 251: 1223-1225.
 Babaian RJ et al. (1999), J. Urol 152, 1952-1955.
 Barnard JA et al. (1995) Gastroenterol. 108(2): 564-580.
 Bier H et al. (1995), Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 252(7): 433-9.
 Bouchard L et al. (1989), Cell 57(6): 931-36.
 Blaber M et al. (1996), Biochemistry 35, 2086-94.
 Blunt AG et al. (1997), J Biol Chem 272, 3733-8.
 Boring CC et al. (1993), CA Cancer J. Clin. 43: 7-26.
 Boucher et al. (1995), Hum. Pathol. 26; 1201-1206.
 Callahan R (1996), Breast Cancer Res Treat, 39, 33-44.
 Carter RE (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 749-753.
 Chang et al., (1981), Fertil. Steril. 36; 659-663.
 Chantry A, 1995, J.Biol. Chem. 270(7): 3068-73.
 Crossley PH et al. (1996b), Cell, 84, 127-36.
 Crossley PH et al. (1995), Development, 121, 439-51.
 Crossley PH, Martinez, S. and Martin, G.R. (1996a) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. Nature, 380, 66-8.
 Dean C et al. (1994), Int. J. Cancer, suppl 8: 103-107.
 Dillioglulil Ö et al. (1995), Eur. Urol. 28, 85-101.
 Doi et al. (1996), Int. J. Cancer 65; 459-459.
 Douglas TH et al. (1995), J. Surg. Oncol. 59(4), 246-250.
 Earp HS et al. (1995), Breast Cancer Res. Treat. 35(1):115-32.
 Eccles SA (1994), Invasion Metastasis 14 (1-6): 337-48.
 Eppenberger U et al. (1994), J. Neurooncol. 22(3): 299-54.
 Dorkin TJ et al. (1999), Oncogene 18: 2755-2761.
 Eriksson AE et al. (1993), Protein. Sci. 2: 1274-84.
 Fernandez-Teran M. et al. (1997), Dev. Biol. 189, 246-55.
 Fujii K et al. (1995), Fxp. Cell. Res. 216(1): 261-72.
 Furst J et al. (1994), Urol. Res. 22, 107-113.
 Furthauer M et al. (1997), Development 129: 9253-64.
 Geissler et al. (1997), Lab. Invest. 76: 859-871.
 Gemel J et al. (1996), Genomics 35: 253-7.
 Ghosh AK et al. (1996), Cell Growth Differ 7: 1925-34.
 Goldfarb M et al. (1996), Cytokine Growth Factor Rev 7: 311-25.
 Goodnow CC et al. (1988), Nature 334: 676-682.
 Goodnow CC et al. (1991), Nature 352: 532-536.
 Greenberg NM et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3439-3443.
 Guy CT et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci, USA 89: 10578-10582.
 Heikinheimo M et al. (1994), Mech Dev, 48: 129-38.
 Henttu P and Vihko P (1989), Bioch. Biophys. Res. Comm. 160: 903-910.
 Hopp TP and Woods KR (1983), Mol. Immunol. 20: 483-9.
 Horoszewicz JSH et al. (1983), Cancer Res. 43: 1803-1818.
 Horoszewicz JSH et al. (1987), Anticancer Res. 7: 927-936.
 Hoshikawa M et al. (1998), Biochem Biophys Res Commun 299: 187-91.
 Husmann I et al. (1996), Cytokine Growth Factor Rev 7: 249-58.
 Israeli RS et al. (1999), Cancer Res. 59: 1807-1811.
 Israeli RS et al. (1993), Cancer Res. 53: 227-230.

- Israeli RS et al. (1994), *Cancer Res.* 59: 6306-6310.
- Jacoby et al. (1984), *Adv. Immunol.* 35: 157-208.
- Johnson RL and Tabin CJ (1997), *Cell* 90: 979-90.
- Kahn D et al. (1999), *J. Urol.* 152: 1490-1995.
- Kapoun AM and Shackleford GM (1997), *Oncogene* 14: 2985-9.
- Kettunen P and Thesleff 2 (1998), *Dev Dyn* 211: 256-68.
- Koga M et al. (1995), *J Steroid Biochem Mol Biol* 54: 1-6.
- Kouhara H et al., (1994), *Oncogene* 9: 455-62.
- Kozak M (1991), *J Cell Biol* 115: 887-903.
- Lapthorn et al. (1994), *Nature* 369: 455-461.
- Lazar et al. (1995), *Cancer Res.* 55: 3735-3738.
- Leek J et al. (1995), *British Journal of Cancer* 72: 583-588.
- Leung HY et al. (1996), *Oncogene* 12: 1833-5.
- Lopes AD (1990), *Cancer Res.* 50: 6423-6429.
- Loric S et al. (1995), *Clin. Chem.* 41(12): 1698-1704.
- Lupu R et al. (1995), *Semin. Cancer. Biol.* 6: 135-145.
- MacArthur CA et al. (1995a), *Cell Growth Differ* 6: 817-25.
- MacArthur CA et al. (1995b), *Development* 121: 3603-13.
- MacArthur CA et al. (1995c), *J Virol* 69: 2501-7.
- Manabe et al. (1985), *Gastroenterology* 89: 1319-1325.
- Marsh SK et al. (1999), *Oncogene* 18, 1053-1060.
- Martin L et al. (1993), *J. Immunol.* 150(49): 1234-43.
- Mattei MG et al. (1995), *Mamm Genome* 6: 196-7.
- McDonnell WM and Askari FD (1996), *New Engl. J. Med* 334: 42-45.
- Meyers EN et al. (1998), *Nat Genet* 18: 136-41.
- Milich DR et al. (1994), *J. Immunol.* 153(1): 429-935.
- Milner PG et al. (1989), *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1096-103.
- Miyashita Y et al. (1994), *Jpn J Cancer Res* 85: 1117-23.
- Modjtahedi H et al. (1993a), *Br. J. Cancer* 67(2): 254-261.
- Modjtahedi H et al. (1993b), *Cell. Biophys.* 22(1-3): 129-46.
- Modjtahedi H et al. (1996), *Br. J. Cancer* 73(2): 228-35.
- Moy FJ et al. (1996), *Biochemistry*, 35: 13552-13561.
- Muller WJ et al. (1988), *Cell* 54(1): 105-115.
- Murphy GP et al. (1996), *Prostate* 28: 266-271.
- Murphy GP et al. (1995), *Prostate* 26: 164-168.
- Murphy GP et al. (1995), *Anticancer Research* 15(4): 1473-1379.
- Nguyen L et al. (1990), *Clin. Chem.* 35: 1450-1955.
- Nonomura N et al. (1990), *Cancer Res* 50: 2316-21.
- O'Sullivan D et al. (1991), *J. Immunology* 147: 2663-9.
- Ohnishi Y et al. (1995), *Br. J. Cancer* 71(5): 969-73.
- Ohuchi N et al. (1997a), *Development* 124: 2235-44.
- Ohuchi H et al. (1997b), *Mech Dev* 62: 3-13.
- Ohuchi N et al. (1994), *Biochem Biophys Res Commun* 204: 882-8.
- Payson RA et al. (1996), *Oncogene* 13: 47-53.
- Pillai et al. (1996), *FEBS Lett.* 387: 23-26.
- Pollard M and Luckert PH (1994), *Anticancer Res.* 14: 901-903.
- Prigent SA and Lemoine NR (1992), *Progress in Growth Factor Research* 4: 1-24.
- R&D focus, *Drug News*, (1996) 5, 21, 9.
- Rammensee H-G. et al. (1995), *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Regelson W (1995), *Cancer* 76: 1299-1301.
- Ries LAG et al. (1996), *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1993: Tables and Graphs*, National Cancer Institute, Bethesda, MD.
- Rinker-Schaeffer CW et al. (1995), *Genomics*, 30(1): 105-108.
- Rochon YP et al. (1994), *Prostate* 25: 219-223.
- Rock KL et al. (1996), *Vaccine* 19: 1560-1568.
- Rock KL and Clark K (1996), *J. Immunol.* 156: 3721-3726.
- Rudra-Ganguly N et al. (1998), *Oncogene* 16: 1487-92.
- Salomon DS et al. (1995), *Critical reviews in Oncology/Hematology* 19: 183-232.
- Sato B et al. (1993), *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 91-8.
- Schlegel J et al. (1994), *J. Neurooncol.* 22(3): 249-54.

- Schmitt JF et al. (1996), *J Steroid Biochem Mol Biol* 57: 173-8.
- Sheaff et al. (1996), *J. Clin. Pathol.* 49: 329-332.
- Sherman L et al. (1998), *Genes Dev* 12: 1058-71.
- Shimamura K and Rubenstein JL (1997), *Development* 129: 2709-18.
- Shirai A and Klinman DM (1993), *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 979-983.
- Sokoloff M et al. (1996), *Cancer* 77(9): 1862-1872.
- Steinhoff U et al. (1994), *Eur. J. Immunol.* 24(3): 773-76.
- Stevens VC (1986), *Ciba Found. Symp.* 119: 200-225.
- Su SL et al. (1995), *Cancer Res.* 55: 1441-1443.
- Syrgos et al. (1998), *Gut* 42: 88-91.
- Talwar et al. (1976), *PNAS* 73: 218-222.
- Talwar et al. (1994), *PNAS* 91: 8532-8536.
- Tanaka A et al. (1992), *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8928-32.
- Tanaka A et al. (1998), *Cancer Research* 58: 2053-56.
- Tanaka A et al. (1995), *FEBS Lett* 363: 226-30.
- Thomas H et al. (1996), *Br. J. Cancer*, 73(1): 65-72.
- Tjoa B et al. (1996), *Prostate* 28: 65-69.
- Tjoa B et al. (1995), *Prostate* 27: 63-69.
- Tokunaga A et al., (1995), *Cancer* 75(6 suppl.): 1918-25.
- Tosi E et al. (1995), *Int. J. Cancer* 62(5): 643-50.
- Trionzi et al. (1994), *Int. J. Onc.* 5: 1997-1453.
- Troyer JK et al. (1995), *Int. J. Cancer* 62: 552-558.
- Valone FH et al. (1995), *J. Clin. Oncol.* 13(9): 2281-92.
- Valve E et al. (1997), *Biochem Biophys Res Commun* 232: 173-7.
- van Dam PA et al. *J. Clin. Pathol.* 1994 47(10): 919-19.
- Weiner LM et al. (1995), *Cancer Res.* 55(20): 4586-4593.
- Wright GL Jr et al. (1996), *Urology* 98: 326-334.
- Wu J et al. (1997), *J Steroid Biochem Mol Biol* 62: 1-10.
- Wu X et al., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N., Mendelsohn, J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin.
- Wynant GE et al. (1991), *Prostate* 18: 229-291.
- Xu X et al. (1998), *Development* 125: 753-65.
- Yamanishi H et al. (1995), *J Steroid Biochem Mol Biol* 52: 99-53.
- Yogeeswaran and Salk (1981), *Science* 212: 1514-1516.
- Yokoyama N et al. (1998), *Dev Biol* 196: 1-10.
- Yoshimura K et al. (1996), *Cancer Lett* 103: 91-7.
- Yoshiura K et al. (1997), *Am J Med Genet* 72: 354-62.
- Young RA and Davis RW (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1194-1198.
- Yule TD (1993), *J. Immunol.* 151(6): 3057-3069.
- Zhang JD et al. (1991), [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 88(12): 5477], *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3446-50.
- Zhu Z et al. (1995), *Int. J. Cancer* 62(3): 319-324.
- Zhu X et al. (1991), *Science* 251: 90-3.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> M&E Biotech A/S
 STEINAA, Lucilla
 NIELSEN, Klaus Gregorius
 DALUM, Iben
 HAANING, Jesper
 LEACH, Dana
 BIRK, Peter
 MOURITSEN, Soren
 GAUTAM, Anand
 KARLSSON, Gunilla

<120> NEUE VERFAHREN ZUR THERAPEUTISCHEN VACCINIERUNG

<130> 22113 PC 1

<140>

<141>

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2253

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2253)

<220>

<221> misc_feature

<222> (58)..(2253)

<223> Human PSM'

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> ggt oder ttg, codierend für Gly bzw. Trp

<400> 1

atg ggt aat ctc ctt cac gaa acc gac tcg gct gtg gcc acc gcg cgc 48

Met Gly Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg

1

5

10

15

cgc ccg cgc tgg ctg tgc gct ggg gcg ctg gtg ctg gcg ggt ggc ttc 96

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe

20

25

30

DE 699 18 146 T2 2005.07.07

ttt ctc ctc ggc ttc ctc ttc ggg tgg ttt ata aaa tcc tcc aat gaa	144
Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu	
35 40 45	
gct act aac att act cca aag cat aat atg aaa gca ttt ttg gat gaa	192
Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu	
50 55 60	
ttg aaa gct gag aac atc aag aag ttc tta tat aat ttt aca cag ata	240
Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile	
65 70 75 80	
cca cat tta gca gga aca gaa caa aac ttt cag ctt gca aag caa att	288
Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile	
85 90 95	
caa tcc cag tgg aaa gaa ttt ggc ctg gat tct gtt gag cta gca cat	336
Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His	
100 105 110	
tat gat gtc ctg ttg tcc tac cca aat aag act cat ccc aac tac atc	384
Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile	
115 120 125	
tca ata att aat gaa gat gga aat gag att ttc aac aca tca tta ttt	432
Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe	
130 135 140	
gaa cca cct cct cca gga tat gaa aat gtt tcg gat att gta cca cct	480
Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro	
145 150 155 160	
ttc agt gct ttc tct cct caa gga atg cca gag ggc gat cta gtg tat	528
Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr	
165 170 175	
gtt aac tat gca cga act gaa gac ttc ttt aaa ttg gaa cgg gac atg	576
Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met	
180 185 190	
aaa atc aat tgc tct ggg aaa att gta att gcc aga tat ggg aaa gtt	624
Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val	
195 200 205	
ttc aga gga aat aag gtt aaa aat gcc cag ctg gca ggg gcc aaa gga	672
Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly	
210 215 220	
gtc att ctc tac tcc gac cct gct gac tac ttt gct cct ggg gtg aag	720
Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys	
225 230 235 240	

tcc tat cca gat ggt tgg aat ctt cct gga ggt ggt gtc cag cgt gga	768
Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly	
245 250 255	
aat atc cta aat ctg aat ggt gca gga gac cct ctc aca cca ggt tac	816
Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr	
260 265 270	
cca gca aat gaa tat gct tat agg cgt gga att gca gag gct gtt ggt	864
Pro Ala Asn Gly Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly	
275 280 285	
ctt cca agt att cct gtt cat cca att gga tac tat gat gca cag aag	912
Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys	
290 295 300	
ctc cta gaa aaa atg ggt ggc tca gca cca cca gat agc agc tgg aga	960
Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg	
305 310 315 320	
gga agt ctc aaa gtg ccc tac aat gtt gga cct ggc ttt act gga aac	1008
Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn	
325 330 335	
ttt tct aca caa aaa gtc aag atg cac atc cac tct acc aat gaa gtg	1056
Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val	
340 345 350	
aca aga att tac aat gtg ata ggt act ctc aga gga gca gtg gaa cca	1104
Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro	
355 360 365	
gac aga tat gtc att ctg gga ggt cac cgg gac tca tgg gtg ttt ggt	1152
Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly	
370 375 380	
ggt att gac cct cag agt gga gca gct gtt gtt cat gaa att gtg agg	1200
Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg	
385 390 395 400	
agc ttt gga aca ctg aaa aag gaa ggg tgg aga cct aga aga aca att	1248
Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile	
405 410 415	
ttg ttt gca agc tgg gat gca gaa gaa ttt ggt ctt ctt ggt tct act	1296
Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr	
420 425 430	
gag tgg gca gag gag aat tca aga ctc ctt caa gag cgt ggc gtg gct	1344
Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala	
435 440 445	

tat att aat gct gac tca tct ata gaa gga aac tac act ctg aga gtt	1392
Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val	
450 455 460	
gat tgt aca ccg ctg atg tac agc ttg gta cac aac cta aca aaa gag	1440
Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu	
465 470 475 480	
ctg aaa agc cct gat gaa ggc ttt gaa ggc aaa tct ctt tat gaa agt	1488
Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser	
485 490 495	
tgg act aaa aaa agt cct tcc cca gag ttc agt ggc atg ccc agg ata	1536
Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile	
500 505 510	
agc aaa ttg gga tct gga aat gat ttt gag gtg ttc ttc caa cga ctt	1584
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu	
515 520 525	
gga att gct tca ggc aga gca cgg tat act aaa aat tgg gaa aca aac	1632
Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn	
530 535 540	
aaa ttc agc ggc tat cca ctg tat cac agt gtc tat gaa aca tat gag	1680
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu	
545 550 555 560	
ttg gtg gaa aag ttt tat gat cca atg ttt aaa tat cac ctc act gtg	1728
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val	
565 570 575	
gcc cag gtt cga gga ggg atg gtg ttt gag cta gcc aat tcc ata gtg	1776
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val	
580 585 590	
ctc cct ttt gat tgt cga gat tat gct gta gtt tta aga aag tat gct	1824
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala	
595 600 605	
gac aaa atc tac agt att tct atg aaa cat cca cag gaa atg aag aca	1872
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr	
610 615 620	
tac agt gta tca ttt gat tca ctt ttt tct gca gta aag aat ttt aca	1920
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr	
625 630 635 640	
gaa att gct tcc aag ttc agt gag aga ctc cag gac ttt gac aaa agc	1968
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser	
645 650 655	

aac cca ata gta tta aga atg atg aat gat caa ctc atg ttt ctg gaa 2016
 Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
 660 665 670

aga gca ttt att gat cca tta ggg tta cca gac agg cct ttt tat agg 2064
 Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg
 675 680 685

cat gtc atc tat gct cca agc agc cac aac aag tat gca ggg gag tca 2112
 His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
 690 695 700

ttc cca gga att tat gat gct ctg ttt gat att gaa agc aaa gtg gac 2160
 Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
 705 710 715 720

cct tcc aag gcc tgg gga gaa gtg aag aga cag att tat gtt gca gcc 2208
 Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
 725 730 735

ttc aca gtg cag gca gct gca gag act ttg agt gaa gta gcc taa 2253
 Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
 740 745 750

<210> 2

<211> 750

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
 35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
 50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
 65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85 90 95

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
 100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
 115 120 125
 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
 130 135 140
 Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
 145 150 155 160
 Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
 165 170 175
 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
 180 185 190
 Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
 195 200 205
 Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
 210 215 220
 Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
 225 230 235 240
 Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly
 245 250 255
 Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
 260 265 270
 Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
 275 280 285
 Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
 290 295 300
 Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg
 305 310 315 320
 Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn
 325 330 335
 Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val
 340 345 350
 Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro
 355 360 365
 Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly
 370 375 380
 Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg
 385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
 405 410 415
 Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
 420 425 430
 Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
 435 440 445
 Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val
 450 455 460
 Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu
 465 470 475 480
 Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser
 485 490 495
 Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
 500 505 510
 Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
 515 520 525
 Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn
 530 535 540
 Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
 565 570 575
 Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
 580 585 590
 Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
 595 600 605
 Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
 610 615 620
 Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
 625 630 635 640
 Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
 645 650 655
 Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
 660 665 670
 Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg
 675 680 685

His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
690 695 700

Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
705 710 715 720

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
725 730 735

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
740 745 750

<210> 3

<211> 3768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3768)

<400> 3

atg gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg 48
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
-20 -15 -10

ccc ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gac atg aag 96
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
-5 -1 1 5

ctg cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg ctc cgc cac 144
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
10 15 20 25

ctc tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa ctc acc tac 192
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
30 35 40

ctg ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg 240
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
45 50 55

cag ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag gtc cca ctg 288
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
60 65 70

cag agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag gac aac tat 336
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
75 80 85

gcc ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg aac aat acc acc cct	384
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro	
90 95 100 105	
gtc. aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag ctt cga agc	432
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser	
110 115 120	
ctc aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag	480
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln	
125 130 135	
ctc tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac	528
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn	
140 145 150	
aac cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc	576
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys	
155 160 165	
cac ccc tgt tct ccg atg tgt aag ggc tcc cgc tgc tgg gga gag agt	624
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser	
170 175 180 185	
tct gag gat tgt cag agc ctg acg cgc act gtc tgt gcc ggt ggc tgt	672
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys	
190 195 200	
gcc cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt	720
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys	
205 210 215	
gct gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc	768
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu	
220 225 230	
cac ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg cac tgc cca gcc ctg gtc	816
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val	
235 240 245	
acc tac aac aca gac acg ttt gag tcc atg ccc aat ccc gag ggc cgg	864
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg	
250 255 260 265	
tat aca ttc ggc gcc agc tgt gtg act gcc tgt ccc tac aac tac ctt	912
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu	
270 275 280	
tct acg gac gtg gga tcc tgc acc ctc gtc tgc ccc ctg cac aac caa	960
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln	
285 290 295	

gag gtg aca gca gag gat gga aca cag cgg tgt gag aag tgc agc aag	1008
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys	
300 305 310	
ccc tgt gcc cga gtg tgc tat ggt ctg ggc atg gag cac ttg cga gag	1056
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu	
315 320 325	
gtg agg gca gtt acc agt gcc aat atc cag gag ttt gct ggc tgc aag	1104
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys	
330 335 340 345	
aag atc ttt ggg agc ctg gca ttt ctg ccg gag agc ttt gat ggg gac	1152
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp	
350 355 360	
cca gcc tcc aac act gcc ccg ctc cag cca gag cag ctc caa gtg ttt	1200
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe	
365 370 375	
gag act ctg gaa gag atc aca ggt tac cta tac atc tca gca tgg ccg	1248
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro	
380 385 390	
gac agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc cag aac ctg caa gta atc ccg	1296
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg	
395 400 405	
gga cga att ctg cac aat ggc gcc tac tcg ctg acc ctg caa ggg ctg	1344
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu	
410 415 420 425	
ggc atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca ctg agg gaa ctg ggc agt gga	1392
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly	
430 435 440	
ctg gcc ctc atc cac cat aac acc cac ctc tgc ttc gtg cac acg gtg	1440
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val	
445 450 455	
ccc tgg gac cag ctc ttt cgg aac ccg cac caa gct ctg ctc cac act	1488
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr	
460 465 470	
gcc aac cgg cca gag gac gag tgt gtg ggc gag ggc ctg gcc tgc cac	1536
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His	
475 480 485	
cag ctg tgc gcc cga ggg cac tgc tgg ggt cca ggg ccc acc cag tgt	1584
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys	
490 495 500 505	

DE 699 18 146 T2 2005.07.07

gtc aac tgc agc cag ttc ctt cgg ggc cag gag tgc gtg gag gaa tgc	1632
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys	
510 515 520	
cga gta ctg cag ggg ctc ccc agg gag tat gtg aat gcc agg cac tgt	1680
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys	
525 530 535	
ttg ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat ggc tca gtg acc tgt	1728
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys	
540 545 550	
ttt gga ccg gag gct gac cag tgt gtg gcc tgt gcc cac tat aag gac	1776
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp	
555 560 565	
cct ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc agc ggt gtg aaa cct gac ctc	1824
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu	
570 575 580 585	
tcc tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag gag ggc gca tgc cag	1872
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln	
590 595 600	
cct tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc tgt gtg gac ctg gat gac aag	1920
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys	
605 610 615	
ggc tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg acg tcc atc gtc tct	1968
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser	
620 625 630	
gcg gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg ggg gtg gtc ttt ggg	2016
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly	
635 640 645	
atc ctc atc aag cga cgg cag cag aag atc cgg aag tac acg atg cgg	2064
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg	
650 655 660 665	
aga ctg ctg cag gaa acg gag ctg gtg gag ccg ctg aca cct agc gga	2112
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly	
670 675 680	
gcg atg ccc aac cag gcg cag atg cgg atc ctg aaa gag acg gag ctg	2160
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu	
685 690 695	
agg aag gtg aag gtg ctt gga tct ggc gct ttt ggc aca gtc tac aag	2208
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys	
700 705 710	

ggc atc tgg atc cct gat ggg gag aat gtg aaa att cca gtg gcc atc	2256
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile	
715 720 725	
aaa gtg ttg agg gaa aac aca tcc ccc aaa gcc aac aaa gaa atc tta	2304
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu	
730 735 740 745	
gac gaa gca tac gtg atg gct ggt gtg ggc tcc cca tat gtc tcc cgc	2352
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg	
750 755 760	
ctt ctg ggc atc tgc ctg aca tcc acg gtg cag ctg gtg aca cag ctt	2400
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu	
765 770 775	
atg ccc tat ggc tgc ctc tta gac cat gtc cgg gaa aac cgc gga cgc	2448
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg	
780 785 790	
ctg ggc tcc cag gac ctg ctg aac tgg tgt atg cag att gcc aag ggg	2496
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly	
795 800 805	
atg agc tac ctg gag gat gtg cgg ctc gta cac agg gac ttg gcc gct	2544
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala	
810 815 820 825	
cgg aac gtg ctg gtc aag agt ccc aac cat gtc aaa att aca gac ttc	2592
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe	
830 835 840	
ggg ctg gct cgg ctg ctg gac att gac gag aca gag tac cat gca gat	2640
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp	
845 850 855	
ggg ggc aag gtg ccc atc aag tgg atg gcg ctg gag tcc att ctc cgc	2688
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg	
860 865 870	
cgg cgg ttc acc cac cag agt gat gtg tgg agt tat ggt gtg act gtg	2736
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val	
875 880 885	
tgg gag ctg atg act ttt ggg gcc aaa cct tac gat ggg atc cca gcc	2784
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala	
890 895 900 905	
cgg gag atc cct gac ctg ctg gaa aag ggg gag cgg ctg ccc cag ccc	2832
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro	
910 915 920	

DE 699 18 146 T2 2005.07.07

```

ccc atc tgc acc att gat gtc tac atg atc atg gtc aaa tgt tgg atg 2880
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
          925                930                935

att gac tct gaa tgt cgg cca aga ttc cgg gag ttg gtg tct gaa ttc 2928
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
          940                945                950

tcc cgc atg gcc agg gac ccc cag cgc ttt gtg gtc atc cag aat gag 2976
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
          955                960                965

gac ttg ggc cca gcc agt ccc ttg gac agc acc ttc tac cgc tca ctg 3024
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
          970                975                980                985

ctg gag gac gat gac atg ggg gac ctg gtg gat gct gag gag tat ctg 3072
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
          990                995                1000

gta ccc cag cag ggc ttc ttc tgt cca gac cct gcc ccg ggc gct ggg 3120
Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
          1005                1010                1015

ggc atg gtc cac cac agg cac cgc agc tca tct acc agg agt ggc ggt 3168
Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly
          1020                1025                1030

ggg gac ctg aca cta ggg ctg gag ccc tct gaa gag gag gcc ccc agg 3216
Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg
          1035                1040                1045

tct cca ctg gca ccc tcc gaa ggg gct ggc tcc gat gta ttt gat ggt 3264
Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly
          1050                1055                1060                1065

gac ctg gga atg ggg gca gcc aag ggg ctg caa agc ctc ccc aca cat 3312
Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His
          1070                1075                1080

gac ccc agc cct cta cag cgg tac agt gag gac ccc aca gta ccc ctg 3360
Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
          1085                1090                1095

ccc tct gag act gat ggc tac gtt gcc ccc ctg acc tgc agc ccc cag 3408
Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln
          1100                1105                1110

cct gaa tat gtg aac cag cca gat gtt cgg ccc cag ccc cct tcg ccc 3456
Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro
          1115                1120                1125

```

cga gag ggc cct ctg cct gct gcc cga cct gct ggt gcc act ctg gaa 3504
 Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1130 1135 1140 1145
 agg gcc aag act ctc tcc cca ggg aag aat ggg gtc gtc aaa gac gtt 3552
 Arg Ala Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1150 1155 1160
 ttt gcc ttt ggg ggt gcc gtg gag aac ccc gag tac ttg aca ccc cag 3600
 Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln
 1165 1170 1175
 gga gga gct gcc cct cag ccc cac cct cct cct gcc ttc agc cca gcc 3648
 Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
 1180 1185 1190
 ttc gac aac ctc tat tac tgg gac cag gac cca cca gag cgg ggg gct 3696
 Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1195 1200 1205
 cca ccc agc acc ttc aaa ggg aca cct acg gca gag aac cca gag tac 3744
 Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1210 1215 1220 1225
 ctg ggt ctg gac gtg cca gtg tga 3768
 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1230

<210> 4
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr	100	105	110
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro	115	120	125
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser	130	135	140
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln	145	150	155
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn	165	170	175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys	180	185	190
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser	195	200	205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys	210	215	220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys	225	230	235
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu	245	250	255
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val	260	265	270
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg	275	280	285
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu	290	295	300
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln	305	310	315
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys	325	330	335
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu	340	345	350
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys	355	360	365
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp	370	375	380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460
 Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser
 645 650 655
 Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg	675	680	685
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly	690	695	700
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu	705	710	715 720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys	725	730	735
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile	740	745	750
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu	755	760	765
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg	770	775	780
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu	785	790	795 800
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg	805	810	815
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly	820	825	830
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala	835	840	845
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe	850	855	860
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp	865	870	875 880
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg	885	890	895
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val	900	905	910
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala	915	920	925
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro	930	935	940
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met	945	950	955 960

```

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

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

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

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

Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
     025                      1030                     1035                     1040

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

<210> 5
<211> 648
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(648)

<400> 5
atg ggc agc ccc cgc tcc gcg ctg agc tgc ctg ctg ttg cac ttg ctg 48
Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
1 5 10 15

gtt ctc tgc ctc caa gcc cag gta act gtt cag tcc tca cct aat ttt 96
Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
20 25 30

aca cag cat gtg agg gag cag agc ctg gtg acg gat cag ctc agc cgc 144
Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg
35 40 45

cgc ctc atc cgg acc tac cag ctc tac agc cgc acc agc ggg aag cac 192
Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His
50 55 60

gtg cag gtc ctg gcc aac aag cgc atc aac gcc atg gca gaa gac gga 240
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly
65 70 75 80

gac ccc ttc gcg aag ctc att gtg gag acc gat act ttt gga agc aga 288
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg
85 90 95

gtc cga gtt cgc ggc gca gag aca ggt ctc tac atc tgc atg aac aag 336
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys
100 105 110

aag ggg aag cta att gcc aag agc aac ggc aaa ggc aag gac tgc gta 384
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val
115 120 125

ttc aca gag atc gtg ctg gag aac aac tac acg gcg ctg cag aac gcc 432
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala
130 135 140

aag tac gag ggc tgg tac atg gcc ttt acc cgc aag ggc cgg ccc cgc 480
 Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160

aag ggc tcc aag acg cgc cag cat cag cgc gag gtg cac ttc atg aag 528
 Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys
 165 170 175

cgc ctg ccg cgg ggc cac cac acc acc gag cag agc ctg cgc ttc gag 576
 Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
 180 185 190

ttc ctc aac tac ccg ccc ttc acg cgc agc ctg cgc ggc agc cag agg 624
 Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
 195 200 205

act tgg gcc ccg gag ccc cga tag 648
 Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg
 210 215

<210> 6
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
 1 5 10 15

Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
 20 25 30

Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg
 35 40 45

Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His
 50 55 60

Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly
 65 70 75 80

Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys
 100 105 110

Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val
 115 120 125

Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala
 130 135 140

Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160

Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys
 165 170 175

Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
 180 185 190

Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
 195 200 205

Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg
 210 215

<210> 7

<211> 2256

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2256)

<400> 7

atg tgg aac gca ctg cag gac aga gac tcc gcg gag gtc ctg gga cac 48
 Met Trp Asn Ala Leu Gln Asp Arg Asp Ser Ala Glu Val Leu Gly His
 1 5 10 15

cgc cag cgc tgg ctc cgt gtt ggg aca ctg gtg ctg gct tta acc gga 96
 Arg Gln Arg Trp Leu Arg Val Gly Thr Leu Val Leu Ala Leu Thr Gly
 20 25 30

acc ttc ctc att ggc ttc ctc ttt ggg tgg ttt ata aaa cct tcc aat 144
 Thr Phe Leu Ile Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Pro Ser Asn
 35 40 45

gaa gct act ggt aat gtt tcc cat tct ggc atg aag aag gag ttt ttg 192
 Glu Ala Thr Gly Asn Val Ser His Ser Gly Met Lys Lys Glu Phe Leu
 50 55 60

cat gaa ttg aag gct gag aac atc aaa aaa ttt tta tac aat ttc aca 240
 His Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr
 65 70 75 80

cgg aca cca cac ttg gca gga aca caa aat aat ttt gag ctt gca aag 288
 Arg Thr Pro His Leu Ala Gly Thr Gln Asn Asn Phe Glu Leu Ala Lys
 85 90 95

caa att cat gac cag tgg aaa gaa ttt ggc ctg gat ttg gtt gag tta	336
Gln Ile His Asp Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Leu Val Glu Leu	
100 105 110	
tcc cat tac gat gtc ttg ctg tcc tat cca aat aaa act cat cct aac	384
Ser His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn	
115 120 125	
tat atc tca ata att aat gaa gat gga aat gag att ttc aaa aca tca	432
Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Lys Thr Ser	
130 135 140	
tta tct gaa cag cca ccc cca gga tat gag aat ata tca gat gta gtg	480
Leu Ser Glu Gln Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Ile Ser Asp Val Val	
145 150 155 160	
cca cca tac agt gcc ttc tct cca caa ggg aca cca gag ggt gat cta	528
Pro Pro Tyr Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Thr Pro Glu Gly Asp Leu	
165 170 175	
gtg tat gtc aac tat gca cga act gaa gac ttc ttt aaa ctg gaa cgg	576
Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg	
180 185 190	
gaa atg aag atc agt tgt tct ggg aag att gtg att gcc aga tat ggg	624
Glu Met Lys Ile Ser Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly	
195 200 205	
aaa gtg ttc aga gga aat atg gtt aaa aat gct caa ctg gca ggg gca	672
Lys Val Phe Arg Gly Asn Met Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala	
210 215 220	
aaa gga atg att ctg tac tca gac cct gct gac tac ttt gtt cct gcg	720
Lys Gly Met Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Val Pro Ala	
225 230 235 240	
gtg aag tcc tat cca gat ggc tgg aac ctc cct gga ggt ggt gtc caa	768
Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln	
245 250 255	
cgt gga aat gtc tta aat ctt aat ggt gca ggt gac ccg ctc aca cca	816
Arg Gly Asn Val Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro	
260 265 270	
ggt tac cca gca aat gaa cat gct tat agg cat gag ttg aca aac gct	864
Gly Tyr Pro Ala Asn Glu His Ala Tyr Arg His Glu Leu Thr Asn Ala	
275 280 285	
gtt ggc ctt cca agt att cct gtc cat cct att gga tat gat gat gca	912
Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Asp Asp Ala	
290 295 300	

cag aaa ctc tta gaa cac atg ggt ggt cca gca ccc cct gac agt agc	960
Gln Lys Leu Leu Glu His Met Gly Gly Pro Ala Pro Pro Asp Ser Ser	
305 310 315 320	
tggaag gga gga tta aaa gtg cct tac aac gtg gga cct ggc ttt gct	1008
Trp Lys Gly Gly Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Ala	
325 330 335	
gga aac ttt tca aca caa aag gtc aag atg cat att cac tct tac act	1056
Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Tyr Thr	
340 345 350	
aaa gtg aca aga atc tat aat gtc att ggc acc ctc aaa gga gct ctg	1104
Lys Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Lys Gly Ala Leu	
355 360 365	
gaa cca gac aga tat gtt att ctt gga ggt cac cga gac gct tgg gta	1152
Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ala Trp Val	
370 375 380	
ttt ggt ggc att gac cct cag agt gga gca gct gtt gtt cat gaa att	1200
Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile	
385 390 395 400	
gtg cgg agc ttt gga acc ctg aag aag aaa gga cgg agg cct aga agg	1248
Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Lys Gly Arg Arg Pro Arg Arg	
405 410 415	
aca att ttg ttt gca agc tgg gat gca gaa gaa ttt ggc ctt ctt ggt	1296
Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly	
420 425 430	
tct act gag tgg gca gag gaa cat tca aga ctc cta caa gag cga ggt	1344
Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu His Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly	
435 440 445	
gtg gct tat att aat gct gat tct tcc ata gaa gga aat tac act cta	1392
Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu	
450 455 460	
aga gtt gat tgc aca cca ctg atg tac agc tta gtg tac aac cta aca	1440
Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val Tyr Asn Leu Thr	
465 470 475 480	
aaa gag ctg caa agc cca gat gaa ggt ttt gaa gga aaa tct ctt tat	1488
Lys Glu Leu Gln Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr	
485 490 495	
gac agc tgg aaa gaa aag agt cct tca cct gag ttc att gga atg ccc	1536
Asp Ser Trp Lys Glu Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ile Gly Met Pro	
500 505 510	

DE 699 18 146 T2 2005.07.07

aga att agc aag ctg ggg tct ggc aat gat ttt gaa gtg ttc ttc caa	1584
Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln	
515 520 525	
aga ctt gga att gct tca ggc aga gcc cga tat act aaa aat tgg aaa	1632
Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Lys	
530 535 540	
act aac aaa gtc agc agc tat cct ctc tat cac agt gtc tat gaa aca	1680
Thr Asn Lys Val Ser Ser Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr	
545 550 555 560	
tat gag ctg gta gta aaa ttt tat gac cca aca ttt aaa tac cac ctc	1728
Tyr Glu Leu Val Val Lys Phe Tyr Asp Pro Thr Phe Lys Tyr His Leu	
565 570 575	
act gtg gcc cag gtt cga gga gcg atg gta ttt gaa ctt gcc aat tct	1776
Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Ala Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser	
580 585 590	
ata gtg ctt ccc ttt gac tgc caa agt tat gct gta gct ctg aag aag	1824
Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Gln Ser Tyr Ala Val Ala Leu Lys Lys	
595 600 605	
tat gct gac act atc tac aat att tca atg aaa cat cca caa gaa atg	1872
Tyr Ala Asp Thr Ile Tyr Asn Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met	
610 615 620	
aag gct tac atg ata tca ttt gat tca ctg ttt tct gca gtc aat aat	1920
Lys Ala Tyr Met Ile Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Asn Asn	
625 630 635 640	
ttt aca gat gtt gca tct aag ttc aat cag aga ctg caa gag tta gac	1968
Phe Thr Asp Val Ala Ser Lys Phe Asn Gln Arg Leu Gln Glu Leu Asp	
645 650 655	
aaa agc aac ccc ata tta ctg aga att atg aat gac cag ctg atg tat	2016
Lys Ser Asn Pro Ile Leu Leu Arg Ile Met Asn Asp Gln Leu Met Tyr	
660 665 670	
ctg gaa cgt gca ttc att gat cct tta ggc tta cca gga agg cct ttc	2064
Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Phe	
675 680 685	
tac agg cat acc atc tat gct cca agc agc cac aac aag tat gca gga	2112
Tyr Arg His Thr Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly	
690 695 700	
gaa tca ttc cct ggg att tat gat gcc ctt ttt gat ata agt agc aaa	2160
Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ser Ser Lys	
705 710 715 720	

gtc aat gct tct aag gcc tgg aac gaa gtg aag aga cag att tct att 2208
 Val Asn Ala Ser Lys Ala Trp Asn Glu Val Lys Arg Gln Ile Ser Ile
 725 730 735

gca acc ttt aca gtg caa gct gca gca gag act ctg agg gaa gta gct 2256
 Ala Thr Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Arg Glu Val Ala
 740 745 750

<210> 8

<211> 752

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Trp Asn Ala Leu Gln Asp Arg Asp Ser Ala Glu Val Leu Gly His
 1 5 10 15

Arg Gln Arg Trp Leu Arg Val Gly Thr Leu Val Leu Ala Leu Thr Gly
 20 25 30

Thr Phe Leu Ile Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Pro Ser Asn
 35 40 45

Glu Ala Thr Gly Asn Val Ser His Ser Gly Met Lys Lys Glu Phe Leu
 50 55 60

His Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr
 65 70 75 80

Arg Thr Pro His Leu Ala Gly Thr Gln Asn Asn Phe Glu Leu Ala Lys
 85 90 95

Gln Ile His Asp Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Leu Val Glu Leu
 100 105 110

Ser His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn
 115 120 125

Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Lys Thr Ser
 130 135 140

Leu Ser Glu Gln Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Ile Ser Asp Val Val
 145 150 155 160

Pro Pro Tyr Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Thr Pro Glu Gly Asp Leu
 165 170 175

Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg
 180 185 190

Glu Met Lys Ile Ser Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly
 195 200 205

Lys Val Phe Arg Gly Asn Met Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala
 210 215 220
 Lys Gly Met Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Val Pro Ala
 225 230 235 240
 Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln
 245 250 255
 Arg Gly Asn Val Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro
 260 265 270
 Gly Tyr Pro Ala Asn Glu His Ala Tyr Arg His Glu Leu Thr Asn Ala
 275 280 285
 Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Asp Asp Ala
 290 295 300
 Gln Lys Leu Leu Glu His Met Gly Gly Pro Ala Pro Pro Asp Ser Ser
 305 310 315 320
 Trp Lys Gly Gly Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Ala
 325 330 335
 Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Tyr Thr
 340 345 350
 Lys Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Lys Gly Ala Leu
 355 360 365
 Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ala Trp Val
 370 375 380
 Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile
 385 390 395 400
 Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Lys Gly Arg Arg Pro Arg Arg
 405 410 415
 Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly
 420 425 430
 Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu His Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly
 435 440 445
 Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu
 450 455 460
 Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val Tyr Asn Leu Thr
 465 470 475 480
 Lys Glu Leu Gln Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr
 485 490 495

Asp Ser Trp Lys Glu Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ile Gly Met Pro
 500 505 510
 Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln
 515 520 525
 Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Lys
 530 535 540
 Thr Asn Lys Val Ser Ser Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr
 545 550 555 560
 Tyr Glu Leu Val Val Lys Phe Tyr Asp Pro Thr Phe Lys Tyr His Leu
 565 570 575
 Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Ala Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser
 580 585 590
 Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Gln Ser Tyr Ala Val Ala Leu Lys Lys
 595 600 605
 Tyr Ala Asp Thr Ile Tyr Asn Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met
 610 615 620
 Lys Ala Tyr Met Ile Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Asn Asn
 625 630 635 640
 Phe Thr Asp Val Ala Ser Lys Phe Asn Gln Arg Leu Gln Glu Leu Asp
 645 650 655
 Lys Ser Asn Pro Ile Leu Leu Arg Ile Met Asn Asp Gln Leu Met Tyr
 660 665 670
 Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Phe
 675 680 685
 Tyr Arg His Thr Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly
 690 695 700
 Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ser Ser Lys
 705 710 715 720
 Val Asn Ala Ser Lys Ala Trp Asn Glu Val Lys Arg Gln Ile Ser Ile
 725 730 735
 Ala Thr Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Arg Glu Val Ala
 740 745 750

<210> 9

<211> 2082

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2082)

<400> 9

```

atg aag aag gag ttt ttg cat gaa ttg aag gct gag aac atc aaa aaa 48
Met Lys Lys Glu Phe Leu His Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys
  1             5             10             15

ttt tta tac aat ttc aca cgg aca cca cac ttg gca gga aca caa aat 96
Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Arg Thr Pro His Leu Ala Gly Thr Gln Asn
      20             25             30

aat ttt gag ctt gca aag caa att cat gac cag tgg aaa gaa ttt ggc 144
Asn Phe Glu Leu Ala Lys Gln Ile His Asp Gln Trp Lys Glu Phe Gly
      35             40             45

ctg gat ttg gtt gag tta tcc cat tac gat gtc ttg ctg tcc tat cca 192
Leu Asp Leu Val Glu Leu Ser His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro
      50             55             60

aat aaa act cat cct aac tat atc tca ata att aat gaa gat gga aat 240
Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn
      65             70             75             80

gag att ttc aaa aca tca tta tct gaa cag cca ccc cca gga tat gag 288
Glu Ile Phe Lys Thr Ser Leu Ser Glu Gln Pro Pro Pro Gly Tyr Glu
      85             90             95

aat ata tca gat gta gtg cca cca tac agt gcc ttc tct cca caa ggg 336
Asn Ile Ser Asp Val Val Pro Pro Tyr Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly
      100            105            110

aca cca gag ggt gat cta gtg tat gtc aac tat gca cga act gaa gac 384
Thr Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp
      115            120            125

ttc ttt aaa ctg gaa cgg gaa atg aag atc agt tgt tct ggg aag att 432
Phe Phe Lys Leu Glu Arg Glu Met Lys Ile Ser Cys Ser Gly Lys Ile
      130            135            140

gtg att gcc aga tat ggg aaa gtg ttc aga gga aat atg gtt aaa aat 480
Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Met Val Lys Asn
      145            150            155            160

gct caa ctg gca ggg gca aaa gga atg att ctg tac tca gac cct gct 528
Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly Met Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala
      165            170            175

```

gac tac ttt gtt cct gcg gtg aag tcc tat cca gat ggc tgg aac ctc	576
Asp Tyr Phe Val Pro Ala Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu	
180 185 190	
cct gga ggt ggt gtc caa cgt gga aat gtc tta aat ctt aat ggt gca	624
Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly Asn Val Leu Asn Leu Asn Gly Ala	
195 200 205	
ggt gac ccg ctc aca cca ggt tac cca gca aat gaa cat gct tat agg	672
Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu His Ala Tyr Arg	
210 215 220	
cat gag ttg aca aac gct gtt ggc ctt cca agt att cct gtc cat cct	720
His Glu Leu Thr Asn Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro	
225 230 235 240	
att gga tat gat gat gca cag aaa ctc tta gaa cac atg ggt ggt cca	768
Ile Gly Tyr Asp Asp Ala Gln Lys Leu Leu Glu His Met Gly Gly Pro	
245 250 255	
gca ccc cct gac agt agc tgg aag gga gga tta aaa gtg cct tac aac	816
Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Lys Gly Gly Leu Lys Val Pro Tyr Asn	
260 265 270	
gtg gga cct ggc ttt gct gga aac ttt tca aca caa aag gtc aag atg	864
Val Gly Pro Gly Phe Ala Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met	
275 280 285	
cat att cac tct tac act aaa gtg aca aga atc tat aat gtc att ggc	912
His Ile His Ser Tyr Thr Lys Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly	
290 295 300	
acc ctc aaa gga gct ctg gaa cca gac aga tat gtt att ctt gga ggt	960
Thr Leu Lys Gly Ala Leu Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly	
305 310 315 320	
cac cga gac gct tgg gta ttt ggt ggc att gac cct cag agt gga gca	1008
His Arg Asp Ala Trp Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala	
325 330 335	
gct gtt gtt cat gaa att gtg cgg agc ttt gga acc ctg aag aag aaa	1056
Ala Val Val His Glu Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Lys	
340 345 350	
gga cgg agg cct aga agg aca att ttg ttt gca agc tgg gat gca gaa	1104
Gly Arg Arg Pro Arg Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu	
355 360 365	
gaa ttt ggc ctt ctt ggt tct act gag tgg gca gag gaa cat tca aga	1152
Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu His Ser Arg	
370 375 380	

DE 699 18 146 T2 2005.07.07

ctc cta caa gag cga ggt gtg gct tat att aat gct gat tct tcc ata	1200
Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile	
385 390 395 400	
 gaa gga aat tac act cta aga gtt gat tgc aca cca ctg atg tac agc	1248
Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser	
405 410 415	
 tta gtg tac aac cta aca aaa gag ctg caa agc cca gat gaa ggt ttt	1296
Leu Val Tyr Asn Leu Thr Lys Glu Leu Gln Ser Pro Asp Glu Gly Phe	
420 425 430	
 gaa gga aaa tct ctt tat gac agc tgg aaa gaa aag agt cct tca cct	1344
Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Asp Ser Trp Lys Glu Lys Ser Pro Ser Pro	
435 440 445	
 gag ttc att gga atg ccc aga att agc aag ctg ggg tct ggc aat gat	1392
Glu Phe Ile Gly Met Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp	
450 455 460	
 ttt gaa gtg ttc ttc caa aga ctt gga att gct tca ggc aga gcc cga	1440
Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg	
465 470 475 480	
 tat act aaa aat tgg aaa act aac aaa gtc agc agc tat cct ctc tat	1488
Tyr Thr Lys Asn Trp Lys Thr Asn Lys Val Ser Ser Tyr Pro Leu Tyr	
485 490 495	
 cac agt gtc tat gaa aca tat gag ctg gta gta aaa ttt tat gac cca	1536
His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu Leu Val Val Lys Phe Tyr Asp Pro	
500 505 510	
 aca ttt aaa tac cac ctc act gtg gcc cag gtt cga gga gcg atg gta	1584
Thr Phe Lys Tyr His Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Ala Met Val	
515 520 525	
 ttt gaa ctt gcc aat tct ata gtg ctt ccc ttt gac tgc caa agt tat	1632
Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Gln Ser Tyr	
530 535 540	
 gct gta gct ctg aag aag tat gct gac act atc tac aat att tca atg	1680
Ala Val Ala Leu Lys Lys Tyr Ala Asp Thr Ile Tyr Asn Ile Ser Met	
545 550 555 560	
 aaa cat cca caa gaa atg aag gct tac atg ata tca ttt gat tca ctg	1728
Lys His Pro Gln Glu Met Lys Ala Tyr Met Ile Ser Phe Asp Ser Leu	
565 570 575	
 ttt tct gca gtc aat aat ttt aca gat gtt gca tct aag ttc aat cag	1776
Phe Ser Ala Val Asn Asn Phe Thr Asp Val Ala Ser Lys Phe Asn Gln	
580 585 590	

aga ctg caa gag tta gac aaa agc aac ccc ata tta ctg aga att atg 1824
Arg Leu Gln Glu Leu Asp Lys Ser Asn Pro Ile Leu Leu Arg Ile Met
595 600 605

aat gac cag ctg atg tat ctg gaa cgt gca ttc att gat cct tta ggc 1872
Asn Asp Gln Leu Met Tyr Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly
610 615 620

tta cca gga agg cct ttc tac agg cat acc atc tat gct cca agc agc 1920
Leu Pro Gly Arg Pro Phe Tyr Arg His Thr Ile Tyr Ala Pro Ser Ser
625 630 635 640

cac aac aag tat gca gga gaa tca ttc cct ggg att tat gat gcc ctt 1968
His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu
645 650 655

ttt gat ata agt agc aaa gtc aat gct tct aag gcc tgg aac gaa gtg 2016
Phe Asp Ile Ser Ser Lys Val Asn Ala Ser Lys Ala Trp Asn Glu Val
660 665 670

aag aga cag att tct att gca acc ttt aca gtg caa gct gca gca gag 2064
Lys Arg Gln Ile Ser Ile Ala Thr Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu
675 680 685

act ctg agg gaa gta gct 2082
Thr Leu Arg Glu Val Ala
690

<210> 10
<211> 694
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Met Lys Lys Glu Phe Leu His Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys
1 5 10 15

Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Arg Thr Pro His Leu Ala Gly Thr Gln Asn
20 25 30

Asn Phe Glu Leu Ala Lys Gln Ile His Asp Gln Trp Lys Glu Phe Gly
35 40 45

Leu Asp Leu Val Glu Leu Ser His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro
50 55 60

Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn
65 70 75 80

Glu Ile Phe Lys Thr Ser Leu Ser Glu Gln Pro Pro Pro Gly Tyr Glu
85 90 95

```

Asn Ile Ser Asp Val Val Pro Pro Tyr Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly
    100                      105                      110

Thr Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp
    115                      120                      125

Phe Phe Lys Leu Glu Arg Glu Met Lys Ile Ser Cys Ser Gly Lys Ile
    130                      135                      140

Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Met Val Lys Asn
    145                      150                      155                      160

Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly Met Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala
    165                      170                      175

Asp Tyr Phe Val Pro Ala Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu
    180                      185                      190

Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly Asn Val Leu Asn Leu Asn Gly Ala
    195                      200                      205

Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu His Ala Tyr Arg
    210                      215                      220

His Glu Leu Thr Asn Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro
    225                      230                      235                      240

Ile Gly Tyr Asp Asp Ala Gln Lys Leu Leu Glu His Met Gly Gly Pro
    245                      250                      255

Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Lys Gly Gly Leu Lys Val Pro Tyr Asn
    260                      265                      270

Val Gly Pro Gly Phe Ala Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met
    275                      280                      285

His Ile His Ser Tyr Thr Lys Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly
    290                      295                      300

Thr Leu Lys Gly Ala Leu Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly
    305                      310                      315                      320

His Arg Asp Ala Trp Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala
    325                      330                      335

Ala Val Val His Glu Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Lys
    340                      345                      350

Gly Arg Arg Pro Arg Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu
    355                      360                      365

Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu His Ser Arg
    370                      375                      380

```

Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile
 385 390 395 400
 Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser
 405 410 415
 Leu Val Tyr Asn Leu Thr Lys Glu Leu Gln Ser Pro Asp Glu Gly Phe
 420 425 430
 Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Asp Ser Trp Lys Glu Lys Ser Pro Ser Pro
 435 440 445
 Glu Phe Ile Gly Met Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp
 450 455 460
 Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg
 465 470 475 480
 Tyr Thr Lys Asn Trp Lys Thr Asn Lys Val Ser Ser Tyr Pro Leu Tyr
 485 490 495
 His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu Leu Val Val Lys Phe Tyr Asp Pro
 500 505 510
 Thr Phe Lys Tyr His Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Ala Met Val
 515 520 525
 Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Gln Ser Tyr
 530 535 540
 Ala Val Ala Leu Lys Lys Tyr Ala Asp Thr Ile Tyr Asn Ile Ser Met
 545 550 555 560
 Lys His Pro Gln Glu Met Lys Ala Tyr Met Ile Ser Phe Asp Ser Leu
 565 570 575
 Phe Ser Ala Val Asn Asn Phe Thr Asp Val Ala Ser Lys Phe Asn Gln
 580 585 590
 Arg Leu Gln Glu Leu Asp Lys Ser Asn Pro Ile Leu Leu Arg Ile Met
 595 600 605
 Asn Asp Gln Leu Met Tyr Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly
 610 615 620
 Leu Pro Gly Arg Pro Phe Tyr Arg His Thr Ile Tyr Ala Pro Ser Ser
 625 630 635 640
 His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu
 645 650 655
 Phe Asp Ile Ser Ser Lys Val Asn Ala Ser Lys Ala Trp Asn Glu Val
 660 665 670

Lys Arg Gln Ile Ser Ile Ala Thr Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu
 675 680 685

Thr Leu Arg Glu Val Ala
 690

<210> 11
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Clostridium tetani

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(45)

<400> 11
 cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg 45
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

<400> 12
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Clostridium tetani

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(63)

<400> 13
 ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc 48
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

gct agc cac ctg gaa 63
 Ala Ser His Leu Glu
 20

<210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

<400> 14
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
 20

<210> 15
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Fusion aus Tetanustoxoid-Epitop und PSM

<400> 15
 Gln Glu Arg Gly Val Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Leu Arg Val Asp Cys Thr
 20 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Fusion aus Tetanustoxoid-Epitop und PSM

<400> 16
 Ala Val Val Leu Arg Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
 1 5 10 15

Ile Thr Glu Leu Glu Met Lys Thr Tyr
 20 25

<210> 17
 <211> 25
 <212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusion aus Tetanustoxoid-Epitop und PSM

<400> 17

Met Phe Leu Glu Arg Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
1 5 10 15

Ile Thr Glu Leu His Val Ile Tyr Ala
20 25

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusion aus Tetanustoxoid-Epitop und PSM

<400> 18

Asn Ser Arg Leu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
1 5 10 15

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Val Asp Cys Thr Pro
20 25 30

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusion aus Tetanustoxoid-Epitop und PSM

<400> 19

Val Val Leu Arg Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
1 5 10 15

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Ser Phe Asp Ser Leu
20 25 30

<210> 20

<211> 31

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Fusion aus Tetanustoxoid-Epitop und PSM

<400> 20

Leu	Met	Phe	Leu	Glu	Phe	Asn	Asn	Phe	Thr	Val	Ser	Phe	Trp	Leu	Arg
1				5				10						15	

Val	Pro	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	His	Leu	Glu	Pro	Ser	Ser	His	Asn
			20					25					30	

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Künstliches His-Tag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 21

cat	cat	cat	cat	cat	cat
His	His	His	His	His	His
1				5	

18

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Künstliches His-Tag

<400> 22

His	His	His	His	His	His
1				5	

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Künstliches His-Tag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(42)

<400> 23

```
atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa      42
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln
  1             5             10
```

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Künstliches His-Tag

<400> 24

```
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln
  1             5             10
```

<210> 25

<211> 69

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(69)

<400> 25

```
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt gga      48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
  1             5             10             15
```

```
gca gtc ttc gtt tcg ccc agc      69
Ala Val Phe Val Ser Pro Ser
          20
```

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Ser
 20

<210> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)

<400> 27
 gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat 33
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10

<210> 29
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(75)

<400> 29
 atg aag gat tcc tgc atc act gtg atg gcc atg gcg ctg ctg tct ggg 48
 Met Lys Asp Ser Cys Ile Thr Val Met Ala Met Ala Leu Leu Ser Gly
 1 5 10 15

ttc ttt.ttc ttc gcg ccg gcc tcg agc 75
 Phe Phe Phe Phe Ala Pro Ala Ser Ser
 20 25

<210> 30
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Met Lys Asp Ser Cys Ile Thr Val Met Ala Met Ala Leu Leu Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Phe Phe Phe Ala Pro Ala Ser Ser
 20 25

<210> 31
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(60)

<400> 31
 atg aga agg atg ctt ctg cac ttg agt gtt ctg act ctc agc tgt gtc 48
 Met Arg Arg Met Leu Leu His Leu Ser Val Leu Thr Leu Ser Cys Val
 1 5 10 15
 tgg gcc act gcc 60
 Trp Ala Thr Ala
 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32
 Met Arg Arg Met Leu Leu His Leu Ser Val Leu Thr Leu Ser Cys Val
 1 5 10 15
 Trp Ala Thr Ala
 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
 1 5 10 15
 Pro Asp Thr Arg
 20

Patentansprüche

1. Verwendung von
- 3) mindestens einem CTL-Epitop, das von einem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, das in ei-

nem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, und

4) mindestens einem ersten T-Helfer-Lymphozyten (T_H)-Epitop, welches für das Tier fremd ist, oder von

3) mindestens einem Nukleinsäurefragment, das für ein CTL-Epitop codiert, das von einem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen, das in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, abgeleitet ist, und

4) mindestens einem ersten Nukleinsäurefragment, das für ein T-Helfer-Lymphozyten (T_H)-Epitop codiert, welches für das Tier fremd ist,

oder von einem nicht-pathogenen Mikroorganismus oder Virus, welcher ein Nukleinsäurefragment trägt, welches für

3) mindestens ein CTL-Epitop, das von einem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, das in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, und

4) mindestens ein erstes T-Helfer-Lymphozyten (T_H)-Epitop, welches für das Tier fremd ist, codiert, und diese exprimiert,

zur Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung zur Behandlung eines pathologischen Prozesses, ausgewählt aus einem Tumor, einer viralen Infektion und einer Infektion, die durch einen intrazellulären Parasiten oder ein Bakterium verursacht wird, indem in dem Tier die simultane Präsentation von dem mindestens einen CTL-Epitop und dem mindestens einen ersten T_H -Epitop auf einer geeigneten Antigen-präsentierenden Zelle (APC) bewirkt wird und dabei eine spezifische cytotoxische T-Lymphozyten(CTL)-Reaktion in dem Tier gegen Zellen induziert wird, die das Zellgebundene Polypeptid-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen oder das Zell-gebundene Antigen in ihrem intrazellulären Kompartiment beherbergen, wobei das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen ausgewählt ist aus einem Tumor-gebundenen Polypeptid-Antigen, einem Selbst-Protein, einem viralen Polypeptid-Antigen und einem Polypeptid-Antigen, das von einem intrazellulären Parasiten oder Bakterium abgeleitet ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Tier ein Mensch ist.

3. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die APC eine dendritische Zelle oder ein Makrophage ist.

4. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Präsentation des CTL-Epitops und des ersten fremden T_H -Epitops auf der APC bewirkt wird, indem dem Immunsystem des Tiers mindestens ein erstes Analogon des Polypeptid-Antigens präsentiert wird, wobei das erste Analogon eine Variation der Aminosäuresequenz des Polypeptid-Antigens umfasst, wobei die Variation mindestens das CTL-Epitop und das erste fremde T_H -Epitop enthält.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das mindestens erste Analogon einen wesentlichen Teil bekannter und vorhergesagter CTL-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens enthält.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der wesentliche Teil bekannter und vorhergesagter CTL-Epitope in der Aminosäuresequenz des mindestens einen ersten Analogons von mindestens 90% der MHC-I-Haplotypen, welche alle bekannten und vorhergesagten CTL-Epitope im Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen erkennen, erkannt wird.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei im wesentlichen alle bekannten CTL-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens in dem mindestens einen ersten Analogon vorhanden sind und/oder wobei im Wesentlichen alle vorhergesagten CTL-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens in dem mindestens einen ersten Analogon vorhanden sind.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei das mindestens eine erste Analogon außerdem einen Teil umfasst, der aus einer Modifikation der Struktur des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens besteht, wobei die Modifikation die Folge hat, dass die Immunisierung des Tieres mit dem ersten Analogon die Produktion von Antikörpern gegen das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen in dem Tier induziert.

9. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, welche außerdem die Verwendung von mindestens einem zweiten Analogon des Polypeptid-Antigens oder einer Nukleinsäure, die ein zweites Analogon des Polypeptid-Antigens codiert, oder mindestens eines nicht-pathogenen Mikroorganismus oder Virus, der ein Nukleinsäurefragment trägt, das für mindestens ein zweites Analogon des Polypeptid-Antigens codiert, zur Herstellung einer immunogenen Zusammensetzung für das Bewirken der Präsentation einer immunogen wirksamen Menge des mindestens einen zweiten Analogons des Polypeptid-Antigens gegenüber dem Immunsystem des Tieres, wobei das zweite Analogon eine Modifikation der Struktur des Polypeptid-Antigens enthält, wo-

bei der Modifikation die Folge hat, dass die Immunisierung des Tieres mit dem zweiten Analogon die Produktion von Antikörpern gegen das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen induziert.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die Modifikation es umfasst, dass mindestens ein zweites fremdes T_H-Epitop von dem zweiten Analogon umfasst ist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 10, wobei erstes) und/oder zweite (s) Analogon/Analoge einen wesentlichen Teil der B-Zell-Epitope des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens umfasst/umfassen.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 11, wobei die Variation und/oder Modifikation Aminosäuresubstitution und/oder -deletion und/oder -insertion und/oder -addition umfasst.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 12, wobei die Variation und/oder Modifikation es umfasst, dass

- mindestens eine erste Gruppierung im ersten und/oder zweiten Analogon bzw. in den ersten und/oder zweiten Analoga umfasst ist, wobei die erste Gruppierung das Dirigieren bzw. Targeting des Analogons zu einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) bewirkt und/oder
- mindestens eine zweite Gruppierung im ersten und/oder zweiten Analogon bzw. in den ersten und/oder zweiten Analoga umfasst ist, wobei die zweite Gruppierung das Immunsystem stimuliert, und/oder
- mindestens eine dritte Gruppierung im ersten und/oder zweiten Analogon bzw. in den ersten und/oder zweiten Analoga umfasst ist, wobei die dritte Gruppierung die Präsentation des Analogons gegenüber dem Immunsystem optimiert.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 13, wobei die Variation und/oder Modifikation die Duplikation von mindestens einem B-Zell-Epitop oder mindestens einem CTL-Epitop des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens umfasst.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 14, wobei die Variation und/oder Modifikation die Einführung eines Haptens umfasst.

16. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das/die erste (n) und/oder zweite (n) fremde (n) T_H-Epitop(e) immundominant ist/sind.

17. Verwendung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das/die erste(n) und/oder das/die zweite(n) fremde (n) T_H-Epitop (e) promiskuitiv ist/sind.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei das/die erste(n) und/oder das/die zweite(n) fremde(n) T_H-Epitop (e) aus einem natürlichen T_H-Epitop und einer künstlichen MHC-II-bindenden Peptidsequenz ausgewählt ist/sind.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das natürliche T_H-Epitop ausgewählt ist aus einem Tetanustoxoidepitop, wie P2 oder P30, einem Diphtherietoxoidepitop, einem Influenza-Virus-Hämagglutinin-Epitop und einem P. falciparum-CS-Epitop.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 19, wobei das/die erste(n) und/oder das/die zweite(n) T_H-Epitop(e) und/oder die ersten und/oder zweiten und/oder dritten Gruppierungen in Form von

- Seitengruppen, die kovalent oder nicht-kovalent an geeignete chemische Gruppen in der Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens oder einer Untersequenz davon gebunden sind, und/oder
- Fusionspartnern mit der Aminosäuresequenz, die von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, vorliegen.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die erste Gruppierung ein im Wesentlichen spezifischer Bindungspartner für ein APC-spezifisches Oberflächen-Antigen ist, wie ein Kohlenhydrat, für den es einen Rezeptor auf der APC gibt, z.B. Mannan oder Mannose.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 21, wobei die zweite Gruppierung ein Cytokin ist, ausgewählt aus Interferon γ (2FN- γ), Flt3L, Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 13 (IL-13), Interleukin 15 (IL-15) und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF), oder einem wirksamen Teil davon; einem Hitzeschockprotein,

ausgewählt aus HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 und Calreticulin (CRT), oder einem wirksamen Teil davon; oder einem Hormon.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei die dritte Gruppierung ein Lipid ist, wie eine Palmitoylgruppe, eine Myristylgruppe, eine Farnesylgruppe, eine Geranyl-Geranylgruppe, ein GPI-Anker und eine N-Acyldiglycerid-Gruppe.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 23, wobei das/die erste(n) und/oder das/die zweite(n) Analogon bzw. Analoga im Wesentlichen die Gesamttertiärstruktur des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens besitzt bzw. besitzen.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 24, wobei die Präsentation durch die APC bewirkt wird, indem dem Tier eine immunogen wirksame Menge des mindestens einen ersten Analogons verabreicht wird.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei auch eine immunologisch wirksame Menge des mindestens einen zweiten Analogons verabreicht wird.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 oder 26, wobei das/die mindestens eine(n) erste(n) und/oder zweite(n) Analogon bzw. Analoga zusammen mit einem pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Trägerstoff und/oder Vehikel und wahlweise einem Adjuvans formuliert werden.

28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei das Adjuvans die Aufnahme der mindestens ersten und/oder zweiten Analoga durch APCs, wie dendritische Zellen, erleichtert.

29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Immuntargeting-Adjuvans; einem immunmodulierenden Adjuvans, wie einem Toxin, einem Cytokin und einem mykobakteriellen Derivat; einer Ölformulierung; einem Polymer; einem Micellen-bildenden Adjuvans; einem Saponin; einer immunstimulierenden Komplexmatrix (ISCOM-Matrix); einem Partikel; DDR; Aluminium-Adjuvantien; DNR-Adjuvantien; γ -Inulin; und einem inkapselnden Adjuvans.

30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei das Cytokin wie in Anspruch 22 definiert ist, oder einem wirksamen Teil davon, wobei das Toxin ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Listeriolysin (LLO), Lipid A (MPL, L180.5/RaLP5), und einem hitzelabilen Enterotoxin, wobei das mykobakterielle Derivat ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Muramyldipeptid, vollständigem Freund'schem Adjuvans, RIBI, und einem Diester aus Trehalose, wie TDM und TDE, wobei das Immuntargeting-Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem CD40-Liganden, CD40-Antikörpern oder spezifisch bindenden Fragmenten davon, Mannose, einem Fab-Fragment, und CTLA-4, wobei die Ölformulierung Squalen oder unvollständiges Freund'sches Adjuvans umfasst, wobei das Polymer ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Kohlenhydrat, wie Dextran, PEG, Stärke, Mannan und Mannose; einem Plastikpolymer und Latex, wie Latexkugeln, wobei das Saponin Quillaja saponaria Saponin, Quil A und QS21 ist, und wobei der Partikel Latex oder Dextran umfasst.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 30, wobei das mindestens eine erste Analogon auf einem Weg verabreicht wird, ausgewählt aus dem oralen Weg und dem parenteralen Weg, wie dem intradermalen, subdermalen, intrakutanen, subkutanen; dem peritonealen, dem bukkalen, dem sublingualen, dem epiduralen, dem spinalen, dem analen und dem intrakranialen Weg.

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 31, wobei das mindestens eine erste Analogon zumindest einmal pro Jahr verabreicht wird, wie beispielsweise mindestens 2, 3, 4, 5, 6 und 12 Mal pro Jahr.

33. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Präsentation bewirkt wird, indem dem Tier der nicht-pathogene Mikroorganismus oder Virus, welcher ein Nukleinsäurefragment trägt, der für das mindestens eine CTL-Epitop und das mindestens eine T_H -Epitop codiert und diese exprimiert, verabreicht wird.

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 12, wobei die Präsentation dadurch bewirkt wird, dass dem Tier der nicht-pathogene Mikroorganismus oder Virus, welcher mindestens ein Nukleinsäurefragment trägt, welches für das mindestens erste Analogon codiert und dieses exprimiert, verabreicht.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das T_H -Epitop und/oder die ersten und/oder zweiten und/oder dritten Gruppierungen in Form von Fusionspartnern mit der Aminosäuresequenz, die von

dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, vorliegen, und wobei die Präsentation bewirkt wird, indem dem Tier der nicht-pathogene Mikroorganismus oder Virus, welcher mindestens ein Nukleinsäurefragment trägt, das das erste und/oder das zweite Analogon codiert und exprimiert, verabreicht wird.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12 oder 34, wobei die Präsentation bewirkt wird, indem dem Tier der nicht-pathogene Mikroorganismus oder Virus, welcher mindestens ein Nukleinsäurefragment trägt, welches das mindestens zweite Analogon codiert und exprimiert, verabreicht wird.

37. Verwendung nach Anspruch 36, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus oder Virus dem Tier einmal verabreicht wird.

38. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Präsentation bewirkt wird, indem das mindestens eine Nukleinsäurefragment in die APC eingebracht wird.

39. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 12, wobei die Präsentation bewirkt wird, indem das mindestens eine Nukleinsäurefragment, das für das erste Analogon codiert und dieses exprimiert, in vivo in die APC einbringt.

40. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das T_H-Epitop und/oder die ersten und/oder zweiten und/oder dritten Gruppierungen in Form von Fusionspartnern mit der Aminosäuresequenz, die von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, vorliegen, und wobei die Präsentation bewirkt wird, indem das mindestens eine Nukleinsäurefragment, das für das erste und/oder zweite Analogon codiert und dieses/dieses exprimiert, in vivo in die APC eingebracht wird.

41. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 12 und 39, welche außerdem die Verwendung von mindestens einem Nukleinsäurefragment, das für das zweite Analogon codiert und dieses exprimiert, umfasst, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Einbringen des mindestens einen Nukleinsäurefragments, das für das zweite Analogon codiert und dieses exprimiert, in die APC in vivo.

42. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Präsentation bewirkt wird, indem mindestens zwei Nukleinsäurefragmente zusammen in vivo in die APC eingebracht werden, wobei eines für das mindestens eine CTL-Epitop codiert und dieses exprimiert, und wobei ein anderes das mindestens eine erste fremde T_H-Epitop codiert und exprimiert, und wobei das erste fremde T_H-Epitop so definiert ist wie in einem der Ansprüche 1, 2 und 19 bis 22.

43. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 bis 42, wobei das/die eingefügte(n) Aminosäurefragment(e) ausgewählt ist/sind aus nackter DNA, DNA, die zusammen mit geladenen oder ungeladenen Lipiden formuliert ist, DNA, die in Liposomen formuliert ist, DNA, die in einem viralen Vektor eingeschlossen ist, DNA, die zusammen mit einem Transfektions-erleichternden Protein oder Polypeptid formuliert ist, DNA, die zusammen mit einem dirigierenden Kohlenhydrat formuliert ist, DNA, die zusammen mit Calcium-präzipitierenden Agentien formuliert ist, DNA, die an ein inertes Trägermolekül gekoppelt ist, und DNA, die zusammen mit einem Adjuvans formuliert ist.

44. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das Adjuvans ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Adjuvantien, die in einem der Ansprüche 28 bis 30 definiert sind.

45. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 bis 44, wobei die Art der Verabreichung die in Anspruch 31 oder 32 definierte ist.

46. Verfahren zur Auswahl eines immunogenen Analogons eines Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, welches in einem Tier schwach immunogen oder nicht-immunogen ist, wobei das immunogene Analogon in der Lage ist, in dem Tier eine CTL-Reaktion gegen Zellen zu induzieren, die ein MHC-Klasse I-Molekül aufweisen, das an ein Epitop gebunden ist, das vom Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen abgeleitet ist, wobei das Verfahren umfasst

- a) Identifizieren von mindestens einer Untersequenz der Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, welches keine bekannten oder vorhergesagten CTL-Epitope enthält,
- b) Herstellen von mindestens einem mutmaßlich immunogenen Analogon des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens, indem in die Aminosäuresequenz des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens mindestens ein T_H-Epitop, das für das Tier fremd ist, an einer Position innerhalb der mindestens einen in Schritt a) identifizierten Untersequenz eingefügt wird, und

c) Auswahl des Analogons/der Analoga, das/die in Schritt b) hergestellt wurde(n), welches) verifizierbar in der Lage ist/sind, eine CTL-Reaktion in dem Tier zu induzieren, wobei das Zell-gebundene Polypeptid-Antigen ausgewählt ist aus einem Tumor-gebundenen Polypeptid-Antigen, einem Selbst-Protein, einem viralen Polypeptid-Antigen und einem Polypeptid-Antigen, das von einem intrazellulären Parasiten oder Bakterium abgeleitet ist.

47. Verfahren nach Anspruch 46, wobei

- 1) die in Schritt a) identifizierte Untereinheit außerdem keine Cysteinreste enthält, oder, alternativ dazu, wobei das in Schritt b) eingefügte T_H-Epitop das Muster der Cysteinreste nicht wesentlich verändert, und/oder
- 2) die in Schritt a) identifizierte Untersequenz keine bekannten oder vorhergesagten Glycosylierungsstellen enthält, oder, alternativ dazu, wobei das in Schritt b) eingefügte T_H-Epitop das Glycosylierungsmuster nicht wesentlich verändert, und/oder
- 3) die in Schritt a) identifizierte Untereinheit signifikant zu einer pathophysiologischen Wirkung beiträgt, die von dem Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen ausgeübt wird, und wobei das Einfügen des fremden T_H-Epitops in Schritt b) die pathophysiologische Wirkung reduziert oder aufhebt, und/oder
- 4) die in Schritt a) identifizierte Untersequenz zu einer Aminosäuresequenz eines anderen Protein-Antigens des Tieres homolog ist, und wobei das Einfügen des T_H-Epitops in Schritt b) die Homologie im Wesentlichen entfernt, und/oder
- 5) das Einfügen des fremden T_H-Epitops in Schritt b) zum Erhalt eines wesentlichen Teils von B-Zell-Epitopen im Zell-gebundenen Polypeptid-Antigen führt.

48. Verfahren nach Anspruch 47, wenn Variante 5 umfasst ist, wobei das Analogon die Gesamttertiärstruktur des Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens besitzt.

49. Verfahren zur Präparation einer Zelle, die ein Analogon eines Zell-gebundenen Polypeptid-Antigens produziert, wobei das Verfahren das Einfügen einer Nukleinsäuresequenz, die ein Analogon codiert, welches entsprechend dem Verfahren eines der Ansprüche 46 bis 48 ausgewählt wurde, in einen Vektor, und die Transformation einer geeigneten Wirtszelle mit dem Vektor umfasst.

50. Verfahren zur Präparation eines Analogons eines Zell-assoziierten Polypeptid-Antigens, wobei das Verfahren das Kultivieren der entsprechend dem Verfahren von Anspruch 49 erhaltenen Zelle unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäuresequenz, die für das Zellgebundene Polypeptid-Antigen codiert, erleichtern, und das Gewinnen des Analogons aus dem Kulturüberstand oder aus den Zellen umfasst.

51. Verfahren nach Anspruch 50, welches außerdem den Schritt der Aufreinigung des gewonnenen Analogons umfasst, und das wahlweise umfasst, das gereinigte Produkt künstlichen posttranslationalen Modifikationen zu unterwerfen, wie Rückfaltung, Behandlung mit Enzymen, chemische Modifikation und Konjugation.

52. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 45, wobei das schwache Zell-gebundene Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 5-Alpha-Reduktase, α -Fetoprotein, AM-1, APC, APRIL, BAGE, β -Catenin, Bc12, bcr-abl (b3a2), CA-125, CASP-8/FLICE, Cathepsinen, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33, CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55 (791Tgp72), CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, EGFR, EMBP, Ena78, Farsyltransferase, FGF8a oder FGF8b, FLK-1/KDR, Folsäure-Rezeptor, G250, GAGE-Familie, Gastrin 17, Gastrin-freisetzendem Hormon (Bombesin), GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel 17, gp-100-in4, gp15, gp75/TRP-1, hCG, Heparanase, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERT (Telomerase), IGFR1, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA (C017-1A), LDLR-FUT, MAGE-Familie IMAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, etc.), Mammaglobin, MAP17, Melan-A/MART-1, Mesothelin, MIC A/B, MT-MMP's, Moxl, Mucinen, wie MUC-1, MUC-2, MUC-3 und MUC-4, die anormal glycosyliert sind, MUM-1, NY-ESO-1, Osteonectin, p15, P170/MDR1, p53, p97/Melanotransferrin, PAI-1, PDGF, Plasminogen (uPA), PRAME, Probasin, Progenipoietin, PSA, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-Genfamilie, STAT3, STn (Mucin-gbd.), TAG-72, TGF- α , TGF- β , Thymosin β 15, TNF- α , TPA, TPI, TRP-2, Tyrosinase, VEGF, ZAG, p16INK4 und Glutathion-S-Transferase.

53. Verwendung nach Anspruch 52, wobei das Zellgebundene Polypeptid-Antigen humanes PSM ist.

54. Verwendung nach Anspruch 53, wobei das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der PSM-Aminosäuresequenz eingefügt wird, der durch Positionen 16-52 und/oder 87-108 und/oder 210-230 und/oder 269-289 und/oder 298-324 und/oder 442-465 und/oder 488-514 und/oder 598-630 und/oder 643-662 und/oder 672-699 aus SEQ ID NO: 2 definiert ist.

55. Verwendung nach Anspruch 53 oder 54, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung bei der Behandlung oder Linderung von Prostatakrebs verwendet wird.
56. Verwendung nach Anspruch 52, wobei das Zellgebundene Polypeptid-Antigen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8b (FGF8b) ist.
57. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der FGF8b-Aminosäuresequenz eingefügt wird, der durch Positionen 1-54 und/oder 178-215 und/oder 55-58 und/oder 63-68 und/oder 72-76 und/oder 85-91 und/oder 96-102 und/oder 106-111 und/oder 115-120 und/oder 128-134 und/oder 138-144 und/oder 149-154 und/oder 158-162 und/oder 173-177 von SEQ ID NO: 6 definiert ist, und wobei das Einfügen bevorzugt die Aminosäuren 26-45 und die Aminosäuren 186-215 nicht wesentlich mit einbezieht.
58. Verwendung nach Anspruch 56 oder 57, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung bei der Behandlung oder Linderung von Krebs, wie Prostatakrebs und Brustkrebs, verwendet wird.
59. Verwendung nach Anspruch 52, wobei das Zellgebundene Polypeptid-Antigen Her2 ist.
60. Verwendung nach Anspruch 59, wobei das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der Her2-Aminosäuresequenz eingefügt wird, der durch die Positionen 5-25 und/oder 59-73 und/oder 103-117 und/oder 149-163 und/oder 210-224 und/oder 250-264 und/oder 325-339 und/oder 369-383 und/oder 465-479 und/oder 579-593 und/oder 632-652 und/oder 653-667 und/oder 661-675 und/oder 695-709 und/oder 710-730 von SEQ ID NO: 3 definiert ist.
61. Verwendung nach Anspruch 59 oder 60, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung bei der Behandlung oder Linderung von Brustkrebs verwendet wird.
62. Analogon von humanem PSM, welches in Menschen immunogen ist, wobei das Analogon einen wesentlichen Teil aller bekannten und vorhergesagten CTL- und B-Zell-Epitope von PSM umfasst und mindestens ein fremdes T_H-Epitop, wie in irgendeinem der Ansprüche 16 bis 19 definiert, mit einschließt.
63. Analogon nach Anspruch 62, wobei das mindestens eine fremde T_H-Epitop als Insertion in der PSM-Aminosäuresequenz oder als Substitution eines Teils der PSM-Aminosäuresequenz oder als Ergebnis der Deletion eines Teils der PSM-Aminosäuresequenz vorliegt.
64. Analogon nach Anspruch 63, wobei das fremde T_H-Epitop an den in Anspruch 54 definierten Positionen eingefügt wird.
65. Analogon von humanem Her2, welches in Menschen immunogen ist, wobei das Analogon einen wesentlichen Teil aller bekannten und vorhergesagten CTL- und B-Zell-Epitope von Her2 umfasst, und mindestens ein fremdes T_H-Epitop, wie in irgendeinem der Ansprüche 16 bis 19 definiert, mit einschließt.
66. Analogon nach Anspruch 65, wobei das mindestens eine fremde T_H-Epitop als eine Insertion in der Her2-Aminosäuresequenz oder als eine Substitution eines Teils der Her2-Aminosäuresequenz oder als das Ergebnis der Deletion eines Teils der Her2-Aminosäuresequenz vorliegt.
67. Analogon nach Anspruch 66, wobei das fremde T_H-Epitop an den in Anspruch 60 definierten Positionen eingefügt ist.
68. Analogon von humanem/Maus-FGF8b, welches in Menschen immunogen ist, wobei das Analogon einen wesentlichen Teil aller bekannten und vorhergesagten CTL- und B-Zell-Epitope von FGF8b umfasst und mindestens ein fremdes T_H-Epitop, wie in irgendeinem der Ansprüche 16 bis 19 definiert, mit einschließt.
69. Analogon nach Anspruch 68, wobei das mindestens eine fremde T_H-Epitop als eine Insertion in der FGF8b-Aminosäuresequenz oder als eine Substitution eines Teils der FGFBb-Aminosäuresequenz oder als das Ergebnis einer Deletion eines Teils der FGF8b-Aminosäuresequenz vorliegt.
70. Analogon nach Anspruch 69, wobei das fremde T_H-Epitop an den in Anspruch 57 definierten Positionen eingefügt ist.
71. Immunogene Zusammensetzung, welche als wirksames immunogenes Mittel das Analogon nach ei-

nem der Ansprüche 62–70 im Gemisch mit einem pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger oder Vehikel, und wahlweise einem Adjuvans, umfasst.

72. Nukleinsäurefragment, welches ein Analogon nach einem der Ansprüche 62 bis 70 codiert.

73. Vektor, der das Nukleinsäurefragment nach Anspruch 72 trägt.

74. Vektor nach Anspruch 73, welcher zur autonomen Replikation befähigt ist.

75. Vektor nach Anspruch 73 oder 74, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Plasmid, einem Phagen, einem Cosmid, einem Minichromosom und einem Virus.

76. Vektor nach einem der Ansprüche 73 bis 75, welcher in 5'→3'-Richtung und mit funktioneller Verknüpfung einen Promotor zum Steuern der Expression des Nukleinsäurefragments nach Anspruch 72, wahlweise eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Leitpeptid codiert, das die Sekretion oder die Integration in die Membran des Polypeptidfragments ermöglicht, das Nukleinsäurefragment nach Anspruch 72, und wahlweise eine Nukleinsäuresequenz, die für einen Terminator codiert, umfasst.

77. Vektor nach einem der Ansprüche 73 bis 76, welcher, wenn er in eine Wirtszelle eingeführt wird, in das Wirtszellgenom integriert wird oder der nicht dazu befähigt ist, in das Wirtszellgenom integriert zu werden.

78. Transformierte Zelle, die den Vektor nach einem der Ansprüche 73–77 trägt.

79. Zusammensetzung zum Induzieren der Produktion von Antikörpern gegen PSM, Her2 oder FGF8b, wobei die Zusammensetzung

1) ein Nukleinsäurefragment nach Anspruch 72 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 73 bis 77, und
2) ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Verdünnungsmittel und/oder Vehikel und/oder Adjuvans umfasst.

80. Stabile Zelllinie, welche den Vektor nach einem der Ansprüche 73 bis 77 umfasst, und welche das Nukleinsäurefragment nach Anspruch 72 exprimiert, und welche wahlweise das Analogon nach einem der Ansprüche 62 bis 70 sezerniert oder auf der Oberfläche trägt.

81. Verfahren zur Präparation der Zelle nach Anspruch 78, wobei das Verfahren die in vitro-Transformation einer Wirtszelle mit dem Nukleinsäurefragment nach Anspruch 72 oder mit dem Vektor nach einem der Ansprüche 73 bis 77 umfasst.

82. Verfahren nach einem der Ansprüche 46 bis 51, wobei das schwache Zell-gebundene Antigen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 5-Alpha-Reduktase, α -Fetoprotein, AM-1, APC, APRIL, BAGE, β -Catenin, Bc12, bcr-abl (b3a2), CA-125, CASP-8/FLICE, Cathepsinen, CD19, CD20, CD21, CD23, CD22, CD33, CD35, CD44, CD45, CD46, CD5, CD52, CD55 (791Tgp72), CD59, CDC27, CDK4, CEA, c-myc, Cox-2, DCC, DcR3, E6/E7, EGFR, EMBP, Ena78, Farsyltransferase, FGF8a oder FGF8b, FLK-1/KDR, Folsäure-Rezeptor, G250, GAGE-Familie, Gastrin 17, Gastrin-freisetzendem Hormon (Bombesin), GD2/GD3/GM2, GnRH, GnTV, GP1, gp100/Pmel 17, gp-100-in4, gp15, gp75/TRP-1, hCG, Heparanase, Her2/neu, HMTV, Hsp70, hTERT (Telomerase), IGFR1, IL-13R, iNOS, Ki67, KIAA0205, K-ras, H-ras, N-ras, KSA (C017-1A), LDLR-FUT, MAGE-Familie IMAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, etc.), Mammaglobin, MAP17, Melan-A/MART-1, Mesothelin, MIC A/B, MT-MMP's, Moxl, Mucinen, wie MUC-1, MUC-2, MUC-3 und MUC-4, die anormal glycosyliert sind, MUM-1, NY-ESO-1, Osteonectin, p15, P170/MDR1, p53, p97/Melanotransferrin, PAI-1, PDGF, Plasminogen (uPA), PRAME, Probasin, Progenipoietin, PSA, PSM, RAGE-1, Rb, RCAS1, SART-1, SSX-Genfamilie, STAT3, STn (Mucin-gbd.), TAG-72, TGF- α , TGF- β , Thymosin β 15, TNF- α , TPA, TPI, TRP-2, Tyrosinase, VEGF, ZAG, p16INK4 und Glutathion-S-Transferase.

83. Verfahren nach Anspruch 82, wobei das Zellgebundene Polypeptid-Antigen humanes PSM ist.

84. Verfahren nach Anspruch 83, wobei das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der PSM-Aminosäuresequenz eingefügt ist, der durch Positionen 16-52 und/oder 87-108 und/oder 210-230 und/oder 269-289 und/oder 298-324 und/oder 442-465 und/oder 488-514 und/oder 598-630 und/oder 643-662 und/oder 672-699 von SEQ ID NO: 2 definiert ist.

85. Verfahren nach Anspruch 82, wobei das Zellgebundene Polypeptid-Antigen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8b (FGF8b) ist.

86. Verfahren nach Anspruch 85, wobei das fremde T-Zell-Epitop in einem Teil der FGF8b-Aminosäuresequenz eingefügt ist, der durch die Positionen 1-54 und/oder 178-215 und/oder 55-58 und/oder 63-68 und/oder 72-76 und/oder 85-91 und/oder 95-102 und/oder 106-111 und/oder 115-120 und/oder 128-134 und/oder 138-144 und/oder 149-154 und/oder 158-162 und/oder 173-177 von SEQ ID NO: 6 definiert ist, und wobei das Einfügen bevorzugt die Aminosäuren 26-45 und Aminosäuren 186-215 nicht wesentlich mit einbezieht.

87. Verfahren nach Anspruch 82, wobei das Zellgebundene Polypeptid-Antigen Her2 ist.

88. Verfahren nach Anspruch 87, wobei das fremde T-Zell-Epitap in einem Teil der Her2-Aminosäuresequenz eingefügt ist, der durch Positionen 5-25 und/oder 59-73 und/oder 103-117 und/oder 149-163 und/oder 210-224 und/oder 250-264 und/oder 325-339 und/oder 369-383 und/oder 465-479 und/oder 579-593 und/oder 632-652 und/oder 653-667 und/oder 661-675 und/oder 695-709 und/oder 710-730 von SEQ ID NO: 3 definiert ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

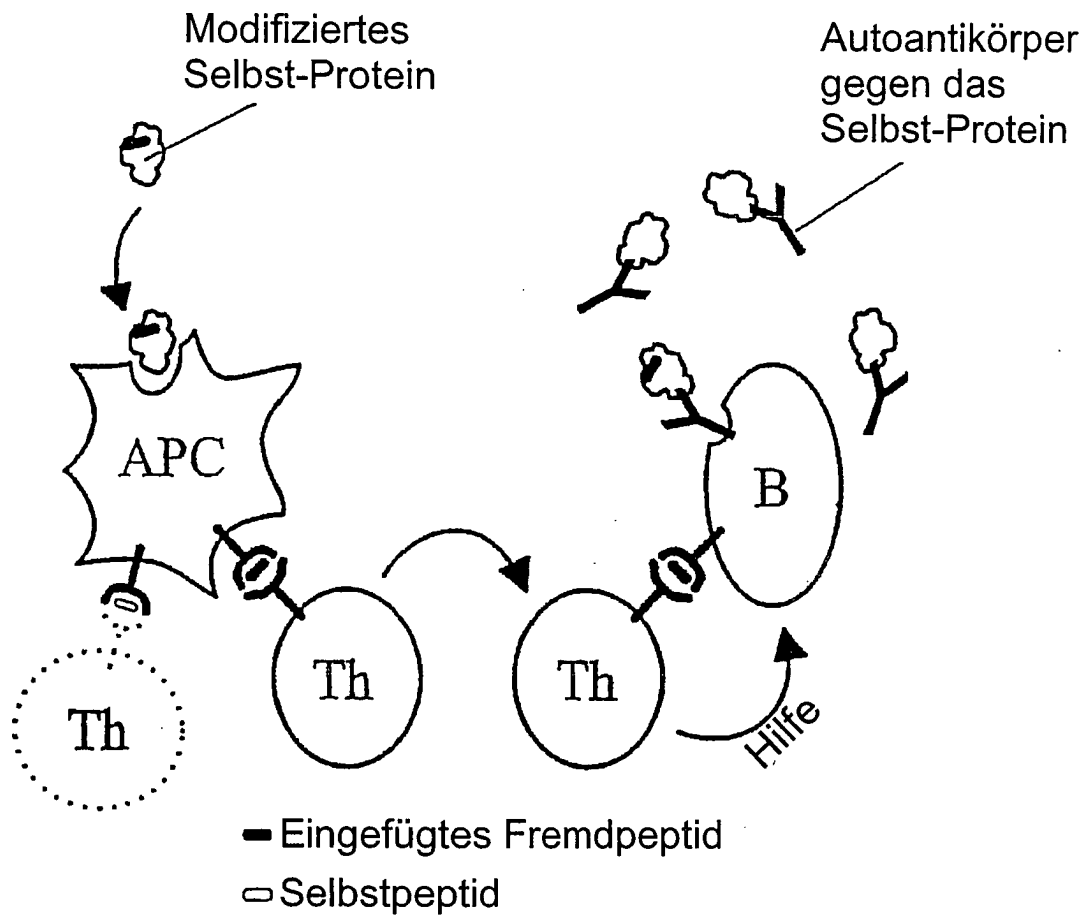


Fig. 1

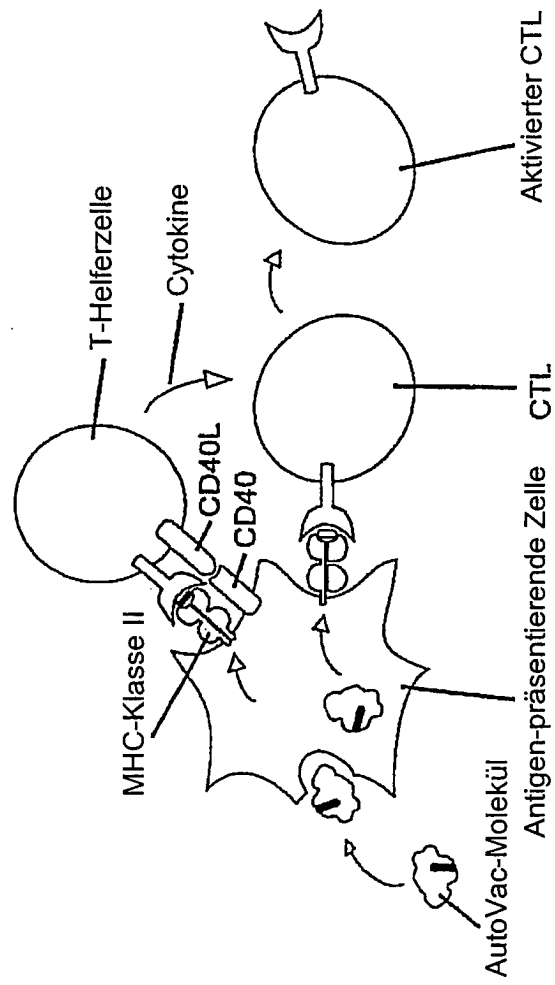


Fig. 2

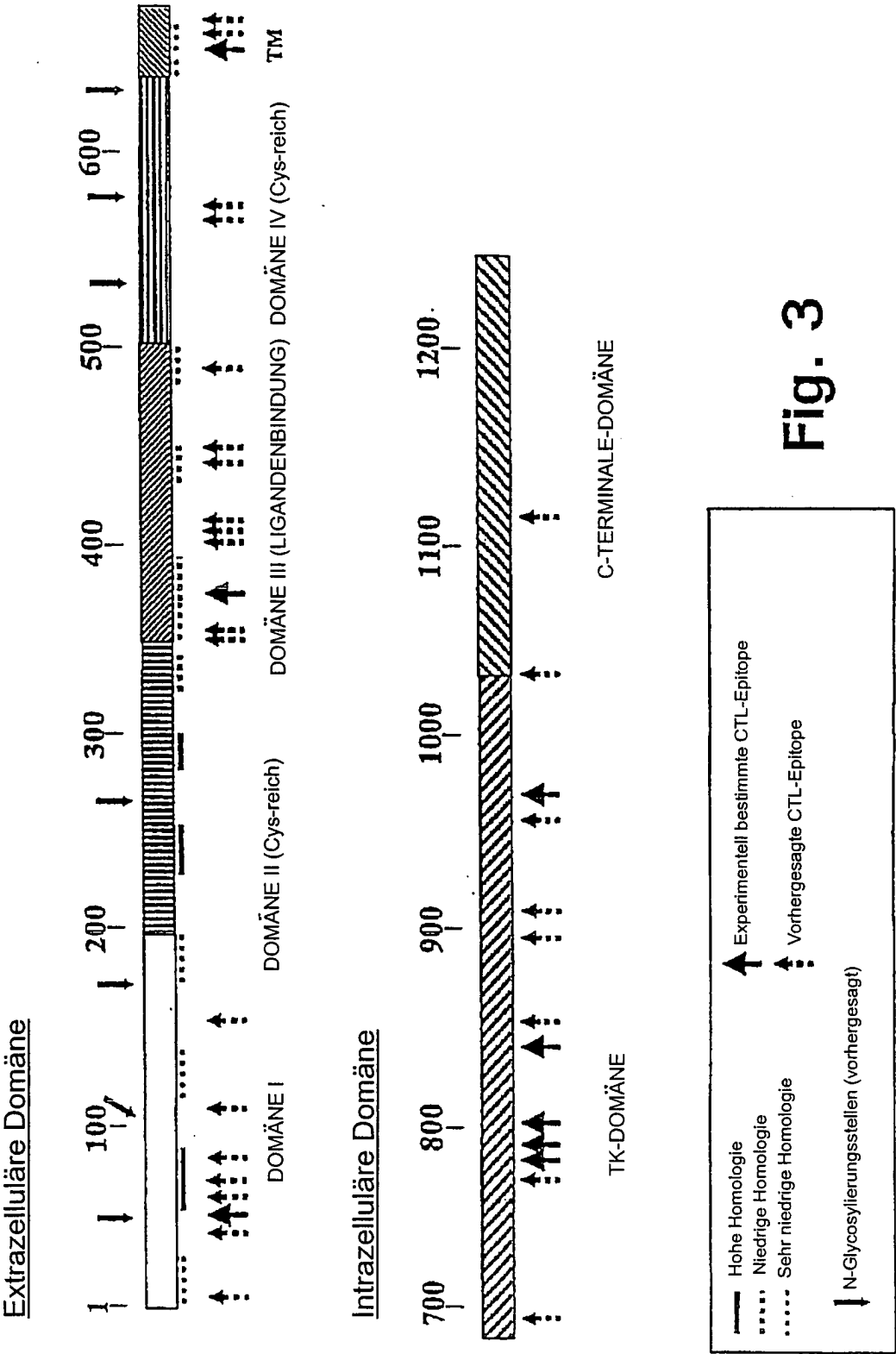


Fig. 3

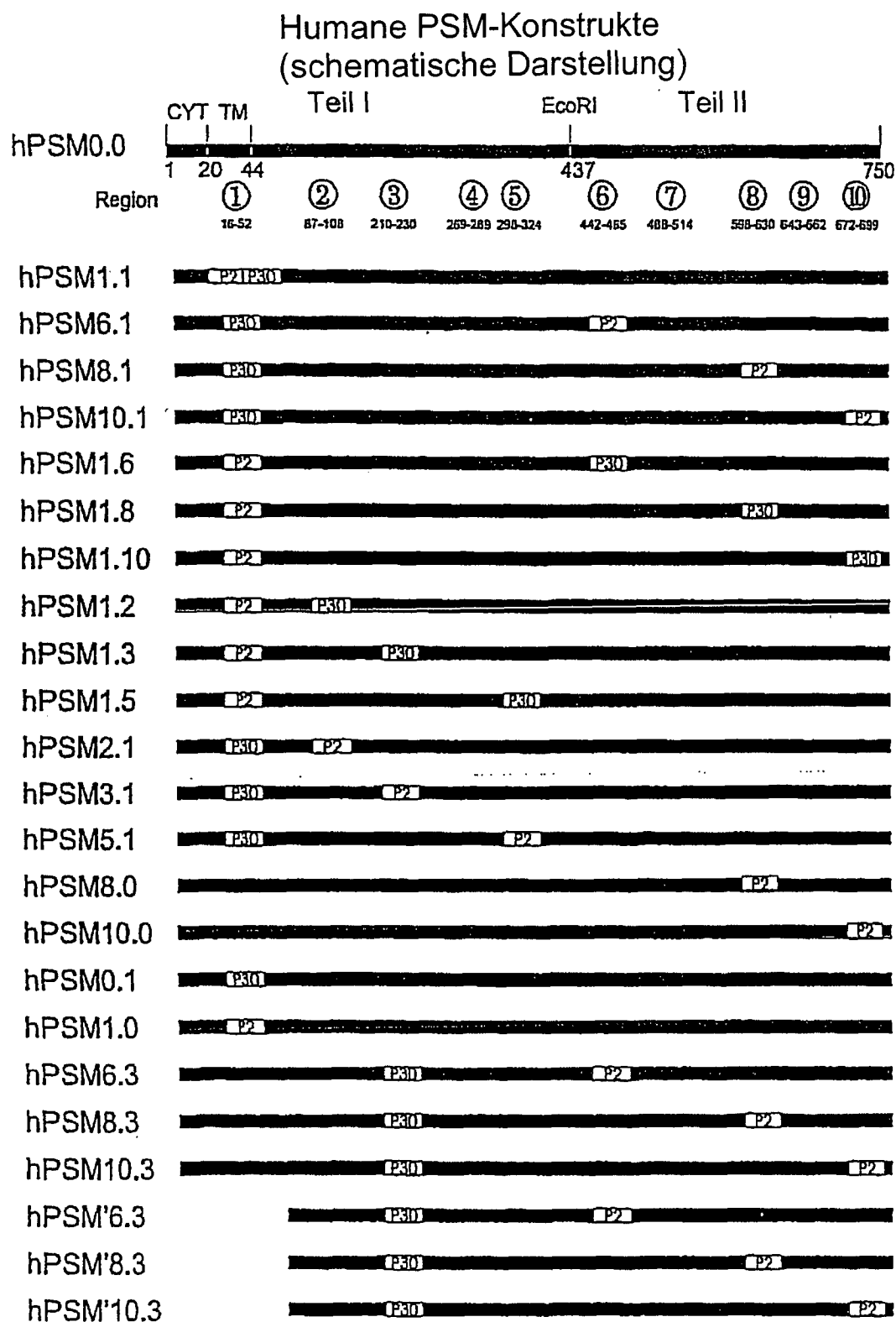


Fig. 4

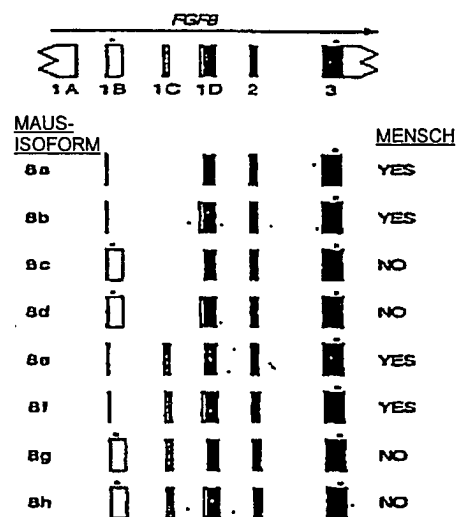
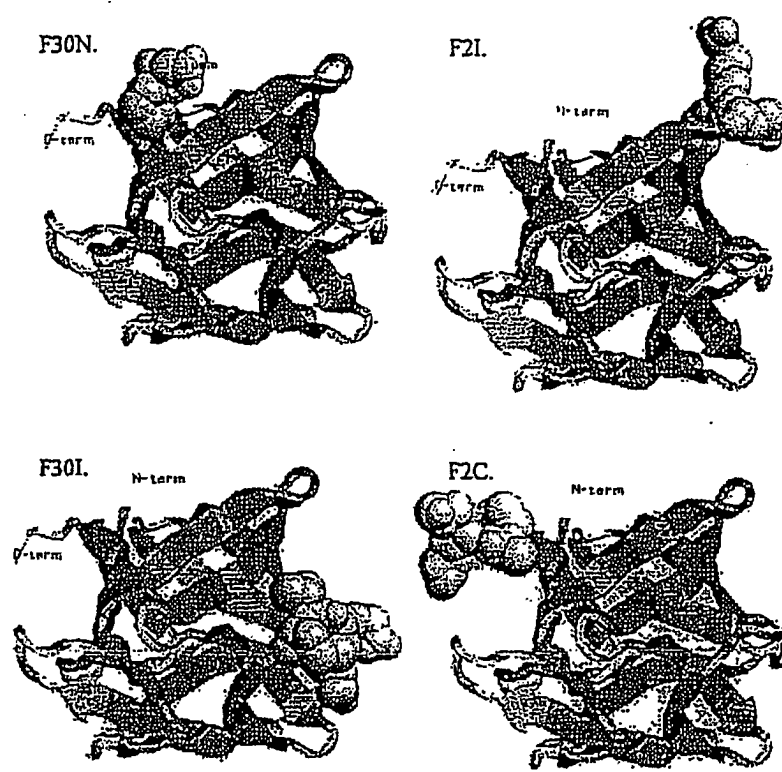


Fig. 5A

FGF8e und -f				FGF8b und -f			
MGSPRSALSC	LLLHLLVLCL	QAQEGPGRGP	ALGRELASLF	RAGREPQGV	QQVTVQSSP	31	
FTQHVREQSL	VTDQLSRRLI	RTYQLYSRTS	GKHVQVLANK	RINAMAEDGD	PFAKLIVETD	91	
TFGSRVRVRG	AETGLYICMN	KKGKLIAKSN	GKGKDCVFTE	IVLENNYTAL	QNAKYEGWYM	151	
AETRKGRPRK	GSKTRQHORE	VHFMKRLPRG	HHTTEQSLRF	EFLNYPPFTR	SLRGSQRTWA	211	
PEPR						215	

Fig. 5B



WT	MGSPRSALSCLLLHLLVLCLOAQVTVQSSPNFTQHVREOSLVTQDLSRRLIRTYQLYSRTSGKHVQ	66
F30N	MAQVTVFNNETVSFHLRVPKVSASHLERRLIRTYQLYSRTSGKHVQ	46
F2I	MAQVTQSSPNFTQHVREOSLVTQDLSRRLIRTYQLYSRTSGKHVQ	46
F30I	MAQVTQSSPNFTQHVREOSLVTQDLSRRLIRTYQLYSRTSGKHVQ	46
F2C	MAQVTQSSPNFTQHVREOSLVTQDLSRRLIRTYQLYSRTSGKHVQ	46
WT	VLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDTF	GSRVRVRGAETGLYICMKNKGKLIK 119
F30N	VLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDTF	GSRVRVRGAETGLYICMKNKGKLIK 99
F2I	VLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDQYIKANSKEIGITELGSRVRVRGAETGLYICMKNKGKLIK	112
F30I	VLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDTF	GSRVRVRGAETGLYICMKNKGKLIK 99
F2C	VLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDTF	GSRVRVRGAETGLYICMKNKGKLIK 99
WT	SNG	KGKDCVFTEIGLENNYTALQNAKYEGWYMAFTRKGRPRKGSKTRQ 167
F30N	SNG	KGKDCVFTEIGLENNYTALQNAKYEGWYMAFTRKGRPRKGSKTRQ 147
F2I	SNG	KGKDCVFTEIGLENNYTALQNAKYEGWYMAFTRKGRPRKGSKTRQ 160
F30I	SNGFNNETVSFHLRVPKVSASHLEDCVFTEIGLENNYTALQNAKYEGWYMAFTRKGRPRKGSKTRQ	165
F2C	SNG	KGKDCVFTEIGLENNYTALQNAKYEGWYMAFTRKGRPRKGSKTRQ 147
WT	HQREVHFMKRLPRGHHTTEQSLRFEFLNYPPT	RSLRGSORTWA PEPR 215
F30N	HQREVHFMKRLPRGHHTTEQSLRFEFLNYPPT	RSLRGSORTWA PEPR 195
F2I	HQREVHFMKRLPRGHHTTEQSLRFEFLNYPPT	RSLRGSORTWA PEPR 208
F30I	HQREVHFMKRLPRGHHTTEQSLRFEFLNYPPT	RSLRGSORTWA PEPR 213
F2C	HQREVHFMKRLPRGHHTTEQSLRFEFLNYPPTQYIKANSKEIGITEL	PEPR 199

Fig. 6