

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506441

(P2004-506441A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/26	A 6 1 K 35/26	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 224 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-521508 (P2002-521508)	(71) 出願人	397062700
(86) (22) 出願日	平成13年8月20日 (2001.8.20)		グラクソスミスクライン バイオロジカル
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月21日 (2003.2.21)		ズ ソシエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/009646		ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3
(87) 国際公開番号	W02002/016413		3 O ルー デ ランスティテュート 8
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		9
(31) 優先権主張番号	0020953.6	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成12年8月24日 (2000.8.24)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン

(57) 【要約】

癌、特に肺、結腸、直腸および乳癌を治療しかつ診断するための組成物および方法を開示する。例示の組成物は、1以上のC r i p t o腫瘍ポリペプチド、その免疫原性部分、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞、ならびにそのようなポリペプチドを発現する細胞に特異的であるT細胞である。開示した組成物は、例えば、疾患、特に肺、結腸、直腸および乳癌の診断、予防および／または治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 全体または配列番号 3 全体でなく、配列番号 1 または 3 に表される配列の少なくとも 20 個の隣接残基からなる配列；

(b) 配列番号 1 またはその少なくとも 20 個の隣接残基および異種融合パートナーをコードするポリヌクレオチドを含んでなる配列；

(c) 上記 a) および b) の配列の縮重変異体；

からなる群から選択される配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

(a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列；および

10

(b) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列と少なくとも 70 % 同一性を有する配列；および

(c) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによりコードされる配列と少なくとも 90 % 同一性を有する配列；

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

発現制御配列と機能的に連結された請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の発現ベクターを用いて形質転換されるかまたはトランスフェクトされた宿主細胞。

20

【請求項 5】

配列番号 2 もしくは 4 の少なくとも 1 つポリペプチドまたはその断片もしくは変異体および異種融合パートナーを含んでなる、融合タンパク質

【請求項 6】

腫瘍タンパク質に特異的な T 細胞を刺激および／または拡大する方法であって、T 細胞を

(a) 請求項 2 に記載のポリペプチド；

(b) 配列番号 2 または 4 のポリペプチド；

(c) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチド；および

(d) 請求項 1 に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞；

30

からなる群から選択される少なくとも 1 つの成分と、

(e) T 細胞の刺激および／または拡大を可能にする条件下でかつ十分な時間、接触させることを含んでなる前記方法。

【請求項 7】

請求項 6 の方法によって調製された T 細胞を含んでなる、単離された T 細胞集団。

【請求項 8】

生理学的に許容しうる担体および免疫賦活剤およびアジュバントからなる群から選択される第 1 成分、ならびに

(a) 請求項 2 に記載のポリペプチド；

(b) 配列番号 2 または 4 のポリペプチド；

40

(c) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1 または 3 のポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 1 のタンパク質と反応することができる抗体；

(f) 請求項 5 に記載の融合タンパク質；

(g) 請求項 7 に記載の T 細胞集団；

(h) 請求項 2 に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞；および

(i) 配列番号 2 または 4 のポリペプチドを発現する抗原提示細胞：からなる群から選択される第 2 成分を含んでなる組成物。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の組成物を患者に投与することを含んでなる、患者の免疫応答を刺激する

50

方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の組成物を患者に投与することを含んでなる、患者の癌を治療する方法。

【請求項 11】

患者の癌の発生を抑制する方法であって、

(a) 患者から単離した CD4+ および／または CD8+ T 細胞を、(i) 請求項 2 に記載のポリペプチド；(ii) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチド；および(iii) 請求項 2 に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞からなる群から選択される少なくとも 1 つの成分とともにインキュベートして T 細胞を増殖するステップ；および

(b) 患者に増殖した T 細胞の有効な量を投与し、それによって患者の癌の発生を抑制するステップを含んでなる前記方法。 10

【請求項 12】

医薬に使用する、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 13】

cripto 抗原を発現する腫瘍の治療に使用する、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 14】

(a) 請求項 2 に記載のポリペプチド；
 (b) 配列番号 2 のポリペプチド；
 (c) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチド；
 (d) 配列番号 1 のポリヌクレオチド； 20
 (e) 配列番号 1 のタンパク質と反応することができる抗体；
 (f) 請求項 5 に記載の融合タンパク質；
 (g) 請求項 7 に記載の T 細胞集団；
 (h) 請求項 2 に記載のポリペプチドを発現する抗原提示細胞；および
 (i) 配列番号 2 のポリペプチドを発現する抗原提示細胞：からなる群から選択される成分の、cripto 抗原を発現する腫瘍を治療するための医薬の製造における使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の技術的分野

本発明は、一般的に、結腸癌、直腸癌、乳癌、膀胱癌および子宮内膜癌などの癌の治療に関する。本発明はさらに特定すると、腫瘍タンパク質であるcriptoタンパク質の少なくとも一部分を含んでなるポリペプチド、およびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に、ある特定の非小長細胞癌(non-small long cell carcinoma)、乳癌、結腸癌、直腸癌などのcriptoを発現する癌種である癌を治療するための医薬組成物、例えばワクチンおよび他の組成物に関する。 30

【0002】

発明の背景

CRIPTOは、上皮増殖因子(EGF)ファミリーと相同性を共有する188個のアミノ酸からなるタンパク質である(EMBO Journal (1989) Vol 8 (7) pp 1987-1991)。 40

【0003】

huCRIPTO mRNAは未分化細胞にだけ検出されて、分化後に消滅する。mCRIPTOは、妊娠および泌乳期に発現し(乳上皮細胞の枝分かれ形態発生を誘導する)、正常乳房細胞の自己分泌増殖因子であると考えられる。CRIPTOは、マウス胚における前後軸の正しい方向付けに必要である。

【0004】

ヒトcripto遺伝子は米国特許第5,654,140号に記載されている。

【0005】

癌は、全世界における重要な保健上の課題である。癌の検出と治療に進歩はあったが、予防および／または治療のための、ワクチンまたはその他の広く成功している方法は、現在 50

のところ見当たらない。一般的に化学療法または外科手術と照射との組合せに基づく現行の治療法は、多数の患者で不十分であることが示されている。

【0006】

大腸癌は、米国において第2の最も高頻度で診断される悪性疾患であるとともに、第2の最も共通した癌死の病因である。1998年に95,600件の大腸癌の新症例が診断される予測であり、47,700人の死亡が予測される。初期局在段階で検出された直腸癌患者の5年間の生存率は92%であるが、残念ながら、わずか37%の直腸癌しかこの段階（生存段階）で診断されない。もし癌が隣接器官またはリンパ節まで拡大すると生存率は64%に、そして遠く転移した患者では7%に低下する。

【0007】

大腸癌の診断は、腸壁を通しての腫瘍の貫入程度に、転移のレベルに、結節併発の有無に直接関係し、従って早期検出と治療は特に重要である。現在、診断は糞便潜血、S字結腸鏡検査、結腸鏡検査およびバリウム二重造影注腸検査のスクリーニングアッセイの利用に助けられている。治療計画は、癌の型と段階によって決定され、外科手術、照射療法および／または化学療法が挙げられる。外科手術（治療の最も普通の形態）後の再発は大きな問題であって、しばしば最終的な死因となる。この疾患の治療への研究は相当行われたにも関わらず、大腸癌を診断しかつ治療するのは依然として困難である。従って、当技術分野ではそのような癌の治療法を改善する必要がある。本発明は、これらの必要を達成しかつさらにその他の関係する利点を提供する。

【0008】

乳癌は、米国および世界中の女性にとって重要な保健上の課題である。この疾患の検出と治療に進歩はあったが、乳癌は、依然として米国において女性の癌に関係する死因の第2位であり、毎年180,000人の女性が冒されている。北米の婦人にとって、乳癌に罹る生存中のオッズは1対8である。

【0009】

現在、乳癌を予防または治療するためのワクチンまたはその他の広く成功している方法は見当たらない。現在、この疾患の管理は、早期診断（日常的な乳房スクリーニング法）と、外科手術、照射療法、化学療法およびホルモン療法など様々な治療の1以上を含む攻撃的治療との組合せに頼っている。特定の乳癌の治療コースは、しばしば、特異的腫瘍マーカーの分析を含む、様々な予後パラメーターに基づいて選択される。例えば、Porter-JordanおよびLippman, Breast Cancer 8:73-100 (1994)を参照。しかし、確立されたマーカーを用いるとしばしば結果の解釈が難しく、乳癌患者に観察される高い死亡率はこの疾患の治療と予防に改良が必要であることを示す。

【0010】

肺癌は米国の男女における第一位の癌死の死因であり、1994年に推定172,000人の新症例が報じられている。診断時の症状に関係なしの全肺癌患者の5年間生存率は13%に過ぎない。これは、該疾患がまだ局在するときに検出された症例における5年間生存率の46%と対照的である。しかし、拡大する前に発見される肺癌はわずか16%でしかない。

【0011】

これらおよび他の癌の治療法に対して相当な研究が行われているにも関わらず、乳房、結腸および直腸癌を効果的に診断しかつ治療することは依然として困難である。従って、当技術分野においてはそのような癌を治療しかつ予防する方法を改善する必要がある。本発明は、これらの必要を満たしかつさらにその他の関係する利点を提供する。

【0012】

発明の概要

一態様においては、本発明は、

(a) 配列番号1もしくは3の全配列でなく、配列番号1もしくは3の配列の少なくとも20個の隣接残基からなる配列、および

10

20

30

40

50

(b) 配列番号1もしくは3または配列番号1もしくは3に与えられた少なくとも20個の隣接ヌクレオチドおよび異種融合パートナーをコードするポリヌクレオチドからなる配列：

からなる群から選択される配列を含んでなるポリヌクレオチド組成物を提供する。

【0013】

本発明は、他の態様においては、上記のポリヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド組成物を提供する。

【0014】

本発明のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドは免疫原性があり、すなわち、免疫応答、特に体液性および／または細胞免疫性応答を誘起することができ、もし必要があれば、それらを適当な担体と結合させおよび／またはそれらにアジュバントを加える。 10

【0015】

本発明はさらに、開示したポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチド配列の断片、変異体および／または誘導体であって、配列番号1もしくは3に記載のポリヌクレオチド配列によりコードされる配列番号2もしくは4に記載のポリペプチド配列の少なくともほぼ50%、好ましくは少なくともほぼ70%そしてさらに好ましくは少なくともほぼ90%のレベルの免疫原性活性レベルを好ましくは有することを特徴とする前記断片、変異体および／または誘導体を提供する。

【0016】

本発明はさらに、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターおよびそのような発現ベクターを用いて形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞を提供する。 20

【0017】

他の態様においては、本発明は、上記のポリペプチドまたはポリヌクレオチドおよび生理学的に許容される担体を含んでなる医薬組成物を提供する。

【0018】

本発明の関係する態様においては、予防もしくは治療に応用するための医薬組成物、例えばワクチン組成物を提供する。そのような組成物は一般的に本発明の免疫原性ポリペプチドまたはポリペプチドおよびアジュバントなどの免疫賦活薬を含んでなる。

【0019】

さらなる態様においては、本発明は、(a) 上記のポリペプチドを発現する抗原提示細胞および(b) 製薬上許容される担体または賦形剤：を含んでなる医薬組成物を提供する。例示の抗原提示細胞としては、樹状細胞、マクロファージ、単球、繊維芽細胞およびB細胞が挙げられる。 30

【0020】

関係する態様においては、(a) 上記のポリペプチドを発現する抗原提示細胞、および(b) 免疫賦活薬を含んでなる医薬組成物が提供される。

【0021】

他の態様においては、本発明はさらに、少なくとも1つの上記ポリペプチドを含んでなる融合タンパク質ならびにそのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、典型的には、生理学的に許容される担体および／または免疫賦活薬を含んでなる医薬組成物、例えばワクチン組成物の形態で提供する。融合タンパク質は、本明細書に記載の多重免疫原性ポリペプチドまたはそれらの部分／変異体を含んでなってもよく、さらに該ポリペプチドの発現、精製および／または免疫原性を容易にする1以上のポリペプチドセグメントを含んでなってもよい。 40

【0022】

さらなる態様においては、本発明は、患者の免疫応答、好ましくはヒト患者のT細胞応答を刺激する方法であって、本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含んでなる前記方法を提供する。患者が肺癌または結腸癌または直腸癌または乳癌に冒された症例では本発明の方法は疾患の治療を提供し、あるいは患者にそのような疾患のリスクがあると考え 50

られれば予防的に治療しうる。特に、患者がc r i p t o抗原を発現する腫瘍に冒されうるときである。

【0023】

さらなる態様においては、本発明は、患者の癌発生を抑制する方法であって、患者に上述の医薬組成物を投与することを含んでなる前記方法を提供する。患者が肺癌または結腸癌または直腸癌または乳癌に冒されている症例では、本発明の方法は疾患の治療を提供し、あるいは患者にそのような疾患のリスクがあると考えられれば予防的に治療しうる。

【0024】

本発明はさらに、他の態様においては、生物サンプルから腫瘍細胞を除去する方法であって、サンプルからのタンパク質発現細胞の除去を可能にする条件下でかつ十分な時間をかけて接触のステップが実施されることを特徴とする、生物サンプルを本発明のポリペプチドと特異的に反応するT細胞に接触させることを含んでなる前記方法を提供する。 10

【0025】

関係する態様においては、患者の癌発生を抑制する方法であって、上記のように処理した生物サンプルを患者に投与することを含んでなる前記方法を提供する。

【0026】

他の態様においては、さらに本発明のポリペプチドに特異的なT細胞を刺激しおよび／または拡大する方法であって、T細胞と1以上の(i)上記のポリペプチド；(ii)そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および／または(iii)そのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞；とを、T細胞の刺激および／または拡大を可能にする条件下でかつ十分な時間をかけて接触させることを含んでなる前記方法を提供する。上記のように調製したT細胞を含んでなる、単離されたT細胞集団も提供する。 20

【0027】

さらなる態様においては、本発明は患者の癌発生を抑制する方法であって、患者に上記のT細胞集団の有効な量を投与することを含んでなる前記方法を提供する。

【0028】

本発明はさらに、患者の癌発生を抑制する方法であって、(a)患者から単離したCD4+および／またはCD8+ T細胞を、1以上の(i)少なくとも本明細書に開示したc r i p t oポリペプチドの免疫原性部分を含有するポリペプチド；(ii)そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および(iii)そのような抗原を発現した抗原細胞とともにインキュベートし；そして(b)増殖したT細胞の有効量を患者に投与してそれによって患者の癌発生を抑制するステップを含んでなる前記方法を提供する。増殖した細胞は、必要ではないが、患者への投与に先だってクローニングしてもよい。 30

【0029】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の詳細な説明を参照すれば、明白になるであろう。本明細書に開示した全ての参考文献は、本明細書に参照によりその全文が個々に組み入れられたかのごとく組み入れられる。

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は、一般的に組成物ならびにそれらの癌と転移の治療および診断での使用に関し、前記癌は特にc r i p t oを発現する癌であって、C r i p t oを発現する肺、結腸、直腸および乳癌が挙げられる。以下にさらに記載するように、例示の本発明の組成物は、限定されるものでないが、ポリペプチド、特に免疫原性ポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、抗体および他の結合剤、抗原提示細胞(APCs)および免疫系細胞(例えば、T細胞)が挙げられる。 40

【0031】

本発明の実施に当たっては、特に反対のことを示さない限り、当技術分野内のウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および組換えDNA技術の通常の方法を使用し、それらの多くを以下に説明の目的で記載する。そのような技術は文献に全て説明されている。例えば、; S a m b r o o kら「分子クローニング：実験マニュアル(M o l e c u l a 50

r Cloning: A Laboratory Manual)」(第2版, 1989); Maniatisら「分子クローニング: 実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」(1982); 「DNAクローニング: 実施手法 (DNA Cloning: A Practical Approach)」, vol. I & II (D. Glover編); 「オリゴヌクレオチド合成 (Oligonucleotide Synthesis)」(N. Gait編, 1984); 「核酸ハイブリダイゼーション (Nucleic Acid Hybridization)」(B. Hames & S. Higgins編, 1985); 「転写と翻訳 (Transcription and Translation)」(B. Hames & S. Higgins編, 1984); 「動物細胞培養 (Animal Cell Culture)」(R. Freshney編, 1986); Perbal, 「分子クローニングの実践的手引き (A Practical Guide to Molecular Cloning)」(1984)を参照。 10

【0032】

本明細書に引用した全ての出版物、特許および特許出願は、前掲または後掲を問わず、本明細書に参照によりその全文が組み入れられる。

【0033】

本明細書および添付の請求項に使用される、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、その内容が明白にそうでないことを示さなければ、複数の参照を含む。 20

【0034】

ポリペプチド組成物

本明細書に使用される、用語「ポリペプチド」は、その通常の意味で、すなわちアミノ酸配列として使用される。ポリペプチドは、特定の長さの産物に限定されるものでなく; 従って、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質はポリペプチドの定義内に含まれ、それらの用語は本明細書において特にそうでないことが示されなければ互換的に使用される。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾物、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに当技術分野で周知される天然および非天然両方の他の修飾物を意味せずまたは排除する。ポリペプチドは全タンパク質、またはその一部配列であってもよい。本発明の文脈における目的の特定のポリペプチドは、実質的にポリペプチドの免疫原性の原因となりかつ免疫応答を誘起しうるエピトープ、すなわち抗原決定基を含んでなるアミノ酸部分配列である。 30

【0035】

例示の本発明のポリペプチドは特に、配列番号2または4のcriptoタンパク質の、少なくとも10個の隣接アミノ酸、好ましくは20個、さらに好ましくは30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180個のアミノ酸の配列を含んでなる。

【0036】

ある特定の好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドは免疫原性である、すなわち、これらのポリペプチドは、criptoを発現する癌の患者由来の抗血清および/またはT細胞を用いるイムノアッセイ(ELISAもしくはT細胞刺激アッセイ)で検出しうる反応を起こす。免疫原性活性のスクリーニングは、当業者が周知する技術を利用して実施することができる。例えば、そのようなスクリーニングは、HarlowおよびLane, 「抗体: 研究室マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988、などに記載の方法を利用して実施することができる。説明のための一例では、ポリペプチドを固体支持体上に固定して患者血清と接触させ、血清内の抗体と固定されたポリペプチドとを結合させてもよい。次いで結合しない血清を除去して、結合した抗体を例えば¹²⁵I-標識プロテインAを用いて検出することができる。 40

【0037】

当業者には理解されうるように、本明細書に開示したポリペプチドの免疫原性部分も本発明に包含される。本明細書に使用される「免疫原性部分」は、それ自身、ポリペプチドを認識するB細胞および／またはT細胞表面抗原受容体と免疫学的に反応性である（すなわち、特異的に反応する）本発明の免疫原性ポリペプチドの断片である。免疫原性部分は一般的に、Paul, 「基礎免疫学（Fundamental Immunology）」, 第3版, 243-247 (Raven Press, 1993) およびその引用文献などに総括された周知の技術を用いて同定することができる。そのような技術としては、抗原特異的抗体、抗血清および／またはT細胞系もしくはクローンと反応する能力についてのポリペプチドのスクリーニングが挙げられる。本明細書に使用される抗血清および抗体は、もしそれらが抗原と特異的に結合する（すなわち、それらがELISAまたは他のイムノアッセイにおいて該タンパク質と反応し、かつ無関係のタンパク質と検出する反応を起こさない）のであれば、「抗原特異的」である。そのような抗血清および抗体は、本明細書に記載のように、かつ周知の技術を用いて調製することができる。

10

20

30

40

50

【0038】

ある好ましい実施形態においては、本発明のポリペプチドの免疫原性部分は、実質的に全長ポリペプチドの反応性以上のレベルで、抗血清および／またはT細胞と反応する（例えば、ELISAまたはT細胞刺激アッセイにおいて）部分である。好ましくは、免疫原性部分の免疫原性活性のレベルは、全長ポリペプチドの免疫原性の少なくともほぼ50%、好ましくは少なくともほぼ70%、そして最も好ましくはほぼ90%超である。複数の事例においては、好ましい免疫原性部分は、対応する全長ポリペプチドの免疫原性より高い免疫原性活性のレベルを有すると同定され、例えば、ほぼ100%以上または150%以上の免疫原性活性を有する。

【0039】

ある特定の他の実施形態においては、例示の免疫原性部分は、N末端リーダー配列および／または膜貫通ドメインを欠失しているペプチドを含んでもよい。他の例示の免疫原性部分は、成熟タンパク質と比較して、小さいNおよび／またはC末端の欠失（例えば、1-30個のアミノ酸、好ましくは5-15個のアミノ酸）を含有する。

【0040】

他の実施形態においては、本発明のポリペプチド組成はまた、本発明のポリペプチド、特に本明細書に開示したアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して産生するT細胞および／または抗体と免疫学的に反応性のある1以上のポリペプチド、またはそれらの免疫原性断片もしくは変異体を含んでなる。

【0041】

他の実施形態においては、本明細書に記載の1以上のポリペプチドと免疫学的反応性のあるT細胞および／または抗体を誘起する1以上のポリペプチド、または本明細書に開示したポリヌクレオチド配列に含有される隣接核酸配列、またはそれらの免疫原性断片もしくは変異体、またはこれらの配列の1以上と中度または高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする1以上の核酸配列によりコードされる1以上のポリペプチドを含んでなるポリペプチドが提供される。

【0042】

本発明は、他の態様においては、本明細書の配列番号2もしくは4に記載されるかまたは配列番号1もしくは3の配列に記載したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド組成物の、全ての中間の長さを含む、少なくとも5、10、15、20、25、50、100、もしくは150個の隣接アミノ酸、またはそれ以上を含んでなるポリペプチド断片を提供する。該ポリペプチドは、配列番号13~94に記載したエピトープの少なくとも1つ、好ましくは複数を含んでなることが好ましい。場合によっては、該断片は異種担体と融合またはさもなくば結合していてもよい。

【0043】

他の態様においては、本発明は、本明細書に記載のポリペプチド組成物の変異体を提供する。一般的に本発明により包含されるポリペプチド変異体は、典型的には、本明細書に記

載のポリペプチド配列に対して、その長さに沿って、少なくともほぼ70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上の同一性（以下に記載のように決定した）を示す。

【0044】

ある好ましい実施形態においては、本発明により提供されるポリペプチド断片および変異体は、本明細書に特定して記述した全長ポリペプチドと反応する抗体およびT細胞に対して免疫活性がある。

【0045】

他の実施形態においては、本発明により提供されるポリペプチド断片および変異体が示す免疫活性のレベルは、本明細書に特定して記述した全長ポリペプチド配列が示すレベルの少なくともほぼ50%、好ましくは少なくともほぼ70%、そして最も好ましくは少なくともほぼ90%またはそれ以上である。 10

【0046】

本明細書に使用される用語、ポリペプチド「変異体」は、典型的には本明細書に特定して開示したポリペプチドとは1以上の置換、欠失、付加および／または挿入のある点が異なるポリペプチドである。そのような変異体は天然であってもよいしまたは合成によって、例えば、本明細書に記載のようによび／または当技術分野で周知の複数の技術のいずれかを用いて、1以上の本発明の上記ポリペプチド配列を修飾しかつその免疫活性を評価することにより作製してもよい。

【0047】

例えば、本発明のポリペプチドのある特定の例示の変異体は、N末端リーダー配列または膜貫通ドメインなどの1以上の部分が除去されている変異体が挙げられる。他の例示の変異体は、小部分（例えば、1-30アミノ酸、好ましくは5-15アミノ酸）を成熟タンパク質のNおよび／またはC末端から除去した変異体が挙げられる。 20

【0048】

多くの場合、変異体は保存的置換を有する。「保存的置換」はアミノ酸を類似の特性をもつ他のアミノ酸により置換する置換であって、従ってペプチド化学の技術者はポリペプチドの二次構造およびヒドロパシー特性（*hydropathic nature*）が実質的に不変であると予想する。以上記載したように、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造に修飾を加えてもなお、所望の特性、例えば免疫原性特性をもつ変異体または誘導体ポリペプチドをコードする機能的分子を得ることができる。ポリペプチドのアミノ酸配列を改変して本発明のポリペプチドの同等もしくはさらに改善された免疫原性変異体または部分を作製するのが所望であれば、当業者は典型的にはコードするDNA配列の1個以上のコドンを下の表に従って変更するであろう。 30

【0049】

例えば、タンパク質構造においてある特定のアミノ酸を他のアミノ酸と置換しても、例えば、抗体の抗原結合領域もしくは基質分子上の結合部位などの、構造についての相互作用結合能力を消失しないようにすることができる。タンパク質の生物学的機能活性を規定するのはタンパク質の相互作用能力と性質であるので、タンパク質配列中のある特定のアミノ酸配列は勿論、その基礎となるDNAコード配列置換を行っても、それに関わりなく、同様の性質を有するタンパク質を得ることができる。従って、それらの生物学的効用と活性の大きな消失を伴うことなく、開示した組成物のペプチド配列、またはそのペプチドをコードする対応DNA配列に様々な変更を行いうると思われる。 40

【0050】

表

アミノ酸			コドン				
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU	
システイン	Cys	C	UGC	UGU			
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU			
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG			
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU			
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU	
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU			
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU		
リシン	Lys	K	AAA	AAG			
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG
メチオニン	Met	M	AUG				
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU			
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU	
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG			
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU	
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU	
トリプロファン	Trp	W	UGG				
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU			

10

20

30

40

50

そのような変更を行う場合、アミノ酸のヒドロパシー指数を考慮することができる。タンパク質の相互作用的な生物学的機能を与えるに当たって、アミノ酸のヒドロパシー指数の重要性は当技術分野で一般的に理解されている（本明細書に参照により組み入れられる、KyteおよびDoolittle、1982）。アミノ酸の相対的ヒドロパシー特性は、得られるタンパク質の二次構造に寄与し、順にタンパク質の他分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定することが容認されている。各アミノ酸は、その疎水性と電荷特性に基づいてヒドロパシー指数が割当てられている（KyteおよびDoolittle、1982）。それらの値は次の通りである：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；トレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リシン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

【0051】

当技術分野では知られているが、ある特定のアミノ酸を類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換して、それでも類似した生物学的活性をもつタンパク質、すなわちそれでも生物学的機能が同等のタンパク質を得ることができる。そのような変更を行うには、置換するアミノ酸のヒドロパシー指数が±2以内が好ましく、±1以内が特に好ましく、そしてさらに±0.5以内が特に好ましい。当技術分野では、同様のアミノ酸の置換を親水性に基づいて効果的に行いすることも理解されている。米国特許第4,554,101号（特定して本明細書に参照によりその全文が組み入れられる）は、隣接アミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性は、タンパク質の生物学的特性と相関があると明記している。

【0052】

米国特許第4, 554, 101号に詳しく記載されているが、次の親水性値がアミノ酸残基に割当てられている：アルギニン（+3.0）；リシン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0 ± 1）；グルタミン酸（+3.0 ± 1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5 ± 1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）。アミノ酸を類似の親水性値を有する他のアミノ酸と置換して、それでも生物学的に同等物、特に免疫学的に同等のタンパク質を得ることができることは理解されている。そのような変更において、置換するアミノ酸の親水性値は±2以内が好ましく、特に±1以内が好ましく、そしてさらに特に±0.5以内が好ましい。

10

【0053】

従って、以上概観したように、アミノ酸置換は一般的に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づいて行われる。以上の様々な特性を考慮にいたした置換の例は、当業者であれば周知しているが、アルギニンとリシン；グルタミン酸とアスパラギン酸；セリンとトレオニン；グルタミンとアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン：が挙げられる。

【0054】

さらに、いずれかのポリヌクレオチドをさらに修飾して *in vivo* 安定性を増加してもよい。可能な修飾は、限定されるものでないが、5' および/または3' 末端におけるフランキンク配列の付加；骨格にホスホジエステラーゼ結合よりもむしろホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用；および/またはイノシン、キューオシンおよびワイブトシン (*wybutosine*)、ならびにアセチル、メチル、チオおよび他の基により修飾された型のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンなどの非伝統的塩基の封入が挙げられる。

20

【0055】

アミノ酸置換はさらに残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。例えば、負に帯電したアミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ；正に帯電したアミノ酸としてはリシンおよびアルギニンが挙げられ；そして類似の親水性値を有する無帯電の極性ヘッドをもつアミノ酸グループとしてはロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的变化を表すアミノ酸の他のグループは、(1) *ala*, *pro*, *gly*, *glu*, *asp*, *gln*, *asn*, *ser*, *thr*；(2) *cys*, *ser*, *tyr*, *thr*；(3) *val*, *ile*, *leu*, *met*, *ala*, *phe*；(4) *lys*, *arg*, *his*；および(5) *phe*, *tyr*, *trp*, *his*が挙げられる。変異体はまた、あるいは代わりに、非保存的变化を含有してもよい。好ましい実施形態においては、変異体ポリペプチドは、5個以下のアミノ酸の置換、欠失または付加によって、自然配列と異なる。変異体はまた（もしくは代わりに）、例えば、ポリペプチドの免疫原性、二次構造およびヒドロパシー特性に最小限の影響を与えるアミノ酸の欠失または付加によって修飾することもできる。

30

40

【0056】

上記のように、ポリペプチドは、翻訳と同時にまたは翻訳後に該タンパク質の輸送を指令するシグナル（またはリーダー）配列をタンパク質のN末端に含んでもよい。ポリペプチドはまた、ポリペプチドの合成、精製または同定を容易にするためのまたはポリペプチドの固体支持体との結合を増強するための、リンカーまたは他の配列（例えば、ポリ-His）とコンジュゲートしてもよい。例えば、ポリペプチドを免疫グロブリンFc領域とコンジュゲートすることができる。

【0057】

50

ポリペプチド配列を比較する場合、もし以下に記載のように最大の対応となるようにアラインメントした時に2つの配列中のアミノ酸の配列が同じであれば、2つの配列は「同一」とであると言う。2つの配列間の比較は、典型的には、比較ウィンドウ全体について配列を比較し、局所領域の配列類似性を同定しかつ比較することによって実施する。本明細書に使用される用語「比較ウィンドウ」は少なくともほぼ20個、通常30～ほぼ75個、40～ほぼ50個の隣接する位置からなるセグメントであって、そのセグメント内で2つの配列を最適にアラインメントした後に配列を同数の隣接位置の参照配列と比較する、前記セグメントを意味する。

【0058】

比較のための最適アラインメントは、生物情報科学ソフトウェア (DNASTAR, Inc., Madison, WI) のレーザージーン (Lasergene) スーツに含まれるメガライン (Megalign) プログラムを利用し、デフォルトパラメーターを用いて実施することができる。このプログラムは、以下の参考文献に記載された複数のアラインメントスキームを実現する: Dayhoff, M. O. (1978) 「タンパク質の進化的変化モデル—遠隔の関係を検出するためのマトリックス (A model of evolutionary change in proteins — Matrices for detecting distant relationships) In Dayhoff, M. O. (編.) 「タンパク質配列および構造のアトラス (Atlas of Protein Sequence and Structure)」, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345—358; Hein J. (1990) 「アラインメントおよび系統遺伝子への統一手法 (Unified Approach to Alignment and Phylogenesis)」 pp. 626—645 「酵素学の方法 (Methods in Enzymology)」 vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. および Sharp, P. M. (1989) CABI OS 5:151—153; Myers, E. W. および Muller W. (1988) CABI OS 4:11—17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406—425; Sneath, P. H. A. および Sokal, R. R. (1973) 「数値分類学—数値分類学の原理と実施 (Numerical Taxonomy — the Principles and Practice of Numerical Taxonomy)」, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. および Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726—730.

【0059】

あるいは、比較のための配列の最適アラインメントは、Smith および Waterman (1981) Add. APL. Math 2:482 の局所同一性アルゴリズム (local identity algorithm) によって、Needleman および Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 の同一性アラインメントアルゴリズム (identity alignment algorithm) によって、Pearson および Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 の類似性検索法 (search for similarity methods) によって、これらのアルゴリズムの計算機実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI) に含まれる GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、および TFASTA) によって、または目視点検によって実施することができる。

【0060】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの好ましい一例はBLASTおよびBLAST 2.0のアルゴリズムであって、それぞれAltschulら(1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402、およびAltschulら(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLASTおよびBLAST 2.0は、例えば、本明細書に記載のパラメーターを用いて、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドのパーセント同一性を決定することができる。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(the National Center for Biotechnology Information)を通して公開されている。アミノ酸配列に対して、スコアリングマトリックスを使用して累積スコアを計算することができる。それぞれの方向のワードヒットの拡張は、累積アラインメントスコアがその最高達成値から量Xだけ外れるか；1以上の負スコア残基アラインメントの蓄積によって累積スコアがゼロ以下となるか；またはいずれかの配列の末端に到達した：ときに止める。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、アラインメントの感度と速度を決定する。

10

【0061】

好ましい一手法においては、「配列同一性のパーセント」を少なくとも20個の位置の比較窓にわたって最適アラインメントされた2つの配列を比較することによって決定し、ここで、2配列の最適アラインメントに対して、比較窓内のポリペプチド配列の部分が参照配列(付加または欠失を含有しない)と比較して、20%以下、通常5~15%、または10~12%の付加または欠失を含有してもよい。パーセントは、同一のアミノ酸残基が両配列にある位置数を確認して対合位置数を得て、これを参照配列内の全位置数(すなわち、窓サイズ)で除し、そしてその結果に100を乗じて配列同一性のパーセントを得ることによって計算する。

20

【0062】

他の例示の実施形態においては、ポリペプチドは、本明細書に記載の多重ポリペプチドを含んでなるか、または少なくとも1つの本明細書に記載のポリペプチドと既知の腫瘍タンパク質などの無関係な配列を含んでなる融合タンパク質であってもよい。融合パートナーは、例えば、Tヘルパーエпитープ、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエпитープの提供を支援してもよいし(免疫学的融合パートナー)、またはタンパク質を自然の組換えタンパク質より高い収率で発現するのを支援してもよい(発現エンハンサー)。ある特定の好ましい融合パートナーは、免疫学的および発現エンハンサー融合タンパク質の両方である。他の融合パートナーは、ポリペプチドの溶解度を増加するかまたはポリペプチドを所望の細胞内コンパートメントにターゲティングしうるように選択してもよい。なおさらなる融合パートナーは、ポリペプチドの精製を容易にする親和性標識が挙げられる。

30

【0063】

融合ポリペプチドは一般的に、化学結合などの標準技術を利用して調製することができる。好ましくは、融合ポリペプチドを組換えポリペプチドとして発現され、非融合ポリペプチドと比較した産生のレベルを増加させる。簡単に説明すると、ポリペプチド成分をコードするDNA配列を別々に組立て、そして適当な発現ベクター中にライゲートする。1つのポリペプチド成分をコードするDNA配列の3'末端を、ペプチドリンカーを用いてまたは用いないで、第2のポリペプチド成分をコードするDNA配列の5'末端とライゲートし、そして配列のリーディングフレームを同相に置く。これによって、両方の成分ポリペプチドの生物学的活性を保持する単一融合ポリペプチドへの翻訳が可能になる。

40

【0064】

ペプチドリンカー配列を用いて第1と第2のポリペプチド成分を十分な距離だけ分離し、それぞれのポリペプチドがその二次および三次構造にフォールドすることを保証してもよい。そのようなペプチドリンカーは、当技術分野で周知の標準技術を用いて融合ポリペプチド中に組み込む。適当なペプチドリンカーは、次の因子に基づいて選択することができる

50

る：（１）フレキシブルな広がったコンフォメーションを採択できること、（２）第１および第２のポリペプチド上の機能的エピトープと相互作用しうる二次構造を採択しないこと；および（３）ポリペプチド機能的エピトープと反応しうる疎水性または帯電性残基を欠くこと。好ましいペプチドリンカー配列は、G l y、A s nおよびS e r残基を含有する。T h rおよびA l aなどの他の中性に近いアミノ酸もリンカー配列に利用しうる。リンカーとして有用に利用しうるアミノ酸配列は、M a r a t e aら、G e n e 40：39-46，1985；M u r p h yら，P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 83：8258-8262，1986；米国特許第4，935，233号および米国特許第4，751，180号に開示されたものが挙げられる。リンカー配列は一般的に、長さが1～ほぼ50個のアミノ酸でありうる。第１と第２のポリペプチドが機能的ドメインを隔離して立体妨害を防止するのに利用しうる非必須N末端アミノ酸領域を有するときは、リンカー配列を必要としない。

10

【0065】

ライゲートしたDNA配列は、適当な転写または翻訳調節エレメントと機能しうる形で連結される。DNAの発現に関与している調節エレメントは、第１ポリペプチドをコードするDNA配列に対して5'だけに置かれる。同様に、翻訳を終えるために必要な停止コドンおよび転写終結シグナルは、第２ポリペプチドをコードするDNA配列に対して3'だけに存在する。

【0066】

融合ポリペプチドは、本明細書に記載のポリペプチドと一緒に、リコール応答を誘起しうる免疫原性タンパク質のような無関係の免疫原性タンパク質を含んでなってもよい。そのようなタンパク質の例は、破傷風、結核および肝炎タンパク質が挙げられる（例えば、S t o u t e rら，N e w E n g l. J. M e d.，336：86-91，1997を参照）。

20

【0067】

ある好ましい実施形態においては、免疫学的融合パートナーは、結核菌（M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s）由来のR a 1 2断片などの放線菌種（M y c o b a c t e r i u m s p.）から誘導される。R a 1 2組成物、ならびにその異種ポリヌクレオチド／ポリペプチド配列の発現および／または免疫原性の増強における利用の方法は、米国特許出願第60／158，585号に記載されており、その開示の全文は本明細書に参照により組み入れられる。簡単に説明すると、R a 1 2は、結核菌（M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s）M T B 3 2 A核酸のサブ配列であるポリヌクレオチド領域を意味する。M T B 3 2 Aは、結核菌（M. t u b e r c u l o s i s）の病原性および非病原性株の遺伝子によりコードされる32KD分子量のセリンプロテアーゼである。M T B 3 2 Aのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は記載されている（例えば、米国特許出願第60／158，585号；本明細書に参照により組み入れられる、S k e i k yら，I n f e c t i o n a n d I m m u n.（1999）67：3998-4007も参照）。M T B 3 2 Aコード配列のC末端断片は、高いレベルで発現しかつ精製過程全体を通して可溶性ポリペプチドとして残る。さらに、R a 1 2は融合した相手の異種免疫原性ポリペプチドの免疫原性を増強しうる。ある好ましいR a 1 2融合ポリペプチドは、M T B 3 2 Aのアミノ酸残基192～323に対応する14KDのC末端断片を含んでなる。他の好ましいR a 1 2ポリヌクレオチドは一般的に、R a 1 2ポリペプチドの一部分をコードする、少なくともほぼ15個の連続ヌクレオチド、少なくともほぼ30個の連続ヌクレオチド、少なくともほぼ60個の連続ヌクレオチド、少なくともほぼ100個の連続ヌクレオチド、少なくともほぼ200個の連続ヌクレオチド、少なくともほぼ300個の連続ヌクレオチドを含んでなる。R a 1 2ポリヌクレオチドは自然の配列（すなわち、R a 1 2ポリペプチドまたはその一部分をコードする内因性配列）を含んでなってもよいしまたはそのような配列の変異体を含んでなってもよい。R a 1 2ポリヌクレオチド変異体は、コードされた融合ポリペプチドの生物学的活性が自然のR a 1 2ポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドと比較して実質的に消滅しないような、1以

30

40

50

上の置換、付加、欠失および／または挿入を含んでなってもよい。変異体は、自然の R a 1 2 ポリペプチドまたはその一部分をコードするポリヌクレオチド配列に対して、好ましくは少なくともほぼ 70 % 同一性、さらに好ましくは少なくともほぼ 80 % 同一性、そして最も好ましくは少なくともほぼ 90 % 同一性を示す。

【0068】

他の好ましい実施形態においては、免疫学的融合パートナーは、グラム陰性菌ヘモフィルス・インフルエンザ B (H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a B) の表面タンパク質であるプロテイン D から誘導される (W O 91 / 18926)。好ましくは、プロテイン D 誘導体は、該タンパク質のほぼ最初の 3 分の 1 (例えば、最初の N 末端の 100 - 110 個のアミノ酸) を含んでなり、プロテイン D は脂質化されていてもよい。ある特定の好ましい実施形態においては、リポプロテイン D 融合パートナーの最初の 109 個の残基が N 末端に含まれてさらなる外因性 T 細胞エпитープをもつポリペプチドを提供し、大腸菌 (E. c o l i) 内の発現レベルを増加する (従って、発現エンハンサーとして機能する)。脂質の尾部 (t a i l) は、抗原提示細胞に対する抗原の最適な提示を保証する。他の融合パートナーとしては、インフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質、N S 1 (赤血球凝集素) が挙げられる。T ヘルパーエピトープを含む様々な断片を利用するが、典型的には、N 末端の 81 個のアミノ酸を使用する。

10

【0069】

他の実施形態においては、免疫学的融合パートナーは L Y T A として知られるタンパク質、またはその一部分 (好ましくは、C 末端部分) である。L Y T A は、アミダーゼ L Y T A として知られる N - アセチル - L - アラニンアミダーゼ (l y t A 遺伝子によりコードされる; G e n e 43 : 265 - 292, 1986) である。L Y T A は、ペプチドグリカン骨格内のある特定の結合を特異的に分解する自己溶解酵素 (a u t o l y s i n) である。L Y T A タンパク質の C 末端ドメインは、コリン、または D E A E などの数種のコリン類似体に対する親和性に関わる。この特性が融合タンパク質の発現に有用な大腸菌 (E. c o l i) C - L Y T A 発現プラスミドの開発に利用されている。アミノ末端に C - L Y T A 断片を含有するハイブリッドタンパク質の精製は記載されている (B i o t e c h n o l o g y 10 : 795 - 798, 1992)。好ましい実施形態においては、L Y T A の反復部分を融合ポリペプチド中に組み込むことができる。反復部分は、残基 178 から始まる C 末端領域に見出される。特に好ましい反復部分は残基 188 ~ 305 である。

20

30

【0070】

さらに他の例示の実施形態は、エンドソーム／リソソームコンパートメントにポリペプチドを導きうるターゲティングシグナルを含んでなる融合ポリペプチドおよびそれらをコードするポリヌクレオチドに関わり、米国特許第 5, 633, 234 号に記載されている。本発明の免疫原性ポリペプチドをこのターゲティングシグナルと融合すると、M H C クラス I I 分子とより効率的に結合して、それによりポリペプチドに特異的な C D 4 + T 細胞の i n v i v o 刺激を増強しうる。

【0071】

融合分子の c r i p t o 部分は、本明細書に記載の C r i p t o 1 または C r i p t o 3 の全長 188 a a タンパク質またはそれらの断片であることが好ましい。

40

【0072】

本発明のポリペプチドは、様々な周知の合成および／または組換え技術のいずれを用いて調製してもよく、後者をさらに以下に記載する。一般的にほぼ 150 個未満のアミノ酸のポリペプチド、部分および他の変異体は、当業者が周知している技術を用いて、合成的方法により作製することができる。ある説明のための例においては、そのようなポリペプチドは、M e r r i f i e l d 固相合成法などの任意の市販の固相技術を用いて合成してもよく、その場合、アミノ酸を逐次的に付加してアミノ酸鎖を伸ばして行く。M e r r i f i e l d, J. A m. C h e m. S o c. 85 : 2149 - 2146, 1963 を参照。ポリペプチドの自動合成用設備は、P e r k i n E l m e r / A p p l i e d B

50

i o S y s t e m s D i v i s i o n (F o s t e r C i t y , C A) などの供給者から市販されており、製造業者の指示に従って操作することができる。

【 0 0 7 3 】

一般的に、本発明のポリペプチド組成物（融合ポリペプチドを含む）は単離される。「単離された」ポリペプチドは元来の環境から除去されたものである。例えば、天然のタンパク質またはポリペプチドは、もし自然系において共存する物質の数種または全てが分離されていれば、単離されている。好ましくは、そのようなポリペプチドはまた、例えば、少なくともほぼ90%純度、さらに好ましくは少なくともほぼ95%純度、そして最も好ましくは少なくともほぼ99%純度に精製される。

【 0 0 7 4 】

ポリヌクレオチド組成物

本発明は、他の態様においては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド組成物を提供する。用語「DNA」および「ポリヌクレオチド」は本明細書においては原則的に互換的に使用され、特定種の全ゲノムDNAから単離されたDNA分子を意味する。本明細書に使用される「単離された」は、ポリヌクレオチドが実質的に他のコード領域から分離していて、該DNA分子が大きな染色体断片または他の機能的遺伝子もしくはポリペプチドコード領域などの無関係なコードDNAの大部分を含有しないことを意味する。勿論、これは、当初単離されたDNA分子を意味するものであって、後に人の手によりそのセグメントに加えられた遺伝子またはコード領域を排除しない。

【 0 0 7 5 】

当業者であれば理解しうるように、本発明のポリヌクレオチド組成物としては、ゲノム配列、ゲノム外配列およびプラスミドにコードされた配列、ならびに、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現するかまたは発現するよう適合させたより小さい遺伝子操作された遺伝子セグメントが挙げられる。そのようなセグメントは、天然に単離されるものであってもよいし、人の手により合成法により改変されてもよい。

【 0 0 7 6 】

また当業者であれば認識しうるように、本発明のポリヌクレオチドは一本鎖（コードまたはアンチセンス）または二本鎖であってよく、またDNA（ゲノムDNA、cDNAまたは合成DNA）またはRNA分子であってよい。RNA分子は、イントロンを含有しかつDNA分子と1対1で対応するHnRNA分子、およびイントロンを含有しないmRNA分子が挙げられる。さらなるコードまたは非コード配列が、必要ではないが、本発明のポリヌクレオチド内に存在してもよく、またポリヌクレオチドは、必要ではないが、他の分子および／または支持物質と連結していてもよい。

【 0 0 7 7 】

ポリヌクレオチドは天然配列（すなわち、本発明のポリペプチド／タンパク質またはその一部分をコードする内因性配列）を含んでもよいしまたはそのような配列の変異体もしくは誘導体、好ましくは免疫原性変異体もしくは誘導体をコードする配列を含んでもよい。

【 0 0 7 8 】

通常は、ポリヌクレオチド変異体は1以上の置換、付加、欠失および／または挿入を含有しうるが、その変異体ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの免疫原性が、本発明に特定して記述したポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドと比較して実質的に減少しないことが好ましい。用語「変異体」はまた、異種起源の相同遺伝子を包含することも理解されなければならない。

【 0 0 7 9 】

さらなる実施形態においては、本発明は、配列番号1または3の1以上と同一のまたはそれと相補的な配列上の様々な長さの連続した一続きの配列を含んでなるポリヌクレオチド断片を提供する。例えば、本発明によって、配列番号1の少なくともおよそ10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400個長、ならびにそれらの中間的な長さの全てを含むポリヌクレオチドが提供される。この文脈における「中間的な長さ」は、例えば、16、17、18、19、など；21、22、23、など

10

20

30

40

50

； 3 0、3 1、3 2、など； 5 0、5 1、5 2、5 3、など； 1 0 0、1 0 1、1 0 2、1 0 3、など； 1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、などの上記例示値の間の任意の長さを意味し、それは 2 0 0～5 0 0、5 0 0～1, 0 0 0 の全整数などを含むことは容易に理解されるであろう。特に好ましいポリヌクレオチドは、配列番号 1 3～9 4 に記述したエピトープをコードするポリヌクレオチドである。

【0080】

本発明の他の実施形態においては、中程度～高度のストリンジェンシー条件下で、本明細書に提供されたポリヌクレオチド配列もしくはそれらの断片、またはそれらの相補配列とハイブリダイズしうるポリヌクレオチド組成物を提供する。ハイブリダイゼーション技術は分子生物学の技術分野では周知である。説明の目的で記載すると、本発明のポリヌクレオチドと他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するための適当な中程度にストリンジェントな条件は、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{ SDS}$ 、 1.0 mM EDTA ($\text{pH } 8.0$) の溶液中で前洗浄し； $50^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ にて $5 \times \text{SSC}$ 中で一夜ハイブリダイゼーションし；次いで $0.1\% \text{ SDS}$ を含有する $2 \times$ 、 $0.5 \times$ および $0.2 \times \text{SSC}$ をそれぞれ用いる 65°C にて 20 分間の洗浄を 2 回行うことを含む。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液の塩含量および／またはハイブリダイゼーションの実施される温度を改変することによるなどして容易に操作しうることを当業者は理解するであろう。例えば、他の実施形態においては、適当な高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションの温度を $60 \sim 65^\circ\text{C}$ または $65 \sim 70^\circ\text{C}$ に上昇させることを除くと上記の条件である。

10

20

【0081】

ある特定の好ましい実施形態においては、上記のポリヌクレオチド、例えば、ポリヌクレオチド変異体、断片およびハイブリダイズする配列は、配列番号 1 または配列番号 3 に具体的に記述したポリペプチド配列と免疫学的に交差反応性のあるポリペプチドをコードする。他の好ましい実施形態においては、そのようなポリヌクレオチドは、本明細書に具体的に記述したポリペプチド配列の免疫原性活性レベルに対して少なくともほぼ 50% 、好ましくは少なくともほぼ 70% 、そしてさらに好ましくは少なくともほぼ 90% の免疫原性活性レベルを有するポリペプチドをコードする。

【0082】

本発明のポリヌクレオチド、またはそれらの断片は、コード配列自身の長さに関係なく、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素切断部位、マルチクローニング部位、他のコードセグメントなどの他の DNA 配列と結合させることができ、それらの全長はかなり変動してもよい。従って、ほとんど任意の長さの核酸断片を使用しうると予想されるが、その全長は調製の容易さと意図する組換え DNA プロトコルの使用によって制限されることが好ましい。例えば、長さがほぼ 10, 000、ほぼ 5000、ほぼ 3000、ほぼ 2, 000、ほぼ 1, 000、ほぼ 500、ほぼ 200、ほぼ 100、ほぼ 50 塩基対である全長など（全ての間長を含む）をもつポリヌクレオチドセグメントの例は、本発明の多くの実施事例において有用であることが意図される。

30

【0083】

ポリヌクレオチド配列を比較するとき、もし以下に記載のとおり最大に一致するようアラインメントしたとき、2つの配列のヌクレオチド配列が同じであれば、その2つの配列は「同一」であるという。2つの配列の間の比較は、典型的には、比較ウィンドウ全体の配列を比較し、局所領域の配列類似性を確認しかつ比較することによって実施する。本明細書で使用される「比較ウィンドウ」は、2つの配列を最適にアラインメントした後に、1つの配列を参照配列に対して同数の連続位置において比較する、少なくともほぼ 20 個、通常は 30～ほぼ 75 個、40～ほぼ 50 個の連続位置のセグメントを意味する。

40

【0084】

比較のための配列の最適なアラインメントは、*Laser gene* 生物情報科学ソフトウェア一式 (DNA STAR, Inc., Madison, WI) に含まれる *Megaalign* プログラムを利用し、デフォルトパラメーターを用いて実施することができる。

50

このプログラムは、以下の参考文献に記載された複数のアラインメントスキームを統合する：Dayhoff, M. O. (1978) 「タンパク質の進化的変化のモデル—遠縁関係を検出するためのマトリックス (A model of evolutionary change in proteins — Matrices for detecting distant relationships), Dayhoff, M. O. (編.) 「タンパク質配列と構造のアトラス (Atlas of Protein Sequence and Structure)」中に収録, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345–358; Hein J. (1990) 「アラインメントおよび系統学への統一手法 (Unified Approach to Alignment and Phylogenesis)」 pp. 626–645 「酵素学における方法 (Methods in Enzymology)」 vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. および Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151–153; Myers, E. W. および Muller W. (1988) CABIOS 4:11–17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406–425; Sneath, P. H. A. および Sokal, R. R. (1973) 「数量分類学—数量分類学の原理と実践 (Numerical Taxonomy — the Principles and Practice of Numerical Taxonomy)」, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. および Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726–730.

【0085】

あるいは、比較のための配列の最適アラインメントは、Smith および Waterman (1981) Add. APL Math 2:482 の局所同一性アルゴリズムによって、Needleman および Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 の同一性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson および Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 の類似性検索法 (search for similarity methods) によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI に含まれる GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、および TFASTA) によって、または目視調査によって、実施することができる。

【0086】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適当なアルゴリズムの好ましい一例は BLAST および BLAST 2.0 アルゴリズムであって、それぞれ Altschul ら (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389–3402、および Altschul ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403–410 に記載されている。BLAST および BLAST 2.0 は、例えば、本明細書に記載のパラメーターを用いて、本発明のポリヌクレオチドに対するパーセント配列同一性を決定することができる。BLAST 解析を実施するためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) から公に入手可能である。説明のための一例においては、ヌクレオチド配列に対する累積スコアはパラメーター M (一対の一致残基に対する報酬スコア; 常に > 0) と N (ミスマッチ残基に対するペナルティスコア; 常に < 0) を用いて計算することができる。それぞれの方向におけるワードヒットの延長は、累積アラインメントスコアがその最高達成値から数量 X だけ外れるか; 1 以上の負にスコ

アラインメントされる残基アラインメントの蓄積によって累積スコアがゼロ以下となるか；またはいずれかの配列の末端に到達したときに、停止される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXはアラインメントの感度と速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列用）はデフォルトとして、11のワード長（W）、および10の期待値（E）、ならびにBLOSUM62スコアリングマトリックス（HenikoffおよびHenikoff（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照）アラインメント、50の（B）、10の期待値（E）、M = 5、N = -4および両鎖の比較を用いる。

【0087】

好ましくは、「配列同一性のパーセント」は、少なくとも20位置の比較ウィンドウにわたり最適にアラインメントされた2つの配列を比較することによって決定するが、ここで、2配列の最適アラインメントについて、比較ウィンドウのポリヌクレオチド配列の部分が、20%以下、通常5~15%、または10~12%の付加または欠失（すなわちギャップ）を、参照配列（これは付加または欠失を含有しない）と比較して含有してもよい。上記パーセントは、同一の核酸塩基が両配列に存在する位置数を決定して一致位置数を得て、この一致位置数を参照配列中の全位置数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除算し、そしてその結果値に100を乗算して配列同一性のパーセントを得ることによって計算する。

10

【0088】

当業者であれば、遺伝コードの縮重の結果として、本明細書に記載のポリペプチドをコードする多数のヌクレオチドが存在することを理解するであろう。これらのポリヌクレオチドのいくつかはいずれかの天然遺伝子のヌクレオチド配列と最小の相同性しか持たない。それにも関わらず、コドン使用の相違により様々となるポリヌクレオチドは本発明により具体的に意図される。さらに、本明細書に提示されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内にある。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、付加および／または置換などの1以上の突然変異の結果として改変された内因性遺伝子である。得られるmRNAおよびタンパク質は、必要ではないが、改変された構造または機能を有する。対立遺伝子は、標準技術（ハイブリダイゼーション、増幅および／またはデータベース配列比較などの）を用いて同定することができる。

20

【0089】

従って、本発明の他の実施形態においては、位置指定突然変異誘発などの突然変異誘発手法を本明細書に記載のポリペプチドの免疫原性変異体および／または誘導体を調製するために使用する。この手法によって、ポリペプチド配列における特定の改変を、それらをコードする基礎となるポリヌクレオチドの突然変異誘発によって実施することができる。これらの技術は、例えば、1以上の上述の検討事項を組み込んだ、1以上のヌクレオチド配列変化をポリヌクレオチド中に導入することにより配列変異体を作製しかつ試験する簡単な手法を、提供する。

30

【0090】

位置指定突然変異誘発によって突然変異体を作製するために、所望の突然変異のDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列、ならびに、橋渡しすべき欠失接続部の両側で安定な二本鎖を形成するのに十分なサイズと配列複雑性をもつプライマー配列を提供する上で十分な数の隣接ヌクレオチドを用いる。選択したポリヌクレオチド配列に突然変異を使用して、該ポリヌクレオチド自身の特性を改良し、改変し、減少させ、修飾し、またはそれらと別の様式で変更させ、および／またはコードされたポリペプチドの特性、活性、組成、安定性、または一次配列を改変することができる。

40

【0091】

本発明のある特定の実施形態においては、本発明者らは、ポリペプチドワクチンの免疫原性などのコードされたポリペプチドの1以上の特性を改変するための開示したポリヌクレオチド配列の突然変異誘発を意図する。位置指定突然変異誘発技術は当技術分野では周知であり、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方の変異体を作製するために広く利用

50

されている。例えば、位置指定突然変異誘発は、DNA分子の特定の部分を改変するためにしばしば利用される。そのような実施形態においては、典型的には長さがほぼ14～ほぼ25個程度のヌクレオチドを含有し、さらに改変される配列である接続部の両側のほぼ5～ほぼ10個の残基を有するプライマーを、使用する。

【0092】

当業者であれば理解しうるように、位置指定突然変異誘発技術はしばしば、一本鎖形態および二本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用する。位置指定突然変異誘発に有用な典型的なベクターとしては、M13ファージなどのベクターが挙げられる。これらのファージは市販されていて容易に入手でき、それらの使用は当業者であれば周知している。二本鎖プラスミドはまた、目的の遺伝子をプラスミドからファージへ導入するステップをもたない位置指定突然変異誘発にも日常的に使用される。

10

【0093】

一般的に、このような位置指定突然変異誘発は、配列内に所望のペプチドをコードするDNA配列を含む一本鎖ベクターを最初に得るかまたはそのようなDNAを含む二本鎖ベクターの2つの鎖を融解分離することによって、実施する。所望の突然変異配列を保持するオリゴヌクレオチドプライマーを一般的には合成によって作製する。次いで、このプライマーを一本鎖ベクターとアニーリングし、大腸菌(E. coli)ポリメラーゼIクレノー断片などのDNA重合酵素で処理して、突然変異保持鎖の合成を完遂する。こうして、1つの鎖は元来の非突然変異配列をコードしかつ第2の鎖は所望の突然変異を保持するヘテロ二本鎖が形成される。次いでこのヘテロ二本鎖ベクターを用いて、大腸菌(E. coli)細胞などの適当な細胞を形質転換し、突然変異配列配置を保持する組換えベクターを含むクローンを選択する。

20

【0094】

位置指定突然変異誘発を利用する選択したペプチドコード化DNAセグメントの配列変異体の作製は潜在的に有用な種を産生する方法を提供するが、これに限定されるものでなく、ペプチドの配列変異体およびそれらをコードするDNA配列を得る他の方法が存在する。例えば、所望のペプチド配列をコードする組換えベクターを、ヒドロキシルアミンなどの突然変異誘発剤を用いて処理し、配列変異体を得ることができる。これらの方法およびプロトコルに関する具体的詳細は、Malloyら、1994； Segal、1976； ProkopおよびBajpai、1991； Kubby、1994；およびManiatisら、1982（それぞれこの目的で本明細書に参照により組み入れられる）の教示に見出される。

30

【0095】

本明細書に使用される、用語「オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発方法」は、テンプレート依存的プロセスおよびベクター媒介型増殖を意味し、その初期濃度と比較して特定の核酸分子濃度の増加または検出可能なシグナル（例えば増幅）の濃度の増加をもたらす。本明細書に使用される用語「オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発方法」は、プライマー分子のテンプレート依存的伸長を伴うプロセスを言うことを意図している。用語「テンプレート依存的プロセス」は、核酸の新しく合成される鎖の配列が周知の相補的塩基対合則（例えば、Watson、1987を参照）により規定される、RNAまたはDNA分子の核酸合成を意味する。典型的には、ベクターが介在する方法論は、DNAまたはRNAベクター中への核酸断片の導入、そのベクターのクローン増幅、および増幅した核酸断片の回収を伴う。そのような方法論の例は、本明細書中に参照によりその全文が明確に組み入れられるものとする米国特許第4,237,224号に記載されている。

40

【0096】

本発明のポリペプチド変異体を作製する他の手法においては、米国特許第5,837,458号に記載の帰納的配列組換えを用いることができる。この手法においては、組換えとスクリーニングまたは選択との反復サイクルを実施して、例えば増強した免疫原性活性をもつ本発明の個々のポリヌクレオチド変異体を「進化させる」。

【0097】

50

本発明の他の実施形態によると、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物が提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドはタンパク質合成の効果的かつ標的化されたインヒビターであり、従って、疾患の原因となるタンパク質の合成を妨げることによりその疾患を治療しうる治療手法をもたらすことが実証されている。タンパク質合成を妨げるアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性はよく立証されている。例えば、ポリガラクトツロナーゼの合成およびムスカリン性2型アセチルコリン受容体は、それぞれのmRNA配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される（米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号）。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子（MDG1）、ICAM-1、E-セレクチン、STK-1、線条体GABAA受容体およびヒトEGFについて実証されている（Jaskulskiら, Science, 1988 Jun 10; 240 (4858): 1544-6; VasanthakumarおよびAhmed, Cancer Commun. 1989; 1 (4): 225-32; Perisら, Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57 (2): 310-20; 米国特許第5,801,154号; 米国特許第5,789,573号; 米国特許第5,718,709号および米国特許第5,610,288号）。アンチセンス構築物はまた、様々な異常細胞増殖、例えば癌を抑制しかつ治療するのに利用しうるということが記載されている（米国特許第5,747,470号; 米国特許第5,591,317号および米国特許第5,783,683号）。

10

20

30

【0098】

従って、ある特定の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列、またはその相補体と特異的に結合できる任意の配列の全体、または一部分を含んでなるオリゴヌクレオチド配列を提供する。一実施形態においては、アンチセンスオリゴヌクレオチドはDNAまたはそれらの誘導体を含んでなる。他の実施形態においては、前記オリゴヌクレオチドはRNAまたはそれらの誘導体を含んでなる。第3の実施形態においては、前記オリゴヌクレオチドはホスホロチオエート化修飾骨格を含んでなる修飾されたDNAである。第4の実施形態においては、前記オリゴヌクレオチド配列はペプチド核酸またはそれらの誘導体を含む。それぞれの事例において、好ましい組成物は、本明細書に開示したポリヌクレオチドの1以上の部分と相補的である配列領域、そしてさらに好ましくは実質的に相補的である配列領域、そしてなおさらに好ましくは完全に相補的である配列領域を含んでなる。

【0099】

所与の遺伝子配列に特異的なアンチセンス組成物の選択は、選んだ標的配列（すなわち、これらの説明の例としてはラットおよびヒト配列）の解析および二次構造、T_m、結合エネルギー、相対的安定性の決定に基づいて行われ、さらにアンチセンス組成物は、宿主の標的mRNAとの特異的結合を低減するかまたは妨げる二量体、ヘアピン、もしくは他の二次構造を形成することが相対的に困難であることに基づいて選択される。

【0100】

mRNAの非常に好ましい標的領域は、AUG翻訳開始コドンまたはその近くの領域であり、さらにその配列が実質的に該mRNAの5'領域と相補的である領域である。これらの二次構造解析および標的位置選択の検討は、例えば、OLIGOプライマー解析ソフトウェアv. 4および/またはBLASTN 2.0.5アルゴリズムソフトウェアを用いて実施することができる（Altschulら, Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25 (17): 3389-402）。

40

【0101】

MPGと呼ばれる短いペプチドベクター（27残基）を使用するアンチセンス送達法の使用も意図する。MPGペプチドは、HIV gp41の融合配列由来の疎水性ドメインおよびSV40 T-抗原の核局在化配列由来の親水性ドメインを含有する（Morrisら, Nucleic Acids Res. 1997 Jul 15; 25 (14): 2730-6）。数分子のMPGペプチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドを被覆して培養

50

哺乳類細胞中に1時間未満で比較的高効率(90%)で送達できることが実証されている。さらに、MPGとの相互作用は、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼに対する安定性および原形質膜を横切る能力の両方を著しく増加する。

【0102】

本発明の他の実施形態においては、本明細書に記載のポリヌクレオチド組成物を、腫瘍細胞において本発明の腫瘍ポリペプチドおよびタンパク質の発現を抑制するリボザイム分子の設計および作製に使用する。リボザイムは、位置特異的な様式で核酸を切断するRNA-タンパク質複合体である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を持つ特異的触媒ドメインを有する(KimおよびCech, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987 Dec; 84(24): 8788-92; ForsterおよびSymons, *Cell*, 1987 Apr 24; 49(2): 211-20)。例えば、多数のリボザイムが、しばしばオリゴヌクレオチド基質中の数個のリン酸エステルの1つだけを切断する高度の特異性をもって、リン酸エステル転移反応を促進する(Cechら, *Cell*, 1981 Dec; 27(3 Pt 2): 487-96; MichelおよびWesthof, *J Mol Biol*, 1990 Dec 5; 216(3): 585-610; Reinhold-HurekおよびShub, *Nature*, 1992 May 14; 357(6374): 173-6)。この特異性は、化学反応に先立って、基質が特異的塩基対合相互作用によってリボザイムの内部ガイド配列(「IGS(internal guide sequence)」)と結合する必要があることによる。

10

【0103】

現在、天然酵素性RNAの6つの基本的種類が知られている。それぞれは、生理的条件下で、RNAリン酸ジエステル結合の加水分解をin transで触媒することができる(すなわち他のRNA分子を切断できる)。一般的に、酵素性核酸は最初に標的RNAと結合することによって作用する。そのような結合は酵素性核酸の標的結合部分を通じて起こり、その結合部分は標的RNAを切断する作用をするこの分子の酵素性部分に密接した近位にある。従って、酵素性核酸は最初に標的RNAを認識してそれと相補的塩基対合によって結合し、そして一旦正しい部位と結合すれば、該核酸は酵素作用によって標的RNAを切断する。そのような標的RNAの戦略的切断は、コードされたタンパク質の合成を指令するその能力を破壊しうる。酵素性核酸はそのRNA標的と結合してそれを切断した後、RNAから解放されて他の標的を探索し、そして繰返し新しい標的と結合してそれを切断することができる。

20

30

【0104】

治療的処置において効果を現すのに必要なリボザイム濃度はアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度より低いので、リボザイムの酵素特性は、アンチセンス技術(この場合、核酸分子は単に核酸標的と結合してその翻訳をブロックする)などの多数の技術より遥かに有利である。この利点は酵素として作用するリボザイムの能力を反映するものである。このようにして、1つのリボザイム分子が多数の標的RNA分子を切断することができる。さらにリボザイムは、標的RNAとの結合の塩基対合機構だけでなく標的RNA切断機構にも依存する阻害特異性を有する高度に特異的なインヒビターである。切断部位近くに単一のミスマッチ、または塩基置換があれば、リボザイムの触媒活性を完全に排除しうる。アンチセンス分子の同様のミスマッチはそれらの作用を阻止しない(Woolfら, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992 Aug 15; 89(16): 7305-9)。従って、リボザイムの作用特異性は、同じRNA部位と結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドより大きい。

40

【0105】

酵素性核酸分子は、ハンマーヘッド、ヘアピン、肝炎δウイルス、グループIイントロンもしくはRNAアーゼP RNA(RNAガイド配列と関連して)またはアカパンカビ属(*Neurospora*) VS RNAモチーフとして形成されうる。ハンマーヘッドモチーフの例は、Rossiら, *Nucleic Acids Res*, 1992 Sep 11; 20(17): 4559-65に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、Ham

50

pelら（欧州特許出願公開EP 0360257）；HampelおよびTritz, Biochemistry 1989 Jun 13; 28(12): 4929-33; Hampelら, Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25; 18(2): 299-304; および米国特許第5, 631, 359号に記載されている。肝炎δウイルスモチーフの例は、PerrottaおよびBeen, Biochemistry. 1992 Dec 1; 31(47): 11843-52に記載されており; RNアーゼPモチーフの例は、Guerrier-Takadara, Cell. 1983 Dec; 35(3 Pt 2): 849-57に記載されており; アカパンカビ属(Neurospora) VS RNAリボザイムモチーフは、Collins(SavilleおよびCollins, Cell. 1990 May 18; 61(4): 685-96; SavilleおよびCollins, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Oct 1; 88(19): 8826-30; CollinsおよびOlive, Biochemistry. 1993 Mar 23; 32(11): 2795-9)に記載されており; そしてグループIイントロンの例は、米国特許第4, 987, 071号に記載されている。本発明の酵素性核酸分子にとって重要なことの全ては、それが標的遺伝子RNA領域の1以上と相補的である特異的基質結合部位を有し、かつそれが基質結合部位内または周囲に、該分子にRNA切断活性を与えるヌクレオチド配列を有することである。このように、リボザイム構築物は本明細書に記載の特定のモチーフに限定されるものではない。

【0106】

リボザイムはまた、それぞれ本明細書に参照により明確に組み入れられる、国際特許出願公開WO 93/23569および国際特許出願公開WO 94/02595に記載のとおり設計し、記載のとおり合成してin vitroおよびin vivoで試験することができる。そのようなリボザイムはまた送達用に最適化することもできる。特定の例を提示しているが、当業者であれば、必要なときには他の種において同等のRNA標的を利用しうることを認識するであろう。

【0107】

リボザイム活性は、リボザイム結合アームの長さを改変するか、または血清リボヌクレアーゼによるそれらの分解を防止する修飾を施したり（例えば、酵素性RNA分子の糖部分に施しうる様々な化学修飾を記載する、国際特許出願公開WO 92/07065; 国際特許出願公開WO 93/15187; 国際特許出願公開WO 91/03162; 欧州特許出願公開第92110298. 4号; 米国特許第5, 334, 711号; および国際特許出願公開WO 94/13688を参照）、細胞内のそれらの有効性を増強する修飾を施したり、RNA合成時間を短縮しかつ化学的必要性を低下させるステムII塩基(stem II bases)を除去したりしたリボザイムを化学合成することによって、最適化することができる。

【0108】

Sullivanら（国際特許出願公開WO 94/02595）は酵素性RNA分子を送達するための一般的方法を記載する。リボザイムは、当業者が精通する様々な方法によって細胞に投与することができ、それらは、以下に制限されるものではないが、リボソーム中の封入、イオン泳動による方法、またはヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、および生物接着性マイクロスフェアなどの他の媒介体中への組込みによる方法が挙げられる。複数の示唆として、リボザイムは、上記媒介体を用いてまたは用いなく、ex vivoで細胞または組織へ直接送達してもよい。あるいは、直接吸入により、直接注射によりまたはカテーテル、注入ポンプもしくはステントの使用により、RNA/媒介体の組合せ物を局所送達してもよい。送達の他の経路は、限定されるものではないが、血管内、筋内、皮下または関節注射、エーロゾル吸入、経口（錠剤または丸薬）、局所的、全身的、眼、腹腔内および/またはくも膜下送達が挙げられる。リボザイム送達および投与のさらに詳細な説明は、それぞれ本明細書に参照により明確に組み入れられる国際特許出願公開WO 94/02595および国際特許出願公開WO 93/23569に

記載されている。

【0109】

細胞内に高濃度のリボザイムを蓄積する他の方法は、リボザイムをコードする配列をDNA発現ベクター中に組み込むことである。リボザイム配列の転写は、真核生物RNAポリメラーゼI (pol I)、RNAポリメラーゼII (pol II)、またはRNAポリメラーゼIII (pol III) に対するプロモーターから駆動される。pol II または pol III プロモーターからの転写物は全細胞において高レベルで発現されるが、所与の細胞型中の所与の pol II プロモーターのレベルは近くに存在する遺伝子調節配列 (エンハンサー、サイレンサーなど) の性質に依存する。原核生物RNAポリメラーゼ酵素が適当な細胞内で発現される場合には、その原核生物RNAポリメラーゼプロモーターを利用することもできる。そのようなプロモーターから発現されるリボザイムは哺乳類細胞内で機能することが示されている。そのような転写ユニットは哺乳類細胞中への導入用の様々なベクター中に組み込むことができ、以下に制限されるものではないが、プラスミドDNAベクター、ウイルスDNAベクター (アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルス) またはウイルスRNAベクター (レトロウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、シンドビスウイルスベクター) が挙げられる。

10

【0110】

本発明の他の実施形態においては、ペプチド核酸 (PNA) 組成物が提供される。PNAは、核酸塩基が偽ペプチド骨格に結合しているDNA模倣物である (GoodおよびNielsen, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997 7 (4) 431-37)。PNAは、伝統的にRNAまたはDNAを使用している複数の方法において利用することができる。しばしば、PNA配列は対応するRNAまたはDNA配列より技術的に優れた機能性を示し、RNAまたはDNAが本来持っていない有用性を有する。作製方法、特性、および利用法を含むPNAの総説は、Corey (Trends Biotechnol 1997 Jun; 15 (6) : 224-9) に記載されている。そのように、ある特定実施形態においては、ACE mRNA配列の1以上の部分と相補的であるPNA配列を作製して、そのようなPNA組成物を用いてACE特異的RNAの翻訳を調節し、改変し、減少させ、または低下させ、それによって、そのPNA組成物を投与しておいた宿主細胞内のACE活性レベルを改変することができる。

20

【0111】

PNAは、DNAの通常のリン酸ジエステル骨格を置き換える2-アミノエチルーグリシン結合を有する (Nielsenら, Science 1991 Dec 6; 254 (5037) : 1497-500; Hanveyら, Science. 1992 Nov 27; 258 (5087) : 1481-5; HyrupおよびNielsen, Bioorg Med Chem. 1996 Jan; 4 (1) : 5-23)。この化学物質は次の3つの重要な結果をもたらす：第1に、DNAまたはホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドとは対照的に、PNAは中性分子である；第2に、PNAはアキラルであって立体選択的な合成を開発する必要がない；そして第3に、PNA合成は固相ペプチド合成用の標準的なBocまたはFmocプロトコルを使用するが、改変Merrifield法を含む他の方法も使用されている。

30

40

【0112】

PNAモノマーまたは既製のオリゴマーが、PerSeptive Biosystems社 (Framingham, MA) から市販されている。BocまたはFmocプロトコルのいずれかによるPNA合成は手作業または自動化プロトコルを簡単に利用する (Nortonら, Bioorg Med Chem. 1995 Apr; 3 (4) : 437-45)。手作業のプロトコルは化学修飾されたPNAの生成または近縁のPNAファミリーの同時合成に適している。

【0113】

ペプチド合成と同様に、特定のPNA合成の成功は選ばれる配列の特性に依存する。例えば、PNAは理論的にはヌクレオチド塩基のいずれの組合せでも組み込みうるが、隣接し

50

たプリンが存在すると生成物において1以上の残基の欠失をもたらさう。この困難が予想されるので、隣接したプリンをもつPNAを作るときには効率悪く付加されるであろう残基のカップリングを反復しなくてはならないことが示唆される。これに続いて、逆相高圧液体クロマトグラフィによりPNAを精製して、ペプチド合成の際に観察されるのと同程度の生成物の収率および純度をもたらすべきである。

【0114】

所与の用途に対するPNAの修飾は、固相合成の際にアミノ酸をカップリングすることによりまたはカルボン酸基を含有する化合物を露出したN末端アミンに結合させることにより、達成できる。あるいはPNAを、合成後に、導入したリシンまたはシステインにカップリングさせることにより修飾してもよい。PNAは容易に修飾できるので、より優れた溶解性または特定機能の必要性に対して最適化するのが容易である。一旦合成すれば、PNAとそれらの誘導体の正体は、質量分析によって確認することができる。複数の研究においてPNAの修飾が行われ、また利用されている（例えば、Nortonら, Bioorg Med Chem. 1995 Apr; 3(4): 437-45; Peterse
10 nら, J Pept Sci. 1995 May-Jun; 1(3): 175-83; Orumら, Biotechniques. 1995 Sep; 19(3): 472-80; Footerら, Biochemistry. 1996 Aug 20; 35(33): 10673-9; Griffithsら, Nucleic Acids Res. 1995 Aug 11; 23(15): 3003-8; Pardridgeら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 6; 92(12): 5592-6
20 ; Boffaら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 14; 92(6): 1901-5; Gambacorti-Passeriniら, Blood. 1996 Aug 15; 88(4): 1411-7; Armitageら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11; 94(23): 12320-5; Seegerら, Biotechniques. 1997 Sep; 23(3): 512-7)。米国特許第5,700,922号は、PNA-DNA-PNAキメラ分子、ならびに診断、生物のタンパク質のモジュレーション、および治療に対して感受性のある病的状態の治療におけるそれらの使用を考察している。

【0115】

PNAのアンチセンス結合特性を特性決定する方法は、Rose (Anal Chem. 1993 Dec 15; 65(24): 3545-9) および Jensenら (Biochemistry. 1997 Apr 22; 36(16): 5072-7) にて考察
30 されている。Roseはキャピラリー電気泳動を用いてPNAとそれらの相補的オリゴヌクレオチドとの結合を確認し、相対結合動態と化学量論を測定している。類似の種類の測定はJensenらがBIAcoreTM技術を用いて実施している。

【0116】

記載されているおよび当業者には明白でありうるPNAの他の用途としては、DNA鎖侵入、アンチセンス阻害、突然変異分析、転写のエンハンサー、核酸精製、転写活性のある遺伝子の単離、転写因子結合のブロッキング、ゲノム切断、バイオセンサー、in situハイブリダイゼーション、などにおける利用が挙げられる。
40

【0117】

ポリヌクレオチド特性決定および発現

本発明のポリヌクレオチド組成物は、様々な十分確立された技術のいずれかを利用して、作製および／または操作することができる（一般的には、Sambrookら, 「分子クローニング：研究室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989、および他の同様な参考文献を参照）。

【0118】

本発明の他の実施形態においては、本発明のポリペプチド、もしくは融合タンパク質また
50

はそれらの機能的同等物をコードするポリヌクレオチド配列あるいはそれらの断片を、適当な宿主細胞内のポリペプチドの発現を指令する組換えDNA分子に使用することができる。遺伝コードが本来示す縮重によって、実質的に同じまたは機能的に同等のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を作製してもよく、これらの配列を用いてクローニングして所与のポリペプチドを発現させてもよい。

【0119】

当業者であれば理解しうるように、複数の例で、非天然コドンを含むポリペプチドコード化ヌクレオチド配列を作製することが有利でありうる。例えば、特定の原核生物または真核生物宿主に好まれるコドンを選択して、タンパク質発現速度を増加するかまたは所望の特性（天然の配列から生成される転写物より長い半減期などの）もつ組換えRNA転写物を生成させることができる。

10

【0120】

さらに、限定されるものでないが、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および／または発現を変更する改変を含む様々な理由でポリペプチドをコードする配列を改変するために、本発明のポリヌクレオチド配列を当業界で一般的に知られる方法を用いて遺伝子操作することができる。例えば、無作為断片化によるDNAシャッフリングならびに遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再組立てを用いて、ヌクレオチド配列を遺伝子操作してもよい。さらに、位置指定突然変異誘発を用いて、新しい制限酵素切断部位の挿入、グリコシル化パターンの改変、コドン選択の変更、スプライス変異体の作製、または突然変異の導入などを行ってもよい。

20

【0121】

本発明の他の実施形態においては、天然、改変、または組換え核酸配列を、融合タンパク質をコードする異種配列とライゲートしてもよい。例えば、ポリペプチド活性のインヒビターについてペプチドライブラリーをスクリーニングするには、市販の抗体によって認識されうるキメラタンパク質をコードすることが有用である。融合タンパク質はまた、ポリペプチドをコードする配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含有するように遺伝子操作し、その結果ポリペプチドが切断されて異種部分から分離して精製されるようにしてもよい。

【0122】

所望のポリペプチドをコードする配列は、当業界で周知の化学的方法を利用して、全体としてまたは部分として合成することができる（Caruthers, M. H. ら（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223、Horn, T. ら（1980）Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232を参照）。あるいは、ポリペプチド、またはその部分のアミノ酸配列を合成する化学的方法を利用して、タンパク質自体を生産してもよい。例えば、ペプチド合成は様々な固相技術（Roberge, J. Y. ら（1995）Science 269:202-204）を用いて実施することができ、自動合成を、例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー（Peptide Synthesizer）（Perkin Elmer, Palo Alto, CA）を用いて達成することができる。

30

【0123】

新しく合成されるペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィ（例えばCreighton, T.（1983）「タンパク質、構造と分子的原理（Proteins, Structures and Molecular Principles）」, WH Freeman and Co., New York, N. Y.）または当業界で利用できる他の同等技術によって実質的に精製することができる。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定（例えば、エドマン分解法）によって確認することができる。さらに、ポリペプチド、またはその任意の部分のアミノ酸配列を、直接合成の際に改変するかおよび／または化学的方法により他のタンパク質またはその任意の部分由来の配列と結合させることによって、変異体ポリペプチドを作製することができる。

40

【0124】

50

所望のポリペプチドを発現するために、ポリペプチドまたは機能的同等物をコードするヌクレオチド配列を、適当な発現ベクター、すなわち挿入したコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有するベクター中に、挿入してもよい。当業者が周知する方法を利用して、目的のポリペプチドをコードする配列および適当な転写および翻訳制御エレメントを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては *in vitro* 組換えDNA技術、合成技術、および *in vivo* 遺伝子組換え技術が挙げられる。そのような技術は、例えば、Sambrook, J. ら (1989) 「分子クローニング：研究室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.、および Ausubel, F. M. ら (1989) 「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley & Sons, New York, N. Y. に記載されている。 10

【0125】

様々な発現ベクター／宿主系を利用してポリヌクレオチド配列を含有しかつ発現させることができる。これらは、限定されるものでないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターを用いて形質転換した酵母；ウイルス発現ベクターを用いて感染させた昆虫細胞系（例えば、バキュロウイルス）；ウイルス発現系（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）もしくは細菌発現ベクター（例えば、Ti または pBR322 プラスミド）を用いて形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。 20

【0126】

発現ベクターに存在する「制御エレメント」または「調節配列」は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を実行するこれらのベクターの非翻訳領域であり、例えばエンハンサー、プロモーター、5' および 3' 非翻訳領域である。そのようなエレメントはそれらの強力度や特異性は様々でありうる。利用するベクター系と宿主に依存して、構成的および誘導性のプロモーターを含む任意の数の適当な転写および翻訳エレメントを使用することができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、PBLUESCRIPT ファージミド (Stratagene, La Jolla, Calif.) または PSPORT1 プラスミド (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) のハイブリッド lacZ プロモーターなどの誘導性プロモーターを用いてもよい。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが一般的に好ましい。もしポリペプチドをコードする配列の複数コピーを含有する細胞系を作製する必要があるらば、SV40 または EBV に基づくベクターを適当な選択マーカーとともに有利に利用しうる。 30

【0127】

細菌系においては、発現されるポリペプチドについて意図する用途に応じて、任意の数の発現ベクターを選択することができる。例えば抗体の誘導などのために、例えば大量に必要であるとき、容易に精製される融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターを使用することができる。そのようなベクターは、限定されるものでないが、目的のポリペプチドをコードする配列を、βガラクトシダーゼのアミノ末端 Met およびそれに続く 7 残基の配列とイン・フレームでベクターにライゲートすることによりハイブリッドタンパク質を産生させる BLUESCRIPT (Stratagene)；pINベクター (Van Heeke, G. および S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264: 5503-5509) などの、多機能性大腸菌 (E. coli) クローニングおよび発現ベクターが挙げられる。pGEXベクター (Promega, Madison, Wis.) を用いて外来ポリペプチドをグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現することもできる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であって、グルタチオン-アガロース・ビーズへの吸着とそ 40 50

れに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解細胞から該タンパク質を容易に精製することができる。そのような系で作られるタンパク質は、ヘパリン、トロンビン、またはX A因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計して、クローニングした目的のポリペプチドをG S T部分から任意に遊離させることができる。

【0128】

酵母、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、 α 因子、アルコールオキシダーゼ、およびP G Hなどの構成的または誘導性プロモーターを含有する複数のベクターを利用することができる。総説としては、A u s u b e lら (前掲) およびG r a n tら (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544を参照。

10

【0129】

植物発現ベクターを利用するときは、ポリペプチドをコードする配列の発現は多数のプロモーターの任意のものによって駆動することができる。例えば、C a M Vの35 Sおよび19 Sプロモーターなどのウイルスプロモーターを単独でまたはT M V由来のオメガリーダー配列 (T a k a m a t s u, N. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311) と組合せて使用することができる。あるいは、R U B I S C Oの小サブユニットまたは熱ショックプロモーターなどの植物プロモーターを使用することができる (C o r u z z i, G. ら (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680; B r o g l i e, R. ら (1984) *Science* 224: 838-843; およびW i n t e r, J. ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105)。これらの構築物は、直接DNA形質転換または病原体媒介トランスフェクションによって植物細胞中に導入することができる。そのような技術は、一般に入手可能な多くの総説に記載されている (例えば、H o b b s, S. またはM u r r y, L. E. in M c G r a w H i l l 「科学と技術の年鑑 (Yearbook of Science and Technology)」 (1992) M c G r a w H i l l, New York, N. Y.; pp. 191-196を参照)。

20

【0130】

昆虫細胞系を利用して目的のポリペプチドを発現させることもできる。例えば、そのような系の1つでは、オートグラファ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (A c N P V) をベクターとして利用し、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞内でまたは幼生トリコプルシア (*Trichoplusia*) 中で外来遺伝子を発現させる。ポリペプチドをコードする配列を、ポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非必須領域中にクローニングして、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置くことができる。ポリペプチドをコードする配列の挿入が成功すると、ポリヘドリン遺伝子が不活化されてコートタンパク質を欠如する組換えウイルスが生成される。次いでその組換えウイルスを用いて、例えばエス・フルギペルダ (*S. frugiperda*) 細胞または幼生トリコプルシア (*Trichoplusia*) を感染させ、目的のポリペプチドを発現させることができる (E n g e l h a r d, E. K. ら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3224-3227)。

30

40

【0131】

哺乳類宿主細胞においては、一般的に、多数のウイルスベースの発現系を利用することができる。例えば、アデノウイルスを発現ベクターとして利用する場合、目的のポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーターと3部リーダー配列からなるアデノウイルス転写／翻訳複合体中にライゲートすることができる。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域への挿入を利用して、感染宿主細胞内で前記ポリペプチドを発現しうる生ウイルスを取得することができる (L o g a n, J. およびS h e n k, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3655-3659)。さらに、ラウス肉腫ウイルス (R S V) エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて哺乳類宿主細胞内の発現を増加させることができる。

50

【0132】

特定の開始シグナルを利用して、目的のポリペプチドをコードする配列のさらに効率的な翻訳を達成することができる。そのようなシグナルとしては、A T G開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入する場合には、さらなる転写または翻訳制御シグナルは必要でない。しかし、コード配列、またはその部分のみを挿入する場合には、A T G開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルを与えなければならない。さらに、開始コドンは、挿入物全体の翻訳を保証するために、正しい読み枠で存在しなければならない。外因性翻訳エレメントおよび開始コドンは天然および合成の様々な起源のものであってよい。発現の効率は、文献 (Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162) に記載されているように、利用する特定の細胞系にとって適切なエンハンサーを含有させることによって増大させることができる。

【0133】

さらに、宿主細胞株を、挿入配列の発現をモジュレートするかまたは発現タンパク質を所望の様式でプロセシングする能力について選ぶことができる。ポリペプチドのそのような修飾は、限定されるものでないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、アシル化が挙げられる。タンパク質の「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセシングを利用して、正しい挿入、フォールディングおよび／または機能を促進することもできる。そのような翻訳後活性に対する特定の細胞機構および特徴的な機構を有する CHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293、およびWI38などの様々な宿主細胞を、外来タンパク質の正しい修飾とプロセシングを保証するように選択することができる。

【0134】

組換えタンパク質を長期間、高収量で生産するために、安定した発現が一般的に好ましい。例えば、目的のポリヌクレオチドを安定して発現する細胞系を、ウイルスの複製起点および／または内因性発現エレメントならびに選択マーカー遺伝子を同じもしくは別のベクター上に含有する発現ベクターを用いて、形質転換することができる。ベクターを導入した後、細胞を1-2日間、富化培地中で増殖させ、その後、選択培地に切り替える。選択マーカーの目的は、選択耐性を与えるためであって、その存在によって、導入した配列の発現に成功した細胞の増殖と回収が可能になる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖させることができる。

【0135】

形質転換した細胞系を回収するために、任意の数の選択系を利用することができる。これらは、限定されるものでないが、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (Wigler, M. ら (1977) Cell 11:223-32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy, I. ら (1990) Cell 22:817-23) 遺伝子が挙げられ、それぞれ tk. sup. -または aprt. sup. -細胞において使用することができる。また、代謝拮抗剤、抗生物質または除草剤耐性を選択の基準に利用してもよい。例えば、メトトレキセート耐性を与える dhfr (Wigler, M. ら (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70) ; アミノグリコシド、ネオマイシンおよび G-418 に対する耐性を与える npt (Colbere-Garapin, F. ら (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14) ; およびクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対してそれぞれ耐性を与える als または pat (Murry, 前掲)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にする trpB、または細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用することを可能にする hisD (Hartman, S. C. および R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51)。可視マーカーの利用も人気があり、そのようなマーカーとして、アントシ

アニン、 β -グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンなどのマーカーが、形質転換体を同定するだけでなく特定のベクター系に起因する一過性または安定したタンパク質発現の量を定量するためにも広く使用されている (Rhodes, C. A. ら (1995) *Methods Mol. Biol.* 55: 121-131)。

【0136】

マーカー遺伝子発現の存在／不在は目的の遺伝子も存在することを示唆するが、その存在と発現は確認する必要があるであろう。例えば、もしポリペプチドをコードする配列がマーカー遺伝子内に挿入されれば、配列を含有する組換え細胞はマーカー遺伝子機能の不在によって同定されうる。あるいはマーカー遺伝子が、単一のプロモーターの制御下に、ポリペプチドをコードする配列とタンデムに配置される可能性もある。誘導または選択に対して応答するマーカー遺伝子の発現は、通常、タンデムに並んだ遺伝子の発現も同様に示す

10

あるいは、所望のポリヌクレオチド配列を含有し発現させる宿主細胞は、当業者が精通する様々な手法によって同定することができる。これらの手法には、限定されるものでないが、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術が挙げられ、これらには例えば核酸もしくはタンパク質を検出および／または定量するための膜、溶液、またはチップに基づく技術が含まれる。

【0137】

目的のポリヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培養物からのタンパク質の発現と回収に適した条件下で培養すればよい。組換え細胞により産生されるタンパク質は、使用する配列および／またはベクターに依存して、分泌されることもありまたは細胞内に含有されることもある。当業者であれば理解しうるように、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、コードされたポリペプチドを原核生物もしくは真核生物細胞膜を通して分泌することを指令するシグナル配列を含有するように設計することができる。他の組換え構築物を用いて、目的のポリペプチドをコードする配列と可溶性タンパク質の精製を容易にしうるポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列とを結合することができる。そのような精製を容易にするドメインは、限定されるものでないが、固定化金属上の精製を可能にするヒスチジントリプトファンモジュールなどの金属キレートペプチド、固定化免疫グロブリン上の精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長／親和性精製システム (ImmuneX Corp., Seattle, Wash.) に利用されるドメインが挙げられる。精製ドメインとコードされたポリペプチドとの間に、XA因子またはエンテロキナーゼに特異的なもの (Invitrogen, San Diego, Calif.) を一例とする切断可能なリンカー配列を含有させて、これを利用して精製を容易にすることができる。そのような発現ベクターの1つは、目的のポリペプチドを含有する融合タンパク質の発現をもたらすものであり、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行する6個のヒスチジン残基をコードする核酸を有する。ヒスチジン残基は、Porath, J. ら (1992, *Prot. Exp. Purif.* 3: 263-281) に記載のようにIMAC (固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィ) 上での精製を容易にするのに対して、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質から所望のポリペプチドを精製する手段を与える。融合タンパク質を含有するベクターの詳細は、Kroll, D. J. ら (1993; *DNA Cell Biol.* 12: 441-453) に与えられる。

20

30

40

【0138】

組換え生産の方法に加えて、本発明のポリペプチドおよびそれらの断片は、固相技術 (Merrifield J. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154) を利用して、直接ペプチド合成により生産することができる。タンパク質合成は、手作業の技術を用いてまたは自動化技術を用いて実施することができる。自動合成は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチドシンセサイザー

50

(Peptide Synthesizer) (Perkin Elmer) を用いて実施することができる。あるいは、様々な断片を別々に化学合成し、化学的方法を用いてそれらを組み合わせて全長分子を作製することができる。

【0139】

T細胞組成物

本発明は、他の態様においては、本明細書に開示した腫瘍ポリペプチドに特異的なT細胞またはその変異体もしくは誘導体を提供する。そのような細胞は一般的に、標準の方法を用いて *in vitro* または *ex vivo* で調製することができる。例えば、T細胞は、骨髄、末梢血、または患者の骨髄もしくは末梢血の一画分から、Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA) から入手可能な Isolix^T System^M などの市販の細胞分離システムを使用して単離することができる (米国特許第5,240,856号; 米国特許第5,215,926号; WO 89/06280; WO 91/16116 および WO 92/07243 も参照)。あるいは、T細胞は、近縁なもしくは近縁でないヒト、非ヒト動物、細胞系または培養物から取得してもよい。

【0140】

T細胞は、ポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび／またはそのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞 (APC) を用いて刺激することができる。そのような刺激は、目的のポリペプチドに特異的なT細胞の産生を可能にする条件下でかつそれに十分な時間にわたり、実施される。好ましくは、本発明の腫瘍ポリペプチドまたはポリヌクレオチドはミクロスフェアなどの送達媒介体内に存在して特異的T細胞の産生を促進する。

【0141】

T細胞が特異的に増殖するか、サイトカインを分泌するか、または本発明のポリペプチドでコートされたかもしくはそのポリペプチドをコードする遺伝子を発現する標的細胞を死滅させる場合には、T細胞は本発明のポリペプチドに対して特異的であると考えられる。T細胞特異性は、様々な標準技術のいずれかを利用して評価することができる。例えば、クロム放出アッセイまたは増殖アッセイにおいて、ネガティブ対照と比較して溶解および／または増殖における2倍を超える刺激指数の増加は、T細胞特異性を示す。そのようなアッセイは、例えば、Chenら, Cancer Res. 54:1065-1070, 1994 に記載の通り実施することができる。あるいは、T細胞の増殖の検出は、様々な既知の技術により実施することができる。例えば、T細胞増殖は、DNA合成速度の増加を測定することによって (例えば、トリチウム化チミジンを用いてT細胞をパルス標識培養し、さらにDNA中に組込まれたトリチウム化チミジンの量を測定することによって) 検出することができる。腫瘍ポリペプチド (100 ng/ml - 100 μg/ml、好ましくは200 ng/ml - 25 μg/ml) との3~7日間の接触により、通常はT細胞の増殖が少なくとも2倍増加する。標準サイトカインアッセイを用いて測定される通り、2~3時間にわたる上記の接触によりT細胞の活性化が起こる。このアッセイでは、サイトカイン (例えば、TNFまたはIFN-γ) 放出レベルの2倍の増加がT細胞の活性化を示す。(Colliganら, 「免疫学の最新プロトコル (Current Protocols in Immunology)」, vol. 1, Wiley Interscience (Greene 1998) を参照)。腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを発現するAPCに応答して活性化されたT細胞は、CD4⁺ および／またはCD8⁺ でありうる。腫瘍ポリペプチド特異的T細胞は標準の技術を用いて増大させることができる。好ましい実施形態においては、T細胞は患者、近縁の供与者または近縁でない供与者から得られて、刺激および増大の後に患者に投与される。

【0142】

治療目的のために、腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCに応答して増殖するCD4⁺ またはCD8⁺ T細胞を、*in vitro* または *in vivo* のいずれかで数を増大させることができる。そのようなT細胞の *in vitro* 増殖は、様々な方法

で達成することができる。例えば、T細胞を腫瘍ポリペプチドまたはそのポリペプチドの免疫原性部分に対応する短ペプチドに再曝露してもよく、その際、インターロイキン-2などのT細胞増殖因子、および／または腫瘍ポリペプチドを合成する刺激体細胞を加えてもまたは加えなくてもよい。あるいは、腫瘍ポリペプチドの存在下で増殖する1以上のT細胞を、クローン化により、数を増大させてもよい。細胞をクローン化する方法は当技術分野で周知であって、限界希釈法が挙げられる。

【0143】

医薬組成物

さらなる実施形態においては、本発明は、細胞または動物に単独でまたは1以上の他の様式の治療法と組み合わせて投与するための、本明細書に記載した1以上のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはT細胞を含有する製薬上許容される溶液の製剤化に関する。特に、本発明は、c r i p t oポリヌクレオチド、ポリペプチド、断片、融合物および変異体の、腫瘍を治療するための医薬組成物における使用に関する。特に、C r i p t oはC r i p t o 1であることが好ましい。

10

【0144】

もし所望であれば、本発明に開示した組成物は、例えば、他のタンパク質またはポリペプチドまたは様々な医薬活性物質などの他の薬剤とさらに組合せて投与できることは理解されるであろう。実際、さらに含有させてもよい他の成分には、その追加の薬剤が標的細胞または宿主組織と接触したときに重大な有害作用を生じなければ、実質的に制限はない。従って、該組成物は、特定の事例において必要となるような様々な他の薬剤と一緒に送達することができる。そのような組成物は宿主細胞もしくは他の生物学的供給源から精製してもよいし、または代わりに本明細書に記載のように化学的に合成してもよい。同様に、そのような組成物は置換または誘導体化したRNAもしくはDNA組成物をさらに含んでもよい。

20

【0145】

従って、本発明の他の態様においては、本明細書に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはT細胞組成物の1以上を、生理学的に許容される担体と組合せて含む医薬組成物が提供される。ある特定の好ましい実施形態においては、本発明の医薬組成物は、予防用および治療用ワクチン用途に使用するための、本発明の免疫原性ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド組成物を含む。ワクチン調製物は、例えばM. F. P o w e l l およびM. J. N e w m a n 編、「ワクチン設計（サブユニットとアジュバント手法）（V a c c i n e D e s i g n （t h e s u b u n i t a n d a d j u v a n t a p p r o a c h））」P l e n u m P r e s s （N Y , 1 9 9 5）に一般的に記載されている。通常、そのような組成物は1以上の本発明のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド組成物を1以上の免疫賦活薬と組合せて含む。

30

【0146】

本明細書に記載のいずれの医薬組成物も、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの製薬上許容される塩を含有しうことは明白であろう。そのような塩は、例えば、有機塩基（例えば第一級、第二級、第三級アミンおよび塩基性アミノ酸の塩）および無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウムおよびマグネシウム塩）を含む製薬上許容される無毒性塩基から調製することができる。

40

【0147】

他の実施形態においては、本発明の例示的な免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物は、上記ポリペプチドがi n s i t uで産生されるように、1以上の該ポリペプチドをコードするDNAを含む。上記のように、ポリヌクレオチドは、当業者には公知の様々な送達系のいずれかに入れて投与することができる。実際、多数の遺伝子送達技術が当技術分野では周知であり、例えば、R o l l a n d , C r i t . R e v . T h e r a p . D r u g C a r r i e r S y s t e m s 1 5 : 1 4 3 - 1 9 8 , 1 9 9 8、およびそれにおいて引用された文献に記載のものが挙げられる。適当なポリヌクレオチド発現系は、勿論、患者における発現に必要な調節用のDNA調節配列（適当なプロモーターおよび終

50

結シグナルなど)を含有する。あるいは、細菌送達系は、その細胞表面にポリペプチドの免疫原性部分を発現するかまたはそのようなエピトープを分泌する細菌(カルメット・گران菌(Bacillus-Calmette-Guerrin)のような)の投与を用いるものであってもよい。

【0148】

従って、ある特定の実施形態においては、本明細書に記載の免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、多数の公知のウイルスベースの系のいずれかを用いて、発現に好適な哺乳類宿主細胞中に導入する。例示的な一実施形態においては、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための好都合で有効なプラットフォームを提供する。本発明のポリペプチドをコードする選択されたヌクレオチド配列をベクター中に挿入し、当技術分野で周知の技術を用いてレトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次に、組換えウイルスを単離し、被験者に送達することができる。多数の例示のレトロウイルス系が記載されている(例えば、米国特許第5,219,740号;MillerおよびRosman(1989) BioTechniques 7:980-990;Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpaら(1991) Virology 180:849-852;Burnsら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037;ならびにBoris-LawrieおよびTemin(1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109)。

10

【0149】

さらに、多数の例示のアデノウイルスベースの系も記載されている。宿主ゲノム中に組み込まれるレトロウイルスと異なり、アデノウイルスは染色体外に留まるので、挿入性突然変異誘発に関連するリスクを最小化する(Haj-AhmadおよびGraham(1986) J. Virol. 57:267-274;Bettrら(1993) J. Virol. 67:5911-5921;Mitterederら(1994) Human Gene Therapy 5:717-729;Sethら(1994) J. Virol. 68:933-940;Barrら(1994) Gene Therapy 1:51-58;Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629;ならびにRichら(1993) Human Gene Therapy 4:461-476)。

20

30

【0150】

様々なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター系も、ポリヌクレオチド送達用に開発されている。AAVベクターは、当技術分野で周知の技術を用いて、容易に構築することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および第5,139,941号;国際特許出願公開番号WO 92/01070およびWO 93/03769;Lebkowskiら(1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996;Vincentら(1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press);Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539;Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129;Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801;ShellingおよびSmith(1994) Gene Therapy 1:165-169;ならびにZhouら(1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875を参照。

40

【0151】

遺伝子導入により本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を送達するために有用なさらなるウイルスベクターは、ワクシニアウイルスおよび鳥類ポックスウイルスなどのポックス科ウイルスから誘導されるものが挙げられる。例として説明すると、新規分子を発現するワクシニアウイルス組換え体は次のように構築することができる。ポリペプチドをコ

50

ードするDNAを最初に適当なベクター中に挿入し、該DNAが、ワクシニアプロモーター、およびチミジンキナーゼ（TK）をコードする配列などのフランキングワクシニアDNA配列に隣接するようにする。次いでこのベクターを用いて細胞をトランスフェクトし、該細胞を同時にワクシニアに感染させる。相同組換えによって、ワクシニアプロモーター＋本発明のポリペプチドをコードする遺伝子はそのウイルスゲノム中に挿入される。得られるTK^{sup}（-）組換え体は、その細胞を5-ブROMODEOキシウリジンの存在下で培養し、それに対し耐性のあるウイルスプラークを拾うことによって選択することができる。

【0152】

ワクシニアに基づく感染／トランスフェクション系は、ある生物の宿主細胞において、本
明細書に記載の1以上のポリペプチドの誘導性かつ一過性の発現または同時発現を提供する
のに都合よく使用することができる。この特定の系においては、細胞を、最初に、バク
テリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体に*i*
*n v i t r o*で感染させる。このポリメラーゼはT7プロモーターを保持するテンプレ
ートだけを転写する精巧な特異性を示す。感染後、細胞を、T7プロモーターにより駆動
される目的のポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトする。細胞質中で発現されたワ
クシニアウイルス組換え体由来のポリメラーゼはトランスフェクトされたDNAをRNA
に転写し、これは次いで宿主翻訳機構によってポリペプチドに翻訳される。この方法は、
大量のRNAとその翻訳産物の、高レベルかつ一過性の細胞質生産を提供する。例えば、
Elroy-SteinおよびMoss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerstら Proc. Natl.
l. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126を参照。

【0153】

あるいは、鶏痘ウイルスおよびカナリアポックスウイルスなどのアビポックスウイルスも
、目的のコード配列を送達するのに利用することができる。哺乳類病原体由来の免疫原を
発現する組換えアビポックスウイルスは、非鳥類種に投与すると防御免疫を与えることが
知られている。アビポックスベクターの使用はヒトおよび他の哺乳類種において特に望ま
しい、というのは、アビポックス属のメンバーは、感受性のある鳥類種においてのみ複製
して産生することが可能であり、従って哺乳類細胞に感染性がないからである。組換えア
ビポックスウイルスを産生する方法は当技術分野で周知であり、ワクシニアウイルスの産
生について上述したのと同様に、遺伝子組換えを用いる。例えば、WO 91/1288
2; WO 89/03429; およびWO 92/03545を参照。

【0154】

多数のアルファウイルスベクターのいずれでも、本発明のポリヌクレオチド組成物の送達
に利用することができ、そのようなベクターは米国特許第5,843,723号;第6,
015,686号;第6,008,035号および第6,015,694号に記載されて
いる。ベネズエラウマ脳炎（VEE）に基づくある特定のベクターも利用することができ
、説明のための例は米国特許第5,505,947号および第5,643,576号に見
出すことができる。

【0155】

さらに、Michaelら J. Biol. Chem. (1993) 268:686
6-6869およびWagnerら Proc. Natl. Acad. Sci. US
A (1992) 89:6099-6103に記載のアデノウイルスキメラベクターなど
の分子コンジュゲートベクターも本発明における遺伝子送達に利用できる。

【0156】

これらおよび他の既知のウイルスベースの送達系に関するさらなる例示的情報は、例えば
、次に見出すことができる: Fisher-Hochら, Proc. Natl. Ac
ad. Sci. USA 86:317-321, 1989; Flexnerら, An
n. N. Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexne
rら, Vaccine 8:17-21, 1990; 米国特許第4,603,112号

10

20

30

40

50

、第4, 769, 330号、および第5, 017, 487号; WO 89/01973; 米国特許第4, 777, 127号; GB 2, 200, 651; EP 0, 345, 242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Rosenfeldら, Science 252:431-434, 1991; Kollisら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994; Kass-Eislerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993; Guzmanら, Circulation 88:2838-2848, 1993; ならびに Guzmanら, Cir. Res. 73:1202-1207, 1993。

【0157】

本発明の他の実施形態においては、ポリヌクレオチドは「裸の」DNAとして投与/送達されるが、このような手法は、例えば、Ulmerら, Science 259:1745-1749, 1993に記載されかつCohen, Science 259:1691-1692, 1993に総説されている。裸のDNAの取込みは、DNAを細胞中に効率よく輸送される生物分解性ビーズ上にコーティングすることによって増加させることができる。

【0158】

さらなる他の実施形態においては、本発明の組成物は、その多くが記載されているが、粒子衝撃法により送達することができる。説明のための一例においては、ガス推進による粒子加速を、Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) および Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI) が製造するものを一例とするデバイスを用いて実施することができ、その数例は米国特許第5, 846, 796号; 第6, 010, 478号; 第5, 865, 796号; 第5, 584, 807号; EP特許第0500 799号に記載されている。この手法は、針を使用しない送達手法であって、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド粒子などの微小粒子の乾燥粉末製剤を、手持式(hand held) デバイスによって発生させたヘリウムガスジェット内で高速に加速して、粒子を目的の標的組織に吹きつける手法を提供する。核酸を送達する場合、その粒子は直径が好ましくは0.4~4.0 μm、さらに好ましくは0.6~2.0 μmの金ビーズであり、DNAコンジュゲートがこれらの上にコーティングされ、「遺伝子銃」中に装填するカートリッジ中に入れられる。粒子は、通常はそして好ましくは皮膚に送達される。皮膚に送達する他の手段は、針を通じた液体製剤の針送達の利用を含む。

【0159】

DNAワクチンは通常、強力な通常はウイルス性のプロモーター、抗原性ペプチドをコードする目的の遺伝子、およびポリアデニル化/転写終結配列を挿入した、細菌プラスミドベクターからなる。そして、目的の遺伝子は、記載した完全criptoタンパク質または単に配列番号13~94に記載したような抗原性ペプチド配列、をコードするものであってよい。プラスミドを、例えば大腸菌(E. coli)などの細菌中で増殖させ、次いで単離し、そして、意図する投与経路に応じて適当な媒質中に調製した後に、宿主に投与することができる。投与後、プラスミドは宿主細胞により取りこまれ、コードされたペプチドが産生される。プラスミドベクターは、哺乳類宿主内でのプラスミド複製および関連動物の染色体DNA中への組み込みを防止するために、真核生物細胞において機能する複製起点なしに作るのが好ましいであろう。

【0160】

伝統的ワクチン接種技術と比較して、DNAワクチン接種には多数の利点がある。第1に、DNA配列によりコードされるタンパク質は宿主で合成されるので、該タンパク質の構造またはコンフォメーションは、その病状に関連する天然のタンパク質に類似しているだろうと予想される。DNAワクチン接種はまた、保存タンパク質由来のエピトープを認識する細胞傷害性Tリンパ球応答を生じることによって、様々なウイルス株に対する防御も提供するだろうと考えられる。さらに、プラスミドは、抗原性タンパク質を産生しうる宿

10

20

30

40

50

主細胞により取り込まれるので、長時間持続する免疫応答を誘発しうる。本技術はまた、多様な免疫原／エピトープを単一調製物中に合わせる可能性も与える。

【0161】

DNAワクチン接種に関係して助けとなる背景の情報は、Donnellyら、「DNAワクチン (DNA vaccines)」Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648に提供されていて、本開示は本明細書にその全文が参照により含まれるものとする。

【0162】

関係する実施形態においては、本発明の組成物のガス推進無針注射 (gas-driven needle-less injection) に有用でありうる他の装置および方法は、Bioject, Inc. (Portland, OR) により与えられたものが挙げられ、それらの数例は米国特許第4,790,824号;第5,064,413号;第5,312,335号;第5,383,851号;第5,399,163号;第5,520,639号;および第5,993,412号に記載されている。

【0163】

他の実施形態においては、本明細書に記載の医薬組成物は、本発明の免疫原性ポリヌクレオチド、ポリペプチド、T細胞および／またはAPC組成物に加えて、1以上の免疫賦活剤を含んでなるであろう。免疫賦活剤は、本質的に、外因性抗原に対する免疫応答 (抗体および／または細胞が介在する) を増強するかまたは強力にするいずれの物質も意味する。好ましい型の免疫賦活剤の1つはアジュバントを含んでなる。多くのアジュバントは、水酸化アルミニウムまたは鉱油などの、抗原を迅速な異化作用から保護するように設計された物質、およびリピドA、百日咳菌 (Bordetella pertussis) または結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) 由来のタンパク質などの免疫応答の刺激因子を含有する。ある特定のアジュバントは市販されていて、例えば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merckアジュバント65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (Smith Kline Beecham, Philadelphia, PA); 水酸化アルミニウムゲル (alum) もしくはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩; カルシウム、鉄もしくは亜鉛の塩; アシル化チロシンの不溶性懸濁液; アシル化糖類; カチオンもしくはアニオン誘導体化した多糖類; ポリホスファゼン; 生物分解性マイクロスフェア; モノホスホリルリピドAおよびquil Aが挙げられる。GM-CSF、インターロイキン-2、-7、-12などのサイトカインおよび他の同様な増殖因子もアジュバントとして利用しうる。

【0164】

本発明のある特定の実施形態においては、アジュバント組成物は優先的にTh1型の免疫応答を誘導するものであることが好ましい。Th1型サイトカイン (例えば、IFN- γ 、TNF α 、IL-2およびIL-12) のレベルが高いと、投与された抗原に対する細胞介在性免疫応答の誘導を有利にする傾向がある。対照的に、Th2型サイトカイン (例えば、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10) のレベルが高いと、体液性免疫応答の誘導を有利にする傾向がある。本明細書で提供されるワクチンの適用後に、患者はTh1型およびTh2型応答を含む免疫応答を備えうる。応答が優先的にTh1型である好ましい実施形態内では、Th1型サイトカインのレベルはTh2型サイトカインのレベルよりも大きい程度まで増加しうる。これらのサイトカインのレベルは標準アッセイを用いて容易に評価することができる。サイトカインファミリーの概説については、MosmannおよびCoffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173, 1989を参照されたい。

【0165】

優先的にTh1型応答を誘発する、ある特定の好ましいアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリピドA、好ましくは3-de-O-アシル化モノホスホリルリピドAと

アルミニウム塩との組合せが挙げられる。Corixa Corporation (Seattle, WA; 例えば、米国特許第4,436,727号;第4,877,611号;第4,866,034号および第4,912,094号を参照されたい)からMPL (登録商標)アジュバントが入手可能である。またCpG含有オリゴヌクレオチド(ここで、CpGジヌクレオチドはメチル化されてない)もTh1応答を優先的に誘導する。そのようなオリゴヌクレオチドは周知であって、例えばWO 96/02555、WO 99/33488ならびに米国特許第6,008,200号および第5,856,462号に記載されている。また免疫賦活性DNA配列も、例えば、Satoら, Science 273:352, 1996によって記載されている。他の好ましくはアジュバントは、Quil Aなどのサポニン、またはその誘導体を含んでなり、QS21およびQS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); エスシン (Escin); ジギトニン; またはカスミソウ (Gypsophila) またはキノア (Chenopodium quinoa) サポニンが挙げられる。他の好ましい製剤は本発明のアジュバントの組合せに、1以上のサポニン、例えば次のQS21、QS7、Quil A、 β -エスシン、またはジギトニンを含む群の少なくとも2つの組合せを含む。

10

【0166】

あるいは、サポニン製剤は、キトサンまたは他のポリカチオンポリマー、ポリラクチドおよびポリラクチド-コ-グリコリド粒子、ポリ-N-アセチルグルコサミンに基づくポリマーマトリックス、多糖類もしくは化学修飾した多糖類からなる粒子、リポソームおよび脂質に基づく粒子、グリセロールモノエステルからなる粒子などからなるワクチンビヒクルと組み合わせてもよい。サポニンはまた、コレステロールの存在のもとで製剤化して、リポソームまたはISCOMなどの微粒子構造を形成してもよい。さらに、サポニンはポリオキシエチレンエーテルもしくはエステルと一緒に微粒子を含まない溶液 (non-particulate solution) もしくは懸濁液で、またはわずかにラメラの (paucilamellar) リポソームもしくはISCOMなどの微粒子構造で製剤化してもよい。サポニンはまた、Carbopol (登録商標) などの賦形剤を用いて粘性を増加するように製剤化するか、またはラクトースなどの粉末賦形剤とともに乾燥粉末形態で製剤化してもよい。

20

【0167】

好ましい一実施形態においては、アジュバント系は、WO 94/00153に記載されるQS21と3D-MPL (登録商標) アジュバントの組合せなどのモノホスホリルリピドAとサポニン誘導体の組合せ、または、WO 96/33739に記載されるQS21をコレステロールによってクエンチした (quenched) 反応原性 (reactogenic) の低い組成物を含む。他の好ましい製剤は、水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含んでなる。他の特に好ましいQS21、3D-MPL (登録商標) アジュバントおよびトコフェロールを含む水中油型エマルジョンを使用するアジュバント製剤がWO 95/17210に記載されている。

30

【0168】

他の増強されたアジュバント系は、CpG含有オリゴヌクレオチドとサポニン誘導体との組合せ、特にWO 00/09159に記載のCpGとQS21との組合せを含む。好ましくは、該製剤はさらに水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含んでなる。

40

【0169】

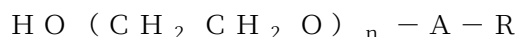
本発明の医薬組成物に使用するさらなる例示のアジュバントとしては、Montanide ISA 720 (Seppic、フランス)、SAF (Chiron、California、米国)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、SBASシリーズのアジュバント (例えば、SmithKline Beecham、Rixensart、ベルギー、から入手しうるSBAS-2またはSBAS-4)、Detox (Enhanzyn (登録商標)) (Corixa, Hamilton, MT)、RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) およびその開示の全文が本明細書に

50

参照により組み入れられる、係属中の米国特許出願第08/853,826号および第09/074,720号に記載のもののような他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート (AGPs)、ならびにWO 99/52549 A1に記載のもののようなポリオキシエチレンエーテルアジュバントが挙げられる。

【0170】

他の好ましいアジュバントとしては、一般式 (I) :



[式中、nは1~50であり、Aは結合または-C(O)-であり、RはC₁-50アルキルまたはフェニルC₁-50アルキルである]

のアジュバント分子が挙げられる。

10

【0171】

本発明の一実施形態は、一般式 (I) (式中、nは1~50、好ましくは4~24、最も好ましくは9であり；R成分はC₁-50、好ましくはC₄-C₂₀アルキルであり、最も好ましくはC₁₂アルキルであり；そしてAは結合である) のポリオキシエチレンエーテルを含んでなるワクチン製剤からなる。ポリオキシエチレンエーテルの濃度は0.1~20%、好ましくは0.1~10%、そして最も好ましくは0.1~1%の範囲であるべきである。好ましいポリオキシエチレンエーテルは次の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-9-ステアリルエーテル (polyoxyethylene-9-stearylether)、ポリオキシエチレン-8-ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。ポリオキシエチレンラウリルエーテルなどのポリオキシエチレンエーテルは、メルク・インデックス (Merck index) (第12版：エントリー7717) に記載されている。これらのアジュバント分子はWO 99/52549に記載されている。

20

【0172】

上記の一般式 (I) によるポリオキシエチレンエーテルは、もし所望であれば、他のアジュバントと組合せてもよい。例えば、好ましいアジュバントの組合せは好ましくは、係属中の英国特許出願GB 9820956.2に記載のCpGとの組合せである。

【0173】

本発明の他の実施形態によれば、本明細書に記載の免疫原性組成物は、樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球、および効率的なAPCとなるように遺伝子工学的に操作することができる他の細胞などの抗原提示細胞 (APC) を介して、宿主に送達される。そのような細胞は、必要ではないが、遺伝子学的に改変して、抗原を提示する能力を増加し、T細胞応答の活性化および/または維持を改良し、それ自身が抗腫瘍効果を有しおよび/または受給者と免疫学的に適合しうる (すなわち、適合したHLAハプロタイプ) ようにしてもよい。APCは一般的に、腫瘍および腫瘍周辺組織を含む様々な体液および器官のいずれから単離してもよく、かつ自己、同種、同系または異種細胞であってもよい。

30

【0174】

本発明のある特定の好ましい実施形態は樹状細胞またはその前駆細胞 (progenitor) を抗原提示細胞として使用する。樹状細胞は高度に強力なAPCであって (BanchereauおよびSteinman, Nature 392:245-251, 1998)、予防または治療用の抗腫瘍免疫を誘発する生理学的アジュバントとして有効であることが示されている (TimmermanおよびLevy, Ann. Rev. Med. 50:507-529, 1999を参照)。一般的に、樹状細胞は、その典型的な形状 (in vitroで目視しうる特徴ある細胞質突起 (樹状突起) をもつin situ星状)、抗原を高効率で取込んでプロセッシングして提示する能力、およびナイーブT細胞応答を活性化する能力に基づいて、同定することができる。樹状細胞は、勿論、通常in vivoまたはex vivoで樹状細胞上に見られない特定の細胞表面受容体またはリガンドを発現するように遺伝子工学的に操作してもよく、本発明はそのような改変した樹状細胞を意図する。樹状細胞の代わりに、分泌小胞抗原を搭載する樹状細胞 (エキソ

40

50

ソームと呼ぶ)もワクチン内に利用することができる(Zitvogelら, Nature Med. 4:594-600, 1998を参照)。

【0175】

樹状細胞と前駆細胞は、末梢血、骨髓、腫瘍浸潤細胞、腫瘍周辺組織—浸潤細胞、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血または任意の他の好適な組織または体液から得ることができる。例えば、樹状細胞は、GM-CSF、IL-4、IL-13および/またはTNF α などのサイトカインの組合せを末梢血から回収した単球の培養物に加えることによって、*ex vivo*で分化させてもよい。あるいは、末梢血、臍帯血または骨髓から回収したCD34陽性細胞を、GM-CSF、IL-3、TNF α 、CD40リガンド、LPS、flt3リガンドおよび/または樹状細胞の分化、成熟および増殖を誘導する他の化合物の組合せを培地に加えることによって、樹状細胞に分化させてもよい。 10

【0176】

樹状細胞は「未成熟」および「成熟」細胞として分類すると好都合であり、これにより、2つのよく特徴付けられた表現型を識別する簡単な方法が可能となる。しかし、この命名法は全ての可能な分化の中間段階を排除しないと解釈すべきである。未成熟樹状細胞は、抗原取込みおよびプロセッシングの高い能力をもつAPCとして特徴付けられ、Fc γ 受容体およびマンノース受容体の高い発現と相関がある。成熟表現型は、典型的には、これらのマーカーの発現はより低い、MHCクラスIおよびクラスII、接着分子(例えば、CD54およびCD11)および補助的刺激分子(例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB)などのT細胞活性化の原因となる細胞表面分子の高い発現によって特徴付けられる。 20

【0177】

APCは一般的に、本発明のポリヌクレオチド(またはその部分もしくは他の変異体)を用いてトランスフェクトして、コードされたポリペプチド、またはその免疫原性部分を細胞表面上に発現させることができる。そのようなトランスフェクションを*ex vivo*で起こして、次いでそのようなトランスフェクトした細胞を含んでなる医薬組成物を本明細書に記載のように治療目的に使用することができる。あるいは、樹状細胞または他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達ビヒクルを患者に投与して、*in vivo*でトランスフェクションを起こさせてもよい。樹状細胞の*in vivo*および*ex vivo*トランスフェクションは、例えば、一般的に、WO 97/24447に記載の方法、または Mahviら, Immunology and cell Biology 75:456-460, 1997に記載の遺伝子銃手法などの、当技術分野で公知のいずれの方法を用いて実施してもよい。樹状細胞の抗原搭載は、樹状細胞もしくは前駆細胞を腫瘍ポリペプチド、DNA(裸の(naked)またはプラスミドベクター内の)もしくはRNAとともに;または抗原発現組換え細菌もしくはウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルスまたはレンチウイルスベクター)とともにインキュベートすることによって達成することができる。搭載前にポリペプチドを、T細胞ヘルプを与える免疫学的パートナー(例えば、担体分子)と共有結合でコンジュゲートしてもよい。あるいは、樹状細胞に、非コンジュゲート免疫学的パートナーを用いて、別々にまたはポリペプチドの存在下でパルス(pulsed)してもよい。 30 40

【0178】

当業者にとって公知のいずれの好適な担体を本発明の医薬組成物に使用してもよいが、担体の型は典型的には、投与の様式に依って変わりうる。本発明の組成物はいずれの適当な投与方法のために製剤化してもよく、例えば、局所、経口、鼻、粘膜、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下および筋内投与が挙げられる。

【0179】

そのような医薬組成物内で使用する担体は生体適合性であり、かつ生物分解性でもありうる。ある特定の実施形態においては、好ましくは、製剤は相対的に一定したレベルの活性成分放出を与える。しかし他の実施形態においては、投与後に直ぐより迅速な放出速度が所望されうる。そのような組成物の製剤は、既知技術を利用する当業者のレベル内にある 50

。この点に関する有用な例示の担体としては、ポリ（ラクチド-コ-グリコチド）、ポリ
アクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微粒子が挙げら
れる。他の例示の遅延放出性担体としては、非液状親水性コア（例えば、架橋多糖または
オリゴ糖）を含んでなる超分子バイオベクター（b i o v e c t o r）および、任意に、
リン脂質などの両親媒性化合物を含んでなる外層が挙げられる（例えば、米国特許第5，
151，254号およびPCT出願WO 94/20078、WO/94/23701お
よびWO 96/06638を参照）。徐放性製剤内に含有される活性化合物の量は、移
植部位、放出の速度と予想持続時間および治療または予防すべき症状の性質に依存する。

【0180】

他の例示の実施形態においては、生物分解性ミクロスフェア（例えば、ポリラクテート、
ポリグリコレート）を本発明の組成物の担体として使用する。好適な生物分解性ミクロス
フェアは、例えば、米国特許第4，897，268号；第5，075，109号；第5，
928，647号；第5，811，128号；第5，820，883号；第5，853，
763号；第5，814，344号；第5，407，609号および第5，942，25
2号に開示されている。WO/99 40934およびそれに引用された参考文献に記載
の改変されたB型肝炎コアタンパク質担体系も多くの適用に有用であろう。他の例示の担
体／送達系は、米国特許第5，928，647号に記載のもののような、宿主のクラスI
制限細胞傷害性Tリンパ球応答を誘導できる微粒子タンパク質複合体を含んでなる担体
を使用する。

10

【0181】

本発明の医薬組成物は多くの場合、さらに1以上のバッファー（例えば、中性緩衝生理食
塩水またはリン酸緩衝生理食塩水）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スク
ロースまたはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、またはグリシ
ンなどのアミノ酸、酸化防止剤、静菌剤、EDTAもしくはグルタチオンなどのキレート
剤、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、製剤を受給者の血液と等張、低張
もしくは弱高張にする溶質、懸濁剤、増粘剤および／または保存剤を含んでなるだろう。
あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化してもよい。

20

【0182】

本明細書に記載の医薬組成物は、密閉アンプルまたはバイアルなどの単位用量または多用
量容器で提供することができる。そのような容器は典型的には製剤を使用するまで無菌か
つ安定に保存する方法で密閉される。一般的に、製剤は油性もしくは水性ビヒクル中の懸
濁液、溶液またはエマルジョンとして保存することができる。あるいは、医薬組成物は、
使用直前に無菌の液状担体の添加だけを必要とする凍結乾燥条件で保存してもよい。

30

【0183】

本明細書に記載の特定の組成物を、例えば、経口、非経口、静脈内、鼻腔内、および筋内
投与を含む様々な治療処方計画および製剤において使用するための、好適な投与および治
療処方計画の開発は当技術分野では周知であり、それらのいくつかを、一般的な例示の目
的で以下に簡単に考察する。

【0184】

ある特定の適用においては、本明細書に開示した医薬組成物は、経口投与によって動物に
送達することができる。その場合、これらの組成物は不活性の希釈剤を用いてまたは吸収
できる食用担体を用いて製剤化してもよいし、または、硬質もしくは軟質シェルのゼラチ
ンカプセルに封入してもよいし、または錠剤に圧縮してもよいし、または直接食品に組み
込んでもよい。

40

【0185】

活性化合物は、さらに賦形剤を組み込んでもよく、摂取しうる錠剤、バッカル錠、トロ
チ、カプセル、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、ウエハ（w a f e r）などの形態で使
用してもよい（例えば、Mathiowitzら，Nature 1997 Mar 27
；386（6623）：410-4；Hwangら，Crit Rev Ther Dru
g Carrier Syst 1998；15（3）：243-84；米国特許第5，6

50

41, 515号; 米国特許第5, 580, 579号 および米国特許第5, 792, 451号を参照)。錠剤、トローチ、丸薬、カプセルなどはまた、任意の様々な追加成分、例えばトラガカントガム、アカシア、コーンスターチ、もしくはゼラチンなどの結合剤; リン酸二カルシウムなどの賦形剤; コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸などの崩壊剤; ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤; および蔗糖、乳糖もしくはサッカリンなどの甘味剤またはペパーミント、ウインターグリーンの油、もしくはチェリー香料などの香料を含有してもよい。単位剤形がカプセルであるとき、上記の型の物質に加えて、液状担体を含有してもよい。様々な他の物質がコーティングとしてまたは投与単位の物理的形態を異なるように改変するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセルを、シェラック、糖、または両方でコーティングしてもよい。勿論、単位剤形を調製するために用いるいずれの物質も、製薬上純粋であり、使用量は実質的に無毒であるべきである。さらに、活性化化合物を徐放性調製物および製剤中に組み込んでもよい。

10

【0186】

典型的には、これらの製剤は、活性化化合物の少なくとも約0.1%以上を含有しうるが、活性成分の割合は、勿論、変えてもよく、全製剤の重量または容積の約1もしくは2%と約60%もしくは70%との間またはそれ以上であるのが好都合でありうる。当然、それぞれの治療上有用な組成物中の活性化化合物の量は好適な投与が化合物の所与の単位用量のいずれかで得られるように調製しうる。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品貯蔵寿命などの要因、ならびに他の薬理学的考慮が、そのような医薬組成物を調製する当業者により考慮されるし、そのようなものとして、様々な投与と治療処方計画が所望されうる。

20

【0187】

あるいは、経口投与用に、本発明の組成物は、うがい薬、歯磨剤、バッカル錠、経口スプレー、または舌下経口投与製剤の形態で1以上の賦形剤とともに組み込んでよい。あるいは、活性成分を、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび重炭酸カリウムを含有するような経口溶液中に組み込んでも、または歯磨剤に分散しても、または治療上有効な量を、水、結合剤、研磨剤、香料、発泡剤、および湿潤剤を含みうる組成物に加えてもよい。あるいは、組成物は、舌下に置くかさもなくば口中で溶解しうる錠剤または溶液形態に作ってもよい。

【0188】

ある特定の状況においては、本明細書に開示した医薬組成物を、非経口的に、静脈内に、筋内に、またはさらに腹腔内にもしくは皮内に送達することが望ましいだろう。そのような手法は、当業者には周知であり、それらのいくつかはさらに、例えば、米国特許第5, 543, 158号; 米国特許第5, 641, 515号および米国特許第5, 399, 363号に記載されている。ある特定の実施形態においては、遊離塩基または薬理学上許容される塩としての活性化化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合して水中で調製することができる。また分散液を、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中でならびに油中で調製することもできる。普通の保存と使用の条件下では、これらの調製物は一般的に微生物の増殖を防止する保存剤を含有するであろう。

30

40

【0189】

注射可能な使用に好適な例示の剤形としては、無菌水溶液または分散液および無菌注射可能溶液もしくは分散液の用事調製のための無菌粉末が挙げられる(例えば、米国特許第5, 466, 468号を参照)。全ての場合に、剤形は無菌でなければならないしかつ容易に注射しうる程度の液体でなければならない。剤形は製造および貯蔵条件下で安定でなければならないしかつ細菌および真菌などの微生物の混入作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど)、それらの好適な混合物、および/または植物油を含有する溶媒または分散媒であってもよい。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には所要の粒径の維持によ

50

り、および／または界面活性剤の使用により維持することができる。微生物作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって促進しうる。多くの場合、等張剤、例えば糖類または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能組成物の吸収の延長は、組成物に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによって実施できる。

【0190】

一実施形態においては、水溶液で非経口投与するために、溶液をもし必要であれば好適に緩衝化し、かつ液希釈剤を最初に十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張にしなければならない。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋内、皮下および腹腔内投与用に特に好適である。この関係で使用しうる無菌水性媒質は本開示を考慮に入れて当業者には分かるであろう。例えば、1用量を等張NaCl溶液1mlに溶解し、そして皮下注入液1000mlに加えるかまたは注入の所定部位に注射することができる（例えば、「レミントンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」第15版、1035-1038および1570-1580頁を参照）。治療する被験者の症状に依っては、若干の用量の変動は必然的に起こりうる。さらに、ヒト投与については、調製物は勿論、FDA生物製剤局の基準によって要求される、無菌性、発熱原性、ならびに一般的安全性および純度基準に適合することが好ましいであろう。

10

【0191】

本発明の他の実施形態においては、本明細書に開示した組成物は中性または塩の形態で製剤化してもよい。例示の製薬上許容される塩としては、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成した、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成した）が挙げられる。また遊離カルボキシル基と形成した塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することができる。製剤において、溶液は、投与製剤と適合しうる方法でかつ治療上有効な量で投与されるであろう。

20

【0192】

担体はさらに、いずれのおよび全ての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、バッファー、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含んでなってもよい。製薬上活性のある物質に対するそのような媒質および薬剤の使用は当技術分野では周知である。いずれの従来の媒質または薬剤も、活性成分と不適合である場合を除いて、治療組成物におけるその使用が意図される。また補充活性成分を組成物中に組み込んでもよい。成句「製薬上許容される」とは、ヒトに投与したとき、アレルギーまたは類似の有害反応を生起しない分子実体および組成物を意味する。

30

【0193】

ある特定の実施形態においては、医薬組成物は鼻腔内スプレー、吸入、および／または他のエーロゾル送達ビヒクルによって送達することができる。遺伝子、核酸およびペプチド組成物を鼻内エーロゾルスプレーを介して肺に直接送達する方法は、例えば、米国特許第5,756,353号および米国特許第5,804,212号に記載されている。同様に、また鼻腔内微粒子樹脂（Takenagaら、J Controlled Release 1998 Mar 2; 52(1-2): 81-7）およびリゾホスファチジルグリセロール化合物（米国特許第5,725,871号）を用いる薬物の送達も製薬技術分野では周知である。同様に、例示のポリテトラフルオロエチレン支持体マトリックスの形態での経粘膜薬物送達は、米国特許第5,780,045号に記載されている。

40

【0194】

ある特定の実施形態においては、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、脂質粒子、小胞などを、本発明の組成物の好適な宿主細胞／生物中への導入に利用する。特に、本発明の組成物は、送達のために、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェアの中に封入してまたはナノ粒子などに製剤化してもよい。あるいは、本発明の組成物は、共有結合によってま

50

たは非共有結合によって、そのような担体ビヒクルの表面に結合させてもよい。

【0195】

可能な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物の形成と使用は一般的に当業者には公知である（例えば、それぞれの全文が特定して本明細書に参照により組み入れられる、Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul; 16 (7) : 307-21; Takakura, Nippon Rinsho 1998 Mar; 56 (3) : 691-5; Chandranら, Indian J Exp Biol. 1997 Aug; 35 (8) : 801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995; 12 (2-3) : 233-61; 米国特許第5, 567, 434号; 米国特許第5, 552, 157号; 米国特許第5, 565, 213号; 米国特許第5, 738, 868号および米国特許第5, 795, 587号を参照）。

【0196】

リポソームは、T細胞懸濁液、一次肝細胞培養物およびPC 12細胞を含む他の方法によってトランスフェクトすることが通常困難である多数の細胞型について使用され、成功している（Renneisenら, J Biol Chem. 1990 Sep 25; 265 (27) : 16337-42; Mullerら, DNA Cell Biol. 1990 Apr; 9 (3) : 221-9）。さらに、リポソームは、ウイルスに基づく送達系では典型的であるDNAの長さ制約がない。リポソームは、遺伝子、様々な薬物、放射線治療剤、酵素、ウイルス、転写因子、アロステリックエフェクターなどを、様々な培養細胞系および動物内に導入するのに効果的に利用されている。さらに、リポソームの利用は、全身送達後の自己免疫応答または許容されない毒性に関係がないようである。

【0197】

ある特定の実施形態においては、リポソームは、水溶媒質中に分散したリン脂質から形成され、多層同心二重層小胞（multilamellar concentric bilayer vesicles）（多層小胞（multilamellar vesicle; MLV）とも呼ばれる）を自然に形成する。

【0198】

あるいは、他の実施形態においては、本発明は、本発明の組成物の製薬上許容されるナノカプセル製剤を提供する。ナノカプセルは一般的に、化合物を安定でかつ再現しうる方法で封入することができる（例えば、Quintanar-Guerreroら, Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec; 24 (12) : 1113-28を参照）。細胞内ポリマーオーバーローディングによる副作用を避けるために、そのような超微粒子（ほぼ0.1 μmサイズ）はin vivoで分解しうるポリマーを用いて設計することができる。そのような粒子は、例えばCouvreurら, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5 (1) : 1-20; zur Muhlenら, Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar; 45 (2) : 149-55; Zambauxら J Controlled Release. 1998 Jan 2; 50 (1-3) : 31-40; および米国特許第5, 145, 684号に記載されたように作製することができる。

【0199】

癌治療法

本発明のさらなる態様においては、本発明に記載の医薬組成物は、癌の治療、特に結腸または結腸直腸癌の免疫療法に使用することができる。他の実施形態においては、該組成物は、乳癌または非小細胞肺癌を治療するのに使用することができる。典型的には、該組成物はcripto抗原を発現する癌および／またはcripto抗原を発現する転移の患者を治療するのに有用であろう。そのような方法内においては、本明細書に記載の医薬組成物を患者、典型的には温血動物、好ましくはヒトに投与する。患者は癌を患っていてもまたはいなくてもよい。従って、上記の医薬組成物は、癌の発生を予防するためにまたは癌を患っている患者を治療するために使用することができる。医薬組成物とワクチンは、

原発性腫瘍の外科除去および／または放射線治療もしくは通常の化学治療薬の投与などの治療の前にまたはその後に投与してもよい。以上考察したように、医薬組成物の投与は、いずれの好適な方法によってもよく、それらとしては静脈内、腹腔内、筋内、皮下、鼻腔内、皮内、肛門、腔、局所および経口経路による投与が挙げられる。

【0200】

ある特定の実施形態内においては、免疫療法は能動免疫療法であってもよく、その場合、治療は、腫瘍に対して反応する内因性宿主免疫系の、免疫応答改変剤（本明細書で提供したポリペプチドおよびポリヌクレオチドなどの）投与による *in vivo* 刺激に依存する。

【0201】

他の実施形態においては、免疫療法は受動免疫療法であってもよく、この治療は、確立された腫瘍免疫反応性をもって直接または間接的に抗腫瘍効果を介在しうる作用物質（エフェクター細胞など）の送達を含み、完全な宿主免疫系に必ずしも依存しない。エフェクター細胞の例としては、先に考察したT細胞、Tリンパ球（CD8+細胞傷害性Tリンパ球およびCD4+Tヘルパー腫瘍浸潤リンパ球など）、キラー細胞（ナチュラルキラー細胞およびリンホカイン活性化キラー細胞）、B細胞、および本明細書で提供したポリペプチドを発現する抗原提示細胞（樹状細胞およびマクロファージなど）が挙げられる。本明細書に列挙したポリペプチドに特異的なT細胞受容体と抗体受容体をクローニングし、発現し、そして養子免疫療法用の他のベクターまたはエフェクター細胞中に導入することができる。

10

20

【0202】

エフェクター細胞は一般的に、本明細書に記載の *in vitro* 増殖により養子免疫療法に十分な量を得ることができる。単一の抗原特異的エフェクター細胞を数十億の数まで *in vivo* 抗原認識を保持して拡大する培養条件は、当技術分野では周知である。そのような *in vitro* 培養条件は、典型的には抗原による断続的刺激を利用し、多くの場合サイトカイン（IL-2などの）および非分裂支持細胞（*feeder cell*）の存在のもとで行う。上記のように、本明細書で提供した免疫反応性ポリペプチドは、十分な数の免疫療法用細胞を生成する目的で、抗原特異的T細胞培養物を迅速に拡大するために使用することができる。特に、樹状細胞、マクロファージ、単球、繊維芽細胞および／またはB細胞などの抗原提示細胞を、当技術分野で周知の標準技術を利用して、免疫反応性ポリペプチドを用いてパルスするかまたは1以上のポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトしてもよい。例えば抗原提示細胞を、組換えウイルスもしくは他の発現系における発現を増加するために適当なプロモーターを有するポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトすることができる。治療に用いる培養エフェクター細胞は、*in vivo* で長期間、増殖しかつ広く分布して生存できなければならない。研究により、培養エフェクター細胞がIL-2を補充した抗原を用いる反復刺激によって、*in vivo* で誘導されて増殖し、長期間、実質的な数で生存しうることを示されている（例えば、Cheever, *Immunological Reviews* 157:177, 1997を参照）。

30

40

【0203】

あるいは、本明細書に列挙したポリペプチドを発現するベクターを、患者から採取した抗原提示細胞中に導入し、クローニングにより *ex vivo* で増殖し、前記患者に戻し移植してもよい。トランスフェクトした細胞は、当技術分野で周知の手段を利用して、好ましくは無菌形態で静脈内、腔内、腹腔内または腫瘍内投与によって患者に再導入することができる。

【0204】

本明細書に記載した治療組成物の投与経路と頻度、および投与量は、個々の事例によって変わり、標準技術を用いて容易に確立することができる。一般的に、医薬組成物およびワクチンは、注射（例えば、皮内（*intracutaneous*）、筋内、静脈内、皮内（*intradermally*）または皮下）によって、鼻腔内（吸引により）または経

50

口で投与することができる。好ましくは、52週間にわたって1～10回用量を投与する。好ましくは、6回用量を1ヶ月間隔で投与し、その後、追加免疫ワクチン接種を定期的に与える。別のプロトコルが個々の患者に適当でありうる。好適な用量は、上記のとおり投与したときに抗腫瘍免疫応答を促進することができ、その応答が基底（すなわち無処置）レベルを少なくとも10～50%超える化合物の量である。そのような応答は、患者の抗腫瘍抗体を測定することによって、または*in vitro*で患者の腫瘍細胞を死滅させうる細胞溶解性エフェクター細胞のワクチンに依存する生成によってモニターできる。そのようなワクチンはまた、ワクチン無接種の患者と比較して、ワクチン接種した患者に臨床的成果の改善（例えば、より高い頻度の寛解、完全または部分的またはより長期の疾病のない状態での生存）に導く免疫応答を生じうるものであるべきである。一般的に、1以上のポリペプチドを含んでなる医薬組成物およびワクチンには、1用量に存在する各ポリペプチドの量は宿主体重1kg当たり約25μg～5mgの範囲にある。患者のサイズによって変わりうるが、好適な用量サイズは典型的には約0.1ml～約5mlの範囲であろう。

10

【0205】

一般的に、適当な投与および治療処方計画は、治療および／または予防利益を提供するのに十分な量の活性化化合物を提供する。そのような応答は、無処置の患者と比較して、処置した患者に臨床的成果の改善（例えば、より高い頻度の寛解、完全または部分的またはより長期の疾病のない状態での生存）を確立することによってモニターすることができる。腫瘍タンパク質に対する既存の免疫応答の増加は、一般的に臨床的成果の改善と相関がある。そのような免疫応答は一般的に、治療前および後の患者から得たサンプルを用いて実施しうる標準の増殖、細胞傷害性またはサイトカインアッセイを用いて評価することができる。

20

【0206】

実施例 1 a

ヒト病変における免疫反応性 C R I P T O - 1 の発現

組織	非関連上皮	前癌性病変		癌腫	
		TA	TVA		
結腸	25/193 (13)	26/65 (40)	10/13 (77)	122/168 (73)**	
		IM		17/37 (46)**	
胃	1/37 (3)	16/30 (53)			
膵臓	10/58 (17)			58/98 (59)**	
		過形成	腺腫		
胆嚢	N. D.	6/9 (67)	4/7 (58)	89/132 (68)**	
			DCIS		
乳房	5/33 (15)		26/55 (47)	497/631 (79)**	10
非小細胞肺				178/195 (91)**	
組織	非関連上皮	嚢胞腺腫		漿液性	粘液性
		漿液性	粘液性		
卵巣	6/7 (86) 閉経後	6/14 (43)	0/7	4/10 (40)	4/5 (80)
					23/40 (58)
					25/48 (52)
		3/9 (33)	3/8 (38)	4/8 (50)	9/10 (90)
				境界線: 10/10	20
子宮内膜	10/28 (36) 閉経後			53/91 (58)*	
			過形成		
			18/30 (60)	68/96 (71)*	
子宮頸	4/25 (17)			40/74 (54)*	
精巣	0/3			29/51 (57)**	
		胎生期癌		精上皮腫	
		19/19 (100)**		10/32 (31)	
副腎皮質				1/3 (33)	30
膀胱	0/6			23/39 (60)**	
腎臓				0/18	
前立腺				0/9	

TA=管状腺腫

TVC=管状絨毛腺腫(Tubulovillous adenoma)

IM=腸上皮化生

** 非関連組織を超える癌腫における統計的に有意な発現

40

【0207】

実施例

実施例 1. 6 : 癌組織における C r i p t o の過剰発現

リアルタイム RT-PCR (U. Gibson. 1996. Genome Research: 6, 996) を利用して、正常および腫瘍組織および／または細胞系のパネルにおける標的タンパク質の mRNA 転写物存在度を比較する。この分析は、優れたワクチン候補が満たさねばならぬ重要な判定基準である C r i p t o 発現の腫瘍特異性を確立する上で重要である。

50

【0208】

TriPure試薬(Roche)を用いて、全RNAをスナップ凍結生検または細胞系から抽出する。正常組織由来の全RNAはInvitrogenからも購入する。ポリA+mRNAをDNAアーゼ処理後の全RNAからオリゴdT磁気ビーズ(Dynal)を用いて精製する。mRNAの定量は、分光蛍光分析(VersaFluor, BioRad)によって、Ribogreen色素(Molecular Probes)を用いて実施する。

【0209】

TaqManプライマー(フォワードプライマー配列: TGGGTAGGAAGAGGAAGCAAAAT、配列番号7: リバースプライマー配列: TGCTTCTCTACCA 10
CCACCTAATCA、配列番号8)およびリアルタイムRT-PCR増幅用のプローブは、Perkin-Elmerプライマー発現ソフトウェアを用いて、TaqMan増幅条件に対するデフォルトオプションを使って設計する。

【0210】

リアルタイム反応は、標準PCRプロトコルに従い、それぞれの反応に対して2ngの逆転写したmRNA(Expand RT, Roche)を用いて組立てる。評価サンプルに依って、SybrIまたはTaqMan検出のいずれかを行う。SybrI検出の場合は、SybrI色素(Molecular Probes)を最終希釈1/75000で 20
リアルタイム検出のために加えて、TaqManプローブを省く。増幅(40サイクル)およびリアルタイム検出をPerkin-Elmer Biosystems PE7700システムで、通常の機器設定を用いて実施する。Ct値はPE7700配列検出器ソフトウェアを用いて計算する。Ct値は、それぞれの組織サンプルから標的mRNA(CtX)についておよびアクチンmRNA(CtA)について得る。

【0211】

主な実験条件下のPCR増幅効率(理論的増幅効率に近かった)ので、 $2^{(CtA - CtX)}$ 値は、アクチン転写物レベルについて標準化したサンプルの相対的標的転写物レベルの評価である。従って、1の値は、候補抗原とアクチンは同じ発現レベルを有することを示唆する。

【0212】

SybrI検出を用いるRT-PCR分析を、1セットの結腸腫瘍について実施し、6人の異なる患者から得た正常な結腸および48の正常組織サンプルと照合した。TaqMan 30
検出を、1セットの結腸腫瘍について実施し、6人の他の患者(反応は3重で実施した)から得た正常な結腸および48の正常組織サンプルと照合した。試験した正常組織(およびグラフに用いた略記号)を以下に示す:

副腎(Ad__Gl)

大動脈(Ao)

膀胱(Bl)

骨髄(Bo__Ma)

脳(Bra、Bra1、Bra2、Bra3、Bra4、Bra5)

子宮頸(Ce)

結腸(Co)

ファローピウス管(Fa__Tu)

心臓(He)

回腸(Il)

腎臓(Ki)

肝臓(Li、Li1、Li2)

肺(Lu)

リンパ節(Ly__No)

食道(Oe)

卵巣(Ov)

40

50

膵臓 (Pa、Panc1、Panc2)

上皮小体 (Parathyroids) (Pa_Thy)

胎盤 (Pl)

前立腺 (Pr)

直腸 (Re)

皮膚 (Sk)

骨格筋 (Sk_Mu)

小腸 (Sm_In)

脾臓 (Sp)

胃 (St)

精巣 (Te)

甲状腺 (Thyr、Thy、Thy1、Thy2)

胸腺 (Thym1、Thym2)

気管 (Tr、Tra)

Sybr I 検出を用いるリアルタイム RT-PCR 反応はまた、以下の 1 セットの 7 種の肺細胞系：

CRL-5803 (癌、非小細胞肺癌、大細胞、神経内分泌、転移部位：リンパ節)

CRL-5807 (細気管支肺胞癌 (Bronchioalveolar carcinoma)、非小細胞肺癌)

CRL-5810 (腺癌、非小細胞肺癌)

CRL-5815 (カルチノイド、肺気管支)

CRL-5865 (腺癌、転移部位：胸水)

CRL-9609 (正常肺、気管支、上皮、ウイルス形質転換した)

HTB-177 (癌、大細胞肺癌、胸水)、

および以下の 2 種の結腸細胞系：

CRL-2159 (癌、盲腸、デューク B (Dukes' B))

CCL-250

でも実施した。

【0213】

新鮮な生検正常肺組織 (Lu(uc1)、Lu(IVG)) および肺腫瘍組織 (LuTum) も対照として実施した。

【0214】

結腸直腸生検および正常組織の RT-PCR 結果を図 1、2、3 および 4、ならびに表 1 に示す。細胞系の RT-PCR 結果を図 5 に示す。

【0215】

【表 1】

10

20

30

	Sybr 検出 ¹	TaqMan 検出 ¹
	結腸直腸腫瘍 対	隣接正常結腸 ²
過剰発現の患者数	5/6	5/6
過剰発現の患者の平均過剰発現倍数	200	90
過剰発現倍数の中央値(最小-最大)	64 (22-724)	20 (4-397)
	結腸直腸腫瘍 対 平均正常組織 ²	
過剰発現の患者数	5/6	4/6
過剰発現の患者の平均過剰発現倍数	10	12
過剰発現倍数の中央値(最小-最大)	11 (3-22)	7 (3-32)
高転写物レベルをもつ正常組織 ³ (正常-対-腫瘍比)	脾臓 (0.5)	脾臓 (0.75)、卵巣 (2) ⁴

10

20

表 1 : 結腸直腸腫瘍と正常組織における Cripto 発現.

1. 転写物レベルを結腸直腸腫瘍および正常組織のパネルについて、2つの検出技術: TaqMan および Sybr を用いて計算した。Cripto に関して TaqMan 検出については、6人の患者が関わり、測定は3重で実施したが、Sybr 検出は6人の異なる患者について実施した。
2. 結腸直腸腫瘍の転写物レベルを、匹敵する正常結腸および平均正常組織の両方の転写物レベルと比較した。
3. 高い転写物レベルを有する正常組織とは、結腸直腸腫瘍転写物レベルの5分の1より高いものである。
4. 卵巣はCripto Sybr実験で評価していない。

30

【0216】

表1、図1、2、3および4は、Criptoは正常な成人組織内に限界的に発現されるが、大多数の結腸直腸腫瘍において高度に過剰発現され、過剰発現率は10倍を上回ることを明らかに示す。さらに、図5は、Criptoが肺腫瘍細胞系(CRL-5815)で著しく過剰発現されることを示す。従って、Cripto腫瘍関連抗原は、結腸直腸癌および肺癌の両方の患者を治療するための好適なワクチン候補である。

40

【0217】

実施例2: 肺腫瘍細胞系からの Cripto-1 c-DNA のクローニング

全RNAを、TriPure試薬を用いて、7種の異なる肺細胞系の 10^7 培養細胞から抽出した(細胞系の完全なリストについては第1節を参照)。全RNAをプールして、mRNAをプールした全RNAから、オリゴ-d(T)磁気ビーズ(Dynal)上で精製した。cDNA合成用に250 ngのmRNAを使用した。mRNAの定量は、分光蛍光分析(VersaFluor, BioRad)により、RiboGreen色素(M

50

olecular Probes) を用いて実施した。cDNA は、全長転写物のみの増幅を確実にする GeneRacer 技術 (Invitrogen) を使って合成した。mRNA を CIP を用いて処理した。mRNA 5' 末端を、TAP (タバコ酸ピロホスファターゼ (Tobacco Acid Pyrophosphatase)) を用いて脱キャップ (decapped) し、特異的 RNA オリゴヌクレオチドと連結した。連結した mRNA を、オリゴ d (T) テール (tailed) プライマーを用いて cDNA に逆転写した。cDNA の増幅は、両方の GeneRacer フランキングプライマー (Advantage, Clontech) を用いて実施した。Crip to 増幅は 10 ng の GeneRacer cDNA で、遺伝子特異的 PCR プライマー (フォワードプライマー配列: CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTT、配列番号 9; およびリバープライマー配列: TTGGGAGAGGGGCAGGGCAAGAGTAAGA、配列番号 10) を用いて実施した。PCR 反応は Advantage II Taq DNA ポリメラーゼ (Clontech) を用いて標準条件下で行った。PCR 産物を PCR4-TOPO プラスミド (Invitrogen) にクローニングした。増幅配列 (配列番号 95) は、コドン 22 (配列番号 96) において天然バージョン (配列番号 6) の Val (GTC) の代わりに Ala (GCC) である変異を提示することが示された。天然バージョンは PCR 突然変異誘発によって回復した。

【0218】

実施例 3: 動物モデルにおける Crip to 腫瘍関連抗原の免疫原性

本発明の抗原の免疫原性は、ウサギおよびマウスを様々な免疫感作の手段を用いて免疫感作することにより実証できる。実際、ペプチドまたは組換えタンパク質のいずれかの Crip to 型を用いる免疫感作は、Crip to に対する特異的抗体の生成を伴う体液性免疫応答を誘導するおよび/または Crip to 特異的細胞性免疫応答を誘導することができた。例えば、Crip to もしくは Crip to 断片をコードする適当なベクター中の裸の DNA、Crip to もしくは Crip to 断片をコードするウイルスベクターにより送達した Crip to 遺伝子を用いる、Crip to タンパク質の in vivo 送達も、Crip to 免疫原性を実証するのに有用であることができた。

【0219】

3. 1: 合成ペプチド免疫感作

ウサギを免疫感作するために選択したヒト Crip to-1 アミノ酸配列由来の合成ペプチドは、GHQEFARPSRGYL (13 アミノ酸、配列番号 11)、および QEEP AIRPRSSQRPVPPMG (18 アミノ酸、配列番号 12) である。次いで合成ペプチドを担体タンパク質 (KLH) とコンジュゲートする。コンジュゲートをフロイント・アジュバントを用いて製剤化し、そして 2 匹のウサギをそれぞれのコンジュゲートを用いて免疫感作する。第 2 回の免疫感作の 4 週間後および第 3 回の免疫感作の 4 週間後に、血液サンプルを採取する。血清中の抗 Crip to 抗体価を ELISA および/または ウェスタンブロットによって標準プロトコルに従い評価する (第 3. 5 節を参照)。

【0220】

3. 2: 核酸免疫感作

pcDNA 3. 1 ベクター (Invitrogen) を用いてワクチン接種プラスミドを構築する。in vivo 翻訳されたタンパク質の分泌を促進するために、従って本発明の抗原に対する体液性応答を誘導するために、Crip to-1 をコードする核酸配列をそれ自身のシグナルペプチドとともに、ベクターのポリクローニング部位に挿入する。該組換え発現プラスミドを用いて、BL21 などの宿主大腸菌 (E. coli) 株を形質転換する。

【0221】

上記組換え株を通常の細胞培養培地で増殖する。細菌を、定常期に到達する前に回収する。マウスに注射するために、Qiagen システムを用いてプラスミド調製を行う。

【0222】

6~8 週齢の Balb/c マウスに、組換え発現プラスミドの筋内注射を行う。最終注射

の2週間後に、血液サンプルを採取する。本発明の抗原に対して誘発された特異的抗体の力価を、E L I S Aおよび／またはウェスタンブロットにより測定する（第3.5節を参照）。

【0223】

3.3：アデノウイルスを用いるウイルスベクター免疫感作

組換えアデノウイルスは、コードされた抗原に対する体液性および細胞性免疫応答を誘発できるので、効果的な遺伝子に基づくワクチン接種用ベクターである。C r i p t o - 1タンパク質をそれ自身のシグナル配列とともにコードするヌクレオチド配列を適当なアデノ誘導体ウイルスベクターに挿入することができた。アデノウイルス組換えベクターをマウスに様々な経路（筋内、鼻腔内、皮内、皮下または腹腔内）によって投与することができた。2週間後に、血液サンプルを採取し、誘発された抗体の力価を試験することができた。細胞性免疫応答を測定する追加の実験も実施することができた。

【0224】

3.4：組換えタンパク質免疫感作

3.4.1：C r i p t o - 1組換えタンパク質の発現および精製

微生物宿主における発現を利用して、免疫感作目的のための本発明の抗原の全タンパク質または断片を産生する。組換えタンパク質は、2つの微生物宿主、大腸菌（E . c o l i）および酵母（サッカロミセス・セレビシアエ（S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e）またはピキア・パストリス（P i c h i a p a s t o r i s）など）に発現することができる。これによって、この特定の抗原産生のための最良の特性をもつ発現系の選択が可能になる。

【0225】

発現戦略は、最初に組換え抗原の一次構造の設計を含む。一般的に、発現のレベルを改良する発現融合パートナー（E F P）および／または抗原の免疫原性特性をモジュレートする免疫融合パートナー（I F P）が、N末端に配置される。さらに、さらなる精製を容易にするのに有用な親和性融合パートナー（A F P）がC末端に含まれる。

【0226】

組換え株を利用できるときは、発現レベルの評価および遺伝子工学的に操作したタンパク質のさらなる溶解度の予測（粗抽出物の挙動分析による）によって、組換え産物を特性付ける。

【0227】

適当な培地中における増殖および組換えタンパク質発現の誘導後に、全抽出物をS D S - P A G Eによって分析する。組換えタンパク質を染色したゲルで可視化し、ウェスタンブロット分析により、ウサギにおけるペプチド免疫感作によって生成した特異的抗ペプチド抗体を用いて同定する（第3.1節を参照）。

【0228】

発現した抗原と発現宿主の様々なバージョンを比較評価することにより、さらなる精製およびさらなる免疫学的評価に使用するのに最も期待できる候補と宿主の選択が可能になるだろう。

【0229】

精製スキームは、組換えタンパク質のヒスチジン親和性テール（t a i l）の存在に基づく古典的手法に従う。典型的な実験においては、破壊した細胞を濾過し、そして無細胞抽出物を、組換えタンパク質を特異的に保持しうるイオン金属アフィニティークロマトグラフィー（I M A C；Q i a g e nからのN i + + N T A）上にローディングする。保持されたタンパク質は、リン酸バッファー中で0～500mMイミダゾール勾配（可能であれば界面活性剤の存在で）によって溶出する。

【0230】

3.4.2：タンパク質免疫感作

ウサギを、アジュバント3 D - M P L / Q S 2 1で製剤化した組換え精製タンパク質を用いて、数週の間隔で数回、筋内に免疫感作する。各免疫感作の3週間後に、血液サンプル

10

20

30

40

50

を採取する。血清中の抗C r i p t o抗体力価を、E L I S Aにより評価する。生成した抗C r i p t o抗体の特異性を、ウェスタンブロット（第3. 5節を参照）により、精製タンパク質を用いかつ適当な対照を含めて試験する。

【0231】

3. 5 : C r i p t oで免疫感作した動物の免疫学的応答アッセイ

C r i p t o免疫感作に対する体液性応答は、動物血清中のC r i p t o特異的抗体力価をE L I S Aおよびウェスタンブロットを用いて測定することにより評価する。C r i p t o-1に由来するペプチドまたは全長タンパク質を有する次の物質をそのような試験に利用することができた：

C r i p t o合成ペプチド（可能なペプチドについては第3. 1節を参照）、または
C r i p t o発現細胞系の培養物から得たペプチド抽出物（可能な細胞系については第1節を参照）、または
一過性でC r i p t o組換えプラスミドを発現するように遺伝子工学的に操作したC O S細胞の溶解物（以下を参照）、または
組換え大腸菌（E. c o l i）または酵母株のタンパク質抽出物（組換え株生成については第3. 3. 1節を参照）、または
精製組換え抗原（抗原精製については第3. 3. 1節を参照）。 10

【0232】

C O S細胞中のC r i p t oの一過性発現は、核酸ワクチン接種用に調製した組換えp c D N A 3. 1プラスミドを用いてC O S細胞を一過的にトランスフェクトすることにより得られる（第3. 2節を参照）。 20

【0233】

E L I S A反応のために、上記抗原の1つをマイクロタイタープレート上にコーティングする（精製組換えタンパク質が好ましい）。次いでE L I S Aを標準プロトコルを用いて実施する。

【0234】

ウェスタンブロットは標準条件下で上記抗原の1つを用いて実施する（精製組換えタンパク質が好ましく、合成ペプチドは使用しない）

細胞性応答はまた、ワクチン接種したマウス脾臓細胞を、そのマウスを免疫感作するのに用いたペプチドを用いて、または全抗原配列を含む抗原に由来する重複ペプチドを用いて i n v i t r o刺激することにより評価してもよい。 30

【0235】

実施例4 : i n v i t r o初回抗原刺激による、存在するC r i p t o特異的ヒトT細胞の実証

C r i p t o-1の免疫学的関連性は、さらにヒトT細胞のi n v i t r o初回抗原刺激によって確認することができる。全てのT細胞リンパ球、T細胞系および樹状細胞は、健康な供与者または癌患者（好ましい供与者はH L A - A 2亜型からである）のP B M C（末梢血単核細胞）から誘導する。

【0236】

H L A対立遺伝子のエピトープ結合性予測：

H L AクラスI結合性ペプチド配列（9量体、10量体）は、パーカー（P a r k e r）のアルゴリズム [P a r k e r Kら 1994] (http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/)、およびラメンゼー（R a m m e n s e e）法 [R a m m e n s e eら 1997] [R a m m e n s e eら 1995] (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm>) のいずれかによって予測される。 40

【0237】

H L AクラスII結合性ペプチド配列（9量体）は、Tエピトープアルゴリズム [S t u r n i o l oら 1999] を用いて予測される。 50

【0238】

CD8+T細胞応答：

CD8+T細胞系を産生させる2つのストラテジー：ペプチドに基づく手法および全遺伝子に基づく手法を利用する。両手法は正しいリーディングフレーム内の目的の全長cDNAを必要とし、これを適当な送達系にクローニングしかつHLA結合性ペプチドの配列を予測するために使う。

【0239】

ペプチドに基づく手法：

この手法では、HLA-A2.1/Kbトランスジェニックマウスモデルを用いてHLA-A2.1ペプチドをスクリーニングする。簡単に説明すると、トランスジェニックマウスをアジュバント化した(adjuvanted)HLA-A2ペプチドを用いて免疫感作し、CD8応答を誘導しうるペプチド(効率的溶解またはペプチドパルス標的細胞上のg-IFN産生によって定義する)をヒト系においてさらに分析する。 10

【0240】

ヒト樹状細胞([Romanira]に従って培養した)を選択したペプチドを用いてパルスし、これを用いてCD8+で選別したT細胞(Facsにより)を刺激する。数週間刺激の後、CD8+系を最初にペプチドパルスした自己BLCL(EBV-Bで形質転換した細胞系)について試験する。ペプチドの正しいin vivoプロセッシングを実証するため、次いでCD8+系をcDNAトランスフェクトした腫瘍細胞(HLA-A2でトランスフェクトしたLnCaP、Skov3またはCAMA腫瘍細胞)について試験する。 20

【0241】

全遺伝子に基づく手法：

CD8+T細胞系を初回抗原刺激し、そして遺伝子銃でトランスフェクトした樹状細胞、レトロウイルスにより形質導入したB7.1でトランスフェクトした繊維芽細胞、組換えポックスウイルス[Kimら]またはアデノウイルス[Butterfieldら]で感染した樹状細胞のいずれかを用いて刺激する。ウイルス感染細胞は、抗原が高レベルで発現されるので非常に効率的に抗原性ペプチドを提示するが、ウイルスT細胞系の過剰増殖を避けるために1回だけしか使用できない。

【0242】

交互に刺激した後に、CD8+系を、上記に示したようにcDNAでトランスフェクトした腫瘍細胞について試験する。ペプチド特異性および同一性を決定して本発明の抗原の免疫学的確証を確認する。 30

【0243】

CD4+T細胞応答：

同様に、またCD4+T細胞免疫応答も評価することができる。特異的CD4+T細胞の生成は、組換え精製タンパク質またはペプチドを搭載する樹状細胞を用いてT細胞を刺激することで行われる。

【0244】

結果：

A- パーカー法を用いるクラス I エピトープの予測

A-1 Cripto-1 および-3 クラス I エピトープ

HLA 対立 遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
A68	10 量体	12	SVIWIMAISK	240.000	配列番号 13
A68	10 量体	117	SVPHDTWLPK	120.000	配列番号 14
B2705	9 量体	33	HQEFARPSR	100.000	配列番号 15
B2705	9 量体	59	IRPRSSQRV	600.000	配列番号 16
B2705	9 量体	72	IQHSKELNR	100.000	配列番号 17
B2705	9 量体	103	GRNCEHDVR	1000.00 0	配列番号 18
B2705	9 量体	110	VRKENCGSV	600.000	配列番号 19
B2705	9 量体	138	LRCFPQAFI	2000.00 0	配列番号 20
B2705	9 量体	161	SRTPELPPS	200.000	配列番号 21
B2705	10 量体	65	QRVPPMGIQH	200.000	配列番号 22
B2705	10 量体	79	NRTCCLNGGT	200.000	配列番号 23
B2705	10 量体	103	GRNCEHDVRK	2000.00 0	配列番号 93
B2705	10 量体	136	GQLRCFPQAF	100.000	配列番号 24
B2705	10 量体	161	SRTPELPPSA	200.000	配列番号 94
B5101	10 量体	143	QAFLPGCDGL	110.000	配列番号 25
B5102	10 量体	143	QAFLPGCDGL	302.500	配列番号 25
B5102	10 量体	150	DGLVMDEHLV	120.000	配列番号 26
B60	9 量体	23	FELGLVAGL	325.000	配列番号 27
B60	9 量体	76	KELNRTCCL	320.000	配列番号

10

20

30

40

					28
B62	9 量体	137	QLRCFPQAF	240.000	配列番号 29
B62	10 量体	136	GQLRCFPQAF	160.000	配列番号 24
B7	9 量体	169	SARTTTFML	120.000	配列番号 30

10

A-2 Cripto-1 特異的クラス I エピトープ

HLA 対立遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
A0201	9 量体	5	KMARFSYSV	668.086	配列番号 31
A0201	10 量体	16	IMAIKVFEL	349.885	配列番号 32
A0201	10 量体	13	VIWIMAIKSV	310.361	配列番号 33
A0201	10 量体	175	FMLVGICLSI	128.242	配列番号 34
B2702	9 量体	7	ARFSYSVIW	500.000	配列番号 35
B2702	9 量体	3	CRKMARFSY	200.000	配列番号 36
B2702	10 量体	7	ARFSYSVIWI	300.000	配列番号 37
B2702	10 量体	37	ARPSRGYLAF	200.000	配列番号 38
B2705	9 量体	7	ARFSYSVIW	1000.00 0	配列番号 35
B2705	9 量体	3	CRKMARFSY	1000.00 0	配列番号 36
B2705	9 量体	170	ARTTTFMLV	600.000	配列番号 39
B2705	9 量体	37	ARPSRGYLA	200.000	配列番号 40
B2705	10 量体	7	ARFSYSVIWI	3000.00 0	配列番号 37
B2705	10 量体	37	ARPSRGYLAF	1000.00 0	配列番号 38
B2705	10 量体	3	CRKMARFSYS	200.000	配列番号 41
B4403	10 量体	34	QEFARPSRGY	120.000	配列番号 42

20

30

40

B5101	9 量体	6	MARFSYSVI	286.000	配列番号 43
B5101	10 量体	169	SARTTTFMLV	110.000	配列番号 44
B5102	9 量体	17	MAISKVFEL	150.000	配列番号 45
B5102	9 量体	6	MARFSYSVI	100.000	配列番号 43
B5103	9 量体	6	MARFSYSVI	100.000	配列番号 43
B5103	10 量体	169	SARTTTFMLV	121.000	配列番号 44
B7	9 量体	36	FARPSRGYL	180.000	配列番号 46

10

A-3 Cripto-3 特異的クラス I エピトープ

HLA 対立遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
A0201	9 量体	5	KMVRFSYSV	668.086	配列番号 47
A0201	9 量体	89	CMLESFCAC	103.417	配列番号 48
A0201	10 量体	16	IMAIKAFEL	152.124	配列番号 49
A0201	10 量体	175	FMLAGICLSI	128.242	配列番号 50
B2702	9 量体	7	VRFSYSVIW	500.000	配列番号 51
B2702	9 量体	3	CRKMVRFSY	200.000	配列番号 52
B2702	10 量体	7	VRFSYSVIWI	300.000	配列番号 53
B2702	10 量体	37	ARPSRGDLAF	200.000	配列番号 54
B2705	9 量体	3	CRKMVRFSY	1000.000	配列番号 52
B2705	9 量体	7	VRFSYSVIW	1000.000	配列番号 51
B2705	9 量体	37	ARPSRGDLA	200.000	配列番号 55
B2705	9 量体	170	ARTTTFMLA	200.000	配列番号 56
B2705	10 量体	7	VRFSYSVIWI	3000.000	配列番号

20

30

40

					53
B2705	10 量体	37	ARPSRGDLAF	1000.000	配列番号 54
B2705	10 量体	59	IRPRSSQRVL	600.000	配列番号 57
B2705	10 量体	3	CRKMVRFSYS	200.000	配列番号 58
B2705	10 量体	65	QRLPMGIQH	200.000	配列番号 59
B5101	9 量体	60	RPRSSQRVL	120.000	配列番号 60
B5102	9 量体	17	MAISKAFEL	150.000	配列番号 61
B7	9 量体	60	RPRSSQRVL	800.000	配列番号 60
B7	9 量体	36	FARPSRGDL	180.000	配列番号 62

注記：スコアはこの配列を含有する分子の解離の半減期の評価である。

B- ラメンゼー法を用いたクラス I エピトープの予測

B-1 Cripto-1 および-3 クラス I エピトープ

HLA 対立 遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
A26	9 量体	179	GICLSIQSY	27	配列番号 63
A26	10 量体	27	LVAGLGHQEF	25	配列番号 64
A26	10 量体	121	DTWLPPKCSL	25	配列番号 65
A3	9 量体	58	AIRPRSSQR	29	配列番号 66
A3	9 量体	13	VIWIMAISK	24	配列番号 67
A3	10 量体	12	SVIWIMAISK	29	配列番号 13
A3	10 量体	117	SVPHDTWLPK	24	配列番号 14
B2705	9 量体	103	GRNCEHDVR	25	配列番号 18
B2705	9 量体	138	LRCFPQAFL	24	配列番号 20

B-2 Cripto-1 特異的クラス I エピトープ

HLA 対立遺伝子	エピトープサイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
A0201	9 量体	83	CLNGGTCML	27	配列番号 68
A0201	9 量体	5	KMARFSYSV	25	配列番号 31
A0201	10 量体	16	IMAIKVFEL	28	配列番号 32
A0201	10 量体	13	VIWIMAIKSV	26	配列番号 33
A26	9 量体	35	EFARPSRGY	24	配列番号 69
A3	9 量体	66	RVPPMGIQH	27	配列番号 70
A3	9 量体	21	KVFELGLVA	24	配列番号 71
B08	9 量体	17	MAISKVFEL	26	配列番号 45
B5101	9 量体	6	MARFSYSVI	25	配列番号 43

10

20

B-3 Cripto-3 特異的クラス I エピトープ

HLA 対立遺伝子	エピトープサイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
A0201	9 量体	83	CLNGGTCML	27	配列番号 68
A0201	9 量体	176	MLAGICLSI	25	配列番号 72
A0201	10 量体	16	IMAIKAFEL	24	配列番号 49
A3	9 量体	66	RVLPMGTQH	29	配列番号 73
B0702	9 量体	60	RPRSSQRVL	24	配列番号 60
B08	9 量体	17	MAISKAFEL	25	配列番号 61

30

40

C- T エピトープ法を用いるクラス II エピトープの予測

C-1 Cripto-1 および-3 クラス II エピトープ

HLA 対立 遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
DRB1*0102	9 量体	70	MGIQHSKEL	1.8	配列番号 74
DRB1*0301	9 量体	152	LVMDEHLVA	5.9	配列番号 75
DRB1*0301	9 量体	158	IVASRTPEL	4.3	配列番号 76
DRB1*0401	9 量体	152	LVMDEHLVA	3.2	配列番号 75
DRB1*0402	9 量体	59	IRPRSSQRV	4.9	配列番号 16
DRB1*0703	9 量体	11	YSVIWIMAI	6	配列番号 77
DRB1*0703	9 量体	158	LVASRTPEL	5.7	配列番号 76
DRB1*0802	9 量体	59	IRPRSSQRV	1.8	配列番号 16
DRB1*0802	9 量体	123	WLPKKCSLC	2.3	配列番号 78
DRB1*0804	9 量体	59	IRPRSSQRV	2.8	配列番号 16
DRB1*0806	9 量体	59	IRPRSSQRV	3.1	配列番号 16
DRB1*1101	9 量体	11	YSVIWIMAI	2.8	配列番号 77
DRB1*1101	9 量体	152	LVMDEHLVA	2.2	配列番号 75
DRB1*1102	9 量体	152	LVMDEHLVA	2.4	配列番号 75
DRB1*1104	9 量体	25	LGLVAGLGHI	2.8	配列番号 79
DRB1*1104	9 量体	152	LVMDEHLVA	3.2	配列番号 75
DRB1*1106	9 量体	25	LGLVAGLGHI	2.8	配列番号 79
DRB1*1106	9 量体	152	LVMDEHLVA	3.2	配列番号 75
DRB1*1107	9 量体	46	FRDDSIWPQ	2.8	配列番号 80
DRB1*1107	9 量体	152	LVMDEHLVA	5.9	配列番号 75
DRB1*1107	9 量体	158	LVASRTPEL	3.3	配列番号 76
DRB1*1305	9 量体	11	YSVIWIMAI	3.7	配列番号 77
DRB1*1307	9 量体	11	YSVIWIMAI	1.2	配列番号 77
DRB1*1501	9 量体	138	LRCFPQAFL	4.3	配列番号 20
DRB1*1501	9 量体	152	LVMDEHLVA	4.5	配列番号 75
DRB1*1502	9 量体	152	LVMDEHLVA	3.5	配列番号 75
DRB5*0101	9 量体	13	VIWIMAI SK	5.3	配列番号 67

C-2 Cripto-1 特異的クラス II エピトープ

HLA 対立 遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
DRB1*0101	9 量体	15	WIMAI SKVF	1.3	配列番号 81
DRB1*0102	9 量体	176	MLVGICLSI	1.8	配列番号 82
DRB1*0102	9 量体	178	VGICLSIQS	1.7	配列番号 83
DRB1*0301	9 量体	17	MAI SKVFEL	3.9	配列番号 45
DRB1*0401	9 量体	178	VGICLSIQS	2.8	配列番号 83
DRB1*0402	9 量体	178	VGICLSIQS	4.2	配列番号 83
DRB1*0404	9 量体	14	IWIMAI SKV	2.9	配列番号 84

DRB1*0404	9 量体	177	LVGICLSIQ	3.3	配列番号 85
DRB1*0404	9 量体	178	VGICLSIQS	3.8	配列番号 83
DRB1*0405	9 量体	175	FMLVGICLS	3.2	配列番号 86
DRB1*0405	9 量体	177	LVGICLSIQ	3.1	配列番号 85
DRB1*0405	9 量体	178	VGICLSIQS	2.8	配列番号 83
DRB1*0703	9 量体	15	WIMAIKVF	5.7	配列番号 81
DRB1*0703	9 量体	17	MAISKVFEL	7.6	配列番号 45
DRB1*0703	9 量体	176	MLVGICLSI	5	配列番号 82
DRB1*0801	9 量体	175	FMLVGICLS	3.8	配列番号 86
DRB1*0802	9 量体	175	FMLVGICLS	3.8	配列番号 86
DRB1*0804	9 量体	175	FMLVGICLS	2.8	配列番号 86
DRB1*1101	9 量体	175	FMLVGICLS	3.9	配列番号 86
DRB1*1101	9 量体	178	VGICLSIQS	2.4	配列番号 83
DRB1*1104	9 量体	175	FMLVGICLS	2.9	配列番号 86
DRB1*1104	9 量体	177	LVGICLSIQ	2.6	配列番号 85
DRB1*1104	9 量体	178	VGICLSIQS	3.4	配列番号 83
DRB1*1106	9 量体	175	FMLVGICLS	2.9	配列番号 86
DRB1*1106	9 量体	177	LVGICLSIQ	2.6	配列番号 85
DRB1*1106	9 量体	178	VGICLSIQS	3.4	配列番号 83
DRB1*1107	9 量体	17	MAISKVFEL	2.9	配列番号 45
DRB1*1107	9 量体	177	LVGICLSIQ	3.6	配列番号 85
DRB1*1107	9 量体	178	VGICLSIQS	3	配列番号 83
DRB1*1302	9 量体	15	WIMAIKVF	3.3	配列番号 81
DRB1*1302	9 量体	175	FMLVGICLS	3	配列番号 86
DRB1*1305	9 量体	15	WIMAIKVF	3.1	配列番号 81
DRB1*1305	9 量体	175	FMLVGICLS	4.3	配列番号 86
DRB1*1307	9 量体	175	FMLVGICLS	3.9	配列番号 86
DRB1*1307	9 量体	177	LVGICLSIQ	1.6	配列番号 85
DRB1*1501	9 量体	6	MARFSYSVI	4.5	配列番号 43
DRB1*1501	9 量体	176	MLVGICLSI	4.1	配列番号 82
DRB1*1502	9 量体	6	MARFSYSVI	3.5	配列番号 43
DRB5*0101	9 量体	15	WIMAIKVF	4.1	配列番号 81

10

20

30

C-2 Cripto-3 特異的クラス II エピトープ

HLA 対立 遺伝子	エピトープ サイズ	開始位置	配列	スコア	配列番号
DRB1*0101	9 量体	15	WIMAIKAF	1.3	配列番号 87
DRB1*0102	9 量体	6	MVRFSYSVI	1.4	配列番号 88
DRB1*0102	9 量体	17	MAISKAFEL	1.6	配列番号 61
DRB1*0401	9 量体	7	VRFSYSVIW	2.9	配列番号 51
DRB1*0401	9 量体	175	FMLAGICLS	2.7	配列番号 89
DRB1*0402	9 量体	67	VLPMGIQHS	3.6	配列番号 90

40

DRB1*0404	9 量体	6	MVRFSSYSVI	2.5	配列番号 88
DRB1*0404	9 量体	14	IWIMAISKA	3.6	配列番号 91
DRB1*0404	9 量体	67	VLPMTGIQHS	3.5	配列番号 90
DRB1*0405	9 量体	175	FMLAGICLS	2.7	配列番号 89
DRB1*0703	9 量体	7	VRFSYSVIW	6.5	配列番号 51
DRB1*0703	9 量体	15	WIMAISKAF	5.7	配列番号 87
DRB1*0703	9 量体	17	MAISKAFEL	7.5	配列番号 61
DRB1*0801	9 量体	16	IMAISKAPE	3	配列番号 92
DRB1*0801	9 量体	175	FMLAGICLS	3.5	配列番号 89
DRB1*0802	9 量体	67	VLPMTGIQHS	1.9	配列番号 90
DRB1*0802	9 量体	175	FMLAGICLS	3.5	配列番号 89
DRB1*0804	9 量体	67	VLPMTGIQHS	2.9	配列番号 90
DRB1*0804	9 量体	175	FMLAGICLS	2.5	配列番号 89
DRB1*0806	9 量体	16	IMAISKAPE	4	配列番号 92
DRB1*1101	9 量体	175	FMLAGICLS	3.5	配列番号 89
DRB1*1102	9 量体	67	VLPMTGIQHS	3.1	配列番号 90
DRB1*1102	9 量体	175	FMLAGICLS	2.5	配列番号 89
DRB1*1107	9 量体	7	VRFSYSVIW	2.8	配列番号 51
DRB1*1301	9 量体	67	VLPMTGIQHS	3.5	配列番号 90
DRB1*1302	9 量体	15	WIMAISKAF	3.3	配列番号 87
DRB1*1302	9 量体	175	FMLAGICLS	3.9	配列番号 89
DRB1*1305	9 量体	15	WIMAISKAF	3.1	配列番号 87
DRB1*1305	9 量体	175	FMLAGICLS	3.9	配列番号 89
DRB1*1307	9 量体	67	VLPMTGIQHS	1.5	配列番号 90
DRB1*1307	9 量体	175	FMLAGICLS	3.5	配列番号 89
DRB1*1501	9 量体	6	MVRFSSYSVI	6.6	配列番号 88
DRB1*1502	9 量体	6	MVRFSSYSVI	5.6	配列番号 88
DRB5*0101	9 量体	15	WIMAISKAF	4.1	配列番号 87

10

20

30

【0245】

実施例5：C r i p t o ワクチンにより誘導される体液性応答の抗腫瘍潜在性
 癌におけるC r i p t o の病態生理学的活性に与えるC r i p t o 特異的体液性応答の抑制効果を評価することに向けられた一連の実験は、様々な標準i n v i t r o アッセイを利用して実施できた。i n v i t r o アッセイは、制限されるものでないが、増殖抑制アッセイ、細胞運動性抑制アッセイ、化学走性抑制アッセイ、細胞外マトリックスタンパク質（E C M）を通じた浸潤の抑制、および増殖シグナル伝達経路抑制であることができた。C r i p t o ペプチドもしくはタンパク質を含むアジュバントを用いて、またはC r i p t o タンパク質をコードするプラスミドD N A もしくはウイルス送達系、例えばアデノウイルスベクターを用いて免疫感作した動物の血清の効果は、C r i p t o 発現細胞系に対するC r i p t o が介在する生物学的効果を測定するこれらのi n v i t r o アッセイで評価することができた。平行して、前記動物から得た免疫前の血清の効果を陰性対照として試験しうる。これらのアッセイに用いる細胞系は、限定されるものでないが、G E O 細胞、N T E R A 2 細胞、C R L - 5 8 1 5 細胞系などのC r i p t o を発現するヒト腫瘍細胞または天然にC r i p t o を過剰発現するマウス腫瘍細胞系であることができた。例えば、G E O およびN T E R A 2 細胞の両方のi n v i t r o 増殖の抑制は、以前にC r i p t o m R N A の翻訳を防止するように設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる処理により実証されている [B a l d a s s a r r e ら, 1996; C i a r d i e l l o ら, 1994; A l p e r ら, 2000]。

40

50

【0246】

5. 1: 免疫感作プロトコル:

マウスまたはウサギを、0、14、および21日目に、ペプチドもしくはタンパク質を含むアジュバントのフットパッド内 (i n t r a - f o o t p a d) 注射、遺伝子銃装置を用いるC r i p t oをコードするプラスミドDNAの皮内注射、またはC r i p t oをコードするウイルスベクター送達系、例えばアデノウイルスベクターの皮内注射によって免疫感作しうる。

【0247】

5. 2: 細胞増殖抑制アッセイ:

免疫感作した動物から得た血清を回収し、様々な希釈度で、96ウェルプレートにプレティングした細胞の培地に加える。同様に、これらの動物の免疫前血清も細胞に陰性対照として加える。細胞を3~7日間処理するだろう。細胞増殖を、³H-チミジン取り込みアッセイ、MTTアッセイ、クリスタルバイオレット染色、または軟寒天培地中の増殖に対するコロニー計数などの標準方法によって測定するだろう。

【0248】

5. 3: 細胞浸潤、運動性および化学走性抑制アッセイ:

血清を免疫感作した動物から免疫感作前および後に回収し、様々な希釈度で、浸潤、運動性および化学走性標準アッセイに使用する細胞懸濁液に加える。C r i p t oが介在する浸潤、運動性および化学走性の抑制は、例えば、限定されるものでないが、市販のマトリゲル挿入物を備えたF a l c o nチャンバー (C o l l a b o r a t i v e R e s e a r c h)、アガロース液滴運動性アッセイ [Y a m a m o t o ら, 1990]、および市販のB o y d e n装置 (N e u r o P r o b e) を、それぞれ利用して評価することができた。

【0249】

5. 4: シグナル伝達抑制アッセイ:

血清を免疫感作した動物から免疫感作前および後に回収し、様々な希釈度で、培養中のC r i p t o発現腫瘍細胞に加える。次いで、ELISAにより検出したC r i p t oの最高濃度 [B i a n c o ら, 2001] を含有する外因性C r i p t oタンパク質またはヒト血清またはミルクを細胞の培地に加える。様々なインキュベーション時間後に、細胞を回収して標準法によって処理して免疫ブロット分析を実施しうる。細胞増殖に関わる様々な重要なシグナル伝達経路のリン酸化状態は、免疫前または後の血清の存在のもとでのこれらのC r i p t oで刺激した細胞において評価しうる。例えば、e r b B - 4およびE R K 1、E R K - 2、およびP 3 8などのマイトジェン活性化タンパク質 (M A P) キナーゼファミリーのチロシンリン酸化状態は、これらの酵素のリン酸化した活性型を認識する抗体を用いる免疫ブロットによって先に記載のように評価しうる [B i a n c o ら, 1999; P a i n e ら, 2000]。

【0250】

実施例6: 動物モデルにおけるC r i p t oワクチンにより誘導される免疫応答の i n v i v o 抗腫瘍効果

ヒトC r i p t oタンパク質、C r i p t oペプチド、またはC r i p t o遺伝子を含むワクチンの予防または治療潜在性は、C r i p t oを発現する同系マウス腫瘍細胞系を用いてチャレンジしたマウスにおいて評価することができる。腫瘍細胞系は、ヒトC r i p t o遺伝子を用いてトランスフェクトしたマウス腫瘍細胞系であることができた。例えば、トランスフェクトした細胞系はヒトC r i p t o遺伝子を用いてトランスフェクトしたT C 1細胞系であることができた。他方、ヒトC r i p t oとそのマウス相同体との間の高い相同性レベルは、ヒトワクチンにより誘導される交差反応性免疫応答がマウスC r i p t o発現腫瘍に対して防御しうることを示唆する。実際、C r i p t o遺伝子 (T D G F - 1) は171個のアミノ酸タンパク質をコードし、そのヒト対応物と93%同一性を有する [L i g u o r i ら, 1996]。従って、マウスを、ヒトC r i p t oワクチンを用いる免疫感作により、マウス腫瘍チャレンジまたは内因的にC r i p t oタン

パク質を過剰発現することが知られる自発的に生じる腫瘍から防御できた。この点について、またMMTV-ポリオーマウイルスミドルT抗原 (middle T antigen)、MMTV-c-ErbB2、およびMT-hTGF α などの複数の異なる発癌遺伝子を過剰発現するように設計されたトランスジェニックマウスの自発性腫瘍も、Crypt oを過剰発現することが示されている [Kennedyら, 1996; Niemeyerら, 1999]。

【0251】

あるいは、同系遺伝子を用いてワクチン接種する目的で、腫瘍をもつマウスを、プラスミドDNAまたはウイルス送達系、例えばマウスCrypt oタンパク質をコードするアデノウイルスベクターを用いてワクチン接種し、マウス腫瘍増殖から防御することができた。

【0252】

6. 1: 予防実験設計:

マウスを、腫瘍チャレンジ前、0および14日目に、Crypt oタンパク質5 μ gを含むアジュバントのフットパッド内注射、遺伝子銃技術を用いるCrypt oをコードするDNAプラスミドの皮内注射、またはCrypt oをコードするウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクターの皮内注射によってワクチン接種できた。次いで、 10^6 個のTC1-CR-1細胞、ヒトCrypt o発現腫瘍細胞を、C57BL/6免疫応答性マウスの脇腹の皮下に、ワクチン接種の1または2週間後に注射できた。腫瘍チャレンジ後数週間にわたって、毎週2回、個々の腫瘍を測定して、腫瘍増殖をin vivoでモニターしなければならない。

【0253】

他方、予防ワクチン接種の有効性は、明白な腫瘍発生前にいずれかの形態のCrypt oワクチンを用いて複数回免疫感作したトランスジェニックマウス [Niemeyerら, 1999] における自発性のCrypt oを発現する腫瘍の発生を抑制することによって評価することができた。

【0254】

6. 2: 治療実験設計:

10^6 個のTC1-CR-1細胞、ヒトCrypt o発現腫瘍細胞を、C57BL/6免疫応答性マウスの脇腹の皮下に注射できた。マウスを、腫瘍チャレンジ後、7および14日目にCrypt oタンパク質5 μ gを含むアジュバントのフットパッド内注射、遺伝子銃技術を用いるCrypt oをコードするDNAプラスミドの皮内注射、またはCrypt oをコードするウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクターの皮内注射によってワクチン接種することができた。腫瘍増殖を、in vivoで毎週2回、個々の腫瘍を測定して、モニターしなければならない。第2回目の免疫感作の1~4週間後に、1群当たり複数のマウスを犠牲にして脾臓細胞、排出 (draining) リンパ節および血清を回収し、免疫応答を分析してCrypt o特異的免疫応答の誘導と抗腫瘍効果との間の相関を確立するだろう。免疫感作により誘導されるCrypt o特異的免疫応答の分析は、Crypt o発現標的細胞に対するサイトカイン産生および溶解活性を含む、抗体力価、抗体アイソタイプのプロフィール、CD4⁺T細胞増殖応答およびCTL CD8⁺T細胞応答を測定することによって評価できた。全てのアッセイは標準プロトコルに従って実施できた。

【0255】

同種の実験は、親マウスを、Crypt oを過剰発現する移植可能なマウス乳腺腫瘍系を用いてチャレンジすることによって実施できた。これらの細胞は、MMTV-ポリオーマウイルスミドルT抗原、MMTV-c-ErbB2、およびMT-hTGF α トランスジェニックマウスなどの様々な発癌遺伝子トランスジェニックマウス株に生じる自発性腫瘍から確立できた。

【0256】

参考文献

10

20

30

40

50

- Alper O, De Santis ML, Stromberg K, Hacker N F, Cho-Chung YS, Salomon DS (2000) 「上皮増殖因子受容体発現のアンチセンス抑制は、卵巣癌細胞における細胞増殖、細胞接着および腫瘍原性を改変する (Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell-adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells)」 *Int J Cancer* 88: 566-574
- Baldassarre G, Bianco C, Tortora G, Ruggiero A, Moasser M, Dmitrovsky E, Bianco AR, Ciardiello F (1996) 「CRIPTOアンチセンスプラスミドを用いるトランスフェクションは、内因性CRIPTO発現を抑制しかつヒト胚性癌細胞系における形質転換を阻害する (Transfection with a CRIPTO anti-sense plasmid suppresses endogenous CRIPTO expression and inhibits transformation in a human embryonal carcinoma cell line)」 *Int J Cancer* 66: 538-543
- Bianco C, Kannan S, De Santis M, Seno M, Tang CK, Martinez-Lacaci I, Kim N, Wallace-Jones B, Lippman ME, Ebert AD, Wechselberger C, Salomon DS (1999) 「Cripto-1は新規受容体を通してerbB-4のチロシンリン酸化を間接的に刺激する (Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erbB-4 through a novel receptor)」 *J Biol Chem* 274: 8624-8629
- Bianco C, Wechselberger C, Ebert A, Khan NI, Sun Y, Salomon DS (2001) 「ヒト乳汁中のCripto-1の同定 (Identification of Cripto-1 in human milk)」 *Breast Cancer Res Treat* 66: 1-7
- Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, Bui LA, Ribas A, Dissette VB, Lau R, Gamradt SC, Glaspy JA, McBride WH, Mukherji B, Economou JS. (1998) 「MART-1アデノウイルスを用いて形質導入した樹状細胞による黒色腫特異的細胞傷害性Tリンパ球の生成 (Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus)」 *J Immunol.* 161: 5607-13
- Ciardiello F, Tortora G, Bianco C, Selvam MP, Basolo F, Fontanini G, Pacifico F, Normanno N, Brandt R, Persico MG (1994) 「アンチセンスRNAとオリゴデオキシヌクレオチドによる、ヒト結腸癌細胞中のCRIPTO発現および腫瘍原性の抑制 (Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides)」 *Oncogene* 9: 291-298
- Kenney NJ, Smith GH, Maroulakou IG, Green JH, Muller WJ, Callahan R, Salomon DS, Dickson RB (1996) 「トランスジェニックマウス由来の乳腺腫瘍中のアンフィレギュリンおよびCripto-1の検出 (Detection of amphiregulin and Cripto-1 in mammary tumors from tran

- sgenic mice)」 *Mol Carcinog* 15: 44-56
- Kim CJ, Prevette T, Cormier J, Overwijk W, Roden M, Restifo NP, Rosenberg SA, Marincola FM. (1997) 「MART-1/Melan Aをコードするポックスウイルスに感染した樹状細胞は*in vitro*でTリンパ球を感作する (Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes *in vitro*)」 *J Immunother.* 20: 276-286
- Liguori G, Tucci M, Montuori N, Dono R, Lago CT, Pacifico F, Armenante F, Persico MG (1996) 「マウスTdgf1遺伝子およびTdgf偽遺伝子の特性決定 (Characterization of the mouse Tdgf1 gene and Tdgf pseudogenes)」 *Mamm Genome* 7: 344-348
- Niemeyer CC, Spencer-Dene B, Wu JX, Adamson ED (1999) 「新生物発生前の乳腺腫瘍マーカー: Crip toおよびアンフィレギュリンはトランスジェニックマウスにおける腫瘍進行の過形成段階に過剰発現する (Preneoplastic mammary tumor markers: Crip to and Amphiregulin are overexpressed in hyperplastic stages of tumor progression in transgenic mice)」 *Int J Cancer* 81: 588-591
- Paine E, Palmantier R, Akiyama SK, Olden K, Roberts JD (2000) 「アラキドン酸はマイトジェン活性化タンパク質 (MAP) キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ2を活性化し、ヒト乳癌細胞系のコラーゲン型IVとの接着にp38 MAPキナーゼ依存経路を通して介在する (Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway)」 *J Biol Chem* 275: 11284-11290
- Parker K, Bednarek M, Coligan J (1994). 「潜在的HLA-A2結合性ペプチドを個々のペプチド側鎖の独立結合性に基づいて格付けするためのスキーム (Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains)」 *J. Immunol.* 152: 163
- Rammensee, Bachmann, Stevanovic (1997). 「MHCリガンドとペプチドモチーフ (MHC ligands and peptide motifs)」 *Landes Bioscience*
- Rammensee, Friede, Stevanovic (1995). 「MHCリガンドとペプチドモチーフ: 第1リスト (MHC ligands and peptide motifs: 1st listing)」 *Immunogenetics* 41, 178-228
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. (1994) 「ヒト血液中の樹状細胞前駆細胞の増殖 (Proliferating dendritic cell progenitors in human blood)」 *J Exp Med.* 180: 83-93
- Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizani L,

Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. (1999) 「DNAマイクロアレイと仮想HLAクラスIIマトリックスを用いる、組織特異的および無差別HLAリガンドデータベースの作製 (Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices)」 Nat Biotechnol. 17: 555-61

Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR (1990) 「5-フルオロウラシルおよびマイトマイシンCの培養ウサギ結膜下繊維芽細胞に与える効果 (Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts)」 Ophthalmology 97: 1204-1210 10

配列指標の簡単な説明

配列番号1: C r i p t o 1 ポリヌクレオチド

配列番号2: C r i p t o 3 ポリヌクレオチド

配列番号2: C r i p t o 3 ポリペプチド1

配列番号3: C r i p t o 1 ポリペプチド

配列番号4: C r i p t o 3 ポリペプチド 20

配列番号5: 米国特許第5654140号に記載のC r i p t o ポリヌクレオチド

配列番号6: 米国特許第5654140号に記載のC r i p t o ポリヌクレオチド

配列番号7~10: PCRプライマー

配列番号11および12: 合成C r i p t o 1 ペプチド

配列番号13~94: C r i p t o 1 および3由来のエピトープ

配列番号95: C r i p t o 1 変異体ポリヌクレオチド

配列番号96: C r i p t o 1 変異体ポリペプチド

配列

Sequence Listing

SEQ ID NO:1

GGAGAATCCCCGAAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGGTCAAACGTCCAAGGCCGAA
AGCCCTCCAGTTTCCCCTGGACGCCTTGCTCCTGCTTCTGCTACGACCTTCTGGGGA
AAACGAATTTCTCATTTTCTTCTTAAATTGCCATTTTCGCTTTAGGAGATGAATGTT
TTCCTTTGGCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAAGCGATGCTAACGCCTCTTTTC
CCCCTAATTGTTAAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGCCCGCTTCTCTTACAGTGT
GATTTGGATCATGGCCATTTCTAAAGTCTTTGAACTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGG
CCATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTCAGAGATGACAGCAT
TTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCCAGCGTGTGCCGCCCAT
GGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTG
CATGCTGGGGTCCCTTTTGTGCCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGACGGAACCTGTGAGCA
CGATGTGCGCAAAGAGAAGTGTGGGTCTGTGCCCCATGACACCTGGCTGCCCAAGAA
GTGTTCCCTGTGTAAATGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTTCTCAGGCATTTCT
ACCCGGCTGTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGA
ACTACCACCGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGCATCTGCCTTTCTAT
ACAAAGCTACTATTAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATACAATTTTAGATATCA
TGCAAATTTTCATGACCAGTAAAGGCTGCTGCTACAATGTCTTAACCTGAAAGATGATC
ATTTGTAGTTGCCTTAAAATAATGAATACAATTTCCAAAATGGTCTCTAACATTTCC
TTACAGAACTACTTCTTACTTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAAAAACTACTTCTTTT
TTCAAAAGAAAGTCAGCCATATCTCCATTGTGCCTAAGTCCAGTGTTTCTTTTTTTT
TTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCACTCTGTCAACCAGGCTGGACTGCAATGACGCGAT
CTTGGTTCACTGCAACCTCCGCATCCGGGGTTCAAGCCATTCTCCTGCCTAAGCCTC
CCAAGTAACTGGGATTACAGGCATGTGTCAACCATGCCAGCTAATTTTTTTTGTATTT
TAGTAGAGATGGGGGTTTACCATATTTGGCCAGTCTGGTCTCGAACTCTGACCTTGT
GATCCATCGATCAGCCTCTCGAGTGCTGAGATTACACACGTGAGCAACTGTGCAAGG
CCTGGTGTTTCTTGATACATGTAATTCTACCAAGGTCTTCTTAATATGTTCTTTTAA
ATGATTGAATTATATGTTTCAGATTATTGGAGACTAATTCTAATGTGGACCTTAGAAT
ACAGTTTTTGAGTAGAGTTGATCAAAATCAATTAAAATAGTCTCTTTAAAGGAAAGA
AAACATCTTTAAGGGGAGGAACCAGAGTGTGAAGGAATGGAAGTCCATCTGCGTGT
GTGCAGGGAGACTGGGTAGGAAAGAGGAAGCAAATAGAAGAGAGAGGTTGAAAAACA
AAATGGGTACTTGATTGGTGATTAGGTGGTGGTAGAGAAGCAAGTAAAAAGGCTAA
ATGGAAGGGCAAGTTTCCATCATCTATAGAAAGCTATATAAGACAAGAACTCCCCCTT
TTTTTCCCAAAGGCATTATAAAAAGAATGAAGCCTCCTTAGAAAAAAATTTATACCT
CAATGTCCCCAACAAGATTGCTTAATAAATTGTGTTTCCCTCAAGCTATTCAATTCT
TTTAACTGTTGTAGAAGACAAAATGTTTACAATATATTTAGTTGTAAACCAAGTGAT
CAAACCTACATATTGTAAAGCCCATTTTTTAAAATACATTGTATATATGTGTATGCACA
GTAAAAATGGAACTATATTGACCTAAAAA

10

20

30

40

SEQ ID NO:2

AAGCTTGC GCGCCATGTAAGGTAAAGTGACTGATTCTATAGCAATCCAATTGTTCCCT
TTGTCTGCCCCGTTTACATATAACAATGTTGTCAATGTTTGATTGAAAAATACCTAGCA
GGCGACACACACACACCTAGCTCCTCAGGCGGAGAGCACCCCTTTCTTGGCCACCCG
GGTATCCCCCAGGGAGTACGGGGCTCAAACACCCCTTTTGGAGAACAAGGTGGAAGC
AAATTT CAGGAAGTAAACTTCCTGAAATAAAATAAAATATCGAATGCCTTGAGACC
CATACATTTT CAGGTTTTCCTAATTAAAGCAATTACTTTCCACCACCCCTCCAACCT
GGAATCACCAACTTGGTTAGAGAACTGATTTTCTTTTTTCTTTTTTTTCCCAA
AGAGTACATCTGATCATTTTAGCCTGCAACTAATGATAGAGATATTAGGGCTAGTTA
ACCACAGTTTTTACAAGACTCCTCTCCCGCGTGTGGGCCATTGTCATGCTGTCGGTCC
CGCCACCTGAAAGGTCTCCCGCCCCGACTGGGGTTTGTGTTGAAGAAGGAGAAT
CCCCGGAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGGTCAAACGTCCAAGGCCGAAAGCCCTC
CAGTTTCCCCTGGACACCTTGCTCCTGCTTCTGCTACGACCTTCTGGGAACGCGAAT
TTCTCATTTTCTTCTTAAATTGCCATTTTCGCTTTAGGAGATGAATGTTTTCTTTG
GCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAAGCGATGCTAACGCCTCTTTCCCCCTAAT
TGTTAAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGTCCGCTTCTCTTACAGTGTGATTTGGA
TCATGGCCATTTCTAAAGCCTTTGAACTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGGCCATCAGG
AATTTGCTCGTCCATCTCGGGGAGACCTGGCCTTCAGAGATGACAGCATTTGGCCCC
AGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCCAGCGTGTGCTGCCCATGGGAATAC
AGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTGCATGCTGG
AGTCCTTTTGTGCCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGACGGAAGTGTGAGCACGATGTGC
GCAAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCCATGACACCTGGCTGCCCCAAGAAGTGTTCCT
TGTGTAATGCTGGCACGGT CAGCTCCGCTGCTTTCCTCAGGCATTTCTACCCGGCT
GTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGAACTACCAC
CGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGCTGGCATCTGCCTTCTATACAAAGCT
ACTATTAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATACAATTTTAGATATTATGCAAATT
TCATGACCCGTAAGGCTGCTGCTACAATGTCTTAAGTAAAGATGATCATTTGTAG
TTGCCTTAAATAATGAATACAATTTCCAAAACGGTCTCTAACATTTCTTTACAGAA
CTAACTACTTCTTACCTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAAAAACTACTTCTTTTTTTCA
AAAGAAAGTCAGCCATATCTCCATTGTGCCCAAGTCCAGTGTCTTTTTTTTTTTTT
GAGACGGAGTCTCACTCTGTCAACCAGGCTGGACTGCAATGACGCGATCTCGGTTCA
CTGCAACCTCCGCATCCGGGGTTCAAGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGC
TGGGATTACAGGCATGTGTCACCATGCCGGCTAATTTTTTTGTATTTTAGTAGAGAC
GGGGGTTT CACCATATTGGCCAGCTGGTCTCGAACTCTGACCTTGTGATCCATCGCT
CGCCTCTCGAGTGCTGAGATTACACACGTGAGCAACTGTGCAAGGCCTGGTGTCTCT
TGATACATGTAATTCTACCAAGGTCTTCTTAATATGTTCTTTTAAATGATTGAATTA
TACACTCAGATTATTGGAGACTAAGTCTAATGTGGACCTTAGAATACAGTTTTGAGT
AGAGTTGATCAAAATCAATTAAATAGTCTCTTTAAAAGGAAAGAAAACATCTTTAA
GGGGAGGAACCAGAGTGCTGAAGGAATGGAAGTCCATCTGCGTGTGTGCAGGGAGAC
TGGGTAGGAAAGAGGAAGCAAATAGAAGAGAGAGGTTGAAAACAAAATGGGTTACT
TGATTGGTGATTAGGTGGTGGTAGAGAAGCAAGTAAAAGGCTAAATGGAAGGGCAA
GTTTCCATCATCTATAGAAAGCTATGTAAGACAAGGACTCCCCTTTTTTTCCCAAAG
GCATTGTAAAAAGAATGAAGTCTCCTTAGAAAAAAATTATACCTCAATGTCCCCAA
CAAGATTGCTTAATAAATGTGTTTCTCCTCAAGCTATTCAATTCTTTTAACTGTTGT
AGAAGAGAAAATGTT CACAATATATTTAGTTGTAAACCAAGTGATCAAACATACATAT
TGTAAGCCCATTTTTTAAATACATTGTATATATGTGTATGCACAGTAAAAATGGAA

10

20

30

40

ACTATATTGACCTAAAAAAGGAAACCACCTTAGGCAGGCAGGACATGCT
CTTCAGAACTCTGCTCTTCAGAGTCCAAAGAAGGGATAAACATCTTTTATNNCCA
TCAAATAGC

SEQ ID NO:3

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEP
AIRPRSSQRPVPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSAR
TTTFMLVGLICLSIQSY

10

SEQ ID NO:4

MDCRKMVRFSYSVIWIMAISKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDSIWPQEEP
AIRPRSSQRPVLPNGIHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSAR
TTTFMLAGICLSIQSY

20

SEQ ID NO:5

GGAGAATCCCCGAAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGGTCAAACGTCCAAGGCCGAA
AGCCCTCCAGTTTCCCCTGGACGCCTTGCTCCTGCTTCTGCTACGACCTTCTGGGGA
AAACGAATTTCTCATTTTCTTCTTAAATTGCCATTTTCGCTTTAGGAGATGAATGTT
TTCCTTTGGCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAAGCGATGCTAACGCCTCTTTTC
CCCCTAATTGTTAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGCCCGCTTCTCTTACAGTGT
GATTTGGATCATGGCCATTTCTAAAGTCTTTGAACTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGG
CCATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTCAGAGATGACAGCAT
TTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCAGCGTGTGCCGCCCAT
GGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTG
CATGCTGGGGTCTTTTTGTGCCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGACGGAAGTGTGAGCA
CGATGTGCGCAAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCCATGACACCTGGCTGCCCCAAGAA
GTGTTCCCTGTGTAAATGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTTCTCAGGCATTTCT
ACCCGGCTGTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGA
ACTACCACCGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGCATCTGCCTTTCTAT
ACAAAGCTACTATTAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATACAATTTTAGATATCA
TGCAAATTTTCATGACCAGTAAAGGCTGCTGCTACAATGTCCTAACTGAAAGATGATC
ATTTGTAGTTGCCTTAAAATAATGAATACAATTTCCAAAATGGTCTCTAACATTTCC
TTACAGAACTACTTCTTACTTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAAAAACTACTTCTTTT
TTCAAAAGAAAGTCAGCCATATCTCCATTGTGCCTAAGTCCAGTGTTTCTTTTTTTT
TTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCACTCTGTACCCAGGCTGGACTGCAATGACGCGAT
CTTGGTTCAGTGAACCTCCGCATCCGGGGTTCAAGCCATTCTCCTGCCTAAGCCTC
CCAAGTAACTGGGATTACAGGCATGTGTACCATGCCAGCTAATTTTTTTTGTATTT

30

40

TAGTAGAGATGGGGGTTTCACCATATTGGCCAGTCTGGTCTCGAACTCTGACCTTGT
GATCCATCGATCAGCCTCTCGAGTGCTGAGATTACACACGTGAGCAACTGTGCAAGG
CCTGGTGTTCCTTGATACATGTAATTCACCAAGGTCTTCTTAATATGTTCTTTTAA
ATGATTGAATTATATGTTTCAGATTATTGGAGACTAATTCTAATGTGGACCTTAGAAT
ACAGTTTTGAGTAGAGTTGATCAAAATCAATTAAATAGTCTCTTTAAAAGGAAAGA
AAACATCTTTAAGGGGAGGAACCAGAGTGCTGAAGGAATGGAAGTCCATCTGCGTGT
GTGCAGGGGAGACTGGGTAGGAAAGAGGAAGCAAATAGAAGAGAGAGGTTGAAAAACA
AAATGGGTACTTGATTGGTGATTAGGTGGTGGTAGAGAAGCAAGTAAAAAGGCTAA
ATGGAAGGGCAAGTTCCATCATCTATAGAAAGCTATATAAGACAAGAACTCCCCTT
TTTTTCCCAAAGGCATTATAAAAAGAATGAAGCCTCCTTAGAAAAAAATTATACCT
CAATGTCCCAACAAGATTGCTTAATAAATTGTGTTTCCTCCAAGCTATTCAATTCT
TTTAACTGTTGTAGAAGACAAAATGTTTACAATATATTTAGTTGTAAACCAAGTGAT
CAAACATACATATTGTAAAGCCCATTTTTAAATACATTGTATATATGTGTATGCACA
GTAAAAATGGAAACTATATTGACCTAAAAA

10

SEQ ID NO:6

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEP
AIRPRSSQRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSAR
TTTFMLVGICLSIQSY

20

SEQ ID NO:7

TGGGTAGGAAAGAGGAAGCAAAT

SEQ ID NO:8

TGCTTCTCTACCACCACCTAATCA

30

SEQ ID NO:9

CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTT

SEQ ID NO:10

TTGGGAGAGGGCAGGGCAAAGAAGTAAGAA

40

SEQ ID NO:11

GHQEFARPSRGYL

SEQ ID NO:12

QEEPAIRPRSSQRVPPMG

10

SEQ ID NO:13

SVIWIMAISK

SEQ ID NO:14

SVPHDTWLPK

20

SEQ ID NO:15

HQEFARPSR

SEQ ID NO:16

IRPRSSQRV

SEQ ID NO:17

30

IQHSKELNR

SEQ ID NO:18

GRNCEHDVR

SEQ ID NO:19

40

VRKENCGSV

SEQ ID NO:20

LRCFPQAFI

SEQ ID NO:21

SRTPELPPS

10

SEQ ID NO:22

QRVPPMGIQH

SEQ ID NO:23

NRTCCLNGGT

20

SEQ ID NO:24

GQLRCFPQAF

SEQ ID NO:25

QAFLPGCDGL

SEQ ID NO:26

30

DGLVMDEHLV

SEQ ID NO:27

FELGLVAGL

SEQ ID NO:28

40

KELNRTCCL

SEQ ID NO:29

QLRCFPQAF

SEQ ID NO:30

SARTTTFML

10

SEQ ID NO:31

KMARFSYSV

SEQ ID NO:32

IMAIKVFEL

20

SEQ ID NO:33

VIWIMAIKSV

SEQ ID NO:34

FMLVGICLSI

SEQ ID NO:35

30

ARFSYSVIW

SEQ ID NO:36

CRKMARFSY

SEQ ID NO:37

40

ARFSYSVIWI

SEQ ID NO:38

ARPSRGYLAF

SEQ ID NO:39

ARTTTFMLV

10

SEQ ID NO:40

ARPSRGYLA

SEQ ID NO:41

CRKMARFSYS

20

SEQ ID NO:42

QEFARPSRGY

SEQ ID NO:43

MARFSYSVI

SEQ ID NO:44

30

SARTTTFMLV

SEQ ID NO:45

MAISKVFEL

SEQ ID NO:46

40

FARPSRGYL

SEQ ID NO:47

KMVRFSYSV

SEQ ID NO:48

CMLESFCAC

10

SEQ ID NO:49

IMAIKAFEL

SEQ ID NO:50

FMLAGICLSI

20

SEQ ID NO:51

VRFSYSVIW

SEQ ID NO:52

CRKMVRFSY

SEQ ID NO:53

30

VRFSYSVIWI

SEQ ID NO:54

ARPSRGDLAF

SEQ ID NO:55

40

ARPSRGDLA

SEQ ID NO:56

ARTTTFMLA

SEQ ID NO:57

IRPRSSQRVL

10

SEQ ID NO:58

CRKMVRFSYS

SEQ ID NO:59

QRVLPMTIQH

SEQ ID NO:60

20

RPRSSQRVL

SEQ ID NO:61

MAISKAFEL

SEQ ID NO:62

30

FARPSRGDL

SEQ ID NO:63

GICLSIQSY

SEQ ID NO:64

40

LVAGLGHQEF

SEQ ID NO:65

DTWLPKKCSL

SEQ ID NO:66

AIRPRSSQR

10

SEQ ID NO:67

VIWIMAISK

SEQ ID NO:68

CLNGGTCML

20

SEQ ID NO:69

EFARPSRGY

SEQ ID NO:70

RVPPMGIQH

SEQ ID NO:71

30

KVFELGLVA

SEQ ID NO:72

MLAGICLSI

SEQ ID NO:73

40

RVLPMGIQH

SEQ ID NO:74

MGIQHSKEL

SEQ ID NO:75

LVMDEHLVA

10

SEQ ID NO:76

LVASRTPEL

SEQ ID NO:77

YSVIWIMAI

20

SEQ ID NO:78

WLPKKCSLC

SEQ ID NO:79

LGLVAGLGH

SEQ ID NO:80

30

FRDDSIWPQ

SEQ ID NO:81

WIMAIKVF

SEQ ID NO:82

40

MLVGICLSI

SEQ ID NO:83

VGICLSIQS

SEQ ID NO:84

IWIMAISKV

10

SEQ ID NO:85

LVGICLSIQ

SEQ ID NO:86

FMLVGICLS

SEQ ID NO:87

20

WIMAISKAF

SEQ ID NO:88

MVRFSYSVI

SEQ ID NO:89

30

FMLAGICLS

SEQ ID NO:90

VLPMGIQHS

SEQ ID NO:91

40

IWIMAISKA

SEQ ID NO:92

IMAIKAFE

SEQ ID NO:93

GRNCEHDVRK

10

SEQ ID NO:94

SRTPELPPSA

SEQ ID NO:95

CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTTTCCCCTGGACGCCTTGCTCCTGCTTCTGCTA
CGACCTTCTGGGGAAAACGAATTTCTCATTTTCTTCTTAAATTGCCATTTTCGCTTT
AGGAGATGAATGTTTTCCTTTGGCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAAGCGATGC
TAACGCCTCTTTTCCCCCTAATTGTTAAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGCCCGC
TTCTCTTACAGTGTGATTTGGATCATGGCCATTTCTAAAGcCTTTGAACTGGGATTA
GTTGCCGGGCTGGGCCATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTC
AGAGATGACAGCATTTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCCAG
CGTGTGCCGCCCATGGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCTG
AATGGGGGAACCTGCATGCTGGGGTCCCTTTGTGCCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGA
CGGAACTGTGAGCACGATGTGCGCAAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCCATGACACC
TGGCTGCCCAAGAAGTGTTCCCTGTGTAAATGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTT
CCTCAGGCATTTCTACCCGGCTGTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCT
TCCAGGACTCCAGAACTACCACCGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGC
ATCTGCCTTCTATACAAAGCTACTATTAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATAC
AATTTTAGATATCATGCAAAATTCATGACCAGTAAAGGCTGCTGCTACAATGTCCTA
ACTGAAAGATGATCATTTGTAGTTGCCTTAAATAATGAATACAATTTCCAAAATGG
TCTCTAACATTTCTTACAGAACTACTTCTTACTTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAA

20

30

SEQ ID NO:96

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEP
AIRPRSSQRPVPMGIQHSKELNRTCCLNNGTGMGLSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSAR
TTTTFMLVIGICLSIQSY

40

【図面の簡単な説明】

【図1】大腸癌患者のC r i p t oのR T－P C R発現分析、S y b r l検出（Tは腫瘍結腸、Nは照合した正常組織）を示す図である。

【図2】大腸癌患者のC r i p t oのR T－P C R発現分析、T a q M a n検出（Tは腫瘍結腸、Nは照合した正常組織）を示す図である。

【図3】正常組織のパネルにおけるC r i p t oのR T－P C R発現分析、S u b r l検出を示す図である。

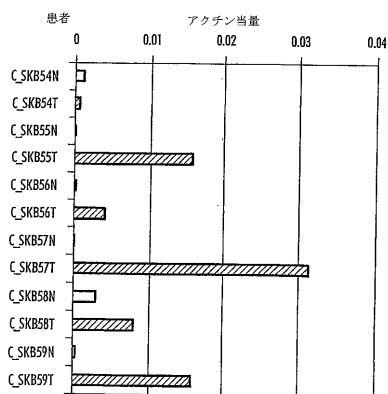
【図4】正常組織のパネルにおけるC r i p t oのR T－P C R発現分析、T a q M a n 50

検出を示す図である。

【図 5】細胞系のパネルにおける C r i p t o の R T - P C R 発現分析を示す図である。

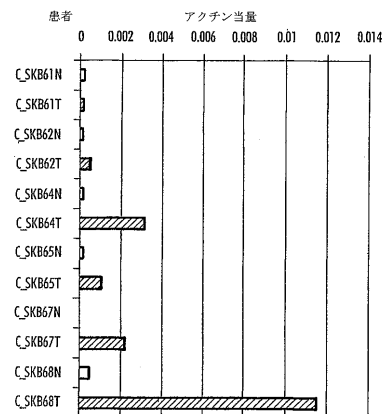
【図 1】

結腸直腸癌患者のCriptoのRT-PCR発現分析、
SybrI検出 (Tは腫瘍結腸、Nは適合させた正常組織)

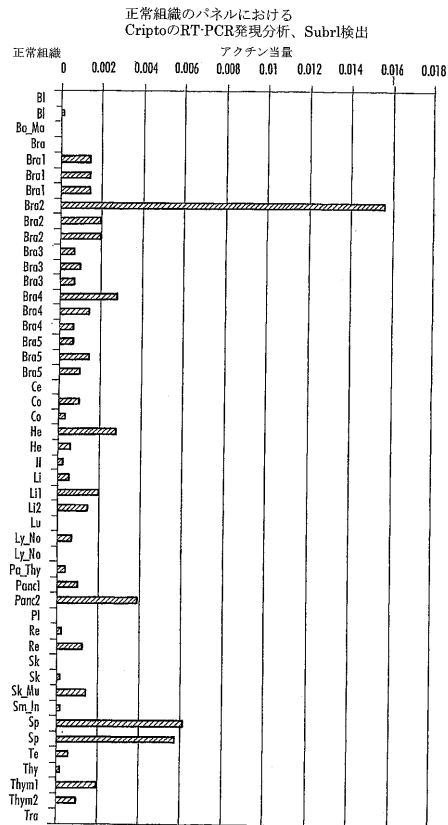


【図 2】

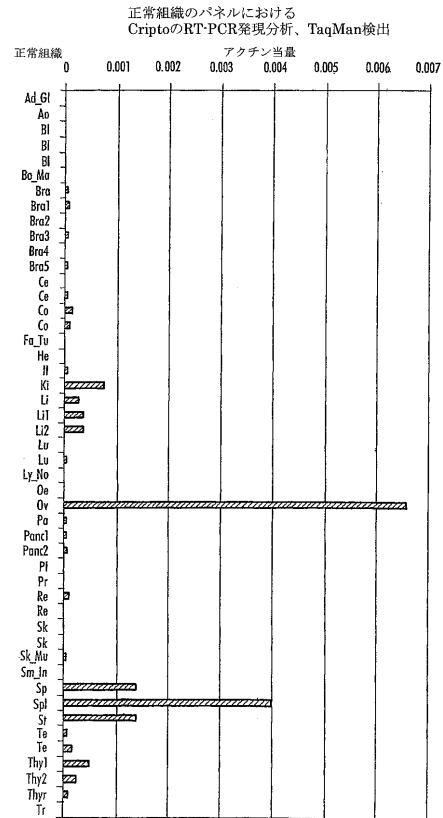
結腸直腸癌患者のCriptoのRT-PCR発現分析、
TaqMan検出 (Tは腫瘍結腸、Nは適合させた正常組織)



【図 3】

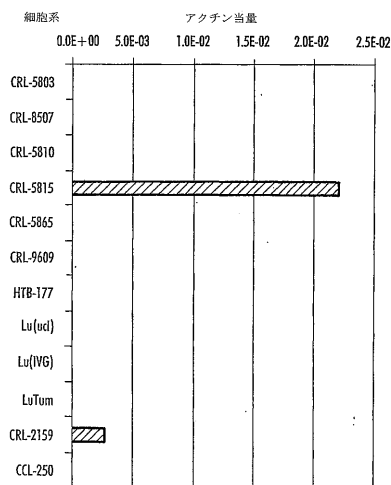


【図 4】



【図 5】

細胞系のパネルにおけるCriptoのRT-PCR発現分析



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16413 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00 (74) Agent: DALTON, Marcus, J., W.; SmithKline Beecham, Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/09646
- (22) International Filing Date: 20 August 2001 (20.08.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0020953.6 24 August 2000 (24.08.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE], Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): CASSART, Jean-Pol [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). COCHE, Thierry [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). PALMANTIER, Remi, M. [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). VINALS Y DE BASSOLS, Carlota [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/16413 A2

(54) Title: VACCINES

(57) Abstract: Compositions and methods for the therapy and diagnosis of cancer, particularly lung, colon, colorectal and breast cancer, are disclosed. Illustrative compositions comprise one or more Cripto tumor polypeptides, immunogenic portions thereof, polynucleotides that encode such polypeptides, antigen presenting cell that expresses such polypeptides, and T cells that are specific for cells expressing such polypeptides. The disclosed compositions are useful, for example, in the diagnosis, prevention and/or treatment of diseases, particularly lung, colon, colorectal and breast cancer.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

VACCINES**TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates generally to therapy of cancer, such as colon, colorectal, breast, bladder, lung and endometrial cancer. The invention is more specifically related to polypeptides, comprising at least a portion of a cripto protein tumor protein, and to polynucleotides encoding such polypeptides, in particular pharmaceutical compositions, e.g., vaccines, and other compositions for the treatment of cancer that are cripto - expressing carcinomas such as certain non-small long cell carcinoma, breast, colon, colorectal cancer.

BACKGROUND OF THE INVENTION

CRIPTO is a 188 aa protein shares homologies with the epidermal growth factor (EGF) family (EMBO Journal (1989) Vol 8 (7) pp1987-1991).

huCRIPTO mRNA is detected only in undifferentiated cells and disappear after cell differentiation mCRIPTO is expressed during pregnancy and lactation (induces branching morphogenesis in mammary epithelial cells) and is suspected to be an autocrine growth factor for normal breast cells. CRIPTO is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo.

Human cripto gene has been expressed US 5,654,140.

Cancer is a significant health problem throughout the world. Although advances have been made in detection and therapy of cancer, no vaccine or other universally successful method for prevention and/or treatment is currently available. Current therapies, which are generally based on a combination of chemotherapy or surgery and radiation, continue to prove inadequate in many patients.

Colon cancer is the second most frequently diagnosed malignancy in the United States as well as the second most common cause of cancer death. An estimated 95,600 new cases of colon cancer will have been diagnosed in 1998, with an estimated 47,700 deaths. The five-year survival rate for patients with colorectal cancer detected in an early-localised stage is 92%, unfortunately, only 37% of colorectal cancer is diagnosed at this stage. The survival stage. The survival rate

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

drops to 64% if the cancer is allowed to spread to adjacent organs or lymph nodes, and to 7% in patients with distant metastases.

The prognosis of colon cancer is directly related to the degree of penetration of the tumour through the bowel wall, to the level of metastasis, to the presence or absence of nodal involvement, consequently, early detection and treatment are especially important. Currently, diagnosis is aided by the use of screening assays for fecal occult blood, sigmoidoscopy, colonoscopy and double contrast barium enemas. Treatment regimens are determined by the type and stage of the cancer, and include surgery, radiation therapy and/or chemotherapy. Recurrence following surgery (the most common form of therapy) is a major problem and is often the ultimate cause of death. In spite of considerable research into therapies for the disease, colon cancer remains difficult to diagnose and treat. Accordingly, there is a need in the art for improved methods for treating such cancers. The present invention fulfils these needs and further provides other related advantages.

Breast cancer is a significant health problem for women in the United States and throughout the world. Although advances have been made in detection and treatment of the disease, breast cancer remains the second leading cause of cancer-related deaths in women, affecting more than 180,000 women in the United States each year. For women in North America, the lifetime odds of getting breast cancer are now one in eight.

No vaccine or other universally successful method for the prevention or treatment of breast cancer is currently available. Management of the disease currently relies on a combination of early diagnosis (through routine breast screening procedures) and aggressive treatment which may including one or more of a variety of treatments such as surgery, radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy. The course of treatment for a particular breast cancer is often selected based on a variety of prognostic parameters, including an analysis of specific tumour markers. See, eg Porter-Jordan and Lippman, Breast Cancer 8:73-100 (1994). However, the use of established markers often leads to a result that this is difficult to interpret, and the high mortality observed in breast cancer patients

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

indicates that improvements are needed in the treatment and prevention of the disease.

Lung cancer is the primary cause of cancer death among both men and women in the US, with an estimated 172,000 new cases being reported in 1994.

- 5 The five-year survival rate among all lung cancer patients, regardless of the state of disease at diagnosis is only 13%. This contrasts with a five-year survival rate of 46% among cases detected while the disease is still localised. However, only 16% of lung cancers are discovered before the disease has spread.

- 10 In spite of considerable research into therapies for these and other cancers, breast, colon and colorectal remains difficult to diagnose and treat effectively. Accordingly, there is a need in the art for improved methods for treating and preventing such cancers. The present invention fulfills these needs and further provides other related advantages.

SUMMARY OF THE INVENTION

- 15 In one aspect, the present invention provides polynucleotide compositions comprising a sequence selected from the group consisting of :

- (a) sequences consisting of at least 20 contiguous residues of a sequence provided in SEQ ID NO: 1 or 3 not being the full sequence of ID NO:1 or 3.
- 20 (b) sequences consisting of Sequence ID NO: 1 or 3 or sequences that consist of at least 20 contiguous nucleotides provided in Seq ID No 1 or 3 and a polynucleotide that encodes for a heterologous fusion partner.

- 25 The present invention, in another aspect, provides polypeptide compositions comprising an amino acid sequence that is encoded by a polynucleotide sequence described above.

The polypeptides and/or polynucleotides of the present invention are immunogenic, i.e., they are capable of eliciting an immune response, particularly a

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

humoral and/or cellular immune response, when if necessary, they are conjugated to a suitable carrier and/or adjuvanted.

The present invention further provides fragments, variants and/or derivatives of the disclosed polypeptide and/or polynucleotide sequences, wherein the fragments, variants and/or derivatives preferably have a level of immunogenic activity of at least about 50%, preferably at least about 70% and more preferably at least about 90% of the level of immunogenic activity of a polypeptide sequence set forth in SEQ ID No: 2 or 4 or a polypeptide sequence encoded by a polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or 3.

The present invention further provides polynucleotides that encode a polypeptide described above, expression vectors comprising such polynucleotides and host cells transformed or transfected with such expression vectors.

Within other aspects, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a polypeptide or polynucleotide as described above and a physiologically acceptable carrier.

Within a related aspect of the present invention, the pharmaceutical compositions, e.g., vaccine compositions, are provided for prophylactic or therapeutic applications. Such compositions generally comprise an immunogenic polypeptide or polynucleotide of the invention and an immunostimulant, such as an adjuvant.

Within further aspects, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising: (a) an antigen presenting cell that expresses a polypeptide as described above and (b) a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Illustrative antigen presenting cells include dendritic cells, macrophages, monocytes, fibroblasts and B cells.

Within related aspects, pharmaceutical compositions are provided that comprise: (a) an antigen presenting cell that expresses a polypeptide as described above and (b) an immunostimulant.

The present invention further provides, in other aspects, fusion proteins that comprise at least one polypeptide as described above, as well as polynucleotides

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

encoding such fusion proteins, typically in the form of pharmaceutical compositions, e.g., vaccine compositions, comprising a physiologically acceptable carrier and/or an immunostimulant. The fusion proteins may comprise multiple immunogenic polypeptides or portions/variants thereof, as described herein, and may further
5 comprise one or more polypeptide segments for facilitating the expression, purification and/or immunogenicity of the polypeptide(s).

Within further aspects, the present invention provides methods for stimulating an immune response in a patient, preferably a T cell response in a human patient, comprising administering a pharmaceutical composition described
10 herein. The patient may be afflicted with lung or colon cancer or colorectal cancer or breast cancer, in which case the methods provide treatment for the disease, or patient considered at risk for such a disease may be treated prophylactically. In particular the patient will be afflicted with a tumour expressing crypto antigens.

Within further aspects, the present invention provides methods for inhibiting
15 the development of a cancer in a patient, comprising administering to a patient a pharmaceutical composition as recited above. The patient may be afflicted with lung, colon, colorectal or breast cancer, in which case the methods provide treatment for the disease, or patient considered at risk for such a disease may be treated prophylactically.

20 The present invention further provides, within other aspects, methods for removing tumor cells from a biological sample, comprising contacting a biological sample with T cells that specifically react with a polypeptide of the present invention, wherein the step of contacting is performed under conditions and for a time sufficient to permit the removal of cells expressing the protein from the
25 sample.

Within related aspects, methods are provided for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising administering to a patient a biological sample treated as described above.

Methods are further provided, within other aspects, for stimulating and/or
30 expanding T cells specific for a polypeptide of the present invention, comprising

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

contacting T cells with one or more of: (i) a polypeptide as described above; (ii) a polynucleotide encoding such a polypeptide; and/or (iii) an antigen presenting cell that expresses such a polypeptide; under conditions and for a time sufficient to permit the stimulation and/or expansion of T cells. Isolated T cell populations comprising T cells prepared as described above are also provided.

Within further aspects, the present invention provides methods for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising administering to a patient an effective amount of a T cell population as described above.

The present invention further provides methods for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising the steps of: (a) incubating CD4+ and/or CD8+ T cells isolated from a patient with one or more of: (i) a polypeptide comprising at least an immunogenic portion of a crypto polypeptide disclosed herein; (ii) a polynucleotide encoding such a polypeptide; and (iii) an antigen-presenting cell that expressed such a polypeptide; and (b) administering to the patient an effective amount of the proliferated T cells, and thereby inhibiting the development of a cancer in the patient. Proliferated cells may, but need not, be cloned prior to administration to the patient.

These and other aspects of the present invention will become apparent upon reference to the following detailed description. All references disclosed herein are hereby incorporated by reference in their entirety as if each was incorporated individually.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS AND SEQUENCE IDENTIFIERS

SEQ ID NO: 1 Cripto 1 Polynucleotide

SEQ ID NO: 2 Cripto 3 Polynucleotide

25 SEQ ID NO: 2 Cripto 3 Polypeptide1

SEQ ID NO: 3 Cripto 1 Polypeptide

SEQ ID NO: 4 Cripto 3 Polypeptide

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO: 5 Cripto Polynucleotide as described in US 5654 140

SEQ ID NO: 6 Cripto Polynucleotide as described in US 5654 140

SEQ ID NOS: 7 -10 PCR primers

5 SEQ ID NOS: 11 & 12 synthetic Cripto 1 peptides

SEQ ID NOS: 13 - 94 Epitopes from Cripto 1 and 3

SEQ ID NO: 95 Cripto 1 variant Polynucleotide

SEQ ID NO: 96 Cripto 1 variant Polypeptide

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 The present invention is directed generally to compositions and their use in the therapy and diagnosis of cancer, particularly cripto expressing cancer and metastases including Cripto expressing lung, colon, colorectal and breast cancers. As described further below, illustrative compositions of the present invention include, but are not restricted to, polypeptides, particularly immunogenic
15 polypeptides, polynucleotides encoding such polypeptides, antibodies and other binding agents, antigen presenting cells (APCs) and immune system cells (e.g., T cells).

 The practice of the present invention will employ, unless indicated specifically to the contrary, conventional methods of virology, immunology, microbiology, molecular biology and recombinant DNA techniques within the skill
20 of the art, many of which are described below for the purpose of illustration. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical
25 Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

All publications, patents and patent applications cited herein, whether supra or infra, are hereby incorporated by reference in their entirety.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise.

POLYPEPTIDE COMPOSITIONS

As used herein, the term "polypeptide" is used in its conventional meaning, i.e. as a sequence of amino acids. The polypeptides are not limited to a specific length of the product; thus, peptides, oligopeptides, and proteins are included within the definition of polypeptide, and such terms may be used interchangeably herein unless specifically indicated otherwise. This term also does not refer to or exclude post-expression modifications of the polypeptide, for example, glycosylations, acetylations, phosphorylations and the like, as well as other modifications known in the art, both naturally occurring and non-naturally occurring. A polypeptide may be an entire protein, or a subsequence thereof. Particular polypeptides of interest in the context of this invention are amino acid subsequences comprising epitopes, i.e. antigenic determinants substantially responsible for the immunogenic properties of a polypeptide and being capable of evoking an immune response

Particularly illustrative polypeptides of the present invention comprise a sequence of at least 10 contiguous amino acids, preferably 20, more preferably 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 amino acids of the cirpto protein of ID NO: 2 or 4.

In certain preferred embodiments, the polypeptides of the invention are immunogenic, i.e., they react detectably within an immunoassay (such as an ELISA or T-cell stimulation assay) with antisera and/or T-cells from a patient with cripto expressing cancer. Screening for immunogenic activity can be performed using techniques well known to the skilled artisan. For example, such screens can be performed using methods such as those described in Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In one illustrative example, a polypeptide may be immobilized on a solid support and contacted with

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

patient sera to allow binding of antibodies within the sera to the immobilized polypeptide. Unbound sera may then be removed and bound antibodies detected using, for example, ^{125} I-labeled Protein A.

As would be recognized by the skilled artisan, immunogenic portions of the polypeptides disclosed herein are also encompassed by the present invention. An "immunogenic portion," as used herein, is a fragment of an immunogenic polypeptide of the invention that itself is immunologically reactive (i.e., specifically binds) with the B-cells and/or T-cell surface antigen receptors that recognize the polypeptide. Immunogenic portions may generally be identified using well known techniques, such as those summarized in Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (Raven Press, 1993) and references cited therein. Such techniques include screening polypeptides for the ability to react with antigen-specific antibodies, antisera and/or T-cell lines or clones. As used herein, antisera and antibodies are "antigen-specific" if they specifically bind to an antigen (i.e., they react with the protein in an ELISA or other immunoassay, and do not react detectably with unrelated proteins). Such antisera and antibodies may be prepared as described herein, and using well-known techniques.

In one preferred embodiment, an immunogenic portion of a polypeptide of the present invention is a portion that reacts with antisera and/or T-cells at a level that is not substantially less than the reactivity of the full-length polypeptide (e.g., in an ELISA and/or T-cell reactivity assay). Preferably, the level of immunogenic activity of the immunogenic portion is at least about 50%, preferably at least about 70% and most preferably greater than about 90% of the immunogenicity for the full-length polypeptide. In some instances, preferred immunogenic portions will be identified that have a level of immunogenic activity greater than that of the corresponding full-length polypeptide, e.g., having greater than about 100% or 150% or more immunogenic activity.

In certain other embodiments, illustrative immunogenic portions may include peptides in which an N-terminal leader sequence and/or transmembrane domain have been deleted. Other illustrative immunogenic portions will contain a small N-

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

and/or C-terminal deletion (e.g., 1-30 amino acids, preferably 5-15 amino acids), relative to the mature protein.

In another embodiment, a polypeptide composition of the invention may also comprise one or more polypeptides that are immunologically reactive with T cells and/or antibodies generated against a polypeptide of the invention, particularly a
5 polypeptide having an amino acid sequence disclosed herein, or to an immunogenic fragment or variant thereof.

In another embodiment of the invention, polypeptides are provided that comprise one or more polypeptides that are capable of eliciting T cells and/or
10 antibodies that are immunologically reactive with one or more polypeptides described herein, or one or more polypeptides encoded by contiguous nucleic acid sequences contained in the polynucleotide sequences disclosed herein, or immunogenic fragments or variants thereof, or to one or more nucleic acid sequences which hybridize to one or more of these sequences under conditions of
15 moderate to high stringency.

The present invention, in another aspect, provides polypeptide fragments comprising at least about 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, or 150 contiguous amino acids, or more, including all intermediate lengths, of a polypeptide compositions set forth herein, such as those set forth in SEQ ID NO: 2 or 4 or those encoded by a
20 polynucleotide sequence set forth in a sequence of SEQ ID NO: 1 or 3. It is preferred that the polypeptides comprise at least one preferably a plurality of epitopes as set forth in sequence ID no 13 to 94. Optionally the fragments are fused or otherwise conjugated to a heterologous carrier.

In another aspect, the present invention provides variants of the polypeptide
25 compositions described herein. Polypeptide variants generally encompassed by the present invention will typically exhibit at least about 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or more identity (determined as described below), along its length, to a polypeptide sequences set forth herein.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

In one preferred embodiment, the polypeptide fragments and variants provide by the present invention are immunologically reactive with an antibody and/or T-cell that reacts with a full-length polypeptide specifically set for the herein.

5 In another preferred embodiment, the polypeptide fragments and variants provided by the present invention exhibit a level of immunogenic activity of at least about 50%, preferably at least about 70%, and most preferably at least about 90% or more of that exhibited by a full-length polypeptide sequence specifically set forth herein.

10 A polypeptide "variant," as the term is used herein, is a polypeptide that typically differs from a polypeptide specifically disclosed herein in one or more substitutions, deletions, additions and/or insertions. Such variants may be naturally occurring or may be synthetically generated, for example, by modifying one or more of the above polypeptide sequences of the invention and evaluating their immunogenic activity as described herein and/or using any of a number of
15 techniques well known in the art.

For example, certain illustrative variants of the polypeptides of the invention include those in which one or more portions, such as an N-terminal leader sequence or transmembrane domain, have been removed. Other illustrative variants include
20 variants in which a small portion (e.g., 1-30 amino acids, preferably 5-15 amino acids) has been removed from the N- and/or C-terminal of the mature protein.

In many instances, a variant will contain conservative substitutions. A "conservative substitution" is one in which an amino acid is substituted for another amino acid that has similar properties, such that one skilled in the art of peptide chemistry would expect the secondary structure and hydrophobic nature of the
25 polypeptide to be substantially unchanged. As described above, modifications may be made in the structure of the polynucleotides and polypeptides of the present invention and still obtain a functional molecule that encodes a variant or derivative polypeptide with desirable characteristics, e.g., with immunogenic characteristics. When it is desired to alter the amino acid sequence of a polypeptide to create an
30 equivalent, or even an improved, immunogenic variant or portion of a polypeptide

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

of the invention, one skilled in the art will typically change one or more of the codons of the encoding DNA sequence according to Table 1.

For example, certain amino acids may be substituted for other amino acids in a protein structure without appreciable loss of interactive binding capacity with
5 structures such as, for example, antigen-binding regions of antibodies or binding sites on substrate molecules. Since it is the interactive capacity and nature of a protein that defines that protein's biological functional activity, certain amino acid sequence substitutions can be made in a protein sequence, and, of course, its underlying DNA coding sequence, and nevertheless obtain a protein with like
10 properties. It is thus contemplated that various changes may be made in the peptide sequences of the disclosed compositions, or corresponding DNA sequences which encode said peptides without appreciable loss of their biological utility or activity.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Table 1

Amino Acids			Codons						
Alanine	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cysteine	Cys	C	UGC	UGU					
Aspartic acid	Asp	D	GAC	GAU					
Glutamic acid	Glu	E	GAA	GAG					
Phenylalanine	Phe	F	UUC	UUU					
Glycine	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidine	His	H	CAC	CAU					
Isoleucine	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lysine	Lys	K	AAA	AAG					
Leucine	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Methionine	Met	M	AUG						
Asparagine	Asn	N	AAC	AAU					
Proline	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamine	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginine	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serine	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Threonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valine	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Tryptophan	Trp	W	UGG						
Tyrosine	Tyr	Y	UAC	UAU					

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biologic function on a protein is generally understood in the art (Kyte and Doolittle, 1982, incorporated herein by reference). It is accepted that the relative hydropathic character of the amino acid contributes to the secondary structure of the resultant protein, which in turn defines the interaction of the protein with other molecules, for example, enzymes, substrates, receptors, DNA, antibodies, antigens, and the like. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

its hydrophobicity and charge characteristics (Kyte and Doolittle, 1982). These values are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6);
 5 histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

It is known in the art that certain amino acids may be substituted by other amino acids having a similar hydropathic index or score and still result in a protein with similar biological activity, i.e. still obtain a biological functionally equivalent
 10 protein. In making such changes, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. U. S. Patent 4,554,101 (specifically incorporated herein by
 15 reference in its entirety), states that the greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with a biological property of the protein.

As detailed in U. S. Patent 4,554,101, the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0);
 20 aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4). It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar
 25 hydrophilicity value and still obtain a biologically equivalent, and in particular, an immunologically equivalent protein. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

As outlined above, amino acid substitutions are generally therefore based on
 30 the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

that take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

In addition, any polynucleotide may be further modified to increase stability in vivo. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends; the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages in the backbone; and/or the inclusion of nontraditional bases such as inosine, queosine and wybutosine, as well as acetyl-methyl-, thio- and other modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine and uridine.

Amino acid substitutions may further be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity and/or the amphipathic nature of the residues. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; and serine, threonine, phenylalanine and tyrosine. Other groups of amino acids that may represent conservative changes include: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; and (5) phe, tyr, trp, his. A variant may also, or alternatively, contain nonconservative changes. In a preferred embodiment, variant polypeptides differ from a native sequence by substitution, deletion or addition of five amino acids or fewer. Variants may also (or alternatively) be modified by, for example, the deletion or addition of amino acids that have minimal influence on the immunogenicity, secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide.

As noted above, polypeptides may comprise a signal (or leader) sequence at the N-terminal end of the protein, which co-translationally or post-translationally directs transfer of the protein. The polypeptide may also be conjugated to a linker or other sequence for ease of synthesis, purification or identification of the polypeptide (e.g., poly-His), or to enhance binding of the polypeptide to a solid

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

support. For example, a polypeptide may be conjugated to an immunoglobulin Fc region.

When comparing polypeptide sequences, two sequences are said to be "identical" if the sequence of amino acids in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence, as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730.

Alternatively, optimal alignment of sequences for comparison may be conducted by the local identity algorithm of Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math 2:482, by the identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, by the search for similarity methods of Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, by computerized implementations of

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

these algorithms (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), or by inspection.

One preferred example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al. (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectively. BLAST and BLAST 2.0 can be used, for example with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the polynucleotides and polypeptides of the invention. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. For amino acid sequences, a scoring matrix can be used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X determine the sensitivity and speed of the alignment.

In one preferred approach, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (i.e., the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

Within other illustrative embodiments, a polypeptide may be a fusion polypeptide that comprises multiple polypeptides as described herein, or that

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

comprises at least one polypeptide as described herein and an unrelated sequence, such as a known tumor protein. A fusion partner may, for example, assist in providing T helper epitopes (an immunological fusion partner), preferably T helper epitopes recognized by humans, or may assist in expressing the protein (an expression enhancer) at higher yields than the native recombinant protein. Certain preferred fusion partners are both immunological and expression enhancing fusion partners. Other fusion partners may be selected so as to increase the solubility of the polypeptide or to enable the polypeptide to be targeted to desired intracellular compartments. Still further fusion partners include affinity tags, which facilitate purification of the polypeptide.

Fusion polypeptides may generally be prepared using standard techniques, including chemical conjugation. Preferably, a fusion polypeptide is expressed as a recombinant polypeptide, allowing the production of increased levels, relative to a non-fused polypeptide, in an expression system. Briefly, DNA sequences encoding the polypeptide components may be assembled separately, and ligated into an appropriate expression vector. The 3' end of the DNA sequence encoding one polypeptide component is ligated, with or without a peptide linker, to the 5' end of a DNA sequence encoding the second polypeptide component so that the reading frames of the sequences are in phase. This permits translation into a single fusion polypeptide that retains the biological activity of both component polypeptides.

A peptide linker sequence may be employed to separate the first and second polypeptide components by a distance sufficient to ensure that each polypeptide folds into its secondary and tertiary structures. Such a peptide linker sequence is incorporated into the fusion polypeptide using standard techniques well known in the art. Suitable peptide linker sequences may be chosen based on the following factors: (1) their ability to adopt a flexible extended conformation; (2) their inability to adopt a secondary structure that could interact with functional epitopes on the first and second polypeptides; and (3) the lack of hydrophobic or charged residues that might react with the polypeptide functional epitopes. Preferred peptide linker sequences contain Gly, Asn and Ser residues. Other near neutral amino acids, such as Thr and Ala may also be used in the linker sequence. Amino acid

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

sequences which may be usefully employed as linkers include those disclosed in Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; U.S. Patent No. 4,935,233 and U.S. Patent No. 4,751,180. The linker sequence may generally be from 1 to about 50 amino acids in length.

- 5 Linker sequences are not required when the first and second polypeptides have non-essential N-terminal amino acid regions that can be used to separate the functional domains and prevent steric interference.

- The ligated DNA sequences are operably linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements. The regulatory elements responsible for
10 expression of DNA are located only 5' to the DNA sequence encoding the first polypeptides. Similarly, stop codons required to end translation and transcription termination signals are only present 3' to the DNA sequence encoding the second polypeptide.

- The fusion polypeptide can comprise a polypeptide as described herein
15 together with an unrelated immunogenic protein, such as an immunogenic protein capable of eliciting a recall response. Examples of such proteins include tetanus, tuberculosis and hepatitis proteins (see, for example, Stoute et al. New Engl. J. Med., 336:86-91, 1997).

- In one preferred embodiment, the immunological fusion partner is derived
20 from a Mycobacterium sp., such as a Mycobacterium tuberculosis-derived Ra12 fragment. Ra12 compositions and methods for their use in enhancing the expression and/or immunogenicity of heterologous polynucleotide/polypeptide sequences is described in U.S. Patent Application 60/158,585, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, Ra12 refers to a
25 polynucleotide region that is a subsequence of a Mycobacterium tuberculosis MTB32A nucleic acid. MTB32A is a serine protease of 32 KD molecular weight encoded by a gene in virulent and avirulent strains of M. tuberculosis. The nucleotide sequence and amino acid sequence of MTB32A have been described (for example, U.S. Patent Application 60/158,585; see also, Skeiky et al., Infection and
30 Immun. (1999) 67:3998-4007, incorporated herein by reference). C-terminal fragments of the MTB32A coding sequence express at high levels and remain as a

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

soluble polypeptides throughout the purification process. Moreover, Ra12 may enhance the immunogenicity of heterologous immunogenic polypeptides with which it is fused. One preferred Ra12 fusion polypeptide comprises a 14 KD C-terminal fragment corresponding to amino acid residues 192 to 323 of MTB32A. Other
5 preferred Ra12 polynucleotides generally comprise at least about 15 consecutive nucleotides, at least about 30 nucleotides, at least about 60 nucleotides, at least about 100 nucleotides, at least about 200 nucleotides, or at least about 300 nucleotides that encode a portion of a Ra12 polypeptide. Ra12 polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes a Ra12
10 polypeptide or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Ra12 polynucleotide variants may contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions such that the biological activity of the encoded fusion polypeptide is not substantially diminished, relative to a fusion polypeptide comprising a native Ra12 polypeptide. Variants preferably exhibit at least about
15 70% identity, more preferably at least about 80% identity and most preferably at least about 90% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native Ra12 polypeptide or a portion thereof.

Within other preferred embodiments, an immunological fusion partner is derived from protein D, a surface protein of the gram-negative bacterium
20 *Haemophilus influenza* B (WO 91/18926). Preferably, a protein D derivative comprises approximately the first third of the protein (e.g., the first N-terminal 100-110 amino acids), and a protein D derivative may be lipidated. Within certain preferred embodiments, the first 109 residues of a Lipoprotein D fusion partner is included on the N-terminus to provide the polypeptide with additional exogenous T-
25 cell epitopes and to increase the expression level in *E. coli* (thus functioning as an expression enhancer). The lipid tail ensures optimal presentation of the antigen to antigen presenting cells. Other fusion partners include the non-structural protein from influenzae virus, NS1 (hemagglutinin). Typically, the N-terminal 81 amino acids are used, although different fragments that include T-helper epitopes may be
30 used.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

In another embodiment, the immunological fusion partner is the protein known as LYTA, or a portion thereof (preferably a C-terminal portion). LYTA is derived from *Streptococcus pneumoniae*, which synthesizes an N-acetyl-L-alanine amidase known as amidase LYTA (encoded by the *LytA* gene; Gene 43:265-292, 5 1986). LYTA is an autolysin that specifically degrades certain bonds in the peptidoglycan backbone. The C-terminal domain of the LYTA protein is responsible for the affinity to the choline or to some choline analogues such as DEAE. This property has been exploited for the development of *E. coli* C-LYTA expressing plasmids useful for expression of fusion proteins. Purification of hybrid 10 proteins containing the C-LYTA fragment at the amino terminus has been described (see *Biotechnology* 10:795-798, 1992). Within a preferred embodiment, a repeat portion of LYTA may be incorporated into a fusion polypeptide. A repeat portion is found in the C-terminal region starting at residue 178. A particularly preferred repeat portion incorporates residues 188-305.

15 Yet another illustrative embodiment involves fusion polypeptides, and the polynucleotides encoding them, wherein the fusion partner comprises a targeting signal capable of directing a polypeptide to the endosomal/lysosomal compartment, as described in U.S. Patent No. 5,633,234. An immunogenic polypeptide of the invention, when fused with this targeting signal, will associate more efficiently with 20 MHC class II molecules and thereby provide enhanced *in vivo* stimulation of CD4+ T-cells specific for the polypeptide.

The crypto part of the fusion molecule may preferably be the whole length 188 aa protein of Cripto 1 or Cripto 3 or a fragment thereof as described herein.

Polypeptides of the invention are prepared using any of a variety of well 25 known synthetic and/or recombinant techniques, the latter of which are further described below. Polypeptides, portions and other variants generally less than about 150 amino acids can be generated by synthetic means, using techniques well known to those of ordinary skill in the art. In one illustrative example, such polypeptides are synthesized using any of the commercially available solid-phase techniques, such 30 as the Merrifield solid-phase synthesis method, where amino acids are sequentially added to a growing amino acid chain. See Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

2146, 1963. Equipment for automated synthesis of polypeptides is commercially available from suppliers such as Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), and may be operated according to the manufacturer's instructions.

In general, polypeptide compositions (including fusion polypeptides) of the invention are isolated. An "isolated" polypeptide is one that is removed from its original environment. For example, a naturally-occurring protein or polypeptide is isolated if it is separated from some or all of the coexisting materials in the natural system. Preferably, such polypeptides are also purified, e.g., are at least about 90% pure, more preferably at least about 95% pure and most preferably at least about 99% pure.

POLYNUCLEOTIDE COMPOSITIONS

The present invention, in other aspects, provides polynucleotide compositions that encode for the polypeptides of the invention. The terms "DNA" and "polynucleotide" are used essentially interchangeably herein to refer to a DNA molecule that has been isolated free of total genomic DNA of a particular species. "Isolated," as used herein, means that a polynucleotide is substantially away from other coding sequences, and that the DNA molecule does not contain large portions of unrelated coding DNA, such as large chromosomal fragments or other functional genes or polypeptide coding regions. Of course, this refers to the DNA molecule as originally isolated, and does not exclude genes or coding regions later added to the segment by the hand of man.

As will be understood by those skilled in the art, the polynucleotide compositions of this invention can include genomic sequences, extra-genomic and plasmid-encoded sequences and smaller engineered gene segments that express, or may be adapted to express, proteins, polypeptides, peptides and the like. Such segments may be naturally isolated, or modified synthetically by the hand of man.

As will be also recognized by the skilled artisan, polynucleotides of the invention may be single-stranded (coding or antisense) or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules. RNA molecules may include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not, be linked to other molecules and/or support materials.

5 Polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes a polypeptide/protein of the invention or a portion thereof) or may comprise a sequence that encodes a variant or derivative, preferably and immunogenic variant or derivative, of such a sequence.

Typically, polynucleotide variants will contain one or more substitutions, 10 additions, deletions and/or insertions, preferably such that the immunogenicity of the polypeptide encoded by the variant polynucleotide is not substantially diminished relative to a polypeptide encoded by a polynucleotide sequence specifically set forth herein). The term "variants" should also be understood to encompass homologous genes of xenogenic origin.

15 In additional embodiments, the present invention provides polynucleotide fragments comprising various lengths of contiguous stretches of sequence identical to or complementary to one or more of the SEQ ID NO:1 or 3. For example, polynucleotides are provided by this invention that comprise at least about 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, the SEQ ID NO: 1 as well as all 20 intermediate lengths there between. It will be readily understood that "intermediate lengths", in this context, means any length between the quoted values, such as 16, 17, 18, 19, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; including all integers through 200-500; 500-1,000, and the like. Particularly preferred polynucleotides are those which 25 encode the epitopes as set forth in SEQ ID NOS: 13 - 94.

In another embodiment of the invention, polynucleotide compositions are provided that are capable of hybridizing under moderate to high stringency conditions to a polynucleotide sequence provided herein, or a fragment thereof, or a complementary sequence thereof. Hybridization techniques are well known in the 30 art of molecular biology. For purposes of illustration, suitable moderately stringent conditions for testing the hybridization of a polynucleotide of this invention with

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

other polynucleotides include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-60°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1% SDS. One skilled in the art will understand that the stringency of hybridization can be readily manipulated, such as by altering the salt content of the hybridization solution and/or the temperature at which the hybridization is performed. For example, in another embodiment, suitable highly stringent hybridization conditions include those described above, with the exception that the temperature of hybridization is increased, e.g., to 60-65°C or 65-70°C.

10 In certain preferred embodiments, the polynucleotides described above, e.g., polynucleotide variants, fragments and hybridizing sequences, encode polypeptides that are immunologically cross-reactive with a polypeptide sequence specifically set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In other preferred embodiments, such polynucleotides encode polypeptides that have a level of immunogenic activity of at least about 50%, preferably at least about 70%, and more preferably at least about 90% of that for a polypeptide sequence specifically set forth herein.

The polynucleotides of the present invention, or fragments thereof, regardless of the length of the coding sequence itself, may be combined with other DNA sequences, such as promoters, polyadenylation signals, additional restriction enzyme sites, multiple cloning sites, other coding segments, and the like, such that their overall length may vary considerably. It is therefore contemplated that a nucleic acid fragment of almost any length may be employed, with the total length preferably being limited by the ease of preparation and use in the intended recombinant DNA protocol. For example, illustrative polynucleotide segments with total lengths of about 10,000, about 5000, about 3000, about 2,000, about 1,000, about 500, about 200, about 100, about 50 base pairs in length, and the like, (including all intermediate lengths) are contemplated to be useful in many implementations of this invention.

When comparing polynucleotide sequences, two sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence, as described below. Comparisons between

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, 40 to about 50, in which a sequence
 5 may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several
 10 alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-
 15 645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical
 20 Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730.

Alternatively, optimal alignment of sequences for comparison may be conducted by the local identity algorithm of Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math 2:482, by the identity alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970)
 25 J. Mol. Biol. 48:443, by the search for similarity methods of Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), or by inspection.

30 One preferred example of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

algorithms, which are described in Altschul et al. (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 and Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, respectively. BLAST and BLAST 2.0 can be used, for example with the parameters described herein, to determine percent sequence identity for the polynucleotides of the invention.

- 5 Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. In one illustrative example, cumulative scores can be calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always >0) and N (penalty score for mismatching residues; always <0). Extension of the word hits in each direction are
- 10 halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for
- 15 nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alignments, (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands.

- Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by
- 20 comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two
- 25 sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid bases occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (i.e., the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

- 30 It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

a polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention. Further, alleles of the genes comprising the
5 polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as
10 hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

Therefore, in another embodiment of the invention, a mutagenesis approach, such as site-specific mutagenesis, is employed for the preparation of immunogenic variants and/or derivatives of the polypeptides described herein. By this approach, specific modifications in a polypeptide sequence can be made through mutagenesis
15 of the underlying polynucleotides that encode them. These techniques provides a straightforward approach to prepare and test sequence variants, for example, incorporating one or more of the foregoing considerations, by introducing one or more nucleotide sequence changes into the polynucleotide.

Site-specific mutagenesis allows the production of mutants through the use of
20 specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Mutations may be employed in a selected polynucleotide sequence to improve, alter, decrease, modify, or otherwise
25 change the properties of the polynucleotide itself, and/or alter the properties, activity, composition, stability, or primary sequence of the encoded polypeptide.

In certain embodiments of the present invention, the inventors contemplate the mutagenesis of the disclosed polynucleotide sequences to alter one or more properties of the encoded polypeptide, such as the immunogenicity of a polypeptide
30 vaccine. The techniques of site-specific mutagenesis are well-known in the art, and are widely used to create variants of both polypeptides and polynucleotides. For

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

example, site-specific mutagenesis is often used to alter a specific portion of a DNA molecule. In such embodiments, a primer comprising typically about 14 to about 25 nucleotides or so in length is employed, with about 5 to about 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

5 As will be appreciated by those of skill in the art, site-specific mutagenesis techniques have often employed a phage vector that exists in both a single stranded and double stranded form. Typical vectors useful in site-directed mutagenesis include vectors such as the M13 phage. These phage are readily commercially-available and their use is generally well-known to those skilled in the art. Double-stranded plasmids are also routinely employed in site directed mutagenesis that eliminates the step of transferring the gene of interest from a plasmid to a phage.

15 In general, site-directed mutagenesis in accordance herewith is performed by first obtaining a single-stranded vector or melting apart of two strands of a double-stranded vector that includes within its sequence a DNA sequence that encodes the desired peptide. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is prepared, generally synthetically. This primer is then annealed with the single-stranded vector, and subjected to DNA polymerizing enzymes such as E. coli polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is then used to transform appropriate cells, such as E. coli cells, and clones are selected which include recombinant vectors bearing the mutated sequence arrangement.

25 The preparation of sequence variants of the selected peptide-encoding DNA segments using site-directed mutagenesis provides a means of producing potentially useful species and is not meant to be limiting as there are other ways in which sequence variants of peptides and the DNA sequences encoding them may be obtained. For example, recombinant vectors encoding the desired peptide sequence may be treated with mutagenic agents, such as hydroxylamine, to obtain sequence variants. Specific details regarding these methods and protocols are found in the

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

teachings of Maloy et al., 1994; Segal, 1976; Prokop and Bajpai, 1991; Kuby, 1994; and Maniatis et al., 1982, each incorporated herein by reference, for that purpose.

As used herein, the term "oligonucleotide directed mutagenesis procedure" refers to template-dependent processes and vector-mediated propagation which result in an increase in the concentration of a specific nucleic acid molecule relative to its initial concentration, or in an increase in the concentration of a detectable signal, such as amplification. As used herein, the term "oligonucleotide directed mutagenesis procedure" is intended to refer to a process that involves the template-dependent extension of a primer molecule. The term template dependent process refers to nucleic acid synthesis of an RNA or a DNA molecule wherein the sequence of the newly synthesized strand of nucleic acid is dictated by the well-known rules of complementary base pairing (see, for example, Watson, 1987). Typically, vector mediated methodologies involve the introduction of the nucleic acid fragment into a DNA or RNA vector, the clonal amplification of the vector, and the recovery of the amplified nucleic acid fragment. Examples of such methodologies are provided by U. S. Patent No. 4,237,224, specifically incorporated herein by reference in its entirety.

In another approach for the production of polypeptide variants of the present invention, recursive sequence recombination, as described in U.S. Patent No. 5,837,458, may be employed. In this approach, iterative cycles of recombination and screening or selection are performed to "evolve" individual polynucleotide variants of the invention having, for example, enhanced immunogenic activity.

According to another embodiment of the present invention, polynucleotide compositions comprising antisense oligonucleotides are provided. Antisense oligonucleotides have been demonstrated to be effective and targeted inhibitors of protein synthesis, and, consequently, provide a therapeutic approach by which a disease can be treated by inhibiting the synthesis of proteins that contribute to the disease. The efficacy of antisense oligonucleotides for inhibiting protein synthesis is well established. For example, the synthesis of polygalacturonase and the muscarine type 2 acetylcholine receptor are inhibited by antisense oligonucleotides

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

directed to their respective mRNA sequences (U. S. Patent 5,739,119 and U. S. Patent 5,759,829). Further, examples of antisense inhibition have been demonstrated with the nuclear protein cyclin, the multiple drug resistance gene (MDG1), ICAM-1, E-selectin, STK-1, striatal GABAA receptor and human EGF
 5 (Jaskulski et al., Science. 1988 Jun 10;240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989;1(4):225-32; Peris et al., Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15;57(2):310-20; U. S. Patent 5,801,154; U.S. Patent 5,789,573; U. S. Patent 5,718,709 and U.S. Patent 5,610,288). Antisense constructs have also been described that inhibit and can be used to treat a variety of abnormal cellular
 10 proliferations, e.g. cancer (U. S. Patent 5,747,470; U. S. Patent 5,591,317 and U. S. Patent 5,783,683).

Therefore, in certain embodiments, the present invention provides oligonucleotide sequences that comprise all, or a portion of, any sequence that is capable of specifically binding to polynucleotide sequence described herein, or a
 15 complement thereof. In one embodiment, the antisense oligonucleotides comprise DNA or derivatives thereof. In another embodiment, the oligonucleotides comprise RNA or derivatives thereof. In a third embodiment, the oligonucleotides are modified DNAs comprising a phosphorothioated modified backbone. In a fourth
 20 embodiment, the oligonucleotide sequences comprise peptide nucleic acids or derivatives thereof. In each case, preferred compositions comprise a sequence region that is complementary, and more preferably substantially-complementary, and even more preferably, completely complementary to one or more portions of polynucleotides disclosed herein.

Selection of antisense compositions specific for a given gene sequence is
 25 based upon analysis of the chosen target sequence (i.e. in these illustrative examples the rat and human sequences) and determination of secondary structure, T_m, binding energy, relative stability, and antisense compositions were selected based upon their relative inability to form dimers, hairpins, or other secondary structures that would reduce or prohibit specific binding to the target mRNA in a host cell.

30 Highly preferred target regions of the mRNA, are those which are at or near the AUG translation initiation codon, and those sequences which are substantially

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

complementary to 5' regions of the mRNA. These secondary structure analyses and target site selection considerations can be performed, for example, using v.4 of the OLIGO primer analysis software and/or the BLASTN 2.0.5 algorithm software (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402).

5 The use of an antisense delivery method employing a short peptide vector, termed MPG (27 residues), is also contemplated. The MPG peptide contains a hydrophobic domain derived from the fusion sequence of HIV gp41 and a hydrophilic domain from the nuclear localization sequence of SV40 T-antigen (Morris et al., Nucleic Acids Res. 1997 Jul 15;25(14):2730-6). It has been
10 demonstrated that several molecules of the MPG peptide coat the antisense oligonucleotides and can be delivered into cultured mammalian cells in less than 1 hour with relatively high efficiency (90%). Further, the interaction with MPG strongly increases both the stability of the oligonucleotide to nuclease and the ability to cross the plasma membrane.

15 According to another embodiment of the invention, the polynucleotide compositions described herein are used in the design and preparation of ribozyme molecules for inhibiting expression of the tumor polypeptides and proteins of the present invention in tumor cells. Ribozymes are RNA-protein complexes that cleave nucleic acids in a site-specific fashion. Ribozymes have specific catalytic domains
20 that possess endonuclease activity (Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(24):8788-92; Forster and Symons, Cell. 1987 Apr 24;49(2):211-20). For example, a large number of ribozymes accelerate phosphoester transfer reactions with a high degree of specificity, often cleaving only one of several phosphoesters in an oligonucleotide substrate (Cech et al., Cell. 1981 Dec;27(3 Pt 2):487-96; Michel
25 and Westhof, J Mol Biol. 1990 Dec 5;216(3):585-610; Reinhold-Hurek and Shub, Nature. 1992 May 14;357(6374):173-6). This specificity has been attributed to the requirement that the substrate bind via specific base-pairing interactions to the internal guide sequence ("IGS") of the ribozyme prior to chemical reaction.

 Six basic varieties of naturally-occurring enzymatic RNAs are known
30 presently. Each can catalyze the hydrolysis of RNA phosphodiester bonds in trans (and thus can cleave other RNA molecules) under physiological conditions. In

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

general, enzymatic nucleic acids act by first binding to a target RNA. Such binding occurs through the target binding portion of a enzymatic nucleic acid which is held in close proximity to an enzymatic portion of the molecule that acts to cleave the target RNA. Thus, the enzymatic nucleic acid first recognizes and then binds a
5 target RNA through complementary base-pairing, and once bound to the correct site, acts enzymatically to cut the target RNA. Strategic cleavage of such a target RNA will destroy its ability to direct synthesis of an encoded protein. After an enzymatic nucleic acid has bound and cleaved its RNA target, it is released from that RNA to search for another target and can repeatedly bind and cleave new
10 targets.

The enzymatic nature of a ribozyme is advantageous over many technologies, such as antisense technology (where a nucleic acid molecule simply binds to a nucleic acid target to block its translation) since the concentration of ribozyme necessary to affect a therapeutic treatment is lower than that of an
15 antisense oligonucleotide. This advantage reflects the ability of the ribozyme to act enzymatically. Thus, a single ribozyme molecule is able to cleave many molecules of target RNA. In addition, the ribozyme is a highly specific inhibitor, with the specificity of inhibition depending not only on the base pairing mechanism of binding to the target RNA, but also on the mechanism of target RNA cleavage.
20 Single mismatches, or base-substitutions, near the site of cleavage can completely eliminate catalytic activity of a ribozyme. Similar mismatches in antisense molecules do not prevent their action (Woolf et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 15;89(16):7305-9). Thus, the specificity of action of a ribozyme is greater than that of an antisense oligonucleotide binding the same RNA site.

25 The enzymatic nucleic acid molecule may be formed in a hammerhead, hairpin, a hepatitis δ virus, group I intron or RNaseP RNA (in association with an RNA guide sequence) or Neurospora VS RNA motif. Examples of hammerhead motifs are described by Rossi et al. Nucleic Acids Res. 1992 Sep 11;20(17):4559-65. Examples of hairpin motifs are described by Hampel et al. (Eur. Pat. Appl.
30 Publ. No. EP 0360257), Hampel and Tritz, Biochemistry 1989 Jun 13;28(12):4929-33; Hampel et al., Nucleic Acids Res. 1990 Jan 25;18(2):299-304 and U. S. Patent

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

5,631,359. An example of the hepatitis δ virus motif is described by Perrotta and Been, *Biochemistry*. 1992 Dec 1;31(47):11843-52; an example of the RNaseP motif is described by Guerrier-Takada et al., *Cell*. 1983 Dec;35(3 Pt 2):849-57; Neurospora VS RNA ribozyme motif is described by Collins (Saville and Collins, 5 *Cell*. 1990 May 18;61(4):685-96; Saville and Collins, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 1;88(19):8826-30; Collins and Olive, *Biochemistry*. 1993 Mar 23;32(11):2795-9); and an example of the Group I intron is described in (U. S. Patent 4,987,071). All that is important in an enzymatic nucleic acid molecule of this invention is that it has a specific substrate binding site which is complementary 10 to one or more of the target gene RNA regions, and that it have nucleotide sequences within or surrounding that substrate binding site which impart an RNA cleaving activity to the molecule. Thus the ribozyme constructs need not be limited to specific motifs mentioned herein.

Ribozymes may be designed as described in Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 15 93/23569 and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595, each specifically incorporated herein by reference) and synthesized to be tested in vitro and in vivo, as described. Such ribozymes can also be optimized for delivery. While specific examples are provided, those in the art will recognize that equivalent RNA targets in other species can be utilized when necessary.

20 Ribozyme activity can be optimized by altering the length of the ribozyme binding arms, or chemically synthesizing ribozymes with modifications that prevent their degradation by serum ribonucleases (see e.g., Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 92/07065; Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/15187; Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 91/03162; Eur. Pat. Appl. Publ. No. 92110298.4; U. S. Patent 5,334,711; and Int. 25 Pat. Appl. Publ. No. WO 94/13688, which describe various chemical modifications that can be made to the sugar moieties of enzymatic RNA molecules), modifications which enhance their efficacy in cells, and removal of stem II bases to shorten RNA synthesis times and reduce chemical requirements.

Sullivan et al. (Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595) describes the 30 general methods for delivery of enzymatic RNA molecules. Ribozymes may be administered to cells by a variety of methods known to those familiar to the art,

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

including, but not restricted to, encapsulation in liposomes, by iontophoresis, or by incorporation into other vehicles, such as hydrogels, cyclodextrins, biodegradable nanocapsules, and bioadhesive microspheres. For some indications, ribozymes may be directly delivered ex vivo to cells or tissues with or without the aforementioned
5 vehicles. Alternatively, the RNA/vehicle combination may be locally delivered by direct inhalation, by direct injection or by use of a catheter, infusion pump or stent. Other routes of delivery include, but are not limited to, intravascular, intramuscular, subcutaneous or joint injection, aerosol inhalation, oral (tablet or pill form), topical, systemic, ocular, intraperitoneal and/or intrathecal delivery. More detailed
10 descriptions of ribozyme delivery and administration are provided in Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94/02595 and Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93/23569, each specifically incorporated herein by reference.

Another means of accumulating high concentrations of a ribozyme(s) within cells is to incorporate the ribozyme-encoding sequences into a DNA expression
15 vector. Transcription of the ribozyme sequences are driven from a promoter for eukaryotic RNA polymerase I (pol I), RNA polymerase II (pol II), or RNA polymerase III (pol III). Transcripts from pol II or pol III promoters will be expressed at high levels in all cells; the levels of a given pol II promoter in a given cell type will depend on the nature of the gene regulatory sequences (enhancers,
20 silencers, etc.) present nearby. Prokaryotic RNA polymerase promoters may also be used, providing that the prokaryotic RNA polymerase enzyme is expressed in the appropriate cells. Ribozymes expressed from such promoters have been shown to function in mammalian cells. Such transcription units can be incorporated into a variety of vectors for introduction into mammalian cells, including but not restricted
25 to, plasmid DNA vectors, viral DNA vectors (such as adenovirus or adeno-associated vectors), or viral RNA vectors (such as retroviral, semliki forest virus, sindbis virus vectors).

In another embodiment of the invention, peptide nucleic acids (PNAs) compositions are provided. PNA is a DNA mimic in which the nucleobases are
30 attached to a pseudopeptide backbone (Good and Nielsen, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997 7(4) 431-37). PNA is able to be utilized in a number methods that

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

traditionally have used RNA or DNA. Often PNA sequences perform better in techniques than the corresponding RNA or DNA sequences and have utilities that are not inherent to RNA or DNA. A review of PNA including methods of making, characteristics of, and methods of using, is provided by Corey (*Trends Biotechnol* 5 1997 Jun;15(6):224-9). As such, in certain embodiments, one may prepare PNA sequences that are complementary to one or more portions of the ACE mRNA sequence, and such PNA compositions may be used to regulate, alter, decrease, or reduce the translation of ACE-specific mRNA, and thereby alter the level of ACE activity in a host cell to which such PNA compositions have been administered.

10 PNAs have 2-aminoethyl-glycine linkages replacing the normal phosphodiester backbone of DNA (Nielsen et al., *Science* 1991 Dec 6;254(5037):1497-500; Hanvey et al., *Science*. 1992 Nov 27;258(5087):1481-5; Hyrup and Nielsen, *Bioorg Med Chem*. 1996 Jan;4(1):5-23). This chemistry has three important consequences: firstly, in contrast to DNA or phosphorothioate 15 oligonucleotides, PNAs are neutral molecules; secondly, PNAs are achiral, which avoids the need to develop a stereoselective synthesis; and thirdly, PNA synthesis uses standard Boc or Fmoc protocols for solid-phase peptide synthesis, although other methods, including a modified Merrifield method, have been used.

PNA monomers or ready-made oligomers are commercially available from 20 PerSeptive Biosystems (Framingham, MA). PNA syntheses by either Boc or Fmoc protocols are straightforward using manual or automated protocols (Norton et al., *Bioorg Med Chem*. 1995 Apr;3(4):437-45). The manual protocol lends itself to the production of chemically modified PNAs or the simultaneous synthesis of families of closely related PNAs.

25 As with peptide synthesis, the success of a particular PNA synthesis will depend on the properties of the chosen sequence. For example, while in theory PNAs can incorporate any combination of nucleotide bases, the presence of adjacent purines can lead to deletions of one or more residues in the product. In expectation of this difficulty, it is suggested that, in producing PNAs with adjacent purines, one 30 should repeat the coupling of residues likely to be added inefficiently. This should be followed by the purification of PNAs by reverse-phase high-pressure liquid

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

chromatography, providing yields and purity of product similar to those observed during the synthesis of peptides.

Modifications of PNAs for a given application may be accomplished by coupling amino acids during solid-phase synthesis or by attaching compounds that contain a carboxylic acid group to the exposed N-terminal amine. Alternatively, PNAs can be modified after synthesis by coupling to an introduced lysine or cysteine. The ease with which PNAs can be modified facilitates optimization for better solubility or for specific functional requirements. Once synthesized, the identity of PNAs and their derivatives can be confirmed by mass spectrometry.

Several studies have made and utilized modifications of PNAs (for example, Norton et al., *Bioorg Med Chem.* 1995 Apr;3(4):437-45; Petersen et al., *J Pept Sci.* 1995 May-Jun;1(3):175-83; Orum et al., *Biotechniques.* 1995 Sep;19(3):472-80; Footer et al., *Biochemistry.* 1996 Aug 20;35(33):10673-9; Griffith et al., *Nucleic Acids Res.* 1995 Aug 11;23(15):3003-8; Pardridge et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5592-6; Boffa et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 14;92(6):1901-5; Gambacorti-Passerini et al., *Blood.* 1996 Aug 15;88(4):1411-7; Armitage et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Nov 11;94(23):12320-5; Seeger et al., *Biotechniques.* 1997 Sep;23(3):512-7). U.S. Patent No. 5,700,922 discusses PNA-DNA-PNA chimeric molecules and their uses in diagnostics, modulating protein in organisms, and treatment of conditions susceptible to therapeutics.

Methods of characterizing the antisense binding properties of PNAs are discussed in Rose (*Anal Chem.* 1993 Dec 15;65(24):3545-9) and Jensen et al. (*Biochemistry.* 1997 Apr 22;36(16):5072-7). Rose uses capillary gel electrophoresis to determine binding of PNAs to their complementary oligonucleotide, measuring the relative binding kinetics and stoichiometry. Similar types of measurements were made by Jensen et al. using BLAcore[™] technology.

Other applications of PNAs that have been described and will be apparent to the skilled artisan include use in DNA strand invasion, antisense inhibition, mutational analysis, enhancers of transcription, nucleic acid purification, isolation of transcriptionally active genes, blocking of transcription factor binding, genome cleavage, biosensors, in situ hybridization, and the like.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

POLYNUCLEOTIDE CHARACTERIZATION AND EXPRESSION

Polynucleotides compositions of the present invention may be prepared and/or manipulated using any of a variety of well established techniques (see
5 generally, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989, and other like references).

In other embodiments of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode polypeptides of the invention, or fusion proteins or functional equivalents thereof, may be used in recombinant DNA molecules to direct
10 expression of a polypeptide in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences that encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence may be produced and these sequences may be used to clone and express a given polypeptide.

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous in
15 some instances to produce polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce a recombinant RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the
20 naturally occurring sequence.

Moreover, the polynucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter polypeptide encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the gene product. For
25 example, DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. In addition, site-directed mutagenesis may be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, or introduce mutations, and so forth.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, to screen peptide libraries for inhibitors of polypeptide activity, it may be useful to encode a chimeric protein that can be recognized by a commercially available antibody. A fusion protein may also be engineered to contain a cleavage site located between the polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the polypeptide may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

Sequences encoding a desired polypeptide may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers, M. H. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, Horn, T. et al. (1980) *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232). Alternatively, the protein itself may be produced using chemical methods to synthesize the amino acid sequence of a polypeptide, or a portion thereof. For example, peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (Roberge, J. Y. et al. (1995) *Science* 269:202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

A newly synthesized peptide may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton, T. (1983) *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y.) or other comparable techniques available in the art. The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure). Additionally, the amino acid sequence of a polypeptide, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

In order to express a desired polypeptide, the nucleotide sequences encoding the polypeptide, or functional equivalents, may be inserted into appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

containing sequences encoding a polypeptide of interest and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook, J. et al. 5 (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., and Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express polynucleotide sequences. These include, but are not limited to, 10 microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial 15 expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems.

The "control elements" or "regulatory sequences" present in an expression vector are those non-translated regions of the vector--enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions--which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements may vary in their strength and 20 specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, may be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the PBLUESCRIPT phagemid (Stratagene, La Jolla, Calif.) or PSPORT1 plasmid (Gibco BRL, Gaithersburg, 25 MD) and the like may be used. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are generally preferred. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of the sequence encoding a polypeptide, vectors based on SV40 or EBV may be advantageously used with an appropriate selectable marker.

30 In bacterial systems, any of a number of expression vectors may be selected depending upon the use intended for the expressed polypeptide. For example, when

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

large quantities are needed, for example for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified may be used. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene), in which the sequence encoding the polypeptide of interest may be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of .beta.-galactosidase so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509); and the like. pGEX Vectors (Promega, Madison, Wis.) may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems may be designed to include heparin, thrombin, or factor XA protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH may be used. For reviews, see Ausubel et al. (supra) and Grant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544.

In cases where plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding polypeptides may be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV may be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311. Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used (Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (see, for example, Hobbs, S. or Murry, L. E. in McGraw Hill

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

An insect system may also be used to express a polypeptide of interest. For example, in one such system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The sequences encoding the polypeptide may be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of the polypeptide-encoding sequence will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses may then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which the polypeptide of interest may be expressed (Engelhard, E. K. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :3224-3227).

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems are generally available. For example, in cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding a polypeptide of interest may be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain a viable virus which is capable of expressing the polypeptide in infected host cells (Logan, J. and Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659). In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells.

Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding a polypeptide of interest. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding the polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a portion thereof, is inserted, exogenous translational control signals including the ATG initiation codon should be provided. Furthermore, the initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used, such as those described in the literature (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162).

In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the protein may also be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells such as CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38, which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities, may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is generally preferred. For example, cell lines which stably express a polynucleotide of interest may be transformed using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, I. et al. (1990) *Cell* 22:817-23) genes which can be employed in tk.sup.- or aprt.sup.- cells, respectively. Also, antimetabolite,

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

antibiotic or herbicide resistance can be used as the basis for selection; for example, dhfr which confers resistance to methotrexate (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); npt, which confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin, F. et al (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14); and
 5 als or pat, which confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murry, *supra*). Additional selectable genes have been described, for example, trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or hisD, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman, S. C. and R. C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51).
 10 The use of visible markers has gained popularity with such markers as anthocyanins, beta-glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, being widely used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes, C. A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-
 15 131).

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding a polypeptide is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing sequences can be identified
 20 by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a polypeptide-encoding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the tandem gene as well.

Alternatively, host cells that contain and express a desired polynucleotide
 25 sequence may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include, for example, membrane, solution, or chip based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein.

30 Host cells transformed with a polynucleotide sequence of interest may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides of the invention may be designed to contain signal sequences which

5 direct secretion of the encoded polypeptide through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may be used to join sequences encoding a polypeptide of interest to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as

10 histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAG extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, Calif.) between the

15 purification domain and the encoded polypeptide may be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a polypeptide of interest and a nucleic acid encoding 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification on IMIAC (immobilized metal ion affinity chromatography) as

20 described in Porath, J. et al. (1992, *Prot. Exp. Purif.* 3:263-281) while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the desired polypeptide from the fusion protein. A discussion of vectors which contain fusion proteins is provided in Kroll, D. J. et al. (1993; *DNA Cell Biol.* 12:441-453).

In addition to recombinant production methods, polypeptides of the

25 invention, and fragments thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield J. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Protein synthesis may be performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Alternatively, various fragments may be

30 chemically synthesized separately and combined using chemical methods to produce the full length molecule.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

T CELLS COMPOSITIONS

The present invention, in another aspect, provides T cells specific for a tumor polypeptide disclosed herein, or for a variant or derivative thereof. Such cells may generally be prepared *in vitro* or *ex vivo*, using standard procedures. For example, T cells may be isolated from bone marrow, peripheral blood, or a fraction of bone marrow or peripheral blood of a patient, using a commercially available cell separation system, such as the Isolex™ System, available from Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; see also U.S. Patent No. 5,240,856; U.S. Patent No. 5,215,926; WO 89/06280; WO 91/16116 and WO 92/07243). Alternatively, T cells may be derived from related or unrelated humans, non-human mammals, cell lines or cultures.

T cells may be stimulated with a polypeptide, polynucleotide encoding a polypeptide and/or an antigen presenting cell (APC) that expresses such a polypeptide. Such stimulation is performed under conditions and for a time sufficient to permit the generation of T cells that are specific for the polypeptide of interest. Preferably, a tumor polypeptide or polynucleotide of the invention is present within a delivery vehicle, such as a microsphere, to facilitate the generation of specific T cells.

T cells are considered to be specific for a polypeptide of the present invention if the T cells specifically proliferate, secrete cytokines or kill target cells coated with the polypeptide or expressing a gene encoding the polypeptide. T cell specificity may be evaluated using any of a variety of standard techniques. For example, within a chromium release assay or proliferation assay, a stimulation index of more than two fold increase in lysis and/or proliferation, compared to negative controls, indicates T cell specificity. Such assays may be performed, for example, as described in Chen et al., *Cancer Res.* 54:1065-1070, 1994. Alternatively, detection of the proliferation of T cells may be accomplished by a variety of known techniques. For example, T cell proliferation can be detected by measuring an increased rate of DNA synthesis (e.g., by pulse-labeling cultures of T cells with tritiated thymidine and measuring the amount of tritiated thymidine incorporated into DNA). Contact with a tumor polypeptide (100 ng/ml - 100 µg/ml, preferably 200 ng/ml - 25 µg/ml) for 3 - 7 days will typically result in at least a two fold increase in proliferation of the T cells. Contact as described above for 2-3 hours should result in activation of the T cells, as

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

measured using standard cytokine assays in which a two fold increase in the level of cytokine release (*e.g.*, TNF or IFN- γ) is indicative of T cell activation (*see* Coligan et al., Current Protocols in Immunology, vol. 1, Wiley Interscience (Greene 1998)). T cells that have been activated in response to a tumor polypeptide, polynucleotide or polypeptide-expressing APC may be CD4⁺ and/or CD8⁺. Tumor polypeptide-specific T cells may be expanded using standard techniques. Within preferred embodiments, the T cells are derived from a patient, a related donor or an unrelated donor, and are administered to the patient following stimulation and expansion.

For therapeutic purposes, CD4⁺ or CD8⁺ T cells that proliferate in response to a tumor polypeptide, polynucleotide or APC can be expanded in number either *in vitro* or *in vivo*. Proliferation of such T cells *in vitro* may be accomplished in a variety of ways. For example, the T cells can be re-exposed to a tumor polypeptide, or a short peptide corresponding to an immunogenic portion of such a polypeptide, with or without the addition of T cell growth factors, such as interleukin-2, and/or stimulator cells that synthesize a tumor polypeptide. Alternatively, one or more T cells that proliferate in the presence of the tumor polypeptide can be expanded in number by cloning. Methods for cloning cells are well known in the art, and include limiting dilution.

20 PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

In additional embodiments, the present invention concerns formulation of one or more of the polynucleotide, polypeptide or T-cell disclosed herein in pharmaceutically-acceptable solutions for administration to a cell or an animal, either alone, or in combination with one or more other modalities of therapy. In particular, the present invention concerns, the use of *cripto* polynucleotides, polypeptides, fragments, fusions and variants in a pharmaceutical composition for the treatment of tumours. In particular it is preferred that the *Cripto* is *Cripto 1*.

It will be understood that, if desired, a composition as disclosed herein may be administered in combination with other agents as well, such as, *e.g.*, other proteins or polypeptides or various pharmaceutically-active agents. In fact, there is virtually no limit to other components that may also be included, given that the

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

additional agents do not cause a significant adverse effect upon contact with the target cells or host tissues. The compositions may thus be delivered along with various other agents as required in the particular instance. Such compositions may be purified from host cells or other biological sources, or alternatively may be chemically synthesized as described herein. Likewise, such compositions may further comprise substituted or derivatized RNA or DNA compositions.

Therefore, in another aspect of the present invention, pharmaceutical compositions are provided comprising one or more of the polynucleotide, polypeptide and/or T-cell compositions described herein in combination with a physiologically acceptable carrier. In certain preferred embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention comprise immunogenic polynucleotide and/or polypeptide compositions of the invention for use in prophylactic and therapeutic vaccine applications. Vaccine preparation is generally described in, for example, M.F. Powell and M.J. Newman, eds., "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)," Plenum Press (NY, 1995). Generally, such compositions will comprise one or more polynucleotide and/or polypeptide compositions of the present invention in combination with one or more immunostimulants.

It will be apparent that any of the pharmaceutical compositions described herein can contain pharmaceutically acceptable salts of the polynucleotides and polypeptides of the invention. Such salts can be prepared, for example, from pharmaceutically acceptable non-toxic bases, including organic bases (e.g., salts of primary, secondary and tertiary amines and basic amino acids) and inorganic bases (e.g., sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium and magnesium salts).

In another embodiment, illustrative immunogenic compositions, e.g., vaccine compositions, of the present invention comprise DNA encoding one or more of the polypeptides as described above, such that the polypeptide is generated *in situ*. As noted above, the polynucleotide may be administered within any of a variety of delivery systems known to those of ordinary skill in the art. Indeed, numerous gene delivery techniques are well known in the art, such as those described by Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198, 1998, and references cited therein. Appropriate polynucleotide expression systems will, of course, contain the

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

necessary regulatory DNA regulatory sequences for expression in a patient (such as a suitable promoter and terminating signal). Alternatively, bacterial delivery systems may involve the administration of a bacterium (such as *Bacillus-Calmette-Guérin*) that expresses an immunogenic portion of the polypeptide on its cell surface or secretes such an epitope.

Therefore, in certain embodiments, polynucleotides encoding immunogenic polypeptides described herein are introduced into suitable mammalian host cells for expression using any of a number of known viral-based systems. In one illustrative embodiment, retroviruses provide a convenient and effective platform for gene delivery systems. A selected nucleotide sequence encoding a polypeptide of the present invention can be inserted into a vector and packaged in retroviral particles using techniques known in the art. The recombinant virus can then be isolated and delivered to a subject. A number of illustrative retroviral systems have been described (e.g., U.S. Pat. No. 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

In addition, a number of illustrative adenovirus-based systems have also been described. Unlike retroviruses which integrate into the host genome, adenoviruses persist extrachromosomally thus minimizing the risks associated with insertional mutagenesis (Haj-Ahmad and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; and Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476).

Various adeno-associated virus (AAV) vector systems have also been developed for polynucleotide delivery. AAV vectors can be readily constructed using techniques well known in the art. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,173,414 and 5,139,941; International Publication Nos. WO 92/01070 and WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current*

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Opinion in Biotechnology 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169; and Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875.

5 Additional viral vectors useful for delivering the nucleic acid molecules encoding polypeptides of the present invention by gene transfer include those derived from the pox family of viruses, such as vaccinia virus and avian poxvirus. By way of example, vaccinia virus recombinants expressing the novel molecules can be constructed as follows. The DNA encoding a polypeptide is first inserted into an appropriate vector so that it is adjacent to a vaccinia promoter and flanking vaccinia DNA sequences, such as the sequence encoding thymidine kinase (TK). This vector is then used to transfect cells which are simultaneously infected with vaccinia. Homologous recombination serves to insert the vaccinia promoter plus the gene encoding the polypeptide of interest into the viral genome. The resulting TK.sup.(-) recombina-

10

15

recombinant can be selected by culturing the cells in the presence of 5-bromodeoxyuridine and picking viral plaques resistant thereto.

A vaccinia-based infection/transfection system can be conveniently used to provide for inducible, transient expression or coexpression of one or more polypeptides described herein in host cells of an organism. In this particular system, cells are first infected in vitro with a vaccinia virus recombinant that encodes the bacteriophage T7 RNA polymerase. This polymerase displays exquisite specificity in that it only transcribes templates bearing T7 promoters. Following infection, cells are transfected with the polynucleotide or polynucleotides of interest, driven by a T7 promoter. The polymerase expressed in the cytoplasm from the vaccinia virus recombinant transcribes the transfected DNA into RNA which is then translated into polypeptide by the host translational machinery. The method provides for high level, transient, cytoplasmic production of large quantities of RNA and its translation products. See, e.g., Elroy-Stein and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126.

20

25

Alternatively, avipoxviruses, such as the fowlpox and canarypox viruses, can also be used to deliver the coding sequences of interest. Recombinant avipox

30

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

viruses, expressing immunogens from mammalian pathogens, are known to confer protective immunity when administered to non-avian species. The use of an Avipox vector is particularly desirable in human and other mammalian species since members of the Avipox genus can only productively replicate in susceptible avian species and therefore are not infective in mammalian cells. Methods for producing recombinant Avipoxviruses are known in the art and employ genetic recombination, as described above with respect to the production of vaccinia viruses. See, e.g., WO 91/12882; WO 89/03429; and WO 92/03545.

Any of a number of alphavirus vectors can also be used for delivery of polynucleotide compositions of the present invention, such as those vectors described in U.S. Patent Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 and 6,015,694. Certain vectors based on Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) can also be used, illustrative examples of which can be found in U.S. Patent Nos. 5,505,947 and 5,643,576.

Moreover, molecular conjugate vectors, such as the adenovirus chimeric vectors described in Michael et al. J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 and Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103, can also be used for gene delivery under the invention.

Additional illustrative information on these and other known viral-based delivery systems can be found, for example, in Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:317-321, 1989; Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103, 1989; Flexner et al., *Vaccine* 8:17-21, 1990; U.S. Patent Nos. 4,603,112, 4,769,330, and 5,017,487; WO 89/01973; U.S. Patent No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner, *Biotechniques* 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434, 1991; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11498-11502, 1993; Guzman et al., *Circulation* 88:2838-2848, 1993; and Guzman et al., *Cir. Res.* 73:1202-1207, 1993.

In another embodiment of the invention, a polynucleotide is administered/delivered as "naked" DNA, for example as described in Ulmer et al., *Science* 259:1745-1749, 1993 and reviewed by Cohen, *Science* 259:1691-1692,

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

1993. The uptake of naked DNA may be increased by coating the DNA onto biodegradable beads, which are efficiently transported into the cells.

In still another embodiment, a composition of the present invention can be delivered via a particle bombardment approach, many of which have been described. In one illustrative example, gas-driven particle acceleration can be achieved with devices such as those manufactured by Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) and Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), some examples of which are described in U.S. Patent Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; and EP Patent No. 0500 799. This approach offers a needle-free delivery approach wherein a dry powder formulation of microscopic particles, such as polynucleotide or polypeptide particles, are accelerated to high speed within a helium gas jet generated by a hand held device, propelling the particles into a target tissue of interest. The particles, when delivering nucleic acid are preferably gold beads of a 0.4 – 4.0 μm , more preferably 0.6 – 2.0 μm diameter and the DNA conjugate coated onto these and then encased in a cartridge for placing into the “gene gun”. The particles are typically and preferably delivered to the skin. Other means of delivery to the skin, comprise utilising needle delivery via a needle of a liquid formulation.

DNA vaccines usually consist of a bacterial plasmid vector into which is inserted a strong, normally viral, promoter, the gene of interest which encodes for an antigenic peptide and a polyadenylation/transcriptional termination sequences. Thus gene of interest may encode a full cripto protein as described or simply an antigenic peptide sequence such as described in seq ID no 13 -94. The plasmid can be grown in bacteria, such as for example E.coli and then isolated and prepared in an appropriate medium, depending upon the intended route of administration, before being administered to the host. Following administration the plasmid is taken up by cells of the host where the encoded peptide is produced. The plasmid vector will preferably be made without an origin of replication which is functional in eukaryotic cells, in order to prevent plasmid replication in the mammalian host and integration within chromosomal DNA of the animal concerned.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

There are a number of advantages of DNA vaccination relative to traditional vaccination techniques. First, it is predicted that because of the proteins which are encoded by the DNA sequence are synthesised in the host, the structure or conformation of the protein will be similar to the native protein associated with the disease state. It is also likely that DNA vaccination will offer protection against different strains of a virus, by generating cytotoxic T lymphocyte response that recognise epitopes from conserved proteins. Furthermore, because the plasmids are taken up by the host cells where antigenic protein can be produced, a long-lasting immune response will be elicited. The technology also offers the possibility of combining diverse immunogens/epitopes into a single preparation.

Helpful background information in relation to DNA vaccination is provided in Donnelly et al "DNA vaccines" Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648, the disclosure of which is included herein in its entirety by way of reference.

In a related embodiment, other devices and methods that may be useful for gas-driven needle-less injection of compositions of the present invention include those provided by Bioject, Inc. (Portland, OR), some examples of which are described in U.S. Patent Nos. 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 and 5,993,412.

According to another embodiment, the pharmaceutical compositions described herein will comprise one or more immunostimulants in addition to the immunogenic polynucleotide, polypeptide, T-cell and/or APC compositions of this invention. An immunostimulant refers to essentially any substance that enhances or potentiates an immune response (antibody and/or cell-mediated) to an exogenous antigen. One preferred type of immunostimulant comprises an adjuvant. Many adjuvants contain a substance designed to protect the antigen from rapid catabolism, such as aluminum hydroxide or mineral oil, and a stimulator of immune responses, such as lipid A, *Bordetella pertussis* or *Mycobacterium tuberculosis* derived proteins. Certain adjuvants are commercially available as, for example, Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); aluminum salts such as aluminum hydroxide gel

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

(alum) or aluminum phosphate; salts of calcium, iron or zinc; an insoluble suspension of acylated tyrosine; acylated sugars; cationically or anionically derivatized polysaccharides; polyphosphazenes; biodegradable microspheres; monophosphoryl lipid A and quil A. Cytokines, such as GM-CSF, interleukin-2, -5, -7, -12, and other like growth factors, may also be used as adjuvants.

Within certain embodiments of the invention, the adjuvant composition is preferably one that induces an immune response predominantly of the Th1 type. High levels of Th1-type cytokines (*e.g.*, IFN- γ , TNF α , IL-2 and IL-12) tend to favor the induction of cell mediated immune responses to an administered antigen. In contrast, high levels of Th2-type cytokines (*e.g.*, IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10) tend to favor the induction of humoral immune responses. Following application of a vaccine as provided herein, a patient will support an immune response that includes Th1- and Th2-type responses. Within a preferred embodiment, in which a response is predominantly Th1-type, the level of Th1-type cytokines will increase to a greater extent than the level of Th2-type cytokines. The levels of these cytokines may be readily assessed using standard assays. For a review of the families of cytokines, see Mosmann and Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Certain preferred adjuvants for eliciting a predominantly Th1-type response include, for example, a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acetylated monophosphoryl lipid A, together with an aluminum salt. MPL² adjuvants are available from Corixa Corporation (Seattle, WA; *see*, for example, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 and 4,912,094). CpG-containing oligonucleotides (in which the CpG dinucleotide is unmethylated) also induce a predominantly Th1 response. Such oligonucleotides are well known and are described, for example, in WO 96/02555, WO 99/33488 and U.S. Patent Nos. 6,008,200 and 5,856,462. Immunostimulatory DNA sequences are also described, for example, by Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Another preferred adjuvant comprises a saponin, such as Quil A, or derivatives thereof, including QS21 and QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; or *Gypsophila* or *Chenopodium quinoa* saponins. Other preferred formulations include more than one saponin in the adjuvant combinations of the present invention, for

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

example combinations of at least two of the following group comprising QS21, QS7, Quil A, β -escin, or digitonin.

Alternatively the saponin formulations may be combined with vaccine vehicles composed of chitosan or other polycationic polymers, polylactide and poly(lactide-co-glycolide) particles, poly-N-acetyl glucosamine-based polymer matrix, particles composed of polysaccharides or chemically modified polysaccharides, liposomes and lipid-based particles, particles composed of glycerol monoesters, etc. The saponins may also be formulated in the presence of cholesterol to form particulate structures such as liposomes or ISCOMs. Furthermore, the saponins may be formulated together with a polyoxyethylene ether or ester, in either a non-particulate solution or suspension, or in a particulate structure such as a paucilamellar liposome or ISCOM. The saponins may also be formulated with excipients such as Carbopol[®] to increase viscosity, or may be formulated in a dry powder form with a powder excipient such as lactose.

In one preferred embodiment, the adjuvant system includes the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative, such as the combination of QS21 and 3D-MPL[®] adjuvant, as described in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol, as described in WO 96/33739. Other preferred formulations comprise an oil-in-water emulsion and tocopherol. Another particularly preferred adjuvant formulation employing QS21, 3D-MPL[®] adjuvant and tocopherol in an oil-in-water emulsion is described in WO 95/17210.

Another enhanced adjuvant system involves the combination of a CpG-containing oligonucleotide and a saponin derivative particularly the combination of CpG and QS21 as disclosed in WO 00/09159. Preferably the formulation additionally comprises an oil in water emulsion and tocopherol.

Additional illustrative adjuvants for use in the pharmaceutical compositions of the invention include Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), the SBAS series of adjuvants (*e.g.*, SBAS-2 or SBAS-4, available from SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Enhanzyn[®]) (Corixa, Hamilton, MT), RC-529

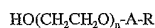
WO 02/16413

PCT/EP01/09646

(Corixa, Hamilton, MT) and other aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs), such as those described in pending U.S. Patent Application Serial Nos. 08/853,826 and 09/074,720, the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entireties, and polyoxyethylene ether adjuvants such as those described in WO 99/52549A1.

Other preferred adjuvants include adjuvant molecules of the general formula

(I):



Wherein, n is 1-50, A is a bond or $-\text{C}(\text{O})-$, R is C_{1-50} alkyl or Phenyl C_{1-50} alkyl.

One embodiment of the present invention consists of a vaccine formulation comprising a polyoxyethylene ether of general formula (I), wherein n is between 1 and 50, preferably 4-24, most preferably 9; the R component is C_{1-50} , preferably C_4 - C_{20} alkyl and most preferably C_{12} alkyl, and A is a bond. The concentration of the polyoxyethylene ethers should be in the range 0.1-20%, preferably from 0.1-10%, and most preferably in the range 0.1-1%. Preferred polyoxyethylene ethers are selected from the following group: polyoxyethylene-9-lauryl ether, polyoxyethylene-9-stearyl ether, polyoxyethylene-8-stearyl ether, polyoxyethylene-4-lauryl ether, polyoxyethylene-35-lauryl ether, and polyoxyethylene-23-lauryl ether. Polyoxyethylene ethers such as polyoxyethylene lauryl ether are described in the Merck index (12th edition: entry 7717). These adjuvant molecules are described in WO 99/52549.

The polyoxyethylene ether according to the general formula (I) above may, if desired, be combined with another adjuvant. For example, a preferred adjuvant combination is preferably with CpG as described in the pending UK patent application GB 9820956.2.

According to another embodiment of this invention, an immunogenic composition described herein is delivered to a host via antigen presenting cells (APCs), such as dendritic cells, macrophages, B cells, monocytes and other cells that may be engineered to be efficient APCs. Such cells may, but need not, be genetically modified to increase the capacity for presenting the antigen, to improve

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

activation and/or maintenance of the T cell response, to have anti-tumor effects *per se* and/or to be immunologically compatible with the receiver (*i.e.*, matched HLA haplotype). APCs may generally be isolated from any of a variety of biological fluids and organs, including tumor and peritumoral tissues, and may be autologous, 5 allogeneic, syngeneic or xenogeneic cells.

Certain preferred embodiments of the present invention use dendritic cells or progenitors thereof as antigen-presenting cells. Dendritic cells are highly potent APCs (Banchereau and Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998) and have been shown to be effective as a physiological adjuvant for eliciting prophylactic or therapeutic 10 antitumor immunity (*see* Timmerman and Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). In general, dendritic cells may be identified based on their typical shape (stellate *in situ*, with marked cytoplasmic processes (dendrites) visible *in vitro*), their ability to take up, process and present antigens with high efficiency and their ability to activate naïve T cell responses. Dendritic cells may, of course, be engineered to 15 express specific cell-surface receptors or ligands that are not commonly found on dendritic cells *in vivo* or *ex vivo*, and such modified dendritic cells are contemplated by the present invention. As an alternative to dendritic cells, secreted vesicles antigen-loaded dendritic cells (called exosomes) may be used within a vaccine (*see* Zitvogel et al., *Nature Med.* 4:594-600, 1998).

20 Dendritic cells and progenitors may be obtained from peripheral blood, bone marrow, tumor-infiltrating cells, peritumoral tissues-infiltrating cells, lymph nodes, spleen, skin, umbilical cord blood or any other suitable tissue or fluid. For example, dendritic cells may be differentiated *ex vivo* by adding a combination of cytokines such as GM-CSF, IL-4, IL-13 and/or TNF α to cultures of monocytes 25 harvested from peripheral blood. Alternatively, CD34 positive cells harvested from peripheral blood, umbilical cord blood or bone marrow may be differentiated into dendritic cells by adding to the culture medium combinations of GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 ligand, LPS, flt3 ligand and/or other compound(s) that induce differentiation, maturation and proliferation of dendritic cells.

30 Dendritic cells are conveniently categorized as "immature" and "mature" cells, which allows a simple way to discriminate between two well characterized

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

phenotypes. However, this nomenclature should not be construed to exclude all possible intermediate stages of differentiation. Immature dendritic cells are characterized as APC with a high capacity for antigen uptake and processing, which correlates with the high expression of Fcγ receptor and mannose receptor. The mature phenotype is typically characterized by a lower expression of these markers, but a high expression of cell surface molecules responsible for T cell activation such as class I and class II MHC, adhesion molecules (*e.g.*, CD54 and CD11) and costimulatory molecules (*e.g.*, CD40, CD80, CD86 and 4-1BB).

APCs may generally be transfected with a polynucleotide of the invention (or portion or other variant thereof) such that the encoded polypeptide, or an immunogenic portion thereof, is expressed on the cell surface. Such transfection may take place *ex vivo*, and a pharmaceutical composition comprising such transfected cells may then be used for therapeutic purposes, as described herein. Alternatively, a gene delivery vehicle that targets a dendritic or other antigen presenting cell may be administered to a patient, resulting in transfection that occurs *in vivo*. *In vivo* and *ex vivo* transfection of dendritic cells, for example, may generally be performed using any methods known in the art, such as those described in WO 97/24447, or the gene gun approach described by Mahvi et al., *Immunology and cell Biology* 75:456-460, 1997. Antigen loading of dendritic cells may be achieved by incubating dendritic cells or progenitor cells with the tumor polypeptide, DNA (naked or within a plasmid vector) or RNA; or with antigen-expressing recombinant bacterium or viruses (*e.g.*, vaccinia, fowlpox, adenovirus or lentivirus vectors). Prior to loading, the polypeptide may be covalently conjugated to an immunological partner that provides T cell help (*e.g.*, a carrier molecule). Alternatively, a dendritic cell may be pulsed with a non-conjugated immunological partner, separately or in the presence of the polypeptide.

While any suitable carrier known to those of ordinary skill in the art may be employed in the pharmaceutical compositions of this invention, the type of carrier will typically vary depending on the mode of administration. Compositions of the present invention may be formulated for any appropriate manner of administration,

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

including for example, topical, oral, nasal, mucosal, intravenous, intracranial, intraperitoneal, subcutaneous and intramuscular administration.

Carriers for use within such pharmaceutical compositions are biocompatible, and may also be biodegradable. In certain embodiments, the formulation preferably provides a relatively constant level of active component release. In other embodiments, however, a more rapid rate of release immediately upon administration may be desired. The formulation of such compositions is well within the level of ordinary skill in the art using known techniques. Illustrative carriers useful in this regard include microparticles of poly(lactide-co-glycolide), polyacrylate, latex, starch, cellulose, dextran and the like. Other illustrative delayed-release carriers include supramolecular biovectors, which comprise a non-liquid hydrophilic core (*e.g.*, a cross-linked polysaccharide or oligosaccharide) and, optionally, an external layer comprising an amphiphilic compound, such as a phospholipid (*see e.g.*, U.S. Patent No. 5,151,254 and PCT applications WO 94/20078, WO/94/23701 and WO 96/06638). The amount of active compound contained within a sustained release formulation depends upon the site of implantation, the rate and expected duration of release and the nature of the condition to be treated or prevented.

In another illustrative embodiment, biodegradable microspheres (*e.g.*, polylactate polyglycolate) are employed as carriers for the compositions of this invention. Suitable biodegradable microspheres are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,897,268; 5,075,109; 5,928,647; 5,811,128; 5,820,883; 5,853,763; 5,814,344, 5,407,609 and 5,942,252. Modified hepatitis B core protein carrier systems, such as described in WO/99 40934, and references cited therein, will also be useful for many applications. Another illustrative carrier/delivery system employs a carrier comprising particulate-protein complexes, such as those described in U.S. Patent No. 5,928,647, which are capable of inducing a class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses in a host.

The pharmaceutical compositions of the invention will often further comprise one or more buffers (*e.g.*, neutral buffered saline or phosphate buffered saline), carbohydrates (*e.g.*, glucose, mannose, sucrose or dextrans), mannitol, proteins,

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

polypeptides or amino acids such as glycine, antioxidants, bacteriostats, chelating agents such as EDTA or glutathione, adjuvants (*e.g.*, aluminum hydroxide), solutes that render the formulation isotonic, hypotonic or weakly hypertonic with the blood of a recipient, suspending agents, thickening agents and/or preservatives.

5 Alternatively, compositions of the present invention may be formulated as a lyophilizate.

The pharmaceutical compositions described herein may be presented in unit-dose or multi-dose containers, such as sealed ampoules or vials. Such containers are typically sealed in such a way to preserve the sterility and stability of the
10 formulation until use. In general, formulations may be stored as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles. Alternatively, a pharmaceutical composition may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier immediately prior to use.

The development of suitable dosing and treatment regimens for using the
15 particular compositions described herein in a variety of treatment regimens, including *e.g.*, oral, parenteral, intravenous, intranasal, and intramuscular administration and formulation, is well known in the art, some of which are briefly discussed below for general purposes of illustration.

In certain applications, the pharmaceutical compositions disclosed herein
20 may be delivered *via* oral administration to an animal. As such, these compositions may be formulated with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or they may be enclosed in hard- or soft-shell gelatin capsule, or they may be compressed into tablets, or they may be incorporated directly with the food of the diet.

25 The active compounds may even be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tables, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like (see, for example, Mathiowitz *et al.*, *Nature* 1997 Mar 27;386(6623):410-4; Hwang *et al.*, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998;15(3):243-84; U. S. Patent 5,641,515; U. S. Patent 5,580,579 and U. S.
30 Patent 5,792,451). Tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain any of a variety of additional components, for example, a binder, such as gum

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

tragacanth, acacia, cornstarch, or gelatin; excipients, such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent, such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant, such as magnesium stearate; and a sweetening agent, such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavoring agent, such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar, or both. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compounds may be incorporated into sustained-release preparation and formulations.

Typically, these formulations will contain at least about 0.1% of the active compound or more, although the percentage of the active ingredient(s) may, of course, be varied and may conveniently be between about 1 or 2% and about 60% or 70% or more of the weight or volume of the total formulation. Naturally, the amount of active compound(s) in each therapeutically useful composition may be prepared in such a way that a suitable dosage will be obtained in any given unit dose of the compound. Factors such as solubility, bioavailability, biological half-life, route of administration, product shelf life, as well as other pharmacological considerations will be contemplated by one skilled in the art of preparing such pharmaceutical formulations, and as such, a variety of dosages and treatment regimens may be desirable.

For oral administration the compositions of the present invention may alternatively be incorporated with one or more excipients in the form of a mouthwash, dentifrice, buccal tablet, oral spray, or sublingual orally-administered formulation. Alternatively, the active ingredient may be incorporated into an oral solution such as one containing sodium borate, glycerin and potassium bicarbonate, or dispersed in a dentifrice, or added in a therapeutically-effective amount to a composition that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants. Alternatively the compositions may be fashioned into a

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

tablet or solution form that may be placed under the tongue or otherwise dissolved in the mouth.

In certain circumstances it will be desirable to deliver the pharmaceutical compositions disclosed herein parenterally, intravenously, intramuscularly, or even intraperitoneally or intradermally. Such approaches are well known to the skilled artisan, some of which are further described, for example, in U. S. Patent 5,543,158; U. S. Patent 5,641,515 and U. S. Patent 5,399,363. In certain embodiments, solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts may be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions may also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations generally will contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

Illustrative pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions (for example, see U. S. Patent 5,466,468). In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (*e.g.*, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and/or vegetable oils. Proper fluidity may be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and/or by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be facilitated by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

In one embodiment, for parenteral administration in an aqueous solution, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, a sterile aqueous medium that can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage may be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. Moreover, for human administration, preparations will of course preferably meet sterility, pyrogenicity, and the general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

In another embodiment of the invention, the compositions disclosed herein may be formulated in a neutral or salt form. Illustrative pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective.

The carriers can further comprise any and all solvents, dispersion media, vehicles, coatings, diluents, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, buffers, carrier solutions, suspensions, colloids, and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions. The phrase "pharmaceutically-acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an allergic or similar untoward reaction when administered to a human.

5 In certain embodiments, the pharmaceutical compositions may be delivered by intranasal sprays, inhalation, and/or other aerosol delivery vehicles. Methods for delivering genes, nucleic acids, and peptide compositions directly to the lungs *via* nasal aerosol sprays has been described, *e.g.*, in U. S. Patent 5,756,353 and U. S. Patent 5,804,212. Likewise, the delivery of drugs using intranasal microparticle
10 resins (Takenaga *et al.*, J Controlled Release 1998 Mar 2;52(1-2):81-7) and lysophosphatidyl-glycerol compounds (U. S. Patent 5,725,871) are also well-known in the pharmaceutical arts. Likewise, illustrative transmucosal drug delivery in the form of a polytetrafluoroethylene support matrix is described in U. S. Patent 5,780,045.

15 In certain embodiments, liposomes, nanocapsules, microparticles, lipid particles, vesicles, and the like, are used for the introduction of the compositions of the present invention into suitable host cells/organisms. In particular, the compositions of the present invention may be formulated for delivery either encapsulated in a lipid particle, a liposome, a vesicle, a nanosphere, or a
20 nanoparticle or the like. Alternatively, compositions of the present invention can be bound, either covalently or non-covalently, to the surface of such carrier vehicles.

The formation and use of liposome and liposome-like preparations as potential drug carriers is generally known to those of skill in the art (see for example, Lasic, Trends Biotechnol 1998 Jul;16(7):307-21; Takakura, Nippon
25 Rinsho 1998 Mar;56(3):691-5; Chandran *et al.*, Indian J Exp Biol. 1997 Aug;35(8):801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995;12(2-3):233-61; U.S. Patent 5,567,434; U.S. Patent 5,552,157; U.S. Patent 5,565,213; U.S. Patent 5,738,868 and U.S. Patent 5,795,587, each specifically incorporated herein by reference in its entirety).

30 Liposomes have been used successfully with a number of cell types that are normally difficult to transfect by other procedures, including T cell suspensions,
- 63 -

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

primary hepatocyte cultures and PC 12 cells (Renneisen *et al.*, J Biol Chem. 1990 Sep 25;265(27):16337-42; Muller *et al.*, DNA Cell Biol. 1990 Apr;9(3):221-9). In addition, liposomes are free of the DNA length constraints that are typical of viral-based delivery systems. Liposomes have been used effectively to introduce genes, various drugs, radiotherapeutic agents, enzymes, viruses, transcription factors, allosteric effectors and the like, into a variety of cultured cell lines and animals. Furthermore, the use of liposomes does not appear to be associated with autoimmune responses or unacceptable toxicity after systemic delivery.

In certain embodiments, liposomes are formed from phospholipids that are dispersed in an aqueous medium and spontaneously form multilamellar concentric bilayer vesicles (also termed multilamellar vesicles (MLVs)).

Alternatively, in other embodiments, the invention provides for pharmaceutically-acceptable nanocapsule formulations of the compositions of the present invention. Nanocapsules can generally entrap compounds in a stable and reproducible way (see, for example, Quintanar-Guerrero *et al.*, Drug Dev Ind Pharm. 1998 Dec;24(12):1113-28). To avoid side effects due to intracellular polymeric overloading, such ultrafine particles (sized around 0.1 μm) may be designed using polymers able to be degraded *in vivo*. Such particles can be made as described, for example, by Couvreur *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988;5(1):1-20; zur Muhlen *et al.*, Eur J Pharm Biopharm. 1998 Mar;45(2):149-55; Zambaux *et al.* J Controlled Release. 1998 Jan 2;50(1-3):31-40; and U. S. Patent 5,145,684.

CANCER THERAPEUTIC METHODS

In further aspects of the present invention, the pharmaceutical compositions described herein may be used for the treatment of cancer, particularly for the immunotherapy of colon or colorectal cancer. In other embodiments the compositions can be used to treat breast, or non-small cell lung carcinoma. Typically the composition will be useful for treating patients whose cancers express cripto antigen and/or whose metastases express cripto antigen. Within such

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

methods, the pharmaceutical compositions described herein are administered to a patient, typically a warm-blooded animal, preferably a human. A patient may or may not be afflicted with cancer. Accordingly, the above pharmaceutical compositions may be used to prevent the development of a cancer or to treat a patient afflicted with a cancer. Pharmaceutical compositions and vaccines may be administered either prior to or following surgical removal of primary tumors and/or treatment such as administration of radiotherapy or conventional chemotherapeutic drugs. As discussed above, administration of the pharmaceutical compositions may be by any suitable method, including administration by intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal, anal, vaginal, topical and oral routes.

Within certain embodiments, immunotherapy may be active immunotherapy, in which treatment relies on the in vivo stimulation of the endogenous host immune system to react against tumors with the administration of immune response-modifying agents (such as polypeptides and polynucleotides as provided herein).

Within other embodiments, immunotherapy may be passive immunotherapy, in which treatment involves the delivery of agents with established tumor-immune reactivity (such as effector cells) that can directly or indirectly mediate antitumor effects and does not necessarily depend on an intact host immune system. Examples of effector cells include T cells as discussed above, T lymphocytes (such as CD8+ cytotoxic T lymphocytes and CD4+ T-helper tumor-infiltrating lymphocytes), killer cells (such as Natural Killer cells and lymphokine-activated killer cells), B cells and antigen-presenting cells (such as dendritic cells and macrophages) expressing a polypeptide provided herein. T cell receptors and antibody receptors specific for the polypeptides recited herein may be cloned, expressed and transferred into other vectors or effector cells for adoptive immunotherapy.

Effector cells may generally be obtained in sufficient quantities for adoptive immunotherapy by growth in vitro, as described herein. Culture conditions for expanding single antigen-specific effector cells to several billion in number with retention of antigen recognition in vivo are well known in the art. Such in vitro culture conditions typically use intermittent stimulation with antigen, often in the

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

presence of cytokines (such as IL-2) and non-dividing feeder cells. As noted above, immunoreactive polypeptides as provided herein may be used to rapidly expand antigen-specific T cell cultures in order to generate a sufficient number of cells for immunotherapy. In particular, antigen-presenting cells, such as dendritic, 5 macrophage, monocyte, fibroblast and/or B cells, may be pulsed with immunoreactive polypeptides or transfected with one or more polynucleotides using standard techniques well known in the art. For example, antigen-presenting cells can be transfected with a polynucleotide having a promoter appropriate for increasing expression in a recombinant virus or other expression system. Cultured 10 effector cells for use in therapy must be able to grow and distribute widely, and to survive long term in vivo. Studies have shown that cultured effector cells can be induced to grow in vivo and to survive long term in substantial numbers by repeated stimulation with antigen supplemented with IL-2 (see, for example, Cheever et al., Immunological Reviews 157:177, 1997).

15 Alternatively, a vector expressing a polypeptide recited herein may be introduced into antigen presenting cells taken from a patient and clonally propagated ex vivo for transplant back into the same patient. Transfected cells may be reintroduced into the patient using any means known in the art, preferably in sterile form by intravenous, intracavitary, intraperitoneal or intratumor administration.

20 Routes and frequency of administration of the therapeutic compositions described herein, as well as dosage, will vary from individual to individual, and may be readily established using standard techniques. In general, the pharmaceutical compositions and vaccines may be administered by injection (e.g., intracutaneous, intramuscular, intravenous, intradermally or subcutaneous), 25 intranasally (e.g., by aspiration) or orally. Preferably, between 1 and 10 doses may be administered over a 52 week period. Preferably, 6 doses are administered, at intervals of 1 month, and booster vaccinations may be given periodically thereafter. Alternate protocols may be appropriate for individual patients. A suitable dose is an amount of a compound that, when administered as described above, is capable of 30 promoting an anti-tumor immune response, and is at least 10-50% above the basal (i.e., untreated) level. Such response can be monitored by measuring the anti-tumor

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

- antibodies in a patient or by vaccine-dependent generation of cytolytic effector cells capable of killing the patient's tumor cells in vitro. Such vaccines should also be capable of causing an immune response that leads to an improved clinical outcome (e.g., more frequent remissions, complete or partial or longer disease-free survival)
- 5 in vaccinated patients as compared to non-vaccinated patients. In general, for pharmaceutical compositions and vaccines comprising one or more polypeptides, the amount of each polypeptide present in a dose ranges from about 25 μ g to 5 mg per kg of host. Suitable dose sizes will vary with the size of the patient, but will typically range from about 0.1 ml to about 5 ml.
- 10 In general, an appropriate dosage and treatment regimen provides the active compound(s) in an amount sufficient to provide therapeutic and/or prophylactic benefit. Such a response can be monitored by establishing an improved clinical outcome (e.g., more frequent remissions, complete or partial, or longer disease-free survival) in treated patients as compared to non-treated patients. Increases in
- 15 preexisting immune responses to a tumor protein generally correlate with an improved clinical outcome. Such immune responses may generally be evaluated using standard proliferation, cytotoxicity or cytokine assays, which may be performed using samples obtained from a patient before and after treatment.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

EXAMPLE 1a

EXPRESSION OF IMMUNOREACTIVE CRIPTO-1 IN HUMAN LESIONS

Tissue	Non-involved Epithelium	Premalignant Lesion		Carcinoma	
		TA	TVA		
Colon	25/193 (13)	26/65(40)	10/13 (77)	122/168 (73)**	
Stomach	1/37 (3)	IM		17/37 (46)**	
Pancreas	10/58 (17)	16/30 (53)		58/98 (59)**	
Gall Bladder	N.D.	Hyperplasias	Adenomas	89/132 (68)**	
Breast	5/33 (15)	6/9(67)	4/7(58)		
Non Small Cell Lung			DCIS	26/55 (47)	497/631 (79)**
					178/195 (91)**
Tissue	Non-involved Epithelium	Cystadenomas		Serous	Mucinous
		Serous	Mucinous		
Ovary	6/7 (86) post-menopausal	6/14(43)	0/7	4/10 (40)	4/5 (80)
					23/40 (58)
					25/48 (52)
		3/9 (33)	3/8 (38)	4/8 (50)	9/10 (90)
				Borderline: 10/10	
Endometrium	10/28 (36) post-menopausal				53/91 (58)*
				Hyperplasias	
				18/30 (60)	68/96 (71)*
Cervix	4/25 (17)				40/74 (54)*
Testis	0/3				29/51 (57)**
			Embryonal Carcinomas		Seminomas
			19/19 (100)**		10/32 (31)
Adrenal Cortex					1/3 (33)
Bladder	0/6				23/39 (60)**
Renal					0/18
Prostate					0/9

- 5 TA=Tubular adenoma
TVC=Tubulovillous adenoma
IM=Intestinal metaplasia
** Statistically significant expression in carcinomas over non-involved tissues

Examples

10

Example 1.6 : Over-expression of Crip1o in cancerous tissues.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Real-time RT-PCR (U. Gibson. 1996. Genome Research: 6,996) is used to compare mRNA transcript abundance of the target protein in a panel of normal and tumor tissues and/or cell lines. This analysis is critical to establish the tumor specificity of Cripto expression, which is an important criterion a good vaccine candidate must fulfil.

5 Total RNA is extracted from snap frozen biopsies or cell lines using TriPure reagent (Roche). Total RNA from normal tissues is also purchased from InVitrogen. Poly-A + mRNA is purified from total RNA after DNAase treatment using oligo-dT magnetic beads (Dyna). Quantification of the mRNA is performed by spectrofluorimetry
10 (VersaFluor, BioRad) using RiboGreen dye (Molecular Probes).

TaqMan primers (forward primer sequence : TGGGTAGGAAGAGGAAGCAAAT, SEQ ID NO:7; reverse primer sequence : TGCTTCTCTACCACCACCTAATCA, SEQ ID NO:8) and probe for real-time RT-PCR amplification are designed with the
15 Perkin-Elmer Primer Express software using default options for TaqMan amplification conditions.

Real-time reactions are assembled according to standard PCR protocols using 2 ng of reverse transcribed mRNA (Expand RT, Roche) for each reaction. Either SybrI or
20 TaqMan detection is undergone, depending on the evaluated sample. In case of SybrI detection, SybrI dye (Molecular Probes) is added at a final dilution of 1/75000 for real-time detection, and TaqMan probe is omitted. Amplification (40 cycles) and real-time detection is performed in a Perkin-Elmer Biosystems PE7700 system using conventional instrument settings. Ct values are calculated using the PE7700 Sequence Detector
25 Software. Ct values are obtained from each tissue sample for the target mRNA (CtX) and for the actin mRNA (CtA).

As the efficiency of PCR amplification under the prevailing experimental conditions is close to the theoretical amplification efficiency, $2^{(CtA-CtX)}$ value is an estimate of the
30 relative target transcript level of the sample, standardized with respect to Actin transcript level. A value of 1 thus suggests the candidate antigen and Actin have the same expression level.

RT-PCR analysis, using SybrI detection, was performed on a set of colon tumor and matched normal colon from 6 different patients and 48 normal tissue samples. A
35 TaqMan detection was run on a set of colon tumor and matched normal colon from 6 other patients (reactions were run in triplicates) and 48 normal tissue samples.

Tested normal tissues (and the abbreviations used in graphics) are shown below :

40 ✓ Adrenal gland (Ad_Gl)
✓ Aorta (Ao)
✓ Bladder (Bl)
✓ Bone marrow Bo_Ma
✓ Brain (Bra, Bra1, Bra2, Bra3, Bra4, Bra5)
✓ Cervix (Ce)
45 ✓ Colon (Co)
✓ Fallopian tube (Fa_Tu)

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

- ✓ Heart (He)
 - ✓ Ileum (Il)
 - ✓ Kidney (Ki)
 - ✓ Liver (Li, Li1, Li2)
 - 5 ✓ Lung (Lu)
 - ✓ Lymph node (Ly_No)
 - ✓ Esophagus (Oe)
 - ✓ Ovary (Ov)
 - ✓ Pancreas (Pa, Panc1, Panc2)
 - 10 ✓ Parathyroid (Pa_Thy)
 - ✓ Placenta (Pl)
 - ✓ Prostate (Pr)
 - ✓ Rectum (Re)
 - ✓ Skin (Sk)
 - 15 ✓ Skeletal muscle (Sk_Mu)
 - ✓ Small intestine (Sm_In)
 - ✓ Spleen (Sp)
 - ✓ Stomach (St)
 - ✓ Testis (Te)
 - 20 ✓ Thyroid (Thyr, Thy, Thy1, Thy2)
 - ✓ Thymus (Thym1,)Thym2
 - ✓ Trachea (Tr, Tra)
- Real-time RT-PCR reactions, using SybrI detection, were also performed on a set of 7 lung cell lines:
- 25 ✓ CRL-5803 (Carcinoma, Non-Small Cell Lung Cancer, large cell, neuroendocrine, metastatic site : lymph node)
 - ✓ CRL-5807 (Bronchioalveolar carcinoma, Non-Small Cell Lung Cancer)
 - ✓ CRL-5810 (Adenocarcinoma, Non-Small Cell Lung Cancer)
 - 30 ✓ CRL-5815 (Carcinoid, lung bronchus)
 - ✓ CRL-5865 (Adenocarcinoma, metastatic site : pleural effusion)
 - ✓ CRL-9609 (Normal lung, bronchus, epithelial, virus transformed)
 - ✓ HTB-177 (Carcinoma, large cell lung cancer, pleural effusion)
- and 2 colon cell lines:
- 35 ✓ CRL-2159 (Carcinoma, Cecum, Dukes' B)
 - ✓ CCL-250
- Fresh biopsy normal lung tissues (Lu(ucl), Lu(IVG)) and a lung tumor tissue (LuTum) were also performed as control.
- 40 RT-PCR results on colorectal biopsies and normal tissues are shown in Figures 1, 2, 3 and 4, and in Table 1. RT-PCR results on cell lines are shown in Figure 5.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

	Sybr detection ¹	TaqMan detection ¹
	Colorectal tumor versus adjacent normal colon²	
Number of over-expressing patients	5/6	5/6
Average over-expression fold in over-expressing patients	200	90
Median over-expression fold (minimum-maximum)	64 (22-724)	20 (4-397)
	Colorectal tumor versus average normal tissues²	
Number of over-expressing patients	5/6	4/6
Average over-expression fold in over-expressing patients	10	12
Median over-expression fold (minimum-maximum)	11 (3-22)	7 (3-32)
Normal tissues with a high transcript level ³ (normal-to-tumor ratio)	Spleen (0.5)	Spleen (0.75), ovary (2) ⁴

Table 1 : Cripto expression in colorectal tumors and normal tissues.

1. Transcript levels were calculated in colorectal tumors and a panel of normal tissues using 2 detection techniques : TaqMan and Sybr. Regarding Cripto,
 - 5 · TaqMan detection involved 6 patients and measures were done in triplicates, whereas Sybr detection was undergone on 6 different patients.
2. Transcript level in colorectal tumors was compared to both matched normal colon and average of normal tissue transcript levels.
- 10 3. A normal tissue has a high transcript level when it is higher than one fifth of colorectal tumors transcript level.
4. Ovary has not been evaluated in Cripto Sybr experiment.

Table 1, Figures 1, 2, 3 & 4 clearly show that Cripto, while being marginally expressed in normal adult tissues, is highly over-expressed in a majority of colorectal tumors, with an over-expression rate of more than ten fold. Moreover, Figure 5 indicates Cripto is dramatically over-expressed in a lung tumor cell line (CRL-5815). Cripto tumor associated antigen is therefore a suitable vaccine candidate to treat both colorectal and lung cancer patients.

Example 2 : Cloning of Cripto-1 c-DNA from lung tumor cell lines.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

- Total RNA was extracted using TriPure reagent from 10^7 cultured cells of 7 different lung cell lines (see section 1 for the complete list of cell lines). Total RNAs were pooled, and mRNA was purified from pooled total RNA on oligo-d(T) magnetic beads (Dyna). 250 ng of mRNA were used for cDNA synthesis.
- 5 Quantification of the mRNA is performed by spectrofluorimetry (VersaFluor, BioRad) using RiboGreen dye (Molecular Probes). cDNA was synthesized using the GeneRacer technology (Invitrogen) which ensures the amplification of only full-length transcripts. mRNA was treated with CIP. mRNA 5' ends were decapped with TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) and were ligated to a specific RNA
- 10 oligonucleotide. The ligated mRNA was reverse transcribed into cDNA using an oligod(T)-tailed primer. Amplification of cDNA was performed using both GeneRacer flanking primers (Advantage, Clontech). Cripto amplification was performed on 10 ng of GeneRacer cDNA using gene specific PCR primers (forward
- 15 primer sequence : CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTT, SEQ ID NO:9; and reverse primer sequence : TTGGGAGAGGGCAGGGCAAGAAGTAAGAA, SEQ ID NO:10). PCR reaction was done with Advantage II Taq DNA polymerase (Clontech) under standard conditions. PCR product was cloned in pCR4-TOPO plasmid (Invitrogen). Amplified sequence (SEQ ID NO:95) was shown to display a variation at codon 22 (SEQ ID NO:96): Ala (GCC) instead of Val (GTC) in the
- 20 native version (SeqID6). Native version was restored by PCR mutagenesis.

Example 3 : Immunogenicity of Cripto tumor-associated antigen in animal models

- 25 The immunogenicity of the antigen of the present invention can be verified by immunizing rabbits and mice using various means of immunization. Indeed, immunization with Cripto forms, either peptide or recombinant protein could induce humoral immune response with the generation of specific antibodies against Cripto and/or could induce a Cripto specific cellular immune response. In vivo delivery of
- 30 Cripto protein using for instance, naked DNA in an appropriate vector encoding Cripto or fragments of Cripto, Cripto genes delivered by a viral vector encoding Cripto or fragments of Cripto, could also be useful to demonstrate Cripto immunogenicity.

35 **3.1 : Synthetic peptide immunization.**

- The synthetic peptides from human Cripto-1 amino-acid sequence selected to immunize rabbits are GHQEFARPSRGL (13 amino acids, SEQ ID NO:11), and QEEPAIRPRSSQRVPPMG (18 amino acids, SEQ ID NO:12). Synthetic peptides are
- 40 then conjugated to a carrier protein (KLH). Conjugates are formulated with Freund's adjuvant, and two rabbits are immunized with each of the conjugates. Four weeks after the second immunization and four weeks after the third immunization, a blood sample is taken. Anti-Cripto antibody titers are estimated in the serum by ELISA and/or Western Blot following standard protocols (see section 3.5).

45 **3.2 : Nucleic acids immunization.**

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

pcDNA3.1 vector (Invitrogen) is used to construct the vaccinating plasmid. To promote secretion of the *in vivo* translated protein and to therefore induce the humoral response against the present invention antigen, nucleic acid sequence encoding Cripto-1 with its own signal peptide is inserted into the vector polycloning site. The recombinant expression plasmid is used to transform a host *E. coli* strain such as BL21.

The above recombinant strain is grown in conventional cell culture medium. Bacteria are harvested before reaching the stationary phase. Plasmid preparation using Quiagen system is undergone for injection in mice.

Six to eight weeks-old Balb/c mice receive intramuscular injections of recombinant expression plasmid. Two weeks after the last injection, a blood sample is taken. Titers of specific antibodies elicited against the present invention antigen are determined by ELISA and/or Western Blot (see section 3.5).

3.3 Viral vector immunization using Adenoviruses.

Recombinant adenoviruses are effective vectors for gene-based vaccination because they are capable of eliciting humoral and cellular immune responses against the encoded antigen. The nucleotide sequence coding for Cripto-1 protein with its own signal sequence could be inserted in an appropriated Adeno derivative viral vector. The adenoviral recombinant vector could be administrated to mice by different routes (intramuscular, intranasal, intradermal, subcutaneous or intraepitoneal). After two week, blood samples could be taken and the titer of antibodies elicited examined. Additional experiments to measure the cellular immune response could also be performed.

3.4 : Recombinant protein immunization.

3.4.1 : Expression and purification of Cripto-1 recombinant protein

Expression in microbial hosts, is used to produce the whole protein or fragments of the invention antigen for immunization purposes. Recombinant proteins may be expressed in two microbial hosts, *E. coli* and in yeast (such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Pichia pastoris*). This allows the selection of the expression system with the best features for this particular antigen production.

The expression strategy first involves the design of the primary structure of the recombinant antigen. In general, an expression fusion partner (EFP) to improve levels of expression and/or an immune fusion partner (IFP) to modulate the immunogenic properties of the antigen, are placed at the N-terminal extremity. In addition, an affinity fusion partner (AFP) useful for facilitating further purification is included at the C-terminal end.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

When the recombinant strains are available, the recombinant product is characterized by the evaluation of the level of expression and the prediction of further solubility of the engineered protein by analysis of its behavior in the crude extract.

5 After growth in appropriate culture medium and induction of the recombinant protein expression, total extracts are analyzed by SDS-PAGE. The recombinant proteins are visualized in stained gels and identified by Western blot analysis using the specific anti-peptide antibodies generated by peptide immunization in rabbit (see
10 section 3.1).

A comparative evaluation of the different versions of the expressed antigen and expression hosts will allow the selection of the most promising candidate and host that is to be used for further purification and further immunological evaluation.

15 The purification schemes follow a classical approach based on the presence of a Histidine affinity tail in the recombinant protein. In a typical experiment the disrupted cells are filtered and the acellular extracts loaded onto an Ion Metal Affinity Chromatography (IMAC; Ni+ +NTA from Qiagen) that will specifically
20 retain the recombinant protein. The retained proteins are eluted by 0-500 mM Imidazole gradient (possibly in presence of a detergent) in a phosphate buffer.

3.4.2 : Protein immunization

25 Rabbits are immunized, intramuscularly several times at several week intervals with recombinant purified protein, formulated in the adjuvant 3D-MPL/QS21. Three weeks after each immunization, blood samples are taken. Anti-Cripto antibody titer is estimated in the serum by ELISA. The specificity of the anti-Cripto antibodies
30 generated is tested by Western Blot (see section 3.5) using the purified protein and including appropriated controls.

3.5 : Immunological response assays of Cripto-immunized animals.

35 Humoral response to Cripto immunization is assessed by measuring Cripto specific antibody titers in animal sera using ELISA and Western Blot. The following material harboring Cripto-1 derived peptides or full protein could be used for such test :

- ✓ Cripto synthetic peptides (see section 3.1 for possible peptides), or
- 40 ✓ protein extracts from cultures of Cripto-expressing cell lines (see section 1 for possible cell lines), or
- ✓ lysates of COS cells that have been engineered to transiently express a Cripto recombinant plasmid (see below), or
- ✓ protein extracts of recombinant *E. coli* or yeast strains (see section 3.3.1 for
45 recombinant strain generation), or

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

- ✓ purified recombinant antigen (see section 3.3.1 for antigen purification).

5 Transient expression of Cripto in COS cells is obtained by transiently transfecting COS cells with recombinant pcDNA3.1 plasmid prepared for nucleic acid vaccination (see section 3.2).

10 For ELISA reactions, one of the above mentioned antigen is coated on microtiter plates (purified recombinant protein is preferred). ELISA is then performed using standard protocol.

15 Western Blots are realized under standard conditions with one of the above mentioned antigen (purified recombinant protein is preferred, synthetic peptides are not used)

The cellular response can also be assessed by stimulating *in vitro* vaccinated mouse spleen cells with the peptides used to immunize the mice, or with antigen-derived overlapping peptides covering the whole antigen sequence.

20 **Example 4 : Demonstration of existing Cripto specific human T-cell by *in vitro* priming**

25 Immunological relevance of Cripto-1 can be further confirmed by *in vitro* priming of human T cells. All T cell lymphocytes, T cell lines and dendritic cells are derived from PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) of healthy donors or cancer patients (preferred donors are from HLA-A2 subtype).

Epitopes binding of HLA alleles prediction:

30 The HLA Class I binding peptide sequences (nonamers, decamers) are predicted either by the Parker's algorithm [Parker K, et al. 1994] (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/), and the Rammensee method [Rammensee, et al. 1997] [Rammensee, et al. 1995] (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm>).

35 The HLA Class II binding peptide sequences (nonamers) are predicted using the Tepitope algorithm [Sturniolo, et al. 1999].

CD8+ T-cell response:

40 Two strategies to raise the CD8+ T cell lines are used: a peptide-based approach and a whole gene-based approach. Both approaches require the full-length cDNA of interest in the correct reading frame to be cloned in an appropriate delivery system and to be used to predict the sequence of the HLA binding peptides.

Peptide-based approach:

45 For this approach, an HLA-A2.1/Kb transgenic mouse model is used for screening of the HLA-A2.1 peptides. Briefly, transgenic mice are immunized with adjuvanted

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

HLA-A2 peptides, those able to induce a CD8 response (as defined by an efficient lysis or g-IFN production on peptide-pulsed target cells) are further analyzed in the human system.

- 5 Human dendritic cells (cultured according to [Romani et al.]) will be pulsed with the selected peptides and used to stimulate CD8+-sorted T cells (by FACS). After several weekly stimulation, the CD8+ lines are first tested on peptide-pulsed autologous BLCL (EBV-B transformed cell lines). To verify the proper in vivo processing of the peptide, the CD8+ lines are then tested on cDNA-transfected tumor cells (HLA-A2 transfected LuCaP, Skov3 or CAMA tumor cells).

- 10 Whole gene-based approach :

CD8+ T cell lines are primed and stimulated with either gene-gun transfected dendritic cells, retrovirally transduced B7.1-transfected fibroblasts, recombinant pox virus [Kim et al.] or adenovirus [Butterfield et al.] infected dendritic cells. Virus

- 15 infected cells are very efficient to present antigenic peptides since the antigen is expressed at high level but can only be used once to avoid the over-growth of viral T cells lines.

- 20 After alternated stimulation, the CD8+ lines are tested on cDNA-transfected tumor cells as indicated above. Peptide specificity and identity is determined to confirm the immunological validation of antigen of the present invention.

CD4+ T-cell response:

- 25 Similarly, the CD4+ T-cell immune response can also be assessed. Generation of specific CD4+ T cells is made using dendritic cells loaded with recombinant purified protein or peptides to stimulate the T-cells.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Results :

A- Prediction of Class I epitopes using the Parker method.

5 A-1 Cripto-1 and -3 Class I epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
A68	Decamer	12	SVIWMATISK	240.000	SEQ ID NO:13
A68	Decamer	117	SVFHDTWLPK	120.000	SEQ ID NO:14
B2705	Nonamer	33	HQEFARPSR	100.000	SEQ ID NO:15
B2705	Nonamer	59	IRPRSSQRV	600.000	SEQ ID NO:16
B2705	Nonamer	72	IQHSKELNR	100.000	SEQ ID NO:17
B2705	Nonamer	103	GRNCEHDVR	1000.000	SEQ ID NO:18
B2705	Nonamer	110	VRKENCGSV	600.000	SEQ ID NO:19
B2705	Nonamer	138	LRCFPPQAF	2000.000	SEQ ID NO:20
B2705	Nonamer	161	SRTPELPFS	200.000	SEQ ID NO:21
B2705	Decamer	65	QRVFPNGIQH	200.000	SEQ ID NO:22
B2705	Decamer	79	NRTCCINGGT	200.000	SEQ ID NO:23
B2705	Decamer	103	GRNCEHDVRK	2000.000	SEQ ID NO:23
B2705	Decamer	136	GQLRCFPQAF	100.000	SEQ ID NO:24
B2705	Decamer	161	SRTPELPFSA	200.000	SEQ ID NO:24
B5101	Decamer	143	QAFLPGCDGL	110.000	SEQ ID NO:25
B5102	Decamer	143	QAFLPGCDGL	302.500	SEQ ID NO:25
B5102	Decamer	150	DGLVMDEHLV	120.000	SEQ ID NO:26
B60	Nonamer	23	FELGLVAGL	325.000	SEQ ID NO:27
B60	Nonamer	76	KELNRTCCL	320.000	SEQ ID

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

					NO:28
B62	Nonamer	137	QLRCFPQAF	240.000	SEQ ID NO:29
B62	Decamer	136	GQLRCFPQAF	160.000	SEQ ID NO:24
B7	Nonamer	169	SARTTTFML	120.000	SEQ ID NO:30

A-2 Crypto-1 specific class I epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
A0201	Nonamer	5	KMARFSYSV	668.086	SEQ ID NO:31
A0201	Decamer	16	IMAIKVFEL	349.885	SEQ ID NO:32
A0201	Decamer	13	VIWIMAIKSV	310.361	SEQ ID NO:33
A0201	Decamer	175	FMLVGICLSI	128.242	SEQ ID NO:34
B2702	Nonamer	7	ARFSYSVIW	500.000	SEQ ID NO:35
B2702	Nonamer	3	CRKMARFSY	200.000	SEQ ID NO:36
B2702	Decamer	7	ARFSYSVIWI	300.000	SEQ ID NO:37
B2702	Decamer	37	ARPSRGYLA	200.000	SEQ ID NO:38
B2705	Nonamer	7	ARFSYSVIN	1000.000	SEQ ID NO:35
B2705	Nonamer	3	CRKMARFSY	1000.000	SEQ ID NO:36
B2705	Nonamer	170	ARTTTFMLV	600.000	SEQ ID NO:39
B2705	Nonamer	37	ARPSRGYLA	200.000	SEQ ID NO:40
B2705	Decamer	7	ARFSYSVIWI	3000.000	SEQ ID NO:37
B2705	Decamer	37	ARPSRGYLA	1000.000	SEQ ID NO:38
B2705	Decamer	3	CRKMARFSYS	200.000	SEQ ID NO:41
B4403	Decamer	34	QEFARPSRGY	120.000	SEQ ID NO:42

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

B5101	Nonamer	6	MARFSYSVI	286.000	SEQ ID NO:43
B5101	Decamer	169	SARTTTFMLV	110.000	SEQ ID NO:44
B5102	Nonamer	17	MAISKVFEL	150.000	SEQ ID NO:45
B5102	Nonamer	6	MARFSYSVI	100.000	SEQ ID NO:43
B5103	Nonamer	6	MARFSYSVI	100.000	SEQ ID NO:43
B5103	Decamer	169	SARTTTFMLV	121.000	SEQ ID NO:44
B7	Nonamer	36	FARPSRGYL	180.000	SEQ ID NO:46

A-3 Crypto-3 specific class I epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
A0201	Nonamer	5	KMVRFSYSV	668.086	SEQ ID NO:47
A0201	Nonamer	89	CMLESFCAC	103.417	SEQ ID NO:48
A0201	Decamer	16	IMAIKAFEL	152.124	SEQ ID NO:49
A0201	Decamer	175	FMLAGICLSI	128.242	SEQ ID NO:50
B2702	Nonamer	7	VRFSYSVIW	500.000	SEQ ID NO:51
B2702	Nonamer	3	CRKMVRFSY	200.000	SEQ ID NO:52
B2702	Decamer	7	VRFSYSVIWI	300.000	SEQ ID NO:53
B2702	Decamer	37	ARPSRGDLAF	200.000	SEQ ID NO:54
B2705	Nonamer	3	CRKMVRFSY	1000.000	SEQ ID NO:52
B2705	Nonamer	7	VRFSYSVIW	1000.000	SEQ ID NO:51
B2705	Nonamer	37	ARPSRGDLA	200.000	SEQ ID NO:55
B2705	Nonamer	170	ARTTTFMLA	200.000	SEQ ID NO:56

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

B2705	Decamer	7	VRFSYSVIWI	3000.000	SEQ ID NO:53
B2705	Decamer	37	ARPSRGDLAF	1000.000	SEQ ID NO:54
B2705	Decamer	59	IRPRSSQRVL	600.000	SEQ ID NO:57
B2705	Decamer	3	CRKMVRFSYS	200.000	SEQ ID NO:58
B2705	Decamer	65	QRVLPMTIQH	200.000	SEQ ID NO:59
B5101	Nonamer	60	RPRSSQRVL	120.000	SEQ ID NO:60
B5102	Nonamer	17	MAISKAFEL	150.000	SEQ ID NO:61
B7	Nonamer	60	RPRSSQRVL	800.000	SEQ ID NO:60
B7	Nonamer	36	FARPSRGDL	180.000	SEQ ID NO:62

NB : Score is an estimate of half-time of disassociation of a molecule containing this subsequence.

5 B- Prediction of Class I epitopes using the Rammensee method.

B-1 Cripto-1 and -3 Class I epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
A26	Nonamer	179	GICLSIQSY	27	SEQ ID NO:63
A26	Decamer	27	LVAGLGHQE F	25	SEQ ID NO:64
A26	Decamer	121	DTWLPKKCSL	25	SEQ ID NO:65
A3	Nonamer	58	AIRPRSSQR	29	SEQ ID NO:66
A3	Nonamer	13	VIWIMAIK	24	SEQ ID NO:67
A3	Decamer	12	SVIWIMAIK	29	SEQ ID NO:13
A3	Decamer	117	SVPHDTWLP K	24	SEQ ID NO:14
B2705	Nonamer	103	GRNCEHDVR	25	SEQ ID NO:18
B2705	Nonamer	138	LRCFPQAFI	24	SEQ ID

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

					NO:20
--	--	--	--	--	-------

B-2 Cripto-1 specific class I epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
A0201	Nonamer	83	CLNGGTCML	27	SEQ ID NO:68
A0201	Nonamer	5	KMARFSYSV	25	SEQ ID NO:31
A0201	Decamer	16	IMAIKVFEL	28	SEQ ID NO:32
A0201	Decamer	13	VIWIMAIKSV	26	SEQ ID NO:33
A26	Nonamer	35	EFARPSRGY	24	SEQ ID NO:69
A3	Nonamer	66	RVPPMGIQH	27	SEQ ID NO:70
A3	Nonamer	21	KVFELGLVA	24	SEQ ID NO:71
B08	Nonamer	17	MAISKVFEL	26	SEQ ID NO:45
B5101	Nonamer	6	MARFSYSVI	25	SEQ ID NO:43

5 B-3 Cripto-3 specific class I epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
A0201	Nonamer	83	CLNGGTCML	27	SEQ ID NO:68
A0201	Nonamer	176	MLAGICLSI	25	SEQ ID NO:72
A0201	Decamer	16	IMAIKAFEL	24	SEQ ID NO:49
A3	Nonamer	66	RVLPNGIQH	29	SEQ ID NO:73
B0702	Nonamer	60	RFRSSQRVL	24	SEQ ID NO:60
B08	Nonamer	17	MAISKAFEL	25	SEQ ID NO:61

C- Prediction of Class II epitopes using the Tepitope method.

10

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

C-1 Crypto-1 and -3 Class II epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
DRB1*0102	Nonamer	70	MGIQHSKEL	1.8	SEQ ID NO:74
DRB1*0301	Nonamer	152	LVMDEHLVA	5.9	SEQ ID NO:75
DRB1*0301	Nonamer	158	LVASRTPEL	4.3	SEQ ID NO:76
DRB1*0401	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.2	SEQ ID NO:75
DRB1*0402	Nonamer	59	IRPRSSQRV	4.9	SEQ ID NO:16
DRB1*0703	Nonamer	11	YSVIWIMAI	6	SEQ ID NO:77
DRB1*0703	Nonamer	158	LVASRTPEL	5.7	SEQ ID NO:76
DRB1*0802	Nonamer	59	IRPRSSQRV	1.8	SEQ ID NO:16
DRB1*0802	Nonamer	123	WLPKKCSLC	2.3	SEQ ID NO:78
DRB1*0804	Nonamer	59	IRPRSSQRV	2.8	SEQ ID NO:16
DRB1*0806	Nonamer	59	IRPRSSQRV	3.1	SEQ ID NO:16
DRB1*1101	Nonamer	11	YSVIWIMAI	2.8	SEQ ID NO:77
DRB1*1101	Nonamer	152	LVMDEHLVA	2.2	SEQ ID NO:75
DRB1*1102	Nonamer	152	LVMDEHLVA	2.4	SEQ ID NO:75
DRB1*1104	Nonamer	25	LGLVAGLGH	2.8	SEQ ID NO:79
DRB1*1104	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.2	SEQ ID NO:75
DRB1*1106	Nonamer	25	LGLVAGLGH	2.8	SEQ ID NO:79
DRB1*1106	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.2	SEQ ID NO:75
DRB1*1107	Nonamer	46	FRDDSIWPQ	2.8	SEQ ID NO:80
DRB1*1107	Nonamer	152	LVMDEHLVA	5.9	SEQ ID NO:75
DRB1*1107	Nonamer	158	LVASRTPEL	3.3	SEQ ID

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

					NO:76
DRB1*1305	Nonamer	11	YSVIWIMAI	3.7	SEQ ID NO:77
DRB1*1307	Nonamer	11	YSVIWIMAI	1.2	SEQ ID NO:77
DRB1*1501	Nonamer	138	LRCFPQAFI	4.3	SEQ ID NO:20
DRB1*1501	Nonamer	152	LVMDEHLVA	4.5	SEQ ID NO:75
DRB1*1502	Nonamer	152	LVMDEHLVA	3.5	SEQ ID NO:75
DRB5*0101	Nonamer	13	VIWIMAIK	5.3	SEQ ID NO:67

C-2 Crypto-1 specific class II epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
DRB1*0101	Nonamer	15	WIMAIKVF	1.3	SEQ ID NO:81
DRB1*0102	Nonamer	176	MLVGICLSI	1.8	SEQ ID NO:82
DRB1*0102	Nonamer	178	VGICLSIQS	1.7	SEQ ID NO:83
DRB1*0301	Nonamer	17	MAISKVFEL	3.9	SEQ ID NO:45
DRB1*0401	Nonamer	178	VGICLSIQS	2.8	SEQ ID NO:83
DRB1*0402	Nonamer	178	VGICLSIQS	4.2	SEQ ID NO:83
DRB1*0404	Nonamer	14	IWIMAIKVF	2.9	SEQ ID NO:84
DRB1*0404	Nonamer	177	LVGICLSIQ	3.3	SEQ ID NO:85
DRB1*0404	Nonamer	178	VGICLSIQS	3.8	SEQ ID NO:83
DRB1*0405	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.2	SEQ ID NO:86
DRB1*0405	Nonamer	177	LVGICLSIQ	3.1	SEQ ID NO:85
DRB1*0405	Nonamer	178	VGICLSIQS	2.8	SEQ ID NO:83
DRB1*0703	Nonamer	15	WIMAIKVF	5.7	SEQ ID

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

					NO:81
DRB1*0703	Nonamer	17	MAISKVFEL	7.6	SEQ ID NO:45
DRB1*0703	Nonamer	176	MLVGICLSI	5	SEQ ID NO:82
DRB1*0801	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.8	SEQ ID NO:86
DRB1*0802	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.8	SEQ ID NO:86
DRB1*0804	Nonamer	175	FMLVGICLS	2.8	SEQ ID NO:86
DRB1*1101	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1101	Nonamer	178	VGICLSIQS	2.4	SEQ ID NO:83
DRB1*1104	Nonamer	175	FMLVGICLS	2.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1104	Nonamer	177	LVGICLSIQ	2.6	SEQ ID NO:85
DRB1*1104	Nonamer	178	VGICLSIQS	3.4	SEQ ID NO:83
DRB1*1106	Nonamer	175	FMLVGICLS	2.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1106	Nonamer	177	LVGICLSIQ	2.6	SEQ ID NO:85
DRB1*1106	Nonamer	178	VGICLSIQS	3.4	SEQ ID NO:83
DRB1*1107	Nonamer	17	MAISKVFEL	2.9	SEQ ID NO:45
DRB1*1107	Nonamer	177	LVGICLSIQ	3.6	SEQ ID NO:85
DRB1*1107	Nonamer	178	VGICLSIQS	3	SEQ ID NO:83
DRB1*1302	Nonamer	15	WIMAIKVF	3.3	SEQ ID NO:81
DRB1*1302	Nonamer	175	FMLVGICLS	3	SEQ ID NO:86
DRB1*1305	Nonamer	15	WIMAIKVF	3.1	SEQ ID NO:81
DRB1*1305	Nonamer	175	FMLVGICLS	4.3	SEQ ID NO:86
DRB1*1307	Nonamer	175	FMLVGICLS	3.9	SEQ ID NO:86
DRB1*1307	Nonamer	177	LVGICLSIQ	1.6	SEQ ID

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

DRB1*1501	Nonamer	6	MARFSYSVI	4.5	NO:85 SEQ ID NO:43
DRB1*1501	Nonamer	176	MLVGICLSI	4.1	SEQ ID NO:82
DRB1*1502	Nonamer	6	MARFSYSVI	3.5	SEQ ID NO:43
DRB5*0101	Nonamer	15	WIMAIKVF	4.1	SEQ ID NO:81

C-2 Crypto-3 specific class II epitopes.

HLA allele	Epitope size	Start position	Sequence	Score	SEQ ID NO:
DRB1*0101	Nonamer	15	WIMAIKAF	1.3	SEQ ID NO:87
DRB1*0102	Nonamer	6	MVRFSYSVI	1.4	SEQ ID NO:88
DRB1*0102	Nonamer	17	MAISKAFEL	1.6	SEQ ID NO:61
DRB1*0401	Nonamer	7	VRFSYSVIW	2.9	SEQ ID NO:51
DRB1*0401	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.7	SEQ ID NO:89
DRB1*0402	Nonamer	67	VLPMTIQHS	3.6	SEQ ID NO:90
DRB1*0404	Nonamer	6	MVRFSYSVI	2.5	SEQ ID NO:88
DRB1*0404	Nonamer	14	IWIMAIKKA	3.6	SEQ ID NO:91
DRB1*0404	Nonamer	67	VLPMTIQHS	3.5	SEQ ID NO:90
DRB1*0405	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.7	SEQ ID NO:89
DRB1*0703	Nonamer	7	VRFSYSVIW	6.5	SEQ ID NO:51
DRB1*0703	Nonamer	15	WIMAIKAF	5.7	SEQ ID NO:87
DRB1*0703	Nonamer	17	MAISKAFEL	7.5	SEQ ID NO:61
DRB1*0801	Nonamer	16	IMAIKAFK	3	SEQ ID NO:92
DRB1*0801	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

DRB1*0802	Nonamer	67	VLPMTIQHS	1.9	SEQ ID NO:90
DRB1*0802	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89
DRB1*0804	Nonamer	67	VLPMTIQHS	2.9	SEQ ID NO:90
DRB1*0804	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.5	SEQ ID NO:89
DRB1*0806	Nonamer	16	IMATSKAFE	4	SEQ ID NO:92
DRB1*1101	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89
DRB1*1102	Nonamer	67	VLPMTIQHS	3.1	SEQ ID NO:90
DRB1*1102	Nonamer	175	FMLAGICLS	2.5	SEQ ID NO:89
DRB1*1107	Nonamer	7	VRFSYSVIW	2.8	SEQ ID NO:51
DRB1*1301	Nonamer	67	VLPMTIQHS	3.5	SEQ ID NO:90
DRB1*1302	Nonamer	15	WIMATSKAF	3.3	SEQ ID NO:87
DRB1*1302	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.9	SEQ ID NO:89
DRB1*1305	Nonamer	15	WIMATSKAF	3.1	SEQ ID NO:87
DRB1*1305	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.9	SEQ ID NO:89
DRB1*1307	Nonamer	67	VLPMTIQHS	1.5	SEQ ID NO:90
DRB1*1307	Nonamer	175	FMLAGICLS	3.5	SEQ ID NO:89
DRB1*1501	Nonamer	6	MVRFSYSVI	6.6	SEQ ID NO:88
DRB1*1502	Nonamer	6	MVRFSYSVI	5.6	SEQ ID NO:88
DRB5*0101	Nonamer	15	WIMATSKAF	4.1	SEQ ID NO:87

Example 5 : anti-tumor potential of the humoral response induced by Cripto vaccines

5

A series of experiments aimed at assessing the inhibitory effect of the Cripto-specific humoral response on the pathophysiological activities of Cripto in cancer could be

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

carried out by using various standards *in vitro* assays. The *in vitro* assays could be, but not restricted to, growth inhibition assay, cell motility inhibition assay, chemotaxis inhibition assay, inhibition of the invasion through extracellular matrix protein (ECM), and growth signal transduction pathway inhibition. The effects of the sera of immunized animals with Cripto peptides or protein in adjuvant, or with a plasmid DNA or a viral delivery system, e.g. adenoviral vector, encoding the Cripto protein could be assessed in these *in vitro* assays that gauge Cripto-mediated biological effects on Cripto-expressing cell lines. In parallel, the effect of the pre-immune sera from the same animals will be tested as negative control. The cell lines used in these assays could be, but not limited to, human tumor cells expressing Cripto such as GEO cells, NTERA2 cells, the CRL-5815 cell line, or murine tumor cell lines that naturally over-express Cripto. As example, the inhibition of the *in vitro* growth of both GEO and NTERA2 cells has previously been demonstrated by treatment with anti-sense oligonucleotides designed to prevent the translation of Cripto mRNA [Baldassarre et al., 1996; Ciardiello et al., 1994; Alper et al., 2000].

5.1 : Immunization protocol :

Mice or rabbits would be immunized on day 0, 14, and 21 by intra-footpad injections of either peptides or protein in adjuvant, intra-dermal injections of a plasmid DNA encoding Cripto using gene-gun devices, or intra-dermal injections of a viral vector delivery system, e.g. adenoviral vector, encoding Cripto.

5.2 : Cell proliferation inhibition assay :

The sera from immunized animals will be collected and added at different dilutions to the culture medium of cells plated in 96-well plates. Similarly, pre-immune sera of these animals will also be added to cells as negative control. The cells will be treated for 3 to 7 days. The cell growth will be measured by standard methods such as ³H-thymidine incorporation assay, MTT assay, crystal violet staining, or colony counting for proliferation in soft agar-medium.

5.3 : Cell Invasion, motility, and chemotaxis inhibition assays :

The sera from immunized animals will be collected pre- and post-immunization and added at different dilutions to cell suspensions used for invasion, motility, and chemotaxis standards assays. The inhibition of Cripto-mediated invasion, motility, and chemotaxis could be assessed with the use of, for instance, but limited to, commercially available Falcon chambers with matrigel inserts (Collaborative Research), agarose droplet motility assay [Yamamoto et al., 1990], and commercially available Boyden apparatus (Neuro Probe), respectively.

5.4 : Signal transduction inhibition assays:

The sera from immunized animals will be collected pre- and post-immunization and added at different dilutions to Cripto-expressing tumor cells in culture. Then, exogenous Cripto protein or human sera or milk containing the highest concentration of Cripto detected by ELISA [Bianco et al., 2001] will be added to the culture medium of the cells. After various incubation times, the cells will be harvested and

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

processed by standard methods in order to perform immunoblot analysis. The phosphorylation status of various key signal transduction pathways involved in cell proliferation will be assessed in these Cripto-simulated cells in the presence of pre- or post-immune sera. For instance, the tyrosine phosphorylation status of erb B-4 and mitogen-activated protein (MAP) kinase family such as ERK1, ERK-2, and P38 will be assessed by immunoblotting with antibodies that recognize the phosphorylated, active form of these enzymes as previous described [Bianco et al., 1999; Paine et al., 2000].

10 **Example 6: *in vivo* anti-tumor effect of the immune response induced by Cripto vaccines in animal models**

The prophylactic or therapeutic potential of vaccines containing the human Cripto protein, Cripto peptides, or Cripto gene can be evaluated in mice challenged with syngeneic murine tumor cell line that express Cripto. The tumor cell lines could be a murine tumor cell line transfected with the human Cripto gene. For instance the transfected cell lines could be the TC1 cell line transfected with human Cripto gene. On the other hand, the high level of homology between human Cripto and its murine homologue suggests that cross-reactive immune responses induced by the human vaccine can protect against mouse Cripto-expressing tumors. Indeed, Cripto gene (TDGF-1) encodes a 171-amino acid protein which has 93% identity with its human counterpart [Liguori et al., 1996]. Therefore mice could be protected by immunization with a human Cripto vaccine from murine tumor challenge or spontaneously arising tumor known to endogenously over-express the Cripto protein. With this respect, spontaneous tumors in transgenic mice designed to over-express several different oncogenes such as MMTV-Polyoma virus middle T antigen, MMTV-c-ErbB2, and MT-hTGF alpha, have been shown also to over-express Cripto [Kenney et al., 1996; Niemeyer et al., 1999].

Alternatively, in order to vaccinate with the syngeneic gene, the tumor-bearing mice could be vaccinated with a plasmid DNA or a viral delivery system, e.g. adenoviral vector, encoding the murine Cripto protein to protect from murine tumor growth.

6.1 : Prophylactic experimental design:

Mice would be vaccinated on day 0 and 14, prior tumor challenge, by either intra - footpad injections of 5µg of Cripto protein in adjuvant, intra-dermal injections of DNA plasmid encoding Cripto using gene-gun technology, or intra-dermal injections of a viral vector, e.g. adenoviral vector, encoding Cripto. Then, 10⁶ TC1-CR-1 cells, human Cripto-expressing tumor cells, could be injected subcutaneously in the flank of C57BL/6 immunocompetent mice 1 or 2 weeks post vaccination. The tumor growth should be monitored *in vivo* by measuring individual tumors twice a week for several weeks post-tumor challenge.

On the other hand, the efficacy of prophylactic vaccination could be assessed by inhibiting the development of spontaneous Cripto-expressing tumors in transgenic mice [Niemeyer et al., 1999] immunized multiple times before onset of the palpable tumor with either form of Cripto vaccines.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

6.2 : Therapeutic experimental design :

- 10⁶ TC1-CR-1 cells, human-Cripto expressing tumor cells, would be injected subcutaneously in the flank of C57BL/6 immunocompetent mice. Mice could be vaccinated on days 7 and 14, post-tumor challenge, by either intra-footpad injections of 5µg Cripto protein in adjuvant, intra-dermal injections of DNA plasmid encoding Cripto using gene-gun technology, or intra-dermal injections of a viral vector, e.g. adenoviral vector, encoding Cripto. The tumor growth should be monitored *in vivo* by measuring individual tumors twice a week. One to 4 weeks after the second immunization, several mice per group will be sacrificed to harvest spleen cells, draining lymph nodes, and sera for analysis of the immune responses to establish a correlation between the induction of a Cripto-specific immune response and the anti-tumor effect. The analysis of the Cripto-specific immune response induced by immunization could be assessed by measuring the antibody titers, antibody isotypic profile, the CD4⁺ T-cell proliferation response, and CTL CD8⁺ T-cell responses including cytokines production and lysis activity against Cripto-expressing target cells. All assays would be performed according to standards protocols.
- A similar kind of experiment could be carried out by challenging parental mice with transplantable murine mammary tumor lines over-expressing Cripto. These cells would be established from spontaneous tumor arising in various oncogene transgenic mouse strains such as MMTV-Polyoma virus middle T antigen, MMTV-c-ErbB2, and MT-hTGF alpha transgenic mice [Niemeyer et al., 1999].

References

- Alper O, De Santis ML, Stromberg K, Hacker NF, Cho-Chung YS, Salomon DS (2000) Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell-adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 88: 566-574
- Baldassarre G, Bianco C, Tortora G, Ruggiero A, Moasser M, Dmitrovsky E, Bianco AR, Ciardiello F (1996) Transfection with a CRIPTO anti-sense plasmid suppresses endogenous CRIPTO expression and inhibits transformation in a human embryonal carcinoma cell line. *Int J Cancer* 66: 538-543
- Bianco C, Kannan S, De Santis M, Seno M, Tang CK, Martinez-Lacaci I, Kim N, Wallace-Jones B, Lippman ME, Ebert AD, Wechselberger C, Salomon DS (1999) Cripto-1 indirectly stimulates the tyrosine phosphorylation of erb B-4 through a novel receptor. *J Biol Chem* 274: 8624-8629
- Bianco C, Wechselberger C, Ebert A, Khan NI, Sun Y, Salomon DS (2001) Identification of Cripto-1 in human milk. *Breast Cancer Res Treat* 66: 1-7
- Butterfield LH, Jilani SM, Chakraborty NG, Bui LA, Ribas A, Dissette VB, Lau R, Gamradt SC, Glaspy JA, McBride WH, Mukherji B, Economou JS. (1998)

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

- Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus. *J Immunol.* 161: 5607-13.
- 5 Ciardiello F, Tortora G, Bianco C, Selvam MP, Basolo F, Fontanini G, Pacifico F, Normanno N, Brandt R, Persico MG (1994) Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides. *Oncogene* 9: 291-298
- 10 Kenney NJ, Smith GH, Maroulakou IG, Green JH, Muller WJ, Callahan R, Salomon DS, Dickson RB (1996) Detection of amphiregulin and Cripto-1 in mammary tumors from transgenic mice. *Mol Carcinog* 15: 44-56
- 15 Kim CJ, Prevette T, Cormier J, Overwijk W, Roden M, Restifo NP, Rosenberg SA, Marincola FM. (1997) Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitize T lymphocytes in vitro. *J Immunother.* 20:276-286.
- 20 Liguori G, Tucci M, Montuori N, Dono R, Lago CT, Pacifico F, Armenante F, Persico MG (1996) Characterization of the mouse Tdgl gene and Tdglf pseudogenes. *Mamm Genome* 7: 344-348
- 25 Niemeyer CC, Spencer-Dene B, Wu JX, Adamson ED (1999) Preneoplastic mammary tumor markers: Cripto and Amphiregulin are overexpressed in hyperplastic stages of tumor progression in transgenic mice. *Int J Cancer* 81: 588-591
- 30 Paine E, Palmantier R, Akiyama SK, Olden K, Roberts JD (2000) Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase- activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase- dependent pathway. *J Biol Chem* 275: 11284-11290
- 35 Parker K, Bednarek M, Coligan J (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163.
- 40 Rammensee, Bachmann, Stevanovic (1997). MHC ligands and peptide motifs. *Landes Bioscience.*
- Rammensee, Friede, Stevanovic (1995). MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, *Immunogenetics* 41, 178-228.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 180:83-93.

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. (1999) Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol.* 17: 555-61.

5

Yamamoto T, Varani J, Soong HK, Lichter PR (1990) Effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on cultured rabbit subconjunctival fibroblasts. *Ophthalmology* 97: 1204-1210

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Sequence Listing

SEQ ID NO:1

5 GGAGAATCCCGGAAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGGTCAAAACGTCCAAGGCCGAA
AGCCCTCCAGTTTCCCTGGACGCCCTTGCTCCTGCTTCTGCTACGACCTTCTGGGGA
AAACGAATTTCTCATTTTCTTTAAATTGCCATTTTCGCTTAGGAGATGAATGTT
TTCCCTTTGGCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAGCGATGCTAACGCCCTCTTTC
CCCTAATTTGTTAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGCCCGCTTCTCTTACAGTGT
10 GATTTGGATCATGGCCATTTCTAAAGTCTTGAACCTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGG
CCATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTCAGAGATGACAGCAT
TTGGCCCCAGGAGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCAGCGTGTGCCGCCAT
GGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCTGAATGGGGGAACCTG
CATGCTGGGGTCCTTTTGTGCCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGACGGAACCTGTAGCA
15 CGATGTGCGCAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCATGACACCTGGCTGCCCAAGAA
GTGTTCCCTGTGTAATGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTCCCTCAGGCATTTCT
ACCCGGCTGTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGA
ACTACCACCGTCTGCACGTACTACCACCTTTTATGCTAGTTGGCATCTGCCTTTCTAT
ACAAAGCTACTATTAAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATACAATTTTAGATATCA
20 TGCAAAATTTTCATGACCAGTAAGGCTGCTGCTACATGTCCTAACTGAAAGATGATC
ATTTGTAGTTGCCTTAAATAATGAATACAATTTCCAAATGGTCTCTAACATTTCC
TTACAGAACTACTTCTTACTTCTTTGCCCTGCCCTCTCCAAAAAATCTACTTCTTTT
TTCAAAAGAAAGTCAGCCATATCTCCATTGTGCCTAAGTCCAGTGTCTTTTCTTTT
TTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCACTCTGTCAACCGGCTGGACTGCAATGACGCGAT
25 CTTGGTTCACTGCAACCTCCGCATCCGGGGTTCAAGCCATTCTCCTGCCTAAGCCTC
CCAAGTAACTGGGATTACAGGCATGTGTACCATGCCAGCTAATTTTTTGTATTT
TAGTAGAGATGGGGTTTCAACATATTGGCCAGTCTGGTCTCGAACTCTGACCTTGT
GATCCATCGATCAGCCTCTCGAGTGTGAGATTACACACGTGAGCAACTGTGCAAGG
CCTGGTGTCTTGTATACATGTAATTTACCAAGGTCTTCTTAATATGTTCTTTTAA
30 ATGATTGAATTTATATGTTTCAGATTATTGGAGACTAATTTCTAATGTGGACCTTAGAAT
ACAGTTTTGAGTAGAGTTGATCAAAATCAATTAATAATAGTCTCTTTAAAGGAAAGA
AAACATCTTTAAGGGGAGGAACAGAGTGTGTAAGGAATGGAAGTCCATCTGCGTGT
GTGCAAGGAGACTGGGTAGGAAAGAGGAAGCAATAGAAAGAGAGGTTGAAAAACA
AATGGGTACTTGTGTTGGTATAGGTGGTGTAGAGAAGCAAGTAAAGGCTAA
35 ATGGAAGGGCAAGTTTCCATCATCTATAGAAAGCTATATAAGACAAGAACTCCCTT
TTTTTCCCAAGGCATTATAAAAGAAATGAAGCCTCCTAGAAAAAAATTTATACCT
CAATGTCCCCAACAGATTGCTTAATAAATTTGTGTTTCCCTCCAGCTATTCAATTC
TTTAACTGTTGTAGAAGACAAAATGTTCAATATATTTAGTTGTAAACCAAGTGAT
CAACTACATATTGTAAAGCCATTTTAAAAATACATTGTATATATGTGTATGCACA
40 GTAAAAATGGAACTATATTGACCTAAAAA

SEQ ID NO:2

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

AAGCTTGC GCGCCATGTAAGGTAAAGTGACTGATTCTATAGCAATCCAATTGTTCCCT
 TTGTCTGCCCGTTTACATATAACAATGTTGCAATGTTTGATTGAAAATACCTAGCA
 GGGCAGACACACACCTAGCTCCTCAGGCGGAGAGACCCCTTCTTGGCCACCCG
 GGTATCCCCCAGGGAGTAGGGGCTCAAAACACCCCTTTGGAGAACAGGTGGAAGC
 5 AAATTTGAGGAAGTAAACTTCTGAAATAAAATAAAATATCGAATGCCTTGAGACC
 CATACATTTTCAGGTTTTCTAATTAAAGCAATTACTTCCACCACCCCTCCAACT
 GGAATCACCACCTTGGTTAGAGAACTGATTTTCTTTTCTTTTCTTTTCCAAA
 AGAGTACATCTGATCATTTAGCCTGCAACTAATGATAGAGATATTAGGGCTAGTTA
 ACCACAGTTTTACAAGACTCCTCTCCCGCGTGTGGGCCATTGTGATGCTGCTGGTCC
 10 CGCCACCTGAAAGGTCTCCCGCCCCGACTGGGGTTGTTGTTGAAGAAGGAGAAT
 CCCCAGAAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGGTCAAAACGTCACAGGCCGAAAGCCCTC
 CAGTTTCCCTGGACACCTTGCTCCTGCTTCTGCTACGACCTTCTGGGAACGCGAAT
 TTCTCATTTTCTTCTTAAATGCCATTTTTCGCTTTAGGAGATGAATGTTTCTTTG
 GCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAAGCGATGCTAACGCCCTTTTCCCTCAAT
 15 TGTTAAAGCTATGGACTGCAAGAAAGATGGTCCGCTTCTTTACAGTGTGATTGGA
 TCATGGCCATTTCTAAAGCCTTTGAACTGGGATTAGTTGCCGGGCTGGGCCATCAGG
 AATTTGCTCGTCCATCTCGGGGAGACCTGGCCCTCAGAGATGACAGCATTTGGCCCC
 AGGAGAGGCTGCAATTGCGCTCGGTCTTCCAGCGTGTGCTGCCCATGGGAATAC
 AGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCGTAATGGGGGAACCTGCATGCTGG
 20 AGTCCCTTTTGTGCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGACGGAACCTGTGAGCAGATGTGC
 GCAAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCCATGACACCTGGCTGCCCAAGAGTGTCCC
 TGTGTAATGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTTCTCAGGCATTCTACCCGGCT
 GTGATGGCCTTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGAATACAC
 CGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGCTGGCATCTGCCCTTCTATACAAAGCT
 25 ACTATTAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATACAATTTAGATATTATGCAAAAT
 TCATGACCCGTAAGGCTGCTGCTACAATGTCCTAACTGAAAGATGATCATTGTAG
 TTGCCTTAAATAATGAATACAATTCCAAAACGGTCTTAACATTTCTTACAGAA
 CTAACACTCTTCTTACCTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAAAAACACTCTCTTTTCA
 AAAGAAAGTCAGCCATATCTCCATTGTGCCCAAGTCCAGTGTCTTTTCTTTTCTT
 30 GAGACGGAGTCTCACTCTGTCAACCCAGGCTGGACTGCAATGACGCGATCTCGTTCA
 CTGCAACCTCCGCTATCCGGGTTCAAGCCATTCTCTGCCCTCAGCCTCCCAAGTAGC
 TGGGATTACAGGCTGTGTCAACATGCCGGCTAATTTTTTCTATTTTAGTAGAGAC
 GGGGTTTACCATATTGGCCAGCTGGTCTCGAACTCTGACCTTGTGATCCATCGCT
 CGCTCTCGAGTGTGAGATTACACAGTGAGCAACTGTGCAAGGCCTGGTGTCTCT
 35 TGATACATGTAATTCTACCAAGGTCTTCTTAATATGTTCTTTTAAATGATTGAATTA
 TACACTCAGATTATTGGAGACTAAGTCTAATGTGGACCTTAGAATACAGTTTGTAGT
 AGAGTTGATCAAAATCAATTAAATAGTCTCTTTAAAGGAAAGAAACATCTTTAA
 GGGGAGGAACCCAGAGTGTGTAAGGAATGGAAGTCCATCTGCGTGTGTGAGGGAGAC
 TGGGTAGGAAGAGGAAGCAATAGAAGAGAGGTTGAAAAACAAAATGGGTACT
 40 TGATTGGTGATTAGTGGTGGTAGAGAAGCAAGTAAAAAGGCTAAATGGAAGGGCAA
 GTTTCATCATCTATAGAAAGCTATGTAAGACAAGGACTCCCTTTTCTTCCCAAAG
 GCATTGTAAAGAAATGAAGTCTCTTAGAAAAAAATATACCTCAATGTCCCAA
 CAAGATTGCTTAATAAATTGTGTTTCTCCCAAGCTATTCAATTCTTTTAACTGTTGT
 45 AGAAGAGAAAATGTTCAATATATTTAGTTGTAAACCAAGTATCAAACTACATAT
 TGTAAGGCCCATTTTAAATACATGTATATATGTGTATGCACAGTAAAAATGGAA

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

ACTATATTGACCTAAAAAAAAAAAAAGGAAACCACCCTTAGGCAGGCAGGACATGCT
CTTCAGAACTCTGCTCTTCAGAGTTCAGAGGATGATAAACATCTTTATNNCCA
TCAAATAGC

5

SEQ ID NO:3

MDCRKMARFYSYVIMWIMAIKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEP
AIRPRSSQVRVPMGIQHSKELNRTCCLNNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGLVMDHLVASRTPELPPSAR
10 TTFMVLVIGICLSIQSY

SEQ ID NO:4

MDCRKMVRFSYVIMWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGDLAFRDDSIWPQEEP
15 AIRPRSSQVRVPMGIQHSKELNRTCCLNNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLPKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFPLPGCDGLVMDHLVASRTPELPPSAR
TTFMVLVIGICLSIQSY

SEQ ID NO:5

20 GGAGAATCCCCGGAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGGTCAAAACGTCCAAGGCCGAA
AGCCCTCCAGTTTCCCTGGACGCCTTGCTCCTGCTTCTGCTACGACCTTCTGGGGA
AAACGAATTTCTCATTTTCTCTTAAATTGCCATTTTCGCTTTAGGAGATGAATGTT
TTCTTTGGCTGTTTGGCAATGACTCTGAATTAAGCGATGCTAACGCCCTCTTTTC
25 CCCCTAATTGTTAAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGCCGCTTCTCTTACAGTGT
GATTTGATCATGGCCATTTCTAAAGTCTTTGAACCTGGGATAGTTGCCGGGCTGGG
CCATCAGGAATTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTCAGAGATGACAGCAT
TTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTGGCCTCGGTCTTCCAGCGTGTGCCGCCAT
GGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCCTGAATGGGGAACTTG
30 CATGCTGGGGTCCCTTTTGGCCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGACGGAAGTGTGAGCA
CGATGTGCGCAAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCATGACACCTGGCTGCCCAAGAA
GTGTTCCCTGTGTAATGCTGGCAGGTGAGCTCCGCTGCTTCTCAGGCATTTCT
ACCCGGCTGTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCTTCCAGGACTCCAGA
ACTACCACCGTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGCATCTGCCTTTCTAT
35 ACAAGCTACTATTAAATCGACATTGACCTATTTCCAGAAATACAATTTTAGATATCA
TGCAAAATTCATGACCAAGTAAGGCTGCTGCTACAATGTCTAACTGAAAGATGATC
ATTTGTAGTTGCCCTAAATAATGAATACAATTTCCAAATGGTCTCTAACATTTCC
TTACAGAACTACTTCTTACTTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAAAAACTACTTCTTTT
TTCAAAAGAAAGTCAGCCATATCTCCATTGTGCTTAAGTCCAGTGTTCTTTTTTTT
40 TTTTTTTTGTAGACGGAGTCTCACTCTGTACCCAGGCTGGACTGCAATGACCGGAT
CTTGGTTCACTGCAACCTCCGCATCCGGGTTCAAGCCATTTCTCTGCCTAAGCCTC
CCAAGTAACGGGATTACAGGCATGTGTACCATGCCAGCTAATTTTTTGTATTT

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

TAGTAGAGATGGGGTTTCACCATATTGGCCAGTCTGGTCTCGAACTCTGACCTTGT
GATCCATCGATCAGCCTCTCGAGTGCTGAGATTACACACGTGAGCAACTGTGCAAGG
CCTGGTGTTCCTTGATACATGTAATCTTACCAAGGTCTTCTTAATATGTCTTTTAA
ATGATTGAATTATATGTTTCAGATTATTGGAGACTAATTCATATGTGGACCTTAGAAT
5 ACAGTTTTGAAGTAGAGTTGATCAAAATCAATTAAATAGTCTCTTTAAAGGAAAGA
AAACATCTTTAAGGGGAGGAACAGAGTGCTGAAGGARTGGAAGTCCATCTGCGTGT
GTGCAGGGAGACTGGGTAGGAAAGAGGAAGCAATAGAAGAGAGAGGTTGAAAAACA
AAATGGGTACTTGATTGGTGATTAGGTGGTGGTAGAGAAGCAAGTAAAAAGGCTAA
ATGGAAGGGCAAGTTCCATCATCTATAGAAAAGCTATATAAGACAAGAACTCCCTT
10 TTTTCCCAAGGCATTATAAAAGAATGAAGCCTCCTTAGAAAAAAATTATACCT
CAATGTCCCAACAAGATTGCTTAATAAATTGTGTTTCCCTCAAGCTATTCAATTCT
TTTAACGTGTGTAGAAGACAAAATGTTCAATATATTAGTTGTAACCAAGTGAT
CAAACTACATATTGTAAGGCCATTTTAAATACATTGTATATATGTGTATGCACA
GTAAAAATGGAACATATATTGACCTAAAAA

SEQ ID NO:6

MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWQEEP
AIRPRSSQVRPFPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHVRKEN
20 CGSVPHDTWLPKKCSLCKWHGQLRCFFQAFPLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSAR
TTTFMLVGICLSIQSYY

SEQ ID NO:7

25 TGGGTAGGAAAGAGGAAGCAAT

SEQ ID NO:8

30 TGCTTCTCTACCACCACCTAATCA

SEQ ID NO:9

CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTT

35 SEQ ID NO:10

TTGGGAGAGGGCAGGGCAAAGAAGTAAGAA

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:11

GHQEFARPSRGYL

5

SEQ ID NO:12

QEEPAIRPRSSQRVPPMG

10

SEQ ID NO:13

SVIWIMAISK

SEQ ID NO:14

15 SVPHDTWLPK

SEQ ID NO:15

20 HQEFARPSR

SEQ ID NO:16

IRPRSSQRV

25

SEQ ID NO:17

IQHSKELNR

SEQ ID NO:18

30 GRNCEHDVR

SEQ ID NO:19

35 VRKENCGSV

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:20

LRCFPQAFI

5

SEQ ID NO:21

SRTPELPSP

10

SEQ ID NO:22

QRVPPMGIQH

SEQ ID NO:23

15 NRTCCINGGT

SEQ ID NO:24

20 GQLRCFPQAF

SEQ ID NO:25

QAFIPLGCDGL

25

SEQ ID NO:26

DGLVMDEHLV

SEQ ID NO:27

30

FELGLVAGL

SEQ ID NO:28

35 KELNRTCCL

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:29

QLRCFPQAF

SEQ ID NO:30

5

SARTTTFML

SEQ ID NO:31

10

KMARFSYSV

SEQ ID NO:32

15

IMAIKVFEL

SEQ ID NO:33

20

VIWIMAIKSV

SEQ ID NO:34

FMLVGICLSI

25

SEQ ID NO:35

ARFSYSVIW

SEQ ID NO:36

30

CRKMARFSY

SEQ ID NO:37

35

ARFSYSVIWI

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:38

ARPSRGYLAF

5

SEQ ID NO:39

ARTTTFMLV

10

SEQ ID NO:40

ARPSRGYLA

15

SEQ ID NO:41

CRKMARFSYS

20

SEQ ID NO:42

QEFARPSRGY

25

SEQ ID NO:43

MARFSYSVI

30

SEQ ID NO:44

SARTTTFMLV

35

SEQ ID NO:45

MAISKVFEL

SEQ ID NO:46

FARPSRGYL

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:47

KMVRFSYSV

SEQ ID NO:48

5

CMLESFCAC

SEQ ID NO:49

10

IMAIKAFEL

SEQ ID NO:50

15

FMLAGICLSI

SEQ ID NO:51

20

VRFSYSVIW

SEQ ID NO:52

CRKMVRFSY

25

SEQ ID NO:53

VRFSYSVIWI

SEQ ID NO:54

30

ARPSRGDLAF

SEQ ID NO:55

35

ARPSRGDLA

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:56

ARTTTEMLA

5

SEQ ID NO:57

IRPRSSQQRVL

10

SEQ ID NO:58

CRKMVRFSYS

SEQ ID NO:59

15 QRVLPMTIQH

SEQ ID NO:60

20 RPRSSQQRVL

SEQ ID NO:61

MAISKAFEL

25

SEQ ID NO:62

FARPSRGDL

SEQ ID NO:63

30 GICLSIQSY

SEQ ID NO:64

35 LVAGLGHQEF

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:65

DTWLPHKCSL

SEQ ID NO:66

5

AIRPRSSQR

SEQ ID NO:67

10

VIWIMAISK

SEQ ID NO:68

15

CLNGGTCML

SEQ ID NO:69

20

EFARPSRGY

SEQ ID NO:70

RVPPMGIQH

SEQ ID NO:71

25

KVFELGLVA

SEQ ID NO:72

30

MLAGICLSI

SEQ ID NO:73

35

RVLPMGIQH

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:74

MGIQHSKEL

SEQ ID NO:75

5

LVMDEHLVA

SEQ ID NO:76

10

LVASRTPEL

SEQ ID NO:77

15

YSVIWIMAI

SEQ ID NO:78

20

WLPKKCSLC

SEQ ID NO:79

LGLVAGLGH

25

SEQ ID NO:80

FRDDSIWPQ

SEQ ID NO:81

30

WIMAIKVF

SEQ ID NO:82

35

MLVGICLSI

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:83

VGICLSIQS

5

SEQ ID NO:84

IWIMAISKV

10

SEQ ID NO:85

LVGICLSIQ

SEQ ID NO:86

15 FMLVGICLS

SEQ ID NO:87

20 WIMAISKAF

SEQ ID NO:88

MVRFSYSVI

25

SEQ ID NO:89

FMLAGICLS

SEQ ID NO:90

30

VLPMGIQHS

SEQ ID NO:91

35 IWIMAISKA

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQ ID NO:92

IMAIKAFE

5

SEQ ID NO:93

GRNCEHDVRK

10

SEQ ID NO:94

SRTPELPSPA

SEQ ID NO:95

15 CGTCCAAGGCCGAAAGCCCTCCAGTTTCCCCTGGACGCCCTTGCTCCTGCTTCTGCTA
CGACCTTCTGGGGAAAACGAATTTCTCATTTTCTTCTTAAATTGCCATTTTCGCTTT
AGGAGATGAATGTTTTCTTGGCTGTTTTGGCAATGACTCTGAATTAAGCGATGC
TAACGCCTCTTTTCCCCCTAATTGTAAAAGCTATGGACTGCAGGAAGATGGCCCGC
TTCTCTTACAGTGTGATTTGGATCATGGCCATTTCTAAGCCTTTGAAGTGGGATTA
20 GTTGCCGGGCTGGGCCATCAGGAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGATACCTGGCCTTC
AGAGATGACAGCATTTGGCCCCAGGAGGAGCCTGCAATTCGGCCTCGGTCTTCCCAG
CGTGTGCCGCCCATGGGGATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACCTGCTGCCTG
AATGGGGGAACCTGCATGCTGGGGTCTTTTGTGCTGCCCTCCCTCCTTCTACGGA
CGGAATCTGTAGCACGATGTGCGCAAAGAGAACTGTGGGTCTGTGCCCCATGACACC
25 TGGCTGCCCAAGAAGTGTCCCTGTGTAAATGCTGGCACGGTCAGCTCCGCTGCTTT
CCTCAGGCATTTCTACCCGGCTGTGATGGCCTTGTGATGGATGAGCACCTCGTGGCT
TCCAGGACTCCAGAACTACCAACCTCTGCACGTACTACCACTTTTATGCTAGTTGGC
ATCTGCCTTTCTATACAAAGCTACTATTAAATCGACTTGACCTATTTCAGAAATAC
AATTTTAGATATCATGCAATTTTCATGACCAGTAAAGGCTGCTGCTACAATGTCCTA
30 ACTGAAAGATGATCATTTGTAGTTGCCTTAAATAATGAATACAATTTCCAAATGG
TCTCTAACATTTCCCTTACAGAACTACTTCTTACTTCTTTGCCCTGCCCTCTCCCAA

SEQ ID NO:96

MDCRKMARFSYSVIWIMAIKAFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEP
35 AIRPRSSQRPVPMGIQHSKELNRTCCNLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKEN
CGSVPHDTWLFKKCSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPSPAR
TTTFMLVGICLSIQSY

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Claims:

1. An isolated polynucleotide comprising a sequence selected from the group consisting of:
 - 5 (a) sequences consisting of at least 20 contiguous residues of a sequence provided in SEQ ID NO: 1 or 3, not being the entire SEQ ID NO: 1 or the entire SEQ ID NO: 3;
 - (b) sequences comprising SEQ ID NO: 1 or at least 20 contiguous residues thereof and a polynucleotide that encodes for a heterologous fusion partner;
 - 10 (c) degenerate variants of sequences in a) and b) above.
2. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - (a) sequences encoded by a polynucleotide of claim 1; and
 - 15 (b) sequences having at least 70% identity to a sequence encoded by a polynucleotide of claim 1; and
 - (c) sequences having at least 90% identity to a sequence encoded by a polynucleotide of claim 1.
3. An expression vector comprising a polynucleotide of claim 1 operably linked to an expression control sequence.
- 20 4. A host cell transformed or transfected with an expression vector according to claim 3.
5. A fusion protein comprising at least one polypeptide of SEQ ID NO:2 or 4 or fragment or variant thereof and heterologous fusion partner.
- 25 6. A method for stimulating and/or expanding T cells specific for a tumour protein, comprising contacting T cells with at least one component selected from the group consisting of:
 - (a) polypeptides according to claim 2;

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

- (b) polypeptides of SEQ ID NO:2 or 4;
 - (c) polynucleotides according to claim 1; and
 - (d) antigen-presenting cells that express a polypeptide according to claim 1,
 - 5 (e) under conditions and for a time sufficient to permit the stimulation and/or expansion of T cells.
7. An isolated T cell population, comprising T cells prepared according to the method of claim 6.
8. A composition comprising a first component selected from the group consisting
- 10 of physiologically acceptable carriers and immunostimulants and adjuvants, and a second component selected from the group consisting of:
- (a) polypeptides according to claim 2;
 - (b) polypeptide of SEQ ID NO: 2 or 4;
 - (c) polynucleotides according to claim 1;

15 (d) polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or 3;

 - (e) antibodies capable of reacting with a protein of SEQ ID NO:1;
 - (f) fusion proteins according to claim 5;
 - (g) T cell populations according to claim 7;
 - (h) antigen presenting cells that express a polypeptide according to claim

20 2; and

 - (i) antigen presenting cell that express a polypeptide of SEQ ID NO: 2 or 4.
9. A method for stimulating an immune response in a patient, comprising administering to the patient a composition of claim 8.
- 25 10. A method for the treatment of a cancer in a patient, comprising administering to the patient a composition of claim 9.

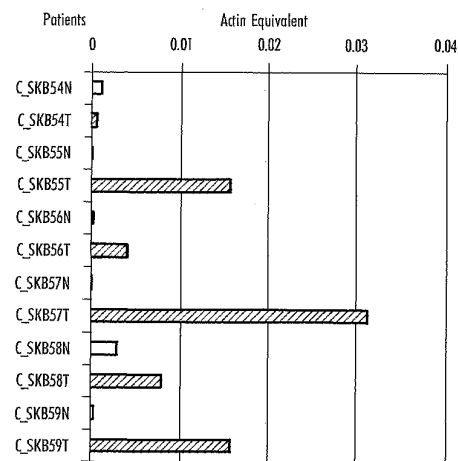
WO 02/16413

PCT/EP01/09646

11. A method for inhibiting the development of a cancer in a patient, comprising the steps of:
- (a) incubating CD4+ and/or CD8+ T cells isolated from a patient with at least one component selected from the group consisting of: (i) polypeptides according to claim 2; (ii) polynucleotides according to claim 1; and (iii) antigen presenting cells that express a polypeptide of claim 2, such that T cell proliferate; and
 - (b) administering to the patient an effective amount of the proliferated T cells, and thereby inhibiting the development of a cancer in the patient.
12. A composition as claimed in claim 8 for use in medicine.
13. A composition as claimed in claim 8 for use in the treatment of tumours that express a crypto antigen.
14. Use of a component selected from the group:
- (a) polypeptides according to claim 2;
 - (b) polypeptide of SEQ ID NO: 2;
 - (c) polynucleotides according to claim 1;
 - (d) polynucleotide of SEQ ID NO: 1;
 - (e) antibodies capable of reacting with a protein of SEQ ID NO:1;
 - (f) fusion proteins according to claim 5;
 - (g) T cell populations according to claim 7;
 - (h) antigen presenting cells that express a polypeptide according to claim 2; and
 - (i) antigen presenting cell that express a polypeptide of SEQ ID NO: 2.
- in the manufacture of a medicament for the treatment of tumours that express crypto antigen.

1/5

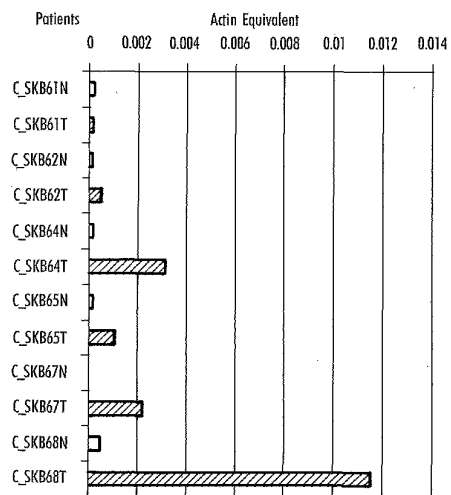
Fig. 1 RT-PCR expression analysis of Cripto on colorectal cancer patients, SybrI detection (T indicates tumor colon, N indicates matched normal tissue).



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

2/5

Fig. 2 RT-PCR expression analysis of Cripto on colorectal cancer patients. TaqMan detection (T indicates tumor colon, N indicates matched normal tissue).

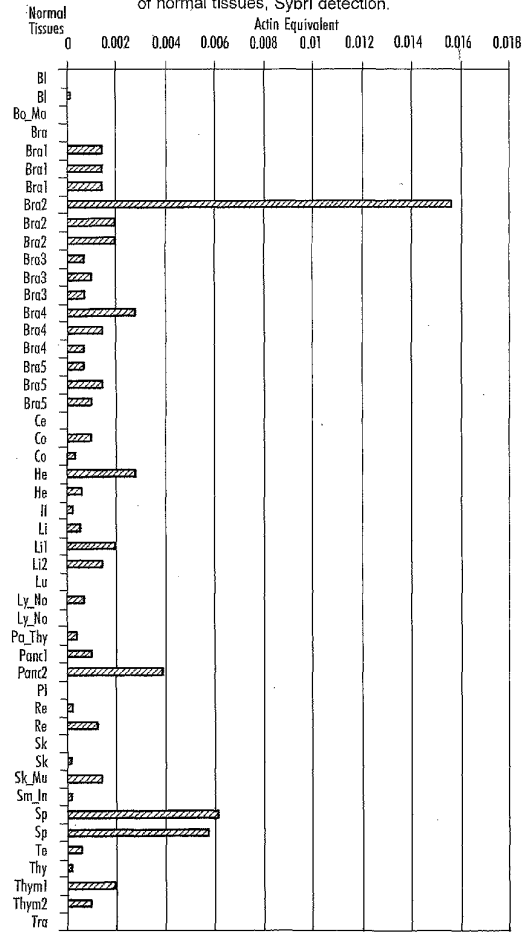


WO 02/16413

PCT/EP01/09646

3/5

Fig. 3 RT-PCR expression analysis of Cripto on a panel of normal tissues, SybrI detection.



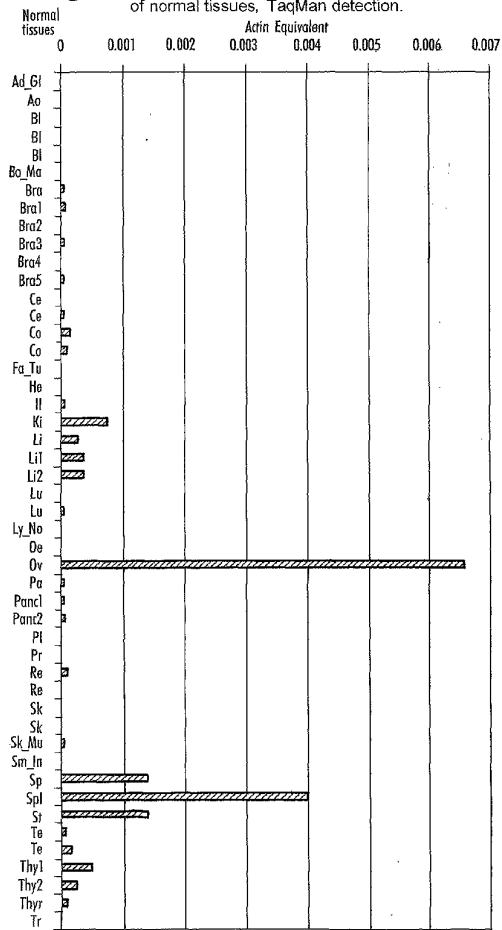
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

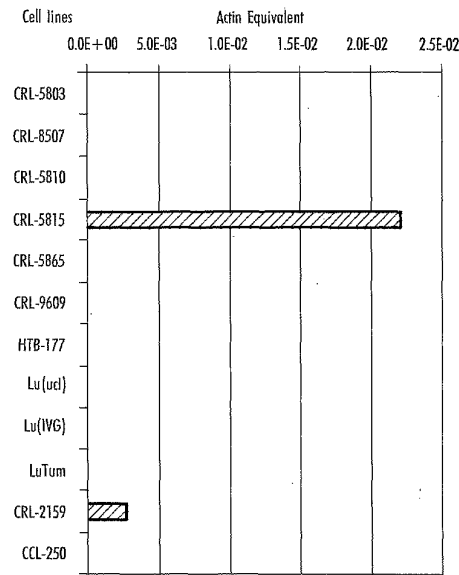
4/5

Fig. 4 RT-PCR expression analysis of Cripto on a panel of normal tissues, TaqMan detection.



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 5 RT-PCR expression analysis of Cripto on a panel of cell lines.



WO 02/16413

PCT/EP01/09646

SEQUENCE LISTING

<110> Smithkline Beecham Biologicals s.a

<120> Vaccines

<130> B45237

<140> PCT EP 01/09646

<141> 2001-08-20

<160> 96

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2688

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```

ggagaatccc cggaaaggct gaggctccag ctcaagggtc aaacgtccaa ggccgaaagc 60
ccctcagttt ccctcggacg ccttgcctct gcttctgcta cgacottctg gggaaaaacg 120
atttctcatt ttcttcttaa attgccattt tcgcttagg agatgaatgt ttctcttggg 180
ctgttttggc aatgactctg aattaaagcg atgctaacgc ctcttttccc cctaattggt 240
aaaagctatg gactgcagg aatgggcccg cttctcttac agtgtgattt ggaatctggc 300
catttctaaa gtctttgaac tgggattagt tgccgggctg ggccalcagg aatttgctcg 360
tccatctcgg ggatacctgg ccttcagaga tgacagcat tggccccagg agggagctgc 420
aatcggcctt cgtcttccc agcgtgtgac gcccatgggg atacagcaca gtaaggagct 480
aaacagaaac tgtgtcctga atgggggaaac ctgcatgtgt ggtcctttt gtgctgtccc 540
tcctctcttc tacggacgga actgtgagca cgaatgtgct aaagagaact gtggtctgt 600
gcccatgac acctggctgc ccaagaagtg ttccctgtgt aaatgctgco acggtcagct 660
cgtgtgtctt cctcaggcat ttctacccgg ctgtgatggc cttgtgatgg atgagcact 720
cgtggcttcc aggaactccag aactaccacc gtctgcacgt actaccactt ttatgctagt 780
tggcatctgc cttctatac aaagtacta ttaactgaca ttgacctatt tccagaaata 840
caattttaga tatcatgcaa atttcatgac cagtaaggc tgcgtctaca atgtctaac 900
tgaagaatga tcatttgtag ttgccttaaa ataataaata caatttccaa aatggtctct 960
aaattttctt tacagaaacta cttctacttt ctttgcctg ccctctccaa aaaaactact 1020
ttttttttta aagaaagtc agccatctct ccatgtgtgc taagtccagt gtttcttttt 1080
tttttttttt ttgagacgga gtctcactct gtcccccagg ctggactgca atgacgcat 1140
cttggtttac tgcacacctc gcatccgggg ttcaaggcat tctctgctt aagcctccca 1200
agtaactggg attacaggca tgtgtcacca tgcccagcta attttttgt attttagtag 1260
agatgggggt ttacacatat tggccagtct ggtctcgaac tctgacctg tgatccatg 1320
atcagcctct cgaatgtctg gattacacac gtgagcaact gtgcaaggcc tgggtttct 1380
tgatcatgtt aattctacca aggtcttctt aatatgtct ttaaatgat tgaattatat 1440
gttcagatta ttggagacta attctaattt ggaccttaga atacagtttt gaggtagatt 1500
gatcaaatc aattaaata gtctctttaa aaggaaagaa aacatcttta agggaggaaa 1560
ccagagtgct gaaggaatgg aagtcctatc gcgtgtgtgc agggagactg ggtaggaaag 1620
aggaagcaaa tagaagagag aggttgaaaa acaaaatggg ttaacttgat ggtgattagg 1680
tgggtgtaga gaagcaagta aaaaggctaa atggaaaggc aagtttccat catctataga 1740
aagctatata agacaagzac tcccttttt ttcccaaggc cattataaaa agaataagc 1800
ctccttagaa aaaaaattat accctaatgt ccccaacaag atgtctaat aaattgtgtt 1860
tcctccaagc tattcaattc ttttaactgt tgtagagac aaaatgttca caatatattt 1920
agtgttaaac caagtgtaca aactacatat tgtaaagccc attttataaa tacattgtat 1980
atatgtgtat gcacagtaaa aatggaaact atattgacct aaaaaaaaaa aaa 2033

```

<210> 2

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<211> 2033
 <212> DNA
 <213> human

<400> 2
 aagcttgccg gccatgtaag gtaaaagtac tgattctata gcaatccaat tgttcctttg 60
 totgcccgtt tacatataac aatgtttgta atgtttgatt gaaaatacct agcaggcgac 120
 acacacacac ctagotcctc aggcggagag caccoccttc ttggccaccc gggatcccc 180
 cagggagtagc ggggctcaaa acaccccttt ggagaacaag gtggaagcaa atttcaggaa 240
 gtasaaactc ctgaataaaa ataaaatata gaatgccttg agaccatac attttcaggt 300
 tttctaat aaagcaatta cttccacca cccctccaac ctggaatcac caacttggtt 360
 agagaaactg attttctttt tttctttttt ttcccaaaa gattacatct gatcatttta 420
 gccgtcaact aatgatagag atattagggc tagttaacca cagttttaca agactcctct 480
 cccgcgtgtg ggccattgtc atgctgtcgg tcccgccac ctgaaaggto tccccgccc 540
 gactgggggt tgtgttgaa gaaggagaat ccccggaag gctgagtctc cagctcaagg 600
 tcaaaaactc caaggccgaa agccctccag tttccctgg acaccttgc cgtgctctg 660
 ctacgacctt ctgggaacgc gaatttctoa tttctctt aaattgccat ttctgcttta 720
 ggagatgaat gttttccttt ggctgttttg gcaatgactc tgaattaaag cgaatgtaac 780
 gccctctttc cccctaattg ttaaaagcta tggactgcag gaagatggto cgtctctct 840
 acagtgtgat ttggatcatg gccatttcta aagcctttga actgggatta gttgcccggc 900
 tgggccaaca ggaatttgct cgtccatctc ggggagacct ggccttcaga gatgacagca 960
 ttggcccca ggaggagcct gcaattcggc ctcggtcttc ccagcgtgtg ctgccatgg 1020
 gaatacagca cagtaaggag ctaaacagaa cctgctgcot gaatggggga aocgtgatc 1080
 tggagtcctt ttgtgctgc cctccctcct tctacggagc gaactgtgag cagcatgtc 1140
 gcaaaagaaa ctgtgggtct gtgcccctat acacctggct gcccaagaag tgttccctgt 1200
 gtaaatgctg gcacggctcag ctccgctgct ttctccaggc atttctacc ggtgtgtatg 1260
 gccctgtgat ggatgagcac ctccgtggct ccaggactcc agaaactaca ccgtctgcac 1320
 gtactaccac ttltatgcta gctggcatct gcccttctat acaaagctac tattaatoga 1380
 cattgacctt ttccagaaa tacaatttta gatattatgc aaatttcagt aocgttaag 1440
 gctgctgcta caatgtccta actgaaagat gatcatttgt agttgcctta aaataatgaa 1500
 tacaatttcc aaaaaggctc ctaacatttc cttaacagaa taactacttc ttacctctt 1560
 gccctgacct ctcccaaaa actacttctt tttaaaaaa aagtcagcc atactcctat 1620
 tgtgccaag tccagtgtt ctlttttttt tttagagcgg agtctcagc tgtcaccag 1680
 gctggactgc aatgacgga tctcgggtca ctgcaacctc cgtatccggg gttaagcca 1740
 ttctcctgoc tccgctccc aagtactgtg gattacaggg atgtgtcac atgcccgtc 1800
 attttttgt attttagtag agcgggggt ttcaccatat tggcagctg gctcgaact 1860
 ctgacctgt gatccatgc tggcctctcg agtctgaga ttacacagt gagcaactgt 1920
 gcaagcctg gtgtttcttg atacatgtaa ttctaccaag gttctcttaa tatgttctt 1980
 taaatgattg aattatacac tcagattatt ggagcctaag tctaattgag acottagaat 2040
 acagttttga gttaggttga tcaaatcaa ttaaatagt ctcttataa ggaagaaaa 2100
 catctttaag gggaggaacc agagtgtga aggaatggaa gtccatctgc gtgtgtcag 2160
 ggagactggg taggaaagag gaagcaata gaagagagag gttgaaaaa azaatgggtt 2220
 acttgattgg tgettaggtg gtgttagaga agcaagtaaa aaggctaaat ggaagggcaa 2280
 gtttccatca tcatagaaa gctatgtaag acaaggactc ccttttttt cccaaaggca 2340
 ttgtaaaaa aatgaagtct ccttagaaaa aaaattatc ctcaatgtcc ccaacaagat 2400
 tgottaataa attgtgttct ctccaagcta ttcaattctt ttaactgttg tagaagagaa 2460
 aatgttcaca atataattag ttgtaaacca agtgaatcaa ctacatattg taaagcccat 2520
 ttttaaaata cattgtatat atgtgtatgc acagtaaaaa tggaaactat attgacctaa 2580
 aaaaaaaaa aggaaccac ccttaggcag gcaggacatg ctcttcagaa ctctgctctt 2640
 cagagttcca aagaaggat aaaacatctt ttatnccat caaatagc 2688

<210> 3
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Human

<400> 3
 Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

```

1      5      10      15
Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
20      25      30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
35      40      45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
50      55      60
Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65      70      75      80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
85      90      95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
100      105      110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
115      120      125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
130      135      140
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
145      150      155      160
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
165      170      175
Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
180      185

```

<210> 4
<211> 188
<212> PRT
<213> human

```

<400> 4
Met Asp Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
1      5      10      15
Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
20      25      30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala Phe Arg Asp
35      40      45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
50      55      60
Gln Arg Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65      70      75      80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Glu Ser Phe Cys Ala
85      90      95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
100      105      110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
115      120      125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
130      135      140
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
145      150      155      160
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
165      170      175
Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
180      185

```

<210> 5
<211> 2033
<212> DNA
<213> human

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

```

<400> 5
ggagaaatccc cggaagggtc gaggctccag ctcaagggtca aaacgtccaa ggccgaaagc 60
ccctcagttt ccctcggagc ccttgctcct gcttctgcta cgaccttctg gggaaaacga 120
atttctcatt ttcttcttaa attgccattt tgcctttagg agatgaatgt ttctccttgg 180
ctgttttggc aatgactctg aattaaagcg atgtctaacg cctctttccc cctaattgtt 240
aaaagctatg gactgcagga agatggcccg ctctctttac agtgtgattt ggaatcatgg 300
catttctaaa gtctttgaac tgggattagt tgcggggctg ggccatcagg aatttgctcg 360
tccatctcgg ggatacctgg ccttcagaga tgacagcatt tggcccccagg aggagcctgc 420
aattcggcct cggtcttccc agcgtgtgccc gcccatgggg atacagcaca gtaaggagct 480
aaacagaacc tgctgcctga atgggggaac ctgcctgctg gggtcctttt gtgcctgccc 540
tcctctcttc tacggacgga actgtgagca cgtatgtgccc aaagagaact gtgggtctgt 600
ggcccatgac acctggctgc ccaagaagtg ttccctgtgt aaatgctgga acggtcagct 660
ccgtgctctt cctcaggcat ttctacccgg ctgtgtatgg cttgtgatgg atgagcactt 720
cgtgggtctc aggaactccg aactaccacc gtctgcacgt actaccactt ttatgctagt 780
tggcatctgc ctttctatac aaagtacta ttaatcgaca ttgacctatt tccagaaata 840
caattttaga tatcatgcaa atttcatgac cagttaaggc tgctgtcaca atgtctaac 900
tgaagaatga tcatttgtag ttgccttaaa ataatgaata caatttccaa aatggtctct 960
aaocatctct tacagaacta cttcttactt ctttgccctg cctctccca aaaaactact 1020
tcttttttca aaagaaagtc agccatattt ccatgtgccc taagtccagt gtttcttttt 1080
tttttttttt ttgagacgga gtctcactct gtcccccagg ctggactgca atgacgcgat 1140
cttggttccc tgcaacctcc gcatccgggg ttcaagccat tctcctgccc aagcctccca 1200
agtaactggg attlacaggca tgtgtcacca tgcccagcta atttttttgt attttagtag 1260
agatgggggt ttccaccatc tggccagctc ggtctgaaac tctgaccttg tgatccatcg 1320
atcagcctct cgagtgtctga gattacacac gtgagcaact gtgcaaggcc tgggtttctt 1380
tgatacatgt aatcttacca aggtcttctt aatatgttct ttlaaatgat tgaattatat 1440
gttcagatta ttggaacta attctaatgt ggaccttaga atacagtttt gtagtagatt 1500
gatcaaaatc aattaaata gtctctttaa agggaaagaa aacatcttta agggggagaa 1560
ccagagtgtc gaaggaaatg aggtccatct gcgtgtgtgc aggggagactg ggtaggaagaa 1620
aggaagcaaa tagaagagag aggttgaaaa acaaaatggg ttaactgatt ggtgattagg 1680
tgggtgtaga gaagcaagta aaaaggctaa atgggaaggc aagtttccat catctataga 1740
aagctatata agacaagaac tccccctttt ttcccaagg cattataaaa agaattgagg 1800
ctccttagaa aaaaattat acotcaatgt ccccaacaaag attgttaat aaattgtgtt 1860
tcctccaaag tattcaattc ttttaactgt tgtagaagac aaaatgttca caatatattt 1920
agtgtgaac caagtgtatc aactacatat tgtaaagccc atttttaaaa tacattgtat 1980
atatgtgtat gcacagtaaa aatggaaact atattgacct aaaaaaaaaa aaa 2033

```

```

<210> 6
<211> 188
<212> PRT
<213> human

```

```

<400> 6
Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
1 5 10 15
Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
20 25 30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
35 40 45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
50 55 60
Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65 70 75 80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
85 90 95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
100 105 110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
115 120 125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
130 135 140

```

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
 165 170 175
 Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
 180 185

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> human

<400> 7
 tgggtaggaa agaggaagca aat 23

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> human

<400> 8
 tgcttctcta ccaccacct atca 24

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> human

<400> 9
 cgtccaaggc cgaaagccct ccagtt 26

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> human

<400> 10
 ttgggagagg gcagggcata gaagtaagaa 30

<210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> human

<400> 11
 Gly His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu
 1 5 10

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> human

<400> 12
 Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser Gln Arg Val Pro Pro
 1 5 10 15
 Met Gly

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 13
Ser Val Ile Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 14
Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys
1 5 10

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 15
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 16
Ile Arg Pro Arg Ser Ser Gln Arg Val
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 17
Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 18
Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg
1 5

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 19
Val Arg Lys Glu Asn Cys Gly Ser Val
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 20
Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala Phe Leu
1 5

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

<400> 21
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 22
Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 23
Asn Arg Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 24
Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala Phe
1 5 10

<210> 25

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 25
Gln Ala Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 26
Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val
1 5 10

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

<400> 27
Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu
1 5

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

<400> 28
Lys Glu Leu Asn Arg Thr Cys Cys Leu
1 5

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

<400> 29
Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala Phe
1 5

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

<400> 30
Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met Leu
1 5

<210> 31
<211> 9

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<212> PRT
<213> human<400> 31
Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val
1 5<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> human<400> 32
Ile Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu
1 5 10<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> human<400> 33
Val Ile Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys Val
1 5 10<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> human<400> 34
Phe Met Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile
1 5 10<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> human<400> 35
Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp
1 5<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> human<400> 36
Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr
1 5<210> 37
<211> 10
<212> PRT

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<213> human

<400> 37

Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> human

<400> 38

Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 39

Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met Leu Val
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 40

Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala
1 5

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> human

<400> 41

Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser
1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> human

<400> 42

Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr
1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> human

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<400> 43
Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 44
Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met Leu Val
1 5 10

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

<400> 45
Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu
1 5

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

<400> 46
Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 47
Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 48
Cys Met Leu Glu Ser Phe Cys Ala Cys
1 5

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

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<400> 49
Ile Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu
1 5 10

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

<400> 50
Phe Met Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser Ile
1 5 10

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 51
Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 52
Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr
1 5

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

<400> 53
Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 54
Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala Phe
1 5 10

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 55

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 56
Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met Leu Ala
1 5

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

<400> 57
Ile Arg Pro Arg Ser Ser Gln Arg Val Leu
1 5 10

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

<400> 58
Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser
1 5 10

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

<400> 59
Gln Arg Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His
1 5 10

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> human

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

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 61
Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 62
Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 63
Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr
1 5

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

<400> 64
Leu Val Ala Gly Leu Gly His Gln Glu Phe
1 5 10

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

<400> 65
Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys Ser Leu
1 5 10

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 66
Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser Gln Arg
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 67
Val Ile Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys
1 5

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 68
Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 69
Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 70
Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 71
Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 72
Met Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser Ile
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 73
Arg Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His
1 5

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 74
Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 75
Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 76
Leu Val Ala Ser Arg Thr Pro Glu Leu
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 77
Tyr Ser Val Ile Trp Ile Met Ala Ile
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 78
Trp Leu Pro Lys Lys Cys Ser Leu Cys
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 79
Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly His
1 5

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 80
Phe Arg Asp Asp Ser Ile Trp Pro Gln
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 81
Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys Val Phe
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 82
Met Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 83
Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 84
Ile Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys Val
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 85
Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln
1 5

<210> 86

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 86
Phe Met Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 87
Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 88
Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 89
Phe Met Leu Ala Gly Ile Cys Leu Ser
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 90
Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His Ser
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> human

<400> 91
Ile Trp Ile Met Ala Ile Ser Lys Ala
1 5

<210> 92
<211> 9

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

<212> PRT
<213> human

<400> 92
Ile Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu
1 5

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 93
Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
1 5 10

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> human

<400> 94
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala
1 5 10

<210> 95
<211> 968
<212> DNA
<213> human

<400> 95
cgtccaagc cgaagccct ccagtttccc ctggacgcct tgcctctgct tctgctacga 60
ccttctgggg aaaaagaatt tctcattttc ttcttaaat gccattttcg ctttgggaga 120
tgaatgtttr cctttggctg ttttggcaat gactctgaat taaagcgctg ctacggcctc 180
ttttccccc aattgttaaa agctatggac tgcaggaaga tggcccgctt ctcttaccgt 240
gtgatattga tcatggccat ttctaaagcc ttggaactgg gattagttgc cgggctgggc 300
catcaggaaat ttgctcgtcc atctcgggga tacctggcct tcaagagatga cagcatttgg 360
ccccaggagg agcctgcaat tcggcctcgg tcttccacgc gtgtgcccgc catggggtg 420
cagcacagta aggagctaaa cagaacctgc tgcctgaatg ggggaacctg catgctgggg 480
tctctttgtg cctgccctcc ctctctctac ggaagggaact gtgagcagca tctgctgaaa 540
gagaactgtg ggtctgtgcc ccatgacacc tggctgccc aagaagtgtt cctgtgtaaa 600
tgttggaacg gtcagctccg ctgctttcct caggcatttc taccggctg tgatggcctt 660
gtgatgggat agcaactcgt ggcttccagg actccagaac taccacgctc tgcacgtact 720
accactttta tgcagttag catctgcctt tctatacaaa gctactatta atcgacattg 780
acctatttcc agaaatacaa tttagatat catgcaaat tcatgaccag taaaggctgc 840
tgtacaaatg tcttaactga aagatgatca ttgtagttag ccttaaaata atgaatacaa 900
tttccaaaat ggtctctaac atttccttac agaactactt ctacttctt tgcctgccc 968
tctcccaa

<210> 96
<211> 188
<212> PRT
<213> human

<400> 96
Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
1 5 10 15
Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly

WO 02/16413

PCT/EP01/09646

```

      20      25      30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
      35      40      45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
      50      55      60
Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
      65      70      75      80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
      85      90      95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
      100      105      110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
      115      120      125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
      130      135      140
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
      145      150      155      160
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
      165      170      175
Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
      180      185

```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016413 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/47, C12N 5/08, A61K 38/18, A61P 35/00(74) Agent: DALTON, Marcus, J., W.; SmithKline Beecham,
Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West
Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(21) International Application Number: PCT/JP01/09646

(22) International Filing Date: 20 August 2001 (20.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0020953.6 24 August 2000 (24.08.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
[BI/BI]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CASSART,**
Jean-Pol [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A.,
Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **COCHET,**
Thierry [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue
de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **PALMANTIER,**
Remi, M. [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A.,
Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **VINALS**
Y DE BASSOLS, Carlota [BE/BE]; GlaxoSmithKline
Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart
(BE).**Published:**
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
5 December 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/016413 A3

(54) Title: CRIPTO TUMOUR POLYPEPTIDE

(57) Abstract: Compositions and methods for the therapy and diagnosis of cancer, particularly lung, colon, colorectal and breast cancer, are disclosed. Illustrative compositions comprise one or more Cripito tumor polypeptides, immunogenic portions thereof, polynucleotides that encode such polypeptides, antigen presenting cell that expresses such polypeptides, and T cells that are specific for cells expressing such polypeptides. The disclosed compositions are useful, for example, in the diagnosis, prevention and/or treatment of diseases, particularly lung, colon, colorectal and breast cancer.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016413 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/08, A61K 38/18, A61P 35/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/09646
- (22) International Filing Date: 20 August 2001 (20.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0020953.6 24 August 2000 (24.08.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): CASSART, Jean-Pol [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). COCHE, Thierry [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). PALMANTIER, Remi, M. [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). VINALS Y DE BASSOLS, Carlota [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (74) Agent: DALTON, Marcus, J., W.; SmithKline Beecham, Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 5 December 2002
Date of publication of the revised international search report: 6 February 2003
- (15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 06/2003 of 6 February 2003, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/016413 A3

(54) Title: CRIP10 TUMOUR POLYPEPTIDE

(57) Abstract: Compositions and methods for the therapy and diagnosis of cancer, particularly lung, colon, colorectal and breast cancer, are disclosed. Illustrative compositions comprise one or more Crip10 tumor polypeptides, immunogenic portions thereof, polynucleotides that encode such polypeptides, antigen presenting cell that expresses such polypeptides, and T cells that are specific for cells expressing such polypeptides. The disclosed compositions are useful, for example, in the diagnosis, prevention and/or treatment of diseases, particularly lung, colon, colorectal and breast cancer.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09646
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N5/08 A61K38/18 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	US 584 399 A (SALOMON S AND PERSICA G) 29 December 1998 (1998-12-29) the whole document ---	1-14
E	WO 01 94629 A (AVALON PHARMACEUTICALS) 13 December 2001 (2001-12-13) SEQ ID NO:6423 --- -/-	1-14
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *-X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 September 2002		Date of mailing of the international search report 09/09/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patonlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Cupido, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09646
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BALDASSARRE G ET AL: "TRANSFECTION WITH A CRIPTO ANTI-SENSE PLASMID SUPPRESSES ENDOGENOUS CRIPTO EXPRESSION AND INHIBITS TRANSFORMATION IN A HUMAN EMBRYONAL CARCINOMA CELL LINE" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 4, no. 66, 16 May 1996 (1996-05-16), pages 538-543, XP008006513 ISSN: 0020-7136 the whole document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/09646
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/JP 01/09646

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 6 and 9-11 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Throughout the claims reference is made to a polynucleotide sequence with SEQ ID NO:3 and a polypeptide with SEQ ID NO:2. It is assumed that these number have been interchanged.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/EP 01/09646	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date	Publication date
US 584399	A	NONE			
WO 0194629	A	13-12-2001	AU 6455901 A	17-12-2001	
			WO 0194629 A2	13-12-2001	
			US 2002115057 A1	22-08-2002	
			US 2002081301 A1	27-06-2002	
			US 2002110821 A1	15-08-2002	
			US 2002102531 A1	01-08-2002	
			US 2002102532 A1	01-08-2002	
			US 2002115085 A1	22-08-2002	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/82	
C 0 7 K 14/82	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R O,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 カサート, ジャンーポール
ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3 3 0 ル デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 コーチュ, チエリー
ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3 3 0 ル デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ポールマンタイアー, レミ, エム.
ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3 3 0 ル デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ヴィナルス イ デュ バッソルス, カルロタ
ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3 3 0 ル デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA36 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04 GA11
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA45
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA25 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23
BA41 DA08 DA25 DC50 MA01 MA02 NA14 ZB021 ZB022 ZB091
ZB211 ZB261 ZC412 ZC751
4C085 AA03 BB01 CC03 DD62 EE06 FF03
4C087 AA01 AA02 BB37 BB43 CA12 DA31 MA02 NA14 ZB02 ZB09
ZB21 ZB26 ZC41 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA86 EA31 FA74