

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500812

(P2005-500812A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(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 31/7052	A 6 1 K 31/7052	4 B O 2 9
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-556623 (P2002-556623)	(71) 出願人	500579888
(86) (22) 出願日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		ジェンザイム・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月23日 (2003.6.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/049964		139, ケンブリッジ, ワン ケンダル
(87) 国際公開番号	W02002/055555		スクエア (番地なし)
(87) 国際公開日	平成14年7月18日 (2002.7.18)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/257,820		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成12年12月21日 (2000.12.21)	(74) 代理人	100108774
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	ニコレット チャールズ エー.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州
			ラミンガム ミル ストリート 4
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA12 BA45 CA01 GA11
			HA12 HA15
			4B029 AA23 CC03 FA15
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療および診断のための抗原性CK-18化合物ならびにその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、CK-18関連癌および悪性腫瘍の進行を検出、診断、予後診断、およびモニタリングするための方法および組成物、ならびに前記方法において使用するためのキットを提供する。さらに、CK-18関連癌および悪性腫瘍に関連する癌抗原のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング法が提供される。

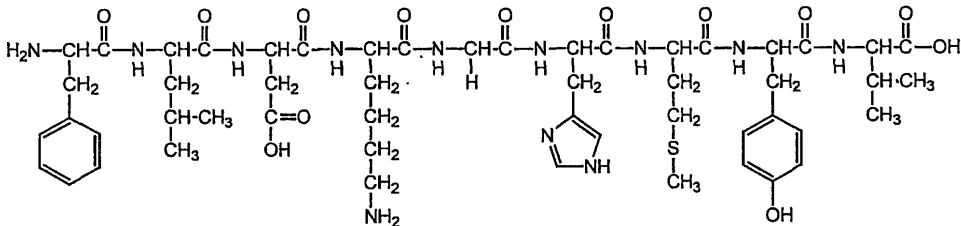
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の構造を有する化合物：

【化 1】

配列番号 :3
FLDKGHMYV



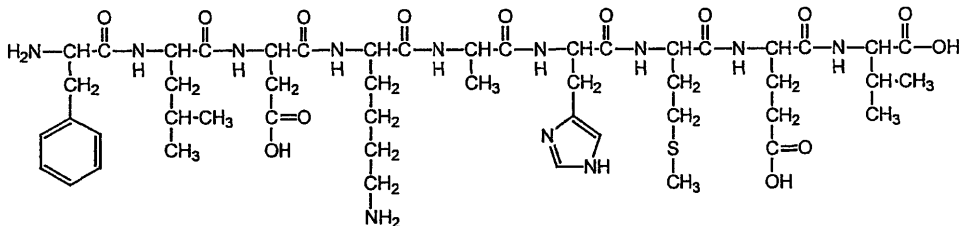
10

【請求項 2】

次の構造を有する化合物：

【化 2】

配列番号 :5
FLDKAHMEV



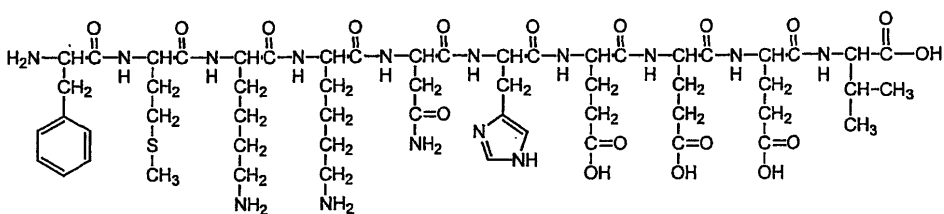
20

【請求項 3】

次の構造を有する化合物：

【化 3】

配列番号 :7
FMKKNHEEEV



30

【請求項 4】

配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸213位、214位、216位、218位、および220位が各々L、D、A、M、およびVであるペプチド。

40

【請求項 5】

配列番号：1のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸213位、214位、216位、218位、219位、および220位が各々L、D、G、M、Y、およびVであるペプチド。

【請求項 6】

配列番号：1のアミノ酸212～221位からなるペプチド。

【請求項 7】

前記ペプチドに結合した生物学的に活性な免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む、請求項4～6のいずれか1項記載のペプチド。

【請求項 8】

50

前記ペプチドに共有結合した物質をさらに含み、該物質が該ペプチドを抗原提示細胞に対して標的化することができる、請求項4～6のいずれか1項記載のペプチド。

【請求項9】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項8記載のペプチド。

【請求項10】

MHCクラスII結合ヘルパーペプチドをさらに含有する、請求項4～6記載のいずれか1項のペプチド。

【請求項11】

配列番号：3のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項12】

配列番号：5のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項13】

配列番号：7のアミノ酸を含むアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項14】

請求項7～12のいずれか1項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項15】

請求項4～6のいずれか1項記載の化合物を特異的に認識して結合する抗体。

【請求項16】

被験者に、有効量の請求項4～6のいずれか1項記載の化合物を送達することを含み、被験者において免疫応答を誘導する方法。

【請求項17】

化合物がMHC分子に関連して送達される、請求項16記載の方法。

【請求項18】

MHC分子が抗原提示細胞の表面上で化合物を提示する、請求項17記載の方法。

【請求項19】

化合物がポリヌクレオチドとして送達される、請求項16記載の方法。

【請求項20】

有効量の請求項15記載の抗体を被験者へ投与する段階を含む、免疫療法の方法。

【請求項21】

MHC分子に関連する請求項4～6記載のいずれか1項の化合物を提示する抗原提示細胞の存在下および使用により、インビトロまたはインビボで生じた免疫エフェクター細胞。

【請求項22】

有効量の請求項21記載の免疫エフェクター細胞を投与する段階を含む、養子免疫療法の方法。

【請求項23】

1つまたは複数の免疫原性リガンドを含む組成物であって、免疫原性リガンドが同一天然リガンドに対する免疫応答を誘発する能力によって個々に特徴付けられており、該免疫原性リガンドが配列番号：3、5および7からなる群から選択される組成物。

【請求項24】

免疫原性リガンドに結合した生物学的に活性な免疫グロブリン可変ドメインをさらに含む、請求項23記載の組成物。

【請求項25】

免疫原性リガンドに結合したMHC分子をさらに含む、請求項23記載の組成物。

【請求項26】

免疫原性リガンドが共有結合する、請求項23記載の組成物。

【請求項27】

免疫原性リガンドに共有結合した物質をさらに含み、該物質が抗原提示細胞に対して該免疫原性リガンドをターゲティングできる、請求項23記載の組成物。

【請求項28】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項27記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

MHCクラスII結合ヘルパーペプチドをさらに含む、請求項28記載の組成物。

【請求項 30】

担体をさらに含む、請求項23記載の組成物。

【請求項 31】

担体が薬学的に許容される担体である、請求項30記載の組成物。

【請求項 32】

1つまたは複数の免疫原性リガンドを含む宿主細胞であって、該免疫原性リガンドが同一天然リガンドに対する免疫応答を誘発する能力によって個々に特徴付けられており、該免疫原性リガンドが配列番号：3、5および7からなる群から選択される宿主細胞。

10

【請求項 33】

宿主細胞が抗原提示細胞であり、免疫原性リガンドが細胞の表面上で提示される請求項32記載の宿主細胞。

【請求項 34】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項33記載の宿主細胞。

【請求項 35】

請求項32記載の宿主細胞および担体を含む組成物。

【請求項 36】

担体が薬学的に許容される担体である、請求項35記載の組成物。

【請求項 37】

被験者において免疫応答を誘導するための方法であり、被験者に1種または複数種の、有効量の免疫原性リガンドを含む組成物を送達する段階を含む方法であって、該免疫原性リガンドの各々が同一天然リガンドに対する免疫応答を誘発する能力によって特徴付けられ、該免疫原性リガンドが配列番号：1、3、5および7からなる群から選択される方法。

20

【請求項 38】

新生物状態、または動物の細胞もしくは組織の新生物状態に対する感受性の診断において役立つ方法であって、

該細胞または組織から単離された試験試料中のCK-18タンパク質の発現量を決定する段階、および

CK-18タンパク質の発現量に基づいて、新生物状態または新生物状態への感受性を診断する段階を含む方法。

30

【請求項 39】

タンパク質の発現量が、該タンパク質を転写するmRNAの量を検出することによって決定される、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

検出する段階が、試験試料を中等度または高度にストリンジェントな条件下において、CK-18mRNAと特異的にハイブリダイズするプローブまたはプライマーを用いて試験することによる、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

プローブまたはプライマーが、配列番号：1に挙げた配列またはそれらの相補体をコードする核酸によってコードされたタンパク質の少なくとも9個の連続残基を含む、請求項40記載の方法。

40

【請求項 42】

プローブまたはプライマーが固体支持体上に不動化されている、請求項40記載の方法。

【請求項 43】

プローブまたはプライマーが検出可能に標識されている、請求項40記載の方法。

【請求項 44】

プローブまたはプライマーが配列番号：2または配列番号：8の少なくとも9個の連続するポリヌクレオチド、およびこれらの配列の相補体からなる配列を含む、請求項40記載の方法。

50

【請求項 45】

プローブまたはプライマーが配列番号：1または7からなる群から選択されるペプチド、および該ペプチドをコードする核酸の相補体をコードする核酸配列を含む、請求項40記載の方法。

【請求項 46】

発現が、正常または対照試料中より少なくとも2倍高い、請求項38記載の方法。

【請求項 47】

検出が、タンパク質を特異的に認識して結合する物質を用いて試料を試験することにより決定される、請求項38記載の方法。

【請求項 48】

物質が、タンパク質またはその抗原結合断片を特異的に認識または結合する生物学的に活性な免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項47記載の方法。

【請求項 49】

物質がポリクローナルまたはモノクローナル抗体である、請求項48記載の方法。

【請求項 50】

物質がタンパク質へ結合する細胞である、請求項48記載の方法。

【請求項 51】

細胞が配列番号：1、3、5および7からなる群から選択されるペプチドの存在下および使用により生じた免疫エフェクター細胞である、請求項50記載の方法。

【請求項 52】

試験試料が乳房または肺から選択される細胞または組織の群から単離される、請求項38記載の方法。

【請求項 53】

検出する段階がインビボイメージングによる、請求項52記載の方法。

【請求項 54】

モノクローナル抗体が配列番号：1、3、5および7からなる群から選択されるペプチドを用いて免疫化された動物から調製される、請求項49記載の方法。

【請求項 55】

物質が、配列番号：1、3、5および7からなる群から選択されるペプチドを用いて免疫化した動物から調製した抗体から単離された、生物学的に活性な免疫グロブリン可変ドメインを含む、請求項47記載の方法。

【請求項 56】

検出がポリメラーゼ連鎖反応またはハイブリダイゼーションアッセイ法による、請求項40記載の方法。

【請求項 57】

固体支持体がチップである、請求項42記載の方法。

【請求項 58】

タンパク質の発現が、mRNAの同一性および発現レベルの発現解析により決定され、mRNAの配列および量を対照試料の発現解析と比較する、請求項38記載の方法。

【請求項 59】

CK-18タンパク質を特異的に認識して結合する少なくとも1種の物質、および試験試料中のCK-18タンパク質と該物質間との結合を検出するための取扱説明書を含む診断キット。

【請求項 60】

物質が固体支持体上で不動化されている、請求項59記載のキット。

【請求項 61】

固体支持体がニトロセルロース、ラテックス、プラスチック、およびチップからなる群から選択される、請求項60記載のキット。

【請求項 62】

物質が抗体であり、検出試薬が抗免疫グロブリン、タンパク質G、タンパク質A、またはレクチンを含む、請求項60記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

検出が、ラジオアイソトープ、蛍光基、発光基、酵素、ビオチン、および色素粒子からなる群から選択される、請求項59記載のキット。

【請求項 6 4】

請求項40記載のプロブまたはプライマーを含む診断キット。

【請求項 6 5】

CK-18タンパク質がそのリガンドへ結合するのを調節する物質についてスクリーニングするためのアッセイ法であって、該タンパク質および該リガンドを含む試料を幾つかの条件下および被験物質の存在下で接触させる段階、ならびにタンパク質と該リガンドとの間の任意の結合、CK-18の結合を調節する物質の指標である該結合における変化を検出する段階とを含むアッセイ法。 10

【請求項 6 6】

調節が、物質とタンパク質との間の増加した結合活性または親和性を含む、請求項65記載のアッセイ法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(技術分野)

本発明は、ヒトの癌および関連悪性腫瘍のための治療、診断、およびスクリーニング法において有用な化合物に関する。 20

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

年間の癌が原因で死亡する人数は上昇し続けている。米国内における男女の癌死の最も一般的な原因は、順に肺癌、結腸癌、および乳癌である。過去数十年間にわたってこれらの疾患を有する患者の生存に関して穏当な客観的改善は行われてきたが、発生率の上昇はこれを上回り、総死亡数は増加し続けている。

【0 0 0 3】

肺癌は、世界中で最も多く見られる形態の癌である。典型的な肺癌の診断は、喀痰細胞診とX線とを組み合わせる。あいにくなことに、症状が出たために患者が医療を求めようとする時点には、癌は通例、治癒不能であるほど進行してしまっている。その結果として、癌は臨床的には明白になっていないが既に局在化していて治療に対して反応する時点で早期に腫瘍マーカーを検出することに研究の焦点が置かれてきた。Mulshineら、「Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors」、*BIOLOGIC THERAPY OF CANCER*、V.T.Devita、S.Hellman、および S.A.Rosenberg編集。フィラデルフィア:J.B.Lippincott, 1991, pp.563~588。 30

【0 0 0 4】

結腸直腸癌は、世界中で3番目に一般的な悪性新生物であり、米国では2番目に多い癌死の原因である。Shike, M.、Winawer, S.J.、Greenwald, P.H.ら、(1990)Primary Prevention of Colorectal Cancer:the WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer(結腸直腸癌の一次予防:結腸直腸癌を予防するためのWHO研究協力センター); Bulletin of the WHO 68(3):377-85;Greenlee, R.T.ら、(2001)Cancer Statistics,2001. CA:A Cancer Journal for Clinicians 51(1):15-36を参照。米国では、この疾患に関連して135,400例の新規症例および56,700人の死亡が発生すると推定されている。患者の約65%は進行した疾患を提示する。 40

【0 0 0 5】

乳癌は、30代から始まって生涯に渡って持続する女性にとって主要な医学的問題である。現在、米国内では女性は8人に1人が一生(80歳まで)の間にこの疾患を発生し、28人中1人が乳癌のために死亡するリスクがあると推定されている。Harrisら編集、「DISEASES OF THE BREAST」、1996:pp.159-168を参照。乳癌は米国内の女性の癌死の2番目に多い原因 50

であり、15～54歳の女性については癌関連死の主要原因である。Forbes(1997)Seminars in Oncology 24(1),Suppl.1,S1-20～S1-35を参照。

【0006】

前立腺癌は、北米の男性において最も一般的な悪性癌である(皮膚癌を除く)。2001年には、米国内でおよそ198,100例の新規症例および31,500例の前立腺癌関連死が発生すると推定されている。上記のGreenlee, R.T.らを参照。前立腺癌は、現在は男性における癌死の第2の主要原因であり、これを上回るのは肺癌だけである。前立腺癌は、全男性の癌の29%および男性癌関連死の11%を占めている。

【0007】

卵巣癌は、米国内の女性における5番目に多い癌死の原因であり、全婦人科癌の中で最高死亡率を有している。上記のGreenlee, R.T.ら、(2001)を参照。2001年には、23,400例の卵巣癌の新規症例が診断され、13,900人の女性がこの疾患のために死亡すると予想されている。上記のGreenlee, R.T.ら、(2001)を参照。卵巣癌から生存した場合の予後は、診断時の疾患の程度に大きく左右される。局所性疾患であると診断された女性は、遠隔性疾患を有する女性に比較して5年間生存率が3倍以上高い。しかしながら診断時に局所性疾患を提示する女性は4分の1に過ぎない。Ries, L.A.ら、(1998), SEER Cancer Statistics Review 1973-1995,ベテスダ、MD:National Cancer Institute(国立癌研究所)を参照。

【0008】

黒色腫は全皮膚癌の約3%を占めており、黒色腫における世界的増加率を超える新生物は女性における肺癌以外にはない。「CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY」(1991)(編集)Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober J.S.:W.B.Saunders Company Philadelphia、pp.340-342;Kirkwood および Agarwala(1993)Principles and Practice of Oncology 7:1-16。黒色腫が明白に皮膚に局在している場合でさえ、患者の最大30%までは全身性転移を発生し、大多数は死亡する。Kirkwood および Agarwala(1993)Principles and Practice of Oncology 7:1-16。

【0009】

癌免疫療法の主要な目標の1つは、確定された腫瘍を排除するために有効であろう腫瘍特異的Tリンパ球反応の誘導である。このような療法の見通しは、腫瘍特異的免疫応答の同定および特性付けに依存する。

【0010】

主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の分子によって提示された抗原性エピトープの認識は、哺乳動物の免疫応答の確立、維持、および実行において中心的な役割を果たす。体細胞および白血球を提示する抗原によって発現する細胞表面MHC分子によって提示されたペプチド抗原のT細胞サーベイランスおよび認識は、例えばウイルス、細菌、および寄生虫のような感染性微生物による侵害を制御するために機能する。さらに、現在では抗原特異的細胞毒性Tリンパ球(CTL)が特定の癌細胞抗原を認識してこれらの抗原を発現する細胞を攻撃できることが証明されている。このT細胞活性は、抗癌ワクチンのための新規戦略を開発するための基礎を提供する。さらに、不適切なT細胞活性化は、例えば関節リウマチ、多発性硬化症、および喘息のような特定の衰弱自己免疫疾患において中心的役割を果たす。従って、MHC分子によって提示された抗原性エピトープの提示および認識は、複数の病理

【0011】

癌患者由来の腫瘍特異的T細胞は、腫瘍細胞に結合してこれを溶解させる。この特異性は、それらがMHCクラスI分子、および一部の細胞タイプではクラスII分子によって腫瘍細胞の表面上で提示された短鎖アミノ酸配列(エピトープ)を認識する能力に基づいている。これらのエピトープは、腫瘍または癌細胞中で固有にまたは異常に発現した遺伝子によってコードされた腫瘍抗原と呼ばれる細胞内タンパク質のタンパク質分解性分解に由来する。

【0012】

特異的抗腫瘍T細胞が入手可能となったため、腫瘍抗原の同定および引き続く抗腫瘍免疫

10

20

30

40

50

応答を誘導するよう設計された癌ワクチンの生産が可能になった。抗腫瘍T細胞は、血液(それらが末梢血単核細胞分画内で所見できる)中、例えば脾臓のような一次および二次リンパ系組織中、卵巢癌患者(腫瘍関連リンパ球またはTAL)における腹水中、または腫瘍自体(腫瘍浸潤性リンパ球またはTIL)中を含む、癌患者の体内に局在している。これらのうち、TILが腫瘍抗原およびT細胞によって認識される腫瘍抗原由来ペプチドの同定において最も有用であった。

【0013】

TILを生成する従来方法は、腫瘍生検組織を細分化する段階およびT細胞成長因子インターロイキン-2(IL-2)の存在下のインビトロで細胞懸濁液を培養する段階を含む。数日間に渡って、腫瘍細胞およびIL-2の組み合わせは腫瘍細胞を使用して腫瘍特異的T細胞の増殖を刺激できる。このようにしてT細胞集団は増大していく。第1の増大に由来するT細胞は、引き続いてマイトマイシンC処理をした、もしくは照射した腫瘍細胞と混合され、その後の腫瘍反応性T細胞のさらなる増殖および濃縮を促進するためにインビトロでIL-2と共に培養される。数ラウンドのインビトロにおける増大後に、強力な抗腫瘍T細胞集団を回収し、これを使用して従来型であるが冗長な発現クローニング方法によって腫瘍抗原を同定できる。Kawakani Y.ら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(9):3515-3519。 10

【0014】

現在インビトロで腫瘍特異的T細胞を生成するために使用されているこの方法は信頼性が低く、この方法によって同定された抗原は必ずしも抗腫瘍免疫応答を誘導しない。多数の実験によって、抗原が成熟T細胞と遭遇すると、無知、アネルギー(免疫反応不顕性)、または物理的欠失のために耐性の誘導を生じさせることが証明されている。Pardoll(1998)Nature Med.4(5):525-531。 20

【0015】

特定のペプチドがT細胞エピトープとして機能する能力は、それがMHC分子の抗原提示ドメインに効果的に結合すること、およびさらにそれがT細胞受容体分子によって特異的に認識され得る適切な1組のアミノ酸を示すことを必要とする。抗原ポリペプチドに由来する天然T細胞エピトープを同定することは可能であるが、これらのペプチドエピトープは必ずしも特定の免疫応答を誘導するように最適化されている抗原を意味していない。実際に、単一アミノ酸またはそれらの配列を変化させる複数の酸の置換基を導入することによって天然エピトープの有効性を向上させるのが可能であることは証明されている(Valmoriら(2000)J.Immunol.164(2):1125-1131)。従って、慎重に最適化されたペプチドエピトープの送達は、有用な免疫応答を誘導するための改良された方法を提供する可能性を有している。 30

【0016】

動物内への抗原の導入は、様々な目的で抗原への免疫応答、またはその欠如を調節するために広範に使用されてきた。これらには、病原体に対するワクチン接種、癌細胞に対する免疫応答の誘導、アレルギー反応の緩和、自己免疫障害の結果として発生する自己抗原への免疫応答の減少、同種移植拒絶の減少、および避妊を目的とする自己抗原に対する免疫応答の誘導が含まれる。

【0017】

より近年には、特定の病原体および腫瘍関連タンパク質が、アミノ酸配列がその病原体または腫瘍関連タンパク質の既知または推定抗原決定基ドメインのアミノ酸配列に一致するペプチドを用いて免疫学的に模倣されてきた。これらの進歩にもかかわらず、このようなペプチド模倣物は一般に免疫応答を誘導することに関して最適には機能しない。 40

【0018】

様々な癌に関連していることが証明された単離された抗原およびその他のバイオマーカーの例は多数あるにもかかわらず、治療、診断、予後診断、およびその他の検出用途のためのこのようなツールの有用性は、例えばそれらが非効率的である、信頼性が低い、感度および/または予測性が欠如していること等の理由で限定されている。従って、癌に関連する抗原、抗原性エピトープ、およびその他のバイオマーカーを同定し、関連癌の早期検出 50

、治療、およびモニタリングにおいて役立つ新規材料およびキットを開発する継続的必要性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、同様に上記の長所を提供する。

【発明の開示】

【0019】

(発明の開示)

本発明は、ヒトサイトケラチン18タンパク質(CK18)関連癌および悪性腫瘍の治療および診断のための新規化合物組成および方法を提供する。

【0020】

さらに、本発明の化合物をコードするポリヌクレオチド、これらの化合物をコードする、例えば配列番号：4、6および8に提供されるような核酸配列（FLDKGHMYV(配列番号：3)、FLDKAHMEV(配列番号：5)、およびFMKKNHEEEV(配列番号：7)のアミノ酸をコードする核酸）も提供され、それらの相補体、および変種も本発明に含まれている。さらにまた、これらのポリヌクレオチドを含む組成物、遺伝子送達賦形剤および/または宿主細胞も提供される。

【0021】

また、本発明により、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、配列番号：3、5および7に提供されるアミノ酸配列が提供され、それらの相補体および変種もまた本発明に含まれている。

【0022】

加えて、本発明は任意でMHC分子の状況に応じて本発明の化合物および組成物の送達により被験者において免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0023】

本発明の化合物はまた、本発明の化合物を特異的に認識して結合する抗体を生成するために有用である。これらの抗体は、被験者に投与された場合は免疫療法においてさらに有用である。

【0024】

本発明はまた、免疫エフェクター細胞、およびMHC分子と関連して本発明のペプチド組成物を提示する抗原提示細胞の存在下および使用によりインビボまたはインビトロで生じた免疫エフェクター細胞を含有する組成物、ならびに被験者に有効量のこれらの免疫エフェクター細胞を投与する段階を含む養子免疫療法の方法を提供する。

【0025】

また本発明によって少なくとも1種、または少なくとも2種、あるいはまた少なくとも3種の免疫原性リガンドを含む組成物が提供されるが、このときこの免疫原性リガンドは、対応する天然リガンドに対する免疫応答を誘発する能力により個々に特徴付けられ、またこの免疫原性リガンドは配列番号：1、3、5および7からなる群から選択される配列を含む。これらの組成物は、薬学的に許容される担体のような担体と組み合わせることができる。

【0026】

さらに本発明によって少なくとも1種、または少なくとも2種、あるいはまた少なくとも3種の免疫原性リガンドを含む宿主細胞が提供されるが、このときこの免疫原性リガンドは対応する天然リガンドに対する免疫応答を誘発する能力により個々に特徴付けられ、さらにこの免疫原性リガンドは配列番号：1、3、5および7からなる群から選択される配列を含む。ある局面では、宿主細胞は抗原提示細胞、例えば樹状細胞である。このような宿主細胞および担体を含む組成物もまた提供される。本発明の宿主細胞は、薬学的に許容される担体のような担体と組み合わせることができる。

【0027】

さらに本発明によって、被験者へ有効量の少なくとも1種、または少なくとも2種、あるいは少なくとも3種の免疫原性リガンドを含む組成物を送達することによってその被験者に免疫応答を誘導する方法が提供されるが、このときこの免疫原性リガンドは各々対応する天然リガンドに対する免疫応答を誘発する能力により特徴付けられ、さらにこのときこの免疫原性リガンドは配列番号：1、3、5および7の配列を含む化合物群から選択される。

【0028】

本発明はさらに、CK-18関連癌および悪性腫瘍の進行を検出、診断、予後診断およびモニタリングするための方法および組成物、ならびにこの方法において使用するためのキットを提供する。

【0029】

さらにまたCK-18関連癌および悪性腫瘍に関連する癌抗原のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング法が提供される。

【0030】

本明細書に記載される方法および組成物は、特に自動ハイスループットアッセイシステムに採用するのに適している。

10

【0031】

(配列表の説明)

配列番号：1。天然ヒトサイトケラチン18タンパク質のアミノ酸配列。この配列は、参照番号NP000215を付して国立バイオテクノロジー情報センター(「National Center for Biotechnology Information: NCBI」)に収蔵されている。

【0032】

配列番号：2。ヒトサイトケラチン18(「CK18」)をコードするmRNAの完全ヌクレオチド配列。この配列は、参照番号NM000224を付して国立バイオテクノロジー情報センター(「NCBI」)に収蔵されている。

【0033】

配列番号：3。化合物1のアミノ酸配列。

20

【0034】

配列番号：4。化合物1をコードするポリヌクレオチド配列。

【0035】

配列番号：5。化合物2のアミノ酸配列。

【0036】

配列番号：6。化合物2をコードするポリヌクレオチド配列。

【0037】

配列番号：7。配列番号：1のアミノ酸212～221位を含むCK18の天然エピトープである化合物3のアミノ酸配列。

30

【0038】

配列番号：8。化合物3をコードするポリヌクレオチド配列。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

(本発明を実施する形態)

本開示を通して、引用元を明記することにより様々な出版物、特許、および公表された特許明細書が参考文献として引用される。これらの出版物、特許、および公表された特許明細書の開示は、本発明が関係する技術分野の最先端の状態をより詳細に記載するため、参照として本明細書に組み入れられる。

【0040】

40

本発明の実施では、他に指示されていなければ、分子生物学の従来技術(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学が使用されるが、これらは当技術分野の技術の範囲内に含まれる。このような技術は文献において十分に説明されている。これらの方法は、次の出版物の中で記載されている。例えば、Sambrookら、「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition」(1989); 「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」(F.M.Ausubelら編集(1987)); シリーズ、「METHODS IN ENZYMOLOGY」(Academic Press, Inc.); 「PCR: A PRACTICAL APPROACH」(M. MacPhersonら、IRL Press at Oxford University Press(1991)); 「PCR2: A PRACTICAL APPROACH」(M.J. MacPherson, B.D. Hames および G.R. Taylor編集(1995)); 「ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL」(Harlow および Lane編集(1988)); 「USING ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL」(Harlow および Lane編集(1999));

50

および「ANIMAL CELL CULTURE」(R.I.Freshney編集(1987))を参照されたい。

【0041】

定義

本明細書における特定の用語は、下記に定義された意味を有することがある。

【0042】

明細書および請求項で使用する、単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈が明白に他の意味を指示していない限り、複数の言及を含む。例えば、「細胞(a cell)」はその混合物を含む、複数の細胞を含む。

【0043】

本明細書で使用する、「含んでいる」という用語は組成物および方法が列挙された要素を含むが、その他の要素も排除していないことを意味すると意図されている。組成物および方法を定義するときに使用した「～から本質的に構成される」は、その組成物に本質的に重要である、他のいかなる要素をも除外することを意味する。従って、本明細書で定義した要素から本質的に構成される組成物は、単離および精製方法からの微量汚染物質ならびに例えばリン酸緩衝生理食塩液、保存剤等のような薬学的に許容される担体は除外しない。「～から構成される」は、微量の他の成分および本発明の組成物を投与するための実質的方法段階以外の要素を除外することを意味する。これらの過渡的用语の各々によって定義された態様は本発明の範囲に含まれる。

【0044】

「天然」、「自然」、または「野生型」抗原は、自然生物学的起源から単離されており、被験者において抗原受容体、特にT細胞抗原受容体(TCR)に特異的に結合できるエピトープを含有するポリペプチド、タンパク質、または断片である。

【0045】

用語「抗原」は、当技術分野において明確に理解されており、免疫原性である物質、即ち免疫源、および免疫学的不応性またはアネルギーを誘導する物質、即ちアネルゲンを含む。

【0046】

「変化した、または修飾された抗原」は、対応する野生型抗原の一次配列とは相違する一次配列を有する抗原である。変化した抗原は、合成または組換え方法によって作製でき、翻訳中または翻訳後に、例えばリン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解性開裂、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの結合によって異なって修飾された抗原性ペプチドを含むがそれらに限定されない。(Fergusonら(1988), Ann.Rev.Biochem.57:285-320)。本発明の修飾された、または変化した抗原性エピトープは、天然または野生型エピトープと同一TCRに結合することが意図されている。

【0047】

本明細書で天然抗原または野生型抗原とも称される「自己抗原」という用語は、抗原に対する自己免疫寛容に起因して被験者において免疫応答をほとんどまたは全く誘導しない抗原性ペプチドである。自己抗原の1つの例は、黒色腫特異的抗原gp100である。

【0048】

用語「腫瘍関連抗原」または「TAA」は、腫瘍に関連する、または特異的である抗原を意味する。既知のTAAsの例には、gp100、MARTおよびMAGEが含まれる。

【0049】

用語「主要組織適合遺伝子複合体」または「MHC」は、T細胞への抗原提示および急速な移植片拒絶のために必要とされる細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を意味する。ヒトでは、MHCは「ヒト白血球抗原」または「HLA」複合体としても知られている。MHCによってコードされたタンパク質は、「MHC分子」として知られており、クラスIおよびクラスII MHC分子に分類される。クラスI MHC分子は、 β_2 -ミクログロブリンと非共有結合的に結合したMHC内でコードされた α 鎖からできている膜ヘテロダイマータンパク質を含む。クラスI MHC分子はほぼすべての有核細胞によって発現され、CD8⁺T細胞への抗原提示において機能することが証明されている。クラスI分子は、ヒトではHLA-A、B、およびCを含む

10

20

30

40

50

。クラスII MHC分子もまた非共有結合的に結合した α および β 鎖から構成される膜ヘテロダイマータンパク質を含む。クラスII MHC分子は、 $CD4^+$ T細胞内で機能することが知られており、ヒトではHLA-DP、-DQ、およびDRを含む。ある好ましい態様では、本発明の組成物およびリガンドは、任意のHLAタイプのMHC分子と複合できる。当業者は、HLAの血清型および遺伝子型に習熟している。例えば、bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_coeficient_viewingのページを参照。Rammensee H.G.、Bachmann J.、および Stevanovic S.、「MHC Ligands and Peptide Motifs」、(1997)、Chapman & Hall Publishers;Schrœuder G.M.Th.ら、「The HLA dictionary」、(1999)Tissue Antigens 54:409-437。

【0050】

本明細書で使用する用語「抗原提示マトリックス」は、T細胞の表面上で抗原がT細胞抗原受容体に結合され得るような方法で抗原を提示できる1個または複数の分子を意味する。抗原提示マトリックスは抗原提示細胞(APC)の表面上、APCの小胞調製物上にあつてよく、または例えばビーズもしくはプレートのような固相支持体上の合成マトリックスの形状であつてよい。合成抗原提示マトリックスの1つの例は、 β_2 -ミクログロブリンに複合された精製MHCクラスI分子、このような精製MHCクラスI分子の多量体、精製MHCクラスII分子、または固体支持体に付着させたその機能的部分である。

【0051】

用語「抗原提示細胞(APC)」は、免疫系の特異的エフェクター細胞によって認識できる抗原MHC複合体の形状で1つまたは複数の抗原を提示することができ、それによって提示されている1つまたは複数の抗原に対する有効な細胞免疫応答を誘導することのできる細胞クラスを意味する。多数のタイプの細胞がT細胞認識のためにそれらの細胞表面上で抗原を提示できるが、有効量で抗原を提示し、さらに細胞毒性Tリンパ球(CTL)応答のためにT細胞を活性化する能力を有しているのはプロフェッショナルAPCだけである。APCは、例えばマクロファージ、B細胞、および樹状細胞のような無傷全細胞;または例えば β_2 -ミクログロブリンに複合した精製MHCクラスI分子のような他の天然型もしくは合成分子であつてよい。

【0052】

用語「樹状細胞(DC)」は、様々なリンパおよび非リンパ組織において所見される形態学的に類似の細胞タイプの様々な集団を意味する(Steinman(1991),Ann.Rev.Immunol.9:271-296)。樹状細胞は、生体内で最も強力かつ好ましいAPCを構成する。全部ではないが樹状細胞のサブセットは骨髓前駆細胞に由来し、末梢血中を少数で循環し、未熟ランゲルハンス細胞として、または最終分化成熟細胞のどちらかとして出現する。樹状細胞は単球から分化できるが、それらは別個の表現型を有している。例えば特定分化マーカーであるCD14抗原は、樹状細胞中では所見されないが、単球によって保有されている。また、成熟樹状細胞は食作用性ではないが、単球は強度に食作用性である細胞である。DCがT細胞活性化および増殖に必要な全てのシグナルを提供することは証明されている。

【0053】

用語「抗原提示細胞補充因子」または「APC補充因子」は、無傷の全細胞および抗原提示細胞を補充できる他の分子の両方を含む。適切なAPC補充因子の例には、例えばインターロイキン4(IL-4)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、セプラゲル(Seprag el)およびマクロファージ炎症性タンパク質3 α (MIP3 α)のような分子が含まれる。これらはイミュネックス(Immunex)社、シェーリング・プラウ(Schering-Plough)社、およびR&D システムズ(R&B Systems)社(ミネアポリス、MN)から入手できる。これらはさらにまた「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」(F.M.Ausubelら編集(1987)の中で開示された方法を使用して組換え技術により作製することもできる。上記の因子と同一の生物学的活性を有するペプチド、タンパク質、および化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

【0054】

用語「免疫エフェクター細胞」は、抗原に結合することができ、免疫応答を媒介する細胞を意味する。これらの細胞には、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、NK細胞ならびに、例えばCTL系、CTLクローン、および腫瘍、炎症またはその他の浸潤液からのCTLのよう

な細胞毒性Tリンパ球(CTL)が含まれるが、それらに限定されない。特定の疾患組織は特異的抗原を発現し、これらの抗原に対して特異的なCTLは同定されている。例えば黒色腫の約80%はgp100として知られる抗原を発現する。

【0055】

本明細書で使用する用語「免疫エフェクター分子」は、抗原特異的に結合できる分子を意味し、これには抗体、T細胞抗原受容体、ならびにMHCクラスIおよびクラスII分子が含まれる。

【0056】

「未処理」免疫エフェクター細胞は、その細胞を活性化できる抗原へ一度も曝露されたことのない免疫エフェクター細胞である。未処理免疫エフェクター細胞の活性化は、抗原特異的武装化エフェクターT細胞内へ増殖および分化させるために、ペプチド:MHC複合体の認識およびプロフェッショナルAPCによる共刺激シグナルの同時送達の両方を必要とする。

【0057】

「免疫応答」は広範にリンパ球の異種物質への抗原特異的応答を意味する。免疫応答を誘発することのできるあらゆる物質は「免疫原性」と言われ、「免疫原」と称されている。免疫原はすべて抗原であるが、しかしながら抗原がすべて免疫原であるわけではない。本発明の免疫応答は、体液性(抗体活性を介す)または細胞媒介性(T細胞活性化を介す)であってよい。

【0058】

本明細書で使用する用語「リガンド」は、他の分子上の特異的部位へ結合する任意の分子を意味する。これを言い換えると、リガンドは免疫エフェクター細胞と反応してタンパク質の特異性を付与する。免疫エフェクター細胞上の相補的結合部位と直接に結合するのがタンパク質内のリガンド部位である。

【0059】

ある態様では、本発明のリガンドは例えば抗体またはT細胞受容体(TCR)のような免疫エフェクター細胞上の抗原決定基またはエピトープへ結合する。リガンドは、本発明の抗原、ペプチド、タンパク質、またはエピトープであってよい。

【0060】

本発明のリガンドは抗体上の受容体へ結合しうる。ある態様では、本発明のリガンドは長さが約4~約8アミノ酸である。

【0061】

本発明のリガンドは、MHCクラスI分子上の受容体へ結合しうる。ある態様では、本発明のリガンドは長さが約7~約11アミノ酸、または9もしくは10アミノ酸である。

【0062】

本発明のリガンドは、MHCクラスII分子上の受容体へ結合しうる。ある態様では、本発明のリガンドは長さが約10~約20アミノ酸である。

【0063】

本明細書で使用する用語「抗原感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞」は、以前に抗原に遭遇した上記のような免疫エフェクター細胞である。その未処理対応物とは対照的に、抗原感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞の活性化には共刺激シグナルを必要としない。ペプチド:MHC複合体は十分に認識される。

【0064】

T細胞に関連して使用した場合の「活性化」は、その細胞がもはやG₀期ではなく、細胞タイプ(例、CD8⁺またはCD4⁺)に特徴的な1つまたは複数の細胞毒素、サイトカイン、およびその他の関連する膜関連タンパク質を産生し始め、その表面上で特定抗原を表示する任意の標的細胞を認識して結合し、そのエフェクター分子を放出できることを意味する。

【0065】

本発明の状況では、用語「認識された」は、1つまたは複数のリガンドを含む本発明の組成物が免疫エフェクター細胞によって認識されて結合されることを意味しているが、この

ときこのような結合は効果的な免疫応答を開始する。リガンドが免疫エフェクター細胞によって認識されるかどうかを判定するアッセイ法は当技術分野で知られており、本明細書に記載されている。

【0066】

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

【0067】

用語「交差反応性」は、機能的に重複している本発明の化合物の特定の免疫原性特性を説明するために使用される。より詳細には、それらによって活性化される天然リガンドおよび/または免疫エフェクター細胞の免疫原性特性は、変化したりリガンドがそれによって活性化される天然リガンドおよび/または免疫エフェクター細胞と「交差反応性」であるように、ある程度は変化したりリガンドに共有される。本発明の目的のためには、交差反応性は複数のレベルで明示される：(i)リガンドレベルでは、例えば変化したりリガンドは天然リガンドCTLのTCRに結合して天然リガンドCTLを活性化できる；(ii)T細胞レベルでは、即ち変化した本発明のリガンドは天然リガンドを表示する細胞を効果的に標的として溶解させることのできるT細胞集団(天然リガンドCTLの集団とは別個)のTCRに結合してT細胞集団を活性化する；および(iii)抗体レベルでは、例えば「抗」変化したりリガンド抗体は天然リガンドを検出、認識、結合し、さらに最終的には宿主から天然リガンド除去する免疫応答におけるエフェクターメカニズムを開始させることができる。

【0068】

本明細書で使用する用語「被験者において免疫応答を誘導する」は、当技術分野において明確に理解された用語であり、抗原(またはエピトープ)を被験者内に導入した後の、抗原(またはエピトープ)をその被験者内に導入する前の免疫応答(もしあれば)と比較した、抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答において少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍、さらにより好ましくは少なくとも約500倍、さらにいっそうより好ましくは少なくとも1,000倍またはそれより多くの増加を検出または測定できることを意味する。抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答には、抗原特異的(またはエピトープ特異的)抗体の産生、およびその分子が特異的に抗原(またはエピトープ)に結合するその表面上で発現する免疫細胞の産生が含まれるが、それらに限定されない。所与の抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答が誘導されたかどうかを決定する方法は当技術分野で周知である。例えば、抗原特異的抗体は、例えば試料中の抗体の不動化抗原(またはエピトープ)への結合が検出可能な標識第二抗体(例、酵素標識マウス抗体ヒトIg抗体)を用いて検出されるELISAを含むがそれに限定されない、当技術分野で知られている任意の様々なイムノアッセイ法を使用して検出できる。

【0069】

「共刺激分子」は、抗原提示細胞およびT細胞表面上で発現する受容体-リガンド対間の相互作用に含まれている。過去数年間に渡って蓄積されてきた研究は、静止T細胞がサイトカイン遺伝子の発現および増殖を誘導するために少なくとも2種のシグナルを必要とすることを証明し確認した(Schwartz R.H.(1990)Science 248:1349-1356 および Jenkins M.K.(1992)Immunol.Today 13:69-73)。特異性を付与するシグナルである1種のシグナルは、TCR/CD3複合体と適切なMHC/ペプチド複合体との相互作用によって発生させることができる。第2のシグナルは抗原特異的ではなく、「共刺激」シグナルと称されている。このシグナルは、最初は、マクロファージおよび樹状細胞のような骨髄由来アクセサリー細胞、いわゆる「プロフェッショナル」APCによって提供される活性として定義されていた。数種の分子は共刺激活性を増強することが証明されている。これらは熱安定性抗原(HSA)(Liu Y.ら(1992)J.Exp.Med.175:437-445)、コンドロイチン硫酸修飾MHC不変鎖(Ii-CS)(Naujokas, M.F.ら(1993)Cell 74:257-268)、細胞内接着分子1(ICAM-1)(Van Seventer G.A.(1990)J.Immunol.144:4579-4586)、B7-1、およびB7-2/B70(Schwartz, R.H.(1992)Cell 71:1065-1068)である。これらの分子は各々T細胞上でそれらの同族リガンドと相互作用すること

10

20

30

40

50

によって共刺激を補助すると思われる。共刺激分子は、正常生理的条件下で未処理T細胞の完全活性化を達成するために必要な共刺激シグナルを媒介する。代表的な1種の受容体-リガンド対は、APCの表面上のB7共刺激分子およびT細胞上のその対応受容体CD28またはCTLA-4である(Freemanら(1993)Science 262:909-911;Youngら(1992)J.Clin.Invest.90:229およびNabaviら(1992)Nature 360:266-268)。その他の重要な共刺激分子は、CD40、CD54、CD80、およびCD86である。用語「共刺激分子」は任意の単一分子または分子の組み合わせを含み、これらはT細胞の表面上でTCRによって結合されたペプチド/MHC複合体と共に作用すると、そのペプチドに結合するT細胞の活性化を達成する共刺激効果を提供する。従ってこの用語には、B7、またはT細胞の表面上のTCRがそのペプチドに特異的に結合したときにペプチド/MHC複合体と共に同族リガンドに結合してT細胞の活性化を生じさせる、APC、その断片(単独、他の分子と複合した、または融合タンパク質の一部として)のような抗原提示マトリックス上の他の共刺激分子が含まれている。共刺激分子は、例えばベックマン・クーラー社(Beckman Coulter, Inc., フラートン、CA)を含む様々な供給元から市販で入手可能である。必ずしも明記されてはいないが、野生型または精製共刺激分子と類似の生物学活性を有する分子(例、組換え生成された、またはその突然変異タンパク質)は、本発明の精神および範囲内で使用することが意図されている。

10

【0070】

本明細書で使用する、互換的に使用される「固相支持体」または「固体支持体」は、特定タイプの支持体に限定されていない。相当に多数の支持体を利用でき、それらは当業者には周知である。固相支持体には、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲルが含まれている。本明細書で使用する「固体支持体」にはさらに、合成抗原提示マトリックス、細胞、およびリポソームが含まれている。適切な固相支持体は、所望の最終使用および様々なプロトコルに対する適合性に基づいて選択されてよい。例えば、ペプチド合成のためには、固相支持体は例えばポリスチレン(例、PAM樹脂(バッケム社(Bachem Inc.))、ペニンシュラ・ラボラトリーズ社(Peninsula Laboratories)等から入手される)、POLYHIPE(登録商標)樹脂(アミノテック社(Aminotech)、カナダ)から入手される)、ポリアミド樹脂(ペニンシュラ・ラボラトリーズ社から入手される)、ポリエチレングリコールを用いてグラフト化されたポリスチレン樹脂TentaGel(登録商標)、(ラップ・ポリマー社(Rapp Polymere)、チュービンゲン、ドイツ)、またはポリジメチルアクリルアミド樹脂(ミリゲン/バイオサーチ社(Milligen/Biosearch、カリフォルニア)から入手される)のような樹脂類を挙げることができる。固体支持体はさらにまた、その上でcDNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体、またはその他の分子がアレイ内に固定されているマイクロチップおよびグリッドを含む。グリッドの表面はガラス、プラスチック、シリコン、金、ゼラチン、またはナイロンを含む多種多様な物質から構成されてよい。Lockhart(2000)Nature, 405:827-836; Srinivas(2001)Clin. Chem., 47:1901-1911。例えば、いわゆるSELDI-MS法(表面強化レーザー脱離イオン化&質量分析法)の使用では、試料を生化学的に特徴付けられた表面(抗体や受容体のような分子を含有する)を備えるチップに曝露させ、その後に質量分析法によって結合タンパク質を可視化および同定する。最近利用できる技術を検討するためには、Srinivas, P.ら(2001) Clinical Chemistry 47(10):1901-1911、およびそこに引用される参照(De Wildt, R.M.T.ら(2000)Nat. Biotech 18:989-94、Arenkov, P.ら(2000)Anal. Biochem. 278:123-31、Haab, B.B.ら(2001)Genome Biol. 2:1-13、およびCahill, D.J.(2001)J Immunol. Methods 250:81-91)を参照されたい。さらに固体支持体の範囲内に含まれるのは、何千個という個別腫瘍標本(試験される数百の個体の相違する組織から)から小さな円筒形の組織が打ち抜かれ、その後抗体、RNA等を用いて試験される組織マイクロアレイである。Hoos, A.ら(2001)Am J. Pathol. 158:1245-51。

20

30

40

【0071】

本明細書で使用する用語「免疫調節物質」は、免疫応答を調節し、本発明の抗原性ペプチドを単独で、または本明細書に記載する任意の様々な処方物のいずれか中に含んでいる分子、巨大分子複合体、または細胞である；本発明の抗原性ペプチドを含むポリペプチド；

50

本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド;APCおよび合成抗原提示マトリックス(共刺激分子の存在下または不在下で)を含む、抗原提示マトリックス上でクラスIまたはクラスII MHC分子に結合している本発明の抗原性ペプチド;別の分子または巨大分子構造に共有結合的または非共有結合的に複合した本発明の抗原性ペプチド;ならびに本発明のペプチドに対して特異的である抗原感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞。

【0072】

用語「免疫応答を調節する」は、免疫応答を誘導する(増加させる、誘発する)段階;および免疫応答を低下させる(抑制する)段階を含む。免疫調節方法(またはプロトコール)は、被験者において免疫応答を調節する方法である。

10

【0073】

本明細書で使用する用語「サイトカイン」は、細胞に例えば成長または増殖を誘導するような様々な効果を発揮する多数の因子のうちの任意の因子を意味する。本発明の実施において単独または組み合わせて使用できるサイトカインの非限定的例には、インターロイキン-2(IL-2)、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-12(IL-12)、G-CSF、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-1 α (IL-1 α)、インターロイキン-11(IL-11)、MIP-11、白血病抑制因子(LIF)、c-kitリガンド、トロンプロポイエチン(TPO)、およびflt3リガンドが含まれる。本発明はさらにまた、1つまたは複数のサイトカインが培地から特異的に除外されている培養条件を含む。サイトカインは、例えばジェンザイム社(Genzyme、フラミンガム、MA)、ジーンテック社(Genentech、サウスサンフランシスコ、CA)、アムゲン社(Amgen、サウザンドオークス、CA)、R&Dシステムズ社(ミニアポリス、MN)およびイミュネックス社(シアトル、WA)のような数社の製造供給元から市販で入手できる。必ずしも明記されていないが、野生型または精製サイトカイン(例、組換え技術により製造された、またはその突然変異タンパク質)と類似の生物学的活性を有する分子は本発明の精神および範囲内で使用することが意図されている。

20

【0074】

用語「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」は、ヌクレオチドの任意の長さのポリマー形を意味するために互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および/またはそれらの類似体を含んでいてよい。ヌクレオチドは任意の三次元構造を有してよく、さらに既知または未知のいずれかの機能を実施できる。用語「ポリヌクレオチド」には、例えば一本鎖、二本鎖、および三重のらせん状分子、遺伝子もしくは遺伝子断片、エキソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、ならびにプライマーが含まれている。天然核酸分子に加えて、本発明の核酸分子はまた修飾核酸分子を含んでいてよい。

30

【0075】

用語「ペプチド」は、2個またはより多くのサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチド模倣物の化合物を意味するため広意味に使用される。サブユニットはペプチド結合によって結合されていてよい。別の態様では、サブユニットは例えばエステル、エーテル等の他の結合によって結合されていてよい。本明細書で使用する用語「アミノ酸」は、グリシンおよびDもしくはL光学異性体の両方を含む天然および/または非天然または合成アミノ酸、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣物を意味する。3個またはより多くのアミノ酸のペプチドは、そのペプチド鎖が短い場合は一般にはオリゴペプチドと呼ばれている。ペプチド鎖が長い場合は、そのペプチドは一般にポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれている。

40

【0076】

用語「遺伝的に修飾された」は、外来遺伝子または核酸配列を含有および/または発現し、順に細胞またはその子孫の遺伝子型または表現型を修飾することを意味する。これを言

50

い換えると、細胞の内因性ヌクレオチドへのいかなる付加、欠失、または崩壊をも意味する。

【0077】

本明細書で使用する「発現」は、それによってポリヌクレオチドがmRNA内に転写され、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質内に翻訳される工程を意味する。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合は、発現は、適切な真核細胞宿主が選択されればmRNAのスプライシングを含んでいてよい。発現のために必要な調節エレメントには、RNAポリメラーゼに結合するためのプロモーター配列およびリボソーム結合のための転写開始配列が含まれる。例えば、細菌発現ベクターはlacプロモーターのようなプロモーターならびに転写開始のためのシャイン・ダルガルノ(Shine-Dalgarno)配列および開始コドンAUGを含む(Sambrookら(1989)前記)。同様に、真核細胞発現ベクターには、RNAポリメラーゼIIに対する異種または同種プロモーター、下流ポリアデニル化シグナル、開始コドンAUG、およびリボソームを剥離させるための停止コドンが含まれている。このようなベクターは市販で入手、または例えば一般にベクターを構築するための下記に記載する方法のような当技術分野において周知の方法に記載された配列によって構築することができる。

10

【0078】

「転写制御下で」は当技術分野において明確に理解された用語であり、通例はDNA配列であるポリヌクレオチド配列の転写が、転写の開始に寄与する、または転写を促進するエレメントに機能的に連結されていることに依存することを示している。「機能的に連結された」は、エレメントがそれらが機能することを許容する配列内にある並置を意味する。

20

【0079】

「遺伝子送達賦形剤」は、宿主細胞内に挿入されたポリヌクレオチドを運ぶことのできる任意の分子であると定義されている。遺伝子送達賦形剤の例は、リボソーム、天然ポリマー、および合成ポリマー;リポタンパク質;ポリペプチド;多糖類;リポ多糖類;合成ウイルス外被;金属粒子;ならびに細菌、または例えばバキュロウイルス、アデノウイルス、およびレトロウイルスのようなウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクターを含む生体適合性ポリマー、ならびに多種多様な真核細胞および原核細胞宿主における発現に関して記載されていて、遺伝子療法および単純タンパク質発現のために使用できる当技術分野において典型的に使用されるその他の組換え賦形剤である。

【0080】

本明細書で使用する「遺伝子送達」、「遺伝子導入」等は、導入のために使用される方法とは無関係に、宿主細胞内への外因性ポリヌクレオチド(しばしば「導入遺伝子」と呼ばれる)の導入を意味する用語である。このような方法には、例えばベクター媒介性遺伝子導入(例えばウイルス感染/トランスフェクション、または様々な他のタンパク質もしくは脂質に基づく遺伝子送達複合体によって)のような様々な周知の技術、および「裸の」ポリヌクレオチド(エレクトロポレーション、「遺伝子銃」送達、およびポリヌクレオチドを導入するために使用される様々な他の技術)の送達を容易にする技術が含まれている。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞中で安定的または一過性的に維持されうる。安定的維持は、典型的には導入されたポリヌクレオチドが宿主細胞と適合する複製起源を含有しているか、または染色体外レプリコン(例、プラスミド)のような宿主細胞のレプリコンもしくは核もしくはミトコンドリア染色体内へ組み込むことを必要とする。多数のベクターが哺乳動物細胞への遺伝子送達を媒介できることが、当技術分野および本明細書に記載するように既知である。

30

40

【0081】

「ウイルスベクター」は、インビボ、エクスピボ、またはインビトロのいずれかにおいて宿主細胞内へ送達されるポリヌクレオチドを含む組換え産生ウイルスまたはウイルス粒子であると定義されている。ウイルスベクターの例には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、αウイルスベクター等が含まれている。例えばセムリキ森林ウイルスに基づくベクターおよびシンドビスウイルスに基づくベクターであるαウイルスベクターもまた遺伝子療法および免疫療法に使用するために開発さ

50

れてきた。Schlesinger および Dubensky(1999)Curr Opin Biotechnol.5:434-439 および Zaksら(1999)Nat.Med.7:823-827を参照。遺伝子導入がレトロウイルスベクターによって媒介される局面では、ベクター構築体はレトロウイルスゲノムまたはその一部、および治療用遺伝子を含むポリヌクレオチドを意味する。本明細書で使用する「レトロウイルス媒介性遺伝子導入」または「レトロウイルス形質導入」は、同一の意味を有しており、細胞に侵入し、そのゲノムを宿主細胞のゲノムに組み込むウイルスによって遺伝子または核酸配列が宿主細胞内へ安定的に運搬される工程を意味する。ウイルスは、その通常の感染メカニズムを通して宿主細胞内に侵入、または細胞内に侵入するために異なる宿主細胞表面受容体もしくはリガンドへ結合するように修飾され得る。本明細書で使用するレトロウイルスベクターは、ウイルスまたはウイルス様侵入メカニズムを通して外因性核酸を細胞内へ導入できるウイルス粒子を意味する。

10

【0082】

レトロウイルスは、それらの遺伝情報をRNAの形状で運ぶことができる;しかしウイルスがいったん細胞に感染すると、RNAは感染細胞のゲノムDNA内に組み込まれるDNAの形態へ逆転写される。組み込まれたDNAの形態はプロウイルスと呼ばれている。

【0083】

遺伝子導入が例えばアデノウイルス(Ad)、偽アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス(AAV)のようなDNAウイルスベクターによって媒介される局面では、ベクター構築体はウイルスゲノムまたはその一部、および導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを意味する。アデノウイルス(Ad)は、比較的明確に特徴付けられた、50種を超える血清型を含む同種ウイルス群である。例えば国際公開広報第95/27071号を参照。Adは容易に増殖するので、宿主細胞ゲノム内へ組み込む必要がない。組換えAd由来ベクター、特に野生型ウイルスの組換えおよび生成の能力を低下させる組換えAd由来ベクターもまた構築されている。国際公開広報第95/00655号および国際公開広報第95/11984号を参照。野生型AAVは宿主細胞ゲノム内へ組み込む高い感染性および特異性を有している。Hermonat and Muzyczka(1984)Proc. Natl.Acad.Sci.USA 81:6466-6470およびLebkowskiら(1988)Mol.Cell.Biol.8:3988-3996を参照。

20

【0084】

プロモーターおよびポリヌクレオチドを機能的に連結させることのできるクローニング部位の両方を含むベクターは当技術分野において周知である。このようなベクターはインビトロまたはインビボでRNAを転写することができ、例えばストラタジーン社(Stratagene、ラホーヤ、CA)およびプロメガ・バイオテック社(Promega Biotech、マジソン、WI)のような供給元から市販で入手できる。発現および/またはインビトロ転写を最適化するために、クローンの5'および/または3'未翻訳部分の除去、付加、または変化させ、転写または翻訳のいずれかのレベルで、余分な潜在的に不適切な代替翻訳開始コドンまたはその他の発現を妨害もしくは減少させる可能性のある他の配列を除去することが必要な場合がある。あるいはまた、発現を増強させるためにコンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンの5'の直後に挿入できる。

30

【0085】

遺伝子送達賦形剤には、さらにDNA/リボソーム複合体、および標的とされたウイルスタンパク質DNA複合体を含む数種の非ウイルスベクターが含まれている。本発明の方法においてさらに標的とする抗体またはその断片も含むリボソームを使用できる。細胞への送達を強化するために、本発明の核酸またはタンパク質は、例えばTCR、CD3、またはCD4のような細胞表面抗原へ結合する抗体またはその結合断片へ共役させることができる。

40

【0086】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応してヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を通して安定化されている複合体を形成する反応を意味する。水素結合は、ワトソン-クリック(Watson-Crick)塩基対合、フーグシュタイン(Hoogsteen)結合、または任意の他の配列特異的方法によって発生しうる。この複合体は、二重鎖構造を形成する二本鎖、複数鎖複合体を形成する3本またはより多くの鎖、単一自己ハイブ

50

リダイジング鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含んでいてよい。ハイブリダイゼーション反応は、例えばPCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素開裂のようなより広範な工程において段階を構成できる。

【0087】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例には次が含まれる。約25℃～約37℃のインキュベーション温度；約6XSSC～約10×SSCのハイブリダイゼーションバッファー濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約6×SSCの洗浄溶液。中等度のハイブリダイゼーション条件の例には次が含まれる。約40℃～約50℃のインキュベーション温度；約9×SSC～約2×SSCのバッファー濃度；約30%～約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC～約2×SSCの洗浄溶液。高度にストリンジェントな条件の例には次が含まれる。約55℃～約68℃のインキュベーション温度；約1×SSC～約0.1×SSCのバッファー濃度；約55%～約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1X SSC、または脱イオン水の洗浄溶液。一般に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は5分間～24時間、1、2、または3回以上の洗浄段階、および洗浄インキュベーション時間は約1、2、または15分間である。SSCは0.15M NaClおよび15mMクエン酸塩バッファーである。他のバッファー系を使用するSSCの等価物を使用できると理解されている。

10

【0088】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域(またはポリペプチドまたはポリペプチド領域)は、整列させて2つの配列を比較した場合塩基(またはアミノ酸)のパーセンテージが同一であることを意味する他の配列との一定のパーセンテージ(例えば、80%、85%、90%、または95%)の「配列同一性」を有している。この整列および相同性率もしくは配列同一性は、例えば「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」(F.M.Ausubelら編集、1987)補遺30、第7.7.18章、表7.7.1に記載されているように当技術分野で周知のソフトウェアプログラムを使用して決定できる。好ましくは、整列にはデフォルトのパラメーターを使用する。好ましい整列プログラムは、デフォルトパラメーターを使用するBLASTである。特に、好ましいプログラムは、次のデフォルトパラメーターを使用するBLASTNおよびBLASTPである。遺伝コード=標準；フィルター=なし；鎖=両方；カットオフ(cutoff)=60；予想=10；マトリックス=BLOSUM62；記述=50；配列；HIGH SCOREによるソート；データベース=非冗長性、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻訳+SwissProtein+SPupdate+PIL。これらのプログラムの詳細は次のインターネットアドレスで見出すことができる。www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

20

30

【0089】

本明細書で使用する「インビボ」遺伝子送達、遺伝子導入、遺伝子療法等は、外因性ポリヌクレオチドを含むベクターの例えばヒトまたは非ヒト哺乳動物のような生体の身体内への直接的導入を意味する用語であり、それにより外因性ポリヌクレオチドはそのような生体の細胞へインビボで導入される。

【0090】

用語「単離された」は、細胞およびさもなければポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片が通常は結び付いている、構成要素から分離されたことを意味する。例えば、ポリヌクレオチドに関しては、単離されたポリヌクレオチドは通常は染色体内で結び付いている5'および3'配列から分離されているポリヌクレオチドである。当業者には明白であるように、非天然型ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片はその天然型対応物から区別するために「単離」を必要としない。さらに、「濃縮された」、「分離された」または「希釈された」ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、1容積当たりの濃度または分子数がその天然型対応物と比較して「濃縮された」より大きい、または「分離された」より小さいことでその天然型対応物から区別できる。天然型対応物とその一次配列において、または例えばそのグリコシル化パターンによって相違する、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、その一次配列によって、あるいは例えばグリコシル化パターンのような他の特徴によって天然

40

50

型対応物から区別できるので、その単離した形態で存在する必要はない。本明細書に開示する発明の各々について明示的には言及しないが、下記に開示する適切な条件下での組成物各々についての上記の態様全てが、本発明によって提供されると理解されなければならない。従って、非天然型ポリヌクレオチドは単離された天然型ポリヌクレオチドとは別個の態様として提供される。細菌細胞内で産生するタンパク質は、細胞中でタンパク質を自然に産生する真核細胞から単離された天然型タンパク質とは別個の態様として提供される。

【0091】

「宿主細胞」、「標的細胞」、または「レシピエント細胞」は、ベクターまたは外因性核酸分子、ポリヌクレオチドおよび/もしくはタンパク質取込みのためのレシピエントであり得るか、またはレシピエントであったことがある、任意の個々の細胞または細胞培養を含有することが意図されている。また、単一細胞の子孫を含有することも意図されており、その子孫は、自然の、偶発的、または意図的な変異を原因として、元の親細胞と(形態学的、またはゲノムもしくは全DNA相補性で)必ずしも完全に同一でなくともよい。細胞は、原核細胞または真核細胞であってよく、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、および例えばネズミ、ラット、サル、またはヒトのような哺乳動物細胞を含むが、それらに限定されない。

10

【0092】

「被験者」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物は、マウス、サル、ヒト、家畜、競技用動物、および愛玩動物を含むがそれらに限定されない。

20

【0093】

「対照」は、比較する目的の実験において使用される代替被験者または試料である。対照は、「陽性」または「陰性」であり得る。例えば、実験の目的が遺伝子の変化した発現レベルと特定タイプの癌との相関を判定することである場合は、一般には陽性対照(そのような変化を有し、その疾患に特徴的な症状を呈している被験者または被験者からの試料)、および陰性対照(変化した発現およびその疾患の臨床症状が欠如している被験者または被験者からの試料)を使用するのが好ましい。

【0094】

互換的に使用され、単数形および複数形のいずれもある用語「癌」、「新生物」、および「腫瘍」は、宿主生体に対して病理的になる悪性形質転換を受けた細胞を意味する。一次癌細胞(即ち、悪性形質転換部位の近くから入手された細胞)は、明確に確立された技術、特に組織学検査によって非癌細胞から容易に区別できる。本明細書で使用する癌細胞の定義には、一次癌細胞だけではなく、癌細胞祖先に由来する任意の細胞も含まれている。これには転移癌細胞、ならびに癌細胞に由来するインビトロ培養物および細胞株が含まれている。通常は固形腫瘍として顕在化するタイプの癌について言及する場合、「臨床的に検出可能な」腫瘍は、例えばCATスキャン、磁気共鳴イメージング(MRI)、X線、超音波、または触診のような方法によって腫瘍塊に基づいて検出できる腫瘍である。生化学的または免疫学的所見単独では、この定義を満たすには不十分なことがある。

30

【0095】

新生物は、組織の比較的自律的な新規増殖によって産生した異常な塊または細胞コロニーである。ほとんどの新生物は、悪性形質転換を受けた単一細胞のクローン性増殖から発生する。正常細胞から新生細胞への形質転換は、細胞ゲノムを直接的かつ不可逆性に変化させる化学的、物理的、または生物学的物質(もしくは事象)によって誘発され得る。新生細胞は、一部の特殊機能の消失、および新規生物学的特性、最も重要には比較的自律的な(制御されない)増殖の特性の獲得を特徴とする。新生細胞はそれらの遺伝性生物学的特徴を子孫細胞へ伝える。

40

【0096】

新生物の過去、現在、および将来予測される生物学的挙動、または臨床経過はさらに良性または悪性と分類されるが、これは診断、治療、および予後において極めて重要な区別で

50

ある。悪性新生物は極めて高度の自律性を明示し、侵襲および転移性に広げることができ、治療に抵抗性で、さらに死を誘発することがある。良性新生物は程度のより低い自律性を有し、通例は侵襲性ではなく、転移せず、さらに一般的には適切に治療されれば大きな傷害を生じさせない。

【0097】

癌は、悪性新生物に対する一般的用語である。退形成は、癌細胞に特徴的な特性であり、正常な構造的および機能的特徴の欠如を意味する(未分化)。

【0098】

腫瘍は、例えば炎症性または他の膨潤のような文字通りあらゆるタイプの膨潤であるが、現代の用法では一般に新生物を意味する。接尾辞「-oma(-腫瘍)」は腫瘍を意味し、通常は線維腫、脂肪腫、その他におけるような良性新生物を意味するが、ときにはいわゆる黒色腫、肝腫、および精上皮腫におけるような悪性新生物、または例えば血腫、肉芽腫、もしくは過誤腫のような非新生物病変をも表す。

10

【0099】

接尾辞「-blastoma(-芽細胞腫)」は、例えば副腎の神経芽細胞腫または眼の網膜芽細胞腫のような胚細胞の新生物を意味する。

【0100】

組織発生とは、組織の起源であり、起源の組織細胞に基づいて新生物を分類する方法である。腺腫は腺上皮の良性新生物である。癌腫は上皮の悪性腫瘍である。肉腫は間充組織の悪性腫瘍である。

20

【0101】

新形成を分類する1つのシステムは、良性または悪性いずれであるかの生物学的(臨床的)挙動、ならびに組織学および細胞学的検査によって決定されるような新生物の起源の組織または細胞である組織発生を利用する。新生物は、有糸分裂できる細胞を含有するほとんど任意の組織から発生する可能性がある。新生物の組織発生分類は、組織学および細胞学的検査によって決定されるような起源の組織(または細胞)に基づいている。

【0102】

「抑制性」腫瘍増殖とは、本明細書に記載する抗原感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞に接触していない場合の増殖と比較して縮小した増殖状態を示している。腫瘍細胞増殖は、腫瘍サイズの測定、腫瘍細胞が³H-チミジン取り込みアッセイ法を使用して増殖するかどうかの測定、または腫瘍細胞の計数を含むがそれらに限定されない当技術分野で周知の任意の手段によって評価できる。「抑制性」腫瘍細胞増殖とは、緩徐化、遅延化のいずれかまたは全部を意味し、「抑制性」腫瘍増殖は腫瘍増殖を停止させた場合の縮小している増殖状態および腫瘍収縮を意味している。

30

【0103】

用語「培養する」は、様々な種類の培地上または培地中での細胞または生体のインビトロ繁殖を意味する。培養中の細胞増殖の子孫は、親細胞と完全に(形態学的、遺伝学的、または表現型的に)同一ではなくてもよいと理解されている。「伸長された」は、細胞の任意の増殖または分割を意味する。

【0104】

「組成物」は、活性物質と例えばアジュバントのような不活性(例えば検出可能な物質または標識)または活性である、その他の化合物または組成物との組み合わせを意味する。

40

【0105】

「薬学的組成物」は、活性物質と、組成物をインビトロ、インビボ、またはエキスビボでの診断的または治療的使用に適合させる不活性または活性の担体との組み合わせを含むことが意図されている。

【0106】

本明細書で使用する用語「薬学的に許容される担体」は、例えばリン酸緩衝食塩液、水、および例えば油/水型もしくは水/油型エマルジョンのようなエマルジョン、および様々なタイプの湿潤剤のような標準医薬用担体のいずれかを含む。組成物はさらにまた安定剤お

50

よび保存料を含むことができる。担体、安定剤、およびアジュバントの例については、Martin, 「REMINGTON'S PHARM.SCI., 15th Ed.」 (Mack Publ.Co., イーストン(1975))を参照されたい。

【0107】

「有効量」は、有益または所望の結果を達成するために十分な量である。有効量は1つまたは複数の投与、適用、または用量で投与できる。

【0108】

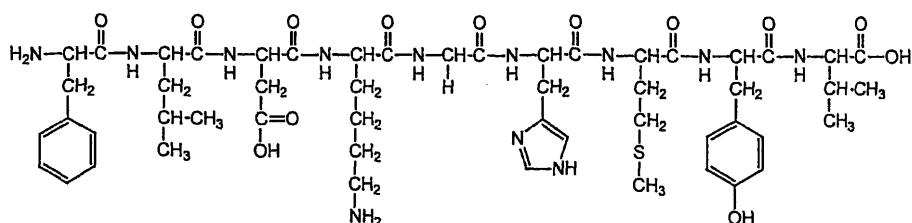
ペプチドリガンド化合物および組成物

本発明は次の構造を有する化合物を提供する。

【化4】

配列番号:3

FLDKGHMYV



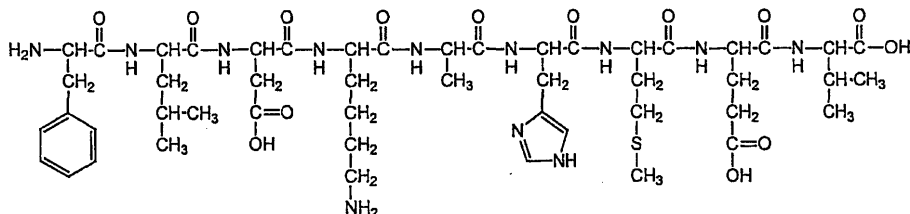
10

または

【化5】

配列番号:5

FLDKAHMEV



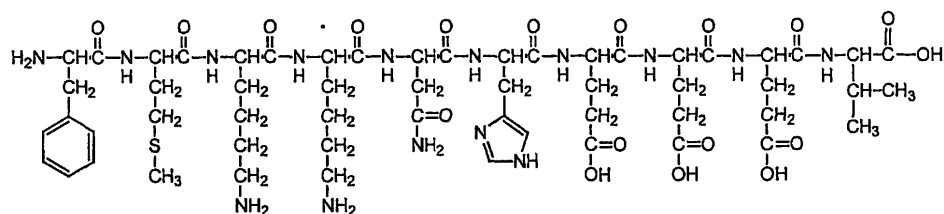
20

または

【化6】

配列番号:7

FMKKNHEEV



30

【0109】

本発明はまた、MHC分子に結合し、同族天然抗原性エピートおよびそれらの対応する天然タンパク質への免疫応答を調節するために有用である組成物を提供する。

【0110】

本発明は、さらに抗癌ワクチンの構成要素として、および差別的な、即ち異常な抗原CK-18の発現を特徴とする細胞に対して特異的である免疫エフェクター細胞を増大させるために有用である組成物を提供する。

【0111】

「CK-18関連癌または悪性腫瘍」は、抗原タンパク質の分化的発現が新生物表現型に対す

40

50

るマーカーとして機能する癌または悪性腫瘍である。CK-18抗原の分化的発現を示す癌のタイプの例には乳癌および肺癌が含まれるが、それらに限定されない。

【0112】

ある態様では、本発明のリガンドは天然抗原性エピトープへのMHC結合に対して匹敵する、または増強した親和性を有する。ペプチド:MHCクラスI結合特性が免疫原性と相関することは証明されている(Sette, A.ら(1994)Immunol.153:5586;van der Burg,S.H.ら(1996)J.Immunol.156:3308)。本発明のリガンドのMHCクラスI分子への匹敵する結合は当技術分野において知られている方法によって測定でき、アルゴリズムに基づいて親和性を計算する方法(例えば、Parkerら(1992)J.Immunol.149:3580-3587を参照)および実験的に結合親和性を決定する方法(例えば、Tanら(1997)J.Immunol.Meth.209(1):25-36を参照)が含まれるがそれらに限定されない。例えば、クラスI分子へのペプチドの相対結合は、様々な濃度の被験ペプチド(例、100mM~1nMの範囲内)を使用して、界面活性剤溶解MHC分子への放射標識標準ペプチドの結合に基づいて測定できる。MHCクラスI重鎖および β_2 -ミクログロブリンが固定濃度(例、5nM)の放射標識標準(対照)ペプチドおよび様々な濃度の被験ペプチドと共に適切な時間(例、2時間~72時間)室温でプロテアーゼ阻害剤の混合物の存在下で共インキュベートされる。対照チューブは標準ペプチドおよびMHC分子を含むが、被験ペプチドを含んでいない。MHC結合放射能がゲル濾過によって測定される。IC₅₀(対照ペプチドの結合の50%阻害を生じさせる被験ペプチドの濃度)が各ペプチドについて計算される。結合親和性を決定するさらなる方法は当技術分野において既知である。別の態様では、本発明のリガンドは天然抗原性エピトープに匹敵するまたは増強された抗原特異的T細胞活性化を誘発する。本発明のリガンドの免疫原性を決定する方法は当技術分野において知られており、al-Ramadiら(1992)J.Immunol.155(2):662-673;およびZuegelら(1998)J.Immunol.161(4):1705-1709に記載されている方法が含まれるが、それらに限定されない。

10

20

【0113】

ある態様では、本発明の組成物は少なくとも1種、あるいは少なくとも2種、あるいは少なくとも3種の本発明の免疫原性リガンドを含む。ある局面では、そのような組成物は単一リガンドの2個またはより多くのコピーを含んでいてよい。また別の局面では、そのような組成物は2個またはより多くのリガンドを含んでいてよいが、このとき前記2個またはより多くのリガンドの各リガンドは前記組成物中のすべての他のリガンドとは別個である。ある態様では、2個またはより多くの免疫原性リガンドが共有結合している。

30

【0114】

本発明は、新規の抗原性ペプチド配列を提供し、これらは抗癌ワクチンの構成要素として、およびヒト癌抗原CK-18の分化的な発現を特徴とする細胞および癌細胞に対して特異的である免疫エフェクター細胞を増大させるために有用である。

【0115】

さらに用語「抗原性ペプチド」に含まれるのは、任意で配列番号：1、3、5、または7の配列を含む介在アミノ酸配列およびポリペプチドを含む本発明の抗原性ペプチドの多量体(鎖状体)である。本発明はまた、これらの配列を含むポリペプチドを提供するが、このときこれらのポリペプチドはヒト癌抗原CK-18細胞毒性Tリンパ球によって優先的に認識される。

40

【0116】

本発明のペプチド配列を含むポリペプチドは、天然ヒトCK-18ポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの配列を変化させることによって調製できる。これは、当業者には周知の組換えDNA技術の方法によって遂行される。例えば、部位特異的突然変異は、ポリヌクレオチド配列に変化を導入するために天然ヒト癌抗原CK-18(配列番号：2)またはエピトープ(配列番号：8)をコードする組換えポリヌクレオチド上で実施されてよい。

【0117】

本発明のタンパク質およびポリペプチドは、例えばパーキン・エルマー/アプライド・バイオシステムズ(Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., フォスターシティ、CA、USA)製の430A型または431A型のような市販で入手できる自動ペプチド合成装置を使用した化学合

50

成によって入手できる。合成されたタンパク質またはポリペプチドは沈降させて、さらに例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製できる。従って、本発明はさらにまた例えばアミノ酸および酵素のようなタンパク質および試薬の配列を提供し、適切な方向および直鎖状配列にあるアミノ酸と結合させることによって、本発明のタンパク質を化学的に合成する工程も提供する。

【0118】

あるいは、タンパク質およびポリペプチドは宿主細胞および下記で説明するベクター系を使用した本明細書で説明するような周知の組換え技術によって入手することもできる

【0119】

ペプチド類似体

当業者には、変化した特性を提供するために任意のペプチドに修飾を加えることができることは周知である。本明細書で使用する用語「アミノ酸」はグリシンおよびDもしくはL光学異性体両方を含む天然および/または非天然または合成アミノ酸、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣物のいずれをも意味する。3個またはより多くのアミノ酸からなるペプチドは、ペプチド鎖が短い場合は一般にオリゴペプチドと呼ばれる。ペプチド鎖が長い場合、そのペプチドは一般にポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれる。

【0120】

本発明のペプチドは非天然アミノ酸を含むように修飾できる。従って、ペプチドは、ペプチドへ特別な特性を伝達するためにD-アミノ酸、D-およびL-アミノ酸の組み合わせ、ならびに様々な「デザイナー」アミノ酸(例、βメチルアミノ酸、C-αメチルアミノ酸、およびN-αメチルアミノ酸、等)を含んでいてよい。さらに、特異的結合段階で特異的アミノ酸を指定することによって、αヘリックスβターン、βシート、γターンを備えるペプチドおよび環状ペプチドを生成できる。一般に、αらせん二次構造またはランダム二次構造が好ましいと考えられる。

【0121】

また別の態様では、有用な化学的および構造的特性を付与するペプチドのサブユニットが選択される。例えば、D-アミノ酸を含むペプチドは、インビボでL-アミノ酸特異的プロテアーゼに耐性である。D-アミノ酸を用いて修飾された化合物は、本発明のペプチドをレトロインバーソ(retro-inverso)ペプチドとして作製するため逆の順序に整列されたアミノ酸を用いて合成できる。さらに、本発明はより明確に定義された構造特性を有するペプチドの調製、ならびに新規特性を備えたペプチドを調製するためのペプチド模倣物および例えばエステル結合のようなペプチド模倣結合の使用を想定している。別の態様は、減少させたペプチド結合、即ち $R_1-CH_2NH-R_2$ (式中、 R_1 および R_2 はアミノ酸残基または配列である)を組み込んだペプチドが生成されてよい。減少させたペプチド結合は、ジペプチドサブユニットとして導入されてよい。このような分子はペプチド結合加水分解、例えばプロテアーゼ活性に対して耐性であると思われる。このような分子は、例えば代謝性崩壊に対する耐性を原因とするインビボでの延長された半減期、またはプロテアーゼ活性のような独特の機能および活性を備えたリガンドを提供すると考えられる。さらに特定の系では拘束ペプチドが機能活性の強化を示すことが周知である。(Hruby(1982)Life Sciences 31:189-199およびHrubyら(1990)Biochem J.268:249-262);本発明はすべての他の位置においてランダム配列を組み込む拘束ペプチドを生成する方法を提供する。

【0122】

高次構造的な拘束を誘導する非古典的アミノ酸

下記の非古典的アミノ酸は、特定高次構造的モチーフを導入するために本発明のペプチド内に組み込まれてよい:1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート(Kazrnierskiら(1991)、J.Am.Chem.Soc.113:2275-2283);(2S,3S)-メチル-フェニルアラニン、(2S,3R)-メチル-フェニルアラニン、(2R,3S)-メチル-フェニルアラニンおよび(2R,3R)-メチル-フェニルアラニン(Kazmierski および Hruby(1991)Tetrahedron Lett.32(41):5769-5772);2-アミノテトラヒドロナフタレン-2-カルボン酸(Landis(1989)博士論文、アリゾナ大学);ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート(Miyakeら(1989)J

10

20

30

40

50

.Takeda Res.Labs.43:53-76);ヒスチジンイソキノリンカルボン酸(Zechelら(1991)Int.J. Pep.Protein Res.38(2):131-138);ならびにHIC(ヒスチジン環状ウレア)、(Dharanipragad aら(1993)Int.J.Pep.Protein Res.42(1):68-77および((1992)Acta.Cryst.,Crystal Struc .Comm.48(IV):1239-1241)。

【0123】

下記のアミノ酸類似体およびペプチド模倣物は、特異的二次構造を誘導するまたは有利にするためにペプチド内へ取り込まれてよい:LL-Acp(LL-3-アミノ-2-プロペニドン-6-カルボン酸)、βターン誘導ジペプチド類似体(Kempら(1985)J.Org.Chem.50:5834-5838);βシート誘導類似体(Kempら(1988)Tetrahedron Lett.29:5081-5082);βターン誘導類似体(Kempら(1988)Tetrahedron Lett.29:5057-5060);αヘリックス誘導類似体(Kempら(1988)Tetrahedron Lett.29:4935-4938);γターン誘導類似体(Kempら(1989)J.Org.Chem.54:109:115);次の参考文献によって提供された類似体:Nagai および Sato(1985)Tetrahedron Lett.26:647-650;およびDiMaioら(1989)J.Chem.Soc.Perkin Trans.p.1687;Gly-Alaターン類似体(Kahnら(1989)Tetrahedron Lett.30:2317);アミド結合同配体(Clonesら(1988)Tetrahedron Lett.29:38S3-38S6);テトラゾール(Zabrockiら(1988)J.Am.Chem.Soc.110:587S-5880);DTC(Samanenら(1990)Int.J.Protein Pep.Res.35:501:509); およびOlsonら(1990)J.Am.Chem.Sci.112:323-333およびGarveyら(1990)J.Org.Chem.56:436の中で教示された類似体。高次構造的に拘束されたβターンおよびβバルジの模倣物ならびにそれらを含むペプチドは、Kahnへ1995年8月8日に発行された米国特許第5,440,013号に記載されている。

【0124】

抗原性ペプチド

本発明の抗原性ペプチドエピトープは様々な処方物において使用できるが、それは使用目的に依存して相違してよい。

【0125】

本発明の抗原性ペプチドエピトープは、様々な他の分子へ共有結合的または非共有結合的に結合(複合)されてよく、その性質は特定の目的に依存して相違してよい。例えば、本発明のペプチドは、天然および合成ポリマー、タンパク質、多糖類、ポリペプチド(アミノ酸)、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、および脂質を含むがそれらに限定されない巨大分子担体へ共有結合的または非共有結合的に複合されることができる。ペプチドは、リポソーム内へ導入するために脂肪酸へ抱合されてよい。米国特許第5,837,249号。本発明のペプチドは、固体支持体と共に共有結合的または非共有結合的に複合されてよく、様々な固体支持体が当技術分野において既知である。本発明の抗原性ペプチドエピトープは、下記でより詳細に説明するように共刺激分子を含む、または含まない抗原提示マトリックスと結び付けられてよい。

【0126】

タンパク質担体の例は、スーパー抗原、血清アルブミン、破傷風トキソイド、オブアルブミン、チログロブリン、ミオグロブリン、および免疫グロブリンを含むがそれらに限定されない。

【0127】

ペプチド-タンパク質担体ポリマーは、例えばカルボジミドのような従来型架橋剤を使用して形成しうる。カルボジミドの例は、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミド(CMC)、1-エチル-3-(3-ジメチアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)および1-エチル-3-(4-アゾニア-44-ジメチルペンチル)カルボジイミドである。

【0128】

その他の適切な架橋剤の例は、臭化シアン、グルタルアルデヒド、および無水コハク酸である。一般に、ホモ二官能性アルデヒド、ホモ二官能性エポキシド、ホモ二官能性イミドエステル、ホモ二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、ホモ二官能性マレイミド、ホモ二官能性ハロゲン化アルキル、ホモ二官能性二硫化ピリジル、ホモ二官能性ハロゲン化アリール、ホモ二官能性ヒドラジド、ホモ二官能性ジアゾニウム誘導体、およびホモ二官能性光反応性化合物を含む多数のホモ二官能性物質のいずれかを使用できる。さらに

、例えばアミン反応性およびスルフヒドリル反応性基を有する化合物、アミン反応性および光反応性基を有する化合物、ならびにカルボニル反応性およびスルフヒドリル反応性基を有する化合物のようなヘテロ二官能性化合物が含まれる。

【0129】

このようなホモ二官能性架橋剤の特別な例には、二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルであるジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)、ジスクシンイミジルスベレート、およびジスクシンイミジルタルタレート;二官能性イミドエステルであるジメチルアジピミデート、ジメチルピメリミデート、およびジメチルスベリミデート;二官能性スルフヒドリル反応性架橋剤である1,4-ジ-[3'(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ブタン、ビスマレイミドヘキサン、およびビス-N-マレイミド-1,8-オクタン;二官能性ハロゲン化アリールである1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンおよび4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン;例えばビス-[b-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィドのような二官能性光反応性物質;二官能性アルデヒドであるホルムアルデヒド、マロンジアルデヒド、スクシンアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびアジプアルデヒド;例えば1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルのような二官能性エポキシド;二官能性ヒドラジドであるアジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、およびコハク酸ジヒドラジド;二官能性ジアゾニウムであるo-トリジン、ジアゾ化およびビス-ジアゾ化ベンジジン;二官能性ハロゲン化アルキルであるN1N'-エチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、N1N'-ヘキサメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、N1N'-ウンデカメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、ならびに例えば各々ala'-ジヨード-p-キシレンスルホン酸およびトリ(2-クロロエチル)アミンのようなハロゲン化ベンジルおよびハロマスタードが含まれている。

10

20

【0130】

ペプチドへのタンパク質の抱合を達成するために使用できる一般的なヘテロ二官能性架橋剤の例には、SMCC(スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)、SIA B(N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート)、SMPB(スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート)、GMBS(N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステル)、MPBH(4-(4-N-マレイミドポフェニル)ブチル酸ヒドラジド、M2C2H(4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル-ヒドラジド)、SMPT(スクシンイミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン)、およびSPDP(N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)が含まれるがそれらに限定されない。

30

【0131】

架橋は、カルボニル基を還元アミノ化によってアミン基またはヒドラジド基へ結合させることによって遂行されてよい。

【0132】

本発明のペプチドは、さらにまたイオン性、吸着性、または生体特異的相互作用を通してのモノマーの非共有結合的付加として処方されてよい。ペプチドと高度に正電荷または負電荷分子との複合は、例えば脱イオン水中のような低イオン強度環境下での塩橋形成を通して実施されてよい。大きな複合体は、各々多数の負電荷および正電荷を含有する例えばポリ-(L-グルタミン酸)またはポリ-(L-リシン)のような電荷ポリマーを使用して作製できる。ペプチドの吸着は、架橋または化学重合タンパク質を効果的に模倣する非共有結合的関連ペプチドスーパー抗原複合体を形成する、例えば微粒子ラテックスビーズのような表面または他の疎水性ポリマーへ実施されてよい。最終的に、ペプチドは他の分子間の生体特異的相互作用の使用を通して非共有結合されてよい。例えば、アビジンまたはストレプトアビジンまたはそれらの誘導体のようなタンパク質に対するビオチンの強力な親和性を利用するとペプチド複合体を形成することができる。これらのビオチン結合タンパク質は、溶液中のビオチンと相互作用できる、または別の分子へ共有結合的に付加できる4つの結合部位を含む。Wilchek(1988)Anal.Biochem.171:1-32。ペプチドは、タンパク質上で利用できるアミン基と反応する例えばD-ビオチンのN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル

40

50

(NHS-ビオチン)のような一般的ビオチン化試薬を使用してビオチン基を有するように修飾できる。ビオチン化ペプチドは、その後大きな複合体を作製するためにアビジンまたはストレプトアビジンと共にインキュベートできる。このようなポリマーの分子量は、アビジンまたはストレプトアビジンに対するビオチン化ペプチドのモル比を慎重に制御することを通して調節できる。

【0133】

さらに本出願によって、診断方法において使用するために検出可能な物質へ抱合された本明細書に記載するペプチドおよびポリペプチドが提供される。例えば、検出可能に標識されたペプチドおよびポリペプチドはカラムに結合することができ、抗体の検出および精製のために使用できる。これらはまた下記で説明する抗体を産生するための免疫原として有用である。

10

【0134】

本発明のペプチドはまた、例えば無菌または水性溶液、薬学的に許容される担体、懸濁液、ならびにエマルジョンのような様々な液相担体と組み合わせることができる。非水性溶剤の例は、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコール、および植物油を含む。抗体を調製するために使用した場合、担体は特異的免疫応答を非特異的に増強するために有用であるアジュバントをさらに含むことができる。当業者であれば、アジュバントが必要であるかどうかを容易に決定して1種を選択できる。しかし、例示する目的でのみ、適切なアジュバントは、フロイント(Freund)の完全および不完全アジュバント、鉍物塩、ならびにポリヌクレオチドを含むがそれらに限定されない。

20

【0135】

抗原性ペプチドリガンドをコードするポリヌクレオチド

本発明はさらに、配列番号：1、3、5、または7の配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドの相補体を提供する。本明細書で使用する用語「ポリヌクレオチド」には、DNA、RNA、および核酸模倣物が含まれている。これらのポリヌクレオチド、またはそれらの相補体に加えて、本発明は、例えば配列またはそれらの相補体へのアンチセンスRNAのようなアンチセンスポリヌクレオチド鎖をさらに提供する。配列番号：2、4、6または8に提供された配列を使用するとアンチセンスRNAを入手でき、その方法はVan der Krolら(1988)BioTechniques 6:958に記載されている。

【0136】

本発明のポリヌクレオチドはPCRを使用して複製できる。PCRテクノロジーは、米国特許第4,683,195号;第4,800,159号;第4,754,065号;および第4,683,202号の主題であり、「PCR:THE POLYMERASE CHAIN REACTION」(Mullisら編集、Birkhauser Press,ボストン(1994))およびそこに言及される参考文献に記載されている。

30

【0137】

あるいは、当業者であれば本明細書に提供された配列および市販のDNA合成装置を使用してDNAを複製できる。従って、本発明はまたポリヌクレオチドの直鎖状配列、適切なプライマー分子、酵素のような化学物質、およびそれらの複製についての説明書を提供する段階、ならびにポリヌクレオチドを入手するためにヌクレオチドを適切な方向で化学的に複製または結合させる段階によって本発明のポリヌクレオチドを入手するための工程を提供する。別の態様では、これらのポリヌクレオチドはさらに単離される。さらにまた、当業者であれば複製および増幅のためにそのポリヌクレオチドを適切な複製ベクター内へ挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞(原核または真核)内へ挿入できる。このように増幅させたDNAは、当業者には周知の方法によって細胞から単離できる。この方法によってポリヌクレオチドを入手するための工程もまた本明細書に提供され、同様にしてポリヌクレオチドも入手される。

40

【0138】

RNAはまず最初にDNAポリヌクレオチドを適切な宿主細胞内へ挿入することによって入手できる。DNAは例えば適切な遺伝子送達賦形剤(例、リポソーム、プラスミド、またはベクター)の使用またはエレクトロポレーションによるような任意の適切な方法によって挿入で

50

きる。細胞が複製し、DNAがRNA内に転写されると、RNAはその後、例えば上記のSambrookら(1989)に記載されているような当業者に周知の方法を用いて単離できる。例えば、mRNAはSambrookら(1989)上記参照に記載されている方法に従って様々な溶菌酵素もしくは化学薬品溶液を使用して単離、または製造業者によって提供される添付の取扱説明書に従い核酸結合樹脂によって抽出できる。

【0139】

少なくとも4個の連続するヌクレオチド、およびより好ましくは少なくとも5個または6個の連続するヌクレオチド、および最も好ましくは少なくとも10個の連続するヌクレオチドを有し、配列番号：1または7のペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して相補性または相同性である配列を示すポリヌクレオチドはハイブリダイゼーション用プローブとして有用である。 10

【0140】

当技術分野では、特異的ハイブリダイゼーションのためには「完全マッチ」プローブは必要とされないことが知られている。少数の塩基の置換、欠失、または挿入によって達成されるプローブ配列における小さな変化は、ハイブリダイゼーション特異性に影響を及ぼさない。一般に、20%塩基対ミスマッチ(最適に整列させたとき)は許容され得る。好ましくは、上記のmRNAを検出するための有用なプローブは、事前に特徴付けられた遺伝子に対応する以前に同定された配列に含まれる匹敵するサイズの相同領域と少なくとも約80%同一である。より好ましくは、プローブは相同領域の整列後に対応する遺伝子配列と85%同一である;いっそうより好ましくは、プローブは90%の同一性を示す。 20

【0141】

これらのプローブは、これらの細胞を含有する様々な細胞または組織を検出またはモニタリングするために放射標識測定法(例、サーザンおよびノーザンブロット解析)において使用できる。プローブはまた、例えば本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドに対応する遺伝子発現を検出するためにハイスループットスクリーニングアッセイ法において使用するチップのような固体支持体またはアレイへ付着させることができる。従って、本発明はさらに、ハイスループットスクリーニングにおいて使用するための固体支持体へ付着させた、上記に定義したような少なくとも1種のプローブおよび/またはこれらの配列の1つの相補体を提供する。

【0142】

本発明のポリヌクレオチドはまた、例えば宿主細胞内へのポリヌクレオチドの形質導入を確認するために、APCにおいて発現している遺伝子または遺伝子転写体を検出するためのプライマーとして機能できる。この状況では、増幅は合理的忠実度で標的配列を複製できるプライマー依存性ポリメラーゼを使用する任意の方法を意味する。増幅は、例えばT7 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素のような天然または組換えDNAポリメラーゼによって実施できる。プライマーの好ましい長さは、上記のプローブに対して同定された長さと同じである。 30

【0143】

本発明はさらに、DNAまたはRNAの複製および/または一過性もしくは安定性発現のためのRNAの転写プロモーターおよび他の調節配列に機能的に連結された単離されたポリヌクレオチドを提供する。本明細書で使用する用語「機能的に連結された」は、プロモーターがRNA転写をDNA分子の外へ方向付けるような方法で配置されたことを意味する。このようなプロモーターの例は、SP6、T4およびT7である。特定の態様では、挿入されたポリヌクレオチドの細胞特異的発現のためには細胞特異的プロモーターが使用される。停止コドンおよび選択可能なマーカー配列、ならびに挿入されたDNAの破片がプロモーターに機能的に連結されることができるクロニング部位を含む、プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーを含有するベクターは当技術分野で周知であり、市販で入手できる。一般的方法およびクロニング戦略については、「GENE EXPRESSION TECHNOLOGY」(Goeddel編集、Academic Press, Inc.(1991))およびその中で言及された参考文献、ならびにマップ、機能的特性、商業的供給業者、および様々な適切なベクターについてのGenEMBL登録番号の資 40 50

料を含む「VECTORS:ESSENTIAL DATA SERIES(Gacesa および Ramji編集, John Wiley & Sons, N.Y.(1994)を参照されたい。好ましくは、これらのベクターはインビトロまたはインビボのRNAを転写できる。

【0144】

これらの核酸を含有する発現ベクターは、タンパク質およびポリペプチドを作製するための宿主ベクター系を入手するために有用である。これらの発現ベクターは、染色体DNAのエピソームまたは不可欠な部分のいずれかとして宿主生体内で複製可能でなければならないことを意味している。適切な発現ベクターは、プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスを含むウイルスベクター、コスミド等を含む。アデノウイルスベクターは、遺伝子をインビボで組織内に導入するために特に有用であるが、それはインビトロおよびインビボ両方におけるのそれらの高レベルの発現および細胞の効率的な形質転換のためである。核酸が適切な宿主細胞、例えば原核または真核細胞および宿主細胞複製物内に挿入されると、タンパク質を組換え的に産生させることができる。適切な宿主細胞はベクターに依存し、周知の方法を使用して構築された哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞を含むことができる。例えば上記のSambrookら(1989)を参照されたい。外因性核酸を細胞内へ挿入するためのウイルスベクターの使用に加えて、例えば細菌細胞に対する形質転換;哺乳動物細胞に対するリン酸カルシウム沈降法を使用したトランスフェクション;DEAE-デキストラン;エレクトロポレーション;またはマイクロインジェクションのような当技術分野で周知の方法によって核酸を宿主細胞内へ挿入できる。この方法については上記のSambrookら(1989)を参照されたい。従って、本発明はさらにタンパク質またはポリペプチドまたは抗体をコードするポリヌクレオチドを含有している宿主細胞、例えば哺乳動物細胞、動物細胞(ラットまたはマウス)、ヒト細胞、または例えば細菌細胞のような原核細胞を提供する。

【0145】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを細胞内へ送達する(インビボ、エクスビボまたはインビトロのいずれかであっても)ために適切な送達賦形剤を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、クローニングまたは発現ベクター内に含まれていてよい。これらのベクター(特に発現ベクター)は、例えば細胞内への送達および/または侵入を促進できる多数の形態のいずれかをとり、順に操作されてよい。

【0146】

ベクターがインビボまたはエクスビボにおける遺伝子療法のために使用される場合は、例えば複製不能レトロウイルスまたはアデノウイルスベクターのような薬学的に許容されるベクターが好ましい。本発明の核酸を含有する薬学的に許容されるベクターは、さらに挿入されたポリヌクレオチドの一過性または安定性発現のために修飾できる。本明細書で使用する用語「薬学的に許容されるベクター」は、分化した細胞内へ核酸を選択的に標的として導入する能力を有するベクターまたは送達賦形剤を含むが、それらに限定されない。そのようなベクターの例は、感染した宿主細胞内でのベクターの広がりを妨げるウイルスタンパク質の産生不能によって定義された「複製不能」ベクターである。複製不能レトロウイルスベクターの例はLNL6(Miller, A.D.ら(1989)BioTechniques 7:980-990)である。遺伝子マーカーのレトロウイルス媒介性遺伝子導入のために複製不能レトロウイルスを使用する方法は明確に確立されている(Correllら(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:8912; Bordignon(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:8912-52; Culver K.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:3155; および Rill D.R.(1991)Blood 79(10):2694-2700)。

【0147】

宿主細胞

本発明のポリヌクレオチドを含有するこれらの単離された宿主細胞は、ポリヌクレオチドの組換え複製およびペプチドの組換え産生のために有用である。あるいは、細胞を使用して本明細書に記載する方法で被験者における免疫応答を誘導できる。宿主細胞が抗原提示細胞である場合、それらを使用により、次いで養子免疫療法において有用となる腫瘍浸潤リンパ球のような免疫エフェクター細胞の集団を増大させることができる。

【0148】

抗体

本発明によって、さらに本発明のポリペプチドと共に特異的に複合体を形成できる抗体も提供される。用語「抗体」には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれている。抗体は、マウス、ラット、およびウサギまたはヒト抗体を含むが、それらに限定されない。抗体は、ポリペプチドおよびそれらのポリペプチドを発現しているAPCを同定および精製するために有用である。

【0149】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の産生、ならびにそれらの対応する核酸配列を推定する実験方法については、当技術分野で周知である。上記のHarlow および Lane 10 (1988)および(1999)ならびに上記のSambrookら(1989)を参照されたい。本発明のモノクローナル抗体は、タンパク質またはその断片を例えばマウスまたはウサギのような動物内へ導入することによって生物学的に産生できる。動物内で細胞を産生する抗体が単離され、骨髓腫細胞またはヘテロ骨髓腫細胞と融合させられると、ハイブリッド細胞またはハイブリドーマが産生する。従って、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞もまた提供される。

【0150】

従ってタンパク質またはその断片、および周知の方法を使用すれば、当業者はタンパク質またはポリペプチドに結合する能力を有する抗体について本発明のハイブリドーマ細胞および抗体を産生およびスクリーニングできる。 20

【0151】

試験されているモノクローナル抗体がタンパク質またはポリペプチドと結合する場合、試験されている抗体と本発明のハイブリドーマによって提供された抗体とは等価である。さらに過剰な実験を行わずに、試験されている抗体が、通常モノクローナル抗体が反応性であるタンパク質またはポリペプチドに本発明のモノクローナル抗体が結合するのを防止するかどうかを判定することにより、抗体が本発明のモノクローナル抗体と同一特異性を有しているかどうかを判定することも可能である。試験されている抗体が本発明のモノクローナル抗体による結合の減少によって示されるように本発明のモノクローナル抗体と競合する場合は、これら2種の抗体が同一または密接に関連するエピトープに結合すると思われる。あるいは、本発明のモノクローナル抗体をそれと通常は反応性であるタンパク質と 30 を事前にインキュベートし、試験されているモノクローナル抗体の抗原に結合する能力が阻害されるかどうかを判定できる。試験されているモノクローナル抗体が阻害された場合は、ほぼ確実にそれが本発明のモノクローナル抗体と同一、または密接に関連するエピトープ特異性を有していると思われる。

【0152】

用語「抗体」はまた、すべてのアイソタイプの抗体を含むことが意図されている。モノクローナル抗体の特定アイソタイプは、初期融合から直接選択することによって調製するか、またはSteplewskiら(1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653またはSpiraら(1984) J. Immunol. Meth. 74:307に記載されている方法を使用した、クラススイッチ変種を単離するための同胞選択技術を使用することによって相違するアイソタイプのモノクローナル抗体を 40 分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製できる。

【0153】

本発明はまた、上記に記載したポリクローナルおよびモノクローナル抗体の生物学的活性断片も提供する。これらの「抗体断片」はその抗原または免疫原と選択的に結合する一部の能力を保持している。このような抗体断片は下記を含むことができるが、それらに限定されない。

- (1) Fab、
- (2) Fab'、
- (3) F(ab')₂、
- (4) Fv、および

(5) SCA

【0154】

「生物学的活性抗体断片」の特別な例は、抗体のCDR領域である。これらの断片を作製する方法は当技術分野において知られており、例えば上記のHarlow および Lane(1988)を参照されたい。

【0155】

本発明の抗体はまた、キメラ抗体およびヒト化抗体を作製するために修飾できる (Oira (1986) BioTechniques 4(3):214)。キメラ抗体は、抗体の重鎖および軽鎖の様々なドメインが複数の種からのDNAによってコードされている抗体である。

【0156】

本発明のモノクローナル抗体の特異性を備えたモノクローナル抗体を分泌する他のハイブリドーマの単離もまた、当業者であれば抗イディオタイプ抗体を産生することによって遂行できる (Herlynら (1986) Science 232:100)。抗イディオタイプ抗体は、対象とするハイブリドーマによって産生したモノクローナル抗体上に存在する固有の決定基を認識する抗体である。

【0157】

2種のハイブリドーマのモノクローナル抗体間のイディオタイプ同一性は、2種のモノクローナル抗体が同一エピトープ決定基の認識に関して同一であることを証明する。従って、モノクローナル抗体上のエピトープ決定基に対する抗体を使用することによって、同一エピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を発現する他のハイブリドーマを同定することが可能である。

【0158】

さらにまた、エピトープを模倣するモノクローナル抗体を産生するために抗イディオタイプテクノロジーを使用することも可能である。例えば、第1モノクローナル抗体に対して作られた抗イディオタイプモノクローナル抗体は、第1モノクローナル抗体によって結合されたエピトープの鏡像である超可変領域中に結合ドメインを有するであろう。従って、この例では、抗イディオタイプモノクローナル抗体はこれらの抗体を産生させるための免疫のために使用できる。

【0159】

本発明で使用する用語「エピトープ」は、本発明のモノクローナル抗体に対する特異的親和性を有する任意の決定基を含むことが意図されている。エピトープ決定基は、通常は例えばアミノ酸または糖側鎖のような化学的に活性な分子の表面分類から構成され、通常は特異的三次元構造特性および特異的電荷特性を有している。

【0160】

本発明の抗体は、検出可能な物質または標識へ結合させることができる。当業者には周知の極めて様々な異なる標識および標識方法がある。

【0161】

低分子量ハプテンへの抗体の結合は、アッセイ法の感受性を増加させることができる。ハプテンは、その後第2反応によって特異的に検出できる。例えば、一般には例えばアビジンと反応するビオチン、または特異的抗ハプテン抗体と反応できるジニトロフェリル、ピリドキサル、およびフルオレセインのようなハプテンを使用する。例えば、上記のHarlow および Lane(1988)および (1999)を参照されたい。

【0162】

本発明のモノクローナル抗体はまた、多数の相違する担体へ結合させることができる。従って、本発明はさらに抗体および活性または不活性である他の物質を含有する組成物を提供する。周知の担体の例は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびにマグネタイトを含む。担体の性質は本発明の目的のためには可溶性であっても不溶性であってもよい。当業者であればモノクローナル抗体に結合させるための他の適切な担体を知っている、または日常の実験を使用してそのような担体を突き止め

10

20

30

40

50

ることができる。

【0163】

抗体、その断片、または抗体を産生する細胞株を含有する組成物は、本発明に含まれている。これらの組成物を薬学的に使用しなければならない場合は、それらは薬学的に許容される担体と併用される。

【0164】

治療方法

また別の態様では、本発明はMHC分子に関連する本発明のペプチド、化合物、および組成物を送達する段階を含む免疫応答を誘導する方法を提供する。従って、本発明のポリペプチドは本明細書に記載する方法を使用して抗原提示細胞内へパルス（puls）できる。抗原提示細胞は、必要なMHC/共刺激分子を発現する樹状細胞(DC)、単球/マクロファージ、Bリンパ球、または他の細胞タイプを含むが、それらに限定されない。下記で説明する方法は、主として最も強力であるDC、好ましくはAPCに焦点を当てる。さらにポリペプチドまたはタンパク質を含有するこれらの宿主細胞が提供される。

10

【0165】

MHC分子関連する本発明のポリペプチドを提示する単離された宿主細胞は、抗原感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞の集団を増大および単離するためにさらに有用である。免疫エフェクター細胞、例えば細胞毒性Tリンパ球は、未処理免疫エフェクター細胞をAPCの表面上のMHC分子と関連するポリペプチドを提示する抗原提示細胞と共に培養することによって産生する。この集団は当技術分野において知られている方法、例えばFACS解析またはフィコール勾配法を使用して精製できる。免疫エフェクター細胞およびそれにより産生した集団を生成および培養するための方法は本発明者の寄与および発明である。細胞および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物は、養子免疫療法において有用である。インビボにおける投与の前に、免疫エフェクター細胞はそれらのCK-18を発現する細胞を溶解させる能力についてスクリーニングされる。

20

【0166】

ある態様では、免疫エフェクター細胞および/またはAPCは遺伝的に修飾される。標準の遺伝子導入法を用いて、共刺激分子および/または刺激サイトカインをコードする遺伝子は、免疫エフェクター細胞の伸長の前、同時、または後に挿入できる。

【0167】

本発明はまた、ポリペプチドに対して免疫応答を誘導する条件下で被験者に有効量のポリペプチドまたはその免疫原性部分投与する段階を含む、被験者において免疫応答を誘導する方法を提供する。ポリペプチドは、処方物中で、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとして投与できる。ポリヌクレオチドは、遺伝子送達賦形剤中で、または順にコードされたポリペプチドを順に組換え的に転写、翻訳、およびプロセッシングする宿主細胞内へ挿入することによって投与できる。このため薬学的に許容される担体中に本発明のポリヌクレオチドを含有する単離された宿主細胞は、有効なワクチン療法のために適切かつ有効量のアジュバント、サイトカイン、または共刺激分子と併用できる。ある態様では、宿主細胞は例えば樹状細胞のようなAPCである。宿主細胞は、有効量のサイトカインおよび/または共刺激分子のいずれかまたは両方をコードするポリヌクレオチドを挿入することによってさらに修飾できる。

30

40

【0168】

本発明の方法は、有効量のサイトカインまたは共刺激分子を被験者へ同時投与することによってさらに修飾できる。

【0169】

CK-18タンパク質の「免疫原性部分」はT細胞を抗原感作し、天然CK-18タンパク質または血清内に存在するCK-18特異的抗体に特異的に結合させることのできる部分である。本明細書に記載したタンパク質の免疫原性部分は、抗体結合アッセイ法において同定できる。このようなアッセイ法は、当業者に公知の例えば上記のHarlow および Lane、(1988)および(1999)に記載されているような多種多様な手段のいずれかを使用して一般的に実施され

50

る。例えば、免疫原性部分は血清内の抗体が不動態化ポリペプチドへ結合するのを許容するために固体支持体(下記に説明するように)上で不動態化させ、動物血清と接触させることができる。結合していない血清は除去され、結合した抗体は、例えば¹²⁵I-標識タンパク質Aを使用して検出される。あるいは、免疫原性部分は血液、その他の試料液、細胞、または組織中のポリペプチドを検出する際に使用するためにモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を産生させるために使用される。

【0170】

本明細書に定義したCK-18タンパク質、ペプチドリガンド、または免疫原性部分は、さらに配列番号：1または7に示した配列の変種も含んでいる。本明細書で使用するポリペプチド「変種」は、ポリペプチドの抗原性特性および/または免疫原性特性が保持されるように、配列番号：1または7と保存置換および/または修飾においてのみ相違するポリペプチドである。配列番号：1または7の変種は、さらにまた配列番号：1または7のアミノ酸配列を修飾し、修飾ポリペプチドの免疫応答性を評価することによって同定できる。診断用結合物質を生成するために有用であるタンパク質およびポリペプチドに対し、変種は新生物細胞または組織、より詳細には卵巣および肺の存在または不在を検出する抗体を生成する能力について修飾ポリペプチドを評価することによって同定できる。このような修飾配列は、例えば本明細書に記載した代表的方法を使用して調製および試験できる。

【0171】

本明細書で使用する「保存的置換」は、ペプチド化学の分野における当業者であれば実質的には変化していないポリペプチドの二次構造および疎水性親水性指標性質を予想するように、アミノ酸が類似特性を有する他のアミノ酸と置換されている置換である。一般に、下記の群のアミノ酸は保存的变化を示す：(1)ala(アラニン)、pro(プロリン)、gly(グリシン)、glu(グルタミン酸)、asp(アスパラギン酸)、gln(グルタミン)、asn(アスパラギン)、ser(セリン)、thr(トレオニン)；(2)cys(システイン)、ser、tyr(チロシン)、thr；(3)val(バリン)、ile(イソロイシン)、leu(ロイシン)、met(メチオニン)、ala、phe(フェニルアラニン)；(4)lys(リシン)、arg(アルギニン)、his(ヒスチジン)；および(5)phe、tyr、trp(トリプトファン)、his。変種はまた、ポリペプチドの抗原性特性、二次構造、および疎水性親水性指標性質に最小の影響しか及ぼさないアミノ酸の欠失または付加を含む他の修飾を含むことができる。例えば、ポリペプチドは共翻訳的または後翻訳的にタンパク質の移動を指令するタンパク質のN末端においてシグナル(またはリーダー)配列へ抱合させることができる。ポリペプチドはまた、ポリペプチドの合成、精製、もしくは同定を容易にするために(例えばポリ-His)、または固体支持体へのポリペプチドの結合を強化するためにリンカーまたは他の配列へ抱合させることができる。例えば、ポリペプチドは免疫グロブリンFc領域へ抱合させることができる。

【0172】

本発明のヌクレオチド、核酸、またはポリヌクレオチド「変種」は、配列番号：2もしくは8、または1つまたは複数のヌクレオチド欠失、置換、もしくは付加を有するその1部分と相違する配列である。このような修飾は、例えばAdelmanら(1983)DNA 2:183によって教示されているオリゴヌクレオチド特異的部位特異的突然変異誘発法のような標準突然変異誘発技術を使用して導入できる。ヌクレオチド変種は、天然型対立遺伝子変種、または非天然型変種であってよい。変種ヌクレオチド配列は、配列番号：2または8と好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、および最も好ましくは少なくとも約90%の同一性を示す。変種ヌクレオチド配列は、一般に高度にストリンジェントな条件下で列挙したヌクレオチド配列へハイブリダイズするであろう。

【0173】

診断方法

さらに本発明によって、罹患した被験者におけるCK-18関連癌または悪性腫瘍の進行、経過、または病期を検出、診断、予後診断、およびモニタリングする際に役立つ方法が提供される。本明細書で使用する用語「診断する」は罹患した被験者におけるCK-18関連癌または悪性腫瘍の進行、経過、または病期を検出、診断、予後診断、およびモニタリングす

10

20

30

40

50

ることを意味している。ある局面では、方法は細胞または組織から単離された試料中のCK-18タンパク質または抗体の分化発現を検出する段階を含み、このときタンパク質または抗体の存在および/または量は細胞または組織の新生物性状態の指標である。CK-18関連新形成は、発現またはタンパク質の発現が新生物性表現型のマーカーとして機能する新形成である。

【0174】

ある局面では、CK-18タンパク質または抗体の量は全身腫瘍組織量と相関する、即ち、発現したCK-18の量は疾患進行に伴って増加する、全身腫瘍組織量における減少に伴って減少する。対照試料中で観察されるレベルの少なくとも2倍のレベルでCK-18タンパク質の発現を示す試験試料は癌を指示していると考えられる。細胞または組織の試料は、遊離形で、または固体支持体へ付着させて提供することができ、組織培養物、市販で入手できる細胞株、患者生検試料から、または組織イメージングのための方法を使用した場合にはインビボで単離できる。

10

【0175】

ある局面では、この方法は、CK-18タンパク質をコードするmRNAまたはそのタンパク質自体をハイブリダイゼーションまたはPCRによって検出および/または定量することによって実施される。最新テクノロジーの向上はこの方法を可能にし、例えば検出は前記試料を前記CK-18mRNAを含む中等度または高度にストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするプローブまたはプライマーを用いて試験することによって行う。ある局面では、プローブまたはプライマーは検出可能に標識されている。適切なプローブの例は、配列番号：2または8からなる群から選択される配列、およびそれらの相補体；配列番号：1または7からなる群から選択されるペプチドをコードする核酸配列、およびそれらの相補体；ならびに配列番号：1または7に記載された配列をコードする核酸によってコードされたタンパク質の少なくとも9個の連続する残基、およびそれらの相補体を含むプローブまたはプライマーを含むがそれらに限定されない。

20

【0176】

別の局面では、CK-18発現は、CK-18タンパク質を特異的に認識して結合する物質を用いて試料を試験することによって検出および/または定量される。物質の例は、CK-18タンパク質を特異的に認識または結合する抗体およびその抗原結合断片である。本発明において、抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、これらは検出可能に標識されていてもいなくてもよい。抗体および抗原結合断片への様々な修飾は当技術分野において知られており、本発明の目的に含まれている。本明細書では実施例を記載する。この局面で使用するために適切なモノクローナル抗体は、配列番号：1または7からなる群から選択されるペプチドを用いて免疫された動物から調製する。抗原結合断片の例には、配列番号：1または7からなる群から選択されるペプチドを用いて免疫された動物から調製された抗体から単離された生物学的活性免疫グロブリン可変ドメインが含まれている。

30

【0177】

抗体を利用する方法は、本明細書に記載した周知の方法を適用して、インビトロまたはインビボで実践できる。

【0178】

別の局面では、物質は例えば配列番号：1、3、5、または7からなる群から選択されるペプチドの存在下でそれを使用して生じさせた免疫エフェクター細胞のようなCK-18タンパク質へ結合する細胞である。

40

【0179】

あるいは、異なるCK-18発現は、発現解析によってmRNAの同一性および発現レベルを決定し、例えばSAGE(米国特許第5,866,330号および第5,695,937号)のような発現解析のような方法を使用して、mRNAの配列および量を正常対照細胞または組織中の発現の配列および量と比較することによって検出および/または定量できる。

【0180】

さらに別の局面では、試料中のCK-18の存在および量は前記タンパク質を特異的に認識し

50

て結合する抗体によって決定および/または定量できる。本明細書に記載するような抗体結合パートナーは、この方法の局面において、および例えばウェスタンブロットのような当技術分野に周知の方法を改良することによって使用するために適切である。

【0181】

別の態様では、試料中に存在するCK-18の量の検出および解析が、被験者における疾患の進行、治療法への応答、または疾患再発をモニタリングするために繰り返される。この局面では、本明細書に記載するような検出/モニタリング方法は先行(対照)試料に引き続いて1回または複数回の時点に単離された1つまたは複数の試料について実施され、引き続く時点に検出されたタンパク質の量と先行(対照)試料で以前に検出された量とが比較される。

10

【0182】

さらに、本発明は本発明の組成物の活性を調節する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。ある局面では、本発明は複数の条件下および被験物質の存在下でタンパク質を含有する試料およびリガンドを接触させ、タンパク質とリガンドとの間の何らかの結合を検出することによってCK-18タンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する物質をスクリーニングするアッセイ法を提供し、結合の欠如はCK-18の結合を調節する物質の存在を示している。あるいは、本発明は複数の条件下および被験物質の存在下でタンパク質を含有する試料とリガンドとを接触させ、またタンパク質とリガンドとの間の何らかの結合を検出し、被験物質を含有していない対照試料と比較することによって、CK-18タンパク質とそのリガンドとの結合を増強させる物質をスクリーニングするため

20

【0183】

例えば、このようなアッセイ法の1つは、哺乳動物細胞が正常に増殖する条件下で哺乳動物細胞を本発明の組成物および「試験化合物」および $[^3\text{H}]$ チミジンと接触させる段階を含む。対照アッセイ法は、「試験化合物」を含まずに実施し、「試験化合物」の存在下で細胞増殖の量と比較することにより、その化合物が増殖を刺激または阻害するかどうかを決定することができる。 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みは、標識の取り込みを測定する液体シンチレーションクロマトグラフィーによって測定できる。このアッセイ法を使用すること

30

【0184】

また別の実施例では、本発明のポリペプチドまたはペプチドに対する結合部位または決定基を発現する哺乳動物細胞または膜調製物が、「試験化合物」の存在下で本発明の標識ポリペプチドまたはペプチドと共にインキュベートされる。「試験化合物」の、ポリペプチドまたはペプチドとその結合部位との相互作用を増強または遮断する能力を測定することができる。さらに、「試験化合物」と結合部位との相互作用に続く既知の第2メッセンジャー系の応答を測定し、「試験化合物」の部位または決定基に結合して第2メッセンジャー応答を誘発する能力が測定でき、それにより「試験化合物」が潜在的アゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定することができる。

40

【0185】

これらのアッセイ法は診断または予後マーカーとして使用できる。これらのスクリーニングアッセイ法を使用して発見された分子の使用により疾患を治療できる、またはポリペプチドまたは分子を活性化または阻害することにより患者に特定の結果を引き起こすことができる。

【0186】

従って、本発明は本発明のポリペプチド、ペプチド、変種、または類似体に結合する化合物を同定する、次の段階を含む方法を含む。(a)候補試験化合物を本発明のポリペプチド、ペプチド、変種または類似体と共にインキュベートする段階;および(b)結合が発生したかどうかを決定する段階。本発明はさらに、アゴニストおよび/またはアンタゴニストを

50

同定する、次の段階を含む方法を含む。(a)候補試験化合物を本発明のポリペプチド、ペプチド、変種、または類似体と共にインキュベートする段階;(b)生物学的活性をアッセイする段階;および(c)前記生物学的活性が変化したかどうかを決定する段階。

【0187】

本明細書に記載した方法を実行するための診断キットもまた提供される。ある局面では、このキットはCK-18タンパク質を特異的に認識して結合する少なくとも1種の物質およびレポーター基を支持できる検出試薬とを含む。この物質として抗体を使用するときは、それらは溶液中にあって、または例えばニトロセルロース、ラテックス、またはプラスチックのような固体支持体上で不動化されていてもよい。検出試薬の例には、抗免疫グロブリン、タンパク質G、タンパク質A、またはレクチンが含まれるが、それらに限定されない。レポーター基はキット内に提供されてよいが、必ずしも提供されなくてもよい。本方法において使用するために適切なレポーター基の例には、ラジオアイソトープ、蛍光基、発光基、酵素、ビオチン、および色素粒子が含まれるが、それらに限定されない。

10

【0188】

これらのキットは、例えばプローブ、プライマー、CK-18特異的抗体、もしくは免疫エフェクター細胞のような上記で説明した1つまたは複数の結合物質、または例えば配列番号：1、3、5、もしくは7からなる群から選択されるペプチドを特異的に認識して結合するように生じさせ単離した抗体のような、CK-18特異的抗体を特異的に認識し、結合する物質を含む。取扱説明書もまた提供できる。

【0189】

例えば配列番号：1、3、5、または7の本発明のポリペプチドは、例えば新生物性細胞または組織を検出できる抗体またはその断片のような結合物質を生成するために、あるいは例えば乳癌または肺癌のようなCK-18タンパク質の発現に関連する新生物状態を有する動物または患者における疾患進行をモニタリングするために使用できる。本発明の結合物質は、本明細書に記載した代表的方法を含む、一般に当技術分野の当業者に既知の方法を使用して調製できる。結合物質は、本明細書に記載した代表的アッセイ法を使用して、CK-18タンパク質の発現および/または過剰発現に関連する新生物状態を伴う、または伴わない患者を区別できる。これを言い換えると、CK-18タンパク質またはその断片に対して生じた抗体またはその他の結合物質は、その疾患に罹患した患者における原発性または転移性癌の存在を示すシグナルを生じさせ、原発性または転移性疾患を有していない個体における疾患の欠如を示す陰性シグナルを生じさせると思われる。CK-18(配列番号：1)および配列番号：3、5、または7に示されているポリペプチドの適切な部分は、そのような新形成が指示されるであろう患者の実質的にすべて(即ち、少なくとも80%、および好ましくは少なくとも約90%)においてCK-18関連新形成の存在を示し、さらに全長タンパク質を用いて試験したときに陰性となるそれらの試料の実質的にすべてにおいてCK-18関連新形成の欠如を示す結合物質を生成できる。例えば2抗体サンドイッチアッセイ法のような下記に記載する代表的アッセイ法を使用により、結合物質のCK-18関連新形成を検出する能力を評価できる。

20

30

【0190】

本明細書に記載したようにCK-18関連新形成を検出できる抗体を生成するために調製されたポリペプチドの能力は、ポリペプチドに対して1つまたは複数の抗体を生じさせ、このような抗体が動物または患者における新形成を検出する能力を決定することによって評価できる。ある局面では、この決定は原発性または転移性CK-18関連新形成を有している、および有していない動物または患者からの生物学的試料を、生成された抗体へ結合するポリペプチドの存在についてアッセイすることによって行われる。このような試験アッセイ法は、例えば下記に記載する代表的方法を使用して実施できる。配列番号：1、3、5、または7に同定されたタンパク質もしくはポリペプチドに対して生じたポリペプチド特異的抗体、またはその断片を単独で、または組み合わせて使用することにより、感受性を向上させることができる。

40

【0191】

50

CK-18関連新形成を検出できるポリペプチドは、動物または患者における癌を診断するための、または疾患進行をモニタリングするための有用なマーカーである。ある態様では、これらの新形成は動物または患者から得た生物学的試料を評価し、規定のカットオフ値と比較した1つまたは複数の上記のポリペプチドのレベルを決定することによって診断される。本明細書で使用するような、適切な「生物学的試料」は血液、血清、尿、および/または分泌物を含む。

【0192】

1つまたは複数の本発明のCK-18タンパク質のレベルは、ポリペプチドに対して特異的な任意の結合物質を使用して評価できる。本発明に関連する「結合物質」は上記のようにポリペプチドへ結合する任意の物質(例えば化合物または細胞)である。本明細書で使用する「結合」は、「複合体」が形成されるような、2つの別個の分子(それらの各々が遊離(即ち溶液中にある)していても細胞または固体支持体の表面上に存在していてもよい)間の非共有結合的つながりを意味する。複合体は支持材料上で自由であっても不動化(共有結合的または非共有結合的のいずれかで)されていてもよい。結合する能力は、複合体を形成するための結合定数を決定することによって評価できる。結合定数は、複合体の濃度を構成要素の濃度の積で除することにより得られる値である。結合定数は、当業者に周知の方法を使用して決定される。

【0193】

上記の要件を満たす任意の物質は結合物質でありうる。例えば、結合物質はペプチド成分を含むもしくは含まないリボソーム、RNA分子、宿主細胞発現エピトープ、本明細書に記載したような免疫エフェクター細胞、またはペプチドであってよい。ある好ましい態様では、結合パートナーは抗体またはその断片である。抗体は、一本鎖、キメラ、CDRグラフト化、またはヒト化を含むがそれらに限定されないポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってよい。これらの抗体を生成する方法は、当業者には周知である。

【0194】

本発明はまた、上記のタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、抗体、およびその断片、ならびに許容される固体もしくは液体担体のいずれかを含有する組成物を提供する。組成物が薬学的に使用される場合は、それらは診断的および治療的使用のために「薬学的に許容される担体」と組み合わせられる。これらの組成物はさらに、例えば癌のような疾患の診断および治療のための薬剤を調製するためにも使用できる。

【0195】

下記の材料および方法は、限定することなく本発明を例示すること、ならびに上記の発明を作製および使用する方法を例示することが意図されている。

【0196】

材料および方法

本発明のポリペプチドの製造

最も好ましくは、本発明の単離されたペプチドは適切な固体相合成方法を使用して合成できる。Steward および Young, 「SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS」、フリーマントル、サンフランシスコ、カリフォルニア州(1968)。1つの好ましい方法は、メリフィールド(Merrifield)工程である。Merrifield(1967)Recent Progress in Hormone Res.23:451を参照。これらのペプチドの抗原活性は、例えば本明細書に記載したようなアッセイ法を使用して便宜的に試験できる。

【0197】

1度本発明の単離されたペプチドが得られると、クロマトグラフィー(例、イオン交換、親和性、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差次的可溶性、またはタンパク質生成のための任意の他の標準技術を含む標準方法によって精製できる。免疫親和性クロマトグラフィーの場合は、エピトープはペプチド、または本発明の関連ペプチドに対して生じた、固定支持体へ付着させた抗体を含む親和性カラムへ結合させることによって単離できる。

【0198】

あるいは、例えばヘキサ-His(インビトロゲン (Invitrogen) 製)、マルトース結合ドメイン(ニュー・イングランド・バイオラブズ (New England Biolabs) 製)、インフルエンザ外被配列(Kolodziejら(1991)*Meth.Enzymol.*194:508-509)、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼのような親和性タグを本発明のペプチドへ付着させ、適切なアフィニティカラムを超えて通過させることによって容易な精製が可能になる。単離されたペプチドはまた、例えばタンパク質分解、核磁気共鳴、およびX線結晶学のような技術を使用して物理的に特徴付けることもできる。

【0199】

さらに本発明の範囲には、例えばリン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解性開裂、抗体分子、膜分子、または他のリガンドへの結合によって翻訳中または翻訳後に差次的に修飾される抗原性ペプチドが含まれる(Fergusonら(1988),*Ann.Rev.Biochem.* 57:285-320)。

10

【0200】

樹状細胞を含むAPCの単離、培養、および増大

下記はAPCの単離についての2種の基本的アプローチについての簡単な説明である。これらのアプローチは、(1)血液から骨髄前駆細胞(CD34+)を単離し、それらを刺激してAPCへ分化させる段階;または(2)末梢血から前もって分化が決定付けられた(precommitted)APCを収集する段階を含む。第1アプローチでは、患者は末梢血中に多数の循環CD34+幹細胞を追加免疫するために例えばGM-CSFのようなサイトカインを用いて治療されなければならない。

20

【0201】

APCを単離するための第2アプローチは、血液中で既に循環している比較的大量の前もって分化が決定付けられたAPCを収集することである。ヒト末梢血から分化が決定付けられたAPCを単離するための以前の方法はメトリザミド勾配および粘着/非粘着段階(Freudenthal P.S.ら(1990),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:7698-7702);パーコール勾配分離(Mehta-Damaniら(1994)*J.Immunol.*153:996-1003);および蛍光活性化細胞選別法(Thomas R.ら(1993)*J.Immunol.*151:6840-6852)のような物理的方法に組み合わせて含んでいた。

【0202】

大量の細胞を相互に分離させる1つの技術は、向流遠心分離水簸法(CCE:countercurrent centrifugal elutriation)として知られている。この方法では、細胞は遠心分離と流速が持続的に上昇するバッファの洗浄流とに同時に曝される。持続的に上昇するバッファの向流は、主として細胞サイズに基づく分画細胞分離をもたらす。

30

【0203】

本発明のある局面では、APCは、例えばマウス、サル、またはヒトのような哺乳動物の白血球分画から単離できる、前もって分化が決定付けられた、または成熟した樹状細胞である(例えば、国際公開広報第96/23060号を参照)。白血球分画は、哺乳動物の末梢血由来でよい。この方法は次の段階を含む。(a)例えば白血球泳動(leukopheresis)のような当技術分野に知られている方法によって哺乳動物起源から入手された白血球分画を提供する段階;(b)交流遠心分離水簸法によって段階(a)の白血球分画を4つまたはより多くのサブフラクションへ分離する段階;(c)細胞をカルシウムイオノフォア、GM-CSFおよびIL-13、またはGM-CSFおよびIL-4と接触させることにより、段階(b)からの1つまたは複数の分画における単球の、樹状細胞への転換を刺激する段階;(d)段階(c)からの樹状細胞濃縮分画を同定する段階;ならびに(e)好ましくは約4°Cで段階(d)の濃縮分画を収集する段階。樹状細胞濃縮分画を同定する1つの方法は、蛍光活性化細胞選別による。白血球分画は、例えば組換え(rh)rhIL-12、rhGM-CSF、またはrhIL-4のような他のサイトカインの存在下でカルシウムイオノフォアを用いて処理できる。白血球分画の細胞はバッファ中で洗浄し、分離段階前にCa++/Mg++非含有培地中に懸濁させることができる。白血球分画は、白血球分離採血法によって得られる。樹状細胞は次のマーカー:HLA-DR、HLA-DQ、またはB7.2のうちの少なくとも1種の存在、および次のマーカー:CD3、CD14、CD16、56、57、およびCD19、20の同時不在によって同定できる。これらの細胞表面マーカーに特異的なモノクローナル抗

40

50

体は市販で入手できる。

【0204】

より詳細には、本方法は白血球分離採血法からの白血球および血小板の濃縮捕集物を収集し、これを次いで向流遠心分離水簸(CCE)によってさらに分画化する段階を必要とする(Abrahamsen, T.G.ら(1991)J.Clin.Apheresis.6:48-53)。細胞試料は特殊水簸ローター内に入れられる。ローターはその後、例えば3,000rpmのような一定速度で回転させる。ローターが所望速度に到達すると、加圧空気を使用して細胞の流速が制御される。水簸機中の細胞は、遠心分離および流速が持続的に上昇するバッファの洗浄流とに同時に曝される。これは、排他的ではないが主として細胞サイズの相違に基づく分画別細胞分離を生じさせる。

10

【0205】

APCおよびより詳細にはDC収集の品質管理、ならびに培養中のそれらの良好な活性化の確証は、単球および樹状細胞小集団ならびに汚染している可能性があるTリンパ球の両方をモニタリングする同時多色FACS解析技術に依存する。これはDCが次のマーカーを発現しないという事実に基づいている：CD3(T細胞)；CD14(単球)；CD16、56、57(NK/LAK細胞)；CD19、20(B細胞)。同時に、DCは、それらが血液中で循環している時点で大量のHLA-DR、有意なHLA-DQ、およびB7.2(しかしB7.1は小量または全く発現しない)を発現する(さらに、それらは単球および好中球によっても発現する脊髄マーカーである、Leu M7およびM9を発現する)。

20

【0206】

死細胞を解析するための第3呈色試薬であるヨウ化プロピジウム(PI)と組み合わせると、全細胞小集団を陽性同定できることが可能になる(表1参照)。

(表1)

新鮮末梢細胞小集団のFACS解析

	色#1	色#2	色#3
	カクテル 3/14/16/19/20/56/57	HLA-DR	PI
生きている樹状細胞	陰性	陽性	陰性
生きている単球	陽性	陽性	陰性
生きている好中球	陰性	陰性	陰性
死細胞	変動性	変動性	陽性

30

【0207】

追加の解析のために追加のマーカーを置換できる。

色#1:CD3単独、CD14単独等；Leu M7またはLeu M9；抗クラス1等。

色#2:HLA-DQ、B7.1、B7.2、CD25(IL2r)、ICAM、LFA-3等。

40

【0208】

収集時のFACS解析の目的は、好中球汚染をモニタリングするため、および適切なマーカーが発現されることを確認するために、予想される分画中でDCが濃縮されていること確認することである。臨床適用に適切なヒト末梢血からの濃縮DCのこの迅速なバルク収集は、絶対的に上記の品質管理のための解析FACS法に依存する。必要であれば、成熟DCはこの時点に「カクテル陰性」細胞についての蛍光選別によって単球から直ちに分離できる。下記で説明するように、単球自体はまだ培養物中でDCまたは機能的DC様細胞に分化できるので、単球からDCを常に分離することは必要ではない可能性がある。

【0209】

収集されると、DC濃縮/単球APC分画(通常は150~190)は将来使用するためにプールおよび

50

凍結保存する、または直ちに短期培養中に配置することができる。

【0210】

あるいは、他の研究者らは樹状細胞をアップレギュレート(活性化)し単球を活性化樹状細胞表現型へ転換するための方法を報告している。この方法は、単球を活性化樹状細胞へ転換する、培地へのカルシウムイオノフォアの添加を含む。例えば24～48時間の培養期間の開始時におけるカルシウムイオノフォアA23187の添加は、プールされた「単球+DC」分画の様な活性化および樹状細胞表現型転換を生じさせた。特徴的に、活性化集団は一様にCD14(Leu M3)陰性になり、HLA-DR、HLA-DQ、ICAM-1、B7.1、およびB7.2をアップレギュレートする。さらに、この活性化バルク集団は、その後さらに精製される少数基礎集団と同様に機能する。

10

【0211】

サイトカイン類の特異的な組合せは、カルシウムイオノフォアを用いて達成された活性化/転換のために増幅(または部分的に置換)させるために有効に使用されてきた。これらのサイトカインは精製または組換え(「rh」)rhGM-CSF、rhIL-2、およびrhIL-4を含むがそれらに限定されない。各サイトカインを単独で加えるのは、最適なアップレギュレーションのためには不適切である。

【0212】

APCへの抗原の提示

免疫のためには、抗原性ペプチド(配列番号:1、3、5、および7)は抗原提示細胞へタンパク質/ペプチドとして、またはタンパク質/ペプチドをコードするcDNAの形態で送達できる。抗原提示細胞(APC)は、必要なMHC/共刺激分子を発現する樹状細胞(DC)、単球/マクロファージ、Bリンパ球、またはその他の細胞タイプから構成できる。下記に記載する方法は、最も強力であるDC、好ましくはAPCに主に焦点を当てる。

20

【0213】

パルスング(pulsing)は、APCを本発明の抗原性タンパク質またはペプチドへ曝露させることによってインビトロ/エキスビボで遂行する。タンパク質またはペプチドは、1～10 μ mの濃度で約3時間に渡りAPCへ添加する。パルスされたAPCは、引き続いて静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内送達経路を通して宿主へ投与できる。

【0214】

タンパク質/ペプチド抗原もまたアジュバントと共に静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内送達経路を通してインビボで送達できる。

30

【0215】

Pagliaら(1996)J.Exp.Med.183:317-322は、インビトロで全タンパク質と共にインキュベートされたAPCがMHCクラスI制限CTLによって認識されること、およびこれらのAPCを用いての動物の免疫がインビボで抗原特異的CTLの発達をもたらすことを証明した。加えて、例えばDCのようなAPCのサイトゾル中での抗原の発現をもたらした数種の異なる技術が記載されている。これらは、(1)腫瘍細胞から単離されたRNAのAPC内への導入、(2)抗原の内因性発現を誘導するために組換えベクターを用いたAPCの感染、および(3)リポソームを使用したDCサイトゾル内への腫瘍抗原の導入を含む。(Boczkowski, Dら(1996)J.Exp.Med.184:465-472;Rouseら(1994),J.Virol.68:5685-5689;およびNairら(1992)J.Exp.Med.175:609-612を参照)。

40

【0216】

フォスター(foster)抗原提示細胞

フォスター抗原提示細胞は、標的細胞として特に有用である。フォスターAPCは、内因性ペプチドと細胞表面MHCクラスI分子との関連を制限する抗原処理経路における変異を含む、T2と称されるヒト細胞株174xCEM.T2に由来する(Zweerinkら(1993)J.Immunol.150:1763-1771)。これはMHCクラスI制限CD8+CTLへの抗原提示のために必要である遺伝子TAP1、TAP2、LMP1、およびLMP2を含むMHCクラスII領域における大きなホモ接合体欠失に起因する。事実上、これらの細胞の表面上には「空の」MHCクラスI分子のみが提示される。培地へ付加された外因性ペプチドは、ペプチドが対立遺伝子特異的結合モチーフを含むことを条件

50

にこれらのMHC分子へ結合する。これらのT2細胞は本明細書では「フォスター」APCと称される。それらは抗原を提示するために本発明と併せて使用できる。

【0217】

特異的組換えMHC対立遺伝子を用いたT2細胞の形質導入は、MHC制限プロファイルの方向変更を可能にする。組換え対立遺伝子に合わせて調整されたライブラリーは、アンカー残基は内因性対立遺伝子への効率的な結合を阻害するので、それらによって優先的に提示されるであろう。

【0218】

MHC分子の高レベル発現は、APCをCTLに対してより高度に可視化する。強力な転写プロモーター(例、CMVプロモーター)を使用したT2細胞中の対象とするMHC対立遺伝子の発現はより反応性の強いAPCを生じさせる(おそらく細胞表面上の反応性MHCペプチド複合体が高濃度であるために)。

【0219】

免疫原性アッセイ法

本発明のリガンドの免疫原性は、下記に例示するものを含むがそれらに限定されない周知の方法によって決定できる。ある態様では、このような方法を使用すると本発明のリガンドを対応する天然抗原性エピトープと比較することができる。

【0220】

⁵¹Cr遊離溶解アッセイ法。抗原特異的T細胞によるペプチドパルス⁵¹Cr標識ターゲットの溶解は、本発明のリガンドを用いてパルスされた標的細胞に対して比較できる。「より活性」であるリガンドは、時間の関数としての標的のより高度の溶解を示すと考えられる。固定時点(例、4時間)での溶解および総合的標的溶解の動態学は、リガンド性能の評価に利用できる(Ware, C.F.ら(1983)J.Immunol.131:1312)。

【0221】

サイトカイン遊離アッセイ法。リガンドパルス標的に接触してT細胞が分泌するサイトカインのタイプおよび量の解析は、機能的活性の尺度とすることができる。サイトカインは、ELISAまたはELISPOTアッセイ法によって測定し、サイトカイン産生の速度および総量を決定することができる。(Fujihashi, K.ら(1993)J.Immunol.Meth.160:181; Tanquay, S.および Killian, J.J.(1994)Lymphokine Cytokine Res.13:259)。

【0222】

インビトロT細胞抗原感作。本発明のリガンドは、正常ドナーまたは患者由来PBMCからリガンド反応性T細胞集団を誘発する能力についてアッセイできる。このシステムでは、誘発されたT細胞を溶解活性、サイトカイン遊離、ポリクローナル性、および天然抗原性エピトープに対する交差反応性について試験できる。(Parkhurst, M.R.ら(1996)J.Immunol.157:2539)。

【0223】

トランスジェニック動物モデル。免疫原性は、HLA遺伝子組換えマウスに本発明のリガンドを用いてワクチン接種し、誘導された免疫応答の性質および大きさを決定することによってインビボで評価できる。あるいは、hu-PBL-SCIDマウスモデルは、ヒトPBLの養子移入によるマウスにおけるヒト免疫系の再構成を可能にする。これらの動物にリガンドを用いてワクチン接種し、上記のように免疫応答について解析できる。(Shirai, M.ら(1995)J.Immunol.154:2733; Mosier D.E.ら(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2443)。

【0224】

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

【0225】

4量体染色。MHC4量体に個々のリガンドをローディングし、それらの適切なエフェクターT細胞集団へ結合する相対能力について試験できる(Altman, J.D.ら(1996)Science 274:5284)。

10

20

30

40

50

【0226】

MHC安定化。T2細胞のような特定細胞株をHLA結合リガンドへ曝露させると細胞表面上のMHC複合体の安定化が生じる。細胞表面上のMHC複合体の定量は、安定化されているHLA対立遺伝子に対するリガンドの親和性と相関していた。従って、この方法を使用によりリガンドエピトープの相対HLA親和性を決定できる。(Stuber, G.ら(1995)Int.Immunol.7:653)。

【0227】

MHC競合。リガンドの、参照リガンドおよびその同族T細胞エフェクターの機能的活性を妨害する能力は、リガンドがMHC結合に対してどの程度良好に競合できるかについての尺度である。阻害の相対レベルを測定することは、MHC親和性の指標である(Feltkamp, M.C.ら(1995)Immunol.Lett.47:1)。

10

【0228】

霊長類モデル。近年報告された非ヒト霊長類(チンパンジー)モデル系の利用により、HLA制限リガンドのインビボ免疫原性をモニタリングできる。チンパンジーはヒトMHC分子と重複するMHCリガンド特異性を共有しているので、従って相対インビボ免疫原性についてHLA制限リガンドを試験することを可能にすることが証明されている(Bertoni, R.ら(1998)J.Immunol.161:4447)。

【0229】

TCRシグナル伝達事象のモニタリング。いくつかの細胞内シグナル伝達事象(例、リン酸化)には、MHCリガンド複合体による良好なTCRエンゲージメントが関連している。これらの事象の定性的および定量的解析は、TCR会合を通してエフェクター細胞を活性化するリガンドの相対能力と関連付けられてきた(Salazar E.ら(2000)Int.J.Cancer 85:829;Isakov N.ら(1995)J.Exp.Med.181:375)。

20

【0230】

本発明のポリペプチド、ペプチド、それらの変種、および類似体の活性を決定するための追加のアッセイ法は当技術分野において知られている。

【0231】

例えば、ポリペプチド、ペプチド、変種または類似体が抗体への結合について他のペプチドと競合する能力を決定するために、例えば放射免疫アッセイ法、ELISA、免疫放射定量測定法、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ法、インサイチュー免疫アッセイ法、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ法、免疫蛍光アッセイ法、タンパク質Aアッセイ法、電気泳動アッセイ法その他のような技術を使用する競合的および非競合的アッセイシステムを含むがそれらに限定されない様々な免疫アッセイ法を使用できる。結合は、抗体捕捉アッセイ、抗原捕捉アッセイ法、および複数抗体サンドイッチアッセイ法を使用して検出することもできる。このようなアッセイ法において結合を検出する方法は当技術分野において知られている。

30

【0232】

免疫エフェクター細胞の増大

本発明は、これらのAPCを利用して抗原特異的免疫エフェクター細胞の濃縮集団の産生を刺激する。抗原特異的免疫エフェクター細胞は、培養中で死ぬAPCを使用して増大される。それによって未処理免疫エフェクター細胞が他の細胞によって抗原感作される工程は、本質的にはCoulie(1997)Molec.Med.Today 3:261-268に記載されている。

40

【0233】

上記の通りに調製されたAPCは、未処理免疫エフェクター細胞と混合される。好ましくは、細胞はIL-2のようなサイトカインの存在下で培養されてよい。樹状細胞は例えばIL12のような強力な免疫刺激性サイトカインを分泌するので、第1のおよび次に続く増大ラウンド中に追加的サイトカインの添加は不要となることがある。任意の事象において、培養条件は抗原特異的免疫エフェクター細胞がAPCよりはるかに高速に増大する(即ち、増殖する)条件である。APCおよび任意のサイトカインの、複数回注入の実施により、抗原特異的細胞の集団をさらに増大させることができる。

【0234】

50

ある態様では、免疫エフェクター細胞はT細胞である。別の態様では、免疫エフェクター細胞は例えばIL-2、IL-11、またはIL-13をコードする導入遺伝子を用いた形質導入によって遺伝的に修飾できる。インビトロ、エクスピボ、およびインビボで導入遺伝子を導入する方法は、当技術分野において周知である。上記のSambrookら(1989)を参照。

【0235】

遺伝子組換えにおいて有用なベクター

一般に、本発明で使用される細胞の遺伝子組換えは、異種または変化した抗原をコードするポリペプチドまたは導入遺伝子を含むベクターを導入することによって遂行される。ウイルス系および非ウイルス系を含む多様な異なる遺伝子導入ベクターを使用できる。本発明の遺伝子組換えにおいて有用なウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ
10 随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびアデノ-レトロウイルスキメラベクターを含むがそれらに限定されない。APCおよび免疫エフェクター細胞は、下記に記載する方法を使用して、または当技術分野において既知の他の任意の適切な方法によって修飾できる。

【0236】

組換えアデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターの構築

本発明の遺伝子組換えにおいて有用なアデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスベクターは当技術分野において既に教示された方法に従って産生できる。例えば、Karlssonら(1986)EMBO J.5:2377;Carter(1992)Curr.Op.Biotechnol.3:533-539;Muzyczka(1992)Current T
20 op.Microbiol.Immunol.158:97-129;「GENE TARGETING:A PRACTICAL APPROACH」(1992)編集 A.L.Joyner、オックスフォード大学出版、NY)を参照されたい。数種のアプローチは実現可能である。好ましいのはヘルパー非依存性複製欠損ヒトアデノウイルス系である。

【0237】

ヒトアデノウイルス2または5に基づく組換えアデノウイルスベクター(Virology 163:614-617(1988))にはアデノウイルスゲノム(通常はE1A/E1B)由来の必須初期遺伝子が含まれていないので、このためイントランス(in trans)で欠損遺伝子生成物を提供する許容細胞株において増殖させなければ複製することができない。欠損アデノウイルスゲノム配列の代わりに、対象とする導入遺伝子をクローニングして、複製欠損アデノウイルスを用いて感染させた細胞中で発現させてもよい。アデノウイルスに基づく遺伝子導入は宿主ゲノム内への導入遺伝子の組み込みを生じさせず(0.1%未満のアデノウイルス媒介性トランスフ
30 ェクションが宿主DNA内への導入遺伝子組み込みを生じさせる)、このため安定性ではないので、アデノウイルスベクターは高力価で伝播させて非複製細胞をトランスフェクトできる。アデノウイルスE1A/E1B遺伝子を用いて形質転換されたヒト胚腎細胞であるヒト293細胞は、有用な許容細胞株を類型化する。しかしながら、複製欠損アデノウイルスベクターがその中に伝播するのを可能にする、HeLa細胞を含む他の細胞株を使用できる。

【0238】

本発明の方法において使用できるアデノウイルスベクターおよびその他のウイルスベクターについて記載した追加の参考文献には、次が含まれる：Horwitz M.S.「ADENOVIRIDAE AND THEIR REPLICATION,in Fields」 B.ら(編集)、VIROLOGY,Vol.2、Raven Press New York、pp.1679-1721(1990); Graham F.ら、「METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.7:GENE TRANSFER AND EXPRESSION PROTOCOLS」、Murray E.(編集)Humana Press,Clifton,N.J.(1991)、pp.109-128; Miller, N.ら(1995)FASEB J.9:190-199; Schreier H.(1994)Pharmaceutica Acta Helvetiae 68:145-159; Schneider および French(1993)Circulation 88:1937-1942;Curiel, D.T.ら(1992)Hum.Gene Ther.3:147-154;Graham F.L.らの国際公開広報第95/00655号(1995年1月5日); Falck-Pedersen, E.S.の国際公開広報第95/16772(1995年6月22日); Deneffe, P.らの国際公開広報第95/23867号(1995年9月8日);Haddada, H.らの国際公開広報第94/26914号(1994年11月24日); Perricaudet, M.らの国際公開広報第95/02697号(1995年1月26日); Zhang, W.ら国際公開広報第95/25071号(1995年10月12日)。様々なアデノウイルスプラスミドもまた、例えばオンタリオ州トロント所在のマイクロビックスバイオシステムズ(Microbix Biosystems)社(例えばマイクロビックス製品情報シート:アデノウイ
40
50

ルスベクター構築用プラスミド、1996年を参照されたい)を含む商業的供給元から入手できる。さらに遺伝子組換えに使用できるアデノ-レトロウイルスキメラベクターの構築および使用を記載しているVileら(1997)Nature Biotechnology 15:840-841; およびFengら(1997)Nature Biotechnology 15:866-870による論文も参照されたい。

【0239】

本発明の方法において使用できるAAVベクターを記載している追加の参考文献には次のものが含まれている: Carter B. 「HANDBOOK OF PARVOVIRUSES」、Vol.I、pp.169-228、1990; Berns、 「VIROLOGY」、pp.1743-1764(Raven Press 1990); Carter B.(1992)Curr.Opin.Biotechnol.3:533-539;Muzyczka, N.(1992)Current Topics in Micro.and Immunol., 158:92-129;Flotte, T.R.ら(1992)Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.7:349-356;Chatterjeeら(1995) Ann.NY Acad.Sci.770:79-90; Flotte, T.R.らの国際公開広報第95/13365号(1995年5月18日); Trempe, J.P.らの国際公開広報第95/13392号(1995年5月18日); Kotin, R.(1994)Hum.Gene Ther.5:793-801; Flotte, T.R.ら(1995)Gene Therapy 2:357-362;Allen J.M.の国際公開広報第96/17947号(1996年6月13日); およびDuら(1996),Gene Therapy 3:254-261。 10

【0240】

APCは、関連ポリペプチドをコードするウイルスベクターを用いて形質導入できる。最も一般的なウイルスベクターには、ワクシニアおよび鶏痘ウイルス(Bronteら(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:3183-3188; Kimら(1997)J.Immunother.20:276-286)のような組換えボックスウイルス、および優先的にはアデノウイルス(Arthurら(1997)J.Immunol.159:1393-1403;Wanら(1997)Human Gene Therapy 8:1355-1363;Huangら(1995)J.Virol.69:2257-2263)が含まれる。ヒトAPCの形質導入のためにはレトロウイルスもまた使用できる(Marinら(1996)J.Virol.70:2957-2962)。 20

【0241】

インビトロ/エキスピボでは、最小量の無血清培地内で16~24時間に渡る感染多重度(MOI)500でのヒトDCのアデノウイルス(Ad)ベクターへの曝露は、90~100%のDCにおいて導入遺伝子発現を確実に発生させる。DCまたはその他のAPCの形質導入の効率、発現している腫瘍抗原に対して特異的な蛍光抗体を使用する免疫蛍光法によって評価できる(Kimら(1997)J.Immunother.20:276-286)。あるいは、この抗体は、基質との反応において呈色生成物を発生させる酵素(例、HRP)へ抱合させることができる。APCによって発現されている抗原性ポリペプチドの実際量はELISAによって評価できる。 30

【0242】

形質導入されたAPCは、引き続いて静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内、または腹腔内送達経路を通して宿主へ投与できる。

【0243】

DC、またはその他のAPCのインビボ形質導入は、静脈内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、または皮膚送達を含む異なる経路を介したAd(またはその他のウイルスベクター)の投与によって遂行できる。好ましい方法は、約 1×10^{10} ~ 1×10^{12} i.u.の総用量を使用した複数の部位でのAdベクターの皮膚送達である。インビボ形質導入のレベルは、APCマーカーおよび発現しているTAAに対して向けられた抗体を用いた共染色によって大まかに評価できる。この染色方法は、投与部位からの生検試料に対して、または排液しているリンパ節もしくはAPC(特にDC)が移動した可能性があるその他の器官からの細胞上に対して実施できる(Condonら(1996)Nature Med.2:1122-1128およびWanら(1997)Hum.Gene Ther.8:1355-1363)。注射部位または形質導入されたAPCが移動した可能性がある他の器官で発現している抗原の量は、組織ホモジネート上でELISAによって評価できる。 40

【0244】

ウイルス遺伝子送達はより効率的であるが、DCはまたインビトロ/エキスピボで例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、またはカチオン性脂質/プラスミドDNA複合体のような非ウイルス遺伝子送達法によっても形質導入できる(Arthurら(1997),Cancer Gene Ther.4:17-25)。形質導入されたAPCは、引き続いて静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉 50

内、または腹腔内送達経路を通して宿主へ投与できる。

【0245】

DC、またはその他のAPCのインビボ形質導入は、潜在的に静脈内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、または皮膚投与経路を通して送達されたカチオン性脂質/プラスミドDNA複合体の投与によって遂行できる。裸のプラスミドDNAの、皮膚内への遺伝子銃送達または注射もまたDCの形質導入をもたらす(Condonら(1996)Nature Med.2:1122-1128;Razら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:9519-9523)。プラスミドDNAの筋肉内送達は、免疫のためにも使用できる(Rosatoら(1997)Hum.Gene Ther.8:1451-1458)。

【0246】

形質導入効率および導入遺伝子発現のレベルは、ウイルスベクターについて上記で記載したように評価できる。 10

【0247】

養子免疫療法およびワクチン

本発明の抗原特異的免疫エフェクター細胞の増大した集団は、養子免疫療法およびワクチンとして利用される。

【0248】

養子免疫療法の方法は、ある局面では、上記のように未処理免疫エフェクター細胞をAPCと共に培養することによって作製された、抗原感作された抗原特異的免疫エフェクター細胞の実質的に純粋な集団を被験者に投与する段階を含む。好ましくは、APCは樹状細胞である。 20

【0249】

ある態様では、本明細書に記載した養子免疫療法は自家療法である。この場合、APCは単一被験者から単離された親細胞を使用して作製される。増大した集団はまた、被験者から単離されたT細胞も使用する。最後に、抗原特異的細胞の増大した集団が同一患者に投与される。

【0250】

また別の態様では、APCまたは免疫エフェクター細胞は例えばIL-2または共刺激分子のような有効量の刺激性サイトカインと共に投与される。

【0251】

本明細書でそれらの使用目的のために有効であると同定された物質は、CK-18を発現する腫瘍を有する被験者へ、および、または追加としてこのような腫瘍を発生することに感受性である、または危険性のある個体へ投与できる。この物質を例えばマウス、ラット、またはヒト患者のような被験者へ投与する場合には、この物質は薬学的に許容される担体へ添加し、全身性または局所性でその被験者へ投与できる。有益に治療され得る患者を決定するために、腫瘍退行をアッセイできる。治療量は、経験的に決定することができ、治療中の病理、治療中の被験者、ならびに治療の有効性および毒性に伴って変化するであろう。 30

【0252】

インビボ投与は、治療の経過を通して単回投与でも、持続的または間欠的にでも達成できる。投与の最も有効な手段および用量を決定する方法は当業者には周知であり、治療に使用される組成物、治療の目的、治療中の標的細胞、および治療中の被験者に伴って変化するであろう。単回投与または複数回投与は、治療担当医師によって選択される用量レベルおよびパターンを用いて実施できる。適切な投薬量の処方物およびこの物質を投与する方法は下記に記す。 40

【0253】

本発明の物質および組成物は、薬剤の製造ならびに例えば薬学的組成物中の有効成分のような従来型方法に従った投与によるヒトおよびその他の動物の治療において使用できる。

【0254】

より詳細には、本明細書では有効成分とも呼ばれる本発明の物質は、鼻腔、局所的(経皮的、エアロゾル、口腔内、および舌下を含む)、非経口(皮下、筋肉内、静脈内、および皮 50

内を含む)および肺を含む任意の適切な経路によって治療のために投与できる。さらにまた、好ましい経路が受容者の状態および年齢、ならびに治療される疾患に伴って変動することは理解されるであろう。

【0255】

上記の考察および例は、単に技術を例示することが意図されている。当業者には明白であるように、上記に対しては本発明の精神および範囲から逸脱せずに様々な変更を加えることができる。

【国際公開パンフレット】

(M)60213740261



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/055555 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, C12N 15/12, C07K 16/18, A61K 39/395, 39/00, C12N 5/05, 5/08, G01N 33/68, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/49964
- (22) International Filing Date: 21 December 2001 (21.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/257,820 21 December 2000 (21.12.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): NICOLETTE, Charles, A. [US/US]; 4 Mill Street, Framingham, MA 01701 (US).
- (74) Agent: KONSKE, Antoinette, E.; McCutchen Doyle Brown & Enersen LLP, Three Embarcadero Center, Suite 1800, San Francisco, CA 94111-4067 (US).
- (81) Designated States (national): AR, 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, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TD), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IT, LI, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CR, 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
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- 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 02/055555 A2

(54) Title: ANTIGENIC CK-18 COMPOUNDS FOR THERAPY AND DIAGNOSIS AND METHODS FOR USING SAME

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for detecting, diagnosing, prognosing and monitoring the progress of CK-18-related cancers and malignancies and kits for use in said methods. Further provided are methods for screening to identify agonists and antagonists of cancer antigens associated with CK-18 related cancers and malignancies.

WQ 02/055555

PCT/US01/49964

ANTIGENIC CK-18 COMPOUNDS FOR THERAPY
AND DIAGNOSIS AND METHODS FOR USING SAME

TECHNICAL FIELD

The invention relates to compounds useful in therapeutic, diagnostic and
5 screening methods for human cancers and related malignancies.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The number of people dying each year from cancer continues to rise. The most
common causes of cancer death for men and women in the United States are, in order
10 cancers of the lung, colon, and breast. While there have been some modest objective
improvements in the survival of patients with these diseases over the past few decades,
the rising incidence more than compensates for this and the total number of deaths
continues to rise.

Lung cancer is the most common form of cancer in the world. Typical diagnosis
15 of lung cancer combines x-ray with sputum cytology. Unfortunately, by the time a
patient seeks medical attention for their symptoms, the cancer is at such an advanced
state it is usually incurable. Consequently, research has been focused on early detection
of tumor markers before the cancer becomes clinically apparent and while the cancer is
still localized and amenable to therapy. Mulshine et al., "Applications of monoclonal
20 antibodies in the treatment of solid tumors," In: BIOLOGIC THERAPY OF CANCER. Edited
by V. T. Devita, S. Hellman, and S. A. Rosenberg. Philadelphia: J B Lippincott, 1991,
pp. 563-588.

Colorectal cancer is the third most common malignant neoplasm worldwide, and
the second leading cause of cancer deaths in the United States. Shike, M., Winawer,
25 S.J., Greenwald, P.H. et al., (1990) Primary Prevention of Colorectal Cancer: the WHO
Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer; Bulletin of the WHO
68(3):377-85; Greenlee, R.T. et al., (2001) Cancer Statistics, 2001. CA: A Cancer
Journal for Clinicians 51(1):15-36. It is estimated that there will be 135,400 new cases
and 56,700 deaths related to the disease in the United States. Approximately 65% of
30 patients present with advanced disease.

Breast cancer is a major medical problem for women beginning in the third
decade of life and continuing throughout senescence. It is currently estimated that in

WO 02/055555

PCT/US01/49964

the United States women have a one in eight chance of developing the disease in their lifetime (by the age of eighty), whereas one in twenty-eight women have a lifetime risk of dying from breast cancer. Harris et. al., Ed. DISEASES OF THE BREAST, 1996: pp. 159-168. Breast carcinoma is the second most common cause of cancer death in

5 women in the United States, and for women between the ages of 15 and 54, the leading cause of cancer-related death. Forbes (1997) Seminars in Oncology 24(1), Suppl. 1, pp.S1-20-S1-35).

Prostate cancer is the most common malignant cancer in North American men (excluding skin). It is estimated that in 2001, approximately 198,100 new cases and
10 31,500 prostate cancer-related deaths will occur in the United States. Greenlee, R.T. et al., *supra*. Prostate cancer is now the second leading cause of cancer death in men, exceeded only by lung cancer. It accounts for 29% of all male cancers and 11% of male cancer-related deaths.

Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death among women in the
15 United States and has the highest mortality rate of all gynecologic cancers. Greenlee, R.T. et al., (2001) *supra*. It is projected for 2001 that 23,400 new cases of ovarian cancer will be diagnosed and 13,900 women will die of the disease. Greenlee, R.T. et al., (2001) *supra*. The prognosis for survival from ovarian cancer is largely dependent upon the extent of disease at diagnosis. Women diagnosed with local disease are over 3
20 times more likely to survive 5 years than women with distant disease. However, only one fourth of women present with localized disease at diagnosis. Ries, L.A. et al., (1998), SEER Cancer Statistics Review 1973-1995, Bethesda, MD: National Cancer Institute.

Melanomas make up approximately three percent of all skin cancers and the
25 worldwide increase in melanoma is unsurpassed by any other neoplasm with the exception of lung cancer in women. CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY (1991) (eds) Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S.; W.B. Saunders Company Philadelphia, pages: 340-342; Kirkwood and Agarwala (1993) Principles and Practice of Oncology 7:1-16. Even when melanoma is apparently localized to the skin, up to
30 30% of the patients will develop systemic metastasis and the majority will die. Kirkwood and Agarwala (1993) Principles and Practice of Oncology 7:1-16.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

One of the major goals of cancer immunotherapy is the induction of tumor-specific T-lymphocyte responses that will be effective in the rejection of established tumors. The prospects for such therapies rely on the identification and characterization of tumor-specific immune responses.

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

Tumor specific T cells, derived from cancer patients, will bind and lyse tumor cells. This specificity is based on their ability to recognize short amino acid sequences
20 (epitopes) presented on the surface of the tumor cells by MHC class I and, in some cell types, class II molecules. These epitopes are derived from the proteolytic degradation of intracellular proteins called tumor antigens encoded by genes that are either uniquely or aberrantly expressed in tumor or cancer cells.

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

The ability of a particular peptide to function as a T cell epitope requires that it bind effectively to the antigen presenting domain of an MHC molecule and also that it display an appropriate set of amino acids that can be specifically recognized by a T cell receptor molecule. While it is possible to identify natural T cell epitopes derived from antigenic polypeptides, these peptide epitopes do not necessarily represent antigens that are optimized for inducing a particular immune response. In fact, it has been shown that it is possible to improve the effectiveness of natural epitopes by introducing single amino or multiple acids substitutions that alter their sequence (Valmori et al. (2000) J. Immunol 164(2):1125-1131). Thus, delivery of carefully optimized peptide epitopes has the potential to provide an improved method to induce a useful immune response.

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

reduction of allograft rejection, and induction of an immune response to a self antigen for the purpose of contraception.

More recently, certain pathogen- and tumor-related proteins have been immunologically mimicked with peptides whose amino acid sequence corresponds to that of a known or predicted antigenic determinant domain of the pathogen- or tumor-related protein. Despite these advances, such peptide mimics generally perform less than optimally with respect to inducing an immune response.

Despite the numerous examples of isolated antigens and other biomarkers shown to be associated with various cancers, the usefulness of such tools for therapeutic diagnostic, prognostic and other detection applications are limited, for example, in that they have been shown to be ineffective, unreliable, lacking in sensitivity and/or predictiveness, and the like. Thus, there exists a continuing need to identify antigens, antigenic epitopes and other biomarkers associated with cancer and to develop new materials and kits to aid in the early detection, therapy and monitoring of related cancers. The present invention satisfies this need and provides related advantages as well.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

The present invention provides novel compounds compositions and methods for the therapy and diagnosis of human cytokeratin 18 protein (CK18) related cancers and malignancies.

Further provided are polynucleotides encoding the compounds of the invention, the nucleic acid sequences encoding these compounds, e.g., provided in SEQ ID NOs: 4, 6 and 8; the nucleic acids encoding the amino acids of FLDKGHMYV (SEQ ID NO:3), FLDKAHMEV (SEQ ID NO:5), and FMKKNHHEEV (SEQ ID NO:7); complements and variants thereof are also encompassed by the invention. Also provided are compositions, gene delivery vehicles and/or host cells comprising these polynucleotides.

Also provided by the invention are polypeptides encoded by the polynucleotides of the invention, the amino acid sequences provided in SEQ ID NOs:3, 5 and 7; complements and variants thereof are also encompassed by the invention.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

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

Also provided by this invention is a composition comprising at least one, or at least two or alternatively at least three immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the corresponding native ligand, and wherein said immunogenic ligand
15 comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7. The compositions can be combined with a carrier such as a pharmaceutically acceptable carrier.

Further provided by this invention is a host cell comprising at least one, or at least two or alternatively at least three immunogenic ligands, wherein said
20 immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the corresponding native ligand, and wherein said immunogenic ligand comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7. In one aspect, the host cell is an antigen presenting cell, e.g., a dendritic cell.

25 Compositions comprising such host cells and a carrier are also provided. The host cells of this invention can be combined with a carrier such as a pharmaceutically acceptable carrier.

Further provided by this invention is a method for inducing an immune response in a subject by delivering to the subject a composition comprising an effective amount
30 of at least one, or at least two or alternatively at least three immunogenic ligands, wherein each of said immunogenic ligands is characterized by an ability to elicit an immune response against the corresponding native ligand, and wherein said

WO 02/055555

PCT/US01/49964

immunogenic ligand is selected from the group of compounds comprising the sequences of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7.

The present invention additionally provides methods and compositions for detecting, diagnosing, prognosing and monitoring the progress of CK-18-related cancers and malignancies and kits for use in said methods.

Further provided are methods for screening to identify agonists and antagonists of cancer antigens associated with CK-18-related cancers and malignancies.

The methods and compositions described herein are particularly suited to be adapted to automation and high-throughput assay systems.

DESCRIPTION OF THE SEQUENCE LISTINGS

SEQ ID NO:1. The amino acid sequence of the native human cytokeratin 18 protein. This sequence is listed in the National Center for Biotechnology Information ("NCBI") under Reference No. NP 000215.

SEQ ID NO:2. The complete nucleotide sequence of an mRNA encoding human cytokeratin 18 ("CK18"). This sequence is listed in the National Center for Biotechnology Information ("NCBI") under Reference No. NM 000224.

SEQ ID NO:3. The amino acid sequence of compound 1.

SEQ ID NO:4. The polynucleotide sequence encoding compound 1.

SEQ ID NO:5. The amino acid sequence of compound 2.

SEQ ID NO:6. The polynucleotide sequence encoding compound 2.

SEQ ID NO:7. The amino acid sequence of compound 3, the native epitope of CK-18, comprising amino acids 212 to 221 of SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:8. The polynucleotide sequence encoding compound 3.

MODES OF CARRYING OUT THE INVENTION

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

The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques),

WO 02/055555

PCT/US01/49964

- microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. These methods are described in the following publications. See, e.g., Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds. (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson et al. IRL Press at Oxford University Press (1991)); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)); ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow and Lane eds. (1988)); USING ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL (Harlow and Lane eds. (1999)); and ANIMAL CELL CULTURE (R.L. Freshney ed. (1987)).

Definitions

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

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

- As used herein, the term "comprising" is intended to mean that the compositions and methods include the recited elements, but not excluding others. "Consisting essentially of" when used to define compositions and methods, shall mean excluding other elements of any essential significance to the combination. Thus, a composition consisting essentially of the elements as defined herein would not exclude trace contaminants from the isolation and purification method and pharmaceutically acceptable carriers, such as phosphate buffered saline, preservatives, and the like. "Consisting of" shall mean excluding more than trace elements of other ingredients and substantial method steps for administering the compositions of this invention. Embodiments defined by each of these transition terms are within the scope of this invention.

- A "native" or "natural" or "wild-type" antigen is a polypeptide, protein or a fragment which contains an epitope, which has been isolated from a natural biological source, and which can specifically bind to an antigen receptor, in particular a T cell antigen receptor (TCR), in a subject.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

The term "antigen" is well understood in the art and includes substances which are immunogenic, *i.e.*, immunogens, as well as substances which induce immunological unresponsiveness, or anergy, *i.e.*, anergens.

5 An "altered or modified antigen" is one having a primary sequence that is different from that of the corresponding wild-type antigen. Altered antigens can be made by synthetic or recombinant methods and include, but are not limited to, antigenic peptides that are differentially modified during or after translation, *e.g.*, by phosphorylation, glycosylation, cross-linking, acylation, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule, membrane molecule or other ligand. (Ferguson et al. (1988) 10 *Ann. Rev. Biochem.* 57:285-320). A modified or altered antigenic epitope of the invention is intended to bind to the same TCR as the native or wild-type epitope.

A "self-antigen" also referred to herein as a native or wild-type antigen is an antigenic peptide that induces little or no immune response in the subject due to self-tolerance to the antigen. An example of a self-antigen is the melanoma specific antigen 15 gp100.

The term "tumor associated antigen" or "TAA" refers to an antigen that is associated with or specific to a tumor. Examples of known TAAs include gp100, MART and MAGP.

The terms "major histocompatibility complex" or "MHC" refers to a complex of 20 genes encoding cell-surface molecules that are required for antigen presentation to T cells and for rapid graft rejection. In humans, the MHC is also known as the "human leukocyte antigen" or "HLA" complex. The proteins encoded by the MHC are known as "MHC molecules" and are classified into class I and class II MHC molecules. Class I MHC includes membrane heterodimeric proteins made up of an α chain encoded in 25 the MHC noncovalently linked with the β_2 -microglobulin. Class I MHC molecules are expressed by nearly all nucleated cells and have been shown to function in antigen presentation to CD8⁺ T cells. Class I molecules include HLA-A, B, and C in humans. Class II MHC molecules also include membrane heterodimeric proteins consisting of noncovalently associated α and β chains. Class II MHC molecules are known to 30 function in CD4⁺ T cells and, in humans, include HLA-DP, -DQ, and DR. In a preferred embodiment, invention compositions and ligands can complex with MHC molecules of any HLA type. Those of skill in the art are familiar with the serotypes and

WO 02/055555

PCT/US01/49964

genotypes of the HLA. See: bimas.dort.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla coefficient viewing page. Rammensee H.G., Bachmann J., and Stevanovic S. MHC Ligands and Peptide Motifs (1997) Chapman & Hall Publishers; Schreuder, G.M. Th. et al. The HLA dictionary (1999) Tissue Antigens 54:409-437.

- 5 The term "antigen-presenting matrix", as used herein, intends a molecule or molecules which can present antigen in such a way that the antigen can be bound by a T-cell antigen receptor on the surface of a T cell. An antigen-presenting matrix can be on the surface of an antigen-presenting cell (APC), on a vesicle preparation of an APC, or can be in the form of a synthetic matrix on a solid support such as a bead or a plate.
- 10 An example of a synthetic antigen-presenting matrix is purified MHC class I molecules complexed to β_2 -microglobulin, multimers of such purified MHC class I molecules, purified MHC Class II molecules, or functional portions thereof, attached to a solid support.

- The term "antigen presenting cells (APC)" refers to a class of cells capable of presenting one or more antigens in the form of antigen-MHC complex recognizable by specific effector cells of the immune system, and thereby inducing an effective cellular immune response against the antigen or antigens being presented. While many types of cells may be capable of presenting antigens on their cell surface for T-cell recognition, only professional APCs have the capacity to present antigens in an efficient amount and
- 15 further to activate T-cells for cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses. APCs can be intact whole cells such as macrophages, B-cells and dendritic cells; or other molecules, naturally occurring or synthetic, such as purified MHC class I molecules complexed to β_2 -microglobulin.

- The term "dendritic cells (DC)" refers to a diverse population of morphologically similar cell types found in a variety of lymphoid and non-lymphoid tissues (Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271-296). Dendritic cells constitute the most potent and preferred APCs in the organism. A subset, if not all, of dendritic cells are derived from bone marrow progenitor cells, circulate in small numbers in the peripheral blood and appear either as immature Langerhans' cells or terminally
- 25 differentiated mature cells. While the dendritic cells can be differentiated from monocytes, they possess distinct phenotypes. For example, a particular differentiating marker, CD14 antigen, is not found in dendritic cells but is possessed by monocytes.
- 30

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

The term "immune effector cells" refers to cells capable of binding an antigen
15 and which mediate an immune response. These cells include, but are not limited to, T cells, B cells, monocytes, macrophages, NK cells and cytotoxic T lymphocytes (CTLs), for example CTL lines, CTL clones, and CTLs from tumor, inflammatory, or other infiltrates. Certain diseased tissue expresses specific antigens and CTLs specific for these antigens have been identified. For example, approximately 80% of melanomas
20 express the antigen known as gp 100.

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

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

"Immune response" broadly refers to the antigen-specific responses of
30 lymphocytes to foreign substances. Any substance that can elicit an immune response is said to be "immunogenic" and is referred to as an "immunogen". All immunogens

WO 02/055555

PCT/US01/49964

are antigens, however, not all antigens are immunogenic. An immune response of this invention can be humoral (via antibody activity) or cell-mediated (via T cell activation).

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

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

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

Invention ligands may bind to a receptor on an MHC class I molecule. In one embodiment, the ligand of the invention is about 7 to about 11 amino acids or alternatively 9 or 10 amino acids, in length.

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

As used herein, the term "educated, antigen-specific immune effector cell", is an immune effector cell as defined above, which has previously encountered an antigen. In contrast with its naïve counterpart, activation of an educated, antigen-specific immune effector cell does not require a costimulatory signal. Recognition of the peptide:MHC complex is sufficient.

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

The term "cross-reactive" is used to describe certain immunogenic properties of invention compounds which are functionally overlapping. More particularly, the immunogenic properties of a native ligand and/or immune effector cells activated thereby are shared to a certain extent by the altered ligand such that the altered ligand is "cross-reactive" with the native ligand and/or the immune effector cells activated thereby. For purposes of this invention, cross-reactivity is manifested at multiple levels:

(i) at the ligand level, *e.g.*, the altered ligands can bind the TCR of and activate native ligand CTLs; (ii) at the T cell level, *i.e.*, altered ligands of the invention bind the TCR of and activate a population of T cells (distinct from the population of native ligand CTLs) which can effectively target and lyse cells displaying the native ligand; and (iii) at the antibody level, *e.g.*, "anti"-altered ligand antibodies can detect, recognize and bind the native ligand and initiate effector mechanisms in an immune response which ultimately result in elimination of the native ligand from the host.

As used herein, the term "inducing an immune response in a subject" is a term well understood in the art and intends that an increase of at least about 2-fold, more preferably at least about 5-fold, more preferably at least about 10-fold, more preferably at least about 100-fold, even more preferably at least about 500-fold, even more preferably at least about 1000-fold or more in an immune response to an antigen (or epitope) can be detected or measured, after introducing the antigen (or epitope) into the subject, relative to the immune response (if any) before introduction of the antigen (or epitope) into the subject. An immune response to an antigen (or epitope), includes, but is not limited to, production of an antigen-specific (or epitope-specific) antibody, and production of an immune cell expressing on its surface a molecule which specifically binds to an antigen (or epitope). Methods of determining whether an immune response to a given antigen (or epitope) has been induced are well known in the art. For example, antigen-specific antibody can be detected using any of a variety of immunoassays known in the art, including, but not limited to, ELISA, wherein, for example, binding of an antibody in a sample to an immobilized antigen (or epitope) is

WO 02/055555

PCT/US01/49964

detected with a detectably-labeled second antibody (e.g., enzyme-labeled mouse anti-human Ig antibody).

"Co-stimulatory molecules" are involved in the interaction between receptor-ligand pairs expressed on the surface of antigen presenting cells and T cells. Research accumulated over the past several years has demonstrated convincingly that resting T cells require at least two signals for induction of cytokine gene expression and proliferation (Schwartz R.H. (1990) *Science* 248:1349-1356 and Jenkins M.K. (1992) *Immunol. Today* 13:69-73). One signal, the one that confers specificity, can be produced by interaction of the TCR/CD3 complex with an appropriate MHC/peptide complex. The second signal is not antigen specific and is termed the "co-stimulatory" signal. This signal was originally defined as an activity provided by bone-marrow-derived accessory cells such as macrophages and dendritic cells, the so called "professional" APCs. Several molecules have been shown to enhance co-stimulatory activity. These are heat stable antigen (HSA) (Liu Y. et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175:437-445), chondroitin sulfate-modified MHC invariant chain (Ii-CS) (Naujokas, M.F. et al. (1993) *Cell* 74:257-268), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (Van Seventer G.A. (1990) *J. Immunol.* 144:4579-4586), B7-1, and B7-2/B70 (Schwartz, R.H. (1992) *Cell* 71:1065-1068). These molecules each appear to assist co-stimulation by interacting with their cognate ligands on the T cells. Co-stimulatory molecules mediate co-stimulatory signal(s), which are necessary, under normal physiological conditions, to achieve full activation of naive T cells. One exemplary receptor-ligand pair is the B7 co-stimulatory molecule on the surface of APCs and its counter-receptor CD28 or CTLA-4 on T cells (Freeman et al. (1993) *Science* 262:909-911; Young et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90:229 and Nabavi et al. (1992) *Nature* 360:266-268). Other important co-stimulatory molecules are CD40, CD54, CD80, and CD86. The term "co-stimulatory molecule" encompasses any single molecule or combination of molecules which, when acting together with a peptide/MHC complex bound by a TCR on the surface of a T cell, provides a co-stimulatory effect which achieves activation of the T cell that binds the peptide. The term thus encompasses B7, or other co-stimulatory molecule(s) on an antigen-presenting matrix such as an APC, fragments thereof (alone, complexed with another molecule(s), or as part of a fusion protein) which, together with peptide/MHC complex, binds to a cognate ligand and results in activation of the T cell

WO 02/055555

PCT/US01/49964

when the TCR on the surface of the T cell specifically binds the peptide. Co-stimulatory molecules are commercially available from a variety of sources, including, for example, Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA). It is intended, although not always explicitly stated, that molecules having similar biological activity as wild-type or purified co-stimulatory molecules (e.g., recombinantly produced or mutants thereof) are intended to be used within the spirit and scope of the invention.

As used herein, "solid phase support" or "solid support", used interchangeably, is not limited to a specific type of support. Rather a large number of supports are available and are known to one of ordinary skill in the art. Solid phase supports include silica gels, resins, derivatized plastic films, glass beads, cotton, plastic beads, alumina gels. As used herein, "solid support" also includes synthetic antigen-presenting matrices, cells, and liposomes. A suitable solid phase support may be selected on the basis of desired end use and suitability for various protocols. For example, for peptide synthesis, solid phase support may refer to resins such as polystyrene (e.g., PAM-resin obtained from Bachem Inc., Peninsula Laboratories, etc.), POLYHIPE® resin (obtained from Aminotech, Canada), polyamide resin (obtained from Peninsula Laboratories), polystyrene resin grafted with polyethylene glycol (TentaGel®, Rapp Polymere, Tübingen, Germany) or polydimethylacrylamide resin (obtained from Miligen/Bioscience, California). Solid supports also include microchips and grids, on which cDNAs, oligonucleotides, peptides, antibodies or other molecules are fixed in arrays. The surface of the grids may be composed of a wide variety of material including glass, plastic, silicon, gold, gelatin or nylon. Lockhart (2000) *Nature*, 405:827-836; Srinivas (2001) *Clin. Chem.*, 47:1901-1911. For example, the use of the so-called SELDI-MS method (surface-enhanced laser desorption-ionization & mass spectroscopy) exposes samples to chips with biochemically characterized surfaces (containing molecules such as antibodies or receptors) followed by mass spectroscopy to visualize and identify the bound proteins. For a review of recently available technology see Srinivas, P. et al. (2001) *Clinical Chemistry* 47(10):1901-1911, and references cited therein such as De Wildt, R.M.T. et al. (2000) *Nat. Biotech* 18:989-94, Aronkov, P. et al. (2000) *Anal. Biochem.* 278:123-31, Haab, B.B. et al. (2001) *Genome Biol.* 2:1-13, and Cahill, D.J. (2001) *J Immunol. Methods* 250:81-91. Also included within a solid support are tissue microarrays in which small cylinders of tissue are

WO 02/055555

PCT/US01/49964

punched out of thousands of individual tumor specimens (from different tissues of hundreds of individuals in a study) and then probed with antibodies, RNA, etc. Hoos, A. et al. (2001) Am J. Pathol. 158:1245-51.

The term "immunomodulatory agent", as used herein, is a molecule, a
 5 macromolecular complex, or a cell that modulates an immune response and encompasses an antigenic peptide of the invention alone or in any of a variety of formulations described herein; a polypeptide comprising an antigenic peptide of the invention; a polynucleotide encoding a peptide or polypeptide of the invention; an antigenic peptide of the invention bound to a Class I or a Class II MHC molecule on an
 10 antigen-presenting matrix, including an APC and a synthetic antigen-presenting matrix (in the presence or absence of co-stimulatory molecule(s)); an antigenic peptide of the invention covalently or non-covalently complexed to another molecule(s) or macromolecular structure; and an educated, antigen-specific immune effector cell which is specific for a peptide of the invention.

15 The term "modulate an immune response" includes inducing (increasing, eliciting) an immune response; and reducing (suppressing) an immune response. An immunomodulatory method (or protocol) is one that modulates an immune response in a subject.

As used herein, the term "cytokine" refers to any one of the numerous factors
 20 that exert a variety of effects on cells, for example, inducing growth or proliferation. Non-limiting examples of cytokines which may be used alone or in combination in the practice of the present invention include, interleukin-2 (IL-2), stem cell factor (SCF), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), G-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-1 alpha (IL-1 α),
 25 interleukin-11 (IL-11), MIP-11, leukemia inhibitory factor (LIF), c-kit ligand, thrombopoietin (TPO) and flt3 ligand. The present invention also includes culture conditions in which one or more cytokine is specifically excluded from the medium. Cytokines are commercially available from several vendors such as, for example, Genzyme (Framingham, MA), Genentech (South San Francisco, CA), Amgen
 30 (Thousand Oaks, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN) and Immunex (Seattle, WA). It is intended, although not always explicitly stated, that molecules having similar

WO 02/055555

PCT/US01/49964

biological activity as wild-type or purified cytokines (*e.g.*, recombinantly produced or mutants thereof) are intended to be used within the spirit and scope of the invention.

The terms "polynucleotide" and "nucleic acid molecule" are used interchangeably to refer to polymeric forms of nucleotides of any length. The polynucleotides may contain deoxyribonucleotides, ribonucleotides, and/or their
 5 analogs. Nucleotides may have any three-dimensional structure, and may perform any function, known or unknown. The term "polynucleotide" includes, for example, single-stranded, double-stranded and triple helical molecules, a gene or gene fragment, exons, introns, mRNA, tRNA, rRNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides,
 10 branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence, nucleic acid probes, and primers. In addition to a native nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of the present invention may also comprise modified nucleic acid molecules.

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

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

As used herein, "expression" refers to the process by which polynucleotides are transcribed into mRNA and translated into peptides, polypeptides, or proteins. If the polynucleotide is derived from genomic DNA, expression may include splicing of the mRNA, if an appropriate eukaryotic host is selected. Regulatory elements required for
 30 expression include promoter sequences to bind RNA polymerase and transcription initiation sequences for ribosome binding. For example, a bacterial expression vector includes a promoter such as the *lac* promoter and for transcription initiation the Shine-

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Dalarno sequence and the start codon AUG (Sambrook et al. (1989) *supra*). Similarly, an eukaryotic expression vector includes a heterologous or homologous promoter for RNA polymerase II, a downstream polyadenylation signal, the start codon AUG, and a termination codon for detachment of the ribosome. Such vectors can be obtained commercially or assembled by the sequences described in methods well known in the art, for example, the methods described below for constructing vectors in general.

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

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

mitochondrial chromosome. A number of vectors are known to be capable of mediating transfer of genes to mammalian cells, as is known in the art and described herein.

A "viral vector" is defined as a recombinantly produced virus or viral particle that comprises a polynucleotide to be delivered into a host cell, either *in vivo*, *ex vivo* or

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

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

- In aspects where gene transfer is mediated by a DNA viral vector, such as an adenovirus (Ad), pseudo adenoviral or adeno-associated virus (AAV), vector construct refers to the polynucleotide comprising the viral genome or part thereof, and a transgene. Adenoviruses (Ads) are a relatively well characterized, homogenous group of viruses, including over 50 serotypes. See, *e.g.*, WO 95/27071. Ads are easy to grow and do not require integration into the host cell genome. Recombinant Ad-derived vectors, particularly those that reduce the potential for recombination and generation of wild-type virus, have also been constructed. See, WO 95/00655 and WO 95/11984. Wild-type AAV has high infectivity and specificity integrating into the host cell's

WO 02/055555

PCT/US01/49964

genome. See, Hermonat and Muzycka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 and Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996.

Vectors that contain both a promoter and a cloning site into which a polynucleotide can be operatively linked are well known in the art. Such vectors are capable of transcribing RNA *in vitro* or *in vivo*, and are commercially available from sources such as Stratagene (La Jolla, CA) and Promega Biotech (Madison, WI). In order to optimize expression and/or *in vitro* transcription, it may be necessary to remove, add or alter 5' and/or 3' untranslated portions of the clones to eliminate extra, potential inappropriate alternative translation initiation codons or other sequences that may interfere with or reduce expression, either at the level of transcription or translation. Alternatively, consensus ribosome binding sites can be inserted immediately 5' of the start codon to enhance expression.

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

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

Examples of stringent hybridization conditions include: incubation temperatures of about 25°C to about 37°C; hybridization buffer concentrations of about 6 X SSC to about 10 X SSC; formamide concentrations of about 0% to about 25%; and wash solutions of about 6 X SSC. Examples of moderate hybridization conditions include: incubation temperatures of about 40°C to about 50°C; buffer concentrations of about 9

WO 02/055555

PCT/US01/49964

X SSC to about 2 X SSC; formamide concentrations of about 30% to about 50%; and wash solutions of about 5 X SSC to about 2 X SSC. Examples of high stringency conditions include: incubation temperatures of about 55°C to about 68°C; buffer concentrations of about 1 X SSC to about 0.1 X SSC; formamide concentrations of about 55% to about 75%; and wash solutions of about 1 X SSC, 0.1 X SSC, or deionized water. In general, hybridization incubation times are from 5 minutes to 24 hours, with 1, 2, or more washing steps, and wash incubation times are about 1, 2, or 15 minutes. SSC is 0.15 M NaCl and 15 mM citrate buffer. It is understood that equivalents of SSC using other buffer systems can be employed.

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

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

The term "isolated" means separated from constituents, cellular and otherwise, in which the polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, are normally associated with in nature. For example, with respect to a

WO 02/055555

PCT/US01/49964

polynucleotide, an isolated polynucleotide is one that is separated from the 5' and 3' sequences with which it is normally associated in the chromosome. As is apparent to those of skill in the art, a non-naturally occurring polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, does not require "isolation" to distinguish it from its naturally occurring counterpart. In addition, a "concentrated", "separated" or "diluted" polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, is distinguishable from its naturally occurring counterpart in that the concentration or number of molecules per volume is greater than "concentrated" or less than "separated" than that of its naturally occurring counterpart. A polynucleotide, peptide, polypeptide, protein, antibody, or fragments thereof, which differs from the naturally occurring counterpart in its primary sequence or for example, by its glycosylation pattern, need not be present in its isolated form since it is distinguishable from its naturally occurring counterpart by its primary sequence, or alternatively, by another characteristic such as glycosylation pattern. Although not explicitly stated for each of the inventions disclosed herein, it is to be understood that all of the above embodiments for each of the compositions disclosed below and under the appropriate conditions, are provided by this invention. Thus, a non-naturally occurring polynucleotide is provided as a separate embodiment from the isolated naturally occurring polynucleotide. A protein produced in a bacterial cell is provided as a separate embodiment from the naturally occurring protein isolated from a eukaryotic cell in which it is produced in nature.

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

A neoplasm is an abnormal mass or colony of cells produced by a relatively autonomous new growth of tissue. Most neoplasms arise from the clonal expansion of a single cell that has undergone neoplastic transformation. The transformation of a normal to a neoplastic cell can be caused by a chemical, physical, or biological agent (or event) that directly and irreversibly alters the cell genome. Neoplastic cells are characterized by the loss of some specialized functions and the acquisition of new biological properties, foremost, the property of relatively autonomous (uncontrolled) growth. Neoplastic cells pass on their heritable biological characteristics to progeny cells.

The past, present, and future predicted biological behavior, or clinical course, of a neoplasm is further classified as benign or malignant, a distinction of great importance in diagnosis, treatment, and prognosis. A malignant neoplasm manifests a greater

WO 02/055555

PCT/US01/49964

degree of autonomy, is capable of invasion and metastatic spread, may be resistant to treatment, and may cause death. A benign neoplasm has a lesser degree of autonomy, is usually not invasive, does not metastasize, and generally produces no great harm if treated adequately.

- 5 Cancer is a generic term for malignant neoplasms. Anaplasia is a characteristic property of cancer cells and denotes a lack of normal structural and functional characteristics (undifferentiation).

- A tumor is literally a swelling of any type, such as an inflammatory or other swelling, but modern usage generally denotes a neoplasm. The suffix "-oma" means tumor and usually denotes a benign neoplasm, as in fibroma, lipoma, and so forth, but sometimes implies a malignant neoplasm, as with so-called melanoma, hepatoma, and seminoma, or even a non-neoplastic lesion, such as a hematoma, granuloma, or hamartoma.

- 10 The suffix "-blastoma" denotes a neoplasm of embryonic cells, such as neuroblastoma of the adrenal or retinoblastoma of the eye.

Histogenesis is the origin of a tissue and is a method of classifying neoplasms on the basis of the tissue cell of origin. Adenomas are benign neoplasms of glandular epithelium. Carcinomas are malignant tumors of epithelium. Sarcomas are malignant tumors of mesenchymal tissues.

- 20 One system to classify neoplasia utilizes biological (clinical) behavior, whether benign or malignant, and the histogenesis, the tissue or cell of origin of the neoplasm as determined by histologic and cytologic examination. Neoplasms may originate in almost any tissue containing cells capable of mitotic division. The histogenetic classification of neoplasms is based upon the tissue (or cell) of origin as determined by histologic and cytologic examination.

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

delaying, and "suppressing" tumor growth indicates a growth state that is curtailed when stopping tumor growth, as well as tumor shrinkage.

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

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

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

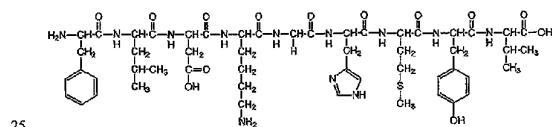
As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water, and emulsions, such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents. The compositions also can include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

An "effective amount" is an amount sufficient to effect beneficial or desired results. An effective amount can be administered in one or more administrations, applications or dosages.

PEPTIDE LIGAND COMPOUND AND COMPOSITIONS

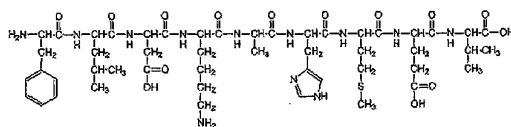
The present invention provides compounds having the following structures:

SEQ ID NO:3
FLDKGHMYV

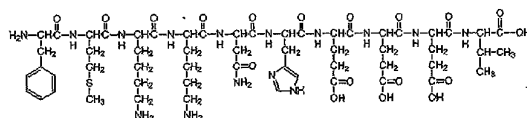


WO 02/055555

PCT/US01/49964

SEQ ID NO:5
FLDKAHMEV

or

SEQ ID NO:7
FMKKNHREEV

5 The present invention also provides compositions that bind to MHC molecules and are useful for modulating immune responses to the cognate native antigenic epitopes and their corresponding native proteins.

This invention further provides compositions which are useful as components of anti-cancer vaccines and to expand immune effector cells that are specific for cells characterized by differential, *i.e.*, aberrant, expression of antigen CK-18.

10 An "CK-18-related cancer or malignancy" is one in which the differential expression of the antigenic protein serves as a marker for the neoplastic phenotype. Examples of cancer types exhibiting differential expression of the CK-18 antigen include, but are not limited to, breast cancer and lung cancer.

15 In one embodiment, the ligands of the invention have comparable or enhanced affinity for MHC binding to the native antigenic epitope. It has been demonstrated that peptide:MHC class I binding properties correlate with immunogenicity (Sette, A. et al. (1994) Immunol. 153:5586; van der Burg, S.H. et al. (1996) J. Immunol. 156:3308). Comparative binding of the ligands of the invention to an MHC class I molecule can be measured by methods that are known in the art and include, but are not limited to,

20 calculating the affinity based on an algorithm (see, for example, Parker et al. (1992) J.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Immunol. 149:3580-3587) and experimentally determining binding affinity (see, for example, Tan et al. (1997) J. Immunol. Meth. 209(1):25-36). For example, the relative binding of a peptide to a class I molecule can be measured on the basis of binding of a radiolabeled standard peptide to detergent-solubilized MHC molecules, using various concentrations of test peptides (e.g., ranging from 100 mM to 1 nM). MHC class I heavy chain and β_2 -microglobulin are coincubated with a fixed concentration (e.g., 5 nM) radiolabeled standard (control) peptide and various concentrations of a test peptide for a suitable period of time (e.g., 2 hours to 72 hours) at room temperature in the presence of a mixture of protease inhibitors. A control tube contains standard peptide and MHC molecules, but no test peptide. The percent MHC-bound radioactivity is determined by gel filtration. The IC_{50} (concentration of test peptide which results in 50% inhibition of binding of control peptide) is calculated for each peptide. Additional methods for determining binding affinity are known in the art. In another embodiment, the ligands of the invention elicit comparable or enhanced antigen-specific T cell activation to the native antigenic epitope. Methods for determining immunogenicity of invention ligands are known in the art and include, but are not limited to, those described in al-Ramadi et al. (1992) J. Immunol. 155(2):662-673; and Zuegel et al. (1998) J. Immunol. 161(4):1705-1709.

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

This invention provides novel, antigenic peptide sequences, which are useful as components of anti-cancer vaccines and to expand immune effector cells that are specific for cells and cancer cells characterized by differential expression of the human cancer antigen CK-18.

Further encompassed by the term "antigenic peptide" are multimers (concatemers) of an antigenic peptide of the invention, optionally including intervening amino acid sequences as well as polypeptides comprising the sequences of SEQ ID

WO 02/055555

PCT/US01/49964

NOs: 1, 3, 5 or 7. The invention also provides polypeptides comprising these sequences wherein the polypeptides are preferentially recognized by human cancer antigen CK-18 cytotoxic T lymphocytes.

Polypeptides comprising the peptide sequences of the invention can be prepared by altering the sequence of polynucleotides that encode the native human CK-18 polypeptide sequence. This is accomplished by methods of recombinant DNA technology well known to those skilled in the art. For example, site directed mutagenesis may be performed on recombinant polynucleotides encoding the native human cancer antigen CK-18 (SEQ ID NO: 2) or the epitope (SEQ ID NO: 8) sequence to introduce changes in the polynucleotide sequence.

The proteins and polypeptides of this invention can be obtained by chemical synthesis using a commercially available automated peptide synthesizer such as those manufactured by Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430A or 431A, Foster City, CA, USA. The synthesized protein or polypeptide can be precipitated and further purified, for example by high performance liquid chromatography (HPLC). Accordingly, this invention also provides a process for chemically synthesizing the proteins of this invention by providing the sequence of the protein and reagents, such as amino acids and enzymes and linking together the amino acids in the proper orientation and linear sequence.

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

PEPTIDE ANALOGUES

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

Peptides of the invention can be modified to include unnatural amino acids. Thus, the peptides may comprise D-amino acids, a combination of D- and L-amino

WO 02/055555

PCT/US01/49964

acids, and various "designer" amino acids (e.g., β -methyl amino acids, C- α -methyl amino acids, and N- α -methyl amino acids, etc.) to convey special properties to peptides. Additionally, by assigning specific amino acids at specific coupling steps, peptides with α -helices β turns, β sheets, γ -turns, and cyclic peptides can be generated. Generally, it is believed that α -helical secondary structure or random secondary structure is preferred.

In a further embodiment, subunits of peptides that confer useful chemical and structural properties will be chosen. For example, peptides comprising D-amino acids will be resistant to L-amino acid-specific proteases *in vivo*. Modified compounds with D-amino acids may be synthesized with the amino acids aligned in reverse order to produce the peptides of the invention as retro-inverso peptides. In addition, the present invention envisions preparing peptides that have better defined structural properties, and the use of peptidomimetics, and peptidomimetic bonds, such as ester bonds, to prepare peptides with novel properties. In another embodiment, a peptide may be generated that incorporates a reduced peptide bond, i.e., $R_1-CH_2NH-R_2$, where R_1 , and R_2 are amino acid residues or sequences. A reduced peptide bond may be introduced as a dipeptide subunit. Such a molecule would be resistant to peptide bond hydrolysis, e.g., protease activity. Such molecules would provide ligands with unique function and activity, such as extended half-lives *in vivo* due to resistance to metabolic breakdown, or protease activity. Furthermore, it is well known that in certain systems constrained peptides show enhanced functional activity (Hruby (1982) Life Sciences 31:189-199 and Hruby et al. (1990) Biochem J. 268:249-262); the present invention provides a method to produce a constrained peptide that incorporates random sequences at all other positions.

NON-CLASSICAL AMINO ACIDS THAT INDUCE CONFORMATIONAL CONSTRAINTS.

The following non classical amino acids may be incorporated in the peptides of the invention in order to introduce particular conformational motifs: 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylate (Kazmierski et al. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:2275-2283); (2S,3S)-methyl-phenylalanine, (2S,3R)-methyl-phenylalanine, (2R,3S)-methyl-phenylalanine and (2R,3R)-methyl-phenylalanine (Kazmierski and Hruby (1991) Tetrahedron Lett. 32(41):5769-5772); 2-aminotetrahydronaphthalene-2-

WO 02/055555

PCT/US01/49964

- carboxylic acid (Landis (1989) Ph.D. Thesis, University of Arizona); hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylate (Miyake et al. (1989) J. Takeda Res. Labs. 43:53-76) histidine isoquinoline carboxylic acid (Zochel et al. (1991) Int. J. Pep. Protein Res. 38(2):131-138); and HIC (histidine cyclic urea), (Dharanipragada et al. (1993) Int. J. Pep. Protein Res. 42(1):68-77) and ((1992) Acta. Cryst., Crystal Struct. Comm. 48(IV):1239-1241).

- The following amino acid analogs and peptidomimetics may be incorporated into a peptide to induce or favor specific secondary structures: LL-Acp (LL-3-amino-2-propenidone-6-carboxylic acid), a β -turn inducing dipeptide analog (Kemp et al. (1985) J. Org. Chem. 50:5834-5838); β -sheet inducing analogs (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:5081-5082); β -turn inducing analogs (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:5057-5060); α -helix inducing analogs (Kemp et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:4935-4938); γ -turn inducing analogs (Kemp et al. (1989) J. Org. Chem. 54:109:115); analogs provided by the following references: Nagai and Sato (1985) Tetrahedron Lett. 26:647-650; and DiMaio et al. (1989) J. Chem. Soc. Perkin Trans. p. 1687; a Gly-Ala turn analog (Kahn et al. (1989) Tetrahedron Lett. 30:2317); amide bond isostere (Clones et al. (1988) Tetrahedron Lett. 29:3853-3856); tetrazole (Zabrocki et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880); DTC (Samanen et al. (1990) Int. J. Protein Pep. Res. 35:501:509); and analogs taught in Olson et al. (1990) J. Am. Chem. Sci. 112:323-333 and Garvey et al. (1990) J. Org. Chem. 56:436. Conformationally restricted mimetics of beta turns and beta bulges, and peptides containing them, are described in U.S. Patent No. 5,440,013, issued August 8, 1995 to Kahn.

ANTIGENIC PEPTIDES

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

- An antigenic peptide epitope of the invention can be covalently or non-covalently linked (complexed) to various other molecules, the nature of which may vary depending on the particular purpose. For example, a peptide of the invention can be covalently or non-covalently complexed to a macromolecular carrier, including, but not limited to, natural and synthetic polymers, proteins, polysaccharides, polypeptides

WO 02/055555

PCT/US01/49964

(amino acids), polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, and lipids. A peptide can be conjugated to a fatty acid, for introduction into a liposome. U.S. Patent No. 5,837,249. A peptide of the invention can be complexed covalently or non-covalently with a solid support, a variety of which are known in the art. An antigenic peptide epitope of the invention can be associated with an antigen-presenting matrix with or without co-stimulatory molecules, as described in more detail below.

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

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

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

Specific examples of such homo-bifunctional cross-linking agents include the bifunctional N-hydroxysuccinimide esters dithiobis(succinimidylpropionate), disuccinimidyl suberate, and disuccinimidyl tartarate; the bifunctional imido-esters dimethyl adipimide, dimethyl pimelimide, and dimethyl suberimide; the bifunctional sulfhydryl-reactive crosslinkers 1,4-di-[3'-(2'-pyridyl)dithio] propionamido]butane, bismaleimido-hexane, and bis-N-maleimido-1, 8-octane; the bifunctional aryl halides 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene and 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfone; bifunctional photoreactive agents such as bis-[b-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide; the bifunctional aldehydes formaldehyde,

WO 02/055555

PCT/US01/49964

malondialdehyde, succinaldehyde, glutaraldehyde, and adipaldehyde; a bifunctional epoxide such as 1,4-butanediol diglycidyl ether; the bifunctional hydrazides adipic acid dihydrazide, carbohydrazide, and succinic acid dihydrazide; the bifunctional diazoniums o-tolidine, diazotized and bis-diazotized benzidine; the bifunctional alkylhalides N1N'-ethylene-bis(iodoacetamide), N1N'-hexamethylene-bis(iodoacetamide), N1N'-undecamethylene-bis(iodoacetamide), as well as benzyhalides and halomustards, such as 1,4'-diiodo-p-xylene sulfonic acid and tri(2-chloroethyl)amine, respectively.

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

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

Peptides of the invention also may be formulated as non-covalent attachment of monomers through ionic, adsorptive, or biospecific interactions. Complexes of peptides with highly positively or negatively charged molecules may be done through salt bridge formation under low ionic strength environments, such as in deionized water. Large complexes can be created using charged polymers such as poly-(L-glutamic acid) or poly-(L-lysine) which contain numerous negative and positive charges, respectively. Adsorption of peptides may be done to surfaces such as microparticle latex beads or to other hydrophobic polymers, forming non-covalently associated peptide-superantigen complexes effectively mimicking cross-linked or chemically polymerized protein. Finally, peptides may be non-covalently linked through the use of biospecific interactions between other molecules. For instance, utilization of the strong affinity of biotin for proteins such as avidin or streptavidin or their derivatives could be used to form peptide complexes. These biotin-binding proteins contain four binding sites that

WO 02/055555

PCT/US01/49964

can interact with biotin in solution or be covalently attached to another molecule. Wilchek (1988) Anal. Biochem. 171:1-32. Peptides can be modified to possess biotin groups using common biotinylation reagents such as the N-hydroxysuccinimidyl ester of D-biotin (NHS-biotin) which reacts with available amine groups on the protein.

5 Biotinylated peptides then can be incubated with avidin or streptavidin to create large complexes. The molecular mass of such polymers can be regulated through careful control of the molar ratio of biotinylated peptide to avidin or streptavidin.

Also provided by this application are the peptides and polypeptides described herein conjugated to a detectable agent for use in the diagnostic methods. For example, 10 detectably labeled peptides and polypeptides can be bound to a column and used for the detection and purification of antibodies. They also are useful as immunogens for the production of antibodies, as described below.

The peptides of this invention also can be combined with various liquid phase carriers, such as sterile or aqueous solutions, pharmaceutically acceptable carriers, 15 suspensions and emulsions. Examples of non-aqueous solvents include propyl ethylene glycol, polyethylene glycol and vegetable oils. When used to prepare antibodies, the carriers also can include an adjuvant that is useful to non-specifically augment a specific immune response. A skilled artisan can easily determine whether an adjuvant is required and select one. However, for the purpose of illustration only, suitable 20 adjuvants include, but are not limited to, Freund's Complete and Incomplete, mineral salts and polynucleotides.

POLYNUCLEOTIDES ENCODING ANTIGENIC PEPTIDE LIGANDS

This invention further provides polynucleotides encoding polypeptides comprising the sequences SEQ ID NOs.: 1, 3, 5, or 7 and the complements of these 25 polynucleotides. As used herein, the term "polynucleotide" encompasses DNA, RNA and nucleic acid mimetics. In addition to these polynucleotides, or their complements, this invention also provides the anti-sense polynucleotide stand, e.g. antisense RNA to the sequences or their complements. One can obtain an antisense RNA using the sequences provided in SEQ ID NOs.: 2, 4, 6 or 8, the methodology described in Van der 30 Krol, et al. (1988) BioTechniques 6:958.

The polynucleotides of this invention can be replicated using PCR. PCR technology is the subject matter of United States Patent Nos. 4,683,195; 4,800,159;

WO 02/055555

PCT/US01/49964

4,754,065; and 4,683,202 and described in PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION (Mullis et al. eds, Birkhauser Press, Boston (1994)) and references cited therein.

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

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

Polynucleotides having at least 4 contiguous nucleotides, and more preferably at least 5 or 6 contiguous nucleotides and most preferably at least 10 contiguous nucleotides, and exhibiting sequence complementarity or homology to the polynucleotides encoding the peptides of SEQ ID NOs: 1 or 7 find utility as hybridization probes.

It is known in the art that a "perfectly matched" probe is not needed for a specific hybridization. Minor changes in probe sequence achieved by substitution, deletion or insertion of a small number of bases do not affect the hybridization specificity. In general, as much as 20% base-pair mismatch (when optimally aligned)

WO 02/055555

PCT/US01/49964

can be tolerated. Preferably, a probe useful for detecting the aforementioned mRNA is at least about 80% identical to the homologous region of comparable size contained in the previously identified sequences which correspond to previously characterized genes. More preferably, the probe is 85% identical to the corresponding gene sequence after alignment of the homologous region; even more preferably, it exhibits 90% identity.

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

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

- 25 The present invention also provides delivery vehicles suitable for delivery of a polynucleotide of the invention into cells (whether *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro*). A polynucleotide of the invention can be contained within a cloning or expression vector. These vectors (especially expression vectors) can in turn be manipulated to assume any of a number of forms which may, for example, facilitate delivery to and/or entry into a
- 30 cell.

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

HOST CELLS

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

ANTIBODIES

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

Laboratory methods for producing polyclonal antibodies and monoclonal antibodies, as well as deducing their corresponding nucleic acid sequences, are known in the art, see Harlow and Lane (1988) and (1999) *supra* and Sambrook et al. (1989) *supra*. The monoclonal antibodies of this invention can be biologically produced by introducing protein or a fragment thereof into an animal, e.g., a mouse or a rabbit. The

WO 02/055555

PCT/US01/49964

antibody producing cells in the animal are isolated and fused with myeloma cells or hetero-myeloma cells to produce hybrid cells or hybridomas. Accordingly, the hybridoma cells producing the monoclonal antibodies of this invention also are provided.

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

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

The term "antibody" also is intended to include antibodies of all isotypes.

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

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

The antibodies of this invention also can be modified to create chimeric antibodies and humanized antibodies (Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4(3):214).

15 Chimeric antibodies are those in which the various domains of the antibodies' heavy and light chains are coded for by DNA from more than one species.

The isolation of other hybridomas secreting monoclonal antibodies with the specificity of the monoclonal antibodies of the invention can also be accomplished by one of ordinary skill in the art by producing anti-idiotypic antibodies (Herlyn et al.

20 (1986) *Science* 232:100). An anti-idiotypic antibody is an antibody which recognizes unique determinants present on the monoclonal antibody produced by the hybridoma of interest.

Idiotypic identity between monoclonal antibodies of two hybridomas

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

It is also possible to use the anti-idiotypic technology to produce monoclonal

30 antibodies which mimic an epitope. For example, an anti-idiotypic monoclonal antibody made to a first monoclonal antibody will have a binding domain in the hypervariable region which is the mirror image of the epitope bound by the first

WO 02/055555

PCT/US01/49964

monoclonal antibody. Thus, in this instance, the anti-idiotypic monoclonal antibody could be used for immunization for production of these antibodies.

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

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

The coupling of antibodies to low molecular weight haptens can increase the sensitivity of the assay. The haptens can then be specifically detected by means of a second reaction. For example, it is common to use haptens such as biotin, which reacts with avidin, or dinitrophenyl, pyridoxal, and fluorescein, which can react with specific anti-hapten antibodies. See Harlow and Lane (1988) and (1999) *supra*.

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

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

THERAPEUTIC METHODS

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

5 polypeptides or proteins are further provided.

Isolated host cells which present the polypeptides of this invention in the context of MHC molecules are further useful to expand and isolate a population of educated, antigen-specific immune effector cells. The immune effector cells, e.g., cytotoxic T lymphocytes, are produced by culturing naïve immune effector cells with antigen-
10 presenting cells which present the polypeptides in the context of MHC molecules on the surface of the APCs. The population can be purified using methods known in the art, e.g., FACS analysis or ficoll gradient. The methods to generate and culture the immune effector cells as well as the populations produced thereby also are the inventor's contribution and invention. Pharmaceutical compositions comprising the cells and
15 pharmaceutically acceptable carriers are useful in adoptive immunotherapy. Prior to administration *in vivo*, the immune effector cells are screened *in vitro* for their ability to lyse cells expressing CK-18.

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

inserting of a polynucleotide coding for an effective amount of either or both a cytokine and/or a co-stimulatory molecule.

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

5 An "immunogenic portion" of a CK-18 protein is a portion that is capable of educating T cells that in turn, specifically bind to native CK-18 protein or CK-18 specific antibodies present within sera. Immunogenic portions of the proteins described herein can be identified in antibody binding assays. Such assays are generally performed using any of a variety of means known to those of ordinary skill in the art, as
10 described, for example, in Harlow and Lane, (1988) and (1999), *supra*. For example, an immunogenic portion can be immobilized on a solid support (as described below) and contacted with animal sera to allow binding of antibodies within the sera to the immobilized polypeptide. Unbound sera is removed and bound antibodies detected using, for example, ¹²⁵I-labeled Protein A. Alternatively, the immunogenic portion is
15 used to generate monoclonal and polyclonal antibodies for use in detection of the polypeptide in blood, other sample fluids, cells or tissues.

An CK-18 protein, peptide ligand or immunogenic portion as defined herein also encompass variants of the sequences shown in SEQ ID NOs.: 1 or 7. A polypeptide "variant," as used herein, is a polypeptide that differs from SEQ ID NOs.: 1 or 7 only in
20 conservative substitutions and/or modifications, such that the antigenic and/or immunogenic properties of the polypeptide are retained. Variants of SEQ ID NOs.: 1 or 7 can also be identified by modifying the amino acid sequence of SEQ ID NOs.: 1 or 7 and evaluating the immunoreactivity of the modified polypeptide. For proteins and polypeptides useful for the generation of diagnostic binding agents, a variant can be
25 identified by evaluating a modified polypeptide for the ability to generate antibodies that detect the presence or absence of a neoplastic cell or tissue, more specifically, ovarian and lung. Such modified sequences can be prepared and tested using, for example, the representative procedures described herein.

As used herein, a "conservative substitution" is one in which an amino acid is
30 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 polypeptide to be substantially unchanged. In general, the following

WO 02/055555

PCT/US01/49964

groups of amino acids represent conservative changes: (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. Variants can also comprise other modifications, including the deletion or addition of amino acids that have minimal influence on the antigenic properties, secondary structure and hydrophobic nature of the polypeptide. For example, a polypeptide may be conjugated to 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 support. For example, a polypeptide can be conjugated to an immunoglobulin Fc region.

A nucleotide, nucleic acid or polynucleotide "variant" of the present invention is a sequence that differs from SEQ ID NOs: 2 or 8 or a portion thereof in having one or more nucleotide deletions, substitutions or additions. Such modifications can be introduced using standard mutagenesis techniques, such as oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis as taught, for example, by Adelman et al. (1983) DNA 2:183. Nucleotide variants may be naturally occurring allelic variants, or non-naturally occurring variants. Variant nucleotide sequences preferably exhibit at least about 70%, more preferably at least about 80% and most preferably at least about 90% identity to SEQ ID NOs: 2 or 8. Variant nucleotide sequences will generally hybridize to the recited nucleotide sequence under conditions of high stringency.

DIAGNOSTIC METHODS

Further provided by the present invention are methods for aiding in the detecting, diagnosing, prognosing, and monitoring the progression, course, or stage of CK-18-related cancers or malignancies in subjects afflicted therewith. As used herein, the term "diagnosing" means detecting, diagnosing, prognosing, and monitoring the progression, course, or stage of CK-18-related cancers or malignancies in subjects afflicted therewith. In one aspect, a method comprises detecting the differential expression of an CK-18 protein or antibody in a sample isolated from a cell or tissue, wherein the presence and/or amount of the protein or antibody is indicative of the neoplastic condition of cell or tissue. An CK-18-related neoplasia is one in which the expression or expression of the protein serves as a marker for the neoplastic phenotype.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

In one aspect the amount of CK-18 protein or antibody correlates with tumor burden, *i.e.*, the amount of CK-18 expressed increases with disease progression or alternatively, decreases a reduction in tumor burden. A test sample which demonstrates the expression of the CK-18 protein at a level at least twice that observed in a control sample is considered to be indicative of cancer. Samples of cells or tissue can be provided free form or attached to a solid support and can be isolated from a tissue culture, commercially available cell line, from a patient biopsy or as in the case of use of the method for tissue imaging, *in vivo*.

In one aspect, the method is practiced by detecting and/or quantifying mRNA encoding CK-18 protein or the protein itself by hybridization or PCR. Modification of current technology enables this method, *e.g.*, detecting is by probing said sample with a probe or primer that specifically hybridizes under conditions of moderate or highly stringent conditions with said CK-18 mRNA. In one aspect, the probe or primer is detectably labeled. Examples of suitable probes include but are not limited to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 2 or 8, and complements thereof; a nucleic acid sequence encoding a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1 or 7, and complements thereof; and probe or primer comprises at least 9 consecutive residues of a protein encoded by a nucleic acid encoding a sequence recited in SEQ ID NOs.: 1 or 7, and complements thereof.

In another aspect, CK-18 expression is detected and/or quantified by probing the sample with an agent that specifically recognizes and binds CK-18 protein. Antibodies, and antigen binding fragments thereof, that specifically recognize or bind to CK-18 protein are examples of agents. For the purpose of this invention, an antibody is a polyclonal or monoclonal antibody, which may or may not be detectably labeled.

Various modifications to antibodies and antigen binding fragments are known in the art and included for the purpose of this invention. Examples are described herein. Suitable monoclonal antibodies for use in this aspect are prepared from an animal immunized with a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1 or 7. Examples of an antigen binding fragment include a biologically active immunoglobulin variable domain isolated from an antibody prepared from an animal immunized with a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1 or 7.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

The method utilizing antibodies can be practiced *in vitro* or *in vivo*, using application of well known methods as described herein.

In another aspect, the agent is a cell that binds to CK-18 protein such as an immune effector cell raised in the presence and at the expense of a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 or 7.

Alternatively, differential CK-18 expression can be detected and/or quantified by determining the identity and expression level of mRNA by expression analysis and comparing the sequences and amount of mRNA to sequences and amount of expression in a normal control cell or tissue, using methods such as expression analysis, *e.g.*, SAGE (Patent Nos. 5,866,330 and 5,695,937).

In yet a further aspect, the presence and amount of CK-18 in a sample can be determined and/or quantified by antibodies that specifically recognize and bind to said protein. Antibody binding partners, as described herein, are suitable for use in this aspect of the method and by modifying methods well known in the art, *e.g.*, Western blot.

In another embodiment, detection and analysis of amount of CK-18 present in a sample is repeated to monitor disease progression, response to a therapeutic regimen, or disease recurrence in a subject. In this aspect, the detecting/monitoring method, as described herein, is performed on one or more sample(s) isolated at one or more times time points subsequent to a prior (control) sample and comparing the amount of protein detected at the subsequent points in time to the amount previously detected in a prior (control) sample.

Additionally, the present invention provides a method screening compounds to identify those which modulate the activity of the invention compositions. In one aspect, the invention provides an assay to screen for agents that inhibit the binding of CK-18 protein to its ligand by contacting a sample comprising the protein and ligand under conditions and in the presence of a test agent and detecting any binding between protein and ligand, the absence of binding being indicative of an agent that modulates the binding of CK-18. Alternatively, the invention is useful to screen for agents that enhance the binding of CK-18 protein to its ligand by contacting a sample comprising the protein and the ligand under conditions and in the presence of a test agent and detecting and comparing any binding between the protein and ligand with a control

WO 02/055555

PCT/US01/49964

sample that does not contain the test agent. Enhancement of binding over the control sample is a positive indication that the test agent enhances the binding of CKC-18 to its ligand. Modulation (increase or inhibit) of binding includes a variation in avidity as well as affinity.

5 For example, one such assay comprises contacting a mammalian cell with an invention composition and the "test compound" and [^3H]thymidine, under conditions where the mammalian cell would normally proliferate. A control assay may be performed without the "test compound" and compared to the amount of cell proliferation in the presence of the "test compound" to determine if the compound stimulates or inhibits proliferation. [^3H] thymidine uptake can be measured by liquid
10 scintillation chromatography which measures the incorporation of the label. Agonists and antagonist compounds may be identified using this assay.

In an alternative example, a mammalian cell or membrane preparation expressing a binding site or determinant for a polypeptide or peptide of the invention is
15 incubated with a labeled polypeptide or peptide of the invention in the presence of the "test compound". The ability of the "test compound" to enhance or block the interaction of the polypeptide or peptide with its binding site, can be measured. Further the response of a known second messenger system following the interaction of the "test compound" and the binding site is measured and the ability of the "test compound" to
20 bind the site or determinant and elicit a second messenger response can be measured to determine if the "test compound" is a potential agonist or antagonist.

These assays can be used as diagnostic or prognostic markers. The molecules discovered using these screening assays can be used to treat disease or to bring about a particular result in a patient by activating or inhibiting the polypeptide or molecule.

25 Thus, the invention includes a method of identifying compounds which bind to a polypeptide, peptide, variant or analog of the invention comprising: (a) incubating a candidate test compound with a polypeptide, peptide, variant or analog of the invention; and (b) determining if binding has occurred. The invention further comprises a method of identifying agonists and/or antagonists comprising: (a) incubating a candidate test
30 compound with a polypeptide, peptide, variant or analog of the invention; (b) assaying a biological activity; and (c) determining if said biological activity has been altered.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Diagnostic kits to practice the methods described herein are also provided. In one aspect, the kit contains at least one agent that specifically recognizes and binds CK-18 protein and a detection reagent which can support a reporter group. When antibodies are used as the agent, they can be in solution or immobilized on a solid support, such as nitrocellulose, latex or a plastic. Examples of detection reagents include but are not limited to anti-immunoglobulin, protein G, protein A, or lectin. Reporter groups can be provided in the kit, but are not necessarily supplied. Examples of reporter groups suitable for use in the methods include but are not limited to radioisotopes, fluorescent groups, luminescent groups, enzymes, biotin and dye particles.

The kits will contain one or more of binding agents described above, *e.g.*, a probe, a primer, an CK-18 specific antibody or immune effector cell, or an agent that specifically recognizes binds CK-18 specific antibody, *e.g.*, antibodies raised and isolated to specifically recognize and bind a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 or 7. Instructions for use can also be provided.

The polypeptides of the present invention, *e.g.*, SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 or 7 can be used to generate binding agents, such as antibodies or fragments thereof, that are capable of detecting neoplastic cells or tissues, or alternatively, for monitoring disease progression in an animal or patient having a neoplastic condition related to the expression of CK-18 protein, *e.g.*, cancers of the breast or lung. Binding agents of the present invention may generally be prepared using methods known to those of ordinary skill in the art, including the representative procedures described herein. Binding agents are capable of differentiating between patients with and without a neoplastic condition associated with the expression and or overexpression of CK-18 protein, using the representative assays described herein. In other words, antibodies or other binding agents raised against an CK-18 protein or fragment thereof will generate a signal indicating the presence of primary or metastatic cancer in patients afflicted with the disease, and will generate a negative signal indicating the absence of the disease in individuals without primary or metastatic disease. Suitable portions of such CK-18 (SEQ ID NO: 1) as well as polypeptides shown in SEQ ID NOs.: 3, 5 or 7 that are able to generate a binding agent that indicates the presence of CK-18-related neoplasia in substantially all (*i.e.*, at least about 80%, and preferably at least about 90%) of the patients for which such neoplasia would be indicated and that indicates the absence of

WO 02/055555

PCT/US01/49964

CK-18-related neoplasia in substantially all of those samples that would be negative when tested with full length protein. The representative assays described below, such as the two-antibody sandwich assay, can be employed for evaluating the ability of a binding agent to detect CK-18 related neoplasia.

5 The ability of a polypeptide prepared as described herein to generate antibodies capable of detecting CK-18-related neoplasia can be evaluated by raising one or more antibodies against the polypeptide and determining the ability of such antibodies to detect neoplasia in animals or patients. In one aspect, this determination is made by assaying biological samples from animals or patients with and without primary or metastatic CK-18-related neoplasia for the presence of a polypeptide that binds to the generated antibodies. Such test assays may be performed, for example, using a representative procedure described below. Polypeptide specific antibodies raised against proteins or polypeptides identified in SEQ ID NOs: 1, 3, 5 or 7, or a fragment thereof, can be used alone or in combination to improve sensitivity.

15 Polypeptides capable of detecting CK-18-related neoplasia are useful markers for diagnosing cancer or for monitoring disease progression in animals or patients. In one embodiment, these neoplasia are diagnosed by evaluating a biological sample obtained from the animal or patient and determining the level of one or more of the above polypeptides, relative to a predetermined cut-off value. As used herein, suitable "biological samples" include blood, sera, urine and/or secretions.

The level of one or more of invention CK-18 proteins can be evaluated using any binding agent specific for the polypeptide(s). A "binding agent," in the context of this invention, is any agent (such as a compound or a cell) that binds to a polypeptide as described above. As used herein, "binding" refers to a noncovalent association between two separate molecules (each of which may be free (i.e., in solution) or present on the surface of a cell or a solid support), such that a "complex" is formed. The complex can be free or immobilized (either covalently or noncovalently) on a support material. The ability to bind can be evaluated by determining a binding constant for the formation of the complex. The binding constant is the value obtained when the concentration of the complex is divided by the product of the component concentrations. Binding constants are determined using methods well known to those of ordinary skill in the art.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Any agent that satisfies the above requirements may be a binding agent. For example, a binding agent may be a ribosome with or without a peptide component, an RNA molecule, a host cell expressing epitope, an immune effector cell as described herein or a peptide. In a preferred embodiment, the binding partner is an antibody, or a
5 fragment thereof. The antibodies can be polyclonal or monoclonal which include, but are not limited to single chain, chimeric, CDR-grafted or humanized. Methods for generating these antibodies are well known to those of skill in the art.

This invention also provides compositions containing any of the above-mentioned proteins, polypeptides, polynucleotides, vectors, cells, antibodies and
10 fragments thereof, and an acceptable solid or liquid carrier. When the compositions are used pharmaceutically, they are combined with a "pharmaceutically acceptable carrier" for diagnostic and therapeutic use. These compositions also can be used for the preparation of medicaments for the diagnosis and treatment of diseases such as cancer.

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

Materials and Methods

Production of the Polypeptides of the Invention

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

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

Alternatively, affinity tags such as hexa-His (Invitrogen), Maltose binding domain (New England Biolabs), influenza coat sequence (Kolodziej et al. (1991) Meth.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Enzymol. 194:508-509), and glutathione-S-transferase can be attached to the peptides of the invention to allow easy purification by passage over an appropriate affinity column. Isolated peptides can also be physically characterized using such techniques as proteolysis, nuclear magnetic resonance, and x-ray crystallography.

5 Also included within the scope of the invention are antigenic peptides that are differentially modified during or after translation, e.g., by phosphorylation, glycosylation, cross-linking, acylation, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule, membrane molecule or other ligand, (Ferguson et al. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320).

10 Isolation, Culturing and Expansion of APCs, Including Dendritic Cells

The following is a brief description of two fundamental approaches for the isolation of APC. These approaches involve (1) isolating bone marrow precursor cells (CD34⁺) from blood and stimulating them to differentiate into APC; or (2) collecting the precommitted APCs from peripheral blood. In the first approach, the patient must
15 be treated with cytokines such as GM-CSF to boost the number of circulating CD34⁺ stem cells in the peripheral blood.

The second approach for isolating APCs is to collect the relatively large numbers of precommitted APCs already circulating in the blood. Previous techniques for isolating committed APCs from human peripheral blood have involved
20 combinations of physical procedures such as metrizamide gradients and adherence/non-adherence steps (Freudenthal, P.S. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7698-7702); Percoll gradient separations (Mehta-Damavi et al. (1994) J. Immunol. 153:996-1003); and fluorescence activated cell sorting techniques (Thomas, R. et al. (1993) J. Immunol. 151:6840-6852).

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

30 In one aspect of the invention, the APC are precommitted or mature dendritic cells which can be isolated from the white blood cell fraction of a mammal, such as a murine, simian or a human (See, e.g., WO 96/23060). The white blood cell fraction can

WO 02/055555

PCT/US01/49964

be from the peripheral blood of the mammal. This method includes the following steps:
 (a) providing a white blood cell fraction obtained from a mammalian source by methods known in the art such as leukapheresis; (b) separating the white blood cell fraction of step (a) into four or more subfractions by countercurrent centrifugal elutriation; (c)
 5 stimulating conversion of monocytes in one or more fractions from step (b) to dendritic cells by contacting the cells with calcium ionophore, GM-CSF and IL-13 or GM-CSF and IL-4; (d) identifying the dendritic cell-enriched fraction from step (c); and (e) collecting the enriched fraction of step (d), preferably at about 4°C. One way to identify the dendritic cell-enriched fraction is by fluorescence-activated cell sorting. The white
 10 blood cell fraction can be treated with calcium ionophore in the presence of other cytokines, such as recombinant (rh) rhIL-12, rhGM-CSF, or rhIL-4. The cells of the white blood cell fraction can be washed in buffer and suspended in $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ free media prior to the separating step. The white blood cell fraction can be obtained by leukapheresis. The dendritic cells can be identified by the presence of at least one of
 15 the following markers: HLA-DR, HLA-DQ, or B7. 2, and the simultaneous absence of the following markers: CD3, CD14, CD16, 56, 57, and CD 19, 20. Monoclonal antibodies specific to these cell surface markers are commercially available.

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

Quality control of APC and more specifically DC collection and confirmation of their successful activation in culture is dependent upon a simultaneous multi-color FACS analysis technique which monitors both monocytes and the dendritic cell
 30 subpopulation as well as possible contaminant T lymphocytes. It is based upon the fact that DCs do not express the following markers: CD3 (T cell); CD14 (monocyte); CD16, 56, 57 (NK/LAK cells); CD19, 20 (B cells). At the same time, DCs do express

WO 02/055555

PCT/US01/49964

large quantities of HLA-DR, significant HLA-DQ and B7.2 (but little or no B7.1) at the time they are circulating in the blood (in addition they express Leu M7 and M9, myeloid markers which are also expressed by monocytes and neutrophils).

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

TABLE 1
FACS analysis of fresh peripheral cell subpopulations

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

Additional markers can be substituted for additional analysis:

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

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

Alternatively, others have reported a method for upregulating (activating) dendritic cells and converting monocytes to an activated dendritic cell phenotype. This method involves the addition of calcium ionophore to the culture media convert monocytes into activated dendritic cells. Adding the calcium ionophore A23187, for example, at the beginning of a 24-48 hour culture period resulted in uniform activation and dendritic cell phenotypic conversion of the pooled "monocyte plus DC" fractions: characteristically, the activated population becomes uniformly CD14 (Leu M3) negative, and upregulates HLA-DR, HLA-DQ, ICAM-1, B7.1, and B7.2. Furthermore, this activated bulk population functions as well on a small numbers basis as a further purified.

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

Presentation of Antigen to the APC

For purposes of immunization, the antigenic peptides (SEQ ID NOs. 1, 3, 5 and 7) can be delivered to antigen-presenting cells as protein/peptide or in the form of cDNA encoding the protein/peptide. Antigen-presenting cells (APCs) can consist of dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, B lymphocytes or other cell type(s) expressing the necessary MHC/co-stimulatory molecules. The methods described below focus primarily on DCs which are the most potent, preferred APCs.

Pulsing is accomplished *in vitro/ex vivo* by exposing APCs to the antigenic protein or peptide(s) of this invention. The protein or peptide(s) are added to APCs at a concentration of 1-10 μ m for approximately 3 hours. Pulsed APCs can subsequently be administered to the host via an intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

Protein/peptide antigen can also be delivered *in vivo* with adjuvant via the intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Paglia et al. (1996) J. Exp. Med. 183:317-322 has shown that APC incubated with whole protein *in vitro* were recognized by MHC class I-restricted CTLs, and that immunization of animals with these APCs led to the development of antigen-specific CTLs *in vivo*. In addition, several different techniques have been described which lead to the expression of antigen in the cytosol of APCs, such as DCs. These include (1) the introduction into the APCs of RNA isolated from tumor cells, (2) infection of APCs with recombinant vectors to induce endogenous expression of antigen, and (3) introduction of tumor antigen into the DC cytosol using liposomes. (See Boczkowski, D. et al. (1996) J. Exp. Med. 184:465-472; Rouse et al. (1994) J. Virol. 68:5685-5689; and Nair et al. (1992) J. Exp. Med. 175:609-612).

Foster Antigen Presenting Cells

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

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Immunogenicity Assays.

The immunogenicity of invention ligands can be determined by well known methodologies including, but not limited to those exemplified below. In one embodiment, such methodology may be employed to compare ligands of the invention with the corresponding native antigenic epitope.

5 **⁵¹Cr-release lysis assay.** Lysis of peptide-pulsed ⁵¹Cr-labeled targets by antigen-specific T cells can be compared for target cells pulsed with the invention ligands. Ligands that are "more active" will show greater lysis of targets as a function of time. The kinetics of lysis as well as overall target lysis at a fixed timepoint (e.g., 4
10 hours) may be used to evaluate ligand performance. (Ware, C.F. et al. (1983) J. Immunol. 131:1312).

Cytokine-release assay. Analysis of the types and quantities of cytokines secreted by T cells upon contacting ligand-pulsed targets can be a measure of functional activity. Cytokines can be measured by ELISA or ELISPOT assays to determine the
15 rate and total amount of cytokine production. (Fujihashi, K. et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:181; Tanquay, S. and Killian, J.J. (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259).

In vitro T cell education. The ligands of the invention can be assayed for the ability to elicit ligand-reactive T cell populations from normal donor or patient-derived
20 PBMC. In this system, elicited T cells can be tested for lytic activity, cytokine-release, polyclonality, and cross-reactivity to the native antigenic epitope. (Parkhurst, M.R. et al. (1996) J. Immunol. 157:2539).

Transgenic animal models. Immunogenicity can be assessed *in vivo* by vaccinating HLA transgenic mice with the ligands of the invention and determining the
25 nature and magnitude of the induced immune response. Alternatively, the hu-PBL-SCID mouse model allows reconstitution of a human immune system in a mouse by adoptive transfer of human PBL. These animals may be vaccinated with the ligands and analyzed for immune response as previously mentioned. (Shirai, M. et al. (1995) J. Immunol. 154:2733; Mosier, D.E. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2443).

30 **Proliferation.** T cells will proliferate in response to reactive ligands. Proliferation can be monitored quantitatively by measuring, for example, ³H-thymidine uptake. (Caruso, A. et al. (1997) Cytometry 27:71).

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Tetramer staining. MHC tetramers can be loaded with individual ligands and tested for their relative abilities to bind to appropriate effector T cell populations. (Altman, J.D. et al. (1996) Science 274:5284).

5 **MHC Stabilization.** Exposure of certain cell lines such as T2 cells to HLA-binding ligands results in the stabilization of MHC complexes on the cell surface. Quantitation of MHC complexes on the cell surface has been correlated with the affinity of the ligand for the HLA allele that is stabilized. Thus, this technique can determine the relative HLA affinity of ligand epitopes. (Stuber, G. et al. (1995) Int. Immunol. 7:653).

10 **MHC competition.** The ability of a ligand to interfere with the functional activity of a reference ligand and its cognate T cell effectors is a measure of how well a ligand can compete for MHC binding. Measuring the relative levels of inhibition is an indicator of MHC affinity. (Feltkamp, M.C. et al. (1995) Immunol. Lett. 47:1).

Primate models. A recently described non-human primate (chimpanzee) model system can be utilized to monitor *in vivo* immunogenicities of HLA-restricted ligands. It has been demonstrated that chimpanzees share overlapping MHC-ligand specificities with human MHC molecules thus allowing one to test HLA-restricted ligands for relative *in vivo* immunogenicity. (Bertoni, R. et al. (1998) J. Immunol. 161:4447).

15 **Monitoring TCR Signal Transduction Events.** Several intracellular signal transduction events (*e.g.*, phosphorylation) are associated with successful TCR engagement by MHC-ligand complexes. The qualitative and quantitative analysis of these events have been correlated with the relative abilities of ligands to activate effector cells through TCR engagement. (Salazar, E. et al. (2000) Int. J. Cancer 85:829; Isakov, N. et al. (1995) J. Exp. Med. 181:375).

20 Additional assays for determining the activity of the invention polypeptides, peptides, variants and analogs thereof, are known in the art.

For example, to determine the ability of a polypeptide, peptide, variant or analog, to compete with another peptide for binding to an antibody, various immunoassays can be employed, including but not limited to, competitive and non-competitive assay systems using technologies such as radioimmunoassays, ELISA, 30 immunoradiometric assays, gel diffusion precipitation reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays, Western Blot, precipitation reactions, agglutination assays, immunofluorescence assays, protein A assays, electrophoretic assays, and the

WO 02/055555

PCT/US01/49964

like. Binding may also be detected using antibody capture assays, antigen capture assays, and multiple-antibody sandwich assays. Methods for detecting binding in such assays are known in the art.

Expansion of Immune Effector Cells

5 The present invention makes use of these APCs to stimulate production of an enriched population of antigen-specific immune effector cells. The antigen-specific immune effector cells are expanded at the expense of the APCs, which die in the culture. The process by which naïve immune effector cells become educated by other cells is described essentially in Coulie (1997) *Molec. Med. Today* 3:261-268.

10 The APCs prepared as described above are mixed with naïve immune effector cells. Preferably, the cells may be cultured in the presence of a cytokine, for example IL-2. Because dendritic cells secrete potent immunostimulatory cytokines, such as IL-12, it may not be necessary to add supplemental cytokines during the first and successive rounds of expansion. In any event, the culture conditions are such that the antigen-specific immune effector cells expand (*i.e.*, proliferate) at a much higher rate than the APCs. Multiple infusions of APCs and optional cytokines can be performed to further expand the population of antigen-specific cells.

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

Vectors Useful in Genetic Modifications

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Construction of Recombinant Adenoviral Vectors or Adeno-Associated Virus Vectors

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

The recombinant adenoviral vectors based on the human adenovirus 2 or 5 (Virology 163:614-617 (1988)) are missing essential early genes from the adenoviral genome (usually E1A/E1B), and are therefore unable to replicate unless grown in permissive cell lines that provide the missing gene products *in trans*. In place of the missing adenoviral genomic sequences, a transgene of interest can be cloned and expressed in cells infected with the replication deficient adenovirus. Although adenovirus-based gene transfer does not result in integration of the transgene into the host genome (less than 0.1% adenovirus-mediated transfections result in transgene incorporation into host DNA), and therefore is not stable, adenoviral vectors can be propagated in high titer and transfect non-replicating cells. Human 293 cells, which are human embryonic kidney cells transformed with adenovirus E1A/E1B genes, typify useful permissive cell lines. However, other cell lines which allow replication-deficient adenoviral vectors to propagate therein can be used, including HeLa cells.

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

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

- 95/23867 (8 September 1995); Haddada, H. et al. WO 94/26914 (24 November 1994); Pericaudet, M. et al. WO 95/02697 (26 January 1995); Zhang, W. et al. WO 95/25071 (12 October 1995). A variety of adenovirus plasmids are also available from commercial sources, including, e.g., Microbix Biosystems of Toronto, Ontario (see, e.g., Microbix Product Information Sheet: Plasmids for Adenovirus Vector Construction, 1996). See
- 5 also, the papers by Vile et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:840-841; and Feng et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:866-870, describing the construction and use of adeno-retroviral chimeric vectors that can be employed for genetic modifications.
- Additional references describing AAV vectors that could be used in the methods
- 10 of the present invention include the following: Carter B. HANDBOOK OF PARVOVIRUSES, Vol. I, pp. 169-228, 1990; Berns, *VIROLOGY*, pp. 1743-1764 (Raven Press 1990); Carter, B. (1992) *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Micro. and Immunol.* 158:92-129; Flotte, T.R. et al. (1992) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:349-356; Chatterjee et al. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 770:79-
- 15 90; Flotte, T.R. et al. WO 95/13365 (18 May 1995); Trempe, J.P. et al., WO 95/13392 (18 May 1995); Kotin, R. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5:793-801; Flotte, T.R. et al. (1995) *Gene Therapy* 2:357-362; Allen J.M. WO 96/17947 (13 June 1996); and Du et al. (1996) *Gene Therapy* 3:254-261.
- APCs can be transduced with viral vectors encoding a relevant polypeptides.
- 20 The most common viral vectors include recombinant poxviruses such as vaccinia and fowlpox virus (Bronte et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3183-3188; Kim et al. (1997) *J. Immunother.* 20:276-286) and, preferentially, adenovirus (Arthur et al. (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Wan et al. (1997) *Human Gene Therapy* 8:1355-1363; Huang et al. (1995) *J. Virol.* 69:2257-2263). Retrovirus also may be used for
- 25 transduction of human APCs (Mariu et al. (1996) *J. Virol.* 70:2957-2962).
- In vitro/ex vivo*, exposure of human DCs to adenovirus (Ad) vector at a multiplicity of infection (MOI) of 500 for 16-24 h in a minimal volume of serum-free medium reliably gives rise to transgene expression in 90-100% of DCs. The efficiency of transduction of DCs or other APCs can be assessed by immunofluorescence using
- 30 fluorescent antibodies specific for the tumor antigen being expressed (Kim et al. (1997) *J. Immunother.* 20:276-286). Alternatively, the antibodies can be conjugated to an enzyme (e.g., HRP) giving rise to a colored product upon reaction with the substrate.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

5 *In vivo* transduction of DCs, or other APCs, can be accomplished by administration of Ad (or other viral vectors) via different routes including intravenous, intramuscular, intranasal, intraperitoneal or cutaneous delivery. The preferred method is cutaneous delivery of Ad vector at multiple sites using a total dose of approximately $1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{12}$ i.u. Levels of *in vivo* transduction can be roughly assessed by co-
10 staining with antibodies directed against APC marker(s) and the TAA being expressed. The staining procedure can be carried out on biopsy samples from the site of administration or on cells from draining lymph nodes or other organs where APCs (in particular DCs) may have migrated (Condon et al. (1996) Nature Med. 2:1122-1128 and Wan et al. (1997) Hum. Gene Ther. 8:1355-1363). The amount of antigen being
15 expressed at the site of injection or in other organs where transduced APCs may have migrated can be evaluated by ELISA on tissue homogenates.

Although viral gene delivery is more efficient, DCs can also be transduced *in vitro/ex vivo* by non-viral gene delivery methods such as electroporation, calcium phosphate precipitation or cationic lipid/plasmid DNA complexes (Arthur et al. (1997) Cancer Gene Ther. 4:17-25). Transduced APCs can subsequently be administered to
20 the host via an intravenous, subcutaneous, intranasal, intramuscular or intraperitoneal route of delivery.

In vivo transduction of DCs, or other APCs, can potentially be accomplished by administration of cationic lipid/plasmid DNA complexes delivered via the intravenous,
25 intramuscular, intranasal, intraperitoneal or cutaneous route of administration. Gene gun delivery or injection of naked plasmid DNA into the skin also leads to transduction of DCs (Condon et al. (1996) Nature Med. 2:1122-1128; Raz et al (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519-9523). Intramuscular delivery of plasmid DNA may also be used for immunization (Rosato et al. (1997) Hum. Gene Ther. 8:1451-1458.)

30 The transduction efficiency and levels of transgene expression can be assessed as described above for viral vectors.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

Adoptive Immunotherapy and Vaccines

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

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

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

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

The agents identified herein as effective for their intended purpose can be administered to subjects having tumors expressing CK-18 as well as or in addition to individuals susceptible to or at risk of developing such tumors. When the agent is administered to a subject such as a mouse, a rat or a human patient, the agent can be added to a pharmaceutically acceptable carrier and systemically or topically administered to the subject. To determine patients that can be beneficially treated, a tumor regression can be assayed. Therapeutic amounts can be empirically determined and will vary with the pathology being treated, the subject being treated and the efficacy and toxicity of the therapy.

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

WO 02/055555

PCT/US01/49964

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

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

10 recipient, and the disease being treated.

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

WO 02/055555

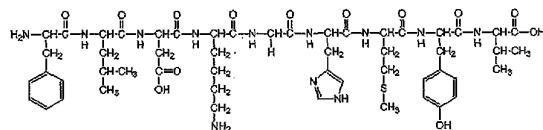
PCT/US01/49964

CLAIMS

What is claimed is:

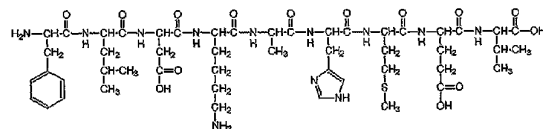
1. A compound having the structure:

SEQ ID NO:3
FLDKGDMYV



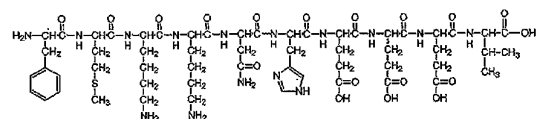
- 5 2. A compound having the structure:

SEQ ID NO:5
FLDKAHMEV



3. A compound having the structure:

SEQ ID NO:7
FMKKNHSEEV



4. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 wherein amino
10 acids 213, 214, 216, 218 and 220, are L, D, A, M and V respectively.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

5. A peptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 wherein amino acids 213, 214, 216, 218, 219, and 220 are L, D, G, M, Y and V respectively.
6. A peptide consisting of amino acids 212 through 221 of SEQ ID NO: 1.
7. A peptide of any one of claims 4 to 6, further comprising a biologically active immunoglobulin variable domain bound to said peptide.
8. A peptide of any one of claims 4 to 6, further comprising an agent covalently linked to said peptide, wherein said agent is capable of targeting said peptide to an antigen presenting cell.
9. The peptide of claim 8, wherein said antigen presenting cell is a dendritic cell.
10. The peptide of any one of claims 4 to 6, further comprising an MHC class II binding helper peptide.
11. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:3.
12. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:5.
13. A polynucleotide that encodes an amino acid sequence comprising the amino acids of SEQ ID NO:7.
14. A polynucleotide that encodes a peptide of any of claims 7 to 12.
15. An antibody that specifically recognizes and binds a compound of any one of claims 4 to 6.
16. A method for inducing an immune response in a subject, comprising delivering an effective amount of a compound of any one of claims 4 to 6 to the subject.
17. The method of claim 16, wherein the compound is delivered in the context of an MHC molecule.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

18. The method of claim 17, wherein the MHC molecule presents the compound on the surface of an antigen presenting cell.
19. The method of claim 16, wherein the compound is delivered as a polynucleotide.
20. A method of immunotherapy, comprising administering to a subject an effective amount of an antibody of claim 15.
21. An immune effector cell that has been raised *in vitro* or *in vivo* in the presence and at the expense of an antigen presenting cell that presents the compound of any one of claims 4 to 6 in the context of an MHC molecule.
22. A method of adoptive immunotherapy, comprising administering an effective amount of the immune effector cell of claim 21.
23. A composition comprising one or more immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of SEQ ID NOs. 3, 5 and 7.
24. The composition of claim 23, further comprising a biologically active immunoglobulin variable domain bound to said immunogenic ligands.
25. The composition of claim 23, further comprising an MHC molecule bound to said immunogenic ligands.
26. The composition of claim 23, wherein said immunogenic ligands are linked covalently.
27. The composition of claim 23, further comprising an agent covalently linked to said immunogenic ligands, wherein said agent is capable of targeting said immunogenic ligands to an antigen presenting cell.
28. The composition of claim 27, wherein said antigen presenting cell is a dendritic cell.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

29. The composition of claim 28, further comprising an MHC class II binding helper peptide.
30. The composition of claim 23, further comprising a carrier.
31. The composition of claim 30, wherein the carrier is a pharmaceutically
5 acceptable carrier.
32. A host cell comprising one or more immunogenic ligands, wherein said immunogenic ligands are individually characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said immunogenic ligand is selected from the group consisting of SBQ ID NOs.: 3, 5 and 7.
- 10 33. The host cell of claim 32, wherein the host cell is an antigen presenting cell and the immunogenic ligands are presented on the surface of the cell.
34. The host cell of claim 33, wherein the antigen presenting cell is a dendritic cell.
35. A composition comprising the host cell of 32 and a carrier.
36. The composition of claim 35, wherein the carrier is a pharmaceutically
15 acceptable carrier.
37. A method for inducing an immune response in a subject, comprising delivering to the subject a composition comprising an effective amount of one or more immunogenic ligands, wherein each of said immunogenic ligands is characterized by an ability to elicit an immune response against the same native ligand, and wherein said
20 immunogenic ligand is selected from the group consisting of SBQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7.
38. A method of aiding in the diagnosis of the neoplastic condition or susceptibility to a neoplastic condition of an animal cell or tissue comprising:
determining the amount of expression of an CK-18 protein in a test sample isolated
25 from said cell or tissue, and

WO 02/055555

PCT/US01/49964

diagnosing a neoplastic condition or susceptibility to a neoplastic condition based on the amount of expression of the CK-18 protein.

39. The method of claim 38, wherein the amount of expression of said protein is determined by detecting the amount of mRNA transcribing said protein.
- 5 40. The method of claim 39, wherein said detecting is by probing said test sample with a probe or primer that specifically hybridizes under conditions of moderate or highly stringent conditions with said CK-18 mRNA.
41. The method of claim 40, wherein said probe or primer comprises at least 9 consecutive residues of a protein encoded by a nucleic acid encoding a sequence recited
10 in SEQ ID NO: 1, or its complement.
42. The method of claim 40, wherein said probe or primer is immobilized on a solid support.
43. The method of claim 40, wherein said probe or primer is detectably labeled.
44. The method of claim 40, wherein said probe or primer comprises a sequence
15 consisting of at least 9 consecutive polynucleotides of SEQ ID NOs: 2 or SEQ ID NO: 8, and complements of these sequences.
45. The method of claim 40, wherein said probe or primer comprises a nucleic acid sequence encoding a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 or 7, and complements of nucleic acids encoding said peptides.
- 20 46. The method of claim 38, wherein said expression is at least 2 fold greater than in a normal or control sample.
47. The method of claim 38, wherein said detected is determined by probing said sample with an agent that specifically recognizes and binds said protein.
48. The method of claim 47, wherein said agent comprises a biologically active
25 immunoglobulin variable domain that specifically recognizes or binds to said protein or an antigen binding fragment thereof.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

49. The method of claim 48, wherein said agent is a polyclonal or monoclonal antibody.
50. The method of claim 48, wherein said agent is a cell that binds to said protein.
51. The method of claim 50, wherein said cell is an immune effector cell raised in the presence and at the expense of a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7.
52. The method of claim 38, wherein said test sample is isolated from the group of cells or tissues selected from breast or lung.
53. The method of claim 52, wherein said detecting is by *in vivo* imaging.
54. The method of claim 49, wherein said monoclonal antibody is prepared from an animal immunized with a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7.
55. The method of claim 47, wherein said agent comprises a biologically active immunoglobulin variable domain isolated from an antibody prepared from an animal immunized with a peptide selected from the group consisting of SEQ ID NOs.: 1, 3, 5 and 7.
56. The method of claim 40, wherein said detection is by polymerase chain reaction or by hybridization assay.
57. The method of claim 42, wherein said solid support is a chip.
58. The method of claim 38, wherein expression of said protein is by determining the identity and expression level of mRNA by expression analysis and comparing the sequences and amount of mRNA to expression analysis of a control sample.
59. A diagnostic kit comprising at least one agent that specifically recognizes and binds CK-18 protein and instructions for detecting binding between CK-18 protein in a test sample and said agent.
60. A kit of claim 59, wherein said agent is immobilized on a solid support.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

61. A kit of claim 60, wherein said solid support is selected from the group consisting of nitrocellulose, latex, plastic and chip.
62. A kit of claim 60, wherein said agent is an antibody and said detection reagent comprises an anti-immunoglobulin, protein G, protein A, or lectin.
- 5 63. A kit of claim 59, wherein said detecting is selected from the group consisting of radioisotopes, fluorescent groups, luminescent groups, enzymes, biotin and dye particles.
64. A diagnostic kit comprising a probe or primer of claim 40.
65. An assay to screen for agents that modulate the binding of CK-18 protein to its
10 ligand comprising contacting a sample comprising said protein and said ligand under conditions and in the presence of a test agent and detecting any binding between said protein and said ligand, a change in said binding being indicative of an agent that modulates the binding of CK-18.
66. The assay of claim 65, wherein said modulation comprises increased avidity or
15 affinity between said agent and said protein.

WO 02/055555

PCT/US01/49964

SEQUENCE LISTING

<110> Nicolette, Charles A.

<120> ANTIGENIC CK-18 COMPOUNDS FOR THERAPY
AND DIAGNOSIS AND METHODS FOR USING SAME

<130> GZ 2108.40

<140> Unassigned

<141> 2001-12-21

<150> 60/257,820

<151> 2000-12-21

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 430

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Ser Phe Thr Thr Arg Ser Thr Phe Ser Thr Asn Tyr Arg Ser Leu
1      5      10      15
Gly Ser Val Gln Ala Pro Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Val Ser Ser Ala
20     25     30
Ala Ser Val Tyr Ala Gly Ala Gly Gly Ser Gly Ser Arg Ile Ser Val
35     40     45
Ser Arg Ser Thr Ser Phe Arg Gly Gly Met Gly Ser Gly Gly Leu Ala
50     55     60
Thr Gly Ile Ala Gly Gly Leu Ala Gly Met Gly Gly Ile Gln Asn Glu
65     70     75     80
Lys Glu Thr Met Gln Ser Leu Asn Asp Arg Leu Ala Ser Tyr Leu Asp
85     90     95
Arg Val Arg Ser Leu Glu Thr Glu Asn Arg Arg Leu Glu Ser Lys Ile
100    105    110
Arg Glu His Leu Glu Lys Lys Gly Pro Gln Val Arg Asp Trp Ser His
115    120    125
Tyr Phe Lys Ile Ile Glu Asp Leu Arg Ala Gln Ile Phe Ala Asn Thr
130    135    140
Val Asp Asn Ala Arg Ile Val Leu Gln Ile Asp Asn Ala Arg Leu Ala
145    150    155    160
Ala Asp Asp Phe Arg Val Lys Tyr Glu Thr Glu Leu Ala Met Arg Gln
165    170    175
Ser Val Glu Asn Asp Ile His Gly Leu Arg Lys Val Ile Asp Asp Thr
180    185    190
Asn Ile Thr Arg Leu Gln Leu Glu Thr Glu Ile Glu Ala Leu Lys Glu
195    200    205
Glu Leu Leu Phe Met Lys Lys Asn His Glu Glu Glu Val Lys Gly Leu
210    215    220
Gln Ala Gln Ile Ala Ser Ser Gly Leu Thr Val Glu Val Asp Ala Pro
225    230    235    240
Lys Ser Gln Asp Leu Ala Lys Ile Met Ala Asp Ile Arg Ala Gln Tyr
245    250    255
Asp Glu Leu Ala Arg Lys Asn Arg Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Trp Ser
260    265    270
Gln Gln Ile Glu Glu Ser Thr Thr Val Val Thr Thr Gln Ser Ala Glu
275    280    285
Val Gly Ala Ala Glu Thr Thr Leu Thr Glu Leu Arg Thr Val Gln

```

Page 1

WO 02/055555

PCT/US01/49964

```

      290      295      300
Ser Leu Glu Ile Asp Leu Asp Ser Met Arg Asn Leu Lys Ala Ser Leu
305      310      315
Glu Asn Ser Leu Arg Glu Val Glu Ala Arg Tyr Ala Leu Gln Met Glu
      325      330      335
Gln Leu Asn Gly Ile Leu Leu His Leu Glu Ser Glu Leu Ala Gln Thr
      340      345      350
Arg Ala Glu Gly Gln Arg Gln Ala Gln Glu Tyr Glu Ala Leu Leu Asn
      355      360      365
Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg Leu Leu
      370      375      380
Glu Asp Gly Glu Asp Phe Asn Leu Gly Asp Ala Leu Asp Ser Ser Asn
      385      390      395
Ser Met Gln Thr Ile Gln Lys Thr Thr Thr Arg Arg Ile Val Asp Gly
      400      405      410
Lys Val Val Ser Glu Thr Asn Asp Thr Lys Val Leu Arg His
      415      420      425      430

```

```

<210> 2
<211> 1407
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2
tcgtccgcaa agcctgagtc ctgtcctttc tctctccccg gacagcatga gcttcaccac 60
tcgtccacc ttctccacca actaccggtc ctggggtctt gtccaggcgc ccagctacgg 120
cgctccggcg gtcagcagtc cggccagcgt ctatgcaggc gctgggggct ctgggttccc 180
gatctccgtg tcccgttcca ccagcttcag ggcgcgcagc gggctccggg gcctggccac 240
cgggatagcc gggggtcttg caggaattgg agcatccagc aacgagaagg agaccatgca 300
aagcctgaac gaccgcttgg cctcttacct ggacagagtg aggagcctgg agaccgagaa 360
ccggaggctg gagagcaaaa tccgggagca cttggagaag aagggaccctc aggtcagaga 420
ctggagccat tacttcaaga tcatcgagga cttgagggtc cagatctctg caaatactgt 480
ggacaatgcc cgcatcgttc tgcagattga caatgctcgt cttgctgctg atgactttag 540
agtcaagtat gagacagagc tggcctatgc ccagctctgtg gagaacgaca tccatgggct 600
cgcaaggtc attgatgaca ccaatatcac acgactctga ctggagacag agatcgaggc 660
tctcaaggag gagctgctct tcatgaagaa gaaccacgaa gaggaagtaa aaggcctaca 720
agcccaagat gccagctctg ggttgacctt ggaggtagat gccctcaaat cttaggacct 780
cgccaagatc atggcagaca ttccggccca atatgcagag ctggctcgga agaaccgaga 840
ggagctagac aagtacttgt ctacacagat tgaggagagc accacagtgg taccacaca 900
gtctgtctgag gttggagctg ctgagacgac gctcacagag ctgagacgta cagtcagtc 960
cttgagatgc gacctggact ccattgagaa tctgaaggcc agcttgagga acagcctgag 1020
ggagggtgag gcccgtctac ccctacagat ggagcagctc aacgggatcc tgcgtcacct 1080
tgagtcagag ctggcacaga cccgggcaga gggacagcgc cagggccagg agtataggc 1140
ctgtctgaac atcagagtcg agctggaggc tggagatgac acctaccgct gcctgtgga 1200
agatggcagc gactttaatc ttgtgatgac cttgacagc agcaactcca tgcaaaccat 1260
ccaaagagcc accacccgcc gbatagtgga ttgcaaatgt gtgtctgaga ccaatgacac 1320
caaatgtctt aggcattaag ccagcagaag cagggtaccg ttgggggagc aggagggcaa 1380
taaaaagttc agagttcatt ggaatgtc

```

```

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 3
Phe Leu Asp Lys Gly His Met Tyr Val
1      5

```

```

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

WO 02/055555

PCT/US01/49964

<220>
<221> misc_feature
<222> 6, 15, 27
<223> n = A,T,C or G

<400> 4
ttyytngara argncayat gtaygtn 27

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Phe Leu Asp Lys Ala His Met Glu Val
1 5

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> 6, 15, 27
<223> n = A,T,C or G

<400> 6
ttyytngara argncayat ggargtn 27

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Phe Met Lys Lys Asn His Glu Glu Glu Val
1 5 10

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> 30
<223> n = A,T,C or G

<400> 8
ttyatgaara araaycayga rgargargtn 30

【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
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/055555 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, C12N 15/12, C07K 16/18, A61K 39/395, 39/00, C12N 5/06, 5/08, G01N 33/68, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/49964
- (22) International Filing Date: 21 December 2001 (21.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/257,820 21 December 2000 (21.12.2000) US
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, 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, GR, 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, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; One Kendall Square, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): NICOLETTE, Charles, A. [US/US]; 4 Mill Street, Framingham, MA 01701 (US).
- (74) Agent: KONSKI, Antoinette, E.; McCutchen, Doyle Brown & Enersen LLP, Three Embarcadero Center, Suite 1800, San Francisco, CA 94111-4067 (US).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 27 February 2003
- 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 02/055555 A3

(54) Title: ANTIGENIC CK-18 COMPOUNDS FOR THERAPY AND DIAGNOSIS AND METHODS FOR USING SAME

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for detecting, diagnosing, prognosing and monitoring the progress of CK-18-related cancers and malignancies and kits for use in said methods. Further provided are methods for screening to identify agonists and antagonists of cancer antigens associated with CK-18 related cancers and malignancies.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/49964
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C07K16/18 A61K39/395 A61K39/00 C12N5/06 C12N5/08 G01N33/68 C12Q1/68		
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 C12N A61K G01N C12Q 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) CHEM ABS Data, EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EBI 'Online! Cytokeratin 18, Database accession no. P05783 XP002223853 abstract	13
X	WO 95 31728 A (BEKI AB, BJOERKLUND PETER (SE); RYDLANDER LARS (SE))) 23 November 1995 (1995-11-23) page 1, line 1 - line 28; page 3, line 23- line 30; page 9, line 1 - line 26; tables 3,5; examples 3,4,6 and claims 1-3,8-11	13, 15, 38-66
X	DE 197 16 346 C (WAGENER CHRISTOPH PROF DR)) 19 November 1998 (1998-11-19) column 1, line 33 - line 45; column 2, line 56 - line 60; figure 1; examples 1-3 -/-	13, 38-66
☒ 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) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the 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 ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 December 2002		23/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmidt, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/49964
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 780 032 A (SILEN AAKE ET AL)) 14 July 1998 (1998-07-14) column 4, line 16 - line 38; column 6, line 37 - column 7, line 30; column 7, line 59 - line 67 -----	13,15, 37-66

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/US 01 /9964

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 59-64 (all partially)

Present claims 59-64 relate to an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely its ability to bind and recognize specifically CK-18.

The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the agent by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which are related to the peptides consisting of or comprising SEQ ID NOs 3,5 and 7, polynucleotides encoding these peptides, antibodies thereof and their methods.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/49964
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: Although claims 16-20, 22 and 37 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.	
2. ☒ Claims Nos.: 59-64 (all partially) 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
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 SEARCH REPORT

Information on patent family members

Initial Application No
PCT/US 01/49964

107/05 01/49964

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9531728	A	23-11-1995	AU	2582195 A	05-12-1995
			EP	0765479 A1	02-04-1997
			JP	10500408 T	13-01-1998
			SE	9500023 A	18-11-1995
			WO	9531728 A1	23-11-1995
DE 19716346	C	19-11-1998	DE	19716346 C1	19-11-1998
US 5780032	A	14-07-1998	SE	470273 B	20-12-1993
			AT	191921 T	15-05-2000
			AU	8546391 A	15-04-1992
			DE	69132122 D1	25-05-2000
			DE	69132122 T2	11-01-2001
			EP	0550561 A1	14-07-1993
			JP	3210666 B2	17-09-2001
			JP	6501469 T	17-02-1994
			SE	9003025 A	25-03-1992
			WO	9205197 A1	02-04-1992
			US	5728537 A	17-03-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/06	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/00	C 0 7 K 16/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 5/00	E
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4B063 QA19 QA20 QQ02 QQ42 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48
 QR55 QR62 QR82 QS16 QS25 QS33 QS34 QX01 QX04
 4B065 AA93X AA93Y AB10 AC14 BA30 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 BA02 BA22 CA53 DC50 NA14 ZB072 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB01 CC02 CC04 CC05 DD22
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB07 ZB26
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 CA04 NA14 ZB07 ZB26
 4H045 AA10 AA11 BA10 BA15 BA41 CA40 DA86 EA20 EA51 FA72