

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の配列の少なくとも8つの連続したアミノ酸の配列を含み、特異的T応答を引き起こすことを特徴とするペプチド化合物。

【請求項2】 配列SPRWWPTCL(配列番号2)と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むことを特徴とする請求項1記載のペプチド化合物。

【請求項3】 天然のアミノ酸以外の少なくとも1つの要素を含むことを特徴とする請求項1または2記載のペプチド化合物。

【請求項4】 下記工程を含むことを特徴とする、配列番号1の配列の約9～10の連続したアミノ酸の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むペプチド化合物を同定する方法：

- a)所定のHLA分子に対する固定モチーフを含む約9～10のアミノ酸の配列を有する断片を決定する、
- b)工程a)で得られたペプチド断片の免疫原性を、好ましくはElispot検定法を実施することにより測定する。

【請求項5】 請求項4記載の方法を用いて得ることができるペプチド化合物。

【請求項6】 下記工程を含むことを特徴とする、請求項1～3および5のいずれかに記載のペプチド化合物の免疫原性を向上させうる人為的な点修飾または突然変異を見出す方法：

- a)所定のHLA分子に対する固定モチーフを含む約9～10のアミノ酸の配列を有する断片を決定する、
- b)残基4、5、6、7または8においてさらに点修飾(例えば、翻訳後修飾)または突然変異を導入する、
- c)工程b)で得られたペプチド断片の免疫原性を、好ましくはElispot検定法を実施することにより測定する。

【請求項7】 配列番号1の配列に関して少なくとも1つの突然変異または修飾を有する、配列番号1の配列の約9～10のアミノ酸の配列を含み、特異的T応答を引き起こすことを特徴とする、請求項6記載の方法を用いて得ることができるペプチド化合物。

【請求項8】 配列 SPRWWPTCL (配列番号2) 由来であることを特徴とする、請求項7記載のペプチド化合物。

【請求項9】 請求項1～3、5、7および8のいずれかに記載の少なくとも1つのペプチド断片をコードする DNA断片。

【請求項10】 配列番号3の配列の少なくとも24の連続したヌクレオチドの配列と少なくとも50%の同一性を有する配列を含むことを特徴とする、請求項9記載の DNA断片。

【請求項11】 真核細胞及び/又は原核細胞、特にヒト細胞において有効なプロモーターに融合した請求項10記載の DNA断片を含む、請求項1～3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド断片を発現するためのベクター。

【請求項12】 さらに、1または2以上の選択マーカー、および場合により、サイトカイン類及び/又はリンホカイン類などの免疫防御を活性化する因子をコードする1または2以上の配列を含む、請求項11に記載の発現ベクター。

【請求項13】 ウイルスベクター、プラスミドベクターまたは偽ベクターであることを特徴とする、請求項11または12に記載のベクター。

【請求項14】 請求項1～3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物をローディングした樹状細胞。

【請求項15】 請求項11～13のいずれかに記載の発現ベクターで形質転換された樹状細胞。

【請求項16】 マクロファージの一部を形成することを特徴とする、請求項14または15記載の樹状細胞。

【請求項17】 請求項1～3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物またはペプチド化合物混合物、および薬剂的に許容しうるビヒクルを含む薬剤組成物。

【請求項18】 請求項11～13のいずれかに記載の発現ベクター、および薬剂的に許容しうるビヒクルを含む薬剤組成物。

【請求項19】 特に、請求項9または10に記載の DNA断片、および薬剂的に許容しうるビヒクルを含む薬剤組成物。

【請求項20】 請求項14～16のいずれかに記載の細胞、および薬剂的に許容

しうるビヒクルを含む薬剤組成物。

【請求項21】 さらに、1または2以上の免疫アジュバント、特に腫瘍に対して細胞傷害性である薬剤を含むことを特徴とする、請求項17~20のいずれかに記載の薬剤組成物。

【請求項22】 静注(IV)、皮下、経口または鼻への投与に適合する薬剤ビヒクルを含むことを特徴とする請求項17~21のいずれかに記載の薬剤組成物。

【請求項23】 正に荷電もしくは負に荷電したリポソーム、ナノ粒子または脂質エマルジョンから選択される薬剤ビヒクルを含むことを特徴とする請求項17~22のいずれかに記載の薬剤組成物。

【請求項24】 医薬品の製造のための、請求項1~3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項25】 がんの治療用医薬品の製造のための、請求項1~3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項26】 特に、*in vitro*で腫瘍特異的 CTLを誘導し、それらを増殖させ、再注入することからなり、該誘導がローディングした樹状細胞の補助により行われてもよい、*ex vivo* 免疫用の医薬品の製造のための、請求項1~3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項27】 *in vivo* 免疫用の医薬品の製造のための、請求項1~3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項28】 がん、特に充実性腫瘍、殊にがん腫、黒色腫、神経芽腫、好ましくは肝がんおよび結腸もしくは腎臓の腺がんの治療用医薬品の製造のための、請求項1~3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項29】 培地において腫瘍の CTL集団を増加させる、及び/又は、例えばIL-2、IFN- およびTNF などの細胞傷害性因子の該 CTLによる分泌を誘導するための、請求項1~3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項30】 免疫防御を刺激して、特に腫瘍の CTL集団を増加させる、及び/又は、例えばIL-2、IFN- およびTNF などの細胞傷害性因子の該 CTLによる分泌を誘導するための医薬品を製造するための、請求項1~3、5、7および8

のいずれかに記載のペプチド化合物の使用。

【請求項31】 下記からなる工程を含む、請求項1～3、5、7および8のいずれかに記載のペプチド化合物を認識する抗体を製造する方法：

- a) 該ペプチド化合物で哺乳動物を免疫する、
- b) 免疫学的検定法において該ペプチドに結合するモノクローナル抗体を分離する。

【請求項32】 請求項31記載の方法により得ることができるモノクローナル抗体。

【請求項33】 下記からなる工程を含む、iCEのORF+1によりコードされるペプチドまたはポリペプチドを検出する方法：

- a) 個体から取り出した試料を、請求項32記載のモノクローナル抗体に接触させ、
- b) ペプチドもしくはポリペプチド/抗体複合体を形成させ、
- c) 該複合体中にあるか該複合体に結合する検出可能な標識により、該ペプチドまたはポリペプチドを検出する。

【請求項34】 がん検出のための、特に請求項32記載の抗体を含む診断用キット。

【請求項35】 個体に存在するがんの予後のための、特に請求項32記載の抗体を含む診断用キット。

【請求項36】 特に、請求項32記載のモノクローナル抗体、および薬剂的に許容しうるビヒクルを含む薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、腫瘍特異的T応答(T細胞反応)を生じさせる、iCE遺伝子のフレームシフトされた配列によりコードされるペプチド配列の少なくとも8つの連続したアミノ酸の配列を含むペプチド化合物に関する。本発明はまた、このペプチド化合物を含む薬剤組成物、およびこれらの化合物の、がんの治療用、特に充実性腫瘍(solid tumor)の治療用の医薬品を製造するための使用にも関する。

【0002】

種々の産物が、腫瘍に関して反応性であるT細胞により認識されることが判明しており、その殆どは黒色腫の患者から分離されている。これらの抗原(Ag)のいくつかは、正常な成人組織におけるその発現が精巢に限られている非変異遺伝子(MAGE-1、MAGE-3、BAGEおよびGAGE)の産物を表す(1~4)。その他の非変異遺伝子には、例えば、正常メラノサイトにおいて発現されるが、その他の正常組織では発現されない分化抗原がある。これらの分化抗原には、メラノサイト系遺伝子産物MART-1/MelanA(5、6)、gp100(6)、チロシナーゼ(7、8)およびgp75(9)がある。黒色腫に関して反応性であるT細胞はまた、 β -カテニン(10)、MUM1(11)およびCDK-4(12)遺伝子の突然変異産物を認識することが明らかになっている。また、腎細胞がん(RCC)に関して反応性であるT細胞は、HLA-A2(13)またはHSP70-2(14)などの点突然変異した遺伝子の産物を認識することが判明している。

【0003】

さらに、反応性T細胞により認識されるいくつかのAgは、MUM-1(11)、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ-V(GnT-V)(15)またはgp100(16)の場合のように、イントロン配列を含む、改変された転写産物により産生される。T細胞による細胞の完全性の監視は、gp75/TRP-1(17)およびNY-E50-1(18)の場合のように、本来のORF内に位置するオルタナティブ(alternative)オープンリーディングフレーム(ORF)によりコードされるペプチドに焦点が合わせられるかもしれない。真核生物におけるオルタナティブORFの使用に関する例は文献にはほとんどなく、対応する産物の生物学的意義は知られていない。しかし、これらの

産物は抗原性標的として用いられ、免疫監視の有効性を高めているかもしれない。具体的には、遺伝子発現の異常な翻訳調節 (c-mys やFGF-2 などについて)(19~21) とがんの発生間の関係はますます明白になってきており、従って、腫瘍における免疫原性ペプチドは、本来の ORFにも、またオルタナティブ ORFに由来するペプチドから生じるかもしれない。

【0004】

本発明に関連して、HLA-B7拘束 (restricted) 腎細胞がん(RCC) に関して反応性であり、in vivo でのクローニングにより増幅された腫瘍浸潤リンパ球(TIL) 由来のT細胞クローンでcDNAライブラリーをスクリーニングすると、腸管カルボキシルエステラーゼ(iCE) 遺伝子のオルタナティブ (A+1 フレームシフト) オープンリーディングフレーム (ORF)によりコードされるノナマーが分離された。このペプチドは、トランスフェクトされたT2細胞を用いる免疫蛍光による結合分析において測定されるように、HLA-B* 0702提示分子に結合する。このオルタナティブ-ORFタンパク質の構成的発現が、細胞傷害性試験においてTIL により認識される、トランスフォームされたHLA-B7* 腎細胞系のすべてにおいて観察された。

【0005】

iCE遺伝子は、RCC腫瘍並びに、正常肝臓、腸管および腎臓の組織において転写される。天然のATG 翻訳開始部位における突然変異は認識を妨げず、これは、関与する機構がフレームシフト (すなわち、リボソームの前方への移動) および再コード化 (recoding) ではないことを示唆している。さらに、+1 ORFにおける代替翻訳開始部位として使用されるうる3つのAUG コドンにおける点突然変異は認識を妨げず、一方上流ACG コドンの突然変異は認識を消失させる。これは、後者のコドンがオルタナティブ ORFの翻訳を開始することを示す。予想外にも、このオルタナティブ ORFはこのように非AUG(ACG)暗号コドンから開始される。

【0006】

従って、本発明は、腫瘍特異的T細胞反応をもたらす、iCE遺伝子のフレームシフトされた配列 (A+1 またはA+2)によりコードされるペプチド配列の少なくとも8つの連続したアミノ酸の配列を含むペプチド化合物に関する。iCE (ホモ・サピエンスの腸管カルボキシルエステラーゼ；肝臓カルボキシルエステラーゼ-2

) のヌクレオチド配列およびペプチド配列は、アクセス番号NM 3869 における www.ncbi.nlm.nih.gov サイトで利用可能である。Schwer, H., Langmann, T., Daig, R., Becker, A., Aslanidis, C. および Schmitz, G. 「ヒト腸管および肝臓に存在する新規な推定カルボキシルエステラーゼの分子クローニングおよび特性決定」 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233(1), 117-120(1997) (MEDLINE 97289502) の文献は参照としてここに援用する。

【0007】

本発明は、より具体的には、下記配列の配列番号1の少なくとも8つの連続したアミノ酸の配列を含むことを特徴とする、特異的T細胞反応を生じさせるペプチド化合物に関する：

【0008】

【化1】

```
TVVRLFLAWLPCMMVPCWLPWRTWWWSSSSTAWVSWASSALETSTQPATGATWTK  
WLHYAGSSSRISPTLEATLTVSPFLASLRVARVCLRLLCPPYPKDSSTEPSWRVAW  
PSCPASLPAQLMSSPRWWPTCLPVTCLTLRPWWAACGARVKRRFLQLTSLSR.
```

【0009】

特に、配列SPRWWPTCL(配列番号2)と少なくとも80%の同一性を有するペプチド化合物が挙げられる。

また本発明は、下記工程を含むことを特徴とする、配列番号1の配列の約9～10の連続したアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含むペプチド化合物を同定する方法に関する：

- a) 所定のHLA分子に対する固定(anchoring)モチーフを含む約9～10のアミノ酸の配列を有する断片を決定する、
- b) 工程a)で得られたペプチド断片の免疫原性を、好ましくはエリスポット(Elispot)検定法を実施することにより測定する。

【0010】

本発明の主題は、この方法により得ることができるペプチド化合物である。

検定するペプチド断片は、この技術分野における一般的知識に基づき化学合成により容易に得られる。

【0011】

Elispot 検定法は従来の文献に広く記載されている。例えば、Herr et al (1998) は、TNF- α を分泌するCD8+Tリンパ球を検出し、定量するためのElispot 法に関する。要約すると、MultiScreen-HAプレート (Millipore、マサチューセッツ州、ベッドフォード) を抗TNF- α 抗体 (クローン195 ; Boehringer Mannheim) で被覆し、CD8+Tリンパ球を抗原性ペプチドの存在下で添加する。分泌されたTNF- α をウサギ抗TNF- α 抗体 (Serotec、英国、オックスフォード)、ビオチン結合ウサギ抗IgG 抗体(Boehringer Mannheim) およびビオチン - アビジン - ペルオキシダーゼ複合体 (Vector、カリフォルニア州、ベーリングゲーム) により検出する。サイトカインが存在する領域の番号と表面領域をコンピューターにより自動的に測定する (Herr et al, 1997)。その他の文献、例えば、Herr et al, (1996) 材料と方法の項第2節132 ~ 135 頁、およびScheibenbogen et al, (1997) 933 頁には、この方法が記載されており、これらも参照としてここに援用する。

【0012】

さらに、本発明は、上記ペプチド化合物の免疫原性を向上させうる人為的な点修飾または突然変異を見出す方法に関し、この方法は、下記工程を含む：

- a) 所定の HLA分子に対する固定(anchoring) モチーフを含む約9 ~ 10のアミノ酸の配列を有する断片を決定する、
- b) 残基4、5、6、7または8においてさらに点修飾 (例えば、翻訳後修飾) または突然変異を導入する、
- c) 工程b) で得られたペプチド断片の免疫原性を、好ましくはエリスポット(Elispot) 検定法を実施することにより測定する。

【0013】

この方法は当分野の技術者に周知である。特に、下記インターネットアドレスに見出される技術を参照のためにここに援用することが可能である。

www.bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla-bind/

この方法は、いわゆる「逆免疫」法を用いて、有効成分 (免疫原性変異ペプチド) を改良できると考えられる人為的 (ヒト腫瘍には存在しない) 点修飾または突然変異を決定することを可能にする。タンパク質のアミノ酸配列の知見に基づ

き、どのペプチドが、その特異性 (HLA-A2, HLA-A1, HLA-B7等) に関係なく HLA ポケットに結合しうるかを予測し、次いでこれらのペプチドの、検討中の HLA 対立遺伝子に効率的に結合する能力について *in vitro* で試験し、そして親和性に重要なある位置のアミノ酸における点修飾または突然変異を導入することが可能である。BIMAS コンピュータープログラムによりこのような予測を得ることが可能である。HLA 分子への固定 (結合) に関与するアミノ酸に関する一般的法則は、Parker et al. (1992 および 1994) および Rammensee et al. (1995) において示された。この情報は参照としてここに援用する。当然、本発明の方法は BIMAS プログラムの使用には限定されず、任意の同等のプログラムを用いて実行できる。

【0014】

別の面において、本発明の主題は、配列番号 1 に関して少なくとも 1 つの突然変異または修飾を有する、配列番号 1 の配列の約 9 ~ 10 のアミノ酸の配列を含むこと、および特異的 T 反応を引き起こすことを特徴とする、上記方法を用いて得ることができるペプチド化合物である。かかるペプチド化合物は特に、配列 SPR WWPTCL (配列番号 2) 由来であってよい。

【0015】

本発明に関連して、「ペプチド化合物」なる用語は、iCE の A+1 または A+2 のオルタナティブ ORF によりコードされるポリペプチド由来の最小限の 1 つのペプチド断片または一連のこれらのペプチド断片からなり、天然または非天然のアミノ酸以外の 1 または 2 以上のその他の要素を場合により含む実体を意味する。これらの要素の目的は、上記ペプチド断片を化学的もしくは物理的に防御する、及び/または体内へのその吸収、及び/もしくはその投与、及び/もしくは生物学的利用能を促進することである。例えば、この防御により、体内に存在する各種プロテアーゼの作用を受けることなく、ペプチドをその標的に到達させることが可能になる。かかる化学的改変はまた、HLA-A2 分子に対する抗原性ペプチドの親和性を増加させ、*in vivo* でのワクチンの効果を向上させうるかもしれない (Rosenberg et al., (1998))。

【0016】

上記要素は、例えば、

- 当分野の技術者に知られており、ペプチドのNH₂ 及び / 又はCOOH末端と反応する保護化学基。この修飾はこのペプチドの免疫原性をあまり低下させない、
- ワクチンのin vivo での有効性を改善する化学基、
- リポペプチドと称されるペプチド化合物を生成するようにペプチド断片に共有結合的に結合する脂質または脂肪酸。パルミチン酸はその中の1例である、Vitiello et al., (1995)、これは参照としてここに援用する。
- 制限部位を有し、完全ペプチド断片を体内のその作用部位に運ぶことを可能にする、該ペプチド断片のための輸送タンパク質。

【0017】

従って、本発明のペプチド化合物は天然のアミノ酸以外に少なくとも1つの要素を含んでもよい。

本発明の別の態様は、上に定義した少なくとも1つのペプチド断片をコードするDNA断片に関する。この断片は、下記配列番号3の配列の少なくとも24の連続したヌクレオチドの配列と少なくとも50%の同一性を有する配列を含んでよい。

【0018】

【化2】

```

acgggtggtgcgcttgtttttggcatggcttccttgtatgatgggttccatgctggc
tgccttggagaacgtggtggtggtcatcatccagtagcgcctgggtgtcctgggc
ttcttcagcactggagacaagcagcaaccggcaactggggctacctggaccaag
tggtgcactacgctgggtccagcagaatatcgcccactttggaggcaaccctga
ccgtgtcaccatttttggcgagtctgcggtggcagcagtggtgtcctcgcttgtt
gtgtcccccatatcccaaggactcttccacggagccatcatggagagtggcgtgg
ccctcctgcccggcctcattgccagctcagctgatgtcatctccacgggtgggtggc
caacctgtctgctgtgaccaagttgactctgaggccctgggtgggctgcctgcgg
ggcaagagtaaagaggagattcttgcaattaacaagcctttcaagatgatccccg
gagtggtggatggggtcttccctgccc

```

【0019】

この配列は、腫瘍細胞において発現される iCE遺伝子のA+1 オルタナティブ 0 RFに相当する。この ORFの発現産物は、HLA-B7拘束 (restricted)RCCに関して反応性であるT細胞のクローンにより認識される。反応性TIL が腫瘍部位において

in situ で増幅される。

【0020】

「DNA断片」なる用語は、一本鎖もしくは二本鎖 DNA、cDNA及び/又はRNA断片を意味する。前記ペプチド断片のアミノ酸配列に相当するヌクレオチド配列は、遺伝暗号の縮重の原則により所定のアミノ酸に対する各種の可能なコドンすべてを含むように変化しうる。本発明の主題はまた、真核細胞及び/又は原核細胞、特にヒト細胞において強力であり有効なプロモーターに融合した上記 DNA断片を含む、ペプチド断片を発現するためのベクターである。このベクターは、ウイルスベクター、プラスミドベクター、または偽ベクターであってよく、選択マーカを含んでも、サイトカイン及び/又はリンホカインなどの免疫物質を発現してもよい。

【0021】

本発明はまた、ペプチド化合物をローディングした樹状細胞、およびペプチド断片を発現する発現ベクターで形質転換された樹状細胞にも関する。これらの細胞はマクロファージであってもよい。Nestle et al., (1998) は、患者から採取した樹状細胞を抗原性ペプチドでローディングし (in vitro培養)、それらを同じ患者のリンパ系に注入することからなるワクチン接種方法を記載している。この刊行物は参照のためにここに援用する。

【0022】

本発明の別の面の主題は、本発明のペプチド化合物またはペプチド化合物混合物および薬剂的に許容しうるビヒクルを含む薬剤組成物である。この組成物は、1または2以上の免疫アジュバント、特に腫瘍に対して細胞傷害性である因子を含んでいてもよい。

【0023】

本発明はまた、上記発現ベクターおよび薬剂的に許容しうるビヒクル、または本発明の DNA断片あるいは上記細胞および薬剂的に許容しうるビヒクルを含む薬剤組成物に関する。

【0024】

本発明の薬剤組成物または組み合わせ製品は、1または2以上の免疫アジュバ

ント、特に腫瘍に対して細胞傷害性である薬剤を含んでもよい。これらの製品は、静注(IV)、皮下、経口または鼻への投与に適合し、好ましくは正に荷電もしくは負に荷電したりポソーム、ナノ粒子または脂質エマルジョンから選択される薬剤ビヒクルを含んていてもよい。

【0025】

本発明の別の面は、がん、特に充実性腫瘍、殊にがん腫、黒色腫、神経芽腫、好ましくは肝がんおよび結腸もしくは腎臓の腺がんの治療のために特に意図された医薬品の製造のための上に定義したペプチド化合物の使用に関する。この医薬品は、特に、*in vitro*で腫瘍特異的 CTLを誘導し、増殖させ、再注入することからなる、*ex vivo* 免疫用であり、この誘導はローディングした樹状細胞の助けにより、または*in vivo* での免疫により行ってもよい。本発明はまた、培地において腫瘍の CTL集団を増加させ、及び/又は例えばIL-2、IFN- およびTNF などの細胞傷害性因子の前記 CTLによる分泌を誘導し、及び/又は免疫防御を刺激して、特に腫瘍の CTL集団を増加させ、及び/又は例えばIL-2、IFN- およびTNF などの細胞傷害性因子の前記 CTLによる分泌を誘導するための、前記ペプチド化合物の使用に関する。

【0026】

別の態様において、本発明は、下記からなる工程を含む、前記ペプチド化合物を認識する抗体を製造する方法に関する：

- a) 前記ペプチド化合物で哺乳動物を免疫する、
- b) 免疫学的検定法において前記ペプチドに結合するモノクローナル抗体を分離する。

【0027】

本発明はまた、この方法により得ることができるモノクローナル抗体に関する。

本発明はまた、下記からなる工程を含む、 iCEのA+1 ORF によりコードされるペプチドまたはポリペプチドを検出する方法：

- a) 個体から取り出した試料を、上記モノクローナル抗体に接触させ、
- b) ペプチドもしくはポリペプチド/抗体複合体を形成させ、

c)この複合体中にあるかこの複合体に結合する検出可能な標識により、このペプチドまたはポリペプチドを検出する、
および、がん検出のための、特に個体に存在するがんの予後のための、特に上記抗体を含む診断キットに関する。

【0028】

特に上記モノクローナル抗体をおよび薬剂的に許容しうるビヒクルを含む組成物は、がん治療に関しても有用であるかもしれない。

iCE cDNAはもともと本来ヒト小腸cDNAライブラリー(31)から単離された。これは、各種哺乳動物種の他のカルボキシルエステラーゼと65%の相同性を示す。これはヒト腸管、肝臓および腎臓において発現され、生体内異物の制御および腸管粘膜の解毒(31)において重要な役割を果たすようである。正常 iCE ORFの最小ヌクレオチド領域においてコードされる一連の多数のT細胞エピトープを試験すると、クラスI HLA-B* 0702拘束要素に関してはそのいずれも認識されない。逆に、+1フレームシフト後のこの領域においてコードされる453-nt ORFは、2、3および9位に HLA-B7 固定用残基を有するノナマー (SPRWWPTCL、配列番号2)をコードすることが判明した。標的感作検定において 10^{-6} M以下のノナペプチドにより半-最大溶解が得られた。このノナペプチドの HLA-B* 0702でトランスフェクトされたT2細胞への結合は経時的に安定であり、これは、in vitroでのT細胞認識、および後者の場合には、対応するTIL 副次集団の腫瘍部位におけるin situ 増幅により示されるようなin vivoでのT細胞増殖には、このオルタナティブORFの少量の発現で十分であることを示唆する。

【0029】

本発明に関して得られる結果から、T細胞エピトープ生成には新規な機構が関与していることが明らかになる。+1翻訳リーディングフレームを生じる非AUG 暗号コドンにより誘導されるオルタナティブ ORFは、TIL により認識される腫瘍Agをコードすることが判明した。その他の2つの例、gp75/TRP-1(17)およびNY-E50-1(18)において、TIL により認識されるペプチドは、本来の ORF内に位置するオルタナティブ ORFによりコードされる。オルタナティブ ORFが翻訳される機構が、gp75/TRP-1(17)について、それに対する認識はエピトープの前の内部AUG の存在

に影響されることが示唆された。このリボソームによるスクリーニング機構に加え、T細胞エピトープ(41)の産生についてはリボソームのフレームシフト(39、40)が示唆されたが、iCE遺伝子の場合、天然のATG 翻訳開始部位を変異させてもペプチド認識には影響しないことから、この可能性は排除される。事実、iCEの+1オルタナティブ ORFにおける暗号に関する第一の内部翻訳開始部位(440位におけるACG コドン)の存在は、in vitroおよびin vivoにおけるT細胞の活性化(すなわち、in situでのT細胞のクローン性増殖を生じさせる)のための十分な量のiCEペプチドの発現を指示するのに十分である。リボソームが、通常のKozak 共通配列を有する第一のAUGを時々避けて、下流のAUGで翻訳を開始する漏出性のスクリーニングモデルは、プリンの代わりに+4位にピリミジンが存在するためにiCEに適用されるかもしれない。

【0030】

我々の知る限り、これは、ヒトの疾患において、非ATG 規定オルタナティブ ORFによりコードされ、組織反応性を有するT細胞により認識されるエピトープの最初の例である。in vitroで樹立された、非トランスフォーム HLA-B7+腎細胞系は、細胞傷害性試験においてTIL 由来クローン3B8により認識された。ATGに規定されない繊維芽細胞増殖因子2分子のオルタナティブ翻訳開始は、ATGに規定されるもの(20)に比べて、ストレスがかかった、もしくはトランスフォームされた細胞において誘導される。同様に、iCEの非ATG開始型の発現は、腫瘍において正に調節され、対応するTILのin situクローン性増殖を生じうる。従って、このiCEのオルタナティブ ORFは、免疫治療における、特に肝がんまたは結腸もしくは腎臓の腺がんをもつ患者における使用に有利である、新規腫瘍Agを発現する。より一般的には、得られた結果は、3つの翻訳リーディングフレームにおいて非AUG コドンにより誘導されるオルタナティブ ORFが、がんや自己免疫疾患などのある種のヒトの疾患においてT細胞エピトープをコードする可能性を示す。

【0031】

本明細書の残部については、以下に示す図の説明が参照されるであろう。

説明

図1:

(A) CTL クローン3B8 による自己RCC-1 細胞系の特異的溶解

自己RCC-1 細胞系およびK562細胞に関して、クローン3B8 の細胞傷害性を、各種E:T 比において標準クロム遊離試験で試験した。mAb W6.32 による溶解の阻止も示す。

(B) 各種の同種細胞系に関する 3B8の細胞傷害性

自己RCC-1 系および各種の同種RCC 細胞系 (RCC-3、RCC-4 およびRCC-5)を用いて18:1の E:T比で標準的クロム試験により3B8 を試験した。対照としてW6.32 を使用して、抗原提示に関与するクラスI HLA分子を阻害した。

図2：選択したプライマーTCRBV(A)およびTCRBJ(B)を用いた、TIL およびクローン3B8 におけるCDR3のサイズの分析

RNAを逆転写、およびプライマーTCRBV5およびBCを用いた40サイクル以上の増幅にかけた。得られた DNAをネステッド蛍光プライマーTCRBC(A)またはTCRBJ152 (B) (13のBJプライマーを試験、BJ1S1-BJ1S7、BJ2S1-BJ2S6)を用いて伸長反応において5サイクル以上コピーした。増幅産物を自動シーケンサーで分析した。得られたプロフィールは、増幅産物のntでのサイズ(x軸) および蛍光強度 (y軸) を示す。優性なピークについて得られた絶対FU値を示す。

【0032】

図3：2C2 または3G7 cDNAクローンおよび自己 HLA-B* 0702 cDNA を含む発現ベクターpcDNA1で一過性にコトランスフェクトされたCOS-7 細胞による CTLクローン3B8 の刺激

対照刺激細胞は、陽性対照として用いられるRCC-1 細胞系、および陰性対照として用いられる HLA-B* 0702 cDNA のみでトランスフェクトされたCOS-7 細胞を含む。iCE cDNAを、HLA-B* 0702 cDNA と共にCOS-7 細胞中に一過性にコトランスフェクトし、48時間後クローン3B8 を添加した。18時間後に TNFの産生を、WEHI細胞に対するその細胞傷害作用により測定した。対照刺激細胞は、陽性対照として用いられるRCC-1 細胞系、および陰性対照として用いられる HLA-B* 0702のみでトランスフェクトされたCOS-7 細胞を含む。

【0033】

図4：3B8 により認識される抗原性ペプチドをコードするiCE cDNA配列の位置

これは、cDNA 2C2クローンの全長iCE cDNA配列、および各種短縮 (truncated) 2C2 cDNAの概略図である。非翻訳5'および3'領域は輪郭のみの四角で表される。ヒト iCEの翻訳配列は、塗りつぶした四角で表され、cDNAクローン2C2 は点を付けた四角で、短縮2C2 cDNAは線を引いた四角で表される。ヌクレオチドは、天然のATG ナンセンスコドンから始まるように番号を付けられている。矢の付いた小さい黒い枠は、P1プライマーおよびP2プライマーの位置を示す。移行RNA をハイブリダイズするためのプローブとして使用されるcDNAは、2つの先端のある矢によって示される。制限部位 (B: Bam HI; Bs: BstX I; E: EcoR I; S: Sma I; X: Xba I)。自己HLA-B * 0702 cDNA および各種短縮cDNAで一過性にトランスフェクトしたCOS-7 細胞の、CTLクローン3B8 による認識を示す。トランスフェクトされた細胞を5000の 3B8細胞と共に保温し、上清中のTNF の量をWEHI-13 細胞に対する細胞傷害効果により測定した。

【0034】

図5 : iCEコード化ペプチドと共に保温した自己EBV-トランスフォーム細胞系の、CTLクローン3B8 による溶解

2000のEBV-トランスフォーム細胞を、HLA-B7- 拘束 iCEペプチドまたは別の対照HLA-B7- 拘束ペプチドの存在下で1時間の間⁵¹クロムと共に保温し標識した。次いで、クローン3B8 をエフェクターとして30:1 に設定した比で添加した。クロム遊離を4時間後に測定した。

【0035】

図6 : iCEペプチドによるT2細胞上でのHLA-B7発現の誘導

T2細胞を、50 μ M 濃度でペプチドを含む無血清培地において26 $^{\circ}$ Cで16時間保温した。次いで、ペプチドを再び添加し、細胞を37 $^{\circ}$ Cで保温した。30分または1時間間隔で、細胞の画分を回収し、HLA-B7発現における変化を、抗 HLA-B7 mAb (HB59)を用いたフローサイトメトリーにより監視した。対照として、HLA-A2拘束HS P70 ペプチドを用いた。

【0036】

図7 : 各種細胞系(A) および各種腫瘍断片(B) におけるiCE RNA 転写産物の分析

ポリ(A)+RNA (A) 5 μ g および全RNA(B) 10 μ g を、1%アガロースを含む変性ホルムアミドゲル上にローディングした。RNA を膜上に移し、移行RNA を、プローブとして使用したcDNAクローン2C2 の³²P-標識断片とハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、分析用の等量のRNA をローディングするための内部対照としての、グリセルアルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) プローブを用いて行った (図示せず)。

【0037】

図8: iCEの非-ATG- 規定オープンリーディングフレームは CTLクローン3B8 により認識される

(A) 本来のおよびオルタナティブ (a+1 シフト) オープンリーディングフレームを有する iCE cDNA コード領域の配列。変異したヌクレオチド (nt) の位置は大文字の太字で表され、相当するコドンは下線を付し、試験された突然変異体A-F の位置 (B) は変異体コドン上に示される。+1 ORFによりコードされる抗原性ペプチドの配列は下線を付す。

(B) COS-7 細胞中HLA-B * 0702でコトランスフェクション後にクローン3B8 からのTNF 遊離を刺激する、点変異体(A-F) の能力を試験した。陰性対照は、HLA-B * 0702もしくはiCE cDNA単独で刺激されたトランスフェクション、またはHLA-B * 0702およびpcDNA1対照プラスミドでのコトランスフェクションを含む。

【0038】

【実施例】

【0039】

【実施例1】材料および方法

細胞系 (cell line)

K562細胞を培養し、200mM L-グルタミン 1%、200mM ピルビン酸ナトリウム 1%、ヘペス 1%、ウシ胎仔血清(FCS) 5%およびペニシリン (Gibco-BRL、英国、ペイスリー) 50IU/mlを添加したRPMI (Gibco-BRL、英国、ペイスリー) からなる培地中で EBVによりトランスフォームされた患者1由来のB細胞系を得た。WEHI-164クローン13(W13) およびCOS-7 細胞を、200mM L-グルタミン 1%、200mM ピルビン酸ナトリウム 1%、ヘペス 1%、ウシ胎仔血清(FCS) 5%およびペニシ

リン 50IU/mlを添加したRPMI (Seromed, Biochrom KG、ベルリン) において培養した。

【0040】

患者およびRCC 細胞系の樹立

RCC 細胞系を既報(22)のようにして樹立した。原発性腫瘍を、根治的腎摘出を受けた未処置の患者から得た。RCC-1 細胞系を患者1 (HLA A1, A32, B7, B12-44, Cw5, Cw7)から樹立した。この患者は透明な顆粒腎細胞がんを有し、転移のない56歳の男性である。外科手術後、断片を酵素切断により処理し、腫瘍細胞懸濁液を完全RCC 培地(22)中で培養した。それぞれ患者2、3、4、5、6、7および8の原発性腫瘍に由来するRCC-2 (HLA A1, A3, B7, B8, Cw7, Cw7)、RCC-3 (HLA A1, A29, B22, B15-62/63, Cw1, Cw7-17)、RCC-4 (HLA A3, A19-29, B7, B12-44, Cw7, Cw16)、RCC-5 (HLA A1, A3, B6, B22-56, Cw1, Cw7)、RCC-6 (HLA A9-24, A32, B12-44, B18, Cw5, Cw5)、RCC-7 (HLA A1, A28-68, B8, B40-60, Cw3, Cw7)およびRCC-8 (HLA A2, A10-25, B18, B13, Cw8, Cw6)腫瘍細胞系を完全RCC 培地中に維持した。

【0041】

患者1のTIL からの CTL作製

自己TIL を、解離させた腫瘍細胞の解凍懸濁液から作製した。自己の混合リンパ球/腫瘍細胞培養物 (MLTC) を次のようにして調製した：1日目に、解離させた腫瘍細胞を、6-ウェルの平底プレート中、200mM L-グルタミン1%、200mM ピルビン酸ナトリウム1%、ヒトAB血清 (Institut Jacques Boy, S.A.、フランス、ランス) 8%およびペニシリン50IU/ml を含み、T細胞増殖因子 (TCGF) 5%およびヒトインターロイキン-2(rIL-2) (Roussel Uclaf、フランス、ロマンビール) を添加したRPMI1640 (Gibco-BRL、英国、ペイスリー) (以後、「MLTC」完全培地と称する) に、 2×10^6 TIL の割合で接種した。MLTC完全培地を必要に応じ、3日毎に捨て、新鮮なMLTC完全培地で置換した。7、15および21日目に、 2×10^6 TIL を、MLTC完全培地を有する6-ウェル平底プレートに接種した 2×10^5 の照射 (100 Gray) 自己腫瘍細胞で再刺激した。15日目に、TIL の細胞傷害活性を自己RCC-1 およびK562細胞系に対して試験し、表面表現型を直接免疫蛍光によ

り特性決定し、細胞を限界希釈によりクローン化した。TIL を、合計200 μ l の MLTC完全培地中に、刺激剤としての照射した自己腫瘍細胞 (1×10^4 / ウェル) およびフィーダー細胞としての照射同種PBL (8×10^4 / ウェル) および照射EBV-トランスフォームB細胞 (2×10^4 / ウェル) を予め接種しておいた、V型96-マイクロウェルプレート (Nunc、デンマーク) に0.6 ~ 600 細胞/ウェルの割合で、接種した。3日毎に上清60 μ l を各ウェルより除去し、新鮮培地60 μ l で置換した。クローンの細胞傷害性を、4-h 標準クロム遊離試験において測定した。7 ~ 10日毎に CTLクローンを、上記のように同種フィーダー細胞系および自己腫瘍細胞系で再刺激した。

【0042】

細胞傷害性検定法

CTLの細胞傷害性を、既報(22)のようにして標準 ^{51}Cr 遊離試験において測定した。標的細胞 (RCC およびK562細胞系) を37 $^{\circ}\text{C}$ において50 μCi ~ 100 μCi の ^{51}Cr (Du pont, NEN, マサチューセッツ州、ボストン) で1時間標識して、 2×10^3 の細胞を96- マイクロウェルプレートにおいて5%FCS 加RPMI 100 μ l に接種した。エフェクター細胞を40 : 1 ~ 0.1 : 1の範囲の各種E:T比でウェルに添加した。mAbによる溶解阻止のために、標的細胞を、エフェクター細胞を加える前に、飽和濃度のmAbの存在下で2時間予備保温した。96- マイクロウェルプレートを37 $^{\circ}\text{C}$ で4時間保温し、 ^{51}Cr 遊離を回収した上清において測定した。細胞傷害性またはTNFの産生の阻害のために、次のmAbを用いた: pan-class I MHC mAbであるW6/32 およびHLA-B/C 特異的mAbであるB1.23.2(ME1)。

【0043】

COS-7 細胞のトランスフェクションおよびトランスフェクション産物のスクリーニング

トランスフェクション実験をDEAE / デキストラン / クロロキン (chloroquin) 法 (5,7,23) を用いてCOS-7 細胞で行った。トランスフェクションの3日前に、COS-7 細胞を96- マイクロウェル平底プレートにおいて 5×10^3 / ウェルの割合で、FES 20%を含むRPMI 150 μ l 中に接種した。トランスフェクション実験は、2つの異なるマイクロウェルプレートにおいて二重に行った。トランスフェクシ

ヨンのために培地を捨て、次いでDEAE / デキストラン (Sigma) 35 μ g およびクロロキン (Sigma) 0.1 mM を含み、cDNAライブラリー由来の約200 の組換えクローン の一群を発現するプラスミド DNA 100ng および自己 HLA-B* 0702 プラスミド 100ng を有するトランスフェクション混合物 30 μ l で置き換えた。COS-7 細胞を 37 で 4 時間保温し、次いで培地を除去し、細胞をジメチルスルフォキシド溶液 10% を含む 1 \times PBS 緩衝液中で 2 時間保温した。細胞を 1 \times PBS 緩衝液中で 1 回洗浄し、FCS 10% を含む RPMI で 2 日間保温した。2 日後、トランスフェクトされた COS-7 細胞のクローン 3B8 による TNF 産生の刺激能を、WEHI 検定法により測定して試験した。

【0044】

トランスフェクトされた COS-7 細胞の TNF 産生の刺激能を試験した(24)。 2×10^3 CTL (クローン 3B8) を FCS 10% を含む RPMI 100 μ l 中で一過性にトランスフェクトされた COS-7 細胞を含む 96- マイクロウェル平底プレートに加えた。18 時間後、各上清を回収し、その TNF 含量を臭化 3-[4,5-ジメチルチオゾール]-2,5-ジフェニルテトラゾリウム (MTT) を用いた比色検定法において WEHI-164 クローン 13 細胞(25) に対する細胞傷害効果を分析することによって測定した。

【0045】

CDR3 のサイズ分析

CTL クローン 3B8 により発現されるか、血液もしくは腫瘍断片において見出される TCRBV 遺伝子セグメントの CDR3 のサイズの分析を、既報(22) のようにして行った。CDR3 のサイズ分析に用いる操作は、TCRBV-BC 断片(26) の独立 RT-PCR 増幅、次いで、TCRBC または TCRBJ 蛍光ネステッドプライマー(27) を用いる PCR 産物の「フロー」および Immunoscope プログラム(28) を用いる ABI 373 自動 DNA シークエンサー (Applied Biosystems Inc.、カリフォルニア州、フォスター市) での電気泳動による蛍光フロー産物の大きさの測定を含む。5' および 3' プライマー位置は固定されているため、フロー産物のサイズの変化は、CDR3 領域の長さにおける違いにのみ基づく。各ピークをその位置 (CDR3 のサイズ) および蛍光強度 (任意の蛍光単位または FU) により特性決定する。CDR3 のサイズモチーフを表す図を最も高いピークについて 100 % として目盛りを定める。健康な供給者由来の血液

において、所定のV 亜科におけるCDR3のサイズの変化を反映するプロフィールのほとんどは、ほぼガウス分布(21)を有する3ヌクレオチド離れた5~8のピークを示す。優勢なピークは非常に強いシグナルとして定義され、その他のCDR3シグナルにおいてはかなりの減少が見られる。

【0046】

cDNA ライブラリーの作製

ポリ(A)+RNA を、Maxi Message Marker™キット (R&D Systems、英国、アビンドン) を製造者の指示に従って用いて、RCC-1 細胞系より抽出した。第一鎖のcDNAを、5'末端にNot I 部位を含むオリゴ-dT プライマーを用いてSuperscript Choice Systems™ Gibco BRL、メリーランド州、ゲーサズバーグ) により合成し、次いで第二鎖のcDNAを合成した。Semi-Bst XI リンカー (Invitrogen) をcDNAの平滑末端に連結し、次いでNot I で切断し、そしてSephacryl S-500 HRカラムでのクロマトグラフィーにより分画した。cDNA画分を発現ベクターpcDNA1のBst XIおよびNot I 部位にサブクローン化した。組換えプラスミドを、E.coli MC 1061/P3中で電気泳動にかけ、この細菌を、アンピシリン50 µg/ml およびテトラサイクリン10 µg/ml を有するLB寒天プレート上で選択した。スクリーニング実験において、RCC-1 cDNAライブラリーを400 グループの200 のDNA クローンに分けた。各グループの細菌を増殖させ、プラスミド DNAをアルカリ溶解法(29)を用いて抽出した。

【0047】

完全長iCE cDNAおよび点突然変異により変異または短縮されたiCE cDNAの単離
グアニジンイソチオシアネート/塩化セシウム遠心操作(30)を用いてRCC 細胞系から全RNA を抽出した。cDNA Cycle™キットを製造者の指示に従って用い、20 µlの反応量中の全RNA 5 µgに逆転写を行った。cDNA反応混合物1 µlをTaq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer) を用いる PCR反応に用いた。ヒトiCE cDNA(31)を増幅するために以下のプライマーを用いた：

- プライマー P1、5'- CCAAGCTTGGTGAATAGCAGCGTGTCCGC-3'
(ヌクレオチド28~48、センス鎖、配列番号4)
- プライマー P2、5'- TGCTCTAGAAGGGAGCTACAGCTCTGTGTG-3'

(ヌクレオチド1666～1687、アンチセンス鎖、配列番号5)

PCRの条件は次の通りである：95 で10分、次いで30増幅サイクル (94 で1分、60 で2分、72 で3分、最後の伸長72 で10分)

こうして得られた PCR産物を、次に、Hind IIIおよびXba I で切断し、配列決定のために発現ベクターpcDNA1のHind IIIおよびXba I 部位中にサブクローン化する。iCE cDNAの公開された配列はアクセス番号Y09616を有する。iCEの突然変異体を、重複するオリゴヌクレオチドプライマー中の所望の点突然変異をコードし、PCRにより変異体を作製することによる位置指定突然変異誘発(32)により得た。PCR産物の配列決定をABI PRISM DNA 配列決定キット (PE Applied Biosystems)で行った。

【0048】

ノーザンブロット分析

全RNA を、グアニジンイソチオシアネート / 塩化セシウム遠心分離法(30)を用いて、各種原発性腫瘍から抽出した。ポリ(A⁺)RNA を、RCC 細胞系および非トランスフォーム腎細胞系から上記のようにして調製した。ポリ(A)⁺RNA 5 μgまたは全RNA 10 μgを1.2 %アガロースを含むホルムアルデヒドゲル中で電気泳動にかけ、Hybond-N⁺ ナイロン膜 (Amersham、英国) に移した。移行されたRNA を、プローブとしての、公開されたヒトiCE cDNA配列(31)のヌクレオチド1033～2009に相当する2C2 cDNA断片およびグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH)cDNAの両者とハイブリッド形成させた。プローブはすべてPrime-ITTM IIランダムプライマー標識キット (Stratagene、カフォルニア州ラホーヤ)を用いて [32P]dCTP (3000Ci mmol⁻¹) で標識した。ハイブリダイゼーションを48 において16時間行った。

【0049】

膜を52 の2 × SSC で2回、0.2 SSC/0.1 %SDS で15分間を1回洗浄し、次いでオートラジオグラフィーにかけるか、Phosphor-Imager (Molecular Dynamics、米国カフォルニア州サニーベル) で分析した。

【0050】

【実施例2】RCC-特異的 CTLクローンをTIL より単離した

患者1由来のTILを、少量のIL-2およびTCGF(22)の存在下で照射自己腫瘍細胞で刺激した。MLTC 15日後に、自己腫瘍細胞に対する特異的細胞溶解活性(40/1のE:T比において31%の溶解)が検出され、TILを自己腫瘍細胞、EBV-トランスフォームB細胞および同種PBLの存在下で、IL-2およびTCGFを添加して限界希釈法によりクローン化した。3B8と命名したTCR α / β + CF8 α + クローンを単離した。これは自己RCC細胞系を溶解するが、NK-感受性K562標的細胞は溶解しない。クローン3B8の自己RCC-1細胞系に対する細胞傷害性は、mAb W6/32により阻害された(図1A)。細胞傷害性(図1B)およびTNF産生試験の両方において、全ての同種HLA-B7 $^+$ RCC細胞系(図1BのRCC-2、RCC-4およびRCC-5)は3B8により認識されるが、HLA-B7 $^-$ RCC細胞系(RCC-7、RCC-6、RCC-7およびRCC-8)はいずれも認識されない。従って、3B8により認識される抗原は、HLA-B7分子により提示され、RCC細胞系において共通に発現することが分かる。6つのクラスI HLA分子がRCC-1よりRT-PCR(33)により単離され、pcDNA1にクローン化され配列決定された。自己HLA-B7 cDNAのヌクレオチド配列により、関与する対立遺伝子をHLA-B7 * 0702と同定することができた。このHLA対立遺伝子のHLA-B7 * 同種RCC細胞系へのトランスフェクションは、CTLクローン3B8による認識(TNF分泌)を誘導するのに十分であることが判明し、このことは、このクローンがすべてのRCCにより発現される共通(shared)抗原の同定を導くという事実を確認するものである。

【0051】

【実施例3】RCC-特異的CTLクローン3B8に対して類似したTCRVB-BCおよびTCRVB-BJ CDR3長でのTIL副次集団のin situ クローン増殖

クローン3B8については、試験した24のV β 亜科プライマーのただ1つ(TCRVB5)および13のTCRBJプライマーのただ1つ(TCRBJ1S2)でシグナルが得られた。CDR3サイズ分布の分析により、3B8のTCRBV5J1S2が腫瘍において優性であることが示され(図2AにおけるTCRBV5-BCプライマーにより、および図2Bにおけるより正確な分析のためのTCRBV5-BJ12プライマーにより示されるように)、一方かかるクローノタイプはPBMCには見出されなかった(TCRBV-BCプライマーでのCDR3長の実質的なガウス分布、図2A参照)。この結果は、cDNA配列決定によりいくつかの場

合において以前に示された (14、34~36) ように、クローン3B8 が腫瘍部位において特異的に増殖されることを強く示唆する。

【0052】

【実施例4】抗原をコードするcDNAの同定

RCC-1 細胞系から抽出したRNA 由来のcDNAライブラリーを発現ベクターpcDNA1 において作製した。このcDNAライブラリーを400 グループの200 組換えプラスミドに分け、各グループを2重に、自己HLA-B7* 0702をコードするcDNAを含む発現ベクターpcDNA1と共にCOS-7 細胞にコトランスフェクトした。COS-7 細胞の、3B8 によるTNF 産生の刺激能を試験した。48時間後、コトランスフェクトされたCOS-7 細胞を3B8 と共に24時間保温し、培養上清中のTNF 濃度を、WEHI細胞に対する細胞傷害効果により測定した。上清中に見出されたTNF の量は、より多い量 (14および15pg/ml)の2重の2つの対を除き、8~11pg/ml の範囲にわたる。これらの候補ウェルに相当する各グループの細菌については、プラスミド DNAを抽出し、サブクローン化した。第2のスクリーニングを、陽性の2重の試料から抽出した50グループの50組換えプラスミドでCOS-7 細胞をトランスフェクトすることにより行った。最後に、COS-7 細胞における第3のスクリーニングにより、抗原の発現をHLA-B7+ COS-7 細胞に導入する2つの同一のcDNAクローン (cDNAクローン2C2 および3G7)を分離した。

【0053】

2C2 cDNAの配列は、1250ntの長さであり、最近同定された、推定腸管カルボキシルエステラーゼをコードするcDNA(31)と、nt763 から2009 (ntはナンセンスコドンからの番号である) にわたって100 %の相同性を有する。公開された配列に相当する完全長のiCE cDNAを同定するために、RT-PCRを、RCC 細胞系から抽出した全RNA から始め、対応する1.6kb の PCR産物をベクターpcDNA1にサブクローン化し、次いで配列を決定した。ヌクレオチド配列は、公開された iCEの配列と同一である。COS-7 細胞でのコトランスフェクション実験は、完全長iCE cDNAが3B8 による認識を与えうることを示した。

【0054】

【実施例5】抗原性ペプチドの同定

抗原性ペプチドをコードする最小ヌクレオチド領域の範囲を定めるために、iCEコード領域に対応する各種短縮cDNAを、2C2 cDNAクローンから得た(図4)。これらのcDNA断片は、発現ベクターpcDNA1にサブクローン化しておき、自己HLA-B7*0702cDNAを含むpcDNA1と共にCOS-7細胞にコトランスフェクトした。最小ヌクレオチドコード領域はヌクレオチド763 および1033の間に存在する。

【0055】

抗原をコードするヌクレオチド配列を減少させるために、数種の短縮cDNAをPCR増幅により得た。これらの短縮cDNAをHLA-B7*対立遺伝子と共にCOS-7細胞にコトランスフェクトした。ヌクレオチド763 から855 の範囲の断片でトランスフェクトしたCOS-7細胞は、CTLクローン3B8により認識されるが、ヌクレオチド763 から834 の範囲の断片でトランスフェクトしたCOS-7細胞は認識されず(図4)、これは、ペプチドコード領域がヌクレオチド763 から855 の範囲に位置することを示す。対応するアミノ酸配列を調べた後、可能なノナマーおよびデカマーをすべて合成し、自己EBV-トランスフォームB細胞を3B8による溶解に感受性にするそれらの能力を評価した。 10^{-4} または 10^{-5} Mにおいて陽性であると判明したものはなかった。

【0056】

最後に、nt768-855の最小領域においてノナマー(SPRWWPTCL)をコードする、nt476、479 および803 位に3つのATGを有するオルタナティブORF(453-nt0RFへ導く+1翻訳オープンリーディングフレーム)が見出された。このノナマーの配列は2、3および9位にHLA-B7-固定用残基を含む。EBV-トランスフォームB細胞の半最大溶解が、 10^{-6} M以下のこのノナペプチドによって得られた(図5)。

【0057】

【実施例6】 iCEペプチドのHLA-B7への結合

HLA-A2-結合ペプチド抗原は、T2細胞上のHLA-A2分子(37)の発現を正に調節(upregulate)する。同様に、HLA-B7*0702でトランスフェクトしたT2細胞(38)を、iCEペプチドの結合能および安定性の解析に用いた(図6)。HLA-A2-拘束HSP70ペプチド(14)である対照と異なり、iCEペプチドの結合は50mMにおいて少

なくとも4時間にわたり安定である。

【0058】

【実施例7】iCE mRNAの組織分布

iCEメッセンジャーの組織分布を測定するために、50のヒト組織に由来するポリ(A)+RNAを個々の点に固定したナイロン膜からなるヒトRNA Master blot™ (Clontech、米国、パロアルト)を、プローブとして使用されるクローン2C2の³²P標識cDNAとハイブリダイゼーションさせた。iCE mRNAは肝臓、腎臓、小腸、結腸および心臓において検出され、脳下垂体、副腎、前立腺および胃において弱い発現が見られた。胎児性組織、骨髄、末梢白血球、肺および脳においてはシグナルは見出されなかった。mRNAの種類を同定するために、ノーザンブロットを、各種RCC細胞系およびトランスフォームされていない腎細胞系由来のポリ(A)+RNA(図7A)、および各種原発性腫瘍、すなわち腎腫瘍、黒色腫、膀胱腫瘍、神経芽腫および結腸腫瘍、から抽出した全RNA(図7B)で作製した。RNAブロットを、2C2配列のヌクレオチド1033-2009に相当するcDNAプローブとハイブリダイゼーションを行わせた。図7Aに示すように、Schwer et al.(31)により既報の、2種類のmRNA(4.5kbおよび3.5kb)がRCCがん細胞系、およびトランスフォームしていない腎細胞において検出された。原発性の腎腫瘍においては、単一のmRNA転写産物(3.5kb)が検出可能であり、一方異なる組織型を有する原発性腫瘍においてはiCE転写産物は何ら検出されなかった(図7B)。別の2.2kbの転写産物が、小腸および肝臓において示されており(31)、試験した各種細胞系または原発性腫瘍においてはかかる転写産物は検出されなかった。従って、RCC腫瘍においては、iCEタンパク質は、主に発現される単一のmRNA種(3.5kb)からコードされる。

【0059】

【実施例8】非-AUG暗号コドンはオルタナティブオープンリーディングフレーム開始する

細胞傷害性試験において認識されるペプチドが、COS-7トランスフェクション試験において対応する配列によりコードされることを確認するために、まず、終止コドンを全長iCE cDNAの、ノナマーのコード配列の直前の807位に導入した。この点突然変異(変異体A)は、COS細胞におけるHLA-B7*0702でのコトラン

スフェクション後、CTLクローン3B8 認識を消失させる。天然のAUG 翻訳開始部位を3位において突然変異させると、この点突然変異(変異体B)は依然として認識されることが判明した(図8)。このことは、iCEの天然のアミノ酸配列も、プログラムされた翻訳フレームシフト(すなわち、コドンからiCEにおけるリボソームの前方への移動)による、および下流配列の再コード化(39、40)によるキメラ配列のいずれも認識されたペプチドをコードしないことを意味する。

【0060】

リボソームのフレームシフト(41)に加え、下流ATGで翻訳を開始するリボソームの走査機構が、T細胞により認識されるオルタナティブリーディングフレームの生成(42)を生じることが判明した。対応する変異iCE pcDNA1ハイブリッドが、COS細胞においてHLA-B7*0702でコトランスフェクトされた場合にも、依然としてTNF-遊離試験においてCTLクローン3B8による認識を与えうるかどうかを試験するために、完全長iCE cDNAの点突然変異を、ノナマーペプチドの上流の+1 ORFにおいて見出される3つのATG部位のそれぞれ(変異体Cは476位および479位、変異体Dは803位)に導入した。図8Bに示されるように、これらの変異のいずれもCTLクローン3B8による認識を消失させない。これらの結果は、非-AUG暗号コドンがiCE cDNAにおいて代替翻訳開始部位として用いられることを実証する。

【0061】

この非-AUG暗号コドンをコードする最小ヌクレオチド領域の範囲を定めるために、+1 ORFを妨げるはずの終止コドンを抗原性ペプチドの上流の各種位置(428および809位の間)に、全長iCE cDNAの466位(変異体E)、519、666および786位における点突然変異により導入した(図8A)。これらの4種の変異体はすべて、コトランスフェクション後のCTLクローン3B8認識を消失させる(図8Aにおいて、446位に対する変異体Eの結果を参照)。次いで、最小ヌクレオチド領域がnt428および466の間に置かれた。次に、この短い配列において可能な非-ATGコドン(CTG,ACG)を探し、440位におけるACGコドンを見出した。このコドンのACTへの突然変異(変異体E)はCTLクローン3B8認識を消失させる(図8B)。従って、+1 ORFにおける最初の非-AUGコドンは翻訳工程を開始するために用い

られる。

【0062】

参考文献

1. Van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. D. Plaen, B. V. d. Eynde, A. Knuth, および T. Boon. 1991. 「ヒト黒色腫に対する細胞溶解性Tリンパ球により認識される抗原をコードする遺伝子」 *Science* 254: 1643.
2. Van der Eynde, B., および V. G. Brichard. 1995. 「T細胞に認識される新規腫瘍抗原」 *Curr. Opin. Immunol.* 7: 674.
3. Gaugler, B., B. V. d. Eynde, P. Van den Bruggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. D. Plaen, B. Lethe, F. Brasseur, and T. Boon. 1994. 「自己細胞溶解性Tリンパ球により黒色腫上で認識される抗原をコードするヒト遺伝子MAGE-3」 *J. Exp. Med.* 179:921.
4. Boel, P., C. Wildmann, M. L. Sensi, R. Brasseur, J. C. Renauld, P. Coulie, T. Boon, and P. Van den Bruggen. 1995. 「BAGE: 細胞溶解性Tリンパ球によりヒト黒色腫上で認識される抗原をコードする新規遺伝子」 *Immunity* 2: 167.
5. Coulie, P. G., V. Brichard, A. V. Pel, T. Wolfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. D. Plaen, C. Lurquin, J. P. Szikora, J. C. Renauld, and T. Boon. 1994. 「自己細胞溶解性Tリンパ球によりHLA-A2黒色腫上で認識される分化抗原をコードする新規遺伝子」 *J. Exp. Med.* 180:35.
6. Kawakami, Y., S. Eliyahu, K. Sakaguchi, P. F. Robbins, L. Rivoltini, J. R. Yanelli, E. Appella, and S. A. Rosenberg. 1994. 「HLA-A2- 拘束腫瘍浸潤リンパ球の多数により認識されるMART-1ヒト黒色腫抗原の免疫優性ペプチドの同定」 *J. Exp. Med.* 180:347.
7. Brichard, V., A. V. Pel T. Wolfel, E. D. Plaen, B. Lethe, P. Coulie, and T. Boon. 1993. 「HLA-A2黒色腫上の自己細胞溶解性Tリンパ球により認識される抗原をコードするチロシナーゼ遺伝子」 *J. Exp. Med.* 178:489.
8. Robbins, P. F., M. El-Gemil, Y. F. Li, S. L. Topalian, L. Rivoltini, K. Sakaguchi, E. Appella, Y. Kawakami, and S. A. Rosenberg. 1995. 「黒

色腫特異的HLA-A24-拘束腫瘍浸潤リンパ球により認識される抗原をコードする新規遺伝子のクローニング」 J. Immunol. 154:5944.

9. Wang, R. F., P. F. Robbins, Y. Kawakami, X. Q. Kang, and S. A. Rosenberg. 1995. 「HLA-A31-拘束腫瘍浸潤リンパ球により認識される黒色腫抗原をコードする遺伝子の同定」 J. Exp. Med. 181:799.

10. Robbins, P. F., M. El-Gamil, Y. F. Li, Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S. A. Rosenberg. 1996. 「変異 - カテニン遺伝子は腫瘍浸潤リンパ球により認識される黒色腫特異的抗原をコードする」 J. Exp. Med. 183:1185

11. Coulie, P. G., F. Lehmann, B. Lethe, J. Herman, C. Lurquin, M. Andrawiss, and T. Boon. 1995. 「ヒト黒色上の細胞溶解性Tリンパ球により認識される抗原性ペプチドをコードする変異イントロン配列」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7976.

12. Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. D. Plaen, T. HankeIn, K.H.M.z. Buschenfelde, and D. Beach. 1995. 「ヒト黒色腫の細胞溶解性Tリンパ球に標的とされるp16ink4a- 非感受性 CDK4 変異体」 Science 269:1281.

13. Brandle, D., F. Brasseur, P. Weynants, T. Boon, and B.J.V.d. Eynde. 1996. 「ヒト腎細胞がん上の自己細胞傷害性Tリンパ球により認識される変異HLA-A2 分子」 J. Exp. Med. 183:2501.

14. Gaudin, C., F. Kremer, E. Angevin, V. Scott, and F. Triebel. 1999. 「ヒト腎細胞がん上の細胞溶解性Tリンパ球により認識されるHSP70-2A変異」 J. Immunol. 162:1730.

15. Guilloux, Y., S. Lucas, V. G. Brichard, A. VanPel, C. Viret, E. D. Plaen, F. Brasseur, B. Lethe, F. Jotereau, and T. Boon. 1996. 「HLA-A2黒色腫上のヒト細胞溶解性Tリンパ球により認識されるペプチドはN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV 遺伝子のイントロン配列によりコードされる」 J. Exp. Med. 183:1173.

16. Robbins, P. F., M. El-Gamil, Y. F. Li, E. B. Fitzgerald, Y. Kawakam

- i, and S. A. Rosenberg. 1997. 「不完全にスプライシングされたgp100 遺伝子のイントロン領域は黒色腫反応性腫瘍浸潤リンパ球により認識されるエピトープをコードする」 *J. Immunol.* 159:303.
17. Wang, R. F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang, and S. A. Rosenberg. 1996. 「細胞傷害性Tリンパ球により認識されるヒト腫瘍抗原としてのTRP-2の同定」 *J. Exp. Med.* 184:2207.
18. Wang, R. F., S. L. Johnston, G. Zeng, S. L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, and S. A. Rosenberg. 1998. 「乳ガンおよび黒色腫の共通腫瘍抗原：異なるオープンリーディングフレームから翻訳された抗原性ペプチドに対するT細胞反応」 *J Immunol* 161:3598.
19. Nanbru, C., I. Lafon, S. Audigier, M. C. Gensac, S. Vagner, G. Huez, and A. C. Prats. 1997. 「内部リボソームエントリー部位による原がん遺伝子c-myc のオルタナティブ翻訳」 *J. Biol. Chem.* 272:32061.
20. Vagner, S., C. Touriol, B. Galy, S. Audigier. M. C. Gensac, F. Almatic, F. Bayard, H. Prats, and A. C. Prats. 1996. 「ヒト繊維芽細胞増殖因子2のCUG-(AUG-ではなく) 開始型の翻訳はトランスフォームされストレスの加わった細胞において活性化される」 *J. Cell. Biol.* 135:1391.
21. Galy, B., A. Maret, A. C. Prats, and H. Prats. 1999. 「細胞トランスフォーメーションは繊維芽細胞増因子2のイソフォームの発現の密度依存性翻訳調節の消失をもたらす」 *Cancer Res.* 59:165.
22. Angevin, E., F. Kremer, C. Gaudin, T. Hercend, and F. Triebel. 1997. 「腎細胞がんにおけるT細胞免疫反応の解析：タイプ1様分化パターンへの偏向、クローン性T細胞増殖および腫瘍特異的細胞傷害性」 *Int. J. Cancer* 72:431.
23. Seed, B. 1987. 「LFA-3 cDNAは、その受容体CD2 に相同のリン脂質結合膜タンパク質をコードする」 *Nature* 329:840.
24. Traversari, C., P. Van der Bruggen, I. F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Van Pel, E. De Plaen, A. Amar-Costesec, and T. Boon. 1992. 「ヒト遺伝子MAGE-1によりコードされるノナペプチドは腫瘍抗原M2-E に対する細

- 胞溶解性Tリンパ球によりHLA-A1上で認識される」 J. Exp. Med 176:1453.
25. Espevik, T., and J. Nissen-Meyer. 1986. 「細胞傷害性因子/ヒト単球由来の腫瘍壊死因子の測定のための高度感受性細胞系WEHI 164クローン13」 J. Immunol. Methods 95:99.
26. Genevee, C., A. Diu, J. Nierat, A. Caignard, P. Y. Dietrich, L. Ferradini, S. Roman-Roman, F. Triebel, and T. Hercend. 1992. 「ポリメラーゼ連鎖反応によるヒトT細胞受容体可変V遺伝子セグメント使用の研究のための亜科特異的オリゴヌクレオチドプライマー(V 1-w29/V 1-w24)の実験的に確認されたパネル」 Eur. J. Immunol 22:1261.
27. Even, J., A. Lim, I. Puisieux, L. Ferradini, P. Y. Dietrich, A. Toubert, T. Hercend, F. Triebel, C. Panneter, and P. Kourilsky. 1995. 「T細胞受容体 - 鎖CDR3サイズ決定により分析された健康なおよび病気のヒトにおけるT細胞収集：腫瘍および炎症性疾患におけるオリゴクローン増殖の証拠」 Res. Immunol. 146:65.
28. Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zoller, and P. Kourilsky. 1993. 「マウスT細胞受容体鎖のCDR3高度可変領域の大きさは、組換え生殖細胞系セグメントの関数として変化する」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2472.
29. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. 「組換えプラスミド DNAスクリーニングのための迅速アルカリ抽出操作」 Nucleic Acid Res 7:1513.
30. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. 「分子クローニング：実験室マニュアル」 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
31. Schwer, H., T. Langmann, R. Daig, A. Becker, C. Aslanidis, and G. Schmitz. 1997. 「ヒト腸管および肝臓に存在する新規な推定カルボキシルエステラーゼの分子クローニングおよび特性決定」 Biochem. Biophys. Res. Comm. 233:117.
32. Mikaelian, I., and A. Sergeant. 1992. 「複数部位指定突然変異を生成させる一般的な迅速方法」 Nuc. Ac. Res. 20:376.

33. Ennis, P. D., J. Zemmour, R. D. Salter, and P. Parham. 1990. 「ポリマーゼ連鎖反応を用いるHLA-A,B cDNAの迅速クローニング：増幅において生じるエラーの頻度および性質」 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2833.
34. Farace, F., F. Orlanducci, P. Y. Dietrich, C. Gaudin, E. Angevin, M. H. Courtier, C. Bayle, T. Hercend, and F. Triebel. 1994. 「B-慢性リンパ性白血病の患者におけるT細胞収集：複数in vivo T細胞クローン増殖の実証」 *J. Immunol.* 153:4281.
35. Farace, F., E. Angevin, I. Poullion, C. Leboullaire, G. Ferir, D. Elias, B. Escudier, and F. Triebel. 1997. (がんワクチンへの特異的T細胞反応を評価するためのT細胞受容体CDR3のサイズ分布分析) *Int. J. Cancer* 71:972.
36. Gaudin, C., P. Y. Dietrich, S. Robache, M. Guillard, B. Escudier, M. J. Terrier-Lacombe, A. Kumar, F. Triebel, and A. Caignard. 1995. 「腎細胞がんにおけるクローン性T細胞副次集団のin vivo 局所増殖」 *Cancer Res.* 55:685.
37. Nijman, H. W., J. G. Houbiers, M. P. Vierboom, S.H.v.d. Burg, J. W. Drijfhout, J. D'Amato, P. Kenemans, C. J. Melief, and W. M. Kast. 1993. 「HLA-A2.1拘束細胞傷害性Tリンパ球の引き金となりうるペプチド配列の同定」 *Eur. J. Immunol.* 23:1215.
38. Smith, K. D., and C. T. Lutz. 1996. 「抗原プロセッシング欠損T2細胞上のHLA-B7 のペプチド依存性発現」 *J. Immunol.* 156:3755.
39. Farabaugh, P. J. 1996. 「プログラムされた翻訳フレームシフティング」 *Annu. Rev. Genet.* 30:507.
40. Matsufuji, S., T. Matsufuji, Y. Miyazaki, Y. Murakami, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, and S. Hayashi. 1995. 「哺乳動物のオルニチンデカルボキシラーゼアンチザイムの解読における自己調節性フレームシフティング」 *Cell* 80:51.
41. Elliott, T., H. Bodmer, and A. Townsend. 1996. 「フレーム外主要組織適合性複合体クラスI-拘束エピトープのin vivo 認識」 *Eur. J. Immunol.* 26:

1175.

42. Bullock, T, N, J., and L. C. Eisenlohr. 1996. 「オルタナティブリーディングフレームにおいてコードされる CTLエピトープの発現のための機構としての本来の開始コドンを通過するリボソーム走査」 J. Exp. Med. 184:1319

【配列表】

LISTAGE DE SEQUENCES

```

<110> INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
<120> COMPOSE PEPTIDIQUE DERIVE D'UNE ORF DECALEE DU GENE ICE
<130> D18280
<160> 5

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Polypeptide codé par la phase ouverte de lecture
      alternative et décalée (+1) de ICE humain

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

```

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Fragment peptidique provenant de la SEQ ID n° 1
 entraînant une réponse T spécifique

<400> 2
 Ser Pro Arg Trp Trp Pro Thr Cys Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 521
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Phase ouverte de lecture alternative et décalée
 (+1) de iCE

<400> 3
 acggtggtgc gcttgTTTT ggcattggctt ccttgatga tggttccatg ctggctgcct 60
 tggagaacgt ggtggtggtc atcatccagt accgctggg tgcctgggc ttcttcagca 120
 ctggagacaa gcacgcaacc ggcaactggg gctacctgga ccaagtggct gcactacgct 180
 ggggccagca gaatatcgcc cactttggag gcaacctga ccgtgtcacc atttttggcg 240
 agtctgcggg tggcacgagt gtgtcttcgc ttgttgtgtc ccccatatcc caaggactct 300
 tccacggagc catcatggag agtggcgtgg ccctcctgcc cggcctcatt gccagctcag 360
 ctgatgtcat ctccacggtg gtggccaacc tgtctgcctg tgaccaagtt gactctgagg 420
 ccctgtggtg ctgcctgcgg ggcaagagta aagaggagat tcttgcaatt aacaagcctt 480
 tcaagatgat ccccggaagt gtggatgggg tcttctgcc c 521

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Amorçe P1

<220>
 <223> Sens

<400> 4
 cccaagcttg gtgaatagca gcgtgtccgc 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Amorçe P2

<220>
 <223> Antisens

<400> 5
 tgctctagaa gggagctaca gctctgtgtg 30

【図1】

- (A) CTL クローン3B8 による自己RCC-1 細胞系の特異的溶解を示す図である。
(B) 各種の同種細胞系に関する 3B8の細胞傷害性を示す図である。

【図2】

選択したプライマーTCRBV(A)およびTCRBJ(B)を用いた、TIL およびクローン3B8 におけるCDR3のサイズの分析を示す図である。

【図3】

2C2 または3G7 cDNAクローンおよび自己 HLA-B* 0702 cDNA を含む発現ベクター-pcDNA1で一過性にコトランスフェクトされたCOS-7 細胞による CTLクローン3B8 の刺激を示す図である。

【図4】

3B8 により認識される抗原性ペプチドをコードするiCE cDNA配列の位置を示す図である。

【図5】

iCEコード化ペプチドと共に保温した自己EBV-トランスフォーム細胞系の、CTLクローン3B8 による溶解を示す図である。

【図6】

iCEペプチドによるT2細胞上でのHLA-B7発現の誘導を示す図である。

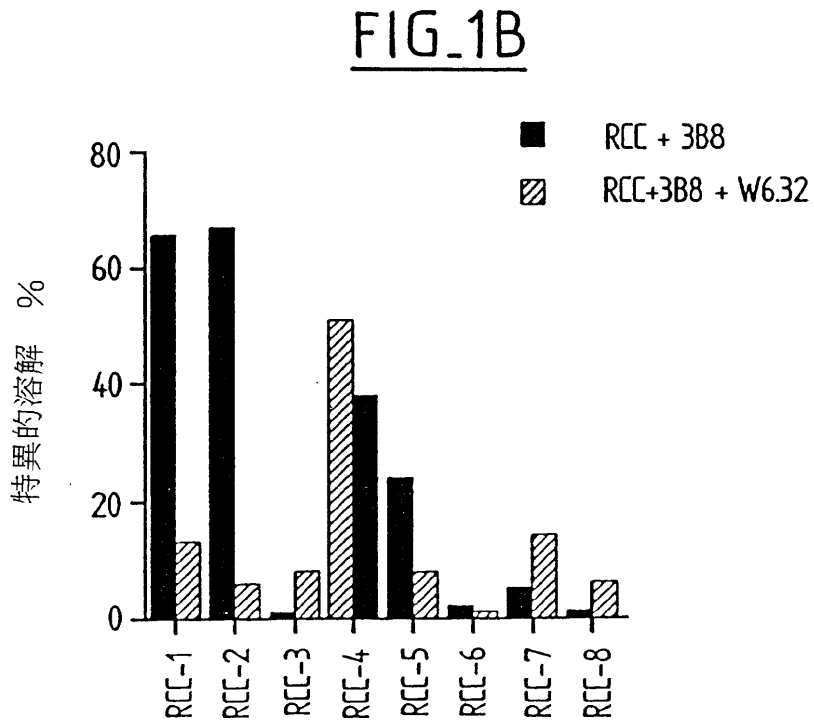
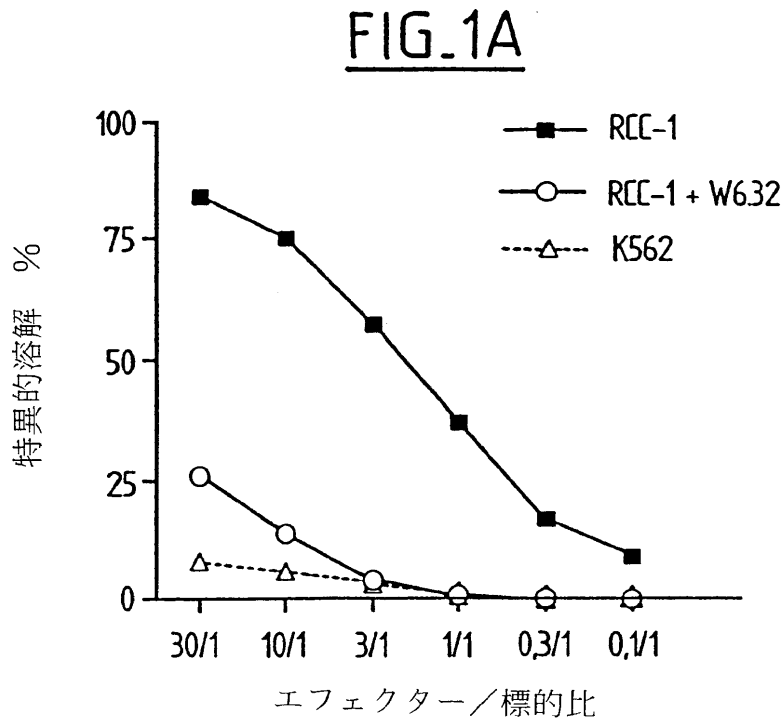
【図7】

各種細胞系(A) および各種腫瘍断片(B) におけるiCE RNA 転写産物の分析を示す図である。

【図8】

(A) 本来のおよびオルタナティブ (a+1 シフト) オープンリーディングフレームを有する iCE cDNA コード領域の配列を示す図、(B) COS-7 細胞中HLA-B* 0702でコトランスフェクション後にクローン3B8 からのTNF 遊離を刺激する、点変異体(A-F) の能力を試験した結果を示す図である。

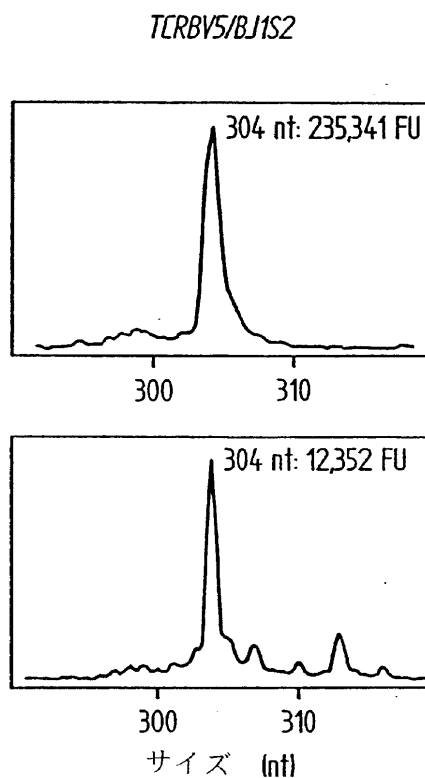
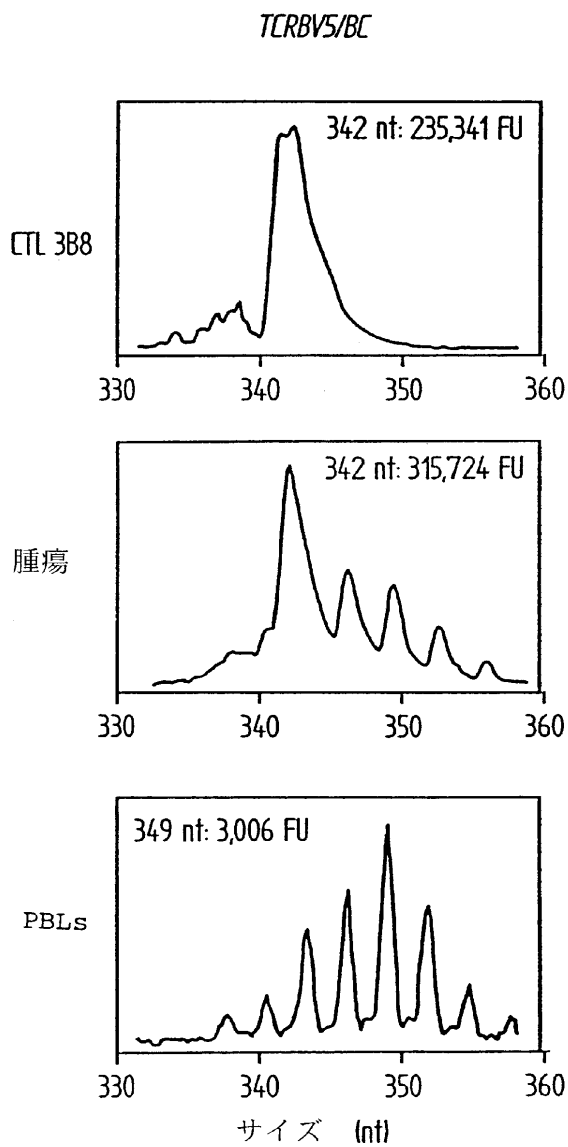
【図1】



【図2】

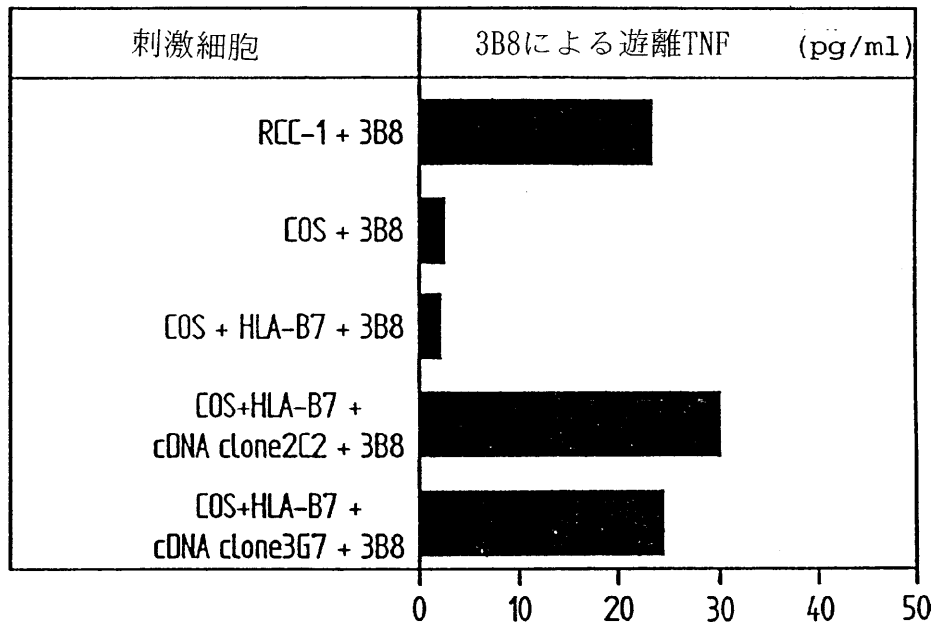
FIG. 2A

FIG. 2B



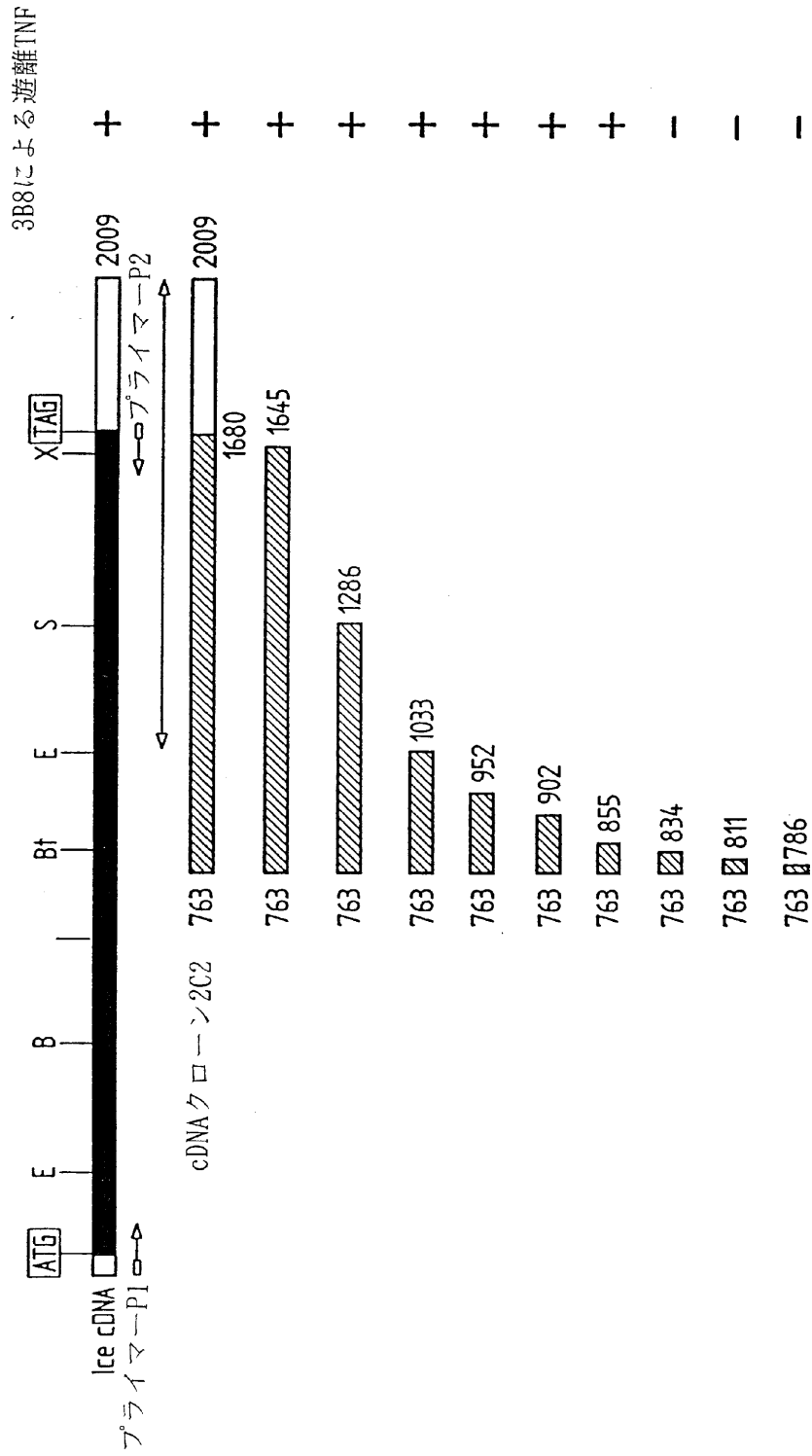
【図3】

FIG. 3

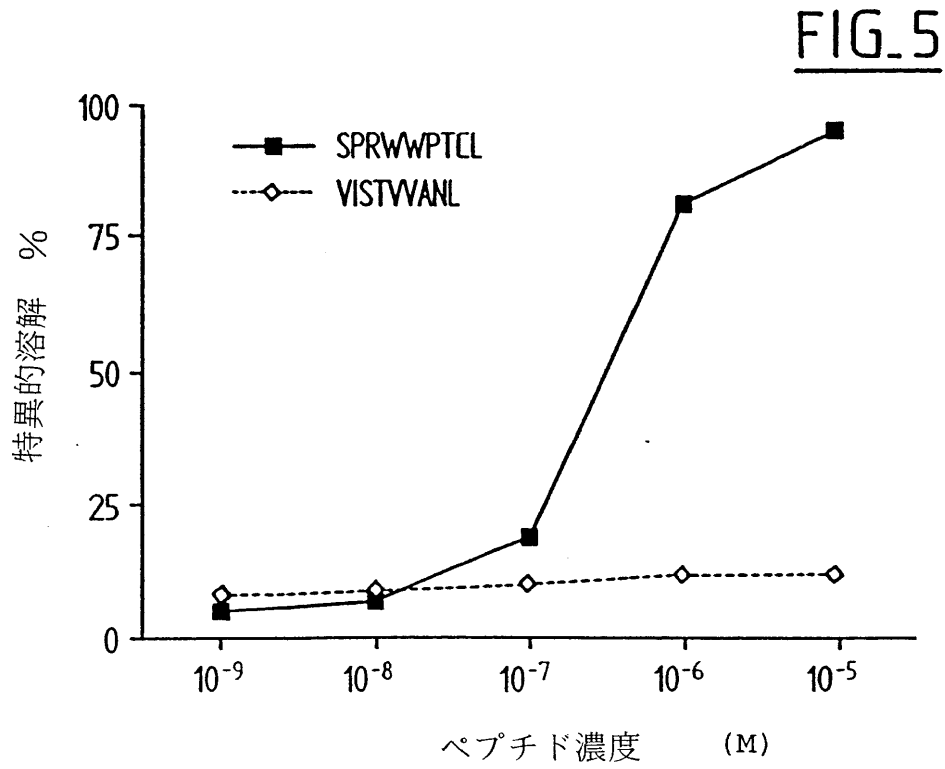


【図4】

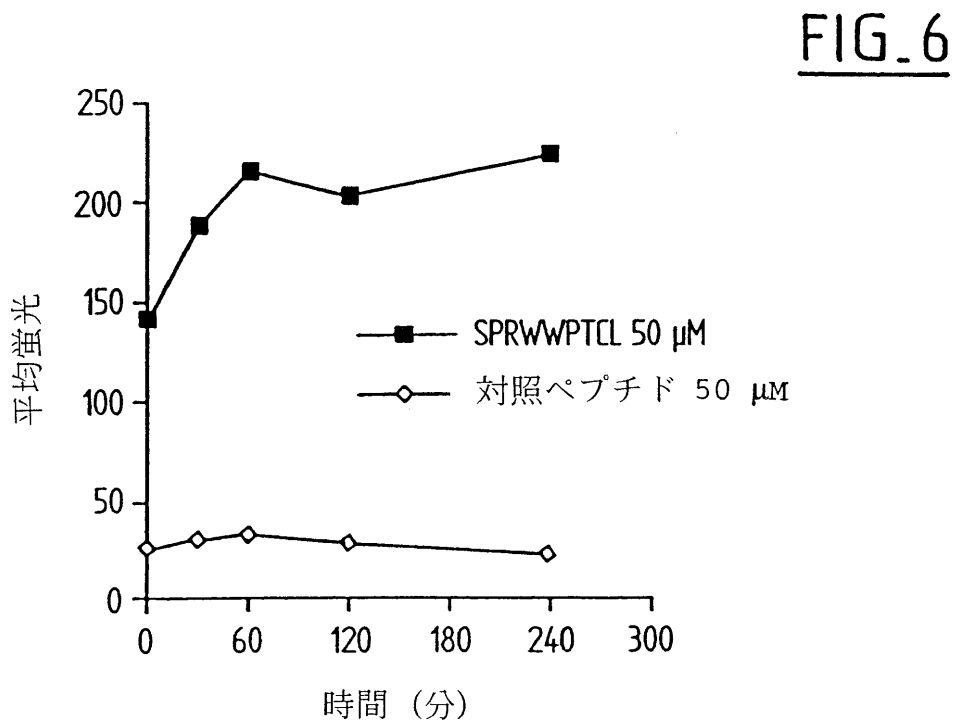
FIG-4



【図5】



【図6】



【図7】

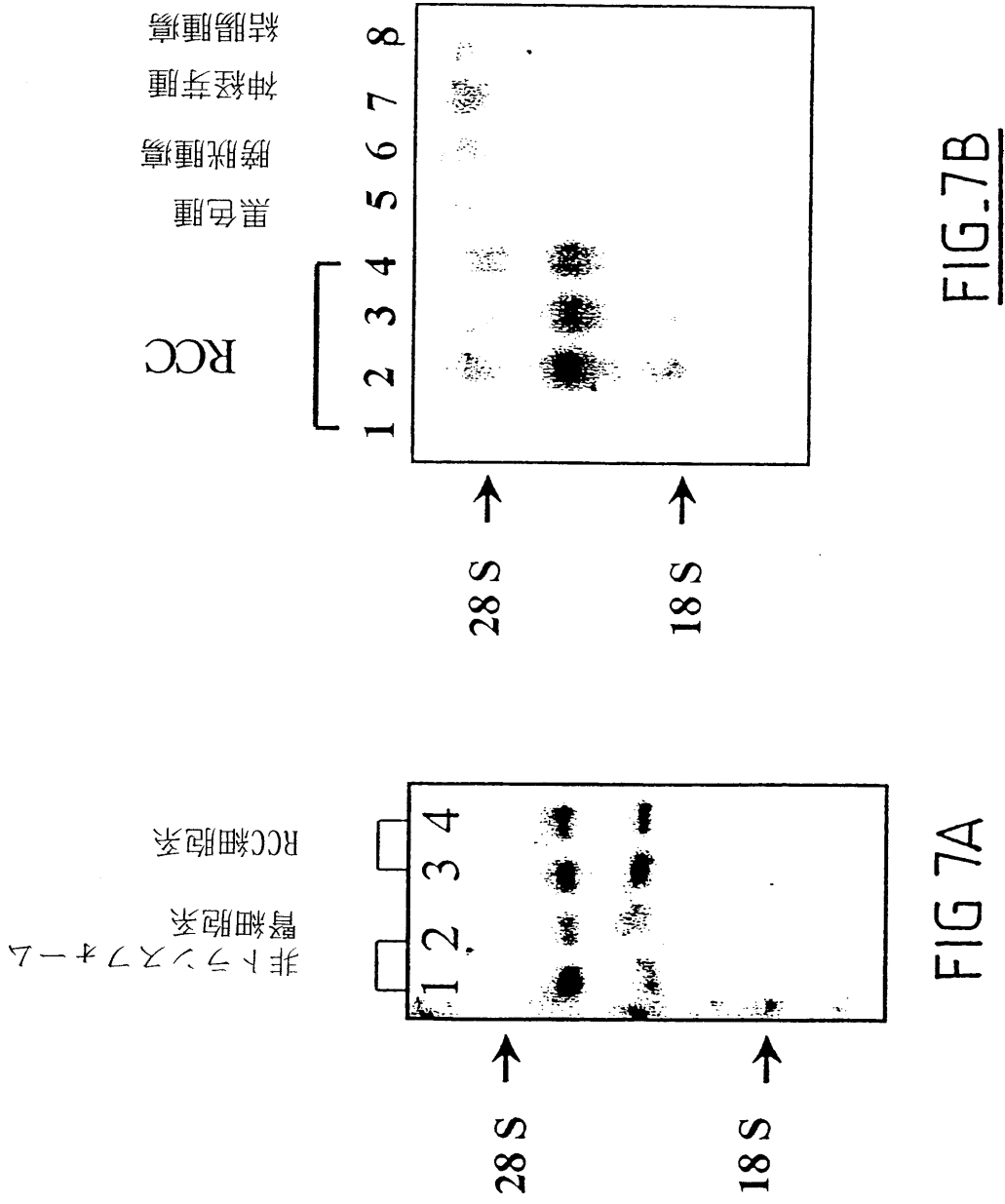


FIGURE 8A

B atGgggctgcacagacttcgtgcgggtgagcgggtggcctgtgggcttctgctgctt 60
M R L H R L R A R L S A V A C G L L L L
cttgteccgggcccaggactcagccagtcctccatcccggaaccacacacaggggcag 120
L V R G Q G Q D S A S P I R T T H T G Q
gtgctggggagtcttgccatgtgaaggcgcacaatgccgggtccaaaaccttcctggga 180
V L G S L V H V K G A N A G V Q T F L G
attccatttgccaagccacctctaggtccgctgcgatttgacccccctgagccccctgaa 240
I P F A K P P L G P L R F A P P E P P E
tcttgagggtgtgaggatggaaccaccatccggccatgtgtctacaggaacctcacc 300
S W S G V R D G T H P A M C L Q D L T
gcagtggagtcagagttcttagccagttcaacatgaccttcccttccgactccatgtct 360
A V E S E F L S Q F N M T F P S D S M S
gaggactgccctgtacctcagcatctacacgccggcccatagccatgaaggctctaacctg 420
E D C L Y L S I Y T P A H S H E G S N L

C cccggtgatgggtggatccacGgtgggtgcgcttgttttggcatgGcttcccttgtAtgAt 480
P V M V W I H G G A L V F G M A S L Y D
- W C G S T V V R L F L A W L P C M M
ggttccatgctggctgccttggagaacgtgggtgggtCatcatccagtaaccgctgggt 540
G S M L A A L E N V V V I I Q Y R L G
V P C W L P W R T W W W S S S T A W V

E

F

FIGURE 8A (suite)

gtccctgggcttcttcagcactggagacaagcagcaaccgggcaactggggctacctggac 600
 V L G F F S T G D K H A T G N W G Y L D
 S W A S S A L E T S T Q P A T G A T W T
 caagtggctgactacgctgggtccagcagaatcgcaccacttggaggcaaccctgac 660
 Q V A A L R W V Q Q N I A H F G G N P D
 K W L H Y A G S S R I S P T L E A T L T
 cgtgtCaccattttggcgagtctgcggtggcacgagtgcttctcgcttggctgtgctcc 720
 R V T I F G E S A G G T S V S S L V V S
 V S P F L A S L R V A R V C L R L L C P
 cccatcccaggactctccacggagccatcatggagagtggtggcctccctcctgccc 780
 P I S Q G L F H G A I M E S G V A L L P
 P Y P K D S S T E P S W R V A W P S C P

D A
 ggcctCattgccagctcagctgAtgtCattctccacgggtggggcacaacctgtctgcctgt 840
 G L I A S S A D V I S T V V A N L S A C
 A S L P A Q L M S S P R W W P T C L P V

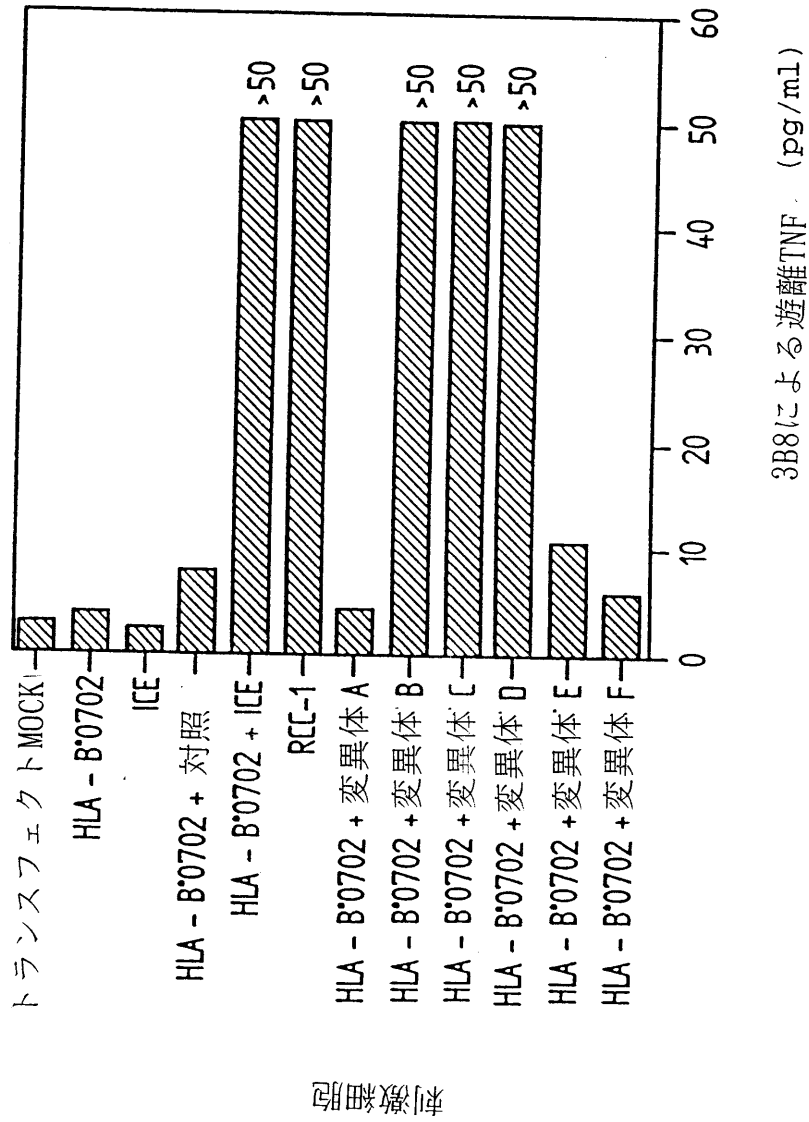
 gaccaagttgactctgaggccctgggtgggtgcctgcggggcagaagagtaagaggatt 900
 D Q V D S E A L V G C L R G K S K E E I
 T K L T L R P W W A A C G A R V K R R F
 cttgcaattacaagcctttcaagatgatccccggagtggtggatgggttcttccctgccc 960
 L A I N K P F K M I P G V V D G V F L P
 L Q L T S L S R -
 aggcacccccaggagctgctggcctctgcccactttcagcctgtcccctagcattgttgggt 1020
 R H P Q E L L A S A D F Q P V P S I V G

FIGURE 8A (suite)

gtcaacaacaatcggtggctcatcccccaagggtcatgaggatctatgatacccag 1081
 V N N N E F G W L I P K V M R I Y D T Q
 aaggaaatggacagagagccctcccaggctgctctgcagaaaaatgttaacgctgctgatg 1140
 K E M D R E A S Q A A L Q K M L T L L M
 ttgcctcctacatttggtagcctgctgagggaggtacattggggacaatggggatccc 1200
 L P P T F G D L L R E E Y I G D N G D P
 cagaccctccaagcagttccaggagatgatggcggaactccatgtttgtgatccctgca 1260
 Q T L Q A Q F Q E M M A D S M F V I P A
 ctccaagtagcacattttcagtggttccccgggcccctgtgtacttctacgagttccagcat 1320
 L Q V A H F Q C S R A P V Y F Y E F Q H
 cagcccagctggctcaagaacatcaggccaccgcacatgaaggcagaccatggtgatgag 1380
 Q P S W L K N I R P P H M K A D H G D E
 ctcccttttggtttcagaaagtcttcttgggggcaactacattaaattcactgaggaagag 1440
 L P F V F R S F F G G N Y I K F T E E E
 gagcagctaagcaggaagatgatgaagtactggggccaactttgcgagaaaaatgggaacccc 1500
 E Q L S R K M M K Y W A N F A R N G N P
 aatggcgaggtctgccacactggccgctgttccagcaggaggaggaataacctgcagctg 1560
 N G E G L P H W P L F D Q E E Q Y L Q L
 aacctacagcctgcggtggccgggctctgaagggccacaggtccagttctggaagaag 1620
 N L Q P A V G R A L K A H R L Q F W K K
 gcgctgccccaaaagatccaggagctcagggagcctgaagagagacacacagagctgtag 1740
 A L P Q K I Q E L E E P E E R H T E L -

【図8B】

FIG_8B



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年8月13日(2001.8.13)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】請求項7

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【請求項7】 配列番号1の配列に関して1つの突然変異または修飾を有する、配列番号1の配列の約9～10のアミノ酸の配列を含み、特異的T応答を引き起こすことを特徴とする、請求項6記載の方法を用いて得ることができるペプチド化合物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/FR 00/01791
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K7/06 C12N9/18		
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 C12N C07K		
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) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CANCERLIT, EMBASE, CHEM ABS Data, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENEMBL 'Online! 28 April 1997 (1997-04-28) SCHWER ET AL.: "H.sapiens mRNA for putative carboxylesterase" XP002135540 cited in the application	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession Y09616 -& SCHWER ET AL.: "Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 233, no. 1, 1997, pages 117-120, XP000891817 the whole document	14-16, 20-23
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *Y* 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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 December 2000		Date of mailing of the international search report 02/01/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5318 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer ALCONADA RODRIG..., A

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 00/01791
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 10 July 1996 (1996-07-10) PINDEL ET AL.: "Human carboxylesterase (hCE-2) mRNA, complete cds." XP002135541</p>	9-13,15, 16,18-23
Y	<p>Accession U60553</p> <p>---& PINDEL ET AL.: "Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 23, 6 June 1997 (1997-06-06), pages 14769-14775, XP002135538 the whole document</p>	14-16, 20-23
X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 25 November 1997 (1997-11-25) SONE,T.: "Homo sapiens mRNA for carboxylesterase, complete cds." XP002135542</p>	9-13,15, 16,18-23
Y	<p>Accession D50579</p>	14-16, 20-23
Y	<p>--- WO 97 29183 A (US HEALTH ;HWU PATRICK (US); REEVES MARK (US); ROSENBERG STEVEN A) 14 August 1997 (1997-08-14) abstract</p>	14-16, 20-23
A	<p>--- HERR WOLFGANG ET AL: "The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 1997, vol. 203, no. 2, 1997, pages 141-152, XP002086405 ISSN: 0022-1759 cited in the application abstract</p>	4,6
A	<p>--- WO 99 18206 A (WANG RONG FU ;GOVERNMENT OF THE UNITED STATE (US); ROSENBERG STEVE) 15 April 1999 (1999-04-15) page 12, line 26 -page 13, line 9 page 13, line 27 -page 15, line 7 page 18, line 6-11 claims 1-69</p>	1-36
A	<p>--- WO 98 55133 A (UNIV CALIFORNIA ;UNIV SOUTHERN CALIFORNIA (US)) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document</p>	1-36

	-/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No PCT/FR 00/01791

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MALARKANNAN SUBRAMANIAM ET AL: "A rare cryptic translation product is presented by K-b major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 1995, vol. 182, no. 6, 1995, pages 1739-1750, XP000864545 ISSN: 0022-1007</p> <p>---</p>	
A	<p>SHASTRI NILABH ET AL: "Major histocompatibility class I molecules can present cryptic translation Products to T-cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1995, vol. 270, no. 3, 1995, pages 1088-1091, XP000891819 ISSN: 0021-9258</p> <p>---</p>	
P, X	<p>RON SIN C ET AL: "A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 163, no. 1, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 483-490, XP002135539 the whole document</p> <p>-----</p>	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/01791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD 9729183 A	14-08-1997	AU 2266097 A CA 2245170 A EP 0879281 A JP 2000505650 T	28-08-1997 14-08-1997 25-11-1998 16-05-2000
WD 9918206 A	15-04-1999	AU 9572098 A EP 1021535 A	27-04-1999 26-07-2000
WD 9855133 A	10-12-1998	AU 7724398 A	21-12-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)		
C 0 7 K	14/47	G 0 1 N	33/577	B	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00	Z N A A	
G 0 1 N	33/53		5/00	B	
	33/577	A 6 1 K	37/02		

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 トリエベル、フレデリック
フランス国、F - 78000ベルサイユ、リュ
ー・サン - ルイ、10

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA01 DA02
EA02 EA04 EA10 FA02 GA11
HA17
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 BA01 BA22 CA18 MA52
MA59 MA63 MA66 NA14 ZB262
4C085 AA14 BB01 BB11 CC23
4C087 AA01 CA12 NA14 ZB26
4H045 AA10 BA15 CA40 DA86 EA28
FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003503042A5	公开(公告)日	2008-04-03
申请号	JP2001506778	申请日	2000-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	古斯达威罗斯研究所		
申请(专利权)人(译)	研究所-Gyusutabu - Ruushii		
当前申请(专利权)人(译)	研究所-Gyusutabu - Ruushii		
[标]发明人	ロンザンクリストフ スコットペロニク トリエベルフレデリック		
发明人	ロンザン、クリストフ スコット、ペロニク トリエベル、フレデリック		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/76 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/47 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 C12N9/18 C12N2799/021 A61K39/00 A61K48/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/395.T A61P35/00 C07K14/47 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024 /EA10 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084 /CA18 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC23 4C087/AA01 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045 /AA10 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	1999008224 1999-06-28 FR		
其他公开文献	JP2003503042A		

摘要(译)

本发明涉及引起特异性T应答的肽化合物，其包含由iCE基因的移码序列编码的肽序列的至少8个连续氨基酸的序列。本发明还涉及包含该肽化合物的药物组合物，以及这些化合物在制备用于治疗癌症，特别是用于治疗实体瘤的药物中的用途。