

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5509185号
(P5509185)

(45) 発行日 平成26年6月4日(2014.6.4)

(24) 登録日 平成26年3月28日(2014.3.28)

(51) Int.Cl.	F I	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	Z N A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
請求項の数 16 外国語出願 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-270382 (P2011-270382)	(73) 特許権者	505289812
(22) 出願日	平成23年12月9日(2011.12.9)		スルヴァック・アンパルトセルスカブ
(62) 分割の表示	特願2005-518634 (P2005-518634)		S U R V A C A p S
原出願日	平成16年1月30日(2004.1.30)		デンマーク、デーコーー1826フレデリ
(65) 公開番号	特開2012-82213 (P2012-82213A)	(74) 代理人	100062144
(43) 公開日	平成24年4月26日(2012.4.26)		弁理士 青山 稜
審査請求日	平成24年1月5日(2012.1.5)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	10/354,090		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成15年1月30日(2003.1.30)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	10/715,417	(74) 代理人	100146259
(32) 優先日	平成15年11月19日(2003.11.19)		弁理士 橋本 諭志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100156155
			弁理士 水原 正弘
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 スルビピン誘導ペプチドおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インビトロおよび/またはインサイチュおよび/またはエクスビボアッセイで試験する場合に、少なくとも一つの以下の特性：

(i) ペプチドをペプチドトランスポーター欠損 T 2 細胞系にロードし、構造依存性抗体を用いて正しく折り畳まれた安定な M H C 重鎖を免疫沈降させ、免疫沈降物を I E F 電気泳動にかけ、そして、ペプチド結合を定量化することを含むアセンブリー結合アッセイにより測定すると最大 5 0 μ M である、クラス I H L A 分子を最大半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力 (C ₅₀ 値) で限定されるクラス I H L A 分子との結合能；

(i i) 癌患者の P B L 集団において E L I S P O T アッセイにより測定すると少なくとも 1 / 1 0 ⁴ P B L の頻度で I N F - 産生細胞を惹起する能力；および/または (i i i) 腫瘍組織におけるエピトープペプチドと反応する C T L のインサイチュ検出能を有する、スルビピンポリペプチドの M H C クラス I 限定ペプチドであって、配列 F T E L T L G E F (配列番号 3 6) を有するノナペプチドである、 M H C クラス I 限定ペプチド。

【請求項2】

スルビピンポリペプチドの2種またはそれ以上の M H C クラス I 限定エピトープペプチドの組合せを含む癌治療用医薬組成物であって、インビトロおよび/またはインサイチュおよび/またはエクスビボアッセイで試験する場合に、各々のペプチドが異なる H L A 特

異性を有し、少なくとも一つの以下の特性：

(i) ペプチドをペプチドトランスポーター欠損 T 2 細胞系にロードし、構造依存性抗体を用いて正しく折り畳まれた安定な M H C 重鎖を免疫沈降させ、免疫沈降物を I E F 電気泳動にかけ、そして、ペプチド結合を定量化することを含むアセンブリー結合アッセイにより測定すると最大 5 0 μ M である、クラス I H L A 分子を最大半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力 (C _{5 0} 値) で限定されるクラス I H L A 分子との結合能；

(i i) 癌患者の P B L 集団において E L I S P O T アッセイにより測定すると少なくとも 1 / 1 0 ⁴ P B L の頻度で I N F - 産生細胞を惹起する能力；および/または

(i i i) 腫瘍組織におけるエピトープペプチドと反応する C T L のインサイチュ検出能を有し、配列 L M L G E F L K L (配列番号 5) を有するノナペプチドと配列 F T E L T L G E F (配列番号 3 6) を有するノナペプチドとの組合せを含む、医薬組成物。

【請求項 3】

エピトープペプチドが癌患者の P B L 集団において I N F - 産生細胞を少なくとも 1 0 / 1 0 ⁴ P B L の頻度で惹起する能力を有する、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

エピトープペプチドが、スルビピンが発現される癌疾患を有する患者の P B L 集団において I N F - 産生細胞を惹起する能力を有する、請求項 2 または 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

癌疾患が、慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫、乳癌、頸癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌からなる群から選択される、請求項 4 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

翻訳後修飾されているエピトープペプチドを含む、請求項 2 ないし 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

リン酸化ペプチドを含む、請求項 2 ないし 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

スルビピントタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されないタンパク質またはペプチドフラグメントから選択される免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントをさらに含む、請求項 2 ないし 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

スルビピントタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが細胞アポトーシスの制御に関与するタンパク質またはそのペプチドフラグメントである、請求項 8 記載の医薬組成物。

【請求項 1 0】

スルビピントタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが B c 1 - 2 またはそのペプチドフラグメントである、請求項 8 または 9 記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

スルビピントタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが I A P タンパク質ファミリーのメンバーまたはそのペプチドフラグメントである、請求項 8 または 9 記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

該 I A P タンパク質ファミリーのメンバーが M L - I A P である、請求項 1 1 記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

スルビピントタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、

10

20

30

40

50

配列番号 78、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83、配列番号 84、および配列番号 85 からなる群より選択される、請求項 8、9、11 および 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

H L A クラス I および H L A クラス I I 限定エピトープを含む請求項 2 ないし 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

アジュバントを含む、請求項 2 ないし 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

P B L 中または腫瘍組織におけるスルピピン反応性 T 細胞の存在のエクスピボまたはインサイチュ診断のための、スルピピンポリペプチドの 2 種またはそれ以上の M H C クラス I 限定エピトープペプチドの組合せを含む医薬組成物であって、インビトロおよび/またはインサイチュおよび/またはエクスピボアッセイで試験する場合に、各々のペプチドが異なる H L A 特異性を有し、少なくとも一つの以下の特性：

(i) ペプチドをペプチドトランスポーター欠損 T 2 細胞系にロードし、構造依存性抗体を用いて正しく折り畳まれた安定な M H C 重鎖を免疫沈降させ、免疫沈降物を I E F 電気泳動にかけ、そして、ペプチド結合を定量化することを含むアセンブリー結合アッセイにより測定すると最大 50 μ M である、クラス I H L A 分子を最大半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力 (C_{50} 値) で限定されるクラス I H L A 分子との結合能；

(i i) 癌患者の P B L 集団において E L I S P O T アッセイにより測定すると少なくとも $1 / 10^4$ P B L の頻度で I N F - γ 産生細胞を惹起する能力；および/または

(i i i) 腫瘍組織におけるエピトープペプチドと反応する C T L のインサイチュ検出能を有し、配列 L M L G E F L K L (配列番号 5) を有するノナペプチドと配列 F T E L T L G E F (配列番号 36) を有するノナペプチドとの組合せを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明はスルピピン誘導ペプチドならび特に癌における診断および治療目的でのその使用に関する。特に、新規ペプチドは、インサイチュおよびエクスピボ応答をはじめとする、癌患者における細胞傷害性 T 細胞応答を惹起できる M H C クラス I 限定 T 細胞エピトープである。特に、かかる新規ペプチドは、認識されている腫瘍関連抗原 (T A A) であるアポトーシス阻害タンパク質スルピピンから誘導される。

【背景技術】

【0002】

(背景技術)

哺乳動物免疫系が外来または異質物質を認識し、これと反応するプロセスは複雑である。この系の重要なファクターは、T 細胞応答である。この応答は、T 細胞が、ヒト主要組織適合性複合体 (M H C) を構成するヒト白血球抗原 (H L A) と称する細胞表面分子、およびペプチドの複合体を認識し、これと相互作用することを必要とする。ペプチドは、H L A / M H C 分子を提示する細胞により処理されるさらに大きな分子から誘導される。T 細胞と H L A / ペプチド複合体の相互作用は限定され、H L A 分子とペプチドの特定の組み合わせについて特異的である T 細胞を必要とする。特異的 T 細胞が存在しないならば、そのパートナー複合体が存在するとしても T 細胞応答は存在しない。同様に、特異的複合体が存在しないならば、応答は存在しないが、T 細胞は存在する。

【0003】

T 細胞が細胞の異常を認識するメカニズムは癌においても関連する。例えば、W O 9 2 / 2 0 3 5 6 において、処理されてペプチドになり、これを次に細胞表面上で発現させて、特異的 C T L により腫瘍細胞の消散につながり得る遺伝子のファミリーが開示されてい

10

20

30

40

50

る。これらの遺伝子は、MAGEファミリーと呼ばれ、「腫瘍拒絶抗原前駆体」または「TRAP」分子をコードするとされ、これから誘導されるペプチドは「腫瘍拒絶抗原」または「TRA」と呼ばれる。

W094/05304において、HLA-A1分子と結合するノナペプチドが開示されている。該文献は、特定のHLA分子についての特定のペプチドの特異性がわかっているならば、特定のペプチドは1つのHLA分子と結合するが、他のものとは結合しないと予想される。これは、異なる個体は異なるHLA表現型を有するので明らかである。その結果、特定のペプチドが特異的HLA分子のパートナーであるということの検証は、診断および治療的効果があるが、これらは特定のHLA表現型を有する個体についてのみ顕著である。

10

【0004】

MHC分子により提示されるいくつかのペプチドが特徴づけられており、これらのいくつかはHLA-ペプチド複合体の機能におそらくは影響を及ぼし得る転写後修飾を有し得る。従って、多くの研究が、悪性形質転換に関するリン酸化のパターンにおける変化と関連する。さらに、リン酸化は、クラスI MHCに結合するペプチドに対して、中性、負または正の影響さえも及ぼし、ホスホペプチド特異性CTL(ペプチドのリン酸化と非リン酸化バージョンを区別)を生成することができ、このようなCTLは多分クラスI MHC限定CTLレパートリーの一部であることが示されている。最近、リン酸化ペプチドは実際に自然に処理され、インビボでMHCクラスI分子により提示されることが示されている。さらに、いくつかの異なるEBV-形質転換されたB-細胞から単離されたクラスI分子からの抽出物中のリン酸化ペプチドの存在が立証されている。

20

【0005】

従って、腫瘍関連抗原(TAA)から誘導されるペプチドエピトープはMHC分子との関連で細胞毒性Tリンパ球(CTL)により抗原として認識することができる(1)。しかしながら、全部でなくてもほとんどの腫瘍は抗原性であることが一般に認識されているが、腫瘍進行が免疫系により容易に制御されるという意味でごくわずかしは実際には免疫原性でない。

この限界を克服するために、例えばTAA-誘導ペプチドでのワクチン接種などいくつかの免疫治療試験が開始された。最大数のCTL規定TAAが特徴づけられている腫瘍である黒色腫に関して、抗原に対する強力なCTL応答がワクチン接種により惹起され、一部の患者は完全に疾患が寛解した(2,3)。しかしながら、これらのワクチン接種試験において用いられるほとんどのペプチドエピトープはメラニン細胞特異性であり、これらのペプチドは非メラニン細胞起源の腫瘍に適用できない。さらに、これらのTAAの発現は異なる患者から得られる腫瘍間で異質であり、ある患者からの転移間でさえも異なり得る。しかしながら、この数年で、多くの異なる癌において発現される多くの腫瘍特異性ペプチド抗原、すなわち、HER-2(4)、Muc-1(5)およびテロメラーゼ(6)が同定されている。

30

【0006】

適切な操作により、腫瘍中に存在する腫瘍抗原を免疫系に暴露することができることも示されている。研究により、免疫応答のCD8+CTLアームは、単独またはCD4+Th細胞との組み合わせにおいて、適応的免疫反応の主要な抗腫瘍エフェクターアームを構成することが示されている。これまで、免疫反応のCTLアームに主に焦点が当てられてきた。しかしながら、CD4+T細胞反応が腫瘍拒絶において、特に誘導期またはインビボでのCTL反応の延長において重要な役割を果たすことがますます明らかになってきている。従って、クラスII限定腫瘍抗原を有効な腫瘍ワクチン接種プロトコル中に組み入れることにより、ワクチンの有効性が増大し得る。

40

アポトーシスは細胞の自殺の遺伝子プログラムであり、アポトーシスの阻害は、形質転換突然変異の蓄積に有利な細胞のライフスパンを延長することにより、癌の形成に關与する重要なメカニズムであることが示唆されている(7)。スルビピンはアポトーシスタンパク質の阻害剤(IAP)のファミリーの最近同定されたメンバーである。約40000

50

00の転写物の世界的な遺伝子発現分析において、スルビピンは多くの種類の癌において常に増加調節されるが、正常組織においては増加調節されないトップ遺伝子の一つとして同定された。スルビピンを過剰発現する充実性悪性腫瘍は、肺、結腸、乳房、膵臓、および前立腺ならびに造血性悪性腫瘍を包含する(9)。さらに、一連の黒色腫および非黒色腫皮膚癌は常にスルビピン陽性であることが報告されている(10、11)。ほとんどのヒトの癌におけるスルビピンの過剰発現は、腫瘍進行におけるアポトーシス阻害の一般的役割を示唆し、これは結腸直腸および膀胱癌、ならびに神経芽種の場合において、スルビピンの発現は望ましくない予後と関連するという観察により実証される概念である。対照的に、スルビピンは正常な成人組織において検出不可能である。これらの特徴は、スルビピンを診断および治療目的の両方について適当なTAAとして適格とする。

10

【0007】

従って、この10年で、主要組織適合性複合体(MHC)に限定された方法でCTLにより認識される多くのTAAが同定された。スルビピンはほとんどのヒト癌において過剰発現され、その機能を阻害するとアポトーシスが增大するので、このタンパク質は治療CTL応答の標的としての働きをする。スルビピンタンパク質およびその有効な診断および治療的使用は、(8)および米国特許第6245523号に開示されており、これらは出典明示により本発明の一部として参照される。スルビピンは、1つのBIRおよび高度に荷電したカルボキシ末端コイル化領域をRINGフィンガーの代わりに含有する16.5kDa細胞質タンパク質であり、B細胞前駆体中に移された場合に、これは成長因子(IL-3)離脱により誘発されたアポトーシスを阻害する。スルビピンをコード化する遺伝子は、エフェクター細胞プロテアーゼレセプター-1(EPR-1)の配列とほぼ同一であるが、反対方向に配向し、このことは、相対した配置において複製された2つの別個の遺伝子の存在を示唆する。従って、スルビピンはアンチセンスEPR-1産物として記載することができる。機能的に、その天然のアンチセンスEPR-1転写物を増加調節することによりスルビピン発現を阻害すると、大規模なアポトーシスが起り、細胞成長が減少する。

20

【0008】

米国特許第6245523号は、精製されたスルビピンの単離を開示し、これはスルビピンタンパク質をコード化する核酸分子、ならびにスルビピンと結合する抗体および他の分子を提供する。米国特許第6245523号はまた、スルビピンタンパク質の抗アポトーシス的に活性なフラグメントおよびその変異体を開示し、ここにおいて、アミノ酸残基が開示されたスルビピン配列のN-またはC-末端または配列内に挿入されている。かかるペプチドはアポトーシスに必要とされる重要な機能的残基、すなわち、67位にTrp、73位にProおよび84位にCysを含有することが特に開示されている。

30

本発明は、MHCクラスI限定ペプチドが、スルビピンタンパク質から誘導できるという知見に基づき、これはMHCクラスIHLA分子と結合することができ、これにより広範囲におよぶ癌疾患にかかっている患者において、エクスピおよびインサイチュCTL免疫反応の両方を惹起する。これらの知見は、細胞により処理されて、TRA機能を有するペプチドになるTRAP分子としてスルビピンが作用することを強力に示唆する。明らかに、これらの知見は、スルビピンが腫瘍細胞により一般的に発現されるようであるという事実のために、一般的に癌疾患の抑制に適用可能である新規治療および診断法を可能にする。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第92/20356号パンフレット

【特許文献2】国際公開第94/05304号パンフレット

【特許文献3】米国特許第6245523号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

50

【0010】

(発明の開示)

従って、本発明はその第一の態様において、スルビピンから誘導されるMHCクラスI限定エピトープペプチドに関し、前記エピトープは以下の特徴の少なくとも1つを有する：

- (i)これがクラスI HLA分子の最大の半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力(C_{50} 値)(本明細書に記載するようなアセンブリー結合検定により測定すると最大50 μ Mである)で限定されるクラスI HLA分子と結合できる、
- (ii)癌患者のPBL集団においてELISPOTアッセイで測定すると少なくとも1/10⁴PBLの頻度でINF- γ 産生細胞を惹起できる、および/または
- (iii)エピトープペプチドと反応するCTLの腫瘍組織においてインサイチュ検出が可能である。

10

【0011】

好ましくは、本発明のペプチドはこれらの3つの特性のうち少なくとも2つ、最も好ましくは全てを有する。

本発明のさらに別の態様は、医薬組成物およびPBL中または腫瘍組織におけるスルビピン反応性細胞の癌患者における存在のエクスピボまたはインサイチュ診断のための組成物であって、前記定義のペプチドを含む組成物を提供する。

さらに別の態様において、本発明は、PBL中または腫瘍組織におけるスルビピン反応性T細胞の癌患者における存在のエクスピボまたはインサイチュ診断のための診断キットであって、本発明のペプチド、およびかかるペプチドとクラスI HLA分子またはかかる分子のフラグメントの複合体を含むキットに関する。

20

【0012】

もう一つ別の態様において、癌患者においてスルビピン反応性T細胞の存在を検出する方法であって、腫瘍組織または血液サンプルを前記定義の複合体と接触させ、該複合体の該組織または該血液細胞との結合を検出することを含む方法も提供される。

さらに別の態様において、本発明は、本発明のペプチド、例えば抗体またはそのフラグメント、およびかかる分子の結合をブロックできる分子と特異的に結合できる分子に関する。

本発明の重要な態様は、癌の治療用医薬を調製するための本発明のペプチドの使用に関する。さらに別の態様は、前記の組成物または分子の、癌の治療用医薬の調製のための使用に関する。

30

さらに別の態様は、独立して、哺乳動物、例えばヒトにおける癌を治療する方法であって、疾患にかかっている患者に有効量の本発明のペプチド、組成物または分子を投与することを含む方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】患者CLL1におけるELISPOTにおいて測定される、ペプチドなし、Sur1(LTLGEFLKL、配列番号10)ペプチドおよびSur9(ELTLGEFLKL、配列番号3)ペプチドに対するT細胞応答を示す。

40

【図2】ペプチドなし、ペプチド類似体Sur1L2(LLLGELFLKL、配列番号4)、およびペプチド類似体Sur1M2(LMLGEFLKL、配列番号5)に対する患者CLL1におけるELISPOTにおいて測定されるT細胞応答を示す。

【図3】ペプチドなし(黒)、Sur1(LTLGEFLKL、配列番号10)ペプチド(灰色)、Sur9(ELTLGEFLKL、配列番号3)ペプチド(白)、類似ペプチドSur1L2(LLLGELFLKL、配列番号4)(淡灰色)、および類似ペプチドSur1M2(LMLGEFLKL、配列番号5)(暗灰色)に対する患者CLL2およびCLL3におけるELISPOTにおいて測定される応答を示す。

【図4】インビトロで一度刺激し、ペプチドなし(黒)、ペプチドSur1(LTLGEFLKL、配列番号10)(灰色)およびSur9(ELTLGEFLKL、配列番号3

50

) (白)に対する応答についてのELISPOTアッセイにおいて分析された患者Me11、Me12、およびMe13からの腫瘍浸潤リンパ節から単離されたT細胞を表す。

【図5】スルビピン特異性CTLの機能的活性を示す。

【図6】乳ガン患者からのPBLにおけるスルビピン反応性CTLの頻度を示す。

【図7】スルビピン誘導ペプチドのHLA-35結合およびスルビピン誘導ペプチドによるHLA-B35分子のペプチドによる回復の分析である。

【図8】癌患者からのPBLにおいて観察される自発的T細胞応答を示す。A)患者CLL5 (10^5 細胞/ウェル)、HEM12 (10^5 細胞/ウェル)、およびHEM8 (5×10^4 細胞/ウェル)からのインピトロで刺激されたPBL中、ペプチド無し(白)、sur51-19(黒)またはsur46-54(灰色)を用いてELISPOTアッセイにおいて測定されたIFNスポット形成細胞の数。B)ペプチドパルス化成熟自己樹状細胞とともに10日間培養された、HEM12からの 1.7×10^5 PBL中のスポット形成細胞の数。

【図9】黒色腫患者における天然および修飾スルビピンペプチドに対する自発的T細胞応答を表す。A)PBL (4×10^3 細胞/ウェル)およびTIL (7×10^4 細胞/ウェル)中患者FM25からのsur51-59およびsur51Y9ならびにFM45 (10^4 細胞/ウェル)からのTILに対するELISPOTアッセイにおいて測定されるスポット形成細胞の数。

【図10】HLA-A1に対するスルビピン誘導ペプチドの結合親和力を示す。

【図11】HLA-A1限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図12】HLA-A11限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図13】HLA-A3限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図14】HLA-A2限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図15】ELISPOTアッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答を表す。

【図16】4人の患者(RW、KN、-WWE、GB)のワクチン治療後のLDH、コリンエステラーゼ、クレアチニン、ヘモグロビン、白血球および血小板の安定な検出の実験値を示す。

【図17】IFN ELISPOTアッセイにより評価されるスルビピンペプチドの免疫性の動態分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

(発明の詳細な記載)

本発明の新規MHCクラスI限定ペプチドは、いくつかの特徴のうちの少なくとも1つを有することにより特徴づけられ、その一つは、本明細書において記載されるようなアセンブリーアッセイにおいてクラスI HLA分子の最大の半分を回復することができるペプチドの量(C_{50} 値)により測定される場合、最大で $50 \mu M$ の親和力に限定されるクラスI HLA分子と結合できる能力である。このアセンブリーアッセイは、既に記載されているようにして行われ(12、13)、ペプチドをペプチドトランスポーター欠損細胞系T2にロードした後のHLA分子の安定化に基づく。その後、正しく折り畳まれた安定なHLA重鎖を、構造依存性抗体を用いて免疫沈降させ、ペプチド結合を定量化する。

このアッセイは、前記親和性で所定のHLA対立分子と結合するその能力について候補ペプチドをスクリーニングするための簡単な手段を提供する。好ましい具体例において、本発明のペプチドは、最高 $30 \mu M$ の C_{50} 値を有するもの、例えば、最高 $10 \mu M$ 、最高 $5 \mu M$ 、最高 $2 \mu M$ を包含する、最高 $20 \mu M$ である C_{50} 値を有するものである。

【0015】

前記のように、HLA系は、ヒト主要組織適合(MHC)系を表す。一般に、MHC系は一連の特徴:移植抗原、胸腺依存性免疫応答、ある種の相補因子およびある疾患の素因を制御する。さらに詳細には、MHCは、MHCのさらに一般的な特徴を決定する3種の異なる種類の分子、すなわち、クラスI、IIおよびIII分子をコード化する。これら

10

20

30

40

50

の分子のうち、クラス I 分子は、ほとんどの有核細胞および血小板の表面上に提示されるいわゆる H L A - A、H L A - B および H L A - C 分子である。

本発明のペプチドは、特定の M H C クラス H L A I 分子と結合する（限定される）その能力により特徴づけられる。従って、一具体例において、ペプチドは、H L A - A 1、H L A - A 2、H L A - A 3、H L A - A 9、H L A - A 1 0、H L A - A 1 1、H L A - A w 1 9、H L A - A 2 3 (9)、H L A - A 2 4 (9)、H L A - A 2 5 (1 0)、H L A - A 2 6 (1 0)、H L A - A 2 8、H L A - A 2 9 (w 1 9)、H L A - A 3 0 (w 1 9)、H L A - A 3 1 (w 1 9)、H L A - A 3 2 (w 1 9)、H L A - A w 3 3 (w 1 9)、H L A - A w 3 4 (1 0)、H L A - A w 3 6、H L A - A w 4 3、H L A - A w 6 6 (1 0)、H L A - A w 6 8 (2 8)、H L A - A 6 9 (2 8) をはじめとする M H C クラス I H L A - A 分子に限定されるものである。文書全体にわたってさらに簡単な記号表示も用いられ、ここにおいて、主に数字の標記、例えば H L A - A 1 9 または H L A - A 2 4 がそれぞれ H L A - A w 1 9 および H L A - A 2 4 (9) の代わりに使用される。特定の具体例において、本発明のペプチドは、H L A - A 1、H L A - A 2、H L A - A 3、H L A - A 1 1 および H L A - A 2 4 からなる群から選択される M H C クラス I H L A 種に限定される。

10

【 0 0 1 6 】

本発明のペプチドは、スルビピンの既知の配列、例えば米国特許第 6 2 4 5 5 2 3 号に開示されている配列から誘導される。特定の H L A 分子と結合する能力を潜在的に有するペプチドの選択は、特定の H L A 分子と結合する既知の配列の整列により行うことができ、これによりいくつかの関連するアミノ酸のペプチドにおける特定の位置での優位性が明らかになる。このような優勢アミノ酸残基は、本明細書において「アンカー残基」または「アンカー残基モチーフ」とも称する。アクセス可能なデータベースにおいて見いだすことができる既知の配列データに基づくこのような比較的簡単な手順にしたがって、ペプチドを特定の H L A 分子と結合しそうなスルビピタンパク質分子から誘導することができる。一連の H L A 分子についてのこのような分析の代表例を以下の表に示す：

20

【 0 0 1 7 】

【表 1 - 1】

HLA 対立遺伝子	1位	2位	3位	5位	6位	7位	C末端
HLA-A1		T, S	D, E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L, V
HLA-A3		L, V, M	F, Y				K, Y, F
HLA-A11		V, I, F, Y	M, L, F, Y , I				K, R
HLA-A23		I, Y					W, I
HLA-A24		Y		I, V	F		I, L, F
HLA-A25		M, A, T	I				W
HLA-A26	E, D	V, T, I, L , F			I, L, V		Y, F
HLA-A28	E, D	V, A, L					A, R
HLA-A29		E					Y, L
HLA-A30		Y, L, F, V					Y
HLA-A31			L, M, F, Y				R
HLA-A32		I, L					W
HLA-A33		Y, I, L, V					R
HLA-A34		V, L					R
HLA-A66	E, D	T, V					R, K
HLA-A68	E, D	T, V					R, K
HLA-A69		V, T, A					V, L
HLA-A74		T					V, L
HLA-B5		A, P	F, Y				I, L
HLA-B7		P					L, F
HLA-B8			K	K, R			L
HLA-B14		R, K					L, V
HLA-B15 (B62)		Q, L, K, P , H, V, I, M, S, T					F, Y, W
HLA-B17							L, V
HLA-B27		R					Y, K, F, L
HLA-B35		P					I, L, M , Y
HLA-B37		D, E					I, L, M
HLA-B38		H	D, E				F, L
HLA-B39		R, H					L, F
HLA-B40 (B60.6 1)		E	F, I, V				L, V, A, W , M, T, R
HLA-B42		L, P					Y, L
HLA-B44		E					F, Y, W

10

20

30

40

【表 1 - 2】

HLA-B46	M, I, L, V			Y, F	
HLA-B48	Q, K			L	
HLA-B51	A, P, G			F, Y, I, V	
HLA-B52	Q	F, Y		I, V	
HLA-B53	P			W, F, L	
HLA-B54	P				
HLA-B55	P			A, V	
HLA-B56	P			A, V	10
HLA-B57	A, T, S			F, W, Y	
HLA-B58	A, T, S			F, W, Y	
HLA-B67	P			L	
HLA-B73	R			P	
HLA-Cw1	A, L			L	
HLA-Cw2	A, L			F, Y	
HLA-Cw3	A, L			L, M	
HLA-Cw4	Y, P, F			L, M, F, Y	
HLA-Cw6	Y			L, Y, F, Y	20
HLA-Cw8	Y			L, I,	
HLA-Cw1	A, L			L, V	
6					

【 0 0 1 8】

このように、例として、HLA-A1と結合する能力を潜在的に有するノナペプチドは以下の配列のうちの一つを有する：Xaa-T-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y、Xaa-T-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y；Xaa-S-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-YまたはXaa-S-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y（Xaaは任意のアミノ酸残基を示す）。同様に、任意の他のHLA分子と結合する能力を潜在的に有する配列を設計することができる。

当業者は、所定のHLA分子のさらに別の「アンカー残基モチーフ」を同定することができるであろうと理解される。

従って、有用な具体例において、本発明のペプチドは、その配列が表中に示す特定のHLA対立遺伝子のそれぞれについて、表中に示すようなアミノ酸残基の任意のものを含むペプチドを包含する。

【 0 0 1 9】

従って、本発明のペプチドを同定するための簡単な方法は：特定のHLA分子、例えば所定の集団中に高い割合で存在するものを選択し、スルピピタンパク質において「アンカー残基モチーフ」を同定するために前記の様な配列分析を行い、1以上の同定されたアンカー残基を含む適当なサイズのペプチドを単離または構築し、得られるペプチドを(i)本明細書において既に記載したようなアセンブリーアッセイを用いて特定のHLA分子と結合する能力、(ii)本明細書において既に記載したようなELISPOTアッセイにより測定すると少なくとも1/10⁴PBLの頻度で癌患者のPBL集団においてINF-産生細胞を惹起するペプチドの能力、および/または(iii)試験されるエピートープペプチドと反応性である腫瘍組織CTLにおいてインサイチュで検出されるペプチドの能力について試験する工程を含む。

【 0 0 2 0】

特定の具体例において、本発明のペプチドは、次から選択される配列を有するHLA-

A 2 限定スルビピン誘導ペプチドである：FLKLDREERA (survivin₁₀₁₋₁₀₉) (配列番号1)、TLPPAWQPFL (スルビピン₅₋₁₄) (配列番号2)、ELTLGEFLKL (スルビピン₉₅₋₁₀₄) (配列番号3)、LLLGEFLKL (配列番号4) およびLMLGEFLKL (配列番号5)。(カッコ内の表示は、米国特許第6245523号に開示されているようなスルビピンにおける残基の位置を示す)。LLLGEFLKL (配列番号4) は、ペプチドの2位における「T」を「L」と置換することにより得られるスルビピン₉₆₋₁₀₄から誘導される配列であり、LMLGEFLKL (配列番号5) は、2位の「T」を「M」で置換することによりスルビピン₉₆₋₁₀₄から誘導される。

【0021】

さらに別の有用な具体例において、本発明のペプチドは、HLA-B5、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B12、HLA-B13、HLA-B14、HLA-B15、HLA-B16、HLA-B17、HLA-B18、HLA-B21、HLA-Bw22、HLA-B27、HLA-B35、HLA-B37、HLA-B38、HLA-B39、HLA-B40、HLA-Bw41、HLA-Bw42、HLA-B44、HLA-B45、HLA-Bw46およびHLA-Bw47の任意のものを包含するMHCクラスI HLA-B分子により限定されるペプチドである。特定の具体例において、本発明のペプチドが結合できるMHCクラスI HLA-B種は、HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27およびHLA-B51から選択される。

【0022】

特定の具体例において、本発明のペプチドは：CPTENEPDL (スルビピン₄₆₋₅₄) (配列番号6)、EPDLAQCF (スルビピン₅₁₋₅₉) (配列番号7)、CPTENEPDY (配列番号8) およびEPDLAQCFY (配列番号9) から選択される配列を有するHLA-B35限定スルビピン誘導ペプチドである(カッコ内の標記は米国特許第6245523号に開示されているスルビピンタンパク質における残基の位置を示す)。CPTENEPDY (配列番号8) はペプチドのC末端における「L」を「Y」で置換することによりスルビピン₄₆₋₅₄から誘導され、EPDLAQCFY (配列番号9) はC末端2における「F」残基を「Y」で置換することによりスルビピン₅₁₋₅₉から誘導される。

【0023】

さらに別の具体例において、本発明のペプチドは、スルビピン₃₈₋₄₆ (Sur38Y9) (P9でCがYに変化、MAEAGFIHY) (配列番号38)、スルビピン₄₇₋₅₆ (Sur47Y10) (P10でQがYに変化、PTENEPDLAY (配列番号39))、スルビピン₉₂₋₁₀₁ (Sur92-101) (QFEELTLGEF) (配列番号27)、およびスルビピン₉₃₋₁₀₁ (Sur93T2 (P2でEがYに変化、FTEELTLGEF (配列番号36))) から選択される配列を有するHLA-A1限定ペプチドである。本発明のペプチドは、HLA-A3限定ペプチド、例えば、スルビピン₁₈₋₂₄ (Sur18K10) (P10でFがKに変化、RISTFKNWPK (配列番号57) および/またはHLA-A11限定ペプチド、例えば、スルビピン₅₃₋₆₂ (Sur53-62) (DLAQCFCK) (配列番号45) および/またはHLA-A2限定ペプチド、例えば、スルビピン₁₈₋₂₈ (Sur18-28) (RISTFKNWPF) (配列番号66) であってもよい。

【0024】

さらに別の有用な具体例において、本発明のペプチドは、HLA-Cw1、HLA-Cw2、HLA-Cw3、HLA-Cw4、HLA-Cw5、HLA-Cw6、HLA-Cw7およびHLA-Cw16の任意のものを包含するMHCクラスI HLA-C分子に限定されるペプチドである。

好ましくは、本発明のペプチドは、50未満のアミノ酸残基、さらに好ましくは最高20のアミノ酸残基、例えば、最高10のアミノ酸残基を含む。特定の具体例において、ペ

10

20

30

40

50

プチドは、ヘプタペプチド、オクトペプチド、ノナペプチド、デカペプチドまたはウンデカペプチドである。

【0025】

本発明のペプチドは、前記のように、スルビピンタンパク質またはそのフラグメントから誘導される。そこからペプチドを誘導できるスルビピンタンパク質は、タンパク質が発現される任意の動物種からのスルビピンタンパク質である。好ましい具体例において、スルビピン出発タンパク質は、齧歯類、ウサギおよび霊長類、例えば人間をはじめとする哺乳動物種から得られる。選択されたスルビピンタンパク質の配列に基づいて、本発明のペプチドはスルビピン出発物質の任意の適当な化学処理または酵素処理により誘導され、その結果、前記のような適当なサイズのペプチドが得られるか、または当業者が精通している任意の慣用のペプチド合成法により合成することができる。

10

【0026】

本発明のペプチドは、誘導されるスルビピンタンパク質の天然の配列である配列を有し得る。しかしながら、所定のHLA分子に対してより高い親和性を有するペプチドは、例えば前記の手順に基づいた少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、欠失または付加により配列を修飾することにより、かかる天然の配列から誘導することができ、これにより所定のHLA分子に関する別のアンカー残基モチーフが同定される。

従って、スルビピン誘導ペプチドの免疫原性を増大させるための、アミノ酸置換をアンカー位置に導入することができるが、TCR接触残基では導入できず、HLAクラスI分子とのペプチドの結合が増大する。この結果、より免疫原性のエピトープが得られる。例えば、これは癌反応性CTLを誘発する能力を向上させ、臨床的に意義のあるCTL応答の誘発にさらに適当であることが示されている。しかしながら、重要なことには、標的癌細胞は細胞表面上で天然のスルビピン誘導ペプチドを発現し、提示するのみである。この点において、修飾されたスルビピン誘導ペプチドについて特異的な治療誘発CTLが天然の類似体と交差反応することは、非常に重要である。

20

【0027】

本発明はさらに、本明細書において開示されているスルビピン誘導ペプチドの変異体および機能的等価物も包含する。本発明に関連して用いられる場合、「機能的等価物」とは、問題の配列のあらかじめ決められたフラグメントの対応する官能基を参照することにより立証される。機能的等価物は、例えば、HLAクラスI分子との類似の結合親和力、またはELISPOA Tアッセイにより示される同様の効力により立証される。

30

本明細書に記載のスルビピン誘導ペプチドの機能的等価物および変異体は、挿入、欠失および同類置換を含む置換の数ならびに範囲が拡大した場合に、好ましい所定の配列と徐々に異なっているアミノ酸配列を示すものと理解されよう。この違いは好ましい所定の配列とスルビピン誘導変異体またはスルビピン誘導機能的等価物の間の相同性の減少として測定される。

アミノ酸配列間の相同性は、当該分野において周知のアルゴリズムを用いて計算することができる。連続したスルビピン誘導アミノ酸残基を含むかまたは該アミノ酸残基からなるフラグメントと相同性を共有するフラグメントは、あらかじめ決められたスルビピン誘導ペプチドと、好ましくは少なくとも約90%相同性、例えば少なくとも94%相同性(95%、96%、97%、98%または99%相同性を包含する)を有する場合に、本発明の範囲内に含まれると考えられる。

40

【0028】

さらに、本発明のペプチドの翻訳後修飾を行うことが有利である場合もある。乳ガンMCF-7または子宮頸癌HeLa細胞を、アドリアマイシン、タキソール、またはUVBをはじめとする抗ガン剤に暴露すると、スルビピンの発現が4~5倍増大することが判明した。抗ガン剤治療後のスルビピンレベルにおける変化は、スルビピンmRNA発現の調節を含まず、新規遺伝子転写と独立していた。反対に、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤フラボピリドールによるThr³⁴上のスルビピンリン酸化の阻害の結果、スルビピン発現が失われ、非リン酸化可能なスルビピンThr³⁴ Alaは野生型スルビピンと比べ

50

て加速されたクリアランスを示した。Th r^{3 4}上のスルビピンリン酸化の逐次除去は、p 5 3と独立して抗ガン剤により誘発される腫瘍細胞アポトーシスを向上させ、インビボでの乳ガン異種移植片モデルにおいて毒性なしに腫瘍増殖を抑制した。これらのデータは、Th r^{3 4}リン酸化は腫瘍細胞におけるスルビピンレベルを高度に制御し、p 3 4^{c d}c²キナーゼ活性の逐次除去はスルビピン生存性チェックポイントを除去し、腫瘍細胞におけるアポトーシスを向上させることができることを示唆する。

【0029】

従って、本発明のスルビピン誘導ペプチドはリン酸化ペプチドを含むと考えられる。天然のスルビピンホスホペプチド抗原は、リン酸化部位Th r 3 4のまわりのMHCペプチド結合モチーフの存在についてスキャンすることにより同定することができる。従って、
 10
 可能なスルビピン誘導ホスホペプチド配列は、T P E R M A E A G F、推定H L A - B 3 5 - および/またはH L A - B 7 7 - および/またはH L A - B 5 1 - 限定ペプチド抗原を包含する。本発明に含まれるさらなる天然のホスホペプチドは：H L A - A 2 : C A C T P E R M A およびC T P E R M A E A ; H L A - A 3 : F L E G C A T P ; H L A - B 7 / H L A - B 3 5 / H L A - B 5 1 : W P F L E G C A C T (リン酸化Th r 残基を太字でマークした)を包含する。

【0030】

本発明のペプチドの重要な特徴は、I N F - 産生レスポンドーT細胞、すなわち癌患者のP B L集団または腫瘍細胞(標的細胞)における特定のペプチドを特異的に認識する細胞毒性T細胞(C T L)を認識または惹起できることである。この活性は、患者から得られるP B Lまたは腫瘍細胞を文献(16)および以下の実施例において記載されているE L I S P O Tアッセイに付すことにより容易に決定される。アッセイ前に、分析されるP B L集団または腫瘍細胞を試験されるペプチドと接触させることにより刺激するのが有利である。好ましくは、ペプチドは本明細書において用いられるE L I S P O Tアッセイにより決定すると少なくとも1 / 1 0⁴ P B Lの頻度でI N F - 産生T細胞を惹起または認識できる。さらに好ましくは、頻度は少なくとも5 / 1 0⁴ P B Lであり、最も好ましくは少なくとも1 0 / 1 0⁴ P B L、たとえば少なくとも5 0または1 0 0 / 1 0⁴ P B Lである。
 20

【0031】

E L I S P O Tアッセイは、スルビピンペプチド特異性T細胞応答をモニターするための強力な手段の代表である。しかしながら、ほとんどの場合におけるE L I S P O T反応性は、標的細胞を溶解させるためのC L Lの能力と相関するが、この概念の決定的証拠は直接に得られるのみである。H L A / ペプチド複合体により単離されたスルビピン反応性細胞が標的細胞を溶解させる機能的能力を有することが示されるので、本発明においてこのような直接的証拠が得られる。さらに、本発明のペプチドを特異的に認識する単離されたC T Lは、例えば黒色腫および乳ガンなどの異なる起源のH L A適合腫瘍細胞を溶解させることができる。この知見は、癌細胞が一般に同じ内因性スルビピンペプチドを処理し、提示することを強く示唆する。従って、本発明における知見の主な意味することは、本発明のペプチドは異なる組織学的起源の様々な細胞上で発現され、H L A分子と複合体形成することである。このことにより、これらの癌細胞はC T Lによる破壊を受けやすくなり、異なる新生腫瘍の成長を制御するためのスルビピン免疫化の潜在的有用性が強調される。3種の関連しない癌、すなわち、乳ガン、黒色腫およびC L Lにかかっている患者から得られるH L A限定スルビピン誘導ペプチドエピトープに対するP B Lおよび腫瘍細胞における自発性C T L応答の存在は、さらにこの腫瘍抗原の普遍的免疫治療可能性を実証する。
 30
 40

【0032】

従って、別の好ましい具体例において、本発明のペプチドは、慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫、乳癌、頸癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌を包含する、スルビピンが発現される癌疾患を有する患者のP B L集団においてI N F - 産生細胞を惹起できる。特に、本発明のペプチドは、乳ガン細
 50

胞系 MCF-7 および 黒色腫細胞系 FM3 から選択される細胞系を包含する癌細胞系のスルビピン発現細胞に対して細胞傷害効果を有する T 細胞の形態において免疫応答を惹起できる。

PBL 集団およびガン細胞系において免疫応答を惹起するその能力に加えて、本発明のペプチドはインサイチュで、すなわち充実性腫瘍組織において細胞溶解性免疫応答を惹起できることが証明された。これは、例えばマルチマー化され、検出可能な標識を備えた HLA-ペプチド複合体を提供し、本発明のエピトープペプチドと反応性である腫瘍組織 CTL において検出するために免疫組織化学的染色のためにかかる複合体を使用することにより証明された。従って、本発明のペプチドのさらに別の重要な特徴は、これがエピトープペプチドと反応性である CTL の腫瘍組織においてインサイチュ検出が可能であること

10

【0033】

本発明のペプチドは、HLA 分子と結合し、その結果、細胞表面上の HLA およびペプチドの複合体であって、次に細胞毒性 T 細胞のエピトープまたは標的としての働きをする複合体を提示するその能力に加えて、他の種類の免疫応答、例えば B 細胞応答を惹起し、その結果、複合体に対する抗体の産生および/または遅延型過敏性 (DTH) 反応が生じると考えられる。後者のタイプの免疫応答は、本発明のペプチドの注射部位での赤みおよび触診可能な硬結として定義される。

異なる HLA 分子は、主なヒト集団において異なる有病率を有することはよく知られている。従って、本発明の方法にしたがって治療できる患者の集団を拡張するため、いくつかの HLA クラス I 分子に限定されたペプチドエピトープを同定するために要件が存在する。異なる HLA 制限エレメントを有する複数のスルビピンエピトープのキャラクタライゼーションにより、2 つの重要な方法でこの標的抗原の臨床的可能性が拡大される。すなわち、(i) スルビピン誘導ペプチドに基づく免疫療法に適した患者の数を増大させる。HLA-A2 抗原は、白人およびアジア人種の約 50% により発現され、HLA-A1 および HLA-A3 抗原はどちらも白人の 25% およびアジア人の 5% により発現され、一方、HLA-A11 抗原は白人の約 15% およびアジア人の 30% により発現される。これらの数は同時発現のために合計することができなくても、これらの多様性により限定されるペプチドの組み合わせはほとんどの癌患者を確実に包含する。(ii) 各患者におけるいくつかの制限エレメントの全体的ターゲティングは HLA-対立遺伝子損失による免疫回避の危険性を減少させるであろう。一つの HLA-対立遺伝子の損失は癌細胞により表される MHC 変更の重要な成分であり、クラス I 発現の全体的な損失は滅多に起こらない事象である。従って、異なる HLA 対立遺伝子に限定されるスルビピンエピトープの同定で、対立遺伝子重複を有する患者において 1 以上の HLA 分子を同時に標的とすることが可能である。

20

30

【0034】

従って、本発明の開示に基づいて、当業者は高度に免疫原性であるマルチエピトープワクチンを開発することができる。好ましくは、かかるワクチンは最もふさわしいスルビピン誘導ペプチドの、所望により以下に記載するような他の適当なペプチドおよび/またはアジュバントとの組み合わせにおける同時送達を促進するために設計するべきである。

40

さらに、既に記載されているように、腫瘍は一般にクラス II MHC を発現しないという事実にかかわらず、腫瘍特異性 T ヘルパー細胞免疫性の惹起、すなわち、クラス II-MHC 限定エピトープでのワクチン接種に対する関心が増大している。これは、多くの場合におけるワクチン誘発性抗腫瘍応答の誘発および有効性が腫瘍特異性 CD4 陽性 T_h 細胞の連携を必要とするという最近の知見に基づく。従って、さらに複雑な組成を有するワクチンの開発を行う重要な因子は、例えば慎重に選択された CTL および T_h 細胞エピトープの集合を含むかまたはコード化するワクチンを設計することにより複数の腫瘍抗原を標的にすることへの要望である。

【0035】

明らかに、多エピトープワクチンは、潜在的に有害なタンパク質、例えば癌タンパク質

50

の導入（遺伝子エンコーディング）を必要とせずに、いくつかの異なる抗原から誘導されるエピトープに対する免疫性を惹起する有効な方法を構成する。このようなワクチンはまた、亜優占種潜在的T細胞エピトープに対する免疫性の選択的誘発を可能にし、これは正常組織において顕著に提示されるエピトープに対して寛容性が存在する、腫瘍関連自己抗原の場合において特に重要である。さらに、抗原提示細胞のイムノプロテアソームとほとんどの腫瘍細胞において存在する「構成的」プロテアソーム間の機能的相違のために、腫瘍細胞上で発現されるある種のエピトープを提示できない可能性がある。ペプチドベースのワクチンの場合、このようなエピトープは、宿主抗原提示細胞による抗原摂取およびプロセッシングと独立した外因性ローディングによる提示を可能にする「MHC可能な」形態において投与することができる。

10

本発明の知見は、スルビピン誘導ペプチドの治療的ならびに診断的用途の基礎を提供することは明らかである。

従って、本発明の重要な態様は組成物に関する。

【0036】

従って、さらに別の態様において、本発明は、本発明の1以上のペプチドを単独または他のタンパク質またはペプチドフラグメントとの組み合わせにおいて含む医薬組成物を提供する。具体例において、このような他のタンパク質またはペプチドフラグメントは、細胞アポトーシスの制御に関連するタンパク質またはそのペプチドフラグメントを包含するが、これらに限定されるわけではない。このようなタンパク質の適当な例は、Bcl-2タンパク質ファミリー、例えばBcl-2タンパク質、Bcl-wタンパク質、Mcl-1タンパク質、Bcl-X_Lタンパク質、および該タンパク質の任意のものから誘導されるペプチドフラグメントから選択することができる。他の公知アポトーシス阻害剤としては、アポトーシスタンパク質の阻害剤（IAP）ファミリーのメンバー、例えばX-IAP、C-IAP1およびC-IAPが挙げられる。これらのタンパク質はすべて比較的偏在的に発現されるが、アポトーシスポリペプチドの阻害剤ML-IAPはかなり選択的な発現を有し、黒色腫において主に検出される。従って、特異的T細胞応答、すなわち細胞毒性T細胞応答またはヘルパーT細胞応答を惹起できるML-IAPのフラグメントは、所望により本発明の組成物中に含めることができる。ML-IAPの有用なペプチドフラグメントは、ML-IAP₂₄₅（RLQEERTCKV）（配列番号75）、ML-IAP₂₈₀（QLCPICRAV）（配列番号76）、ML-IAP₉₀（RLASFYDWPL）（配列番号77）、ML-IAP₁₅₄（LLRSKGRDFV）（配列番号78）、ML-IAP₂₃₀（VLEPPGARDV）（配列番号79）、ML-IAP₉₈（PLTAEVPPPEL）（配列番号80）、ML-IAP₃₄（SLGSPVLGL）（配列番号81）、ML-IAP₅₄（QILGQLRPL）（配列番号82）、ML-IAP₉₉（LTAEVPPPEL）（配列番号83）、ML-IAP₈₃（GMGSEELRL）（配列番号84）およびML-IAP₂₀₀（ELPTPRREV）（配列番号85）を包含する。

20

30

【0037】

さらに、本発明の組成物は、本明細書において既に定義されたクラスI限定エピトープおよび/またはクラスII限定エピトープを含むマルチエピトープワクチンとして提供することができる。

40

現在好ましいマルチエピトープワクチンの例としては、例えばHLA-A2、HLA-A3、およびHLA-B35表現型を有する患者などの所定の患者の組織タイプに依存するスルビピン誘導ペプチドエピトープの「オーダーメイド」組み合わせを含み、sur1M2、sur9、sur18K10、sur46Y9、sur51Y9を含むワクチンと共にワクチン接種することができる。さらに、本発明の医薬組成物は、少なくとも1種の、スルビピンタンパク質に属するか、またはこれから誘導されるタンパク質またはペプチドフラグメントから選択されるさらに別の免疫原性タンパク質またはそのペプチドフラグメントを含むのが有利である。特別な具体例において、免疫原性タンパク質またはそのペプチドフラグメントは、本明細書において既に記載したようなBcl-2タンパク質ファ

50

ミリーから誘導される。さらに別の免疫原性 B c l - 2 誘導ペプチドは、B c l₁₇₂、B c l₁₈₀、B c l₂₀₈、および B c l₂₁₄ から選択される配列を有する H L A - A 2 限定ペプチドである。

【0038】

本発明のペプチドは比較的小さな分子であるので、ワクチン、免疫原性組成物などを製造するために、このような組成物において様々な物質、例えばアジュバントとペプチドを組み合わせる必要がある場合もある。広義のアジュバントは、免疫応答を促進する物質である。しばしば、一般に好まれるアジュバントは、フロインドの完全または不完全アジュバント、または死菌ビー・ペルツシス (B . p e r t u s s i s) であって、例えば a l u m 沈降抗原との組み合わせにおいて用いられる。アジュバントの一般的議論は、G o d i n g、モノクローナル抗体 (M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s & P r a c t i c e (第 2 版、1986)、61 - 63 ページに記載されている。しかしながら、G o d i n g は、興味のある抗原が低分子量のものであるかまたは免疫原性が不十分である場合、免疫原性キャリアとのカップリングが推奨されると記載している。かかるキャリア分子の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミンおよびニワトリイムノグロブリンが挙げられる。様々なサポニン抽出物も免疫原性組成物におけるアジュバントとして有用であると示唆されている。最近、周知のサイトカインである顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) のアジュバントとしての使用が提案されている (W O 97 / 28816)。

【0039】

従って、本発明は、任意の前記のものまたはその組み合わせをはじめとする任意のアジュバント物質をさらに含む治療組成物を包含する。抗原、すなわち本発明のペプチドおよびアジュバントは任意の適当な順序で別々の投与することができると考えられる。

本発明の医薬組成物における抗原の選択は、当業者により決定できるパラメータに依存する。既に記載したように、本発明の異なるペプチドのそれぞれは、特定の H L A 分子により細胞表上に提示される。従って、治療される患者が H L A 表現型に関連して分類されるならば、特定の H L A 分子に結合することが知られているペプチドが選択される。

あるいは、興味のある抗原は所定の集団における様々な H L A 表現型の優勢に基づいて選択される。一例として、H L A - A 2 は白色人種集団における最も優勢な表現型であるので、H L A - A 2 と結合するスルビピン誘導ペプチドを含有する組成物はこの集団の大部分において活性であろう。しかしながら、本発明の組成物は、2 以上のスルビピン誘導ペプチドの組み合わせを含有し得、それぞれが異なる H L A 分子と特異的に相互作用して、標的集団の大部分におよぶ。従って、例として、医薬組成物は、例えば H L A - A 2 および H L A - B 35 などの標的集団における H L A 表現型の優勢に対応する H L A - A および H L A - B 分子を包含する、H L A - A 分子に限定されるペプチドと H L A - B 分子に限定されるペプチドの組み合わせを含有することができる。さらに、組成物は H L A - C 分子に限定されるペプチドを含むことができる。

【0040】

本発明の有用な免疫原性組成物は、本明細書において定義されるスルビピン誘導ペプチドに加えて、免疫学的に有効な量の本明細書において定義されるスルビピタンパク質またはその免疫原性フラグメントを含んでもよいと考えられる。

医薬組成物における本発明の免疫原性ペプチドの量は、特定の用途に応じて変わる。しかしながら、免疫原の単一量は好ましくは約 10 μg ~ 約 5000 μg、さらに好ましくは約 50 μg ~ 約 2500 μg、例えば約 100 μg ~ 約 1000 μg である。投与様式としては、皮内、皮下および静脈内投与、徐放性処方形態における埋め込みなどが挙げられる。当該分野において公知のありとあらゆる投与形態が本発明に含まれる。また、凍結乾燥形態および溶液、懸濁液またはエマルジョン形態 (所望により、慣用の医薬的に許容される担体、希釈剤、保存料、アジュバント、緩衝剤成分などを含んでもよい) などの注射可能な免疫原性ペプチド組成物の処方に適当であることが当該分野において知られている慣用の投与形態も含まれる。

【0041】

本発明の組成物の免疫保護効果は、いくつかの方法を用いて決定することができる。その例は、以下の実施例において記載される。免疫原性組成物により誘発されるCTL応答をどのようにして決定するかについてのさらに別の例は、前出のW097/28816に記載されている。有効な免疫応答は、免疫化および/またはワクチン組成物のペプチドを特異的に認識する抗体の検出後のDTH反応の発生によっても決定することができる。

好ましい具体例において、本発明の医薬組成物は、癌疾患に対する免疫応答を惹起できる免疫原性組成物またはワクチンである。本明細書において用いられる場合、「免疫原性組成物またはワクチン」なる表現は、癌細胞に対して少なくとも1種の免疫応答を惹起する組成物を意味する。従って、かかる免疫応答は前記のタイプの任意のものである：細胞溶解の原因である細胞表面上に提示されたHLA/ペプチド複合体を認識できるCTLが生成するCTL応答、すなわち、ワクチン接種された患者において癌細胞に対する細胞傷害効果を有するエフェクターT細胞の産生を惹起するワクチン；抗癌抗体を産生させるB細胞応答；および/またはDTHタイプの免疫応答。

【0042】

有用な具体例において、MHCクラスI分子を患者からの抗原提示細胞(APC)上にロードするか、患者からPBLを単離し、細胞を患者に注入により戻す前に細胞をペプチドとともにインキュベートするか、または患者から前駆体APCを単離し、細胞を患者に注入により戻す前にサイトカインおよび抗原を使用して細胞をプロフェッショナルAPCに分化させるかのいずれかにより、本発明のペプチドを投与することにより、癌疾患に対する免疫原性応答が惹起される。従って、本発明の一具体例において、癌患者を治療する方法は、エクスピボでペプチドを患者の抗原提示細胞(APC)に提示し、続いてこのように処理されたAPCを患者に注入により戻すことによりペプチドが投与されるものである。これを行うのに少なくとも2つの代替法がある。一つの代替法は、癌患者からAPCを単離し、MHCクラスI分子をペプチドとともにインキュベート(ロード)することである。MHCクラスI分子のローディングとは、APCをペプチドと共にインキュベートして、ペプチドに対して特異的なMHCクラスI分子を有するAPCがペプチドと結合し、その後、これを細胞に提示できることを意味する。その後、APCを患者に再注入する。もう一つの代替法は、樹状細胞生物学の分野においてなされた最近の発見に依存する。この場合において、単球(樹状細胞前駆体である)が患者から単離され、サイトカインおよび抗原の使用によりインビトロで分化されてプロフェッショナルAPCになる。これは、実施例3および5に記載され、ここにおいて、接着PBL(主に単球である)はGM-CSF、IL-4およびTNF- α と共にインビトロで培養される。その後、インビトロで生成したDCはペプチドでパルスされ、患者に注入される。

【0043】

スルビピンがほとんどの癌形態において発現されるらしいという事実により、本発明のワクチンを、スルビピンが発現される任意のタイプの癌疾患を制御するために提供することができる。従って、例として、本発明のワクチン組成物は、慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫、乳ガン、頸癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌に対して免疫学的に活性である。

前記載事項から、当業者は本発明のペプチドが癌診断手段として有用であり、特にペプチドがあらゆる種類の癌において発現されるスルビピンから誘導される場合に有用である。従って、本発明のペプチドは癌疾患について広く適用できる診断および予後判定法を開発するための基礎を提供する。他の有用な具体例において、本発明の組成物は、例えばPBL中または腫瘍組織におけるスルビピン反応性T細胞の検出に基づいた癌患者における存在のエクスピボまたはインサイチュ診断用組成物である。

【0044】

従って、さらに別の態様において、PBL中または腫瘍組織におけるスルビピン反応性T細胞の存在のエクスピボまたはインサイチュ診断用診断キットであって、1以上の本発明のペプチドを含む診断キット、および癌患者においてスルビピン反応性T細胞の存在を

10

20

30

40

50

検出する方法であって、腫瘍組織または血液サンプルを本発明のペプチドとクラス I H L A 分子またはかかる分子のフラグメントの複合体と接触させ、該複合体の該組織または該血液細胞との結合を検出することを含む方法が提供される。

もう一つ別の有用な診断または予後判定法は、異種動物種における抗体、例えばその後、ペプチドを提示する癌細胞の存在について診断するために使用できる本発明のヒトスルビピン誘導ペプチドに対するネズミ抗体の生成に基づく。このような免疫化の目的のために、ペプチドの量は例えば前記のようなインビボ療法の間用いられるものより少なくてもよい。一般に、好ましい用量は約 $1 \mu\text{g}$ ~ 約 $750 \mu\text{g}$ のペプチドの範囲である。本発明のペプチドでの免疫化に基づいてモノクローナル抗体を生成することもできる。従って、本発明は、本発明のペプチドと特異的に結合できる分子、特にモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体（そのフラグメントを包含する）、および、例えば本発明のペプチドに対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体に対して生成された抗体などの、かかる結合をブロックすることができる分子に関する。

【0045】

一態様において、本発明は、本発明のペプチドとクラス I H L A 分子またはかかる分子のフラグメントとの複合体を提供し、これは前記のように診断試薬として有用である。複合体は、次の実施例において記載されるようなものをはじめとする任意の慣用の手段により調製される。かかる複合体はモノマーであっても、マルチマーであってもよい。

本発明は、癌疾患を緩和または治療するための手段を提供する。従って、本発明のさらに別の態様は、癌の治療用医薬を調製するための前記定義のようなペプチドの使用である。本発明のさらに別の態様は、癌の治療用医薬を調製するための前記定義の分子または組成物の使用に関する。好ましくは、癌疾患は：慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫、乳ガン、子宮頸癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌を例として包含するスルビピンの発現と関連する。使用は、疾患にかかっている患者に有効量の本発明の医薬組成物、本発明のペプチドに特異的に結合できる分子および/またはかかる分子の結合をブロックできる分子を投与することを含む。

場合によっては、本発明の使用を放射線療法または化学療法などの慣用の癌治療法と組み合わせるのが適当である。

【0046】

本発明を以下の非制限的实施例および図においてさらに詳細に説明する。

図中、

図1は、患者 CLL 1 における ELISPOT において測定される、ペプチドなし、Sur 1 (L T L G E F L K L 、配列番号 10) ペプチドおよび Sur 9 (E L T L G E F L K L 、配列番号 3) ペプチドに対する T 細胞応答を示す。P B L を重複試験において 6×10^5 細胞/ウェルでプレートする前に一度ペプチドで刺激した。C C D スキャニング装置およびコンピューターシステムを用いてペプチドあたりのスポットの平均数を計算した。

図2は、ペプチドなし、ペプチド類似体 Sur 1 L 2 (L L L G E F L K L 、配列番号 4)、およびペプチド類似体 Sur 1 M 2 (L M L G E F L K L 、配列番号 5) に対する患者 CLL 1 における ELISPOT において測定される T 細胞応答を示す。P B L を重複試験において 10^4 細胞/ウェルでプレートする前に一度ペプチドで刺激した。C C D スキャニング装置およびコンピューターシステムを用いてペプチドあたりのスポットの平均数を計算した。

【0047】

図3は、ペプチドなし（黒）、Sur 1 (L T L G E F L K L 、配列番号 10) ペプチド（灰色）、Sur 9 (E L T L G E F L K L 、配列番号 3) ペプチド（白）、類似ペプチド Sur 1 L 2 (L L L G E F L K L 、配列番号 4)（淡灰色）、および類似ペプチド Sur 1 M 2 (L M L G E F L K L 、配列番号 5)（暗灰色）に対する患者 CLL 2 および CLL 3 における ELISPOT において測定される応答を示す。各実験は重複試験において 10^5 細胞/ウェルで行い、ペプチドあたりのスポットの平均数を計算した。

図4は、インビトロで一度刺激し、ペプチドなし(黒)、ペプチドSur1(LTLGEFLKL、配列番号10)(灰色)およびSur9(ELTLGEFLKL、配列番号3)(白)に対する応答についてのELISPOTアッセイにおいて分析された患者Mel1、Mel2、およびMel3からの腫瘍浸潤リンパ節から単離されたT細胞を表す。各実験は重複試験においてウェルあたり 10^5 細胞で行った。各実験において、ペプチドを添加していない2つのウェルも含めた。ペプチドあたりの平均数を各患者について計算した。

図5は、スルビピン特異性CTLの機能的活性を示す。スルビピンコートされた磁気ビーズを用いて黒色腫浸潤リンパ節からCTLを単離した。(A)黒色腫細胞系;HLA-A2陽性FM3(三角)およびHLA-A2陰性FM45(四角)の特異的溶解。(B)乳ガン細胞系;HLA-A2陽性MCF-7(三角)およびHLA-A2陰性BT-20(四角)の特異的溶解。

【0048】

図6は、乳ガン患者からのPBLにおけるスルビピン反応性CTLの頻度を示す。反応性をELISPOTにより3人の乳ガン患者(それぞれ上、中、下)において調べた。各患者について、アッセイをペプチドの不在下、sur1ペプチドの存在下、sur9の存在下、および修飾sur1M2ペプチドの存在下で行った。ウェルあたり 1×10^4 エフェクター細胞を使用した。グラフは、反応性細胞の定量化を表し;灰色の柱状グラフはIFN- γ 産生細胞の平均数を表す。

図7は、スルビピン誘導ペプチドのHLA-35結合およびスルビピン誘導ペプチドによるHLA-B35分子のペプチドによる回復の分析である。代謝的に標識されたT2-B35細胞の溶解産物を、50、5、0.5、0.05および0.005mMのペプチドの存在下、4でインキュベートした。HLA-35の回復をアセンブリーアッセイにおいて分析し、ImageGaugeホスホルイメージャーソフトウェア(富士写真フィルム株式会社、日本)を用いてIEF-ゲル電気泳動後に定量化した。 C_{50} 値はHLA-B35との最大結合の半分に必要なペプチドの濃度である。

図8は、癌患者からのPBLにおいて観察される自発的T細胞応答を示す。A)患者CLL5(10^5 細胞/ウェル)、HEM12(10^5 細胞/ウェル)、およびHEM8(5×10^4 細胞/ウェル)からのインビトロで刺激されたPBL中、ペプチド無し(白)、sur51-19(黒)またはsur46-54(灰色)を用いてELISPOTアッセイにおいて測定されたIFN- γ スポット形成細胞の数。B)ペプチドパルス化成熟自己樹状細胞とともに10日間培養された、HEM12からの 1.7×10^5 PBL中のスポット形成細胞の数。柱状グラフは2回の測定値の平均を表す。

【0049】

図9は、黒色腫患者における天然および修飾スルビピンペプチドに対する自発的T細胞応答を表す。A)PBL(4×10^3 細胞/ウェル)およびTIL(7×10^4 細胞/ウェル)中患者FM25からのsur51-59およびsur51Y9ならびにFM45(10^4 細胞/ウェル)からのTILに対するELISPOTアッセイにおいて測定されるスポット形成細胞の数。柱状グラフは非特異性IFN- γ 放出を差し引いた2回の測定値の平均を表す。

図10は、HLA-A1に対するスルビピン誘導ペプチドの結合親和力を示す。クラスI MHC重鎖はホスホルイメージャーで定量化した。安定化されたHLA-A1重鎖のマウントは、添加されたペプチドの結合親和力と直接関連する。40、4、0.4、0.04 μ MのSur93-101(線)、Sur93T2(四角)、Sur49-58(円)またはインフルエンザA、PB1591-599(三角)により誘発されるHLA-A1のペプチドによる回復(任意単位)。

図11は、HLA-A1限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。黒色腫患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBLまたはTIL中Sur92-101、Sur38Y9、Sur47Y10、およびSur93T2に反応して形成されるペプチド特異性IF

10

20

30

40

50

N スポットの平均数。示されるペプチド特異性応答は黒色腫 (Mel) 患者からの 6 PBL サンプルおよび 3 TIL サンプルの分析中観察された。非特異性 IFN スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

【0050】

図12はHLA-A11限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。癌患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBLまたはTIL中Sur53-62に反応して形成されるペプチド特異性IFN スポットの平均数。ペプチド特異性応答は、5人の黒色腫 (Mel) 患者 (5 PBL、1 TIL) および2人のCLL (CLL) 患者 (PBL) の分析において観察された。非特異性IFN スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

10

図13は、HLA-A3限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。黒色腫患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBLまたはTIL中Sur18LK10に反応して形成されるペプチド特異性IFN スポットの平均数。示されるペプチド特異性応答は、黒色腫 (Mel) 患者からの23 PBLサンプルおよび4 TILサンプルの分析中観察された。非特異性IFN スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

図14は、HLA-A2限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。癌患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBL中11merペプチド、Sur18-28に反応して形成されるペプチド特異性IFN スポットの平均数。示されるペプチド特異性応答は、2人の黒色腫 (Mel) 患者、6人のCLL (CLL) 患者、および2人の乳ガン (MC) 患者からの10 PBLサンプルの分析において観察された。非特異性IFN スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

20

【0051】

図15は、ELISPOTアッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答を表す。5人の黒色腫患者 (mel25、mel26、mel3、mel16、mel39)、2人のCLL患者 (CLL1、CLL54) および2人の乳ガン患者 (breast11、breast15) からの 10^5 インビトロ刺激PBL中sur6-14 (LPPAWQPFL) に反応して形成されたペプチド特異的IFN スポットの平均数。非特異的IFN スポットを差し引く。

30

図16は、4人の患者 (RW、KN、-WWE、GB) のワクチン治療後のLDH、コリンエステラーゼ、クレアチニン、ヘモグロビン、白血球および血小板の安定な検出の実験値を示す。

図17は、IFN ELISPOTアッセイにより評価されるスルビピンペプチドの免疫性の動態分析を示す。初回DCワクチン接種前およびその後3ヶ月にPBMCを得た。バックグラウンドを越えるIFN スポット形成細胞の数を図示する。

【0052】

次の表において、本発明において用いられるペプチドのアミノ酸配列およびそのそれぞれの配列番号を記載する：

【表 2 - 1】

配列番号	記号表示	配列
1	Sur6	FLKLDREERA
2	Sur8	TLPPAWQPFL
3	Sur9	ELTLGEFLKL
4	Sur1L2	LLLGEFLKL
5	Sur1M2	LMLGEFLKL
6	Sur 46-54	CPTENEPLD
7	Sur51-59	EPDLAQCFE
8	Sur46Y9	CPTENEPLD
9	sur51Y9	EPDLAQCFY
10	Sur1	LTLGEFLKL

【表 2 - 2】

11	C1	ILKEPVHGV
12	Sur2	RAIEQLAAM
13	Sur3	KVRRRAIEQL
14	Sur4	STFKNWPFL
15	Sur5	SVKKQFEEL
16	Sur7	TAKKVRRAI
17	Sur10	ETAKKVRRAI
18	Sur 6-14	LPPAWQPFL
19	Sur 11-19	QPFLKDHRI
20	Sur 34-43	TPERMAEAGF
21	C24	YPLHEQHQM
22	Sur14-22	LKDHRISTF
23	Sur38-46	MAEAGFIHC
24	Sur93-101	FEELTLGEF
25	Sur47-56	PTENEPDLAQ
26	Sur49-58	ENEPDLAQCF
27	Sur92-101	QFEELTLGEF
28	C1	VSDGGPNLY
29	sur14Y9	LKDHRISTY
30	sur93Y9	FEELTLGEY
31	sur92Y9	QFEELTLGEY
32	sur34Y9	TPERMAEAGY
33	sur49Y9	ENEPDLAQCY
34	Sur92T2	QTEELTLGEF
35	Sur92S2	QSEELTLGEF
36	Sur93T2	FTEELTLGEF
37	Sur93S2	FSEELTLGEF
38	Sur38Y9	MAEAGFIHY
39	Sur47Y10	PTENEPDLAY
40	Sur 5-13	TLPPAWQPF
41	Sur 53-61	DLAQCFFCF
42	Sur 54-62	LAQCFFCFK
43	Sur 95-103	ELTLGEFLK
44	Sur 112-120	KIAKETNNK
45	Sur 13-22	FLKDHRISTF
47	Sur 53-62	DLAQCFFCFK
50	Sur 103-112	KLDRERAKNK
51	Sur 112-121	KIAKETNNKK
52	Sur 113-122	IAKETNNKKK
53	C3	ILRGVAHK
54	Sur5K9	TLPPAWQPK
55	Sur53K9	DLAQCFFCK

10

20

30

40

【表 2 - 3】

56	Sur54L2	LLQCFFCFK
57	Sur13K9	FLKDHRISTK
58	Sur18K10	RISTFKNWPK
59	Sur113L2	ILKETNNKKK
60	SurEx3-A3-1	TIRRKNLRK
61	SurEx3-A3-2	PTIRRKNLRK
62	Sur2b-A3-1	RITREEHKK
63	C4	AVFDRKSDAK
64	C6	QPRAPIRPI
65	C7	RPPIFIRRL
66	Sur4-14	PTLPPAWQPFL
67	Sur18-28	RISTFKNWPFL
68	Sur54-64	LAQCFFCFKEL
69	Sur86-96	FLSVKKQFEEL
70	Sur88-98	SVKKQFEELTL
71	Sur103-113	KLDRERAKNKI
72	Ebv, BMLF1	GLCTLVAML
73	Hiv, Pol	ILKEPVHGV
74	インフルエンザA、核タンパク質 265-273	ILRGVVAHK

10

20

【実施例】

【0053】

実施例 1

癌患者におけるアポトーシス阻害タンパク質スルビピンに対する細胞毒性 T リンパ球応答の同定

概要

スルビピンから誘導される CTL エピトープを使用して、ELISPOT 分析により、慢性リンパ性白血病 (CLL) 患者からの末梢血および黒色腫患者からの腫瘍浸潤リンパ節におけるかかる抗原に対する特異的 T 細胞反応性を検討した。スルビピン誘導ペプチドエピトープに対する CTL 応答は、6 人の黒色腫患者のうちの 3 人、および 4 人の CLL 患者のうちの 3 人において検出された。6 人の健常対照からの PBL において T 細胞反応性は検出されなかった。従って、スルビピン誘導ペプチドは、抗ガン免疫療法の重要かつ広範囲に適用可能な標的としての働きをする。

30

はじめに

スルビピンタンパク質を、HLA-A*0201 (HLA-A2) 結合ペプチドモチーフの存在に関してスキャンし、首尾良く同定した後、ELISPOT アッセイにより白血病および黒色腫患者において特異的 T 細胞反応性について試験するためにペプチドを使用した。両患者において、2 つのスルビピン誘導ペプチドエピトープに対するコホート CTL 応答が検出され、一方、健常対照において T 細胞反応性は検出できなかった。これらのデータは、スルビピンが自己 T 細胞により認識される広範囲に発現された腫瘍抗原を代表することを示唆する。

40

【0054】

物質および方法

患者および健常対照

CLL と診断された 4 人の患者 (CLL 1 - 4 と表示) からの末梢静脈血サンプルおよび 6 人の健常者からの血液サンプルをヘパリン化試験管中に集めた。Lymphopre

50

p分離を用いてPBLを単離し、10%ジメチルスルホキシドを含むウシ胎仔血清(FCS)中凍結させた。さらに、腫瘍浸潤リンパ節からのリンパ球を6人の黒色腫患者(mel11-6と表示)から得た。新たに切除されたリンパ節を細かく刻んで小片にし、粉碎して細胞を培養物中に放出させ、低温保存した。PBLは黒色腫患者のうち4人から得られた。包含される全ての個体は、HLA-A2特異的抗体BB7.2を用いたFACS分析により決定されるようにHLA-A2陽性であった。抗体をハイブリドーマ上清から精製した。州立大学病院(Herlev、デンマーク)から患者サンプルを入手した。これらの測定の前に患者からインフォームドコンセントを得た。

【0055】

スルビピン誘導ペプチド

全てのペプチドは、Research Genetics(ハンツビル、AL、USA)から入手し、HPLCおよびMC分析により実証されるように>90%の純度で提供された。使用したペプチドを表1に記載する。

【表3】

表1 この実験において調査したペプチドおよびそのHLA-A2との結合親和力

名称	タンパク質 ^a	配列	配列番号	C ₅₀ (μM) ^b
C1	HIV-1 pol ₄₇₆₋₄₈	ILKEPVHGV	11	0.7
Sur1	Survivin ₉₆₋₁₀₄	LTLGEFLKL	10	>100
Sur2	Survivin ₁₃₃₋₁₄₁	RAIEQLAAM	12	結合無し
Sur3	Survivin ₁₃₀₋₁₃₈	KVRRRAIEQL	13	>100
Sur4	Survivin ₂₀₋₂₈	STFKNWPFL	14	結合無し
Sur5	Survivin ₈₈₋₉₆	SVKKQFEEL	15	Not binding
Sur6	Survivin ₁₀₁₋₁₀₉	FLKLDRELA	1	30
Sur7	Survivin ₁₂₇₋₁₃₅	TAKKVRRAI	16	結合無し
Sur8	Survivin ₅₋₁₄	TLPPAWQPF	2	30
Sur9	Survivin ₉₅₋₁₀₄	ELTLGEFLK	3	10
Sur10	Survivin ₁₂₆₋₁₃₅	ETAKKVRRAI	17	結合無し
Sur1L2		LLLGEFLKL	4	1
Sur1M2		LMLGEFLKL	5	1

a 下付き文字で示した値の範囲は、米国特許第6245523号に開示されるようなスルビピン配列におけるペプチドの位置を示す。

b C₅₀値は、以下に記載するようにして決定されるHLA-A2との最大結合の半分に必要なペプチドの濃度である。

【0056】

クラスI MHC分子とのペプチド結合についてのアセンブリーアッセイ

合成ペプチドの[35S]メチオニンで代謝的に標識されたクラスI MHC分子に対する結合についてのアセンブリーアッセイを記載されているようにして行った(12、13)。アセンブリーアッセイは、ペプチドをペプチドトランスポーター欠損細胞系T2にロードした後のクラスI分子の安定化に基づく。その後、構造依存性抗体を用いて適切に折り畳まれた安定HMC重鎖を免疫沈降させた。IEF電気泳動後、ゲルをホスホルイメージャースクリーンに暴露し、Imagequantホスホルイメージャープログラム(Molecular Dynamics、サニーベール、CA)を用いてペプチド結合を定量化した。

【0057】

PBLの抗原刺激

ELISPOTアッセイの感度を拡大するために、分析前にPBLを一度インビトロで刺激した(14、15)。新しい、あらかじめ凍結させたPBLによりELISPOTアッセイにおいて同様の結果が得られた。0日に、PBLまたは粉碎されたリンパ節を解凍し、AIM V培地(Life Technologiew、ロスキレ、デンマーク)、5%熱不活化ヒト血清および2mMのL-グルタミン中、10 μ Mのペプチドの存在下で24穴プレート(Nunc、デンマーク)中、2 \times 10⁶細胞の濃度で2ml/ウェルでプレートした。各実験において、ペプチドを含まないウェルを含めた。2日後、300IU/mlの組み換えインターロイキン-2(IL-2)(Chiron、ラーティンゲン、ドイツ)を培養物に添加した。培養された細胞を12日にELISPOTアッセイにおいて反応性について試験した。

10

【0058】

ELISPOTアッセイ

ペプチドエピトープ特異性インターフェロン- γ 放出エフェクター細胞を定量化するために用いられるELISPOTアッセイを(16)におけるのと同様に行った。簡単に説明すると、ニトロセルロース底の96穴プレート(MultiScreen MAIP N45、Millipore、Hedehusene、デンマーク)を抗INF- γ 抗体(1-D1K、Mabtech、Nacka、スウェーデン)でコートした。ウェルをAIM V培地により洗浄し、ブロックし、細胞を異なる細胞濃度で重複試験において添加した。ペプチドを次いで各ウェルに添加し、プレートを一夜インキュベートした。翌日、培地を捨て、ビオチニル化二次抗体(7-B6-1-Biotin、Mabtech)の添加の前にウェルを洗浄した。プレートを2時間インキュベートし、洗浄し、アビジン-酵素接合体(AP-Avidin、Calbiochem、Life Technologies)を各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、酵素基質NBT/BCIP(Gibco、Life Technologies)を各ウェルに添加し、室温で5~10分間インキュベートした。暗紫色スポットが出現したら水道水で洗浄することにより反応を停止させた。AlphaImager System(Alpha Innotech、サンリアンドロ、CA、USA)を用いてスポットをカウントし、ペプチド特異性CTL頻度をスポット形成細胞の数から計算することができた。アッセイはすべて各ペプチド抗原について重複試験で行った。

20

30

【0059】

結果

HLA-A2に対するスルビピン誘導ペプチドの結合

主HLA-A2特異性アンカー残基(17)を用いて、スルビピタンパク質のアミノ酸配列を最もありそうなHLA-A2ノナマーおよびデカマーペプチドエピトープについてスクリーンした。10のスルビピン誘導ペプチドを合成し、HLA-A2に対する結合について調べた。HIV-1pol476-484(ILKEPVHGV、配列番号11)(表1)からのエピトープを正の対照として使用した。クラスI MHCの最大回復の半分に必要なペプチド濃度(C₅₀値)は正の対照について0.7 μ Mであった。対照的に、Sur9と表されるペプチド(ELTLGEFLKLL、配列番号3)はC₅₀=10 μ Mの親和力で結合した。Sur6(FLKLDREERA、配列番号1)およびSur8(TLPPAWQPFL、配列番号2)と表されるペプチドはそれぞれHLA-A2とC₅₀=30 μ Mで結合するが、Sur1(LTLGEFLKLL、配列番号10)およびSur3(KVRRRAIEQL、配列番号13)はさらに弱く結合した(C₅₀>100 μ M)。試験した10のペプチドのうち5つ(Sur2、Sur4、Sur5、Sur7、およびSur10)はHLA-A2と結合しなかった。

40

Sur1は弱いHLA-A2バインダーであるので、より良好なアンカー残基(ロイシンまたはメチオニン)が2位で天然のスレオニンと置換されているSur1L2およびSur1M2でそれぞれ表される2種のペプチド類似体を合成した。これらのペプチドはど

50

ちらも正の対照とほとんど同様の高さの親和力でHLA - A 2と結合する ($C_{50} = 1 \mu M$)。

【0060】

CLL患者におけるスルビピンに対するCTL応答

5人のHLA - A 2陽性CLL患者からのPBLをELISPOTアッセイにおける実験の前に一度インビトロで刺激した。この手続きは、ELISPOTの感度を拡大するために選択された。前記10種のスルビピン誘導ペプチドの全てを実験の第一ラインに含めた。Sur 1およびSur 9に対する応答が検出され、これらのペプチドのデータのみを図に示す。図1は、患者CLL 1において決定されるSur 1およびSur 9に対するCTL反応性を示す。各スポットは、ペプチド反応性INF - 産生細胞を表す。ペプチドあたりのスポットの平均数を、CDDスキャニング装置およびコンピューターシステムを用いて計算した。 6×10^5 あたり52のSur 9ペプチド特異性スポット(ペプチドが添加されていないスポットを差し引いた後)がCLL 1患者において検出された(図1)。弱HLA - A 2結合ペプチドSur 1に対して反応は検出されなかったが、患者は強HLA - A 2結合ペプチド類似体Sur 1 M 2に対して強力に反応した(10^4 細胞あたり35のペプチド特異性スポット)(図2)。この患者において他の強HLA - A 2結合ペプチド類似体Sur 1 L 2に対して反応は検出されなかった。患者CLL 2はSur 9に対して強力に反応し(10^5 細胞あたり128のペプチド特異性スポット)、Sur 1に対しては弱く反応した(10^5 細胞あたり22のペプチド特異性スポット)(図3)。Sur 1 L 2類似体に対する応答は、天然のエピトープと比較して若干増大しただけであったが、患者はデカマーペプチドSur 9に関してはSur 1 M 2ペプチドに対して同様に強力に応答した。患者CLL 3において、Sur 9に対する弱い応答が観察された(図3)。Sur 1または修飾Sur 1ペプチドに対して該患者においてはスルビピン応答は観察されなかった(データは省略)。スルビピンに対する応答が健康な個人において検出できるかどうかを調べるために、6人の健康なHLA - A 2陽性対照からのPBLを分析した。どの対照においても任意のスルビピン誘導ペプチドに対する応答は観察されなかった。

【0061】

黒色腫患者におけるスルビピンに対するCTL応答

HLA - A 2陽性黒色腫患者からの腫瘍浸潤リンパ節から単離されたTリンパ球を試験した。新たに切除されたリンパ節を細かく刻んで小フラグメントにし、粉碎して、細胞を培養物中に放出させた。細胞をELISPOTアッセイにおける試験前に一度インビトロでペプチドで刺激した。スルビピン特異性T細胞は分析した6人の患者のうち3人において検出された。患者Me 1 2およびMe 1 3において強力なSur 9応答が検出された。Sur 1ペプチドに対するより弱い応答もこれらの患者において検出された(図4)。Me 1 1において、弱く結合したペプチドSur 1に対する応答は、より強力なHLA - A 2バインダーSur 9に対する応答よりも強力であった(図4)。先の3人の黒色腫患者(Me 1 4 ~ 6)からの腫瘍浸潤リンパ節において応答は検出されなかった。スルビピン反応性患者の2人(Me 1 1およびMe 1 2)から、および非反応患者の2人(Me 1 4およびMe 1 5)からのPBLを試験した。これらの患者のいずれかからのPBLにおいてSur 9またはSur 1のいずれかに対する応答は検出できなかった(データは省略)。

【0062】

実施例 2

癌患者におけるインビボおよびエクスピボのスルビピン誘導MHCクラスI限定T細胞エピトープに対する自発性細胞毒性T細胞応答

概要

スルビピン誘導MHCクラスI限定T細胞エピトープに対する自発性細胞毒性T細胞応答は、乳ガン、白血病、および黒色腫患者においてインサイチュならびにエクスピボで示された。さらに、MHC / ペプチド複合体でコートされた磁気ビーズにより単離されたス

10

20

30

40

50

ルビピン反応性T細胞は、異なる組織タイプのHLA適合腫瘍に対して細胞毒性であった。普遍的腫瘍抗原であるので、スルビピンは抗ガン免疫療法の広範囲に適用可能な標的としての働きをすることができる。

【0063】

材料および方法

T細胞染色およびT細胞選別のためのHLAペプチド複合体の構築

HLA A*0201の細胞外ドメイン(残基1~275)の5'末端との融合物においてビオチンタンパク質リガーゼ(BirA)を用いた酵素ビオチニル化の認識部位は、イー・コリBL21(DE3)において発現された。組み換えタンパク質を、8M尿素中可溶化させた封入体から、サイズ(Sephadex G25, Pharmacia)およびイオン交換(mono-Q, Pharmacia)クロマトグラフィーにより精製した。修飾スルビピンペプチドSur1M2(LMLGEFLKL、配列番号5)またはMAAペプチドgp100154-163の存在下で希釈によりHLA A*0201をインピットで折り畳み、その後、既に記載されているようにしてビオチニル化した(35、36)。Pharmacia Sephadex G25カラム上でゲル濾過して未結合ビオチンを除去した後、タンパク質をストレプトアビジン-FITC接合デキストラン分子(L. Winther (DAKO、デンマーク)の好意により提供された)でマルチマー化して、免疫組織化学用多価HLA-デキストラン化合物を生成させた。HLA A*0201構築物はMark M. Davis博士(スタンフォード大学微生物学および免疫学科(パロ・アルト、CA)の好意により贈呈された。細胞分離は、既に記載されているようにして行った(37)。簡単に説明すると、 5×10^6 ストレプトアビジン接合磁気ビーズ(Dynal、オスロ、ノルウェー)を2回200 μ lの冷PBS中で洗浄し、0.5 μ gのペプチド/A*0201モノマーを添加し、混合物を15分間室温でインキュベートした。2回洗浄した後、これらのビーズをPBLと1:10の割合で混合し、その後、1時間インキュベートし、続いて磁場中ビーズ結合細胞を沈降させた。沈降工程を1回繰り返した。

【0064】

免疫組織化学的染色

FITC接合マルチマーペプチド/MHC複合体で染色するために、組織片を一夜乾燥し、その後冷アセトン中5分間固定した。全てのインキュベーション工程は室温、暗所で:(i)一次抗体(1:100希釈)を45分、(ii)Cys3-接合ヤギ抗マウス(1:500希釈;コード115-165-100、Jackson ImmunoResearch、Dianova(ハンブルグ、ドイツ)から入手)を45分間、および(iii)最後にマルチマーを75分間で行った。各工程間にスライドを10分間PBS/BSA0.1%中で2回洗浄した。スライドをベクタシールド中でマウントし、共焦点顕微鏡下で観察するまで冷蔵庫中で保存した。

【0065】

細胞毒性アッセイ

CTLによる細胞毒性の慣用の[51Cr]アッセイを(13)に記載されているようにして行った。標的細胞は自己EBV-形質転換B細胞系、HLA-A2陽性乳ガン細胞系MCF-7(ATCCで入手可能)、HLA-A2陽性黒色腫細胞系FM3(38)、HLA-A2陰性乳ガン細胞系BT-20(ATCCで入手可能)およびHLA-A2陰性黒色腫細胞系FM45(38)であった。全てのガン細胞系はRT-PCRにより調べるとスルビピンを発現した(データは省略)。

【0066】

ELISPOTアッセイ

ペプチドエピトープ特異性IFN- γ 放出エフェクター細胞を定量化するためにELISPOTアッセイを使用し、これはすでに記載されている(39)。簡単に説明すると、ニトロセルロース底の96穴プレート(MultiScreen MAIP N45、Millipore)を抗IFN- γ 抗体(1-D1K、Mabtech、スウェーデン)

10

20

30

40

50

でコートし、AIM V (Gibco BRL、Life Technologies Inc.、ガイサズバーグ、MD、USA)を用いて非特異性結合をブロックした。リンパ球を異なる細胞濃度で、特異性ペプチドおよびT2細胞と共に添加し、一夜37℃でインキュベートした。2回洗浄後、ビオチニル化検出抗体(7-B6-1-ビオチン、Mabtech)を添加した。アルカリホスファターゼ-アビジンをそれぞれの基質(Gibco BRL)と共に用いて特異性結合を可視化した。暗紫色スポットが出現したら反応を停止させ、AlphaImager System(Alpha Innotech、サンリアンドロ、CA、USA)を用いてこれを定量化した。ELISPOTに使用したペプチドは、実施例1に記載されるようなSur1、Sur9およびSur1類似ペプチドSur1M2であった。

10

【0067】

結果

HLA-A2/スルビピン反応性T細胞のインサイチュ染色

実施例1において、白血病および黒色腫におけるT細胞により認識される2種のスルビピン誘導ペプチドエピトープ、すなわちSur1が同定された。HLA-A2に対するSur1の弱い結合親和力は、2位のスレオニンをさらに良好なアンカー残基(メチオニン; Sur1M2)で置換することにより実質的に向上された。この測定は、安定なHLA-A2/ペプチド複合体の構築を可能にする。これらの複合体は、デキストラン分子を用いてマルチマー化され、これをストレプトアビジンおよびFITCと接合させた。マルチマー化されたMHC-複合体を、アセトン固定された凍結物質を染色するために使用した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Sur1M2/HLA-A*0201反応性CTLは腫瘍微小環境においてインサイチュで容易に検出することができた。本発明者らは、一次腫瘍およびIII期の黒色腫患者の症徴リンパ節ならびに一次乳ガン病巣においてかかる細胞を表した。染色の特異性を確実にするために、一連の負の対照を行った。ペプチド/HLA-デキストランマルチマーと同じ腫瘍上の黒色腫分化抗原gp100から誘導されるペプチドの使用も、Sur1M2/HLA-デキストランマルチマーの使用も、HLA-A2陰性ドナーから得られる腫瘍サンプルの場合、陽性染色をもたらさなかった。

20

【0068】

単離されたスルビピン反応性CTLは異なる起源の腫瘍細胞系を溶解する

スルビピン反応性CTLの機能的容量を特徴づけるために、HLA-A2/Sur1M2-複合体(36)でコートされた磁気ビーズによりこれらの細胞を単離した。新たに切除された黒色腫浸潤リンパ節を細かく刻んで小フラグメントにし、粉碎して、細胞を培養物中に放出させた。細胞を単離前にインビトロでペプチドで一度刺激した。単離後1日、IL-2を添加し、5日でこれらの細胞が腫瘍細胞を殺す能力をELISPOTまたは標準的51Cr放出アッセイのいずれかにより試験した。まず、ELISPOT分析により、修飾Sur1M2/HLA-A2複合体を用いて単離されたCTLが天然のSur1ペプチドに対しても応答することを立証することができた(データは省略)。第二に、HLA-A2陽性黒色腫細胞系FM3(図5A)およびHLA-A2陽性乳ガン細胞系MCF-7(図5B)に対するスルビピン反応性の細胞毒性を試験した。単離されたT細胞は、両HLA-A*0201細胞系を有効に溶解させた。対照的に、HLA-A2陰性黒色腫細胞系FM45(図5A)またはHLA-A2陰性乳ガン細胞系BT-20(図5B)に対して細胞毒性は観察されなかった。

30

40

【0069】

ELISPOTによりPBLにおいて測定されるスルビピン反応性

10人のHLA-A2陽性乳ガン患者からのスルビピン反応性T細胞の存在をELISPOTにより試験した。分析前に、PBLを一度インビトロで刺激して、アッセイの感度を拡大した。次のスルビピンペプチド: Sur1、Sur9およびSur1M2に対する反応性を試験した。スルビピン特異性T細胞は10人のHLA-A2陽性乳ガン患者のうちの6人において検出された。代表例を図6に示す。2人の患者からのPBLにおいて、Sur1および修飾された類似体Sur1M2に対してであるが、Sur9(図6、上、

50

中) に対しては反応が検出され、3人の患者において、Sur9に対する反応が検出されたが、Sur1またはSur1M2に対しては検出されず(図6、下)、1人の患者がSur1M2にのみ反応した。対照的に、20人の健康なHLA-A2陽性ドナーからのPBLにおいてはスルビピン反応は検出されなかった。同様に、14人のHLA-A2陽性黒色腫患者からのPBLを試験した。スルビピン反応はこれらの患者のうち7人において存在した(表2)。2人の患者がSur9ペプチドに対して反応し、2人がSur1M2ペプチドに対して反応し、1人がSur1とSurM2の両方に対して反応し、1人が3つのペプチド全てに対して反応した。実施例1において、3人の慢性リンパ性白血病(CLL)患者におけるスルビピンに対するT細胞反応を試験した(表2: CLL1、CLL2、CLL3)。3人のさらに別のCLL患者からのPBLを使用してこれらの実験をさらに拡大した。明らかに、全ての患者は少なくとも1つのスルビピンエピトープに対してT細胞反応をもたらした(表2; CLL5、CLL6、CLL7)。加えて、慢性骨髄性白血病(CML)にかかっている1人の患者からのPBLを試験した。この患者において、3つのペプチド全てに対する反応が同定された(データは省略)。データを表2にまとめる。

【0070】

【表4】

表2 ELISPOTにより測定されるPBLにおけるスルビピンペプチド特異性Tリンパ球を有する患者

黒色腫a)			
患者	Sur1	Sur9	Sur1M2
P4	-	-	97
P11	-	-	112
P13	-	-	71
P15	61	-	101
P17	-	172	-
P39	-	127	-
P64	112	70	128
乳ガンb)			
患者	Sur1	Sur9	Sur1M2
B1	122	-	208
B2	67	-	72
B3	-	54	-
B4	-	45	-
B5	-	19	-
B6	-	-	24
CLL c)			
患者	Sur1	Sur9	Sur1M2
CLL1	-	27	320
CLL2	-	39	-
CLL3	23	127	122
CLL5	-	100	124
CLL6	-	121	360
CLL7	68	132	174

a) 10^4 あたりの反応性細胞の出現率; 14人の患者を試験した。

b) 10^4 あたりの反応性細胞の出現率; 10人の患者を試験した。

c) 10^5 あたりの反応性細胞の出現率; 7人の患者を試験した。

【0071】

実施例3

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA-B35限定免疫応答 概要

この実験において、HLA-B35に限定される2種のスルビピン誘導エピトープを同定し、特徴づけた。これらのエピトープの両方に対する特異性T細胞反応性は、異なる造血性悪性腫瘍および黒色腫を有する患者からの末梢血において存在した。C末端アンカー残基の置換は、黒色腫患者からの腫瘍浸潤リンパ球による認識を向上させた。さらに、一次黒色腫病巣におけるインサイチュのスルビピンに対する自発性細胞毒性T細胞応答が示された。これらのエピトープは関連する患者の悪性腫瘍ならびにHLA特性に関連してスルビピンペプチドに基づく将来のワクチン法の適用可能性を拡大する。

実施例1および2において、HLA-A2限定スルビピン誘導T細胞エピトープを試験した。HLA-A2は白色人種集団の約30%においてのみ発現され(63)、治療できる患者の割合を拡大するために他のHLAクラスI分子に限定されるペプチドエピトープを同定する必要がある。この研究において、白色人種集団の9%において発現される(63)HLA-B35に限定されるスルビピンからの2種の新規T細胞エピトープを同定し、これらのスルビピンペプチドに対する自発的免疫応答は、異なる造血性悪性腫瘍および黒色腫を有する患者において検出された。

【0072】

材料および方法

患者

癌患者からの末梢静脈血を集め、Lymphoprep分離を用いてPBLを単離し、HLA分類し(大学病院臨床免疫学科、コペンハーゲン)、10%DMSOを含むFCS中で凍結させた。さらに分析するために10人のHLA-B35陽性患者を選択した。これらの患者はそれぞれ、黒色腫、CLL、濾胞性リンパ腫(FL)、肥満性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)および多発性骨髄腫(MM)にかかっていた。血液サンプルを集めた時点で、患者はそれ以前の4ヶ月以内に医学的治療を受けていなかった。さらに、リンパ節から単離された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を3人の黒色腫患者から集め、10%DMSOを含むFCS中で凍結させた。

【0073】

ペプチド

7種の合成スルビピン誘導ペプチド: Sur6-14、Sur11-19、Sur34-43、Sur46-54、Sur51-59、Sur46Y9、Sur51Y9、およびEBV誘導ペプチドの一つであるEBNA3A457-466(63)をこの研究において使用した。全てのペプチドはResearch Genetics(ハンツビル、AL)から入手し、HPLCおよびMC分析により確認されるように>90%の純度で提供された。ペプチドを次の表3に示す。

10

20

30

【表5】

表3 スルビビン誘導ペプチドのHLA-B35結合

名称	タンパク質および位置	配列	配列番号	C ₅₀ (μM)	
Sur6-14	Survivin ₆₋₁₄	LPPAWQPF L	18	>100	
Sur11-19	Survivin ₁₁₋₁₉	QPFLKDHR I	19	Not binding	
Sur34-43	Survivin ₃₄₋₄₃	TPERMAEA GF	20	>100	10
Sur46-54	Survivin ₄₆₋₅₄	CPTENEPD L	6	20	
Sur51-59	Survivin ₅₁₋₅₉	EPDLAQCF F	7	13	
Sur46Y9	修飾ペプチド	CPTENEPD Y	8	4	
Sur51Y9	修飾ペプチド	EPDLAQCF Y	9	1.5	
C24	EBNA3A ₄₅₈₋₄₆₆	YPLHEQH QM	21	0.8	20

【0074】

MHCクラスI分子に対するペプチド結合のアセンブリーアッセイ

合成ペプチドの[35S]メチオニンで代謝的に標識されたHLA-B35分子に対する結合親和力を測定するために実施例1および2に記載されるアセンブリーアッセイを使用した。簡単に説明すると、アッセイは、HLA-B35(J. Haurum博士の好意により提供されたもの、Symphogen ApS、Lyngby、デンマーク)で安定にトランスフェクトされたTAP欠損細胞系T2から細胞溶解により放出される空HLA分子のペプチドによる安定化に基づく。安定に折り畳まれたHLA分子を、構造依存性mAb W6/32を用いて免疫沈降させた。HLA分子をIEF電気泳動により分離し、ゲルをホスホリメージャースクリーン(Imaging plate、富士写真フイルム株式会社、日本)に暴露し、分析し、適切に折り畳まれたHLA分子の量を、Image Gaugeホスホリメージャーソフトウェア(富士写真フイルム株式会社、日本)を用いて定量化した。

30

【0075】

PBLの抗原刺激

ELISPOTアッセイの感度を拡張するために、リンパ球を分析前にペプチドでインビトロで一度刺激した(14、15)。PBLまたはTILを解凍し、96穴プレート中50 μMの個々のペプチドエピトープで2時間26 °Cで刺激し(ペプチドあたり5 × 10⁵ ~ 10⁶細胞)、さらに10日間37 °Cで5%ヒト血清(HS)を含むx-vivo中24穴プレート(Nunc、ロスキレ、デンマーク)中、2 × 10⁶細胞/ウェルで培養するためにプールのした。インキュベーションの第2日に、40 μg/mlのIL-2(Apodan A/S、デンマーク)を添加した。10日に、培養された細胞をELISPOTアッセイにおける反応性について試験した。

40

【0076】

ELISPOTアッセイ

癌患者から集められたPBLまたはTILにおけるペプチド特異性IFN-γ放出エフェクター細胞を定量化するために使用されたELISPOTアッセイは、実施例1に記載されるようにして行った。簡単に説明すると、ニトロセルロース底の96穴プレート(M

50

ultiScreen MAIP N45; Millipore、Hedehusene、デンマーク)をヒトIFN- γ に対するmAb、7.5 μ g/ml (1-D1K; Mabtech、Nacka、スウェーデン)でコートした。ウェルを洗浄し、x-vivo (x-vivo 15TM BioWhittaker、Molecular Applications APS、デンマーク)中でブロックし、細胞を重複試験において異なる濃度で添加した。抗原提示のために、 10^4 T2-B35細胞(10 μ Mペプチドを含むか含まない)を各ウェルに添加した。プレートを一夜インキュベートし、細胞を捨て、ビオチニル化二次抗体(7-B6-1-ビオチン; Mabtech)を添加する前にウェルを洗浄した。プレートを2時間室温でインキュベートし、洗浄し、アビジン-アルカリホスファターゼ接合体を添加した(AP-Avidin; Calbiochem、Life Technologies, Inc.)。1時間室温でインキュベーションした後、酵素基質ニトロブルーテトラゾリウム/5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(コード番号K0598、DakoCytomation Norden A/S)を添加し、暗紫色スポットが3~7分で出現した。水道水で洗浄することにより反応を停止させた。Alpha Imager System(Alpha Innotech、サンリアンドロ、CA)を用いてスポットをカウントし、ペプチド特異性T細胞の出現率をスポット形成細胞の数から計算した。

10

全てのアッセイは、各ペプチド抗原について重複試験において行い、同じウェルにおいて培養されたリンパ球を同じ細胞数で、ペプチドと共にまたはペプチド無しで試験して、培養物中のペプチド特異性細胞の数を測定した。

20

【0077】

樹状細胞(DS)の成熟化

接着細胞を培養の2時間後にPBLから単離した。これらをさらに10日間、10% FCSを含むRPMI 1640(GibcoTM Invitrogen corporation、UK)において培養した。800 ng/mlのGM-CSF(PreproTech、ロンドン、UK)および40 ng/mlのIL-4(PreproTech)を3日おきに添加した。10日に、50 ng/mlのTNF- α (PreproTech)を添加することによりDCを24時間成熟化させた。成熟化後、DCを放出させ、3 μ g/mlの2-マイクログロブリンの存在下、20 μ Mペプチドで2時間、26 でパルスした。

30

【0078】

ペプチド特異性T細胞の単離

実施例2において記載されたsur51Y9/HLA-B35コートされた磁気ビーズを用いて抗体特異性細胞を単離した。2.5 μ gのモノマーを 5×10^6 ビーズと共に40 μ lのPBS中20分間室温でインキュベートすることにより、HLA-B35とsur51Y9のビオチニル化モノマー(ProImmune、オックスフォード、UKから入手)をストレプトアビジンコートされた磁気ビーズ(Dynabeads M-280、Dyna1 A/S、オスロ、ノルウェー)とカップリングさせた。磁気装置(Dyna1 A/S、オスロ、ノルウェー)を用いて磁気複合体を3回PBS中で洗浄し、その後、5%BSAを含むPBS中1:10の割合でPBLと混合し、非常に穏やかに1時間回転させた。磁気複合体と結合する抗原特異性CD8⁺細胞を2または3回穏やかに洗浄した。単離された細胞を、5%ヒト血清で補足されたx-vivo中に数回再懸濁させ、2時間インキュベートした後、磁気ビーズを放出させ、細胞懸濁液から除去した。天然のペプチドと修飾されたペプチド間の交差反応性を分析するために、ELISPOTアッセイにおいて単離された抗原特異性CD8⁺T細胞を使用した。

40

【0079】

変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)によるTCRクローン型マッピング

ヒトTCR BV領域1~24のDGGEクローン型マッピングは、(66)に詳細に記載されている。簡単に説明すると、Purescript単離キット(Gentra Systems Inc. MN)を用いてRNAを単離し、共通の定常領域プライマーと

50

ともにTCRベータ鎖の可変領域のプライマーを用いたPCRにより転写されたcDNAを増幅した。コンピュータープログラムMELT87を使用して、50bpのGCリッチな配列(GC-clamp)が定常領域プライマーの5'末端に結合すると仮定すると、増幅されたDNA分子がDGC分析に適することが確認された。DGC分析を、20%から80%の尿素とホルムアミドの勾配を含有する6%ポリアクリルアミドゲル中で行った。電気泳動を160Vで4.5時間、1×TAE緩衝液中、54の一定温度で行った。

【0080】

免疫組織化学的染色

実施例2に記載された手順を用いて、癌患者の腫瘍病巣において抗原特異性T細胞をインサイチュで同定するためにマルチマー化ペプチド/HLA複合体を使用した。ピオチニル化sur51Y9/HLA-B35モノマーはProimmune limited、オックスフォード、UKから供給された。sur51Y9/HLA-B35のピオチニル化されたモノマーは、ストレプトアビジン-FITC接合デキストラン分子(L. Winter博士(DAKO, Glostrup, デンマーク)の好意により提供されたもの)でマルチマー化し、免疫組織化学のために多価HLA-デキストラン化合物を生成させた。組織片を一夜乾燥し、続いて冷アセトン中5分間固定した。全てのインキュベーション工程は、暗所、室温で行った:(a)45分の一次抗体(1:100希釈)(b)Cy3-接合ヤギ抗マウス抗体(1:500希釈;コード155-165-100;Jackson ImmunoResearch, Dianova, ハンブルグ、ドイツから入手)を45分間;最後に(c)マルチマーを75分間。各工程間で、スライドをPBS/BSA0.1%中10分間2回洗浄した。スライドをベクタシールド中でマウントし、共焦点顕微鏡(Leica)下で観察するまで冷蔵庫中に入れた。

【0081】

結果

HLA-B35結合スルビピン誘導ペプチドの同定

スルビピンのアミノ酸配列を、アンカー残基を有するノナマーおよびデカマーペプチドについて、HLA-B35のペプチド結合モチーフにしたがってスクリーニングした(67)。2位にN末端アンカーとしてプロリンを、C末端アンカー残基としてフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシンまたはチロシンを含有する5種のペプチドを選択した(表3)アセンブリーアッセイにより、HLA-B35を有効に安定化させることができる2種のペプチド、sur51-59(EPDLAQCF、配列番号7)およびsur46-54(CPTENEPL、配列番号6)が明らかになった。さらに、2種のペプチド、sur34-43(TPERMAEAGF、配列番号20)およびsur6-14(LPPAWQPF、配列番号18)は弱い安定化を示すが、残りのペプチドはHLA-B35を全く安定化しなかった。HLA-B35の最大回復の半分に必要なペプチド濃度(C50)は、sur51-59について13μM、sur46-54について20μMと推定される。比較として、EBNA3A458-466(YPLHEQHQM、配列番号21)からの陽性対照-エピトープC24は0.8μMの推定C50値を有していた。

sur46-54およびsur51-59の結合親和力を向上させるために、C末端アミノ酸を、さらに良好なアンカー残基であるチロシンと置換した(67)。修飾ペプチドによるHLA-B35の回復をアセンブリーアッセイにおいて分析し、C50値はsur51Y9について1.5μM、sur46Y9について4μMと推定された(図7)。

【0082】

天然のペプチドエピトープに対する自発性免疫応答

最初に、5人の患者を4種の天然のHLA-B35結合ペプチドsur51-59、sur46-54、sur34-43およびsur6-14に対する自発性免疫応答について分析した。これらの5人の患者は異なる造血性悪性腫瘍を有していた:HEM8およびHEM18はMMにかかり、HEM12はFL、HEM9はDLBCL、CLL5はCLLにかかっていた。

10

20

30

40

50

ペプチド前駆体CTLを検出するために10日のインビトロ刺激後、PBLに関してINF-ELISPOTアッセイを行った。自発性免疫応答が天然のHLA-B35結合ペプチドのうちの2つ、sur51-59およびsur46-54に対して検出された。2人の患者、HEM12およびCLL5は、sur51-59およびsur46-54の両方に対して応答を示したが、HEM8はsur51-59に対してのみ応答を示した(図8AおよびB)。2人の残りの患者、HEM9およびHEM18において応答は検出できず、任意の患者において弱く結合したペプチドsur34-46およびsur6-14に対する応答は検出できなかった。

インビトロ刺激に対する別の方法を患者HEM12において使用した。すなわち、PBLを、sur51-59でパルスされた成熟自己樹状細胞と同時培養して、インビトロのCTL応答を刺激した。この培養物から得られるPBLはELISPOTにおいてsur51-59に対して強い反応性を示した(図8B)。

【0083】

修飾ペプチドの増大した認識

前記のように、HLA-B35親和力を増大するためのペプチド修飾の結果、天然のペプチドと比較してHLA-B35について5~10倍の高い親和力が得られた。5人の黒色腫患者のグループを、ELISPOTアッセイにより天然および修飾ペプチドの両方に対する自発性免疫応答について分析した。PBLサンプルはインビトロ刺激後に分析し、TILサンプルは直接分析した。自発性免疫応答は、5人の患者のうち3人からのPBLまたはTILのいずれかにおいて観察された。FM25はPBLおよびTILサンプルの両方においてsur51-59およびsur-51Y9に対して反応性を示した(図9A)。FM45は修飾ペプチドsur51Y9に対してのみ応答し、強力な応答がTILにおいて検出可能であった。PBLはこの患者からは得られなかった(図9A)。FM74はTILにおいてsur46Y9に対して強い応答を示したが、天然のペプチドに対する応答は検出できなかった(図9B)。sur46Y9に対する弱い応答がFM74からのPBLにおいても観察された(データは省略)。

【0084】

天然および修飾ペプチド間の交差反応性

sur51Y9のHLA-B35に対する高い親和力は、sur51Y9を有するHLA-B35の安定なモノマーの産生を可能にする。異なる癌患者から得られる腫瘍浸潤リンパ節およびPBLにおけるスルビピン反応性Tリンパ球の存在を確認して、磁気ビーズをかかるとHLA-B35/Sur51Y9複合体でコートし、スルビピンペプチド反応性Tリンパ球を患者CLL5から得られるPBLから単離するためにこれらを使用した。この患者は、sur51-59に対して強力な応答を示した。顕微鏡で可視化されるようにビーズは特定の細胞の細胞表面上にしっかりと結合し(データは省略)、磁場による抗原特異性細胞の沈降を可能にする。単離されたsur51Y9特異性細胞はsur51-59に対して強力に反応することができ(図9)、残りのPBLにおいては応答は検出できなかった(データは省略)。単離は、RT-PCR/DGGEに基づくTCRクローン型マッピングにより分析した。この技術により、ごく少数の細胞しか利用可能でない場合でも、複合細胞集団におけるT細胞クローン分析が可能になる。これらの分析は、8の異なるクローンが単離されたことを示した(データは省略)。

【0085】

黒色腫病巣においてインサイチュで存在する抗原特異性T細胞

ストレプトアビジンおよびFITCと接合したデキストラン分子を用いてsur51Y9/HLA-B35モノマーをマルチマー化した。マルチマー化されたMHC複合体を使用して、実施例2に記載された手順を用いてアセトン固定された凍結物質を染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて抗原特異性細胞を可視化した。3人の患者から得られる一次黒色腫の断片を分析し、Sur51Y9/HLA-B35反応性CTLは患者の一人における腫瘍微小環境においてインサイチュで容易に検出できた。グランザイムBに対するmAbでの同時染色により、これらのスルビピン特異性CTLはグランザイムBを放出し、細

10

20

30

40

50

胞毒性活性を發揮することが示され、HLA-B35陰性黒色腫患者を対照として使用した(データは省略)。

【0086】

実施例4

異なるHLA-A限定特性を有する新規スルビピン誘導CTLエピトープの同定

概要

新規HLA-A1-、HLA-A2-、HLA-A3-およびHLA-A11-限定スルビピンエピトープを癌患者におけるCTL応答に基づいて特徴づけた。これらのエピトープは明らかにスルビピン誘導ペプチドに基づく免疫療法に適した患者の数を増大させた。さらに、いくつかの限定エレメントの全体的ターゲティングはHLA-対立遺伝子損失による免疫回避の危険性を減少させる。

10

【0087】

材料および方法

患者

患者サンプルはWurzburg大学(ドイツ)およびHerlev(デンマーク)の大学病院から受け取った。これらの測定の前に患者からインフォームドコンセントを得た。組織タイピングは大学病院の臨床免疫学科(コペンハーゲン、デンマーク)で行った。Lymphoprep分離を用いて黒色腫、乳ガン、および慢性リンパ性白血病(CLL)の癌患者から得られる末梢血リンパ球(PBL)を単離し、10%ジメチルスルホキシドを含むウシ胎仔血清(FCS)中で凍結させた。さらに、黒色腫患者からの一次病巣および組織浸潤リンパ節からのTリンパ球を得た。新たに切除された腫瘍組織を細かく刻んで小フラグメントにし、粉碎して低温保存するために腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を放出させた。

20

ペプチド

全てのペプチドはInvitrogen(カールズバッド、CA, USA)から購入し、HPLCおよびMS分析により確かめられるように>80%の純度で提供された。使用した全てのペプチドを以下の表4および実施例5に記載する。

【0088】

細胞系

ヒトT細胞系はB-LCL.174およびLCL-CEM細胞のTAP1およびTAP2欠損ハイブリッドであり、従って低レベルのHLAクラスI分子(HLA-A*0201およびHLA-B*5101)を細胞表面で発現するだけである。HLA-A*0301でトランスフェクトされたT2細胞はA McMichael博士(IMM、ジョン・ラドクリフ病院、オックスフォード)の好意により提供された。HLA-A*1101でトランスフェクトされたT2細胞はM Masucci博士(MTC、カロリンスカ協会、ストックホルム、スウェーデン)の好意により提供された。BM36.1細胞系もTAP機能が欠損し、表面でHLAクラスI(HLA-A*0101、HLA-B*3501)の低発現を有するT2と同様の表現型を有する。BM36.1細胞はA Ziegler博士(フンボルト大学、ベルリン、ドイツ)の好意により提供された。

30

【0089】

MHCクラスI分子に対するペプチド結合についてのアセンブリーアッセイ

[³⁵S]-メチオニンで代謝的に標識された合成ペプチド(Invitrogen、カールズバッド、CA, USA)のHLA-A1、-A2、-A3、または-A11に対する結合親和力を既に記載されているようにして(12)アセンブリーアッセイにおいて測定した。アッセイは、TAP欠損細胞系から細胞溶解により放出された空HLA分子のペプチドによる安定化に基づく。HLAクラスI特異性構造依存性mAbW6/32を用いて安定に折り畳まれたHLA分子を免疫沈降させ、等電点(IEF)ゲル電気泳動法により分離した。ImageGaugeホスホルイメジャープログラム(フジ写真フィルム株式会社、カールトン、TX, USA)を用いてMHC重鎖バンドを定量化した。バンドの強度はアッセイ中に回収されるペプチド結合クラスI-MHC複合体の量に比例する

40

50

。次に、HLA分子の安定化の程度は添加されたペプチドの結合親和力と直接関連する。HLA分子の回収を分析するために使用されるペプチド濃度は、HLA-A1およびHLA-A11については40、4、0.4、0.04 μM、HLA-A2およびHLA-A3については100、10、1、0.1、0.01 μMであった。C₅₀値を次に各ペプチドについて最大安定化の半分に必要なペプチド濃度として計算した。

【0090】

PBLの抗原刺激

ELISPOTアッセイの感度を拡大するために、PBLを分析前に一度インビトロで刺激した。0日に、PBLまたは粉碎されたリンパ節を解凍し、x-vivo培地(Bio Whittaker、Walkersville、メリーランド)、5%熱不活化ヒト血清、および2 mMのL-グルタミン中、10 μMのペプチドの存在下で、24穴プレート(Nunc、ロスキレ、デンマーク)中、2 ml/ウェルで2 × 10⁶細胞としてプレートした。2日後、20 IU/mlの組み換えインターロイキン-2(IL-2)(Chiron、ラーティンゲン、ドイツ)を培養物に添加した。培養された細胞を10日にELISPOTにおいて反応性について試験した。

【0091】

ELISPOTアッセイ

既に記載されているようにして(16)、ペプチドエピトープ特異性インターフェロン-放出エフェクター細胞を定量化するためにELISPOTアッセイを使用した。簡単に説明すると、ニトロセルロース底の96穴プレート(MultiScreen MAIP N45、Millipore、Hedehusene、デンマーク)を抗IFN-抗体(1-D1K、Mabtech、Nacka、スウェーデン)でコートした。ウェルを洗浄し、x-vivo培地によりブロックし、細胞を重複試験において異なる細胞濃度で添加した。ペプチドをついで各ウェルに添加し、プレートを一夜インキュベートした。翌日、培地を捨て、ビオチニル化二次抗体(7-B6-1 ビオチン、Mabtech)の添加前にウェルを洗浄した。プレートを2時間インキュベートし、洗浄し、アビジン-アルカリホスファターゼ接合体(Calbiochem、Life Technologies、Inc. サンディエゴ、CA、USA)を各ウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、洗浄し、酵素基質NBT/BCIP(DakoCytomation、Norden A/S、Glostrup、デンマーク)を各ウェルに添加し、室温で5~10分間インキュベートした。暗紫色スポットが出現したら、水道水で洗浄することにより反応を停止させた。ImmunoSpotシリーズ2.0アナライザー(CTL Analyzers、LLC、クリーブランド、US)を用いてスポットをカウントし、スポット形成細胞の数からペプチド特異性CTL出現率を計算できた。全てのアッセイは各ペプチド抗原について重複試験において行った。

【0092】

結果

HLA-A1限定スルビピンエピトープの同定

HLA-A1に対するスルビピン誘導ペプチドの結合

主HLA-A1特異性アンカー残基、3位のアスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)およびC末端のチロシン(Y)、フェニルアラニン(F)を用いて、スルビピタンパク質のアミノ酸配列を最もありそうなHLA-A1ノナマーおよびデカマーペプチドエピトープについてスクリーンした。その結果、6のスルビピン誘導ペプチドが合成され、HLA-A1に対する結合について調べた(表4)。さらに、2つのペプチドSur38-46(MAEAGFIHC)(配列番号23)およびSur47-56(PTENEPDLAQ)(配列番号25)は両方ともRammenseeら(<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/>で入手可能)による予想アルゴリズムにより可能な良好なバインダーとして同定されたので、主なアンカーの一つを含有するのみであるにもかかわらず、含まれていた。C₅₀値は各ペプチドについて、HLA-A1の最大回復の半分に必要なペプチド濃度として推定された(表4)。しかしながら、こ

これらのペプチドの一つ Sur 92 - 101 (Q F E E L T L G E F) (配列番号 27) のみがインフルエンザ A タンパク質からの公知の正の対照エピトープ、図 10 に例示されるような塩基性ポリメラーゼ 1 (P B 1) (V S D G G P N L Y) とほとんど同様の高い親和力で結合する。Sur 93 - 101 (F E E L T L G E F) (配列番号 24) は H L A - A 1 に対して低い結合親和力を有し、一方、分析された他のペプチドはどれも H L A - A 1 と結合しなかった (表 4)。従って、本発明者らは、良好なアンカー残基が天然のペプチドと置換された多くの類似ペプチドを合成した。本発明者らは、C 末端でそれぞれシステイン (C) またはグルタミン (Q) の代わりにチロシン (Y) を導入して 2 種のペプチド、Sur 38 - 46 (M A E A G F I H C) (配列番号 23) および Sur 47 - 56 (P T E N E P D L A Q) (配列番号 25) を修飾した。修飾されたペプチドはいずれも H L A - A 1 と強力に結合した (表 4)。さらに、本発明者らは、2 つのペプチド Sur 92 - 101 および Sur 93 - 101 において 2 位のアミノ酸を補助アンカー スレオニン (T) またはセリン (S) で置換した。これらの修飾は Sur 92 - 101 の H L A - A 1 に対する結合の正の影響を有していなかった。対照的に Sur 93 T 2 (F T E L T L G E F) (配列番号 36) は H L A - A 1 と高い親和力で結合した (表 4)。図 10 は、天然の低親和力ペプチド Sur 93 - 101、高親和力修飾ペプチド Sur 93 T 2 および非結合ペプチド Sur 49 - 58 の、インフルエンザから得られる正の対照エピトープと比較しての結合を示す。最後に、本発明者らは、Sur 14 - 22、Sur 34 - 43、Sur 49 - 58、Sur 51 - 59、Sur 92 - 101、および Sur 93 - 101 を C 末端でチロシン (Y) で修飾したが、これはこれらのペプチドのいずれについても H L A - A 1 に対する結合親和力を向上させなかった (データは省略)。

【0093】

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対する H L A - A 1 限定 C T L 応答

6 人の黒色腫患者から得られる P B L および 3 人の黒色腫患者から得られる T I L を、E L I S P O T により、4 種の高親和力スルビピン推定ペプチド Sur 38 Y 9、Sur 47 Y 10、Sur 92 - 101、および Sur 93 T 2 のいずれかに対する C T L 特異性の存在について分析した。スルビピン誘導ペプチドの少なくとも一つに対する T 細胞反応性は、分析された 9 人の患者の全部からの 3 種の P B L サンプルおよび 1 種の T I L サンプルにおいて観察された。図 11 において見られるように、1 人の患者 Me 1 . A 1 - 3 からの P B L は 4 種のペプチド、Sur 38 Y 9、Sur 47 Y 10、Sur 92 - 101、および Sur 93 T 2 に対する T 細胞応答を有していた。Me 1 . A 1 - 2 は、Sur 47 Y 10、Sur 92 - 101 および Sur 93 T 2 に対して応答を示したが、Me 1 . A 1 - 1 / T I L および Me 1 . A 1 - 4 / P B L 応答はそれぞれ Sur 47 Y 10 および Sur 93 T 2 に対して観察された (図 11)。

加えて、10 人の黒色腫患者を E L I S P O T により天然のペプチド Sur 93 - 101、Sur 38 - 46 および Sur 47 - 56 に対する免疫反応性について試験したが、これらの患者のいずれにおいてもペプチド特異性応答は検出されなかった (データは省略)。

【0094】

H L A - A 1 1 限定スルビピンエピトープの同定

スルビピン誘導ペプチドの H L A - A 1 1 に対する結合

スルビピンタンパク質のアミノ酸配列を、H L A - A 3 および H L A - A 1 1 を包含する H L A - A 3 超科のものに対応する結合モチーフを有するノナマーまたはデカマーペプチドについてスクリーンした。主要アンカー残基、2 位にロイシン (L) および C 末端にリシン (K) を有するペプチド配列を、R a m m e n s e e らによる予想アルゴリズムにしたがってこれらの位置に関連するアミノ酸を有するペプチド配列と共に選択した (表 4)。

13 種のペプチドをスルビピンのタンパク質配列から予想し、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 との結合について分析した。これらのペプチドのうちの 3 つ、Sur 53 - 62 (D L A Q C F F C F K) (配列番号 47)、Sur 54 - 62 (L A Q C F F C F K)

10

20

30

40

50

(配列番号42)およびSur112-120(KIAKETNNK)(配列番号44)は、EBV核抗原4からのウイルスエピトープ(AVFD RKSDAK)(配列番号63)に匹敵する高い親和力でHLA-A11と結合した。加えて、1つのペプチド、Sur112-121(KIAKETNNKK)(配列番号51)はHLA-A11と弱く結合した(表4)。

【0095】

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA-A11限定CTL応答

5人の黒色腫患者および2人のCLL患者からのPBLを、4種のHLA-A11結合ペプチド、Sur53-62; Sur54-62、Sur112-120、およびSur112-121に対するT細胞反応性について試験した。本発明者らは、2人の黒色腫患者Mel.A11-1、Mel.A11-2からのPBLにおいてELISPOTによりスルビピン誘導ペプチドSur53-62に対する応答を検出することができた(図12)。さらに、本発明者らは、患者Mel.A11-2において腫瘍浸潤リンパ節からの腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中Sur53-62特異性T細胞を検出した(図12)。患者Mel.A11-1において、スルビピンペプチドSur53-62に対する強力な免疫応答が2年の期間にわたって採取された5種の異なるサンプルにおいて観察された(データは省略)。

10

【0096】

HLA-A3限定スルビピンエピトープの同定

HLA-A3に対するスルビピン誘導ペプチドの結合

HLA-A3超科に対する結合について予想されるスルビピン誘導ペプチドをHLA-A3に対する結合についてさらに分析した。2つのペプチドSur112-120(KIAKETNNK)(配列番号44)およびSur112-121(KIAKETNNKK)(配列番号57)のみが、ウイルスエピトープ、インフルエンザA核タンパク質265-273(ILRGSV AHK)(配列番号74)と同様に、HLA-A3と高い親和力で結合した(表4)。さらに、2つのペプチドSur53-62(DLAQCFFCFK)(配列番号47)およびSur95-103(ELTLGEFLK)(配列番号43)はHLA-A3と弱く結合した。

20

【0097】

HLA-A3についての結合親和力を増大させるために検出可能な結合を有さないペプチドのいくつかを修飾した。かくして、本発明者らは、さらに良好なアンカー残基ロイシン(L)が2位の天然のアラニン(A)と置換されているSur54-62およびSur113-122の2つの類似ペプチドを合成した。Sur54L2(LLQCFFCFK)(配列番号56)はHLA-A3と高い親和力で結合するが、Sur113L2(ILKETNNKKK)(配列番号59)は弱くしか結合しなかった(表4)。加えて、本発明者らは、C末端の天然のフェニルアラニン(F)がさらに良好なアンカー残基リシン(K)で置換されたSur5-13、Sur13-22、Sur18-27、およびSur53-61の4つの類似ペプチドを合成した。Sur5K9(TLPPAWQPK)(配列番号54)およびSur18K10(RISTFKNWPK)(配列番号58)はHLA-A3と高い親和力で結合するが、置換は天然の類似体と比較して、Sur13K9(FLKDHRISTK)(配列番号57)およびSur53K9(DLAQCFFCFK)(配列番号55)に対する結合に関して検出可能な影響を及ぼさなかった。

30

40

【0098】

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA-A3限定CTL応答

黒色腫患者からの9サンプル(5PBLおよび4TIL)を、2つの天然の高親和力HLA-A3結合ペプチドSur112-120およびSur112-121、ならびに2つの天然の弱結合ペプチドSur53-62およびSur95-103に対する免疫反応性について分析した。しかしながら、これらのペプチドに対する免疫応答はどの患者においてもELISPOTにおいて検出できなかった。したがって、同じ患者を3つの高親和性修飾スルビピン誘導ペプチドSur5K9、Sur18K10、およびSur54L2

50

に対する自発性免疫反応性について分析した。CTL反応性は、3人の患者、Mel . A 3 - 1、Mel . A 3 - 2、Mel . A 3 - 3からのTILサンプルにおけるSur 1 8 Kに対して検出された(図13)。2つの他のペプチド、Sur 5 K 9およびSur 5 4 L 2に対する応答は検出されなかった。これらの応答をさらに確認するために、さらに18人の黒色腫患者からのPBLをSur 1 8 K 1 0に対するCTL反応性について分析した。3人の応答する患者、Mel . A 3 - 4、Mel . A 3 - 5、およびMel . A 3 - 6がこれらのなかから見いだされ、その結果、27人の分析された患者のうち合計6人の患者が応答した(図13)。

【0099】

新規HLA - A 2限定スルビピンエピトープの同定

HLA - A 2に対する11-merスルビピン誘導ペプチドの結合

スルビピンタンパク質のアミノ酸配列を、主要HLA - A 2特異性アンカー残基を用いて最も可能性の高いHLA - A 2 11-merペプチドエピトープについてスクリーンした。6種のスルビピン推定ペプチドを合成し、HLA - A 2に対する結合について調べた。調べたペプチドはどれも、E p t e i n - B a r r ウイルスB M L F ₂₈₀₋₂₈₈ペプチド(G L C T L V A M L)(配列番号72)からの公知の正対照エピトープと同様の高い親和力では結合しなかった(表4)。HLA - A 2の最大回復の半分に必要なペプチド濃度(C₅₀値)は正の対照について0.9μMであった。比較として、ペプチドS u r 1 8 - 2 8 (R I S T F K N W P F L)(配列番号67)およびS u r 8 6 - 9 6 (F L S V K K Q F E E L)(配列番号69)はHLA - A 2と弱く結合した(C₅₀はそれぞれ69μMおよび72μM)。しかしながら、公知のHLA - A 2限定スルビピンエピトープはHLA - A 2と同様に弱く結合し; S u r 9 5 - 1 0 4 (E L T L G E F L K L)(配列番号43)は中くらいの親和力で結合し(C₅₀ = 10μM)、S u r 9 6 - 1 0 4 (L T L G E F L K L)(配列番号10)は弱くしか結合しなかった(C₅₀ > 100μM)。試験した残りの4つの11-merペプチド、(S u r 4 - 1 4 (P T L P P A W Q P F L)(配列番号66)、S u r 5 4 - 6 4 (L A Q C F F C F K E L)(配列番号68)、S u r 8 8 - 9 8 (S V K K Q F E E L T L)(配列番号70)、およびS u r 1 0 3 - 1 1 3 (K L D R E R A K N K I)(配列番号74)はHLA - A 2と結合しなかった。

【0100】

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA - A 2限定CTL応答

2種の弱結合11merペプチド、S u r 1 8 - 2 8およびS u r 8 6 - 9 6がHLA - A 2により提示され、癌患者の免疫系により認識されるかどうかを調べるために、10人の癌患者(2人の黒色腫(Mel)、6人のCLL(CLL)、および2人の乳ガン(MC)患者)をまず分析した。S u r 1 8 - 2 8に対するCTL応答が、分析された10人の患者のうちの2人(CLL - 1、CLL - 2、図14)からのPBLにおいて見いだされ、一方、S u r 8 6 - 9 6に対して応答は検出されなかった(データは省略)。これらのS u r 1 8 - 2 8特異性応答を確認するために、さらに12人の患者(7人の黒色腫、1人のCLL、および4人の乳ガン患者)からのPBLをこのペプチドに対するCTL反応性に関して分析した。これらのうち、4人の患者(CLL - 3、MC - 1、MC - 2、Mel . A 2 - 1)がELISPOTにより検出可能なS u r 1 8 - 2 8特異性免疫活性を有していた(図14)。従って、分析された22人の患者のうち6人のPBLはS u r 1 8 - 2 8に対するCTL応答を有していた。

【0101】

HLA - B 7限定スルビピンエピトープの同定

HLA - B 7に対するスルビピン誘導ペプチドの結合

スルビピンタンパク質のアミノ酸配列を、HLA - B 7のペプチド結合モチーフのアンカー残基を有する9~10のアミノ酸のペプチドについてスクリーンした。5つのペプチドを選択し、アセンブリーアッセイにおいてHLA - B 7を安定化させるその能力について分析した。C₅₀値を各ペプチドについてHLA - B 7の最大安定化の半分に必要なペ

10

20

30

40

50

プチド濃度として推定した(表4)。2つのスルビピン誘導ペプチドsur6-14(LPPAWQPFL)(配列番号18)およびsur11-19(QPFLKDHRI)(配列番号19)はHLA-B7を若干安定化させ、 C_{50} 値は100 μ M以上であり; sur46-54(CPTENEPDL)(配列番号6)、sur51-59(EPDLAQCFE)(配列番号7)、およびsur34-43(TPERMAEAGF)(配列番号20)はHLA-B7と結合しなかった(表4)。

【0102】

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA-B7限定CTL応答

5人の黒色腫患者(mel25、mel26、mel3、mel6、mel39)、2人のCLL患者(CLL1、CLL54)および2人の乳ガン患者(breast11、breast15)から得られるHLA-B7陽性PBLを弱HLA-B7結合ペプチドsur6-14(LPPAWQPFL)(配列番号18)およびsur11-19(QPFLKDHRI)(配列番号19)に対するT細胞反応性について試験した。本発明者らは、CLL患者および乳ガン患者におけるスルビピン誘導ペプチドsur6-14に対して強力な自発的CTL応答を検出することができた(図15)。さらに、本発明者らは、黒色腫患者mel3においてこのペプチドに対する弱い応答を検出することができた(図15)。

10

【0103】

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA対立遺伝子限定免疫応答の概要

前記実施例において記載されたMHCクラスI分子に対するペプチド結合についてのアッセイを用いて、9~11のアミノ酸残基を含む一連のスルビピン誘導ペプチドを次のHLA対立遺伝子との結合について試験した:HLA-A1、HLA-A3、HLA-A11およびHLA-B7。加えて、ペプチドのいくつかを、これも前記のELISPOTを用いてCTL免疫応答を惹起するその能力について試験した。

20

前記実施例において得た結果を含む結果のまとめを以下の表4に示す。

【0104】

【表 6 - 1】

表 4 選択されたスルビビン誘導ペプチドについての C_{50} および ELISPOT データ

HLA 対立遺伝子	ペプチド長	位置	配列	C_{50} (μ M)	コメント	配列番号	脚注
HLA-A1	9mer	Sur14-22	LKDHRISTF	NB		22	
		Sur51-59	EPDLAQCF	NB		7	
		Sur38-46	MAEAGFIHC	NB		23	
		Sur93-101	FEELTLGEF	>100		24	
		Sur34-43	TPERMAEAGF	NB		20	
	10mer	Sur47-56	PTENEPDLAQ	NB		25	
		Sur49-58	ENEPDLAQCF	NB		26	
		Sur92-101	QFEELTLGEF	2		27	
		対照ペプチド C1	VSDGGPNLY	0.8		28	
		修飾ペプチド sur14Y9	LKDHRISTY	NB		29	
	sur51Y9	EPDLAQCFY		弱く結合	9		
	sur93Y9	FEELTLGEY	NB		30		
	sur92Y9	QFEELTLGEY	NB		31		
	sur34Y9	TPERMAEAGY	NB		32		
	sur49Y9	ENEPDLAQCY	NB		33		
	Sur92T2	QTEELTLGEF	2		34		
	Sur92S2	QSEELTLGEF	100		35		
	Sur93T2	FTEELTLGEF	1		36		
	Sur93S2	FSEELTLGEF	30		37		
	Sur38Y9	MAEAGFIHY	0.8		38		
	Sur47Y10	PTENEPDLAY	0.4		39		
HLA-A2		Sur4-14	PTLPPAWQFL	NB		66	
		Sur18-28	RISTFKNWFL	69		67	
		Sur54-64	LAQCFFCFKEL	NB		68	
		Sur86-96	FLSVKKQFEL	72		69	

10

20

30

【表 6 - 2】

HLA-A3	9mer	Sur 5-13	TLPPAWQP F	NB		40	
		Sur 53-6 1	DLAQCFFC F	NB		41	
		Sur 54-6 2	LAQCFFCF K	NB		42	
		Sur 95-1 03	ELTLGEFLK	>100		43	
		Sur 112- 120	KIAKETNNK	2		44	i
	10mer	Sur 13-2 2	FLKDHRIST F	NB		45	
		Sur 18-2 7	RISTFKNWP F	NB		46	
		Sur 53-6 2	DLAQCFFC FK	100		47	ii
		Sur 84-9 3	CAFLSVKK QF	NB		48	
		Sur 101- 110	FLKLDRERA K	NB		49	
		Sur 103- 112	KLDRERAKN K	NB		50	
		Sur 112- 121	KIAKETNNK K	1		51	
		Sur 113- 122	IAKETNNKK K	NB		52	
	対照 ペプチド	C3	ILRGSVAHK	0.1-0.3		53	
	修飾 ペプチド	Sur5K9	TLPPAWQP K	2		54	
		Sur53K9	DLAQCFFC K	NB		55	
		Sur54L2	LLQCFFCF K	1		56	
		Sur13K9	FLKDHRIST K	NB		57	
		Sur18K1 0	RISTFKNWP K	0.02		58	
		Sur113L2	ILKETNNKK K	>100		59	
		SurEx3- A3-1	TIRRNLRK	0.5		60	iii
		SurEx3- A3-2	PTIRRNLR K	NB		61	

10

20

30

【表 6 - 3】

		Sur2b-A 3-1	RITREEHKK	NB		62	
	対照 ペプチド	インフル エンザA 核タンパ ク質 26 5-27 3	ILRGSVAHK	0.1		74	
HLA-A 11	9mer	Sur 5-13	TLPPAWQP F	NB		40	
		Sur 53-6 1	DLAQCFFC F	NB		41	
		Sur 54-6 2	LAQCFFCF K	0.4		42	
		Sur 95-1 03	ELTLGEFLK	NB		43	
		Sur 112- 120	KIAKETNNK	1		44	
	10mer	Sur 13-2 2	FLKDHRIST F	NB		45	
		Sur 18-2 7	RISTFKNWP F	NB		46	
		Sur 53-6 2	DLAQCFFC FK	5		47	
		Sur 84-9 3	CAFLSVKK QF	NB		48	
		Sur 101- 110	FLKLDRE K	NB		49	
		Sur 103- 112	KLDRERAK K	NB		50	
		Sur 112- 121	KIAKETNNK K	>100		51	iv
		Sur 113- 122	IACKETNNK K	NB		52	
	対照 ペプチド	C4	AVFDRKSDA K	0.2		63	
HLA-B 7	9mer	Sur 6-14	LPPAWQPFL	>100		18	v
		Sur 11-1 9	QPFLKDHRI	>100		19	
		Sur 46-5 4	CPTENEPDL	NB		6	
		Sur 51-5 9	EPDLAQCFF	NB		7	
	10mer	Sur 34-4 3	TPERMAEA GF	NB		20	
	対照 ペプチド	C6	QPRAPIRPI	0.1		64	

【 0 1 0 5 】

ⁱ ELISPOTにより1人のリンパ腫患者 (HEM34) においてペプチド Sur 112-120 に対する応答が観察された。ⁱⁱ ELISPOTにより3人のリンパ腫患者 (HEM9、11、34) においてペプチド Sur 53-62 に対して応答が検出された。^{iv} ELISPOTにより黒色腫患者 (FM-TIL95) において弱い応答が観察された。^v ⁱⁱ 黒色腫患者 (PM6) において Sur 112-121 に対する応答が観察さ

10

20

30

40

50

れ、転移性リンパ節懸濁液において最も顕著であり、ELISPOTにより一次腫瘍からのTILおよびPBLにおいてはさらに弱かった。

v i i i C L L 患者 (C L L 9) においてペプチド S u r 6 - 1 4 に対する応答が観察され、e l i s p o t によりリンパ腫患者 (H E M 2 1) においてさらに弱い応答が観察された (データは省略) 。

【 0 1 0 6 】

実施例 5

免疫原としてスルビピン誘導体を用いた治療試験法

概要

5 人のよく前治療された I V 期の黒色腫患者に、修飾された H L A - A 2 限定スルビピンエピトープ、すなわち、例外的使用設定において自己樹状細胞により提示された s u r 1 M 2 ペプチドをワクチン接種した。患者のうち 4 人はこのエピトープに対して E L I S P O T アッセイにより測定すると強力な T 細胞応答を示した。さらに、インサイチュペプチド / H L A - A 2 マルチマー染色により、スルビピン反応性細胞の内臓組織および軟組織転移中への浸潤が明らかになった。明らかに、毒性を伴うワクチン接種は観察されなかった。データから、後期黒色腫患者においてもスルビピンに対する T 細胞応答を惹起でき、これらのワクチン接種は良好な耐用性を有することが示された。

10

【 0 1 0 7 】

材料および方法

患者の適格基準および治療計画

全ての臨床手順は、ヘルシンキ宣言に従い、すべての患者は治療前にインフォームドコンセントを受けた。I V 期の皮膚またはぶどう膜黒色腫患者は、少なくとも 2 種の異なる化学、免疫、または化学免疫療法にもかかわらず疾患が進行している場合に適格であった。加えて、患者は 1 8 歳以上であり、H L A A * 0 2 0 1 を発現し、頭蓋、胸郭および腹部コンピューター断層撮影法により確認される測定可能な疾患にかかっていたいなければならなかった。患者のクラノフスキー指数は 6 0 % 以上でなければならなかった。全身的化学および / または免疫療法を、ワクチン接種前 4 週間以内に行わなかった。重要な除外基準は、C N S 転移、活性自己免疫または感染性疾患、妊娠および授乳、ならびに重大な精神異常の徴候であった。ペプチドパルス化樹状細胞は既に記載されているように生成された (8 2) 。簡単に説明すると、白血球除去輸血から得られる P B M C を L y m p h o p r e p T M (N y c o m e d P h a r m a) で単離し、アリコートに分けて凍結し、液体窒素中で貯蔵した。ワクチン接種の 1 週間前に、P B M C を解凍し、洗浄し、ゲンタマイシン、グルタミンおよび熱不活化自己血漿を含有する培地中で培養した。1 日および 5 日に、I L - 4 および G M - C S F を添加した。成熟 D C を分化させるために、T N F - およびプロスタグランジン E 2 を 6 日に添加した。7 日に、成熟 D C の表現型および形態的特徴、すなわち不明瞭な外観および = 7 5 % C D 8 3 発現を示す細胞を修飾スルビピン誘導 H L A - A 2 限定スルビピン₉₆₋₁₀₄ エピトープ、L M L G E F L K L (配列番号 1 0) (C l i n a l f a 、スイス) 1 4 でパルス化した。1 日および 5 日に培養物から採取されたサンプルの微生物試験が無菌であると証明される場合にのみ細胞をワクチン接種に使用した。

20

30

40

【 0 1 0 8 】

最初の 2 回のワクチン接種については 7 日間隔、続いてさらなるワクチン接種について 2 8 日間隔で患者にワクチン接種した。合計 1 0 ~ 2 0 × 1 0 6 の成熟スルビピン₉₆₋₁₀₄ パルス化 D C を、1 % ヒト血清アルブミンを含有する P B S 中に再懸濁させ、局所リンパ節に近い大腿部の腹側正中領域において、注射部位ごとに 1 . 5 × 1 0 6 D C のアリコートで皮内注射した。排液リンパ節が除去および / または照射された肢節を排除した。患者の健康状態の重大な悪化または C N S 転移の発生の不在下で、5 回のワクチン接種後に白血球除去輸血を繰り返した。

【 0 1 0 9 】

臨床および免疫学的応答の測定

50

ワクチン接種前、およびその後3ヶ月ごとまたは疾患の進行の重大な臨床的徴候が見られた場合に、CTスキャンを行った。3ヶ月ごとに得られるPBM Cを用いて免疫学的応答をELISPOTアッセイによりモニターして、スルビピン₉₆₋₁₀₄特異性IFN- γ 放出を検出した。ELISPOTアッセイの感度を拡大するために、PBM Cを、5%熱不活化ヒト血清および2mMのL-グルタミンで補足されたx-vivo培地(Bio Whittaker、Walkersville、メリーランド)中、10 μ Mのペプチドの存在下で、24穴プレート(Nunc、デンマーク)中1 \times 10⁶細胞/mlの濃度でインビトロで1回刺激した。2日後、40IU/mlの組み換えインターロイキン-2(IL-2)(Chiron、レーティンゲン、ドイツ)を添加した。10日後、細胞を反応性について試験した。この目的のために、ニトロセルロース底の96穴プレート(MultiScreen MAIP N45、Millipore、Glostrup、デンマーク)を抗INF- γ 抗体(1-D1K、Mabtech、スウェーデン)でコートした。リンパ球を、ウェルごとに200 μ lのx-vivo培地中10⁴~10⁵細胞で10⁴T2細胞および当該ペプチドと共に最終濃度2 μ Mで添加した。37 $^{\circ}$ Cで一夜インキュベーションし、2回洗浄した後、ビオチニル化検出抗体(7-B6-1-ビオチン、Mabtech、スウェーデン)を添加し;アルカリホスファターゼ-アビジンをそれぞれの基質(GibcoBRL)と共に使用して、その特異的結合を可視化した。暗紫色(AlphaImager System(Alpha Innotech、サンリアンドロ、CA、USA)を用いて定量化した)が出現したら反応を停止させた。

【0110】

スルビピン₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201反応性CD8⁺Tリンパ球を、マルチマー-スルビピン₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201複合体により、ワクチン接種部位ならびに内臓、軟組織、または皮膚転移の両方でインサイチュで追跡した。ワクチン接種部位を全ての患者において皮内注射後24時間で切除し、一方、転移病巣は、容易にアクセス可能である選択された患者(患者KNおよびGB)においてのみ除去するか、または治癒目的で除去した(患者WW)。マルチマー-ペプチド/MHC複合体の染色法は既に記載されている(68)。HLA-A*0201の細胞外領域(残基1-275)の5'末端で酵素ビオチニル化の認識部位を導入することにより、マルチマー-スルビピン₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201複合体を生成させた。組み換えタンパク質をサイズ排除(Sephadex G25、Pharmacia、エルランゲン、ドイツ)およびイオン交換(mono-Q、Pharmacia)クロマトグラフィーにより精製し、それぞれのペプチドおよび2-ミクログロブリンの存在下での希釈によりインビトロで折り畳んだ。Sephadex G25カラム上でのゲル濾過後、タンパク質をデキストラン分子と接合させたストレプトアビジン-FITC(L. Winter博士(DAKO、コペンハーゲン、デンマーク)の好意により提供されたもの)でマルチマー化して、多価HLA-デキストラン複合体を生成させた。それぞれのサンプルの低温保存断片を一夜乾燥し、続いて冷アセトン中で5分間固定した。全てのインキュベーション工程を暗所、室温で次のように行った:(i)抗体-CD8抗体(1:100、クローンHIT8a、Pharmingen、サンディエゴ、CA)を45分間、(ii)Cy3-接合ヤギ抗マウス(1:500希釈;コード115-165-100、Dianova、ハンブルグ、ドイツ)を45分間、最後に(iii)マルチマーを75分間。各工程間で、スライドをPBS/BSA0.1%中10分間2回洗浄した。最後に、スライドをベクタシールド中でマウントし、Leica共焦点顕微鏡(TCS 4D、Leica、マンハイム、ドイツ)下で観察した。

【0111】

結果

患者の特徴、毒性および臨床経過

5人のかなり進行したIV期黒色腫患者を登録させた。2人はぶどう膜黒色腫にかかっており、1人は軟組織黒色腫にかかっており、残りの1人は皮膚黒色腫にかかっていた。症候性脳転移の徴候のために、1人の患者は2回だけワクチン接種した後治療をやめた。

他の4人の患者は15回までのワクチン接種を受けた。1人の患者は残存する転移を外科的に切除した後、腫瘍のない状態で心不全により死亡した。もう一人の患者は内臓転移(RW)の出現のために10回のワクチン接種後に治療をやめた。1人の患者は15回のワクチン接種後も実験を続けた。詳細な患者の特徴、薬歴、ワクチン接種回数および生存状況を表5にまとめる。

【0112】

重大な毒性は起こらなかった。従って、ヘモグロビン、白血球および血小板、ならびに乳酸脱水酵素、クレアチニンおよびコリンエステラーゼはワクチン接種療法により影響を受けなかった(図16)。全身性または局所毒性の徴候は注射部位で観察されなかった。さらに、傷の治癒の低下、出血性障害、心不全、脈管炎または炎症性腸管疾患は検出されなかった。1人の患者(WW)において、既存の肝臓転移はワクチン接種療法下で安定化されたが、新しい副腎転移が起こった。残念なことに、この患者は治療的手術後に腫瘍がなかったが心不全のために死亡した。脳転移が患者PBにおいてワクチン接種開始後わずか4週間で検出された。従って、この患者は2回のみDC注射した後さらなるワクチン接種から排除しなければならなかった。他の3人の患者はその全般的な健康状態が実質的に損なわれることなく転移性疾患のゆっくりとした進行を示した。際だって、患者KNに関して、ワクチン開始時での重度の転移および疾患の進行が速かったにもかかわらず、13ヶ月(ワクチン開始から死亡まで)の全体的な生存が達成された。患者GBはスルビピン-ペプチドパルス化DCでのワクチン接種の開始後14ヶ月でプロトコルを続けていた。しかしながら、両患者(RWおよびGB)は腫瘍抑制のために、皮下腫瘍の照射(RW)または局所化学療法(GB)のいずれかの追加の局所治療を受けていたことに注目すべきである。

10

20

【0113】

スルビピン特異性CD8+T細胞応答

細胞毒性T細胞応答の反応速度をモニターするために、ワクチン接種前および3ヶ月後に得られたPBMCを、IFN- γ についてのELISPOTにより修飾スルビピン₉₆₋₁₀₄ エピトープに対する反応性について試験した。分析前に、このアッセイの感度を拡大するためにPBMCを一度インピトロで刺激した。試験した4人の患者全てにおいて、スルビピン₉₆₋₁₀₄ 反応性T細胞の誘発が顕著であった(図17)。他のHLA-A*0201限定スルビピンペプチド、すなわち非修飾スルビピン₉₆₋₁₀₄ および隣接するSur9エピトープに対する反応性についての分析は、患者のうちの2人(KNおよびRW)においてこれらのペプチドに対してT細胞応答を示した(データは省略)。

30

【0114】

末梢血における腫瘍特異性T細胞応答の測定の予後および臨床値は繰り返し問題として取り上げられてきた；従って、本発明者らはペプチド/MHCマルチマー染色によるインサイチュ腫瘍浸潤リンパ球中、スルビピン₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201反応性CD8+Tリンパ球の存在についても試験した。この方法を有効にするために、本発明者らはまず24時間以内にワクチン接種部位で発生する遅延型過敏性反応からの組織サンプルを分析した。この分析により、ペプチドパルス化DCの皮内注射は強力なペプチド特異性炎症性T細胞浸潤を誘発するという先の観察が確認された。次に、ペプチド/MHCマルチマー染色法を軟組織および内臓転移に適用し、これによりCD8+浸潤物中スルビピン₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201反応性細胞の存在が明らかになった。この観察により、ワクチン接種は所望の特異性を有するT細胞を誘発するだけでなく、これらに必要なホーミング能力を付与することが示唆される。

40

【0115】

【 表 7 】

表5 ワクチン接種試験の概要：患者の特徴

患者ID	年齢/性別	一次腫瘍からI V期までの時間	薬歴	測定可能な疾患	臨床転帰	ワクチン接 種回数	初回ワクチ ン接種後の 生存期間
GB	40才/女性	4年8ヶ月	LITT、フオ テムシン/IL -2IFN α 、 トレオスルファ ン/ジェムシタ ピン	肝臓	PD (既存および新規 肝臓病巣、新規脾臓お よび胸膜転移のゆっく りした増殖)	15	+14ヶ月
KN	53才/男性	11年	IL-2IFN α /ヒスタミン 、フオテムシン 、トレオスルフ アン/ジェムシ タピン	肝臓、腎臓、軟 組織、骨	PD (既存の病巣、新 規リンパ節、胸膜およ び縦隔病巣のゆっく りした増殖)	13	13ヶ月
WW	73才/男性	14ヶ月	外科手術、DC ワクチン接種、 デカルバジン	肝臓	PD (安定な肝臓、新 規副腎転移)	12	12ヶ月 (手 術後の発 作のため)
RW	72才/男性	16年	外科手術、放射 線療法、アドリ ブラスチン/イ フォスファアミド 、イクソチン、 デカルバジン、 TNF/メルフ アラン	軟組織	PD (既存および新規 軟組織転移の増殖；1 2回ワクチン接種後、 心臓、肺および筋肉転 移を検出)	12	+12ヶ月
PB	52才/男性	2年3ヶ月	放射線療法	肺、腎臓	PD (新規皮膚および 脳転移)	2	4ヶ月

【 0 1 1 6 】

参考文献

Int.J.Clin.Lab.Res., 27: 81-86, 1997.

2. Rosenberg, S. A. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J.Natl.Cancer Inst.*, 20;88: 1635-1644, 1996.

3. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Burlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P., and Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int.J.Cancer*, 80: 219-230, 1999. 10

4. Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 58: 732-736, 1998.

5. Brossart, P., Heinrich, K. S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V. L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood*, 93: 4309-4317, 1999. 20

【 0 1 1 7 】

6. Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., and Nadler, L. M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.*, 10: 673-679, 1999.

7. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17: 3247-3259, 1998. 30

8. Altieri, D. C., Marchisio, P. C., and Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest*, 79: 1327-1333, 1999.

9. Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., and Altieri, D. C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J.Biol.Chem.*, 273: 11177-11182, 1998.

10. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J.Invest Dermatol.*, 113: 1076-1081, 1999. 40

【 0 1 1 8 】

11. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest*, 79: 1121-1126, 1999.

12. Andersen, M. H., Sondergaard, I., Zeuthen, J., Elliott, T., and Haurum, J. S. An assay for peptide binding to HLA-Cw*0102. *Tissue Antigens.*, 54: 185-190, 1999. 50

13. Andersen, M. H., Bonfill, J. E., Neisig, A., Arsequell, G., Ndergaard, I., Neefjes, J., Zeuthen, J., Elliott, T., and Haurum, J. S. Phosphorylated Peptides Can Be Transported by TAP Molecules, Presented by Class I MHC Molecules, and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL. *J.Immunol.*, 163: 3812-3818, 1999.
14. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., Winkelhake, J., and Spack, E. G. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J.Immunol. Methods*, 210: 149-166, 1997. 10
15. Pass, H. A., Schwarz, S. L., Wunderlich, J. R., and Rosenberg, S. A. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J.Sci.Am.*, 4: 316-323, 1998.
- 【 0 1 1 9 】
16. Berke, Z., Andersen, M. H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., and Haurum, J. S. Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*, 14: 419-426, 2000. 20
17. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.
18. Cornelison, T. L. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr.Opin.Oncol.*, 12: 466-473, 2000.
19. Lee, S. P., Chan, A. T., Cheung, S. T., Thomas, W. A., CroomCarter, D., Dawson, C. W., Tsai, C. H., Leung, S. F., Johnson, P. J., and Huang, D. P. CTL control of EBV in naso-pharyngeal carcinoma (NPC): EBV-specific CTL responses in the blood and tumors of NPC patients and the antigen-processing function of the tumor cells. *J.Immunol.*, 165: 573-582, 2000. 30
20. Swana, H. S., Grossman, D., Anthony, J. N., Weiss, R. M., and Altieri, D. C. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N.Engl.J.Med.*, 341: 452-453, 1999.
- 【 0 1 2 0 】
21. Salgaller, M. L., Afshar, A., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 55: 4972-4979, 1995. 40
22. Salgaller, M. L., Marincola, F. M., Cormier, J. N., and Rosenberg, S. A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.
23. Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jon-geneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J.Immunol.*, 160: 1750-1758, 1998. 50

24. Pardoll, D. M. Cancer vaccines. *Nat.Med.*, 4: 525-531, 1998.
25. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C. A., Becker, V., Gross, A. J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G. A., and Ringert, R. H. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat.Med.*, 6: 332-336, 2000.
- 【 0 1 2 1 】
26. Becker, J. C., Guldberg, P., Zeuthen, J., Brocker, E. B., and thor Straten, P. Accumulation of identical T cells in melanoma and vitiligo-like leukoderma. *J.Invest.Dermatol.*, 113: 1033-1038, 1999. 10
27. Rohayem, J., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Oehmichen, A., Schmitz, M., Mehlhorn, J., Conrad, K., and Rieber, E. P. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 2000. Apr. 1.;60.(7.):1815.-7., 60: 1815-1817.
28. Adida, C., Haioun, C., Gaulard, P., Lepage, E., Morel, P., Briere, J., Dombret, H., Reyes, F., Diebold, J., Gisselbrecht, C., Salles, G., Altieri, D. C., and Molina, T. J. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 96: 1921-1925, 2000. 20
29. Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
30. Kawasaki, H., Altieri, D. C., Lu, C. D., Toyoda, M., Tenjo, T., and Tanigawa, N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 5071-5074, 1998. 30
- 【 0 1 2 2 】
31. Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H. G., and Rieber, E. P. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.*, 60: 4845-4849, 2000.
32. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Becker, J. C., and thor Straten, P. Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.*, 61: 869-872, 2001. 40
33. Lee, K. H., Panelli, M. C., Kim, C. J., Riker, A. I., Bettinotti, M. P., Roden, M. M., Fetsch, P., Abati, A., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J.Immunol.*, 161: 4183-4194, 1998.
34. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, 50

- J. H., and White, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat. Med.*, 4: 321-327, 1998.
35. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274: 94-96, 1996.
【 0 1 2 3 】
36. Schrama, D., Andersen, M. H., Terheyden, P., Schroder, L., Pedersen, L. O., thor Straten, P., and Becker, J. C. Oligoclonal T-Cell Receptor Usage Of Melanocyte Differentiation Antigen-reactive T Cells in Stage IV Melanoma Patients. *Cancer Res.*, 61: 493-496, 2001. 10
37. Luxembourg, A. T., Borrow, P., Teyton, L., Brunmark, A. B., Peterson, P. A., and Jackson, M. R. Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+ T cells usable in immunotherapy. *Nat. Biotechnol.*, 16: 281-285, 1998.
38. Kirkin, A. F., Reichert Petersen, T., Olsen, A. C., Li, L., thor Straten, P., and Zeuthen, J. Generation of human-melanoma specific T lymphocyte clones defining novel cytolytic targets with panels of newly established melanoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.*, 41: 71-81, 1995. 20
39. Scheibenbogen, C., Lee, K. H., Mayer, S., Stevanovic, S., Moebius, U., Herr, W., Rammensee, H. G., and Keilholz, U. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 3: 221-226, 1997.
40. thor Straten, P., Guldberg, P., Gronbaek, K., Zeuthen, J., and Becker, J. C. In Situ T-Cell Responses against Melanoma Comprise High Numbers of Locally Expanded T-Cell Clonotypes. *J. Immunol.*, 163: 443-447, 1999. 30
【 0 1 2 4 】
41. Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veele, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Wouter, D. J., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.*, 193: 73-88, 2001.
42. de Vries, T. J., Fourkour, A., Wobbes, T., Verkroost, G., Ruiter, D. J., and van Muijen, G. N. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.*, 57: 3223-3229, 1997. 40
43. Jager, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., and Knuth, A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int. J. Cancer*, 66: 470-476, 1996.
44. Cormier, J. N., Abati, A., Fetsch, P., Hijazi, Y. M., Rosenberg, S. A., Mari 50

ncola, F. M., and Topalian, S. L. Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J.Immunother.*, 21: 27-31, 1998.

45. Riker, A., Cormier, J., Panelli, M., Kammula, U., Wang, E., Abati, A., Fetsch, P., Lee, K. H., Steinberg, S., Rosenberg, S., and Marincola, F. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery*, 126: 112-120, 1999.

【 0 1 2 5 】

46. Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W. J., and Lotze, M. T. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J.Clin.Invest*, 98: 1633-1641, 1996. 10

47. Grossman, D., Kim, P. J., Schechner, J. S., and Altieri, D. C. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98: 635-640, 2001.

48. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58: 5315-5320, 1998. 20

49. Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J. J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A., and Abad, A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J.Clin.Oncol.*, 17: 2100-2104, 1999.

50. Nakagawara, A. Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities. *Hum.Cell*, 11: 115-124, 1998. 30

【 0 1 2 6 】

51. Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., and Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother.*, 50: 3-15, 2001.

52. Melief, C. J., Toes, R. E., Medema, J. P., van der Burg, S. H., Ossendorp, F., and Offringa, R. Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv.Immunol.*, 75:235-82.: 235-282, 2000. 40

53. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity.*, 11: 263-270, 1999.

54. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396: 580-584, 1998.

55. Zaffaroni, N. and Daidone, M. G. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist.Up* 50

dat., 5: 65-72, 2002.

【 0 1 2 7 】

56. Shinozawa, I., Inokuchi, K., Wakabayashi, I., and Dan, K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk.Res*, 24: 965-970, 2000.

57. Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97: 2777-2783, 2001. 10

58. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.*, 3: 917-921, 1997.

59. Altieri, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 46-54, 2003.

60. Olie, R. A., Simoes-Wust, A. P., Baumann, B., Leech, S. H., Fabbro, D., Stahel, R. A., and Zangemeister-Wittke, U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*, 60: 2805-2809, 2000. 20

【 0 1 2 8 】

61. Andersen, M. H. and thor Straten, P. Survivin--a universal tumor antigen. *Histol.Histopathol.*, 17: 669-675, 2002.

62. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., Brocker, E. B., Becker, J. C., and thor, S. P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res*, 61: 5964-5968, 2001.

63. Currier, J. R., Kuta, E. G., Turk, E., Earhart, L. B., Loomis-Price, L., Janetzki, S., Ferrari, G., Birx, D. L., and Cox, J. H. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J.Immunol.Methods*, 260: 157-172, 2002. 30

64. Elvin, J., Potter, C., Elliott, T., Cerundolo, V., and Townsend, A. A method to quantify binding of unlabeled peptides to class I MHC molecules and detect their allele specificity. *J Immunol Methods*, 158: 161-171, 1993.

65. Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M., and Sette, A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74: 929-937, 1993. 40

【 0 1 2 9 】

66. thor Straten, P., Barfoed, A., Seremet, T., Saeterdal, I., Zeuthen, J., and Guldborg, P. Detection and characterization of alpha-beta-T-cell clonality by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Biotechniques*, 25: 244-250, 1998.

67. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., and Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50: 213-219, 1999.

68. Schrama, D., Pedersen Ls, L. O., Keikavoussi, P., Andersen, M. H., Straten, P. P., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Becker, J. C. Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells. *J. Invest Dermatol.*, 119: 1443-1448, 2002.

69. Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.*, 59: 6097-6102, 1999.

70. Hicklin, D. J., Marincola, F. M., and Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today*, 5: 178-186, 1999.

【 0 1 3 0 】

71. Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F., and Ferrone, S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol.*, 12: 3-13, 2002.

72. Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W. M., Melief, C. J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., and . The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.*, 153: 5586-5592, 1994.

73. Moudgil, K. D. and Sercarz, E. E. Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol. Today*, 15: 353-355, 1994.

74. Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Kawakami, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.*, 157: 2539-2548, 1996.

75. Guichard, G., Zerbib, A., Le Gal, F. A., Hoebeke, J., Connan, F., Choppin, J., Briand, J. P., and Guillet, J. G. Melanoma peptide MART-1(27-35) analogues with enhanced binding capacity to the human class I histocompatibility molecule HLA-A2 by introduction of a beta-amino acid residue: implications for recognition by tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Med. Chem.*, 43: 3803-3808, 2000.

【 0 1 3 1 】

76. Clay, T. M., Custer, M. C., McKee, M. D., Parkhurst, M., Robbins, P. F., Kerstann, K., Wunderlich, J., Rosenberg, S. A., and Nishimura, M. I. Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J. Immunol.*, 162: 1749-1755, 1999.

77. Melief, C. J., van der Burg, S. H., Toes, R. E., Ossendorp, F., and Offringa, R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.*, 188: 177-182, 2002.

78. Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., and Knuth, A. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer*, 71: 142-147, 1997.

10

20

30

40

50

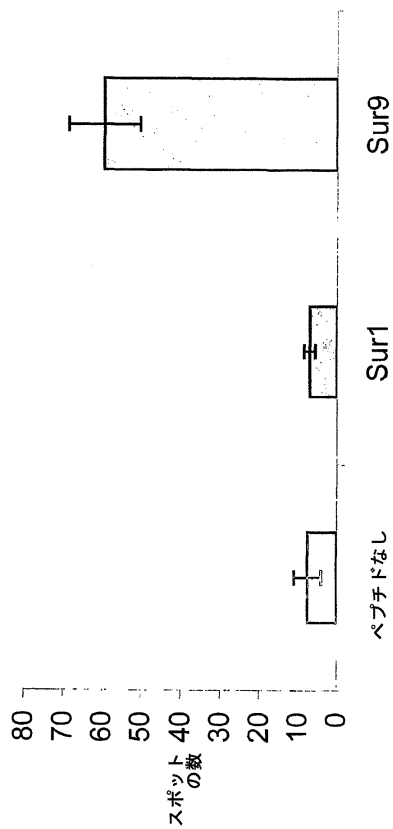
79. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den, D. P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E., and Schuler, G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J.Exp.Med.*, 190: 1669-1678, 1999.

80. Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R., and Greenberg, P. D. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of T cell-mediated vitiligo. *J.Exp.Med.*, 192: 1637-1644, 2000.

10

81. Simon, R. M., Steinberg, S. M., Hamilton, M., Hildesheim, A., Khleif, S., Kwak, L. W., Mackall, C. L., Schlom, J., Topalian, S. L., and Berzofsky, J. A. Clinical trial designs for the early clinical development of therapeutic cancer vaccines. *J.Clin.Oncol.*, 19: 1848-1854, 2001.

【図1】



【図2】

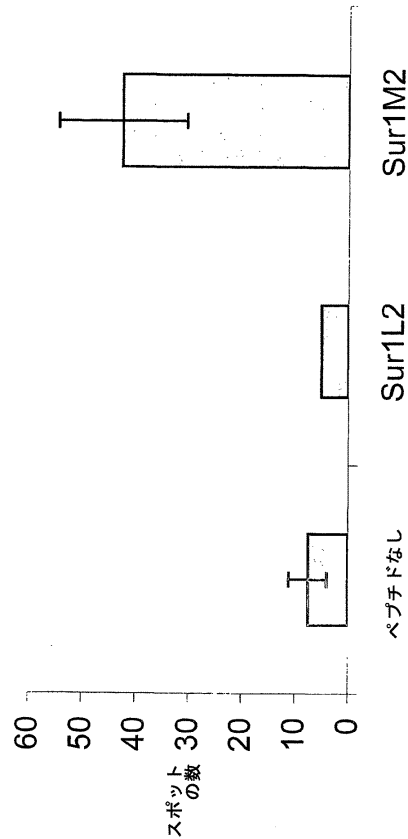
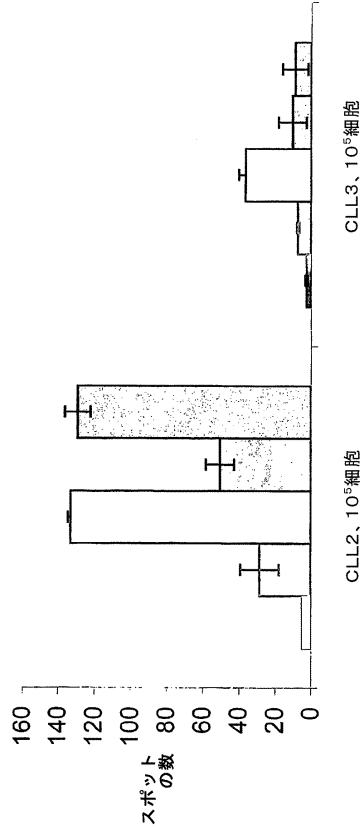


Fig. 1

Fig. 2

【 図 3 】



【 図 4 】

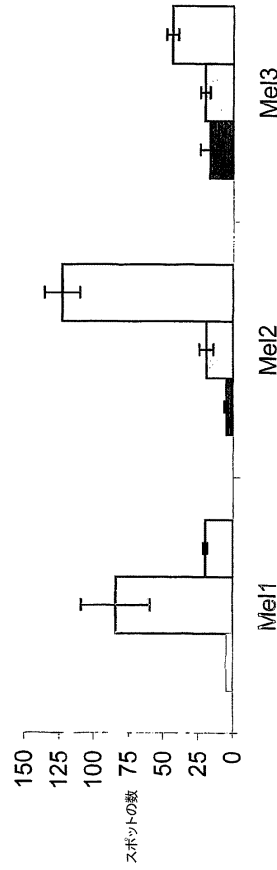


Fig. 3

Fig. 4

【 図 5 】

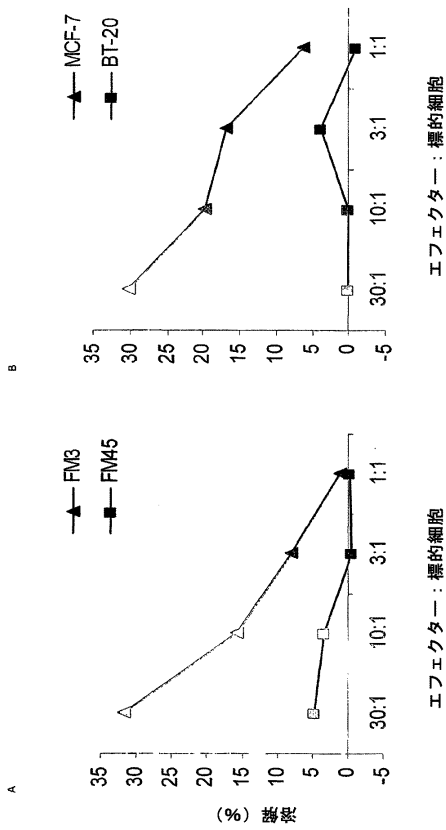


Fig. 5

【 図 6 】

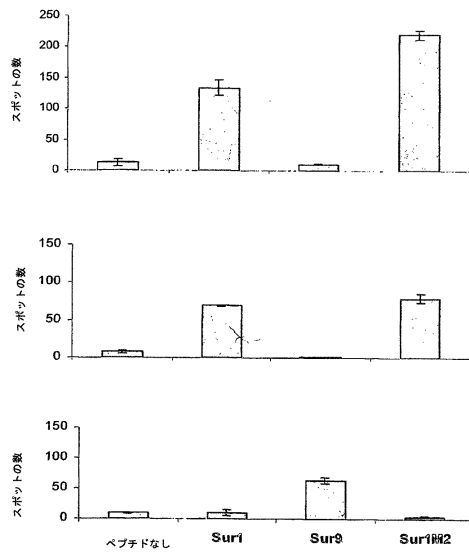


Fig.6

【 図 7 】

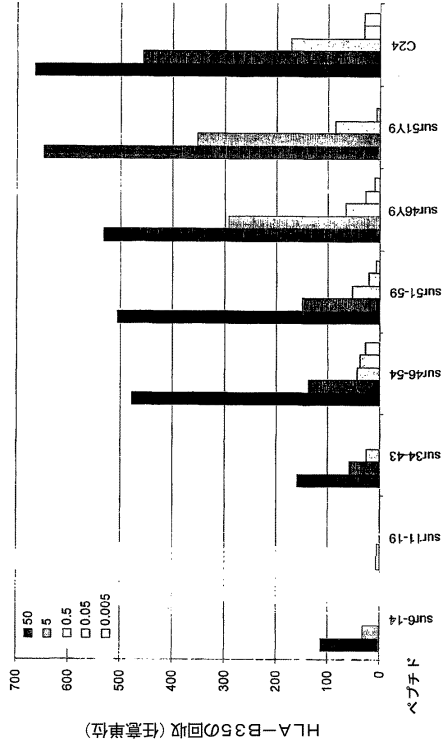


Fig. 7

【 図 8 】

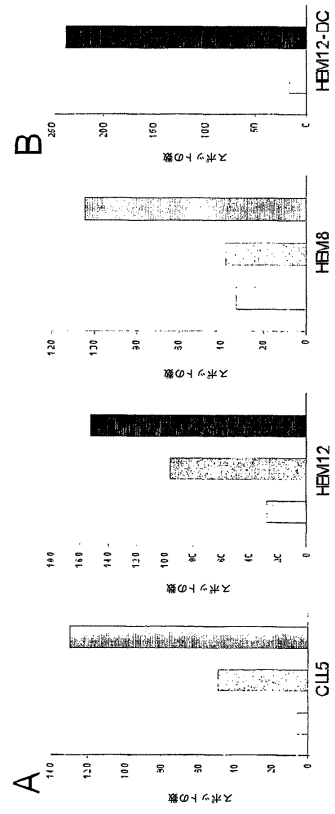


Fig. 8

【 図 9 】

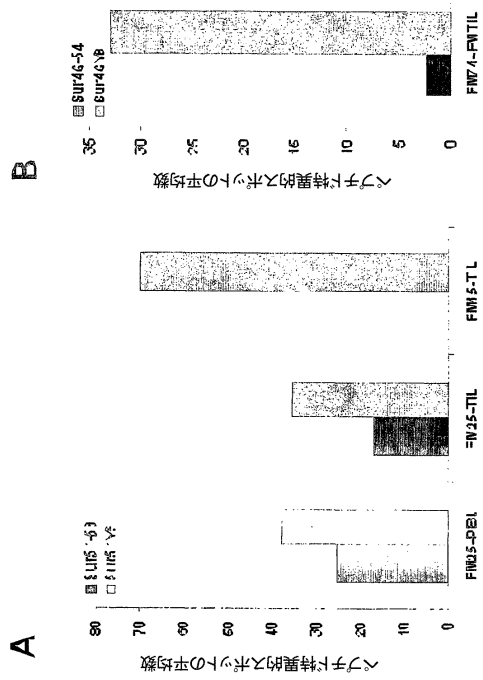


Fig. 9

【 図 10 】

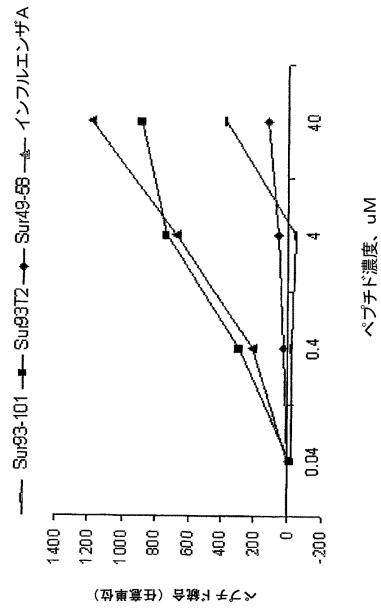
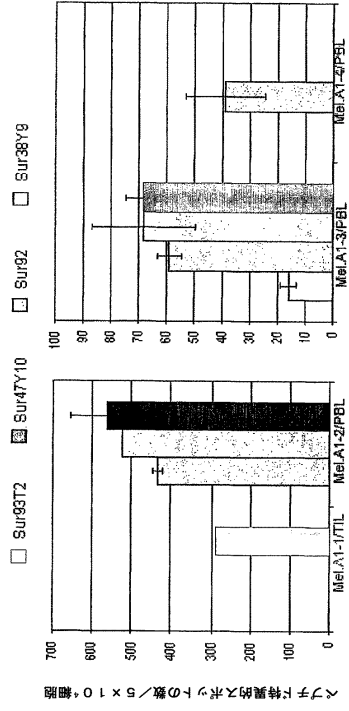


Fig. 10

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

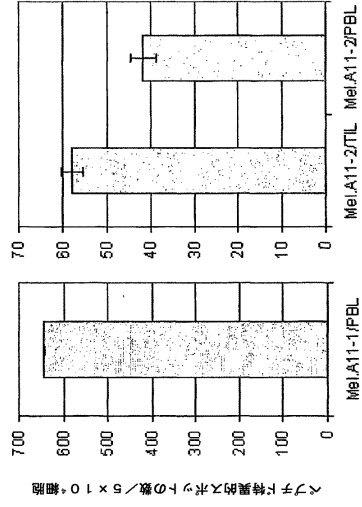
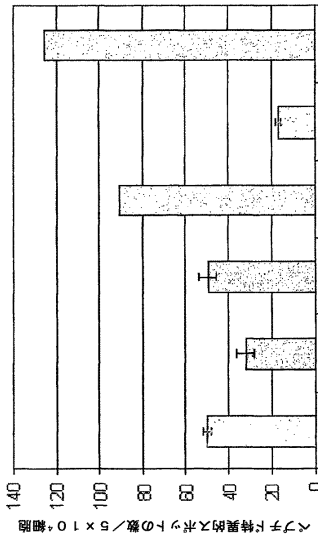


Fig. 11

Fig. 12

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

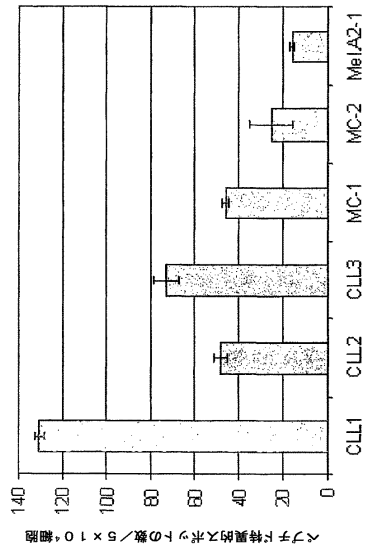


Fig. 13

Fig. 14

【図15】

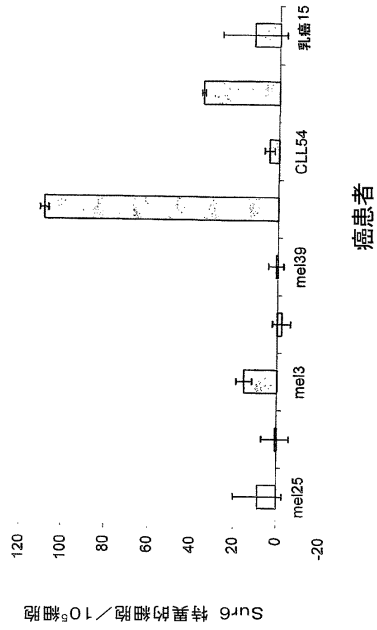


Fig. 15

【図16】

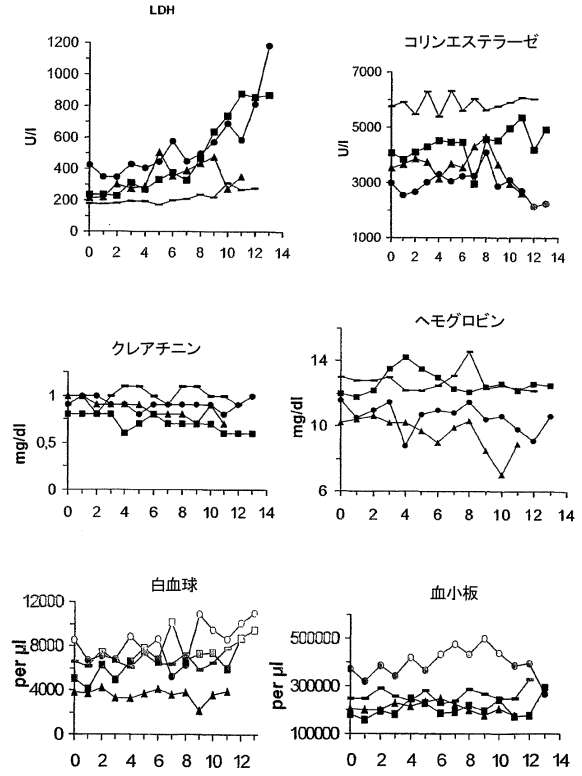


Fig. 16

【図17】

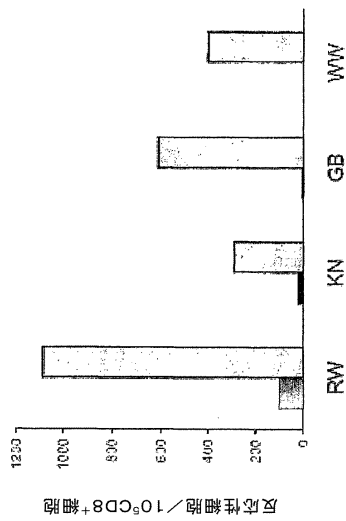


Fig. 17

【配列表】

0005509185000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 37/04
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 Y

(72)発明者 エイヴィン・ペール・トール・ストラテン
デンマーク、デーコー - 2 6 5 0 ヴイドウレ、カテリーネ・ブートフスヴァイ 1 7 番

(72)発明者 マス・ハル・アナセン
デンマーク、デーコー - 2 9 0 0 ヘレルupp、スチューエン・チル・ヴェンストレ、エスタースヴァイ 2 7 番

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 Cancer Research , 2 0 0 1 年 , vol.61 , p.5964-5968

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K 7 / 0 6
A 6 1 K 3 8 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 3 7 / 0 4
C 1 2 Q 1 / 0 2
G 0 1 N 3 3 / 5 3
CAp l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	存活蛋白衍生的肽及其用途		
公开(公告)号	JP5509185B2	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	JP2011270382	申请日	2011-12-09
申请(专利权)人(译)	Suruvakku安公寓酒店细胞Sukabu		
当前申请(专利权)人(译)	Suruvakku安公寓酒店细胞Sukabu		
[标]发明人	エイヴィンパール・トール・ストラテン マス・ハル・アナセン		
发明人	エイヴィン・パール・トール・ストラテン マス・ハル・アナセン		
IPC分类号	C07K7/06 C12Q1/02 A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53 C07K14/47 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/5158 A61P1/00 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/4738 C07K14/4747 G01N33/574 G01N33/57484 A61K38/04 A61K39/001102 A61K39/00115		
FI分类号	C07K7/06.ZNA C12Q1/02 A61K37/02 A61K39/00.H A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53.Y A61K38/00 C07K14/47.ZNA C07K16/18 C07K7/06		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA20 4H045/FA71		
代理人(译)	山田卓司		
优先权	10/354090 2003-01-30 US 10/715417 2003-11-19 US		
其他公开文献	JP2012082213A JP2012082213A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) 要解决的问题: 提供作为MHC I类限制性T细胞表位的存活蛋白衍生肽, 以及使用所述肽进行诊断和治疗的方法, 特别是在癌症中。一种源自肿瘤相关抗原survivin的MHC I类限制性肽, 能够以高亲和力与I类HLA分子结合, 能够在癌症患者的PBL群体中引发产生INF-γ的细胞, 能够原位检测细胞毒性T细胞的肽, 含有该肽的治疗和诊断组合物, 及其用途。【选择图】无

HLA	1位	2位	3位	5位	6位	7位	C末端
HLA-A1		T, S	D, E			L	Y
HLA-A2		L, M	F, Y		V		L, V
HLA-A3		V, I, F, Y	M, L, F, Y				K, Y, F
HLA-A11			I				K, R
HLA-A23		I, Y		I, V			W, I
HLA-A24		Y			P		I, L, F
HLA-A25		M, A, T					W
HLA-A26	E, D	V, T, I, L			I, L, V		Y, F
HLA-A28	E, D	V, A, L					A, R
HLA-A29		E					Y, L
HLA-A30		Y, L, F, V					Y
HLA-A31			L, M, F, Y				R
HLA-A32		I, L					W
HLA-A33		Y, I, L, V					R
HLA-A34		V, L					R
HLA-A66	E, D	T, V					R, K
HLA-A68	E, D	T, V					R, K
HLA-A69		V, T, A					V, L
HLA-A74		A, P					V, L
HLA-B5		T	F, Y				I, L
HLA-B7		P					L, F
HLA-B8			K		K, R		L
HLA-B14		R, K					L, V
HLA-B15 (B62)		Q, L, K, P, H, V, I, M, S, T					F, Y, W
HLA-B17		R					L, V
HLA-B27							Y, K, F, L
HLA-B35		P					L, I, L, M
HLA-B37		D, E					I, L, M
HLA-B38		H	D, E				F, L
HLA-B39		R, H					L, F
HLA-B40 (B60, 61)		E	F, I, V				L, V, A, W, M, T, R
HLA-B42		L, P					Y, L
HLA-B44		E					F, Y, W