(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2010-178739
(P2010-178739A)
(43)公開日　平成22年8月19日(2010.8.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4B063
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	101	4B064
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B065
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4C085

審査請求 有　請求項の数 52　ＯＬ　（全 137 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-31273(P2010-31273)
(22)出願日　平成22年2月16日(2010.2.16)
(62)分割の表示　特願2005-253464(P2005-253464)の分割
原出願日　平成7年4月21日(1995.4.21)
(31)優先権主張番号　08/231,565
(32)優先日　平成6年4月22日(1994.4.22)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/417,174
(32)優先日　平成7年4月5日(1995.4.5)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　502006782
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国　メリーランド州　２０８５２，ロックヴィル，エグゼキュティブ・ブールバード　６０１１，スイート　３２５，ナショナル　インスティチューツ・オブ・ヘルス，オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰

最終頁に続く

(54)【発明の名称】メラノーマ抗原

(57)【要約】　（修正有）
【課題】Ｔ細胞によって認識されるメラノーマ抗原をコードする遺伝子、およびそれらに対応するタンパク質、ならびにこれらの遺伝子またはタンパク質を用いての予防、診断および治療方法を提供する。
【解決手段】Ｔリンパ球により認識されるＭＡＲＴ－１と命名されたメラノーマ抗原をコードする核酸配列、上記核酸配列がコードするタンパク質、および上記タンパク質に対する抗体。上記抗原タンパク質および抗体を用いた、メラノーマまたは転移性メラノーマの診断、評価または予後診断するためのバイオアッセイ。さらに、ＭＡＲＴ－１に由来する免疫原性ペプチドおよびｇｐ１００と命名された第２のメラノーマ抗原。ＭＡＲＴ－１メラノーマ抗原またはｇｐ１００抗原に由来し、免疫原性を高めるように改変された免疫原性ペプチド。上記タンパク質およびペプチドの、メラノーマの予防または治療のための免疫原としての使用。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１のヌクレオチド配列、又は配列番号１のヌクレオチド配列に縮重しているヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。
【請求項２】
配列番号２の部分、及びＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）、ＥＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号１７）、又はＡＡＧＩＧＩＬＴＶＩ（配列番号１８）のアミノ酸配列を含むペプチド。
【請求項３】
ＭＡＲＴ－１タンパク質を製造する方法であって、
（ａ）請求項１の核酸を発現ベクターに挿入し、
（ｂ）該発現ベクターを宿主細胞内に移入し、
（ｃ）該ベクターの増幅及び該タンパク質の発現に適する条件下で該宿主細胞を培養し、そして
（ｄ）該タンパク質を収穫する
ことを含む、上記方法。
【請求項４】
発現ベクターがバキュロウイルスベクターである、請求項３の方法。
【請求項５】
宿主細胞が昆虫細胞である、請求項３の方法。
【請求項６】
請求項１の核酸を含む、組換え発現ベクター。
【請求項７】
請求項６の組換え発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項８】
前記組換え発現ベクターによりコードされる前記タンパク質の発現を可能にするように、請求項６の組換え発現ベクターでトランスフォーム又はトランスフェクトされた宿主生物。
【請求項９】
生物学的サンプル中のＭＡＲＴ－１（配列番号２）をコードするｍＲＮＡを検出するｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法であって、
（ａ）前記生物学的サンプルと請求項１の核酸の相補体とを該相補体と該ｍＲＮＡとの間に複合体が形成される条件下で接触させ；そして
（ｂ）該複合体を検出する
工程を含む、前記方法。
【請求項１０】
サンプルが、哺乳類組織、哺乳類細胞、剖検サンプル、病理サンプル、及び生検サンプルからなる群から選択される、請求項９の方法。
【請求項１１】
生物学的サンプルが疾患状態に苦しむ哺乳類からのものである、請求項９又は１０の方法。
【請求項１２】
（ｃ）前記ｍＲＮＡのレベルを決定することをさらに含む、請求項９～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記疾患状態がメラノーマ又は転移性メラノーマである、請求項１１又は１２の方法。
【請求項１４】
生物学的サンプル中のＭＡＲＴ－１タンパク質（配列番号２）を検出するｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法であって、
（ａ）サンプル中の上記タンパク質と特異的に反応して複合体を形成する試薬を接触させ

；そして
（ｂ）該タンパク質と該試薬との間に該複合体の形成を検出する
工程を含む、前記方法。
【請求項１５】
サンプルが、哺乳類組織、哺乳類細胞、剖検サンプル、病理サンプル、及び生検サンプルからなる群から選択される、請求項１４の方法。
【請求項１６】
試薬が抗体又はその抗原結合断片である、請求項１４又は１５の方法。
【請求項１７】
試薬がモノクローナル抗体である、請求項１６の方法。
【請求項１８】
生物学的サンプルが疾患状態に苦しむ哺乳類からのものである、請求項１４～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
疾患状態がメラノーマ又は転移性メラノーマである、請求項１８の方法。
【請求項２０】
生物学的サンプル中のＭＡＲＴ－１（配列番号２）をコードするゲノム核酸を検出するｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法であって、
（ａ）請求項１の核酸を、該核酸と該ゲノム核酸との間に複合体が形成される条件下で生物学的サンプルと接触させ；そして
（ｂ）該複合体を検出する
工程を含む、前記方法。
【請求項２１】
さらに、
（ｃ）ゲノム配列の変化を決定する
ことを含む請求項２０の方法であって、前記変化が該ゲノムＤＮＡ配列の欠失、置換、付加又は増幅である、前記方法。
【請求項２２】
配列番号２の部分からなる単離された免疫原性ペプチドであって、当該部分がＭＡＲＴ－１配列（配列番号２）に由来する５～２０個の隣接するアミノ酸を含み、細胞性応答又は液性応答を引き起こし得る前記ペプチド。
【請求項２３】
配列番号２の少なくとも５～２０個の隣接するアミノ酸を含む単離された免疫原性ペプチドであって、アミノ酸置換を含み、細胞性応答又は液性応答を引き起こし得る前記ペプチド。
【請求項２４】
ペプチドの長さが少なくとも９アミノ酸である、請求項２２又は２３の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項２５】
（ｉ）ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）、（ｉｉ）ＥＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号１７）、及び（ｉｉｉ）ＡＡＧＩＧＩＬＴＶＩ（配列番号１８）から成る群から選択される配列を含む、請求項２２の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項２６】
ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）である、請求項２５の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項２７】
ペプチド配列が、ＭＨＣ分子へのペプチドの結合を増強するために、ＭＡＲＴ－１配列（配列番号２）の少なくとも１つのアミノ酸の改変を含有する、請求項２２～２６のいずれか１項に記載の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項２８】
アミノ酸配列ＷＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号５３）を含む、請求項２７の単離された免疫

原性ペプチド。
【請求項２９】
ペプチドの長さが少なくとも９アミノ酸である、請求項２７の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３０】
改変が、ペプチド配列中の少なくとも１つのアミノ酸の置換を含む、請求項２７又は２９の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３１】
アミノ酸の置換が、ペプチド配列中の（ｉ）第１位、（ｉｉ）第２位、（ｉｉｉ）第３位、（ｉｖ）第９位、（ｖ）第１０位、及び（ｖｉ）上記（ｉ）～（ｖ）のうちの少なくとも２つの組み合わせ、からなる群から選択される部位に存在する、請求項３０の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３２】
アミノ酸の置換が第１位に存在する、請求項３１の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３３】
アミノ酸置換が第２位又は第９位に存在する、請求項３１の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３４】
式：$X_1X_2X_3$ＩＧＩＬＴX_4
（式中、X_1は任意のアミノ酸であり；
X_2は任意の疎水性脂肪族アミノ酸であり；
X_3は任意のアミノ酸であり；そして
X_4は任意の疎水性脂肪族アミノ酸である）
のアミノ酸配列を含む、請求項２２又は２３の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３５】
X_1がメチオニン、ロイシン、アラニン、グリシン、スレオニン、イソロイシン、チロシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、セリン、リジン又はアスパラギン酸からなる群から選択される、請求項３４の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３６】
X_2がメチオニン、ロイシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、バリン又はスレオニンからなる群から選択される、請求項３４又は３５の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３７】
X_3がメチオニン、ロイシン、アラニン、グリシン、スレオニン、イソロイシン、チロシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、リジン、セリン又はアスパラギン酸からなる群から選択される、請求項３４～３６のいずれか１項に記載の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３８】
X_4がメチオニン、ロイシン、アラニン、グリシン、イソロイシン、バリン又はスレオニンからなる群から選択される、請求項３４～３７のいずれか１項に記載の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項３９】
配列番号４及び５０～６７から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３４～３８のいずれか１項に記載の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項４０】
配列番号５０、５３、５４、及び５８から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３９の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項４１】
ペプチドが、ＨＬＡ－Ａ２により認識される、請求項２２～４０のいずれか１項に記載の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項４２】

ペプチドが天然、合成又は組換えペプチドである、請求項２２～４１のいずれか１項に記載の単離された免疫原性ペプチド。
【請求項４３】
請求項２２～４２のいずれか１項に記載のペプチドをコードする、単離された核酸。
【請求項４４】
請求項４３の少なくとも１つの核酸を含む、組換え発現ベクター。
【請求項４５】
請求項４４の組換え発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項４６】
請求項４４の組換え発現ベクターで、該組換え発現ベクターによりコードされるタンパク質が発現するように、トランスフォーム又はトランスフェクトされた宿主生物。
【請求項４７】
請求項２２～４２のいずれか１項に記載の免疫原性ペプチドと反応し得る抗体。
【請求項４８】
モノクローナル抗体である、請求項４７の抗体。
【請求項４９】
薬学的に許容される担体中の請求項１又は４３の核酸によってコードされるタンパク質又はペプチドを含む、哺乳類を免疫するためのワクチン。
【請求項５０】
ＭＡＲＴ－１タンパク質（配列番号２）に由来するペプチドの免疫原性を評価する方法であって、
（ａ）ＭＡＲＴ－１のアミノ酸配列（配列番号２）に基づいて複数のペプチドを調製し；
（ｂ）該ペプチドの少なくとも１つを哺乳類細胞株とインキュベートし；
（ｃ）該細胞株の哺乳類細胞を腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）に暴露し；そして
（ｄ）該細胞によるＴＩＬの認識をスクリーニングする
工程を含む、前記方法。
【請求項５１】
工程（ａ）のペプチドが約９～１０アミノ酸である、請求項５０の方法。
【請求項５２】
工程（ｂ）の該細胞株の細胞が、ＣＯＳ細胞、Ｔ２細胞、２９３細胞、ＣＨＯ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、樹状突起細胞、単核細胞、及びＥＢＶでトランスフォームされたＢ細胞株からなる群から選択される、請求項５１の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、米国特許出願第０８／２３１，５６５号（１９９４年4月２２日出願）の一部継続出願であり、ここにその全体を援用する。
【０００２】
発明の分野
本発明は、ヒトの癌の予防および治療の分野内にある。より具体的には、本発明は、Ｔ細胞によって認識されるメラノーマ抗原をコードする遺伝子、およびそれらに対応するタンパク質、ならびにこれらの遺伝子またはタンパク質を用いての予防、診断および治療への適用に関する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
メラノーマは、メラノサイトまたはメラノサイト関連母斑細胞のいずれかから誘導される、攻撃的な、時として転移性の腫瘍である（非特許文献１）。メラノーマは全皮膚癌のおおよそ３％近くに達し、メラノーマの世界的増加は、女性の肺がんを除く他のいかなる新生物も及ばない（非特許文献１、非特許文献２）。メラノーマは、明らかに皮膚に局在

している場合でさえ、最大で３０％の患者は、将来、全身に転移し、その大部分は死に至るであろう（非特許文献２）。メラノーマ治療の古典的様式には、外科手術、放射線および化学療法が含まれる。過去１０年間では、免疫療法および遺伝子治療が、メラノーマ治療の新しい可能性のある方法として現れてきた。

【０００４】

Ｔ細胞は、ほとんどのネズミ腫瘍モデルで腫瘍の退縮に重要な役割を演じている。単一の癌抗原を認識する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）は、多くのネズミ腫瘍から単離することができる。これらＴＩＬ＋インターロイキン２の養子免疫伝達は、確立された肺および肝臓への転移の退縮を仲介することが出来る（非特許文献３）。さらに、ＴＩＬを注射することによるＩＦＮ－γの分泌は、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）でのネズミ腫瘍の退縮と明らかな相関を示し、腫瘍抗原によるＴ細胞の活性化を示唆している（非特許文献４）。腫瘍ＴＩＬを、転移性メラノーマ患者内に養子免疫伝達した場合、メラノーマ患者の３５～４０％の転移癌の退縮を仲介することが知られており、このＴＩＬの能力は、抗原を認識することの臨床上の重要性を証明している（非特許文献５；非特許文献６）。

【０００５】

ＣＢ８$^{+}$Ｔ細胞上のＴ細胞受容体は、抗原ペプチド（ＨＬＡ－Ａ２の場合９～１０アミノ酸）、β－２ミクログロブリンおよび主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩ重鎖（ヒトではＨＬＡ－Ａ、Ｂ、Ｃ）からなる複合体を認識する。内在的に合成されたタンパク質の消化によって生成したペプチドは、小胞体に輸送され、ＭＨＣクラスＩ重鎖およびβ２ミクロブロブリンと結合し、最終的に、細胞表面のＭＨＣクラスＩの分子の溝に発現する。それ故、Ｔ細胞は、細胞表面上に発現した完全な分子を検出する抗体とは対照的に、細胞の内側のタンパク質を起源とする分子を検出することが出来る。それ故、Ｔ細胞によって認識される抗原は、抗体によって認識される抗原より、より有用であろう。

【０００６】

癌に対する免疫応答がヒトに存在することの強力な証拠は、メラノーマ沈積物中にリンパ球が存在することによって提供される。これらのリンパ球は、単離すると、ＭＨＣ拘束性に、自己のおよび同種移植のメラノーマに特異的な腫瘍抗原を認識する能力を持つ（非特許文献７、非特許文献８、非特許文献９、非特許文献１０、非特許文献１１、非特許文献１２、非特許文献１３、非特許文献１４）。転移性メラノーマ患者からのＴＩＬは、生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）でメラノサイト－メラノーマ系列に特異的な組織抗原を含む共有抗原を認識する（非特許文献１５、非特許文献１６）。抗メラノーマＴ細胞は、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）では、おそらく腫瘍部位でのクローン拡張および蓄積の結果として、ＴＩＬ中に多く存在すると思われる（非特許文献１７）。多くのメラノーマ患者がこれらの腫瘍に対して細胞性応答および体液性応答を装備しているという事実、ならびにメラノーマがＭＨＣ抗原および腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）の両方を発現しているという事実は、メラノーマ患者を免疫治療するためには、さらなるメラノーマ抗原の同定および特徴付けが重要であることを示唆している。

【０００７】

末梢血リンパ球は、メラノーマ腫瘍抗原と思われる抗原の同定に用いられた。非特許文献１８は、生体内で変異誘発腫瘍細胞を用いて繰り返し免疫化した患者の末梢血で確認されたＴ細胞クローンを用いて、ＭＡＧＥ－１と呼ばれるメラノーマ抗原をコードする遺伝子の特徴を調べた。メラノーマ患者の末梢血リンパ球から誘導された細胞毒性Ｔ細胞は、抗原ペプチドをコードするＭＡＧＥ－１の同定に用いられた（非特許文献１９）。また、非特許文献２０は、生体外で、腫瘍で繰り返し刺激することによって感受性になった患者の末梢血リンパ球を用いて、チロシナーゼと呼ばれるメラノーマ抗原をコードする遺伝子の特徴を調べた。さらに、メラノーマ抗原の治療への可能性の確認は、Ｂｒｏｗｎら（特許文献１）によって提供されている。Ｂｒｏｗｎら（特許文献１）は、組換え体ワクシニアウイルスを基礎としたメラノーマワクチンに関し、この中で、メラノーマ抗原ｐ９７はネズミモデルで腫瘍細胞の挑戦を予防する効果を示すと報告している。さらなるメラノーマ抗原の特徴を調べることは、癌、特にメラノーマの免疫療法の新規戦略の開発のために

重要である。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【特許文献１】米国特許第５，２６２，１７７号明細書
【特許文献２】国際公開第９０／１４４４３号
【特許文献３】国際公開第９０／１４４２４号
【特許文献４】国際公開第９３／２０８１８５号
【特許文献５】欧州特許出願第０５６３４８５Ａ１号明細書
【特許文献６】国際特許出願第１８４，１８７号
【特許文献７】欧州特許出願第０１７１４９６号明細書
【特許文献８】欧州特許出願第０１７３４９４号明細書
【特許文献９】国際公開第８６／０１５３３号
【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】“Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ”、１９９１、Ａｂｂａｓ，Ａ．Ｋ．、Ｌｅｃｈｔｍａｎ，Ａ．Ｈ．、Ｐｏｂｅｒ，Ｊ．Ｓ．編；Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｃｏｍｐａｎｙ、フィラデルフィア：３４０－３４１
【非特許文献２】ＫｉｒｋｗｏｏｄおよびＡｇａｒｗａｌａ、１９９３、Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、７：１－１６
【非特許文献３】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．ら、１９８６、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２３：１３１８－１３２１
【非特許文献４】Ｂａｒｔｈ，Ｒ．Ｊ．ら、１９９１、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：６４７－６５８
【非特許文献５】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．ら、１９８８、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．、３１９：１６７６－１６８０
【非特許文献６】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．、１９９２、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、１０：１８０－１９９
【非特許文献７】Ｉｔｏｈ，Ｋ．ら、１９８６、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、４６：３０１１－３０１７
【非特許文献８】Ｍｕｕｌ，Ｌ．Ｍ．ら、１９８７、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１３８：９８９－９９５
【非特許文献９】Ｔｏｐａｌｉａｎ，Ｓ．Ｌ．ら、１９８９、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４２：３７１４－３７２５
【非特許文献１０】Ｄａｒｒｏｗ，Ｔ．Ｌ．ら、１９８９、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４２：３３２９－３３３５
【非特許文献１１】Ｈｏｍ，Ｓ．Ｓ．ら、１９９１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．、１０：１５３－１６４
【非特許文献１２】Ｋａｗａｋａｍｉ，Ｙ．ら、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４８：６３８－６４３
【非特許文献１３】Ｈｏｍ，Ｓ．Ｓ．ら、１９９３、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．、１３：１８－３０
【非特許文献１４】Ｏ’Ｎｅｉｌ，Ｂ．Ｈ．ら、１９９３、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５１：１４１０－１４１８
【非特許文献１５】Ｋａｗａｋａｍｉ，Ｙ．ら、１９９３、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．、１４：８８－９３
【非特許文献１６】Ａｎｉｃｈｉｎｉ，Ａ．ら、１９９３、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１７７：９８９－９８８
【非特許文献１７】Ｓｅｎｓｉ，Ｍ．ら、１９９３、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１７８：１

２３１－１２４６
【非特許文献１８】Ｖａｎ Ｄｅｒ Ｂｒｕｇｇｅｎ，Ｐ．ら、１９９１、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５４：１６４３－１６４７
【非特許文献１９】Ｔｒａｖｅｒｓａｒｉ，Ｃ．ら、１９９２、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１７６：１４５３－１４５７
【非特許文献２０】Ｂｒｉｃｈａｒｄ，Ｖ．ら、１９９３、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１７８：４８９－４９５
【非特許文献２１】Ｙｏｋｏｙａｍａ，Ｗ．Ｍ．ら、１９９１、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４７：３２２９－３２３６
【非特許文献２２】Ｓｉｎｇｅｒ，Ｓ．Ｊ．、１９９０、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．、６：２４７－２９６
【非特許文献２３】Ａｕｓｂｅｌら編、１９８７、“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、ニューヨーク州ニューヨーク
【非特許文献２４】Ｓａｍｂｒｏｏｋら編、１９８９、“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ．Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、ニューヨーク
【非特許文献２５】Ｇｌｕｚｍａｎ，Ｙ．ら、１９８１、Ｃｅｌｌ、２３：１７５－１８２
【非特許文献２６】Ｂｉｒｎｂｏｉｍ，Ｈ．Ｃ．、１９８８、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１６：１４８７－１４９７
【非特許文献２７】Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ，Ｐ．ら、１９８７、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１６２：１５６－１５９
【非特許文献２８】Ｃｈｉｒｇｗｉｎ，Ｊ．Ｍ．ら、１９７９、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、１８：５２９４－５２９９
【非特許文献２９】Ａｖｉｖ，Ｈ．ら、１９７２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、６９：１４０８－１４１２
【非特許文献３０】Ａｌｗｉｎｅ，Ｊ．Ｃ．ら、１９７７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７４：５３５０－５３５４
【非特許文献３１】Ｋａｆａｔｏｓ，Ｆ．Ｃ．ら、１９７９、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、７：１５４１－１５２２
【非特許文献３２】Ｈｏｌｌａｎｄｅｒ，Ｍ．Ｃ．ら、１９９０、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、９：１７４－１７９
【非特許文献３３】Ｗａｔｓｏｎ，Ｊ．Ｄ．ら、１９９２、“Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＤＮＡ”、第２版、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ、ニューヨーク
【非特許文献３４】Ａｕｓｂｅｌら、１９８７、“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”、増補９、１９９０、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、ニューヨーク州ニューヨーク
【非特許文献３５】Ｄａｌｅ，Ｒ．Ｎ．Ｋ．ら、１９７３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７０：２２３８－２２４２
【非特許文献３６】Ｈｅｃｈ，Ｒ．Ｆ．、１９６８、Ｓ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、９０：５５１８－５５２３
【非特許文献３７】Ｂａｒｔｏｎ，Ｓ．Ｋ．ら、１９９２、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、１１４：８７３６－８７４０
【非特許文献３８】Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｒ．Ｔ．ら、１９８３、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１３３：１２５－１３１
【非特許文献３９】Ｅｒｉｃｋｓｏｎ，Ｐ．Ｆ．ら、１９８２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、５１：２４１－２４９
【非特許文献４０】Ｍａｔｔｈａｅｉ，Ｆ．Ｓ．ら、１９８６．Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１５７：１２３－１２８

【非特許文献４１】Ｖａｎｄｅｒ Ｐｌｏｅｇ，Ｍ．、Ｒａａｐ，Ａ．Ｋ．、１９８８、“Ｎｅｗ Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｃｙｔｏｌｏｇｙ”、Ｇｏｅｒｔｔｌｅｒ，Ｋ．、Ｆｅｉｃｈｔｅｒ，ＧＥ．，Ｗｉｔｔｅ，Ｓ．編、１３－２１頁、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、ニューヨーク
【非特許文献４２】Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｒ．Ｂ．、１９６３、Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｓｏｃ．８５：２１４９
【非特許文献４３】“Ｂａｓｉｃ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ”、１９９１、Ｓｔｉｔｅｓ，Ｄ．Ｆ．およびＴｅｒｒ，Ａ．Ｉ．編、Ａｐｐｌｅｔｏｎ ａｎｄ Ｌａｎｇｅ、コネチカット州ノーウォーク、カリフォルニア州サンマテオ
【非特許文献４４】ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５、Ｎａｔｕｒｅ、２５６：４９５－４９７
【非特許文献４５】Ｃａｍｐｂｅｌｌ、“Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｏｄｅｎｔ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ”、Ｂｕｒｄｏｎら編、１９８５、“Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”、第１３巻、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、アムステルダム
【非特許文献４６】Ｈｕｓｅら、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４６：１２７５－１２８１
【非特許文献４７】“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ”、１９９１、Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｐ．ＰｒｉｃｅおよびＤａｖｉｄ，Ｊ．Ｎｅｏｍａｎ編、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州ニューヨーク
【非特許文献４８】Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｄｉａｇｎｏｓｉｓ、第２版、ＲｏｓｅおよびＢｉｇａｚｚｉ編、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、ニューヨーク、１９８０
【非特許文献４９】Ｃａｍｐｂｅｌｌら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ社、１９６４
【非特許文献５０】Ｏｅｌｌｉｒｉｃｈ，Ｍ．、１９８４、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２２：８９５－９０４
【非特許文献５１】ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ編、１９８８、“Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ニューヨーク
【非特許文献５２】Ｍ．Ｂｏｄａｎｓｚｋｙ、１９８４、“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ”、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ、ニューヨーク州ニューヨーク
【非特許文献５３】Ｐａｒｋｅｒ，Ｋ．ら、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４９：３５８０
【非特許文献５４】Ｋｕｂｏ，ＲＴら、１９９４、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５２：３９１３－３９２４
【非特許文献５５】Ｒｕｐｐｅｒｔ，Ｊ．ら、１９９３、Ｃｅｌｌ、７４：９２９－９３７
【非特許文献５６】Ｆａｌｋ，Ｋ．ら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ、３５１：２９０－２９６
【非特許文献５７】Ｃｏｕｌｉｅ，Ｐ．ら、１９９２、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ、５０：２８９－２９７
【非特許文献５８】Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｒ．Ｃ．、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２６０：９２６－９３２
【非特許文献５９】Ｋａｗａｓａｋｉ，Ｙ．ら、１９８９、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４２：２４５３－３４６１

【非特許文献６０】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．ら、１９９２、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、３：７５－９０
【非特許文献６１】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．ら、１９９２、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ、３：５７－７３
【非特許文献６２】Ｃａｂｉｌｌｙら、１９８７、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４：３４３９
【非特許文献６３】Ｎｉｓｈｉｍｕｒａら、１９８７、Ｃａｎｃ．Ｒｅｓ．、４７：９９９
【非特許文献６４】Ｗｏｏｄら、１９８５、Ｎａｔｕｒｅ、３１４：４６６
【非特許文献６５】Ｓｈａｗら、１９８８、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．、８０：１５５５３
【非特許文献６６】Ｍｏｒｒｉｓｏｎ Ｓ．、１９８５、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２９：１２０２
【非特許文献６７】Ｏｉら、１９８６、ＢｉｏＴｅｃｎｉｑｕｅｓ、４：２１４
【非特許文献６８】Ｊｏｎｅｓら、１９８６、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５５２
【非特許文献６９】Ｖｅｒｈｏｅｙａｎら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３９：１５３４
【非特許文献７０】Ｂｉｅｄｌｅｒｅｔら、１９８８、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４１：４０５３
【非特許文献７１】Ｇｏｄｉｎｇ，Ｊ．Ｗ．１９８３．Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ、Ｐｌａｄｅｒｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ社、ニューヨーク州ニューヨーク、ｐｐ．５６－９７
【非特許文献７２】Ｖｉｔｅｔｔａら（１９９１）、“Ｂｉｏｌｏｇｉｃ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ”、Ｄｅ Ｖｉｔａ ＶＴ、Ｈｅｌｌｍａｎ Ｓ．、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．編、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ社、フィラデルフィア
【非特許文献７３】Ｌａｒｓｏｎ，Ｓ．Ｍ．ら（１９９１）、“Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ”、Ｄｅ Ｖｉｔａ Ｖ．Ｔ．、Ｈｅｌｌｍａｎ Ｓ．、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．編、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔ社、フィラデルフィア
【非特許文献７４】Ｋｗｏｎら（１９９１）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：９２２８－９２３２
【非特許文献７５】Ｍａｒｅｓｈら（１９９４）ＤＮＡ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ １３：８７－９５
【非特許文献７６】Ｂｏｏｎ，Ｔ（１９９２）、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、５８：１７７－２１０
【非特許文献７７】Ｚｅｍｍｏｕｒ，Ｊ．ら（１９９２）Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ ４０：２２１－２２８
【非特許文献７８】ＡＳＨＩ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第２版、１９９０
【非特許文献７９】Ｃｅｒｕｎｄｏｌｏ，Ｖ．ら（１９９０）Ｎａｔｕｒｅ、３４５：４４９－４５２
【非特許文献８０】Ｓｃｈｗａｒｔｚｅｎｔｒｕｂｅｒ，Ｄ．ら（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ． １４６：３６７４－６８１
【非特許文献８１】Ｋａｗａｋａｍｉ，Ｙ．ら（１９８８）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６８：２１８３－２１９１
【非特許文献８２】Ｍｉｋｉ，Ｔ．ら（１９８９）Ｇｅｎｅ；８３：１３７－１４６
【非特許文献８３】Ｍｉｋｉら（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｉ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：５１６７－５１７１
【非特許文献８４】Ｓｅｅｄ，Ｂ．およびＡｒｕｆｆｏ，Ａ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：３３６５－３３６９
【非特許文献８５】Ｃｒｏｗｌｅｙ，Ｎ．Ｊ．ら（１９９１），Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１

４６：１６９２－１６９９
【非特許文献８６】Ｈｕｎｔ，Ｄ．Ｆ．ら（１９９２）、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５５：１２６１－１２６３
【非特許文献８７】Ｎｉｊｍａｎ，Ｈ．Ｗ．ら（１９９３）、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：１２１５－１２１９
【非特許文献８８】Ｚａｋｕｔ，Ｒ．ら（１９９３），Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５３：５－８
【非特許文献８９】Ｋｎｕｔｈ．Ａ．ら（１９８９）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：２８０４－２８０８
【非特許文献９０】Ｗｏｌｆｅｌ，Ｔ．ら（１９８７），Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７０：７９７－８１０
【非特許文献９１】Ｓｌｉｎｇｌｕｆｆ，Ｃ．Ｌ．ら（１９９３）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：２９５５－２９６３
【非特許文献９２】Ｓｔｏｒｋｕｓ，Ｗ．Ｊ．ら（１９９３）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：３７１９－３７２７
【非特許文献９３】Ｎｏｒｄｌｕｎｄ，Ｊ．Ｊ．ら（１９８３）、Ｊ．Ａｍ．Ａｃａｄ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．９：６８９－６９５
【非特許文献９４】Ｂｙｓｔｒｙｎ，Ｊ－Ｃら（１９８７）、Ａｒｃｈ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１２３：１０５３－１０５５
【非特許文献９５】Ｒｉｃｈａｒｄｓ，Ｊ．Ｍ．ら（１９９２）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１０：１３３８－１３４３
【非特許文献９６】Ｃｏｈｅｎ，Ｔ．ら（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１８：２８０７
【非特許文献９７】Ｓｈｉｌｙａｎｓｋｙ，Ｊ．ら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：２８２９－２８３３
【非特許文献９８】Ｋｉｍ，Ｒ．およびＷｉｓｔｏｗ，Ｇ．Ｊ．（１９９２）Ｅｘｐ．Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．５５：６５７－６６２
【非特許文献９９】Ａｄｅｍａ，Ｇ．Ｉ．ら（１９９３）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ、１４３：１５７９－１５８５
【非特許文献１００】Ｇｏｗｎ，Ａ．Ｍ．ら（１９８６）Ａｍ　Ｊ　Ｐａｔｈｏｌ　１２３：１９５－２０３
【非特許文献１０１】Ｃｏｌｏｍｂａｒｉ，Ｒ．ら（１９８８）Ｖｉｒｃｈｏｗｓ　Ａｒｃｈｉｖ　Ａ　Ｐａｔｈｏｌ　Ａｎａｔ　４１３：１７－２４
【非特許文献１０２】Ｖｅｎｎｅｇｏｏｒ，Ｃ．ら（１９８８）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１３０：１７９－１９２
【非特許文献１０３】Ｖｏｇｅｌ，Ａ．Ｍ．およびＥｓｃｌａｍａｄｏ，Ｒ．Ｍ．（１９８８）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４８：１２８６－１２９４
【非特許文献１０４】Ｓｃｈａｕｍｂｕｒｇ－Ｌｅｖｅｒ，Ｇ．ら（１９９１）Ｊ．Ｃｕｔａｎ．Ｐａｔｈｏｌ．１８、４３２－４３５
【非特許文献１０５】Ｂａｋｋｅｒ，Ａ．Ｂ．Ｈ．ら（１９９４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：１００５－１００９
【非特許文献１０６】Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．Ａ．ら（１９９４）Ｊ．ＮＣＩ．８６：１１５９
【非特許文献１０７】Ｋｕｂｏ，ＲＴら（１９９４）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：３１９３
【非特許文献１０８】Ｋａｗａｋａｍｉ，Ｙ．ら（１９９４）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８０：３４７
【非特許文献１０９】Ｋａｗａｋａｍｉ，Ｙ．ら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：６４５８
【非特許文献１１０】Ｓｅｔｔ　Ａ．ら（１９９４）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏ

ｌ．３１：８１３
【非特許文献１１１】Ｋａｗａｋａｍｉ，Ｙ．（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９１：３５１５
【非特許文献１１２】Ｗｏｌｆｅｌ，Ｔ．（１９９４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：７５９
【非特許文献１１３】Ｃｏｘ，Ａ．Ｌ．ら（１９９４）．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６４：７１６
【非特許文献１１４】Ｒｉｖｏｌｔｉｎｉ，Ｌら（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４：２２５７－２２６５
【非特許文献１１５】Ｆａｌｋら（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ．３５１：２９１

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
発明の概要
本発明は、一般的には、Ｔリンパ球によって認識されるメラノーマ抗原をコードする核酸配列（ＭＡＲＴ－１）、ならびにこれらの配列によってコードされるタンパク質およびペプチドに関する。さらに、本発明は、これらの核酸配列、タンパク質およびペプチドのバイオアッセイを提供する。また、本発明は、ＭＡＲＴ－１アミノ酸配列より誘導され、それらの免疫原性を増強するように修飾したペプチドを提供する。また、本発明は、ここに記載された核酸配列、タンパク質、ペプチドまたは修飾ペプチドの治療への使用を、提供する。
【００１１】
本発明の一般的な目的は、ＭＡＲＴ－１メラノーマ抗原をコードする、実質的に精製され単離された核酸配列を提供することにある。
本発明のその他の目的は、ベクターおよびＭＡＲＴ－１をコードする核酸配列の全体または部分からなる組換え分子を提供することにある。
【００１２】
本発明のその他の目的は、ＭＡＲＴ－１をコードする核酸配列の全体または部分によってコードされる組換えタンパク質を作り出すことにある。
本発明のさらなる目的は、ＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドまたはその部分と反応するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を提供することにある。
【００１３】
本発明の目的は、生体サンプル中のＭＡＲＴ－１遺伝子またはＭＡＲＴ－１　ｍＲＮＡを検出する方法を提供することにある。
本発明のその他の目的は、生体サンプル中のＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドを検出する方法を提供することにある。
【００１４】
本発明の目的は、ヒトの病気、特にメラノーマおよび転移性メラノーマの診断法を提供することにある。
本発明のさらなる目的は、ＭＡＲＴ－１をコードする核酸配列の全部または部分およびその対応タンパク質またはＭＡＲＴ－１アミノ酸配列より誘導したペプチドからなる、予防的または治療的使用方法を提供することにある。
【００１５】
また、本発明の目的は、ＭＡＲＴ－１をコードする核酸配列全体あるいは部分またはその対応タンパク質からなる、メラノーマを予防または治療するための、メラノーマワクチンを提供することからなる。
【００１６】
本発明のさらなる目的は、ワクチンに用いるための、ＭＡＲＴ－１タンパク質配列より誘導した免疫原性ペプチドを提供することにある。
本発明のその他の目的は、ＭＡＲＴ－１タンパク質配列由来ペプチドの免疫原性を増加

させるか、またはそれらペプチドのＭＨＣ分子との結合を強化することによって抗メラノーマ免疫応答の誘発を強化するように修飾した、ＭＡＲＴ－１タンパク質配列由来ペプチドを、ここに記載したような予防的または治療的方法に用いるために、提供することにある。

【００１７】

さらに、本発明のその他の目的は、ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体あるいは部分またはその対応タンパク質あるいはペプチド、および哺乳動物内でメラノーマ抗原に対する抗体産生を促進する能力を持つ少なくとも１つの免疫原性分子を含む、多価ワクチンを提供することにある。

【００１８】

本発明のその他の目的は、ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体あるいは部分またはその対応タンパク質を遺伝子治療のプロトコールに用いて、メラノーマを予防または治療する方法を提供することにある。

【００１９】

本発明のさらなる目的は、ワクチンに用いるための、ｇｐ１００メラノーマ抗原タンパク質配列に由来する免疫原性ペプチドを提供することにある。

本発明のさらなるその他の目的は、ｇｐ１００メラノーマ抗原配列由来ペプチドの免疫原性を増加させるか、またはＭＨＣ分子との結合を強化することによって抗メラノーマ免疫応答の誘発を強化するように修飾したｇｐ１００メラノーマ抗原由来ペプチドを、ここに記載したような予防的治療的方法に用いるために、提供することにある。

【００２０】

本発明のさらなるその他の目的は、ここに記載したワクチンを用いた、メラノーマの予防的治療的免疫化法を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、免疫療法のための潜在的標的を構成するであろうメラノーマ抗原を同定する方法を提供することにある。

【００２１】

本発明のさらなるその他の目的は、免疫療法に用いるための、ＭＡＲＴ－１配列またはｇｐ１００配列のいずれかに由来する免疫原性ペプチド候補を同定する方法を提供することにある。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１】図１は、ＭＡＲＴ－１抗原をコードするｃＤＮＡヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。疎水性領域を下線で示す。

【図２】図２Ａおよび図２Ｂは、ＴＩＬによって認識されるＭＡＲＴ－１ペプチドの滴定について示している。Ｔ２細胞を、様々な濃度の精製ＭＡＲＴ－１ペプチド、Ｍ９－１、Ｍ９－２、Ｍ９－３、Ｍ１０－３、Ｍ１０－４およびＭ１０－５と共にインキュベートし、ＴＩＬクローンＡ４２（図２Ａ）またはＴＩＬ細胞株ＴＩＬ１２３５（図２Ｂ）による溶解を、Ｅ（エフェクター）：Ｔ（標的）比をＡ４２では２０：１、ＴＩＬ１２３５では４０：１として、４時間－^{51}Ｃｒ遊離細胞毒性アッセイによって測定した。ペプチドＭ９－２は、１ｎｇ／ｍｌの濃度でＴ２細胞を感受性にした。精製したペプチドＭ１０－４は、ＴＩＬ１２３５によって認識されたが、Ａ４２によっては認識されなかった（Ｍ９－１　｜－｜、Ｍ９－２　●－●、Ｍ９－３　■－■、Ｍ１０－２　▲－▲、Ｍ１０－３　▼－▼、Ｍ１０－４　■－■、Ｍ１０－５　＋－＋）。

【図３】図３Ａは、自己由来^{111}Ｉｎ標識ＴＩＬ１２００の養子免疫伝達を受けた後の転移性メラノーマ患者１２００の放射性核種スキャンを示す。矢印は、左腿の転移病巣に該当するＴＩＬ蓄積領域の１つを示す。図３Ｂは、ＴＩＬ１２００＋ＩＬ－２で治療後の皮下の転移腫瘍の退縮を示す。治療は０日に開始した。

【図４】図４Ａおよび図４Ｂは、ｃＤＮＡ２５の全長核酸配列を示す。開始コドンおよび停止コドンを下線で示す。

【図５】図５Ａは、ｃＤＮＡ２５の全長アミノ酸配列を示す。抗原ペプチドを下線で示す

。図５Ｂは、全長ｃＤＮＡ２５（ｃＤＮＡ２５ＦＬ）、端を切り取った形のｃＤＮＡ２５（ｃＤＮＡ２５ＴＲ）、Ｐｍｅ１１７、ＭＥ２０およびｇｐ１００のアミノ酸配列の比較を示す（●は欠損を示し；－は同一を示す）。

【図６】図６Ａ、図６Ｂおよび図６Ｃは、メラノーマ（図６Ａ）および新生児メラノサイト細胞株（図６Ｂ）および様々な新鮮組織（図６Ｃ）（１０～２０μｇの全ＲＮＡ）と、ｃＤＮＡ２５プローブ（ｐＣＲＩＩ－ｃＤＮＡ２５のＳａｌＩ消化断片）およびβ－アクチンプローブ（クローンテック）とのノーザンブロット解析を示す。Ｃ３２、５８６ｍｅｌメラノーマ細胞株およびＮＨＥＭ５２９、ＮＨＥＭ５３０新生児メラノサイト細胞株は、非常に弱い陽性であった。

【図７】図７Ａ～図７Ｂは、ｇｐ１００エピトープおよびエピトープ解析で試験したＤＮＡ断片の位置ならびにＣＴＬによる認識を示す。図７Ａ；エピトープ解析で試験した５つのＤＮＡ断片（Ｄ３、Ｄ５、Ｄ４、Ｃ４、２５ＴＲ）を示す（－－－、同一アミノ酸）。同定されたエピトープの位置を下線で示す。図７Ｂ；ＨＬＡ－Ａ２．１ｃＤＮＡと共に、ｐｃＤＮＡ３プラスミド中のそれぞれのＤＮＡ断片をトランスフェクトしたＣＯＳ７細胞のＣＴＬ（６２０－１、６２０－２、６６０－１、１１４３、１２００）による、ＩＦＮ－γ分泌アッセイによる認識を示す（＋、認識；－、非認識）。

【図８】図８Ａ～図８Ｄは、ＣＴＬ溶解に対してＨＬＡ－Ａ２．１＋Ｔ２細胞を増感させることによるｇｐ１００の滴定を示す。ペプチドと共にあらかじめインキュベートしたＴ２細胞の溶解は、４時間－^{51}Ｃｒ遊離細胞毒性アッセイで試験した。図８Ａ；$G9_{154}$（■）または$G10_{154}$（●）と共にインキュベートしたＴ２細胞のＴＩＬ１２００による溶解。図８Ｂ；$G9_{209}$（■）または$G10_{208}$（●）と共にインキュベートしたＴ２細胞のＴＩＬ６２０による溶解。図８Ｃ；$G9_{280}$（■）と共にインキュベートしたＴ２細胞のＴＩＬ６６０－１による溶解。図８Ｄ；Ｇ１０－５（■）と共にインキュベートしたＴ２細胞のＴＩＬ６６０－２による溶解。

【発明を実施するための形態】

【００２３】

発明の詳細な説明

本発明をより完全に理解するために、以下の定義をここに記載する。核酸配列は、これに限定されるわけではないが、ＤＮＡ、ＲＮＡまたはｃＤＮＡを含む。ここで用いられる核酸配列は、単離精製した核酸配列を指す。ＭＡＲＴ－１メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）は、ＭＡＲＴ－１遺伝子の生成物である１種以上のＲＮＡ転写物を指す。ここで用いられている実質的に相同とは、図１に示すＭＡＲＴ－１核酸配列（配列番号１）と任意のその他の核酸配列のそれとの間の実質的な一致を指す。実質的に相同とは、ＭＡＲＴ－１配列とその他の任意の核酸配列のそれとの間で、約５０～１００％の相同性、望ましくは約７０～１００％の相同性、最も望ましくは約９０～１００％の相同性を意味する。さらに、ここで用いられる実質的に相同とは、図１に示すＭＡＲＴ－１抗原のアミノ酸配列（配列番号２）と任意のその他のアミノ酸配列のそれとの間の実質的な一致をも指す。

【００２４】

主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）は、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）を含む、異なる種に記載される組織適合性抗原のシステムを包括して意味する一般的な名称である。

メラノーマという言葉は、限定するわけではないが、黒色腫、転移性黒色腫、メラノサイトまたはメラノサイト関連母斑細胞に由来する黒色腫、悪性黒色腫、黒色上皮腫、黒色肉腫、本来の位置（ｉｎ　ｓｉｔｕ）の黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫、侵襲性黒色腫、または家族性異型性母斑および黒色腫（ＦＡＭ－Ｍ）症候群を含む。哺乳動物のそのようなメラノーマは、染色体異常、退行性成長発達障害、分裂促進剤、紫外線照射（ＵＶ）、ウイルス感染、遺伝子の不適切組織での発現、遺伝子発現の変化、または発癌剤に原因を有する場合もある。前述のメラノーマは、本出願に記載した方法に従って、診断、評価または治療することが出来る。

【００２５】

非定型母斑とは、異常かつ前癌状態の特徴を持つ母斑を意味する。

メラノーマ抗原または免疫原とは、哺乳動物中の細胞性あるいは体液性免疫応答の原因となり得る、ＭＡＲＴ－１タンパク質の全てあるいはその部分またはＭＡＲＴ－１タンパク質配列を基礎としたペプチドを意味する。そのような抗原はまた、ＭＡＲＴ－１タンパク質（配列番号２）の全て、一部または複数の部分を用いて免疫化された動物の抗体と反応するであろう。そのようなタンパク質またはペプチドは、本発明のＭＡＲＴ－１核酸配列の全てまたは部分によってコードされるであろう。

【００２６】

免疫原性ペプチドとは、哺乳動物中で細胞性あるいは体液性免疫応答の原因となり得る、ＭＡＲＴ－１タンパク質配列またはｇｐ１００タンパク質配列に由来するペプチドを意味する。そのようなペプチドは、ペプチドで免疫化された動物の抗体と反応するであろう。そのようなペプチドは、アミノ酸の長さが約５～２０、望ましくは約８～１５、最も望ましくは約９～１０である。

【００２７】

当業者は、本発明のバイオアッセイが任意の脊椎動物種の生体サンプルまたは組織の分析に用い得ることを理解するであろう。望ましい実施態様では、哺乳類の生体サンプルまたは組織が分析される。

【００２８】

組織は、単一細胞、臓器全体およびその部分を含むが、これらに限定されるわけではない。生体サンプルは、組織、哺乳動物組織の初代培養物、生体組織検査（生検）検体、病理検体、および検死検体を含むが、これらに限定されるわけではない。哺乳動物は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ネズミ、ラット、ブタ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジおよびヤギを含むが、これらに限定されるわけではない。

【００２９】

本発明は、Ｔ細胞によって認識される、新規のメラノーマ抗原をコードする核酸配列を提供する。この新規メラノーマ抗原は、ＭＡＲＴ－１（Ｍｅｌａｎｏｍａ Ａｎｔｉｇｅｎ Ｒｅｃｏｇｎｉｚｅｄ ｂｙ Ｔ－ｃｅｌｌｓ－１）と呼ぶ。ＭＡＲＴ－１は、いかなる既知のメラノーマ抗原とも意味のある相同性を示さず、それ故新しいメラノーマ抗原であると言える。ＭＡＲＴ－１抗原は、アミノ酸２７～４７位（配列番号２）とそれに続く３つのアルギニン残基からなる高疎水性領域を含み、この配列は膜貫通タンパク質を示唆している。タンパク質全体とは明らかな相同性は存在しなかったが、以前にネズミのナチュラルキラー細胞表面タンパク質ＮＫＲ－Ｐ１（非特許文献２１）として認知された、ＩＩ型膜タンパク質と３７％の同一性を示す、２７アミノ酸からなるセグメント（アミノ酸５７～８３位；配列番号２）が存在する。ＭＡＲＴ－１は、多くのＩ型膜タンパク質の特徴であるリーダータンパク質を含まない（非特許文献２２）。

【００３０】

ＭＡＲＴ－１ＲＮＡの発現は、新鮮なおよび培養したメラノーマおよびメラノサイト細胞株およびヒト網膜に限定されるようであり、この発現は、試験したその他のいかなる新鮮なまたは培養した組織またはその他の腫瘍組織にも見出されなかった。ＭＡＲＴ－１のｃＤＮＡ配列を図１（配列番号１）に示す。また、ＭＡＲＴ－１タンパク質の推定アミノ酸配列を図１（配列番号１）に示す。

【００３１】

図１（配列番号１）に示すＭＡＲＴ－１核酸配列は、本発明の望ましい実施態様を表している。しかしながら、遺伝子コードの縮重によって、図１（配列番号１）に示すｃＤＮＡ配列を変化させても、依然としてＭＡＲＴ－１タンパク質抗原をコードすることの出来るＤＮＡ配列が結果として得られるであろうことは、当業者に理解される。それ故、そのようなＤＮＡ配列は、図１（配列番号１）に示した配列と機能的に等価であり、本発明の内に包含されるであろう。さらに、当業者は、図１（配列番号１）に示すＭＡＲＴ－１核酸配列が所定の種の中で対立遺伝子変化を自然に起こすことを理解するであろう。これらの変化もまた、本発明に包含されるであろう。

【００３２】

予想されるＭＡＲＴ－１抗原は、約１３ｋＤの１１８アミノ酸からなるタンパク質である。本発明は、さらに、本発明のＭＡＲＴ－１抗原またはタンパク質と実質的に同一の機能を持つ、ＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドまたはその類似体を含む。そのようなタンパク質またはポリペプチドは、タンパク質断片、またはＭＡＲＴ－１タンパク質の置換、付加、あるいは欠損変異体を含むが、これらに限定されるわけではない。また、本発明は、ＭＡＲＴ－１抗原と実質的に相同であるタンパク質またはペプチドを包含する。実質的に相同とは、ＭＡＲＴ－１と任意のその他のアミノ酸配列またはタンパク質またはペプチドとの間の、約５０～１００％の相同性、望ましくは約７０～１００％の相同性、最も望ましくは約９０～１００％の相同性を意味する。

【００３３】

「類似体」という言葉は、具体的にここに示したＭＡＲＴ－１配列（図１、配列番号１）と実質的に同一なアミノ酸残基配列を持つ任意のポリペプチドであって、その１つ以上の残基が機能的に同様の残基と保存的に置換され、かつここに記載したようなＭＡＲＴ－１抗原の機能的態様を示している、前記のポリペプチドを含む。保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンのような非極性（疎水性）残基の１つをそれ以外の非極性残基と置換すること、アルギニンとリジンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、グリシンとセリンとの間、のように、極性（親水性）残基の１つをもう１つと置換すること、リジン、アルギニンまたはヒスチジンのような塩基性残基の１つをそれ以外の塩基性残基と置換すること、アスパラギン酸またはグルタミン酸のような酸性残基の１つをそれ以外の酸性残基と置換することが含まれる。

【００３４】

また「保存的置換」という語句は、非誘導体化残基の代わりに化学的に誘導体化した残基を用いることを含む。「化学的誘導体」とは、官能基側鎖の反応によって化学的に誘導体化した１つ以上の基を持つ対象ポリペプチドを指す。そのような誘導体化分子の例としては、例えば、遊離アミノ基を誘導体化して、アミン塩酸塩、ｐ－トルエン硫酸基、カルボベンゾキシ基、ｔ－ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成するようなそれらの分子が含まれる。遊離カルボキシル基を誘導体化して、塩、メチルおよびエチルエステルあるいはその他の型のエステルまたはヒドラジンを形成させても良い。遊離水酸基を誘導体化して、ｏ－アシルまたはｏ－アルキル誘導体を形成させても良い。ヒスチジンのイミダゾール窒素を誘導体化して、Ｎ－ｉｍ－ベンジルヒスチジンを形成させても良い。また、化学的誘導体としては、２０の標準アミノ酸の１つ以上の自然発生アミノ酸誘導体を含む、タンパク質またはペプチドを含む。例えば：４－ヒドロキシプリンはプリンと置換されて良く；５－ヒドロキシリジンはリジンと置換されて良く；３－メチルヒスチジンはヒスチジンと置換されて良く；ホモセリンはセリンと置換されて良く；またオルニチンはリジンと置換されて良い。また、必要な活性が維持される限り、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、その配列がＭＡＲＴ－１のＤＮＡにコードされるポリペプチドの配列と関連する、１つ以上の残基の付加および／または欠損を持つ任意のポリペプチドを含む。

【００３５】

また、本発明は、ＭＡＲＴ－１核酸配列（配列番号１）の全体または部分およびベクターからなる組換えＤＮＡ分子を提供する。本発明で用いるに適した発現ベクターは、核酸配列に機能し得るように結合させた少なくとも１つの発現制御エレメントからなって良い。発現制御エレメントは、ベクター中に挿入され、核酸配列の発現を制御調節する。発現制御エレメントの例として、ｌａｃシステム、ファージλのオペレータおよびプロモーター領域、酵母プロモーター、ならびにポリオーマ、アデノウイルス、レロトウイルスまたはＳＶ４０から誘導したプロモーターが含まれるが、これらに限定されるわけではない。さらに、望ましいかまたは必要とされる機能エレメントには、リーダー配列、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、ならびに宿主システム中で核酸配列を適切に転写し次いで翻訳するに必要なまたは望ましいその他の任意の配列が含まれるが、これらに限定されるわけではない。当業者は、必要または望ましい発現制御エレメントの適切な組み合わせは、

選択した宿主のシステムに依存することを理解するであろう。さらに、発現ベクターは、宿主システム中で核酸配列を含む発現ベクターを伝達し次いで複製するに必要なエレメントをさらに含むべきであることを理解するであろう。そのようなエレメントの例としては、複製起源および選択マーカーが含まれるが、これらに限定されるわけではない。さらに、当業者は、そのようなベクターが従来の方法を用いて容易に構築され（非特許文献２３）、または商品として入手できることを理解するであろう。

【００３６】

本発明のその他の態様は、ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体または部分を含む組換え発現ベクターが挿入された宿主生物体に関する。本発明のＭＡＲＴ－１核酸配列で形質転換される宿主細胞には、動物、植物、昆虫および酵母細胞のような真核生物、ならびに大腸菌のような原核生物が含まれる。遺伝子を運ぶベクターを細胞中に導入する手段としては、ＤＥＡＥデキストラン法、リポフェクション、リン酸カルシウム法あるいはその他の当業者に既知の方法（非特許文献２４）を用いたマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、形質導入、またはトランスフェクションが含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【００３７】

望ましい実施態様では、真核生物細胞内で機能する真核生物発現ベクターが用いられる。そのようなベクターの例としては、これらに限定されるわけではないが、レトロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、鶏痘ウイルスベクター、細菌発現ベクター、ｐｃＤＮＡ３（インビトロジェン、カリフォルニア州サンディエゴ）のようなプラスミド、またはバキュウロウイルス伝達ベクターが含まれる。望ましい真核生物細胞株には、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、２９３細胞（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ１５７３）、Ｔ２細胞、樹状突起細胞、または単核細胞が含まれるが、これらに限定されるわけではない。特に望ましい実施態様では、組換えＭＡＲＴ－１タンパク質発現ベクターは、ＭＡＲＴ－１タンパク質に固有なプロセシングおよび修飾を確実にするために、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、２９３細胞（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ１５７３）、Ｔ２細胞、樹状突起細胞、または単核細胞のような哺乳動物細胞に導入される。別の実施態様では、ＭＡＲＴ－１　ＤＮＡが、ＣＯＳ７（非特許文献２５）中に導入される。適当な細胞の選択は、当業者の内にある。

【００３８】

ある実施態様では、発現した組換えＭＡＲＴ－１タンパク質は、ＭＡＲＴ－１タンパク質に特異的な抗体を用いたクマシーブルー染色およびウエスタンブロッティングを含むこの技術分野で既知の方法に従って、検出されるであろう。

【００３９】

さらなる実施態様では、宿主細胞によって発現した組換えタンパク質は、粗溶解物として得られるか、または分別沈殿、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル電気泳動、親和性および免疫親和性クロマトグラフィーおよびその類似物などを含む、この技術分野で既知の標準的なタンパク質精製法によって精製することが出来る（非特許文献２３）。免疫親和性クロマトグラフィーの場合には、組換えタンパク質は、ＭＡＲＴ－１タンパク質に特異的な抗体を結合させた樹脂を含むカラムを通過させることによって精製されるであろう（非特許文献２３）。

【００４０】

本発明の核酸配列またはその部分は、正常なおよび病的な組織中でのＭＡＲＴ－１遺伝子発現を検出するプローブとして有用である。それ故、本発明のその他の態様は、（ａ）本発明の核酸配列の全体または部分を、生体サンプルと、核酸配列とｍＲＮＡとの間で複合体を形成させるような条件下で接触させ、（ｂ）該複合体を検出し、さらに（ｃ）該ｍＲＮＡのレベルを定量する：工程からなる、生体サンプル中のＭＡＲＴ－１タンパク質をコードするｍＲＮＡを検出するバイオアッセイに関する。

【００４１】

ＲＮＡは、全細胞ＲＮＡとして、またはポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡとして単離することが出来る。全細胞ＲＮＡは、当業者に既知のいろいろな方法によって単離できる（非特許文献２３）。そのような方法には、分別沈殿によるＲＮＡ抽出（非特許文献２６）、有機溶媒によるＲＮＡ抽出（非特許文献２７）、および強変性剤によるＲＮＡ抽出（非特許文献２８）が含まれる。ポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡは、オリゴｄ（Ｔ）カラムを用いた親和性クロマトグラフィー（非特許文献２９）によって、全細胞ＲＮＡから選択することが出来る。工程（ｃ）の細胞内ｍＲＮＡレベルを定量する方法の例としては、これに限られるわけではないが、ノーザンブロッティング（非特許文献３０）、ドットスロット－ハイブリダイゼーション（非特許文献３１）、フィルターハイブリダイゼーション（非特許文献３２）、ＲＮａｓｅ防御（非特許文献２４）、ポリメラーゼ連鎖反応（非特許文献３３）および核ランオフアッセイ（非特許文献３４）が含まれる。

【００４２】

また、バイオアッセイの工程（ｂ）の複合体の検出は、様々な技術によって実行することが出来る。シグナル増幅による複合体の検出は、放射性標識および酵素を含むいくつかの従来の標識技術によって成し遂げることが出来る（非特許文献２４、非特許文献２３）。また、放射性標識キットは、商品として入手することが出来る。バイオアッセイの工程（ｃ）でプローブとして用いられるＭＡＲＴ－１核酸配列は、ＲＮＡであっても、またはＤＮＡであって良い。ＤＮＡ配列を標識する望ましい方法は、クレノウ酵素またはポリヌクレオチドキナーゼを用い、^{32}Ｐで標識する方法である。ＲＮＡまたはリボプローブ配列を標識する望ましい方法は、ＲＮＡポリメラーゼを用い、^{32}Ｐまたは^{35}Ｓで標識する方法である。さらに、ピリミジンおよびプリン環に化学基を付着させる方法（非特許文献３５、非特許文献３６）、化学蛍光によって検出する方法（非特許文献３７）およびビオチン化した核酸プローブを用いる方法（非特許文献３８、非特許文献３９、非特許文献４０）、および商品として入手できる製品を用いた蛍光による検出方法を含む、放射能によらないシグナル増幅技術が知られている。

【００４３】

このバイオアッセイ中で用いることの出来る生体サンプルの例としては、これらに限られるわけではないが、哺乳動物の初代培養物、メラノサイト細胞株のような哺乳動物の継代細胞株、皮膚または網膜のような哺乳動物の臓器、組織、生体組織検査検体、新生物、病理検体、および検死検体が含まれる。

【００４４】

望ましい実施態様では、実施例１に例示されているように、^{32}Ｐ放射性標識ＭＡＲＴ－１プローブが用いられる。望ましいＭＡＲＴ－１プローブは、図１の全長ｃＤＮＡ（配列番号１）である。おおよそ１．６ｋｂのｃＤＮＡ（図１；配列番号１）は、ベクター内へクローン化され、得られたプラスミドは、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）、１２３０１ Ｐａｒｋｌａｗｎ Ｄｒｉｖｅ、メリーランド州ロックビル ２０８５２、米国に１９９４年４月１４日に寄託され、ＡＴＣＣ受託番号７５７３８を付与された。全長ＭＡＲＴ－１核酸配列は、ｐＣＲＩＩプラスミドをＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｈｏＩ制限酵素で消化することによって単離することが出来る。この１．６ｋｂの核酸配列は、次に、プローブとして用いることが出来る。このプローブは、様々な組織あるいは生体サンプルから単離された全ＲＮＡまたはポリＡ$^{+}$ＲＮＡ中のＭＡＲＴ－１ ｍＲＮＡの検出に用いられる。

【００４５】

その他の実施態様では、図１（配列番号１）のＭＡＲＴ－１配列を基にしたオリゴヌクレオチド対の組み合わせは、生体サンプル中のＭＡＲＴ－１ ｍＲＮＡを検出するためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プライマーとして用いられる。これらのプライマーは、選択されたＲＮＡ核酸配列を増幅するための逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）工程後の方法中で用いることが出来、その詳細は、非特許文献２３の１５章に記載されている。オリゴヌクレオチドは、様々な製造者によって販売されている自動装置によって合成することが出来、あるいは、本発明の核酸配列を基にして商品として製造することも

できる。当業者は、サンプル中のＭＡＲＴ－１　ＲＮＡを増幅させるための、ＭＡＲＴ－１核酸配列を基にしたＰＣＲプライマーを選択する方法を知るであろう。

【００４６】

本発明のＭＡＲＴ－１核酸配列またはその部分（図１：配列番号１）は、正常または異常な哺乳動物組織中のＭＡＲＴ－１遺伝子の変化を検出するのに有用である。変化とは、ＭＡＲＴ－１遺伝子配列の付加、欠失、置換あるいは重複、またはＭＡＲＴ－１遺伝子配列の遺伝子増幅を意味する。それ故、本発明のその他の態様は、（ａ）本発明の核酸配列の全体または部分を、生体サンプルから単離したゲノムＤＮＡと、該核酸配列と該ゲノムＤＮＡの間で複合体が形成されるような条件下で接触させ、（ｂ）該サンプルを検出し、さらに、（ｃ）対照サンプルと比較することによって、該ＭＡＲＴ－１遺伝子中の変化を決定する：工程からなる、生体サンプル中のＭＡＲＴ－１遺伝子の変化を検出するためのアッセイに関する。

【００４７】

生体サンプルからＤＮＡを単離し、遺伝子中の変化を検出し、ＭＡＲＴ－１核酸プローブとゲノムＤＮＡ配列との複合体を検出するための、標準的方法は、非特許文献２４、および非特許文献２３のようなマニュアルに提供されている。

【００４８】

また、本発明のＭＡＲＴ－１核酸配列（図１；配列番号１）は、他の種のＭＡＲＴ－１相同体を単離するプローブとして用いることが出来る。望ましい実施態様では、ＭＡＲＴ－１　ｃＤＮＡ（図１；配列番号１）は、哺乳動物ｃＤＮＡライブラリーのスクリーニングに用いられ、陽性クローンを選択し、配列決定を行う。ｃＤＮＡライブラリーを構築できる組織源の例としては、皮膚、網膜、メラノサイト、新生児の皮膚および胚が含まれるが、これらに限られるわけではない。望ましくは、哺乳動物のライブラリーは、プローブとしてＭＡＲＴ－１　ｃＤＮＡ（図１；配列番号１）を用いてスクリーニングされる。当業者は、相同体の検出に用いられるに適当なハイブリダイゼーション条件を理解するであろう。核酸のハイブリダイゼーション、ライブラリーの構築およびクローニング技術のための従来からの方法は、非特許文献２４および非特許文献２３に記載されている。

【００４９】

ＭＡＲＴ－１タンパク質の全体またはその部分は、メラノーマ細胞上に提示される抗原であることが知られている。それ故、本発明のその他の態様では、病気に苦しむ哺乳動物から単離した生体サンプル中のＭＡＲＴ－１　ＲＮＡまたはＭＡＲＴ－１　ｍＲＮＡのレベルの変化の検出に用いられるＭＡＲＴ－１核酸プローブを提供する。そのような病気の例としては、これらに限られるわけではないが、メラノーマが含まれる。ＭＡＲＴ－１　ｍＲＮＡレベルでの変化とは、対照となるサンプルと比較したＲＮＡレベルの増加あるいは減少、または対照サンプルと比較したＭＡＲＴ－１　ｍＲＮＡの出現あるいは消滅を意味する。ＭＡＲＴ－１　ｍＲＮＡの変化の検出は、病状の診断または評価を可能にするであろう。それ故、ＭＡＲＴ－１　ｍＲＮＡレベルの変化は、罹患した哺乳動物の予後を予想するであろう。

【００５０】

その他の実施態様では、本発明の核酸は、哺乳動物組織のｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションに用いられ、組織内でのＭＡＲＴ－１遺伝子発現の正確な位置または細胞内での位置を決定することが出来る。ＭＡＲＴ－１核酸配列を標識する望ましい方法は、ＳＰ６ポリメラーゼを用いた生体外での転写による^{35}Ｓ標識ＲＮＡプローブを合成することである。ＭＡＲＴ－１プラスミド（ＡＴＣＣ受託番号７５７３８）では、センス鎖はＴ７プロモーターの制御下にあり、アンチセンス鎖はＳＰ６プロモーター制御下にある。プローブは、おおよそ長さ４００～２００塩基対のプローブに加水分解されることが望ましい。組織をｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションのために調製し、プローブを合成し、シグナルを検出する従来の方法は、非特許文献２３の１４章および非特許文献４１に見出すことが出来る。次いで、プローブを哺乳動物の組織切片と接触させ、そのままの位置で、従来の方法によって解析が行われる。用い得る組織の例としては、哺乳動物の胚、皮膚、

リンパ節および網膜のような哺乳動物成体組織、生検検体、病理検体および検死検体が含まれるが、これらに限られるわけではない。望ましい実施態様では、ＭＡＲＴ－１　ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション用プローブは、侵襲性初期メラノーマの病変組織中でＭＡＲＴ－１　ＲＮＡの発現を評価してメラノーマ病変の急激な垂直増殖期を特徴付けるために、また組織内での病変の辺縁を評価するために用いられても良い。

【００５１】

本発明のさらなるその他の実施態様では、ＭＡＲＴ－１（配列番号１）核酸配列の全体またはその部分は、トランスジェニック動物を作り出すために用いることが出来る。望ましくは、ＭＡＲＴ－１遺伝子は、胚形成期、望ましくは１細胞期、一般的には８細胞期より以前に、動物または動物の原細胞に導入される。ＭＡＲＴ－１遺伝子を持つトランスジェニック動物を作り出す手段はいくつかある。その１つの方法は、ＭＡＲＴ－１配列の全体または部分を持つレトロウイルスを使用することからなる。トランス遺伝子を含むレトロウイルスは、トランスフェクションによって胚期動物内に導入される。その他の方法は、胚内にトランス遺伝子を直接注入することを含む。さらなるその他の方法としては、当業者に既知の胚幹細胞法または相同組換え法が用いられる。ＭＡＲＴ－１トランス遺伝子を導入できる動物の例としては、霊長類、マウス、ラットまたはその他の齧歯類が含まれるが、これらに限られるわけではない。そのようなトランスジェニック動物は、メラノーマ研究用生体モデルとして、また、メラノーマの診断法または治療法を評価するために有用であろう。

【００５２】

さらに、本発明は、ＭＡＲＴ－１タンパク質、または、図１（配列番号２）に定義したアミノ酸配列あるいはその特有部分を持つ、ペプチドまたは修飾ペプチドまたはその類似体と反応するひとつの抗体または複数の抗体類からなる。本発明の実施態様では、抗体は、起源的にモノクローナルまたはポリクローナルである。抗体を産生するために用いられるＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドは、天然物または組換え体を源にして良く、化学合成によって合成しても良い。天然ＭＡＲＴ－１タンパク質は、哺乳動物の生体サンプルから単離することが出来る。生体サンプルには、新鮮なメラノーマ、皮膚、網膜のような、哺乳動物組織、メラノーマ培養物あるいは培養メラノサイトのような哺乳動物細胞の初代培養物または継代培養物が含まれるが、これらに限られるわけではない。天然ＭＡＲＴ－１タンパク質は、組換えタンパク質の単離法として上に記載した方法と同一の方法で単離しても良い。組換えＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドは、従来の方法で産生して良く、また従来の方法で精製しても良い。合成ＭＡＲＴ－１ペプチドは、本発明の推定アミノ酸配列（図１；配列番号２）を基にして特別注文するかあるいは商品として製造するか、または当業者に既知の方法（非特許文献４２）によって合成しても良い。ＭＡＲＴ－１ペプチドの例としては、ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（Ｍ９－２；配列番号４）、ＥＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（Ｍ１０－３；配列番号１７）およびＡＡＧＩＧＩＬＴＶＩ（Ｍ１０－４；配列番号１８）（ペプチドは、１文字アミノ酸コードで表す）が含まれるが、これらに限られるわけではない。最も望ましいペプチドは、ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）である。

【００５３】

別の方法として、ＭＡＲＴ－１タンパク質配列に由来するペプチドは、ペプチドが存在しているＭＨＣ分子とペプチドとの結合を強化することによってそれらの免疫原性を増加させるように修飾しても良い。用いられて良いそのような修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドの例は、表１４に示すペプチドであるが、これらに限定されるわけではない。望ましい実施態様では、ＭＨＣクラスＩとの結合を強化するように修飾されたＭＡＲＴ－１ペプチドは、ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）である。修飾ペプチドの例としては、ＡＬＧＩＧＩＬＴＶ（Ｍ９－２－２Ｌ）（配列番号５０）、ＷＡＧＩＧＩＬＴＶ（Ｍ９－２－１Ｗ）（配列番号５３）、ＦＡＧＩＧＩＬＴＶ（Ｍ９－２－１Ｆ）（配列番号５４）およびＡＡＹＩＧＩＬＴＶ（Ｍ９－２－３Ｙ）（配列番号５８）が挙げられる。ペプチドまたは修飾ペプチドは、ペプチドの抗原性を強化するためにキャリヤー分子と結合させても良い。キャリ

ヤー分子の例としては、これらに限定されるわけではないが、ヒトアルブミン、ウシアルブミン、リポタンパク質およびキーホールリンペットヘモシアニン（非特許文献４３）が含まれる。

【００５４】

本発明の検出方法として用いられる典型的な抗体分子は、完全な免疫グロブリン分子、実質的に完全な免疫グロブリン分子、または、抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子の部分であり、Ｆ（ａｂ）、Ｆ（ａｂ’）、Ｆ（ａｂ）$_2$およびＦ（Ｖ）としてこの技術分野で既知のそれら免疫グロブリン分子の部分を含む。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、この技術分野で既知の方法に従って産生して良い（非特許文献４４；非特許文献４５）。また、抗体または抗原結合断片は、遺伝子工学によって作り出されても良い。大腸菌内で重鎖と軽鎖の両方の遺伝子を発現させる技術は、ＰＣＴ特許出願：特許文献２および特許文献３、ならびに非特許文献４６の主題である。

【００５５】

本発明の抗体は、天然のまたは変性させたＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドあるいはその類似体、または修飾ペプチドあるいはその類似体と反応するであろう。抗体が用いられる具体的なイムノアッセイは、抗体に望ましいように行われるであろう。抗体は、ＭＡＲＴ－１タンパク質あるいはその部分に対して、またはＭＡＲＴ－１アミノ酸配列に相同な合成ペプチドに対して産生されて良い。

【００５６】

１つの実施態様では、本発明の抗体は、生体サンプル中の新規ＭＡＲＴ－１タンパク質を検出するためにイムノアッセイに用いられる。この方法では、本発明の抗体を生体サンプルと接触させ、ＭＡＲＴ－１抗原と抗体との間の複合体の形成を検出する。本発明のイムノアッセイは、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、免疫蛍光アッセイ、酵素イムノアッセイ、化学蛍光アッセイ、免疫組織化学アッセイおよびその類似アッセイなどであって良い（非特許文献４７、非特許文献２３）。この技術分野で既知のＥＬＩＳＡの標準技術は、非特許文献４８および非特許文献４９に記載されており、これらの両方はここに援用される。そのようなアッセイは、以下に記載されている、直接的、間接的、競合的または非競合的イムノアッセイであって良い（非特許文献４７、非特許文献５０）。そのような検出アッセイに適当な生体サンプルは、哺乳動物組織、メラノーマおよびメラノサイト細胞株、皮膚、胚、リンパ節、病理検体、検死検体、および生検検体を含む。タンパク質は、以下に記載の従来の方法で、生体サンプルから単離されて良い（非特許文献２３）。

【００５７】

本発明の抗体は、それ故、病気または疾病に苦しむ哺乳動物から単離した生体サンプル中の、ＭＡＲＴ－１抗原またはＭＡＲＴ－１抗原の発現レベルの変化を検出するイムノアッセイに用いることが出来る。生体サンプルの例としては、これらに限定されるわけではないが、哺乳動物組織、生検組織サンプル、メラノーマおよびリンパ節生検サンプル、病理および組織サンプルが含まれる。これらのイムノアッセイによって評価できる病気の例としては、これらに限定されるわけではないが、メラノーマおよびメラノーマが次に転移する部位の組織が含まれる。発現レベルの変化とは、対照サンプルと比較してのＭＡＲＴタンパク質あるいはその部分の増加または減少を意味する。また、変化とは、ＭＡＲＴ－１タンパク質の置換、欠失または付加変異を包含する。そのような変異は、ＭＡＲＴ－１タンパク質に特異的なエピトープと反応することが知られている本発明の抗体を用いることによって、また対照と比較してエピトープが存在するか否かを決定することによって決定することが出来る。それ故、本発明の抗体は、病気に罹った哺乳動物を診断、評価、予知するためのイムノアッセイに用いることが出来る。

【００５８】

望ましい実施態様では、本発明のＭＡＲＴ－１抗体は、免疫細胞化学の手法を用いてメラノーマに苦しむ哺乳動物の組織生検からＭＡＲＴ－１抗原の存在を評価するために用いられる。そのような病気組織中のＭＡＲＴ－１抗原の詳述な評価は、病気に苦しむ哺乳動

物の病気の進行を予知するために用いることが出来る。具体的には、ＭＡＲＴ－１抗体は、メラノーマ病変の急激な垂直増殖期を特徴づけるために用いることが出来る。免疫組織化学のための従来の方法は、非特許文献５１および非特許文献２３に記載されている。

【００５９】

その他の実施態様では、本発明の抗体は、ＭＡＲＴ－１タンパク質またはその部分を精製するために用いられて良い。免疫親和性クロマトグラフィーは、当業者に既知の従来の方法によって行うことが出来る（非特許文献２３）。

【００６０】

その他の望ましい実施態様では、ＭＡＲＴ－１タンパク質を特異的に認識する抗体を含むウサギの抗血清は、ウエスタンブロット解析で該タンパク質を検出するために用いられる。そのような抗血清は、ＭＡＲＴ－１タンパク質の全体あるいはその１つあるいはいくつかの部分、またはＭＡＲＴ－１タンパク質配列から合成したペプチドに対するものである。望ましくは、ＭＡＲＴ－１の推定アミノ酸配列に由来するＭＡＲＴ－１合成ペプチドが用いられる（図１、配列番号２）。別の方法として、修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドを用いても良い。ペプチドは、自動ペプチド合成機を用いて標準方法で合成され、実施例２に記載したような高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を用いて精製される。精製したペプチドは、非特許文献５２に記載のように、担体に結合させて良い。従来の方法を用いて、担体と結合させたＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドでウサギを免疫して良い。望ましくは、アジュバンド中、約０．１～約１０ｍｇの抗原を用いて良く、最も望ましくは、アジュバンド中、約１ｍｇの抗原を用いて良い。動物は同様の効能促進剤の投与を受け、抗血清力価はＥＬＩＳＡアッセイによって評価される。抗血清の満足できるレベルは、抗ペプチド抗体力価がプラトーに達する時点で得られる。この抗体は、上記の標準イムノアッセイに用いることが出来る。

【００６１】

Ｔリンパ球は、ＭＨＣ分子と結合したペプチド断片の形でＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩ分子と関連する抗原を認識する。与えられたＭＨＣ対立遺伝子と結合するペプチドの程度は、ペプチド内での特定位置のアミノ酸による（非特許文献５３、非特許文献５４、非特許文献５５、非特許文献５６、これらはそれぞれここに援用される）。それ故、本発明のその他の実施態様は、ペプチドの関連するＭＨＣ分子とペプチドとの結合を強化することによって、免疫原性を増加させるように修飾した、ＭＡＲＴ－１タンパク質配列（図１；配列番号２）由来ペプチドに関する。例として、修飾は、所定免疫原性ペプチド配列内のアミノ酸の置換、欠失あるいは付加、所定免疫原性ペプチド配列内に存在するアミノ酸変異または所定免疫原性ペプチド配列内の存在するアミノ酸の誘導体化を含んで良い。免疫原性ペプチド配列からなる任意のアミノ酸は、本発明に従って修飾されて良い。望ましい実施態様では、所定免疫原性ペプチド配列内で、少なくとも１つのアミノ酸が置換される。任意のアミノ酸が、免疫原性ペプチド配列内の所定アミノ酸を置換するために用いられて良い。修飾ペプチドとは、修飾され、Ｔ細胞に存在する場合に関連するＭＨＣ分子との結合強化を示す、任意の免疫原性ＭＡＲＴ－１ペプチドを含むことを意図する。

【００６２】

例として、ＨＬＡ－Ａ２対立遺伝子は、９または１０アミノ酸からなるペプチドを結合する。結合を強化するために変えても良いペプチドの位置の例としては、ペプチドの第１位、第２位、第３位、および最終位が含まれるが、これらに限定されるわけではない。免疫原性ペプチド配列のこれらの位置を置換するために、任意のアミノ酸が用いられて良い。ＨＬＡ－Ａ２との結合を強化するために、ペプチドの第２位のアミノ酸は疎水性の脂肪族アミノ酸であることが望ましい。第２位で用いられて良いアミノ酸の例としては、これらに限られるわけではないが、ロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリン、スレオニンまたはグリシンが含まれる。望ましくは、ロイシンまたはメチオニンがペプチドの第２位に見出される。ペプチドの最後のアミノ酸（ペプチドの長さによって９位か１０位のアミノ酸）は、疎水性脂肪族アミノ酸が望ましい。ペプチドの最後の位置に用いても良いアミノ酸の例としては、バリン、メチオニン、ロイシン、アラニン、イソロイシ

ン、スレオニンまたはグリシンが含まれるが、これらに限られるわけではない。望ましくは、バリンがペプチドの最後の位置に見出される。また、ペプチドの第１位および第３位のアミノ酸は、ＭＨＣクラスＩ分子とペプチドの結合を強化するために修飾されても良い。ペプチドの第１位および第３位のアミノ酸は、任意のアミノ酸であって良い。望ましくは、第１位および第３位のアミノ酸は、疎水性の脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。これらの位置に用いられて良いアミノ酸の例としては、ロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、イソロイシン、スレオニン、グリシン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、セリン、アスパラギン酸またはリジンが含まれるが、これらに限られるわけではない。修飾されて良いＭＡＲＴ－１ペプチドの例としては、これらに限定されるわけではないが、ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）、ＥＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号１７）およびＡＡＧＩＧＩＬＴＶＩ（配列番号１８）（ペプチドは１文字アミノ酸コードで表されている）が含まれる。例として、免疫原性ＭＡＲＴ－１ペプチドＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）は、次式$X_1X_2X_3$ＩＧＩＬＴX_4（配列番号１２２）、に従って修飾されて良い：

式中、X_1は、任意のアミノ酸、望ましくは任意の疎水性脂肪族アミノ酸、または芳香族アミノ酸であって良い。用いて良いアミノ酸の例としては、これらに限られるわけではないが、アラニン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、リシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、スレオニン、グリシンまたはセリンが含まれる。

X_2は、任意の疎水性アミノ酸、望ましくは脂肪族疎水性アミノ酸であって良い。用いて良いアミノ酸の例としては、これらに限られるわけではないが、ロイシン、メチオニン、イソロイシン、バリン、スレオニン、アラニンまたはグリシンが含まれる。

X_3は、任意のアミノ酸、望ましくは、任意の疎水性の脂肪族アミノ酸、または芳香族アミノ酸であって良い。用いて良いアミノ酸の例としては、これらに限られるわけではないが、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、リジン、アスパラギン酸、セリン、アラニン、グリシン、イソロイシン、バリン、またはスレオニンが含まれる。

X_4は、任意の疎水性アミノ酸、望ましくは疎水性の脂肪族アミノ酸であって良い。用いられて良いアミノ酸の例としては、これらに限られるわけではないが、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニン、スレオニン、またはグリシンが含まれる。

【００６３】

作り出されて良い修飾ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）ペプチド配列の例として、表１４（実施例５）にペプチドを示すが、これらに限られるわけではない。

さらに、本発明は、修飾したＭＡＲＴ－１アミノ酸配列（図１；配列番号２）に由来するこれらの免疫原修飾ペプチドの類似体を含む。類似体という言葉は、これらの修飾ペプチドの機能的態様を示す任意のペプチドを含むことを意図する。類似体という言葉は、また、上記のようなこれらの修飾ペプチドの保存的置換または化学的誘導体を含む。これらの修飾ペプチドは、従来の方法に従って、合成によってまたは組換えによって作り出されて良い。

【００６４】

組換えあるいは天然のＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドあるいはその類似体、または修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドあるいはその類似体は、予防または治療のためのワクチンとして用いられて良い。治療目的で提供される場合、ワクチンは、メラノーマのいかなる存在にも先だって提供される。ＭＡＲＴ－１ワクチンの予防投与では、哺乳動物内のメラノーマを防ぐかまたは減退させるために供されるべきである。望ましい実施態様では、メラノーマに罹る危険性の高い哺乳動物、望ましくはヒトは、本発明のワクチンで予防的に処置される。そのような哺乳動物の例としては、これらに限られるわけではないが、メラノーマの家族歴を持つヒト、異型性母斑歴を持つヒト、ＦＡＭ－Ｍ症候群歴を持つヒト、または以前に切除したメラノーマに苦しみ、それ故再発の危険性のあるヒトが含まれる。治療目的で提供される場合、ワクチンは、メラノーマまたは転移性メラノーマ上に存在する腫瘍抗原への患者自身の免疫応答を強化するために提供される。免疫原として作用するワクチンは、細胞、組換え発現ベクターをトランスフェクトした細胞からの細胞溶解物、ＭＡ

ＲＴ－１組換え発現ベクターをトランスフェクトした細胞からの細胞溶解物、または発現したタンパク質を含む培養上清であって良い。別の方法では、免疫原は、部分的にあるいは実質的に精製した組換えＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドあるいはその類似体、または修飾したペプチドあるいはその類似体である。タンパク質またはペプチドは、リポタンパク質と結合させるか、またはリポゾームの形であるいは補助剤と共に投与されて良い。

【００６５】

免疫原は純粋なまたは実質的に純粋な形で投与することが出来るが、医薬組成物、調合物または調製物として存在することが望ましい。

本発明の調合物は、獣医学およびヒトへの両方に用いられるが、１つ以上の医薬として許容可能な担体、および所望するならばその他の治療成分と共に、上記のような免疫原からなる。担体は、調合物のその他の成分と適合し、その宿主に有害でないという意味で「許容可能」であらねばならない。調合物は、便宜上、単位投与の形で存在して良く、医薬分野で熟知されている任意の方法によって調製されて良い。

【００６６】

すべての方法は、１つ以上の補助成分を構成する担体と共に活性成分を組み合わせの中に持ち込む工程を含む。一般的には、調合物は、液体担体または微細に分割される固体担体またはその両方と共に活性成分を組み合わせの中に均一にかつ親密に持ち込み、次いで、必要であれば、生成物を望ましい調合物に形成することによって、調製される。

【００６７】

静脈内、筋肉内、皮下、または腹腔内投与に適した調合物は、宿主の血液と等張であることが望ましい溶液と共に、活性成分の無菌水溶液からなると便利である。そのような調合物は、便宜上、塩化ナトリウム（例えば０．１～２．０Ｍ）、グリシンなどのような生理学的に適合する物質を含み、かつ生理的条件と適合する緩衝ｐＨを持つ水中に固体活性成分を溶解して水溶液を生成し、該水溶液を無菌にすることによって調製されて良い。これらは、ユニット中または複数の投与容器中、例えば密封アンプルまたはバイアル中に存在して良い。

【００６８】

本発明の調合物は、安定化剤を組み込んでも良い。安定化剤の例としては、それら単独でまたは混合物として用いられるポリエチレングリコール、タンパク質、サッカライド、アミノ酸、無機酸および有機酸が挙げられる。これらの安定化剤は、望ましくは、免疫原重量部当たり０．１１～１０，０００重量部の量で混合される。２種類以上の安定化剤が用いられる予定の場合、それらの総量は上記の範囲であることが望ましい。これらの安定化剤は、適当な濃度およびｐＨの水溶液中で用いられる。そのような水溶液の具体的な浸透圧は、一般的には、０．１～３．０オスモルの範囲であり、望ましくは０．８～１．２の範囲である。水溶液のｐＨは、５．０～９．０の範囲内、望ましくは６～８の範囲内に調製される。本発明の免疫原の調合には、抗吸着剤を用いても良い。

【００６９】

さらなる医薬的方法が、作用の持続期間を制御するために用いられても良い。制御放出調製物は、タンパク質またはそれらの誘導体を複合または吸収するポリマーの使用を通して成し遂げられて良い。制御送達は、適当な高分子（例えばポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、または硫酸プロタミン）、および高分子の濃度、ならびに放出を制御するために組み込み方法を選択することによって、行われて良い。制御放出調製物より作用持続期間を制御するためのその他の可能な方法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ乳酸またはエチレンビニルアセテート共重合体のような重合体物質の粒子内に、ＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドおよびその類似体を組み込むことである。別法として、重合体粒子内にこれらの薬剤を組み込む代わりに、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース、あるいは、ゼラチン－ミクロカプセルおよびポリメチルメタシレートミクロカプセル）によって調製されたミクロカプセル内に、または、コロイド薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブ

ミン小球、ミクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）内、およびマクロエマルジョン内に、これらの物質を閉じ込めることが可能である。

【００７０】

経口調製物が所望される場合、組成物は、ラクトース、スクロース、デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム、結晶化セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウムまたはアラビアゴムのような、典型的な担体と組み合わせて良い。

【００７１】

本発明のタンパク質は、キットの形で、単独でまたは上記の医薬組成物の形で供給されて良い。

ワクチン注射は、従来の方法で行うことが出来る。例えば、免疫原は、塩類溶液または水のような適当な希釈液、または完全あるいは不完全な補助剤中で用いることが出来る。さらに、免疫原は、タンパク質免疫原性を作り出すために担体に結合させても良いが、させなくても良い。そのような担体分子には、これらに限られるわけではないが、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、破傷風毒素などが含まれる。また、免疫原は、リポタンパク質とカップリングさせても、またはリポソームの形であるいは補助剤と共に投与されても良い。免疫原は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、およびその類似部位等のような、抗体産生に適した任意の経路によって投与することが出来る。免疫原は、１度に、または抗ＭＡＲＴ－１免疫細胞または抗ＭＡＲＴ－１抗体の有効な力価が作り出されるまで断続的な間隔で投与されて良い。抗ＭＡＲＴ－１免疫細胞の存在は、免疫化される前および後のＭＡＲＴ－１抗原に対するＣＴＬ前駆体（細胞毒性Ｔリンパ球）の頻度を、ＣＴＬ前駆体分析アッセイ（非特許文献５７）を用いて測定することによって評価されてであろう。抗体は、上記のイムノアッセイを用いて血清中で検出されるであろう。

【００７２】

本発明のワクチンまたは免疫原の投与は、予防目的または治療目的のいずれかであって良い。予防目的で提供される場合、免疫原は、メラノーマによるいかなる存在にも先んじてまたはいかなる徴候にも先んじて提供される。免疫原の予防投与では、哺乳動物内のメラノーマを予防するかまたは弱毒化するために供される。治療目的で提供される場合、免疫原は、病気の始まりに（あるいは直後に）または病気の任意の徴候の始まりに提供される。免疫原の治療投与は、病気を弱毒化するために供される。

【００７３】

望ましい実施態様では、ワクチンは、組換えＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチド発現ベクターを用いて調製される。個体にワクチンを供給するために、ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体または部分をコードする遺伝子配列を、上記のように発現ベクター内に挿入し、免疫化される哺乳動物内に導入する。前述のワクチンに用いて良いベクターの例としては、これらに限定されるわけではないが、不完全なレトロウイスルベクター、アデノウイルスベクター、ワクチニアウイルスベクター、鶏痘ウイルスベクター、またはその他のウイルスベクターが含まれる（非特許文献５８）。ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体または部分を有するウイルスベクターは、メラノーマのいかなる証拠も認められない間に、またはメラノーマに罹った哺乳動物の病気の退縮を仲介するためかのどちらかに哺乳動物内に導入することが出来る。哺乳動物にウイルスベクターを投与するための方法の例としては、これらに限られるわけではないが、生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）でウイルスに細胞をさらすこと、罹患組織内へのレロトウイルスまたはウイルスの産生細胞株の注入、またはウイルスの静脈内投与が含まれる。別法として、ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体または部分を持つウイルスベクターは、医薬として許容可能な担体内で、メラノーマ内に直接注入するかまたは局所適用することによって局所的に投与されて良い。ＭＡＲＴ－１核酸配列の全体または部分を持つウイルスベクターの投与量は、ウイルス粒子の力価を基本とする。投与される免疫原の望ましい範囲は、哺乳動物、望ましくはヒト当たり約10^{6}～約10^{11}ウイルス粒子であろう。免疫化後のワクチンの効果は、特異的溶解活性あるいは特異的サイトカ

イン産生によってまたは腫瘍退縮によって評価されるのと同様に、抗原を認識する抗体または免疫細胞の産生によって評価することが出来る。当業者は、前述のパラメータを評価する従来からの方法を知っているであろう。免疫化される哺乳動物が既にメラノーマまたは転移性メラノーマに罹っている場合、ワクチンは、その他の治療処置と共に投与することが出来る。その他の治療処置の例としては、これらに限られるわけではないが、Ｔ細胞免疫療法の採用、サイトカインまたはメラノーマ用のその他の治療薬剤の共投与が含まれる。

【００７４】

あるいは、実質的にあるいは部分的に精製したＭＡＲＴ－１タンパク質の全体または部分を、医薬として許容可能な担体内のワクチンとして投与しても良い。投与されて良いＭＡＲＴ－１タンパク質の範囲は患者当たり約０．００１～約１００ｍｇであり、望まし投与量は患者当たり約０．０１～約１００ｍｇである。望ましい実施態様では、ＭＡＲＴ－１ペプチドＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）（１文字コードで表す）またはその類似体が、そのような治療を必要とする哺乳動物に治療目的でまたは予防目的で投与される。修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドの代わりに、表１４に示した例を用いても良い。望ましい投与量は約０．００１ｍｇ～約１００ｍｇ、最も望ましくは約０．０１ｍｇ～約１００ｍｇであろう。ペプチドは、合成によってまたは組換えによって作り出されて良い。免疫化は、抗免疫原抗体または免疫細胞の充分な力価が得られるまで、必要に応じて繰り返して行われる。

【００７５】

さらなるその他の代わりの実施態様では、レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターを哺乳動物細胞内へ導入することもできる。レトロウイルスベクターを導入することの出来る哺乳動物細胞の例としては、これらに限られるわけではないが、哺乳動物の初代培養物または哺乳動物の継代培養物、ＣＯＳ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３、または２９３細胞（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ１５７３）が含まれる。遺伝子を運搬するベクターを細胞内に導入する手段には、これらに限られるわけではないが、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、トランスフェクション、またはＤＥＡＥデキストラン、リポフェクチン、リン酸カルシウムを用いたトランスフェクション、または当業者に既知のその他の方法（非特許文献２４）が含まれる。ＭＡＲＴ－１抗原を発現している哺乳動物細胞は、哺乳動物に投与することができ、ワクチンまたは免疫原として供される。ＭＡＲＴ－１抗原発現細胞を投与する方法の例としては、これらに限られるわけではないが、静脈内、腹腔内または病巣内が含まれる。望ましい実施態様では、ペプチドＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）に関連するＭＡＲＴ－１核酸配列の部分が、ＭＡＲＴ－１発現ベクターに挿入され、哺乳動物細胞内に導入される。あるいは、ＭＨＣ分子とのそれらの結合を強化するように修飾されたＭＡＲＴ－１ペプチド関連核酸配列を用いても良い。例として、表１４に示す修飾ペプチドをコードする核酸配列を発現ベクターに挿入し、哺乳動物細胞内に導入しても良い。

【００７６】

本発明のワクチン調合物は、メラノーマ関連ＭＡＲＴ－１抗原のようなメラノーマ関連抗原に対して直接的な免疫応答を誘発する免疫原からなる。ワクチン調合物は、最初に動物モデルで、手始めに齧歯動物、次いでヒト以外の霊長類、最後にヒトで評価されて良い。免疫化法の安全性は、免疫化された動物の一般的健康状態への免疫化による影響（体重変化、発熱、食欲状態等）を探し出すことによって、また検死の病理学的変化を探し出すことによって決定される。動物で最初に試験した後、メラノーマ癌患者で試験できる。従来からの方法を用いて、患者の免疫応答が評価され、ワクチンの効果が決定されるであろう。

【００７７】

本発明のさらなるその他の実施態様では、ＭＡＲＴ－１タンパク質の全体、１つあるいはいくつかの部分、またはＭＡＲＴ－１ペプチドあるいはその類似体または修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドあるいはその類似体を、生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で培養された樹状突起

細胞にさらして良い。培養樹状突起細胞は、樹状突起細胞修飾抗原または抗原でパルス処理した樹状突起細胞からなるＴ細胞依存性抗原を作り出す手段を提供し、樹状突起細胞内で、抗原は処理され抗原活性化樹状突起細胞上に発現する。ＭＡＲＴ－１抗原活性化樹状突起細胞または処理された樹状突起細胞抗原は、ワクチンまたはメラノーマ治療用の免疫原として用いられて良い。樹状突起細胞は、抗原が中に取り込まれ樹状突起細胞表面上に示されるに充分な時間、抗原にさらされるべきである。得られた樹状突起細胞または樹状突起細胞処理抗原は、次いで、治療を必要とする個体に投与することが出来る。そのような方法は、Ｓｔｅｉｎｍａｎら（特許文献４）およびＢａｎｃｈｅｒｅａｕら（特許文献５）に記載されており、ここに援用する。

【００７８】

本発明のさらなるその他の実施態様では、個体から単離されたＴ細胞は生体外で（ｉｎｖｉｔｒｏ）ＭＡＲＴ－１タンパク質あるいはその部分、またはＭＡＲＴ－１ペプチドあるいはその類似体、またはＭＡＲＴ－１修飾ペプチドあるいはその類似体にさらし、次いでそのような治療を必要とする患者に治療上有効な量を投与することが出来る。Ｔリンパ球を単離できる例としては、これらに限られるわけではないが、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）、リンパ節、または腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）が含まれる。そのようなリンパ球は、処置した個体からまたは宿主から、この技術分野で既知の方法によって単離し、生体外で培養することが出来る（非特許文献５９）。リンパ球は、ＲＰＭＩあるいはＲＰＭＩ１６４０またはＡＩＭ－Ｖのような培地中で１～１０週間培養される。生存能はトリパンブルー色素排除試験によって評価される。リンパ球は、培養の一部または全期間中、ＭＡＲＴ－１タンパク質の全体または部分にさらされる。望ましい実施態様では、リンパ球は10^7細胞当たり約１～約１０μｇ／ｍｌの濃度で、リンパ球培養の全期間または一部期間、ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）ペプチド（１文字コードで表す）にさらされる。ペプチドに感作させた後、Ｔリンパ球は、そのような治療を必要とする哺乳動物に投与される。あるいは、表１４に示す修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドをリンパ球にさらしても良い。このような感作Ｔ細胞を哺乳動物に投与するための方法の例としては、これらに限られるわけではないが、静脈内、腹腔内、または病巣内が含まれる。これらの感作Ｔリンパ球の効果を測定し評価するパラメータには、これらに限定されるわけではないが、治療される哺乳動物内での免疫細胞の産生または腫瘍の退縮が含まれる。従来からの方法が、これらのパラメータを評価するために用いられる。そのような治療は、サイトカインまたは遺伝子修飾細胞と共に施すことが出来る（非特許文献６０、非特許文献６１）。

【００７９】

ワクチンとしての使用に加えて、組成物は、ＭＡＲＴ－１抗原、ペプチドあるいはその類似体、または修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドおよびその類似体に対する抗体を調製するために用いることが出来る。抗体は、抗メラノーマ薬剤として直接用いることが出来る。抗体を調製するために、宿主動物は、ＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドあるいはその類似体、または修飾ペプチドあるいはその類似体を免疫原として用いて免疫化され、上記のようなワクチン用担体と結合される。宿主の血清または血漿は、適当な時間間隔で集められて、免疫原と反応する抗体からなる組成物を提供する。γ－グロブリン画分またはＩｇＧ抗体は、例えば、飽和硫酸アンモニウムあるいはＤＥＡＥセファデックス、またはその他の当業者に既知の技術を用いることによって得ることが出来る。抗体は、化学療法のようなその他の抗癌薬剤と関連するであろう多くの不利な副作用とは実質上無関係である。

【００８０】

抗体組成物は、潜在する不利な免疫システム応答を最小にすることによって、宿主システムにより一層適合させることが出来る。このことは、外来種抗体のＦｃ部分の全体あるいは一部を除去することによって、または、例えばヒト／ヒトハイブリドーマからの抗体を用いるといったような宿主動物と同一種の抗体を用いることによって成し遂げられる。ヒト化（即ちヒトに非免疫原性である）抗体は、例えば、抗体の免疫原性部分を、類似しているが非免疫原性である部分で置換する（即ちキメラ抗体）ことによって作られて良い。そのようなキメラ抗体は、１つの種からの抗体の反応性部分または抗原結合部分、およ

び異なる種からの抗体のＦｃ部分（非免疫原性）を含んでよい。キメラ抗体の例としては、これらに限られるわけではないが、非ヒト哺乳動物－ヒトのキメラ、齧歯動物－ヒトのキメラ、ネズミ－ヒトおよびラット－ヒトのキメラ（Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（特許文献６）、Ｔａｎｉｇｕｃｈｉ　Ｍ.（特許文献７）、Ｍｏｒｒｉｓｏｎら（特許文献８）、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら（特許文献９）、非特許文献６２、非特許文献６３、非特許文献６４、非特許文献６５、ここにそのすべてを援用する）が含まれる。

【００８１】

「ヒト化」キメラ抗体の一般的概説は、非特許文献６６によっておよび非特許文献６７によって提供される。

適当な「ヒト化」抗体は、ＣＤＲまたはＣＥＡの置換によって代わりに作り出すことが出来る（非特許文献６８、非特許文献６９、非特許文献７０、これらのすべてはここに援用する）。

【００８２】

抗体または抗原結合断片は、遺伝子工学によって作り出されても良い。大腸菌内で重鎖および軽鎖の両方の遺伝子を発現させるための技術は、以下のＰＣＴ特許出願：特許文献２および特許文献３、ならびに非特許文献４６の主題である。

【００８３】

また、抗体は、免疫応答を強化する手段として用いることもできる。抗体は、抗体のその他の治療投与に用いられるそれと同様の量を投与することが出来る。例えば、プールしたγグロブリンは、患者当たり約１ｍｇ～約１００ｍｇの範囲で投与される。このように、ＭＡＲＴ－１抗原と反応する抗体は、単独でまたはメラノーマに罹った哺乳動物への他の抗癌治療と共に、抵抗なく投与することが出来る。抗癌治療の例としては、これらに限られるわけではないが、化学療法、放射線治療、ＴＩＬを用いた養子免疫療法が含まれる。

【００８４】

あるいは、抗ＭＡＲＴ－１抗原抗体は、免疫原としての抗イディオタイプ抗体を投与することによって誘発することもできる。便宜上、上記の方法に従って調製した精製抗ＭＡＲＴ－１抗体調製物を用いて、宿主動物に抗イディオタイプ抗体を誘発させる。組成物は、適当に希釈されて宿主動物へ投与される。投与後、通常は繰り返し投与後、宿主は抗イディオタイプ抗体を作り出す。Ｆｃ領域への免疫原性応答を排除するために、宿主動物と同一種によって作り出した抗体を用いるか、または投与した抗体のＦｃ領域を排除することが出来る。宿主動物内の抗イディオ抗体の導入に次いで、血清または血漿は、抗体組成物を提供するために取り除かれる。組成物は、抗ＭＡＲＴ－１抗体のための上記の方法に従って、または親和性マトリックスに結合した抗ＭＡＲＴ－１抗体を用いた親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。産生された抗イディオタイプ抗体は、標準的なＭＡＲＴ－１抗原と立体構造が同じであり、ＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチド類似体またはその部分を用いるよりもむしろ、ＭＡＲＴ－１メラノーマ抗原ワクチンを調製するために用いられて良い。

【００８５】

動物に抗ＭＡＲＴ－１抗体を誘発させる手段として用いた場合、抗体を注入する方法は、ワクチン注射の目的と同じ、即ち、補助剤とともにまたは補助剤を用いずに、生理学的に適当な希釈剤中有効濃度で、筋肉内、腹腔内、皮下、病巣内、またはその類似部位などに注射される。１種類以上の効能促進剤の注入が望ましい。

【００８６】

また、本発明のＭＡＲＴ－１誘導タンパク質またはペプチドまたは修飾ペプチドは、病気前後の予防を意図する抗血清の産生に用いることを意図する。ここでは、ＭＡＲＴ－１抗原、ペプチドあるいはその類似体、または修飾ＭＡＲＴ－１ペプチドあるいはその類似体は、適当な補助剤と調合され、ヒト抗血清を産生するための既知の方法に従って、ヒトボランティアに注射により投与される。注射されたタンパク質に応答する抗体は、免疫化に次いで、数週間の間、末梢血清をサンプリングすることによって、抗ＭＡＲＴ－１血清

抗体の存在を検出するために、ここに記載されたようなイムノアッセイを用いて、モニターされる。

【００８７】

免疫化された個体からの抗血清は、進行性メラノーマの危険性のある個体の予防処置として投与されて良い。抗血清は、メラノーマに罹った個体の病後の予防治療にも有用である。

【００８８】

ＭＡＲＴ－１抗原の抗体および抗イディオタイプ抗体のｉｎ　ｖｉｖｏでの使用および診断的使用の両方に対してモノクローナル抗体を使用するのが好適であろう。モノクローナル抗ＭＡＲＴ－１抗体または抗イディオタイプ抗体は以下のように製造できる。免疫化動物から脾臓またはリンパ球を取り出し、不死化させるかまたは当業者には既知の方法によりハイブリドーマの製造に使用した（非特許文献７１）。ヒト－ヒトハイブリドーマを製造するために、ヒトリンパ球供与者が選択された。ＭＡＲＴ－１抗原を運ぶメラノーマを持つことが知られている供与者が適したリンパ球供与者であろう。リンパ球は末梢血試料から単離でき、もし供与者が脾摘出を受けるならば脾臓細胞を使用してもよい。エプスタインーバールウイルス（ＥＢＶ）がヒトリンパ球の不死化に使用でき、ヒト－ヒトハイブリドーマを産生するためにはヒト融合パートナーが使用できる。ペプチドによるｉｎ　ｖｉｔｒｏでの１次免疫化もまたヒトモノクローナル抗体の産生に使用できる。好適なＭＡＲＴ－１ペプチドの例としては、ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）、ＥＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号１７）およびＡＡＧＩＧＩＬＴＶＩ（配列番号１８）（ペプチドは１文字アミノ酸コードで表されている）が挙げられるがそれらに制限されるわけではない。最も好適にはＡＡＧＩＧＩＬＴＶ（配列番号４）が免疫原として使用される。もしくは、ＭＡＲＴ－１アミノ酸配列から誘導され、ＭＨＣクラスＩ分子への結合性を促進させるように修飾されたペプチドもまた使用される。例えば、表１４に示された修飾ペプチドが免疫原として使用されるであろう。

【００８９】

不死化細胞により分泌される抗体をスクリーニングして所望の特異性を持つ抗体を分泌するクローンを決定する。モノクローナルＭＡＲＴ－１抗原またはペプチド抗体については、抗体はＭＡＲＴ－１抗原またはペプチドに結合しなければならない。モノクローナル抗イディオタイプ抗体については、抗体は抗ＭＡＲＴ－１抗体に結合しなければならない。所望の特異性を持つ抗体を産生する細胞が選択される。

【００９０】

ここに記載された抗体またはキメラ抗体はまた常法により毒素分子、放射性同位元素および薬剤と結合させてもよい（非特許文献７２、非特許文献７３）。抗体が結合されるであろう毒素の例としてはリシンまたはジフテリア毒素が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。薬剤または化学療法剤の例にはシクロホスファミドまたはドキソルブシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。放射性同位元素の例には^{131}Ｉが挙げられるが、それに限定されるわけではない。上記の薬品に共有結合で結合する抗体は癌免疫療法においてメラノーマに処置に使用できる。

【００９１】

病変のある部位への局所的投与は、局所適用、注射および組換え的に注入液を発現している細胞を含む多孔性装置の移植、ＭＡＲＴ－１抗体またはキメラ抗体、毒素、薬剤または放射性標識またはそれらの一部が含まれた多孔性装置の移植を含む（これらに限定されるわけではない）本分野では既知の手段により達成される。

【００９２】

上記の抗体およびそれらの抗原結合性断片はキット単独としてまたはｉｎ　ｖｉｖｏ使用のための医薬組成物として供給される。抗体は治療的使用、イムノアッセイにおける診断的使用またはここに記載したＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドを精製するための免疫親和性試薬としての使用において用いられるであろう。

【００９３】

本発明はまた、腫瘍浸潤リンパ球により認識される第２のメラノーマをコードしているｃＤＮＡ２５（図４Ａおよび図４Ｂ；配列番号２６）と称される、実質的に精製され単離された核酸配列も提供する。ｃＤＮＡ２５によりコードされたメラノーマ抗原を認識するＴＩＬはｉｎ　ｖｉｖｏ腫瘍排除に関連している。ＴＩＬはＨＬＡ－Ａ２に関連してｃＤＮＡ２５によりコードされているメラノーマ抗原を認識した。ｃＤＮＡ２５核酸配列（図４Ａおよび図４Ｂ；配列番号２６）とメラノサイト－メラノーマ特異的タンパク質ｇｐ１００をコードしている遺伝子の核酸配列との比較により、この配列はｇｐ１００として以前に同定された配列とは似てはいるが異なっていることが示された。ｇｐ１００として以前に同定された配列にはｇｐ１００（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ３２２９５；ｇｐ９５とも称される）、Ｐｍｅｌ　１７（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ７７３４８；非特許文献７４）およびＭＥ２０（非特許文献７５）が挙げられる。

【００９４】

ここに提供されるｃＤＮＡ２５配列（図４Ａおよび図４Ｂ；配列番号２６）はＧｅｎｂａｎｋの以前に報告されたｇｐ１００配列（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ３２２９５）とは２ヌクレオチド異なっており、Ｐｍｅｌ　１７配列（非特許文献７４）とは３ヌクレオチド異なっており、かつ２１塩基対が欠失し、およびＭＥ２０配列（非特許文献７５）とは１ヌクレオチド異なっている。アミノ酸レベルでは、ｃＤＮＡ２５によりコードされているタンパク質はＧｅｎｂａｎｋのｇｐ１００配列（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ３２２９５）とは１６２位の１アミノ酸、Ｐｍｅｌ　１７と比較すると１６２位および２７２位の２つのアミノ酸が異なっており、しかもＰｍｅｌ　１７の５８８～５９４位に存在している７アミノ酸が含まれていない。従って、ｃＤＮＡ２５はｇｐ１００の遺伝子の異なった１つの形をコードしているように思われる。ｃＤＮＡ２５核酸配列（図４Ａおよび図４Ｂ；配列番号２６）およびアミノ酸配列（図Ａ；配列番号２７）と以前に報告されているｇｐ１００配列間の相違は多形、対立遺伝子変異または腫瘍中での突然変異によるものであろう。マウス腫瘍での実験でＴ細胞により認識される新規抗原は不活性化遺伝子のコード領域における点突然変異から生じることが示されている（非特許文献７６）。

【００９５】

本発明はまたここで提供されるｇｐ１００タンパク質配列またはその類似体から誘導される免疫原性ペプチドを提供する。（図５Ａおよび図７Ａ；配列番号２７および１２１）。これらの免疫原性ペプチドはＴＩＬにより認識されるｇｐ１００タンパク質の抗原性部分（図５Ａおよび図７Ａ；配列番号２７および１２１）を表している。免疫原性ペプチドの例にはＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ（ペプチドＧ１０－４；配列番号３３）、ＶＬＹＲＹＧＳＦＳＶ（ペプチドＧ１０－５；配列番号３４）、ＡＬＤＧＧＮＫＨＦＬ（ペプチドＧ１０－２２；配列番号３５）、ＶＬＫＲＣＬＬＨＬ（ペプチドＧ９－１９；配列番号３６）、ＶＬＰＳＰＡＣＱＬＶ（ペプチドＧ１０－８；配列番号３７）、ＳＬＡＤＴＮＳＬＡＶ（ペプチドＧ１０－９；配列番号３８）、ＳＶＳＶＳＱＬＲＡ（ペプチドＧ９－２１６；配列番号３９）、ＹＬＥＰＧＰＶＴＡ（ペプチドＧ９－２８０；配列番号４０）、ＬＮＶＳＬＡＤＴＮ（ペプチドＧ１０－４００；配列番号４１）、ＫＴＷＧＱＹＷＱＶ（ペプチド$Ｇ９_{154}$；配列番号４６；図７Ａ；アミノ酸１５４～１６２位）、ＫＴＷＧＱＹＷＱＶＬ（ペプチド$Ｇ１０_{154}$；配列番号４７；図７Ａ；アミノ酸１５４～１６３位）、ＩＴＤＱＶＰＦＳＶ（ペプチド$Ｇ９_{209}$；配列番号４８；図７Ａ；アミノ酸２０９～２１７位）およびＴＩＴＤＱＶＰＦＳＶ（ペプチド$Ｇ１０_{208}$；配列番号４９；図７Ａ；アミノ酸２０８～２１７位）が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。本発明はさらにｇｐ１００アミノ酸配列（図５Ａおよび図７Ａ；配列番号２７および１２１）から誘導されるこれらの免疫原性ペプチドの類似体も含んでいる。類似体という用語はこれらの免疫原性ペプチドの機能的特色を示す任意のペプチドを含んでいる。類似体という用語はまた上記のペプチドの保存的置換体または化学的誘導体も含んでいる。これらの免疫原性ペプチドはＭＡＲＴ－１に対して記載したように、同一の方法または様式により合成的にまたは組換えにより製造されるであろう。

【００９６】

本発明のさらに別の態様では、ｇｐ１００配列（図５Ａおよび図７Ａ；配列番号２７および１２１）に由来する免疫原性ペプチドは、Ｔ細胞に提示された場合にペプチドが会合するＭＨＣ分子への結合を促進することにより免疫原性を増加させるように修飾される。例えば、修飾には免疫原性ペプチド配列内の１以上のアミノ酸の欠失または付加、または所定の免疫原性ペプチド配列内のアミノ酸の挿入、または所定の免疫原性ペプチド配列内に存在するアミノ酸の誘導体化、または所定の免疫原性ペプチド配列内のアミノ酸の突然変異が含まれるであろう。好適な修飾においては、所定の免疫原性ペプチド配列において少なくとも１つのアミノ酸が置換される。所定の免疫原性ペプチド配列を構成する任意のアミノ酸は本発明により修飾されるであろう。任意のアミノ酸が免疫原性ペプチド配列内の所定のアミノ酸の置換に使用されるであろう。修飾は免疫原性ｇｐ１００ペプチド内のどのアミノ酸位置で生じてもよい。修飾ｇｐ１００ペプチドにはＴ細胞に提示された場合にペプチドが会合するＭＨＣ分子への結合促進を示す任意の修飾ｇｐ１００ペプチドが含まれることを意図する。

【００９７】

例えば、ＨＬＡ－Ａ２に関連してＴ細胞に認識されるペプチドは長さ９～１０アミノ酸である。好適には、ＨＬＡ－Ａ２へのペプチドの結合促進のためには、ペプチド中の第２位および最後の位置は疎水性アミノ酸、好適には脂肪族疎水性アミノ酸である。第２位はロイシン、メチオニン、イソロイシン、バリン、トレオニン、グリシンまたはアラニンのような脂肪族疎水性アミノ酸であろうが、それらに限定されるわけではない。ペプチドの最後の位置は（ペプチドの長さに依存して第９位または第１０位）バリン、ロイシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、グリシン、メチオニン、バリン、またはトレオニンのような脂肪族疎水性アミノ酸であろうが、それらに限定されるわけではない。

【００９８】

免疫原性ペプチドの第１位および第３位は、任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸で置換されていてもよい。ペプチドの第１位および第３位に使用できるアミノ酸の例としてはアラニン、ロイシン、リジン、イソロイシン、グリシン、メチオニン、バリン、トレオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、セリン、リジンまたはチロシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【００９９】

本態様に従って修飾されるであろうｇｐ１００ペプチドの例としてはＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ（ペプチドＧ１０－４；配列番号３３）、ＶＬＹＲＹＧＳＦＳＶ（ペプチドＧ１０－５；配列番号３４）、ＡＬＤＧＧＮＫＨＦＬ（ペプチドＧ１０－２２；配列番号３５）、ＶＬＫＲＣＬＬＨＬ（ペプチドＧ９－１９；配列番号３６）、ＶＬＰＳＰＡＣＱＬＶ（ペプチドＧ１０－８；配列番号３７）、ＳＬＡＤＴＮＳＬＡＶ（ペプチドＧ１０－９；配列番号３８）、ＳＶＳＶＳＱＬＲＡ（ペプチドＧ９－２１６；配列番号３９）、ＹＬＥＰＧＰＶＴＡ（ペプチドＧ９－２８０；配列番号４０）、ＬＮＶＳＬＡＤＴＮ（ペプチドＧ１０－４００；配列番号４１）、ＫＴＷＧＱＹＷＱＶ（ペプチドＧ９$_{154}$；配列番号４６；図７Ａ；アミノ酸１５４～１６２位）、ＫＴＷＧＱＹＷＱＶＬ（ペプチドＧ１０$_{154}$；配列番号４７；図７Ａ；アミノ酸１５４～１６３位）、ＩＴＤＱＶＰＦＳＶ（ペプチドＧ９$_{209}$；配列番号４８；図７Ａ；アミノ酸２０９～２１７位）およびＴＩＴＤＱＶＰＦＳＶ（ペプチドＧ１０$_{208}$；配列番号４９；図７Ａ；アミノ酸２０８～２１７位）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１００】

例えば、免疫原性ｇｐ１００ペプチドＫＴＷＧＱＹＷＱＶ（配列番号４６）に由来する修飾ｇｐ１００ペプチドは式$X_1X_2X_3$ＧＱＹＷＱX_4（配列番号１２３）を持っており、式中：

X_1は任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはアラニン、ロイシン、リジン、イソロイシン、グリシン、メチオニン、バリン、トレオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、リジンまたはセリン、アスパラギン酸またはチロシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではな

い。

X_2は任意の疎水性アミノ酸、好適には脂肪族疎水性アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、イソロイシン、アラニン、トレオニン、グリシンまたはバリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。最も好適であるのは、ロイシン、メチオニンまたはイソロイシンである。

X_3は任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはアラニン、ロイシン、リジン、イソロイシン、グリシン、メチオニン、バリン、トレオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、セリン、リジンまたはチロシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_4は任意の疎水性アミノ酸、好適には脂肪族疎水性アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはバリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、アラニン、トレオニンまたはグリシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１０１】

修飾ペプチドの例は表１５に示されている。好適な修飾ペプチドはＫＩＷＧＱＹＷＱＶ（Ｇ９－１５４－２１）（配列番号７０）である。

もしくは、免疫原性ｇｐ１００　ＩＴＤＱＶＰＦＳＶ（Ｇ９－２０９；配列番号４８）が修飾され、そのような修飾ペプチドは一般式$X_1X_2X_3$ＱＶＰＦＳX_4（配列番号１２４）を持っており、式中：

X_1は任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリン、トレオニン、グリシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはチロシン、アスパラギン酸またはセリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_2は任意の疎水性アミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリン、トレオニン、またはグリシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_3は任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、イソロイシン、バリン、トレオニン、グリシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸またはセリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_4は任意の疎水性アミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリンまたはトレオニンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１０２】

ＩＴＤＱＶＰＦＳＶに由来する修飾ペプチドの例が表１６に示されている。好適にはペプチドＦＬＤＱＶＰＦＳＶ（ペプチドＧ９－２０９－１Ｆ２Ｌ）が使用される。

例えば、免疫原性ｇｐ１００ペプチドＹＬＥＰＧＰＶＴＡ（Ｇ９－２８０；配列番号４０）に由来する修飾ｇｐ１００ペプチドはまたＭＨＣクラスＩ分子、好適にはＨＬＡ－Ａ２またはそのサブタイプへの結合を促進するように修飾される。

【０１０３】

修飾ペプチドは一般式$X_1X_2X_3$ＰＧＰＶＴX_4（配列番号１２５）を持っており、式中：

X_1は任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリン、トレオニン、グリシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはチロシン、アスパラギン酸またはセリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_2は任意の疎水性アミノ酸、好適には脂肪族疎水性アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリン、トレオニン、またはグリシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_3は任意のアミノ酸、好適には疎水性脂肪族アミノ酸または芳香族アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、イソロイシン、バリン、トレオ

ニン、グリシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン酸またはセリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

X_4は任意の疎水性アミノ酸、好適には脂肪族疎水性アミノ酸である。使用できるアミノ酸の例としてはロイシン、メチオニン、アラニン、イソロイシン、バリン、トレオニンまたはグリシンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１０４】

ＹＬＥＰＧＰＶＴＡ（Ｇ９－２８０；配列番号４０）に由来する修飾ペプチドの例は表１７に示されている。好適な修飾ペプチドはＹＬＥＰＧＰＶＴＶ（Ｇ９－２８０－９Ｖ）（配列番号１０４）である。

【０１０５】

本発明にはここに開示したｇｐ１００配列（図５Ａ；配列番号２７および図７Ａ；配列番号１２１）に由来するこれらの修飾ペプチドの類似体もさらに含まれる。類似体という用語には、上記のこれらの修飾ペプチドの機能的特色を示す任意のペプチドが含まれることを意図する。これらの修飾ペプチドは常法により合成的にまたは組換え的に提供される。

【０１０６】

別の態様では、表１５～表１７に示すようなｇｐ１００アミノ酸配列または修飾ｇｐ１００ペプチドまたはそれらの類似体は治療的にまたは予防的にワクチンとして使用される。予防的には、ワクチンはメラノーマの徴候の前に投与される。これらのペプチドの予防的投与は哺乳類においてメラノーマを防止または減少させるために働くはずである。

【０１０７】

好適な態様において、メラノーマの危険性が高い哺乳類（好適にはヒト）はこれらのワクチンで予防的に処置される。もしくは、メラノーマまたは転移性メラノーマ上に提示される腫瘍抗原への患者自信の免疫応答を促進するために治療的にワクチンが投与されるであろう。免疫原として働くワクチンは、細胞、ｇｐ１００免疫原性ペプチドをコードしている核酸配列を運ぶ組換え体発現ベクターでトランスフェクトされた細胞からの細胞溶解物または発現されたタンパク質を含んでいる培養上清液であろう。これらの免疫原性ペプチドをコードしている核酸配列が導入される発現ベクターはＭＡＲＴ－１で記載したものと同一である。もしくは、免疫原は部分的または実質的に精製された組換え体ｇｐ１００ペプチドまたはそれらの類似体である。

【０１０８】

投与されるべき免疫原は純粋なまたは実質的に純粋な形でも可能であるが、上記ＭＡＲＴ－１で記載した医薬組成物、処方または製剤として存在させるのが好適である。ワクチン接種は前にＭＡＲＴ－１で記載したような常法により実施できる。

ｇｐ１００免疫原性ペプチドおよびそれをコードする核酸配列は、前にＭＡＲＴ－１で記載したのと同一の方法または様式で、バイオアッセイに、または抗体の作製に用いることができる。

【０１０９】

本発明のさらに別の態様において、１つ以上のメラノーマ抗原に対する多価ワクチンが提供される。そのような多価ワクチンはＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドまたは修飾ペプチドの全てまたは一部、またはｇｐ１００ペプチドまたは修飾ペプチドまたはそれらの組み合わせを含んでいる。

【０１１０】

メラノーマ抗原をコードしている遺伝子の同定において、従来は抗原で免疫化またはあらかじめ処置したメラノーマ患者から単離されたＰＢＬを利用していた（非特許文献１８、非特許文献２０、非特許文献１９）。好適な方法は腫瘍を持つ患者を免疫化することなく、該患者からのＴＩＬにより認識される腫瘍抗原をコードしている遺伝子を同定することである。同定された遺伝子は増殖している癌に対する自然の免疫応答に含まれた抗原をコードしているので、そのような方法で可能性が大きくなる。従って、本発明はメラノーマを持つ患者の腫瘍からの腫瘍浸潤性リンパ球単離物（ＴＩＬ）を用いるｃＤＮＡ発現ク

ローニングを利用したメラノーマ抗原コード遺伝子の同定法も提供する。本方法は以下の工程を含んでいる：（ａ）メラノーマを持つ哺乳類の腫瘍から腫瘍浸潤性リンパ球を単離し；（ｂ）哺乳類細胞株内にメラノーマｃＤＮＡライブラリーを導入し；（ｃ）該哺乳類細胞を該ＴＩＬに暴露し；（ｄ）該ＴＩＬにより認識される該哺乳類細胞中の該ｃＤＮＡによりコードされている抗原の発現をスクリーニングし；および（ｅ）該抗原に対応する該ｃＤＮＡを単離する。工程（ａ）の腫瘍浸潤性リンパ球はメラノーマを持つ患者の病巣、皮下組織または内臓を含む（しかしこれらに限定されるわけではない）から単離されるであろう。工程（ｂ）で使用されるｃＤＮＡライブラリーの製造に使用される細胞の例としては新鮮なまたは培養されたメラノーマ細胞が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。好適には、ｃＤＮＡライブラリーはメラノーマ抗原を発現していない哺乳類細胞内へ導入される。もしＴＩＬによる認識のための所望のＨＬＡハロタイプを発現していない非ヒト哺乳類細胞またはヒト細胞が工程（ｂ）で使用されるならば、そのような細胞は以下に記載するようにＨＬＡ遺伝子で同時トランスフェクションできる。工程（ｂ）で使用できる細胞の例としては乳癌細胞株ＭＤＡ２３１（ＡＴＣＣ＃ＨＴＢ２６）またはＣＯＳ７細胞（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ１６５１）のような腫瘍細胞株が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。使用できるＭＨＣ遺伝子の例としてはＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ遺伝子、好適であるのはＨＬＡ－Ａ２およびそのサブタイプ（非特許文献７７）が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。使用に適したＭＨＣ遺伝子はｃＤＮＡライブラリー源であった腫瘍細胞のハロタイプにより決定される。標準的な方法が、ＴＩＬ単離物により認識されるハロタイプの決定に使用できる（非特許文献７８）。ＴＩＬにより認識される抗原を発現しているｃＤＮＡクローンを含む細胞の認識の評価法の例としては、γインターフェロンアッセイ、ＴＮＦ分泌（非特許文献１８）または認識された抗原をコードするｃＤＮＡでトランスフェクトされた細胞の溶解などが挙げられるが、これらに限定されるわけではない。そのようなアッセイは当業者には既知の常法により実施される。ｃＤＮＡを含むベクターの隣接部位に特異的なプライマーを用いるＰＣＲによりメラノーマ抗原が単離できる。ＴＩＬにより認識される抗原に対応するｃＤＮＡの単離法の例としてはＰＣＲが挙げられるが、これに限定されるわけではない。

【０１１１】

メラノーマ抗原をコードしている遺伝子または核酸配列が同定されたら、次の工程はこれらの遺伝子によりコードされているタンパク質の抗原性部分またはエピトープを同定することである。従って、本発明のさらに別の態様では、ＭＡＲＴ－１タンパク質（図１；配列番号２）またはｇｐ１００タンパク質（図５Ａおよび図７Ａ；配列番号２７および１２１）の推定アミノ酸配列に由来するペプチドの免疫原性を評価するための方法が提供される。本方法は以下の工程を含んでいる：（ａ）ＭＡＲＴ－１（図１；配列番号２）またはｇｐ１００（図５Ａおよび図７Ａ；配列番号２７および１２１）アミノ酸配列に基づく多数のペプチドを調製し；（ｂ）少なくとも１つの該ペプチドと哺乳類細胞株をインキュベートし；（ｃ）該ペプチドとインキュベートした該哺乳類細胞を腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）に暴露し；および（ｄ）該ペプチドとインキュベートした該細胞をＴＩＬの認識でスクリーニングする。約２５～５アミノ酸、より好適には２０～１０アミノ酸、最も好適には９～１０アミノ酸のペプチドを使用するのが好ましい。工程（ｂ）で使用される細胞の例としてはＴ２細胞（非特許文献７９）またはＥＢＶ形質転換Ｂ細胞株（非特許文献９）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。ペプチドとインキュベートされた細胞の認識の評価法の例としては^{51}Ｃｒ放出細胞毒性アッセイ（非特許文献７９）またはγ－ＩＦＮまたはＴＮＦ分泌のようなリンホカインアッセイ（非特許文献８０）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０１１２】

Ｔ細胞認識抗原はＭＨＣクラスＩ分子と複合体を形成する。すべての哺乳類種のＭＨＣ座は多数の遺伝子を含んでおり、高度に多型である。異なったＭＨＣ分子またはハロタイプ型は異なった抗原に結合する。ヒトにおいてＨＬＡ複合体はクラスＩ分子をコードしているＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ遺伝子座を含んでいる。リンパ球はＨＬＡ

クラスＩ分子に関して腫瘍抗原を認識するであろう。もし組換え体ＭＡＲＴ－１発現ベクターを含む細胞がＴＩＬでスクリーニングされるがヒト細胞ではなく（ＣＯＳ細胞のような）、または所望のハロタイプを発現しないならば、ＭＨＣクラスＩ遺伝子を含む発現ベクターが細胞内へ導入されるであろう（実施例１参照）。これは本発明のさらに別の態様を表している。ＭＡＲＴ－１抗原およびＨＬＡ抗原を発現している細胞は特異的ＭＨＣクラスＩ拘束型に関連して腫瘍抗原の存在を検出するためにＴＩＬでスクリーニングできる。適したハロタイプはライブラリーが誘導される腫瘍のハロタイプにより決定される。使用できるＭＨＣクラスＩ遺伝子の例としてはＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ遺伝子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。好適なＭＨＣ特異性または拘束型の例としてはＨＬＡ－Ａ１、ＨＬＡ－Ａ２．１サブタイプ（非特許文献７７）のようなＨＬＡ－Ａ２またはＨＬＡ－Ａ２４が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。最も好適であるのはＨＬＡ－Ａ２．１遺伝子である。

【０１１３】

獣医学的な使用もまた、ここに記載された組成物および治療的応用により含まれることを意図する。

本明細書で引用したすべての本、文献および特許は全文のまま援用する。以下の実施例は本発明の種々の態様を例示するものであり、その範囲を限定するものではない。

【実施例１】

【０１１４】

腫瘍内に浸潤した自己Ｔ細胞により認識される、共有ヒトメラノーマ抗原をコードする遺伝子のクローニング

細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の作製および細胞株の培養

非特許文献８１に記載されているように、ＣＴＬは、切り出された腫瘍標本から細胞の懸濁液を６０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２（Ｃｅｔｕｓ－腫瘍部門、カイロン社、カリフォルニア州エメリーベル）と３０～７０日培養することにより作製した。ＴＩＬ５０１およびＴＩＬ１２３５は主としてＣＤ８$^{+}$であり、進行した転移性メラノーマを持つ患者の腫瘍標本に由来した。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞クローン、ＴＩＬ５０１．Ａ４２は限界希釈法により確立され、１２０ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２と照射された（週に１度を４～６回）自己由来腫瘍細胞とともに培養された。

【０１１５】

メラノーマ細胞株３９７ｍｅｌ、５０１ｍｅｌ、５２６ｍｅｌ、５３７ｍｅｌ、６２４ｍｅｌ、８８８ｍｅｌ、９５２ｍｅｌ、およびエプスタインーバールウイルス（ＥＢＶ）形質転換Ｂ細胞株、５０１ＥＢＶＢ、８３６ＥＢＶＢは我々の研究室で確立され、１０％ウシ胎児血清（ＦＣＳ）（Ｂｉｏｆｌｕｉｄｓ、メリーランド州ロックビル）を含むＲＰＭＩ　１６４０（ＧＩＢＣＯ／Ｌｉｆｅｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ニューヨーク州グランドアイランド）培地中で培養された（非特許文献９）。正常培養メラノサイト、ＮＨＥＭ４８３、ＮＨＥＭ４９３、ＮＨＥＭ５２７、ＮＨＥＭ５２９、ＮＨＥＭ５３０、ＮＨＥＭ５３３、ＮＨＥＭ６１６およびＮＨＥＭ６８０はクローンテック、カリフォルニア州サンディエゴから購入され、ＦＭ７２５、ＦＭ８０１、ＦＭ９０２はＷｉｓｔａｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、ペンシルバニア州フィラデルフィアのＭ．Ｈｅｒｌｙｎから提供を受け、ＨＡ００２はエール大学、コネチカット州ニューヘーブンのＲ．Ｈａｌａｂａｎから提供を受け、メラノサイト増殖培地（ＭＧＭ、クローンテック）中で培養した。メラノーマ細胞株Ｃ３２、ＲＰＭＩ７９５１、ＷＭ１１５、Ａ３７５、ＨＳ６９５Ｔ、Ｍａｌｍｅ３Ｍ、結腸癌細胞株Ｃｏｌｌｏ、ＳＷ４８０、ＷｉＤｒ、乳癌細胞株ＭＤＡ２３１、ＭＣＦ７、ＨＳ５７８、ＺＲ７５、神経芽細胞腫細胞株ＳＲ－Ｎ－ＳＨ、膠腫細胞株Ｕ１３８ＭＧ、ＨＳ６８３、Ｈ４、肉腫細胞株１４３Ｂ、アデノウイルスタイプ５で形質転換された胎児性腎臓細胞株２９３はＡＴＣＣ、メリーランド州ロックビルから購入され、腎癌細胞株ＵＯＫ１０８およびＵＯＫ１１７はＮＩＨ、メリーランド州ベセスダのＭ．Ｌｉｎｅｈａｎから提供を受けた。肺小細胞癌細胞株Ｈ１０９２はテキサス大学サウスウェスタン、テキサス州ダラスのＪ．Ｄ．Ｍｉｎｎａから提供された。Ｅｗｉｎｇ肉腫細胞株ＴＣ７１、

ＲＤ－ＥＳ、６６７４はＮＩＨ、メリーランド州ベセスダのＭ．Ｔｓｏｋｏｓから提供された。神経芽細胞腫細胞株ＳＫ－Ｎ－ＡＳはＮＩＨ、メリーランド州ベセスダのＯ．Ｍ．Ｅｌ　Ｂａｄｒｙから提供を受けた。形質細胞腫細胞株ＨＭＹ－Ｃ１ＲおよびＭ１線維芽細胞株はＮＩＨ、メリーランド州ベセスダのＷ．Ｂｉｄｄｉｓｏｎから提供を受けた。腎臓上皮細胞ＫＡＭ、ＷＬＣはサウスカロライナ医科大学、サウスカロライナ州チャールストンのＤ．Ｊ．Ｈａｚｅｎ－ＭａｒｔｉｎおよびＤ．Ａ．Ｓｅｎｓから提供された。サル腎臓細胞株ＣＯＳ７はＮＩＨ、メリーランド州ベセスダのＷ．Ｌｅｏｎａｒｄから提供を受けた。

【０１１６】

細胞毒性アッセイ

^{51}Ｃｒ放出アッセイは非特許文献８３に記載されているように実施された。簡単に記すと、^{51}Ｃｒで標識された５０００個の標的細胞を異なった数のエフェクター細胞と混合し、５時間インキュベートした。次に上清液を集め、放射活性を測定して特異的溶解の割合を計算した。

【０１１７】

ＩＦＮ－γ放出アッセイ

９６穴平底マイクロプレートを用い、ウェル当たり１２０ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を含む３００μｌのＡＩＭ－Ｖ培地中、５万～１０万個の応答細胞および４×１０^{4}～１０^{5}個の刺激細胞を混合した。２０時間インキュベートした後、１００μｌの上清を集め、抗ヒトＩＦＮ－γモノクローナル抗体（ｍＡｂ）（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ、カリフォルニア州カマリロ）で被覆した酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）プレート（Ｉｍｍｕｎｏｐｌａｔｅ　ＭａｘｉＳｏｒｐ、Ｎｕｎｃ、デンマーク）に加えた。４℃で１晩インキュベートした後、プレートを３回洗浄し、ウサギ抗ヒトＩＦＮ－γポリクローナル抗体（Ａｂ）（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ、カリフォルニア州カマリロ）の１：２０００希釈液を１００μｌ加えて３７℃で２時間インキュベートした。プレートは３回洗浄し、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧポリクローナル抗体（Ａｂ）（ベーリンガーマンハイム、インディアナ州インディアナポリス）の１：２０００希釈液を１００μｌ加えた。３７℃で１時間インキュベートした後、１００μｌの４ｍｇ／ｍｌ　ｐ－ニトロフェノール　ホスフェート（シグマ、ミズーリ州セントルイス）を加え、室温で暗所にて１０～２０分インキュベートし、反応を停止させるために２５μｌの１Ｎ　ＮａＯＨを加えた。４０５ｎｍの波長で光学密度を測定し、同一のアッセイで測定された組換え体ＩＦＮ－γ標品（Ｂｉｏｇｅｎ、マサチューセッツ州ケンブリッジ）と比較してＩＦＮ－γの濃度を計算した。

【０１１８】

ｃＤＮＡ発現クローニング

ｃＤＮＡライブラリーは非特許文献８２および非特許文献８３に記載されているようにＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株５０１ｍｅｌからのポリＡ　ＲＮＡから構築された。簡単に記すと、第１鎖ｃＤＮＡはリンカープライマーＧＧＡＣＡＧＧＣＣＧＡＧＧＣＧＧＣＣ（Ｔ）$_{40}$（配列番号４２）で合成され、続いて第２鎖ｃＤＮＡ合成が行われた。Ｔ４ＤＮＡリガーゼで処理した後、２つのオリゴヌクレオチドＣＣＡＩＴＣＧＣＧＡＣＣ（配列番号４３）およびＧＧＴＣＧＣＧＡＴＴＧＧＴＡＡ（配列番号４４）からなるＳｆｉＩアダプターをｃＤＮＡの末端に連結した。ｃＤＮＡはＳｆｉＩで消化し、消化された断片はスパンカラムを通して単離された。ｃＤＮＡは次にＳｆｉＩ消化により調製されたバクテリオファージλｐＣＥＶ２７（非特許文献８３）ベクターアームと混合し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏパッケージングが実施された。

【０１１９】

メラノーマ抗原をスクリーニングするため、改良リン酸カルシウム法（Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ、ストラタジーン）を用いて、約１０^{7}クローンを含む増幅ｃＤＮＡライブラリーが、ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$抗原非発現細胞株ＭＤＡ２３１クローン７およびＡ３７５クローン１－４内へトランスフェクトされた。Ｇ４１８（ＢＲＬ

、メリーランド州ゲイサーズバーグ）選択後、個々のコロニーを単離し、９６穴マイクロプレート中で培養してレプリカプレートを作製した。５×１０^{4}ＴＩＬ１２００および５×１０^{4}ＴＩＬ１２３５の混合物を、コンフルエント近くまで増殖しているトランスフェクト体を含むマイクロプレートのウェルに加え、２０時間インキュベートした。上清を集め、ＩＦＮ－γをＥＬＩＳＡで測定した。

【０１２０】

陽性トランスフェクト体のゲノムＤＮＡからトランスフェクトされた遺伝子を取り出すため、挿入された遺伝子に隣接するＳＰ６およびＴ７プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）が実施された。増幅産物はｐｃＤＮＡ３ベクター（インビトロジェン、カリフォルニア州サンディエゴ）内へクローン化された。ｃＤＮＡ２２および２３については、完全長ｃＤＮＡを含むＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｈｏＩ断片が発現ベクターｐｃＤＮＡ３（インビトロジェン、カリフォルニア州サンディエゴ）内へサブクローン化された。

【０１２１】

クローン化ｃＤＮＡが腫瘍抗原をコードしているかどうかを試験するため、クローン化遺伝子を含むｐｃＤＮＡ３がＤＥＡＥデキストラン法（非特許文献８４）によりＣＯＳ７細胞株内へ一過性にトランスフェクトされた。簡単に記すと、６穴プレートを用い、ウェル当たり３×１０^{5}個の細胞を１００μｇのＤＥＡＥデキストラン（シグマ）、０．１ｍＭのクロロキンおよびクローン化遺伝子および／またはｐｃＤＮＡ－ＨＬＡ－Ａ２．１（非特許文献７７）を含むｐｃＤＮＡ３を１μｇ含む０．７５ｍｌのＤＭＥＭ中、３７℃で４時間インキュベートした。培地を除去した後、１０％ＤＭＳＯを含むＨＢＳＳ緩衝液を加えて２分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、７．５％ＦＣＳ　ＤＭＥＭ中で２日間インキュベートした。２９３細胞株はリポフェクタミン（ＢＲＬ、メリーランド州ゲイサーズバーグ）を用い、使用説明書に従って一過性にトランスフェクトされた。インキュベーション後、トランスフェクトされたＣＯＳ７または２９３細胞のＴＩＬからＩＦＮ－γ放出を媒介する能力が評価された。ＨＬＡ－Ａ２遺伝子の発現はフローサイトメトリーにより試験された。安定なトランスフェクト体はリン酸カルシウム法により作製され、個々のコロニーおよびプールされたトランスフェクト体は細胞毒性およびＩＦＮ－γ放出アッセイによりＴＩＬへの反応性が試験された。

【０１２２】

クローン化遺伝子のＤＮＡ配列決定はｄＧＴＰおよび７－デアザ－ｄＧＴＰを用いるジデオキシ鎖停止法により実施された。ＤＮＡおよびタンパク質配列はＧｅｎｅＢａｎｋのＧＣＧプログラム、ＥＭＢＬデータライブラリー　ヌクレオチドデータベースおよびＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴ、ＰＩＲ、ＧｅｎＰｅｐｔ、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎタンパク質データバンクタンパク質データベースにより解析された。

【０１２３】

ノーザンブロット解析

全ＲＮＡはグアニジン－イソシアネート－塩化セシウム遠心分離法（非特許文献２８）により単離された。正常組織からの全ＲＮＡはクローンテック（カリフォルニア州パロアルト）から購入された。全ＲＮＡの１０～２０μｇが１％アガロース　ホルムアルデヒドゲル電気泳動にかけられ、ナイロン膜（Ｄｕｒａｌｏｎ－ＵＶ膜、ストラタジーン、カリフォルニア州ラホヤ）へ転写された。クローン２２からの完全長ｃＤＮＡを含むＳａｌＩ消化断片およびβ－アクチンｃＤＮＡ（クローンテック）はランダムプライミングにより標識され、プローブとして使用された。プローブとのハイブリダイゼーションはＱｕｉｋＨｙｂプロトコール（ストラタジーン）に従って６８℃で２～１６時間行われた。膜を、２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳを用いて２回、６０℃にて１５分間、０．１×ＳＳＣを用いて１回、６０℃にて１５分間洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

【０１２４】

メラノーマ患者からの培養ＴＩＬの特徴付け

ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ患者から複数のＴＩＬが確立され、ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$およびＨＬＡ－Ａ２$^{-}$患者からのメラノーマ細胞株の溶解が試験された。患者のＨＬＡ型検査は通

常のＨＬＡ型検査技術により実施された。ＭＨＣクラスＩ抗原を最もよく発現し、メラノーマ抗原認識の優勢な拘束要素であることが示されている（非特許文献８５）ので、ＨＬＡ－Ａ２が選択された。ＴＩＬ５０１、ＴＩＬ１２３５およびＴＩＬ１２００はＨＬＡ－Ａ２拘束性様式で共有メラノーマ抗原の特異的認識を示した。ＴＩＬ５０１．Ａ４２は限界希釈によりＴＩＬ５０１から確立されたＴ細胞クローンであった。これらのＴＩＬは種々のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマまたはメラノサイト細胞株と同時培養された場合には溶解またはＩＦＮ－γ、ＴＮＦαおよびＧＭ－ＣＳＦを含むサイトカインの放出を起こすが、ＨＬＡ－Ａ２$^{-}$メラノーマ細胞株または乳癌細胞株ＭＤＡ２３１を含むＨＬＡ－Ａ２$^{+}$非メラノーマ細胞株では起こさない。２つの代表的な実験が表１に示されている。従って、これらのＣＴＬはメラノサイト系列特異的抗原に由来する非突然変異体ペプチドを認識するように思われる。

【０１２５】

Ｔ細胞により認識されるメラノーマ抗原をコードするｃＤＮＡのクローニング

ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$５０１ｍｅｌメラノーマ細胞株からのｃＤＮＡライブラリーを、２つの非常にトランスフェクト可能なＨＬＡ－Ａ２．１$^{+}$癌細胞株ＭＤＡ２３１およびＡ３７５内へトランスフェクトした。これらの細胞株はメラノーマ特異的ＴＩＬにより溶解されないが、Ｍ１$_{59-66}$ペプチド（ＧＩＬＧＦＶＦＴＬ；１文字コード（配列番号４５）、インフルエンザマトリックスタンパク質由来）でインキュベーション後またはＭ１遺伝子を含む組換え体ワクシニアウイルスの感染後にＨＬＡ－Ａ２拘束性インフルエンザＭ１特異的ＣＴＬにより溶解される（データは示されていない）。従って、これらの細胞株は正常な抗原プロセッシングおよび提示能を示すが、関連メラノーマ抗原の発現が欠けているためこれらメラノーマ特異的ＴＩＬにより溶解されない。Ｇ４１８で選択後、各々の細胞株から約６７００個のトランスフェクトされたクローンが単離され、マイクロプレートで増殖された。ＩＦＮ－γ放出アッセイを用い、２１個のＭＤＡ２３１および２７個のＡ３７５陽性クローンが単離され、再スクリーニングされた。これらのクローンの内、８個のＭＤＡ２３１および７個のＡ３７５クローンが２回目のスクリーニングアッセイで陽性であった。

【０１２６】

組み込まれた遺伝子をとるため、これら陽性トランスフェクト体からのゲノムＤＮＡを用い、挿入遺伝子に隣接するＳＰ６およびＴ７プライマーでＰＣＲが行われた。ＭＤＡ－２２およびＭＤＡ－２３トランスフェクト体からの１．６ｋｂバンドを含む１～２本の鮮明なバンドを示した７個のトランスフェクト体から増幅された８つの遺伝子がｐＣＲＩＩクローニングベクター内へサブクローン化され、さらにｐｃＤＮＡ３真核生物発現ベクター内へクローン化された。ｃＤＮＡ２２プローブによるノーザンブロット解析により検出された１．６ｋｂバンドは、この断片が完全長ｃＤＮＡであったことを示唆した。

【０１２７】

クローン２２または２３からのｃＤＮＡを含む発現ベクターｐｃＤＮＡ３のＣＯＳ７または２９３細胞内への一過性トランスフェクションは、ＨＬＡ－Ａ２．１遺伝子と一緒に加えると、ＩＦＮ－γの特異的放出により示されるＴＩＬ１２３５およびＴＩＬ５０１．Ａ４２への反応性を与えた（表２、実験１および実験２）。これらｃＤＮＡ断片のＭＤＡ２３１またはＡ３７５ｍｅｌ細胞株内への安定なトランスフェクションもまた、ＴＩＬ１２３５およびＴＩＬ５０１．Ａ４２への反応性を与えた（表２、実験３）。ＴＩＬ５０１．Ａ４２はｃＤＮＡ２２で安定にトランスフェクションされたＭＤＡ２３１を溶解できた（データは示されていない）。以上の結果は、メラノーマ患者からのＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬにより認識されるメラノーマ抗原をこれらのｃＤＮＡがコードしていることを示している。別のクローン、ＭＤＡ－２５のトランスフェクションはＴＩＬ１２００のみからインターフェロンγの放出を刺激した。このｃＤＮＡの特徴付けにより、それはモノクローナル抗体ＨＭＢ４５により認識され、従来記述されているメラノーマ抗原ｇｐ１００とは類似しているものの異なっていることが明らかにされた。このクローンは実施例３にさらに詳細に記載されている。

【０１２８】
【表１Ａ】

表１　メラノーマおよびメラノサイトに対するＴＩＬ５０１．Ａ４２およびＴＩＬ１２３５の特異性

Ａ．溶解特異性*

標的*	HLA-A2	TIL501.A42	TIL1235	LAK+
			%溶解	
501mel	+	54	51	78
526mel	+	25	33	74
624mel	+	23	27	75
952mel	+	10	11	75
Malme3M	+	36	41	70
C32	+	17	23	82
RPMI7951	+	1	6	67
WM115	+	-2	3	68
HS695T	+	1	2	87
397mel	-	-1	0	70
MDA231	+	0	3	94

【０１２９】

【表１Ｂ】

Ｂ．サイトカイン放出特異性**

刺激細胞**	HLA-A2	TIL501.A42	TIL1235	TIL586++
			pg IFN-	γ/ml
501mel	+	647	219	<50
586mel	-	<50	<50	1034
NHEM493	+	1835	850	<50
NHEM527	+	1638	749	<50
NHEM530	+	1224	2532	<50
NHEM533	+	300	251	<50
NHEM616	+	635	423	<50
FM725	+	5975	1471	<50
FM801	+	1375	893	62
NHEM483	-	<50	<50	<50
NHEM680	-	<50	<50	548
HA002	-	<50	<50	<50

【０１３０】
ＴＩＬ５０１．Ａ４２およびＴＩＬ１２３５はほとんどのＨＬＡ－Ａ２メラノーマ細胞株を溶解し、ＨＬＡ－Ａ２メラノーマおよびメラノサイトと培養した場合ＩＦＮ－γを分泌した。
＊^{51}Ｃｒ放出アッセイはＴＩＬ５０１．Ａ４２に対してはＥ：Ｔ＝２０：１で、ＴＩＬ１２３５に対しては４０：１で行われた。乳癌細胞株ＭＤＡ２３１を除いて全ての標的はメラノーマ細胞株である。
＊＊ＴＩＬおよび刺激細胞を２０時間一緒にインキュベートした後、上清中のＩＦＮ－γが測定された。５０１ｍｅｌおよび５８６ｍｅｌはメラノーマ細胞株である。他の全ては正常メラノサイト細胞株である。
＋ＬＡＫ：リンホカイン活性化キラー細胞。
＋＋ＴＩＬ５８６はＭＨＣクラスＩ拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬであり、ＨＬＡ－Ａ２により拘束されない。
【０１３１】
クローン２２および２３のｃＤＮＡ配列はＰＣＲにより導入された変化と信じられる単一の塩基を除いて同一であった。２つの他の独立して増幅された断片もまたこの領域を明らかにするために配列決定され、コンセンサス配列が図１に示されている。この遺伝子中の最長のオープンリーディングフレームは１３ｋｄの１１８アミノ酸タンパク質に対応する３５４塩基から成っている。この配列は確立されたデータベース内のどの完全長ヌクレオチド配列またはタンパク質配列とも有意な類似性を示さなかった。アミノ酸２７～４７

位はＨＬＡ－Ａ２結合ペプチド（非特許文献５６、非特許文献８６、非特許文献５５、非特許文献８７）を含むであろう疎水性領域から成っている。ｃＤＮＡ２２および２３によりコードされている抗原はＭＡＲＴ－１（Ｔ細胞－１により認識されるメラノーマ抗原）と称された。作製した１０種のＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬ株のうち９種がＭＡＲＴ－１を認識し、４種がここに記載し、単離されたｇｐ１００の１つの型を認識したが（実施例３参照）、どれもＭＡＧＥ－１を認識しなかった（非特許文献８８；データは示されていない）。

【０１３２】

【表２】

表２　遺伝子２２または２３でトランスフェクトされたＨＬＡ－Ａ２$^{+}$細胞株と培養された場合のＴＩＬ５０１．Ａ４２およびＴＩＬ１２３５によるインターフェロンγ分泌

刺激細胞	トランスフェクトされた遺伝子	HLA-A2	TIL501.A42	TIL1235
			pg/ml	
実験１				
501mel	ナシ	+	1009*	1076
397mel	ナシ	-	<50	<50
COS7	ナシ	-	<50	<50
COS7	HLA-A2.1	+	<50	<50
COS7	22	-	<50	<50
COS7	HLA-A2.1+22	+	771	1049
実験２				
501mel	ナシ	+	ND+	1051
397mel	ナシ	-	ND	<50
293	HLA-A2.1	+	ND	<50
293	22	-	ND	<50
293	HLA-A2.1+22	+	ND	255
実験３				
501mel	ナシ	+	1073	1056
397mel	ナシ	-	<50	<50
MDA231	ナシ	+	<50	<50
MDA231	23	+	674	725
A375	ナシ	+	<50	<50
A375	23	+	264	131

【０１３３】
ＤＥＡＥデキストラン法によりＨＬＡ－Ａ２．１および／またはｃＤＮＡ２２を含むｐｃＤＮＡ３で一過性にトランスフェクトされたＣＯＳ７または２９３細胞株（実験１および実験２）、またはｃＤＮＡ２３で安定にトランスフェクトされたＡ３７５またはＭＤＡ２３１細胞株（実験３）と一緒にＴＩＬを２０時間インキュベートした後に上清中のＩＦＮ－γが測定された。ＩＦＮ－γはＴＩＬがｃＤＮＡ２２または２３でトランスフェクトさ

れたＨＬＡ－Ａ２[+]細胞株とインキュベートされた場合のみに分泌された。
[*]刺激因子なしのＴＩＬ単独により分泌されたＩＦＮ－γ（＜５０ｐｇ／ｍｌ）は差し引かれている。
[+]実施されなかった。
【０１３４】

【表３】

表3　種々の組織および細胞株におけるＭＡＲＴ－１遺伝子の発現

メラノーマ		正常新鮮組織		結腸癌	
				Collo	-
HLA-A2+		脳	-	SW480	-
		網膜	+	WiDr	-
501mel	+	副腎	-		
526mel	+	肺	-	乳癌	
624mel	+	肝臓	-	MDA231	-
Malme3M	+	腎臓	-	MCF7	-
952mel	+	脾臓	-	HS578	-
697mel	+	胸腺	-	ZR75	-
C32	+	精巣			
RPMI7951	-	胎児肝臓	-	神経芽腫	
WM115	-			SK-N-AS	-
A375	-	非メラノーマ細胞株		SK-N-SH	-
HLA-A2-		Ｔ細胞		Ewing肉腫	
		TILA	-	TC75	-
397mel	+	TILB	-	RD-ES	-
888mel	+			6647	-
537mel	+	Ｂ細胞			
586mel	+	Daudi	-	肉腫	
		HMY-C1R	-	143B	-
メラノサイト		501EBVB	-		
		836EBVB	-	膠腫	
NHEM483	+			U138MG	-
NHEM493	+	線維芽細胞		HS683	-
NHEM529	+	M1 線維芽細胞	-		
NHEM530	+			腎細胞癌	
FM902	+	腎臓上皮細胞		UOK108	-
FM906	+	KAM	-	UOK117	-
HA002	+	WLC	-		
				小細胞肺癌	
				H1092	-

【０１３５】
遺伝子２２の完全長ｃＤＮＡをプローブとして、１０～２０μｇの全ＲＮＡをノーザンブロット解析で調べた。ほとんどのメラノーマ、試験された全てのメラノサイト細胞株および網膜が陽性であった。

【０１３６】

ＭＡＲＴ－１の発現

ＭＡＲＴ－１をコードしている遺伝子の発現を評価するため、メラノーマ、メラノサイトおよび非メラノーマ癌細胞株ならびに正常組織を含む種々の細胞株のノーザンブロット解析が実施された（表３）。１０種のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株の内の７種、４種全てのＨＬＡ－Ａ２$^{-}$メラノーマ細胞株、および試験された７種全てのメラノサイト株でＭＡＲＴ－１　ＲＮＡ発現が陽性であった。最近我々の研究室で確立された全てのＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株はこのノーザンブロット解析においてＭＡＲＴ－１　ＲＮＡを発現した。表３に示した１０種のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株においてＭＡＲＴ－１発現とＴＩＬ５０１．Ａ４２による溶解の間には完全な相関がある。ＭＡＲＴ－１抗原を認識するＴＩＬ５０１．Ａ４２は試験された１７種のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株の内１３種（７６％）を溶解させた（データは示されていない）。ノーザンブロット解析によりｍＲＮＡ発現が試験された１０種の正常ヒト組織では網膜のみが陽性であった。Ｔ細胞、Ｂ細胞、腎臓上皮細胞または線維芽細胞、または１９種の非メラノーマ腫瘍では陽性は観察されなかった。従って、ＭＡＲＴ－１は、皮膚および網膜由来のメラノサイト系列細胞で発現され、またメラノーマ細胞でも発現される、これまでに記載のない抗原であるようである。

【０１３７】

Ｔ細胞クローンおよび免疫選択されたメラノーマクローン（非特許文献８９、非特許文献９０）の一団を用いた研究、並びにメラノーマ細胞からのＨＰＬＣ分画ペプチド分析の研究（非特許文献９１、非特許文献９２）は、免疫応答を惹起できる複数の抗原ペプチドがメラノーマ上に存在することを示唆している。ｃＤＮＡクローニングにより、メラノーマ抗原をコードしている２つの遺伝子が同定されている；ＭＡＲＴ－１（図１；配列番号１）およびｇｐ１００遺伝子（実施例３参照；図４Ａおよび図４Ｂ；配列番号２６）。ＭＡＲＴ－１およびここで同定された型のｇｐ１００（図４および図５Ａ；配列番号２６および２７）は両方ともＨＬＡ－Ａ２．１拘束性ＴＩＬで認識される。ＭＡＲＴ－１抗原は約１３ｋｄの１１８アミノ酸のタンパク質である。ＭＡＲＴ－１に関する遺伝子またはアミノ酸配列はこれまで報告されていない。

【０１３８】

ＭＡＲＴ－１　ＲＮＡは１４種のＨＬＡ－Ａ２．１陽性または陰性メラノーマ株の内１１種、７種のメラノサイト株の内７種で発現された。網膜組織を除き、試験された正常組織、Ｔ細胞株、Ｂ細胞株、腎臓上皮株、線維芽細胞株、または結腸癌、乳癌、脳腫瘍、腎臓癌、肺癌または骨肉腫由来の１９種の腫瘍細胞株ではＭＡＲＴ－１発現は観察されなかった。

【０１３９】

繰り返しのｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ免疫化後の末梢血リンパ球に由来するＴ細胞により認識される別のメラノーマ抗原、ＭＡＧＥ－１が記載されている（非特許文献１８）。

【０１４０】

メラノーマ腫瘍抗原に関連した遺伝子の同定は、ウイルスまたは細菌ベクター系内へのこれら遺伝子の導入に基づいた癌患者の免疫療法において活性で特異的な免疫化法に対する新規な可能性を開くものである。ＭＡＲＴ－１のようなメラノサイト－メラノーマ系列抗原に対して誘導された免疫応答は正常細胞に対しても発生されるであろう可能性が存在する。多分抗メラノサイト免疫応答から生じる白斑が好ましい予後に関連することがメラノーマ患者において報告されており（非特許文献９３、非特許文献９４）、化学免疫療法に対応する患者においても報告されている（非特許文献９５）。抗メラノサイト－メラノーマ反応性を持つＴＩＬが進行メラノーマ患者に投与されており（非特許文献５、非特許文献６）、散在性白斑がこれらの患者に見られるが、網膜細胞上のこれらメラノサイト抗原の潜在的発現に関係した不利な眼科学的影響は観察されなかった。

【０１４１】

ＨＬＡ－Ａ２は約５０％の個体に存在しており、ＨＬＡ－Ａ２拘束性ＭＡＲＴ－１抗原もまたメラノーマ上に広く発現されているので、ＭＡＲＴ－１による免疫化は活性な免疫療法の開発に特に有用であろう。

【実施例２】

【０１４２】

ＭＡＲＴ－１の免疫原性エピトープの特徴付け

メラノーマ特異的ＣＴＬ株およびＴＩＬ由来クローンの作製

メラノーマ特異的ＣＴＬ株は、前に報告されているように（非特許文献８１）、転移性メラノーマから作製される単一細胞懸濁液を６０００Ｕ／ｍｌのＩＬ－２（Ｃｅｔｕｓ－Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、カイロン社、カリフォルニア州エメリービル）と培養することにより作製した。Ｔ細胞クローンＡ４２は患者５０１から限界希釈法により確立された。

【０１４３】

ＣＴＬによる抗原認識の評価

非特許文献８１に記載されているように、ＩＦＮ－γ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＴＮＦ－αを測定するために^{51}Ｃｒ放出アッセイおよびＥＬＩＳＡを用いたサイトカイン放出アッセイが実施され、ＴＩＬの反応性が解析された（実施例１参照）。メラノーマ細胞株は本研究室で確立された。ＴＩＬによる既知抗原認識の解析のため、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００、またはチロシナーゼ関連タンパク質（ｇｐ７５）（非特許文献９６）をコードしているｃＤＮＡをＨＬＡ－Ａ２．１　ｃＤＮＡとともにトランスフェクトされたＣＯＳ７細胞株がＴＩＬと２０時間インキュベートされ、上清へ分泌されたＩＦＮ－γ量が実施例１に記載されたようにＥＬＩＳＡにより測定された。プラスミドｐｃＤＮＡ３（インビトロジェン、カリフォルニア州サンディエゴ）中のＭＡＲＴ－１（実施例１参照）またはｇｐ１００（実施例３参照）をコードするｃＤＮＡは、ＴＩＬ１２３５またはＴＩＬ１２００を各々スクリーニングすることにより５０１ｍｅｌメラノーマｃＤＮＡからクローン化された（実施例１参照）。ｐＣＥＶ２７プラスミド中のチロシナーゼ関連タンパク質（ｇｐ７５）は、ｇｐ７５の報告されている配列（非特許文献９６）に基づいてＰＣＲにより作製したプローブを用いて５０１ｍｅｌメラノーマｃＤＮＡライブラリーから単離された。

【０１４４】

ペプチド合成および抗原ペプチドの同定

ペプチドはＧｉｌｓｏｎ　ＡＭＳ４２２多ペプチド合成機を用いて固相法により合成された。ペプチドはＶｙｄａｃ　Ｃ－４カラムを用いて０．０５％ＴＦＡ／水－アセトニトリルで溶出するＨＰＬＣにより精製した。抗原ペプチドを同定するため、各々のペプチドと２時間あらかじめインキュベートしたＴ２細胞株のＴＩＬ溶解が^{51}Ｃｒ放出細胞毒性アッセイを用いて測定された。

【０１４５】

ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬ

ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＣＴＬ株およびクローンＡ４２は、１０人のメラノーマ患者の腫瘍浸潤リンパ球から確立された。これらのＴＩＬはＨＬＡ－Ａ２を発現している自己由来およびほとんどの同種由来の新鮮または培養メラノーマ細胞を認識するが、ＨＬＡ－Ａ２$^{-}$メラノーマまたはＨＬＡ－Ａ２$^{+}$非メラノーマ細胞株（非特許文献１２）を認識しなかった。またそれらは新生児皮膚由来ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$正常培養メラノサイトも認識した（実施例１および非特許文献１５参照）。すなわち、これらのＴＩＬはＨＬＡ－Ａ２に関連してメラノーマおよびメラノサイトで発現されるタンパク質に由来する非突然変異体自己ペプチドを認識した。

【０１４６】

ＴＩＬによる別のメラノーマタンパク質の認識

ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００の１つの型（図５Ａ；配列番号２６、実施例３参照）、およびチロシナーゼ関連タンパク質（ｇｐ７５）を含む４種の単離されたメラノーマタンパク質の認識の頻度を評価するため、ＣＯＳ７に対するＴＩＬの反応性が、これら３種のタン

パク質をコードしているｃＤＮＡを、ＨＬＡ－Ａ２．１をコードしているｃＤＮＡとともにまたはなしでトランスフェクトされた細胞株上で試験された。９種のＴＩＬを用いたいくつかの実験の内１つが表４に示されている。９種のＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬの内８種が、ＭＡＲＴ－１およびＨＬＡ－Ａ２．１で同時にトランスフェクトされたＣＯＳ７とインキュベートした場合にＩＦＮ－γを分泌した。比較的オリゴクローナルなＣＴＬ株であるＴＩＬ１２００（非特許文献９７）のみがこのＣＯＳトランスフェクト体に応答しなかった。４種のＴＩＬ（６２０、６６０、１１４３、１２００）は、ＨＬＡ－Ａ２．１とともにトランスフェクトした場合にｇｐ１００を認識した。ＴＩＬ１２００はＴＩＬ６２０、６６０および１１４３と比較して多量のＩＦＮ－γを分泌しており、これら後者の３種のＴＩＬ株中の小さなＴ細胞サブセットのみがｇｐ１００を認識したことを示唆している。これらＴＩＬのいずれもがこのアッセイを用いてもｇｐ７５を認識しなかった。従って、ＭＡＲＴ－１は、メラノーマ患者に由来するほとんどのＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬにより認識される共通のメラノーマ抗原である。

【０１４７】

ＴＩＬに対するＭＡＲＴ－１エピトープの同定

これらのＴＩＬに対するＭＡＲＴ－１エピトープを同定するため、ＨＬＡ－Ａ２．１への既知ペプチドの結合モチーフ（非特許文献５６、非特許文献８６、非特許文献５５）に基づいて２３個のペプチドが選択され、合成され（＞９０％純度）、そして各々のペプチドとＴ２株をインキュベーション後にＴＩＬによるＨＬＡ－Ａ２．１$^{+}$Ｔ２細胞株の溶解を試験することによりスクリーニングされた（表５）。Ｔ２細胞（非特許文献７９）細胞株は、ペプチドＭ９－２、Ｍ１０－３またはＭ１０－４とあらかじめインキュベートした場合、試験された４種すべてのＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬにより溶解された。両方とも１０アミノ酸ペプチドであるＭ１０－３およびＭ１０－４はＭ９－２配列を含んでおり、Ｍ１０－３はそのＮ末端に追加のグルタミン酸を持ち、Ｍ１０－４はそのＣ末端に余分のイソロイシンを持っている。これらのペプチドはＭＡＲＴ－１の疎水性の推定膜貫通ドメインに位置している。これらのペプチドとインキュベートされた他のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$細胞を標的として使用した場合に同一の溶解が観察され、それらにはＨＬＡ－Ａ２．１遺伝子でトランスフェクトされた、エプスタインーバールウイルス形質転換Ｂ細胞のＫ４Ｂ（ＮＩＨのＷｉｌｌｉａｍ　Ｂｉｄｄｓｏｎ博士から提供を受けた；非特許文献９２）および５０１ＥＢＶＢ（非特許文献９）、またはＨＭＹ－ＣＩＲ　Ｂ細胞（ＮＩＨのＷｉｌｌｉａｍ　Ｂｉｄｄｓｏｎ博士；非特許文献９２）が含まれる（データは示されていない）。

【０１４８】

ペプチドＭ９－１、Ｍ９－２、Ｍ９－３、Ｍ１０－２、Ｍ１０－３、Ｍ１０－４およびＭ１０－５はさらに精製され、ＭＡＲＴ－１反応性ＴＩＬ１２３５またはＴ細胞クローンＡ４２（図２）によるＴ２細胞の溶解を感作する相対的能力を評価するために力価を測定された。精製されたペプチドＭ９－２、Ｍ１０－３およびＭ１０－４は各々１ｎｇ／ｍｌ、１００ｎｇ／ｍｌおよび１０００ｎｇ／ｍｌの最少濃度が必要とされた。精製されたＭ１０－４は図２に示したように１０μｇでさえもＴＩＬクローンＡ４２により認識されなかった。Ｍ９－１、Ｍ９－３、Ｍ１０－２およびＭ１０－５ペプチドはＡ４２でもＴＩＬ１２３５でも認識されなかった。

【０１４９】

【表４】

表4　ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬによるメラノーマ抗原の認識

刺激細胞株	トランスフェクトされたｃＤＮＡ	HLA-A2	TIL 501	TIL 620	TIL 660	TIL 1074	TIL 1088	TIL 1128	TIL 1143	TIL 1200	TIL 1235
			IFN-γ分泌(pg/ml)								
501mel	ナシ	+	93	72	530	670	491	272	354	736	750
397mel	ナシ	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COS7	ナシ	-	0	0	0	0	0	0	14	0	0
COS7	HLA-A2.1	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COS7	MART-1	-	0	0	0	0	0	0	12	0	0
COS7	gp100	-	0	0	0	0	0	0	14	0	0
COS7	gp75	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COS7	HLA-A2.1 +MART-1	+	270	196	131	625	328	52	184	0	743
COS7	HLA-A2.1+ +gp100	+	0	89	17	0	0	0	14	391	8
COS7	HLA-A2.1+ +gp75	+	0	0	0	11	0	0	7	0	0

【０１５０】
ＨＬＡ－Ａ２．１とともにまたはなしで、メラノーマで発現されるタンパク質をコードしているｃＤＮＡで同時トランスフェクトされたＣＯＳ７細胞と一緒にＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬをインキュベートした後の上清でＩＮＦ－γは測定された。ＴＩＬ１２００を除く全てのＴＩＬは、ＭＡＲＴ－１およびＨＬＡ－Ａ２．１をコードしているｃＤＮＡで同時トランスフェクトされたＣＯＳ７と培養した場合にＩＦＮ－γを分泌した。ＴＩＬ６２０、６６０、１１４３および１２００は、ｇｐ１００およびＨＬＡ－Ａ２．１をコードしているｃＤＮＡで同時トランスフェクトされたＣＯＳ７と培養した場合にＩＦＮ－γを分泌した。
【０１５１】

【表５】

表5　合成ＭＡＲＴ－１ペプチドと前もってインキュベートしたＴ２細胞の溶解

標的	ペプチド		A42	TIL 1235	TIL 660	TIL 1074
				%特異的溶解		
501mel	ナシ		47	30	31	41
397mel	ナシ		1	0	1	2
T2	ナシ		-2	-3	-1	1
T2	M9-1	TTAEEAAGI	-10	-5	-5	-4
T2	M9-2	AAGIGILTV	64	80	40	56
T2	M9-3	GIGILTVIL	18	20	0	10
T2	M9-4	GILTVILGV	1	-1	-3	2
T2	M9-5	ILTVILGVL	-2	-1	-5	-1
T2	M9-6	LTVILGVLL	1	0	1	0
T2	M9-7	TVILGVLLL	-2	-3	-2	1
T2	M9-8	VILGVLLLI	1	5	-2	-2
T2	M9-9	ALMDKSLHV	-1	-4	-8	0
T2	M9-10	SLHVGTQCA	-1	1	-8	4
T2	M9-11	PVVPNAPPA	-2	0	4	-1
T2	M9-12	NAPPAYEKL	1	-2	0	6
T2	M10-1	YTTAEEAAGI	-4	-2	-3	3
T2	M10-2	TAEEAAGIGI	7	11	12	15
T2	M10-3	EAAGIGILTV	55	66	31	51
T2	M10-4	AAGIGILTVI	34	68	29	21
T2	M10-5	GILTVILGVL	-1	2	7	10
T2	M10-6	ILTVILGVLL	1	6	6	7
T2	M10-7	LTVILGVLLL	-2	-1	-1	2
T2	M10-8	TVILGVLLLI	-6	-1	-1	11
T2	M10-9	RALMDKSLHV	3	5	8	11
T2	M10-10	SLHVGTQCAL	-2	-8	2	9
T2	M10-11	SLQEKNCEPV	3	2	2	9

【０１５２】

２３個のペプチド（配列番号３～２５）（９量体１２個および１０量体１１個）（＞９０％純度）が合成され、異なった患者由来のＴＩＬクローンＡ４２、ＴＩＬ株ＴＩＬ１２３５、ＴＩＬ６６０およびＴＩＬ１０７４による溶解性が、各々のペプチド（１０μｇ／ｍｌ）とあらかじめインキュベートされたＨＬＡ－Ａ２$^{+}$Ｔ２細胞に対し、Ａ４２に対しては２０：１のＥ：Ｔ比で、他のＴＩＬ株に対しては４０：１のＥ：Ｔ比にて４時間の^{51}

Ｃｒ放出細胞毒性アッセイで試験された。Ｍ９－２、Ｍ１０－３およびＭ１０－４とインキュベートされた場合にＴ２細胞はよく溶解された。Ｍ１０－３およびＭ１０－４は全Ｍ９－２配列（下線）を含んでいる。

【０１５３】

異なった患者から確立されたＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬによるＭＡＲＴ－１ペプチドの認識

種々のＨＬＡ－Ａ２拘束性ＭＡＲＴ－１特異的ＴＩＬがＭＡＲＴ－１抗原中の同一エピトープを認識するかまたは異なったエピトープを認識するかを評価するため、各々のペプチドとあらかじめインキュベートされたＴ２細胞（非特許文献７９）の溶解が１０人のメラノーマ患者由来ＴＩＬで試験された。１０種のＴＩＬを用いた代表的な実験は表６に示されている。Ｍ９－２およびＭ１０－３は１０種のＴＩＬの内９種およびＡ４２クローンで認識され（ＴＩＬ１２００のみが陰性であった）、ＭＡＲＴ－１およびＨＬＡ－Ａ２．１をコードしているｃＤＮＡで同時にトランスフェクトされたＣＯＳ７細胞と同一の溶解パターンであった。ＴＩＬ６２０およびＴＩＬ１０８８はペプチドなしでまたは無関係のペプチド添加後に低レベルの非特異的溶解を示したが、Ｍ９－２、Ｍ１０－３およびＭ１０－５ペプチドとあらかじめインキュベートすると有意にＴ２細胞の溶解増加を示した。Ｍ１０－４の認識はＴＩＬ内では異なっているが、Ｔ細胞クローンＡ４２またはＴ細胞株ＴＩＬ１２３５によるＭ１０－４への異なった反応性と似ていた（図２Ａおよび図２Ｂ）。Ｍ９－２またはＭ１０－３に必要とされるよりも、より高濃度（１μｇ／ｍｌ）のＭ１０－４が溶解のために必要とされた。これらの１０種のＴＩＬおよびクローンＡ４２はまた、Ｍ９－２またはＭ１０－３とあらかじめインキュベートされたＴ２細胞とインキュベートした場合、ＩＦＮ－γ、ＧＭ－ＣＳＦおよびＴＮＦ－αを含むサイトカインも分泌した（データは示されていない）。従って、Ｍ９－２またはＭ１０－３は、ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬの大多数により認識される共通のエピトープである。

【０１５４】

【表６】

表６　ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬによるＭＡＲＴ－１ペプチドの認識

標的	ペプチド (μg/l)	TIL 501	TIL 620	TIL 660	TIL 107	TIL 1088	TIL 1128	TIL 1143	TIL 1200	TIL 1235	TIL 1363	clone A42
		%特異的溶解										
501mel	ナシ	42	9	35	32	31	19	24	41	32	43	41
397mel	ナシ	3	16	6	1	1	4	3	3	3	4	1
T2	ナシ	0	7	-3	-6	7	-6	-7	-6	7	7	-6
T2	M9-1(1)	4	15	-4	1	31	1	-5	-1	1	4	3
T2	M9-2 (1)	86	75	73	79	98	30	36	2	92	82	91
T2	M9-2(0.001)	52	49	23	32	81	9	6	1	10	1	63
T2	M9-3 (1)	5	25	0	1	19	0	1	-2	0	-2	-4
T2	M10-2(1)	10	22	5	8	21	8	3	7	7	7	6
T2	M10-3(1)	84	68	68	73	79	24	27	1	42	67	62
T2	M10-3(0.001)	91	50	33	25	86	13	14	0	14	39	1
T2	M10-4(1)	83	47	16	35	80	6	3	1	14	53	0
T2	M10-4(0.001)	0	11	3	0	14	4	-1	-1	2	-3	-3
T2	M10-5(1)	4	14	1	4	13	2	3	0	3	0	2

【０１５５】
１０人の患者由来のＴＩＬクローンＡ４２およびＴＩＬ株による、精製ペプチドＭ９－１、Ｍ９－２、Ｍ９－３、Ｍ１０－３、Ｍ１０－４およびＭ１０－５とあらかじめインキュベートされたＴ２細胞の溶解性が、Ａ４２に対しては２０：１のＥ：Ｔ比で、他のＴＩＬ株に対しては４０：１のＥ：Ｔ比にて４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイで試験された。１０種のＴＩＬの内９種は、ペプチドＭ９－２またはＭ１０－３とインキュベートされたＴ２細胞を溶解した。１０種のＴＩＬの内７種は、１μｇ／ｍｌ濃度のペプチドＭ１０－４とインキュベートされたＴ２細胞を溶解した。

【０１５６】
１０人のメラノーマ患者由来のＴ細胞による既知メラノーマタンパク質認識の相対頻度が試験された。これらのＴＩＬの内９種により優勢に認識されるＭＡＲＴ－１抗原中の共通エピトープＭ９－２およびＭ１０－３も同定された。スクリーニングアッセイにおいて、ＴＩＬ１２３５を用いたｃＤＮＡ発現クローニングによりＭＡＲＴ－１をコードしているｃＤＮＡが単離された（実施例１参照）。ＭＡＲＴ－１は１つの膜貫通ドメインを含む１１８アミノ酸のタンパク質であり、実施例３に記載したｇｐ１００の１つの型のｃＤＮＡの発現パターンと同様に、ほとんどのメラノーマ細胞ならびに培養メラノサイトおよび網膜で発現される。ｇｐ１００は１０種のＴＩＬの内４種により認識される。
【０１５７】
用量反応分析に基づくと、ペプチドＭ９－２が溶解について最も効果的にＴ２細胞を感作しており（図２）、このペプチドが自然にプロセシングされて腫瘍細胞上に提示されているかもしれないことが示唆される。Ｍ９－２を認識するＴ細胞はペプチドＭ１０－３またはＭ１０－４と反応するであろう（なぜなら、後者の１０量体ペプチドはペプチドＭ９－２の９アミノ酸の配列を含んでいるから）。異なったＴＩＬによるこれら３ペプチドの認識にはいくらかの相違が存在する。例えば、Ｍ１０－４はＴ細胞クローンＡ４２によってはあまり認識されないが、いくつかのＴＩＬ株によってはよく認識される。しかしながら溶解を観察するにはより高濃度のＭ１０－４が必要とされた。このことは、ＨＬＡ－Ａ２に関連するＭ９－２およびＭ１０－４ペプチドへのＴＣＲ親和性の変化によるものであろうし、もしくは、ＴＩＬ株はＭ９－２またはＭ１０－４のみを認識する異なったＴ細胞クローンを含んでいるかもしれない。ペプチドＭ１０－３およびＭ１０－４もまた自然にプロセシングされて腫瘍細胞上に提示されるかもしれない。ＨＬＡ－Ａ２により提示される多数のメラノーマ抗原の存在は、種々のＴ細胞クローンによるメラノーマ細胞クローンの認識を解析することにより（非特許文献８９、非特許文献９０）、またはＨＬＡ－Ａ２メラノーマ細胞から単離されたＨＰＬＣペプチド画分を解析することにより（非特許文献９１、非特許文献９２）、以前に示唆されている。
【０１５８】
メラノーマ患者由来のほとんどのＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬが共通のＭＡＲＴ－１ペプチドを認識するがｇｐ７５は認識しないという観察結果は、Ｍ９－２またはＭ１０－３ＭＡＲＴ－１ペプチドが、ｉｎ　ｖｉｖｏでＴ細胞応答を誘導する際に他の既知メラノーマ抗原よりも免疫原性であることを示唆している。本研究で使用されたいくつかのＴＩＬがＩＬ－２とともに自家移植患者に注射され、興味深いことにｇｐ１００タンパク質（図５Ａ；配列番号２７）を認識する４種全てのＴＩＬ（６２０、６６０、１０７４、１２００）が有効に腫瘍退縮を誘導した（５０％を超える腫瘍減少）。ＴＩＬ１２００を除く全てはＭＡＲＴ－１も認識した。
【実施例３】
【０１５９】
ｉｎ　ｖｉｖｏ腫瘍拒絶に関連する腫瘍浸潤リンパ球により認識される第２のヒトメラノーマ抗原の同定
ｃＤＮＡ発現クローニング
ｇｐ１００と称されるメラノーマ抗原の１つの型をコードしているｃＤＮＡ２５クローンは、実施例１および非特許文献８３に記載されているような技術および類似の技術を用いてクローン化された。簡単に記すと、５０１ｍｅｌメラノーマ細胞株から作製されたλｐＣＥＶ２７中のｃＤＮＡライブラリーでトランスフェクトされた乳癌細胞株ＭＤＡ２３１（ＡＴＣＣ＃ＨＴＢ２６）をＴＩＬと同時培養した場合のインターフェロンλ（ＩＦＮ－γ）分泌の測定により抗原陽性をスクリーニングした。ＴＩＬ１２００は非特許文献８１に記載されているように作製した。組み込まれたｃＤＮＡは陽性トランスフェクト体のゲノムＤＮＡからＰＣＲにより回収され、哺乳類発現プラスミドｐＣＤＮＡ３（インビトロジェン、カリフォルニア州サンディエゴ）内へクローン化された。ｃＤＮＡ２５の完全長ｃＤＮＡはｃＤＮＡ２５プローブを用いて５０１ｍｅｌ　λファージライブラリーから

単離された。完全長ｃＤＮＡ２５を含むλファージは、ＸｈｏＩで消化し、次にＴ４　ＤＮＡリガーゼで自己連結してプラスミドｐＣＥＶ２７－ＦＬ２５を作製した。もしくは、ｇｐ１００のために設計された特異的プライマーを用いてＰＣＲにより完全長ｃＤＮＡ２５をｐＣＲＩＩ（インビトロジェン）にクローン化し、続いてｐｃＤＮＡ３内へクローン化した（ｐｃＤＮＡ３－ＦＬ２５）。このｃＤＮＡがメラノーマ抗原をコードしているか否かを試験するため、ＣＯＳ７、Ａ３７５またはＭＤＡ２３１内へ再トランスフェクトし、得られたトランスフェクト体はＴＩＬ１２００の刺激で試験した。プラスミドクローンｐＣＥＶ２７－ＦＬ－２５のＤＮＡ配列を自動化ＤＮＡシークエンサー（モデル３７３Ａ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）にて、Ｔａｑダイデオキシターミネーターサイクルシークエンシングキット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社）を用い、使用説明書に従って決定した。

【０１６０】

ペプチド合成および抗原ペプチドの同定

ペプチドはＧｉｌｓｏｎ　ＡＭＳ４２２多ペプチド合成機を用いて固相法により合成された。ペプチドはＶｙｄａｃ　Ｃ－４カラムを用いて０．０５％ＴＦＡ／水－アセトニトリルで溶出するＨＰＬＣにより精製した。抗原ペプチドを同定するため、ペプチドと２時間あらかじめインキュベートしたＴ２　ＲＥＴ細胞のＴＩＬによる溶解が^{51}Ｃｒ放出細胞毒性アッセイを用いて測定された。

【０１６１】

ＴＩＬ１２００を用いる転移性メラノーマ患者の処置

広く転移したメラノーマを持ち、化学療法および放射線治療がうまくいかなかった２９才の男性患者（患者番号１２００）を２５ｍｇ／ｋｇのシクロホスホアミドの単一用量で処置し、続いて１．６×１０^{11}個のＴＩＬ（９．１×１０^{9}個のインジウム標識ＴＩＬを含む）に加えて７用量のＩＬ－２（７２０，０００ＩＵ／ｋｇ）を８時間ごとに静脈注射した。ＴＩＬおよびＩＬ－２による２回目の処置は３週間後に行われた。放射性核種スキャンはＴＩＬの腫瘍沈着による局在化を示した（図３Ａ）。処置後８日および１１日目での皮下腫瘍の生検は腫瘍へのＴＩＬの有意な局在化を示した（正常組織と比較した腫瘍グラム当たりの注射物の比は各々１４．９および１４．０であった）。患者の癌は１回目の処置後急速に退縮した。処置後３ヶ月では３カ所の肝臓病変の内２カ所が消失し、３番目の病変も５０％退縮していた。多数の皮下転移物も図３Ｂに示されているように（個々の病変の垂直直径の積が示されている）完全に退縮していた。

【０１６２】

ＴＩＬ１２００のｉｎ　ｖｉｔｒｏ機能の特徴付け

ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ患者から確立された多数のＴＩＬ株はＭＨＣクラスＩ拘束性様式でメラノーマ細胞株を溶解させ（非特許文献１２）、同一の腫瘍細胞株と一緒に培養した場合ＩＦＮ－γ、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）または顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）を放出することが示されている（非特許文献１３）。患者１２００の転移性皮下腫瘍塊から確立されたＣＤ８$^{+}$ＣＴＬ株ＴＩＬ１２００は、新鮮な自己由来メラノーマ細胞、および１５種のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$同種由来メラノーマ細胞株の内１０種を溶解させるが、１８種のＨＬＡ－Ａ２$^{-}$メラノーマ細胞株の内１６種または８種のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$非メラノーマ細胞株の内６種は溶解させない（非特許文献９７）。表７はＴＩＬにより溶解される５種の代表的なＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株、ＴＩＬにより溶解されない４種の代表的なＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株および１種のＨＬＡ－Ａ２$^{-}$メラノーマ細胞株に対する細胞毒性アッセイを示している。ＴＩＬ１２００はまた、新生児包皮から確立されたＨＬＡ－Ａ２$^{+}$正常培養メラノサイトおよびＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株が同時培養された場合にＩＦＮ－γを分泌した（表８）。従って、ＴＩＬ１２００はほとんどのメラノーマおよびＨＬＡ－Ａ２拘束性様式の培養新生児メラノサイトにおいて発現される非突然変異自己ペプチドを認識するようである。

【０１６３】

【表７】

表７　ＴＩＬ１２００による抗原認識の特異性：ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$、ｇｐ１００$^{+}$メラノーマ細胞株の溶解

標的	HLA-A2	gp100		TIL1200	LAK
	FACS ノーザン				
				（％特異的溶解）	
501mel	+	+	+	46	78
526mel	+	+	+	39	74
624mel	+	+	+	33	76
952mel	+	+	+	25	76
Malme3M	+	+	+	43	70
C32	+	-	-/+*	6	82
RPMI7951	+	-	-	9	67
WM115	+	-	-	5	68
HS695T	+	-	-	3	87
397mel	-	+	+	0	70

【０１６４】
前に記載したように（非特許文献８１）、４０：１のエフェクター：標的比で細胞毒性を測定するために５時間－^{51}Ｃｒ放出アッセイが実施された。モノクローナル抗体ＨＭＢ４５（Ｅｎｚｏ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、ニューヨーク州ニューヨーク）により認識されるＨＬＡ－Ａ２およびｇｐ１００の発現はフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）により測定された。ｇｐ１００　ＲＮＡの発現はｃＤＮＡ２５をプローブとし、ノーザンブロットにより解析された。
＊－／＋は非常に弱い陽性を示している。
【０１６５】

【表８】

表８　ＴＩＬ１２００による抗原認識の特異性：
ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$新生児メラサイトの認識

刺激細胞	HLA-A2	TIL1200	TIL888
		(pgIFN-γ/ml)	
501mel	+	562	0
624mel	+	439	0
397mel	-	0	0
888mel	-	0	1970
NHEM493	-	441	0
NHEM527	+	418	0
NHEM530	+	164	0
NHEM616	+	53	0
FM725	+	107	0
FM801	+	250	343
NHEM483	-	0	0
NXEM680	-	0	0
HA002	-	0	0

【０１６６】
ＴＩＬによるＩＦＮ－γ分泌は前に実施例１で記載したようにＥＬＩＳＡで測定した。ＴＩＬ単独で分泌されたＩＦＮ－γ量は差し引かれている（ＴＩＬ８８８に対しては８８ｐｇ／ｍｌ、ＴＩＬ１２００に対してはゼロ）。ＴＩＬ８８８はＭＨＣクラスＩ拘束性メラノーマ特異的ＣＴＬであるが、ＨＬＡ－Ａ２によっては拘束されない。ＮＨＥＭ、ＦＭおよびＨＡは正常培養メラノサイト細胞株に当てはまるが、他は全てメラノーマ細胞株である。

【０１６７】
Ｔ細胞に認識されるメラノーマ抗原をコードするｃＤＮＡのクローニング

ほとんどのＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬにより溶解されたＨＬＡ－Ａ２$^{+}$５０１ｍｅｌメラノーマ細胞株からのλｐＣＥＶ２７中のｃＤＮＡライブラリーは、非常にトランスフェクトされ易いＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ抗原陰性ＭＤＡ２３１クローン７またはＡ３７５クローン１－４内へ安定にトランスフェクトされた。Ｇ４１８耐性細胞を集め、各々の細胞株から約６７００個の個々のトランスフェクト体を単離し、ＴＩＬ１２００からのＩＦＮ－γ分泌を刺激する能力でスクリーニングした。２回目のスクリーニングで陽性であった４個のＭＤＡ２３１および１個のＡ３７５トランスフェクト体から、組み込まれたＤＮＡに隣接するＳＰ６／Ｔ７プライマーを用いるＰＣＲにより６つのＤＮＡ断片が単離され、哺乳類発現ベクターｐｃＤＮＡ３（インビトロジェン）内へクローン

化された。

【０１６８】

ｐｃＤＮＡ３ベクター中のこれらの断片は、ｐｃＤＮＡ３－ＨＬＡ－Ａ２．１とともにまたはなしで、ＣＯＳ７細胞において一過性に発現させた。ＨＬＡ－Ａ２．１とともに試験されたｃＤＮＡの１つ、ｃＤＮＡ２５をＣＯＳ７内へトランスフェクトすると、再現性よくＴＩＬ１２００からのＩＦＮ－γ分泌刺激能が与えられた。Ａ３７５内へのｃＤＮＡ２５の安定なトランスフェクションもまたＴＩＬ１２００からのＩＦＮ－γ放出を刺激した（表９、実験１および実験２）。ｃＤＮＡ２５プローブを使用したメラノーマのノーザンブロット解析により検出された２．２ｋｂバンドは、クローン化１．６ｋｂ断片は完全長ｃＤＮＡではなかったことを示唆している。３個のｃＤＮＡ２５のクローンを独立にＰＣＲで増幅して、ＧｅｎｅＢａｎｋデータベースのコンセンサスＤＮＡ配列と比較したところ、ｃＤＮＡ２５は、過去に登録された２つの遺伝子、すなわちｇｐ１００（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｍ７７３４８）およびＰｍｅｌ１７（非特許文献７４）とは異なることが判明した。ｃＤＮＡ２５は、ＧｅｎＢａｎｋのｇｐ１００（受託番号Ｍ７７３４８、ｇｐ９５としても知られている。）とは２つのヌクレオチドが異なっており、Ｐｍｅｌ１７の配列（非特許文献７４）と比べると、３塩基の違いと、２１塩基の欠失がある点で異なっていた（図５Ｂ）。

【０１６９】

【表９】

表９　Ａ３７５およびＣＯＳ７へのｃＤＮＡ２５のトランスフェクション

	刺激細胞	トランスフェクトした遺伝子	ＨＬＡ－Ａ２	TIL1200による分泌
実験１	５０１ｍｅｌ	なし	＋	(pgIFNγ/ml) 987
	３９７ｍｅｌ	なし	－	0
	Ａ３７５	なし	＋	0
	Ａ３７５	ｐｃＤＮＡ３－２５	＋	230
実験２	５０１ｍｅｌ	なし	＋	662
	３９７ｍｅｌ	なし	－	0
	ＣＯＳ７	なし	－	0
	ＣＯＳ７	ＨＬＡ－Ａ２．１	＋	0
	ＣＯＳ７	ｐｃＤＮＡ３－２５	－	0
	ＣＯＳ７	HLA-A2.1+pcDNA3-25	＋	310
実験３	５０１ｍｅｌ	なし	＋	908
	３９７ｍｅｌ	なし	－	0
	ＣＯＳ７	なし	－	0
	ＣＯＳ７	ＨＬＡ－Ａ２．１	＋	0
	ＣＯＳ７	ｐＣＥＶ２７－ＦＬ２５	－	0
	ＣＯＳ７	HLA-A2.1+pCEV27-FL25	＋	742
	ＣＯＳ７	ｐｃＤＮＡ３－ＦＬ２５	－	0
	ＣＯＳ７	HLA-A2.1+pcDNA3-FL25	＋	801

【０１７０】
一部欠損ｃＤＮＡ２５を含むｐｃＤＮＡ３（ｐｃＤＮＡ３－２５）を安定にトランスフェクトしたＨＬＡ－Ａ２$^{+}$Ａ３７５（実験１）、またはｐｃＤＮＡ３－２５（実験２）、全長ｃＤＮＡ２５を含むｐｃＤＮＡ３（ｐｃＤＮＡ３－ＦＬ２５）もしくは全長ｃＤＮＡ２５を含むｐＣＥＶ２７（ｐＣＥＶ２７－ＦＬ２５）（実験３）をＨＬＡ－Ａ２．１を含むｐｃＤＮＡ３（ＨＬＡ－Ａ２．１）と共に一過性にトランスフェクトしたＣＯＳ７を、ＴＩＬ１２００とともにインキュベートしたところ、ＴＩＬ１２００はＩＦＮ－γを分泌した。ＨＬＡ－Ａ２の発現はフローサイトメトリーにより決定され、インターフェロンγの分泌はＥＬＩＳＡにより測定された。

【０１７１】
全長ｃＤＮＡ２５（ＦＬ２５）を、２つのプラスミドｐＣＥＶ２７－ＦＬ２５またはｐｃＤＮＡ３－ＦＬ２５に単離した。いずれのプラスミドもｐｃＤＮＡ３－ＨＬＡ－Ａ２．１と共にＣＯＳ７にトランスフェクトしたところ、ＴＩＬ１２００によるＩＦＮ－γ分泌誘導能がＣＯＳ７に付与された。全長ＤＮＡとＨＬＡ－Ａ２．１とをトランスフェクトしたＣＯＳ７により刺激されたＩＦＮ－γの分泌量は、５０１ｍｅｌの刺激による量と同程

度であり、一部欠損ｃＤＮＡ２５をトランスフェクトしたＣＯＳ７の刺激による量よりも高かった。これはおそらく一部欠損ｃＤＮＡ２５において、正常ＡＵＧ開始コドンで開始される翻訳が改良されたことによると思われる（表９、実験２および実験３）。あるいは、一部欠損ｃＤＮＡ２５で失われた５’領域が、ＴＩＬ１２００においてクローンにより認識される他のエピトープを含んでいるのかもしれない。ＴＩＬ１２００からのＩＦＮ－γ放出にはＨＬＡ－Ａ２．１の発現が必要であったこと、およびトランスフェクトされた細胞が無関係なＴＩＬからのＩＦＮ－γ分泌を刺激しなかったという事実（データは示していない）は、ｃＤＮＡ２５がＨＬＡ－Ａ２．１存在下でＴＩＬ１２００により認識される抗原をコードしていたこと、およびＴ細胞からのＩＦＮ－γ放出を非特異的に誘導する分子をコードしていなかったことを示す。

【０１７２】

ｃＤＮＡ２５プローブを用いたスクリーニングにより５０１ｍｅｌ　ｃＤＮＡライブラリーからクローニングされた一部欠損ｃＤＮＡ２５および全長ｃＤＮＡ２５の塩基配列および対応するアミノ酸配列（図５Ａ）を、正常メラノサイトから単離されたＰｍｅｌ１７、およびメラノーマ細胞株ＭＥＬ－１から単離されたｇｐ１００のＧｅｎＢａｎｋ配列（図５Ｂ）と比較した。全長ｃＤＮＡ２５は、ｇｐ１００のアミノ酸配列と比べると１６２位において異なっていた。このアミノ酸の相違は、おそらく多型または腫瘍における突然変異により生じたのであろう。Ｐｍｅｌ１７と比較すると、ｃＤＮＡ２５は１６２位および２７４位の２つのアミノ酸が異なり、Ｐｍｅｌ１７では５８８～５９４位に存在した７アミノ酸を含まなかった。オリジナルのＭＤＡ２３１トランスフェクト体から単離された一部欠損ｃＤＮＡ２５のアミノ酸配列は、１つの余分なシチジル酸によるフレームシフトのために３’末端（６４９位～最後まで）に異なる配列を持つ。この相違が、真に異なる対立遺伝子であることによるのか、またはＤＮＡを操作する過程で生じた突然変異によるのかは明確ではない。とはいえ、ＴＩＬ１２００は、２３６位～６４８位までの間に位置する非突然変異ペプチドを認識するようである。ｃＤＮＡ２５はまた、アミノ酸配列において、ウシの網膜色素上皮で特異的に発現するｃＤＮＡ　ＲＰＥ１（非特許文献９８）と８７％の類似性、およびニワトリの色素上皮細胞から単離されたメラノソーム基質タンパク質をコードするｃＤＮＡ　ＭＭＰ１１５（非特許文献９７）と６０％の類似性を示した。

【０１７３】

ｇｐ１００タンパク質は、モノクローナル抗体ＨＭＢ４５により認識されることが知られていた（非特許文献９９）。全長ｃＤＮＡ２５をトランスフェクトしたＣＯＳ７細胞は、フローサイトメトリーで、このモノクローナル抗体を用いて検出された。ｐＣＥＶ２７－ＦＬ２５またはｐｃＤＮＡ３－ＦＬ２５のいずれかを一過性に発現した後、ＣＯＳ７は、ＨＭＢ４５により検出される抗原を発現した（データは示していない）。

【０１７４】

ｃＤＮＡ２５のＲＮＡの発現

ｃＤＮＡの組織特異的発現を評価するため、ｃＤＮＡ２５プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。１５種のメラノーマ細胞株のうち１０種、および６種のメラニン細胞株の全てがｃＤＮＡ２５を発現していた（図６Ａおよび図６Ｂ）。多くの正常組織では網膜のみで発現が見られた（図６Ｃ）。Ｔ細胞（ＴＩＬＡ、Ｂ）由来の７種の細胞株、Ｂ細胞（５０１ＥＢＶＢ、８３６ＥＢＶＢ）および線維芽細胞（Ｍ１）、および２０種の非メラノーマ腫瘍細胞株（結腸癌のＣｏｌｌｏ、ＳＷ４８０、ＷｉＤｒ；乳癌のＭＤＡ２３１、ＭＣＦ７、ＨＳ５７８、ＺＲ７５；神経芽細胞腫のＳＫ－Ｎ－ＡＳ、ＳＫ－Ｎ－ＳＨ；ユーイング肉腫のＴＣ７５、ＲＤ－ＥＳ、６６４７；肉腫の１４３Ｂ；神経膠腫のＵ１３８ＭＧ、ＨＳ６８３；腎細胞癌のＵＯＫ１０８、ＵＯＫ１１７；肺小細胞癌のＨ１０９２；バーキットリンパ腫のＤａｕｄｉ；骨髄腫のＨＭＹ）は全てｃＤＮＡ２５を発現していなかった（データは示していない）。したがって、この遺伝子は、モノクローナル抗体であるＨＭＢ４５、ＮＫＩ／ｂｅｔａｂ、またはＨＭＢ－５０を用いて解析したときの、先に単離された型のｇｐ１００の発現パターンと同様に、メラノサイト系列細胞で特異的

に発現していることが明らかとなった（非特許文献９９、非特許文献１００、非特許文献１０１、非特許文献１０２、非特許文献１０３）。ｃＤＮＡ２５プローブにより新生児の培養メラノサイト細胞株で検出されたＲＮＡの発現レベルは、メラノーマ細胞株での発現に比べて有意に低かった。ｃＤＮＡ２５を用いたノーザンブロット解析およびＨＭＢ４５抗体を用いたフローサイトメトリーにより検出されたｇｐ１００の発現と、１０種のＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ細胞株でのＴＩＬ１２００によるメラノーマの溶解との間には、表７に示すように完全な相関があった。

【０１７５】

ｇｐ１００でのエピトープの同定

一部欠損した形のｃＤＮＡ２５のアミノ酸配列をＨＬＡ－Ａ２．１の既知の結合領域（非特許文献５６、非特許文献８６、非特許文献５５）と比較することにより、ｃＤＮＡ２５をもとに長さ９または１０アミノ酸の３０個のペプチドを合成した。ＴＩＬ１２００は、ＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ配列のペプチド（配列番号２７、残基４５７～４８６。図５Ａ、配列番号３３）と共にインキュベートしたときのみＨＬＡ－Ａ２$^{+}$細胞株Ｔ２を溶解したが、他の２９個のペプチドと共にインキュベートしたときには溶解しなかった（表１０、図５Ａ）。ＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ配列のペプチド（配列番号３３）のみが、ＴＩＬ１２００によるＩＦＮ－γ分泌をも刺激することができた（データは示していない）。

【０１７６】

ＴＩＬ由来の多くのメラノーマ特異的ＣＴＬが、メラノサイト－メラノーマ系列に特異的なタンパク質に由来する非突然変異自己ペプチドを認識するようである。なぜなら、これらのＴＩＬは、適切な拘束要素を共有するほとんどのメラノーマ細胞株および正常培養メラノサイトを認識するからである（非特許文献１６、非特許文献１５）。メラノーマ患者の免疫療法に有益なメラノーマ抗原を単離および同定する目的でＴＩＬ１２００が用いられた。ＴＩＬは転移癌の患者に投与すると腫瘍部位に局在し、かつ腫瘍の劇的な退縮を伴った。非活性化リンパ球およびリンホカイン活性化キラー細胞とは対照的に、自己ＴＩＬは腫瘍部位に局在することが示されている。この局在は、これらのＴＩＬが腫瘍の退縮を仲介する能力と相関していた（データは示していない）。複数のＣＴＬ種を含むＴＩＬ株の１つであるＴＩＬ１２００は、最も高頻度で発現するＭＨＣクラスＩ抗原（約５０％の人がもつ）でありかつメラノーマ特異的ＣＴＬの誘導における主要な拘束要素であることが示されているＨＬＡ－Ａ２の存在下で、腫瘍抗原を認識した（非特許文献８５）。

【０１７７】

Ｔ細胞による認識をスクリーニングに用いてｃＤＮＡ発現クローニングを行うことにより、ＴＩＬ１２００によって認識される抗原をコードし、かつモノクローナル抗体ＨＭＢ４５、ＨＭＢ５０、またはＮＫＩ／ｂｅｔａｂによっても認識される膜局在糖タンパク質ｇｐ１００の１つの型として同定された、１つのｃＤＮＡ（図４Ａおよび図４Ｂ、配列番号２６）が同定されている（非特許文献９９、非特許文献１００、非特許文献１０１、非特許文献１０２、非特許文献１０３）。これらの抗体は、メラノサイト系列の組織に高度に特異的で、かつほとんどのメラノーマ細胞を強く染色する。ＮＫＩ／ｂｅｔａｂは、成人の正常皮膚のメラノサイトとも反応する（非特許文献１０２）。ＨＭＢ４５またはＮＫＩ／ｂｅｔａｂ抗体のいずれかを用いた免疫電子顕微鏡の研究によって、ｇｐ１００タンパク質は、主に膜および細胞質内の第ＩおよびＩＩ期のメラノソームの線維状マトリックスに位置することが明らかになった（非特許文献１０２、非特許文献１０４）。全く独立な手順によって別の型のｇｐ１００をコードするｃＤＮＡもｇｐ１００に対するウサギポリクローナル抗血清を用いたスクリーニングによって単離され（非特許文献９９）、ＴＩＬ１２００はこのｃＤＮＡクローンをトランスフェクトさせたＨＬＡ－Ａ２$^{+}$細胞株も溶解した（非特許文献１０５）。

【０１７８】

【表１０】

表１０　ペプチドＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬと共にパルスした
Ｔ２　ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$細胞株のＴＩＬ１２００による溶解

標的	ＨＬＡ－Ａ２	ペプチド*	ＴＩＬ１２００	ＴＩＬ１２３５$^{+}$
		（μｇ／ｍｌ）	（特異的溶解の％）**	
５０１ｍｅｌ	＋	０	６６	５１
３９７ｍｅｌ	－	０	１	０
Ｔ２	＋	０	２	１
Ｔ２	＋	４０	２８	ＮＤ$^{++}$
Ｔ２	＋	１０	３２	０
Ｔ２	＋	１	２４	ＮＤ
Ｔ２	＋	０．１	６	ＮＤ
Ｔ２	＋	０．０１	０	ＮＤ
Ｔ２	＋	０．００１	２	ＮＤ

【０１７９】
＊ＴＩＬ１２００は、ＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ（残基４５７～４６６）の１０量体ペプチドと共に刺激するとＴ２細胞を溶解したが、他の２９個のペプチド（配列番号２７）（残基２７３～２８１、残基２９７～３０６、残基３７３～３８１、残基３９９～４０７、残基３９９～４０８、残基４０９～４１８、残基４５６～４６４、残基４６３～４７１、残基４６５～４７３、残基４７６～４８５、残基５１１～５２０、残基５１９～５２８、残基５４４～５５２、残基５４４～５５３、残基５７０～５７９、残基５７６～５８４、残基５７６～５８５、残基５８５～５９３、残基５９２～６００、残基５９７～６０５、残基５９７～６０６、残基６０２～６１０、残基６０２～６１１、残基６０３～６１１、残基６０５～６１４、残基６０６～６１４、残基６０６～６１５、残基６１９～６２７、残基６２９～６３８）の場合は溶解しなかった。
$^{+}$ＴＩＬ１２３５は、ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＣＴＬであり、ｇｐ－１００を認識しない。
＊＊Ｅ：Ｔは５０：１である。
$^{+}$$^{+}$ＮＤは、行っていないことを示す。

【０１８０】
腫瘍内の自己抗原ｇｐ１００と反応性のあるＴ細胞の存在、および抗原反応細胞の特異的な蓄積および増加から考えられる結果としての腫瘍部位におけるこれらＴ細胞の豊富化の可能性（非特許文献１７）は、癌の増殖における自己抗原への免疫応答の性質および自己抗原に対する免疫寛容の機構について重要な疑問を提起する。ノーザンブロット解析によって示されたメラノサイトにおけるｇｐ１００の発現と比べてメラノーマ細胞におけるｇｐ１００の発現が増加していること、または腫瘍部位に独特の炎症状態（サイトカインの分泌および細胞表面の補助刺激性分子の発現と関係していると思われる）が存在することが、ｇｐ１００に対する寛容を発生させる可能性がある。脱色素化が、優れた予後と関連し（非特許文献９３、非特許文献９４）、そしてメラノーマ患者への化学免疫療法に対する臨床反応（非特許文献９５）とも関連することが報告されている。メラノーマ特異的

ＴＩＬが投与された患者には散発性の白斑が見られるが、メラノサイトの破壊に関連する不都合な眼科学的作用は観察されていない。患者１２００は白斑またはいかなる眼科的副作用も生じなかった。

【０１８１】

ＴＩＬ１２００とＩＬ－２を患者１２００へ導入することが癌の退縮に関連していたため、ｇｐ１００タンパク質（図５Ａ；配列番号２７）および同定された１０アミノ酸からなるペプチドはヒトの腫瘍拒絶抗原を代表すると思われる。ＩＬ－２もまた腫瘍拒絶に関連しているであろうが、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）におけるＴＩＬ２０００の腫瘍堆積物への到達および抗腫瘍応答の急速性はＴＩＬ療法に対する応答の特徴である。ＭＡＲＴ－１同様にｇｐ１００を認識した他の３種のＴＩＬ株の養子免疫伝達も腫瘍の退縮に関連していた（データは示していない）。

【０１８２】

チロシナーゼ（非特許文献２０）およびＭＡＲＴ－１（実施例１を参照）はＨＬＡ－Ａ２拘束性ＣＴＬによって認識されたメラノーマ抗原として同定されている。もう１つの抗原であるＭＡＧＥ－１はＨＬＡ－Ａ１拘束性メラノーマ特異的ＣＴＬによって認識され、精巣および様々な癌細胞において発現している（非特許文献１８）。しかし、近年開発された１０種のＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬはいずれもＭＡＧＥ－１を認識しないと思われている（非特許文献８８）。

【０１８３】

メラノーマにおけるｇｐ１００タンパク質の広範な発現、腫瘍に浸潤するＴ細胞によるペプチドの認識、個人の５０％に存在しているＨＬＡ－Ａ２によるその拘束性、および抗ｇｐ１００反応性と患者１２００における癌退縮との関連性は、ｇｐ１００抗原、特にｇｐ１００アミノ酸配列に由来する新規免疫原ペプチド（図５Ａ；配列番号２７）がメラノーマ患者に対する有効な免疫療法の開発に特に有用であることを示唆する。

【実施例４】

【０１８４】

生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）腫瘍認識に関連するＴＩＬによるヒトメラノーマ抗原の複数エピトープの認識

材料と方法

ＴＩＬからのＣＴＬの作製および転移性メラノーマ患者の治療

メラノーマ特異的なＣＴＬは、以前に記載された方法（非特許文献８１）に従って、６０００ＩＵのＩＬ－２を含む培地においてＴＩＬから誘導および増殖させた。ＮＣＩの外科部門の自家移植患者に投与された全ての使用可能なＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＣＴＬが本研究において使われた。ＴＩＬは以前に報告されているように（非特許文献５、非特許文献１０６）、ＩＬ－２とともに転移性メラノーマの自家移植患者の静脈内に投与した。フィッシャーの正確確立検定を使用して、ＴＩＬによるｇｐ１００の認識とＴＩＬ処理に対する外科的応答との関連性の決定、並びにＭＡＲＴ－１認識との関連性の決定を行った。

【０１８５】

ペプチドの合成

ペプチドはペプチド合成機（モデル　ＡＭＳ　４２２；Ｇｉｌｓｏｎ社、オハイオ州ワージントン）を使用して固相法により合成した（純度＞９０％）。合成されるペプチドは、報告されているＨＬＡ－Ａ２．１結合モチーフに基づくヒトｇｐ１００配列から選択した（非特許文献５６、非特許文献８６、非特許文献５５、非特許文献１０７）。以下のペプチドも試した：８量体ペプチド８個（１９９位、２１２位、２１８位、２３７位、２６６位、２６７位、２６８位、２６９位の残基から始まる；図７Ａ参照）、９量体ペプチド８４個（残基が２位、４位、１１位、１８位、１５４位、１６２位、１６９位、１７１位、１７８位、１９９位、２０５位、２０９位、２１６位、２４１位、２４８位、２５０位、２５５位、２６２位、２６６位、２６７位、２６８位、２７３位、２７８位、２８０位、２８３位、２８６位、２８７位、２９８位、２９０位、３０９位、３１６位、３３２位

、３３５位、３５０位、３５４位、３５８位、３６１位、３７１位、３７３位、３８４位、３８９位、３９７位、３９９位、４００位、４０２位、４０７位、４０８位、４２０位、４２３位、４２５位、４４６位、４４９位、４５０位、４５６位、４６３位、４６５位、４８５位、４８８位、５０１位、５１２位、５３６位、５４４位、５６３位、５７０位、５７１位、５７６位、５７７位、５７８位、５８３位、５８５位、５９０位、５９２位、５９５位、５９８位、５９９位、６０１位、６０２位、６０３位、６０４位、６０６位、６０７位、６１３位、６１９位、６４８位から始まる；図７Ａ参照）および１０量体ペプチド７７個（残基が９位、１７位、５７位、８７位、９６位、１５４位、１６１位、１６９位、１７７位、１９７位、１９９位、２００位、２０８位、２１６位、２２４位、２３２位、２４０位、２４３位、２５０位、２６６位、２６７位、２６８位、２７２位、２８５位、２８７位、２８９位、２９７位、３１８位、３２３位、３３１位、３４２位、３５０位、３５５位、３５７位、３６５位、３８０位、３８３位、３８８位、３９１位、３９５位、３９９位、４００位、４０６位、４０７位、４０９位、４１５位、４３２位、４４９位、４５３位、４５７位、４６２位、４７６位、４８４位、４８９位、４９２位、５１１位、５１９位、５３６位、５４３位、５４４位、５４８位、５６８位、５７０位、５７１位、５７６位、５７７位、５８４位、５９０位、５９５位、５９８位、５９９位、６０１位、６０２位、６０３位、６０５位、６１１位、６２９位から始まる；図７Ａ参照）を合成した。第１のスクリーニングにおいて同定された、可能性のあるエピトープはＣ－４カラム（ＶＹＤＡＣ、カリフォルニア州ヘプセリア）を用いてＨＰＬＣによって精製し（＞９８％純度）、ペプチドの分子量は以前に記載されているように（実施例３；非特許文献１０８、非特許文献１０９）、質量分析測定によって確認された。

【０１８６】

ＨＬＡ－Ａ２．１へのペプチド結合アッセイ

以前に記述されているように（非特許文献５５、非特許文献５４、非特許文献１１０）、可溶性ＨＬＡ－Ａ２．１重鎖、ヒトβ２－マイクログロブリン、放射性標識したペプチドＨＢｃ$_{18-27}$（ＦＬＰＳＤＹＦＰＳＶ）および様々な濃度の試料ペプチドを、プロテアーゼ阻害剤の存在下で２日間室温でともにインキュベートした。ＨＬＡ－Ａ２．１に結合した標識ペプチドの割合はゲルろ過による分離後に計算され、標識ペプチドの結合の５０％を阻害するのに必要な試料ペプチドの濃度を計算した。ペプチドのＨＬＡ－Ａ２．１への相対親和性についても、以前に記載されたように（非特許文献１１０）、比（標識ペプチドの結合を５０％阻害するための標準ＨＢｃ$_{18-27}$ペプチド濃度／標識ペプチドの結合を５０％阻害するための試料ペプチド濃度）として計算した。ペプチドの結合は、強（＜５０ｎＭで５０％を阻害、比＞０．１）、中（５０～５００ｎＭ、比０．１～０．０１）、または弱（＞５００ｎＭ、比＜０．０１）として定義する（非特許文献５５、非特許文献５４、非特許文献１１０）。

【０１８７】

ｇｐ１００の全長ｃＤＮＡを含むｐｃＤＮＡ３プラスミド（実施例３；非特許文献１０９）をＸｈｏＩおよびＸｂａＩで消化した。α－ホスホロチオン酸デオキシヌクレオシド３リン酸をＸｂａＩ部位へ組込ませた後、Ｅｘｏ Ｓｉｚｅ Ｄｅｌｅｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社、マサチューセッツ州ベバリー）を用いて標準エクソヌクレアーゼＩＩＩ段階的欠失（ｎｅｓｔｅｄ ｄｅｌｅｔｉｏｎ）を行った。欠失したクローンは自己連結および増幅を行った。それぞれのクローンの正確な欠失はＤＮＡ配列決定によって確認した。エピトープを含む領域を同定するために、全長ｇｐ１００ ｃＤＮＡの３’末端からエクソヌクレアーゼによる連続欠失によって作製されたｃＤＮＡ断片（Ｄ３、Ｄ５、Ｄ４、Ｃ３）並びに５’コード領域を欠く欠失型ｇｐ１００ ｃＤＮＡ（２５ＴＲ）（実施例６３；非特許文献１０９）を含むｐｃＤＮＡ３プラスミド（インビトロジェン、カリフォルニア州サンディエゴ）をＨＬＡ－Ａ２．１ ｃＤＮＡとともにＣＯＳ７細胞にトランスフェクトさせ、トランスフェクトされたＣＯＳ細胞のＴＩＬによる認識をＩＦＮ－γ放出アッセイを用いて評価した（実施例１；非特許文献１１１）。

【０１８８】

Ｔ細胞による抗原認識の評価

Ｔ細胞による抗原認識を調査するために、^{51}Ｃｒ放出アッセイまたはＩＦＮ－γ放出アッセイを以前に記載されている方法によって行った（実施例１および実施例２；非特許文献１１１、非特許文献８１）。メラノーマ抗原をコードするｃＤＮＡおよびＨＬＡ－Ａ２．１　ｃＤＮＡをトランスフェクトされたＣＯＳ７細胞、またはペプチドと事前にインキュベートしておいたＴ２細胞のいずれかを刺激因子としてＩＦＮ－γ放出アッセイに使用した。ペプチドで刺激したＴ２細胞は細胞毒性アッセイの標的としても使用した（非特許文献１０８）。

【０１８９】

ＴＩＬ処理に対する臨床応答に相関したＴＩＬによるｇｐ１００の認識

ＴＩＬに由来するＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＣＴＬ１４種の内４種がｇｐ１００を認識し、１３種がＭＡＲＴ－１を認識した（３種はｇｐ１００およびＭＡＲＴ－１の両方を認識した）。メラノーマ抗原をコードするｃＤＮＡをＨＬＡ－Ａ２．１　ｃＤＮＡとともにトランスフェクトしたＣＯＳ７細胞に対するＴＩＬの反応性によって調べたところ、いずれもチロシナーゼまたはｇｐ７５を認識しなかった（実施例２；非特許文献１０８）。これら４種のｇｐ１００反応性ＣＴＬのＨＬＡ－Ａ２拘束性および認識特異性については以前に立証されている（実施例１～３；非特許文献１０９、非特許文献１２、非特許文献１４、非特許文献９７）。これら１４種のＣＴＬの内１０種をＩＬ－２とともに自家移植患者に投与した。表１１に概説するように、ｇｐ１００を認識可能なＣＴＬによって処置した患者４人全てが客観的な部分的応答（＞５０％の腫瘍退縮）を生じた。ＴＩＬ療法に対する臨床応答は、ＴＩＬのｇｐ１００に対する反応性と関連した（ｐ＝０．００４８）が、ＭＡＲＴ－１とは関連しなかった（ｐ＝０．４）。これらのデータは、ｇｐ１００が生体内で（ｉｎ　ｖｉｖｏ）腫瘍縮退に関与し得るエピトープを含むことを示唆した。

【０１９０】

ｇｐ１００反応性ＴＩＬによって認識されるエピトープの同定

これら４種のｇｐ１００反応性ＣＴＬによって認識されるエピトープを同定するために、ＨＬＡ－Ａ２．１結合モチーフを含む１６９個のペプチドを合成した。ペプチド認識は、それぞれのペプチドとともに予めインキュベートしたＨＬＡ－Ａ２．１$^{+}$　Ｔ２細胞に対するこれらのＣＴＬの反応性を細胞毒性アッセイおよびＩＦＮ－γ放出アッセイを用いて試験することによって評価した。表１２に示すように、細胞毒性アッセイにおいて７個のペプチドがｇｐ１００反応性ＴＩＬによって認識された。同時に行われたＩＦＮ－γ放出アッセイの結果は細胞毒性アッセイの結果と矛盾しないものであった。ＴＩＬ６２０（６２０－１、６２０－２）またはＴＩＬ６６０（６６０－１、６６０－２、６６０－３）の別々のサブカルチャーを、自家移植患者に投与したＴＩＬ培養物から増殖させて別々に培養すると、少しずつ異なる特異性をもっていたが、これは恐らく試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で異なるクローンが増殖したことによると思われる。Ｇ９$_{209}$（ＩＴＤＱＶＰＦＳＶ）（配列番号４８）およびＧ９$_{209}$のＮ末端に余分のスレオニンを持つＧ１０$_{208}$（ＴＩＴＤＱＶＰＦＳＶ）（配列番号４９）はＴＩＬ６２０によってのみ認識された。Ｇ９$_{154}$（ＫＴＷＧＱＹＷＱＶ）（配列番号４６）およびＧ９$_{154}$のＣ末端に余分にロイシンを持つＧ１０$_{154}$（ＫＴＷＧＱＹＷＱＶＬ）（配列番号４７）はＴＩＬ１２００、ＴＩＬ６２０－２およびＴＩＬ６６０－２によって認識された。Ｇ１０－４（ＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ）（配列番号３３）は示したように（実施例３）、ＴＩＬ１２００によって認識された。ペプチドＧ９$_{280}$（ＹＬＥＰＧＰＶＴＡ）（配列番号４０）はＴＩＬ６６０およびＴＩＬ１１４３によって認識された。ＴＩＬ６６０－３はＧ９$_{280}$同様にＧ１０－５（ＶＬＹＲＹＧＳＦＳＶ）（配列番号３４）も認識した。Ｇ１０－５とともに予めインキュベートしたＴ２細胞の溶解は反復的に低く、これは恐らくＴ細胞クローン中の小サブセットがこのエピトープに特異的であったためである。

【０１９１】

既知のＨＬＡ－Ａ２．１結合モチーフを用いてエピトープの同定を補うために、もう１つの方法がエピトープを含む領域の同定に使用された。５種のｇｐ１００　ｃＤＮＡ断片すなわち、４種はｃＤＮＡの３’末端からのエクソヌクレアーゼ欠失により作製され（Ｄ３、Ｄ４、Ｄ５、Ｃ４）、１種は５’コード領域の最初の７０５塩基対を欠失する部分的なｃＤＮＡクローン（２５ＴＲ）であり、これらをｐｃＤＮＡ３プラスミドに挿入し、ＨＬＡ－Ａ２．１　ｃＤＮＡとともにＣＯＳ７細胞にトランスフェクトさせた。断片の位置は図７Ａに示してある。４種のｇｐ１００反応性ＴＩＬによるこれらトランスフェクト体の認識はＩＦＮ－γ放出アッセイを用いて評価した（図７Ｂ）。ＴＩＬ１２００は２５ＴＲ、Ｄ５、Ｄ４またはＣ４断片をトランスフェクトしたＣＯＳ細胞を認識したが、Ｄ３については認識せず、少なくとも２個のエピトープがアミノ酸残基１４６～１６３および２３６～６６１の領域に存在していることを示唆している。１４６～１６３の領域にＨＬＡ－Ａ２．１結合モチーフを含むペプチドはＧ９$_{154}$およびＧ１０$_{154}$のみに過ぎず、両者ともＴＩＬ１２００によって認識された。Ｇ１０－４は領域２３６～６６１に位置し、ＴＩＬ１２００によって認識された。ＴＩＬ６２０－１はＣ４をトランスフェクトしたＣＯＳ細胞を認識したが、Ｄ３、Ｄ５、Ｄ４または２５ＴＲについては認識せず、エピトープは残基１８７～２７０の内部に存在することを示唆している。ＴＩＬ６２０－１によって認識されたＧ９$_{209}$およびＧ１０$_{208}$はこの領域に位置した。ＴＩＬ６２０のもう１つのサブカルチャーであるＴＩＬ６２０－２もまたＤ５およびＤ４をトランスフェクトした細胞を認識したがＤ３は認識せず、および１４７～１６３の領域内のＧ９$_{154}$およびＧ１０$_{154}$を認識した（これらはＴＩＬ１２００によっても認識された）。ＴＩＬ６６０－１およびＴＩＬ１１４３はＣ４または２５ＴＲをトランスフェクトした細胞を認識したがＤ３、Ｄ５、またはＤ４は認識せず、エピトープが１８７～２７０および２３６～６６１の２領域に存在することを示唆している。２５ＴＲ断片内に位置するがＣ４断片内には位置しないＧ９$_{280}$はＴＩＬ６６０およびＴＩＬ１１４３によって認識された。

【０１９２】

メラノーマのエピトープの試験管内での（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）ＨＬＡ－Ａ２．１に対する結合親和性

Ｔ２細胞をＣＴＬ溶解に対し感受性にするために１μｇ／ｍｌの濃度が必要であるＧ１０－４を除き（実施例３；非特許文献１０９）、この研究で同定されたすべてのｇｐ１００エピトープはＴ２細胞をＣＴＬ溶解に対し１ｎｇ／ｍｌの濃度で感受性にした（図８Ａ～図８Ｄ）。Ｇ１０－５は１０ｎｇ／ｍｌ以上の濃度ではＣＴＬでの細胞毒性を阻害するようであった。なぜなら、全４時間の細胞毒性アッセイの間ペプチドが培養液中に存在する条件では、１０ｎｇ／ｍｌ以上のＧ１０－５と共にインキュベートしたＴ２細胞の溶解は、このアッセイを１～１０ｎｇ／ｍｌの濃度で行ったときより低くなったからである（図８Ｄ）。これらのエピトープのＨＬＡ－Ａ２．１に対する相対結合親和性も試験管内の競合的結合アッセイを用いて測定された（表１３）。Ｇ９$_{154}$のＨＬＡ－Ａ２．１分子に対する結合親和性（１１ｎＭで標準的ペプチドの５０％を阻害）は、Ｇ９$_{154}$のＣ末端に余分なロイシンを含むＧ１０$_{154}$（１０１０ｎＭ）より高く、Ｇ１０$_{154}$よりも低濃度でＴ２細胞を感受性にすることが出来た（図８Ａ）。Ｇ９$_{209}$のＨＬＡ－Ａ２．１への結合親和性（８４ｎＭ）はまた、Ｇ９$_{209}$のＮ末端に余分のスレオニンを含むＧ１０$_{208}$より（２０８０ｎＭ）高く、Ｇ１０$_{208}$よりも低濃度でＴ２細胞を感受性にすることが出来た（図８Ｂ）。ゆえに、９量体ペプチドは、対応する１０量体ペプチドよりＣＴＬ溶解に対してＴ２細胞を感受性にする効果が大きく、ＨＬＡ－Ａ２．１に対する結合親和性も、より高かった。これは、同定されたＭＡＲＴ－１の９及び１０アミノ酸ペプチド（Ｍ９－２、Ｍ１０－３、Ｍ１０－４）にもあてはまった（実施例２；非特許文献１０８）。Ｔ２細胞溶解アッセイにおけるペプチド滴定の結果は、試験管内結合アッセイで測定したＨＬＡ－Ａ２．１結合親和性の結果と相関した。他のｇｐ１００エピトープＧ９$_{280}$、Ｇ１０－４またはＧ１０－５は、ＨＬＡ－Ａ２．１に対して各々９５ｎＭ、４８３ｎＭまたは１３ｎＭで５０％阻害を示す結合親和性を持っていた。以前に同定されたＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマエピトープのＨＬＡ－Ａ２．１結合親和性は、ＭＡＲＴ－

１（実施例２；非特許文献１０８）およびチロシナーゼ（非特許文献１１２；配列番号３１および３２）においても測定された（Ｍ９－２（３９７ｎＭ）、Ｍ１０－３（２２７２ｎＭ）、Ｍ１０－４（５５５５ｎＭ）、Ｔ９$_{1}$（３３３ｎＭ）、Ｔ９$_{369}$（４０ｎＭ））。１０量体ペプチド（Ｇ１０$_{154}$、Ｇ１０$_{208}$、Ｇ１０－３、Ｇ１０－４）を除き、これらに重複する９量体エピトープ（Ｇ９$_{154}$、Ｇ９$_{209}$、Ｍ９－２）が存在するが、全てのメラノーマエピトープはいずれもＨＬＡ－Ａ２．１に対して高い（Ｇ９$_{154}$、Ｇ１０－５、Ｔ９$_{369}$）または中程度の（Ｇ９$_{209}$、Ｇ９$_{280}$、Ｇ１０－４、Ｍ９－２、Ｔ９$_{1}$）結合親和性を持っている。

【０１９３】

考察

自家移植患者へ養子免疫伝達した場合の腫瘍退縮に関連する４種のＴＩＬによって認識されるヒトメラノーマ抗原ｇｐ１００の複数のエピトープがこの研究で同定された。この研究で記載された５つのエピトープのうち、Ｇ９$_{154}$またはＧ１０$_{154}$が最も一般的に認識されるようであった。これらは異なる患者由来の４種のｇｐ１００反応性ＴＩＬの内３種によって認識されたからである。Ｇ９$_{280}$ペプチドは異なる患者のＰＢＬ由来の５種全てのＣＴＬによって認識されることが報告されているが（非特許文献１１３）、この研究では、これは４種のｇｐ１００反応性ＴＩＬのうち２種にしか認識されなかった。この相違は、使われたＴ細胞の源（ＴＩＬとＰＢＬ）によるものであろう。

【０１９４】

ＭＡＲＴ－１ペプチドのＭ９－２はＭ９$_{27}$とも呼ばれ、ＭＡＲＴ－１ペプチドＭ１０－３はＭ１０$_{26}$とも呼ばれ、そしてＭＡＲＴ－１ペプチドのＭ１０－４はＭ１０$_{27}$とも呼ばれることは理解されよう。また、ｇｐ１００ペプチドＧ１０－４もまたＧ１０$_{457}$と呼ばれ、ｇｐ１００ペプチドＧ１０－５もまたＧ１０$_{476}$と呼ばれることが認められるであろう。

【０１９５】

【表１１】

【０１９６】

表１１　ＨＬＡ－Ａ２拘束性メラノーマ特異的ＴＩＬによる抗原認識の概要

	TIL									
	１２００	６２０	６６０	１１４３	１０７４	１０８８	１２３５	１３１８	１３６３	１３９９
臨床の反応	PR	PR	PR	PR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
抗原（エピトープ）										
ｇｐ１００	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－
	($G9_{154}$)	($G9_{209}$)	($G9_{280}$)	($G9_{280}$)						
	(G10-4)	($G9_{154}$)	($G9_{154}$)							
			(G10-5)							
MART－１	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
		(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)	(M9-2)
チロシナーゼ	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
ｇｐ７５	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－

Ｇ９（１０）：ｇｐ１００－９（１０）量体ペプチド；Ｍ９－２：ＭＡＲＴ－1_{27-35}ペプチド

ＴＩＬによるｇｐ１００の認識は、ＨＬＡ－Ａ２拘束性ＴＩＬを用いた養子免疫療法に対する臨床応答と有意（ｐ＜０．００１）に相関する。

*ＰＲ：部分的応答（腫瘍の垂直直径の積和が＞５０％減少）；ＮＲ：応答なし（＜５０％の減少）

10　20　30　40

【表１２】

表１２　ＴＩＬによるｇｐ１００ペプチドの認識

標的細胞	ペプチド	TIL E：T＝４０：１での特異的溶解％					
実験１		６２０－１	６２０－２	６６０－１	１１４３	１２００	１２３５
６２４mel	無し	３２	３６	４７	２０	７７	１１
３９７mel	無し	２	３	０	０	０	０
Ｔ２	無し	０	５	３	１	０	２
Ｔ２	Ｍ９－２	１９	８４	６９	４９	１	８６
Ｔ２	$G9_{154}$	０	２１	４	０	１００	０
Ｔ２	$G10_{154}$	３	１９	７	４	７５	２
Ｔ２	$G9_{209}$	４５	２１	０	３	０	０
Ｔ２	$G10_{208}$	４２	３６	７	４	２	３
Ｔ２	$G9_{280}$	２	７	４３	１１	０	０
Ｔ２	Ｇ１０－４	０	７	６	０	１５	０
Ｔ２	Ｇ１０－５	２	７	２	１	７	０
実験２		６２０－１	６２０－２	６６０－２	１１４３	１２００	１２３５
６２４mel	無し	６０	６５	７４	４９	８２	１８
３９７mel	無し	２	６	０	０	０	０
Ｔ２	無し	１	１２	１	０	１	２
Ｔ２	Ｍ９－２	３６	８５	５０	３９	０	６０
Ｔ２	$G9_{154}$	５	２７	３２	１	７８	５
Ｔ２	$G10_{154}$	４	３１	３０	２	８５	３
Ｔ２	$G9_{209}$	２２	７４	５	４	１	３
Ｔ２	$G10_{208}$	３５	８０	７	１０	１	５
Ｔ２	$G9_{280}$*	２	９	７５	３４	１	２
実験３				６６０－３	１１４３	１２００	１２３５
６２４mel	無し			５２	１５	６６	４０
３９７mel	無し			５	３	７	４
Ｔ２	無し			７	３	７	４
Ｔ２	Ｍ９－２			５０	６２	４	９４
Ｔ２	$G9_{280}$			９９	３７	９	５
Ｔ２	Ｇ１０－４			０	０	５０	０
Ｔ２	Ｇ１０－５			１４	２	６	５

【０１９７】
１μｇ／ｍｌ（＊　１ｎｇ／ｍｌ）のＭＡＲＴ１エピトープＭ９－２（ＡＡＧＩＧＩＬＴＶ）及びｇｐ１００エピトープ$G9_{154}$（ＫＴＷＧＯＹＷＱＶ）、$G10_{154}$（ＫＴＷＧＱＹＷＧＶＬ）、$G9_{209}$（ＩＴＤＱＶＰＦＳＶ）、$G10_{208}$（ＴＩＴＤＱＶＰＦＳＶ）、$G9_{280}$（ＹＬＥＰＧＰＶＴＡ）、Ｇ１０－４（ＬＬＤＧＴＡＴＬＲＬ）、Ｇ１０－５（ＶＬＹＲＹＧＳＦＳＶ）と共にあらかじめインキュベートしたＴ２細胞のＴＩＬによる溶解は、４時間－^{51}Ｃｒ遊離アッセイで測定された。ＴＩＬ６２０－１、ＴＩＬ６２０－２またはＴＩＬ６６０－１、ＴＩＬ６６０－２、ＴＩＬ６６０－３は、自己移植患者に投与されたＴＩＬと同一ＴＩＬから増殖させたが、但し別々に培養した。６２４ｍｅｌは、ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$、ｇｐ１００$^{+}$、ＭＡＲＴ－１$^{+}$のメラノーマ細胞株であり、３９７ｍｅｌは、ＨＬＡ－Ａ２$^{-}$メラノーマ細胞株であり、Ｔ２細胞は、ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$Ｔ細胞－Ｂ細胞ハイブリドーマである。
下線：統計的に有意な溶解である。
【０１９８】

【表１３】

表１３　ヒトメラノーマエピトープのＨＬＡ－Ａ２．１に対する相対結合親和性

タンパク質	ペプチド	配列	５０％阻害（ｎＭ）[a]	標準に対する相対比[b]
gp100	$G9_{154}$	KTWGQYWQV	11	0.45
	$G10_{154}$	KTWGQYWQVL	1010	0.005
	$G9_{209}$	ITDQVPFSV	84	0.06
	$G10_{208}$	TITDQVPFSV	2080	0.0024
	$G9_{280}$	YLEPGPVTA	95	0.053
	G10－4	LLDGTATLRL	483	0.01
	G10－5	VLYRYGSFSV	13	0.38
MART－1	M9－2	AAGIGILTV	395	0.013
	M10－3	EAAGIGILTV	2272	0.0022
	M10－4	AAGIGILTVI	5555	0.0009
チロシナーゼ	$T9_{1}$	MLLAVLYCL	333	0.015
	$T9_{369}$	YMNGTMSQV	40	0.13

【０１９９】
ａ．標準放射性標識ＨＢＣ１８－２７ペプチドの５０％阻害に必要とされる試料ペプチド濃度。
ｂ．試料ペプチドの結合親和性と、標準ペプチド（５ｎＭで５０％阻害）の結合親和性の比。ペプチドは、高結合ペプチド（＜５０ｎＭ、比＞０．１で５０％阻害）；中程度結合ペプチド（５０～５００ｎＭ、比０．１～０．０１）；弱結合ペプチド（＞５００ｎＭ、比＜０．０１）と定義される。
【実施例５】
【０２００】
免疫原性の改良のためのメラノーマエピトープの改変
材料と方法
ペプチド合成とＨＬＡ－Ａ２．１結合アッセイ
ペプチドは固相法により多ペプチド合成機を用いて合成され、前に記載したようにＨＰＬＣによって精製された（非特許文献１１４）。ペプチドのＨＬＡ－Ａ２．１に対する相対結合は、界面活性剤で可溶化したＭＨＣ分子に対する放射性標識標準ペプチドの結合阻害に基づいて、前に記載したように測定された（非特許文献１１４）。手短にいうと、様々な濃度の試験ペプチド（１００μＭ～１ｎＭの範囲）を、５ｎＭの放射性標識Ｈｂｃ１８－２７（ＦＬＰＳＤＹＦＰＳＶ）（配列番号１２５）ペプチド及びＨＬＡ－Ａ２．１重鎖及びβ２－ミクログロブリンと共に室温で２日間プロテアーゼ阻害剤存在下でインキュ

ベートした。ＭＨＣに結合した放射能の割合はゲルろ過によって決定され、各々のペプチドについて５０％阻害する量が計算された。

【０２０１】

ペプチド特異的ＣＴＬの誘導

ＰＢＭＣはＨＬＡ－Ａ２$^{+}$メラノーマ患者及び正常な供与者の末梢血からフィコール－ハイパック勾配遠心によって分離され、新鮮な状態または低温保存の試料として用いられた。ペプチド特異的ＣＴＬ株は以下のように作製された。０日目に、ＰＢＭＣを１．５×１０^{6}／ｍｌの濃度で２４穴プレート（２ｍｌ／ウェル）内の１０％ヒトＡＢ血清、Ｌ－グルタミン、抗生物質（ＣＭ）を含むＩｓｃｏｖｅ’ｓ培地に１μｇ／ｍｌのペプチドが存在下で培養した。２日後、１２ＩＵ／ｍｌのインターロイキン２（ＩＬ－２）（カイロン社、カリフォルニア州エメリービル）を培養液に加えた。リンパ球は次のように毎週再刺激された：応答細胞を回収し、１度洗浄し、２４穴プレートに２．５×１０^{5}細胞／ｍｌの濃度になるようＣＭ存在下で移した。自家移植したＰＢＭＣを解凍し、ＰＢＳで２回洗浄し、５～８×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度にＣＭに再懸濁する。そして１μｇ／ｍｌペプチドと１５ｍｌの円錐型チューブ（５ｍｌ／チューブ）中において３時間３７℃でパルスした。これらのＰＢＭＣ（刺激細胞）に３０００ラドの線量の放射線を照射して、１度ＰＢＳで洗浄し、応答細胞に応答細胞：刺激細胞の比が１：３～１：１０の範囲で加えた。次の日、１２ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を培養液に加えた。これらのＣＴＬの活性は最低２ラウンド（１４日間）のペプチド刺激後に細胞毒性アッセイによって試験された。ＴＩＬからＣＴＬを作製するため、解離させた腫瘍の懸濁液を１～２日間、腫瘍細胞の接着を許す１０％ＦＣＳ／ＲＰＭＩ　１６４０培地で培養した。非接着画分から回収されたリンパ球は前に記載したようにペプチド特異的ＣＴＬの誘導に用いられた。

【０２０２】

ＣＴＬによる抗原認識の評価

^{51}Ｃｒ放出細胞毒性アッセイをＣＴＬによるペプチドとメラノーマ細胞の認識を検出するために行った。ペプチドの認識を解析するためＴ２細胞株を１μｇ／ｍｌのペプチドと共に３７℃で２時間あらかじめインキュベートした。そして、洗浄してから^{51}Ｃｒ放出細胞毒性アッセイに標的細胞として用いた。メラノーマ細胞株６２４ｍｅｌは我々の研究室において確立された（実施例１参照）。

【０２０３】

抗メラノーマＴ細胞の誘導のために、自然のメラノーマエピトープより抗原性の強いペプチドを作製する目的で、特異的ＭＨＣクラスＩ対立形質に結合するペプチドのコンセンサスモチーフをもとに、少なくとも１つのアミノ酸を変化させた様々なペプチドを作製した（非特許文献１１５、非特許文献５４、非特許文献５３、非特許文献５５）（表１４、表１５、表１６、及び表１７）。従来単離されたウイルス性エピトープ及び自然にプロセシングされたＨＬＡ－Ａ２．１結合ペプチドのほとんどは、第２の主要なアンカー部位にロイシンまたはメチオニンを、最後の主要なアンカー部位（優勢なアンカーアミノ酸）にバリンを含み、ＨＬＡ－Ａ２．１に対し高い結合親和性を持っていたが、単離されたＭＡＲＴ－１またはｇｐ１００メラノーマエピトープは、主要なアンカー部位にアラニン（Ｍ９－２の第２位及びＧ９－２８０の第９位）やスレオニン（Ｇ９－１５４及びＧ９－２０９の第２位）のような非優勢アミノ酸を含む。Ｍ９－２、Ｇ９－２０９及びＧ９－２８０は高親和性の結合ペプチドではない。ＨＬＡ－Ａ２のペプチドへの結合には重要であるが、Ｔ細胞受容体による認識にはそれほど重要でない第１位、２位、３位、または９位のアミノ酸を変化させることによって、ＨＬＡ－Ａ２．１により高い親和性で結合し、しかも天然のエピトープ特異的Ｔ細胞によって認識され得る人工ペプチドを作ることができる。

【０２０４】

修飾されたＭ９－２、Ｇ９－２８０、Ｇ９－２０９、Ｇ９－１５４ペプチドのうちで、Ｍ９－２－２Ｌ、Ｍ９－２－１Ｆ、Ｍ９－２－３Ｙ、Ｇ９－２８０－９Ｖ、Ｇ９－２８０－９Ｌ、Ｇ９－２８０－９Ｉ、Ｇ９－２８０－１Ｆ、Ｇ９－２０９－２Ｌ、Ｇ９－２０９－２Ｍ、Ｇ９－２０９－２Ｉ、Ｇ９－２０９－１Ｆ、Ｇ９－２０９－１Ｙ、Ｇ９－２０９

－１Ｗ２Ｌ、Ｇ９－２０９－１Ｆ２Ｌ、Ｇ９－２０９－１Ｙ２Ｌは、より高い結合親和性を持ち、元のメラノーマ反応性Ｔ細胞によって認識される（表１４、表１５、表１６、及び表１７）。Ｇ９－１５４－２Ｉ、Ｇ９－２０９－１Ｆ２ＬまたはＧ９－２８０－９Ｖ（表１８、表１９及び表２０）とともにパルスした自家移植ＰＢＭＣで刺激したＰＢＬは、天然エピトープ（Ｇ９－１５４、Ｇ９－２０９、Ｇ９－２８０）で刺激したＰＢＬより元のエピトープのみならずメラノーマ細胞（６２４ｍｅｌ）をもよく認識し、溶解させた。

【０２０５】

これらの結果は、修飾したペプチドは天然エピトープのかわりに抗腫瘍Ｔ細胞の誘導のために使うことが出来ることを示した。我々の研究で使われた特定のＴ細胞によって認識されなかったがＨＬＡ－Ａ２．１に対して高い結合親和性を持つ他のペプチドは、試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）または生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）で元のメラノーマエピトープを認識可能な異なるＴ細胞セットを誘導するであろう。これらの修飾したペプチドは、試験管内（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）での抗メラノーマＴ細胞の誘導、及びメラノーマ患者の治療またはメラノーマの予防のための患者に対する免疫付与に用いることが出来るだろう。

【０２０６】

【表１４】

表１４　改変ＭＡＲＴ－１　Ｍ９－２ペプチド

ペプチド	配　　列	ＨＬＡ－A2.1に対する結合親和性(nM)	M9－2応答性T細胞による認識
M9－2親	AAGIGILTV（配列番号4）	１０６４	＋
M9－2－2L	ALGIGILTV（配列番号５０）	１０	＋
M9－2－2M	AMGIGILTV（配列番号５１）	１４	－
M9－2－2I	AIGIGILTV（配列番号５２）	７７	－
M9－2－1W	WAGIGILTV（配列番号５３）	１３５１	＋
M9－2－1F	FAGIGILTV（配列番号５４）	２４４	＋
M9－2－1Y	YAGIGILTV（配列番号５５）	１３６	－
M9－2－3W	AAWIGILTV（配列番号５６）	６５	－
M9－2－3F	AAFIGILTV（配列番号５７）	６７	－
M9－2－3Y	AAYIGILTV（配列番号５８）	１０２	＋
M9－2－1K2L	KLGIGILTV（配列番号５９）	１４	－
M9－2－1K2M	KMGIGILTV（配列番号６０）	２７	－
M9－2－1K2I	KIGIGILTV（配列番号６１）	９４	－
M9－2－1W2L	WLGIGILTV（配列番号６２）	１１	－
M9－2－1F2L	FLGIGILTV（配列番号６３）	1.8	－
M9－2－1Y2L	YLGIGILTV（配列番号６４）	3.2	－
M9－2－2L3W	ALWIGILTV（配列番号６５）	5.5	－
M9－2－2L3F	ALFIGILTV（配列番号６６）	1.4	－
M9－2－2L3Y	ALYIGILTV（配列番号６７）	3.7	－

【０２０７】

【表１５】

表１５　改変ｇｐ１００　Ｇ９－１５４ペプチド

ペプチド	配　　列	HLA－A2.1に対する結合親和性(nM)	G9-154応答性T細胞による認識
G9-154親	KTWGQYWQV (配列番号４６)	5.7	+
G9-154-2L	KLWGQYWQV (配列番号６８)	2	+
G9-154-2M	KMWGQYWQV (配列番号６９)	6.5	+
G9-154-2I	KIWGQYWQV (配列番号７０)	3	+
G9-154-1W	WTWGQYWQV (配列番号７１)	60	−
G9-154-1F	FTWGQYWQV (配列番号７２)	1.6	−
G9-154-1Y	YTWGQYWQV (配列番号７３)	2.5	−
G9-154-1A	ATWGQYWQV (配列番号７４)	5.2	+
G9-154-1L	LTWGQYWQV (配列番号７５)	3.4	+
G9-154-3Y	KTYGQYWQV (配列番号７６)	30	+
G9-154-3F	KTFGQYWQV (配列番号７７)	21	+
G9-154-1A2L	ALWGQYWQV (配列番号７８)	2.3	+
G9-154-1L2L	LLWGQYWQV (配列番号７９)	1.6	+
G9-154-1W2L	WLWGQYWQV (配列番号８０)	2.8	−
G9-154-1F2L	FLWGQYWQV (配列番号８１)	2.6	−
G9-154-1Y2L	YLWGQYWQV (配列番号８２)	1.7	−

【０２０８】

【表１６】

表１６　改変ｇｐ１００　Ｇ９－２０９ペプチド

ペプチド	配　　列	HLA－A2.1に対する結合親和性(nM)*	G9-209応答性T細胞による認識
G9-209親	ITDQVPFSV (配列番号４８)	１７２	＋
G9-209-2L	ILDQVPFSV (配列番号８３)	3.3	＋
G9-209-2M	IMDQVPFSV (配列番号８４)	１９	＋
G9-209-2I	IIDQVPFSV (配列番号８５)	４０	＋
G9-209-1F	FTDQVPFSV (配列番号８６)	６１	＋
G9-209-1W	WTDQVPFSV (配列番号８７)	７１１	＋
G9-209-1Y	YTDQVPFSV (配列番号８８)	８５	＋
G9-209-3W	ITWQVPFSV (配列番号８９)	３４	－
G9-209-3F	ITFQVPFSV (配列番号９０)	６６	－
G9-209-3Y	ITYQVPFSV (配列番号９１)	３３	－
G9-209-3A	ITAQVPFSV (配列番号９２)	９５	－
G9-209-3M	ITMQVPFSV (配列番号９３)	４０	－
G9-209-3S	ITSQVPFSV (配列番号９４)	６４９	－
G9-209-2L3W	ILWQVPFSV (配列番号９５)	1.7	－
G9-209-2L3F	ILFQVPFSV (配列番号９６)	2	－
G9-209-2L3Y	ILYQVPFSV (配列番号９７)	5	－
G9-209-2L3A	ILAQVPFSV (配列番号９８)	１１	－
G9-209-2L3M	ILMQVPFSV (配列番号９９)	7.6	－
G9-209-2L3S	ILSQVPFSV (配列番号１００)	２０	－
G9-209-1W2L	WLDQVPFSV (配列番号１０１)	１２	＋
G9-209-1F2L	FLDQVPFSV (配列番号１０２)	2.2	＋
G9-209-1Y2L	YLDQVPFSV (配列番号１０３)	2.3	＋

【０２０９】

＊標準放射性標識ペプチドＨＢＣ１８－２７を５０％阻害するのに必要な試料ペプチドの濃度。ペプチドは、高結合ペプチド（＜５０ｎＭで５０％阻害）、中結合ペプチド（５０～５００ｎＭ）、および低結合ペプチド（＞５００ｎＭ）として定義される（実施例４参照）。

【０２１０】

【表１７】

表１７　改変ｇｐ１００　Ｇ９－２８０ペプチド

ペプチド	配　　列	HLA－A2.1に対する結合親和性(nM)	G9-280応答性T細胞による認識
G9-280親	YLEPGPVTA (配列番号４０)	455	+
G9-280-9V	YLEPGPVTV (配列番号１０４)	48	+
G9-280-9L	YLEPGPVTL (配列番号１０５)	88	+
G9-280-9I	YLEPGPVTI (配列番号１０６)	65	+
G9-280-1F	FLEPGPVTA (配列番号１０７)	125	+
G9-280-1W	WLEPGPVTA (配列番号１０８)	833	+
G9-280-3Y	YLYPGPVTA (配列番号１０９)	17	−
G9-280-3W	YLWPGPVTA (配列番号１１０)	3.2	−
G9-280-3F	YLFPGPVTA (配列番号１１１)	3.2	−
G9-280-3M	YLMPGPVTA (配列番号１１２)	4.3	−
G9-280-3S	YLSPGPVTA (配列番号１１３)	42	−
G9-280-3A	YLAPGPVTA (配列番号１１４)	9.3	−
G9-280-3M9V	YLMPGPVTV (配列番号１１５)	12	−
G9-280-3S9V	YLSPGPVTV (配列番号１１６)	23	−
G9-280-3A9V	YLAPGPVTV (配列番号１１７)	15	−
G9-280-3Y9V	YLYPGPVTV (配列番号１１８)	8.9	−
G9-280-3F9V	YLFPGPVTV (配列番号１１９)	5.8	−
G9-280-3W9V	YLWPGPVTV (配列番号１２０)	7.4	−

【０２１１】

【表１８】

表１８　改変Ｇ９－１５４ペプチドを使用した抗メラノーマＣＴＬの誘導

エフェクター　Ｔ細胞

標　的	Ｇ９－１５４で刺激されたＰＢＬ	Ｇ９－１５４－２１で刺激されたＰＢＬ
	特異的溶解％（Ｅ：Ｔ＝４０：１）	
Ｔ２	１１	１
Ｔ２＋Ｇ９－１５４	１４	３７
Ｔ２＋Ｇ９－１５４－２１	８	３８
６２４ｍｅｌ	５	２３

【０２１２】
^{51}Ｃｒ放出アッセイは、ペプチドであらかじめインキュベートした自家移植ＰＢＭＣで４回刺激した後に行った。
【０２１３】

【表１９】

表１９　改変Ｇ９－２０９ペプチドを使用した抗メラノーマＣＴＬの誘導

エフェクター　Ｔ細胞

標　的	Ｇ9－２０９で刺激されたＰＢＬ	Ｇ9－２０９－１Ｆ２Ｌで刺激されたＰＢＬ
	特異的溶解％（Ｅ：Ｔ＝４０：１）	
Ｔ２	0	0
Ｔ２＋Ｇ９－２０９	6	８５
Ｔ２＋Ｇ９－２０９－１Ｆ２Ｌ	1	８６
６２４ｍｅｌ	4	６３

【０２１４】
^{51}Ｃｒ放出アッセイは、ペプチドであらかじめインキュベートした自家移植ＰＢＭＣで４回刺激した後に行った。
【０２１５】

【表２０】

表２０　改変Ｇ９－２８０ペプチドを使用した抗メラノーマＣＴＬの誘導

エフェクター　Ｔ細胞

標　的	Ｇ９－２８０で刺激されたＰＢＬ	Ｇ９－２８０－９Ｖで刺激されたＰＢＬ
	特異的溶解％（Ｅ：Ｔ＝４０：１）	
Ｔ２	３	０
Ｔ２＋Ｇ９－２８０	１１	８７
Ｔ２＋Ｇ９－２８０－９Ｖ	８	５８
６２４ｍｅｌ	１１	７１

【０２１６】

^{51}Ｃｒ放出アッセイは、ペプチドであらかじめインキュベートした自家移植ＰＢＭＣで４回刺激した後に行った。

【実施例６】

【０２１７】

哺乳動物におけるメラノーマの治療のためのＭＡＲＴ－１ワクチン

ＭＡＲＴ－１ワクチンは、メラノーマにくるしむ哺乳動物を治療するのに効果的であろう。例えば、ＭＡＲＴ－１は個体に投与できる。哺乳動物は、本明細書中に記載したＭＡＲＴ－１タンパク質、ペプチドまたは改変ペプチド約１ｍｇ～約１００ｍｇの範囲で免疫することができる。または、哺乳動物、好適にはヒトは、ワクシニアウイルス、アデノウイルスまたは鶏ポックスウイルスのようなウイルスベクター中に挿入したＭＡＲＴ－１核酸配列で免疫することができる。免疫原性ＭＡＲＴ－１ペプチドまたは改変ペプチドまたはその類似体に対応するＭＡＲＴ－１核酸配列を持つウイルス粒子を、哺乳動物、好適にはヒトあたり約10^{6}～約10^{11}個の範囲で投与することができる。哺乳動物は、免疫原に対する抗体について、または免疫原を認識する細胞毒性リンパ球（ＣＴＬ）の増加について従来の方法によって、または活動性疾患の臨床的症候の緩和についてモニターされる。評価の対象となる特定パラメータには、ワクチン抗原または腫瘍退縮を認識する免疫細胞の産生が含まれる。このようなワクチンは、予防的にまたは治療的に投与される。哺乳動物は、また、レトロウイルスベクターに挿入したｇｐ－１００核酸配列またはＧＰ－１００免疫原性ペプチドまたは改変ペプチドまたはその類似体で免疫できる。使用されるレトロウイルス中の抗原の示唆される量の範囲は、哺乳動物、好適にはヒトあたりウイルス粒子約10^{6}～約10^{11}個である。レトロウイルスワクチンの反応および効能は、上述したように評価される。

【実施例７】

【０２１８】

メラノーマに苦しむ哺乳動物を治療的に処置するための、メラノーマ抗原由来免疫原性ペプチドに対して感作されたリンパ球の使用

メラノーマ抗原に対してあらかじめ感作されたＴリンパ球は、メラノーマに苦しむ哺乳動物を治療的に処置するのに効果的である。Ｔリンパ球は、末梢血リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球より単離し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＭＡＲＴ－１タンパク質またはペプチドにさらす。Ｔリンパ球は、末梢血またはメラノーマ懸濁液から単離し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養する（非特許文献８１）。Ｔリンパ球は、約１～約１０ｍｇ／ｍｌの濃度にて約１～１６時間のあいだＭＡＲＴ－１ペプチドＡＡＧＩＧＩＬＴＶにさらす。抗原にさらされたＴリンパ球は、哺乳動物、好適にはヒトに約10^{9}～約10^{12}リンパ球／哺乳動物にて投与される。あるいは、Ｔリンパ球は改変ＭＡＲＴ－１ペプチドにさらされる。リンパ球は、静脈内、腹膜内または傷害部に投与される。この処置は、サイトカイン、放射線療法、メラノーマ病変の外科的切除および化学療法薬、養子免疫法によるＴリンパ球治療のような他の治療的処置とともに同時に投与できる。または、Ｔリンパ球を、ｇｐ１００免疫原ペプチドまたは本明細書中に記載した改変免疫原ペプチドにさらしてもよい。

【０２１９】

寄託した態様は本発明の１つの側面についての単なる例示であり、本発明は寄託した核酸配列の範囲に限らず、機能的に同等であるいかなる配列も本発明の範囲内である。実際に、本明細書中に示し、記載したものに加えて発明を様々に改変することは、前の記載および以下の図により当業者には可能である。このような改変は、請求の範囲内である。

［配列表］

【表１－１】

配列表

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

(B) STREET: 6011 EXECUTIVE BOULEVARD-BOX 13

(C) CITY: ROCKVILLE

(D) STATE: MARYLAND

(E) COUNTRY: USA

(F) POSTAL CODE: 20852

(ii) TITLE OF INVENTION: MELANOMA ANTIGENS AND THEIR USE IN DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC METHODS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 126

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: MORGAN & FINNEGAN

(B) STREET: 345 PARK AVENUE

(C) CITY: NEW YORK

(D) STATE: NEW YORK

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 10154

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: FLOPPY DISK

(B) COMPUTER: IBM PC COMPATIBLE

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: ASCII

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

【表１－２】

(A) APPLICATION NUMBER: PCT/US95/05063

(B) FILING DATE: 21-APR-1995

(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US/08/417,174

(B) FILING DATE: 05-APR-1995

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US/08/231,565

(B) FILING DATE: 22-APR-1994

(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: WILLIAN S. FEILER

(B) REGISTRATION NUMBER: 26,728

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 2026-4124

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (212)758-4800

(B) TELEFAX: (212)751-6849

(C) TELEX: 421792

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 1:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 1559

(B) 型: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: SEQ ID NO: 1:

AGCAGACAGA GGACTCTCAT TAAGGAAGGT GTCCTGTGCC 40

CTGACCCTAC AAGATGCCAA GAGAAGATGC TCACTTCATC 80

TATGGTTACC CCAAGAAGGG GCACGGCCAC TCTTACACCA 120

【表１－３】

CGGCTGAAGA GGCCGCTGGG ATCGGCATCC TGACAGTGAT 160
CCTGGGAGTC TTACTGCTCA TCGGCTGTTG GTATTGTAGA 200
AGACGAAATG GATACAGAGC CTTGATGGAT AAAAGTCTTC 240
ATGTTGGCAC TCAATGTGCC TTAACAAGAA GATGCCCACA 280
AGAAGGGTTT GATCATCGGG ACAGCAAAGT GTCTCTTCAA 320
GAGAAAAACT GTGAACCTGT GGTTCCCAAT GCTCCACCTG 360
CTTATGAGAA ACTCTCTGCA GAACAGTCAC CACCACCTTA 400
TTCACCTTAA GAGCCAGCGA GACACCTGAG ACATGCTGAA 440
ATTATTTCTC TCACACTTTT GCTTGAATTT AATACAGACA 480
TCTAATGTTC TCCTTTGGAA TGGTGTAGGA AAAATGCAAG 520
CCATCTCTAA TAATAAGTCA GTGTTAAAAT TTTAGTAGGT 560
CCGCTAGCAG TACTAATCAT GTGAGGAAAT GATGAGAAAT 600
ATTAAATTGG GAAAACTCCA TCAATAAATG TTGCAATGCA 640
TGATACTATC TGTGCCAGAG GTAATGTTAG TAAATCCATG 680
GTGTTATTTT CTGAGAGACA GAATTCAAGT GGGTATTCTG 720
GGGCCATCCA ATTTCTCTTT ACTTGAAATT TGGCTAATAA 760
CAAACTAGTC AGGTTTTCGA ACCTTGACCG ACATGAACTG 800
TACACAGAAT TGTTCCAGTA CTATGGAGTG CTCACAAAGG 840
ATACTTTTAC AGGTTAAGAC AAAGGGTTGA CTGGCCTATT 880
TATCTGATCA AGAACATGTC AGCAATGTCT CTTTGTGCTC 920
TAAAATTCTA TTATACTACA ATAATATATT GTAAAGATCC 960
TATAGCTCTT TTTTTTTGAG ATGGAGTTTC GCTTTTGTTG 1000
CCCAGGCTGG AGTGCAATGG CGCGATCTTG GCTCACCATA 1040
ACCTCCGCCT CCCAGGTTCA AGCAATTCTC CTGCCTTAGC 1080
CTCCTGAGTA GCTGGGATTA CAGGCGTGCG CCACTATGCC 1120
TGACTAATTT TGTAGTTTTA GTAGAGACGG GGTTTCTCCA 1160
TGTTGGTCAG GCTGGTCTCA AACTCCTGAC CTCAGGTGAT 1200
CTGCCCGCCT CAGCCTCCCA AAGTGCTGGA ATTACAGGCG 1240
TGAGCCACCA CGCCTGGCTG GATCCTATAT CTTAGGTAAG 1280

【表１－４】

ACATATAACG CAGTCTAATT ACATTTCACT TCAAGGCTCA 1320

ATGCTATTCT AACTAATGAC AAGTATTTTC TACTAAACCA 1360

GAAATTGGTA GAAGGATTTA AATAAGTAAA AGCTACTATG 1400

TACTGCCTTA GTGCTGATGC CTGTGTACTG CCTTAAATGT 1440

ACCTATGGCA ATTTAGCTCT CTTGGGTTCC CAAATCCCTC 1480

TCACAAGAAT GTGCAGAAGA AATCATAAAG GATCAGAGAT 1520

TCTGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1559

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 2:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 118

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: Protein

(xi) 配列: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Arg Glu Asp Ala His Phe Ile Tyr Gly Tyr Pro Lys
1 5 10

Lys Gly His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala
15 20 25

Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu
30 35 40

Ile Gly Cys Trp Tyr Cys Arg Arg Arg Asn Gly Tyr Arg Ala
45 50 55

Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val Gly Thr Gln Cys Ala Leu
60 65 70

Thr Arg Arg Cys Pro Gln Glu Gly Phe Asp His Arg Asp Ser
75 80

Lys Val Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val Val Pro
85 90 95

【表１－５】

Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser
100 105 110
Pro Pro Pro Tyr Ser Pro
115

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 3:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 3:

Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 4:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 4:

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 5:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

【表１－６】

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 5:

Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 6:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 6:

Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 7:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 7:

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 8:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

【表１－７】

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 8:

Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 9:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 9:

Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 10:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 10:

Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu Ile

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 11:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

【表１－８】

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 11:

Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 12:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 12:

Ser Leu His Val Gly Thr Gln Cys Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 13:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 13:

Pro Val Val Pro Asn Ala Pro Pro Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 14:

(i) 配列の特性:

【表１－９】

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 14:

Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 15:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 15:

Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 16:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 16:

Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 17:

【表１－１０】

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 17:

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 18:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 18:

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 19:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 19:

Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu

1 5 10

【表１－１１】

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 20:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 20:

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 21:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 21:

Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 22:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 22:

Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu Ile

【表１－１２】

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 23:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 23:

Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 24:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 24:

Ser Leu His Val Gly Thr Gln Cys Ala Leu

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 25:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 25:

【表１－１３】

Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val
1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 26:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 2172

(B) 型: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: SEQ ID NO: 26:

GTCGACGGCC ATTACCAATC GCGACCGGGA AGAACACAAT 40
GGATCTGGTG CTAAAAAGAT GCCTTCTTCA TTTGGCTGTG 80
ATAGGTGCTT TGCTGGCTGT GGGGGCTACA AAAGTACCCA 120
GAAACCAGGA CTGGCTTGGT GTCTCAAGGC AACTCAGAAC 160
CAAAGCCTGG AACAGGCAGC TGTATCCAGA GTGGACAGAA 200
GCCCAGAGAC TTGACTGCTG GAGAGGTGGT CAAGTGTCCC 240
TCAAGGTCAG TAATGATGGG CCTACACTGA TTGGTGCAAA 280
TGCCTCCTTC TCTATTGCCT TGAACTTCCC TGGAAGCCAA 320
AAGGTATTGC CAGATGGGCA GGTTATCTGG GTCAACAATA 360
CCATCATCAA TGGGAGCCAG GTGTGGGGAG GACAGCCAGT 400
GTATCCCCAG GAAACTGACG ATGCCTGCAT CTTCCCTGAT 440
GGTGGACCTT GCCCATCTGG CTCTTGGTCT CAGAAGAGAA 480
GCTTTGTTTA TGTCTGGAAG ACCTGGGGCC AATACTGGCA 520
ATTTCTAGGG GGCCCAGTGT CTGGGCTGAG CATTGGGACA 560
GGCAGGGCAA TGCTGGGCAC ACACACCATG GAAGTGACTG 600
TCTACCATCG CCGGGGATCC CGGAGCTATG TGCCTCTTGC 640
TCATTCCAGC TCAGCCTTCA CCATTACTGA CCAGGTGCCT 680
TTCTCCGTGA GCGTGTCCCA GTTGCGGGCC TTGGATGGAG 720
GGAACAAGCA CTTCCTGAGA AATCAGCCTC TGACCTTTGC 760

【表１－１４】

CCTCCAGCTC CATGACCCCA GTGGCTATCT GGCTGAAGCT 800
GACCTCTCCT ACACCTGGGA CTTTGGAGAC AGTAGTGGAA 840
CCCTGATCTC TCGGGCACTT GTGGTCACTC ATACTTACCT 880
GGAGCCTGGC CCAGTCACTG CCCAGGTGGT CCTGCAGGCT 920
GCCATTCCTC TCACCTCCTG TGGCTCCTCC CCAGTTCCAG 960
GCACCACAGA TGGGCACAGG CCAACTGCAG AGGCCCCTAA 1000
CACCACAGCT GGCCAAGTGC CTACTACAGA AGTTGTGGGT 1040
ACTACACCTG GTCAGGCGCC AACTGCAGAG CCCTCTGGAA 1080
CCACATCTGT GCAGGTGCCA ACCACTGAAG TCATAAGCAC 1120
TGCACCTGTG CAGATGCCAA CTGCAGAGAG CACAGGTATG 1160
ACACCTGAGA AGGTGCCAGT TTCAGAGGTC ATGGGTACCA 1200
CACTGGCAGA GATGTCAACT CCAGAGGCTA CAGGTATGAC 1240
ACCTGCAGAG GTATCAATTG TGGTGCTTTC TGGAACCACA 1280
GCTGCACAGG TAACAACTAC AGAGTGGGTG GAGACCACAG 1320
CTAGAGAGCT ACCTATCCCT GAGCCTGAAG GTCCAGATGC 1360
CAGCTCAATC ATGTCTACGG AAAGTATTAC AGGTTCCCTG 1400
GGCCCCCTGC TGGATGGTAC AGCCACCTTA AGGCTGGTGA 1440
AGAGACAAGT CCCCCTGGAT TGTGTTCTGT ATCGATATGG 1480
TTCCTTTTCC GTCACCCTGG ACATTGTCCA GGGTATTGAA 1520
AGTGCCGAGA TCCTGCAGGC TGTGCCGTCC GGTGAGGGGG 1560
ATGCATTTGA GCTGACTGTG TCCTGCCAAG GCGGGCTGCC 1600
CAAGGAAGCC TGCATGGAGA TCTCATCGCC AGGGTGCCAG 1640
CCCCCTGCCC AGCGGCTGTG CCAGCCTGTG CTACCCAGCC 1680
CAGCCTGCCA GCTGGTTCTG CACCAGATAC TGAAGGGTGG 1720
CTCGGGGACA TACTGCCTCA ATGTGTCTCT GGCTGATACC 1760
AACAGCCTGG CAGTGGTCAG CACCCAGCTT ATCATGCCTG 1800
GTCAAGAAGC AGGCCTTGGG CAGGTTCCGC TGATCGTGGG 1840
CATCTTGCTG GTGTTGATGG CTGTGGTCCT TGCATCTCTG 1880
ATATATAGGC GCAGACTTAT GAAGCAAGAC TTCTCCGTAC 1920

【表１－１５】

CCCAGTTGCC ACATAGCAGC AGTCACTGGC TGCGTCTACC 1960

CCGCATCTTC TGCTCTTGTC CCATTGGTGA GAACAGCCCC 2000

CTCCTCAGTG GGCAGCAGGT CTGAGTACTC TCATATGATG 2040

CTGTGATTTT CCTGGAGTTG ACAGAAACAC CTATATTTCC 2080

CCCAGTCTTC CCTGGGAGAC TACTATTAAC TGAAATAAAT 2120

ACTCAGAGCC TGAAAAAAAA TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2160

AAAAAAAAAA AA 2172

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 27:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 661

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: Protein

(xi) 配列: SEQ ID NO: 27:

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu
1 5 10

Ala Val Ile Gly Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr
15 20

Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val Ser
25 30 35

Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu
40 45

Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Cys
50 55 60

Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn
65 70

Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala Asn Ala Ser Phe
75 80

【表１－１６】

Ser Ile Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val
85 90 95
Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn Asn Thr
100 105
Ile Ile Asn Gly Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro
110 115 120
Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp Ala Cys Ile Phe
125 130
Pro Asp Gly Gly Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser
135 140
Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp
145 150 155
Gly Gln Tyr Trp Gln Phe Leu Gly Gly Pro Val Ser
160 165
Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly
170 175 180
Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg
185 190
Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser
195 200
Ser Ala Phe Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser
205 210 215
Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala Leu Asp Gly Gly
220 225
Asn Lys His Phe Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe
230 235 240
Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala
245 250
Glu Ala Asp Leu Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp

【表１－１７】

255 260
Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg Ala Leu Val Val
260 265 270
Thr His Thr Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
275 280
Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser
285 290 295
Cys Gly Ser Ser Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly
300 305
His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro Asn Thr Thr Ala
310 315
Gly Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr
320 325 330
Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro Ser Gly Thr
335 340
Thr Ser Val Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Ile Ser
345 350 355
Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr Ala Glu Ser Thr
360 365
Gly Met Thr Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val
370 375
Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu
380 385 390
Ala Thr Gly Met Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val
395 400
Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala Gln Val Thr Thr
405 410 415
Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro
420 425

【表１－１８】

Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile
430 435
Met Ser Thr Glu Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro
440 445 450
Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys
455 460
Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
465 470 475
Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly
480 490
Ile Glu Ser Ala Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser
495 500
Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val Ser Cys
505 510 515
Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile
520 525
Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu
530 535 540
Cys Gln Pro Val Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu
545 550
Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly Gly Ser Gly Thr
555 560
Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser
565 570 575
Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile Met Pro Gly
580 585
Gln Glu Ala Gly Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val
590 595 600
Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala Val Val Leu Ala

【表１－１９】

605 610

Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp

615 620

Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His

625 630 635

Trp Leu Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro

640 645

Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Gln

650 655 660

Val

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 28:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 7

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: Protein

(xi) 配列: SEQ ID NO: 28:

Val Pro Gly Ile Leu Leu Thr

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 29:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 7

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: Protein

(xi) 配列: SEQ ID NO: 29:

Leu Leu Ser Gly Gln Gln Val

【表１－２０】

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 30:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 12

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: Protein

(xi) 配列: SEQ ID NO: 30:

Pro Pro Gln Trp Ala Ala Gly Leu Ser Thr Leu Ile

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 31:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 31:

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 32:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 32:

【表１－２１】

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 33:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 33:

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 34:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 34:

Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val
1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 35:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

【表１－２２】

(xi) 配列: SEQ ID NO: 35:

Ala Leu Asp Gly Gly Asn Lys His Phe Leu

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 36:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 36:

Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 37:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 37:

Val Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 39:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

【表１－２３】

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 39:

Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 40:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 40:

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 41:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 41:

Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 42:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 58

(B) 型: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 二本鎖

【表１－２４】

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: SEQ ID NO: 42:

GGACAGGCCG AGGCGGCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 40

TTTTTTTTTT TTTTTTTT 58

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 43:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 12

(B) 型: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: SEQ ID NO: 43:

CCAATCGCGA CC 12

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 44:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 15

(B) 型: ヌクレオチド

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: SEQ ID NO: 44:

GGTCGCGATT GGTAA 15

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 45:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

【表１－２５】

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 45:

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 46:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 46:

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 47:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 47:

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val Leu

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 48:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

【表１－２６】

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 48:

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 49:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 49:

Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5 10

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 50:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 50:

Ala Leu Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 51:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

【表１－２７】

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 51:

Ala Met Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 52:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 52:

Ala Ile Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 53:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 53:

Trp Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 54:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

【表１－２８】

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 54:

Phe Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 55:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 55:

Tyr Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 56:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 56:

Ala Ala Trp Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 57:

(i) 配列の特性:

【表１－２９】

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 57:

Ala Ala Phe Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 58:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 58:

Ala Ala Tyr Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 59:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 59:

Lys Leu Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 60:

【表１－３０】

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 60:

Lys Met Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 61:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 61:

Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 62:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 62:

Trp Leu Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

【表１－３１】

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 63:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 63:

Phe Leu Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 64:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 64:

Tyr Leu Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 65:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 65:

Ala Leu Trp Ile Gly Ile Leu Thr Val

【表１－３２】

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 66:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 66:

Ala Leu Phe Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 67:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 67:

Ala Leu Tyr Ile Gly Ile Leu Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 68:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 68:

【表１－３３】

Lys Leu Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 69:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 69:

Lys Met Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 70:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 70:

Lys Ile Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 71:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

【表１－３４】

(xi) 配列: SEQ ID NO: 71:

Trp Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 72:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 72:

Phe Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 73:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 73:

Tyr Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 74:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

【表１－３５】

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 74:

Ala Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 75:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 75:

Leu Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 76:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 76:

Lys Thr Tyr Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 77:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

【表１－３６】

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 77:

Lys Thr Phe Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 78:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 78:

Ala Leu Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 79:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 79:

Leu Leu Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 80:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

【表１－３７】

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 80:

Trp Leu Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 81:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 81:

Phe Leu Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 82:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 82:

Tyr Leu Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 83:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

【表１－３８】

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 83:

Ile Leu Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 84:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 84:

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 85:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 85:

Ile Ile Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 86:

(i) 配列の特性:

【表１－３９】

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 86:

Phe Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 87:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 87:

Trp Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 88:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 88:

Tyr Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 89:

【表１－４０】

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 89:

Ile Thr Trp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 90:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 90:

Ile Thr Phe Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 91:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 91:

Ile Thr Tyr Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

【表１－４１】

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 92:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 92:

Ile Thr Ala Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 93:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 93:

Ile Thr Met Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 94:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 94:

Ile Thr Ser Gln Val Pro Phe Ser Val

【表１－４２】

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 95:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 95:

Ile Leu Trp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 96:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 96:

Ile Leu Phe Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 97:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 97:

【表１－４３】

Ile Leu Tyr Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 98:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 98:

Ile Leu Ala Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 99:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 99:

Ile Leu Met Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 100:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

【表１－４４】

(xi) 配列: SEQ ID NO: 100:

Ile Leu Ser Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 101:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 101:

Trp Leu Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 102:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 102:

Phe Leu Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 103:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

【表１－４５】

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 103:

Tyr Leu Asp Gln Val Pro Phe Ser Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 104:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 104:

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 105:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 105:

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Leu

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 106:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

【表１－４６】

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 106:

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ile

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 107:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 107:

Phe Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 108:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 108:

Trp Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 109:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

【表１－４７】

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 109:

Tyr Leu Tyr Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 110:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 110:

Tyr Leu Trp Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 111:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 111:

Tyr Leu Phe Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 112:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

【表１－４８】

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 112:

Tyr Leu Met Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 113:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 113:

Tyr Leu Ser Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 114:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 114:

Tyr Leu Ala Pro Gly Pro Val Thr Ala

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 115:

(i) 配列の特性:

【表１－４９】

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 115:

Tyr Leu Met Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 116:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 116:

Tyr Leu Ser Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 117:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 117:

Tyr Leu Ala Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 118:

【表１－５０】

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 118:

Tyr Leu Tyr Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 119:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 119:

Tyr Leu Phe Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 120:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 120:

Tyr Leu Trp Pro Gly Pro Val Thr Val

1 5

【表１－５１】

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 121:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 661

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: Protein

(xi) 配列: SEQ ID NO: 121:

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

【表１－５２】

125 130
Pro Asp Gly Gly Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser
135 140
Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp
145 150 155
Gly Gln Tyr Trp Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser
160 165
Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly
170 175 180
Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg
185 190
Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser
195 200
Ser Ala Phe Thr Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser
205 210 215
Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala Leu Asp Gly Gly
220 225
Asn Lys His Phe Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe
230 235 240
Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala
245 250
Glu Ala Asp Leu Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp
255 260
Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg Ala Leu Val Val
260 265 270
Thr His Thr Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
275 280
Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser
285 290 295

【表１－５３】

Cys Gly Ser Ser Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly
300 305
His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro Asn Thr Thr Ala
310 315
Gly Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr
320 325 330
Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro Ser Gly Thr
335 340
Thr Ser Val Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Ile Ser
345 350 355
Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr Ala Glu Ser Thr
360 365
Gly Met Thr Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val
370 375
Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu
380 385 390
Ala Thr Gly Met Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val
395 400
Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala Gln Val Thr Thr
405 410 415
Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro
420 425
Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile
430 435
Met Ser Thr Glu Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro
440 445 450
Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys
455 460
Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr

【表１－５４】

465 470 475
Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly
480 490
Ile Glu Ser Ala Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser
495 500
Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu Thr Val Ser Cys
505 510 515
Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile
520 525
Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu
530 535 540
Cys Gln Pro Val Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu
545 550
Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly Gly Ser Gly Thr
555 560
Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser
565 570 575
Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile Met Pro Gly
580 585
Gln Glu Ala Gly Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val
590 595 600
Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala Val Val Leu Ala
605 610
Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp
615 620
Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His
625 630 635
Trp Leu Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro
640 645

【表１－５５】

Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Gln
650 655 660
Val

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 122:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 122:

Xaa Xaa Xaa Ile Gly Ile Leu Thr Xaa
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 123:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 123:

Xaa Xaa Xaa Gly Gln Tyr Trp Gln Xaa
1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 124:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

【表１－５６】

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 124:

Xaa Xaa Xaa Gln Val Pro Phe Ser Xaa

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 125:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 9

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 125:

Xaa Xaa Xaa Pro Gly Pro Val Thr Xaa

1 5

(2) 配列情報 SEQ ID NO: 126:

(i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 10

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: SEQ ID NO: 126:

Phe Leu Pro Ser Asp Tyr Phe Pro Ser Val

1 5 10

【図１】

```
   1  AGCAGACAGAGGACTCTCATTAAGGAAGG TGTCCTGTGCCCTGACCCTACAAGATGCCA   59
                                                            MetPro     2

  60  AGAGAAGATGCTCACTTCATCTATGGTTAC CCCAAGAAGGGGCACGGCCACTCTTACACC  119
   3  ArgGluAspAlaHisPheIleTyrGlyTyr ProLysLysGlyHisGlyHisSerTyrThr   22

 120  ACGGCTGAAGAGGCCGCTGGGATCGGCATC CTGACAGTGATCCTGGGAGTCTTACTGCTC  179
  23  ThrAlaGluGluAlaAlaGlyIleGlyIle LeuThrValIleLeuGlyValLeuLeuLeu   42

 180  ATCGGCTGTTGGTATTGTAGAAGACGAAAT GGATACAGAGCCTTGATGGATAAAAGTCTT  239
  43  IleGlyCysTrpTyrCysArgArgArgAsn GlyTyrArgAlaLeuMetAspLysSerLeu   62

 240  CATGTTGGCACTCAATGTGCCTTAACAAGA AGATGCCCACAAGAAGGGTTTGATCATCGG  299
  63  HisValGlyThrGlnCysAlaLeuThrArg ArgCysProGlnGluGlyPheAspHisArg   82

 300  GACAGCAAAGTGTCTCTTCAAGAGAAAAAC TGTGAACCTGTGGTTCCCAATGCTCCACCT  359
  83  AspSerLysValSerLeuGlnGluLysAsn CysGluProValValProAsnAlaProPro  102

 360  GCTTATGAGAAACTCTCTGCAGAACAGTCA CCACCACCTTATTCACCTTAAGAGCCAGCG  419
 103  AlaTyrGluLysLeuSerAlaGluGlnSer ProProProTyrSerPro

 420  AGACACCTGAGACATGCTGAAATTATTTCT CTCACACTTTTGCTTGAATTTAATACAGAC  479

 480  ATCTAATGTTCTCCTTTGGAATGGTGTAGG AAAAATGCAAGCCATCTCTAATAATAAGTC  539
 540  AGTGTTAAAATTTTAGTAGGTCCGCTAGCA GTACTAATCATGTGAGGAAATGATGAGAAA  599
 600  TATTAAATTGGGAAAACTCCATCAATAAAT GTTGCAATGCATGATACTATCTGTGCCAGA  659
 660  GGTAATGTTAGTAAATCCATGGTGTTATTT TCTGAGAGACAGAATTCAAGTGGGTATTCT  719
 720  GGGGCCATCCAATTTCTCTTTACTTGAAAT TTGGCTAATAACAAACTAGTCAGGTTTTCG  779
 780  AACCTTGACCGACATGAACTGTACACAGAA TTGTTCCAGTACTATGGAGTGCTCACAAAG  839
 840  GATACTTTTACAGGTTAAGACAAAGGGTTG ACTGGCCTATTTATCTGATCAAGAACATGT  899
 900  CAGCAATGTCTCTTTGTGCTCTAAAATTCT ATTATACTACAATAATATATTGTAAAGATC  959
 960  CTATAGCTCTTTTTTTTTGAGATGGAGTTT CGCTTTTGTTGCCCAGGCTGGAGTGCAATG 1019
1020  GCGCGATCTTGGCTCACCATAACCTCCGCC TCCCAGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTTAG 1079
1080  CCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCGTGC GCCACTATGCCTGACTAATTTTGTAGTTTT 1139
1140  AGTAGAGACGGGGTTTCTCCATGTTGGTCA GGCTGGTCTCAAACTCCTGACCTCAGGTGA 1199
1200  TCTGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGG AATTACAGGCGTGAGCCACCACGCCTGGCT 1259
1260  GGATCCTATATCTTAGGTAAGACATATAAC GCAGTCTAATTACATTTCACTTCAAGGCTC 1319
1320  AATGCTATTCTAACTAATGACAAGTATTTT CTACTAAACCAGAAATTGGTAGAAGGATTT 1379
1380  AAATAAGTAAAAGCTACTATGTACTGCCTT AGTGCTGATGCCTGTGTACTGCCTTAAATG 1439
1440  TACCTATGGCAATTTAGCTCTCTTGGGTTC CCAAATCCCTCTCACAAGAATGTGCAGAAG 1499
1500  AAATCATAAAGGATCAGAGATTCTGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1559
```

図１

【図２】

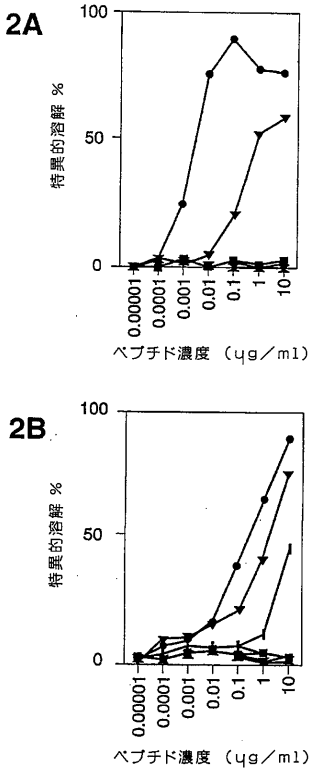


図２

【図３】

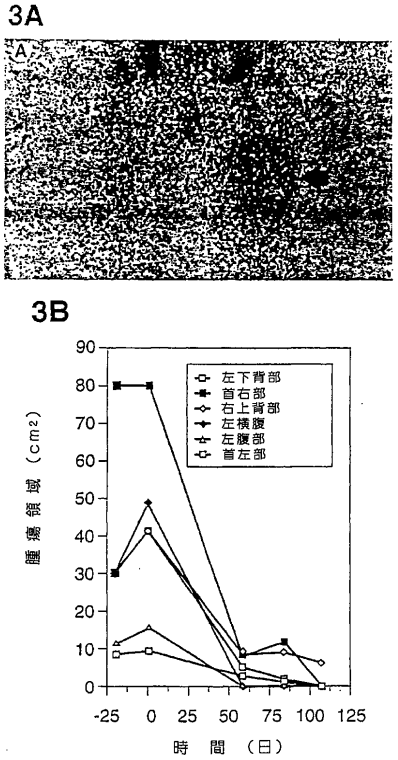


図３

【図４】

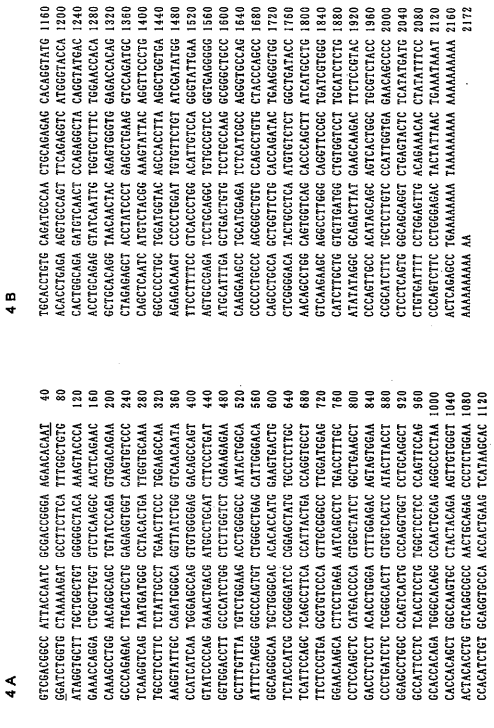


図４

【図５】

5A

```
  1  MDLVLKRCLL HLAVIGALLA VGATKVPRNQ DWLGVSRQLR TKAWNRQLYP
 51  EWTEAQRLDC WRGGQVSLKV SNDGPTLIGA NASFSIALNF PGSQKVLPDG
101  QVIWVNNTII NGSQVWGGQP VYPQETDDAC IFPDGGPCPS GSWSQKRSFV
151  YVWKTWGQYW QFLGGPVSGL SIGTGRAMLG THTMEVTVYH RRGSRSYVPL
201  AHSSSAFTIT DQVPFSVSVS QLRALDGGNK HFLRNQPLTF ALQLHDPSGY
251  LAEADLSYTW DFGDSSGTLI SRALVVTHTY LEPGPVTAQV VLQAAIPLTS
301  CGSSPVPGTT DGHRPTAEAP NTTAGQVPTT EVVGTTPGQA PTAEPSGTTS
351  VQVPTTEVIS TAPVQMPTAE STGMTPEKVP VSEVMGTTLA EMSTPEATGM
401  TPAEVSIVVL SGTTAAQVTT TEWVETTARE LPIPEPEGPD ASSIMSTESI
451  TGSLGPLLDG TATLRLVKRQ VPLDCVLYRY GSFSVTLDIV QGIESAEILQ
501  AVPSGEGDAF ELTVSCQGGL PKEACMEISS PGCQPPAQRL CQPVLPSPAC
551  QLVLHQILKG GSGTYCLNVS LADTNSLAVV STQLIMPGQE AGLGQVPLIV
601  GILLVLMAVV LASLIYRRRL MKQDFSVPQL PHSSSHWLRL PRIFCSCPIG
651  ENSPLLSGQQ V
```

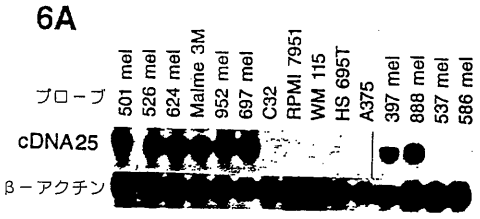
5B

```
Pmel17     M-----V-----Q-----P-----VPGILLT-----LLSGQQV
ME20       M-----V-----Q-----L-----.......------------
gp100      M-----V-----Q-----L-----.......------------
cDNA25FL   M-----F-----Q-----L-----.......------------
cDNA25TR               Q-----L-----.......-----PPQWAAGLSTLI
           1    162   236   274   588         649
```

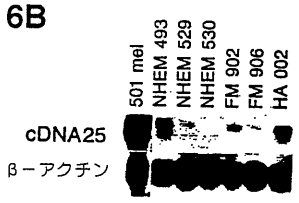
図５

【図６】

6A



6B



6C

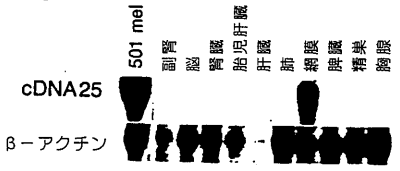


図６

【図７】

7A

```
  1     MDLVLKRCLL HLAVIGALLA VGATKVPRNQ DWLGVSRQLR TKAWNRQLYP
      D3---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      D5---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      D4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      C4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
 51     EWTEAQRLDC WRGGQVSLKV SNDGPTLIGA NASFSIALNF PGSQKVLPDG
      D3---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      D5---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      D4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      C4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
101     QVIWVNNTII NGSQVWGGQP VYPQETDDAC IFPDGGPCPS GSWSQKRSFV
      D3---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      D5---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      D4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
      C4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
151     YVWKTWGQYW QVLGGPVSGL SIGTGRAMLG THTMEVTVYH RRGSRSYVPL
      D3----D3
      D5---------- ---D5
      D4---------- ---------- ---------- ---------- -----D4
      C4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
201     AHSSSAFTIT DQVPFSVSVS QLRALDGGNK HFLRNQPLTF ALQLHDPSGY
      C4---------- ---------- ---------- ---------- ----------
                                         25TR----- ----------
251     LAEADLSYTW DFGDSSGTLI SRALVVTHTY LEPGPVTAQV VLQAAIPLTS
      C4---------- ----------C4
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
301     CGSSPVPGTT DGHRPTAEAP NTTAGQVPTT EVVGTTPGQA PTAEPSGTTS
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
351     VQVPTTEVIS TAPVQMPTAE STGMTPEKVP VSEVMGTTLA EMSTPEATGM
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
401     TPAEVSIVVL SGTTAAQVTT TEWVETTARE LPIPEPEGPD ASSIMSTESI
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
451     TGSLGPLLDG TATLRLVKRQ VPLDCVLYRY GSFSVTLDIV QGIESAEILQ
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
501     AVPSGEGDAF ELTVSCQGGL PKEACMEISS PGCQPPAQRL CQPVLPSPAC
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
551     QLVLHQILKG GSGTYCLNVS LADTNSLAVV STQLIMPGQE AGLGQVPLIV
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
601     GILLVLMAVV LASLIYRRRL MKQDFSVPQL PHSSSHWLRL PRIFCSCPIG
    25TR---------- ---------- ---------- ---------- ----------
651     ENSPLLSGQQ V
    25TR---------- -25TR
```

7B

DNA 断片	620-1	620-2	TIL 660-1	1143	1200
D3	-	-	-	-	-
D5	-	+	-	-	+
D4	-	+	-	-	+
C4	+	+	+	+	+
25TR	-	-	+	+	+

図７

【図８】

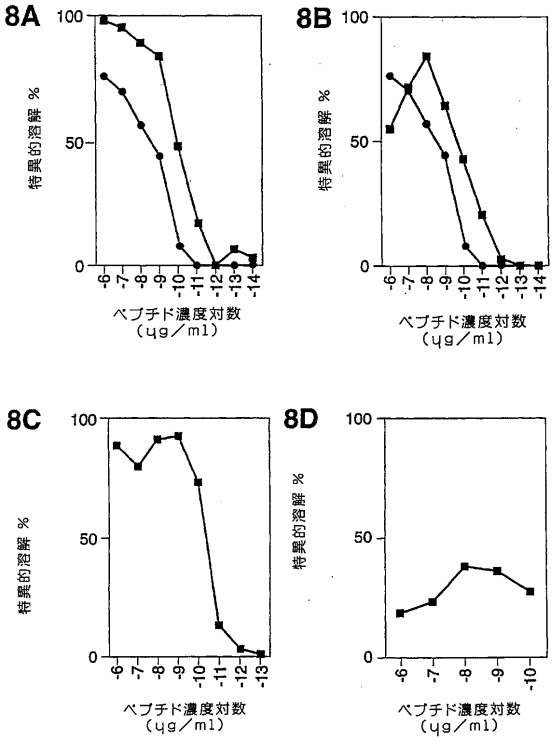


図８

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			ＦＩ			テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ	*14/705*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/705		４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ	*16/30*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/30		
Ｃ０７Ｋ	*7/06*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/06		
Ａ６１Ｋ	*39/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ａ６１Ｐ	*37/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ	*33/577*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ	
Ｃ１２Ｎ	*1/15*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/577	Ｂ	
Ｃ１２Ｎ	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ０７Ｋ	*7/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	7/08		
			Ｃ１２Ｐ	21/08		

(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100091638
弁理士　江尻　ひろ子
(72)発明者　カワカミ，ユタカ
アメリカ合衆国メリーランド州２０８５２，ロックヴィル，コングレッショナル・レーン　２２８
(72)発明者　ローゼンバーグ，スティーブン・エイ
アメリカ合衆国メリーランド州２０８５４，ポトマック，アイロン・ゲート・ロード　１０１０４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 CA02 DA02 EA02 EA04 GA11 HA12 HA17 HA20
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QR32 QR56 QR73 QS32 QX02 QX07
4B064 AG27 AG31 CA10 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA45 CA46
4C085 AA03 CC21 CC32 EE01
4H045 AA11 BA09 BA15 CA41 DA50 DA86 EA29 EA51 FA20 FA74

专利名称(译)	黑色素瘤抗原		
公开(公告)号	JP2010178739A	公开(公告)日	2010-08-19
申请号	JP2010031273	申请日	2010-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	カワカミユタカ ローゼンバーグスティーブンエイ		
发明人	カワカミ,ユタカ ローゼンバーグ,スティーブン·エイ		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/68 C07K14/705 C07K16/30 C07K7/06 A61K39/00 A61P37/04 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/577 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C07K7/08 C12P21/08 A01K67/027 A61K38/00 A61K39/395 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/32 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.C C12N5/00.101 C12Q1/02 C12Q1/68.A C07K14/705 C07K16/30 C07K7/06 A61K39/00.H A61P37/04 A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/577.B C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C07K7/08 C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12N15/13 C12N15/63.Z C12N15/866.Z C12N5/10 C12Q1/6813.Z C12Q1/6869.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR73 4B063/QS32 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/BA15 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/FA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	08/231565 1994-04-22 US 08/417174 1995-04-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供编码被T细胞识别的黑素瘤抗原的基因，与之对应的蛋白质，以及使用这些基因或蛋白质的预防，诊断和治疗方法。 编码被T淋巴细胞识别的称为MART-1的黑素瘤抗原的核酸序列，由该核酸序列编码的蛋白质和针对该蛋白质的抗体。 使用上述抗原蛋白和抗体的用于诊断，评估或预测黑色素瘤或转移性黑色素瘤的生物测定法。 另外，衍生自MART-1和第二种黑色素瘤抗原gp100的免疫原性肽。 一种源自MART-1黑色素瘤抗原或gp100抗原并经过修饰以增强免疫原性的免疫原性肽。 上述蛋白质和肽作为预防或治疗黑素瘤的免疫原的用途。 [选择图]无

表11 HLA-A2陽性メラノーマ特異的TILによる抗原認識の概要

腫瘍の反応	TIL 1200	820	660	1143	1074	1088	1235	1318	1363	1399
抗原(エピトープ)	PR	PR	PR	PR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
gp100	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
($G9_{154}$) ($G9_{209}$) ($G9_{210}$) ($G9_{280}$)										
(G1H-4) ($G9_{154}$) ($G9_{154}$)										
(G1H-5)										
MART-1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2) (M9-2)										
チロシナーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gp75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

G9(10):gp100-9(10)量体ペプチド;M9-2:$MART-1_{27-35}$ペプチド
TILによるgp100の認識は、HLA-A2陽性TILを用いた塩子発現細胞に対する亜証の発ヒ有意(p<0.001)に相関する。
*PR:部分的応答(腫瘍の推定直径の減少が>50%減少);NR:応答なし(<50%の減少)