

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5198354号
(P5198354)

(45) 発行日 平成25年5月15日(2013.5.15)

(24) 登録日 平成25年2月15日(2013.2.15)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/82 (2006.01)	C O 7 K 14/82	
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	
C O 7 K 16/32 (2006.01)	C O 7 K 16/32	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 O 2 L
請求項の数 16 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-115844 (P2009-115844)
 (22) 出願日 平成21年5月12日(2009.5.12)
 (62) 分割の表示 特願平10-505606の分割
 原出願日 平成9年7月8日(1997.7.8)
 (65) 公開番号 特開2009-178166 (P2009-178166A)
 (43) 公開日 平成21年8月13日(2009.8.13)
 審査請求日 平成21年5月12日(2009.5.12)
 (31) 優先権主張番号 96201945.1
 (32) 優先日 平成8年7月11日(1996.7.11)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 309004585
 ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメ
 リカ アズ リプレゼンテッド バイ ザ
 セクレタリー、デパートメント オブ
 ヘルス アンド ヒューマン サービシー
 ズ
 THE U. S. A. AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
 アメリカ合衆国、20892-7660
 メリーランド州、ベセスダ、イグゼキュー
 ティブ プールバード 6011、スイ
 ト 325、メールストップコード 76
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】メラノーマ関連ペプチド類似体およびメラノーマに対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2番目のトレオニンがイソロイシン、ロイシンまたはバリンに置換されている配列番号2のアミノ酸配列からなることを特徴とする、転移メラノーマに対するリンパ球に対して免疫原性であるペプチド。

【請求項 2】

配列番号6、7または8のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項1記載のペプチド。

【請求項 3】

請求項1または2記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とするヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項1または2記載のペプチドまたは請求項3記載のヌクレオチドを含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 5】

前記ペプチドが薬学的に許容しうる担体または希釈剤と混合していることを特徴とする請求項4記載のワクチン。

【請求項 6】

前記ペプチドであらかじめローディングした抗原提示細胞を含むことを特徴とする請求項4または5記載のワクチン。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 記載のペプチドに対する T 細胞レセプターまたは該 T 細胞レセプターを発現している細胞を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 8】

アジュバント、1 または 2 以上のサイトカイン、CD 2、CD 3、CD 27、CD 28 もしくはほかの T 細胞表面抗原に対する抗体ならびに CD 4 + T 細胞もしくは CD 8 + T 細胞を刺激するヘルパーエピトープからなる群より選ばれた 1 または 2 以上の化合物も含むことを特徴とする請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 9】

a 患者由来のメラノーマのサンプルから腫瘍浸潤リンパ球を単離する段階、
b 請求項 1 または 2 記載のペプチドと前記リンパ球を反応させる段階、
c 該抗原に対して結合するリンパ球を単離する段階、
を含むことを特徴とする、抗原反応性腫瘍浸潤リンパ球の産生方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 または 2 記載のペプチドと検出可能なマーカーとのコンジュゲート。

【請求項 11】

検出可能なマーカーが放射性核種であることを特徴とする請求項 10 記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

請求項 10 または 11 記載のコンジュゲートを含むことを特徴とする、請求項 1 記載のペプチドに対する抗体の検出用キット。

20

【請求項 13】

請求項 1 または 2 記載のペプチドに特異的に結合することを特徴とする腫瘍浸潤リンパ球。

【請求項 14】

請求項 13 記載の腫瘍浸潤リンパ球を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 15】

請求項 1 または 2 記載のペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体。

【請求項 16】

請求項 1 または 2 記載のペプチドのいずれか 1 または 2 以上を含む医薬組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は癌の治療と診断、特にメラノーマ関連ペプチド類似体、そのエピトープ、メラノーマに対するワクチンならびにメラノーマ検出用およびワクチン接種モニタリング用の診断薬に関する。

【背景技術】

【0002】

正常組織から腫瘍組織への段階的変化の間に、腫瘍関連抗原が現れる。腫瘍関連抗原の特徴はそれらを保持する腫瘍の起源に著しく依存する。動物腫瘍に関連する抗原の存在は前世紀に記録されており、ヒトの癌の抗原的特徴は主としてモノクローナル抗体による最近の研究を通して十分に確立されている。

40

【0003】

これらの抗原を単離して化学的に特徴づけようとする試みには非常な困難があり、その多くは抗原保持分子を溶液から沈殿させるのに適した試薬がないことと関係していた。

【0004】

他の多くの刺激因子と同様に腫瘍関連抗原も、単一の防御機序だけではなく、防御機序の集合全体を（特異的なものも非特異的なものも、また体液性のものも細胞性のものも）活性化する。腫瘍増殖に対するインビボ（in vivo）での耐性における主な役割は T リンパ球によって果たされる。これらの細胞は抗原提示細胞（APC）によってそれらに提示さ

50

れた腫瘍関連抗原を認識し、その認識によって活性化される。活性化と分化が起きると、これらの細胞はその腫瘍細胞を攻撃し殺す。

【 0 0 0 5 】

細胞障害性Tリンパ球(CTL)は、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子の抗原結合溝に提示された長さが9~11アミノ酸の短いペプチド断片を認識する(Townsendら, 1986, Cell 44:959; Bjorkmanら, 1987, Nature 329:512)。これらのペプチドは通常、細胞内タンパク質プールに由来し、小胞体の内腔中でMHCクラスI重鎖および β 2-ミクログロブリン分子と会合した後、そのMHC-ペプチド複合体が細胞表面に輸送される。同じ抗原内に抗原性ペプチドと推定されるものは数多く存在するにもかかわらず、CTLによる認識のために選択されるのは数種類のペプチドに過ぎない。

10

【 0 0 0 6 】

MHCクラスI/I抗原はしばしば充実性腫瘍中でダウンレギュレートされる。これはすべてのクラスI/I抗原に影響する場合もあるし、その一部のみに影響する場合もある。細胞傷害性Tリンパ球媒介性溶解のために適当な標的細胞を感作できるウイルスペプチドや細胞性ペプチドも、MHCクラスI抗原の発現レベルが低い細胞内で産生された場合には、そうすることができないと考えられる。細胞毒感受性は、少なくともいくつかの場合には、インターフェロン γ および腫瘍壊死因子 α でMHCクラスI/I抗原の発現レベルを高めることによって誘導することができる。

【 0 0 0 7 】

エピトープのMHCクラスI結合親和力は、ペプチド-MHC複合体の免疫原性を決定する重要なパラメーターである。抗ウイルスCTLによって認識されるヒト組織適合抗原(HLA-A*0201)拘束性エピトープ(restricted epitopes)の分析から、数種類のペプチドがHLA-A*0201に高い親和力で結合することが立証された。また、HLA-A*0201形質転換マウスを用いたモチーフ含有エピトープ候補の免疫原性分析によって、CTL反応を誘導するにはペプチドがある閾値MHCクラスI親和力を持つ必要があることが明らかになった(Ressingら, 1995, J. Immunol. 154:5934; Setteら, 1994, J. Immunol. 153:5586)。MHCクラスI結合親和力に加えて、細胞表面におけるペプチド-MHC複合体の安定性もCTLエピトープの免疫原性に寄与する。したがってMHCクラスI結合親和力とペプチド-MHC複合体の安定性は、CTL-エピトープ型の治療用ワクチンを開発するために特定のペプチド決定基を選択する際の重要な基準である。

20

30

【 0 0 0 8 】

最近、いくつかの抗原が抗メラノーマCTLの標的抗原として同定された。遺伝学的アプローチにより、腫瘍特異抗原MAGE-1および-3とメラニン細胞系特異抗原チロシナーゼが同定された(van der Bruggenら, 1991, Science 254:1643; Gauglerら, 1994, J. Exp. Med. 179:921; Brichardら, 1993, J. Exp. Med. 178:489)。

【 0 0 0 9 】

本出願人らによる同時係属中の特許出願(EP 0 668 350)では、gp100メラニン細胞特異タンパク質がメラノーマ腫瘍浸潤リンパ球の標的抗原であると同定された。

【 0 0 1 0 】

最近、さらに2つのメラニン細胞分化抗原Melan-A/MART-1およびgp75が抗メラノーマCTLの標的抗原として同定された(Coulieら, 1994, J. Exp. Med. 180:35; Kawakamiら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3515; Wangら, 1995, (vol 181, 799頁, 1995) J. Exp. Med. 181:1261, 10-12)。現在では、これらの抗原に由来しHLA-A*0201に対して様々な親和力を示す8つのHLA-A*0201拘束性エピトープが特徴づけられている(Wolfelら, 1994, Eur. J. Immunol. 24:759; Coxら, 1994, Science 264:716; Kawakamiら, 1995, J. Immunol. 154:3961; Bakkerら, 1995, Int. J. Cancer 62:97; Kawakamiら, 1994, J. Exp. Med. 180:347; Castelliniら, 1995, J. Exp. Med. 181:363)。

40

【発明の概要】

50

【0011】

メラニン細胞分化抗原 gp100 および Melan-A/MART-1 に由来する2つのHLA-A*0201 提示エピトープの免疫原性を改善する試みとして、HLA-A*0201 結合親和力を向上させるために、それらエピトープ内でのアミノ酸置換が行われた。

【0012】

驚くべきことに、これらのエピトープ類似体は元のエピトープからみて改善された免疫原性を持つことを見出した。さらに本発明では、それらのエピトープ類似体が、天然エピトープを内因的にプロセシングし提示する標的細胞との交差反応性を示すペプチド特異的CTLを誘導させることを立証する。

10

【0013】

改善された免疫原性を持つ本発明のこれらエピトープ類似体の使用は、慢性ウイルス性疾患および癌に関してCTL-エピトープ型ワクチンの開発に貢献しうる。

【0014】

より詳細に述べると、MHCクラスI親和力とペプチド-MHC複合体安定性はMHCクラスI 提示エピトープの免疫原性を決定する重要なパラメーターであるから、2つのメラニン細胞分化抗原由来エピトープのHLA-A*0201 結合能を、T細胞レセプター(TCR)との相互作用に影響を及ぼすことなく、向上させようかどうかを検討する。アラニン置換体を使ってMelan-A/MART-1 27-35 エピトープとgp100 154-162 エピトープを詳細に分析したところ、4番目から7番目まで(Melan-A/MART-1 27-35)または5番目から7番目まで(gp100 154-162)のアミノ酸がTCR認識にとって決定的な残基であることが明らかになった。これらのデータは、HLA-A*0201 分子のX線結晶学による研究(Saperら, 1991, J. Mol. Biol. 219:277; Latronら, 1992, Science 257:964)と一致して、MHC分子の外側に向って配向しているこのペプチドの4番目と5番目のより自由な残基が突出したTCR接触部位としての役割を持つことを含意している。HLA-A*0201 についてはMelan-A/MART-1 27-35 エピトープとgp100 154-162 エピトープの6番目と7番目のアミノ酸がMHCペプチド結合溝中の二次ポケットと相互作用するだけでなく、TCR相互作用にとっても決定的な残基であることが立証されている(Ruppertら, 1993, Cell 74:929; Maddenら, 1993, Cell 75:693)。

20

30

【0015】

驚くべきことに、gp100 154-164 エピトープの8番目のアラニン置換KWGQYWAVは増大したHLA-A*0201 親和力を示すペプチドをもたらした。さらにこのエピトープ類似体は、天然エピトープと比較して10倍低い濃度で、gp100 反応性CTLによって認識された。これらのデータは、非アンカー位置におけるアミノ酸置換が増大したMHCクラスI親和力とT細胞認識をもたらしうることを立証している。

【0016】

HLA-A*0201 結合モチーフに対してV、L、MまたはIによるN末端アンカー置換を行なうことにより、HLA-A*0201 に対して改善された親和力を持つエピトープ類似体であって、野生型エピトープ反応性CTLによってなお認識されるものを、両エピトープについて同定することを試みた。Melan-A/MART-1 エピトープについては、HLA-A*0201 に対して同等(M)もしくは改善された(V、LおよびI)親和力を持つエピトープ類似体を得られた。しかしN末端アンカー置換はいずれも、T細胞反応性の減少を引き起こした。このエピトープの場合は、明らかに、N末端アンカー残基がペプチドの中心にある側鎖の位置ぎめに影響を及ぼし、それによってTCR相互作用が排除される。最近、同様の観察結果がインフルエンザAマトリックスタンパク質のHLA-B*3501 拘束性エピトープに関して記述されている(Dongら, 1996, Eur. J. Immunol. 26:335)。このペプチドの2番目のセリン残基をより一般的なHLA-B*3501 N末端アンカーであるプロリンに置換すると、HLA-B*3501 への結合はかなり増強されたが、このエピトープ類似体は天然エピトープと反応するCTLによって認

40

50

識されなかった。さらにこのペプチドはペプチドアンタゴニストとしてふるまうことが、MHCクラスIIおよびクラスI提示ペプチドの両方のT細胞認識について立証された (Dongら, 1996, Eur. J. Immunol. 26:335; De Magistrisら, 1992, Cell 68:625; Klenermanら, 1994, Nature 369:403)。これらの発見はアンカー残基置換がMHCクラスI結合に影響を及ぼすだけでなく、ある場合にはペプチド-MHC複合体のコンフォメーション変化をももたらし、それがTCRとの相互作用の変化につながりうることを例証するものである。

【0017】

しかしgp100 154-162エピトープの場合は、アラニン置換類似体KTWGQYWA^AVの他にも、改善されたHLA-A*0201親和力を持ち、しかも野生型エピトープと比較して10倍低い濃度で抗gp100 CTLによって認識される3つのアンカー置換類似体K^VWGWQYWQV、K^LWGWQYWQVおよびK^IWGWQYWQVが得られた。HLA-A*0201/K^b形質転換マウスを用いたインビボでの免疫実験により、これらのエピトープ類似体は免疫原性であって、エピトープ類似体と天然エピトープの両方と反応するマウスCTLの誘導をもたらし、それが立証された。これらのエピトープ類似体の免疫原性は予想されるものであった。というのは、これらのエピトープ類似体と天然エピトープのペプチド-MHC複合体安定性はどちらも同等に高かったからである。

10

【0018】

ドナー由来のPBLを用いたインビトロ(in vitro)でのCTL誘導実験により、内因的に野生型エピトープを提示する腫瘍細胞との交差反応性を示すエピトープ類似体特異的CTLを獲得しうることが立証された。健康なドナーのT細胞レパートリー(repertoire)は、野生型エピトープと反応するTリンパ球の他に、明らかにgp100 154-162エピトープ類似体と反応するT細胞をも含有する。種々のgp100 154-162エピトープ類似体および野生型gp100 154-162と反応するクローン化CTLのTCR利用法を分析すれば、野生型エピトープに対するCTL活性を誘導するのに使用できるT細胞レパートリーのスペクトルに関して有益な情報が得られるだろう。癌の免疫療法については、エピトープ類似体を用いて抗原性腫瘍エピトープに対するT細胞レパートリー中の多様な特異性を活性化することにより、患者が免疫時に抗腫瘍反応をうまく開始する可能性を増大させることができる。また野生型エピトープに対する耐性が観察される場合でも、修飾エピトープなら免疫反応を引き出すことができるかもしれない。

20

30

【0019】

免疫療法のプロトコルに「改善された」エピトープを使用すれば、生体内の抗原提示細胞の細胞表面におけるペプチド-MHC複合体の量が増大し、抗原特異的CTLの初回刺激が強化されるだろう。癌免疫療法におけるそれらの可能性とは別に、改善された免疫原性を持つエピトープ類似体の使用は、慢性ウイルス疾患に関するCTL-エピトープ型ワクチンの開発にも寄与しうる。

【0020】

したがって本発明の目的は、配列番号1のアミノ酸配列(ただし、2番目または8番目のアミノ酸が置換されている)の少なくとも一部分からなることを特徴とする、転移メラノーマに対するリンパ球に対して免疫原性であるペプチドである。

40

【0021】

本発明の好ましい態様は2番目のトレオニンがイソロイシン、ロイシンまたはバリンで置換されているペプチドである。

【0022】

本発明のもう1つの好ましい態様は8番目のグルタミンがアラニンで置換されているペプチドである。

【0023】

本発明のとくに好ましい態様は配列番号2~8のアミノ酸配列からなることを特徴とするペプチドである。

【0024】

50

「ペプチド」という用語はアミノ酸の分子鎖を指し、その生成物の特定の長さを指すものではなく、また必要であれば、たとえばマンノシル化、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化またはリン酸化などによってインビボまたはインビトロで修飾されてもよい。したがってとりわけポリペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、このペプチドの定義に包含される。またペプチドは(キメラ)タンパク質の一部であってもよいし、そのペプチドまたはタンパク質をコードするRNAまたはDNA配列(の一部)であってもよい。

【0025】

もちろん、本発明ペプチドの断片と同様に機能的誘導体も本発明に包含される。機能的誘導体には、全配列中の1または2以上のアミノ酸が異なり、欠失、置換、逆位または付加を持つペプチドが含まれるものとする。生物活性および免疫学的活性を本質的に変化させないと予想できるアミノ酸置換は記述されている。関係するアミノ酸間でのアミノ酸置換または進化の過程で頻繁に起って来た置換は、とりわけSer/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Valである(Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., ワシントンD.C., 1978, vol. 5, suppl. 3を参照)。この情報に基づいてLipmanとPearsonは、相同なポリペプチド間の機能的類似性を決定する迅速かつ高感度なタンパク質比較法を開発した(Science 227, 1435-1441, 1985)。

10

【0026】

また、gp100(またはMelan)に由来するその他のペプチド類似体であって、腫瘍浸潤リンパ球による標的細胞溶解を誘導しうるものも、これらペプチドの機能的誘導体であるものとする。

20

【0027】

さらに、それらペプチドの付加塩、それらペプチドのアミド(特にC末端アミド)、エステル(特にC末端エステル)およびN-アシル誘導体(特にN末端アシル誘導体とN-アセチル誘導体)も、それらペプチドの機能的誘導体であるものとする。

【0028】

本発明のペプチドは合成的に、組換えDNA技術によって、また該ペプチドのアミノ酸配列がウイルスDNAの一部であるDNA配列によってコードされる場合はウイルスによって産生されうる。合成ペプチドの製造法は当該技術分野でよく知られている。

30

【0029】

有機化学的ペプチド合成法には、均一相での、またはいわゆる固相を使った、縮合反応による必要なアミノ酸のカップリングが含まれると考えられる。この縮合反応は次のように行なうことができる:

a) 遊離のカルボキシル基と保護されたその他の反応性基とを持つ化合物(アミノ酸、ペプチド)と、遊離のアミノ基と保護されたその他の反応性基とを持つ化合物(アミノ酸、ペプチド)の、縮合剤存在下での縮合反応; b) 活性化されたカルボキシル基と遊離のまたは保護されたその他の反応性基とを持つ化合物(アミノ酸、ペプチド)と、遊離のアミノ基と遊離のまたは保護されたその他の反応性基とを持つ化合物(アミノ酸、ペプチド)の縮合反応。

40

【0030】

カルボキシル基の活性化は、とりわけ、カルボキシル基を酸ハライド、アジド、無水物、イミダゾリド、あるいはN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたはp-ニトロフェニルエステルなどの活性エステルに変換することによって起こりうる。

【0031】

前記縮合反応の最も一般的な方法は、The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology Vol. 1-3 (Gross, E. およびMeinhof, J.編) 1979, 1980, 1981 (Academic Press社)に記述されているようなカルボジイミド法、アジド法、混成無水物法ならびに活性エステルを用いる方法

50

である。

【0032】

組換えDNA技術によるペプチドの製造は既知の一般法であるが、これには多くの可能性があり、そのすべてがいくらか異なる結果につながる。発現させようとするポリペプチドはDNA配列によって（より正確に述べると核酸配列によって）コードされる。

【0033】

本発明のペプチドをコードする配列を含む核酸配列も本発明の一部である。

【0034】

本発明のペプチドをコードする配列は、好ましくは配列番号2～8に示す配列である。

【0035】

当該技術分野ではよく知られているように、遺伝コードは縮重しているので、同じアミノ酸をコードする別のコドンを与えるような塩基の置換をあるコドン内で行なうことができる。例えばアミノ酸であるグルタミン酸のコドンはGATでありGAAでもある。したがって配列番号1～8に示すようなアミノ酸配列を持つポリペプチドの発現には、そのような代替的コドン組成を持つ派生的な核酸配列を利用することができ、したがって異なる核酸配列を見出しうる。

【0036】

本明細書において「ヌクレオチド配列」とは、任意の長さのヌクレオチドの重合体を指し、リボ核酸（RNA）配列とデオキシリボ核酸（DNA）配列の両方を示す。原則としてこの用語は分子の一次構造を指す。したがってこの用語は二本鎖DNAおよび一本鎖DNAならびに二本鎖RNAおよび一本鎖RNAとそれらの修飾体を包含する。

【0037】

前記ペプチド類似体の免疫原性断片であるペプチドも本発明の一部である。

【0038】

免疫原性断片は免疫原反応を誘導する能力を保有している断片、すなわちその断片を特異的に認識する抗体を惹起できるか、またはその断片によって活性化されたTリンパ球を発見できるものである。もう一つの可能性はDNAワクチンである。

【0039】

前述のように腫瘍関連抗原の免疫原作用はT細胞活性化機序によってしばしば誘発されることが知られている（Townsendら，1989，H.，Ann. Rev. Immunol. 7, 601-624）。T細胞レセプター（TCR）依存かつMHC拘束的にメラノーマ細胞を認識する細胞障害性Tリンパ球（CTL）は、腫瘍保持患者から単離されている（Knuthら，1992，Cancer surveys. 39-52）。もう一つのメラニン細胞特異抗原であるチロシナーゼ由来のペプチドは、あるCTLクローンによって認識されることが示されている（Brichardら，1993，J. Exp. Med.，178，489-495）。

【0040】

MHC分子によるT細胞の活性化には、その短い断片（例えば8～12mers）がTリンパ球に対して提示される抗原のプロセッシングが必要であることがわかっている。

【0041】

本発明のペプチドは無関係な配列（すなわち自然界ではそれらが結合していない配列）と隣接していることが好ましい。なぜなら、そのような隣接配列は、おそらくはAPCによるより良いプロセッシングと提示により、これらペプチドの免疫原性を高めることがわかっているからである。

【0042】

前記のペプチドまたは一連のペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるヌクレオチド配列は、本発明のもう一つの部分を構成する。

【0043】

組換えDNA技術によるペプチドの産生にこれらの配列を使用すること（これについては後に詳しく例証する）に続いて、本発明のペプチドに関して配列表に開示した配列情報は診断目的にも使用できる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

例えばそれぞれUSP 4, 683, 202とEP 329, 822に記述されているようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)や核酸配列に基いた増幅法(NASBA;nucleic acid sequence based amplification)などの核酸増幅技術によってgp100またはgp100様タンパク質を検出するための診断試験の基礎として、これらの配列からプライマーを得ることができる。

【 0 0 4 5 】

これらのヌクレオチド配列は、本発明のペプチドを組換えDNA技術で産生するために使用できる。そのためには、そのヌクレオチド配列が、適当な宿主細胞をトランスフォーメーションまたはトランスフェクションするために使用できるクローニングビヒクル(ve
hicle)中に含まれていなければならない。

10

【 0 0 4 6 】

核酸配列のクローニングには、広範な種々の宿主細胞とクローニングビヒクルの組み合わせを有効に使用することができる。例えば有用なクローニングビヒクルとしては染色体、非染色体および合成DNA配列、例えば様々な既知の細菌プラスミドや、より広い宿主域を持つpBR322などのプラスミド、種々のpUC、pGEMおよびpBluescriptプラスミド、バクテリオファージ(例えばラムダ-gt-Wes、シャロン28およびM13系ファージ)、プラスミドとファージまたはウイルスDNA(例えばSV40、アデノウイルスまたはポリオマウイルスDNA)の組み合わせに由来するベクターなどを挙げることができる(Rodriquezら, 1988, 編, Vectors, Butterworths; Lenstraら, 19
90, Arch. Virol., 110, 1-24)。

20

【 0 0 4 7 】

有用な宿主としては、細菌宿主、酵母とその他の菌類、植物または動物宿主、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、メラノーマ細胞、樹状細胞、サル細胞およびその他の宿主を包含してよい。

【 0 0 4 8 】

ペプチドの発現に使用されるビヒクルは、さらにそのペプチドをコードする核酸配列に作動可能に連結されたコントロール配列を含むだろう。そのようなコントロール配列は一般にプロモーター配列と、発現レベルをレギュレートおよび/またはエンハンスさせる配列からなる。さらに複製起点および/または優性選択マーカーも、そのようなビヒクルには存在することが多い。もちろんコントロール配列とその他の配列は、選択した宿主細胞に依存して変動しうる。

30

【 0 0 4 9 】

宿主細胞をトランスフォーメーションまたはトランスフェクションする技術は当該技術分野でよく知られている(例えばManiatisら, 1982/1989, Molecular cloning: A laboratory Manual, コールドスプリングハーバー研究所)。

【 0 0 5 0 】

当該ペプチドの情報に次いで、そのペプチドが結合するとわかっているMHC分子の情報を保持するベクターで宿主細胞をコトランスフォーメーションまたはコトランスフェクションすれば、きわめて実用的である。そのMHC分子はHLA-A2.1、HLA-A
1もしくはHLA-A3.1またはメラノーマ患者中に存在することがわかっているその他任意のHLA対立形質であることが好ましい。メラノーマ細胞がメラノーマ患者に由来するHLA-A2.1拘束性の細胞障害性T細胞クローンによって認識される抗原を持つことは確証されている(Anichiniら, 1993, J. Exp. Med., 177, 989-998)ので、HLA-A
-A2.1はとりわけ好ましい。

40

【 0 0 5 1 】

本発明ペプチドの発現にとりわけ適した宿主細胞はネズミEL4およびP8.15細胞である。該ペプチドの発現にはヒトBLM細胞(Katanoら, 1984, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 108, 197)がとりわけ適している。なぜならこの細胞は既にMHC分子HLA-A
-A2.1を発現できるからである。

50

【0052】

本発明のペプチドはメラノーマ治療用のワクチンに使用できる。

【0053】

このワクチンは、免疫原として有効量の活性ペプチドに加えて、薬学的に許容しうる担体または希釈剤をも含有してもよい。

【0054】

本発明のペプチド（特にオリゴペプチド）の免疫原性は架橋するか、または免疫原性担体分子（すなわち患者の免疫学的反応を独立して誘起する特性を持つ巨大分子であって、そこに本発明のペプチドを共有結合できるもの）あるいはタンパク質の一部であっても結合することによってエンハンスすることができる。

10

【0055】

担体分子への共有結合は当該技術分野でよく知られる方法を使って行なうことができ、その的確な選択は使用する担体分子の性質によって決まるだろう。免疫原性担体分子がタンパク質である場合、本発明のペプチドは、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなどの水溶性カルボジイミドまたはグルタルアルデヒドなどを使って結合できる。

【0056】

このような結合剤は別個の担体分子を使用することなくペプチド同士を架橋するためにも使用できる。そのような架橋によるポリペプチドまたはペプチド集合体への変換も免疫原性を増大させうる。

【0057】

本発明で有用な薬学的に許容しうる担体または希釈剤の例には、SPGAなどの安定化剤、炭水化物（例えばマンノース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、グルコース、デキストランなど）、アルブミンやカゼインなどのタンパク質、ウシ血清や脱脂乳などのタンパク質含有剤および緩衝液（例えばリン酸緩衝液）を含む。

20

【0058】

任意に、アジュバント活性を持つ1または2以上の化合物をワクチンに加えてもよい。好適なアジュバントは、例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油乳剤（例えばBayol F（登録商標）やMarco 152（登録商標）のもの）、サポニン、ビタミンE可溶化物などである。

【0059】

樹状細胞は、抗原の取り込みに使用されて抗原プロセッシングを促進するマンノースレセプターを発現するプロフェッショナル（professional）なAPCである。

30

【0060】

本発明のワクチンはとりわけ静脈内、腹腔内、鼻腔内、皮内、皮下または筋肉内に投与することができる。

【0061】

投与すべき有益な有効量は患者の年齢と体重およびそのワクチンの投与法に依存して変化するだろう。

【0062】

当該ワクチンはT細胞応答を特異的に獲得するために使用できるが、ワクチン接種後にB細胞応答が誘発される可能性もある。その場合は、そのB細胞応答がそのワクチンのペプチドに対する抗体の形成をもたらし、その抗体は抗原産生のソースすなわち腫瘍細胞に向けられることになる。このようにして腫瘍細胞が両免疫系の応答によって攻撃されるので、これは有利な特徴である。

40

【0063】

当該ワクチンが抗原提示細胞（APC）によってMHC分子中に提示されるようなペプチドを含んでなる場合、両免疫系はさらにより効果的に誘発されるだろう。抗原提示は、本発明ペプチドの一つがローディングされた単球、マクロファージ、指状突起細胞、ランゲルハンス細胞、そしてとりわけ樹状細胞を用いることによって、またはペプチドを含むタンパク質またはマンノシル化されたタンパク質をローディングすることによって達成でき

50

る。A P Cのローディングは本発明ペプチドをA P C内またはA P Cの近傍へ導くことによって達成できるが、A P Cに完全なg p 1 0 0抗原をプロセッシングさせることがより好ましい。この方法により、インビボの状況をもっとリアルに模倣した提示が達成される。さらに、その細胞によって使用されるM H Cはそのエピトープを提示するのに適したタイプのものである。

【 0 0 6 4 】

A P Cをエピトープの提示に使用することの総合的な利点は、この点で、使用されるA P C細胞の選択である。タイプの異なるA P Cから、刺激性A P Cと阻害性A P Cがあることがわかっている。

【 0 0 6 5 】

好ましいものは、同時刺激性 (co-stimulating) 分子を持つことを特徴とするいわゆる「プロフェッショナル」抗原提示細胞であって、抗原提示の過程に重要な役割を持つ、記載の細胞タイプである。そのような同時刺激性分子は、例えばB 7、C D 2 5、C D 4 0、C D 7 0、C T L A - 4または耐熱性抗原 (Schwartz, 1992, Cell 71, 1065-1068) などである。

【 0 0 6 6 】

やはり抗原提示細胞として作用しうることが示されている線維芽細胞は、これらの同時刺激性分子を持たない。

【 0 0 6 7 】

メラニン細胞ペプチド類似体の情報を保有するクローニングビヒクルで既にトランスフェクションされた細胞を使用して、その細胞をM H CクラスI分子のヌクレオチド配列 (例えばH L A A 2 . 1、H L A A 1またはH L A A 3 . 1をコードする配列) を含むクローニングビヒクルでコトランスフェクションすることもできる。これらの細胞は抗原提示細胞として作用し、その表面に発現されたM H CクラスI分子中にペプチド類似体を提示するだろう。その細胞が前述の同時刺激性分子 (具体的にはB 7 (B 7 . 1、B 7 . 2)、C D 4 0) の1つまたは同様の機能を持つ分子 (例えば細胞系にトランスフェクションされたサイトカイン) を発現しうる場合、この提示はエンハンスされると考えられる。この発現は、その細胞をそのような同時刺激性分子をコードする配列情報を持つ第三のクローニングビヒクルでトランスフォーメーションまたはトランスフェクションした結果であってもよいが、その細胞がすでに同時刺激性分子産生能を持っていてもよい。

【 0 0 6 8 】

目的の発現産物の他にも、発現されてその細胞の目的の免疫原反応に負の影響を及ぼしうる数多くの要素を保有するこれらの細胞を伴うワクチンの代わりに、ペプチドがローディングされたM H C分子を露出させるリポソームであって、例えばそこにリンフォカインを充填したもので、ワクチンを構成させることもできる。そのようなリポソームは免疫学的T細胞反応を誘発するだろう。

【 0 0 6 9 】

インビボと同じ方法でペプチドを提示することによって、エンハンスされたT細胞応答が誘発されるだろう。さらに、比較的大きな抗原提示細胞の天然のアジュバント作用によって、B細胞応答も誘発される。このB細胞応答はとりわけ、そのペプチド - M H C複合体に対する抗体の生成をもたらすだろう。この複合体は特に、患者中でg p 1 0 0のエピトープが天然に提示されることが示されている場であってそれゆえT細胞応答を誘発することができる腫瘍細胞中に認められる。本発明のペプチドを既に提示しているA P Cのワクチン接種によって拡大されるのは、この自然に起っている現象である。拡大によって、拡大されたT細胞応答が誘発されるばかりでなく、M H C - ペプチド複合体に対する抗体をもたらすB細胞応答も開始されるだろう。

【 0 0 7 0 】

本発明のワクチンは、ワクチン接種後にT細胞応答とB細胞応答の両方の開始と維持に増強作用を持つ数多くの化合物によって強化することができる。

【 0 0 7 1 】

ワクチンへのサイトカイン類の添加は、そのようにしてT細胞応答をエンハンスするだろう。好適なサイトカインは、例えばIL-2、IL-4、IL-7またはIL-12などのインターロイキン、GM-CSF、RANTES、MIP-、腫瘍壊死因子、IFN-などのインターフェロン類、ケモカインなどである。

【0072】

同様に、CD2、CD3、CD27およびCD28などのT細胞表面抗原に対する抗体も免疫原反応をエンハンスするだろう。

【0073】

またCD4⁺ヘルパー細胞またはCD8⁺キラー細胞を刺激するためのヘルパーエピトープの添加も免疫原反応を強化する。また、例えば熱ショック由来タンパク質やコレラ毒素などといった他の抗原に由来するヘルパーエピトープも使用できる。

10

【0074】

本発明ペプチドに対する反応性腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の使用は、本発明のもう一つの部分を構成する。この方法での第一段階は患者から試料を採取することである。これは通常、局部麻酔下に腫瘍沈着物を切除することによって行われる。次にこの標本中に存在するTILを既知の方法に従って4~8週間培養増殖する(Topalianら, 1987, J. Immunol. Meth. 102, 127-141)。次いでこの培養期間中にTILを本発明ペプチドまたはgp100タンパク質との反応性について調べる。抗原を認識するTILを単離し、さらに培養する。

【0075】

20

この方法によって得られる反応性腫瘍浸潤リンパ球も本発明の一部を構成する。gp100およびそのエピトープと特異的に反応するそのようなTIL細胞系の一例(TIL1200と呼ぶ)を発見した。このTIL1200細胞系はMHC分子HLA-A2.1をも発現する。さらに、この細胞系によるTCR、CD3およびCD8の発現も立証されている。さらにTIL1200はHLA-A2.1とgp100の両方を発現するトランスフェクタントを認識する。

【0076】

このTIL1200と、gp100を認識するその他のTILはメラノーマ患者の治療に適している。そのような治療のためには、TILを前述のように培養し、それを静脈内注入により患者に戻す。治療の成功は腫瘍保有宿主の全身照射またはシクロホスファミドによる治療による予備治療によっておよびインターロイキン-2の同時投与によって増強することができる(Rosenbergら, 1986, Science 223, 1318-1321)。

30

【0077】

患者に注入によって戻されるTILは好ましくは自家TIL(すなわち患者自身の腫瘍に由来するもの)であるが、アロゲンのTILの注入も考えられる。

【0078】

前述の方法によって得られるTILのもう一つの利用法はインビボの診断への使用である。TILを例えば¹¹¹In(Fisherら, 1989, J. Clin. Oncol. 7, 250-261)または他の任意の適当な診断マーカーでラベルすれば、それらはメラノーマ患者中の腫瘍沈着の同定に適するようになる。

40

【0079】

本発明ペプチドまたはgp100タンパク質に対する反応性CTLによって発現されるT細胞レセプター(TCR)は、本発明のもう一つの部分を構成する。当該術分野ではよく知られているようにTCRはCTLの特異性を決定する。したがってTCR(とりわけその可変領域)をコードするcDNAを単離し、T細胞に導入することにより、抗腫瘍活性を任意のT細胞に移入させることができる。とくに、そのようなTCRを自家T細胞に導入した後、そのT細胞を増殖すれば、自家患者への養子移入に好適な多数のCTLが得られる。

【0080】

また、このT細胞レセプターを保有する細胞をワクチン接種に使用することもできる。

50

【 0 0 8 1 】

ワクチンは、本発明のペプチドを発現する能力を持つメラノーマ細胞から構成させることもできる。これらの細胞はNK I - b e t e b (g p 1 0 0 に対するもの)などの特異的抗体を使って患者から単離できるが、天然の g p 1 0 0 産生細胞であるかもしくは本発明のペプチドを産生するように遺伝子操作されている培養メラノーマ細胞系からそれらのメラノーマ細胞を作ることにもできる。これらの細胞は照射によって非腫瘍原性にし、患者に注入する(戻す)ことができる。これらメラノーマ細胞の免疫学的作用を増強するには、リンフォカイン、好ましくはインターロイキン - 2 (IL-2)または顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を産生するように、それらを遺伝的に改変することが好ましい。ペプチド⁺/ g p 1 0 0 ⁺メラノーマ細胞を、I L - 2 または G M - C S F の 産 生 を コー ド する 配 列 を 持 つ ク ロ ー ニ ング ビ ヒ ク ル で ト ラ ンス フ ェ ク シ ョ ン す る こ と が 可 能 である。

10

【 0 0 8 2 】

そのようなワクチンの患者への注入により、CTLの生成が刺激されるだろう。

【 0 0 8 3 】

同様の効果を持つもう1つのタイプのワクチン接種は、純粋なDNA、例えば本発明のペプチド(相同体および非相同体(キメラタンパク質)または反復体)をコードするDNA配列を持つベクターまたはベクターウイルスのDNAを用いるワクチン接種である。注射すると、その抗原またはペプチドを発現する細胞に、そのウイルスが感染またはそのDNAが形質転換されるだろう。

20

【 0 0 8 4 】

本発明のペプチドに対する抗体も本発明の一部である。

【 0 0 8 5 】

これらのペプチドに対する単一特異性抗体は、Hallらの方法(1984, Nature 311, 379-387)の変法により、複特異性(polyspecific)抗血清からアフィニティー精製法で得ることができる。複特異性抗血清は標準的な免疫法に従ってウサギを免疫することによって得ることができる。

【 0 0 8 6 】

本明細書にいう単一特異性抗体とは、関連する抗原に対して同種の結合特性を持つ単一の抗体種または複数の抗体種と定義される。本明細書にいう同種の結合とは、その抗体種が本発明のリガンド結合ドメインに結合できることを指す。

30

【 0 0 8 7 】

これらの抗体はモノクローナル抗体であることが好ましく、ヒト化モノクローナル抗体であることがより好ましい。

【 0 0 8 8 】

モノクローナル抗体は、当該技術分野で知られている方法により、近交系マウス(好ましくはB a l b / c)を適当なタンパク質で免疫することによって調製できる(Koehler, G.およびMilstein C., 1975, Nature 256, 495-497)。次いでダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)などの適当な細胞培養培地中のヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリン中で生育することによりハイブリドーマ細胞を選択する。抗体産生ハイブリドーマを好ましくはM a c P h e r s o n の 軟 寒 天 法 (1973, Tissue Culture Methods and Applications, KruseおよびPaterson編, Academic Press)を使ってクローン化する。分離したコロニーを適当な培養培地が入った培養用培養プレートの各ウェルに移す。抗体産生細胞は、適当な免疫原を使ったスクリーニングによって同定される。免疫原陽性ハイブリドーマ細胞は当該技術分野で知られる技術で維持される。特異的抗モノクローナル抗体は、そのハイブリドーマをインビトロで培養するか、当該技術分野で知られる手法によりハイブリドーマを注射した後、マウスで腹水を調製することによって産生される。

40

【 0 0 8 9 】

ヒト化抗体を使用することが好ましい。CDR移植法などの抗体ヒト化法が知られている(Jonesら, 1986, Nature 321, 522-525)。本発明のポリペプチドと反応する抗体に対

50

する抗原反応を避けるためにもう1つ考えられることは、ヒト抗体またはその断片もしくは誘導体の使用である。

【0090】

ヒト抗体は単離したBリンパ球のインビトロの刺激によって産生できる。またヒト抗体は、本発明リガンド結合ドメインの少なくとも1つで免疫したヒトから収集された(不活化)Bリンパ球から単離することもできる。

【0091】

前述の抗体はメラノーマ患者の受動ワクチン接種に使用できる。この種のワクチンに好ましいタイプの抗体は、MHC分子と結合して提示された前述のペプチドに対する抗体である。この種の抗体を生産するには、APCによって提示されたペプチドの免疫化が必要である。そのような免疫化は前述のように行なうことができる。また、ペプチド-MHC複合体に対するヒト抗体を、該ペプチドの1つをローディングしたAPCからなるワクチンで処置された患者から単離することもできる。

【0092】

本発明ワクチンの1つによる処置後に形成される抗体は、該ワクチン接種のモニタリングにも使用できる。そのような方法のためには、その患者の血清を入手し、ワクチン接種に使ったペプチドに対する抗体を検出する。この検出操作から抗体価を知ることにより、追加ワクチン接種の必要があるかどうかを判断することができる。

【0093】

血清中の該抗体の特異的検出は、ラベルされたペプチドによって達成できる。ラベルはインビトロの診断の分野で知られている診断マーカーならどれでもよいが、最も好ましいもの(また広く使用されているもの)は酵素、色素、金属および放射性核種(例えば ^{67}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I または ^{131}I)である。

【0094】

放射性診断マーカーは本発明のペプチドに直接結合するか、そのペプチドに直接またはリンカーもしくはスペーサー分子を介して結合されたキレート成分によって結合することができる。放射性核種をペプチドまたはペプチド様構造に結合する技術は、(腫瘍)診断薬の分野では、インビボ試験とインビトロ試験の両方で使用されるラベルされた抗体の数多くの応用例から既に知られている。

【0095】

ペプチドの直接ラベルは、例えば1バイアル法(one-vial method; Haismaら, 1986, J. Nucl. med. 27, 1890)に記述されているように行なうことができる。リンカーまたはスペーサー分子を使用してまたは使用せずに、キレート団を介してペプチドをラベルする一般的な方法は、例えばUSP 4, 472, 509とUSP 4, 485, 086に記述されている。DTPAの二環式無水物を用いるキレート団はHnatowichら(1983, J. Immunol. Meth. 65, 147-157)に開示されている。ジアミドジメルカプチド化合物による結合はEP 188, 256に開示されている。

【0096】

例示のため、次に説明する添付の図面を参照して本発明をさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図1】アラニン置換エピトープの標的細胞感作。(A)クロム標識T2標的細胞を様々な量の表示したアラニン置換エピトープ類似体と共に1時間前培養した。Melan-A/MART-1 27-35反応性TIL1235リンパ球をエフェクター/標的比20で添加した。(B)アラニン置換gp100 154-162類似体の標的細胞感作を、エフェクター/標的比20のgp100反応性TIL1200リンパ球を使って分析した。

【図2】N末端アンカー置換エピトープの標的細胞感作。クロム放出実験を図1と同様に行なった。(A)Melan-A/MART-1 27-35反応性TIL1235リンパ球を使って、Melan-A/MART-1 27-35類似体による標的細胞感作を

10

20

30

40

50

分析した。(B) gp100 154-162 反応性 TIL1200 リンパ球を使って、gp100 154-162 類似体による標的細胞感作を評価した。

【図3】HLA-A*0201/K^b形質転換マウスにおける gp100 154-162 エピトープ類似体の免疫原性。ペプチドなし、10mM 野生型 gp100 154-162 または 10mM のマウスの免疫に使用したエピトープ類似体と共に前培養したクロムでラベルされたジャーカット A2/K^b 標的細胞を用いて、免疫マウスから得たバルク CTL をその溶解活性について試験した。各ペプチドについて、反応するマウスのバルク CTL の平均特異溶解率を示す。標準偏差が平均値の 15% を超えることはなかった。2 回の実験のうち代表的な 1 実験を示す。

【図4】インビトロで誘導したエピトープ類似体特異的 CTL 培養物のペプチド特異的応答性。クロムでラベルされた HLA-A*0201+T2 標的細胞を、10mM の関連 HLA-A*0201 結合ペプチド、10mM 野生型 gp100 154-162 または 10mM の CTL 誘導に使用したエピトープ類似体と共に前培養した。種々の CTL 培養物を 20:1 のエフェクター:標的比で添加した。2 回の実験のうち代表的な 1 実験を示す。

【図5】エピトープ類似体によって誘導した CTL 培養物は、野生型エピトープを内因的に提示するメラノーマ細胞を溶解する。クロムでラベルされた HLA-A2.1+BLM および Me1 624 メラノーマ細胞を標的細胞として使用した。BLM 細胞は gp100 の発現を欠く。種々の CTL 培養物を 20:1 のエフェクター:標的比で添加した。2 回の実験のうち代表的な 1 実験を示す。

【発明を実施するための形態】

【0098】

材料と方法

細胞培養

HLA-A*0201+メラノーマ系 BLM は以前に記述されているように培養した (Bakerら, 1994, J. Exp. Med. 179:1005)。TIL1200 リンパ球と TIL1235 リンパ球は以前に報告されているように培養した (Kawakamiら, 1992, J. Immunol. 148:638)。T2 細胞 (Salterら, 1985, Immunogenetics, 21:235) と HLA-A*0201+B リンパ芽球様 JY 細胞は、5% FCS (BioWhittaker, ベルギー・ヴェルヴィエ) を補足した Iscove 培地 (Gibco, 英国スコットランド・ペーズリー) で維持した。HLA-A*0201/K^bキメラ分子を発現するジャーカット A*0201/K^b細胞 (Irwinら, 1989, J. Exp. Med. 170:1091) は 0.8mg/ml G418 (Gibco, 英国スコットランド・ペーズリー) を補足した 5% FCS を含む Iscove 培地で培養した。

【0099】

HLA-A*0201+リンパ球

健康な白人ボランティアは、モノクローナル抗体 BB7.2 (Parhamら, 1981, Hum. Immunol. 3:277) および MA2.1 (Parhamら, 1978, Nature 276:397) を用いてフローサイトメトリーにより、HLA-A2 表現型に分類された。ドナーに白血球除去血輸血を行い、PBMC をフィコール/ハイパック密度勾配遠心分離法によって単離した。それらの細胞は 4×10^7 PBMC ずつ低温保存した。

【0100】

形質転換マウス

HLA-A*0201/K^b形質転換マウスを使用した (動物業者は米国インディアナポリスの Harlan Sprague Dawley 社)。マウスを清潔な慣用の条件下に飼育した。この形質転換マウスは、HLA-A*0201 1 および 2 ドメインは無傷のまま、重鎖の 3 ドメインが対応するネズミ H-2K^bドメインで置換されている HLA-A*0201/K^bキメラ遺伝子の産物を発現する (Virielloら, 1991, J. Exp. Med. 173:1007)。これにより、ネズミ CD8⁺T リンパ球上のネズミ CD8 分子は、ハイブリッド MHC クラス I 分子の同系 3 ドメインと相互作用することができる。

【0101】

ペプチド

10

20

30

40

50

C T Lの誘導とクロム放出アッセイのために、A B I M E Dマルチプルシンセサイザー (multiple synthesizer) を使ってF m o c ペプチド化学により、遊離のカルボキシ末端を持つペプチドを合成した。分析用H P L Cによれば、ペプチドはいずれも90%を超える純度を持っていた。ペプチドはD M S Oに溶解して、-20℃で保存した。

【0102】

T 2細胞でのH L A - A * 0 2 0 1アップレギュレーション

T 2細胞でのペプチド誘導性H L A - A * 0 2 0 1アップレギュレーションは以前に記述されているように行なった (Nijmanら, 1993, Eur. J. Immunol. 23:1215)。簡単に述べると、ペプチドをD M S O原液から種々の濃度に希釈し(最終D M S O濃度0.5%)、 10^5 個のT 2細胞と共に体積100mlの無血清I s c o v e培地中、3mg/mlヒト γ 2 - ミクログロブリン (Sigma, ミズーリ州セントルイス)の存在下に37℃、5%CO₂で14時間インキュベートした。T 2細胞の細胞表面におけるH L A - A * 0 2 0 1分子の安定化は、抗H L A - A 2モノクローナル抗体B B 7 . 2 (Parhamら, 1981, Hum. Immunol. 3:277)を用いてフローサイトメトリーで分析した。蛍光指数 (Fluorescence Index) は (実験平均蛍光 ÷ バックグラウンド平均蛍光) - 1、として表す。背景平均蛍光値はT 2細胞を同等濃度のH L A - A * 0 2 0 1非結合ペプチドと共にインキュベートすることによって得た。

10

【0103】

競合用H L A - A * 0 2 0 1ペプチド結合アッセイ

H L A - A * 0 2 0 1に対するペプチド結合は、H L A - A * 0 2 0 1+J Y細胞を用いて、以前に記述されているように分析した (van der Burgら, 1995, Hum. Immunol. 44:189)。簡単に述べると、マイルドに酸処理されたJ Y細胞を150nMフルオレセイン (FL)でラベルされた基準ペプチド (FLPSDC(-FL)FPSV) および数濃度の競合ペプチドと共に、1.0mg/ml γ 2 - ミクログロブリン (Sigma, ミズーリ州セントルイス)の存在下にインキュベートした。次に、それらの細胞を洗浄し、パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリーによって分析した。競合ペプチドの不在下で得た平均蛍光 (MF)を最大結合とみなし0%とした。また基準ペプチドなしで得たMFを100%阻害とした。結合阻害百分率は次式を使って計算した: $(1 - (MF_{150nM基準} \text{ および競合ペプチド} - MF_{基準ペプチドなし})) \div (MF_{150nM基準} - MF_{基準ペプチドなし}) \times 100\%$ 。競合ペプチドの結合能を、FLでラベルされた基準ペプチドの結合を50%阻害するのに必要な濃度 (IC₅₀)として表わす。

20

30

【0104】

37℃におけるM H C - ペプチド複合体安定性の測定

M H C - ペプチド複合体安定性の測定を行なった。M H CクラスI分子のデノボ合成を停止するために、H L A - A * 0 2 0 1+ホモ接合J Y細胞を10⁻⁴Mエメチン (Sigma, 米国セントルイス)で、37℃で1時間処理した。次にそれらの細胞にマイルドに酸処理を施し、次いで200mMのペプチドを室温で1時間ローディングした。その後、遊離のペプチドを除去するために細胞を2回洗浄し、37℃で0、2、4および6時間インキュベートした。次にその細胞をモノクローナル抗体B B 7 . 2 (Parhamら, 1981, Hum. Immunol. 3:277)を用いて染色し、パラホルムアルデヒドで固定し、フローサイトメトリーで分析した。

40

【0105】

H L A - A * 0 2 0 1 / K^b形質転換マウスにおけるC T L誘導

H L A - A * 0 2 0 1 / K^b形質転換マウス3匹の各群に、H - 2 I - A^b拘束性H B Vコア抗原由来Tヘルパーエピトープ (128 - 140; 配列T P P A Y R P P N A P I L) (Milichら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:1620) 140mgの存在下にI F A中に乳化したペプチド100mgを尾静脈の根元に皮下注射した。11日後、マウスを犠牲にし、脾細胞 (10ml中30 × 10⁶細胞)をペプチドローディングした同系照射L P S刺激B細胞リンパ芽球 (比4:1)により試験管内で再刺激した。培養第6日に、バルク応答細胞集団をその特異的溶解活性について試験した。

50

【0106】

H L A - A * 0 2 0 1 + ドナー由来 C T L のインビトロ誘導

樹状細胞は、融解した P B M C を使用して、以前に記述されているように (Bakker ら, 1995, Cancer Res. 55:5330) R o m a n i らの手法 (Romani ら, 1994, J. Exp. Med. 180:83) に従って生成した。培養開始前に、樹状細胞に 5 0 m M のペプチドをローディングした。自家 C D 8 + 濃縮応答 T リンパ球は、融解した P B M C を 2 時間付着させた後、C D 4 + T 細胞の非接着画分を抗 C D 4 モノクローナル抗体 R I V - 7 (Leerling ら, 1990, Dev. Biol. Stand. 71:191) とヒツジ抗マウス I g G 被覆磁性ビーズ (DynaI, スウェーデン・オスロ) とを使って部分的に枯渇させることによって調製した。刺激開始時に、 2×10^5 個のペプチドローディングされた D C と 2×10^6 個の応答細胞を、5 % プールヒト A B + 血清、 10^3 U / m l I L - 6 (Sandoz, スイス・バーゼル) および 5 n g / m l I L - 1 2 を含む I s c o v e 培地 2 m l が入った 2 4 ウェル組織培養プレート (Costar, オランダ・バートホーフドルフ) の各ウェルで共培養した。

10

【0107】

第 8 日と第 1 5 日に、ペプチドをパルスした樹状細胞を刺激細胞として使用することにより、応答細胞集団を再刺激した。それぞれ最終濃度 1 0 U / m l と 5 n g / m l の I L - 2 (Cetus Corp., カリフォルニア州エメリービル) と I L - 7 (Genzyme, マサチューセッツ州 ケンブリッジ) を含む培地で、各培養を増殖させた。その 1 週間後に、付着ペプチドパルス P B M C を使って既に記述されているように各培養物を再刺激した (Bakker ら, 1995, Cancer Res. 55:5330)。少なくとも 4 回の再刺激後に、応答細胞集団をその特異的溶解活性について調べた。

20

【0108】

クロム放出アッセイ

クロム放出アッセイは以前に記述されているように行なった (Bakker ら, 1994, J. Exp. Med. 179:1005)。簡単に述べると、 10^6 個の標的細胞を 100 m C i $Na_3^{51}CrO_4$ (Amersham, 英国バッキンガムシア) と共に 1 時間インキュベートした。次に様々な量のエフェクター細胞を、U 底微量定量プレート (Costar, オランダ・バートホーフドルフ) のウェル 3 つずつに入れた標的細胞に、1 5 0 m l の最終体積で加えた。ペプチド認識アッセイでは、標的細胞を 1 0 0 m l の体積中で様々な濃度のペプチドと 3 7 で 3 0 分または 6 0 分あらかじめインキュベートした後、エフェクター細胞を加えた。5 時間のインキュベーション後、上清の一部を収集し、その放射活性含有量を測定した。3 つ一組のウェルの平均特異的溶解百分率は、次式を使って計算した。特異的溶解 (%) = ((実験放出 - 自発的放出) ÷ (最大放出 - 自発的放出)) × 1 0 0 。

30

【実施例】

【0109】

実施例 1 :

M e l a n - A / M A R T - 1 2 7 - 3 5 エピトープと g p 1 0 0 1 5 4 - 1 6 2 エピトープに関する H L A - A * 0 2 0 1 結合および / または T C R 相互作用に関与するアミノ酸残基の同定

M e l a n - A / M A R T - 1 2 7 - 3 5 エピトープと g p 1 0 0 1 5 4 - 1 6 2 エピトープは、転移メラノーマに由来する H L A - A * 0 2 0 1 拘束性 T I L 系を用いて同定された。M e l a n - A / M A R T - 1 2 7 - 3 5 エピトープは、H L A - A * 0 2 0 1 + 標的細胞上に提示された場合に M e l a n - A / M A R T - 1 特異的 T I L 1 2 3 5 系を誘発できる名目 (nominal) エピトープであることがわかった (Kawakami ら, 1994, J. Exp. Med. 180:347)。g p 1 0 0 アミノ酸 1 5 5 - 1 6 1 付近に位置する 8 m e r s から 1 1 m e r s までの一群のペプチドのなかから、我々は 9 m e r s である 1 5 4 - 1 6 2 が、g p 1 0 0 反応性 T I L 1 2 0 0 系による溶解に関して H L A - A * 0 2 0 1 + 標的細胞を最も効率よく感作するペプチドであると同定した (Bakker ら, 1995, Int. J. Cancer 62:97)。現在では、M e l a n - A / M A R T - 1 2 7 - 3 5 9 m e r s と g p 1 0 0 1 5 4 - 1 6 2 9 m e r s は H L A - A * 0 2 0 1 + メラノーマ細胞の

40

50

細胞表面から溶離され、タンデム質量分析法によって同定されており、このことは、それらが実際にHLA-A*0201中に内因的に提示される名目エペトープであることを示している。HLA-A*0201結合および/またはTCR相互作用に關与する両エペトープ中のアミノ酸残基を同定するために、本来のアミノ酸がアラニン残基で置換されているエペトープ類似体を合成した。アラニン残基が野生型エペトープ中に存在する場合は、それらをアミノ酸であるグリシンに置換した。プロセシング欠損細胞系T2を用いる間接結合アッセイ法により、それら置換ペプチドをHLA-A*0201への結合について評価した(Nijmanら, 1993, Eur. J. Immunol. 23:1215)。Melan-A/MART-1エペトープ中の置換はいずれも、T2細胞の細胞表面でHLA-A*0201分子を安定化する能力のほとんど完全な喪失をもたらした(表I)。Melan-A/MART-1 27-35類似体を μM 濃度でMelan-A/MART-1特異的CTLによる溶解に關するHLA-A*0201⁺標的細胞の感作に使用した場合、このエペトープの4番目から7番目までの位置におけるアラニン置換について、我々は標的細胞溶解の減少を観察した(表I)。また、2番目の位置におけるグリシン置換はCTL反応性の減少をもたらした。したがってMelan-A/MART-1 27-35エペトープ中のこれらの位置にあるアミノ酸はTCR相互作用に關与すると考えられる。

【0110】

gp100 154-162エペトープの場合、エペトープ類似体のHLA-A*0201親和力の減少は、3番目と9番目の位置でのアラニン置換のみに観測された(表I)。T細胞認識に關しては、このエペトープの5番目、6番目および7番目の位置におけるアラニン置換は許されず、このことは、これらの位置にあるアミノ酸がTCRに關してこのエペトープ内の決定的な接触残基であることを示している。

【0111】

次に、 μM 濃度で反応性を誘導したエペトープ類似体を滴定することにより、關連するCTLによる溶解に關してT2標的細胞を感作するそれらの相対能力を評価した(図1)。エペトープ類似体はいずれの場合もその感作能が野生型エペトープと比較して同等もしくは劣っていた。ただし、gp100 154-162の8番目の位置におけるアラニン置換は例外であって、驚くべきことに、このペプチドは10倍低い濃度でさえgp100反応性CTLによる標的細胞の溶解を誘導することができた。

【0112】

実施例2:

gp100 154-162エペトープとMelan-A/MART-1 27-35エペトープにおけるN末端アンカー残基置換はどちらもHLA-A*0201に対する親和力の改善をもたらす

Melan-A/MART-1 27-35エペトープとgp100 154-162エペトープは共に通常でないN末端アンカー残基を持つので、我々はこれらの残基を一般的なHLA-A*0201アンカー残基V、L、IまたはMに置換した(Drijfhoutら, 1995, Hum. Immunol. 43:1)。次いで我々はそれらのペプチドを、HLA-A*0201結合と、關連するCTLによる溶解に關して標的細胞を感作するそれらの能力について試験した。メチオニン置換を除いて、Melan-A/MART-1エペトープ中のアンカー残基置換はすべてHLA-A*0201への結合の有意な改善をもたらした(表II)。これらのペプチドを1mMの濃度でローディングしたHLA-A*0201⁺標的細胞は、メチオニン置換エペトープ以外は、Melan-A/MART-1反応性CTLによって認識された(表II)。メチオニン置換ペプチドは野生型エペトープと同等なレベルでHLA-A*0201に結合したが、CTL活性を誘導することはできなかった。Melan-A/MART-1アンカー置換ペプチドを用いた滴定実験により、これらのエペトープ類似体はTIL1235による溶解に關して標的細胞を感作する点で野生型よりも劣ることが明らかになった(図2)。

【0113】

T2アッセイ法を用いた場合、メチオニン置換エペトープを除くgp100 154-

10

20

30

40

50

162アンカー置換ペプチドはすべて野生型エピトープと同等なHLA-A*0201結合を示した(表II)。興味深いことに、これらのペプチドは、野生型ペプチドと比較して10倍低い濃度で標的細胞上にローディングされた場合も、TIL1200によって認識され(図2)、一方、メチオニン置換ペプチドは何も相違を示さなかった。これらの発見は、天然エピトープ内のアミノ酸置換がT細胞認識の改善をもたらしていることを立証している。

【0114】

実施例3:

gp100 154-162エピトープ類似体による改善された標的細胞感作はHLA-A*0201への増大した親和力と相関する

10

置換されたgp100 154-162エピトープの強化されたCTL認識をHLA-A*0201親和力の改善に帰することができるかどうかを評価するために、ここでは、それらペプチドのHLA-A*0201結合能を、ラベルされた基準ペプチドと問題のペプチドとの競争に基く、より高感度な細胞結合型HLA-A*0201結合アッセイ法を使って調べた(van der Burgら, 1995, Hum. Immunol. 44:189)。このアッセイ法で得たHLA-A*0201結合親和力から、野生型と比較して10倍低い濃度でTIL1200による溶解に関して標的細胞を感作できるペプチドはすべて、HLA-A*0201により高い親和力で結合していることが明らかになった(表III)。N末端アンカー置換に加えて、C末端アンカー位置に隣接する極性残基の疎水性残基への置換も、見かけ上TCR認識に影響を及ぼすことなく、HLA-A*0201親和力が改善されたエピトープ類似体をもたらした(KTWGQYWAV)。MHCクラスI-ペプチド複合体解離速度の測定によって、試験したエピトープ類似体が野生型と比較して少なくとも同等に安定であることが明らかになった(表III)。試験したペプチドはすべて4時間を超えるDT₅₀(複合体の50%が減衰するのに必要な時間)を示した。3時間以上のDT₅₀値を持つペプチドはHLA-A*0201/K^b形質転換マウス中で免疫原性だった。総合するとこれらのデータは、gp100 154-162エピトープ類似体が野生型gp100 154-162と比較して類似するまたは増大した免疫原性をもちうることを示している。

20

【0115】

実施例4:

HLA-A*0201/K^b形質転換マウスにおけるgp100 154-162エピトープ類似体の免疫原性

30

MHCクラスI結合親和力と解離速度を測定したgp100 154-162エピトープ類似体の生体内での免疫原性を決定するため、HLA-A*0201/K^b形質転換マウスにgp100 154-162野生型エピトープ、エピトープ類似体KTWGQYWA^uV、KVWGQYWQV、KLWGQYWQVまたはKIWGQYWQV、もしくはコントロールのペプチド(HBVコア18-27; FLPSDDFPSV)をワクチン接種した。これらの形質転換マウスの作出(Vitielloら, 1991, J. Exp. Med. 173:1007)とそのインビボ免疫原性分析への使用は以前に記述されている(Ressingら, 1995, J. Immunol. 154:5943; Setteら, 1994, J. Immunol. 153:5586)。図3に示すように、gp100 154-162エピトープ類似体KTWGQYWA^uV、KVWGQYWQVおよびKLWGQYWQVはきわめて効率よくCTL応答を誘導した。それより程度は低いが、エピトープ類似体KIWGQYWQVと野生型gp100 154-162もCTL応答を誘発できた。gp100 154-162エピトープ類似体をワクチン接種したマウスに由来するバルクCTLは、ワクチン接種に使用したペプチドと野生型エピトープをローディングしたジャーカットA*0201/K^b細胞をどちらも特異的に溶解した。興味深いことに、エピトープ類似体に対して生じたCTLバルク培養物はすべて、野生型エピトープをパルスした標的細胞を、ワクチン接種に使用したエピトープ類似体をパルスした標的細胞と比較して同等かそれ以上に認識した。このように、試験したgp100 154-162エピトープ類似体はすべて、HLA-A*0201/K^b形質転換マウス中で免疫原性であり、天然のgp100 154-162エピトープとの交差反応性を示すCTLを誘導し

40

50

た。

【0116】

実施例5：

内因的にHLA-A*0201に提示された野生型gp100 154-162との交差反応性を示すgp100 154-162エピトープ類似体特異的ヒトCTLのインビトロ誘導

次に我々は、HLA-A*0201+の健康なドナーのT細胞レパトリー内にgp100 154-162エピトープ類似体を認識できるT前駆細胞が存在するかどうかを評価するためのインビトロCTL誘導アッセイを行なった。これを達成するため、我々は、過去に記述されているように、ペプチドローディングされた樹状細胞の自家応答Tリンパ球との共培養を開始した(Bakkerら, 1995, Cancer Res. 55:5330)。数回の再刺激後、応答T細胞を細胞障害活性について試験した(図4)。gp100 154-162エピトープ類似体KTWGQYWAV、KVWGQYWQV、KLWGQYWQVおよびKIWGQYWQVに対して生じたバルクCTL集団はすべて、CTL誘導に使用したペプチドと共にインキュベートしたHLA-A*0201+T2標的細胞を効率よく溶解した。無関係なペプチドの存在下では低いバックグラウンド溶解だけが観測された。またこれらのgp100 154-162エピトープ類似体反応性CTLは、野生型gp100 154-162と共にインキュベートしたT2標的細胞をも効率良く溶解した。これらのCTL応答細胞集団が内因的にプロセッシングされ提示された野生型エピトープをも認識しうかどうかという問題と取り組むために、我々はHLA-A*0201+メラノーマ細胞系BLMとMel 624を標的として用いるクロム放出実験を行なった。BLM細胞はタンパク質レベルでもmRNAレベルでもgp100抗原の発現を失っている(Ademaら, 1993, Am. J. Pathol. 143:1579)。図5に示すように、ペプチド誘導CTL培養物はいずれも抗原発現性Mel 624細胞を溶解したが、抗原陰性のBLM細胞に対する溶解は観察されないか、バックグラウンド溶解しか観察されなかった。さらに、抗gp100 154-162類似体CTLによって放出されるTNFから、これらCTLの内因的に提示された野生型gp100 154-162との反応性が立証された(未公表のデータ)。これらのデータは、gp100 154-162エピトープ類似体をローディングした樹状細胞を用いて誘導されたこれら4種類のCTL培養物がすべて、HLA-A*0201+Mel 624細胞によって内因的にプロセッシングされ提示された天然のgp100 154-162エピトープを認識したことを示している。

【0117】

10

20

30

【表 1】

表 1. アラニン置換エピトープの HLA-A*0201 結合および標的細胞感作

	HLA-A*0201 の安定化 ^a		TIL1235 による 標的細胞の溶解 ^b		HLA-A*0201 の安定化		TIL1200 による 標的細胞の溶解
	50 μ M	25 μ M	gp100 154-162	50 μ M	25 μ M		
Melan A/MART-1 27-35	2.26	2.12	-3	YLEPGPVTA ^c	3		
YLEPGPVTA ^c	1.20	1.11	40	KTWGQYWQV	2.06	1.40	67
AAGIGILTV	1.07	1.11	52	ATWGQYWQV	1.94	1.42	75
GAGIGILTV	0.96	1.05	6	KAWGQYWQV	1.57	1.20	64
AGGIGILTV	0.98	0.99	13	KTAGQYWQV	1.17	1.02	58
AAAGILTV	0.93	0.97	0	KTWAQYWQV	1.45	1.13	63
AAGAGILTV	1.01	1.01	4	KTWGAYWQV	1.59	1.25	9
AAGIAILTV	0.93	1.00	2	KTWGQAWQV	1.42	1.15	7
AAGIGALTV	1.10	1.13	6	KTWGQYAQV	1.31	1.14	-2
AAGIGIATV	1.05	1.01	11	KTWGQYWAV	1.72	1.35	73
AAGIGILAV	1.00	1.03	26	KTWGQYWQA	1.08	1.02	76
AAGIGILTA							

^a HLA-A2.1 に対するペプチドの結合は、示したペプチド濃度でのプロセッシング検出用 T2 細胞系を用いて分析した。

数字は蛍光指数 (Fluorescence Index) すなわち実験平均蛍光を T2 細胞を同じ濃度で HLA-A2.1 非結合ペプチドとともにインキュベートした場合に得られる平均蛍光で割った指数で示す。

^b 数字は E:T の比が 20:1 での関連 TIL 系による特異的溶解の % を示す。

^c gp100 280 - 288.

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

【 表 2 】

表Ⅱ. N末端アンカー置換エpiteープのHLA - A*0201結合および標的細胞感作

	HLA-A*0201 の安定化 ^a		TIL1235による 標的細胞の溶解 ^b		HLA-A*0201 の安定化		TIL1200による 標的細胞の溶解
	50 μM	25 μM	gp100 154-162	25 μM	50 μM	25 μM	
Melan A/MART-1 27-35	2.26	2.12	-1		2.06	1.40	3
YLEPGPVTA ^c	1.20	1.11	40		2.13	1.57	69
AAGIGILTV	1.62	1.36	27		2.19	1.55	65
AVGIGILTV	2.21	1.93	16		1.73	1.28	57
ALGIGILTV	1.18	1.05	6		2.00	1.43	68
AMGIGILTV	1.58	1.29	27				
AIGIGILTV							

a HLA - A2.1に対するペプチドの結合は、示したペプチド濃度でのプロセッシング検出用T2細胞系を用いて分析した。

数字は蛍光指数 (Fluorescence Index) すなわち実験平均蛍光をT2細胞を同じ濃度でHLA - A2.1非結合ペプチドとともにインキュベートした場合に得られる平均蛍光で割った指数で示す。

b 数字はE : Tの比が20 : 1での関連TIL系による特異的溶解の%を示す。

c gp100 280 - 288.

【 0 1 1 9 】

10

20

30

40

【表 3】

表Ⅲ. gp100 154 - 162 エピトープ類似体の HLA - A*0201 結合および複合体安定性

ペプチド	親和力 IC ₅₀ (μ M) ^a	安定性 (DT50%) ^b
FLPSDFFPSV ^c	0.5	> 4 時間
KTWGQYWQV	1.4	> 4 時間
KTWGQYWAV	0.5	> 4 時間
KVWGQYWQV	0.8	> 4 時間
KLWGQYWQV	0.4	> 4 時間
KIWGQYWQV	0.6	> 4 時間

a HLA - A*0201 に対するペプチドの結合は、マイルドに酸処理した HLA - A*0201 + B - LCL を用いて 4°C での競合試験において分析した。ペプチドの結合能力は、蛍光でラベルした基準ペプチドの結合の 50% 阻害するのに必要なペプチドの濃度として示している。

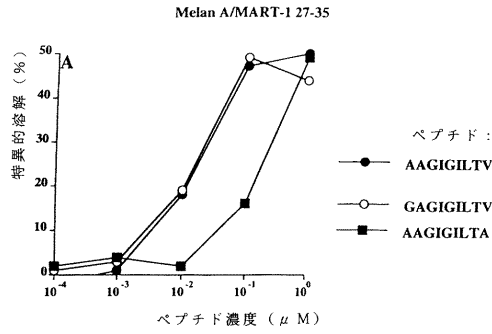
b HLA - A*0201 - ペプチド複合体の分離率はエメチンを前処理した HLA - A*0201 + B - LCL を用いて測定した。マイルドに酸処理したのち、空の細胞表面 HLA - A*0201 分子は、室温でペプチドとともにローディングされ、B - LCL はそののち 37°C に置いた。細胞表面 HLA - A*0201 分子の減衰はフローサイトメトリーにより分析した。分離率は、37°C での MHC クラス I - ペプチド複合体の 50% が減衰するのに必要な時間として表わされている。

c HBC 18 - 27. 標識していない基準ペプチド。

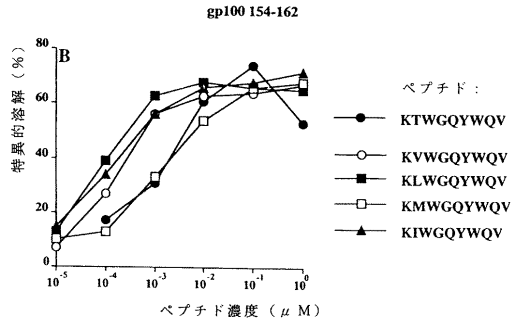
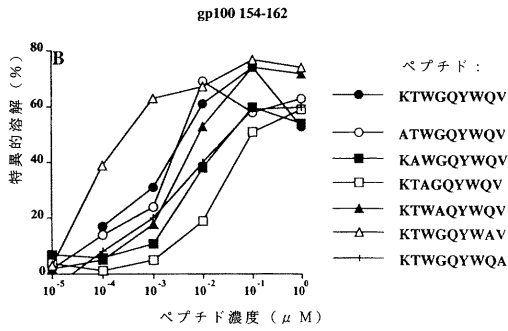
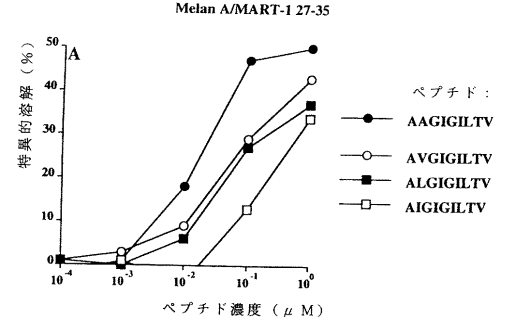
10

20

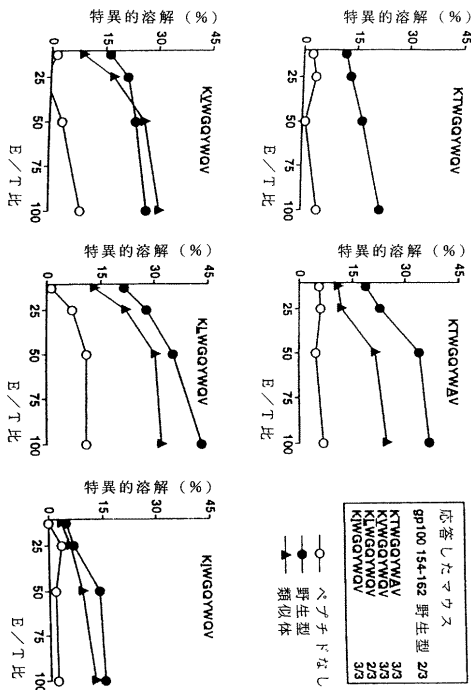
【図1】



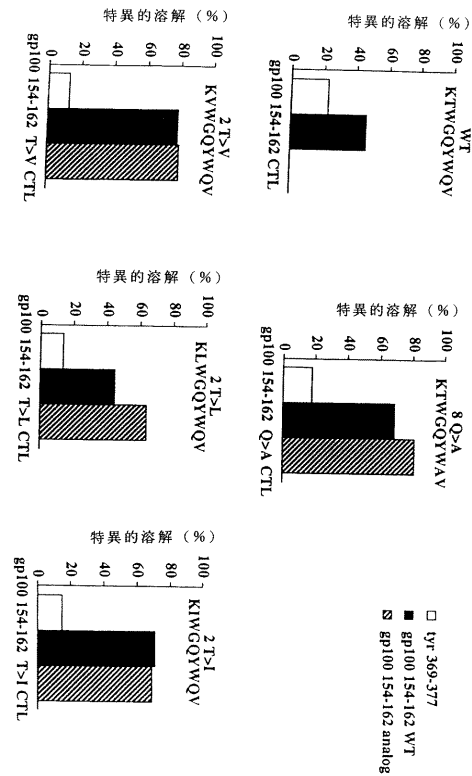
【図2】



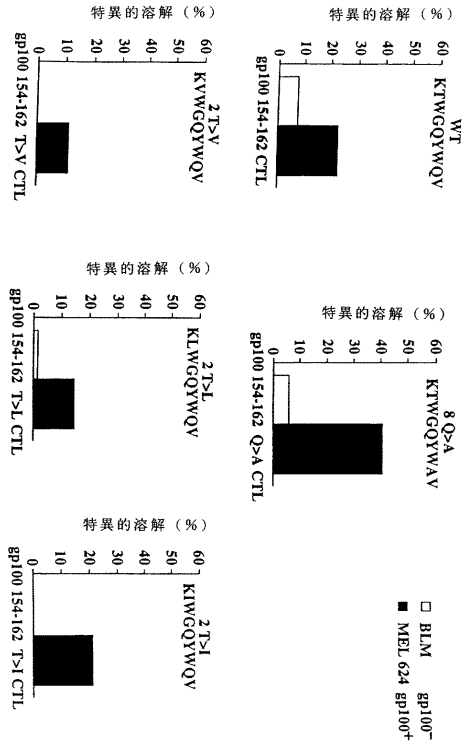
【図3】



【図4】



【 5 】



【 配列表 】

0005198354000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00		H
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39		
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53		N

(73)特許権者 309004585

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー、
 ー、デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ
 THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DE
 PARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
 アメリカ合衆国、20892-7660 メリーランド州、ベセスダ、イグゼキューティブ プー
 ルバード 6011、スイート 325、メールストップコード 7660、ナショナル インス
 ティチュート オブ ヘルス、オフィス オブ テクノロジー トランスファー(番地なし)

(74)代理人 100098464

弁理士 河村 洸

(74)代理人 100154449

弁理士 谷 征史

(74)代理人 100149630

弁理士 藤森 洋介

(72)発明者 フィフドール、カルル フスタフ

オランダ王国、エンエル - 5211 デーデー セルトーヘンボス、ウェストワル 54

(72)発明者 アデマ、ホセ ヤン

オランダ王国、エンエル - 6561 エーデー フルースベーク、ハイドンストラート 53

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第95/029193(WO, A1)

特開平07-278193(JP, A)

特許第4386463(JP, B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/00 - 16/46

CA/REGISTRY(STN)

专利名称(译)	黑素瘤相关肽类似物和针对黑素瘤的疫苗		
公开(公告)号	JP5198354B2	公开(公告)日	2013-05-15
申请号	JP2009115844	申请日	2009-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	美国卫生及公共服务部		
申请(专利权)人(译)	美利坚合众国政府作为复制禅泰德局局长，卫生和人类Sabishizu系		
当前申请(专利权)人(译)	美利坚合众国为复制禅泰德局局长，卫生和人类Sabishizu系		
[标]发明人	フィフドールカルルフスタフ アダマホセヤン		
发明人	フィフドール、カルル フスタフ アダマ、ホセ ヤン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/82 C07K7/06 C07K16/32 C12N5/0783 A61K39/00 A61K39/39 G01N33/53 G01N33/574 A61K38/00 A61K51/08 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/30 C12N15/11 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/4748 A61K38/00 C07K14/47 C07K16/3053		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/82 C07K7/06 C07K16/32 C12N5/00.202.L A61K39/00.H A61K39/39 G01N33/53.N C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.E C12N5/00.202.U C12N5/0783 C12N5/09		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B065/AA94X 4B065/BA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/DD86 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA74		
优先权	1996201945 1996-07-11 EP		
其他公开文献	JP2009178166A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供可用于诱导天然表位反应性CTL (细胞毒性T淋巴细胞) 的肽。ZSOLUTION：提供与癌症治疗和诊断相关的诊断剂，特别是与黑素瘤相关肽类似物具有改善的免疫原性，其表位，抗黑素瘤疫苗，识别抗原的肿瘤浸润性T淋巴细胞和用于检测黑素瘤的诊断和监测接种疫苗。具有改善的免疫原性的肽的使用可能有助于基于病毒疾病和癌症中的疫苗开发CTL表位。Z

表1. フラニニドエーテルのHLA-A*02:01結合および細胞毒性

Melan-A/MART-1 epitope	HLA-A*02:01 の安定性 ^a		HLA-A*02:01 の安定性 ^b		TIL20による 細胞毒性の割合 ^c
	50 μM	25 μM	50 μM	25 μM	
YLERPVTA ^c	2.26	2.12	-3	YLERPVTA	3
AAGGLTV	1.20	1.11	40	KTWGQWQV	67
GAGGLTV	1.07	1.11	52	ATWGQWQV	75
AGGGLTV	0.96	1.05	6	KAWGQWQV	64
AAAGLTV	0.98	0.99	13	KTAGQWQV	58
AAGGLTV	0.93	0.97	0	KTWAGQWQV	63
AAGALTV	1.01	1.01	4	KTWGAYWQV	9
AAGGLTV	0.93	1.00	2	KTWGQAWQV	7
AAGGLTV	1.10	1.13	6	KTWGQVWQV	2
AAGGLAV	1.05	1.01	11	KTWGQWAV	73
AAGGLTA	1.00	1.03	26	KTWGQWQA	76

^a HLA-A*02:01に対するペプチド結合は、示したペプチド濃度でのプロセッシング放出T細胞を用いて分析した。
^b 数字は結合指数 (Fluorescence Index) すなわち平均蛍光強度を72細胞を用いた濃度でHLA-A*02:01結合ペプチドともインキュベートした場合に得られる平均強度で割った値を示す。
^c 数字は表1でのHLA-A*02:01による細胞毒性の割合を示す。