

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5431952号
(P5431952)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月13日(2013.12.13)

| (51) Int.Cl. | | F I | |
|--------------|------------------|---------|----------|
| C 1 2 N | 15/09 (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 A |
| C 1 2 Q | 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/68 Z |
| C 1 2 Q | 1/02 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/02 |
| G O 1 N | 33/53 (2006.01) | G O 1 N | 33/53 D |
| G O 1 N | 33/574 (2006.01) | G O 1 N | 33/574 A |

請求項の数 14 (全 18 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2009-541805 (P2009-541805) | (73) 特許権者 | 506261523 |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年11月28日 (2007.11.28) | | ヨハネス グーテンベルク ユニベルジテ |
| (65) 公表番号 | 特表2010-512762 (P2010-512762A) | | ート マインツ |
| (43) 公表日 | 平成22年4月30日 (2010.4.30) | | ドイツ, 5 5 1 2 2 マインツ, ザールシ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2007/010329 | | ェトラーセ 2 1 |
| (87) 国際公開番号 | W02008/080468 | (74) 代理人 | 100088904 |
| (87) 国際公開日 | 平成20年7月10日 (2008.7.10) | | 弁理士 庄司 隆 |
| 審査請求日 | 平成22年10月14日 (2010.10.14) | (74) 代理人 | 100124453 |
| (31) 優先権主張番号 | 102006060824.0 | | 弁理士 資延 由利子 |
| (32) 優先日 | 平成18年12月21日 (2006.12.21) | (74) 代理人 | 100135208 |
| (33) 優先権主張国 | ドイツ (DE) | | 弁理士 大杉 卓也 |
| | | (74) 代理人 | 100152319 |
| | | | 弁理士 曾我 亜紀 |
| | | (74) 代理人 | 100163544 |
| | | | 弁理士 平田 緑 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者の個別化治療的ワクチン接種の主成分となる、腫瘍患者の腫瘍関連抗原 (TAA) に対する個々のT細胞反応パターンの検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍患者の抗腫瘍 T 細胞の選択的標的抗原を同定する方法であって：

a) 少なくとも 1 人の腫瘍患者の血液から得られた T 細胞を準備する工程であって、該 T 細胞は腫瘍細胞系とのインピトロでの接触により刺激をされてないものであり、

b) 前記腫瘍患者から得られた自己由来の T 細胞免疫原性腫瘍関連抗原 (TAA) を発現する、樹状細胞 (DC) および / または B リンパ球 (BLC) を準備する工程であって、前記 DC および BLC は TAA をコードする複数の mRNA の中から選択したものであらかじめトランスフェクトされたものであり、

c) 前記 a) の T 細胞を前記 b) の DC および / または BLC と接触させる工程、および

d) 前記 TAA がトランスフェクトされた DC および / または BLC において、T 細胞によって認識された TAA を同定する工程

を含む方法。

【請求項 2】

DC および / または BLC の抗原を認識する T 細胞を増殖させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

DC および / または BLC の抗原を認識する T 細胞に基づいて、少なくとも 1 人の腫瘍患者の抗腫瘍 T 細胞の選択的標的抗原を同定する工程をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

T A A に対する T 細胞の反応性についての対照アッセイをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

認識された T A A が提示されるための再連結 H L A 対立遺伝子を判定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

T 細胞が腫瘍患者から得られた末梢血液から単離されたものである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

m R N A がいくつかのカテゴリーの抗原、分化抗原、C / G 抗原、突然変異抗原および過剰発現抗原から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

抗原がチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 2 (T R P 2)、g p 1 0 0、M A G E、G A G E、B A G E および m e l a n N M A R T I などのメラニン細胞特異性タンパク質または C / G タンパク質から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

突然変異抗原が融合タンパク質から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

腫瘍患者の個々の抗原発現パターンが同定される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

特定の腫瘍に罹患している腫瘍患者群の抗原発現パターンが同定される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

検出された腫瘍が悪性メラノーマである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

構造的に正常な T A A もしくは共通の T A A を発現する腫瘍患者群の抗原発現パターンが同定される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法、および同定された腫瘍患者群の抗原発現パターンを腫瘍の診断の材料とする工程、を含む患者の腫瘍の診断材料を提供する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は以下の工程を含む腫瘍患者の抗腫瘍 T 細胞の選択的標的抗原を同定する方法に関する： a) 少なくとも 1 人の腫瘍患者の血液由来の腫瘍細胞系とのインビトロでの接触により刺激を受けない T 細胞を準備する工程、 b) 前記腫瘍患者にとって自己由来であり、かつ T 細胞免疫原性腫瘍関連抗原 (T A A) を発現する、樹状細胞 (D C) および / または B リンパ球 (B L C) を準備する工程であって、前記 D C および B L C が T 細胞免疫原性腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする複数の m R N A の中から選択したものであらかじめトランスフェクトされた工程、 c) 前記 T 細胞を前記 D C および / または B L C に接触させる工程、および d) トランスフェクトした D C および / または B L C において、 T 細胞に認識された T A A を同定する工程。該方法はさらに D C および / または B L C の抗原を認識する T 細胞を増殖させる工程も含み得る。さらに本発明は個別の腫瘍ワクチンまたは個別の腫瘍治療用物質の生成法、ならびにその個別の腫瘍ワクチンまたは個別の腫瘍治療用物質を用いる腫瘍性疾患治療のための対応する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

癌細胞は多数の腫瘍関連抗原 (T A A) を発現する。腫瘍反応性細胞毒性 T リンパ球 (

10

20

30

40

50

CTL)によりTAA由来オリゴペプチドが認識されると腫瘍細胞が破壊されることがヒトのインビトロモデルで判明した。細胞質が分解されたタンパク質に由来し、細胞表面上の主要な組織適合性複合体(HLAクラスIおよびII)の分子によって提示される、オリゴペプチドをCTLは認識する。

【0003】

1つの特定アプローチは具体的な活性的免疫療法に代表され、該療法は腫瘍細胞上のTAAに対する患者の免疫系を感作し、長期免疫を誘導するものである。従って、免疫療法の文脈上、ワクチンはそれぞれのTAAを有する患者に適用する。これまで癌免疫療法のアプローチは、腫瘍組織に通常発現し、ここから集団に最も高頻度で発生するそれらのHLA対立遺伝子によりペプチドが提示される分化抗原および癌/生殖細胞系抗原(C/G

10

抗原)のカテゴリーから2、3種のTAAを使用することに限られていた。そのため研究対象の患者らがワクチン接種抗原に対する免疫応答を通常起こし得るか否かは分析しなかった(Rosenbergら、*Nat. Med.* 10: 909, 2004)。TAA由来候補ペプチドに対する反応性についての末梢血リンパ球の発現試験により、肺癌患者および消化管腫瘍患者のTAA由来ペプチドでワクチン接種を個別化することが日本の研究グループにより試みられた。反応性が示されたペプチドのみワクチン接種に使用した(Mineら、*Cancer Sci.* 94: 548, 2003; Satoら、*Cancer Sci.* 94: 802, 2003)。TAA由来候補ペプチドの選択はHLA

20

【0004】

A2およびHLA A24結合ペプチドに限定されていた。実際、これらはアジア人集団群において最も高頻度で発生するHLA対立遺伝子であるが、それゆえにHLA A2およびHLA A24陽性患者にしか利用できない。別のHLA対立遺伝子によって提示される同一のTAA由来のペプチドに対するT細胞応答は該方法では包含され得ない。さらに、該方法は候補ペプチドで患者の末梢T細胞を刺激することに基づいていた。一方、それらの方法は明らかにペプチド特異性T細胞を増殖させるが、該T細胞は腫瘍細胞を認識しないことが多いと示唆する研究もある。このことは、腫瘍細胞がTAA由来ペプチドを処理および提示しないという事実、あるいはT細胞が、刺激に使用される高ペプチド濃度のみ反応し、腫瘍細胞に自然に提示される非常に低濃度のペプチドには反応しないという事実のいずれかに基づいている。

30

40

50

65%の悪性メラノーマおよび37~57%の肺腫瘍において、数種のC/G抗原の同時発現が存在し得る(Simpsonら、Nat. Rev. Cancer 5: 615, 2005)。悪性メラノーマの場合、90%を超える腫瘍が分化抗原を付加的に発現する(Boonら、Ann. Rev. Immunol. 24: 175, 2006)。従って一般的に、癌患者における腫瘍 宿主相互作用の個々の性質を考慮しているワクチン接種研究はわずかしかない。

【0005】

DE 10 2005 041 616には、CD8陽性細胞毒性Tリンパ球(CTL)によりペプチド抗原として認識され、腫瘍細胞のCTL誘導溶解および/またはアポトーシスを引き起こす特定のメラノーマ関連オリゴペプチドが記述されている。さらに、本発明は癌治療におけるこれらのメラノーマ関連オリゴペプチドの使用に関連する。

10

【0006】

DE 10 2005 013 846には、腫瘍に関連して発現した抗原およびこれらをコードする核酸を同定および提供するための戦略が記述されている。この戦略は、細胞表面に接触できる、潜在的癌特異性抗原に関する観点でのヒトタンパク質の分析および核酸データベースに基づいている。データマイニングにより、初めに、できる限り完全に既知の遺伝子すべてのリストを作成し、遺伝子からmRNA、mRNAからタンパク質といった基本原理に従って1つ以上の膜貫通ドメインの有無について試験する。この後、ホモロジー検索をし、検索でヒットしたものを組織特異的群(とりわけ腫瘍組織)に分類し、mRNAの実在について調べる。最後に、このように同定されたタンパク質を、例えば発現分析およびタンパク質化学法により腫瘍中の異常な活性化について評価する。

20

【0007】

患者の免疫系の選択的標的抗原についての知識は、効果的な治療ワクチン接種に使用可能な患者に合わせて作成するTAAワクチンの生成をもたらし得る。従って本発明の目的は、個々の患者の末梢血からの腫瘍特異性T細胞応答およびその標的抗原を同定する方法を提供することである。この方法に基づいて、本発明の有利な実施態様もさらに提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】DE 10 2005 041 616

30

【特許文献2】DE 10 2005 013 846

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Rosenbergら、Nat. Med. 10: 909, 2004

【非特許文献2】Mineら、Cancer Sci. 94: 548, 2003

【非特許文献3】Satoら、Cancer Sci. 94: 802, 2003

【非特許文献4】Weinschenkら、Cancer Res. 62: 5818, 2002

【非特許文献5】Rammensee, Immunology and Cell Biology 84: 290, 2006

【非特許文献6】Srivastava, Curr. Opin Immunol. 18: 201, 2006

【非特許文献7】O'Rourkeら、Cancer Immunol. Immunother. 52: 387, 2003

40

【非特許文献8】Simpsonら、Nat. Rev. Cancer 5: 615, 2005

【非特許文献9】Boonら、Ann. Rev. Immunol. 24: 175, 2006

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の第1の態様では、T細胞免疫原性である腫瘍患者のそれらのTAAを同定する方法により本課題は解決され、前記方法には、a)少なくとも1人の腫瘍患者の血液由来T細胞を準備する工程、b)腫瘍患者にとって自己由来であり、かつT細胞免疫原性腫瘍関連抗原(TAA)を発現する、樹状細胞(DC)および/またはBリンパ球(BLC)を準備する工程であって、該DCおよびBLCがT細胞免疫原性腫瘍関連抗原(TAA)

50

をコードする複数の mRNAの中から選択したものであらかじめトランスフェクトされた工程、c) T細胞を DC および / または BLC と接触させる工程、d) DC および / または BLC の抗原を認識するそれらの T細胞を同定する工程、および e) DC および / または BLC の抗原を認識するそれらの T細胞に基づいて、少なくとも 1 人の腫瘍患者の抗原発現様式を同定する工程が含まれる。

【0011】

Mitchell および Nair (Mitchell および Nair, RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. J Clin Invest. 2000 Nov;106(9):1065-9) ならびに Nair ら (Induction of tumour-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumour RNA-transfected dendritic cells. Ann Surg. 2002 Apr;235(4):540-9.) は腫瘍細胞の代用物として腫瘍 (全体) mRNA (「腫瘍細胞の抗原性内容物をコードする mRNA」) でトランスフェクトした樹状細胞を使用する可能性についてふれている。ワクチン接種、生じた T細胞応答のモニタリング、および新たな TAA の同定にこれらの腫瘍細胞同等物を使用する。腫瘍患者の T細胞をエキソピボで刺激するため、RNA をトランスフェクトした DC により同一の抗原提示細胞 (APC) を使用する場合を除いて、本発明には公開されたこの方法と共通するところはない。転移悪性腫瘍の患者が血液中に抗腫瘍 T細胞応答を示すことは一連の患者モデルから公知である。これらの T細胞は大抵、腫瘍により発現された TAA のうち非常に限られたサブセットしか認識せず、実際のペプチドエピトープおよびこれらのペプチドを認識する HLA 対立遺伝子の観点では、認識は非常に個別特異的である。

【0012】

最先端技術の方法 (上述の Mitchell および Nair に記述したのものも含む) の多くが、腫瘍に特異的に発現し、その後癌免疫療法にとって潜在的標的として働く、遺伝子の同定に關している。それにもかかわらず、腫瘍抗原の発現はそれが免疫原性でもあるということの意味するものではない。発現に加えて、その免疫原性は、ペプチドが前記 TAA タンパク質から処理され各々の患者の個々の HLA 分子に結合し得るか否か、ならびに患者の T細胞受容体が HLA ペプチド複合体を認識し得るか否かという事項に決定的に従属する。このことから当然に、少なくとも数十の (現在公知の) 潜在的免疫原性 TAA から、個々の TAA 由来のほんの少数のペプチドのみしか実際に個々の患者の T細胞応答を誘起しないが、このことは不十分にしか予測できないということになる。この問題の解決策として、本発明は本発明にしたがった刺激および試験アッセイを提供する。それは腫瘍細胞との相互作用を介して患者に生じ、活性化され得るそれらの T細胞応答を同定する。反応性はその後に行われる ELISPOT アッセイで、抗原接触に対するサイトカイン放出により確認する。その後、続いて検出可能 T細胞応答がワクチン接種により特異的に増幅され得る。

【0013】

このことによって、これまで行ってきたすべてのワクチン接種研究と比較して本質的差異が示される。これらワクチン接種研究は「所望の抗原」に対するそれぞれの応答の増幅および生成をターゲットにしたものであり、それぞれの腫瘍中で発現はその所望の抗原に対して実際に与えられたが、その所望の抗原がすべてワクチンを接種した患者に免疫原性であったか否かの証拠は無かった。上記の方法と対照的に、本発明にしたがった本方法は患者からの腫瘍細胞の生成には全く依存していない。

【0014】

本発明にしたがった方法が DC および / または BLC の抗原を認識する T細胞の増殖をさらに含むことが好ましい。本発明にしたがった方法が TAA に対する T細胞の反応性についての対照アッセイをさらに含むことが、なお一層好ましい。それぞれの方法は当業者に公知であり、以下の実施例に例示的に記述されている (例えば IFN g ELISPOT アッセイ)。本発明にしたがったなお一層好ましい方法は、認識されたものとして TAA を提示する再連結 HLA 対立遺伝子の検出をさらに含む。好ましい HLA 対立遺伝子は Cw16 ; Cw6 ; Cw7 ; Cw2 ; Cw3 ; DP4 ; DR1 ; DR2 ; DR3 ; DR

10

20

30

40

50

4 ; D R 7 ; D R 1 1 ; D R 1 2 ; D R 1 3 ; D R 1 5 ; D R 8 ; D R 5 2 ; A 1 ; A 2 ; A 3 ; A 2 9 ; A 2 4 ; A 3 1 ; A 3 4 ; B 7 ; B 1 3 ; B 1 5 ; B 3 5 ; B 3 7 ; B 5 1 ; B 5 3 ; B 5 7 ; B 3 7 ; B 1 8 ; B 4 0 ; B 4 4 ; B 5 2 ; D Q 6 ; D P 4 ; D P 1 ; D P 1 0 ; および A 6 8 から選択される。それぞれの方法は当業者に公知であり、以下の実施例に例示的に記述されている。本発明にしたがった方法には利点がある：初期の方法と対照的に、本方法は、腫瘍特異性 T 細胞の増殖に初期に必要な安定的な腫瘍細胞系の生成には依存していない。その代わりに、T 細胞免疫原性腫瘍関連抗原 (T A A) をコードする複数の m R N A の中から選択したもの (「パネル」) であらかじめトランスフェクトしてある、好ましくは自己由来の樹状細胞 (D C) または B リンパ球 (B L C) により、腫瘍患者の末梢血液由来細胞を刺激する。パネルはいくつかのカテゴリの複数の抗原、特に、分化および癌 / 生殖細胞系タイプの抗原を含む。本発明の文脈では、短期刺激プロトコールにおいて、腫瘍患者の末梢血液由来 T 細胞は 3 5 種以下の免疫原性 T A A と個々に合わさって増殖した。それぞれの患者の樹状細胞または B 細胞を、抗原コード m R N A が付された抗原提示細胞として使用した。これらの刺激反応のレスポンスリンパ球をこれら T A A の認識について試験し、それらの H L A 制限要素を測定した。

10

【 0 0 1 5 】

自己由来の腫瘍細胞の利便性に依存することなく、刺激および反応性アッセイにより抗腫瘍 T 細胞の標的抗原の個々のスペクトルを同定することが可能になる。これまでこれらの試験は少数の患者モデルでしか可能でなかった。それらのモデルでは、腫瘍反応性 T 細胞の刺激および増殖にその後使用されるそれぞれの腫瘍から安定増殖細胞系が確立され得る。このパネル由来のそれぞれの抗原を認識する T 細胞を増殖することが好ましく、例えば本発明にしたがった付加的方法に、および / または薬剤療法に使用可能である。予想どおり、T 細胞の認識パターンはほとんど個々の患者に特異的であり；個々の反応パターンは、個々の腫瘍の抗原発現パターン、個々の H L A 表現型、およびそれぞれの H L A ペプチド複合体に対する抗原特異的応答を生じさせるための個々の T 細胞レパートリーの能力によって左右される。本明細書に記述されているその後の反応アッセイにおいては、刺激抗原に対する T 細胞の反応性が確認可能であり、認識されたものとして T A A ペプチドを提示する再連結 H L A 対立遺伝子が検出できた。

20

【 0 0 1 6 】

本発明にしたがった方法のさらなる態様では、T 細胞は腫瘍患者の末梢血液から単離する。しかし T 細胞の他の一般的な採取源もまた使用可能である。

30

【 0 0 1 7 】

本発明にしたがった好ましい、方法では、D C または B L C にトランスフェクトした m R N A はいくつかのカテゴリの抗原、すなわち分化抗原、C / G 抗原、突然変異抗原および過剰発現抗原から選択される。本発明者らは抗原型としてメッセンジャー R N A (m R N A) を選択した。m R N A は多種の細胞の一時的なトランスフェクションに適しており、完全長の抗原をコードし、よって可能性あるエピトープの全体を包含している。初期のいくつかの研究では、T 細胞応答の検出に対する m R N A トランスフェクト D C の適合性が分析された (Britten ら、J Immunol Methods 287:125, 2004; Britten ら、Immunol Methods 299:165, 2005) 。計画した試験では、インビトロ転写 (I V T) T A A コード m R N A を、それぞれの患者の末梢血液由来 m D C にトランスフェクトする。その後 R N A トランスフェクト D C は刺激細胞として、T A A 反応性 T 細胞の増殖に役立つであろう。

40

【 0 0 1 8 】

それらの発現パターンに基づいて、腫瘍関連抗原 (T A A) はいくつかのカテゴリに分類できる (これに関しては <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellpeptides.htm> も参照) :

a) 分化抗原は、それらが生成される組織タイプの腫瘍および細胞にのみ発現する。例えば、悪性メラノーマ (M M) の分化抗原はチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 2 (T R P 2) 、 g p 1 0 0 および m e l a n A / M A R T 1 などのメラニン細胞

50

特異性タンパク質である。

b) 配偶子およびトロホプラスト細胞とは別に、「癌/生殖細胞系」抗原(C/G抗原、「共通して腫瘍特異的」)は他の分化組織のいずれにも発現しない。悪性形質転換に起因する後成的変化は癌細胞にC/G抗原の異常な発現を招く。ほとんどの腫瘍細胞はいくつかのC/G抗原を同時に発現し、それらの発現は腫瘍進行の過程で維持される。また、C/G抗原はいくつかの組織構造の多数の腫瘍で発現する。

c) 「ミスセンス」点突然変異のある抗原、および遺伝子断片の腫瘍特異的転座を経て生成される融合タンパク質は突然変異した抗原のカテゴリーに分類される。ごく少数の例外は別として、現在まで公知である点突然変異抗原は、それらが発見された個々の腫瘍に特異的である。対照的に、例えば(慢性骨髄性白血病の)BCR/ABLなどの悪性腫瘍特異性融合タンパク質は血液癌性疾患に通常存在する。

10

d) TAAの第4のカテゴリーとして、過剰発現抗原は腫瘍に存在し得る。これらは分化正常組織の細胞中で厳密に調整されて発現するタンパク質を含む。なぜなら、これらの多くが増殖、細胞周期、アポトーシス等の機能を自身で調整するからである。

【0019】

チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 2 (TRP 2)、gp100およびmelan A/MART 1などのメラニン細胞特異性タンパク質、またはMAGE、GAGE、BAGEなどのC/G抗原から分化抗原が選択される本発明にしたがった方法が好ましい(これに関しては、図1も参照)。融合タンパク質、例えばBCR/ABLおよび他の公知の癌関連融合物から突然変異抗原が選択される本発明にしたがった方法がさら

20

【0020】

本発明のさらなる態様では、提示されたT細胞刺激アッセイにより、多人数の患者群において自己由来の抗腫瘍T細胞によって認識され得る構造的正常(「共通の」)抗原が検

30

【0021】

これらのTAAは用語「共通の抗原」によって分類し、その発現は組織の同じ起源の異なる腫瘍(例えばメラノーマ中の「分化抗原」)で、または異なる組織構造の腫瘍で検出された。「過剰発現抗原」およびいわゆる「癌/生殖細胞系抗原」(後者は「共通腫瘍特異的」としても指定されている)は全く異なる腫瘍に発現するTAAに属す。上述したように、用語「共通の」は異なる腫瘍に共通している抗原の発現にのみ関連し、それらの免疫原性には関連していない。異なるメラノーマ患者において、それらの腫瘍が4つのカテゴリー(癌/生殖細胞系抗原、分化抗原、過剰発現抗原および突然変異抗原)すべての多数の抗原を発現することが検出された。しかし、これらのうちのほんの一部、しかも全く異なるTAAだけがそれぞれの患者でT細胞免疫原性であった。また、T細胞応答の特異性(どのTAA由来ペプチドがどのHLA分子によって提示され、認識されるか)はそれぞれの患者に非常に特異的であった。従って、目的とする試験では、「共通の」抗原すべては潜在的に免疫原性であることから、対象となる。

40

【0022】

50

本発明の意味合いにおいて特に好ましい「共通の」抗原は（括弧内に位置を示す）、B AGE 1; G AGE 1, 2, 8; G AGE 3, 4, 5, 6, 7; GnTV（イントロン）; HERV K MEL; KK LC 1; KM HN 1; L AGE 1; M AGE A1; M AGE A2; M AGE A3; M AGE A4; M AGE A6; M AGE A9; M AGE A10; M AGE A12; M AGE C2; ムチン; NA 88; NY ESO 1 / L AGE 2; S AGE; Sp17; SSX 2、SSX 4; および TRP2 INT2（イントロン2）である。

【0023】

本発明のさらなる態様では、それは上述した方法を含む患者の腫瘍を初めに同定する方法、および規定した腫瘍患者の抗原発現パターンに基づいて腫瘍を同定する方法に関する。本発明のさらなる態様では、それは上述した方法を含む個別の腫瘍ワクチンを生成する方法、および同定したTAA（単数）/TAA（複数）を腫瘍ワクチン中に処方する方法に関する。本発明の別のさらなる態様では、それは上述した方法を含む個別の腫瘍治療用物質を生成する方法、および増殖させて同定した自己由来のDCおよび/またはBLCを腫瘍治療用物質中に処方する方法に関する。原則として、免疫原性腫瘍抗原の選択から、特定の患者に免疫原性である抗原を選択的に取り除く。これらの抗原はその後それぞれの患者の治療的免疫化のための多エピトープワクチンに使用可能であることが好ましい。これらの抗原を用いた治療的ワクチン接種によって、個々のケースで免疫応答が仮にも可能であるか否かが明確ではない抗原を用いたワクチン接種よりも著しく良好な臨床成績が保証される。アッセイには腫瘍細胞は必要ないことから、そのアッセイはパネル抗原またはその一部を発現する腫瘍の患者すべてに広く利用可能である。腫瘍細胞に依存しなければ、腫瘍が臨床的にないが、腫瘍性疾患再発のリスクは高い患者にもそのアッセイが使用可能となる。特にこれらの患者は治療的ワクチン接種の理想的な対象と考えられる。

【0024】

従って、治療すべき腫瘍性疾患には、例えば腎臓、乳、膵臓、胃、精巣および/または皮膚癌が含まれる。従って腫瘍性疾患の列挙は例示にすぎず、使用範囲を限定するわけではない。特定のペプチドに特異的である特別に生成されたT細胞は効果的かつ選択的に腫瘍細胞を死滅させ得ることは最先端技術では公知である。概して、いくつかの適用形態では腫瘍ワクチンに腫瘍関連抗原が使用可能である。このようにしてTigheら（Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint, Immunol. Today 19(2):89-97, 1998）は、それぞれ好適なアジュバントもしくは担体系と結びついた組み換えタンパク質として、あるいはプラスミドベクター中で抗原をコードするcDNAとして抗原は投与可能であることを報告した。これらの場合、抗原は必ず患者の体内の抗原提示細胞（APC）により処理され、提示され、それにより免疫応答を誘発する。Meliefら（Peptide-based cancer vaccines, Curr. Opin. Immunol. 8:651-657, 1996）はさらなる可能性、すなわち合成ペプチドをワクチンとして使用することを示した。また、（多エピトープ）ワクチンとしてT細胞により認識されたTAA RNA（単数または複数）の投与も可能である。RNAは直接的に、またはトランスフェクトしたDCの形態で使用可能である。

【0025】

従って、好ましい実施態様では、TAA RNAまたはTAA ペプチドはアジュバントを添加して使用可能であるか、または単独でも使用可能である。アジュバントとして、例えば顆粒球 マクロファージ コロニー刺激因子（GM-CSF）が使用可能である。さらにこのようなアジュバントの例には水酸化アルミニウム、例えばフロイントアジュバントなどの鉱油のエマルジョン、サポニンまたはシリコン化合物が含まれる。アジュバントと共に使用することにより、誘発された免疫応答が増幅可能になり、および/またはワクチンが安定化するという利点をもたらされる。

【0026】

その付加的な態様における本発明は、同定された1種以上のTAA RNAまたはTAA ペプチドを含む医薬組成物にさらに関する。この組成物は、例えば非経口投与に、または例えば皮下、皮内もしくは筋肉内投与に、または経口投与に役立つ。従って、医薬的

10

20

30

40

50

に許容でき、好ましくは水性である担体中にRNAまたはペプチドを溶解または懸濁する。また、該組成物は例えばバッファー、結合剤、希釈剤等の賦形剤を含有することが可能である。

【0027】

RNAまたはペプチドはまた、例えばサイトカインなどの免疫刺激物質と共に投与が可能である。例えばA. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients、第3版、2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical pressではこのような組成物中に使用可能な助剤を包括的に示している。

【0028】

従って該薬剤は腫瘍性疾患の防止、予防および/または治療に使用可能である。

10

【0029】

従って、ペプチド(単数)またはペプチド(複数)またはRNA(単数または複数)はそれぞれ医薬組成物中に治療有効量で存在する。よって該組成物に含まれたRNAによってコードされたペプチド(単数)またはペプチド(複数)は少なくとも2種の異なるタイプのHLAに結合することもできる。

【0030】

個別の単一のワクチンまたは治療用物質である腫瘍ワクチンまたは腫瘍治療用物質が多エピトープワクチンまたは治療用物質である本発明にしたがった方法が特に好ましい。従って腫瘍ワクチンまたは腫瘍治療用物質は、患者中の腫瘍(単数)または腫瘍(複数)と効果的に闘うことができる患者または患者群に特異的に適応しているTAAまたはT細胞を含む。従って、腫瘍治療の個別化におけるすべての形態と同様に、個々のケースにおいて治療が成功する機会が増える。

20

【0031】

本発明のさらなる態様では、それは、上述した方法、および同定した抗原発現パターンに基づいた腫瘍性疾患の治療、を含む腫瘍性疾患の治療法に関する。最終的に、本発明は、上述した方法、および生成した腫瘍ワクチンまたは腫瘍治療用物質に基づいた腫瘍性疾患の治療、を含む腫瘍性疾患の治療法に関する。従って治療対象の腫瘍性疾患には、上述したように例えば腎臓、乳房、膵臓、胃、精巣および/または皮膚癌が含まれる。効果的な治療および投与経路に必要な有効量は患者特異的なパラメーターに基づいて担当医が容易に決定できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0032】

本発明はこれから添付の実施例に基づいて以下にさらに説明するがそれらに限定されない。本明細書で引用された参考文献すべては、本発明の目的のため、全体が参照により援用される。以下に図を説明する：

【図1】患者モデルM Z 2で同定された腫瘍関連抗原の概略図。出典参考文献：MAGE A 1 : Traversari Cら、J Exp Med 1992; 176: 1453-7、van der Bruggen Pら、Eur J Immunol 1994a; 24: 2134-40 ; MAGE A 3 Gaugler Bら、J Exp Med 1994; 179 : 921-30 ; BAGE Boel Pら、Immunity 1995; 2: 167-75 ; GAGE 1, 2, 8 Van den Eynde Bら、J Exp Med 1995; 182: 689-98 ; GAGE 3, 4, 5, 6, 7 De B 40
acker Oら、Cancer Res 1999; 59: 3157-65 ; チロシナーゼ Brichard VGら、Eur J Immunol 1996; 26: 224-230およびMAGE A 6 Vantomme Vら、Cancer Immun [serial online] 2003; 3: 17

【図2】刺激アッセイの図式的概略図。

【図3】腫瘍細胞(図3)、非トランスフェクトDC(図3)およびTAA RNAトランスフェクトDC(図4、5)で刺激された、患者M Z 2のCD8+ T細胞の反応分析；腫瘍細胞で刺激されたT細胞はMAGE A 1 / HLA Cw16トランスフェクト体のみ認識した(図3、上図)；非トランスフェクトDCで刺激したT細胞はトランスフェクト体を何ら認識しなかった(図3、下図)；MAGE A 1をトランスフェクトしたDCで刺激したT細胞は反応アッセイ中、MAGE A 1 / HLA A 1トランスフェクト体 50

およびMAGE A1/HLA Cw16トランスフェクト体を認識した(図4、左上図); BAGEをトランスフェクトしたDCで刺激したT細胞はBAGE/HLA B44トランスフェクト体およびBAGE/HLA Cw16トランスフェクト体を認識した(図4、右上図); GAGE 1をトランスフェクトしたDCで刺激したT細胞はGAGE 1/HLA Cw6トランスフェクト体を認識した(図4、下図); 他の刺激T細胞は反応アッセイ中のTAA/HLAトランスフェクト体を何ら認識しなかった(図5)。

【図4】同上

【図5】同上

【実施例】

【0033】

この数年、本発明者らは、メラノーマ患者のいくつかの腫瘍モデルにおいてT細胞で認識されたTAAを発見し、その特徴を明らかにした。これについての前提条件は、各患者の安定増殖する腫瘍細胞系、および患者の末梢血液から単離したリンパ球であった。インビトロで自己由来の腫瘍細胞系でT細胞を刺激することにより、本発明者らは腫瘍反応性T細胞集団およびT細胞クローンを生成することができた。これらはTAAの同定に使用した。このことにより、TAA/HLAを組み合わせたものの個々のスペクトルが、試験した各患者の抗腫瘍T細胞により認識されることが分かった。あらゆるケースで、分化抗原、C/G抗原ならびに突然変異抗原の新たなペプチドエピトープが認識された。例外的なケースでのみ、文献からすでに公知のペプチド/HLA複合体が確認された。明らかに、腫瘍特異的TAA発現パターン、個々のHLAタイプ、および所与の抗原を組み合わせたものに対して反応する高度に可変なT細胞レパートリーの能力を組み合わせると個々に特異的な反応パターンがもたらされる。現在、非常に少数の患者のみから得られた自己由来のT細胞をインビトロで刺激するための腫瘍細胞系を生成することが可能であることから、これらの腫瘍-宿主相互作用の固有性は個々の患者モデルで分析のみ可能である。しかし、刺激なしには患者血液由来の腫瘍反応性T細胞は現行の方法で検出ができない。何故なら末梢血液でのそれら頻度は非常に小さいためである。そのため本発明者らは、腫瘍患者の末梢血液由来T細胞をTAAで刺激するための腫瘍細胞系の代用品を探し始めた。未成熟樹状細胞(iDC)はインビトロで末梢血液単球から生成し、成熟DC(mDC)に分化させることが可能である。mDCは効果的にT細胞を刺激し得る専門的抗原提示細胞である。8種(モデルMZ2)および13種(D05 GS)のT細胞認識抗原が公知

である2つのメラノーマモデルにおいて、本発明者らは、それぞれの抗原および対照抗原(D05 GS)で患者のmDCをトランスフェクトし、そのトランスフェクトDCで患者の末梢血液由来T細胞を刺激した。本発明者らは抗原型としてメッセンジャーRNA(mRNA)を選択した。mRNAは多種の細胞の一時的なトランスフェクションに適しており、抗原を完全長でコードしており、よって可能性あるエピトープ全体を含んでいる。初期のいくつかの研究では、mRNAトランスフェクトDCのT細胞応答検出への適合性を試験した(Brittenら、J Immunol Methods 287:125, 2004; Brittenら、J Immunol Methods 299:165, 2005)。計画したアッセイでは、インビトロで転写した(IVT)TAAをコードするmRNAはそれぞれの患者の末梢血液由来mDCにトランスフェクトするはずである。RNAトランスフェクトDCはTAA反応性T細胞の増殖に刺激細胞として働くことが好ましい。後者はIFN- γ ELISPOTアッセイで確認すべきである。原則として刺激アッセイを利用し、抗原が部分的に発現することが公知のある種の腫瘍を有する各患者中のTAAに対するT細胞反応性を同定することが可能である。認識した抗原をその後使用し、例えば多エピトープワクチンの形態で患者に治療的免疫化を行うことができた。

【0034】

TAAをコードするmRNAを有する患者由来成熟樹状細胞の生成およびトランスフェクション:

「従来の」成熟DC(成熟DCはmDC)ならびにいわゆるfast DCの両方(mfDC; 成熟短期培養DC)を使用し、RNAトランスフェクトDCでT細胞を刺激した。

10

20

30

40

50

m D C を Jonuleit ら (Eur. J. Immunol. 1997; 27 (12): 3135-42) の方法に記載の患者の P B M C の単球、および Dauer ら (J. Immunol. 2003; 170 (8): 4069-76) の方法に記載の m f D C から生成した。T A A R N A によるトランスフェクションでは、transmessenger RNA トランスフェクション試薬 (Qiagen, Hilden) を用いて、 2×10^5 個の D C を反応ごとに $0.8 \mu\text{g}$ のインビトロ転写 R N A でトランスフェクトした。その後その細胞をインキュベーター中で 3 時間インキュベートした。

【 0 0 3 5 】

トランスフェクトした D C による患者の T 細胞の刺激：

インキュベーター中で 3 時間インキュベートした直後、トランスフェクトした D C を使用し、事前に単離した患者の $\text{CD}8^+$ T 細胞を刺激した。これにより 24 ウェル細胞培養プレートの培養単位 (C U) ごとに、 1×10^5 個のトランスフェクト D C および 2×10^5 個の $\text{CD}8$ 陰性細胞 (いわゆる「支持細胞」、100 グレイで照射) により $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の $\text{CD}8^+$ T 細胞を刺激した。ヒト組み換えインターロイキン 2 (I L 2 ; 25 IU/ml) を T 細胞成長因子として添加した。10% のヒト血清 (健常ドナーのプール血清) を追加した AIM-V 培地 (Invitrogen, Karlsruhe) を培地として使用した。対照実験では、自己由来のメラノーマ細胞 (1×10^5) ならびに非トランスフェクト D C で T 細胞を刺激した。実験開始後 7 日目に、同じプロトコールに従って T 細胞を再度刺激し、その後の 4 ~ 5 日目に T A A の認識について分析した。

【 0 0 3 6 】

刺激に使用した T A A に対する T 細胞の反応性の判定：

実験の 11 日目または 12 日目に $\text{CD}8^+$ T 細胞を、刺激 T A A に対するそれらの反応性および認識における H L A 制限について試験した。例えば D C に対する自己反応性 T 細胞の非特異的反応性を排除するため、反応アッセイ用の抗原提示細胞として 293 T 細胞または COS7 細胞を使用した。これらは T A A をコードする c D N A を含む真核細胞発現ベクターでトランスフェクトした。個々の反応中、各 T A A c D N A は患者の各 H L A 対立遺伝子の c D N A で同時トランスフェクトし、24 時間後、I F N E L I S P O T アッセイで T 細胞によるトランスフェクト体の認識を試験した。トランスフェクションのため Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) を使用した。Lennerz ら (PNAS 2005; 102 (44): 16013-16018) が報告したプロトコールに従ってアッセイを行った。提示した方法を 2 つの良好に特徴付けた患者モデルで試験した：

【 0 0 3 7 】

I : モデル M Z 2 M E L

初期に、8 種の T 細胞認識 T A A / H L A を組み合わせたものをモデル M Z 2 で同定した (図 1) : M A G E A 1 / H L A A 1 (Traversari C. ら、J. Exp. Med. 1992; 176: 1453-7)、M A G E A 3 / H L A A 1 (Gaugler B. ら、J. Exp. Med. 1994; 179: 921-30)、M A G E A 1 / H L A C w 1 6 (van der Bruggen P. ら、Eur. J. Immunol. 1994a; 24: 2134-4)、B A G E 1 / H L A C w 1 6 (Boel P. ら、Immunity 1995; 2: 167-75)、G A G E 1, 2, 8 / H L A C w 6 (Van den Eynde B. ら、J. Exp. Med. 1995; 182: 689-98)、チロシナーゼ / H L A B 4 4 (Brichard V.G. ら、Eur. J. Immunol. 1996; 26: 224-230)、G A G E 3, 4, 5, 6, 7 / H L A A 2 9 (De Backer O. ら、Cancer Res. 1999; 59: 3157-65)、および M A G E A 6 / H L A C w 1 6 (Vantomme V. ら、Cancer Immun. [serial online] 2003; 3: 17)。 $\text{CD}8^+$ T 細胞を患者の P B M C から単離し、上述の方法に従って各々 8 種の T A A でトランスフェクトした D C で刺激した (図 2)。次の反応アッセイでは、4 / 8 T 細胞特異性が検出できた (図 4 ~ 5)。また、未だ発見されていなかったある種の T A A が同定された：B A G E 1 / H L A B 4 4 (図 4)。非トランスフェクト D C ならびに自己由来のメラノーマ細胞でも T 細胞を同時に刺激した。しかし非トランスフェクト D C による刺激では T A A 特異的 T 細胞応答は増幅せず、メラノーマ細胞による刺激では R N A D C による刺激と同一の T A A スペクトルが認識された。

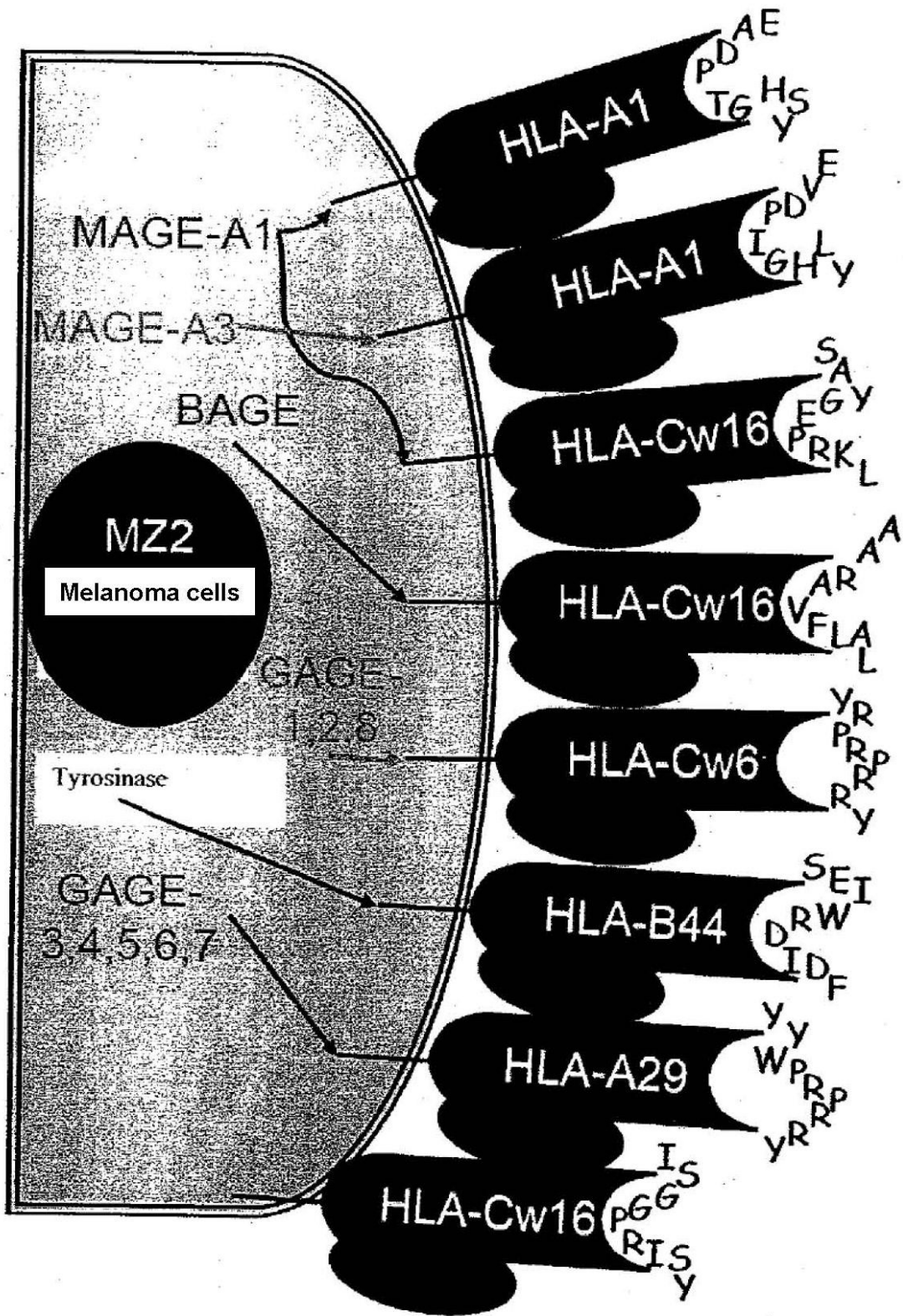
【 0 0 3 8 】

I I : モデル D 0 5 G S

刺激アッセイ時、このモデルで16種のT細胞認識TAAが同定された。上述の方法から転用して、実験では、事前に単離したCD8⁺T細胞の代わりにPBMCを使用した。このこと以外では上述のプロトコールに従って実験を行った：一定量のPBMC(1.2 × 10⁶/反応)を、各TAA RNAでトランスフェクトしたDC、ならびに非トランスフェクトDC、およびメラノーマ細胞で刺激した。7日目に再度刺激した後、12日目に反応アッセイにてT細胞を使用した。メラノーマ細胞で刺激したT細胞は16種の公知の抗原中、11種を認識した。非トランスフェクトDCで刺激したT細胞は抗原を全く認識しなかった。このことから非特異的TAA反応性は生じないことが分かる。TAA RNA刺激T細胞により4つの公知の反応性が再度認識された。また、ある種の特異性が新たに発見され(MAGE C2/HLA A2)、この特異性は、追加実験で分かるように、腫瘍クローンはMAGE C2を発現しないためメラノーマ刺激アプローチで使用された腫瘍細胞クローン(クローン6)による刺激で検出できた。しかし、クローン6が単離され、患者D05 GSにワクチン接種するために長年使用されたメラノーマ細胞系にMAGE C2は発現する。このことにより、患者の末梢血液のMAGE C2反応性T細胞の存在が明らかになり得る。これらT細胞がMAGE C2 RNAトランスフェクトDCによる刺激を経て検出され得るという事実により、刺激アッセイの効率および特異性が明確に示されている。

【図1】

Figure 1



【 図 2 】

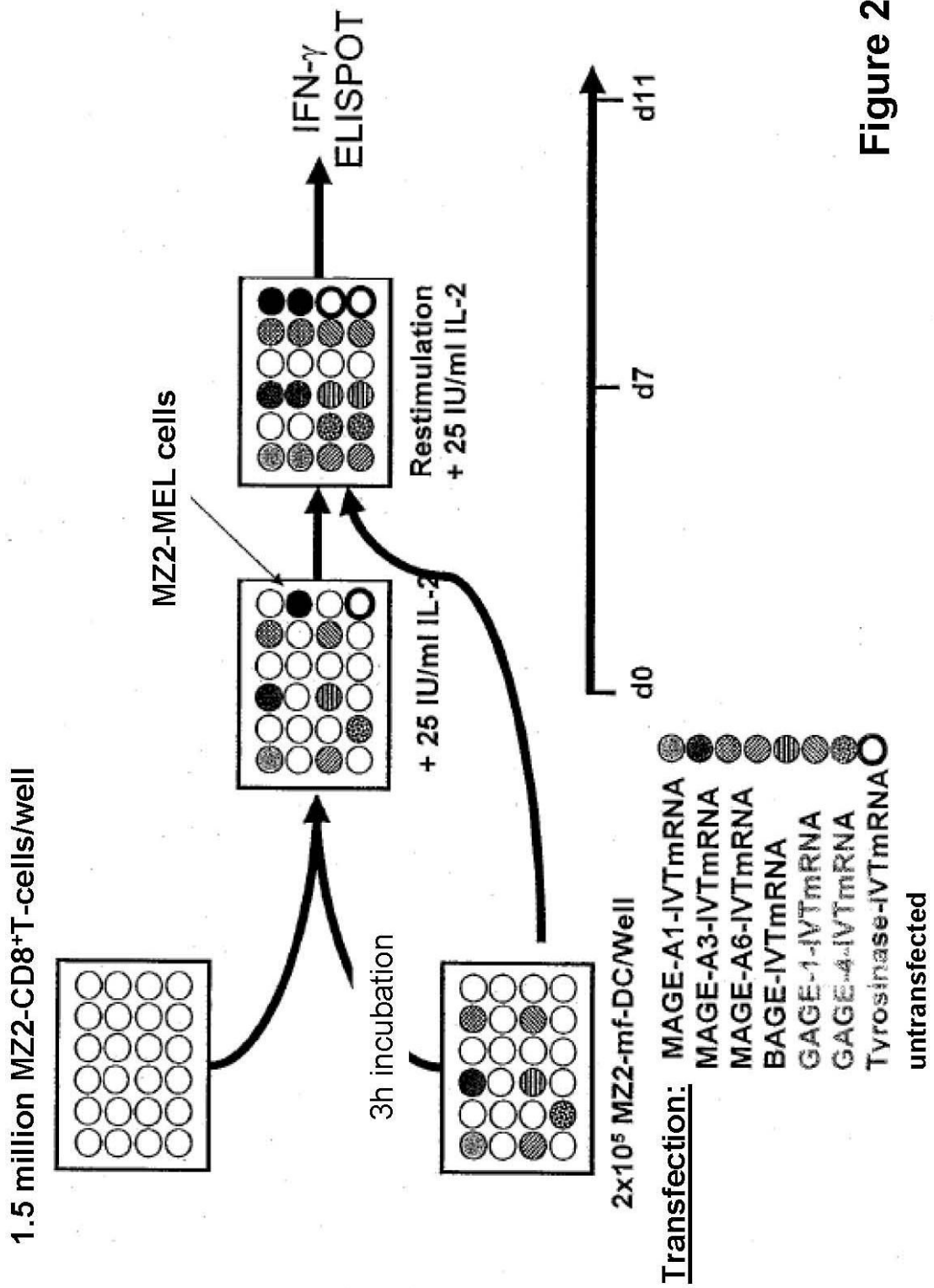


Figure 2

【 3 3 】

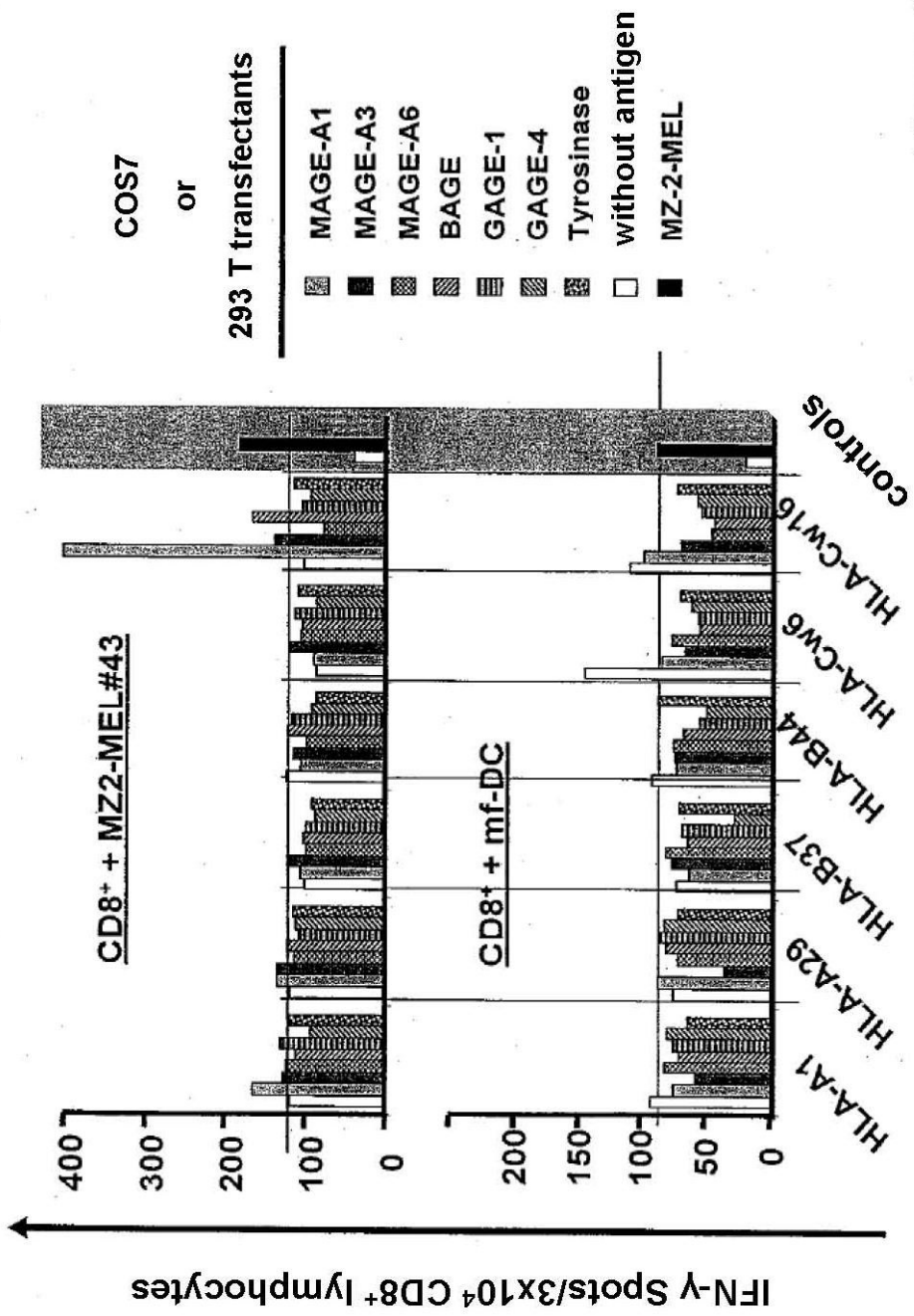


Figure 3

【 図 4 】

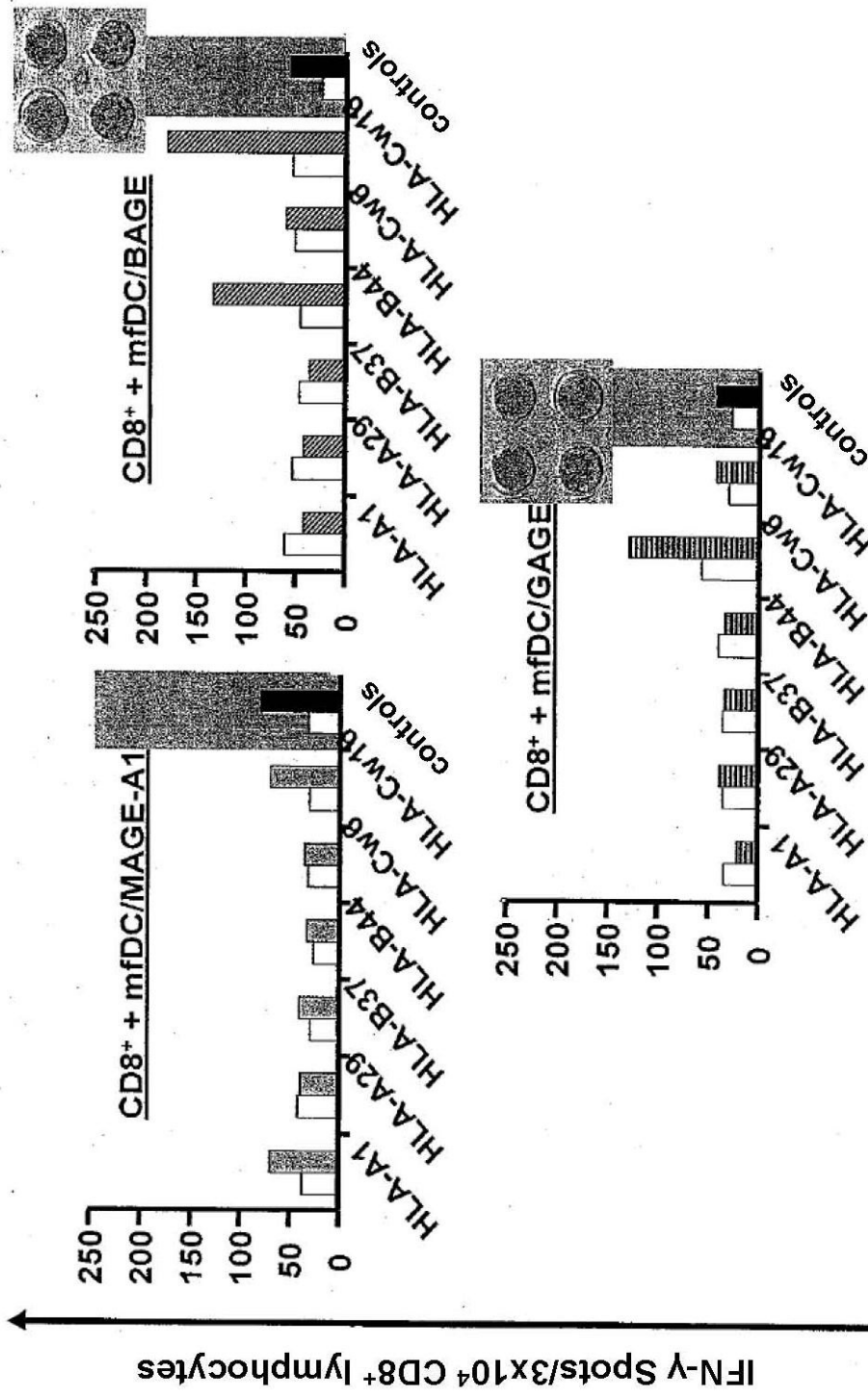


Figure 4

【 図 5 】

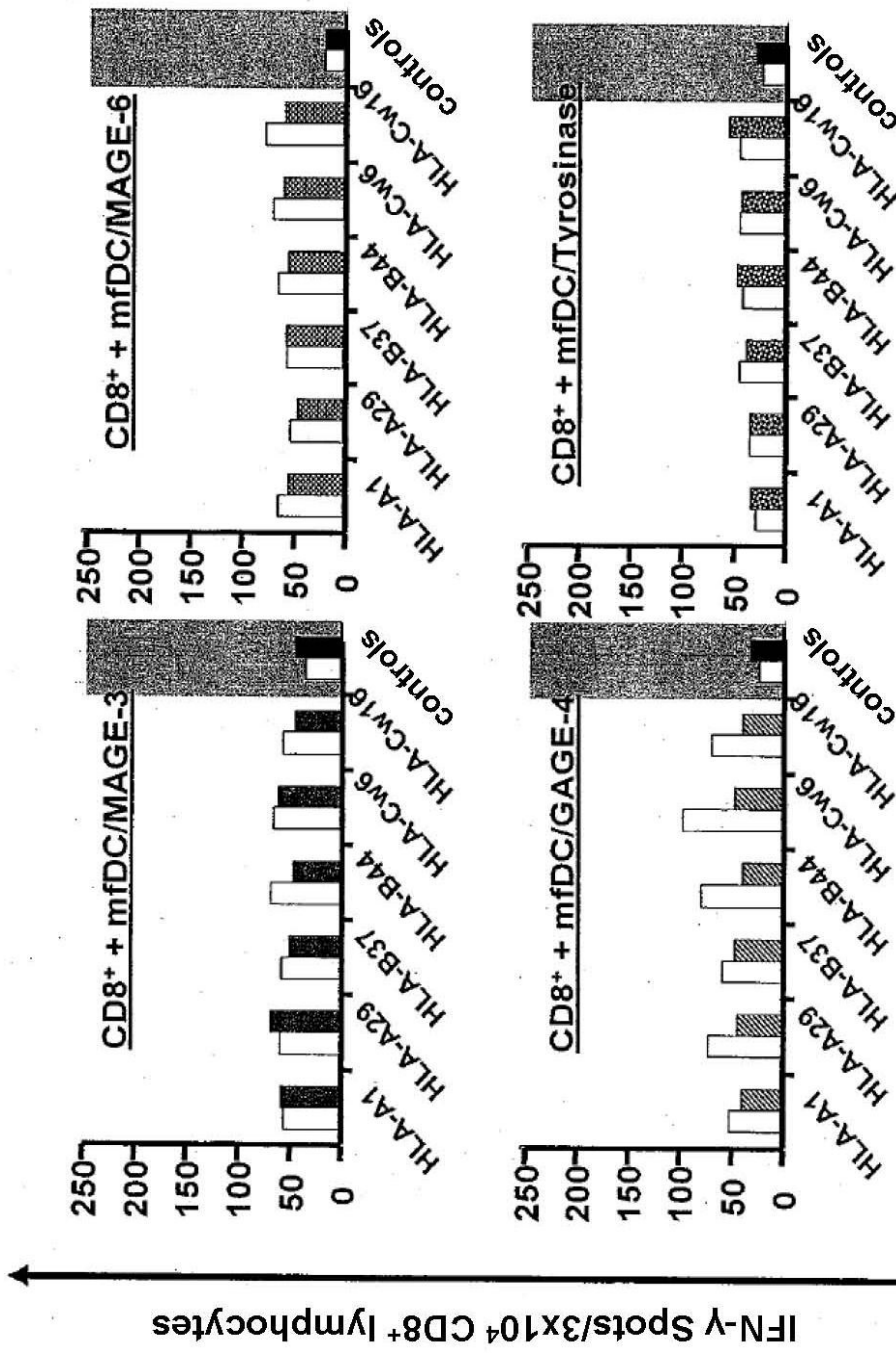


Figure 5

フロントページの続き

- (72)発明者 ファトー, マルティナ
ドイツ, 5 5 2 8 6 ヴォルシュタット, カスターニエンリング 27アー
- (72)発明者 ヴェサルグ, エマニュエル
ドイツ, 6 4 2 9 5 ダルムシュタット, ハンナ アレント ヴェグ 31
- (72)発明者 レネルツ, ヴォルカー
ドイツ, 5 5 2 7 0 オバー オルム, アン デル シュヴァルトツェン ヘック 15
- (72)発明者 ヴァン デル プリュッヘン, ピエール
ベルギー, ベー 1 2 0 0 ブリュッセル, アベニュー ヒポクラテ 74, ユーシーエル 74
59, ルートヴィヒ インスティテュート フォー キャンサー リサーチ ブリュッセル
- (72)発明者 ヴェルフエル, トマス
ドイツ, 5 5 1 2 8 マインツ, アルバヌスシュトラッセ 47
- (72)発明者 デボ, セレナ
ドイツ, 5 5 1 2 9 マインツ, フェルドガルテンエステーエール. 18

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 Ann. Surg. (2002) vol.235, no.4, p.540-549
J. Immunol. (2001) vol.166, no.5, p.2953-2960

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

P u b M e d

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 检测肿瘤患者肿瘤相关抗原 (TAA) 的个体T细胞反应模式, 这是患者个体化治疗性疫苗接种的主要成分 | | |
| 公开(公告)号 | JP5431952B2 | 公开(公告)日 | 2014-03-05 |
| 申请号 | JP2009541805 | 申请日 | 2007-11-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 古腾堡海胆Beruji大老美因茨 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 古腾堡Uniberujiteto美因茨 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 古腾堡Uniberujiteto美因茨 | | |
| [标]发明人 | ファトーマルティナ ヴェサルグエマニユエル レネルツヴォルカー ヴァンデルブリュッヘンピエール ヴェルフエルトマス デボセレナ | | |
| 发明人 | ファトー,マルティナ ヴェサルグ,エマニユエル レネルツ,ヴォルカー ヴァンデルブリュッヘン,ピエール ヴェルフエル,トマス デボ,セレナ | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/574 | | |
| CPC分类号 | C07K14/4748 G01N33/505 G01N2333/70539 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.A C12Q1/68.Z C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/574.A | | |
| 代理人(译) | 庄司隆 Shinobe百合子 | | |
| 优先权 | 102006060824 2006-12-21 DE | | |
| 其他公开文献 | JP2010512762A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

鉴定抗肿瘤T细胞的优先靶抗原包括从肿瘤患者的血液分离T细胞, 用选择的编码肿瘤相关抗原的mRNA转染自体树突细胞或B细胞, 使T细胞与树突细胞或B细胞接触, 并鉴定T细胞识别的抗原。还包括以下独立权利要求: (1) 基于如上确定的抗原表达模式鉴定患者的肿瘤; (2) 通过鉴定上述肿瘤相关抗原并将抗原配制成疫苗来产生个体化抗肿瘤疫苗; (3) 基于如上确定的抗原表达模式治疗肿瘤疾病。 - 活动: 细胞抑制。 - 作用机制: 疫苗。

