

(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2012-82213

(P2012-82213A)

(43) 公開日 平成24年4月26日 (2012.4.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47 Z N A	4 B O 6 3
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 C O 8 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	

審査請求 有 請求項の数 28 O L 外国語出願 (全 154 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-270382 (P2011-270382)	(71) 出願人	505289812
(22) 出願日	平成23年12月9日 (2011.12.9)		スルヴァック・アンパルトセルスカブ
(62) 分割の表示	特願2005-518634 (P2005-518634)		S U R V A C A p S
原出願日	平成16年1月30日 (2004.1.30)		デンマーク、デーコーー 1 8 2 6 フレデリ
(31) 優先権主張番号	10/354,090	(74) 代理人	100062144
(32) 優先日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		弁理士 青山 稔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	10/715,417		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成15年11月19日 (2003.11.19)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100146259
			弁理士 橋本 諭志
		(74) 代理人	100156155
			弁理士 水原 正弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スルビピン誘導ペプチドおよびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 M H C クラス I 限定 T 細胞エピトープであるスルビピン誘導ペプチド、ならびに前記ペプチドの、特に癌における診断および治療への使用方法を提供する。

【解決手段】 腫瘍関連抗原スルビピンから誘導される M H C クラス I 限定ペプチドであって、クラス I H L A 分子と高い親和力で結合でき、癌患者の P B L 集団において I N F - γ 産生細胞を惹起でき、腫瘍組織において細胞毒性 T 細胞のインサイチュ検出が可能であるペプチド、該ペプチドを含む治療用および診断用組成物ならびにその使用。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スルビピンから誘導される MHC クラス I 限定エピトープペプチドであって、以下の特性：

(i) クラス I HLA 分子を最大半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力 (C_{50} 値) (本明細書に記載するようなアセンブリー結合検定により測定すると最大 $50 \mu M$ である) で限定されるクラス I HLA 分子との結合能；

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

(i i i) エピトープペプチドと反応する CTL の腫瘍組織におけるインサイチュ検出能；のうちの少なくとも一つを有する、エピトープペプチド。

10

【請求項 2】

最大 $30 \mu M$ である C_{50} 値を有する請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

最大 $20 \mu M$ である C_{50} 値を有する請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 4】

MHC クラス I HLA - A 分子により限定される請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 5】

HLA - A 1、HLA - A 2、HLA - A 3、HLA - A 1 1 および HLA - A 2 4 からなる群から選択される MHC クラス I HLA 種により限定される請求項 4 記載のペプチド。

20

【請求項 6】

HLA - A 2 により限定される請求項 4 または 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 7】

FLKLDRELA (配列番号 1)、TLPPAWQPFL (配列番号 2)、ELTLGEFLKL (配列番号 3)、LLLGEFLKL (配列番号 4) および LMLGEFLKL (配列番号 5) からなる群から選択される請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 8】

MHC クラス I クラス I HLA - B 分子により限定される請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

30

【請求項 9】

HLA - B 7、HLA - B 3 5、HLA - B 4 4、HLA - B 8、HLA - B 1 5、HLA - B 2 7 および HLA - B 5 1 からなる群から選択される MHC クラス I HLA - B 種により限定される請求項 8 記載のペプチド。

【請求項 10】

HLA - B 3 5 または HLA - B 7 により限定される請求項 8 または 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 11】

CPTENEPDL (配列番号 6)、EPDLAQCF (配列番号 7)、CPTENEPDY (配列番号 8)、EPDLAQCFY (配列番号 9)、LPPAWQPFL (配列番号 10) および QPFLKDHRI (配列番号 11) からなる群から選択される請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

40

【請求項 12】

最大 20 個のアミノ酸残基を含む前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 13】

最大 10 個のアミノ酸残基を含む請求項 12 記載のペプチド。

【請求項 14】

ノナペプチドまたはデカペプチドである前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

50

【請求項 15】

哺乳動物種のスルビピンの天然の配列である前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 16】

ヒトスルビピンから誘導される請求項 15 記載のペプチド。

【請求項 17】

少なくとも 1 個のアミノ酸残基の置換、欠失または付加によりスルビピンの天然の配列から誘導される前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 18】

リン酸化される前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

10

【請求項 19】

米国特許第 6,245,523 号において開示されている天然のスルビピンの Thr 34 を含む請求項 18 記載のペプチド。

【請求項 20】

各特異性 HLA 対立遺伝子に関して次の表に示すようなアミノ酸残基のいずれかを含む前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド：

【表 1 - 1】

HLA 対立遺伝子	1 位	2 位	3 位	5 位	6 位	7 位	C 末端
HLA-A1		T, S	D, E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L, V
HLA-A3		L, V, M	F, Y				K, Y, F
HLA-A11		V, I, F, Y	M, L, F, Y, I				K, R
HLA-A23		I, Y					W, I
HLA-A24		Y		I, V	F		I, L, F
HLA-A25		M, A, T	I				W
HLA-A26	E, D	V, T, I, L, F			I, L, V		Y, F
HLA-A28	E, D	V, A, L					A, R
HLA-A29		E					Y, L
HLA-A30		Y, L, F, V					Y
HLA-A31			L, M, F, Y				R
HLA-A32		I, L					W
HLA-A33		Y, I, L, V					R
HLA-A34		V, L					R
HLA-A66	E, D	T, V					R, K
HLA-A68	E, D	T, V					R, K
HLA-A69		V, T, A					V, L
HLA-A74		T					V, L
HLA-B5		A, P	F, Y				I, L
HLA-B7		P					L, F
HLA-B8			K	K, R			L

20

30

40

【表 1 - 2】

HLA-B14	R, K				L, V	
HLA-B15 (B62)	Q, L, K, P, H, V, I, M, S, T				F, Y, W	
HLA-B17					L, V	
HLA-B27	R				Y, K, F, L	
HLA-B35	P				I, L, M , Y	10
HLA-B37	D, E				I, L, M	
HLA-B38	H	D, E			F, L	
HLA-B39	R, H				L, F	
HLA-B40 (B60, 6 1)	E	F, I, V			L, V, A, W , M, T, R	
HLA-B42	L, P				Y, L	
HLA-B44	E				F, Y, W	
HLA-B46	M, I, L, V				Y, F	20
HLA-B48	Q, K				L	
HLA-B51	A, P, G				F, Y, I, V	
HLA-B52	Q	F, Y			I, V	
HLA-B53	P				W, F, L	
HLA-B54	P					
HLA-B55	P				A, V	
HLA-B56	P				A, V	
HLA-B57	A, T, S				F, W, Y	
HLA-B58	A, T, S				F, W, Y	
HLA-B67	P				L	30
HLA-B73	R				P	
HLA-Cw1	A, L				L	
HLA-Cw2	A, L				F, Y	
HLA-Cw3	A, L				L, M	
HLA-Cw4	Y, P, F				L, M, F, Y	
HLA-Cw6					L, I, V, Y	
HLA-Cw6	Y				L, Y, F	
HLA-Cw8	Y				L, I,	
HLA-Cw1 6	A, L				L, V	40

【請求項 2 1】

癌患者の P B L 集団において I N F - γ 産生細胞を少なくとも $10 / 10^4$ P B L の頻度で惹起する能力を有する前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 2 2】

スルビピンが発現される癌疾患を有する患者の P B L 集団において I N F - γ 産生細胞を惹起する能力を有する前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 2 3】

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

請求項 2 2 記載のペプチド。

【請求項 2 4】

癌疾患を有する患者の P B L 集団において、乳癌細胞系 M C F - 7 および黒色腫細胞系 F M 3 からなる群から選択される細胞系を包含する癌細胞系のスルビビン発現細胞に対して細胞傷害効果を有する I N F - γ 産生細胞を惹起する能力を有する前記請求項のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 2 6】

請求項 4 記載のペプチドを請求項 8 記載のペプチドとの組み合わせにおいて含む請求項 2 5 記載の組成物。

10

【請求項 2 7】

請求項 6 記載のペプチドを請求項 1 0 記載のペプチドとの組み合わせにおいて含む請求項 2 6 記載の組成物。

【請求項 2 8】

癌疾患に対して免疫応答を惹起する能力を有するワクチンである請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 9】

スルビビタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されないタンパク質またはペプチドフラグメントから選択される免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントをさらに含む請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 3 0】

スルビビタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されないタンパク質またはペプチドフラグメントが細胞アポトーシスの制御に関与するタンパク質またはそのペプチドフラグメントである請求項 2 9 記載の組成物。

【請求項 3 1】

スルビビタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されないタンパク質またはそのペプチドフラグメントから選択される免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが B c 1 - 2 またはそのペプチドフラグメントである請求項 2 9 記載の組成物。

【請求項 3 2】

マルチエピトープワクチンである請求項 2 5 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 3 3】

ワクチンがスルビビンが発現される癌疾患に対して免疫応答の惹起能を有する請求項 3 2 記載の組成物。

【請求項 3 4】

癌疾患が慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫、乳癌、頸癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌からなる群から選択される請求項 3 3 記載の組成物。

【請求項 3 5】

ワクチンがワクチン接種された対象において癌細胞に対して細胞傷害効果を有するエフェクター T 細胞の産生を惹起する請求項 3 3 または 3 4 に記載の組成物。

40

【請求項 3 6】

P B L 中または腫瘍組織におけるスルビビン反応性 T 細胞の存在のエキスピボまたはインサイチュ診断のための組成物であって、請求項 1 記載のペプチドを含む組成物。

【請求項 3 7】

P B L 中または腫瘍組織におけるスルビビン反応性 T 細胞の存在のエキスピボまたはインサイチュ診断のための診断キットであって、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含む診断キット。

【請求項 3 8】

請求項 1 記載のペプチドおよびクラス I H L A 分子またはかかかる分子のフラグメン

50

トの複合体。

【請求項 39】

モノマーである請求項 38 記載の複合体。

【請求項 40】

マルチマーである請求項 38 記載の複合体。

【請求項 41】

スルビビン反応性 T 細胞の存在を検出する方法であって、腫瘍組織または血液サンプルを請求項 38 記載の複合体と接触させ、該複合体と該組織または該血液細胞との結合を検出することを含む方法。

【請求項 42】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のペプチドに対して特異的結合能を有する分子。

【請求項 43】

抗体またはそのフラグメントである請求項 42 記載の分子。

【請求項 44】

請求項 42 または 43 記載の分子の結合の遮断能を有する分子。

【請求項 45】

癌の治療用医薬を調製するための請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項において定義されるペプチドの使用。

【請求項 46】

癌の治療用医薬を調製するための、請求項 25 記載の組成物、請求項 42 記載の分子または請求項 44 記載の分子の使用。

【請求項 47】

治療される疾患がスルビビンが発現される癌疾患である請求項 45 または 46 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 48】

癌疾患が慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫、乳癌、頰癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌からなる群から選択される請求項 46 記載の使用。

【請求項 49】

さらに別の治療と組み合わせられる請求項 45 ~ 48 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 50】

さらに別の治療が放射線治療または化学療法である請求項 49 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明はスルビビン誘導ペプチドならび特に癌における診断および治療目的でのその使用に関する。特に、新規ペプチドは、インサイチュおよびエクスビポ応答をはじめとする、癌患者における細胞傷害性 T 細胞応答を惹起できる MHC クラス I 限定 T 細胞エピートプである。特に、かかる新規ペプチドは、認識されている腫瘍関連抗原 (TAA) である

【背景技術】

【0002】

(背景技術)

哺乳動物免疫系が外来または異質物質を認識し、これと反応するプロセスは複雑である。この系の重要なファクターは、T 細胞応答である。この応答は、T 細胞が、ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) を構成するヒト白血球抗原 (HLA) と称する細胞表面分子、およびペプチドの複合体を認識し、これと相互作用することを必要とする。ペプチドは、HLA / MHC 分子を提示する細胞により処理されるさらに大きな分子から誘導される。T 細胞と HLA / ペプチド複合体の相互作用は限定され、HLA 分子とペプチドの特定の

10

20

30

40

50

組み合わせについて特異的であるT細胞を必要とする。特異的T細胞が存在しないならば、そのパートナー複合体が存在するとしてもT細胞応答は存在しない。同様に、特異的複合体が存在しないならば、応答は存在しないが、T細胞は存在する。

【0003】

T細胞が細胞の異常を認識するメカニズムは癌においても関連する。例えば、WO92/20356において、処理されてペプチドになり、これを次に細胞表面上で発現させて、特異的CTLにより腫瘍細胞の消散につながり得る遺伝子のファミリーが開示されている。これらの遺伝子は、MAGEファミリーと呼ばれ、「腫瘍拒絶抗原前駆体」または「TRAP」分子をコードするとされ、これから誘導されるペプチドは「腫瘍拒絶抗原」または「TRA」と呼ばれる。

10

WO94/05304において、HLA-A1分子と結合するノナペプチドが開示されている。該文献は、特定のHLA分子についての特定のペプチドの特異性がわかっているならば、特定のペプチドは1つのHLA分子と結合するが、他のものとは結合しないと予想される。これは、異なる個体は異なるHLA表現型を有するので明らかである。その結果、特定のペプチドが特異的HLA分子のパートナーであるということの検証は、診断および治療的効果があるが、これらは特定のHLA表現型を有する個体についてのみ顕著である。

【0004】

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

20

【0005】

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

30

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

40

【0006】

適切な操作により、腫瘍中に存在する腫瘍抗原を免疫系に暴露することができることも示されている。研究により、免疫応答のCD8+CTLアームは、単独またはCD4+Th細胞との組み合わせにおいて、適応的免疫反応の主要な抗腫瘍エフェクターアームを構成することが示されている。これまで、免疫反応のCTLアームに主に焦点が当てられてきた。しかしながら、CD4 T細胞反応が腫瘍拒絶において、特に誘導期またはインビ

50

ボでのCTL反応の延長において重要な役割を果たすことがますます明らかになってきている。従って、クラスII限定腫瘍抗原を有効な腫瘍ワクチン接種プロトコル中に組み入れることにより、ワクチンの有効性が増大し得る。

アポトーシスは細胞の自殺の遺伝子プログラムであり、アポトーシスの阻害は、形質転換突然変異の蓄積に有利な細胞のライフスパンを延長することにより、癌の形成に關与する重要なメカニズムであることが示唆されている(7)。スルビピンはアポトーシスタンパク質の阻害剤(IAP)のファミリーの最近同定されたメンバーである。約4000000の転写物の世界的な遺伝子発現分析において、スルビピンは多くの種類の癌において常に増加調節されるが、正常組織においては増加調節されないトップ遺伝子の一つとして同定された。スルビピンを過剰発現する充実性悪性腫瘍は、肺、結腸、乳房、脾臓、および前立腺ならびに造血性悪性腫瘍を包含する(9)。さらに、一連の黒色腫および非黒色腫皮膚癌は常にスルビピン陽性であることが報告されている(10、11)。ほとんどのヒトの癌におけるスルビピンの過剰発現は、腫瘍進行におけるアポトーシス阻害の一般的役割を示唆し、これは結腸直腸および膀胱癌、ならびに神経芽種の場合において、スルビピンの発現は望ましくない予後と関連するという観察により実証される概念である。対照的に、スルビピンは正常な成人組織において検出不可能である。これらの特徴は、スルビピンを診断および治療目的の両方について適当なTAAとして適格とする。

【0007】

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

【0008】

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

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

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第92/20356号パンフレット

【特許文献2】国際公開第94/05304号パンフレット

【特許文献3】米国特許第6245523号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の開示)

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

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

【0011】

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

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

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

【0012】

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

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

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

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

【図面の簡単な説明】

【0013】

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

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

【図 3】ペプチドなし（黒）、Sur 1（L T L G E F L K L、配列番号 10）ペプチド（灰色）、Sur 9（E L T L G E F L K L、配列番号 3）ペプチド（白）、類似ペプチド Sur 1 L 2（L L L G E F L K L、配列番号 4）（淡灰色）、および類似ペプチド Sur 1 M 2（L M L G E F L K L、配列番号 5）（暗灰色）に対する患者 C L L 2 および C L L 3 における E L I S P O T において測定される応答を示す。

【図 4】インビトロで一度刺激し、ペプチドなし（黒）、ペプチド Sur 1（L T L G E F L K L、配列番号 10）（灰色）および Sur 9（E L T L G E F L K L、配列番号 3）（白）に対する応答についての E L I S P O T アッセイにおいて分析された患者 Me 1 1、Me 1 2、および Me 1 3 からの腫瘍浸潤リンパ節から単離された T 細胞を表す。

【図 5】スルビビン特異性 C T L の機能的活性を示す。

10

【図 6】乳ガン患者からの B P L におけるスルビビン反応性 C T L の頻度を示す。

【図 7】スルビビン誘導ペプチドの H L A - 3 5 結合およびスルビビン誘導ペプチドによる H L A - B 3 5 分子のペプチドによる回復の分析である。

【図 8】癌患者からの P B L において観察される自発的 T 細胞応答を示す。A）患者 C L L 5（ 10^5 細胞 / ウェル）、H E M 1 2（ 10^5 細胞 / ウェル）、および H E M 8（ 5×10^4 細胞 / ウェル）からのインビトロで刺激された P B L 中、ペプチド無し（白）、sur 5 1 - 1 9（黒）または sur 4 6 - 5 4（灰色）を用いて E L I S P O T アッセイにおいて測定された I F N γ スポット形成細胞の数。B）ペプチドパルス化成熟自己樹状細胞とともに 10 日間培養された、H E M 1 2 からの 1.7×10^5 P B L 中のスポット形成細胞の数。

20

【図 9】黒色腫患者における天然および修飾スルビビンペプチドに対する自発的 T 細胞応答を表す。A）P B L（ 4×10^3 細胞 / ウェル）および T I L（ 7×10^4 細胞 / ウェル）中患者 F M 2 5 からの sur 5 1 - 5 9 および sur 5 1 Y 9 ならびに F M 4 5（ 10^4 細胞 / ウェル）からの T I L に対する E L I S P O T アッセイにおいて測定されるスポット形成細胞の数。

【図 10】H L A - A 1 に対するスルビビン誘導ペプチドの結合親和力を示す。

【図 11】H L A - A 1 限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図 12】H L A - A 1 1 限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図 13】H L A - A 3 限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

【図 14】H L A - A 2 限定ペプチドに対する自発的応答を示す。

30

【図 15】E L I S P O T アッセイにより測定されるスルビビン誘導ペプチドに対する自発的 T 細胞応答を表す。

【図 16】4 人の患者（▲ R W、● K N、- W W E、■ G B）のワクチン治療後の L D H、コリンエステラーゼ、クレアチニン。ヘモグロビン、白血球および血小板の安定な検出の実験値を示す。

【図 17】I F N γ E L I S P O T アッセイにより評価されるスルビビンペプチドの免疫性の動態分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

（発明の詳細な記載）

40

本発明の新規 M H C クラス I 限定ペプチドは、いくつかの特徴のうちの少なくとも 1 つを有することにより特徴づけられ、その一つは、本明細書において記載されるようなアセンブリーアッセイにおいてクラス I H L A 分子の最大の半分を回復することができるペプチドの量（ C_{50} 値）により測定される場合、最大で $50 \mu M$ の親和力に限定されるクラス I H L A 分子と結合できる能力である。このアセンブリーアッセイは、既に記載されているようにして行われ（12、13）、ペプチドをペプチドトランスポーター欠損細胞系 T 2 にロードした後の H L A 分子の安定化に基づく。その後、正しく折り畳まれた安定な H L A 重鎖を、構造依存性抗体を用いて免疫沈降させ、ペプチド結合を定量化する。

このアッセイは、前記親和性で所定の H L A 対立分子と結合するその能力について候補ペプチドをスクリーニングするための簡単な手段を提供する。好ましい具体例において、

50

本発明のペプチドは、最高 $30 \mu\text{M}$ の C_{50} 値を有するもの、例えば、最高 $10 \mu\text{M}$ 、最高 $5 \mu\text{M}$ 、最高 $2 \mu\text{M}$ を包含する、最高 $20 \mu\text{M}$ である C_{50} 値を有するものである。

【0015】

前記のように、HLA系は、ヒト主要組織適合(MHC)系を表す。一般に、MHC系は一連の特徴：移植抗原、胸腺依存性免疫応答、ある種の相補因子およびある疾患の素因を制御する。さらに詳細には、MHCは、MHCのさらに一般的な特徴を決定する3種の異なる種類の分子、すなわち、クラスI、IIおよびIII分子をコード化する。これらの分子のうち、クラスI分子は、ほとんどの有核細胞および血小板の表面上に提示されるいわゆるHLA-A、HLA-BおよびHLA-C分子である。

本発明のペプチドは、特定のMHCクラスHLA I分子と結合する(限定される)その能力により特徴づけられる。従って、一具体例において、ペプチドは、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A9、HLA-A10、HLA-A11、HLA-Aw19、HLA-A23(9)、HLA-A24(9)、HLA-A25(10)、HLA-A26(10)、HLA-A28、HLA-A29(w19)、HLA-A30(w19)、HLA-A31(w19)、HLA-A32(w19)、HLA-Aw33(w19)、HLA-Aw34(10)、HLA-Aw36、HLA-Aw43、HLA-Aw66(10)、HLA-Aw68(28)、HLA-A69(28)をはじめとするMHCクラスI HLA-A分子に限定されるものである。文書全体にわたってさらに簡単な記号表示も用いられ、ここにおいて、主に数字の標記、例えばHLA-A19またはHLA-A24がそれぞれHLA-Aw19およびHLA-A24(9)の代わりに使用される。特定の具体例において、本発明のペプチドは、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11およびHLA-A24からなる群から選択されるMHCクラスI HLA種に限定される。

【0016】

本発明のペプチドは、スルビピンの既知の配列、例えば米国特許第6245523号に開示されている配列から誘導される。特定のHLA分子と結合する能力を潜在的に有するペプチドの選択は、特定のHLA分子と結合する既知の配列の整列により行うことができ、これによりいくつかの関連するアミノ酸のペプチドにおける特定の位置での優位性が明らかになる。このような優勢アミノ酸残基は、本明細書において「アンカー残基」または「アンカー残基モチーフ」とも称する。アクセス可能なデータベースにおいて見いだすことができる既知の配列データに基づくこのような比較的簡単な手順にしたがって、ペプチドを特定のHLA分子と結合しそうなスルビピタンパク質分子から誘導することができる。一連のHLA分子についてのこのような分析の代表例を以下の表に示す：

【0017】

10

20

30

【表 1 - 1】

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

10

20

30

40

【表 1 - 2】

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

【0018】

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

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

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

【0019】

従って、本発明のペプチドを同定するための簡単な方法は：特定のHLA分子、例えば所定の集団中に高い割合で存在するものを選択し、スルビビンタンパク質において「アンカー残基モチーフ」を同定するために前記の様な配列分析を行い、1以上の同定されたアンカー残基を含む適当なサイズのペプチドを単離または構築し、得られるペプチドを(i)本明細書において既に記載したようなアセンブリーアッセイを用いて特定のHLA分子と結合する能力、(ii)本明細書において既に記載したようなELISPOTアッセイにより測定すると少なくとも $1/10^4$ PBLの頻度で癌患者のPBL集団においてINF- γ 産生細胞を惹起するペプチドの能力、および/または(iii)試験されるエピートペプチドと反応性である腫瘍組織CTLにおいてインサイチュで検出されるペプチドの能力について試験する工程を含む。

【0020】

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

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

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

10

20

30

40

50

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

【 0 0 2 5 】

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

10

【 0 0 2 6 】

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

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

20

【 0 0 2 7 】

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

30

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

アミノ酸配列間の相同性は、当該分野において周知のアルゴリズムを用いて計算することができる。連続したスルビビン誘導アミノ酸残基を含むかまたは該アミノ酸残基からなるフラグメントと相同性を共有するフラグメントは、あらかじめ決められたスルビビン誘導ペプチドと、好ましくは少なくとも約 9 0 % 相同性、例えば少なくとも 9 4 % 相同性 (9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % 相同性を包含する) を有する場合に、本発明の範囲内に含まれると考えられる。

40

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明のペプチドの翻訳後修飾を行うことが有利である場合もある。乳ガン M C F - 7 または子宮頸癌 H e 1 a 細胞を、アドリアマイシン、タキソール、または U V B をはじめとする抗ガン剤に暴露すると、スルビビンの発現が 4 ~ 5 倍増大することが判明した。抗ガン剤治療後のスルビビンレベルにおける変化は、スルビビン m R N A 発現の調節を含まず、新規遺伝子転写と独立していた。反対に、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤フラボピリドールによる T h r ^{3 4} 上のスルビビンリン酸化の阻害の結果、スルビビン発現が失われ、非リン酸化可能なスルビビン T h r ^{3 4} → A 1 a は野生型スルビビンと比べ

50

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

【0029】

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

【0030】

本発明のペプチドの重要な特徴は、I N F - γ 産生レスポンダーT細胞、すなわち癌患者のP B L 集団または腫瘍細胞 (標的細胞) における特定のペプチドを特異的に認識する細胞毒性T細胞 (C T L) を認識または惹起することである。この活性は、患者から得られるP B L または腫瘍細胞を文献 (1 6) および以下の実施例において記載されているE L I S P O T アッセイに付すことにより容易に決定される。アッセイ前に、分析されるP B L 集団または腫瘍細胞を試験されるペプチドと接触させることにより刺激するのが有利である。好ましくは、ペプチドは本明細書において用いられるE L I S P O T アッセイにより決定すると少なくとも1 / 1 0⁴ P B L の頻度でI N F - γ 産生T細胞を惹起または認識できる。さらに好ましくは、頻度は少なくとも5 / 1 0⁴ P B L であり、最も好ましくは少なくとも1 0 / 1 0⁴ P B L、たとえば少なくとも5 0 または1 0 0 / 1 0⁴ P B L である。

【0031】

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

【0032】

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

10

20

30

40

50

胞系 M C F - 7 および黒色腫細胞系 F M 3 から選択される細胞系を包含する癌細胞系のスルビピン発現細胞に対して細胞傷害効果を有する T 細胞の形態において免疫応答を惹起できる。

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

10

【 0 0 3 3 】

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

異なる H L A 分子は、主なヒト集団において異なる有病率を有することはよく知られている。従って、本発明の方法にしたがって治療できる患者の集団を拡張するため、いくつかの H L A クラス I 分子に限定されたペプチドエピトープを同定するために要件が存在する。異なる H L A 制限エレメントを有する複数のスルビピンエピトープのキャラクタライゼーションにより、2つの重要な方法でこの標的抗原の臨床的可能性が拡大される。すなわち、(i) スルビピン誘導ペプチドに基づく免疫療法に適した患者の数を増大させる。H L A - A 2 抗原は、白人およびアジア人種の約 5 0 % により発現され、H L A - A 1 および H L A - A 3 抗原はどちらも白人の 2 5 % およびアジア人の 5 % により発現され、一方、H L A - A 1 1 抗原は白人の約 1 5 % およびアジア人の 3 0 % により発現される。これらの数は同時発現のために合計することができなくとも、これらの多様性により限定されるペプチドの組み合わせはほとんどの癌患者を確実に包含する。(i i) 各患者におけるいくつかの制限エレメントの全体的ターゲティングは H L A - 対立遺伝子損失による免疫回避の危険性を減少させるであろう。一つの H L A - 対立遺伝子の損失は癌細胞により表される M H C 変更の重要な成分であり、クラス I 発現の全体的な損失は滅多に起こらない事象である。従って、異なる H L A 対立遺伝子に限定されるスルビピンエピトープの同定で、対立遺伝子重複を有する患者において 1 以上の H L A 分子を同時に標的とすることが可能である。

20

30

【 0 0 3 4 】

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

40

さらに、既に記載されているように、腫瘍は一般にクラス I I M H C を発現しないという事実にかかわらず、腫瘍特異性 T ヘルパー細胞免疫性の惹起、すなわち、クラス I I - M H C 限定エピトープでのワクチン接種に対する関心が増大している。これは、多くの場合におけるワクチン誘発性抗腫瘍応答の誘発および有効性が腫瘍特異性 C D 4 陽性 T_h 細胞の連携を必要とするという最近の知見に基づく。従って、さらに複雑な組成を有するワクチンの開発を行う重要な因子は、例えば慎重に選択された C T L および T_h 細胞エピトープの集合を含むかまたはコード化するワクチンを設計することにより複数の腫瘍抗原を標的にすることへの要望である。

【 0 0 3 5 】

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

50

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

10

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

従って、本発明の重要な態様は組成物に関する。

【0036】

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

20

30

【0037】

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

40

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

50

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

【0038】

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

【0039】

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

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

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

【0040】

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

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

【 0 0 4 1 】

本発明の組成物の免疫保護効果は、いくつかの方法を用いて決定することができる。その例は、以下の実施例において記載される。免疫原性組成物により誘発されるCTL応答をどのようにして決定するかについてのさらに別の例は、前出のWO 97 / 2 8 8 1 6 に記載されている。有効な免疫応答は、免疫化および / またはワクチン組成物のペプチドを特異的に認識する抗体の検出後のDTH反応の発生によっても決定することができる。

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

【 0 0 4 2 】

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

【 0 0 4 3 】

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

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

【 0 0 4 4 】

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

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

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

【0045】

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

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

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

【0046】

本発明を以下の非制限的实施例および図においてさらに詳細に説明する。

図中、

図1は、患者CLL1におけるELISPOTにおいて測定される、ペプチドなし、Sur1 (LTLEFLKL、配列番号10) ペプチドおよびSur9 (ELTLEFLKL、配列番号3) ペプチドに対するT細胞応答を示す。PBLを重複試験において 6×10^5 細胞/ウェルでプレートする前に一度ペプチドで刺激した。CCDスキャニング装置およびコンピューターシステムを用いてペプチドあたりのスポットの平均数を計算した。

図2は、ペプチドなし、ペプチド類似体Sur1L2 (LLLGEFLKL、配列番号4)、およびペプチド類似体Sur1M2 (LMLGEFLKL、配列番号5) に対する患者CLL1におけるELISPOTにおいて測定されるT細胞応答を示す。PBLを重複試験において 10^4 細胞/ウェルでプレートする前に一度ペプチドで刺激した。CCDスキャニング装置およびコンピューターシステムを用いてペプチドあたりのスポットの平均数を計算した。

【0047】

図3は、ペプチドなし（黒）、Sur1 (LTLEFLKL、配列番号10) ペプチド（灰色）、Sur9 (ELTLEFLKL、配列番号3) ペプチド（白）、類似ペプチドSur1L2 (LLLGEFLKL、配列番号4)（淡灰色）、および類似ペプチドSur1M2 (LMLGEFLKL、配列番号5)（暗灰色）に対する患者CLL2およびCLL3におけるELISPOTにおいて測定される応答を示す。各実験は重複試験において 10^5 細胞/ウェルで行い、ペプチドあたりのスポットの平均数を計算した。

図 4 は、インビトロで一度刺激し、ペプチドなし（黒）、ペプチド Sur 1 (L T L G E F L K L、配列番号 10) (灰色) および Sur 9 (E L T L G E F L K L、配列番号 3) (白) に対する応答についての E L I S P O T アッセイにおいて分析された患者 Me 1 1、Me 1 2、および Me 1 3 からの腫瘍浸潤リンパ節から単離された T 細胞を表す。各実験は重複試験においてウェルあたり 10^5 細胞で行った。各実験において、ペプチドを添加していない 2 つのウェルも含めた。ペプチドあたりの平均数を各患者について計算した。

図 5 は、スルビピン特異性 C T L の機能的活性を示す。スルビピンコートされた磁気ビーズを用いて黒色腫浸潤リンパ節から C T L を単離した。(A) 黒色腫細胞系 ; H L A - A 2 陽性 F M 3 (三角) および H L A - A 2 陰性 F M 4 5 (四角) の特異的溶解。(B) 乳ガン細胞系 ; H L A - A 2 陽性 M C F - 7 (三角) および H L A - A 2 陰性 B T - 2 0 (四角) の特異的溶解。

【 0 0 4 8 】

図 6 は、乳ガン患者からの P B L におけるスルビピン反応性 C T L の頻度を示す。反応性を E L I S P O T により 3 人の乳ガン患者 (それぞれ上、中、下) において調べた。各患者について、アッセイをペプチドの不在下、sur 1 ペプチドの存在下、sur 9 の存在下、および修飾 sur 1 M 2 ペプチドの存在下で行った。ウェルあたり 1×10^4 エフェクター細胞を使用した。グラフは、反応性細胞の定量化を表し ; 灰色の柱状グラフは I F N - γ 産生細胞の平均数を表す。

図 7 は、スルビピン誘導ペプチドの H L A - 3 5 結合およびスルビピン誘導ペプチドによる H L A - B 3 5 分子のペプチドによる回復の分析である。代謝的に標識された T 2 - B 3 5 細胞の溶解産物を、50、5、0.5、0.05 および 0.005 mM のペプチドの存在下、4 でインキュベートした。H L A - 3 5 の回復をアセンブリーアッセイにおいて分析し、Image Gauge ホスホルイメージャーソフトウェア (富士写真フイルム株式会社、日本) を用いて I E F - ゲル電気泳動後に定量化した。 C_{50} 値は H L A - B 3 5 との最大結合の半分に必要なペプチドの濃度である。

図 8 は、癌患者からの P B L において観察される自発的 T 細胞応答を示す。A) 患者 C L L 5 (10^5 細胞 / ウェル)、H E M 1 2 (10^5 細胞 / ウェル)、および H E M 8 (5×10^4 細胞 / ウェル) からのインビトロで刺激された P B L 中、ペプチド無し (白)、sur 5 1 - 1 9 (黒) または sur 4 6 - 5 4 (灰色) を用いて E L I S P O T アッセイにおいて測定された I F N γ スポット形成細胞の数。B) ペプチドパルス化成熟自己樹状細胞とともに 10 日間培養された、H E M 1 2 からの 1.7×10^5 P B L 中のスポット形成細胞の数。柱状グラフは 2 回の測定値の平均を表す。

【 0 0 4 9 】

図 9 は、黒色腫患者における天然および修飾スルビピンペプチドに対する自発的 T 細胞応答を表す。A) P B L (4×10^3 細胞 / ウェル) および T I L (7×10^4 細胞 / ウェル) 中患者 F M 2 5 からの sur 5 1 - 5 9 および sur 5 1 Y 9 ならびに F M 4 5 (10^4 細胞 / ウェル) からの T I L に対する E L I S P O T アッセイにおいて測定されるスポット形成細胞の数。柱状グラフは非特異性 I F N γ 放出を差し引いた 2 回の測定値の平均を表す。

図 10 は、H L A - A 1 に対するスルビピン誘導ペプチドの結合親和力を示す。クラス I M H C 重鎖はホスホルイメージャーで定量化した。安定化された H L A - A 1 重鎖のマウントは、添加されたペプチドの結合親和力と直接関連する。40、4、0.4、0.04 μ M の Sur 9 3 - 1 0 1 (線)、Sur 9 3 T 2 (四角)、Sur 4 9 - 5 8 (円) またはインフルエンザ A、P B 1 5 9 1 - 5 9 9 (三角) により誘発される H L A - A 1 のペプチドによる回復 (任意単位)。

図 11 は、H L A - A 1 限定ペプチドに対する自発的応答を示す。E L I S P O T アッセイにより測定されるスルビピン誘導ペプチドに対する自発的 T 細胞応答。黒色腫患者からの 5×10^4 インビトロ刺激 P B L または T I L 中 Sur 9 2 - 1 0 1、Sur 3 8 Y 9、Sur 4 7 Y 1 0、および Sur 9 3 T 2 に応答して形成されるペプチド特異性 I F

10

20

30

40

50

N γ スポットの平均数。示されるペプチド特異性応答は黒色腫（Me1）患者からの6 PBLサンプルおよび3 TILサンプルの分析中観察された。非特異性IFN γ スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

【0050】

図12はHLA-A11限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビビン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。癌患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBLまたはTIL中Sur53-62に应答して形成されるペプチド特異性IFN γ スポットの平均数。ペプチド特異性応答は、5人の黒色腫（Me1）患者（5 PBL、1 TIL）および2人のCLL（CLL）患者（PBL）の分析において観察された。非特異性IFN γ スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

10

図13は、HLA-A3限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビビン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。黒色腫患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBLまたはTIL中Sur18LK10に应答して形成されるペプチド特異性IFN γ スポットの平均数。示されるペプチド特異性応答は、黒色腫（Me1）患者からの23 PBLサンプルおよび4 TILサンプルの分析中観察された。非特異性IFN γ スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

図14は、HLA-A2限定ペプチドに対する自発的応答を示す。ELISPOTアッセイにより測定されるスルビビン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答。癌患者からの 5×10^4 インビトロ刺激PBL中11merペプチド、Sur18-28に应答して形成されるペプチド特異性IFN γ スポットの平均数。示されるペプチド特異性応答は、2人の黒色腫（Me1）患者、6人のCLL（CLL）患者、および2人の乳ガン（MC）患者からの10 PBLサンプルの分析において観察された。非特異性IFN γ スポットを差し引く。バー：重複試験の範囲。

20

【0051】

図15は、ELISPOTアッセイにより測定されるスルビビン誘導ペプチドに対する自発的T細胞応答を表す。5人の黒色腫患者（me125、me126、me13、me16、me139）、2人のCLL患者（CLL1、CLL54）および2人の乳ガン患者（breast11、breast15）からの 10^5 インビトロ刺激PBL中sur6-14（LPPAWQPFL）に应答して形成されたペプチド特異的IFN γ スポットの平均数。非特異的IFN γ スポットを差し引く。

30

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

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

【0052】

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

【表 2 - 1】

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

【表 2 - 2】

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

10

20

30

40

【表 2 - 3】

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

10

20

【実施例】

【0053】

実施例 1

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

概要

30

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

はじめに

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

40

【0054】

物質および方法

患者および健常対照

CLLと診断された4人の患者(CLL1-4と表示)からの末梢静脈血サンプルおよび6人の健常者からの血液サンプルをヘパリン化試験管中に集めた。Lymphoprep

50

p 分離を用いて P B L を単離し、10%ジメチルスルホキシドを含むウシ胎仔血清 (F C S) 中凍結させた。さらに、腫瘍浸潤リンパ節からのリンパ球を6人の黒色腫患者 (m e l 1 - 6 と表示) から得た。新たに切除されたリンパ節を細かく刻んで小片にし、粉碎して細胞を培養物中に放出させ、低温保存した。P B L は黒色腫患者のうち4人から得られた。包含される全ての個体は、H L A - A 2 特異的抗体 B B 7 . 2 を用いた F A C S 分析により決定されるように H L A - A 2 陽性であった。抗体をハイブリドーマ上清から精製した。州立大学病院 (H e r l e v 、デンマーク) から患者サンプルを入手した。これらの測定の前に患者からインフォームドコンセントを得た。

【 0 0 5 5 】

スルビビン誘導ペプチド

全てのペプチドは、R e s e a r c h G e n e t i c s (ハンツビル、A L 、U S A) から入手し、H P L C および M C 分析により実証されるように > 90% の純度で提供された。使用したペプチドを表 1 に記載する。

【表 3】

表 1 この実験において調査したペプチドおよびその H L A - A 2 との結合親和力

名称	タンパク質 ^a	配列	配列番号	C ₅₀ (μM) ^b
C1	HIV-1 pol ₄₇₆₋₄₈₄	ILKEPVHGV	11	0.7
Sur1	Survivin ₉₆₋₁₀₄	LTLGEFLKL	10	>100
Sur2	Survivin ₁₃₃₋₁₄₁	RAIEQLAAM	12	結合無し
Sur3	Survivin ₁₃₀₋₁₃₈	KVRRRAIEQL	13	>100
Sur4	Survivin ₂₀₋₂₈	STFKNWPFL	14	結合無し
Sur5	Survivin ₈₈₋₉₆	SVKKQFEEL	15	Not binding
Sur6	Survivin ₁₀₁₋₁₀₉	FLKLDRELA	1	30
Sur7	Survivin ₁₂₇₋₁₃₅	TAKKVRRAI	16	結合無し
Sur8	Survivin ₅₋₁₄	TLPPAWQPF	2	30
Sur9	Survivin ₉₅₋₁₀₄	L ELTLGEFLK	3	10
Sur10	Survivin ₁₂₆₋₁₃₅	L ETAKKVRRA I	17	結合無し
Sur1L2		LLLGEFLKL	4	1
Sur1M2		LMLGEFLKL	5	1

a 下付き文字で示した値の範囲は、米国特許第 6 2 4 5 5 2 3 号に開示されるようなスルビビン配列におけるペプチドの位置を示す。

b C₅₀ 値は、以下に記載するようにして決定される H L A - A 2 との最大結合の半分に必要なペプチドの濃度である。

【 0 0 5 6 】

クラス I M H C 分子とのペプチド結合についてのアセンブリーアッセイ

合成ペプチドの [3 5 S] -メチオニンで代謝的に標識されたクラス I M H C 分子に対する結合についてのアセンブリーアッセイを記載されているようにして行った (1 2 、 1 3) 。アセンブリーアッセイは、ペプチドをペプチドトランスポーター欠損細胞系 T 2 にロードした後のクラス I 分子の安定化に基づく。その後、構造依存性抗体を用いて適切に折り畳まれた安定 H M C 重鎖を免疫沈降させた。I E F 電気泳動後、ゲルをホスホルイメージャースクリーンに暴露し、I m a g e q u a n t ホスホルイメージャープログラム (M o l e c u l a r D y n a m i c s 、 サニーベール、C A) を用いてペプチド結合を定量化した。

【 0 0 5 7 】

P B L の抗原刺激

E L I S P O T アッセイの感度を拡大するために、分析前に P B L を一度インビトロで刺激した (1 4 、 1 5) 。新しい、あらかじめ凍結させた P B L により E L I S P O T アッセイにおいて同様の結果が得られた。0 日に、P B L または粉碎されたリンパ節を解凍し、A I M V 培地 (L i f e T e c h n o l o g i e w 、ロスキレ、デンマーク)、5 % 熱不活化ヒト血清および 2 m M の L - グルタミン中、1 0 μ M のペプチドの存在下で 2 4 穴プレート (N u n c 、デンマーク) 中、2 × 1 0 ⁶ 細胞の濃度で 2 m l / ウェルでプレートした。各実験において、ペプチドを含まないウェルを含めた。2 日後、3 0 0 I U / m l の組み換えインターロイキン - 2 (I L - 2) (C h i r o n 、ラーティンゲン、ドイツ) を培養物に添加した。培養された細胞を 1 2 日に E L I S P O T アッセイにおいて反応性について試験した。

10

【 0 0 5 8 】

E L I S P O T アッセイ

ペプチドエピトープ特異性インターフェロン - γ - 放出エフェクター細胞を定量化するために用いられる E L I S P O T アッセイを (1 6) におけるのと同様に行った。簡単に説明すると、ニトロセルロース底の 9 6 穴プレート (M u l t i S c r e e n M A I P N 4 5 、M i l l i p o r e 、H e d e h u s e n e 、デンマーク) を抗 I N F - γ 抗体 (1 - D 1 K 、M a b t e c h 、N a c k a 、スウェーデン) でコートした。ウェルを A I M V 培地により洗浄し、ブロックし、細胞を異なる細胞濃度で重複試験において添加した。ペプチドを次いで各ウェルに添加し、プレートを一夜インキュベートした。翌日、培地を捨て、ビオチニル化二次抗体 (7 - B 6 - 1 - B i o t i n 、M a b t e c h) の添加の前にウェルを洗浄した。プレートを 2 時間インキュベートし、洗浄し、アビジン - 酵素接合体 (A P - A v i d i n 、C a l b i o c h e m 、L i f e T e c h n o l o g i e s) を各ウェルに添加した。プレートを室温で 1 時間インキュベートし、酵素基質 N B T / B C I P (G i b c o 、L i f e T e c h n o l o g i e s) を各ウェルに添加し、室温で 5 ~ 1 0 分間インキュベートした。暗紫色スポットが出現したら水道水で洗浄することにより反応を停止させた。A l p h a I m a g e r S y s t e m (A l p h a I n n o t e c h 、サンリアンドロ、C A . U S A) を用いてスポットをカウントし、ペプチド特異性 C T L 頻度をスポット形成細胞の数から計算することができた。アッセイはすべて各ペプチド抗原について重複試験で行った。

20

30

【 0 0 5 9 】

結果

H L A - A 2 に対するスルビビン誘導ペプチドの結合

主 H L A - A 2 特異性アンカー残基 (1 7) を用いて、スルビビタンパク質のアミノ酸配列を最もありそうな H L A - A 2 ノナマーおよびデカマーペプチドエピトープについてスクリーンした。1 0 のスルビビン誘導ペプチドを合成し、H L A - A 2 に対する結合について調べた。H I V - 1 p o l 4 7 6 - 4 8 4 (I L K E P V H G V 、配列番号 1 1) (表 1) からのエピトープを正の対照として使用した。クラス I M H C の最大回復の半分に必要なペプチド濃度 (C ₅₀ 値) は正の対照について 0 . 7 μ M であった。対照的に、S u r 9 と表されるペプチド (E L T L G E F L K L 、配列番号 3) は C ₅₀ = 1 0 μ M の親和力で結合した。S u r 6 (F L K L D R E R A 、配列番号 1) および S u r 8 (T L P P A W Q P F L 、配列番号 2) と表されるペプチドはそれぞれ H L A - A 2 と C ₅₀ = 3 0 μ M で結合するが、S u r 1 (L T L G E F L K L 、配列番号 1 0) および S u r 3 (K V R R A I E Q L 、配列番号 1 3) はさらに弱く結合した (C ₅₀ > 1 0 0 μ M) 。試験した 1 0 のペプチドのうち 5 つ (S u r 2 、S u r 4 、S u r 5 、S u r 7 、および S u r 1 0) は H L A - A 2 と結合しなかった。

40

S u r 1 は弱い H L A - A 2 バインダーであるので、より良好なアンカー残基 (ロイシンまたはメチオニン) が 2 位で天然のスレオニンと置換されている S u r 1 L 2 および S u r 1 M 2 でそれぞれ表される 2 種のペプチド類似体を合成した。これらのペプチドはど

50

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

【 0 0 6 0 】

C L L 患者におけるスルビビンに対するC T L 応答

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

10

20

【 0 0 6 1 】

黒色腫患者におけるスルビビンに対するC T L 応答

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

30

40

【 0 0 6 2 】

実施例 2

癌患者におけるインビボおよびエキスピボのスルビビン誘導M H C クラスI 限定T 細胞エピトープに対する自発性細胞毒性T 細胞応答

概要

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

50

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

【 0 0 6 3 】

材料および方法

T 細胞染色および T 細胞選別のための H L A ペプチド複合体の構築

H L A A * 0 2 0 1 の細胞外ドメイン (残基 1 ~ 2 7 5) の 5 ' 末端との融合物においてビオチンタンパク質リガーゼ (B i r A) を用いた酵素ビオチニル化の認識部位は、イー・コリ B L 2 1 (D E 3) において発現された。組み換えタンパク質を、8 M 尿素中可溶化させた封入体から、サイズ (S e p h a d e x G 2 5 、 P h a r m a c i a) およびイオン交換 (m o n o - Q 、 P h a r m a c i a) クロマトグラフィーにより精製した。修飾スルビピンペプチド S u r 1 M 2 (L M L G E F L K L 、配列番号 5) または M A A ペプチド g p 1 0 0 1 5 4 - 1 6 3 の存在下で希釈により H L A A * 0 2 0 1 をインピットで折り畳み、その後、既に記載されているようにしてビオチニル化した (3 5 、 3 6) 。 P h a r m a c i a S e p h a d e x G 2 5 カラム上でゲル濾過して未結合ビオチンを除去した後、タンパク質をストレプトアビジン - F I T C 接合デキストラン分子 (L . W i n t h e r (D A K O 、デンマーク) の好意により提供された) でマルチマー化して、免疫組織化学用多価 H L A - デキストラン化合物を生成させた。H L A A * 0 2 0 1 構築物は M a r k M . D a v i s 博士 (スタンフォード大学微生物学および免疫学科 (パロ・アルト、C A) の好意により贈呈された。細胞分離は、既に記載されているようにして行った (3 7) 。簡単に説明すると、 5×10^6 ストレプトアビジン接合磁気ビーズ (D y n a l 、オスロ、ノルウェー) を 2 回 $200 \mu\text{l}$ の冷 P B S 中で洗浄し、 $0.5 \mu\text{g}$ のペプチド / A * 0 2 0 1 モノマーを添加し、混合物を 1 5 分間室温でインキュベートした。2 回洗浄した後、これらのビーズを P B L と 1 : 1 0 の割合で混合し、その後、1 時間インキュベートし、続いて磁場中ビーズ結合細胞を沈降させた。沈降工程を 1 回繰り返した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

免疫組織化学的染色

F I T C 接合マルチマーペプチド / M H C 複合体で染色するために、組織片を一夜乾燥し、その後冷アセトン中 5 分間固定した。全てのインキュベーション工程は室温、暗所で : (i) 一次抗体 (1 : 1 0 0 希釈) を 4 5 分、(i i) C y s 3 - 接合ヤギ抗マウス (1 : 5 0 0 希釈 ; コード 1 1 5 - 1 6 5 - 1 0 0 、 J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 D i a n o v a (ハンブルグ、ドイツ) から入手) を 4 5 分間、および (i i i) 最後にマルチマーを 7 5 分間で行った。各工程間にスライドを 1 0 分間 P B S / B S A 0 . 1 % 中で 2 回洗浄した。スライドをベクタシールド中でマウントし、共焦点顕微鏡下で観察するまで冷蔵庫中で保存した。

【 0 0 6 5 】

細胞毒性アッセイ

C T L による細胞毒性の慣用の [5 1 C r] アッセイを (1 3) に記載されているようにして行った。標的細胞は自己 E B V - 形質転換 B 細胞系、H L A - A 2 陽性乳ガン細胞系 M C F - 7 (A T C C で入手可能) 、 H L A - A 2 陽性黒色腫細胞系 F M 3 (3 8) 、 H L A - A 2 陰性乳ガン細胞系 B T - 2 0 (A T C C で入手可能) および H L A - A 2 陰性黒色腫細胞系 F M 4 5 (3 8) であった。全てのガン細胞系は R T - P C R により調べるとスルビピンを発現した (データは省略) 。

【 0 0 6 6 】

E L I S P O T アッセイ

ペプチドエピトープ特異性 I F N - γ 放出エフェクター細胞を定量化するために E L I S P O T アッセイを使用し、これはすでに記載されている (3 9) 。簡単に説明すると、ニトロセルロース底の 9 6 穴プレート (M u l t i S c r e e n M A I P N 4 5 、 M i l l i p o r e) を抗 I F N - γ 抗体 (1 - D 1 K 、 M a b t e c h 、スウェーデン)

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

10

【0067】

結果

HLA-A2 / スルビビン反応性T細胞のインサイチュ染色

実施例1において、白血病および黒色腫におけるT細胞により認識される2種のスルビビン誘導ペプチドエピトープ、すなわちSur1が同定された。HLA-A2に対するSur1の弱い結合親和力は、2位のスレオニンをさらに良好なアンカー残基(メチオニン; Sur1M2)で置換することにより実質的に向上された。この測定は、安定なHLA-A2 / ペプチド複合体の構築を可能にする。これらの複合体は、デキストラン分子を用いてマルチマー化され、これをストレプトアビジンおよびFITCと接合させた。マルチマー化されたMHC-複合体を、アセトン固定された凍結物質を染色するために使用した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Sur1M2 / HLA-A*0201反応性CTLは腫瘍微小環境においてインサイチュで容易に検出することができた。本発明者らは、一次腫瘍およびIII期の黒色腫患者の症徴リンパ節ならびに一次乳ガン病巣においてかかる細胞を表した。染色の特異性を確実にするために、一連の負の対照を行った。ペプチド / HLA-デキストランマルチマーと同じ腫瘍上の黒色腫分化抗原gp100から誘導されるペプチドの使用も、Sur1M2 / HLA-デキストランマルチマーの使用も、HLA-A2陰性ドナーから得られる腫瘍サンプルの場合、陽性染色をもたらさなかった。

20

【0068】

単離されたスルビビン反応性CTLは異なる起源の腫瘍細胞系を溶解する

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

30

40

【0069】

ELISPOTによりPBLにおいて測定されるスルビビン反応性

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

50

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

【0070】

【表4】

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

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

a) 10^4 あたりの反応性細胞の出現率; 14人の患者を試験した。

b) 10^4 あたりの反応性細胞の出現率; 10人の患者を試験した。

c) 10^5 あたりの反応性細胞の出現率; 7人の患者を試験した。

【 0 0 7 1 】

実施例 3

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対する H L A - B 3 5 限定免疫応答

概要

この実験において、H L A - B 3 5 に限定される 2 種のスルビピン誘導エピトープを同定し、特徴づけた。これらのエピトープの両方に対する特異性 T 細胞反応性は、異なる造血性悪性腫瘍および黒色腫を有する患者からの末梢血において存在した。C 末端アンカー残基の置換は、黒色腫患者からの腫瘍浸潤リンパ球による認識を向上させた。さらに、一次黒色腫病巣におけるインサイチュのスルビピンに対する自発性細胞毒性 T 細胞応答が示された。これらのエピトープは関連する患者の悪性腫瘍ならびに H L A 特性に関連してスルビピンペプチドに基づく将来のワクチン法の適用可能性を拡大する。

10

実施例 1 および 2 において、H L A - A 2 限定スルビピン誘導 T 細胞エピトープを試験した。H L A - A 2 は白色人種集団の約 3 0 % においてのみ発現され (6 3) 、治療できる患者の割合を拡大するために他の H L A クラス I 分子に限定されるペプチドエピトープを同定する必要がある。この研究において、白色人種集団の 9 % において発現される (6 3) H L A - B 3 5 に限定されるスルビピンからの 2 種の新規 T 細胞エピトープを同定し、これらのスルビピンペプチドに対する自発的免疫応答は、異なる造血性悪性腫瘍および黒色腫を有する患者において検出された。

【 0 0 7 2 】

材料および方法

20

患者

癌患者からの末梢静脈血を集め、L y m p h o p r e p 分離を用いて P B L を単離し、H L A 分類し (大学病院臨床免疫学科、コペンハーゲン) 、1 0 % D M S O を含む F C S 中で凍結させた。さらに分析するために 1 0 人の H L A - B 3 5 陽性患者を選択した。これらの患者はそれぞれ、黒色腫、C L L 、濾胞性リンパ腫 (F L) 、肥満性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L) および多発性骨髄腫 (M M) にかかっていた。血液サンプルを集めた時点で、患者はそれ以前の 4 ヶ月以内に医学的治療を受けていなかった。さらに、リンパ節から単離された腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を 3 人の黒色腫患者から集め、1 0 % D M S O を含む F C S 中で凍結させた。

【 0 0 7 3 】

30

ペプチド

7 種の合成スルビピン誘導ペプチド : S u r 6 - 1 4 、S u r 1 1 - 1 9 、S u r 3 4 - 4 3 、S u r 4 6 - 5 4 、S u r 5 1 - 5 9 、S u r 4 6 Y 9 、S u r 5 1 Y 9 、および E B V 誘導ペプチドの一つである E B N A 3 A 4 5 7 - 4 6 6 (6 3) をこの研究において使用した。全てのペプチドは R e s e a r c h G e n e t i c s (ハンツビル、A L) から入手し、H P L C および M C 分析により確認されるように > 9 0 % の純度で提供された。ペプチドを次の表 3 に示す。

【表 5】

表 3 スルビビン誘導ペプチドのHLA-B*35結合

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

【0074】

MHCクラスI分子に対するペプチド結合のアセンブリーアッセイ

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

【0075】

PBLの抗原刺激

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

【0076】

ELISPOTアッセイ

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

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

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

【0077】

樹状細胞 (DS) の成熟化

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

【0078】

ペプチド特異性T細胞の単離

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

【0079】

変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) によるTCRクローン型マッピング

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

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

【0080】

免疫組織化学的染色

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

【0081】

結果

HLA-B35結合スルビピン誘導ペプチドの同定

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

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

【0082】

天然のペプチドエピトープに対する自発性免疫応答

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

10

20

30

40

50

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

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

【0083】

修飾ペプチドの増大した認識

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

【0084】

天然および修飾ペプチド間の交差反応性

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

【0085】

黒色腫病巣においてインサイチュで存在する抗原特異性T細胞

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

10

20

30

40

50

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

【0086】

実施例 4

異なる HLA-A 限定特性を有する新規スルビピン誘導 CTL エピトープの同定

概要

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

10

【0087】

材料および方法

患者

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

20

ペプチド

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

【0088】

細胞系

ヒト T 細胞系は B - L C L , 174 および L C L C E M 細胞の T A P 1 および T A P 2 欠損ハイブリッドであり、従って低レベルの HLA クラス I 分子（HLA-A*0201 および HLA-B*5101）を細胞表面で発現するだけである。HLA-A*0301 でトランスフェクトされた T2 細胞は A M c M i c h e a e l 博士（IMM、ジョン・ラドクリフ病院、オックスフォード）の好意により提供された。HLA-A*1101 でトランスフェクトされた T2 細胞は M M a s u c c i 博士（MTC、カロリンスカ協会、ストックホルム、スウェーデン）の好意により提供された。BM36.1 細胞系も TAP 機能が欠損し、表面で HLA クラス I（HLA-A*0101、HLA-B*3501）の低発現を有する T2 と同様の表現型を有する。BM36.1 細胞は A Z i e g l e r 博士（フンボルト大学、ベルリン、ドイツ）の好意により提供された。

30

【0089】

MHC クラス I 分子に対するペプチド結合についてのアセンブリーアッセイ

[³⁵S]-メチオニンで代謝的に標識された合成ペプチド（I n v i t r o g e n、カールズバッド、CA、USA）の HLA-A1、-A2、-A3、または -A11 に対する結合親和力を既に記載されているようにして（12）アセンブリーアッセイにおいて測定した。アッセイは、TAP 欠損細胞系から細胞溶解により放出された空 HLA 分子のペプチドによる安定化に基づく。HLA クラス I 特異性構造依存性 mAb W6/32 を用いて安定に折り畳まれた HLA 分子を免疫沈降させ、等電点（IEF）ゲル電気泳動法により分離した。I m a g e G a u g e ホスホリメジャープログラム（フジ写真フィルム株式会社、カールトン、TX、USA）を用いて MHC 重鎖バンドを定量化した。バンドの強度はアッセイ中に回収されるペプチド結合クラス I MHC 複合体の量に比例する

40

50

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

【0090】

PBLの抗原刺激

ELISPOTアッセイの感度を拡大するために、PBLを分析前に一度インビトロで刺激した。0日に、PBLまたは粉碎されたリンパ節を解凍し、x-vivo培地(Bio Whittaker、Walkersville、メリーランド)、5%熱不活化ヒト血清、および2mMのL-グルタミン中、10 μ Mのペプチドの存在下で、24穴プレート(Nunc、ロスキレ、デンマーク)中、2ml/ウェルで 2×10^6 細胞としてプレートした。2日後、20IU/mlの組み換えインターロイキン-2(IL-2)(Chiron、ラーティンゲン、ドイツ)を培養物に添加した。培養された細胞を10日にELISPOTにおいて反応性について試験した。

10

【0091】

ELISPOTアッセイ

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

20

30

【0092】

結果

HLA-A1限定スルビピンエピトープの同定

HLA-A1に対するスルビピン誘導ペプチドの結合

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

40

50

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

【0093】

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

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

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

【0094】

H L A - A 1 1 限定スルビピンエピトープの同定

スルビピン誘導ペプチドの H L A - A 1 1 に対する結合

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

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

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

【0095】

癌患者におけるスルビビン誘導ペプチドに対するHLA-A11限定CTL応答

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

10

【0096】

HLA-A3限定スルビビンエピトープの同定

HLA-A3に対するスルビビン誘導ペプチドの結合

20

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

【0097】

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

30

40

【0098】

癌患者におけるスルビビン誘導ペプチドに対するHLA-A3限定CTL応答

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

50

に対する自発性免疫反応性について分析した。CTL反応性は、3人の患者、Me1 . A3 - 1、Me1 . A3 - 2、Me1 . A3 - 3からのTILサンプルにおけるSur18Kに対して検出された(図13)。2つの他のペプチド、Sur5K9およびSur54L2に対する応答は検出されなかった。これらの応答をさらに確認するために、さらに18人の黒色腫患者からのPBLをSur18K10に対するCTL反応性について分析した。3人の応答する患者、Me1 . A3 - 4、Me1 . A3 - 5、およびMe1 . A3 - 6がこれらのなかから見いだされ、その結果、27人の分析された患者のうち合計6人の患者が応答した(図13)。

【0099】

新規HLA - A2限定スルビピンエペトープの同定

10

HLA - A2に対する11-merスルビピン誘導ペプチドの結合

スルビピンタンパク質のアミノ酸配列を、主要HLA - A2特異性アンカー残基を用いて最も可能性の高いHLA - A2 11-merペプチドエペトープについてスクリーンした。6種のスルビピン推定ペプチドを合成し、HLA - A2に対する結合について調べた。調べたペプチドはどれも、Eptein - BarrウイルスBMLF₂₈₀₋₂₈₈ペプチド(GLCTLVAML)(配列番号72)からの公知の正対照エペトープと同様の高い親和力では結合しなかった(表4)。HLA - A2の最大回復の半分に必要なペプチド濃度(C₅₀値)は正の対照について0.9μMであった。比較として、ペプチドSur18-28(RISTFKNWPFLL)(配列番号67)およびSur86-96(FLSVKKQFEEL)(配列番号69)はHLA - A2と弱く結合した(C₅₀はそれぞれ69μMおよび72μM)。しかしながら、公知のHLA - A2限定スルビピンエペトープはHLA - A2と同様に弱く結合し; Sur95-104(ELTLGEFLKL)(配列番号43)は中くらいの親和力で結合し(C₅₀ = 10μM)、Sur96-104(LTLGEFLKL)(配列番号10)は弱くしか結合しなかった(C₅₀ > 100μM)。試験した残りの4つの11-merペプチド、(Sur4-14(PTLP PAWQPFL)(配列番号66)、Sur54-64(LAQCF FCFKEL)(配列番号68)、Sur88-98(SVKKQFEELTL)(配列番号70)、およびSur103-113(KLDRE RAKNKI)(配列番号74)はHLA - A2と結合しなかった。

20

【0100】

30

癌患者におけるスルビピン誘導ペプチドに対するHLA - A2限定CTL応答

2種の弱結合11merペプチド、Sur18-28およびSur86-96がHLA - A2により提示され、癌患者の免疫系により認識されるかどうかを調べるために、10人の癌患者(2人の黒色腫(Me1)、6人のCLL(CLL)、および2人の乳ガン(MC)患者)をまず分析した。Sur18-28に対するCTL応答が、分析された10人の患者のうちの2人(CLL-1、CLL-2、図14)からのPBLにおいて見いだされ、一方、Sur86-96に対して応答は検出されなかった(データは省略)。これらのSur18-28特異性応答を確認するために、さらに12人の患者(7人の黒色腫、1人のCLL、および4人の乳ガン患者)からのPBLをこのペプチドに対するCTL反応性に関して分析した。これらのうち、4人の患者(CLL-3、MC-1、MC-2、Me1 . A2 - 1)がELISPOTにより検出可能なSur18-28特異性免疫活性を有していた(図14)。従って、分析された22人の患者のうち6人のPBLはSur18-28に対するCTL応答を有していた。

40

【0101】

HLA - B7限定スルビピンエペトープの同定

HLA - B7に対するスルビピン誘導ペプチドの結合

スルビピンタンパク質のアミノ酸配列を、HLA - B7のペプチド結合モチーフのアンカー残基を有する9~10のアミノ酸のペプチドについてスクリーンした。5つのペプチドを選択し、アセンブリーアッセイにおいてHLA - B7を安定化させるその能力について分析した。C₅₀値を各ペプチドについてHLA - B7の最大安定化の半分に必要なペ

50

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

【0102】

癌患者におけるスルビビン誘導ペプチドに対するHLA-B7限定CTL応答

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

10

【0103】

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

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

20

前記実施例において得た結果を含む結果のまとめを以下の表4に示す。

【0104】

【表 6 - 1】

表 4 選択されたスルビピン誘導ペプチドについての C_{50} および E L I S P O T データ

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

10

20

30

【表 6 - 2】

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

10

20

30

【表 6 - 3】

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

【0105】

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

10

20

30

40

50

れ、転移性リンパ節懸濁液において最も顕著であり、E L I S P O Tにより一次腫瘍からのT I LおよびP B Lにおいてはさらに弱かった。

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

【0106】

実施例 5

免疫原としてスルビピン誘導体を用いた治療試験法

概要

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

【0107】

材料および方法

患者の適格基準および治療計画

全ての臨床手順は、ヘルシンキ宣言に従い、すべての患者は治療前にインフォームドコンセントを受けた。I V期の皮膚またはぶどう膜黒色腫患者は、少なくとも2種の異なる化学、免疫、または化学免疫療法にもかかわらず疾患が進行している場合に適格であった。加えて、患者は18歳以上であり、H L A A * 0 2 0 1を発現し、頭蓋、胸郭および腹部コンピューター断層撮影法により確認される測定可能な疾患にかかっている必要なかった。患者のクラノフスキー指数は60%以上でなければならなかった。全身的化学および/または免疫療法を、ワクチン接種前4週間以内に行わなかった。重要な除外基準は、C N S転移、活性自己免疫または感染性疾患、妊娠および授乳、ならびに重大な精神異常の徴候であった。ペプチドパルス化樹状細胞は既に記載されているように生成された(82)。簡単に説明すると、白血球除去輸血から得られるP B M CをL y m p h o p r e p T M (N y c o m e d P h a r m a)で単離し、アリコートに分けて凍結し、液体窒素中で貯蔵した。ワクチン接種の1週間前に、P B M Cを解凍し、洗浄し、ゲンタマイシン、グルタミンおよび熱不活化自己血漿を含有する培地中で培養した。1日および5日に、I L - 4およびG M - C S Fを添加した。成熟D Cを分化させるために、T N F - γ およびプロスタグランジンE 2を6日に添加した。7日に、成熟D Cの表現型および形態的特徴、すなわち不明瞭な外観および= 75% C D 8 3発現を示す細胞を修飾スルビピン誘導H L A - A 2限定スルビピン₉₆₋₁₀₄エピトープ、L M L G E F L K L (配列番号10) (C l i n a l f a、スイス) 14でパルス化した。1日および5日に培養物から採取されたサンプルの微生物試験が無菌であると証明される場合にのみ細胞をワクチン接種に使用した。

【0108】

最初の2回のワクチン接種については7日間隔、続いてさらなるワクチン接種について28日間隔で患者にワクチン接種した。合計10~20×10⁶の成熟スルビピン₉₆₋₁₀₄パルス化D Cを、1%ヒト血清アルブミンを含有するP B S中に再懸濁させ、局所リンパ節に近い大腿部の腹側正中領域において、注射部位ごとに1.5×10⁶D Cのアリコートで皮内注射した。排液リンパ節が除去および/または照射された肢節を排除した。患者の健康状態の重大な悪化またはC N S転移の発生の不在下で、5回のワクチン接種後に白血球除去輸血を繰り返した。

【0109】

臨床および免疫学的応答の測定

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

10

20

30

40

50

【0110】

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

【0111】

結果

患者の特徴、毒性および臨床経過

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

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

【0112】

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

10

20

【0113】

スルビビン特異性CD8+T細胞応答

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

30

【0114】

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

40

【0115】

【表 7】

表 5 ワクチン接種試験の概要：患者の特徴

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

10

20

30

40

【0116】

参考文献

1. Van den Eynde, B. J. and Boon, T. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. 50

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

2. Rosenberg, S. A. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. J.Natl.Cancer Inst., 20;88: 1635-1644, 1996.
3. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P., and Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA- A1. Int.J.Cancer, 80: 219-230, 1999. 10
4. Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. Cancer Res., 58: 732-736, 1998.
5. Brossart, P., Heinrich, K. S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V. L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. Blood, 93: 4309-4317, 1999. 20
【 0 1 1 7 】
6. Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., and Nadler, L. M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity., 10: 673-679, 1999.
7. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene, 17: 3247-3259, 1998. 30
8. Altieri, D. C., Marchisio, P. C., and Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. Lab Invest, 79: 1327-1333, 1999.
9. Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., and Altieri, D. C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. J.Biol.Chem., 273: 11177-11182, 1998.
10. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. J.Invest Dermatol., 113: 1076-1081, 1999. 40
【 0 1 1 8 】
11. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. Lab Invest, 79: 1121-1126, 1999.
12. Andersen, M. H., Sondergaard, I., Zeuthen, J., Elliott, T., and Haurum, J. S. An assay for peptide binding to HLA-Cw*0102. Tissue Antigens., 54: 185-190, 1999. 50

13. Andersen, M. H., Bonfill, J. E., Neisig, A., Arsequell, G., Ndergaard, I., Neefjes, J., Zeuthen, J., Elliott, T., and Haurum, J. S. Phosphorylated Peptides Can Be Transported by TAP Molecules, Presented by Class I MHC Molecules, and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL. *J.Immunol.*, 163: 3812-3818, 1999.

14. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., Winkelhake, J., and Spack, E. G. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J.Immunol .Methods*, 210: 149-166, 1997. 10

15. Pass, H. A., Schwarz, S. L., Wunderlich, J. R., and Rosenberg, S. A. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J.Sci.Am.*, 4: 316-323, 1998.

【 0 1 1 9 】

16. Berke, Z., Andersen, M. H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., and Haurum, J. S. Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr /abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*, 14: 419-426, 2000. 20

17. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.

18. Cornelison, T. L. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr.Opin.Oncol.*, 12: 466-473, 2000.

19. Lee, S. P., Chan, A. T., Cheung, S. T., Thomas, W. A., CroomCarter, D., Dawson, C. W., Tsai, C. H., Leung, S. F., Johnson, P. J., and Huang, D. P. CTL control of EBV in naso-pharyngeal carcinoma (NPC): EBV-specific CTL responses in the blood and tumors of NPC patients and the antigen-processing function of the tumor cells. *J.Immunol.*, 165: 573-582, 2000. 30

20. Swana, H. S., Grossman, D., Anthony, J. N., Weiss, R. M., and Altieri, D. C. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N.Engl.J.Med.*, 341: 452-453, 1999.

【 0 1 2 0 】

21. Salgaller, M. L., Afshar, A., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by peripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 55: 4972-4979, 1995. 40

22. Salgaller, M. L., Marincola, F. M., Cormier, J. N., and Rosenberg, S. A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.

23. Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jon-geneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J.Immunol.*, 160: 1750-1758, 1998. 50

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

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

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

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

【 0 1 2 5 】

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

10

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

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

20

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

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

30

【 0 1 2 6 】

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

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

40

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

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

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

50

dat., 5: 65-72, 2002.

【 0 1 2 7 】

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

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

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

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

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

【 0 1 2 8 】

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

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

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

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

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

【 0 1 2 9 】

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

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

68. Schrama, D., Pedersen Ls, L. O., Keikavoussi, P., Andersen, M. H., Straten, P. P., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Becker, J. C. Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells. *J. Invest Dermatol.*, 119: 1443-1448, 2002.
69. Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.*, 59: 6097-6102, 1999.
70. Hicklin, D. J., Marincola, F. M., and Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol. Med. Today*, 5: 178-186, 1999. 10
- 【 0 1 3 0 】
71. Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F., and Ferrone, S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol.*, 12: 3-13, 2002.
72. Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W. M., Melief, C. J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., and . The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.*, 153: 5586-5592, 1994. 20
73. Moudgil, K. D. and Sercarz, E. E. Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol. Today*, 15: 353-355, 1994.
74. Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A., and Kawakami, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J. Immunol.*, 157: 2539-2548, 1996. 30
75. Guichard, G., Zerbib, A., Le Gal, F. A., Hoebeke, J., Connan, F., Choppin, J., Briand, J. P., and Guillet, J. G. Melanoma peptide MART-1(27-35) analogues with enhanced binding capacity to the human class I histocompatibility molecule HLA-A2 by introduction of a beta-amino acid residue: implications for recognition by tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Med. Chem.*, 43: 3803-3808, 2000.
- 【 0 1 3 1 】
76. Clay, T. M., Custer, M. C., McKee, M. D., Parkhurst, M., Robbins, P. F., Kerstann, K., Wunderlich, J., Rosenberg, S. A., and Nishimura, M. I. Changes in the fine specificity of gp100(209-217)-reactive T cells in patients following vaccination with a peptide modified at an HLA-A2.1 anchor residue. *J. Immunol.*, 162: 1749-1755, 1999. 40
77. Melief, C. J., van der Burg, S. H., Toes, R. E., Ossendorp, F., and Offringa, R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.*, 188: 177-182, 2002.
78. Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., and Knuth, A. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer*, 71: 142-147, 1997. 50

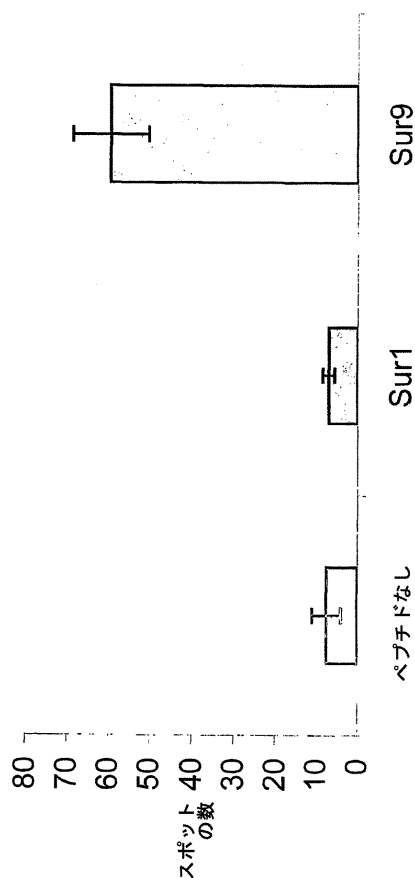
79. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den, D. P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E., and Schuler, G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands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

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

10

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

【図 1】



【図 2】

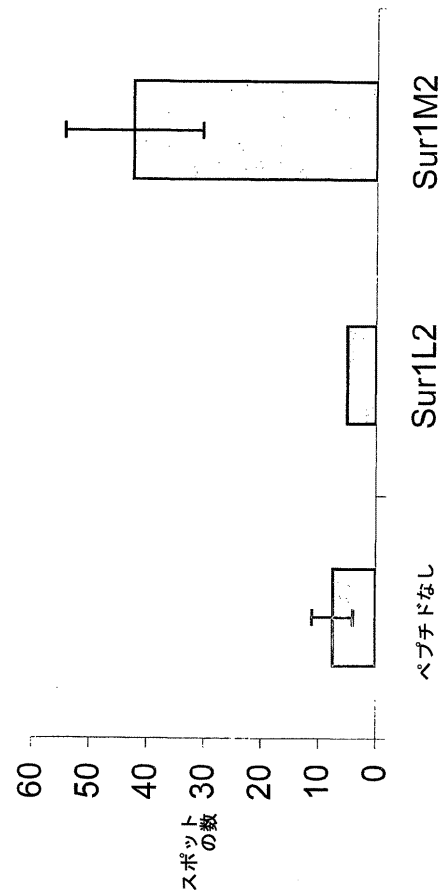
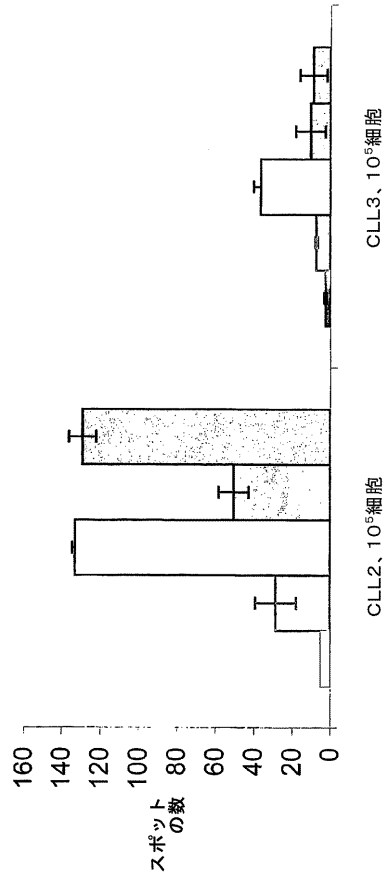


Fig. 1

Fig. 2

【図 3】



【図 4】

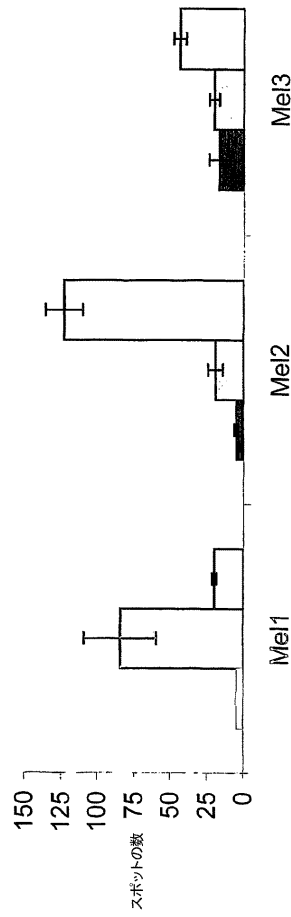


Fig. 3

Fig. 4

【図 5】

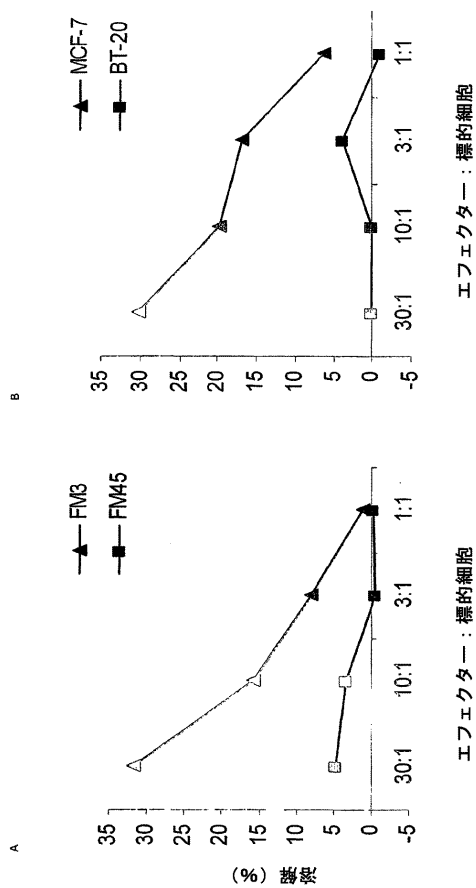


Fig. 5

【図 6】

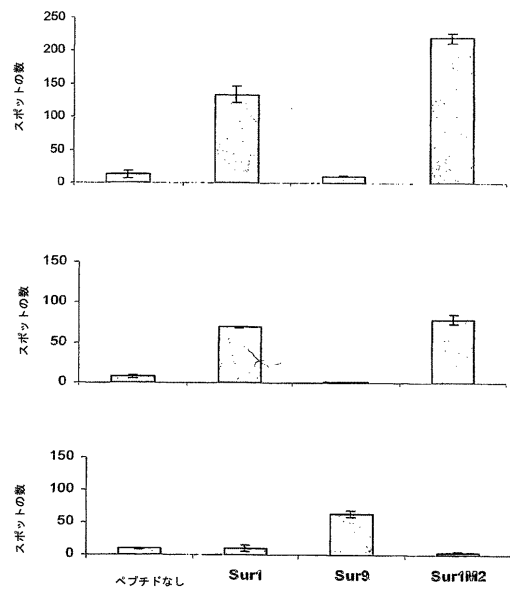


Fig. 6

【図 7】

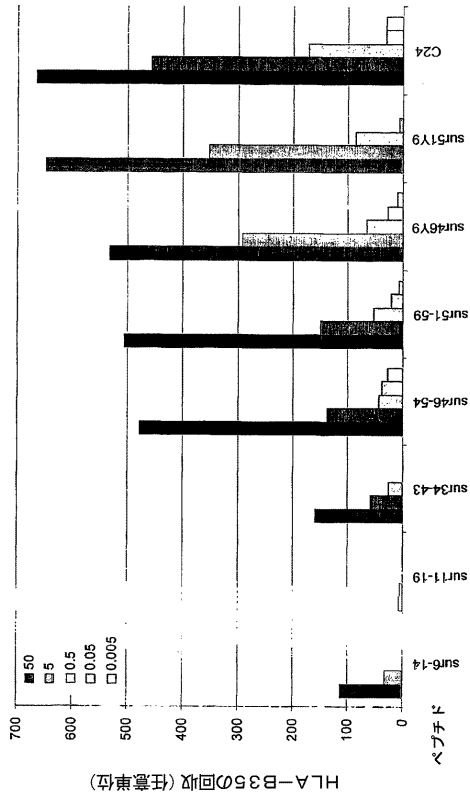


Fig. 7

【図 8】

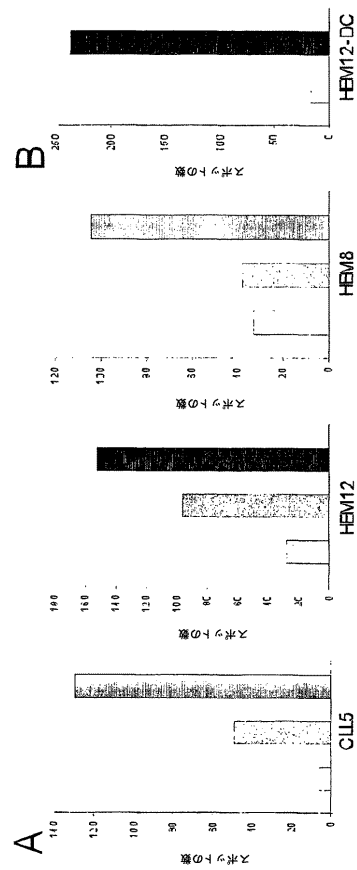


Fig. 8

【図 9】

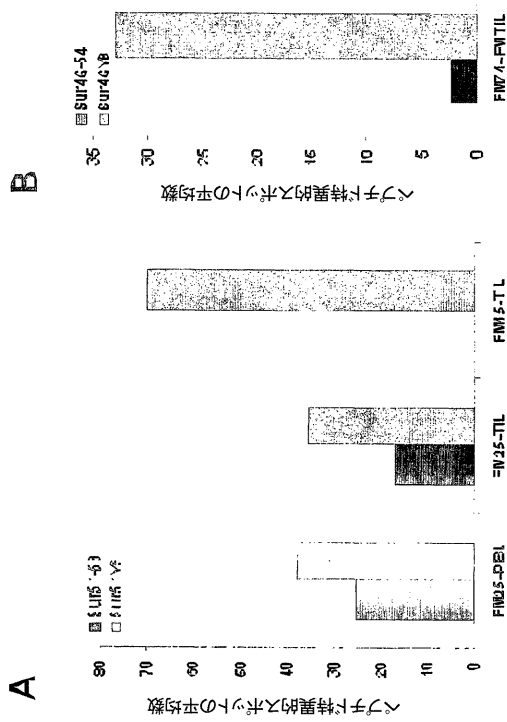


Fig. 9

【図 10】

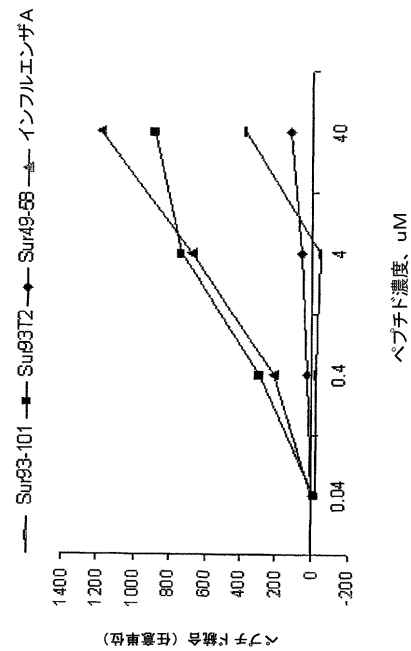


Fig. 10

【図 1 1】

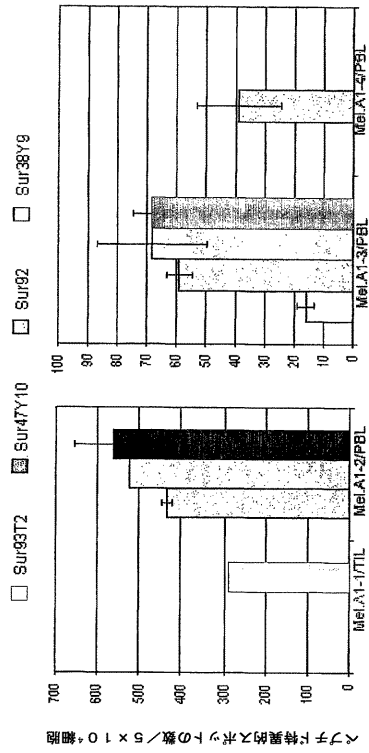


Fig. 11

【図 1 2】

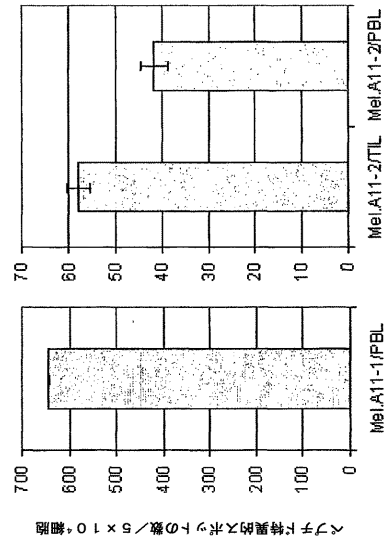


Fig. 12

【図 1 3】

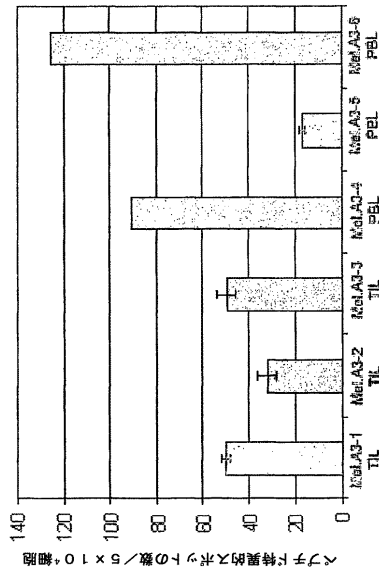


Fig. 13

【図 1 4】

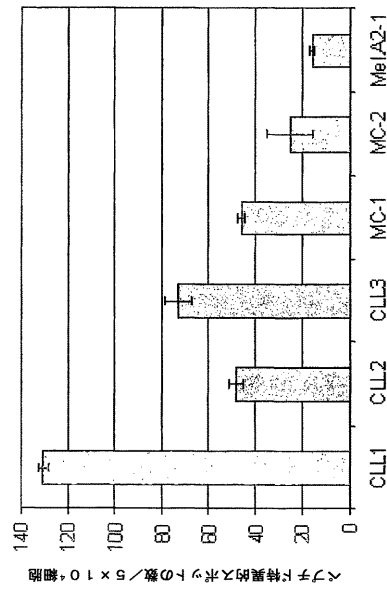
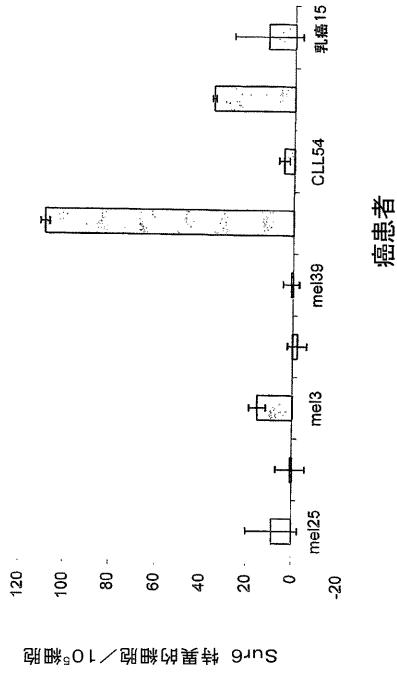


Fig. 14

【図 15】



【図 16】

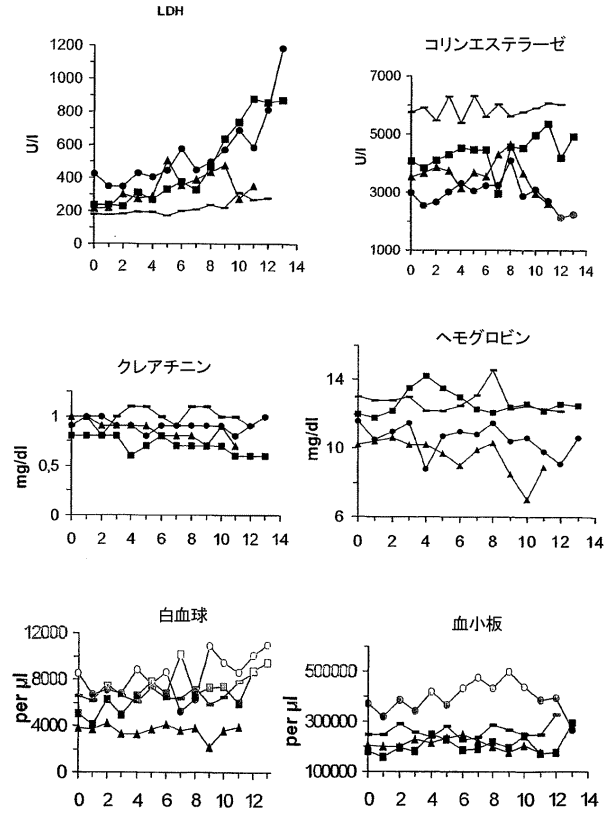


Fig. 15

Fig. 16

【図 17】

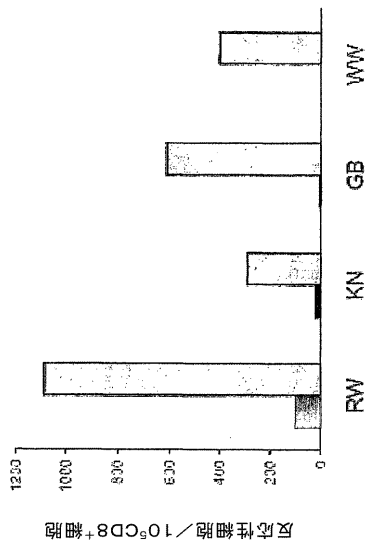


Fig. 17

【配列表】

2012082213000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年1月5日(2012.1.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

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

(i) 本明細書に記載のアセンブリー結合アッセイにより測定すると最大50 μ Mである、クラスI HLA分子を最大半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力(C_{50} 値)で限定されるクラスI HLA分子との結合能；

(ii) 癌患者のPBL集団においてELISPOTアッセイにより測定すると少なくとも1/10⁴ PBLの頻度でINF- γ 産生細胞を惹起する能力；および/または

(iii) 腫瘍組織におけるエピトープペプチドと反応するCTLのインサイチュ検出能を有する、スルビビンポリペプチドのMHCクラスI限定ペプチドであって、

CPTENE PDY (配列番号6)、EPDLAQCF (配列番号7)、CPTENE PDY (配列番号8)、EPDLAQCFY (配列番号9)、LPPAWQPFL (配列番号18)、FTELT LGEF (配列番号36)、FSELT LGEF (配列番号37)、MAEAGFIHY (配列番号38)およびLAQCF FCFK (配列番号42)からなる群より選択される配列を有するノナペプチド；

QTEELT LGEF (配列番号34)およびPTENE PDLAY (配列番号39)からなる群より選択される配列を有するデカペプチド；または

配列RISTFKNWPFL (配列番号67)を有するウンデカペプチドである、MHCクラスI限定ペプチド。

【請求項2】

該ペプチドが、CPTENE PDY (配列番号6)、EPDLAQCF (配列番号7)、CPTENE PDY (配列番号8)、EPDLAQCFY (配列番号9)、LPPAWQPFL (配列番号18)、FTELT LGEF (配列番号36)、MAEAGFIHY (配列番号38)、PTENE PDLAY (配列番号39)およびRISTFKNWPFL (配列番号67)からなる群より選択される、請求項1記載のMHCクラスI限定ペプチド。

【請求項3】

該ペプチドが、CPTENE PDY (配列番号8)、EPDLAQCFY (配列番号9)、FTELT LGEF (配列番号36)、FSELT LGEF (配列番号37)、MAEAGFIHY (配列番号38)およびPTENE PDLAY (配列番号39)からなる群より選択される、請求項1記載のMHCクラスI限定ペプチド。

【請求項4】

該ペプチドが、LPPAWQPFL (配列番号18)およびFTELT LGEF (配列番号36)からなる群より選択される、請求項1記載のMHCクラスI限定ペプチド。

【請求項5】

該ペプチドが、FTELT LGEF (配列番号36)である、請求項1または2記載のMHCクラスI限定ペプチド。

【請求項6】

スルビビンポリペプチドの2種またはそれ以上のMHCクラスI限定エピトープペプチドの組合せを含む癌治療用医薬組成物であって、インビトロおよび/またはインサイチュ

および／またはエキスピボアッセイで試験する場合に、各々のペプチドが異なるHLA特異性を有し、少なくとも一つの以下の特性：

(i) 本明細書に記載のアセンブリー結合アッセイにより測定すると最大50 μ Mである、クラスI HLA分子を最大半分まで回復できるペプチドの量により測定される親和力(C_{50} 値)で限定されるクラスI HLA分子との結合能；

(ii) 癌患者のPBL集団においてELISPOTアッセイにより測定すると少なくとも1/10⁴ PBLの頻度でINF- γ 産生細胞を惹起する能力；および／または

(iii) 腫瘍組織におけるエピトープペプチドと反応するCTLのインサイチュ検出能を有し、配列番号5に記載の配列を含むペプチドとCPTENE PDY (配列番号6)、EPDLAQCFY (配列番号7)、CPTENE PDY (配列番号8)、EPDLAQCFY (配列番号9)、LPPAWQPFL (配列番号18)、QFEELTLGEF (配列番号27)、FTELTTLGEF (配列番号36)、MAEAGFIHY (配列番号38)、PTENE PDLAY (配列番号39) およびRISTFKNWPFL (配列番号67) からなる群より選択される配列を有するペプチドとの組合せを含む、医薬組成物。

【請求項7】

配列番号5に記載の配列を含むペプチドとCPTENE PDY (配列番号8)、EPDLAQCFY (配列番号9)、FTELTTLGEF (配列番号36)、MAEAGFIHY (配列番号38) およびPTENE PDLAY (配列番号39) からなる群より選択される配列を有するペプチドとの組合せを含む、請求項6記載の医薬組成物。

【請求項8】

配列番号5に記載の配列を含むペプチドとLPPAWQPFL (配列番号18) およびFTELTTLGEF (配列番号36) からなる群より選択される配列を有するペプチドとの組合せを含む、請求項6記載の医薬組成物。

【請求項9】

配列番号5に記載の配列を含むペプチドと配列FTELTTLGEF (配列番号36) を有するペプチドとの組合せを含む、請求項6または7記載の医薬組成物。

【請求項10】

該ペプチドが最大20個のアミノ酸残基を含む、請求項6または7記載の医薬組成物。

【請求項11】

該ペプチドが最大10個のアミノ酸残基を含む、請求項6または7記載の医薬組成物。

【請求項12】

該ペプチドが、ノナペプチド、デカペプチドまたはウンデカペプチドである、請求項6または7記載の医薬組成物。

【請求項13】

哺乳動物種のスルビピンの天然の配列であるエピトープペプチドを含む、請求項6ないし12のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項14】

ヒトスルビピンから誘導されるエピトープペプチドを含む、請求項6ないし13のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

エピトープペプチドが癌患者のPBL集団においてINF- γ 産生細胞を少なくとも10/10⁴ PBLの頻度で惹起する能力を有する、請求項6ないし14のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項16】

エピトープペプチドが、スルビピンが発現される癌疾患を有する患者のPBL集団においてINF- γ 産生細胞を惹起する能力を有する、請求項6ないし15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項17】

癌疾患が、慢性リンパ性白血病および慢性骨髄性白血病を含む造血性悪性腫瘍、黒色腫

、乳癌、頸癌、卵巣癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌および前立腺癌からなる群から選択される、請求項 16 記載の医薬組成物。

【請求項 18】

翻訳後修飾されているエピトープペプチドを含む、請求項 6 ないし 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

リン酸化ペプチドを含む、請求項 6 ないし 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

スルビピンタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されないタンパク質またはペプチドフラグメントから選択される免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントをさらに含む、請求項 6 ないし 19 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

スルビピンタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが細胞アポトーシスの制御に関与するタンパク質またはそのペプチドフラグメントである、請求項 20 記載の医薬組成物。

【請求項 22】

スルビピンタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが Bc1 - 2 またはそのペプチドフラグメントである、請求項 20 または 21 記載の医薬組成物。

【請求項 23】

スルビピンタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが IAP タンパク質ファミリーのメンバーまたはそのペプチドフラグメントである、請求項 20 または 21 記載の医薬組成物。

【請求項 24】

該 IAP タンパク質ファミリーのメンバーが ML - IAP である、請求項 23 記載の医薬組成物。

【請求項 25】

スルビピンタンパク質ファミリーに属さないかまたはこれから誘導されない免疫原性タンパク質またはペプチドフラグメントが、配列番号 75、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 78、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83、配列番号 84、および配列番号 85 からなる群より選択される、請求項 20、21、23 または 24 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

HLA クラス I および HLA クラス II 限定エピトープを含む請求項 6 ないし 25 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

アジュバントを含む、請求項 6 ないし 26 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

PBL 中または腫瘍組織におけるスルビピン反応性 T 細胞の存在のエキスピボまたはインサイチュ診断のための組成物である、請求項 6 ないし 27 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y	

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

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

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QR48 QS33 QX01
4C084 AA02 AA07 BA01 BA17 BA23 DC50 MA02 NA14 ZB262
4C085 AA03 BB11 CC32 EE01 EE03
4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 CA40 DA75 DA86 EA28 FA20 FA71

【外国語明細書】

1

SURVIVIN-DERIVED PEPTIDES AND USE THEREOF

FIELD OF INVENTION

5

The present invention relates to novel survivin-derived peptides and their use for diagnostic and therapeutic purposes, specifically in cancer. In particular, the novel peptides are MHC Class I-restricted T-cell epitopes that are capable of eliciting cytotoxic T-cell responses in cancer patients including *in situ* and *ex vivo* responses. Specifically, such novel
10 peptides are derived from the apoptosis inhibitor protein survivin, a recognized tumor associated antigen (TAA).

TECHNICAL BACKGROUND AND PRIOR ART

15

The process by which the mammalian immune system recognizes and reacts to foreign or alien materials is a complex one. An important facet of the system is the T-cell response. This response requires that T cells recognize and interact with complexes of cell surface molecules referred to as human leukocyte antigens (HLA) constituting the human major
20 histocompatibility complex (MHC), and peptides. The peptides are derived from larger molecules, which are processed by the cells, which also present the HLA/MHC molecule. The interaction of T cells and complexes of HLA/peptide is restricted, requiring a T cell that is specific for a particular combination of an HLA molecule and a peptide. If a specific T cell is not present, there is no T-cell response even if its partner complex is present. Similarly,
25 there is no response if the specific complex is absent, but the T cell is present.

The mechanism by which T cells recognize cellular abnormalities has also been implicated in cancer. E.g. in WO92/20356, a family of genes is disclosed which are processed into peptides which, in turn, are expressed on cells surfaces, and can lead to lysis of the tumour cells by specific CTLs. These genes are referred to as the MAGE family and are said
30 to code for "tumour rejection antigen precursors" or "TRAP" molecules, and the peptides derived therefrom are referred to as "tumour rejection antigens" or "TRAs".

In WO 94/05304, nonapeptides are disclosed which bind to the HLA-A1 molecule. The reference discloses that given the known specificity of particular peptides for particular HLA
35 molecules, one should expect a particular peptide to bind one HLA molecule, but not others. This is significant, because different individuals possess different HLA phenotypes. As a result, while identification of a particular peptide as being a partner for a specific HLA molecule has diagnostic and therapeutic ramifications, these are only relevant for individuals with that particular HLA phenotype.
40

Several peptides presented by MHC molecules have been characterized and it has been found that some of these may carry posttranslational modifications possibly having an impact on the functionality of the HLA-peptide complex. Thus, a number of studies have

associated alterations in the pattern of phosphorylation with malignant transformation.

Furthermore, it has been shown that phosphorylation could have a neutral, negative or even a positive effect on peptide binding to class I MHC and that phosphopeptide-specific CTL, which discriminated between the phosphorylated and the non-phosphorylated

5 versions of the peptide, could be generated, showing that such CTL most likely are part of the class I MHC-restricted CTL repertoire. Recently, it has been shown that phosphorylated peptides indeed are processed naturally and presented by MHC class I molecules *in vivo*. Additionally, the presence of phosphorylated peptides in extracts from isolated class I molecules from several different EBV-transformed B-cells has been established.

10

Thus, it is well established that peptide epitopes derived from tumor associated antigens (TAAs) can be recognized as antigens by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in the context of MHC molecules (1). However, although it is generally accepted that most if not all, tumours are antigenic, only a few are indeed immunogenic in the sense that tumour pro-

15 gression is readily controlled by the immune system.

To overcome this limitation, several immunotherapeutic trials have been initiated, e.g. vaccinations with TAA-derived peptides. For melanoma, the tumour for which the largest number of CTL-defined TAAs has been characterized, powerful CTL responses against anti-

20 gens have been induced by vaccination and some patients experienced a complete remission of their disease (2,3). However, most of the peptide epitopes used in these vaccination trials are melanocyte specific, and these peptides cannot be applied for tumours of non-melanocyte origin. Furthermore, expression of these TAAs is heterogeneous among tumours from different patients and can even vary among metastases obtained from one

25 patient. However, during the last couple of years a number of tumour specific peptide antigens, which are expressed in a number of different cancers, have been identified, i.e. HER-2 (4), Muc-1 (5) and telomerase (6).

It has also been shown that by proper manipulation tumor antigens present in tumors can

30 be exposed to the immune system. Studies have shown that the CD8+ CTL arm of the immune response, alone or in combination with CD4+ T_H cells, constitutes the primary anti-tumor effector arm of the adaptive immune response. Up till now the focus has mainly been on the CTL arm of the immune response. However, it is becoming more and more clear that the CD4 T cell response plays an essential role in tumor rejection, especially in

35 the induction phase or in the extension of a CTL response *in vivo*. Consequently, the incorporation of class II-restricted tumor antigens into effective tumor vaccination protocols might increase the effectiveness of the vaccines.

Apoptosis is a genetic program of cellular suicide, and inhibition of apoptosis has been

40 suggested to be an important mechanism involved in cancer formation by extending the life span of cells favouring the accumulation of transforming mutations (7). Survivin is a recently identified member of the family of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). In a global gene expression analysis of about 4 million transcripts, survivin was identified as one of the top genes invariably up-regulated in many types of cancer but not in normal

tissue (8). Solid malignancies overexpressing survivin include lung, colon, breast, pancreas, and prostate cancer as well as hematopoietic malignancies (9). Additionally, series of melanoma and non-melanoma skin cancers have been reported to be invariably survivin positive (10,11). The overexpression of survivin in most human cancers suggests a general
5 role of apoptosis inhibition in tumor progression, a notion substantiated by the observation that in the case of colorectal and bladder cancer, as well as neuroblastoma, expression of survivin was associated with an unfavourable prognosis. In contrast, survivin is undetectable in normal adult tissues. These characteristics qualify survivin as a suitable TAA for both diagnostic and therapeutic purposes.

10 Thus, during the last decade a large number of TAAs have been identified which are recognized by CTLs in a major histocompatibility complex (MHC)-restricted fashion. As survivin is overexpressed in most human cancers and inhibition of its function results in increased apoptosis, this protein may serve as a target for therapeutic CTL responses. The survivin
15 protein and the potential diagnostic and therapeutic use hereof are disclosed in (8) and US 6.245.523, which are incorporated herein by reference. Survivin is a 16.5 kDa cytoplasmic protein containing a single BIR and a highly charged carboxy-terminal coiled region instead of a RING finger, which inhibits apoptosis induced by growth factor (IL-3) withdrawal when transferred in B cell precursors. The gene coding for survivin is nearly identical to the
20 sequence of Effector Cell Protease Receptor-1 (EPR-1), but oriented in the opposite direction, thus suggesting the existence of two separate genes duplicated in a head-to-head configuration. Accordingly, survivin can be described as an antisense EPR-1 product. Functionally, inhibition of survivin expression by up-regulating its natural antisense EPR-1 transcript results in massive apoptosis and decreased cell growth.

25 US 6.245.523 discloses the isolation of purified survivin and it provides nucleic acid molecules that encode the survivin protein, and antibodies and other molecules that bind to survivin. US 6.245.523 also discloses anti-apoptotically active fragments of the survivin protein and variants hereof wherein an amino acid residue has been inserted N- or C-terminal to, or within, the disclosed survivin sequence. It is specifically disclosed that such
30 peptides should contain key functional residues required for apoptosis, i.e. Trp at position 67, Pro at position 73 and Cys at position 84.

The present invention is based on the discovery that MHC Class I restricted peptides can
35 be derived from the survivin protein, which are capable of binding to MHC Class I HLA molecules and thereby eliciting both *ex vivo* and *in situ* CTL immune responses in patients suffering from a wide range of cancer diseases. These findings strongly suggest that survivin acts as a TRAP molecule, which is processed by cells into peptides having TRA functionality. Evidently, these findings open the way for novel therapeutic and diagnostic ap-
40 proaches which, due to the fact that survivin appears to be expressed universally by tumour cells, are generally applicable in the control of cancer diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the invention pertains in a first aspect to a MHC Class I-restricted epitope peptide derived from survivin, said epitope having at least one of the following characteristics:

- (i) capable of binding to the Class I HLA molecule to which it is restricted at an affinity as measured by the amount of the peptide that is capable of half maximal recovery of the Class I HLA molecule (C_{50} value) which is at the most 50 μ M as determined by the assembly binding assay as described herein,
- (ii) capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a cancer patient at a frequency of at least 1 per 10^4 PBLs as determined by an ELISPOT assay, and/or
- (iii) capable of *in situ* detection in a tumour tissue of CTLs that are reactive with the epitope peptide.

Preferably, the peptide of the invention has at least two, most preferably all of these three features.

In further aspects the invention provides a pharmaceutical composition and a composition for *ex vivo* or *in situ* diagnosis of the presence in a cancer patient of survivin reactive T-cells among PBLs or in tumour tissue, which composition comprises a peptide as defined above.

In yet further aspects the invention relates to a diagnostic kit for *ex vivo* or *in situ* diagnosis of the presence in a cancer patient of survivin reactive T-cells among PBLs or in tumor tissue, which kit comprises a peptide according of the invention, and a complex of such a peptide and a Class I HLA molecule or a fragment of such molecule.

In another aspect there is also provided a method of detecting in a cancer patient the presence of survivin reactive T-cells, the method comprising contacting a tumour tissue or a blood sample with a complex as defined above and detecting binding of the complex to the tissue or the blood cells.

In still further aspects the invention pertains to a molecule that is capable of binding specifically to a peptide of the invention such as an antibody or a fragment hereof, and to a molecule that is capable of blocking the binding of such a molecule.

An important aspect of the invention relates to the use of the peptides of the invention for the preparation of a medicament for the treatment of cancer. A further aspect relates to the use of the composition or the molecule as mentioned above for the preparation of a medicament for the treatment of cancer.

Still further aspects relate independently to a method for treating cancer in a mammal, such as a human, comprising the administration to a patient suffering from the disease an effective amount of the peptide, composition or a molecule of the invention.

5

DETAILED DISCLOSURE OF THE INVENTION

The novel MHC Class I-restricted peptide of the invention is characterised by having at least one of several features, one of which is the ability to bind to the Class I HLA molecule to which it is restricted at an affinity, which, when it is measured by the amount of the peptide that is capable of half maximal recovery of the Class I HLA molecule (C_{50} value) in an assembly assay as described herein, is at the most 50 μ M. This assembly assay is carried out as described previously (12,13), and it is based on stabilisation of the HLA molecule after loading of peptide to the peptide transporter deficient cell line T2. Subsequently, correctly folded stable HLA heavy chains are immunoprecipitated using conformation dependent antibodies and the peptide binding is quantitated.

This assay provides a simple means of screening candidate peptides for their ability to bind to a given HLA allele molecule at the above affinity. In preferred embodiments, the peptide of the invention in one having a C_{50} value, which is at the most 30 μ M, such as a C_{50} value, which is at the most 20 μ M including C_{50} values of at the most 10 μ M, at the most 5 μ M and at the most 2 μ M.

As mentioned above, the HLA system represents the human major histocompatibility (MHC) system. Generally, MHC systems control a range of characteristics: transplantation antigens, thymus dependent immune responses, certain complement factors and predisposition for certain diseases. More specifically, the MHC codes for three different types of molecules, i.e. Class I, II and III molecules, which determine the more general characteristics of the MHC. Of these molecules, the Class I molecules are so-called HLA-A, HLA-B and HLA-C molecules that are presented on the surface of most nucleated cells and thrombocytes.

The peptides of the present invention are characterised by their ability to bind to (being restricted to) a particular MHC Class I HLA molecule. Thus, in one embodiment the peptide is one which is restricted to a MHC Class I HLA-A molecule including HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10, HLA-A11, HLA-Aw19, HLA-A23(9), HLA-A24(9), HLA-A25(10), HLA-A26(10), HLA-A28, HLA-A29(w19), HLA-A30(w19), HLA-A31(w19), HLA-A32(w19), HLA-Aw33(w19), HLA-Aw34(10), HLA-Aw36, HLA-Aw43, HLA-Aw66(10), HLA-Aw68(28), HLA-A69(28). More simple designations are also used throughout the literature, where only the primary numeric designation is used, e.g. HLA-A19 or HLA-A24 instead of HLA-Aw19 and HLA-A24(9), respectively. In specific embodiments, the peptide of the invention is restricted to a MHC Class I HLA species selected from the group consisting of HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 and HLA-A24.

The peptides of the invention are derived from the known sequence of survivin, e.g. the sequence disclosed in US 6.245.523. The selection of peptides potentially having the ability to bind to a particular HLA molecule can be made by the alignment of known sequences that bind to a given particular HLA molecule to thereby reveal the predominance of a few related amino acids at particular positions in the peptides. Such predominant amino acid residues are also referred to herein as "anchor residues" or "anchor residue motifs". By following such a relatively simple procedure based on known sequence data that can be found in accessible databases, peptides can be derived from the survivin protein molecule which are likely to bind to the particular HLA molecule. Representative examples of such analyses for a range of HLA molecules are given in the below table:

HLA allele	Position 1	Position 2	Position 3	Position 5	Position 6	Position 7	C-terminal
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K, Y, F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y,I				K, R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L,V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L
HLA-B5		A,P	F,Y				I,L
HLA-B7		P					L,F
HLA-B8			K	K,R			L
HLA-B14		R,K					L,V
HLA-B15		Q,L,K,P,H,					F,Y,W

(B62)	V,I,M,S,T				
HLA-B17					L,V
HLA-B27	R				Y, K,F,L
HLA-B35	P				I, L, M, Y
HLA-B37	D,E				I,L,M
HLA-B38	H	D,E			F,L
HLA-B39	R,H				L,F
HLA-B40 (B60,61)	E	F,I,V			L,V,A,W,M, T,R
HLA-B42	L,P				Y,L
HLA-B44	E				F,Y,W
HLA-B46	M,I,L,V				Y,F
HLA-B48	Q,K				L
HLA-B51	A,P,G				F,Y,I,V
HLA-B52	Q	F,Y			I,V
HLA-B53	P				W,F,L
HLA-B54	P				
HLA-B55	P				A,V
HLA-B56	P				A,V
HLA-B57	A,T,S				F,W,Y
HLA-B58	A,T,S				F,W,Y
HLA-B67	P				L
HLA-B73	R				P
HLA-Cw1	A,L				L
HLA-Cw2	A,L				F,Y
HLA-Cw3	A,L				L,M
HLA-Cw4	Y,P,F				L,M,F,Y
HLA-Cw6	Y				L,Y,F,Y
HLA-Cw8	Y				L,I,
HLA-Cw16	A,L				L,V

Thus, as an example, nonapeptides potentially having the ability to bind to HLA-A1 would have one of the following sequences: Xaa-T-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y, Xaa-T-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y; Xaa-S-D-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y or Xaa-S-E-Xaa-Xaa-Xaa-L-Xaa-Y (Xaa indicating any amino acid residue). In a similar manner, sequences potentially having the ability to bind to any other HLA molecule can be designed.

It will be appreciated that the person of ordinary skill in the art will be able to identify further "anchor residue motifs" for a given HLA molecule.

Thus, in useful embodiments, the peptides of the invention include peptides, the sequences of which comprise, for each of the specific HLA alleles listed in the table, any of the amino acid residues as indicated in the table.

Thus, a simple approach to identifying peptides of the invention includes the following steps: selecting a particular HLA molecule, e.g. one occurring at a high rate in a given population, carrying out an alignment analysis as described above to identify "anchor residue motifs" in the survivin protein, isolating or constructing peptides of a suitable size that comprise one or more of the identified anchor residues and testing the resulting peptides for (i) capability to bind to the particular HLA molecule using the assembly assay as described herein, (ii) the capability of the peptides to elicit INF- γ -producing cells in a PBL population of a cancer patient at a frequency of at least 1 per 10^4 PBLs as determined by an ELISPOT assay as described herein, and/or (iii) the capability of the peptides to detect *in situ* in a tumour tissue CTLs that are reactive with the epitope peptides being tested.

In specific embodiments, the peptide of the invention is an HLA-A2 restricted survivin-derived peptide having a sequence selected from the following: FLKLDREERA (survivin₁₀₁₋₁₀₉) (SEQ ID NO:1), TLPPAWQPFL (survivin₅₋₁₄) (SEQ ID NO:2), ELTLGEFLKL (survivin₉₅₋₁₀₄) (SEQ ID NO:3), LLLGEFLKL (SEQ ID NO:4) and LMLGEFLKL (SEQ ID NO:5). (The designations in brackets indicate the positions of the residues in the survivin protein as disclosed in US 6.245.523). LLLGEFLKL (SEQ ID NO:4) is a sequence derived from survivin₉₆₋₁₀₄ by substituting "T" in position 2 of the peptide with an "L" and LMLGEFLKL (SEQ ID NO:5) is derived from survivin₉₆₋₁₀₄ by substituting "T" in position 2 with "M".

In further useful embodiments, the peptide of the invention is a peptide, which is restricted by a MHC Class I HLA-B molecule including any of the following: HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12, HLA-B13, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B16, HLA-B17, HLA-B18, HLA-B21, HLA-Bw22, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B39, HLA-B40, HLA-Bw41, HLA-Bw42, HLA-B44, HLA-B45, HLA-Bw46 and HLA-Bw47. In specific embodiments, the MHC Class I HLA-B species to which the peptide of the invention is capable of binding is selected from HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 and HLA-B51.

In specific embodiments, the peptide of the invention is an HLA-B35-restricted survivin-derived peptide having a sequence selected from the following: CPTENEPDL (survivin₄₆₋₅₄) (SEQ ID NO:6), EPDLAQCF (survivin₅₁₋₅₉) (SEQ ID NO:7), CPTENEPDY (SEQ ID NO:8) and EPDLAQCFY (SEQ ID NO:9). (The designations in brackets indicate the positions of the residues in the survivin protein as disclosed in US 6.245.523). CPTENEPDY (SEQ ID NO:8) is a sequence derived from survivin₄₆₋₅₄ by substituting "L" in the C-terminal of the peptide with a "Y" and EPDLAQCFY (SEQ ID NO:9) is derived from survivin₅₁₋₅₉ by substituting an "F" residue in the C-terminal 2 with a "Y".

In further specific embodiments, the peptide of the invention is a HLA-A1 restricted peptide having a sequence selected from the following: Survivin₃₈₋₄₆ (Sur38Y9) (a C changed to a Y at P9, MAEAGFIHY)(SEQ ID NO:38), Survivin₄₇₋₅₆ (Sur47Y10) (a Q changed to a Y at P10, PTENEPDLAY(SEQ ID NO:39)), Survivin₉₂₋₁₀₁ (Sur92-101) (QFEELTLGEF) (SEQ ID NO:27), and Survivin₉₃₋₁₀₁ (Sur93T2 (a E changed to a T at P2, FTELTLGEF (SEQ ID NO:36))). The peptide of the invention may also be a HLA-A3 restricted peptide such as Survivin₁₈₋₂₄ (Sur18K10) (a F changed to a K at P10, RISTFKNWPK (SEQ ID NO:57) and/or a HLA-A11 restricted peptide such as Survivin₅₃₋₆₂ (Sur53-62)(DLAQCFCK)(SEQ ID NO:45) and/or a HLA-A2 restricted peptide such as Survivin₁₈₋₂₈ (Sur18-28) (RISTFKNWPFL)(SEQ ID NO:66).

In further useful embodiments, the peptide of the invention is a peptide, which is restricted to a MHC Class I HLA-C molecule including any of the following: HLA-Cw1, HLA-Cw2, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6, HLA-Cw7 and HLA-Cw16.

Preferably, the peptide of the invention comprises less than 50 amino acid residues, and more preferably it comprises at the most 20 amino acid residues, such as at the most 10 amino acid residues. In specific embodiments, the peptide is a heptapeptide, an octopeptide, a nonapeptide, a decapeptide or an undecapeptide.

The peptide of the invention is, as mentioned above, derived from a survivin protein or a fragment hereof. The survivin protein from which the peptide can be derived is survivin protein from any animal species in which the protein is expressed. In preferred embodiments, the survivin starting protein is from a mammal species including a rodent species, rabbit and a primate species such as humans. Based on the sequence of the selected survivin protein, the peptide of the invention is derived by any appropriate chemical or enzymatic treatment of the survivin starting material that results in a peptide of a suitable size as indicated above, or it can be synthesised by any conventional peptide synthesis procedures with which the person of ordinary skills in the art is familiar.

The peptide of the invention may have a sequence which is a native sequence of the survivin protein from which is derived. However, peptides having a higher affinity to any given HLA molecule may be derived from such a native sequence by modifying the sequence by substituting, deleting or adding at least one amino acid residue, e.g. on the basis of the procedure described above whereby anchor residue motifs in respect of the given HLA molecule are identified.

Accordingly, to increase the immuogenicity of survivin-derived peptides, amino acid substitutions can be introduced at anchor positions, but not at TCR contact residues, to increase peptide binding to the HLA class I molecule. This has resulted in more immunogenic epitopes, e.g., this has enhanced the capacity to induce cancer-reactive CTL and it has been demonstrated to be more suitable for the induction of clinically meaningful CTL responses. Importantly, however, the target cancer cells do only express and present the native survivin-derived peptide on the cell-surface. In that respect, it is of crucial

importance that therapy-induced CTL specific for the modified survivin-derived peptides cross-react with the native analogues.

The present invention also encompasses variants and functional equivalents of the survivin-derived peptides as disclosed herein. "Functional equivalents" as used in the present context is established by means of reference to the corresponding functionality of a predetermined fragment of the sequence in question. Functional equivalence can be established by e.g. similar binding affinities to HLA class I molecules, or similar potency demonstrated by the ELISPOT assay.

10

Functional equivalents or variants of a survivin-derived peptide as described herein will be understood to exhibit amino acid sequences gradually differing from the preferred, predetermined sequences, as the number and scope of insertions, deletions and substitutions including conservative substitutions, increases. This difference is measured as a reduction in homology between a preferred, predetermined sequence and the survivin-derived variant or survivin-derived functional equivalent.

15

The homology between amino acid sequences may be calculated using algorithms well known in the art. Fragments sharing homology with fragments comprising or consisting of consecutive survivin-derived amino acid residues are to be considered as falling within the scope of the present invention when they are preferably at least about 90% homologous, such as at least 94% homologous, including 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homologous with a predetermined survivin-derived peptide.

20

Furthermore, it may be advantageous to carry out post-translational modifications of the peptides of the invention. It has been shown that exposure of breast carcinoma MCF-7 or cervical carcinoma HeLa cells to anticancer agents including Adriamycin, Taxol, or UVB resulted in a 4-5-fold increased survivin expression. Changes in survivin levels after anticancer treatment did not involve modulation of survivin mRNA expression and were independent of *de novo* gene transcription. Conversely, inhibition of survivin phosphorylation on Thr³⁴ by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol resulted in loss of survivin expression, and nonphosphorylatable survivin Thr³⁴→Ala exhibited accelerated clearance as compared with wild-type survivin. Sequential ablation of survivin phosphorylation on Thr³⁴ enhanced tumor cell apoptosis induced by anticancer agents independently of p53 and suppressed tumor growth without toxicity in a breast cancer xenograft model *in vivo*. These data suggest that Thr³⁴ phosphorylation critically regulates survivin levels in tumor cells and that sequential ablation of p34^{cdc2} kinase activity may remove the survivin viability checkpoint and enhance apoptosis in tumor cells.

30

35

Accordingly, it is contemplated that the survivin-derived peptides of the invention encompass phosphorylated peptides. Native survivin phosphopeptide antigens may be identified by scanning for the presence of MHC peptide binding motifs around the phosphorylation site Thr³⁴. Thus, possible survivin-derived phosphopeptide sequences include T P E R M A E A G F, a putative HLA-B35- and/or HLA-B7- and/or a HLA-B51-restricted peptide antigen. Additional native phosphopeptides encompassed herein include:

40

HLA-A2: C A C **T** P E R M A and C **T** P E R M A E A; HLA-A3: F L E G C A C **T** P; HLA-B7/HLA-B35/HLA-B51: W P F L E G C A C **T** (Phosphorylated Thr residue marked in bold).

A significant feature of the peptide of the invention is its capability to recognise or elicit
 5 INF- γ -producing responder T cells, i.e. cytotoxic T cells (CTLs) that specifically recognise the particular peptide in a PBL population or tumour cells of a cancer patient (target cells). This activity is readily determined by subjecting PBLs or tumour cells from a patient to an ELISPOT assay as described in reference (16) and in the following examples. Prior to the assay, it may be advantageous to stimulate the PBL population or the tumour cells to be
 10 assayed by contacting the cells with the peptide to be tested. Preferably, the peptide is capable of eliciting or recognising INF- γ -producing T cells at a frequency of at least 1 per 10^4 PBLs as determined by an ELISPOT assay as used herein. More preferably the frequency is at least 5 per 10^4 PBLs, most preferably at least 10 per 10^4 PBLs, such as at least 50 or 100 per 10^4 PBLs.

15 The ELISPOT assay represents a strong tool to monitor survivin peptide specific T-cell responses. However, although it has been shown that ELISPOT reactivity in most cases correlates with the capacity of the CLLs to lyse target cells, the conclusive evidence for this notion can only be given directly. Such direct evidence is provided herein, as it was demonstrated (see Example 2) that survivin reactive cells isolated by means of HLA/peptide
 20 complexes possess the functional capacity of lysing target cells. Additionally, it was demonstrated that the isolated CTLs specifically recognising a peptide of the invention were capable of lysing HLA-matched tumour cells of different origin, e.g. melanomas and breast cancer. This finding strongly suggests that cancer cells in general process and present the
 25 same endogenous survivin peptide. Therefore, a major implication of the findings herein is that the peptides of the invention are expressed and complexed with HLA molecules on a variety of cancer cells of different histological origins. This renders these cancer cells susceptible to destruction by CTLs and emphasizes the potential usefulness of survivin immunization to control the growth of different neoplasms. The presence of spontaneous CTL-
 30 responses in PBLs and tumour cells to HLA-restricted survivin-derived peptide epitopes from patients suffering from three unrelated cancer types, i.e., breast cancer, melanoma and CLL, further substantiates the universal immunotherapeutic potential of this tumour antigen.

35 Accordingly, in another preferred embodiment the peptide of the invention is capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a patient having a cancer disease where survivin is expressed including a haematopoietic malignancy including chronic lymphatic leukemia and chronic myeloid leukemia, melanoma, breast cancer, cervix cancer, ovary cancer, lung cancer, colon cancer, pancreas cancer and prostate cancer.

40 Specifically, the peptide of the invention is able to elicit an immune response in the form of T cell having cytotoxic effect against survivin expressing cells of a cancer cell line, including a cell line selected from the breast cancer cell line MCF-7 and the melanoma cell line FM3.

In addition to their capacity to elicit immune responses in PBL populations and cancer cell lines, it was demonstrated that the peptides of the invention are also capable of eliciting cytolytic immune responses *in situ*, i.e. in solid tumour tissues. This was demonstrated by providing HLA-peptide complexes, e.g. being multimerised and being provided with a detectable label, and using such complexes for immunohistochemistry stainings to detect in a tumour tissue CTLs that are reactive with the epitope peptide of the invention. Accordingly, a further significant feature of the peptide of the invention is that it is capable of *in situ* detection in a tumour tissue of CTLs that are reactive with the epitope peptide.

- 10 It is contemplated that the peptides of the invention, in addition to their capacity to bind to HLA molecules resulting in the presentation of complexes of HLA and peptides on cell surfaces, which complexes in turn act as epitopes or targets for cytolytic T cells, may elicit other types of immune responses, such as B-cell responses resulting in the production of antibodies against the complexes and/or a Delayed Type Hypersensitivity (DTH) reaction.
- 15 The latter type of immune response is defined as a redness and palpable induration at the site of injection of the peptide of the invention.

- It is well known, that the different HLA molecules are of different prevalence in the major human populations. Accordingly, there is a requirement for identifying peptide epitopes restricted to several HLA class I molecules to extend the patient cohort that can be treated according to the methods of the present invention. The characterisation of multiple survivin epitopes with different HLA restriction elements broadens the clinical potential of this target antigen in two important ways: (i) It increases the number of patients eligible for immunotherapy based on survivin-derived peptides. The HLA-A2 antigen is expressed by around 50 % of the Caucasian and Asian populations, the HLA-A1 and HLA-A3 antigens are both expressed by around 25 % of Caucasians and 5 % of Asians, whereas the HLA-A11 antigen is expressed by around 15 % of Caucasians and 30 % of Asians. Even though these numbers cannot be summed up due to co-expression, a combination of peptides restricted by a multiplicity of these would certainly encompass most cancer patients, (ii)
- 20 restricted to several HLA class I molecules to extend the patient cohort that can be treated according to the methods of the present invention. The characterisation of multiple survivin epitopes with different HLA restriction elements broadens the clinical potential of this target antigen in two important ways: (i) It increases the number of patients eligible for immunotherapy based on survivin-derived peptides. The HLA-A2 antigen is expressed by around 50 % of the Caucasian and Asian populations, the HLA-A1 and HLA-A3 antigens are both expressed by around 25 % of Caucasians and 5 % of Asians, whereas the HLA-A11 antigen is expressed by around 15 % of Caucasians and 30 % of Asians. Even though these numbers cannot be summed up due to co-expression, a combination of peptides restricted by a multiplicity of these would certainly encompass most cancer patients, (ii)
 - 25 by around 50 % of the Caucasian and Asian populations, the HLA-A1 and HLA-A3 antigens are both expressed by around 25 % of Caucasians and 5 % of Asians, whereas the HLA-A11 antigen is expressed by around 15 % of Caucasians and 30 % of Asians. Even though these numbers cannot be summed up due to co-expression, a combination of peptides restricted by a multiplicity of these would certainly encompass most cancer patients, (ii)
 - 30 The collective targeting of several restriction elements in each patient is likely to decrease the risk of immune escape by HLA-allele loss. Loss of a single HLA allele is a significant component of MHC alterations described for cancer cells, whereas total loss of Class I expression is a rather infrequent event . Thus, with the identification of survivin epitopes restricted to different HLA alleles, it is now possible to target more than one HLA-molecule simultaneously in patients with allelic overlap.
 - 35 simultaneously in patients with allelic overlap.

- Accordingly, based on the disclosure of the present invention the person of skill in the art would be able to develop highly immunogenic multi-epitope vaccines. Preferably, such vaccines should be designed so as to facilitate a simultaneous delivery of the best-suited survivin-derived peptides optionally in combination with other suitable peptides and/or adjuvants as described hereinafter.
- 40 survivin-derived peptides optionally in combination with other suitable peptides and/or adjuvants as described hereinafter.

Furthermore, as previously described, there has been an increased focus on eliciting tumor-specific T helper cell immunity, i.e., vaccinating with class II-MHC restricted

epitopes despite the fact that tumors generally do not express class II MHC. This is based on the recent finding that the induction and efficacy of the vaccine-induced anti-tumor response in many cases requires the cooperation of tumor-specific CD4 positive T_h cells. Thus, an important factor driving the development of vaccines having a more complex composition is the desire to target multiple tumor antigens e.g. by designing vaccines comprising or encoding a collection of carefully selected CTL and T_h cell epitopes.

Obviously, multi-epitope vaccines constitute an efficient way to raise immunity against epitopes derived from several different antigens without the need for introducing (genes encoding) potentially hazardous proteins such as oncoproteins. Such vaccines also permit selective induction of immunity against subdominant and cryptic T cell epitopes, which can be especially important in the case of tumor-associated autoantigens for which tolerance may exist for the epitopes that are prominently presented in normal tissues. Furthermore, antigen-presenting cells may fail to present certain epitopes that are expressed on tumor cells because of functional differences between the immunoproteasomes of antigen-presenting cells and the 'constitutive' proteasomes present in most tumor cells. In the case of peptide-based vaccines, such epitopes can be administered in an 'MHC-ready' form, which enables presentation through exogenous loading independently of antigen uptake and processing by host antigen-presenting cells.

20

It is evident that the findings of the present invention provide the basis for therapeutic as well as diagnostic applications of the survivin-derived peptides.

25

Thus, an important aspect of the present invention relates to a composition comprising:

Accordingly, in a further aspect the present invention provides a pharmaceutical composition comprising one or more of the peptides of the invention alone or in suitable combination with other proteins or peptide fragments. In specific embodiments such other proteins or peptide fragments include but are not limited to proteins involved in regulation of cell apoptosis or peptide fragments hereof. Suitable examples of such proteins can be selected from the Bcl-2 protein family, e.g., the Bcl-2 protein, the Bcl-w protein, the Mcl-1 protein, the Bcl-X_L protein, and peptide fragments derived from any of the proteins. Other known apoptosis inhibitors include members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family such as X-IAP, C-IAP1 and C-IAP2 these proteins are all relatively ubiquitously expressed whereas the inhibitor of apoptosis polypeptide ML-IAP has a rather selective expression, and is predominantly detected in melanomas. Thus, fragments of ML-IAP capable of eliciting a specific T-cell response i.e a cytotoxic T-cell response or a helper T-cell response may optionally be included in the composition of the present invention. Useful peptide fragments of ML-IAP include ML-IAP₂₄₅ (RLQEERTCKV)(SEQ ID NO:75), ML-IAP₂₈₀ (QLCPICRAPV)(SEQ ID NO:76), ML-IAP₉₀ (RLASFYDWPL)(SEQ ID NO:77), ML-IAP₁₅₄ (LLRSKGRDFV)(SEQ ID NO:78), ML-IAP₂₃₀ (VLEPPGARDV)(SEQ ID NO:79), ML-IAP₉₈ (PLTAEVPPPEL)(SEQ ID NO:80), ML-IAP₃₄ (SLGSPVLGL)(SEQ ID NO:81), ML-IAP₅₄ (QILGQLRPL)(SEQ ID NO:82), ML-IAP₉₉ (LTAEVPPPEL)(SEQ ID NO:83), ML-IAP₈₃ (GMGSEELRL)(SEQ ID NO:84) and ML-IAP₂₀₀ (ELPTPRREV)(SEQ ID NO:85).

Additionally, the composition according to the present invention may be provided as a multiepitope vaccine comprising class I restricted epitope and/or class II restricted epitopes as defined hereinbefore.

5

Example of a presently preferred multiepitope vaccines include "tailor made" combinations of survivin-derived peptide eptiopes depending of the tissue type of the given patient, e.g., a subject carrying HLA-A2, HLA-A3, and HLA-B35 phenotypes could be vaccinated with a vaccine comprising sur1M2, sur9, sur18K10, sur46Y9, sur51Y9. Additionally, the

10 pharmaceutical composition of the invention may advantageously comprise at least one further immunogenic protein or peptide fragment hereof selected from a protein or peptide fragment not belonging to or derived from the survivin protein. In specific embodiments, the immunogenic protein or peptide fragment thereof is derived from the Bcl-2 protein family as described hereinbefore. A further immunogenic Bcl-2-derived peptide is an HLA-
15 A2 restricted peptide having a sequence selected from the following: Bcl₁₇₂, Bcl₁₈₀, Bcl₂₀₈, and Bcl₂₁₄

As the peptides of the invention are relatively small molecules it may be required in such compositions to combine the peptides with various materials such as adjuvants, to produce
20 vaccines, immunogenic compositions, etc. Adjuvants, broadly defined, are substances which promote immune responses. Frequently, the adjuvant of choice is Freund's complete or incomplete adjuvant, or killed *B. pertussis* organisms, used e.g. in combination with alum precipitated antigen. A general discussion of adjuvants is provided in Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2nd edition, 1986) at pages 61-63. Goding
25 notes, however, that when the antigen of interest is of low molecular weight, or is poorly immunogenic, coupling to an immunogenic carrier is recommended. Examples of such carrier molecules include keyhole limpet haemocyanin, bovine serum albumin, ovalbumin and fowl immunoglobulin. Various saponin extracts have also been suggested to be useful as adjuvants in immunogenic compositions. Recently, it has been proposed to use
30 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), a well known cytokine, as an adjuvant (WO 97/28816).

Accordingly, the invention encompasses a therapeutic composition further comprising any adjuvant substance including any of the above or combinations thereof. It is also contemplated that the antigen, i.e. the peptide of the invention and the adjuvant can be administered separately in any appropriate sequence.
35

The choice of antigen in the pharmaceutical composition of the invention will depend on parameters determinable by the person of skill in the art. As it has been mentioned, each
40 of the different peptides of the invention is presented on the cell surfaces by a particular HLA molecule. As such, if a subject to be treated is typed with respect to HLA phenotype, a peptide/peptides are selected that is/are known to bind to that particular HLA molecule.

Alternatively, the antigen of interest is selected based on the prevalence of the various HLA phenotypes in a given population. As an example, HLA-A2 is the most prevalent phenotype in the Caucasian population, and therefore, a composition containing a survivin-derived peptide binding to HLA-A2 will be active in a large proportion of that population.

- 5 However, the composition of the invention may also contain a combination of two or more survivin-derived peptides, each interacting specifically with a different HLA molecule so as to cover a larger proportion of the target population. Thus, as examples, the pharmaceutical composition may contain a combination of a peptide restricted to a HLA-A molecule and a peptide restricted to a HLA-B molecule, e.g. including those HLA-A and HLA-B molecules
10 that correspond to the prevalence of HLA phenotypes in the target population, such as e.g. HLA-A2 and HLA-B35. Additionally, the composition may comprise a peptide restricted to an HLA-C molecule.

- It is contemplated that useful immunogenic compositions of the inventions in addition to a
15 survivin-derived peptide as defined herein may comprise an immunologically effective amount of the survivin protein as such as it is defined herein or an immunogenic fragment hereof.

- The amount of the immunogenic peptide of the invention in the pharmaceutical composition may vary, depending on the particular application. However, a single dose of the immunogen is preferably anywhere from about 10 µg to about 5000 µg, more preferably from about 50 µg to about 2500 µg such as about 100 µg to about 1000 µg. Modes of administration include intradermal, subcutaneous and intravenous administration, implantation in the form of a time release formulation, etc. Any and all forms of administration known to
25 the art are encompassed herein. Also any and all conventional dosage forms that are known in the art to be appropriate for formulating injectable immunogenic peptide composition are encompassed, such as lyophilised forms and solutions, suspensions or emulsion forms containing, if required, conventional pharmaceutically acceptable carriers, diluents, preservatives, adjuvants, buffer components, etc.

- 30 The immunoprotective effect of the composition of the invention can be determined using several approaches. Examples hereof are provided in the following examples. A further example on how to determine a CTL response provoked by the immunogenic composition is provided in WO 97/28816, *supra*. A successful immune response may also be determined
35 by the occurrence of DTH reactions after immunisation and/or the detection of antibodies specifically recognising the peptide(s) of the vaccine composition.

- In preferred embodiments, the pharmaceutical composition of the invention is an immunogenic composition or vaccine capable of eliciting an immune response to a cancer disease.
40 As used herein, the expression "immunogenic composition or vaccine" refers to a composition eliciting at least one type of immune response directed against cancer cells. Thus, such an immune response may be any of the types mentioned above: A CTL response where CTLs are generated that are capable of recognising the HLA/peptide complex presented on cell surfaces resulting in cell lysis, i.e. the vaccine elicits the production in the

vaccinated subject of effector T-cells having a cytotoxic effect against the cancer cells; a B-cell response giving rise to the production of anti-cancer antibodies; and/or a DTH type of immune response.

- 5 In useful embodiments an immunogenic response directed against a cancer disease is elicited by administering the peptide of the invention either by loading MHC class I molecules on antigen presenting cells (APCs) from the patient, by isolating PBLs from the patient and incubating the cells with the peptide prior to injecting the cells back into the patient or by isolating precursor APCs from the patient and differentiating the cells into professional
10 APCs using cytokines and antigen before injecting the cells back into the patient. Thus, in one embodiment of the present invention, a method for treating cancer patients is one wherein the peptide is administered by presenting the peptide to the patient's antigen presenting cells (APCs) *ex vivo* followed by injecting the thus treated APCs back into the patient. There are at least two alternative ways of performing this. One alternative is to iso-
15 late APCs from the cancer patient and incubate (load) the MHC class I molecules with the peptide. Loading the MHC class I molecules means incubating the APCs with the peptide so that the APCs with MHC class I molecules specific for the peptide will bind the peptide and therefore be able to present it to T cells. Subsequently, the APCs are re-injected into the patient. Another alternative way relies on the recent discoveries made in the field of den-
20 dritic cell biology. In this case, monocytes (being dendritic cell precursors) are isolated from the patient and differentiated *in vitro* into professional APC (or dendritic cells) by use of cytokines and antigen. This is described in Examples 3 and 5, where adherent PBLs (being mainly monocytes) are cultured *in vitro* together with GM-CSF, IL-4 and TNF- α . Subsequently, the *in vitro* generated DCs are pulsed with the peptide and injected into the
25 patient.

- Due to the fact that survivin appears to be expressed in most cancer forms, it is very likely that vaccines of the invention can be provided to control any type of cancer disease where survivin is expressed. Thus, as examples, the vaccine composition of the invention is im-
30 munologically active against a haematopoietic malignancy including chronic lymphatic leukemia and chronic myeloid leukemia, melanoma, breast cancer, cervix cancer, ovary cancer, lung cancer, colon cancer, pancreas cancer and prostate cancer.

- From the above description, the skilled person will readily realise that the peptides of the
35 invention are useful as cancer diagnostic tools, particularly so, as the peptides are derived from survivin expressed in all cancer types. Therefore, the peptides of the invention provide the basis for developing universally applicable diagnostic and prognostic procedures in respect of cancer diseases. Thus, in other useful embodiments the composition of the invention is a composition for *ex vivo* or *in situ* diagnosis of the presence in a cancer patient,
40 e.g. based on the detection of survivin reactive T-cells among PBLs or in tumour tissue.

Accordingly, there is, in still further aspects, provided a diagnostic kit for *ex vivo* or *in situ* diagnosis of the presence of survivin reactive T-cells among PBLs or in tumor tissue comprising one or more peptides of the invention, and a method of detecting in a cancer

patient the presence of survivin reactive T-cells, the method comprising contacting a tumor tissue or a blood sample with a complex of a peptide of the invention and a Class I HLA molecule or a fragment of such molecule and detecting binding of the complex to the tissue or the blood cells.

5

Another useful diagnostic or prognostic approach is based on generating antibodies in a heterologous animal species, e.g. murine antibodies directed against a human survivin-derived peptide of the invention, which can then be used, e.g. to diagnose for the presence of cancer cells presenting the peptide. For such immunisation purposes, the amount of
10 peptide may be less than that used in the course of *in vivo* therapy, such as that mentioned above. In general, a preferred dose can range from about 1 µg to about 750 µg of peptide. It is also possible to produce monoclonal antibodies based on immunisation with a peptide of the invention. Accordingly, the present invention also relates to a molecule, in particular a monoclonal or polyclonal antibody including a fragment hereof, that is capable
15 of binding specifically to a peptide of the invention and to a molecule that is capable of blocking such a binding, e.g. an antibody raised against the monoclonal or polyclonal antibody directed against a peptide of the invention.

In one aspect, the invention provides a complex of a peptide of the invention and a Class I
20 HLA molecule or a fragment of such molecule, which is useful as a diagnostic reagent such as it is described *supra*. The complex is made by any conventional means including those described in the following examples. Such a complex may be monomeric or multimeric.

The present invention provides the means for alleviating or curing a cancer disease. Accordingly, it is a further aspect of the invention to use the peptides as defined hereinbefore
25 for the preparation of a medicament for the treatment of cancer. A still further aspect of the present invention relates to the use of a molecule or a composition as defined hereinbefore for the preparation of a medicament for the treatment of cancer. Preferably, a cancer disease associated with the expression of survivin, including as examples: a
30 haematopoietic malignancy including chronic lymphatic leukemia and chronic myeloid leukemia, melanoma, breast cancer, cervix cancer, ovary cancer, lung cancer, colon cancer, pancreas cancer and prostate cancer. The use comprises administering to a patient suffering from the disease an effective amount of the pharmaceutical composition according to the invention, a molecule that is capable of binding specifically to a peptide of
35 the invention and/or a molecule that is capable of blocking the binding of such a molecule.

In some cases it will be appropriate to combine the use of the invention with a conventional cancer treatment such as radiotherapy or chemotherapy.

40

The invention will now be described in further details in the below, non-limiting examples and the figures, wherein

Fig. 1 illustrates T-cell response as measured in an ELISPOT in patient CLL1 to no peptide, Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO:10) peptide and Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO:3) peptide. PBLs were stimulated once with peptide before plated at 6×10^5 cells per well in duplicate. The average number of spots per peptide was calculated using a CCD scanning device and
 5 a computer system,

Fig. 2 illustrates T-cell response as measured in an ELISPOT in patient CLL1 to no peptide, the peptide analogue Sur1L2 (LLLGEFLKL, SEQ ID NO:4), and the peptide analogue Sur1M2 (LMLGEFLKL, SEQ ID NO:5). PBLs were stimulated once with peptide before plated
 10 at 10^4 cells per well in duplicate. The average number of spots per peptide was calculated using a CCD scanning device and a computer system,

Fig. 3 shows responses as measured in an ELISPOT in patient CLL2 and CLL3 to no peptide (black bar), the Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO:10) peptide (grey bar), the Sur9
 15 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO:3) peptide (white bar), the analogue peptide Sur1L2 (LLLGEFLKL, SEQ ID NO:4) (light grey bar), and the analogue peptide Sur1M2 (LMLGEFLKL, SEQ ID NO:5) (dark grey bar). Each experiment was performed with 10^5 cells per well in duplicate, and the average number of spots was calculated,

20 Fig. 4 represents T cells that were isolated from tumour infiltrated lymph nodes from patient Mel1, Mel2, and Mel3, stimulated once in vitro and analyzed in an ELISPOT assay for response to no peptide (black bar) the peptides Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO:10) (grey bar) and Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO:3) (white bar). Each experiment was performed in duplicate with 10^5 cells per well. In each experiment two wells without addition of peptide
 25 was also included. The average number of spots per peptide was calculated for each patient,

Fig. 5 shows functional activity of survivin specific CTLs. CTLs were isolated from a melanoma infiltrated lymph node using survivin coated magnetic beads. (A) Specific lysis of
 30 melanoma cell lines; the HLA-A2 positive FM3 (triangle) and the HLA-A2 negative FM45 (square). (B) Specific lysis of breast cancer cell lines; the HLA-A2 positive MCF-7 (triangle) and the HLA-A2 negative BT-20 (square),

Fig. 6 shows frequency of survivin reactive CTLs in PBL from breast cancer patients. Reactivity was examined in three breast cancer patients (top, middle, and bottom, respectively)
 35 by the ELISPOT. For each patient the assays were performed in the absence of peptide, in the presence of sur1 peptide, in the presence of sur9, and in the presence of the modified sur1M2 peptide. 1×10^4 effector cells per well were used. The graph depicts the quantification of reactive cells; grey columns represent the average number of IFN- γ
 40 producing cells,

Fig. 7 illustrates HLA-B35 binding of survivin-derived peptides and analysis of the peptide-mediated recovery of HLA-B35 molecules by survivin-derived peptides. Lysates of metabolically labeled T2-B35 cells were incubated at 4°C in the presence of 50, 5, 0.5, 0.05 and

0.005 mM of peptide. The recovery of HLA-B35 was analyzed in an assembly assay and quantified subsequent to IEF-gel electrophoresis, using ImageGauge phosphorimager software (FUJI photo film Co., LTD., Japan). The C_{50} value is the concentration of the peptide required for half-maximal binding to HLA-B35,

5

Fig. 8 shows spontaneous T-cell responses observed in PBLs from cancer patients. A) The number of IFN γ spot forming cells measured in ELISPOT assay without peptide (white bars), with sur51-59 (black bars) or sur46-54 (gray bars), among *in vitro* stimulated PBLs from patient CLL5 (10^5 cells/well), HEM12 (10^5 cells/well), and HEM8 (5×10^4 cells/well). B)

10 The number of spot forming cells among 1.7×10^5 PBLs from HEM12, cultured for 10 days with peptide-pulsed matured autologous dendritic cells. The columns represent the average of two measurements,

Fig. 9 demonstrates spontaneous T-cell responses against native and modified survivin

15 peptides in melanoma patients. A) The number of spot forming cells measured in ELISPOT assay against sur51-59 and sur51Y9 from patient FM25 in PBLs (4×10^3 cells/well) and TILs (7×10^4 cells/well) as well as TILs from FM45 (10^4 cells/well). B) The number of spot forming cells measured in ELISPOT assay against sur46 and sur46Y9 measured in TILs from FM74 (5×10^3 cells/well). The columns represent the average of two measurements with the

20 non-specific IFN γ release subtracted,

Fig. 10 illustrates binding affinity of survivin-derived peptides to HLA-A1. Class I MHC heavy chain bands were quantified on a Phosphorimager. The amount of stabilized HLA-A1 heavy chain is directly related to the binding affinity of the added peptide. The peptide-mediated recovery of HLA-A1 (arbitrary units) induced by 40, 4, 0.4, 0.04 μ M of Sur93-101 (*line*), Sur93T2 (*square*), Sur49-58 (*circle*) or Influenza A, PB1 591-599 (*triangle*),

25

Fig. 11 shows spontaneous responses against HLA-A1 restricted peptides. Spontaneous T-cell responses against survivin-derived peptides as measured by ELISPOT assay. The average number of peptide specific IFN γ spots formed in response to Sur92-101, Sur38Y9, Sur47Y10, and Sur93T2 among 5×10^4 *in vitro* stimulated PBL or TIL from melanoma patients. The peptide specific responses showed were observed among analyses of 6 PBL samples and 3 TIL samples from melanoma (Mel) patients. Non-specific IFN γ spots are subtracted. *Bars*: range of duplicates,

35

Fig. 12 shows spontaneous responses against HLA-A11 restricted peptides. Spontaneous T-cell responses against survivin-derived peptides as measured by the ELISPOT assay. The average number of peptide specific IFN γ spots formed in response to Sur53-62 among 5×10^4 *in vitro* stimulated PBL or TIL from cancer patients. The peptide specific responses showed were observed among analyses of 5 melanoma (Mel) patients (5 PBL, 1 TIL) and 2 CLL (CLL) patients (PBL). Non-specific IFN γ spots are subtracted. *Bars*: range of duplicates,

40

Fig. 13 illustrates spontaneous responses against HLA-A3 restricted peptides. Spontaneous

T-cell responses against survivin-derived peptides as measured by the ELISPOT assay. The average number of peptide specific IFN γ spots formed in response to Sur18K10 among 5×10^4 *in vitro* stimulated PBL or TIL from melanoma patients. The peptide specific responses showed were observed among analyses of 23 PBL samples and 4 TIL samples from melanoma (Mel) patients. Non-specific IFN γ spots are subtracted. Bars: range of duplicates,

Fig. 14 illustrates spontaneous responses against HLA-A2 restricted peptides. Spontaneous T cell responses against survivin-derived peptides as measured by the ELISPOT assay. The average number of peptide specific IFN γ spots formed in response to the 11mer peptide, Sur18-28 among 5×10^4 *in vitro* stimulated PBL from cancer patients. The peptide specific responses showed were observed among analyses of 10 PBL samples from 2 melanoma (Mel), 6 CLL (CLL), and 2 mamma carcinoma (MC) patients. Non-specific IFN γ spots are subtracted. Bars: range of duplicates,

Fig. 15 illustrates spontaneous T cell responses against survivin-derived peptides as measured by the ELISPOT assay. The average number of peptide specific IFN γ spots formed in response to sur6-14 (LPPAWQPFL) among 10^5 *in vitro* stimulated PBL from five melanoma patients (mel25, mel26, mel3, mel6, mel39), two CLL patients (CLL1, CLL54) and 2 breast cancer patients (breast11, breast 15). Non-specific IFN γ spots are subtracted,

Fig. 16 illustrates the laboratory values of stable detection of LDH, cholinesterase, creatinine, hemoglobin, leucocytes and thrombocytes following vaccination therapy of four patients ($\blacktriangle$ RW, $\bullet$ KN, $-$ WWE, $\blacksquare$ GB), and

Fig. 17 demonstrates kinetic analysis of immunity to survivin peptides assessed by IFN γ ELISPOT. PBMCs were obtained before the first DC vaccination and three months thereafter. The numbers of IFN γ spot-forming cells above background are depicted.

In the following table, amino acid sequences for peptides used herein and their respective SEQ ID NOs are listed:

SEQ ID NO:	DESIGNATION	SEQUENCE
1	Sur6	FLKLD RERA
2	Sur8	TLPPAWQPFL
3	Sur9	ELTLGEFLKL
4	Sur1L2	LLLGEFLKL
5	Sur1M2	LMLGEFLKL
6	Sur 46-54	CPTENEPDL
7	Sur51-59	EPDLAQCF
8	Sur46Y9	CPTENEPDY

9	sur51Y9	EPDLAQCFY
10	Sur1	LTLGEFLKL
11	C1	ILKEPVHGV
12	Sur2	RAIEQLAAM
13	Sur3	KVRRRAIEQL
14	Sur4	STFKNWPFL
15	Sur5	SVKKQFEEL
16	Sur7	TAKKVRRAI
17	Sur10	ETAKKVRRAI
18	Sur 6-14	LPPAWQPFL
19	Sur 11-19	QPFLKDHRl
20	Sur 34-43	TPERMAEAGF
21	C24	YPLHEQHQM
22	Sur14-22	LKDHRISTF
23	Sur38-46	MAEAGFIHC
24	Sur93-101	FEELTLGEF
25	Sur47-56	PTENEPDLAQ
26	Sur49-58	ENEPDLAQCF
27	Sur92-101	QFEELTLGEF
28	C1	VSDGGPNLY
29	sur14Y9	LKDHRISTY
30	sur93Y9	FEELTLGEY
31	sur92Y9	QFEELTLGEY
32	sur34Y9	TPERMAEAGY
33	sur49Y9	ENEPDLAQCY
34	Sur92T2	QTEELTLGEF
35	Sur92S2	QSEELTLGEF
36	Sur93T2	FTEELTLGEF
37	Sur93S2	FSEELTLGEF
38	Sur38Y9	MAEAGFIHY
39	Sur47Y10	PTENEPDLAY
40	Sur 5-13	TLPPAWQPF
41	Sur 53-61	DLAQCFFCF
42	Sur 54-62	LAQCFFCFK
43	Sur 95-103	ELTLGEFLK
44	Sur 112-120	KIAKETNNK
45	Sur 13-22	FLKDHRISTF
47	Sur 53-62	DLAQCFFCFK
50	Sur 103-112	KLDRERAKNK
51	Sur 112-121	KIAKETNNKK
52	Sur 113-122	IAKETNNKKK
53	C3	ILRGsvAHK
54	Sur5K9	TLPPAWQPK
55	Sur53K9	DLAQCFFCCK
56	Sur54L2	LLQCFFCFK

57	Sur13K9	FLKDHRISTK
58	Sur18K10	RISTFKNWPK
59	Sur113L2	ILKETNNKKK
60	SurEx3-A3-1	TIRRKNLRK
61	SurEx3-A3-2	PTIRRKNLRK
62	Sur2b-A3-1	RITREEHKK
63	C4	AVFDRKSDAK
64	C6	QPRAPIRPI
65	C7	RPPIFIRRL
66	Sur4-14	PTLPPAWQPFL
67	Sur18-28	RISTFKNWPFL
68	Sur54-64	LAQCFFCFKEL
69	Sur86-96	FLSVKKQFEEL
70	Sur88-98	SVKKQFEELTL
71	Sur103-113	KLDRERAKNKI
72	Ebv, BMLF1	GLCTLVAML
73	Hiv, Pol	ILKEPVHGV
74	Influenza A, nucleoprotein265- 273	ILRGSAHK

EXAMPLE 1

5

Identification of a cytotoxic T-lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients
10 Summary

Using CTL epitopes derived from survivin, specific T-cell reactivity against such antigens in peripheral blood from chronic lymphatic leukemia (CLL) patients and in tumor-infiltrated lymph nodes from melanoma patients by ELISPOT analysis have been studied. CTL re-

15 sponses to survivin-derived peptide epitopes were detected in three out of six melanoma patients and in three out of four CLL patients. No T-cell reactivity was detected in PBL from six healthy controls. Thus, survivin-derived peptides may serve as important and widely applicable targets for anti-cancer immunotherapeutic strategies.

20 Introduction

The survivin protein was scanned for the presence of HLA-A*0201 (HLA-A2) binding peptide motifs and after successful identification, the peptides were used to test for specific T-cell reactivity in leukemia and melanoma patients by ELISPOT assay. In both patient co-

25 horts CTL responses to two survivin-derived peptide epitopes were detected, whereas no

T-cell reactivity could be detected in the healthy controls. These data suggest that survivin represent a widely expressed tumor antigen recognized by autologous T cells.

Materials and Methods

5

Patients and normal controls

Peripheral vein blood samples from 4 patients diagnosed with CLL (designated CLL1-4) and blood samples from 6 normal individuals were collected into heparinised tubes. PBLs were isolated using Lymphoprep separation and frozen in fetal calf serum (FCS) with 10% di-methylsulphoxide. Additionally, T lymphocytes from tumor-infiltrated lymph nodes were obtained from 6 melanoma patients (designated mel1-6). Freshly resected lymph nodes were minced into small fragments, crushed to release cells into culture and cryopreserved. PBLs were available from 4 of the melanoma patients. All individuals included were HLA-A2 positive as determined by FACS analysis using the HLA-A2 specific antibody BB7.2. The antibody was purified from hybridoma supernatant. Patient samples were obtained from the State University Hospital, Herlev, Denmark. Informed consent was obtained from the patients prior to any of these measures.

20 *Survivin-derived peptides*

All peptides were obtained from Research Genetics (Huntsville, AL, USA) and provided at >90% purity as verified by HPLC and MS analysis. The peptides used are listed in Table 1.

25 Table 1. Peptides examined in this study and their binding affinity to HLA-A2

Name	Protein ^a	Sequence	SEQ ID NO:	C ₅₀ (μM) ^b
C1	HIV-1 pol ₄₇₆₋₄₈₄	ILKEPVHGV	11	0.7
Sur1	Survivin ₉₆₋₁₀₄	LTLGEFLKL	10	>100
Sur2	Survivin ₁₃₃₋₁₄₁	RAIEQLAAM	12	Not binding
Sur3	Survivin ₁₃₀₋₁₃₈	KVRRRAIEQL	13	>100
Sur4	Survivin ₂₀₋₂₈	STFKNWPFL	14	Not binding
Sur5	Survivin ₈₈₋₉₆	SVKKQFEEL	15	Not binding
Sur6	Survivin ₁₀₁₋₁₀₉	FLKLDRELA	1	30
Sur7	Survivin ₁₂₇₋₁₃₅	TAKKVRRAI	16	Not binding
Sur8	Survivin ₅₋₁₄	TLPPAWQPFL	2	30
Sur9	Survivin ₉₅₋₁₀₄	ELTLGEFLKL	3	10
Sur10	Survivin ₁₂₆₋₁₃₅	ETAKKVRRAI	17	Not binding
Sur1L2		LLLGEFLKL	4	1
Sur1M2		LMLGEFLKL	5	1

^a The value range listed in subscript indicates the position of the peptide in the survivin sequence as disclosed in US 6.245.523

30

^b The C_{50} value is the concentration of the peptide required for half maximal binding to HLA-A2 determined as described below

Assembly assay for peptide binding to class I MHC molecules

5

Assembly assays for binding of the synthetic peptides to class I MHC molecules metabolically labeled with [³⁵S]-methionine were carried out as described (12,13). The assembly assay is based on stabilization of the class I molecules after loading of peptide to the peptide transporter deficient cell line T2. Subsequently, correctly folded stable MHC heavy chains are immunoprecipitated using conformation-dependent antibodies. After IEF electrophoresis, gels were exposed to phosphorImager screens, and peptide binding was quantified using the Imagequant PhosphorImager program (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

15 *Antigen stimulation of PBLs*

To extend the sensitivity of the ELISPOT assay, PBLs were stimulated once in vitro prior to analysis (14,15). Fresh and previously frozen PBLs gave similar results in the ELISPOT assay. On day 0, PBLs or crushed lymph node were thawed and plated in 2 ml/well at a concentration of 2×10^6 cells in 24-well plates (Nunc, Denmark) in AIM V medium (Life Technologies, Roskilde, Denmark), 5% heat-inactivated human serum and 2 mM of L-glutamine in the presence of 10 μ M of peptide. In each experiment a well without peptide was included. Two days later 300 IU/ml recombinant interleukin-2 (IL-2) (Chiron, Ratingen, Germany) was added to the cultures. The cultured cells were tested for reactivity in the ELISPOT assay on day 12.

ELISPOT assay

The ELISPOT assay used to quantify peptide epitope-specific interferon- γ -releasing effector cells was performed as in (16). Briefly, nitrocellulose bottomed 96-well plates (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedehusene, Denmark) were coated with anti-IFN- γ antibody (1-D1K, Mabtech, Nacka, Sweden). The wells were washed, blocked by AIM V medium, and cells were added in duplicates at different cell concentrations. Peptides were then added to each well and the plates were incubated overnight. On the following day, medium was discarded and the wells were washed prior to addition of biotinylated secondary antibody (7-B6-1-Biotin, Mabtech). The plates were incubated for 2 hours, washed and Avidin-enzyme conjugate (AP-Avidin, Calbiochem, Life Technologies) was added to each well. Plates were incubated at RT for 1 hour and the enzyme substrate NBT/BCIP (Gibco, Life Technologies) was added to each well and incubated at room temperature for 5-10 min. The reaction was terminated by washing with tap water upon the emergence of dark purple spots. The spots were counted using the AlphaImager System (Alpha Innotech, San Leandro, CA. USA) and the peptide specific CTL frequency could be calculated from the numbers of spot-forming cells. The assays were all performed in duplicate for each peptide antigen.

Results

Binding of survivin derived peptides to HLA-A2

5 The amino acid sequence of the survivin protein was screened for the most probable HLA-A2 nona- and decamer peptide epitopes, using the main HLA-A2 specific anchor residues (17). Ten survivin-derived peptides were synthesized and examined for binding to HLA-A2. An epitope from HIV-1 pol476-484 (ILKEPVHGV, SEQ ID NO:11) (Table 1) was used as a positive control. The peptide concentration required for half maximal recovering of class I
 10 MHC (C_{50} value) was 0.7 μ M for the positive control. In comparison, the peptide designated Sur9 (ELTLGEFLKL, SEQ ID NO:3) bound at an affinity of $C_{50} = 10 \mu$ M. The peptides designated Sur6 (FLKLDRELA, SEQ ID NO:1) and Sur8 (TLPPAWQPFL, SEQ ID NO:2), respectively bound to HLA-A2 at $C_{50} = 30 \mu$ M, whereas Sur1 (LTLGEFLKL, SEQ ID NO:10) and Sur3 (KVRRAIEQL, SEQ ID NO:13) bound weaker ($C_{50} > 100 \mu$ M). Five of the peptides
 15 examined (Sur2, Sur4, Sur5, Sur7, and Sur10) did not bind to HLA-A2.

Since Sur1 is a weak HLA-A2 binder, two analogue peptides designated Sur1L2 and Sur1M2, respectively in which a better anchor residue (leucine or methionine) replaced the native threonine at position 2 were synthesized. Both of these peptides bind with almost
 20 similar high affinity to HLA-A2 as the positive control ($C_{50} = 1 \mu$ M).

CTL response to survivin in CLL patients

PBLs from four HLA-A2 positive CLL patients were stimulated once in vitro before examination in the ELISPOT assay. This procedure was chosen to extend the sensitivity of the ELISPOT. All of the above 10 survivin-derived peptides were included in the first line of experiments. Responses were detected to Sur1 and Sur9 and only data for these peptides are given in the figures. Fig. 1 shows CTL reactivity to Sur1 and Sur9 as determined in patient CLL1. Each spot represents a peptide reactive, INF- γ -producing cell. The average
 30 number of spots per peptide was calculated using a CCD scanning device and a computer system. Fifty-two Sur9 peptide specific spots (after subtraction of spots without added peptide) per 6×10^5 were detected in the CLL1 patient (Fig. 1). No response was detected to the weak HLA-A2 binding peptide Sur1, however the patient responded strongly to the strong HLA-A2 binding peptide analogue Sur1M2 (35 peptide specific spots per 10^4 cells) (Fig. 2). No response was detected to the other strong HLA-A2 binding peptide analogue Sur1L2 in this patient (Fig. 2). Patient CLL2 responded strongly to Sur9 (128 peptide specific spots per 10^5 cells) and weakly to Sur1 (22 peptide specific spots per 10^5 cells) (Fig. 3). The response to the Sur1L2 analogue was only slightly increased relative to the natural epitope, whereas the patient responded similarly strongly to the Sur1M2 peptide as to the
 40 decamer peptide Sur9. In patient CLL3 a weak response to Sur9 was observed (Fig. 3). No response to Sur1 or the modified Sur1 peptides were observed in the patient. No survivin responses were detected in the last patient CLL4 (data not shown). PBLs from 6 healthy HLA-A2 positive controls were analyzed to investigate whether a response to survivin could

be detected in healthy individuals. No response was observed in any of the controls to any of the survivin-derived peptides.

CTL response to survivin in melanoma patients

5

T lymphocytes isolated from tumour infiltrated lymph nodes from HLA-A2 positive melanoma patients were examined. The freshly resected lymph node was minced into small fragments and crushed to release cells into culture. Cells were stimulated once with peptide in vitro before examination in the ELISPOT assay. Survivin specific T cells were detected in three of the six patients analyzed. A strong Sur9 response was detected in patient Mel2 and Mel3. A weaker response to the Sur1 peptide was also detected in these patients (Fig. 4). In Mel1 the response to the weakly binding peptide Sur1 was stronger than the response to the stronger HLA-A2 binder Sur9 (Fig. 4). No response was detected in the tumor-infiltrated lymph nodes from the last three melanoma patients (Mel4-6). PBLs from two of the survivin reacting patients, Mel1 and Mel2, and from two of the non-reacting patients, Mel4 and Mel5, were examined. No response could be detected to either Sur9 or Sur1 in PBLs from any of these patients (data not shown).

20 EXAMPLE 2

Spontaneous cytotoxic T-cell responses to survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ and ex vivo in cancer patients

25 Summary

Spontaneous cytotoxic T-cell responses to survivin-derived MHC class I restricted T-cell epitopes were demonstrated in situ as well as ex vivo in breast cancer, leukemia, and melanoma patients. Moreover, survivin reactive T cells isolated by magnetic beads coated with MHC/peptide complexes were cytotoxic to HLA-matched tumours of different tissue types. Being a universal tumor antigen, survivin may serve as a widely applicable target for anti-cancer immunotherapy.

Materials and Methods

35

Construction of HLA-peptide complexes for T-cell staining and T-cell sorting

A recognition site for enzymatic biotinylation using biotin protein ligase (BirA) in fusion with the 5'-end of the extracellular domains of HLA A*0201 (residues 1-275) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was purified by size- (Sephadex G25, Pharmacia) and ion exchange (mono-Q, Pharmacia) chromatography from inclusion bodies solubilised in 8 M urea. The HLA A*0201 was folded *in vitro* by dilution in the presence of the modified survivin peptide Sur1M2 (LMLGEFLKL, SEQ ID NO:5) or the MAA peptide gp100154-163, and subsequently biotinylated as described previously (35, 36).

After gel filtration on a Pharmacia Sephadex G25 column to remove unbound biotin, the protein was multimerised with streptavidin-FITC conjugated dextran molecules (kindly provided by L. Winther, DAKO, Denmark) to generate multivalent HLA-dextran compounds for immunohistochemistry. The HLA A*0201 construct was a kind gift of Dr. Mark M. Davis (Dept. of Microbiology and Immunology, Stanford University, Palo Alto, CA). Cell separation was performed as previously described (37). Briefly, 5×10^6 streptavidin-conjugated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway) were washed twice in 200 μ l cold PBS, 0.5 μ g peptide/A*0201 monomers were added and the mixture incubated for 15 min. at room temperature. After two washes these beads were mixed with PBLs at a ratio of 1:10 and subsequently incubated for 1 h followed by a precipitation of bead-bound cells in a magnetic field. The precipitation step was repeated once.

Immunohistochemistry stainings

For staining with FITC-conjugated multimeric peptide/MHC complexes, tissue sections were dried overnight and subsequently fixed in cold acetone for 5 min. All incubation steps were performed at room temperature and in the dark: (i) 45 min. of the primary antibody (1:100 diluted), (ii) Cy 3-conjugated goat anti-mouse (1:500 diluted; code 115-165-100, Jackson ImmunoResearch, obtained from Dianova, Hamburg, Germany) for 45 min. and finally (iii) the multimers for 75 min. Between each step the slides were washed two times for 10 min. in PBS/BSA 0.1%. The slides were mounted in vectashield and kept in the refrigerator until observed under the confocal microscope.

Cytotoxicity assay

Conventional [^{51}Cr]-release assays for CTL-mediated cytotoxicity were carried out as described in (13). Target cells were autologous EBV-transformed B-cell lines, the HLA-A2 positive breast cancer cell line MCF-7 (available at ATCC), the HLA-A2 positive melanoma cell line FM3 (38), the HLA-A2 negative breast cancer cell line BT-20 (available from ATCC) and the HLA-A2 negative melanoma cell line FM45 (38). All cancer cell lines expressed survivin as examined by RT-PCR (data not shown).

ELISPOT assay

The ELISPOT assay was used to quantify peptide epitope-specific IFN- γ releasing effector cells and has been described previously (39). Briefly, nitrocellulose bottomed 96-well plates (MultiScreen MAIP N45, Millipore) were coated with an anti-IFN- γ antibody (1-D1K, Mabtech, Sweden) and non-specific binding was blocked using AIM V (GibcoBRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Lymphocytes were added at different cell concentrations together with the specific peptides and T2 cells and incubated overnight at 37°C. Following two washes the biotinylated detection antibody (7-B6-1-Biotin, Mabtech) was added. Specific binding was visualised using alkaline phosphatase-avidin together with the respective substrate (GibcoBRL). The reaction was terminated upon the appearance of dark purple spots, which were quantitated using the AlphaImager System (Alpha Innotech,

San Leandro, CA, USA). The peptides used for the ELISPOT were Sur1, Sur9 and the Sur1 analogue peptide Sur1M2 as described in Example 1.

Results

5

In situ staining of HLA-A2/survivin reactive T cells

In Example 1 two survivin-derived peptide epitopes recognized by T cells in leukemia and melanoma, i.e., Sur1 were identified. The weak binding affinity of Sur1 to HLA-A2 was improved substantially by replacing threonine at position 2 with a better anchor residue (methionine; Sur1M2). This measure enabled the construction of stable HLA-A2/peptide complexes. These complexes were multimerised using dextran molecules, which were conjugated with streptavidin and FITC. Multimerised MHC-complexes were used to stain acetone-fixed, frozen material. Using a confocal laser microscope, Sur1M2/HLA-A*0201 reactive CTLs could readily be detected in situ in the tumor microenvironment. We depicted such cells in the primary tumor and the sentinel lymph node of a stage III melanoma patient as well as in a primary breast cancer lesion. To ensure the specificity of the staining, a series of negative controls was carried out. Neither the use of peptide/HLA-dextran multimers with peptides derived from the melanoma differentiation antigen gp100 on the same tumour, nor Sur1M2/HLA-dextran multimers in case of a tumour sample obtained from an HLA-A2 negative donor resulted in a positive staining.

Isolated survivin reactive CTLs lyse tumour cell lines of different origin

25 To characterise the functional capacity of survivin-reactive CTLs, these cells were isolated by means of magnetic beads coated with HLA-A2/Sur1M2-complexes (36). A freshly resected melanoma infiltrated lymph node was minced into small fragments and crushed to release cells into culture. Cells were stimulated once with peptide in vitro prior to isolation. One day after isolation IL-2 was added, and on day 5 the capacity of these cells to kill tumour cells was tested either by ELISPOT or in standard 51Cr release assays. First, by means of ELISPOT analysis it was possible to establish that CTLs isolated using the modified Sur1M2/HLA-A2-complex also responded to the native Sur1 peptide (data not shown). Second, the cytotoxicity of the survivin reactive CTLs against the HLA-A2 positive melanoma cell-line FM3 (Fig. 5 A) and the HLA-A2 positive breast-cancer cell line MCF-7 (Fig. 5 B) was tested. The isolated T cells effectively lysed both HLA-A*0201 cell lines. In contrast, no cytotoxicity was observed against the HLA-A2 negative melanoma cell line FM45 (Fig. 5 A) or the HLA-A2 negative breast cancer cell line BT-20 (Fig. 5 B).

Survivin reactivity measured in PBL by ELISPOT

40

The presence of survivin reactive T cells in PBLs from ten HLA-A2 positive breast cancer patients was examined by the ELISPOT. Before analysis, PBLs were stimulated once in vitro to extend the sensitivity of the assay. Reactivity to the following survivin peptides was examined: Sur1, Sur9 and Sur1M2. Survivin specific T cells were detected in six out of the

ten HLA-A2 positive breast cancer patients. Representative examples are given in Fig. 6. In PBLs from two patients a response against Sur1 and the modified analogue Sur1M2, but not against Sur9 (Fig. 6, top, middle) was detected, in three patients a response to Sur9 was detected, but not to Sur1 or Sur1M2 (Fig. 6 bottom), and one patient responded only to Sur1M2. In contrast, no survivin responses were detected in PBLs from 20 healthy HLA-A2 positive donors. Similarly, PBLs from fourteen HLA-A2 positive melanoma patients were examined. Survivin responses were present in seven of these patients (Table 2). Two patients responded to the Sur9 peptide, three to the Sur1M2 peptide, one to both Sur1 and SurM2, and one to all three peptides. In Example 1, T-cell response to survivin in 3 chronic lymphatic leukemia (CLL) patients was tested (Table 2; CLL1, CLL2, CLL3). These studies were extended using PBLs from three additional CLL patients. Notably, all patients produced a T-cell response to at least one survivin epitope (Table 2; CLL5, CLL6, CLL7). In addition, PBLs from one patient suffering from chronic myeloid leukemia (CML) was examined. In this patient, a response to all three peptides was identified (data not shown). The data are summarized in Table 2.

Table 2. Patients with survivin peptide-specific T lymphocytes in PBLs as measured by ELISPOT

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

- a) Frequency of reactive cells per 10^4 ; 14 patients examined.
- b) Frequency of reactive cells per 10^4 ; 10 patients examined.
- c) Frequency of reactive cells per 10^5 ; 7 patients examined.

5

EXAMPLE 3

10 **HLA-B35-restricted immune responses to survivin-derived peptides in cancer patients**

Summary

15 In this study, two survivin-derived epitopes, which are restricted to HLA-B35 were identified and characterized. Specific T-cell reactivity against both of these epitopes was present in the peripheral blood from patients with different haematopoietic malignancies and melanoma. Substitutions of the C-terminal anchor residue improved the recognition by tumor infiltrating lymphocytes from melanoma patients. Furthermore, spontaneous cytotoxic T-cell responses to survivin in situ in a primary melanoma lesion was demonstrated. These
20 epitopes extends the applicability of future vaccine strategies based on survivin peptides in relation to malignancies as well as the HLA profile of the patients involved.

In Examples 1 and 2, HLA-A2 restricted survivin-derived T-cell epitopes were studied. Since HLA-A2 is only expressed in about 30% of the Caucasian population (63), peptide
25 epitopes restricted to other HLA class I molecules need to be identified to extend the fraction of patients that could be treated. In this study, two novel T-cell epitopes from survivin restricted to HLA-B35, which is expressed in 9% of the Caucasian population (63), were identified, and spontaneous immune responses to these survivin peptides were detected in patients with different haematopoietic malignancies and melanoma.

30

Materials and Methods

Patients

35 Peripheral vein blood samples from cancer patients were collected, PBLs were isolated using Lymphoprep separation, HLA-typed (Department of Clinical Immunology, University Hospital, Copenhagen) and frozen in FCS with 10% DMSO. Ten HLA-B35 positive patients were selected for further analysis. These patients suffered from melanoma, CLL, follicular lymphoma (FL), diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) and Multiple Myeloma (MM), re-
40 spectively. At the time blood samples were collected patients had not been medically treated within the previous four months. Additionally, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) isolated from lymph nodes were collected from three of the melanoma patients and frozen in FCS with 10% DMSO.

Peptides

Seven synthetic survivin-derived peptides were used in this study: Sur6-14, Sur11-19, Sur34-43, Sur46-54, Sur51-59, Sur46Y9, Sur51Y9, and one EBV-derived peptide, EBNA3A 457-466 (63). All peptides were obtained from Research Genetics (Huntsville, AL) and provided at >90% purity, as verified by HPLC and MC analyses. The peptides are listed in Table 3 below.

Table 3. HLA-B35 binding of survivin-derived peptides

10

Name	Protein and position	Sequence	SEQ ID NO:	C ₅₀ (μM)
Sur6-14	Survivin ₆₋₁₄	LPPAWQPFL	18	>100
Sur11-19	Survivin ₁₁₋₁₉	QPFLKDHRI	19	Not binding
Sur34-43	Survivin ₃₄₋₄₃	TPERMAEAGF	20	>100
Sur46-54	Survivin ₄₆₋₅₄	CPTENEPDL	6	20
Sur51-59	Survivin ₅₁₋₅₉	EPDLAQCF	7	13
Sur46Y9	Modified peptide	CPTENEPDY	8	4
Sur51Y9	Modified peptide	EPDLAQCFY	9	1.5
C24	EBNA3A ₄₅₈₋₄₆₆	YPLHEQHQM	21	0.8

Assembly assay for peptide binding to MHC class I molecules

The assembly assay described in Examples 1 and 2 was used to measure binding affinity of the synthetic peptides to HLA-B35 molecules metabolically labeled with [S35]methionine. Briefly, the assay is based on peptide-mediated stabilization of empty HLA molecules released, upon cell lysis, from the TAP deficient cell line T2, stably transfected with HLA-B35 (kindly provided by Dr J. Haurum, Symphogen ApS, Lyngby, Denmark). Stably folded HLA-molecules were immunoprecipitated using the conformation-dependent mAb W6/32. The HLA molecules were separated by IEF electrophoresis, gels were exposed to phosphorimager screens (Imaging plate, FUJI photo film Co., LTD., Japan), analyzed and the amount of correctly folded HLA molecules were quantified using ImageGauge phosphorimager software (FUJI photo film Co., LTD., Japan).

25 Antigen stimulation of PBLs

To extend the sensitivity of the ELISPOT assay, lymphocytes were stimulated once in vitro with peptide prior to analysis (14, 15). PBLs or TILs were thawed and stimulated with 50μM of the individual peptide epitopes in 96-well plates for 2 h at 26°C (5x10⁵-10⁶ cells per peptide), and pooled for further 10 days of culture at 37°C in x-vivo with 5% human serum (HS), in 24 well plates (Nunc, Roskilde, Denmark), with 2x10⁶ cells per well. At the second day of incubation 40 μg/ml IL-2 (Apodan A/S, Denmark) were added. At day 10, the cultured cells were tested for reactivity in the ELISPOT assay.

35 The ELISPOT assay

The ELISPOT assay used to quantify peptide specific, IFN- γ releasing effector cells in PBLs or TILs collected from cancer patients was performed as described in Example 1. Briefly, nitrocellulose-bottomed 96-well plates (MultiScreen MAIP N45; Millipore, Hedeheusene, Denmark) were coated with mAb against human IFN- γ , 7.5 μ g/ml (1-D1K; Mabtech, Nacka, Sweden). Wells were washed and blocked in x-vivo (x-vivo 15TM BioWhittacker, Molecular Applications Aps, Denmark) and cells were added in duplicates at different concentrations. For antigen presentation, 10^4 T2-B35 cells, with and without 10 μ M peptide, were added per well. Plates were incubated overnight, the cells discarded, and wells washed prior to addition of biotinylated secondary antibody (7-B6-1-Biotin; Mabtech). Plates were incubated 2 h at room temperature, washed and avidin-alkaline phosphatase conjugate was added (AP-Avidin; Calbiochem, Life Technologies, Inc.). After 1 h of incubation at room temperature, the enzyme substrate nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Code No.K0598, DakoCytomation Norden A/S) was added, and dark purple spots emerged in 3-7 min. The reaction was terminated by washing with tap water. Spots were counted using the Alpha Imager System (Alpha Innotech, San Leandro, CA), and the frequency of peptide specific T cells were calculated from the number of spot forming cells.

All assays were performed in duplicates for each peptide antigen, and lymphocytes cultured in the same well, were tested in equal cell numbers with and without peptide, to measure the number of peptide specific cells in the culture.

Maturation of dendritic cells (DCs)

Adherent cells were isolated from PBLs after 2 h of culture. These were cultured for 10 additional days in RPMI 1640 (GibcoTM Invitrogen corporation, UK) with 10% FCS. 800 ng/ml GM-CSF (PreproTech, London, UK) and 40 ng/ml IL-4 (PreproTech) were added every third day. At day 10, DCs were matured for 24 h by adding 50 ng/ml TNF- α (PreproTech). After maturation, DCs were released and pulsed with 20 μ M peptide in the presence of 3 μ g/ml β 2-microglobulin for 2 h at 26°C.

Isolation of peptide specific T cells

Antigen specific cells were isolated using sur51Y9/HLA-B35-coated magnetic beads as described in Example 2. Biotinylated monomers of HLA-B35 with sur51Y9 (obtained from ProImmune, Oxford, UK) were coupled to streptavidin coated magnetic beads (Dynabeads M-280, Dynal A/S, Oslo, Norway) by incubating 2.5 μ g monomers with 5×10^6 beads in 40 μ l PBS for 20 min. at room temperature. The magnetic complexes were washed three times in PBS, using a magnetic device (Dynal A/S, Oslo, Norway) and subsequently mixed with PBLs at a ratio of 1:10 in PBS with 5% BSA, and rotated very gently for 1 h. Antigen specific CD8⁺ T cells associating with the magnetic complexes were gently washed two or three times. Isolated cells were resuspended several times in x-vivo supplemented with 5% human serum and incubated for 2 h before the magnetic beads were released and re-

moved from the cell suspension. The isolated antigen specific CD8⁺ T cells were used in ELISPOT assay to analyze the cross-reactivity between the native and modified peptide.

TCR clonotype mapping by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

5

DGGE clonotype mapping of the human TCR BV regions 1-24 has been described in details (66). Briefly, RNA was isolated using the Purescript Isolation Kit (Gentra Systems Inc. MN) and transcribed cDNA was amplified by PCR using primers for the variable regions of the TCR beta chains in conjunction with a common constant region primer. The computer program MELT87 was used to ensure that the amplified DNA molecules were suited for DGGE analysis provided a 50 bp GC-rich sequence (GC-clamp) was attached to the 5'-end of the constant region primer. DGGE analysis was done in 6% polyacrylamide gels containing a gradient of urea and formamide from 20% to 80%. Electrophoresis was performed at 160 V for 4.5 hours in 1x TAE buffer at a constant temperature of 54°C.

15

Immunohistochemistry stainings

Multimerised peptide/HLA complexes were used to identify antigen specific T cells in situ in tumor lesions of cancer patients using the procedure described in Example 2. Biotinylated sur51Y9/HLA-B35 monomer was supplied by Proimmune limited, Oxford, UK. The biotinylated monomers of sur51Y9/HLA-B35 were multimerised with streptavidin-FITC-conjugated dextran molecules (kindly provided by L. Winther, DAKO, Glostrup, Denmark) to generate multivalent HLA-dextran compounds for immunohistochemistry. Tissue sections were dried overnight and subsequently fixed in cold acetone for 5 min. All the incubation steps were performed in the dark at room temperature: (a) 45 min of the primary antibody (1:100 diluted) (b) Cy 3-conjugated goat-anti-mouse antibody (1:500 diluted; code 115-165-100; Jackson ImmunoResearch, obtained from Dianova, Hamburg, Germany) for 45 min; and finally (c) the multimers for 75 min. Between each step, the slides were washed two times for 10 min in PBS/BSA 0.1%. The slides were mounted in vectashield and kept in the refrigerator until observed under the confocal microscope (Leica).

Results

Identification of HLA-B35 binding survivin-derived peptides

35

The amino acid sequence of survivin was screened for nonameric and decameric peptides with anchor residues, according to the peptide-binding motif of HLA-B35 (67). Five peptides were selected containing proline as the N-terminal anchor in position 2 and phenylalanine, leucine, isoleucine or tyrosine as C-terminal anchor residues (Table 3). Assembly assay revealed two peptides, sur51-59 (EPDLAQCFF, SEQ ID NO:7) and sur46-54 (CPTENEPDL, SEQ ID NO:6) that were able to stabilise HLA-B35 efficiently. Additionally, two peptides, sur34-43 (TPERMAEAGF, SEQ ID NO:20) and sur6-14 (LPPAWQPFL, SEQ ID NO:18) showed a weak stabilization, whereas the remaining peptide did not stabilize HLA-B35 at all. The peptide concentration required for half maximal recovery of HLA-B35 (C50)

was estimated at 13 μ M for sur51-59 and 20 μ M for sur46-54. In comparison, the positive control-epitope C24 from EBNA3A458-466 (YPLHEQHQM, SEQ ID NO:21) had an estimated C₅₀ value of 0,8 μ M.

- 5 To enhance the binding affinity of sur46-54 and sur51-59 the C-terminal amino acid was replaced with tyrosine, a better anchor residue (67). The recovery of HLA-B35 mediated by the modified peptides was analyzed in the assembly assay, and C₅₀ values were estimated at 1.5 μ M for sur51Y9 and 4 μ M for sur46Y9 (Fig. 7).

10 *Spontaneous immune responses against native peptide epitopes*

Initially, five patients were analyzed for spontaneous immune responses to the four native HLA-B35 binding peptides sur51-59, sur46-54, sur34-43 and sur6-14. These five patients had different haematopoietic malignancies: HEM8 and HEM18 suffered from MM, HEM12
15 from FL, HEM9 had DLBCL, and CLL5 had CLL.

INF- γ ELISPOT assays were performed on PBLs after 10 days of in vitro stimulation to detect peptide precursor CTLs. Spontaneous immune responses were detected against two of the native HLA-B35 binding peptides, sur51-59 and sur46-54. Two patients, HEM12 and
20 CLL5 showed a response to both sur51-59 and sur46-54, whereas HEM8 only showed a response to sur51-59 (figure 8A and B). No response could be detected in the two remaining patients, HEM9 and HEM18, and no response could be detected to the poorly binding peptides sur34-46 and sur6-14 in any patients.

25 An alternative approach to in vitro stimulation was used in patient HEM12, i.e. PBLs were co-cultured with matured autologous dendritic cells pulsed with sur51-59 to stimulate a CTL response in vitro. PBLs from this culture showed strong reactivity towards sur51-59 in ELISPOT (figure 8B).

30 *Increased recognition of modified peptides*

As described above, peptide modifications to enhance the HLA-B35 affinity resulted in a 5-10-fold higher affinity for HLA-B35 relative to the native peptides. A group of five melanoma patients were analyzed for spontaneous immune responses to both the native and
35 modified peptides by means of ELISPOT assay. PBL samples were analyzed after in vitro stimulation, whereas TIL samples were analyzed directly. Spontaneous immune responses were observed in either PBLs or TILs from three of the five patients. FM25 showed reactivity against sur51-59 and sur51Y9 in both PBL and TIL samples (Fig. 9A). FM45 responded only to the modified peptide sur51Y9, with a strong response detectable in TILs. No PBLs
40 were available from this patient (figure 9A). FM74 showed a strong response to sur46Y9 in TIL, but no response to the native peptide was detectable (figure 9B). A weak response to sur46Y9 was also observed in PBLs from FM74 (data not shown).

Cross-reactivity between the native and modified peptide

The high affinity of sur51Y9 to HLA-B35 enables the production of stable monomers of HLA-B35 with sur51Y9. Having established the presence of survivin reactive T lymphocytes in tumor infiltrated lymph nodes and PBLs from different cancer patients, magnetic beads
5 were coated with such HLA-B35/Sur51Y9-complexes and these were used to isolate survivin peptide reactive T lymphocytes from PBL from patient CLL5. This patient showed a strong response to sur51-59. Beads were tightly bound to the cell surface of the specific cells, as visualized by microscopy (data not shown), permitting precipitation of antigen specific cells by a magnetic field. The isolated sur51Y9 specific cells responded strongly to
10 sur51-59, (figure 9), whereas no response could be detected in the remaining PBLs (data not shown). The isolation was analyzed by the RT-PCR/DGGE based TCR clonotype mapping. This technique allows the analysis for T-cell clonality in complex cell populations, even if only small numbers of cells are available. These analyses showed that 8 distinct clones were isolated (data not shown).

15

Antigen specific T cells present in situ in a melanoma lesions

Sur51Y9/HLA-B35 monomers were multimerised using dextran molecules conjugated with streptavidin and FITC. Multimerised MHC-complexes were used to stain acetone-fixed, frozen material using the procedure described in Example 2. Antigen specific cells were visu-
20 alized using a confocal laser microscope. Sections of primary melanoma from three patients were analyzed, and Sur51Y9/HLA-B35-reactive CTLs could readily be detected in situ in the tumor microenvironment in one of the patients. Co-staining with a mAb against granzyme B showed that these survivin specific CTLs released granzyme B, exerting
25 cytotoxic activity, HLA-B35 negative melanoma patients were used as controls (data not shown).

EXAMPLE 4

30

Identification of novel survivin-derived CTL epitopes with different HLA-A-restriction profiles

Summary

35

Novel HLA-A1-, HLA-A2-, HLA-A3- and HLA-A11-restricted survivin epitopes were characterised on the basis of CTL responses in cancer patients. These epitopes significantly increase the number of patients eligible for immunotherapy based on survivin-derived peptides. Additionally, the collective targeting of several restriction elements is likely to
40 decrease the risk of immune escape by HLA-allele loss.

Materials and Methods

Patients

Patient samples were received from the University of Würzburg, Germany and the University Hospital in Herlev, Denmark. Informed consent was obtained from the patients prior to any of these measures. Tissue typing was conducted at Department of Clinical Immunology, University Hospital, Copenhagen, Denmark. Peripheral blood lymphocytes (PBL) from cancer patients with melanoma, mamma carcinoma, and chronic lymphocytic leukemia (CLL) were isolated using Lymphoprep separation and frozen in fetal calf serum (FCS) with 10% dimethylsulphoxide. Furthermore, T lymphocytes from primary lesions and from tumor infiltrated lymph nodes from melanoma patients were obtained. Freshly resected tumor tissue was minced into small fragments, and crushed to release tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) for cryopreservation.

Peptides

All peptides were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and provided at >80% purity as verified by HPLC and MS analysis. All peptides used are listed in Table 4, Example 5 below.

Cell lines

The human T2 cell line is a TAP1 and TAP2 defective hybrid of the B-LCL.174 and the T-LCL CEM cells and thus only express low levels of HLA class I molecules (HLA-A*0201 and HLA-B*5101) at the cell surface. T2 cells transfected with HLA-A*0301 were kindly provided by Dr A McMichael, IMM, John Radcliffe Hospital, Oxford. T2 cells transfected with HLA-A*1101 were kindly provided by Dr M Masucci, MTC, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. The BM36.1 cell line is also defective in TAP function and has a similar phenotype as T2 with low expression of HLA class I (HLA-A*0101, HLA-B*3501) at the surface. The BM36.1 cells were kindly provided by Dr A Ziegler, Humboldt University, Berlin, Germany.

Assembly assay for peptide binding to MHC class I molecules

The binding affinity of synthetic peptides (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to HLA-A1, -A2, -A3, or -A11 molecules metabolically labeled with [³⁵S]-methionine was measured in the assembly assay, as described previously (12). The assay is based on peptide-mediated stabilization of empty HLA molecules released upon cell lysis, from the TAP-deficient cell lines. Stably folded HLA-molecules were immune-precipitated using the HLA class I-specific, conformation-dependent mAb W6/32, and separated by isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis. MHC heavy chain bands were quantified using the ImageGauge Phosphorimager program (FUJI photo film Co., Carrollton, TX, USA). The intensity of the band is proportional to the amount of peptide-bound class I MHC complex recovered during the assay. Subsequently, the extent of stabilization of the HLA-molecule is directly related to the binding affinity of the added peptide. The peptide concentration used to analyze the recovery of the HLA-molecules was 40, 4, 0.4, 0.04 μM for HLA-A1 and HLA-

A11, and 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μ M for HLA-A2 and HLA-A3. The C_{50} value was subsequently calculated for each peptide as the peptide concentration sufficient for half maximal stabilization.

Antigen stimulation of PBL

5

To extend the sensitivity of the ELISPOT assay, PBL were stimulated once *in vitro* prior to analysis. At day 0, PBL or crushed lymph nodes were thawed and plated as 2×10^6 cells in 2 ml/well in 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in x-vivo medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland), 5% heat-inactivated human serum, and 2 mM of L-glutamine in the presence of 10 μ M of peptide. Two days later 20 IU/ml recombinant interleukin-2 (IL-2) (Chiron, Ratingen, Germany) was added to the cultures. The cultured cells were tested for reactivity in the ELISPOT on day 10.

ELISPOT assay

15

The ELISPOT assay was used to quantify peptide epitope-specific interferon- γ releasing effector cells as previously described (16). Briefly, nitrocellulose bottomed 96-well plates (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedeusene, Denmark) were coated with anti-IFN- γ antibody (1-D1K, Mabtech, Nacka, Sweden). The wells were washed, blocked by X-vivo medium, and the cells were added in duplicates at different cell concentrations. The peptides were then added to each well and the plates were incubated overnight. The following day, media was discarded and the wells were washed prior to addition of biotinylated secondary antibody (7-B6-1-Biotin, Mabtech). The plates were incubated for 2 hours, washed, and avidin-alkaline phosphatase conjugate (Calbiochem, Life Technologies, Inc. San Diego, CA, USA) was added to each well. The plates were incubated at room temperature for one hour, washed, and the enzyme substrate NBT/BCIP (DakoCytomation Norden A/S, Glostrup, Denmark) was added to each well and incubated at RT for 5-10 min. Upon the emergence of dark purple spots, the reaction was terminated by washing with tap-water. The spots were counted using the ImmunoSpot® Series 2.0 Analyzer (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, US) and the peptide specific CTL frequency could be calculated from the numbers of spot-forming cells. All assays were performed in duplicates for each peptide antigen.

35 Results

Identification of HLA-A1 restricted survivin epitopes

Binding of survivin-derived peptides to HLA-A1

40

The amino acid sequence of the survivin protein was screened for the most probable HLA-A1 nonamer or deca-mer peptide epitopes, using the main HLA-A1 anchor residues, aspartic acid (D), glutamic acid (E) at position 3 and tyrosine (Y), phenylalanine (F) at the

C-terminus. Accordingly, six survivin-derived peptides were synthesized and examined for binding to HLA-A1 (table 4). Additionally, the two peptides Sur38-46 (MAEAGFIHC)(SEQ ID NO:23) and Sur47-56 (PTENEPDLAQ) (SEQ ID NO:25) was included, in spite they only contain one of the main anchors, since both were identified as possible good binders by the predictive algorithm by Rammensee et al. available at <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/>. C₅₀ values were estimated for each peptide as the peptide concentration needed for half maximal stabilization of HLA-A1 (table 4). However, only one of these peptides Sur92-101 (QFEELTLGEF) (SEQ ID NO:27) bound with almost similar high affinity as a known positive control epitope from the Influenza A protein, basic polymerase 1 (PB1) (VSDGGPNLY) as exemplified in figure 10. Sur93-101 (FEELTLGEF) (SEQ ID NO:24) had a low binding affinity for HLA-A1, whereas none of the other peptides analyzed bound to HLA-A1 (Table 4). Consequently, we synthesized a number of analogue peptides in which better anchor residues replaced the natural amino acids. We modified the two peptides Sur38-46 (MAEAGFIHC) (SEQ ID NO:23) and Sur47-56 (PTENEPDLAQ) (SEQ ID NO:25) introducing tyrosine (Y) instead of cysteine (C) or glutamine (Q) respectively at the C-terminus. Both of the modified peptides bound strongly to HLA-A1 (table 4). Additionally, we substituted the amino acids at position 2 with the auxiliary anchors threonine (T) or serine (S) in the two peptides Sur92-101 and Sur93-101. These modifications did not have a positive effect of the binding of Sur92-101 to HLA-A1. In contrast, the Sur93T2 (FTELTLGEF) (SEQ ID NO:36) bound with high affinity to HLA-A1 (Table 4). Figure 10 illustrates the binding of the native low affinity peptide Sur93-101, the high affinity modified peptide Sur93T2 and the non-binding peptide Sur49-58 as compared to the positive control epitope from influenza. Finally, we modified Sur14-22, Sur34-43, Sur49-58, Sur51-59, Sur92-101, and Sur93-101 with tyrosine (Y) at the C-terminus, however this did not improve binding affinity to HLA-A1 for any of these peptides (data not shown).

HLA-A1 restricted CTL responses against survivin-derived peptides in cancer patients

PBL from six melanoma patients and TIL from three melanoma patients were analyzed for the presence of CTL specific against any of the four high affinity survivin deduced peptides Sur38Y9, Sur47Y10, Sur92-101, and Sur93T2 by means of ELISPOT. T-cell reactivity against at least one of the survivin-derived peptides was observed in three PBL samples and one TIL sample from the total of nine patients analyzed. As seen in figure 11, PBL from one patient, Mel.A1-3 hosted a T-cell response against all four peptides, Sur38Y9, Sur47Y10, Sur92-101, and Sur93T2. Mel.A1-2 showed responses against Sur47Y10, Sur92-101 and Sur93T2, whereas in Mel.A1-1/TIL and Mel.A1-4/PBL responses were observed against Sur47Y10 and Sur93T2, respectively (figure 11).

In addition, ten melanoma patients were tested for immune reactivity against the native peptides Sur93-101, Sur38-46 and Sur47-56 by means of ELISPOT; however, no peptide-specific responses were detected in any of these patients (data not shown).

Identification of HLA-A11 restricted survivin epitopes

Binding of survivin-derived peptides to HLA-A11

The amino acid sequence of the survivin protein was screened for nonamer or deca-mer peptides with binding motifs corresponding to that of the HLA-A3 super-family, including HLA-A3 and HLA-A11. Peptide sequences with the main anchor residues, leucine (L) in position 2 and lysine (K) at the C-terminus, were chosen together with peptide sequences having related amino acids at these positions according to the predictive algorithm by Rammensee et al. (table 4).

Thirteen peptides were predicted from the protein sequence of survivin and analyzed for binding to HLA-A11 and HLA-A3. Three of these peptides, Sur53-62 (DLAQCFFCFK) (SEQ ID NO:47), Sur54-62 (LAQCFFCFK) (SEQ ID NO:42) and Sur112-120 (KIAKETNNK) (SEQ ID NO:44) bound HLA-A11 with high affinity, comparable to the viral epitope from EBV nuclear antigen 4 (AVFDRKSDAK) (SEQ ID NO:63). In addition, one peptide, Sur112-121 (KIAKETNNKK) (SEQ ID NO:51) bound weakly to HLA-A11 (Table 4).

15 *HLA-A11 restricted CTL responses against survivin-derived peptides in cancer patients*

PBL from five melanoma patients and two CLL patients were tested for T-cell reactivity against the four HLA-A11 binding peptides Sur53-62; Sur54-62, Sur112-120, and Sur112-121. We were able to detect responses against the survivin-derived peptide Sur53-62 in PBL from two of the melanoma patients, Mel.A11-1, Mel.A11-2, by means of ELISPOT (figure 12). Additionally, we were able to detect Sur53-62 specific T-cells among tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from a tumor infiltrated lymph node in patient Mel.A11-2 (figure 12). In the patient Mel.A11-1 a strong immune response against the survivin peptide Sur53-62 was observed in five different blood samples taken over a period of two years (data not shown).

Identification of HLA-A3 restricted survivin epitopes

Binding of survivin-derived peptides to HLA-A3

30

The survivin-derived peptides predicted for binding to the HLA-A3 super-family were additionally analyzed for the binding to HLA-A3. Only two of the peptides Sur112-120 (KIAKETNNK) (SEQ ID NO:44) and Sur112-121 (KIAKETNNKK) (SEQ ID NO:57) bound HLA-A3 with high affinity, similar to the viral epitope, Influenza A nucleoprotein 265-273 (ILRGSAVHK) (SEQ ID NO:74) (Table 4). Furthermore, two peptides Sur53-62 (DLAQCFFCFK) (SEQ ID NO:47) and Sur95-103 (ELTLGEFLK) (SEQ ID NO:43) bound weakly to HLA-A3.

Some of the peptides with no detectable binding were modified in an attempt to increase the binding affinity for HLA-A3. Thus, we synthesized two analogue peptides of Sur54-62 and Sur113-122 in which a better anchor residue leucine (L) replaced the natural alanine (A) at position 2. Sur54L2 (LLQCFFCFK) (SEQ ID NO:56) bound HLA-A3 with high affinity, whereas Sur113L2 (ILKETNNKKK) (SEQ ID NO:59) only bound weakly (Table 4). In addition, we synthesized four analogue peptides of Sur5-13, Sur13-22, Sur18-27, and

Sur53-61 in which the better anchor residue lysine (K) replaced the natural phenylalanine (F) at the C-terminus. Sur5K9 (TLPPAWQPK) (SEQ ID NO:54) and Sur18K10 (RISTFKNWPCK) (SEQ ID NO:58) bound to HLA-A3 with high affinity, whereas the substitutions had no detectable effect on the binding to HLA-A3 of Sur13K9 (FLKDHRISTK) (SEQ ID NO:57) and Sur53K9 (DLAQCFCK) (SEQ ID NO:55) compared to the native analogues.

HLA-A3 restricted CTL responses against survivin-derived peptides in cancer patients

10 Nine samples from melanoma patients (five PBL and four TIL) were analyzed for immune reactivity against the two native high affinity HLA-A3 binding peptides Sur112-120 and Sur112-121, as well as the two native, weak binding peptides Sur53-62 and Sur95-103. However, no immune responses against these peptides could be detected by ELISPOT in any of the patients. Subsequently, the same patients were analyzed for spontaneous
15 immune reactivity against the three high affinity, modified survivin-derived peptides, Sur5K9, Sur18K10, and Sur54L2. CTL reactivity was detected against Sur18K10 in TIL samples from three patients, Mel.A3-1, Mel.A3-2, Mel.A3-3 (figure 13). No responses were detected against the two other peptides, Sur5K9 and Sur54L2. To further verify these responses, PBL from additional eighteen melanoma patients were analyzed for CTL
20 reactivity against Sur18K10. Three responding patients, Mel.A3-4, Mel.A3-5, and Mel.A3-6, were found among these, resulting in a total of six responding patients among the twenty-seven patients analyzed (figure 13).

Identification of a novel HLA-A2 restricted survivin epitope

25

Binding of 11-mer survivin-derived peptides to HLA-A2

The amino acid sequence of the survivin protein was screened for the most probable HLA-A2 11-mer peptide epitopes, using the main HLA-A2 specific anchor residues. Six survivin
30 deduced peptides were synthesized and examined for binding to HLA-A2. None of the peptides examined bound with similar high affinity as a known positive control epitope from Epstein-Barr virus BMLF₂₈₀₋₂₈₈ peptide (GLCTLVAML) (SEQ ID NO:72) (Table 4). The peptide concentration required for half maximal recovery of HLA-A2 (C_{50} value) was 0.9 μ M for the positive control. In comparison, the peptides Sur18-28 (RISTFKNWPFL) (SEQ ID
35 NO:67) and Sur86-96 (FLSVKKQFEEL) (SEQ ID NO:69) bound weakly to HLA-A2 (C_{50} = 69 μ M and 72 μ M respectively). However, the two known HLA-A2-restricted survivin epitopes bound in a similar way weakly to HLA-A2; Sur95-104 (ELTLGEFLKL) (SEQ ID NO:43) bound with intermediate affinity (C_{50} = 10 μ M) whereas Sur96-104 (LTLGEFLKL) (SEQ ID
40 NO:10) bound only weakly (C_{50} >100 μ M). The remaining four 11-mer peptides examined (Sur4-14 (PTLPPAWQPFL) (SEQ ID NO:66), Sur54-64 (LAQCFFCFKEL) (SEQ ID NO:68), Sur88-98 (SVKKQFEELTL) (SEQ ID NO:70), and Sur103-113 (KLDREKAKNKI) (SEQ ID NO:74)) did not bind to HLA-A2.

HLA-A2 restricted CTL responses against survivin-derived peptides in cancer patients

PBL from ten cancer patients (two melanoma (Mel), six CLL (CLL), and two mamma carcinoma (MC) patients) was initially analyzed to investigate whether the two weak binding 11mer peptides, Sur18-28 and Sur86-96 were presented by HLA-A2 and
 5 recognized by the immune system of cancer patients. CTL responses against Sur18-28 were found in PBL from two of the ten patients analyzed (CLL-1, CLL-2, figure 14), whereas no responses could be detected against Sur86-96 (data not shown). To further verify these Sur18-28 specific responses, PBL from additional twelve patients (seven melanoma, one CLL, and four mamma carcinoma patients) were analyzed for CTL
 10 reactivity against this peptide. Among these, four patients (CLL-3, MC-1, MC-2, Mel.A2-1) had Sur18-28 specific immune activity detectable by ELISPOT (Figure 14). Thus, altogether PBL from six out of twenty-two patients analyzed hosted a CTL response against Sur18-28.

15 Identification of HLA-B7 restricted survivin epitopes

Binding of survivin derived peptides to HLA-B7

The amino acid sequence of the survivin protein was screened for peptides of nine to ten
 20 amino acids, with anchor residues according to the peptide binding motif of HLA-B7. Five peptides were selected and analyzed for their ability to stabilize HLA-B7 in the assembly assay. C_{50} values were estimated for each peptide as the peptide concentration needed for half maximal stabilization of HLA-B7 (table 4). Two survivin-derived peptides, sur6-14 (LPPAWQPFL) (SEQ ID NO:18) and sur11-19 (QPFLKDHRI) (SEQ ID NO:19) stabilized HLA-
 25 B7 weakly, with C_{50} values above 100 μ M; whereas sur46-54 (CPTENEPDL) (SEQ ID NO:6), sur51-59 (EPDLAQCF) (SEQ ID NO:7), and sur34-43 (TPERMAEAGF) (SEQ ID NO:20) did not bind to HLA-B7 (table 4).

HLA-B7 restricted CTL responses against survivin derived peptides in cancer patients

30 HLA-B7 positive PBL from five melanoma patients (mel25, mel26, mel3, mel6, mel39), two CLL patients (CLL1, CLL54) and 2 breast cancer patients (breast11, breast 15) were tested for T-cell reactivity against the weak HLA-B7 binding peptides sur6-14 (LPPAWQPFL) (SEQ ID NO:18) and sur11-19 (QPFLKDHRI) (SEQ ID NO:19). We were able to detect a strong
 35 spontaneous CTL response against the survivin derived peptide sur6-14 in PBL in a CLL patient and in a breast cancer patient (figure 15). Additionally, we were able to detect a weak response against this peptide in the melanoma patient mel3 (figure 15).

40 Summary of HLA allele-restricted immune responses to survivin-derived peptides in cancer patients

A range of survivin-derived peptides comprising 9-11 amino acid residues were tested for binding to the following HLA alleles: HLA-A1, HLA-A3, HLA-A11 and HLA-B7 using the as-

sembly assay for peptide binding to MHC class I molecules described in the preceding examples. In addition, several of the peptides were tested for their capacity to elicit a CTL immune response using the ELISPOT assay as also described above.

- 5 A summary of the results, including results obtained in the previous examples, are given in the below Table 4:

Table 4. C_{50} and ELISPOT data for selected survivin-derived peptides

HLA allele	Peptide length	Position	Sequence	C_{50} (μ M)	Remarks	SEQ ID NO:	Footnotes
HLA-A1	9mer	Sur14-22	LKDHRISTF	NB		22	
		Sur51-59	EPDLAQCF	NB		7	
		Sur38-46	MAEAGFIHC	NB		23	
		Sur93-101	FEELTLGEF	>100		24	
	10mer	Sur34-43	TPERMAEAGF	NB		20	
		Sur47-56	PTENEPDLAQ	NB		25	
		Sur49-58	ENEPDLAQCF	NB		26	
		Sur92-101	QFEELTLGEF	2		27	
	Control peptide	C1	VSDGGPNLY	0.8		28	
	Modified peptides	sur14Y9	LKDHRISTY	NB		29	
		sur51Y9	EPDLAQCFY		Weak binding	9	
		sur93Y9	FEELTLGEY	NB		30	
		sur92Y9	QFEELTLGEY	NB		31	
		sur34Y9	TPERMAEAGY	NB		32	
		sur49Y9	ENEPDLAQCY	NB		33	
		Sur92T2	QTEELTLGEF	2		34	
		Sur92S2	QSEELTLGEF	100		35	
		Sur93T2	FTEELTLGEF	1		36	
		Sur93S2	FSELTLGEF	30		37	
		Sur38Y9	MAEAGFIHY	0.8		38	
		Sur47Y10	PTENEPDLAY	0.4		39	
HLA-A2		Sur4-14	PTLPPAWQPFL	NB		66	
		Sur18-28	RISTFKNWPFL	69		67	
		Sur54-64	LAQCFFCFKEL	NB		68	
		Sur86-96	FLSVKKQFEEL	72		69	
		Sur88-98	SVKKQFEELTL	NB		70	
		Sur103-113	KLDRERAKNKI	NB		71	
	Control peptide	EBV,BMLF1	GLCTLVAML	3		72	

		HIV, Pol	ILKEPVHGV	0.2		73	
HLA-A3	9mer	Sur 5-13	TLPPAWQPF	NB		40	
		Sur 53-61	DLAQCFFCF	NB		41	
		Sur 54-62	LAQCFFCFK	NB		42	
		Sur 95-103	ELTLGEFLK	>100		43	
		Sur 112-120	KIAKETNNK	2		44	i
	10mer	Sur 13-22	FLKDHRISTF	NB		45	
		Sur 18-27	RISTFKNWPF	NB		46	
		Sur 53-62	DLAQCFFCFK	100		47	ii
		Sur 84-93	CAFLSVKKQF	NB		48	
		Sur 101-110	FLKLDREKAK	NB		49	
		Sur 103-112	KLDREKAKNK	NB		50	
		Sur 112-121	KIAKETNNKK	1		51	
		Sur 113-122	IAKETNNKKK	NB		52	
	Control peptide	C3	ILRGSAHK	0.1-0.3		53	
	Modified peptides	Sur5K9	TLPPAWQPK	2		54	
		Sur53K9	DLAQCFFCK	NB		55	
		Sur54L2	LLQCFFCFK	1		56	
		Sur13K9	FLKDHRISTK	NB		57	
		Sur18K10	RISTFKNWPK	0.02		58	
		Sur113L2	ILKETNNKKK	>100		59	
		SurEx3-A3-1	TIRRNLRK	0.5		60	iii
		SurEx3-A3-2	PTIRRNLRK	NB		61	
		Sur2b-A3-1	RITREEHKK	NB		62	
	Control peptide	Influenza A, nucleoprotein 265-273	ILRGSAHK	0.1		74	
HLA-A11	9mer	Sur 5-13	TLPPAWQPF	NB		40	
		Sur 53-61	DLAQCFFCF	NB		41	
		Sur 54-62	LAQCFFCFK	0.4		42	
		Sur 95-103	ELTLGEFLK	NB		43	
		Sur 112-120	KIAKETNNK	1		44	
	10mer	Sur 13-22	FLKDHRISTF	NB		45	
		Sur 18-27	RISTFKNWPF	NB		46	
		Sur 53-62	DLAQCFFCFK	5		47	
		Sur 84-93	CAFLSVKKQF	NB		48	
		Sur 101-110	FLKLDREKAK	NB		49	
		Sur 103-112	KLDREKAKNK	NB		50	
		Sur 112-121	KIAKETNNKK	>100		51	iv

		Sur 113-122	IAKETNNKKK	NB		52	
	Control peptide	C4	AVFDRKSDAK	0.2		63	
HLA-B7	9mer	Sur 6-14	LPPAWQPFL	>100		18	v
		Sur 11-19	QPFLKDHRI	>100		19	
		Sur 46-54	CPTENEPDL	NB		6	
		Sur 51-59	EPDLAQCFE	NB		7	
	10mer	Sur 34-43	TPERMAEAGF	NB		20	
	Control peptides	C6	QPRAPIRPI	0.1		64	
		C7	RPPIFIRRL	0.5		65	

ⁱAn response was observed against the peptide Sur112-120 in one lymphoma patient (HEM34) by means of ELISPOT. ⁱⁱResponses were detected against the peptide Sur53-62 in 3 lymphoma patients (HEM9, 11, 34) by means of ELISPOT. ^{iv}A weak response was observed in a melanoma patient (FM-TIL95) by means of ELISPOT. ^{vii}A response was observed against Sur112-121 in a melanoma patient (PM6), most evident in metastatic lymph-node suspension, and weaker in the TIL from primary tumor and PBL by means of ELISPOT.

^{viii}An response against the peptide Sur6-14 was observed in a CLL patient (CLL9), and a weaker response was observed in a lymphoma patient by means of elispot (HEM 21) (data not shown).

EXAMPLE 5

15

Therapeutic trial procedures using survivin-derived peptides as immunogens

Summary

20 Five heavily pretreated stage IV melanoma patients were vaccinated with the modified HLA-A2-restricted survivin epitope, namely the sur1M2 peptide, presented by autologous dendritic cells in a compassionate use setting. Four of the patients mounted strong T-cell response to this epitope as measured by ELISPOT assay. Furthermore, in situ peptide/HLA-A2 multimer staining revealed the infiltration of survivin reactive cells into both visceral and soft tissue metastases. Notably, vaccination associated toxicity was not observed. The data demonstrate that it is feasible to induce T-cell response against survivin, even in late stage melanoma patients, and that these vaccinations are well tolerated.

25

Materials and Methods

30

Patient eligibility criteria and treatment regimen

All clinical procedures were in accordance with the Declaration of Helsinki and all patients provided informed consent prior to therapy. Stage IV cutaneous or uveal melanoma patients were eligible when their disease was progressive despite at least two different chemo-, immuno, or chemoimmunotherapies. In addition, a patients had to be 18 years or
 5 older, express HLA*0201, and suffer from measurable disease validated by cranial, thoracic and abdominal computed tomography scans. Patients' Karnofsky Index had to be 60% or better. No systemic chemo-, and/or immunotherapy was allowed within 4 week prior to vaccination. Important exclusion criteria were evidence of CNS metastases, active autoimmune or infectious diseases, pregnancy and lactation, as well as significant
 10 psychiatric abnormality. Peptide pulsed dendritic cells were generated as previously described (82). Briefly, PBMCs from leukapheresis were isolated on LymphoprepTM (Nycomed Pharma), frozen in aliquots and stored in liquid nitrogen. One week prior to vaccination, PBMCs were thawed, washed and cultured in medium containing gentamycin, glutamine and heat inactivated autologous plasma. On day 1 and 5, IL-4 and GM-CSF were
 15 added. To differentiate mature DCs, TNF- γ and prostaglandin E2 were added on day 6. On day 7, cells displaying phenotypical and morphological characteristics of mature DCs, i.e. a veiled appearance and = 75% CD83 expression, were pulsed with a modified survivin-derived HLA-A2 restricted survivin₉₆₋₁₀₄ epitope, LMLGEFLKL (SEQ ID NO 10)(Clinalfa, Switzerland)14. Cells were only used for vaccination if microbial tests of samples taken
 20 from cultures on days 1 and 5 proved to be sterile.

Patients were vaccinated at 7-day intervals for the first two vaccinations followed by 28-day intervals for further vaccinations. A total of $10\text{--}20 \times 10^6$ mature, survivin₉₆₋₁₀₄ pulsed DCs were resuspended in PBS, containing 1% human serum albumin, and injected
 25 intradermally in aliquots of 1.5×10^6 DCs per injection site in the ventromedial regions of the thighs close to the regional lymph nodes. Limbs where draining lymph nodes had been removed and/or irradiated were excluded. Leukapheresis was repeated after 5 vaccinations in absence of severe deterioration of patient's state of health or occurrence of CNS metastases.

30

Measurement of clinical and immunological responses

CT scans were performed prior to vaccination and every three months thereafter or in case of severe clinical signs of disease progression. Immunological responses were monitored
 35 by the ELISPOT assay, using PBMCs obtained every three months, to detect survivin₉₆₋₁₀₄ specific IFN- γ release. To extend the sensitivity of the ELISPOT assay, PBMCs were stimulated once *in vitro* at a concentration of 1×10^6 cells per ml in 24-well plates (Nunc, Denmark) in X-vivo medium (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland), supplemented with 5% heat-inactivated human serum and 2 mM of L-glutamine in the presence of 10 μ M of
 40 peptide. Two days later, 40 IU/ml recombinant interleukin-2 (IL-2) (Chiron, Ratingen, Germany) were added. After 10 days the cells were tested for reactivity. To this end, nitrocellulose bottomed 96-well plates (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Glostrup, Denmark) were coated with an anti-IFN- γ antibody (1-D1K, Mabtech, Sweden). Lymphocytes were added at $10^4 - 10^5$ cells in 200 μ l X-vivo medium per well together with

10⁴ T2-cells and the relevant peptides at a final concentration of 2 µM. After an overnight incubation at 37°C and two washes, the biotinylated detection antibody (7-B6-1-Biotin, Mabtech, Sweden) was added; its specific binding was visualised using alkaline phosphatase-avidin together with the respective substrate (GibcoBRL). The reaction was
 5 terminated upon the appearance of dark purple spots, which were quantitated using the AlphaImager System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

Survivin₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 reactive CD8+ T lymphocytes were also tracked *in situ* both at the vaccination sites as well as in visceral, soft tissue, or cutaneous metastases by means
 10 of multimeric survivin₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 complexes. Vaccination sites were excised 24 h after intradermal injection in all patients, whereas metastatic lesions were only removed in selected patients, if easily accessible (patients KN and GB), or removed during a curative intent (patient WW). The staining procedure for multimeric peptide/MHC complexes has been described recently (68). The multimeric survivin₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 complexes were
 15 generated by introduction of a recognition site for enzymatic biotinylation at the 5' end of the extracellular domains of HLA-A*0201 (residues 1-275). The recombinant protein was purified by size-exclusion (Sephadex G25, Pharmacia, Erlangen, Germany) and ionexchange (mono-Q, Pharmacia) chromatography and folded *in vitro* by dilution in presence of the respective peptides and β2-microglobulin. After gel filtration on a
 20 Sephadex G25 column, the protein was multimerized with streptavidin-FITC conjugated to dextran molecules (kindly provided by L. Winther, DAKO, Copenhagen, Denmark) to generate multivalent HLA-dextran complexes. Cryopreserved sections of the respective samples were dried over-night and subsequently fixed in cold acetone for 5 min. All incubation steps were performed in the dark at room temperature as follows: (i) 45 min of
 25 an anti-CD8 antibody (1:100, clone HIT8a, Pharmingen, San Diego, CA), (ii) Cy3-conjugated goat antimouse (1:500 diluted; code 115-165-100, Dianova, Hamburg, Germany) for 45 min and finally (iii) the multimers for 75 min. Between each step the slides were washed twice for 10 min in PBS/BSA 0.1%. Finally, slides were mounted in vectashield and observed under a Leica Confocal Microscope (TCS 4D, Leica, Mannheim,
 30 Germany).

Results

Patient characteristics, toxicity and clinical course

35 Five far-advanced stage IV melanoma patients were enrolled, two suffering from uveal melanoma, one from soft tissue melanoma and the remaining two from cutaneous melanoma. Due to the manifestation of symptomatic brain metastases, one patient was taken off therapy after only two vaccinations. The other four patients received up to 15
 40 vaccinations. One patient died from cardiac arrest in tumor free status after surgical resection of remaining metastases. Another patient was taken off therapy after 10 vaccinations because of appearance of visceral metastases (RW). One patient remained on study after 15 vaccinations. Detailed patient characteristics, previous therapy, number of vaccinations and survival status are summarized in table 5.

No major toxicities occurred. Thus, hemoglobin, leucocytes and thrombocytes, as well as lactate dehydrogenase, creatinine and cholinesterase were not influenced by the vaccination therapy (Fig. 16). No signs of systemic or local toxicity were observed at the injection sites. Furthermore, there was no detection of impaired wound healing, hemorrhagic disorders, cardiac dysfunction, vasculitis or inflammatory bowel disease. In one patient (WW), pre-existing liver metastases could be stabilized under vaccination therapy, but a new adrenal metastasis still occurred. Unfortunately, this patient died due to cardiac arrest, even though tumor-free after curative surgery. A brain metastasis was detected in patient PB only 4 weeks after initiation of vaccination. Therefore, this patient had to be excluded from further vaccinations after only two DC injections. The other three patients demonstrated slow progression of metastatic disease without substantial impairment in their general state of health. Remarkably, for patient KN, an overall survival of 13 months (from vaccination start to death) could be achieved despite a heavy metastatic load and fast disease progression at the start of vaccination. Patient GB remained on protocol 14 months after initiation of vaccination with survivin-peptide pulsed DCs. It should be noted, however, that both patients (RW and GB) received additional localized treatment for tumor control, either radiation of subcutaneous tumors (RW) or local chemotherapy (GB).

Survivin-specific CD8+ T cell responses

To monitor the kinetics of cytotoxic T cell responses, PBMCs obtained prior to and three months after vaccination were tested for reactivity to the modified survivin₉₆₋₁₀₄ epitope by ELISPOT for IFN- γ . Before analysis, PBMCs were stimulated once *in vitro* to extend the sensitivity of this assay. In all four patients tested, an induction of survivin₉₆₋₁₀₄ reactive T cells was evident (Fig. 17). Analysis for reactivity to other HLA-A*0201 restricted survivin peptides, i.e. the non-modified survivin₉₆₋₁₀₄ and the adjacent Sur9 epitope, demonstrated a T cell response against these peptides in two of the patients (KN and RW)(data not shown).

The prognostic and clinical value of measurements of tumor-specific T-cell responses in peripheral blood has been questioned repeatedly; thus, we also tested for the presence of survivin₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 reactive CD8+ T lymphocytes among tumor infiltrating lymphocytes in situ by peptide/MHC multimer staining. To validate the method, we first analyzed tissue samples from delayed type hypersensitivity reactions occurring at the vaccination site within 24 hrs. This analysis confirmed earlier observations that intradermal injections of peptide-pulsed DC induce a strong peptide-specific inflammatory T-cell infiltrate. Subsequently, the peptide/MHC multimer staining procedure was applied on soft tissue and visceral metastases, which revealed the presence of survivin₉₆₋₁₀₄/HLA-A*0201 reactive cells among the CD8+ infiltrate. This observation suggests that the vaccination does not only induce T cell with the desired specificity, but also endows them with the necessary homing capacity.

Table 5. Summary of vaccination trials: patient characteristics

Patient ID	Age/ Sex	Time from primary tumor to stage IV	Previous therapy	Measurable disease	Clinical outcome	No. of vaccinations	Survival after first vaccination*
GB	40/female	4 years, 8 months	LITT, fotemustine/IL- 2IFN α , treosulfan/gemcitabi ne	liver	PD (slow growth of pre-existing and new hepatic lesions, new pancreas and pleural metastases)	15	+14 months
KN	53/ male	11 years	IL-2IFN α /histamine, fotemustine, treosulfan/gemcitabi ne	liver, kidney, soft tissue, bone	PD (slow growth of pre-existing lesions, new lymph node, pleural and mediastinal lesions)	13	13 months
WW	73/male	14 months	surgery,DC- vaccination, decarbazine	liver	PD (stable hepatic, but new adrenal metastasis)	12	12 months due post- surgical stroke
RW	72/male	16 years	surgery,radiotherapy ,adriablastin/ifosfamid ,ixoten,decarbazine, TNF/melphalan	soft tissue	PD (growth of pre- existing and new soft tissue metastases; detection of heart, lung and muscle metastases after 12 vaccinations)	12	+12 months
PB	52/male	2 years, 3 months	radiotherapy	lung, kidney	PD (new skin and brain metastases)	2	4 months

REFERENCES

1. Van den Eynde, B. J. and Boon, T. Tumor antigens recognized by T lymphocytes.
5 Int.J.Clin.Lab.Res., 27: 81-86, 1997.
2. Rosenberg, S. A. Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. J.Natl.Cancer Inst., 20;88: 1635-1644, 1996.
- 10 3. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Burlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P., and Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA- A1. Int.J.Cancer, 80: 219-230, 1999.
15
4. Brossart, P., Stuhler, G., Flad, T., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific
20 cytotoxic T lymphocytes. Cancer Res., 58: 732-736, 1998.
5. Brossart, P., Heinrich, K. S., Stuhler, G., Behnke, L., Reichardt, V. L., Stevanovic, S., Muhm, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., and Brugger, W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. Blood, 93: 4309-4317, 1999.
25
6. Vonderheide, R. H., Hahn, W. C., Schultze, J. L., and Nadler, L. M. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity., 10: 673-679, 1999.
30
7. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene, 17: 3247-3259, 1998.
8. Altieri, D. C., Marchisio, P. C., and Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. Lab Invest, 79: 1327-1333, 1999.
35
9. Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., and Altieri, D. C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. J.Biol.Chem., 273: 11177-11182, 1998.
10. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. J.Invest Dermatol., 113: 1076-1081, 1999.
40

11. Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest*, 79: 1121-1126, 1999.
- 5 12. Andersen, M. H., Sondergaard, I., Zeuthen, J., Elliott, T., and Haurum, J. S. An assay for peptide binding to HLA-Cw*0102. *Tissue Antigens*, 54: 185-190, 1999.
13. Andersen, M. H., Bonfill, J. E., Neisig, A., Arsequell, G., ndergaard, I., Neefjes, J., Zeuthen, J., Elliott, T., and Haurum, J. S. Phosphorylated Peptides Can Be Transported by
 10 TAP Molecules, Presented by Class I MHC Molecules, and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL. *J.Immunol.*, 163: 3812-3818, 1999.
14. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., Winkelhake, J., and Spack, E. G. A sensitive ELISPOT
 15 assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J.Immunol.Methods*, 210: 149-166, 1997.
15. Pass, H. A., Schwarz, S. L., Wunderlich, J. R., and Rosenberg, S. A. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT as-
 20 say. *Cancer J.Sci.Am.*, 4: 316-323, 1998.
16. Berke, Z., Andersen, M. H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., and Haurum, J. S. Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*, 14: 419-426, 2000.
 25
17. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.
- 30 18. Cornelison, T. L. Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment. *Curr.Opin.Oncol.*, 12: 466-473, 2000.
19. Lee, S. P., Chan, A. T., Cheung, S. T., Thomas, W. A., CroomCarter, D., Dawson, C. W., Tsai, C. H., Leung, S. F., Johnson, P. J., and Huang, D. P. CTL control of EBV in naso-
 35 pharyngeal carcinoma (NPC): EBV-specific CTL responses in the blood and tumors of NPC patients and the antigen-processing function of the tumor cells. *J.Immunol.*, 165: 573-582, 2000.
20. Swana, H. S., Grossman, D., Anthony, J. N., Weiss, R. M., and Altieri, D. C. Tumor
 40 content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N.Engl.J.Med.*, 341: 452-453, 1999.
21. Salgaller, M. L., Afshar, A., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Kawakami, Y., and Rosenberg, S. A. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by pe-

ripheral blood lymphocytes stimulated in vitro with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 55: 4972-4979, 1995.

22. Salgaller, M. L., Marincola, F. M., Cormier, J. N., and Rosenberg, S. A. Immunization
5 against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization
with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.
23. Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., and Romero, P. Enhanced generation of specific
10 tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J.Immunol.*, 160: 1750-1758, 1998.
24. Pardoll, D. M. Cancer vaccines. *Nat.Med.*, 4: 525-531, 1998.
- 15 25. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C. A., Becker, V., Gross, A. J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G. A., and Ringert, R. H. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat.Med.*, 6: 332-336, 2000.
- 20 26. Becker, J. C., Guldberg, P., Zeuthen, J., Bröcker, E. B., and thor Straten, P. Accumulation of identical T cells in melanoma and vitiligo-like leukoderma. *J.Invest.Dermatol.*, 113: 1033-1038, 1999.
27. Rohayem, J., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Oehmichen, A., Schmitz, M., Mehlhorn, J.,
25 Conrad, K., and Rieber, E. P. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.*2000.Apr.1.;60.(7.):1815.-7., 60: 1815-1817.
28. Adida, C., Haioun, C., Gaulard, P., Lepage, E., Morel, P., Briere, J., Dombret, H.,
30 Reyes, F., Diebold, J., Gisselbrecht, C., Salles, G., Altieri, D. C., and Molina, T. J. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 96: 1921-1925, 2000.
29. Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y., and Nakagawara, A. High expression of
35 Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, 19: 617-623, 2000.
30. Kawasaki, H., Altieri, D. C., Lu, C. D., Toyoda, M., Tenjo, T., and Tanigawa, N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer*
40 *Res.*, 58: 5071-5074, 1998.
31. Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanovic, S., Ockert, D., Rammensee, H. G., and Rieber, E. P. Generation of survivin-specific CD8+ T

effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.*, 60: 4845-4849, 2000.

32. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Becker, J. C., and thor Straten, P. Identification of a
5 Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Pa-
tients. *Cancer Res.*, 61: 869-872, 2001.

33. Lee, K. H., Panelli, M. C., Kim, C. J., Riker, A. I., Bettinotti, M. P., Roden, M. M.,
Fetsch, P., Abati, A., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. Functional dissociation be-
10 tween local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination.
J.Immunol., 161: 4183-4194, 1998.

34. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzenuber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M.,
Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J.
15 R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. Immu-
nologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of pa-
tients with metastatic melanoma. *Nat.Med.*, 4: 321-327, 1998.

35. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer Williams, M. G.,
20 Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lym-
phocytes. *Science*, 274: 94-96, 1996.

36. Schrama, D., Andersen, M. H., Terheyden, P., Schroder, L., Pedersen, L. O., thor
Straten, P., and Becker, J. C. Oligoclonal T-Cell Receptor Usage Of Melanocyte Differentia-
25 tion Antigen-reactive T Cells in Stage IV Melanoma Patients. *Cancer Res.*, 61: 493-496,
2001.

37. Luxembourg, A. T., Borrow, P., Teyton, L., Brunmark, A. B., Peterson, P. A., and Jack-
son, M. R. Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+ T cells usable in immunotherapy.
30 *Nat.Biotechnol.*, 16: 281-285, 1998.

38. Kirkin, A. F., Reichert Petersen, T., Olsen, A. C., Li, L., thor Straten, P., and Zeuthen,
J. Generation of human-melanoma specific T lymphocyte clones defining novel cytolytic
targets with panels of newly established melanoma cell lines. *Cancer Immu-
35 nol.Immunother.*, 41: 71-81, 1995.

39. Scheibenbogen, C., Lee, K. H., Mayer, S., Stevanovic, S., Moebius, U., Herr, W.,
Rammensee, H. G., and Keilholz, U. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T
lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza pro-
40 teins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin.Cancer Res.*, 3: 221-226,
1997.

40. thor Straten, P., Guldberg, P., Grønbæk, K., Zeuthen, J., and Becker, J. C. In Situ T-Cell Responses against Melanoma Comprise High Numbers of Locally Expanded T-Cell Clonotypes. *J.Immunol.*, 163: 443-447, 1999.
- 5 41. Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Wouter, D. J., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J.Exp.Med.*, 193: 73-88, 2001.
- 10 42. de Vries, T. J., Fourkour, A., Wobbles, T., Verkroost, G., Ruiter, D. J., and van Muijen, G. N. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res.*, 57: 3223-3229, 1997.
- 15 43. Jager, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., and Knuth, A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int.J.Cancer*, 66: 470-476, 1996.
- 20 44. Cormier, J. N., Abati, A., Fetsch, P., Hijazi, Y. M., Rosenberg, S. A., Marincola, F. M., and Topalian, S. L. Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J.Immunother.*, 21: 27-31, 1998.
- 25 45. Riker, A., Cormier, J., Panelli, M., Kammula, U., Wang, E., Abati, A., Fetsch, P., Lee, K. H., Steinberg, S., Rosenberg, S., and Marincola, F. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery*, 126: 112-120, 1999.
- 30 46. Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W. J., and Lotze, M. T. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J.Clin.Invest*, 98: 1633-1641, 1996.
- 35 47. Grossman, D., Kim, P. J., Schechner, J. S., and Altieri, D. C. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98: 635-640, 2001.
- 40 48. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58: 5315-5320, 1998.
49. Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J. J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A., and Abad, A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of sur-

- vivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J.Clin.Oncol.*, 17: 2100-2104, 1999.
50. Nakagawara, A. Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of
5 neurotrophic signals and genetic abnormalities. *Hum.Cell*, 11: 115-124, 1998.
51. Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F., and Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother.*, 50: 3-15, 2001.
- 10 52. Melief, C. J., Toes, R. E., Medema, J. P., van der Burg, S. H., Ossendorp, F., and Ofringa, R. Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv.Immunol.*, 75:235-82.: 235-282, 2000.
53. Gilboa, E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity.*, 11: 263-270, 1999.
15
54. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 396: 580-584, 1998.
- 20 55. Zaffaroni, N. and Daidone, M. G. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist.Updat.*, 5: 65-72, 2002.
56. Shinozawa, I., Inokuchi, K., Wakabayashi, I., and Dan, K. Disturbed expression of the
25 anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk.Res*, 24: 965-970, 2000.
57. Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L., Piccoli, P., Chilosi, M., and Caligaris-Cappio, F. Survivin is expressed on CD40 stimulation
30 and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 97: 2777-2783, 2001.
58. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat.Med.*, 3: 917-921, 1997.
- 35 59. Altieri, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 46-54, 2003.
60. Olie, R. A., Simoes-Wust, A. P., Baumann, B., Leech, S. H., Fabbro, D., Stahel, R. A., and Zangemeister-Wittke, U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*, 60: 2805-2809, 2000.
40
61. Andersen, M. H. and Straten, P. Survivin--a universal tumor antigen. *Histol.Histopathol.*, 17: 669-675, 2002.

62. Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., Bröcker, E. B., Becker, J. C., and thor, S. P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res*, 61: 5964-5 5968, 2001.
63. Currier, J. R., Kuta, E. G., Turk, E., Earhart, L. B., Loomis-Price, L., Janetzki, S., Ferrari, G., Birx, D. L., and Cox, J. H. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J.Immunol.Methods*, 260: 157-172, 10 2002.
64. Elvin, J., Potter, C., Elliott, T., Cerundolo, V., and Townsend, A. A method to quantify binding of unlabeled peptides to class I MHC molecules and detect their allele specificity. *J Immunol Methods*, 158: 161-171, 1993. 15
65. Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M., and Sette, A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74: 929-937, 1993.
66. thor Straten, P., Barfoed, A., Seremet, T., Saeterdal, I., Zeuthen, J., and Guldberg, P. Detection and characterization of alpha-beta-T-cell clonality by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Biotechniques*, 25: 244-250, 1998. 20
67. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., and Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, 50: 213-219, 25 1999.
68. Schrama, D., Pedersen Ls, L. O., Keikavoussi, P., Andersen, M. H., Straten, P. P., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Becker, J. C. Aggregation of antigen-specific T cells at 30 the inoculation site of mature dendritic cells. *J.Invest Dermatol.*, 119: 1443-1448, 2002.
69. Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E., and Gerharz, C. D. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.*, 59: 6097-6102, 1999.
70. Hicklin, D. J., Marincola, F. M., and Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in 35 human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol.Med.Today*, 5: 178-186, 1999.
71. Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F., and Ferrone, S. HLA class I antigen abnormalities 40 and immune escape by malignant cells. *Semin.Cancer Biol.*, 12: 3-13, 2002.
72. Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W. M., Melief, C. J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., and . The relationship between class I binding affinity

and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J.Immunol.*, 153: 5586-5592, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

81. Simon, R. M., Steinberg, S. M., Hamilton, M., Hildesheim, A., Khleif, S., Kwak, L. W., Mackall, C. L., Schlom, J., Topalian, S. L., and Berzofsky, J. A. Clinical trial designs for the

early clinical development of therapeutic cancer vaccines. *J.Clin.Oncol.*, 19: 1848-1854, 2001.

1/20

SEQUENCE LISTING

5 <110> Straten, Eivind Per Thor
Andersen, Mads Hald

<120> SURVIVIN-DERIVED PEPTIDES AND USE
THEREOF

10 <130> 31757PC01

<150> US 60/352,284
<151> 2003-01-30

15 <160> 85

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

20 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 1
Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala

30 1 5

<210> 2
<211> 10
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

40 <400> 2
Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
1 5 10

45 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 3
55 Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10

2/20

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

10 <400> 4
Leu Leu Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

15 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 5
Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
25 1 5

<210> 6
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

35 <400> 6
Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu
1 5

40 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 7
50 Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe
1 5

<210> 8
55 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

3/20

<223> Sur53K9 peptide
<400> 8
Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Tyr
5 1 5

<210> 9
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sur53K9 peptide
15 <400> 9
Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Tyr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Sur53K9 peptide
25 <400> 10
Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5

<210> 11
35 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
40 <223> Sur53K9 peptide
<400> 11
Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
50 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sur53K9 peptide
55 <400> 12
Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met
1 5

4/20

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 13
10 Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu
1 5

<210> 14
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sur53K9 peptide

<400> 14
Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu
1 5
25

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

35 <400> 15
Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
1 5

40 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 16
Thr Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile
50 1 5

<210> 17
<211> 10
55 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

5/20

<400> 17
Glu Thr Ala Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile
1 5 10

5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

15 <400> 18
Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
1 5

20 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 19
Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile
30 1 5

<210> 20
<211> 10
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

40 <400> 20
Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe
1 5 10

45 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 21
55 Tyr Pro Leu His Glu Gln His Gln Met
1 5

<210> 22

6/20

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 22
Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe
10 1 5

<210> 23
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide
20
<400> 23
Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys
1 5

25
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30
<220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 24
35 Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5

<210> 25
40 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sur53K9 peptide

<400> 25
Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln
1 5 10

50

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

7/20

<400> 26
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe
1 5 10

5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10

<220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 27
15 Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5 10

<210> 28
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
25 <223> Sur53K9 peptide

<400> 28
Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr
1 5

30

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

40 <400> 29
Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Tyr
1 5

45 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 30
55 Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Tyr
1 5

<210> 31
<211> 10

8/20

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Sur53K9 peptide

<400> 31
Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Tyr
1 5 10

10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

20 <400> 32
Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Tyr
1 5 10

25 <210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 33
Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Tyr
35 1 5 10

<210> 34
<211> 10
40 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

45 <400> 34
Gln Thr Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5 10

50

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 35

9/20

Gln Ser Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5 10

5 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 36
Phe Thr Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
15 1 5

<210> 37
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide
25 <400> 37
Phe Ser Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe
1 5

30 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 38
40 Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Tyr
1 5

<210> 39
45 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sur53K9 peptide

<400> 39
Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Tyr
1 5 10
55

<210> 40
<211> 9
<212> PRT

10/20

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

5 <400> 40
Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe
1 5

10 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 41
20 Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe
1 5

<210> 42
25 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sur53K9 peptide

<400> 42
Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys
1 5

35 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

45 <400> 43
Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys
1 5

50 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 44
Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys

11/20

```

1          5

<210> 45
5 <211> 10
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

  <220>
10 <223> Sur53K9      peptide

  <400> 45
  Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe
    1          5          10

15

  <210> 46
  <211> 10
  <212> PRT
20 <213> Artificial Sequence

  <220>
  <223> Sur53K9      peptide

25 <400> 46
  Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe
    1          5          10

30 <210> 47
  <211> 10
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

35 <220>
  <223> Sur53K9      peptide

  <400> 47
  Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys
40  1          5          10

  <210> 48
  <211> 10
45 <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

  <220>
  <223> Sur53K9      peptide
50

  <400> 48
  Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe
    1          5          10

55

  <210> 49
  <211> 10
  <212> PRT
  <213> Artificial Sequence

```

12/20

<220>
<223> Sur53K9 peptide

5 <400> 49
Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
1 5 10

10 <210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 50
Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
20 1 5 10

<210> 51
<211> 10
25 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

30 <400> 51
Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys
1 5 10

35 <210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 52
45 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys
1 5 10

<210> 53
50 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Sur53K9 peptide

<400> 53
Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
1 5

13/20

<210> 54
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

10 <400> 54
Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Lys
1 5

15 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 55
25 Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Lys
1 5

<210> 56
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Sur53K9 peptide

<400> 56
Leu Leu Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys
1 5

40 <210> 57
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

50 <400> 57
Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Lys
1 5 10

55 <210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

14/20

<220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 58
5 Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Lys
1 5 10

<210> 59
10 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
15 <223> Sur53K9 peptide

<400> 59
Ile Leu Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys
1 5 10

20
<210> 60
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

30 <400> 60
Thr Ile Arg Arg Lys Asn Leu Arg Lys
1 5

35 <210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 61
Pro Thr Ile Arg Arg Lys Asn Leu Arg Lys
45 1 5 10

<210> 62
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

55 <400> 62
Arg Ile Thr Arg Glu Glu His Lys Lys
1 5

15/20

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

10 <400> 63
Ala Val Phe Asp Arg Lys Ser Asp Ala Lys
1 5 10

15 <210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 64
Gln Pro Arg Ala Pro Ile Arg Pro Ile
25 1 5

<210> 65
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

35 <400> 65
Arg Pro Pro Ile Phe Ile Arg Arg Leu
1 5

40 <210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 66
50 Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu
1 5 10

<210> 67
55 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

16/20

```

<223> Sur53K9      peptide

<400> 67
Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu
5  1              5              10

<210> 68
<211> 11
10 <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9      peptide
15
<400> 68
Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
    1              5              10

20
<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25
<220>
<223> Sur53K9      peptide

<400> 69
30 Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
    1              5              10

<210> 70
35 <211> 11
    <212> PRT
    <213> Artificial Sequence

<220>
40 <223> Sur53K9      peptide

<400> 70
Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr Leu
    1              5              10
45

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
50 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9      peptide

55 <400> 71
Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
    1              5              10

```

17/20

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 72
10 Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu
1 5

<210> 73
15 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sur53K9 peptide

<400> 73
Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5
25

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

35 <400> 74
Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
1 5

40 <210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 75
Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val
50 1 5 10

<210> 76
<211> 10
55 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

18/20

<400> 76
Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val
1 5 10
5

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

15 <400> 77
Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp Trp Pro Leu
1 5 10

20 <210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 78
Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe Val
30 1 5 10

<210> 79
<211> 10
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

40 <400> 79
Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg Asp Val
1 5 10

45 <210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 80
55 Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
1 5 10

<210> 81

19/20

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 81
Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly Leu
10 1 5

<210> 82
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide
20
<400> 82
Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu
1 5

25
<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

30
<220>
<223> Sur53K9 peptide

<400> 83
35 Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
1 5

<210> 84
40 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sur53K9 peptide

<400> 84
Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu
1 5
50

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sur53K9 peptide

20/20

<400> 85

Glu Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val

1

5

CLAIMS

1. A MHC Class I-restricted epitope peptide derived from survivin, said epitope having at
5 least one of the following characteristics:
- (i) capable of binding to the Class I HLA molecule to which it is restricted at an affinity as measured by the amount of the peptide that is capable of half maximal recovery of the Class I HLA molecule (C_{50} value) which is at the most 50 μ M as determined by the assembly binding assay as described herein,
10
- (ii) capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a cancer patient at a frequency of at least 1 per 10^4 PBLs as determined by an ELISPOT assay, and/or
- 15 (iii) capable of *in situ* detection in a tumor tissue of CTLs that are reactive with the epitope peptide.
2. A peptide according to claim 1 having a C_{50} value, which is at the most 30 μ M.
- 20 3. A peptide according to any of claims 1-2 having a C_{50} value, which is at the most 20 μ M.
4. A peptide according to any of claims 1-3, which is restricted by a MHC Class I HLA-A molecule.
- 25 5. A peptide according to claim 4, which is restricted by a MHC Class I HLA species selected from the group consisting of HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 and HLA-A24.
6. A peptide according to any one of claims 4 or 5, which is restricted by HLA-A2.
- 30 7. A peptide according to any one of claims 4-6, which is selected from the group consisting of FLKLDREERA (SEQ ID NO:1), TLPPAWQPFL (SEQ ID NO:2), ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:3), LLLGEFLKL (SEQ ID NO:4) and LMLGEFLKL (SEQ ID NO:5).
8. A peptide according to any one of claims 1-3, which is restricted by a MHC Class I HLA-B
35 molecule.
9. A peptide according to claim 8, which is restricted by a MHC Class I HLA-B species selected from the group consisting of HLA-B7, HLA -B35, HLA -B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 and HLA-B51.
- 40 10. A peptide according to any one of claims 8 or 9, which is restricted by HLA-B35 or HLA-B7.

11. A peptide according to any one of claims 8-10, which is selected from the group consisting of CPTENEPDL (SEQ ID NO:6), EPDLAQCF (SEQ ID NO:7), CPTENEPDY (SEQ ID NO:8), EPDLAQCFY (SEQ ID NO:9), LPPAWQPFL (SEQ ID NO:18) and QPFLKDHRI (SEQ ID NO:19).

5

12. A peptide according to any of the preceding claims comprising at the most 20 amino acid residues.

13. A peptide according to claim 12 that comprises at the most 10 amino acid residues.

10

14. A peptide according to any one of the preceding claims, which is a nonapeptide or a decapeptide.

15. A peptide according to any one of the preceding claims, which is a native sequence of survivin of a mammal species.

16. A peptide according to claim 15 that is derived from human survivin.

17. A peptide according to any one of the preceding claims, which is derived from a native sequence of survivin by substituting, deleting or adding at least one amino acid residue.

18. A peptide according to any of the preceding claims, which is phosphorylated.

19. A peptide according to claim 18, which comprises Thr34 of the native survivin disclosed in US 6.245.523.

20. A peptide according to any one of the preceding claims comprising, for each specific HLA allele, any of the amino acid residues as indicated in the following table:

HLA allele	Position 1	Position 2	Position 3	Position 5	Position 6	Position 7	C-terminal
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K, Y, F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y,I				K, R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W

60

HLA-A33		Y,I,L,V				R
HLA-A34		V,L				R
HLA-A66	E,D	T,V				R,K
HLA-A68	E,D	T,V				R,K
HLA-A69		V,T,A				V,L
HLA-A74		T				V,L
HLA-B5		A,P	F,Y			I,L
HLA-B7		P				L,F
HLA-B8			K	K,R		L
HLA-B14		R,K				L,V
HLA-B15 (B62)		Q,L,K,P, H,V,I,M, S,T				F,Y,W
HLA-B17						L,V
HLA-B27		R				Y, K,F,L
HLA-B35		P				I, L, M, Y
HLA-B37		D,E				I,L,M
HLA-B38		H	D,E			F,L
HLA-B39		R,H				L,F
HLA-B40 (B60,61)		E	F,I,V			L,V,A,W, M,T,R
HLA-B42		L,P				Y,L
HLA-B44		E				F,Y,W
HLA-B46		M,I,L,V				Y,F
HLA-B48		Q,K				L
HLA-B51		A,P,G				F,Y,I,V
HLA-B52		Q	F,Y			I,V
HLA-B53		P				W,F,L
HLA-B54		P				
HLA-B55		P				A,V
HLA-B56		P				A,V
HLA-B57		A,T,S				F,W,Y
HLA-B58		A,T,S				F,W,Y
HLA-B67		P				L
HLA-B73		R				P
HLA- Cw1		A,L				L
HLA- Cw2		A,L				F,Y
HLA- Cw3		A,L				L,M
HLA- Cw4		Y,P,F				L,M,F,Y
HLA-						L,I,V,Y

61

Cw6							
HLA-		Y					L,Y,F
Cw6							
HLA-		Y					L,I,
Cw8							
HLA-		A,L					L,V
Cw16							

21. A peptide according to any one of the preceding claims that is capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a cancer patient at a frequency of at least 10 per 10^4 PBLs.

5

22. A peptide according to any one of the preceding claims, which is capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a patient having a cancer disease where survivin is expressed.

10 23. A peptide according to claim 22 where the cancer disease is selected from the group consisting of a haematopoietic malignancy including chronic lymphatic leukemia and chronic myeloid leukemia, melanoma, breast cancer, cervix cancer, ovary cancer, lung cancer, colon cancer, pancreas cancer and prostate cancer.

15 24. A peptide according to any one of the preceding claims, which is capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a patient having a cancer disease, said INF- γ -producing cells having cytotoxic effect against survivin expressing cells of a cancer cell line, including a cell line selected from the group consisting of the breast cancer cell line MCF-7 and the melanoma cell line FM3.

20

25. A pharmaceutical composition comprising the peptide according to any one of claims 1-24.

25 26. A composition according to claim 25 that comprises a peptide according to claim 4 in combination with a peptide according to claim 8.

27. A composition according to claim 26 comprising a peptide according to claim 6 in combination with a peptide according to claim 10.

30 28. A composition according to any one of claims 25-27, which is a vaccine capable of eliciting an immune response against a cancer disease.

29. A composition according to any one of claims 25-28, further comprising an immunogenic protein or peptide fragment selected from a protein or peptide fragment not
35 belonging to or derived from the survivin protein family.

30. A composition according to claim 29, where the protein or peptide fragment not belonging to or derived from the survivin protein family is a protein, or peptide fragment hereof, involved in regulation of cell apoptosis.

5 31. A composition according to claim 29 where the immunogenic protein or peptide fragment selected from a protein or peptide fragment hereof not belonging to or derived from the survivin protein family is Bcl-2 or a peptide fragment hereof.

32. A composition according to any one of claims 25-31, which is a multiepitope vaccine.

10

33. A composition according to claim 32 where the vaccine is capable of eliciting an immune response against a cancer disease where survivin is expressed.

34. A composition according to claim 33 where the cancer disease is selected from the
15 group consisting of a haematopoietic malignancy including chronic lymphatic leukemia and chronic myeloid leukemia, melanoma, breast cancer, cervix cancer, ovary cancer, lung cancer, colon cancer, pancreas cancer and prostate cancer.

35. A composition according to claims 33 or 34 where the vaccine elicits the production in
20 the vaccinated subject of effector T-cells having a cytotoxic effect against the cancer cells.

36. A composition for ex vivo or in situ diagnosis of the presence of survivin reactive T-cells among PBLs or in tumor tissue, the composition comprising a peptide according to claim 1.

25

37. A diagnostic kit for ex vivo or in situ diagnosis of the presence of survivin reactive T-cells among PBLs or in tumour tissue, the kit comprising a peptide according to any one of claims 1-24.

30 38. A complex of a peptide according to claims 1 and a Class I HLA molecule or a fragment of such molecule.

39. A complex according to claim 38 which is monomeric.

35 40. A complex according to claim 38 which is multimeric.

41. A method of detecting the presence of survivin reactive T-cells, the method comprising contacting a tumour tissue or a blood sample with a complex according to claim 38 and detecting binding of the complex to the tissue or the blood cells.

40

42. A molecule that is capable of binding specifically to a peptide according to any of claims 1-24.

43. A molecule according to claim 42 which is an antibody or a fragment hereof.

44. A molecule that is capable of blocking the binding of a molecule according to claim 42 or 43.

5 45. Use of a peptide as defined in an any of claims 1-24 for the preparation of a medicament for the treatment of cancer.

46. Use of a composition according to claim 25, a molecule according to claim 42 or a molecule according to claim 44 for the preparation of a medicament for the treatment of
10 cancer.

47. The use according to any one of claims 45 or 46, wherein the disease to be treated is a cancer disease where survivin is expressed.

15 48. The use according to claim 46 wherein the cancer disease is selected from the group consisting of a haematopoietic malignancy including chronic lymphatic leukemia and chronic myeloid leukemia, melanoma, breast cancer, cervix cancer, ovary cancer, lung cancer, colon cancer, pancreas cancer and prostate cancer.

20 49. The use according to any one of claims 45-48, which is combined with a further treatment.

50. The use according to claim 49 wherein the further treatment is radiotherapy or chemotherapy.

(57) Abstract: MHC Class I-restricted peptides derived from the tumor associated antigen, survivin, which peptides are capable of binding to Class I HLA molecules at a high affinity, capable of eliciting INF- γ -producing cells in a PBL population of a cancer patient and capable of *in situ* detection of cytotoxic T cells in a tumor tissue, therapeutic and diagnostic composition comprising the peptide and uses thereof.

【 図 1 】

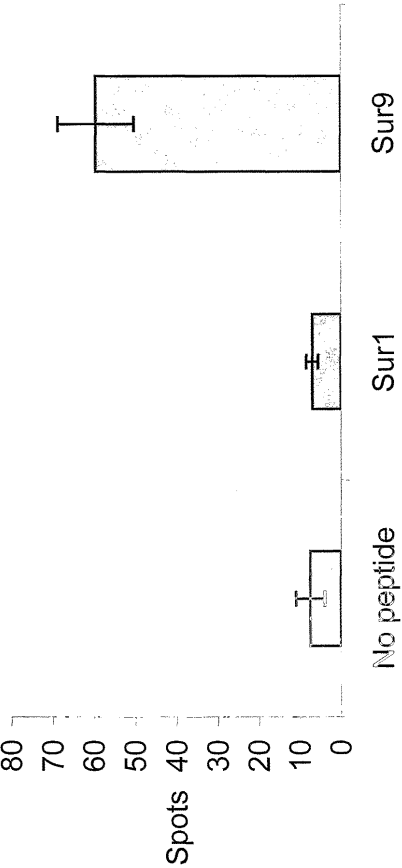


Fig. 1

【 図 2 】

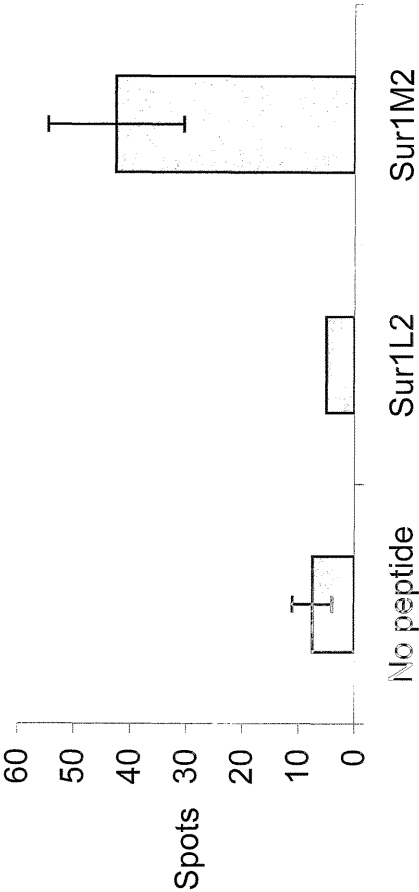


Fig. 2

【 図 3 】

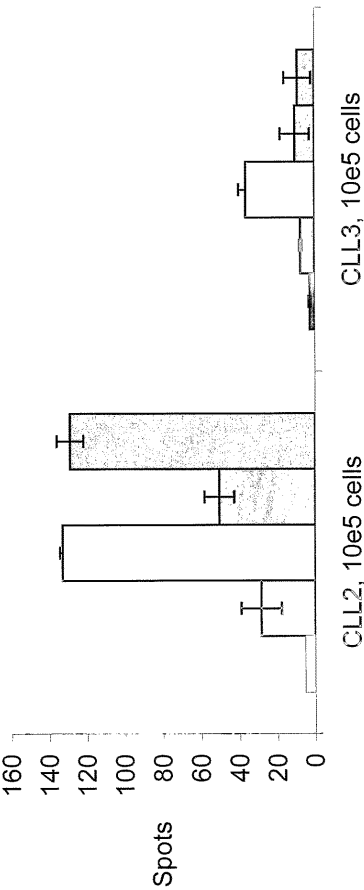


Fig. 3

【 図 4 】

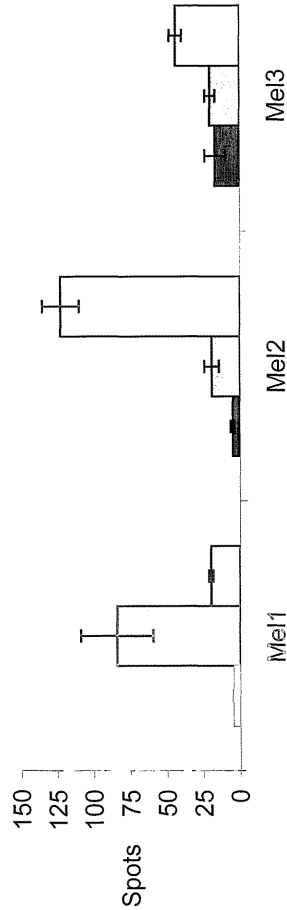


Fig. 4

【 図 5 】

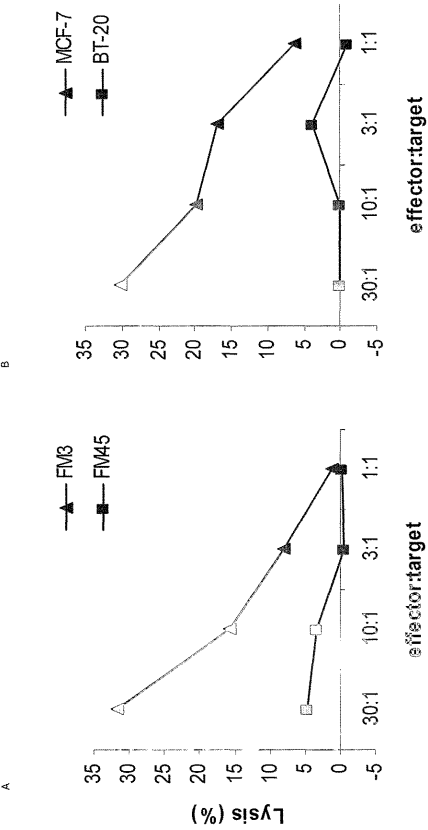


Fig. 5

【 図 6 】

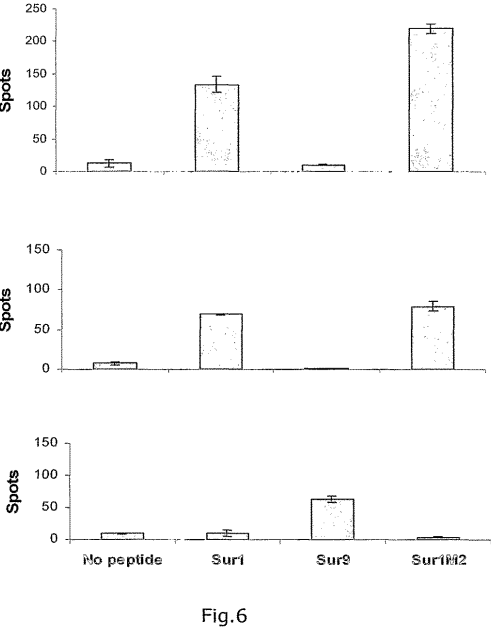


Fig.6

【 図 7 】

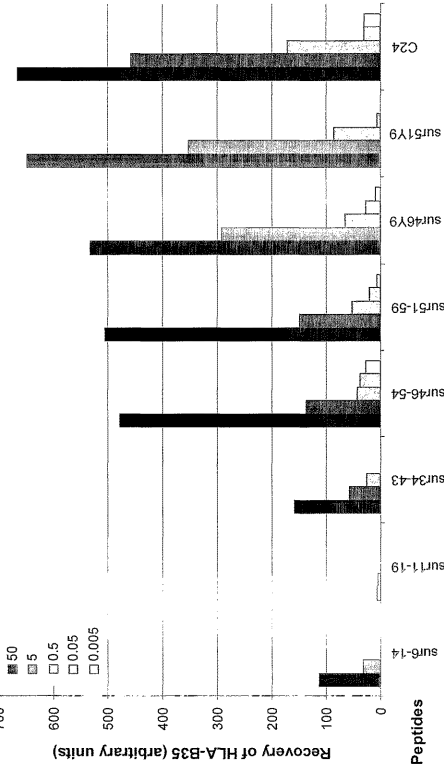


Fig. 7

【 図 8 】

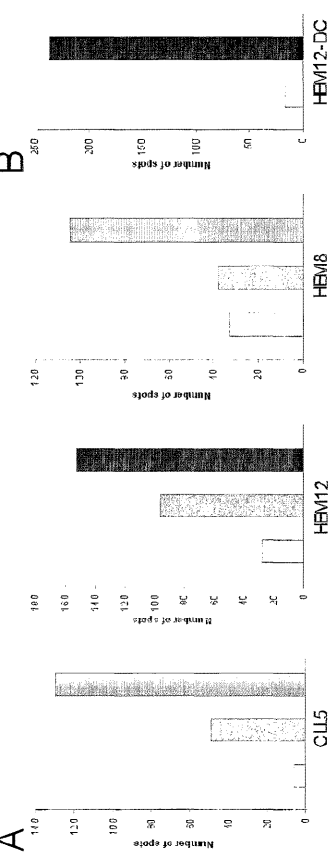


Fig. 8

【 図 9 】

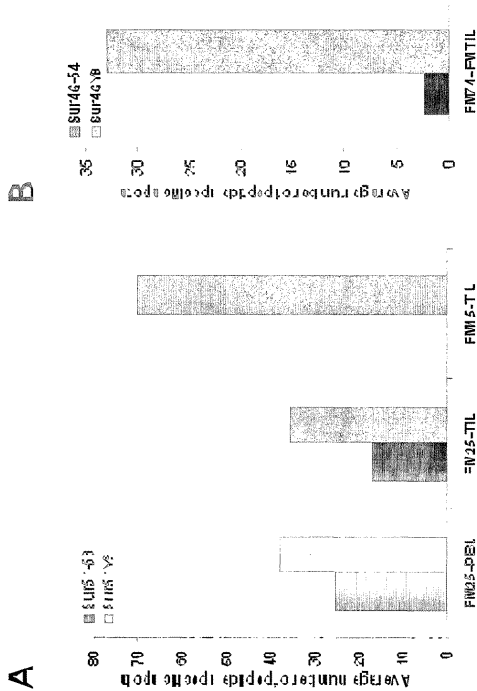


Fig. 9

【 図 10 】

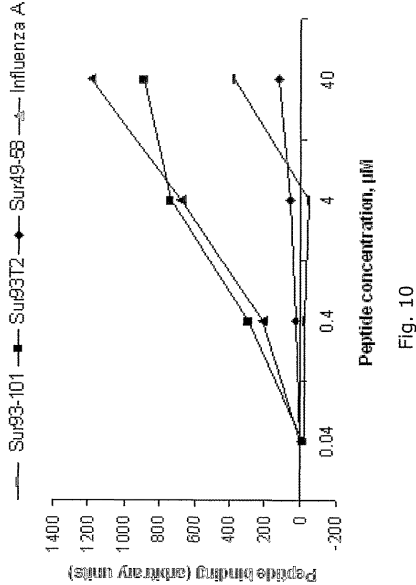


Fig. 10

【 図 11 】

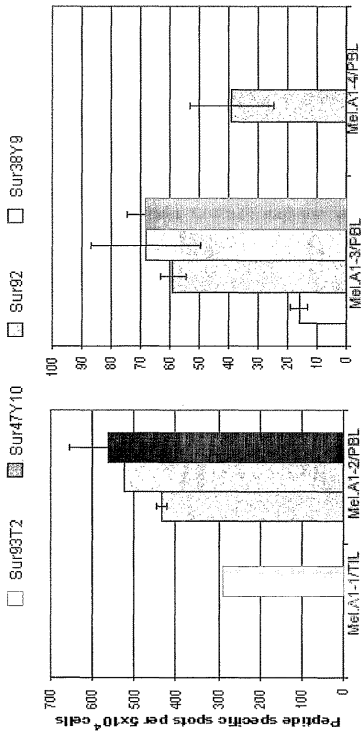


Fig. 11

【 図 12 】

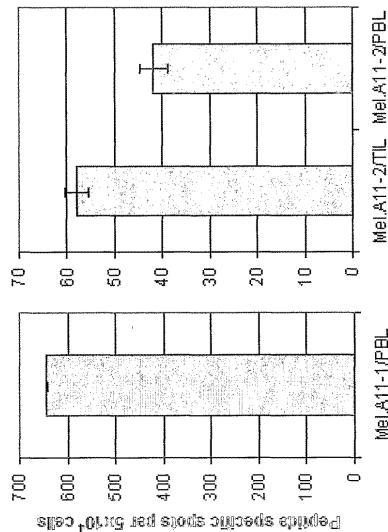


Fig. 12

【 図 1 3 】

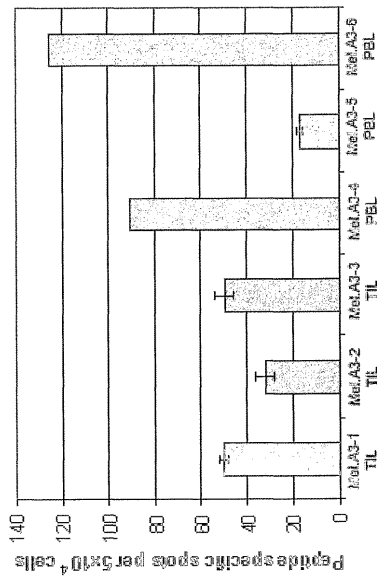


Fig. 13

【 図 1 4 】

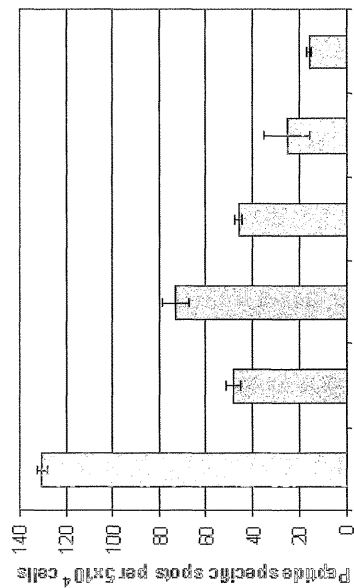


Fig. 14

【 図 1 5 】

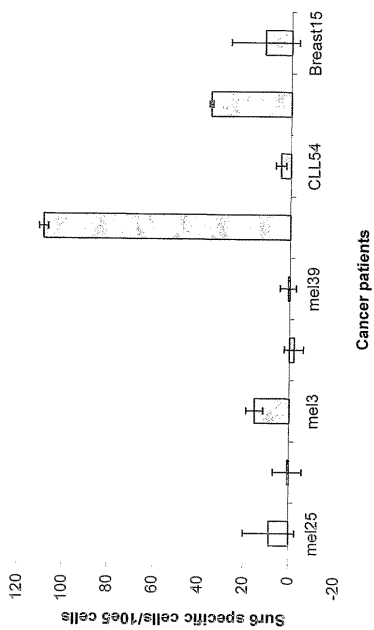


Fig. 15

【 図 1 6 】

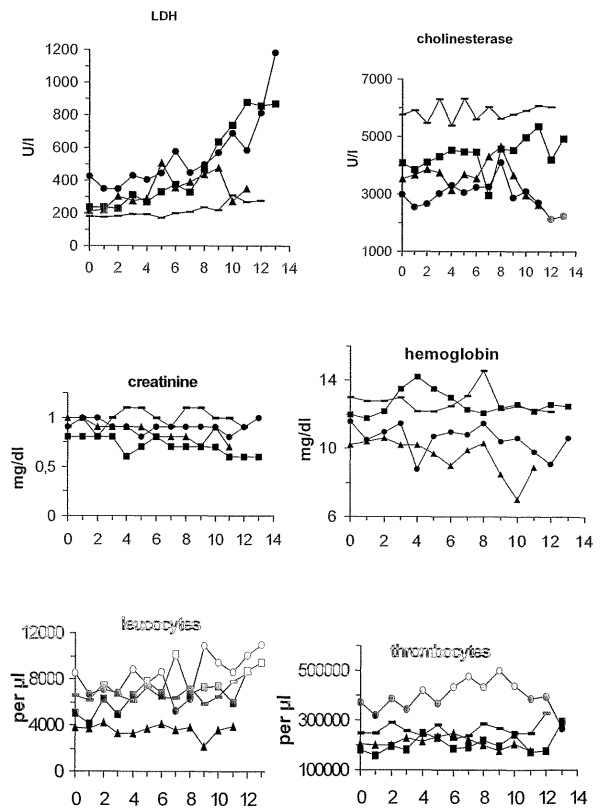
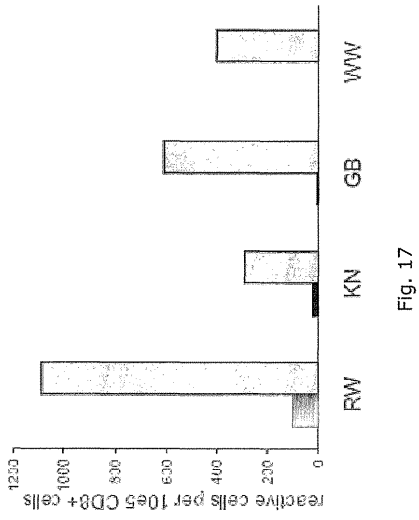


Fig. 16

【図 17】



专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2012082213A5	公开(公告)日	2012-07-12
申请号	JP2011270382	申请日	2011-12-09
申请(专利权)人(译)	Suruvakku安公寓酒店细胞Sukabu		
[标]发明人	エイヴィンパールトールストラテン マスハルアナセン		
发明人	エイヴィン・パール・トール・ストラテン マス・ハル・アナセン		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K7/06 C12Q1/02 A61K38/00 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/5158 A61P1/00 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/08 A61P15/00 A61P17/00 C07K14/4738 C07K14/4747 G01N33/574 G01N33/57484 A61K38/04 A61K39/001102		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C07K16/18 C07K7/06 C12Q1/02 A61K37/02 A61K39/00.H A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/FA20 4H045/FA71		
代理人(译)	山田卓司		
优先权	10/354090 2003-01-30 US 10/715417 2003-11-19 US		
其他公开文献	JP2012082213A JP5509185B2		

摘要(译)

解决的问题：提供一种存活蛋白衍生的肽，其是MHC I类限制性T细胞表位，以及将该肽用于特别是在癌症中的诊断和治疗的方法。MHC I类限制性肽，源自肿瘤相关抗原survivin，能够以高亲和力结合I类HLA分子，能够诱导癌症患者PBL人群和肿瘤组织中产生INF- γ 的细胞 能够原位检测细胞毒性T细胞的肽，包含该肽的治疗和诊断组合物及其用途。[选择图]
无