

(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2006-122046

(P2006-122046A)

(43) 公開日 平成18年5月18日(2006.5.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-282886 (P2005-282886)	(71) 出願人	000003159
(22) 出願日	平成17年9月28日 (2005.9.28)		東レ株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2004-283768 (P2004-283768)		東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(32) 優先日	平成16年9月29日 (2004.9.29)	(72) 発明者	西川 義文
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株
(31) 優先権主張番号	特願2004-283769 (P2004-283769)		式会社基礎研究所先端融合研究所内
(32) 優先日	平成16年9月29日 (2004.9.29)	(72) 発明者	岡野 文義
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株
			式会社基礎研究所先端融合研究所内
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA12 BA36 BA41 CA01
			4B065 AA94X AC20 BA21 CA24 CA25
			CA44 CA46
			4C084 AA02 BA01 BA23 DC50 NA14
			ZB26
			4C085 AA14 CC23
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L Aクラス I I 拘束性新規癌抗原ペプチド

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、腫瘍関連抗原由来の新規な H L Aクラス I I 拘束性 T 細胞エピトープを同定することで、扁平上皮癌等の幅広い腫瘍に応用でき、または応用可能な腫瘍が限られていても腫瘍の患者のうち多くの人に応用でき、またはその腫瘍の治療や診断を補完しつつ各種腫瘍に応用できる癌療法の一助となるペプチド等を提供することにある。

【解決手段】本発明は、癌関連抗原 S A R T 2 由来の新規 H L Aクラス I I 拘束性エピトープの同定及び単離を開示する。S A R T 2 由来の新規 H L Aクラス I I エピトープは、C D 4 陽性 T リンパ球の活性および増殖を刺激する。遺伝子産物は、癌患者の予防、治療および診断のための免疫治療的戦略の有望な候補である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の内 10 以上の連続したアミノ酸配列からなり、T 細胞の増殖および活性化を刺激するペプチド。

【請求項 2】

H L A クラス I I 分子に結合する請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

以下の (a)、(b) または (c) の H L A クラス I I 分子に結合するペプチド。

(a) 配列番号 4 , 6 または 8 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

(b) 配列番号 4 , 6 または 8 で表されるアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチド。 10

(c) (a) に記載のペプチドの変異体または誘導体であるペプチド。

【請求項 4】

(1) 配列番号 3、配列番号 5 または配列番号 7 で表されるポリヌクレオチド分子、(2) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド分子、(3) (1) または (2) において、1 もしくは複数個の塩基が置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド分子、および (4) 前記 (1) ~ (3) のいずれかのポリヌクレオチド分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子、からなる群より選択されるポリヌクレオチド分子。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを認識する白血球。 20

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドに対する抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチド分子を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の白血球を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。 30

【請求項 11】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む腫瘍の診断剤。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む腫瘍の予防剤。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを有効成分として含む腫瘍の治療剤。

【請求項 14】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチド分子を有効成分として含む腫瘍の診断剤。

【請求項 15】

請求項 6 に記載の抗体を有効成分として含む腫瘍の診断剤。 40

【請求項 16】

H L A クラス I I 分子と請求項 1 ~ 3 に記載のペプチドとの複合体に選択的に結合する、単離 C D 4 陽性 T 細胞。

【請求項 17】

癌細胞を傷害する能力を有する請求項 16 に記載の単離 C D 4 陽性 T 細胞。

【請求項 18】

H L A クラス I I 分子と請求項 1 ~ 3 に記載のペプチドとの複合体を含む、単離抗原提示細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HLA分子によりT細胞と結合し、これに提示される腫瘍関連遺伝子産物の断片、具体的にはそのペプチド、このようなペプチドをコードする核酸分子、ならびに関連抗体およびT細胞などに関する。これらは、医薬、とりわけ腫瘍の診断および治療において有用である。

【背景技術】

【0002】

哺乳類免疫系が外来または異質物質を認識し、それと反応する過程は複雑である。系の重要な一面はT細胞応答であり、これは、CD4またはCD8細胞表面タンパク質に対して陽性である成熟T細胞を一部包含する。T細胞は、ヒト白血球抗原（「HLA」）または主要組織適合性複合体（「MHC」）と呼ばれるペプチドおよび分子の他の細胞上の細胞表面複合体を介して他の細胞を認識し、それと相互作用し得る。ペプチドは、HLA/MHC分子も提示する細胞によりプロセッシングされる大型分子に由来する。T細胞とHLA/ペプチドの複合体との相互作用は制限され、HLA分子とペプチドの特定の複合体に対する特異的T細胞を要する。特異的T細胞が存在しない場合には、その相手複合体が存在する場合でもT細胞応答は認められない。同様に、特定の複合体が存在しないが、しかしT細胞は存在する場合、応答は認められない。

【0003】

外来抗原に対するT細胞応答は、細胞溶解性T細胞およびヘルパーT細胞の両方を含む。CD8+細胞傷害性または細胞溶解性T細胞（CTL）は、活性時にHLAクラスI分子（例えばHLA-A2, HLA-A24等）により提示される適切な抗原を提示する細胞を溶解するT細胞である。CD4陽性ヘルパーT細胞は、それらの表面のHLAクラスII分子（例えば、HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*09等）により適切な抗原を提示するマクロファージおよび抗原提示細胞を刺激するためにサイトカインを分泌するT細胞である。

【0004】

T細胞が異質物質を認識するメカニズムは、癌にも関係があるとされてきた。例えば、自家黒色腫に対して向けられる多数の細胞溶解性T細胞（CTL）クローンが記載されている。いくつかの場合、これらのクローンにより認識される抗原が特性化されている。これらの遺伝子の発現産物はペプチドにプロセッシングされ、次にこれが細胞表面に提示される。これは、特異的CTLによる腫瘍細胞の溶解をもたらす得る。

【0005】

特定のHLA分子に関する特定のペプチドの既知の特異性が示された場合は、あるHLA分子を結合するが、他のものは結合しない特定のペプチドを予測し得る。これは、異なる個体は異なるHLA表現型を有するため、重要である。その結果、特定のHLA分子に対する相手であるとの特定のペプチドの同定は診断的および療法的問題を有するが、これらは特定のHLA表現型を有する個体に関して当てはまるに過ぎない。

【0006】

抗腫瘍免疫におけるCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞）の重要性は、これらの細胞が協同的およびエフェクター機能に役立つだけでなく、免疫記憶を保持するのにも重要な動物モデルにおいて実証されている（非特許文献1により再検討されている）。

【0007】

近年、発症頻度の高い扁平上皮癌においてHLA-A24拘束性の癌抗原タンパク質（SART2）が存在し、宿主CTLによって認識される癌抗原ペプチドの存在が報告された（例えば非特許文献2、特許文献1参照）。扁平上皮癌はヒトの癌で最も多く認められる癌の一つであり、特に食道癌や肺癌での扁平上皮癌は現在の化学療法や放射線治療に比較的抵抗性を示すことが知られている。現在、癌抗原を攻撃するCTLを活性化する腫瘍抗原ペプチド等を用いた特異的免疫療法の開発が期待される。

【特許文献1】特開平11-318455号公報

10

20

30

40

50

【非特許文献１】トパリアン（Topalian），「カレント・オピニオン・イムノロジー（Current opinion in immunology）」、１９９４年、第６巻、ｐ ７４１ - ７４５

【非特許文献２】ナカオ（Nakao）、外１２名、「ジャーナル・オブ・イムノロジー（Journal of immunology）」、２０００年、第１６４巻、ｐ．２５６５ - ２５７４

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

近年、癌抗原を攻撃するＣＴＬを活性化する腫瘍抗原ペプチド等を用いた特異的免疫療法が注目されているが、臨床試験において十分な治療効果が得られないとの報告がなされている。そのため、ヘルパーＴ細胞を増殖させることのできるペプチドの発見が極めて重要とされている。 10

【０００９】

本発明の課題は、扁平上皮癌等の幅広い腫瘍に応用でき、または応用可能な腫瘍に限られていても腫瘍の患者のうち多くの人に応用でき、またはその腫瘍の治療や診断を補完しつつ各種腫瘍に応用できる癌療法の一助となるペプチド等を提供することにある。

【００１０】

本発明は、ＳＡＲＴ２の発現を特徴とする症状の治療または診断に用いられ得る。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本発明において、ＳＡＲＴ２遺伝子は、ヘルパーＴ細胞を誘導するペプチドである腫瘍拒絶抗原をコードするということが示された。このペプチドは、抗原提示細胞により提示されると、Ｔ細胞の活性化および増殖を有効に誘導する。 20

【００１２】

本発明は、ＨＬＡ分子を結合する単離ＳＡＲＴ２ペプチドおよびこのようなペプチドの機能的変異体を提供するが、機能的変異体は、ＳＡＲＴ２ペプチド配列の１または数個のアミノ酸付加、置換または欠失を含む。本発明は、このようなペプチドをコードする単離核酸分子、それらの核酸分子を含有する発現ベクター、それらの核酸分子でトランスフェクトされる宿主細胞、ならびにそれらのペプチドおよびペプチドとＨＬＡ分子の複合体に対する抗体も提供する。ペプチドとＨＬＡ分子の複合体を認識するＴ細胞も提供される。上記の分子および上記の細胞を含有する医薬組成物、診断剤、予防剤、治療剤も付加的に提供される。さらに本ペプチドを認識するＴ細胞が反応するすべてのペプチドも提供される。 30

【００１３】

具体的には、本発明は以下の構成からなる。

[１] 配列番号２に記載のアミノ酸配列の内１０以上の連続したアミノ酸配列からなり、Ｔ細胞の増殖および活性化を刺激するペプチド。

[２] ＨＬＡクラスⅡ分子に結合する請求項１に記載のペプチド。

[３] 以下の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）のＨＬＡクラスⅡ分子に結合するペプチド。

（ａ）配列番号４，６または８で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

（ｂ）配列番号４，６または８で表されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチド。 40

（ｃ）（ａ）に記載のペプチドの変異体または誘導体であるペプチド。

[４] （１）配列番号３、配列番号５または配列番号７で表されるポリヌクレオチド分子、（２）[１]～[３]のいずれかに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド分子、（３）（１）または（２）において、１もしくは複数個の塩基が置換、欠失又は付加されたポリヌクレオチド分子、および（４）前記（１）～（３）のいずれかのポリヌクレオチド分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子、からなる群より選択されるポリヌクレオチド分子。

[５] [１]～[３]のいずれかに記載のペプチドを認識する白血球。

[６] [１]～[３]のいずれかに記載のペプチドに対する抗体。 50

[7] [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む医薬組成物。
[8] [4] に記載のポリヌクレオチド分子を有効成分として含む医薬組成物。
[9] [5] に記載の白血球を有効成分として含む医薬組成物。
[1 0] [6] に記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。
[1 1] [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む腫瘍の診断剤

。
[1 2] [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む腫瘍の予防剤
。
[1 3] [1] ~ [3] のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む腫瘍の治療剤

。
[1 4] [4] に記載のポリヌクレオチド分子を有効成分として含む腫瘍の診断剤。
[1 5] [6] に記載の抗体を有効成分として含む腫瘍の診断剤。
[1 6] H L A クラス I I 分子と [1] ~ [3] に記載のペプチドとの複合体に選択的に結合する、単離 C D 4 陽性 T 細胞。
[1 7] 癌細胞を傷害する能力を有する [1 6] に記載の単離 C D 4 陽性 T 細胞。
[1 8] H L A クラス I I 分子と [1] ~ [3] に記載のペプチドとの複合体を含む、単離抗原提示細胞。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明は、H L A 分子により提示される単離 S A R T 2 ペプチドであって、T 細胞の増殖および活性化を刺激するペプチドを提供する。本発明の一態様は、配列番号 4 , 6 または 8 のアミノ酸配列を含む単離ペプチドである。クラス I により提示されるペプチドならびにクラス I I により提示される抗原性ペプチドの使用は、療法的抗腫瘍予防接種の効力を改善し得る。このような効果は、配列番号 4 , 6 または 8 のペプチドの変異体または誘導体であっても同様に発揮され、配列番号 4 , 6 または 8 のアミノ酸配列中 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含むペプチドであっても同様な効力をもち得る。また、本発明のペプチドのアミノ酸配列をコードする D N A および / または本発明のペプチドを認識する白血球および / または抗体は、腫瘍の診断、予防、治療に有用である。さらには、H L A クラス I I 分子と本発明のペプチドの複合体に結合する単離性 C D 4 陽性 T 細胞、あるいは H L A クラス I I 分子と本発明のペプチドの複合体を含む単離性抗原提示細胞も腫瘍の診断、予防、治療に有用である。さらに、H L A クラス I I 分子により提示される抗原についての知見は、腫瘍抗原または腫瘍抗原遺伝子を組み込んだ組換え体ウイルスにより免疫感作された癌患者の免疫応答の評価のために有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 5 】

S A R T 2 がプロセシングされて H L A に結合できる形態となったペプチドは、特に H L A クラス I I に結合するものが好ましく、任意の長さまたは配列のものであり得る、と当業者に理解されるであろう。

【 0 0 1 6 】

以下の実施例で実証されるように、S A R T 2 タンパク質は、適切にプロセシングされ、H L A クラス I I 分子により提示され、そして C D 4 陽性 T 細胞を刺激するのに有効である。S A R T 2 由来のペプチド、例えば配列番号 4 , 6 または 8 のペプチドは、一端または両端に付加された 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれ以上のアミノ酸を有し得る。このようなペプチドの抗原性部分は、H L A、特に H L A クラス I I による提示のために生理学的条件下で切り取られる。H L A クラス I I ペプチド長は約 10 アミノ酸 ~ 約 30 アミノ酸の間で変動し得るということも当業界で周知である (エンゲルハード (Engelhard)、アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annual review of immunology)、1994 年 12 巻、p. 181 - 201) ことから、本発明のペプチドとして、配列番号 4 , 6 または 8 のアミノ酸配列 (もしくは配列番号 4 , 6 または 8 のアミノ酸配列の一部) を含有する約 10 アミノ酸 ~ 約 30 アミノ酸残基からなるペプチド

が好ましい。繰込み組のHLAクラスII結合ペプチドが同定されており、この場合、ペプチドは、コア配列を共有するが、しかしアミノおよび/またはカルボキシル末端に異なるアミノ酸を有する。本明細書中に開示されたペプチドより少ないアミノ酸を有するSART2のペプチドも、本発明に含まれる。したがって、付加的SART2のHLAクラスII結合ペプチドならびにSART2のHLAクラスII結合ペプチドと相同のSART2のHLAクラスII結合ペプチドは、本明細書中に記載した手法にしたがって当業者により同定され得る。

【0017】

実施例に記載された手法は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドを同定するために利用され得る。したがって、細胞をSART2ポリペプチドに接触させることにより、または当該SART2タンパク質の発現を指図する核酸分子を細胞に導入することにより、例えば抗原提示細胞、例えば正常血液ドナーの樹状細胞に組換え体SART2タンパク質（またはその断片）を装入し得る。次に、抗原提示細胞を用いて、SART2のHLAクラスII結合ペプチドを認識する特定のCD4陽性T細胞の活性化および増殖をin vitroで誘導し得る。次に、例えばCD4陽性T細胞の活性化および増殖を刺激するために用いられるSART2タンパク質のペプチド断片で細胞を刺激することにより、実施例に記載したように、ペプチドの配列が確定され得る。あるいは、SART2タンパク質由来のペプチドを抗原提示細胞に装入し得る。HLAクラスII結合ペプチドを選択するためのコンピューターソフトウェアも利用可能である。HLAクラスII分子はペプチドが結合することのできるポケット構造を有しており、HLAクラスIIのサブタイプにより化学的な性質あるいは構造の大きさが異なる。これらのポケット構造をプロファイルすることで、その構造に相互作用できるペプチドを推測することが可能である。例えばTEPITOPアルゴリズム；（ステューニオロ（Sturniolo）、外10名、「ネイチャー・バイオテクノロジー（Nature biotechnology）、1999年、第17巻、p. 555 - 561、マニシ（Manici）、外10名、「ザ・ジャーナル・オブ・エクスperimental medicine）、1999年、第189巻、p. 871 - 876」、SYFPEITHIアルゴリズム（ラメンセー著（Rammensee）、外4名、「イムノジェネティクス（Immunogenetics）、1999年、第50巻、p. 213 - 219）、ProPredアルゴリズム（シン（Singh）、外1名、「バイオインフォマティクス（Bioinformatics）、2001年、第17巻、p. 1236 - 1237）あるいはRANKPEPアルゴリズム（レイチェ（Rechle）、外2名、「ヒューマン・イムノロジー（Human immunology）、2002年、第63巻、p. 701 - 709）が利用可能である。このように選択されたペプチドは、特定のCD4陽性T細胞を誘導するために、ならびにペプチドの同定のために、本明細書中に記載した検定中で用いられ得る。HLAクラスII結合のためのペプチドを選択および試験するさらに別の方法は、当業界で周知である。

【0018】

上記のように、本発明でいう、SART2のHLAクラスII結合ペプチドは、SART2のHLAクラスII結合ペプチドの機能的変異体を包含する。本明細書中で用いる場合、HLAクラスII結合ペプチドの「変異体」または「誘導体」とは、HLAクラスII結合ペプチドの一次アミノ酸配列に対して1つまたはそれ以上の修飾を含有し、本明細書中に開示されたHLAクラスIIおよびT細胞受容体結合特性を保持するペプチドである。SART2のHLAクラスII結合ペプチド機能的変異体を作製する修飾は、例えば、1）SART2のHLAクラスII結合ペプチドの特性、例えば発現系でのペプチド安定性またはHLA - ペプチド結合のようなタンパク質 - タンパク質結合の安定性を強化するために、2）SART2のHLAクラスII結合ペプチドに対する新規の活性または特性、例えばCTLを誘導するCTLエピトープ等の抗原性エピトープの付加または検出可能部分の付加を提供するために、あるいは3）同一または類似のT細胞刺激特性を生じる異なるアミノ酸配列を提供するためになされ得る。SART2のHLAクラスII結合ペプチドに対する修飾は、ペプチドをコードする核酸に対してなされることができ、その例

としては、欠失、点突然変異、切頭化、アミノ酸置換およびアミノ酸の付加が挙げられる。あるいは、修飾は、例えば開裂、リンカー分子の付加、検出可能部分（例えばビオチン）の付加、脂肪酸の付加、あるアミノ酸の別のアミノ酸による置換等により、ポリペプチドに対して直接なされ得る。変異体は、無作為ペプチドあるいは1つまたはそれ以上の位置に置換を含むSART1ペプチドの配列を基礎にしたペプチドであり得るペプチドのライブラリーからも選択され得る。例えば、ペプチドライブラリーは、HLAクラスII分子に結合されたSART2のヘルパーエピトープペプチドの複合体との競合検定に用いられ得る（例えば、SART2のHLAクラスII結合ペプチドを装入された樹状細胞）。HLAクラスII分子とのSART2ペプチドの結合に関して競合するペプチドは、シーケンシングされ、他の検定に用いられて（例えばCD4陽性T細胞の増殖）、SART2ペプチド機能的変異体としての適合性を確定され得る。他の機能的変異体としては、ペプチド模倣化合物が挙げられる。ペプチド模倣物は、HLAクラスII結合のために調製されCD4陽性T細胞の刺激に関して試験され得る。

10

【0019】

SART2のHLAクラスII結合ペプチドのアミノ酸配列は、天然または非天然起源であり得る。即ち、それらは、天然SART2のHLAクラスII結合ペプチド分子を含み得るか、あるいはアミノ酸配列が、提示される場合にヘルパーT細胞を刺激する能力を保持し、HLAクラスII分子との結合の特性を保持する限り、修飾化配列を含み得る。例えば、SART2のHLAクラスII結合ペプチドは、この状況においては、SART2のHLAクラスII結合ペプチドおよび非関連アミノ酸配列、標識化ペプチド、SART2発現癌を有する患者から単離されたペプチド、SART2を発現する培養細胞から単離されたペプチド、非ペプチド分子に結合されたペプチド、ならびに配列番号4, 6または8を含むその他の分子を含む融合タンパク質であり得る。

20

【0020】

次に、HLAクラスII結合分子との変異体ペプチドの結合、およびT細胞の刺激が、標準手法により確定される。例えば、下記で例示されるように、変異体ペプチドは、SART2ペプチドを結合するHLAクラスII分子を含有する抗原提示細胞と接触されて、変異体ペプチドと抗原提示細胞との複合体を形成し得る。次にこの複合体は、HLAクラスII結合分子により提示されるSART2のHLAクラスII結合ペプチドを認識するT細胞と接触され得る。T細胞は、SART2の発現を特徴とする症状を有する患者から得られる。T細胞による変異体ペプチドの認識は、TNFまたはIFN γ 産生のようなT細胞刺激の指標を測定することにより確定され得る。同様の手法は、他のSART2のHLAクラスII結合ペプチドの同定および特性化のために実行され得る。HLAクラスII結合分子との変異体ペプチドの結合、およびHLAクラスII結合分子により提示される変異体ペプチドによるT細胞の刺激は、変異体ペプチドが機能的変異体であることを示す。本方法は、機能的変異体によるT細胞の刺激の有効性の鑑定として、SART2のHLAクラスII結合ペプチドによるT細胞の刺激および機能的変異体によるT細胞の刺激を比較する過程も包含し得る。機能的変異体をSART2のHLAクラスII結合ペプチドと比較することにより、T細胞刺激特性の増大を示すペプチドが調製され得る。

30

【0021】

上記の方法のいずれかにより調製されるSART2のHLAクラスII結合ペプチドの変異体をシーケンシングして、必要な場合には、アミノ酸配列を確定し、したがって、このような変異体をコードするヌクレオチド配列を推定し得る。

40

【0022】

さらに本発明の一部は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドまたはその変異体をコードする核酸配列、ならびに上記のヌクレオチド配列からなる核酸分子とハイブリダイズする他の核酸配列である。核酸ハイブリダイゼーションパラメーターは、このような方法を編集する参考文献、例えばサムブルック（Sambrook）著、「モレキュラー・クローニング ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor L

50

aboratory Press)、1989年、第1 - 3巻に見出され得る。

【0023】

本発明のポリヌクレオチド分子には「本発明のポリヌクレオチド分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子」も包含される。ポリヌクレオチド分子としてDNA分子を代表例にとると、「DNA分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA分子」は、例えば前述のMolecular Cloningに記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、例えば、 $6 \times SSC$ 、 $0.5\% SDS$ および 50% ホルムアミドの溶液中で $42^\circ C$ にて加温した後、 $0.1 \times SSC$ 、 $0.5\% SDS$ の溶液中で $68^\circ C$ にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリダイズのシグナルが観察されることを表す。用いられ得る条件、試薬等があるが、当業者はこのような条件に通じており、従ってこの条件に限定されない。

10

【0024】

しかしながら、本発明のSART2のHLAクラスII結合ペプチドをコードする核酸の相同体および対立遺伝子の明瞭な同定を可能にする方法で当業者は条件を操作し得ることを理解されたい。当業者は、その後ルーチンに単離されるこのような分子の発現に関する細胞およびライブラリーのスクリーニングとその後の関連核酸分子の単離およびシーケンシングのための方法にも周知している。

【0025】

概して、相同体および対立遺伝子は、典型的にはそれぞれSART2のHLAクラスII結合ペプチドのアミノ酸配列またはこのようなペプチドをコードする核酸と少なくとも 90% のアミノ酸同一性および/または少なくとも 75% のヌクレオチド同一性を共有する。いくつかの場合には、相同体および対立遺伝子は、少なくとも 95% のヌクレオチド同一性および/または少なくとも 90% のアミノ酸同一性を共有し、そしてさらにその他の場合には、少なくとも 90% のヌクレオチド同一性および/または少なくとも 95% のアミノ酸同一性を共有する。上記の核酸の相補体も本発明に包含される。

20

【0026】

SART2のHLAクラスII結合ペプチドをコードする核酸に関するスクリーニングでは、³²Pプローブと一緒に上記の条件を用いて、核酸ハイブリダイゼーション、例えばサザンブロットまたはノーザンブロットが実施され得る。SART2のHLAクラスII結合ペプチドをコードするDNAが最後に移された膜を洗浄後、放射能シグナルを検出するために、その膜はX線フィルムに対して配置される。

30

【0027】

本発明は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドの同一アミノ酸残基をコードする代替的コドンを含む核酸配列の使用も包含する。例えば、本明細書中に開示されているように、ペプチドQLNLKNVQRNLILLHPQLLLLDQIHL(配列番号4)は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドである。ロイシン残基(配列番号4の第2番目のアミノ酸)は、コドンUUA, UUG, CUU, CUC, CUAおよびCUGによりコードされ得る。6つのコドンは各々、ロイシン残基をコードするという目的に関して等価である。したがって、ロイシンコードヌクレオチドトリプレットのいずれかをを用いて、in vitroまたはin vivoでタンパク質合成装置を指図して、ロイシン残基を組み入れ得る、ということは当業者には明らかであろう。同様に、配列番号4のSART2のHLAクラスII結合ペプチドを含む他のアミノ酸残基をコードするヌクレオチド配列トリプレットとしては、以下のものが挙げられる: CGA, CGC, CGG, CGT, AGAおよびAGG(アルギニンコドン); AAAおよびAAG(リシンコドン); GUA, GUC, GUGおよびGUU(バリンコドン); GAAおよびGAG(グルタミンコドン); UUCおよびUUU(フェニルアラニンコドン)ならびにUACおよびUAU(チロシンコドン)。その他のアミノ酸残基は、ポリヌクレオチド配列により同様にコードされ得る。したがって本発明は、遺伝子コードの縮重のためにコドン配列中のネイティブSART2のHLAクラスII結合ペプチドコード核酸とは異なる縮重核酸を包含する。

40

50

【 0 0 2 8 】

本発明は、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの付加、置換および欠失を含む修飾核酸分子も提供する。好ましい実施形態では、これらの修飾核酸分子および/またはそれらがコードするポリペプチドは、非修飾核酸分子および/またはポリペプチドの少なくとも1つの活性または機能、例えば抗原性、酵素活性、受容体結合、MHCクラスIおよびクラスII分子によるペプチドの結合による複合体の形成等を保持する。ある種の実施形態では、修飾核酸分子は、修飾ポリペプチド、好ましくは本明細書中に別記されているような保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする。修飾核酸分子は、非修飾核酸分子に構造的に関連があり、好ましい実施形態では、修飾および非修飾核酸分子が当業者に既知のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするよう十分に構造的に非修飾核酸分子と関連する。 10

【 0 0 2 9 】

例えば、単一アミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする修飾核酸分子が調製され得る。これらの核酸分子は各々、本明細書中に記載したような遺伝子コードの縮重に対応するヌクレオチド変化と相容れない1、2または3つのヌクレオチド置換を有し得る。同様に、2つのアミノ酸変化を有するポリペプチドをコードする修飾核酸分子が調製され得るが、これらは例えば2～6のヌクレオチド変化を有する。例えばアミノ酸2および3、2および4、2および5、2および6等をコードするコドンのヌクレオチドの置換を含めたこれらと同様の多数の修飾核酸分子が当業者により容易に意図される。上記の例では、2つのアミノ酸の各組合せは、修飾核酸分子の組に、ならびにアミノ酸置換をコードするすべてのヌクレオチド置換に含まれる。当業者に容易に意図されるように、さらなる置換（即ち、3またはそれ以上）、付加または欠失（例えば、停止コドンまたはスプライス部位（単数または複数）の導入による）を有するポリペプチドをコードする付加的核酸分子も調製され得るし、本発明に包含される。上記の核酸またはポリペプチドはいずれも、本明細書中に開示された核酸および/またはポリペプチドに対する構造的関連または活性の保持に関して、ルーチン実験により試験され得る。 20

【 0 0 3 0 】

本発明のポリヌクレオチド分子はDNAまたはRNAの形態をとることができ、DNAにはcDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAが包含される。また、DNAおよびRNAは一本鎖または二本鎖であってよく、一本鎖の場合はセンス鎖またはアンチセンス鎖の両者が包含され得る。 30

【 0 0 3 1 】

SART2のポリペプチド、例えばSART2またはそれらに由来するHLAクラスII結合ペプチドの理想的な形態は、少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは2つ以上のHLA型に結合することが可能で、CD4陽性T細胞を増殖させることのできる性質を持つことである。例えば、実施例で示すように本発明のペプチドは2つのHLA型に結合することが可能で、CD4陽性T細胞を増殖させることのできる性質を持つ。

【 0 0 3 2 】

本発明は、発現ベクター中での、ならびに原核生物（例えば大腸菌）または真核生物（例えば樹状細胞、CHO細胞、COS細胞、酵母発現系、細胞内寄生原虫発現系、乳酸菌発現系および昆虫細胞における組換えバキュロウイルス発現）である宿主細胞および細胞株をトランスフェクトするための本配列の使用を包含することも理解されたい。発現ベクターは、関連配列、即ち上記のものがプロモーターと操作可能に結合されることを必要とする。ヒトHLA分子はSART2のHLAクラスII結合ペプチドを提示することが見出されているので、発現ベクターは、HLA分子をコードする核酸配列も含み得る（他のSART2のHLAクラスII結合ペプチドに関しては、異なるHLA分子が用いられ得る）。ベクターが両コード配列を含有する状況では、それは正常ではいずれか一方を発現しない細胞をトランスフェクトするために用いられ得る。 40

【 0 0 3 3 】

本明細書中で用いる場合、「ベクター」とは、異なる遺伝子環境間の輸送のための、ま 50

たは宿主細胞中での発現のための制限および結紮により所望の配列が挿入され得る多数の核酸のいずれかであり得る。ベクターは、典型的にはDNAで構成されるが、RNAベクターも利用可能である。ベクターとしては、プラスミド、ファジミドおよびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。クローニングベクターは、宿主細胞中で自律的に複製可能であるかまたはゲノム中に組み込まれ得るクローニングベクター、ならびに新規の組換えベクターが宿主細胞中で複製するその能力を保持するようにベクターが決定可能様式で切断され、そして所望のDNA配列が結紮され得る1つまたはそれ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によりさらに特性化されるクローニングベクターである。プラスミドの場合、所望の配列の複製は、プラスミドが宿主細菌内でコピー数を増大する場合は多数回起こり得るし、あるいは宿主が有糸分裂により繁殖する前には宿主当たり1回だけ起こり得る。ファージの場合は、複製は、溶菌期中は能動的に起こり、溶原期中は受動的に起こり得る。発現ベクターは、調節配列に操作可能的に連結され、そしてRNA転写体として発現され得るように、所望のDNA配列が制限および結紮により挿入され得るベクターである。

10

【0034】

ベクターは、ベクターで形質転換またはトランスフェクトされていたか、またはされていなかった細胞の同定に用いるのに適した1つまたはそれ以上のマーカー配列をさらに含有し得る。マーカーとしては、例えば、抗生物質またはその他の化合物に対する耐性または感受性を増大または低減するタンパク質をコードする遺伝子、その活性が当業界で既知の標準検定により検出可能である酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼまたはルシフェラーゼ）をコードする遺伝子、ならびに形質転換化またはトランスフェクト化した細胞、宿主、コロニーまたはプラークの表現型に視覚的に作用する遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）が挙げられる。好ましいベクターは、それらが操作可能的に連結されるDNAセグメント中に存在する構造遺伝子産物の自律的複製および発現が可能なベクターである。

20

【0035】

好ましくは、発現ベクターは、タンパク質またはペプチドが発現される細胞のエンドソームに対してSART2のポリペプチド、例えばSART2またはそれらに由来するHLAクラスII結合ペプチドを標的化する配列を含有する。HLAクラスII分子は、HLAクラスII分子と他の分子の結合を妨害する不変鎖（Ii）を含有する。この不変鎖はエンドソーム中で切断され、それによりHLAクラスII分子によるペプチドの結合を可能にする。したがって、SART2のHLAクラスII結合ペプチドおよびその前駆体（例えばSART2タンパク質）はエンドソームに対して標的化され、それによりHLAクラスII分子と結合するSART2のHLAクラスII結合ペプチドを強化することが好ましい。エンドソームに分子を向けるためのターゲティングシグナルは当業界で既知であり、これらのシグナルは、エンドソームターゲティングシグナルを含有する融合タンパク質が産生されるよう、発現ベクター中に組み入れられ得るのが便利である。サンダーソン（Sanderson）（「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）」、1995年、第92巻、p. 7217 - 7221）、ウ（Wu）（「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）」、1996年、第92巻、p. 11671 - 11675）およびトムソン（Thomson）（「ジャーナル・オブ・バイロロジー（Journal of virology）」、1998年、第72巻、p. 2246 - 2252）は、エンドソームターゲティングシグナル（不変鎖Iiおよびリソソーム関連膜タンパク質LAMP-1を含む）ならびにエンドソームおよび/またはリソソーム細胞区画に抗原を向ける場合のそれらの使用を記載している。

30

40

【0036】

50

本明細書中で用いる場合、コード配列および調節配列は、調節配列の影響または制御下にコード配列の発現または転写を置くような方法でそれらが共有結合される場合、「操作可能的に」連結されるといわれる。コード配列が機能性タンパク質に翻訳されるのが望ましい場合、5'調節配列中のプロモーターの誘導がコード配列の転写を生じ、二つのDNA配列間の結合の性質が(1)フレームシフト突然変異の導入を生じない、(2)コード配列の転写を指図するプロモーター領域の能力を妨げない、または(3)タンパク質に翻訳される対応するRNA転写体の能力を妨げないならば、二つのDNA配列は操作可能的に連結されるといわれる。したがって、結果的に生じる転写体が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳され得るようにプロモーター領域がそのDNA配列の転写を実行可能であった場合には、プロモーター領域はコード配列と操作可能的に連結される。

10

【0037】

遺伝子発現に必要とされる調節配列の的確な性質は、種または細胞型間で変わり得るが、しかし概して、必要な場合には、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等のような、それぞれ転写および翻訳の開始に関与する5'非転写化および5'非翻訳化配列を含む。特に、このような5'非転写化調節配列は、操作可能的に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。調節配列は、望ましい場合には、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列も含み得る。本発明のベクターは、5'リーダーまたはシグナル配列を任意に含み得る。適切なベクターの選定および設計は、当業者の能力および自由裁量の範囲内である。

【0038】

20

発現のための必要な素子をすべて含有する発現ベクターは市販されており、当業者に既知である(例えば、サムブルック(Sambrook)著、「モレキュラー・クローニング ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年、第1-3巻を参照)。細胞は、SART2のHLAクラスII結合ポリペプチドをコードする異種DNA(あるいはRNA)の細胞への導入により遺伝子工学処理される。その異種DNA(あるいはRNA)は、宿主細胞中での異種DNAの発現を可能にするために転写性素子の操作可能制御下に置かれる。本明細書中に記載されているように、このような発現構築物は、エンドソームターゲティングシグナル、好ましくはヒト不変鎖またはそのターゲティング断片をコードするヌクレオチド配列も任意に含

30

【0039】

哺乳類細胞中でのmRNA発現のための好ましい系は、G418耐性を付与する遺伝子(安定トランスフェクト化細胞株の選択を促す)、およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)エンハンサー-プロモーター配列のような選択可能マーカ含有するpRC/CMV(Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能)のような系である。さらに、霊長類またはイヌ細胞株中での発現に適しているのは、エプスタイン-バーウイルス(EBV)複製起点を含有し、多コピー染色体外素子としてのプラスミドの保持を促すpCEP4ベクター(Invitrogen)である。別の発現ベクターは、in vitroでの転写を効率的に刺激するポリペプチド延長因子1αのプロモーターを含有するpEF-BOSプラスミドである。本

プラスミドは、ミジズマ(Mishizuma)ら(「ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic acids research)」、1990年、第18巻、p. 5322)により記載されており、トランスフェクション実験におけるその使用は、例えばデモウリン(Demoulin)ら(「モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and cellular biology)」、1996年、第16巻、p. 4710-4716)により開示されている。さらに別の好ましい発現ベクターは、スタンフォード-ペリカウデット(Stratford-Perricaudet)らにより記載されたアデノウイルスであり、これはE1およびE3タンパク質を欠いている(「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インバスティゲーション(The Journal of clinical investigation)」、1992年、第90巻、p. 626-630)。Adeno.P1A組換え体としてのアデノウイルスの使用は、P1Aに対する免疫感作のためのマウスにお

40

50

ける皮内注射において、ワーニアー（Warnier）らにより開示されている（「インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー（International journal of cancer）」、1996年、第67巻、p. 303 - 310）。

【0040】

「障害」または「症状」という用語が本明細書中で用いられる場合、それは、SART2のHLAクラスII結合ペプチドが発現される任意の病理学的症状を指す。このような障害としては、癌、例えばグリオーマを含む脳腫瘍、頭、首、肺、子宮または食道の扁平上皮癌、メラノーマ、肺または子宮の腺癌、腎癌が挙げられる。

【0041】

開示に基づいたいくつかの療法的アプローチは、SART2のHLAクラスII結合ペプチド提示細胞に対する対象の免疫系による応答の誘導において前提とされる。このようなアプローチの1つは、組織での表現型の異常細胞を有する対象への、SART2のHLAクラスII結合ペプチドとHLAクラスII分子の複合体を認識する白血球、好ましくは本発明のペプチドに特異的な自家CD4陽性T細胞の投与である。このようなCD4陽性T細胞をin vitroで開発することは当業者の技術の範囲内である。一般に、対象から採取される細胞の試料、例えば血球は、複合体を提示し、CD4陽性T細胞を惹起し得る細胞と接触されて、増殖する。標的細胞は、HLAクラスII分子を保有する抗原提示細胞、例えば樹状細胞またはB細胞であり得る。標的細胞は、細胞の試料がまず分類されてCD4陽性T細胞集団を単離する場合、COS細胞のようなトランスフェクト体でもあり得る。上記の四量体技術は分類のために用いられ得る。これらのトランスフェクト体はそれらの表面の所望の複合体を提示し、問題のCD4陽性T細胞と組合されると、その増殖を刺激する。COS細胞は、他の適切な宿主細胞と同様に、広範に利用可能である。CD4陽性T細胞の特異的産生は、下記に記載される。クローン拡張性自家CD4陽性T細胞が次に対象に投与される。次にCD4陽性T細胞は対象の免疫応答を刺激し、それにより所望の療法的目標を達成する。

【0042】

上記の療法は、対象の異常細胞の少なくともいくつかに関連HLA/ペプチド複合体を提示するものと仮定する。これは、特定のHLA分子を提示する細胞の同定方法、ならびに関連配列、この場合にはSART2配列のDNAを発現する細胞の同定方法を当業界が非常に熟知しているので、非常に容易に確定され得る。上記の療法は、本発明による利用可能な療法の唯一の形態というわけではない。CD4陽性T細胞は、多数のアプローチを用いてin vivoでも惹起され得る。一アプローチは、複合体を発現する非増殖性細胞の使用である。このアプローチに用いられる細胞は、複合体を正常に発現する細胞、例えば樹状細胞、あるいは複合体の提示に必要な遺伝子の一方または両方でトランスフェクトされた細胞であり得る。同様に、当該遺伝子の一方または両方を保有するベクターが用いられ得る。ウイルスまたは細菌ベクターが特に好ましい。例えば、SART2のHLAクラスII結合ペプチドをコードする核酸は、ある種の組織または細胞型におけるSART2のHLAクラスII結合ペプチドの発現を指図するプロモーターおよびエンハンサー配列と操作可能的に連結され得る。核酸は、発現ベクター中に組み入れられ得る。発現ベクターは、SART2のHLAクラスII結合ペプチドをコードするもののような外因性核酸の挿入を可能にするよう構築されるか、または修飾された非修飾細胞外染色体核酸、プラスミドまたはウイルスゲノムであり得る。SART2のHLAクラスII結合ペプチドをコードする核酸は、レトロウイルスゲノム中にも挿入され、それにより標的組織または細胞型のゲノムへの核酸の組込みを促し得る。これらの系では、当該遺伝子は微生物、例えばワクシニアウイルス、概してボックスウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルスまたは細菌BCG、ならびに事実上、宿主細胞を「感染」させる物質により保有される。結果として生じる細胞は、当該複合体を提示し、自家CD4+T細胞により認識され、次にこれが増殖する。

【0043】

同様の作用は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドをアジュバントと組合せて

、in vivoでのHLAクラスII提示細胞中への組み入れを促すことにより達成され得る。HLAクラスII結合部分より大きい場合、SART2のHLAクラスII結合ペプチドはHLA分子のペプチド相手を産生するのに必要な場合にプロセッシングされ得る。一般に、対象は、有効量のSART2のHLAクラスII結合ペプチドの皮内注射を受けることができる。当業界での免疫感作プロトコール標準に従って、初期用量と、その後の追加免疫用量を投与することができる。

【0044】

上記の組成物またはプロトコールのいずれかは、細胞溶解性T細胞応答の誘導のためのSART2のHLAクラスII結合ペプチドも含み得る。例えば、下記で実証されるように、SART2タンパク質は細胞中でプロセッシングされて、HLAクラスIIおよびHLAクラスII応答の両方を生じ得る。HLAクラスIIおよびクラスII分子を結合するSART2ペプチド（またはこのようなペプチドをコードする核酸）を投与することにより、免疫応答改善がTヘルパー細胞およびTキラー細胞の両方を誘導することにより提供され得る。

10

【0045】

さらに、非SART2腫瘍関連ペプチドも、HLAクラスIIおよび/またはクラスIIにより免疫応答を増大するために投与され得る。癌細胞が1つより多い腫瘍関連遺伝子を発現し得ることは十分に確立されている。特定の対象が付加的腫瘍関連遺伝子を発現するか否かを当業者が確定し、次に上記のSART2組成物および治療剤および予防剤中にこのような遺伝子の発現産物に由来するHLAクラスIIおよび/またはHLAクラスII結合ペプチドを含むことは、ルーチン実験の範囲内である。

20

【0046】

本発明は、本明細書中に記載されているように、多数の用途を有し、そのいくつかは本明細書中に記載されている。以下の用途はSART2のHLAクラスII結合ペプチドに関して記載されるが、しかし他の構造的または機能的に関連するSART2のHLAクラスII結合ペプチドに等しく適用可能である。第一に、本発明は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドの発現を特徴とする疾患を当業者が診断するのを可能にする。これらの方法は、生物学的試料中でのSART2のHLAクラスII結合ペプチド、またはSART2のHLAクラスII結合ペプチドとHLAクラスII分子の複合体の発現を確定する過程を含む。ペプチドまたはペプチドとHLAクラスII分子の複合体の発現は、ペ

30

【0047】

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体に対する抗体は、例えば、レイル（Lane）ら著、「アンティボディーズ；ア・ラボラトリー・マニュアル（Antibodies; A Laboratory Manual）、第1版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Cold Spring Harbor Laboratory Press）、1989年」などに記載の方法により、本発明のペプチドを用いて適切な方法で適切な動物を免疫することにより、腫瘍抗原タンパク質を認識する抗体、あるいはその活性を中和する抗体を容易に作製できる。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング、免疫

40

【0048】

本発明のペプチドおよび/又は本発明のポリヌクレオチド分子および/又は本発明のペプチドに反応する白血球および/又は本発明のペプチドに対する抗体を有効成分とする医薬組成物は、SART2を発現している癌細胞に反応し、その増殖を抑制させることで、SART2の発現を特徴とする症状を治療するという効果も期待できるであろう。これら医薬組成物はSART2の発現を特徴とする症状が発症する前に投与されることで、その症状、例えば腫瘍、に対する予防剤となりうる。また、SART2の発現を特徴とする症状が発症する後にこれら医薬組成物を投与することで、その症状、例えば腫瘍、に対する治療剤となりうる。さらに、本発明のペプチド、本発明のポリヌクレオチド分子、本発明

50

のペプチドに反応する白血球、本発明のペプチドに対する抗体をを適宜選択した2種類以上を組み合わせることで、SART2の発現を特徴とする症状を治療する効果を高めるといふ効果も期待できるであろう。

【0049】

治療剤および予防剤も、SART2のHLAクラスII結合ペプチドまたはその前駆体をコードする裸DNAまたはRNAを包含するが、これらはin vitroで産生され、注射、粒子衝撃、鼻腔吸入およびその他の方法により投与され得る。「裸核酸」型の治療剤および予防剤は、裸核酸によりコードされるペプチドに特異的なCTLの生成を含めた免疫学的応答を惹起することが実証されている。治療剤および予防剤は、ウイルス、リボソームまたはその他の粒子、例えば薬剤送達に有用なポリマー粒子中に充填された核酸も含む。

10

【0050】

免疫感作プロトコールの一部として、免疫応答を増強する物質が、癌の治療剤および予防剤の核酸またはペプチド構成成分とともに投与され得る。このような免疫応答増強化合物は、アジュバントまたはサイトカインとして分類され得る。アジュバントは、抗原の貯蔵所（細胞外またはマクロファージ内）を提供し、マクロファージを活性化し、かつ特定組のリンパ球を刺激することにより、免疫学的応答を強化し得る。多数の種類のアジュバントが、当業界で周知である。特定の例としては、MPL (SmithKline Beecham)、サルモネラ属の *Salmonella minnesota* Re 595 リポ多糖類の精製および酸加水分解後に得られる同類物；QS21 (SmithKline Beecham)、Quillja saponaria 抽出物から精製される純QA-21 サポニン；PCT出願WO96/33739 (SmithKline Beecham) に記載されたDQS21；QS-7、QS-17、QS-18 およびQS-L1 (ソ (So)、外10名、「モレキュルズ・アンド・セル (Molecules and cells)」、1997年、第7巻、p. 178-186)；フロイントの不完全アジュバント；フロイントの完全アジュバント；ビタミンE；モンタニド；ミョウバン；CpGオリゴヌクレオチド（例えば、クレイグ (Kreig)、外7名、「ネイチャー (Nature)」、第374巻、p. 546-549)を参照)；ならびにスクアレンおよび/またはトコフェロールのような生分解性油から調製される種々の油中水エマルションが挙げられる。好ましくは、ペプチドは、DQS21/MPLの組合せと混合されて投与される。DQS21対MPLの比は、典型的には約1:10~10:1、好ましくは約1:5~5:1、さらに好ましくは約1:1である。典型的には、ヒト投与に関しては、DQS21およびMPLは、約1μg~約100μgの範囲でワクチン処方物中に存在する。その他のアジュバントが当業界で既知であり、本発明に用いられ得る（例えば、ゴッディング (Goding) 著、「モノクローナル・アンチボディーズ：プリンシプル・アンド・プラクティス (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)」、第2版、1986年を参照)。ペプチドおよびアジュバントの混合物またはエマルションの調製方法は、予防接種の当業者には周知である。

20

30

【0051】

対象の免疫応答を刺激するその他の因子も、対象に投与され得る。例えばその他のサイトカインも、リンパ球刺激特性の結果として、予防接種プロトコールに有用である。このような目的のために有用な多数のサイトカインは当業者に既知であり、その例としては、ワクチンの防御作用を強化することが示されているインターロイキン-12 (IL-12)、GM-CSF、IL-18 および Flt3-Ligand が挙げられる。

40

【0052】

投与される場合、本発明の治療用組成物は、製薬上許容可能な調製物中で投与される。このような調製物は、製薬上許容可能な濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、相溶性担体、補助免疫増強剤、例えばアジュバントおよびサイトカイン、ならびに任意にその他の療法的作用物質をルーチンに含有し得る。

【0053】

本発明はさらに、本発明の腫瘍抗原に関するペプチドもしくはその変異体・誘導体を含有する医薬を提供する。本発明の腫瘍抗原タンパク質および腫瘍抗原ペプチドは、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投

50

与したりすることができる。また、剤型としては、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッド（脂質）を結合させた製剤などが用いられる。また、腫瘍抗原ペプチドをパルスした樹状細胞やマイクロファージなどの抗原提示細胞や本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードするDNAあるいはRNAを導入した細胞を投与する方法も考えられる。この場合に導入するDNAあるいはRNAの望ましい形態として、本発明のペプチドを含む様々なヘルパーエピトープあるいはCTLエピトープである腫瘍抗原ペプチドもしくは腫瘍抗原をコードするDNAあるいはRNAを一つ、もしくはそれ以上を細胞に導入するか、これらDNAあるいはRNAを一つ、もしくはそれ以上を連結させて細胞に導入する方法が考えられる。また、前述したDNAあるいはRNAの代わりにペプチド、ポリペプチドあるいはタンパク質を細胞に導入することも考えられる。

10

【0054】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子またはオリゴヌクレオチド分子もしくはその化学的修飾体を含む医薬に関する。本発明のポリヌクレオチド分子またはオリゴヌクレオチド分子を含む「医薬」は、例えば、本発明のDNAを腫瘍患者等に投与することで腫瘍を治療または予防することができる。本発明のDNAを投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス、1994年4月、p. 20 - 45、月刊薬事、1994年、第36巻、第1号、p. 23 - 48、実験医学増刊、1994年、第12巻、第15号、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

【0055】

20

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス等のRNAウイルスまたはDNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

【0056】

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

30

【0057】

これらの本発明のポリヌクレオチド分子またはオリゴヌクレオチド分子を有するプラスミドも本発明の範囲に含まれる。

【0058】

本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードする遺伝子を実際に医薬として作用させるには、遺伝子を直接体内に導入する*in vivo*方法、およびヒトからある種の細胞を採取し体外で遺伝子を該細胞に導入しその細胞を体内に戻す*ex vivo*方法がある（日経サイエンス、1994年4月、p. 20 - 45、月刊薬事、1994年、第36巻、第1号、p. 23 - 48、実験医学増刊、1994年、第12巻、第15号、およびこれらの引用文献等）。*In vivo*方法がより好ましい。

40

【0059】

*In vivo*方法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与することが出来る。*in vivo*方法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含む注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のDNAを含むリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

【0060】

製剤中の本発明のDNA含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整

50

することができるが、通常本発明のDNAとして、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0061】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を用いて、腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子の発現を制御することができる。この方法によって腫瘍抗原タンパク質の生産量を減らすことで、自己免疫疾患を治療または予防することができる。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する医薬も本発明に包含される。

【0062】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを発現プラスミドに組み込む場合、このアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入する方法としては例えば、実験医学、1994年、第12巻に述べられている方法が挙げられ、リポソームや組換えウイルスなどを利用した方法が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの発現プラスミドは通常の発現ベクターを用いてプロモーターの後ろに逆向きに、すなわち本発明の遺伝子が3'から5'の向きに転写されるように、本発明の遺伝子をつなぐだけで簡単に作製できる。

【0063】

このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを有するプラスミドも本発明に包含される。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体をそのまま投与する場合、安定化剤、緩衝液、溶媒などと混合して製剤された後、投与時には抗生物質、抗炎症剤、麻酔薬などと同時に用いることもできる。こうして作製された製剤は様々な方法で投与可能である。投与は連日または数日から数週間おきになされるのが好ましい。また、この様な頻回の投与を避けるために徐放性のミニベレット製剤を作製し患部近くに埋め込むことも可能である。あるいはオスモチックポンプなどを用いて患者に連続的に徐々に投与することも可能である。通常投与量は作用部位における濃度が0.1nM-10μMになるように調製する。

【0064】

このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を含有する医薬も本発明に包含される。

【0065】

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体に対する抗体を腫瘍の治療に用いることも可能である。例えば、SART2の発現を特徴とする症状を発症した患者に本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体に対する抗体を有効量投与することで、癌の治療に望ましい応答を誘導することができる。本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体に対する抗体の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0066】

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体、あるいは本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体に対する抗体、あるいは本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体で誘導したT細胞、例えば単離性CD4陽性T細胞、および樹状細胞などの単離抗原提示細胞における癌に対する治療効果は動物モデルを用いて検証することもできる。例えば、免疫不全マウス（ヌードマウス、スキッドマウス等）あるいはヒトHLAトランスジェニックマウスに腫瘍細胞を移植する前あるいは移植後、有効量でかつ最適の投与方法でペプチド、抗体あるいは細胞を投与することで、癌に対する治療効果を判定できるが、これに限定されるわけではない。この場合の本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体、あるいは本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体に対する抗体の投与量としては、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましいし、細胞の投与量としては、通常1～10000000000個、好ましくは100000～10000000000個であり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0067】

本発明の治療用組成物を用いて免疫応答を刺激するのが望ましい場合、これは、血清中

10

20

30

40

50

の抗体価の増大、細胞傷害性リンパ球のクローン性拡張またはいくつかのその他の望ましい免疫学的応答を引き起こす体液性抗体応答の刺激を包含し得る。投与方式によって、1ナノグラム/キログラム～100ミリグラム/キログラムの範囲の免疫原の用量が有効であると考えられる。好ましい範囲は、500ナノグラム～500マイクログラム/キログラムであると思われる。絶対量は、種々の要因、例えば投与のために選定される物質、投与が1回投与であるか多数回投与であるか、ならびに個々の患者パラメーター、例えば年齢、健康状態、サイズ、体重および疾患の段階によるであろう。これらの要因は当業者には周知であり、ルーチン実験で取り扱われ得る。

【0068】

また、本発明のペプチドを有効成分として含む腫瘍の診断剤を提供することもできる。つまり、SART2の発現を特徴とする症状を免疫学的に診断することも可能である。免疫学的診断法は、イムノプロット法、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EISA)、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。例えば、本発明の腫瘍抗原ペプチドもしくはその変異体・誘導体を固相化し、SART2の発現を特徴とする症状をもつ患者由来の血清もしくは血漿を反応させることで、患者血清もしくは血漿中のSART2に対する抗体価を測定することが可能である。

【0069】

これらの単離SART2のHLAクラスII結合ペプチド、かかるペプチドを含むタンパク質、あるいはペプチドおよびHLAクラスII分子の複合体は、アジュバントのような物質と組合されて、SART2のHLAクラスII結合ペプチドの発現を特徴とする障害を治療するのに有用な治療剤および予防剤を生成し得る。さらに、この治療剤および予防剤は、それらの表面にSART2のHLAクラスII結合ペプチド/HLA複合体を提示する細胞、例えば樹状細胞、B細胞、非増殖性トランスフェクト体等から調製され得る。治療剤および予防剤として細胞が用いられるすべての場合に、これらは、CD4陽性T細胞を刺激するのに必要な構成成分の一方または両方に関するコード配列でトランスフェクトされた細胞、あるいはトランスフェクションを必要とせずにすでに両分子を発現している細胞であり得る。例えば、自己抗原提示細胞は、患者から単離され、HLAクラスIIおよびHLAクラスII分子の会合中でSART2エピトープを提示する細胞を得るよう処理され得る。これらの細胞は、CD4陽性およびCD8陽性細胞応答の両方を刺激することが可能である。樹状細胞は、HLAクラスIおよびHLAクラスIIエピトープでも

【0070】

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体をワクチンとして接種することは、腫瘍の予防方法および予防用組成物を提供することができる。例えば、腫瘍抗原ペプチドもしくはその変異体・誘導体を接種しておき、腫瘍抗原に対する抗体の作用を期待する液性免疫、例えば抗体依存性細胞傷害、もしくは腫瘍抗原に対するT細胞の作用を期待する細胞性免疫の誘導を促すことで、腫瘍の発生を予防することができる。

【0071】

本発明は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドの発現を特徴とする障害を有する対象を当業者が治療するための治療剤又は治療方法の提供を可能にする。治療は、SART2のHLAクラスII結合ペプチドとHLAクラスII分子の複合体を対象中で高濃度化する因子を治療剤として投与する過程、およびこのような複合体に特異的であるCD4陽性T細胞を治療剤として投与する過程を包含する。上記の治療に有用な因子としては、SART2のHLAクラスII結合ペプチドおよびその機能的変異体、このようなSART2ペプチドを含むエンドソーム標的化融合タンパク質、このようなタンパク質およびペプチドを発現する核酸(核酸を含有するウイルスを含む)、このようなペプチドおよびHLAクラスII結合分子の複合体、SART2のHLAクラスII結合ペプチドおよびHLAクラスII結合分子の複合体を保有する抗原提示細胞、例えば樹状細胞、B細胞、非増殖性トランスフェクト体等が挙げられる。本発明は、当業者が、SART2のHLAクラスII結合ペプチドに特異的なCD4陽性T細胞に関してT細胞の集団を選択的に高濃

度化することも可能にする。S A R T 2 の H L A クラス I I 結合ペプチドの単離は、S A R T 2 の H L A クラス I I 結合ペプチドをコードする核酸を単離するのも可能にする。核酸は、in vivoで、あるいは原核生物または真核生物宿主細胞中でS A R T 2 の H L A クラス I I 結合ペプチドを生成するために用いられ得る。熟練従事者に周知の種々の方法を用いて、単離S A R T 2 の H L A クラス I I 結合ペプチドを得ることができる。例えば、発現ベクターを細胞中に導入して、ペプチドの産生を生じ得る。別の方法では、m R N A 転写体が微量注射され、そうでなければ細胞中に導入されて、コード化ポリペプチドの産生を生じ得る。細胞無含有抽出物、例えば網状赤血球溶解物系におけるm R N A の翻訳も、ペプチドを産生するために用いられ得る。本発明のS A R T 2 の H L A クラス I I 結合ペプチドを含むペプチドは、in vitroでも合成され得る。当業者は、単離S A R T 2 の H L A クラス I I 結合ペプチドを生成するために、既知のペプチド単離方法にも容易に従い得る。これらの例としては、免疫クロマトグラフィー、H P L C、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよび免疫アフィニティークロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0072】

製剤中の本発明の腫瘍抗原ペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~1000mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

【0073】

本発明の調製物は、有効量で投与される。有効量とは、単独でまたはさらなる用量とともに、所望の応答を刺激する製剤調製物の量である。癌を治療する場合、望ましい応答は、癌の進行の抑制である。これは、疾患の進行を一時的に遅くすることのみを包含し得るが、しかしさらに好ましくは、永続的に疾患の進行を停止させることを包含する。免疫応答を誘導する場合には、望ましい応答は、用いられるS A R T 2 免疫原（単数または複数）に特異的である抗体またはT細胞の増大である。これらの望ましい応答は、ルーチン法により監視され得るし、あるいは本明細書中で考察される本発明の診断方法により監視され得る。

20

【0074】

本発明のポリヌクレオチドには、本発明のペプチド配列を含むD N A領域をP C R法により増幅できるプライマーが含まれている。該プライマーは、S A R T 2 の発現を特徴とする症状をもつ患者からの組織、血液などからR N A、c D N Aを調整し、P C R法により診断をすることに用いることができる。さらに、S A R T 2 の発現を特徴とする症状をもつ患者からの組織、血液などからR N Aを調整し、本発明のポリヌクレオチドをプローブに用いたノーザンブロット法によって腫瘍の診断が可能となる。また、本発明のポリヌクレオチド分子を用いたD N Aチップは、S A R T 2 の発現を特徴とする症状をもつ患者からの組織、血液などから調整したc D N Aを材料にした腫瘍の診断を可能とする。これらは、本発明のポリヌクレオチド分子を有効成分として含む腫瘍の診断剤の一態様であるが、本発明のポリヌクレオチド分子を有効成分とする腫瘍の診断剤はこのような態様に限定されない。

30

【0075】

さらに、本発明のペプチドに対する抗体はS A R T 2 の発現を特徴とする症状に対する診断剤を提供することができる。例えば、本発明のペプチドに対する抗体を有効成分として含む腫瘍の診断剤をS A R T 2 の発現を特徴とする症状をもつ患者由来の組織と反応させ、S A R T 2 の発現を検出することが可能である。腫瘍組織においてS A R T 2 は顕著に発現していることから、前記方法により腫瘍の診断を行うことが可能である。

40

【0076】

本明細書中に記載した治療のいずれかにより生成されるか、または強化される免疫応答は、当業界で既知の種々の方法によりモニタリングされ得る。例えば、所定の抗原に特異的なT細胞の存在は、抗原性ペプチドを提示する可溶性蛍光原性M H C分子四量体によるT細胞受容体の直接標識により検出され得る（ダンバー（Dunbar）、外5名、「カレント

50

・バイオロジー (Current biology)」、1998年、第8巻、p. 413 - 416)。
要するに、 $\beta 2$ -ミクログロブリンおよびクラスI分子を結合するペプチド抗原の存在下で、可溶性MHCクラスI分子がin vitroで折り畳まれる。精製後、MHC/ペプチド複合体は精製され、ピオチンで標識される。ピオチニル化ペプチド-MHC複合体を標識化アビジン(例えば、フィコエリスリン)と4:1のモル比で混合することにより、四量体が形成される。四量体は次に、末梢血またはリンパ節のようなCTLの供給源と接触させられる。四量体は、ペプチド抗原/MHCクラスI複合体を認識するCTLを結合する。四量体により結合された細胞は、蛍光活性化細胞分類により分類されて、反応性CTLを単離し得る。単離CTLは次に、本明細書中に記載したような使用のためにin vitroで拡張され得る。四量体としてのMHCクラスII分子の使用は、近年、クラウフォード(Crawford)ら(「イムニティー (Immunity)」、1998年、第8巻、p. 675 - 682)により実証された。多量体性可溶性MHCクラスII分子は、共有的に結合されたペプチドと複合化された。クラスII四量体は、適切化特異性および親和性で特異的T細胞と結合することが示された。したがって、四量体を用いて、予防接種プロトコールに対するCD4陽性およびCD8陽性細胞応答の両方をモニタリングすることができる。

10

【0077】

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体を投与する場合、in vitroで培養した樹状細胞にパルスすることで効果を上げることができる。

【0078】

すなわち、骨髓、臍帯血あるいは患者末梢血から、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)とIL-3(あるいはIL-4)により樹状細胞を誘導し、その培養系に腫瘍関連ペプチドを加えることにより、腫瘍特異的な樹状細胞を誘導することができる。この樹状細胞を有効量投与することで、癌の治療に望ましい応答を誘導できる。さらに好ましくは、腫瘍特異的な樹状細胞を誘導後、T細胞を樹状細胞と相互作用させて増殖させ、投与することである。

20

【0079】

用いる細胞は、健康人から提供された骨髓や臍帯血、患者本人の骨髓や末梢血等を用いることができるが、患者本来の自家細胞を使う場合は、安全性が高く、重篤な副作用を回避することも期待できる。末梢血または骨髓は新鮮試料、低温保存試料及び凍結保存試料のいずれでもよい。末梢血は、全血を培養してもよいし、白血球成分だけを分離して培養してもよいが、後者の方が効率的で好ましい。さらに白血球成分の中でも単核球を分離してもよい。また、骨髓や臍帯血を起源とする場合には、骨髓を構成する細胞全体を培養してもよいし、これから単核球を分離して培養してもよい。末梢血やその白血球成分、骨髓細胞には、樹状細胞の起源となる単核球、造血幹細胞又は未成熟樹状細胞やCD4陽性細胞等が含まれている。用いられるサイトカインは、安全性と生理活性が確認された特性のものであれば、天然型、あるいは遺伝子組み換え型等、その生産手法については問わないが、好ましくは医療用に用いられる品質が確保された標品が必要最低量で用いられる。添加するサイトカインの濃度は、樹状細胞が誘導される濃度であれば特に限定されず、通常サイトカインの合計濃度で10~1000ng/mL程度が好ましく、さらに好ましくは20~500ng/mL程度である。培養は、白血球の培養に通常用いられている周知の培地を用いて行うことができる。培養温度は白血球の増殖が可能であれば特に限定されないが、ヒトの体温である37℃程度が最も好ましい。また、培養中の気体環境は白血球の増殖が可能であれば特に限定されないが、5%CO₂を通気することが好ましい。さらに培養期間は、必要数の細胞が誘導される期間であれば特に限定されないが、通常3日~8週間の間で行われる。細胞の分離や培養に供される機器は、適宜適当なものを用いることができるが、医療用に安全性が確認され、かつ操作が安定して簡便であることが好ましい。特に細胞培養装置については、シャーレ、フラスコ、ボトル等の一般的容器に拘わらず、積層型容器や多段式容器、ローラーボトル、スピナー式ボトル、バッグ式培養器、中空系カラム等も用いることができる。

30

40

【0080】

50

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体により *in vitro* で培養された樹状細胞および T 細胞の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常 $1 \sim 10000000000$ 個、好ましくは $1000000 \sim 10000000000$ 個であり、これを数日ないし数月に 1 回投与するのが好ましい。

【0081】

本発明のペプチドもしくはその変異体・誘導体は *in vivo* 投与においても、癌の治療に望ましい応答を誘導できる。

【0082】

樹状細胞増殖因子 Flt3-Ligand あるいはその代替物を有効量投与し、腫瘍関連ペプチドあるいはそのペプチド配列をコードする mRNA および RNA を投与する。この時、好ましくは樹状細胞を活性化するアジュバントとして有効量の Imiquimod あるいは CpG 等、さらに好ましくは IL-2 とジフテリア毒素由来の融合タンパク質である Ontak 等を投与して CD25 陽性細胞を除くことで癌の治療に望ましい応答を誘導できる。 10

【実施例】

【0083】

実施例 1：SART2 由来ペプチドエピトープ反応性 CD4 陽性 T 細胞の誘導

(1) ヒト SART2 タンパク質のアミノ酸配列の情報を GenBank から得た。CD4 陽性 T 細胞抗原エピトープ予測のため、SYFPEITHI アルゴリズム、ProPred アルゴリズム、および RANKPEP アルゴリズムの 3 つのコンピューター予測プログラムを用いてヒト SART2 タンパク質のアミノ酸配列を解析し、3 種類のペプチドを選択した (配列番号 4：SART2 548-574、配列番号 6：SART2 915-940、配列番号 8：SART2 532-556)。 20

【0084】

(2) HLA-DRB1*09/14 陽性、HLA-DRB1*04/09 陽性、HLA-DRB1*04/15 陽性、HLA-DRB1*14/15 陽性の健常人から末梢血を分離し、Lymphocyte separation medium (Organon Teknica, Durham, NC) に重層して $1,500 \text{ rpm}$ で室温で 20 分間遠心分離した。PBMC を含有する相間を収穫し、冷リン酸塩緩衝液中で 3 回 (またはそれ以上) 洗浄し、末梢血単核球 (PBMC) を得た。得られた PBMC を AIM-V 培地 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) 20 ml に懸濁し、培養フラスコ (Falcon) 中に 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ の条件下で 2 時間付着させた。非付着細胞は T 細胞調製に用い、付着細胞は樹状細胞を調製するために用いた。 30

【0085】

一方、付着細胞を AIM-V 培地中で IL-4 (1000 U/ml) および GM-CSF (1000 U/ml) の存在下で培養した。6 日後に IL-4 (1000 U/ml)、GM-CSF (1000 U/ml)、IL-6 (1000 U/ml 、Genzyme, Cambridge, MA)、IL-1 β (10 ng/ml 、Genzyme, Cambridge, MA) および TNF- α (10 ng/ml 、Genzyme, Cambridge, MA) を添加した AIM-V 培地に交換してさらに 2 日間培養した後得られた非付着細胞集団を樹状細胞として用いた。

【0086】

(3) 調製した樹状細胞を AIM-V 培地中に 1×10^6 細胞/ ml の細胞密度で懸濁し、選択したペプチドを 10 mg/ml の濃度で添加し、24 穴プレートを用いて 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ の条件下で 4 時間培養した。培養後、X 線照射 (3000 rad) し、AIM-V 培地で洗浄し、 10% ヒト AB 血清 (Nabi, Miami, FL)、IL-6 (1000 U/ml) および IL-12 (10 ng/ml 、Genzyme, Cambridge, MA) を含有する AIM-V 培地で懸濁し、24 穴プレート 1 穴当りにそれぞれ 1×10^5 細胞ずつ添加した。さらに調製した T 細胞集団を 1 穴当りそれぞれ 1×10^6 細胞添加し、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ の条件下で培養した。7 日後、それぞれの培養上清を捨て、上記と同様にして得た各ペプチドで処理後 X 線照射した樹状細胞を 10% ヒト AB 血清 (Nabi, Miami, FL) および IL-2 (10 U/ml 、Genzyme, Cambridge, MA) を含有する AIM-V 培地で懸濁し、24 穴プレート 1 穴当りにそれぞれ 1×10^5 細胞ずつ添加し、さらに培養した。同様の操作を 7 日間おきに 4 ~ 6 回繰返した後刺激された T 細胞を回収し、フローサイトメト 40 50

リーによりCD4陽性T細胞の誘導を確認した。

【0087】

実施例2：HLA-DRB1陽性CD4陽性T細胞を刺激するSART2由来ヘルパーエピトープの決定

(1) HLA-DRB1*09/14陽性細胞を用いて、上記で誘導した各穴のT細胞の内、本発明のペプチドである配列番号4, 6または8に示すペプチドで刺激されたT細胞が増殖していることが確認された。本T細胞の配列番号4, 6または8に示すペプチドに対する特異性を調べるために、それぞれのペプチドでパルスされた樹状細胞(10mg/mlの濃度でAIM-V培地中各ペプチドを添加し、37、5%CO₂の条件下で4時間培養)5×10⁴個に対して、4~6回繰返し各ペプチドで刺激された5×10³個のT細胞を添加し、10%ヒトAB血清を含むAIM-V培地中で96穴プレートにて37、5%CO₂の条件下で72時間培養した。なお、培養開始から48時間後にそれぞれの培養液に1mCiずつのトリチウムチミジンを添加した。培養後、細胞ハーベスターにて細胞をガラス濾紙上に回収し、トリチウムチミジンの取り込み量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。また、48時間培養後の上清を取って、IFN-γの産生量をELISA法により測定した。その結果、ペプチドをパルスしていない樹状細胞を用いた穴の培養上清に比べて、配列番号4, 6または8に示すペプチドをパルスした樹状細胞を用いた穴の培養上清において顕著なIFN-γ産生が確認された。(図1)。さらに、図2に示すように、配列番号4, 6または8に示すペプチドの刺激によってT細胞が増殖していることが確認された。従って、配列番号4, 6または8に示すペプチドは特異的にHLA-DRB1*09/14陽性CD4陽性T細胞を増殖刺激させ、IFN-γ産生を誘導する能力を有するT細胞エピトープペプチドであることが判明した。

【0088】

(2) 次に、HLA-DRB1*09/14陽性T細胞を増殖刺激させる能力を有する本ペプチドが、SART2タンパク質が抗原提示細胞内でナチュラルにプロセスされてHLA-DR上に提示されるエピトープであるかどうかについて検討した。図3に示すようにRT-PCR法により、グリオーマ細胞株、T98GにおいてSART2の発現を確認した。T98Gのライセートを未成熟樹状細胞に添加して消化させ、樹状細胞を成熟化させた後、配列番号4, 6または8に示すペプチドで刺激されたT細胞が本樹状細胞によって刺激されるかを調べた。1.5×10⁶個のT98G細胞のペレットを液体窒素および湯浴を用いて7回凍結融解を繰り返し、細胞ライセートを作製した。一方、HLA-DRB1*09/14陽性、HLA-DRB1*04/09陽性、HLA-DRB1*04/15陽性、HLA-DRB1*14/15陽性の健常人から末梢血を分離し、Lymphocyte separation mediumに重層して1,500rpmで室温で20分間遠心分離した。PBMCを含有する相間を収穫し、冷リン酸塩緩衝液中で3回(またはそれ以上)洗浄し、PBMCを得た。得られたPBMCをAIM-V培地20mlに懸濁し、培養フラスコ(Falcon)中に37、5%CO₂の条件下で2時間付着させ、付着細胞をAIM-V培地中でIL-4(1000U/ml)およびGM-CSF(1000U/ml)の存在下で6日間培養し、未成熟樹状細胞を作製した。作製した各細胞ライセートを5×10⁵個の未成熟樹状細胞に添加し、IL-4(1000U/ml)、GM-CSF(1000U/ml)、IL-6(1000U/ml)、IL-1β(10ng/ml)およびTNF-α(10ng/ml)を添加したAIM-V培地中で2日間培養した。また同時に、未成熟樹状細胞に配列番号4, 6または8に示すペプチドを添加したもの、および未成熟樹状細胞にPBMCの細胞ライセート(1.5×10⁶個の細胞ペレットから作製)を添加したものをそれぞれ作製し、IL-4(1000U/ml)、GM-CSF(1000U/ml)、IL-6(1000U/ml)、IL-1β(10ng/ml)およびTNF-α(10ng/ml)を添加したAIM-V培地中で37、5%CO₂の条件下で2日間培養した。培養後の各樹状細胞をX線照射(3000rad)し、AIM-V培地で洗浄後、10%ヒトAB血清を含有するAIM-V培地で懸濁し、96穴プレート1穴当りにそれぞれ3.3×10⁴個ずつ添加した。これらに5×10⁴個の配列番号4, 6または8

に示すペプチドで刺激されたT細胞を添加し、37、5%CO₂の条件下で72時間培養した。なお、培養開始から48時間後にそれぞれの培養液に1mCiずつのトリチウムチミジンを添加した。培養後、細胞ハーベスターにて細胞をガラス濾紙上に回収し、トリチウムチミジンの取り込み量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。その結果、配列番号4に示すペプチドSART2 548-574で刺激されたHLA-DRB1*09/14陽性およびHLA-DRB1*04/15陽性T細胞は、T98G細胞のライセートを添加した樹状細胞の刺激によって増殖(図4、図5、図6)、配列番号6に示すペプチドSART2 915-940で刺激されたHLA-DRB1*09/14陽性およびHLA-DRB1*04/09陽性T細胞は、T98G細胞のライセートを添加した樹状細胞の刺激によって増殖(図7、図8)、そして配列番号8に示すペプチドSART2 532-556で刺激されたHLA-DRB1*09/14陽性およびHLA-DRB1*14/15陽性T細胞は、T98G細胞のライセートを添加した樹状細胞の刺激によって増殖していることが確認された(図9、図10)。さらに、これらの反応は抗HLA-DR中和抗体の添加によって阻害されていることから、配列番号4、6または8に示すペプチドが、SART2タンパク質が抗原提示細胞内でナチュラルにプロセスされてHLA-DR上に提示されるエピトープであることが明らかになった。

【0089】

実施例3：SART2由来ペプチドエピトープ反応性CD4陽性T細胞のキラー活性

配列番号8に示すペプチドSART2 532-556で刺激されたHLA-DRB1*09/14陽性T細胞がT98G細胞を傷害するかどうかについて調べた。T98G細胞に1000 U/mlのIFN- γ と10mg/mlの配列番号8に示すペプチドSART2 532-556を加え、37で一晩培養した。その後、 2×10^5 個のT98G細胞に対し、50 μ Ciのクロミウムを加えて37で4時間培養した。冷リン酸塩緩衝液中で2回(またはそれ以上)洗浄し、得られたT98G細胞を10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地に懸濁しターゲット細胞として調整した。また、4~6回繰返し配列番号8に示すペプチドSART2 532-556で刺激された 8×10^4 個、 2×10^4 個、 5×10^3 個のHLA-DRB1*09/14陽性T細胞を 1×10^3 個のターゲット細胞と混合し、37で4時間培養した。培養後、培養上清をガラス濾紙上に回収し、培養上清へのクロミウムの放出量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。対照実験として、クロミウムを加えていない 1×10^4 個のT98G細胞(コールドターゲット細胞)を、4~6回繰返し配列番号8に示すペプチドSART2 532-556で刺激された 8×10^4 個、 2×10^4 個、 5×10^3 個のHLA-DRB1*09/14陽性T細胞と 1×10^3 個のターゲット細胞とで混合し、37で4時間培養した。培養後、培養上清をガラス濾紙上に回収し、培養上清へのクロミウムの放出量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。図11に示すように、配列番号8に示すペプチドSART2 532-556で刺激されたHLA-DRB1*09/14陽性T細胞は癌細胞であるT98G細胞を傷害するキラー活性を有していることが明らかとなり、コールドターゲット細胞存在下ではこの活性が低下することから癌細胞特異的なキラー活性であることが判明した。

【0090】

本発明の他の態様は当業者には明らかであり、ここに繰り返す必要はない。本明細書中に引用した参考文献は各々、それらの記載内容全体が参照により本明細書中に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】SART2由来の配列番号4、6または8に示すペプチドに特異的なT細胞からのIFN- γ の産生を示す図である。

【図2】SART2由来の配列番号4、6または8に示すペプチドに特異的なT細胞の増殖を示す図である。

【図3】腫瘍抗原SART2がグリオーマ細胞株T98G細胞に発現していることを示す図である。bpはDNAの塩基数を示す。

【図4】SART2由来のペプチドSART2 548-574で誘導されたHLA-DRB1*09/14陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドを認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*09/14陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、PBMC LysateはHLA-DRB1*09/14陽性のPBMCライセートを示す。

【図5】SART2由来のペプチドSART2 548-574で誘導されたHLA-DRB1*09/14陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドをHLA-DR拘束的に認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*09/14陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、PBMC LysateはHLA-DRB1*09/14陽性のPBMCライセート、aHLA-DRはHLA-DRに対する阻害抗体を示す。 10

【図6】SART2由来のペプチドSART2 548-574で誘導されたHLA-DRB1*04/15陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドをHLA-DR拘束的に認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*04/15陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、aHLA-DRはHLA-DRに対する阻害抗体を示す。

【図7】SART2由来のペプチドSART2 915-940で誘導されたHLA-DRB1*09/14陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドをHLA-DR拘束的に認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*09/14陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、PBMC LysateはHLA-DRB1*09/14陽性のPBMCライセート、aHLA-DRはHLA-DRに対する阻害抗体を示す。 20

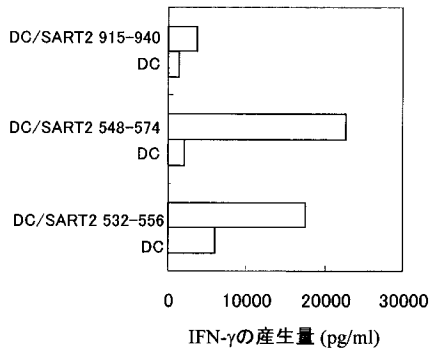
【図8】SART2由来のペプチドSART2 915-940で誘導されたHLA-DRB1*04/09陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドをHLA-DR拘束的に認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*04/09陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、PBMC LysateはHLA-DRB1*04/09陽性のPBMCライセート、aHLA-DRはHLA-DRに対する阻害抗体を示す。

【図9】SART2由来のペプチドSART2 532-556で誘導されたHLA-DRB1*09/14陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドをHLA-DR拘束的に認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*09/14陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、PBMC LysateはHLA-DRB1*09/14陽性のPBMCライセート、aHLA-DRはHLA-DRに対する阻害抗体を示す。 30

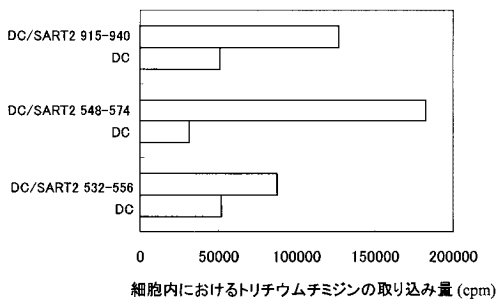
【図10】SART2由来のペプチドSART2 532-556で誘導されたHLA-DRB1*14/15陽性CD4陽性T細胞株が、樹状細胞によって腫瘍細胞からナチュラルにプロセスされた本ペプチドをHLA-DR拘束的に認識することを示す図である。DCはHLA-DRB1*14/15陽性の樹状細胞、T98G LysateはT98G細胞の細胞ライセート、PBMC LysateはHLA-DRB1*14/15陽性のPBMCライセート、aHLA-DRはHLA-DRに対する阻害抗体を示す。 40

【図11】SART2由来のペプチドSART2 532-556で誘導されたHLA-DRB1*09/14陽性CD4陽性T細胞株がT98G細胞に対して傷害活性を有することを示す図である。

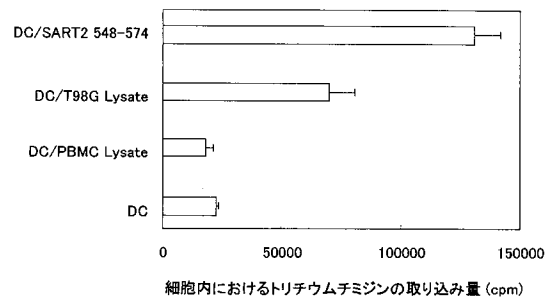
【図 1】



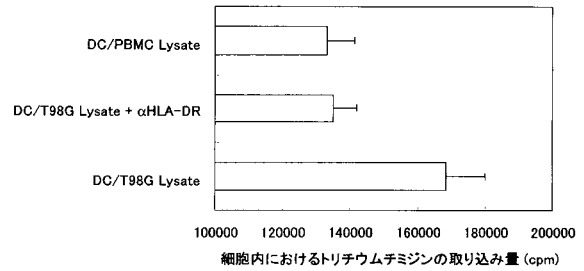
【図 2】



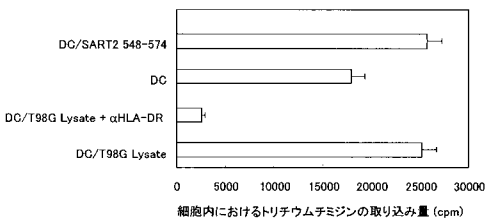
【図 4】



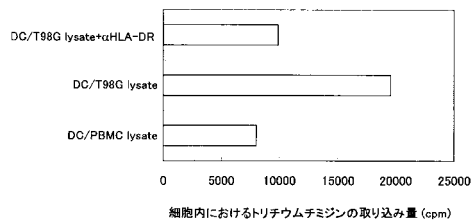
【図 5】



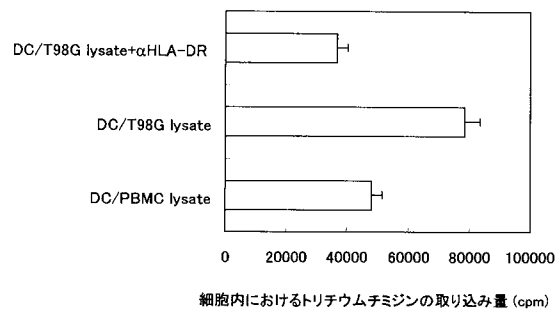
【図 6】



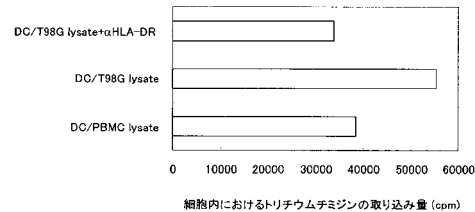
【図 8】



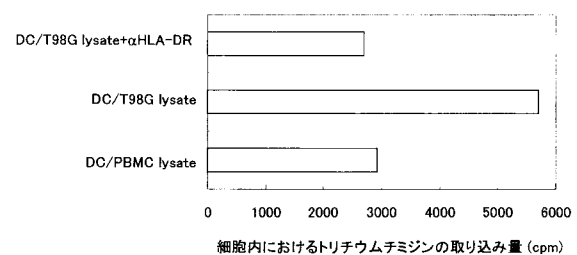
【図 7】



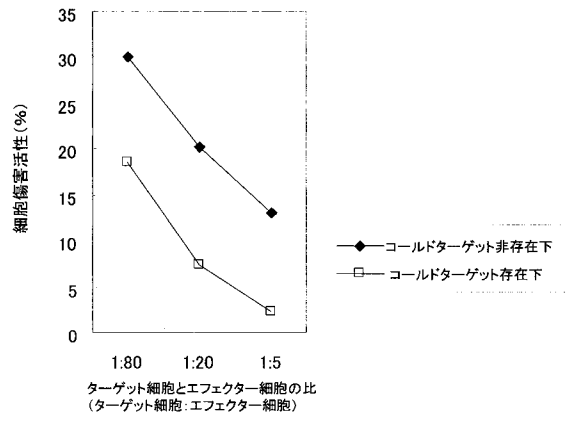
【図 9】



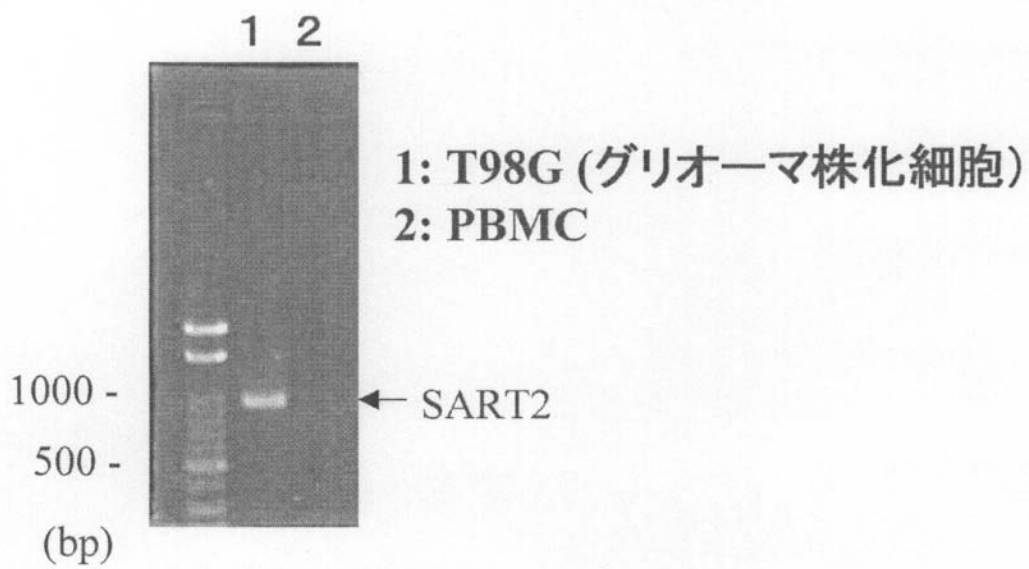
【図 10】



【図 1 1】



【図 3】



【配列表】

[2006122046000001.app](#)

 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 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
 4C087 AA01 AA02 BB37 CA16 NA14 ZB26
 4H045 AA11 BA10 CA41 DA50 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006122046A5	公开(公告)日	2008-11-13
申请号	JP2005282886	申请日	2005-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
申请(专利权)人(译)	东丽株式会社		
[标]发明人	西川義文 岡野文義		
发明人	西川 義文 岡野 文義		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C07K16/28 C12N5/06 A61K38/00 A61K35/14 A61K39/395 A61P35/00 A61K31/7088 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12N5/00.E A61K37/02 A61K35/14.Z A61K39/395.T A61P35/00 A61K31/7088 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA41 4B024/CA01 4B065/AA94X 4B065/AC20 4B065/BA21 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA14 4C085/CC23 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/CA16 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	2004283768 2004-09-29 JP 2004283769 2004-09-29 JP		
其他公开文献	JP4961706B2 JP2006122046A		

摘要(译)

本发明要解决的问题本发明的目的是提供一种新的HLA II类限制性T细胞表位，该表位来自肿瘤相关抗原，可应用于广泛的肿瘤如鳞状细胞癌或具有有限的适用肿瘤这可以应用于肿瘤患者中的许多人，或者可以应用于各种肿瘤，同时补充肿瘤的治疗或诊断。 本发明公开了鉴定和分离源自癌症相关抗原SART2的新型HLA II类限制性表位。来自SART 2的新型HLA II类表位刺激CD4阳性T淋巴细胞的活性和增殖。基因产物是用于癌症患者的预防，治疗和诊断的免疫治疗策略的有希望的候选者。 【选择图】无