

(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2004-216
(P2004-216A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395 E	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 T	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 35 O L		(全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-124482 (P2003-124482)	(71) 出願人	596094371 伊東 恭悟
(22) 出願日	平成15年4月28日 (2003. 4. 28)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-126764 (P2002-126764)		佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
(32) 優先日	平成14年4月26日 (2002. 4. 26)	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	伊東 恭悟 佐賀県三養基郡基山町けやき台2丁目25番地9号
		(72) 発明者	七條 茂樹 福岡県久留米市東櫛原町47-3 アーサー櫛原リベックス608号
		Fターム(参考)	2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍抗原

(57) 【要約】

【課題】細胞傷害性T細胞 (CTL) により認識される腫瘍抗原を見出すこと。

【解決手段】HLA-A31、HLA-A11またはHLA-A33の少なくとも1つのHLA-A拘束性にCTLにより認識されるペプチドまたはポリペプチド、これらの1つをコードする塩基配列またはその相補的配列を含んでなるポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、ペプチドまたはポリペプチドに対する抗体、ペプチドまたはポリペプチドのCTLによる認識を増強する化合物、ペプチドまたはポリペプチドの発現を促進する化合物、ペプチドおよび/またはポリペプチドからなるCTL誘導剤、これらの1種以上を含む医薬組成物、ペプチドおよび/またはポリペプチドを用いるCTL誘導方法、ペプチドまたはポリペプチドの製造方法、化合物のスクリーニング方法、これらの測定方法、並びにスクリーニング方法または測定方法に使用する試薬キット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 から配列番号 8 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項 2】

配列表の配列番号 9 から配列番号 14 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり 1 つまたは複数の H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび / または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチド。

【請求項 3】

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が、H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 からなる群から選ばれる H L A - A である請求項 2 に記載のポリペプチド。 10

【請求項 4】

配列表の配列番号 1 から配列番号 8 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド並びに配列番号 9 から配列番号 14 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり 1 つまたは複数の H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび / または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドからなる群から選ばれる 1 つ以上のペプチドおよび / またはポリペプチドからなる医薬。

【請求項 5】

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が、H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 からなる群から選ばれる H L A - A である請求項 4 に記載の医薬。 20

【請求項 6】

配列表の配列番号 1 から配列番号 8 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド並びに配列番号 9 から配列番号 14 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなり 1 つまたは複数の H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性に細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび / または細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドからなる群から選ばれる 1 つ以上のペプチドおよび / またはポリペプチドを含有する癌ワクチン。

【請求項 7】

H L A 表現型が H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A である癌に用いる請求項 6 に記載の癌ワクチン。 30

【請求項 8】

癌が前立腺癌、大腸癌、胃癌、子宮頸癌、乳癌、肺癌、食道癌、膀胱癌またはメラノーマである請求項 7 に記載の癌ワクチン。

【請求項 9】

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 から選ばれる 1 つ以上の H L A - A である請求項 6 から 8 のいずれか 1 項に記載の癌ワクチン。

【請求項 10】

配列表の配列番号 1 から配列番号 8 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 9 から配列番号 14 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドより選ばれる 1 つ以上のペプチドおよび / またはポリペプチドを含有する、1 つまたは複数の H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性細胞傷害性 T 細胞の誘導剤。 40

【請求項 11】

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 から選ばれる少なくとも 1 つの H L A - A である請求項 10 に記載の細胞傷害性 T 細胞の誘導剤。

【請求項 12】

配列表の配列番号 1 から配列番号 8 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号 9 から配列番号 14 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペ 50

チドからなる群から選ばれる1つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチドを使用することを特徴とする、1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞の誘導方法。

【請求項13】

HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AがHLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33から選ばれる少なくとも1つのHLA-Aである請求項12に記載の細胞傷害性T細胞の誘導方法。

【請求項14】

配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド。

10

【請求項15】

配列表の配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなり1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項16】

配列表の配列番号15から配列番号19のいずれか1に記載の塩基配列であって、該塩基配列がコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドが1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるものである塩基配列またはその相補的塩基配列からなる

20

【請求項17】

HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AがHLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33から選ばれる少なくとも1つのHLA-Aである請求項15または16に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】

請求項14から17のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項19】

請求項14から18のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター

30

【請求項20】

組換えベクターが発現組換えベクターである請求項19に記載の組換えベクター。

【請求項21】

請求項19または20に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項22】

請求項20に記載の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程を含む、請求項1に記載のペプチドまたは請求項2若しくは3に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項23】

請求項1に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

40

【請求項24】

請求項1に記載のペプチドおよび/または請求項2若しくは3に記載のポリペプチドの少なくとも1つに対する、1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、および/または請求項14から17のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求項1に記載のペプチド、請求項2または3に記載のポリペプチド、請求項14から18のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項19または20に記載の組換えベクター、請求項21に記載の形質転換体、または請求項23に記載の抗体のうち少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項25】

50

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 から選ばれる少なくとも 1 つの H L A - A である請求項 2 4 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 または 2 5 に記載のスクリーニング方法により得られた化合物。

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 若しくは 3 に記載のポリペプチドの少なくとも 1 つに対する、1 つまたは複数の H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性細胞傷害性 T 細胞による認識を増強する化合物、または請求項 1 4 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現を増強する化合物。

10

【請求項 2 8】

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 から選ばれる少なくとも 1 つの H L A - A である請求項 2 7 に記載の化合物。

【請求項 2 9】

請求項 1 に記載のペプチド、請求項 2 または 3 に記載のポリペプチド、請求項 1 4 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求項 1 9 または 2 0 に記載の組換えベクター、請求項 2 1 に記載の形質転換体、または請求項 2 3 に記載の抗体、または請求項 2 6 から 2 8 のいずれか 1 項に記載の化合物のうちの少なくとも 1 つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物。

20

【請求項 3 0】

癌治療が、H L A 表現型が H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A である癌に対する癌治療である請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A が H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 から選ばれる少なくとも 1 つの H L A - A である請求項 3 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

癌が前立腺癌、大腸癌、胃癌、子宮頸癌、乳癌、肺癌、食道癌、膀胱癌またはメラノーマである請求項 2 9 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 3 3】

請求項 1 に記載のペプチド、請求項 2 または 3 に記載のポリペプチド、または請求項 1 4 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの定量的あるいは定性的な測定方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載のペプチド、請求項 2 または 3 に記載のポリペプチド、請求項 1 4 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求項 1 9 または 2 0 に記載の組換えベクター、または請求項 2 3 に記載の抗体の少なくとも 1 つ以上を含んでなる試薬キット。

【請求項 3 5】

請求項 2 4 若しくは 2 5 に記載のスクリーニング方法または請求項 2 7 に記載の測定方法に使用する試薬キットであって、請求項 1 に記載のペプチド、請求項 2 または 3 に記載のポリペプチド、請求項 1 4 から 1 7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求項 1 9 または 2 0 に記載の組換えベクター、または請求項 2 3 に記載の抗体の少なくとも 1 つ以上を含んでなる試薬キット。

40

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】

本発明は腫瘍抗原に関し、さらに詳しくは H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A、例えば H L A - A 3 1、H L A - A 1 1 または H L A - A 3 3 の少なくとも 1 つの H L A - A 拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞により認識されるペプチドまたは該ペプチドを含むポリペプチドに関する。また、該ペプチドまたは該ポリペプチドの 1 つ以上を含

50

む医薬、癌ワクチンおよび細胞傷害性T細胞の誘導剤に関する。さらに、該ペプチドまたは該ポリペプチドの1つ以上を用いる細胞傷害性T細胞の誘導方法に関する。さらにまた、該ペプチドまたは該ポリペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含むポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体に関する。また、該ペプチドおよび/または該ポリペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリペプチドの細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、および該ポリヌクレオチドの発現を促進する化合物に関する。さらに、該ペプチド、該ポリペプチド、該ポリヌクレオチド、該組換えベクター、該形質転換体、該抗体および該化合物から選ばれる少なくとも1つを含む医薬組成物または試薬キットに関する。さらにまた、該ペプチドまたは該ポリペプチドの製造方法、該化合物のスクリーニング方法、該ペプチドまたは該ポリペプチドまたは該ポリヌクレオチドの測定方法に関する。

10

【0002】

【従来の技術】

生体における癌の排除には免疫系、特に細胞性免疫に係る細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T Lymphocyte; 以下、CTLと略称することもある。)が重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞の浸潤が認められている(非特許文献1)。この腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞の標的分子(腫瘍抗原)は、メラノーマにおいて初めて発見された。腫瘍細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて8個乃至11個のアミノ酸からなるペプチド(腫瘍抗原ペプチド)になり、主要組織適合性抗原(MHC)であるヒト白血球抗原(HLA)分子と結合して腫瘍細胞表面上に提示される。細胞傷害性T細胞はHLAと腫瘍抗原ペプチドとからなる複合体を認識して腫瘍細胞を傷害する。すなわち、細胞傷害性T細胞はHLA拘束性に腫瘍細胞を認識する。

20

【0003】

HLAは細胞膜抗原であり、ほとんど全ての有核細胞上に発現している。HLAはクラスI抗原とクラスII抗原に大別されるが、細胞傷害性T細胞により抗原ペプチドと共に認識されるHLAはクラスI抗原である。HLAクラスI抗原はさらにHLA-A、HLA-B、HLA-C等に分類され、ヒトでは有核細胞がそれぞれ異なった量のHLA-A、HLA-B、およびHLA-Cを有する。また、その遺伝子は多型性に富むことが報告されている。例えば、HLA-AにはA1、A2、A24、A26、およびA31等の、HLA-BにはB8、B27、およびB46等の、HLA-CにはCw3やCw6等の多型が存在する。そのため、それぞれの個体が有するHLAの型は必ずしも同一ではない。HLA-A亜領域の多型の1つであるHLA-A31対立遺伝子(allele)は、ブラジルインディアン(Brazilian Amerinds)の約65%、アメリカインディアンの約60%、モンゴル人の約20%、日本人の約12.5%、中国人、韓国人およびブラジル人の約10%、並びに白人(Caucasians)およびラテンアメリカ人(Hispanics)の約5%において発現している(非特許文献2-4)。

30

【0004】

細胞傷害性T細胞はHLAクラスI抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するとき、HLAの型をも認識する。また、HLA分子と結合する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列には、HLAの型により異なるモチーフ(規則的配列)が存在することが知られている。

40

【0005】

近年、腫瘍拒絶抗原遺伝子およびT細胞抗原受容体等の特異免疫に関与する分子が、メラノーマ、食道癌およびその他の癌で同定されており、進行癌または転移性癌においてペプチドによる特異的免疫療法が検討されている(非特許文献5-10)。例えば欧米では、腫瘍抗原投与により癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされつつあり、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2を静脈内投与することにより、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている(非特許文献11)。このように腫瘍抗原は、癌ワクチンとして利用すること

50

により、有効な癌治療効果を期待できる。

【0006】

しかしながら、癌の多様性を考えると、一種類の腫瘍抗原からなる癌ワクチンを用いて全ての癌を治療することは不可能である。実際、複数ペプチドを用いた免疫療法 (multi-peptide based immunotherapy) が、癌治療において有効であることが報告されている (非特許文献12-14)。また、癌細胞の種類や組織の違いにより、発現している腫瘍抗原の種類や発現量が異なると考えられる。同定されている腫瘍抗原はメラノーマ由来のものが多く、発病頻度の高い上皮性の癌や腺癌等に由来する腫瘍抗原の報告は少ない。

【0007】

さらに、HLA遺伝子の多型により各個体において機能する腫瘍抗原ペプチドの種類が異なることから、それぞれのHLAに応じた腫瘍抗原ペプチドを同定することは、癌治療において高い効果を得るために重要である。

【0008】

勿論、単一の腫瘍抗原を用いて細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法によっても、該腫瘍抗原を有する癌の治療効果は得られる。しかし、癌の治療において抗原特異的な細胞傷害性T細胞を誘導および/または活性化し、かつ癌の多様性に対応して高い治療効果を得るためには、HLA拘束性および癌の多様性に応じた数多くの新たな腫瘍抗原を発見し利用することが重要である。

【0009】

以下に、本明細書において引用した文献を列記する。

【特許文献1】国際公開第WO01/11044号公報

【非特許文献1】「アーカイブス オブ サージェリー (Archives of Surgery)」、1990年、第126巻、p.200-205。

【非特許文献2】アイザワ (Aizawa M.)、「ザ プロシーディングス オブ ザ サード アジア オセアニア ヒストコンパティビリティ ワークショップ コンファレンス (The Proceedings of the 3rd Asia-Oceania Histocompatibility workshop conference)」、オックスフォード:オックスフォード プレス (Oxford Press)、1986年。

【非特許文献3】ベリヒラ (Belich M.P.)、「ネイチャー (Nature)」、1992年、第357巻、p.326-329。

【非特許文献4】セッター (Sette A.)、「イムノジェネティクス (Immunogenetics)」、1999年、第50巻、p.201-212。

【非特許文献5】「サイエンス (Science)」、1991年、第254巻、p.1643-1647。

【非特許文献6】「ジャーナル オブ エクスperimental メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、1996年、第183巻、p.1185-1192。

【非特許文献7】ゴミ (Gomi, S.)ら、「ジャーナル オブ イムノロジー (Journal of Immunology)」、1999年、第163巻、p.4994-5004。

【非特許文献8】「プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ 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.432-436。

【非特許文献9】「サイエンス (Science)」、1995年、第269巻、p.1281-1284。

【非特許文献10】「ジャーナル オブ エクスperimental メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、1996年、第183巻、p.1185-1192。

10

20

30

40

50

- al of Experimental Medicine)」、1997年、第186巻、p.785-793。
- 【非特許文献11】「ネイチャー メディシン (Nature Medicine)」、1998年、第4巻、p.321-327。
- 【非特許文献12】「クリニカル キャンサー リサーチ (Clinical Cancer Research)」、2001年、第7巻、p.3950-3962。
- 【非特許文献13】「ジャーナル オブ クリニカル オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)」、2001年、第19巻、p.3836-3847。
- 【非特許文献14】「ネイチャー メディシン (Nature Medicine)」、1998年、第4巻、p.328-332。 10
- 【非特許文献15】イトウら (Ito, M. et al.)、「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、2001年、第61巻、p.2038-2046。
- 【非特許文献16】パーカーら (Parkar, K.C. et al.)、「ジャーナル オブ イムノロジー (Journal of Immunology)」、1994年、第152巻、p.163-。
- 【非特許文献17】ワンら (Wang, R.F. et al.)、「ジャーナルオブ エクスペリメンタル メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、1995年、第181巻、p.799-804。 20
- 【非特許文献18】ワンら (Wang, R.F. et al.)、「ジャーナルオブ エクスペリメンタル メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、1996年、第183巻、p.1131-1140。
- 【非特許文献19】ワンら (Wang, R.F. et al.)、「ジャーナルオブ イムノロジー (Journal of Immunology)」、1998年、第160巻、p.890-897。
- 【非特許文献20】ミサーレら (Missale, G. et al.)、「ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (Journal of Experimental Medicine)」、1993年、第177巻、p.751-762。
- 【非特許文献21】サムブルック等編 [モレキュラークロニング, ア ラボラトリーマニユアル 第2版] コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989年。 30
- 【非特許文献22】村松正實編 [ラボマニユアル遺伝子工学] 丸善株式会社、1988年。
- 【非特許文献23】エールリッヒ, H. E. 編 [PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用] ストックトンプレス、1989年。
- 【非特許文献24】ウルマー (Ulmer)、「サイエンス (Science)」、1983年、第219巻、p.666-。
- 【非特許文献25】「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。
- 【非特許文献26】「ペプチド シンテシス (Peptide Synthesis)」、インターサイエンス (Interscience)、ニューヨーク (New York) 40
- 【非特許文献27】「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)」、1999年、第81巻、p.459-466。
- 【非特許文献28】「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、1999年、第59巻、p.4056-4063。
- 【非特許文献29】ニシザカら (Nishizaka, S. et al.)、「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、2000年、第60巻、p.4830-4837。
- 【0010】 50

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドとしての作用を有するポリペプチドまたはペプチド、例えば大腸癌患者の特異的免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドまたはペプチドを見い出して提供することである。現在、HLA-A2拘束性またはHLA-A24拘束性の腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドは数多く見出されてきているが、HLA-A31拘束性のものについては報告されていない。

【0011】

本発明の課題の1つは、少なくともHLA-A31拘束性に細胞傷害性T細胞により認識されるおよび/または細胞傷害性T細胞を誘導するポリペプチドまたはペプチドを提供することである。課題の別の1つは、該ポリペプチドまたは該ペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含むポリヌクレオチドを提供することである。課題のまた別の1つは、該ポリペプチドおよび/またはペプチドに対する抗体、該ポリペプチドまたは該ペプチドの少なくとも1つに対する細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、該ポリヌクレオチドの発現を促進する化合物、該ポリペプチドおよび/または該ペプチドからなる細胞傷害性T細胞誘導剤を提供することである。さらに、課題の別の1つは、これらの1つ以上を含む医薬組成物または試薬キットを提供することである。さらに、課題のまた別の1つは、該ポリペプチドおよび/または該ペプチドを用いる細胞傷害性T細胞の誘導方法、該化合物のスクリーニング方法、並びに該ポリペプチドまたは該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドの測定方法を提供することである。

10

20

【0012】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、大腸癌患者由来の腫瘍浸潤リンパ球(Tumour-Infiltrating Lymphocyte)から樹立した腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を用い、当該細胞傷害性T細胞をHLA-A31拘束性に活性化する腫瘍抗原をコードする遺伝子を、ヒト大腸癌細胞株(human colon cancer cell line)SW620由来のcDNAクローンから同定した。そして該遺伝子の遺伝子産物から細胞傷害性T細胞をHLA-A31拘束性に活性化するポリペプチドまたはペプチドを取得し、さらに該ペプチドが、HLA表現型がHLA-A31、HLA-A11またはHLA-A33である癌患者の末梢血単核細胞から各HLA-A拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導することを見出して本発明を完成した、

30

【0013】

すなわち本発明は、

1. 配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、
2. 配列表の配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなり1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチド、
3. HLA-A3スーパータイプに属するHLA-Aが、HLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33からなる群から選ばれるHLA-Aである前記2.のポリペプチド、
4. 配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド並びに配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなり1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドからなる群から選ばれる1つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチドからなる医薬、
5. HLA-A3スーパータイプに属するHLA-Aが、HLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33からなる群から選ばれるHLA-Aである前記4.の医薬、
6. 配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド並びに配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなり1つ

40

50

または複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドからなる群から選ばれる1つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチドを含有する癌ワクチン、

7. HLA表現型がHLA-A3スーパータイプに属するHLA-Aである癌に用いる前記6.の癌ワクチン、

8. 癌が前立腺癌、大腸癌、胃癌、子宮頸癌、乳癌、肺癌、食道癌、膀胱癌またはメラノーマである前記7.の癌ワクチン、

9. HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AがHLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33から選ばれる1つ以上のHLA-Aである前記6.から8.のいずれかの癌ワクチン、

10. 配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドより選ばれる1つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチドを含有する、1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞の誘導剤、

11. HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AがHLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33から選ばれる少なくとも1つのHLA-Aである前記10.の細胞傷害性T細胞の誘導剤、

12. 配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドおよび配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドからなる群から選ばれる1つ以上のペプチドおよび/またはポリペプチドを使用することを特徴とする、1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞の誘導方法、

13. HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AがHLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33から選ばれる少なくとも1つのHLA-A前記12.の細胞傷害性T細胞の誘導方法、

14. 配列表の配列番号1から配列番号8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド、

15. 配列表の配列番号9から配列番号14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなり1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるポリペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド、

16. 配列表の配列番号15から配列番号19のいずれか1に記載の塩基配列であって、該塩基配列がコードするアミノ酸配列からなるポリペプチドが1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識されるものである塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチド、

17. HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AがHLA-A31、HLA-A11およびHLA-A33から選ばれる少なくとも1つのHLA-Aである前記15.または16.のポリヌクレオチド、

18. 前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

19. 前記14.から18.のいずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

20. 組換えベクターが発現組換えベクターである前記19.の組換えベクター、

21. 前記19.または20.の組換えベクターを導入されてなる形質転換体、

22. 前記20.の組換えベクターを導入されてなる形質転換体を培養する工程を含む、前記1.のペプチドまたは前記2.若しくは3.のポリペプチドの製造方法、

23. 前記1.のペプチドを免疫学的に認識する抗体、

24. 前記1.のペプチドおよび/または前記2.若しくは3.のポリペプチドの少なくとも1つに対する、1つまたは複数のHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘

10

20

30

40

50

束性細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、および/または前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチドの発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、前記1.のペプチド、前記2.または3.のポリペプチド、前記14.から18.のいずれかのポリヌクレオチド、前記19.または20.の組換えベクター、前記21.の形質転換体、または前記23.の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法、

25. H L A - A 3スーパータイプに属するH L A - AがH L A - A 3 1、H L A - A 1 1およびH L A - A 3 3から選ばれる少なくとも1つのH L A - Aである前記24.のスクリーニング方法、

26. 前記24.または25.のスクリーニング方法により得られた化合物、 10

27. 前記1.のペプチドまたは前記2.若しくは3.のポリペプチドの少なくとも1つに対する、1つまたは複数のH L A - A 3スーパータイプに属するH L A - A拘束性細胞傷害性T細胞による認識を増強する化合物、または前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチドの発現を増強する化合物、

28. H L A - A 3スーパータイプに属するH L A - AがH L A - A 3 1、H L A - A 1 1およびH L A - A 3 3から選ばれる少なくとも1つのH L A - Aである前記27.の化合物、

29. 前記1.のペプチド、前記2.または3.のポリペプチド、前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチド、前記19.または20.の組換えベクター、前記21.の形質転換体、または前記23.の抗体、または前記26.から28.のいずれかの化合物のうちの少なくとも1つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物、 20

30. 癌治療が、H L A表現型がH L A - A 3スーパータイプに属するH L A - Aである癌に対する癌治療である前記29.の医薬組成物、

31. H L A - A 3スーパータイプに属するH L A - AがH L A - A 3 1、H L A - A 1 1およびH L A - A 3 3から選ばれる少なくとも1つのH L A - Aである前記30.の医薬組成物、

32. 癌が前立腺癌、大腸癌、胃癌、子宮頸癌、乳癌、肺癌、食道癌、膀胱癌またはメラノーマである前記29.から31.のいずれかの医薬組成物、

33. 前記1.のペプチド、前記2.または3.のポリペプチド、または前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチドの定量的あるいは定性的な測定方法、 30

34. 前記1.のペプチド、前記2.または3.のポリペプチド、前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチド、前記19.または20.の組換えベクター、または前記23.の抗体の少なくとも1つ以上を含んでなる試薬キット、

35. 前記24.若しくは25.のスクリーニング方法または前記27.の測定方法に使用する試薬キットであって、前記1.のペプチド、前記2.または3.のポリペプチド、前記14.から17.のいずれかのポリヌクレオチド、前記19.または20.の組換えベクター、または前記23.の抗体の少なくとも1つ以上を含んでなる試薬キット、
からなる。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の理解のために、本明細書において用いる用語についてまず説明する。腫瘍抗原とは腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞に認識されるおよび/または細胞傷害性T細胞を誘導し得るものであり、腫瘍細胞が有する蛋白質またはペプチドを意味する。また腫瘍抗原ペプチドとは、該腫瘍抗原が腫瘍細胞内で分解されて生じるペプチドであり、H L A分子と結合して細胞表面上に提示されることにより腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞に認識されるおよび/または細胞傷害性T細胞を誘導し得るペプチドを意味する。さらに、腫瘍抗原が有する腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導および/または活性化し得るアミノ酸配列の部位を腫瘍抗原エピトープ(腫瘍抗原決定基)という。

【0015】

以下、H L A - A分子に結合して細胞表面上に提示され細胞傷害性T細胞を誘導および/ 50

または活性化し得る腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをHLA-A拘束性腫瘍抗原またはHLA-A拘束性腫瘍抗原ペプチドということがある。例えばHLA-A31分子に結合して細胞表面上に提示され細胞傷害性T細胞を誘導および/または活性化し得る腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをHLA-A31拘束性腫瘍抗原またはHLA-A31拘束性腫瘍抗原ペプチドという、また、かかる腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドを認識する細胞傷害性T細胞をHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞ということがある。

【0016】

ここで、「認識する(recognize)」とは、認識するものが、認識される対象を他のものと見分けて認知し、例えば認知した対象に結合することを意味する。特に、本明細書において、細胞傷害性T細胞が腫瘍細胞あるいは腫瘍抗原ペプチドを認識するとは、細胞傷害性T細胞がHLA分子により提示された腫瘍抗原ペプチドにT細胞抗原受容体を介して結合することを意味する。「活性化する」とは、ある活性若しくは作用を有するものまたは状態を、さらに増強するまたは作動させることを意味する。特に、本明細書において、細胞傷害性T細胞が活性化するとは、細胞傷害性T細胞がHLA分子により提示された抗原を認識することにより、例えばインターフェロン-(以下、IFN-と略称する。)を産生すること、あるいは細胞傷害性T細胞が認識した標的細胞に対し細胞傷害活性を示すことを意味する。「誘導する」とは、ある活性若しくは作用をほとんど持たないものまたは状態から、該活性または該作用を発生させることを意味する。特に、本明細書において、抗原特異的な細胞傷害性T細胞を誘導するとは、インビトロあるいはインビボにおいて、ある抗原を特異的に認識する細胞傷害性T細胞を分化および/または増殖させることを意味する。また、本明細書において細胞傷害性T細胞の誘導剤とは、ある抗原を特異的に認識するCD8陽性T細胞が存在しないあるいは非常に低い割合でしか存在しない状態から、該抗原を認識する細胞傷害性T細胞が非常に多い割合で存在するような状態へと変化させる作用を示す薬剤を意味する。

10

20

【0017】

本明細書においては、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドのうち長鎖ペプチドをポリペプチドという。例えば蛋白質も本明細書においてはポリペプチドに含まれる。また、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチドを、単にペプチドという。以降、アミノ酸配列を表記する場合、1文字にて表記する場合と3文字にて表記する場合がある。

30

【0018】

以下、本発明について発明の実施の態様を説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

【0019】

本発明に係るポリペプチドおよびペプチドは、ヒト大腸癌細胞株SW620由来のcDNAクローンがコードするポリペプチドおよび該ポリペプチドの部分ペプチドである。該cDNAを細胞に導入して発現させると、該細胞は腫瘍特異的細胞傷害性T細胞に認識され、当該細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または活性化することができる。より具体的には、HLA-A31を有する細胞で発現させると、HLA-A31拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞に認識され、当該細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または活性化することができる。

40

【0020】

かかるcDNAがコードするポリペプチドの部分ペプチドのうち腫瘍抗原エピトープを有するペプチドは、その特性の1つとして、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞に認識され、当該細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または活性化することができる。より具体的には、HLA-A31拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞に認識され、当該細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または活性化することができる。

【0021】

上記cDNAの同定は、以下のように行なった。まず、大腸癌患者(HLA-A0207/3101、HLA-B46/51、HLA-Cw1)(この大腸癌患者を以下OKと呼

50

ぶこともある。)の腫瘍浸潤リンパ球から既報(非特許文献15)に記載の方法にしたがって樹立した腫瘍特異的細胞傷害性T細胞株OK-CTLのサブラインOKA31-CTLを用い、これを活性化する腫瘍抗原を同定した。OKA31-CTLは、他のサブラインと比べて相対的に強くHLA-A31を認識し、その抗原認識はHLA-A遺伝子座拘束性である。すなわち、HLA-A31陽性(以下、HLA-A31⁺と表記する。)細胞により提示された抗原は認識するが、HLA-A31陰性(以下、HLA-A31⁻と表記する。)細胞により他の型のHLA分子を介して提示された抗原は認識しない。HLA-A31陽性とは、HLA表現型がHLA-A31であることを意味する。HLA-A31陰性とは、HLA表現型がA31以外のものであることを意味する。

【0022】

本発明者らは既に、HLA-A2拘束性OK-CTLサブラインを活性化する腫瘍抗原をコードする遺伝子を、ヒト大腸癌細胞株SW620のcDNAライブラリーから遺伝子発現クローニング法を用いて単離・同定している。本発明においては該遺伝子の中から、HLA-A31拘束性にOKA31-CTLを活性化する腫瘍抗原をコードする5種類の遺伝子を見い出した。

10

【0023】

5種類の遺伝子の同定は、HLA-A2拘束性OK-CTLサブラインを活性化する腫瘍抗原をコードするcDNAとHLA-A3101 cDNAとをサル腎細胞株COS-7に共遺伝子導入し、該導入遺伝子が発現された細胞のうちOKA31-CTLからのIFN- γ 産生を促進するものを選択することにより行った(実施例1参照。)。得られた5種類のcDNAクローンの塩基配列は、配列表の配列番号15から19に記載した。これらの塩基配列は、GenBank等の既存のデータベースを用いた相同性検索により、表1に示した既知遺伝子のもとの相同性を有することが判明した。しかし、これら既知遺伝子がHLA-A31拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または活性化する腫瘍抗原をコードすることを示すデータは今まで報告されていない。

20

【0024】

【表1】

クローン (塩基長 bp) [DDBJ アクセッション 番号]	配 列 番 号	遺伝子が コードする ポリペプチド (アミノ酸長)	配 列 番 号	相同性の高い遺伝子 [GenBankアクセッション番号]
40 (2978) [AB062293]	15	PP 40 (599)	9	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member1 (ABCE1) [XM_003555]
45 (1549) [AB062391]	16	PP 45 (439)	10	dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase [BC002594]
56 (2505) [AB062393]	17	PP 56 (444)	11	β -tubulin mRNA(structural) [AF141349] [BC002347]
76 (1358) [AB062398]	18	PP 76 (180)	12	CGI-37(interaction with 60s ribosome) [AF132971] HSPC031 [XM_007837]
85 (2283) [AB062481]	19	PP 85-F2 (303)	13	KIAA0036 [NM_014642]
		PP 85-F3 (264)	14	[BC005806]

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

これら遺伝子はHLA-A31拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子であり、上記のようにHLA-A31⁺細胞で発現させると、HLA-A31拘束性に細胞傷害性T細胞を活性化してIFN- γ 産生を促進した。これら遺伝子がコードするアミノ酸配列を、配列番号9から14に記載した(表1参照)。

【 0 0 2 6 】

ヒト大腸癌細胞株SW620から得た上記遺伝子がコードするポリペプチドは、細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原として使用できる。該ポリペプチドとして好ましくは、配列番号9から14のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。かかるポリペプチドを認識する細胞傷害性T細胞としては、少なくともHLA-A31拘束性またはHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞が挙げられる。また、本ポリペプチドは、腫瘍抗原エピトープを特定して腫瘍抗原ペプチドを得るための材料として用いることもできる。

【 0 0 2 7 】

腫瘍抗原ペプチドは、上記ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計し合成したペプチドから細胞傷害性T細胞を誘導および/または活性化するものを選択することにより取得できる。細胞傷害性T細胞の誘導および/または活性化の判定方法としては、例えば、ペプチドをパルスした細胞とOKA31-CTL等の細胞傷害性T細胞とを共に培養して、活性化された細胞傷害性T細胞から産生されるIFN- γ を測定し、これを指標として判定する方法等を例示できる。当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-A31と結合して細胞表面上に提示され、かつ細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原エピトープとしての性質を有するものであればよく、少なくとも5個以上、好ましくは7個以上、さらに好ましくは9個乃至11個のアミノ酸残基からなるペプチドである。さらに好ましくは、配列番号1から8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。これらペプチドは、HLA-A31拘束性の腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。

【0028】

配列番号1から8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるペプチドは、具体的には以下の方法により取得した。まず、上記ポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、HLA-A31結合モチーフに適合する9merから11merのペプチドを設計し、常法により合成した。ペプチドの設計は、米国国立予防衛生研究所(NIH)のバイオインフォマティクスアンドモレキュラーアナリシスセクション(Bioinformatics & Molecular Analysis Section; BIMAS)が開示しているデータベース「HLAペプチド結合予測(HLA Peptide Binding Predictions)」を用い(http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind)、さらに既報(非特許文献16-18)を参照して行った。合成したペプチドからの、HLA-A31拘束性に細胞傷害性T細胞により認識されるペプチドの選択は以下のように行った。各ペプチドを細胞(HLA-A3101を発現させたCOS-7細胞またはOKA31-EBV-B細胞株)にそれぞれパルスした後、OKA31-CTLと共に培養し、培養上清中に産生されるIFN- γ を測定した。ネガティブコントロール(OKA31-CTLにより認識されないペプチド)と比較してOKA31-CTLからのIFN- γ 産生を促進したペプチドを、OKA31-CTLにより認識されるペプチドであると判定した。

【0029】

合成したペプチドのうち8種類のペプチド(配列番号1から8)が、OKA31-CTLからのIFN- γ 産生を用量依存的に促進した(実施例2参照。)。また、これらのペプチドは、癌患者から得た末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell; 以下、PBMCと略称することもある。)から、細胞傷害性T細胞を誘導した。健常人由来のPBMCにおいては癌患者由来のPBMCと比べて細胞傷害性T細胞が誘導される例が少なかった。誘導された細胞傷害性T細胞は、HLA-A31⁺標的細胞、例えばヒト肺腺癌細胞株LC-1または誘導に用いたペプチドをパルスしたHLA-A31⁺細胞を認識してIFN- γ 産生を促進し且つ該標的細胞を溶解したが、HLA-A31⁻標的細胞は溶解しなかった(実施例3および4参照。)。細胞傷害性T細胞の誘導はペプチド特異的であり、誘導に用いたペプチドと、標的細胞により提示されたペプチドとが同一の場合に、誘導された細胞傷害性T細胞は標的細胞を認識してこれを傷害した(実施例4参照。)。これらから、誘導された細胞傷害性T細胞はHLA-A31拘束性かつペプチド特異的な細胞傷害性T細胞であることが判明した。かくして、HLA-A31拘束性に腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を活性化するおよび/または誘導する8種類の腫瘍抗原ペプチドを得た。これらペプチドは上記遺伝子において、HLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチドとは全く異なる領域にコードされるペプチドであった。

【0030】

配列番号1から8に記載のペプチドは、HLA-A31⁺癌患者由来のPBMCのみならず、HLA表現型がHLA-A11またはHLA-A33である癌患者由来のPBMCからも、同様に各HLA-A拘束性に腫瘍細胞を溶解する細胞傷害性T細胞を誘導した(実施例5および6参照。)。HLA-A31は、HLA-A3、HLA-A11、HLA-A33およびHLA-A68などの対立遺伝子が属するHLA-A3スーパータイプ(supertype)の1つである。今までに、ウイルス蛋白質あるいはメラノーマ抗原由来の同一のエピトープペプチドが、異なったHLA-A3スーパータイプにより認識されることが報告されている(非特許文献19および20)。これらから、本ペプチドは、HLA-A31分子のみならず、HLA-A3スーパータイプ、例えばHLA-A11分子またはHLA-A33分子などと結合し、各HLA拘束性に細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または活性化することが明らかになった。

【0031】

本明細書において、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-Aとは、HLA-A3、HLA-A11、HLA-A31、HLA-A33およびHLA-A68など、HLA-A3スーパータイプであると報告されているHLA-Aを意味する。好ましくはHLA

- A 3 1、H L A - A 1 1 および H L A - A 3 3 からなる群から選ばれる少なくとも1つの H L A - A であり、より好ましくは H L A - A 3 1 である。

【 0 0 3 2 】

本ペプチドは好ましくは H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性の腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび/または該細胞傷害性 T 細胞により認識される腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。また上記のとおり、1つのペプチドが H L A - A 3 スーパータイプに属する複数の H L A - A 拘束性に腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または該細胞傷害性 T 細胞により認識される腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。さらに、本ポリヌクレオチドは本ペプチドをその一部として有するため、H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A 表現型を示す細胞内で発現させると本ペプチド同様に該 H L A - A 拘束性の腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導するおよび/または該細胞傷害性 T 細胞により認識されると考えられる。

10

【 0 0 3 3 】

このように特定されたポリペプチドまたはペプチドにおいて1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を有するものも本発明の範囲に包含される。変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってよい。好ましくは、かかる変異を有するポリペプチドまたはペプチドであって、細胞傷害性 T 細胞により、好ましくは少なくとも H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性細胞傷害性 T 細胞により認識されるポリペプチドまたはペプチドが望ましい。変異を導入する手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖反応法 (P C R) 等を単独でまたは適宜組合わせて用いることができる。例えば成書に記載の方法 (非特許文献 2 1 - 2 3) に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、ウルマーの技術 (非特許文献 2 4) を利用することもできる。変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質 (物性、機能、生理活性または免疫学的活性等) を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸 (極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等) の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

20

30

【 0 0 3 4 】

本発明に係るポリヌクレオチドは、上記ポリペプチドまたはペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドである。好ましくは、配列番号 1 から 8 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号 9 から 1 4 のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドである。より好ましくは、配列番号 1 5 から 1 9 のいずれか 1 に記載の塩基配列またはその相補的塩基配列からなるポリヌクレオチドである。該ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドも本発明の範囲に包含される。さらに、本発明の範囲には、上記ポリペプチドのアミノ酸配列中で H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A - A 拘束性の腫瘍抗原エピトープをコードする領域に対応する 1 5 個以上、好ましくは 2 1 個以上、より好ましくは 3 3 個以上のヌクレオチドからなるポリヌクレオチドも包含される。本ポリヌクレオチドは、H L A - A 3 スーパータイプに属する H L A 表現型を示す細胞で発現させたときに、該 H L A - A 拘束性の細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または活性化できると考えられる。本ポリヌクレオチドにはその 3' 末端にポリ (A) [p o l y (A)] 構造が存在するが、ポリ (A) の数は腫瘍抗原として作用するアミノ酸のコード部位に影響するものではないため、その数は特に限定されない。かかる有用なポリヌクレオチドの選択は、例えば公知の蛋白質発現系を利用してポリペプチドまたはペプチドを発現させ、該ポリペプチドまたはペプチドの細胞傷害性 T 細胞誘導能および/または活性化能を測定することにより可能である。

40

【 0 0 3 5 】

50

さらに、上記ポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドも本発明の範囲に包含される。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば成書に記載の方法（非特許文献21）等に従うことができる。これらポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチドにハイブリダイゼーションするものであれば目的のポリヌクレオチドの相補的配列でなくてもよい。

【0036】

本ポリヌクレオチドは、いずれも本ポリペプチドまたはペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸としての試薬や標準品としても利用できる。

【0037】

ポリヌクレオチドを適当なベクターDNAに組込むことにより、組換えベクターを取得できる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののほか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポパウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクター等を用いることができる。

10

20

【0038】

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組合わせて作製する。ベクターDNAにポリヌクレオチドを組込む方法は、自体公知の方法を適用できる。例えば、適当な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適当なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

30

【0039】

ポリヌクレオチドが組込まれたベクターDNAを、自体公知の宿主に導入することにより形質転換体を得られる。宿主に導入するベクターDNAは、1種のベクターDNAであってもよく、2種以上のベクターDNAを導入してもよい。宿主としては、例えば大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞または動物細胞等が例示できる。ベクターDNAの宿主細胞への導入は、自体公知の手段が応用できる。例えば成書に記載されている標準的な方法（非特許文献21）により実施できる。より好ましい方法としては、遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷（scrape loading）、バリスティック導入（ballistic introduction）および感染等が挙げられる。

40

【0040】

宿主に導入するベクターDNAとして発現ベクターを使用すれば、該ベクターに組込んだ遺伝子を発現させることが可能である。所望の遺伝子を組込んだ発現ベクターDNAを導入した形質転換体は、各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、形質転換体により発現される遺伝子産物の機能を指標にして実施できる。あるいは、宿主中または宿主外に産生された遺伝子産物量を指標にして行ってもよく、培地中の形質転換体量を指標にして行ってもよい。

50

【0041】

本ポリペプチドまたはペプチドは、該ポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ発現ベクター、または該ベクターを導入した形質転換体を用いて、遺伝子工学的技術により製造可能である。また、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば成書に記載の方法（非特許文献25および26）が例示できるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

【0042】

本ポリペプチドまたはペプチドの精製および/または回収は、該ポリペプチドまたは該ペプチドの機能、例えば細胞傷害性T細胞誘導能および/または活性化能を指標にして実施できる。精製および/または回収の方法としては、硫酸やアルコール等を用いた溶解度差に基づく分画手段、ゲルろ過、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等が挙げられ、これらを単独でまたは組合わせて使用する。好ましくは、精製および/または回収しようとするポリペプチドまたはペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作成し、該抗体を用いて特異的に吸着回収する方法を使用する。

【0043】

抗体は、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は該ポリペプチドまたはペプチド、またはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。該ポリペプチドおよび/またはペプチドに特異的な抗体を作成するためには、該ポリペプチドまたはペプチドに固有なアミノ酸配列からなる領域を用いることが好ましい。この領域のアミノ酸配列は、必ずしも該ポリペプチドまたはペプチドのものと同様または同一である必要はなく、その立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が一次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は免疫学的に該ポリペプチドおよび/またはペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、抗原抗体結合反応を測定する公知方法によって決定できる。

【0044】

抗体の産生には、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、抗原をアジュバントの存在下または非存在下で、単独でまたは担体に結合して動物に投与し、体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより抗体が得られる。担体はそれ自体が宿主に対して有害作用を示さずかつ抗原性を増強せしめるものであれば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニン等が例示できる。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント（FCA）、フロイント不完全アジュバント（FIA）、R i b i (M P L)、R i b i (T D M)、R i b i (M P L + T D M)、百日咳ワクチン（Bordetella pertussis vaccine）、ムラミルジペプチド（MDP）、アルミニウムアジュバント（ALUM）、およびこれらの組合わせを例示できる。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

【0045】

ポリクローナル抗体は、免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得できる。好ましい抗体回収手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法が挙げられる。

【0046】

モノクローナル抗体は、免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3-X63-Ag8細胞等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することにより生産できる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作成してこれをクローン化し、本発明に係るポリペプチドおよび/またはペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗

10

20

30

40

50

体を回収する。

【0047】

かくして得られた、上記ポリペプチドまたはペプチドを認識し結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、該ポリペプチドまたは該ペプチドの精製用抗体、試薬、または標識マーカ等として利用できる。

【0048】

本発明に係るポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体または抗体は、単独でまたは複数を組合わせて用いることにより、細胞傷害性T細胞による該ポリペプチドまたは該ペプチドの認識を増強する物質のスクリーニングに有効な手段を提供する。スクリーニング方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。

10

【0049】

例えば、腫瘍抗原ペプチドをパルスした細胞を用いて細胞傷害性T細胞を刺激し、該細胞傷害性T細胞による腫瘍抗原ペプチドの認識および/または該細胞傷害性T細胞の活性化を測定する実験系を構築し、該実験系を用いて被検物質を試験することにより、本発明に係るペプチドの細胞傷害性T細胞による認識を増強する物質を選別できる。腫瘍抗原ペプチドをパルスする細胞としては、HLA-A3スーパータイプに属するHLA表現型を示す細胞、例えばHLA-A31⁺、HLA-A11⁺および/またはHLA-A33⁺である細胞株が例示できる。あるいは、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A以外の表現型を示す細胞に、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-AのいずれかのcDNAを常法により遺伝子導入して細胞表面上に該HLA-A分子を発現させた細胞を用いることもできる。細胞への腫瘍抗原のパルスは、細胞と腫瘍抗原とを常法にしたがって共に培養することにより実施可能である(実施例2参照)。該細胞傷害性T細胞としては、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞株、例えばOKA31-CTL等を用いる。細胞傷害性T細胞と標的細胞の組合わせは、好ましくは両細胞のHLA表現型の少なくとも一方が一致することが望ましい。細胞傷害性T細胞による腫瘍抗原ペプチドの認識および/または細胞傷害性T細胞の活性化は、簡便には細胞傷害性T細胞からのIFN- γ 産生量を指標にして測定できる。この実験系は同定方法の1つを説明するものであり、本発明に係る同定方法はこれに限定されない。

20

【0050】

本発明は、上記スクリーニング方法によって得られた化合物も包含する。該化合物は、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞による本発明に係るポリペプチドまたはペプチド、例えば配列番号1から8のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドまたは配列番号9から14のいずれか1に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの認識を増強する化合物であり得る。あるいは本発明に係るポリヌクレオチドの発現を増強する化合物であり得る。かくして選別された化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮してさらに選別することにより、医薬組成物として調製可能である。

30

【0051】

本発明に係るポリペプチドまたはペプチドは、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性の腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導するおよび/または該細胞傷害性T細胞により認識されるため、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドとして使用できる。したがって、本ペプチドおよび/または本ポリペプチドを含有する細胞傷害性T細胞の誘導剤、並びに本ペプチドおよび/または本ポリペプチドを用いることを特徴とする細胞傷害性T細胞の誘導方法も本発明の範囲に包含される。本誘導剤および誘導方法により誘導される細胞傷害性T細胞としては、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性の細胞傷害性T細胞が例示できる。本ポリペプチドまたはペプチドは、細胞傷害性T細胞を誘導および/または活性化するために、単独で使用してもよいし、2つ以上を組合わせて使用してもよい。細胞傷害性T細胞は種々の抗原を認識する複数の細胞集団であることから、好ましくはこれらを2つ以上組合わせて用いることが推奨される。

40

50

【0052】

細胞傷害性T細胞の誘導方法は、その一態様として、本発明に係るペプチドを細胞にパルスする工程、および該工程で得られた細胞を用いて細胞傷害性T細胞の前駆細胞を含む細胞集団を刺激する工程を含む。ペプチドをパルスする細胞としては、HLA-A3スーパータイプに属するHLA表現型を示す細胞、例えば該表現系を示す公知の細胞株が例示できる。あるいは、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A以外の表現型を示す細胞に、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-Aのいずれか1つのcDNAを常法により遺伝子導入して細胞表面上に該HLA-A分子を発現させた細胞を用いることもできる。細胞へのペプチドのパルスは、細胞と腫瘍抗原ペプチドとを常法にしたがって共に培養することにより実施可能である（実施例2参照。）。細胞傷害性T細胞の前駆細胞を含む細胞集団は、例えばヒト末梢血より調製した末梢血細胞、より好ましくは末梢血単核細胞、さらに好ましくはHLA-A3スーパータイプに属するHLA表現型を示す末梢血単核細胞が挙げられる。当該細胞集団の刺激は、当該細胞集団とペプチドをパルスしたHLA-A3⁺細胞とを常法にしたがって共に培養することにより実施可能である（実施例3参照。）。細胞集団と標的細胞との組み合わせは、好ましくは両細胞のHLA表現型の少なくとも一方が一致することが望ましい。

10

【0053】

本発明に係るポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、組換えベクター、形質転換体、抗体または化合物を、単独でまたは複数を組合わせて利用することによって、これらからなる群から選ばれる少なくとも1つを含有する医薬組成物を提供できる。

20

【0054】

本発明においては、本遺伝子のうちクローン40、クローン56、クロー76およびクローン85について、腫瘍細胞および組織における発現を検討し、いずれも上皮癌細胞株や腺癌細胞株（食道癌、肺腺癌、大腸腺癌および胃腺癌）で正常組織と比較して高レベルで発現していることを明らかにした（実施例7）。

【0055】

本医薬組成物は癌の治療、好ましくは本発明に係る5種類の遺伝子の1つ以上を発現している癌の治療、より好ましくは該遺伝子の1つ以上を発現しておりHLA表現型の一方または両方がHLA-A3スーパータイプに属するHLAである癌の治療に使用できる。より具体的には、胃癌、食道癌、大腸癌、小腸癌、十二指腸癌、肺癌、肝臓癌、胆嚢癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、口腔癌、骨癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、神経芽腫、メラノーマ等の固形腫瘍、あるいは血液癌（白血病または悪性リンパ腫等）等の非固形腫瘍等のいずれにも適応可能である。好ましくは前立腺癌、大腸癌、胃癌、子宮癌、乳癌、肺癌、食道癌、膀胱癌またはメラノーマなどの治療に有用であると考えられる。癌のHLA表現型は、例えば癌患者のHLAクラスI表現型を慣用の血清学的方法（非特許文献15）で測定することにより判定できる。癌のHLA表現型の判定はこの方法に限らず、慣用の方法のいずれも使用することができる。

30

【0056】

HLA-A3スーパータイプは、世界人口の多くで発現が認められるHLA-A対立遺伝子である。例えば、白人、北アメリカ黒人、日本人、中国人およびラテンアメリカ人の、それぞれ37.5%、42.1%、45.8%、52.7%および43.1%で認められている。したがって、本発明に係る医薬組成物は、大多数の癌患者の特異的免疫療法に適応できる可能性があり、非常に有用性が高い。

40

【0057】

また、本ポリペプチドは、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原エピトープと、HLA-A2拘束性細胞傷害性T細胞により認識される腫瘍抗原エピトープの両方を有する。そのため、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A⁺およびHLA-A2⁺の細胞に本ポリペプチドを発現させることにより、HLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性およびHLA-A2拘束性の細胞傷害性T細胞を共に誘導し得ると考えられる。これらから、本ポリペプチド

50

、該ポリペプチドコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、および該組換えベクターを含む形質転換体を含む医薬組成物は、HLA表現型としてHLA-A3スーパータイプに属するHLAとHLA-A2とを有する癌の治療、例えばHLA表現型がA31/A2、A11/A2またはA33/A2である癌に特に有効である場合があると考えている。

【0058】

具体的には、例えば本発明に係るポリペプチドおよびペプチドから選ばれる1つ以上からなる医薬、さらに本発明に係るポリペプチドおよびペプチドから選ばれる1つ以上を含有する医薬組成物は、いわゆる癌ワクチンとして使用できる。ここでいう癌ワクチンとは、腫瘍細胞に対する特異的免疫応答の誘導および/または増強により、腫瘍細胞を選択的に傷害する薬物を意味する。その投与量は、細胞傷害性T細胞による該ポリペプチドまたは該ペプチドの認識の程度により適宜変更を加えて決定可能であるが、一般的には活性本体として0.01mg乃至100mg/日/成人ヒト、好ましくは0.1mg乃至10mg/日/成人ヒトである。これを数日乃至数月に1回投与する。投与方法は、公知の医療用ペプチドの投与方法に準じて行えばよく、好適には皮下、静脈内、あるいは筋肉内投与にて行われる。投与に際して、免疫応答の誘導および/または増強のために、本発明に係るポリペプチドおよび/またはペプチドは適当なアジュバントの存在下または非存在下に、単独でまたは担体に結合して用いることができる。担体は、それ自体が人体に対して有害な作用を及ぼさなければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸またはアルブミン等が例示される。アジュバントは、通常のペプチドワクチン接種に用いられるものであればよく、フロイント不完全アジュバント(FIA)、アルミニウムアジュバント(ALUM)、百日咳ワクチン(Bordetella pertussis vaccine)および鉱物油等が例示される。剤形は自体公知のペプチドを製剤化する手段を応用して適宜選択できる。

10

20

【0059】

または例えば、患者の末梢血より単核細胞画分を採取して、本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを用いて刺激した後に、細胞傷害性T細胞の誘導および/または細胞傷害性T細胞の活性化が認められた該単核細胞画分、あるいは該単核細胞画分から精製した細胞傷害性T細胞を、当該患者の血液中に戻すことによって、有効な癌ワクチン効果が得られる。ポリペプチドまたはペプチドによる刺激は、単核細胞画分をポリペプチドまたはペプチド、ポリペプチドまたはペプチド発現させた細胞、またはペプチドをパルスした細胞と共に培養することにより行うことができる。培養の条件、例えば単核細胞濃度、ポリペプチドまたはペプチドの濃度、培養時間等は、簡単な実験により決定できる。培養時に、インターロイキン-2等のリンパ球増殖能を有する物質を添加してもよい。細胞傷害性T細胞の精製は常法により行うことができるが、例えばCD8⁺細胞を回収することにより実施可能である。

30

【0060】

癌ワクチンとして本発明に係るポリペプチドまたはペプチドを使用する場合、1種類のポリペプチドまたはペプチドのみでも癌ワクチンとして有効であるが、複数の種類の上記ポリペプチドまたはペプチドを組合わせて使用することもできる。複数ペプチドに基づく免疫療法が有効であると報告されていること(非特許文献12-14)、および癌患者の細胞傷害性T細胞は複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であることから、1種類のペプチドを癌ワクチンとして使用するより複数種類を組合わせて使用する方が、より高い効果が得られるときがある。またこのとき、本発明のポリペプチドおよびペプチドからなる群から選ばれるものを組合わせて使用してもよいが、これらから選ばれる少なくとも1種類のポリペプチドまたはペプチドに、公知の腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドから選ばれる少なくとも1種類を組合わせて使用してもよい。組合わせて使用する公知の腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドはHLA-A3スーパータイプに属するHLA-A拘束性のものに限定されず、他の型のHLA、例えばHLA-A2やHLA-A24等と共に細胞傷害性T細胞に認識される腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドであってもよい。公知の腫瘍抗原または

40

50

腫瘍抗原ペプチドとしては、l c k 遺伝子および s r c 遺伝子（特許文献 1）、S A R T - 1 遺伝子（非特許文献 27）、S A R T - 3 遺伝子（非特許文献 28）、並びにサイクロフィリン B 遺伝子（非特許文献 7）等に由来する腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドが例示されるが、これらに限定されない。

【0061】

本発明に係るポリヌクレオチドは、癌の遺伝子治療に利用することができる。これらポリヌクレオチドをベクターに担持させ、直接体内に導入して発現させる方法またはヒトから細胞を採取した後に体外で細胞内に導入して発現させる方法のいずれも利用可能である。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性のものを用いる。その投与量は、細胞傷害性 T 細胞による該ポリペプチドまたはペプチドの認識の程度により変化するが、一般的には本発明のポリペプチドまたはペプチドをコードする DNA 含量として 0.1 μ g 乃至 100 mg / 日 / 成人ヒト、好ましくは 1 μ g 乃至 50 mg / 日 / 成人ヒトである。これを数日乃至数月に 1 回投与する。

10

【0062】

（測定方法および試薬）

本発明に係るポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクターおよび抗体は、それ自体を単独で、診断マーカーや試薬等として使用可能である。これらは試薬であるとき、緩衝液、塩、安定化剤、および / または防腐剤等の物質を含んでもよい。また本発明は、これらのうちの 1 つまたはそれ以上を充填した、1 個またはそれ以上の容器を含んでなる試薬キットも提供する。なお、製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクターまたは抗体それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。該試薬および試薬キットは、本発明に係る同定方法、細胞傷害性 T 細胞の誘導方法、または該ポリペプチド、ペプチドおよびポリヌクレオチドの定量的または定性的測定に使用できる。当該測定をするための方法は、当業者に周知の方法を利用して構築できる。このような測定法には、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析および酵素免疫固相法（E L I S A）等がある。また、核酸は、例えば増幅、P C R、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）、R N A アーゼ保護、ノーザンブロッティングおよびその他のハイブリダイゼーション法を用いて R N A レベルでの検出および定量が可能である。

20

30

【0063】

測定される試料としては、個体由来の細胞、血液、尿、唾液、髄液、組織生検または剖検材料等が挙げられる。また、測定される核酸は、上記各試料から自体公知の核酸調製法で得られる。核酸は、ゲノム DNA を検出に直接使用してもよく、あるいは分析前に P C R またはその他の増幅法を用いて酵素的に増幅してもよい。R N A または c D N A を同様に用いてもよい。正常遺伝子型との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出できる。増幅 DNA を標識した上記ポリペプチドをコードする DNA にハイブリダイゼーションさせることにより点突然変異を同定できる。

【0064】

かかる測定により本発明に係るポリペプチド、ペプチドまたはポリヌクレオチドの変異、減少または増加を検出することにより、当該ポリペプチドまたはペプチドが関連する疾患、例えば上皮性癌または腺癌等の診断が可能になる。

40

【0065】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

また、実施例においてヒト由来の試料を用いた実験は、試料提供者である全ての患者のインフォームドコンセントを得て行なったものである。

【0066】

【実施例 1】

50

(腫瘍抗原をコードするcDNAクローンの同定)

腫瘍特異的細胞傷害性T細胞として、大腸癌患者(HLA-A0207/3101、HLA-B46/51、HLA-Cw1)の腫瘍浸潤リンパ球から文献(非特許文献7および19)に記載の方法に準拠して樹立したOK-CTLのサブラインであるOKA31-CTLを用いた。OKA31-CTLは、他のサブラインと比較して相対的に強くHLA-A31に反応し、HLA-A31拘束性に腫瘍抗原を認識して活性化する。例えば、ヒト胃腺癌細胞株MKN28(遺伝子型はHLA-A31であるが、表現型としてはHLA-A31が検出されない細胞株)にHLA-A31を遺伝子導入により発現させたもの(以下、MKN28-A31と称する。)、またはヒト肺腺癌細胞株LC-1(A3101/3302)などのHLA-A31⁺標的細胞を認識してIFN- γ 産生を促進した。さらに、⁵¹Crで標識したこれら標的細胞を用いた慣用の細胞傷害性試験において、標的細胞からの⁵¹Cr遊離が認められたことから、OKA31-CTLがこれら標的細胞を傷害して溶解することが明らかになった。しかし、HLA-A31⁻腫瘍細胞(例えばMKN28、大腸腺癌細胞株SW620(A0201/2402)および肺腺癌細胞株1-87(A0207/1101))、およびPHAで刺激したHLA-A31⁺正常T細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった。OKA31-CTLによるMKN28-A31またはHLA-A31⁺LC-1の認識の結果認められたIFN- γ 産生の促進は、抗HLA-クラスIモノクローナル抗体または抗CD8モノクローナル抗体により阻害された。これらから、OKA31-CTLは、HLA-A31拘束性に腫瘍抗原を認識するCTLであると考えられる。

10

20

【0067】

本発明者らは既に、ヒト大腸癌細胞株SW620のcDNAライブラリーから遺伝子発現クローニング法を用いて、HLA-A2に強く反応するHLA-A2拘束性OK-CTLサブラインを活性化する腫瘍抗原をコードする遺伝子を単離・同定した。これらの遺伝子を対象にして、OKA31-CTLをHLA-A31拘束性に活性化する腫瘍抗原をコードする遺伝子を同定した。

【0068】

SW620細胞のcDNAライブラリーからの、HLA-A2拘束性OK-CTLサブラインを活性化する腫瘍抗原をコードする遺伝子の単離・同定は以下のように行った。まず、SW620細胞のpoly(A)⁺RNAをcDNAに転換してSalIアダプターにライゲーションし、発現ベクターpCMV-SPORT-2(Invitrogen)に挿入した。また、HLA-A0207のcDNAを、RT-PCRによって得、真核細胞発現ベクターpCR3(Invitrogen)にクローン化した。

30

【0069】

SW620細胞cDNAライブラリーは100クローンずつプールし、各ウエル毎にプールしたcDNA200ngとHLA-A0207cDNA200ngとを、100 μ lのlipofectamine(Invitrogen)/Opti-MEM(Invitrogen)1:200混液中で30分間混合した。この混合物の50 μ lをCOS-7細胞(細胞数 1×10^4)に加え、6時間インキュベーションして共遺伝子導入した。次いで10%FCSを含むRPMI-1640培地を加えて2日間培養した後、HLA-A2拘束性OK-CTLサブライン(細胞数 2×10^5)を各ウエルに添加した。さらに18時間インキュベーション後、上清を100 μ l採り、産生されたIFN- γ をELISA法で測定した。このとき、ネガティブコントロールとして遺伝子を導入していないCOS-7細胞を用い、HLA-A2拘束性OK-CTLサブラインによるIFN- γ 産生を検討し、産生されたIFN- γ の値をバックグラウンドとして各測定値から減算した。HLA-A2拘束性OK-CTLサブラインからのIFN- γ 産生の促進が認められたcDNAをCTL活性化能が陽性であると判定し、この判定基準によりcDNAライブラリーのプールをスクリーニングした。

40

【0070】

CTL活性化能が認められた上記SW620cDNAライブラリーのプールから個別にク

50

クローンを取り出してさらにスクリーニングを行うことにより、CTL活性化能陽性クローンを選別した。得られたクローンのHLA-A2拘束性OK-CTLサブライン活性化における用量依存性を検討し、最終的に65個のクローンを得た。得られたcDNAクローンの塩基配列の決定は、DNAシーケンシングキット(Perkin-Elmer)を用い、ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer(Perkin-Elmer)を使用して、ダイデオキシヌクレオチドシーケンシング法で行った。さらに、cDNAクローンがコードするアミノ酸配列を塩基配列から推定した。

【0071】

次に、上記65個の各cDNAクローンを、PCR3にクローン化したHLA-A3101 cDNAと共に、上記同様の方法でCOS-7細胞に共遺伝子導入した。このCOS-7細胞によるOKA31-CTLの活性化を上記同様の方法で検討した。 10

【0072】

その結果、クローン40、クローン45、クローン56、クローン76およびクローン85の5個のcDNAクローンが、それぞれHLA-A31拘束性かつ用量依存的にOKA31-CTLを活性化し、IFN- γ 産生を促進した。一方、発現ベクターpCMV-SPORT-2のみをHLA-A3101と共に共遺伝子導入したCOS-7細胞では、OKA31-CTLからのIFN- γ 産生は促進されなかった。

【0073】

得られた5個の各遺伝子についてGenBankに対して相同性検索を行った。その結果、上記表1に示した遺伝子と高い相同性を有することが明らかになった。しかし、これら 20
遺伝子がHLA-A31拘束性にCTLを誘導および/または活性化する腫瘍抗原をコードするというデータは、今まで報告されていない。

【0074】

【実施例2】

(腫瘍抗原ペプチドの同定)

腫瘍抗原をコードする上記遺伝子から腫瘍抗原ペプチドを得るために、クローン40、クローン45、クローン56、クローン76およびクローン85がそれぞれコードするアミノ酸配列に基づいて、BIMASが開示しているデータベース「HLAペプチド結合予測(HLA Peptide Binding Predictions)」(http://bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind)を用い 30
、さらに既報(非特許文献16-18)を参照して、それぞれ異なる複数個の9merから11merのペプチドを設計し合成した。

【0075】

HLA-A3101を常法により遺伝子導入して発現させたCOS-7細胞またはOK-EBV-B細胞に、合成したそれぞれのペプチドをパルスした後、OKA31-CTLと共に培養し、OKA31-CTLから産生されるIFN- γ を定量することにより、HLA-A31拘束性にCTLを活性化するペプチドを選択した。OK-EBV-B細胞は、大腸癌患者OKの末梢血B細胞にエプスタイン・バーウイルス(Epstein-Barr Virus)(EBV)を感染させて得た無限増殖性を有する培養細胞株である。すなわち、OKA31-CTLとOK-EBV-B細胞は同一個体に由来する細胞株である 40
。

【0076】

詳しくは、HLA-A3101遺伝子を導入したCOS-7細胞またはOK-EBV-B細胞を上記合成された各ペプチド(10 μ M)と共に、5%CO₂-95%エア(Air)の下で37℃にて3時間インキュベーションすることにより、細胞表面上に発現されたHLA-A31にペプチドを結合させた。このようにペプチドをパルスしたCOS-7細胞またはOK-EBV-B細胞を標的細胞(T)として用いた。また、OKA31-CTLをエフェクター細胞(E)として用いた。細胞数1 \times 10⁴の標的細胞と標的細胞の5倍乃至20倍量のエフェクター細胞とを混合し(E/T比=5~20)、18時間インキュベーションした。このとき、エフェクター細胞の誘導に用いたペプチドと標的細胞にパ 50

ルスしたペプチドとが同じものになるように、エフェクター細胞と標的細胞とを組合わせた。インキュベーション後の上清100 μ lを回収してELISAでIFN- γ を測定した。OKA31-CTLに認識されないペプチドをパルスしたCOS-7細胞をネガティブコントロールとして用いて同様に測定を行った。その結果、配列番号1から8のいずれか1に記載したアミノ酸配列からなる8種類のペプチドがOKA31-CTLにより認識され、該OKA31-CTLからのIFN- γ 産生を促進した。得られた8種類のペプチドは、クローン40由来の40-P47(配列番号1)、クローン45由来の45-P54(配列番号2)、クローン56由来の56-P28、56-P31、および56-P32(配列番号3から5)、クローン76由来の76-P20(配列番号6)、並びにクローン85由来の85-P10(配列番号7)および85-P11(配列番号8)である。結果は図1から図7に示した。

10

【0077】

【実施例3】

(ペプチドによる癌患者末梢血単核細胞からのCTLの誘導)

実施例2で得た8種類のペプチドのうち、40-P47(配列番号1)、56-P28(配列番号3)、56-P31(配列番号4)、56-P32(配列番号5)、76-P20(配列番号6)、85-P10(配列番号7)および85-P11(配列番号8)について、ヒトPBMCからのCTL誘導能を検討した。PBMCは、HLA-A31⁺癌患者10例(前立腺癌患者4例、大腸癌患者2例、胃癌患者1例、子宮頸癌患者2例および乳癌患者1例)およびHLA-A31⁺健康人6例の各血液試料から常法に従って調製した。PBMCのHLAクラスI表現型の決定は慣用の血清学的方法により行った(非特許文献15)。

20

【0078】

各PBMC(細胞数 1×10^5)を、培養培地〔45%RPMI-1640培地、45%AIM-V培地(Invitrogen社)、100U/mlのIL-2、0.1mMのMEMノンエッセンシャルアミノ酸溶液(Invitrogen社)および10%牛胎児血清(FCS)からなる。〕200 μ lを加えた96ウエルU底型マイクロカルチャープレート(Nunc)の各ウエル中で、ペプチド各10 μ Mとインキュベーションした。培養3日目および6日目に半量の培地を除き、対応する各ペプチドを含む上記組成の培地と交換した。培養9日目に細胞を回収し、IL-2のみを加えてペプチド非存在下でさらに培養し、培養12日目に細胞を回収して洗浄しエフェクター細胞(E)として用いた。エフェクター細胞は、種々の標的細胞(T)とE/T比10で混合し、5%CO₂-95%Airの条件下で37 $^{\circ}$ Cにて18時間インキュベーションした。インキュベーション後の上清100 μ lを回収して、産生されたIFN- γ 量をELISAにより測定した。標的細胞として、HLA-A31⁺ヒト肺腺癌細胞株LC-1(A3101/3302)、HLA-A31⁻腫瘍細胞(例えば大腸腺癌細胞株SW620(A0201/2402)、肺腺癌細胞株1-87(A0207/1101)、およびMKN28細胞)、MKN28-A31細胞、または培養に用いたペプチドと同じペプチドをパルスした細胞を用いた。ペプチドをパルスする細胞としては、HLA-A31 cDNAを導入したC1R細胞(以下、C1R-A31と略称する。)を用いた。また、標的細胞としてペプチドをパルスしたC1R-A31を用いる場合は、ネガティブコントロールとしてHLA-A31拘束性CTLを誘導しないヒト免疫不全ウイルス由来ペプチド(HIVペプチド:RLRFLLLIVTR、配列番号20)を用い、HIVペプチドをパルスした細胞を認識したCTLのIFN- γ 産生量をバックグラウンドとして各測定値から減算した。C1R-A31以外の標的細胞を用いる場合は、エフェクター細胞のみをインキュベーションした時のIFN- γ 産生量をバックグラウンドとして各測定値から減算した。算出された各測定値(NET)はスチューデントt検定で統計処理し、P値が0.05以下であるものを有意差があると見なした。

30

40

【0079】

ペプチドでパルスしたC1R-A31細胞を標的細胞として用いた結果の代表的な例を表

50

2 に示した。40 - P 4 7 (配列番号 1)、56 - P 2 8 (配列番号 3)、56 - P 3 1 (配列番号 4)、56 - P 3 2 (配列番号 5)、76 - P 2 0 (配列番号 6)、85 - P 1 0 (配列番号 7) または 85 - P 1 1 (配列番号 8) と共にそれぞれ培養した 10 例の癌患者由来の P B M C のうち、それぞれ 5 例 (50%)、3 例 (30%)、4 例 (40%)、4 例 (40%)、5 例 (50%)、5 例 (50%)、および 7 例 (70%) の P B M C が I F N - 産生を促進した。すなわち、これらペプチドが標的細胞に対する反応における癌患者由来 P B M C からの I F N - 産生を促進したと考えられる。一方、6 例の健常人由来の P B M C からの I F N - 産生については、56 - P 3 1 (配列番号 4) が 2 例、40 - P 4 7 (配列番号 1)、56 - P 3 2 (配列番号 5)、76 - P 2 0 (配列番号 6) および 85 - P 1 0 (配列番号 7) がそれぞれ 1 例で促進したが、56 - P 2 8 (配列番号 3) および 85 - P 1 1 (配列番号 8) は促進しなかった。

【0080】

【表 2】

患者例	IFN- γ 産生 (pg/ml)						
	40-P47	56-P28	56-P32	56-P31	76-P20	85-P11	85-P10
前立腺癌							
例 1	0	21	0	<u>97</u>	<u>83</u>	16	1
例 2	<u>65</u>	9	2	0	1	0	<u>275</u>
例 3	<u>470</u>	<u>946</u>	<u>1219</u>	<u>357</u>	<u>155</u>	<u>913</u>	<u>189</u>
例 4	0	3	4	1	9	<u>80</u>	0
大腸癌							
例 5	0	<u>108</u>	6	12	<u>840</u>	0	14
例 6	<u>129</u>	4	8	0	<u>305</u>	<u>1116</u>	<u>135</u>
胃癌							
例 7	1	2	<u>83</u>	0	1	<u>169</u>	13
子宮頸癌							
例 8	<u>97</u>	<u>967</u>	<u>1895</u>	<u>359</u>	0	<u>919</u>	<u>151</u>
例 9	<u>753</u>	36	<u>918</u>	<u>701</u>	<u>171</u>	<u>371</u>	<u>628</u>
乳癌							
例 10	2	12	5	6	11	<u>74</u>	9
健常人							
例 1	0	0	0	0	0	16	<u>104</u>
例 2	0	0	6	<u>101</u>	0	18	0
例 3	0	15	0	0	63	4	0
例 4	0	0	0	<u>129</u>	0	22	0
例 5	12	4	0	0	0	0	2
例 6	<u>193</u>	0	<u>65</u>	0	12	42	0

【0081】

また、各ペプチドで培養した P B M C は、標的細胞として H L A - A 3 1 ⁺ 腫瘍細胞 L C - 1 を用いたときにも I F N - 産生を促進した。一方、H L A - A 3 1 ⁻ 腫瘍細胞 (S W 6 2 0、1 - 8 7、M K N - 2 8) を標的細胞として用いたときには I F N - 産生を促進しなかった。しかし、H L A - A 3 1 c D N A を導入して発現させた M K N 2 8 細胞に対しては反応し、I F N - 産生を促進した。代表的な結果を患者例 4 (前立腺癌)

、患者例 5 (大腸癌) および患者例 8 (子宮頸癌) について図 8 に示した。標的細胞に対する反応における癌患者 P B M C からの I F N - 産生は、抗 H L A - クラス I 抗体または抗 C D 8 抗体により阻害されたが、抗 H L A - クラス I I 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 1 4 抗体または抗 H L A - A 2 4 抗体によっては阻害されなかった。すなわち、各ペプチドで培養した P B M C 中の I F N - 産生細胞は、C D 8 ⁺ の表現型を有する H L A - クラス I 拘束性の C T L であると考えられる。

【 0 0 8 2 】

また、各ペプチドで培養した P B M C は、培養に用いたペプチドを同じペプチドをコードする c D N A と H L A - A 3 1 c D N A とを共遺伝子導入した C O S - 7 細胞と共に培養したときに、I F N - 産生を促進した。

10

【 0 0 8 3 】

これらから、4 0 - P 4 7 (配列番号 1)、5 6 - P 2 8 (配列番号 3)、5 6 - P 3 1 (配列番号 4)、5 6 - P 3 2 (配列番号 5)、7 6 - P 2 0 (配列番号 6)、8 5 - P 1 0 (配列番号 7) および 8 5 - P 1 1 (配列番号 8) が、癌患者 P B M C から、H L A - A 3 1 拘束性 C T L を誘導することが判明した。

【 0 0 8 4 】

【実施例 4】

(ペプチドにより誘導された C T L の細胞傷害活性)

実施例 3 においてペプチドで 1 2 日間培養した P B M C をさらに I L - 2 の存在下で 1 0 日間以上培養後にエフェクター細胞として用い、各種標的細胞に対する細胞傷害活性を標準的な 6 時間の ^{5 1} C r 遊離試験 (非特許文献 1 5) で測定した。すなわち、エフェクター細胞と ^{5 1} C r 標識した各標的細胞とを、E / T 比 3、1 0 または 3 0 で混合して 6 時間インキュベーションした後に、上清中に遊離された ^{5 1} C r の放射活性を測定した。得られた結果は、標的細胞を完全に溶解したときの放射活性を 1 0 0 % として算出した % 溶解 (% l y s i s) で表した。標的細胞として、H L A - A 3 1 ⁺ 腫瘍細胞 L C - 1、H L A - A 3 1 ⁻ 腫瘍細胞 S W 6 2 0 または 1 - 8 7、H L A - A 3 1 ⁺ 正常細胞である P H A 芽球化 T 細胞 (P H A - b l a s t o i d T c e l l)、エプスタインバーウイルスで形質転換した B 細胞株 (E B V - B) および C 1 R - A 3 1 を用いた。

20

【 0 0 8 5 】

各ペプチドで培養した P B M C は、H L A - A 3 1 ⁺ 腫瘍細胞を特異的に溶解した。代表的な結果を図 9 に示した。このことから、4 0 - P 4 7 (配列番号 1)、5 6 - P 2 8 (配列番号 3)、5 6 - P 3 1 (配列番号 4)、5 6 - P 3 2 (配列番号 5)、7 6 - P 2 0 (配列番号 6)、8 5 - P 1 0 (配列番号 7) および 8 5 - P 1 1 (配列番号 8) は癌患者の P B M C から H L A - A 3 1 拘束性の腫瘍特異的 C T L を誘導することが明らかになった。

30

【 0 0 8 6 】

さらにペプチドによる P B M C からの C T L 誘導がペプチド特異的であることを実証するために、コールドターゲットインヒビションアッセイを行った。すなわち、エフェクター細胞と ^{5 1} C r 標識した M K N 2 8 - A 3 1 細胞 (h o t ということもある。) とを用いて行う ^{5 1} C r 遊離試験において、エフェクター細胞を得るために用いたペプチドと同じペプチドでパルスした C 1 R - A 3 1 細胞 (c o l d ということもある。) を、c o l d / h o t 比 1 0 になるように添加し、6 時間インキュベーション後に上清中に遊離した ^{5 1} C r の放射活性を測定した。ネガティブコントロールとして、H I V ペプチド (配列番号 2 0) でパルスした C 1 R - A 3 1 細胞を用いた。図 1 0 に代表的な例として、5 6 - P 2 8 (配列番号 3) で培養した患者例 5 (大腸癌) 由来の P B M C をエフェクター細胞として用いた結果を示す。エフェクター細胞は、M K N 2 8 - A 3 1 細胞に対して細胞傷害活性を示し、M K N 2 8 - A 3 1 細胞を溶解した。しかし、標的細胞として M K N 2 8 - A 3 1 細胞に c o l d を添加したものをを用いたとき、エフェクター細胞の M K N 2 8 - A 3 1 細胞に対する細胞傷害活性は有意に低下した。一方、ネガティブコントロールを加えても、エフェクター細胞の細胞傷害活性に影響は見られなかった。このことから、ペプ

40

50

チドによりP B M Cから誘導されたC T Lは該ペプチドに特異的であることが判明した。

【0087】

【実施例5】

(ペプチドによる癌患者末梢血単核細胞からのC T Lの誘導)

ペプチド40 - P 4 7 (配列番号1)、56 - P 2 8 (配列番号3)、56 - P 3 1 (配列番号4)、56 - P 3 2 (配列番号5)、76 - P 2 0 (配列番号6)、85 - P 1 0 (配列番号7)および85 - P 1 1 (配列番号8)について、ヒトP B M CからのC T L誘導能を検討した。P B M Cは、H L A - A 3 3⁺癌患者6例(肺癌患者2例、前立腺癌患者3例および大腸癌患者1例)およびH L A - A 1 1⁺癌患者9例(肺癌患者2例、前立腺癌患者5例、膀胱癌患者1例およびメラノーマ患者1例)の各血液試料から常法に従って調製した。

10

【0088】

各P B M C (細胞数 1×10^5)はペプチド各 $10 \mu\text{M}$ と共に実施例3に記載の方法で培養し、エフェクター細胞として用いた。標的細胞として、各ペプチドでパルスしたC 1 R - A 3 3細胞またはC 1 R - A 1 1細胞を用いた。C 1 R - A 3 3細胞およびC 1 R - A 1 1細胞はそれぞれ、C 1 R細胞にH L A - 3 3 c D N AおよびH L A - A 1 1 c D N Aを常法により遺伝子導入して作成した。エフェクター細胞と標的細胞とは、培養またはパルスに用いたペプチドが一致するように組合わせて、E / T比10で混合し、5% C O₂ - 95% A i rの条件下で37℃にて18時間インキュベーションした。インキュベーション後の上清 $100 \mu\text{l}$ を回収して、産生されたI F N - γ 量をE L I S Aにより測定した。また、ネガティブコントロールとしてH L A - A 3 1拘束性C T Lを誘導しないH I Vペプチド(配列番号20)を用い、H I Vペプチドをパルスした細胞を認識したC T LのI F N - γ 産生量をバックグラウンドとして各測定値から減算した。ポジティブコントロールとしてはインフルエンザウイルス由来ペプチド(F l uペプチド: N V K N L Y E K V K、配列番号21)およびエプスタインバーウイルス由来ペプチド(E B Vペプチド: I V T D F S V I K、配列番号22)を用いた。算出された各測定値(N E T)はスチューデントt検定で統計処理し、P値が0.05以下であるものを有意差があると見なした。H L A - A 3 3⁺癌患者由来のP B M CおよびH L A - A 1 1⁺癌患者由来のP B M Cをエフェクター細胞として用いた結果をそれぞれ表3および4に示した。これらの表中で、I F N - γ 産生の促進が有意であると認められたものを下線で示した。

20

30

【0089】

56 - P 2 8 (配列番号3)、56 - P 3 1 (配列番号4)、56 - P 3 2 (配列番号5)、76 - P 2 0 (配列番号6)、85 - P 1 0 (配列番号7)または85 - P 1 1 (配列番号8)と共にそれぞれ培養した6例のH L A - A 3 3⁺癌患者由来のP B M Cのうち、それぞれ2例(33%)、1例(17%)、1例(17%)、1例(17%)、4例(67%)、および4例(67%)のP B M CがI F N - γ 産生を促進した(表3)。すなわち、これらペプチドが、ペプチドでパルスしたC 1 R - A 3 3細胞に対する反応におけるH L A - A 3 3⁺癌患者由来P B M CからのI F N - γ 産生を促進したと考えられる。

【0090】

また、40 - P 4 7 (配列番号1)、56 - P 2 8 (配列番号3)、56 - P 3 1 (配列番号4)、56 - P 3 2 (配列番号5)、76 - P 2 0 (配列番号6)、または85 - P 1 0 (配列番号7)と共にそれぞれ培養した9例のH L A - A 1 1⁺癌患者由来のP B M Cのうち、それぞれ2例(22%)、4例(44%)、2例(22%)、1例(11%)、2例(22%)、および4例(44%)のP B M CがI F N - γ 産生を促進した(表4)。すなわち、これらペプチドが、ペプチドでパルスしたC 1 R - A 1 1細胞に対する反応におけるH L A - A 1 1⁺癌患者由来P B M CからのI F N - γ 産生を促進したと考えられる。

40

【0091】

【表3】H L A - A 3 3⁺癌患者由来のP B M CからのC T L誘導

ペプチド	配列番号	癌患者由来PBMC						有効例/ 全例
		#1 肺癌	#2 肺癌	#3 前立腺癌	#4 前立腺癌	#5 前立腺癌	#6 大腸癌	
HIV	20	0	0	NT	0	0	0	0/5
Flu	21	<u>234</u>	4	NT	0	0	<u>803</u>	2/5
EBV	22	<u>305</u>	0	NT	0	<u>116</u>	<u>105</u>	3/5
85-P10	7	<u>432</u>	<u>239</u>	5	<u>113</u>	0	<u>124</u>	4/6
85-P11	8	0	<u>381</u>	<u>42</u>	<u>130</u>	0	<u>122</u>	4/6
76-P20	6	0	0	<u>228</u>	0	2	0	1/6
56-P28	3	0	0	<u>141</u>	0	0	<u>104</u>	2/6
56-P31	4	0	20	0	<u>306</u>	0	0	1/6
56-P32	5	4	0	0	0	0	<u>500</u>	1/6
40-P47	1	0	0	0	0	0	0	0/6

10

【 0 0 9 2 】

【表 4】HLA - A 1 1⁺ 癌患者由来の P B M C からの C T L 誘導

ペプチド	配列番号	癌患者由来PBMC									有効例/ 全例
		#7 肺癌	#8 肺癌	#9 前立腺癌	#10 前立腺癌	#11 前立腺癌	#12 前立腺癌	#13 前立腺癌	#14 膀胱癌	#15 メラノーマ	
HIV	20	62	0	0	5	0	1	10	0	29	0/9
Flu	21	<u>1363</u>	<u>244</u>	NT	NT	<u>533</u>	<u>269</u>	NT	<u>950</u>	NT	5/5
EBV	22	<u>1297</u>	34	NT	NT	<u>487</u>	32	NT	<u>1436</u>	NT	3/5
85-P10	7	10	0	<u>114</u>	9	0	0	<u>590</u>	<u>371</u>	<u>155</u>	4/9
85-P11	8	18	0	0	0	0	7	0	52	0	0/9
76-P20	6	0	65	<u>106</u>	0	34	11	0	<u>307</u>	0	2/9
56-P28	3	226	44	156	107	54	1	NT	149	0	4/8
56-P31	4	<u>152</u>	0	0	0	<u>289</u>	39	0	0	0	2/9
56-P32	5	0	60	10	0	0	<u>141</u>	0	0	0	1/9
40-P47	1	11	0	0	<u>102</u>	0	0	<u>267</u>	0	31	2/9

20

表 3 および 4 において、N T とは試験しなかったこと意味する。

30

【 0 0 9 3 】

8 5 - P 1 1 (配列番号 8) で培養した H L A - A 3 3⁺ 癌患者由来 P B M C の、該ペプチドをパルスした C 1 R - A 3 3 細胞に対する反応における I F N - 産生の促進は、抗クラス I 抗体または抗クラス C D 8 抗体により阻害された (図 1 1 A)。また、8 5 - P 1 0 (配列番号 7) で培養した H L A - A 1 1⁺ 癌患者由来 P B M C の、該ペプチドをパルスした C 1 R - A 1 1 細胞に対する反応における I F N - 産生の促進も、抗クラス I 抗体または抗クラス C D 8 抗体により阻害された (図 1 1 B)。これらから、上記ペプチドにより I F N - 産生が促進された細胞は、クラス I 抗原および C D 8 の表現型を示す細胞、すなわち C T L であると考えられる。

【 0 0 9 4 】

40

このように、本ペプチドは、H L A - A 3 1⁺ 癌患者のみならず、H L A - A 1 1⁺ 癌患者または H L A - A 3 3⁺ 癌患者の P B M C から各 H L A - A 拘束性の C T L を誘導することが明らかになった。

【 0 0 9 5 】

【実施例 6】

(ペプチドにより誘導された C T L の細胞傷害活性)

実施例 5 においてペプチドで 1 2 日間培養した P B M C をさらに I L - 2 の存在下で 1 0 日間以上培養後にエフェクター細胞として用い、各種標的細胞に対する細胞傷害活性を標準的な 6 時間の⁵ ¹ C r 遊離試験 (非特許文献 1 5) で測定した。標的細胞として、肺腺癌細胞株 L C - 1 (A 3 1 0 1 / 3 3 0 2)、子宮頸癌細胞株 R K N 細胞 (A 3 3 0 2 /

50

)、肺腺癌細胞株 11-18 (A0201/A2402)、肺腺癌細胞株 1-87 (A0207/1101)、肺扁平上皮癌細胞株 QG56 (A2601/)、食道癌細胞株 KE5 (A1101/)、大腸癌細胞株 SW620 (A0201/2402)、HLA-A33⁺ または HLA-A11⁺ 正常細胞である PHA 芽球化 T 細胞を用いた。

【0096】

各ペプチドで培養した HLA-A33⁺ 癌患者由来 PBMC は、HLA-A33⁺ 腫瘍細胞を特異的に溶解した。代表的な結果を図 12 に示した。このことから、56-P28 (配列番号 3)、56-P31 (配列番号 4)、56-P32 (配列番号 5)、76-P20 (配列番号 6)、85-P10 (配列番号 7) または 85-P11 (配列番号 8) は HLA-A33⁺ 癌患者の PBMC から腫瘍特異的 CTL を誘導することが明らかになった。

10

【0097】

また、各ペプチドで培養した HLA-A11⁺ 癌患者由来 PBMC は、HLA-A11⁺ 腫瘍細胞を特異的に溶解した。代表的な結果を図 13 に示した。このことから、40-P47 (配列番号 1)、56-P28 (配列番号 3)、56-P31 (配列番号 4)、56-P32 (配列番号 5)、76-P20 (配列番号 6)、または 85-P10 (配列番号 7) は HLA-A11⁺ 癌患者の PBMC から腫瘍特異的 CTL を誘導することが明らかになった。

【0098】

さらに実施例 4 と同様の方法により、コールドターゲットインヒビションアッセイを行った。エフェクター細胞として、56-P31 (配列番号 4) と共に培養した肺癌患者由来 PBMC (HLA-A11/) または 85-P10 (配列番号 7) と共に培養した肺癌患者由来 PBMC (HLA-A11/) を用いた。ポジティブコントロールとして、Flu ペプチド (配列番号 21) と共に培養したこれら PBMC を用いた。hot として、⁵¹Cr 標識した肺扁平上皮癌細胞株 QG56 (A2601/) または食道癌細胞株 KE5 (A1101/) を用いた。cold として、56-P31 (配列番号 4)、85-P10 (配列番号 7) または HIV ペプチド (配列番号 20) をパルスした C1R-A11 細胞を用いた。

20

【0099】

図 14 A に示したように、56-P31 (配列番号 4) と共に培養した肺癌患者由来 PBMC (HLA-A11/) は、KE5 細胞に対して QG56 細胞と比較して強い細胞傷害作用を示した。このことから、該 PBMC は HLA-A11 拘束性に細胞傷害活性を示すことが明らかになった。標的細胞として KE5 細胞に cold (56-P31 (配列番号 4) をパルスした C1R-A11 細胞) を添加したのを用いたとき、KE5 細胞に対する該 PBMC の細胞傷害活性は有意に低下した。一方、HIV ペプチド (配列番号 20) をパルスした C1R-A11 細胞を加えても、KE5 細胞に対する該 PBMC の細胞傷害活性に影響は見られなかった。また、図 14 B に示したように、85-P10 (配列番号 7) と共に培養した肺癌患者由来 PBMC (HLA-A11/) の KE5 細胞に対する細胞傷害活性も同様に、cold (85-P10 (配列番号 7) をパルスした C1R-A11 細胞) の添加により有意に低下した。

30

40

【0100】

これらから、これらペプチドにより PBMC から誘導された HLA-A11 拘束性 CTL はペプチド特異的であることが判明した。また、該 CTL は、HLA-A11 と該ペプチドとの複合体を認識することが明らかになった。

【実施例 7】

(組織および各種癌細胞における各クローンの発現)

実施例 1 で得られたクローン 40、クローン 45、クローン 56、クローン 76 およびクローン 85 のうち、クローン 40、クローン 56、クローン 76 およびクローン 85 について、組織および各種癌細胞における mRNA の発現をノザンブロットング分析により検討した。ノザンブロットング分析は、各種腫瘍細胞 (肺腺癌細胞株 1-87、胃腺癌

50

細胞株 MKN-28、肺腺癌細胞株 LC-1、大腸癌細胞株 SW620 および食道癌細胞株 KE4) または健常人由来の PBMC から抽出した総 RNA、あるいは各組織由来の総 RNA を用いて、既報 (非特許文献 29) に記載の方法に準じて行った。プローブ cDNA は、³²P 標識した以下のものを用いた; EcoRI で消化したクローン 40 の第 420 ~ 1,314 番目の 0.9 kb 断片 cDNA; XbaI で消化したクローン 56 の第 334 ~ 1,598 番目の 1.3 kb p 断片 cDNA; BarI および NcoI で消化したクローン 78 の第 494 ~ 1,169 番目の 0.7 kb p 断片 cDNA; HindIII で消化したクローン 85 の第 858 ~ 1,798 番目の 0.9 kb p 断片 cDNA。また、 α -アクチン mRNA を発現程度のコントロールとして同様に検出した。 α -アクチン mRNA 検出用プローブとして、ヒト α -アクチン cDNA (Clonetech) を用いた。得られた結果を基に、下記式 1 により相対的発現レベルを算出し、表 5 に示した。

【0101】

【式 1】

インデックス = (試料の各クローン濃度 / 試料の α -アクチン濃度) \times (SW620 細胞の α -アクチン濃度 / SW620 細胞の各クローン濃度)

【0102】

【表 5】

細胞株または組織	クローン 40	クローン 56	クローン 76	クローン 85
腫瘍細胞				
KE4	1.05	1.83	0.22	1.44
1-87	0.28	0.40	0.21	0.86
MKN-28	0.46	0.89	0.18	0.61
LC-1	0.84	1.22	0.52	1.12
SW620	1.00	1.00	1.00	1.00
正常組織				
PBMC	0.10	0.11	<0.05	0.47
精巣	0.46	0.28	0.20	2.78
肺	0.16	0.11	<0.05	0.56
胃	NT	0.05	<0.05	NT
小腸	<0.05	0.16	<0.05	0.52
大腸	<0.05	0.13	<0.05	0.60
骨格筋	0.18	<0.05	<0.05	0.49
胎盤	0.15	0.22	<0.05	0.47

【0103】

クローン 40、クローン 56、クローン 76 およびクローン 85 はいずれも、検討した全ての腫瘍細胞で高いレベルで発現していた。クローン 40、クローン 56、およびクローン 76 は精巣においても発現していたが、そのレベルは腫瘍細胞と同等か、より低かった。一方、精巣以外の正常組織における発現レベルは低かった。クローン 85 は、正常組織においても発現レベルが高く、精巣において強く発現していたが、それ以外の正常組織における発現レベルは腫瘍細胞における発現レベルより低かった。

【0104】

【発明の効果】

HLA-A31 拘束性腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞に認識される腫瘍抗原をコードする遺伝子を、ヒト大腸癌細胞株 SW620 から単離・同定した。さらに得られた遺伝子にコードされるポリペプチドに基づいて、該腫瘍抗原のエピトープを有するペプチドを見出した。

本ペプチドは、HLA-A31⁺癌患者、HLA-A11⁺癌患者またはHLA-A33⁺癌患者の血液より調製した末梢血単核細胞から、該ペプチドおよびポリペプチドを認識して腫瘍細胞を傷害する腫瘍特異的細胞傷害性T細胞を誘導した。HLA-A31対立遺伝子、HLA-A11対立遺伝子またはHLA-A33対立遺伝子はHLA-A3スーパータイプに属するHLAであり、世界人口の多くで発現が認められるHLA-A対立遺伝子である。このように本ペプチドは、1つのペプチドであってもHLA-A3スーパータイプに属する1つまたは複数のHLA-A拘束性に腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し得るという特徴を有する。したがって、本発明は、大多数の癌患者の特異的免疫療法に適用できる可能性があり、非常に有用性が高い。

また、本ポリペプチドまたはペプチドは、既に報告されている腫瘍抗原ペプチドと組合わせて使用することにより、複数種類のHLA拘束性細胞傷害性T細胞の誘導および/または活性化が可能であるため、本発明により癌の多様性に対応することが可能になる。

このように本発明により、癌等の、例えば前立腺癌、大腸癌、胃癌、子宮頸癌、乳癌、肺腺癌、食道癌、膀胱癌またはメラノーマ等の特異的免疫療法が可能になり、癌治療において多大な貢献を期待できる。特に、HLA表現型の一方または両方がHLA-A3スーパータイプに属するHLAである癌患者の特異的免疫療法の開発に有用である。また、本発明は、細胞傷害性T細胞による癌の認識に関する分子の基礎的研究にも多大に寄与するものである。

【0105】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号2：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号3：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号4：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号5：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号6：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号7：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号8：HLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞に認識される設計されたペプチド。

配列番号20：HIV蛋白質から設計したペプチド

配列番号21：インフルエンザウイルス蛋白質から設計したペプチド

配列番号22：EBV蛋白質から設計したペプチド

【0106】

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo

<120> Tumor antigen

<130> NP03-1075

10

<150> JP P2002-126764

<151> 2002-04-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

<400> 1

Phe Ile Met Ala Thr Tyr Leu Ala Asp Arg

1

5

10

40

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

10

<400> 2

Trp Val Phe Lys Glu Glu Gly Val Leu Arg

1 5 10

20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

30

<400> 3

Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

<400> 4

20

Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Val Phe Arg

1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

40

<400> 5

Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Cys Leu Arg
 1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

<400> 6

Lys Phe Thr Lys Thr His Lys Phe Arg
 1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

10

20

30

40

<400> 7

Arg Gln Arg Ala Met Arg Leu Ser Arg

1 5

<210> 8

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Designed peptide recognized by HLA-A31 restricted cytotoxic T lymphocytes

20

<400> 8

His Gln Glu Ile Leu Ile Leu Leu Arg

1 5

30

<210> 9

<211> 599

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

40

Met Ala Asp Lys Leu Thr Arg Ile Ala Ile Val Asn His Asp Lys Cys

1	5	10	15	
Lys Pro Lys Lys Cys Arg Gln Glu Cys Lys Lys Ser Cys Pro Val Val				
	20	25	30	
Arg Met Gly Lys Leu Cys Ile Glu Val Thr Pro Gln Ser Lys Ile Ala				10
	35	40	45	
Trp Ile Ser Glu Thr Leu Cys Ile Gly Cys Gly Ile Cys Ile Lys Lys				
	50	55	60	20
Cys Pro Phe Gly Ala Leu Ser Ile Val Asn Leu Pro Ser Asn Leu Glu				
65	70	75	80	
Lys Glu Thr Thr His Arg Tyr Cys Ala Asn Ala Phe Lys Leu His Arg				
	85	90	95	30
Leu Pro Ile Pro Arg Pro Gly Glu Val Leu Gly Leu Val Gly Thr Asn				
	100	105	110	
Gly Ile Gly Lys Ser Thr Ala Leu Lys Ile Leu Ala Gly Lys Gln Lys				
	115	120	125	40

Pro Asn Leu Gly Lys Tyr Asp Asp Pro Pro Asp Trp Gln Glu Ile Leu
 130 135 140

Thr Tyr Phe Arg Gly Ser Glu Leu Gln Asn Tyr Phe Thr Lys Ile Leu
 145 150 155 160

10

Glu Asp Asp Leu Lys Ala Ile Ile Lys Pro Gln Tyr Val Asp Gln Ile
 165 170 175

Pro Lys Ala Ala Lys Gly Thr Val Gly Ser Ile Leu Asp Arg Lys Asp
 180 185 190

20

Glu Thr Lys Thr Gln Ala Ile Val Cys Gln Gln Leu Asp Leu Thr His
 195 200 205

30

Leu Lys Glu Arg Asn Val Glu Asp Leu Ser Gly Gly Glu Leu Gln Arg
 210 215 220

Phe Ala Cys Ala Val Val Cys Ile Gln Lys Ala Asp Ile Phe Met Phe
 225 230 235 240

40

Asp Glu Pro Ser Ser Tyr Leu Asp Val Lys Gln Arg Leu Lys Ala Ala
 245 250 255

Ile Thr Ile Arg Ser Leu Ile Asn Pro Asp Arg Tyr Ile Ile Val Val
 260 265 270

10

Glu His Asp Leu Ser Val Leu Asp Tyr Leu Ser Asp Phe Ile Cys Cys
 275 280 285

Leu Tyr Gly Val Pro Ser Ala Tyr Gly Val Val Thr Met Pro Phe Ser
 290 295 300

20

Val Arg Glu Gly Ile Asn Ile Phe Leu Asp Gly Tyr Val Pro Thr Glu
 305 310 315 320

Asn Leu Arg Phe Arg Asp Ala Ser Leu Val Phe Lys Val Ala Glu Thr
 325 330 335

30

Ala Asn Glu Glu Glu Val Lys Lys Met Cys Met Tyr Lys Tyr Pro Gly
 340 345 350

40

Met Lys Lys Lys Met Gly Glu Phe Glu Leu Ala Ile Val Ala Gly Glu

355

360

365

Phe Thr Asp Ser Glu Ile Met Val Met Leu Gly Glu Asn Gly Thr Gly
 370 375 380

Lys Thr Thr Phe Ile Arg Met Leu Ala Gly Arg Leu Lys Pro Asp Glu
 385 390 395 400

Gly Gly Glu Val Pro Val Leu Asn Val Ser Tyr Lys Pro Gln Lys Ile
 405 410 415

Ser Pro Lys Ser Thr Gly Ser Val Arg Gln Leu Leu His Glu Lys Ile
 420 425 430

Arg Asp Ala Tyr Thr His Pro Gln Phe Val Thr Asp Val Met Lys Pro
 435 440 445

Leu Gln Ile Glu Asn Ile Ile Asp Gln Glu Val Gln Thr Leu Ser Gly
 450 455 460

Gly Glu Leu Gln Arg Val Ala Leu Ala Leu Cys Leu Gly Lys Pro Ala
 465 470 475 480

10

20

30

40

Asp Val Tyr Leu Ile Asp Glu Pro Ser Ala Tyr Leu Asp Ser Glu Gln
 485 490 495

Arg Leu Met Ala Ala Arg Val Val Lys Arg Phe Ile Leu His Ala Lys
 500 505 510

10

Lys Thr Ala Phe Val Val Glu His Asp Phe Ile Met Ala Thr Tyr Leu
 515 520 525

20

Ala Asp Arg Val Ile Val Phe Asp Gly Val Pro Ser Lys Asn Thr Val
 530 535 540

Ala Asn Ser Pro Gln Thr Leu Leu Ala Gly Met Asn Lys Phe Leu Ser
 545 550 555 560

30

Gln Leu Glu Ile Thr Phe Arg Arg Asp Pro Asn Asn Tyr Arg Pro Arg
 565 570 575

Ile Asn Lys Leu Asn Ser Ile Lys Asp Val Glu Gln Lys Lys Ser Gly
 580 585 590

40

Asn Tyr Phe Phe Leu Asp Asp
595

<210> 10

<211> 439

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Glu Pro Ser Thr Ala Ala Arg Ala Trp Ala Leu Phe Trp Leu Leu
1 5 10 15

20

Leu Pro Leu Leu Gly Ala Val Cys Ala Ser Gly Pro Arg Thr Leu Val
 20 25 30

Leu Leu Asp Asn Leu Asn Val Arg Glu Thr His Ser Leu Phe Phe Arg
 35 40 45

30

Ser Leu Lys Asp Arg Gly Phe Glu Leu Thr Phe Lys Thr Ala Asp Asp
50 55 60

180

185

190

Leu Val Leu Asp Ile Leu Thr Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ser Phe Phe
 195 200 205

Pro Asp Lys Pro Ile Thr Gln Tyr Pro His Ala Val Gly Lys Asn Thr
 210 215 220

Leu Leu Ile Ala Gly Leu Gln Ala Arg Asn Asn Ala Arg Val Ile Phe
 225 230 235 240

Ser Gly Ser Leu Asp Phe Phe Ser Asp Ser Phe Phe Asn Ser Ala Val
 245 250 255

Gln Lys Ala Ala Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ser Gln Thr Gly Asn Tyr
 260 265 270

Glu Leu Ala Val Ala Leu Ser Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Gly Val
 275 280 285

Leu Arg Val Gly Pro Val Ser His His Arg Val Gly Glu Thr Ala Pro
 290 295 300

10

20

30

40

Pro Asn Ala Tyr Thr Val Thr Asp Leu Val Glu Tyr Ser Ile Val Ile
 305 310 315 320

Gln Gln Leu Ser Asn Gly Lys Trp Val Pro Phe Asp Gly Asp Asp Ile
 325 330 335

10

Gln Leu Glu Phe Val Arg Ile Asp Pro Phe Val Arg Thr Phe Leu Lys
 340 345 350

20

Lys Lys Gly Gly Lys Tyr Ser Val Gln Phe Lys Leu Pro Asp Val Tyr
 355 360 365

Gly Val Phe Gln Phe Lys Val Asp Tyr Asn Arg Leu Gly Tyr Thr His
 370 375 380

30

Leu Tyr Ser Ser Thr Gln Val Ser Val Arg Pro Leu Gln His Thr Gln
 385 390 395 400

Tyr Glu Arg Phe Ile Pro Ser Ala Tyr Pro Tyr Tyr Ala Ser Ala Phe
 405 410 415

40

Ser Met Met Leu Gly Leu Phe Ile Phe Ser Ile Val Phe Leu His Met
 420 425 430

Lys Glu Lys Glu Lys Ser Asp
 435

10

<210> 11

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 11

Met Arg Glu Ile Val His Ile Gln Ala Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile
 1 5 10 15

Gly Ala Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile Asp Pro
 20 25 30

30

Thr Gly Thr Tyr His Gly Asp Ser Asp Leu Gln Leu Asp Arg Ile Ser
 35 40 45

40

Val Tyr Tyr Asn Glu Ala Thr Gly Gly Lys Tyr Val Pro Arg Ala Ile

50

55

60

Leu Val Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ser Gly Pro
 65 70 75 80

Phe Gly Gln Ile Phe Arg Pro Asp Asn Phe Val Phe Gly Gln Ser Gly
 85 90 95

Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu
 100 105 110

Val Asp Ser Val Leu Asp Val Val Arg Lys Glu Ala Glu Ser Cys Asp
 115 120 125

Cys Leu Gln Gly Phe Gln Leu Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly
 130 135 140

Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Asn Thr Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser
 165 170 175

10

20

30

40

Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu
 180 185 190

Val Glu Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr
 195 200 205

10

Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp
 210 215 220

20

Leu Asn His Leu Val Ser Ala Thr Met Ser Gly Val Thr Thr Cys Leu
 225 230 235 240

Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn Ala Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn
 245 250 255

30

Met Val Pro Phe Pro Arg Leu His Phe Phe Met Pro Gly Phe Ala Pro
 260 265 270

Leu Thr Ser Arg Gly Ser Gln Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Glu
 275 280 285

40

Leu Thr Gln Gln Val Phe Asp Ala Lys Asn Met Met Ala Ala Cys Asp
 290 295 300

Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu Thr Val Ala Ala Val Phe Arg Gly Arg
 305 310 315 320

10

Met Ser Met Lys Glu Val Asp Glu Gln Met Leu Asn Val Gln Asn Lys
 325 330 335

Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu Trp Ile Pro Asn Asn Val Lys Thr Ala
 340 345 350

20

Val Cys Asp Ile Pro Pro Arg Gly Leu Lys Met Ala Val Thr Phe Ile
 355 360 365

30

Gly Asn Ser Thr Ala Ile Gln Glu Leu Phe Lys Arg Ile Ser Glu Gln
 370 375 380

Phe Thr Ala Met Phe Arg Arg Lys Ala Phe Leu His Trp Tyr Thr Gly
 385 390 395 400

40

Glu Gly Met Asp Glu Met Glu Phe Thr Glu Ala Glu Ser Asn Met Asn
 405 410 415

Asp Leu Val Ser Glu Tyr Gln Gln Tyr Gln Asp Ala Thr Ala Glu Glu
 420 425 430

10

Glu Glu Asp Phe Gly Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala
 435 440

<210> 12

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Arg Pro Leu Thr Glu Glu Glu Thr Arg Val Met Phe Glu Lys Ile
 1 5 10 15

30

Ala Lys Tyr Ile Gly Glu Asn Leu Gln Leu Leu Val Asp Arg Pro Asp
 20 25 30

Gly Thr Tyr Cys Phe Arg Leu His Asn Asp Arg Val Tyr Tyr Val Ser
 35 40 45

40

Glu Lys Ile Met Lys Leu Ala Ala Asn Ile Ser Gly Asp Lys Leu Val
 50 55 60

Ser Leu Gly Thr Cys Phe Gly Lys Phe Thr Lys Thr His Lys Phe Arg
 65 70 75 80

10

Leu His Val Thr Ala Leu Asp Tyr Leu Ala Pro Tyr Ala Lys Tyr Lys
 85 90 95

20

Val Trp Ile Lys Pro Gly Ala Glu Gln Ser Phe Leu Tyr Gly Asn His
 100 105 110

Val Leu Lys Ser Gly Leu Gly Arg Ile Thr Glu Asn Thr Ser Gln Tyr
 115 120 125

30

Gln Gly Val Val Val Tyr Ser Met Ala Asp Ile Pro Leu Gly Phe Gly
 130 135 140

Val Ala Ala Lys Ser Thr Gln Asp Cys Arg Lys Val Asp Pro Met Ala
 145 150 155 160

40

Ile Val Val Phe His Gln Ala Asp Ile Gly Glu Tyr Val Arg His Glu
 165 170 175

Glu Thr Leu Thr
 180

10

<210> 13

<211> 303

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 13

Met Lys Pro Thr Gly Thr Asp Pro Arg Ile Leu Ser Ile Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Val Ala Lys Ser Pro Glu Gln Asn Val Pro Val Ile Leu Leu Lys Leu
 20 25 30

30

Lys Glu Ile Ile Asn Ile Thr Pro Leu Gly Ser Ser Glu Leu Lys Lys
 35 40 45

40

Ile Lys Gln Asp Ile Tyr Cys Tyr Asp Leu Ile Gln Tyr Cys Leu Leu

50

55

60

Val Leu Ser Gln Asp Tyr Ser Arg Ile Gln Gly Gly Trp Thr Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Gln Leu Thr Gln Ile Leu Ser His Cys Cys Val Gly Leu Glu Pro
 85 90 95

Gly Glu Asp Ala Glu Glu Phe Tyr Asn Glu Leu Leu Pro Ser Ala Ala
 100 105 110

Glu Asn Phe Leu Val Leu Gly Arg Gln Leu Gln Thr Cys Phe Ile Asn
 115 120 125

Ala Ala Lys Ala Glu Glu Lys Asp Glu Leu Leu His Phe Phe Gln Ile
 130 135 140

Val Thr Asp Ser Leu Phe Trp Leu Leu Gly Gly His Val Glu Leu Ile
 145 150 155 160

Gln Asn Val Leu Gln Ser Asp His Phe Leu His Leu Leu Gln Ala Asp
 165 170 175

10

20

30

40

Asn Val Gln Ile Gly Ser Ala Val Met Met Met Leu Gln Asn Ile Leu
 180 185 190

Gln Ile Asn Ser Gly Asp Leu Leu Arg Ile Gly Arg Lys Ala Leu Tyr
 195 200 205

10

Ser Ile Leu Asp Glu Val Ile Phe Lys Leu Phe Ser Thr Pro Ser Pro
 210 215 220

Val Ile Arg Ser Thr Ala Thr Lys Leu Leu Leu Leu Met Ala Glu Ser
 225 230 235 240

20

His Gln Glu Ile Leu Ile Leu Leu Arg Gln Ser Thr Cys Tyr Lys Gly
 245 250 255

Leu Arg Arg Leu Leu Ser Lys Gln Glu Thr Gly Thr Glu Phe Ser Gln
 260 265 270

30

Glu Leu Arg Gln Leu Val Gly Leu Leu Ser Pro Met Val Tyr Gln Glu
 275 280 285

40

Val Glu Glu Gln Ile Gln Thr Ile Lys Asp Val Ala Gly Asp Lys

290

295

300

<210> 14

<211> 264

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 14

Met Leu Leu Glu Ile Asn Arg Gln Lys Glu Glu Glu Asp Leu Lys Leu

1

5

10

15

20

Gln Leu Gln Leu Gln Arg Gln Arg Ala Met Arg Leu Ser Arg Glu Leu

20

25

30

Gln Leu Ser Met Leu Glu Ile Val His Pro Gly Gln Val Glu Lys His

35

40

45

30

Tyr Arg Glu Met Glu Glu Lys Ser Ala Leu Ile Ile Gln Lys His Trp

50

55

60

Arg Gly Tyr Arg Glu Arg Lys Asn Phe His Gln Gln Arg Gln Ser Leu

65

70

75

80

40

Ile Glu Tyr Lys Ala Ala Val Thr Leu Gln Arg Ala Ala Leu Lys Phe
 85 90 95

Leu Ala Lys Tyr Arg Lys Lys Lys Lys Leu Phe Ala Pro Trp Arg Gly
 100 105 110

10

Leu Gln Glu Leu Thr Asp Ala Arg Arg Val Glu Leu Lys Lys Arg Val
 115 120 125

Asp Asp Tyr Val Arg Arg His Leu Gly Ser Pro Met Ser Asp Val Val
 130 135 140

20

Ser Arg Glu Leu His Ala Gln Ala Gln Glu Arg Leu Gln His Tyr Phe
 145 150 155 160

30

Met Gly Arg Ala Leu Glu Glu Arg Ala Gln Gln His Arg Glu Ala Leu
 165 170 175

Ile Ala Gln Ile Ser Thr Asn Val Glu Gln Leu Met Lys Ala Pro Ser
 180 185 190

40

Leu Lys Glu Ala Glu Gly Lys Glu Pro Glu Leu Phe Leu Ser Arg Ser
 195 200 205

Arg Pro Val Ala Ala Lys Ala Lys Gln Ala His Leu Thr Thr Leu Lys
 210 215 220

10

His Ile Gln Ala Pro Trp Trp Lys Lys Leu Gly Glu Glu Ser Gly Asp
 225 230 235 240

Glu Ile Asp Val Pro Lys Asp Glu Leu Ser Ile Glu Leu Glu Asn Leu
 245 250 255

20

Phe Ile Gly Gly Thr Lys Pro Pro
 260

<210> 15

30

<211> 2978

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gccgtgagaa cacgctgtgt ggctgaaaag tgaaggcaag agctgatttg gccctctgtgc 60

40

icccctccgc aaggggatcg tttctccag aagagctgga tattcttctg cccagttatg	120	
gcagacaagt taacgagaat tgctattgtc aacctgaca aatgtaaacc taagaaatgt	180	
cgacaggaat gcaaaaagag ttgtcctgta gticgaatgg gaaaattatg catagaggtt	240	
acaccccaga gcaaaatagc atggatttcc gaaactcttt gtattgggtg tggtatctgt	300	10
attaagaaat gccccttgg cgcttatca atgtcaatc taccaagcaa ctggaaaaa	360	
gaaaccacac atcgatattg tgccaatgcc ttcaaacttc acaggttgcc tatecctctg	420	
ccaggigaag ttttgggatt agttggaact aatggattg gaaagtcaac tgcittaaaa	480	20
atttagcag gaaaacaaaa gccaaacctt ggaaagtacg atgatcttcc tgactggcag	540	
gagattiga ctatttccg tggatctgaa ttacaaaatt actttacaaa gattctagaa	600	
gaigacctaa aagccatcat caaacctcaa taigttagacc agattcttaa ggcigcaaag	660	
gggacagigg gatctatctt ggaccgaaaa gatgaaacaa agacacaggc aatigtatgt	720	30
cagcagcttg attaaccca cctaaaagaa cgaaatgttg aagatcttcc aggaggagag	780	
tgcagagat ttgcttgtgc tgtcgtttgc atacagaaag ctgatatttt catgtttgat	840	
gagccttcta gttacctaga tgtcaagcag cgtttaaagg ctgctattac tatacgatct	900	40
ctaataaatc cagatagata tatcatigtg gtggaacatg atctaagtgt attagactat	960	

ctctccgact tcctctgctg tttatatggt gtaccaagcg cctatggagt tgcactatg 1020
 ccttttagtg taagagaagg cataaacatt tttttggatg gctatgttcc aacagaaaac 1080
 ttgagattca gagatgcatc acttgTTTT aaagtggctg agacagcaaa tgaagaagaa 1140
 gttaaaaaaga tgtgtatgta taaataicca ggaatgaaga aaaaaatggg agaatttgag 1200
 cttagcaattg tagctggaga gtttacagat tcTgaaatta tggTgatgct gggggaaaat 1260
 ggaacgggta aaacgacatt taccagaatg ctTgctggaa gacttaaac tgatgaagga 1320
 ggagaagTac cagttctaaa tgcagttat aagccacaga aaattagTcc caaatcaact 1380
 ggaagTgtc gccagttact acatgaaaag ataagagatg ctTatactca cccacaattt 1440
 gtgaccgatg taatgaagcc tcTgcaaatt gaaaacatca ttgatcaaga ggtgcagaca 1500
 ttatctggTg gtgaactaca gcgagtagct ttagcccttt gctTgggcaa acctgctgat 1560
 gtctattTaa ttgatgaacc atctgcatat ttggattctg agcaaagact gatggcagct 1620
 cgagTtgTca aacgtttcat actccaTgca aaaaagacag cttTgtTgt ggaacatgac 1680
 ttcatcaTgg ccacctatct agcggatcgc gtcatcgttt ttgatggTgt tccatctaaG 1740
 aacacagTtg caaacagTcc tcaaaccctt ttggctggca tgaataaatt ttTgtctcag 1800

10

20

30

40

ctigaaaita caticagaag agatccaaac aactataggg cacgaataaa caaacttaat 1860
 tcaattaagg atgtagaaca aaagaagagt ggaaactact ttttcttgga tgattagact 1920
 gactctgaga atattgataa gccatttatt aaaaggagta tttactagaa tttttgtca 1980
 tataaaactt gaatcaggat tttatgcccc acatactctg gaacttgaag tataatatac 2040
 ttaatataac ataaaaagcc agttgggttc taaattgtag ttgaaacaca gaaaatgcca 2100
 cttttcigt ccigaagagg ctcttttctg cataatattc taaaatgaag acatttcaag 2160
 ctatacaaat tacttccaag tttcatgat gtatgggaag attttcagta ggtgtattat 2220
 attcacggta ccaaagtctg accagtggtg ctccattttt taaatctiga aaagggtttc 2280
 igtacttacc iggtttgcca agtatgccag tgtaatgaaa ctgcccttat tttaaaagcc 2340
 agtcaaagat tccactgatt gacattgat aaataaacat caggattatg tttattgttt 2400
 gtttcagtc ttgcactat attaccagta tatggtttcc gaggaagatt atciactgca 2460
 aaacaccact gtiggaaaaa taggtatttt taaattgttt ttaatctttt ttgggtcttt 2520
 taaacatggt tagcaaaaac caattcagtt ccattccccg caaaaacc ctaactttac 2580
 tcigaacitt tttgttttt gcattccatg aggttctgta ttcagtcatt ctctaggtaa 2640

10

20

30

40

igtcatttt gtacacatat attatataa tcactgattg agatttagga aaaagcattt 2700
 ctaaagaata ttigcttccc ttagaactac agactcgaag tctttaaaga tggigcctaa 2760
 gcatctaigt attttttta agttccacag atttttctgt tgggcagcca aggattataa 2820
 accacttccc taaaggcaac attaatgcaa aagccccac cccatggctt ccatctttg 2880
 catcaccacc actcctgaac cccatttct gattigtcag aattttttt taacaaaact 2940
 aaaaaigaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2978

10

<210> 16

<211> 1549

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gctgggtcct tcggcaggag gaggaagatg gagcccagca ccgcgcccg ggcttgggcc 60
 ctcttttggg tgcctctgcc ctgcttggc gcggtttgcg ccagcggacc ccgcacctta 120
 gtgctgctgg acaacctcaa cgtgcgggag actcattcgc tttcttccg gagcctgaag 180
 gaccgggct ttgagctcac attcaagacc gctgatgacc ccagcctgtc tctcataaag 240
 tatggggaat tctctatga caatctcacc atttctccc ctctggtaga agattttgga 300

30

40

ggcaacaica acgiggagac catcagtgcc tttattgacg gcggaggcag tgtgctggta	360	
gctgccagct ccgacattgg tgacctctt cgagagctgg gcagtgagtg cgggattgag	420	
ttgacgagg agaaaacggc tgtcattgac catcacaact atgacatctc agaccttggc	480	
cagcatacgc tcatcgtggc tgacactgag aacctgctga aggccccaac catcgttggg	540	10
aaatcatctc taaatcccat cctctttcga ggtgttggga tggtagccga tcttgataac	600	
ccttgggigc tggacatcct gacgggctct tccacctctt actccttctt cccggacaag	660	
cctatcacc agtatccaca tgcggtaggg aagaacacc tctcatigc tgggctccag	720	20
gccaggaaca atgcccgcgt catcttcagc ggctccctcg acttcttcag cgactcttc	780	
tccaactcag cagtcagaa ggcggcgccc ggctcccaga ggtattccca gacaggcaac	840	
taigaactag ctgiggccct ctcccgtgg gtgttcaagg aggagggigt cctccgtgtg	900	
gggccigtgt cccatcatcg ggtgggcgag acagccccac ccaatgccta cacigtact	960	30
gacctagigg agtatagcat cgtgatccag cagctctcaa atggcaaag ggtccccttt	1020	
gatggcgaig acattcagct ggagttgtc cgcaatgatc cttttgtgag gaccttctg	1080	
aagaagaaaag gtagcaata cagtgttcag ttcaagttgc ccgacgtgta tggigtattc	1140	40
cagtttaaag tggattacaa ccggctaggc tacacacacc tgtactctc cactcaggta	1200	

tccgtgcggc cactccagca cacgcagtat gacgccttca tccccctggc ctacccttac 1260
 tacgccagcg ccttctccat gatgctgggg ctcttcatct tcagcatcgt cttcttggac 1320
 atgaaaggaga aggagaagtc cgactgaggg gctagagccc tctccgcaca gcgtggagac 1380
 ggggcagggg ggggggttat taggattggt ggttttgttt tgccttggtt aaagccgtgg 1440
 gaaaaatggca caactttacc tctgtgggag atgcaacact gagagccaag gggtgggagt 1500
 tgggataatt tttatataaa agaagttttt ccactttgaa ttgctaaaa 1549

10

<210> 17
 <211> 2505
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 17
 cgtttgcacc tcgctgctcc agcctctggg gcgcattcca accitccagc ctgcgacctg 60
 cggagaaaaa aaaattactt atttcttgc cccatacata ccttgaggcg agcaaaaaat 120
 taaattttaa ccatgagggg aatcgtgcac atccaggctg gtcagtgtgg caaccagatc 180
 ggtgccaagt tctgggaggt gatcagtgat gaacatggca tcgacccac cggcacctac 240
 cacggggaca gcgacctgca gctggaccgc atctctgtgt actacaatga agccacaggt 300

30

40

ggcaaatatg ttctctgtgc cactctggig gatctagaac ctgggacat ggactctgtt 360
 cgctcaggic cttttggcca gatctttaga ccagacaact ttgtatttgg tcagtctggg 420
 gcaggtaaca actgggccaaggccactac acagagggcg ccgagctggt tgattctgtc 480
 ctggatgtgg tacggaagga ggcagagagc tgtgactgcc tgcagggctt ccagctgacc 540
 cactcactgg gcggggcac aggccttggga atgggcactc tccttatcag caagatccga 600
 gaagaatacc ctgatcgcat catgaatacc ttcagtgtgg tgccttcacc caaagtgtct 660
 gacaccgtgg tcgagcccta caatgccacc ctctccgtcc atcagttggt agagaatact 720
 gatgagacct attgcatgga caacgaggcc ctctatgata tctgcttccg cactctgaag 780
 ctgaccacac caacctacgg ggatctgaac caccitgtct cagccacat gagtgggtgtc 840
 accacctgcc tccgtttccc tggccagctc aatgctgacc tccgcaagtt ggcagtcaac 900
 atggtccect tcccagctct ccatttcttt atgcctggct ttgccccctc caccagccgt 960
 ggaagccagc agtatcgagc tctcacagtg ccggaactca cccagcaggt cttcgatgcc 1020
 aagaacaatga tggctgcttg tgacccccgc cacggccgat acctcaccgt ggctgctgtc 1080
 ttccgtggtc ggaigtccat gaaggaggtc gatgagcaga tgcttaacct gcagaacaag 1140

10

20

30

40

aacagcagct acttgggga atggatcccc aacaatgtca agacagccgt ctgtgacatc	1200	
ccaccicgig gccicaagat ggcagtcacc ttcaatggca atagcacagc catccaggag	1260	
ctctcaagc gcatctcgga gcagttcact gccatgttcc gccggaaggc ctctctccac	1320	
tggtacacag gcgagggcat ggacgagatg gagttaccg aggctgagag caacatgaac	1380	10
gacctcgict ctgagatca gcagtaccag gatgccaccg cagaagagga ggaggatttc	1440	
ggigaggagg ccgaagagga ggcctaaggc agagccccca tcacctcagg ctctcagtt	1500	
cccttagccg tcttactcaa ctgccccctt cctctccctc agaatttgig ttigtgctt	1560	20
ctatctggt tttgttttt tctctgggg ggggggtcta gaacagtgcc tggcacatag	1620	
taggcgctca ataaatactt gttgttga tgtctctct ctcttccac tctgggaaac	1680	
ctaggttct gccattctgg gtgacctgt attctttct ggtgccatt ccattgtcc	1740	
agttaatact tctcttaaa aatctcaag aagctgggtc tccagatccc atttagaacc	1800	30
aaccaggigc tgaaaacaca tgtagataat ggccatcctc ctaagcccaa agtagaaaat	1860	
ggtagaaggt agtgggtaga agtcactata taaggaaggg gatgggattt tccattctaa	1920	
aagttttgga gagggaaac caggctatta aagtcactaa atttctaagt atgtccattt	1980	40
cccactcag ctcaagggg ggtgtcagca gtattatctc cactttcaat ctcccccaa	2040	

gctctactct ggaggagtct gteccactct gteaagtgga atcttccct tccaactct 2100
 acctccctca ctccagctct tccccigtat cagagaaagg gatcaagggg gtggggaggg 2160
 gggaaaagaga ccagccttgg tccctaagcc tccagaaacg tctcttaat ccccaccttt 2220
 tcttactccc aaaaaagaat gaacacctct gactctggag tgggtatac tgccacatca 2280
 gtgtttgagt cagtcctcag aggagagggg aacctctctc catctttttt gcaacatctc 2340
 attcttctct ttgtctgttg ctccccctct cacacacttg gttttgttct atctacatt 2400
 tgagatttct atttatgtt gaacttcttg cttttttca tattgaaaag atgacatcgc 2460
 cccaagagcc aaaaataaat gggaaatgaa aaaaaaaaaa aaaaa 2505

10

20

<210> 18
 <211> 1358
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 18
 gtccaaccc agggggaaaa atcggcctt tgactgaaga ggagaccctg gtcattgttg 60
 agaagatagc gaaatacatt ggggagaatc tccaactgct ggtggaccgg cccgatggca 120
 cctactgitt ccgtctgcac aacgaccggg tgiactatgt gactgagaag attatgaagc 180

40

iggccgcaa tattccggg gacaagctgg tgcgctggg gacctgcitt ggaaaattca 240
 ctaaaacceca caagtttcgg ttgcacgtca cagctctgga ttaccttgc ccttatgcca 300
 agtataaagt ttggataaag cctgggtgcag agcagtcctt cctgtatggg aacctatgtt 360
 tgaaatcigg tctgggtcga atcactgaaa atacttctca gtaccagggc gtgggtgggtt 420
 actccatggc agacatccct ttgggttttg gggttggcagc caaatctaca caagactgca 480
 gaaaagtaga ccccatggcg attgtgggtat ttcaicaagc agacattggg gaatatgtgc 540
 ggcatgaaga gacgttgact taaaacgaag ccaticcaag gacagacggc tgtatggaaa 600
 ggccgagctt tgtttccgtt gtttgtgtgg actccacat catgttgaat tttgtcaaca 660
 ctctggccctc ttccaggact tcttatttac tgtactctct atcactgaca aatgcaggct 720
 ggattcttat tatatacaga gatggctcaa aaatgggggt tccagatcitt gtgacgaaat 780
 agaatactgt ttcatattg aatcagaggg ctctctgttc tgagaaatag gttcaaaatc 840
 attggaacca ggaacaagaa tagcttattg ttatctgtga taacctgtt ttctaaacac 900
 aaggatttcc ttttttatta atatgcaaca tagacattgc cataacagaa taataaacca 960
 catgtgggggt tttaaaaatg aaatttggct aataggagca attcagctat tttctatac 1020

10

20

30

40

agtaattggt gtgiggata gaagaaaaac gggttcaaac cccacttcg ccacctacca 1080
 gctataatggc ctigaatgag tcattcagct ttaataaggc tcattttctt ctgtttaaaa 1140
 agacacaaaa ctigaaaatc agctttggcc atctacctga gaattagaaa gtcctgatttt 1200
 iggaattaga aatcatgatt gtaggctggg cacagtggct cgcgcctgta atcccagcac 1260
 ttggggaggc caaggcggac ggatcacttg aggttaggag ttgagacca gccctggccaa 1320
 caiggigaaa ccccatctct actaaaaaaaa aaaaaaaaa 1358

10

<210> 19

<211> 2283

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 19

cgctccagg cccctcccg cgccgcgacg cacgctgccc cggaaggccg cggcgcctgta 60
 gtcggcgcc ccaggttctt tagtggaga acgcgaagcg aggatgagtg atccgtggag 120
 gcagtaacag gcgcggcgag ggagaagtga tcccgaaga atcaaggctg ggccggacct 180
 ggiggccigg caacaggtaa taagagaaat gaagccaaca ggtacagacc caaggatctt 240
 atctatagct gcigaagttg caaaaagccc tgagcagaat gtccctgita tactgttgaa 300

30

40

gttaaagaa ataataaca tcacacctt aggaagctca gagtgaaga aaatcaaca	360	
agatataat igtatgatc tcattcaata ttgctcttg gtcctcagtc aagattattc	420	
tcgaatccag ggigggttga ctacaattc ccagcttaca cagatattaa gccattgctg	480	
tgiggcttg gagccaggag aagatgcaga ggaattttac aatgaattac ttccatcagc	540	10
igcagaaaat ttctagttt tggggagaca attacaaca igtittatca atgcagctaa	600	
ggcigaagaa aaagatgaat tactacactt ttccaattt gtgactgatt ctctctctg	660	
gctttggga ggccatgtg aacttattca gaatgtacta caaagtgatc atttcttaca	720	20
tttactgcaa gctgacaatg tccaatagg atctgcagtc atgatgatgc tacagaatat	780	
attacagatc aacagtggg atttactcag aataggaaga aaagccctgt attcaatttt	840	
agaigaagtt atttcaagc tttttcaac tcttagtcca gttataagaa gtactgctac	900	
aaaactccta ctgtgatgg ctgaatcca tcaggaattt ttgattttac tgagacaaag	960	30
tacctgctac aaaggactca gacgtctact aagtaaacag gaaactggga ctgaattcag	1020	
tcaagaactt agacagcttg ttggcctttt aagcccaatg gtctatcagg aagtagaaga	1080	
gcagatccaa acgatcaaag atgttgctgg agataaatag gcagaaggaa gaagaggacc	1140	40
tcaaattaca attgcaactt caaagacaga gagccatgag actttcccga gaattgcagc	1200	

tgagtatgct cgaatagtt catccaggtc aggtggagaa acactatcgg gaaatggaag 1260
 agaaatcagc actgattatc cagaaacatt ggagagggtta cagggaaagg aaaaattttc 1320
 accaacagag gcagtccttc atagagtata aagcagctgt cacacttcaa agagcagcgc 1380
 ttaaattcct agcgaagtac cgtaagaaaa agaaactatt tgctccttgg cgaggactcc 1440
 aagaactcac tgaigcacgc cgagtigaac tgaagaaacg agtggatgac tatgtcagaa 1500
 gacatttggg ctctccaatg tcagatgtgg tcagtaggga gctccatgcc caagctcaag 1560
 aacgactgca acactacttt atgggcaggg ccctagaaga gcgagcccag cagcacagag 1620
 aagctctgat agcacagatc agcaccaacg ttgaacagct aatgaaggca ccaagtctga 1680
 aggaggcaga agggaaagaa cctgagctct tectaagtag atccaggcct gtggcagcca 1740
 agccaagca ggcccctctc acaacctga agcacataca agcaccttgg tggaagaagc 1800
 ttggagaaga atctggagat gagattgatg ttccaaagga tgagcttagt atagaattag 1860
 aaaatttatt cattggttga accaaaccac cttagtgagt aaccttaaga attgacacaa 1920
 atctcatatt ttaggagatt atattggttc tgccctctggc atgctggtag actagggcca 1980
 tctaactta ttattttcca gaggttctcc tccagacaag acctgcagta agcaaagagt 2040

10

20

30

40

tatattciac ctctctctca attttcttt tctttctct gtatcctcat ccttagccac 2100

acacagatt gtgtggcttt tattgtagaa ctaaacttag catagtgttc tgttgtttac 2160

atgaagtgig ttttctttg gtttctctg tttccaact aaatatttt ttctaaataa 2220

atatttcaa caattgatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 2280

aaa 2283

10

- <210> 20
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial

20

<220>

<223> Designed peptide based on the amino acid sequence of HIV protein

<400> 20

30

Arg Leu Arg Phe Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg

1 5 10

- <210> 21
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Artificial

40

<220>

<223> **Designed peptide based on the amino acid sequence of influenza virus protein**

<400> 21

Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys

1 5 10

10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> **Designed peptide based on the amino acid sequence of EBV protein**

<400> 22

30

Ile Val Thr Asp Phe Ser Val Ile Lys

【図面の簡単な説明】

【図1】ペプチド40-P47（配列番号1）がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞（OKA31-CTL）を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

【図2】ペプチド45-P54（配列番号2）および40-P47（配列番号1）がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞（OKA31-CTL）を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

40

【図3】ペプチド56-P28（配列番号3）がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞（OKA31-CTL）を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

【図4】ペプチド56-P28（配列番号3）および56-P31（配列番号4）がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞（OKA31-CTL）を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

【図5】ペプチド56-P31（配列番号4）、56-P32（配列番号5）および76-P20（配列番号6）がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞（OKA31-CTL）を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

50

【図6】ペプチド85-P10(配列番号7)がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞(OKA31-CTL)を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

【図7】ペプチド85-P11(配列番号8)がHLA-A31拘束性細胞傷害性T細胞(OKA31-CTL)を活性化してIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。図中、NCはネガティブコントロールを意味する。

【図8】図8Aは、ペプチド85-P11(配列番号8)または56-P28(配列番号3)で培養したHLA-A31⁺癌患者由来の末梢血単核細胞(PBMC)が、HLA-A31⁺肺腺癌細胞株に対する反応におけるIFN- γ 産生を促進したが、HLA-A31⁻腫瘍細胞(1-87およびSW620)に対する反応におけるIFN- γ 産生は促進しなかったことを示す図である。図8Bは、ペプチド85-P11(配列番号8)で培養したHLA-A31⁺癌患者由来PBMCが、HLA-A31⁻腫瘍細胞MKN28に対する反応におけるIFN- γ 産生を促進しないが、HLA-A31⁻cDNAを導入したMKN28(MKN28-A31)に対する反応におけるIFN- γ 産生は促進したことを示す図である。図8Cは、ペプチド56-P28(配列番号3)で培養したHLA-A31⁺癌患者由来PBMCが、当該ペプチドをパルスしたC1R-A31細胞に対する反応におけるIFN- γ 産生を促進したが、HIVペプチド(配列番号20)をパルスしたC1R-A31細胞に対する反応におけるIFN- γ 産生は促進しなかったことを示す図である。図8AからCにおいて、ペプチドにより促進されたIFN- γ 産生は、抗HLA-クラスI抗体または抗CD8抗体により阻害された。図中、アスタリスク(*)はスチューデントt検定により有意差が認められたことを示す。

【図9】ペプチド40-P47(配列番号1)、56-P28(配列番号3)、56-P31(配列番号4)、56-P32(配列番号5)、76-P20(配列番号6)、85-P10(配列番号7)または85-P11(配列番号8)で培養したHLA-A31⁺癌患者由来の末梢血単核細胞が、HLA-A31⁺肺腺癌細胞株LC-1を溶解したが、HLA-A31⁻肺腺癌細胞株1-87およびHLA-A31⁺PHA芽球化正常T細胞は溶解しなかったことを示す図である。図中、アスタリスク(*)はスチューデントt検定により有意差が認められたことを示す。

【図10】コールドターゲットインヒビションアッセイにおいて、ペプチド56-P28(配列番号3)で培養したHLA-A31⁺癌患者由来の末梢血単核細胞のMKN28-A31細胞に対する溶解作用が、当該ペプチドをパルスしたC1R-A31細胞の添加により阻害されたが、HIVペプチド(配列番号20)をパルスしたC1R-A31では阻害されなかったことを示す図である。図中、アスタリスク(*)はスチューデントt検定により有意差が認められたことを示す。

【図11】図11Aは、ペプチド85-P11(配列番号8)で培養したHLA-A33⁺癌患者由来の末梢血単核細胞(PBMC)が、該ペプチドをパルスしたC1R-A31に対する反応におけるIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。一方、HIVペプチド(配列番号20)をパルスしたC1R-A31は認識せずIFN- γ 産生を促進を促進しなかった。また、IFN- γ 産生の促進は、抗HLA-クラスI抗体または抗CD8抗体により阻害された。図11Bは、ペプチド85-P10(配列番号7)で培養したHLA-A11⁺癌患者由来の末梢血単核細胞(PBMC)が、該ペプチドをパルスしたC1R-A11に対する反応におけるIFN- γ 産生を促進したことを示す図である。一方、HIVペプチド(配列番号20)をパルスしたC1R-A11は認識せずIFN- γ 産生を促進を促進しなかった。また、IFN- γ 産生の促進は、抗HLA-クラスI抗体または抗CD8抗体により阻害された。図中、アスタリスク(*)はスチューデントt検定により有意差が認められたことを示す。

【図12】ペプチド56-P28(配列番号3)、56-P31(配列番号4)、76-P20(配列番号6)、85-P10(配列番号7)または85-P11(配列番号8)で培養したHLA-A33⁺癌患者由来の末梢血単核細胞が、HLA-A33⁺腫瘍細胞株(LC-1およびRKN)を溶解したが、HLA-A31⁻腫瘍細胞株(11-87お

よび 1 - 8 7) および H L A - A 3 3 ⁺ P H A 芽球化正常 T 細胞 (P H A - b l a s t) は溶解しなかったことを示す図である。図中、アスタリスク (*) はスチューデント t 検定により有意差が認められたことを示す。

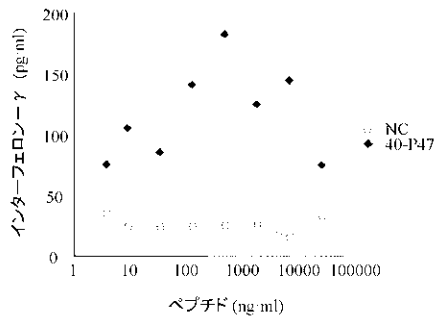
【図 1 3】ペプチド 4 0 - P 4 7 (配列番号 1)、5 6 - P 2 8 (配列番号 3)、7 6 - P 2 0 (配列番号 6) または 8 5 - P 1 0 (配列番号 7) で培養した H L A - A 1 1 ⁺ 癌患者由来の末梢血単核細胞が、H L A - A 1 1 ⁺ 腫瘍細胞株 (1 - 8 7 および K E 5) を溶解したが、H L A - A 1 1 ⁻ 腫瘍細胞株 (M K N 2 8、R K N および S W 6 2 0) および H L A - A 1 1 ⁺ P H A 芽球化正常 T 細胞 (P H A - b l a s t) は溶解しなかったことを示す図である。図中、アスタリスク (*) はスチューデント t 検定により有意差が認められたことを示す。

【図 1 4】図 1 4 A は、コールドターゲットインヒビションアッセイにおいて、ペプチド 5 6 - P 3 1 (配列番号 4) で培養した H L A - A 1 1 ⁺ 肺癌患者由来の末梢血単核細胞の K E 5 細胞に対する溶解作用が、当該ペプチドをパルスした C 1 R - A 1 1 細胞の添加により阻害されたが、H I V ペプチド (配列番号 2 0) をパルスした C 1 R - A 1 1 では阻害されなかったことを示す図である。図 1 4 B は、同アッセイにおいてペプチド 8 5 - P 1 0 (配列番号 7) で培養した H L A - A 1 1 ⁺ 膀胱癌患者由来の末梢血単核細胞の K E 5 細胞に対する溶解作用が、当該ペプチドをパルスした C 1 R - A 1 1 細胞の添加により阻害されたが、H I V ペプチド (配列番号 2 0) をパルスした C 1 R - A 1 1 では阻害されなかったことを示す図である。図中、アスタリスク (*) はスチューデント t 検定により有意差が認められたことを示す。

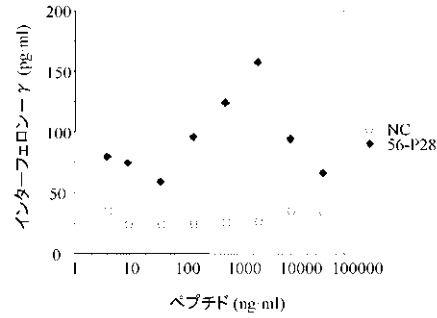
10

20

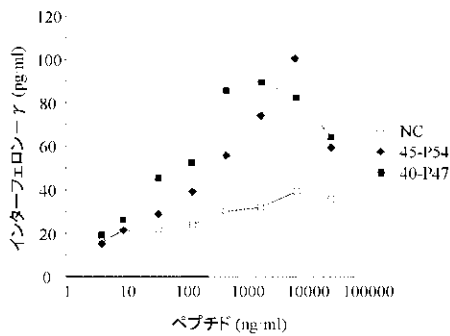
【 図 1 】



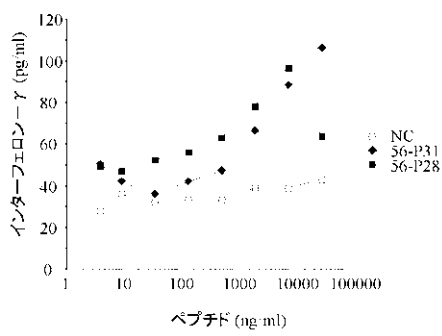
【 図 3 】



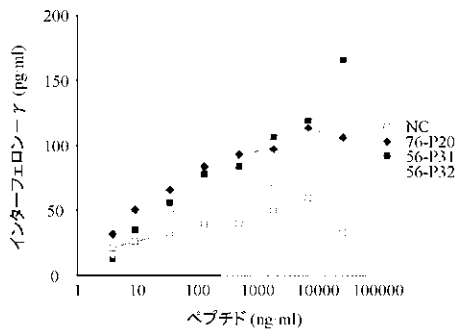
【 図 2 】



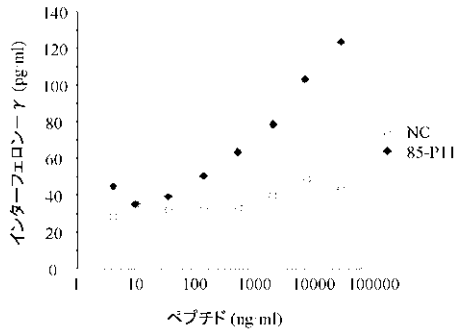
【 図 4 】



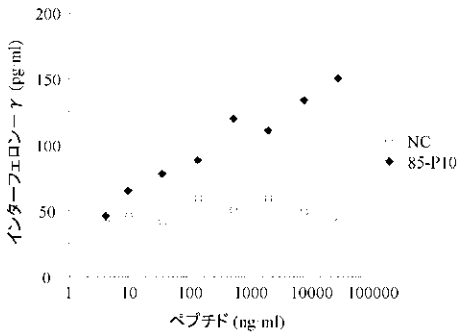
【 図 5 】



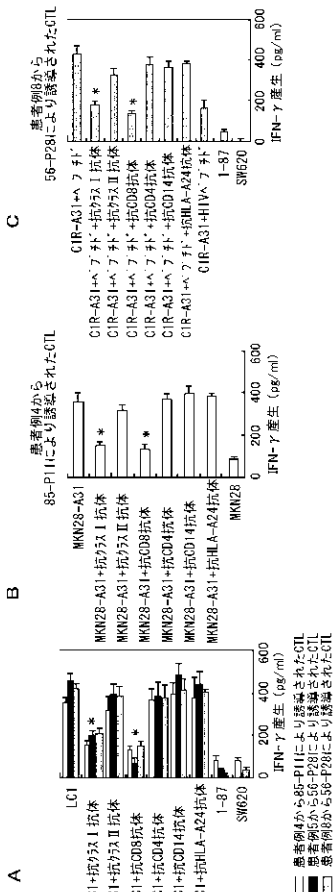
【 図 7 】



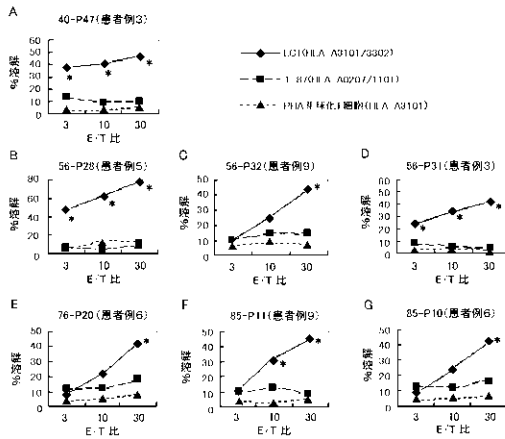
【 図 6 】



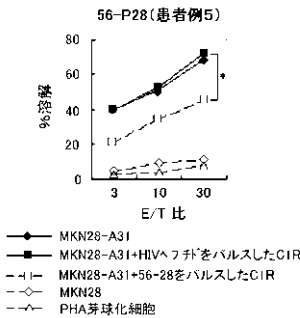
【 図 8 】



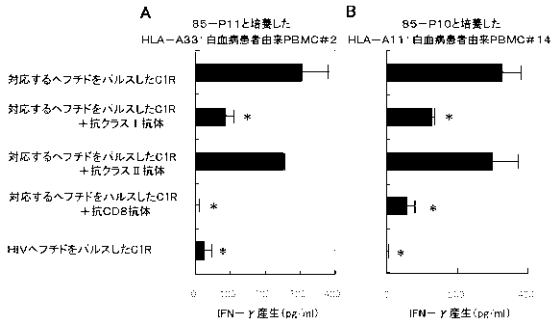
【 図 9 】



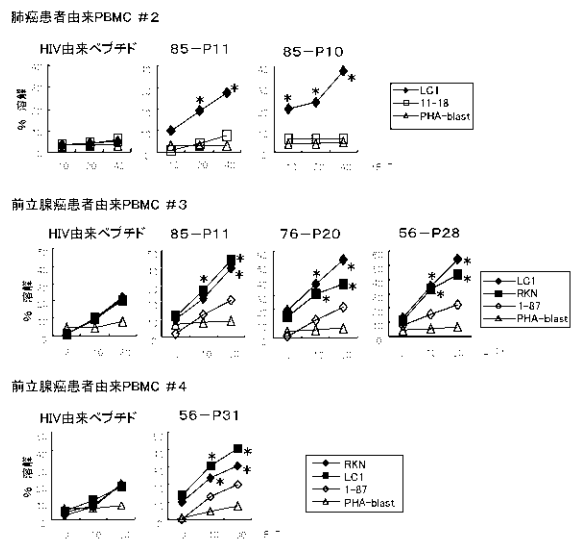
【 図 10 】



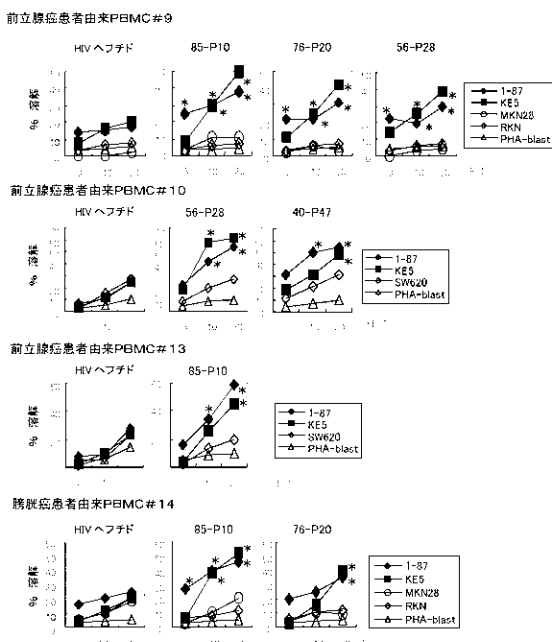
【 図 1 1 】



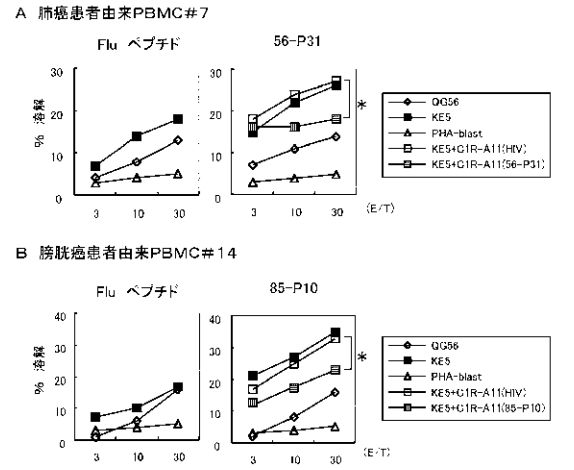
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/06	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/74	C 0 7 K 14/74	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/30	C 0 7 K 16/30	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA36 CA04 DA02 EA04 GA11
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ79 QR32 QR48 QR51 QR55 QR77
 QS36 QX07
 4B064 AG31 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90X AA93X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA22 BA23 CA62 DA27 NA14
 ZB261 ZB262 ZC022
 4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC21 CC32
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 NA14 ZB26 ZC02
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA15 CA41 DA86 EA20 EA50
 FA74

专利名称(译)	肿瘤抗原		
公开(公告)号	JP2004000216A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003124482	申请日	2003-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	伊东恭悟		
申请(专利权)人(译)	伊藤KyoSatoru		
[标]发明人	伊東恭悟 七條茂樹		
发明人	伊東 恭悟 七條 茂樹		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P43/00 C07K7/06 C07K14/74 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61P43/00. 111 C07K7/06 C07K14/74 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1 /68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063 /QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX07 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065 /AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA62 4C084 /DA27 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/BB01 4C085/CC21 4C085/CC32 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA41 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	2002126764 2002-04-26 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：找出细胞毒性T淋巴细胞（CTL）识别的肿瘤抗原。解决方案：CTL识别的肽或多肽被至少一种HLA-A限制，如HLA-A31，HLA-A11和HLA-A33，该多核苷酸含有编码其中一种或其互补序列的碱基序列，重组载体，转化体，抗肽或多肽的抗体，增强CTL识别肽或多肽的化合物，加速肽或多肽表达的化合物，由肽组成的CTL诱导剂和/或多肽，含有≥1种药物组合物，使用肽和/或多肽诱导CTL的方法，制备肽或多肽的方法，筛选化合物的方法，测定它们的方法和提供了用于筛选方法的试剂盒或测量它们的方法。Z

クローン (塩基長 bp) [DDBJ アクセッション 番号]	配 列 番 号	遺伝子が コードする ポリペプチド (アミノ酸長)	配 列 番 号	相同性の高い遺伝子 [GenBankアクセッション番号]
40 (2978) [AB062293]	15	PP 40 (599)	9	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member1 (ABCE1) [XM_003555]
45 (1549) [AB062391]	16	PP 45 (439)	10	dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycosyltransferase [BC002594]
56 (2505) [AB062393]	17	PP 56 (444)	11	β -tubulin mRNA(structural) [AF141349] [BC002347]
76 (1358) [AB062398]	18	PP 76 (180)	12	CGI-37(interaction with 60s ribosome) [AF132971] HSPC031 [XM_007837]
85 (2283) [AB062481]	19	PP 85-F2 (303)	13	KIAA0036 [NM_014642]
		PP 85-F3 (264)	14	[BC005806]