



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105903006 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(21)申请号 201610202421.1

C07K 7/06(2006.01)

(22)申请日 2008.12.05

C07K 14/47(2006.01)

(30)优先权数据

G01N 33/574(2006.01)

2007-314552 2007.12.05 JP

(62)分案原申请数据

200880119136.7 2008.12.05

(71)申请人 株式会社癌免疫研究所

地址 日本,大阪府

(72)发明人 杉山治夫

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 穆德骏

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书49页

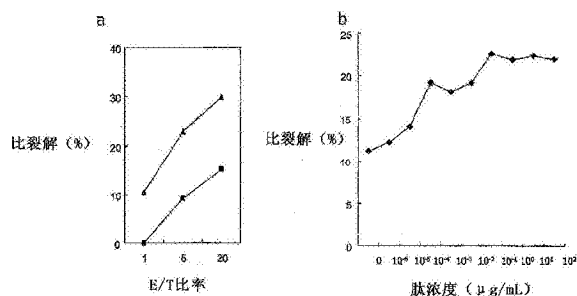
序列表27页 附图23页

(54)发明名称

癌症疫苗组合物

(57)摘要

本申请涉及癌症疫苗组合物。具体地,本申请涉及用于人类白细胞抗原(HLA)-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物,含有肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽。



1. 肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽在制备用于人类白细胞抗原(HLA)-A*0206阳性人员的癌症治疗或预防的癌症疫苗组合物中的应用,其中部分肽是

WT1₁₈₇肽:Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:2)。

2. 肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽在制备用于人类白细胞抗原(HLA)-A*0206阳性人员的癌症治疗或预防的癌症疫苗组合物中的应用,其中部分肽是

WT1₁₂₆肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:3)。

3. 权利要求1或2的应用,还包含佐剂。

4. 编码权利要求1或2中所述的部分肽的DNA在制备用于HLA-A*0206阳性人员的癌症治疗或预防的癌症疫苗组合物中的应用。

5. 编码权利要求1或2中所述的部分肽的RNA在制备用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物中的应用。

6. 用于诱导WT1特异性CTLs的方法,包括在存在权利要求1或2中所述的部分肽的情况下,培养源自于HLA-A*0206阳性人员的外周血单核细胞(PBMCs),以获得从其诱导的WT1特异性CTLs。

7. 用于诱导呈递权利要求1或2中所述的部分肽的树突状细胞的方法,包括在存所述部分肽的情况下培养源自于HLA-A*0206阳性人员的未成熟树突状细胞,以获得从其诱导的呈递所述部分肽的树突状细胞。

8. 权利要求1或2中所述的部分肽、针对它们的抗体或WT1特异性CTLs在制备用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断的诊断试剂中的应用。

9. 由权利要求6的方法诱导的WT1特异性CTLs或由权利要求7的方法诱导的树突状细胞在制备用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断的诊断试剂中的应用。

10. 权利要求1或2中所述的部分肽在制备用于HLA-A*0206阳性人员的癌症治疗或预防的药物中的应用。

癌症疫苗组合物

[0001] 本申请是申请日为2008年12月5日、申请号为200880119136.7、发明名称为“癌症疫苗组合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于人类白细胞抗原(HLA)-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物,包含肿瘤抑制基因Wilms'肿瘤1(WT1)的蛋白产物(在下文中有时简称为WT1蛋白)或其部分肽(在下文中有时简称为WT1肽)。本发明还涉及用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物,包含编码上面提到的WT1蛋白或WT1肽的DNA或RNA,以及用于诱导WT1特异性CTLs的方法,用于诱导呈递癌症抗原的树突状细胞的方法,以及用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断方法,和在HLA-A*0206阳性人员中治疗或预防癌症的方法。

[0003] 本发明还涉及用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物,包含WT1肽的修饰的肽。

背景技术

[0004] Wilms'肿瘤基因WT1作为Wilms'肿瘤,即一种儿童肾脏肿瘤(参见非专利文献1)中与肿瘤发生相关的基因被分离到。该基因编码与细胞生长和分化、以及凋亡和组织发育的调控机制有关的锌指转录因子。

[0005] WT1基因最初被分类为肿瘤抑制基因。但是,根据下面的(i)到(iii)中显示的最新证据:

[0006] (i)在各种人类恶性肿瘤和实体癌症包括造血恶性肿瘤例如白血病和骨髓增生异常综合征(MDS)中野生型WT1基因的高表达,

[0007] (ii)用WT1反义寡核苷酸处理的人类白血病细胞和实体癌细胞的生长抑制,以及

[0008] (iii)野生型WT1基因的组成性表达对小鼠骨髓性前体细胞的生长促进和分化抑制,

[0009] 表明野生型WT1基因对各种不同恶性疾病表现出致癌效应强于肿瘤抑制效应(参见专利文献1)。

[0010] 在实体肿瘤,例如胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、生殖细胞癌、肝癌、皮肤癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、宫颈癌和卵巢癌中WT1基因的高表达,也是已知的(参见专利文献2)。

[0011] 总的来说,用于消除外来物质的免疫系统包括体液免疫,其中涉及了识别抗原并用作抗原呈递细胞的巨噬细胞,识别由巨噬细胞呈递的抗原并产生各种不同淋巴因子以活化其他T细胞的辅助T细胞,以及通过淋巴因子的作用分化成抗体产生细胞的B淋巴细胞;以及细胞介导的免疫,其中通过对抗原呈递作出响应进行分化而产生的细胞毒性T淋巴细胞(CTLs),攻击并破坏靶细胞。

[0012] 目前,已经认为癌症免疫主要是基于其中涉及CTLs的细胞介导的免疫。在基于CTL的癌症免疫中,前体T细胞识别以I类主要组织相容性复合物(MHC)与癌抗原的复合物的形式呈递的癌抗原,从而分化并生长成攻击并破坏癌细胞的CTLs。在这种情况下,癌细胞在细

胞表面上呈递I类MHC抗原与癌抗原的复合物,所述复合物是CTLs的靶(参见非专利文献2到5)。MHC在人类中被称为人类白细胞抗原(HLA)。

[0013] 据认为,由癌细胞、即靶细胞表面上的I类MHC抗原呈递的上述癌抗原,是通过在癌细胞中合成的抗原蛋白的细胞内蛋白酶介导的加工产生的大约8到12个氨基酸的肽(参见非专利文献2到5)。目前,对各种不同癌症的抗原蛋白的搜索正在进行之中,但是只鉴定到几个蛋白是癌症特异性抗原。

[0014] 本发明人根据WT1基因表达产物的氨基酸序列,合成了各由7到30个连续的氨基酸组成的多肽,它们每个含有据推测用作与HLA-A*2402或HLA-A*0201结合的锚定氨基酸的至少一个氨基酸,验证了这些肽与HLA-A*2402或HLA-A*0201的结合(这些肽是HLA-A*2402-或HLA-A*0201-限制性的),并发现肽与HLA-A*2402或HLA-A*0201的结合诱导了CTLs,引起了对靶细胞的细胞毒性应答(在下文中简称为CTL应答)。根据该事实,这些肽被鉴定为源自于WT1基因表达产物(WT蛋白)的CTL表位。

[0015] 目前,鉴定到了只针对HLA-A*2402和HLA-A*0201(参见专利文献3)、HLA-A*3303(参见专利文献4)或HLA-A*1101(参见专利文献5)的WT1特异性CTL表位。已证实,由上述文献公开的多肽诱导的CTL应答受HLA-A*2402、HLA-A*0201、HLA-A*3303和HLA-A*1101限制。

[0016] 这表明了肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物是有前途的肿瘤排斥抗原,也称为肿瘤相关抗原(TAA)的可能性。事实上,在健康献血者的外周血中没有观察到高水平的WT1特异性CTLs或高滴度抗WT1抗体,但是在癌症患者的外周血中观察到了。

[0017] 但是,HLA类型的多样性足以用作鉴定个体的标志物。在HLAs中,I类MHC抗原被分类为HLA-A、HLA-B和HLA-C,II类MHC抗原被分类为HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR。每种类别具有几种抗原类型。每种HLA的抗原结合位点具有遗传多态性。例如,已知HLA-A、HLA-B和HLA-C分别具有27种或以上,59种或以上,以及10种或以上的多态性(等位基因)。

[0018] 因此,对于与除了HLA-A*2402、HLA-A*0201、HLA-A*3303和HLA-A*1101之外其他类型的HLAs结合,并诱导CTL应答的癌抗原的鉴定,从而向更广泛的对象使用免疫疗法,存在着需求。

[0019] 同时,在两个文献中报道了下列三种修饰的WT1肽:

[0020] WT1₁₈₇P1Y肽(YLGEQQYSV;SEQ ID NO:12),WT1₁₂₆P1Y肽(YMFPNAPYL;SEQ ID NO:35)(对于上述两种肽参见专利文献6),以及WT1₁₂₆P9M肽(RMFPNAPYM;SEQ ID NO:52)(参见专利文献7)。

[0021] 此外,在欧洲专利No.1127068的审查的书面论证中报道了下列两种肽:

[0022] WT1₁₂₆P2L肽(RLFPNAPYL;SEQ ID NO:39)和WT1₁₂₆P2L&P9V肽(RLFPNAPYV;SEQ ID NO:75)(参见非专利文献7)。

[0023] 但是,从未报道这些WT1修饰肽是否可用作与除了HLA-A*2402、HLA-A*0201、HLA-A*3303和HLA-A*1101之外其他类型的HLAs结合,并诱导CTL应答的癌抗原。

[0024] 专利文献1:JP-A 9-104629

[0025] 专利文献2:JP-A 11-035484

[0026] 专利文献3:WO 00/06602单行本

[0027] 专利文献4:日本专利申请No.2006-045287

[0028] 专利文献5:日本专利申请No.2006-355356

- [0029] 专利文献6:WO 2005/053618单行本
- [0030] 专利文献7:WO 2007/016466单行本
- [0031] 非专利文献1:Gessler,M.等,Nature,vol.343,pp.774-778,1990
- [0032] 非专利文献2:Cur.Opin.Immunol.,vol.5,p.709,1993
- [0033] 非专利文献3:Cur.Opin.Immunol.,vol.5,p.719,1993
- [0034] 非专利文献4:Cell,vol.82,p.13,1995
- [0035] 非专利文献5:Immunol.Rev.,vol.146,p.167,1995
- [0036] 非专利文献6:Mol.Cell.Biol.,vol.11,p.1707,1991
- [0037] 非专利文献7:欧洲专利No.1127068的审查的书面论证
- [0038] 发明简述
- [0039] 本发明待解决的问题
- [0040] 本发明的目标是将用于患有恶性肿瘤、包括白血病的患者的癌症治疗和/或预防方法,进一步施用于HLA-A*0206阳性人员,该方法是基于肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物(WT1蛋白)或其部分肽(WT1肽)。
- [0041] 解决问题的手段
- [0042] 为了实现上述目标,本发明人进行了深入的研究。结果,他发现各自源自于人类WT1蛋白,已知只诱导HLA-A*0201-限制性CTLs的WT1₁₈₇肽(SLGEQQYSV)和WT1₁₂₆肽(RMFPNAPYL),令人吃惊地也诱导HLA-A*0206-限制性CTLs。在已知只有在WO 00/06602单行本中描述的肽是诱导HLA-A*0201限制性CTLs的WT1肽的情况下,本发明人发现WT1₁₈₇肽的修饰的肽(也被称为修饰的WT1₁₈₇肽)和WT1₁₂₆肽的修饰的肽(也被称为WT1₁₂₆修饰肽),也与HLA-A*0201分子结合。基于这些发现,本发明人进行了深入研究,并完成了本发明。
- [0043] 即,本发明涉及下列(1)到(17)。
- [0044] (1)用于人类白细胞抗原(HLA)-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物,包含肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽。
- [0045] (2)上述(1)的组合物,其中肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物是下列(a)或(b)的蛋白:
- [0046] (a)由SEQ ID NO:1的氨基酸序列构成的蛋白,或
- [0047] (b)由在氨基酸序列(a)中包含一个到几个氨基酸的缺失、取代或添加的氨基酸序列构成的蛋白,它们中任何一个在HLA-A*0206阳性人员中是免疫原性的。
- [0048] (3)上述(1)的组合物,其中部分肽是
- [0049] WT1₁₈₇肽:Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:2),
- [0050] WT1₁₂₆肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:3),
- [0051] WT1₁₈₇P1F肽:Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:11),
- [0052] WT1₁₈₇P2M肽:Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:16),
- [0053] WT1₁₈₇P3M肽:Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:20),
- [0054] WT1₁₂₆P1F肽:Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:34),
- [0055] WT1₁₂₆P2L肽:Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:39),
- [0056] WT1₁₂₆P3M肽:Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:46)或
- [0057] WT1₁₂₆P9V肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val(SEQ ID NO:49)。
- [0058] (4)上述(1)到(3)的组合物,还包含佐剂。

[0059] (5)用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物,含有编码肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的DNA。

[0060] (6)用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物,含有编码肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的RNA。

[0061] (7)用于诱导WT1特异性CTLs的方法,包括在存在肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的情况下,培养源自于HLA-A*0206阳性人员的外周血单核细胞(PBMCs),以获得从其诱导的WT1特异性CTLs。

[0062] (8)用于诱导呈递肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的树突状细胞的方法,包括在存在蛋白产物或其部分肽的情况下培养源自于HLA-A*0206阳性人员的未成熟树突状细胞,以获得从其诱导的呈递蛋白产物或其部分肽的树突状细胞。

[0063] (9)用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断方法,包括

[0064] i)在来自HLA-A*0206阳性人员的样品中检测或定量肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽、针对它们的抗体或WT1特异性CTLs的步骤,以及将蛋白产物或其部分肽、针对它们的抗体或WT1特异性CTLs的量,与没有发生癌症情况下的量进行比较的步骤,或

[0065] ii)向HLA-A*0206阳性对象给药通过上述(7)中提到方法诱导的WT1特异性CTLs或通过上述(8)中提到的方法诱导的树突状细胞的步骤,以及确定CTLs或树突状细胞在HLA-A*0206阳性对象中的位置或区域的步骤。

[0066] (10)用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物,包含下列肽:

[0067] WT1₁₈₇肽:Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:2)的修饰肽或WT1₁₂₆肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:3)的修饰肽,它们任一种都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中是免疫原性的。

[0068] (11)上述(10)的组合物,其中修饰肽是

[0069] WT1₁₈₇P1F肽:Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:11),

[0070] WT1₁₈₇P2M肽:Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:16),

[0071] WT1₁₈₇P3M肽:Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:20),

[0072] WT1₁₂₆P1F肽:Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:34),

[0073] WT1₁₂₆P2L肽:Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:39),

[0074] WT1₁₂₆P3M肽:Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:46)或

[0075] WT1₁₂₆P9V肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val(SEQ ID NO:49)。

[0076] (12)治疗或预防癌症的方法,包括向HLA-A*0206阳性人员给药含有肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的组合物。

[0077] (13)肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽,用于在HLA-A*0206阳性人员中治疗或预防癌症。

[0078] (14)治疗或预防癌症的方法,包括向HLA-A*0201阳性人员给药含有下列肽的组合物:

[0079] WT1₁₈₇肽:Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:2)的修饰肽或WT1₁₂₆肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:3)的修饰肽,它们任何一种都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中是免疫原

性的。

[0080] (15)下列肽:

[0081] WT1₁₈₇肽:Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:2)的修饰肽或WT1₁₂₆肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:3)的修饰肽,它们任何一种都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中是免疫原性的,

[0082] 用于在HLA-A*0201阳性人员中治疗或预防癌症。

[0083] (16)治疗或预防癌症的方法,包括将编码肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的RNA导入HLA-A*0206阳性人员的树突状细胞。

[0084] (17)编码肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽的RNA,用于在HLA-A*0206阳性人员中治疗或预防癌症。

[0085] 本发明还涉及肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽在生产用于在HLA-A*0206阳性人员中治疗或预防癌症的癌症疫苗组合物中的应用。

[0086] 本发明还涉及使用下列肽:

[0087] WT1₁₈₇肽:Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val(SEQ ID NO:2)的修饰肽或WT1₁₂₆肽:Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(SEQ ID NO:3)的修饰肽,它们任何一种都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中是免疫原性的,

[0088] 来生产用于在HLA-A*0201阳性人员中治疗或预防癌症的癌症疫苗组合物。

[0089] 本文使用的“癌症疫苗组合物”是指通过接种或给药于动物、包括人类,用来预防或治疗癌症的药物。“治疗”除了完全治愈疾病状态之外,还指通过将症状的发展和/或恶化抑制到某种尽管没有完全治愈的程度,来中止疾病状态的发展;或在朝向治愈的方向上改进所有或部分疾病状态。“预防”是指阻止、抑制或延迟疾病的发生。

[0090] 下列术语:源自于HLA-A*0206阳性或HLA-A*0201阳性人员的外周血单核细胞、未成熟树突状细胞、WT1特异性CTLs、样品等,是指分别从HLA-A*0206阳性或HLA-A*0201阳性人员分离或收集的外周血单核细胞、未成熟树突状细胞、WT1特异性CTLs、生物学样本等,例如血液。源自于HLA-A*0206阳性或HLA-A*0201阳性人员的WT1特异性CTLs,也包括从HLA-A*0206阳性或HLA-A*0201阳性人员分离或收集的外周血单核细胞、未成熟树突状细胞或生物学样本例如血液诱导的CTLs。

[0091] 本发明的效果

[0092] 本发明能够在HLA-A*0206阳性对象中体内和体外诱导WT1特异性CTLs。尽管使用含有WT1蛋白或WT1肽的疫苗进行免疫治疗的对象通常限于HLA-A*0201阳性患者和HLA-A*2402阳性患者,但本发明可以将对象的范围拓宽到HLA-A*0206阳性患者。HLA-A2,这是I类HLA抗原的一种血清型,在高加索人中频率最高(大约50%),并且绝大多数具有HLA-A*0201,而只有大约4%的高加索人具有HLA-A*0206。另一方面,HLA-A24是日本人中频率最高的血清型(大约58%),绝大多数具有HLA-A*2402。大约42%的日本人具有HLA-A2。在他们当中,只有大约43%具有HLA-A*0201,其他人具有HLA-A*0206或HLA-A*0207。换句话说,大约18%的日本人具有HLA-A*0201,大约17%的日本人具有HLA-A*0206。因此,从日本人中鉴定到至少HLA-A*0206限制性CTL表位以及HLA-A*0201限制性CTL表位这个事实,对于将癌症免

疫疗法的对象拓宽到HLA-A*0206阳性人员来说是非常有用的。因为14%的中国人和9%的南朝鲜人具有该等位基因,因此有可能将本发明的癌症疫苗组合物应用于更广泛的对象。

[0093] 本发明的癌症疫苗组合物用于治疗表达WT1的癌症例如造血肿瘤和HLA-A*0206阳性人员中的实体癌症。本发明的癌症疫苗组合物也可用于在HLA-A*0206阳性人员中预防癌症的发生。

附图说明

[0094] 图1显示了从HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs诱导的WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性。图1a显示了针对⁵¹Cr标记的B-LCLs的细胞毒性活性。图1b显示了针对⁵¹Cr标记的自体B-LCLs的细胞毒性活性随着用于脉冲PBMCs的WT1₁₈₇肽的浓度平行地增加。

[0095] 图2显示了从HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs诱导的WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性。图2a和2b分别显示了从图1a的献血者之外的两个健康献血者独立获得的CTLs针对⁵¹Cr标记的B-LCLs的细胞毒性活性。

[0096] 图3a显示了WT1₁₈₇肽特异性CTLs针对用WT1基因转化的B-LCLs,或用模拟载体转化的B-LCLs的细胞毒性活性。图3b显示了WT1₁₈₇肽特异性CTLs针对0206K562细胞、K562细胞、KH88细胞或JY细胞的细胞毒性活性。

[0097] 图4显示了I类和/或II类HLA抗体对WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性的抑制。

[0098] 图5显示了从HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs诱导的WT1₁₂₆肽特异性CTLs针对⁵¹Cr标记的B-LCLs的细胞毒性活性。

[0099] 图6a和6b分别显示了从两个不同供体独立诱导的WT1₁₂₆肽特异性CTLs针对0206K562细胞、K562细胞、KH88细胞或JY细胞的细胞毒性活性。

[0100] 图7显示了用与WT1₁₂₆肽结合的HLA四聚体和抗CD8抗体染色的CTLs的流式细胞分析结果。CTLs通过用修饰的肽刺激来自HLA-A*0201阳性供体1的PBMCs进行诱导。

[0101] 图8显示了通过用WT1₁₂₆P1F肽刺激来自HLA-A*0201阳性供体1的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0102] 图9显示了通过用WT1₁₂₆P2L肽刺激来自HLA-A*0201阳性供体1的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0103] 图10显示了用与WT1₁₂₆肽结合的HLA四聚体和抗CD8抗体染色的CTLs的流式细胞分析结果。CTLs通过用WT1₁₂₆P2L肽刺激来自HLA-A*0201阳性供体2的PBMCs进行诱导。

[0104] 图11显示了通过用WT1₁₂₆P2L肽刺激来自供体2的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0105] 图12显示了通过用修饰的WT1₁₂₆肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体3的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0106] 图13显示了通过用WT1₁₂₆P9V肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体3的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0107] 图14显示了通过用修饰的WT1₁₂₆肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体4的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0108] 图15显示了通过用修饰的WT1₁₂₆肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体4的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0109] 图16显示了通过用修饰的WT1₁₈₇肽刺激来自HLA-A*0201阳性供体的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0110] 图17显示了通过用WT1₁₈₇P1F肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0111] 图18显示了通过用WT1₁₈₇P2M肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体的PBMCs而诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。

[0112] 图19显示了对修饰的WT1₁₈₇肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0113] 图20显示了对修饰的WT1₁₈₇肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0114] 图21显示了对修饰的WT1₁₈₇肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0115] 图22显示了对修饰的WT1₁₈₇肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0116] 图23显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0117] 图24显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0118] 图25显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0119] 图26显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0120] 图27显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0121] 图28显示了对修饰的WT1₁₈₇肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0122] 图29显示了对修饰的WT1₁₈₇肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0123] 图30显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0124] 图31显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0125] 图32显示了对修饰的WT1₁₂₆肽诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果。

[0126] 本发明的最佳实施方式

[0127] 在下文中,将对本发明进行说明。

[0128] 当在本说明书和附图中对氨基酸残基进行缩写时,使用下面的编码。

[0129] Ala或A:丙氨酸残基

[0130] Arg或R:精氨酸残基

[0131] Asn或N:天冬酰胺残基

[0132] Asp或D:天冬氨酸残基

[0133] Cys或C:半胱氨酸残基

[0134] Gln或Q:谷氨酰胺残基

[0135] Glu或E:谷氨酸残基

[0136] Gly或G:甘氨酸残基

[0137] His或H:组氨酸残基

[0138] Ile或I:异亮氨酸残基

[0139] Leu或L:亮氨酸残基

[0140] Lys或K:赖氨酸残基

[0141] Met或M:甲硫氨酸残基

[0142] Phe或F:苯丙氨酸残基

[0143] Pro或P:脯氨酸残基

[0144] Ser或S:丝氨酸残基

[0145] Thr或T:苏氨酸残基

[0146] Trp或W:色氨酸残基

[0147] Tyr或Y:酪氨酸残基

[0148] Val或V:缬氨酸残基

[0149] 本发明的WT1蛋白可以是作为Wilms'肿瘤的致病基因分离到的锌指类型的转录因子的基因产物,能够与HLA-A*0206分子结合,从而用作恶性肿瘤的靶抗原的基因产物。更具体来说,本发明的WT1蛋白优选为由449个氨基酸组成的人类WT1蛋白(序列列表:SEQ ID NO:1),或由在人类WT1蛋白的氨基酸序列中含有一个到几个氨基酸(优选大约2到6个氨基酸)的缺失、取代或添加的氨基酸序列构成的蛋白,并且它在HLA-A*0206阳性人员中是免疫原性的。用于添加或取代的氨基酸除了20种基因编码的氨基酸之外,可以是非天然氨基酸。

[0150] WT1蛋白的部分肽(WT1肽)是指由构成WT1蛋白的一部分氨基酸序列组成的肽。WT1肽可以是由8到12个、优选8到9个源自于WT1蛋白的氨基酸组成,并与HLA-A*0206分子结合从而诱导细胞毒性T细胞的肽。特别优选的是WT1₁₈₇肽(Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val;SEQ ID NO:2)或WT1₁₂₆肽(Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu;SEQ ID NO:3),二者都描述在WO 00/06602单行本中。

[0151] 包含了WT1肽的一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加的修饰的肽,也可以用作本发明的WT1肽,只要它在HLA-A*0206阳性人员中是免疫原性的。这样的修饰的肽的例子包括修饰的WT1₁₈₇肽和修饰的WT1₁₂₆肽。

[0152] 修饰的WT1₁₈₇肽优选是从N-末端起第4到8位上含有与WT1₁₈₇肽在相应位置上具有的相同的氨基酸残基(EQQYS)的肽,更优选是从N-末端起第4到9位上含有与WT1₁₈₇肽在相应位置上具有的相同的氨基酸残基(EQQYSV)的肽。这样的修饰的WT1₁₈₇肽优选是由任何下列SEQ ID NO:4到26和54到62的氨基酸序列组成的肽。

[0153] WT1₁₈₇P1G肽(GLGEQQYSV;SEQ ID NO:4)

[0154] WT1₁₈₇P1A肽(ALGEQQYSV;SEQ ID NO:5)

[0155] WT1₁₈₇P1V肽(VLGEQQYSV;SEQ ID NO:6)

[0156] WT1₁₈₇P1L肽(LLGEQQYSV;SEQ ID NO:7)

[0157] WT1₁₈₇P1I肽(ILGEQQYSV;SEQ ID NO:8)

[0158] WT1₁₈₇P1M肽(MLGEQQYSV;SEQ ID NO:9)

[0159] WT1₁₈₇P1W肽(WLGEQQYSV;SEQ ID NO:10)

[0160] WT1₁₈₇P1F肽(FLGEQQYSV;SEQ ID NO:11)

[0161] WT1₁₈₇P1Y肽(YLGEQQYSV;SEQ ID NO:12)

[0162] WT1₁₈₇P2V肽(SVGEQQYSV;SEQ ID NO:13)

[0163] WT1₁₈₇P2Q肽(SQGEQQYSV;SEQ ID NO:14)

[0164] WT1₁₈₇P2I肽(SIGEQQYSV;SEQ ID NO:15)

[0165] WT1₁₈₇P2M肽(SMGEQQYSV;SEQ ID NO:16)

[0166] WT1₁₈₇P3L肽(SLLEQQYSV;SEQ ID NO:17)

[0167] WT1₁₈₇P3A肽(SLAEQQYSV;SEQ ID NO:18)

[0168] WT1₁₈₇P3V肽(SLVEQQYSV;SEQ ID NO:19)

[0169] WT1₁₈₇P3M肽(SLMEQQYSV;SEQ ID NO:20)

- [0170] WT₁₈₇P3P肽(SLPEQQYSV;SEQ ID NO:21)
- [0171] WT₁₈₇P3W肽(SLWEQQYSV;SEQ ID NO:22)
- [0172] WT₁₈₇P3F肽(SLFEQQYSV;SEQ ID NO:23)
- [0173] WT₁₈₇P3Y肽(SLYEQQYSV;SEQ ID NO:24)
- [0174] WT₁₈₇P3S肽(SLSEQQYSV;SEQ ID NO:25)
- [0175] WT₁₈₇P3I肽(SLIEQQYSV;SEQ ID NO:26)
- [0176] WT₁₈₇P9L肽(SLGEQQYSL;SEQ ID NO:53)
- [0177] WT₁₈₇P1D肽(DLGEQQYSV;SEQ ID NO:54)
- [0178] WT₁₈₇P1E肽(ELGEQQYSV;SEQ ID NO:55)
- [0179] WT₁₈₇P1H肽(HLGEQQYSV;SEQ ID NO:56)
- [0180] WT₁₈₇P1K肽(KLGEQQYSV;SEQ ID NO:57)
- [0181] WT₁₈₇P1N肽(NLGEQQYSV;SEQ ID NO:58)
- [0182] WT₁₈₇P1P肽(PLGEQQYSV;SEQ ID NO:59)
- [0183] WT₁₈₇P1Q肽(QLGEQQYSV;SEQ ID NO:60)
- [0184] WT₁₈₇P1R肽(RLGEQQYSV;SEQ ID NO:61)
- [0185] WT₁₈₇P1T肽(TLGEQQYSV;SEQ ID NO:62)
- [0186] 修饰的WT₁₂₆肽优选是从N-末端起第4到8位上含有与WT₁₂₆肽在相应位置上具有的相同的氨基酸残基(PNAPY)的肽。这样的修饰的WT₁₂₆肽优选是由任何下列SEQ ID NO:27到52和63到75的氨基酸序列组成的肽。
- [0187] WT₁₂₆P1G肽(GMFPNAPYL;SEQ ID NO:27)
- [0188] WT₁₂₆P1A肽(AMFPNAPYL;SEQ ID NO:28)
- [0189] WT₁₂₆P1V肽(VMFPNAPYL;SEQ ID NO:29)
- [0190] WT₁₂₆P1L肽(LMFPNAPYL;SEQ ID NO:30)
- [0191] WT₁₂₆P1I肽(IMFPNAPYL;SEQ ID NO:31)
- [0192] WT₁₂₆P1M肽(MMFPNAPYL;SEQ ID NO:32)
- [0193] WT₁₂₆P1W肽(WMFPNAPYL;SEQ ID NO:33)
- [0194] WT₁₂₆P1F肽(FMFPNAPYL;SEQ ID NO:34)
- [0195] WT₁₂₆P1Y肽(YMFPNAPYL;SEQ ID NO:35)
- [0196] WT₁₂₆P2V肽(RVFPNAPYL;SEQ ID NO:36)
- [0197] WT₁₂₆P2Q肽(RQFPNAPYL;SEQ ID NO:37)
- [0198] WT₁₂₆P2A肽(RAFP NAPYL;SEQ ID NO:38)
- [0199] WT₁₂₆P2L肽(RLFPNAPYL;SEQ ID NO:39)
- [0200] WT₁₂₆P2I肽(RIFPNAPYL;SEQ ID NO:40)
- [0201] WT₁₂₆P3I肽(RMIPNAPYL;SEQ ID NO:41)
- [0202] WT₁₂₆P3L肽(RMLPNAPYL;SEQ ID NO:42)
- [0203] WT₁₂₆P3G肽(RMGPNAPYL;SEQ ID NO:43)
- [0204] WT₁₂₆P3A肽(RMAPNAPYL;SEQ ID NO:44)
- [0205] WT₁₂₆P3V肽(RMVPNAPYL;SEQ ID NO:45)
- [0206] WT₁₂₆P3M肽(RMMPNAPYL;SEQ ID NO:46)

[0207] WT₁₂₆P3P肽(RMPPNAPYL;SEQ ID NO:47)

[0208] WT₁₂₆P3W肽(RMWPNAPYL;SEQ ID NO:48)

[0209] WT₁₂₆P9V肽(RMFPNAPYV;SEQ ID NO:49)

[0210] WT₁₂₆P9A肽(RMFPNAPYA;SEQ ID NO:50)

[0211] WT₁₂₆P9I肽(RMFPNAPYI;SEQ ID NO:51)

[0212] WT₁₂₆P9M肽(RMFPNAPYM;SEQ ID NO:52)

[0213] WT₁₂₆P1D肽(DMFPNAPYL;SEQ ID NO:63)

[0214] WT₁₂₆P1E肽(EMFPNAPYL;SEQ ID NO:64)

[0215] WT₁₂₆P1H肽(HMFPNAPYL;SEQ ID NO:65)

[0216] WT₁₂₆P1K肽(KMFPNAPYL;SEQ ID NO:66)

[0217] WT₁₂₆P1N肽(NMFPNAPYL;SEQ ID NO:67)

[0218] WT₁₂₆P1P肽(PMFPNAPYL;SEQ ID NO:68)

[0219] WT₁₂₆P1Q肽(QMFPNAPYL;SEQ ID NO:69)

[0220] WT₁₂₆P1S肽(SMFPNAPYL;SEQ ID NO:70)

[0221] WT₁₂₆P1T肽(TMFPNAPYL;SEQ ID NO:71)

[0222] WT₁₂₆P2I&P9I肽(RIFPNAPYI;SEQ ID NO:72)

[0223] WT₁₂₆P2I&P9V肽(RIFPNAPYV;SEQ ID NO:73)

[0224] WT₁₂₆P2L&P9I肽(RLFPNAPYI;SEQ ID NO:74)

[0225] WT₁₂₆P2L&P9V肽(RLFPNAPYV;SEQ ID NO:75)

[0226] 尤其是,修饰的WT₁₈₇肽优选为WT₁₈₇P1F肽(SEQ ID NO:11),WT₁₈₇P2M肽(SEQ ID NO:16)或WT₁₈₇P3M肽(SEQ ID NO:20),更优选为WT₁₈₇P1F肽或WT₁₈₇P2M肽,更优选为WT₁₈₇P2M肽。修饰的WT₁₂₆肽优选为WT₁₂₆P1F肽(SEQ ID NO:34),WT₁₂₆P2L肽(SEQ ID NO:39),WT₁₂₆P3M肽(SEQ ID NO:46)或WT₁₂₆P9V肽(SEQ ID NO:49),更优选为WT₁₂₆P2L肽,WT₁₂₆P3M肽或WT₁₂₆P9V肽,更优选为WT₁₂₆P9V肽。

[0227] 本发明的癌症疫苗组合中,WT1肽优选为WT₁₈₇肽,WT₁₂₆肽,WT₁₈₇P1F肽,WT₁₈₇P2M肽,WT₁₈₇P3M肽,WT₁₂₆P1F肽,WT₁₂₆P2L肽,WT₁₂₆P3M肽或WT₁₂₆P9V肽。更优选的是WT₁₈₇肽,WT₁₂₆肽,WT₁₈₇P1F肽,WT₁₈₇P2M肽,WT₁₂₆P2L肽,WT₁₂₆P3M肽或WT₁₂₆P9V肽。更优选的是WT₁₈₇肽,WT₁₂₆肽,WT₁₈₇P2M肽或WT₁₂₆P9V肽。特别优选的是WT₁₈₇肽或WT₁₂₆肽。

[0228] WT1肽的衍生物也可以用作WT1肽。例如,WT₁₈₇或WT₁₂₆肽的衍生物可以由上面提到的9个连续的氨基酸以及结合到其N和/或C末端的各种不同物质的氨基酸序列形成。各种不同的物质可以是例如氨基酸、肽、其类似物等。这种与WT₁₈₇肽、WT₁₂₆肽或其修饰的肽结合的物质通过例如细胞内加工等经历的体内酶处理,最后产生了由上述的9个氨基酸构成的肽,并作为与HLA-A*0206分子的复合物呈递在细胞表面上。因此,可以在具有HLA-A*0206的患者中诱导WT1特异性CTL应答。

[0229] WT1肽可以通过在本技术领域通常使用的方法来制备,例如在《肽合成》(Peptide Synthesis,Interscience,New York,1966),《蛋白》(The Proteins,Vol.2,Academic Press Inc.,New York,1976),《肽合成》(Peptide synthesis,Maruzen Co.,Ltd.,1975),《肽合成基础和实验》(Basis and Experiments of Peptide Synthesis,Maruzen Co.,Ltd.1985),《药物开发续编》第14卷“肽合成”(the Sequel to Development

of Pharmaceuticals, Vol.14(peptide synthesis), Hirokawa Publishing Company, 1991) 等中描述的肽合成方法。

[0230] 对于筛选WT1肽及其修饰的肽的方法来说,例如,优选的方法包括在用肽单一刺激的情况下,对某些具有HLA-A*0206的患者的PBMCs(外周血单核细胞)进行IFN γ 分析,然后选择显示出良好响应的肽,这种方法的优点在于简单。

[0231] 在本发明中,多核苷酸、例如编码上述的在HLA-A*0206阳性人员中具有免疫原性的WT1蛋白或WT1肽的DNA,也可以用作癌症疫苗组合物的活性成分。也就是说,通过将编码WT1蛋白或WT1肽的多核苷酸插入到适合载体、优选为表达载体中,然后将载体给药到动物包括人类中,可以在活的生物体内产生癌症免疫。多核苷酸的例子包括DNA、RNA等,优选为DNA或RNA。多核苷酸的碱基序列可以根据在HLA-A*0206阳性人员中具有免疫原性的WT1蛋白或WT1肽的氨基酸序列来确定。多核苷酸可以通过已知的DNA或RNA合成方法、PCR方法来制备。这样的用于HLA-A*0206阳性人员的、包含编码WT1蛋白或WT1肽的DNA的癌症疫苗组合物,也是本发明的一个方面。WT1蛋白或WT1肽优选为WT1肽,更优选为WT1₁₈₇肽、WT1₁₂₆肽或其修饰的肽,最优选的是WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽。用于插入上述DNA的表达载体没有具体的限制。RNA不是必须插入到载体中,可以原样用作组合物的活性成分。

[0232] 本发明的癌症疫苗组合物可以包含佐剂。佐剂没有限制,只要在与用作抗原的WT1蛋白或WT1肽一起或分别给药后,它可以非特异性地增强对抗原的免疫应答就行。佐剂的例子包括引起沉淀类型的佐剂和油状佐剂。引起沉淀类型的佐剂的例子包括氢氧化钠、氢氧化铝、磷酸钙、磷酸铝、明矾、PEPES和羧基乙烯基聚合物。优选的油状佐剂是可以形成微胶粒、使得油包围着抗原的水溶液的佐剂。其具体例子包括液体石蜡、羊毛脂、弗氏佐剂、Montanide ISA-763AVG、Montanide ISA-51、不完全弗氏佐剂和完全弗氏佐剂。这些佐剂也可以作为其中两种或多种的混合物使用。优选的是油状佐剂。

[0233] 本发明的癌症疫苗组合物中佐剂的量没有具体限制,只要能够非特异性增强针对抗原的免疫应答就行。其量可以根据佐剂的种类等适合地选择。

[0234] 本发明的癌症疫苗组合物可以口服或肠胃外(例如腹膜内、皮下、皮内、肌肉内、静脉内、鼻内等)给药。在肠胃外给药的情况下,活性成分、即WT1蛋白或WT1肽,也可以通过将疫苗组合物施加到皮肤,或通过皮肤上黏贴含有疫苗组合物的贴片,经皮吸收。本发明的疫苗组合物也可以通过吸入等给药。疫苗组合物优选肠胃外给药,更优选皮内或皮下给药。皮内或皮下给药的身体部位优选为例如上臂等。

[0235] 依赖于给药途径,本发明的癌症疫苗组合物可以采用各种不同的剂型,其示例性剂型包括固体制剂和液体制剂。癌症疫苗组合物可以采取例如用于口服的内用固体或液体制剂,用于肠胃外给药的注射剂等的形式。

[0236] 用于口服的内用固体制剂的例子包括片剂、丸剂、胶囊剂、粉末剂和颗粒剂。

[0237] 为了制备内用固体制剂,WT1蛋白或WT1肽不用处理,与添加剂混合,或成粒(按照例如搅拌成粒,流化床成粒,干法成粒,旋转搅拌流化床成粒等),然后按照通常的方法进行加工。例如,胶囊剂可以通过囊封等制备,片剂可以通过制片等制备。在固体制剂中可以适当地掺入一种或两种或以上的添加剂。添加剂的例子包括赋形剂例如乳糖、甘露糖醇、葡萄糖、微晶体纤维素和玉米淀粉;黏合剂例如羟丙基纤维素,聚乙烯吡咯烷酮和偏硅酸铝镁;分散剂例如玉米淀粉;崩解剂例如羧甲基纤维素钙;润滑剂例如硬脂酸镁;增溶剂例如谷氨

酸和天冬氨酸;稳定剂;水溶性聚合物包括纤维素,例如羟丙基纤维素,羟丙基甲基纤维素和甲基纤维素,以及合成的聚合物例如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇;以及甜味剂例如白糖,糖粉,蔗糖,果糖,葡萄糖,乳糖,还原麦芽糖糖浆(麦芽糖醇糖浆),还原麦芽糖糖浆粉(麦芽糖醇糖浆粉),高葡萄糖玉米浆,高果糖玉米浆,蜂蜜,山梨糖醇,麦芽糖醇,甘露糖醇,木糖醇,赤藓糖醇,阿斯巴甜,糖精和糖精钠。

[0238] 如果需要,颗粒或片剂可以用包层剂等覆盖,可以用两个或多个层覆盖。包层剂的例子包括白糖,明胶,羟丙基纤维素和邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素。胶囊可以通过将活性成分与普仑司特水合物和从上述赋形剂适合地选择的赋形剂混合,可选地将混合物成粒,以及可选地用包层剂覆盖获得的颗粒,然后进行胶囊填充,来制备。可选地,胶囊可以通过向适合的胶囊基材(明胶等)添加甘油、山梨糖醇等以增加其塑性,然后用获得的基材囊封活性成分,来制备。如果需要,可以向胶囊基材添加着色剂或防腐剂(二氧化硫;以及对羟基苯甲酸酯例如对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯)。胶囊包括硬胶囊和软胶囊。

[0239] 用于口服的内用液体制剂的例子包括水,悬液/乳液,糖浆,在使用前溶解的制剂例如干糖浆,以及酞剂。为了制备内用的液体制剂,将WT1蛋白或WT1肽溶解、悬浮或乳化在常用于内用液体制剂的稀释剂中。稀释剂的例子包括纯水,乙醇及其混合物。液体制剂可以进一步包含润湿剂,悬浮剂,乳化剂,甜味剂,调味剂,香料,防腐剂或缓冲剂。干糖浆可以通过例如将活性成分与普仑司特水合物和附加成分例如白糖、糖粉、蔗糖、果糖、葡萄糖和乳糖混合,来制备。干糖浆也可以常用的方式制成颗粒。

[0240] 用于肠胃外给药的剂型的例子包括注射剂、软膏、凝胶、霜剂、贴片、气溶胶和喷雾剂。优选的是注射剂。例如,注射剂优选包含带有WT1蛋白或WT1肽的常规载体。

[0241] 用于肠胃外给药的注射剂可以是水性注射剂或油状注射剂。水性注射剂可以按照已知方法制备,例如通过向水性溶剂(用于注射的水,纯水等)适当地添加可药用添加剂以制成溶液,将WT1蛋白或WT1肽与溶液混合,使用过滤器等对获得的混合物进行过滤除菌,然后将得到的滤液装填无菌容器。可药用添加剂的例子包括上面提到的佐剂;等渗剂例如氯化钠,氯化钾,甘油,甘露糖醇,山梨糖醇,硼酸,硼砂,葡萄糖和丙二醇;缓冲剂例如磷酸盐缓冲溶液,乙酸盐缓冲溶液,硼酸盐缓冲溶液,碳酸盐缓冲溶液,柠檬酸盐缓冲溶液,Tris缓冲溶液,谷氨酸盐缓冲溶液和 ϵ -氨基己酸盐溶液;防腐剂例如对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸乙酯,对羟基苯甲酸丙酯,对羟基苯甲酸丁酯,氯代丁醇,苯甲醇,苯扎氯铵,脱氢乙酸钠,乙二胺四乙酸钠,硼酸和硼砂;增稠剂例如羟乙基纤维素,羟丙基纤维素,聚乙烯醇和聚乙二醇;稳定剂例如亚硫酸氢钠,硫代硫酸钠,乙二胺四乙酸钠,柠檬酸钠,抗坏血酸和二丁基羟基甲苯;以及pH调节剂例如盐酸,氢氧化钠,磷酸和乙酸。注射剂可以进一步含有适合的增溶剂,其例子包括醇类例如乙醇;多元醇例如丙二醇和聚乙二醇;以及非离子表面活性剂例如聚山梨酸酯80,聚氧乙烯氢化蓖麻油50,溶血卵磷脂和普卢兰尼克(pluronic)多元醇。此外,蛋白例如牛血清白蛋白和匙孔血蓝蛋白,多糖例如氨基葡聚糖等,可以包含在注射剂中。为了制备油状注射剂,使用例如芝麻油或大豆油作为油性溶剂,作为增溶剂可以混合有苯甲酸苄酯或苯甲醇。制备的注射剂通常储存在适合的安瓿、玻璃小瓶等中。液体制剂例如注射剂,也可以通过低温保存或冷冻干燥来去除水分和保存。冷冻干燥的制备物可以在使用前通过将它们复溶在添加的注射用蒸馏水等中,以备使用。

[0242] 本发明的癌症疫苗组合物的另一种剂型可以是含有WT1蛋白或WT1肽的脂质体,如果需要,多糖和/或其他成分可以混合在癌症疫苗组合物中。

[0243] 本发明的癌症疫苗组合物的剂量,随着使用的WT1蛋白、WT1肽或DNA的种类,患者的年龄和体重,待治疗的疾病等而变化。例如,在疫苗组合物含有WT1肽、例如WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽的情况下,每日剂量以WT1肽的量计,优选为大约0.1 μ g/kg bw到1mg/kg bw。WT1肽的剂量通常为0.0001mg到1000mg,优选为0.01mg到1000mg,更优选为0.1mg到10mg。该量优选在几天到几个月内一次给药。

[0244] 本发明的癌症疫苗组合物是用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物。用作选择HLA-A*0206阳性人员的标准的HLA类型,可以从例如供体的外周血测定。测定HLA类型的方法的例子包括已知方法,例如DNA分型方法,例如SBT(基于测序的分型)方法或SSP方法,以及HLA分型方法。在SBT方法中,将PCR扩增的DNA的碱基序列与已知等位基因的碱基序列数据进行比较,以精确鉴定HLA基因类型。在SSP方法中,在使用各种不同的特异性针对相应HLA等位基因的引物进行PCR扩增后,然后进行电泳以检查阳性条带。因此,可以鉴定HLA基因类型。

[0245] 当本发明的癌症疫苗组合物已被给药到HLA-A*0206阳性人员中时,疫苗组合物中的HLA-A*0206限制性WT1蛋白或WT1肽,或从疫苗组合物中的DNA或RNA表达的WT1蛋白或WT1肽,结合到HLA-A*0206阳性人员的抗原呈递细胞(树突状细胞)表面上的HLA-A*0206分子上。这诱导了特异性抗肿瘤免疫,即WT1特异性CTLs,其破坏对象(HLA-A*0206阳性人员)中的癌细胞。这种抗肿瘤免疫可以通过例如WT1特异性CTL应答、针对癌细胞的细胞毒性试验(例如⁵¹Cr释放细胞毒性试验)等来检查。例如,各由来自WT1蛋白的9个氨基酸组成,并已被报道能够诱导WT1特异性CTL应答的HLA-A*0201限制性WT1₁₈₇肽和WT1₁₂₆肽,能够诱导HLA-A*0206限制性应答。大约17%的日本人HLA-A*0206阳性的,而几乎同样比例的是HLA-A*0201阳性的。在下面的实施例1到5中,从三个HLA-A*0206阳性献血者的PBMCs制备了WT1₁₈₇肽特异性CTLs。诱导的CTLs对表达WT1的HLA-A*0206阳性的白血病细胞显示出细胞毒性效应。因为WT1₁₈₇肽和WT1₁₂₆肽特异性CTL的活性可以被抗I类HLA抗体抑制,因此发现了活性由I类HLA限制性的CTLs表现。包含WT1₁₈₇肽和/或WT1₁₂₆肽或其修饰的肽的WT1蛋白或WT1肽,可以作为疫苗用于HLA-A*0206阳性癌症患者以及HLA-A*0201阳性癌症患者。因此,基于WT1蛋白或WT1肽的、用于患有恶性肿瘤例如造血肿瘤和实体癌症的患者的免疫疗法,可以进一步应用于HLA-A*0206阳性癌症患者。包括将本发明的癌症疫苗组合物给药到HLA-A*0206阳性人员中的HLA-A*0206阳性人员中治疗和/或预防癌症的方法是本发明的优选实施方案之一。

[0246] 在HLA-A*0206阳性人员中,本发明的癌症疫苗组合物可以用于治疗和/或预防伴随有WT1基因表达增加的癌症:例如造血肿瘤例如白血病,骨髓增生异常综合症,多发性骨髓瘤和恶性淋巴瘤;以及实体癌症例如胃癌,结肠癌,肺癌,乳腺癌,生殖细胞癌,肝癌,皮肤癌,膀胱癌,前列腺癌,子宫癌,宫颈癌和卵巢癌。

[0247] 本发明的癌症疫苗组合物的示例性给药方法是下述方法,包括从HLA-A*0206阳性患者的外周血收集PBMCs,从PBMCs提取树突状细胞,用作为活性成分包含在本发明的癌症疫苗组合物中的肽例如WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽、或多核苷酸例如DNA或RNA对树突状细胞进行脉冲,以及通过皮下给药等将树突状细胞返回到患者。用于使用WT1肽等脉冲树突状细胞的条

件没有具体限制,只要能够获得本发明的效果就行,可以是常用的条件。

[0248] 在使用编码WT1蛋白或WT1肽的RNA作为癌症疫苗组合物的情况下,优选给药组合物,使得RNA被导入到HLA-A*0206阳性人员的树突状细胞中。用于将RNA导入HLA-A*0206阳性人员的树突状细胞中的示例性方法是下述方法,包括以与上述相同的方式从HLA-A*0206阳性人员收集树突状细胞,以及使用电脉冲将RNA导入树突状细胞。在树突状细胞中从导入的RNA表达的WT1蛋白或WT1肽,允许呈递在其表面上。通过将用RNA脉冲过的树突状细胞返回到HLA-A*0206阳性人员中,可以在活的生物体中快速产生癌症免疫。这样的癌症治疗或预防方法,包括将编码WT1蛋白或WT1肽的RNA导入HLA-A*0206阳性人员的树突状细胞,是本发明的优选实施方案之一。

[0249] 本发明的另一个实施方案涉及通过在存在WT1蛋白或WT1肽的情况下,培养源自于HLA-A*0206阳性人员的PBMCs,以获得从其诱导的WT1特异性CTLs,来诱导WT1特异性CTLs的方法。PBMCs所源自的对象没有具体限制,只要对象是HLA-A*0206阳性的就行。WT1蛋白或WT1肽的例子包括WT1₁₈₇肽、WT1₁₂₆肽及其修饰的肽,优选为WT1₁₈₇肽和WT1₁₂₆肽。例如,可以通过在存在WT1₁₈₇肽(或WT1₁₂₆肽)的情况下培养源自HLA-A*0206阳性人员的PBMCs,从PBMCs中的CTL前体细胞诱导WT1特异性CTLs。用于源自HLA-A*0206阳性人员的PBMCs的培养条件没有具体限制,可以是常用的条件。这样获得的CTLs识别WT1₁₈₇肽(或WT1₁₂₆肽)与HLA-A*0206分子的复合物。因此,通过使用本发明诱导的WT1特异性CTLs,可以在HLA-A*0206阳性人员中特异性破坏高表达WT1的肿瘤细胞,由此可以治疗和/或预防对象,即HLA-A*0206阳性人员中的造血肿瘤和实体癌症。用于将这种WT1特异性CTLs给药到HLA-A*0206阳性对象中的方法没有具体限制,例如可以与上述的癌症疫苗组合物给药方法相同。

[0250] 本发明的另一个实施方案涉及用于诱导WT1特异性CTLs的试剂盒,包含HLA-A*0206限制性WT1蛋白或WT1肽作为基本组分。优选情况下,试剂盒用于上面提到的诱导源自于HLA-A*0206阳性人员的WT1特异性CTLs的方法。这样的试剂盒可以包含例如收集PBMCs的手段,佐剂和反应容器,以及HLA-A*0206限制性WT1蛋白或WT1肽。利用试剂盒,可以有效地诱导识别癌症抗原例如WT1₁₈₇肽和WT1₁₂₆肽与HLA-A*0206分子的复合物的WT1特异性CTLs。

[0251] 本发明的另一个实施方案涉及用于诱导呈递WT1蛋白或WT1肽的树突状细胞的方法,方法通过在存在WT1蛋白或WT1肽的情况下,培养源自于HLA-A*0206阳性人员的未成熟树突状细胞,来获得从其诱导的呈递WT1蛋白或WT1肽的树突状细胞。WT1蛋白或WT1肽的例子包括WT1₁₈₇肽、WT1₁₂₆肽及其修饰的肽,优选为WT1₁₈₇肽和WT1₁₂₆肽。未成熟树突状细胞所源自的对象没有具体限制,只要对象是HLA-A*0206阳性的就行。因为未成熟树突状细胞存在于PBMCs等中,因此也可以将PBMCs在例如存在WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽的情况下进行培养。通过将这样获得的树突状细胞给药于HLA-A*0206阳性人员,有效地诱导了上面提到的WT1特异性CTLs,由此可以治疗和/或预防对象中的造血肿瘤和实体癌症。用于将这种树突状细胞给药到HLA-A*0206阳性对象中的方法没有具体限制,例如可以与上述的癌症疫苗组合物的给药方法相同。

[0252] 本发明的另一个实施方案涉及用于诱导呈递WT1蛋白或WT1肽的树突状细胞的试剂盒,包含HLA-A*0206限制性WT1蛋白或WT1肽作为基本组分。优选情况下,试剂盒用于上面提到的用于诱导树突状细胞的方法。这样的试剂盒可以包含例如收集未成熟树突状细胞和PBMCs的手段,佐剂和反应容器,以及HLA-A*0206限制性WT1蛋白或WT1肽。利用试剂盒,可以

有效地诱导通过HLA-A*0206分子呈递WT1蛋白或WT1肽的树突状细胞。

[0253] HLA-A*0206阳性人员中的癌症,可以利用下述物质诊断:

[0254] (1)WT1蛋白或WT1肽,由上述方法诱导的WT1特异性CTLs,或由上述方法诱导的树突状细胞,或

[0255] (2)针对下列的抗体:WT1蛋白或WT1肽,由上述方法诱导的WT1特异性CTLs,或由上述方法诱导的树突状细胞。

[0256] 这样的癌症诊断方法也是本发明的一个方面。在上述(1)中,癌症诊断优选使用由上述方法诱导的WT1特异性CTLs进行。WT1蛋白或WT1肽的例子包括WT1₁₈₇肽、WT1₁₂₆肽及其修饰的肽,优选为WT1₁₈₇肽和WT1₁₂₆肽。

[0257] 根据本发明,用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断的示例性方法,包括在来自HLA-A*0206阳性人员的样品中检测或定量WT1蛋白或WT1肽、针对它们的抗体或WT1特异性CTLs的步骤,以及将蛋白或其部分肽、针对它们的抗体或WT1特异性CTLs的量,与没有发生癌症的情况下的量进行比较的步骤。

[0258] 在癌症患者样品(例如血液)中,存在着从癌细胞释放的WT1肽和/或WT1蛋白,并且针对癌抗原的免疫应答增强了。也就是说,癌症患者样品具有增加量的针对WT1肽或WT1蛋白的抗体、WT1特异性CTLs等。因此,当样品中WT1肽或WT1蛋白、针对它们的抗体或WT1特异性CTLs的量,与没有发生癌症情况下的量相比增加时,可能发生了癌症。抗体的量可以通过例如ELISA方法测量。WT1特异性CTLs可以通过使用WT1多聚体、例如下面描述的MHC四聚体的方法来检测。

[0259] 可选地,也可以通过将上述CTLs、树突状细胞或抗体与来自HLA-A*0206阳性对象的样品一起温育,或将上述CTLs、树突状细胞或抗体给药到HLA-A*0206阳性对象中,然后确定CTLs、树突状细胞或抗体的位置、区域、量等,来进行癌症诊断。因为CTLs和树突状细胞具有聚集在癌细胞周围的性质,可以通过将CTLs或树突状细胞给药到对象中,并检测其位置或区域,来进行癌症诊断。用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断方法,包括将通过上述方法诱导的WT1特异性CTLs或树突状细胞给药到HLA-A*0206阳性对象中的步骤,以及确定CTLs或树突状细胞在HLA-A*0206阳性对象中的位置或区域的步骤,也是本发明的一个方面。

[0260] 也可以通过将CTLs或树突状细胞与来自HLA-A*0206阳性对象的样品一起温育以允许它们反应,加入针对CTLs或树突状细胞的抗体,继续温育,并通过与抗体结合的标记物等检测或定量癌细胞和CTLs的抗体结合复合物、抗体结合的树突状细胞等,来进行癌症的诊断。当癌细胞和CTLs的抗体结合复合物或抗体结合的树突状细胞的量,与没有发生癌症的情况下的量相比增加时,可能发生了癌症。上面提到的CTLs、树突状细胞或抗体可以被标记。标记能够使诊断有效地进行。来自HLA-A*0206阳性对象的样品的例子包括从HLA-A*0206阳性人员获得的生物学样本,例如尿液、血液、组织提取液、唾液、泪液和其他体液,血液是优选的。

[0261] 使用上述WT1蛋白或WT1肽对HLA-A*0206阳性人员进行癌症诊断的方法的例子,包括MHC四聚体分析、MHC五聚体分析和MHCdextramer分析,其中每种分析方法使用了WT1肽作为抗原。例如,在使用WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽作为抗原肽的MHC四聚体分析或MHC五聚体分析中,可以使用MHC/WT1₁₈₇肽复合物或MHC/WT1₁₂₆肽复合物作为探针,在HLA-A*0206阳性人员中检测WT1特异性CTLs。因为癌症患者显示出WT1特异性CTLs的高表达,因此可以通过测量HLA-

A*0206阳性人员中WT1特异性CTLs的表达来诊断癌症。因为癌症患者显示出针对癌抗原的增强的免疫应答,因此也可以通过在HLA-A*0206阳性人员中检测针对WT1蛋白或WT1肽的免疫应答,来诊断癌症。检测免疫应答的方法的例子包括通过ELISA测量针对WT1蛋白或WT1肽的抗体的方法。这种使用肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物或其部分肽对HLA-A*0206阳性人员进行癌症诊断的方法,也是本发明的一个方面。MHC四聚体分析和MHC五聚体分析可以通过已知的方法,使用可商购试剂盒来进行,例如“WT1四聚体”试剂盒(Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.)。

[0262] 用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断也可以通过下述方法来进行,方法包括将来自HLA-A*0206阳性对象的样品与针对下列物质的抗体进行反应的步骤:WT1蛋白或WT1肽,由上述方法诱导的WT1特异性CTLs或由上述方法诱导的树突状细胞;以及对抗体与WT1蛋白或WT1肽的复合物、或抗体与WT1特异性CTLs或树突状细胞的复合物进行检测或定量的步骤。当抗体与WT1蛋白或WT1肽的复合物、或抗体与WT1特异性CTLs或树突状细胞的复合物的量,与没有发生癌症的情况下的量相比增加时,可能发生了癌症。

[0263] 针对树突状细胞的抗体的例子包括识别WT1肽/HLA-A*0206复合物的抗体。因为这样的抗体能够识别WT1肽和HLA-A*0206分子,因此抗体可以识别通过I类HLA呈递WT1肽的树突状细胞。

[0264] 识别CTLs的WT1肽/HLA-A*0206/TCR(T细胞抗原受体)复合物的抗体,也可以用作针对树突状细胞的抗体。这样的抗体能够识别树突状细胞与CTL的复合物,以及癌细胞与CTL的复合物。

[0265] 可以通过将这样的抗体与来自HLA-A*0206阳性对象的样品一起温育以允许它们形成复合物,并通过抗体发射的荧光对癌细胞和CTLs的抗体结合复合物、呈递WT1肽的抗体结合的树突状细胞等进行检测或定量,来进行癌症的诊断。当癌细胞和CTLs的抗体结合复合物、呈递WT1肽的抗体结合的树突状细胞等的量,与没有发生癌症的情况下的量相比增加时,可能发生了癌症。

[0266] 包括将含有WT1蛋白或WT1肽的组合物给药到HLA-A*0206阳性人员中的治疗或预防癌症的方法,也是本发明的一个方面。含有WT1蛋白或WT1肽的组合物及其优选实施方案,与对于上述癌症疫苗组合物所描述的相同。

[0267] 使用WT1蛋白或WT1肽在HLA-A*0206阳性人员中治疗或预防癌症,及其在用于在HLA-A*0206阳性人员中治疗或预防癌症的癌症疫苗组合物的生产中的应用,也是本发明的一个方面。WT1蛋白或WT1肽及其优选实施方案,与对于上述癌症疫苗组合物所描述的相同。

[0268] 用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物,也是本发明的一个方面,该癌症疫苗组合物包含WT1₁₈₇肽(SEQ ID NO:2)或WT1₁₂₆肽(SEQ ID NO:3)的修饰的肽,其中任何一个都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性。

[0269] 修饰的WT1₁₈₇肽或修饰的WT1₁₂₆肽的例子,包括含有上述WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽的一个或几个氨基酸缺失、取代或添加的肽。修饰的WT1₁₈₇肽优选为在从N末端起第4到8位上含有与WT1₁₈₇肽在相应位置上含有的相同的氨基酸残基的肽。就此而言,修饰的肽优选为上述的SEQ ID NOS:4到12,15和16,18到20和22到25的肽。WT1₁₈₇P9L肽(SLGEQQYSL;SEQ ID NO:53)也是优选的。修饰的WT1₁₂₆肽优选为在从N末端起第4到8位上含有与WT1₁₂₆肽在相应位置上

含有的相同的氨基酸残基的肽。例如,优选的是上述的SEQ ID NOS:27到37和39到52的肽。

[0270] 在本发明的另一个优选实施方案中,上述的SEQ ID NOS:4到26和53到62的肽可以用作修饰的WT₁₁₈₇肽,上述的SEQ ID NOS:27到52和63到75的肽可以用作修饰的WT₁₁₂₆肽。在SEQ ID NOS:4到75的修饰的肽中,除了WT₁₁₈₇P1D肽、WT₁₁₈₇P1E肽、WT₁₁₈₇P1H肽、WT₁₁₈₇P1P肽和WT₁₁₈₇P2Q肽,以及WT₁₁₂₆P1D肽、WT₁₁₂₆P1E肽、WT₁₁₂₆P1P肽、WT₁₁₂₆P2A肽和WT₁₁₂₆P2Q肽之外的肽,都是优选的。

[0271] 尤其是,修饰的WT₁₁₈₇肽优选为WT₁₁₈₇P1F肽、WT₁₁₈₇P2M肽或WT₁₁₈₇P3M肽,更优选为WT₁₁₈₇P1F肽或WT₁₁₈₇P2M肽。修饰的WT₁₁₂₆肽优选为WT₁₁₂₆P1F肽、WT₁₁₂₆P2L肽、WT₁₁₂₆P3M肽或WT₁₁₂₆P9V肽,更优选为WT₁₁₂₆P1F肽或WT₁₁₂₆P2L肽。

[0272] 在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽的使用量,与上述用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物中WT1肽的使用量相同。用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的其他成分及其优选实施方案,与上述用于HLA-A*0206阳性人员的疫苗组合物的相同。

[0273] 编码上述在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽的DNA和RNA,也可以用作用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的活性成分。这样的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物,也是本发明的一个方面。

[0274] 在用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物中除了上述DNA和RNA之外的其他成分及其优选实施方案,与上述用于HLA-A*0206阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。

[0275] 可以通过将PBMCs在上述HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽存在的情况下进行培养,从源自于HLA-A*0201阳性人员的PBMCs诱导WT1特异性CTLs。这种诱导WT1特异性CTLs的方法也是本发明的一个方面。

[0276] 在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽的优选实施方案,与用于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。

[0277] 可以通过将未成熟树突状细胞在上述HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的肽存在的情况下进行培养,从源自于HLA-A*0201阳性人员的未成熟树突状细胞诱导呈递修饰的WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽的树突状细胞。这种用于诱导呈递修饰的WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽的树突状细胞的方法,也是本发明的一个方面。修饰的肽的优选例子与用于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。

[0278] 可以通过使用在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或修饰的WT₁₁₂₆肽、针对它们的抗体、由修饰的肽诱导的WT1特异性CTLs或由修饰的肽诱导的树突状细胞,在HLA-A*0201阳性人员中诊断癌症。这种用于HLA-A*0201阳性人员的癌症诊断方法,也是本发明的一个方面。用于HLA-A*0201阳性人员的癌症诊断方法及其优选实施方案,与上述的用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断方法及其优选实施方案相同。

[0279] 用于HLA-A*0201阳性人员的癌症诊断方法的例子包括MHC四聚体分析、MHC五聚体分析和MHC dextramer分析,其中每种使用了在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或修饰的WT₁₁₂₆肽作为抗原。修饰的肽的优选例子与用于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。

[0280] HLA-A*0201阳性人员中的癌症可以通过使用针对下列物质的抗体进行诊断:上述的在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性的修饰的WT₁₁₈₇肽或修饰的WT₁₁₂₆肽,由修饰的肽

诱导的WT1特异性CTLs或由修饰的肽诱导的树突状细胞。这种用于HLA-A*0201阳性人员的癌症诊断方法也是本发明的一个方面。修饰的肽的优选例子与用于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。用于HLA-A*0201阳性人员的癌症诊断方法及其优选实施方案,与上述用于HLA-A*0206阳性人员的癌症诊断方法及其优选实施方案相同。

[0281] 治疗或预防癌症的方法也是本发明的一个方面,所述方法包括向HLA-A*0201阳性人员给药含有下列肽的癌症疫苗组合物:

[0282] WT1₁₈₇肽(SEQ ID NO:2)的修饰肽或WT1₁₂₆肽(SEQ ID NO:3)的修饰肽,任何一个都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性。

[0283] 修饰的肽的优选例子与用于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。癌症疫苗组合物及其优选实施方案与对于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的疫苗组合物所描述的相同。

[0284] 本发明涉及使用下述肽:

[0285] WT1₁₈₇肽(SEQ ID NO:2)的修饰肽或WT1₁₂₆肽(SEQ ID NO:3)的修饰肽,任何一个都是肿瘤抑制基因WT1的蛋白产物的部分肽,修饰的肽在HLA-A*0201阳性人员中具有免疫原性,

[0286] 用于在HLA-A*0201阳性人员中治疗或预防癌症,以及使用它们生产用于在HLA-A*0201阳性人员中治疗或预防癌症的癌症疫苗组合物。

[0287] 修饰的肽的优选例子与用于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的癌症疫苗组合物的相同。癌症疫苗组合物及其优选实施方案与对于上述的用于HLA-A*0201阳性人员的疫苗组合物所描述的相同。

实施例

[0288] 下面,将通过实施例对本发明进行更详细的说明,但本发明不限于此。在实施例中的缩写表示下列含义。合成的肽从SIGMA GENOSYS JAPAN购买。

[0289] DCs:树突状细胞s

[0290] PBMCs:外周血单核细胞

[0291] CD:分化簇(白细胞分化抗原)

[0292] GM-CSF:粒细胞单核细胞集落刺激因子

[0293] IL:白介素

[0294] TNF α :肿瘤坏死因子- α

[0295] PGE:前列腺素

[0296] Gy:灰质(gray)

[0297] B-LCLs:B-类淋巴母细胞系

[0298] EB病毒:Epstein-Barr病毒

[0299] tBu:叔丁基

[0300] Trt:三苯甲基

[0301] Fmoc:9-苄基甲氧基羰基

[0302] 实施例1(能够与WT1肽结合的HLA分子的预测)

[0303] 能够与WT1₁₈₇肽(SEQ ID NO:2)结合的HLA分子使用NetMHC2.0服务器预测程序进行预测。

[0304] 结果,能够诱导WT1特异性CTLs的HLA-A*0201限制性WT1₁₈₇肽,在与HLA-A*0206分子的结合亲和性方面,在NetMHC2.0服务器预测程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-2.0/>)中排序高。

[0305] 实施例2(从HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs制备WT1₁₈₇肽特异性CTLs,以及CTLs的细胞毒性试验)

[0306] (1)分离HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs,以及DCs的制备

[0307] 首先,从每个HLA-A*0206健康献血者(三个人)的外周血通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心分离PBMCs。然后,使用抗人类CD14磁性珠-DM(由Becton, Dickinson and company (BD)制造),从PBMCs中筛选CD14阳性细胞。在这种情况下,认为在单核细胞群体中存在大量CD14阳性细胞。将选择的CD14阳性细胞在X-VIVO15培养基(由BioWhittaker, Walkersville, MD制造)中培养,培养基中添加有1v/v%人类AB血清,800IU/mL GM-CSF(由Pepro Tech INC, Rocky Hill, NJ制造)和1000IU/mL IL-4(由Pepro Tech INC制造),以制备DCs。

[0308] (2)自体成熟DCs的诱导

[0309] 将在上述(1)中制备的DC在37℃下培养1天,然后向含有DCs的培养孔添加含有10ng/mL TNFα(肿瘤坏死因子-α; Pepro Tech INC, Rocky Hill, NJ)、10ng/mL IL-β、1000IU/mL IL-6和1μg/mL PGE2的成熟化细胞因子混合物。在37℃培养24小时后,获得了自体的成熟DCs。

[0310] (3)WT1₁₈₇肽特异性CTLs的诱导

[0311] 将自体成熟DCs用WT1₁₈₇肽脉冲,使用30Gy辐射进行辐照,并与从HLA-A*0206阳性健康献血者获得的富含CD8阳性T细胞的PBMCs共培养。DCs用WT1₁₈₇肽的脉冲通过将DCs在存在10μg/mL的WT1₁₈₇肽的情况下在37℃培养30分钟来进行。使用CD8微珠和MS柱(由Miltenyi Biotec GmbH制造)从HLA-A*0206阳性健康献血者富集CD8阳性T细胞。

[0312] 从第二次刺激开始,已经用肽脉冲然后用辐射辐照过的自体PBMCs被用作选择性刺激细胞。在第二次刺激后2天,向培养基中加入浓度分别为10IU/mL和10ng/mL的重组IL-2(由Shionogi & Co., Ltd.提供)和IL-7(由Pepro Tech INC制造)。在第4次刺激后,将细胞在37℃培养10天,然后使用离心机通过离心收集获得的细胞(CTLs)。通过⁵¹Cr释放细胞毒性试验检测这些细胞(CTLs)针对靶细胞的细胞毒性活性。

[0313] (4)细胞毒性试验

[0314] 细胞毒性试验通过⁵¹Cr释放细胞毒性试验来进行。⁵¹Cr释放细胞毒性试验如下进行。首先,将靶细胞(1×10^7 细胞/mL)在存在100μL ⁵¹Cr(比活性:1mCi/ml)的情况下,在添加有10%胎牛血清的RPMI1640(由NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.制造)中,在37℃温育1.5小时,以便用⁵¹Cr标记靶细胞。然后,将⁵¹Cr标记的靶细胞添加到含有不同数量的在上述(3)中获得的CTLs(悬浮在100μL测定培养基中)的96孔圆底板的孔中,与CTLs混合,然后在37℃温育4小时。这些细胞被混合成使得E/T比例(细胞数比例)为1:1, 5:1, 20:1或25:1,其中CTLs和⁵¹Cr标记的靶细胞分别用“E”和“T”表示。在温育完成后,从每个孔收集100μL上清液。测定从标记细胞释放的⁵¹Cr的量,并基于⁵¹Cr的释放计算比裂解率(%)。比裂解率(%)按照

下述方式计算。

[0315] 比裂解率(%)=(测试样品的释放-自发释放)/(最大释放-自发释放)×100

[0316] 在公式中,自发释放的量是指在只含有靶细胞的孔中培养上清液的荧光量,最大释放量是指其中靶细胞已经通过1质量%的TritonX-100的处理完全裂解的培养基的荧光量。

[0317] 使用的靶细胞是B-LCLs、K562细胞、JY细胞和KH88细胞,它们将在下面详细描述。KH88细胞与在下面实施例9中使用的KH88OF8细胞相同。

[0318] B-LCLs,通过从HLA-A*0206阳性献血者获得的外周血B淋巴细胞的EB病毒介导的转化而建立,不表达WT1。

[0319] K562细胞,从慢性粒细胞性白血病急变期患者建立起来,是表达WT1、不表达I类HLA的细胞系。本发明人不能获得表达WT1的HLA-A*0206阳性的野生型白血病细胞系。因此,也使用了用HLA-A*0206基因转化K562细胞而制备的0206K562细胞。使用抗HLA-A2抗体(克隆BB7.2;由BD Biosciences Pharmingen制造)进行的FACS分析显示,用HLA-A*0206基因转化的0206K562细胞在细胞表面上表达HLA-A*0206分子。

[0320] Western印记分析显示,用WT1基因转化的B-LCL细胞表达WT1。用模拟载体转化的B-LCL细胞用作对照。

[0321] JY细胞是通过EB病毒介导的转化建立的不表达WT1的HLA-A*0206阴性B细胞系。

[0322] KH88细胞是表达WT1的HLA-A*0206阴性白血病细胞系。

[0323] 每种细胞系在添加有10v/v%热失活的胎牛血清、50IU/mL青霉素和50mg/mL链霉素的RPMI1640培养基中培养。

[0324] (5)抗体和流式细胞术分析

[0325] 抗人类CD14、CD86、CD80、CD83和HLA-DR mAbs购自BD。DCs的浓度和成熟通过使用上面列出的单克隆抗体(mAbs)分析细胞表面抗原来证实。样品使用流式细胞术(FACS Calibur;由BD制造)使用了CellQuest软件进行分析。

[0326] (6)结果

[0327] 检测了是否可以从HLA-A*0206阳性献血者的PBMCs制备WT1₁₈₇肽特异性CTLs。使用通过用WT1₁₈₇肽脉冲的自体DCs或PBMCs重复地刺激来自HLA-A*0206阳性健康献血者的富含CD8阳性T细胞的PBMCs而获得的CTLs,检测了WT1₁₈₇肽特异性细胞毒性活性。CTLs针对WT1₁₈₇肽脉冲的自体B-LCL细胞,与针对非WT1₁₈₇肽脉冲的B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图1a)。在图1a中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CTLs(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心三角形表示用10μg/mL WT1₁₈₇肽脉冲的细胞,实心正方形表示没有用WT1₁₈₇肽脉冲的细胞。从两个不同的HLA-A*0206阳性健康献血者分离的PBMCs类似制备的CTLs,也显示了与上述相同的细胞毒性活性(图2a和2b)。在图2中,实心三角形表示用10μg/mL WT1₁₈₇肽脉冲的细胞,封闭的正方形表示没有用WT1₁₈₇肽脉冲的细胞。这些结果显示出每种细胞毒性活性对WT1₁₈₇肽都是特异性的。

[0328] CTLs的细胞毒性活性随着用于脉冲DCs或PBMCs的WT1₁₈₇肽的浓度平行地增加,在肽浓度为0.1μg/mL处达到平台(图1b)。WT1₁₈₇肽比裂解的半最高浓度(半最高裂解值)是大约 5×10^{-5} μg/mL。这显示出CTLs的TCRs(T细胞抗原受体)对WT1₁₈₇肽/HLA-A*0206复合物的亲和性相当高。该结果有力地表明,使用WT1₁₈₇肽诱导的CTLs能够识别WT1₁₈₇肽。

[0329] 按照与上述同样的方式,使用通过用WT1₁₈₇肽脉冲的DCs或PBMCs刺激来自HLA-A*0206阳性献血者的富含CD8阳性T细胞的PBMCs而获得的CTLs,检测了针对外源表达WT1的各种不同靶细胞的细胞毒性活性。结果显示在图3a和3b中。在图3a和3b中显示的对于靶细胞的相应细胞毒性活性是在同时测定的。图3a显示了WT1₁₈₇肽特异性CTLs针对用WT1基因转化的B-LCLs(表达WT1,HLA-A*0206阳性;实心三角形)或用模拟载体转化的B-LCLs(不表达WT1,HLA-A*0206阳性;实心正方形)的细胞毒性活性。图3b显示了WT1₁₈₇肽特异性CTLs针对0206K562细胞(表达WT1,HLA-A*0206阳性;实心正方形)、K562细胞(表达WT1,HLA-A*0206阴性;空心正方形)、KH88细胞(表达WT1,HLA-A*0206阴性;实心圆圈)或JY细胞(不表达WT1,HLA-A*0206阴性;实心三角形)的细胞毒性活性。

[0330] CTLs针对用WT1转化的B-LCLs(表达WT1,HLA-A*0206阳性),与针对用模拟载体转化的B-LCLs(不表达WT1,HLA-A*0206阳性)相比,显示出更强的细胞毒性活性(图3a)。此外,如图3b中所示,CTLs针对用HLA-A*0206转化的0206K562细胞(表达WT1,HLA-A*0206阳性),与针对K562细胞(表达WT1,HLA-A*0206阴性)、KH88细胞(表达WT1,HLA-A*0206阴性)或JY细胞(不表达WT1,HLA-A*0206阴性)相比,显示出更强的细胞毒性活性。换句话说,CTLs针对表达WT1的HLA-A*0206阳性的靶白血病细胞显示出显著的细胞毒性活性,但是针对不表达WT1的和/或HLA-A*0206阴性细胞不显示细胞毒性活性。该结果证明,在体外制备的WT1₁₈₇肽特异性CTLs,对内源表达WT1的例如白血病细胞并且HLA-A*0206阳性的肿瘤细胞显示出细胞毒性活性。图3b中的结果有力地表明,WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性受到I类HLA-A的限制。这是基于针对0206K562细胞比针对K562细胞观察到了更强的细胞毒性活性这一事实。

[0331] 上述结果证明了上面提到的培养的CTLs是WT1₁₈₇肽特异性CTLs。

[0332] 每张图的结果是典型的数据,基本上可以一定的偏差重现。

[0333] 实施例3(验证限制WT1₁₈₇肽特异性CTLs的HLA的类型)

[0334] 检验了在实施例2中获得的WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性是否受I类HLA的限制。在存在或不存在针对I类HLA或II类HLA的mAbs的情况下,进行了⁵¹Cr释放细胞毒性试验。使用自体B-LCLs作为靶细胞。在本实验中,E/T比例是5:1。

[0335] 结果显示在图4中。图4a显示了使用B-LCLs(不表达WT1₁₈₇,HLA-A*0206阳性)作为靶细胞,在不存在针对I类HLA的mAbs(抗I类HLA mAbs)和针对II类HLA的mAbs(抗II类HLA mAbs)的情况下进行的试验的结果。图4b显示了使用WT1₁₈₇肽脉冲的B-LCLs(表达WT1₁₈₇,HLA-A*0206阳性)作为靶细胞,在不存在抗I类HLA mAbs和存在抗II类HLA mAbs的情况下进行的试验的结果。图4c显示了使用WT1₁₈₇肽脉冲的B-LCLs(表达WT1₁₈₇,HLA-A*0206阳性)作为靶细胞,在存在抗I类HLA mAbs和不存在抗II类HLA mAbs的情况下进行的试验的结果。图4d显示了使用WT1₁₈₇肽脉冲的B-LCLs(表达WT1₁₈₇,HLA-A*0206阳性)作为靶细胞,在不存在抗I类HLA mAbs和抗II类HLA mAbs的情况下进行的试验的结果。

[0336] 如图4中所示,WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性被添加抗I类HLA抗体完全抑制了,但是不被抗II类HLA抗体抑制。结果表明,正如预计的,WT1₁₈₇肽特异性CTLs的细胞毒性活性受到I类HLA的限制。

[0337] 实施例4(针对肿瘤细胞的细胞毒性试验)

[0338] 使用在实施例2中获得的WT1₁₈₇肽特异性CTLs,在体外进行了针对表达WT1的HLA-

A*0206阳性肿瘤细胞的细胞毒性试验。细胞毒性试验按照在实施例2中描述的⁵¹Cr释放细胞毒性试验进行。结果,WT1₁₈₇肽特异性CTLs显示出针对表达WT1的肿瘤细胞的细胞毒性活性(数据未显示)。

[0339] 实施例5(制备WT1₁₂₆肽特异性CTLs,以及CTLs的细胞毒性试验)

[0340] WT1₁₂₆肽特异性CTLs按照与实施例2(3)中相同的方式制备,区别只是用WT1₁₂₆肽(SEQ ID NO:3)代替了WT1₁₈₇肽。细胞毒性试验使用这些CTLs,按照与实施例2中相同的方式进行,测定了WT1₁₂₆肽特异性的细胞毒性活性。图5显示了从与图2b中相同的HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs诱导的WT1₁₂₆肽特异性CTLs的细胞毒性活性。在图5中,实心三角形表示用10μg/mL WT1₁₂₆肽脉冲的细胞,实心正方形表示没有用WT1₁₂₆肽脉冲的细胞。CTLs针对WT1₁₂₆肽脉冲的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆肽脉冲的B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图5)。该结果显示CTLs的细胞毒性活性对WT1₁₂₆肽是特异性的。

[0341] 按照与实施例2中相同的方式,使用通过用WT1₁₂₆肽脉冲的DCs或PBMCs刺激来自HLA-A*0206阳性献血者的富含CD8阳性T细胞的PBMCs而制备的CTLs,检测了针对各种不同的内源表达WT1的靶细胞的细胞毒性活性。针对每种靶细胞的细胞毒性活性显示在图6a和6b中。在图6a和6b中的靶细胞是0206K562细胞(表达WT1,HLA-A*0206阳性;实心正方形)、K562细胞(表达WT1,HLA-A*0206阴性;空心正方形)、KH88细胞(表达WT1,HLA-A*0206阴性;实心圆圈)和JY细胞(不表达WT1,HLA-A*0206阴性;实心三角形)。图6a显示了从与图2a中相同的HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs诱导的WT1₁₂₆肽特异性CTLs的细胞毒性活性。图6b显示了从与图2b中相同的HLA-A*0206阳性健康献血者的PBMCs诱导的WT1₁₂₆肽特异性CTLs的细胞毒性活性。

[0342] 与WT1₁₈₇肽特异性CTLs相同,WT1₁₂₆肽特异性CTLs对表达WT1的HLA-A*0206阳性靶白血病细胞显示出显著的细胞毒性活性,但是对不表达WT1的和/或HLA-A*0206阴性细胞没有细胞毒性活性。该结果证明,在体外制备的WT1₁₂₆肽特异性CTLs,对内源表达WT1的例如白血病细胞和HLA-A*0206阳性的肿瘤细胞,显示出细胞毒性活性。图6a和6b的结果有力地表明,WT1₁₂₆肽特异性CTLs的细胞毒性活性受到I类HLA-A的限制。这是基于针对0206K562细胞比针对K562细胞观察到了更强的细胞毒性活性这一事实。

[0343] 上述结果证明了获得的CTLs是WT1₁₂₆肽特异性CTLs。

[0344] 每张图的结果是典型的数据,基本上可以以一定的偏差重现。

[0345] 实施例6(疫苗组合物的制备)

[0346] 制备了下述癌症疫苗组合物1到8。它们仅仅是本发明的癌症疫苗组合物的例子。

[0347] 癌症疫苗组合物1

[0348] WT1₁₈₇肽 3mg

[0349] Montanide ISA-51 400mg

[0350] 5%葡萄糖水溶液 400mg

[0351] 将上述成分混合,混合物命名为癌症疫苗组合物1。

[0352] 癌症疫苗组合物2

[0353] WT1₁₈₇肽 1mg

[0354] Montanide ISA-51 400mg

[0355] 5%葡萄糖水溶液 400mg

- [0356] 将上述成分混合,混合物命名为癌症疫苗组合物2。
- [0357] 癌症疫苗组合物3
- [0358] WT₁₁₈₇肽 0.001mg
- [0359] Montanide ISA-51 400mg
- [0360] 5%葡萄糖水溶液 400mg
- [0361] 将上述成分混合,混合物命名为癌症疫苗组合物3。
- [0362] 癌症疫苗组合物4
- [0363] WT₁₁₈₇肽 10mg
- [0364] Montanide ISA-51 400mg
- [0365] 5%葡萄糖水溶液 400mg
- [0366] 将上述成分混合,混合物命名为癌症疫苗组合物4。
- [0367] 癌症疫苗组合物5到8
- [0368] 癌症疫苗组合物5到8按照与上述癌症疫苗组合物1到4中相同的方式制备,不同之处在于用WT₁₁₂₆肽代替WT₁₁₈₇肽。
- [0369] 实施例7(修饰的肽对HLA-A*0206分子的亲和性)
- [0370] 对于WT₁₁₈₇肽、WT₁₁₂₆肽和在从WT₁₁₈₇肽或WT₁₁₂₆肽的N末端起的第1、2、3或9位上含有氨基酸取代的修饰的肽,使用NetMHC2.0服务器预测程序分析了对HLA-A*0206分子的亲和性。修饰的WT₁₁₈₇肽和修饰的WT₁₁₂₆肽的分析结果分别显示在表1和2中。较小的值(肽在较低浓度下具有结合能力)表示较高的亲和性。
- [0371] 表1

[0372]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	预测分值	亲和性 (nM)	结合强度
WT ₁₁₈₇	SLGEQQYSV	2	0.776	11	强结合 (SB)
WT ₁₁₈₇ P1G	GLGEQQYSV	4	0.756	13	SB
WT ₁₁₈₇ P1A	ALGEQQYSV	5	0.812	7	SB
WT ₁₁₈₇ P1V	VLGEQQYSV	6	0.755	14	SB
WT ₁₁₈₇ P1L	LLGEQQYSV	7	0.810	7	SB
WT ₁₁₈₇ P1I	ILGEQQYSV	8	0.782	10	SB
WT ₁₁₈₇ P1M	MLGEQQYSV	9	0.877	3	SB

[0373]

WT1 ₁₈₇ P1W	WLGEQQYSV	10	0.876	3	SB
WT1 ₁₈₇ P1F	FLGEQQYSV	11	0.926	2	SB
WT1 ₁₈₇ P1Y	YLGEQQYSV	12	0.896	3	SB
WT1 ₁₈₇ P2V	SVGEQQYSV	13	0.722	20	SB
WT1 ₁₈₇ P2Q	SQGEQQYSV	14	0.824	6	SB
WT1 ₁₈₇ P2I	SIGEQQYSV	15	0.734	17	SB
WT1 ₁₈₇ P2M	SMGEQQYSV	16	0.798	8	SB
WT1 ₁₈₇ P3L	SLLEQQYSV	17	0.865	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3A	SLAEQQYSV	18	0.844	5	SB
WT1 ₁₈₇ P3V	SLVEQQYSV	19	0.869	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3M	SLMEQQYSV	20	0.896	3	SB
WT1 ₁₈₇ P3P	SLPEQQYSV	21	0.791	9	SB
WT1 ₁₈₇ P3W	SLWEQQYSV	22	0.883	3	SB
WT1 ₁₈₇ P3F	SLFEQQYSV	23	0.864	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3Y	SLYEQQYSV	24	0.857	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3S	SLSEQQYSV	25	0.801	8	SB
WT1 ₁₈₇ P3I	SLIEQQYSV	26	0.880	3	SB
WT1 ₁₈₇ P9L	SLGEQQYSL	53	0.586	88	弱结合

[0374] 表2

[0375]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	预测分值	亲和性 (nM)	结合强度
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	0.83	6	SB
WT1 ₁₂₆ P1G	GMFPNAPYL	27	0.76	14	SB
WT1 ₁₂₆ P1A	AMFPNAPYL	28	0.80	8	SB
WT1 ₁₂₆ P1V	VMFPNAPYL	29	0.75	15	SB
WT1 ₁₂₆ P1L	LMFPNAPYL	30	0.80	8	SB
WT1 ₁₂₆ P1I	IMFPNAPYL	31	0.77	11	SB
WT1 ₁₂₆ P1M	MMFPNAPYL	32	0.86	4	SB
WT1 ₁₂₆ P1W	WMFPNAPYL	33	0.88	3	SB
WT1 ₁₂₆ P1F	FMFPNAPYL	34	0.91	2	SB
WT1 ₁₂₆ P1Y	YMFPNAPYL	35	0.88	3	SB
WT1 ₁₂₆ P2V	RVFPNAPYL	36	0.78	11	SB
WT1 ₁₂₆ P2Q	RQFPNAPYL	37	0.85	4	SB

[0376]

WT1 ₁₂₆ P2A	RAFPNAPYL	38	0.67	35	SB
WT1 ₁₂₆ P2L	RLFPNAPYL	39	0.80	8	SB
WT1 ₁₂₆ P2I	RIFPNAPYL	40	0.78	10	SB
WT1 ₁₂₆ P3I	RMIPNAPYL	41	0.84	5	SB
WT1 ₁₂₆ P3L	RMLPNAPYL	42	0.83	6	SB
WT1 ₁₂₆ P3G	RMGPNAPYL	43	0.71	23	SB
WT1 ₁₂₆ P3A	RMAPNAPYL	44	0.79	9	SB
WT1 ₁₂₆ P3V	RMVPNAPYL	45	0.82	6	SB
WT1 ₁₂₆ P3M	RMMPNAPYL	46	0.86	4	SB
WT1 ₁₂₆ P3P	RMPPNAPYL	47	0.72	21	SB
WT1 ₁₂₆ P3W	RMWPNAPYL	48	0.85	5	SB
WT1 ₁₂₆ P9V	RMFPNAPYV	49	0.91	2	SB
WT1 ₁₂₆ P9A	RMFPNAPYA	50	0.77	12	SB
WT1 ₁₂₆ P9I	RMFPNAPYI	51	0.81	7	SB
WT1 ₁₂₆ P9M	RMFPNAPYM	52	0.65	42	SB

[0377] 实施例8(修饰的肽对HLA-A*0201分子的亲和性)

[0378] 对于WT1₁₈₇肽、WT1₁₂₆肽和在从WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽的N末端起的第1、2、3或9位上含有氨基酸取代的修饰的肽,使用NetMHC2.0服务器预测程序分析了对HLA-A*0201分子的亲和性。修饰的WT1₁₈₇肽和修饰的WT1₁₂₆肽的分析结果分别显示在表3和4中。较小的值表示较高的亲和性。

[0379] 表3

[0380]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	预测分值	亲和性 (nM)	结合强度
WT1 ₁₈₇	SLGEQQYSV	2	0.721	20	SB
WT1 ₁₈₇ P1G	GLGEQQYSV	4	0.672	34	SB
WT1 ₁₈₇ P1A	ALGEQQYSV	5	0.648	44	SB
WT1 ₁₈₇ P1V	VLGEQQYSV	6	0.705	24	SB
WT1 ₁₈₇ P1L	LLGEQQYSV	7	0.658	40	SB
WT1 ₁₈₇ P1I	ILGEQQYSV	8	0.698	26	SB
WT1 ₁₈₇ P1M	MLGEQQYSV	9	0.717	21	SB
WT1 ₁₈₇ P1W	WLGEQQYSV	10	0.628	55	SB

[0381]

WT1 ₁₈₇ P1F	FLGEQQYSV	11	0.824	6	SB
WT1 ₁₈₇ P1Y	YLGEQQYSV	12	0.809	7	SB
WT1 ₁₈₇ P2I	SIGEQQYSV	15	0.556	121	SB
WT1 ₁₈₇ P2M	SMGEQQYSV	16	0.740	16	SB
WT1 ₁₈₇ P3A	SLAEQQYSV	18	0.811	7	SB
WT1 ₁₈₇ P3V	SLVEQQYSV	19	0.766	12	SB
WT1 ₁₈₇ P3M	SLMEQQYSV	20	0.876	3	SB
WT1 ₁₈₇ P3W	SLWEQQYSV	22	0.863	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3F	SLFEQQYSV	23	0.852	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3Y	SLYEQQYSV	24	0.854	4	SB
WT1 ₁₈₇ P3S	SLSEQQYSV	25	0.793	9	SB
WT1 ₁₈₇ P9L	SLGEQQYSL	53	0.640	49	SB

[0382] 表4

[0383]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	预测分值	亲和性 (nM)	结合强度
WT1 ₁₂₆ P1G	GMFPNAPYL	27	0.80	9	SB
WT1 ₁₂₆ P1A	AMFPNAPYL	28	0.81	7	SB
WT1 ₁₂₆ P1V	VMFPNAPYL	29	0.81	8	SB
WT1 ₁₂₆ P1L	LMFPNAPYL	30	0.82	7	SB
WT1 ₁₂₆ P1I	IMFPNAPYL	31	0.81	8	SB
WT1 ₁₂₆ P1M	MMFPNAPYL	32	0.85	4	SB
WT1 ₁₂₆ P1W	WMFPNAPYL	33	0.80	8	SB
WT1 ₁₂₆ P1F	FMFPNAPYL	34	0.91	2	SB
WT1 ₁₂₆ P1Y	YMFPNAPYL	35	0.90	2	SB
WT1 ₁₂₆ P2V	RVFPNAPYL	36	0.55	127	SB
WT1 ₁₂₆ P2Q	RQFPNAPYL	37	0.49	262	SB
WT1 ₁₂₆ P2L	RLFPNAPYL	39	0.78	10	SB
WT1 ₁₂₆ P2I	RIFPNAPYL	40	0.64	48	SB
WT1 ₁₂₆ P3I	RMIPNAPYL	41	0.74	16	SB
WT1 ₁₂₆ P3L	RMLPNAPYL	42	0.78	10	SB
WT1 ₁₂₆ P3G	RMGPNAPYL	43	0.60	73	SB
WT1 ₁₂₆ P3A	RMAPNAPYL	44	0.73	17	SB

[0384]

WT ₁₂₆ P3V	RMVPNAPYL	45	0.68	31	SB
WT ₁₂₆ P3M	RMMPNAPYL	46	0.83	6	SB
WT ₁₂₆ P3P	RMPPNAPYL	47	0.61	66	SB
WT ₁₂₆ P3W	RMWPNAPYL	48	0.83	6	SB
WT ₁₂₆ P9V	RMFPNAPYV	49	0.84	5	SB
WT ₁₂₆ P9A	RMFPNAPYA	50	0.73	18	SB
WT ₁₂₆ P9I	RMFPNAPYI	51	0.79	9	SB
WT ₁₂₆ P9M	RMFPNAPYM	52	0.69	29	SB

[0385] 实施例9(由各种不同的修饰的WT₁₂₆肽诱导的HLA-A*0201限制性CTLs的比较)

[0386] (1)目的

[0387] 根据实施例8的结果,选择了WT₁₂₆P1F肽(SEQ ID NO:34)、WT₁₂₆P2L肽(SEQ ID NO:39)、WT₁₂₆P3M肽(SEQ ID NO:46)和WT₁₂₆P9V肽(SEQ ID NO:49)作为待测试的修饰的WT₁₂₆肽,并进行了下列实验以筛选能够诱导具有高细胞毒性活性的CTLs的修饰的WT₁₂₆肽。除非特别指明,在实施例9到12中使用的反应试剂、培养基、实验方法等,与实施例1中相同。在实施例9到12中,除非特别指明,否则培养在37℃进行。

[0388] (2)材料与方法

[0389] 从显示出表达HLA-A*0201分子的健康人类供体(HLA-A*0201阳性健康献血者)分离PBMCs,使用抗人类CD14磁性粒-DM从PBMCs中分离CD14阳性细胞。通过向补充有1v/v%人类AB血清的X-VIVO15培养基中添加800IU/mL GM-CSF和1000IU/mL IL-4,制备了培养基,并将CD14阳性细胞在培养基中培养1天。

[0390] 向上述培养物中添加含有10ng/mL TNFα、10ng/mL IL-β、1000IU/mL IL-6和1μg/mL PGE2的成熟化细胞因子混合物。在继续培养1天后,获得了自体的成熟DCs。

[0391] 将自体成熟DCs用10μg/mL在实施例13中获得的WT₁₂₆修饰肽(WT₁₂₆P1F肽, WT₁₂₆P2L肽, WT₁₂₆P3M肽或WT₁₂₆P9V肽)脉冲,培养4小时,并用35Gy辐射进行辐照。将这样获得的细胞用作刺激细胞,用于CTL诱导。

[0392] 将用作应答细胞的PBMCs(2×10^6 细胞/孔)与上述的DCs(2×10^5 细胞/孔)在24孔板中共培养。一周后,通过加入已经用肽脉冲过并用75Gy辐射辐照过的T2细胞,进行重新刺激。在重新刺激后3天,加入20IU/mL IL-2。通过加入肽脉冲过的、辐照过的T2细胞,将同样的重新刺激再重复3次,然后富集应答细胞中的CD8阳性细胞。

[0393] 对于CD8阳性T细胞,通过流式细胞仪分析了对与WT₁₂₆肽结合的HLA-A*0201四聚体的反应性,并检测了针对各种不同靶细胞的细胞毒性活性。

[0394] 使用的靶细胞是K562细胞、0206K562细胞、JY细胞、KH80F8细胞、TF-1细胞和THP-1细胞,它们显示在表5中。这些细胞的特点显示在表5中。从HLA-A*0201阳性供体的血液通过EB病毒感染建立的B-类淋巴母细胞系(B-LCL),也被用作靶细胞。

[0395] 表5

[0396]

靶细胞	HLA-A*0201	HLA-A*0206	WT1
K562	阴性	阴性	表达
0206K562	阴性	阳性	表达
JY	阳性	阴性	不表达
KH880F8	阴性	阴性	表达
TF-1	阳性	阴性	表达
THP-1	阳性	阴性	表达

[0397] (3)结果

[0398] 图7显示了来自HLA-A*0201阳性供体1,使用不同的修饰WT₁₁₂₆肽刺激,然后用与WT₁₁₂₆肽结合的PE(藻红蛋白)标记的HLA-A*0201四聚体(Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.)和APC-Cy7标记的抗CD8抗体(APC-Cy7:别藻蓝蛋白-花青素-7)染色的PBMCs的流式细胞分析的结果。当PBMCs用上面提到的四聚体和抗CD8抗体染色时,通过修饰的肽刺激而诱导的CTLs与四聚体和抗CD8抗体结合,由此可以分别检测到四聚体发射的荧光和抗CD8抗体发射的荧光。在图7a到7e中,垂直轴表示HLA-A*0201四聚体发射的荧光的强度,水平轴表示抗CD8抗体发射的荧光的强度。图7a到7e中的每个框显示了诱导的、能够识别WT₁₁₂₆肽的HLA-A*0201限制性CTLs的频率(%)。图7a显示了没有用任何WT₁₁₂₆修饰肽刺激并用上述四聚体和抗CD8抗体染色的PBMCs(背景)的分析结果。图7b显示了用WT₁₁₂₆P1F肽刺激并染色的PBMCs的分析结果。图7c显示了用WT₁₁₂₆P2L肽刺激并染色的PBMCs的分析结果。图7d显示了用WT₁₁₂₆P3M肽刺激并染色的PBMCs的分析结果。图7e显示了用WT₁₁₂₆P9V肽刺激并染色的PBMCs的分析结果。

[0399] 上述的通过用WT₁₁₂₆P1F肽刺激PBMCs而诱导的CTLs的频率是0.14%(图7b)。上述的通过用WT₁₁₂₆P2L肽刺激PBMCs而诱导的CTLs的频率是0.37%(图7c)。使用这些肽单独诱导的CTLs是HLA四聚体阳性,CD8阳性的,并能够与结合WT₁₁₂₆肽的HLA-A*0201四聚体结合。这些结果显示,使用修饰的WT₁₁₂₆肽刺激PBMCs诱导了能够识别野生型肽(WT₁₁₂₆肽)的CTLs。

[0400] 图8显示了通过使用WT₁₁₂₆P1F肽刺激来自供体1的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图8中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心菱形表示其中使用JY细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT₁₁₂₆P1F肽脉冲过的JY细胞作为靶细胞的组。

[0401] JY细胞是HLA-A*0201阳性和WT1阴性的。CTLs针对WT₁₁₂₆P1F肽脉冲过的JY细胞,与针对没有用WT₁₁₂₆P1F肽脉冲过的JY细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性。该结果显示,诱导了对于用于上述刺激的肽是特异性的,并受HLA-A*0201的限制的CTLs。

[0402] 图9显示了通过使用WT₁₁₂₆P2L肽刺激来自供体1的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图9中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。在图9a中,实心菱形表示其中使用JY细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT₁₁₂₆P2L肽脉冲过的JY细胞作为靶细胞的组。在图9b中,实心菱形表示其中使用TF-1细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用THP-1细胞作为靶细胞的组,实心三角形表示其中使用KH880F8细胞作为靶细胞的

组,十字表示其中使用B-LCL细胞作为靶细胞的组。

[0403] 诱导的CTLs针对WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的JY细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的JY细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图9a)。诱导的CTLs针对TF-1细胞和THP-1细胞,二者都是HLA-A*0201阳性和WT1阳性的,与针对HLA-A*0201阴性和WT1阳性的KH880F8细胞、以及HLA-A*0201阳性和WT1阴性的B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图9b)。正如从结果清楚地看到的,使用WT1₁₂₆P2L肽刺激所诱导的CTLs受HLA-A*0201的限制,能够破坏内源性表达WT1的癌细胞。

[0404] 图10显示了来自HLA-A*0201阳性供体2,使用WT1₁₂₆P2L肽刺激,然后用与WT1₁₂₆肽结合的PE标记的HLA-A*0201四聚体和APC-Cy7标记的抗CD8抗体染色的PBMCs的流式细胞分析的结果。即图10显示了用与WT1₁₂₆肽结合的HLA四聚体和抗CD8抗体染色的诱导的CTLs的流式细胞分析的结果。垂直轴表示HLA-A*0201四聚体发射的荧光的强度,水平轴表示抗CD8抗体发射的荧光的强度。

[0405] 图10的右上区中的细胞是受HLA-A*0201限制并能够识别WT1₁₂₆肽的诱导的CTLs。用WT1₁₂₆P2L肽刺激的PBMCs中5.43%的淋巴细胞,是能够与结合WT1₁₂₆肽的HLA-A*0201的四聚体结合的HLA四聚体阳性、CD8阳性的CTLs。该结果显示,使用修饰的肽刺激PBMCs,诱导能够识别野生型肽的CD8阳性CTLs。

[0406] 图11显示了通过使用WT1₁₂₆P2L肽刺激来自供体2的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图11a和11b中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。在图11a中,实心菱形表示其中使用JY细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT1₁₂₆肽脉冲过的JY细胞作为靶细胞的组。在图11b中,实心菱形表示其中使用JY细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的JY细胞作为靶细胞的组。

[0407] 诱导的CTLs针对WT1₁₂₆肽脉冲过的JY细胞,与针对没有用WT1₁₂₆肽脉冲过的JY细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图11a)。诱导的CTLs针对WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的JY细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的JY细胞相比,也显示出更强的细胞毒性活性(图11b)。正如从结果清楚地看到的,使用WT1₁₂₆P2L肽刺激而诱导的CTLs能够识别WT1₁₂₆P2L肽和野生型WT1₁₂₆肽二者。

[0408] 实施例10(由各种不同的修饰的WT1₁₂₆肽诱导的HLA-A*0206限制性CTLs的比较)

[0409] (1)目的

[0410] 根据实施例7的结果,选择了WT1₁₂₆P1F肽、WT1₁₂₆P2L肽、WT1₁₂₆P3M肽和WT1₁₂₆P9V肽作为待测试的修饰的WT1₁₂₆肽,并进行了下列实验以筛选能够诱导具有高细胞毒性活性的CTLs的修饰的WT1₁₂₆肽。

[0411] (2)材料与方法

[0412] 从显示出表达HLA-A*0206分子的健康人类供体(HLA-A*0206阳性健康献血者)分离PBMCs,使用抗人类CD14磁性粒-DM从PBMCs中分离CD14阳性细胞。通过向补充有1v/v%人类AB血清的X-VIVO15培养基中添加800IU/mL GM-CSF和1000IU/mL IL-4,制备了培养基,并将CD14阳性细胞在培养基中培养1天。

[0413] 向上述培养物中添加含有10ng/mL TNF α 、10ng/mL IL- β 、1000IU/mL IL-6和1 μ g/mL PGE2的成熟化细胞因子混合物。在继续培养1天后,获得了自体的成熟DCs。

[0414] 将自体成熟DCs用10 μ g/mL在实施例13中获得的WT1₁₂₆修饰肽(WT1₁₂₆P1F肽, WT1₁₂₆P2L肽, WT1₁₂₆P3M肽或WT1₁₂₆P9V肽)脉冲,培养4小时,并用35Gy辐射进行辐照。将这样获得的细胞用作刺激细胞,用于CTL诱导。

[0415] 将富含CD8阳性T细胞的PBMCs(2×10^6 细胞/孔)与上述的DCs(2×10^5 细胞/孔)在24孔板中共培养。10天后,通过加入已经用肽脉冲过并用35Gy辐射辐照过的PBMCs,进行重新刺激。在重新刺激后2天,加入10IU/mL IL-2和10ng/mL IL-7。通过将同样的重新刺激再重复4次,富集了CD8阳性T细胞。检测了CD8阳性T细胞针对各种不同靶细胞的细胞毒性活性。

[0416] 使用的靶细胞是从HLA-A*0206阳性供体的血液通过EB病毒感染建立的B-LCL, K562细胞和0206K562细胞。

[0417] (3)结果

[0418] 图12显示了使用不同的肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体3的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。图12a显示了用WT1₁₂₆P2L肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。图12b显示了用WT1₁₂₆P3M肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。图12c显示了用WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。在图12a到12c中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心菱形表示其中使用自体B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用与上述刺激中使用的相同的修饰的WT1₁₂₆肽脉冲过的自体B-LCL细胞作为靶细胞的组。

[0419] 用WT1₁₂₆P2L肽刺激所诱导的CTLs,针对HLA-A*0206阳性和WT1阴性的WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图12a)。用WT1₁₂₆P3M肽刺激所诱导的CTLs,针对HLA-A*0206阳性和WT1阴性的WT1₁₂₆P3M肽脉冲过的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P3M肽脉冲过的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图12b)。用WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs,针对HLA-A*0206阳性和WT1阴性的WT1₁₂₆P9V肽脉冲过的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P9V肽脉冲过的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图12c)。

[0420] 这些结果显示,诱导了对于上述刺激所用的肽是特异性的,并受HLA-A*0206的限制的CTLs。

[0421] 图13显示了使用WT1₁₂₆P9V肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体3的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图13中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心菱形表示其中使用自体B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT1基因转染的自体B-LCL细胞作为靶细胞的组。

[0422] 在图13中,使用WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs,针对通过将WT1基因转染到最初为HLA-A*0206阳性和WT1阴性的B-LCL细胞中而制造成WT1阳性的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1基因转染的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图12c)。正如从结果中清楚地看到的,使用WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs受到HLA-A*0206的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₂₆肽而显示出细胞毒性活性。

[0423] 图14显示了使用不同的肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体4的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。图14a显示了用WT1₁₂₆P2L肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。图14b显示了用WT1₁₂₆P3M肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。图14c显示了用

WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。在图14a到14c中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心菱形表示其中使用自体B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用与上述刺激中使用的相同的修饰的WT1₁₂₆肽脉冲过的自体B-LCL细胞作为靶细胞的组。

[0424] 用WT1₁₂₆P2L肽刺激所诱导的CTLs,针对HLA-A*0206阳性和WT1阴性的WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P2L肽脉冲过的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图14a)。用WT1₁₂₆P3M肽刺激所诱导的CTLs,针对HLA-A*0206阳性和WT1阴性的WT1₁₂₆P3M肽脉冲过的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P3M肽脉冲过的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图14b)。用WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs,针对HLA-A*0206阳性和WT1阴性的WT1₁₂₆P9V肽脉冲过的自体B-LCL细胞,与针对没有用WT1₁₂₆P9V肽脉冲过的自体B-LCL细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图14c)。这些结果显示,诱导了对于上述刺激所用的肽是特异性的,并受HLA-A*0206的限制的CTLs。

[0425] 图15显示了使用不同的肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体4的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。使用的靶细胞是HLA-A*0206阴性、WT1阳性的K562细胞,以及通过在其中转染HLA-A*0206基因而造成内源性呈递WT1抗原肽的K562细胞(0206K562细胞)。图15a显示用WT1₁₂₆P2L肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。图15b显示了用WT1₁₂₆P3M肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。图15c显示了用WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs的细胞毒性活性。在图15a到15c中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心菱形表示其中使用K562细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中0206K562细胞、即通过在其中转染HLA-A*0206基因而造成内源性呈递WT1抗原肽的K562细胞作为靶细胞的组。

[0426] 在图15a到15c中,在每种情况下,使用WT1₁₂₆P2L肽、WT1₁₂₆P3M肽或WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs,针对0206K562细胞与针对K562细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性。正如从结果清楚地看到的,使用任何这些修饰的肽刺激所诱导的CTLs受到HLA-A*0206的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₂₆肽而显示出细胞毒性活性。

[0427] 实施例11(由各种不同的修饰的WT1₁₈₇肽所诱导的HLA-A*0201限制性CTLs的比较)

[0428] (1)目的

[0429] 根据实施例8的结果,选择了WT1₁₈₇P1F肽(SEQ ID NO:11)、WT1₁₈₇P2M肽(SEQ ID NO:16)和WT1₁₈₇P3M肽(SEQ ID NO:20)作为待测试的修饰的WT1₁₈₇肽,并进行了下列实验以筛选能够诱导具有高细胞毒性活性的CTLs的修饰的WT1₁₈₇肽。

[0430] (2)材料与方法

[0431] 从显示出表达HLA-A*0201分子的健康人类供体(HLA-A*0201阳性健康献血者)分离PBMCs,使用抗人类CD14磁性粒-DM从PBMCs中分离CD14阳性细胞。通过向补充有1v/v%人类AB血清的X-VIVO15培养基中添加800IU/mL GM-CSF和1000IU/mL IL-4,制备了培养基,并将CD14阳性细胞在培养基中培养1天。

[0432] 向上述培养物中添加含有10ng/mL TNF α 、10ng/mL IL- β 、1000IU/mL IL-6和1 μ g/mL PGE2的成熟化细胞因子混合物。在继续培养1天后,获得了自体的成熟DCs。

[0433] 将自体成熟DCs用10 μ g/mL在实施例13中获得的修饰的WT1₁₈₇肽(WT1₁₈₇P1F肽,WT1₁₈₇P2M肽或WT1₁₈₇P3M肽)脉冲,培养4小时,并用35Gy辐射进行辐照。将这样获得的细胞用

作刺激细胞,用于CTL诱导。

[0434] 将用作响应细胞的PBMCs(2×10^6 细胞/孔)与上述的DCs(2×10^5 细胞/孔)在24孔板中共培养。一周后,通过加入已经用肽脉冲过并用75Gy辐射辐照过的T2细胞,进行重新刺激。在重新刺激后3天,加入20IU/mL IL-2。通过加入肽脉冲过的、辐照过的T2细胞,将同样的重新刺激再重复3次,然后富集了应答细胞中的CD8阳性细胞。检测了CD8阳性T细胞针对靶细胞,在这里即是JY细胞的细胞毒性活性。

[0435] (3)结果

[0436] 图16显示了使用WT1187P1F肽(图16a)或WT1187P2M肽(图16b)刺激来自HLA-A*0201阳性供体的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图16a和16b中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。实心菱形表示其中使用JY细胞作为靶细胞的组,实心三角形表示其中使用WT1187肽脉冲过的JY细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用在上述刺激中使用的WT1187修饰肽(WT1187P1F肽)脉冲过的JY细胞作为靶细胞的组。JY细胞是HLA-A*0201阳性的,WT1阴性的。

[0437] 使用WT1187P1F肽刺激所诱导的CTLs,对WT1187肽脉冲过的JY细胞和WT1187P1F肽脉冲过的JY细胞显示出相等的细胞毒性活性,与针对没有用肽脉冲过的JY细胞相比,活性更强(图16a)。使用WT1187P2M肽刺激所诱导的CTLs,对WT1187肽脉冲过的JY细胞和WT1187P2M肽脉冲过的JY细胞显示出相等的细胞毒性活性,与针对没有用肽脉冲过的JY细胞相比,活性更强(图16b)。正如从结果清楚地看到的,使用修饰的肽刺激所诱导的CTLs,可以识别修饰的肽和野生型WT1187肽二者。

[0438] 实施例12(由各种不同的修饰的WT1187肽所诱导的HLA-A*0206限制性CTLs的比较)

[0439] (1)目的

[0440] 根据实施例7的结果,选择了WT1187P1F肽、WT1187P2M肽和WT1187P3M肽作为待测试的修饰的WT1187肽,并进行了下列实验以筛选能够诱导具有高细胞毒性活性的CTLs的修饰的WT1187肽。

[0441] (2)材料和方法

[0442] 从显示出表达HLA-A*0206分子的健康人类供体(HLA-A*0206阳性健康献血者)分离PBMCs,使用抗人类CD14磁性粒-DM从PBMCs中分离CD14阳性细胞。通过向补充有1v/v%人类AB血清的X-VIVO15培养基中添加800IU/mL GM-CSF和1000IU/mL IL-4,制备了培养基,并将CD14阳性细胞在培养基中培养1天。

[0443] 向上述培养物中添加含有10ng/mL TNF α 、10ng/mL IL- β 、1000IU/mL IL-6和1 μ g/mL PGE2的成熟化细胞因子混合物。在继续培养1天后,获得了自体的成熟DCs。

[0444] 将自体成熟DCs用在实施例13中获得的修饰的WT1187肽(WT1187P1F肽,WT1187P2M肽或WT1187P3M肽)脉冲,培养4小时,并用35Gy辐射进行辐照。将这样获得的细胞用作刺激细胞,用于CTL诱导。

[0445] 将富含CD8阳性T细胞的PBMCs(2×10^6 细胞/孔)与上述的DCs(2×10^5 细胞/孔)在24孔板中共培养。10天后,通过加入已经用肽脉冲过并用35Gy辐射辐照过的PBMCs,进行重新刺激。在重新刺激后2天,加入10IU/mL IL-2和10ng/mL IL-7。将同样的重新刺激再重复4次,富集了CD8阳性T细胞。检测了CD8阳性T细胞针对各种不同靶细胞的细胞毒性活性。

[0446] 使用的靶细胞是从HLA-A*0206阳性供体的血液通过EB病毒感染建立的B-LCL, K562细胞和0206K562细胞。

[0447] (3)结果

[0448] 图17显示了使用WT1₁₈₇P1F肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图17中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。在图17a中,实心菱形表示其中使用B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT1₁₈₇肽脉冲过的B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心三角形表示其中使用WT1₁₈₇P1F肽脉冲过的B-LCL细胞作为靶细胞的组。在图17b中,实心菱形表示其中使用K562细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用0206K562细胞、即通过在其中转染HLA-A*0206基因而制造成内源性呈递WT1抗原肽的K562细胞作为靶细胞的组。

[0449] 使用WT1₁₈₇P1F肽刺激所诱导的CTLs,对WT1₁₈₇肽脉冲过的B-LCL细胞和WT1₁₈₇P1F肽脉冲过的B-LCL细胞显示出相等的细胞毒性活性,与针对没有用肽脉冲过的B-LCL细胞相比,活性更强(图17a)。当使用HLA-A*0206阴性、WT1阳性的K562细胞,以及通过在其中转染HLA-A*0206基因而制造成内源性呈递WT1抗原肽的K562细胞(0206K562细胞)作为靶细胞时,使用WT1₁₈₇P1F肽刺激所诱导的CTLs,针对0206K562细胞与针对K562细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图17b)。正如从结果清楚地看到的,使用WT1₁₈₇P1F肽刺激所诱导的CTLs能够识别WT1₁₈₇P1F肽和野生型WT1₁₈₇肽二者。类似地,发现了CTLs受到HLA-A*0206的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₈₇肽显示出细胞毒性活性。

[0450] 图18显示了使用WT1₁₈₇P2M肽刺激来自HLA-A*0206阳性供体的PBMCs所诱导的CTLs的细胞毒性活性的测量结果。在图18中,垂直轴表示细胞毒性活性,水平轴表示通过肽刺激获得的CD8阳性T细胞(效应细胞:E)相对于靶细胞(靶:T)的比率(E/T比率)。在图18a中,实心菱形表示其中使用B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用WT1₁₈₇肽脉冲过的B-LCL细胞作为靶细胞的组,实心三角形表示其中使用WT1₁₈₇P2M肽脉冲过的B-LCL细胞作为靶细胞的组。在图18b中,实心菱形表示其中使用K562细胞作为靶细胞的组,实心正方形表示其中使用0206K562细胞、即通过在其中转染HLA-A*0206基因而制造成内源性呈递WT1抗原肽的K562细胞作为靶细胞的组。

[0451] 使用WT1₁₈₇P2M肽刺激所诱导的CTLs,对WT1₁₈₇肽脉冲过的B-LCL细胞和WT1₁₈₇P2M肽脉冲过的B-LCL细胞显示出相等的细胞毒性活性,与针对没有用肽脉冲过的B-LCL细胞相比,活性更强(图18a)。当使用HLA-A*0206阴性、WT1阳性的K562细胞,以及通过在其中转染HLA-A*0206基因而制造成内源性呈递WT1抗原肽的K562细胞(0206K562细胞)作为靶细胞时,使用WT1₁₈₇P2M肽刺激所诱导的CTLs,针对0206K562细胞与针对K562细胞相比,显示出更强的细胞毒性活性(图18b)。正如从结果清楚地看到的,使用WT1₁₈₇P2M肽刺激所诱导的CTLs能够识别WT1₁₈₇P2M肽和野生型WT1₁₈₇肽二者。类似地,发现了CTLs受到HLA-A*0206的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₈₇肽显示出细胞毒性活性。

[0452] 正如从实施例9到12的结果清楚地看到的,用修饰的WT1₁₂₆肽,即WT1₁₂₆P1F肽、WT1₁₂₆P2L肽、WT1₁₂₆P3M肽或WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs,受到HLA-A*0206的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₂₆肽显示出细胞毒性活性。特别是,WT1₁₂₆P9V肽、WT1₁₂₆P2L肽和WT1₁₂₆P3M肽高度有效。

[0453] 正如从上述结果清楚地看到的,用修饰的WT1₁₈₇肽,即WT1₁₈₇P1F肽、WT1₁₈₇P2M肽或WT1₁₈₇P3M肽刺激所诱导的CTLs,受到HLA-A*0206的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₈₇肽显示出细胞毒性活性。特别是,WT1₁₈₇P2M肽和WT1₁₈₇P1F肽高度有效。

[0454] 因此,显示了这些修饰的肽,可以有效地用于在HLA-A*0206阳性人员中治疗和预防伴随有WT1基因表达增加的癌症。

[0455] 正如从上述结果清楚地看到的,用修饰的WT1₁₂₆肽,即WT1₁₂₆P1F肽、WT1₁₂₆P2L肽、WT1₁₂₆P3M肽或WT1₁₂₆P9V肽刺激所诱导的CTLs,受到HLA-A*0201的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₂₆肽显示出细胞毒性活性。特别是,WT1₁₂₆P1F肽和WT1₁₂₆P2L肽是高度有效的。

[0456] 正如从上述结果清楚地看到的,用修饰的WT1₁₈₇肽,即WT1₁₈₇P1F肽、WT1₁₈₇P2M肽或WT1₁₈₇P3M肽刺激所诱导的CTLs,受到HLA-A*0201的限制,并通过识别内源性呈递的野生型WT1₁₈₇肽显示出细胞毒性活性。特别是,WT1₁₈₇P2M肽和WT1₁₈₇P1F肽高度有效。因此,显示了这些修饰的肽,有效地用于在HLA-A*0201阳性人员中治疗和预防伴随有WT1基因表达增加的癌症。

[0457] 实施例13

[0458] WT1₁₈₇P2V肽(SVGEQQYSV;SEQ ID NO:13;H-Ser-Val-Gly-Glu-Gln-Gln-Tyr-Ser-Val-OH)的合成

[0459] 1.合成保护的肽树脂(H-Ser(tBu)-Val-Gly-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Val-Alko-树脂)

[0460] 将0.4g Fmoc-Val-Alko-树脂(Alko是对烷氧基苯甲醇)(由WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES,LTD制造;0.80mmol/g)放置在由Advanced ChemTech制造的ACT496固相合成仪的反应容器中,用DMF(N,N'-二甲基甲酰胺)洗涤(步骤1),用25%哌嗪在DMF中的溶液处理(5分钟×1次,30分钟×1次)以除去Fmoc基团(步骤2),再次用DMF洗涤(步骤3)以获得H-Val-Alko-树脂。向该反应容器中加入0.7mL NMP(N-甲基吡咯烷酮)和121mg(0.96mmol)DIPCI(N,N'-二异丙基碳二亚胺)在0.9mL NMP中的溶液,然后加入368mg(0.96mmol)Fmoc-Ser(tBu)-OH和147mg(0.96mmol)HOBT(1-羟基苯并三唑)一水化物在1.8mL NMP中的溶液。偶联反应在室温进行60分钟(步骤4)。附加的偶联反应使用与上述相同量的Fmoc-Ser(tBu)-OH、HOBT一水化物和DIPCI进行(步骤5)。将获得的树脂用DMF洗涤(步骤6),去保护(步骤7),并再次洗涤(步骤8)以给出H-Ser(tBu)-Val-Alko-树脂。然后,通过使用Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Val-OH和Fmoc-Ser(tBu)-OH重复步骤4到8,连续地进行偶联。从反应容器收集获得的肽树脂,用乙醚洗涤,然后在真空干燥,得到980mgH-Ser(tBu)-Val-Gly-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Val-Alko-树脂。上面提到的合成过程的概要显示在表6中。

[0461] <合成过程>

[0462] 表6

[0463]

步骤	反应试剂	重复 (次数)	持续时间 (min)
1) 洗涤	DMF 3mL	5	0.3
2) 去保护	25%哌嗪/DMF 3mL	1	5
		1	30
3) 洗涤	DMF 3mL	5	0.3
4) 偶联	每种 Fmoc-氨基酸 (3 Eq) , HOBT (3 Eq) , DIPCI (3 Eq) /NMP 3.4mL	1	60
5) 偶联	每种 Fmoc-氨基酸 (3 Eq) , HOBT (3 Eq) , DIPCI (3 Eq) /NMP 3.4mL	1	60
6) 洗涤	DMF 3mL	5	0.3
7) 去保护	25%哌嗪/DMF 3mL	1	5
		1	30
8) 洗涤	DMF 3mL	5	0.3

[0464] 2. 保护的肽树脂的去保护

[0465] 向980mg H-Ser(tBu)-Val-Gly-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Val-Alko-树脂中加入5mL三氟乙酸/水/三异丙基硅烷的混合溶液(95/2.5/2.5(体积比))。将混合物在室温搅拌2.5小时。过滤除去树脂,将得到的滤液加入到冰冷的乙醚中。使用玻璃滤器收集产生的沉淀。将残余物用乙醚洗涤,真空干燥,得到268mg粗肽。

[0466] 3. 粗肽的纯化

[0467] 将268mg获得的粗肽溶解在20%的乙酸水溶液中,通过反相液相色谱进行纯化。

[0468] 泵:Shimadzu LC-8A

[0469] 柱:YMC-Pack Pro C18 AS12S11-2530WT 3cmΦ×25cm

[0470] 洗脱液1:H₂O/0.1%TFA[0471] 洗脱液2(第二种洗脱液):CH₃CN/0.1%TFA

[0472] 流速:10mL/min

[0473] 检测:UV220nm

[0474] 在用浓度为1%的第二种洗脱液平衡后,将柱子装载粗肽溶液。然后,允许第二种洗脱液的浓度在30分钟内增加到8%,随后在120分钟内增加到14%。收集含有目标化合物的级份,在真空中蒸发掉乙腈,然后将残余物冷冻干燥。由此获得了105mg目标WT1₁₈₇P2V肽(SVGEQQYSV;SEQ ID NO:13;H-Ser-Val-Gly-Glu-Gln-Gln-Tyr-Ser-Val-OH)。

[0475] 用于纯化的肽的HPLC分析和质谱的条件如下。

[0476] HPLC分析(Shimadzu LC-10Avp)

- [0477] 柱:YMC-Pack Pro C18 AS-302 4.6mm Φ ×150mm
- [0478] 洗脱液1:H₂O/0.1%TFA
- [0479] 洗脱液2:CH₃CN/0.1%TFA
- [0480] 梯度:允许洗脱液2的浓度在30分钟内从10%增加到40%。
- [0481] 流速:1mL/min
- [0482] 检测:UV220nm
- [0483] 纯度:97.4%,保留时间:11.22分钟
- [0484] 氨基酸分析(Hitachi L-8500氨基酸分析仪)
- [0485] 水解:1%苯酚/6N盐酸水溶液,110℃,24小时
- [0486] 分析方法:茚三酮方法
- [0487] Ser:1.78(2)Glx:3.26(3)*Gly:(1)Val:2.04(2)Tyr:1.06(1)
- [0488] *)Gly=标准氨基酸,括号中的数字是理论值。
- [0489] 质谱(Applied Biosystems API 150EX质谱仪)
- [0490] m/z=996.9[M+1]⁺(理论值=996.5)
- [0491] 氨基酸序列分析(Applied Biosystems 491蛋白测序仪)
- [0492] 从N末端Ser到C末端Val,对氨基酸序列进行了连续检查。
- [0493] 按照与上述相同的方式合成了在表7和8中显示的肽。
- [0494] 表7

[0495]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	获得的 粗肽的 量 (mg)	获得的纯 化肽的量 (mg)	HPLC 纯度 (%)	HPLC 保留时 间 (min)	质谱 (m/z)
WT1 ₁₈₇ P2Q	SQGEQQYSV	14	251	88	98.2	9.21	1026.0
WT1 ₁₈₇ P2I	SIGEQQYSV	15	244	91	97.6	12.98	1010.7
WT1 ₁₈₇ P2M	SMGEQQYSV	16	260	22	96.9	11.91	1029.1
WT1 ₁₈₇ P3L	SLLEQQYSV	17	238	176	96.8	18.24	1066.9
WT1 ₁₈₇ P3A	SLAEQQYSV	18	268	172	99.1	13.67	1024.8
WT1 ₁₈₇ P3V	SLVEQQYSV	19	267	182	98.7	15.26	1052.8
WT1 ₁₈₇ P3M	SLMEQQYSV	20	280	63	94.8	16.12	1084.8
WT1 ₁₈₇ P3P	SLPEQQYSV	21	227	132	98.1	14.02	1050.8
WT1 ₁₈₇ P3W	SLWEQQYSV	22	248	40 (从 100 mg 粗肽)	99.4	20.00	1139.5
WT1 ₁₈₇ P3F	SLFEQQYSV	23	224	110	98.3	19.44	1100.8
WT1 ₁₈₇ P3Y	SLYEQQYSV	24	236	114	98.5	15.76	1116.7
WT1 ₁₈₇ P3S	SLSEQQYSV	25	261	130	99.1	13.33	1040.8
WT1 ₁₈₇ P3I	SLIEQQYSV	26	270	162	97.3	17.51	1066.9

[0496] 表8

[0497]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	获得的 粗肽的 量 (mg)	获得的纯 化肽的量 (mg)	HPLC 纯度 (%)	HPLC 保留时 间 (min)	质谱 (m/z)
WT1 ₁₂₆ P2V	RVFPNAPYL	36	253	130	96.5	20.65	1077.1
WT1 ₁₂₆ P2Q	RQFPNAPYL	37	274	87	98.7	18.43	1106.1
WT1 ₁₂₆ P2A	RAFPNAPYL	38	240	63	99.0	19.03	1049.1
WT1 ₁₂₆ P9A	RMFPNAPYA	50	262	139	94.3	16.59	1066.8
WT1 ₁₂₆ P9M	RMFPNAPYM	52	295	167	95.7	19.75	1126.8

[0498] 同样地合成了表9到12中显示的肽,但是用于纯化的肽的HPLC分析和质谱条件如下。

[0499] HPLC分析(Agilent HP1100或Thermo Fisher Scientific Surveyor)

[0500] 柱:Thermo Fisher Scientific BioBasic-18 3mmΦ×250mm

[0501] 洗脱液1:H₂O/0.1%TFA

[0502] 洗脱液2:CH₃CN/0.1%TFA

[0503] 梯度:允许洗脱液2的浓度在20分钟内变化到表中显示的浓度。

[0504] 流速:0.4mL/min

[0505] 检测:215nm

[0506] 质谱

[0507] Thermo Bioanalysis Dynamo质谱仪(MALDI-TOF)

[0508] 表9

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HPLC 纯 度 (%)	HPLC 保留 时间 (min)	HPLC 梯度	质谱 (m/z)
WT1 ₁₈₇ P1G	GLGEQQYSV	4	100	12.72	5-60%	980.7
WT1 ₁₈₇ P1A	ALGEQQYSV	5	98.9	12.00	10-50%	993.0
WT1 ₁₈₇ P1V	VLGEQQYSV	6	98.9	14.98	5-50%	1022.3
WT1 ₁₈₇ P1L	LLGEQQYSV	7	97.6	12.75	10-65%	1037.6
WT1 ₁₈₇ P1I	ILGEQQYSV	8	98.8	13.46	5-60%	1037.2
WT1 ₁₈₇ P1M	MLGEQQYSV	9	95.5	14.15	5-60%	1054.0

[0509]

WT1 ₁₈₇ P1W	WLGEQQYSV	10	98.9	15.60	5-60%	1109.9
WT1 ₁₈₇ P1F	FLGEQQYSV	11	95.8	13.14	10-65%	1070.8
WT1 ₁₈₇ P9L	SLGEQQYSL	53	95.4	12.49	10-55%	1024.6

[0510]

[0511] 表10

[0512]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HPLC 纯 度 (%)	HPLC 保留 时间 (min)	HPLC 梯 度	质谱 (m/z)
WT1 ₁₂₆ P1G	GMFPNAPYL	27	99.6	15.39	10-70%	1009.5
WT1 ₁₂₆ P1A	AMFPNAPYL	28	98.8	13.79	10-85%	1023.3
WT1 ₁₂₆ P1V	VMFPNAPYL	29	98.4	14.00	10-85%	1052.2
WT1 ₁₂₆ P1L	LMFPNAPYL	30	98.9	14.91	10-80%	1066.3
WT1 ₁₂₆ P1I	IMEFPNAPYL	31	99.2	13.93	10-80%	1065.4
WT1 ₁₂₆ P1M	MMFPNAPYL	32	100	13.77	10-80%	1083.5
WT1 ₁₂₆ P1W	WMFPNAPYL	33	97.5	15.64	10-80%	1139.3
WT1 ₁₂₆ P1F	FMFPNAPYL	34	98.8	14.78	10-85%	1099.7
WT1 ₁₂₆ P2L	RLFPNAPYL	39	98.6	13.11	10-80%	1090.9
WT1 ₁₂₆ P2I	RIFPNAPYL	40	100	13.74	10-70%	1090.1
WT1 ₁₂₆ P3I	RMIPNAPYL	41	97.4	14.17	10-70%	1076.7
WT1 ₁₂₆ P3L	RMLPNAPYL	42	100	13.88	10-65%	1076.4
WT1 ₁₂₆ P3G	RMGPNAPYL	43	96.7	12.63	10-65%	1020.9
WT1 ₁₂₆ P3A	RMAPNAPYL	44	95.2	13.95	10-60%	1034.9
WT1 ₁₂₆ P3V	RMVPNAPYL	45	92.9	14.67	10-60%	1062.7
WT1 ₁₂₆ P3M	RMMPNAPYL	46	91.8	14.87	10-60%	1094.8
WT1 ₁₂₆ P3P	RMPPNAPYL	47	95.8	13.56	10-65%	1058.8
WT1 ₁₂₆ P3W	RMWPNAPYL	48	99.6	15.21	10-70%	1149.7
WT1 ₁₂₆ P9V	RMFPNAPYV	49	99.2	13.86	10-60%	1096.5
WT1 ₁₂₆ P9I	RMFPNAPYI	51	99.4	14.00	10-65%	1110.7

[0513] 表11

[0514]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HPLC 纯度 (%)	HPLC 保留 时间 (min)	HPLC 梯度	质谱 (m/z)
WT1 ₁₈₇ P1D	DLGEQQYSV	54	96.6	13.43	5-60%	1038.2
WT1 ₁₈₇ P1E	ELGEQQYSV	55	96.4	11.83	10-60%	1052.2
WT1 ₁₈₇ P1H	HLGEQQYSV	56	98.0	15.79	5-40%	1060.2
WT1 ₁₈₇ P1K	KLGEQQYSV	57	99.0	13.77	5-45%	1052.2
WT1 ₁₈₇ P1N	NLGEQQYSV	58	95.8	14.34	5-50%	1037.0
WT1 ₁₈₇ P1P	PLGEQQYSV	59	95.9	14.68	5-50%	1020.0
WT1 ₁₈₇ P1Q	QLGEQQYSV	60	96.8	13.28	5-60%	1051.3
WT1 ₁₈₇ P1R	RLGEQQYSV	61	100	13.27	5-60%	1079.6
WT1 ₁₈₇ P1T	TLGEQQYSV	62	96.7	14.40	5-50%	1025.0

[0515] 表12

[0516]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HPLC 纯 度 (%)	HPLC 保留 时间 (min)	HPLC 梯度	质谱 (m/z)
WT1 ₁₂₆ P1D	DMFPNAPYL	63	99.2	14.72	10-75%	1067.3
WT1 ₁₂₆ P1E	EMFPNAPYL	64	99.1	15.20	5-70%	1082.1
WT1 ₁₂₆ P1H	HMFPNAPYL	65	96.7	14.52	10-70%	1089.9
WT1 ₁₂₆ P1K	KMFPNAPYL	66	95.9	13.96	10-75%	1080.0
WT1 ₁₂₆ P1N	NMFPNAPYL	67	99.8	14.69	10-75%	1066.3
WT1 ₁₂₆ P1P	PMFPNAPYL	68	96.9	14.26	10-80%	1049.3
WT1 ₁₂₆ P1Q	QMFPNAPYL	69	95.1	14.94	10-70%	1080.3
WT1 ₁₂₆ P1S	SMFPNAPYL	70	99.8	14.28	10-80%	1040.8
WT1 ₁₂₆ P1T	TMFPNAPYL	71	98.8	13.72	10-85%	1053.5
WT1 ₁₂₆ P2I&P9I	RIFPNAPYI	72	97.0	14.23	10-65%	1089.5
WT1 ₁₂₆ P2I&P9V	RIFPNAPYV	73	100	12.23	10-80%	1077.0
WT1 ₁₂₆ P2L&P9I	RLFPNAPYI	74	97.7	13.43	10-75%	1090.8
WT1 ₁₂₆ P2L&P9V	RLFPNAPYV	75	97.0	12.83	10-75%	1076.9

[0517] 实施例14

[0518] (使用表达HLA-A*0201的转基因小鼠评估修饰的肽诱导特异性免疫细胞的活性，并验证诱导的特异性免疫细胞与野生型肽的交叉反应性)

[0519] <方法>

[0520] (1)修饰的肽候选物

[0521] 对于WT₁₈₇肽、WT₁₂₆肽及其修饰的肽(在WT₁₈₇肽或WT₁₂₆肽从N末端起的第1、2、3和/或9位上含有一个或两个氨基酸残基的取代的肽),使用本技术领域已知的方法,即下列4种计算机数据库介导的方法,分析了针对HLA-A*0201分子的亲和性:

[0522] BIMAS(<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html>), SYFPEITHI(<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html>), RANKPEP(<http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>)和NetMHC3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)。WT₁₈₇肽及其修饰肽的分析结果显示在表13到16和21中。WT₁₂₆肽及其修饰肽的分析结果显示在表17到20和22到23中。预测的亲和性用分值显示。

[0523] 表13

[0524]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT ₁₈₇	SLGEQQYSV	2	285	27	96/64.43%	0.721
WT ₁₈₇ P1A	ALGEQQYSV	5	285	27	95/63.76%	0.720
WT ₁₈₇ P1F	FLGEQQYSV	11	1312	26	82/55.03%	0.862
WT ₁₈₇ P1G	GLGEQQYSV	4	285	26	86/57.72%	0.672
WT ₁₈₇ P1I	ILGEQQYSV	8	485	27	90/60.40%	0.698
WT ₁₈₇ P1L	LLGEQQYSV	7	485	27	89/59.73%	0.719
WT ₁₈₇ P1M	MLGEQQYSV	9	485	25	92/61.74%	0.770
WT ₁₈₇ P1V	VLGEQQYSV	6	485	26	92/61.74%	0.705
WT ₁₈₇ P1W	WLGEQQYSV	10	1312	25	71/47.65%	0.693

[0525] 表14

[0526]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT ₁₈₇	SLGEQQYSV	2	285	27	96/64.43%	0.721
WT ₁₈₇ P2I	SIGGEQQYSV	15	39	25	85/57.05%	0.556
WT ₁₈₇ P2M	SMGEQQYSV	16	206	25	84/56.38%	0.740
WT ₁₈₇ P2Q	SQGEQQYSV	14	29	17	52/34.90%	0.455
WT ₁₈₇ P2V	SVGEQQYSV	13	25	21	78/52.35%	0.461

[0527] 表15

[0528]

肽	氨基酸序列	SEQ	HLA-A*0201 结合分值			
		ID NO	BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₈₇	SLGEQQYSV	2	285	27	96/64.43%	0.721
WT1 ₁₈₇ P3A	SLAEQQYSV	18	285	29	110/73.83%	0.811
WT1 ₁₈₇ P3F	SLFEQQYSV	23	1055	28	114/76.51%	0.852
WT1 ₁₈₇ P3I	SLIEQQYSV	26	285	29	115/77.18%	0.817
WT1 ₁₈₇ P3L	SLLEQQYSV	17	1055	29	116/77.85%	0.839
WT1 ₁₈₇ P3M	SLMEQQYSV	20	1055	28	114/76.51%	0.876
WT1 ₁₈₇ P3P	SLPEQQYSV	21	285	27	95/63.76%	0.748
WT1 ₁₈₇ P3S	SLSEQQYSV	25	285	27	110/73.83%	0.793
WT1 ₁₈₇ P3V	SLVEQQYSV	19	285	27	113/75.84%	0.766
WT1 ₁₈₇ P3W	SLWEQQYSV	22	2367	28	98/65.77%	0.863
WT1 ₁₈₇ P3Y	SLYEQQYSV	24	913	28	111/74.50%	0.854

[0529] 表16

[0530]

肽	氨基酸序列	SEQ	HLA-A*0201 结合分值			
		ID NO	BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₈₇	SLGEQQYSV	2	285	27	96/64.43%	0.721
WT1 ₁₈₇ P9L	SLGEQQYSL	53	88	27	89/59.73%	0.640

[0531] 表17

[0532]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	314	22	70/46.98%	0.802
WT1 ₁₂₆ P1A	AMFPNAPYL	28	314	24	77/51.68%	0.808
WT1 ₁₂₆ P1F	FMFPNAPYL	34	1444	23	64/42.95%	0.909
WT1 ₁₂₆ P1G	GMFPNAPYL	27	314	23	68/45.64%	0.795
WT1 ₁₂₆ P1I	IMFPNAPYL	31	534	24	72/48.32%	0.802
WT1 ₁₂₆ P1L	LMFPNAPYL	30	534	24	71/47.65%	0.819
WT1 ₁₂₆ P1M	MMFPNAPYL	32	534	22	74/49.66%	0.852
WT1 ₁₂₆ P1V	VMFPNAPYL	29	534	23	74/49.66%	0.804
WT1 ₁₂₆ P1W	WMFPNAPYL	33	1444	22	53/35.57%	0.799

[0533] 表18

[0534]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	314	22	70/46.98%	0.802
WT1 ₁₂₆ P2A	RAFPNAPYL	38	6	18	47/31.54%	0.376
WT1 ₁₂₆ P2I	RIFPNAPYL	40	60	22	71/47.65%	0.640
WT1 ₁₂₆ P2L	RLFPNAPYL	39	435	24	82/55.03%	0.784
WT1 ₁₂₆ P2Q	RQFPNAPYL	37	44	14	38/25.50%	0.485
WT1 ₁₂₆ P2V	RVFPNAPYL	36	38	18	64/42.95%	0.552

[0535] 表19

[0536]

肽	氨基酸序列	SEQ	HLA-A*0201 结合分值			
		ID NO	BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	314	22	70/46.98%	0.802
WT1 ₁₂₆ P3A	RMAPNAPYL	44	85	23	66/44.30%	0.734
WT1 ₁₂₆ P3G	RMGPNAPYL	43	85	21	52/34.90%	0.602
WT1 ₁₂₆ P3I	RMIPNAPYL	41	85	23	71/47.65%	0.741
WT1 ₁₂₆ P3L	RMLPNAPYL	42	314	23	72/48.32%	0.781
WT1 ₁₂₆ P3M	RMMPNAPYL	46	314	22	70/46.98%	0.834
WT1 ₁₂₆ P3P	RMPPNAPYL	47	85	21	51/34.23%	0.613
WT1 ₁₂₆ P3V	RMVPNAPYL	45	85	21	69/46.31%	0.680
WT1 ₁₂₆ P3W	RMWPNAPYL	48	2293	22	61/40.94%	0.867

[0537] 表20

[0538]

肽	氨基酸序列	SEQ ID	HLA-A*0201 结合分值			
		NO	BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	314	22	70/46.98%	0.802
WT1 ₁₂₆ P9A	RMFPNAPYA	50	73	16	53/35.57%	0.731
WT1 ₁₂₆ P9I	RMFPNAPYI	51	153	20	74/49.66%	0.790
WT1 ₁₂₆ P9M	RMFPNAPYM	52	73	16	65/43.62%	0.686
WT1 ₁₂₆ P9V	RMFPNAPYV	49	1022	22	77/51.68%	0.838

[0539] 表21

[0540]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₈₇	SLGEQQYSV	2	285	27	96/64.43%	0.721
WT1 ₁₈₇ P1D	DLGEQQYSV	54	21	24	81/54.36%	0.252
WT1 ₁₈₇ P1E	ELGEQQYSV	55	21	22	85/57.05%	0.366
WT1 ₁₈₇ P1H	HLGEQQYSV	56	10	25	83/55.70%	0.610
WT1 ₁₈₇ P1K	KLGEQQYSV	57	998	26	89/59.73%	0.745
WT1 ₁₈₇ P1N	NLGEQQYSV	58	285	25	90/60.40%	0.613
WT1 ₁₈₇ P1P	PLGEQQYSV	59	6	22	78/52.35%	0.287
WT1 ₁₈₇ P1Q	QLGEQQYSV	60	285	25	87/58.39%	0.630
WT1 ₁₈₇ P1R	RLGEQQYSV	61	285	25	88/59.06%	0.690
WT1 ₁₈₇ P1T	TLGEQQYSV	62	285	25	93/62.42%	0.669

[0541] 表22

[0542]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	314	22	70/46.98%	0.802
WT1 ₁₂₆ P1D	DMFPNAPYL	63	24	21	63/42.28%	0.353
WT1 ₁₂₆ P1E	EMFPNAPYL	64	24	19	67/44.97%	0.501
WT1 ₁₂₆ P1H	HMFPNAPYL	65	11	22	65/43.62%	0.747
WT1 ₁₂₆ P1K	KMFPNAPYL	66	1099	23	71/47.65%	0.841
WT1 ₁₂₆ P1N	NMFPNAPYL	67	314	22	72/48.32%	0.734
WT1 ₁₂₆ P1P	PMFPNAPYL	68	7	19	60/40.27%	0.802
WT1 ₁₂₆ P1Q	QMFPNAPYL	69	314	22	69/46.31%	0.757
WT1 ₁₂₆ P1S	SMFPNAPYL	70	314	24	78/52.35%	0.819
WT1 ₁₂₆ P1T	TMFPNAPYL	71	314	22	75/50.34%	0.779

[0543] 表23

[0544]

肽	氨基酸序列	SEQ ID NO	HLA-A*0201 结合分值			
			BIMAS	SYFPEITHI	RANKPEP	NetMHC3.0
WT1 ₁₂₆	RMFPNAPYL	3	314	22	70/46.98%	0.802
WT1 ₁₂₆ P2I&P9I	RIFPNAPYI	72	29	20	75/50.34%	0.617
WT1 ₁₂₆ P2I&P9V	RIFPNAPYV	73	195	22	78/52.35%	0.722
WT1 ₁₂₆ P2L&P9I	RLFPNAPYI	74	212	22	86/57.72%	0.780
WT1 ₁₂₆ P2L&P9V	RLFPNAPYV	75	1415	24	89/59.73%	0.818

[0545] 选择至少在一个数据库中被预测为与野生型肽(WT1₁₈₇肽或WT1₁₂₆肽)相比具有相等或更高亲和性的修饰的肽,与野生型肽一起在下述的(2)到(4)中作为测试样品。

[0546] (2)肽制备物的制备和给药

[0547] 将在实施例13中合成并冷冻干燥的肽,在DMSO(由Nacalai Tesque, Inc.制造)中制备成40mg/mL的浓度。然后,将32.5μL制备的肽的DMSO溶液与540μL注射用蒸馏水(由Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.制造)混合。接下来,使用玻璃注射器将550μL混合物与700μL弗氏不完全佐剂(Montanide ISA-51)混合,以制备油包水乳液。通过将300μL制备物(油包水乳液)皮下注射到尾根,对表达HLA-A*0201的转基因小鼠(株系名称:HLA-A2+HLA-DR1+/Iaβ°β2m,EMMA ID号EM:01783)进行免疫接种。每种肽使用2或3只小鼠进行评估。

[0548] (3)脾细胞的制备

[0549] 在免疫接种后7天分离脾脏。通过在载玻片泡沫部分上进行摩擦,将脾脏压碎,然后使用ACK裂解缓冲液(由Lonza Co.制造)进行溶血处理来制备脾细胞。在该实验中,使用CTM(T细胞完全培养基:在RPMI-1640培养基(由Invitrogen Corporation制造)中添加有10%FBS,10mM HEPES,20mM L-谷氨酰胺,1mM丙酮酸钠,1mM MEM非必需氨基酸,1%MEM维生素和55μM 2-巯基乙醇,前提是这些浓度都是终浓度)作为脾细胞的培养基,细胞悬液被制备成浓度为 5×10^6 细胞/mL。

[0550] (4)Elispot方法

[0551] 通过ELISPOT方法,使用IFN γ 作为指标,检测了给药的肽是否具有诱导WT1特异性免疫细胞的活性。方法按照随附的手册进行。在以50μL/孔的量将CTM加入到用于ELISPOT的板(由BD Japan制造,目录号No.551083)中之后,在板中加入体积为100μL的脾细胞悬液(5×10^5 细胞/孔)。然后,向其中加入量为50μL/孔的给药的肽或野生型肽(肽的终浓度:2μg/mL)。该测定方法已知是能够预测细胞毒性活性的一种替代方法(J. Immunological Methods, 1995, 181, 45-54)。

[0552] <结果>

[0553] 对于修饰的WT1₁₈₇肽来说,诱导特异性细胞介导的免疫的活性的评估结果显示在图19到22和28到29中,对于修饰的WT1₁₂₆肽来说,显示在图23到27和30到32中。在图19到32的每张图中,垂直轴表示在 5×10^5 个脾细胞中抗原肽特异性应答细胞的数量(斑点/ 5×10^5 细胞),水平轴表示用于评估的个体小鼠(2或3只小鼠)。白色条表示在没有用抗原肽刺激的情况下应答的特异性免疫细胞的数量。灰色条表示对使用野生型肽的刺激应答的特异性免疫细胞的数量。黑色条表示对使用给药的(修饰)肽的刺激应答的特异性免疫细胞的数量。

[0554] 图19到32显示了下列肽诱导特异性细胞介导的免疫的相应活性:

[0555] 图19a:WT1₁₈₇P1A肽,b:WT1₁₈₇P1F肽,c:WT1₁₈₇P1G肽,d:WT1₁₈₇P1I肽,e:WT1₁₈₇P1L肽,f:WT1₁₈₇P1M肽。

[0556] 图20a:WT1₁₈₇P1V肽,b:WT1₁₈₇P1W肽,c:WT1₁₈₇P2I肽,d:WT1₁₈₇P2M肽,e:WT1₁₈₇P2Q肽,f:WT1₁₈₇P2V肽。

[0557] 图21a:WT1₁₈₇P3A肽,b:WT1₁₈₇P3F肽,c:WT1₁₈₇P3I肽,d:WT1₁₈₇P3L肽,e:WT1₁₈₇P3M肽,f:WT1₁₈₇P3P肽。

[0558] 图22a:WT1₁₈₇P3S肽,b:WT1₁₈₇P3V肽,c:WT1₁₈₇P3W肽,d:WT1₁₈₇P3Y肽,e:WT1₁₈₇P9L肽。

[0559] 图23a:WT1₁₂₆P1A肽,b:WT1₁₂₆P1F肽,c:WT1₁₂₆P1G肽,d:WT1₁₂₆P1I肽,e:WT1₁₂₆P1L肽,f:WT1₁₂₆P1M肽。

[0560] 图24a:WT1₁₂₆P1V肽,b:WT1₁₂₆P1W肽,c:WT1₁₂₆P2A肽,d:WT1₁₂₆P2I肽,e:WT1₁₂₆P2L肽,f:WT1₁₂₆P2Q肽。

[0561] 图25a:WT1₁₂₆P2V肽,b:WT1₁₂₆P3A肽,c:WT1₁₂₆P3G肽,d:WT1₁₂₆P3I肽,e:WT1₁₂₆P3L肽,f:WT1₁₂₆P3M肽。

[0562] 图26a:WT1₁₂₆P3P肽,b:WT1₁₂₆P3V肽,c:WT1₁₂₆P3W肽,d:WT1₁₂₆P9A肽,e:WT1₁₂₆P9I肽,f:WT1₁₂₆P9M肽。

[0563] 图27:WT1₁₂₆P9V肽。

[0564] 图28a:WT1₁₈₇P1D肽,b:WT1₁₈₇P1E肽,c:WT1₁₈₇P1H肽,d:WT1₁₈₇P1K肽。

[0565] 图29a:WT1₁₈₇P1N肽,b:WT1₁₈₇P1P肽,c:WT1₁₈₇P1Q肽,d:WT1₁₈₇P1R肽,e:WT1₁₈₇P1T肽。

[0566] 图30a:WT1₁₂₆P1D肽,b:WT1₁₂₆P1E肽,c:WT1₁₂₆P1H肽,d:WT1₁₂₆P1K肽,e:WT1₁₂₆P1N肽,f:WT1₁₂₆P1P肽。

[0567] 图31a:WT1₁₂₆P1Q肽,b:WT1₁₂₆P1S肽,c:WT1₁₂₆P1T肽,d:WT1₁₂₆P2I&P9I肽,e:WT1₁₂₆P2I&P9V肽,f:WT1₁₂₆P2L&P9I肽。

[0568] 图32:WT1₁₂₆P2L和P9V肽。

[0569] 如这些结果中显示的,当除了WT1₁₈₇P1D肽、WT1₁₈₇P1E肽、WT1₁₈₇P1H肽、WT1₁₈₇P1P肽和WT1₁₈₇P2Q肽,以及WT1₁₂₆P1D肽、WT1₁₂₆P1E肽、WT1₁₂₆P1P肽、WT1₁₂₆P2A肽和WT1₁₂₆P2Q肽之外的修饰的肽给药到小鼠中时,明显地以有效的方式诱导了特异性免疫细胞。

[0570] 接下来,分析了通过修饰的肽的刺激所诱导的特异性免疫细胞与野生型肽的交叉反应性(表24和25)。结果显示,特别是WT1₁₈₇修饰肽中的WT1₁₈₇P1A肽,WT1₁₈₇P1I肽,WT1₁₈₇P1L肽,WT1₁₈₇P1M肽,WT1₁₈₇P1N肽,WT1₁₈₇P1Q肽,T1₁₈₇P1T肽,WT1₁₈₇P1V肽,WT1₁₈₇P2V肽,WT1₁₈₇P2M肽,WT1₁₈₇P2I肽,WT1₁₈₇P3A肽,WT1₁₈₇P3F肽,WT1₁₈₇P3P肽,WT1₁₈₇P3S肽,WT1₁₈₇P3V肽和WT1₁₈₇P9L肽;以及WT1₁₂₆修饰肽中的WT1₁₂₆P1S肽,WT1₁₂₆P2I肽,WT1₁₂₆P2L肽,WT1₁₂₆P2V肽,WT1₁₂₆P3W肽,WT1₁₂₆P9I肽,WT1₁₂₆P9M肽和WT1₁₂₆P9V肽,能够诱导可以有效识别修饰的肽和野生型肽二者的特异性免疫细胞。

[0571] 表24

[0572]

交叉反应性 (%)	修饰的 WT1 ₁₈₇ 肽			
	在第 1 位修饰	在第 2 位修饰	在第 3 位修饰	在第 9 位修饰
80-100	WT1 ₁₈₇ P1A WT1 ₁₈₇ P1N WT1 ₁₈₇ P1Q WT1 ₁₈₇ P1T WT1 ₁₈₇ P1V	WT1 ₁₈₇ P2V WT1 ₁₈₇ P2M WT1 ₁₈₇ P2I	WT1 ₁₈₇ P3A WT1 ₁₈₇ P3P WT1 ₁₈₇ P3S	WT1 ₁₈₇ P9L
60-80	WT1 ₁₈₇ P1I WT1 ₁₈₇ P1L WT1 ₁₈₇ P1M		WT1 ₁₈₇ P3F WT1 ₁₈₇ P3V	
40-60	WT1 ₁₈₇ PIR		WT1 ₁₈₇ P3Y	
20-40	WT1 ₁₈₇ P1F WT1 ₁₈₇ P1W		WT1 ₁₈₇ P3L	
0-20	WT1 ₁₈₇ P1G WT1 ₁₈₇ P1K		WT1 ₁₈₇ P3I WT1 ₁₈₇ P3M WT1 ₁₈₇ P3W	
ND*	WT1 ₁₈₇ P1D WT1 ₁₈₇ P1E WT1 ₁₈₇ P1H WT1 ₁₈₇ P1P	WT1 ₁₈₇ P2Q		

[0573] 表25

[0574]

交叉反应性 (%)	修饰的 WT1 ₁₂₆ 肽				
	在第 1 位修饰	在第 2 位修饰	在第 3 位修饰	在第 9 位修饰	在第 2&9 位修饰
80-100		WT1 ₁₂₆ P2L WT1 ₁₂₆ P2V	WT1 ₁₂₆ P3W	WT1 ₁₂₆ P9M WT1 ₁₂₆ P9I	
60-80	WT1 ₁₂₆ P1S	WT1 ₁₂₆ P2I		WT1 ₁₂₆ P9V	
40-60	WT1 ₁₂₆ P1A WT1 ₁₂₆ P1H WT1 ₁₂₆ P1K WT1 ₁₂₆ P1M WT1 ₁₂₆ P1N				
20-40	WT1 ₁₂₆ P1G WT1 ₁₂₆ P1I WT1 ₁₂₆ P1Q WT1 ₁₂₆ P1W			WT1 ₁₂₆ P9A	
0-20	WT1 ₁₂₆ P1F WT1 ₁₂₆ P1L WT1 ₁₂₆ P1T WT1 ₁₂₆ P1V		WT1 ₁₂₆ P3A WT1 ₁₂₆ P3G WT1 ₁₂₆ P3I WT1 ₁₂₆ P3L WT1 ₁₂₆ P3M WT1 ₁₂₆ P3P WT1 ₁₂₆ P3V		WT1 ₁₂₆ P2I&P9I WT1 ₁₂₆ P2I&P9V WT1 ₁₂₆ P2L&P9I WT1 ₁₂₆ P2L&P9V
ND*	WT1 ₁₂₆ P1D WT1 ₁₂₆ P1E WT1 ₁₂₆ P1P	WT1 ₁₂₆ P2Q WT1 ₁₂₆ P2A			
ND*: 由于没有显示活性而未测量					

[0575] 工业实用性

[0576] 本发明的癌症疫苗组合物可用作药物,用于在HLA-A*0206阳性人员中治疗和预防表达WT1的癌症。本发明的癌症疫苗组合物还可用作药物,用于在HLA-A*0201阳性人员中治疗和预防表达WT1的癌症。

序列表

<110> 株式会社癌免疫研究所

<120> 癌症疫苗组合物

<130> SPI162029-91

<150> JP2007-314552

<151> 2007-12-05

<160> 75

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

[0001]

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

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

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
165 170 175

[0002] Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270

	Ser	Asp	Asn	His	Thr	Thr	Pro	Ile	Leu	Cys	Gly	Ala	Gln	Tyr	Arg	Ile	
		275						280							285		
	His	Thr	His	Gly	Val	Phe	Arg	Gly	Ile	Gln	Asp	Val	Arg	Arg	Val	Pro	
		290						295					300				
	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Val	Arg	Ser	Ala	Ser	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	
	305					310					315					320	
	Arg	Pro	Phe	Met	Cys	Ala	Tyr	Pro	Gly	Cys	Asn	Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	
				325						330						335	
	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg	Lys	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	
				340						345					350		
[0003]	Tyr	Gln	Cys	Asp	Phe	Lys	Asp	Cys	Glu	Arg	Arg	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	
			355						360					365			
	Gln	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Arg	His	Thr	Gly	Val	Lys	Pro	Phe	Gln	
		370						375					380				
	Cys	Lys	Thr	Cys	Gln	Arg	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	His	Leu	Lys	Thr	
	385					390					395					400	
	His	Thr	Arg	Thr	His	Thr	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu	Lys	Pro	Phe	Ser	Cys	
					405					410					415		
	Arg	Trp	Pro	Ser	Cys	Gln	Lys	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Val	
				420						425					430		
	Arg	His	His	Asn	Met	His	Gln	Arg	Asn	Met	Thr	Lys	Leu	Gln	Leu	Ala	
			435						440					445			

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 2

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 3

<211> 9

[0004] <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 3

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 4

Gly Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 5

Ala Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

[0005]

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 6

Val Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 7

Leu Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 8

Ile Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

[0006]

<223> Synthetic peptide

<400> 9

Met Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 10

Trp Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 11

Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

[0007]

<400> 12

Tyr Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 13

Ser Val Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 14

Ser Gln Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 15

[0008]

Ser Ile Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 16

Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 17

Ser Leu Leu Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 18

Ser Leu Ala Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

[0009]

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 19

Ser Leu Val Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 20

Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 21

Ser Leu Pro Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

[0010]

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 22

Ser Leu Trp Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 23

Ser Leu Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 24

Ser Leu Tyr Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

[0011]

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 25

Ser Leu Ser Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 26

Ser Leu Ile Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 27

Gly Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

[0012]

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 28

Ala Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 29

Val Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 30

Leu Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

[0013]

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 31

Ile Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 32

Met Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 33

Trp Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

[0014]

<400> 34

Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 35

Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 36

Arg Val Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 37

[0015]

Arg Gln Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 38

Arg Ala Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 39

Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 40

Arg Ile Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

[0016]

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 41

Arg Met Ile Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 42

Arg Met Leu Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 43

Arg Met Gly Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

[0017]

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 44

Arg Met Ala Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 45

Arg Met Val Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 46

Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

[0018]

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 47

Arg Met Pro Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 48

Arg Met Trp Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 49

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

[0019]

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 50

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 51

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 52

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Met

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

[0020]

<223> Synthetic peptide

<400> 53

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Leu

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 54

Asp Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

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

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 55

Glu Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

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

<220>
<223> Synthetic peptide

[0021]

<400> 56

His Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 57

Lys Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5

<210> 58
<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 58

Asn Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 59

[0022]

Pro Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 60

Gln Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 61

Arg Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 62

Thr Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1 5

[0023]

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 63

Asp Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 64

Glu Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 65

His Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

[0024]

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 66

Lys Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 67

Asn Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 68

Pro Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

[0025]

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 69

Gln Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 70

Ser Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 71

Thr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

[0026]

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 72

Arg Ile Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 73

Arg Ile Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 74

Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile

1 5

[0027]

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 75

Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val

1 5

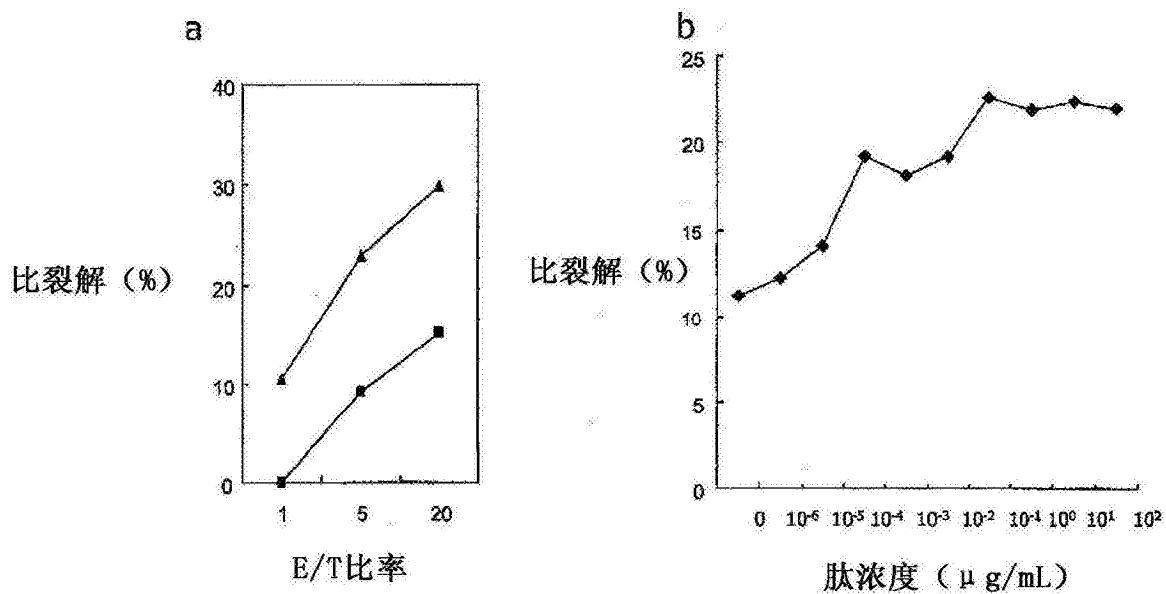


图1

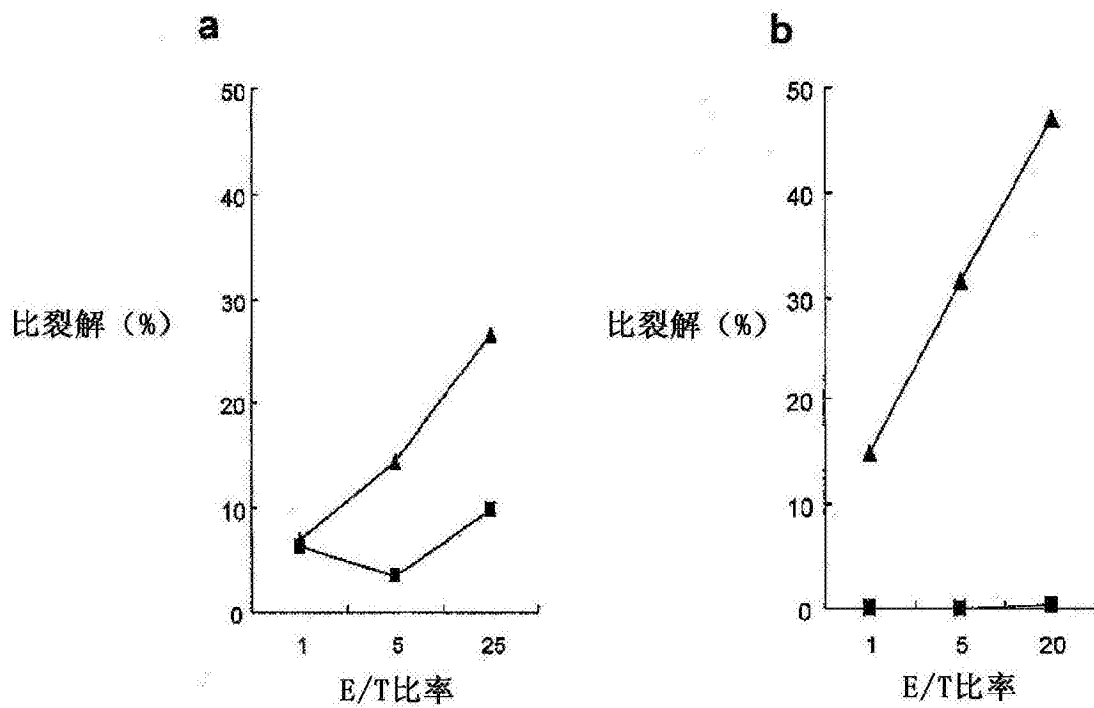


图2

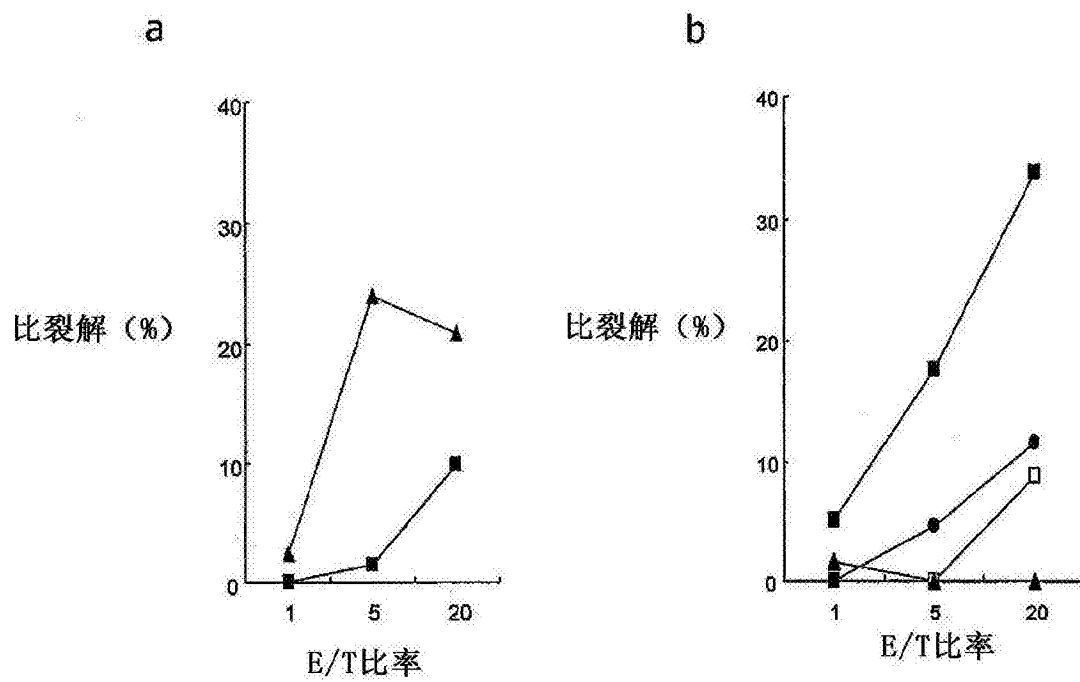


图3

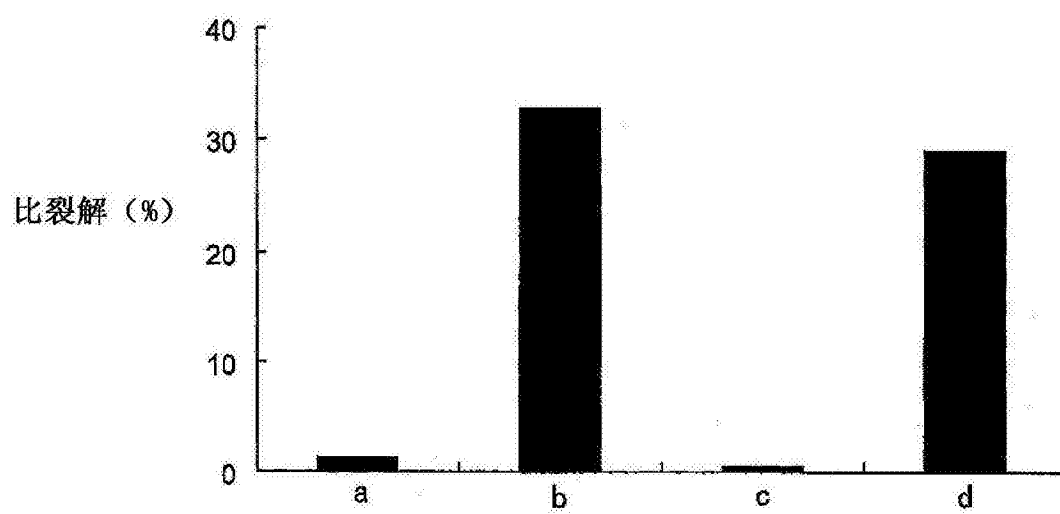


图4

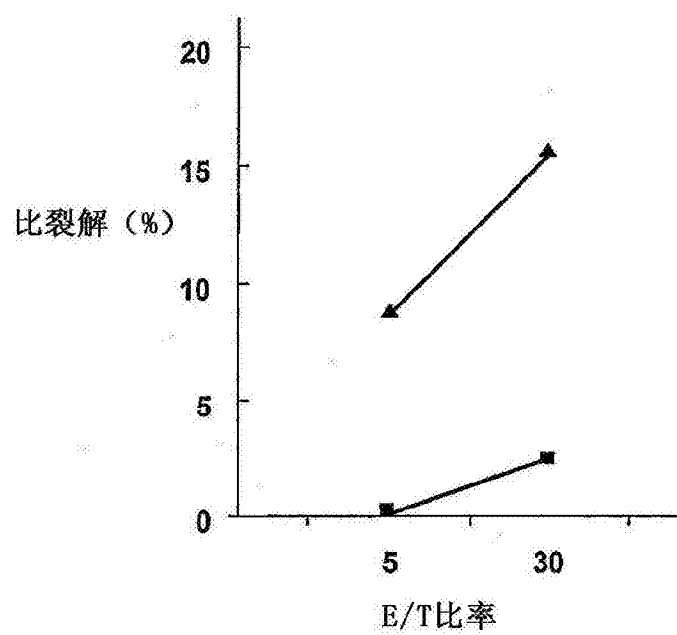


图5

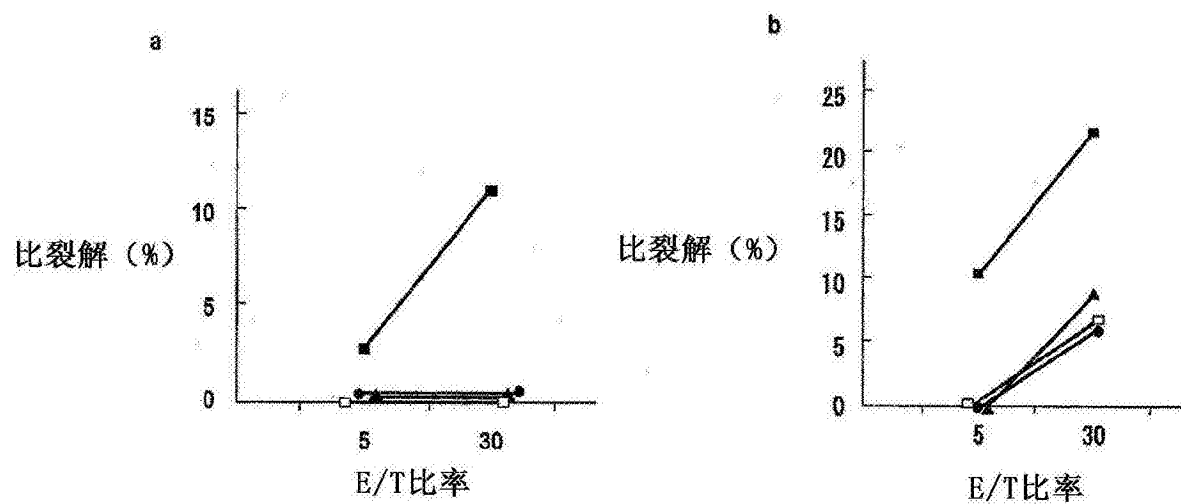


图6

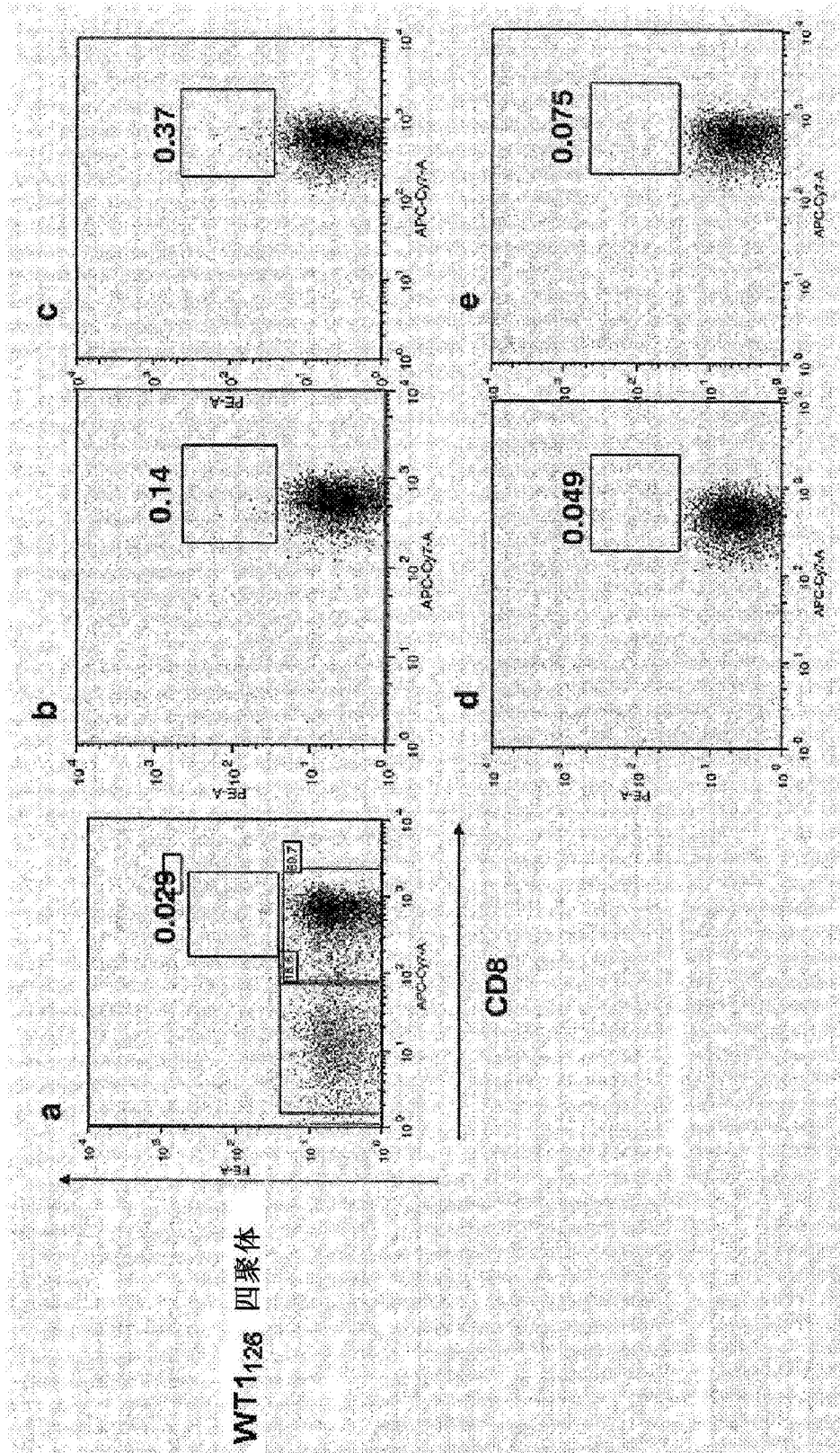


图7

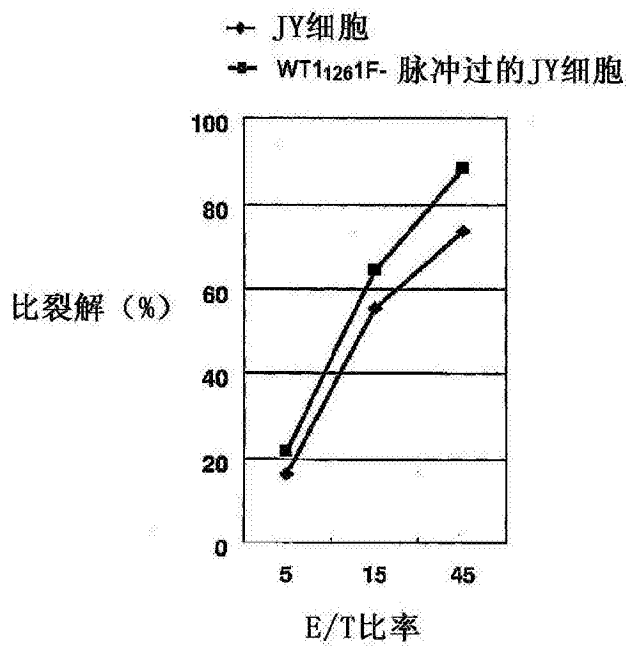


图8

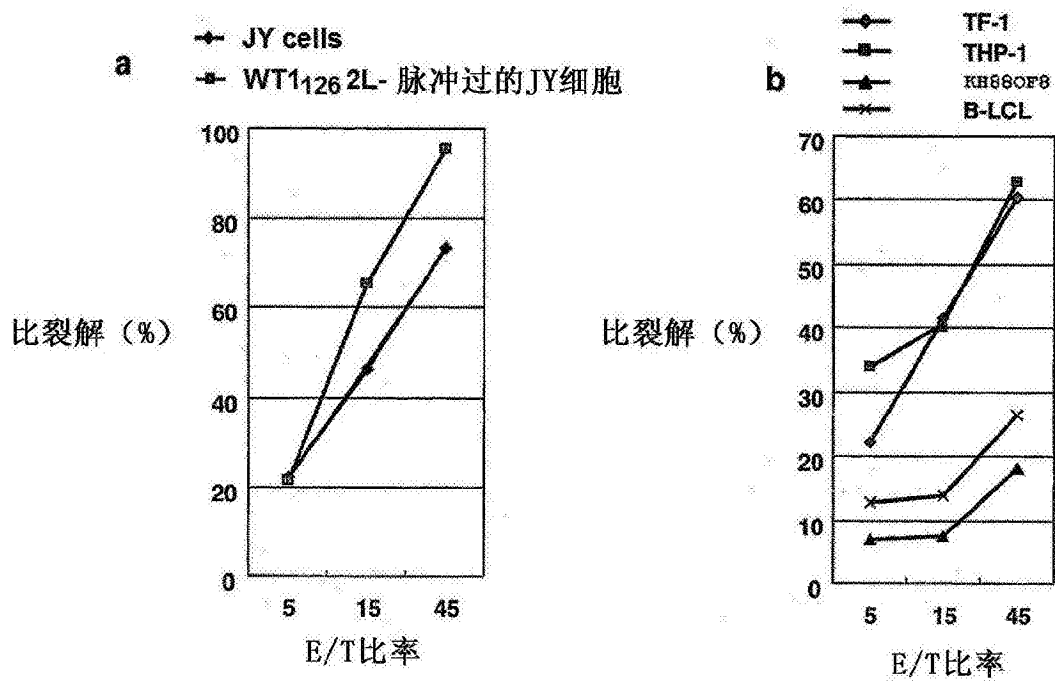


图9

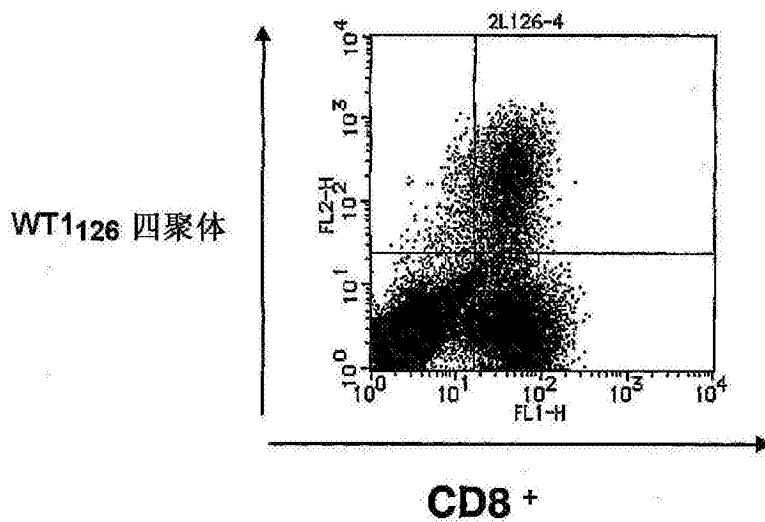


图10

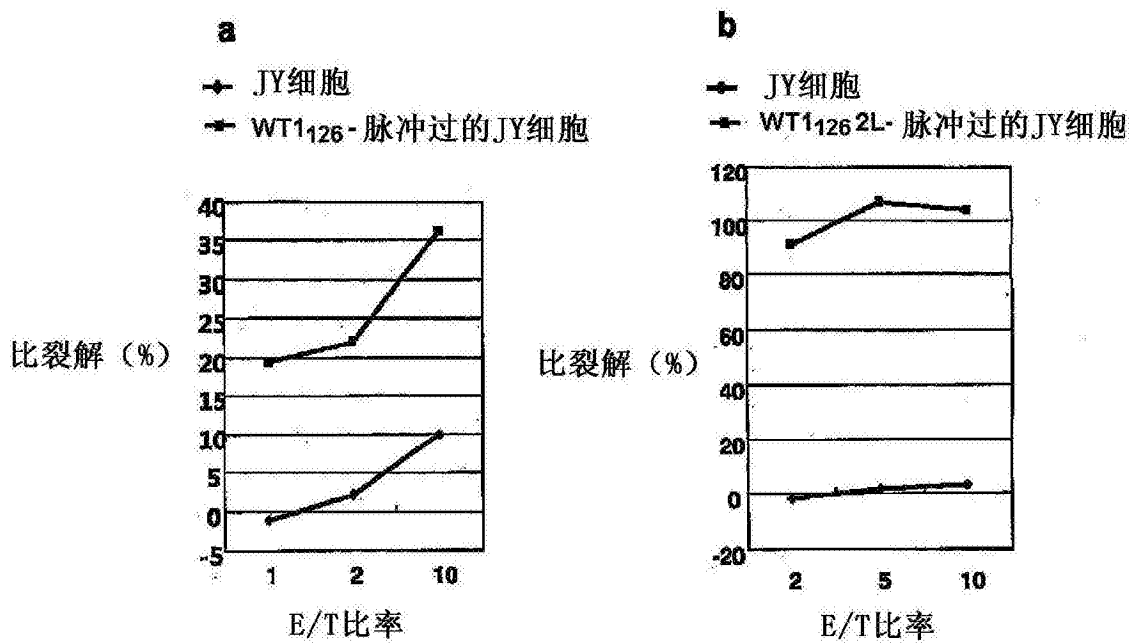


图11

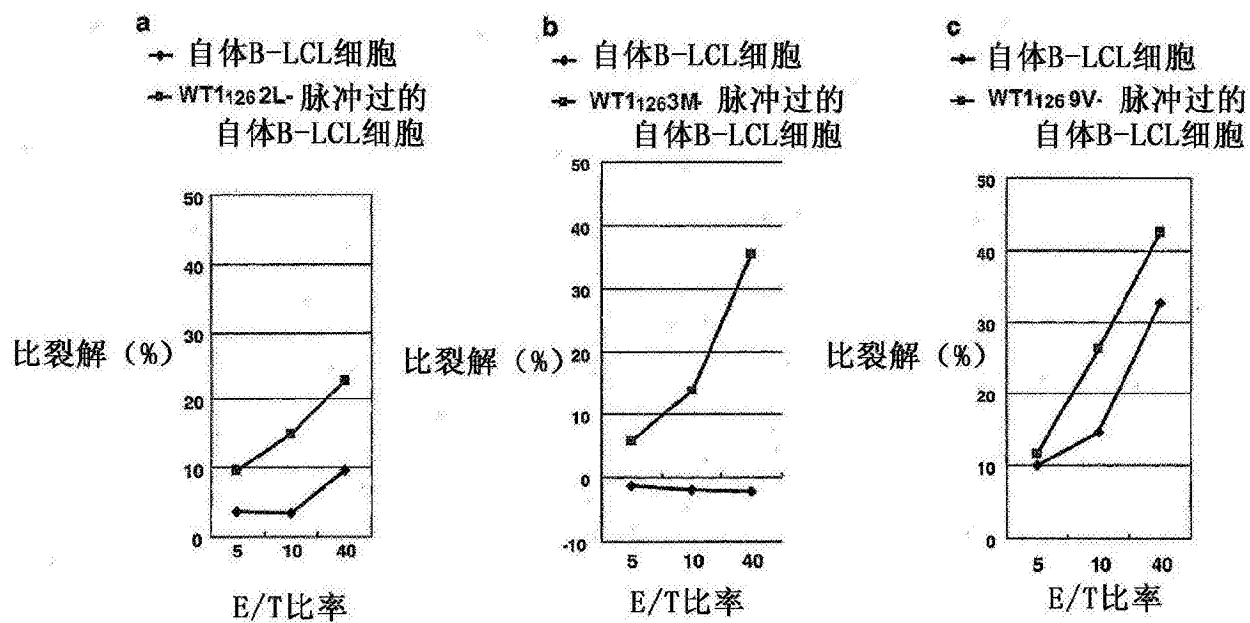


图12

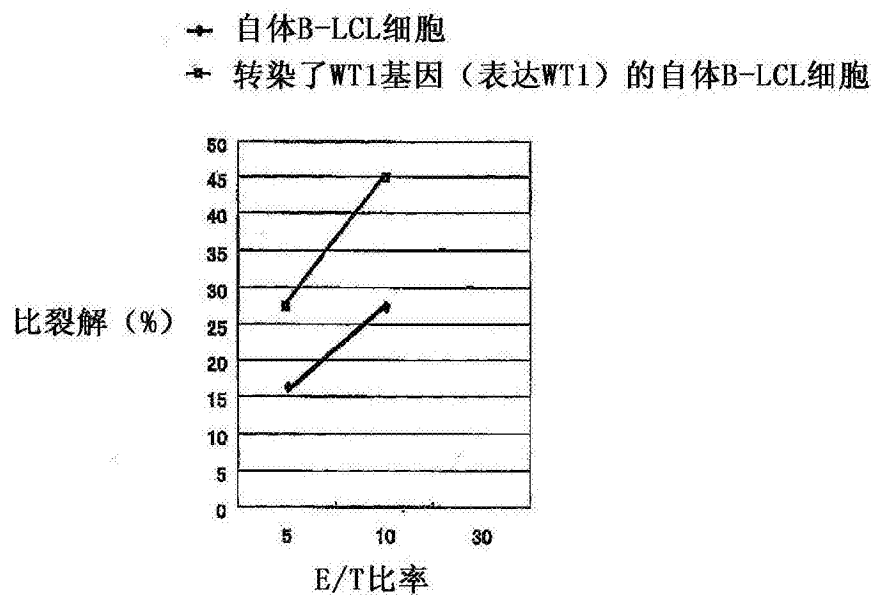


图13

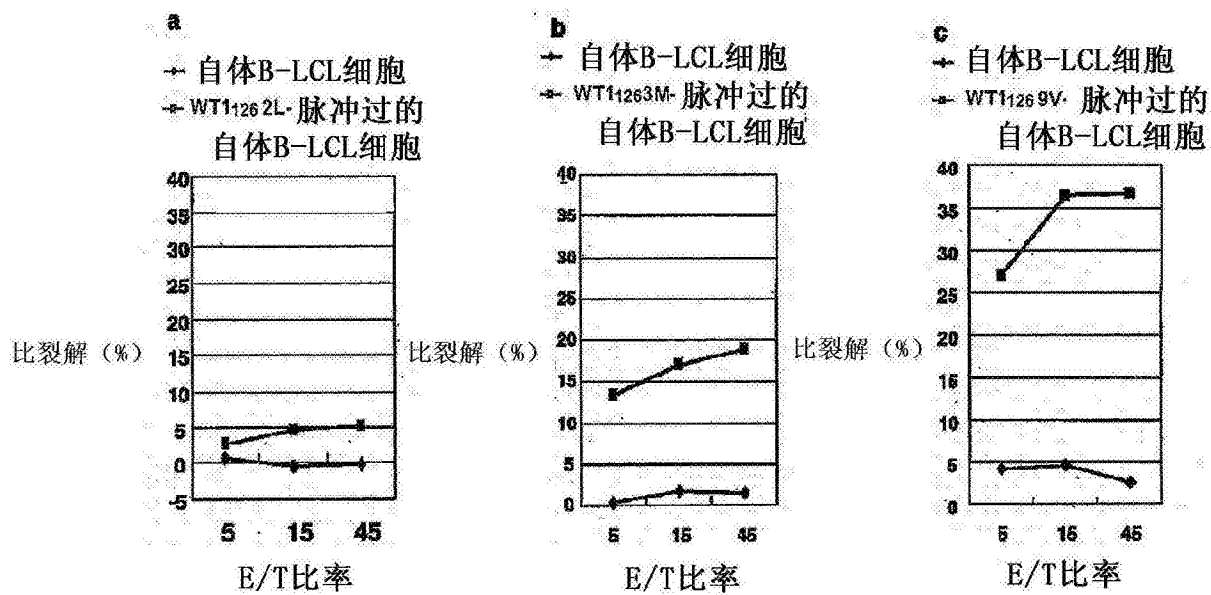


图14

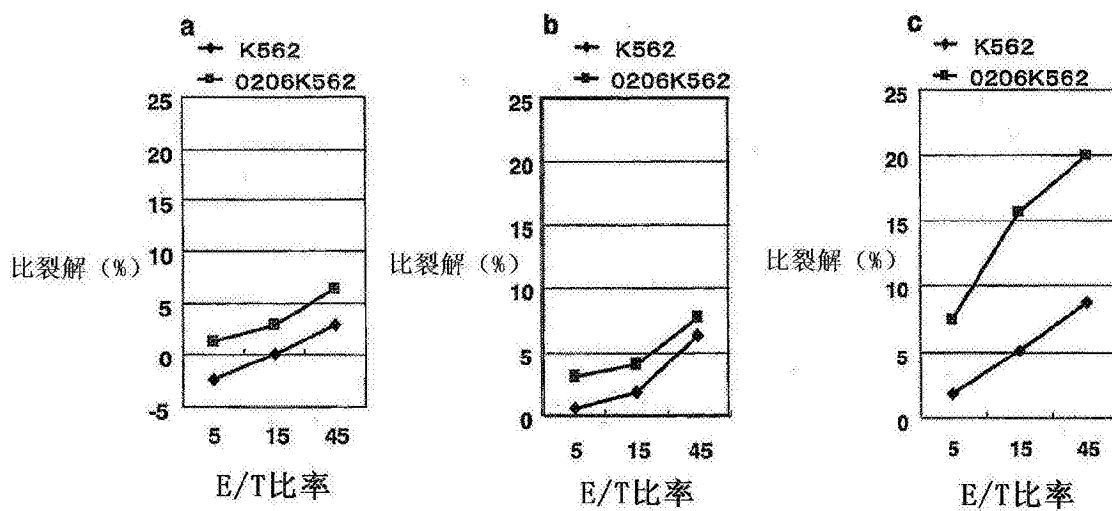


图15

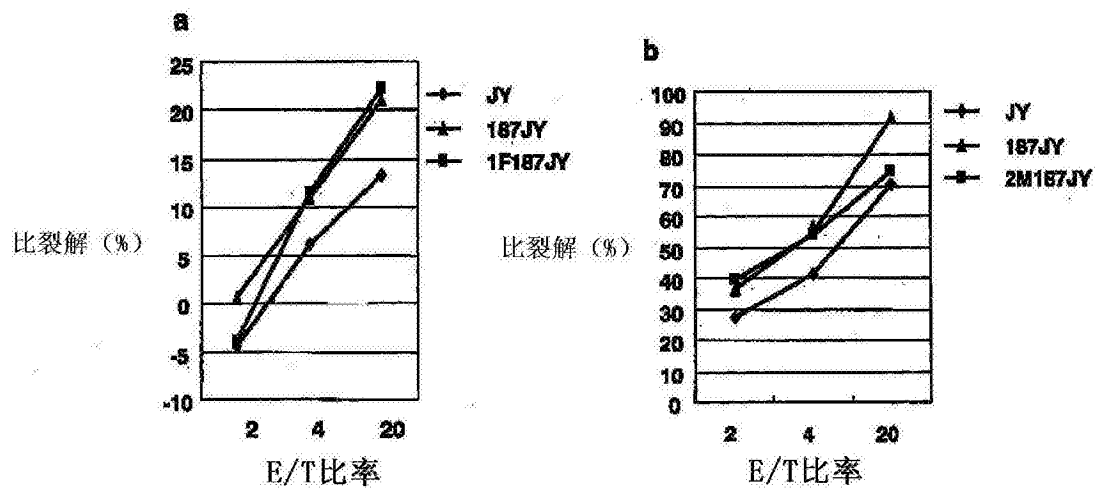


图16

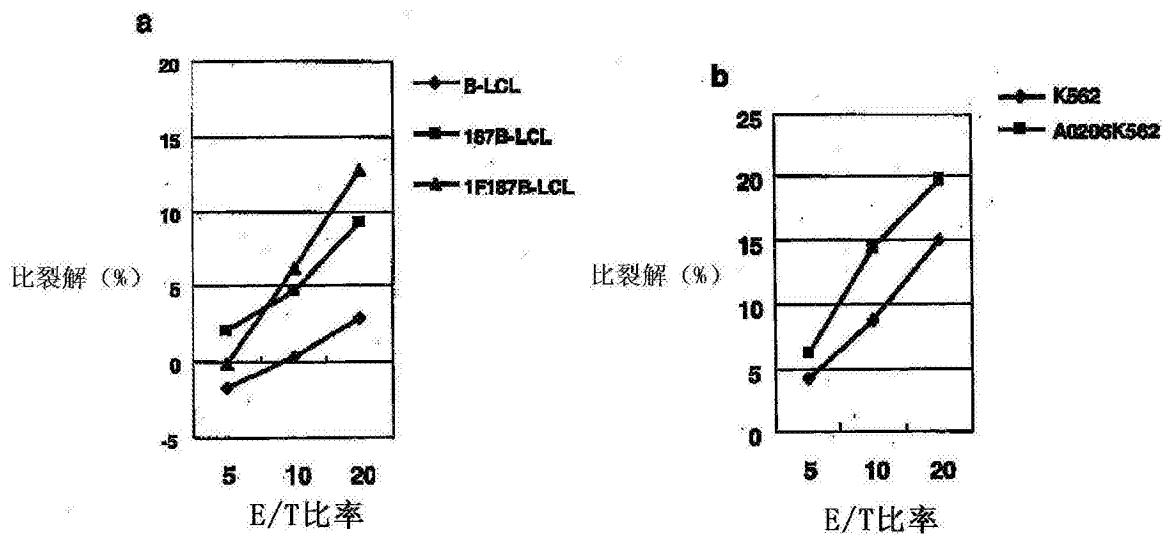


图17

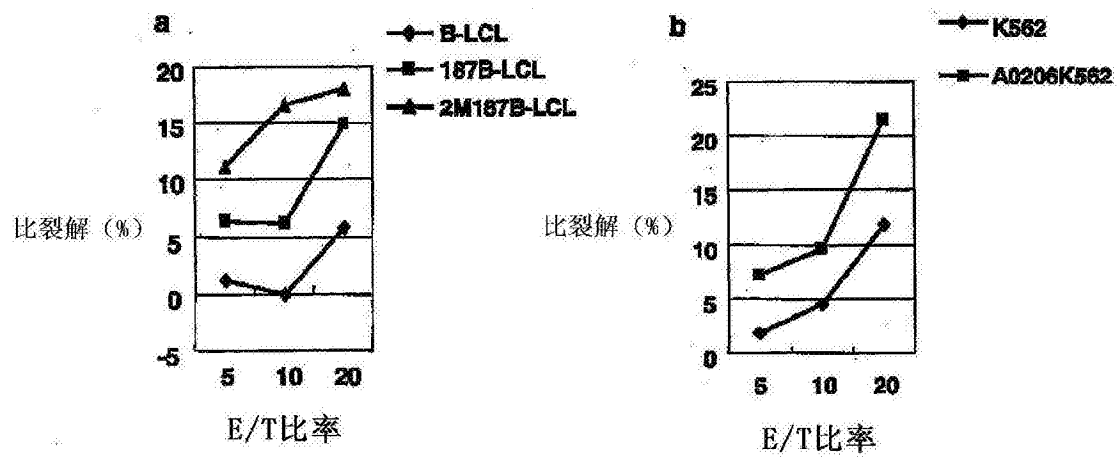


图18

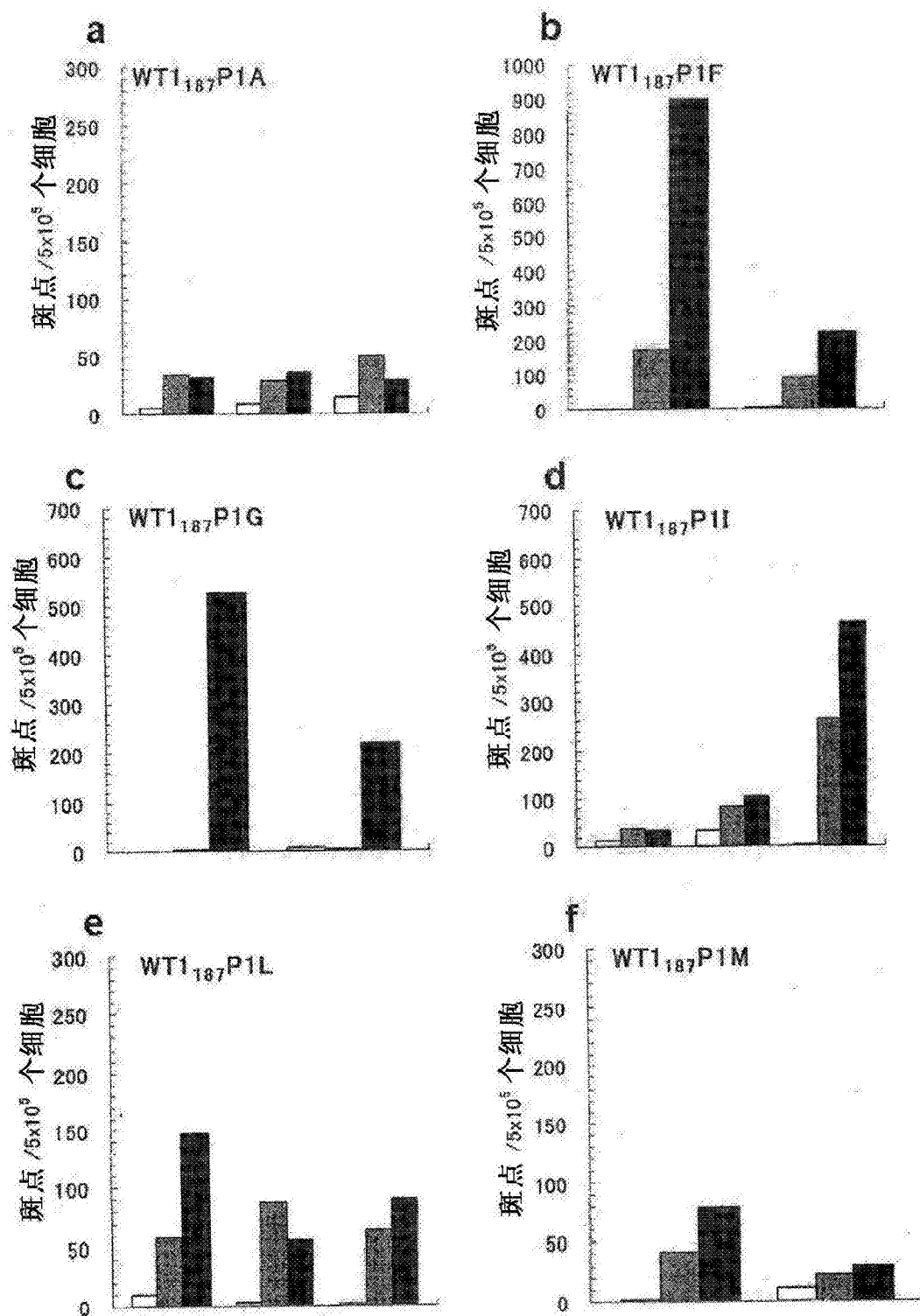


图19

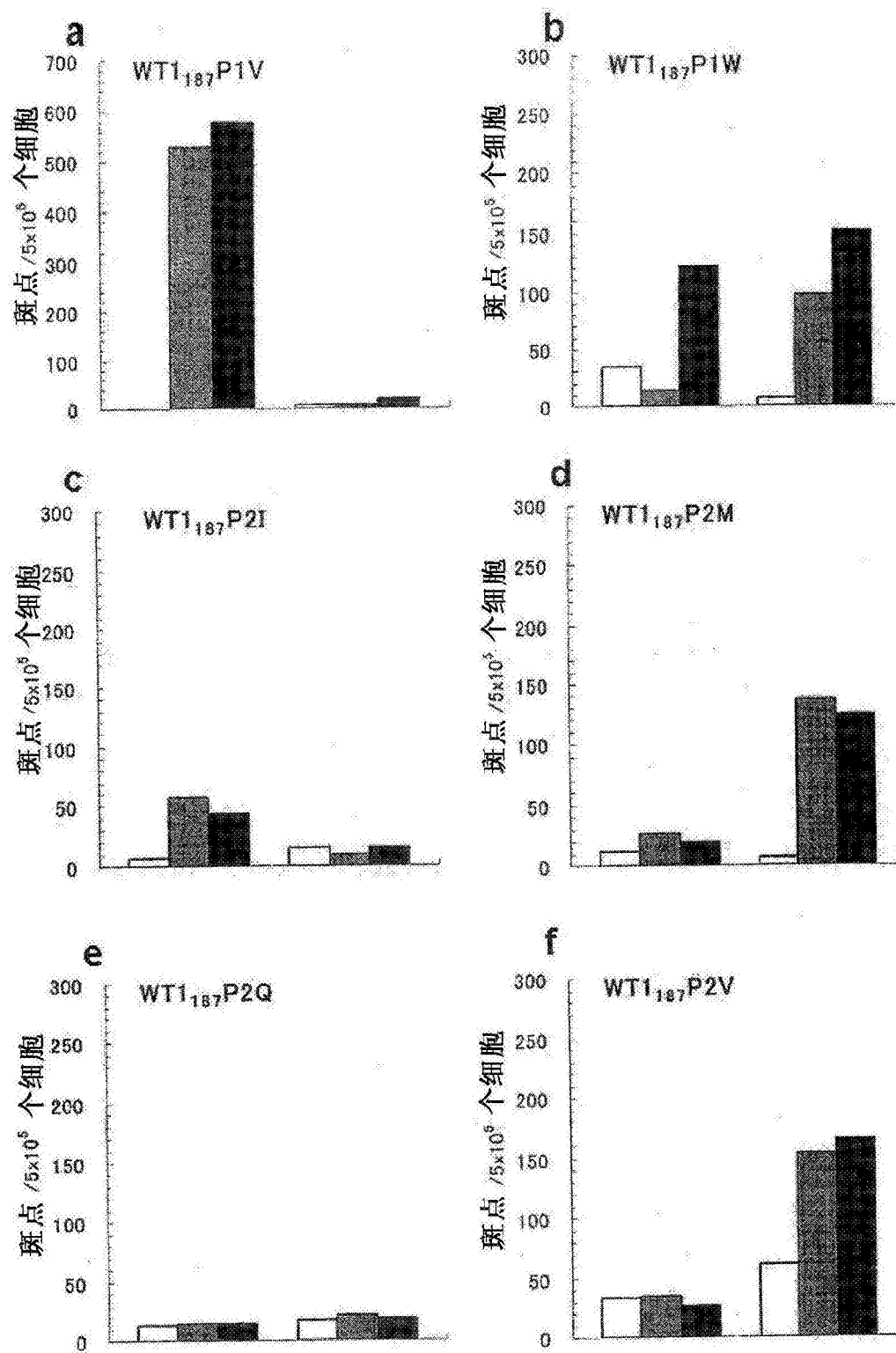


图20

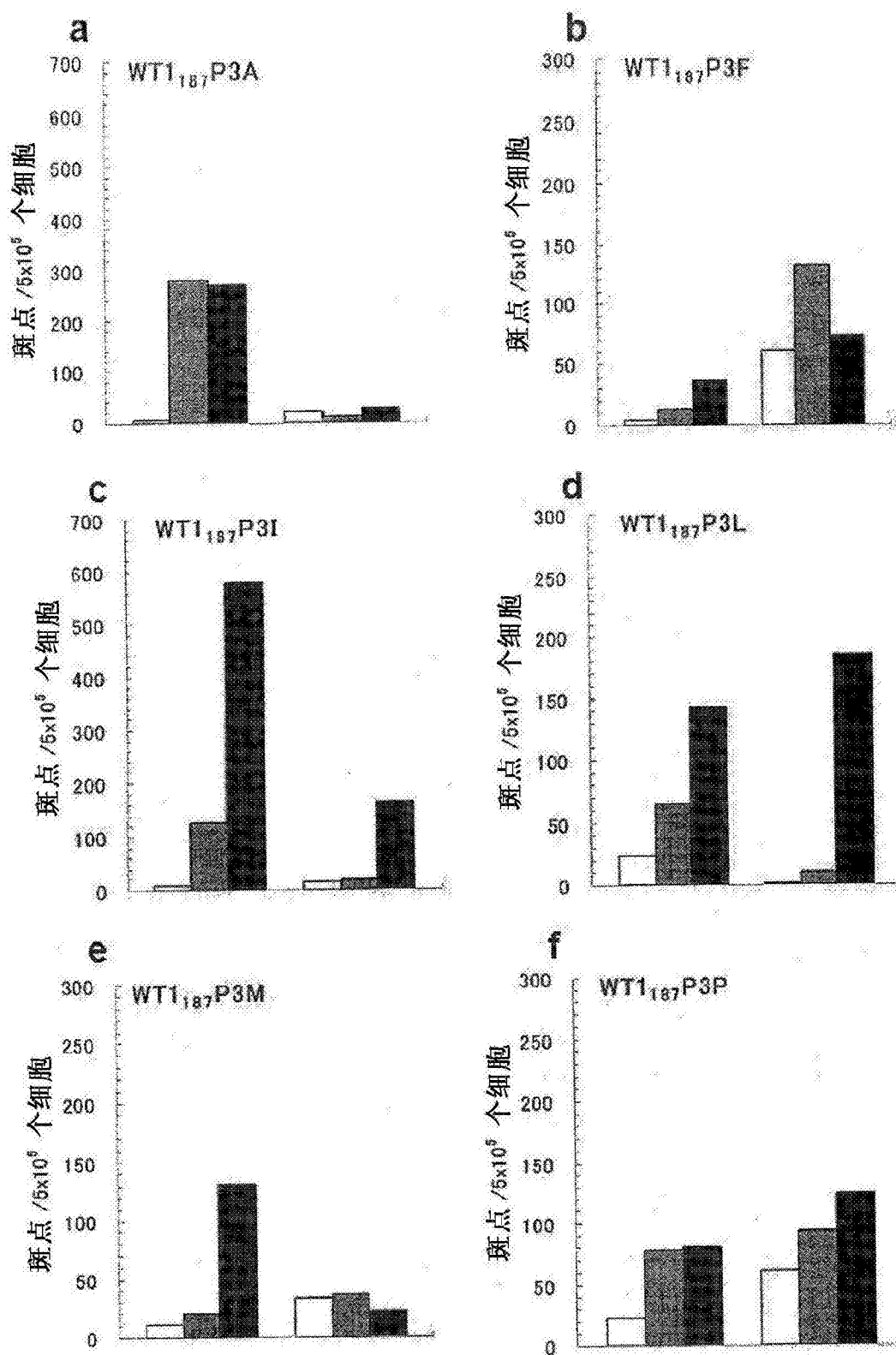


图21

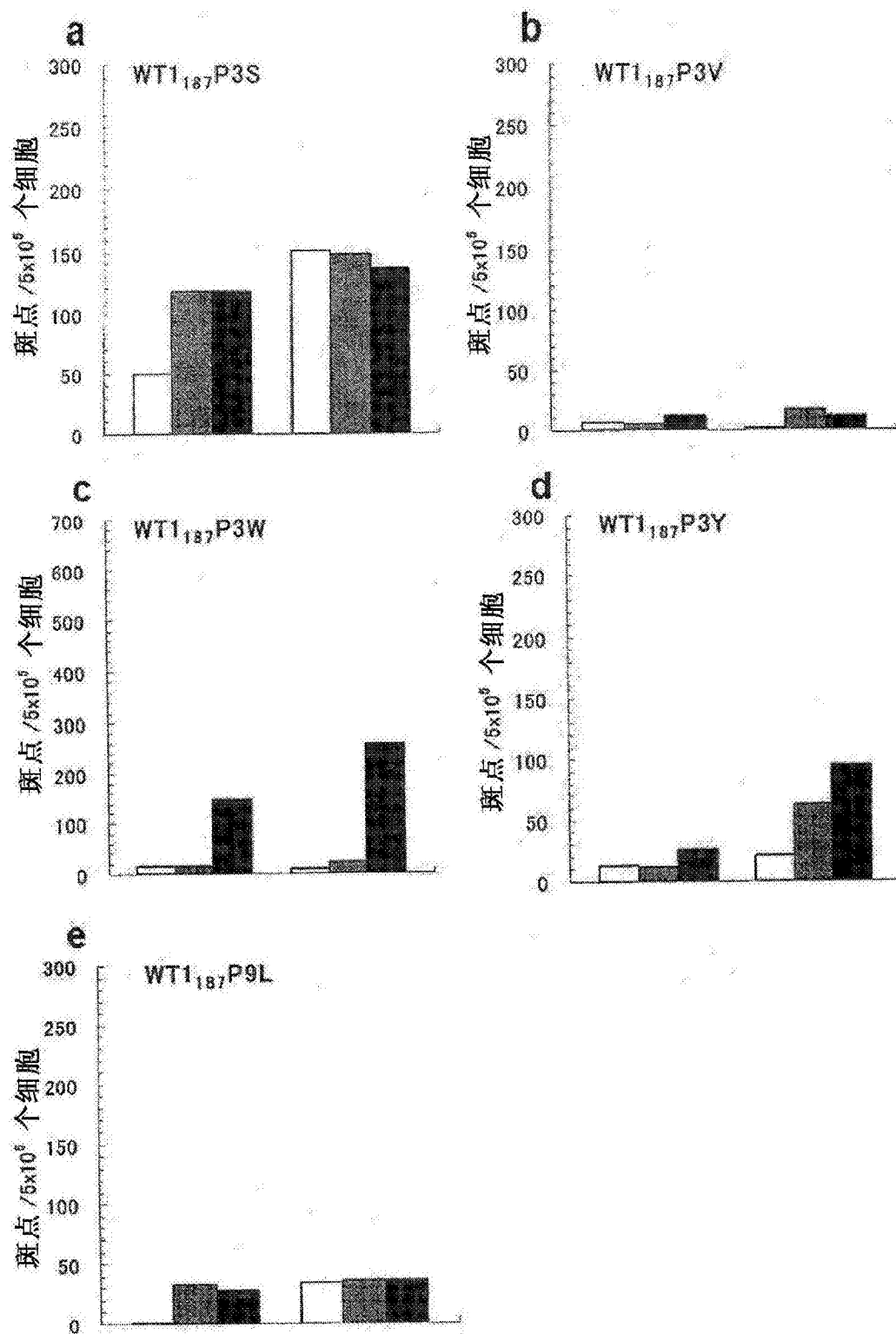


图22

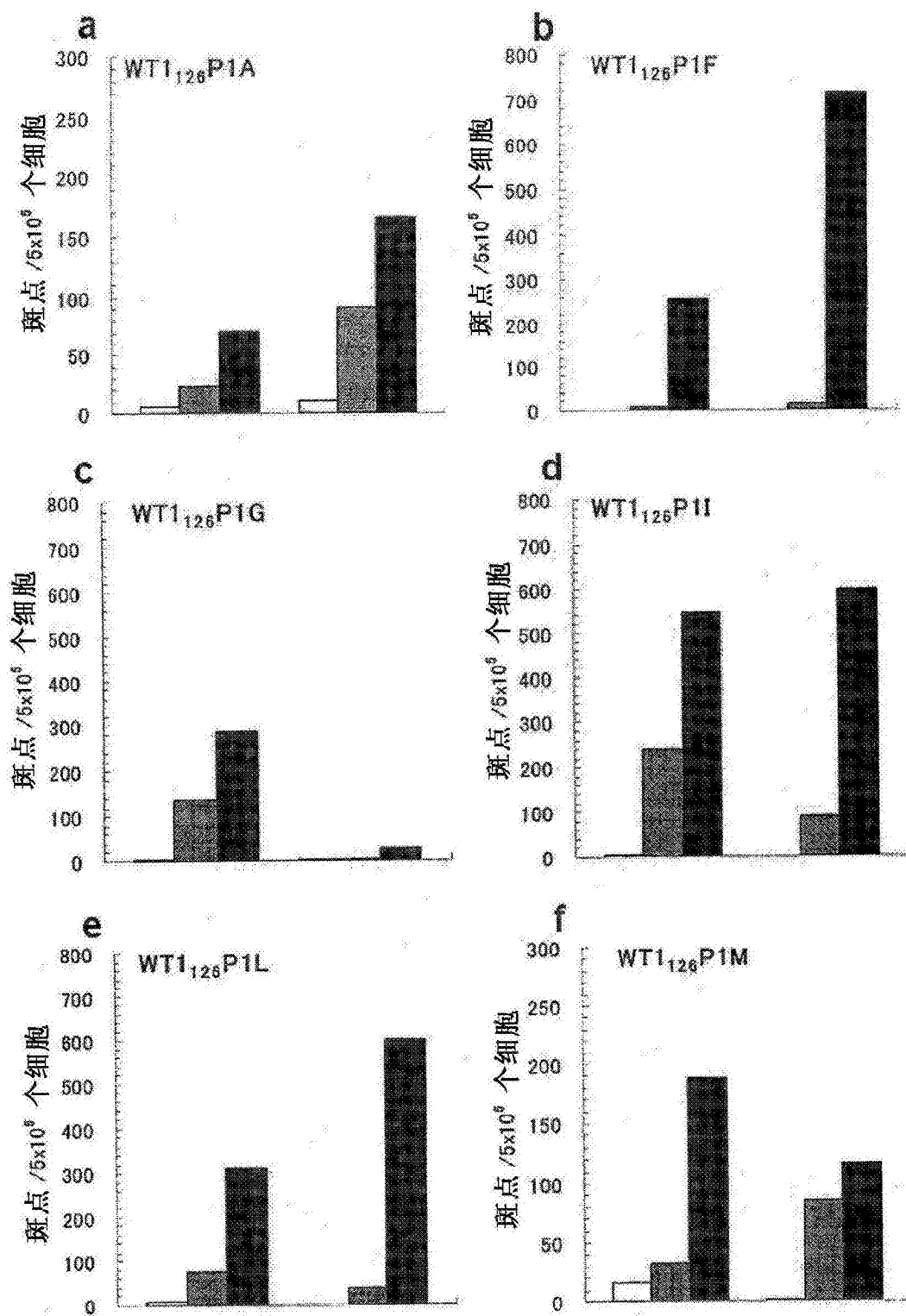


图23

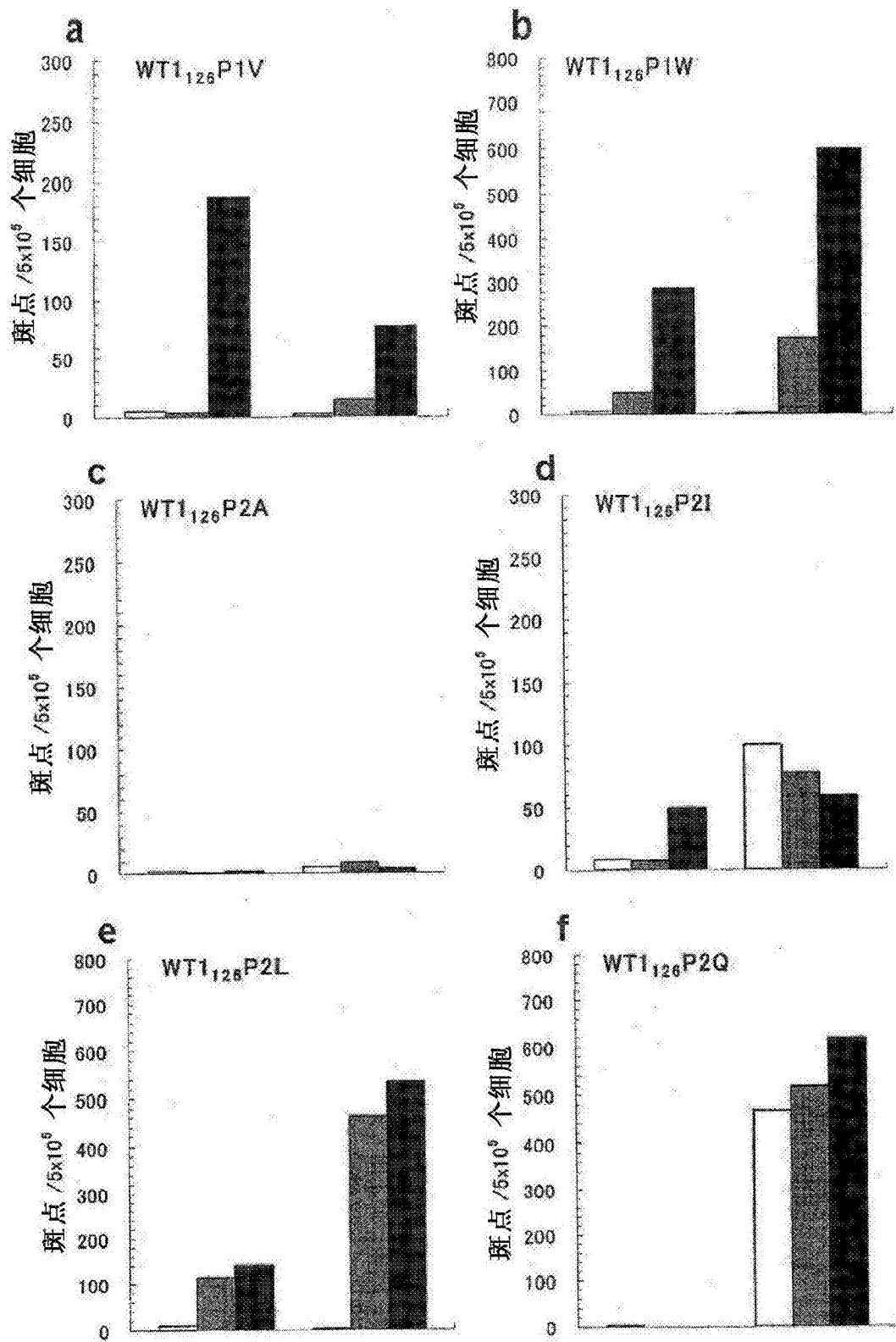


图24

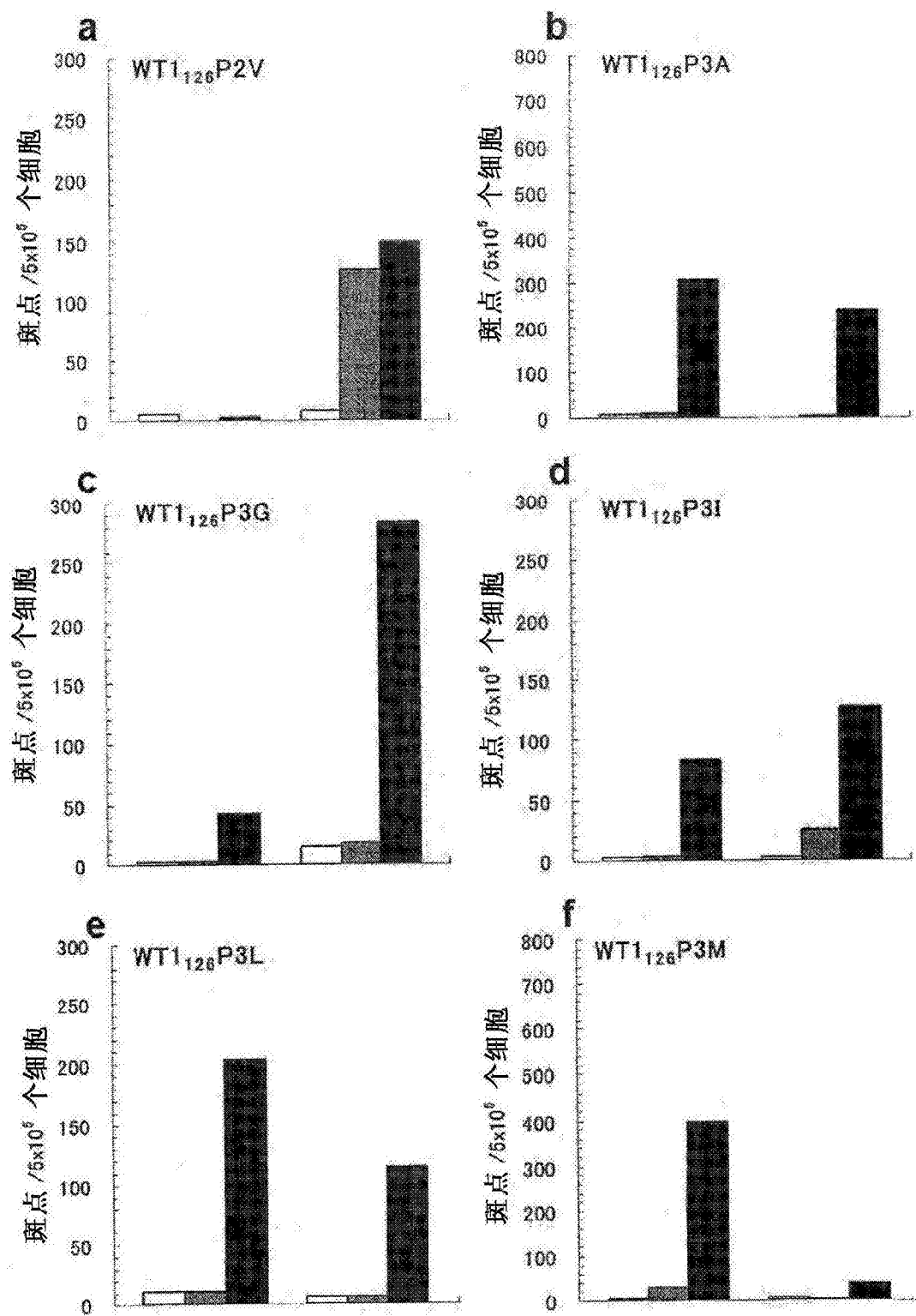


图25

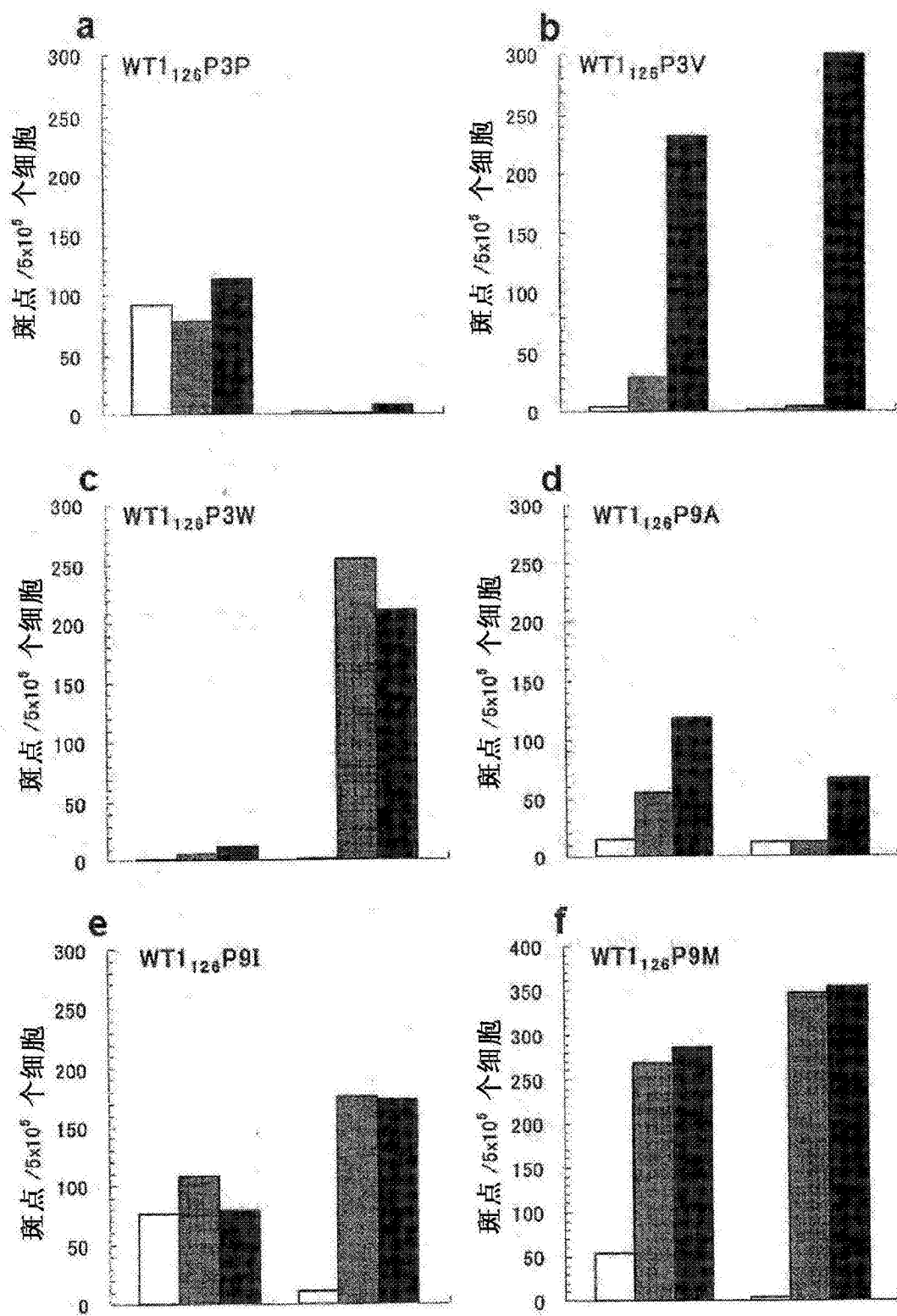


图26

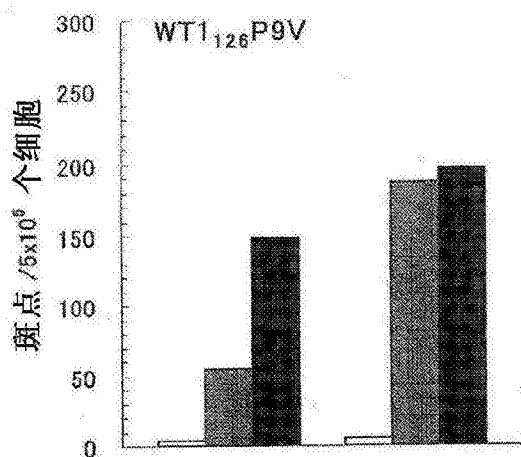


图27

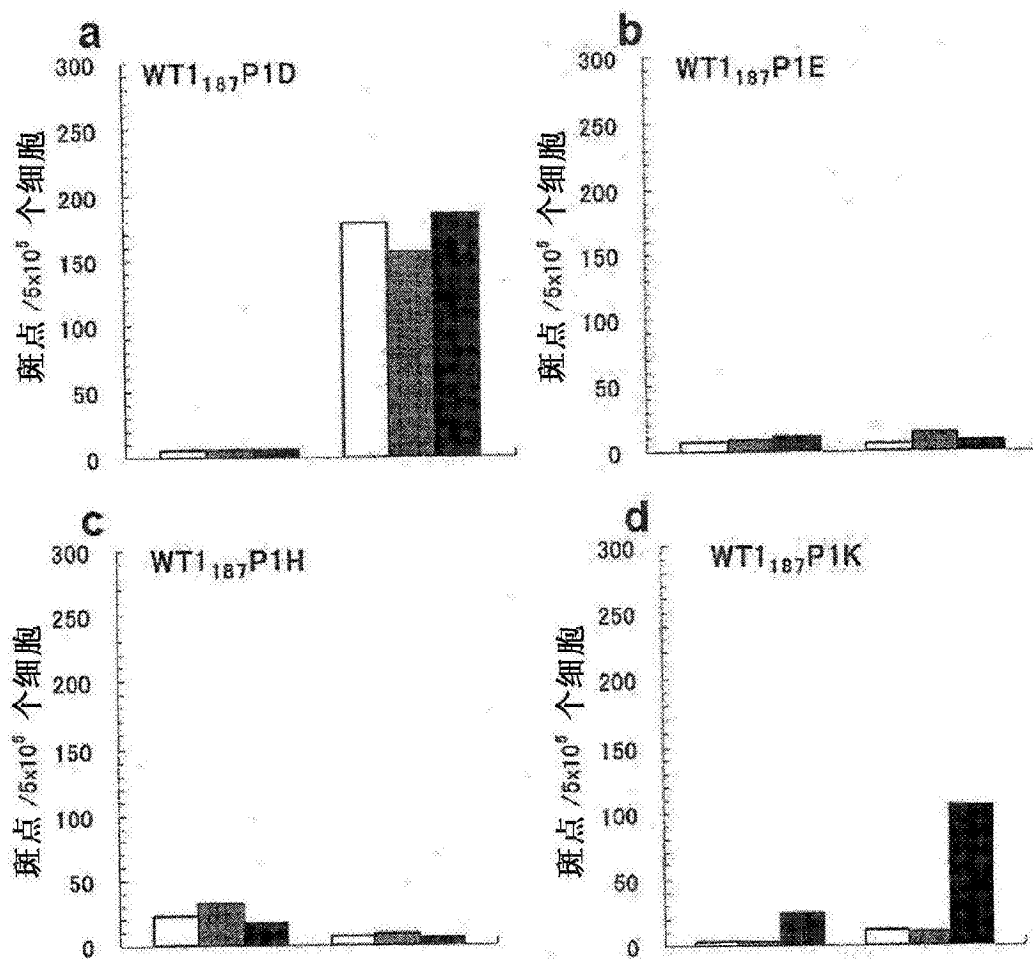


图28

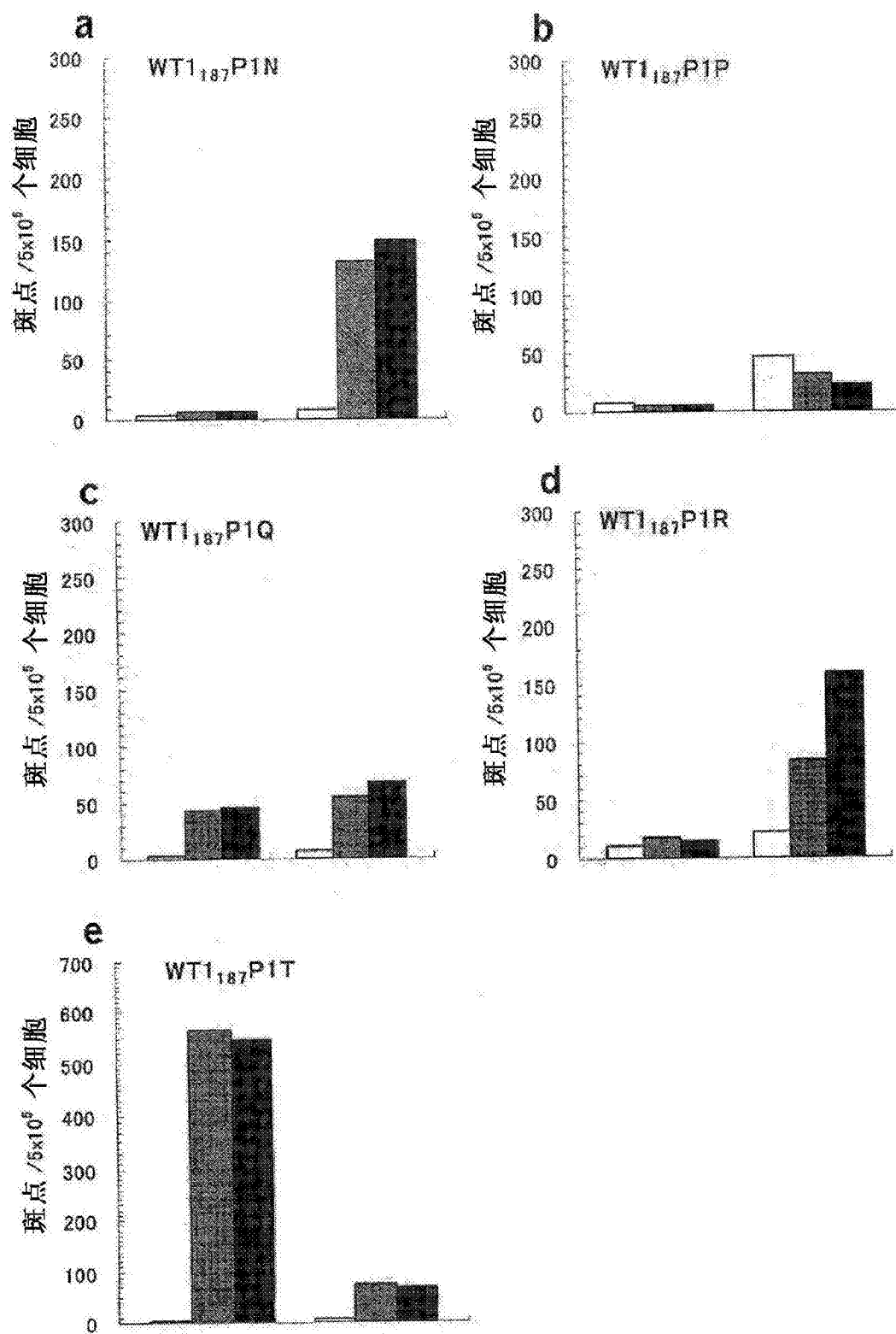


图29

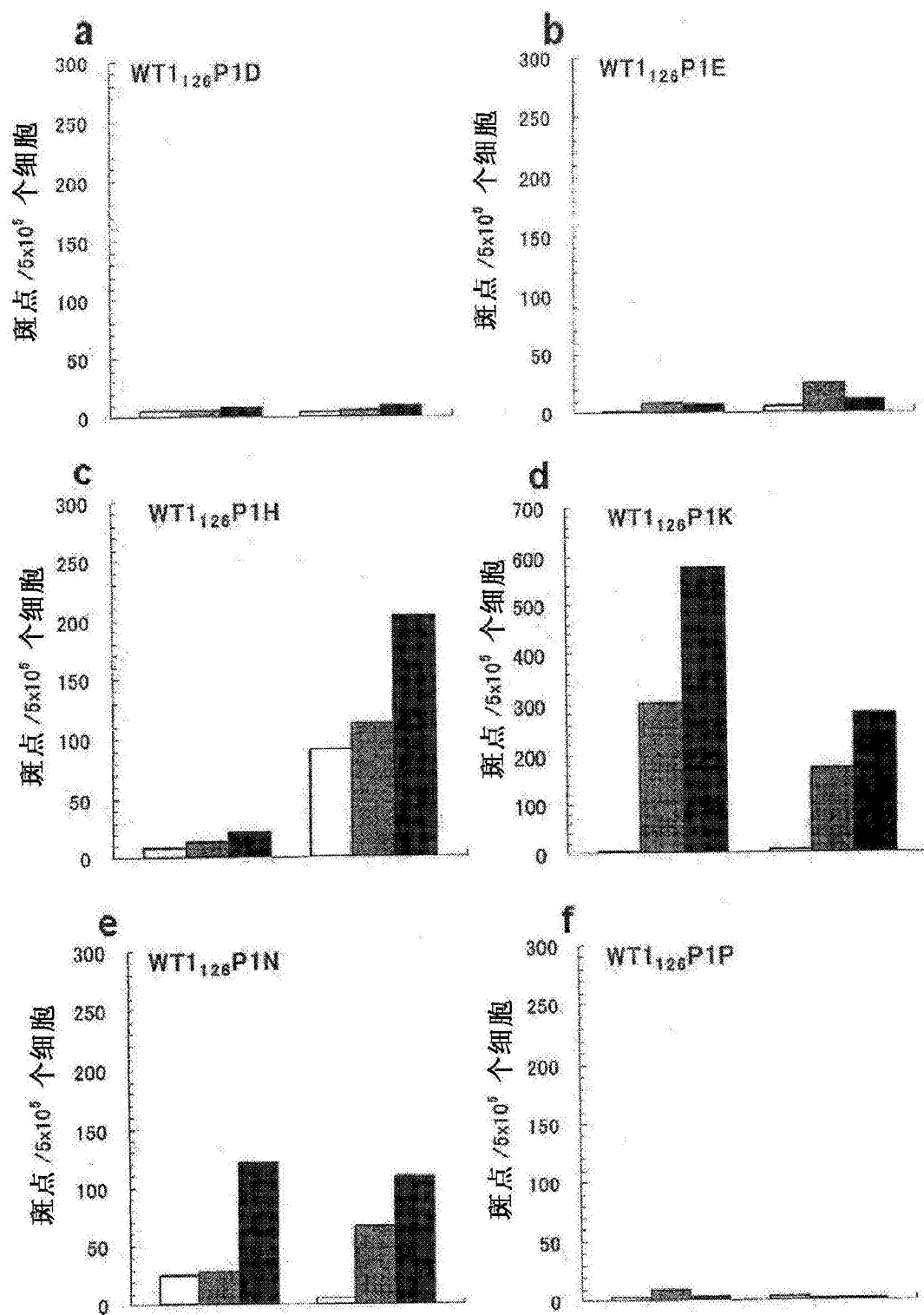


图30

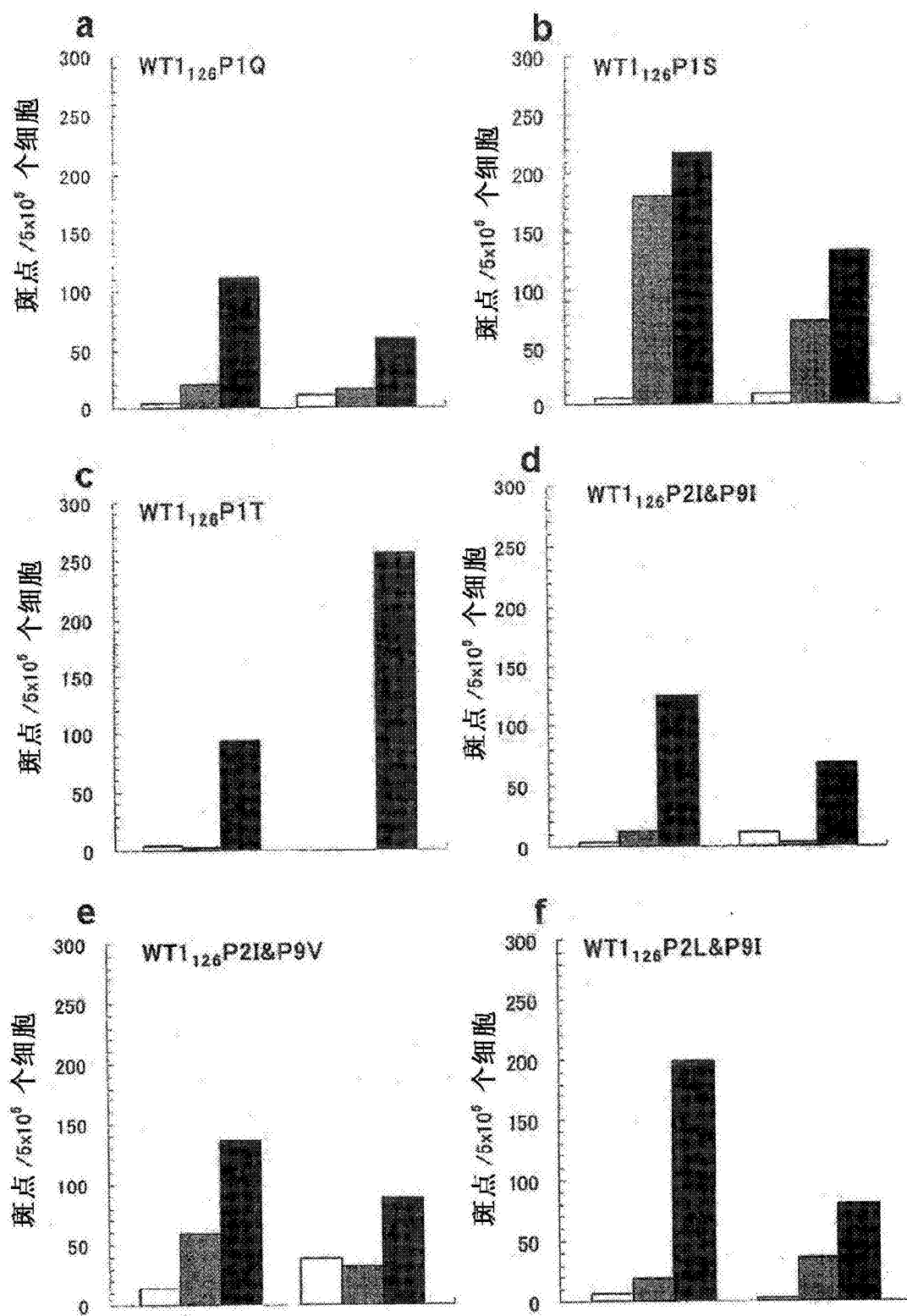


图31

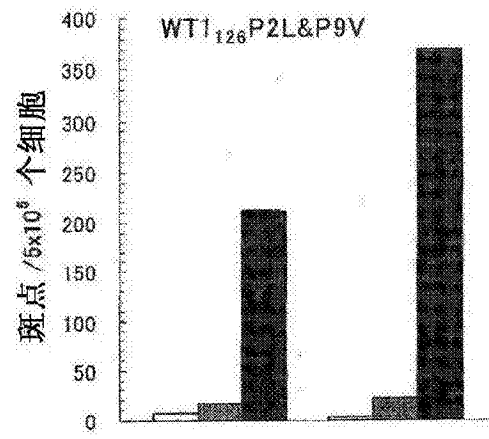


图32