(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3608788号
(P3608788)
(45)発行日　平成17年1月12日(2005.1.12)　(24)登録日　平成16年10月22日(2004.10.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C07K 14/705	C07K	14/705	ZNA
C07K 7/06	C07K	7/06	
C12N 5/10	G01N	33/53	D
C12N 15/09	G01N	33/574	A
G01N 33/53	G01N	33/577	B

請求項の数 15　(全 18 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-507373
(86)(22)出願日　平成5年8月30日(1993.8.30)
(65)公表番号　特表平8-500837
(43)公表日　平成8年1月30日(1996.1.30)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/008157
(87)国際公開番号　WO1994/005304
(87)国際公開日　平成6年3月17日(1994.3.17)
審査請求日　平成12年6月30日(2000.6.30)
(31)優先権主張番号　08/073,103
(32)優先日　平成5年6月7日(1993.6.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　07/938,334
(32)優先日　平成4年8月31日(1992.8.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ルドヴィグ・インスティテュート・フォー・キャンサー・リサーチ
アメリカ合衆国　１０１０５　ニューヨーク州、ニューヨーク、アベニュー・オブ・ジ・アメリカズ　１３４５番
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　田村　恭生
(74)代理人
弁理士　高山　裕貢

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＭＡＧＥ－３遺伝子から誘導されてＨＬＡ－Ａ１により提示される単離されたノナペプチドおよびそれらの用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr、
（ｂ）Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr、
（ｃ）Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr、
（ｄ）Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr、及び
（ｅ）Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr、
からなる群より選択される単離されたノナペプチド。
【請求項２】
請求項１に記載のノナペプチドをコードする、単離された核酸分子。
【請求項３】
CTL応答を起こすことができる単離され、トランスフェクトされた非ヒトセルラインであって、HLA分子をコードする核酸分子、及び、請求項２に記載の核酸分子を含むセルライン。
【請求項４】
該HLA分子がHLA－A1であり、そして該ノナペプチドをコードする配列が、Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyrをコードする、請求項３に記載の単離され、トランスフェクトされた非ヒトセルライン。
【請求項５】
該セルラインがマウスセルラインである、請求項３に記載の単離され、トランスフェクト

された非ヒトセルライン。
【請求項６】
該セルラインがCOSセルラインである、請求項３に記載の単離され、トランスフェクトされた非ヒトセルライン。
【請求項７】
複数のHLA分子をコードする配列、及び、複数のノナペプチドをコードする配列によってトランスフェクトされた、請求項３に記載の単離され、トランスフェクトされた非ヒトセルライン。
【請求項８】
該セルラインがP1 HTR A1である、請求項３に記載の単離され、トランスフェクトされた非ヒトセルライン。
【請求項９】
MAGE抗原を細胞障害性細胞に提示するHLA分子を決定する方法であって、請求項７に記載の単離され、トランスフェクトされた非ヒトセルラインを該MAGE抗原に特異的な細胞障害性Ｔ細胞のサンプルと培養し、そして、その溶解を該HLA分子による該MAGE抗原の提示として、決定する方法。
【請求項１０】
アミノ酸配列
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
を有する、単離されたノナペプチド。
【請求項１１】
請求項10に記載のノナペプチドをコードする、単離された核酸分子。
【請求項１２】
請求項11に記載の核酸分子でトランスフェクトされた、単離された非ヒトセルライン。
【請求項１３】
マウスセルラインである、請求項12に記載のセルライン。
【請求項１４】
COSセルラインである、請求項12に記載のセルライン。
【請求項１５】
癌病態を患っている疑いのある該患者から得られるサンプルを、
（ａ）ノナペプチド：
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
または
（ｂ）HLA－A1分子と該ノナペプチドとの複合体
に特異的に結合する抗体または細胞障害性Ｔ細胞と接触させ、該病態の指標として結合性を測定することから成る、癌病態の決定方法。
【発明の詳細な説明】
本出願は、1992年８月31日出願の同時係属出願第07/938,334号、および1993年３月26日出願の同第08/037,230号の一部継続出願である。
発明の分野
本発明は、免疫遺伝学およびペプチド化学に関する。詳細には本発明は、免疫原として、またHLA－A1分子の標的として有用であることを含め、種々の点で有用なノナペプチドに関する。とりわけ本発明は、MAGE－３遺伝子によりコードされている腫瘍拒絶抗原（tumor rejection antigen）前駆体から誘導され、ヒト白血球抗原であるHLA－A1により提示される、いわゆる「腫瘍拒絶抗原」に関する。
背景と従来技術
宿主有機体による癌細胞の認識または認識欠如に関する研究は、多くの異なった観点で続けられてきた。該分野を理解するということは、基礎免疫学および腫瘍学の両方を幾分理解することであろうと考えられる。
マウス腫瘍に関する初期の研究により、同系動物に移植した場合、そのマウス腫瘍が腫瘍

細胞の拒絶を導く分子を呈すことがわかった。これらの分子は、受容動物においてＴ細胞により「認識」され、移植細胞の溶解と共に細胞傷害性Ｔ細胞応答を引き起こす。この証拠は、インビトロにおいてメチルコラントレンといったような化学発癌物質により誘発される腫瘍を用いることで初めて得られた。腫瘍により発現されてＴ細胞応答を誘起する抗原は、腫瘍毎に異なることが分かった。化学発癌物質による腫瘍の誘発と細胞表面抗原の相違に関する一般的教示については、Prehnら,J.Natl.Canc.Inst.18:769－778（1957）;Kleinら,Cancer Res.20:1561－1572（1960）;Gross,Cancer Res.3:326－333（1943）;Basombrio,Cancer Res.30:2458－2462（1970）を参照。このクラスの抗原は、「腫瘍特異的移植抗原」または「TSTAs」として知られるようになった。化学発癌物質により誘発されてそのような抗原提示が観察された後に、インビトロにおいて紫外線照射により腫瘍が誘発される場合にも同様の結果が得られた［Kripke,J.Natl.Canc.Inst.53:333－1336（1974）を参照］。

上記腫瘍タイプの場合にＴ細胞媒介性の免疫応答が観察されたのに対し、自然発生腫瘍は一般に非免疫原性であると考えられた。従って、自然発生腫瘍には、腫瘍ができている患者の腫瘍に対して応答を引き起こす抗原は存在しないと確信された［Hewittら,Brit.J.Cancer 33:241－259（1976）を参照］。

一連のtum^-抗原を提示するセルラインは、BoonらのJ.Exp.Med.152:1184－1193（1980）［この開示は引用によって包含される］で記載されているように、マウス腫瘍細胞またはセルラインの突然変異誘発により得られる免疫原性変異体である。詳述すると、tum^-抗原は、同系マウスにおいて免疫応答を起こさず、また腫瘍を形成する腫瘍細胞（すなわち、「tum^+」細胞）を突然変異することにより得られる。これらのtum^+細胞を突然変異すると、それらは同系マウスにより拒絶されて、腫瘍を形成しなくなる（すなわち、「tum^-」）［Boonら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:272（1977）を参照］［この開示は引用によって包含される］。この現象を起こす多くの腫瘍タイプが示されている［例えば、Frostら,Cancer Res.43:125（1983）を参照］。

tum^-変異体は、免疫拒絶反応を開始させるので、進行性腫瘍を形成しないように思われる。この仮説を支持する証拠には、腫瘍の「tum^-」変異体、すなわち通常は腫瘍を形成しない変異体が、亜致死性照射により免疫系が抑制されたマウスにおいて腫瘍を形成できること［Van Pelら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:5282－5285（1979）；およびtum^-細胞である肥満細胞腫P815を腹腔内注射すると、12～15日間指数的に増殖した後、リンパ球およびマクロファージ流入する中、僅か数日で排除されるという観察［Uyttenhoveら,J.Exp.Med.152:1175－1183（1980）］が包含される。さらなる証拠には、免疫抑制量の放射線を与えても、マウスが、同じtum^-変異体に対する再刺激に耐えるのを可能とする免疫記憶を、その後の細胞の再刺激によって獲得するという観察が包含される［Boonら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:272－275（1977）;Van Pelら, 上記;Uyttenhoveら, 上記］。

その後の研究により、自然発生腫瘍が突然変異誘発を受けると、応答を引き起こす免疫原性変異体が生成されることが分かった。それどころか、これらの変異体は、元の腫瘍に対する免疫防御応答を誘起することができた［Van Pelら,J.Exp.Med.157:1992－2001（1983）を参照］。こうして、同系拒絶応答の標的である腫瘍において、いわゆる「腫瘍拒絶抗原」の提示を誘起するのが可能であるということが示された。外来遺伝子を自然発生腫瘍にトランスフェクトした場合にも同様の結果が得られた［このことに関しては、Fearsonら,Cancer Res.48:1975－1980（1988）を参照］。

腫瘍細胞表面に提示され、細胞傷害性Ｔ細胞に認識されて、細胞溶解を引き起こす抗原クラスが認められている。このクラスの抗原を以後、「腫瘍拒絶抗原」または「TRAs」と称する。TRAsは、抗体応答を誘起したり、しなかったりする。これらの抗原が研究されてきた範囲は、インビトロにおいての細胞傷害性Ｔ細胞による特性付け研究、すなわち、ある特定の細胞傷害性Ｔ細胞（以後、「CTL」と称する）サブセットによる抗原の同定に関する研究である。該サブセットは、提示された腫瘍拒絶抗原を認識して増殖し、抗原を提示している細胞を溶解する。特性付け研究では、抗原を発現している細胞を特異的に溶解するCTLクローンが同定された［こういった研究例は、Levyら,Adv.Cancer Res.24:1－59（1

977）;Boonら,J.Exp.Med.152:1184－1193（1980）;Brunnerら,J.Immunol.124:1627－1634（1980）;Maryanskiら,Eur.J.Immunol.124:1627－1634（1980）;Maryanskiら,Eur.J.Immunol.12:406－412（1982）;Palladinoら,Canc.Res.47:5074－5079（1987）に見い出すことができる］。こういったタイプの分析は、副組織適合抗原、雌に特異的なＨ－Ｙ抗原、および「tum⁻」抗原と称し、本明細書中で論じたクラスの抗原等、CTLsにより認識される他のタイプの抗原に必要である。

上記内容の代表的腫瘍は、P815として知られている［DePlaenら,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2274－2278（1988）;Szikoraら,EMBO J 9:1041－1050（1990）、およびSibilleら,J.Exp.Med.172:35－45（1990）を参照］［この開示は引用によって包含される］。P815腫瘍は肥満細胞腫であり、DBA/2マウスにおいてメチルコラントレンで誘発され、またインビトロにおける腫瘍およびセルラインとして培養されている。P815系は、突然変異誘発後、P91A［DePlaen,上記］、35B［Szikora,上記］、およびP198［Sibille,上記］と称する変異体を含め、多くのtum⁻変異体を生成する。腫瘍拒絶抗原とは対照的に（これが重要な特徴である）、tum⁻抗原は、腫瘍細胞が突然変異誘発された後にしか存在しない。腫瘍拒絶抗原は、突然変異誘発することなく特定の腫瘍細胞に存在する。従って、文献に関し、セルラインは、「P1」と称する系のようなtum⁺となって、tum⁻変異体の産生を誘起することができる。tum⁻表現型は親系の表現型とは異なるので、tum⁻セルラインはそれらの親tum⁺系と比べてDNAが違うであろうと予想され、この違いは、tum⁻細胞における重要な遺伝子の位置を決定するのに利用することができる。その結果、P91A、35BおよびP198といったようなtum⁻変異体の遺伝子は、遺伝子のコード領域における点突然変異により、それらの正常な対立遺伝子とは違うということが分かった［SzikoraおよびSibille,上記、並びにLurquinら,Cell 58:293－303（1989）を参照］。このことは、本発明のTRAsではあてはまらないことが証明されている。これらの文献はまた、tum⁻抗原から誘導されるペプチドがL^d分子に提示されてCTLsに認識されるということをも実証した。P91AはL^dにより、P35はD^dにより、またP198はK^dにより提示される。

本願と同じ譲受人に譲渡された、1992年５月22日出願のPCT出願PCT/US92/04354では、MAGE族と称する、一連のヒト腫瘍拒絶抗原前駆体コード遺伝子を教示している。これらの遺伝子の幾つかはまた、van der BruggenらのScience 254:1643（1991）でも論じられてもいる。MAGE族の種々の遺伝子が腫瘍細胞において発現し、そのような腫瘍の診断用マーカーとして、さらにはまた本明細書中で論じる他の目的のためのマーカーとして働き得るということは現在明らかである［Traversariら,Immunogenetics 35:145（1992）;van der Bruggenら,Science 254:1643（1991）もまた参照］。タンパクがプロセッシングされて細胞表面に提示される機序は、現在かなりよく文献で示されている。［該分野の開発に関する大まかな経緯は、Barinaga,「Getting Some ′Backbone′:How MHC Binds Peptides」,Science 257:880（1992）に見い出すことができる;Fremontら,Science 257:919（1992）;Matsumuraら,Science 257:927（1992）;Latronら,Science 257:964（1992）もまた参照］。一般的に、これらの文献では、MHC/HLA分子に結合するペプチドとして９個の長さのアミノ酸（「ノナペプチド」）が必要であること、またノナペプチドの１番目および９番目の残基の重要性を教えている。

遺伝子のMAGE族に関する研究により、実際に特定のノナペプチドが腫瘍細胞の表面に提示され、ノナペプチドの提示には、提示する分子がHLA－A1であることを要することが現在明らかにされている。MAGE－１腫瘍拒絶抗原（「TRA」または「ノナペプチド」と称する）の複合体は、細胞傷害性Ｔ細胞（「CTLs」と称する）により該抗原を提示している細胞の溶解を引き起こす。こういった観察は、本明細書中で論じるように、診断および治療の両方に関係がある。例えば、本願の親出願である、1992年８月31日出願の米国特許出願第07/938,334号に示されている研究では、種々のMAGE遺伝子の相同領域を、関連のあるノナペプチドをコードするMAGE－１遺伝子領域と比較すると、高い相同性があるということが示された。それどころか、これらの観察により、全て同じＮ末端およびＣ末端アミノ酸を有する一連のノナペプチドであるという、本明細書中で開示特許請求する本発明の一態様が導かれた。これらのノナペプチドは、単独での、または担体ペプチドと組み合わせた免

疫原としての使用を含め、種々の目的に有用であるとして記載した。ノナペプチドは、抗原性エピトープを構成するのに十分な大きさであり、それに対して生成される抗体は、ノナペプチドが単独で存在しても、またはより大きなポリペプチドの一部として存在するとしても、そのノナペプチドを同定するのに有用であるとして記載した。
ノナペプチドは、メラノーマのような腫瘍細胞の表面上の種々のHLAサブタイプを同定するのに有用であると記載した。この能力により、ノナペプチドは、診断用マーカーおよび治療薬の両方に役立つ。これらの特徴を以下に論じる。
ノナペプチドをコードする核酸配列は本明細書中にも記載している。これらの核酸配列はまた、腫瘍の有無を診断するプローブとしても有用であると記載した。
また本出願により、ヒト以外の細胞をヒトHLA分子をコードする核酸配列でトランスフェクトできる細胞モデルを使用できたということを如何にして見い出したかをも示した。次いで、その結果得られるトランスフェクタントは、特定のHLA分子に関するノナペプチド特異性を試験するのに、またはMAGE遺伝子での別のトランスフェクションを目的として使用することができる。同時トランスフェクタントは、MAGEを基礎とする特定のTRAが特定のHLA分子により提示されるかどうかを決定するのに使用することができた。
本発明は、先の２つの親出願に記載されているペプチドの１つに関する。とりわけ、MAGE－３によりコードされている腫瘍拒絶抗原前駆体から誘導されるノナペプチド：
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
は、ヒト白血球抗原であるHLA－A1により提示されることが現在見い出されている。この発見とそれらの結果を以下の開示に記載する。

【図面の簡単な説明】

図１は、MAGE－１遺伝子の300塩基対フラグメントが関連のある腫瘍拒絶抗原をコードするとして同定された操作の概要を説明している。
図２は、細胞を種々のMAGE－１ペプチドと共にインキュベートした細胞溶解研究を示している。
図３は、MAGE－１ノナペプチドの存在下にHLA－１遺伝子でトランスフェクトされたマウス細胞の溶解と、MAGE－１をコードする配列で同時トランスフェクトした場合のマウス細胞の溶解とを比較している。
図４は、種々のMAGE遺伝子の相同部分から得られるノナペプチドと、これらのノナペプチドをコードする核酸配列とを比較している。
図５は、種々のセルラインに対してCTLクローン20/38を用いるクロミウム放出アッセイの結果を示している。
図６は、CTLクローン20/38の抗原特異性を決定するために試みたアッセイの結果を示している。
図７は、TNF放出アッセイをトランスフェクトされた種々の細胞に対して行う場合に得られた結果を示している。
図８は、本発明のペプチドを用いる細胞溶解アッセイの結果を示している。
配列番号:1－９は、MAGE遺伝子およびこれらをコードする核酸配列から得られる相同ノナペプチドを示す。

好ましい態様の詳細な説明

実施例　１

van der BruggenらのScience 254:1643（1991）［この開示は引用によって包含される］に記載されている2.4kbのBam IIIフラグメントは、MAGE－１タンパクをコードする遺伝子のエキソン２および３しか含まれていないことで知られている。このフラグメントは、MZ2－Ｅ抗原の発現をE^-抗原欠損セルライン変異体MZ2－MEL.2.2に伝達して、E^+CTLsによるトランスフェクタントの細胞溶解を引き起こす。DePlaenらのProc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2274（1988）、およびChomezらのImmunogenetics 35:241（1990）による先の研究により、発現ベクターの形でトランスフェクトされていなくても、抗原ペプチドをコードする配列を含む小さな遺伝子フラグメントはそれらの抗原を規則正しく発現することが立証されている。これらの観察を考慮して、2.4Kbのフラグメントより小さなフラグメントで実験

を行った。2.4kbのフラグメントをより小さなフラグメントへと切断するのに、種々の制限酵素を使用した。得られたより小さなフラグメントを、pTZ18Rプラスミドベクターにクローンした。エキソン３から取り出した300塩基対フラグメントは、オリゴヌクレオチドVDB 14:

５′－CAGGGAGCCAGTCACAAAG－３′

およびCHO 9:

５′－ACTCAGCTCCTCCCAGATTT－３′

を用いるポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）増幅により得られた。これらのプライマーは、MAGE－１の300塩基対フラグメントをエキソン１の422～722位の間で増幅する。このフラグメントを発現ベクターPSVK3にクローンした。その新規構築物をpSVtkneoβプラスミドと共に、MZ2.MEL2.2セルラインに同時トランスフェクトした。このことは、４×10^6個の細胞とpSVtkneoβ［Nicolasら,CSH Conf.Cell Prolif 10:469（1983）］3ug、およびpTZ18RまたはPSVK3構築物30ugを用い、リン酸カルシウム沈降法［Traversariら,Immunogenetics 35:145（1992）；

Wölfelら,

Immunogenetics 26:178（1987）］を利用して行った。次いで、得られた該トランスフェクタントを、G418ネオマイシン類似化合物を含む培地中にて選択した。トランスフェクションしてから15日後に、抗Ｅ抗原CTL82/30によるTNF産生を刺激する能力に関して、耐性細胞を試験した。このことは、1500CTL82/30を含有するサンプル100ulをトランスフェクトされた細胞４×10^4個へ加えることにより行った。TNFの存在を評価するために、上澄みサンプル（50ul）を取って、３×10^4個のWEHI 164クローン13細胞［Espevikら,J.Immunol.Meth.95:99（1986）］に加えた。例えば、Traversariらの上記文献に従い、MTT比色アッセイを利用して、24時間後にWEHI細胞の死亡率を評価した。

図１に示すように、これらの実験により、MZ2E抗原の発現を有効に伝達することのできる、MAGE－１のエキソン由来の300塩基対フラグメントが同定された。

実施例　２

MAGE－１遺伝子は、非常に関連のある幾つかの遺伝子族に属する［van der Bruggenら,上記を参照］。先の実験は、MAGE－２およびMAGE－３がMZ2－Ｅ抗原の発現を指令しないことを示した。明らかに300塩基対フラグメントが発現を指令するので、MAGE－２およびMAGE－３遺伝子の相同部分は300塩基対フラグメントに匹敵していた。違いは明らかであり、AthertonらのJ.Chem.Soc.1:538（1981）に従って、一時的にＮ－末端を保護するＦ－mocを用い、15アミノ酸ペプチドを幾つか合成した。そのペプチドをＣ－18逆相HPLCにより精製し、アミノ酸分析により特徴付けた。

ペプチドが得られたら、BoonらのJ.Exp.Med.152:1184（1980）のクロミウム放出法を利用する細胞溶解アッセイでペプチドを試験した。簡単に言えば、94ウエルのマイクロプレートにおいて、種々の濃度のペプチドを用い、1000個の^{51}Cr標識化E^-標的細胞を37℃で30分間インキュベートした。

等容量のCTL（CTLの数は標的細胞の数の５倍である）を含むサンプルを加えた（セルライン82/30）。４時間後にクロミウム放出を測定した。抗E CTLsにより細胞溶解するE^-細胞の感作が、MAGE－１の巨大な読み取り枠の158－172コドンに対応するペプチドで観察された。より短いペプチドを調製し、有効な細胞溶解が、ペプチド：

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr

で観察された。

図２に示す結果により、結合したり、細胞溶解を起こすには、１番目および９番目のアミノ酸が重要であったということが実証される。このことは、MHC－１分子が一般にノナペプチドにより結合することを述べている先の報告［Rotzschkeら,Nature 348:252（1990）］に一致する。図２はまた、最大細胞溶解値の半分が5nMのペプチド濃度で得られたということをも示している。

実施例　３

どんな分子が関連のあるMAGE－１抗原を提示したかを決定するために実験を行った。この

ことを行うためには、GirdlestoneのNucl.Acids.Res.18:6701（1990）で教示されている、HLA－A1遺伝子をマウスセルラインであるP1.HTRにトランスフェクトした。このセルラインは、マウス肥満細胞腫セルラインP815の非常にトランスフェクトされ易い変異体である。その結果得られ、「P1.HTR.A1」と称するトランスフェクタントを、先に論じたノナペプチドの存在下、同じ細胞溶解アッセイを利用してインキュベートした。対照もまた使用した。

図３は、このセルラインが細胞溶解されたことを示しており、ヒト以外の細胞を用いて細胞溶解ペプチドをスクリーニングするためのモデルが開発されたことを示す。

本明細書中に記載していない実験ではあるが、COS細胞でも同様の結果が得られた。

またさらなる実験も行ったが、この実験では、P1.HTR A1セルラインをMAGE－1 cDNAでトランスフェクトした。この同時トランスフェクトされた細胞を用いて実施例２の細胞溶解アッセイを行うと、それらもまた溶解されることが見い出された。

実施例　４

MAGE族に属する種々の遺伝子が相同的であると仮定して、遺伝子の相同領域内の類似性を同定するために比較を行った。これらの領域を図４に示す。これらのペプチドおよびそれらをコードする核酸配列は同一ではないが、かなり高く相同的であり、とりわけ１番目および９番目の残基はかなりの相同性を示す。

実施例　５

本実施例、および以下の実施例６－８は、1993年３月26日出願の同時係属出願第08/037,230号の実施例37－40に対応する。

細胞溶解CTLクローン「20/38」は、MZ2メラノーマ患者の末梢血液リンパ球から得られた。このクローンは、Van den EyndeらのInt.J.Cancer 44:634－640（1989）に記載されている［この開示は引用によって包含される］。CTLクローンは、HerinらのInt.J.Cancer 39:390－396（1987）に従って単離された［これは引用によって包含される］。しかし、本明細書中にアッセイを説明する。自己メラノーマ細胞をインビトロにおいて成長させた後、10％のHEPESおよび30％のFCSを加えたDMEM中に10^7細胞/mlの割合で再懸濁させ、200μCi/mlのNa（^{51}Cr）O_4と共に37℃で45分間インキュベートした。10mMのHEPESを加えたDMEMで標識細胞を３回洗浄した。次いで、これらを、10mMのHEPESおよび10％のFCSを加えたDMEM中に再懸濁させた後、10^3個の細胞を含んでいる懸濁液100μｌを96ウエルのマイクロプレートに分配した。CTLクローンのサンプルを同じ培地100ulに添加し、アッセイを２回行った。プレートを100×Ｇで４分間遠心分離し、5.5％のCO_2雰囲気下、37℃で４時間インキュベートした。

プレートを再び遠心分離し、上澄み100ulを集めて計数した。^{51}Cr放出パーセンテージを以下のようにして計算した：

$$^{51}\mathrm{Cr放出}\ (\%) = \frac{(\mathrm{ER}-\mathrm{SR})}{(\mathrm{MR}-\mathrm{SR})} \times 100$$

［式中、ERは観察される実験的な^{51}Cr放出であり、SRは10^3個の標識細胞を培地200ulのみでインキュベートすることにより測定される自然放出であり、またMRは0.3％のトリトンＸ－100 100ulを標的細胞に加えることにより得られる最大放出である］。

高CTL活性を示した単核血液サンプルを増加させ、限界希釈法によりクローン化し、同じ方法を利用して再びスクリーニングした。

標的細胞K562を試験するために同じ方法を利用した。EBV－Ｂ細胞を使用する場合に変更しなくてはならないことは、DMEM培地を５％のFCSを加えたハンクス培地で置き換えることだけであった。

これらの実験により、CTLクローン20/38が単離された。

図５は、これらのアッセイの結果を示している。具体的には、CTLクローンは自己メラノーマセルラインMZ2－MEL.3.0を細胞溶解したが、EBV－Ｂセルライン、繊維芽細胞、K562または非自己メラノーマセルラインSK－MEL－29は細胞溶解しなかったということが分かる。

実施例　6

CTLクローンが自己セルラインに特異的であると認められてから、抗原特異性に関して試験した。このことを行うのに、MZ2患者から得られる抗原欠損変異体を同じタイプの上記クロミウム放出アッセイで試験した。これらの標的セルラインは、D^+、E^+、F^+、A^+であるMZ2－MEL 3.0、D^-であるMZ2－MEL.61、E^-であるMZ2－MEL 2.2、およびF^-であるMZ2－MEL.4であった。CTLクローン20/38の他に、抗Ａ（CTL28/336）、抗Ｆ（CTL76/6）、および抗Ｅ（CTL22/13）であることが知られているクローンを試験した。

これらの結果を図６に示す。CTLクローン20/38は、D^-セルラインであるMZ2－MEL.61を除き、クロミウム放出を起こす全てのセルラインを細胞溶解したことが分かるので、CTLクローンが抗Ｄであることが示される。CTLクローンによるTNF放出が、抗原Ｄを提示するメラノーマセルラインの存在下にのみ観察されるという実験［この実験は本明細書中に包含されていない］により、この結果を確認した。

実施例　7

抗原Ｄが標的分子と同定されてから、抗原Ｄを提示するHLAタイプを決定する研究を行った。実施例Ａに記載されている実験は、抗原ＤがMZ2－MELに提示されることを示したが、このセルラインのHLA特異性は分かっている［すなわち、A1、A29、B37、B44、Cw6、C.cl.10］。しかし、HLA分子であるA29、B44およびC.cl.10を欠くMZ2－MELの変異体もまた、依然として抗原Ｄを発現することが知られていたので、これらは考慮すべきものから外すことができた。B37を発現するセルラインに関しては何も見い出すことができなかったので、研究を行わなかった。

合計して13個の同種セルライン、即ちHLA－A1（13のうち10）か、またはCw6（13のうち３）のいずれかを発現する13個のセルラインを試験した。TraversariらのImmunogenetics 35:145－152（1992）［この開示は引用によって包含される］の方法を利用し、CTLクローン20/38によるTNFの放出を刺激する能力に関して、これらのセルラインを試験した。このアッセイでは、WEHI164－13細胞に対する上澄みの毒性を試験することによりTNF放出を測定する。

このアッセイでは、1500個のCTLクローン細胞および25u/mlのＩＬ－２の存在下に、同種セルラインから得られる細胞サンプル（3000個、10,000個または30,000個の細胞）を培養した。24時間後、毒性に関し、培養物から得られる上澄みをWEHI細胞に対して試験した。結果を以下の表１に示す。

CTLクローン20/38からのTNF放出を８つのセルラインが刺激することが見い出された。これらのセルラインは全てHLA－A1であった。Cw6を提示するセルラインはいずれも刺激しなかった。

MAGE発現を決定するために、セルラインをさらにアッセイした。TNF放出を刺激する８つのセルライン全てがMAGE－３を発現したが、これに反してネガティブである２つのHLA－A1セルラインは発現しなかった。

表　1

メラノーマ	細胞数	TNF pg／ml 実験例 1 −	実験例 1 ＋CTL 20/38	実験例 2 −	実験例 2 ＋CTL 20/38	Mage-3 の発現	HLA-A1 の発現
MZ2-MEL.61.2	50000		1		4	+++	+
MZ2-MEL-ET1	50000		＞120		＞120	+++	+
	1666		66		＞120		
	30000	1	＞120	1	＞120		
LY-1-MEL	10000	1	＞120	1	＞120	+++	+
	3000	＜1	114	2	＞120		
	30000	＜1	＞120				
MI-10221	10000	＜1	71			+++	+
	3000	＜1	74				
	30000	1	57				
LY-2-MEL	10000	1	86			+++	+
	3000	1	91				
	30000	1	＞120				
LY-4-MEL	10000	1	＞120			+++	+
	3000	1	＞120				
	30000	1	112				
SK23-MEL	10000	1	116			++++	+
	3000	1	105				
	30000	1	3	2	4		
MI-665/2-MEL	10000	1	2	2	5	−	+
	3000	1	5.2	1	5		
	30000	1	＞120				
LB34-MEL	10000	1	＞120			++++	+
	3000	1	＞120				
	30000	1	11	1	30		
LB45-MEL	10000	1	6	1	12	−	+
	3000	1	2	＜1	7		
	30000	1	77	5	98		
NA-6-MEL	10000	1	104	5	＞120	+++	+
	3000	1	110	4	＞120		
	30000	1	＞120				
MI-13443-MEL	10000	1	＞120			++++	+
	3000	1	＞120				
	30000	1	8	4	9		
LB5-MEL	10000	＜1	5	4	11	+	−
	3000	＜1	5	1	5		
	30000	1	4	2	5		
SK64-MEL	10000	1	2	1	5	?	−
	3000	1	1	1	4		
	30000			1	3.5		
LB33-MEL	10000			1	4	+++	−
	3000			1	3		
LB73-MEL	50000		16			−	−

1500個のCTL20/38および25u/mlのIL－２を、指示された数の種々の同種メラノーマ細胞と混合した。24時間後、その上澄み中に存在するTNFの量を、WEHI－164－13細胞に対するその細胞毒性を試験することによりアッセイした。

実施例　８

実施例７で示した結果を考慮して、抗原Ｄが実際にMAGE－３から誘導される腫瘍拒絶抗原であるかどうかを決定するために実験を行った。このことを行うのに、pcDNA I/Ampへとクローン化されたHLA－A1の遺伝子100ng、および（ａ）pcDNA I/Ampへとクローン化され

たMAGE－１のcDNA、（ｂ）pcDSRαへとクローン化されたMAGE－２のcDNA、または（ｃ）pcDSRαへとクローン化されたMAGE－３のcDNAのうちの１つの100ngでCOS－７受容細胞をトランスフェクトした。製造元の指示に従って、トランスフェクトする配列をプラスミドへ連結させた。10％のウシ胎児血清を加えたダルベッコの改変イーグル培地（DMEM）が入った組織培養平底マイクロウエルへ、COS－７のサンプルを15,000細胞／ウエルの割合で播種した。その細胞を37℃で一晩インキュベートし、培地を取り除いた後、10％のNu血清、400μg/mlのDEAE－デキストラン、100μMのクロロキニン、および上記プラスミドを含むDMEM培地30μl/ウエルで置き換えた。37℃で４時間インキュベーションした後、培地を取り除いて、10％のDMSOを含むPBS50μｌで置き換えた。20分後、この培地を取り除き、10％のFCSを加えたDMEM200μｌで置き換えた。

このようにして培地を変えた後、COS細胞を37℃で24時間インキュベートした。次いで、培地を捨て、25u/mlのIL－２を加えた10％のヒト貯蔵血清を含むアイスコーブ（Iscove）培地の100μｌ中、1500個のCTLクローン細胞20/38を添加した。24時間後に上澄みを取り、TraversariらのImmunogenetics 35:145－152（1992）［この開示は引用によって包含される］に記載されているようにして、TNF含量をWEHI細胞におけるアッセイで測定した。これらの結果を図７に示す。

CTLクローンは、HLA－A1およびMAGE－３でトランスフェクトされたCOS－７細胞により強く刺激されたが、他のMAGE遺伝子でトランスフェクトされた細胞によっては刺激されなかったことが分かる。このことから、抗原Ｄは、MAGE－３遺伝子によりコードされた腫瘍拒絶抗原前駆体から誘導される腫瘍拒絶抗原であり、このTRAはHLA－A1分子により提示されるという結論に達する。

実施例　９

「MAGE－３」遺伝子から誘導されるペプチド：

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr

を用いて、さらなる実験を行った。

実施例２でペプチドを調製したときと同じ方法でこのペプチドを調製した。実施例２に記載したクロミウム放出アッセイもまた利用した。MZ2.MEL43の抗原Ｄ欠損変異体であるMZ2－MEL 61.2セルラインを^{51}Crで標識した後、抗原Ｄ特異的細胞溶解細胞クローンCTL20/38と、種々の濃度のペプチドとを用いて試験した。種々の濃度のペプチドと共に、MZ2－MEL 61.2およびCTL20/38を1.5:1の割合で組み合わせた。その混合物を４時間インキュベートした後、クロミウム放出を測定した。対照として、クロミウム標識化MZ2－MEL.43を使用した。

図８に示した結果により、このペプチドは、細胞溶解Ｔ細胞クローンが標的細胞を認識して溶解することから、確かに腫瘍拒絶抗原として作用することが示される。

先の実施例により、MAGE－３から誘導されるノナペプチドはHLA－A1分子により提示され、またHLA－A1とノナペプチドとの複合体を提示する細胞が特異的CTL細胞に認識されて溶解されるということが示される。この観察により、本発明のノナペプチドは治療および診断の両方に使用できるということが示される。

後者の使用カテゴリーの場合では、例えば、特定のHLA分子を発現する腫瘍、または癌細胞自体を同定するためにノナペプチドを使用することができる。癌細胞を含むサンプルまたは腫瘍細胞をそれに結合するノナペプチドと接触させ、得られた材料と複合体に特異的なCTLサンプルとを組み合わせる。細胞溶解が起これば、その腫瘍／癌細胞はHLA－A1提示体として同定することができる。

治療的には、ノナペプチドを使用することができる主な方法が２つある。インビボにおける治療法では、処置すべき腫瘍にノナペプチドが標的化する態様でノナペプチドを投与すればよい。こういったことは、直接注射、時間放出投与、腫瘍特異的抗体との組み合わせ等により行うことができる。HLA－A1分子に結合すると、CTL応答が起こり、腫瘍の細胞溶解が起こる。勿論、そのような治療法では、腫瘍の細胞溶解を起こすのに十分な量のノナペプチドを投与する。この量は、各々の患者、腫瘍のタイプや大きさ等によって様々である。

また「インビトロ」タイプの治療も考えられる。先に示したように、HLA－A1分子がMAGE－３により誘導されるノナペプチドに結合する場合、もしこれがペプチド/HLA複合体に特異的なCTLsと接触しているなら、CTL増殖応答が起こる。CTLsはインビボにおける腫瘍細胞溶解物質であることから、その結果得られる膨張化集団を患者に投与することができる。CTLsは、患者自身の血液または他のCTLs源を用いることにより、もしくはあらかじめ確定されているペプチド特異的CTLのサンプルを接触させることにより膨張化することができる。このことに関し、CTL20/38に注目すると、上記治療は時にその開発方法として有用であった。

本明細書中に記載したタイプの治療法は、特にメラノーマに対して有用である。サンプル分析により、コーカサス人全人口の26％がHLA－A1対立遺伝子を発現することが示されている。従って、少なくとも26％のコーカサスのメラノーマ人口を、本ペプチドを用いる治療法の潜在的対象人とみなすことができる。その患者はまた、表面に提示されるHLA－A1とノナペプチドとの複合体を含む増殖細胞を用いて処置することもできる。

示したような核酸配列は種々の方法で使用することができる。MAGE遺伝子は腫瘍において発現することから、その核酸配列は、腫瘍細胞を同定するためのプローブとして使用することができる。このことは、標識化ハイブリッド形成プローブ、PCR、または当業界で知られている種々の核酸プローブに基づくアッセイにより行うことができる。

本明細書中に記載したヒト以外のセルラインの開発により、本明細書中に記載した本発明の幾つかの特徴を行うためのユニークな方法が示される。例えば、実施例により、CTLsはHLAとノナペプチドとの複合体を認識するが、複合体を提示する細胞のタイプは区別しないらしいということが示される。従って、CTLsを作成するために、ヒトのサンプルにおけるそれらの有無を同定するために、単離された本発明のヒト以外のセルラインを使用することができる。

上述のように、本発明はまた、HLA－A1遺伝子、およびノナペプチドをコードする配列の両方でトランスフェクトされた、単離されたヒト以外のセルラインをも包含する。本発明は、遺伝子をコードする１つのHLAおよび１つのMAGEペプチドでのトランスフェクションに制限されず、それどころか、本発明は、一つ以上のHLA遺伝子および一つ以上のMAGE抗原をコードする配列を含有し得るポリトランスフェクトされた細胞を包含する。MAGE－１により誘導されたノナペプチドおよびMAGE－３により誘導されたノナペプチドの両方が共通のHLA分子により提示されるという知見が得られれば、上記の主張が支持される。表面におけるHLAおよびペプチドの適切な対の発現が、選択された特異的CTLの同定、または治療に関連のあるCTL増殖の発生のいずれかを導くので、そのような細胞は万能エフェクター細胞としてみなすことができる。同時トランスフェクトまたはポリトランスフェクトされた細胞は、当業界で周知である適当なアジュバントと組み合わせると、ワクチンとして働き得る。メラノーマおよび乳癌のような種々の癌病態の処置は、これらのトランスフェクタントを用いて行うことができる。

使用した用語および表現は、説明のための用語として使用するものであって、制限するためのものではなく、示し、かつ記載した特徴またはそれらの一部に属する幾つかの同義語を除外する用語および表現の使用を意図するものではなく、本発明の範囲内で種々の変更態様が可能であることが認められている。

配列表

（１）　一般的情報：

（ｉ）　特許出願人：ルドヴィグ・インスティテュート・フォー・キャンサー・リサーチ

（ii）　発明の名称:MAGE－３遺伝子から誘導されてHLA－A1により提示される単離されたノナペプチドおよびそれらの用途

（iii）　配列の数:9

（iv）　連絡先：

（Ａ）　名宛人：フェルフェ・アンド・リンチ

（Ｂ）　通り：サード・アベニュー805番

（Ｃ）　市：ニューヨーク・シティ

（Ｄ） 州：ニューヨーク
（Ｅ） 国：アメリカ合衆国
（Ｆ） ZIP:10022
（ｖ） コンピューター解読書式：
（Ａ） 媒体型：ディスケット、5.25インチ、360kb記憶
（Ｂ） コンピューター:IBM PC/2
（Ｃ） オペレーティング・システム:PC－DOS
（Ｄ） ソフトウエア：ワードパーフェクト
（vi） 本出願のデータ：
（Ａ） 出願番号:08/073,103
（Ｂ） 出願日:1993年６月７日
（vii） 先行技術データ：
（Ａ） 出願番号:07/938,334
（Ｂ） 出願日:1992年８月31日
（Ａ） 出願番号:08/037,230
（Ｂ） 出願日:1993年３月26日
（viii） 弁理士／代理人情報：
（Ａ） 氏名：ハンソン、ノルマン・ディー
（Ｂ） 登録番号:30,946
（Ｃ） 参照／整理番号:LUD293.1
（ix） 電話連絡先情報：
（Ａ） 電話番号：（212）688－9200
（Ｂ） ファックス番号：（212）838－3884
（２） 配列番号１の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－１ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号1:

GAA GCA GAC CCC ACC GGC CAC TCC TAT 27

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr

5

（２） 配列番号２の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－２ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号2:

GAA GTG GTC CCC ATC AGC CAC TTG TAC 27
Glu Val Val Pro Ile Ser His Leu Tyr
5

（２） 配列番号３の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－21ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号3:

GAA GTG GTC CGC ATC GGC CAC TTG TAG 27
Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr
5

（２） 配列番号４の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－３ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号4:

GAA GTG GAC CCC ATC GGC CAC TTG TAC 27
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
5

（２） 配列番号５の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－４ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号5:

GAA GTG GAC CCC GCC AGC AAC ACC TAC 27
Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr
5

（２） 配列番号６の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸

（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－41ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号6:

```
GAA GTG GAC CCC ACC AGC AAC ACC TAC                    27
Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr
 5
```

（２） 配列番号７の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－５ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号7:

```
GAA GCG GAC CCC ACC AGC AAC AAC TAC                    27
Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr
 5
```

（２） 配列番号８の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－51ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号8:

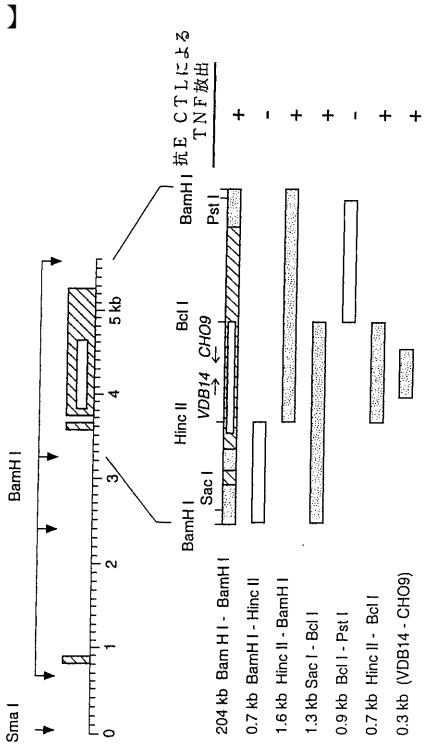
```
GAA GCG GAC CCC ACC AGC AAC ACC TAC                    27
Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr
 5
```

（２） 配列番号９の情報：
（ｉ） 配列の特徴：
（Ａ） 長さ:27塩基対
（Ｂ） 型：核酸
（Ｃ） 鎖の数：一本鎖
（Ｄ） トポロジー：直鎖状
（ii） 分子の種類：ゲノムDNA
（ix） 特徴：
（Ａ） 名称／略語:MAGE－６ノナペプチドをコードする配列
（xi） 配列：配列番号9:

GAA GTG GAC CCC ATC GGC CAC GTG TAC 27
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr
5

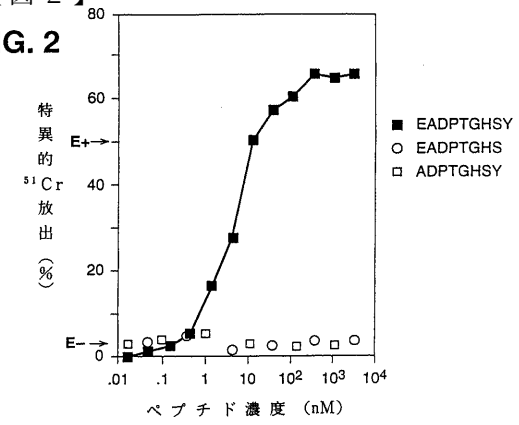
【図１】

FIG. 1



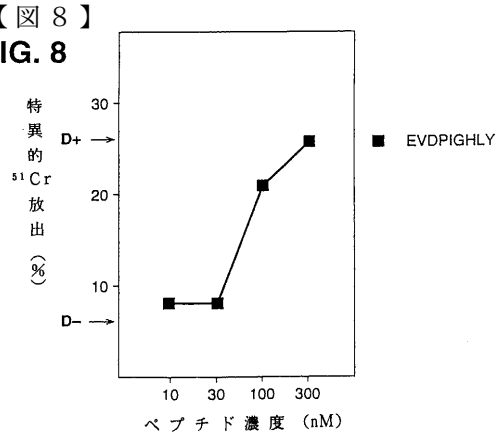
【図２】

FIG. 2



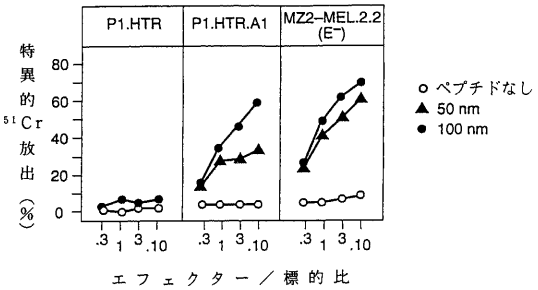
【図８】

FIG. 8



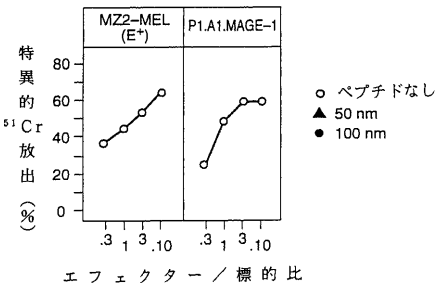
【図３Ａ】

FIG. 3A



【図３Ｂ】

FIG. 3B



【図４】

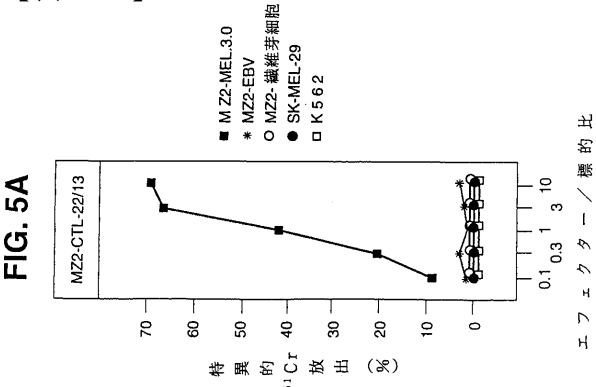
FIG. 4

MAGE 1	E	A	D	P	T	G	H	S	Y
MAGE 2	E	V	V	P	I	S	H	L	Y
MAGE 21	E	V	V	R	I	G	H	L	Y
MAGE 3	E	V	D	P	I	G	H	L	Y
MAGE 4	E	V	D	P	A	S	N	T	Y
MAGE 41	E	V	D	P	T	S	N	T	Y
MAGE 5	E	A	D	P	T	S	N	T	Y
MAGE 51	E	A	D	P	T	S	N	T	Y
MAGE 6	E	V	D	P	I	G	H	V	Y

MAGE 1	GAA	GCA	GAC	CCC	ACC	GGC	CAC	TCC	TAT
MAGE 2	GAA	GTG	GTC	CCC	ATC	AGC	CAC	TTG	TAC
MAGE 21	GAA	GTG	GTC	CGC	ATC	GGC	CAC	TTG	TAC
MAGE 3	GAA	GTG	GAC	CCC	ATC	GGC	CAC	TTG	TAC
MAGE 4	GAA	GTG	GAC	CCC	GCC	AGC	AAC	ACC	TAC
MAGE 41	GAA	GTG	GAC	CCC	ACC	AGC	AAC	ACC	TAC
MAGE 5	GAA	GCG	GAC	CCC	ACC	AGC	AAC	ACC	TAC
MAGE 51	GAA	GCG	GAC	CCC	ACC	AGC	AAC	ACC	TAC
MAGE 6	GAA	GTG	GAC	CCC	ATC	GGC	CAC	GTG	TAC

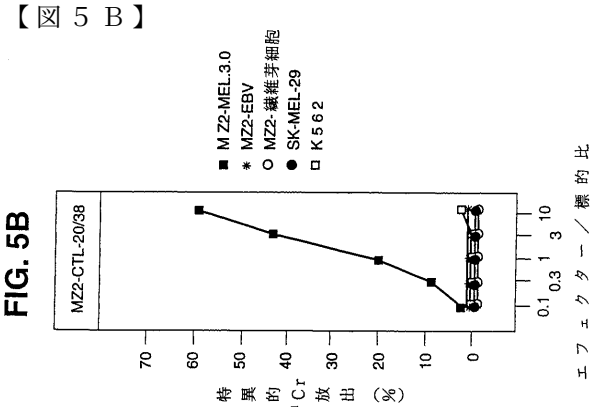
【図５Ａ】

FIG. 5A



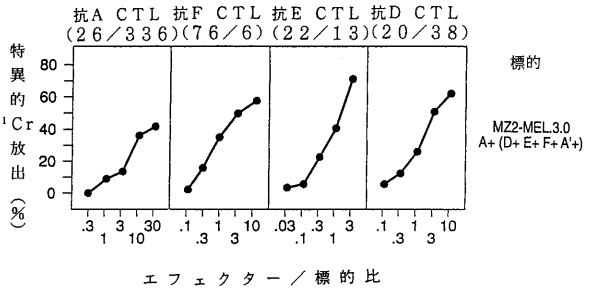
【図５Ｂ】

FIG. 5B



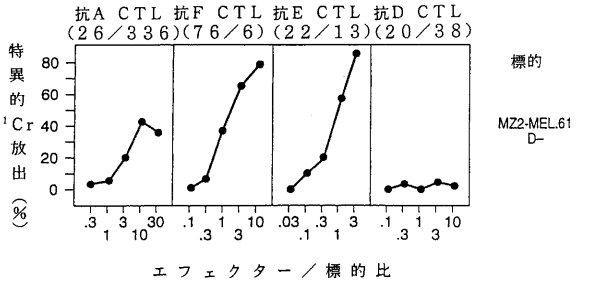
【図６Ａ】

FIG. 6A



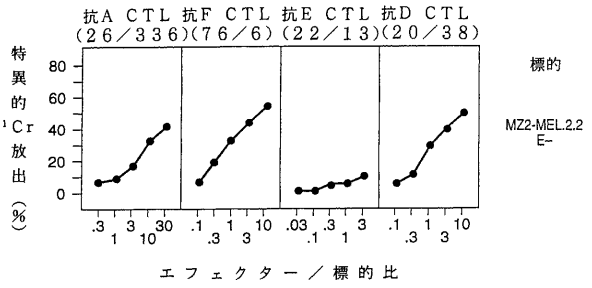
【図６Ｂ】

FIG. 6B



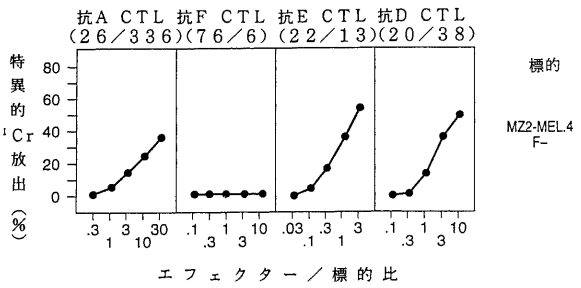
【図６Ｃ】

FIG. 6C



【図６Ｄ】

FIG. 6D



【図７】

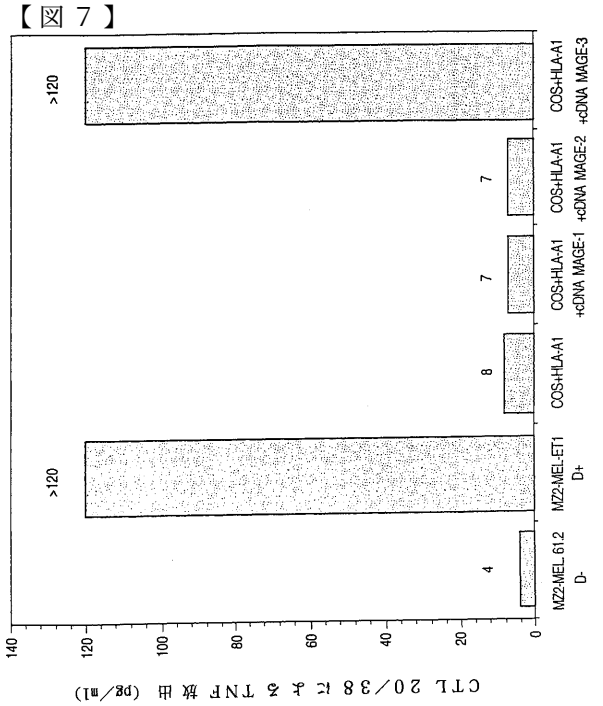


FIG. 7

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		
G01N 33/574	C12N	15/00	A
G01N 33/577	C12N	5/00	B

(31)優先権主張番号 08/037,230
(32)優先日 平成5年3月26日(1993.3.26)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ブーン－ファルアー、ティエリー
ベルギー国 ビー―１２００ ブリュッセル、ユー・シー・エル ７４５９、アベニュー・ヒポクレイト ７４番
(72)発明者 ファン・デァ・ブリューゲン、ピエール
ベルギー国 ビー―１２００ ブリュッセル、ユー・シー・エル ７４５９、アベニュー・ヒポクレイト ７４番
(72)発明者 デ・プラエン、エチエンヌ
ベルギー国 ビー―１２００ ブリュッセル、ユー・シー・エル ７４５９、アベニュー・ヒポクレイト ７４番
(72)発明者 リルキン、クリストフ
ベルギー国 ビー―１２００ ブリュッセル、ユー・シー・エル ７４５９、アベニュー・ヒポクレイト ７４番
(72)発明者 トラヴェルサリー、カティア
イタリア国 アイ―ミラノ、セスト・エス・ジョバンニ ２００９９番

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特開平６－５１１１４４（ＪＰ，Ａ）
Immunogenetics,Vol.35(1992)p.145-152
J.Exp.Med.,Vol.176(1992.Nov.)p.1453-1457

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
CA(STN)
REGISTRY(STN)
SwissProt/PIR/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)