

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5060134号  
(P5060134)

(45) 発行日 平成24年10月31日(2012.10.31)

(24) 登録日 平成24年8月10日(2012.8.10)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 07 K 7/06	(2006.01)
C 07 K 14/82	(2006.01)
C 12 N 1/15	(2006.01)
C 12 N 1/19	(2006.01)

C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K	7/06	
C 07 K	14/82	
C 12 N	1/15	
C 12 N	1/19	

請求項の数 16 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-544119 (P2006-544119)
(86) (22) 出願日	平成16年12月10日 (2004.12.10)
(65) 公表番号	特表2007-523633 (P2007-523633A)
(43) 公表日	平成19年8月23日 (2007.8.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/041921
(87) 國際公開番号	W02005/058937
(87) 國際公開日	平成17年6月30日 (2005.6.30)
審査請求日	平成19年12月10日 (2007.12.10)
(31) 優先権主張番号	60/529,329
(32) 優先日	平成15年12月12日 (2003.12.12)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	506200382 ガバメント オブ ザ ユナイテッド ス テイツ オブ アメリカ・アズ リブレゼ ンティッド バイ ザ セクレタリー・デパ ートメント オブ ヘルス アンド ヒュ ーマン サービシーズ
(74) 代理人	100102668 弁理士 佐伯 憲生
(72) 発明者	ジェフリー シュロム アメリカ合衆国 メリーランド州 208 52 ロックビル エグゼクティブ・ブー ルヴアード 6011 スイート 325 10301

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト細胞傷害性Tリンパ球のエピトープ及びそのMUC-1の非VNTR (non-variable number of tandem repeat sequence) 由来のアゴニストエピト

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号1のアミノ酸配列を含有してなる、長さ12アミノ酸までのポリペプチド。

## 【請求項2】

配列番号19のアミノ酸配列を含有してなる、長さ12アミノ酸までのポリペプチド。

## 【請求項3】

配列番号14のアミノ酸配列を含有してなる、長さ12アミノ酸までのポリペプチド。

## 【請求項4】

配列番号15のアミノ酸配列を含有してなる、長さ12アミノ酸までのポリペプチド。

## 【請求項5】

配列番号16のアミノ酸配列を含有してなる、長さ12アミノ酸までのポリペプチド。

## 【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドの1つまたはそれ以上をコードする核酸配列を含有してなる、単離された核酸分子。

## 【請求項7】

核酸配列が、配列番号20、21及び33～35からなる群より選択される、請求項6に記載の核酸分子。

## 【請求項8】

誘導型プロモーターに作動可能に連結された、請求項6又は7に記載の核酸分子を含有して成る、核酸ベクター。

10

20

**【請求項 9】**

請求項8に記載のベクターを含有してなる、宿主細胞。

**【請求項 10】**

請求項1～5のいずれか一項に記載の一つ又はそれ以上のポリペプチドをコードする単離された核酸分子を含有してなる、MUC-1腫瘍抗原に対する免疫応答を生じさせるための医薬組成物。

**【請求項 11】**

単離された核酸分子が、ベクターに含有されているものである、請求項10に記載の医薬組成物。

**【請求項 12】**

MUC-1腫瘍に対して免疫応答が惹起される、請求項10又は11に記載の医薬組成物。

10

**【請求項 13】**

請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドのいずれか一つ又はそれ以上を含有してなる、MUC-1腫瘍の治療又は予防のための医薬組成物。

**【請求項 14】**

癌を患っている患者から単離した樹状細胞を、請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドのいずれか一つ又はそれ以上で処理した樹状細胞を含有してなる、MUC-1腫瘍を患っているか、又はそれに罹患する恐れのある患者を治療するための医薬組成物。

**【請求項 15】**

癌を患っている患者から単離した樹状細胞を請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドのいずれか一つ又はそれ以上で処理した樹状細胞に接触させることにより活性化した末梢血单核細胞（PMBC）を含有してなる、MUC-1腫瘍を患っているか、又はそれに罹患する恐れのある患者を治療するための医薬組成物。

20

**【請求項 16】**

弱い免疫原を結合した請求項1～5のいずれか一項に記載のポリペプチドを含有してなる、弱い免疫原性の抗原に対する免疫応答を惹起させるための医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

30

**(関連出願)**

本出願は、2003年12月12日に出願された米国仮出願第60/529,329号の優先権を主張するものであり、当該仮出願を参照してその全てを本明細書に取り込む。

**【0002】**

従来のMUC-1免疫原性癌抗原及びHLAアンカー残基の外側にあるCTLエピトープの配列は同定されている。特に、本発明は、HLAアンカー残基を修飾して固形腫瘍、白血病又はリンパ腫に関連する天然抗原に対する、より強力な免疫反応を提供することによってT細胞を活性化する方法に関するものである。

**【背景技術】****【0003】**

40

腫瘍関連抗原であるMUC-1又はDF-3/MUC-1は、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、結腸直腸癌及び前立腺癌など多くのヒト腺癌並びに多発性骨髄腫及び幾つかのB細胞非ホジキンリンパ腫を含む造血器腫瘍の細胞表面で過剰発現されている。MUC-1は、管腔表面の正常な上皮組織では発現しているが、腫瘍組織のアピカル(apical)には局在しないことが明らかになっている。さらに、MUC-1は、ヒト腺癌では正常な組織に比べてグリコシル化が不十分であるため、このタンパク質コアの抗原エピトープはより大きく露出している。MUC-1の高レベルの発現及び分泌も、予後不良及び高転移能と関連していることが示されている。膵臓癌、卵巣癌及び多発性骨髄腫の患者から主要組織適合性複合体(MHC)非拘束性の細胞傷害性T細胞を樹立できることが最初に実証され、これらのT細胞が20個のアミノ酸の(VNTR(variable number of tandem repeat))<sup>2</sup>領

50

域にあるMUC-1タンパク質コアを認識することが示された。VNT R領域は、MUC-1特異的抗体の産生に対してだけでなく、MHC非拘束性CTLに対しても免疫原性があるが、VNT Rの外側の領域の免疫原性については、比較的限られた情報しか利用することができない。

#### 【0004】

現在の癌治療法には、放射線療法及び化学療法などがあるが、これらの療法は患者に特に有害な副作用をもたらす。

#### 【0005】

したがって、腫瘍を予防及び治療するために長期間持続する保護作用を有する、改良された、より安全性の高い治療法が必要とされている。特に、現在利用可能な治療薬よりも特異性が高く、毒性の低い治療法が必要とされている。10

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明は、抗腫瘍細胞傷害性Tリンパ球(CTL)エピトープの同定及び特徴付けに関し、特にMUC-1の非VNT R細胞外領域にあるMUC-1のCTLエピトープに関するものである。免疫原性エピトープを有するものとして従来から知られているVNT Rの領域は、MUC-1の領域とは異なる。本発明はまた、天然型ペプチドよりも強力な免疫細胞反応を生じさせるエンハンサーAGニストエピトープの産生にも関する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

好適な態様において、本発明は、例えば、MUC-1のような腫瘍抗原に由来するAGニストポリペプチド抗原であって、天然型ポリペプチドよりも強力な免疫応答を刺激するAGニストポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

#### 【0008】

別の好適な態様において、AGニストポリペプチドは、天然型のポリペプチドよりも高い親和力でHLA分子に結合する。好ましくは、AGニストポリペプチドは、HLA分子に対して天然型のポリペプチドよりも高い結合定数( $K_a$ )を有する。また好適に、AGニストポリペプチドは、HLA分子に対して天然型のポリペプチドよりも低い解離定数( $K_d$ )を有する。30

#### 【0009】

別の好適な態様において、核酸分子は、最長で約12アミノ酸のAGニストポリペプチドをコードする。好ましくは、AGニストポリペプチドは、ムチン腫瘍抗原に由来する。

#### 【0010】

別の好適な態様において、AGニストポリペプチドは、MUC-1の非VNT R領域に由来する。好ましくは、AGニストポリペプチドは、免疫応答を惹起させる。

#### 【0011】

本発明の一態様において、惹起される免疫応答は細胞性免疫応答である。細胞性免疫応答は、細胞傷害性T細胞応答、Tヘルパー細胞応答、及びB細胞免疫応答を含む。

#### 【0012】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すアミノ酸配列に対応する(すなわち、それをコードできる)核酸配列を含む核酸分子又はその断片若しくは変異体を提供する。配列番号1～19を以下に示す。

#### 【0013】

配列番号 (ペプチド)	ペプチド配列	塩基配列	配列番号 (ヌクレオチド数)
1	ATWGQDVTSV	GCC/ACC/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	20
2	ALWGQDVTSV	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	21
3	ALLVLVCVLV	GCC/CTG/CTG/GTC/CTG/GTC/TGC/GTC/CTG/GTC	22
4	TISDVSVD	ACC/ATC/TCG/GAT/GTC/TCG/GTC/TCG/GAT/GTC	23
5	ALAIYLYLIAL	GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG/ATC/GCC/CTG	24
6	VLLVALAVYL	GTC/CTG/GTC/GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG	25
7	YLIALAVCQC	TAC/CTG/ATC/GCC/CTG/GCC/GTC/TGC/CAA/TGC	26
8	WGQDVTSVPV	TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC/CCA/GTC	27
9	REGTINVHDV	AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC/CAC/GAT/GTC	28
10	GTQSPFFLLL	GGC/ACC/CAG/TCT/CCT/TTC/TTC/CTG/CTG/CTG	29
11	LAFREGTINV	CTG/GCC/TTC/AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC	30
12	TLASHSTKTID	ACT/CTG/GCC/TCG/CAC/TCG/ACC/AAG/ACC/GAT	31
13	LQRDISEMFL	CTG/CAA/AGA/GAT/ATC/TCG/GAA/ATG/TTC/CTG	32
14	AIWGQDVTSV	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	33
15	ALWGQDVTSL	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	34
16	AMWGQDVTSV	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	35
17	AMWGQDVTSL	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	36
18	AIWGQDVTSL	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	37
19	ALWGQDVTSV		

10

**【0014】**

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すアミノ酸のいずれか一つを発現する、単離された核酸分子を含むベクターを提供する。

**【0015】**

別の好適な態様において、ベクターは、例えば、B7-1、ICAM-1及びLFA-3など免疫細胞共刺激分子をコードする核酸分子を含む。

**【0016】**

さらに別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示す分子又はその断片若しくは変異体、及び任意に、例えば、B7-1、ICAM-1及びLFA-3.35などの免疫細胞共刺激分子を含むベクターによる樹状細胞への形質導入を提供する。

30

**【0017】**

本発明の一態様において、配列番号1～19の何れかに示す分子及びその断片若しくは変異体、並びに任意に免疫細胞共刺激分子を含むベクターによって形質導入された樹状細胞は、細胞傷害性T細胞応答の活性化など、免疫応答を惹起させる。

**【0018】**

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド又はその断片若しくは変異体をコードする一つ又はそれ以上の、誘導型プロモーターに作動可能に連結された核酸配列を含有して成る核酸ベクターを提供する。

**【0019】**

別の好適な態様において、核酸ベクターは、ウイルスベクター、プラスミドなどである。好ましくは、核酸ベクターは、組織特異的な誘導型プロモーター、及び免疫細胞共刺激分子を含んでいてもよい。

40

**【0020】**

別の好適な態様において、ベクターは配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドのいずれか一つをコードする核酸配列を含む。

**【0021】**

別の好適な態様において、ベクターは、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドであって、配列番号1～19の何れかに、少なくとも約10%、より好ましくは25%の配列相同性、さらにより好ましくは、配列番号1～19の何れかに、約40%、50%、

50

60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有するポリペプチドをコードする。

【0022】

別の好適な態様において、ベクターは、配列番号20～37の何れかに示す配列であって、配列番号20～37の何れかに、少なくとも約10%、より好ましくは25%の配列相同性、さらに好ましくは、配列番号30～37の何れかに、約40%、50%、60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有する配列を含む。

【0023】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すベクターのポリペプチド産物であって、配列番号1～19の何れかに、少なくとも約10%、より好ましくは25%、さら好ましくは、約40%、50%、60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有するポリペプチド産物を発現する宿主細胞を提供する。好ましくは、宿主細胞は、例えば、単球／マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞である。

【0024】

別の好適な態様において、本発明は、MUC-1腫瘍を患っているか、又はそれに罹患する恐れのある患者を治療する方法であって、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド又はその断片若しくは変異体を患者に投与することを含有してなる、方法を提供する。

【0025】

別の好適な態様において、本発明は、MUC-1腫瘍を患っているか又はそれに罹患する恐れのある患者を治療する方法であって、配列番号20～37の何れかに示す核酸又はその断片若しくは変異体を患者に投与することを含有してなる、方法を提供する。

【0026】

別の好適な態様において、本発明は、MUC-1腫瘍抗原に対する免疫応答を生じさせる方法であって、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド又はその断片若しくは変異体をコードする単離核酸分子及び任意に免疫細胞共刺激分子を、細胞性免疫応答を生じさせるのに十分な治療有効量を投与することを含む方法を提供する。好ましくは、ベクターは、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドであって、配列番号1～19の何れかに、少なくとも約10%、より好ましくは25%、さらに好ましくは、約40%、50%、60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有するポリペプチドを発現する。

【0027】

別の好適な態様において、本発明は、MUC-1腫瘍を患っているか又はそれに罹患する恐れのある患者を治療する方法であって、癌を患っている患者から樹状細胞を単離すること及び配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド又はその断片若しくは変異体によって樹状細胞を処理することを含有してなる方法を提供する。好ましくは、処理した樹状細胞を患者に投与する。

【0028】

別の好適な態様において、本発明は、弱い免疫原性抗原に対する免疫応答を生じさせる方法であって、HLAに対して高い親和力をもつポリペプチドを弱い免疫原に融合させたものを患者に投与することを含有してなる方法を提供する。

【0029】

本発明の一態様において、ポリペプチドは、配列番号19のHLAが結合している断片を含む。

【0030】

本発明の別の態様において、弱い免疫原は、分化抗原又は腫瘍抗原である。

【0031】

別の好適な態様において、配列番号19のHLAが結合している断片は、癌胎児性抗原、腫瘍抗原、自己抗原、ウイルス抗原などに融合している。

10

20

30

40

50

## 【0032】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド又はその断片若しくは変異体を提供する。

## 【0033】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドであって、配列番号1～19の何れかに、少なくとも約10%、より好ましくは25%、さらに好ましくは、約40%、50%、60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有するポリペプチドを提供する。

## 【0034】

本発明の一態様において、ポリペプチドは、配列番号19を含む。好ましくは、ポリペプチドは、高い親和力をもってHLA分子に結合し、また、HLAに対して天然型ポリペプチドよりも高い結合定数( $K_a$ )、及び/又はHLAに対して天然型ポリペプチドよりも低い解離定数( $K_d$ )を有する。

## 【0035】

本発明の別の態様において、ポリペプチドはムチン腫瘍抗原に由来し、好ましくは、ポリペプチドは、MUC-1の非VNTR領域に由来する。

## 【0036】

本発明の別の態様において、ポリペプチドの抗原提示細胞による抗原提示は、免疫応答、好ましくは細胞性免疫応答を誘導する。例えば、細胞性免疫応答は、細胞傷害性T細胞応答、Tヘルパー細胞応答又はB細胞免疫応答である。

20

## 【0037】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19のアミノ酸配列に、少なくとも約60%の相同性を有するアミノ酸配列を含むアゴニストポリペプチド又はその断片若しくは変異体を提供し、より好ましくは、当該アゴニストポリペプチドは、配列番号1～19のアミノ酸配列に、少なくとも約80%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、より好ましくは、当該アゴニストポリペプチドは、配列番号1～19のアミノ酸配列に、少なくとも約90%、95%又は99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

## 【0038】

別の好適な態様において、MUC-1腫瘍を患っているか又はそれに罹患する恐れのある患者を治療する方法が開示される。当該方法は、癌を患う患者から樹状細胞を単離すること、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドで当該樹状細胞を処理すること、処理した樹状細胞によって末梢血单核細胞を活性化すること、及び、活性化されたPBM C細胞を患者に投与することを含むことが可能である。

30

## 【0039】

本発明の他の態様は後述する。

## 【0040】

## (発明の詳細な説明)

本明細書において、本発明者らは、とりわけ、非VNTR領域の外側に存在し、癌治療における免疫療法にとって重要な、MUC-1の新規クラスI HLA-A2エピトープの同定について説明する。本発明者らは、IFN- $\gamma$ 産生によって測定したところ、これらのエピトープがヒトT細胞を活性化できることを明らかにしている。特に、アミノ酸第92～101位がであるためP-92と命名された一つのエピトープATWGQDVTSV(配列番号1)が、HLA-A2にもっとも強いレベルで結合し、ヒトT細胞においてIFN- $\gamma$ を最も大量に誘導することが示された。本発明は、また、エピトープALW GQDVTSV(配列番号19; P-93Lと命名)の何れかに示すエンハンサーAGONISTエピトープの作成法も提供する。

40

## 【0041】

ほぼすべての腫瘍が、多数の腫瘍関連抗原を発現しており、それらの大部分が腫瘍の中で不均一に発現されている。これは、固有の抗原不均一性、空間配置など、腫瘍環境における環境因子又は治療的介入による抗原連続変異によって起こりうることが分かっている

50

。したがって、多数の導入遺伝子を発現するワクチンは、この抗原不均一性という障害を緩和するのに十分役立ちうる。CEAは、結腸直腸癌、膵臓癌、及び胃癌の大部分で発現し、約70%の非小細胞肺癌、50%の乳癌、また、頭頸部癌や卵巣癌の一部など、その他の腫瘍型でも発現している(Thompson JA、Grunert F、Zimmermann W、「癌胎児性抗原遺伝子ファミリー：分子生物学及び臨床的視点(Carcinoembryonic antigen gene family:molecular biology and clinical perspectives)」、J Clin Lab Anal 1991; 5:344-66; 及び Robbins PF、Eggensperger D、Qi CF、Schlom J、「ヒトの乳癌及び肺癌におけるヒト癌胎児性抗原及び非特異的交差反応性抗原の発現の定義(Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas)」Int J Cancer 1993; 53:892-7)。一方、MUC-1は、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌及び卵巣癌の大部分と、他の癌型において過剰発現される(Kufe D、Inghirami G、Abe M、「新規モノクローナル抗体(DF3)とヒトの悪性対良性の乳癌との示差的反応性(Differential reactivity of a novel monoclonal antibody(DF3) with human malignant versus benign breast tumors)」、Hybridoma 1984; 3:223-32; Burchell J、Gendler S、Taylor-Papadimitriou Jら、「ヒト乳汁ムチンのコアタンパク質に対する乳癌反応性モノクローナル抗体の開発と特徴づけ(Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin)」、Cancer Res 1987; 47:5476-82; Zotter S、Hageman PC、Lossnitzer A、Mooi WJ、Hilgers J、「ヒト多型性上皮性ムチンの組織及び腫瘍における分布(Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin)」Cancer Rev 1988; 11-12:55-101; Kotera Y、Fontenot JD、Pcher G、Metzgar RS、Finn OJ、「乳癌、膵臓癌、及び結腸癌の患者由来の血清における、ヒトムチンMUC-1のVNTRエピトープに対する液性免疫(Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients)」、Cancer Res 1994; 54:2856-60; 及びGoydos JS、Eler E、Whiteside TL、Finn OJ、Lotze MT、「合成ムチンペプチドワクチンの第1相試験。腺癌患者における特異的免疫応答の誘導(A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma)」、J Surg Res 1996; 63:298-304)。したがって、これらの2つの抗原を個別標的又は複数標的することは、両抗原を発現する癌型にとって有利であることが分かる。

## 【0042】

特定の態様に於いては、核酸分子は図9に記載された通りの配列を有さない。

## 【0043】

特定の態様に於いては、核酸分子は図10に記載された通りの配列を有さない。

10

20

30

40

50

## 【0044】

特定の態様に於いては、核酸分子は図9に記載された通りの配列を有す。

## 【0045】

特定の態様に於いては、核酸分子は図10に記載された通りの配列を有す。

## 【0046】

特定の態様に於いては、核酸分子は図9に記載された通りの配列の連續したヌクレオチドである約30ヌクレオチド部分を有さない。

## 【0047】

特定の態様に於いては、核酸分子は図10に記載された通りの配列の連續したヌクレオチドである約30ヌクレオチド部分を有さない。 10

## 【0048】

特定の態様に於いては、核酸分子は図9に記載された通りの配列を有す。

## 【0049】

特定の態様に於いては、核酸分子は図10に記載された通りの配列を有す。

## 【0050】

特定の態様に於いては、核酸分子は、2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/37810及び2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/38643の図7及び/又は8に記載された通りの配列の連續したヌクレオチドである約30ヌクレオチド部分を有さない。 20

## 【0051】

特定の態様に於いては、核酸分子は、2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/37810及び2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/38643の図7及び/又は8に記載された通りの配列を有す。

## 【0052】

特定の態様に於いては、核酸分子は、2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/37810及び2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/38643に記載された通りの配列の連續したヌクレオチドである約30ヌクレオチド部分を有さない。

## 【0053】

特定の態様に於いては、核酸分子は、2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/37810及び2004年11月12日付け出願のPCT出願番号PCT/US04/38643に記載された通りの配列を有す。 30

## 【0054】

本明細書によって使用されている特定の用語の定義は以下の通りである。

## 【0055】

本明細書において、「分子」は、ベクター、抗体、タンパク質、薬剤などであって、治療に使用され、本発明の方法によって患者において検出することができるものすべてを含むよう総称的に用いられる。例えば、治療効果を高めるよう、又は細胞における遺伝子移入及び/又は遺伝子発現の有効性又は選択性を高めるよう一緒に作用することができる異なったタイプの遺伝子をコードする、多数の異なったタイプの核酸輸送用ベクターなどである。核酸輸送用ベクターは、裸の核酸として又は核酸が細胞の中に入るのを容易にする1種類以上の分子に結合した輸送用媒体にして提供することができる。適当な輸送用媒体は、リポソーム製剤、ポリペプチド、多糖類、リポ多糖類、ウイルス製剤（例えば、ウイルス、ウイルス粒子、人工ウイルスエンベロープなど）、細胞輸送用媒体などであるが、これらに限定されるものではない。 40

## 【0056】

本明細書において、「分子を細胞に投与する」（例えば、発現ベクター、核酸、サイトカイン、輸送用媒体、薬剤など）という用語は、細胞に分子を形質導入、形質移入、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、又はシューティング(shooting)を意味する。いくつかの態様において、標的細胞に輸送用細胞を（例えば、細胞融合によって

又は輸送用細胞が標的細胞の近くに来たら輸送用細胞を溶解することによって)接触させて、標的細胞の中に分子を導入する。

## 【0057】

「又は」という用語は、包括的にも排他的にも使用されることがある。

## 【0058】

「遺伝的改変」とは、細胞の正常なヌクレオチドに対する付加、欠失又は破損を意味する。APCの遺伝的改変を行うことができる方法が、本発明の趣旨と範囲に含まれる。当該技術分野に於いて承認されている方法は、ウイルスによる遺伝子導入、リポソームによる遺伝子移入、形質移入、及び遺伝子導入などである。

## 【0059】

「核酸分子」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、特段の記載がない限り、本明細書全体で互換的に使用される。本明細書において、「核酸分子」は、1本鎖型又は2本鎖らせん型になっている、リボヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、ウリジン又はシチジン;「RNA分子」)、又はデオキシリボヌクレオシド(デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、又はデオキシシチジン;「DNA分子」)のリン酸エステルの重合体又はホスホロチオエート及びチオエステルなど、それらのリン酸エステル類似体を意味する。2本鎖DNA--DNA、DNA-RNA、及びRNA--RNAのらせん型が可能である。核酸分子という用語、特にDNA分子又はRNA分子は、当該分子の1次構造及び2次構造を意味し、特定の3次形状に限定するものではない。すなわち、この用語は、とりわけ直鎖状又は環状DNA分子に見られる2本鎖DNA(例えば制限酵素断片)、プラスミド、及び染色体を含む。具体的な2本鎖DNA分子の構造を考察する際には、DNAの非翻訳鎖(すなわち、mRNAに相同な配列を有する鎖)に沿って5から3方向になっている配列だけを示すという通常の慣行に従って、配列を本明細書に記載するものとする。「組換えDNA分子」とは、分子生物学的処置を施したDNA分子である。

## 【0060】

本明細書において、また、添付の請求の範囲において、文の前後関係から明確に特段の指示がない限り、単数形('a'、「an」、及び'the')は、複数形への言及も含む。したがって、例えば、「宿主細胞(a host cell)」と言うときは、その宿主細胞が複数のときを含み、「抗体(the antibody)」と言うときには、1個以上の抗体、及び当業者に公知の等価物を指す等である。

## 【0061】

本明細書において、「断片又は分節」という用語は、核酸配列、遺伝子又はペプチドに適用される場合には、通常、約5個以上の連続した核酸塩基(核酸配列又は遺伝子について)又はアミノ酸(ペプチドについて)のことであり、長さが、典型的には約10個以上の連続した核酸塩基又はアミノ酸、より典型的には約20個以上の連続した核酸塩基又はアミノ酸、普通には約30個以上の連続した核酸塩基又はアミノ酸、好ましくは約40個以上の連続した核酸塩基又はアミノ酸、より好ましくは約50個以上の連続した核酸塩基又はアミノ酸、また、さらに好ましくは、少なくとも約60個から80個以上の連続した核酸塩基又はアミノ酸であろう。本明細書において、「重複断片」は、ある核酸又はタンパク質のアミノ末端から開始して、その核酸又はタンパク質のカルボキシ末端で終わる連続した核酸又はペプチドの断片を意味する。核酸又はペプチドの各断片は、次の核酸又はペプチドの断片と約1個以上の連続した核酸又はアミノ酸の配置を共有しており、より好ましくは約3個以上の連続した核酸又はアミノ酸の配置を共有しており、最も好ましくは約10個以上の連続した核酸又はアミノ酸の配置を共有している。

## 【0062】

核酸の場合、有意な「断片」とは、約17ヌクレオチド以上、一般的には約20ヌクレオチド以上、より一般的には約23ヌクレオチド以上、通常は約26ヌクレオチド以上、より通常は約29ヌクレオチド以上、しばしば約32ヌクレオチド以上、より頻繁には約35ヌクレオチド以上、典型的には約38ヌクレオチド以上、より典型的には約41ヌク

10

20

30

40

50

レオチド以上、普通には約44ヌクレオチド以上、より普通には約47ヌクレオチド以上、好ましくは約50ヌクレオチド以上、より好ましくは約53ヌクレオチド以上、また、特に好適な態様において、約56個又はそれ以上のヌクレオチドの連続した分節である。

#### 【0063】

「ベクター」は、細胞に形質導入、トランスフェクト（形質移入）、トランスフォーム（形質転換）又は感染して、当該細胞が、当該細胞に本来存在する核酸及び／又はタンパク質以外の、又は当該細胞にとって本来とは異なった態様で、核酸及び／又はタンパク質を発現させることができる組成物である。核酸が、細胞外の環境から細胞の中に移行すると、細胞は核酸によって「形質導入」される。核酸を細胞の中に移入するいずれの方法を用いることも可能であり、この用語は、別段の記載がない限り、細胞の中に核酸を輸送する特定の方法を意味するものではない。核酸が細胞の中に導入されて、安定して複製される場合に、細胞は核酸によって「トランスフォーム（形質転換）」される。ベクターは、ウイルス粒子、リボソーム、タンパク質コーティングなど、核酸が細胞の中に入れるよう補助する物質を含んでいてもよい。「細胞形質導入ベクター」は、核酸が一旦細胞の中に形質導入されれば、その細胞の中で安定して複製及び発現することができる核酸をコードするベクターである。

10

#### 【0064】

「転写調節配列」は、本明細書全体にわたって使用される一般用語であり、開始シグナル、エンハンサー、プロモーター、サイレンシング要素などのDNA配列であって、それらが作動可能に連結しているタンパク質コード配列の転写を誘導、阻害、又は調節するDNA配列を意味する。

20

#### 【0065】

本明細書において、「下流」という用語は、ヌクレオチド配列に沿った方向について言う場合には、5末端から3末端への方向を意味する。同様に、「上流」という用語は、3末端から5末端への方向を意味する。

#### 【0066】

本明細書において、「遺伝子」という用語は、遺伝子、及び現在公知のその変異体、及び解明される可能性がある更なる変異体を意味する。

#### 【0067】

30

「変異体」という用語は、ポリヌクレオチド配列との関係で用いられる場合、野生型遺伝子に関係したポリヌクレオチド配列を含む。この定義は、また例えば、「対立遺伝子」、「スプライス」、「分子種」、又は「多型」の変異体も含む。スプライス変異体は、参照分子に対し有意な一致を示すことができるが、通常は、mRNAプロセッシング過程におけるエクソンの選択的スプライシングによって、ポリヌクレオチドの数が多くなったり少なくなったりする。対応するポリペプチドは、さらなる機能ドメインを有することもあり、ドメインがなくなることもある。分子種変異体は、一つの分子種から別の分子種に変るポリヌクレオチド配列である。本発明において特に有用なのは、野生型標的遺伝子の変異体である。変異体は、核酸配列中の一つ又はそれ以上の突然変異によって生じ、改変されたmRNA、又はその構造若しくは機能が改変されているか、改変されていないポリヌクレオチドになることができる。いかなる天然型又は組換え型の遺伝子も、0個、1個又は多数の対立遺伝子型をもつ可能性がある。変異体を生じさせる一般的な突然変異による変化は、通常、ヌクレオチドの自然な欠失、付加又は置換とされる。これらの種類の変化は、単独で起こることがあり、又はその他と組み合わされて所定の配列において1回以上起こることがある。

40

#### 【0068】

本明細書において、ポリペプチドの「変異体」は、1個以上のアミノ酸残基が改変されているアミノ酸配列を意味する。変異体は、置換されたアミノ酸が同じような構造又は化学的性質を有する「保存的」変化（例えば、イソロイシンによるロイシンの置換）を有する可能性がある。より稀には、変異体が、「非保存的」変異（例えば、トリプトファンに

50

よるグリシンの置換)を有する可能性もある。同じような軽微な変異には、アミノ酸の欠失若しくは挿入、又はその両者も含みうる。どのアミノ酸残基が、生物活性を損なうことなく置換、挿入、又は欠失を行うことができるかを決定するための指針は、例えば、LASERGENEソフトウェア(DNASTAR)など、当該技術分野において周知のコンピュータプログラムを利用して見つけ出すことができる。

#### 【0069】

その結果得られるポリペプチドは、一般的に、互いに対しても有意なアミノ酸相同性を有するはずである。多型性変異体は、定められた種に属する被検体間ににおける、特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が変化しているもののことである。多型性変異体は、「一塩基変異多型」(SNP)、すなわち、ポリヌクレオチド配列が一塩基変化する単一塩基突然変異も包含する。

#### 【0070】

「相補的」又は「相補体」という用語は完全に互換的に使用されており、一方の配列が他方の配列に逆平行の方向で結合することができ、各配列の3'末端が、もう一方の配列の5'末端に結合して、一方の配列にあるA、T(U)、G、及びCが、他方の配列において、それぞれT(U)、A、C、及びGと配列されるとき、2つの配列は相補的であるという意味である。通常は、オリゴヌクレオチドの相補配列は、定義済みの配列に対し、少なくとも80%又は90%、好ましくは95%、最も好ましくは100%の相補性を有する。好ましくは、それらの対立遺伝子又は変異体が同定される。このような配列相同性は、BLASTプログラムを用いて測定することもできる。

10

#### 【0071】

「相補配列」がポリヌクレオチド配列を意味するとき、この用語は、塩基対形成ルールによる、別の核酸分子における塩基配列に関するものである。具体的には、この用語又は同様の用語は、例えば、2本鎖DNA分子の2本鎖間、又はオリゴヌクレオチドプライマーと、配列決定若しくは増幅すべき1本鎖核酸上のプライマー結合部位のヌクレオチドとの間などのように、ヌクレオチド又は核酸の間でハイブリダイゼーション又は塩基対形成することを意味する。相補的ヌクレオチドは、一般的に、A及びT(又はA及びU)、又はC及びGである。2つの1本鎖のRNA分子又はDNA分子は、最適に整列及び比較し、また、適当なヌクレオチド挿入又は欠失を入れると、一方の鎖のヌクレオチドが、他方の鎖のヌクレオチドの少なくとも約95%、通常は少なくとも約98%、また、より好ましくは約99%~約100%で対形成するときに実質的に相補的であると言われる。相補的なポリヌクレオチド配列は、例えばBLASTプログラムなど、周知のコンピュータアルゴリズム及びソフトウェアを使用するなど、さまざまな方法によって同定することが可能である。

20

#### 【0072】

ペプチド/アミノ酸配列に関連して使用されるとき、「実質的な配列相同性」という用語は、配列が実質的に同一であるか類似しているため、立体構造において配列が同一となり、そのため同じ生物活性を生じさせるペプチド/アミノ酸の配列を意味する。この用語は一般的な配列の進化を意味するものではない。

30

#### 【0073】

「実質的な配列相同性」を有するペプチド/アミノ酸配列とは、通常、少なくとも望ましい活性に関与することが知られている領域全体にわたって、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも80%の相同性を有する配列のことである。最も好ましくは、末端を除く部位で相違が5残基以下のものである。好ましくは、配列の相違とは、少なくとも上記領域に於いては、「保存的改変(conservative modifications)」である。

40

#### 【0074】

2つのペプチド/アミノ酸配列又は2つの核酸配列の配列相同性を測定するために、最適な比較を行う目的で配列を整列させる(例えば、最適に整列させるために、第1若しくは第2のアミノ酸配列又は核酸配列の一方若しくは両方にギャップを導入して、比較するために相同でない配列を無視する)。例えば、比較するために整列させる参照用配列の長

50

さは、当該参照用配列の 30 % 以上、好ましくは 40 % 以上、より好ましくは 50 % 以上、さらに好ましくは 60 % 以上、さらにより好ましくは 70 %、80 % 又は 90 % 以上である（例えば、第 2 の配列を、例えば 100 アミノ酸残基を有する第 1 のアミノ酸配列に整列させる場合、30 アミノ酸残基以上、好ましくは 40 アミノ酸残基以上、より好ましくは 50 アミノ酸残基以上、さらに好ましくは 60 アミノ酸残基以上、さらにより好ましくは 70、80 又は 90 アミノ酸残基以上を整列させる）。そして、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第 1 配列中の位置が、第 2 配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められていれば、その位置で分子は一致している（本明細書において、アミノ酸又はヌクレオチドの「相同性」は、アミノ酸又はヌクレオチドの「配列相同性」と同じである）。2 つの配列間における相同性は、2 つの配列を最適に整列させるために導入する必要があるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮した上で、それらの配列に共通する同一の位置数の関数である。

#### 【 0075 】

本明細書において、「タンパク質」及び「ポリペプチド」は互換的に使用される。「ペプチド」という語は、2 本以上のアミノ酸又はアミノ酸類似化合物（非天然型アミノ酸など）の鎖であって、ペプチド (- N H C O - ) 結合によって隣接するアミノ酸と結合している鎖を意味する。したがって、本発明に係るペプチドは、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ミメトープ (mimotope) 及びペプチド模倣体を含む。ミメトープ及びペプチド模倣体を調製する方法は当該技術分野公知である。

#### 【 0076 】

本明細書において、「ミメトープ」及び「ペプチド模倣体」は互換的に使用される。ある化合物 X の「ミメトープ」とは、X の機能的活性に必要な X の化学構造が、X の立体構造を模倣する別の化学構造で置き換えられている化合物を意味する。ペプチド模倣体の例には、ペプチド骨格が一つ又はそれ以上のベンゾジアゼピン分子（例えば、James, G. L. ら (1993) Science 260 : 1937 - 1942 参照）及び「レトロインベルソ (retro-inverso)」ペプチド (Sisto の米国特許第 4,522,752 号を参照されたい）によって置換されているペプチド化合物などがある。また、「ミメトープ」及び「ペプチド模倣体」という用語は、天然型のアミノ酸以外の部分であって、ペプチドの機能を顕著に損なう程に干渉することなく、立体構造的及び機能的にペプチド含有化合物の特定のアミノ酸の代わりとなる部分も意味する。アミノ酸模倣体の例は、D 型アミノ酸などである。周知のペプチド合成処理法を用いて、一つ又はそれ以上の D 型アミノ酸で置換されたペプチドを作製することができる。さらなる置換には、例えば、b - シアノアラニン、カナバニン、ジエンコル酸、ノルロイシン、3 - ホスホセリン、ホモセリン、ジヒドロキシフェニルアラニン、5 - ヒドロキシトリプトファン、1 - メチルヒスチジン又は 3 - メチルヒスチジンなどの官能基をもつ変異型側鎖を有するアミノ酸類似体などがある。

#### 【 0077 】

本明細書において、化合物 X の「類似体」は、X の機能的活性に必要な X の化学構造を保持するが、X とは異なる一定の化学構造も含む化合物を意味する。天然のペプチドの類似体の例は、一つ又はそれ以上の非天然型アミノ酸を含むペプチドである。また、「類似体」という用語は、修飾されたミメトープ及び / 又はペプチド模倣体、修飾されたペプチド及びポリペプチド、並びにペプチド及びポリペプチドの対立遺伝子変異体を含むものもある。したがって、ペプチドの類似体は、本来のペプチドに対して実質的に相同、すなわち換言すると、実質的な配列相同性を有するペプチド類似体を作り出すことができる。「アミノ酸」という用語は当該技術分野において公知の意味をもつ。好適なアミノ酸は合成誘導体はもとより天然型アミノ酸及び例えばカゼイン、すなわちカザミノ酸などのタンパク質又は、例えば、酵母；肉の分解物などの動物性産物；大豆蛋白、綿実蛋白、コーンスティーブリカーなどの植物性産物の酵素分解物若しくは化学分解物に由来するアミノ酸などである（例えば、「トレーダーの発酵用培地案内 (Traders' Guide

10

20

30

40

50

to Fermentation Media)」、Traders Protein, Memphis、テネシー州(1988)、「バイオテクノロジー：産業微生物学教科書(Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology)」、Sinauer Associates, Sunderland、マサチューセッツ州(1989)、及び「コーンスティーブリカーに関する製品データシート(Product Data Sheet for Corn Steep Liquor)」、Grain Processing Corp.、アイオワ州、を参照されたい)。

#### 【0078】

本発明に係る組換えポリペプチドは、当該技術分野に於いて周知の処理法によって、発現系を含む遺伝的に改変された宿主細胞から調製することができる。したがって、更なる態様において、本発明は、ポリヌクレオチド又は本発明に係るポリヌクレオチドを含む発現系、このような発現系によって遺伝的に改変された宿主細胞、及び組換え技術によって本発明に係るポリペプチドを製造することに関する。無細胞翻訳系を用い、本発明に係るDNA構築物に由来するRNAを用いてこのようなタンパク質を產生させることができる。

#### 【0079】

組換え体を作製するために、宿主細胞を遺伝的に改変して、本発明に係るポリヌクレオチドのために発現系又はその一部を取り込ませることができる。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davisらの「分子生物学の基礎的方法(Basic Methods in Molecular Biology)」(1986)及びSambrookらの「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州(1989)など、多くの標準的な実験マニュアルに記載されている方法によって行うことができる。このような方法で好適なものは、例えば、リン酸カルシウム形質移入法、DEAE-デキストラン媒介形質移入法、トランスベクション法、マイクロインジェクション、陽イオン性脂質による形質移入法、エレクトロポレーション、形質導入法、スクレープローディング法(scrape loading)、弾道導入法、感染などである。

#### 【0080】

「異種性」要素とは、それが天然に存在している実体とは異なる実体の中に導入されているか、その中で產生される要素を意味する。例えば、ある生物に由来し、遺伝子工学技術によって別の生物に導入されたポリヌクレオチドは、異種性ポリヌクレオチドであって、発現すると、異種性ポリペプチドをコードすることができるポリヌクレオチドである。同様に、天然のコード配列から取り出され、別のコード配列に作動可能に連結しているプロモーター又はエンハンサーは、異種性プロモーター又はエンハンサーである。代替可能な用語は「外在性(foreign)」又は「外来性(exogenous)」などである。異種性ヌクレオチド配列は、アミノ酸配列、即ちペプチド又はポリペプチドをコードすることができる。

#### 【0081】

本明細書において、「プロモーター」は、それが作動可能に連結されている遺伝子又はコード配列の転写を調節するポリヌクレオチド配列を意味する。さまざまな異なった由来からの構成型、誘導型及び抑制型のプロモーターなど多数のプロモーターは当該技術分野に於いて周知であり、クローニングされたポリヌクレオチド配列として又はクローニングされたポリヌクレオチド配列の範囲内で(例えば、ATCCなどの寄託機関及びその他の商業的供給源、又は患者から)入手可能である。

#### 【0082】

本明細書において「エンハンサー」とは、それが作動可能に連結されている遺伝子又はコード配列の転写を促進するポリヌクレオチド配列を意味する。さまざまな異なった由来

10

20

30

40

50

源からの多数のエンハンサーは当該技術分野で周知であり、クローニングされたポリヌクレオチド配列として又はクローニングされたポリヌクレオチド配列の範囲内で（例えば、A T C Cなどの寄託機関及びその他の商業的供給源、又は患者から）入手可能である。また、プロモーター配列（広範に使用されているC M V プロモーターなど）を含むポリヌクレオチドの多くが、エンハンサー配列も含んでいる。

#### 【0083】

「作動可能に連結されている」とは、このように表現される要素が、意図された通りに機能できる関係になって並列していることを意味する。プロモーターがコード配列の転写を調節すれば、そのプロモーターはコード配列に作動可能に連結されている。作動可能に連結されているプロモーターは、通常、コード配列の上流に位置しているが、必ずしもそれと隣接している必要はない。エンハンサーが、コード配列の転写を増加させれば、そのエンハンサーは、コード配列に作動可能に連結されている。作動可能に連結されているエンハンサーは、コード配列の上流、内部又は下流に位置することが可能である。ポリアデニル化配列が、コード配列からポリアデニル化配列まで転写が進行するようにコード配列の下流末端に位置していれば、そのポリアデニル化配列は、コード配列に作動可能に連結されている。

10

#### 【0084】

本明細書において、「遺伝子輸送」、「遺伝子移入」などは、導入するために用いられる方法には関係なく外来性のポリヌクレオチド（時に「導入遺伝子」と呼ばれる）を宿主細胞の中に導入することを意味する用語である。このような方法には、（例えば、ウイルス感染／トランスフェクション又はその他タンパク質もしくは脂質を利用する遺伝子輸送複合体による）ベクター介在型遺伝子移入法、及び、「裸の」ポリヌクレオチドの輸送を促進する技術（例えば、エレクトロポレーション、「遺伝子銃」輸送法及びポリヌクレオチドを導入するために利用されるその他さまざまな技術）などさまざまな周知の技術がある。導入されたポリヌクレオチドは、宿主細胞の中で安定的又は一時的に維持することができる。安定した維持には、通常、導入されたポリヌクレオチドが、宿主細胞に適合した複製開始点を含んでいるか、染色体外レブリコン（例えばプラスミド）、又は核若しくはミトコンドリアの染色体のような宿主細胞の中に組み込まれることが必要である。当該技術分野公知であるように、また本明細書に記載されているように、多くのベクターが、遺伝子の哺乳動物細胞への導入を媒介する能力があることが知られている。

20

#### 【0085】

本明細書において、「標的細胞」又は「受容細胞」は、外来性の核酸分子、ポリヌクレオチド及び／又はタンパク質のレシピエントとなることが望ましいか、レシピエントとなっている被検細胞又は細胞を意味する。この用語は、単細胞の後代を含むことも意図している。

30

#### 【0086】

本明細書において、「インビボ」遺伝子輸送、遺伝子導入、遺伝子治療などは、外来性ポリヌクレオチドを含むベクターを、ヒト又はヒト以外の哺乳動物などの生物の体内に直接導入することを意味する用語であり、それによって、外来性ポリヌクレオチドが、その生物の細胞の中にインビボで導入される。

40

#### 【0087】

核酸が、細胞外の環境から細胞の中に移入されると、細胞は当該核酸によって「形質導入」される。核酸を細胞の中に導入する任意の方法を使用することができる。すなわち、この用語は、別段の記載がない限り、核酸を細胞の中に輸送する特定の方法を意味するものではない。核酸が細胞の中に導入されて安定して複製されるとき、細胞はその核酸によって「形質転換」される。ベクターは、細胞によって発現されるべき核酸（通常はR N A又はD N A）を含む。ベクターは、ウイルス粒子、リポソーム、タンパク質コートなど、核酸が細胞の中に入るのを補助する物質を含んでいてもよい。「細胞形質導入ベクター」は、核酸が、細胞の中に一旦導入されると、当該細胞の中で安定して複製及び発現することができる核酸をコードするベクターである。

50

## 【0088】

本明細書において、「相同意組換え」は、1つのベクター上にあるヌクレオチド配列が、別のベクター上にあるヌクレオチド配列と相同であることを意味する。これら2つの配列を、制限酵素を用いて切断しライゲーションすると、これら2つのベクターが合成される。一般的には、数キロベースの(5'末端及び3'末端で)改变されない隣接DNAがベクターの中に含まれる(相同意組換えベクターの説明については、例えば、Thomass及びCapuccini, Cell, 51: 503 (1987)を参照)。

## 【0089】

相同性を有する核酸配列は、比較すると、有意な配列相同性又は類似性を示す。核酸において配列相同性の標準となるのは、当該技術分野に於いて一般的に利用される、配列比較による配列相同性と、ハイブリダイゼーション条件に基づく測定値のいずれかである。ハイブリダイゼーション条件は、下記に詳しく説明する。

## 【0090】

配列相同性及び配列相同性は、本明細書においては互換的に使用される。

## 【0091】

「ストリンジエンシー」は、温度、イオン強度及びホルムアミドなどの添加剤の濃度など、核酸が置かれる条件の組み合わせであって、二重鎖の解離をもたらすものを意味する。例えば、より高い温度、より低いイオン強度及びより高いホルムアミド濃度など、二重鎖がより解離しやすい条件を「高ストリンジエンシー」と呼ぶ。

## 【0092】

高い選択性を必要とする用途では、一般的に、例えば、約50°Cから約70°Cの温度で約0.02Mから約0.10MのNaClを供給するような、比較的低塩及び/又は高温の条件という、比較的高ストリンジエントな条件を用いてハイブリッドを形成することが望まれる。

## 【0093】

特定の用途では、より低いストリンジエンシー条件が必要とされると考えられている。これらの条件下では、プローブの配列と標的鎖の配列とが完全に相補的でなかったとしてもハイブリダイゼーションを起こす可能性があるが、複数の位置でミスマッチが起こる。塩濃度を上げ、温度を下げることにより、条件をより低ストリンジエントにすることができる。例えば、適度のストリンジエンシー条件は、約0.1から0.25MのNaClで約37°Cから55°Cとすることにより提供できるが、低ストリンジエンシー条件は、約0.15から0.9Mの塩、約20°Cから約55°Cという範囲の温度により提供できる。このように、ハイブリダイゼーション条件は、望ましい結果に応じて簡単に操作することができる。

## 【0094】

「ハイブリダイゼーション条件」という語句及びそれに文法的に相当する語句が、持続時間とともに使用される場合には、ハイブリダイゼーション反応混合液を、混合液中の反応物と随伴試薬の濃度に照らして、ポリヌクレオチドプローブを標的配列にアニールさせて、一般的には核酸二重鎖を形成するのに十分な時間、温度、pHの条件に置くことを指す。ハイブリダイゼーションを生じさせるのに必要とされる、そのような時間、温度及びpHの条件は、当該技術分野に於いて周知であるように、ハイブリダイズさせるポリヌクレオチドプローブの長さ、ポリヌクレオチドプローブと標的との間の相補性の程度、ポリヌクレオチドのグアニジン及びシトシンの含有量、望ましいハイブリダイゼーションのストリンジエンシー及びハイブリダイゼーション反応混合液における、ハイブリダイゼーションの反応速度に影響する可能性がある塩類又は付随試薬の存在に応じて決まる。あるハイブリダイゼーション反応混合液についてハイブリダイゼーション条件を最適にする方法は、当該技術分野に於いて周知である。

## 【0095】

本明細書において、核酸配列の比較に関して「実質的な配列相同性」とは、分節、又はそれらの相補鎖が、比較されたときに、適当なヌクレオチドの挿入又は欠失を伴って、又

10

20

30

40

50

クレオチドの約 50 %以上、一般的には 56 %以上、より一般的には 59 %以上、通常は 62 %以上、より通常は 65 %以上、頻繁には 68 %以上、より頻繁には 71 %以上、典型的には 74 %以上、より典型的には 77 %以上、普通には 80 %以上、より普通には 85 %以上、好ましくは約 90 %以上、より好ましくは約 95 から 98 %以上、及び特定の態様において、ヌクレオチドの約 99 %以上という高さで最適に整列されるときに同一であるという意味である。あるいは、選択的なハイブリダイゼーション条件下で、一般的には配列番号 1 に由来する断片を用いて、分節が、ある鎖又はその相補鎖にハイブリダイズする場合に実質的な配列相同性が存在する。一般的には、約 14 ヌクレオチド以上の伸長に対して約 55 %以上、好ましくは約 65 %以上、より好ましくは約 75 %以上、また最も好ましくは約 90 %以上の配列相同性があるときに選択的ハイブリダイゼーションが起きた。Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12 : 203 - 213 参照。配列相同性を比較する配列の長さは、説明されているとおり、より長い伸長鎖にわたることができ、特定の態様においては、約 17 ヌクレオチド以上、通常は約 20 ヌクレオチド以上、より通常的には約 24 ヌクレオチド以上、一般的には約 28 ヌクレオチド以上、より一般的には約 40 ヌクレオチド以上、好ましくは約 50 ヌクレオチド以上、また、より好ましくは約 75 ~ 100 ヌクレオチド以上伸長している。分節の終端は、さまざまな塩基対の組み合わせが可能である。配列の相同性又は相同率を決定するには、BLAST アルゴリズムなど、下記で検討する配列類似性に関するプロトコル及びプログラムを適宜利用する。

## 【0096】

10

「多型性」という用語は、遺伝子又はその一部（例えば、対立遺伝子変異体）の複数の形態の共存を意味する。2つ以上の異なった型、すなわち、2つの異なったヌクレオチド配列が存在する遺伝子の部位は「遺伝子の多型性領域」と呼ばれる。遺伝子の多型性領域における特異的な遺伝子配列が対立遺伝子である。多型性領域は単一のヌクレオチドであってもよく、その相同性が、さまざまな対立遺伝子で異なっている。多型性領域は、数々ヌクレオチド長のこともある。

## 【0097】

20

本発明に係る核酸及びタンパク質の配列は、さらに、例えば、同じファミリーの別のメンバーや関連配列を同定するために公開データベースに対して検索を行うための「クエリーア配列」として利用することもできる。このような検索は、Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403 - 10 のNBLAST 及びXBLAST プログラム（バージョン 2.0）を用いて行うことができる。BLAST ヌクレオチド検索を、NBLAST プログラムにより、スコア = 100、語長 = 12 で実施して、本発明のNIP2b、NIP2cL、及びNIP2cS の核酸分子に相同的ヌクレオチド配列を得ることができる。BLAST タンパク質検索を、XBLAST プログラムにより、スコア = 50、語長 = 3 で実施して、本発明のNIP2b、NIP2cL、及びNIP2cS のタンパク質分子に相同的アミノ酸配列を得ることができる。比較する目的でギャップを入れたアラインメントを得るために、Altschul (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17) : 3389 - 3402 に記載されているように、ギャップ付き BLAST を利用することができる。BLAST 及びギャップ付き BLAST プログラムを利用する際には、各プログラム（例えば XBLAST 及び NBLAST）の初期設定パラメータを用いることもできる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov 参照。

30

## 【0098】

40

手作業、又は当業者には公知の利用可能ないくつかのコンピュータプログラムを用いて配列類似性検索を行うことも可能である。好ましくは、利用可能であり当業者に公知であるblast (Blast) 及びスミス - ウォーターマン (Smith - Waterman) のアルゴリズムなどを用いることができる。blast は、ヌクレオチド配列及びタンパク質配列のデータベースの解析を支援するために設計されたNCBI の配列類似性検索ツールである。GCG パッケージは、公共データベース、又はローカルで利用できる検索

50

用データベースのいずれかで使用可能な B l a s t のローカル版を提供する。 G C G パッケージ v 9 . 0 は、配列を編集、マッピング、比較、及び整列することによって、配列の解析ができるようとする 1 0 0 を超える関連のあるソフトウェアプログラムを含む市販のソフトウェアパッケージである。 G C G パッケージに含まれるその他のプログラムには、例えば、 R N A の二次構造予測、核酸断片のアセンブリ、及び進化的解析を容易にするプログラムが含まれている。さらに、もっとも著名な遺伝子データベース（ジェンバンク、 E M B L 、 P I R 、及びスイスプロット）が、 G C G パッケージとともに頒布されていて、データベースの検索及び操作プログラムを用いて完全にアクセス可能である。インターネット、例えば、 h t t p : / / w w w . g c g . c o m / を通じて G C G にアクセスすることができる。フェッチ（ F e t c h ）は、受入番号に基づいてアノテーションされているジェンバンクレコードを得ることができる、 E n t r e z と同じような、 G C G で使用することができるツールである。別の配列類似性検索は、 P a n g e a 社の G e n e W o r l d 及び G e n e T h e s a u r u s によって行うことができる。 G e n e W o r l d 2 . 5 は、ポリヌクレオチド及びタンパク質の配列を解析するための自動化された、フレキシブルな高速処理用アプリケーションである。 G e n e W o r l d は、配列の自動的な解析とアノテーションを可能にする。 G C G のように、 G e n e W o r l d も、配列の相同性検索、遺伝子発見、配列のマルチプルアラインメント、二次構造予測、及びモチーフ同定のためのいくつかのツールを組み込んでいる。 G e n e T h e s a u r u s 1 . 0 （商標）は、多数の由来から情報提供する、配列及びアノテーションデータ登録サービスであり、公開及びローカルのデータに対する関係データモデルを提供する。

#### 【 0 0 9 9 】

別の代替的な配列類似性検索を、例えば B l a s t P a r s e によって行うことができる。 B l a s t P a r s e は、上記のストラテジーを自動的に行う、 U N I X （登録商標）プラットホーム上で動く P E R L スクリプトである。 B l a s t P a r s e は、関心のある標的受入番号のリストを取り出して、すべてのジェンバンクフィールドを、より簡単な検索及び解析を行うための「関係データベース」フォーマットにして保存することができる「タブ区切り」テキストに構文解析して、融通性を与える。最終的には、簡単にソート、フィルター掛け、及びクエリを行うことができる一連の完全に構文分析されたジェンバンクレコード、及びアノテーションされた関係データベースが得られる。

#### 【 0 1 0 0 】

本明細書において、「特異的にハイブリダイズする」又は「特異的検出する」という用語は、核酸分子が、試料核酸のおよそ 6 個以上の連續したヌクレオチドにハイブリダイズできることを意味する。

#### 【 0 1 0 1 】

「実質的に精製された」は、本来の環境から取り出され、単離又は分離された核酸分子及びタンパク質であって、本来はそれらが結合している他の成分を約 6 0 % 以上、好ましくは約 7 5 % 以上、そして最も好ましくは約 9 0 % 以上含まない核酸分子及びタンパク質を意味する。

#### 【 0 1 0 2 】

「抗原」は、抗体又は T リンパ球（ T 細胞）と特異的に反応する物質である。「抗原結合部位」は、抗原と特異的結合する免疫グロブリン分子の一部である。さらに、抗原結合部位は、 M H C 分子又は T 細胞レセプターなどを含むが、これらだけに限定されない抗原結合分子上にある同様の部位を含む。「抗原処理」は、抗原を断片に分解して（例えば、蛋白質をペプチドに分解して）、「抗原提示細胞」によって特異的な T 細胞に対して提示するために、これらの断片の一つ又はそれ以上を（例えば、結合によって） M H C 分子と会合することを意味する。

#### 【 0 1 0 3 】

「樹状細胞」（ D C ）は強力な抗原提示細胞であり、インビオにおいて健全な適応的免疫反応を開始させることができる。活性化された成熟した D C が、 T 細胞の活性化及び増殖に必要なシグナルを提供することが明らかになっている。これらのシグナルは、 2 つの

10

20

30

40

50

タイプに分類することができる。第1のタイプは、免疫応答に特異性を付与するが、T細胞レセプター / CD3（「TCR / CD3」）複合体と、APCの表面上にある主要組織適合複合体（上記「MHC」）クラスI又はIIのタンパク質によって表される抗原ペプチドとの相互作用によって仲介される。シグナルの第2のタイプは、補助刺激シグナルと呼ばれるが、抗原特異的でもMHC拘束性でもなく、第1のタイプのシグナルが存在すると、T細胞の完全な増殖反応とT細胞エフェクター機能の誘導とをもたらすことができる。したがって、この2重のシグナル伝達は、活発な免疫応答を生じさせることができる。上記したとおり、ほとんどの鳥類以外の脊椎動物では、DCは、骨髓由来の前駆細胞から生じる。未成熟のDCは、末梢血及び臍帯血並びに胸腺に見出される。別の未成熟固体群が他所に存在する可能性がある。さまざまな成熟段階にあるDCが、脾臓、リンパ節、扁桃腺及びヒトの腸に見出される。鳥類のDCは、鳥類に独特の一次免疫器官であるファブリキウス嚢でもに見出すことができる。好適な態様において、本発明の樹状細胞は、哺乳動物の細胞であり、好ましくはヒト、マウス、又はラットの細胞である。

#### 【0104】

「共刺激分子」は、T細胞の表面上のT細胞レセプターが結合しているペプチド / MHC複合体とともに作用すると、ペプチドに結合するT細胞を活性化する補助刺激効果をもたらす単一の分子又は分子を組み合わせたものを包含する。

#### 【0105】

本明細書において、「免疫レセプター」は、クラスI MHC (HLA - A、-B、-C、-Gなど) 及び、例えば、Gp49、PIR、PIRA、PIRB、LIR、NKR - P1、NKp46、Digr1、ILT、MIR、KIRなど、その他の免疫関連レセプターを意味するだろう。MHCは、MHCクラスII及びMHCクラスIII、それらの誘導体及び変異体など、その他のクラスも含むことも可能である。ヒトMHC複合体は、ヒト白血球抗原 (HLA) 複合体とも呼ばれる。MHC抗原は、MHCクラスI抗原 (ヒトでは、このクラスにHLA - A、-B及び-C抗原が含まれる)、及びMHCクラスII抗原 (ヒトでは、このクラスにHLA - DP、-DQ、及び-DR抗原が含まれる) に分類される。したがって、「MHC - II抗原」、「MHCクラスII抗原」、及び「MHCクラスII移植抗原」という用語は、本明細書において互換的に使用され、ヒトではHLA - DP、-DQ、及び-DR抗原を含む、このクラスのタンパク質を意味する。「MHCクラスII遺伝子」、及び「MHC - II遺伝子」という用語は、本明細書において互換的に使用され、MHCクラスII移植抗原をコードする遺伝子を意味する。「MHC - II」という用語は、本明細書においては、MHCクラスII移植抗原をコードする遺伝子座を意味し、また、この遺伝子座によってコードされる一群のタンパク質を意味する。移植抗原は、MHCクラスI及びIIの抗原以外の細胞表面分子も含む。これらの抗原には以下のものがある。(1) 血液細胞認識に関わるABO抗原、(2) 白血球細胞間の認識に関わるICAMなどの細胞接着分子、及び(3) HLA - 1抗原を含むが、MHC複合体によってコードされてはいない44kdの重鎖ポリペプチドと結合しているポリペプチドである2 - ミクログロブリン。HLAのハプロタイプ / アロタイプは、患者毎に異なっているため、患者のHLA型を判定するのにしばしば役立つ。HLA型は、標準的なタイピング法と、Ficol勾配法によって精製された末梢血リンパ球 (PBL) とによって判定することが可能である。

#### 【0106】

「診断」又は「診断する」とは、病的状態の存在又は性質を同定することを意味する。診断法は、その感度及び特異性が異なる。診断測定法の「感度」とは、試験の結果陽性とされた病気をもつ患者の割合（「真の陽性」の割合）である。測定法によって検知されなかった、病気をもつ患者は「偽陰性」である。病気でなく、測定法で陰性という試験結果になった患者は「真の陰性」と呼ばれる。診断測定法の「特異性」は、1引く偽陽性の割合であるが、ここで「偽陽性」の割合は、試験で陽性という結果が出たのに病気でない者の割合と定義される。具体的な診断法で確定的な病状診断ができなくても、診断に役立つ陽性の表示を提供すれば十分である。

10

20

30

40

50

## 【0107】

「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用され、治療すべき哺乳動物である対象を意味し、ヒトである患者が好適である。場合によっては、本発明に係る方法は、マウス、ラット、及びハムスターなどのげっ歯類、ならびに靈長類などであるが、これらに限定されない、実験動物において、獣医学的用途において、また、病気に対する動物モデルの開発において用途がある。

## 【0108】

「標識分子」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、又は抗体を標識するために使用される化学的又は生化学的な部分である。それらは、放射性核種、酵素、基質、補助因子、阻害因子、蛍光剤、発色剤、化学発光剤、磁気粒子などであるが、これらに限定されるものではない。レポーター分子は、特定のポリヌクレオチド、ポリペプチド、又は抗体に特異的に結合し、その存在を確認して、定量を可能にする。

10

## 【0109】

本明細書において「試料」は、広い意味をもつ。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド及び抗体などを含む試料は、体液；細胞調製物の可溶性画分、すなわち細胞を増殖させた培地；染色体、オルガネラ又は細胞から単離若しくは抽出された膜；溶液中にあるか、又は基質に結合したゲノムDNA、RNA、又はcDNA、ポリペプチド、又はペプチド；細胞；組織；組織プリント(tissue print)；指紋、皮膚又は髪などを含むことがある。

## 【0110】

20

本明細書において、「新鮮腫瘍」は、手術などの方法で宿主から取り出した腫瘍を意味する。

## 【0111】

本明細書において、「増殖性疾患」、「腫瘍性疾患」、「腫瘍」、「癌」は互換的に使用され、無制御で異常な細胞増殖を特徴とする症状を意味する。好ましくは、治療すべき癌は、MUC-1陽性の癌であり、異常な細胞増殖は、どの器官の細胞であってもよい。癌の例は、上皮性悪性腫瘍、芽細胞腫及び非上皮性悪性腫瘍などであるが、これらに限定されるものではない。本明細書において、「上皮性悪性腫瘍」は、皮膚に見られる上皮、すなわちより広範には、身体器官の内皮層に発生する新生物を意味する。

## 【0112】

30

「治療」は、ある疾患の病理又は症状の進行又は変化を阻止する意図で行われる介入である。したがって、「治療」は、治療上の処置と予防的又は防止的処置の両方を意味する。また、「治療」は、苦痛緩和医療としても特定することができる。治療を必要とする者には、すでに疾患有する者及び疾患を予防しようとする者が含まれる。腫瘍(例えば、癌)の治療において、治療薬は、腫瘍細胞の病変を直接に減少させるか、腫瘍細胞をして、例えば、放射線及び/又は化学療法など、他の治療薬による治療に対してより感受性を高めることができる。

## 【0113】

本明細書において、「そのような治療を必要とする」とは、治療を必要としている、又は治療により恩恵を受ける患者がヒトである場合に、医師、看護師、又は臨床看護師などの介護者による判断である。この判断は介護者の専門知識における各種要因に基づいてなされるが、これには本発明の組成物によって治療可能な病気に、患者が罹患しているか又は罹患する恐れがあるという知見を含むものである。

40

## 【0114】

本明細書において使用される「免疫系の細胞」又は「免疫細胞」は、B細胞とも呼ばれるBリンパ球、T細胞とも呼ばれるTリンパ球、ナチュラルキラー(NK)細胞、リンフォカイン活性化キラー(LAK)細胞、单球、マクロファージ、好中球、顆粒球、肥満細胞、血小板、ランゲルハンス細胞、幹細胞、樹状細胞、末梢血单核細胞、腫瘍浸潤(TIL)細胞、ハイブリドーマなど遺伝子改変免疫細胞、薬剤で改変された免疫細胞及び上記細胞型の誘導体、前駆細胞又は先駆細胞などであるが、これらに限定されることなく、ア

50

ッセイすることができる免疫系のあらゆる細胞を含むという意味である。

【0115】

「免疫エフェクター細胞」は、抗原に結合することができる細胞であって、免疫応答の仲介をする細胞を意味する。これらの細胞は、T細胞（Tリンパ球）、B細胞（Bリンパ球）、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞及び細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、例えば、CTL株、CTLクローン及び腫瘍、炎症性又はその他の浸潤に由来するCTLなどであるが、これらに限定されるものではない。

【0116】

「T細胞」又は「Tリンパ球」は、胸腺で発生するリンパ球のサブセットであり、CD3複合体のタンパク質と結合するヘテロダイマーのレセプター（例えば、細胞の抗原/MHC特異性に関するT細胞表面上のヘテロダイマータンパク質である再構成されたT細胞レセプター）を有するサブセットである。T細胞の応答は、別の細胞に対するそれらの作用（例えば、標的細胞傷害、マクロファージ、活性化、B細胞活性化）、又はそれらが產生するサイトカインを測定することによって検出することができる。

10

【0117】

本明細書において「活性化T細胞」という用語は、T細胞活性化を表す抗原（すなわちT細胞活性化マーカー）を発現するT細胞を意味する。T細胞活性化マーカーの例は、CD25、CD26、CD30、CD38、CD69、CD70、CD71、ICOS、OX-40及び4-1BBなどであるが、これらに限定されるものではない。活性化マーカーの発現は、例えば、ウエスタンプロット解析、ノーザンプロット解析、RT-PCR、  
20 免疫蛍光アッセイ法及び蛍光標示式細胞分離装置（FACS）による解析など、当業者に公知の技術で測定することができる。

20

【0118】

本明細書において、「静止T細胞」は、T細胞活性化マーカーを発現しないT細胞を意味する。静止T細胞は、CD25<sup>-</sup>、CD69<sup>-</sup>、ICOS<sup>-</sup>、SLAM<sup>-</sup>及び4-1BB<sup>-</sup>であるT細胞などであるが、これらに限定されるものではない。これらマーカーの発現は、ウエスタンプロット解析、ノーザンプロット解析、RT-PCR、免疫蛍光アッセイ法及び蛍光標示式細胞分離装置（FACS）による解析など、当業者に既知の技術によつて測定することができる。

30

【0119】

「CD4」は、APCの表面上にあるMHCクラスII分子に結合している抗原ペプチドのT細胞レセプターによる認識にとって重要な細胞表面タンパク質である。活性化が起きると、無処理のCD4<sup>+</sup>T細胞は、Th1細胞及びTh2細胞という、それぞれの細胞型が、それらが产生するサイトカインによって特徴付けられている、少なくとも2つの細胞型の1つに分化する。「Th1細胞」は、主に、細胞性免疫及び炎症反応に対してマクロファージを活性化することに関するが、一方、「Th2細胞」又は「ヘルパーT細胞」は、主に、B細胞を刺激して抗体を產生させる（液性免疫）に関与する。CD4は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対するレセプターである。Th1細胞に対するエフェクター分子は、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、CD40リガンド、Fasリガンド、IL-3、TNF- $\beta$ 及びIL-2などであるが、これらに限定されるものではない。  
40 Th2細胞に対するエフェクター分子は、IL-4、IL-5、CD40リガンド、IL-3、GS-CSF、IL-10、TGF- $\beta$ 及びエオタキシンなどであるが、これらに限定されるものではない。Th1型サイトカイン反応の活性化は、Th2型サイトカイン反応を抑制することができる。

40

【0120】

「CD8」は、MHCクラスI分子に結合した抗原ペプチドのT細胞レセプターによる認識に重要な細胞表面タンパク質である。CD8<sup>+</sup>T細胞は、通常、「細胞傷害性T細胞」又は「キラーT細胞」及び活性型マクロファージになる。エフェクター分子は、ペーフォリン、グランザイム、Fasリガンド、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及びTNF- $\beta$ などであるが、これらに限定されるものではない。

50

## 【0121】

本明細書において、抗体と、タンパク質もしくはペプチドとの相互作用について「特異的結合」又は「特異的に結合する」という用語は、この相互作用が、タンパク質上の特定の構造（すなわち、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存することを意味する。すなわち、抗体が、タンパク質一般ではなく、特異的なタンパク質の構造を認識して結合する。例えば、ある抗体がエピトープ「A」に対して特異的であれば、標識された「A」及び当該抗体を含む反応液中に、エピトープA（すなわち、遊離した非標識のA）を含むタンパク質が存在すると、当該抗体に結合した標識付きAの量が減少する。一般的に、「特異的結合」は、例えば、抗原提示細胞上にあるMHC分子及びペプチドへのTリンパ球によって発現されるT細胞レセプターの結合など、免疫関連分子の、そのリガンドに対する結合を意味する。

10

## 【0122】

「活性」、「活性化」又は「増強」は、免疫細胞が反応して、測定可能なレベルで免疫機能を示すことができるということである。活性化の程度を測定するとは、事前に活性化された結果としてさらに刺激されると、増強された活性を発現できる免疫細胞の能力を定量的に測定することを意味する。この増強された能力は、免疫細胞が刺激されて、低用量の刺激物質に応答して活性に至らしめられる活性化プロセスの過程で生じる生化学的な変化によって生じる可能性がある。

## 【0123】

免疫細胞活性は、（1）細胞又はDNAの複製を測定することによる細胞増殖、（2）IFN- $\alpha$ 、GM-CSF又はTNF- $\alpha$ などのサイトカインの具体的な測定値を含む活性されたサイトカインの產生、（3）細胞媒介性の標的傷害又は溶解、（4）細胞分化、（5）免疫グロブリン产生、（6）表現型の変化、（7）走化性を有するケモタクチン（chemotaxis）に応答できることを意味する化学走化性因子又は走化性の產生、（8）その他いくつかの免疫細胞型の活性を阻害することによる免疫抑制、及び（9）活性化された免疫細胞が断片化されることを意味する、異常な活性化の指標としてのアボトーシス、等により測定可能であるがこれらに限定されるものではない。

20

## 【0124】

「アジュvant」は、それと混合された抗原に対する免疫応答を促進することができる物質である。宿主の種に応じて、さまざまなアジュvantを用いて、免疫学的応答を増強することができる。このようなアジュvantには、フロイント、水酸化アルミニウムなどの無機物ゲル及びリゾレシチン、フルロニックポリオール（pluronic polyols）、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、KLH及びジニトロフェノールなどの表面活性化物質、また、しばしばヒトで使用されるBCG（カルメット・グラン桿菌）及びコリネバクテリウム・バルブム、ならびにCCR6のリガンド及びその他のケモカインレセプターなどがあるが、これらに限定されるものではない。

30

## 【0125】

「ケモカイン」は、食細胞及びリンパ球などの細胞の移動及び活性化に関与する小さなサイトカインであり、炎症反応において役割を果たす。3つのクラスのケモカインが、成熟タンパク質の保存されたシステイン（C）残基の並び方によって定義されている。すなわち、CXC、つまり1個のアミノ酸残基によって、最初の2個の保存システイン残基が隔てられている ケモカイン；CC、つまり最初の2個の保存システイン残基が隣り合っている ケモカイン；C、つまり4個の保存システイン残基のうち2個（1番目と3番目）がない ケモカインである。CXCサブファミリーの中で、ケモカインは、さらに2つのグループに分けることができる。CXCケモカインの1つのグループは、アミノ末端近くにある1番目のシステイン残基の直前にELR（グルタミン酸-ロイシン-アルギニン）モチーフという特徴的なアミノ酸3個の配列を有する。CXCケモカインの2つ目のグループには、そのようなELRドメインは存在しない。ELRドメインを有するCXCケモカイン（IL-8、GRO/ $\beta$ / $\gamma$ 、マウスKC、マウスマIP-2、ENA-78、GCP-2、PBP/CTAPII/-TG/NAP-2など）は、ミエロペルオ

40

50

キシダーゼ及びその他の酵素の放出を伴う好中球脱顆粒を誘導する化学誘因物質及び活性化因子として主に好中球上で作用する。ELRドメインをもたないCXCCケモカイン（例えば、IP-10 / マウスCRG、Mig、PBSF / SDF-1、PF4など）、CCケモカイン（例えば、MIP-1<sub>α</sub>、MIP-1<sub>β</sub>、RANTES、MCP-1 / 2 / 3 / 4 / マウスJE / マウスマRC、エオタキシン、I-309 / TCA3、HCC-1、C10）及びCケモカイン（例えばリンフォタクチン）は、単球、樹状細胞、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、B-リンパ球、好塩基球及び好酸球を化学誘因して活性化する。

#### 【0126】

「サイトカイン」は、そのサイトカインが作用する細胞の表面上にある「サイトカインレセプター」を通して、別の細胞の行動に影響を与える細胞によって作られるタンパク質である。リンパ球によって製造されるサイトカインは、「リンフォカイン」とも称される。サイトカインの例は、インターロイキン、インターフェロンなどである。10

#### 【0127】

「免疫学的に有効な」とは、免疫応答を活性化して、癌などの増殖性細胞増殖疾患を予防又は治療するのに有効な量のペプチド又はその断片を意味する。言うまでもなく、そのような量は、多くの要素によって種及び患者に於いてさまざまである。例えば、マウスに比べてヒトでは、通常、より高い用量が効果的な免疫応答をもたらすために必要とする。

#### 【0128】

本明細書において、「ポリペプチド」という用語は、本明細書に記載されている配列を含む全長タンパク質など、あらゆる長さのアミノ酸鎖を包含する。本明細書に記載されている配列を含むタンパク質のエピトープを含むポリペプチドは、エピトープだけからなることもあり、別の付加的配列を含む場合もある。付加的配列は、天然のタンパク質に由来することあり、異種性のこともある。また、そのような配列は、免疫原性又は抗原性の性質を有することもある（がそうである必要はない）。20

#### 【0129】

本明細書において、「抗体」という用語は、少なくとも1つの結合ドメインからなるポリペプチド又はポリペプチドのグループを意味するが、ここで、抗体結合ドメインは、抗原の抗原決定基の特徴に相補的な内部表面形状と電荷分布を有する3次元結合スペースであって、抗原との免疫学的反応を可能にする3次元結合スペースを形成するための抗体分子の可変ドメインの折り畳みから形成される。抗体は、Fab断片、Fab<sub>2</sub>断片、F(ab)<sub>2</sub>断片及びF(ab')<sub>2</sub>断片だけでなく、結合ドメインを含む組換えタンパク質を含む。本明細書において「抗体」という用語は、抗体全体の改変によって作成されたか、又は組換えDNA法を用いてデノボ合成された抗体断片も含む。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又は单鎖抗体も含む。抗体の「Fc」部位は、1本以上の重鎖定常領域ドメインであるCH1、CH2及びCH3を含むが、重鎖の可変領域を含まない、免疫グロブリン重鎖の当該部位を意味する。30

#### 【0130】

本明細書において、「エピトープ」は、B-細胞及び/又はT細胞の表面抗原レセプターによって認識される（すなわち、特異的に結合される）ポリペプチドの一部である。エピトープは、通常、Paul、「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」、第3版、243-247(Raven Press, 1993)及びそこで引用されている参考文献に要約されているような周知の技術を用いて同定することができる。そのような技術には、天然のポリペプチドから得られたポリペプチドを、抗原特異的な抗血清及び/又はT細胞株もしくはクローンと反応できるかをスクリーニングすることなどが含まれる。ポリペプチドのエピトープは、（例えば、ELISA及び/又はT細胞反応性アッセイ法において）全長ポリペプチドの反応性と同様のレベルで、そのような抗血清及び/又はT細胞と反応する部位である。このようなスクリーニングは、通常、Harlow及びLane、「抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Labor

1020304050

actory、1988に記載されているものなど、当業者に周知の方法を用いて行うことができる。B-細胞及びT細胞のエピトープは、コンピュータ分析によって予測することも可能である。腫瘍組織で選択的に発現される、あるポリペプチドのエピトープを含むポリペプチドは、（付加的なアミノ酸配列の有無にかかわらず）本発明の範囲に含まれる。

#### 【0131】

本明細書において、「アゴニストポリペプチド」は、天然のポリペプチドよりも強い免疫応答を活性化するポリペプチドにおけるエピトープを意味する。アゴニストポリペプチド対天然ポリペプチドの性質の違いの例は、a)より低いペプチド濃度でのHLA分子結合、(b)解離アッセイ法におけるHLA分子に対するより高い親和力を示す、(c)抗原提示細胞とともに用いると、天然のペプチドを用いて誘導されたT細胞によるよりも多くのIFN- $\gamma$ の産生を誘導するなどであるが、これらに限定されるものではない。増加又は増強された免疫応答は、上記したように測定される。10

#### 【0132】

本明細書において、「天然のポリペプチド」は、自然環境の中で見出されるポリペプチドを意味する。例えば、天然のMUC-1腫瘍抗原は、患者の腫瘍細胞で発現されている。。

#### 【0133】

好適な態様において、アゴニストペプチドは、天然のポリペプチドに比べてより強い免疫応答を生じさせる。例えば、天然のP-92ペプチドと比べると、アゴニストペプチドは、(a)より低いペプチド濃度でHLA-A2に結合し、(b)解離アッセイ法においてHLA-A2に対してより高い親和力を示し、(c)抗原提示細胞とともに用いると、天然のペプチドを用いて誘導されたT細胞によって、より多くのIFN- $\gamma$ 産生を誘導し、また、(d)健常な有志協力者及び膵臓癌患者から、より効率的にMUC-1特異的ヒトT細胞株を作出することができた。最も重要なのは、アゴニストエピトープを用いて作成したT細胞株は、天然のエピトープでパルスされた標的の溶解及びMUC-1を発現するHLA-A2ヒト腫瘍細胞の溶解において、天然のエピトープを用いて作成したT細胞株よりも効率的であったということである。20

#### 【0134】

別の好適な態様において、腫瘍、感染症などに罹っているか、それらに罹患する恐れのある患者を、例えば、樹状細胞(DC)など、配列番号1~19の何れかに示すポリペプチド又はその断片若しくは変異体をコードするウイルスベクターによって形質導入されている、自己抗原を提示する細胞であって、任意に共刺激分子を発現する細胞によって治療する。例えば、rF-MUC-1/TRICOMに感染した自系DCをAPCとして用いた。rF-MUC-1/TRICOMは、MUC-1及び三連構造のヒト共刺激分子(TRICOMと命名されたB7-1、ICAM-1及びLFA-3)に対する導入遺伝子を含む複製欠損型アビポックスベクターである。rF-MUC-1/TRICOMは、ヒトDCに効率的に感染して、共刺激分子のそれぞれを、MUC-1同様、DC表面上で過剰発現させることができた(表2)。30

#### 【0135】

別の好適な態様において、本発明は、弱い免疫原性抗原に対する免疫応答を生じさせる方法であって、弱い免疫原に融合したHLAに対して高い親和力を有する、配列番号1~19のいずれか1つの何れかに示すアゴニストポリペプチド、その変異体又は断片を患者に投与することを含む方法を提供する。40

#### 【0136】

好適な態様において、本発明は、例えばMUC-1などの腫瘍抗原に由来するアゴニストポリペプチド抗原であって、当該アゴニストポリペプチドが、天然のポリペプチドに比べると強い免疫反応刺激するアゴニストポリペプチド抗原をコードする単離核酸を提供する。腫瘍抗原の別例は、HER2/neu、癌胎児性抗原(CEA)、p53などであるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0137】

50

50

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すアミノ酸配列に対応する核酸配列を含む核酸分子又はその断片若しくは変異体を提供する。配列番号1～19を以下に示す。

【0138】

配列番号 (ペプチド)	ペプチド配列	塩基配列	配列番号 (ヌクレオチド数)
1	ATWGQDVTSV	GCC/ACC/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	20
2	ALWGQDVTSV	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	21
3	ALLVLVCVLV	GCC/CTG/CTG/GTC/CTG/GTC/TGC/GTC/CTG/GTC	22
4	TISDVSVSDV	ACC/ATC/TCG/GAT/GTC/TCG/GTC/TCG/GAT/GTC	23
5	ALAIVYLIAL	GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG/ATC/GCC/CTG	24
6	VLVALAIVYL	GTC/CTG/GTC/GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG	25
7	YLIALAVQCQ	TAC/CTG/ATC/GCC/CTG/GCC/GTC/TGC/CAA/TGC	26
8	WGQDVTSVPV	TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC/CCA/GTC	27
9	REGTINVHDV	AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC/CAC/GAT/GTC	28
10	GTOSPFLLL	GGC/ACC/CAG/TCT/CCT/TTC/TTC/CTG/CTG/CTG	29
11	LAFREGTINV	CTG/GCC/TTC/AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC	30
12	TLASHSTKTD	ACT/CTG/GCC/TCG/CAC/TCG/ACC/AAG/ACC/GAT	31
13	LQRDISEMFL	CTG/CAA/AGA/GAT/ATC/TCG/GAA/ATG/TTC/CTG	32
14	AIWGQDVTSV	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	33
15	ALWGQDVTSL	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	34
16	AMWGQDVTSV	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	35
17	AMWGQDVTSL	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	36
18	AIWGQDVTSL	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	37
19	ALWGQDVTSV		

10

20

【0139】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示すアミノ酸を発現する単離された核酸分子又はその断片若しくは変異体を含むベクターを提供する。当該ベクターは、好ましくは、例えば、B7-1、ICAM-1及びLFA-3など免疫細胞共刺激分子をコードしている。

【0140】

30

さらに別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19の何れかに示す分子又はその断片若しくは変異体及び任意に、例えば、B7-1、ICAM-1及びLFA-3、35などの免疫細胞共刺激分子を含むベクターによる、樹状細胞の形質導入を提供する。これらの組換えベクターは、MUC-1<sup>+</sup>腫瘍と診断されている患者に対して特異的な抗腫瘍作用を提供する。しかし、この抗原は、1つの具体例にすぎず、如何なる意味でも制限的なものと解釈されるべきではない。この他にさまざまなタイプの癌を治療するために有用な抗原の例としては、過剰発現型又は突然変異体型の抗原が含まれるが、それらに限定されるものではない。例えば、乳癌、腎臓癌、前立腺癌及び他のHER2腫瘍などのHer2/neu<sup>+</sup>腫瘍、胃腸癌に対する癌胎児性抗原(CEA)、肺癌、消化管癌及び膀胱癌に対するK-ras、広範な腫瘍性成長に影響するp53、頭頸部癌におけるSARDT3。

40

【0141】

別の好適な態様において、癌に罹っているか、癌に罹患する恐れのある患者の樹状細胞を、アゴニストポリペプチドエピトープを発現する組換えベクターによってインビボで形質導入する。樹状細胞を患者から単離して、生体外でベクターとともに培養し、その後、培養された樹状細胞を患者の体内に再融合することができる。樹状細胞の培養は、下記の実施例において詳しく説明する。あるいは、このような治療を必要とする患者にベクターを投与することができる。

【0142】

好適な態様において、形質導入された樹状細胞は、例えば、それらの表面上にあるMU

50

C - 1 抗原アゴニストペプチド断片などの抗原を提示する。提示された抗原に対して特異的なリンパ球は活性化され、増殖して、MUC - 1 抗原を発現する腫瘍細胞を認識する。リンパ球は、B 細胞、T ヘルパー細胞及び細胞傷害性 T 細胞を含む。抗原エピトープを発現する細胞の免疫細胞による認識は、腫瘍細胞の破壊をもたらす。

【 0 1 4 3 】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号 1 ~ 19 の何れかに示すポリペプチド又はその断片若しくは変異体をコードする 1 つ又はそれ以上の、誘導型プロモーターに作動可能に連結する核酸配列を含む核酸ベクターを提供する。

【 0 1 4 4 】

別の好適な態様において、当該核酸ベクターは、ウイルスベクターやプラスミドなどである。好ましくは、当該核酸ベクターは、組織特異的な誘導型プロモーターを含み、また、免疫細胞共刺激分子を含んでいてもよい。

【 0 1 4 5 】

別の好適な態様において、配列番号 1 ~ 19 の何れかに示すポリペプチドのいずれか 1 つをコードする核酸配列を含むベクター。

【 0 1 4 6 】

別の好適な態様において、ベクターは、配列番号 1 ~ 19 の何れかに示すポリペプチドであって、配列番号 1 ~ 19 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 10 %、より好ましくは 25 %、さらにより好ましくは約 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 99.9 % の配列相同性を有するポリペプチドをコードする。

【 0 1 4 7 】

別の好適な態様において、本発明は、配列番号 1 ~ 19 の何れかに示すベクターのポリペプチド産物であって、配列番号 1 ~ 19 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 10 %、より好ましくは 25 %、さらにより好ましくは約 40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 99.9 % の配列相同性を有するポリペプチド産物を発現する宿主細胞を提供する。

【 0 1 4 8 】

本発明に従って、形質導入された樹状細胞は、抗原を免疫系細胞に提示し、免疫系を活性化して、例えば、MUC - 1 抗原を発現する腫瘍細胞などの腫瘍抗原エピトープを認識させる。

【 0 1 4 9 】

好適な態様において、ベクターは、下記の実施例に詳しく述べているように、アゴニストポリペプチド及び共刺激分子をコードする核酸分子を含むアビポックスペクターである。その他のベクターを用いることも可能である。好適なベクターは、ウイルスベクター、融合タンパク質及び化学抱合体などである。レトロウイルスベクターは、モロニーマウス白血病ウイルスなどである。DNA ウイルスベクターが好適である。ウイルスベクターは、選ばれた細胞に遺伝子を導入するために選択することが可能である。このようなベクターは、オルソポックス又はアビポックスベクターなどのポックスベクター、単純ヘルペス I 型ウイルス (HSV) ベクターなどのヘルペスウイルスベクター (Gellerら、1995、J. Neurochem., 64: 487; Limら、1995、「DNA クローニング：哺乳動物系 (DNA Cloning : Mammalian Systems)」、D. Glover 編、Oxford Univ. Press, オックスフォード, イギリス; Gellerら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 1149)、他のアデノウイルスベクター (Legal LaSallieら、1993, Science 259: 988; Davidsonら、1993, Nat. Genet. 3: 219; Yangら、1995, J. Virol. 69: 2004) 及びアデノ随伴ウイルスベクター (Kaplitt ら、1994, Nat. Genet. 8: 148; Kotin ら、国際公開第 98/11244 号 (WO 98/11244) (3/19/1998) 及び Chiorini ら、国際公開第 99/61601 号 (WO 99/61601) (12/2/1999) ) などである。

10

20

30

40

50

## 【0150】

ポックスウイルスベクターは、遺伝子を細胞の細胞質の中に導入する。アビポックスウイルスベクター、核酸を短期間発現させるだけである。アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター及び単純ヘルペスウイルスベクターは、神経細胞の中に核酸を挿入するのに好適である。アデノウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（約4ヶ月）よりも短い期間の発現（約2ヶ月）をもたらすが、これは、HSVベクターよりも短い。ベクターは、標準的な技術、例えば、感染、形質移入、形質導入又はトランスフォーメーション（形質転換）によって導入することができる。遺伝子導入法の例は、例えば、裸のDNAのカルシウムリン酸沈殿法、DEAEデキストラノン法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト融合法、リポフェクション法、細胞マイクロインジェクション法及びウイルスベクター法などである。10

## 【0151】

ベクターを用いて、本質的には、任意の望ましい標的細胞を標的することができる。例えば、定位注入法を用いて、ベクター（例えばアデノウイルス、HSV）を望ましい位置に向かわせることができる。その他に利用できる方法には、カテーテル法、静脈内、非経口、腹腔内及び皮下への注射並びに経口又はその他既知の経路による投与法が含まれる。

## 【0152】

さらに別の好適な方法はDNA免疫法である。DNA免疫法は、腫瘍マーカーをコードするプラスミドDNA（pDNA）ベクターの皮下注射を用いる。pDNA配列が、抗原提示細胞（APC）、好ましくは樹状細胞によって取り込まれる。細胞の内側に入るとすぐ、タンパク質をコードするDNAは転写・翻訳されて、リンパ球に提示される。20

## 【0153】

遺伝子構築物は、選ばれた核酸配列をコードし、好ましくは、遺伝子発現に必要な調節要素に作動可能に連結している細胞内輸送配列を含む。

## 【0154】

細胞に取り込まれると、遺伝子構築物は、機能的な染色体外分子として、細胞の中に存在し続け、及び／又は細胞の染色体DNAの中に組み込まれる。DNAは、細胞に取り込まれて、そこで、プラスミドの形で隔離した遺伝物質として留まる。あるいは、染色体の中に組み込まれ得る直鎖状DNAを細胞の中に導入することができる。細胞の中にDNAを導入するときは、染色体の中へのDNAの組み込みを促進する試薬を加えることができる。組み込みを促進するのに有用なDNA配列も、DNA分子の中に含まれうる。あるいは、RNAを細胞に投与することも可能である。遺伝子構築物を、セントロメア、テロメア及び複製開始点を含む直鎖状のミニ染色体として提供することも考えられる。遺伝子構築物は、細胞の中で生存する弱毒化した微生物又は組換え微生物ベクターの中で遺伝子物質の一部として残ることができる。遺伝子構築物は、組換えウイルスワクチンのゲノムの一部であってもよく、遺伝子物質は、細胞の染色体の中に組み込まれるか、染色体外に残ったままでいるかのいずれかである。30

## 【0155】

遺伝子構築物は、核酸分子の遺伝子発現に必要な調節要素を含む。これらの要素は、プロモーター、開始コドン、終止コドン及びポリアデニル化シグナルなどである。さらに、例えば、配列番号1～19の何れかに示すアゴニストポリペプチド又はその断片若しくは変異体などの、選択した配列の遺伝子発現に対してエンハンサーが必要とされる。これらの要素が、望ましいタンパク質をコードする配列に作動可能に連結していること、そして、調節要素が、それらが投与される患者の体内で機能できることが必要である。40

## 【0156】

開始コドン及び終止コドンは、通常、免疫原性標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部であると考えられている。しかし、これらの要素は、遺伝子構築物を投与される患者の体内で機能することが必要である。開始コドン及び終止コドンは、コード配列と同じ読み枠に存在しなければならない。

## 【0157】

1020304050

使用されるプロモーター及びポリアデニル化シグナルは、患者の細胞の中で機能しなければならない。

#### 【0158】

本発明を実施するために有用な、特に、ヒトの遺伝子ワクチンの產生に有用なプロモーターの例は、シミアン・ウイルス40(SV40)由來のプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVの長い末端反復配列LTR)プロモーターなどのヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、モロニーウイルス、ALV、CMV最初期プロモーターなどのサイトメガロウイルス(CMV)、エブスタイン・バー・ウイルス(EBV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、また、ヒト・アクチン、ヒト・ミオシン、ヒト・ヘモグロビン、ヒト・筋肉クレアチニン及びヒト・メタロチオネインなどのヒト遺伝子に由来するプロモーターなどであるが、これらに限定されるものではない。10

#### 【0159】

本発明を実施するために有用な、特に、ヒトの遺伝子ワクチンの產生に有用なポリアデニル化シグナルの例は、SV40ポリアデニル化シグナル及びLTRポリアデニル化シグナルなどであるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0160】

DNA発現に必要とされる調節要素に加えて、他の要素をDNA分子に含ませることもできる。そのような付加的要素には、エンハンサーなどがある。エンハンサーは、ヒト・アクチン、ヒト・ミオシン、ヒト・ヘモグロビン、ヒト・筋肉クレアチニン並びにCMV、RSV及びEBVに由来するエンハンサーなど、ウイルスのエンハンサーを含むが、これらに限定されないグループから選択することができる。20

#### 【0161】

遺伝子構築物は、構築物を染色体外に維持し、構築物のコピーを細胞の中に多数產生するために哺乳動物の複製開始点を備えることができる。例えば、In vitrorogen社(カリフォルニア州サンディエゴ)のプラスミドpCEP4及びpREP4は、エブスタイン・バー・ウイルスの複製開始点と、組み込まれることなく、多数のコピーのエピソーム複製を生じさせる核抗原EBNA-1のコードする領域とを含む。

#### 【0162】

タンパク質の產生を最大にするため、構築物を投与する細胞における遺伝子発現に十分に適した調節配列を選択することができる。さらに、細胞の中でもっとも効率的に転写されるコドンを選択することができる。当業者は、細胞の中で機能するDNA構築物を作成することができる。30

#### 【0163】

本発明に係る方法は、患者の組織に核酸分子を投与する工程を含む。いくつかの好適な態様において、核酸分子は、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、皮下、皮内、もしく局所的に、又は、洗浄液(lavage)によって、膣、直腸、尿道、頬及び舌下腺からなるグループから選択される粘膜組織に投与される。

#### 【0164】

いくつかの態様において、核酸分子は、促進剤の投与と同時に細胞に送達される。促進剤は、ポリヌクレオチド機能増進剤又は遺伝子ワクチン促進剤とも呼ばれる。促進剤は、例えば、1994年1月26日出願の国際出願番号PCT/US94/00899及び1995年3月30日出願の国際出願番号PCT/US95/04071で説明されており、両方とも参考されて本明細書に組み込まれる。核酸分子とともに投与される促進剤は、核酸分子との混合物として投与されるか、核酸分子の投与とは別に、同時に、その前に、又は後に投与することができる。40

#### 【0165】

いくつかの好適な態様において、本発明に係る遺伝子構築物は、例えば、安息香酸エステル、アニリド、アミジン、ウレタン及びこれらの塩酸塩で、局所麻酔剤ファミリーなどからなるグループから選択される促進剤とともに処方又は投与される。促進剤は、遺伝子構築物の前、それと同時、又はその後に投与される。促進剤及び遺伝子構築物は、同一の50

組成物に処方することができる。

【0166】

本発明のいくつかの態様において、患者は、まず、遺伝子構築物を投与する前に、促進剤の注射を受ける。すなわち、例えば、遺伝子構築物の投与の約1週間から10日前までに、患者は、まず促進剤を注射される。いくつかの態様において、患者は、遺伝子構築物を投与する約1から5日前又は後に促進剤を注射され、いくつかの態様においては、投与する24時間前又は後に促進剤を注射される。あるいは、もしすぐに使用されるのであれば、促進剤は、遺伝子構築物の投与と同時に、数分前、又は数分後に投与する。したがって、促進剤と遺伝子構築物を混合して、単一の薬学的組成物を作成することができる。

【0167】

10

いくつかの態様において、遺伝子構築物は、促進剤なしで、すなわち、促進剤を含まない処方剤とし、促進剤の投与と同時に遺伝子構築物を投与しない投与プロトコルを用いて投与される

【0168】

本発明に従って細胞に送達される核酸分子は、予防用及び/又は治療用の免疫剤として機能するタンパク質に対する遺伝子の鑄型として機能することができる。好適な態様において、核酸分子は、動物の細胞の中でコード領域を転写及び翻訳するために必要な調節配列を含む。

【0169】

20

本発明の更なる態様において、本明細書に記載されたアゴニストポリペプチドを、MUC-1陽性腫瘍の免疫療法に使用することができる。これらの態様において、化合物（ポリペプチド、抗体、又は核酸分子）は、好ましくは、薬学的組成物又はワクチンに取り入れられる。薬学的組成物は、このような化合物の一つ又はそれ以上、及び生理学的に許容される担体を含む。ワクチンは、一つ又はそれ以上のポリペプチド及びアジュバント又はリポソーム（その中に化合物が取り込まれる）などの免疫応答亢進剤を含むことができる。薬学的組成物及びワクチンは、さらに、例えば、米国特許第4,897,268号及び第5,075,109号に開示されているような生物分解性ミクロスフィアなどの送達系を含むことができる。本発明の範囲に含まれる薬学的組成物及びワクチンは、一つ又はそれ以上の別のポリペプチドなど、その他の化合物を含むこともできる。

【0170】

30

本発明の薬学的組成物において、当業者に既知の任意の適当な担体を用いることができるが、担体のタイプは、投与形態によって変る。皮下注射などの非経口投与用には、担体は、水、食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、又は緩衝液を好適に含む。経口投与させるためには、上記担体のいずれか、又は、マンニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース及び炭酸マグネシウムなどの固形担体を使用することができる。生物分解性ミクロスフィア（例えば、ポリ乳酸ポリグリコール酸）も、本発明に係る薬学的組成物の担体として使用することができる。

【0171】

40

さまざまなアジュバントのいずれかを、本発明に係るワクチンに使用して、免疫応答を非特異的に増進することができる。ほとんどのアジュバントは、水酸化アルミニウム又はミネラルオイルなど、急速な代謝から抗原を保護するよう設計された物質、及びリピドA、百日咳菌（Bordetella pertussis）又は結核菌に由来するタンパク質などの免疫応答刺激剤を含む。適当なアジュバントは、例えば、フロイント不完全アジュバント及び完全アジュバント（Difco Laboratories、デトロイト、ミシガン州）、メルクアジュバント65（Merck and Company社、ローウェー、ニュージャージー州）、ミヨウバン、生物分解性ミクロスフィア、モノホスホリルリピドA及びクワイルA（quail A）のように市販されている。GM-CSF又はインターロイキン-2、-7若しくは-12などのサイトカインもアジュバントとして使用できる。

50

**【 0 1 7 2 】**

別の好適な態様において、本発明は、MUC-1腫瘍に罹っているか、罹患する恐れのある患者を治療する方法であって、配列番号1～19の何れかに示すペプチド又はそれらの断片若しくは変異体を被験者に投与することを含む方法を提供する。

**【 0 1 7 3 】**

本発明によれば、細胞性免疫応答を生じさせるのに十分な治療有効量のアゴニストポリペプチドを投与することによってMUC-1腫瘍抗原に対する免疫応答を生じさせるが、ここで、アゴニストポリペプチドは、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド又はそれらの断片若しくは変異体のいずれか1つであり、場合によっては、免疫細胞共刺激分子であってもよい。好ましくは、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドであって、配列番号1～19のいずれか1つに、少なくとも約10%、より好ましくは25%、さらにより好ましくは、約40%、50%、60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有する。

10

**【 0 1 7 4 】**

ペプチドは、癌を罹っているか、癌に罹患する恐れのある患者に投与される。特定の癌についての明確な臨床診断が、疾患の初期段階を含めて、ペプチドを投与する根拠となる。MUC-1陽性癌のように、疾患の家族歴があり、確実な予後指標によって危険があると予測されている患者を予防的に治療して発症前に癌を阻止できる場合には、予防的に施用するのが妥当であり、又は手術後に投与することもできる。

**【 0 1 7 5 】**

20

ペプチドワクチンは、薬学的に許容される媒体に入れて数多くの可能な処方で投与することができる。短いペプチドの場合、免疫原性を高めるために、ペプチドをKLHなどの担体に結合させることができる。ワクチンは、その多くが当業者に公知のアジュバントとともに投与することができる。ワクチンで初回免疫化した後、追加免疫を行うことができる。ワクチンは、免疫応答を誘導するのに十分な投与量にして、当業者によって容易に決定することができる常法によって投与される。

**【 0 1 7 6 】**

予防に関連したペプチドの有効性は、以下の基準に基づいて判断される。限界希釈法によって測定されたペプチド反応性T細胞の頻度、ペプチド反応性T細胞株及びクローンの増殖反応、患者から樹立された望ましいペプチドに対するT細胞株及びクローンのサイトカインプロフィールなど。有効性は、反応性細胞の頻度の低下、天然型に比べ改変ペプチドによるチミジン取り込みの減少、並びにTNF及びIFN- $\gamma$ の減少によって確認される。臨床的測定値には、カプラン・マイヤー曲線上における、1年及び2年間隔での再発率、持続的な癌期進行の遅延、MRI上のT2画像の領域及び体積の変化を含む腫瘍の数及び大きさの減少並びにガドリニウム増強画像によって決定される病変部の数及び体積の減少などがある。

30

**【 0 1 7 7 】**

本発明に係るペプチド、その変異体及び断片は、単独で、又は薬学的組成物として投与することができる。簡単に言うと、本発明に係る薬学的組成物は、一つ又はそれ以上の薬学的又は生理学的に許容できる担体、希釈剤、又は賦形剤と混合された一つ又はそれ以上のペプチドを含む。このような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液、グルコース、マンノース、スクロース、又はデキストランなどの炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、又は、グリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）及び保存剤を含むことができる。さらに、本発明に係る薬学的組成物は、例えば、-インターフェロンのようなサイトカインなどの付加的有効成分を一つ又はそれ以上含むこともできる。

40

**【 0 1 7 8 】**

本発明に係る組成物は、例えば、経口、経鼻、静脈、頭蓋内、腹腔内、皮下、又は筋肉内への投与など、指示された投与形態に合わせて処方することができる。本発明の別の態

50

様の範囲内で、本明細書に記載された組成物を、徐放型インプラントの一部として投与することも可能である。さらに別の態様の範囲内では、凍結乾燥物としての安定性を提供する適当な賦形剤を利用して、本発明に係る組成物を、凍結乾燥物として処方化し、その後再水和することができる。

#### 【0179】

本発明に係る薬学的組成物は、治療（又は予防）すべき病気に適した方法で投与することができる。投与の量と頻度は、患者の状態、患者の病気のタイプと重度などの要素によって決められる。適当な投与量は臨床試験によって決定することができるが、本発明の特に好適な態様の範囲では、本明細書記載のペプチド、変異体、もしくはその断片、又は薬学的組成物を、約5から50mg/kgの範囲の用量で投与することができる。ペプチド類似体の投与量は、約5～50mg/kgであるが、より正確には試験をした後に決定される。患者を、上記したように、MRIにより治療の有効性及び臨床症状の悪化について観察することができる。10

#### 【0180】

MRIを用いて、ガドリニウム-DTPA-増強画像法（McDonaldら、Ann. Neurol. 36:14, 1994）により活動性病変を、又はT2加重技術（T2-weighted techniques）により病変の位置及び程度を測定することができる。簡単に言うと、基線MRIを得る。各後続実験に対し、同一の画像平面と対象位置を使用する。病変部の検出を最大にし、病変部の追跡を容易にするために位置決め及び画像化の順序を選択する。各後続実験において、同一の位置決め及び画像化の順序を使用する。放射線科医師によってMS病変の位置と程度を判定する。病変領域の輪郭を描き、切片ごとに合計して総病変領域を得る。新しい病変の証拠、活動性病変の出現率、病変領域の変化率という3つの解析を行うことができる（Pattyら、Neurology 43:665, 1993）。基線と比較して患者において、又は治療グループ対照群において統計的に有意な改善があったときには、治療による改善を確認する。20

#### 【0181】

本発明の別の態様において、癌を患っているか、癌に罹患する恐れのあると診断された患者に任意の腫瘍抗原ポリペプチドを投与することができる。同定された腫瘍抗原に相当するポリペプチドを用いて、免疫系の細胞を刺激して、例えば、CEA、p53、K-rasなどの腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞を認識及び溶解することができる。30

#### 【0182】

抗体の使用を含むさまざまな方法が腫瘍の治療において適用されているが、活性化された細胞傷害性T細胞を用いた試みに成功したことは、あったとしても、ほとんど記録されていない。理論的には、細胞傷害性T細胞は、腫瘍を治療する好適な手段である。しかし、細胞傷害性T細胞を特異的に活性化するために利用できる方法はなかった。抗体とは対照的に、CD8細胞の表面上にあるT細胞レセプターは、外来性抗原を直接認識することができない。抗原は、まず、樹状細胞など、T細胞レセプターに提示されなければならない。

#### 【0183】

CD8 T細胞への抗原提示は、クラスI型の主要組織適合複合体（MHC）分子によって行われる。主要組織適合複合体（MHC）は、免疫応答において重要な役割を果たす広範な糖タンパク質ファミリーをコードする大きな遺伝子座を意味する。MHC遺伝子は、HLA（ヒト白血球抗原：human leukocyte antigen）複合体とも呼ばれるが、ヒトの6番染色体上に位置する。MHC遺伝子によってコードされる分子は、細胞表面に存在して、組織移植片を「非自己」と認識することに大きく関わっている。したがって、膜結合型MHC分子は、T細胞による抗原の認識に密接に関係する。40

#### 【0184】

MHC産物は、I、II及びIIIという3つの主要なクラスに分けられる。主にヘルパー細胞として働くT細胞はCD4を発現し、最初に、クラスII分子と相互作用するが、一方、CD8発現細胞は、主に細胞傷害性エフェクター細胞を代表し、クラスI分子と50

相互作用する。

【0185】

クラスI分子は、内生タンパク質の細胞内分解から主に生じるペプチドに結合することができる膜糖タンパク質である。MHC分子と、ウイルス、バクテリア及びその他の外来性タンパク質由来のペプチドとの複合体は、T細胞の抗原反応性を開始させるリガンドを含む。これに対し、MHC分子と、正常な細胞産物から生じたペプチドとの複合体は、胸腺において、T細胞が自己ペプチドを寛容するように「教える」役割を果たす。クラスI分子は、完全無欠の抗原を提示するわけではなく、それらのペプチド断片であって、「ペプチド結合溝」上に「搭載された」ものを提示する。

【0186】

当業者に認識されるように、「宿主適合的」細胞又は「自系」細胞という用語は、細胞が投与される患者又は「宿主」のハプロタイプと同一又は類似したハプロタイプの細胞を意味する。

【0187】

ペプチドに結合したクラスI MHC分子だけを提示しても、通常は、CD8細胞を活性化する上で有効ではなかった。事実上、CD8細胞は、例えば、樹状細胞のように、ペプチド結合型クラスI MHC分子だけでなく、共刺激分子も提示するような抗原提示細胞によって活性化される。このような共刺激分子には、現在ではB7.1及びB7.2と命名された2つのサブグループになっていると認識されているB7、ICAM-1及びLFA-3などがある。また、インテグリンなどの細胞接着分子も、このプロセスを補助することが分かっている。

【0188】

樹状細胞は、血液など、すべての組織及び器官に見られる抗原提示細胞である。具体的には、樹状細胞は、Tリンパ球に抗原を提示する。すなわち、抗原を処理して提示し、未処理の記憶T細胞からの応答を刺激する。抗原提示における役割以外に、樹状細胞は、非リンパ組織と直接情報を交換して、非リンパを調査して傷害シグナル（例えば、虚血、感染、又は炎症）又は腫瘍増殖を測定する。シグナルがあると、樹状細胞は、リンパ球及び単球を始動させるIL-1を放出して免疫応答を開始させる。CD8 T細胞が、クラスI MHCが結合したペプチド及び共刺激分子を有する樹状細胞などの抗原提示細胞と相互作用すると、CD8 T細胞が活性化されて増殖してエフェクターT細胞になる。一般的には、参照して本明細書に取り込むJaneway及びTraversのImmunobiology、Current Biology Limited、ロンドン（1994）、を参照されたい。

【0189】

したがって、必要とされており、本発明が提供するものは、T細胞を活性化させることにより、その増殖を促し、例えばMUC-1などの望ましい抗原を発現する細胞に対して細胞傷害性とし、投与された抗原に特異的な記憶細胞を維持する手段である。このように、さまざまな腫瘍エピトープに対して免疫系が準備されており、自然発生癌が生じたら、準備された免疫細胞のプールが活性化して腫瘍細胞を認識し、死滅させる。

【0190】

好ましくは、免疫系に提示されるエピトープは、本明細書に記載されているようなアゴニストエピトープを含む。アゴニストポリペプチド又はその断片若しくは変異体は、好ましくは、配列番号1～19のアミノ酸配列と約60%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、より好ましくは、アゴニストポリペプチドは、配列番号1～19のアミノ酸配列に約80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、より好ましくは、アゴニストポリペプチドは、配列番号1～19のアミノ酸配列に少なくとも約90%、95%又は99.9%相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【0191】

記憶T細胞の生物学の概説は、Duttonら（1998）Ann. Rev. Immunol. 16: 201-23で見ることができる。記憶細胞は、さまざまなパターンの細

10

20

30

40

50

胞表面マーカーを発現し、未処理の細胞のやり方とは機能的に異なるいくつかの方法で応答する。ヒトの記憶細胞は CD45RA-、CD45RO+である。未処理細胞とは対照的に、記憶細胞は、全範囲のT細胞サイトカインを分泌する。

#### 【0192】

また、ケモカイン及びサイトカインも、免疫応答の発生において強力な役割を果たしている。白血球の輸送におけるケモカインの役割は、Bagagliini (1998) Nature 392: 565-8によって概説されており、そこでは、活性化のタイプと程度が異なるリンパ球の複雑な輸送における遊走反応がケモカインによって媒介されることが示唆されている。低分子を使用してケモカインを遮断することが、Bagagliini及びMoser (1997) J. Exp. Med. 186: 1189-1191によって概説されている。10

#### 【0193】

リンパ球ホーミングにおけるケモカインのさまざまな特異的役割については既述されている。例えば、Campbellら (1998) Scienceは、SDF-1 (PB SFとも呼ばれる)、6-C-kine (Exodus-2とも呼ばれる) 及びMIP-3 (ELC又はExodus-3とも呼ばれる) が、ほとんどのCD4+ T細胞など、循環液中のほとんどのリンパ球の接着を誘導し、MIP-3 (LARC又はExodus-1とも呼ばれる) が記憶CD4+ T細胞の接着を開始させたが、未処理のCD4+ T細胞は開始させなかつことを明らかにした。Tangemannら (1998) J. Immunol. 161: 6330-7は、リンパ球を二次リンパ器官へホーミングさせる高内皮細静脈 (HEV) 関連ケモカインである二次リンパ組織ケモカイン (SLC) の役割を開示している。Campbellら (1998) J. Cell Biol. 141 (4): 1053-9は、SLCに対するレセプターをCCR7として記載しており、また、そのリガンドであるSLCが、生理学的剪断 (physiological shear) 下におけるインテグリン依存性のリンパ球ローリングを迅速に停止できることを記載している。20

#### 【0194】

成熟B細胞は、免疫アッセイ法で測定することができる。例えば、CD19及びCD20などの細胞表面抗原によって、蛍光色素又は酵素で標識したモノクローナル抗体をこれらの抗原に用いて測定することができる。形質細胞に分化しているB細胞は、細胞内免疫グロブリンを染色して、固定した培養細胞塗抹標本における直接的免疫蛍光法によって数えることができる。30

#### 【0195】

成熟と細胞分化を測定するためにいくつか異なった方法を利用することができる。例えば、このような方法の1つは、細胞の表現型を測定することによる。免疫細胞の表現型及び任意の表現型の変化は、さまざまな免疫細胞型に特徴的な膜タンパク質に結合するモノクローナル抗体を用いて、免疫蛍光染色した後にフローサイトメトリーを行って評価することができる。

#### 【0196】

細胞分化を測定する第2の手段は、細胞機能を測定することによるものである。これは、細胞内の酵素、mRNA、遺伝子、タンパク質、もしくはその他の代謝物の発現、又は細胞からの分泌を測定することにより生化学的に行うことができる。また、バイオアッセイ法を用いて、機能的な細胞分化を測定し、又は患者の腫瘍、腫瘍細胞株若しくは新鮮腫瘍からの細胞に対する特異的抗体の産生を測定することもできる。40

#### 【0197】

免疫細胞は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗血清のいずれかで検出することができる多様な細胞表面分子を発現する。分化又は活性化を経た免疫細胞を、固定した培養細胞塗抹標本における直接的免疫蛍光法によって、特徴的な細胞表面タンパク質の存在を染色することによって数えることができる。

#### 【0198】

50

インビトロ T 細胞細胞傷害性アッセイ法が当業者に周知である。好適な方法は、5時間の $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイ法で細胞傷害性を測定することである。特に、20時間 $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイ法が好適である。本明細書において「標的細胞」とも呼ばれる腫瘍細胞を平底マイクロタイタープレートに塗布し、37度で一晩インキュベートする。翌日、標的を洗浄して、37度にて $^{51}\text{Cr}$ で標識する。 $^{51}\text{Cr}$ は、エンドサイトーシス又はピノサイトーシスによって標的細胞によって取り込まれ、細胞質の中に保持される。腫瘍細胞を含むウェルを洗浄した後、「エフェクター細胞」と呼ばれる腕付き(armed)又は腕なし(unarmed)のATCを、さまざまなE:T比で平板塗布し、37度で一晩インキュベートする。細胞溶解は、エフェクター細胞による標的細胞の破壊により標的細胞から上清の中に放出された $^{51}\text{Cr}$ の量を示す尺度である。マイクロタイタープレートを1000rpmで10分間遠心分離し、約50μlから約100μlの等量液を取り出して、放射活性のレベルを翌日ガンマカウンターで測定して、特異的溶解の割合(%)を計算する。

#### 【0199】

以下の公式を用いて、特異的溶解の割合を測定する。

$$\left( \frac{\text{標的細胞から放出される } ^{51}\text{Cr}}{\text{自然に標的細胞から放出される } ^{51}\text{Cr}} - \frac{\text{標的細胞から放出される } ^{51}\text{Cr の最大量}}{\text{自然に標的細胞から放出される } ^{51}\text{Cr}} \right) \times 100$$

#### 【0200】

自然に標的細胞から放出される $^{51}\text{Cr}$ は、エフェクター細胞が加えられていない腫瘍細胞を用いて測定される。標的細胞から放出される $^{51}\text{Cr}$ の最大量は、例えば、1M HClを加えることによって得られ、標的細胞の細胞質に存在する $^{51}\text{Cr}$ の総量を表す。

#### 【0201】

Tリンパ球の活性を測定するための他の方法は、下記の実施例において説明する混合リンパ球反応によるものである。それ以外にも、トリチル化チミジン( $^3\text{H-TdR}$ )による標的細胞の標識のような細胞傷害性アッセイ法を用いることができる。 $^3\text{H-TdR}$ は、標的細胞によって細胞の核の中に取り込まれる。 $^3\text{H-TdR}$ の放出は、DNAの断片化による細胞死の尺度となる。このアッセイ法は、上記したように行われるが、但し、インキュベートする時間は約48時間以上であり、50μlから約100μlの上清を、約1ml以上のシンチレーション液の存在下でベータカウンターによって測定する。上記の公式を用いて、特異的溶解の割合の計算を行う。

#### 【0202】

好適な態様において、ポリペプチドは、正常な被験者における発現レベルと比較して、少なくとも、癌の患者においてより高いレベルで発現されるが、好ましくは、ポリペプチドは、正常な被験者における発現と比較すると、癌の患者で約5から約10倍以上の高さで発現する。好ましくは、癌は、MUC-1<sup>+</sup>癌であり、被検者試料は、ヒト被検者のような靈長類などの哺乳動物被検対象から得る。

#### 【0203】

別の好適な態様において、本発明は、MUC-1腫瘍を患っているか、それに罹患する恐れのある患者を治療する方法であって、癌を患う患者から樹状細胞を単離すること、そして、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド又はそれらの断片若しくは変異体で上記樹状細胞を処理することを含む方法を提供する。好ましくは、処理した樹状細胞を患者に投与する。

#### 【0204】

さらに別の好適な態様において、自己樹状細胞を患者から単離し、本明細書で詳細に説明されているベクターによって形質導入し、培養して、再び、患者に再注入することができる。

#### 【0205】

「単離され」又は「精製され」た細胞集団は、それが本来結びついている細胞及び物質

10

20

30

40

50

を実質的に含まない。実質的に含まない A P C、又は実質的に精製された A P C とは、集団の 50 % 以上が A P C であり、好ましくは 70 % 以上、より好ましくは 80 % 以上、更により好ましくは 90 % 以上が、それらが本来一緒になっている非 A P C 細胞を含まないという意味である。

#### 【 0 2 0 6 】

細胞表面発現マーカーに基づいて、さまざまな成熟段階の樹状細胞を単離することができる。例えば、成熟樹状細胞は、提示するための新規のタンパク質を捕捉しにくくなるが、より容易に休止 T 細胞を刺激して成長及び分化させることができる。したがって、成熟樹状細胞が重要なものとなりうる。成熟樹状細胞は、形態の変化、非接着性及びさまざまなマーカーの存在によって同定することができる。このようなマーカーには、B7.2、<sup>10</sup> CD40、CD11c<sup>+</sup> 及び MHC class II などの細胞表面マーカーが含まれるが、これらに限定されるものではない。あるいは、炎症促進性サイトカインの産生を観察及び解析することによって、成熟を確認することができる。一般的なサイトフルオログラフィー及び細胞選別技術、ならびに蛍光標示式細胞分離装置 (FACS) などの装置を用いて、樹状細胞を集めて解析することができる。樹状細胞成熟のさまざまな段階の細胞表面抗原に対して特異的な抗体が市販されている。

#### 【 0 2 0 7 】

患者に投与される樹状細胞の量も、患者の健康状態によって変化するので、実施者がすべての適切な要素を考慮して決定すべきである。しかし、好ましくは約  $1 \times 10^6$  から約  $1 \times 10^{12}$ 、より好ましくは約  $1 \times 10^8$  から約  $1 \times 10^{11}$ 、及び更に好ましくは約  $1 \times 10^9$  から約  $1 \times 10^{10}$  の樹状細胞が成人に使用される。これらの用量は、患者の年齢、体重、サイズ、健康状態、性別、治療すべき腫瘍のタイプ、投与経路、治療が局所的なものか全身的なものか又はその他の要素によって変る。当業者であれば、具体的な事情および患者の必要に適合するように適切な投薬量及び投薬計画を容易に導き出すことができるはずである。<sup>20</sup>

#### 【 0 2 0 8 】

細胞構成成分を再導入する方法は当該技術分野公知であり、Honshikらに付与された米国特許第 4,844,893 号及び Rosenberg に付与された第 4,690,915 号などに例示されている手順を含む。例えば、静脈内注射によって活性化 CD8 細胞を投与するのが適切である。ドナー細胞の注入によって生じる毒性が少しでも、妊娠した女性に見られたら、それ以上の注入を即座に停止することとなる。毒性は、国立癌研究所 (NCI) の基準による。<sup>30</sup>

#### 【 0 2 0 9 】

##### 毒性類別 - NCI 共通毒性基準

\* 等級 I ~ II の毒性が生じた場合、被験者は注入計画を続行することができる。

\* 等級 III の毒性が生じた場合、毒性が等級 I ~ II に低下するまで「薬剤」を留保し、その後注入を再開する。再開後、等級 III 又は IV の毒性が生じた場合、「薬剤」の注入を停止する。

\* 等級 IV の毒性が生じた場合、被験者に等級 IV の毒性が生じていることを記録し、次回注入はそれ以前の用量に減少させる。以前の用量で等級 IV の毒性が生じた場合、「薬剤」を停止する。<sup>40</sup>

\* 特定の投薬量で 3 人の被験者のうち 1 人に等級 IV の毒性が生じた場合、さらに 3 人の被験者をその細胞用量レベルで参加させ、その用量レベルで、全部で 6 人の被験者としなければならない。ある細胞用量レベルで 6 被験者のうち 2 人が等級 IV の毒性を表した場合、この用量は最大耐用量 (MTD) と定義される。次の 3 被験者に前回細胞投与量の 66% (3 分の 2 ) を投与する。用量増大を評価するため、各被験者に、6 回の注入のうち少なくとも 4 回は、同じ用量レベルで投与しなければならない。

#### 【 0 2 1 0 】

その全文が本明細書に組み込まれる米国特許第 6,497,876 号に記載されているように、大量の抗原提示樹状細胞を生体外で生じさせることができる。1 人の患者の CD<sup>50</sup>

$34^+$  造血前駆細胞及び幹細胞を収集した後、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) 及び f1t-3 リガンド (f1t3-L) などのサイトカインを用いて、インビトロで細胞の規模を拡大し、それらを樹状細胞系統の細胞に分化させることができる。また、サイトカインを用いて、収集前に循環液中の CD34<sup>+</sup> 細胞の数を増加させることもできる。得られた樹状細胞を、免疫応答を誘導させたいと思う抗原に対して曝露し、抗原を処理させる（この処理は、当該技術分野に於いて、時に「抗原パルシング (antigen-pulsing)」と呼ばれる）。そして、抗原パルスされた（又は、抗原・発現）樹状細胞は、CD40 結合タンパク質によって活性化されてから、患者に投与される。

## 【0211】

10

樹状細胞は、独特の形態と広範な組織分布を有する不均一な細胞集団である。樹状細胞系及び免疫におけるその役割は、本明細書において参照して組み込まれている Steinman, R.M., Ann. Rev. Immunol., 9: 271-296 (1991) によって概説されている。樹状細胞の細胞表面は特異で、ベール様の突起をもち、細胞表面マーカーである CD1a<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD86<sup>+</sup> 又は HLA-DR<sup>+</sup> を有するという特徴をもつ。樹状細胞は、MHC 拘束性 T 細胞を感作する高い能力をもち、T 細胞の成長及び寛容過程における自己抗原及び免疫過程での外来抗原の両方とも、非常に効果的に生体内原位置で T 細胞に抗原提示する。

## 【0212】

20

それらが効果的に抗原提示できるため、自己樹状細胞は、生体外のアロ抗原のアジュvantとして好適に利用されている（例えば、Romania、J. Exp. Med., 180: 83 (1994) 参照）。樹状細胞を免疫刺激剤として使用するのは、樹状細胞が末梢血において低頻度であること、リンパ器官との接触可能性が限られていること及び樹状細胞の最終分化状態が原因で制限されている。樹状細胞は、骨髓又は末梢血液の CD34<sup>+</sup> 前駆細胞及び末梢血単核細胞から発生し、サイトカインである GM-CSF サルグラモスチム (sargramostim)、Leukine (登録商標; Immunex 社、ワシントン州、シアトル)、TNF- $\alpha$ 、c-kit リガンド (幹細胞因子 (SCF))、造血幹細胞因子 (SF)、又は肥満細胞増殖因子 (MGF) としても知られている）及び IL-4 によって、樹状細胞の増殖及び成熟を促進することができる。最近になって、f1t3-L が、インビボ及びインビトロで、機能的に成熟した多数の樹状細胞の生成を促進することが明らかにされている。

30

## 【0213】

## 樹状細胞の生体外培養

造血幹細胞及び前駆細胞を生体外で増殖させる方法は、参考されて本明細書に組み込まれる米国特許第 5,199,942 号に記載されている。その他にも適当な方法が当該技術分野公知である。簡単に言うと、生体外での培養及び増殖は、(1) CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞及び前駆細胞を患者の末梢血又は骨髄外植片から採取すること、そして(2) このような細胞を生体外で増殖させること、を含む。米国特許第 5,199,942 号に記載されている細胞増殖因子以外にも、f1t3-L、IL-1、IL-3 及び c-kit リガンドを用いることができる。

40

## 【0214】

CD34 マーカーを有する幹細胞又は前駆細胞は、骨髄内の単核細胞の僅か約 1% から 3% を構成するにすぎない。末梢血における CD34<sup>+</sup> 幹細胞又は CD34<sup>+</sup> 前駆細胞の量は、骨髄におけるよりも約 10~100 倍少ない。f1t3-L などのサイトカインを用いて、インビボで樹状細胞の数を増加又は結集させることができる。患者の樹状細胞の量を増加させることで、腫瘍抗原又はバクテリアもしくはウイルスの抗原など、患者の体内にすでに存在する抗原の T 細胞に対する抗原提示を促進することができる。あるいは、免疫目的で患者に抗原を投与する前、それと同時、又はその後にサイトカインを投与することも可能である。

## 【0215】

50

当該技術分野公知のアフェレーシス法を用いて末梢血細胞を集め。例えば、Bishoら、Blood, vol. 83, No. 2, pp. 610 - 616 (1994) 参照。簡単に言うと、例えば、ヘモネティックス・モデルV50 (Haemonetics Model V50) 血漿交換装置 (Haemonetics社、Braintree, Mass.) など、従来からの装置を用いて、末梢血前駆細胞 (PBPC) 及び末梢血幹細胞 (PBS-C) を集める。1kgあたり約 $6.5 \times 10^8$  個の単核細胞 (MNC) が集まるまで、一般的には、1週あたり5回を超えないよう4時間の採集を行なう。細胞を標準的な培地に懸濁してから、遠心分離して、赤血球と好中球を取り除く。2つの層の界面にある細胞 (軟膜) を取り出して、HBSSに再懸濁する。懸濁された細胞は、主に単核細胞であり、細胞混合物の相当の部分が初期幹細胞である。

10

## 【0216】

細胞集団から CD34<sup>+</sup> 造血幹細胞又は CD34<sup>+</sup> 前駆細胞を同定し、分離するためのさまざまな細胞選択技術が知られている。例えば、モノクローナル抗体 (又はその他の特異的細胞結合タンパク質) を用いて、幹細胞又は前駆細胞上に見られるマーカータンパク質又は表面抗原タンパク質に結合させることができる。造血幹細胞に対するこのようなマーカー又は細胞表面抗原のいくつかが (例えば f1t-3, CD34, My-10 及び Thy-1)、特異的結合タンパク質として、当該技術分野に於いて知られている。

## 【0217】

1つの方法において、抗体若しくは結合タンパク質を、例えば、ガラスピーズ若しくはフラスコ、磁気ビーズ、又は適当なクロマトグラフィー用樹脂などの表面に固定し、細胞の集団と接触させる。すると、幹細胞はビーズ基質に結合する。あるいは、結合タンパク質を細胞混合液とインキュベートすることができ、生じた合成物は、抗体 - 細胞複合体に対してアフィニティーを有する表面に接触した。不要な細胞及び細胞物質を除去して、比較的純粋な幹細胞の集団を提供する。特異的細胞結合タンパク質は、例えば、発色団又はフルオロフォアで蛍光標識することもでき、標識された細胞をソーティング (選別) によって分離することができる。好ましくは、単離は免疫アフィニティーカラムによって行う。

20

## 【0218】

免疫アフィニティーカラムは、どのような形状でもよいが、通常は、充填ベッド型反応器を含む。これらのバイオリアクターにおける充填ベッドは、好ましくは、実質的に基質を均一にコートする多孔性材料からできている。多孔性材料は、高い表面面積対体積比をもたらし、細胞がベッドから流れ出ることを妨げることなく、細胞混合液が広い接触面積上を流れることができるようにする。基質は、その独自の性質によって、又は化学成分を付加することによって、細胞結合タンパク質上に存在する部分に対し高いアフィニティーを示さなければならない。典型的な基質は、アビジン及びストレプトアビジンなどであるが、それら以外の従来からある基質を使用することも可能である。

30

## 【0219】

有用な方法の1つにおいて、分離すべき細胞上の細胞表面抗原を認識するモノクローナル抗体を一般的には更に改変して、ビオチン部分が提示されるようにする。それによって、アビジンに対するビオチンのアフィニティーが、モノクローナル抗体を充填ベッドの表面に取り外し可能な形で固定する (Berensonら、J. Immunol. Meth., 91:11, 1986 参照)。充填ベッドを洗浄して、未結合の物質を除去し、常法を用いて標的細胞を遊離させる。アビジンでコートされた充填ベッドに固定された抗CD34モノクローナル抗体を利用する、上記タイプの免疫アフィニティーカラムについては、例えば、国際公開 93/08268 号 (WO 93/08268) に記載されている。

40

## 【0220】

静止期の幹細胞を選択する別法は、5 - フルオロウラシル (5-FU) 又は 4 - ヒドロキシシクロホスファミド (4-HC) などのアルキル化剤のような代謝拮抗物質を用いて、より系列づけられた分裂中の細胞型において細胞死を誘導することである。幹細胞には全く、あるいはほとんど影響を及ぼさない増殖因子を附加して、非静止期細胞が増殖及び

50

分化するように刺激して、非幹細胞を増殖及び分化させて、それらが、5-FU又は4-HCの細胞傷害作用をより受けやすいようにする。参照されて本明細書に組み込まれるBerardら、Science, 267: 104 (1995) 参照。

### 【0221】

単離された幹細胞は、速度制御フリーザー( controlled rate freezer ) (例えば、Cryo-Med社製、マウントクレメンス、ミシガン州)の中で凍結させることができ、抗凍結剤としてジメチルスルホキシドを用いて、液体窒素の気相の中で保存することができる。樹状細胞(新鮮なもの、又は凍結されたもの)の増殖及び培養のために、無血清又は血清を用いた培地など、さまざまな増殖用及び培養用の培地を用いることができる。有用な増殖培地には、RPMI、TC 199、イスコフ改変ダルベッコ培地(iscoveら、F.J. Exp. Med., 147: 923 (1978))、D MEM、フィッシャー培地、アルファ培地、NCTC、F-10、リーボビツツL-15 (Leibovitz s L-15)、MEM及びマッコイ培地などがある。培地に含まれる具体的な栄養分は、血清アルブミン、トランスフェリン、脂質、コレステロール、2-メルカプトエタノール又はモノチオグリセロールなどの還元剤、ピルビン酸、酪酸、及びヒドロコルチゾン-2-ヘミスクシネットのようなグルココルチコイドなどである。より具体的には、標準的な培地は、エネルギー源、ビタミン又はその他の細胞補助有機化合物、培地のpHを安定させるように作用する、HEPES又はTrisなどの緩衝液及びさまざまな無機塩を含む。さまざまな無血清細胞増殖用培地が、参照されて本明細書に組み込まれる国際公開第95/00632号に記載されている。採集されたCD3<sup>+</sup>細胞を、例えば、本明細書に記載されているような適当なサイトカインとともに培養する。そして、CD34<sup>+</sup>細胞は、分化させられ、樹状細胞系列の細胞に決定づけられる。そして、フローサイトメトリー又は同様の手段によって、CD1a、HLA DR、CD80及び/又はCD86など、樹状細胞の特徴であるマーカーを用いて、これらの細胞をさらに精製する。培養された樹状細胞を、例えば同種異系のクラスI HLA分子などの抗原に曝露して、抗原を処理させてから、一定量のCD40結合タンパク質とともに培養して樹状細胞を活性化させる。あるいは、樹状細胞を、同種異系クラスI HLA分子又は免疫関連レセプターをコードする遺伝子によって形質移入し、その後、一定量のCD40結合タンパク質とともに培養して抗原提示樹状細胞を活性化させる。

### 【0222】

そして、抗原特異的免疫応答を促進するために、活性化された抗原運搬樹状細胞を患者に投与する。樹状細胞は、抗原投与の前、それと同時、又はその後に投与することができる。あるいは、患者からT細胞を採集して、インビトロで、活性化された抗原運搬樹状細胞に曝露して、抗原特異的T細胞を刺激し、それらを患者に投与することができる。

### 【0223】

#### 有用なサイトカイン

さまざまなサイトカインが、樹状細胞の生体外培養において役立つ。F1t3-Lは、参照されて本明細書に組み込まれるEP0627487A2及び国際公開第94/28391号に記載されているポリペプチドの属を意味する。ヒトf1t3-L cDNAは、1993年8月6日に米国メリーランド州ロックビルにあるアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託され、ATCC 69382という受託番号を付与された。IL-3は、参照されて本明細書に組み込まれる米国特許第5,108,910号に記載されているようなインターロイキン-3ポリペプチドの属を意味する。本発明において使用するのに適したヒトIL-3タンパク質をコードするDNA配列は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)から、受託番号ATCC 67747として公に入手できる。c-kitリガンドは、肥満細胞増殖因子(MGF)、造血幹細胞因子、又は幹細胞因子(SCF)とも呼ばれ、参照されて本明細書に組み込まれるEP423,980に記載されている。その他有用なサイトカインには、インターロイキン-4(IL-4; Mosleyら、Cell 59: 335 (1989)、Idzerdaら、J. Exp. Med. 171: 861 (1990) 及びGalizziら、Int 50

1. Immunol. 2: 669 (1990)、これらは各々、参照されて本明細書に組み込まれる)及び顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF; 米国特許第5,108,910号及び第5,229,496号に記載されており、これらは各々参照されて本明細書に組み込まれる)などがある。市販されているGM-CSF(サルグラモスチム、登録商標Leukine)は、ワシントン州、シアトルにあるImmunex社から入手可能である。さらに、GM-CSF/IL-3融合タンパク質(すなわち、GM-CSFとIL-3のC末端からN末端までの融合)も、樹状細胞の生体外培養において有用である。このような融合タンパク質は公知であり、米国特許第5,199,942号、第5,108,910号及び第5,073,627号に記載されており、これらは各々参照されて本明細書に組み込まれる)。好適な融合タンパク質は、米国特許第5,199,942号に記載されているPIXY321である。  
10

#### 【0224】

有用なサイトカインは、樹状細胞の表面にあるレセプターに結合して、シグナルを伝達することによって作用する。さらに、CD40結合タンパク質について本明細書に記載されているように、適当なサイトカインレセプターに結合して、樹状細胞にシグナルを伝達する付加的な結合タンパク質を調製することも可能である。例えば、国際公開95/27062号は、F1t-3Lに対するレセプターであるF1t-3に対するアゴニスト性抗体について記載されており、それから、多様なF1t-3結合タンパク質を調製することができる。これ以外に有用なサイトカインは、樹状細胞を培養するのに役立つサイトカインの生物活性型類似化合物などである。有用なサイトカイン類似体は、天然のサイトカインに実質的に類似したアミノ酸配列を有し、それらの特異的レセプターに結合して、生体信号を伝達することができる生物活性を有する。このような類似体を当該技術分野公知の方法によって調製及び試験することができる。  
20

#### 【0225】

抗原を提示する樹状細胞を調製する代替法は、抗原、又はそれに由来する特異的ポリペプチドをコードする遺伝子で樹状細胞を形質移入することである。樹状細胞が、MHCとの関連で抗原を発現するとすぐに、CD40結合タンパク質によって樹状細胞が活性化され、その後、患者に投与されて、その抗原に対して強化及び改善された免疫応答を提供する。  
30

#### 【0226】

活性化された抗原提示樹状細胞をワクチンのアジュバントとして用いて、抗原投与の前、それと同時、又はその後に投与することができる。さらに、例えばCD40結合タンパク質(すなわち可溶性CD40L)、又は可溶性CD83分子など、免疫応答を調節するサイトカインの投与の前、それと同時に、樹状細胞を被験者に投与することができる。これら以外に有用なサイトカインには、インターロイキン(IL)1、2、4、5、6、7、10、12及び15、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、又はGM-CSF/IL-3融合タンパク質などのコロニー刺激因子(CSF)又は、TNF-若しくはc-kitリガンドなど、他のサイトカインなどがあるが、これらに限定されるものではない。さらに、これらサイトカインの生物活性型誘導体；及びそれらを併用したものも有用である。  
40

#### 【0227】

CD40は、細胞外領域におけるシステインリッチなモチーフの存在によって定義されている、腫瘍壞死因子(TNF)/神経成長因子(NGF)レセプターファミリーの一員である(Smithら、Science 248:1019, 1990; MallettとBarclay、Immunology Today 12:220; 1991)。このファミリーは、リンパ球抗原CD27、CD30(ホジキンリンパ腫及びリード・シュテルンベルグ細胞に見られる抗原)、TNFに対する2つのレセプター、4-1BBと呼ばれるマウスタンパク質、ラットOX40抗原、NGFレセプター及びFas抗原を含む。ヒトCD40抗原(CD40)は、277アミノ酸からなり、分子量30,600のペプチドである(Stamenkovicら、EMBO J. 8:1403, 1989)  
50

。 C D 4 0 L は、免疫応答におけるフィードバック制御において重要であると考えられている。例えば、 C D 4 0 <sup>+</sup> 抗原提示細胞が T 細胞に抗原を提示すると、それが活性化されて、 C D 4 0 L を発現するようになる。次に、 C D 4 0 L は、さらに抗原提示細胞を活性化して、その抗原提示効率を高めて、クラス I 及びクラス I I の M H C 、 C D 8 0 及び C D 8 6 共刺激分子、そしてさまざまなサイトカインの発現を上方制御する ( C a u x ら、 J . E x p . M e d . 1 8 0 : 1 2 6 3 , 1 9 9 4 ) 。

#### 【 0 2 2 8 】

そして、精製された樹状細胞を抗原でパルス（に曝露）し、それらに、免疫系の他の細胞に対して提示するのに適した方法で抗原を取り込ませる。抗原は、古典的に処理されて、2つの経路で提示される。サイトゾル区画のタンパク質に由来するペプチドは、クラス I M H C 分子に関連して提示されるが、その一方、エンドサイトーシス経路で見られるタンパク質に由来するペプチドは、クラス I I M H C に関連して提示される。しかし、当業者は、例えば、 M H C クラス I 上で発現される外来腫瘍抗原を認識する C D 8 <sup>+</sup> 腫瘍特異的 T 細胞の反応などの例外があることを認識している。 M H C 依存型抗原処理及びペプチド提示に関する概説は、 G e r m a i n , R . N . , C e l l 7 6 : 2 8 7 ( 1 9 9 4 ) にある。

#### 【 0 2 2 9 】

抗原によって樹状細胞をパルスする数多くの方法が知られており、当業者は、選択した抗原に対して適切な方法を開発することを日常的な実験であると見なしている。通常、細胞の生存率を促進する条件下で培養樹状細胞に抗原を加え、細胞が、この抗原を取り込んで処理し、クラス I 又はクラス I I の M H C のいずれかとともに細胞表面上に抗原ペプチドを発現するのに十分な時間を与える。約 2 4 時間（約 1 8 から約 3 0 時間、好ましくは 2 4 時間）という時間である。樹状細胞は、抗原をコードする D N A でそれらを形質移入することによって、抗原に曝露することも可能である。 D N A が発現されると、抗原は、おそらく、サイトゾル / クラス I 経路を介して処理される。

#### 【 0 2 3 0 】

本発明は、活性化され、抗原パルスされた樹状細胞を含む治療用組成物を使用する方法を提供する。このような細胞を、可溶性サイトカインレセプターもしくはサイトカインとともに、又はその他の免疫調節性分子とともに使用することも考えられる。本発明に係る組成物は、投与されると同種異系免疫応答を促進し、ボーラス注射、持続注入、インプラントからの持続放出、又はその他適切な技術によって投与することができる。一般的には、上にある細胞を、抗原パルスされ、活性化された樹状細胞と、生理学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤とをともに含む組成物の形にして投与する。このような担体は、使用投薬量及び濃度においてはレシピエントに対して非毒性である。中性緩衝食塩水、又は血清アルブミンと混合した食塩水が、典型的な適合希釈剤である。

#### 【 0 2 3 1 】

一定のタイプの免疫応答を促進するためには、活性化され、抗原パルスされた樹状細胞とともに別のサイトカインを投与することも考えられる。いくつか有用なサイトカイン（又はペプチド調節因子）が、 S c h r a d e r , J . W . ( M o l I m m u n o l 2 8 : 2 9 5 ; 1 9 9 1 ) で検討されている。そのような因子には、インターロイキン 1 、 2 、 4 、 5 、 6 、 7 、 1 0 、 1 2 及び 1 5 ；顆粒球 - マクロファージ・コロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、インターロイキン - 3 及び顆粒球 - マイクロファージ・コロニー刺激因子を含む融合タンパク質、インターフェロン - 、 T N F 、 T N F - 、 f l t - 3 リガンド及びこれらの生物的に活性な誘導体（単独又は組み合わせたもの）などがある。特に好適なサイトカインは C D 4 0 リガンド（ C D 4 0 L ）である。本明細書に記載されているように、その他のサイトカインも有用である。このようなサイトカインをコードする D N A も、例えば、樹状細胞をそのサイトカインを発現するよう形質移入することにより、本発明の方法において有用である。これらの免疫調節分子の投与は、本発明に係る細胞と同時に、別途、又は連続して投与することを含む。

#### 【 0 2 3 2 】

10

20

30

40

50

別の好適な態様において、本発明は、配列番号1～19のいずれか一つに、少なくとも約10%、より好ましくは25%、更に好ましくは、約40%、50%、60%、70%、80%、90%又は99.9%の配列相同性を有する、配列番号1～19のいずれか一つにより同定されるポリペプチドを提供する。樹状細胞は、生体外培養の間に、これらのポリペプチドのいずれかでパルスすることができる。

#### 【0233】

本発明の一つの態様において、ポリペプチドは、配列番号19を含む。好ましくは、ポリペプチドは、高い親和力をもってHLA分子に結合し、HLAに対して、天然のポリペプチドよりも高い結合定数( $K_a$ )及び/又はHLAに対して天然のポリペプチドよりも低い解離定数( $K_d$ )を有する。

10

#### 【0234】

本発明の別の態様において、ポリペプチドはムチン腫瘍抗原に由来し、好ましくは、ポリペプチドは、MUC-1の非可変縦列反復領域数に由来する。

#### 【0235】

本発明の別の態様において、ポリペプチドの抗原提示細胞による抗原提示は、免疫応答、好ましくは細胞性免疫応答を誘導する。例えば、細胞性免疫応答は、細胞傷害性T細胞応答、Tヘルパー細胞応答又はB細胞免疫応答である。

#### 【0236】

さらに別の態様において、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチドをコードする核酸分子の変異体を用いて、例えば、MUC-1陽性癌を検出して溶解するために、免疫細胞に形質移入することができる。「対立遺伝子」又は「変異体」は、ある遺伝子の別の形態である。本発明において特に有用なのは、本発明に係る方法の何れかに示すMUC-1<sup>+</sup>腫瘍細胞マーカーの可能性があるものをコードする遺伝子の変異体である。変異体は、核酸配列における一つ又はそれ以上の突然変異によって得られ、その構造又は機能が変化することもしないこともある別のmRNA又はポリペプチドになりうる。任意の天然型又は組換え型の遺伝子は、0、1、又は多くの対立遺伝子型をもつことができる。変異体を生じさせる共通した突然変異による変化は、通常、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、又は置換による。これらの変異のタイプは、それぞれ、単独又は他の変化とともに、所定の配列において一回又はそれ以上起きることがある。

20

#### 【0237】

本発明に係る組成物及び方法は、上記ポリペプチド及びそれらのポリペプチドをコードする核酸配列の変異体も含む。本明細書において、ポリペプチドの「変異体」は、ポリペプチドの抗原及び/又は免疫原としての性質を保持するような置換及び/又は変更があるために天然のポリペプチドとは異なるポリペプチドである。このような変異体は、通常、上記ポリペプチド配列の一つを改変し、改変されたポリペプチドの反応性を、上記したような抗血清及び/又はT細胞によって評価することによって同定することができる。核酸の変異体は、コードされているポリペプチドの抗原及び/又は免疫原としての性質を保持するような、一つ又はそれ以上の置換、欠失、挿入及び/又は変更を含む。本明細書に記載されたポリペプチドの好適な変異体の一つは、ヌクレオチドの20%を超えない位置でのヌクレオチドの置換、欠失、挿入及び/又は変更を含む変異体である。

30

#### 【0238】

好ましくは、変異体は保存的置換を含むが、それに限定されるものではない。「保存的置換」とは、アミノ酸が、同様の性質をもつ別のアミノ酸に置換されるものであるため、ペプチド化学の技術分野における当業者は、ポリペプチドの二次構造及び疎水性親水性指標となる性質が実質的には変化しないと予想するであろう。一般的に、以下のアミノ酸グループが、保存的变化を示す。(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2)cys、ser、tyr、thr；(3)val、ile、leu、met、ala、phe；(4)lys、arg、his；及び(5)phe、tyr、trp、his。しかし、あらゆるタイプの置換が、本発明の範囲及び態様に含まれる。

40

50

## 【0239】

また（又は、あるいは）、変異体は、例えば、ポリペプチドの免疫原又は抗原としての性質、二次構造及び疎水性親水性指標としての性質に最小の影響しか与えない欠失又は付加によって改変することができる。例えば、ポリペプチドを、翻訳と同時に又は翻訳後にタンパク質の移動を指令するシグナル（又はリーダー）配列にたんぱく質のN末端で結合させることができる。また、ポリペプチドの合成、精製又は同定を容易にするために（例えばポリ-His）、又は、ポリペプチドが固体支持体に結合するのを促進するためにリンクマー又はそれ以外の配列にポリペプチドを結合させることもできる。例えば、ポリペプチドを、免疫グロブリンのFc領域に結合させることができる。

## 【0240】

一般的に、いくつかの技術の任意のものを用いて、本明細書に記載されたポリペプチドの全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を調製することができる。例えば、そのようなポリペプチドをコードするcDNA分子は、対応するmRNAのMUC-1腫瘍特異的発現に基づき、ディファレンシャルディスプレイPCRを用いてクローニングすることができる。この技術は、正常な組織及びMUC-1陽性腫瘍組織から調製したRNA錠型の増幅産物を比較する。例えば、(dT)12AGプライマーなどのランダムプライマーを用いて、RNAを逆転写してcDNAを調製することができる。ランダムプライマーを用いてcDNAを増幅した後、腫瘍RNAに特異的な増幅産物に対応するバンドを、銀染色したゲルから切り出して、下記の実施例に記載されている適当なベクターにサブクローニングすることができる。配列番号1～6のいずれか一つによって開示されているMUC-1腫瘍特異的ポリペプチド及びその変異体の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を、任意のランダムプライマーを用いて上記したようにして調製したcDNAから増幅することができる。

10

## 【0241】

あるいは、本明細書に記載されたポリペプチド（又は、その一部）をコードする遺伝子を、ヒトゲノムDNA、又は腫瘍細胞cDNAから、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅することができる。

## 【0242】

本発明の態様において、一つ又はそれ以上の核酸分子の存在は、正常な被検者の試料と関連づけられる。試料は、好ましくは、増殖性細胞成長障害、特にMUC-1<sup>+</sup>癌を有すると推測される哺乳動物から得られる。

20

## 【0243】

2つの配列（核酸又はポリヌクレオチド）の間の相同性及び類似性の割合は、数学的アルゴリズムを用いて決定することができる（例えば、コンピュータ分子生物学，Lesk, A.M.編, Oxford University Press, ニューヨーク州, 1988；バイオコンピューティング：インフォマティックス及びゲノムプロジェクト（Biocomputing: Informatics and Genome Project），Smith, D.W.編, Academic Press, ニューヨーク州, 1993；配列データのコンピュータ解析、第1部（Computer Analysis of Sequence Data, Part 1），Griffith, A.M. and Griffith, H.G.編, Humana Press, ニュージャージー州, 1994；分子生物学における配列解析（Sequence Analysis in Molecular Biology），von Heijne, G., Academic Press, 1987；及び、配列解析プライマー（Sequence Analysis Primer），Gribskov, M. and Devereux, J.編, M Stockton Press, ニューヨーク州, 1991参照）。

30

## 【0244】

別の好適な態様において、本発明に係るMUC-1のペプチド断片及び誘導体は、それらが免疫系を活性化して、例えば、MUC-1を発現する細胞など、癌細胞を溶解するのに十分な長さのものである。したがって、配列番号1～19の何れかに示すポリペプチド

40

50

をコードするMUC-1核酸分子、断片及び誘導体は、配列番号1～19のいずれか一つの何れかに示す配列と比較して約90%以上のヌクレオチド、普通には、配列番号1～19の何れかに示す配列と比較して約80%以上のヌクレオチド、より普通には、配列番号1～19の何れかに示す配列と比較して約70%以上のヌクレオチド、さらにより一般的には、約40%又は50%のヌクレオチドを好適に含む。

#### 【0245】

2つの核酸配列の相同性の割合を決定するためには、最適な比較を行う目的で配列を整列させる(例えば、最適なアラインメントを行うために、第1及び第2のアミノ酸配列又は核酸配列の一方若しくは両方にギャップを導入し、また、比較目的で非相同的配列を無視することができる)。好適な態様において、比較目的で整列される参照用配列の長さは、参照用配列の長さの30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらにより好ましくは60%以上、そしてさらにより以上、好ましくは70%、80%又は90%以上である。そして、対応するヌクレオチド位置にあるヌクレオチドを比較する。第1の配列のある位置が、第2の配列の対応する位置と同じヌクレオチドによって占められているときは、その位置で分子は同一である(本明細書において、核酸の「相同性」は、核酸の「配列相同性」と同義である)。2つの配列間における相同性の割合は、2つの配列を最適に整列させるために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した上で、それらの配列に共通する同一の位置数の関数である。

#### 【0246】

配列の比較及び2つの配列間の相同性の割合の決定は、数学的アルゴリムを用いて行うことができる。好適な態様において、2つのヌクレオチド配列の相同性の割合は、NWS gap dna C M Pマトリックス及び40、50、60、70又は80というギャップの重み及び1、2、3、4、5又は6という配列長の重みを用い、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム(Genetics Computer Groupを通してオンラインで入手することができる)を用いて決定される。GAPプログラムとともに使用されるパラメータの好適で非限定的な例は、ギャップペナルティーが12、ギャップ伸長ペナルティーが4、そして、フレームシフトのギャップペナルティーが5のBlossum 62スコアリングマトリックスなどである。

#### 【0247】

別の態様において、PAM120重み付けされた残基表を用い、ギャップ長ペナルティーを12、ギャップペナルティーを4として、ALIGNプログラム(バージョン2.0又はバージョン2.0U)に組み込まれているメイヤーズとミラー(Meyers and Miller)のアルゴリズム(Comput. Appl. Biosci. 4:11-17(1988))を用いて、2つのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列の相同性の割合を決定する。

#### 【0248】

腫瘍性疾患又は腫瘍細胞の治療は、本明細書全体にわたって、また、下記の実施例において記載されており、以下(1)から(8)の効果を一つ又はそれ以上生じさせることができる一定量のベクター及び/又はペプチドを意味する。(1)ある程度の腫瘍増殖の阻害であって、(i)減速及び(ii)完全な増殖停止を含む；(2)腫瘍細胞数の減少；(3)腫瘍サイズの維持；(4)腫瘍サイズの減少；(5)末梢器官への腫瘍細胞の浸潤の(i)減少、(ii)減速、又は(iii)完全な阻止を含む阻害；(6)転移の(i)減少、(ii)減速、又は(iii)完全な阻止を含む阻害；(7)(i)腫瘍サイズの維持、(ii)腫瘍サイズの減少、(iii)腫瘍増殖の減速(iv)浸潤の減少、減速、もしくは阻止、又は(v)転移の減少、減速、もしくは阻止し得る抗腫瘍免疫応答の増強；及び/又は、(8)疾患に伴う症状の一つ又はそれ以上をある程度緩和すること。

#### 【0249】

このように、本発明の一つの態様において、癌に罹っている患者の治療、又は癌に罹患者の恐れのある患者に対して予防的に治療するために、任意の変異体、断片、突然変異体を用いて、例えば樹状細胞などの免疫細胞に形質導入することができる。上記のとおり、

10

20

30

40

50

本発明において同定された核酸配列の好適な使用は、例えば、MUC-1癌細胞を溶解する治療法を創出するためのものである。核酸分子は、遺伝子の野生型、対立遺伝子、変異体、突然変異、又は断片をコードするDNA分節を含むベクターによって発現されうる。核酸分子の突然変異及び対立遺伝子は、治療用ベクターの構築にも好適に使用される。例えばMUC-1陽性癌に対する抵抗性を付与するために望ましい核酸配列を含むベクターは、好ましくは、その配列を一つ又はそれ以上有する。あるいは、ベクターは、一つ又はそれ以上のその核酸配列、又は対立遺伝子変異体との組み合わせからなってもよい。ベクターは、さまざまな対立遺伝子変異体のカセット、又は野生型核酸分子からなるものでもよい。

## 【0250】

本発明によれば、従来の分子生物学、微生物学及び組換えDNA技術を、当業者であれば適宜用いることができる。このような技術は文献で十分に説明されている。例えば、Sambrook、Fritsch及びManiatis、「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク州(以下「Sambrookら、1989」)；「DNAクローニング：実用的方法(DNA Cloning: A Practical Approach)」第I及びII巻(D.N.Glover編, 1985)；オリゴヌクレオチド合成(Oligonucleotide Synthesis)(M.J.Gait編, 1984)；核酸ハイブリダイゼーション(Nucleic Acid Hybridization)[B.D.Hames及びS.J.Higgins編, (1985)]；転写と翻訳(Transcription And Translation)[B.D.Hames&S.J.Higgins, 編, 1984)]；動物細胞培養(Animal Cell Culture)[R.I.Freshney編, (1986)]；固定細胞及び酵素(Immobilized Cells And Enzymes)[IRL Press, (1986)]；B.Perbal, 分子クローニングへの実用的手引き(A Practical Guide To Molecular Cloning)(1984)；F.M.Ausubelら(編)、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley&Sons, Inc.(1994)などを参照。

## 【0251】

遺伝子又はその断片若しくは対立遺伝子の患者への導入は、ベクター、リポソーム、裸のDNA、アジュバントに補助されたDNA、遺伝子銃、カテーテルなどの使用を含みうる。ベクターは、国際公開第93/04701号に記載されているような化学的抱合体であって、標的部分(例えば、細胞表面レセプターに対するリガンド)及び核酸結合部分(例えばポリリジン)を有するもの、ウイルスベクター(例えばDNA又はRNAのウイルスベクター)、PCT/US95/02140(国際公開第95/22618号)に記載されているような融合タンパク質であって、標的部分(標的細胞に特異的な抗体)及び核酸結合部分(例えばプロタミン)を含むもの、プラスミド、ファージなどである。ベクターは、染色体性、非染色体性又は合成ベクターであってよい。

## 【0252】

別の好適な態様において、細胞は、試料、患者又はドナー患者から単離して精製され、細胞の任意の特性を測定するために機能アッセイにおいて用いられる。単離及び精製された細胞集団に応じて、当該技術分野公知である適切な機能アッセイを行なうことができる。例えば、細胞の集団が、腫瘍抗原のような望ましい抗原に特異的なT細胞である場合、細胞傷害性T細胞アッセイ、T細胞増殖アッセイ、サイトカインプロフィール、T細胞成熟又は記憶T細胞に対する表面抗原の決定などを行うことができる。

## 【0253】

本発明において有用な細胞単離は当該技術分野に於いて周知である。例えば、末梢血单

10

20

30

40

50

核細胞（P B M C）を患者から採取して、例えばフィコール・ハイパーク法（F i c o l 1 / H y p a q u e）などの密度勾配遠心分離法によって単離することができる。標準的方法を用いて、特定の細胞集団を除去又は濃縮することができる。例えば、プラスチックに付着させて、単核細胞／マクロファージを単離することができる。例えば、T 細胞又はB 細胞の表面マーカーに対する抗体を用いて、陽性選択及び／又は陰性選択することによって、例えば、細胞を特異的一次モノクローナル抗体（m A b）とともにインキュベートし、次いで一次m A b に結合する二次抗体で被覆した磁気ビーズを用いて、m A b を結合する細胞を単離することによって、T 細胞又はB 細胞を濃縮又は除去することができる。幹細胞特異的m A b（例えば、抗C D 3 4 m A b）を用いる同様の技術により、末梢血又は骨髄由来の造血幹細胞を単離することができる。標準的方法に従って蛍光活性化細胞選別法により、特定の細胞集団を単離することもできる。細胞特異的表面マーカーに対するモノクローナル抗体が当該技術分野公知であり、多くが市販されている。

#### 【0254】

所望であれば、最初に「比較的に粗い」分離法を用いることにより、最終分化細胞の大部分を除去することができる。例えば、磁気ビーズ分離法を用いて、多数の細胞系列が決定ずみの細胞を最初に除去することができる。望ましくは、全造血細胞の約80%以上、通常は70%以上を除去することができる。

#### 【0255】

分離の方法には、抗体で被覆した磁気ビーズを用いる磁気分離法；アフィニティークロマトグラフィー；モノクローナル抗体と結合しているか、又はモノクローナル抗体とともに用いる、補体及び細胞毒などを含む（これらに限定されない）細胞傷害性因子；そして、例えば、プレートなどの固体基質に付着した抗体による「パニング」、エルトリエーション、又はその他便利な技術などがありうるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0256】

スクリーニングの手順には、分子をスクリーニングしてM U C - 1 腫瘍抗原に対する免疫応答を生じさせる方法が含まれうる。この方法は、

M U C - 1 の非V N T R の一部をコードする核酸を改変するこ と、

改変した核酸を発現させて分子を産生させること、

樹状細胞を当該分子に接触させること、そして

T 細胞を樹状細胞に接触させることとを含み、

T 細胞によるI F N - 産生の変調が、当該分子が免疫応答を生じさせる可能性があることを示す。

#### 【0257】

正確な分離を可能にする技術には、例えば、複数の色チャンネル、低角度及び鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなど、様々な程度の精巧さを有しうるフローサイトメトリーが含まれるが、これに限定されるものではない。

#### 【0258】

本明細書において開示されるペプチドは、本明細書中に列挙された対応配列によってコードすることができるが、以下の縮重コドンによりコードすることもできる。

#### 【0259】

10

20

30

40

アミノ酸	暗号コード
A	GCT, GCC, GCA, GCG
R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
N	AAT, AAC
D	GAT, GAC
C	TGT, TGC
G	GGT, GGC, GGA, GGG
Q	CAA, CAG
E	GAA, GAG
H	CAT, CAC
I	ATC, ATT, ATA
L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG
K	AAA, AAG
M	ATG
F	TTT, TTC
P	CCT, CCC, CCA, CCG
S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
T	ACT, ACC, ACA, ACG
W	TGG
Y	TAT, TAC
V	GTT, GTC, GTA, GTG

10

20

## 【0260】

本発明は、好適な態様に言及して詳細に説明されている。しかし、当然のことながら、当業者は、本開示に照らして、本発明の趣旨及び範囲内で改変及び改良を加えることができる。以下の非制限的な実施例は、本発明の例示である。

## (実施例)

## 【実施例1】

## 【0261】

## 実験材料及び方法

## 細胞培養物

ヒト乳房腺癌細胞株MCF-7 (HLA-A2陽性及びMUC-1陽性) 及びSK-Mel-24 (HLA-A2陽性及びMUC-1陰性) をアメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (Manassas, バージニア州) から購入した。培養物は、マイコプラズマを含んでおらず、完全培地 [10%のウシ胎児血清、2 mMのグルタミン、100ユニット/mlのペニシリン及び100 µg/mlのストレプトマイシン (Invitrogen Life Technologies, Inc) を添加したRPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, カリフォルニア州)] の中で維持した。C1R細胞株は、内在性のHLA-A又はHLA-B抗原を発現しないヒト血漿白血病細胞株である。C1R-A2細胞は、形質移入されたゲノムクローニングであるHLA-A2.1を発現するC1R細胞である。これらの細胞は、Dr. William E. Biddison (国立神経疾患・脳卒中研究所 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke)、NIH, Bethesda, メリーランド州) から入手した。174CEM-T2細胞株 (T2) の輸送欠失変異体は、Dr. Peter Cresswell (エール大学医学部 (Yale University School of Medicine)、New Haven, コネチカット州) から提供された。C1R-A2細胞及びT2細胞はマイコプラズマを含まず、それぞれ、RPMI 1640 完全培地及びイスコフ改変ダルベッコ完全培地 (Invitrogen Life Technologies) の中で維持した。

## 【0262】

## ペプチド

30

40

50

H L A - A 2 結合ペプチドの共通モチーフとの一致について、M U C - 1 のアミノ酸配列を調べた。P a r k e r K . C . ら ( J . I mmuno l . , 1 5 2 : 1 6 3 - 1 7 5 , 1 9 9 4 ) によって開発された、N I H のバイオインフォマティクス及び分子解析部門 (B i o I n f o r m a t i c s a n d M o l e c u l e A n a l y s i s S e c t i o n o f N I H ( B I M A S ) ) のコンピューター・アルゴリズムを用いたが、これは、ペプチド / M H C 複合体の予測された解離半減期に従って、M H C 結合ペプチドの可能性があるものをランク付けする。H L A - A 2 対立遺伝子が最も普通に発現するクラス I 対立遺伝子であるため、それを選択した。非 V N T R 由来の 1 0 量体のペプチドが各共通モチーフに一致している場合には、それらを合成した。1 0 量体のM U C - 1 ペプチドのパネル (表 1) 及び P - 9 2 M U C - 1 ペプチドの P 1 から P 1 0 の位置に一アミノ酸置換を有する類似体 (図 1 参照) は純度 > 9 0 % で、アメリカン・ペプチド・カンパニー社 (A m e r i c a n P e p t i d e C o m p a n y ( S u n n y v a l e , カリフォルニア州) ) によって製造された。また、純度 > 9 6 % の C E A ペプチドである C A P 1 - 6 D ( 2 8 ) は、アメリカン・ペプチド・カンパニー社 (S u n n y v a l e , カリフォルニア州) によって製造された。

#### 【 0 2 6 3 】

##### フローサイトメトリー解析

###### ( i ) 単色フローサイトメトリー解析

単色フローサイトメトリー解析法は、既述されている (G a u d a g n i F . ら、C ancer Res . : 5 0 : 6 2 4 8 - 6 2 5 5 , 1 9 9 0 ) 。簡単に言えば、C a<sup>2+</sup> 及び M g<sup>2+</sup> を含まない冷たい D P B S で細胞を 3 回洗浄してから、H L A - A 2 ( A 2 , 2 8 , O n e L a m b d a , I n c . , C a n o g a P a r k , カリフォルニア州) 、 C D 3 、 C D 4 、 C D 8 及び C D 5 6 ( B D B i o s c i e n c e s , S a n J o s e , カリフォルニア州) に対する m A b を 1 μg 用いて、4 °で 1 時間染色した。ミネラルオイル形質細胞腫 1 0 4 E ( C a p p e l / O r g a n o n T e k n i k a C o r p . , W e s t C h e s t e r , ペンシルバニア州) をアイソタイプ対照として用いた。次いで、細胞を 3 回洗浄して、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 標識したヤギ抗マウス免疫グロブリン (I g G) (K i r k e g a a r d a n d P e r r y L a b o r a t o r i e s , G a i t h e r s b u r g , メリーランド州) の 1 : 1 0 0 の希釈液を用いてインキュベートした。4 8 8 n m で 1 5 m W の励起を有するブルーレーザーを備えた B e c t o n D i c k i n s o n F A C S c a n を用いて、細胞を直ちに解析した。1 0 , 0 0 0 個の生細胞からデータを収集し、保存して、結果を生成するために使用した。

#### 【 0 2 6 4 】

###### ( i i ) 2 色フローサイトメトリー解析

2 色フローサイトメトリー解析の手順は、以下の例外を除いては、単色フローサイトメトリー解析と同様であった。抗 M H C クラス I I F I T C / 抗 C D 1 1 c P E 、抗 M H C クラス I I F I T C / 抗 C D 8 0 P E 、抗 C D 5 8 F I T C / 抗 C D 5 4 P E 、抗 M H C クラス I F I T C / 抗 M H C クラス I I P E 及び抗 I g G 1 F I T C / 抗 I g G 2 a P E (アイソタイプ対照) を用いて樹状細胞を解析し、> 9 6 % の樹状細胞が C D 1 1 c 及び M H C クラス I I 陽性であった。

#### 【 0 2 6 5 】

T 細胞株の解析に用いた抗体は、抗 C D 5 6 F I T C / 抗 C D 8 P E 、抗 C D 4 F I T C / 抗 C D 8 P E 及び抗 C D 4 5 R 0 F I T C / 抗 C D 4 9 d P E であり、T - 1 1 9 1 - P 9 2 細胞及び T - 1 1 9 1 P - 9 3 L 細胞の > 9 8 % が C D 8 陽性であった。C D 4 、 C D 8 、 C D 2 8 、 C D 4 5 R 0 、 C D 5 6 、 C D 4 9 d 、 C D 5 4 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 C D 5 8 及び C D 1 1 c に対する抗体は B D B i o s c i e n c e s 社から購入した。M H C クラス I 及び M H C クラス I I に対する抗体は、英國オクスフォードにある S e r o t e c 社から購入した。1 時間同時に染色を行ってから、細胞を 3 回洗浄して、上記のように再懸濁し、4 8 8 n m で 1 5 m W の励起を有するブルーレーザ

10

20

30

40

50

ーを備えたB e c t o n D i c k i n s o n F A C S c a n を用い、C E L L Q u e s t プログラムを用いて直ちに解析した。

#### 【0266】

陽性細胞の%及び平均蛍光強度(M F I)で結果を示した。M F Iを用いて、ゲート設定蛍光ドットプロットにおける全細胞の平均を測定して決定された蛍光レベルを表した。F A C S C A N 上で対数目盛りにしてM F I値を集めた。

#### 【0267】

##### H L A - A 2へのペプチド結合

P - 92 及びP - 92類似体のH L A - A 2分子への結合を、フローサイトメトリーにより示される、T 2 A 2細胞への結合によって評価した。本アッセイにおいて、ペプチド結合の結果、T 2細胞の表面上にあるH L A - A 2分子の安定性が増大(蓄積)することを、H L A - A 2分子に対する抗体結合の増加により測定する。要約すれば、無血清イスコフ改変ダルベッコ完全培地中 $1 \times 10^6$ 個の細胞を、濃度 $50 \mu g / m l$ のペプチドとともに、5%CO<sub>2</sub>中、24ウェル培養プレート内において、37でインキュベートした。T 2細胞及び単色解析法を用いて、ペプチド結合についてフローサイトメトリーを行った。上記したように、細胞をD P B Sで3回洗浄した後、細胞 $10^6$ 個につきH L A - A 2特異的なM A b (One Lambda, Inc.)の1:100希釈液を用いて1時間インキュベートした。アイソタイプ対照としてU P C - 10(Cappel/Organon Teknika)を用いた。次いで、細胞を3回洗浄して、F I T C標識した抗マウスIgG(BD Biosciences)の1:100希釈液を用いてインキュベートした。上記したように、F A C S c a n で解析を行った。細胞の調製及び染色の全過程で、細胞を氷上に置いた。

#### 【0268】

##### P B M C に由来するD C の培養

ヘパリン処理した血液から、H L A - A 2の正常なドナーであるP B M Cを採取した。既述されているように(Boyum, A. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97(Suppl): 51-76, 1968)、リンパ球分離用媒体勾配(Organon Teknika, Durham, ノースカロライナ州)を用いて、P B M Cを分離した。Sal lustoら(J. Exp. Med., 179: 1109-1118, 1994)に記載されている手順の変法を用いてD Cを調製した。グルタミン2mM、ストレプトマイシン $50 \mu g / m l$ 及びゲンタマイシン $10 \mu g / m l$ (Invitrogen Life Technologies, Inc.)を含むA I M - V培地にP B M C( $1.5 \times 10^8$ )を再懸濁して、T - 150フラスコ(Corning Costar Corp., Cambridge, マサチューセツ州)に付着させた。37で2時間置いた後、非付着細胞を静かに洗い流した。付着細胞は、 $100 n g / m l$ の組換えヒトG M - C S F(r h G M - C S F)及び $20 n g / m l$ の組換えヒトI L - 4(r h I L - 4)を含むA I M - V培地の中で6~7日間培養した。3日ごとに培養培地を補充した。

#### 【0269】

組換えウイルス及びM U C - 1を含むアビポックスウイルスによるD Cへの感染(r F - M U C - 1 / T R I C O M)

Jenkins S.ら、A I D S Res. Hum. Retroviruses, 7: 991-998, 1991に記載された通りに、組換え鶏痘ウイルスを作成した。この組換えウイルスの母体ウイルスとして、鶏痘ウイルスのP O X V A C - T Cワクチン株からブラーク精製した単離株を用いた。M U C - 1、L F A - 3、I C A M - 1及びB 7 - 1の配列を、鶏痘ウイルスゲノムのB a m H I、J領域に挿入した。さらに、鶏痘C 1プロモーターの制御下にl a c Z遺伝子を含ませて、-ガラクトシダーゼの発色アッセイ法を用いて、組換えウイルスを同定して単離した。鶏痘ウイルスに挿入したM U C - 1遺伝子は、天然のM U C - 1遺伝子から変異している。それは、30アミノ酸のシグナル配列、続いてM U C - 1タンパク質の成熟型N末端配列の最初の38アミノ酸、20アミノ

酸反復配列の 10 の同一コピー及びこのタンパク質の C 末端部分をコードする。各反復配列中に、コードされたアミノ酸を変更しない多数の第 3 塩基変異を有するコドンを含む重複合成ヌクレオチドを用いて、600 bp の反復配列を作成した。これは、反復アミノ酸配列を維持する際に、ポックス・ウイルスで不安定な重複ヌクレオチド配列を最小限に抑えるために行われた。

#### 【0270】

rF-MUC-1/TRICOM は、40K プロモーターの制御下にある MUC-1 遺伝子、ワクシニア 30K プロモーターの制御下にあるヒト LFA-3 遺伝子、ワクシニア I3 プロモーターの制御下にあるヒト ICAM-1 遺伝子及び合成した初期 / 後期 (sE / L) プロモーターの制御下にあるヒト B7-1 遺伝子を含む組換え鶏痘ウイルスである。  
10 樹状細胞 (DC) ( $1 \times 10^6$ ) を、1ml の Opti-MEM 培地 (Life Technologies, Inc.) 中で、rF-MUC-1/TRICOM 又は対照用アビポックスウイルスベクター (FP-WT) とともに 37 度インキュベートした。滴定実験により、2 時間 40 : 1 の MOI に等しい  $4 \times 10^7$  の プラーク形成単位 / ml で、約 75 % の感染 DC において導入遺伝子の発現を誘導できることが実証された。

感染した DC を、100ng/ml の rhGM-CSF、20ng/ml の rhIL-4 及び 20ng/ml の TNF-  
20 を含む 10ml の新鮮で温かい RPMI-1640 完全培地中に懸濁し、24 時間培養してから、APC として用いた。

#### 【0271】

##### T 細胞株の作成

Tsang K.Y. ら、J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-990, 1995 に記載されたプロトコルの変法を用いて、MUC-1 特異的 CTL を作成した。T 細胞株 T-1191-P-93L 及び T-1191-P-92 を作成するために、rF-MUC-1/TRICOM に感染させた自己樹状細胞を APC として用いた。次いで、10 : 1 のエフェクター対 APC の比にして、自己の非接着性細胞を APC に添加した。そして、CO2 を 5 % 含有する加湿した雰囲気中、37 度 3 日間、培養物をインキュベートした。次いで、7 日間、濃度 20 単位 / ml の組換えヒト IL-2 を培養物に添加し、IL-2 含有培地を 3 日毎に補充した。ペプチドとともに 3 日間インキュベートすることと、7 日間の IL-2 補充とが、1 回の IVS サイクルを構成した。11 日目に、rF-MUC-1/TRICOM に感染させた自己 DC によって、上記したように一次培養物を再刺激して、次の IVS サイクルを開始させた。rF-MUC-1/TRICOM に感染した自己 DC を、3 回の IVS サイクルで APC として用いた。3 回目の IVS サイクルの後、(23,000 ラド) 照射した自己 EBV 形質転換 B 細胞を APC として用いた。EBV 形質転換 B 細胞で再刺激するには、濃度 50mg/ml のペプチドを用いて、エフェクター対 APC の比 1 : 3 で再刺激のために自己 EBV 形質転換 B 細胞をパルスした。次いで、CO2 を 5 % 含んだ加湿雰囲気中、37 度 3 日間培養物をインキュベートした。ペプチドを含んだ培地を除去してから、濃度 20 単位 / ml の組換えヒト IL-2 を培養液に数日間添加した。上記と同一の刺激プロトコルを用いて、P-92 ペプチド又は P-93L ペプチドでパルスされた自己 DC によって PBMC を刺激することにより、患者 18 及び 23 から T 細胞株 (T-18-P-92, T-18-P-93L, T-23-P-92 及び T-23-P-93L) 作成した。DC の解析及び同定に用いたマーカーは、CD11c、MHC-クラス II、CD80、CD54、CD58 及び CD83 であった。CD3 も陰性マーカーとして用いた。  
30  
40

#### 【0272】

##### 細胞傷害性アッセイ

標的細胞 (C1R-A2 又は腫瘍細胞) を、50 μCi の <sup>111</sup>I インジウム標識したオキシキノリン (Medi-Physics Inc., Arlington, イリノイ州) を用いて室温で 15 分間標識した。100 μl の RPMI-1640 完全培地中の標的細胞 ( $0.3 \times 10^4$  個) を、平底測定プレート (Corning Costar Corp) の 96 ウェルのそれぞれに添加した。標識した C1R-A2 標的細胞を、エフェク  
50

ター細胞を添加する前に、5%のCO<sub>2</sub>中において37℃で60分間、表示した濃度のペプチドとともにインキュベートした。標的として癌腫細胞を用いる場合には、ペプチドを用いなかった。エフェクター細胞を、10%のプールされたヒトAB型血清を添加した RPMI 1640 完全培地100μlに懸濁して、標的細胞に添加した。そして、プレートを、37℃で4時間又は16時間、5%のCO<sub>2</sub>中においてインキュベートした。採取器(harvester frames: Skatron, Inc., Sterling, バージニア州)を用いて上清を回収して、ガンマ線計数を行った。測定は3回反復して行ない、標準偏差を計算した。以下の公式を用いて特異的溶解を計算した(値はすべてcpm)。

$$\% \text{ 溶解} = \frac{\text{観察された放出量} - \text{自発的放出量}}{\text{全放出量} - \text{自発的放出量}} \times 100$$

10

自発的放出量は、100μlのRPMI-1640完全培地を添加したウェルから測定した。放出可能な全放射活性量は、2.5%のTriton X-100で標的を処理して得られた。

#### 【0273】

##### サイトカインの検出

さまざまなペプチド濃度でIL-2を含まない培地中において、ペプチドをパルスされた自己EBV形質転換B細胞に24時間曝露されたT細胞の上清を、ELISAキット(R&D Systems, Minneapolis, ミネソタ州)を用いて、INF-の分泌についてスクリーニングした。結果をpg/mlで表示した。CBA装置(BD Pharmingen, San Diego, カリフォルニア州)を用いて、特異T細胞による複数のサイトカインの分泌も測定した。CBA装置は、フローサイトメトリーによる蛍光検出を利用して、粒子による免疫アッセイ法において可溶性検体を測定する。BDのヒトTh1/Th2サイトカインCBAキットを用いて、単一サンプル中のIL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF-aタンパク質のレベルを測定した。サイトカイン捕捉用ビーズを、PE結合検出抗体と混合してから、組換えサイトカイン標準、又は試験試料とともにインキュベートして、サンドウイッチ複合体を形成させた。BD Pharmingen CBA解析ソフトウェアを用いて、グラフィック及び表形式で、サンプルの結果を作成した。結果はpg/mlで表示した。

20

#### 【0274】

##### 統計的解析

両側ペアt検定(Stat View statistical software, Abacus Concepts, Berkeley, カリフォルニア州)を用いて、平均値間の差を統計的に解析した。

#### 【0275】

##### 毒性類別 - NCI共通毒性基準

\*等級I～IIの毒性が生じた場合、被検者は注入計画を続行することができる。

\*等級IIIの毒性が生じた場合、毒性が等級I～IIに低下するまで「薬剤」を留保し、その後注入を再開する。再開後、等級III又はIVの毒性が生じた場合、「薬剤」の注入を停止する。

40

\*等級IVの毒性が生じた場合、被検者に等級IVの毒性が生じていることを記録し、次回注入をそれ以前の用量に減少させる。以前の用量で等級IVの毒性が生じた場合、「薬剤」を停止する。

\*特定の投薬量で3人の被検者のうち1人に等級IVの毒性が生じた場合、さらに3人の被検者をその細胞用量レベルで参加させ、その用量レベルで、全部で6人の被検者としなければならない。ある細胞用量レベルで6被検者のうち2人が等級IVの毒性を示した場合、この用量はMTDと定義される。次の3被検者に前回細胞投与量の66%(3分の2)を投与する。用量増大を評価するため、各被検者に、6回の注入のうち少なくとも4回は、同じ用量レベルで投与しなければならない。

#### 【実施例2】

50

## 【0276】

## 新規MUC-1結合モチーフ

ヒトMUC-1の一次アミノ酸配列を、新規HLA-A2結合ペプチドの共通モチーフについて解析した。12個の10量体ペプチドを同定し、その結果合成して、T2細胞結合アッセイにおいてHLA-A2分子との結合を調べた。アミノ酸配列及びこれらの10量体ペプチドの位置を表1に示す。CEA CAP1-6Dペプチド及びNCAペプチドを、それぞれ陽性対照及び陰性対照として用いた。12個のペプチドの予測される結合も表1に示す。これらのペプチドのうち3つ(P-92、P-94及びP-1108)が、T2アッセイにおいて最高レベルの結合を有することを示した。

## 【0277】

## 【表1】

(表1) ヒトMUC-1ペプチドのHLA-A2分子への結合

ペプチド	MUC-1におけるアミノ酸の位置	配列	HLA-A2*への結合予測	T2結合#
P-92	92-101	ATWGQDVTSV	POS	740
P-94	94-103	WGQDVTSVPV	NEG	591
P-1108	1108-1117	REGTINVHDV	NEG	482
P-4	4-13	GTQSPFFLLL	NEG	467
P-1105	1105-1114	LAFREGTINV	NEG	461
P-1004	1004-1013	TLASHSTKTD	NEG	442
P-1069	1069-1078	LQRDISEMFL	NEG	433
P-1162	1162-1171	ALLVLVCVLV	POS	431
P-1135	1135-1144	TISDVSVSDV	POS	422
P-1172	1172-1181	ALAIVYLLAL	POS	372
P-1169	1169-1178	VLVALAIVYL	POS	369
P-1177	1177-1186	YLIALAVCQC	POS	338
CAP1-6D	NA	YLSGADLNL	POS	975
NCA	NA	YRPGENLNL	NEG	365

\*既に報告されたモチーフに基づいて予測された結合(37); POS=陽性; NEG=陰性

#相対的蛍光度で結果を表した。

CAP1-6Dは、陽性対照として使用されたHLA-A2結合癌胎児性抗原ペプチドである。

NCAペプチドを陰性対照として用いた。

NA=該当なし

10

20

30

## 【実施例3】

## 【0278】

## MUC-1特異的T細胞株の樹立

次いで、外見上健常なドナーのPBM CからMCU-1特異的T細胞株を樹立することができるかを決定するために実験を行った。これを行うために、rF-MUC-1/TRICOMに感染した自己DCをAPCとして用いた。rF-MUC-1/TRICOMは、MUC-1及び三連構造ヒト共刺激分子(TRICOMと命名された、B7-1、ICAM-1及びLFA-3)に相当する導入遺伝子を含む複製欠損アビポックスペクターである。rF-MUC-1/TRICOMは、ヒトDCに効率的に感染して、MUC-1同様、各共刺激分子をDC表面上に過剰発現させることができた(表2)。細胞の約96%がCD11c及びMHC-クラスII陽性であった。

40

## 【0279】

## 【表2】

(表2) rF-MUC-1/TRICOMに感染したDCの表現型解析

感染した樹状細胞	CD80	CD54	CD58	クラスI	MUC-1	
非感染	4.8 (13.6)	59.5 (62.3)	68.1 (18.2)	99.7 (271.8)	5.0 (95.7)	
FP/WT	7.4 (13.3)	79.3 (83.4)	74.0 (19.5)	99.5 (176.3)	3.1 (50.7)	
rF-MUC-1/TRICOM	30.9 (35.7)	84.5 (133.9)	79.8 (27.4)	99.9 (189.3)	31.6 (213.1)	10

DC上における表面マーカー発現のフローサイトメトリー解析。使用したDCを、100ng/mlのrhGM-CSFおよび20ng/mlのrhIL-4を含むAIM-V培地の中で7日間培養した。FP/WTまたはrF-MUC-1/TRICOMによる感染に用られたDCを「実験材料および方法」の項に記載したとおりに培養した。  
結果は、陽性細胞のパーセンテージを示し、括弧内の数字はMFIを表す。

## 【0280】

作成されたMUC-1特異的T細胞(T-1191-MUC-1と命名)の特異性を、IVSを3回行った(実験材料及び方法参照)後に解析して、それらが、表1に記載した各MUC-1ペプチドでパルスされた自己B細胞で刺激した後に、IFN- $\gamma$ を放出できるかを調べた。表3に示した結果は、T-1191-MUC-1細胞を、ペプチドであるP-92、P-1135、P-94、P-1004、P-1069及びP-4でパルスされた自己B細胞で刺激すると、T細胞が、IFN- $\gamma$ を産生したが、他のペプチドでパルスされた自己B細胞を用いた場合には、IFN- $\gamma$ を産生しなかったことを実証している。表1及び3に示した結果は、P-92ペプチドが、最高レベルのT2結合を行うとともに、T-1191-MUC-1細胞を活性化して、最高レベルのIFN- $\gamma$ を産生させることができることを実証している。したがって、さらなる試験のためにこのペプチドを選択した。

## 【0281】

## 【表3】

(表3) MUC-1ペプチドでパルスされた自己B細胞で刺激されたT-1191-MUC-1細胞によるIFN- $\gamma$ の產生

ペプチド	IFN- $\gamma$ の產生(pg/ml)	
	ペプチドあり	ペプチドなし
P-92	380.8	<52.3
P-1135	347.2	<52.3
P-94	323.6	<52.3
P-1004	305.6	<52.3
P-1069	288.0	<52.3
P-4	260.0	<52.3
P-1105	<52.3	<52.3
P-1108	<52.3	<52.3
P-1162	<52.3	<52.3
P-1169	<52.3	<52.3
P-1172	<52.3	<52.3
P-1177	<52.3	<52.3

T-1191-MUC-1細胞をIVS-3においてエフェクターとして用いた。濃度25 $\mu$ g/ml、エフェクター対APCの比率1:3で、さまざまなMUC-1ペプチドでパルスされた照射済み自己EBV形質転換B細胞によってT細胞を刺激した。24時間培養した上清を集めて、INF- $\gamma$ の分泌についてスクリーニングした。

## 【実施例4】

## 【0282】

## ペプチド解析

P-92の2位及び10位における一次及び二次のHLA-A2アンカーアミノ酸残基の解析により、これらの位置におけるアミノ酸の変化が、ペプチドのHLA-A2分子への結合能力を強化しうることが明らかになった。従って、表4に示すように、P-92の6つの異なる類似体を合成し、天然のP-92ペプチドとともに、T2細胞への結合能力について試験を行った。CEAのCAP-7(HLA-A3結合ペプチド)は、HLA-A2に結合しないことが既に示されているので、陰性対照として用いた。表4に示したように、6つの類似体ペプチドのうち4つが、P-92ペプチドよりも高レベルでHLA-A2に結合した。類似体P-93L及びP-93Iは、もっとも効率的にHLA-A2に結合した。

## 【0283】

10

20

30

## 【表4】

(表4) MUC-1ペプチド類似体

アミノ酸配列	当初名称	T 2 結合*	
ATWGQDVTSV	P-92 (天然型)	510	
AIWGQDVTSV	I-93	823	
ALWGQDVTSV	L-93	821	
ALWGQDVTSL	L-93/L-101	736	
AMWGQDVTSV	M-93	723	10
AMWGQDVTSL	M-93/L-101	325	
AIWGQDVTSL	I-93/L-101	280	

P-92親ペプチド(MUC-1のアミノ酸92~101位)および類似体ペプチドのアミノ酸配列。アミノ酸を一文字コードで示す。置換アミノ酸を太字体且つ斜字体で示す。

\*結果を相対的蛍光値で表示した。HLA-A3ペプチド(T2結合=200)を陰性対照として、CAP1-6D(T2結合=875)を陽性対照として用いた。

## 【0284】

次いで、実験を行って、さまざまなペプチド濃度でP-93L及びP-93IがHLA-A2に結合する能力を比較した。図1から明らかなように、P-93L及びP-93Iペプチドは、すべてのペプチド濃度においてP-92よりも高いレベルでHLA-A2に結合した。結合レベルは、さまざまなペプチド濃度でP-93L及びP-93Iについて同様であった。したがって、これらのデータは、一次アンカー位置2(MUC-1分子の93位)が変更されているP-93L及びP-93Iが、ともにペプチドP-92の強力なアゴニストであることを示していた。

## 【実施例5】

## 【0285】

## ペプチド-MHC複合体の安定性

ペプチドP-92(天然型)、P-93L及びP-93Iに関するペプチド-MHC複合体の安定性を調べた。ペプチドをT2細胞とともに一晩インキュベートし、未結合ペプチドを洗い落としてから、ブレフェルジン-Aとともにインキュベートして、新しいクラスI分子が細胞表面に送達されるのをロックした。さまざまな時点で、ペプチド-HLA-A-A2複合体の存在について細胞を解析した。図2に示したように、P-93L-HLA-A-A2複合体及びP-93I-HLA-A2複合体は、8時間にわたる観察時間に於いて、P-92-HLA-A2複合体よりも安定していたが、P-93L-HLA-A2複合体の方が、同じ時間に於いて、P-93I-HLA-A2複合体よりわずかに安定していた。従って、P-93L及びP-93Iの方が、天然のP-92ペプチドより、ペプチドのMHCへの結合性及びペプチド-MHC複合体の安定性ともに勝っていることが示された。

## 【0286】

P-93L及びP-93IのアゴニストペプチドがT-1191-MUC-1細胞を活性化させる能力を、さまざまなペプチド濃度で比較した。図3から明らかなように、各ペプチド濃度において、APCをP-93Lペプチドでパルスしたとき、P-93Iペプチド又は天然のP-92ペプチドと比較して、T-1191-MUC-1細胞による最大レベルのINF-産生がもたらされた。したがって、さらなる試験のためにP-93Lアゴニストペプチドを選択した。次に、P-92ペプチド又はP-93LペプチドでパルスされたAPCで刺激されたT-1191-MUC-1細胞のサイトカインプロファイルを解析した。解析にはCBAアッセイ法を用いた。表5は、ペプチドなし、P-92ペプチド及びP-93Lペプチド、でパルスされたAPCにより刺激されたT-1191-MUC-1細胞株によって產生された6つのサイトカインのそれぞれのレベルを示す。これら

20

30

40

50

の結果は、P-92ペプチドで刺激されるよりも、P-93Lペプチドで刺激された方が、T細胞によるI型サイトカインIL-2及びIFN- $\gamma$ の産生が増大することを実証した。低レベル又は検出不能なレベルの2型サイトカインIL-4及びIL-10が、どちらのペプチドでも見られた。24時間の時点では、上清中にはTNF-aを検出できなかった。

## 【0287】

## 【表5】

(表5) MUC-1ペプチドで刺激したT細胞によるサイトカイン産生に関するCBAアッセイ

10

ペプチド	サイトカイン					
	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
なし	<20	<20	<20	<20	<20	<20
P-92	58.8	<20	<20	<20	<20	266
P-93L	366.9	<20	140.9	<20	<20	650

IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ の産生を解析した。各サイトカイン濃度、0 pg/ml、312 pg/ml、および5000 pg/mlでの標準を、試料中におけるこれら6種類のサイトカインの濃度を測定するために使用した。IVS-3におけるT-1191 MUC-1細胞をエフェクターとして用いた。濃度25  $\mu$ g/ml、およびエフェクター対APCの比率1:3で、ペプチドなし、またはP-92ペプチドもしくはP-93Lペプチドでパルスされた照射済み自己EBV形質転換B細胞によってT細胞を刺激した。24時間培養した上清を集めて、サイトカインの分泌についてスクリーニングした。結果をpg/ml/10<sup>6</sup>細胞/mlで表した。

20

## 【0288】

天然のP-92ペプチド及びアゴニストP-93Lペプチドの生物学的活性をさらに比較するために、さらに2つのT細胞株を樹立した。これは、APCとしてrF-MUC-1/TRICOMに感染した自己DC及びエフェクターとして外見上健常なドナー由来の自己PBMCを用いて行なった。3回のIVS後、P-92ペプチド又はP-93Lペプチドのいずれかでパルスされた自己B細胞でT細胞株を刺激した。これら2つの細胞株は、>98%がCD8陽性細胞、99%がCD49d陽性細胞、<2%がCD56陽性細胞及び>75%がCD45RO陽性細胞であることを示した。次いで、ペプチドでパルスした標的を溶解できるかについて、これら2つのT細胞株を解析した。T-1191-P-93Lは、P-93LペプチドでパルスされたC1R-A2細胞を、P-92ペプチドでパルスされた細胞よりも大きな範囲で溶解することが示された(図4、四角形)。T-1191-P-92も、P-93Lペプチドでパルスされた標的細胞を、P-92ペプチドでパルスされた標的細胞よりも大きな範囲で溶解した(図4、三角形)。図4のデータも、標的細胞を天然ペプチドでパルスした場合に、アゴニストP-93Lペプチドを用いて樹立されたT細胞株の方が、天然ペプチドを用いて樹立されたT細胞株より高レベルで標的細胞を溶解することを示している。これは、異なる2つのE:T比率で見られた。T-1191-P-93L細胞及びT-1191-P-92細胞は、対照であるCEA CAP1-6Dペプチドでパルスされた場合には、C1R-A2細胞を溶解しなかつた。

30

## 【実施例6】

## 【0289】

## 標的細胞認識

次に、試験を行って、これら2つのT細胞株が、MUC-1陽性及びHLA-A2陽性の乳癌細胞株MCF-7を溶解することができるかを測定した。MUC-1陰性でHLA

40

50

- A 2 陽性の SK - Mel - 24 メラノーマ細胞株を陰性対照として用いた。表 5 に示したように、MCF - 7 細胞は、T - 1191 - P - 92 細胞及び T - 1191 - P - 93 L 細胞によって溶解された。SK - Mel - 24 細胞に対する溶解は観察されなかった。T - 1191 - P - 93 L 細胞は、T - 1191 - P - 92 細胞株と比較して、MCF - 7 細胞をより大きく溶解することが示された。CEA CAP1 - 6D 対照用ペプチドではなく、対応する MUC - 1 ペプチドでパルスされた非標識 C1R - A2 細胞を添加すると、両方の T 細胞株の細胞傷害活性が低下して、溶解の MUC - 1 特異性を示した（表 5）。抗 HLA - A2 抗体を添加すると溶解が阻害され、対照用抗体 UPC - 10 では阻害されなかったことから明らかなように、MCF - 7 細胞に対するこれらの T 細胞株の細胞傷害活性も、HLA - A2 拘束性であることが示された（表 6）。

10

## 【0290】

## 【表 6】

（表 6） MUC - 1 特異的 T 細胞株 T - 1191 - P - 92 および T - 1191 - P - 93 L が、MUC - 1 発現腫瘍細胞株（MCF - 7）を溶解する能力

標的	T-1191-P-92	T-1191-P-93L
MCF-7	16.5 (2.7)*	24.5 (4.5)*
MCF-7 + C1R-A2	15.6 (3.2)*	21.6 (2.9)*
MCF-7 + C1R-A2 + P-92	4.2 (2.2)	6.1 (1.9)
MCF-7 + C1R-A2 + P-93L	3.0 (1.5)	3.5 (1.2)
MCF-7 + C1R-A2 + CAP1-6D	17.1 (3.8)*	20.8 (3.9)*
SK-Mel-24	0.5 (1.1)	1.4 (0.8)

結果を E : T = 25 : 1 における特異的溶解の割合 (%) で示す。括弧内の数字は標準偏差である。MCF - 7 (ヒト乳房癌細胞株) 細胞は、MUC - 1 陽性および HLA - A2 陽性である。SK - Mel - 24 (メラノーマ) 細胞は、MUC - 1 陰性および HLA - A2 陽性である。T - 1191 - P - 92 細胞および T - 1191 - P - 93 L 細胞は IVS - 5 で使用した。IVS 3 から IVS 5 まで、T - 1191 - P - 92 細胞株は、天然 P - 92 ペプチド上で継代したが、T - 1191 - P - 93 細胞株は、アゴニスト P - 93 L ペプチド上で継代した。MCF - 7 細胞を <sup>111</sup>I n で標識した。標識化 MCF - 7 細胞および非標識 C1R - A2 細胞を 1 : 10 の比で用いた。C1R - A2 細胞を、P - 92 ペプチド (25 μg/ml)、P - 93 L ペプチド (25 μg/ml) または CAP1 - 6D 対照用ペプチド (25 μg/ml) とともに、またはこれらなしでインキュベートした。

20

\* MCF - 7 細胞対 SK - Mel - 24 細胞の溶解を比較したときに統計的に有意な溶解 ( $p < 0.01$ 、両側 t 検定)。MCF - 7 + C1R - A2 対 MCF - 7 + C1R - A2 + P - 92 ペプチドまたは MCF - 7 + C1R - A2 対 MCF - 7 + C1R - A2 + P - 93 L ペプチドの溶解を比較しても統計的な有意性がある。

30

## 【0291】

抗 HLA - A2 抗体を添加すると溶解が阻害され、対照用抗体 UPC - 10 では阻害されなかったことから明らかなように、MCF - 7 細胞に対するこれらの T 細胞株の細胞傷害活性も、HLA - A2 拘束性であることが示された（表 7）。

## 【0292】

40

T 細胞株 T - 1191 - P - 92 及び T - 1191 - P - 93 L は、外見上健常な被検者由来であった。そして、2人の脾臓癌患者（患者 23 及び 18）からさらに別の T 細胞株を樹立することができるか否かを決定するために実験を行った。4つの MUC - 1 特異的 T 細胞株を作成して、T - 23 - P - 92、T - 23 - P - 93 L、T - 18 - P - 92 及び T - 18 - P - 93 L と命名した。T 細胞株 T - 18 - P - 92 及び T - 18 - P - 93 L を、それぞれ P - 92 ペプチド及び P - 93 L ペプチドでパルスされた自己 DC で PBMC を刺激することにより、患者 18 から生成した。T 細胞株 T - 23 - P - 92 及び T - 23 - P - 93 L は、それぞれ P - 92 及び P - 93 L ペプチドでパルスされた自己 DC で PBMC を刺激することにより、患者 23 から作成された。表 8 から明らかなように、P - 92 ペプチド又は P - 93 L ペプチドでパルスされた DC で刺激したところ

50

、2人の肺臓癌患者由来の4つのT細胞株すべてが刺激されて、IFN- $\gamma$ を産生することができた。しかし、これらのT細胞をCEAペプチドCAP1-6Dによって同じように刺激しても、IFN- $\gamma$ の産生は認められなかった。4つのT細胞株すべてで、P-93Lアゴニストペプチドを用いた場合の方が、P-92天然ペプチドと比較して高レベルのIFN- $\gamma$ の産生が見られた。所定のペプチドを用いて刺激した場合と、アゴニストペプチドを用いて得たT細胞株は、天然のペプチドに由来するT細胞株よりも高レベルの刺激を常に示したことに留意すべきである。

## 【0293】

## 【表8】

(表8) 2人の肺臓癌患者から作成したT一細胞株による、P-92およびアゴニストP-93Lペプチドで刺激されたときのIFN- $\gamma$ の産生

T-細胞株	ペプチド		
	P-92	P-93L	CAP1-6D
T-23-P-92	299.8	644.5	<26
T-23-P-93L	400.5	973.0	<26
T-18-P-92	168.0	366.6	<26
T-18-P-93L	378.2	524.1	<26

結果を、産生されたpg IFN- $\gamma$ で表した。

2人の肺臓癌患者(被検者23および18)から樹立した4つのMUC-1特異的T一細胞株に由来する細胞を、IVS-4においてエフェクター細胞として用いた。P-92でパルスされた自己DC(T-23-P-92およびT-18-P-92)、またはP-93Lでパルスされた自己DC(T-23-P-93LおよびT-18-P-93L)で刺激して、これらのT細胞株を樹立した。IFN- $\gamma$ を産生させるため、濃度25 $\mu$ g/mlおよびエフェクター対APCの比率10:1で、P-92ペプチドまたはP-93Lペプチドでパルスされた照射ずみHLA-A陽性の同種DCによってT細胞株を刺激した。24時間の培養した上清を集めて、IFN- $\gamma$ 分泌についてスクリーニングした。

## 【実施例7】

## 【0294】

## 癌患者由来の細胞株による標的の細胞溶解

次に、癌患者23から得たT細胞株が、MUC-1陽性HLA-A2陽性の癌細胞を溶解することができるか否かを決定するために実験を行った。SK-Mel-24細胞株(MUC-1陰性及びHLA-A2陽性)を、特異性についての陰性対照として用いた。表9及び10に見られるように、T-23-P-93L細胞株、T-23-P-92細胞株、T-18-P-93L細胞株、及びT-18-P-92細胞株は、2つの異なるE:T比でMCF-7癌細胞の溶解を示したが、メラノーマ細胞株の溶解は認められなかった。上記の結果に従って、アゴニストペプチドを用いて得られたT細胞株(T-23-P-93L、T-18-P-93L)は、天然ペプチドを用いて得られたT細胞株(T-23-P-92、T-18-P-92)よりも優れた腫瘍細胞溶解を示した。これは、2つの異なるE:T比で見られた。

## 【0295】

10

20

30

40

## 【表9】

(表9) アゴニストペプチドP-93Lによって作成された、肺臓癌被検者由来のT細胞株が、天然MUC-1を発現する癌細胞を溶解する能力

T-細胞株	標的	E:T比
		25:1
		12.5:1
T-23-P-93L	MCF-7	24.6 (1.0)*#
T-23-P-93L	SK-Mel-24	1.3 (1.1)
T-23-P-92	MCF-7	14.4 (0.6)*
T-23-P-92	SK-Mel-24	0.5 (1.6)

\* T-23-P-93L細胞およびT-23P-92細胞によるMCF-7細胞の溶解対SK-Mel-24細胞の溶解を比較したときの統計的有意性 ( $P < 0.01$ 、両側t検定)。

# T-23-P-93L細胞とT-23-P-92細胞によるMCF-7細胞の溶解を比較したときの統計的有意性 ( $P < 0.01$ 、両側t検定)。

結果を溶解の割合 (%) で表す。

## 【0296】

## 【表10】

20

(表10) アゴニストペプチドP-93Lによって作成された、肺臓癌被検者由来のT細胞株の、天然MUC-1を発現する癌細胞を溶解する能力

T-細胞株	標的	E:T比
		25:1
		12.5:1
T-18-P-93L	MCF-7	25 (0.8)*#
T-18-P-93L	SK-Mel-24	1.1 (0.9)
T-18-P-92	MCF-7	12.1 (0.3)*
T-18-P-92	SK-Mel-24	0.9 (1.4)

\* T-18-P-93L細胞およびT-18-P-92細胞によるMCF-7細胞の溶解対SK-Mel-24細胞の溶解を比較したときの統計的有意性 ( $P < 0.01$ 、両側t検定)。

# T-18-P-93L細胞およびT-18-P-92細胞によるMCF-7細胞の溶解を比較したときの統計的有意性 ( $P < 0.01$ 、両側t検定)。

結果を溶解の割合 (%) で表す。

## 【実施例8】

## 【0297】

## 実験材料及び方法

40

解析した2つのウイルスベクターは、複製可能な組換えワクシニアウイルス(rV-)及びアビポックスベクターである鶏痘(rF-)であり、後者は哺乳動物細胞において複製不能である。各ベクターは、3種類のヒト共刺激分子(TRICOMと名づけられたB7-1、ICAM-1、LFA-3)に対する導入遺伝子をコードし、CEA及びMUC-1の両導入遺伝子は、アゴニスト・エピトープも含んでいる。ベクターをrV-CEA/MUC/TRICOM及びrF-CEA/MUC/TRICOMと命名した。

## 【0298】

どちらのベクターも、ヒト樹状細胞(DC)の中で5つの導入遺伝子すべてを忠実に発現させることができることが示されている。どちらかのベクターに感染したDCは、CEA特異的及びMUC-1特異的なT細胞株を、CEA-TRICOMベクター又はMUC

50

- 1 - TRICOMベクターで感染したDCと同じレベルまで活性化することが示されている。したがって、CEAとMUC-1の間に抗原競合が存在するという証拠は観察されなかった。また、rV-CEA/MUC/TRICOM又はrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したヒトDCも、MUC-1及びCEAの両方に特異的なT細胞株を生じさせる能力があることが示されているが、これらのT細胞株も、内生的にMUC-1及び/又はCEAを発現するヒト腫瘍細胞はもとより、MUC-1ペプチド又はCEAペプチドでパルスされた標的を溶解できることが示されている。

### 【0299】

#### 細胞培養物

ヒト乳房腺癌細胞株MCF-7 (HLA-A2陽性、CEA陰性及びMUC-1陽性) 10  
 、結腸直腸癌細胞株SW1463 (HLA-A2陽性、CEA陽性及びMUC-1陽性) 及びメラノーマ細胞株SK-Mel-24 (HLA-A2陽性、CEA陰性及びMUC-1陰性) をアメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (Manassas, バージニア州) から購入した。培養物は、マイコプラズマを含んでおらず、完全培地 [10%のウシ胎児血清、2 mMのグルタミン、100ユニット/mlのペニシリン及び100 µg/mlのストレプトマイシン (Invitrogen Life Technologies) ] を添加した RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, カリフォルニア州) ] の中で維持した。C1R細胞株は、内在性のHLA-A又はHLA-B抗原を発現しないヒト血漿白血病細胞株である。C1R-A2細胞は、形質移入されたゲノムクローンであるHLA-A2.1を発現する C1R細胞である。これらの細胞は、Dr. William E. Biddison (国立神経疾患・脳卒中研究所 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke), NIH, Bethesda, メリーランド州) から入手した。174CEM-T2細胞株 (T2) の輸送欠失変異体は、Dr. Peter Cresswell (エール大学医学部 (Yale University School of Medicine), New Haven, コネチカット州) から提供された。C1R-A2細胞及びT2細胞はマイコプラズマを含まず、それぞれ、RPMI 1640 完全培地及びイスクوف改変ダルベッコ完全培地 (Invitrogen Life Technologies) の中で維持した。V8T細胞株は、CEAのCAP-1エピトープに対するCD8<sup>+</sup>CTL細胞株である。T-1191-P93L細胞株は、MUC-1ペプチドを用いてインビトロにおいて刺激された健常なドナー由来の末梢血単核細胞 (PBMC) から作成されたCD8<sup>+</sup>MUC-1特異的CTL細胞株である。V8T細胞株及びT-1191-P93L細胞株は両方とも、既述したとおりに培養した。

### 【0300】

#### ペプチド

使用したHLA-A2結合ペプチドは、以下のものを含んでいた。すなわち、(a) CEAペプチドと命名されたCEAアゴニストペプチドCAP1-6D (YLSGADLN<sub>L</sub>)、(b) MUC-1ペプチドと命名されたMUC-1アゴニストペプチドP-93L (ALWGQDVTSV)、(c) 前立腺特異的抗原 (PSA) ペプチドPSA-3 (VISNDVCAQV)。すべてのペプチドは96%よりも高い純度で、アメリカン・ペプチド・カンパニー社 (American Peptide Company, Inc., (Sunnyvale, カリフォルニア州)) によって製造された。

### 【0301】

#### BMCからのDCの培養

HLA-A2の正常なドナーPBMCを、ヘパリン化血液から得た。既述されているとおりに(51)、(Boyum A. 「ヒト血液から顆粒球及びリンパ球を単離するための一段階処理法。1 g の重力場における白血球細胞の一般的な沈降特性 (A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. Ge

10

20

30

40

50

neral sedimentation properties of white blood cells in 1 g gravity field)、Scand J Clin Lab Invest 1968; 97 (Suppl) : 51 - 76)、リンパ球分離媒体勾配(Organon Teknika, Durham, ノースカロライナ州)を用いてPBMCを分離した。Sallustoら(Sallusto F, Lanzavecchia A.、培養ヒト樹状細胞による可溶性抗原の効率的な提示は、顆粒球/マクロファージ・コロニー刺激因子とインターロイキン-4によって維持され、腫瘍壞死因子によって下方制御される(Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulo cyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor necrosis factor alpha)、J. Exp. Med., 179: 1109 - 1118, 1994))によって説明されている手順の変法を用いてDCを調製した。2 mMのグルタミン、50 µg/mlのストレプトマイシン及び10 µg/mlのゲンタマイシン(Invitrogen Life Technologies, Inc.)を含むAIM-V培地にPBMC( $1.5 \times 10^8$ )を再懸濁して、T-150フラスコ(Corning Costar Corp., Cambridge, マサチューセツ州)に付着させた。37で2時間経過後、非付着細胞を静かに洗い流した。100 ng/mlの組換えヒトGM-CSF(rhGM-CSF)及び20 ng/mlの組換えヒトIL-4(rhIL-4)を含むAIM-V培地の中で6~7日間、付着細胞を培養した。3日ごとに培養基を補充した。

### 【0302】

組換えウイルス、ならびにrV-CEA/MUC/TRICOM及びrF-CEA/MUC/TRICOMによるDCの感染

rV-CEA/MUC/TRICOM及びrF-CEA/MUC/TRICOMは、6Dの変更を含むヒトCEA遺伝子、93Lの変更を含むヒトMUC-1遺伝子並びにヒト共刺激分子B7-1、ICAM-1及びLFA-3をコードする(図5)(Zaremba S, Barzaga E, Zhu Mら、ヒト癌胎児性抗原由来のエンハンサーagonistである細胞傷害性Tリンパ球ペプチドの同定(Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen)、Cancer Res 1997; 57: 4570 - 7, 及びTsang KY, Palena C, Gulley J, Arlen P, Schlom J.ヒト細胞傷害性Tリンパ球エピトープ、及びそのMUC-1の非VNTR由来のアゴニストエピトープ(A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the non-variable number of tandem repeat sequence of MUC-1)、Clin Cancer Res 2004; 10: 2139 - 49)。(Hodge JW, McLaughlin JP, Kantor JA, Schlom J.; Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor responses; Vaccine 1997; 16: 759 - 68)に記載されているように、相同的組換えによって組換えベクターを作成した。DC( $1 \times 10^6$ 個)を、1mlのOpti-MEM培地(Invitrogen Life Technologies)中で、rF-CEA/MUC/TRICOM、rV-CEA/MUC/TRICOM、対照のアビポックスウイルスベクター(FP-WT)又は対照のワクシニアベクター(V-WT)とともに37でインキュベートした。

滴定実験によって、 $40 \text{ p f u}$  / 細胞の感染多重度 (MOI) に等しい、 $4 \times 10^4$  プラーケ形成単位 (pfu) / ml の rF-CEA/MUC/TRICOM を 2 時間 DC に感染させると、約 60 % の感染 DC の中で導入遺伝子の発現を定常的に誘導できることが実証された。同様の滴定実験によって、 $5 \text{ p f u}$  / 細胞の MOI に等しい、 $0.5 \times 10^7$  pfu / ml の rV-CEA/MUC/TRICOM を 1 時間 DC に感染させると、約 35 % の感染 DC の中で導入遺伝子の発現を定常的に誘導できることが実証された。rF-CEA/MUC/TRICOM については 50 % ~ 65 % の感染効率、rV-CEA/MUC/TRICOM 及び rV-CEA/MUC/TRICOM を感染させるのに、さまざまなドナーベースの DC を用いた。 $100 \text{ ng}$  / ml の rhGM-CSF 及び  $20 \text{ ng}$  / ml の rhIL-4 を含む新鮮で温かい RPMI-1640 完全培地 10 ml に感染した DC を懸濁し、24 時間培養してから、APC として用いた。

### 【0303】

#### フローサイトメトリー解析

以下の抗体の組み合わせを用いて T 細胞株上で 2 色フローサイトメトリー解析を行った。抗 CD56 - FITC / 抗 CD8 - PE、抗 CD8 - FITC / 抗 CD45RA - FITC 及び抗 CD8 - FITC / 抗 CD27 - PE。抗体はすべて BDバイオサイエンス社 (San Jose, カリフォルニア州) から購入した。4 で 1 時間、同時に染色を行ってから、Ca<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> を含まない冷たいリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄し、同じ緩衝液に再懸濁して、FACScan 及び CellQuest プログラム (BD Biosciences) を用いて直ちに解析した。10,000 個の生細胞からデータを収集し、保存し、結果を作成するために用いた。DC を解析する手順は、上記した手順と同じであった。以下の抗体の組み合わせを用いた。すなわち、抗 MHC-クラス II - FITC / 抗 CD80 - PE、抗 CD58 - FITC / 抗 CD54 - PE、抗 MHC クラス I - FITC / 抗 MHC クラス II - PE 及び抗 IgG1 - FITC / 抗 IgG2a - PE (アイソタイプ対照)。MHC クラス I 及びクラス II に対する抗体は、Serotec 社 (オックスフォード, イギリス) から購入し、他の抗体は BD Bioscience 社から購入した。抗 CEA モノクローナル抗体 COL-1 及び抗 MUC-1 抗体 (DF-3 及び DF-3P) も用いた (Muraro R, Wunderlich D, Thor A. ら、ヒト結腸癌腫瘍と正常な成人組織で異なって発現される癌胎児性抗原上にある同じレパートリーのエピトープのモノクローナル抗体による定義 (Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinoma versus normal adult tissues) Cancer Res 1985; 45: 5769-80)。MOPC-104E (IgM) (Cappel / Organon Teknica Corp., West Chester, ペンシルバニア州) を陰性対照として用いた。

### 【0304】

染色後、細胞を 3 回洗浄した後、FITC で標識したヤギ抗マウス免疫グロブリン (IgG) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, メリーランド州) の 1 : 100 希釀液でインキュベートした。上記したように解析を行った。結果を、陽性細胞の割合 (%) 及び平均蛍光強度 (MFI) で表した。MFI 値を対数スケールで得て、それを用いて、蛍光ドットプロットにおけるすべての細胞の平均を測定して決定した蛍光のレベルを表した。

### 【0305】

#### 免疫プロット解析

MPER 哺乳動物タンパク質抽出用試薬 (Pierce, Rockford, イリノイ州) を用いて、非感染 DC、 $40 \text{ MOI}$  の rF-CEA/MUC/TRICOM ベクター、rF-CEA (6D)-TRICOM ベクター、又は rF-MUC-1/TRICOM

ベクターに感染させたDC及び5MOIのrV-CEA/MUC/TRICOMベクターに感染させたDCを溶解した。MicroBCAタンパク質アッセイ用キット(Pierce)を用いて、溶解物のタンパク質濃度を測定し、Bio-Dot精密濾過装置(BioRad Laboratories, Hercules, カリフォルニア州)を製造業者の指示に従って用いて、1サンプル当たり $20\mu g$ のタンパク質画分をPVDF膜12の上にプロットした。プロットした後、BSA(Biosource International, Camarillo, カリフォルニア州)を5%含むPBSを用いて、室温で1時間、膜をブロックした。次いで、0.25%のTween-20を含むPBSを用いて膜を3回洗浄してから、 $1\mu g/ml$ のCOL-1抗体、DF-3抗体、又はDF3-P抗体の溶液を用いて、室温で2時間インキュベートした。そして、上記したように膜を3回洗浄してから、HRPに結合した抗マウスIgG(Kirkegaard & Perry Laboratories)の1:3000希釈液を用いて室温で1時間インキュベートした。CEA及びMUC-1タンパク質の免疫検出には、Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce)を用いた。

### 【0306】

#### T細胞株の作成

Tsangらに記載されたプロトコルの変法を用いて、CEA及び/又はMUC-1に特異的なCTLを作成した(Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CAら. 組換えワクシニアCEAワクチンによって免疫された患者由来のヒト癌胎児性抗原に特異的なヒト細胞傷害性T細胞の作成(Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine) J Natl Cancer Inst 1995; 87: 982-90)。T細胞株T-rV及びT-rFを作成するために、それぞれrV-CEA/MUC/TRICOM又はrF-CEA/MUC/TRICOMに感染させた自己DCをAPCとして用いた。10:1のエフェクター対APCの比にして、自己の非接着性細胞をAPCに添加した。そして、CO<sub>2</sub>を5%含有する加湿した雰囲気中、37で3日間、培養物をインキュベートした。次いで、7日間、濃度20単位/mlの組換えヒトIL-2を培養物に添加し、IL-2含有培地を3日毎に補充した。ペプチドとともに3日間インキュベートすることと、7日間のIL-2補充とが、1回のインビトロ刺激(IVS)サイクルを構成した。上記したように、rV-CEA/MUC/TRICOM又はrF-CEA/MUC/TRICOMに感染した自己DCで、それぞれT-rV及びT-rFを再刺激し、11日目に次のIVSサイクルを開始した。rV-CEA/MUC/TRICOM及びrF-CEA/MUC/TRICOMに感染した自己DCを、3回のIVSサイクルの間APCとして用いた。T-rF(CEA)細胞株及びT-rF(MUC)細胞株を作成するために、1回のIVSの間、rF-CEA/MUC/TRICOMを感染させた自己DCでT細胞を刺激してから、さらに2回のIVSの間、それぞれCAP1-6Dペプチド又はP-93Lペプチドでそれぞれパルスした非感染の自己DCを用いて再刺激した。3回目のIVSの後、(23,000ラド)照射した自己EBV形質転換B細胞をAPCとして用いた。EBV形質転換B細胞を $25\mu g/ml$ のペプチドでパルスして、エフェクター対APCの比率1:3で再刺激に用いた。

### 【0307】

次いで、5%CO<sub>2</sub>を含む加湿雰囲気中、37で3日間培養物をインキュベートした。ペプチドを含んだ培地を除去してから、濃度20単位/mlの組換えヒトIL-2を培養液に7日間添加した。上記と同じ刺激の手法を用いて、PBMCをrF-CEA/MUC/TRICOMに感染した自己DCで刺激して、患者55、49及び41からT細胞株を作成した。患者55は、最初に限局性膵臓癌のホイップル処置を受け、続いて膵臓床(pancreatic bed)へのアジュベント放射線療法を受けた。この患者は局所

再発を起こしていたため、本臨床試験に加わる前に、5 FU / ロイコボリンを用いた化学療法を受けた後、ワクシニア - CEA 及び ALVAC - CEA を用いる実験的ワクチン試験を受けた。患者 41 は、肝転移を有する結腸直腸癌と診断された。この患者は、本試験に加わる前に、5 FU / ロイコボリン / CPT - 11 、5 FU / ロイコボリン / オキサリプラチナ及びゼローダを含む異なる三つの化学療法が進められていた。患者 49 は、肝転移及び肺転移した結腸直腸癌に罹患していた。この患者は、本試験に加わる前に、CPT - 11 / 5 FU / ロイコボリンによる化学療法の 4 サイクルに従って進んでいた。

### 【0308】

#### 細胞傷害性アッセイ

標的細胞 (C1R-A2 又は腫瘍細胞) を、 $50 \mu\text{Ci}$  の  $^{111}\text{In}$  ジウム標識したオキシキノリン (Medi-Physics Inc., Arlington, イリノイ州) を用いて室温で 15 分間標識した。 $100 \mu\text{l}$  の RPMI - 1640 完全培地中の標的細胞 ( $0.3 \times 10^4$  個) を、平底測定プレート (Corning Costar Corp) の 96 ウエルのそれぞれに添加した。標識した C1R-A2 標的細胞を、エフェクター細胞を添加する前に、5 % の CO<sub>2</sub> 中において 37 °C で 60 分間、表示した濃度のペプチドとともにインキュベートした。標的として癌腫細胞を用いる場合には、ペプチドを用いなかった。エフェクター細胞を、10 % のプールされたヒト AB 型血清を添加した RPMI 1640 完全培地  $100 \mu\text{l}$  に懸濁して、標的細胞に添加した。そして、プレートを、6 時間又は 16 時間、5 % の CO<sub>2</sub> 中においてインキュベートした。採取器 (Skatron, Inc., Sterling, バージニア州) を用いて上清を回収して、ガム線計数を行った。測定は 3 回反復して行ない、標準偏差を計算した。以下の公式を用いて特異的溶解を計算した (値はすべて cpm)。

% 溶解 = (観察された放出量 - 自発的放出量) / (全放出量 - 自発的放出量) × 100  
自発的放出量は、 $100 \mu\text{l}$  の RPMI - 1640 完全培地を添加したウェルから測定した。放出可能な全放射活性量は、2.5 % の Triton X - 100 で標的を処理して得られた。

### 【0309】

#### サイトカインの検出

さまざまなペプチド濃度で IL - 2 を含まない培地中において、ペプチドをパルスされた自己 EBV 形質転換 B 細胞に 24 時間曝露された T 細胞の上清を、ELISA キット (Biosource International) を用いて、INF - の分泌についてスクリーニングした。結果を pg / ml で表示した。

### 【0310】

#### 統計的解析

両側ペア t 検定 (Stat View statistical software, Abacus Concepts, Berkeley, カリフォルニア州) を用いて、平均値間の差を統計的に解析した。

### 【0311】

まず、ヒト DC を rV - CEA / MUC / TRICOM に感染させると、5 つの導入遺伝子それぞれの発現がもたらされるか否かを決定するために実験を行った。最初の実験では、rV - CEA / MUC / TRICOM に対して 5 及び 10 という MOI を用いたが、どちらの MOI でも、同様の結果になったため、以後の実験では MOI を 5 にして用いた。図 6 から明らかなように、非感染のヒト DC は CEA を発現しない (単クローニング抗体 C0L - 1 により検出される) が、DC による CD80, CD54 及び CD58, MHC クラス I 及び MHC クラス II の発現は、いくつかの研究において既に報告されている発現と同様である (Tsang KY, Zhu MZ, Even J. ら、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の活性化の促進を目的とする、共刺激分子の導入遺伝子 (CD80) を発現する組換えアビポックスペクターによるヒト樹状細胞の感染 (The infection of human dendritic cells with recombinant avipox vectors expressing a costimulatory molecule))。

tory molecule transgene (CD80) to enhance the activation of antigen-specific cytotoxic T cells)、Cancer Res 2001; 61: 7568-76; 及び Zhu MZ, Terasawa H, Gulley Jら、ヒト樹状細胞におけるアビポックスベクターによる三連の共刺激分子の過剰発現を介するヒトT細胞の活性化増強 (Enhanced activation of human T cells via avipox vector-mediated hyperexpression of a triad of costimulatory molecules in human dendritic cells) Cancer Res 2001; 61: 3725-34)。V-WTによる感染は、これら8つの表面マーカーのいずれにも、あったとしてもほとんど影響しなかった(図6)。一方、rV-CEA/MUC/TRICOMによる感染は、CEA、MUC-1、CD80、CD54及びCD58の発現レベルを顕著に増加させることができたが、MHCクラスI及びクラスIIの発現レベルには、計測可能なほどには影響しなかった。既に公表されている結果と一致して、同ドナー由来のDCをrV-CEA(6D)-TRICOMに感染させたところ、CEA、CD80、CD54、及びCD58のレベルは、rV-CEA/MUC/TRICOMに感染したときに見られるのと同様のレベルにまで上昇したが、MUC-1又はMHCのクラスIもしくはクラスIIの発現は変わらなかった。さらに、rV-TRICOMと混合したrV-MUC-1(rV-MUC-1-TRICOM構築物は利用できなかつた)をDCに感染させると、MUC-1及び3つの共刺激分子の発現増強レベルは、rV-CEA/MUC/TRICOMによる場合に見られる発現レベルと同様であることが示されたが、MHCのクラスI及びクラスIIの発現レベルにも、CEAの発現欠如にも影響しなかった(データ省略)。非感染DC及び対照用ベクターに感染したDC中において、低レベルのMUC-1が検出された。

これは、インビトロで培養した場合、MUC-1が、ヒトのDC及び単核球由来のDC上で発現することを示した、Wykesらの報告(Wykes M, Mac Donald KP, Tran Mら。MUC1上皮ムチン(CD227)は、活性化樹状細胞によって発現される(MUC1 epithelial mucin(CD227) is expressed by activated dendritic cells)、J Leukoc Biol 2002; 72: 692-701)と一致している。

#### 【0312】

ヒトDCをrF-CEA/MUC/TRICOMに感染させると、5つの導入遺伝子それぞれの発現がもたらされるか否かを決定するために並行実験を行った。最初の実験では、rF-CEA/MUC/TRICOMについて20及び40というMOIを用いたところ、40MOIのほうが導入遺伝子の発現が多かつたため、以後の実験ではそれを用いた。図7から明らかなように、FP-WTによる感染は、これら解析した8つの表面マーカーのいずれにも、あったとしてもほとんど影響しなかった。一方、rF-CEA/MUC/TRICOMによる感染は、CEA、MUC-1、CD80、CD54及びCD58の発現レベルを顕著に増加させることができたが、MHCクラスI及びクラスIIの発現レベルには影響しなかった。同ドナー由来のDCをrF-CEA(6D)-TRICOMに感染させたところ、CEA、CD80、CD54、及びCD58のレベルは、rF-CEA/MUC/TRICOMに感染させたときに見られるのと同様のレベルにまで上昇したが、MUC-1又はMHCのクラスIもしくはクラスIIの発現は変わらなかった。さらに、DCにrF-MUC-1-TRICOMを感染させると、MUC-1及び3つの共刺激分子の発現増強レベルは、rF-CEA/MUC/TRICOMによる場合に見られる発現レベルと同様であることが示されたが、MHCのクラスI及びクラスIIの発現レベルにも、CEAの発現欠如にも影響しなかった(データ省略)。免疫プロット解析により、rF-CEA/MUC/TRICOM、rF-CEA(6D)-TRICOM、rF-MUC-1-TRICOMベクターに感染したDC、又は非感染DCの上におけるCEA及びMUC-1の発現を解析した。図8に示したように、rF-CEA(6D)-T

R I C O M、r F - C E A / M U C / T R I C O M、及びr V - C E A / M U C / T R I C O Mに感染したD CにおいてC E Aが検出されたが、非感染D Cや、r F - M U C - 1 - T R I C O Mに感染したD Cでは検出されなかった。

上記のように、D Cは低レベルのM U C - 1を発現したが、r F - M U C - 1 - T R I C O M、r V - C E A / M U C / T R I C O M、及びr F - C E A / M U C / T R I C O Mに感染したD Cでは、M U C - 1発現の大きな増加が明確に見られ、一方、r F - C E A ( 6 D ) - T R I C O Mに感染したC Dではこの増加は見られなかった(図8)。

### 【0313】

本発明者らは、C E AアゴニストペプチドであるC A P - 1 ( 6 D )、及びM U C - 1アゴニストペプチドであるP - 93LでパルスされたD Cが、ヒトT細胞を活性化できることを実証した。r F - C E A / M U C / T R I C O MベクターをヒトD Cに感染させると、C E A特異的及びM U C - 1特異的なT細胞によってI FN - 1の産生が刺激されうるか否かを決定するために実験を行った。これらの結果も、r F - C E A ( 6 D ) - T R I C O M又はr F - M U C - 1 - T R I C O Mに感染したヒトD Cが、これらのT細胞を活性化させる能力と比較された。表11から明らかなように、非感染D C、又はF P - W Tに感染したD Cは、C E A特異的T細胞株(V8T)、又はM U C - 1特異的T細胞株(T-1191-P93L)によるI N F - 1産生をもたらさなかった。C E AペプチドでパルスされたD Cは、C E A特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導し、M U C - 1ペプチドでパルスされたD Cは、M U C - 1特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導した。同様に、r F - C E A ( 6 D ) - T R I C O Mに感染したD Cは、C E A特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導し、一方、r F - M U C - 1 - T R I C O Mに感染したD Cは、M U C - 1特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導した。しかし、r F - C E A / M U C / T R I C O MによるD C感染は、C E A特異的T細胞株及びM U C - 1特異的T細胞株内におけるI FN - 1産生を誘導し、単一の腫瘍抗原導入遺伝子だけを含むベクターを用いた場合に見られるレベルと同等のレベルで誘導した。これらの実験は、r F - C E A / M U C / T R I C O Mベクター内では、T細胞株を活性化させる能力においてC E AとM U C - 1の間に抗原競合が存在しないことを示しているのかもしれない。

### 【0314】

r V - C E A / M U C / T R I C O MベクターをヒトD Cに感染させると、C E A特異的及びM U C - 1特異的なT細胞によってI FN - 19の産生が刺激されうるか否かを決定するために実験を行った。これらの結果も、r V - C E A ( 6 D ) - T R I C O M又はr V - M U C - 1とr V - T R I C O Mに感染したヒトD CがこれらのT細胞を活性化させる能力と比較された。表12から明らかなように、非感染D C又はr V - W Tに感染したD Cは、C E A特異的T細胞株又はM U C - 1特異的T細胞株によるI N F - 1産生をもたらさなかった。C E AペプチドでパルスされたD Cは、C E A特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導し、M U C - 1ペプチドでパルスされたD Cは、M U C - 1特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導した。同様に、r V - C E A ( 6 D ) - T R I C O Mに感染したD Cは、C E A特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導し、一方、M U C - 1ベクターに感染したD Cは、M U C - 1特異的T細胞株のみによってI N F - 1産生を誘導した。しかし、r V - C E A / M U C / T R I C O MによるD C感染は、C E A特異的T細胞株及びM U C - 1特異的T細胞株内におけるI FN - 1産生を誘導し、単一の腫瘍抗原導入遺伝子だけを含むベクターを用いた場合に見られるレベルと同等のレベルで誘導した。これらの実験は、r F - C E A / M U C / T R I C O Mベクターを用いるT細胞株を活性化させる能力においてC E AとM U C - 1の間に抗原競合が存在しないことを示しているのかもしれない。次に、r F - C E A / M U C / T R I C O M及び/又はr V - C E A / M U C / T R I C O Mに感染した自己D CをA P Cとして用いて、P B M CからヒトT細胞を構築することができるか否かを決定した。

### 【0315】

「実験材料と方法」の項に記載したように、3回I V Sを行った後、得られたT細胞を

解析して、ペプチドでパルスされたDC又はベクターに感染したDCによってそれらが活性化されうるか調べた。表13から明らかなように、rV-CEA/MUC/TRICOM又はrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCをAPCとして用いて樹立したT細胞株はどちらも、非感染の20DC又はFP-WTに感染したDCによって刺激しても、活性化してIFN- $\gamma$ を産生することができなかった。これらの結果は、ワクシニアウイルスと鶏痘との間には、T細胞エピトープに関して交差反応性がないマウス系における以前の観察結果と一致しており(Hodge JW, Poole DJ, Aarts WMら、改変ワクシニアウイルスのアンカラ組換え株は、多様な抗原刺激及び追加免疫処方ににおいてワクシニア組換え株と同じくらい強力に治療的抗腫瘍応答を誘発する(Modified vaccinia virus ankara recombinant 10 s are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses) Cancer Res 2003; 63: 7942-9)、また、鶏痘エピトープに対して哺乳動物のT細胞を作成するのは難しいことを示した、以前のマウス及びヒトにおける実験とも一致している(未発表データ)。他方、rV-CEA/MUC/TRICOM又はrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したAPCを用いて作成したT細胞株はどちらも活性化されて、CEAペプチド又はMUC-1ペプチドのいずれかでパルスされたDCをAPCとして用いるとIFN- $\gamma$ を産生した(表13)。これらの結果は、どちらかのベクターに感染したDCは、CEA及びMUC-1両抗原に対するT細胞をPBMCから生じさせることを示しているのかもしれない。

### 【0316】

rV-CEA/MUC/TRICOM又はrF-CEA/MUC/TRICOMのいずれかに感染したDCによって生じたT細胞株は、rF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCに曝露されると、IFN- $\gamma$ を産生した。さらなる実験で、まずrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCをAPCとして用いて、T細胞を生じさせ、次いで、2回のIVSの間、CEAペプチドでパルスしたAPCを用いて継代した。表13から分かるように、これらのT細胞は、MUC-1ペプチドでパルスされたDCによって活性化される能力を失ったが、CEAペプチドでパルスされたDCにより活性化されて、IFN- $\gamma$ を産生する能力は保持していた。逆に、まずrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCを用いて生じたT細胞を、MUC-1ペプチドでパルスされたDCの存在下で継代すると、T細胞は、CEAペプチドでパルスされたDCによって活性化される能力を失ったが、MUC-1ペプチドによって活性化される能力は保持していた。

### 【0317】

次に、rV-CEA/MUC/TRICOMベクター又はrF-CEA/MUC/TRICOMベクターのいずれかに感染したDCをAPCとして用いて樹立されたT細胞株が、ヒト標的細胞を溶解することができるか否かを決定するために実験を行った。表14から明らかなように、両方のT細胞株とも、C1R-A2細胞を溶解することができなかつたが、CEAペプチド又はMUC-1ペプチドのいずれかでパルスされたC1R-A2細胞を溶解することはできた。どちらのT細胞株も、対照であるPSAペプチドでパルスされたC1R-A2細胞を溶解することはできなかった。他方、rF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCを用いて樹立され、その後はCEAペプチドでパルスされたDCをAPCとして用いて継代されたT細胞株は、CEAペプチドでパルスされた標的細胞を溶解することはできたが、MUC-1ペプチド又はPSAペプチドでパルスされた標的細胞を溶解することはできなかつた。逆に、rF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCを用いて樹立され、その後はMUC-1ペプチドでパルスされたDCをAPCとして用いて継代されたT細胞株は、MUC-1ペプチドでパルスされた標的細胞を溶解することはできたが、CEAペプチド又はPSAペプチドでパルスされた標的細胞を溶解することはできなかつた。

### 【0318】

10

20

30

40

50

次に、rV - CEA / MUC / TRICOMベクター又はrF - CEA / MUC / TRICOMベクターに感染したDCを用いて作成したT細胞株が、天然のCEA又はMUC-1のいずれかを発現するヒト腫瘍細胞を溶解する能力を有するか否かを判定するために実験を行った。次の3つのHLA - A2+標的細胞株を評価した。すなわち、MUC-1陽性でCEA陰性のMCF-7ヒト乳癌細胞株、CEA及びMUC-1について陽性のヒト結腸癌細胞株SW1463、並びにMUC-1及びCEAの発現について陰性であるSK-Mel-24ヒトメラノーマ細胞株である。本発明者らは、MUC-1陰性及びCEA陽性のHLA - A2+細胞株を同定することができなかった。表14から明らかなように、rV - CEA / MUC / TRICOM又はrF - CEA / MUC / TRICOMに感染したDCを用いて作成したT細胞株はどちらも、乳癌細胞株及び結腸癌細胞株を溶解することができたが、メラノーマ細胞株を溶解することはできなかった。10

#### 【0319】

他方、rF - CEA / MUC / TRICOMに感染したDCを用いて作成し、その後、2回のIVSの間CEAペプチドでパルスされたDCを用いて再刺激したT細胞株は、CEA陽性 / MUC-1陽性の結腸癌株を溶解することができたが、CEA陰性 / MUC-1陽性の乳癌細胞株及びCEA陰性 / MUC-1陰性のメラノーマ細胞株を溶解することはできなかった。rF - CEA / MUC / TRICOMに感染したDCを用いて作成し、その後、2回のIVSの間、MUC-1ペプチドでパルスしたDCによって再刺激したT細胞株は、結腸癌及び乳癌の細胞株を溶解することができたが、メラノーマ細胞株を溶解することはできなかった。総体的に、これらのデータは、組換えワクシニアベクターも組換えアビポックスベクターも、それぞれが正確に5つのヒト導入遺伝子を発現できるように構築することが可能のこと、及びこれらのベクターが、2つのヒト腫瘍関連抗原に対してヒトT細胞を活性化させる能力には抗原競合が認められないということを示しているのかもしれない。20

#### 【0320】

T - rV、T - rF、T - rF(CEA)及びT - rF(MUC)T細胞株を、外見上健常な個体から作成した。4つ細胞株はすべて、>97%がCD8陽性、<2%がCD56陽性、>75%がCD45RA陽性、及び>81%がCD27陽性であった。次に、特異的なT細胞株を脾臓癌患者（患者55）から得ることができるか否か判定するために実験を行った。rF - CEA / MUC / TRICOMに感染したDCをAPCとして用いてT細胞株を作成して、T - 55と名づけた。フローサイトメトリー解析により測定すると、T - 55細胞株は99.9%がCD8陽性、<2%がCD56陽性、73.6%がCD45RA陽性及び87%がCD27陽性であった。表15から明らかなように、このT細胞株は、rF - CEA / MUC / TRICOMに感染した自己DC、及びCEAペプチド又はMUC-1ペプチドのいずれかでパルスされたDCによって刺激されると、IFN- $\gamma$ を産生するが、PSA - 3ペプチドでは産生しないことが示された。30

#### 【0321】

次に、23のこのT細胞株がCEA及び / 又はMUC-1陽性及びHLA - A2陽性である癌細胞株を溶解することができるか否かを決定するために実験を行った。メラノーマ細胞株SK-Mel-24（MUC-1陰性、CEA陰性、及びHLA - A2陽性）を陰性対照として用いた。表16から明らかなように、T - 55細胞株は、CEAペプチド及びMUC-1ペプチドでパルスされたC1R - A2細胞を溶解するが、PSA - 3ペプチドでは溶解しないことが示された。さらに、T - 55細胞株は、さまざまなE : T比で、MCF-7細胞及びSW1463細胞を溶解したが、メラノーマ細胞株の溶解は示さなかつた。さらに2つのT細胞株を結腸癌患者から樹立した。これらのT細胞株をT - 41及びT - 49と名づけた。T - 41細胞株は、98.8%がCD8陽性、<1%がCD56陽性、33.6%がCD45RA陽性、及び96.8%がCD27陽性であった。T - 49細胞株は、98.9%がCD8陽性、<1%がCD56陽性、29.8%がCD45RA陽性、及び95.3%がCD27陽性であった。表15から明らかなように、T - 41及びT - 49の両細胞株は、rF - CEA / MUC / TRICOMに感染した自己DC、4050

及び CEA ペプチド又は MUC - 1 ペプチドでパルスされた DC を用いて刺激されると、 IFN -  $\gamma$  を産生するが、 PSA - 3 ペプチドでは産生しないことが示された。表 17 から明らかなように、 T - 41 及び T - 49 の細胞株はどちらも、さまざまな E : T 比で MCF - 7 と SW1463 の溶解を示すが、 SK - Mel - 24 細胞株の溶解は示さなかった。

#### 【 0322 】

癌治療用ワクチンの開発及び使用における 2 つの主な関心事は、 ( a ) 腫瘍関連抗原の不十分な免疫原性、そして ( b ) 腫瘍の抗原不均質性である。ここで説明したベクターを開発して、これら 2 つの問題に取り組んだ。これらのベクターは、本発明者らの知る限りでは、アビポックスペクターの中に 5 つの完全な導入遺伝子が挿入されていて、複製不可能なベクターの初めてのものである。並列した 5 つの導入遺伝子構築物の組換えワクシニアウイルスも開発された。両ベクターとも、各導入遺伝子は自身のプロモーターによって作動した。前臨床モデル及び臨床試験における以前の実験によって、異なった 2 つのワクチンを用いる多様な抗原刺激及び追加免疫ワクチン療法の方が、一つのワクチンを連續使用するよりも優れていることが実証されている。こうした理由によって、組換えワクシニアベクター及び組換え鶏痘ベクターが開発されたのである。

10

#### 【 0323 】

表 12 ~ 17 に示されているように、 DC を rV - CEA / MUC / TRICOM ベクター又は rF - CEA / MUC / TRICOM ベクターに感染させると、 CEA - TRICOM ベクター又は MUC - 1 - TRICOM ベクターに感染した DC を APC として用いる場合と同じくらい効率的に、 T 細胞株を活性化する結果となった。さらに、 rV - CEA / MUC / TRICOM 又は rF - CEA / MUC / TRICOM に感染した DC を用いて作成した T 細胞は、 CEA 又は MUC - 1 のいずれかを発現する標的細胞を溶解することができた。

20

#### 【 0324 】

## 【表 1 1】

(表 1 1) r F - C E A / M U C / T R I C O M により刺激された、 C E A 特異的および  
M U C - 1 特異的な T 細胞株による I F N -  $\gamma$  の産生

樹状細胞の処理	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	
	CEA 特異的 CTL	MUC-1 特異的 CTL
非感染	< 15	< 15
FP-WT	< 15	< 15
非感染 + CEA ペプチド	772	< 15
非感染 + MUC-1 ペプチド	< 15	458
FP-WT + CEA ペプチド	689	< 15
FP-WT + MUC-1 ペプチド	< 15	404
rF-CEA(6D)-TRICOM	475	< 15
rF-MUC-1-TRICOM	< 15	298
rF-CEA/MUC/TRICOM	455	278

C E A 特異的 T 細胞 (V 8 T) および M U C - 1 特異的 T 細胞 (T - 1 1 9 1 - P 9 3 L) を、  
非感染の自己 DC 単独、または C E A ペプチド (C A P 1 - 6 D) もしくは M U C - 1 ペプチド  
(P - 9 3 L) でパルスされた非感染自己 DC ; 対照ベクター F P - W T に感染した DC 単独、  
または C E A ペプチドもしくは M U C - 1 ペプチドでパルスされた、対照ベクター F P - W T に  
感染した DC ; r F - C E A / M U C / T R I C O M 、 r F - C E A (6 D) - T R I C O M 、  
または r F - M U C - 1 / T R I C O M に感染した DC によって刺激した。ペプチドは、 2 5  $\mu$   
g / ml の濃度で用いた。エフェクター対 A P C の比率は 1 0 : 1 であった。2 4 時間培養後の  
上清を集めて、 I F N -  $\gamma$  の産生についてスクリーニングした。

10

20

## 【 0 3 2 5 】

## 【表12】

(表12) rV-CEA/MUC/TRICOMにより刺激された、CEA特異的およびMUC-1特異的なT細胞株によるIFN- $\gamma$ の産生

樹状細胞の処理	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	
	CEA特異的CTL	MUC-1特異的CTL
非感染	<15	<15
V-WT	<15	<15
非感染 + CEAペプチド	820	<15
非感染 + MUC-1ペプチド	<15	550
V-WT + CEAペプチド	720	<15
V-WT + MUC-1ペプチド	<15	358
rV-CEA(6D)-TRICOM	384	<15
rV-MUC-1 + rV-TRICOM	<15	213
rV-CEA/MUC/TRICOM	285	256

CEA特異的T細胞 (V8T) およびMUC-1特異的T細胞 (T-1191-P93L) を、非感染の自己DC単独、またはCEAペプチド (CAP1-6D) もしくはMUC-1ペプチド (P-93L) でパルスされた非感染自己DC；対照ベクターV-WTに感染したDC単独、またはCEAペプチドもしくはMUC-1ペプチドでパルスされた、対照ベクターV-WTに感染したDC；rV-CEA/MUC/TRICOM、rV-CEA(6D)-TRICOM、またはrV-MUC-1 + rV-TRICOMに感染したDCによって刺激した。ペプチドは、25 μg/mlの濃度で用いた。エフェクター対APCの比率は10:1であった。24時間培養後の上清を集めて、IFN- $\gamma$ の産生についてスクリーニングした。

10

20

## 【0326】

## 【表13】

(表13) rV-CEA/MUC/TRICOMベクターまたはrF-CEA/MUC/TRICOMベクターを用いて樹立された、CEA特異的およびMUC-1特異的な

30

T細胞によるIFN- $\gamma$ の産生

T細胞株	APCとして使用される樹状細胞				
	非感染	FP-WT	rF-CEA/MUC/	非感染 +	非感染 +
		TRICOM	CEAペプチド	MUC-1ペプチド	
T-rV	<15.6	<15.6	>1,000	976.3	514.0
T-rF	<15.6	<15.6	>1,000	550.0	446.0
T-rF(CEA)	<15.6	<15.6	403.9	729.2	<15.6
T-rF(MUC)	<5.6	<15.6	381.4	<15.6	626.8

40

ヒトT細胞株T-rV、T-rF、T-rF(CEA) およびT-rF(MUC) を、「実験材料および方法」の項に記載したとおりに作成した。これらのT細胞株を、非感染の自己DC単独、またはCEAペプチドもしくはMUC-1ペプチド (P-93L) でパルスされた非感染自己DC、対照ベクターFP-WTに感染したDC単独、およびrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCによって刺激した。ペプチドは、25 μg/mlの濃度で用いた。エフェクター対APCの比率は10:1であった。24時間培養後の上清を集めて、IFN- $\gamma$ の分泌についてスクリーニングした。

50

【0327】

【表14】

(表14) r V-C E A / M U C / T R I C O M および r F-C E A / M U C / T R I C O M に感染した DC を A P C として用いて樹立された T 細胞株がヒト腫瘍細胞を溶解する能力

C1R-A2細胞をパルスしたペプチド							
T-細胞 株	ペプチド なし	CEA ペプチド	MUC-1 ペプチド	PSA ペプチド	MCF-7	SW1463	SK-Mel- 24
T-rV	-2.1(1.26)	57.9(4.5) <sup>a</sup>	50.0(1.3) <sup>a</sup>	0.6(2.4)	34.4(0.1) <sup>b</sup>	27.8(0.5) <sup>b</sup>	1.6(1.1)
T-rF	3.58(3.9)	62.0(4.6) <sup>a</sup>	59.7(0.8) <sup>a</sup>	3.8(0.2)	31.0(2.4) <sup>b</sup>	25.6(1.2) <sup>b</sup>	2.7(2.0)
T-rF (CEA)	4.3(1.6)	62.8(1.9) <sup>a</sup>	-1.9(1.0)	2.7(1.0)	4.2(3.2)	32.3(2.1) <sup>b</sup>	0.6(3.5)
T-rF (MUC)	-1.6(3.2)	-3.6(5.5)	46.4(3.3) <sup>a</sup>	1.4(4.5)	38.2(1.3) <sup>b</sup>	25.2(1.3) <sup>b</sup>	0.1(1.1)

結果は溶解率 (%) で表示されている。ヒト T 細胞株 T-rV、T-rF、T-rF (CEA) および T-rF (MUC) は、「実験材料および方法」の項に記載されているようにして樹立した。

6 時間<sup>111</sup>I n 放出アッセイを C1R-A2 細胞で行い、16 時間<sup>111</sup>I n 放出アッセイを MCF-7、SW1463、および SK-Mel-24 細胞で行った。CEA ペプチド (CAP1-6D)、MUC-1 ペプチド (P-93L)、および PSA ペプチド (PSA-3) を 25 μg/m1 の濃度で用いた。MCF-7 (ヒト乳房癌細胞株 : HLA-A2+、MUC-1 陽性、および CEA 陰性)；SW1463 (直腸結腸癌細胞株 : HLA-A2+、MUC-1 陽性、および CEA 陽性)；SK-Mel-24 (ヒトメラノーマ細胞株 : HLA-A2+、MUC-1 陰性、CEA 陰性)。エフェクター対標的の比率は 25 : 1 であった。

\* 溶解を C1R-A2 細胞と比較した場合の統計的有意性 (P < 0.01、両側 t 検定)。

<sup>b</sup> 溶解を SK-Mel-24 細胞と比較した場合の統計的有意性 (P < 0.01、両側 t 检定)。

【0328】

20

30

## 【表15】

(表15) rF-CEA/MUC/TRICOMに感染した自己DCを用いて、癌患者由来のT細胞株を樹立すると、CEAエピトープおよびMUC-1エピトープに対して反応性を示す。

T-細胞 株	APCとして用いた樹状細胞					
	FP-WT	rF-CEA/MU	非感染+	非感染+	非感染+	
	C1/ TRICOM	CEAペプチド	MUC-1ペプチド	PSAペプチド		
T-55	<15.6	<15.6	>1,000	>1,000	985.8	<15.6
T-49	<15.6	<15.6	>1,000	974.2	819.0	<15.6
T-41	<15.6	<15.6	846.4	933.4	745.0	<15.6

T-55、T-49およびT-41は、3回のIVSの間、rF-CEA/MUC/TRICOM(40 MOI)に感染した自己DCによって、肺臓癌患者(#55)および結腸癌患者(#49および#41)から単離されたT細胞を刺激することによって樹立された。エフェクター対APCの比率は10:1であった。ペプチドは濃度25 μg/mlで用いた。24時間培養後の上清を集めて、IFN-γの分泌についてスクリーニングした。結果はIFN-γのpg/mlで表示してある。

## 【0329】

## 【表16】

(表16) rF-CEA/MUC/TRICOMに感染したDCをAPCとして用いて肺臓癌患者から樹立されたT細胞株(T-55)がヒト腫瘍細胞を溶解する能力

エフェクター:標的	C1R-A2細胞をパルス					
	CEA	MUC-1	PSA	MCF-7	SW1463	SK-Mel-24
50:1	0(0.6)	52.4(3.3) <sup>a</sup>	53.3(0.4) <sup>a</sup>	0(0.1)	23.8(1.2) <sup>b</sup>	24.1(1.2) <sup>b</sup>
25:1	0(0.9)	30.3(1.3) <sup>a</sup>	34.4(0.8) <sup>a</sup>	0.6(0.5)	20.4(1.1) <sup>b</sup>	17.6(0.3) <sup>b</sup>
12.5:1	0(0.2)	16.4(1.8) <sup>a</sup>	26.2(5.0) <sup>a</sup>	0(0.2)	13.8(1.2) <sup>b</sup>	15.2(0.4) <sup>b</sup>

6時間<sup>111</sup>I放出アッセイをC1R-A2細胞で行い、16時間<sup>111</sup>I放出アッセイをMCF-7、SW1463、およびSK-Mel-24細胞で行った。結果は溶解率(%) (SD)で表示されている。CEAペプチド(CAP1-6D)、MUC-1ペプチド(P-93L)、およびPSAペプチド(PSA-3)はすべて25 μg/mlの濃度で用いた。MCF-7(ヒト乳房癌細胞株:HLA-A2+、MUC-1陽性、およびCEA陰性)；SW1463(結腸癌細胞株:HLA-A2+、MUC-1陽性、およびCEA陽性)；SK-Mel-24(ヒトメラノーマ細胞株:HLA-A2+、MUC-1陰性、CEA陰性)。

T-55は、3回のIVSの間、rF-CEA/MUC/TRICOM(40 MOI)に感染した自己DCを用いて、肺臓癌患者(#55)から単離したT細胞株を刺激して樹立された。

<sup>a</sup> 溶解をC1R-A2細胞と比較した場合の統計的有意性(P<0.01、両側t検定)。

<sup>b</sup> 溶解をSK-Mel-24細胞と比較した場合の統計的有意性(P<0.01、両側t検定)。

## 【0330】

## 【表 17】

(表17) r F-C E A / M U C / T R I C O M に感染したDCをA P Cとして用いて結腸癌患者から樹立されたT細胞株 (T-49およびT-41) がヒト腫瘍細胞を溶解する能力

T-細胞株		MCF-7	SW1463	SK-Mel-24
T-49	40:1	20.6 (0.9) <sup>a</sup>	42.9 (1.9) <sup>a</sup>	0.8 (0.1)
	20:1	12.0 (1.6) <sup>a</sup>	30.2 (0.3) <sup>a</sup>	0.2 (0.2)
	10:1	6.7 (1.0)	21.9 (2.1) <sup>a</sup>	1.9 (0.8)
T-41	40:1	24.4 (1.6) <sup>a</sup>	33.4 (1.3) <sup>a</sup>	0.9 (0.3)
	20:1	20.5 (1.2) <sup>a</sup>	26.1 (1.1) <sup>a</sup>	1.2 (0.5)
	10:1	11.0 (2.0) <sup>a</sup>	20.1 (0.1) <sup>a</sup>	2.0 (0.2)

T-49およびT-41は、3回のI V Sの間、r F-C E A / M U C / T R I C O M (40 MOI) に感染した自己DCによって、結腸癌患者 (#49および#41) から単離されたT細胞を刺激することによって樹立された。16時間<sup>111</sup>I n放出アッセイをMCF-7細胞、SW1463細胞、およびSK-Mel-24細胞に対して行った。結果は溶解率 (%) (SD) で表示されている。MCF-7 (ヒト乳房癌細胞株: HLA-A2+、MUC-1陽性、およびCEA陰性); SW1463 (結腸癌細胞株: HLA-A2+、MUC-1陽性、およびCEA陽性); SK-Mel-24 (ヒトメラノーマ細胞株: HLA-A2+、MUC-1陰性、CEA陰性)。

<sup>a</sup> 溶解をSK-Mel-24細胞と比較した場合の統計的有意性 (P < 0.01、両側t検定)。

10

20

## 【0331】

本明細書中に記載されたすべての文献は、参照して本明細書に取り込む。

## 【0332】

以上の記述は本発明の例示であり、当然のことながら、添付の「特許請求の範囲」に記載された本発明の範囲又は本旨を逸脱することなく変更及び修正が可能である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0333】

【図1A】図1Aは、MUC-1ペプチドP-92並びにアゴニストP-93L及びP-931のHLA-A2分子への結合を示すもので、ペプチドを濃度0~50 μg/mlで使用した場合のグラフである。P-92 MUC-1ペプチド(白四角)、P-93L(黒四角)、P-931(黒三角)。結果は、平均蛍光強度(MFI)で表す。

30

【図1B】図1Bは、MUC-1ペプチドP-92並びにアゴニストP-93L及びP-931のHLA-A2分子への結合を示すもので、ペプチドを濃度0~50 μg/mlで使用した場合のグラフである。P-92 MUC-1ペプチド(白四角)、P-93L(黒四角)、P-931(黒三角)。結果は、平均蛍光強度(MFI)で表す。

【図2】図2は、P-92ペプチド、P-93Lペプチド又はP-931ペプチドとHLA-A2との複合体の安定性の比較を示すグラフである。T2細胞を、濃度50 μg/mlのP-92ペプチド(白四角)、P-93Lペプチド(黒四角)又はP-931ペプチド(黒三角)と一緒にインキュベートした後、未結合のペプチドを洗い流してから、ブレフェルジン-Aとともにインキュベートして、細胞表面に新しいクラスI分子が輸送されるのを遮断した。表示された時間に、表面ペプチドであるHLA-A2複合体の存在を見るために細胞を染色した。結果を、0時間目を100%として比較した相対的な結合割合で表す。

40

【図3】図3は、天然型MUC-1ペプチドP-92(白四角)、P-93Lペプチド(黒四角)及びP-931ペプチド(黒三角)でパルスした自己B細胞が、MUC-1特異的T細胞によるIFN-γ産生を誘導することができることを示すグラフである。ペプチドは、0~6.25 μg/mlの濃度で用いた。結果をpg/mlで示す。

【図4】図4は、P-92ペプチド及びP-93LペプチドでパルスされたC1R-A2

50

に対する、MUC-1特異的T細胞株の細胞傷害性を示すグラフである。P-93LペプチドでパルスされたC1R-A2に対するT-1191-P-93L（黒四角）、P-92ペプチドでパルスされたC1R-A2に対するT-1191-P-93L（白四角）、CAP1-6DペプチドでパルスされたC1R-A2に対するT-1191-P-93L（黒丸）、P-93LペプチドでパルスされたC1R-A2に対するT-1191-P-92（黒三角）、P-92ペプチドでパルスされたC1R-A2に対するT-1191-P-92（白三角）、CAP1-6DペプチドでパルスされたC1R-A2に対するT-1191-P-92（白丸）。16時間の<sup>1</sup><sup>1</sup><sup>1</sup>Iインジウム放出アッセイ（16-h<sup>1</sup><sup>1</sup><sup>1</sup>In release assay）におけるE:T比=25:1及び12.5:1。バー=SD。

【図5】図5は、ウイルス構築物の概略図を示す。

10

【図6】図6は、非感染の、又は対照のベクター（V-WT）に感染した若しくはrV-CEA/MUC/TRICOMに感染したヒトDCにおける表面マーカー発現のフローサイトメトリー分析をグラフによって示したものである。DC（1×10<sup>6</sup>）を、1mlのOpti-MEM培地において、5:1のMOIでrV-CEA/MUC/TRICOM又は対照のベクター（V-WT）と共に37℃で1時間インキュベートした。感染したDCを、100ng/mlのrhGM-CSF及び20ng/mlのrhIL-4を含む10mlの新鮮で温かい完全培地に懸濁した後、24時間培養した。各ヒストグラム中の数字は、陽性細胞の割合と平均蛍光強度（括弧内）を示している。

【図7】図7は、非感染の、又は対照のベクター（FP-WT）に感染した若しくはrF-CEA/MUC/TRICOMに感染したヒトDCにおける表面マーカー発現のフローサイトメトリー分析をグラフによって示したものである。DC（1×10<sup>6</sup>）を、1mlのOpti-MEM培地において、40:1のMOIでrF-CEA/MUC/TRICOM又は対照のベクター（FP-WT）と共に37℃で2時間インキュベートした。感染したDCを、100ng/mlのrhGM-CSF及び20ng/mlのrhIL-4を含む10mlの新鮮で温かい完全培地に懸濁した後、24時間培養した。各ヒストグラム中の数字は、陽性細胞の割合と平均蛍光強度（括弧内）を示している。

20

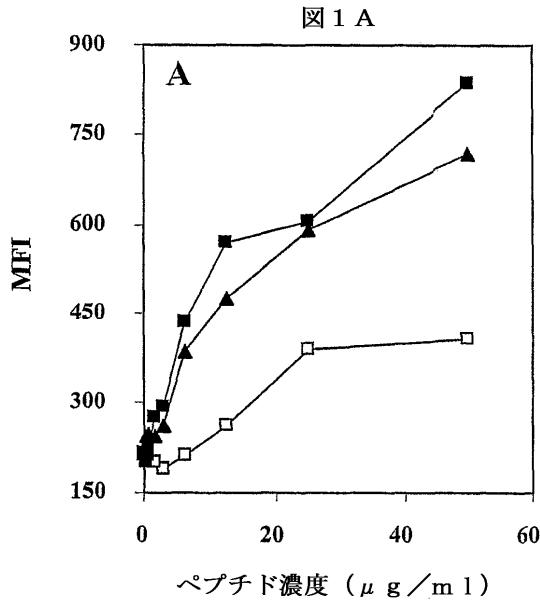
【図8】図8は、非感染の、又はrF-CEA TRICOM、rF-MUC-1-TRICOM、rF-CEA/MUC/TRICOM及びrV-CEA/MUC/TRICOMに感染したヒトDCの免疫プロット解析を示す。モノクローナル抗体COL-1及びDF-3を、それぞれCEA及びMUC-1を検出するために用いた。

30

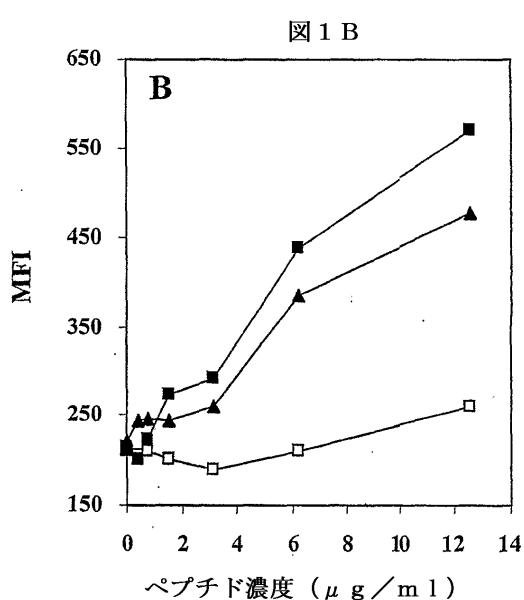
【図9】図9は、wMUC-1(6)ベクターのヌクレオチド配列である。

【図10】図10は、wMUC-1(6)のヌクレオチド配列である。

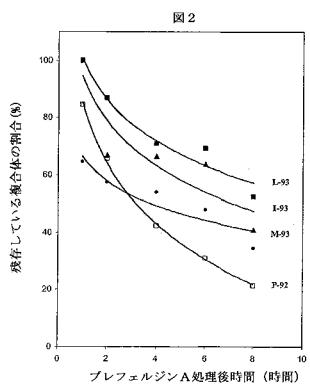
【図1A】



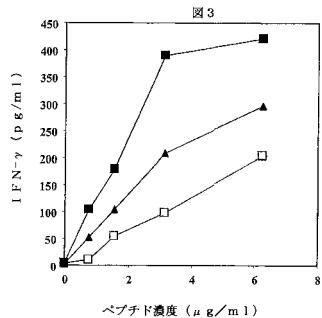
【図1B】



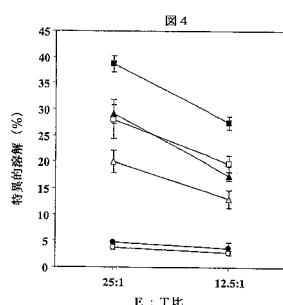
【図2】



【図3】



【図4】

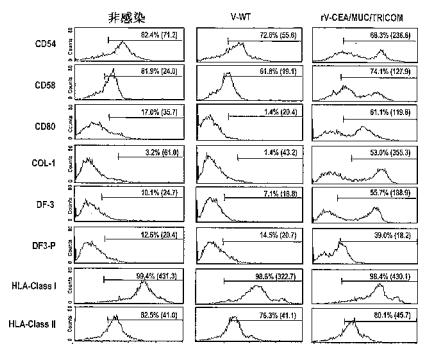


【図5】

ウイルス	名称	注入量 (μL)
rV-CEA(2D)-ICAM-LFA-3	rV-CEA(2D)-TRICOM	p10 CEA(69) p20 LFA-2 1 ICAM-2 45L B7.1
rV-CEA(2D)-ICAM-LFA-3	rV-CEA(2D)-TRICOM	p10 CEA(69) p20 LFA-2 1 ICAM-1 45L B7.1
rV-MUC-1/B7-1/ICAM-LFA-3	rV-MUC-1/TRICOM	p10 MUC-1 p20 LFA-2 1 ICAM-1 45L B7.1
rV-CEA(2D)/MUC-1/B7-1/ICAM-LFA-3	rV-CEA(2D)/TRICOM	p10 CEA(69) 45L MUC-1 (S9L) p10 LFA-2 1 ICAM-1 45L B7.1
rV-CEA(2D)/MUC-1/B7-1/ICAM-LFA-3	rV-CEA/MUC/TRICOM	p10 CEA(69) 45L MUC-1 (S9L) p10 LFA-2 1 ICAM-1 45L B7.1

図5

〔 図 6 〕



☒ 6

〔 図 8 〕

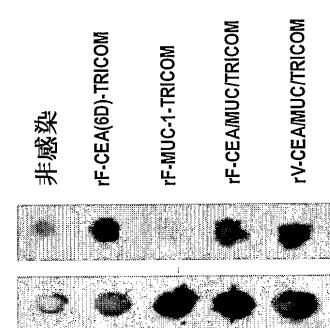
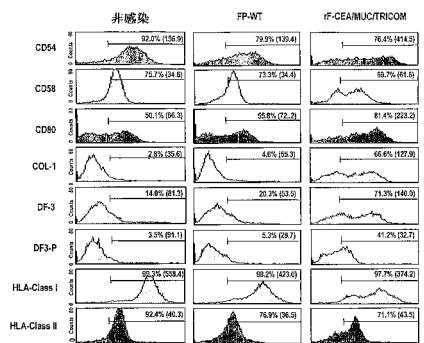


图 8

【図 7】



四三

〔 図 9 〕

(図 10)

-MUC-1 (6) の配列

9

wMUC = 1 (6) のアミノ酸配列

图 10

【配列表】

0005060134000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.CI.		F I
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(72)発明者 ウォンヨ ツアン  
アメリカ合衆国 メリーランド州 20814 ベセスタ ヨーク・レーン 5420

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第03/099193 (WO, A1)  
Int. J. Cancer, 2001年, Vol.91, pp.385-392  
日本消化器外科学会雑誌, 1998年, Vol.31, No.6, p.1635, #示II-34  
滋賀医大誌, 1999年, Vol.14, pp.19-28  
Clinical Cancer Research, 2004年, Vol.10, pp.2139-2149

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
C12P 1/00 - 41/00  
C07K 1/00 - 19/00  
UniProt/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS  
/REGISTRY(STN)

(54)【発明の名称】ヒト細胞傷害性Tリンパ球のエピトープ及びそのMUC-1の非VNT (non-varia  
ble number of tandem repeats) 由来のアゴニストエピト  
ープ