(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 670 T2** 2005.03.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 658 113 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 670.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/08157**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 920 419.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/005304**
(86) PCT-Anmeldetag: **30.08.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.03.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.06.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.10.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.03.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/705**
C07K 16/30, G01N 33/574

(30) Unionspriorität:

938334	**31.08.1992**	**US**
37230	**26.03.1993**	**US**
73103	**07.06.1993**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Ludwig Institute for Cancer Research, New York, N.Y., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte
HANSMANN-KLICKOW-HANSMANN, 22767 Hamburg

(72) Erfinder:
BOON-FALLEUR, Thierry, B-1200 Brussels, BE;
VAN DER BRUGGEN, Pierre, B-1200 Brussels, BE;
DE PLAEN, Etienne, B-1200 Brussels, BE;
LURQUIN, Christophe, B-1200 Brussels, BE;
TRAVERSARI, Catia, I-Milano, IT

(54) Bezeichnung: **VOM MAGE-3-GEN ABGELEITETES UND VON HLA-A1 PRÄSENTIERTES, ISOLIERTES NONAPEPTID UND DESSEN ANWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ER FINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Immungenetik und Peptidchemie. Insbesondere betrifft sie ein Nonapeptid, das in verschiedener Weise einsetzbar ist, einschließlich als Immunogen oder als ein Ziel für das HLA-A1-Molekül. Insbesondere betrifft sie ein sogenanntes "Tumorantigen", das von dem Tumorantigenvorläufer abgeleitet ist, der durch das Gen MAGE-3 kodiert wird und durch die menschlichen Leukozytenantigene des HLA-A1 präsentiert wird.

HINTERGRUND UND STAND DER TECHNIK

[0002] Die Untersuchung der Erkennung oder des Fehlens einer Erkennung von Krebszellen durch einen Wirtsorganismus hat sich in viele verschiedene Richtungen entwickelt. Ein Verständnis des Gebiets setzt gewisse Grundkenntnisse sowohl der Immunologie als auch der Onkologie voraus.

[0003] Frühe Forschung an Maus-Tumoren ergab, daß diese Moleküle aufweisen, die zur Abwehr von Tumorzellen führen, wenn sie in syngene Tiere transplantiert wurden. Diese Moleküle werden durch T-Zellen im Empfängertier "erkannt" und provozieren eine Antwort zytolytischer T-Zellen mit Lysis der transplantierten Zellen. Dieser Nachweis wurde zuerst mit Tumoren erhalten, die in vitro durch chemische Karzinogene, wie beispielsweise Methylcholanthren, induziert wurden. Es zeigte sich, daß die von Tumoren exprimierten Antigene, die die T-Zellantwort hervorriefen, für jeden Tumor anders sind. Siehe Prehn et al., J. Natl. Canc. Inst. 18: 769–778 (1957); Klein et al., Cancer Res. 20: 1561–1572 (1960); Gross, Cancer Res. 3: 326–333 (1943), Basombrio, Cancer Res. 30: 2458–2462 (1970) für allgemeine Lehren über die Induktion von Tumoren mit chemischen Karzinogenen und Unterschieden bei Zelloberflächen-Antigenen. Diese Klasse von Antigenen ist bekannt geworden als "tumorspezifische Transplantationsantigene" oder "TSTAs ("tumor specific transplantation antigens). Nach der Beobachtung der Präsentation solcher Antigene bei Induktion durch chemische Karzinogene wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet, wenn Tumoren in vitro mit ultravioletter Strahlung induziert wurden. Siehe Kripke, J. Natl. Canc. Inst. 53: 333–1336 (1974).

[0004] Während T-Zell-vermittelte Immunantworten für die oben beschriebenen Tumorarten beobachtet wurden, wurde angenommen, daß spontane Tumoren grundsätzlich nicht-immunogen sind. Es wurde daher angenommen, daß diese keine Antigene präsentieren, die eine Antwort auf den Tumor in dem tumortragenden Subjekt provozierten. Siehe Hewitt et al., Brit. J. Cancer 33: 241–259 (1976).

[0005] Die Familie der tum^--Antigen-präsentierenden Zellinien sind immunogene Varianten, die durch Mutagenese von Maustumorzellen oder -zellinien, wie von Boon et al., J. Exp. Med. 152: 1184–1193 (1980) beschrieben, erhalten wurden. Genauer gesagt, werden tum^--Antigene durch Mutieren von Tumorzellen erhalten, die keine Immunantwort in syngenen Mäusen generieren und Tumoren ausbilden (d.h. "tum^+-Zellen). Wenn diese tum^+-Zellen mutagenisiert sind, werden sie von syngenen Mäusen abgewehrt und bilden keine Tumoren (daher "tum^-"). Siehe Boon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 272 (1977). Es konnte gezeigt werden, daß viele Tumorarten dieses Phänomen zeigen. Siehe z.B. Frost et al., Cancer Res. 43: 125 (1983).

[0006] Es scheint, daß tum^--Varianten keine fortschreitenden Tumoren ausbilden, weil sie einen Immunabwehrprozeß hervorrufen. Zu den Indizien, die für diese Hypothese sprechen, gehört die Möglichkeit von "tum^-"-Tumorvarianten, d.h. solchen, die normalerweise keine Tumoren bilden, dieses aber doch bei Mäusen mit durch subletale Bestrahlung unterdrücktem Immunsystem zu tun, Van Pel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5282–5285 (1997), sowie die Beobachtung, daß intraperitoneal injizierte Mastozytom-P815-tum^--Zellen sich exponentiell für 12–15 Tage vermehren und dann in nur wenigen Tagen inmitten eines Zustroms von Lymphozyten und Makrophagen eliminiert werden (Uyttenhove et al., J. Exp. Med. 152: 1175–1183 (1980). Weitere Indizien schließen die Beobachtung ein, daß Mäuse ein Immungedächtnis erwerben, das es ihnen erlaubt, einer nachfolgenden Konfrontation mit derselben tum^--Variante zu widerstehen, selbst wenn immunsuppressive Strahlungsmengen bei der nachfolgenden Konfrontation verabreicht werden (Boon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 272–275 (1977); Van Pel et al., s. oben; Uyttenhove et al., s. oben).

[0007] Spätere Forschung ergab, daß, wenn spontane Tumoren einer Mutagenese unterzogen wurden, immunogene Varianten gebildet wurden, die eine Antwort hervorriefen. In der Tat waren diese Varianten in der Lage, eine Immunantwort gegen den ursprünglichen Tumor auszulösen. Siehe Van Pel et al., J. Exp. Med. 157: 1992–2001 (1983). Auf diese Weise wurde gezeigt, daß es möglich ist, die Präsentation sogenannter "Tumorantigene" bei einem Tumor hervorzurufen, der ein Ziel für eine syngene Abwehrantwort ist. Ähnliche Ergeb-

nisse wurden erzielt, wenn fremde Gene in spontane Tumoren transfiziert wurden. Siehe diesbezüglich Fearson et al., Cancer Res. 48: 2975–1980 (1988).

[0008] Es ist eine Klasse von Antigenen erkannt worden, die an der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden und von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, was zu Lysis führt. Diese Klasse von Antigenen wird im folgenden als "Tumorantigene" oder "TRAs" bezeichnet. TRAs können Antikörperantworten auslösen oder auch nicht. Soweit diese Antikörper untersucht wurden, ist dies durch Charakterisierungsstudien zu zytolytischen T-Zellen in vitro erfolgt, d.h. die Untersuchung der Identifizierung des Antigens durch eine bestimmte Untergruppe von zytotoxischen T-Zellen (im folgenden "CTL"). Die Untergruppe proliferiert bei Erkennung des präsentierten Tumorantigens, und die Zellen, die das Antigen präsentieren, werden lysiert. Charakterisierungsstudien haben CTL-Klone identifiziert, die spezifisch Zellen lysieren, die das Antigen exprimieren. Beispiele dieser Arbeit können in Levy et al., Adv. Cancer Res. 24: 1-59 (1977); Boon et al., J. Exp. Med. 152: 1184–1193 (1980); Brunner et al., J. Immunol. 129: 1627–1634 (1980); Maryanski et al., Eur. J. Immunol. 124: 1627–1634; Maryanski et al., Eur. J. Immunol. 12: 406–412 (1982); Palladino et al., Canc. Res. 47: 5074–5079 (1987) gefunden werden. Diese Art von Analysen ist für andere Arten von Antigenen, die durch CTLs erkannt werden, einschließlich Haupthistokompatibilitäts-Antigenen, den männerspezifischen H-Y-Antigenen und einer Klasse von Antigenen, die als "tum-"-Antigene bezeichnet und hier beschrieben werden, erforderlich.

[0009] Ein Tumor, der für den oben beschriebenen Gegenstand beispielhaft ist, ist als P815 bekannt. Siehe DePlaen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2274–2278 (1988); Szikora et al., EMBO J 9: 1040–1050 (1990) und Sibille et al., J. Exp. Med. 172: 34–45 (1990). Der P815-Tumor ist ein Mastozytom, induziert mit Methylcholanthren in einer DBA/2-Maus und kultiviert sowohl als In-vitro-Tumor als auch als Zellinie. Die P815-Linie hat nach Mutagenese viele tum^--Varianten, einschließlich Varianten, die als P91A (DePlaen, s. oben), 35B (Szikora, s. oben) und P198 (Sibille, s. oben) bezeichnet werden, hervorgebracht. Im Gegensatz zu Tumorantigenen – und dies ist ein wesentlicher Unterschied – sind die tum^--Antigene nur zugegen, wenn die Tumorzellen mutagenisiert wurden. Tumorantigene sind auf Zellen eines gegebenen Tumors ohne Mutagenese vorhanden. Folglich kann, unter Bezugnahme auf die Literatur, eine Zellinie tum^+ sein, wie die als "P1" bezeichnete Linie, und kann dazu angeregt werden, tum^--Varianten hervorzubringen. Da sich der tum^--Phänotyp von dem der Elternzellinie unterscheidet, erwartet man einen Unterschied in der DNA von tum^--Zellinien im Vergleich zu ihren tum^+-Elternlinien, und dieser Unterschied kann ausgenutzt werden, um die interessierenden Gene in tum^--Zellen zu lokalisieren. Als Ergebnis wurde gefunden, daß Gene von tum^--Varianten wie beispielsweise P91A, 35B und P198 sich von ihren normalen Allelen durch Punktmutationen in den codierenden Bereichen des Gens unterscheiden. Siehe Szikora und Sibille, s. oben, sowie Lurquin et al., Cell 58: 293:303 (1989). Dies ist nachweislich nicht der Fall bei den TRAs der vorliegenden Erfindung. Diese Veröffentlichungen zeigten ebenfalls, daß von tum^--Antigenen abgeleitete Peptide von dem Ld-Molekül zur Erkennung durch CTLs präsentiert werden. P91A wird durch L^d, P35 durch D^d und P198 durch K^d präsentiert.

[0010] Die PCT-Anmeldung PCT/U592/04354, angemeldet am 22. Mai 1992, übertragen auf denselben Rechtsnachfolger wie die vorliegende Anmeldung, lehrt eine Familie von kodierenden Genen für menschliche Tumorantigenvorläufer, die als MADE-Familie bezeichnet wird. Mehrere dieser Gene sind auch in van der Bruggen et al., Science 254: 1643 (1991), beschrieben. Es ist nun klar, daß die verschiedenen Gene der MAGE-Familie in Tumorzellen exprimiert werden und als Marker zur Diagnose solcher Tumoren sowie für andere Zwecke dienen können, die hier beschrieben werden. Siehe auch Traversari et. al., Immunogenetics 35: 145 (1992); van der Bruggen et al., Science 254: 1643 (1991). Die Mechanismen, durch die ein Protein verarbeitet und auf einer Zelloberfläche präsentiert wird, sind nunmehr recht gut dokumentiert. Eine kursorische Übersicht über die Entwicklung auf diesem Gebiet kann Barinaga, "Getting Some 'Backbone': How MHC Binds Peptides", Science 257: 880 (1992) entnommen werden; siehe auch Fremont et al., Science 257: 919 (1992); Matsumura et al., Science 257: 927 (1992); Latron et al., Science 257: 964 (1992). Diese Manuskripte weisen auf ein Erfordernis, wonach das Peptid, das an einen MHC/HLA-Molekül bindet, neun Aminosäuren lang (ein "Nonapeptid") ist sowie die Bedeutung des ersten und neunten Restes des Nonapeptids hin.

[0011] Untersuchungen zur MAGE-Familie von Genen haben nun ergeben, daß ein bestimmtes Nonapeptid in der Tat auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert wird, und daß die Präsentation des Nonapeptids erfordert, daß das präsentierende Molekül HLA-A1 ist. Komplexe des MAGE-1-Tumorantigens (das "TRA" oder "Nonapeptid") führen zur Lyse der ihn präsentierenden Zelle durch zytotoxische T-Zellen ("CTLs"). Diese Beobachtung hat sowohl diagnostische als auch therapeutische Folgen, die hier beschrieben sind.

[0012] Untersuchungen, die zum Beispiel in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/938,334, angemeldet am 31. August 1992, die die Stammanmeldung zu der vorliegenden Anmeldung ist, dargestellt sind, zeigten, daß beim Vergleich homologer Bereiche verschiedener MAGE-Gene mit der Region des für das rele-

vante Nonapeptid kodierenden MRGE-1-Gens keine große Homologie besteht. In der Tat führte diese Beobachtung zu einem der Aspekte der hier offenbarten und beanspruchten Erfindung, welcher eine Familie von Nonapeptiden ist, die alle dieselben N-terminalen und C-terminalen Aminosäuren aufweisen. Diese Nonapeptide wurden beschrieben als geeignet für verschiedene Zwecke, die ihre Verwendung als Immunogen, entweder allein oder gekoppelt an Trägerpeptide, beinhaltet. Nonapeptide sind von ausreichender Größe, um ein antigenes Epitop zu bilden, und die hiergegen erzeugten Antikörper wurden als geeignet zur Identifizierung des Nonapeptids beschrieben, entweder so wie es allein vorliegt oder als Teil eines größeren Polypeptids.

[0013] Die Nonapeptide wurden als geeignet zur Identifizierung verschiedener HLA-Untergruppen auf der Oberfläche von Tumorzellen, wie Melanomen, beschrieben. Mittels dieser Fähigkeit dienten sie sowohl als diagnostische Marker als auch als therapeutische Mittel. Diese Merkmale werden unten diskutiert.

[0014] Die Nukleinsäuresequenzen, die für die Nonapeptide kodieren, werden ebenfalls hier beschrieben. Diese Nukleinsäuresequenzen wurden ebenfalls als geeignet beschrieben als diagnostische Sonden für die Anwesenheit von Tumoren.

[0015] Die Anmeldung zeigte auch, wie gefunden worden ist, daß ein Zellmodell verwendet werden konnte, wobei eine nichtmenschliche Zelle mit einer Nukleinsäuresequenz transfiziert werden kann, die für ein menschliches HLA-Molekül kodiert. Der erhaltenen Transfektant konnte dann verwendet werden, um die Nonapeptid-Spezifität des jeweiligen HLA-Moleküls zu testen, oder konnte als Gegenstand für eine zweite Transfektion mit einem MACE-Gen verwendet werden. Der Cotransfektant konnte verwendet werden, um zu bestimmen, ob das jeweilige MACE-basierte TRA von dem jeweiligen HLA-Molekül präsentiert wird.

[0016] Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit einem der Peptide, das in der früheren der beiden Stammanmeldungen beschrieben ist. Insbesondere ist nun gefunden worden, daß das Nonapeptid

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr,

abgeleitet von dem durch MAGE-3 kodierten Tumorantigenvorläufer von dem menschlichen Leukozytenantigen HLA-A1 präsentiert wird. Dieser Befund und die Konsequenzen daraus werden in der nun folgenden Offenbarung beschrieben.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0017] **Fig.** 1 skizziert das Verfahren, durch das ein Fragment des MAGE-1-Gens aus 300 Basenpaaren als kodierend für das relevante Tumorantigen identifiziert wurde.

[0018] **Fig.** 2 zeigt Lyse-Studien, bei denen Zellen mit verschiedenen MAGE-1-Peptiden inkubiert wurden.

[0019] **Fig.** 3 vergleicht die Lyse von Mauszellen, die mit HLA-A1-Genen transfiziert wurden, in Gegenwart des MAGE-1-Nonapeptids und bei Transfektion mit der für MAGE-1 kodierenden Sequenz.

[0020] **Fig.** 4 vergleicht Nonapeptide von verschiedenen homologen Abschnitten des MAGE-Gens und die Nukleinsäuresequenzen, die für diese Nonapeptide kodieren.

[0021] **Fig.** 5 zeigt Ergebnisse eines Chromfreisetzungstests unter Verwendung des CTL-Klons 20/38 bei verschiedenen Zellinien.

[0022] **Fig.** 6 präsentiert das Ergebnis eines Tests, der durchgeführt wurde, um die Antigenspezifität des CTL-Klons 20/38 zu bestimmen.

[0023] **Fig.** 7 zeigt die Ergebnisse, die erhalten wurden, wenn ein TNF-Freisetzungstest bei verschiedenen transfizierten Zellen durchgeführt wurde.

[0024] **Fig.** 8 beschreibt die Ergebnisse eines Lyse-Tests unter Verwendung des erfindungsgemäßen Peptids.

[0025] Die SEQ ID NO: 1–9 zeigen homologe Nonapeptide von MAGE-Genen und die Nukleinsäuresequenzen, die für diese kodieren.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Beispiel 1

[0026] Von dem 2,4-kb-BamIII-Fragment, beschrieben durch van der Bruggen et al., Science 254: 1643 (1991), ist bekannt, daß es nur die Exons 2 und 3 des Gens enthält, das für das MAGE-1-Protein kodiert. Das Fragment überträgt die Expression des Antigens MZ2-E auf die E -Antigenverlust-Zellinienvariante MZ2-MEL.2.2 und führt zur Lyse der Transfektanten durch E^+-CTLs. Vorangegangene Arbeiten durch DePlaen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2274 (1988), und Chomez et al., Immunogenetics 35: 241 (1990), haben ergeben, daß kleine Genfragmente, die kodierende Sequenzen von Antigenpeptiden enthalten, diese Antigene regelmäßig exprimieren, selbst wenn sie nicht in Form von Expressionsvektoren transfiziert wurden. Angesichts dieser Beobachtungen wurden Versuche mit kleineren Fragmenten des 2,4-kb-Fragments durchgeführt. Verschiedene Restriktionsenzyme wurden verwendet, um das 2,4-kb-Fragment in kleinere Fragmente zu zerschneiden. Die erhaltenen kleineren Fragmente wurden in den Plasmidvektor pTZ18R kloniert. Ein Fragment von 300 Basenpaaren, entnommen aus Exon 3, wurde mittels Vervielfältigung durch Polymerasekettenreaktion ("PCR") unter Verwendung der Oligonukleotide VDB 14:

5'–CAGGGAGCCAGTCACAAAG–3'

und CHO 9:

5'–ACTCAGCTCCTCCCAGATTT–3'.

erhalten.

[0027] Diese Primer amplifizieren ein 300-Basenpaar-Fragment von MAGE 1 zwischen den Positionen 422 und 722 des Exons 1. Das Fragment wurde in den Expressionsvektor PSVK3 kloniert. Die neuen Konstrukte wurden mit dem Plasmid pSVtkneoß in die MZ2.MEL 2.2-Zellinien cotransfiziert. Dies wurde erreicht durch Verwendung des Calziumphosphat-Präzipitationsverfahrens (Traversari et al., Immunogenetics 35: 145 (1992); Wolfel et al., Immunogenetics 26: 178 (1987)), unter Verwendung von 4×10^6 Zellen und 3 µg pSVtkneoß (Nicolas et al., CSH Conf. Cell Pralif 10: 469 (1983)), und 30 µg des pTZ18R- oder PSVK3-Konstrukts. Die Transfektanten wurden dann in Medium mit dem Neomycin-Analogon G418 selektiert. Fünfzehn Tage nach der Transfektion wurden resistente Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, die TNF-Bildung durch die Anti-E-Antigen-CTL 82/30 zu stimulieren. Dies wurde erreicht durch Zugabe von 100-µl-Proben, die 1500 CTL 82/30 enthielten, zu 4×10^4 transfizierten Zellen. Überstandsproben (50 µl) wurden abgenommen und zu 3×10^4 WEHI-164-Klon-13-Zellen (Espevik et al., J. Immunol. Meth. 95: 99 (1986), gegeben, um die Anwesenheit von TNF zu ermitteln. Die Sterblichkeit der WEHI-Zellen wurde 24 Stunden später unter Verwendung eines photometrischen MTT-Tests nach z. B. Traversari et al., s. oben, bestimmt.

[0028] Wie in **Fig.** 1 dargestellt, identifizierten diese Versuche ein Fragment von 300 Basenpaaren vom MAGE-1-Exon 3, das in der Lage war, die Expression des Antigens MZ2E wirksam zu übertragen.

Beispiel 2

[0029] Das MAGE-1-Gen gehört zu einer Familie von verschiedenen eng verwandten Genen. Siehe van der Bruggen et al., oben. Vorangegangene Versuche haben festgestellt, daß MAGE-2 und MAGE-3 die Expression des Antigens MZ2E nicht regelten. Da das 300-Basenpaar-Fragment dies eindeutig tat, wurden die homologen Bereiche der MAGE-2- und MAGE-3-Gene mit dem 300-Basenpaar-Fragment verglichen. Die Unterschiede waren klar und verschiedene Peptide mit 15 Aminosäuren wurden gemäß Atherton et al., J. Chem. Soc. 1: 538 (1981), unter Verwendung von f-moc für einen vorübergehenden N-terminalen Schutz synthetisiert. Die Peptide wurden durch C-18-Umkehrphasen-HPLC gereinigt und durch Aminosäurenanalyse charakterisiert.

[0030] Nachdem die Peptide gesichert waren, wurden sie in Lyse-Tests untersucht, unter Verwendung des Freisetzungsverfahrens nach Boon et al., J. Exp. Med. 152: 1184 (1980). Kurz gesagt, wurden 1000 ^{51}Cr-markierte E^--Zielzellen in 96-Loch-Mikroplatten unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Peptiden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

[0031] Ein gleiches Volumen einer CTL-haltigen Probe wurde zugegeben (Zellinie 82/30), wobei die Zahl von CTLs fünfmal größer war als die ihres Ziels. Die Chromfreisetzung wurde nach vier Stunden gemessen. Die Sensibilisierung von E^--Zellen gegenüber Lyse durch die Anti-E-CTLs wurde mit einem Peptid beobachtet, das den Codons 158–172 des großen offenen Leserasters von MAGE-1 entsprach. Kürzere Peptide wurden hergestellt und eine effiziente Lyse wurde mit dem folgenden Peptid beobachtet:

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr.

[0032] Die Ergebnisse, dargestellt in **Fig.** 2, zeigen, daß die erste und neunte Aminosäure kritisch waren für die Bindung und die Bewirkung der Lyse. Dies befindet sich in Übereinstimmung mit vorangegangenen Berichten, die feststellen, daß MHC-I-Moleküle im allgemeinen durch Nonapeptide gebunden werden (Rotzschke et al., Nature 348: 252 (1990)). **Fig.** 2 zeigt auch, daß die halbmaximale Lyse bei einer Peptidkonzentration von 5 nM erhalten wurde.

Beispiel 3

[0033] Es wurden Versuche durchgeführt, um festzustellen, welches Molekül das relevante MAGE-1-Antigen präsentierte. Um dies zu erreichen, wurde ein HLA-A1-Gen, wie von Girdlestone, Nucl. Acids. Res. 18: 6701 (1990), beschrieben, in eine Maus-Zellinie, P1.HTR, transfiziert. Diese Linie ist eine hochtransfizierbare Variante der Maus-Mastozytom-Zellinie P815. Die erhaltenen Transfektanten, bezeichnet als "P1.HTR.A1", wurden unter Verwendung desselben Lyse-Tests in Gegenwart des oben beschriebenen Nonapeptids inkubiert. Kontrollen wurden ebenfalls eingesetzt.

[0034] **Fig.** 3 zeigt, daß die Zellinie lysiert wurde, was zeigt, daß ein Modell zum Screening eines lytischen Peptids unter Verwendung einer nicht-menschlichen Zelle entwickelt wurde.

[0035] In Versuchen, die hier nicht beschrieben sind, wurden ähnliche Ergebnisse mit COS-Zellen erhalten.

[0036] Darüber hinaus wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, bei denen die Zellinie P1.HTR.A1 mit MAGE-1-cDNA transfiziert wurden. Wenn der Lyse-Test aus Beispiel 2 mit diesen cotransfizierten Zellen durchgeführt wurde, wurde gefunden, daß sie ebenfalls lysiert wurden.

Beispiel 4

[0037] Angesichts der Homologie der verschiedenen Gene innerhalb der MAGE-Familie wurde ein Vergleich durchgeführt, um Ähnlichkeiten zwischen den homologen Bereichen der Gene zu identifizieren. Diese Bereiche sind in **Fig.** 4 dargestellt. Diese Peptide und die Nukleinsäuresequenzen, die für sie kodieren, sind nicht identisch, zeigen aber ein großes Maß an Homologie, insbesondere die identischen ersten und neunten Reste.

Beispiel 5

[0038] Dieses Beispiel, und die folgenden Beispiel 6–8, entsprechen den Beispielen 37–40 der parallel anhängigen Anmeldung mit der Seriennummer 08/037,230, angemeldet am 26. März 1993.

[0039] Ein zytotoxischer CTL-Klon "20/38" wurde von Lymphozyten des peripheren Blutes des Melanom-Patienten MZ2 erhalten. Dieser Klon wird durch Van den Eynde et al., Int. J. Cancer 44: 634-640 (1989), beschrieben. Der CTL-Klon wurde gemäß Herin et al., Int. J. Cancer 39: 390–396 (1987), isoliert. Der Test wird jedoch hier beschrieben. Autologe Melanomzellen wurden in vitro angezogen und dann zu 10^7 Zellen/ml in DMEM, versetzt mit 10% HEPES und 30% FCS, resuspendiert und für 45 Minuten bei 37 °C mit 200 µCi/ml Na(^{51}Cr)O_4 inkubiert. Die markierten Zellen wurden dreimal mit DMEM, versetzt mit 10 mM HEPES, gewaschen. Diese wurden dann in DMEM, versetzt mit 10 mM HEPES und 10% FCS, resuspendiert, wonach 100-µl-Teilmengen, enthaltend 10^3 Zellen, in 96-Loch-Mikroplatten gegeben wurden. Proben der CTL-Klone wurden in 100 µl desselben Mediums zugegeben und Tests wurden in zwei Parallelen durchgeführt. Die Platten wurden für vier Minuten bei 100g zentrifugiert und für vier Stunden bei 37 °C in einer 5,5%igen CO_2-Atmosphäre inkubiert.

[0040] Die Platten wurden erneut zentrifugiert und 100-µl-Teilmengen des Überstands wurden gesammelt und gezählt. Die Prozentanteile der ^{51}Cr-Freisetzung wurden wie folgt berechnet:

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

wobei ER die beobachtete experimentelle ^{51}Cr-Freisetzung ist, SR die bei Inkubation von 10^3 markierten Zellen in 200 µl Medium allein gemessene spontane Freisetzung ist und MR die maximale Freisetzung ist, die durch Zugabe von 100 µl 0,3% Triton X-100 zu den Zielzellen erhalten wurde.

[0041] Jene mononukleären Blutproben, die eine hohe CTL-Aktivität zeigten, wurden expandiert und mittels Verdünnungsreihen kloniert, und wurden erneut unter Verwendung derselben Methodik gescreent.

[0042] Dasselbe Verfahren wurde verwendet, um die K562-Zielzellen zu testen. Wenn EBV-B-Zellen verwendet wurden, bestand die einzige Änderung darin, daß das DMEM-Medium durch Hank-Medium, versetzt mit 5% FCS, ersetzt wurde.

[0043] Diese Versuche führten zur Isolierung des CTL-Klons 20/38.

[0044] **Fig.** 5 stellt die Ergebnisse dieser Tests dar. Insbesondere ist ersichtlich, daß der CTL-Klon die autologe Melanom-Zellinie MZ2.MEL.3.0 lysierte, nicht jedoch die EBV-B-Zellinien, Fibroblasten, K562 oder die nicht-autologe Melanom-Zellinie SK-MEL-29 lysierte.

Beispiel 6

[0045] Nachdem der CTL-Klon als spezifisch für die autologe Zellinie erkannt wurde, wurde er auf seine Antigen-Spezifität getestet. Hierfür wurden Antigen-Verlustvarianten, die vom Patienten MZ2 erhalten wurden, in derselben Art Chromfreisetzungstest wie oben beschrieben getestet. Diese Ziel-Linien waren MZ2-MEL 3.0, die D^+, E^+, F^+, A^+ ist, MZ2-MEL.61, die D^- ist, MZ2-MEL 2.2, die E^- ist, und MZ2-MEL.4, die F^- ist. Zusätzlich zu dem CTL-Klon 20/38 wurden Klone getestet, von denen bekannt ist, daß sie anti-A (CTL 28/336), anti-F (CTL 76/6), und anti-E (CTL 22/13) sind.

[0046] Diese Ergebnisse sind in **Fig.** 6 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß der CTL-Klon 20/38 mit Ausnahme der D^--Zellinie MZ2.MEL.61 alle Zellinien unter Chromfreisetzung lysierte, was darauf hindeutet, daß der CTL-Klon anti-D ist. Dieses Ergebnis wurde in hier nicht dargestellten Experimenten bestätigt, bei denen eine TNF-Freisetzung durch den CTL-Klon nur in Gegenwart der Melanom-Linien, die Antigen D präsentieren, beobachtet wurde.

Beispiel 7

[0047] Nachdem Antigen D als Zielmolekül identifiziert war, wurden Studien durchgeführt, um den HLA-Typ festzustellen, der es präsentiert. Die in Beispiel A beschriebenen Versuche zeigten, das Antigen D durch MZ2-MEL präsentiert wurde, und die HLA-Spezifität dieser Zellinie ist bekannt (d. h. A1, A29, B37, B44, Cw6, C.cl.10). Es ist jedoch auch bekannt, daß eine Variante von MZ2-MEL, die die HLA-Moleküle A29, B44 und C.c1.10 verloren hatte, Antigen D weiterhin exprimierte, so daß diese aus der Überlegung ausgeschlossen werden konnten. Es wurden keine Studien bei Linien durchgeführt, die B37 exprimieren, da keine gefunden werden konnten.

[0048] Insgesamt wurden 13 allogene Linien getestet, die entweder HLA-A1 (10 von 13) oder Cw6 (3 von 13) exprimierten. Die Zellinien wurden unter Verwendung des Verfahrens von Traversari et al., Immunogenetics 35: 145–152 (1.992), auf ihre Fähigkeit getestet, die Freisetzung von TNF durch den CTL-Klon 20/38 zu stimulieren. Dieser Tests mißt: die TNF-Freisetzung mittels Untersuchung der Toxizität des Überstands auf WEHI-164-13-Zellen.

[0049] Bei diesen Tests wurden Zellproben (3000, 10000 oder 30000 Zellen) von den allogenen Linien in Gegenwart von 1500 Zellen des CTL-Klons und 25 u/ml IL-2 kultiviert. Vierundzwanzig Stunden später wurde der Überstand von den Kulturen auf die Toxizität gegenüber den WEHI-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

[0050] Es zeigte sich, daß acht Zellinien die TNF-Freisetzung vom CTL-Klon 20/38 stimulieren. Alle diese Linien waren HLA-A1. Keine der Cw6 präsentierenden Linien tat dies.

[0051] Die Zellinien wurden auch untersucht, um die MADE-Expression zu bestimmen. Alle acht Linien, die die TNF-Freisetzung stimulierten, exprimierten MAGE-3, wohingegen die zwei HLA-A1-Linien, die negativ waren, dies nicht taten.

Tabelle 1

Melanom	Anzahl von Zellen	Bsp. 1		Bsp. 2		Expression von MAGE-3	Expression von HLA-A 1
		+CTL 20/38		+CTL 20/38			
MZ2-MEL-61.2	50000	1		4		+++	+
MZ2-MEL-ET1	50000	>120		>120		+++	+
	1666	66		>120			
LY-1-MEL	30000	1	>120	1	>120	+++	+
	10000	1	>120	1	>120		
	3000	<1	114	2	>120		
MI-10221	30000	<1	>120			+++	+
	10000	<1	71				
	3000	<1	74				
LY-2-MEL	30000	1	57			+++	+
	10000	1	86				
	3000	1	91				
LY-4-MEL	30000	1	>120			+++	+
	10000	1	>120				
	3000	1	>120				
SK23-MEL	30000	1	112			++++	+
	10000	1	116				
	3000	1	105				
MI-665/2-MEL	30000	1	3	2	4	-	+
	10000	1	2	2	5		
	3000	1	5,2	1	5		
LB34-MEL	30000	1	>120			++++	+
	10000	1	>120				
	3000	1	>120				
LB45-MEL	30000	1	11	1	30	-	+
	10000	1	6	1	12		
	3000	1	2	<1	7		
NA-6-MEL	30000	1	77	5	98	+++	+
	10000	1	104	5	>120		
	3000	1	110	4	>120		
MI-13443-MEL	30000	1	>120			++++	+
	10000	1	>120				
	3000	1	>120				
LB5-MEL	30000	1	8	4	9	+	-
	10000	<1	5	4	11		
	3000	<1	5	1	5		
SK64-MEL	30000	1	4	2	5	?	-
	10000	1	2	1	5		
	3000	1	1	1	4		
LB33-MEL	30000			1	3,5	+++	-
	10000			1	4		
	3000			1	3		
LB73-MEL	30000		16			-	-
	10000						
	3000						

[0052] 1500 CTL-20/38 und 25 u/ml IL2 wurden mit der angegebenen Zahl von Zellen der verschiedenen allogenen Melanome gemischt. Später wurde die im Überstand vorhandene TNF-Menge durch Untersuchung der Zytotoxizität gegenüber WEHI-164-13-Zellen getestet.

Beispiel 8

[0053] Angesichts der Ergebnisse, die in Beispiel 7 dargestellt sind, wurden Versuche durchgeführt, um festzustellen, ob Antigen D in der Tat ein von MAGE-3 abgeleitetes Tumorantigen war. Um dies zu tun, wurden Empfänger-COS-7-Zellen mit 100 ng des Gens für HLA-A1, kloniert in pcDNA I/Amp, und 100ng einer (a) cDNA für MAGE-1, kloniert in pcDNA I/Amp, (b) cDNA für MAGE-2, kloniert in pcDSRα, oder (c) cDNA für MAGE-3, kloniert in pcDSRe, transfiziert. Die transfizierenden Sequenzen wurden nach Herstelleranweisungen in die Plasmide ligiert. Proben von COS-7-Zellen wurden zu 15.000 Zellen/Loch in Gewebekultur-Flachboden-"Microwells" in Dulbecos modifiziertem Eagle-Medium ("DMEM"), versetzt mit fötalem Kälberserum, angeimpft. Die Zellen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert, Medium wurde entfernt und dann durch 30

µl/Loch DMEM-Medium, enthaltend 10% Nu-Serum, 400 µg/ml DEAE-Dextran, 100 µM Chloroquin und die oben beschriebenen Plasmide, ersetzt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium entfernt und durch 50 µl PBS, enthaltend 10% DMSO, ersetzt. Dieses Medium wurde nach zwei Minuten entfernt und durch 200 µl DMEM, versetzt mit 10% FCS, ersetzt.

[0054] Im Anschluß an diesen Wechsel des Mediums wurden die COS-Zellen für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde dann verworfen und 1500 Zellen des CTL-Klons 20/38 in 100 µl Iscove-Medium, enthaltend 10% gepooltes Humanserum, versetzt mit 25 u/ml IL-2, wurden zugegeben. Der Überstand wurde nach 24 Stunden entfernt und der TNF-Gehalt wurde in einem Test auf WEHI-Zellen, wie durch Traversari et al., Immunogenetics 35: 145-152.(1992), beschrieben, bestimmt. Diese Ergebnisse sind in **Fig.** 7 dargestellt.

[0055] Es ist ersichtlich, daß der CTL-Klon stark durch COS 7-Zellen, die mit HLA-A1 und MAGE-3 transfiziert waren, stimuliert wurde, nicht jedoch durch Zellen, die mit anderen MAGE-Genen transfiziert waren. Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß Antigen D ein von dem durch das Gen MAGE-3 kodierten Tumorantigenvorläufer abgeleitetes Tumorantigen ist, und daß dieses TRA durch HLA-A1-Moleküle präsentiert wird.

Beispiel 9

[0056] Weitere Experimente wurden durchgeführt unter Verwendung des von dem Gen "MAGE-3" abgeleiteten Peptids

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr.

[0057] Das Peptid wurde in der gleichen Weise wie die Peptide aus Beispiel 2 hergestellt. Der Chromfreisetzungstest, der in diesem Beispiel beschrieben wurde, wurde ebenfalls verwendet. Die Zellinie MZ2-MEL 61.2, die eine Antigen-D-Verlustvariante von MZ2.MEL43 ist, wurde mit ^{51}Cr markiert und wurde dann mit dem Antigen-D-spezifischen zytotoxischen Zell-Klon CTL-20/38 und verschiedenen Konzentrationen des Peptids getestet. MZ2-MEL61.2 und CTL 20/38 wurden in einem Verhältnis von 1,5:1, zusammen mit dem Peptid in verschiedenen Konzentrationen, zusammengebracht. Die Mischung wurde für vier Stunden inkubiert, wonach die Chromfreisetzung gemessen wurde. Als Kontrolle wurden chrommarkierte MZ2-MEL.43 verwendet.

[0058] Die Ergebnisse, dargestellt in **Fig.** 8, zeigen, daß das Peptid als Tumorantigen agiert, indem die zytotoxischen T-Zellklone die Zielzellen erkennen und lysieren.

[0059] Die vorangegangenen Beispiele zeigen, daß ein von MAGE-3 abgeleitetes Nonapeptid durch HLA-A1-Moleküle präsentiert wird, und Zellen, die den Komplex aus HLA-A1 und dem Nonapeptid präsentieren, durch spezifische CTL-Zellen erkannt und lysiert werden. Diese Beobachtung zeigt, daß das erfindungsgemäße Nonapeptid sowohl therapeutisch als auch diagnostisch angewendet werden kann.

[0060] Für den Fall der letzteren Verwendungskategorie kann das Nonapeptid zum Beispiel zur Identifizierung von Tumoren verwendet werden, die ein bestimmtes HLA-Molekül exprimieren, oder Krebszellen als solche. Man bringt eine Krebszellen enthaltende Probe oder eine Tumorzelle in Kontakt mit dem Nonapeptid, das hieran bindet, und kombiniert das Material mit einer CTL-Probe, die für den Komplex spezifisch ist. Wenn eine Lyse folgt, kann die Tumor-/Krebszelle als HLA-A1-Präsentierer identifiziert werden.

[0061] Therapeutisch gibt es zwei Hauptmöglichkeiten, wie das Nonapeptid verwendet werden kann. Bei einem therapeutischen In-vivo-Ansatz kann das Nonapeptid in einer Weise verabreicht werden, die die zu behandelnden Tumoren anvisiert. Dies kann durch direkte Injektion, Retard-Administration, Kopplung an tumorspezifische Antikörper usw. geschehen. Auf die Bindung an HLA-A1-Moleküle kommt es zu einer CTL-Antwort, die zur Lyse des Tumors führt. Bei solch einem therapeutischen Ansatz wird das Nonapeptid natürlich in einer Menge verabreicht, die ausreicht, um zur Lyse des Tumors zu führen. Diese Menge wird in Abhängigkeit von dem jeweiligen Patienten, der Art und Größe des Tumors usw. variieren.

[0062] Eine "In-vitro"-Form der Therapie ist ebenfalls vorgesehen. Wie oben angegeben, tritt eine proliferative CTL-Antwort auf, wenn HLA-A1-Moleküle an das MAGE-3-abgeleitete Nonapeptid binden, wenn sie mit den CTLs in Kontakt gebracht werden, die spezifisch für den Peptid/HLA-Komplex sind. Da die CTLs die Mittel der Tumorlyse in vivo sind, können die erhaltenen expandierten Populationen an den Patienten verabreicht werden. Die CTLs können durch Verwendung des eigenen Bluts des Patienten oder einer anderen Quelle von CTLs expandiert werden, oder durch Kontakt mit Proben peptidspezifischer CTLs, die früher erlangt wurden. In dieser Hinsicht sei darauf hingewiesen, daß CTL 20/38, oben beschrieben, seit einiger Zeit erhältlich war, so wie auch die Methodik für dessen Entwicklung.

[0063] Therapien des hier beschriebenen Typs sind besonders geeignet für Melanom. Die Analyse von Proben hat gezeigt, daß etwa 26% der kaukasischen Bevölkerung insgesamt HLA-A1-Allele präsentieren. Daher können mindestens 26% der kaukasischen Melanom-Populationen als potentielle Subjekte für die Therapie mit dem Peptid betrachtet werden. Die Patienten können auch mit proliferativen Zellen behandelt werden, die Komplexe aus HLA-A1 und dem Nonapeptid auf ihrer Oberfläche präsentiert aufweisen.

[0064] Die Nukleinsäuresequenzen können, wie angegeben, auf vielfältige Weise verwendet werden. MAGE-Gene werden in Tumoren exprimiert und die Nukleinsäuresequenzen können daher als Sonden zur Identifizierung von Tumorzellen verwendet werden. Dies kann erreicht werden durch markierte Hybridisierungssonden, PCR oder jeden der verschiedenen Nukleinsäuresonden-basierten Tests, der im Stand der Technik bekannt ist.

[0065] Die Entwicklung der hier beschriebenen nicht-menschlichen Zellinien bildet einen einzigartigen Weg, einige der Merkmale der hier beschriebenen Erfindung auszuführen. Die Beispiele zeigen z. B., daß die CTLs den Komplex aus HLA und Nonapeptid erkennen, und nicht zwischen den Zelltypen, die die Komplexe präsentieren, zu unterscheiden scheinen. Die isolierten, nicht-menschlichen Zellinien gemäß der Erfindung können daher verwendet werden, um CTLs zu erzeugen und ihre Anwesenheit in menschlichen Proben zu identifizieren.

[0066] Wie angegeben, beinhaltet die Erfindung auch isolierte nichtmenschliche Zellinien, die sowohl mit einem HLA-A1-Gen als auch einer Sequenz, die für das Nonapeptid kodiert, transfiziert sind. Man ist nicht beschränkt auf die Transfektion mit einem für HLA kodierenden Gen und einem MAGE-Peptid, und in der Tat umfaßt die Erfindung mehrfach transfizierte Zellen, die mehr als ein HLA-Gen und mehr als eine für ein MAGE-Antigen kodierende Sequenz enthalten. Der Befund, daß sowohl ein MAGE-1-abgeleitetes Nonapeptid als auch ein MAGE-3-abgeleitetes Nonapeptid durch ein gewöhnliches HLA-Molekül präsentiert werden, unterstützt diese Behauptung. Solche Zellen können als universelle Effektor-Zellen angesehen werden, da die Anwesenheit von geeigneten Paaren aus HLA und Peptid auf der Oberfläche entweder zur Identifikation von spezifischen CTLs nach eigener Wahl oder zur Erzeugung einer CTL-Proliferation in einem therapeutischen Kontext führt. Solche Zellen, seien sie cotransfiziert oder mehrfach transfiziert, können als Vaccine dienen, wenn sie mit einem geeigneten Adjuvans kombiniert werden, wie sie im Stand der Technik gut bekannt sind. Die Behandlung von verschiedenen Krebszuständen, wie beispielsweise Melanom und Brustkrebs, kann unter Verwendung dieser Transfektanten durchgeführt werden.

[0067] Die Begriffe und Ausdrücke, die verwendent wurden, werden als Begriffe zur Beschreibung und nicht der Beschränkung verwendet, und es liegt keine Intention vor, durch Verwendung solcher Begriffe und Ausdrücke irgendwelche Äquivalente der gezeigten und beschriebenen Merkmale oder Teile davon auszuschließen, wobei ersichtlich ist, daß verschiedene Modifikationen innerhalb des Bereichs der Erfindung möglich sind.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:
VOM MAGE-3-GEN ABGELEITETES UND VON HLA-A1 PRÄSENTIERTES, ISOLIERTES NONAPEPTID UND DESSEN ANWENDUNGEN

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) KORRSPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Felfe & Lynch
(B) STRASSE: 805 Third Avenue
(C) STADT: New York City
(D) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 10022

(v) COMPUTERLESBARE FORM:
(A) MEDIENTYP: Diskette, 3,5 Zoll, 360 kb Kapazität
(B) COMPUTER: IBM PS/2
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS
(D) SOFTWARE: Wordperfect

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: 08/073,103
(B) ANMELDETAG: 07. JUNI 1993

(vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: 07/938,334
(B) ANMELDETAG: 31. AUGUST 1992
(A) ANMELDENUMMER: 08/037,230
(B) ANMELDETAG: 26. MÄRZ 1993

(viii) DATEN DES VERTRETERS/ANWALTS:
(A) NAME: Hanson, Norman D.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30946
(C) AKTENZEICHEN/LISTENNUMMER: LUD 293.1

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSDATEN:
(A) TELEFON:(212) 688-9200
(B) TELEFAX: (212) 838-3884

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-1-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAA GCA GAC CCC ACC GGC CAC TCC TAT 27
Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr
5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-2-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-21-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-3-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GAA GTG GAC CCC ATC GGC CAC TTG TAC 27

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-4-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GAA GTG GAC CCC GCC AGC AAC ACC TAC 27

Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-41-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-5-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-51-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzelstrang

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLEKÜLART: genomische DNA

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: MAGE-6-Nonapeptid-Kodierungssequenz

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

GAA GTG GAC CCC ATC GGC CAC GTG TAC 27

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr

5

Patentansprüche

1. Isoliertes Nonapeptid zur Verwendung in der Therapie oder Diagnose, wobei das Nonapeptid ein MAGE-abgeleitetes Nonapeptid ist, das in der Lage ist, einen Komplex mit einem HLA-A1-Molekül zu bilden und die Lyse von Zellen hervorzurufen, die Komplexe aus dem Nonapeptid und dem HLA-Molekül präsentieren, wobei das Nonapeptid ausgewählt ist aus:

Glu Val Val Pro Ile Ser His Leu Tyr (SEQ ID NO: 2);

Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 3);

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4);

Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 5);

Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 6);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 7);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 8); und

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr (SEQ ID NO: 9).

2. Isoliertes Nonapeptid nach Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4).

3. In-vitro-Verfahren zur Feststellung der Bindung eines Testpeptids an ein MHC-Molekül, umfassend das Inkontaktbringen des Peptids mit einem MHC-Molekül in Kombination mit einem MHC-bindenden Nonapeptid und Feststellen des Bindungsgrades des Testpeptids oder des Nonapeptids mit dem MHC-Molekül, wobei das MHC-bindende Nonapeptid MAGE-abgeleitet und in der Lage ist, einen Komplex mit einem HLA-A1-Molekül zu bilden und die Lyse von Zellen hervorzurufen, die Komplexe aus dem Nonapeptid und dem HLA-Molekül präsentieren, wobei das Nonapeptid ausgewählt ist aus:

Glu Val Val Pro Ile Ser His Leu Tyr (SEQ ID NO: 2);

Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 3);

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4);

Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 5);

Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 6);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 7);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 8); und

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr (SEQ ID NO: 9).

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das MHC-Molekül von einer Zelle präsentiert wird, die mit einer Nukleinsäuresequenz transfiziert ist, die für das MHC-Molekül kodiert.

5. Immunogenes Molekül, umfassend ein an ein Trägermolekül gebundenes Nonapeptid, wobei das Nonapeptid MAGE-abgeleitet und in der Lage ist, einen Komplex mit einem HLR-A1-Molekül zu bilden und die Lyse von Zellen hervorzurufen, die Komplexe aus dem Nonapeptid und dem HLA-Molekül präsentieren, wobei das Nonapeptid ausgewählt ist aus:

Glu Val Val Pro Ile Ser His Leu Tyr (SEQ ID NO: 2);

Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 3);

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4);

Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 5);

Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 6);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 7);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 8); und

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr (SEQ ID NO: 9).

6. Isolierte, transfizierte nichtmenschliche Zellinie, die mit einem Nukleinsäuremolekül transfiziert ist, das für ein MAGE-abgeleitetes Nonapeptid kodiert, das in der Lage ist, einen Komplex mit einem HLA-A1-Molekül zu bilden und die Lyse von Zellen hervorzurufen, die Komplexe aus dem Nonapeptid und dem HLA-Molekül präsentieren, wobei das Nonapeptid ausgewählt ist aus:

Glu Val Val Pro Ile Ser His Leu Tyr (SEQ ID NO: 2);

Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 3);

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4);

Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 5);

Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 6);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 7);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 8); und

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr (SEQ ID NO: 9).

7. Isolierte, transfizierte nichtmenschliche Zellinie, die in der Lage ist, eine CTL-Antwort auszulösen, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül, das für ein HLA-Molekül kodiert, und ein Nukleinsäuremolekül, das für ein MAGE-abgeleitetes Nonapeptid kodiert, das in der Lage ist, einen Komplex mit einem HLA-A1-Molekül zu bilden und die Lyse von Zellen hervorzurufen, die Komplexe aus dem Nonapeptid und dem HLA-Molekül präsentieren, wobei das Nonapeptid ausgewählt ist aus:

Glu Val Val Pro Ile Ser His Leu Tyr (SEQ ID NO: 2);

Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 3);

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4);

Glu Val Asp Pro Ala Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 5);

Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 6);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 7);

Glu Ala Asp Pro Thr Ser Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 8); und

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr (SEQ ID NO: 9).

8. Isolierte, transfizierte nichtmenschliche Zellinie nach Anspruch 7, wobei das HLA-Molekül HLA-A1 ist und das Nukleinsäuremolekül für Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4) kodiert.

9. Isolierte, transfizierte nichtmenschliche Zellinie nach Anspruch 6 oder 7, wobei die Zellinie eine

Maus-Zellinie, eine COS-Zellinie, eine P1.HTR.A1-Zellinie oder eine P1.A1, MAGE-1-Zellinie ist.

10. Isolierte, transfizierte nichtmenschliche Zellinie nach Anspruch 7, transfiziert mit einer Mehrzahl von HLA-A1-Molekül-Kodierungssequenzen und einer Mehrzahl von Nonapeptid-Kodierungssequenzen.

11. Verfahren zur Feststellung der Empfindlichkeit einer menschlichen Zelle gegenüber der Lyse durch eine zytolytische T-Zelle, die spezifisch ist für einen Komplex aus einem MAGE-Antigen und einem HLA-Molekül, umfassend das Inkontaktbringen einer isolierten, transfizierten nichtmenschlichen Zellinie nach Anspruch 7 mit einem MAGE-Antigen, wobei die Zellinie mit einer Nukleinsäuresequenz transfiziert ist, die für ein HLA-Molekül kodiert, das für die menschliche Zelle charakteristisch ist, und mit einer Probe von für das MAGE-Antigen spezifischen zytolytischen T-Zellen, und das Feststellen der Lyse der transfizierten Zellinie als Feststellung der Empfindlichkeit der menschlichen Zellinie gegenüber der Lyse durch die zytolytische T-Zelle.

12. Verfahren zur Feststellung eines HLA-Moleküls, das ein MAGE-Antigen gegenüber einer zytolytischen T-Zelle präsentiert, umfassend das Kultivieren einer isolierten, transfizierten Zellinie nach Anspruch 10 mit einer Probe von für das MRGE-Antigen spezifischen zytolytischen T-Zellen, und das Feststellen von deren Lyse als Feststellung der Präsentation des MAGE-Antigens durch das HLA-Molekül.

13. Verfahren zur Überwachung der CTL-Aktivität bei einem Patienten, umfassend das Zusammenmischen einer CTL-Körperflüssigkeitsprobe des Patienten mit einer Zellinie nach Anspruch 7 in vitro und das Feststellen der Reaktion dazwischen als Messung der CTL-Aktivität bei dem Patienten.

14. Verfahren zur Hervorrufung der Proliferation von CTLs, umfassend das Inkontaktbringen einer CTL-haltigen Körperflüssigkeitsprobe eines Patienten in vitro mit einer Zellinie nach Anspruch 7, wobei die Zellinie ein MAGE-Nonapeptid präsentiert, für das mindestens eine CTL in der Probe spezifisch ist, wobei die mindestens eine CTL als Antwort auf das Nonapeptid proliferiert.

15. Verfahren zur Feststellung eines kanzerösen Zustandes, umfassend das Inkontaktbringen einer Probe von einem Patienten, der im Verdacht steht, einen kanzerösen Zustand zu haben, mit einer Substanz, die spezifisch an
(a) das Nonapeptid Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr (SEQ ID NO: 4) oder
(b) Komplexe aus einem HLA-A1-Molekül und dem Nonapeptid bindet, und das Feststellen der Bindung als Anzeichen für den kanzerösen Zustand.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

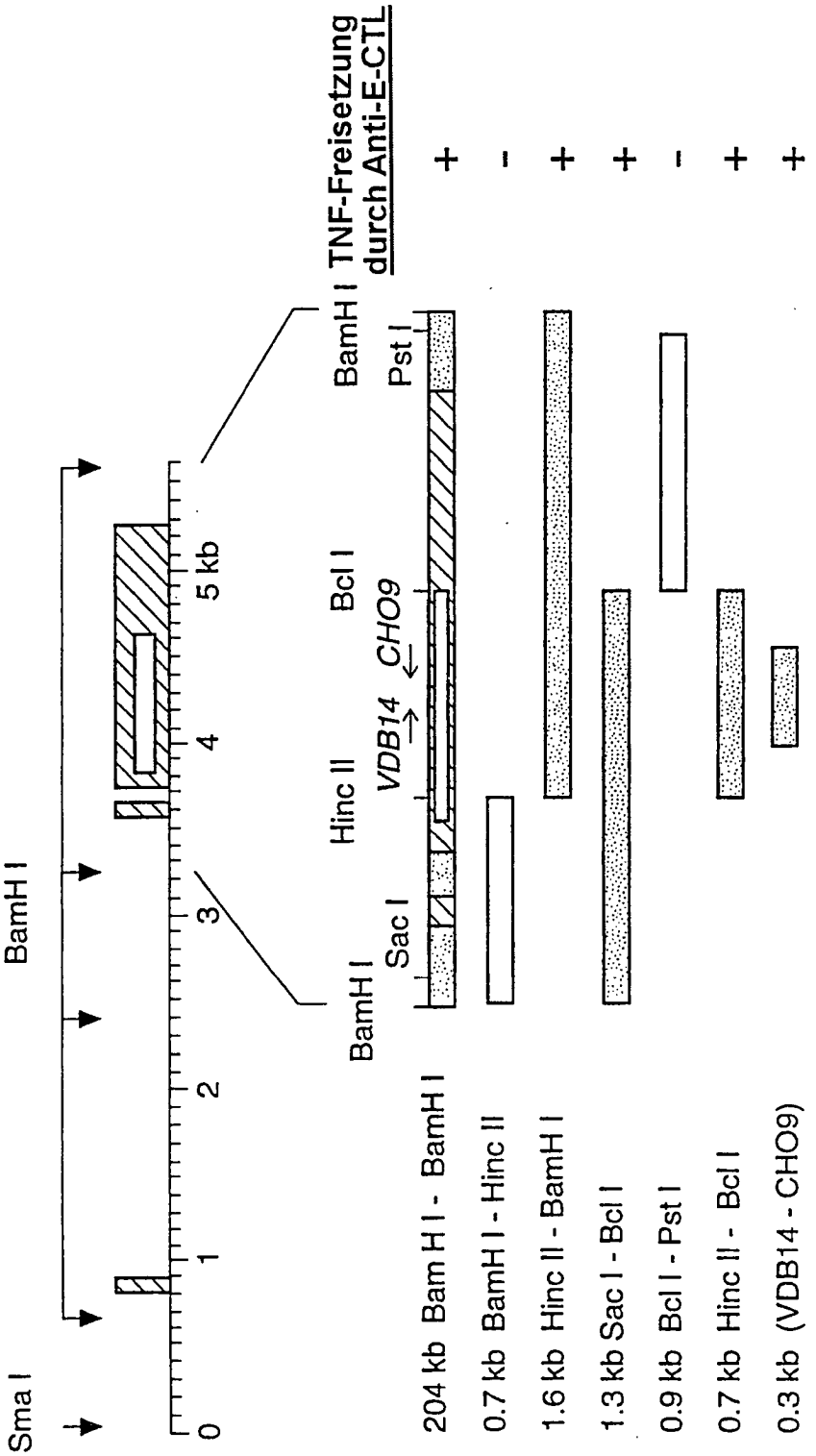


FIG. 2

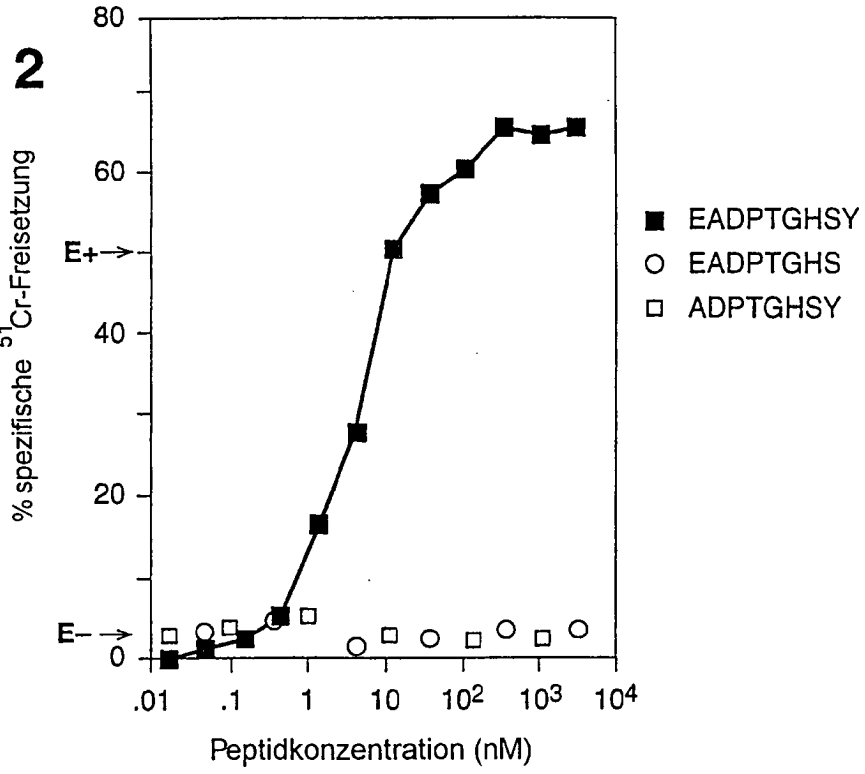

80
60
E+
40
20
E–
0
% spezifische 51Cr-Freisetzung
.01
.1
1
10
10²
10³
10⁴
Peptidkonzentration (nM)
EADPTGHSY
EADPTGHS
ADPTGHSY

FIG. 8

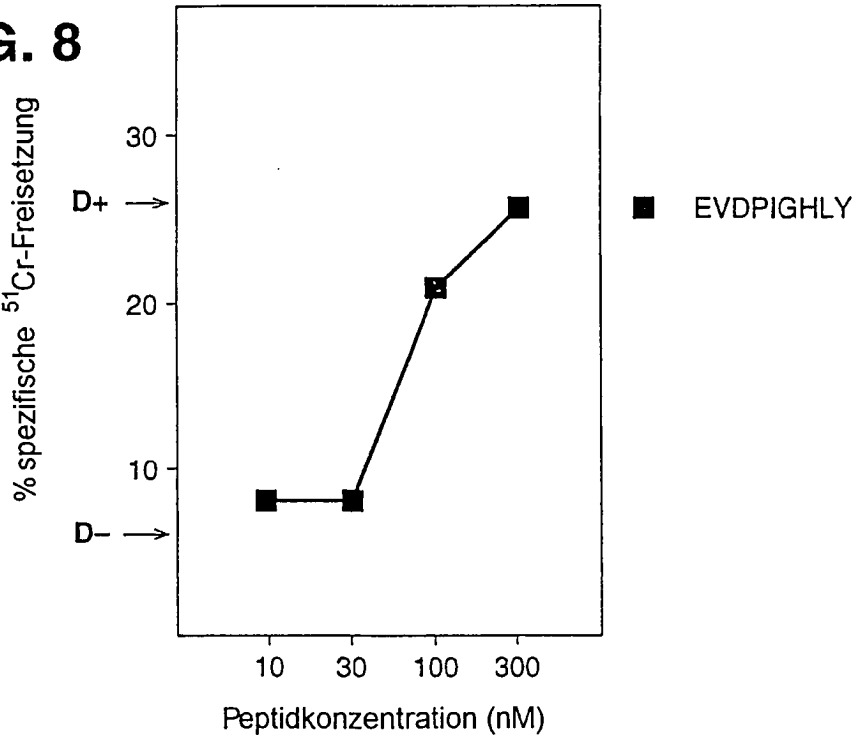

30
D+
20
10
D–
% spezifische 51Cr-Freisetzung
10
30
100
300
Peptidkonzentration (nM)
EVDPIGHLY

FIG. 3A

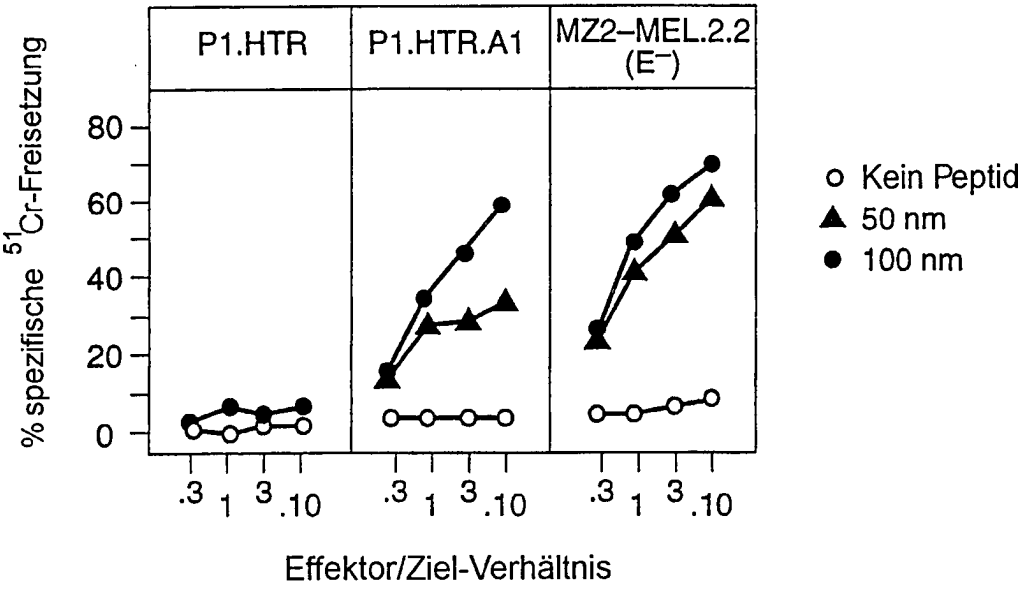

P1.HTR
P1.HTR.A1
MZ2–MEL.2.2 (E⁻)
% spezifische 51Cr-Freisetzung
80
60
40
20
0
.3 1 3 .10
Effektor/Ziel-Verhältnis
Kein Peptid
50 nm
100 nm

FIG. 3B

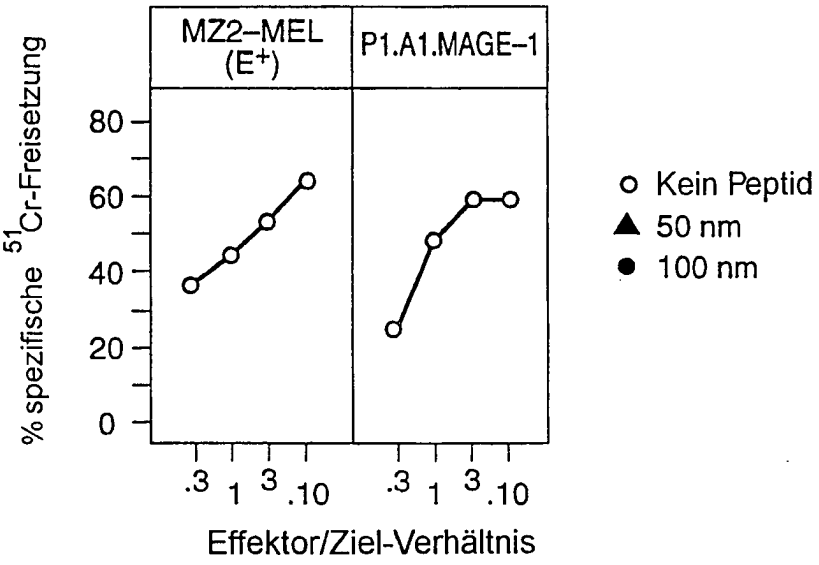

MZ2–MEL (E+)
P1.A1.MAGE–1
% spezifische 51Cr-Freisetzung
80
60
40
20
0
.3 1 3 .10
Effektor/Ziel-Verhältnis
Kein Peptid
50 nm
100 nm

FIG. 4

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

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

FIG. 5A

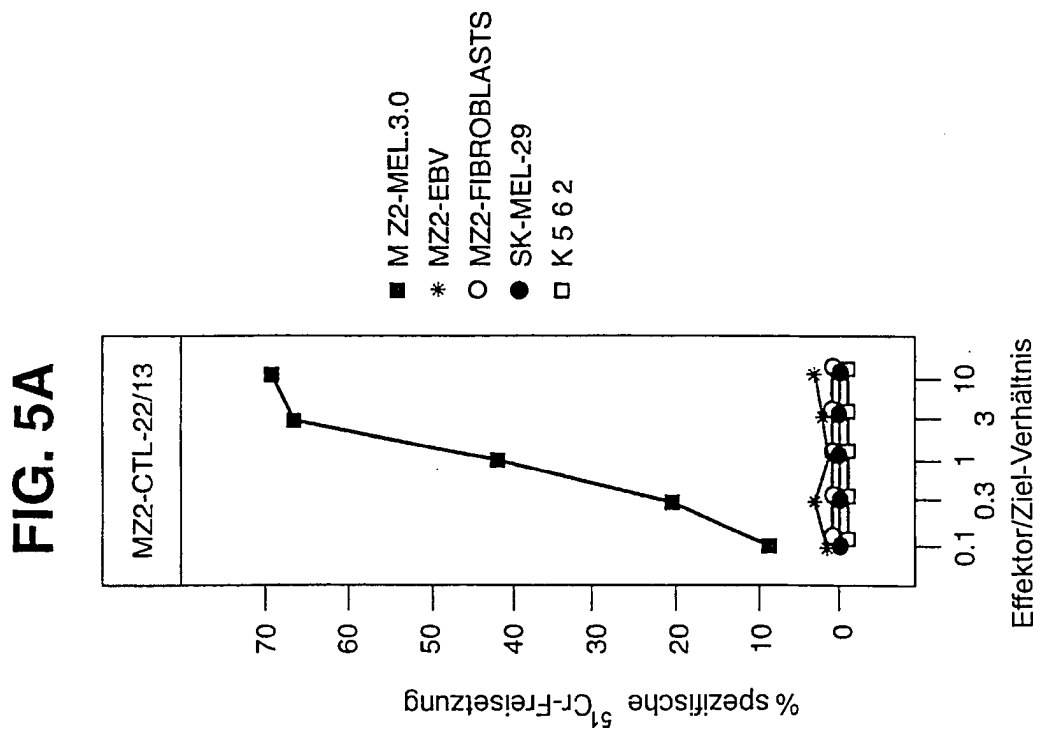

MZ2-CTL-22/13
M Z2-MEL.3.0
MZ2-EBV
MZ2-FIBROBLASTS
SK-MEL-29
K 5 6 2
% spezifische 51Cr-Freisetzung
0
10
20
30
40
50
60
70
0.1
0.3
1
3
10
Effektor/Ziel-Verhältnis

FIG. 5B

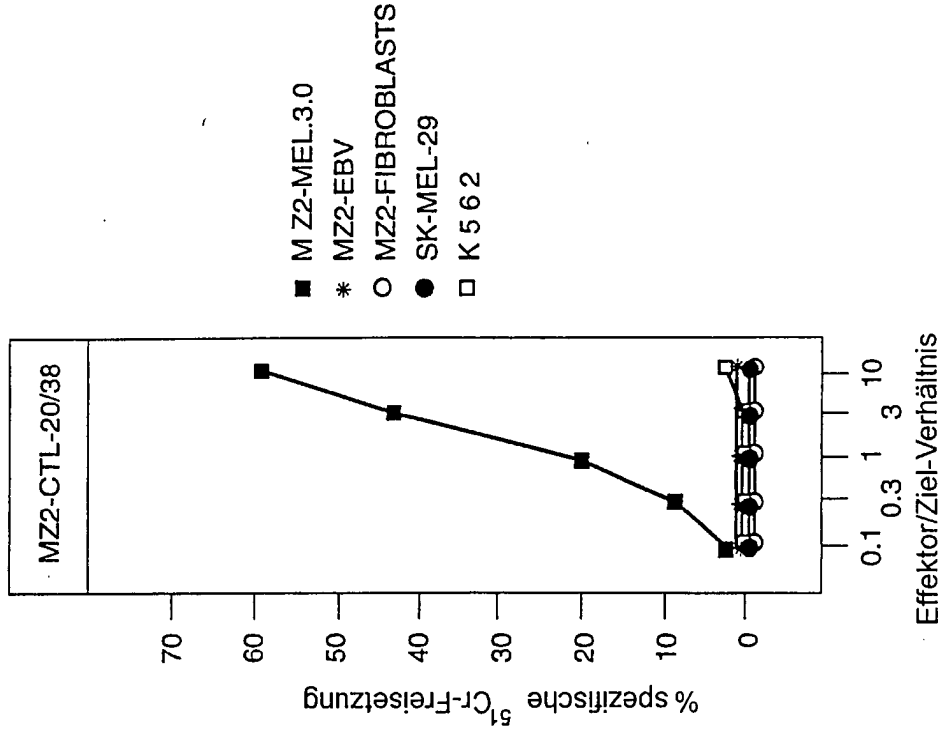

MZ2-CTL-20/38
M Z2-MEL.3.0
MZ2-EBV
MZ2-FIBROBLASTS
SK-MEL-29
K 5 6 2
% spezifische 51Cr-Freisetzung
0
10
20
30
40
50
60
70
0.1
0.3
1
3
10
Effektor/Ziel-Verhältnis

FIG. 6A

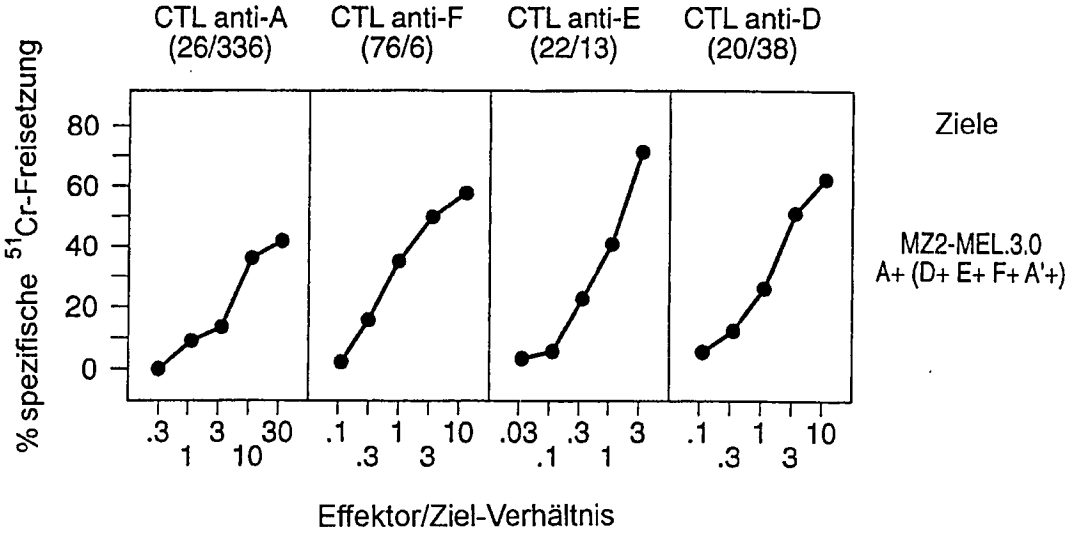

CTL anti-A (26/336)
CTL anti-F (76/6)
CTL anti-E (22/13)
CTL anti-D (20/38)
% spezifische 51Cr-Freisetzung
80
60
40
20
0
.3 1 3 10 30
.1 .3 1 3 10
.03 .1 .3 1 3
.1 .3 1 3 10
Effektor/Ziel-Verhältnis
Ziele
MZ2-MEL.3.0
A+ (D+ E+ F+ A'+)

FIG. 6B

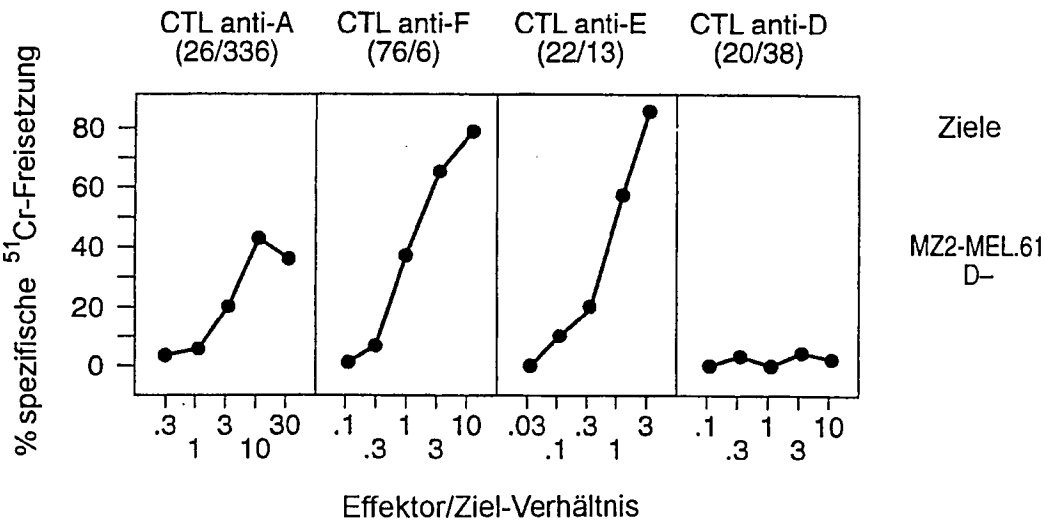

CTL anti-A (26/336)
CTL anti-F (76/6)
CTL anti-E (22/13)
CTL anti-D (20/38)
% spezifische 51Cr-Freisetzung
80
60
40
20
0
.3 1 3 10 30
.1 .3 1 3 10
.03 .1 .3 1 3
.1 .3 1 3 10
Effektor/Ziel-Verhältnis
Ziele
MZ2-MEL.61
D–

FIG. 6C

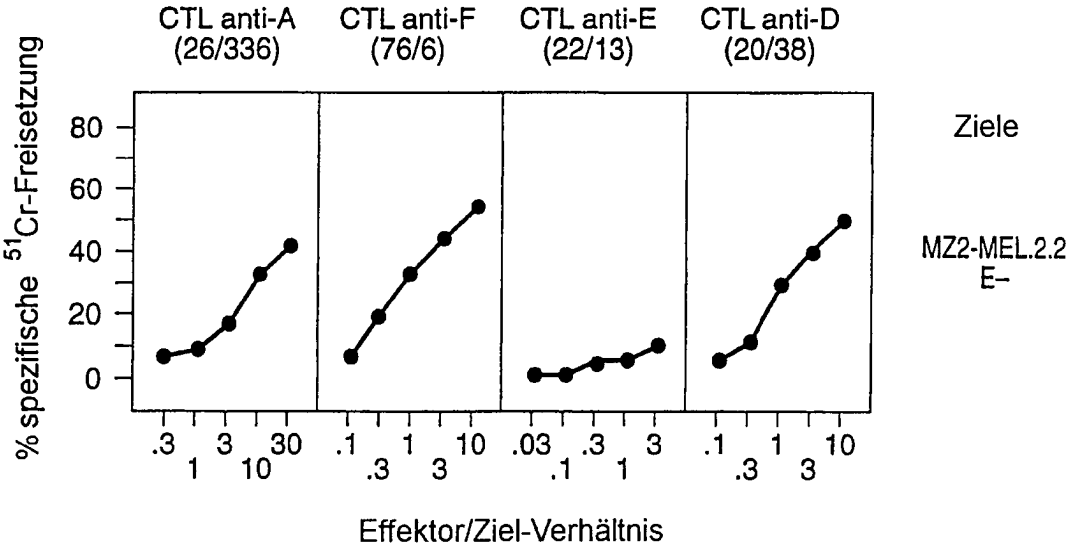
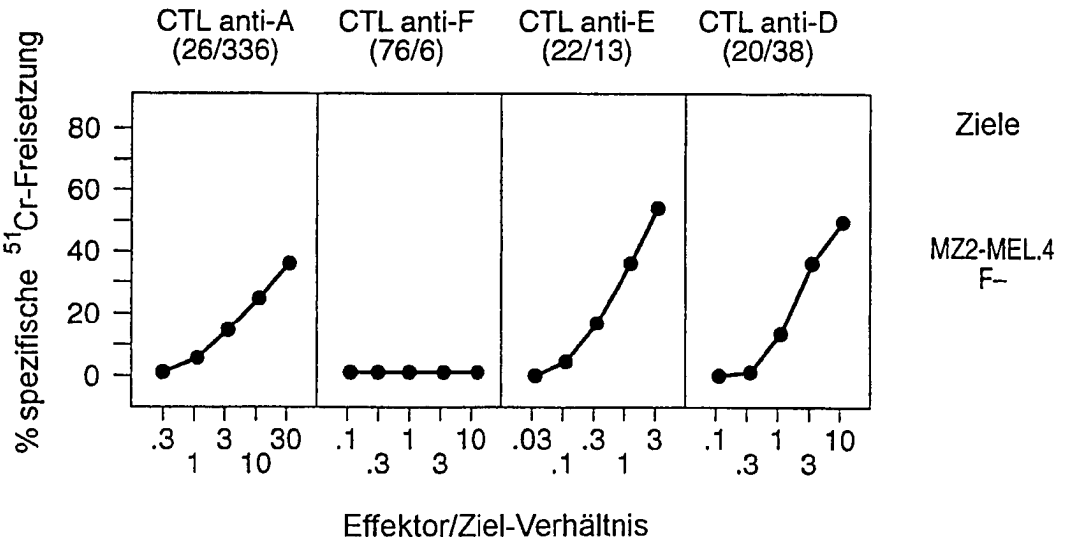

CTL anti-A (26/336)
CTL anti-F (76/6)
CTL anti-E (22/13)
CTL anti-D (20/38)
% spezifische 51Cr-Freisetzung
80
60
40
20
0
.3 1 3 10 30
.1 .3 1 3 10
.03 .1 .3 1 3
.1 .3 1 3 10
Effektor/Ziel-Verhältnis
Ziele
MZ2-MEL.2.2 E-

FIG. 6D


CTL anti-A (26/336)
CTL anti-F (76/6)
CTL anti-E (22/13)
CTL anti-D (20/38)
% spezifische 51Cr-Freisetzung
80
60
40
20
0
.3 1 3 10 30
.1 .3 1 3 10
.03 .1 .3 1 3
.1 .3 1 3 10
Effektor/Ziel-Verhältnis
Ziele
MZ2-MEL.4 F-

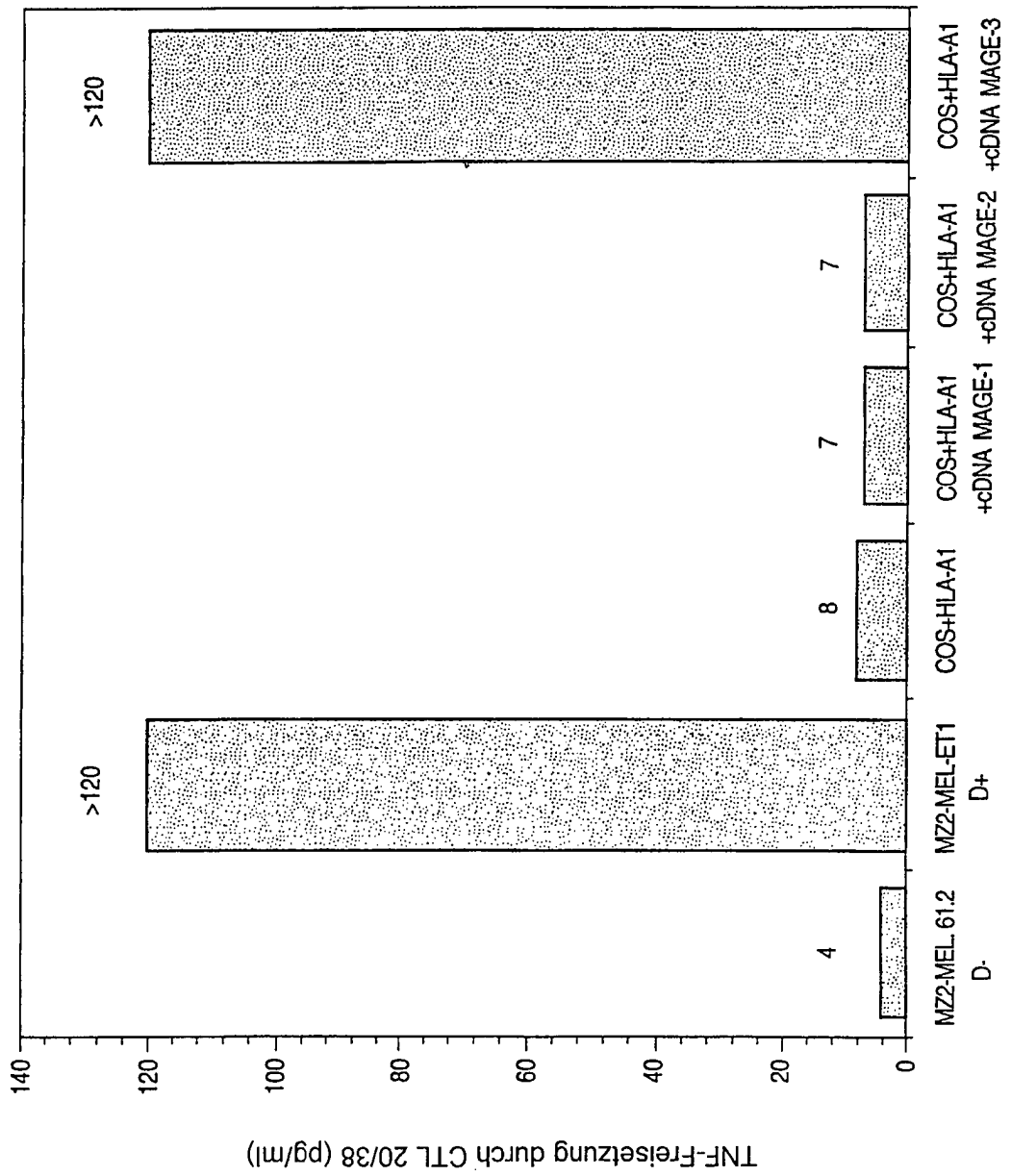

TNF-Freisetzung durch CTL 20/38 (pg/ml)
0
20
40
60
80
100
120
140
4
>120
8
7
7
>120
MZ2-MEL 61.2
MZ2-MEL-ET1
COS+HLA-A1
COS+HLA-A1
COS+HLA-A1
COS+HLA-A1
D-
D+
+cDNA MAGE-1
+cDNA MAGE-2
+cDNA MAGE-3

FIG. 7