

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/82

C07K 7/00 C12N 15/00

A61K 39/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99810209.1

[43] 公开日 2001 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 1314916A

[22] 申请日 1999.7.30 [21] 申请号 99810209.1

[30] 优先权

[32] 1998.7.31 [33] JP [31] 218093/1998

[86] 国际申请 PCT/JP99/04130 1999.7.30

[87] 国际公布 WO00/06602 日 2000.2.10

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.27

[71] 申请人 杉山治夫

地址 日本大阪

[72] 发明人 冈芳弘 杉山治夫

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 杨宏军

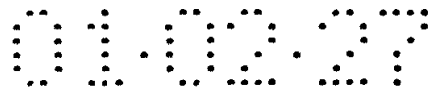
权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图页数 16 页

[54] 发明名称 基于癌抑制基因 WT1 的产物的癌抗原

[57] 摘要

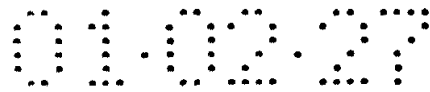
本发明涉及 Wilms 肿瘤癌抑制基因 WT1 的产物,以该氨基酸序列中包括与 I 类主要组织适合性抗原 (MHC) 结合的锚定氨基酸在内的连续 7~30 个氨基酸构成的肽作为有效成分的癌抗原,以及含有它们的癌疫苗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权利要求书

- 1、癌抗原，以癌抑制基因 WT1 的产物或其一部分肽作为活性成分。
- 2、如权利要求 1 所述的癌抗原，以序列号 1 的氨基酸序列中包括用于与 MHC 分子结合所必需的锚定氨基酸在内的 7~30 个连续氨基酸构成的肽为活性成分，或者以序列号 2 的氨基酸序列中包括用于与 MHC 分子结合所必需的锚定氨基酸在内的 7~30 个连续氨基酸构成的肽作为活性成分。
- 3、如权利要求 1 或 2 所述的癌抗原，所说的抗原是带来癌抑制基因 WT1 高度表达的癌抗原。
- 4、如权利要求 1 或 2 所述的癌抗原，所说的癌为白血病、骨髓形成综合症、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、胃癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、胚细胞癌、肝癌、皮肤癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、子宫颈癌或卵巢癌。
- 5、如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的癌抗原，所说的肽为以下任意一种：
K^b 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (序列号 3)
K^b 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (序列号 4)
D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (序列号 5)
D^b 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (序列号 6)
D^b 235 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (序列号 7)
WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (序列号 8)
- 6、如权利要求 5 所述的癌抗原，所说的肽为
D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (序列号 5)
或
WH 187 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (序列号 8)
- 7、癌疫苗，含有权利要求 1 至 6 中任意一项所述的癌抗原。



说明书

基于癌抑制基因 WT1 的产物的癌抗原

技术领域

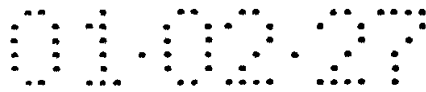
本发明涉及以 Wilms 肿瘤的癌抑制基因 WT1 的产物为基础的癌抗原。该癌抗原作为针对白血病、骨髓异形成综合症、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤等血癌或实体瘤，例如胃癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、胚细胞瘤、肝癌、皮肤癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、子宫颈癌、卵巢癌等以及 WT1 表达的所有癌的抗癌疫苗上有用的。

背景技术

用于排除异物的免疫机构一般包括与识别抗原作为抗原提示细胞作用的巨噬细胞、识别该巨噬细胞的抗原提示产生各种淋巴因子使其他 T-细胞等活化的辅助 T 细胞、通过该淋巴因子的作用分化成抗体产生细胞的 B 淋巴细胞等有关的体液免疫以及接受抗原提示分化成的杀伤 T 细胞攻击破坏靶细胞的细胞免疫。

现在，认为癌的免疫主要是与杀伤 T 细胞有关的细胞性免疫引起的。在杀伤 T 细胞引起的癌免疫中，识别以主要组织适合抗原 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 第 I 类与癌抗原形成的复合体形式提示的癌抗原的前体 T 细胞分化增殖生成的杀伤 T 细胞攻击破坏癌细胞。这时，癌细胞在其细胞表面提示 MHC 第 I 类抗原与癌抗原形成的复合体，它成为杀伤 T 细胞的靶细胞 (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev, 146, 167, 1995)。

作为靶细胞的癌细胞上通过 MHC 第 I 类抗原提示的上述癌抗原可以认为是癌细胞内合成的抗原蛋白质被细胞内蛋白酶处理生成的约 8 ~ 12 个氨基酸构成的肽 (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。



现在，对于各种癌进行了抗原蛋白质的检索，证明是癌特异抗原的物质较少。

Wilms 肿瘤的癌抑制基因 WT1 (WT1 基因) 是根据对 Wilms 肿瘤、无红彩、泌尿生殖器异常、精神发达迟滞等并发的 WAGR 综合症的解析，作为 Wilms 肿瘤的一种原因基因从染色体 11p13 分离出的物质 (Gessler, M. 等, Nature, Vol. 343, p. 774-778 (1990)), 基因组 DNA 通过约 50kb 由 10 个外显子构成，其 cDNA 为约 3kb。由 cDNA 推测出的氨基酸序列如序列号 1 所示 (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991)。

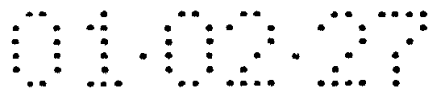
WT1 基因在人白血病中高度表达，用 WT1 反义低聚物 (antisense oligomer) 处理白血病细胞能够抑制其细胞增殖 (特开平 9-104627 号公报) 等提示 WT1 基因可以促进白血病细胞的增殖。而且，WT1 基因在胃癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、胚细胞癌、肝癌、皮肤癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、子宫颈癌、卵巢癌等实体瘤中高度表达 (特愿平 9-191635)，判断出 WT1 基因是白血病和实体瘤中新的肿瘤标识物。但是，尚未证明 WT1 基因表达产物是作为癌疫苗有用的癌特异抗原。

发明公开

因此，本发明确认了 WT1 基因表达产物作为癌抗原的可能性，提供了一种新型癌抗原。

本发明人为了解决上述问题进行了各种研究，结果合成了 WT1 基因表达产物的氨基酸序列中含有被预测在小鼠和人的 I 类 MHC 和 II 类 MHC 的结合中作为锚定氨基酸 (anchor amino acid) 起作用的至少 1 个氨基酸的连续 7~30 个氨基酸构成的多肽，确认这些肽与 MHC 蛋白质结合，同时确认与 I 类 MHC 抗原结合时诱导杀伤 T 细胞，而且对靶细胞具有杀细胞效果，从而完成了本发明。

因此，本发明提供小鼠 WT1 表达产物或含有其一部分的癌抗原。在优选的方式中，本发明提供以与 WT1 的 cDNA 对应的序列号 1 所示的氨基酸序列中包括用于与 MHC 抗原结合的锚定氨基酸在内的 6~30 个氨基酸构成的肽作为活性成分的癌抗原。



而且本发明提供以与人 WT1 的 cDNA 对应的序列号 2 所示的氨基酸序列中包括用于与 MHC 抗原结合的锚定氨基酸在内的 7~30 个氨基酸构成的肽作为活性成分的癌抗原。

本发明还提供含有上述癌抗原的癌疫苗。

附图的简单说明

图 1 表示实施例 1 中用 D^b126 肽免疫的细胞与非免疫细胞在流式细胞测量法中 CD4⁺细胞与 CD8⁺细胞的比例。

图 2 是比较实施例 2 中用 D^b126 肽免疫的细胞对于用 D^b126 肽脉冲的靶细胞和未脉冲的靶细胞的杀细胞作用。

图 3 是与图 2 含义相同的图。

图 4 中 A 表示实施例 3 中使用 D^b126 肽诱导的 CTL 对于用 D^b126 肽脉冲的 T2 细胞的杀细胞效果, B 表示实施例 3 中使用 WH187 肽诱导的 CTL 对于用 WH187 肽脉冲的 T2 细胞的杀细胞效果。

图 5 表示由 D^b126 肽诱导的 CTL 的表面标识物通过 FACS 解析的结果 (CD19 细胞以及 CD3 细胞)。

图 6 表示 CD4 细胞以及 CD8 细胞与图 5 同样的图。

图 7 表示 CD56 细胞与图 5 同样的图。

图 8 表示 WH187 肽诱导的 CTL 的表面标识物通过 FACS 解析的结果 (CD19 细胞和 CD3 细胞)。

图 9 表示 CD4 细胞和 CD8 细胞与图 8 同样的图。

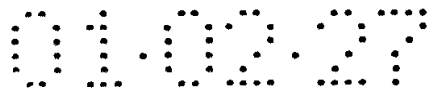
图 10 表示 CD56 细胞与图 8 同样的图。

图 11 表示抗 HLA - A2.1 抗体对 D^b126 肽特异性 CTL 引起的对于用 D^b126 肽脉冲的 T2 细胞的特异性细胞溶解的影响。

图 12 是比较 D^b126 肽特异性 CTL 对于表达 WT1 的靶细胞或不表达 WT1 的靶细胞的细胞溶解活性。a 表示 E:T 比为 7.5:1 的情况下的结果, b 表示 E:T 比为 15:1 的情况下的结果。

图 13 是比较 D^b126 肽特异性 CTL 对于先天表达 WT1 的肿瘤细胞 (FBL3) 或不表达 WT1 的肿瘤细胞 (RMA) 的细胞溶解效果。

图 14 是比较 D^b126 肽特异性 CTL 对于用 WT1 基因胞质转移的细胞



以及未进行胞质转移的同一细胞的细胞溶解效果。

图 15 表示 I 类抗 H-2 抗体对 D^b126 肽特异性 CTL 的细胞毒性的影响。

图 16 表示使用 D^b126 肽作为疫苗使用，免疫小鼠时的体内免疫效果。

图 17 表示将表达 WT1 的质粒作为 DNA 疫苗投给小鼠时的免疫效果。

图 18 是图 17 的对照，是表示投给不表达 WT1 的质粒时不产生免疫效果的图。

发明的实施方式

本发明中，作为设计癌抗原肽时的基础，选择小鼠 I 类 MHC 的 K^b 和 D^b，以及人 HLA 的 A*0201，选择预测与它们具有高亲和性的肽。

根据 Immunogenetics Vol. 41, p. 178-228 (1995) 的记载，预测与 K^b 结合的锚定氨基酸是 5 号的 Phe 和 Tyr 以及 8 号的 Leu 和 Met 等，另外预测与 D^b 结合的锚定氨基酸是 5 号的 Asn 以及 9 号的 Met 和 Ile 等。

另外，已知癌细胞表面上 I 类 MHC 提示的癌抗原肽的大小为约 8~12 个。因此，本发明的癌抗原肽是序列号 1 所示 WT1 基因产物的氨基酸序列中包括锚定氨基酸在内的连续 7~30 个氨基酸构成的肽。氨基酸的数目优选为 8~12 个，例如 8 或 9 个。

在本发明中，作为其具体例子，I 类 MHC 与 K^b 结合的肽使用由 8 个氨基酸构成的下述肽：

K^b 45 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu (序列号 3)

K^b 330 Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (序列号 4)

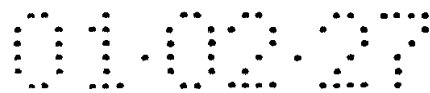
I 类 MHC 与 D^b 结合的肽使用由 9 个氨基酸构成的下述肽：

D^b 126 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (序列号 5)

D^b 221 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met (序列号 6)

D^b 235 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (序列号 7)

上述序列中带下划线的氨基酸是被预测作为锚发挥作用的氨基酸。



其次，使用未提示抗原肽 (empty) 但表达 K^b 以及 D^b 的细胞线测定这些肽中 K^b45 以及 K^b330 与 I 类 MHC 的 K^b 的结合性， D^b126 、 D^b221 和 D^b235 与 I 类 MHC 的 D^b 的结合性。

也就是说，在 26°C 下培养 RMA-S，使 I 类 MHC 高度表达，在 37°C 下培养该培养细胞与被测肽溶液 1 小时。这样，不与肽结合的 MHC 分子变得不稳定，从细胞表面消失，仅残留与肽结合的 I 类 MHC 分子。其次，用识别 I 类 MHC (K^b , D^b) 的荧光标识单克隆抗体给 RMA-S 细胞染色。最后，通过 FACS 解析，由每个细胞的平均荧光量计算结合解离常数 (Immunol. Lett., 47, 1, 1995)。

结果，得到了下述结果。

K^b 45	- 4. 5 7 8 4 8 3 8 (log)
K^b 330	- 5. 7 6 1 7 7 3 2
D^b 126	- 6. 2 8 3 4 9 6 8
D^b 221	- 5. 7 5 4 5 3 9 8
D^b 235	- 6. 1 4 5 7 6 2 4

如上所述，与 K^b 或 D^b 具有强~中度的结合亲和性 (kd 值) 但显示最高结合亲和性的 D^b126 肽在以后的实验中被使用。

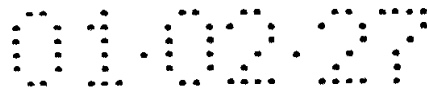
另外，对于人，根据 Immunogenetics Vol. 41, p, 178-228 (1995) 的记载，预测与人 HLA-A*0201 结合的锚定氨基酸是 N-末端至 2 号 Leu 和 Met 以及 N-末端至 9 号 Val 和 Leu。因此合成了人 WT1 蛋白质的氨基酸序列 (Mol. Coll. Biol. Vol. 11, p. 1707-1712, 1991) (序列号 2) 中符合上述条件的 9 个氨基酸构成的 2 种肽。

D^b 126; Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (序列号 5)
(与小鼠中 D^b126 的序列相同)

WH 187; Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (序列号 8)
(下划线表示锚定氨基酸)

如下所述测定上述肽与 HLA-A*0201 的结合能。

在 37°C 下培养上述肽与具有 empty 的 HLA-A*0201 的 T2 细胞 (J. Immunol., 150, 1763, 1993; Blood, 88, 2450, 1996) 1 小时后，用



识别 HLA - A2.1 的荧光标识单克隆抗体给 T2 细胞染色，通过 FACS 解析，由每个细胞的平均荧光量计算结合解离常数。

结合能	
肽	Kd (M)
D ^b 126	1.89×10^{-6}
WH187	7.61×10^{-6}

2 种肽均具有中度以上的结合亲和性。

使用上述 D^b126 以及 WH187 作为与人 MHC 对应的肽，进行以下试验。

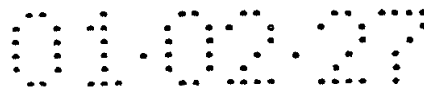
本发明还涉及以上述抗原为有效成分的癌疫苗。该疫苗可以用于 WT1 基因的表达水平上升伴有的癌，例如白血病、骨髓异形成综合症、多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤等血癌，胃癌、大肠癌、肺癌、乳腺癌、胚细胞癌、肝癌、皮肤癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫癌、子宫颈癌、卵巢癌等实体瘤的预防或治疗。该疫苗可以通过口服给药或非口服给药，例如腹腔内给药、皮下给药、皮内给药、肌肉内给药、静脉内给药、鼻腔内给药等形式给药。

而且，作为本发明疫苗的给药方法，也可以从患者的末梢血收集单核细胞，从中取出分叶细胞，用本发明的肽脉冲，通过给患者皮下给药等返回到患者中的方法。

疫苗除上述作为有效成分给药的肽之外，还可以含有可药用的载体，例如适当的佐剂，例如氢氧化铝等矿物胶；溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇等表面活性剂；聚阴离子；肽；或油乳浊液。或者，也可以混合到脂质体中，或含有多糖和/或疫苗中配合的其它集合体。给药量一般每天 $0.1 \mu\text{g} \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$ 。

另外本发明中编码上述多肽疫苗的 DNA 也可以作为疫苗 (DNA 疫苗) 使用。也就是说，通过将编码 WT1 或其一部分的核酸，优选将 DNA 插入适当的载体，优选插入表达载体中后，投给动物，可以产生癌免疫。其具体例子如实施例 9 所示。

实施例



其次结合实施例说明本发明的肽作为癌抗原和癌疫苗是有用的。

实施例 1

在 C57BL/6 小鼠的腹腔内每周注射 2 次 D^b126 肽 100 μ g、来源于猪的乳酸脱氢酶 (LDH) 200 μ g 以及弗罗因德不完全佐剂 0.5ml, 进行免疫处理。该免疫处理 1 周后摘出小鼠的脾脏, 配制脾脏细胞的悬浮液。另一方面, 在 37 $^{\circ}$ C 下, 培养用 D^b126 肽脉冲的同系小鼠的放射线照射脾细胞和含有肽 50 μ g/ml 的溶液 30 分钟, 作为抗原提示细胞。

将上述免疫处理后的脾细胞与放射线照射脾细胞混合, 一同培养 5 日, 诱导配制杀伤 T 细胞。另一方面, 用 D^b126 肽脉冲 (与 100 μ g/ml 的肽溶液在 37 $^{\circ}$ C 下培养 30 分钟) 的 Europium 标记 EL-4 细胞 (表达 K^b 和 D^b) 作为靶细胞, 采用常规方法, 按照下述操作进行 Killing 分析 (表 1)。

结果, 以 D^b126 脉冲的 EL-4 细胞作为靶时可见杀细胞效果, 但以未用 D^b126 脉冲的 EL-4 细胞作为靶时, 几乎见不到杀细胞效果。

表 1

	小鼠 A	小鼠 B
肽 +	76.6%	37.2%
肽 -	4.9%	0.9%

E/T 比 40:1

其次, 将 Killing 分析中具有显著杀细胞效果的脾细胞试样用荧光标识的抗 CD4 抗体和抗 CD8 抗体染色, 通过流式细胞测量法解析 CD4 和 CD8 的表达。

结果, 如图 1 所示, 与非免疫对照细胞相比, 用 D^b126 肽进行免疫处理的脾细胞中, 杀伤 T 细胞代表的 CD8⁺ 细胞增加, CD8⁺ 细胞对于辅助 T 细胞等代表的 CD4⁺ 细胞的比例反向增加。

实施例 2

如下所述配制来源于 C57BL/6 小鼠骨髓的分叶细胞 (dendritic cells, DC)。按照常规方法, 在 GM-CSF 存在下培养骨髓细胞, 配制来源于骨髓的分叶细胞 (J. Exp. Med. 182, 255, 1995)。

将培养 7 天后的分叶细胞与 $10\mu\text{M}$ 的 OVAII (Ovalbumin II) 以及 $1\mu\text{M}$ 的 D^b126 肽一同培养 3 小时后, 洗净。

其次, 将上述 DC 细胞由皮内注射到 C57B1/6 小鼠的 foot pads 和 hands 上, 第 5 日取出所属淋巴结, 配制细胞悬浮液。另一方面, 配制用 D^b126 肽脉冲、放射线照射的 B7.1-RMA-S 细胞 (转染编码 Co-stimulatory molecule——B7.1 的基因的 RMA-S 细胞)。

其次, 通过混合培养上述来源于淋巴结的细胞悬浮液和 B7.1-RMA-S 细胞, 在体外进行再刺激。

其次, 在体外进行再刺激的第 5 天, 以 ⁵¹Cr 标记的 RMA-S 细胞作为靶, 进行 Killing 分析。以再刺激第 5 天回收的淋巴细胞总体的 1/8 用作效应细胞时作为最大 E/T 比 (1.0)。

如图 2 和图 3 所示, 用 D^b126 肽免疫的来源于小鼠淋巴结的效应细胞杀死了用该肽脉冲的靶细胞, 相反却没有杀死未用该肽脉冲的靶细胞。

另外, 与实施例 1 同样用流式细胞测量法解析 CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞的比为 CD4:CD8=1:1.4~1.7, 与非免疫小鼠细胞 (对照) 相比, 用 D^b126 肽免疫的小鼠细胞中 CD8⁺细胞增加, CD4⁺细胞:CD8⁺细胞的比 (对照细胞中为约 2:1) 在免疫的细胞中逆转。

实施例 3

共同培养与肽 D^b126 或 WH187 ($40\mu\text{g}/\text{ml}$) 培养 1 小时后用放射线照射的 T2 细胞 2×10^4 个与具有 HLA-A*0201 的健康人末梢单核细胞 1×10^6 个。一周后, 在上述共同培养体系中加入与肽 ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 培养 1 小时后用放射线照射的 T2 细胞, 进行再刺激。第二天, 在培养液中加入人 IL-2 (最终浓度 $100 \text{ JRU}/\text{ml}$)。

以后, 用肽脉冲后经放射线照射的 T2 细胞反复刺激 5 次后, 以肽被脉冲的 T2 细胞或肽未被脉冲的 T2 细胞作为靶, 进行 Killing 分析。另外, 对诱导的 CTL 的表面标识物进行 FACS 解析。

Killing 分析按照常规方法以用 Europium 标记的 T2 细胞脉冲肽得到的物质作为靶进行。

Effector: Target 比 (E/T 比) 为 10:1

共同培养时间: 3 小时

培养液中的肽浓度: 5 μ g/ml

结果如图 4 所示。图 4 中 A 表示用 D^b126 肽诱导的 CTL 对 D^b126 肽脉冲的 T2 细胞的杀细胞效果, 图 4 中 B 表示用 WH187 肽诱导的 CTL 对 WH187 脉冲的 T2 细胞的杀细胞效果。

在任何一种场合下, 对于用肽脉冲的 T2 细胞均可见较强的杀细胞效果。

FACS 解析的结果如图 5~10 所示。图 5~7 表示用 D^b126 肽诱导的人 CTL 的结果, 几乎所有的细胞都为 CD8 阳性。图 8~图 10 表示 WH187 肽诱导的人 CTL 的结果。CD4 阳性细胞和 CD8 阳性细胞数目几乎相同。

实施例 4

为了对 D^b126 肽特异性 CTL 的细胞溶解活性的 MHC 限制性进行试验, 使用抗 HLA-A2.1 单克隆抗体以阻滞 CTL 对于用肽脉冲的 T2 细胞的细胞毒性活性。在 E/T 比为 5:1 时, 在对 HLA-A2.1 分子的阻滞单克隆抗体 (BB7.2) 存在下或不存在下, 测定用 D^b126 肽脉冲的 T2 细胞的特异性细胞溶解。

结果如图 11 所示。该图中符号*表示用抗 H-2K^b 单克隆抗体代替抗 HLA-A2.1 单克隆抗体的结果。如该图说明的那样, 通过添加 60 μ g/ml 的抗 HLA-A2.1 单克隆抗体, 细胞毒性下降至 T2 细胞的细胞溶解底数。同型的无关单克隆抗体 (抗 H-2K^b 单克隆抗体 Y3) 对 T2 细胞的溶解没有效果。

实施例 5

对于 D^b126 肽特异性 CTL 是否能杀死先天表达 WT1 的 HLA-A2.1 阳性白血病细胞进行试验。使用 TF1 细胞 (表达 WT-1, HLA-A2.1 阳性)、JY 细胞 (不表达 WT1, HLA-A2.1 阳性) 以及 Molt-4 细胞 (表达 WT1, HLA-A2.1 阴性) 作为靶细胞, 在 E:T 比为 7.5:1 (a) 或 15:1 (b) 时, 测定细胞毒性。

结果如图 12 所示。D^b126 肽特异性 CTL 对于先天表达 WT1 的 HLA

- A2.1 阳性的白血病细胞 TF1 具有显著的细胞毒性，但对于 Molt-4（表达 WT1，HLA-A2.1 阴性）或 JY 细胞（不表达 WT1，HLA-A2.1 阳性）显示底数水平的细胞溶解。

实施例 6

对于 D^b126 肽特异性 CTL 是否能识别并溶解先天表达 WT1 的肿瘤细胞进行试验。对于表达 WT1 的肿瘤细胞（FBL3）或不表达 WT1 的肿瘤细胞（RMA）（图 13），或者转染 WT1 基因的 C1498 细胞或未转染 WT1 基因的 C1498 细胞（图 14），以图 13 和图 14 所示 E/T 比测定特异性细胞溶解。

如图 13 所示，D^b126 肽特异性 CTL 溶解先天表达 WT1 的 FBL3 细胞，不溶解不表达 WT1 的 RMA 细胞。而且如图 14 所示，与不表达 WT1 的母 C1498 细胞相比，D^b126 肽特异性 CTL 可以杀死转染小鼠 WT1 基因的 C1498 细胞。这样，由于 CTL 引起的杀细胞可以确认靶向的分子确实是 WT1 肽。这些结果表明 D^b126 肽特异性 CTL 可以通过 WT1 蛋白质的细胞内加工天然产生，而且可以识别 WT1 表达细胞的 H-2 D^b 分子上存在的 D^b126 肽或有关的肽。

实施例 7

为了对 CTL 的细胞溶解活性是否为 MHC 限制性进行试验，在 I 类 H-2 分子的抗体存在下进行测定。也就是说，在对 H-2 K^b（28.13.3S）、H-2 D^b（28.11.5S）或 H-2 L^d（MA143）的调整了效价的单克隆抗体存在下，测定 D^b126 肽特异性 CTL 引起的对于用 D^b126 肽脉冲的 RMA-S 细胞的细胞溶解活性。使用同型的单克隆抗体作为对照单克隆抗体。

结果如图 15 所示。随着 H-2 D^b 的抗体浓度增加，抑制 CTL 对于用 D^b126 肽脉冲的 RMA-S 细胞的细胞溶解活性，但是 H-2 K^b 或 H-2 L^d 的抗体不抑制 CTL 的细胞溶解活性。这些结果表明 CTL 发挥 H-2 D^b 限制性细胞溶解活性。

实施例 8

对于 D^b126 肽引起的积极免疫是否会导致生物体内肿瘤免疫进行试验。用 D^b126 肽脉冲的 LPS 活化脾细胞（图 16 中的实线）、单纯 LPS

活化脾细胞（网线）或单纯磷酸缓冲液（PBS）（虚线）使小鼠 1 周免疫 1 次。进行 3 周的免疫后，在腹腔内注射 3×10^7 个 FBL3 白血病细胞。

结果如图 16 所示。用 D^b126 肽免疫的小鼠克服了肿瘤挑战并生存下来，非免疫小鼠以及仅用 LPS 活化脾细胞免疫的小鼠不能拒绝肿瘤挑战而死亡。免疫小鼠和非免疫小鼠两者均在上述腹腔内接种肿瘤细胞后 3 天观察到腹水。非免疫小鼠的腹水继续增加，而且小鼠死亡。另一方面，免疫小鼠的腹水缓慢减少，小鼠完全拒绝肿瘤挑战，并生存下来。非免疫小鼠时刻可以观察到自然的退化（regression）。预测这种退化是特异性 CTL 对 Friend 白血病病毒（FBL3 白血病细胞是由该病毒进行胞质转移形成的）的自然诱导产生的。这是因为这种 CTL 诱导在 C57BL/6 小鼠中时刻可以观察到。

实施例 9 DNA 疫苗

给 6~8 周龄的 C57BL/6 小鼠每隔 10 天肌肉注射 100 μ g 表达 WT1 的质粒 DNA（将小鼠 WT1cDNA（Molecular and Cellular Biology, Vol. 11, No. 3, p. 1701-1712(1991), p. 1709 的左栏）的 Sau 3AI 片断连接在 CMV - IE 启动子上，制作持续表达 WT1 的质粒）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 11105-11109(1995)），共计 3 次。最后肌肉注射的 10 天后，取出小鼠的脾，调整脾细胞，与表达 WT1 的 mWT1C1498 细胞（40Gy 放射线照射）在 37 $^{\circ}$ C 下共同培养 6 天后，使用表达 WT1 的 C1498（PM5G - mWT1）和不表达 WT1 的 C1498（PM5G）作为靶细胞，进行 Killing 分析（用 Europium 标记）。另外，C1498 是不表达 WT1 的小鼠骨髓性白血病细胞株。

诱导产生了细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL），它可以杀死表达 WT1 的 C1498（PM5G - mWT1）细胞，但不杀死不表达 WT1 的细胞。

结果如图 17 所示。

作为对照，进行与上述相同的试验，用不表达 WT1（不具有 WT1cDNA）的质粒代替表达 WT1 的质粒给小鼠肌肉注射。与上述试验同样采取脾细胞，用表达 WT1 的 C1498（PM5G - mWT1）体外刺激后，进

行 killing 分析。

如图 18 所示，不具有 WT1cDNA 的对照质粒 DNA 的肌肉注射没有诱导 WT1 蛋白特异性 CTL。

上述结果证明本发明的肽确实发挥癌抗原的作用，诱导增殖针对癌细胞的杀伤 T 细胞（癌细胞伤害性 T 细胞）。因此，本发明的癌抗原肽作为针对伴有 WT1 基因表达上升的白血病和实体瘤的癌疫苗是有用的。

01007

100	105	110
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe		
115	120	125
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile		
130	135	140
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr		
145	150	155
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe		
165	170	175
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln		
180	185	190
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser		
195	200	205
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp		
210	215	220
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln		
225	230	235
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser		
245	250	255
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu		
260	265	270
Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile		
275	280	285
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser		
290	295	300
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys		
305	310	315
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys		
325	330	335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415

Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala
 435 440 445

Leu
 449

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

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

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

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile

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

Leu

449

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 3

Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu

1

5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 5

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合在肽

<400> 6

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 7

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 8

Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val

1

5

说明书附图

图 1

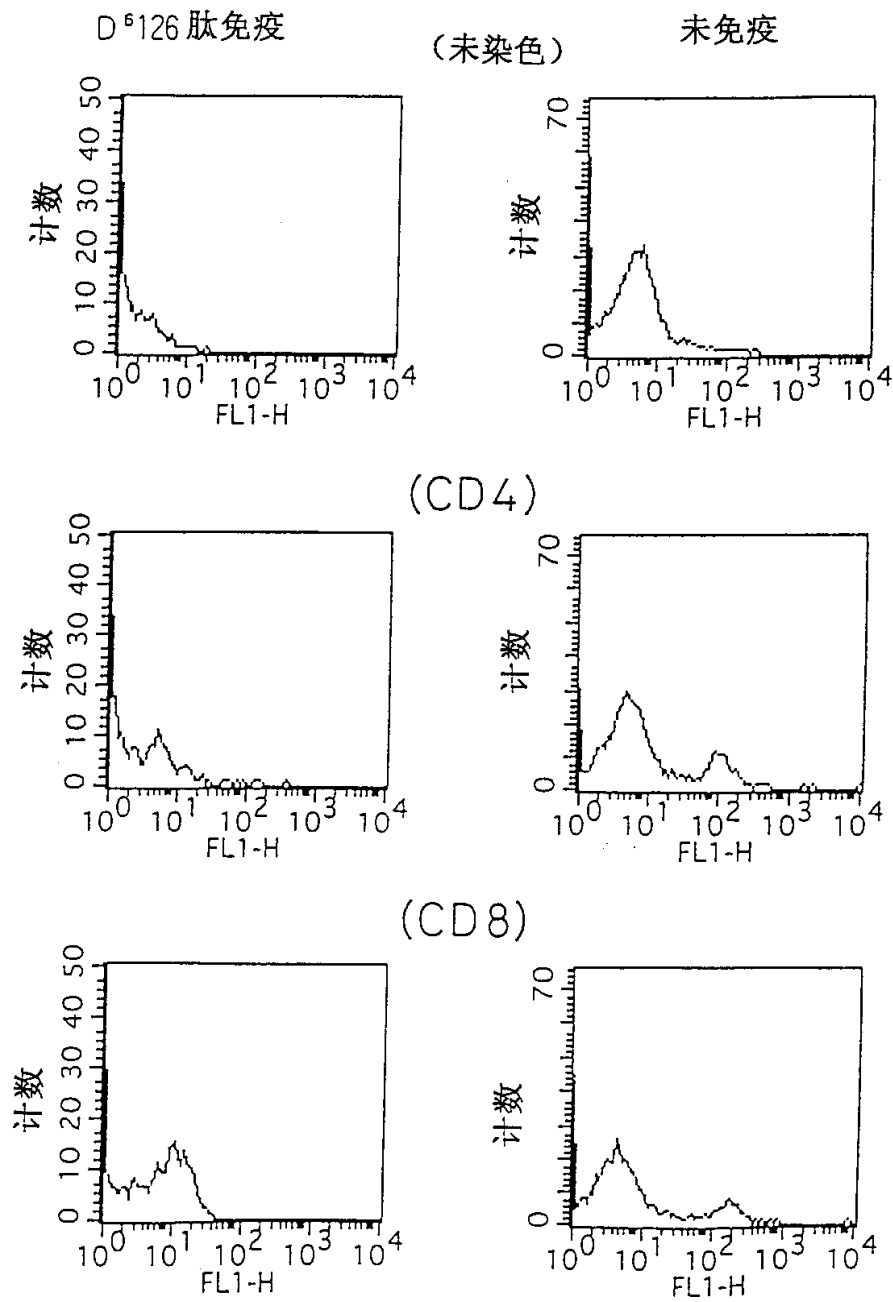
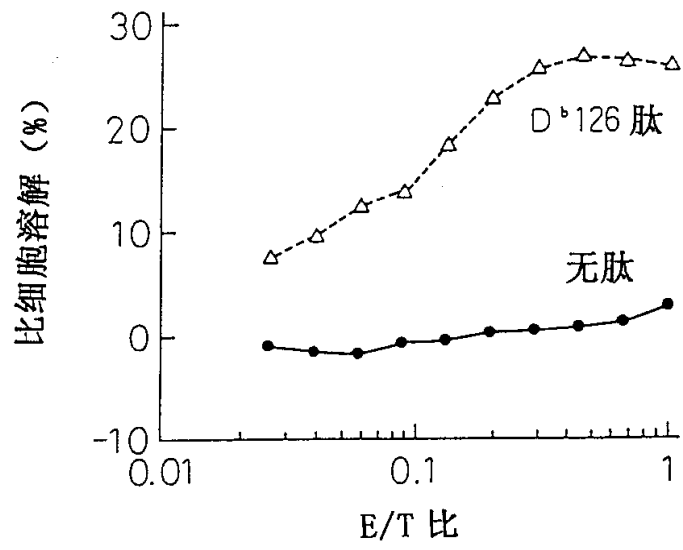


图 2

小鼠 1



小鼠 2

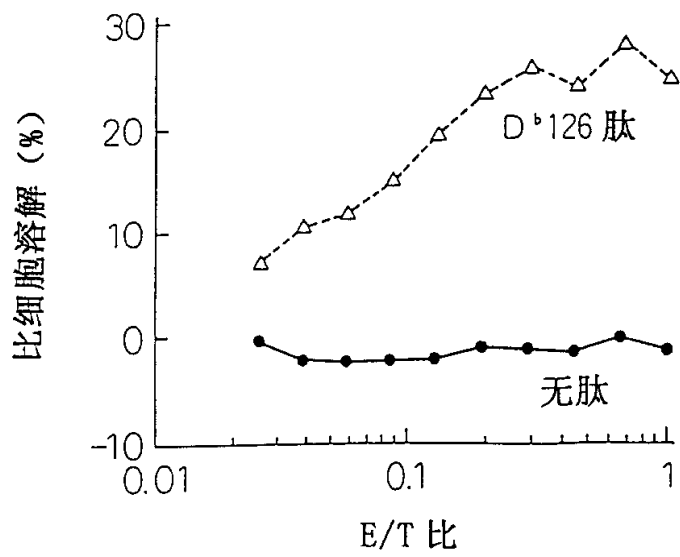
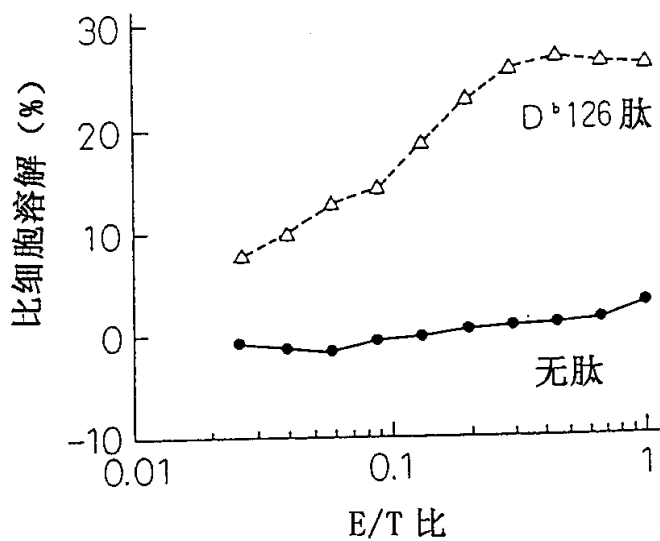


图 3

小鼠 3



小鼠 4

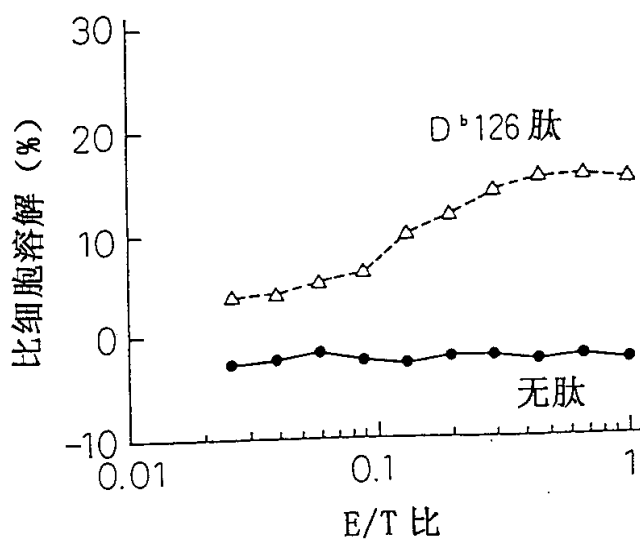


图 4

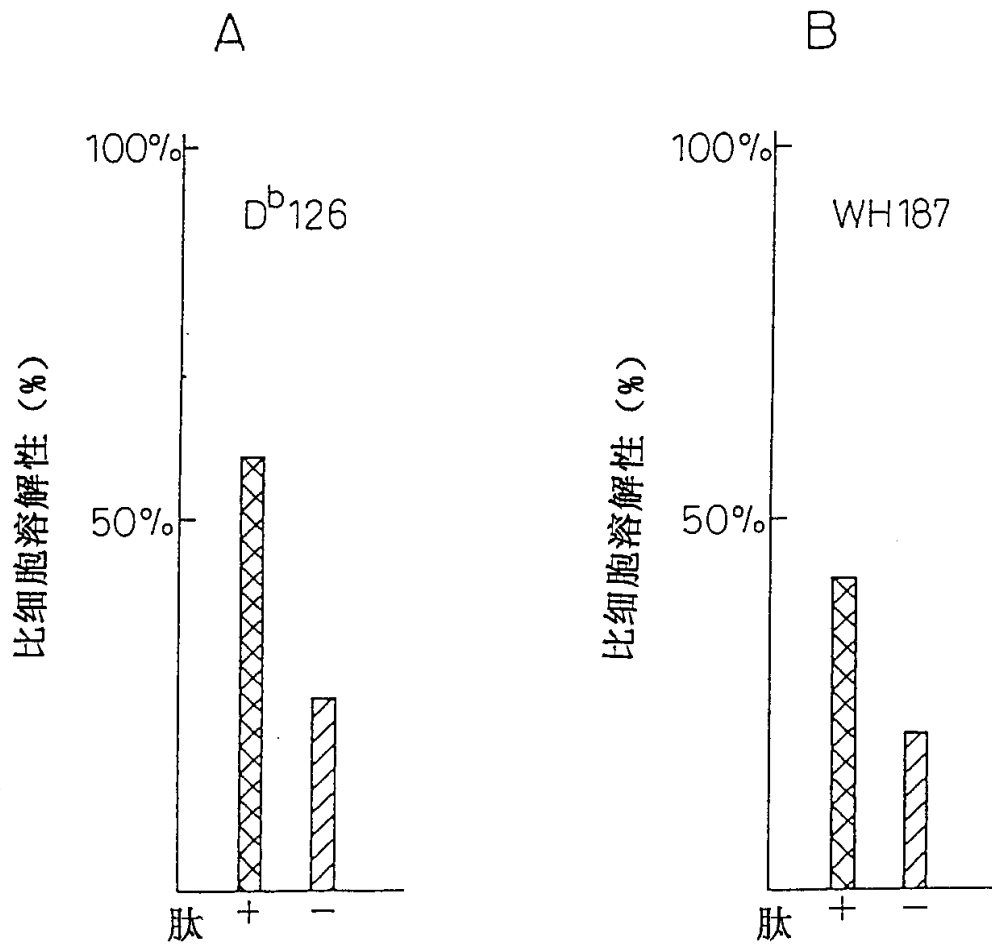


图 5

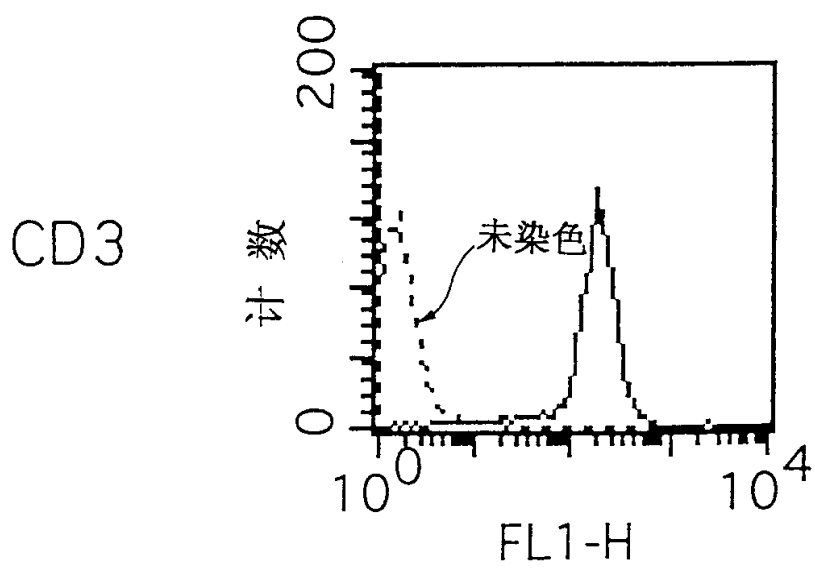
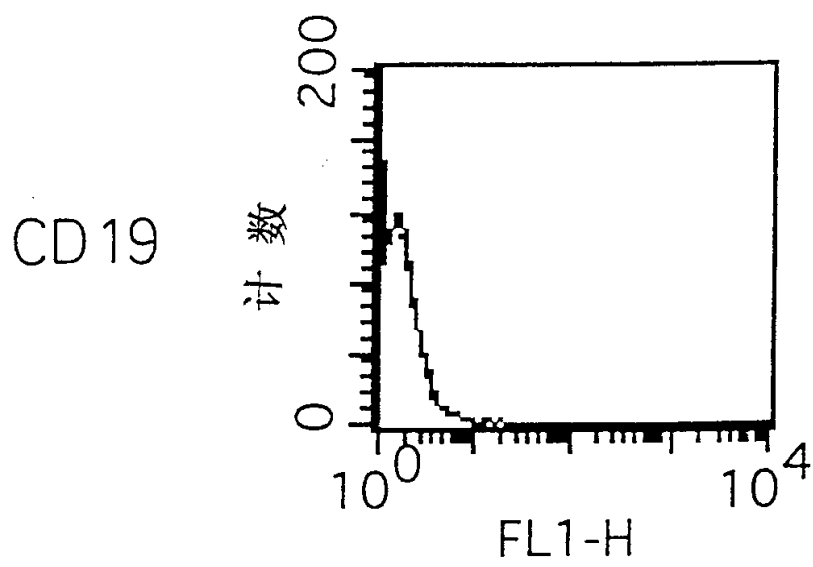


图 6

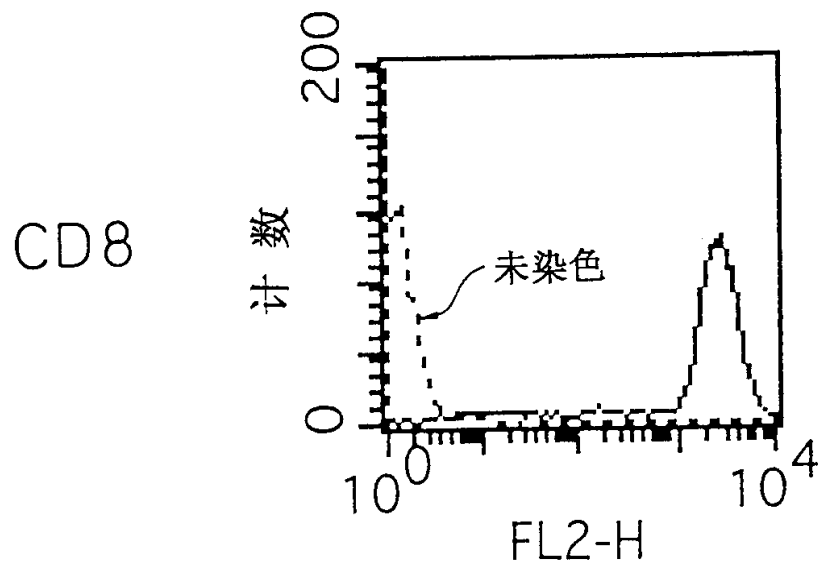
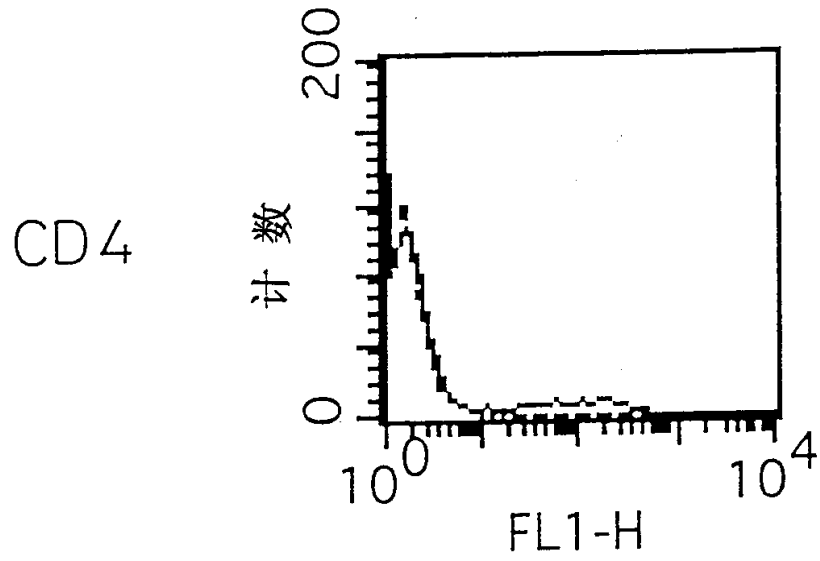


图 7

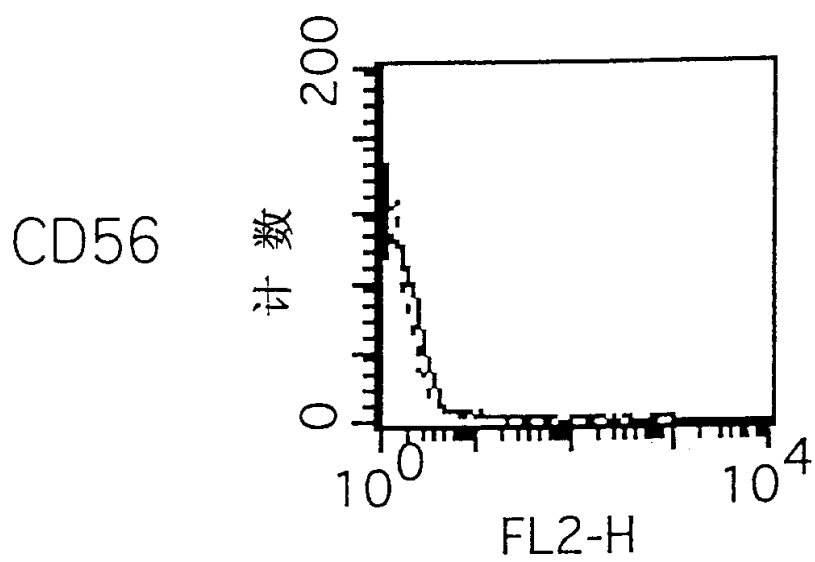


图 8

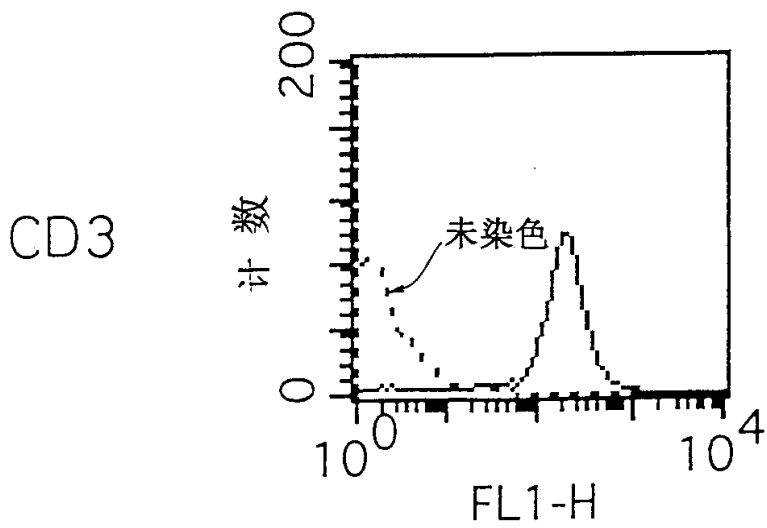
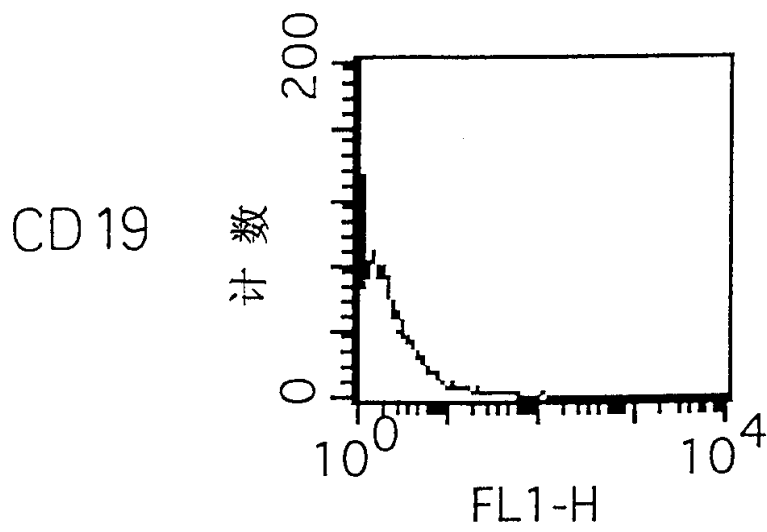


图 9

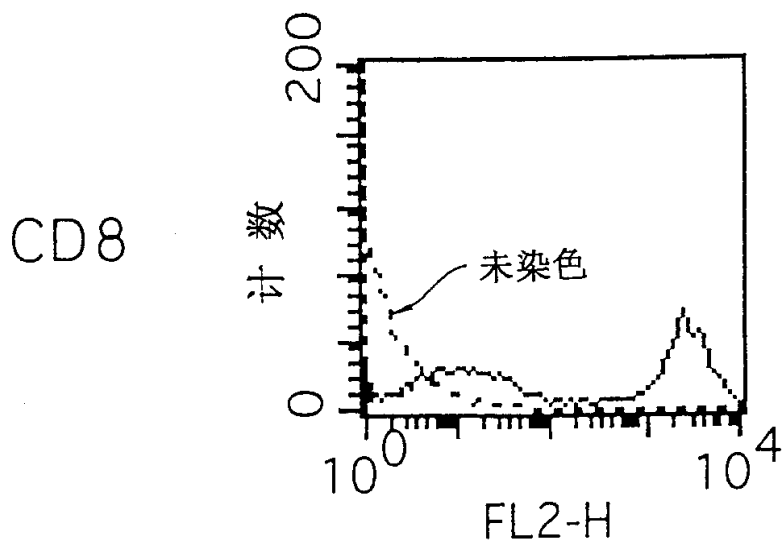
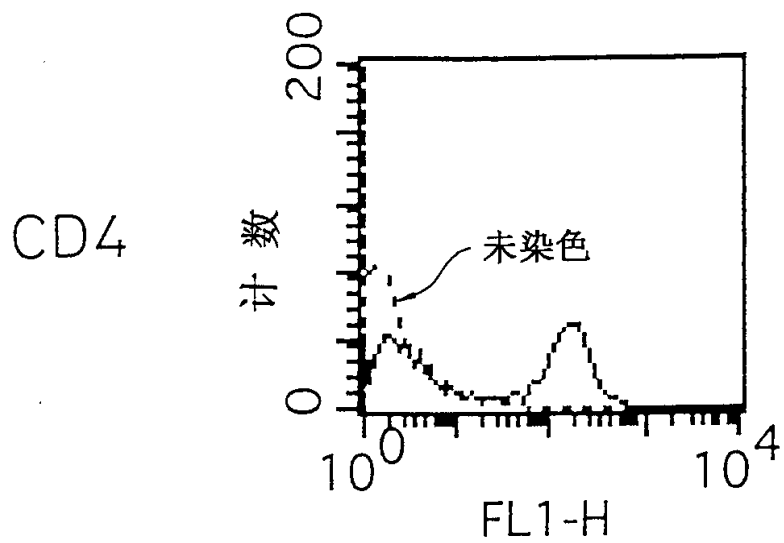


图 10

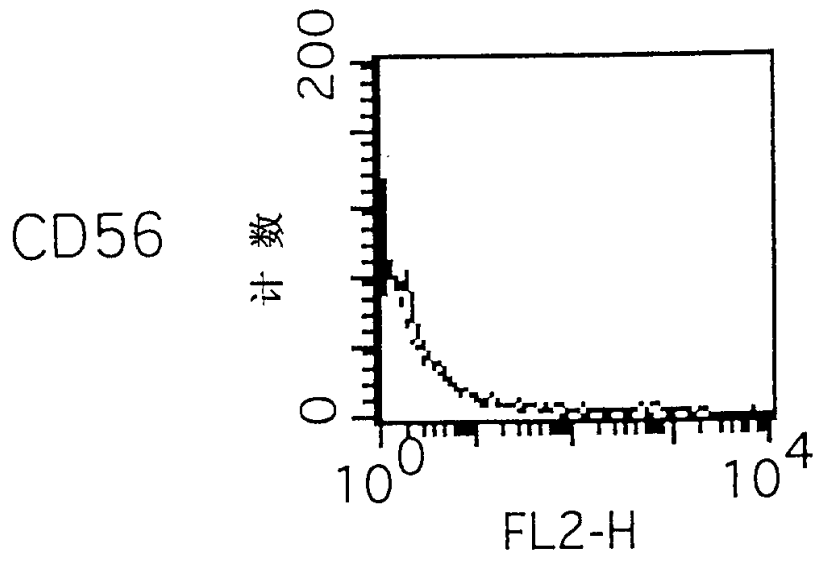


图 11

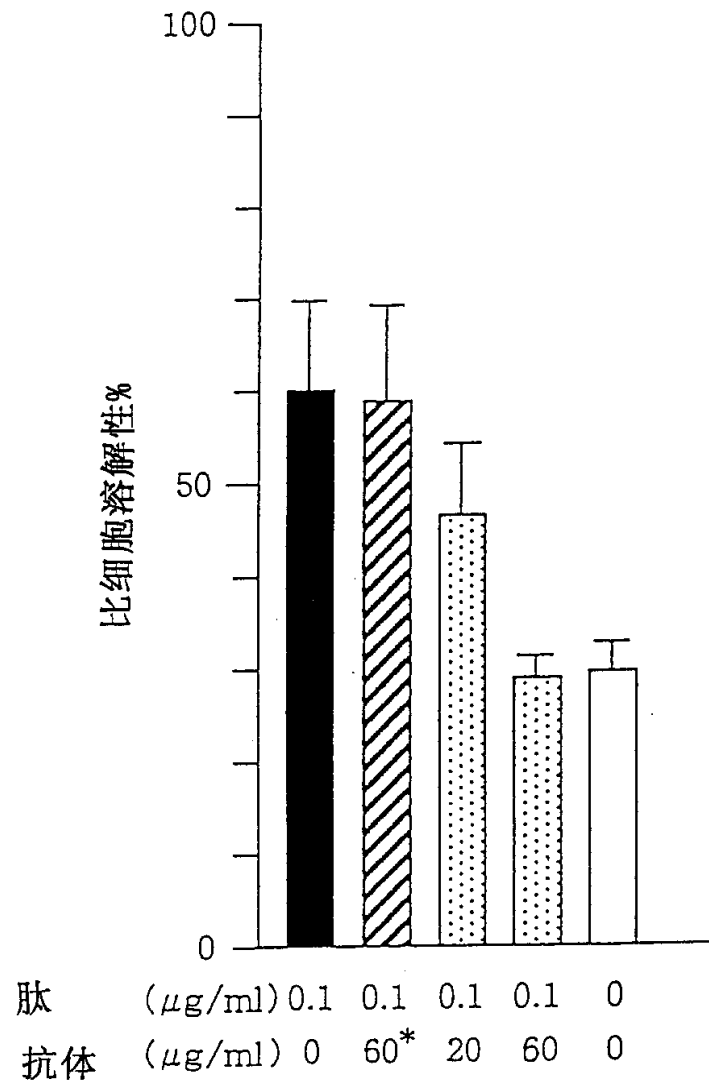


图 12

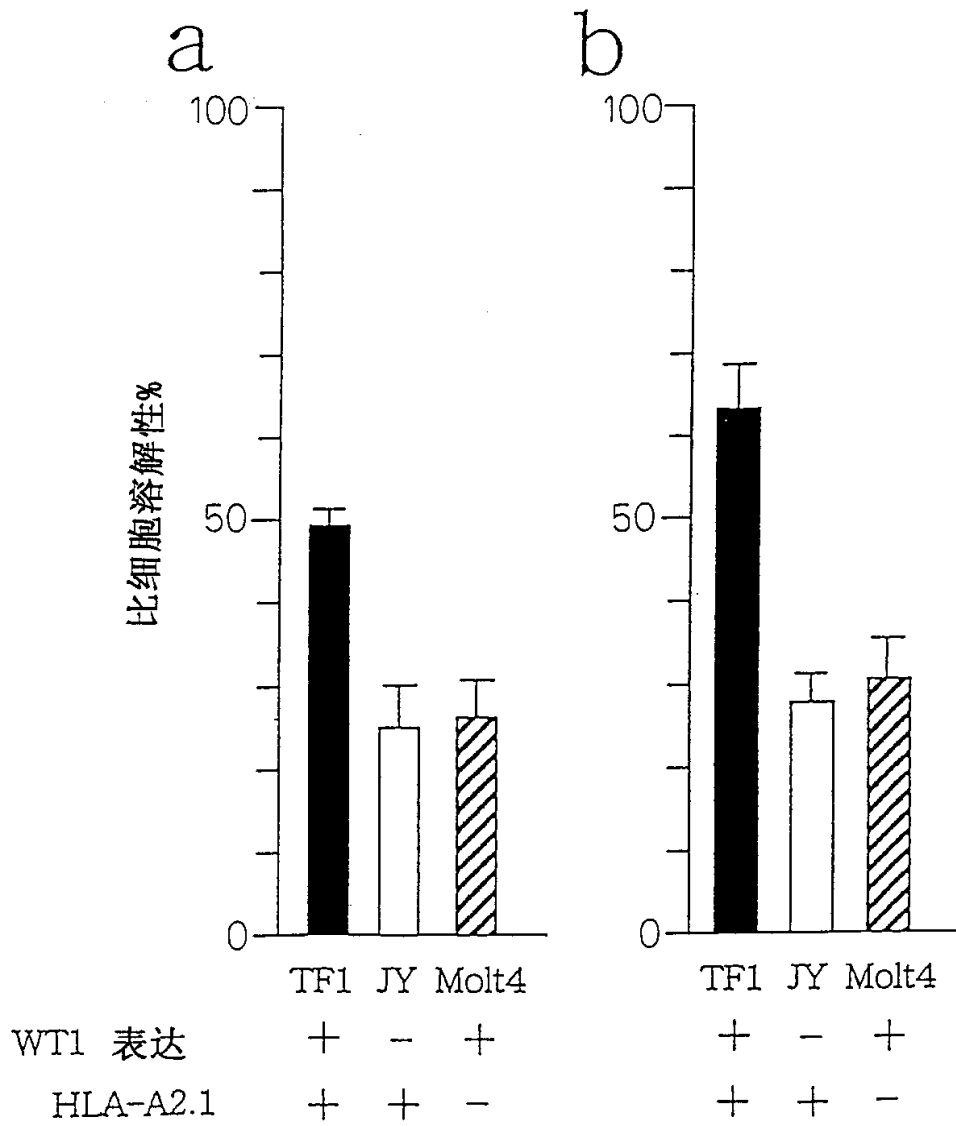


图 13

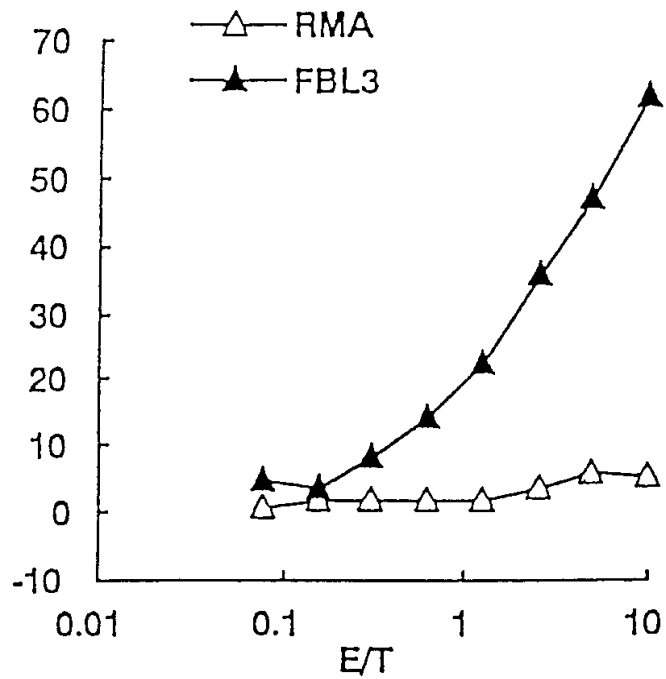


图 14

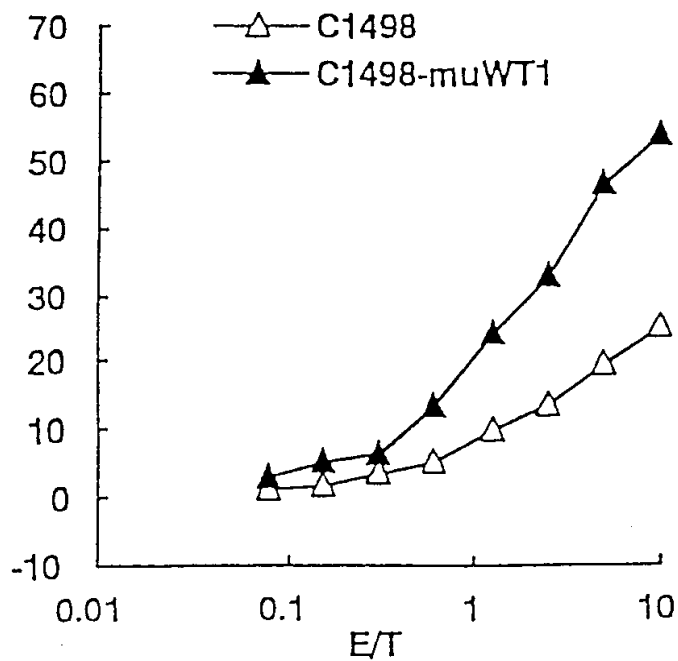


图 15

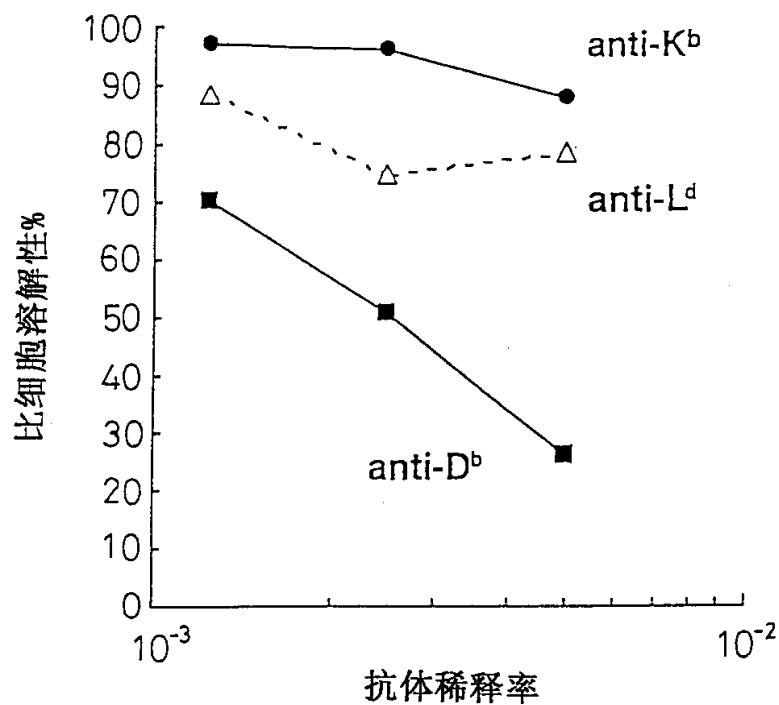


图 16

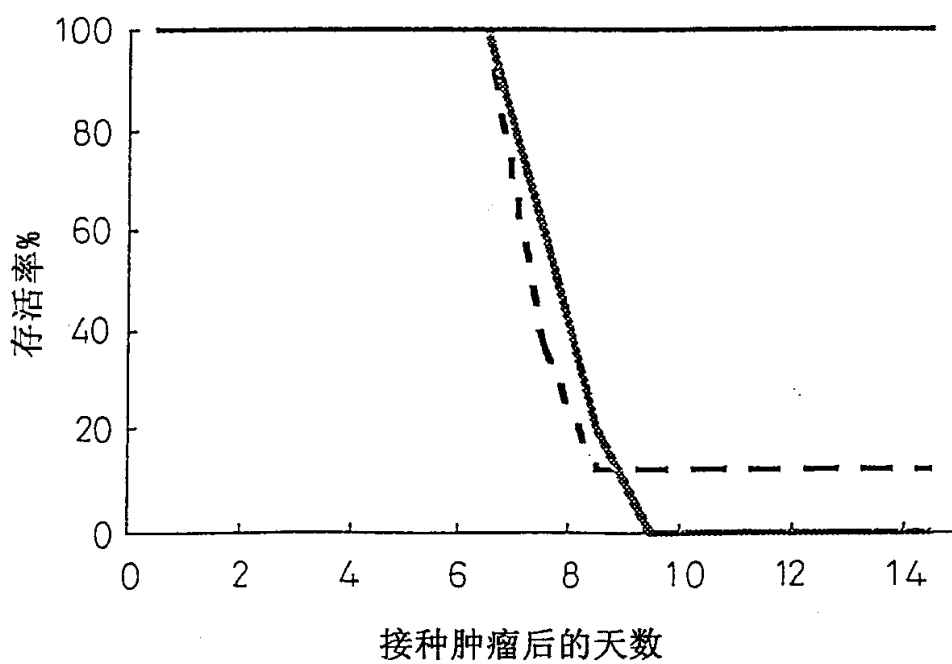


图 17

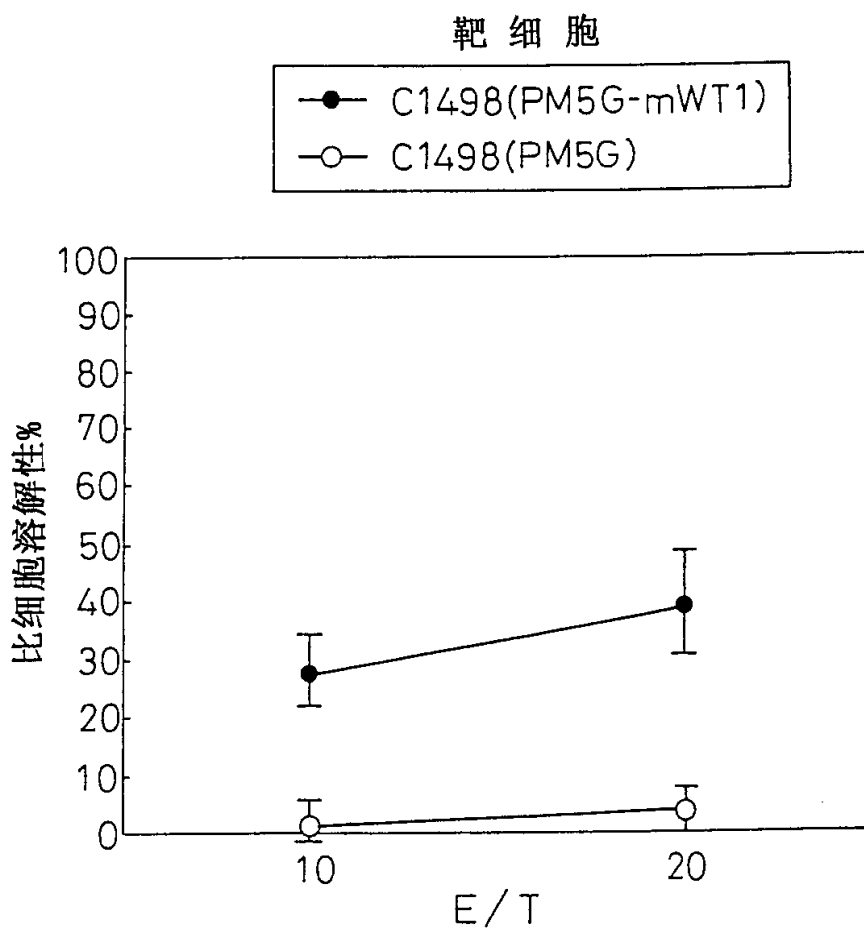


图 18

