

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 963781 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **963781**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 14/705

C07K 16/30

A61K 35/14

C12N 5/08

G01N 33/574

C07K 7/06

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.03.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.09.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **21.03.1995 PCT/US1995/003408**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

24.03.1994 US 217187

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Ludwig Institute For Cancer Research, 1345 Avenue of the Americas, New York, NY 10105, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Van Der Bruggen, Pierre, Belgium, BELGIA, (BE)

2 •Boon-Falleur, Thierry, Belgium, BELGIA, (BE)

3 •Traversari, Catia, Italy, ITALIA, (IT)

4 •Fleischauer, Katharina, Italy, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Eristettyjä, MAGE-3-peräisiä peptidejä, jotka kompleksoivat HLA-A2-mol ekyylejä, ja niiden käyttöjä

Isolerade, MAGE-3-härledda peptider, som bildar komplex med HLA-A2-mol ekylor, och användningar av dessa

Eristettyjä, MAGE-3-peräisiä peptidejä, jotka kompleksoivat HLA-A2-molekyylejä, ja niiden käyttöjä

Keksinnön aihepiiri

5 Tämä keksintö koskee immuunigenetiikkaa ja peptidikemiaa. Tarkemmin ottaen se koskee peptidejä, kuten nonameerit, dekameerit ja undekameerit, jotka ovat eri tavoin käyttökelpoisia, mukaan lukien immunogeenit ja ligandit HLA-A2-molekyylille. Tarkemmin ottaen se koskee ns.
10 "kasvainhyljintäantigeenia", joka saadaan MAGE-3-geenin koodittamasta kasvainhyljintäantigeeniprekursorista ja jonka esittää MHC-luokan I molekyyli HLA-A2.

Tausta ja alan tekninen taso

15 Tutkimus syöpäsolujen tunnistuksesta tai tunnistuksen puutteesta isäntäorganismien toimesta on edennyt moniin eri suuntiin. Alan ymmärtäminen edellyttää jonkin tasoista sekä immunologian että onkologian perusteiden ymmärtämistä.

20 Varhainen tutkimus hiirikasvaimilla paljasti, että nämä osoittivat molekyylejä, jotka johtivat kasvainsolujen hyljintään syngeenisiin eläimiin siirrettyinä. T-solut vastaanottavassa eläimessä "tunnistavat" nämä molekyylit, jotka aiheuttavat sytolyyttisen T-soluvasteen, johon liittyy vastaanottajasolujen lyysi. Nämä todisteet saatiin
25 ensiksi *in vitro* kemiallisilla karsinogeeneilla kuten metyylikolantreenilla indusoiduilla kasvaimilla. Kasvainten ilmentämät antigeenit, jotka synnyttivät T-soluvasteen, todettiin erilaisiksi kullekin kasvaimelle. Katso Prehn *et al.*, *J. Natl. Canc. Inst.* 18 (1957) 769 - 778; Klein *et al.*, *Cancer Res.* 20 (1960) 1561 - 1572; Gross, *Cancer res.* 3 (1943) 326 - 333; Basombrio, *Cancer Res.* 30 (1970) 2458 - 2462 yleisten oppien osalta kasvainten indusoinnista kemiallisilla karsinogeeneilla ja eroista solupinta-
30 antigeeneissa. Tämä antigeeniluokka on tullut tunnetuksi "kasvainspesifisinä transplantaatioantigeeneina" eli ni-
35

mellä "TSTA". Seurattaessa havaintoja, jotka tehtiin tällaisten antigeenien presentaatiosta kemiallisilla karsino-
geeneilla indusoituina, saatiin samankaltaisia tuloksia
indusoidessa kasvaimia *in vitro* ultraviolettisäteilyllä.

5 Katso Kripke, *J. Natl. Canc. Inst.* 53 (1974) 333 - 1336.

Vaikka *supra* kuvatun tyyppisille kasvaimille havaittiin T-soluvälitteisiä immuunivasteita, spontaanien kasvainten arveltiin yleensä olevan ei-immunogeenisiä. Tämän vuoksi uskottiin, etteivät nämä esitä antigeenejä,
10 jotka indusivat vastaan kasvaimelle sitä kantavassa koh-
teessa. Katso Hewitt *et al.*, *Brit. J. Cancer* 33 (1976)
241 - 259.

Tum⁻-antigeenin osoittavien solulinjojen luokan muodostavat immunogeeniset variantit, jotka saadaan muta-
15 genisoimalla hiirikasvainsoluja tai -solulinjoja, kuten kuvaavat Boon *et al.*, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 1184 - 1193, joka julkaisu sisällytetään tähän viitteeksi. Tarkemmin ottaen tum⁻-antigeenejä saadaan mutagenisoimalla kasvainsoluja, jotka eivät muodosta immuunivastetta syngeneisissä
20 hiirissä ja muodostavat kasvaimia (eli "tum⁺"-soluja). Kun näitä tum⁺-soluja mutagenisoidaan, syngeneiset hiiret hylkivät niitä, eivätkä muodosta kasvaimia (sitien "tum⁻"). Katso Boon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 272, joka julkaisu sisällytetään tähän viitteeksi. Monien kasvainten on osoitettu osoittavan tämän ilmiön. Katso esim. Frost *et al.*, *Cancer Res.* 43 (1983) 125.

Vaikuttaa siltä, että tum⁻-variantit eivät onnistu muodostamaan eteneviä kasvaimia, koska ne käynnistävät immuunihylkimisprosessin. Todisteisiin tämän oletuksen
30 tueksi lukeutuvat kasvainten "tum⁻"-varianttien, eli niiden, jotka eivät normaalisti muodosta kasvaimia, kyky tehdä niin hiirissä, joiden immuunijärjestelmiä on suppressoitu lähes tappavalla säteilyllä, Van Pel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 5282 - 5285; ja havainto,
35 että syöttösolukasvaimen P815 vatsaontelon sisäi-

sesti ruiskutetut tum⁻-solut lisääntyvät eksponentiaalisesti 12 - 15 päivän ajan, minkä jälkeen ne eliminoituvat vain muutamassa päivässä lymfosyytti- ja makrofagitulvan vaikutuksesta [Uyttenhove et al., *J. Exp. Med.* 152 (1980) 1175 - 1183]. Lisätodisteisiin kuuluu havainto, että hiiret hankkivat immuunimuistin, joka tekee niille mahdolliseksi vastustaa myöhempää haastetta samalla tum⁻-variantilla jopa silloin, kun annetaan immuunisuppressiivisiä määriä säteilyä solujen seuraavan haastamisen kanssa [Boon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 272 - 275; Van Pel et al., *supra*; Uyttenhove et al., *supra*].

Myöhemmissä tutkimuksissa todettiin, että kohdistettaessa spontaaneihin kasvaimiin mutagenisointi muodostui immunogeenisiä variantteja, jotka kuitenkin tuottivat vasteen. Itse asiassa nämä variantit kykenivät synnyttämään suojaavan immuunivasteen alkuperäistä kasvainta vastaan. Katso Van Pel et al., *J. Exp. Med.* 157 (1983) 1992 - 2001. Täten on osoitettu, että on mahdollista synnyttää niin sanotun "kasvainhyljintäantigeenin" presentaatio kasvaimessa, joka on syngeneisen hylkimisvasteen kohde. Samankaltaisia tuloksia on saatu siirrettäessä vierasgeenejä spontaaneihin kasvaimiin. Katso Fearson et al., *Cancer Res.* 48 (1988) 2975 - 2980 tämän osalta.

On tunnistettu antigeenien luokka, jotka esiintyvät kasvainsolujen pinnalla ja jotka sytolyyttiset T-solut tunnistavat, mikä johtaa lyysiin. Tätä antigeenien luokkaa kutsutaan "kasvainhyljintäantigeeneiksi" tai nimellä "TRA":t tästä eteenpäin. TRA:t saattavat synnyttää tai olla synnyttämättä vasta-ainevasteita. Laajuus, jossa näitä antigeenejä on tutkittu, on ollut sytolyyttisten T-solujen karakterisointitutkimusten puitteissa *in vitro*, eli tutkimalla antigeenin identifikaatiota jonkin nimenomaisen sytolyyttisen T-solu- ("CTL" tästä eteenpäin) alaryhmän toimesta. Alaryhmä lisääntyy tunnistessaan esitetyn kasvainhyljintäantigeenin ja antigeenin esittävässä soluissa

tapahtuu lyysi. Karakterisointitutkimuksissa on identi-
 fioitu CTL-klooneja, jotka spesifisesti aiheuttavat lyysin
 antigeenit ilmentävissä soluissa. Esimerkkejä tästä työstä
 löytyy julkaisuista Levy *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 24
 5 (1977) 1 - 59; Boon *et al.*, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 1184 -
 1193; Brunner *et al.*, *J. Immunol.* 124 (1980) 1627 - 1634;
 Maryanski *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 124 (1980) 1627 - 1634;
 Maryanski *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 12 (1982) 406 - 412;
 Palladino *et al.*, *Canc. Res.* 47 (1987) 5074 - 5079. Tämän
 10 tyyppistä analyysiä tarvitaan muun tyyppisille CTL:ien
 tunnistamille antigeeneille, mukaan lukien vähäisemmät
 histokompatibiliteettiantigeenit, urosspesifiset H-Y-
 antigeenit ja "tum⁻"-antigeeneiksi kutsuttujen antigeenien
 luokka tässä kuvatun mukaisesti.

15 *Supra* kuvatusta kohteesta esimerkkikasvain tunne-
 taan nimellä P815. Katso DePlaen *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA 85 (1988) 2274 - 2278; Szikora *et al.*, *EMBO J.* 9
 (1990) 1041 - 1050; ja Sibille *et al.*, *J. Exp. Med.* 172
 (1990) 35 - 45, jotka julkaisut sisällytetään tähän viit-
 20 teiksi. P815-kasvain on syöttösolukasvain, jonka indusoi
 DBA/2-hiiressä metyylikolantreeni ja jota voidaan viljellä
 sekä *in vitro* -kasvaimena että solulinjana. P815-solulin-
 jasta on muodostettu mutagenisoimalla monia tum⁻-variantte-
 ja mukaan lukien variantit, joita kutsutaan nimillä P91A
 25 (DePlaen, *supra*), 35B (Szikora, *supra*) ja P198 (Sibille,
supra). Vastoin kuin kasvainhyljintäantigeenit - ja tämä
 on keskeinen ero -tum⁻-antigeenejä esiintyy vasta kasvain-
 solujen mutagenisoinnin jälkeen. Kasvainhyljintäantigeene-
 jä esiintyy tietyn kasvaimen soluilla ilman mutagenisoin-
 30 tia. Täten viitaten kirjallisuuteen solulinja voi olla tum⁺
 kuten "P1":ksi kutsuttu solulinja, ja se voidaan provosoi-
 da tuottamaan tum⁻-variantteja. Koska tum⁻-fenotyyppi poik-
 keaa kantasolulinjan fenotyypistä, on odotettavissa ero
 tum⁻-solulinjojen DNA:ssa verrattuna niiden tum⁺-kantasolu-
 35 linjoihin, ja tätä eroa voidaan hyödyntää kiinnostavn gee-

nin paikantamiseksi tum⁻-soluissa. Tuloksena todettiin, että tum⁻-varianttien kuten P91A:n, 35B:n ja P198:n geenit eroavat normaaleista alleleistaan pistemutaatioilla geenin kooditusalueella. Katso Szikora ja Sibille, *supra*, ja Lurquin *et al.*, *Cell* 58 (1989) 293 - 303. On ilmennyt, että näin ei ole asianlaita tämän keksinnön mukaisten TRA:iden osalta. Nämä julkaisut osoittivat myös, että tum⁻-antigeenistä saadut peptidit esiintyvät L^d-molekyylillä tunnistettavaksi CTL:ien toimesta. P91A esiintyy L^d:llä, P35 D^d:llä ja P198 K^d:llä.

PCT-patenttihakemuksessa US92/04 354, joka jätettiin 22. toukokuuta 1992 ja jota vastaavan patentin omistaa sama hakija kuin tämän kohteena olevan patentin, esitetään ryhmä ihmisen kasvainhyljintäantigeeniprekursoria koodittavia genejä, jota kutsutaan MAGE-ryhmäksi. Useita näistä geneistä käsittelevät myös van der Bruggen *et al.*, *Science* 254 (1991) 1643. Nyt on selvää, että MAGE-ryhmän eri geenit ilmentyvät kasvainsoluissa, ja voivat toimia merkkeinä tällaisten kasvainten diagnosoille, sekä muissa tässä käsitellyissä tarkoituksissa. Katso myös Traversari *et al.*, *Immunogenetics* 35 (1992) 145; van der Bruggen *et al.*, *Science* 254 (1991) 1643. Mekanismi, jolla proteiini prosessoidaan ja esiintyy solupinnalla, on nyt dokumentoitu verraten hyvin. Yleiskatsaus tämän alan kehityksestä löytyy julkaisusta Barinaga "Getting Some 'Backbone': How MHC Binds Peptides", *Science* 257 (1992) 880; katso myös Fremont *et al.*, *Science* 257 (1992) 919; Matsumura *et al.*, *Science* 257 (1992) 927; Latron *et al.*, *Science* 257 (1992) 964. Näissä julkaisuissa viitataan yleisesti edellytykseen, että MHC/HLA-molekyyliin sitoutuvan peptidin on oltava 9 aminohapon mittainen ("nonapeptidi"), sekä nonapeptidin 1. ja 9. tähteen merkitykseen.

MAGE-ryhmän geenien tutkimuksissa on nyt paljastunut, että jokin nimenomainen nonapeptidi todella esiintyy joidenkin kasvainsolujen pinnalla ja että nonapeptidin

presentaatio edellyttää, että presentoiva molekyyli on HLA-A1. MAGE-1-kasvinhyljintäantigeeni- ("TRA" tai "nonapeptidi") kompleksit johtavat antigeenin esittävän solun lyysiin sytolyyttisten T-solujen ("CTL":ien) toimesta.

5 Huomiota kehoitetaan kiinnittämään esim. samanaikaisesti jätettyihin patenttihakemuksiin sarjanrot _____, Townsend et al., ja _____, Melief et al., joista kumpikin käsittelee tutkimuksia muilla MAGE-peräisillä peptideillä.

10 Tutkimukset, jotka esitetään esim. US-patenttihakemuksissa sarjanrot 07/938 334, joka jätettiin 31. elokuuta 1992, ja 073 103, joka jätettiin 7. kesäkuuta 1993, osoittavat, että verrattaessa eri MAGE-geenien homologisia alueita MAGE-1-geenialueeseen, joka koodittaa oleellista nonapeptidiä, esiintyy huomattavasti homologiaa. Itse asiassa nämä havainnot johtivat yhteen keksinnön tässä julkistettuun ja patentoitavaksi vaadittuun näkökohtaan, joka on nonapeptidien ryhmä, joista kaikilla on samat N-pää- ja C-pääaminohapot. Näitä nonapeptidejä kuvattiin
 20 käyttökelpoisiksi eri tarkoituksiin mukaan lukien niiden käyttö immunogeeneina joko yksinään tai kantajapeptideihin kytkettyinä. Nonapeptidit ovat riittävän kokoisia muodostaakseen antigeenisen epitoopin, ja näitä vastaan muodostettuja vasta-aineita on kuvattu käyttökelpoisiksi nonapeptidin identifioimiseksi joko sen esiintyessä yksinään tai osana suurempaa polypeptidiä.

25 Nämä viitteet, etenkin julkaisu sarjanro 073 103, osoittivat yhteyden HLA-A1:n ja MAGE-3:n välillä; kuitenkin vain noin 26 %:lla kaukaasiaalaisesta väestöstä ja
 30 17 %:lla neekerisukuisesta väestöstä esiintyy HLA-A1-molekyyliä solupinnoilla. Täten olisi hyödyllistä saada lisätietoja muun tyyppisten MHC-molekyylien presentoimista peptideistä siten, että sopivat osuudet väestöstä voivat hyötyä edellä esitetystä tutkimuksesta.

Nyt on todettu, että MAGE-3-peräisten peptidien antigeenipresentaatio ei rajoitu HLA-A1-molekyyleihin. Keksinnön seuraavaksi esitetyssä julkistuksessa identifioidaan peptidejä, jotka kompleksoivat MHC-luokan I molekyylin HLA-A2. Tämän havainnon seuraamukset, joihin kuuluvat terapeuttiset ja diagnostiset käytöt, ovat seuraavassa julkistuksessa esitetyn keksinnön kohteita.

Yksityiskohtainen kuvaus edullisista suoritusmuodoista

Esimerkki 1

MAGE-3-geenin sekvenssi tunnetaan esim. julkaisuista sarjanro 037 230 ja PCT/US92/04 354, joista kumpaankin viitataan edellä ja jotka molemmat sisällytetään tähän kokonaisuudessaan viitteiksi. Samoin tiedetään, että sytolyyttiset T-solut aiheuttavat lyysin HLA-A2-soluissa, jotka on transfektoitu MAGE-3:a koodittavalla nukleiinihappomolekyylillä (katso esim. julkaisu sarjanro 037 230, joka julkaisu sisällytetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi; katso myös US-patenttihakemus sarjanro 073 103, joka julkaisu sisällytetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi).

Nämä havainnot viittasivat MAGE-3-geenin koodittaman aminohapposekvenssin tutkimiseen käyttäen Nijmanin et al. kehittämää pisteytyssysteemiä, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 1215, joka julkaisu sisällytetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi, sellaisten MAGE-3-peräisten peptidien identifioimiseksi, jotka oletettavasti sitoutuvat HLA-A2-MHC-molekyyliin. Suppeasti esitettynä tässä viitteessä kuvataan systeemiä, jossa peptidin pituudella voidaan tavata "ankkuri"-aminohappoja, "voimakkaita" ja "heikkoja" aminohappoja. Ankkuriasemat ovat 2. ja 9. aminohapon kohdalla. Löytyy 3 mahdollista asemaa, jossa voi sijaita voimakas aminohappo, ja neljä asemaa, jossa voi sijaita heikko aminohappo. Nonameerille mahdolliset maksimipisteet ovat $6^2 \times 4^3 \times 2^4$, eli 36 864. Tällaisia pep-

tidejä identifioitiin, ja ne ovat peptidejä, joihin tästä eteenpäin viitataan.

Esimerkki 2

5 Edellä esitetyn protokollan mukaan identifioidut peptidit syntetisoitiin proteiinisyntetisaattoria käyttäen ja liuotettiin pitoisuudeksi 0,5 mM 0,9-%:iseen NaCl-liuokseen, jossa oli 5 % DMSO:ta (tai 5 % DMF:ää peptidille tunnusnumero 3). Nämä peptidiliuokset varastoitiin -80 °C:seen niiden käyttöön asti.

10 Solulinjaa 174CEM.T2 (tästä eteenpäin "T2") käytettiin sen määrittämiseksi, sitoutuivatko peptidit HLA-A2-molekyyleihin vai eivät. Tätä solulinjaa kuvaavat Cerundolo et al., *Nature* 345 (1990) 449 - 452; ja Spies et al., *Nature* 348 (1990) 744 - 747, jotka molemmat julkaisut
15 sisällytetään tähän viitteiksi. Tämä on solulinja, josta puuttuu reitti, joka toimittaa peptidejä endoplastiseen retikulumiin, jossa MHC-luokan I heterodimeerit kootaan. Se kykenee kokoamaan MHC-luokan I molekyylejä, mutta nämä ovat epästabiileja, ja hajoavat solulyysissä vapaiksi ras-
20 kaaksi ja kevyeksi ketjuksi yön yli inkuboitessa. Heterodimeerit voidaan kuitenkin stabiloida *in vitro* lisäämällä sopivia peptidiligandeja kuten kuvaavat Townsend et al., *Nature* 340 (1989) 443 - 448; Townsend et al., *Cell* 62 (1990) 285 - 195; Cerundolo et al., *supra*; Schumacher et al., *Nature* 350 (1991) 703 - 706; Elliot et al., *Nature* 351 (1991) 402 - 406; Elvin et al., *Eur. J. Immunol.* 21 (1991) 2025 - 2031. Näin stabiloidut molekyylit voidaan
25 immuunisaostaa MHC-luokan I molekyylille spesifisillä vasta-aineilla.

30 Tätä taustaa vasten T2-solut pestiin seerumivapaassa IMDM-kasvualustassa, minkä jälkeen $1,0 \times 10^6$ solua suspendoitiin 400 µl:aan seerumivapaata IMDM-kasvualustaa yhdessä 100 µl:n synteettistä peptidiä kanssa (loppupitoisuus: 0,1 mM, 1 % DMSO). Seosta inkuboitiin yön yli
35 37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen solut pestiin ja värjätettiin

peräkkäin HLA-A2-spesifisellä monoklonaalisella vasta-aineella BB7.2 ja FITC-leimatulla polyklonaalisen vuohi-anti-hiiri-IgG-sitoutumisfragmenteilla. Fluoresenssisuhde laskettiin seuraavasta kaavasta:

5

Koenäytteen keskimääräinen fluoresenssi

Taustan keskimääräinen fluoresenssi

10 Tästä saatiin "keskimääräinen fluoresenssisuhde" eli MFR. Nijmanin *et al.*, *supra*, mukaan MFR yli 1,5 osoittaa sitoutumista HLA-A2:een.

Identifioitiin 5 peptidiä, joiden ennustettiin sitoutuvan spesifisesti HLA-A2-molekyyleihin. Nämä viisi testattiin edellä kuvatulla määrityksellä, jolloin kolmen niistä, eli sekvenssien tunnusnumerot 1, 3 ja 4, todettiin sitoutuvan HLA-A2-molekyyleihin. Kunkin MFR-arvo oli yli 1,5:n, eli:

20	Peptidi	MFR
	M3-44.53 STLVEVTLGEV (sekv. tunnusnumero 1)	3,5
	M3-108.116 ALSRKVAEL (sekv. tunnusnumero 2)	2,17
		(ja < 1,5)
	M3-195.203 IMPKAGLLI (sekv. tunnusnumero 3)	2,37
25	M3-220.228 KIWEELSVL (sekv. tunnusnumero 4)	2,37
	M3-277.286 ALVETSYVKV (sekv. tunnusnumero 5)	1,8
		(ja <1,5)

30 Peptidien M3108.116 ja M3-277.286 MFR-arvot olivat < 1,5 joissakin koeajoissa, jolloin niitä ei enää tarkasteltu.

Esimerkki 3

35 Esimerkissä 2 saadut tulokset viittasivat lisäkokeisiin, ja peptidiä M3-220-228 käytettiin sytolyyttisen T-solukloonin muodostamiseksi, jota kutsutaan tästä eteenpäin nimellä CTL4.2. CTL-klooni saatiin käyttämällä

T2-soluja Houbiersin *et al.* mukaan, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 2072, joka on jo aiemmin kokonaisuudessaan sisällytetty tähän viitteeksi.

Sitten kun CTL-klooni oli eristetty, sitä käytettiin kromivapautumismäärityksessä Boonin *et al.* mukaan, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 1184, joka julkaisu sisällytetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi. T2-solun lisäksi testattiin solulinja SK23, joka on HLA-A2:n esittävä solulinja. Tulokset esitetään seuraavassa:

10

Efektorisoluu (E): CTL4.2

Kohde (T): HLA-A2-solu + sekvenssi tunnusnumero 4

E/T-suhde	⁵¹ Cr-vapautumisprosentti			
	T2	T2 + pept.	SK23	SK23 + pept.
15	30	91	0	35
	7,5	88	-1	33
	1,9	84	-1	14
	0,5	57	-1	2

20

Nämä tulokset osoittavat, että sekvenssillä tunnusnumero 4 sykäytetyissä soluissa tapahtuu spesifinen lyysi sytolyyt-tisen T-solukloonin 4.2 vaikutuksesta. Lyysiä ei tapahdu peptidin puuttuessa.

25

Edellä kuvataan MAGE-3-kasvainhyljintäantigeeni-prekursorista saatujen sellaisten peptidien identifiointia, jotka ovat vuorovaikutuksessa MHC-luokan I molekyylin HLA-A2 kanssa. Erityisen kiinnostavia, muodostaen osan esillä olevan keksinnön kohteesta, ovat peptidit, joita edustavat sekvenssit tunnusnumero 3 ja 4. Nämä peptidit syntetisoidaan helposti Merrifieldin peptidisynteesimenetelyillä ja vastaavilla, jolloin sekvenssien tunnusnumerot 3 ja 4 mukaiset eristetyt peptidit ovat osa tässä kuvattua keksintöä.

30

Kuten on mainittu, peptidit muodostavat kompleksin HLA-A2-molekyylien kanssa, ja nämä kompleksit on immuunisaostettu, mikä johtaa keksinnön edelleen seuraavaan ominaispiirteeseen, jonka muodostavat HLA-A2-molekyylin ja jommankumman näistä peptideistä eristetyt kompleksit.

Molemmat peptidit ja kompleksit ovat käyttökelpoisia eri tavoin. Kuten esitettiin, peptidit sitoutuvat HLA-A2-molekyyliin, jolloin ne ovat käyttökelpoisia määrityksissä, joissa määritetään, esiintyykö näytteessä HLA-A2:n esittäviä soluja vai ei. Peptidi saatetaan kosketuksiin kiinnostavan näytteen kanssa jossain määritettävässä muodossa, kuten leimattu peptidi (radioleima, kromoforinen leima jne.), tai peptidi, joka on kiinnitetty kiinteään faasiin, kuten kolonni tai agarooosi- tai Sepharose-helmet, ja solujen sitoutuminen siihen määritetään käyttäen tavanomaisia analyttisiä menetelmiä.

Sekä peptidejä että eristettyjä komplekseja voidaan käyttää monoklonaalisten vasta-aineiden tai sytolyyttisten T-solukloonien muodostamiseksi, jotka ovat spesifisiä edellä mainituille komplekseille. Alan taitajat ovat varsin hyvin perillä tämän suorittamiseksi tarvittavista menettelyistä, ja sytolyyttisen T-solukloonin muodostamista kuvataan edellä. Koska syöpäsolut esittävät sekvenssien tunnusnumerot 3 ja 4 mukaisten MAGE-3-peräisten peptidien ja HLA-A2:n komplekseja, näitä monoklonaalisia vasta-aineita ja sytolyyttisiä T-soluklooneja voidaan käyttää reagensseina, jotka ovat käyttökelpoisia syövän diagnostisoinniseksi. Edellä esitetty kromivapautumismääritys on esimerkki määrityksistä, joissa käytetään CTL:iä kiinnostavien kohteiden määrittämiseksi, ja immuunimääritykset ja niiden suoritus ovat alalla varsin tuttuja.

Näin saadut sytolyyttiset T-solukloonit ovat käyttökelpoisia terapeuttisissa ympäristöissä kuten adoptiivinen siirto. Katso Greenberg, *J. Immunol.* 136:5 (1986) 1917; Reddel *et al.*, *Science* 257 (1992) 238; Lynch *et al.*,

Eur. J. Immunol. 21 (1991) 1403; Kast et al., *Cell* 59 (1989) 603; jotka kaikki sisällytetään tähän viitteiksi. Tässä metodologiassa edellä esitetyt peptidit yhdistetään antigeenin esittäviin soluihin ("APC":t) stabiilien kompleksien muodostamiseksi. Monia tällaisia metodologioita tunnetaan, esimerkiksi ne, jotka julkistetaan seuraavissa viitteissä: Leuscher et al., *Nature* 351 (1991) 72 - 74; Romero et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991) 603 - 612; leuscher et al., *J. Immunol.* 148 (1992) 1003 - 1011; Romero et al., *J. Immunol.* 150 (1993) 3825 - 3831; Romero et al., *J. Exp. med.* 177 (1993) 1247 - 1256; ja Romero et al., US-patenttihakemus sarjanro 133 407, joka jätettiin 5. lokakuuta 1993, jotka kaikki julkaisut sisällytetään tähän viitteiksi. Tämän jälkeen presentoivat solut saatetaan kosketuksiin sytolyyttisten T-solujen lähteen kanssa sytolyyttisten T-solukloonien muodostamiseksi, jotka ovat spesifisiä kiinnostavalle kompleksille. Edullisesti tämä suoritetaan käyttämällä autologista T-solukloonia, joka esiintyy esimerkiksi verinäytteessä, joka on otettu potilaasta, jota on määrää hoitaa CTL:illä. Sitten kun CTL:t on muodostettu, nämä reperfusoidaan hoidettavaan kohteeseen määränä, joka riittää lievittämään syöpätilaa, kuten aiheuttamalla lyyysin syöpäsoluissa, estämällä niiden lisääntymisen jne.

Keksinnön muut näkökohdat ovat alan taitajalle ilmeisiä, eikä niitä tarvitse tässä toistaa.

Käytettyjä ilmaisuja käytetään kuvaavina ilmaisuina eikä rajaavasti, eikä tällaisia ilmaisuja käyttämällä ole minkäänlaista tarkoitusta sulkea pois mitään esitettyjen ominaispiirteiden tai niiden osien ekvivalentteja, koska todetaan erilaisten modifikaatioiden olevan mahdollisia keksinnön suojapiirin puitteissa.

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANTS: Van der Bruggen, Pierre; Boon-Falleur,
Thierry; Traversari, Catia; Fleischauer, Katharina

5 (ii) TITLE OF INVENTION: ISOLATED, MAGE-3 DERIVED
PEPTIDES WHICH COMPLEX WITH HLA-A2 MOLECULES AND USES THEREOF

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Felfe & Lynch
10 (B) STREET: 805 Third Avenue
(C) CITY: New York City
(D) STATE: New York
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 10022

(v) COMPUTER READABLE FORM:

15 (A) MEDIUM TYPE: Diskette, 5.25 inch, 360 kb
storage

(B) COMPUTER: IBM PS/2
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS
(D) SOFTWARE: Wordperfect

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

20 (A) APPLICATION NUMBER: 08/217,187
(B) FILING DATE: 24-MARCH-1994
(C) CLASSIFICATION: 435

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Hanson, Norman D.
25 (B) REGISTRATION NUMBER: 30,946
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: LUD 5344

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (212) 688-9200
(B) TELEFAX: (212) 838-3884

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 10 amino acid
 (B) TYPE: amino acids
 (D) TOPOLOGY linear
 (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

5

10

Thr Leu Val Glu Val Thr Leu Gly Glu Val
 5 10

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 9 amino acid
 (B) TYPE: amino acids
 (D) TOPOLOGY linear
 (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

15

20

Ala Leu Ser Arg Lys Val Ala Glu Leu
 5

25

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 9 amino acid
 (B) TYPE: amino acids
 (D) TOPOLOGY linear
 (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

30

Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile
 5

Patenttivaatimukset

5 1. Eristetty peptidi, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat sekvenssit, joiden tunnusnumerot ovat 3 ja 4.

2. HLA-A2:n ja patenttivaatimuksen 1 mukaisen eristetyn peptidin eristetty kompleksi.

10 3. Eristetty sytolyyttinen T-soluklooni, joka on spesifinen kompleksille, joka muodostuu HLA-A2:sta ja peptidistä, jonka sekvenssin tunnusnumerot ovat 3 ja 4.

4. Monoklonaalinen vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti kompleksiin, joka muodostuu HLA-A2:sta ja peptidistä, jonka sekvenssin tunnusnumerot ovat 3 ja 4.

15 5. Menetelmä syöpätilaa potevan kohteen identifiointiseksi, jonka menetelmän mukaan mainitusta kohteesta otettu näyte saatetaan ruumiin ulkopuolella kosketuksiin reagenssin kanssa, joka on spesifinen kompleksille, joka muodostuu HLA-A2:sta ja peptidistä, jonka sekvenssin tunnusnumerot ovat 3 ja 4, ja määritetään mainitun reagenssin reaktio mainitun näytteen solun kanssa syöpätilan määrittämiseksi.

20 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa mainittu reagenssi on sytolyyttinen T-soluklooni.

25 7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa mainittu reagenssi on monoklonaalinen vasta-aine.