

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4291508号
(P4291508)

(45) 発行日 平成21年7月8日(2009.7.8)

(24) 登録日 平成21年4月10日(2009.4.10)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02

請求項の数 32 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-516030 (P2000-516030)	(73) 特許権者	502006782
(86) (22) 出願日	平成10年9月22日 (1998.9.22)		アメリカ合衆国
(65) 公表番号	特表2002-500002 (P2002-500002A)		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
(43) 公表日	平成14年1月8日 (2002.1.8)		52, ロックヴィル, エグゼクティブ・
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/019794		ブルバード 6011, スイート 32
(87) 国際公開番号	W01999/019478		5, ナショナル インスティテューツ・オブ・
(87) 国際公開日	平成11年4月22日 (1999.4.22)		ヘルス, オフィス・オブ・テクノロジー・
審査請求日	平成17年9月22日 (2005.9.22)		トランスファー
(31) 優先権主張番号	60/061, 589	(74) 代理人	100089705
(32) 優先日	平成9年10月10日 (1997.10.10)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100071124
			弁理士 今井 庄亮
		(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠式

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌胎児性抗原 (CEA) のアゴニストおよびアンタゴニストペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列 Y L S G A D L N L (配列番号 2)、Y L S G A D I N L (配列番号 3) Y L S G A N I N L (配列番号 4) 又は Y L S G A C L N L (配列番号 5) からなるペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 記載の少なくとも 1 つのペプチド及び薬学的に許容しうるキャリアーを含む、薬剤組成物。

【請求項 3】

さらに免疫刺激性分子を含む、請求項 2 記載の薬剤組成物。

【請求項 4】

免疫刺激性分子が I L - 2、B 7 . 1、B 7 . 2、I C A M - 1、L F A - 3、C D 7 2、G M - C S F、T N F、I N F、I L - 1 2、I L - 6 及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 2 又は 3 記載の薬剤組成物。

【請求項 5】

さらに H L A クラス I 分子又は H L A クラス I 分子を発現している細胞を含む、請求項 2 ~ 4 いずれか 1 項記載の薬剤組成物。

【請求項 6】

さらに化学療法薬剤、抗生物質、抗ウイルス薬剤、抗真菌薬剤、又はシクロホスファミドを含む、請求項 2 ~ 5 いずれか 1 項記載の薬剤組成物。

10

20

【請求項 7】

さらにアジュバントを含む、請求項 2 ~ 6 いずれか 1 項記載の薬剤組成物。

【請求項 8】

アジュバントが、ミョウバン、不完全フロイントアジュバント、Q S 2 1 及び R i b i D e t o x ^{T M} からなる群より選択される、請求項 7 記載の薬剤組成物。

【請求項 9】

請求項 1 記載のペプチド及び免疫グロブリン分子を含む、ペプチド - 免疫グロブリン結合体。

【請求項 10】

ペプチドがリポソームに取り込まれている、請求項 2 記載の薬剤組成物。

10

【請求項 11】

キャリアー分子に結合している請求項 1 記載のペプチドを含む、ペプチド - キャリアー分子結合体。

【請求項 12】

キャリアー分子が、インフルエンザペプチド、破傷風トキソイド、破傷風トキソイド - C D 4 エピトープ、シュードモナス (P s e u d o m o n a s) 外毒素 A、ポリ - L - リジン、脂質テール及び小胞体シグナル配列からなる群より選択される、請求項 1 1 記載のペプチド - キャリアー分子結合体。

【請求項 13】

請求項 1 のアゴニストペプチド及び C E A をコードする核酸配列を含むベクターを含むキット。

20

【請求項 14】

さらに免疫刺激性分子を含む、請求項 1 3 記載のキット。

【請求項 15】

請求項 1 記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離 D N A。

【請求項 16】

配列番号 7 又は 8 のヌクレオチド配列を含む単離 D N A。

【請求項 17】

請求項 1 5 又は 1 6 記載の D N A を含むベクター。

【請求項 18】

ベクターが大腸菌 (E . c o l i) プラスミド、リステリア (L i s t e r i a) ベクター、オルトポックス (o r t h o p o x) ウイルス、アビポックス (a v i p o x) ウイルス、カプリポックス (c a p r i p o x) ウイルス、スイポックス (s u i p o x) ウイルス、ワクシニア (v a c c i n i a) ウイルス、バキュロウイルス (b a c u l o v i r u s)、ヒトアデノウイルス (a d e n o v i r u s)、S V 4 0 又はウシパピローマ (p a p i l l o m a) ウイルスである、請求項 1 7 記載のベクター。

30

【請求項 19】

さらに、少なくとも 1 つの H L A クラス I 分子をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 7 又は 1 8 のベクター。

【請求項 20】

請求項 1 7 又は 1 8 のベクターを含む宿主細胞。

40

【請求項 21】

さらに H L A クラス I 分子を発現する、請求項 2 0 の宿主細胞。

【請求項 22】

抗原提示細胞である、請求項 2 1 の宿主細胞。

【請求項 23】

樹状細胞である、請求項 2 2 の宿主細胞。

【請求項 24】

C E A 又はそのエピトープを発現している腫瘍を有する宿主を治療するための 医薬組成物 であって、(a) 宿主に導入される、C E A 又はそのエピトープに特異的な細胞傷害性

50

Tリンパ球及び(b)定期的な間隔で、宿主に導入される請求項1記載のペプチドを含む、前記医薬組成物。

【請求項25】

患者においてCEAエピトープ発現癌腫細胞を阻害する医薬組成物であって、請求項1のペプチドの有効量を含む、前記医薬組成物。

【請求項26】

さらに免疫刺激性分子を含む、請求項25記載の医薬組成物。

【請求項27】

免疫刺激性分子がIL-2、B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、CD72、GM-CSF、TNF、INF、IL-12、IL-6及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項26記載の医薬組成物。

10

【請求項28】

さらにアジュバントを含む、請求項25～27のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項29】

癌腫細胞が、胃腸、乳房、膵臓、膀胱、卵巣、肺、又は前立腺癌腫細胞である、請求項25～28いずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項30】

さらに、CEAをコードする遺伝子を含むベクターを含む、請求項25～29のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項31】

請求項1記載のペプチドでパルスされている抗原提示細胞を含む、ペプチドでパルスされた細胞。

20

【請求項32】

抗原提示細胞が、樹状細胞、Bリンパ球、単球及びマクロファージからなる群から選択される、請求項31記載のペプチドでパルスされた細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒト癌胎児性抗原(CEA)のアゴニストおよびアンタゴニストとして作用することが可能であるペプチドの調製および使用に関する。より詳細には、多様な腫瘍性(neoplastic)状態に対し、本発明のアゴニストペプチドを、単独で、またはrV-CEAなどの他の免疫原と共に初回抗原刺激および追加免疫プロトコルで、免疫原として用いることができる。これらには、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、および乳癌が含まれる。したがって、本発明はまた、癌に対するワクチンの産生および使用にも関する。本発明のペプチドアゴニストはまた、養子移入研究のため、例えばワクチン投与されている患者由来のT細胞の増殖を容易にするのに用いることもできる。本発明のペプチドアンタゴニストは、T細胞が関与するものなどの自己免疫反応がワクチン投与されている患者で起こった際、このような反応を抑制するのに有用性があることが見出される。したがって、本発明はまた、自己免疫疾患、特にリンパ球および他の抗原提示細胞により媒介される自己免疫疾患に対するワクチンの産生および使用にも関する。

30

40

【0002】

発明の背景

現代の癌免疫療法の主要な問題は、腫瘍細胞の溶解を促進する明示されている腫瘍関連抗原(TAA)からの細胞傷害性Tリンパ球(CTL)エピトープの同定である。ヒト癌の抗原の大部分は、腫瘍特異的ではなく、そして正常組織の細胞とは対照的に悪性細胞で過剰発現されている。したがって、ヒトの癌に対する免疫は大部分、主にすべての細胞種に質的に共通の自己分子に対して向けられる、有効な免疫反応の成立に、かかっている。

【0003】

ヒト癌胎児性抗原(CEA)は、大部分の結腸、直腸、胃および膵臓腫瘍(1)、50%程度の乳房癌腫(2)および70%の肺癌腫(3)上に発現している180 kDの糖タンパク質である。C

50

EAはまた、胎児消化管組織にも、そしてより少ない程度に正常結腸上皮細胞にも発現している。CEAの免疫原性は、はっきりしておらず、患者において抗CEA抗体の存在を報告するいくつかの研究がある(4-7)一方、他の研究では見られていない(8-10)。CEAは、最初に、1965年にヒト消化管の腺癌における癌特異的胎児抗原として記載された(Gold, P. およびFreeman, S.O. (1965) Exp. Med. 121:439-462)。それ以来、CEAはヒト胃腸管のほとんどすべての固形腫瘍において過剰に産生されている細胞表面抗原として性質決定されてきている。ヒトCEAタンパク質に対する遺伝子がクローンされている(Oikawaら (1987) Biochim. Biophys. Res. 142:511-518; 欧州特許出願第EP 0346710号)。

【0004】

最近、CEAに対するヒトCTL反応の最初の証拠が報告された(11)。このCAP1ペプチドは、試験された多様なCEAペプチドの中で最も高いレベルのT2細胞結合を示し、該T細胞の刺激は、細胞傷害性T細胞株の生成を生じた。我々は、HLA-A2に対する結合、およびCEAを発現している組換えワクシニアウイルス(rV-CEA)で免疫されている癌腫患者由来の末梢血単核細胞(PBMC)から特異的なCTLを生成する能力に基づき、9量体のペプチドを同定し、CAP1(配列YLSGANLNLを持つ)(SEQ ID NO:1)と名付けた。例えば、5人の患者由来の末梢血リンパ球(PBL)は、rV-CEAでの免疫後、CAP1ペプチドに対するT細胞反応の徴候を示した。他の2つの研究室は、その後、ペプチドでパルスされている樹状細胞を抗原提示細胞(APC)として使用し、*in vitro*でCAP1特異的CTLを生成している(12)。また、最近、アピボックス組換え体ALVAC-CEAで免疫されている癌腫患者由来のPBMCから、CAP1特異的CTLを生成することが可能であることも報告されてきている(13)。いくつかのグループもまた、抗CEA抗体の生成、および抗CEAモノクローナル抗体(MAb)に対する抗Id(14)、組換えCEAタンパク質(15)、またはrV-CEA(16)のいずれかでの免疫に続くCEA特異的増殖性T細胞反応を報告してきている。

【0005】

何人かの研究者は、免疫優性(immunodominant)ペプチドでのPBMCの*in vitro*刺激により、腫瘍関連抗原およびウイルス抗原に対するCTLを導入してきている。gp100黒色腫抗原(17-19)、HIVポリメラーゼペプチド(20)およびパピローマウイルス腫瘍抗原E6(21)を用いた最近の研究は、ペプチド配列への修飾後、免疫原性が亢進していることを立証した。これらの研究において、置換はアンカー位であり、そしてネズミまたはヒトMHC抗原に対する結合を増加させることを意図していた。このアプローチは、ウイルス抗原エピトープに関する、免疫原性およびクラスI MHC(主要組織適合遺伝子複合体)分子に対するペプチド結合親和性の間で、立証されている相関関係に基づいた(22)。

【0006】

以前の研究者はまた、CEA断片でも研究している。このように、Shively(1989)は、欧州特許出願公開(EP第0343946 A2号)において、特有のエピトープ(抗体との反応性により定義されるような)を含む、多くのCEA断片を報告している。後者のCEA断片は長さ177アミノ酸残基であり、CAP1の9量体配列を含む。しかし、CAP1配列を含む、より短いCEA断片は何ら記載されなかった。

【0007】

つまり、rV-CEAのCEA特異的免疫反応を追加免疫するための剤としてのrV-CEA単独の使用は、ワクシニアウイルスに対する免疫反応を刺激するという障害を被る。しかし、rV-CEAおよびCAP1の新規の組み合わせは、それ自体、癌患者の治療に対する「第二世代プロトコル」として示唆された。

【0008】

免疫原性ペプチドが、保存的方式で修飾されている場合(例えば、疎水性アミノ酸が疎水性アミノ酸に置換されている場合)、修飾されたペプチドは、分子の形状、電荷および疎水性特性の維持に基づき、おそらく同様の免疫原性活性を有することは、認められている原理である。

【0009】

より詳細には、Maddenによる研究(33)は、T細胞認識の前駆段階であるMHC複合体化のた

10

20

30

40

50

めのペプチドにおける特定のアミノ酸の優先を同定してきている。Maddenと共に他の研究者も(31)ペプチドにおける特定のアミノ酸位置がT細胞認識に利用可能であることを示唆している。

【0010】

Skipperら(40)は、チロシナーゼの天然発生ペプチドエピトープの同定および性質決定を記載し、この中で、ペプチド配列はDNAから予測されるものとは異なっている。この修飾ペプチドは、チロシナーゼ特異的ヒト細胞傷害性Tリンパ球(「CTL」)による方が、直接の翻訳産物によるよりも効率よく認識され、そして細胞表面上のHLA-A2.1分子により提示される2つのペプチドのただ1つである。該修飾は、アスパラギンをアスパラギン酸で置換することである。著者は、該アスパラギンはタンパク質合成中に小胞体においてN糖鎖付加され、そして翻訳後、脱アミド化されると提唱している。

10

【0011】

CAP1の場合、位置2、9、および1での一次および二次アンカーは、すでに好ましいアミノ酸で占められており、そしてしたがって、異なるアプローチを取って、TCRに対し結合する能力を亢進させるのを試みることにより、ペプチド免疫原性を改善した。TCRと接触すると期待されるアミノ酸残基を改変することにより、非MHCアンカー位置での置換を持つCAP1類似体(analog)を生成することが可能であると思われた。こうした類似体は、その後、天然ペプチドよりも効率よくCTLを刺激することが可能なT細胞エンハンサーアゴニストに相当する可能性がある。以前の結果は、いくつかのペプチド類似体は、抗原性ペプチドに対する反応を阻害することにより、T細胞アンタゴニストとして作用することが可能であるという概念を支持した(23-29)。こうした阻害は、TCR特異的であることが示され、そしてMHCタンパク質に対するペプチド結合の競合によっては説明できなかった。同様に、ペプチドエンハンサーアゴニストは、MHC結合の増加を伴わずに、エフェクター機能を増加させる類似体であるであろう。したがって、我々は、CAP1特異的CTLのT細胞受容体(TCR)と相互作用するであろうと我々が予測した残基に対する単一アミノ酸置換を含む類似体のパネルを解析することにより、CAP1免疫原性を増加させようと努めた。本発明は、ヒトCTLエピトープに関する最初のこうした例である、CAP1ペプチドに対する新規T細胞エンハンサーアゴニストの構築に関する。

20

【0012】

発明の概要

本発明は、CAP-1ペプチド配列由来の単一または二重アミノ酸変化であるペプチドの同定に関する。CAP-1ペプチドは、癌胎児性抗原(本明細書において「CEA」と称される)の高度に免疫原性であるエピトープとして同定されてきており、CEA特異的細胞溶解性T細胞(「CTL」)反応を刺激することが可能である。CEAはいくつかの種類の癌細胞に多量に見られる細胞表面抗原である。したがって、CAP-1などの、細胞溶解性CTL反応を刺激することが可能なCEAペプチドは、癌免疫療法において使用するための潜在的な免疫原である。

30

【0013】

本発明のペプチドのいくつかは、CAP-1およびCEAのアゴニストである；すなわち、これらは抗原提示細胞のMHC複合体およびT細胞のT細胞受容体(「TCR」)複合体との間の相互作用を容易にする。したがって、これらのペプチドは、CEA発現癌を伴う患者を治療するおよび/または該患者にワクチン投与するための、免疫原として利用することが可能である。また、これらのペプチドは、癌患者へのT細胞の養子移入のため、培養中のT細胞を刺激するのに用いることも可能である。4つのこうしたペプチドはアミノ酸配列：

40

- (1) YLSGADLNL (アゴニストCAP1-6D) (SEQ ID NO:2) ;
- (2) YLSGAD^uINL (アゴニストCAP1-6D、7I) (SEQ ID NO:3) ;
- (3) YLSGAN^uINL (アゴニストCAP1-7I) (SEQ ID NO:4) ; および
- (4) YLSGA^uCLNL (アゴニストCAP1-6C) (SEQ ID NO:5)

を有する。下線のアミノ酸はCAP-1ペプチド配列からのアミノ酸変化を同定する。ペプチドCAP1-6DおよびCAP1-6D、7Iは、本発明にしたがう特に好ましいペプチドであり、そしてCAP-1活性に比べ亢進した活性を有する。ペプチドCAP1-7IおよびCAP1-6Cは、CAP-1と同様

50

の活性を有する。

【0014】

本発明の他のペプチドは、CEAのアンタゴニストとして作用する；すなわち、これらは、MHC - ペプチド複合体およびTCR複合体の相互作用を通じて起こる、CEA特異的T細胞活性化および殺傷を減少させまたは除去する。

【0015】

本発明は、アゴニストペプチドおよびCEAをコードする遺伝子を含むベクターまたは組換え的に産生されているCEAタンパク質を含むキットを含む。さらに、該キットは、免疫刺激性分子を含んでもよい。

【0016】

本発明はまた、アンタゴニストペプチドを単独でまたは免疫抑制性剤と組み合わせて含むキットも含む。

【0017】

本発明の別の目的は、1つまたはそれ以上のアゴニストペプチドを単独でまたは免疫刺激性分子と組み合わせて、および薬学的に許容しうるキャリアーを含む薬剤組成物である。

【0018】

本発明の別の目的は、1つまたはそれ以上のアンタゴニストペプチドを単独でまたは免疫抑制性剤と組み合わせて、および薬学的に許容しうるキャリアーを含む薬剤組成物である。

【0019】

本発明の本側面は、少なくとも1つのアゴニストペプチドをコードする核酸配列または少なくとも1つのアンタゴニストペプチドをコードする核酸配列である。

【0020】

本発明の別の側面は、少なくとも1つのアゴニストペプチドをコードする核酸配列または少なくとも1つのアンタゴニストペプチドをコードする核酸配列を含むベクターおよびこうしたベクターを含む宿主細胞である。

【0021】

本発明の別の側面は、癌免疫療法におけるこれらのペプチドの使用に関する。アゴニストペプチドは、CEAに対する細胞溶解性免疫反応を刺激するのに有用であり、腫瘍減少および/または予防を生じる。したがって、本発明はまた、癌ワクチンと共に該ペプチドで癌患者を治療する方法にも関する。アンタゴニストペプチドは、CEAまたはCAP-1に対する自己免疫反応を調節する方法において有用である。

【0022】

本発明のさらに別の側面は、アゴニストパルスされている抗原提示細胞である。

【0023】

発明の詳細な説明

本発明は、天然のCEAエピトープ、CAP-1 (SEQ ID NO:1) のペプチドアゴニストであり、SEQ ID NO:1のアンタゴニストでもある。このアゴニストは、CEAまたはCEAエピトープを発現している癌腫細胞の増殖を抑制するかあるいはそれを殺す、抗原特異的な細胞傷害性Tリンパ球を誘導する能力を特徴とする。本発明のアンタゴニストは、CEA特異的な免疫応答を抑制あるいは阻止するのに役立つ。そのようなペプチドは、CAP-1またはCEAに対するどんな不必要な免疫応答を止めるのにも用い得る。アンタゴニストのそのような利用の一例は、治療が腫瘍細胞を根絶やしにし、CEAを発現している正常細胞を攻撃し始めるといふ、癌の免疫療法の際に起こり得る、可能性のあるどんな自己免疫反応をも制御することである。本発明に従い、アンタゴニストは正常組織に対する甚大な被害を都合よく阻止するだろう。

【0024】

本発明のペプチドアゴニストは、約8-13アミノ酸、好ましくは9-10アミノ酸を含む。好ましい態様においては、本発明のアゴニストペプチドは、少なくとも1個のアミノ酸置換を非アンカー部位に含む。一態様では、アゴニストは天然のCAP-1 (SEQ ID NO:1) と比較し

10

20

30

40

50

て位置6に置換を有する配列を含む。別の態様では、アゴニストは天然のCAP-1 (SEQ ID NO:1)と比較して位置7にアミノ酸置換を有する配列を含む。さらに別の態様では、アゴニストは、天然のCAP-1と比較して位置6および位置7にアミノ酸置換を含む。置換されたアミノ酸は、細胞傷害性Tリンパ球上のTCR複合体とペプチド-MHC抗原リガンド複合体との相互作用を増強するのに役立つ。そのように増強された相互作用の結果、細胞傷害性Tリンパ球によるエフェクター機能がより大きくなる。

【0025】

置換の一例には、位置6でのAspおよびCysあるいは位置7でのIleが含まれる。一態様においては、ペプチドアゴニストには以下のアミノ酸配列が含まれる。

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
天然CAP-1									
ペプチド	Y	L	S	G	A	N	L	N	L
アゴニスト	Y	L	S	G	A	<u>D</u>	L	N	L
アゴニスト	Y	L	S	G	A	<u>D</u>	<u>I</u>	N	L
アゴニスト	Y	L	S	G	A	N	<u>I</u>	N	L
アゴニスト	Y	L	S	G	A	<u>C</u>	L	N	L

本発明のアゴニストペプチドは、組み換えDNA技術あるいは化学ペプチド合成により得ることができる。

【0026】

アゴニストペプチドは、ほ乳動物、このましくはヒトにおいて免疫原として利用するために薬学的に許容可能なキャリアーと組み合わせて薬剤組成物中に製剤化することができる。この組成物には、免疫応答を増強するために1つあるいはそれ以上の他の成分がさらに含まれており、それらにはインターロイキン2、インターロイキン6、インターロイキン12、インターフェロンガンマ、腫瘍壊死因子アルファ、GM-CSF、B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、CD72、およびシクロフォスファミドといった、免疫刺激分子が含まれるが、それらに限定はされない。

【0027】

アゴニストペプチドは、CEA特異的免疫応答、好ましくは細胞性免疫応答を誘導するのに効果的な量を動物個体に投与する。免疫源としての変異体rasペプチドの効力は、この技術分野で知られているようなin vivoあるいはin vitroのパラメーターにより決定し得る。これらのパラメーターには、抗原特異的細胞傷害性アッセイ、CEAあるいはCEAエピトープを発現している腫瘍の縮退、CEAあるいはCEAエピトープを発現している癌細胞の阻害、サイトカイン産生等が含まれるが、これらに限定はされない。

【0028】

少なくとも1つあるいはそれ以上のアゴニストペプチドは、ほ乳類のワクチン接種あたり、約0.05 mgから約10 mg、好ましくはワクチン接種あたり約0.1 mgから約5 mgの用量で投与し得る。いくつかの用量を、表示してあるように数週間の期間に渡って提供し得る。一態様においては、1ヶ月毎に3ヶ月間、ある用量を提供する。アゴニストペプチドは、リボソームに取り込まれて、単独で、あるいはアジュバントと組み合わせて、免疫応答を増強すると知られている、サイトカイン、生物応答修飾物質、あるいはこの技術分野で他の試薬と共に投与し得る（アメリカ合衆国特許番号、5,643,599; 5,464,630; 5,059,421; 4,885,172）。アジュバントには、RIBI DetoxTM、QS21、ミョウバンおよび不完全フロイントアジュバントが含まれるが、これらに限定はされない。一態様においては、変異体rasペプチドをDetoxTM (RIBI Immunochem Research, Hamilton, MT)と組み合わせて投与し得る。RIBI DetoxTMには、スクアレンおよびtween 80との水中油型の懸濁液として調製された、Mycobacterium phlei由来の細胞壁骨格およびSalmonella minnesota R595由来のモノホスホリル脂質Aが活性成分として含まれている。

【0029】

アゴニストペプチドは、ペプチドの免疫原性を増強するためにヘルパーペプチドあるいは巨大なキャリアー分子と結合させることもできる。これらの分子には、インフルエンザペ

10

20

30

40

50

プチド、破傷風毒素、破傷風毒素CD4エピトープ、シュードモナス外毒素A、ポリ-L-リジン、脂質尾部、小胞体（ER）シグナル配列および類似のものが含まれるが、これらに限定はされない。

【0030】

本発明のペプチドは、この技術分野で是認されている手法を用いて免疫グロブリン分子と結合させることもできる。免疫グロブリン分子は、腫瘍細胞上にはあるが、正常細胞上にはないかあるいは極めて低量しかない表面受容体に特異的であり得る。免疫グロブリンは、特定の組織に特異的であってもよい。そのようなペプチド-免疫グロブリン結合体により、特異的な組織および/または細胞へのペプチドのターゲティングが可能になる。

【0031】

ペプチド特異的な免疫応答をほ乳類個体に誘導するための、アゴニストペプチドのもう一つの効果的な形態は、アゴニストペプチドをパルスした抗原提示細胞である。抗原提示細胞には、樹状細胞、Bリンパ球、単球、マクロファージおよび類似のものが含まれるが、これらに限定はされない。好ましい態様においては、アゴニストペプチドをパルスした抗原提示細胞は、樹状細胞である。

【0032】

本発明は、効果的な量のアゴニストを単独で、あるいは免疫刺激分子および/またはアジュバントと組み合わせて、あるいはリポソーム製剤中で用いて、供給源由来のリンパ球を刺激することにより、CEAおよびアゴニストペプチド特異的な細胞傷害性Tリンパ球を *in vivo* あるいは *in vitro* で生み出す方法をも提供する。リンパ球の供給源には、末梢血、腫瘍組織、リンパ節、および胸膜液あるいは腹水および類似のものといった滲出液が含まれるが、これらに限定はされない。

【0033】

本発明の、CEAおよびアゴニストペプチド特異的な細胞傷害性Tリンパ球は、CEAアゴニストあるいはペプチドと免疫反応性がある。この細胞傷害性Tリンパ球は、腫瘍細胞および癌の発生を抑制し、CEAあるいはそのエピトープを発現している腫瘍細胞あるいはアゴニストを発現している腫瘍細胞の増殖を抑制するか、あるいは殺す。この細胞傷害性Tリンパ球は、抗原特異的であることに加え、MHCクラスI拘束性である。一態様においては、細胞傷害性Tリンパ球はMHCクラスI HLA-A2拘束性である。細胞傷害性Tリンパ球はCD8⁺の表現型を有する。

【0034】

CEAあるいはCEAエピトープを発現している癌腫細胞を保有する、選択された患者に、適切なペプチドアゴニストを混ぜたDETOXTMアジュバントを、1ヶ月間の間隔で3回まで皮下にワクチン接種し、ペプチドアゴニストを *ex vivo* であらかじめパルスした自己由来の末梢血単核球を単独であるいはペプチドアゴニストと組み合わせて、癌腫患者にワクチン接種することもできる。抗CEA T細胞応答は、増殖アッセイにより測定して評価する。

【0035】

本発明のCEAアゴニストペプチドによるワクチン接種は、高度に特異的かつ全身性の抗CEA細胞性免疫応答を誘導する。さらに、そのようなMHCクラスI拘束性のアゴニストペプチドの開発は、癌患者において特異的なCD8⁺ CTLの誘導および増殖のために用い得る、能動的（すなわちワクチン接種）および受動的（すなわち細胞養子移入のための *ex vivo* 拡大）免疫療法の双方に重要に密接に関係している。

【0036】

結腸癌、肺癌、膵臓癌、子宮内膜癌、乳癌甲状腺癌、メラノーマ、口腔癌、喉頭癌、精上皮腫、肝細胞癌、胆管癌、急性骨髄芽球性白血病、基底細胞癌腫、扁平上皮癌腫、前立腺癌および類似のものを含むがこれらに限定はされない、CEAあるいはそのエピトープを発現している固形腫瘍を持った患者は、アゴニストペプチドによる免疫の恩恵を受ける。本発明のアゴニストペプチドを用いた治療に敏感に反応する患者は、CEAあるいはCEAエピトープを有する癌を持った患者である。

【0037】

ペプチドは、GMP条件下で化学的に合成し、HPLCにより>95%の純度にまで精製し、凍結乾燥することができる。薬剤組成物は、ペプチドを塩化ナトリウムなどの薬学的に許容可能なキャリアーとともに再構成することにより製剤化する。一例においては、それぞれミリリットルの溶液には1500 µgのアゴニストペプチドと9.0 mgの塩化ナトリウムが含まれる。

【0038】

アゴニストペプチドをアジュバントと投与する場合は、患者に投与する直前にペプチドをアジュバントと混ぜるのが望ましい。

【0039】

アゴニストペプチドは、皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、静脈内および類似のものを含むがそれらに限定はされない様々な経路で患者に投与することができる。一態様においては、アゴニストペプチドは皮下に投与する。ペプチドは、1つあるいはそれ以上の部位で患者に投与し得る。一態様においては、ペプチドは、単独であるいはアジュバントと組み合わせて、三角筋、大腿および腹の上の3箇所にて皮下投与する。

【0040】

免疫応答を誘導するもう一つの方法では、アゴニストペプチドをパルスした抗原提示細胞を、抗原特異的な免疫応答を誘導するのに効果的な量で患者に投与する。抗原提示細胞には、樹状細胞、Bリンパ球、単球、マクロファージおよび類似のものが含まれるが、これらに限定はされない。一態様においては、樹状細胞をRomani, N.ら(1994)に記載の方法により患者から単離する。単離された樹状細胞をアゴニストペプチドと共に約0.5から約3時間の間、*in vitro*で培養し、洗浄して、結合していないペプチドを除く。アゴニストペプチドをパルスした樹状細胞を、約 10^6 から約 10^9 個の樹状細胞の濃度で患者に戻し移入する。そのような濃度は、腫瘍細胞の増殖を抑制するかあるいは殺すことのできるアゴニストペプチド特異的な細胞傷害性Tリンパ球の誘導を含む、患者において免疫応答を誘導するのに効果的である。

【0041】

免疫した患者における抗腫瘍応答を決定するための基準は以下の通りである。

1. 完全寛解(CR)：腫瘍のあらゆる証拠の完全な消失および最低4週間の、異常分析の正常レベルへの復帰。

【0042】

2. 部分的応答(PR)：少なくとも4週間、どの病変部の進行もなく、いかなる新たな病変部の出現もない状態で、測定した全ての病変部の垂直直径(perpendicular diameters)の結果の合計の、少なくとも50%の減少。

【0043】

3. 安定した疾患(SD)：部分的応答あるいは進行に必要とされるものを満たすには小さすぎるような、測定可能な疾患の変化であり、すくなくとも12週間、新たな病変部が全く出現しない。疾患の悪化はない場合がある。

【0044】

4. 進行性の疾患(PD)あるいは再発：進行性の疾患であるとみなされるためには、以下の基準のうちどの1つも満たされていなければならない：
悪性疾患の新たな領域の発生(測定可能あるいは触診可能)
測定可能な悪性疾患の処理前の領域の増加(>25%)。

【0045】

アゴニストペプチドによる免疫化に対する免疫学的応答は、ワクチン接種の前後の、*in-vitro* T細胞増殖アッセイおよび/または*in-vitro* T細胞細胞傷害性アッセイにより評価する。

【0046】

本発明には、腫瘍特異的なアゴニストペプチドに対する、T細胞増殖および細胞傷害性T細胞株の樹立のための*in vitro*免疫が含まれる。末梢血単核球(PBMC)、リンパ節組織(LNT)、あるいは腫瘍浸潤リンパ球(TIL)由来のペプチド特異的なT細胞の、アゴニストペ

10

20

30

40

50

プチドおよびIL-2による *in vitro* 培養は、CEAおよびアゴニストペプチド特異的なT細胞を生み出す。これらのT細胞を、アゴニストペプチドにより感作されたAPC（EBVトランスフォームされた自己のB細胞あるいは自己の腫瘍細胞を本明細書中で記載した）に対する細胞傷害性に関して分析する。生み出されたT細胞クローンを、CD3、CD4、およびCD8の発現に関してフローサイトメトリーにより表現型を特徴づける。CEAあるいはCEAエピトープを発現している腫瘍細胞を抑制あるいは殺すために、アゴニストペプチド特異的な細胞傷害性リンパ球を、患者に養子移入することができる。次に、好ましくはアジュバントと共にアゴニストペプチドで、患者を再免疫し得る。

【 0 0 4 7 】

概して、例えば、30から60分間に及ぶ、それぞれ約200から約250 mlの、1から3回の注入など、注入毎に約 1×10^5 と 2×10^{11} 個の間の細胞傷害性T細胞を投与する。注入の完結後、患者をインターロイキン2（IL-2）といった生物学的応答修飾物質にて処理し得る。IL-2の場合、組み換えIL-2を静脈内に、8時間毎にkg体重あたり720,000 IUの用量で投与する。抗原特異的な細胞傷害性T細胞の患者への養子移入後、*in vivo* でT細胞の数をさらに拡大させるために、細胞傷害性T細胞を感作するのに用いたアゴニストペプチドにて患者をさらに処理し得る。

【 0 0 4 8 】

本発明は、アゴニストペプチドをコードするDNA配列およびその変異体を包含する。

【 0 0 4 9 】

一態様においては、アゴニストペプチドをコードするDNA配列は、以下の配列、

TAC CTT TCG GGA GCG AAC CTC AAC CTC (SEQ. ID No:6)

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu (SEQ. ID No:1)

を含むDNA配列の変異体である。

【 0 0 5 0 】

SEQ. ID No:6の変異体の1つには、コドンCTC（位置7のLeu）の代わりにコドンATC（Ile）が含まれるが、それに限定はされない。SEQ. ID No:6の別の変異体には、コドンAAC（位置6のAsn）の代わりにコドンTGT（Cys）が含まれるが、それに限定はされない。

【 0 0 5 1 】

別の態様においては、アゴニストペプチドをコードするDNA配列には以下のもの、

TAC CTT TCG GGA GCG GAC CTC AAC CTC (SEQ. ID No:7)

Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Leu Asn Leu (SEQ. ID No:2)

およびその変異体が含まれる。

【 0 0 5 2 】

さらに別の態様においては、アゴニストペプチドをコードするDNA配列には、以下のもの、

TAC CTT TCG GGA GCG GAC ATC AAC CTC (SEQ. ID No:8)

Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Ile Asn Leu (SEQ. ID No:3)

またはその変異体が含まれる。

【 0 0 5 3 】

本発明の範囲内には、機能的に等価なアゴニストペプチドあるいは増強された免疫原性を有するペプチドをもたらず修飾を提供する、コドン縮重性に基づく保存的な置換が含まれる。

【 0 0 5 4 】

本発明はさらに、アゴニストペプチドをコードするDNAを含むベクターおよびプラスミドを提供する。このベクターには、*E. coli* プラスミド、リステリアベクターおよび組み換えウイルスベクターが含まれるがこれらに限定はされない。組み換えウイルスベクターは、アゴニストペプチドをコードするDNA配列を含む、オルトボックスウイルス、アピボックスウイルス、カプリボックスウイルス、スイボックスウイルス、ワクシニア、バキュロウイルス、ヒトアデノウイルス、SV40、ウシパピローマウイルス等を含むがこれらに限定はされない。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

組み換えアゴニストペプチドは、Bei et al J. Clin. Lab. Anal. 9:261-268 (1995)の方法に従い、バキュロウイルス発現系を用いて得ることができる。組み換えウイルスベクターは、アメリカ合衆国特許番号5,093,258 ; WO96/10419 ; Cepko et al Cell 37:1053-1062 (1984) ; Morin et al Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:4626-4630 (1987) ; Lowe et al Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3896-3900 (1987) ; Panicali & Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:4927-4931 (1982) ; Mackett et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:7415-7419 (1982) ; WO 91/19803 ; Perkus et al Science 229:981-984 (1985) ; Kaufman et al Int. J. Cancer 48:900-907 (1991) ; Moss Science 252:1662 (1991) ; Smith and Moss, BioTechniques, Nov/Dec, p.306-312 (1984) ; アメリカ合衆国特許番号4,738,846 ; Sutter and Moss Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10847-10851 (1992) ; Sutter et al Virology (1994) ; およびBaxby and Paeletti Vaccine 10:8-9 (1992)などの、この技術分野で知られている方法により構築することができる。

10

【 0 0 5 6 】

ベクターあるいはプラスミドにより運ばれるアゴニストペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞は、原核および真核の宿主細胞であり、E. coli、リステリア、バチルス種、COS細胞、Vero細胞、トリ胚、線維芽細胞、腫瘍細胞、抗原提示細胞および類似のものが含まれるが、それらに限定はされない。宿主細胞が抗原提示細胞の場合は、宿主細胞はさらにMHCクラスI分子を発現していなければならない。

【 0 0 5 7 】

我々は、最近、rV-CEAで免疫した患者におけるCEAに対するCTL応答の証拠を報告した(11)。(a)HLA-A2に対する強い結合する、および(b)正常組織上に発現しているCEA遺伝子ファミリーのうちの他のメンバーとの非同源性のため、9-merのペプチドCAP1を用いてCTLはin vitroで拡大させた。同じ患者の免疫前血液では増殖しなかったのに対し、CTLが免疫後の患者のPBMCから生じた。加えて、CAP1をパルスした樹状細胞は、免疫していない癌患者の末梢血由来の-A2拘束性CTLのin vitroの増殖を刺激した(12)。最終的に、全長CEA mRNAをコードする樹状細胞で刺激することによりCTLをin vitroで生じさせた場合は、CAP1に対する細胞傷害性は、他の6個の-A2結合性CEAペプチドに対する活性よりも高かった(S. Nair and E. Gilboa、私信あるいは未発表の観察)。そのような結果は、CAP1はCEA分子の免疫上優位なエピトープであるという意見を指示する。

20

30

【 0 0 5 8 】

本発明は、非アンカー位置にアミノ酸置換を導入して本発明のアゴニストペプチドを形成することにより、CAP1ペプチドの免疫原性を改善することを意図する。エフェクターとしてT-Vac8 CTLを用いる場合は、類似体CAP1-6DはCAP1そのものよりもずっとよく、溶解する標的細胞を感作した。さらなる研究により、第二の-A2拘束性、CAP1特異的CTLであるT-Vac24の細胞溶解活性は、CAP1-6Dにより、CAP1によるのと同程度かあるいはそれよりも大きかったということが示された。これらの増強された反応性の証明は、クラスI MHCによる改善された提示ということでは説明できない。結局、CAP1-6Dは、癌腫患者および正常なドナーの両者のPBMCから、in vitroでCTLを刺激するのに用いることができた。本発明に先行して、この同じ方法論を用いて正常なドナーから抗CAP-1 CTLを刺激するという試みは、成功しなかった。本発明は、天然の配列による刺激が特異的な細胞傷害活性を生み出すのに失敗した、天然のCAP1による刺激とは対照的に、CAP1-6Dで正常なドナーを刺激することに関連する。対照的に、Cap1-6Dによる刺激により、特異的な抗CAP1ペプチド反応性も抗腫瘍反応性をも有するいくつかのCTLが生み出された。したがって、類似体ペプチドCAP1-6Dは天然のCAP1よりも効果的に、CAP1特異的なヒトCTLの集団を選択することができる。そのようなアゴニストは、CEAを発現している癌腫に対するT細胞指向性のワクチンの設計に応用できるだろう。

40

【 0 0 5 9 】

本発明は、養子免疫療法のための腫瘍特異的T細胞のより効率的な誘導および拡大にも関連する。近年、クラスI HLA抗原によりCTLに提示され得る腫瘍関連抗原ペプチドの特徴づ

50

けにおいて多大な進展が達成された。点突然変異したras (35、36)、p53 (37、38) あるいは -カテニン (39) などの、変異がネオ抗原を生み出すような例では、ワクチン接種戦略は、免疫系は一度も出会ったことのない抗原に対しては“寛容”ではないという仮説のもと、新規の配列を標的とする。さらに最近では、ネオ抗原は翻訳後脱アミノ化によっても生じ得るということが提唱された (29、40)。しかし、多くの例では、癌療法の意図した標的はネオ抗原ではなく、むしろ、悪性細胞により過剰発現されたあるいは異所性に発現された、正常の腫瘍胎児性あるいは分化抗原である。それがCEAの場合である (41)。そのような状況では、“寛容”に頼ったモデルから、免疫系はこれらの抗原に出会ったことがあり、それらに対してはあまり応答できないと予想される。この古典的な概念は近年、過剰発現した分化抗原、癌遺伝子、および癌抑制遺伝子 (37、38、42-44) に対して引き出される免疫に関する多数の報告により疑われている。それにも関わらず、目的の抗腫瘍活性を持ったT細胞を誘導し拡大させることはしばしば経験的に困難であり、それゆえ、CTLを誘導するための新しい戦略を工夫することが望まれている。

10

【0060】

いくつかのクラスII結合性ペプチドが、置換によりクラスII抗原への結合を増加させることなくマウスおよびヒトのThクローンの応答を増強すると記載された (29、45-47)。しかし、ヒトのクラスIペプチドの中では、CTLの誘導に関して記載されている唯一の置換は、HLAに対する結合を増加させるものであった (17-20)。それらの研究における置換は、クラスI MHC抗原に対する結合モチーフを規定する一次あるいは二次アンカー位置にある残基を目的としていた。非アンカー位置を目的とした置換 (19) であっても、HLA-A2に対する結合性をあげることによりその増強効果を達成していた。本報告中の類似体CAP1-6Dは、異なる種類の置換CTLペプチド、T細胞受容体によるペプチド-MHCリガンドの認識を増強し、結合を上昇させることなくより大きなエフェクター機能を生み出すアゴニストであるとみられるものの典型である。我々の知る限り、これは、ヒトのCTLについて記載された最初のそのようなエンハンサーアゴニストペプチドである。

20

【0061】

CAP1-6Dの存在下における標的の溶解感受性の上昇は、よりよい抗原提示によるものではないようである。結合実験により、HLA-A2は天然のCAP1を提示し、類似体CAP1-6DおよびCAP1-7Iをほぼ同程度に提示することが示される。別の可能性は、CAP1-6Dは1つ以上の対立遺伝子により提示されるT-Vac8はペプチド-MHC複合体に対して無差別であるために、活性の上昇を示す、というものである。しかし、T-Vac8、T-Vac24、および免疫していない患者由来のCTLは、CAP1-6Dにより、よりよい溶解を示した。HLA-A2は用いた標的上の唯一のクラスI MHCであるため、改善された溶解は別のクラスI MHCの補充では説明できない。

30

【0062】

複数のドナー由来の抗CAP1 CTLはアゴニスト交差反応性を示すため、多数の-A2個体由来のCTLの増殖を刺激するのにCAP1-6Dを用いることができたということがあり得る。T-Vac8とT-Vac24の間の、アゴニストに対する応答の程度における極めて明確な違いにより、我々は励まされている；このことは、それぞれのエフェクターはことなるTCR遺伝子区分を利用しているということ、および、それにも関わらずそれらは天然の配列およびCAP1-6D置換の両方を認識することができるということを意味している。CAP1-6Dの、異なるT細胞受容体を発現しているT細胞を伴うアゴニストとして作用する能力は、治療能力を明らかに拡大させる。したがって、本発明は、アゴニストで刺激し、その結果、免疫していない個体において正常の配列を認識するT細胞を誘導することにも関連する。そのような個体は、おそらく、修飾された配列には一度も出会ったことがないだろうし、そして、アゴニストはT細胞応答を誘発することにおいてより効率的であるため、そのようなアゴニストは天然の配列に基づいた免疫原よりも容易にCTLを選択することができるだろう。

40

【0063】

ペプチド由来のCTLは有用な治療剤であるためには、内在性の抗原を発現する腫瘍細胞を溶解することができるということを証明することが必須である (48、49)。以前 (11) に、我々は、腫瘍細胞はCEAを加工し、CAP1による刺激によって生み出されたCTLにより認識

50

される抗原を提示しているということを示した。本発明に従い、CAP1-6Dによる刺激によって正常なドナーから増殖させたCTLも、同種異系のCEA陽性、HLA-A2陽性の腫瘍細胞を認識することができる。これらのT細胞は-A2陰性の腫瘍細胞あるいはCEA発現のない-A2陽性の細胞を認識できない。

【0064】

我々は、CAP1-6Dアゴニストによって選択されるCTLは、その後天然のCAP1配列による刺激によって維持することができるということも示した。患者のCTLは、in vivoで能動的な免疫によって樹立されたか、ex vivo拡大後に養子移入されたかによらず、天然の配列のみに出会うとみられるため、このことは重要な知見である。これにより、CTLをin vivoで延長した期間維持することができる。

10

【0065】

CAP1を選択し試した元々の理由のうちの1つは、ヒトゲノム中の報告されている他の配列と同一でないことであった。それゆえ、達成されたあらゆる免疫応答は他の抗原を持った正常組織を傷害しないだろうと予想された。この理由により、ペプチドCAP1-6DおよびCAP1-71に関してタンパク質データベースの同様の検索に着手し、それらがGenebank (Genetics Computer Group, Madison, WI)の他の場所にはヒトの配列としては報告されていないことが明らかになった。しかし、2つの類似の配列、YLVNVDLNL (SEQ. ID No: 9)およびYLHDFEFL (SEQ. ID No: 10)がそれぞれアフリカ豚コレラウイルスおよび麻疹ウイルス由来の抗原について報告されている。これらの配列はHLA-A2の共通モチーフに一致しており、それゆえ感染された個体にCAP1と交差反応性の抗原を発現させる。興味深い可能性の1つは、何人かの患者に抗CAP1 CTLが存在することはエピトープ模倣の一例を表しているということである(50)。

20

【0066】

最近の2つの報告では、修飾されたアスパラギン残基はクラスI MHCペプチドの免疫原性を増強し得ると示唆している。Skipperら(40)はリンパ球腫瘍細胞混合培養にて誘導したCTLを用いて、メラノーマ細胞の抽出物中の抗原を同定した。抗原性のある1つのペプチドは、チロシナーゼ由来の配列と9位置中8個が同一であり、位置3のアスパラギンがアスパラギン酸に置き換わっていた。合成ペプチドを用いて分析したところ、CTLは遺伝的に予想されたアスパラギンを含むペプチドに対してよりもアスパラギン酸ペプチドに対してより活性であった。これらの著者らは、翻訳後脱アミノ化が正常の分化抗原から抗原性のあるペプチドを生み出し得ると予想している。最近、Chenら(51)は、アスパラギンを含む抗原性ペプチドの安定化されたサクシミド誘導体に対するマウスCTLの誘導を報告している。これらのCTLは天然のアスパラギンペプチドでパルスした標的を殺すことができるが、その感受性は低かった。彼らは、in vivoおよびin vitroにおけるタンパク質の脱アミノ化は、免疫応答を誘導することができる、改変された自己リガンドを表す、一過性のサクシミド中間体を作りだし得るという可能性をあげている。KershおよびAllen(52)は、ヘモグロビンペプチド中のTCRに接触するアスパラギンをアスパラギン酸と置き換え、マウスThクローンに対する応答性を完全に破壊した。現在のところ、我々はCAP1-6Dの増強された反応性が天然の配列の脱アミノ化により、その結果CAP1によって我々が検出する反応を感作するという可能性を排除できない。しかし、免疫後のCTLを誘導したのと同じ患者の免疫前のPBMCから抗CAP1 CTLを誘導することが繰り返し不成功であったことが、これに対する反論である。同様に、予想される脱アミノ化は、T-Vac8 CTLによるCAP1-6CあるいはCAP1-71などの他の類似体の認識を説明できなかった。それよりも、T-Vac8およびT-Vac24の両方に由来するT細胞受容体も、本明細書中で記載する新しい株に由来するものも、天然のCAP1配列からいくらかの偏りがあることを認識し得るといことの方が原因であるとみられる。

30

40

【0067】

まとめると、T細胞受容体と潜在的に相互作用すると予想される位置にアミノ酸置換を持った免疫上優位なCEAペプチドの類似体の合成により、我々はエンハンサーアゴニストを同定できた。このアゴニストは、2つの異なるCEA CTLによって認識され、それらのうちの

50

一方の活性を2-3オーダーの規模で上昇させる。アゴニストは、天然のペプチド配列よりもずっと容易に、免疫していない正常のドナー由来の末梢血由来のCTLの増殖を刺激することもできた。最も重要なのは、エンハンサーアゴニストを用いて誘導したCTLは、内在性のCEAを発現している腫瘍細胞株を含め、天然の配列を提示する標的をも認識し、溶解できたことである。本発明に従い、このエンハンサーアゴニストペプチドの特徴づけが、*in vivo*で免疫源として、あるいは自己の抗腫瘍CTLの*ex vivo*拡大のために用いた場合に、より攻撃的な抗腫瘍免疫療法を容易にする。本発明にしたがって用いた合成アプローチは、他のペプチド性CTLエピトープの免疫原性を改善するのにも有用である。

【0068】

材料と方法

ペプチド

CEAペプチドCAP1の位置p5からp8に対する単一アミノ酸置換のパネルは、ピン法 (pin technology) (Chiron Mimotopes, Victoria, Australia) を使用するf-moc化学により作製された。CAP1 (YLSGANLNL) およびCAP1-6D (YLSGADLNL) は、96%以上の純度であり、マルチプルペプチドシステム (Multiple Peptide Systems) (San Diego, CA) によっても作製される。さらなるペプチドCAP1-7IおよびNCA571は、アプライドバイオシステム432Aシンセサイザーで合成され、C18逆相HPLCにより90%以上の純度にされた。

【0069】

細胞株

T-Vac8 (53) およびT-Vac24 (11) は、CEAペプチドCAP1に特異的なヒトCTLである。これらの細胞株は、以前に発表した方法 (11) に従って、CAP1およびIL-2を使用するPBMCの*in vitro*刺激によって生成された。簡単に言うと、後免疫化PBMCは、第I相試験においてrV-CEAを投与された、進行性のガンを持つHLA-A2+個体由来であった。PBMCはリンパ球分離培地 (Organon Teknika, Durham, NC) の密度勾配で分離され、 2×10^5 の細胞を50 μ g/mlのペプチドと共に滅菌96穴培養プレート (Corning Costar, Cambridge, MA) のウェルに静置した。5%のCO₂を含む加湿雰囲気中で37 °Cで5日間インキュベートした後、上清を捨て、10 U/mlのヒトIL-2 (外科部門からの譲与, NCI) を含む培地に置き換えた。培養細胞は3日毎に11日間に渡ってIL-2を与え、そして放射線照射 (4000 rad) した自己由来のPBMC (5×10^5) とペプチドを用いて再刺激した。新鮮なIL-2は3日ごとに供給し、2週間毎に引き続く再刺激を行った。CTLは、グルタミン (GIBCO/BRL)、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび10%の保存ヒトAB血清 (Gemini Bioproducts, Inc., Calabasas, CA) を含むコンプリーTRPMI (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) 培地で維持した。

【0070】

細胞株C1R-A2 (Dr. W. Biddison, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MDからの提供) は、10%牛胎児血清 (FBS, Biofluids Inc., Rockville, MD)、グルタミン、非必須アミノ酸、およびビルビン酸 (Biofluids)、および1 mg/ml G418を含むコンプリーTRPMIで維持した。細胞株174.CEM-T2 (Dr. P. Creswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CTより提供) は、内因性ペプチドプロセッシングを欠損しており、10%FBSを含むIscove's (GIBCO/BRL) で維持した。C1R-A2およびT2の両細胞株は、HLA-A2と共に内因性ペプチドを提示する。

【0071】

CEA陽性腫瘍細胞株SW480、SW1463、SW1116およびSW837は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) から入手し、ATCCカタログに記載されている各々の培地中で毎週継代した。CEA陰性黒色腫瘍株Skme124 (Dr. S. Rosenberg, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MDからの提供) は、RPMI 1640、10%FBSおよび10 μ g/ml ゲンタマイシン (Life Technologies) 中で毎週継代した。CEA陰性卵巣腫瘍CaOV3はDr. R. Freedman (MD Anderson Cancer Center, Houston TX) から提供され、15%FBS、グルタミン、12 μ g/ml インシュリン (Sigma, St. Louis, MO)、10 μ g/ml ヒドロコルチゾン (Biofluids) および10 μ g/ml ゲンタマイシンを含むRPMIで培養した。全

10

20

30

40

50

ての腫瘍株は、CTLアッセイのためにアイソトープで標識する前に、トリプシン/ベルセン (Versene) (Biofluids) で5-10分間トリプシン処理をした。高感受性ナチュラルキラー (NK) 標的K562はATCCから入手し、RPMI 1640、10%FBS中で毎週継代した。

【0072】

細胞の生成

T細胞株T-N1およびT-N2は、以下の通りにペプチドを用いた *in vitro* 刺激により二人の正常HLA-A2陽性ドナーのPBMCから生成した。最初の刺激サイクルでは、T細胞を、CD3+ MicroCollector フラスコ (Applied Immune Sciences, Santa Clare, CA) 上でのパニングによってポジティブ選択した。CD3+細胞 (3×10^6) は、感染重度 (multiplicity of infection) が10でヒトB7を発現するワクチニアウイルスによりあらかじめ感染し、50 $\mu\text{g/ml}$ CAP1あるいはCAP-6Dペプチドおよび2 $\mu\text{g/ml}$ ヒト α 2ミクログロブリン (Intergen, Purchase, NY) でバルスし、放射線照射 (10,000 rad) した、 10^6 の174.CEM-T2細胞と共に培養した。培養細胞は5%のCO₂を含む37°Cの加湿雰囲気中にて、フィーダー細胞として放射線照射 (2500 rads) された 2×10^7 の自己由来PBMCと共に、総量10 ml中に10%ヒト血清、2 mM グルタミンおよび10 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを含むRPMIの入ったT25フラスコ内でインキュベートした。培養中で24時間後、10 U/mlのhIL-2および0.1 ng/mlのrIL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を加えた。培養中で9日後、細胞は、T細胞に対する刺激細胞と2.5:1の割合で25 $\mu\text{g/ml}$ ペプチドと共にあらかじめインキュベートした、放射線照射 (10,000 rads) した自己由来EBV-B細胞を使用して再刺激し、そしてIL-2およびIL-12を24時間後再び加えた。ペプチド濃度は、最終濃度が3.12 $\mu\text{g/ml}$ に達するまで各々の続く刺激サイクルで半分にした。

【0073】

加えて、CTLは、既報の手順 (11) に従いCAP1-6Dを用いた刺激によってVac8のガン患者の後免疫化PBMCから生成した。

【0074】

CTLアッセイ

標的細胞は⁵¹Crまたは¹¹¹Inで標識して、そして丸底マイクロプレート (Corning Costar) にてペプチドと共にまたはペプチドを伴わずにウェル毎に2,000-10,000でインキュベートした。1時間後、T細胞を加えた。4時間後、上清を回収し (Skatron, Inc., Sterling VA)、アイソトープ放出を測定した。全てのアッセイは3回繰り返す、特異的放出パーセントは以下に従って計測した。

【0075】

【数1】

(観測した放出 - 自然放出)

$$\frac{\text{(観測した放出 - 自然放出)}}{\text{(最大放出 - 自然放出)}} \times 100$$

【0076】

ここでは、自然放出はT細胞を除くことで得られ、最大放出は1%トライトンX100を加えることで得られる。

【0077】

結合アッセイ

HLA-A2に対するペプチドの結合を、プロセッシング欠損174.CEM-T2細胞と共にインキュベートし、細胞表面ペプチド-A2複合体の安定性を測定することにより評価した。(30)。簡単に言うと、細胞を回収し、血清無しRPMIで洗浄した後、様々な濃度のペプチドを用いて $1-2 \times 10^6$ cells/well で一晩インキュベートした。翌日、細胞を回収し、Ca²⁺、Mg²⁺および5%FBSを含むPBSで洗浄した後、単一色フローサイトメトリー解析のため小分けした。細胞を、抗体無し、抗A2抗体A2, 69 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) あるいはアイソタイプ適合コントロール抗体UPC-10 (Organon Teknika) と共に、氷上にて1時間イン

キュベートした後、洗浄し、フルオレッセンス-イソチオシアネート (FITC) ヤギ抗マウスIg (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) で1時間染色した。細胞表面の染色はBecton Dickinsonフローサイトメーター (Mountain View, CA) にて測定され、10,000の生細胞の平均蛍光強度 (MFI) をペプチド濃度に対してプロットした。

【0078】

TCR鎖の使用

T-N1 CTLは、CAP1-6D類似体を使用した抗原刺激の5サイクルについて、記述した通りに培養した。そして、株を分離し、二分した培養細胞を5回のさらなる刺激サイクルのためそれぞれCAP1あるいはCAP1-6Dを用いて維持した。フィコールで精製したT細胞 (5×10^5) を、ヒト T細胞受容体の様々な領域に対する19種の抗V および2種の抗V マウスモノクローナル抗体のパネルを用いて染色した。細胞は10 μ g/mlの精製抗体と共に、30分間でインキュベートした。使用した非標識モノクローナルは：V 3.1クローン8F10、V 5 (a)クローン1C1、V 5 (b)クローンW112、V 5 (c)クローンLC4、V 6.7クローンOT145、V 8 (a)クローン16G8、V 12クローンS511、V 13クローンBAM13、V 2クローンF1およびV 12.1クローン6D6 (T Cell Diagnostics, Woburn, MA) およびV 18 (Immunotech, Westbrook, ME) であった。細胞を、10 μ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Southern Biotechnology Associates) を用いて暗所で30分間染色した。直接に標識したモノクローナルは：FITC標識V 11、V 21.3、V 13.6、V 14、V 16、V 17、V 20とV 22およびPE標識V 9とV 23 (Immunotech) であった。細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定し、FACSFlowバッファー (Becton Dickinson) で洗浄してBecton Dickinsonフローサイトメーターを使用して解析した。

【0079】

【実施例】

CAP1置換ペプチド

T細胞活性についての効果を調べるための位置を決定するにはいくつかの要因が考えられた。シーケンシングおよびマッピング実験により結合モチーフが決定され、その中の位置2およびC末端 (位置9あるいは10) はHLA-A2によるペプチド提示に重要である (概観のため、31参照)。加えて、位置1のTyrは効果的な二次的アンカーとして同定された (20、32)。CEAペプチドのCAP1がこれら三つの位置で好ましいアミノ酸を持っているため、これらの残基は変更しなかった。そのかわり、ヒトCAP1特異的細胞障害性T細胞を刺激する類似体を発見することを期待して、我々はTCRとの相互作用が予想される残基に注目した。可溶性HLA-A2に結合するいくつかのペプチドのX線結晶学的研究から、全ての結合ペプチドはペプチド結合溝に共通な立体構造をとることが示唆される (33)。五つの型のペプチドを調べたとき、残基5から8は結合溝から突き出ており、潜在的にTCRとの結合に有用である。そのため、位置5から8 (p5-p8) の残基を20種の天然アミノ酸それぞれを用いて合成した80種のCAP1類似体ペプチドのパネルを産生した。それらのペプチドをCAP1-pAAと表し、ここではpはペプチド中の位置を示しており、AAは置換アミノ酸を示し、一文字のアミノ酸コードを使用している；すなわち、CAP1-6Dは位置6がアスパラギン酸で占められているということである。

【0080】

CAP1-6D類似体に対する標的の亢進したCTL感受性

潜在的TCR認識におけるこれらアミノ酸置換の効果は、T-Vac8と命名されたCAP1特異的、HLA-A2拘束性ヒトCTL株を使用して研究された。簡単に言うと、T-Vac8は材料と方法で述べたように、rV-CEAを投与されていた患者からのPBMCをin vitroでペプチド刺激することによって生成された。最初のスクリーニングのため、T-Vac8を細胞障害アッセイに使用して、(三つのペプチド濃度における) ペプチドパネルの各々の構成分子と共にインキュベートして標識したC1R-A2細胞からの¹¹¹In放出を測定した。(T-Vac8不在下での) 標的からの自然放出は各々の個々のペプチドにより決定した。

【0081】

その結果は図1Aから1Dに示す。80種のの単一アミノ酸置換のうち、ほとんどでT-Vac8の細

胞障害性を活性化することに失敗した。しかし、6つの独立した置換体は反応性を持続させた。位置5において、3つの類似体CAP1-5F、CAP1-5IおよびCAP1-5Sは、CAP1自身と比較して減少したレベルであったにもかかわらず、刺激を提供した。位置6において、置換体CAP1-6CおよびCAP1-6DはT-Vac8の細胞障害性を活性化し、それらは中間的な(0.1 μg/ml)ペプチド濃度においてより活性化したため、CAP1と同じかあるいはそれ以上になるようである、からである。位置7において、類似体CAP1-7Iもまた活性を示した。最後に、位置8においては、ひとつの類似体もT-Vac8による溶解に対する標的的感受性にするにはなかった。その後、二つの最も活性の高い類似体(CAP1-6DおよびCAP1-7I)を詳細に解析し、CAP1-6Cは酸化的条件の下でジスルフィド形成に参与するために除いた。

【0082】

天然CAP1および類似体CAP1-6DとCAP1-7Iのより純粋な調製品(純度90-96%)を合成し、ペプチド濃度のより広い範囲で、標的として二つの異なる細胞株を使用してCTLアッセイを行って比較した(図2Aと2B)。T2細胞を使用すると、類似体CAP1-6Dは、天然CAP1よりも少なくとも 10^2 倍効果的であった。CAP1-6Dの細胞溶解活性は 10^{-4} μg/mlで最大値の1/2であった(図2A)。これに対し、CAP1-7I類似体と天然CAP1の配列は、ペプチド力価の全領域においてそれぞれ他方と対比でき、 10^{-2} μg/mlで最も効果的な溶解の半分を示した。標的としてC1R-A2細胞を使用すると、CAP1-6Dは溶解を媒介する点でCAP1と比較して同様に 10^2 倍と 10^3 倍の間で効果的であった(図2B)。

【0083】

CAP1-6Dペプチドもまた、第2のCEA特異的T細胞株、T-Vac24を用いて試験した(11)。この株は、天然CAP1ペプチドを用いてin vitro刺激することによる様々なガン患者のrV-CEA後ワクチン化PBMCから生成した；支配的なCD8+T-Vac8と比較すると、T-Vac24はCD4+CD8+両陽性細胞を高い割合で持っている(11)。T-Vac24を使用した4時間の ^{111}In 放出アッセイでは、CAP1-6Dは天然CAP1配列(20%溶解)より僅かに効果的であった(30%溶解)；その違いはT-Vac8の時よりも顕著ではなかったが、類似体に対する感度の増加は三つの別々な実験においてみられた。類似体ペプチドは明らかに、第2のCAP1特異的CTLの溶解装置に参与している。

【0084】

類似体および天然ペプチドはHLA-A2による同一の提示を示す

CTLアッセイにおけるCAP1-6Dの有効性の増加は、標的によるより良い提示によっている可能性がある。最も活性の高いCAP1類似体は、輸送欠損ヒト細胞株T2における細胞表面HLA-A2を測定することにより、HLA-A2に対する結合について試験された。濃度の4-log範囲にわたり比較したとき、天然CAP1および二つの類似体CAP1-6DとCAP1-7Iは全て等しくT2細胞上に提示した(図3)。加えて、分離実験は3つのペプチドで形成するHLA-A2複合体には安定性に関して明らかでない違いが見られないことを示す(図3-挿入)。ペプチドでパルスしたT2細胞を非結合ペプチドを取り除くように洗浄した時、細胞表面ペプチド-A2複合体の半減期は12.5時間(CAP1)、9.7時間(CAP1-6D)、および10.8時間(CAP1-7I)であった。どちらかといえば、アゴニストペプチドで形成される複合体は僅かに安定性が低くなるようだ。HLA-A2への結合に関して違いがないため、CTLアッセイにおけるCAP1-6Dの有効性の改善は、T細胞受容体によるより良い関与、エンハンサーアゴニストペプチドの作動特性、によっている可能性がある。

【0085】

CAP1-6Dを用いて生成されたヒトCTLも天然CAP1を認識する

CAP1-6Dアゴニストは、もしそれが確立した癌腫を持つ患者由来のCEA特異的CTLの成長を刺激することができれば、実験的および臨床的な応用に有用であろう。一つの実験では、Vac8のガン患者(T-Vac8 CTLを確立した患者と同じrV-CEA患者からのもの)由来の後rV-CEA免疫化PBMCを、CAP1-6Dを用いてin vitroで刺激し、刺激の5周目の後、CAP1あるいはCAP1-6Dでコートされている標的に対するCTL活性について検査した。この新たな株は、CAP1-6Dあるいは天然CAP1のどちらかでコートされた標的細胞に対して、ペプチド依存性細胞障害活性を示した(表1)。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

Vac8およびVac24の患者由来の後免疫化PBMCは、前免疫化PBMCが陰性であるのに対しCAP1で刺激されるとき、既にCTL活性を産生することが示されていた(11, 34)。さらに、健常で非免疫のドナーからのCTL活性をCAP1ペプチドを用いて刺激するという以前の試みは成功していなかった。アゴニストペプチドが実際に天然CAP1よりも免疫原性が高いかどうかを試験するため、我々は、CAP1-6Dを使用し、健常で非免疫のドナーからCTLを生成することを試みた。外見上健常な個人由来のHLA-A2+ PBMCは、CAP1あるいはCAP1-6Dアゴニストのいずれかで*in vitro*にて刺激された。*in vitro*刺激の4サイクルの後、細胞株を、CAP1あるいはCAP1-6DのいずれかでパルスしたC1R-A2細胞に対する特異性について検査した。

【 0 0 8 7 】

CAP1あるいはCAP1-6Dペプチドでの刺激によりT細胞株を産生する一方で、ペプチド特異的溶解はCAP1-6Dを用いて生成された株内でのみ得られた。異なるドナー由来の二つの独立したT細胞株はCAP1-6Dを使用して導き出され、T-N1およびT-N2と称された(各々、図4Aおよび図4B)。両CTL株は天然CAP1ペプチドでパルスしたC1R-A2標的を溶解する。しかし、さらに効率的な溶解はCAP1-6Dアゴニストを使用することで得られる。T-N1 CTLはCAP1よりも3-10倍低いペプチド濃度でCAP1-6Dを認識し、T-N2はCAP1よりも100倍良くそのアゴニストを認識する。これに対して、CAP1を用いた刺激によって健常なドナーからCTL細胞株を生成する試みにより、結果としてペプチド依存性溶解を持たない株が生じ、そして初期刺激サイクルでの細胞株の損失をもたらした。このように、二つのペプチドを使用してT細胞を生成する試みは、エフェクターステージ、すなわち標的の溶解においてだけでなく、おそらく低い前駆体頻度におけるT細胞の選択においても、アゴニストとしての活動を行うCAP1-6Dの能力を示した。

【 0 0 8 8 】

アゴニストを用いて確立されたCTLが天然CAP1配列で維持できるかどうかを決定するため、T-N1をCAP1-6Dを使用して前述のように5サイクルの間培養し、そしてデュプリケートの培養に分け、アゴニストあるいはCAP1上で維持した。T-N1はどちらかのペプチドを用いて刺激される場合に成長を続け、CTLアッセイでは両ペプチドに反応した。T-N1におけるTCR使用の表現型の解析により、多数の細胞(71%)がV_H12を利用し、V_H5.3を利用するのは少数であることが示される(表2)。TCR V_H使用の同パターンは、5回のさらなる刺激サイクルの間に本細胞がCAP1に対してスイッチした後に観察された。このV_H使用のパターンはT-Vac8使用パターンとは異なっていた。これらのデータは、本アゴニストがおそらく低い前駆体頻度であるT細胞を選択することができることを示し、しかしひとたび選択されれば、そのようなCTLは天然CAP1で維持されうることを示す。

【 0 0 8 9 】

CAP1-6Dを用いて生成されたCTLは特異的にCEA⁺、HLA-A2⁺腫瘍細胞を溶解した。研究は、エンハンサーアゴニストを用いて生成されたCTLが内因的にCEAを発現するヒト腫瘍細胞を溶解するという能力を決めるために行われた。T-N1およびT-N2を、CEA⁺/A2⁺(SW480とSW1463)、CEA⁺/A2⁻(SW1116)あるいはCEA⁻/A2⁺(CaOV3とSKme124)である腫瘍細胞のパネルに対して試験した。健常なドナーからのT細胞株(T-N2)を、内因的にCEAを発現する腫瘍標的を溶解するという能力について試験した。アゴニストを用いて生成されたT-N2 CTLはCEAおよびHLA-A2の両方を発現する腫瘍細胞を溶解し、その一方でCEA⁻/A2⁺Skme124黒色腫細胞の検出可能な(titratable)溶解は示さなかった(図5A)。K562の著しい溶解は観察されなかった。これに対して、天然CAP1を用いた刺激により生成した細胞株は検出可能な抗腫瘍活性を示さなかった(図5B)。CEA陽性腫瘍標的に対するT-N2の反応のHLA-A2.1の拘束性は、CEA陽性HLA-A2.1陰性腫瘍細胞、ワクチニア-A2.1構造物(rV-A2.1)の感染後のSW837、の特異的溶解によってさらに示された。SW837標的がA2.1トランスジーン無しのコントロール野生型ワクチニアに感染されたとき、溶解は観察されなかった(図6)。

【 0 0 9 0 】

第2のドナーから得られたCTL株(T-N1)が内因性CEAを発現する癌腫標的を殺す能力を図7Aおよび7Bに示す。T-N1は特異的にSW480腫瘍細胞を溶解する。これは、IFN- γ を用いて

10

20

30

40

50

腫瘍細胞を前処理、つまりHLA-A2およびCEAの両方の細胞表面密度を高める処理、をすることで79%溶解まで劇的に亢進する。T-N1殺傷の特異性は、卵巣由来腫瘍CaOV3、黒色腫瘍Skmel24、あるいはNK標的K562などのCEA⁻/A2⁺ 腫瘍を溶解する能力の無さによって示される。最後に、HLA-A2による拘束性は、T-N1がCEA⁺/A2⁻ SW1116腫瘍細胞を(図7A)、IFN- γ 処理の後でさえも(図7B)、溶解できないことにより示される。

【0091】

【表1】

表1：rVCEAで免疫したHLA-A2患者のPBMC由来のCAP1-6D類似体を用いた刺激により生成されたCTL

エフェクター/標的比	%溶解		
	ペプチドなし	CAP1	CAP1-6D
25:1	10%	41%	40%
6.25:1	0.5%	38%	46%

T細胞は5回のin vitro刺激の後にアッセイした。細胞障害活性は25 μ g/mlのペプチドでの4時間の放出アッセイにおいて決定された。

【0092】

【表2】

表2：CAP1-6Dアゴニスト上で確立したCTL株のTCR使用

TCR 使用法 ^a	T-N1 ^b		T-N1 ^c	
	%陽性 MFI		%陽性 MFI	
v β 12	71	83	70	83
v β 5.3	18	47	20	57
v β 3.1	6	48	8	46
v β 8	3	30	6	26
v β 13.6	2	19	3	39
v β 12.1	3	43	3	40

^a 19 V β および2 V α 抗体のパネルを使用してFACS解析により決定された(材料と方法を参照)。陽性に染色する抗体のみが示される。

^b 材料と方法の項に記載したように、CTL株はアゴニストCAP1-6D上で選択され、維持された。

^c CTL株は、5回の刺激サイクルの間アゴニストCAP1-6D上で選択され、さらなる10サイクルの間CAP1上で維持された。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

本発明は、それについての好ましい態様を含めて詳細に記述されている。しかし、当業者は、本開示を考慮して、本発明の精神と目的からはずれずにそれについての修正および改良を行いうる。

【 0 0 9 4 】

引用した参考文献はここに参考文献として援用する。

参考文献

1. Muraro, R., Wunderlich, D., Thor, A., Lundy, J., Noguchi, P., Cunningham, R., and Schlom, J. Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes of carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinoma versus normal adult tissues. *Cancer Res.*, 45: 5769-5780 1985. 10
2. Steward, A.M., Nixon, D., Zamcheck, N., and Aisenberg, A. Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients: serum levels and disease progress. *Cancer*, 33: 1246-1252, 1974.
3. Vincent, R.G. and Chu, T.M. Carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma of the lung. *J. Thor. Cardiovas. Surg.*, 66: 320-328, 1978.
4. Gold, J.M., Freedman, S.O., and Gold, P. Human anti CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis. *Nature New Biology*, 239: 60-62. 1973.
5. Pompecki, R. Presence of immunoglobulin G in human sera binding to carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA). *Eur. J Cancer*, 16: 973-974, 1980. 20
6. Ura, Y., Ochi, Y., Hamazu, M., Ishida, M., Nakajima, K., and Watanabe, T. Studies on circulating antibodies against CEA and CEA like antigen in cancer patients. *Cancer Lett.*, 25: 283-295, 1985.
7. Fuchs, C., Krapf, F., Kern, P., Hoferichter, S., Jager, W., and Kalden, J.R. CEA-containing immune complexes in sera of patients with colorectal and breast cancer-analysis of complexed immunoglobulin classes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 26:180-184, 1988.
8. LoGerfo, P., Herter, F.P., and Bennett, S.j. Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignancies. *Int. J. Cancer*, 9: 344-348. 1972. 30
9. MacSween, J.M. The antigenicity of carcinoembryonic antigen in man. *Int. J. Cancer*, 15: 246-252. 1975.
10. Chester, K.A. and Begent, H.J. Circulating immune complexes (CIC), carcinoembryonic antigen (CEA) and CIC containing CEA as markers for colorectal cancer. *Clin. Exp. Immunol.*, 58: 685-693, 1984.
11. Tsang, K Y., Zaremba, S., Nieroda, C.A., Zhu, M.Z, Hamilton, J.M., and Schlom, J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 982-990. 1995. 40
12. Gadea, J., Brunette, E., Philip, M., Lyeriy, H.K., Philip, R., and Alters, S. Generation of antigen specific CTL using peptide and gene modified dendritic cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (abstr)*, 3154. 1996.
13. Marshall, J.L., Hawkins, M.j., Richmond, E, Tsang, K., and Schlom, J. A study of recombinant ALVAC-CEA in patients with advanced CEA-bearing cancers., *J. Immunol. [abstr]*. 19: 461. 1996.
14. Foon, K.A., Chakraborty, M., John, W.J., Sherraff, A., Kohler, H., and Bhattacharya-Chatterjee, M. Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine. *J. Clin. Invest.*, 96: 334-342, 1995. 50

15. Fagerberg, J., Samanci, A., Yi, Q., Strigard, K., Ryden, U., Wahren, B., and Mellstedt, H. Recombinant carcinoembryonic antigen and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for active immunization of colorectal carcinoma patients. *J. Immunol.* [abstr]. 19: 461. 1996.
16. Conry, R.M., Saleh, M.N., Schlom, J., and LoBuglio, A.F. Human immune response to carcinoembryonic antigen tumor vaccines. *J. Immunother.* [abstr], 18: 137, 1995.
17. Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Kawakami, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residue. *J. Immunol.*, 157: 2539-2548, 1996. 10
18. Salgaller, M.L., Marincola, F.M., Cormier, J.N., and Rosenberg, S.A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.
19. Bakker, A.B.H., van der Burg, S.H., Huubens, R.J.F., Drijfhout, J.W., Melief, C.J., Adema, G.J., and Figdor, C.G. Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild type epitope. *Int. J. Cancer*, 70: 302-309, 1997.
20. Pogue, R.R., Eron, J., Frelinger, J.A., and Matsui, M. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92: 3166-8170, 1995. 20
21. Lipford, G., Bauer, S., Wagner, H., and Heeg, K. Peptide engineering allows cytotoxic T cell vaccination against human papilloma virus tumor antigen E6. *Immunol.*, 84: 298-303. 1995.
22. Grey, H.M., Ruppert, J., Vitiello, A., Sidney, J., Kast, W.M., Kubo, R.T., and Sette, A. Class I MHC-peptide interactions: structural requirements and functional implications. *Cancer Surv.*, 22: 37-49, 1995.
23. De Magistris, M.T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F.C.A., Grey, H.M., and Sette, A. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell*, 68: 625-634. 1992. 30
24. Bertoletti, A., Sette, A., Chissari, F.V., Penna, A., Levrero, M., Carli, M.D., Fiaccadori, F., and Ferrari, F. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature*, 369: 407410, 1994.
25. Klenerman, P., Rowland-Jones, S., McAdam, S., Edwards, J., Daenke, S., Lalloo, D., Koppe, B., Rosenberg, W., Boyd, D., Edwards, A., Giangrande, P., Phillips, R.E., and McMichael, A.J. Cytotoxic T cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 gag variants. *Nature*. 369: 403-407. 1994.
26. Kuchrco, V.K., Greer, J.M., Kaul, D., Ishioka, G., Franco, A., Sette A., Sobel, R.A., and Lees, M.B. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J. Immunol.*, 153: 3326-3336. 1994. 40
27. Jameson, S.C. and Bevan, M.J. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*, 2: 1-11, 1995.
28. Meier, U-C., Klenerman, P., Griffin, P., James, W., Koppe, B., Larder, B., McMichael, A., and Phillips, R. Cytotoxic T lymphocyte lysis inhibited by viable HIV mutants. *Science*. 270: 1360-1362. 1995.
29. Chen, Y., Matsushita, S., and Nishimura, Y. Response of a human T cell clone to a large panel of altered peptide ligands carrying single residue substitutio 50

- ns in an antigenic peptide: characterization and frequencies of TCR agonist and TCR antagonism with or without partial activation. *J. Immunol.*, 157: 3783-3790. 1996.
30. Nijman, H.W., Houbiers, J.G., Vierboom, M.P., van der Hurg, S.H., Drijfhout, J.W., D'Amaro, J., Kenemans, P., Melief, C.J., and Kast, W.M. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 23: 1215-1219, 1993.
31. Rammensee, H-G., Friede, T., and Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41: 178-228, 1995.
32. Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., and Sette, A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74: 929-937. 1993. 10
33. Madden, D.R., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, 75: 693-708, 1993.
34. Hamilton, J.M., Chen, A.P., Nguyen, B., Grem, J., Abrams, S., Kantor, J., Phares, J.C., Bastian, A., Brooks, C., Morrison, G., Allegra, C.J., and Schlom, J. Phase I study of recombinant vaccinia virus (rV) that expresses human carcinoembryonic antigen (CEA) in adult patients with adenocarcinomas. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* [abstr], 961. 1994. 20
35. Abrams, S.I., Horan Hand, P., Tsang, K.Y., and Schlom, J. Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin. Oncol.*, 23: 118-134, 1996.
36. Elas, A.V., Nijman, H.W., Van Minne, C.E., Mourer, J.S., Kast, W.M., Melief, C.J.M., and Schrier, P.I. Induction and characterization of cytotoxic T lymphocytes recognizing a mutated p21 RAS peptide presented by HLA-A2010. *Int. J. Cancer*, 61: 389-396, 1995.
37. Houbiers, J.G.A., Nijman, H.W., van der Burg, S.H., Drijfhout, J.W., Kenemans, P., van de Velde, C.J.H., Brande, A., Momburg, F., Kast, W.M., and Melief, C.J.M. In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild type p53. *Eur. J. Immunol.*, 23:2072-2077, 1993. 30
38. Ropke, M., Regner, M., and Claesson, M.H. T cell mediated cytotoxicity against p53-protein derived peptides in bulk and limiting dilution cultures of healthy donors. *Scand. J. Immunol.*, 42: 98-103, 1995.
39. Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S. A mutated betacatenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1185-1192, 1996.
40. Skipper, J.C.A., Hendrickson, R.C., Guiden, P.H., Brichard, V., van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Jr., Boon, T., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from post-translational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J. Exp. Med.*, 183: 527-534, 1996. 40
41. Thompson, J.A., Grunert, F., and Zimmerman, W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.*, 5: 344-366, 1991.
42. Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647, 1991.
43. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L, Miki, T., and Rosenberg, S.A. Cloning of the gene coding for a share 50

d human melanocyte antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 3515-3519. 1994.

44. Peoples, G.E., Goedegebuure, P.S., Smith, R., Linehan, D.C., Yoshino, I., and Eberlein, T.J. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. Proc. Nat. Acad. Sci.. 92: 432-436, 1995.

45. Matsuoka, T., Kohrogi, H., Ando, M., Nishimura, Y., and Matsushita, S. Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: up regulation of IL-12 by analogue peptide. J. Immunol., 157:4837-4843. 1996 .

46. Ikagawa, S., Matsushita, S., Chen, Y-Z, Ishikawa, T., and Nishimura, Y. Single amino acid substitutions on a Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1)-derived peptide induced alterations in human T cell responses and T cell receptor antagonism. J. Aller. Clin. Immunol., 97: 53-64, 1996. 10

47. England, R.D., Kullberg, M.C., Cornette, J.L., and Berzofsky, J.A. Molecular analysis of a heteroclitic T cell response to the immunodominant epitope of sperm whale myoglobin: Implications for peptide partial agonists. J. Immunol., 155: 4295-4306, 1995.

48. Ropke, M., Hald, J., Guldberg, P., Zeuthen, J., Norgaard, L, Fugger, L., Svejgaard, A., Van Der Burg, S., Nijman, H.W., Melief, C.J.M., and Claesson, M.H. Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. Proc. Nat. Acad. Sci., 93: 14704-14707, 1996. 20

49. Correale, P., Walmsley, K., Nieroda, C., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J., and Tsang, K.Y. In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. J. Natl. Cancer Inst., 89: 293-300, 1997.

50. Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. Cell, 80: 695-705, 1995.

51. Chen, W., Ede, N.J., Jackson, D.C., McCluskey, J., and Purcell, A.W. CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement: Implications for immunity and vaccine design. J. Immunol., 157: 1000-1005, 1996. 30

52. Kersh, G.J. and Allen, P.M. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: A single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. J. Exp. Med 184: 1259-1268, 1996.

53. Tsang, K.Y. Zhu, M.Z. Nieroda, C.A, Correale, P., Zaremba, S., Hamilton, J.M., Cole, D., Lam, C., and Schlom, J. Phenotypic Stability of a Cytotoxic T Cell Line Directed Against an Immunodominant Epitope of Human Carcinoembryonic Antigen (accepted by Clinical Cancer Res.). 40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 A - 1 D : CEA CTL T-Vac8による溶解に対するCEA CAP1ペプチドにおける単一アミノ酸置換の影響。 C1R-A2細胞を¹¹¹Inで標識し、そして1 μg/ml (黒)、0.1 μg/ml (白) および0.01 μg/ml (斜線) の各置換ペプチドとともに、丸底ウェル (2,000 / ウェル) 中で1時間インキュベーションした。T-Vac8 CTLをE:T=1.45:1で添加し、そして同位体放出を4時間後に測定した。各ペプチドに関し、自然放出を1 μg/mlで測定した。すべてのアッセイは、トリPLICATEで行った。図1A - 1Dは、それぞれ、位置p5からp8での置換を表す。アミノ酸は、一文字記号で示している ; 天然CAP1配列をコードするアミノ酸は、各図に示してあり、そして右端にある。

【図 2】 図 2 A および 2 B : CAP1および類似体は、CEA CTL T-Vac8細胞傷害性に対 50

し、異なる感受性を示す。図2AのT2および図2BのC1R-A2標的細胞を⁵¹Crで標識し、そして示されている濃度のCAP1とともに()または置換ペプチドCAP1-6Dとともに()またはCAP1-7Iとともに()、丸底96ウェルプレート(10,000/ウェル)中でインキュベーションした。1時間後、T-Vac8 CTLをE:T=2.5:1で添加し、そして同位体放出を4時間後に測定した。すべてのアッセイは、トリプリケートで行った。NCA571()は、CEAと関連遺伝子NCAの最適整列の後に得られた9量体ペプチドである(11)。

【図3】 図3: HLA-A2複合体への結合および該複合体の安定性に対するCAP1ペプチドにおける単一アミノ酸置換の影響。T2細胞を血清不含培地中に回収し、その後、示されている濃度で、ペプチドCAP1とともに()、CAP1-6Dとともに()、またはCAP1-7Iとともに()一晚インキュベーションした(10⁶/ウェル)。細胞を回収し、コンホメーション感受性Mab BB7.2、HLA特異的抗体W6/32(示されていない)およびアイソタイプコントロールAb MOPC-195(示されていない)での染色により、機能的HLA-A2分子の細胞表面発現に関しアッセイした。平均蛍光強度を、生存しているゲート化(gated)細胞集団で測定した。

図挿入: 細胞を100 μg/mlのペプチドと一晚インキュベーションし、その後、非結合ペプチドを含まないように洗浄し、そして37 でインキュベーションした。示されている時間で、細胞表面ペプチド-HLA-A2複合体の存在に関し、細胞を染色した。エラーバーは、2つの実験に対するSEMを示す。

【図4】 図4 Aおよび4 B: 外見上健康な個人からCAP1-6Dを用い生成されたCTLは、CAP1およびCAP1-6Dを認識する。CAP1-6Dを用いCTL株(T-N1およびT-N2と称される)を生成し、そしてペプチド特異性に関しアッセイした。エフェクター対標的比20:1での刺激5サイクルの後、T-N1をアッセイした(図4A)。エフェクター対標的比15:1で10サイクルの後、T-N2をアッセイした(図4B)。⁵¹Cr標識C1R-A2標的(5,000/ウェル)を、示されている量のCAP1()またはCAP1-6D()ペプチドとインキュベーションした。4時間後、ガンマカウンターで同位体放出の量を測定した。値は、トリプリケート培養から測定した。

【図5】 図5 Aおよび5 B: 外見上健康なドナー由来のCAP1-6D生成T細胞株は内因性CEA発現腫瘍細胞を認識するがCAP1生成T細胞株はしない。CAP1-6D生成T-N2 CTL(図5A)および天然CAP1で生成されたT細胞(図5B)を、腫瘍標的SW480およびSW1463(CEA⁺、HLA-A2⁺、それぞれ および)、SKmel24(CEA⁻、-A2⁺、)およびK562()に対する*in vitro*刺激9サイクルの後、アッセイした。HLAを上方制御するため - IFNの存在下で、腫瘍細胞を72時間培養した。細胞をトリプシン処理し、そして⁵¹Crで標識し、そして増加するエフェクター対標的比でT-N2 CTLとインキュベーションした(5,000細胞/ウェル)。培養を4時間インキュベーションし、そして、ガンマカウンターで同位体放出の量を測定した。値は、トリプリケート培養から測定した。

【図6】 図6: CAP1-6Dアゴニストに由来するCTL株(T-N2)のMHCクラス1 A2.1拘束性。CTL株T-N2を、ヒト結腸癌腫SW837標的細胞に対するエフェクターとして用いた。SW837はCEA陽性であり、そしてHLA-A2.1陰性である。SW837は、A2.1トランスジーンを含む組換えワクシニア(黒四角)または野生型ワクシニア()のいずれかで10:1のMOIで感染させた。

【図7】 図7 Aおよび7 B: CAP1-6Dで生成されたCTLは、CEA陽性、HLA-A2陽性腫瘍を溶解する: IFN上方制御の影響。CAP1-6Dで生成されたT-N1 CTLを多様な腫瘍細胞株: SW480(CEA⁺およびHLA-A2⁺、)、SW1116(CEA⁺だが-A2⁻、)およびCaOV3(CEA⁻だが-A2⁺、)に対しアッセイした。腫瘍細胞を - IFNの非存在下(図7A)または存在下(図7B)で72時間培養し、トリプシン処理し、そして⁵¹Crで標識し、その後、増加するエフェクター対標的比でT-N1 CTLとインキュベーションした(5,000細胞/ウェル)。培養を4時間インキュベーションし、そして、ガンマカウンターで同位体放出の量を測定した。値は、トリプリケート培養から測定した。

10

20

30

40

【 図 1 】

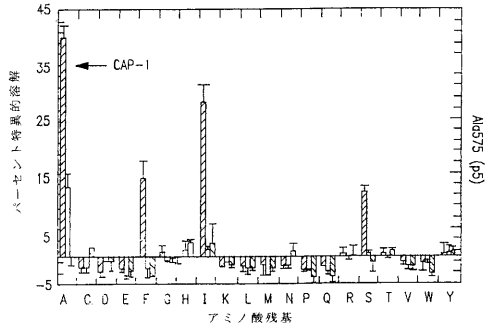


図 1A

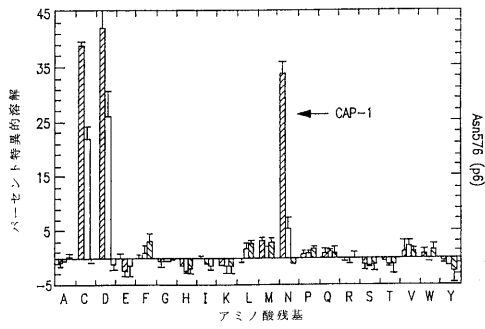


図 1 B

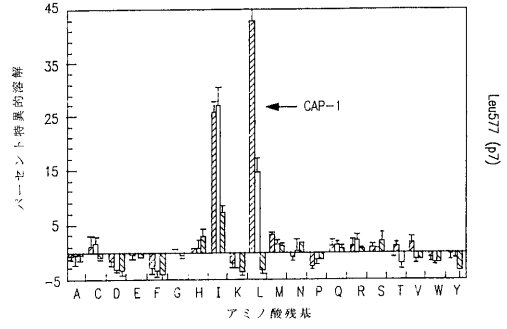


図 1 C

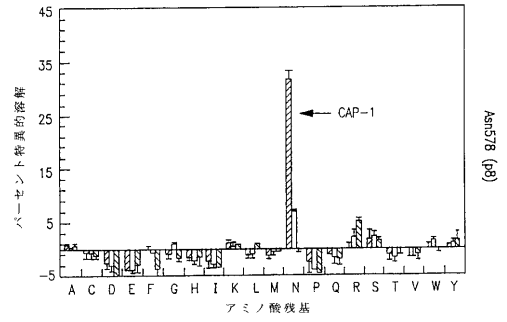


図 1 D

【 図 2 】

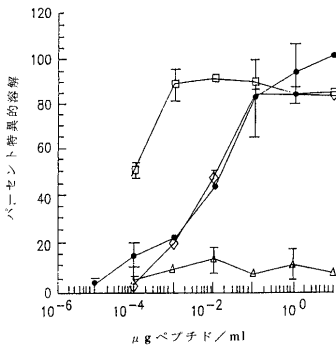


図 2A

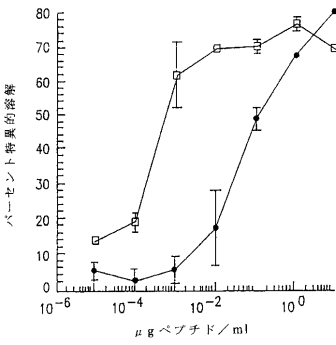


図 2B

【 図 3 】

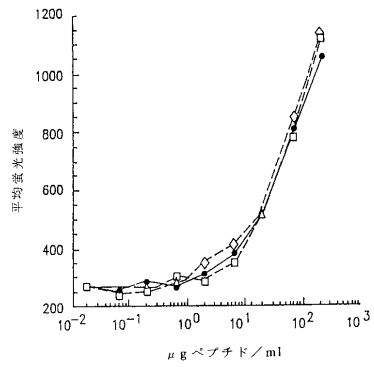


図 3A

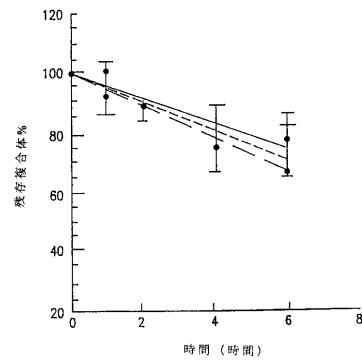


図 3B

【 図 4 】

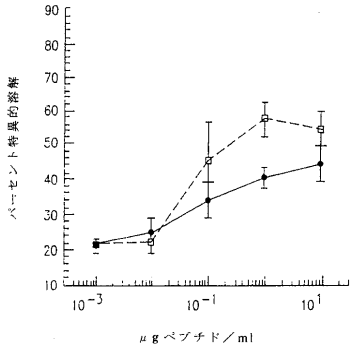


図 4A

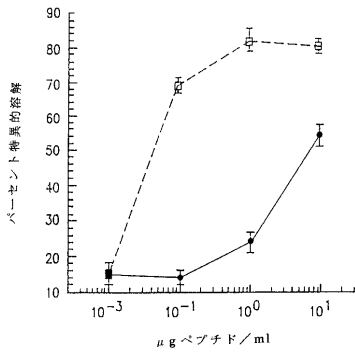


図 4B

【 図 5 】

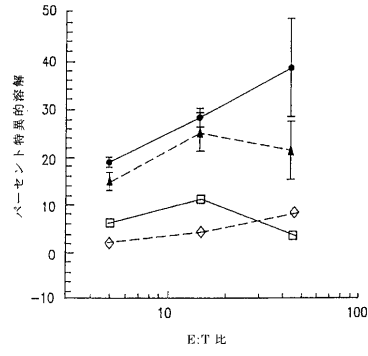


図 5A

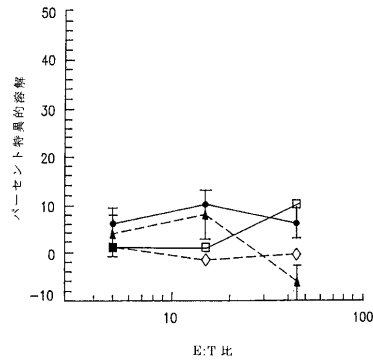


図 5B

【 図 6 】

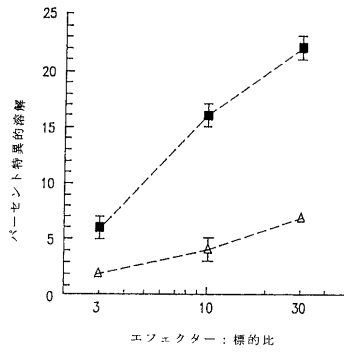
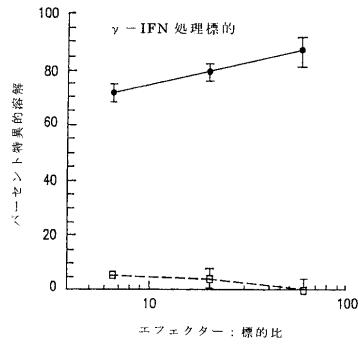


図 7B



【 図 7 】

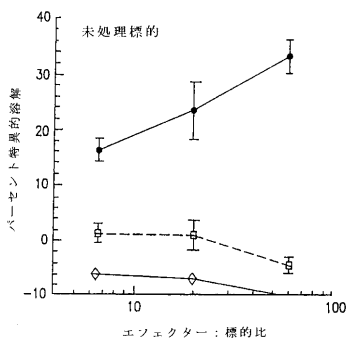


図 7A

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	B

(74)代理人 100075236

弁理士 栗田 忠彦

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100092886

弁理士 村上 清

(72)発明者 シュロム, ジェフリー

アメリカ合衆国メリーランド州20854, ポトマック, ソーレル・アベニュー 10301

(72)発明者 バーザガ, エレン

アメリカ合衆国メリーランド州20850, ロックビル, ラットガーズ・ストリート 512

(72)発明者 ザレンバ, サム

アメリカ合衆国メリーランド州20852, ロックビル, ローリンズ・アベニュー 243, ナンバー 102

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 Journal of the National Cancer Institute(1995),Vol.87,No.13,p.982-990

Cancer Research(1997.Oct),Vol.57,p.4570-4577

Hum. Immunol.(1997 Mar),Vol.53,No.1,p.81-89

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00

C07K 14/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

REGISTRY(STN)

CA(STN)