

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6523685号
(P6523685)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月10日 (2019.5.10)

(51) Int.Cl.		F 1
C07K	7/06	(2006,01)
C12N	15/11	(2006,01)
C12N	5/10	(2006,01)
A61K	38/08	(2019,01)
A61K	31/7088	(2006,01)

請求項の数 27 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-551304 (P2014-551304)
(86) (22) 出願日	平成25年1月3日 (2013.1.3)
(65) 公表番号	特表2015-504071 (P2015-504071A)
(43) 公表日	平成27年2月5日 (2015.2.5)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/020058
(87) 國際公開番号	W02013/103658
(87) 國際公開日	平成25年7月11日 (2013.7.11)
審査請求日	平成27年12月29日 (2015.12.29)
(31) 優先権主張番号	61/582, 723
(32) 優先日	平成24年1月3日 (2012.1.3)
(33) 優先権主張國	米国 (US)

前置審查

(73) 特許権者 510002280
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国 メリーランド州 208
92-7660 ベトヘスタ エムエスシ
-7660 スイテ325 エクエクトイ
ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
インスティチュート オブ ヘルス オ
フィス オブ テクノロジー トランسف
ア
(74) 代理人 100080791
弁理士 高島 一
(74) 代理人 100125070
弁理士 土井 京子
(74) 代理人 100136629
弁理士 鎌田 光宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MUC1腫瘍抗原のネイティブ及びアゴニストCTLエピトープ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号 3 2、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 4 及び配列番号 2 9 からなる群より選択される 1 以上のアミノ酸配列を含む、MUC1 ポリペプチド又はそのフラグメントであって、該ポリペプチド又はそのフラグメントがそれに含まれる前記アミノ酸配列の各々に特異的な T 細胞を活性化し得、

但し、以下のアミノ酸配列を有する 2 つのポリペプチド：

10

20

及び

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ala
 Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly
 Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn
 Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala Thr Ser Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe
 Phe Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser
 Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr
 Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His Ser Pro Gly Ser Gly
 Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly
 Ser Ala Ala Leu Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly
 Ser Thr Thr Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro Gly
 Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Tyr Leu Asp Thr Arg Pro Ala Pro Val
 Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly
 Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala
 Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser
 Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser
 Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn
 His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Leu Ser Phe His Ile
 Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu
 Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu
 Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu
 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala
 Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser
 Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val
 Leu Val Tyr Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Val Arg Arg Lys
 Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr
 Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Leu Phe Arg Ser Pro Tyr
 Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala
 Ala Ala Ser Ala Asn Leu His His His His His

を除く、MUC 1 ポリペプチド又はそのフラグメント。

【請求項 2】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むペプチドであって、該ペプチドがそれに含まれる前記アミノ酸配列の各々に特異的な T 細胞を活性化し得、

但し、以下のアミノ酸配列を有する 2 つのポリペプチド：

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Ala
 Thr Thr Ala Pro Lys Pro Ala Thr Val Val Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala
 Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr
 Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe
 Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Ala His Gly Val Thr Ser Tyr Leu Asp Thr Arg
 Pro Ala Pro Val Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Glu Ser Arg
 Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val
 Leu Val Cys Val Leu Val Tyr Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln
 Val Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro
 Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Leu Phe
 Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Leu Ser Tyr Thr Asn
 Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Leu Trp
 Gly Gln Asp Val Thr Ser His His His His His

及び

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ala

10

20

30

40

50

Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly
 Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn
 Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 Ser Leu Asp Lys Arg Glu Ala Glu Ala Thr Ser Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe
 Phe Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser
 Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr
 Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His Ser Pro Gly Ser Gly
 Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly
 Ser Ala Ala Leu Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly
 Ser Thr Thr Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro Gly
 Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Tyr Leu Asp Thr Arg Pro Ala Pro Val
 Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly
 Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala
 Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser
 Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser
 Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Ser Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn
 His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Leu Ser Phe His Ile
 Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Gly Phe Leu Gly Leu
 Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Phe Leu Gly Leu
 Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu
 Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala
 Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser
 Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val
 Leu Val Tyr Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Val Arg Arg Lys
 Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr
 Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Leu Phe Arg Ser Pro Tyr
 Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Ser Tyr Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala
 Ala Ala Ser Ala Asn Leu His His His His His
 を除く、ペプチド。

【請求項3】 30

ペプチドが、完全長MUC1アミノ酸配列又はそのフラグメントを含む、請求項2に記載のペプチド。

【請求項4】

ペプチドが、配列番号5、配列番号8、配列番号10、配列番号13、配列番号14、配列番号29及び配列番号32の1以上を更に含む、請求項3に記載のペプチド。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載のペプチド又はポリペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項6】

請求項5に記載の核酸を含むベクター。 40

【請求項7】

ベクターが、プラスミド、酵母、ポックスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス、及びシンドビスウイルスからなる群より選択される、請求項6に記載のベクター。

【請求項8】

ベクターが、オルソポックス、アビポックス、カブリポックス、及びスイポックスウイルスからなる群より選択されるポックスウイルスである、請求項7に記載のベクター。

【請求項9】

ポックスウイルスが、ワクシニア、鶏痘、及びカナリア痘ウイルスからなる群より選択される、請求項8に記載のベクター。 50

【請求項 10】

(i) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のペプチド又はポリペプチド、(i i) 請求項 5 に記載の 1 つ以上の核酸、又は(i i i) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のベクターを含む、単離された細胞。

【請求項 11】

細胞がヒト細胞である、請求項 10 に記載の細胞。

【請求項 12】

細胞が、抗原提示細胞又は腫瘍細胞である、請求項 10 又は 11 に記載の細胞。

【請求項 13】

(a) (i) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のペプチド又はポリペプチド、(i i) 請求項 5 に記載の 1 つ以上の核酸、(i i i) 請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のベクター、又は(i v) 請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の 1 つ以上の細胞 10
、及び

(b) 医薬上許容される担体
を含む組成物。

【請求項 14】

さらに免疫賦活 / 制御分子を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

免疫賦活 / 制御分子が、インターロイキン (I L) - 2 、 I L - 4 、 I L - 6 、 I L - 20
12 、インターフェロン (I F N) - 、腫瘍壊死因子 (T N F) - 、 B 7 . 1 、 B 7
. 2 、 I C A M - 1 、 L F A - 3 、 C D 7 0 、 R A N T E S 、 G - C S F 、 O X - 4 0 L
、 4 1 B B L 、抗 C T L A - 4 、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 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

免疫賦活 / 制御分子が、(i) キトサンと複合化した、 I L - 1 2 をコードするプラスミド、及び(i i) キトサンと混合した組換え I L - 1 2 からなる群より選択される、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

化学療法剤、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、シクロフォスファミド、又はそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 18】

1 つ以上のアジュバントをさらに含む、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

1 つ以上のアジュバントが、ミョウバン、アルミニウム塩、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、アルミニウムシリカ、リン酸カルシウム、不完全フロイントアジュバント、 Q S 2 1 、 M P L - A 、 R I B I D E T O X ^{T M} 、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 18 に記載の組成物。 40

【請求項 20】

顆粒球单球コロニー刺激因子 (G M - C S F) をさらに含む、請求項 13 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

リポソームをさらに含む、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチド又はポリペプチドを含むリポソーム。

【請求項 23】

請求項 2 2 に記載のリポソーム及び医薬上許容される担体を含む組成物。

【請求項 24】

対象において免疫応答を増強するための、請求項 13 ~ 21 及び 23 のいずれか一項に 50

記載の組成物。

【請求項 25】

対象においてMUC1を発現する癌を抑制するための、請求項13～21及び23のいずれか一項に記載の組成物で刺激されたリンパ球を含む組成物。

【請求項 26】

対象においてMUC1を発現する癌を抑制するための、請求項13～21及び23のいずれか一項に記載の組成物で処理された樹状細胞を含む組成物。

【請求項 27】

対象においてMUC1を発現する癌を抑制するための、養子移入されるT細胞を產生する方法であって、請求項13～21及び23のいずれか一項に記載の組成物でin vitroにてT細胞を刺激する工程を含む、方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2012年1月3日出願の米国仮特許出願第61/582,723号(参照により組み込まれる)の利益を主張する。

【0002】

電子出願された物件の参照による組み込み

本願明細書と同時提出され、かつ、以下の通り識別されるコンピューター可読のヌクレオチド/アミノ酸の配列表が、本明細書中、参照によりその全体が組み込まれる: 2013年1月2日付ファイル名「711788_ST25.txt」、7,367バイトのASCII(テキスト)ファイル1件。 20

【背景技術】

【0003】

MUC1(CD227)は、小さなC末端サブユニット(MUC1-C)に共有結合する大きなN末端サブユニット(MUC1-N)のヘテロ二量体から構成されるI型膜糖タンパク質である。MUC1-Nは、完全に細胞外であり、高度にグリコシリ化されており、20アミノ酸の可変数タンデムリピート(VNTR)ドメインからほとんど全てが構成される。MUC1-Cは短い細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質テール又はドメイン(MUC1-CD)からなる。 30

【0004】

MUC1は、通常、上皮細胞の頂端表面上、及び造血細胞や活性化T細胞などの非上皮細胞の小さなサブセット中に発現する。健康な上皮におけるその主な機能は、潤滑、並びに化学薬品及び微生物因子に対する物理的バリアを提供することである。他の細胞タイプにおける、その生理的役割は明確ではない。

【0005】

多くのヒト癌腫(卵巣、胸、肺臓、大腸及び前立腺など)及び血液系腫瘍(多発性骨髄腫及びいくつかのB細胞非ホジキンリンパ腫など)は、MUC1を異常に過剰発現するということが証明されている。正常な組織におけるそのクラスター化した発現と対照的に、MUC1は腫瘍細胞の全表面に均一に分散する。さらに、MUC1は、一般的に腫瘍においてグリコシリ化が不十分であり、タンパク質コアの新規かつ潜在的な抗原エピトープを免疫システムにさらしている。MUC1の発現及び分泌は、予後不良及び高転移能とも関連している。 40

【0006】

MUC1は腫瘍関連抗原であるため、MUC1を治療用の癌ワクチンのターゲット候補として利用する多くの計画が、癌ワクチンに対するターゲット候補としてのMUC1の利用に対して最近の20年の間評価されている。臨床試験では、タンパク質、ペプチド、アジュバント、担体、ex vivoで培養された樹状細胞(DCs)、可溶化液、樹状細胞融合、リポソーム、ポックスウイルス、アデノウイルス、酵母、及び樹状細胞をターゲ 50

ットとする C 型レクチンが試験されている。

【 0 0 0 7 】

免疫療法に対するターゲットとして M U C 1 を使用するほとんどの臨床試験は、長期完全寛解に達することができなかった、進行した転移性疾患を有する被験者を登録する。この結果における 1 つの要因は、これらの臨床試験の大多数は、M U C 1 に対する体液性免疫応答又は細胞性免疫応答を高めるために、V N T R ドメインに焦点をあてていることだといえる。腫瘍進行の間に血液中に流される、V N T R ドメインを含む N 末端サブユニットの相当量は、表面上に M U C 1 を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答の欠如を部分的に説明できる。

【 0 0 0 8 】

M U C 1 - C は、M U C 1 の C 末端サブユニットである。M U C 1 の切断後、大きな細胞外サブユニットにも関わらず、M U C 1 - C は、シングルパス（ 28 アミノ酸）膜貫通ドメイン（ T D ）によって、細胞膜に固定されたままである。M U C 1 ではなく、M U C 1 - C が、おそらく N 末端サブユニットの切断により、いくつかの種々の腫瘍細胞株及び癌標本でタンパク質の優勢な形態であることが明らかになっている。さらに、N 末端サブユニットが 1 又は 2 点でクラスター化され、健康な上皮における M U C 1 の正常な挙動を想起させるのに対して、M U C 1 - C は、腫瘍細胞の表面全体にわたって均一に分布する。重要なことに、いくつかの組織標本では、M U C 1 - C の存在に対してポジティブに染色されるが、N 末端サブユニットに対してはネガティブとなり得ることが実証されている。

【 0 0 0 9 】

最近の数年間において、癌遺伝子としての M U C 1 - C の役割に関する証拠が急速に蓄積されている。M U C 1 - C D の 72 アミノ酸残基は、いくつかのミトコンドリア、細胞質、細胞膜、及び核成分との相互作用を伴う、細胞内シグナリング機能の注目に値する範囲と関連する。M U C 1 - C D は、鎖関連 70 - k D プロテインキナーゼ（ Z A P - 70 ）、プロテインキナーゼ C の アイソフォーム（ P K C ）、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 （ G S K - 3 ）、並びにチロシンキナーゼ c - S r c 及び L c k などのいくつかのキナーゼに対するターゲットである。M U C 1 - C D のリン酸化は、線維芽細胞増殖因子レセプター 3 、血小板由来増殖因子レセプター、及び E r b B ファミリーのメンバーを含むいくつかの細胞表面増殖因子レセプターの活性化に反応して起こるかもしれない。リン酸化に加え、M U C 1 - C D は、 - カテニン、エストロゲンレセプター - 、及びヒートショックプロテインなどのいくつかのタンパク質及びレセプターと直接結合できる。M U C 1 - C トランスフェクションは、増殖率の増加、足場非依存性の細胞増殖、及び化学療法剤に対する耐性など、予め全長の M U C 1 タンパク質に起因する形質転換の誘導及び発癌活性を起こすのに十分である。c - S r c により活性化された M U C 1 - C シグナリングは、癌細胞の運動性、浸潤、転移を刺激する E - カドヘリン接着結合及びインテグリン接着斑の両方の崩壊に関わっており、上皮間葉転移における M U C 1 - C の潜在的役割を示唆する。特異的細胞内 M U C 1 ペプチドが、癌の進行を抑制できるということも証明されている。最後に、M U C 1 - C はヒト多能性幹細胞の増殖を媒介し、その発現は、未分化細胞を同定及び単離するためのマーカーとして利用できるということが示されている。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

M U C 1 - C の新たな特異的細胞傷害性 T リンパ球（ C T L ）エピトープ及びエンハンサー・ゴニストペプチドの同定が望まれている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明は、配列番号 2 、配列番号 5 、配列番号 8 、配列番号 10 、配列番号 13 、配列番号 14 、配列番号 29 、及び配列番号 32 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含

10

20

30

40

50

む、単離されたペプチドを提供する。本発明は、20以下のアミノ酸残基を有し、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号11、配列番号15、配列番号26、又は配列番号30を含む、単離されたペプチドも提供する。

【0012】

他の側面において、本発明は、ペプチドをコードする核酸と、核酸を含むベクターと、ペプチド、核酸又はベクターを含む細胞と、それらの組成物とを提供する。

【0013】

本発明は、宿主においてMUC1を発現する癌に対する免疫応答の増強方法であって、ペプチド、核酸、ベクター又は細胞を含む組成物の治療上有効量を宿主に投与する工程を含み、該宿主の免疫応答が増強される方法も提供する。

10

【0014】

本発明はさらに、対象においてMUC1を発現する癌を抑制する方法であって、(a)対象からリンパ球を得る(単離する)工程、(b)宿主に対し、ペプチド、核酸、ベクター又は細胞を含む組成物で該リンパ球を刺激して、ex vivoにて細胞傷害性Tリンパ球を産生する工程、及び(c)該細胞傷害性Tリンパ球を対象へ投与する工程を含み、該対象においてMUC1を発現する癌が抑制される方法を提供する。

【0015】

本発明は、対象においてMUC1を発現する癌を抑制する方法であって、(a)対象から樹状細胞を得る(単離する)工程、(b)ペプチド、核酸、ベクター又は細胞を含む組成物で該樹状細胞をex vivoにて処理する工程、及び(c)処理した樹状細胞を対象へ投与する工程を含み、該対象においてMUC1を発現する癌が抑制される方法を提供する。

20

【0016】

さらに、本発明は、対象においてMUC1を発現する癌の抑制であって、(a)癌に罹患した対象から末梢血单核細胞(PBMCs)を得る工程、(b)該PBMCsから樹状細胞を単離する工程、(c)ペプチド、核酸、ベクター又は細胞を含む組成物で該樹状細胞をex vivoにて処理する工程、(d)処理した樹状細胞で該PBMCsをex vivoにて活性化する工程、及び(e)活性化したPBMCsを対象へ投与する工程を含み、該対象においてMUC1を発現する癌が抑制される、癌の抑制を提供する。

【0017】

本発明はさらに、対象においてMUC1を発現する癌の抑制であって、(a)癌に罹患した対象から末梢血单核細胞(PBMCs)を得る工程、(b)該PBMCsから樹状細胞を単離する工程、(c)ペプチド、核酸、ベクター又は細胞を含む組成物で該樹状細胞をex vivoにて処理する工程、(d)処理した樹状細胞で該PBMCsをex vivoにて活性化する工程、(e)活性化したPBMCsからTリンパ球をex vivoで単離する工程、及び(f)単離したTリンパ球を対象へ投与する工程を含み、該対象においてMUC1を発現する癌が抑制される、癌の抑制を提供する。

30

【0018】

本発明は、対象においてMUC1を発現する癌を抑制するために、ペプチド、核酸、ベクター又は細胞を含む組成物でin vitroにて刺激された、養子移入されるT細胞の使用を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】図1A～Cは、ネイティブペプチド及びアゴニストペプチドに特異的なT細胞株によるIFN- γ の産生を示すグラフである。IFN- γ (pg/mL)はY軸に示され、(A)P1172又はP1172(1Y);(B)P1177又はP1177(10V);並びに(C)P1240及びP1240(1Y)のそれぞれのペプチド濃度(pg/mL)はX軸に示されている。

【図1B】図1A～Cは、ネイティブペプチド及びアゴニストペプチドに特異的なT細胞

50

株によるIFN- γ の産生を示すグラフである。IFN- γ (pg/mL)はY軸に示され、(A)P1172又はP1172(1Y);(B)P1177又はP1177(10V);並びに(C)P1240及びP1240(1Y)のそれぞれのペプチド濃度(pg/mL)はX軸に示されている。

【図1C】図1A~Cは、ネイティブペプチド及びアゴニストペプチドに特異的なT細胞株によるIFN- γ の産生を示すグラフである。IFN- γ (pg/mL)はY軸に示され、(A)P1172又はP1172(1Y);(B)P1177又はP1177(10V);並びに(C)P1240及びP1240(1Y)のそれぞれのペプチド濃度(pg/mL)はX軸に示されている。

【図2】図2A~Bは、T細胞株T-P432-3F10K(A)及びT-P483-2L3F(B)を用いた、HLA-A3 $^{+}$, MUC1 $^{+}$ ターゲット細胞のペプチド特異的なT細胞株溶解を示すグラフである。それぞれの図において、溶解(%)はY軸上、及びX軸上には(a)T細胞株のみ、(b)T細胞株+K562-A3、及び(c)T細胞株+K562-A3+対応するA3ペプチドである。

【図3】図3は、ペプチド/HLA-A2複合体(それぞれVNTR-1、VNTR-2、VNTR-3、VNTR-4及びVNTR-5ペプチド)の安定性を示すグラフである。残存する複合体の割合はY軸上、及び時間は時(hours)としてX軸上に示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、癌のワクチン予防又は治療において利用可能である、ヒト腫瘍関連抗原(TAA)ムチン1(MUC1)由来のヒト細胞溶解性Tリンパ球(CTL)エピトープ及びそのアナログを含むペプチドを提供する。特に、本発明は、MUC1-C由来ヒトCTLエピトープ及びそのアナログを含むペプチドを提供する。

【0021】

第一の実施形態において、本発明のペプチドは、XLAIVYLIAL(配列番号3)のアミノ酸配列(式中、Xは、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくはアラニン又はチロシンである)を含むか、本質的に該アミノ酸配列からなるか、又は該アミノ酸配列からなる。配列番号3のXがアラニンの場合、該ペプチドは、MUC1の1172~1181位のCTLエピトープ(配列番号1)に一致する。配列番号3のXがチロシンの場合、該ペプチドは、MUC1のエンハンサーアゴニストエピトープ(配列番号2)に一致する。

【0022】

第二の実施形態において、本発明のペプチドは、YLIALAVCQX(配列番号6)のアミノ酸配列(式中、Xは、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくはシステイン又はバリンである)を含むか、本質的に該アミノ酸配列からなるか、又は該アミノ酸配列からなる。配列番号6のXがシステインの場合、該ペプチドは、MUC1の1177~1186位のCTLエピトープ(配列番号4)に一致する。配列番号6のXがバリンの場合、該ペプチドは、MUC1のエンハンサーアゴニストエピトープ(配列番号5)に一致する。

【0023】

第三の実施形態において、本発明のペプチドは、XLSYTNPAV(配列番号9)のアミノ酸配列(式中、Xは、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくはセリン又はチロシンである)を含むか、本質的に該アミノ酸配列からなるか、又は該アミノ酸配列からなる。配列番号9のXがセリンの場合、該ペプチドは、MUC1の1240~1248位のCTLエピトープ(配列番号7)に一致する。配列番号9のXがチロシンの場合、該ペプチドは、MUC1のエンハンサーアゴニストエピトープ(配列番号8)に一致する。

【0024】

第四の実施形態において、本発明のペプチドは、ALX₁IVYLIAX₂(配列番号11)(式中、X₁及びX₂は、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくは、X₁はアラニン又はフェニルアラニンであり、X₂はロイシン又はリシンである)を含む。配列番号11のX₁がアラニンであり、かつ配列番号11のX₂がロイシンの場合、該ペプチドは、MUC1の1172~1181位のCTLエピトープ(配列番号1)に一致する。配列

10

20

30

40

50

番号 11 の X_1 がフェニルアラニンであり、かつ配列番号 11 の X_2 がリシンの場合、該ペプチドは、MUC1 のエンハンサー・アゴニストエピトープ（配列番号 10）に一致する。

【0025】

第五の実施形態において、本発明のペプチドは、 $S X_1 X_2 R S P Y E K$ （配列番号 15）（式中、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくは、 X_1 はトレオニン又はロイシンであり、 X_2 はアスパラギン酸、チロシン又はフェニルアラニンである）を含む。配列番号 15 の X_1 がトレオニンであり、かつ配列番号 15 の X_2 がアスパラギン酸の場合、該ペプチドは、MUC1 の 1223 ~ 1231 位の CTL エピトープ（配列番号 12）に一致する。配列番号 15 の X_1 がロイシンであり、かつ配列番号 15 の X_2 がチロシンの場合、該ペプチドは、MUC1 のエンハンサー・アゴニストエピトープ（配列番号 13）に一致する。配列番号 15 の X_1 がロイシンであり、かつ配列番号 15 の X_2 がフェニルアラニンの場合、該ペプチドは、MUC1 のエンハンサー・アゴニストエピトープ（配列番号 14）に一致する。

【0026】

第六の実施形態において、本発明のペプチドは、 $X_1 X_2 A P P A H X_3 V$ （配列番号 26）（式中、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくは、 X_1 はセリン又はチロシンであり、 X_2 はトレオニン又はリシンであり、かつ X_3 はアスパラギン又はグリシンである）を含む。配列番号 26 の X_1 、 X_2 及び X_3 が、それぞれセリン、トレオニン及びアスパラギンの場合、該ペプチドは、MUC1 の可変数タンデムリピート（VNTR）領域の CTL エピトープ（配列番号 27）に一致する。配列番号 26 の X_1 、 X_2 及び X_3 が、それぞれセリン、トレオニン及びグリシンの場合、該ペプチドは、MUC1 の VNTR 領域の CTL エピトープ（配列番号 28）に一致する。配列番号 26 の X_1 、 X_2 及び X_3 が、それぞれチロシン、リシン及びグリシンの場合、該ペプチドは、MUC1 の VNTR 領域のエンハンサー・アゴニストエピトープ（配列番号 29）に一致する。

【0027】

第七の実施形態において、本発明のペプチドは、 $X_1 X_2 D T R P A P X_3$ （配列番号 30）（式中、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸であり得るが、好ましくは、 X_1 はアラニン又はチロシンであり、 X_2 はプロリン又はロイシンであり、かつ X_3 はグリシン又はバリンである）を含む。配列番号 30 の X_1 、 X_2 及び X_3 が、それぞれアラニン、プロリン及びグリシンの場合、該ペプチドは、MUC1 の VNTR 領域の CTL エピトープ（配列番号 31）に一致する。配列番号 30 の X_1 、 X_2 及び X_3 が、それぞれチロシン、ロイシン及びバリンの場合、該ペプチドは、MUC1 の VNTR 領域のエンハンサー・アゴニストエピトープ（配列番号 32）に一致する。

【0028】

本発明のペプチドは、配列番号 1 ~ 15 及び 26 ~ 32 のアミノ酸配列の 1 つ、並びに 1 つ以上の隣接残基を含むことができる。隣接残基は、ペプチドの免疫応答（例、CTL 活性）を誘導する能力を阻害しないように選択されるべきである。そのような残基の選択のための指針は、MUC1 自身と関連する配列によって提供される。例えば、ペプチドを使用するために、MUC1 タンパク質（好ましくはヒト MUC1）の対応する位置の残基と同一である、又は類似する特性を持つ残基を選択できる。

【0029】

ペプチドがネイティブ MUC1 配列に存在する CTL エピトープ（例、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 12、配列番号 27、配列番号 28 及び配列番号 31）を含む場合、ペプチドは望ましくは、20 以下（例、19 以下、18 以下、17 以下、16 以下、15 以下、14 以下、13 以下、12 以下、11 以下又は 10 以下）のアミノ酸残基を有する。一実施形態において、追加のアミノ酸残基は、存在する場合には、MUC1（例、MUC1-N、MUC1-C 又は VNTR 領域）由来である。この点において、本発明のペプチドは、MUC1（例、MUC1-N、MUC1-C 又は VNTR 領域）タ

10

20

30

40

50

ンパク質の20以下の連続するアミノ酸を含む、MUC1(例、MUC1-N、MUC1-C又はVNT R領域)タンパク質のフラグメントであり得、ここで、該ペプチドは配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号12、配列番号27、配列番号28、及び配列番号31のアミノ酸配列を含む。MUC1タンパク質の追加のアミノ酸残基は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号12、配列番号27、配列番号28、及び配列番号31のアミノ酸配列のいずれかの末端又は両端に位置し得る。

【0030】

特に、本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号12、配列番号27、配列番号28、及び配列番号31のアミノ酸配列のC末端に、11以下(例、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下、1以下、又は0)のアミノ酸残基を含み得、かつ/又は配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号12、配列番号27、配列番号28、及び配列番号31のアミノ酸配列のN末端に、11以下(例、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下、1以下、又は0)のアミノ酸残基を含み得、ここで、本発明のペプチドは合計で20以下のアミノ酸残基を有する。

【0031】

ペプチドが、MUC1のエンハンサー・ゴニストエピトープ(例、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号10、配列番号13、配列番号14、配列番号29又は配列番号32)を含む場合、ペプチドは任意の適切な長さであり得る。一実施形態において、ペプチドは20以下(例、19以下、18以下、17以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下又は10以下)のアミノ酸残基を有する。追加のアミノ酸残基は、存在する場合には、好ましくはMUC1(例、MUC1-C)タンパク質由来、又は本明細書に記載のMUC1の配列に基づく。追加のアミノ酸残基は、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号10、配列番号13、配列番号14、配列番号29又は配列番号32のアミノ酸配列のいずれかの末端又は両端に位置し得る。

【0032】

他の実施形態において、本発明は、1つ以上の対応するアミノ酸残基が、1つ以上のMUC1のエンハンサー・ゴニストエピトープ(例、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号10、配列番号13、配列番号14、配列番号29又は配列番号32)で置き換えられている、MUC1アミノ酸配列又はそのフラグメントを含むポリペプチドを提供する。例えば、ポリペプチドは、1172位のアラニンがチロシンで置き換えられている(配列番号2のエンハンサー・ゴニストエピトープに相当)、完全長のMUC1アミノ酸配列又はそのフラグメントを含み得る。

【0033】

ペプチドは、任意の方法、例えば、ペプチドを合成することにより、又は細胞内で適切なアミノ酸配列をコードする核酸を発現させ、細胞よりペプチドを回収することなどによって、調製され得る。そのような方法の組み合わせも利用できる。ペプチドのde novo合成方法及び組み換えるにペプチドを製造する方法は当分野で公知である(例、Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994参照)。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明は、ペプチドをコードする核酸も提供する。核酸はDNA又はRNAを含むことができ、一本鎖又は二本鎖であり得る。さらに、核酸は、ヌクレオチドアナログ又は誘導体（例、イノシン又はホスホロチオエートヌクレオチドなど）を含むことができる。核酸はペプチドを単独で、又は融合タンパク質の一部としてコードできる。ペプチドをコードする核酸は、核酸と、細胞への核酸のデリバリー及び／又は細胞での核酸の発現を可能にする要素とを含む構築物の一部として提供され得る。そのような要素としては、例えば、発現ベクター、プロモーター、並びに転写及び／又は翻訳配列が挙げられる。適したベクター、プロモーター、転写／翻訳配列、及び他の要素、並びにかかる核酸及び構築物の調製方法は、当分野で公知である（例、Sambrook et al. , 上記参照；Ausubel et al. , 上記参照）。 10

【0035】

本発明はさらに、核酸を含むベクターを提供する。適したベクターの例として、プラスミド（例、DNAプラスミド）、酵母（例、サッカロマイセス）、及びウイルスベクター、例えば、ポックスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、アルファウイルス、バキュロウイルス（baculovirus）、及びシンドビスウイルスなどが挙げられる。ベクターがプラスミド（例、DNAプラスミド）の場合、該プラスミドはキトサンと複合化され得る。好ましくは、ベクターは、オルソポックス、アビポックス、鶏痘、ラクーンポックス、家兔痘、カブリポックス（例、羊痘）、レポリポックス、及びスイポックス（例、豚痘）からなる群から選択されるポックスウイルスである。アビポックスウイルスの好ましい例として、鶏痘、鳩痘、及びカナリア痘、例えばALVACが挙げられる。オルソポックスウイルスの好ましい例として、ワクシニア、改変ワクシニアアンカラ（MVA）、Wyeth、NYVAC、TROYVAC、Dry-Vax、POXVAC-TC（Scherling-Plough Corporation）、及びそれらの誘導体が挙げられる。例えば、Wyeth株の誘導体はこれに限定されないが、機能的K1L遺伝子を欠いた誘導体を含む。 20

【0036】

ベクターが宿主（例、ヒト）への投与のためである場合、ベクター（例、ポックスウイルス）は好ましくはターゲット細胞において低い複製効率を有する（例、細胞あたり約1子孫以下、又は、より好ましくは、細胞あたり0.1子孫以下）。複製効率は、ターゲット細胞の感染後のウイルス力価の決定によって、容易に経験的に決定され得る。 30

【0037】

ペプチドをコードする核酸に加えて、ベクターは、1つ以上の免疫賦活／制御分子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、サイトカイン、又は免疫応答を増強し得る他の分子（例、前立腺特異抗原（PSA）及び癌胎児性抗原（CEA）などの追加の腫瘍関連抗原、又はCEA-6Dなどのそれらの改変体）をコードする遺伝子も含むことができる。ペプチドをコードする核酸及び任意の他の外来性遺伝子は、好ましくは、結果として生じる組換えウイルスのウイルス生存率に影響を及ぼさない、ベクター（例、ポックスウイルス）の部位又は領域（挿入領域）に挿入される。そのような領域は、組換えウイルスのウイルス生存率に重大な影響を及ぼすことなく、組換えの構成を許容する領域に対して、ウイルスDNAのセグメントを試験することにより、容易に同定され得る。 40

【0038】

チミジンキナーゼ（TK）遺伝子は、容易に利用でき、多くのウイルスに存在する挿入領域である。特に、TK遺伝子は、全ての検査されたポックスウイルスゲノムにおいて見つけられている。さらなる適した挿入部位は、国際特許出願公開公報WO 2005/048957に記載されている。例えば、鶏痘において、挿入領域はBamHI J フラグメント、EcoRI-HindIIIフラグメント、BamHI フラグメント、EcoRV-HindIII フラグメント、長い特有な配列（LUS）挿入部位（例、FPV006/FPV007及びFPV254/FPV255）、FP14挿入部位（FPV060 50

/ F P V 0 6 1)、及び 4 3 K 挿入部位 (F P V 1 0 7 / F P V 1 0 8) を含むが、これに限定されない。ワクシニアにおいて、挿入部位は 4 4 / 4 5 、 4 9 / 5 0 、及び 1 2 4 / 1 2 5 を含むが、これに限定されない。

【 0 0 3 9 】

ベクターが、ペプチドをコードする核酸、及び / 又は他の外来性遺伝子 (例、 1 つ以上の免疫賦活 / 制御分子をコードするもの) を含む組換え鶏痘ウイルスの場合、ペプチドをコードする核酸は、 1 つの領域 (例、 F P 1 4 領域) に挿入されることができ、外来性遺伝子は他の領域 (例、 B a m H I J 領域) に挿入され得る。

【 0 0 4 0 】

本発明のベクターは、適したプロモーター及び制御エレメント、例えば転写制御エレメント又はエンハンサーなどを含み得る。ベクターがポックスウイルスベクターの場合、ポックスウイルスプロモーターを利用して、これにはワクシニア 7 . 5 K プロモーター、ワクシニア 3 0 K プロモーター、ワクシニア 4 0 K プロモーター、ワクシニア I 3 プロモーター、合成初期 / 後期 (S E / L) プロモーター、 7 . 5 プロモーター、 H H プロモーター、 1 1 K プロモーター、及び P i プロモーターが含まれるが、これに限定されない。プロモーターは、典型的には構成的プロモーターであるものの、誘導性プロモーターも本発明のベクターにおいて利用され得る。そのような誘導可能なシステムは、遺伝子発現の制御を可能にする。

【 0 0 4 1 】

ペプチド、ペプチドをコードする核酸、又はベクターを含む細胞も、本明細書において提供される。適した細胞は、原核細胞並びに真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、酵母、真菌、及びバクテリア (大腸菌など) を含む。細胞は、研究又はペプチドの產生のために役立つように *in vitro* でもよく、又は *in vivo* でも可能である。細胞は、ペプチドパルスされた抗原提示細胞もあり得る。適した抗原提示細胞は、樹状細胞、 B リンパ球、単球、マクロファージなどを含むが、これに限定されない。

【 0 0 4 2 】

一実施形態において、細胞は樹状細胞である。異なる成熟段階の樹状細胞は、細胞表面の発現マーカーに基づいて単離され得る。例えば、成熟樹状細胞は、提示のために新しいタンパク質を捉えることはほとんどできないが、増殖及び分化のために休止 T 細胞を刺激することはより上手くできる。従って、成熟樹状細胞は重要となり得る。成熟樹状細胞は、形態学におけるそれらの変化及び種々のマーカーの存在によって、同定され得る。そのようなマーカーは、 B 7 . 2 、 C D 4 0 、 C D 1 1 及び M H C クラス I I などの細胞表面マーカーを含むが、これに限定されない。あるいは、成熟は炎症性サイトカインの產生の観察又は測定によって、同定され得る。

【 0 0 4 3 】

樹状細胞は、典型的な細胞蛍光法、並びに細胞選別技術及び装置、例えば蛍光活性化セルソーター (F A C S) などを使用して、集められ、解析され得る。成熟段階が異なる樹状細胞の細胞表面抗原に特異的な抗体は、商業的に利用可能である。

【 0 0 4 4 】

ペプチド、核酸、ベクター又は細胞は単離され得る。用語「単離された」は、本明細書において使用される場合、生物学的環境 (例、細胞、組織、培養培地、体液など) から取り除かれた又は任意の程度に純度を上げられた (例、合成培地から単離された) 、組成物若しくは化合物を包含する。単離された組成物及び化合物は、従って、合成され又は天然で産生され得る。

【 0 0 4 5 】

ペプチド、核酸、ベクター又は細胞は、ペプチド、核酸、ベクター又は細胞と、担体 (例、医薬上又は生理学的に許容される担体) とを含む組成物 (例、医薬組成物) として製剤化され得る。さらに、ペプチド、核酸、ベクター、細胞又は本発明の組成物は、本明細書に記載の方法において、単独で又は医薬製剤の一部として利用され得る。

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

50

組成物(例、医薬組成物)は、2以上のペプチド、核酸、ベクター、若しくは細胞又は本発明の組成物を含むことができる。あるいは、又はさらに、組成物は1つ以上の他の医薬活性剤又は薬品を含むことができる。医薬組成物の利用に適してよい、そのような他の医薬活性剤又は薬品の例として、抗癌剤(例、化学療法剤)、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬、シクロフォスファミド、及びそれらの組み合わせが挙げられる。適した抗癌剤は、限定されないが、アルキル化剤、ナイトロジエンマスター、葉酸拮抗薬、プリン拮抗薬、ピリミジン代謝拮抗物質、紡錘体阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アポトーシス誘導剤、血管新生抑制剤、ポドフィロトキシン、ニトロソウレア、シスプラチン、カルボプラチン、インターフェロン、アスピラギナーゼ、タモキシフェン、ロイプロリド、フルタミド、メゲストロール、マイトイシン、ブレオマイシン、ドキソルビシン、イリノテカン、タキソール、ゲルダナマイシン(例、17-AAG)、及び当分野で公知の種々の抗癌ペプチド並びに抗体を含む。

【0047】

担体は、慣習的に使用されるもののいずれもあり得、溶解度、及び活性化合物との反応性の欠如など、生理化学的な考慮点によって、及び投与経路によってのみ限定される。本明細書に記載の医薬上許容される担体、例えば、賦形剤、アジュvant、医薬品添加物、及び希釈剤は、当業者に周知であり、容易に公衆に利用可能である。医薬上許容される担体は、活性剤に対し化学的に不活性であるもの、及び使用条件下、有害な副作用又は毒性を有さないものであることが好ましい。

【0048】

担体の選択は、特定のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又は本発明のそれらの組成物、及び使用される他の活性剤又は医薬品、並びにペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物を投与するために使用される特定の方法によって、一部は決定されるだろう。

【0049】

組成物は、さらに又は代わりに、1つ以上の免疫賦活／制御分子を含むことができる。任意の適した免疫賦活／制御分子を使用でき、例えば、インターロイキン(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-12、インターフェロン(IFN)-、腫瘍壞死因子(TNF)-、B7.1、B7.2、ICAM-1、LFA-3、CD70、RANTES、G-CSF、OX-40L、41BBL、抗CTLA-4、及びそれらの組み合わせなどが使用できる。好ましくは、組成物は、B7.1、ICAM-1、及びLFA-3(TRICOMともいう)の組み合わせを含む。1つ以上の免疫賦活／制御分子は、1つ以上の免疫賦活／制御分子をコードする核酸を含むベクター(例、ポックスウイルスベクターなどの組換えウイルスベクター)の形で投与され得る。例えば、1つ以上の免疫賦活／制御分子(例、IL-12)は、キトサンあり又はなしでDNAプラスミドの形で投与され得る。あるいは、1つ以上の免疫賦活／制御分子は、キトサンと混合したタンパク質(例、組換えIL-12)など、タンパク質(例、組換えタンパク質)として投与され得る。

【0050】

本発明の一実施形態において、組成物は、本発明のペプチドをコードする核酸を含む第一の組換えベクター、並びにB7.1、ICAM-1及びLFA-3をコードする核酸を含む第二の組換えベクターを含む。他の実施形態において、本発明のペプチドをコードする核酸、並びにB7.1、ICAM-1、及びLFA-3をコードする核酸は、同じ組換えベクターにある。第一及び/又は第二のベクターは、他の腫瘍関連抗原(例、CEA)、それらの変形体(例、CEA-6D)、又はそれらのエピトープをさらに含むことができる。

【0051】

本発明は、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物、及び任意で、免疫賦活／制御分子、例えばB7-1、ICAM-1及びLFA-3などで樹状細胞を形質導入する方法を提供する。本発明の一局面において、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物で宿主に形質導入された樹状細胞は、細胞傷害性T細胞応答の活性化な

10

20

30

40

50

どの免疫応答を起こす。

【0052】

本発明は、MUC1腫瘍にかかった又はかかりやすい患者の治療方法、及び／又は、MUC1を発現する癌に対する免疫応答の増強方法、及び／又は、MUC1を発現する癌の抑制方法を提供する。第一の実施形態において、本発明の方法は、1つ以上のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物の治療上有効量を対象へ投与する工程を含む。本発明のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物は、MUC1を発現する癌の進行を妨げるために、特に他の個体よりもそのような癌になるリスクの高い個体において、又はMUC1を発現する癌に苦しめられている患者を治療するために使用され得る。本発明のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物は、任意のステージにあるMUC1を発現する癌の対象を治療するために使用され得る。10

【0053】

第二の実施形態において、本発明の方法は、対象から樹状細胞を得る（単離により）工程、治療上有効量のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物の1つ以上で該樹状細胞を処理する工程、及び処理した樹状細胞を対象へ投与する工程を含む。

【0054】

第三の実施形態において、本発明の方法は、(a) 対象から抹消血単核細胞(PBMCs)を得る（単離する）工程、(b) 該PBMCsから樹状細胞を単離する工程、(c) 治療上有効量のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物の1つ以上で該樹状細胞をex vivoにて処理する工程、(d) 処理した樹状細胞で該PBMCsをex vivoにて活性化する工程、及び(e) 活性化したPBMCsを対象へ投与する工程を含む。20

【0055】

第四の実施形態において、本発明の方法は、(a) 対象からPBMCsを得る（単離する）工程、(b) 該PBMCsから樹状細胞を単離する工程、(c) 治療上有効量のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物の1つ以上で該樹状細胞をex vivoにて処理する工程、(d) 処理した樹状細胞で該PBMCsをex vivoにて活性化する工程、及び(e) 活性化したPBMCsを対象へ投与する工程を含む。

【0056】

第五の実施形態において、本発明の方法は、(a) 対象からPBMCsを得る（単離する）工程、(b) 該PBMCsから樹状細胞を単離する工程、(c) 治療上有効量のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物の1つ以上で該樹状細胞をex vivoにて処理する工程、(d) 処理した樹状細胞で該PBMCsをex vivoにて活性化する工程、(e) 活性化したPBMCsからTリンパ球をex vivoで単離する工程、及び(e) 単離したTリンパ球を対象へ投与する工程を含む、該対象においてMUC1を発現する癌を抑制する方法を含む。30

【0057】

本発明は、対象においてMUC1を発現する癌を抑制するために、治療上有効量のペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物の1つ以上でin vitroにて刺激された、養子移入されるT細胞の使用も提供する。40

【0058】

MUC1を発現する癌は、MUC1を発現する任意の癌であり得、これにはヒト癌腫（例えば卵巣、胸、脾臓、結腸直腸、肺、甲状腺、胃、頭頸部及び前立腺）並びに血液系腫瘍（多発性骨髄腫及びいくつかのB細胞非ホジキンリンパ腫）が含まれるが、これに限定されない。

【0059】

ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はこれらの組成物は、任意の方法によって宿主へ投与され得る。例えば、ペプチド、核酸、又は本明細書に記載の、核酸のデリバリー及び発現を可能にする構築物の一部としての核酸を含む組成物と細胞を接触させることによってなど、種々の技術のいずれかによって、ペプチド又はペプチドをコードする核酸（例、50

ベクターとして)は細胞(例、宿主における)内に導入され得る。細胞内で核酸を導入及び発現するための具体的なプロトコルは、当分野で公知である(参照、例、Sambrook et al. (eds.), 上記参照; Ausubel et al., 上記参照)。

【0060】

ペプチド、核酸、ベクター、細胞、及び組成物を宿主(対象)に投与するのに適した方法は、当分野で公知である。宿主(対象)は、哺乳動物(例、マウス、ラット、ハムスター又はモルモットなどの齧歯動物、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、靈長類又はヒト)などの任意の適した宿主であり得る。

【0061】

例えは、ペプチド、核酸又はベクター(例、組換えポックスウイルス)は、*ex vivo* 10 腫瘍細胞をペプチド、核酸、若しくはベクターにさらすことにより、又はペプチド、核酸、若しくはベクターを宿主へ注入することにより、宿主へ投与され得る。ペプチド、核酸、ベクター(例、組換えポックスウイルス)又はベクターの組み合わせ、細胞、及び組成物は、癌病変又は腫瘍への直接注入により、又は局所適用(例、医薬上許容される担体とともに)により、直接投与(例、局所投与)され得る。

【0062】

ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は、単独で、又はアジュバントと組み合わせて、リポソーム内への取り込み(例、米国特許第5,643,599号、5,464,630号、5,059,421号、及び4,885,172号に記載)、サイトカインとともに、生物学的応答修飾物質(例、インターフェロン、インターロイキン-2(IL-2)、及びコロニー刺激因子(CSF、GM-CSF、及びG-CSF))とともに、又は免疫応答を増強することが公知の、当分野の他の試薬とともに投与され得る。

【0063】

適したアジュバントの例として、ミョウバン、アルミニウム塩、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、アルミニウムシリカ(aluminum silica)、リン酸カルシウム、不完全フロイントアジュバント、QS21、MLP-A、及びRIBI DETOXTMが挙げられる。

【0064】

本発明での使用に対して特に好ましいアジュバントは、サイトカインGM-CSFである。GM-CSFは、樹状細胞による抗原プロセシング及び提示を増強するため、効果的なワクチンアジュバントとして示されている。実験研究及び臨床試験によって、組換えGM-CSFは、種々の免疫原を対象とした宿主免疫を増強できるということが示唆されている。

【0065】

GM-CSFは、ウイルスベクター(例、ポックスウイルスベクター)を用いて、又は医薬製剤において単離されたタンパク質として、投与され得る。GM-CSFはペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物の最初の投与前、投与中又は投与後に、宿主へ投与され、宿主の抗原特異的免疫応答を増強できる。例えは、組換えGM-CSFタンパク質は、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物でのワクチン接種の各日に宿主へ投与され、次の各3日間(すなわち合計4日間)投与され得る。任意の適した用量のGM-CSFも使用できる。例えは、1日当たり50~500μg(例、100μg、200μg、300μg、400μg、及びそれらの範囲)の組換えGM-CSFを投与できる。GM-CSFは、任意の適切な方法(例、皮下投与)により投与でき、好ましくは、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物での宿主のワクチン接種部位又はその近くに投与される。

【0066】

一実施形態において、本発明のペプチドは、ヘルパーペプチド又は大きな担体分子に結合させて、ペプチドの免疫原性を増強できる。これらの分子は、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CD4エピトープ、シュードモナス体外毒素A、

10

20

30

40

50

ポリ L リジン、脂質尾部、小胞体 (E R) シグナル配列などを含むが、これに限定されない。

【 0 0 6 7 】

本発明のペプチドは、当分野で認められた方法を用いて、免疫グロブリン分子と結合され得る。該免疫グロブリン分子は、腫瘍細胞に存在するが通常の細胞には存在しない又はごく少量しか存在しない表面レセプターに特異的であり得る。該免疫グロブリンは、特定の組織（例、胸、卵巣、結腸又は前立腺組織）に特異的であり得る。そのようなペプチド-免疫グロブリン結合体は、特定の組織及び／又は細胞へのペプチドのターゲッティングを許容する。

【 0 0 6 8 】

ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は、M U C 1 特異的免疫応答、好ましくは細胞性免疫応答を生じるのに効果的な量で、宿主（例、ヒトなどの哺乳動物）へ投与される。免疫原としてのペプチド、核酸、ベクター又は細胞の有効性は、当分野で公知の *i n v i v o* 又は *i n v i t r o* パラメーターによって決定されてもよい。これらのパラメーターは、抗原特異的な細胞毒性試験、M U C 1 又はM U C 1 エピトープを発現する腫瘍の退縮、M U C 1 又はM U C 1 エピトープを発現する癌細胞の抑制、サイトカインの産生などを含むが、これに限定されない。

10

【 0 0 6 9 】

任意の適した用量のペプチド、核酸、ベクター、細胞又はそれらの組成物は、宿主に投与され得る。適切な用量は、宿主の年齢、体重、身長、性別、全身状態、既往歴、疾患進行、及び全身腫瘍組織量などの因子に応じて変化し、臨床医によって決定され得る。例えば、ペプチドは、ワクチン接種あたり約 0 . 0 5 m g から約 1 0 m g まで（例、0 . 1 m g、0 . 5 m g、1 m g、2 m g、3 m g、4 m g、5 m g、6 m g、7 m g、8 m g、9 m g、及びそれらの範囲）の用量で宿主（例、ヒトなどの哺乳動物）に投与されることが可能であり、好ましくはワクチン接種あたり約 0 . 1 m g から約 5 m g である。種々の用量（例、1、2、3、4、5、6 又はそれ以上）が、提供（例、数週間又は数か月にわたって）され得る。一実施形態において、用量は3か月の間毎月提供される。

20

【 0 0 7 0 】

ベクターがウイルスベクターの場合、適した用量は、約 $1 \times 1 0 ^ 5$ から約 $1 \times 1 0 ^ {1 2}$ （例、 $1 \times 1 0 ^ 6$ 、 $1 \times 1 0 ^ 7$ 、 $1 \times 1 0 ^ 8$ 、 $1 \times 1 0 ^ 9$ 、 $1 \times 1 0 ^ {1 0}$ 、 $1 \times 1 0 ^ {1 1}$ 、及びそれらの範囲） プラーク形成単位 (p f u s) を含むことができるものの、より低用量又はより高用量を宿主に投与できる。例えば、約 $2 \times 1 0 ^ 8$ p f u s を投与（例、約 0 . 5 m L 量で投与）できる。

30

【 0 0 7 1 】

本発明の細胞（例、細胞傷害性 T 細胞）は、注入あたり、約 $1 \times 1 0 ^ 5$ 細胞と $2 \times 1 0 ^ {1 1}$ 細胞との間（例、 $1 \times 1 0 ^ 6$ 、 $1 \times 1 0 ^ 7$ 、 $1 \times 1 0 ^ 8$ 、 $1 \times 1 0 ^ 9$ 、 $1 \times 1 0 ^ {1 0}$ 、及びそれらの範囲）の用量で宿主に投与され得る。細胞は、例えば、1 ~ 3（例、2）回の注入により投与され得る。細胞の投与に加え、宿主は、インターロイキン 2 (I L - 2) などの生物学的応答修飾物質を投与され得る。投与される細胞が細胞傷害性 T 細胞の場合、*i n v i v o* の T 細胞の数をさらに増やすように細胞傷害性 T 細胞に刺激を与えるために、細胞傷害性 T 細胞の投与後、ペプチド、核酸、ベクター、又はそれらの組成物が投与され得る。

40

【 0 0 7 2 】

投与される細胞が樹状細胞の場合、対象に投与される樹状細胞の量は、対象の状態によつて変化し、実務者により全ての適切な要因を考慮して決められるべきである。好ましくは、約 $1 \times 1 0 ^ 6$ から約 $1 \times 1 0 ^ {1 2}$ （例、約 $1 \times 1 0 ^ 7$ 、約 $1 \times 1 0 ^ 8$ 、約 $1 \times 1 0 ^ 9$ 、約 $1 \times 1 0 ^ {1 0}$ 、又は約 $1 \times 1 0 ^ {1 1}$ であつて、本明細書に記載の細胞数の、いずれかの範囲を含む）の樹状細胞がヒト成人に利用される。これらの量は、対象の年齢、体重、大きさ、体調、性別、治療されるべき腫瘍の種類、投与経路、治療は局所又は全身かどうか、及び他の要因によって変わる。当業者は、対象の特殊な状況及びニーズに合わせるた

50

めに、適した投与量及び投与スケジュールを容易に導き出せるべきである。

【0073】

本発明は、有効量の本発明のペプチド、核酸、ベクター又は細胞を単独で、又は1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又はアジュバントと組み合わせて、又はリポソーム製剤で、リンパ球を刺激することにより、*in vivo*、*ex vivo*又は*in vitro*で、ペプチド特異的な細胞傷害性Tリンパ球を產生する方法を提供する。リンパ球は、例えば、末梢血、腫瘍組織、リンパ節、及び胸膜液又は腹水液のような滲出液など、任意の適したソース由来のリンパ球であり得る。

【0074】

MUC1ペプチド特異的細胞傷害性Tリンパ球は、MUC1に対して免疫反応性である。好ましくは、細胞傷害性Tリンパ球は、腫瘍細胞及び癌の発生を抑制し、MUC1又はそのエピトープを発現する腫瘍細胞の増殖を抑制するか、又は該細胞を死滅させる。細胞傷害性Tリンパ球は、抗原特異的であることに加えて、MHCクラスI拘束性であり得る。一実施形態において、細胞傷害性Tリンパ球は、MHCクラスIHLA-A2拘束性である。他の実施形態において、細胞傷害性Tリンパ球は、MHCクラスIHLA-A3拘束性である。細胞傷害性Tリンパ球は、好ましくはCD8⁺表現型を有する。

10

【0075】

一実施形態において、リンパ球は宿主から取り出され、*ex vivo*でペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物により刺激され、細胞傷害性Tリンパ球を產生する。細胞傷害性Tリンパ球は、癌に対する免疫応答を増強するために宿主に投与でき、それにより癌を抑制する。従って、本発明は、宿主の癌を抑制する方法であって、(a)リンパ球を得る工程(例、宿主より)、(b)ペプチド、核酸、ベクター、細胞又はそれらの組成物で該リンパ球を刺激して、細胞傷害性Tリンパ球を產生する工程、及び(c)該細胞傷害性Tリンパ球を宿主へ投与する工程を含み、癌が抑制される方法を提供する。

20

【0076】

他の実施形態において、宿主内のリンパ球は、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物が宿主へ投与されることにより刺激され、細胞傷害性Tリンパ球を產生し、かかる細胞傷害性Tリンパ球は癌への免疫応答を増強し、それによって癌を抑制する。

【0077】

本発明はプライム及びブーストのプロトコルを含む。特に、プロトコルは、本発明のペプチドと、任意選択で1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又は他の腫瘍関連抗原(例、CEA)、それらの改変体、並びにそれらの免疫原性エピトープをコードする1つ以上の組換ベクターを含む組成物での最初の「プライム」と、それに続いて、本発明のペプチド、又は本発明のペプチドと、任意選択で1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又は他の腫瘍関連抗原(例、CEA)、それらの改変体、並びにそれらの免疫原性エピトープをコードする1つ以上のポックスウイルスベクターを含む組成物での1回、又は好ましくは複数回の「ブースト」を含む。

30

【0078】

最初のプライミングワクチン接種は、1つ以上のベクターを含み得る。一実施形態において、単一のベクター(例、ポックスウイルスベクター)は、本発明のペプチド並びに1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又は他の腫瘍関連抗原(例、CEA)、それらの改変体、並びにそれらの免疫原性エピトープのデリバリーに利用される。他の実施形態において、2つ以上のベクター(例、ポックスウイルスベクター)は、プライミングワクチン接種を含み、これは一回の注射で同時に投与される。

40

【0079】

ブースティングワクチン接種も、1つ以上のベクター(例、ポックスウイルスベクター)を含み得る。一実施形態において、単一のベクターは、本発明のペプチド並びに1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又は他の腫瘍関連抗原(例、CEA)、それらの改変体、並びにそれらの免疫原性エピトープ(ブースティングワクチン接種のため)のデリバリーに利用される。他の実施形態において、2つ以上のベクターは、ブースティングワクチン

50

接種を含み、これは一回の注射で同時に投与され得る。

【0080】

異なるベクター（例、ポックスウイルスベクター）は、異なる時間間隔での接種のために、異なるセットの治療用分子を運ぶベクターを用いた、異種のプライム／ブーストプロトコルを提供するために使用できる。例えば、1つの異種のプライム／ブースト組み合わせにおいて、第一のオルソポックスベクター組成物をプライムに使用し、第二のアビポックスベクター組成物をブーストに使用する。

【0081】

ベクター（例、ポックスウイルスベクター）の投与スケジュールは典型的に、ブースティングベクターの頻回投与を伴う。ブースティングベクターは、任意の適した期間（例、2～4週間毎）で1～3回（例、1、2又は3回）、任意の適した期間の間（例、6～12週間で合計少なくとも5から15回ブースティングワクチン接種）投与され得る。例えば、プライマリーウクチン接種は、組換えワクシニア又はMVAベクターを含み、それに続いて、複数回のブースターウクチン接種では、アビポックスベクター用いる。特定の実施形態において、宿主は、プライミングベクターで一回ワクチン接種を受けた後、2週間毎に6ブーストのブースティングベクター、その後4週間毎にブースティングベクター、そして疾病進行に応じた期間、ブースティングベクターを続ける。

【0082】

本発明はさらに、医薬上許容される担体中、少なくとも第一の組換えベクター（例、ポックスウイルスベクター）であって、そのゲノム又はその一部に本発明のペプチドをコードする核酸が組み込まれているものを有するキットを提供する。第一の組換えベクター（例、ポックスウイルスベクター）は、1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又は他の腫瘍関連抗原（例、CEA）、それらの変形体、並びにそれらの免疫原性エピトープをコードする1つ以上の核酸も含むことができる。第一の組換えベクターに加え、キットは、医薬上許容される担体中、1つ以上の免疫賦活／制御分子及び／又は他の腫瘍関連抗原（例、CEA）、それらの変形体、並びにそれらの免疫原性エピトープをコードする1つ以上の核酸を含む第二の組換えベクターを有し得る。キットはさらに、容器、注射針、及びキットの使用方法についての説明書を提供する。他の実施形態において、キットはさらに、GM-CSFなどのアジュvant及び／又はキット構成物品とともに市販されているアジュvantを使用するための説明書を提供する。

【0083】

ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は、皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、静脈内、及び腫瘍内を含む（これに限定されない）様々なルートによって、宿主に投与され得る。複数回投与される場合、宿主の1つ以上の部位に投与され得る。

【0084】

ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物の投与は、「予防的」又は「治療的」であり得る。予防的に提供される場合、宿主の免疫システムが、宿主が発症しやすい腫瘍と戦うことを可能にするために、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は腫瘍形成に先立って提供される。例えば、遺伝性癌感受性を有する宿主は、そのような予防免疫接種で治療されることが好ましい患者群である。ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物の予防的な投与は、MUC1を発現する癌を予防し、改善し、又は遅らせる。治療的に提供される場合、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は、MUC1を発現する癌の診断時又は診断後に提供される。

【0085】

宿主がすでにMUC1を発現する癌又は転移性癌と診断されている場合、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は、化学療法又は放射線などの他の治療的処置と併せて投与され得る。

【0086】

好ましい実施形態において、ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物を宿主へ投与すると、結果として、本発明のペプチド並びに任意選択で1つ以上の免疫賦活

10

20

30

40

50

/ 制御分子及び / 又は他の腫瘍関連抗原 (例、 CEA)、それらの改变体、並びにそれらの免疫原性エピトープ (同時投与されたもの) を発現する宿主細胞がもたらされる。本発明のペプチド (すなわち、 MUC1 抗原) は、感染した宿主細胞の細胞表面に発現し得る。1つ以上の免疫賦活 / 制御分子及び / 又は他の腫瘍関連抗原 (例、 CEA)、それらの改变体、並びにそれらの免疫原性エピトープは、細胞表面に発現することが可能であり、又は宿主細胞によって活発に分泌されてもよい。MUC1 抗原及び免疫賦活 / 制御分子の両方が発現すると、特定の T 細胞に必要な MHC 拘束性ペプチドと、該 T 細胞に適切なシグナルが提供されて、抗原認識、並びに抗原特異的 T 細胞の増殖又はクローン性増殖に役立つ。総合的な結果は、免疫システムのアップレギュレーションである。好ましくは、免疫反応のアップレギュレーションは、癌 (例、乳癌、卵巣癌、結腸癌、肺癌、甲状腺癌、胃癌、頭頸部癌又は前立腺癌) 細胞の増殖を抑制する又は死滅させることができる、抗原特異的ヘルパー T リンパ球及び / 又は細胞傷害性 T リンパ球の増加である。

10

【 0087 】

本発明の方法について、医薬組成物の種々の適切な製剤が存在する。非経口、皮下、静脈内、筋肉内、及び腹腔内投与のための以下の製剤が代表的であるが、これに制限されない。当業者ならば、本発明のペプチド、核酸、ベクター、細胞又は組成物のこれらの投与ルートが公知であり、2つ以上のルートを用いて特定の合成物を投与することができるものの、特定のルートが他のルートと比べてより即効性があり、より効果的な反応を提供できるということを理解するだろう。

20

【 0088 】

注射製剤は、本発明に基づいて好まれるこれら製剤のうちの1つである。注射用組成物として効果的な医薬担体の要件は、当業者に周知である (例、 *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238 - 250 (1982), and ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622 - 630 (1986) 参照)。

20

【 0089 】

非経口投与に適した製剤は、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を、意図されるレシピエントの血液と等張とする溶質を含むことができる水性及び非水性の等張滅菌注射液、並びに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、及び防腐剤を含むことができる水性及び非水性の滅菌懸濁液を含む。ペプチド、核酸、ベクター、細胞、又はそれらの組成物は、医薬担体中、生理学的に許容される希釈剤中で投与でき、これは例えば滅菌液体又は液体の混合物などであって、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及び関連する糖溶液、エタノール、イソプロパノール、若しくはヘキサデシルアルコールなどのアルコール、プロピレン glycole 若しくはポリエチレン glycole などのグリコール、ジメチルスルホキシド、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノールなどのグリセロールケタール、ポリ(エチレン glycole) 400 などのエーテル、油、脂肪酸、脂肪酸エステル若しくはグリセリド、石鹼若しくは洗剤などの医薬上許容される界面活性化剤の添加を有する若しくは有さないアセチル化脂肪酸グリセリド、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース若しくはカルボキシメチルセルロースなどの懸濁化剤、又は乳化剤及び他の医薬アジュバントを含む。

30

【 0090 】

非経口製剤で利用できる油は、石油系、動物性、植物性、及び合成油を含む。油の具体例として、ピーナツ、大豆、胡麻、綿実、トウモロコシ、オリーブ、ワセリン及び鉱物の油が挙げられる。非経口製剤での利用に適した脂肪酸は、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸を含む。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、脂肪酸エステルの適切な例である。

40

【 0091 】

非経口製剤での利用に適した石鹼は、脂肪アルカリ金属 (fatty alkali m

50

e t a l) 、アンモニウム及びトリエタノールアミン塩を含み、並びに適した洗剤は、(a) 例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド、及びアルキルピリジニウムハライドなどの陽イオン性洗剤、(b) 例えば、アルキル、アリル、及びオレフィンスルホネート、アルキル、オレフィン、エーテル、及びモノグリセライドスルフェート、並びにスルホサクシネットなどの陰イオン性洗剤、(c) 例えば、脂肪アミンオキシド (fatty amine oxides) 、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー (polyoxyethylene polypropylene copolymers) などの非イオン性洗剤、(d) 例えば、アルキル - b - アミノブロピオネート、及び 2 - アルキル - イミダゾリン四級アンモニウム塩などの両性洗剤、並びに(e) それらの混合物を含む。

10

【0092】

防腐剤及び緩衝液を使用してもよい。注射部位の炎症を最小限にする又は排除するためには、そのような組成物は、約 12 から約 17 の親水性 - 親油性バランス (HLB) を有する 1 つ以上の非イオン性界面活性剤を含んでもよい。そのような製剤における界面活性剤の量は、一般的に約 5 重量 % から約 15 重量 % の範囲である。適した界面活性剤としては、モノオレイン酸ソルビタンなどのポリエチレンソルビタン脂肪酸エステル、及びエチレンオキサイドの疎水性塩基との高分子量付加物（プロピレンオキサイドのプロピレングリコールとの縮合により形成される）を含む。

【0093】

非経口製剤は、アンプル及びバイアルなどの、単位用量又は複数用量密閉容器に入れて供給することができ、かつ、フリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存でき、これは、使用直前に、注射のために滅菌液体賦形剤、例えば水の添加のみを必要する。即席注射用液及び懸濁液は、滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製できる。

20

【0094】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、当然ながら、その範囲を制限するものであると解釈されるべきではない。

【実施例】

【0095】

実施例 1

以下の材料及び方法は、実施例 2 ~ 5 で議論する実験のために使用した。

30

【0096】

細胞培養

MCF - 7 ヒト乳腺癌細胞株 (HLA - A2⁺ / MUC1⁺) 、 CF - PAC - 1 ヒト肺臓腺癌細胞株 (HLA - A2⁺ / MUC1⁺) 、 SK - Mel - 24 メラノーマ細胞株 (HLA - A2⁺ / MUC1⁻) 、及び ASPC - 1 ヒト肺臓腺癌細胞株 (HLA - A2⁻ / MUC1⁺) を American Type Culture Collection (Manassas , VA) から購入し、 10 % ウシ胎児血清、 2 mM グルタミン、 100 units / mL ペニシリソ、 100 µg / mL ストレプトマイシン、 0.5 µg / mL アムホテリシン B (Mediatech , Inc .) 、及び 0.01 µg / mL ヒト組換えインスリン (Invitrogen Life Technologies , Inc . , Carlsbad , CA) を補充した DMEM 完全培地 (Mediatech , Inc . , Manassas , VA) 中で維持した。全ての培養は、マイコプラズマフリーだった。 HLA - A * 0201 (Storkus et al . , J . Immunol . , 138 : 1657 - 1659 (1987)) を発現する K562 ヒト慢性骨髓性白血病細胞株 (K562 / A * 0201) (Anderson et al . , J . Immunol . , 151 : 3407 - 3419 (1993)) は、 C . Britten (Johannes Gutenberg University of Mainz , Mainz , Germany) から入手し、 10 % の熱失活させたウシ胎児血清、 2 mM グルタミン、 100 units / mL ペニシリソ、 100 µg / mL ストレプトマイシン、 0.5 µg / mL 、 0.7 mg / mL G418 を補充した RPMI - 1640 完全培地で培養した。 174CE

40

50

M-T2細胞株(T2)トランスポート欠失変異株(Hogan et al., J. Exp. Med., 168:725-736 (1988))は、Dr. Peter Cresswell(Yale University School of Medicine, New Haven, CT)により提供された。C1R-A2細胞及びT2細胞は、マイコプラズマフリーであり、それぞれ、RPMI-1640完全培地及びイスコフ改変ダルベッコ完全培地(Mediatech, Inc.)で維持した。

【0097】

ペプチド

MUC1-Cのアミノ酸配列は、ペプチド/MHC複合体の予測される解離半減期により潜在的なMHC結合ペプチドを位置づける、アメリカ国立衛生研究所のバイオインフォマティクス及び分子解析部門(BioInformatics and Molecule Analysis Section)(Parker et al., J. Immunol., 152:163-175 (1994))のコンピューターアルゴリズムを使用して、HLA-A2結合についてコンセンサスモチーフの適合をスキャンした。American Peptide Company(Sunnyvale, CA)は、7つの9-merペプチド又は10-merペプチド及びそれらのアナログをMUC1-Cから合成した。ペプチドの純度は>90%だった。

【0098】

フローサイトメトリー解析

単色のフローサイトメトリー解析は、Guadagni et al., Cancer Res., 50:6248-6255 (1990)で以前に述べられている。簡単には、Ca²⁺及びMg²⁺フリーの冷ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を3回洗浄し、その後、抗HLA-A2, 28(One Lambda, Inc., Canoga Park, CA)、抗CD3、抗CD4、及び抗CD8(BD Biosciences, San Jose, CA) FITC結合モノクローナル抗体を用いて4で1時間染色した。マウスIgG2a, k FITC(BD Biosciences)をアイソタイプコントロールとして用いた。次いで、細胞をCa²⁺及びMg²⁺フリーの冷PBSで3回洗浄後、同じ緩衝液に再懸濁し、FACScan(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)及びCellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を用いてすぐに分析した。結果は、10,000個の生細胞から集めたデータから得られ、陽性細胞のパーセント及び平均蛍光強度(MFI)で表した。MFI値は対数スケールで集め、蛍光ドットプロットで全細胞の平均を測定することにより決定された蛍光レベルを表すのに使用した。

【0099】

2色のフローサイトメトリー解析の手順は、以下を除いて単色の解析と同様である。樹状細胞は、以下の抗体組み合わせ：抗MHCクラスII FITC/抗CD11c APC；抗クラスI FITC/抗CD80フィコエリトリン(PE)；抗クラスI FITC/抗CD83PE；抗クラスI FITC/抗CD86PE；抗クラスI FITC/抗クラスII PE；抗クラスI FITC/抗CD58PE；抗クラスI FITC/抗CD54PEを用いて分析した。マウスIgG1, k FITC、マウスIgG1, k PE、及びマウスIgG2a, k FITCをアイソタイプコントロールとして用いた。>96%のDCがCD11c⁺及びMHCクラスII⁺であった。MHCクラスIIに対する抗体は、Serotec(Oxford, UK)から購入し、他の抗体はBD Biosciencesから購入した。

【0100】

ペプチドのHLA-A2への結合

P1172、P1177、P1240及びそれらのアナログのHLA-A2分子への結合は、フローサイトメトリーによって実証されるように(Nijman et al., Eur. J. Immunol., 23:1215-1219 (1993))、T2A2細胞でのHLA-A2発現のアップレギュレーションによって評価した。

10

20

30

40

50

【0101】

PBMCs由来のDCsの培養

末梢血単核細胞(PBMCs)は、PANVAC-VF臨床試験に登録されたHLA-A⁺の患者のヘパリン処理済血液から得た。リンパ球分離媒体グラジエント(MPB biomedicals, Aurora, OH)を用いて、製造者の指示に従ってPBMCsを分離した(Boyum, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 97:51-76(1968))。DCsは, Sal lusto et al., J. Exp. Med., 179:1109-1118(1994)に記載されるように、PBMCsから調製した。

【0102】

10

T細胞株の產生

Tsang et al., J. Natl. Cancer Inst., 87:982-990(1995)により述べられているプロトコルの修正により、MUC1-C特異的CTLsを產生した。P1172、P1172(1Y)、P1177、及びP1177(10V)特異的T細胞株は、MUC1-CEAベースのワクチンを接種した2人の結腸癌患者から產生した。P1240及びP1240(1Y)特異的T細胞株は、MUC1-CEAベースのワクチンを接種した卵巣癌患者及び乳癌患者から產生した。前述のとおり生成したCD40L又は酵母成熟自己DCsを、抗原提示細胞(APCs)として使用した。ワクチン接種後70日目に得たPBMCsをAPCsに添加し、12.5μg/mLの対応するペプチドで、エフェクター:APCが10:1の比率でパルスした。3回のin vitro刺激(IVS)サイクルのために、自己DCsをAPCsとして使用した。3回目のIVSサイクル後、放射線照射(23,000rads)された自己EBV形質転換B細胞を、APCsとして使用した。EBV形質転換B細胞での再刺激のために、12.5μg/mLの濃度でペプチドを用いて、自己EBV形質転換B細胞を、エフェクター:APCが1:3の比率でパルスした。5%CO₂を含む加湿大気中で、培養物を3日間、37℃でインキュベートした。その後、培養物に7日間、20U/mLの濃度の組換えヒトIL-2を補充し；IL-2を含む培地を3日毎に補給した。ペプチドとの3日間のインキュベーション及び7日間のIL-2補充は、1回のIVSサイクルを構成した。

【0103】

20

テトラマー染色

ストレプトアビシン-PE標識P1172(1Y)/HLA-A*0201テトラマー、PE標識P1177(10V)/HLA-A*0201テトラマー、PE標識P1240/HLA-A*0201テトラマーは、Tetramer Core Facility(Atlanta, GA)により調製された。PE標識HIV gag(配列番号25)/HLA-A*0201テトラマーは、Beckman Coulter(Fullerton, CA)から入手し、ネガティブコントロールとして使用した。1μLのテトラマー及び抗CD8-FITC抗体(BD Biosciences)で30分間、室温で暗所にてPBMCs(1×10⁶)を染色し、FACS緩衝液で2回洗浄し、FACScan及びCellQuestソフトウェアを使用して解析した。結果は、100,000個の細胞から集めたデータから得た。

【0104】

40

細胞傷害性アッセイ

ターゲット細胞を、50μCiの¹¹¹Inで標識したオキシキノリン(Medi-Physics Inc., Arlington, IL)で、室温にて15分間標識した。100μLの RPMI-1640完全培地中のターゲット細胞(3×10³)を、平底アッセイプレートの各96ウェルに添加した。10%のプールされたヒトAB血清を補充した100μLのRPMI-1640完全培地にエフェクター細胞を懸濁し、ターゲット細胞に添加した。次いで、プレートを37℃、5%CO₂、4又は16時間インキュベートした。ハーベスターフレームズ(harvester frames)(Skatron

50

, Inc., Sterling, VA) を用いてガンマ線計数するために、上清を回収した。測定を 3 回行い、標準偏差を算出した。特異的溶解は以下の計算式により算出した(全ての値は cpm で表示)。

【0105】

【化 1】

$$\text{溶解(%)} = \frac{\text{観察された遊離} - \text{自然遊離}}{\text{全遊離} - \text{自然遊離}} \times 100$$

【0106】

10

100 μL の RPMI - 1640 完全培地を添加したウェルから、自然遊離を決定した。ターゲットを 2.5% Triton X-100 で処理後、全遊離放射活性を得た。

【0107】

サイトカインの検出

種々のペプチド濃度の IL-2 を含まない培地中、ペプチドパルスした自己 DCs 又は自己 EBV 形質転換 B 細胞により 24 時間刺激された T 細胞の上清を、ELISA キット (BioSource International, Camarillo, CA) により INF-γ の分泌についてスクリーニングした。結果は pg/mL で表した。

【0108】

統計解析

20

対応のある両側スチューデント t 検定及び StatView ソフトウェア (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を使用して、統計学的有意性を算出した。

【0109】

実施例 2

本実施例は、MUC1-C サブユニットの CTL エピトープ及びそのアナログの決定を実証する。

【0110】

MUC1-C サブユニットの第一のアミノ酸配列 (MUC1 配列の残基 1098 から 1254 に対応) を、HLA-A2 結合ペプチドのコンセンサスモチーフについて解析した。2 つの 10-mer ペプチド (P1172 及び P1177 と称する) 及び 1 つの 9-mer ペプチド (P1240 と称する) を同定し、合成した (表 1 参照)。ネイティブエピトープ P1172、P1177、及び P1240 の 3 つのアナログ (それぞれ P1172 (1Y)、P1177 (10V)、及び P1240 (1Y)) を、1 位及び 10 位のアミノ酸残基の單一アミノ酸置換により作製した。各アナログは、対応するネイティブエピトープよりも HLA-A2 分子に対する高い予測親和性を有した。

30

【0111】

HLA-A2 分子に対して高い親和性を有するペプチド (NGEPP703) (Cereda et al., Cancer Immunol. Immunother., 59: 63-71 (2010)) 及び特異的な HLA-A3 ペプチド (CAP-7) を、それぞれ、ポジティブコントロール及びネガティブコントロールとしてアッセイで使用した。

40

【0112】

【表1】

表1. MUC1ペプチドのHLA-A2分子への結合。

ペプチド*	アミノ酸配列	配列番号	MUC1におけるアミノ酸の位置	T2結合 [#]
P1172	ALAIVYLI AL	1	1172-1181	248.6
P1172(1Y)	YLAIIVYLI AL	2	1172-1181	245.1
P1177	YLIALAVCQC	4	1177-1186	211.2
P1177(10V)	YLIALAVCQV	5	1177-1186	299.1
P1240	SLSYTNPAV	7	1240-1248	325.8
P1240(1Y)	YLSYTNPAV	8	1240-1248	342.1
NGEP (P703) (ポジティブコントロール)	GLFDEYLEMV	16	NA	481.93
CAP-7 (ネガティブコントロール)	HLFGYSWYK	17	NA	109.1

*ペプチドは12.5 μg/mLの濃度で使用した。

[#]結果は平均蛍光強度(MFI)で表した。

NGEP (P703)ペプチドはHLA-A2結合ペプチドである。

CAP-7ペプチドはHLA-A3結合CEAペプチドである

【0113】

P1177、P1172、及びP1240は、HLA-A2分子に対し、ネガティブコントロールと比較してより高い親和性を示した。アナログペプチドP1177(10V)及びP1240(1Y)は、HLA-A2分子に対し、対応するネイティブペプチドP1177及びP1240と比較してより高い親和性を示した。

【0114】

アナログ及びネイティブペプチドのペプチド/HLA-A2複合体の安定性は、HLA-A2分子の残存する複合体のパーセンテージを異なる時点(0、2、4、6、8、及び10時間)で決定することにより解析した。アナログペプチドP1177(10V)は、ネイティブペプチドP1177よりも、クラスI分子に対してより結合活性が高いことを各時点で実証した。P1172(1Y)及びP1172、並びにP1240(1Y)及びP1240の間では、解離半減期に関して違いは認められなかった。

【0115】

実施例3

本実施例は、MUC1-CサブユニットのCTLエピトープ及びそのアナログのさらなる特徴を実証する。

【0116】

P1172、P1177、P1240、及びそれらの対応するアナログの免疫原性を、*in vitro*で特異的CTLsを産生する能力を評価することによりさらに調べた。組換えワクシニア-CEA-MUC1-TRICOM及び組換え鶏痘-CEA-MUC1-TRICOMでワクチン接種された、結腸癌患者(患者1)由来及び乳癌患者(患者2)由来のPBMCsを用いて、これらのMUC1-Cネイティブ及びアゴニストペプチドに対して特異的CD8⁺細胞株を樹立した。P1172、P1172(1Y)、P1177、及びP1177(10V)を用いて患者1から産生されたT細胞株は、それぞれ、T-1-P1172、T-1-1172(1Y)、T-1-P1177、及びT-1-P1177(10V)とした。P1240及びP1240(1Y)を使用して患者2から産生したT細胞株は、それぞれ、T-2-P1240及びT-2-P1240(1Y)とした

10

20

30

40

50

。

【0117】

これらのT細胞株の特異性を評価するために、対応するペプチドでパルスされ放射線照射された自己B細胞を用いて、IFN- γ リリースアッセイを行った。対応するペプチドでパルスされ放射線照射された自己B細胞を用いて、APC:T細胞が2:1の比率でT細胞を刺激した。T細胞は $5 \times 10^5 / \text{mL}$ の濃度で使用した。24時間の培養上清を集め、IFN- γ の分泌を調べた。T-1-P1172(1Y)、T-1-P1177(10V)、及びT-2-P1240(1Y)細胞株は、対応するネイティブペプチドを用いて産生されたT細胞株と比較して、より高レベルのIFN- γ を産生した(表2)。

【0118】

10

【表2】

表2. ペプチドでパルスされたB細胞で刺激されたMUC1-C特異的T細胞株によるIFN- γ の産生。

T細胞株	ペプチド	IFN- γ (pg/mL)
T-1-P1172	P1172	158.3
T-1-P1172(1Y)	P1172(1Y)	605.0
T-1-P1177	P1177	666.4
T-1-P1177(10V)	P1177(10V)	>1,000
T-4-P1240	P1240	437.3
T-4-P1240(1Y)	P1240(1Y)	>1,000

20

【0119】

次いで、アゴニストペプチド特異的T細胞を活性化するネイティブペプチド及びアゴニストペプチドの能力を比較するために、種々の濃度で試験を行った。各ペプチド濃度において、アゴニストペプチドP1172(1Y)、P1177(10V)、及びP1240(1Y)でAPCsをパルスすると、ネイティブペプチドP1172、P1177、及びP1240と比較して、アゴニストペプチド特異的T細胞株による、最大レベルのIFN- γ 産生が導かれた(図1A~1C参照)。

30

【0120】

次いで、上述と同じ臨床試験より他の結腸癌患者(患者3)のPBMCsから、P1177及びP1177(10V)を使用して更なるT細胞株を樹立し、それぞれT-3-P1177及びT-3-P1177(10V)とした。T-3-P1177(10V)はT-3-P1177よりも高レベルのIFN- γ を産生した(>1,000 pg/mL対456 pg/mL)。

30

【0121】

実施例4

本実施例は、癌患者のMUC1 CTLエピトープ及びエンハンサーアナログペプチドの免疫原性を実証する。

40

【0122】

T細胞株T-1-P1172、T-1-1172(1Y)、T-1-P1177、T-1-P1177(10V)、T-2-P1240、及びT-2-P1240(1Y)におけるMUC1-C特異的CD8 $^{+}$ T細胞の頻度を、P1172(1Y)/HLA-A*0201テトラマー、P1177(10V)/HLA-A*0201テトラマー、P1240(1Y)/HLA-A*0201テトラマー、及び抗CD8抗体を使用して調べた。アゴニストエピトープ特異的T細胞株T-1-P1172(1Y)、T-3-P1177(10V)、及びT-2-P1240(1Y)では、対応するネイティブペプチドを使用して産生したT細胞株と比較して、高頻度のMUC1-C特異的CD8 $^{+}$ T細胞が産生され

50

た（それぞれ、6.38%対1.53%、6.18%対3.53%、及び6.6%対1.6%）。

【0123】

次いで、これらのT細胞株を、MUC1⁺/HLA-A2⁺乳癌細胞株（MCF-7）及びMUC1⁺/HLA-A2⁺肺臓癌細胞株（CF-PAC-1）に対する細胞傷害性活性について試験した。MUC1⁻/HLA-A2⁺メラノーマ細胞株（SK-MEL-24）及びMUC1⁺/HLA-A2⁻肺臓癌細胞株（ASPC-1）をネガティブコントロールとして使用した。これらの腫瘍細胞株のHLA-A2及びMUC1-Cの発現を、フローサイトメトリーで評価した（表3参照）。

【0124】

【表3】

表3. 樹立されたヒト腫瘍細胞株におけるMUC1及びHLA-A2の発現。

腫瘍細胞株	MUC1発現*	HLA-A2発現*
MCF-1	48.4 (363.8)	85.9 (36.8)
CF-PAC-1	75.6 (120.7)	99.9 (192.3)
ASPC-1	56.6 (86.7)	陰性
SK-MEL-24	2.9 (100.7)	99.7 (466.6)

*値は陽性細胞のパーセントで表した（MF1）。

10

20

【0125】

MUC1-Cエピトープ特異的T細胞株を用いて、16時間の¹¹¹Inリリースアッセイを行った。MCF-7細胞は、アゴニストエピトープ特異的T細胞株により、対応するネイティブエピトープに特異的なT細胞株よりも著しく溶解された。予想通り、SK-MEL-24細胞に対する溶解は観察されなかった（表4参照）。

【0126】

【表4】

表4. MUC 1 - CアゴニストT細胞株及びネイティブエピトープで產生したT細胞株によるMUC 1⁺腫瘍細胞の溶解。

T細胞株	E : T 比	MCF-7 (HLA-A2 ⁺ /MUC-1 ⁺) [#]	SK-MEL (HLA-A2 ⁺ /MUC-1 ⁻) [#]
T-1-P1172	50:1	26.4 (2.72)	8.0 (2.1)
	25:1	3.9 (1.78)	ND
T-1-P1172(1Y)	50:1	40.7 (10.5)*	0
	25:1	25.5 (3.40)*	ND
T-1-P177	50:1	53.6 (6.34)	4.6 (0.86)
	25:1	38.5 (0.69)	ND
T-1-P1177(10V)	50:1	54.4 (2.98)	0
	25:1	46.2 (3.22)*	ND
T-4-P1240	50:1	9.2 (1.11)	ND
	25:1	8.4 (0.21)	0.8 (0.12)
T-4-P1240(1Y)	50:1	25.9 (2.1)*	ND
	25:1	20.8 (1.52)*	1.3 (0.47)

* p < 0.01 アゴニスト対ネイティブエピトープの t 検定による。

[#]結果は特異的溶解のパーセントで表示する（標準偏差）。

ND = 実施していない

【0127】

実施例5

本実施例は、本発明のペプチドを用いて產生したT細胞株のCTL細胞溶解の特異性及びHLA-A2拘束性を実証する。

【0128】

T-1-P1177(10V)及びT-2-P1240(1Y)細胞は、該細胞株が高レベルのIFN-、高パーセンテージのテトラマー⁺T細胞、及び殺腫瘍細胞の増大を生じたため、選択した。

【0129】

CTL細胞溶解の特異性及びHLA-A2拘束性を確認するため、T-1-P1177(10V)及びT-2-P1240(1Y)細胞を、ターゲットとしたCF-PAC-1細胞とともにコールドターゲット阻害アッセイで使用した。¹¹¹Inで標識したCF-PAC-1細胞及び非標識のK562/A2.1細胞を、1:10で使用した。K562/A2.1細胞を、ペプチド(25 μg/mL)あり又はなしで2時間インキュベートした。

【0130】

P1177(10V)及びP1240(1Y)ペプチドバルスされた非標識のK562/A2.1細胞の添加は、エフェクター：ターゲット比が25:1で、T-1-P1177(10V)及びT-2-P1240(1Y)細胞のCF-PAC-1コントロールに対するCTL活性を、それぞれ21.1%から4.0%溶解及び13.5%から1.7%溶解まで減少させた（表5）。

【0131】

10

20

30

40

【表5】

表5. MUC1-C特異的T細胞株によるCF-PAC-1の溶解抑制。

ターゲット細胞	MUC1-Cアゴニスト特異的T細胞 (T-4-1777-10V) [#]
CF-PAC-1	21.2 (5.2)
CF-PAC-1 + K562/A2.1	16.9 (0.8)
CF-PAC-1 + K562/A2.1 + P1177(10V)	4.0 (1.5)*
ターゲット細胞	MUC1-Cアゴニスト特異的T細胞 (T-4-1240-1Y) [#]
CF-PAC-1	13.5 (5.1)
CF-PAC-1 + K562/A2.1	11.9 (2.3)
CF-PAC-1 + K562/A2.1 + P1240(1Y)	1.7 (1.2)*

* p < 0.01ペプチドあり又はなしでの溶解のt検定による。

#結果は25:1のE:T比で特異的溶解のパーセントで表示する（標準偏差）。

【0132】

抗体ブロッキング試験を実施して、溶解がHLA-A2拘束性であるかどうかを決定した。16時間の¹¹¹Inリリースアッセイにおいて、いずれの抗体も含まないか、UPC-10 (10 μg / mL) を含むか、又は抗HLA-A2 (10 μg / mL) を含む、培地でCF-PAC-1細胞を1時間インキュベートした。CF-PAC-1細胞に対するT-1-P1177(10V)及びT-2-P1240(1Y)のCTL活性は、抗HLA-A2抗体では溶解が抑制されたがコントロール抗体UPC-10では抑制されなかったことから示されるように、HLA-A2拘束性であることが示された（表6）。

【0133】

【表6】

表6. T細胞株による腫瘍細胞溶解のHLA-A2特異的抑制。

T-4-P1177(10V)の処理	溶解 [#]
なし	23.4 (1.9)
抗-HLA-A2	7.4 (1.7)*
UPC-10 (ネガティブコントロール)	20.8 (3.1)
T-4-P1240(1Y)の処理	溶解 [#]
なし	16.6 (1.2)
抗-HLA-A2	5.6 (2.0)*
UPC-10 (ネガティブコントロール)	13.6 (1.5)

* p < 0.01ペプチドあり又はなしでの溶解のt検定による。

#結果は25:1のE:T比で特異的溶解のパーセントとして表示する（標準偏差）。

【0134】

これらの結果は、アゴニストエピトープを用いて產生されたMUC1-C特異的T細胞が、抗原特異的及びHLA-A2拘束性の様式で、ネイティブMUC-1を内在的に発現する腫瘍細胞を溶解することを示した。

【0135】

実施例6

以下の材料及び方法は、実施例7～9において議論する実験のために使用した。

10

20

30

40

50

【0136】

患者

前述のCEAベース及びMUC1ベースウイルスワクチン(PANVAC-V/F)(Gulley et al., Clin. Cancer Res., 14:3060-3069(2008))の臨床試験で登録された卵巣癌患者の抹消血単核細胞(PBMCs)を使用した。PANVACは、CEA、MUC1、及び3つの共刺激分子(B7.1、細胞間接着分子1(ICAM-1)、及びリンパ球機能関連抗原3(LFA-3))を発現する、組換えワクシニア(V)及び鶏痘(F)ベクターからなる。プライムとしてワクシニア、ブースト注射として鶏痘を用いて、最初の月は隔週で、それ以降は月1回与えた。

【0137】

HLA-A3⁺の健康なドナー由来のPBMCsを、記載される参照集団として使用した。アメリカ国立衛生研究所臨床センター(National Institutes of Health Clinical Center)の治験審査委員会は手順を承認し、インフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に従って得られた。

【0138】

細胞培養

ヒト卵巣癌細胞株SKOV3(HLA-A3⁺及びMUC1⁺)、及び膵臓癌細胞株CFPAC1(HLA-A3⁺及びMUC1⁺)並びにASPC-1(HLA-A3⁺及びMUC1⁻)はAmerican Type Culture Collection(Manassas, VA)より購入した。全ての細胞培養物は、マイコプラズマフリーであり、完全培地(10%ウシ胎仔血清、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン及び2mM L-グルタミンを補充した RPMI 1640)(Mediatech, Herndon, VA)中で維持した。C1R A3及びK562-A3細胞:C1R(Dr. WEBiddison(NINDS, NIH, Bethesda, MD)から親切な贈与)及びK562(ATCC)は、NCI-Fredrick Eukaryotic Expression Group(Fredrick, MD)によって、HLA-A3を発現するためにHLA-A3ベクターでトランスフェクトされた。0.2mg/mlのG-418(Mediatech)を補充したRPMI完全培地で、それらを維持した。

【0139】

ペプチド

MUC1-Cのアミノ酸配列は、ペプチド/MHC複合体の予測される解離半減期により潜在的なMHC結合ペプチドを位置づけるためにParkerらによって開発されたコンピューターアルゴリズム(Parker et al., J. Immunol., 152:163-175(1994))を使用して、HLA-A3結合ペプチドについてコンセンサスモチーフの適合をスキャンした。American Peptide Company(Sunnyvale, CA)が、結合親和性を増大させるために、アミノ酸置換したMUC1-C由来の、7つの9-mer又は10-merペプチドアナログを合成した。ペプチドの純度は>90%だった。

【0140】

PBMCs由来樹状細胞の培養

患者から末梢血を集め、密度勾配遠心法によりPBMCsを単離した(Lymphocyte Separation Medium, ICN Biochemicals, Aurora, VA)。樹状細胞(DCs)は、以前に記載された手順(Yokokawa et al., Int. J. Cancer, 121:595-605(2007))の変更を使用して產生した。100ng/ml GM-CSF及び20ng/ml IL-4(PeproTech, Rocky Hill, NJ)を含むAIM-V培地内で、樹状細胞を増殖させた。5日間培養後、1μg/ml CD40L及び1μg/ml エンハンサー(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)の24時間添加によりDCsを成熟させた。次いで、それらを、PBMCsの最初のin vitro

10

20

30

40

50

刺激 (IVS1) のためにすぐに使用するか、又は今後の使用のために分割して凍結した。

【0141】

T細胞株の產生

Tsang et al., J. Nat. Cancer Inst., 87: 982-990 (1995)により述べられているプロトコルの改訂版を使用し、MUC1-C特異的細胞傷害性Tリンパ球を產生した。放射線照射された自己DCsを、12.5 μg/m¹のペプチドで2時間パルスし、次いで、PBMCsを10:1の比率で添加した。3日後、ヒトIL-2 (20Cetus units/ml)を加えた。細胞を7日毎に、再刺激した。3回目のin vitro刺激 (IVS) 後、抗原提示細胞として自己エプスタイン バーウイルス形質転換B細胞を使用して、3:1の比率で細胞を再刺激した。

【0142】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析 (FACS) は、以前に記載されたように (Yokokawa et al., 上記参照) 行った。簡単には、ヤギ抗ヒト二次 FITC結合抗体とともにGAP-A3抗体をHLA-A3に使用し、DF3抗体を細胞外MUC-1に使用した。CD8-PE、CD45RA-PECy7、CD62L-FITC及びCXCR3-APC (BD Biosciences, San Jose, CA) で40分間、4°で染色することにより、T細胞株に対して4色FACS解析を実施した。LSRII (BD) により1×10⁵細胞を得て、FlowJo 9.0.1ソフトウェア (Tree Star Inc, Ashland, OR) を使用してデータを解析した。適切なアイソタイプコントロールを使用し、死細胞は解析から除いた。

【0143】

テトラマー染色

NIH Tetramer Core Facility (Atlanta, GA) により、フィコエリトリン (PE) で標識したHLA-A3-P432-3F10K及びHLA-A3-P483-2L3Fテトラマーを調製し、PEで標識したMHCクラスIヒトネガティブテトラマー (Kit No T01044) をBeckman Coulter Inc (Sykesville, MD) から得た。ネガティブテトラマーは、特異性は知られておらず、及びどのHLA対立遺伝子のヒトCD8⁺T細胞にも結合しない。テトラマーを1:100で希釈して使用し、細胞を45分、4°で染色した。LSRII (BD) により1×10⁵細胞を得て、FlowJo 9.0.1ソフトウェア (Tree Star Inc, Ashland, OR) を使用してデータを解析した。

【0144】

細胞傷害性アッセイ及びコールドターゲット阻害アッセイ

T細胞により媒介される死滅を決定するために、16時間の¹¹¹Inリリースアッセイを使用した (Tsang et al., 上記参照)。37°で20分間、2×10⁶ターゲット細胞を60 μCiの¹¹¹Inオキサイド (GE Health care, Vienna, VA) で標識し、96ウェルの丸底培養プレート中、3000細胞/ウェルで使用した。T細胞を異なる比率で添加した。全てのアッセイは、10%ウシ胎児血清、グルタミン、及び抗生物質 (Mediatech, Manassas, VA) で置き換えた RPMI培地内で実施された。培地のみでターゲット細胞をインキュベートすることによって自然遊離を決定し、2.5% Triton X-100でインキュベートすることによって完全溶解を決定した。計算式を用いて溶解を算出した (全ての値はcpmで表示) :

【0145】

【化2】

$$\text{溶解(%)} = \frac{\text{観察された遊離 (cpm)} - \text{自然遊離}}{\text{完全遊離 (cpm)} - \text{自然遊離}} \times 100$$

10

20

30

40

50

【 0 1 4 6 】

コールドターゲット阻害アッセイは、K 5 6 2 - A 3 細胞又はペプチドパルスされたK 5 6 2 - A 3 細胞を1：10の比率でウェルに添加することによって実施した（Y o k o k a w a e t a l . , 上記参照）。

【 0 1 4 7 】**サイトカインの検出**

2 . 2 × 1 0 ⁶ T 細胞、及びペプチド P 4 3 2 - 3 F 1 0 K 又は P 4 8 3 - 2 L 3 F でパルスされた 5 . 5 × 1 0 ⁶ 自己 B 細胞を 2 4 時間、ウェルあたり 5 m L の培地でインキュベートした。サイトカインの検出のために、上清を M u l t i - a r r a y テクノロジー（M e s o S c a l e D i a g n o s t i c s , G a i t e r s b u r g , M D ）で解析した。 10

【 0 1 4 8 】**E L I S P O T アッセイ**

H L A - A 3 ⁺ 患者における C D 8 免疫応答の測定は、A r l e n e t a l . , C a n c e r I mmunol . I mmunothe r . , 4 9 : 5 1 7 - 5 2 9 (2 0 0 0) により述べられている手順の変更を用いて、酵素結合免疫吸着スポットアッセイ（E L I S P O T ）によって行った。A P C として K 5 6 2 - A 3 細胞を使用して、アッセイを実施した。E L I S P O T は、ペプチドによる刺激に応じて I F N ̢ を放出する T 細胞の頻度を測定する。P 4 3 2 - 3 F 1 0 K 、 P 4 8 3 - 2 L 3 F 、ペプチドなし、又は H I V g a g ペプチド（配列番号 2 5 : ネガティブコントロール）を使用した。ワクチン接種前又は接種後に各患者の P B M C s を比較した。陽性反応は、I F N ̢ 分泌細胞において 2 倍増加として得点された。スポットは、イムノスポットカウンター（C e l l u l a r T e c h n o l o g y L t d , S h a k e r H e i g h t s , O H ）を使用して解析した。 20

【 0 1 4 9 】**統計解析**

統計的評価のため、2群間でノンパラメトリックマン - ホイットニー検定を使用した（G r a p h P a d S o f t w a r e , L a J o l l a , C A ）。< 0 . 0 5 の P 値を有意とみなした。 30

【 0 1 5 0 】**実施例 7**

本実施例は、M U C 1 - C サブユニットの C T L エピトープ及びそれらのアナログの決定を実証する。

【 0 1 5 1 】

M U C 1 - C アミノ酸配列は、免疫療法に使用できる可能性がある C D 8 ⁺ T 細胞エピトープを同定するために、H L A - A 3 結合ペプチドについてコンセンサスモチーフの適合をスキャンした。ネイティブエピトープの予測される結合は低いので、T 細胞レセプターに対するより高い結合が予測される 7 つの新しいペプチドを調製した（表 7 参照）。

【 0 1 5 2 】

【表7】

表7. MUC1-Cネイティブ及びアゴニストペプチドのHLA-A3分子に対する結合。

ペプチド*	配列	配列番号	MUC1におけるアミノ酸の位置	予測される結合 [#]	
ネイティブ 432	ALAIIVYLIAL	1	1172	5.4	10
P432-3F10K	ALFIVYLI K	10	1172	900	
ネイティブ 483	STDRSPYEK	12	1223	3.0	
P483-2L3Y	SLYRSPYEK	13	1223	300	
P483-2L3F	SLFRSPYEK	14	1223	300	
ネイティブ 423	LLVLVVCVLVA	18	1163	1.35	
P423-6I/10K	LLVLVIVLV K	19	1163	270	
P423-10K	LLVLVVCVLV K	20	1163	180	
ネイティブ 440	GQLDIFPAR	21	1192	4.00	
P440-3F/7I/9K	GLLDIFPAK	22	1192	200	
ネイティブ 452	GQLDIFPAR	23	1204	2.43	20
P452-2L/9K	GLLDIFPAK	24	1204	405	

【0153】

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の産生能力について、これらのペプチドを調べた。PBMCsのin vitro刺激によりCTLを産生し、次いで、ターゲットとしてのペプチドパルスされたC1RA3細胞とともに、細胞傷害性アッセイに使用した。T-432-3F10K及びT-483-2L3F(それぞれ、P432-3F10K及びP483-2L3Fに対応)と称する、2つのペプチドで産生された細胞株は、高い細胞傷害性活性を実証し、これらのペプチドを以降の実験に使用した。

【0154】

ペプチドP432-3F10K及びペプチドP483-2L3Fで産生されたT細胞株におけるMUC1-C特異的CD8⁺T細胞の頻度を決定するために、HLA-A3-P432-3F10Kテトラマー及びHLA-A3-P483-2L3Fテトラマー解析を使用した。6回のIVSサイクル後、20%及び16%のT細胞が、それぞれP432-3F10Kテトラマー及びP483-2L3Fテトラマーに結合した。0.01%及び0.04%の細胞は、ネガティブテトラマーに結合した。

【0155】

サイトカイン産生を誘導するMUC1-Cペプチドの能力を試験するために、実施例6に記述したPANVAC卵巣癌臨床試験の2人の患者由来のP432-3F10K及びP483-2L3F特異的T細胞株(1.1×10^6 T細胞/mL)を、P432-3F10K又はP483-2L3Fで24時間パルスした自己B細胞と、24時間インキュベートした。刺激した細胞及び刺激していない細胞の上清のサイトカインレベルを評価した。表8に示すように、刺激後にいくつかのI型サイトカインが増加した。

【0156】

【表8】

表8. ペプチドP432-3F10K及びP483-2L3Fを用いて2人の卵巣癌患者から產生したMUC1-C特異的T細胞株によるサイトカイン產生。

患者	ペプチド	IVS	IL-2*	IL-12p70*	IFN γ *	IL-6*	TNF α *
I	P432-3F10K	7	40	5	350	16	180
	P483-2L3F	7	7	5	180	12	46
II	P432-3F10K	8	3	7	50	80	130
	P483-2L3F	8	15	9	2590	150	470

*値はpg/mLで表した

10

【0157】

実施例8

本実施例は、本発明のペプチドの癌細胞を抑制する能力を実証する。

【0158】

4回又は6回のIVS後、2人の癌患者由来のペプチド特異的T細胞株を、細胞傷害性アッセイに使用した。ヒト卵巣癌細胞株SKOV3、及び膵臓癌細胞株ASPC-1を、FACS解析のために、HLA-A3及びMUC1に対する抗体で染色した。SKOVはHLA-A3(99%)及びMUC1(94%)を発現したのに対し、ASPC-1はMUC1陽性(71%)であったが、HLA-A3を発現しなかった。

【0159】

癌細胞株を放射性インジウム(^{111}In)とインキュベートし、特異的T-432-3F10K及びT-483-2L3FT細胞株とともに細胞傷害性アッセイに使用した。T細胞は、MUC1及びHLA-A3の両方を発現する腫瘍細胞を特異的に殺したが、MUC1を発現するがHLA-A3は発現していない細胞は殺さなかった。

20

【0160】

さらに、ターゲットとして膵臓癌細胞株CF-PAC-1(HLA-A3⁺及びMUC1⁺)を、コールドターゲットとしてペプチドパルスK562-A3細胞を用いて、コールドターゲット阻害アッセイを実施した。これらの細胞は効率的にペプチドを提示し、1:10の比率で添加された場合に、腫瘍細胞の溶解をブロックするが、ペプチドにさらされていないK562-A3細胞は、同じ濃度で添加された場合、腫瘍溶解に影響を及ぼさなかつた(図2A、2B参照)。T細胞:ターゲット細胞の比率は25:1であった。

30

【0161】

実施例9

本実施例は、癌患者における本発明のペプチドの免疫原性を実証する。

【0162】

臨床ワクチン試験の3人の患者のPBMCsを、ペプチドP432-3F10K又はペプチドP483-2L3Fにさらした自己樹状細胞で、2回のIVSサイクルで刺激し、最後の刺激から1週間後、細胞をCD8-FITC(20μL)と、P432-3F10K/P483-2L3F-テトラマー-PE(1μL)又はネガティブテトラマー-PC(1μL)のいずれかとで45分間染色後、FACS解析に供した。

40

【0163】

表9及び表10に示すように、20~60%の細胞が、2回の刺激後にテトラマーと結合した。表9及び表10の結果は、全てのCD8⁺T細胞からのテトラマー陽性細胞の頻度で表す。

【0164】

【表9】

表9. 癌患者由来PBMCSにおける、テトラマーを有するP432-3F10K特異的CD8⁺T細胞の同定。

サンプル	P432-3F10K テトラマー (%)	ネガティブテトラマー (%)
ワクチン接種前癌患者		
III	44.5	0.30
IV	22.0	0.18
V	31.5	0.08
ワクチン接種後癌患者		
III	59.9	3.4
IV	23.8	0.25
V	22.0	0.30

【0165】

【表10】

表10. 癌患者由来PBMCSにおける、テトラマーを有するP483-2L3F特異的CD8⁺T細胞の同定。

サンプル	P483-2L3F テトラマー (%)	ネガティブテトラマー (%)
ワクチン接種前癌患者		
III	64.7	0.00
IV	45.5	0.50
V	53.5	0.15
ワクチン接種後癌患者		
III	80.9	0.46
IV	65.7	0.47
V	43.8	0.24

【0166】

臨床ワクチン試験に登録した癌患者のPBMCSにおいて、P432-3F10K及びP483-2L3Fペプチドに反応するCD8⁺T細胞の存在を評価するため、IFNELISPOTアッセイを実施した。P432-3F10K及びP483-2L3Fペプチドを、25 μg / mLの濃度でELISPOTアッセイに使用して、特異的T細胞の前駆体頻度を決定した。ペプチドパルスしたK562-A3細胞をAPCとして、エフェクター：APCを1:2の比率で使用した。HIVペプチド及びペプチドなしをコントロールとして使用した。

【0167】

表11に示すように、11人の患者のうち5人が、ワクチン接種前及び接種後3か月のPBMCSにおいて、ペプチドP432-3F10Kによる刺激で特異的なIFN産生を示した。いずれの患者もP483-2L3Fペプチドに対して特異的な反応を示さず、患者IはPBMCSが少なすぎたため評価できなかった。

【0168】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1. M U C 1 及び C E A を発現する腫瘍を有する患者の末梢血における、 P A N V A C でのワクチン接種前及び後の、 P 4 3 2 - 3 F 1 0 K 及び P 4 8 3 - 2 L 3 F に特異的な T 細胞の前駆体頻度。

患者	時点	P432-3F10K	P483-2L3F
患者 II	前	1/6316	<1/200000
	後	1/2372	<1/200000
患者 III	前	1/6522	<1/200000
	後	1/5455	<1/200000
患者 IV	前	1/2000	<1/200000
	後	1/1322	<1/200000
患者 V	前	<1/200000	<1/200000
	後	<1/200000	<1/200000
患者 VI	前	1/4511	<1/200000
	後	1/21429	<1/200000
患者 VII	前	<1/200000	<1/200000
	後	<1/200000	<1/200000
患者 VIII	前	<1/200000	<1/200000
	後	<1/200000	<1/200000
患者 IX	前	<1/200000	<1/200000
	後	<1/200000	<1/200000
患者 X	前	<1/200000	<1/200000
	後	<1/200000	<1/200000
患者 XI	前	1/4196	<1/200000
	後	1/7229	<1/200000

10

20

30

40

50

【0 1 6 9】

実施例 1 0

以下の材料及び方法は、実施例 1 1 及び 1 2 において議論する実験のために使用した。

【0 1 7 0】

ペプチドの H L A - A 2 への結合

p V N T R 1 、 p V N T R 2 、 p V N T R 4 及びそれらのアナログ (p V N T R 3 及び p V N T R 5) の H L A - A 2 分子への結合を、フローサイトメトリーによって実証されるように、 T 2 A 2 細胞での H L A - A 2 発現のアップレギュレーションによって評価した (N i j m a n e t a l . , Eur . J . Immunol . , 2 3 : 1 2 1 5 - 1 2 1 9 (1 9 9 3)) 。

【0 1 7 1】

T 細胞株の產生

T s a n g e t a l . , J . Nat . Cancer Inst . , 8 7 : 9 8 2 - 9 9 0 (1 9 9 5) により述べられたプロトコルを修正して、 M U C 1 - C 特異的 C T L s を產生した。 p V N T R 3 、 p V N T R 5 特異的 T 細胞株を、 P S A ベースワクチンでワクチン接種した前立腺患者から產生した。先に記載するように作製した C D 4 0 L 又は酵母成熟自己 D C s を抗原提示細胞 (A P C s) として使用した。ワクチン接種後 9 4 日目に得た P B M C s を A P C s に添加し、エフェクター : A P C を 1 0 : 1 の比率で、 1 2 . 5 μ g / m L の対応するペプチドでパルスした。自己 D C s を A P C s として、 3 回の in v i t r o 刺激 (I V S) サイクルに使用した。放射線照射 (2 3 , 0 0 0 r a d s) された自己 E B V 形質転換 B 細胞を A P C s として、 3 回の I V S サイクル後に使用した。 E B V 形質転換 B 細胞での再刺激のために、 1 2 . 5 μ g / m L の濃度のペプチドを使用して、自己 E B V 形質転換 B 細胞をエフェクター : A P C が 1 : 3 の比率でパルスした。 5 % C O ₂ を含む加湿大気中で、培養物を 3 日間、 3 7 ℃ でインキュベートした。次いで、培養物に、 2 0 U / m L の濃度で組換えヒト I L - 2 を 7 日間補充した； I L -

2を含む培地を3日毎に補充した。ペプチドとの3日間のインキュベーション及び7日間のIL-2補充は、1回のIVSサイクルを構成した。

【0172】

細胞傷害性アッセイ

ターゲット細胞を、 $50 \mu\text{Ci}$ の ^{111}In で標識したオキシキノリン(Medi-Physics Inc., Arlington, IL)で15分間、室温で標識した。RPMI-1640完全培地 $100 \mu\text{L}$ 中のターゲット細胞(3×10^3)を、平底アッセイプレートの各96ウェルに添加した。10%のプールされたヒトAB血清を補充したRPMI-1640完全培地 $100 \mu\text{L}$ にエフェクター細胞を懸濁し、ターゲット細胞に添加した。次いで、5%CO₂中、37度で4又は16時間、プレートをインキュベートした。ガンマ線計数のために、ハーベスター・フレームズ(harvester frames)(Skatron, Inc., Sterling, VA)を使用して上清を回収した。測定は3回を行い、標準偏差を算出した。特異的溶解は以下の計算式により算出した(全ての値はcpmで表示)。

【0173】

【化3】

$$\text{溶解}(\%) = \frac{\text{観察された遊離} - \text{自然遊離}}{\text{全遊離} - \text{自然遊離}} \times 100$$

20

【0174】

$100 \mu\text{L}$ のRPMI-1640完全培地を添加したウェルから自然遊離を決定した。ターゲットを2.5%Triton X-100で処理後、全遊離放射活性を得た。

【0175】

細胞培養

MCF-7ヒト乳腺癌細胞株(HLA-A2⁺/MUC1⁺)、CF-PAC-1ヒト肺臓腺癌細胞株(HLA-A2⁺/MUC1⁺)、SK-Mel-24メラノーマ細胞株(HLA-A2⁺/MUC1⁻)、及びASPC-1ヒト肺臓腺癌細胞株(HLA-A2⁻/MUC1⁺)をAmerican Type Culture Collection(Manassas, VA)から購入し、10%ウシ胎児血清、2mMグルタミン、100units/mLペニシリソ、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ アムホテリシンB(Mediatech, Inc.)、及び $0.01 \mu\text{g}/\text{mL}$ ヒト組換えインスリン(Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA)を補充したDMEM完全培地(Mediatech, Inc., Manassas, VA)中で維持した。全ての培養物はマイコプラズマフリーだった。

30

【0176】

実施例11

本実施例は、MUC1 VNT領域のCTLエピトープ及びそれらのアナログの決定を実証する。

40

【0177】

MUC1 VNTアミノ酸配列は、免疫療法に使用できる可能性があるCD8⁺T細胞エピトープを同定するために、HLA-A2結合ペプチドについてコンセンサスモチーフの適合をスキャンした。3つの9-merペプチド(VNT-1、VNT-2、及びVNT-4と称する)を同定し、合成した(表12参照)。

【0178】

ネイティブエピトープVNT-2及びVNT-4の2つのアナログ(それぞれVNT-3及びVNT-5)は、1、2、及び9位のアミノ酸残基のアミノ酸置換により产生した(表12参照)。各アナログは、対応するネイティブエピトープよりもHLA-

50

A2分子に対する高い予測親和性を有した。

【0179】

HLA-A2分子に対して高い親和性を有するペプチド(NGEPP703)(Cereda et al., Cancer Immunol. Immunother., 59: 63-71 (2010))及び特異的なHLA-A3ペプチド(CAP-7)を、それぞれ、ポジティブコントロール及びネガティブコントロールとしてアッセイで使用した。

【0180】

【表12】

表12. MUC1 VNTRペプチドのHLA-A2分子に対する結合。

ペプチド*	アミノ酸配列	配列番号	予測される結合	T2A2結合#
VNTR-1	STAPPAHNV	27	0.966	169.0
VNTR-2	STAPPAHGV	28	0.966	165.7
VNTR-3 (アゴニスト)	YLAPPAHGV	29	319.9	485.5
VNTR-4	APDTRPAPG	31	0	209.7
VNTR-5 (アゴニスト)	YLDTRPAPV	32	127.9	647.4
NGEP(P703) (ポジティブコントロール)	GLFDEYLEMV	16	NA	485.3
CAP-7 (ネガティブコントロール)	HLFGYSWYK	17	NA	83.8

*ペプチドは25 μg/mLの濃度で使用した。

#結果は平均蛍光強度(MFI)で表した。

【0181】

VNTR-1、VNTR-2、及びVNTR-4は、HLA-A2分子に対し、ネガティブコントロールと比較してより高い親和性を示した。アナログペプチドVNTR-3及びVNTR-5は、HLA-A2分子に対し、それぞれ対応するネイティブペプチドVNTR-2及びVNTR-4と比較してより高い親和性を示した。

【0182】

アナログ及びネイティブペプチドのペプチド/HLA-A2複合体の安定性は、HLA-A2分子の残存する複合体のパーセンテージを異なる時点(0、2、4、6、8、及び10時間)で決定することにより解析した。アナログペプチドVNTR-3及びVNTR-5は、それぞれのネイティブペプチドVNTR-2及びVNTR-4よりも、クラスI分子に対してより高い結合活性を各時点で実証した(図3参照)。

【0183】

実施例12

本実施例は、癌患者におけるMUC1 VNTRエンハンサーアナログペプチドの免疫原性を実証する。

【0184】

PBMCsのin vitro刺激によるCTLsの産生能力について、VNTR-3及びVNTR-5ペプチドを調べた。次いで、得られたT細胞株(それぞれT-VNTR-3及びT-VNTR-5)を、MUC1+/HLA-A2+乳癌細胞株(MCF-7)及びMUC1+/HLA-A2+/A3+膵臓癌細胞株(CFPAC-1)に対する細

10

20

30

40

50

胞傷害性活性について試験した。MUC1⁻/HLA-A2⁺メラノーマ細胞株(SK-MEL)及びMUC1⁺/HLA-A2⁻肺臓癌細胞株(ASPC-1)をネガティブコントロールとして使用した。

【0185】

MUC1 VNTRエピトープ特異的T細胞株を使用して、¹¹¹Inリリースアッセイを行った。予想通り、ASPC-1(HLA-A2⁻)及びSK-MEL(MUC1⁻)細胞に対する溶解は観察されなかった(表13参照)。

【0186】

【表13】

表13. VNTR特異的T細胞はHLA-A2及びMUC-1を発現する腫瘍細胞を殺す。

T細胞株	E:T比	MCF-7 (HLA-A2 ⁺ MUC1 ⁺) [#]	CF-PAC-1 (HLA-A2 ⁺ /A3 ⁺ MUC1 ⁺) [#]	ASPC-1 (HLA-A2 ⁻ MUC1 ⁺) [#]	SK-MEL (HLA-A2 ⁺ MUC1 ⁻) [#]
T-VNTR-3	25:1	42.2 (7.3)	16.9 (3.6)	1.3 (1.9)	5.0 (2.5)
	12.5:1	24.6 (3.5)	10.9 (1.3)	-0.8 (0.6)	-1.5 (2.1)
T-VNTR-5	25:1	53.4 (8.4)	48.9 (4.9)	-0.8 (0.4)	-0.6 (4.3)
	12.5:1	45.1 (3.0)	31.2 (2.4)	-1.4 (0.6)	1.5 (0.5)

#結果は特異的溶解のパーセントで表示する(標準偏差)。

【0187】

T-VNTR-3(VNTR-3アゴニストペプチド特異的T細胞株)及びT-VNTR-5(VNTR-5アゴニストペプチド特異的T細胞株)を 1×10^5 細胞/mLの濃度で別々に培養した。APC:T細胞の比率は3:1だった。アゴニスト又はネイティブペプチドを種々の濃度で使用した(表14及び15参照)。24時間後に上清を集め、IFN- γ の量を決定した。アゴニストペプチドで刺激したVNTR-3及びVNTR-5特異的T細胞株は、ネイティブペプチドでの刺激と比較して高レベルのIFN- γ を産生した(表14及び15参照)。

【0188】

【表14】

表14. アゴニストペプチドで刺激されたVNTR-3特異的T細胞株は高レベルのIFN- γ を産生した。

ペプチド	ペプチド濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	25 [#]	12.5 [#]	6.25 [#]	3.13 [#]	1.56 [#]	0 [#]
VNTR-3 (アゴニスト)	771.5	766.1	685.3	457.6	304.9	<15.6
VNTR-2 (ネイティブ)	261.0	203.0	127.0	75.8	29.0	<15.6

#結果はIFN- γ のpg/mLで表示する。

【0189】

10

20

30

40

【表15】

表15. アゴニストペプチドで刺激されたVNTR-5特異的T細胞株は高レベルのIFN- γ を産生した。

ペプチド	ペプチド濃度($\mu\text{g/mL}$)					
	25 [#]	12.5 [#]	6.25 [#]	3.13 [#]	1.56 [#]	0 [#]
VNTR-5 (アゴニスト)	543.7	496.2	452.9	322.0	205.1	<15.6
VNTR-4 (ネイティブ)	117.9	109.3	63.1	53.2	19.8	<15.6

#結果はIFN- γ のpg/mLで表示する。

【0190】

CTL細胞溶解の特異性及びHLA-A2拘束性を確認するため、T-VNTR-3及びT-VNTR-5細胞を、膵臓癌細胞株CF-PAC-1(HLA-A2⁺/A3⁺及びMUC1⁺)とともにコールドターゲット阻害アッセイで使用した。CF-PAC-1細胞、及びVNTRアゴニストペプチドでパルスされた又はパルスされていない自己B細胞を、ターゲットとして使用した。

【0191】

表16のデータにより実証されるように、対応するVNTRアゴニストペプチドでパルスされた自己B細胞は、腫瘍細胞の溶解をブロックするが、ペプチドにさらされていない自己B細胞は、腫瘍溶解に影響を及ぼさなかった。

【0192】

【表16】

表16. MUC1特異的T細胞株によるCF-PAC-1の溶解抑制。

ターゲット細胞	MUC1アゴニストペプチド (pVNTR-3)-特異的T細胞 (T-VNTR-3) [#]	MUC1アゴニストペプチド (pVNTR-5)-特異的T細胞 (T-VNTR-5) [#]
CF-PAC-1+B	38.3 (3.5)	25.8 (1.9)
CF-PAC-1+B+pVNTR-3	16.0 (10.0)	-
CF-PAC-1+B+pVNTR-5	-	12.0 (3.7)

#結果は特異的溶解のパーセントで表示する(標準偏差)。

【0193】

刊行物、特許出願及び特許を含む、本明細書中に引用した全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個々に且つ具体的に示されているのと同程度、及びその全体が本明細書中に記載されているのと同程度まで、参照によって本明細書中に組み込まれる。

【0194】

本発明の説明に関して(特に以下の特許請求の範囲に関して)、用語「a」及び「an」及び「the」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中に特記しないか文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。用語「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」及び「含む(containing)」は、特記しない限り、オープンエンドの用語(即ち、「～を含むがそれらに限定されない」を意味する)と解釈すべきである。

10

20

30

40

50

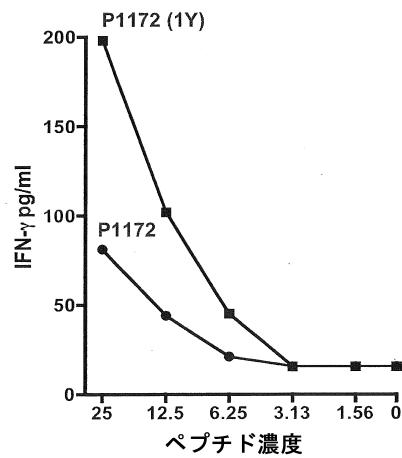
本明細書中の値の範囲の記述は、本明細書中に特記しない限り、その範囲内に入る各個別の値に個々に言及する省略方法として働くことのみを意図しており、各個別の値は、それが本明細書中に記述されているかのように本明細書中に組み込まれる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施できる。本明細書中に提供される任意の及び全ての例文又は例示的語句（例えば、「など（such as）」）の使用は、本発明をより明瞭にすることのみを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のどの語句も、特許請求されていない任意の要素を本発明の実施に必須のものとして示していると解釈すべきではない。

【0195】

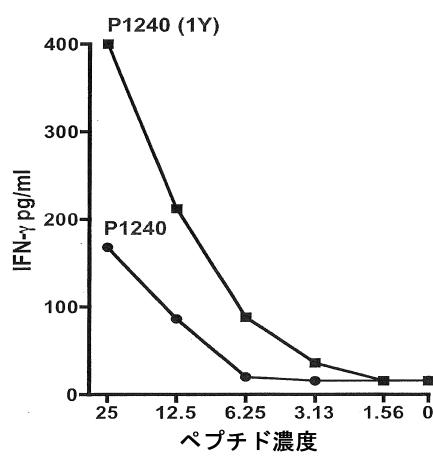
10

発明者が知る、発明を実施するための最良の形態を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書中に記載されている。これらの好ましい実施形態のバリエーションは、上述の説明を読めば当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がかかるバリエーションを適宜使用することを予期しており、本発明者らは、本明細書中に具体的に記載されたのとは異なる方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によつて許容されるとおり、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載される主題の全ての変更形態及び同等物を含む。さらに、その全ての可能なバリエーションでの上記要素の任意の組み合わせが、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

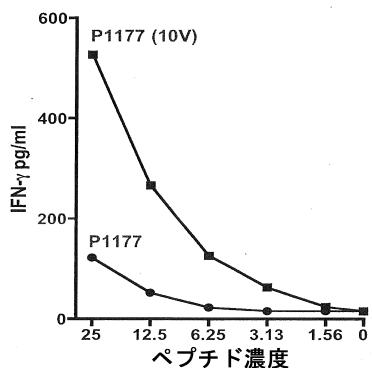
【図1A】



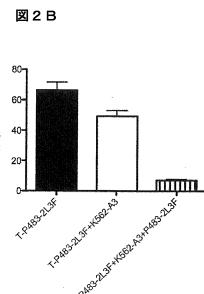
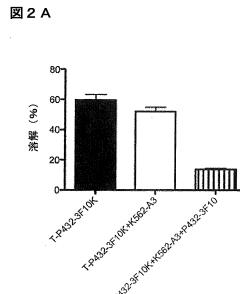
【図1C】



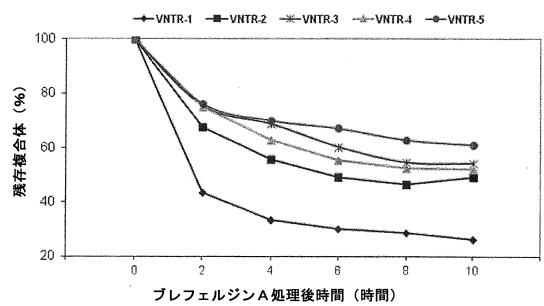
【図1B】



【図2】



【図3】



【配列表】

0006523685000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/15
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K	9/127
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(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、ポートマク、ソレール アヴェニュー 1030
1

(72)発明者 ツアン、クォン - ヨク

アメリカ合衆国、メリーランド州 20814、ベトヘスダ、ヨーク レーン 5420

審査官 上條 肇

(56)参考文献 特表2003-510094 (JP, A)

国際公開第2010/037395 (WO, A2)

特表2007-523633 (JP, A)

特表2009-544291 (JP, A)

国際公開第2013/025972 (WO, A1)

特表2014-524445 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K	1 / 0 0	-	1 9 / 0 0
A 6 1 K	3 9 / 0 0	-	3 9 / 4 4
A 6 1 K	4 9 / 0 0	-	4 9 / 0 4
A 6 1 K	5 1 / 0 0	-	5 1 / 1 2
C 1 2 N	1 5 / 0 0	-	1 5 / 9 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq