

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-510567
(P2006-510567A)

(43) 公表日 **平成18年3月30日(2006.3.30)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 5
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 C	4 C O 8 7
A 6 1 K 35/64 (2006.01)	A 6 1 K 35/64	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-565553 (P2002-565553)	(71) 出願人 598093026 オーソー・マクニール・フアー・マシュー・チカル・インコーポレーテッド アメリカ合衆国ニュージャージー州08869-0602ラリタン・ユーエスルート ナンバー202
(86) (22) 出願日 平成14年2月19日 (2002.2.19)	(74) 代理人 100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日 平成15年8月20日 (2003.8.20)	(72) 発明者 デグロウ, ジュリ アメリカ合衆国カリフォルニア州92117サンディエゴ・ベイクストリート3515
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/005748	
(87) 国際公開番号 W02002/065992	
(87) 国際公開日 平成14年8月29日 (2002.8.29)	
(31) 優先権主張番号 60/270, 252	
(32) 優先日 平成13年2月20日 (2001.2.20)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の治療のための細胞治療方法

(57) 【要約】

T細胞応答は、損なわれた免疫系を伴うヒトでしばしば減少される。われわれは、腫瘍細胞をインピボで溶解することが可能な、抗原特異的エフェクターへの、投薬を受けたことのない細胞傷害性Tリンパ球前駆細胞 (CTLp) の単離、刺激および拡張方法を開発した。本エキスピボプロトコルは完全に機能的なエフェクターを生じさせる。ヒトHLAクラスIおよび規定された補助分子でトランスフェクトされた人工産物の抗原提示細胞 (AAPC; キイロシヨウジョウバエ (Drosophila melanogaster)) を、正常ドナーおよび癌患者双方からのCD8+ T細胞を刺激するのに使用する。シヨウジョウバエ (Drosophila) 細胞の表面上に高密度まで発現されたクラスI分子は空であり、特異的ペプチドを内因性に発現する腫瘍細胞を認識するポリクローナル応答の生成をもたらす複数のペプチドの効率的な添加を見込む。生成される応答は、ペプチドエピトープが規定される免疫原である場合に、確固、抗原特異的かつ再現可能である。本人工産物抗原発現系は、集団のかなり大多数の大部分の癌を治療するよう適合させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a . 天然に存在しない抗原提示細胞系 (n n A P C) を調製すること (前記 n n A G C は、癌と関連する約 1 5 までの異なるペプチド分子を同時に提示することが可能であり、前記ペプチド分子はそれぞれが長さ約 6 ないし 1 2 アミノ酸であり) ;
- b . 前記癌を伴う被験体もしくは適するドナーから C D 8 ⁺ 細胞を収集すること ;
- c . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を前記 n n A P C 細胞系で刺激すること ;
- d . 馴化成長培地 (C G M) もしくは I L - 2 、 I L - 7 よりなる群から選択されるサイトカインを含有する培地に前記 C D 8 ⁺ 細胞を添加すること (前記サイトカインは個別にもしくは組合せで使用することができ) ;
- e . 前記被験体もしくは適するドナーから収集された懸濁されない末梢血単球もしくは C D - 8 枯渇末梢血単球を、約 1 ないし 5 0 μ g / m l の、前記 n n A P C が同時に提示することができる前記ペプチドの 1 種と混合すること ;
- f . 前記末梢血単球懸濁物を、所望の末梢血単球を除く懸濁物中の全部の成分を無効にするのに必要な十分な線量の線放射で照射すること ;
- g . 接着性末梢血単球を単離すること ;
- h . 前記接着性末梢血単球に、約 1 μ g / m l ないし 5 0 μ g / m l の前記各ペプチドを添加すること ;
- i . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を、 1 の末梢血単球に対し約 1 0 の C D 8 ⁺ 細胞の比で、前記接着性末梢血単球と組み合わせること ; および
- j . 前記被験体に C D 8 ⁺ 懸濁物を接種すること
- を含んで成る、前記被験体の治療方法。

10

20

【請求項 2】

前記 n n A P C が約 1 0 までのペプチド分子を提示することが可能である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記ペプチド分子が長さ約 8 ないし 1 0 アミノ酸である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記ペプチド分子が約 1 0 n M ないし 1 0 0 μ M の濃度範囲にある、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 5】

前記サイトカイン成分が I L - 2 である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記サイトカイン成分が、組合せの I L - 2 および I L - 7 である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

線放射の線量が約 3 , 0 0 0 ないし 7 , 0 0 0 ラドである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

線放射の線量が約 5 , 0 0 0 ラドである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

- a . 天然に存在しない抗原提示細胞系 (n n A P C) を調製すること (前記 n n A P C は癌と関連する約 1 5 までの異なるペプチド分子を同時に提示することが可能であり) ;
- b . 前記癌を伴う被験体から C D 8 ⁺ 細胞を収集すること ;
- c . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を前記 n n A P C 細胞系で約 6 ないし 7 日間刺激すること ;
- d . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を培地中の I L - 2 および I L - 7 で刺激すること ;
- e . 前記被験体から収集された末梢血単球を、約 2 0 μ g / m l の各ペプチドと混合すること ;
- f . 前記 C D 8 枯渇末梢血単球懸濁物を、約 5 , 0 0 0 ラドの線放射で照射すること ;
- g . 接着性末梢血単球を単離すること ;
- h . 前記接着性末梢血単球に、約 1 μ g / m l ないし 5 0 μ g / m l の前記エピトープを

40

50

添加すること；

i . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を、 1 の末梢血単球に対し約 1 0 の C D 8 ⁺ 細胞の比で、 前記接着性末梢血単球と組み合わせること；

j . C D 8 ⁺ 細胞および末梢血単球の前記組み合わせられた懸濁物を約 6 ないし 7 日間刺激すること；

k . C D 8 ⁺ 細胞および末梢血単球の前記懸濁物を、 培地中の I L - 2 および I L - 7 で刺激すること；

l . 適する C T L 活性、 純度、 無菌性およびエンドトキシン含量について C D 8 ⁺ 懸濁物をアッセイすること； ならびに

m . 前記被験体に C D 8 ⁺ 懸濁物を接種すること
を含んで成る、 前記被験体の治療方法。

10

【請求項 1 0】

各ペプチドが長さ約 8 ないし 1 0 アミノ酸である、 請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

a . 天然に存在しない抗原提示細胞系 (n n A P C) を調製すること (前記 n n A P C は黒色腫と関連する約 1 5 までの異なるペプチド分子を同時に提示することが可能であり、 各ペプチドは長さ 8 ないし 1 0 アミノ酸であり) ；

b . 前記黒色腫を伴う被験体から C D 8 ⁺ 細胞を収集すること；

c . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を前記 n n A P C 細胞系で約 6 ないし 7 日間刺激すること；

d . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を培地中の I L - 2 および I L - 7 で刺激すること；

20

e . 前記被験体から収集された末梢血単球を、 約 2 0 μ g / m l の、 前記 n n A P C が提示することができる各ペプチドと混合すること；

f . 前記 C D 8 枯渇末梢血単球懸濁物を約 5 , 0 0 0 ラドの 線放射で照射すること；

g . 接着性末梢血単球を単離すること；

h . 前記接着性末梢血単球に、 約 1 μ g / m l ないし 5 0 μ g / m l の前記エピトープを添加すること；

i . 前記 C D 8 ⁺ 細胞を、 1 の末梢血単球に対し約 1 0 の C D 8 ⁺ 細胞の比で前記接着性末梢血単球と組み合わせること；

j . C D 8 ⁺ 細胞および末梢血単球の前記組み合わせられた懸濁物を約 6 ないし 7 日間刺激すること；

30

k . C D 8 ⁺ 細胞および末梢血単球の前記懸濁物を培地中の I L - 2 および I L - 7 で刺激すること；

l . C D 8 ⁺ 懸濁物を、 適する C T L 活性、 純度、 無菌性およびエンドトキシン含量についてアッセイすること； ならびに

m . 前記被験体に C D 8 ⁺ 懸濁物を接種すること
を含んで成る、 前記被験体の治療方法。

【請求項 1 2】

前記 n n A P C が 1 0 のペプチドを提示する、 請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ペプチドが、 チロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇、 チロシナーゼ₂₀₇₋₂₁₆、 g p 1 0 0₂₀₉₋₂₁₇、 g p 1 0 0₁₅₄₋₁₆₂、 M A R T - 1₂₇₋₃₅、 H E R - 2 / n e u₇₈₉₋₇₉₇、 H E R - 2 / n e u₃₆₉₋₃₇₇、 C - レクチン₈₋₁₆、 P e c 6 0₂₀₋₂₉ および P e c 6 0₂₅₋₃₃ である、 請求項 1 2 記載の方法。

40

【請求項 1 4】

ヒトクラス I H L A 分子、 結合分子および共刺激分子を発現する核酸でトランスフェクトされたキイロシヨウジヨウバエ (D r o s o p h i l a m e l a n o g a s t e r) 細胞由来の天然に存在しない抗原提示細胞 (n n A P C) であって、 前記核酸によりコードされる 1 5 までの異なるペプチド分子を同時に提示することが可能である n n A P C 。

【請求項 1 5】

50

前記 nnAPC が、10 までの異なるペプチド分子を同時に提示することが可能である、請求項 14 記載の天然に存在しない抗原提示細胞 nnAPC。

【請求項 16】

前記 nnAPC が、以下の 10 種のペプチド分子、チロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇、チロシナーゼ₂₀₇₋₂₁₆、gp100₂₀₉₋₂₁₇、gp100₁₅₄₋₁₆₂、MART-1₂₇₋₃₅、HER-2/neu₇₈₉₋₇₉₇、HER-2/neu₃₆₉₋₃₇₇、C-レクチン₈₋₁₆、Pec60₂₀₋₂₉ および Pec60₂₅₋₃₃ を同時に提示する、請求項 15 記載の天然に存在しない抗原提示細胞 nnAPC。

【請求項 17】

段階、

- a. キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 卵から昆虫細胞系を調製すること；
 - b. 前記昆虫細胞を、昆虫細胞を成長させるのに適する培地、好ましくはシュナイダー [Schneider]TM ドロソフィラ (*Drosophila*) 培地中で成長させること；
 - c. pRmHa-1 発現ベクターから pRmHa-3 プラスミドを作成すること (前記 pRmHa-3 プラスミドは、メタロチオネインプロモーター、金属応答コンセンサス配列、およびキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から単離されたポリアデニル化シグナルを担持するアルコール脱水素酵素遺伝子を包含し)；
 - d. 前記 pRmHa-3 プラスミドに、ヒトクラス I HLA A2.1、B7.1、B7.2、ICAM-1、-2 ミクログロブリンおよび LFA-3 の相補 DNA を挿入すること (A2.1 はいずれかのヒトクラス I DNA 配列で置換することができ)；
 - e. 前記昆虫細胞を、phshneo プラスミド、および相補 DNA を含有する前記 pRmHa-3 プラスミドでトランスフェクトすること；
 - f. 前記昆虫細胞を CuSO₄ と接触させて前記昆虫細胞中のトランスフェクトされた遺伝子の発現を誘導することにより nnAPC を創製すること
- よりなる、15 までのペプチド分子を同時に提示することが可能な天然に存在しない抗原提示細胞 (nnAPC) の製造方法。

【請求項 18】

前記 nnAPC が 10 までのペプチドを提示することが可能である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

前記昆虫細胞系が、細胞を 12 日間成長させること、所望の細胞を同定することが可能であるペプチドをもつ前記所望の細胞を選択すること、ならびに前記所望の細胞を OKT3 および IL-2 で拡張することにより調製される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】

前記所望の細胞を同定することが可能な前記ペプチドが四量体である、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

段階 (a) の前記ペプチド分子が、配列番号 1 から 42 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドから選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 22】

段階 (a) の前記ペプチド分子が、配列番号 1 から 42 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドから選択される、請求項 9 記載の方法。

【請求項 23】

段階 (a) の前記ペプチド分子が、配列番号 1 から 42 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドから選択される、請求項 17 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0001】

癌は、治療の領域でなされたかなりの進歩にもかかわらず大きな健康の問題であり続けている。化学療法、放射線治療、外科的介入および三者の組合せという標準的治療レジメンは、永続する治癒を生じさせることにしばしば失敗する。多くの場合、治療を受けた癌患者は、しばしば、いくらかの期間の後に疾患状態に戻り、病状をさらに悪化させることは、患者に対するこれらの治療レジメンの苛烈さである。

【0002】

癌治療の発展を複雑にする別の要因は、癌が単一の生物学的作用物質もしくは因子によってではなく、しかしむしろ作用物質および要因の組合せにより引き起こされることが見出されたことである。単一の原因物質もしくは事象が治療の焦点である大部分の医学的治療と異なり、癌治療は複数の生物学的因子を取り扱うことを必要とする。

10

【0003】

近年、研究は患者自身の免疫系を利用する癌治療を開発することに向けられている。1つのこうしたアプローチは養子免疫療法である。養子免疫療法は、腫瘍もしくは癌細胞を治療する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を生成させるために患者自身の細胞を使用することを要する。しかしながら、この技術は、ヒト患者についての実現可能な臨床的治療レジメンとして十分に証明されないままである。CTLを免疫化するための適正なエピトープを同定するという問題を別として、従来技術は、複数の抗原に十分に標的を定めて癌を効果的に治療するためのAPCへの十分な数の異なるエピトープの提示方法を提供しない。本発明は、まだ対処されていない必要性を満足し、ならびに他の利益を提供する。

20

【発明の開示】

【0004】

本発明は、10までもしくはそれ以上の異なるペプチドを同時に提示することが可能な天然に存在しない抗原提示細胞（nnAPC）、nnAPCの製造方法、癌の治療のための前記nnAPCの使用法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

本発明は：

- a. 天然に存在しない抗原提示細胞系（nnAPC）を調製することであって、前記nnAPCは、癌と関連する約15までの異なるペプチド分子、好ましくは約10の異なるペプチド分子を同時に提示することが可能であり、各ペプチドは長さ約6ないし12アミノ酸、好ましくは長さが約8ないし10アミノ酸、かつ約10nMないし100μMの濃度範囲にあり；
- b. 癌を伴う被験体もしくは適するドナーからCD8⁺細胞を収集すること；
- c. 前記CD8⁺細胞を前記nnAPC細胞系で刺激すること；
- d. 馴化成長培地（CGM）もしくはIL-2、IL-7のようなサイトカインを含有する培地、好ましくはIL-2、または組合せのIL-2およびIL-7に前記CD8⁺細胞を添加すること；
- e. 前記被験体もしくは適するドナーから収集された懸濁されない末梢血単球、あるいはCD-8枯渇末梢血単球を、約10ないし50μg/mlのペプチドと混合すること；
- f. 前記末梢血単球懸濁物を、約3,000ないし7,000ラドの範囲、好ましくは約5,000ラドの線量のような、懸濁物中のこれらの細胞の増殖を予防するのに必要な十分な線量の線放射で照射すること、あるいは、末梢血リンパ球懸濁物を、限定されるものでないがマイトマイシンCを挙げることができる細胞増殖抑制剤で処理してもよい；
- g. 接着性末梢血単球を単離すること；
- h. 前記接着性末梢血単球に、約10ng/mlないし10μg/mlの前記各ペプチドを添加すること；
- i. 前記CD8⁺細胞を、1の末梢血単球に対し約10のCD8⁺細胞の比で、前記接着性末梢血単球と組み合わせること；
- j. 場合によっては、CD8⁺細胞および末梢血単球の前記組み合わせられた懸濁物を約

30

40

50

6 ないし 7 日間刺激すること；

k . 場合によっては、 $CD8^+$ 細胞および末梢血単球の前記懸濁物を培地中の IL - 2 および IL - 7 で刺激すること；

l . 場合によっては、 $CD8^+$ 懸濁物を適する CTL 活性についてアッセイすること、ならびに、場合によって、CTL の純度、無菌性 (sterility) およびエンドトキシン含量についてアッセイすること；ならびに、

m . 前記被験体に $CD8^+$ 懸濁物を接種すること
を含んで成る、前記被験体の治療方法を提供する。

【0006】

本発明の別の態様は：

a . 天然に存在しない抗原提示細胞系 (nnAPC) を調製することであって、前記 nnAPC は癌と関連する約 15 までの異なるペプチド分子、好ましくは約 10 のペプチドを同時に提示することが可能であり、各ペプチドは長さが 8 ないし 10 アミノ酸であり；

b . 癌を伴う被験体から $CD8^+$ 細胞を収集すること；

c . 前記 $CD8^+$ 細胞を前記 nnAPC 細胞系で約 6 ないし 7 日間刺激すること；

d . 前記 $CD8^+$ 細胞を培地中の IL - 2 および IL - 7 で刺激すること；

e . 前記被験体から収集された末梢血単球を、約 $20 \mu g / ml$ の各ペプチドと混合すること；

f . 前記 $CD8$ 枯渇末梢血単球懸濁物を、約 5 , 000 ラドの線放射で照射すること；

g . 接着性末梢血単球を単離すること；

h . 前記接着性末梢血単球に、約 $10 \mu g / ml$ の前記エピトープを添加すること；

i . 前記 $CD8^+$ 細胞を、1 の末梢血単球に対し約 10 の $CD8^+$ 細胞の比で前記接着性末梢血単球と組み合わせること；

j . $CD8^+$ 細胞および末梢血単球の前記組み合わせられた懸濁物を約 6 ないし 7 日間刺激すること；

k . $CD8^+$ 細胞および末梢血単球の前記懸濁物を、培地中の IL - 2 および IL - 7 で刺激すること；

l . 適する CTL 活性、純度、無菌性およびエンドトキシン含量について $CD8^+$ 懸濁物をアッセイすること；ならびに

m . 前記被験体に $CD8^+$ 懸濁物を接種すること
を含んで成る、前記被験体の治療方法を提供する。

【0007】

本発明の別の態様は：

a . 天然に存在しない抗原提示細胞系 (nnAPC) を調製することであって、前記 nnAPC は黒色腫と関連する約 15 までの異なるペプチド分子、好ましくは約 10 のペプチドを同時に提示することが可能であり、各ペプチドは長さが 8 ないし 10 アミノ酸であり；

b . 黒色腫を伴う被験体から $CD8^+$ 細胞を収集すること；

c . 前記 $CD8^+$ 細胞を前記 nnAPC 細胞系で約 6 ないし 7 日間刺激すること；

d . 前記 $CD8^+$ 細胞を培地中の IL - 2 および IL - 7 で刺激すること；

e . 前記被験体から収集された末梢血単球を、約 $20 \mu g / ml$ の、前記 nnAPC が提示することができる各ペプチドと混合すること；

f . 前記 $CD8$ 枯渇末梢血単球懸濁物を、約 5 , 000 ラドの線放射で照射すること；

g . 接着性末梢血単球を単離すること；

h . 前記接着性末梢血単球に、約 $10 \mu g / ml$ の前記エピトープを添加すること；

i . 前記 $CD8^+$ 細胞を、1 の末梢血単球に対し約 10 の $CD8^+$ 細胞の比で前記接着性末梢血単球と組み合わせること；

j . $CD8^+$ 細胞および末梢血単球の前記組み合わせられた懸濁物を約 6 ないし 7 日間刺激すること；

k . $CD8^+$ 細胞および末梢血単球の前記懸濁物を培地中の IL - 2 および IL - 7 で刺

10

20

30

40

50

激すること；

l. CD8⁺懸濁物を、適するCTL活性、純度、無菌性およびエンドトキシン含量についてアッセイすること；ならびに

m. 前記被験体にCD8⁺懸濁物を接種することを含んで成る、前記被験体の治療方法を提供する。

【0008】

本発明の別の態様は、nnAPCが以下のペプチド、チロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇、チロシナーゼ₂₀₇₋₂₁₆、gp100₂₀₉₋₂₁₇、gp100₁₅₄₋₁₆₂、MART-1₂₇₋₃₅、HER-2/neu₇₈₉₋₇₉₇、HER-2/neu₃₆₉₋₃₇₇、C-レクチン₈₋₁₆、Pec60₂₀₋₂₉およびPec60₂₅₋₃₃を提示する、黒色腫の治療方法である。

10

【0009】

本発明の別の態様は、感染したもしくは形質転換された細胞を排除する治療がCTLにより達成されることが立証されている、クラスI HLA分子と通常は関連する不十分な(in sufficient)もしくは不十分な(in adequate)免疫応答をもたらす疾患もしくは疾患状態の治療方法である。

【0010】

本発明の別の態様は、クラスI HLA分子と通常は関連する不十分な(in sufficient)もしくは不十分な(in adequate)免疫応答をもたらす疾患もしくは疾患状態の治療方法であって、CTLによる排除を受けやすいことが示されている感染したもしくは形質転換された細胞は：

20

a. 天然に存在しない抗原提示細胞系(nnAPC)を調製することであって、前記nnAPCは前記疾患もしくは疾患状態と関連する約15までの異なるペプチド分子、好ましくは約10の異なるペプチド分子を同時に提示することが可能であり、各ペプチドは長さが約6ないし12アミノ酸、好ましくは長さが約8ないし10アミノ酸、かつ、約10nMないし100μMの濃度範囲にあり；

b. CD8⁺細胞を前記被験体もしくは適するドナーから収集すること；

c. 前記CD8⁺細胞を前記nnAPC細胞系で刺激すること；

d. 前記CD8⁺細胞を、CGMもしくはIL-2、IL-7のようなサイトカインを含む培地好ましくはIL-2、または組合せのIL-2およびIL-7に添加すること；

30

e. 前記被験体もしくは適するドナーから収集された懸濁されない末梢血単球、あるいはCD-8枯渇末梢血単球を、約10ないし50μg/mlのペプチドと混合すること；

f. 前記末梢血単球懸濁物を、約3,000ないし7,000ラドの範囲、好ましくは約5,000ラドの線量のような、所望の末梢血単球を除く懸濁物中の全部の成分を無効にする(sterilize)のに必要な十分な線量の線放射で照射すること；

g. 接着性末梢血単球を単離すること；

h. 前記接着性末梢血単球に、約10ng/mlないし10μg/mlの前記各ペプチドを添加すること；

i. 前記CD8⁺細胞を、1の末梢血単球に対し約10のCD8⁺細胞の比で、前記接着性末梢血単球と組み合わせること；

40

j. 場合によっては、CD8⁺細胞および末梢血単球の前記組み合わせられた懸濁物を、約6ないし7日間刺激すること；

k. 場合によっては、CD8⁺細胞および末梢血単球の前記懸濁物を、培地中のIL-2およびIL-7で刺激すること；

l. 場合によっては、適するCTL活性についてCD8⁺懸濁物をアッセイすること、ならびに、場合によってはCTLの純度、無菌性およびエンドトキシン含量についてアッセイすること；ならびに

m. 前記被験体にCD8⁺懸濁物を接種することを含んで成る方法により治療する。

【0011】

50

本発明は、発現のためヒトクラス I H L A、結合および共刺激分子をコードする D N A でトランスフェクトされたキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 細胞由来の天然に存在しない抗原提示細胞 (n n A P C) を提供し、n n A P C は 15 までの異なるペプチド分子、好ましくは 10 のペプチド分子を提示することが可能である。

【0012】

本発明の別の態様は、被験体の治療を高める多様な所望の機能と関連するペプチドを提示する n n A P C を提供する。例えば、治療されている疾患もしくは疾患状態と関連するペプチドに加えて、n n A P C は、細胞-細胞接着を高めるもしくは付加的な細胞活性化シグナルを伝達する、リンパ球機能抗原 (L F A - 1、L F A - 2 および L F A - 3)、細胞間接着分子 1 (I C A M - 1)、T 細胞共刺激因子 (C D 2、C D 28、B 7) のような補助分子 (a c c e s s o r y m o l e c u l e) と関連するペプチドを提示することができる。

10

【0013】

本発明の別の態様は、いくつかの型の癌と関連するペプチドを提示する n n A P C を提供する。例えば、H E R - 2 / n e u のような乳癌関連ポリペプチドと関連するもしくはそれ由来のペプチドは、M A R T - 1 もしくは M A G E のような黒色腫関連ポリペプチドと関連するもしくはそれ由来のペプチドとともに提示されるかもしれない。

【0014】

本発明の別の態様は、10 までの異なるペプチド分子を同時に提示することが可能な天然に存在しない抗原提示細胞 (n n A P C) の製造方法を提供し、前記方法は、段階：

20

a . キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 卵から昆虫細胞系を調製すること；あるいは、ヒト M H C クラス I 分子および共刺激接着分子を発現させるための昆虫細胞系を調製すること；

b . 前記昆虫細胞を、昆虫細胞を成長させるのに適する培地、好ましくはシュナイダー [S c h n e i d e r] ^{T M} ドロソフィラ (*Drosophila*) 培地中で成長させること；

c . p R m H a - 1 発現ベクターから p R m H a - 3 プラスミドを作成することであって、前記 p R m H a - 3 プラスミドは、メタロチオネインプロモーター、金属応答コンセンサス配列、およびキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から単離されたポリアデニル化シグナルを担持するアルコール脱水素酵素遺伝子を包含し；

30

d . 前記 p R m H a - 3 プラスミドに、ヒトクラス I H L A A 2 . 1、B 7 . 1、B 7 . 2、I C A M - 1、 - 2 ミクログロブリンおよび L F A - 3 の相補 D N A を挿入することであって、A 2 . 1 はいずれかのヒトクラス I D N A 配列で置換することができる；

e . 前記昆虫細胞を、p h s h n e o プラスミド、および相補 D N A を含有する前記 p R m H a - 3 プラスミドでトランスフェクトすること；ならびに

f . 前記昆虫細胞を C u S O ₄ と接触させて前記昆虫細胞中のトランスフェクトされた遺伝子の発現を誘導することにより n n A P C を創製すること

40

【0015】

本発明の昆虫細胞は、昆虫細胞を成長させるのに適する培地 (下で「昆虫成長培地」と称される) 中で成長させる。シュナイダー [S c h n e i d e r] ^{T M} ドロソフィラ (*Drosophila*) 培地、グレース昆虫培地、および T C - 100 昆虫培地のような、昆虫成長培地は、多数の供給元から商業的に入手可能である。あるいは、昆虫成長培地は当業者により調製することができる。典型的には、該培地は、無機塩 (例えば、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、リン酸カリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウムおよびリン酸ナトリウム)、アミノ酸、多様な炭水化物、ならびに化学種 (I m o g e n e S c h n e i d e r , E x p . Z o o l . (1964) 156 (1) : p g .

50

91)のような、昆虫細胞の成長を促進かつ持続するのに必要な成分を包含することができる。あるいは、該培地は、ビタミン、ミネラル、および昆虫細胞の成長で補助する他の成分もまた包含することができる。

【0016】

以下は、本明細で使用される略語および定義の一覧である。

略語

A P C	抗原提示細胞	
C D 8 ⁺	C D 8 ⁺ T細胞	
C T L	細胞傷害性Tリンパ球	
E	エフェクター	10
F a s	C D 9 5としてもまた知られる、T細胞上のエピトープ	
I C A M	細胞間接着分子	
I L	インターロイキン	
L A K	リンホカイン活性化型キラー細胞	
L F A	リンパ球機能抗原	
M H C	主要組織適合抗原複合体	
n n A P C	天然に存在しない抗原提示細胞	
N P	核タンパク質	
P B M C	末梢血単核細胞	
P B S	リン酸緩衝生理的食塩水	20
P C R	ポリメラーゼ連鎖反応	
R P M I	ロズウェル パーク メモリアル インスティテュート (R o s w e l l	
l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e)		
R W J P R I	R . W . ジョンソン ファーマシューティカル リサーチ インスティ	
t y u t e (T h e R . W . J o h n s o n P h a r m a c e u t i c a l R e s e a r c h I n s t i t u t e)		
T	標的	
T C P	T細胞抗原受容体	
T I L	腫瘍浸潤リンパ球	

以下は、多様なペプチドエピトープについて本明細で使用される略語の一覧である。個々のアミノ酸残基は、当業者により容易に既知かつ使用される一文字記号に従って同定される。

【0017】

【表 1】

アミノ酸	略語	
	3-文字	1-文字
アラニン	ala	A
バリン	val	V
ロイシン	leu	L
イソロイシン	ile	I
プロリン	pro	P
フェニルアラニン	phe	F
トリプトファン	tyr	W
メチオニン	met	M
グリシン	gly	G
セリン	ser	S
トレオニン	thr	T
システイン	cys	C
チロシン	tyr	Y
アスパラギン	asn	N
グルタミン	gln	Q
アスパラギン酸	asp	D
グルタミン酸	glu	E
リシン	lys	K
アルギニン	arg	R
ヒスチジン	his	H

10

20

30

【0018】

ペプチドエピトープの略語

本明細書で使用される「チロシナーゼ369-377」もしくは「チロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇」はアミノ酸配列 Y M N G T M S Q V (配列番号1)を指す。この定義内に、配列 Y M N G T M S Q V (配列番号1)のアミノ酸残基「N」を「D」に改変して Y M D G T M S Q V (配列番号2)のアミノ酸配列をもたらす翻訳後事象から生じる、配列 Y M D G T M S Q V (配列番号2)のペプチドもまた包含される (Skipperrå, J. E. x p . M e d . (1 9 9 6) 1 8 3 : 5 2 7 - 5 3 4)。

40

【0019】

本明細書で使用される「チロシナーゼ207-216」もしくは「チロシナーゼ₂₀₇₋₂₁₆」という用語はアミノ酸配列 F L P W H R L F L L (配列番号3)を指す。

【0020】

本明細書で使用される「g p 1 0 0 2 0 9 - 2 1 7」もしくは「g p 1 0 0 2 0 9 - 2 1 7」という用語はアミノ酸配列 I T D Q V P F S V (配列番号4)を指す。

【0021】

本明細書で使用される「g p 1 0 0 1 5 4 - 1 6 2」もしくは「g p 1 0 0 1 5 4 - 1 6 2」という用語はアミノ酸配列 K T W G Q Y W Q V (配列番号5)を指す。

【0022】

50

本明細書で使用されるところの「MART - 1 27 - 35」もしくは「MART - 1 27 - 35」という用語はアミノ酸配列AAGIGILTV(配列番号6)を指す。

【0023】

本明細書で使用されるところの「HER - 2 / neu 789 - 797」もしくは「HER - 2 / neu₇₈₉₋₇₉₇」という用語はアミノ酸配列CLTSTVQLV(配列番号7)を指す。

【0024】

本明細書で使用されるところの「HER - 2 / neu 369 - 377」もしくは「HER - 2 / neu₃₆₉₋₃₇₇」という用語はアミノ酸配列KIFGSLAFL(配列番号8)を指す。

10

【0025】

本明細書で使用されるところの「C - レクチン 8 - 16」もしくは「C - レクチン₈₋₁₆」という用語はアミノ酸配列KMASRSMRL(配列番号9)を指す。

【0026】

本明細書で使用されるところの「Pec60 20 - 29」もしくは「Pec60₂₀₋₂₉」という用語はアミノ酸配列ALALAALLVV(配列番号10)を指す。

【0027】

本明細書で使用されるところの「Pec60 25 - 33」もしくは「Pec60₂₅₋₃₃」という用語はアミノ酸配列ALLVVDREV(配列番号11)を指す。

【0028】

本明細書で使用されるところの「CD8ペプチド 59 - 70」もしくは「CD8ペプチド₅₉₋₇₀」という用語は、AAEGLDTQRFSG(配列番号12)のアミノ酸配列を指す。

20

用語および定義

本明細書で使用されるところの「養子免疫療法」という用語は、疾患もしくは疾患状態の治療のためのドナーもしくは自己のTリンパ球の投与を指し、ここで疾患もしくは疾患状態は、クラスI HLA分子と通常は関連する不十分な(insufficient)もしくは不十分な(inadequate)免疫応答をもたらす。養子免疫療法は、感染したもしくは形質転換された細胞の排除がCTLにより達成されることが立証されているいかなる疾患もしくは疾患状態にも適切な治療である。例えば、疾患もしくは疾患状態は、限定されるものでないが、黒色腫、前立腺、乳房、結腸直腸、胃、咽頭部、脾、子宮頸、卵巣、骨、白血病および肺癌のような癌および/もしくは腫瘍；B型肝炎、C型肝炎、ヒト免疫不全ウイルスのようなウイルス感染症；結核、らいおよびリステリア症のような細菌感染症、ならびにマラリアのような寄生虫感染症を挙げることができる。

30

【0029】

本明細書で使用されるところの「B7.1」という用語は抗原提示細胞に関連する共刺激分子を指す。

【0030】

本明細書で使用されるところの「BCNU」という用語は1,3-ビス(2クロロエチル)-1-ニトロソ尿素としてもまた知られるカルムスチンを指す。

40

【0031】

本明細書で使用されるところの「BSE」という用語はウシ海綿状脳症を指す。

【0032】

本明細書で使用されるところの「CD」という用語は、抗原エピトープおよび機能によるグループ分けされる分化抗原クラスターすなわちTリンパ球(元は)、Bリンパ球、単球、マクロファージおよび顆粒球を指す。

【0033】

本明細書で使用されるところの「DTIC」という用語は、ダカルバジンすなわち5-(3,3-ジメチル-1-トリアゼノ)-イミダゾール-4-カルボキサミドを指す。

【0034】

50

本明細書で使用されるところの「エキスピボ」もしくは「エキスピボ療法」という用語は、該改変された細胞により生じられる治療上の利益の長期のもしくは一定の送達により改善することができる病理学的状態を治療するのに該改変された細胞を使用することができるような、生物学的材料（典型的には細胞）を患者もしくは適するドナーのような適する代替供給源から得かつ改変する治療を指す。治療（treatment）は患者もしくは代替供給源のいずれかから得られた改変された生物学的材料の患者への再導入を包含する。エキスピボ療法の一利益は、治療からの望ましくない傍系の影響に患者を曝露することなく治療の利益を患者に提供する能力である。例えば、サイトカインはしばしば、患者のCTLの拡張を刺激するために癌もしくはウイルス感染症を伴う患者に投与される。しかしながら、サイトカインは患者において流感様の症状の発症をしばしば引き起こす。エキスピボ手順において、サイトカインは患者の身体の外側でCTLの拡張を刺激するのに使用され、そして患者はサイトカインの曝露および結果としての副作用を容赦される。あるいは、適する状況もしくは条件下で、適切な場合かつ被験体が利益を得ることができる場合、被験体を、低レベルの投薬量のインターフェロン、インターフェロンおよび/もしくはIL-2で同時に治療することができる。インターフェロンの期待される効果は、おそらく抗原特異的CTLによる溶解に対し腫瘍細胞を感作することであり、また、IL-2の効果は、おそらく抗原特異的CTLの持続性を高めることである。

10

【0035】

本明細書で使用されるところの「HEPES」という用語はN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'2-エタンスルホン酸緩衝液を指す。

20

【0036】

本明細書で使用されるところの「HLA-A2.1」という用語は、およそ45%の白人種で見出されるHLAクラスI分子を指す。

【0037】

本明細書で使用されるところの「MART-1」もしくは「T細胞-1により認識される黒色腫抗原」という用語は黒色腫関連抗原を指す。この抗原のアミノ酸および核酸配列、ならびに多様な特徴は、「黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用（Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods）」と題された1999年11月30日公布の米国特許第5,994,523号明細書；「黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用（Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods）」と題された1999年2月23日公布の米国特許第5,874,560号明細書；ならびに「黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用（Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods）」と題された1998年12月1日公布の米国特許第5,844,075号明細書に開示される。とりわけ、米国特許第5,994,523号明細書は、それぞれ配列番号1および配列番号2として図1にMART-1の完全長の核酸およびアミノ酸配列を開示する。前述の図1は引用することにより本明細書に組み込まれる。

30

40

【0038】

本明細書で使用されるところの「MAGE」は黒色腫関連抗原を指す。この抗原のアミノ酸および核酸配列、ならびに多様な特徴は、「それと関連する複数の抗原についてアッセイすることによる乳癌および黒色腫の決定方法（Methods for Determining Breast Cancer and Melanoma by Assaying for a Plurality of Antigens Associated Therewith）」と題された2000年10月31日公布の米国特許第6,140,050号明細書；「MAGE-XP遺伝子のメッセンジャーRNAを検出することによる癌のスクリーニング方法（Method of Screening for Cancer by Detecting Messenger RNA for

50

a M A G E - X P G e n e) 」と題された1998年6月2日公布の米国特許第5, 759, 783号明細書; および「合成ペプチドエピトープを使用するヒトにおける抗腫瘍細胞傷害性Tリンパ球の誘導 (I n d u c t i o n o f A n t i - T u m o r C y t o t o x i c T L y m p h o c y t e s i n H u m a n s U s i n g S y n t h e t i c P e p t i d e E p i t o p e s) 」と題された1997年9月2日公布の米国特許第5, 662, 907号明細書に開示される。

【0039】

本明細書で使用されるどころの「MPC-10」という用語は磁性粒子濃縮装置を指す。

【0040】

本明細書で使用されるどころの「NK細胞」という用語はナチュラルキラー細胞を指す。

【0041】

本明細書で使用されるどころの「OKT3」という用語は、オルソクローン (O R T H O C L O N E) O K T 3、ムロモナブ (m u r o m o n a b) - C D 3、抗CD3モノクローナル抗体を指す。

【0042】

本明細書で使用されるどころの「TAP-1, 2」という用語は、抗原プロセッシング関連輸送タンパク-1, 2を指す。

【0043】

本明細書で使用されるどころの「Th細胞」という用語はヘルパーT細胞、CD4+を指す。

【0044】

本明細書で使用されるどころの「チロシナーゼ」という用語は、黒色腫に関連するタンパク質を指す (B r i c h a r dら、J . E x p . M e d . (1 9 9 3) 1 7 8 : 4 8 9 - 4 9 5 ; R o b b i n sら、C a n c e r R e s . (1 9 9 4) 5 4 : 3 1 2 4 - 3 1 2 6) 。 「 P 1 5 およびチロシナーゼ黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用 (P 1 5 a n d T y r o s i n a s e M e l a n o m a A n t i g e n s a n d T h e i r U s e i n D i a g n o s t i c a n d T h e r a p e u t i c M e t h o d s) 」と題された1998年12月1日公布の米国特許第5, 843, 648号明細書は、図7、図AないしDにチロシナーゼに関連する抗原ペプチドおよび関連するポリ核酸を開示し、前述の図は引用することにより本明細書に組み込まれる。「異常細胞上のヒト白血球抗原A2 (H L A - A 2) 分子およびチロシナーゼ由来ペプチドを含有する複合体の検出方法 (M e t h o d f o r D e t e c t i n g C o m p l e x e s C o n t a i n i n g H u m a n L e u k o c y t e A n t i g e n A 2 (H L A - A 2) M o l e c u l e s a n d a T y r o s i n a s e D e r i v e d P e p t i d e o n A b n o r m a l C e l l s) 」と題された1996年1月30日公布の米国特許第5, 487, 974号明細書は、実施例9で表3にチロシナーゼおよび黒色腫と関連する付加的なペプチドを開示し、前述は引用することにより本明細書に組み込まれる。

【0045】

本明細書で使用されるどころの「gp100」という用語は腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) により認識される黒色腫抗原を指す。gp100を認識するTILはインビボの腫瘍拒絶と関連する (B a k k e rら、J . E x p . M e d . (1 9 9 4) 1 7 9 : 1 0 0 5 - 1 0 0 9 ; K a w a k a m iら、J . I m m u n o l . (1 9 9 5) 1 5 4 : 3 9 6 1 - 3 9 6 8) 。 gp100に関連する抗原ペプチドは、「黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用 (M e l a n o m a A n t i g e n s a n d T h e i r U s e i n D i a g n o s t i c a n d T h e r a p e u t i c M e t h o d s) 」と題された1999年11月30日公布の米国特許第5, 994, 523号明細書; 「黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用 (M e l a n o m a

10

20

30

40

50

Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods)」と題された1999年2月23日公布の米国特許第5,874,560号明細書；ならびに「黒色腫抗原ならびに診断および治療法におけるそれらの使用(Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods)」と題された1998年12月1日公布の米国特許第5,844,075号明細書に開示される。とりわけ、米国特許第5,994,523号明細書は、図4および5にGP100に係る核酸およびアミノ酸配列をそれぞれ開示する。配列番号27、33、34、35、36、37、38、39、40および41として同定されるものを包含する該アミノ酸配列由来の抗原ペプチドもまた開示される。前述の図4および5の全部、ならび

10

【0046】

本明細書で使用されるところの「黒色腫」という用語は、限定されるものでないが黒色腫、転移性黒色腫、メラノサイトもしくはメラノサイト関連神経細胞いずれか由来の黒色腫、黒色肉腫、黒色癌腫、黒色上皮腫、黒色腫インシトウ表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫、侵襲型黒色腫もしくは家族性異型黒子・黒色腫(FAM-M)症候群を指す。哺乳動物におけるこうした黒色腫は、染色体異常、変性性の成長および発生障害、有糸分裂促進剤、紫外線放射(UV)、ウイルス感染症、遺伝子の不適切な組織発現、遺伝子の発現の変化、ならびに細胞上での提示もしくは発癌物質により引き起こされるかもしれない。前述の黒色腫は、本出願に記述される方法により診

20

【0047】

本明細書で使用されるところの「C-レクチン」という用語は、卵巣癌に関連することが見出されている配列のペプチドを指す。

【0048】

本明細書で使用されるところの「主要組織適合抗原複合体」もしくは「MHC」という用語は、ヒト白血球抗原(HLA)を包含する多様な種で記述される組織適合抗原系を包含することを意味される包括的呼称である。

【0049】

本明細書で使用されるところの「エピトープ」、「ペプチドエピトープ」、「抗原性ペプチド」および「免疫原性ペプチド」という用語は、哺乳動物において細胞性免疫応答を引き起こすことが可能な抗原由来のペプチドを指す。こうしたペプチドは、該ペプチドで免疫化された動物からの抗体ともまた反応性であるかもしれない。こうしたペプチドは長さが約5ないし20アミノ酸、好ましくは長さが約8ないし15アミノ酸、および最も好ましくは長さが約9ないし10アミノ酸であってよい。

30

【0050】

本明細書で使用されるところの「Pec60」という用語は、卵巣および乳癌に関連することが見出されている配列のペプチドを指す。

【0051】

本明細書で使用されるところの「類似物」という用語は、とりわけ1個もしくはそれ以上の残基が機能的に類似の残基で保存的に置換されかつ本明細書に記述されるところの本発明の機能的局面を表す本明細書に示される、本発明の配列に実質的に同一のアミノ酸残基配列を有するいかなるポリペプチドも包含する。保存的置換の例は、イソロイシン、バリン、ロイシンもしくはメチオニンのような1個の非極性(疎水性)残基の代わりに別のものの置換、アルギニンとリシンとの間、グルタミンとアスパラギンとの間、グリシンとセリンとの間のような1個の極性(親水性)残基の代わりに別のものの置換、リシン、アルギニンもしくはヒスチジンのような1個の塩基性残基の代わりに別のものの置換、またはアスパラギン酸もしくはグルタミン酸もしくは別のもののような1個の酸性残基の置換を包含する。

40

【0052】

50

本明細書で使用されるところの「保存的置換」という用語は、誘導体化されない残基の代わりに化学的に誘導体化された残基の使用もまた包含する。

【0053】

本明細書で使用されるところの「化学的誘導体」という用語は、官能性側基の反応により化学的に誘導体化された1個もしくはそれ以上の残基を有する主題のポリペプチドを指す。こうした誘導体化された分子の例は、例えば、遊離アミノ基がアミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基もしくはホルミル基を形成するように誘導体化された分子を包含する。遊離カルボキシル基は、塩、メチルおよびエチルエステルもしくは他の型のエステルまたはヒドラジドを形成するように誘導体化してよい。遊離ヒドロキシル基はO-アシルもしくはO-アルキル誘導体を形成するように誘導体化してよい。ヒスチジンのイミダゾール窒素はN-イン-ベンジルヒスチジン(im-benzyl histidine)を形成するように誘導体化してよい。20種の標準的アミノ酸の1個もしくはそれ以上の天然に存在するアミノ酸誘導体を含有するタンパク質もしくはペプチドもまた化学的誘導体として包含される。例えば：4-ヒドロキシプロリンをプロリンの代わりに用いてよく；5-ヒドロキシリシンをリシンの代わりに用いてよく；3-メチルヒスチジンをヒスチジンの代わりに用いてよく；ホモセリンをセリンの代わりに用いてよく；そしてオルニチンをリシンの代わりに用いてよい。本発明のタンパク質もしくはポリペプチドは、欠くことのできない活性が維持される限りは、その配列が本発明の対応する核配列にコードされるポリペプチドの配列に関して1個もしくはそれ以上の付加および/もしくは欠失または残基を有するいかなるポリペプチドもまた包含する。

【0054】

本明細書で使用されるところの「HER-2/neu」という用語は、1個もしくはそれ以上の膜会合型の受容体様癌遺伝子タンパク質を発現もしくは過剰発現する癌遺伝子を指す。HER-2/neuの発現もしくは過剰発現に関連することが見出された癌は、ある種の乳房、胃、卵巣、結腸および唾液腺の癌などである。HER-2/neu癌遺伝子はチロシンタンパク質キナーゼファミリーの癌遺伝子の1メンバーであり、そして上皮増殖因子受容体(EGFR)と高程度の相同性を共有する。HER-2/neuは細胞の成長および/もしくは分化で役割を演じることが示されている。HER-2/neuは、本質的に正常な遺伝子産物の増大されたもしくは無秩序な発現から生じる量的機構により悪性病変を誘導するようである。「HER-2/neu癌遺伝子が関連する悪性病変の診断および治療のためのHER-2/neuタンパク質に対する免疫反応性(Immunoreactivity to HER-2/neu Protein for Diagnosis and Treatment of Malignancies in Which the HER-2/neu Oncogene is Associated)」と題された2000年6月13日公布の米国特許第6,075,122号明細書は、第12段第31行ないし第13段第7行で、CD8⁺T細胞応答を導き出すペプチドを開示し、配列番号により同定されるものは引用することにより本明細書に組み込まれる。

【0055】

HER-2/neu(p185)はHER-2/neu癌遺伝子のタンパク質産物である。乳房、卵巣、結腸、肺および前立腺の癌を包含する多様な癌において、HER-2/neu遺伝子が増幅されそしてHer-2/neuタンパク質が過剰発現される。HER-2/neuは悪性の形質転換と関連する。それは、非浸潤性管癌の50%ないし60%、および全乳癌の20%ないし40%、ならびに卵巣、前立腺、結腸および肺で生じる腺癌のかなりの部分で見出される。HER-2/neuは、悪性の表現型のみならず、しかしまた全部の侵襲性乳癌の1/4で見出される悪性病変の攻撃性とも緊密に関連する。HER-2/neuの過剰発現は、乳房および卵巣双方の癌における乏しい予後と相関する。HER-2/neuは、長さがおよそ1255アミノ酸(aa)である185kdの相対分子量をもつ膜貫通タンパク質である。それは、上皮増殖因子受容体(EGFR)に対

する40%の相同性をもつおよそ645aaの細胞外結合ドメイン(ECD)、高度に疎水性の膜貫通固定ドメイン(TMD)、およびEGFRに対する80%の相同性をもつおよそ580アミノ酸のカルボキシ末端細胞質ドメイン(CD)を有する。

【0056】

癌遺伝子に関する進行中の研究は、悪性病変細胞中で効果をもたらしかつ形質転換の原因であるかもしくはそれと関連する最低40種の癌遺伝子を同定した。癌遺伝子は、(癌遺伝子により発現されるタンパク質のような)それらの遺伝子産物の推定の機能もしくは位置に基づき、多様な群に分類されている。癌遺伝子は正常細胞の生理学のある局面に不可欠であると考えられる。

【0057】

癌は、治療の領域でなされたかなりの進歩にもかかわらず大きな健康の問題であり続けている。化学療法、放射線治療、外科的介入および三者の組合せという標準的治療レジメンは、永続する治癒を生じさせることにしばしば失敗する。多くの場合、治療を受けた癌患者は、しばしば、いくらかの期間の後に疾患状態に戻り、病状をさらに悪化させることは、患者に対するこれらの治療レジメンの苛烈さである。黒色腫の例において、転移性黒色腫の治癒は慣習的化学療法を使用して達成されていない。35%ないし50%の奏効率が、併用化学療法のダートマスレジメン(DTIC、シスプラチン、BCNUおよびタモキシフェン)で報告されているが、しかし、生存期間は6ないし10ヶ月に留まっている。高率の再発が、攻撃的な「高用量強度」化学療法、ならびに自己骨髄移植を伴う造血の多血症について報告されている。にもかかわらず、生存期間の中央値は短かった(およそ4ヶ月)。

【0058】

Rosenbergらは、多様な癌の治療として活性化されたリンパ球の注入を使用することを試みた。当初、リンホカイン活性化型キラー細胞(LAK)、および後にIL-2でエキスピボ活性化された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を使用した。しかし、有効性の証拠は不確かである。事実、対照臨床試験は、患者へのIL-2の直接投与を上回るエキスピボ活性化された細胞の使用に対する利点を示すことに失敗した。従って、LAKおよびTIL療法の利益は重要でなく、かつ、副作用は、典型的には、多くの試験が早期に中断されたほどひどい。

【0059】

マウス腫瘍モデルにおける研究は、養子免疫療法すなわち腫瘍抗原(1種もしくは複数)に特異的なT細胞のインビボ免疫感作が最小限の毒性を伴い非常に有効であることを立証した。ヒト腫瘍の治療にこの戦略を適用するための大きな障害は、腫瘍細胞を細胞傷害性Tリンパ球(CTL)媒介性の破壊に対し感受性にする免疫原性抗原の同定である。黒色腫患者からの腫瘍反応性T細胞の単離は、CTLが向けられる腫瘍抗原(エピトープ)のいくつかの同定に至った。これらは、チロシナーゼ(Brichardら、J. Exp. Med. (1993) 178: 489-495; Robbinsら、Cancer Res. (1994) 54: 3124-3126)、MART 1/Melan A(Kawakamiら、J. Exp. Med. (1994) 180: 347-352)、gp100(Bakkerら、J. Exp. Med. (1994) 179: 1005-1009; およびKawakamiら、J. Immunol. (1995) 154: 3961-3968)、ならびにMAGE(Gauglerら、J. Exp. Med. (1994) 179: 921-930)を包含する。これらのうち、チロシナーゼおよびMART-1は黒色腫でほぼ普遍的に発現され、そして従って養子免疫療法についての論理的選択である。

【0060】

近年、およそ数年の生存の大きな改善が、免疫学的療法を受けている小さな割合の黒色腫患者で示されている。これは、「癌ワクチン」での能動的な特異的免疫療法、ならびにIL-2、インターフェロンおよびインターフェロンのようなサイトカインのような免疫系の非特異的推進物質(booster)の使用を包含する。しかしながら、サイ

10

20

30

40

50

トカインの利益は、悪心および発熱のようなそれらの使用にしばしば付随する副作用により小さくされる。

【0061】

細胞溶解性T細胞(CD8⁺)はウイルス感染症に対する主要防御線である。CD8⁺リンパ球はウイルスにより感染した宿主細胞を特異的に認識しかつ殺す。理論的には、癌を包含する他の型の疾患と闘うのに免疫系を利用することが可能であるはずである。しかしながら、わずかなインビトロ/エクスピボ手順が、CTLを特異的に活性化するのに利用可能である。上に示された重要な黒色腫抗原の同定、および下述されるCTLの特異的インビトロ活性化方法は、今や、転移性黒色腫の養子免疫療法の概念の試験を可能にする。

【0062】

全てのナイーブなT細胞は、免疫応答を導き出すための活性化に2種のシグナルを必要とする。CD8⁺リンパ球(CTL)について、特異性を分け与える第一のシグナルは、抗原提示細胞(APC)の表面上に存在するクラスI MHC(HLA)複合体に結合された抗原の免疫原性ペプチドフラグメント(エピトープ)のCD8⁺細胞への提示よりなる。この複合体は、シグナルを細胞内で伝えるT細胞抗原受容体(TCR)により特異的に認識される。

【0063】

T細胞受容体への結合はT細胞の活性化を誘導するのに必要であるがしかし十分でなく、そして通常、細胞増殖もしくはサイトカイン分泌に至ることができない。完全な活性化は第二の共刺激シグナル(1種もしくは複数)を必要とし、これらのシグナルは活性化カスケードをさらに高めるようはたらく。抗原提示細胞上の共刺激分子のなかで、B7およびICAM-1のような細胞接着分子(インテグリン)が、T細胞上のそれぞれCD28およびLFA-1に結合することによりこの過程で補助する。CD8⁺細胞が、適切な共刺激分子の相互作用の存在下でクラスI MHC分子により結合された免疫原性ペプチド(エピトープ)を担持する抗原提示細胞と相互作用する場合に、CD8⁺細胞は完全に活性化された細胞溶解性T細胞となる。

【0064】

リンパ球に媒介される細胞殺傷は、T細胞活性化について上述された認識過程によって抗原を担持する標的(腫瘍)細胞へのCD8⁺ CTLの結合で開始する、一連の生物学的事象を必要とする。

【0065】

上述されたところの、CD8⁺細胞と抗原提示細胞もしくは標的(腫瘍)細胞との間の相互作用を図1に描く。該相互作用は、T細胞抗原受容体(TCR)への、APCもしくは標的細胞上のMHCクラスI分子と共同しての抗原の結合で開始する。リンパ球機能抗原(LFA-1、LFA-2およびLFA-3)、細胞間接着分子1(ICAM-1)、T細胞共刺激因子(CD2、CD28、B7)のような補助分子が、細胞-細胞接着を高めるか、もしくは付加的な細胞活性化シグナルを伝達する。

【0066】

細胞-細胞相互作用の後に、CTLは可溶性細胞溶解メディエーター(T細胞の細胞質顆粒中に貯蔵されるパーフォリンおよびグランザイム)ならびにCTL表面分子(Fasリガンド)の作用により標的細胞を殺す。細胞溶解性の攻撃後に、標的細胞は、壊死(膜の穿孔およびオルガネラ破壊)もしくはアポトーシス(クロマチン凝縮、DNA断片化および膜泡形成)により死ぬ。

【0067】

リンパ球に媒介される細胞溶解の機構を図2にグラフィカルに示す。図2の図Aにおいて、標的細胞に結合した後に、CTL中の細胞質顆粒が、細胞間空隙中へのパーフォリンおよびグランザイムを含有する顆粒の放出のため、標的細胞に迅速に向け直される。これらのタンパク質分解酵素が標的細胞の原形質膜に孔を形成し、ついには細胞壊死に至る。図Bにおいて、標的細胞に結合した後に、CTL上のFasリガンド発現のレベルが増大する。Fasリガンドと、標的細胞上のFas受容体の相互作用がアポトーシスにつなが

10

20

30

40

50

る。CPP32のようなプロテアーゼ、およびIL-1 β 変換酵素(ICE)に関連する他者がアポトーシスの誘導に関係している。インビトロCD8⁺活性化に、天然に存在する抗原提示細胞、例えば樹状細胞、マクロファージ、自己腫瘍細胞を使用することが可能である。しかしながら、このアプローチ後の活性化の効率は低い。これは、天然のAPCのクラスI分子が、腫瘍エペトープ以外に多くの他の型のペプチドエペトープを含有するためである。ペプチドの大部分は正常の無害の細胞タンパク質由来であり、腫瘍に対して実際に有効であるとみられる活性の天然のAPCの数の希釈(dilution)をもたらす(Allisonら, Curr. Op. Immunol. (1995) 7: 682-686)。

【0068】

この問題に対するより直接的かつ効率的なアプローチは、(癌のような)特定の疾患と闘うことに関連したそれらのエペトープもしくは(黒色腫特異的抗原のような)腫瘍特異的抗原のみでCD8⁺細胞を特異的に活性化することである。この目的のため、人工産物の抗原提示細胞を、キョウジョウバエ(Drosophila melanogaster)(ショウジョウバエ)細胞中でMHCクラスI分子を発現させることにより創製する。ショウジョウバエ(Drosophila)は免疫系を有しないため、クラスI分子上にペプチドエペトープを添加することに関与するTAP-1, 2ペプチド輸送タンパクが存在しない。結果として、クラスI分子は、空容器(empty vesicle)としてショウジョウバエ(Drosophila)細胞表面上に出現する。これらのトランスフェクトされたショウジョウバエ(Drosophila)細胞を、限定されるものでないが黒色腫特異的エペトープを挙げるができる癌もしくは腫瘍特異的エペトープのようなクラスI分子に結合する外因性ペプチドとともにインキュベートすることにより、すべてのクラスI分子を同一のペプチドで占有することが可能である。これらのショウジョウバエ(Drosophila)APC中に単一ペプチドを含有するクラスI分子の高密度発現は、抗原ペプチドに完全に特異的である細胞傷害性CD8⁺T細胞のインビトロでの生成を可能にする。ショウジョウバエ(Drosophila)細胞を調製するための方法および手順は、「ヒトクラスI MHCおよび2-ミクログロブリンを発現する昆虫細胞を使用する細胞傷害性T細胞のインビトロ活性化(In Vitro Activation of Cytotoxic T-Cells Using Insect Cells Expressing Human Class I MHC and 2-Microglobulin)」と題された1996年6月25日公布の米国特許第5,529,921号明細書、ならびに「MHCクラスI抗原および2-ミクログロブリンをコードする遺伝子を発現しかつ空複合体を集成することが可能なショウジョウバエ細胞系、ならびに前記細胞系の作成方法(Drosophila Cell Lines Expressing Genes Encoding MHC Class I Antigens And 2-Microglobulin and Capable of Assembling Empty Complexes and Methods of Making Said Cell Lines)」と題された1994年5月24日公布の米国特許第5,314,813号明細書に教示される。とりわけ、米国特許第5,529,921号明細書は、第26段第56行ないし第28段第22行で、前駆細胞の培養物の多様な分離および/もしくは濃縮方法を開示する。

【0069】

加えて、この特徴は、高用量の多様なサイトカインでの免疫系のインビボ刺激に対する必要性を除外する。それによりサイトカインにより引き起こされる副作用をなしで済ませる治療をもたらす。あるいは、適する状況もしくは条件下で、適切な場合かつ被験体が利益を得ることができる場合、被験体を、低レベルの投薬量のインターフェロン、インターフェロンおよび/もしくはIL-2で同時に治療することができる。

【0070】

サイトカインでのインビボ刺激に対する必要性を除外することは、患者の治療の質の向上を提供する。患者へのサイトカインの投与を包含する治療レジメンは、しばしば、悪心

10

20

30

40

50

、嘔吐および発熱のような流感様の症状を発症する患者をもたらす。これらの副反応は一般に生命を脅かさないが、とは言え既に弱らされた状態にある患者で起こるとりわけ重症の反応は、生命を危うくする状況をもたらす可能性がある。別の考慮は、それ以外は有益な治療レジメンの患者の受容性およびコンプライアンスに対してこうした副反応が有する有害な影響である。サイトカインでのインビボ刺激に対する必要性を除去することは、患者の快適さを向上させる治療レジメンをもたらす、また、彼もしくは彼女の患者が従うことがよりありそうである有効な治療方法を臨床家に提供する。

【0071】

腫瘍の養子免疫療法のための本方法の有用性は、APCとしてトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞、およびT細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウスの2C系統からのCD8⁺細胞を使用してマウスで立証されている。この系において、精製されたCD8⁺ 2C細胞は、共刺激分子B7-1およびICAM-1もまた担持するMHCクラスI (L^d) のトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞により提示されるインビトロペプチドに高度に反応性である。プライミングされないCD8⁺ T細胞についての最小要件を規定するためのプローブとしてのトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞 (Caiら、P.N.A.S.U.S.A (1996) 93:14736-14741)。あるいは、分離されないマウス脾細胞を精製された2C細胞の代わりに応答体 (responder) として使用する場合は、共刺激分子に対する必要性は当てはまらない。この例において、脾集団中のCD8⁺細胞は活性化されたB細胞から「傍観者 (bystander)」共刺激を受領する。この知見を利用して、MHCクラスI (L^d) のトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞が、添加されたリンホカインの非存在下でインビトロで同系のP815肥満細胞腫の腫瘍特異的ペプチドに応答するように正常DBA/2マウス脾細胞を誘導することが可能であることを示すことが可能であった。P815肥満細胞腫を担持するDBA/2マウスへのこれらのCTLの注入は迅速な腫瘍退縮に至った (Sunら、Immunity (1996) 4:555-564)。

【0072】

手順的には、正常DBA/2マウス脾細胞を、DBA/2由来P815肥満細胞腫細胞系からの腫瘍特異的エピトープP1A.35-43ペプチドで添加された、MHCクラスI (L^d) のトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞とともにインビトロで培養した。5日後に培養物から収集されたリンパ球は、インビトロでP815腫瘍細胞に対する強い細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 活性を表したが、しかし、図3、図Aに示されるとおり、P1A.35-43を発現しないP815の突然変異体細胞系P1024を溶解することに失敗した。これらのCTLを、3日前にP815細胞を以前に接種されたDBA/2マウスに注入した場合、腫瘍は第一週の間妨害を受けずに成長したが、しかし、その後、図3、図Bに示されるとおり、次の週の間排除された。図3、図Bに示されるとおり、CTLをウイルス核タンパク質ペプチドのような無関係の抗原に対してインビトロで免疫化した場合、特異性は、P815の成長に対するいずれかの影響の非存在により立証された。要約すれば、主要組織適合抗原複合体クラスI (L^d) のトランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞は、添加されたリンホカインの非存在下で、同系のP815肥満細胞腫の腫瘍特異的ペプチドにインビトロで応答するように正常DBA/2マウス脾細胞を誘導した。P815肥満細胞腫を担持するDBA/2マウスへのこれらのCTLの注入は迅速な腫瘍の退縮に至った (Wolfeら、J.Exp.Med. (1993) 178:489-495)。

インビトロのヒト研究

健康被験体からのヒトCTLをチロシナーゼに対してインビトロで免疫化した。ショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞のみでの一次刺激後に、チロシナーゼを担持するJY細胞の特異的溶解が、試験された全部のCTLエフェクター対JY標的の比で明らかであった。健康被験体からのチロシナーゼ特異的CTLを、完全な刺激/再刺激プロトコルを使用して誘導し、そしてMalme-3M黒色腫細胞系を殺すそれらの能力につい

て試験した。1もしくは2の可能な例外を伴い、Malme 3Mに対する特異的CTL活性が、全ドナーにおいて変動する程度まで誘導された。大部分については、対照のMalme 3腫瘍細胞に対する反応性は最小限であった。黒色腫患者からの細胞もまた、健康志願者由来のものに類似の活性および特異性のCTLを生成させるために、チロシナーゼエピトープに対してインビトロで免疫化した。

【0073】

インビトロで細胞傷害性Tリンパ球を生成させるためのいかなる天然のもしくは人工産物の抗原提示細胞(APC)系の使用も、これらの系が生成することが可能である抗原特異性により制限される。

【0074】

以下のAPC系を利用して、単一エピトープに対する抗原特異的CTLを生成させた。すなわち、1)規定されたペプチドを適用された(pulsed)ヒト樹状細胞(DC); 2)リンパ芽球から得られかつペプチドを適用された末梢血単核細胞(PBMC); 3)天然のペプチドが酸ストリッピングされ(acid-stripped)かつ目的のペプチドが添加されたリンパ芽球様細胞系(LCL); 4)空のクラスI分子を発現するよう工作されたショウジョウバエ(Drosophila)細胞;ならびにヒトクラスIおよび共刺激分子でトランスフェクトされたマウス3T3細胞(J. B. LatoucheとM. Sadelain, Nature Biotech (2000) 18: 405-409)。

【0075】

樹状細胞(DC)は、一次抗原細胞の提示におけるそれらの広範な応用のために、ヒトにおける一次抗原提示細胞系とみなされる。自己もしくは外来タンパク質はDC内でプロセッシングされる。結果として生じるペプチドエピトープがHLA分子により提示され、そしてDCの表面に輸送される。しかしながら、DCがインビトロで一貫して生成されることができず、CTLが4種の異なるペプチドに対し方向を定めたことが見出された。これは、4種のペプチドのそれぞれに対応する活性を有するCTLを提供したとみられる。加えて、ペプチドの適用の時点でのDCの表現型(成熟もしくは未熟)は結果に影響しないこともまた見出された。

【0076】

あるいは、ショウジョウバエ(Drosophila)細胞の刺激は、通常、10までの異なる型のペプチドに対し向けられるCTLをもたらした。これは、10種のペプチドのそれぞれに対し活性であるCTLを提供する。

【0077】

CTL応答を導き出すショウジョウバエ(Drosophila)細胞およびDCの能力を、最初に、単一ペプチドエピトープに対しそれぞれの標準的刺激プロトコルに従って評価した。DCおよびトランスフェクトされたショウジョウバエ(Drosophila)細胞を比較するために、未熟DCを、IL-4およびGM-CSFの存在下で自己単球を1週間培養することにより生成させた。成熟DCは、回収の24時間前の培地へのTNFの添加により、未熟DCから得た。DC(未熟および成熟)を回収し、ペプチドを適用し、そしてCD8細胞およびペプチドを適用されたショウジョウバエ(Drosophila)細胞の刺激に使用された手順に従って、精製されたCD8細胞と混合した。ショウジョウバエ(Drosophila)細胞は、図7に示されるとおり、チロシナーゼペプチドエピトープ689について評価される場合に、DCよりも一般により良好な刺激物質であることが見出された。さらに、未熟もしくは成熟いずれの表現型を表すDC(図8)も、規定されたペプチドを使用してAPCに適用した場合に、特異的CTL応答の導出においてショウジョウバエ(Drosophila)細胞ほど効率的でなかった。これは、免疫系中でDCにより演じられる支配的役割のため、とりわけ驚くべきことである。1ドナーでの比較試験を図9に示されるとおり実施した。特異的殺傷が、刺激物質として人工細胞を使用する場合に4種の異なるペプチドに対して生成された一方、未熟DCは無意味の特異的殺傷をもたらし、また、成熟DCは刺激に使用された4種のペプチドの1種の

10

20

30

40

50

みに対する特異的殺傷をもたらした。

細胞傷害性リンパ球の調製

抗CD8抗体での陽性選択により白血球成分分取 (leukapheresis) サンプルから単離されたCD8⁺細胞を、ヒトクラスI分子 (HLA-A2.1)、B7.1、ICAM-1、LFA-3およびB7.2を発現するショウジョウバエ (Drosophila) 細胞により提示される4種の異なる黒色腫関連ペプチドに対して刺激する。CD8⁺細胞を、IL-2およびIL-7の存在下にペプチドエピトープを添加された自己単球で2回再刺激する。CTLをOKT3およびIL-2とともに非特異的に拡張する。CTL活性をMalmesbury 3M細胞に対して測定し、また、CD8⁺ T細胞の純度をフローサイトメトリーにより評価する。

10

【0078】

製造過程およびプロトコルは、優良実験室規範 (Good Laboratory Practice) および優良製造規範 (Good Manufacturing Practice) に従って行う。「優良実験室規範」および「優良製造規範」は、米国食品医薬品局 (United States Food and Drug Administration) により設定されている実験室および製造の実務の基準であり、かつ、当業者に容易に知られる。CTLは、正体 (identity)、生存率、CTL活性、無菌性およびエンドトキシン含量についてモニターする。

【0079】

乳房および卵巣癌を治療するための本発明の方法における使用に適するペプチドエピトープの一覧を以下の表1に示す。以下の表1に列挙されるものに加えて広範なペプチドエピトープもまた、乳房および卵巣癌を治療するための本発明の方法での使用に適することができるが、但しこうしたペプチドはT細胞エピトープであることが、当業者に容易に明らかである。

20

【0080】

【表 2】

表1

乳房および卵巣癌の標的としての腫瘍関連抗原の同定されたHLA-A2.1拘束性ペプチド

標的 (残基)	名称	PRI #	AKA	配列 (配列番号:)	HLAペプチド 結合予測
Her-2/neu					
789-797		826	E90	CLTSTVQLV (配列番号:7)	160
48-56		827	D113	HLYQGCQVV (配列番号:13)	
369-377		835	E75	KIFGSLAFL (配列番号:8)	481
654-662		837	GP2	IISAVVGIL (配列番号:14)	
650-658		838	GP1	PLTSIISAV (配列番号:15)	
773-782		861		VMAGVGSPYV (配列番号:16)	
851-859		862	E89	VLVKSPNHV (配列番号:17)	118
971-979		863	C85	ELVSEFSRM (配列番号:18)	
AES アミノ enhancer of the split (Notch)					
G128-135		893	G76	GPLTLPV (配列番号:19)	
MUC-1 ムチン					
950-958		908	1.1	STAPVHNV (配列番号:20)	
CEA 癌胎児性抗原					
571-579		879	CAP-1	YLSGANLNL (配列番号:21)	
FBP 葉酸結合タンパク質					
191-199		914	E39	EIWTHSYKV (配列番号:22)	
C-レクチン MESM, RELP					
8-16			C8	KMASRSMRL (配列番号:9)	CTL 活性
77-86			C77	SILSLKEAST (配列番号:23)	CTL 活性

10

20

30

【 0 0 8 1 】

40

【表 3】

標的 (残基)	名称	PRI #	AKA	配列 (配列番号:)	HLAへフットー 結合予測
NY-ESO-1					
157-165C		894		SLLMWITQC (配列番号:24)	天然
157-165V		906		SLLMWITQV (配列番号:25)	改変
155-163		913		QLSLLMWIT (配列番号:26)	
Pec60					
20			P20	ALALAALLVV (配列番号:10)	CTL 活性
25			P25	ALLVVDREV (配列番号:11)	CTL 活性
CA-125					
157-165		900		YLETFREQV (配列番号:27)	38
255-263		902		VLLKLRPV (配列番号:28)	88
337-345		901		GLQSPKSPL (配列番号:29)	21
546-554		903		ELYIPVDL (配列番号:30)	5
898-906		899		KALFAGPPV (配列番号:31)	13
414-422		910		FMWGNLTLA (配列番号:32)	315
MAGE-3					
271-279		909		FLWGPRALV (配列番号:33)	
テロメラーゼ hTRT					
540-548		907		ILAKFLHWL (配列番号:34)	
865-873		911		RLVDDFLV (配列番号:35)	
G250					
245-262		912		HLSTAFARV (配列番号:36)	

10

20

30

【0082】

以下の実施例は本発明を具体的に説明する目的上提供されるが、しかし、本発明を該実施例の内容に制限しない。

40

実施例 1

ショウジョウバエ (*Drosophila*) 抗原提示細胞の製造

シュナイダー (Schneider) S2 細胞系を、発表された手順に従ってキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) (オレゴン (Oregon) - R) 卵から調製し、そしてアメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection) に寄託した (CRL 10974)。S2 細胞は、10% ウシ胎児血清を補充された商業的シュナイダー (Schneider) ドロソフィラ (*Drosophila*) 培地中で成長させる。

【0083】

S2 細胞中で MHC クラス I および 共刺激タンパク質を発現させるための pRmHa -

50

3 プラスミドは、文献に記述されるとおり構築された p R m H a - 1 発現ベクター由来であった。それは、メタロチオネインプロモーター、金属応答コンセンサス配列、およびキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から単離されたポリアデニル化シグナルを担持するアルコール脱水素酵素遺伝子を含む。

トランスフェクションのための相補 DNA を以下のとおり調製した：

H L A - A 2 . 1 および - 2 ミクログロブリン：発表された配列由来のプライマーを使用する K 5 6 2 細胞からの逆転写 P C R

B 7 . 1：発表された配列由来のプライマーを使用する K 5 6 2 細胞からの逆転写 P C R

I C A M - 1：発表された配列由来のプライマーを使用する K 5 6 2 細胞からの逆転写 P C R

B 7 . 2：発表された配列由来のプライマーを使用する H L - 6 0 細胞 (A T C C C C L - 2 4 0) からの逆転写 P C R

L F A - 3：発表された配列由来のプライマーを使用する H L - 6 0 細胞 (A T C C C C L - 2 4 0) からの逆転写 P C R

相補 DNA は個別に p R m H a - 3 ベクターに挿入した。S 2 細胞を、リン酸カルシウム沈殿法を使用して、H L A - A 2 . 1、B 7 . 1 および I C A M - 1 プラスミド DNA、ならびに p h s h n e o プラスミドの混合物でトランスフェクトした。安定にトランスフェクトされた細胞を、ジェネチシンを含むシュナイダー (S c h n e i d e r) 培地中で培養することにより選択した。使用 2 4 時間前に、トランスフェクトされた遺伝子の発現を $C u S O_4$ の添加により誘導した。発現のレベルは、抗 H L A - A 2 . 1、抗 B 7 . 1 および抗 I C A M - 1 抗体を使用するフローサイトメトリーにより評価した。3 0 % 以上の細胞による H L A 発現が、C D 8⁺リンパ球の効率的なインビトロ活性化に必要である。

ヒト C D 8⁺細胞の単離

C D 8⁺細胞は、ダイナビーズ [D y n a b e a d s]TM 単離手順 (ダイナル (D y n a l)) を使用する陽性選択により白血球成分分取サンプルから単離する。抗ヒト C D 8 マウスモノクローナル抗体 (ヒト グロブリン [ガンマガード (G a m m a g a r d)^(R)] 1 m l 中 5 0 μ g) を、1 % ヒト血清アルブミン (バクスター - ハイランド (B a x t e r - H y l a n d)) および 0 . 2 % クエン酸ナトリウムを補充されたダルベッコの P B S 中の洗浄された細胞に添加する。穏やかな混合を伴う 4 で 4 5 分のインキュベーション後に、ヒツジ抗マウス I g G で被覆されたダイナル (D y n a l) 磁性ビーズ (ダイナビーズ [D y n a b e a d s]TM) を含む同一緩衝液中で、1 : 1 のビーズ対細胞の比で洗浄かつ再懸濁する。細胞およびビーズを滅菌管に入れ、そして 4 で 4 5 分間穏やかに混合する。この時間の終了時に、抗体結合された細胞を、製造元の説明書 (ダイナル (D y n a l)) に従って M P C - 1^(R) 分離装置を使用して磁気的に除去する。C D 8 細胞 - ビーズ複合体の解離を、C D 8 ペプチド₅₉₋₇₀ (A A E G L D T Q R F S G ; 配列番号 1 2) の存在下 3 7 で 4 5 分間のインキュベーションにより達成する。遊離ビーズを磁気的に除去し、そして C D 8 細胞を計数しかつフローサイトメトリーにより分析して純度を評価する。C D 8⁺細胞の回収は典型的に 8 0 % より大きい。表 1 は、抗 C D 8 抗体での陽性選択による正常ヒト P B M C 調製物からの 1 4 の別個の C D 8⁺調製物の細胞組成を要約する。

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

【表4】

表2
フローサイトメリーにより分析された陽性選択によるCD8⁺細胞の精製

細胞型	PBMC		選択後	
	平均%(範囲)		平均%(範囲)	
CD8 T 細胞	15%	(7-24)	82%	(56-95)
CD4 T 細胞	36%	(14-52)	2%	(0.1-10)
CD 14 単球	15%	(7-26)	0.8%	(0.2-2)
CD15 好中球	12%	(8-21)	0.6%	(0.1-3)
CD19 B 細胞	2%	(0.4-7)	3%	(0.5-9)
CD56 NK 細胞	6%	(2-17)	6%	(0.1-20)

10

【0085】

精製されたヒトCD8⁺細胞のインビトロ免疫感作
一次刺激

トランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) S2細胞を、10%ウシ胎児血清およびCuSO₄を補充されたシュナイダー (Schneider) 培地 (10⁶個の細胞/ml) 中、27°Cで24時間インキュベートする。細胞を回収し、洗浄し、そして100μg/mlのヒトチロシナーゼ₃₆₆₋₃₇₇を含有する昆虫X-プレス培地 (Insect X-press medium) (バイオウイタッカー (BioWhittaker)) に再懸濁する。27°Cで3時間のインキュベーション後に、S2細胞を、10%自己血清を補充されたRPMI培地 (ギブコ (Gibco)) 中1:10の比でCD8⁺細胞と混合する。細胞混合物を37°Cで4日間インキュベートし、その間にショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞が死に絶える。第5日に、IL-2 (20U/ml) およびIL-7 (30U/ml) を添加して、チロシナーゼ特異的CTL集団を選択的に拡張する。

20

再刺激

白血球成分分取の時点で得られた凍結自己CD8⁺枯渇PBMCを融解し、洗浄し、そして10%自己血清 (2マイクログロブリンの供給源として) および20μg/mlのチロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇を含有するRPMI培地中10⁶個の細胞/mlで再懸濁する。線照射 (5,000ラド) 後に細胞を37°Cで2時間インキュベートする。ダルベッコのPBSで洗浄することにより非接着細胞を除去する。10%自己血清および10μg/mlのチロシナーゼ₃₆₉₋₃₇₇を含有するHepes緩衝RPMI培地中での90分間のインキュベーションにより、接着性単球にチロシナーゼエピトープを添加する。上清を除去し、そしてショウジョウバエ (*Drosophila*) 活性化されたCD8⁺細胞懸濁物 (10%自己血清を含むRPMI培地中3×10⁶個の細胞/ml) を、1の接着性単球に対し10のCD8⁺細胞の比で添加する。37°Cで3ないし4日の培養後に、IL-2 (20U/ml) およびIL-7 (30U/ml) を、培地交換を伴い添加して、チロシナーゼ特異的CTL集団を選択的に拡張する。

30

40

非特異的拡張

エフェクター細胞を、自己血清、抗CD3モノクローナル抗体 (OKT^(R)3)、IL-2および線照射された自己PBMCを補充されたRPMI培地中でそれらを培養することにより、非特異的に拡張する。

活性および純度のアッセイ

CTLアッセイ

Malme-3M細胞を⁵¹Cr放出アッセイでの標的細胞として使用する。4%ウシ胎児血清、1%HEPES緩衝液および0.25%ゲンタマイシンを含有するRPMI培地中の5×10⁶個のMalme-3M細胞を、0.1mCiの⁵¹Crで37°Cで1時間標

50

識する。細胞を4回洗浄し、かつ、10%ウシ胎児血清（ハイクローン（HyClone））を含むRPMI中 10^5 個の細胞/mlに希釈する。96穴マイクロタイタープレート中で、 $100\mu\text{l}$ のエフェクターCTLおよび $100\mu\text{l}$ のペプチド添加された ^{51}Cr 標識Malmes 3M標的細胞を、100:1、20:1および4:1（エフェクター:標的）の比で組合せる。K562細胞を20:1（K562:Malmes 3M）の比で添加して、ナチュラルキラー細胞のバックグラウンド溶解を低下させる。非特異的溶解は非腫瘍性HLA-A2.1線維芽細胞系Malmes 3を使用して評価する。 ^{51}Cr の自発的放出および最大放出を測定するための対照を二重で（in duplicate）包含する。37℃で6時間のインキュベーション後に、プレートを遠心分離し、そして上清を計数して ^{51}Cr 放出を測定する。

10

【0086】

特異的溶解のパーセントは、以下の等式：

【0087】

【数1】

$$\frac{\text{サンプルの c p m} - \text{自発的放出の c p m}}{\text{最大放出の c p m} - \text{自発的放出の c p m}} \times 100$$

【0088】

を使用して計算する。
フローサイトメトリー。

20

【0089】

インビトロ活性化の前および後のCD8⁺細胞を、蛍光モノクローナル抗体およびFACS分析を使用して、細胞表面マーカーの数について分析した。健康なドナーからの細胞を使用する典型的な活性プロトコルからの結果を表2に示す。

【0090】

【表5】

表3

インビトロ活性化されたCD8⁺細胞のフローサイトメトリー分析

30

マーカー/細胞型	活性化前 平均%	活性化後 平均%
CD8 T細胞	98	99
TCRαβ T細胞受容体	98	92
CD44 リンパ節ホーミング受容体	91	99
CD45ROメモリT細胞	58	88
CD45RA	41	31
CD62L HEVホーミング受容体	24	38
CD56 NK細胞	1	11
CD25 活性化T細胞	0.1	29

40

【0091】

活性および純度に加えて、CTL調製物を、無菌性およびエンドトキシン含量についてアッセイすることができる。

【0092】

【表 6】

試薬

試薬	供給元	等級	注
rh IL-2	カイロン(Chiron)	USP	滅菌溶液
rh IL-7	ジェンザイム(Genzyme)	研究	凍結乾燥された滅菌溶液
ヒトロシナーゼ ³⁶⁹⁻³⁷⁷		研究	
ダイナビーズ[Dynabeads] [®] M-450	ダイナル(Dynal)	GMP	ヒツジ抗マウスIgG磁性ビーズ
ヒト血清アルブミン		USP	滅菌, 非発熱原性の肝炎ウイルスを 含まない25%溶液
ウシ胎児血清	ジェミニ(Gemini)	研究	滅菌, BSE, エントキシン, マイコプラズマを 含まない
ガンマガード[Gammagard] [®]	バクスター(Baxter)	USP	滅菌の注射用ヒト免疫グロブリン溶液
抗-CD8 抗体		研究	マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体
CD8 ヘフド ⁵⁹⁻⁷⁰		研究	磁性ビーズからのCD8 ⁺ 細胞の遊離
W6/32	ATCC	研究	マウス抗ヒトHLA-A,B,Cモノクローナル抗体

10

20

【0093】

【表 7】

細胞系

細胞系	供給元	注
ショウジョウバエ(Drosophila)S2	ATCC	CRL 10974
M3	UCSD	非-HLA-A2.1ヒト黒色腫
Malme 3	ATCC	黒色腫患者からの正常皮膚線維芽細胞
Malme 3M	ATCC	肺からの転移性黒色腫(Malme3と同一の患者)
M14	UCSD	HLA-A2.1ヒト黒色腫
K562	ATCC	ヒト赤白血病細胞系, NK細胞の標的
JY細胞	ATCC	HLA-A2.1およびB7を発現するEBV形質転換された ヒトB細胞系
P815 および P1024	ATCC	DBA/2 マウス肥満細胞腫細胞系
Jurkat A2.1	ATCC	ヒトHLA-A2.1でトランスフェクトされた急性T細胞白血病

30

ATCC : アメリカン タイプ[®] カルチャー コレクション(American Type Culture Collection)

40

【0094】

実施例 2

黒色腫に対する細胞傷害性 T 細胞注入の試験

試験の目的

本実施例は、以下の因子：

1. インビトロ免疫感作後の再注入された自己CTLの安全性および忍容性；
2. 制限希釈分析での全身循環の要因考慮 (factoring) における注入されたCTLの動力学；
3. ラジオシントグラフィーによるCTLの全身の配置；
4. 免疫組織学による生検された結節の細胞組成 (CTL、TH、NK、B細胞)；なら

50

びに

5.2ヶ月にわたる測定可能な傷害の退縮および応答の持続期間

に従って評価されるところの黒色腫の治療における細胞傷害性T細胞注入の有効性を教示する。

患者集団

治療への適格性は、患者が測定可能もしくは評価可能であった組織学的に報告された切除不可能な悪性黒色腫およびHLA-A2表現型を有することを必要とした。治療前評価は、MRIもしくはCTスキャンによる脳の放射線学的評価、胸部および腹部のCT走査、ならびに、とりわけ皮膚およびリンパ節の身体検査を包含した。治療された患者の総数は15(9例の男性および6例の女性)であった。年齢は、58歳の平均を伴う33から75歳までの範囲にわたった。転移性疾患の平均持続期間は1.5年であった。アネルギーの状態が存在したかどうかを決定するための治療前皮膚試験を15例中14例の患者で実施し、14例中5例は評価された普遍的抗原の全7種について陰性と判定された。患者は、HLA-A2特異的モノクローナル抗体(BB7.2)を用いるFACS分析によりHLA-A2ハプロタイプについてスクリーニングした。サブタイプ分類(subtyping)はPCR分析により実施した。患者の1例を除く全部がHLA-A*0201であり、例外(患者08)はHLA-A*0205であった。

エキスピボで生成された自己CTLでの治療

15例の患者を本臨床プロトコル下に治療した。全患者は、自己CTLの少なくとも単回注入を受領した。各患者に投与された周期の数および細胞の用量は表1に要約する。インビトロで生成された細胞の数は、アフェレーシス(apheresis)処置から単離されたPBMCの数、および各PBMC調製物中に存在するCD8⁺T細胞の数のような患者関連の因子に依存した。インビトロで生成された細胞の全部をドナーに再注入したため、各患者に投与された用量は必然的に変動した。患者間の用量を正規化する試みにおいて、計算された「効力」得点を各用量について記録した。該値は、細胞の総数にペプチド添加された標的細胞で得られた溶解活性を掛けることにより得た。注入されたT細胞の用量は、 4×10^7 個の最小(患者08)から 3.2×10^9 個の最大(患者13)までの範囲にわたった。患者は各周期の終了時の彼らの臨床状態に基づいて第二、第三もしくは第四の治療周期に進化した。アフェレーシスサンプルから得られたPBMCの数は、とりわけその後の周期の開始が以前のものの終了に近かった場合に、付加的周期を受けている患者でより低い傾向があった。これは、前の周期の間に投与されたIFN-2bによる持続性のリンパ球減少に帰される。単離されたナイーブなCD8⁺T細胞の総数はPBMC調製物のそれぞれ中のその割合に依存した。CD8⁺T細胞のパーセントは患者間で8%ないし31%の間で変動した。得られた拡張係数は最終的な細胞数にもまた寄与し、そして0.1から6.0倍の範囲にわたった。エキスピボでCTLを生成させるための手順は本明細および上の実施例1に教示される。

IFN-2bに対する応答におけるクラスIおよび黒色腫関連抗原のアップレギュレーション

インビボで黒色細胞腫を溶解する抗原特異的CTLの能力を高める試みにおいて、低用量のIFN-2bを、CTL注入前連続5日間、および追加の4週間に週3回投与した。サイトカインに対するインビボ応答の一測定方法は、連続的時間点で得られる生検を特異的抗体での陽性染色についての免疫組織化学的分析により評価することである。連続的生検を、クラスIおよび抗原発現の双方の評価のため、複数の皮膚傷害を伴う1例の患者(患者04)で得た。生検は、クラスIおよびMART-1発現がいずれの治療前も弱く陽性であったことを示した(生検A)。 $10 \text{ MU} / \text{m}^2$ の皮下注入の5日後に、これら2種のマーカーの劇的な増大が示された(生検B)。チロシナーゼおよびgp100について、免疫組織化学的染色は治療前サンプルでそれぞれ陰性ないし弱く陽性であった(生検A)。最初の5日のIFN投与および13回の追加治療後に、これらの後者の抗原の発現が、染色された組織サンプル中で増大した(生検C)。

エキスピボで生成されたCTLの抗原特異性

全患者からの生成されたCTLを、生検材料が系統を樹立するために利用可能であった場合、ペプチド添加されたT2標的、HLA-A2黒色腫細胞系(Malm3M)および自己黒色腫系統に対して、遊離日に評価した。細胞の各調製された用量をその細胞溶解活性について評価した。各ペプチド単独で、もしくは全4種のペプチドを同時にのいずれかを提示するペプチド添加されたT2細胞を使用して、各患者について生成されるCTL応答の特異性を決定した。内因性に発現された黒色腫関連抗原を担持する細胞を溶解する能力を、HLA-A2を合致された系統もしくは自己腫瘍系統で評価した。細胞溶解活性に加え、抗原特異性を、特異的ペプチド刺激に応答して作成される細胞内インターフェロン産生の確立された検出方法で評価した。エクスピボプロトコルの終了時に生成されたCTLをこの方法により評価した。ペプチドのそれぞれに特異的な細胞の割合を個別に記録した。患者13からの各大量の(bulk)CD8培養物中の特異的細胞の数を、T細胞のその集団中で検出されるペプチド特異性のそれぞれを加えることにより計算した。特異的細胞の総数の増加を、各連続する治療周期で検出することができた。

10

CTL治療後の腫瘍生検に浸潤するCD8およびCD4細胞の検出

治療の前、間および後の全患者からの生検サンプルが理想的であったと思われる。しかしながら、実験条件は制限された数の患者のみからの生検サンプルを見込んだ。腫瘍組織は試験に参入した15例の患者の5例から得た。2例の患者(患者08および13)において、生検サンプルは、T細胞療法後それぞれ5および6週で入手可能であった。組織サンプルの検査は、浸潤するCD8およびCD4双方の細胞の存在を示した。腫瘍サンプルの1つは、追跡検査の時点(T細胞の第二の注入後4週間)までに大きさが増大した、頭皮の後頭部領域の皮膚傷害から採取した。該生検は、リンパ球でひどく浸潤された組織の壊死を示した。他の生検は股関節置換手術の間に取り出された大腿骨頭部からであった。患者08からの皮膚傷害は一般的クラスIおよび特異的HLA-A2マーカー双方について強く陽性(4+)であった。チロシナーゼおよびgp100は弱く陽性(それぞれ1+および2+)であった一方、MART-1はこの同一のサンプルで陰性であった。患者13からの生検の領域もまた、より不均質な染色;HLA-A2.1分子の発現を欠く腫瘍細胞の明確な集団、およびMAAの1種もしくはそれ以上を伴い壊死性であった。しかしながら、無傷の組織領域は強いクラスI(4+)および黒色腫関連抗原の全部を示した。この後者のサンプルにおけるリンパ球浸潤は、腫瘍結節に深く浸潤するよりはむしろそれらを取り巻くようであった。しかしながら、腫瘍に直接関連した最高の割合の細胞はCD8細胞であった。これらの患者の双方からの治療前生検サンプルの欠如は、治療前の組織サンプル中の類似の型の浸潤する細胞の確認を予防した。

20

30

T細胞療法後のCTスキャンは客観的応答を確認する

CTスキャンは治療前スクリーニング基準および治療後追跡検査の一部であった。患者10は治療前スキャン(99年6月23日)の5週間後に 8×10^8 個のCTLの単回注入を受領した(99年7月27日)。注入1ヶ月後に胸部のCTスキャンを反復した場合(99年8月27日)に、肺傷害の大きさの劇的な減少が示された。同様に、患者14は、 6.6×10^8 個の細胞での第一の注入(99年10月5日)の3.5週間前に参入過程の一部として胸部CTスキャンを受けた(99年9月10日)。 11.5×10^8 個の細胞での第二の注入1ヶ月後の追跡CTスキャン(99年1月7日)は3個の別個の傷害の劇的な縮小を示した。患者13は前および後CTスキャンで測定されたような客観的応答もまた有した。傍気管腺症は周期I後に 7.8 cm^2 (試験前)から 4.4 cm^2 となり、そして周期II後に消失した。

40

アレルギー状態の存在はCTLを生成させるもしくは臨床応答を予防する能力を排除しなかった

本プロトコル下で治療された患者の大部分は以前の医学的介入を受領していた。治療前皮膚試験を実施して、一団の7種の普遍的抗原に対するアレルギー応答が、エクスピボでCTLを生成させるかもしくは報告された臨床応答を予防するかのいずれかの不能と相関するかどうかを決定した。エクスピボでCTLを生成させる能力は、患者の治療前皮膚試験の結果と相関しなかった。患者03および04(双方とも混合型応答体(mixed

50

responder))は、第二の周期の開始前に反復皮膚試験を受け、そしてアネルギーのままであったことは注目されるべきであろう。

実施例 3

乳房および卵巣腫瘍細胞を溶解することが可能なHER-2/neu特異的CTLの生成われわれは、全部の形態の癌にこのアプローチを用いて標的を定めることができるかどうかを決定するために、他の腫瘍型にわれわれのCTL生成技術を適用することに興味をもった。HER-2/neuは、多くのヒトの癌、主として乳房、卵巣および結腸の腺癌において増幅かつ過剰発現されるEGFRに対する相同性をもつ癌原遺伝子である。それはしばしば攻撃的疾患と関連し、そして乏しい予後の指標である可能性がある。それはこれらの型の癌の可能な標的としていくつかの臨床試験で研究されている。

【0095】

1990年代早期に、HER-2/neu HLA-A2.1拘束性ペプチドエピトープが、コンピュータ補助ペプチド結合アルゴリズム、もしくは卵巣癌患者の腹水から単離されたCTLをマッピングすることのいずれかにより同定された(表3)。

【0096】

【表 8】

表3

HLA-A2.1-拘束性HER-2/neu/ペプチド

HER-2/neu ペプチド	PRI #	他の ID#	位置	配列 (配列番号)	参考文献
48-56	827	D113	EC	HLYQGCQVV (配列番号:13)	Disis et al., 1994
369-377	835	E75	EC	KIFGSLAFL (配列番号:8)	Fisk et al., 1995
650-658	838	GP1	TM	PLTSISAV (配列番号:15)	Fisk et al., 1995
654-662	837	GP2	TM	IISAVVGIL (配列番号:14)	Peoples et al., 1995
773-782	861	N/A	IC	VMAGVGSPPYV (配列番号:16)	Lustgarten et al., 1997
789-797	826	E90	IC	CLTSTVQLV (配列番号:7)	Disis et al., 1994
851-859	862	E89	IC	VLVKSPNHV (配列番号:17)	Disis et al., 1994
971-979	863	C85	IC	ELVSEFSRM (配列番号:18)	Fisk et al., 1995

【0097】

ペプチドの全部を合成し、同定番号(PRI#)を与え、そして、黒色腫関連のT細胞ペプチドエピトープについてわれわれが使用した同一の方法を利用してエクスピボでCTLを生成させる能力について評価した。CD8細胞を正常ドナーから単離して、既知のCTLペプチドエピトープを添加されたショウジョウバエ(Drosophila)細胞を用いてエクスピボでCTLを慣例に生成させる能力を決定した。ペプチド826、835、861および863はCTL生成の最高の頻度を有した(表4)。

【0098】

10

20

30

40

【表 9】

表4
 正常ドナーにおけるHER-2/neu CTL生成の頻度

ドナー	826	827	835	837	838	861	862	863
193	+		+					
194	+	-	+	-	-	+	-	+
195	+		+			+		+
196	+	-	+	-	-	+		
197	+	-	+	-	+	+	-	+
198	-	-	+	-	+	+	-	+
207	+		+			+		+
212	+		+			+		+
218	+		+			+		+
232	-		+			+		-
233	+		+			+		+
241		+				+		
243		+				+		

10

【0099】

トランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞は10種までの異なるペプチドエピトープを提示する独特の能力を有する (図10) 一方、われわれは、これらのペプチドに対するCTLをエキスピボで生成することの頻度により4種のHER-2/neuペプチド、826、835、861および863を選択した。これら4種の異なるHER-2ペプチドは、トランスフェクトされたショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞の表面上に提示されたHLA-A2.1分子への弱いないし中程度の結合体 (binder) を表す。われわれは、黒色腫関連ペプチドでのわれわれの経験が、弱いクラスI結合体を実際にそれらが天然のT細胞エピトープを表す場合に腫瘍細胞を認識する強力なCTLを一般に生成することを示唆しているため、弱いA2結合体を包含する傾向がある。われわれが標的を定める腫瘍関連タンパク質の大多数は自己抗原であり、そしてそれ自体、ウイルスペプチドとともにみられるクラスI分子に対する高親和性を有することを期待することができる。低いし中程度の結合体は、一般に、腫瘍細胞を非常に効率的に溶解するCTLを生成させる。これは、ショウジョウバエ (*Drosophila*) 細胞に対する低親和性結合体である (図3) がそれでもなおペプチド添加された標的細胞 (T2) もしくはより重要には黒色腫細胞 (Malmes M) 双方を溶解することが可能な強力なCTLを慣例に生成させるエピトープを表す (図12) MART-1ペプチドで立証された。

20

30

【0100】

HER-2/neuはEGF-Rファミリーの1メンバーでありかつ増殖因子受容体として機能する。HER-2タンパク質はヒトにおいて胎児の発生の間に発現される。成体では、該タンパク質は多くの正常組織の上皮細胞中で弱く検出可能である。正常細胞において、HER-2遺伝子は単一コピーとして存在する。該遺伝子の増幅および/もしくは関連タンパク質の過剰発現が、乳房、卵巣、子宮、胃を包含する多くのヒト癌、および肺の腺癌で同定されている。HER-2とEGF-R受容体との間の配列の差異を表5に示す。われわれが評価した4種のHER-2ペプチドの3種は、2種のタンパク質の間の3個もしくはそれ以上のアミノ酸変化を有する。単一のアミノ酸変化は2種のタンパク質を区別するのに十分である。

40

【0101】

【表 1 0】

表5
HER-2/neu 対 EGF-R

タンパク質	ペプチド#	配列 (配列番号)	変化数
HER - 2/neu EGFR	835	KIFGSLAFL (配列番号:8) SISGDLHI (配列番号:37)	5
HER - 2/neu EGFR	861	VMAGVGSPYV (配列番号:16) VAASVDNPHV (配列番号:38)	5
HER - 2/neu EGFR	863	ELVSEFSRM (配列番号:18) ELIIEFSKM (配列番号:39)	3
HER - 2/neu EGFR	826	CLTSTVQLV (配列番号:7) CLTSTVQLI (配列番号:40)	1
HER - 2/neu EGFR	689-697	RLLQETELV (配列番号:41) RLLQERELV (配列番号:42)	1

10

20

【 0 1 0 2】

C T L が 4 週間のエキスビボ刺激プロトコル後に生成された後、われわれは、免疫化ペプチドを用いて調製された H L A - A 2 . 1 四量体分子を使用して、ペプチド特異的細胞が存在したかどうかを評価した。図 1 3 に立証されるとおり、ペプチド特異的 C T L を生成させる能力はドナー依存性であった。図 A (ドナー 2 6 1) において、該ドナーはペプチド 8 3 5 に対する強い C T L 応答を示した (3 7 . 5 5 %) 。図 B (ドナー 2 6 2) において、ペプチド特異的 C T L を 8 3 5 および 8 6 1 双方の四量体分子で検出することができる (それぞれ 3 . 6 % および 1 5 . 1 %) 。これは、該刺激プロトコルの終了時にペ

30

プチド特異的 C T L を保証するための複数のペプチドの使用を支持する。本エキスビボプロトコルは、多特異性 C T L を比較的容易に生成させることを可能にする。

抗ペプチドおよび抗腫瘍応答

完全なエキスビボプロトコルの完了後に、生成された C T L を抗原特異性について評価した。C T L を生成させるために、第 0 日にショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞に 4 種の H E R - 2 ペプチドの組合せを添加した。4 週のエキスビボ刺激プロトコルの終了時に、大量の C D 8 培養物を抗原特異性について評価した。免疫化ペプチドのそれぞれを添加された T 2 細胞を標的細胞として使用した。図 1 4 に典型的な応答を描く。大量の培養物は 4 種の H E R - 2 ペプチドのそれぞれに対する特異性を含有する。抗腫瘍応答を卵巣腫瘍細胞系 (A T C C ; H T B - 7 7) で評価した。標的細胞系が H L A - A 2 . 1 拘束性でない場合、われわれは + / - アッセイ系を有するように細胞系をトランスフェクトした。H L A - A 2 . 1 を H T B - 7 7 系統にトランスフェクトした場合、C D 8 エフェクター細胞による高められた殺傷が示された (図 1 5 、 図 A ないし D) 。個々のペプチドを代表する H E R - 2 特異的エフェクターを評価して、この腫瘍細胞系上でのペプチドエピトープのそれぞれの提示を確認した。

40

【 0 1 0 3】

H L A - A 2 . 1 でトランスフェクトされた乳房腺癌細胞系 (A T C C ; H T B - 1 3 1) もまた、H E R - 2 特異的ペプチドエフェクターでの腫瘍溶解を立証する能力について評価された。ペプチド 8 6 1 に特異的な C T L は、H L A - A 2 . 1 でトランスフェクトされた場合にこの腫瘍細胞系を溶解することができた (図 1 6) 。

50

腫瘍細胞の溶解に必要とされる I F N 処理

H T B - 7 7 / A 2 . 1 細胞系は、ペプチド特異的溶解を立証するために I F N での前処理を必要とする。細胞を、 ^{51}Cr 放出アッセイの開始前 2 4 時間、5 0 0 U / m l の I F N (2 5 n g / m l の比活性) で処理した。図 1 7 で、I F N の添加は、H L A - A 2 . 1 でトランスフェクトされた細胞系の高められた溶解をもたらした。H L A - A 2 . 1 および H E R - 2 双方の表面発現に対するこの用量の I F N の影響を決定するために、F A C S 分析を実施して、誘導の 2 4 および 4 8 時間後双方のこれらの分子のレベルを測定した。図 1 8、図 A および B は F A C S 分析の結果を描く。図 A で、I F N での誘導後 2 4 および 4 8 時間に、H T B - 7 7 細胞の表面上での H E R - 2 分子の促進は存在しなかった。H L A - A 2 . 1 でトランスフェクトされた細胞では、H E R - 2 も H L A - A 2 . 1 も、類似の処理プロトコル後に表面の発現レベルの増大を立証しなかった。示されたことは、m R N A レベルをマイクロアレイ D N A チップ分析により評価した場合の T A P - 1 の発現、ならびに H L A - D M および - D R、カテプシン S および D ならびにカスパーゼ 5 のレベルの増大であった (図 1 9)。これは、I F N の存在下で H T B - 7 7 / A 2 . 1 細胞の促進殺傷が存在する理由を説明するとみられる。この特定の分子のアプレギュレーションは、H E R - 2 分子のより効率的なプロセッシングをもたらして目的のペプチドのより良好な提示を可能にするとみられる。

10

ペプチド

合成ペプチドはペプチド合成機 (ギルソン カンパニー インク (G i l s o n C o m p a n y , I n c .)) を使用して標準的な F m o c 化学により作成した。全部のペプチドは C - 8 カラムでの逆相 H P L C により > 9 5 % 純度まで精製した。純度および正体は、電子スプレーイオン化を用いる質量分析計を使用して確立した。黒色腫関連ペプチドは : ペプチド 8 1 9 は M A R T - 1 特異的であり (A A G I G I L T V 配列番号 6)、8 1 7 および 8 5 3 は双方が g p 1 0 0 ペプチドであり (それぞれ I T D Q V P F S V 配列番号 4 および K T W G Q Y W Q V 配列番号 5)、チロシナーゼ特異的ペプチドは 6 8 9 および 7 9 2 であり、7 9 2 は、ペプチド 6 8 9 により表される天然の配列 (Y M N G T M S Q V 配列番号 1) の翻訳後修飾されたバージョン (Y M D G T M S Q V 配列番号 2) を表したを包含した。ペプチド 8 2 6 (C L T S T V Q L V 配列番号 7) および 8 3 5 (K I F G S L A F L 配列番号 8) は、p 1 8 5 タンパク質のそれぞれ細胞内および細胞外ドメインからの H E R - 2 / n e u 配列を表した。P e c 6 0 ₂₀ (A L A L A A L L V V 配列番号 1 0) P e c 6 0 ₂₅ (A L L V V D R E V 配列番号 1 1) は卵巣腫瘍系統で検出される粘液素タンパク質を表す重なり合う配列であった。C - レクチンもまた卵巣腫瘍細胞系で検出されるタンパク質であり、そしてその配列からのペプチド (C - レクチン ₈) は K M A S R S M R L 配列番号 9 により表される。

20

30

インビトロ細胞傷害性アッセイ

標準的 ^{51}Cr 放出アッセイを実施して、T 2 細胞に添加された黒色腫関連ペプチドエピトープの C T L エフェクター細胞認識を測定した。収穫物 3×10^6 個の T 2 細胞を、R P M I + 1 0 % F B S (培地) 中で成長させた。0 . 1 m C i の ^{51}Cr を添加し、そして水浴中 3 7 °C でインキュベートした。標識された細胞を 1 0 m l の 4 % 洗浄液 (R P M I + 4 % F B S) およびペレットに添加し、追加の 2 回洗浄し、そして自発的対洗剤に溶解された細胞の放射活性を記録するために 0.2×10^6 個 / m l の最終濃度に培地で再懸濁した。細胞に 2 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の適切なペプチド (1 種もしくは複数) を 3 0 分間適用した。5 0 μL を、1 0、2、0 . 4 および 0 . 0 8 $\times 10^6$ 個 / m l の C D 8 エフェクター細胞をそれぞれ含有する各 9 6 穴プレートに添加し、これを 3 7 °C で 6 時間インキュベートし、回転しそして上清について収集した。

40

フローサイトメトリーおよび四量体染色

細胞を、F A C S 緩衝液 (P B S 中 1 % B S A、0 . 0 2 % N a N ₃) 中 4 °C で 3 0 分間のインキュベーション、次いで同一緩衝液での洗浄により、F I T C もしくは P E 結合モノクローナル抗体で標識した。細胞を、データ獲得およびそのセルクエスト (C e l l Q u e s t) ソフトウェアを用いる F A C S c a n フローサイトメーター (ベクトン

50

ディッキンソン (B e c t o n D i c k i n s o n)) での分析前に 0 . 5 % ホルムアルデヒド中で固定した。非特異的染色は、標識精製された一次抗体に対する使用された同一の二次抗体、もしくは一次抗体を直接標識した場合はアイソタイプを合致された対照を用いて測定した。四量体染色は、陰性対照として配列 S L Y V T V A T L 配列番号 4 3 をもつ H L A - A 2 . 1 特異的 H I V g a g 四量体分子 (ベックマン コールター (B e c k m a n C o u l t e r)) を用いて実施した。HER - 2 特異的 四量体は、配列 C L T S T V Q L V (8 2 6 配列番号 7)、K I F G S L A F L (8 3 5 配列番号 8) もしくは V M A G V G F S P Y V (8 6 1 配列番号 1 6) ペプチドを用いて作成した。PE 標識 四量体 H L A - A 2 . 1 ペプチド複合体を、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 標識抗ヒト C D 8 a (B D ファーマジン (B D P h a r M a g i n)) モノクローナル抗体とともに使用して、エピトープ特異的 C D 8 + T 細胞を、包装挿入物に記述されたとおり染色した。サンプルをベクトン ディスケンソン (B e c t o n D i s c k e n s o n) F A C S c a n での二色フローサイトメトリーにより分析し、そしてゲートされた (g a t e d) C D 8 + T 細胞を、四量体 H L A - A 2 . 1 ペプチド複合体での染色について検査した。

10

実施例 4

本エクスピボ刺激プロトコルを用いる付加的な乳房および卵巣特異的 C T L の生成

われわれは、多様な腫瘍起源の数種の腫瘍抗原の全部の既知の H L A - A 2 . 1 拘束性ペプチドエピトープに対する C T L 応答を生成する能力を立証した。われわれの当初の研究は黒色腫に焦点を当て、ここで、われわれは、M A R T - 1、g p 1 0 0 およびチロシナーゼの黒色腫関連タンパク質に特異的な 4 種の異なるペプチドエピトープに特異的な C T L で治療された患者における客観的臨床応答を立証することが可能であった [R i c h a r d s ら, A m e r . S o c . C l i n . O n c o l . , カリフォルニア州サンフランシスコ (2 0 0 1 年 5 月)]。

20

【 0 1 0 4 】

広範な他の癌に存在する他の腫瘍抗原に対する C T L を生じさせる能力を拡大するため、われわれは、数種の異なる腫瘍型に共通の腫瘍抗原に対する発表されたおよび新規の配列を選択した。これらは、A E S、M U C - 1、C E A、F B P、C - レクチン、N Y - E S O - 1、P e c 6 0、C A - 1 2 5、M A G E - 3、テロメラゼおよび G 2 5 0 を包含する。表 7 はこれらの抗原、発現の頻度およびそれらを発現する癌を記述する。われわれのエクスピボ刺激プロトコルを用いてのこれらのペプチドへの応答の頻度を表 6 に列挙する。

30

【 0 1 0 5 】

【表 1 1】

表6

正常ドナーにおける乳房および卵巣へのヒトEトープに対する応答の頻度

ドナー	879	893	894	899	900	901	902	903	906	907	908	909	910	911	912	913	914
248	+	+	+														
249	+	+	+														
250	+	-	+														
251	-	-	+														
252	+	-	+														
253	-	-	+	+													
254	+	-	+	+													
255					-	+	+	-	+	+	+	+					
256					+	-	+	+	+	+	-	+					
257													+	+	+		
259													+	-	-		
260					-	-	-	-									+
261									+	+	+	+					
262									+	+	-	+					-
265	+	+	+	+	-	-	-	-	+				+	+		-	

10

20

【 0 1 0 6 】

【表 1 2】

表6
腫瘍抗原の記述

抗原	記述
CA-125	癌抗原125は、卵巣腫瘍およびいくつかの卵巣細胞系により発現される上皮細胞マーカーである。卵巣癌患者の約85%が増大された血清CA125を有し、そして従って血清腫瘍マーカーとして普遍的に使用される。 (Cancer Letters(1999年10月)145(1-2)pg. 133-141)
MUC-1	ムチンは正常および悪性双方の上皮で発現される膜貫通糖タンパク質である。グリコシル化されない形態のMUC-1は、乳房および卵巣癌のような多くのヒト腺癌、ならびに多発性骨髄腫およびB細胞リンパ腫を包含する血液学的悪性病変の細胞表面で過剰発現される。 (Blood(1999年6月)93(12)pg. 4309-4317)
G250	85%の腎細胞癌で発現されるがしかし正常な腎組織で発現されない腎細胞癌関連抗原。それは約50%の浸襲性乳癌で発現される腫瘍関連抗原MN/CAIXに同一である。 (Cancer Research(1999年11月); 59(21)pg. 5554-5559)
FBP	葉酸結合タンパク質は葉酸輸送に関与する受容体である。それは90%を越える卵巣腫瘍および20~50%の乳癌で過剰発現される。 (Anticancer Research(1999年7-8月)19(4B)pg. 2907-2916)
HER-2/neu	配列および構造がEGF-Rに類似の膜貫通タンパク質をコードする癌原遺伝子(HER-2)。HER-2/neuは乳房および卵巣腫瘍で正常組織より約200倍過剰発現される。それは腎細胞および肺癌でもまた同定されている。 (J.Exp.Med(1995年6月vol. 181,pg. 2109-2117)
NY-ESO-1	30%の乳房、前立腺および卵巣癌、肺癌、膀胱癌、頭頸部癌ならびに黒色腫で見出される癌精巢抗原。この抗原を発現する腫瘍を伴う癌を有する患者は、通常、それに対する循環抗体も同様に有する。 (J.Immunology(2000)vol. 165pg. 948-955)
CEA	癌胎児性抗原は上皮腫瘍(結腸、乳房、癌)で頻繁に発現される腫瘍関連抗原である。血清中のCEAレベルは疾患段階と相関する可能性があり、そして疾患の治療および再発をモニターするのに使用する。 (Human Immunology(1998) vol. 59 pg. 1-14)
MAGE-3	転移性黒色腫の障害および細胞系の70~80%で発現される癌精巢抗原。それは黒色腫関連もしくはMAGRタンパク質のファミリーのメンバーである。加えて、MAGE-3は20~60%の上皮腫瘍(結腸、乳房、肺、胃癌)で見出されている。 (Human Immunology(1998) vol. 59 pg. 1-14)
AES	アミ/enhancer of split タンパク質は、Enhancer of split遺伝子によりコードされる一組の転写リプレッサーの一部である。この腫瘍抗原は卵巣および乳房腫瘍の腫瘍関連リンパ球で固定された。 (Molecular Immunology(1998)35(17)pg. 1121-1133)
HTR	テロラーゼ(hTR)は、テロメアDNAの合成および伸長を触媒する特殊化した型の逆転写酵素(hTRTもしくはhTERT)である。この酵素の活性は、乳房、甲状腺、膀胱、子宮頸、前立腺、結腸、脾および胃の癌を包含する全部のヒト腫瘍の約90%で上昇されている。 (Cancer Research(2001年12月)61(23)pg. 8336-8370)

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】発明にかかる、抗原提示細胞もしくは標的細胞(この場合は腫瘍細胞)との細胞傷害性Tリンパ球としてもまた知られるCD8⁺細胞の間の相互作用のグラフィック描写である。

【図2(A-B)]発明にかかる、リンパ球に媒介される細胞増加症の機構の2図のグラフィック描写である。

【図3】発明にかかる、ヒト空クラスI分子を発現するショウジョウバエ(Drosop 50

h i l a) 細胞上に複数のペプチドを添加するのに使用することができるペプチド結合体を同定するための競争アッセイで数種の異なるペプチドを試験した実験の結果を示す。

【図4 (A - C)】発明にかかる、ショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞に単一のエピトープとして添加された場合の C T L を生じさせる能力について3種の黒色腫ペプチドを試験した実験の結果を示す。単一ドナーにおいて、単独ないし3種の異なるショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 調製物を添加された場合のペプチドのそれぞれに対して、C T L 活性が導き出された。応答の特異性を、高親和性結合体、対照 H B c ペプチドと比較した。

【図5 (A - C)】発明にかかる、4種までの異なるペプチドを単一のショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞に添加した実験の一連の結果を示す。表されたペプチドのそれぞれにおける C T L 活性が3週間の刺激プロトコル後にみられ、そしてこの図でグラフに描かれている。

【図6 (A - C)】発明にかかる、3種の異なる一次インビトロ刺激プロトコル後の C T L 活性を示す。

【図7 (A - B)】発明にかかる、標準的刺刺激プロトコル後の単一ペプチドエピトープに対する C T L 応答を導き出す、樹状細胞に対するショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞の能力を比較する。

【図8】発明にかかる、成熟もしくは未熟いずれかの表現型を表す樹状細胞が、細胞に適用するのに規定されたペプチドを使用した場合に特異的 C T L 応答の導出においてショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞ほど効率的でなかったことを示す。

【図9 (A - C)】発明にかかる、4種のペプチドを提示する3種の異なるインビトロ刺激プロトコルに対して単一ドナーにより生成された C T L 活性を示す。

【図10】発明にかかる、ショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞に組合せで添加された10種のペプチドに対し生成された C T L 活性を示す。

【図11】発明にかかる、ヒト H L A - A 2 . 1 クラス I 分子でトランスフェクトされたショウジョウバエ (D r o s o p h i l a) 細胞上での H E R - 2 ペプチド (8 2 6 、 8 3 5 、 8 6 1 および 8 6 3) のペプチド結合能力を示す。

【図12】発明にかかる、M A R T - 1 特異的エフェクター細胞に対する抗ペプチドおよび抗腫瘍応答を立証する。T 2 細胞には M A R T - 1 ペプチドもしくは陰性対照 (H B c) を添加した。M a l m e 3 M は黒色腫系統であり、M a l m e 3 は非腫瘍細胞系である。

【図13 (A - B)】発明にかかる、2例の異なるドナーからの H E R - 2 特異的 C D 8 エフェクター細胞の四量体染色を示す。

【図14】発明にかかる、ペプチドの添加された T 2 細胞で評価された H E R - 2 エフェクター細胞に対する抗ペプチド応答を示す。

【図15 (A - D)】発明にかかる、H L A - A 2 . 1 でトランスフェクトされた場合の卵巣腫瘍細胞系 (H T B - 7 7) の高められた殺傷を立証する。

【図16】発明にかかる、H L A - A 2 . 1 でトランスフェクトされた場合の乳癌細胞系 (H T B - 1 3 3) の高められた殺傷を示す。

【図17】発明にかかる、腫瘍細胞系 H T B - 7 7 / A 2 . 1 の溶解を立証するのに I F N 前処理が必要とされることを示す。

【図18 (A - B)】発明にかかる、H L A - A 2 および H E R - 2 の表面発現が、2種の細胞系 (H T B - 7 7 および H T B - 7 7 / A 2 . 1) での I F N 誘導により影響を及ぼされないことを立証するグラフである。

【図19】発明にかかる、どのタンパク質の m R N A レベルが I F N での誘導後に H T B - 7 7 / A 2 . 1 細胞中で上昇されるかを示すグラフである。

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<110> Moriarty, Ann
 Leturcq, Didier
 Degraw, Juli
 Heiskala, Marja
 Peterson, Per
 Jackson, Michael

10

<120> A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS

<130> ORT-1557

<160> 42

<170> PatentIn version 3.1

20

<210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val
 1 5

30

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val

1 5
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 3
 Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe Leu Leu
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 Ile Asp Thr Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
 1 5
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6

10

20

30

Ala Ala Gly Ile Gly Leu Thr Val
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val
1 5

10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

20

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu
1 5

30

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Val
 1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Leu Leu Val Val Asp Arg Glu Val
 1 5

10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly
 1 5 10

20

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val
 1 5

30

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val
1 5

10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val
1 5 10

20

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val
1 5

30

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gly Pro Leu Thr Pro Leu Pro Val
1 5

10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Thr Ala Pro Val His Asn Val
1 5

20

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

30

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val
1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

10

Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr
1 5 10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

20

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
1 5

30

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 27

Tyr Leu Glu Thr Phe Arg Glu Gln Val
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Val Leu Leu Lys Leu Arg Arg Pro Val
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 29

Gly Leu Gln Ser Pro Lys Ser Pro Leu
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Leu Tyr Ile Pro Ser Val Asp Leu
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 31

Lys Ala Leu Phe Ala Gly Pro Pro Val
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 32

Phe Met Trp Gly Asn Leu Thr Leu Ala
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 33

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 35

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 36

His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 37

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Ile
1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Val Ala Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val
1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 39

Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 40

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 41

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val
1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

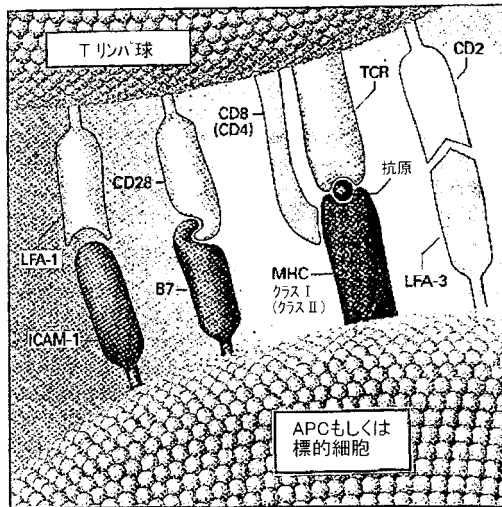
<400> 42

Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu Val
1 5

【 図 1 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

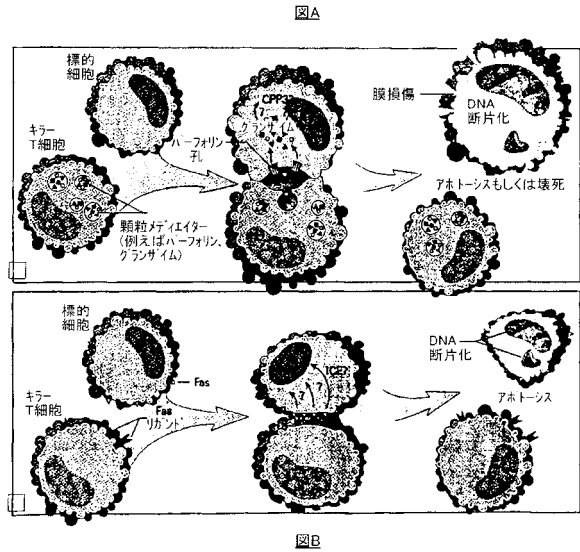
Figure 1



【 図 2 (A - B) 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

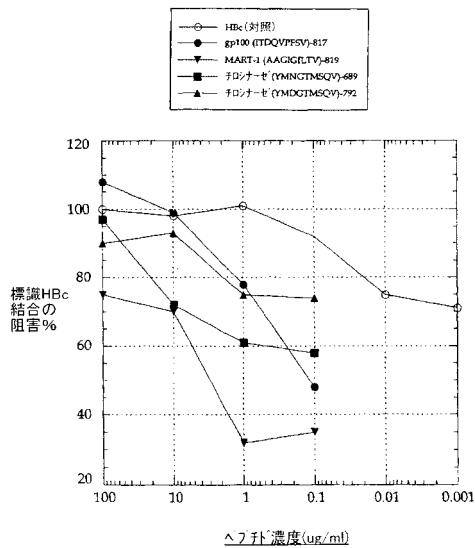
Figure 2



【 図 3 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

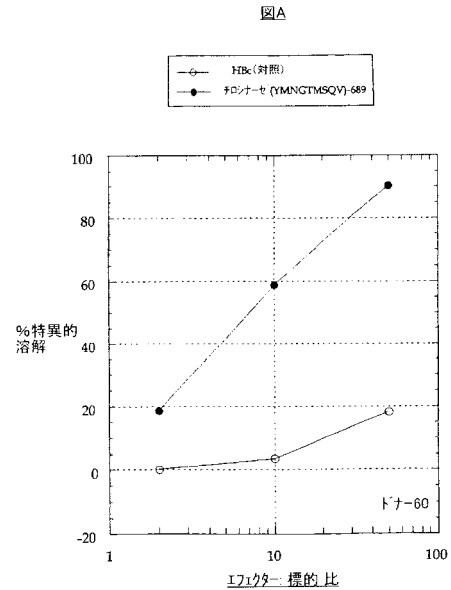
Figure 3



【 図 4 A 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

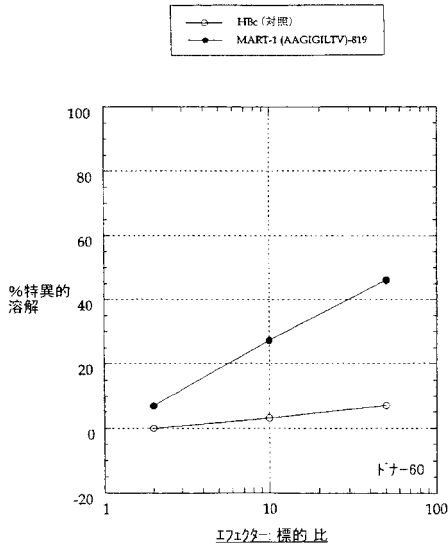
Figure 4



【 図 4 B 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

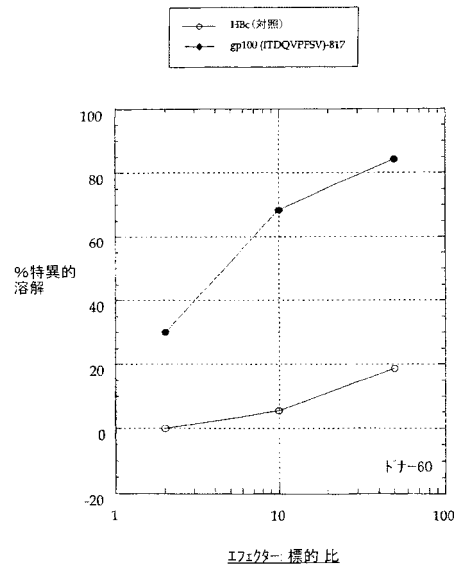
Figure 4
図B



【 図 4 C 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

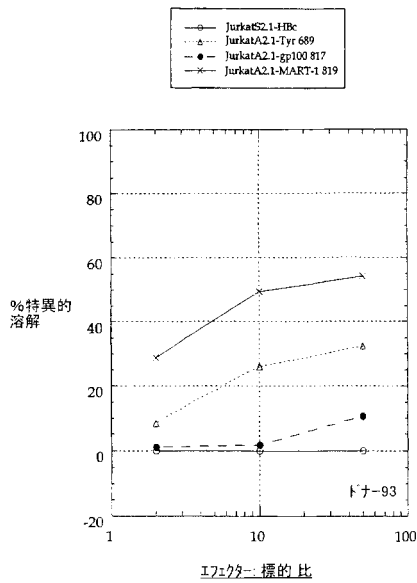
Figure 4
図C



【 図 5 A 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

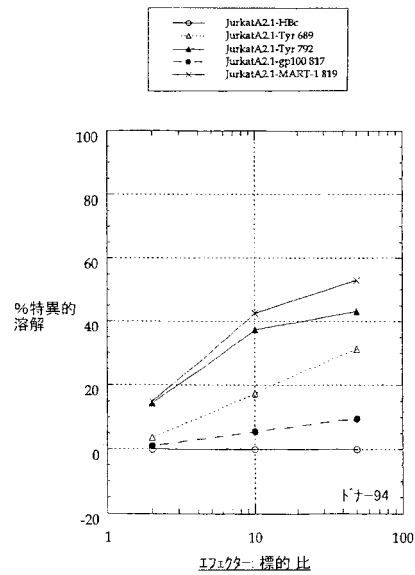
Figure 5
図A



【 図 5 B 】

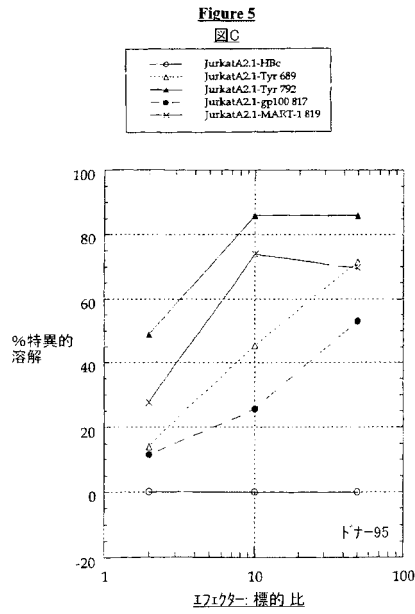
TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 5
図B



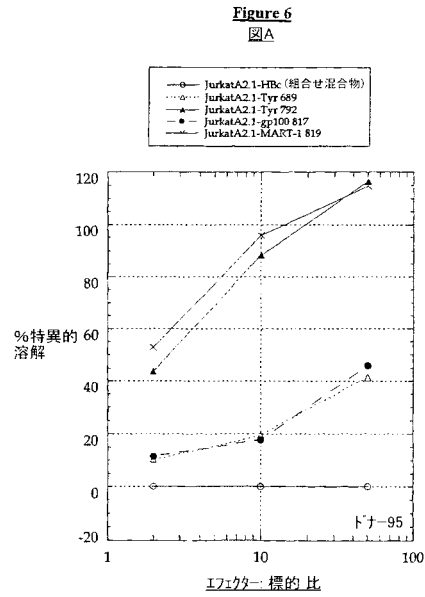
【 図 5 C 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT



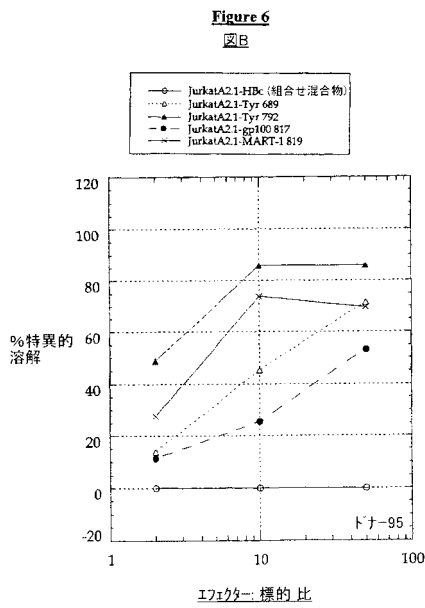
【 図 6 A 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT



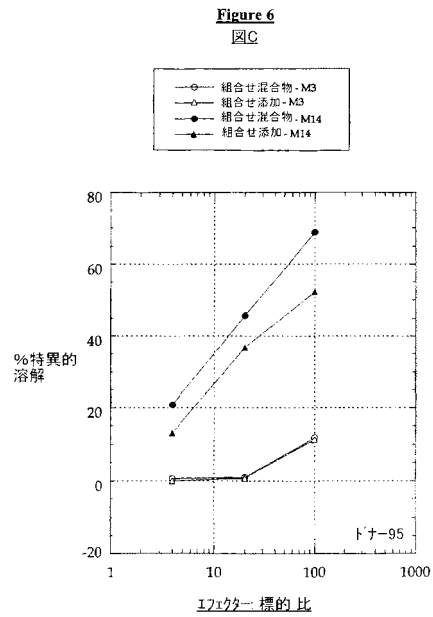
【 図 6 B 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT



【 図 6 C 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

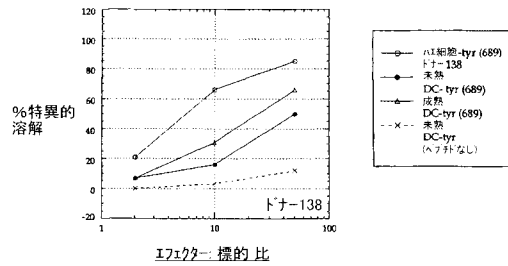


【 図 7 (A - B) 】

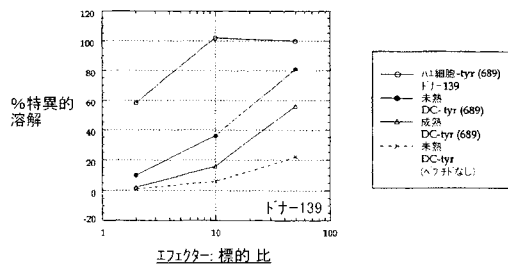
TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 7

図A



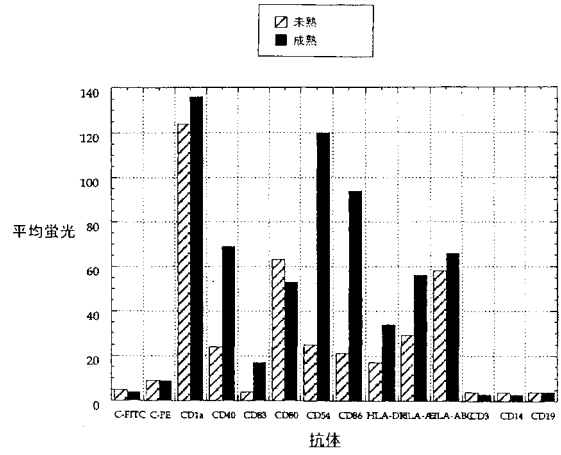
図B



【 図 8 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 8

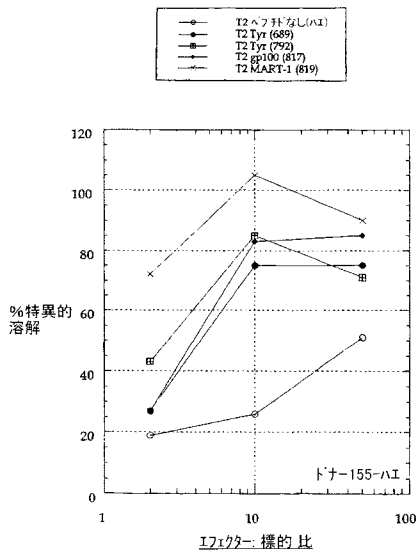


【 図 9 A 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 9

図A

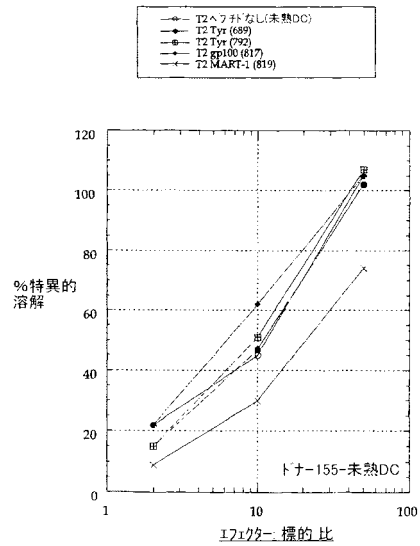


【 図 9 B 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 9

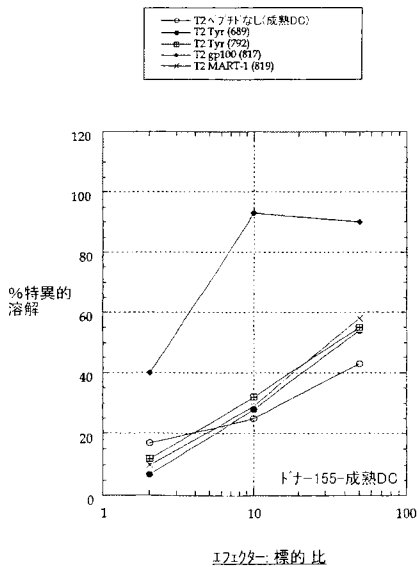
図B



【 図 9 C 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

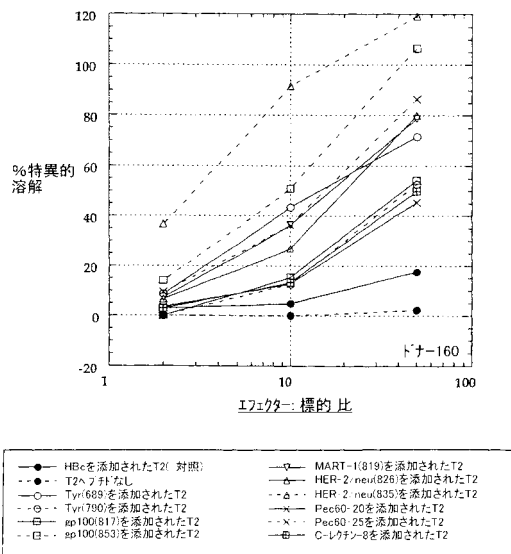
Figure 9
 図9C



【 図 1 0 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

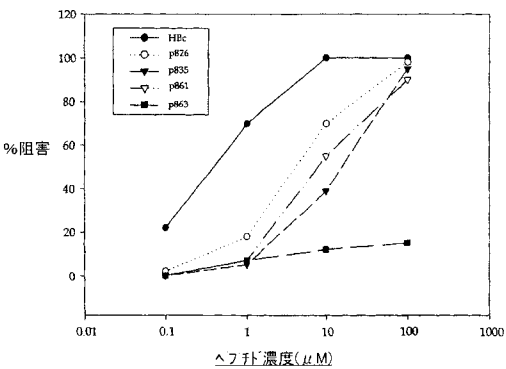
Figure 10



【 図 1 1 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

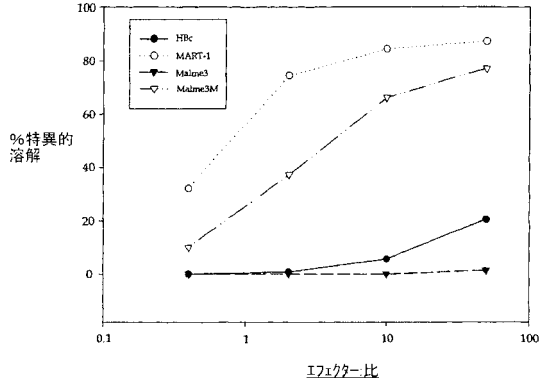
Figure 11



【 図 1 2 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

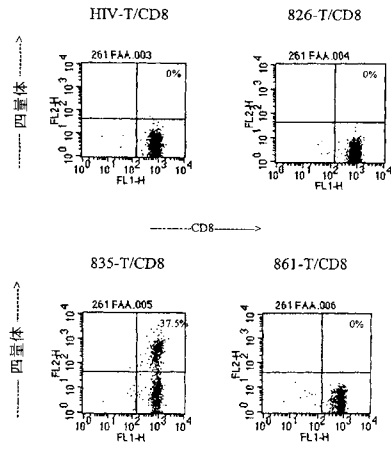
Figure 12



【 図 1 3 A 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

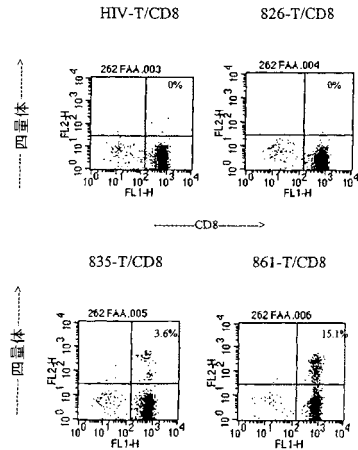
Figure 13 図A



【 図 1 3 B 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557

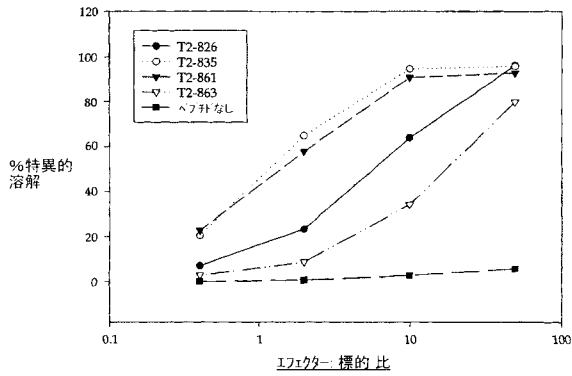
Figure 13 図B



【 図 1 4 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 14

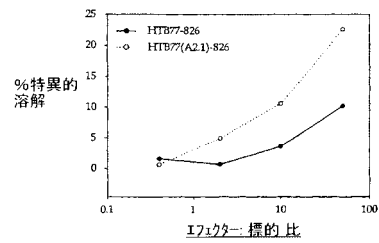


【 図 1 5 (A - B) 】

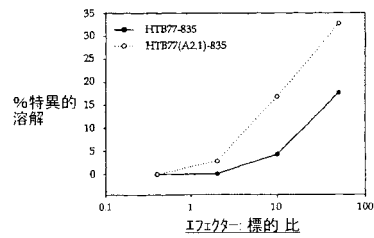
TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 15

図A



図B

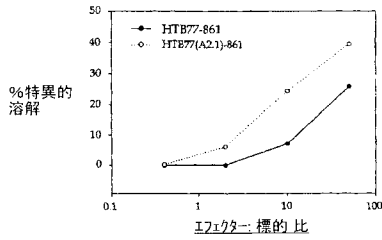


【 図 15 (C - D) 】

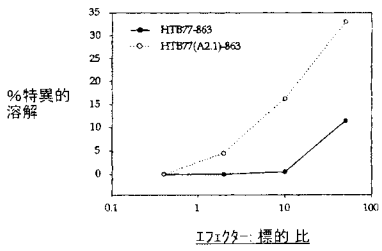
TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO: ORT-1557-PCT

図C

Figure 15



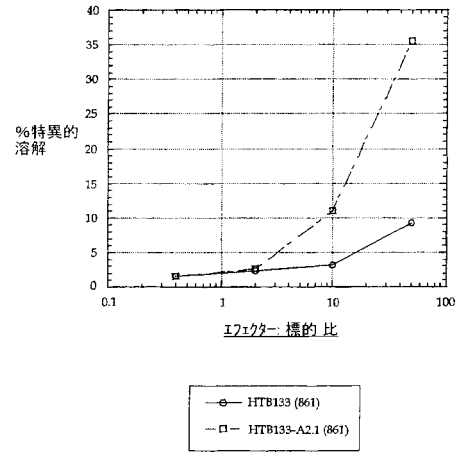
図D



【 図 16 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO: ORT-1557-PCT

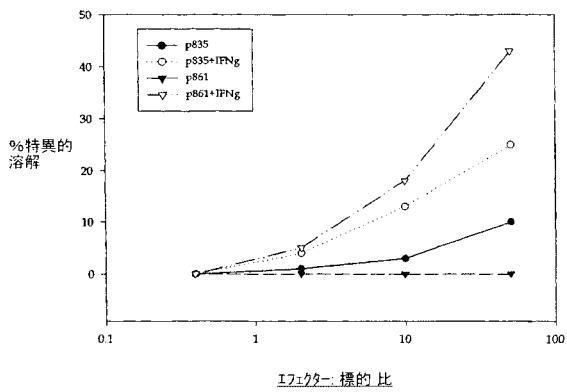
Figure 16



【 図 17 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO: ORT-1557-PCT

Figure 17

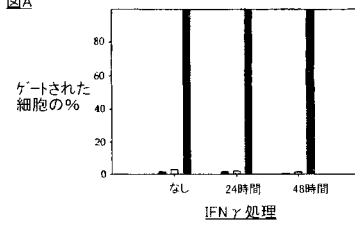


【 図 18 (A - B) 】

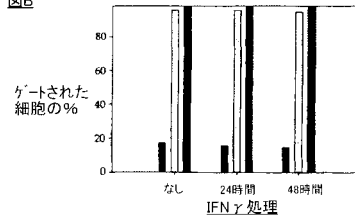
TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
 INVENTORS: MORIARTY, et al.
 APP NO: N/A
 ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
 DOCKET NO: ORT-1557-PCT

Figure 18

図A



図B

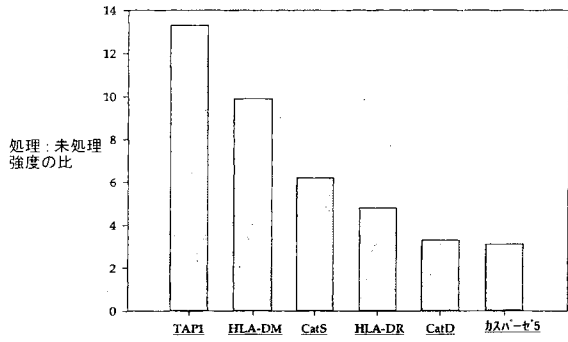


■ 二次Ab
 □ A2
 ▨ HER2

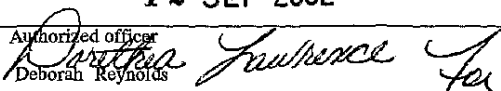
【 図 19 】

TITLE: A CELL THERAPY METHOD FOR THE TREATMENT OF TUMORS
INVENTORS: MORIARTY, et al.
APP NO: N/A
ATTY: John W. Wallen, III TELEPHONE: (858) 784-3239
DOCKET NO.: ORT-1557-PCT

Figure 19



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/05748
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 5/02, 5/06; A61K 48/00 US CL : 435/320.1, 325, 348; 424/93.1, 93.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/320.1, 325, 348; 424/93.1, 93.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LATOUCHE, J. et al. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. Nat. Biotech. April 2000, Vol. 18, pages 405-409, see entire document.	1-23
Y	SCHULTZE, J. L. et al. Antologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro. Blood. May 1997, Vol. 89, No. 10, pages 3806-3816, see entire document.	1-23
P,Y	GUELLY, C. et al. Activation requirements of circulating antigen-specific human CD8+ memory T cells probed with insect cell-based artificial antigen-presenting cells. Eur. J. Immunol. January 2002, Vol. 32, pages 182-192, see entire document.	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 23 July 2002 (23.07.2002)		Date of mailing of the international search report 12 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  Deborah Reynolds Telephone No. 703-308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/05748

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG:Medline, Embase, Cancerlit, Scisearch, Biosis; BRS/EAST-USpatfull, Epo, Jpo, Derwint
search terms: artificial antigen presenting cell, aapo, insect cells, drosophila, baculovirus

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54	
C 0 7 K 14/55 (2006.01)	C 0 7 K	14/55	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 モリアーティ, アン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 6 4 ポウエイ・ロマスベルデスドライブ 1 3 0 3 8

(72) 発明者 ルターク, デイディエ・ジエイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 0 9 サンディエゴ・ブイ 3 0 ・クラウンポイントドライブ 3 9 9 9

(72) 発明者 ジャクソン, マイケル・アール

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 4 デルマル・ピアフェリノ 1 2 7 2 8

(72) 発明者 ピーターソン, パー・エイ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 2 1 ベドミンスター・パインコート 1

(72) 発明者 ヘイスカラ, マージヤ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サンディエゴ・ピアニープ 1 2 7 8 2

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB10 AC14 BA30 BB23 CA24 CA44

4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA17 BA23 CA59 DA01 MA02

NA10 NA13 NA14 ZB261

4C087 AA01 AA02 AA03 BB21 BB34 BB63 CA04 CA21 DA16 MA02

NA10 NA13 NA14 ZB26

4H045 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 CA40 CA51 DA02 DA04 DA86

EA28 FA72