

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4592702号
(P4592702)

(45) 発行日 平成22年12月8日 (2010. 12. 8)

(24) 登録日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00

H

A 6 1 K 39/39 (2006. 01)

A 6 1 K 39/39

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 37/04 (2006. 01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 18 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-534095 (P2006-534095)
 (86) (22) 出願日 平成16年9月30日 (2004. 9. 30)
 (65) 公表番号 特表2007-507521 (P2007-507521A)
 (43) 公表日 平成19年3月29日 (2007. 3. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/032147
 (87) 国際公開番号 W02005/032475
 (87) 国際公開日 平成17年4月14日 (2005. 4. 14)
 審査請求日 平成18年10月26日 (2006. 10. 26)
 (31) 優先権主張番号 60/507, 175
 (32) 優先日 平成15年9月30日 (2003. 9. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/572, 543
 (32) 優先日 平成16年5月18日 (2004. 5. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506107221
 ラドウィック インスティテュート フォ
 ア キャンサー リサーチ
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101
 58 ニューヨーク サード ストリート
 605
 (73) 特許権者 500021413
 シーエスエル、リミテッド
 オーストラリア連邦ビクトリア州、パーク
 ビル、ポプラー、ロード、45
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NY-ESO-1 とアジュバントの *in vivo* 有効性

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号: 1 のアミノ酸配列を含む NY-ESO-1 タンパク質及びサポニン系アジュバントを含む、癌に罹患している患者の治療および癌の再発を防止するための免疫原性組成物であって、前記癌の細胞が前記 NY-ESO-1 を発現している、前記組成物。

【請求項 2】

サポニン系アジュバントが ISCOM である、請求項 1 または 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

筋肉内投薬形態である、請求項 1 または 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

皮内用剤形である、請求項 1 または 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

皮下用剤形である、請求項 1 または 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

癌に罹患している対象者において NY-ESO-1 に対する抗体応答を誘導するために十分な量で NY-ESO-1 タンパク質及びサポニン系アジュバントを含み、前記癌の細胞が NY-ESO-1 を発現している細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

タンパク質およびサポニンを CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞応答の両者を誘導するために十分な量で含む、請求項 6 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

等量のNY-ESO-1およびサポニン系アジュバントを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

10 μ g から 500 μ g のNY-ESO-1タンパク質を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか1項記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

100 μ g のNY-ESO-1タンパク質を含む、請求項 9 記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

癌の治療および再発防止用医薬の調製における、配列番号: 1 のアミノ酸配列を含むNY-ESO-1タンパク質およびサポニン系アジュバントを含む免疫原性組成物の使用であって、前記癌の細胞がNY-ESO-1を発現している、前記使用。 10

【請求項 12】

サポニン系アジュバントがISCOMである、請求項 11 記載の使用。

【請求項 13】

医薬が筋肉内投薬形態である、請求項 11 または 12 記載の使用。

【請求項 14】

医薬が皮下用剤形である、請求項 11 または 12 記載の使用。

【請求項 15】

医薬が皮下用剤形である、請求項 11 または 12 記載の使用。 20

【請求項 16】

医薬が等量のNY-ESO-1およびサポニン系アジュバントを含む、請求項 11 ~ 15 のいずれか1項記載の使用。

【請求項 17】

医薬が10 μ g から 500 μ g のNY-ESO-1タンパク質を含む、請求項 11 ~ 16 のいずれか1項記載の使用。

【請求項 18】

医薬が100 μ g のNY-ESO-1タンパク質を含む、請求項 17 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願：本出願は出願番号60/572,543（2004年5月18日出願）の部分継続出願であり、出願番号60/572,543は出願番号60/507,175（2003年9月30日出願）の部分継続出願である（両出願は引用によりその全体が本明細書に含まれる）。

本発明は癌の治療及び予防のために効果的な方法に関する。より具体的には、本発明は、癌に罹患しているか、又は癌に罹りやすい患者の治療及び予防に関する。癌は、NY-ESO-1と称される癌-精巢抗原の発現を特徴とする。本発明はまた、MHC-クラスII分子と結合する新規なCD4⁺T細胞エピトープに関する情報を提供する。

【背景技術】

【0002】

40

親出願さらにその親出願で報告された研究は以下の文献で公表されている：Marakovsky et al. Clin. Canc. Res., 10:2879-2890 (4/15/04)；Q. Chen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(25):9363-9368 (6/22/04)；及びDavis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(29):10697-10702 (7/20/04)。NY-ESO-1分子（本明細書では配列番号:1）（前記は例えば米国特許5,804,381号、6,274,145号、6,252,052号、及び6,525,177号に記載されている、前記文献は全て引用により本明細書に含まれる）は、潜在的な癌治療薬としていくつかの理由から興味深い。NY-ESO-1分子は、悪性疾患（メラノーマ、肝細胞癌、軟組織肉腫並びに肺、膀胱、頭頸部及び乳房の癌を含む）で広く発現される。例えば以下を参照されたい：Chen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:1914-1918 (1997)；及びJunghlut et al. Int. J. Canc., 92:856-860 (2001)（前記両文献は引用により本明細書に 50

含まれる)。更に、この抗原を発現する唯一の正常組織タイプは、RT-PCR及び免疫組織化学の両者によって実証されたとおり精巣組織である。これらの理由により、前記は“癌-精巣”抗原と称される。これらに関する概論として、Scanlanらの文献(Cancer Immunity, 4:1 (2004))を参照されたい(前記は引用により本明細書に含まれる)。

【0003】

悪性疾患においてNY-ESO-1を発現している癌罹患患者は、NY-ESO-1に対して自発性の液性並びに細胞性CD8⁺及びCD4⁺T細胞応答を生じることが示された(以下の文献を参照されたい: Stockert et al. J. Exp. Med., 187:1349-54(1998); Jager et al. J. Exp. Med., 187:265-270(1998); 及びJager et al. Int. J. Cancer, 84:506-510(1999))。さらにまた、多くの報告がHLAクラスI又はクラスII拘束ペプチドを特定しており、これらはNY-ESO-1に見いだされ、CD4⁺/CD8⁺T細胞エピートープを表すアミノ酸配列を有する(2つの上掲書(Jager)とともに下記の文献を参照されたい: Jager et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:12980-12203(2000); Gnjatich et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:10917-10922(2000); Jager et al. Cancer Immunity, 2:12-24(2002); Zeng et al. J. Immunol., 165:1153-1159(2000); Zarour et al. Cancer Res., 60:4946-4952(2000); Zarour et al. Cancer Res., 62:213-218(2002); Jager et al. J. Exp. Med., 191:625-630(2000); Zeng et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:3964-3969(2001); Gnjatich et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:8862-8867(2003); 及びWang et al. J. Immunol., 161:3598-3606(1998)) (前記全ての文献は引用によりその全体が本明細書に含まれる)。この分野の代表的な特許文献には前掲の特許とともに米国特許6,417,165号及び6,605,711号がある(前記文献は引用により本明細書に含まれる)。一般的には、これらCD4⁺及びCD8⁺エピートープの同定は、その者の癌によって発現された抗原に対して自発性免疫応答を生じた患者の調査からもたらされた。

【0004】

NY-ESO-1の自発性又は天然の免疫原性によってNY-ESO-1は癌ワクチンとして有望な候補物質となった。HLA-A2拘束NY-ESO-1ペプチドを種々のアジュバントと組み合わせて用いる臨床試験の結果、これらペプチドワクチンは安全であり、T細胞応答が合成ペプチドに対応して生じる得ることが示された(以下の文献を参照されたい: Jager et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:12198-12203(2000); 及びDavis et al. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 2774(2002))。これらの試験は、HLA-A2陽性患者に限定されることによる限界があるが、それにもかかわらず単一のHLA-A2拘束エピートープに対する応答でいくつかの臨床的利点を示した(上掲書(Jager et al.)を参照されたい)。

他方、完全長のNY-ESO-1タンパク質によるワクチン免疫は、より生理学的なワクチン組成物(すなわち免疫原性組成物)を提示することは議論の余地がなく、前記は、専門の“抗原提示細胞”又は“APC”による抗原の取り込み及びプロセッシング、並びに同族のヘルパー活性と併せてHLAクラスI及びIIによる抗原性ペプチドの交差提示を可能にする(以下を参照されたい: Ploegh, Science, 304:1262-1263(2004))。これは、抗体応答と同様に、NY-ESO-1配列内に含まれる多数のCD8⁺及びCD4⁺T細胞エピートープに対するより広い免疫応答を誘発する潜在能力を有する。このような事例では、HLA-A2陽性患者にワクチン免疫を限定する必要はなく、したがってNY-ESO-1を発現する腫瘍をもつ癌患者の全てにこのワクチンを適用することができる。

【0005】

タンパク質及びペプチドは、ワクチンとして使用するために製剤化されるとき、好ましくはアジュバントと組み合わされる。癌ワクチンで使用するために最適なアジュバントはまだ同定されていない。ISCOMとして知られているアジュバント(サポニン系アジュバントの1つでありQS-21及びその変種(ただしこれに限定されない)が含まれる)は、安全であり、十分な寛容性を有し、さらに動物とヒトで強力な抗体及びT細胞応答を誘導する能力をもつことが示された。ISCOMは、例えば米国特許6,352,697号及びPCT出願WO96/11711(両文献は引用により本明細書に含まれる)に記載されている。要約すれば、記載されているISCOMワクチンは、サポニン、ステロール及び抗原を含むワクチンであり、抗原はサ

ポニン：ステロール複合体に疎水性相互作用を介して結合している。ISCOMATRIXワクチンは同じ成分を含むが、抗原は疎水性相互作用で結合していない（さらに以下の文献を参照されたい：Barr et al. *Immunol. Cell Biol.*, 74:8-25(1996)；及びEnnis et al. *Virology*, 259:256-261(1999)）。これらの報告は癌ワクチンに特別に言及しているわけではないが、ISCOMについて報告された結果は、前記が癌のワクチン免疫に対して重要なアジュバントであることを示した。

前掲の親出願は、NY-ESO-1及びISCOMによるワクチン免疫が癌患者に対してどのように治療的有効性を提供したかを開示した。本明細書に記載したデータはこの研究を更に詳述するもので、以下で説明される。

【 0 0 0 6 】

腫瘍特異的CD8⁺T細胞は腫瘍の免疫的監視で重要な役割を果たすことは周知であるが、CD8⁺T細胞の活性化は一般にCD4⁺細胞の支援を必要とする（例えば以下を参照されたい：Cella et al. *J. Exp. Med.* 184:747-752(1996)；Wang et al. *Trends Immunol.*, 22:269-276(2001)）。これは一般的に腫瘍免疫及び自己免疫については正しく、さらに、例えば“クロス-プライミング”の場合の腫瘍特異的免疫のための重要な経路であろう（Yu et al. *J. Exp. Med.*, 197:989-995(2003)）。CD4⁺TからAPCによって受け入れられる同系の支援はこのメカニズムに必須であろう（Bennett et al. *J. Exp. Med.*, 186:65-70(1997)）。 “T支援”のメカニズムは最近ではより重点的な研究の中心であった。Tヘルパー細胞は、それらのCD40リガンド発現のアップレギュレーションを介してCD8⁺T細胞のプライミングを支援することができ、続いて前記は、専門のAPC、おそらくは樹状突起細胞（DC）で発現されるCD40分子と相互作用し、それら細胞に未感作CD8⁺T細胞をプライミングするための“ライセンス”（8）を与える（Bennett et al. *Nature*, 393:478-480(1998)；Schonberger et al. *Nature*, 393:480-483(1998)；Ridge et al. *Nature*, 393:474-478(1998)）。さらに、CD4⁺T細胞はまた、普遍的増殖因子（例えばIL-2（Fearon et al. *Cell*, 60:397-403(1990)を参照されたい）を提供することによりCD8⁺T細胞を支援し、CD8⁺T細胞の活性化及び増殖を促進することができる。さらに、CD4⁺T細胞はまた、DCにライセンスを与えた後非常に重要な役割を果たす。前記役割には直接的エフェクター機能、例えばIFN γ の分泌（Christensen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5135-5140(1999)；Marzo et al. *J. Immunol.*, 165:6047-6055(2000)）及び細胞障害性が含まれる。より最近では、CD4⁺T細胞はまた、CD8⁺T細胞が完全に活性化されるために（Gao et al. *Cancer Res.*, 62:6438-6441(2002)）、それらの機能性を維持するために（Cardin et al. *J. Exp. Med.* 184:863-871(1996)）、さらに効率的に拡張するためにメモリー応答が必要であることが示された（Janssen et al. *Nature*, 421:852-856(2002)）。遺伝子ノックアウト実験及びin vivo抗体仲介枯渇実験により、CD4⁺T細胞の必要性もまた、腫瘍（Marzo et al. 上掲書）及びいくつかのウイルス抗原（Matloubian et al. *J. Virol.*, 68:8056-8063(1994)）に対する全身性免疫応答で明らかにされた。マウスの免疫学的実験では、Tヘルパー決定基は免疫化にしばしば組み入れられ（Vitiello et al. *J. Immunol.*, 157:5555-5562(1996)）、CD8⁺T細胞の誘導が強化された。前記は今やより良好な抗ウイルス及び抗腫瘍治療法の一般的な考え方として推奨されている（Zajac et al. *Curr. Opin. Immunol.*, 10:444-449(1998)；Yu et al. *J. Clin. Invest.*, 110:289-294(2002)）。しかしながら、臨床試験の大半はこれまでのところ実際ので普遍的な方法を示すことができず、臨床結果は希望を持たせるというよりも失望させるものである。前記設計における潜在的欠陥の1つは、十分な強調がCD8⁺T細胞及びCD4⁺T細胞相互作用に与えられてなかったということかもしれない。有効なワクチンは、完全長の腫瘍抗原又は力強いCD4⁺の支援を取り込む抗原であろうということは極めて蓋然性が高い（Zeng et al. *Cancer Res.*, 62:3630-3635(2002)）。後者は、種々のMHCクラスI及びII分子の多型性要求を考慮に入れながら、同時に免疫系の引き金となる“危険”信号を提供する汎用ワクチンの設計により大きな挑戦を提供する（以下を参照されたい：Matzinger et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 12:991-1045(1994)）。

上掲書に記載されているように、抗NY-ESO-1抗体を生じる患者は通常検出可能なCD8⁺T

10

20

30

40

50

細胞応答を有することはしばしば観察されている (Jager et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4760-4764(2000); Zeng et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:3964-3969(2001))。より最近では、この観察はCD4⁺T細胞にも拡大されている (Gnjatic et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:8862-8867(2003))。

【発明の開示】

【0007】

本発明ではNY-ESO-1抗原及びサポニンを含む新規なワクチン製剤が提供され、さらにNY-ESO-1ワクチンで免疫された患者から新規なCD4⁺T細胞決定基が同定され、この性状が決定される。

1990年代の初めに最初のヒト腫瘍CD8⁺T細胞決定基が同定されて以来、150を超えるCD8⁺T細胞決定基及び数ダースのCD4⁺決定基の性状が明らかにされた (総説として以下を参照されたい: Renkuist et al. Cancer Immunol. Immunother., 50:3-15(2001); Davis et al., J. Leukoc. Biol., 73:3-29(2003))。CD8⁺T細胞決定基の中で、大半は腫瘍細胞又は腫瘍由来細胞株によって提示されている。特定された最小限度のCD8⁺T細胞決定基の多くがペプチド系ワクチンの抗原として世界中で用いられている (Yu et al. 上掲書; Davis et al. 上掲書; Jager et al. Curr. Opin. Immunol., 14:178-182(2002))。

したがって、本明細書で示される本発明の特徴にはNY-ESO-1及びサポニンの免疫原性組成物が含まれる (良好な寛容性を有し、高度に免疫原性であり、さらにそれを投与された患者で液性免疫応答 (Ab) 及びT細胞 (CD4⁺及びCD8⁺T細胞の両者) 免疫応答を誘発する)。前記免疫原性組成物を投与された患者は、偽薬 (プラセボ) 又はNY-ESO-1タンパク質のみを投与された患者の臨床結果と比較して優れた結果を示した。

【0008】

実施例 1 .

本実施例では、上述の製剤を試験するために用いたin vivo実験が記載される。簡単に記せば、それは、二重盲検、偽薬照合、用量増加フェーズI臨床試験である。

適格患者は、免疫組織化学的に又はRT-PCRによって判定したとき以前にNY-ESO-1を発現する癌を示した者と規定した。患者は残留症状が最小限で (すなわち症状は検出不能、又は小容積、末梢 (locoregional) 症状のみ)、5年以内の再発リスクは少なくとも25%であった。さらにまた、患者は他の有効な利用可能な、又は適切な治療法を受けておらず、予想される余命は少なくとも3ヶ月あり、免疫不全若しくは免疫抑制療法を受けていないことが必要であった。

5種類の用量レベルを用いた: 用量レベルAは12 µgのISCOM中に10 µgのNY-ESO-1タンパク質 (3患者); 用量レベルBは36 µgのISCOM中に36 µgのタンパク質 (3患者); 用量レベルCは120 µgのISCOM中に100 µgのタンパク質 (16患者、HLA-A2陽性及び陰性患者間で均等に分割) 及び用量レベルDはISCOM無しで100 µgのNY-ESO-1 (16患者、HLA-A2陽性及び陰性患者間で均等に分割)。任意抽出を用量レベルC及びDで実施し、それによって各群で4人のさらに追加の患者 (HLA-A2陽性及び陰性患者間で均等に分割) は偽薬として滅菌食塩水を投与されるようにした。

投与試験は、4週間 (28日) 間隔で3回の筋肉内注射の他にDTH試験のための2回の皮内注射 (1 µg) から成っていた。

【0009】

実施例 2 .

試験の基準日及び84日目に患者をDTH反応について調べた。1 µgのNY-ESO-1タンパク質の注射後2日して (すなわちDay2及びDay86)、硬結及び発赤を測定した。これらの測定はワクチン接種の前後に実施した。既存反応性は、少なくとも6mmという基準値硬結と規定した。ワクチン接種の陽性反応は、2回目の読みが少なくとも6mmで基準値硬結の2倍であるものと規定した。

ワクチンを投与された患者は、特にレベルCの用量を投与されとき、一般的にDTH反応を生じた。いくつかの顕著なDTH反応が観察された。これらの反応は発赤及び硬結を特徴とした。生検材料の反応は皮膚のリンパ球様細胞浸潤 (主としてCD4⁺T細胞からなり、CD8⁺T

10

20

30

40

50

細胞の小集団を含む)を示した。CD8⁺T及びCD4⁺T細胞の特異性はこれらのDTH陽性患者の1人で判定した。単離した浸潤リンパ球を、完全なNY-ESO-1アミノ酸配列をカバーする一式のオーバーラップする18merの認識について試験した。NY-ESO-1ペプチドの認識は、T. Jungら(J. Immunol. Methods, 159:197-207(1993)、前記文献は引用により本明細書に含まれる)が記載した細胞内IFN γ 染色アッセイを用いて確認した。NY-ESO-1/ISCOM免疫原性組成物は、NY-ESO-1タンパク質と比較して、以下のようにDTH反応の強化を示した: レベルDの用量(すなわちISCOMアジュバントを含まないNY-ESO-1タンパク質)を投与された患者では1/16であるのに比較して、レベルCの用量の免疫原性組成物を投与された患者では1/16が増強されたDTH反応を示した。

レベルAの用量では、1人の患者が既存のDTH反応を示し、これは予想通りワクチン接種後も変化しなかった(Jager et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:12198(2000)、上記参照)。さらにもう1人の患者が陽性反応を示した。レベルBの用量の患者は全て既存の反応を有し、これら患者もまた、予想通り投与後に変化を示さなかった。これらの結果は全て図1に示されている。

合計46人の患者のうち、9人が既存のDTH反応を有していた。偽薬群の8人に関しては、1人が既存の反応性を有し、2番目の患者は2回目のDTH注射後に9mmの硬結及び30mmの発赤を生じた。これら患者は両名ともHLA-A2陰性で、上掲書で考察したように抗体応答は生じなかった。

【0010】

実施例3.

対象者はまた、彼らがNY-ESO-1に対する抗体応答を生じたか否かを決定するために試験した。アッセイは、Stockertら(J. Exp. Med. 187:1349(1998))が開示したように標準的なELISAで実施した。簡単に記せば、捕捉抗原はワクチンの製造に使用したのと同じ精製NY-ESO-1タンパク質とした。検出抗体は、セイヨウワサビベルオキシダーゼ標識アフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgGとした。アッセイは、ワクチン接種前並びにDay14、42、70及び86の5箇所の時点で実施した。

5000を超える処置前力価を有する患者は既存反応を有するものとみなし、一方、5000未満の処置前力価を有する患者でワクチン接種後の任意の時点で5000を越える液性力価を生じた者はNY-ESO-1に対し陽性抗体応答を有するとみなした。

全部で3人の患者が5000を超える既存抗体力価を有し、これはワクチン接種プロトコル中に顕著に変化しなかった。NY-ESO-1タンパク質及びISCOMアジュバントの免疫原性組成物(すなわち用量B又はC)を投与された全ての患者は陽性応答を生じ、一方、アジュバントを含まないNY-ESO-1タンパク質(用量D)を投与された患者の4/16が前記のような応答を生じた。これら4人の応答は一般的には、NY-ESO-1タンパク質及びアジュバントの免疫原性組成物を投与された患者の力価よりもはるかに低い力価応答であり、この応答における免疫原性組成物の重要性が示された。ウェスタンブロットアッセイは、患者血清がNY-ESO-1を認識できるということの更なる確認を提供した。

偽薬患者はいずれもこの試験中に抗体応答を生じなかった。図2はこれらの結果の要旨である。

更に別の分析で、一連のELISA実験をワクチン接種患者の選択サンプルで実施した。この実験では、標準的な哺乳動物細胞株(すなわちCHO細胞株)で生成したNY-ESO-1タンパク質を用い、大腸菌(E. coli)で製造したNY-ESO-1を用いて実施したELISAと比較した。図3に見られるように、一致した結果が両方の組換えNY-ESO-1タンパク質で用いて得られた。

【0011】

実施例4.

これらの実験は、この試験における患者のT細胞応答を測定するために設計した。

最初のT細胞アッセイはHLA-A2⁺の患者に限定した。使用した方法は、文献記載の方法(Jung et al. J. Immunol. Meth., 159:197-207(1993)、前記文献は引用により本明細書に含まれる)を改変した、フローサイトメトリーアッセイ又は細胞内サイトカイン染色(“

ICS”) アッセイである。この方法は、T細胞の細胞内インターフェロンガンマ発現をHLA-ペプチドテトラマー結合と共に測定するために設計された。

簡単に記せば、 5×10^6 の末梢血単核細胞を標準的な方法を用いてHLA-A2陽性患者から採取した。これらの細胞を続いて、米国特許6,525,177号(前記文献は引用により本明細書に含まれる)の配列番号:8で示されるNY-ESO-1タンパク質のアミノ酸157 - 163から成るペプチドでパルスした。ペプチドパルスは、 $250 \mu\text{M}$ の2-カルボキシエチルホスフィンヒドロクロリド(“TCEP”)の存在下で30分、室温で $0.1 \mu\text{M}$ のペプチドを用いて実施した。続いて細胞を洗浄し、24ウェルプレートで10%ウシ胎児血清及び10IU/mLのIL-2を含む2mLのRPMI中で培養した。

細胞を培養7日後に採集し、細胞内ガンマインターフェロン発現についてアッセイし、同じペプチドを用いてパルスしたT2細胞と比較した。

HLA-A2患者については、テトラマーHLA-A2/NY-ESO-1ペプチド157-163複合体(下記文献(Jager et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4760-4765(2000)にしたがって調製)の結合により、NY-ESO-1 157 - 163ペプチドに特異的なCD8⁺T細胞を検出した。

5人の患者が陽性CD8⁺T細胞応答を示した。これら患者のうちで、1人の患者が、用量“ A ”、3人が用量“ C ”、1人が用量“ D ”、すなわちISCOMと10 μg のタンパク質、ISCOMと100 μg のNY-ESO-1タンパク質の免疫原性組成物、及び100 μg のNY-ESO-1単独を投与された。用量Aを投与された患者は既存の抗体応答を示し、用量Cを投与された患者の1人も同様であった。第二番目の用量Cを投与された患者は既存のDTH反応を有していた。NY-ESO-1 157 - 163番ペプチドに対するNY-ESO-1特異的T細胞応答の検出は、ICS及びテトラマー染色アッセイの両方で一致した。

【 0 0 1 2 】

実施例 5 .

これらの実験は、単一のCD8⁺T細胞ペプチド抗原に対するNY-ESO-1 T細胞応答を測定する実施例4の実験のフォローアップのために設計した。特に、これらは、NY-ESO-1のMHC-クラスI及びIIエピトープの両エピトープに対してより広範囲のCD8⁺及びCD4⁺T細胞応答がNY-ESO-1/ISCOM免疫原性組成物によって誘導されたか否かを決定するために設計した。

上記実施例4に記載した方法を用いたが、ただしT2細胞およびTCEPを除いた。自家末梢血単核細胞(“PBMC”)をT2細胞の代わりに用いた。標準的方法を用いて、一連のオーバーラップするNY-ESO-1ペプチドを合成した。これらは2つの群に分類された:6アミノ酸ずつオーバーラップする18mer、前記は刺激ペプチド抗原として用いた;2アミノ酸ずつオーバーラップする13merは特異性アッセイで標的細胞をパルスするために用いた。各々の18merペプチドで自己由来のPBMCをパルスし、in vitroでCD4⁺細胞を刺激し、上記に記載したように13merペプチドを用いてCD8⁺T細胞を特異性について測定した。

1人の代表的な患者の結果は図4及び5に示されている。前記は13merに対するNY-ESO-1のT細胞認識を示す。図4はCD8⁺T細胞についての結果を、図5はCD4⁺細胞についての結果を示す。NY-ESO-1 13merに対するアミノ酸残基番号はX軸により表されている。刺激に用いた18merに関しては、これらは、下記のように、NY-ESO-1(配列番号:1)の完全な配列のアミノ酸番号に対応する文字でY軸に示されている:

10

20

30

文字 (図1及び2)	アミノ酸
a	13-30
b	19-36
c	43-60
d	49-66
e	67-84
f	79-86
g	85-102
h	91-108
i	97-114
j	121-138
k	127-144
l	133-150
m	151-168
n	157-174
o	157-170

10

図5では、同じアミノ酸残基に対応する文字は、“aa”を除いて新しく、NY-ESO-1アミノ酸の37 - 54に対応する。新規なエピトープは星印が付されている。

ペプチドのより完全な表は以下のとおりである：

20

CD8 ⁺ T細胞エピトープ：		
アミノ酸	ペプチド	注釈
21-33	PGIPDGPGGNAGG	新規
17-29	GPGGPGIPDGP GG	新規
69-81	ASGLNGCCRCGAR	新規
79-91	GARGPESRLLEFY	新規
127-139	TVSGNILTIRLTA	新規
129-141	SGNILTIRLTAAD	新規
151-163	SCLQQLSLLMWIT	155-163HLA-A2エピトープを含む
157-165	SLLMWITQC	HLA-A2エピトープ
157-169	SLLMWITQCFLPV	既知のHLA-A2エピトープを含む (157-165; 157-167; 159-162)

30

【 0 0 1 3 】

CD4 ⁺ T細胞エピトープ：		
アミノ酸	ペプチド	注釈
39-51	ATGGRGPRGAGAA	新規
85-97	SRLLEFY LAMPFA	新規
89-101	EFY LAMPFATPME	新規
123-135	LKEFTVSGNILTI	新規
157-169	SLLMWITQCFLPV	新規 ^a
157-170	SLLMWITQCFLPVL	HLA-DP4エピトープ ^a
161-173	WITQCFLPVFLAQ	新規

40

^a HLA-DP4 157-170エピトープからアミノ酸が1つ欠如 (Zeng et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:3964-3969(2001))

50

【 0 0 1 4 】

ただ1人の代表的患者から得られた結果は、免疫原性組成物を投与されたワクチン接種患者の末梢血には広範囲のNY-ESO-1に特異的な循環CD4⁺及びCD8⁺T細胞が存在するという明瞭な証拠を示している。これらの細胞は、多数のNY-ESO-1エピトープ（これまでに知られているもの知られていないものの両エピトープ）について特異的である。

さらにまた別のフォローアップ実験では、用量C（すなわちNY-ESO-1タンパク質 + ISCOM アジュバントという免疫原性組成物）を投与された6人の患者から採取したサンプルを同じ方法で分析した：すなわち、T細胞サンプルを上記で述べたように18mer/13merNY-ESO-1ペプチドでマッピングした。

図6は、さらに別の患者のこのT細胞認識分析の結果を示している。CD4⁺T細胞エピトープは明色枠の中にあり、CD8⁺T細胞エピトープは暗色枠の中にある。図の一番上のアミノ酸配列は、本出願を通して用いたNY-ESO-1のアミノ酸配列である。以前に明らかにされたNY-ESO-1エピトープは、上掲書とともに、Gnjaticらの文献（Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 100:8862-8887(2003)、前記文献は引用により本明細書に含まれる）でも見出すことができる。

これらの検出されたT細胞応答の多くは本ワクチンによって誘導されたものである。なぜならば前記患者はいずれもNY-ESO-1に対し既存の免疫応答を有していなかったからである。これらエピトープのいくつかに対して自発性又は自然に誘発された応答は癌患者で以前に記載された。以下を参照されたい：Gnjatic et al. 上掲書；Jager et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4760-4765(2000)；及びZeng et al. Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 98:3964(2001)。前記文献は、NY-ESO-1/ISCOM免疫原性組成物は、天然のプロセッシングされたエピトープに対しT細胞応答を誘導することを指摘している。これらの結果はまた、本ワクチンは、CD8⁺及びCD4⁺T細胞の両細胞について新規なペプチドエピトープに対するT細胞応答を誘導することを示した。

【 0 0 1 5 】

実施例 6 .

42人のメラノーマ患者で3ヶ月処置のワクチンスケジュールを完了させた。合計13人の患者に用量Cの免疫原性組成物（NY-ESO-1及びISCOM）を投与した。これらの患者のうちで、ただ1人が283-1000日の範囲の追跡調査で中間点の709日で再発した。上記で考察したようにこれらのワクチン接種患者ではまた免疫原性組成物によりNY-ESO-1に対しAb及びT細胞の免疫学的応答が誘導された。対照的に、用量D（NY-ESO-1タンパク質のみ）を投与された患者では、6/16の患者が実際に再発し、偽薬を投与された患者では5/7が再発した。これらの患者は全体的にNY-ESO-1に対する免疫応答は低かった。748日の中間点の追跡調査後、偽薬を投与された患者の5/7及び用量D（NY-ESO-1タンパク質のみ）を投与された患者の6/16が再発した。合計19人がNY-ESO-1/ISCOMアジュバントの免疫原性組成物（用量A、B及びC）を投与され、2/19のみが再発した。

NY-ESO-1/ISCOM免疫原性組成物を投与された患者の全員と偽薬投与患者との比較によって、図7に示したように再発の時間に有意な相違が示された（ $p = 0.02$ ）。補助変数について調節した後、調査開始時の病期、原発病巣の厚さ、年齢、診断後の期間、調査開始時に想定された再発リスク、調査開始前の再発回数及び最後の摘除からの期間に関して集団間に有意な相違は存在しなかった。

この最初の分析から1年後、NY-ESO-1/ISCOM免疫原性組成物を投与された患者群で5/19の再発があった。NY-ESO-1タンパク質のみを投与された群では更にもう1例の再発（すなわち7/16）があった。偽薬群は1年前と同じで5/7が再発した。

【 0 0 1 6 】

実施例 7 .

この実施例では、更に別のCD4⁺T細胞決定基を追跡する実験とともにそれらの使用について述べる。第一段階として、下記で説明するようにin vitro刺激アッセイを実施するために、自家単球から誘導された樹状突起細胞（MoDC）を入手した。MoDCを使用したのは、それらの外因性抗原の取込能力及びそれら抗原をCD8⁺及びCD4⁺T細胞に提示する能力のた

10

20

30

40

50

めである。MoDCを作製するために、Luftらの方法（J. Immunol. 167:2529-2537(2001)、前記文献は引用により本明細書に含まれる）を用いた。簡単に記せば、CD14⁺細胞を抗CD4結合MACビーズを用いてサンプルから単離し、続いてGM-CSF（20ng/mL）及びIL-4（500U/mL）含有培養液で7-8日培養した。これによって、未成熟MoDCが得られた。前記細胞は限られた量のCD80及びCD83を発現した。

続いてこのMoDCに上記に記載したワクチンの10-20 µg/mLを37℃で2時間装荷させた。続いて細胞をTNF α（20ng/mL）、INF α（1000U/mL）及びプロスタグランジンE2（TNP）（1 µM）と接触させ、37℃でさらに2時間インキュベートした。TNPによる処置はMoDCを成熟させた（すなわちMoDCは高レベルのCD80及びCD83を発現した）。さらにまた、それらはより高レベルのCD86及びHLA-DRを発現した。

10

【0017】

実施例8.

続いて前出実施例に記載した成熟MoDCを用いて、アミノ酸157-165から成るNY-ESO-1ペプチドに特異的なCD8⁺T細胞を生成した。

これを実施するために、自家CD14-PBMC（すなわち前記CD14⁺細胞と同じ患者から採取された細胞）を、IL-2（10U/mL）の存在下でワクチンを装荷させておいたMoDCと一緒にした（DC：PBMC比は1：10）。前記培養に新しい培養液を2-3日毎に補給し、細胞密度に応じて分割した。10-13日後に細胞を採集し、18mer及び13 NY-ESO-1ペプチドに対してスクリーニングした。CD8⁺T細胞の測定として、IFN γ の産生を測定した。

この結果は、これらの細胞（すなわちMoDC）は実際にT細胞の増殖を刺激することができを示した。

20

【0018】

実施例9.

次に、NY-ESO-1に対するCD4⁺及びCD8⁺T細胞応答を調べた。特に、上記で述べた未成熟MoDCに上記に記載したようにワクチンを装荷した。続いて、このMoDCを上記で述べたようにTNPで成熟させ、同じ患者に由来する融解したCD14-PBMCと約10から15日間上記で述べたように同時培養し、T細胞を生成した。得られたT細胞を1組の18merNY-ESO-1ペプチド（NY-ESO-1の全配列をカバーする）を用いてスクリーニングした。このNY-ESO-1ペプチドは12アミノ酸ずつ互いにオーバーラップしていた。

このスクリーニングは、エプスタイン-バーウイルスで形質転換した自家Bリンパ球細胞株（BLCL）を抗原提示細胞（“APC”）として用いて実施した。これら細胞株は、MoDC及びPBMCを入手した患者から樹立させた。Jungら（J. Immunol. Methods, 159:197-207(1993)、前記文献は引用により本明細書に含まれる）の細胞内サイトカイン染色法（ICS）を用いた。簡単に記せば、Shermanら（J. Exp. Med., 175:1221-1226(1992)、前記文献は引用により本明細書に含まれる）が記載したように、10%のウシ胎児血清の存在下で37℃で2時間、BLCLを1 µM濃度のペプチドでパルスし、血清中プロセッシング及び潜在的抗原取り込みを可能にした。続いて、培養バルクT細胞及びブレフェルジン（Brefeldin）A（BFA、10 µg/mL）を、さらに4時間添加してから細胞を採集し、PBS中の抗CD4-PE又は抗CD8-サイクロームによって染色した。続いて細胞を洗浄し、PBS中の1%パラホルムアルデヒドで固定した。さらに0.2%のサポニンの存在下で細胞を抗INF γ で染色した。100,000細胞のサンプルを分析した。

30

培養はわずかに約6%のCD8⁺T細胞を含んでいた。これらの細胞は明瞭に識別可能な抗原特異的CD8⁺T細胞であったが、より大量のCD4⁺T細胞拡張の結果としてさらに希釈されていた。

40

【0019】

実施例10.

実施例9に記載した実験から得られた顕著なCD4⁺T細胞の拡張故に、以下の実験ではCD4⁺T細胞の研究に力を注いだ。

自家BLCLをAPCとして用いて、上記に記載したように刺激した抗原特異的CD4⁺T細胞を1組の18merNY-ESO-1ペプチド（上記のようにNY-ESO-1配列の全体をカバーする）に対して

50

上記で述べたように調べた。これらのペプチドをFCSの存在下で室温で60分BLCLとともにインキュベートした。続いて、採集及び標準的ICSの前に、さらに4時間、CD4⁺T細胞及びBFAを上述のように添加した。

結果は、最強のCD4⁺応答は、アミノ酸85-102番及び157-174番から成るNY-ESO-1ペプチドでパルスされたBLCLからもたらされることを示した。

1組の18merを用いて得られた結果に続いて、同じCD4⁺T細胞培養を上記と同じ方法を用いて、1組の13merNY-ESO-1ペプチド（NY-ESO-1配列全体をカバーし、被検ペプチドは11アミノ酸のオーバーラップを有している）に対してスクリーニングした。この追加のスクリーニングは、提示ペプチドのコア配列について独立したより正確な判定を得るために実施した。

結果は、最強の応答は、NY-ESO-1のアミノ酸85-97番及び157-169番から成るペプチドに対するものであることを示した。

【 0 0 2 0 】

実施例 1 1 .

最強の応答を誘導するCD4⁺T細胞決定基が実施例10で検出されたので、HLA拘束、すなわちどのHLAがこれらCD4⁺T細胞決定基を提示するかについての研究に力を注いだ。

HLA拘束は、上記で述べたように自家BLCLを用い、それらをNY-ESO-1のアミノ酸85-102番又は157-174番から成る1 μ Mのペプチドで37 $^{\circ}$ Cで1時間パルスすることによって決定した。続いて細胞を洗浄し、20 μ Lの抗HLAクラスII抗体上清をさらに1時間添加した。続いて、上記の実施例9及び10で用いたCD4⁺T細胞及びBFAをさらに4時間添加し、標準的方法によって採集した。活性化T細胞のIFN γ の産生を上記に記載した標準的ICSアッセイで測定した。

これらのブロッキングアッセイでは、抗DR抗体は、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドに対するT細胞応答を効率的に阻止し、一方、抗DP抗体は、NY-ESO-1のアミノ酸157-174番から成るペプチドに対するT細胞応答を阻止した。

NY-ESO-1のアミノ酸157-169番から成るペプチドは、以前に同定されたHLA-DPAによって拘束されるCD4⁺細胞決定基である。この患者はDP4陽性であるので、NY-ESO-1のアミノ酸157-169番から成るペプチドに対する強い応答は以前に同定されたCD4⁺細胞決定基であることを裏付けるが、しかしながら、T細胞がNY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドを認識するという事実（すなわち、アミノ酸85-102番から成るペプチドがDR拘束CD4⁺細胞によって認識されるという事実）は新規な発見である。

【 0 0 2 1 】

実施例 1 2 .

拘束DR分子をさらに同定するために、前記患者と同一のホモ接合HLA-DR対立遺伝子座（DR1⁺9080;DR2⁺T242）を発現している、エプスタイン-バーウイルスで形質転換したBリンパ球細胞株（BLCL）を入手した。さらにまた、ホモ接合HLA-DR対立遺伝子座（DR6⁺/DR7⁺:T282）を発現するが、HLA-DR1⁺及びHLA-DR2⁺対立遺伝子座がないBLCLを、自己由来のヘテロ接合HLA-DR対立遺伝子座（DR1⁺/DR2⁺）を発現するLCL（？）とともに用いた。実施例1に記載したMoDCで初めに刺激したバルクT細胞をNY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドでさらに刺激し、このペプチドでパルスした種々のAPC（すなわちDR2についてホモ接合のAPC、DR1⁺についてホモ接合のAPC、DR1⁺/DR2⁺についてヘテロ接合の自己由来APC、及びHLA-DRをもつがDR1⁺又はDR2⁺のないAPC）に対して試験した。

結果は、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドに特異的なT細胞のもっとも強い応答は、自己由来のヘテロ接合LCL（DR1⁺/DR2⁺）に対するT細胞の応答から生じた。この結果はまた、これらの抗原特異的T細胞の大半はDR-2に拘束されていることを示した。さらに、ホモ接合DR1⁺細胞株は全抗原特異的T細胞の約10%を刺激し、このことは、ホモ接合DR2⁺APCに対するよりも自己由来のヘテロ接合DR2⁺APCに対して強い応答があることを潜在的に説明できよう。最後に、予想されたように、DR1⁺又はDR2⁺対立遺伝子座のどちらかを欠いたAPCはもっとも低い応答を惹起した。

同じペプチド（すなわちNY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチド）内に多数のCD

10

20

30

40

50

4⁺T細胞決定基が存在する可能性を調べるために、T細胞亜株を前出の実施例で考察したバルクT細胞株から誘導し、続いてホモ接合DR2⁺及びDR1⁺株とともにヘテロ接合DR1⁺/DR2⁺株に対して試験した。

結果は、この亜株の1つは、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドに特異的なT細胞の全てについてもつばらDR1拘束性を示すことを示した。したがって、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチド内に少なくとも2つのCD4⁺T細胞決定基（すなわち1つはDR2⁺によって提示され、1つはDR1⁺によって提示される）が存在する。

【 0 0 2 2 】

実施例 1 3 .

さらに、最小限のCD4⁺T細胞決定基配列を同定するために、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番内に見出される13merのペプチドの力価を測定し、NY-ESO-1のアミノ酸85-97番及び89-101番から成るコア配列の分布をDR1拘束性又はDR2拘束性T細胞亜株のどちらかを用いて決定した。

続いて、この13merのコア配列を基準にして伸長又は短縮ペプチドを合成し、これを用いてFCSの非存在下で1時間、ホモ接合の自家PMBCをパルスし、血清仲介プロセッシングを回避した。用量依存力価測定を用いた。抗原特異的T細胞を添加する前に、過剰なペプチドを洗浄した。標準的なICSアッセイを上記に記載したように実施した。

結果は、この最小であるがDR-1拘束性T細胞決定基に対するもっとも強力な配列は、NY-ESO-1のアミノ酸89-100番から成るペプチドであることを示した。DR-2拘束性T細胞決定基のための最小配列はNY-ESO-1のアミノ酸86-99番から成るペプチドであった。この後者の決定基に特異的なT細胞は、NY-ESO-1のアミノ酸89-100番から成るDR1拘束性最小ペプチドを認識しなかった。アミノ酸88番を含む変種を調製し、上述の態様と同じ態様で調べたとき、強力な応答が観察され、アミノ酸88番はDR2⁺細胞との結合に必須であることが示唆された。

【 0 0 2 3 】

実施例 1 4 .

実施例7に記載したCD4⁺T細胞決定基のための最小配列を入手した後、CD4⁺T細胞の免疫優性ヒエラルキーにおけるこれらの決定基の重要性を決定するために力を注いだ。

この問題に答えるために、患者から採取した多数のPMBC（ワクチン接種後種々の時点で採集された）を融解し、2つの部分に分割した。これらの細胞を報告された最小DP4拘束ペプチド（すなわちNY-ESO-1のアミノ酸157-169番から成るペプチド）又はDR2拘束ペプチド（NY-ESO-1のアミノ酸86-99番から成る）のどちらかで刺激した。抗原特異的T細胞の百分率を、上述のように標準的なICSアッセイでDay11またはDay14（？）に調べた。

結果は、DR2拘束性CD4⁺T細胞応答はより初期に検出され、その程度はDP4拘束性CD4⁺T細胞応答よりも強いことを示した。さらにまた、NY-ESO-1のアミノ酸157-165番から成るペプチドに対する特異的なCD8⁺T細胞応答に対するより初期の分析と比較して、DR2拘束性CD4⁺T細胞応答は、最も早く検出できる前述のCD8⁺T細胞応答と同じ時期に検出可能であった。

したがって、この新規に同定されたDR2拘束性CD4⁺T細胞決定基（すなわちアミノ酸86-99）は免疫優性であった。

【 0 0 2 4 】

実施例 1 5 .

次に、NY-ESO-1のアミノ酸86-99番から成るペプチドに対して特異的な新規なCD4⁺T細胞のポリクローナルT細胞レセプター（TCR）使用頻度を測定した。ワクチン接種後86日で患者から採集したPMBCをDP4拘束ペプチド（NY-ESO-1のアミノ酸150-170番から成るペプチド）又はDR2拘束ペプチド（NY-ESO-1のアミノ酸86-99番から成るペプチド）のどちらかで刺激した。続いて、このT細胞を活性化し、ICSアッセイでただ1種のVβ抗体とともに染色した。Vβ陽性及び抗原特異的T細胞は、全抗原特異的T細胞の%として表した。

結果は、NY-ESO-1のアミノ酸86-99番から成るペプチドに特異的な新規なCD4⁺T細胞は、以前に同定されたDP4拘束CD4⁺T細胞よりも広いTCR使用頻度を有することを示した。

【 0 0 2 5 】

実施例 1 6 .

上述の新規に同定されたT細胞の決定基は天然に提示される決定基であると仮説を立てた。NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドに特異的なCD4⁺T細胞株を用いて、上記で述べたようにワクチンでパルスした(10 µg/mL)上述の自家MoDCの抗原提示を読み取った。

結果は、DR1及びDR2拘束性CD4⁺T細胞決定基の両方がワクチンを装荷された自家MoDCによって提示されることを示した。換言すれば、完全長のタンパク質及びアジュバントでパルスされた後、これらのDCは完全長のタンパク質をプロセッシングし、新規に発見されたNY-ESO-1決定基を自然に提示した。

さらにまた、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドに特異的なCD4⁺T細胞株を用いて、Jagerら(J. Exp. Med., 191:625-630(2000)、前記文献は引用により本明細書に含まれる)が記載したDR1⁺メラノーマ細胞株NW-Mel-38の抗原提示を読み取った。このCD4⁺T細胞株をさらに用いて、DR2⁺のアロジェニック細胞株LAR1の抗原提示を読み取った。これらのメラノーマ細胞株の両方を、10%FCS、L-グルタミン(2mM)、2-ME(5 × 10⁻⁵M)及び抗生物質(ペニシリン100U/mL、ストレプトマイシン100 µg/mL)を補充したRPMI-1640から成る“RP-10”とともに培養した。さらに、DR1⁺及びDR2⁺細胞株を、100ng/mLの組換えヒトINF γとともに、又は前記INF γ無しに48時間培養した。

結果は、NY-ESO-1のアミノ酸85-102番から成るペプチドに特異的なCD4⁺T細胞株は、in vitroでのINF γの処置の後で両メラノーマ細胞株によって提示された天然提示NY-ESO-1決定基を認識することを示した。CD4⁺T細胞株は、INF γで誘導されていない上記細胞株でも、又は(予想されたように)適切なDR対立遺伝子座を発現していない腫瘍細胞によっても活性化されなかった。

【 0 0 2 6 】

実施例 1 7 .

臨床試験の数人の患者については、マッチするワクチン接種前腫瘍サンプル及び免疫原性組成物によるワクチン接種後の再発腫瘍サンプルを入手することができた。NY-ESO-1抗原、HLAクラスI重鎖及びβ₂-ミクログロブリン(β₂M)の発現は、NY-ESO-1 CD8⁺T細胞ペプチドエピトープの腫瘍細胞による提示、及び組成物を投与された患者におけるNY-ESO-1特異的T細胞による認識のために重要である。これら3つの分子の発現を、マッチする腫瘍サンプルで、適切なモノクローナル抗体を用いて標準的な免疫組織化学分析によって分析した。6人の患者を精査した。4人の患者がNY-ESO-1 ISCOM免疫原性組成物(1:用量A、3:用量C)を投与され、各人について再発腫瘍は前記3つの重要な分子の少なくとも1つの発現の顕著な低下または消失を示した。これらの患者の1人では、NY-ESO-1及びHLAクラスI重鎖の両方の発現が減少し、もう1人では、3つ全ての発現が減少した。用量D群(NY-ESO-1単独)の患者を分析し、再発腫瘍でNY-ESO-1の発現の減少が示された。免疫原性組成物に誘導された、NY-ESO-1に対する免疫応答が全ての5人の患者で見られた。NY-ESO-1特異的免疫を患者で誘発したワクチンは、抗原発現の低下或いは再発腫瘍で観察される提示の低下をもたらす免疫学的選別圧力をもたらしたかもしれない。最後に、さらにもう1人の偽薬患者を分析した。前記患者は再発腫瘍で前記3つの重要な分子の発現に変化を示さなかった。

前述の実施例は、本発明のいくつかの特徴を示している。それらの特徴は、NY-ESO-1と称される抗原を発現する対象者において、NY-ESO-1及びサポニン系アジュバント(特にISCOM)の製剤を前記対象者に投与することにより癌を治療又は予防する方法に関する。

本治療は、NY-ESO-1の発現が示されるいずれの癌に対しても有効である。発現は、例えばRT-PCR、患者サンプル(例えば血清、血液、尿など)の免疫学的分析、NY-ESO-1誘導ペプチドとMHC分子との複合体に特異的なT細胞(CD4⁺及びCD8⁺の両者)の分析などにより示すことができる。これらの方法は周知であるので、NY-ESO-1分子の発現の測定は日常的なものである。

【 0 0 2 7 】

データが示すようにNY-ESO-1の発現は癌にのみ付随しているので、治療的方法と同様に予防的方法も意図される。精巣での発現が観察されているが、精巣細胞はMHC分子を発現せず、したがって免疫反応性細胞の標的ではない。したがって、対象者が何らかの態様にNY-ESO-1発現を示すが、腫瘍を同定することができない場合、本明細書に記載の事柄における治療を指示し、癌の開始を予防することができる。

NY-ESO-1タンパク質とISCOMとの組合せは、NY-ESO-1に対する細胞性及び液性応答の共同誘導に有効である。既知のT細胞応答及びこれまで知られていなかったT細胞応答が、MHCクラスI及びクラスIIのどちらの関係においても同定された。ISCOMアジュバントの添加は、タンパク質を単独で使用するよりもはるかに強力な応答を生じた。

実際に、本発明は、以下に規定するように有効な量のNY-ESO-1タンパク質をサポニン含有アジュバントと組み合わせて、投与の必要がある（NY-ESO-1を発現している）対象者に投与することを含む。投与の態様は変動し得る。本明細書に記載した実験では、対象患者は筋肉内注射を受けた。他の可能な投与形態には、静脈内、経口、皮内、舌下、皮下投与が含まれ、これらは、座薬、鼻内スプレー、徐放性パッチ、体内徐放性装置などによる。他の投与形態もまた当業者には明瞭で、ここで繰り返す必要はない。

投与される製剤の量は、多数の要因、例えば症状の重篤度、対象患者の全体的な健康状態及び年齢などに応じて変動するであろう。しかしながら、一般的には約10から約500 μg の用量のタンパク質が約10から約500 μg のサポニン系アジュバントと組み合わせられ、より好ましくは各々が約25から約250 μg 、さらに好ましくは各々が50から約150 μg 、もっとも好ましくは各々が約100 μg である。上記の実施例はタンパク質及びアジュバントの両者で同一の量を用いたが、これは最も広い意味で本発明の要件ではないことは理解されよう。

【0028】

本明細書で用いられる“タンパク質”はNY-ESO-1タンパク質の全ての形態を指し、上記で引用した米国特許6,525,177号の配列番号:8に開示されたタンパク質の他に本特許（例えば実施例9）に記載の形態（配列番号:8のアミノ酸10 - 180番及び10 - 121番から成る形態）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。実際のところ、NY-ESO-1のいずれのフラグメントも、本明細書で用いられるタンパク質の定義の一部と考えられるべきである。フラグメントとは完全長のNY-ESO-1分子の任意の部分の指し、前記は、細胞内でプロセッシングされてペプチドを生じ、続いてMHC分子（前記はMHCクラスI又はクラスIIであろう）と複合体を形成するために十分な大きさであり、例えばGnjaticら（J. Immunol., 170: 1191-1196(2003)、前記文献は引用により本明細書に含まれる）が記載したフラグメントである。さらにまた、NY-ESO-1に見出される複数のアミノ酸配列を含む、合成のポリトープもこの定義の一部である。前記ポリトープは、細胞内でプロセッシングされたとき、それらが個々のペプチドを形成し、これらペプチドが続いてMHC分子と上述のように複合体を形成できるような態様で互いに連結されている。

さらにまたこの定義の一部は、米国特許6,525,177号の配列番号:8に見出されるアミノ酸配列に対応する分子の同族体である。NY-ESO-1アミノ酸の配列内の変動はそれらの結合能力に影響を与えず、実際のところ、結合能力を改善することができることが知られている（例えば米国特許6,417,165号及び6,605,711号を参照されたい、前記文献は引用により本明細書に含まれる）。本明細書で用いられる“相同性”はしたがって、本明細書で指すNY-ESO-1のアミノ酸配列の全体又は一部に対して少なくとも70%同一、好ましくは80%同一、さらにもっとも好ましくは90%同一である分子を指すが、ただしそれらは、MHCクラスI又はMHCクラスIIバインダーに対応する少なくとも1つのアミノ酸配列を含む。

さらにまた、相同なタンパク質抗原LAGE（PCT出願W098 32855）も本発明の一部であり、前記は、サポニンアジュバントと結合された、NY-ESO-1と共通の多くの免疫原性ペプチドを含む。さらにまた、NY-ESO-1又はLAGEとサポニン系アジュバント（例えばISCOM）との組合せも本発明の一部であり、さらに別のTRAP抗原、例えばCT-抗原、MAGEA1 - A12、MAGE-C1/CT7、MAGE-CT/CT10、SSX-2、SSX-4、SSX-5及び分化抗原、例えばMelan-A、gp100、チロシナーゼ、NY-CO-58、NY-BR-1を含み得る。これらは例示であって、網羅的なものではない。

さらにまた、新規な抗原性ペプチド及び対応する核酸分子も本発明の部分として請求される、前記は、本明細書に記載したNY-ESO-1特異的CD8⁺及びCD4⁺T細胞のためのエピトープを表す。前記新規なNY-ESO-1ペプチドを使用する方法は、例えば特許出願W098 14468；W099 53938；W001 364531；W002 26778；及びW002 068800（前記文献は全て引用により本明細書に含まれる）に記載/開示されているか、又はそうでなければ当業者に公知の技術である。

本発明はまた、本明細書に示した規定にしたがってタンパク質を、1つ又は2つ以上の免疫反応性のNY-ESO-1ペプチドと一緒に、アジュバントと一緒に投与することを含む。そのような多くのペプチドは公知である。

本発明の他の特徴は当業者には公知で、ここでさらに繰り返す必要はない。

10

使用した用語及び表現は説明のために用いられ、限定を意図せず、さらにそのような用語及び表現によって、記載されたものと等価のいずれのものも排除することを意図するものではなく、さらに種々の改変が本発明の範囲内において可能である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】DTH反応及びそれらの程度を決定するために実施した患者の試験から得られたデータを示す。

【図2】抗体応答を測定するために設計した実験から得られた結果の要旨を示す。

【図3】細菌細胞及び哺乳類細胞由来の組換えNY-ESO-1を用いたELISAの比較である。

【図4】実施例5で考察されている、NY-ESO-1系13merペプチドを用いた実験の結果を示す。

20

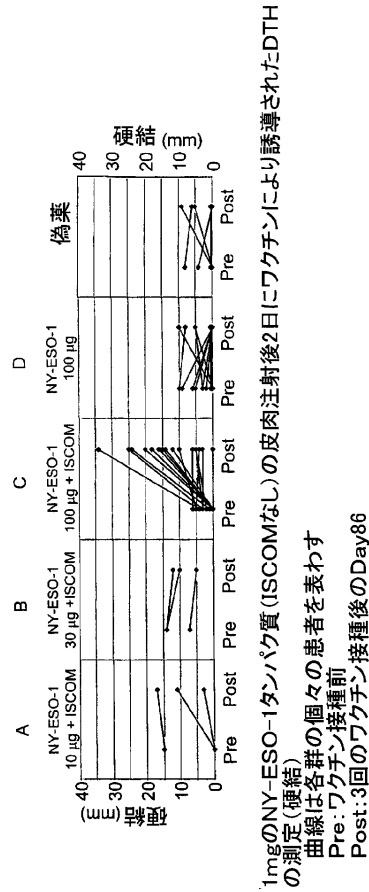
【図5】さらに別の13merペプチドの結果を示す。実施例5を参照されたい。

【図6】CD4⁺及びCD8⁺エピトープを決定するために、13mer及び18merペプチドを用いた結果を示す。

【図7】本発明の免疫原性組成物を投与された患者及び投与されなかった患者で再発期間を比較した結果を示す。

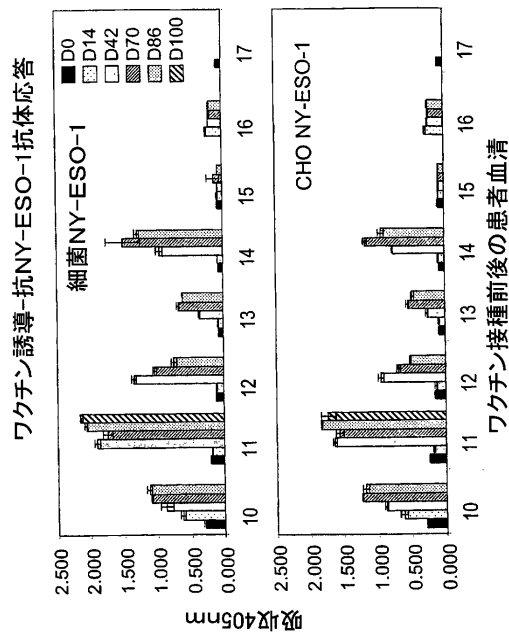
【図 1】

Figure 1



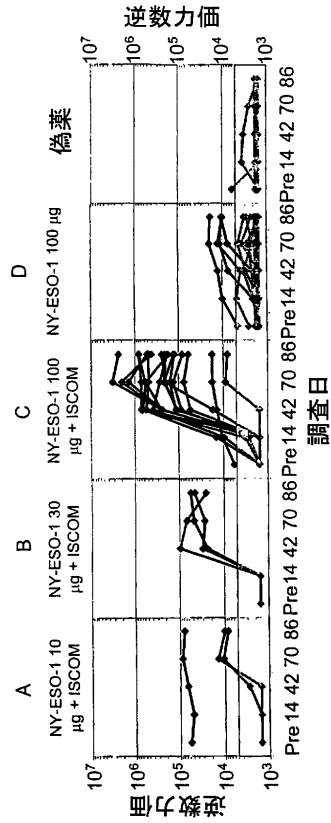
【図 3】

Figure 3



【図 2】

Figure 2



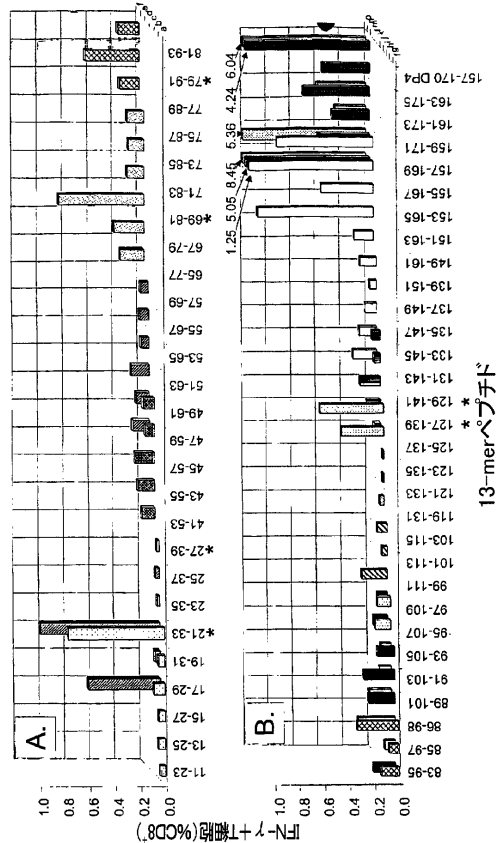
ワクチンによって誘導された抗体反応。曲線は各群の個々の患者を表す

Y軸はログスケールによる逆数力価である

【図 4】

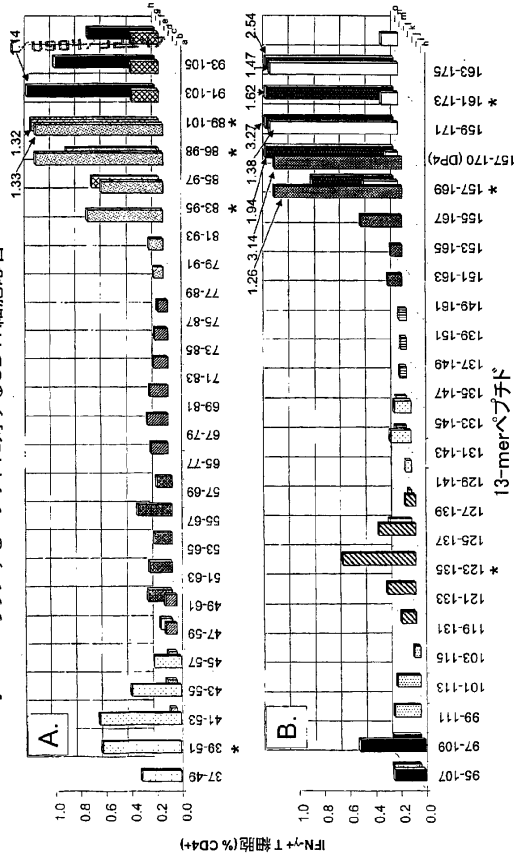
Figure 4

オーバーラップするペプチドに対するCD8⁺T細胞応答



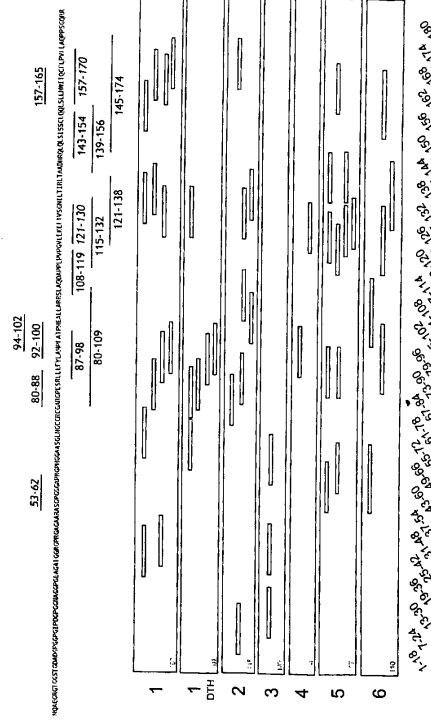
【図 5】

Figure 5
オーバーラップするペプチドに対するCD4T細胞応答



【図 6】

Figure 6

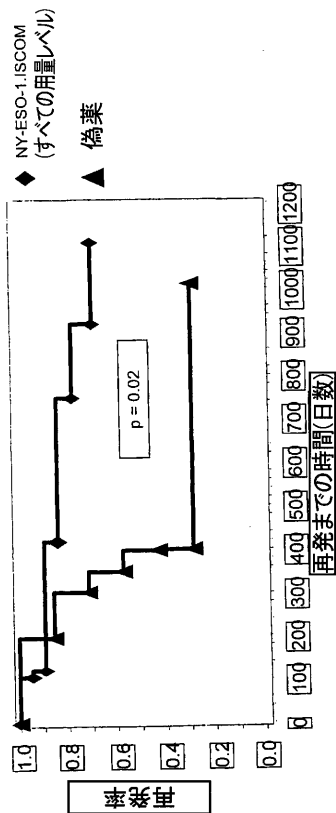


ワクチン誘導T細胞応答

【図 7】

Figure 7

NY-ESO-1.ISCOM接種後の無症状生存



【配列表】

0004592702000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/705 (2006.01) C 0 7 K 14/705 Z N A

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(72)発明者 シーボン ジョナサン

オーストラリア 3 0 8 4 ヴィクトリア ハイデルバーグ スタッドレー ロード オースティン ヘルス

(72)発明者 デイヴィス イアン

オーストラリア 3 0 8 4 ヴィクトリア ハイデルバーグ スタッドレー ロード オースティン ヘルス

(72)発明者 チェン ウェイサン

オーストラリア 3 0 8 4 ヴィクトリア ハイデルバーグ スタッドレー ロード オースティン ヘルス

(72)発明者 グレン ジーモン

ドイツ連邦共和国 3 5 0 0 2 マルブルク ポシュトファッハ 1 2 3 0 ツェットエルペー
ペーリンク ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ヘッド オブ リサーチ
アンド ディヴェロップメント内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表 2 0 0 1 - 5 0 7 2 1 2 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 1 6 4 6 6 5 (U S , A 1)

国際公開第 0 3 / 0 4 7 5 0 6 (W O , A 1)

国際公開第 0 3 / 0 7 6 4 5 5 (W O , A 1)

特表 2 0 0 2 - 5 2 6 4 1 9 (J P , A)

特表 2 0 0 2 - 5 2 2 3 9 7 (J P , A)

特表平 0 4 - 5 0 1 7 1 4 (J P , A)

特表 2 0 0 2 - 5 3 8 0 7 4 (J P , A)

国際公開第 9 9 / 0 1 8 2 0 6 (W O , A 1)

CHEN, Q. et al., "Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant.", PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A , 2 0 0 4 年 6 月 2 2 日, Vol.101, No.25, P.9363-9368

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

UniProt/GeneSeq

PubMed

Science Direct

WPI