



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 07 103 T2 2006.10.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 444 261 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 07 103.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP02/12764**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 787 687.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/042243**

(86) PCT-Anmeldetag: **14.11.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **22.05.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.08.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.10.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/47 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:
8377 15.11.2001 US

(73) Patentinhaber:
**Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei
Tumori, Mailand/Milano, IT**

(74) Vertreter:
**Gille Hrabal Struck Neidlein Prop Roos, 40593
Düsseldorf**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:
**GAMBACORTI-PASSERINI, Carlo, I-20133 Milano,
IT; PASSONI, Lorena, I-20133 Milano, IT**

(54) Bezeichnung: **IMMUNOGENE ALK (ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE) PEPTIDE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein immunogenes Peptid, das von der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) abstammt und das bei der Immuntherapie von Tumoren verwendet werden kann. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf ein cytotoxisches T-Lymphozyten(CTL)-Epitop von dem ALK-Protein, auf in vivo und in vitro Verfahren unter Verwendung des ALK-Peptids nach der Erfindung für die Aktivierung von ALK spezifischen CTLs und für die Stimulierung einer Immunantwort gegen ALK positive Tumore sowie auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die für die Verwendung bei solchen Verfahren geeignet sind.

[0002] Die Entdeckung der Tumor assoziierten Antigene (TAAs) zeigte, dass Tumorzellen durch das Immunsystem spezifisch erkannt werden können, was zu der Hypothese führte, dass die meisten, wenn nicht alle, Tumore Antigene exprimieren, die cytotoxische T-Lymphozyten potentiell angreifen können (Renkvist N et al., (2001) Cancer Immunol Immunother., 50: 3–15). Die Identifizierung der immunogenen Epitope führte zu ihrer Verwendung als Ziele, um die spezifische Clearance von neoplastischen Zellen durch auf TAA zielende Strategien zu vermitteln, einschließlich der Impfung, wie zum Beispiel eine allelspezifische Impfung auf Peptidbasis (Bremers AJ et al., (2000) Eur J Surg Oncol., 26: 418–424; Kugler A. et al., (2000) Nat Med., 6: 332–336, Nestle FO et al., (1989) Nat Med., 4: 328–332).

[0003] Ein Schwerpunkt bei der Entwicklung von effizienten Impfprotokollen besteht in der Identifizierung von geeigneten und wirksamen TAAs, die eine Immunantwort induzieren können, welche das Tumorwachstum beeinflusst. Das ideale Ziel für die Immunzerstörung ist ein tumor-spezifisches Protein, das in normalen Zellen nicht exprimiert ist und das für den bösartigen Phänotyp essentiell ist (Gilboa E., (1999) Immunity, 11: 263–270).

[0004] ALK ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die zum ersten Mal von Morris et al. identifiziert wurde (Morris SW et al., (1994) Science, 263: 1281–1284) als Teil des Fusionsproteins NPM/ALK (onkogenes, anaplastisches Lymphomkinase-Fusionprotein) in Zelllinien, die von ALCL abstammen. Mehr als die Hälfte der AL-CL(anaplastische großzellige Lymphome)-Fälle besitzen eine t(2;5) chromosomale Translokation, die zur Expression des NPM/ALK Fusionsproteins führt. Dieses Fusionsprotein besteht aus dem N-terminalen Abschnitt des nuklearen Phosphorproteins Nucleophosmin (NPM), der mit dem gesamten intrazellulären Abschnitt von ALK verbunden ist, die ihre katalytische Kinasedomäne enthält (Morris SW et al., (1994) Science, 263: 1281–1284; Fallini B et al., (1999) Blood, 93: 2697–2706). Es wurde deutlich gezeigt, dass konstitutiv aktivierte NPM/ALK ein potentes Onkogen ist, das transformierende und Tumor erzeugende Eigenschaften hat (Fujimoto J et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93: 4181–4186; Bischof D. et al., (1997) Mol. Cell. Biol., 17: 2312–2325; Kuefer MU et al., Blood (1997) 90: 2901–2910; Wellmann A. et al., (1997) FASEB J., 11: 965–972).

[0005] Während NPM ein konstitutives Gen ist, das allgegenwärtig in normalen Zellen exprimiert wird, ist die ALK-Expression auf das zentrale Nervensystem (CNS) in embryogenen und adulten Mäusen beschränkt (Iwahara T et al., (1997) Onkogene, 14: 439–449; Morris S. et al., (1997) Onkogene, 14: 2175–2188). Beim Menschen wurde ALK in geringen Mengen in einigen Perizyten und zerstreuten Gliazellen in spezifischen Bereichen des CNS nachgewiesen. ALK wird normalerweise in lymphoblutbildenden Geweben nicht exprimiert (Pulford K et al., (1997) Blood, 89: 1394–1404). Als Ergebnis der t(2;5) chromosomalen Translokation wird ALK jedoch ektopisch mit hohen Mengen in Lymphoidzellen exprimiert und die konstitutive Tyrosinkinaseaktivität führt zu einem dereguliertem Lymphozytenwachstum (Bischof D. et al., (1998) Mol. Cell. Biol., 18: 6951–6961).

[0006] Das hohe Niveau an Expression von NPM/ALK und seinen Varianten in Lymphomzellen und ihre direkte Rolle bei der Lymphogenese, kombiniert mit der Tatsache, dass normales ALK in geringen Mengen in immunprivilegiertem CNS exprimiert wird, lässt vermuten, dass ALK ein ideales Ziel für die Immuntherapie sein könnte. Tatsächlich wurden zirkulierende Antikörper, die NPM/ALK erkennen, kürzlich in Seren von ALCL-Patienten entdeckt (Pulford K, et al., (2000) Blood, 96: 1605–1607).

[0007] Die Isolierung der ALK-Peptide mit HLA-A0201 Bindemotiv und die Fähigkeit zur Induktion einer in vitro Immunantwort wurde vor kurzem berichtet von Passoni et al., (2000) (Blood Bd. 96 – Abstract Nr. 1459). Es wurde insbesondere berichtet, dass das Dekapeptid SLAMDLLHV die CTL-Zytotoxizität gegen NPM/ALK-positive Lymphomzelllinien stimulieren kann.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt ein Peptid bereit, das von der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) abstammt und das die MHC Klasse I beschränkten, cytotoxischen Lymphozytenreaktionen gegen Tumorzellen, welche das NPM/ALK-Fusionsprotein exprimieren, als ein Ergebnis einer t(2;5) Translokation induzieren kann. Das offenbarte Peptid ist in der Kinasedomäne des Fusionsproteins lokalisiert und stellt ein ALK-Epitop

dar, das ferner charakterisiert ist durch spontane Reifung und Präsentation an der Oberfläche von Tumorzellen. Während Onkogene mit Punktmutationen durch ein eingeschränktes Expressionsmuster gekennzeichnet sind, welches auf eine kleine Zahl von Patienten beschränkt ist, ist transloziertes ALK ein breit exprimiertes, tumorassoziertes Antigenmerkmal von ALK-positiven Lymphomen (z.B. Alkoma), Neuroblastomen und ALK exprimierende Neoplasien. Dieses Merkmal macht ALK zu einem attraktiven Ziel für Impfprotokolle.

[0009] Nach einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein HLA-A*0201-bindendes ALK-Peptid (SEQ ID Nr. 2) bereit. Das offenbarte Peptid ist charakterisiert durch die in vivo Immunogenität in HLA-A*0201 transgenischen Mäusen und die Fähigkeit zur Stimulierung von MHC Klasse I beschränkte, ALK-spezifische CTLs in vitro unter Verwendung von menschlichen peripheren Blutlymphozyten, die aus gesunden Spendern erzielt werden. Die Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die das ALK-Peptid nach der Erfindung in Kombination mit wenigstens einem pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoff bereitstellt. Gemäß einer besonderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine Impfstoffzusammensetzung bereit.

[0010] Eine alternative Ausführungsform der Erfindung stellt Antikörper bereit, die das Epitop selektiv erkennen, welches durch das offenbarte ALK-Peptid dargestellt wird. Die ALK-spezifischen Antikörper, die von der Erfindung umfasst sind, umfassen monoklonale und polyklonale Antikörper und aktive Fragmente davon.

[0011] Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren bereit zur Induktion einer cytotoxischen Reaktion gegen Tumorzellen, welche ein ALK-Antigen exprimieren, wobei das Verfahren das Inkontaktbringen von T-Lymphozyten mit einem ALK-Peptid unter Bedingungen umfasst, die für die CTL-Aktivierung geeignet sind. In einer besonderen Ausführungsform beschreibt die Erfindung ein Verfahren, wobei die Lymphozyten mit Antigen präsentierenden Zellen kontaktiert werden, welche das Peptid nach der Erfindung, das an ein HLA-A*0201 Molekül gebunden ist, umfasst (trägt oder präsentiert). Nach einer alternativen Ausführungsform beschreibt die Erfindung ein Verfahren, welches das Inkontaktbringen von Lymphozyten direkt mit dem ALK-Peptid nach der Erfindung umfasst.

[0012] Nach besonderen Ausführungsformen bezieht sich die Erfindung auf isolierte Antigen präsentierende Zellen wie, aber nicht beschränkt auf, HLA-A2. 1 positive dendritische Zellen oder autologe, periphere, mononukleäre Blutzellen, die das ALK-Peptid nach der Erfindung tragen, sowie auf isolierte T-Lymphozyten, die selektiv einen Komplex binden können, der ein HLA Klasse I Molekül und das ALK-Peptid umfasst.

[0013] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung des ALK-Peptids nach der Erfindung für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren bereit, welche durch die Expression eines ALK-Antigens gekennzeichnet sind, wie ein Alkom, ein Neuroblastom oder eine ALK exprimierende Neoplasie. Eine alternative Ausführungsform besteht in der Verwendung von Antigen präsentierenden Zellen, die das ALK-Peptid tragen, oder autologen T-Lymphozyten, die spezifisch (z.B. fähig zur Bindung von oder zur Interaktion mit) für Komplexe eines HLA-A*0201 Moleküls sind, das mit den ALK-Peptiden assoziiert ist, für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren, die ein ALK-Antigen exprimieren.

[0014] Gemäß weiteren Ausführungsformen stellt die Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle bereit, die für das ALK-Peptid nach der Erfindung codieren, chimäre Gene, die ein isoliertes Nukleinsäuremolekül nach der Erfindung unter der Kontrolle eines heterologen Promoters umfassen, sowie Expressionsvektoren, die ein chimäres Gen nach der Erfindung umfassen. Diese Ausführungsformen nach der Erfindung finden Anwendung bei der Herstellung eines Wirtsvektorsystems für die Herstellung des ALK-Peptids nach der Erfindung und für die Isolierung von Wirtszellen und Zelllinien, die ein chimäres Gen nach der Erfindung umfassen.

Fig. 1A und 1B. Induktion von Anti-ALK spezifischen Effektoren in peripheren Blutlymphozyten von gesunden Spendern (PBLs).

[0015] PBLs, die von fünf Spendern (DG, ZB, SA, PG und BF) erzielt wurden, wurden mit autologen Peptid-gepulsten DCs aktiviert und wöchentlich mit Peptid-beladenen, autologen Monozyten restimuliert. Die erzielten T-Zell-Massenkulturen wurden getestet für die Antigenspezifität, wobei mit der dritten Stimulierungsrunde begonnen wurde. Die cytotoxische Aktivität wurde bestimmt in einem Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest mit einem E:T Verhältnis von 50:1 (■) und 25:1 (○), wobei als Targets verwendet wurden entweder T2-Zellen, die mit 5 µM Erkennungspeptid oder irrelevantes, Matrix abstammendes Influenzapeptid (FLU) gepulst waren (**Fig. 1A**) oder NPM/ALK positive Lymphomzelllinien SU-DHL1 und SUP-M2 (**Fig. 1B**). Die Ergebnisse von einem repräsentativen Experiment, wobei zwei Experimente durchgeführt wurden, sind dargestellt.

Fig. 2A und 2B. IFN- γ Freisetzung von in vitro induzierten Anti-ALK CTL Linien.

[0016] Autologe EBV-transformierte B-Zellen (LCL) (**Fig. 2A**) und T2-Zellen (**Fig. 2B**) wurden gepulst mit 5 μ M p280–89 und p376–85 Peptiden sowie dem Influenzamatixpeptid (FLU: irrelevantes Peptid) und wurden dann verwendet als Stimulator in einem IFN- γ Freisetzungstest. Die Vorinkubation mit 5 μ g/ml Anti-HLA-A2 mAb CR11.351 hemmt die IFN- γ Sekretion. Die Ergebnisse von einem repräsentativem Experiment, wobei wenigstens drei Experimente durchgeführt wurden, sind dargestellt.

Fig. 3A und 3B. Peptidempfindlichkeit von in vitro induzierten ALK-spezifischen CTLs.

[0017] T2-Zellen wurden inkubiert mit titrierten Mengen von p280–89 (**Fig. 3A**) und p376–85 (**Fig. 3B**) Peptiden sowie mit dem Influenzamatixpeptid (FLU) und wurden dann als Stimulator verwendet in einem IFN- γ Freisetzungstest unter Verwendung der CTL-Linien, die von den Spendern ZB und DG und SA hergestellt wurden. Die Ergebnisse von einem repräsentativen Experiment, wobei zwei Experimente durchgeführt wurden, sind dargestellt.

Fig. 4A–4C. Spezifische Lyse von ALCL Zelllinien, die endogen NPM/ALK exprimieren.

[0018] P280–89 spezifische CTL-Linien, erzeugt von den Spendern DG (**Fig. 4A**) und ZB (**Fig. 4B**), und p376–85 spezifische CTL-Linien, erzeugt von dem Spender SA (**Fig. 4C**), erkennen effizient und lysieren HLA-angepasste ALCL Lymphomzelllinien (SU-DHL1 und SUP-M2), die endogen NPM/ALK exprimieren. Die Lyse wurde gehemmt in Gegenwart von Anti-HLA-A2 mAb CR11.351 und es wurde keine Aktivität nachgewiesen gegen HLA-A2.1 + Zelllinien FM3 (Melanom), HCT-116 (Darmkarzinom) und MCF-7 (Brustkarzinom). Die cytotoxische Aktivität wurde bestimmt in einem Standard- ^{51}Cr -Freisetzungstest mit einem E:T Verhältnis von 50:1 (■), 25:1 (□), 12:1 (▤). Die Ergebnisse von einem repräsentativen Experiment, wobei drei Experimente durchgeführt wurden, sind gezeigt.

Fig. 5A und 5B. Lyse von Neuroblastomzellen, die natives ALK exprimieren.

[0019] Anti-p280–89 (**Fig. 5A**) und p375–86 (**Fig. 5B**) CTL-Linien erkennen und töten Neuroblastomzellen, die natives ALK in einer HLA-beschränkten Weise exprimieren. IMR 32 (HLA-A2.1 +/ALK+), SK-N-SH (HLA-A2.1 –/ALK+) und NB-5 (HLA-A2.1 +/ALK–) Zelllinien wurden als Ziele verwendet in Standard- ^{51}Cr -Freisetzungstests unter Verwendung von ALK-Peptid spezifischen ALK-Zelllinien, die von den Spendern DG und ZB (p280–89 spezifische CTL-Linie) (**Fig. 5A**) und vom Spender SA (p375–86 spezifische CTL-Linie) (**Fig. 5B**) hergestellt wurden. E:T Verhältnis 50:1 (■), 25:1 (□), 12:1 (▤). Die Ergebnisse von einem Experiment, wobei drei Experimente durchgeführt wurden, sind gezeigt.

[0020] Die Erfindung basiert auf der Identifizierung von neuen CTL-Epitopen innerhalb des NPM/ALK-Fusionsproteins. Insbesondere wurde ein Tumor assoziiertes CTL-Epitop in der ALK-Tyrosinkinasedomäne identifiziert, das die folgenden Eigenschaften hat: (a) Bindung an HLA-A2.1 Moleküle, (b) Immunogenität in vivo in HLA-A*0201 transgenischen Mäusen, (c) in vitro Stimulation von spezifischen CTL Reaktionen unter Verwendung von PBLs von gesunden Spendern, (d) spontane Reifung und Präsentation an der Oberfläche von Tumorzellen.

[0021] Da das ALK-Protein von normalen Zellen nicht exprimiert wird, mit der Ausnahme von einigen CNS-Zellen in niedrigen Mengen, haben die Erfinder untersucht, ob die ALK-Kinase ein Ziel für eine Antigen spezifische zellvermittelte Immuntherapie sein könnte. Eine Reihe von Peptiden, die von ALK abstammen, wurden somit hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu HLA-A*0201 Molekülen getestet und die Bindungspeptide wurden dann hinsichtlich ihrer Fähigkeit eingestuft, eine spezifische Immunantwort auszulösen, die durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) sowohl in vivo in HLA-A*0201 transgenischen Mäusen als auch in vitro in den peripheren Blutlymphozyten (PBLs) von gesunden Spendern vermittelt wird.

[0022] Sieben Peptide, die an das HLA-A*0201 Molekül binden können und eine in vivo Immunogenität zeigen, wurden so identifiziert. Von diesen Peptiden waren die Peptide p280–89 (SLAMDLLHV, SEQ ID Nr. 1), p376–85 (GVLLWEIFSL, SEQ ID Nr. 2), p281–89 (LAMLDLLHV, SEQ ID Nr. 3), p282–90 (AMLDLLHVA, SEQ ID Nr. 4) und p377–85 (VLLWEIFSL, SEQ ID Nr. 5) innerhalb der Kinasedomäne, p456–65 (ALPIEYGPLV, SEQ ID Nr. 6) war stromabwärts von der Kinasedomäne und p621–629 (SLTANMKEV, SEQ ID Nr. 7) lag innerhalb des C-terminalen Abschnitts des Proteins.

[0023] Zwei HLA-A*0201 beschränkte CTL-Epitope, p280–89 (SLAMDLLHV, SEQ ID Nr. 1) und p375–86

(GVLLWEIFSL, SEQ ID Nr. 2), induzierten Peptid spezifische CTL Linien, die fähig waren, spezifisch IFN- γ freizusetzen nach Stimulierung mit ALK peptidgepulsten, autologen EBV-transformierten B-Zellen (LCLs) oder T2-Zellen. Anti-ALK CTLs lysierten HLA-abgestimmte ALCL und Neuroblastomzelllinien, die endogen ALK-Proteine exprimierten. Die CTL-Aktivität wurde gehemmt durch Anti-HLA-A2 mAb CR11.351, was mit einem Klasse I-beschränkten Mechanismus der Cytotoxizität konsistent ist.

[0024] Die Ergebnisse der Experimente, bei denen die ALK-Peptide auf ihre Immunogenität getestet wurden, bestätigen die Existenz einer effizienten Anti-ALK Vorläuferpopulation, die innerhalb der T-Zellpopulation von gesunden Spendern vorhanden ist. Unter Berücksichtigung der relativ niedrigen Ausgangszahl von PBLs (36×10^6), die zum Start von jedem einzelnen Sensitivitätsexperiment verwendet wurde, liegen solche Vorläufer wahrscheinlich in einer hohen Frequenz vor. Unter Beachtung der bekannten Schwierigkeit zur Erzeugung von Immunreaktionen in vitro ist es bemerkenswert, dass die Testung von nur drei gesunden Spendern für jedes Peptid eine spezifische Immunantwort in wenigstens einem Spender induzierte, was die Stärke von ALK hinsichtlich der Immunogenität vermuten lässt.

[0025] Die Anti-ALK spezifische CTL Population reagiert wahrscheinlich nicht gegen normale CNS-Zellen, da CNS eine immunologisch privilegierte Stelle ist, wo unter physiologischen Bedingungen Antigene nicht dem Immunsystem ausgesetzt sind. Das geringe Expressionsniveau in dem normalen CNS ist höchstwahrscheinlich zu niedrig, um eine CTL-Erkennung sicher zu stellen, wie dies gezeigt wurde mit menschlichen MAGE-spezifischen und mit p53-spezifischen Mäusen CTLs. Im Gegensatz dazu führt das hohe Expressionsniveau von NPM/ALK, angetrieben durch den starken NPM-Promoter, zu einer substantiellen Menge an NPM/ALK-Reifung durch das Proteosom, was zu einer signifikanten Expression der von ALK abstammenden Epitope an der Zelloberfläche führt. Dies ermöglicht die Immunantwort gegen ALK, das für bösartige Zellen selektiv ist.

[0026] Die Herunterregulierung der Tumorantigenexpression stellt ein Problem für die Entwicklung von Immuntherapien dar aufgrund der möglichen Immunselektion von nicht-exprimierenden Tumorklonen. Da ALK für die neoplastische Transformation von lymphoiden Zellen notwendig ist, ist es unwahrscheinlich, dass ein Tumorfurchtphänomen durch ALK-Antigen-Verlustvarianten auftritt.

[0027] Verlagertes ALK wird in etwa 83% der ALCL-Kinder beziehungsweise in 31% der ALCL-Erwachsenen exprimiert (Drexler HG. et al., Leukemia. 2000; 14: 1533–1559), was anzeigt, dass ALK ein stabiles Lymphom-spezifisches Kennzeichen ist. Kürzlich wurde das ALK-positive Lymphom oder „Alkoma“ als eine getrennte Tumoreinheit erkannt (Benharroch D et al., Blood 1998; 91: 2076–2084). Eine breite ALK-Expression ist nicht auf einen oder wenige Patienten beschränkt, wie dies der Fall ist bei Krebsgenen mit Punktmutationen. Dieses Merkmal macht ihre Verwendung in Impfprotokollen einfacher und breiter anwendbar.

[0028] Ferner wurde gezeigt, dass ALK spezifische CTLs effizient ALK+ Neuroblastom-Tumorlinien abtöten. Das Abtöten von Neuroblastomzellen durch eine CTL-Reaktion, die spezifisch für ALK-Epitope ist, zeigt das Potential von ALK als ein gemeinsames Tumorantigen für mehrfache Malignitäten.

[0029] Nach einem ersten Aspekt stellt die Erfindung das HLA-A*0201 beschränkte Peptid SEQ ID Nr. 2 bereit, welches eine cytotoxische Reaktion stark aktiviert.

[0030] Aufgrund der relativ kurzen Länge kann das Peptid gemäß der Erfindung auf vielfältige Weise hergestellt werden. Es kann zum Beispiel in Lösung oder auf einem Festträger gemäß bekannten Techniken synthetisiert werden. Verschiedene automatische Synthesegeräte sind kommerziell verfügbar und können gemäß bekannten Protokollen benutzt werden. Siehe zum Beispiel Stewart and Young, (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Aufl., Pierce Chemical Co.; Tam et al., J. Am. Chem. Soc., (1983) 105: 6442; Merrifield, The Peptides, Gross and Meinenhofer, Hrsg. Academic Press, (1979) New York, Seiten. 1–284.

[0031] Die Aminosäuresequenz des Peptides nach der Erfindung kann durch Deletion, Substitution oder Addition von einem oder mehreren Resten modifiziert werden, sofern die so erzielten Derivate zumindest die gleiche, vorzugsweise jedoch eine höhere immunogene Aktivität als die nicht-modifizierten Peptide bilden. Die Peptide können auch konjugiert werden mit Lipiden, Glycosylresten und anderen Peptiden, um Eigenschaften zu verbessern, wie eine höhere Affinität zu dem HLA-Molekül, eine höhere Immunogenität oder eine bessere Bioverfügbarkeit nach Verabreichung. Die Peptide können auch mit verschiedenen Epitopen konjugiert werden, die eine zelluläre T-Helferreaktion durch die gleiche oder eine verschiedene Klasse der MHC-Moleküle induzieren können.

[0032] Die Erfindung umfasst auch isolierte Nukleinsäuremoleküle, die für HLA-A*0201-bindendes ALK-Pep-

tid der SEQ ID Nr. 2 codiert. Die Wahl einer spezifischen Nukleotidsequenz, die für das ALK-Peptid codiert, wird von dem gewählten Expressionssystem abhängen und kann aufgrund der Degeneration des genetischen Codes verändert werden. Die Erfindung umfasst auch einen Expressionsvektor, in dem die passende Nukleinsäuresequenz operabel mit einem heterologen Promoter verbunden ist, sowie ein Wirtsvektorsystem für die Herstellung eines Peptides, welches diesen Expressionsvektor in einer geeigneten Wirtszelle umfasst, und eine Zelllinie, die das Nukleinsäuremolekül, das für ein ALK-Peptid codiert, umfasst.

[0033] Das ALK-Peptid nach der Erfindung kann in vitro oder in vivo durch die Verwendung einer rekombinanten DNA-Technologie hergestellt werden, um eine Nukleotidsequenz zu produzieren, die für ein ALK-Peptid von Interesse codiert. Eine geeignete codierende Sequenz kann zum Beispiel in einen Expressionsvektor eingesetzt werden und der Expressionsvektor wird in eine geeignete Wirtszelle durch Transformation oder Transfektion eingebracht. Die erzielte Wirtszelle wird unter Bedingungen kultiviert, die für die Expression der codierenden Sequenz und die Herstellung des codierten Peptides geeignet sind. Diese Verfahren sind im allgemeinen Stand der Technik bekannt, wie dies beschrieben ist von Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982), und Ausubel et al., (Hrsg.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York (1987). Es liegt somit innerhalb der Fähigkeiten eines Fachmanns, eine Nukleinsäuresequenz vorzubereiten und herzustellen, welche für ein ALK-Peptid nach der Erfindung codiert. Geeignete Nukleotidsequenzen können zurücktranslatiert werden unter Verwendung von Codons, die für Aminosäuren von einem der hier offenbarten ALK-Peptide codieren und bei denen es gezeigt wurde, dass sie für menschliche Lymphozyten immunogen sind.

[0034] Alternativ kann die codierende Sequenz für die Peptide der hier vorgeschlagenen Länge durch chemische Techniken synthetisiert werden, zum Beispiel mit dem Phosphotriesterverfahren von Matteucci et al., (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 3185. Die chemische Synthese stellt die Möglichkeit bereit, die codierende Sequenz zu modifizieren, um geeignete Linker aufzunehmen, welche die Ligation in allgemein verfügbare und gut bekannte Expressionsvektoren erleichtern. Zahlreiche Vektoren und geeignete Wirtssysteme sind im Stand der Technik breit verfügbar. Für die Expression des Peptides wird im Allgemeinen die codierende Sequenz mit einem operabel verbundenen Stopp- und Startcodon, Promoter- und Terminatorregionen und normalerweise einem Replikationssystem bereitgestellt, um einen Expressionsvektor für einen bestimmten zellulären Wirt zu schaffen. Bakterielle Zellen, Hefezellen oder Säugetierzellen können in Kombination mit geeigneten Vektoren und Kontrollsequenzen verwendet werden.

[0035] Gemäß einem weiteren Aspekt ist die Erfindung auf pharmazeutische Zusammensetzungen gerichtet, die eine wirksame Menge des hier beschriebenen Peptides enthalten. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen für eine therapeutische Behandlung können für eine parenterale, orale oder lokale Verabreichung verwendet werden. Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen parenteral verabreicht, zum Beispiel intravenös, intramuskulär. Aktuelle Verfahren für die Herstellung und die parenterale Verabreichung von pharmazeutischen Zusammensetzungen nach der Erfindung sind bekannt oder nahe liegend für einen Fachmann und sind zum Beispiel im Detail beschrieben in Remington's *Pharmaceutical Science*, 17. Aufl., Mack Publishing Company, Easton, PA (1985).

[0036] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform liegen die Zusammensetzungen in Form von Impfstoffen vor, die insbesondere geeignet sind für eine präventive Impfung von Personen mit Krebsempfindlichkeit oder für eine therapeutische Impfung von neoplastischen Patienten. Zusätzlich zu den Wirkstoffen werden die Impfstoffzusammensetzungen einen oder mehrere pharmazeutisch akzeptable Trägerstoffe enthalten.

[0037] „Wirksame Menge“ bedeutet eine Menge, die eine wirksame CTL-Reaktion gegen eine Tumorzelle auslösen kann. Solch eine Menge wird abhängig sein von dem Weg und dem Typ der Verabreichung, von der Stärke des zu behandelnden pathologischen Befundes und von dem allgemeinen Zustand des Patienten. Geeignete Mengen werden im Allgemeinen variieren von 1 bis 1000 µg, vorzugsweise von 100 bis 300 µg, aufgeteilt in drei oder mehr Verabreichungen in 1 Monatsintervallen oder häufiger. Allgemeine Verfahren für die Herstellung und die Verwendung von Impfstoffen sind den Fachleuten bekannt (siehe zum Beispiel Paul, *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York (1989) oder Cryz, S. J., *Immunotherapy and Vaccines*, VCH Verlagsgesellschaft, 1991). Impfstoffe werden im Allgemeinen in Form von injizierbaren Suspensionen oder Lösungen hergestellt, wobei sie aber auch in Feststoffform oder als Liposomzubereitungen verwendet werden können. Die immunogenen Inhaltsstoffe werden vorzugsweise mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoffen gemischt, wie Emulgatoren, Puffermittel oder Hilfsstoffen, welche die Wirksamkeit des Impfstoffes verstärken. Der Impfstoff kann mit einer einzelnen oder mehreren Dosen verabreicht werden. Im Falle von mehreren Dosierungen werden 1 bis 10 getrennte Dosierungen bereitgestellt, wobei jede eine Antigenmenge im Bereich von 1 bis 1000 µg enthält. Es folgt eine Auffrischungsdosis zu bestimmten Zeitintervallen.

len, die notwendig ist, um die Immunreaktion aufrecht zu erhalten oder zu verstärken. Falls notwendig, kann eine Dosis nach mehreren Monaten verabreicht werden. In jedem Fall wird das Behandlungsschema von der Reaktion des Patienten und von dem Tumorfortschritt abhängig sein.

[0038] Die Zusammensetzungen und die Verfahren nach der Erfindung können auch für eine ex vivo Therapie benutzt werden. Mit ex vivo Therapie ist gemeint, dass therapeutische oder immunogene Manipulationen außerhalb des Körpers durchgeführt werden. Lymphozyten oder Antigen präsentierende Zellen können dem Patienten zum Beispiel entnommen werden und mit hohen Dosen der fraglichen Peptide behandelt werden, wobei eine stimulierende Konzentration des Peptids in der Zellkultur bereitgestellt werden kann, die weit oberhalb der Menge liegt, die von einem Patienten gebildet oder toleriert werden könnte, wenn das Peptid in vivo verabreicht würde. Nach der Behandlung kann die Zellpopulation (zum Beispiel cytotoxische T-Lymphozyten, Bulk-Lymphozytenpopulationen oder Antigen präsentierende Zellen) in den Wirt zurückgebracht werden. Alternativ können Patientenzellen mit Vektoren behandelt werden, die eine Nukleinsäuresequenz tragen, welche für das ALK-Peptid nach der Erfindung codiert. Nach Transfektion können die Zellen entweder in vitro vermehrt werden, bis eine gewünschte Zelldichte erzielt ist, oder die Zellen werden direkt dem Patienten wieder zugeführt für eine in vivo Expansion.

[0039] Die Erfindung stellt insbesondere ein Verfahren für die Induktion einer cytotoxischen Reaktion gegen Tumorzellen bereit, die ein oder mehrere ALK-Epitope exprimieren, wobei das Verfahren das Inkontaktbringen von T-Lymphozyten mit dem Peptid nach der Erfindung unter Bedingungen umfasst, die für die Aktivierung der cytotoxischen T-Zellen geeignet sind. Geeignete Bedingungen zur Erzielung der gewünschten cytotoxischen Effekte umfassen die direkte Exposition der T-Lymphozyten mit dem Peptid in Kultur oder mit den Antigen präsentierenden Zellen (APC), welche die HLA Klasse I Moleküle exprimieren, die zuvor mit dem Peptid beladen (zum Beispiel „tragen“) wurden. Geeignete APCs sind periphere, autologe, mononukleäre Blutzellen (PBMC), dendritische Zellen, Makrophagen oder aktivierte B-Zellen. Das Peptid wird einer APC-Kultur für einen Zeitraum zugesetzt, der für die Bindung ausreichend ist, und anschließend wird eine Zellpopulation zugefügt, die T-Lymphozyten enthält, welche aktiviert werden, um zu proliferieren und um die Zytotoxizität zu vermitteln.

[0040] Die Lymphozyten können dem behandelten Patienten entnommen werden und nach Aktivierung wieder in den gleichen Patienten eingespritzt werden. Die Peptid/APC-Bindung kann durch vorhergehendes „Abziehen“ der Histokompatibilitätsmoleküle, die auf den APCs vorhanden sind, verstärkt werden. Optional können die APCs von dem Patienten genetisch modifiziert werden, um das HLA-A*0201 Allel zu exprimieren. Das HLA-A2.1 Allel ist zum Beispiel verfügbar unter GenBank Nr. M84379, Proteinsequenz Nr. PID g403144.

[0041] Das Kulturmedium kann ferner ein oder mehrere Zytokine enthalten, um die Aktivierung der CD8+ Vorläufer zu erhöhen. Vor der Wiedereinführung in den Patienten können die Lymphozyten zum Beispiel über eine Affinitätssäule, die mit einem spezifischen Liganden derivarisiert ist, gereinigt werden. T-Lymphozyten können zum Beispiel selektiv angereichert werden durch Verwendung einer Affinitätssäule, die mit einem Reagenz derivarisiert ist, wie ein Antikörper oder ein aktives Fragment davon, das an CD3, CD8 oder CD4 bindet.

[0042] Ein weiterer Gegenstand nach der Erfindung sind Antigen präsentierende Zellen (APCs), vorzugsweise dendritische Zellen, welche das Peptid nach der Erfindung tragen (präsentieren). Der Ausdruck „tragen“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf einen molekularen Komplex, der von einer Bindungswechselwirkung zwischen einem ALK-Peptid nach der Erfindung und einem HLA Klasse I Molekül abstammt. Die APCs können genetisch modifiziert werden, zum Beispiel durch Transfektion mit geeigneten viralen oder retroviralen Vektoren, um den erforderlichen intrazellulären Prozess und die molekulare Spezies zu übertragen, die für die Expression des relevanten ALK-Peptides in einer MHC Klasse I beschränkter Weise auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Alternativ können die APCs mit dem Peptid in Kultur beladen werden.

[0043] Die Erfindung stellt ferner einen cytotoxischen, T-Zellen spezifisch erkennenden Komplex bereit, der aus einem HLA Klasse I Molekül, vorzugsweise HLA-A*0201, und aus dem Peptid SEQ ID Nr. 2 gebildet ist. Die cytotoxische T-Lymphozytenlinie kann durch Selektion, ausgehend von einem Lymphozytenpool, von Zellen erzielt werden, die nach Exposition mit Tumorzellen, welche antigene ALK-Determinanten enthalten, aktiviert werden können.

[0044] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung einer Person bereit, die eine Erkrankung aufweist, welche durch die Expression von ALK-Antigenen gekennzeichnet ist, wobei das Verfahren die Verabreichung einer wirksamen Menge des ALK-Peptides SEQ ID Nr. 2, oder einer Menge von APCs, die solch ein ALK-Peptid tragen, oder von autologen T-Lymphozyten, die spezifisch für Komplexe eines HLA-A*0201 Moleküls und eines ALK-Peptides nach der Erfindung sind, an die Person umfasst. Erkranken-

kungen, die von solch einer Behandlung profitieren können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, ALK-positive Lymphom und Neuroblastom.

[0045] Eine weitere Ausführungsform nach der Erfindung bezieht sich auf Antikörper, Fragmente oder Derivate davon, welche das Peptid nach der Erfindung erkennen und binden. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gegen spezifische Peptide sind im Stand der Technik gut bekannt (Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 494, oder J. G. R. Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1982). Die Antikörper gemäß der Erfindung umfassen monoklonale und polyklonale Antikörper sowie ihre F(ab')₂, Fab, Fv oder scFv Fragmente.

Beispiel 1: HLA-A*0201 Bindungstests

[0046] Um die Bindungsfähigkeit der vorhergesagten Peptide an die HLA-A*0201 Moleküle zu bestimmen, wurde ein in vitro zellulärer Bindungstest unter Verwendung der TAP-defizienten Zelllinie T2 durchgeführt. Der Ausdruck TPA, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf „Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation“. T2-Zellen sind HLA-A*0201 positiv, TAP-negative, menschliche Zellen. T2-Zellen wurden mit 100 µM des Peptids in serumfreiem RPMI 1640, ergänzt mit 5 µg/ml von menschlichem β₂m (Fluka, Buchs, Deutschland), für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die HLA-A*0201 Expression wurde dann gemessen mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Anti-HLA-A2.1 mAb BB7.2 und anschließender Inkubation mit FITC-konjugierten F(ab')₂ Ziege-Antimaus Ig (BioSource, Camarillo, CA). Die Fähigkeit der Peptide, die von ALK abstammen, zur Bindung an die HLA-A*0201 Moleküle wurde bestimmt durch Messung der Bindungsaffinität, die ausgedrückt ist als Fluoreszenzindex (FI), der als Verhältnis (mittlerer Kanal der Fluoreszenz) zwischen der Probe und einer Kontrolle, die irrelevantes Peptid (PML/RARα: VASGAGEAA) enthält, definiert. Ein Anwachsen über die Kontrolle von wenigstens 65% (FI > 2) wurde willkürlich als Absperrung gewählt.

[0047] Um die Stabilität des HLA-A*0201/Peptid-Komplexes zu bestimmen, wurden T2-Zellen (10⁶/ml) über Nacht bei 37°C mit 10 µM von jedem Peptid in serumfreiem RPMI 1640 inkubiert, das mit 100 ng/ml von menschlichem β₂m ergänzt war. Die Zellen wurden dann viermal gewaschen, um das freie Peptid zu entfernen, für 1 Stunde mit 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Frankreich) inkubiert, um die Zelloberflächenexpression der neu synthetisierten HLA-A*0201 Moleküle zu blockieren, gewaschen und inkubiert bei 37°C für 0, 2, 4, 6 oder 8 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-HLA-A2.1 mAb BB7.2 gefärbt. Für jeden Zeitpunkt wurde die Peptid induzierte HLA-A*0201 Expression berechnet als durchschnittlicher Fluoreszenzwert von Peptid inkubierten T2-Zellen/durchschnittlicher Fluoreszenzwert von T2-Zellen in Abwesenheit des Peptides. Der Dissoziationskomplex₅₀ (DC₅₀) wurde definiert als die Zeit, die für einen 50% Verlust der HLA-A*0201/Peptid-Komplexe, die bei t = 0 stabilisiert waren, erforderlich war.

[0048] Das Peptidbindungsvermögen und die HLA-A*0201/Peptidkomplex-Stabilität sind in der Tabelle 1 gezeigt.

Beispiel 2: In vivo Immunogenität von Peptiden, die von ALK abstammen, in HHD-Mäusen.

Tiere

[0049] HHD (human human D^b) transgenische Mäuse wurden zuvor beschrieben (Pascolo, et al., (1997) J. Exp. Med., 185: 2043; Firat, H., et al., (1999) Eur. J. Immunol., 29: 3112). Die HHD-Mäuse waren defizient für das β₂-Mikroglobulin (β₂m)-Gen und für Maus-MHC Klasse I H-2D^b Moleküle und sind transgenisch für ein chimäres HLA-A*0201/D^b Molekül. Sie sind insbesondere β₂m^{-/-}, D^b^{-/-} doppelt knockout und exprimieren ein Transgen, das für eine HLA-A*0201 Monokette codiert, die zusammengesetzt ist aus einer chimären schweren Kette (α1 und α2 Domänen von menschlichem HLA-A*0201, α3 und intrazellulären Domänen von D^b), und die über ihren N-Terminus an den C-Terminus der menschlichen β₂-Mikroglobulin (β₂m) leichten Kette über ein 15 Aminosäurepeptid verbunden ist. Das chimäre Molekül ist das einzige Klasse I Molekül, das an der Oberfläche der HHD-Zellen serologisch nachweisbar ist.

[0050] Die Mäuse wurden in einem Temperatur kontrollierten Raum mit zyklischer Beleuchtung aufbewahrt. Alle in vivo Experimente wurden gemäß den lokalen ethischen Richtlinien durchgeführt.

Verfahren

[0051] Um das in vivo immunogene Potential der von ALK abstammenden, hochaffinen Bindungspeptide zu bestimmen, wurden H-2D^b^{-/-}, β₂m^{-/-}, HLA-A*0201 transgenische Monoketten (HHD)-Mäuse immunisiert. In

diesen Mäusen ist das periphere CD8⁺ T-Zellrepertoire sowohl auf der Thymusebene als auch auf der peripheren Ebene mit transgenischen HLA Klasse I menschlichen Molekülen gebildet. Die HHD-Maus ist somit ein nützliches Tiermodell, um die Fähigkeit von individuellen Peptiden zu testen hinsichtlich der Induktion von HLA-A*0201-beschränkten CTL-Reaktionen in vivo (Firat H. et al., (1999) Eur J Immunol. 29: 3112–3121; Minev B. et al., (2000) Proc Natl Acad Sci USA. 97: 4796–4801).

[0052] Den HHD-Mäusen wurde subkutan an der Basis des Schwanzes 100 µg des Peptides, das in „Incomplete Freund's Adjuvant“ (IFA) emulgiert war, in Gegenwart von 140 µg des IA^b beschränkten HBV Kernantigen-abstammenden T-Helferepitops (p128–40; TPPAYRPPNAPIL) injiziert. Nach 11 Tagen wurden Milzzellen von Mäusen (5×10^7 Zellen in 10 ml) in vitro mit 10 µM des Peptides wieder stimuliert. Am Tag 6 der Kultur wurden die Zellen für die spezifische Cytotoxizität in einem 4-Stunden ⁵¹Cr-Feisetzungstest unter Verwendung von RMA-S/HHD-Zellen als Ziele, die mit 1 µM Peptid gepulst waren, oder alleine getestet.

[0053] Wie in der Tabelle 1 angezeigt, induzierte die Immunisierung der HHD-Mäuse mit Peptiden, die von ALK abstammen, die Peptid spezifischen CTL-Reaktionen.

Tabelle 1

Affinität von ALK-abstammenden Peptiden zu HLA-A*0201 Molekülen und Immunogenität in HHD-Mäusen

Peptid (*)	FI (**)	DC ₅₀ (hs) (***)	R/T HHD-Mäuse (****)	% Lyse (*****)
p280-89	5,6 ± 0,92	4	3/6	63 – 49 – 18
p376-85	2,8 ± 0,17	6	3/6	24 – 15 – 15
p282-90	5,4 ± 1,78	4-6	3/6	80 – 56 – 50
p377-85	3 ± 0,35	4-6	3/6	48 – 24 – 21
p621-29	3,5 ± 0,16	4-6	2/6	63 – 53
p281-89	3,5 ± 0,65	2	2/6	42 – 34
p456-65	4,2 ± 0,25	2-4	2/6	67 – 15

* Die Position bezieht sich auf die NPM/ALK-Sequenz.

** Verhältnis (mittlerer Kanal der Fluoreszenz) zwischen der Probe und einer Kontrolle, die ein irrelevantes Peptid enthält. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als der Durchschnittswert von vier Experimenten ± Standardfehler des arithmetischen Mittels.

*** DC₅₀: Halbwertszeit des Zerfalls der HLA-A*0201/Peptid-Komplexe.

**** R/T Responder versus getestete Mäuse. Mäuse wurden als Responder betrachtet, wenn die spezifische Lyse der mit Peptid beladenen RMA-S/HDD Zielzellen zumindest 15% oberhalb der Lyse von RMA-S/HDD lag.

***** Prozentsatz der Lyse von mit Peptid beladenen RMA-S/HDD Zellen bei einem E:T Verhältnis von 60:1. Die Werte entsprechen der maximalen Lyse, die für jede Responder-Maus beobachtet wurde.

Beispiel 3: Stimulierung von ALK-spezifischen CTLs, die von gesunden Spender PBLs abstammten.

[0054] Blut wurde von HLA-A*0201 normalen, freiwilligen Spendern gesammelt. PBMC wurde aus dem Gesamtblut durch Ficol/Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Schweden)-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dendritische Zellen (DCs) wurden gemäß dem Protokoll von Sallustro und Lanzavecchia (Sallustro F. et al, (1994) Jexp Med. 179: 1109–1118) erzeugt. Anhaftende, Monozyten-angereicherte, periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 20 ng/ml rekombinanten menschlichem Interleukin (IL)-4 (R & D Systems, Minneapolis, MN) und 800 U/ml rekombinanten, menschlichem Granulozyten-Makrophagen-, Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) (Sandoz, Basel, Schweiz) ergänzt war. Am Tag 5 der Kultur wurden dem Medium 10 ng/ml an rekombinanten, menschlichem Tumornekrosefaktor (TNF)-α (Knoll, Ludwigshafen, Deutschland) zugesetzt. Nach 40 Stunden wurde der Oberflächenphenotyp der von Monozyten abstammenden DCS bestimmt durch die Einfarben-Durchflusszytometrie unter Verwendung der folgenden mAbs: Fluorescein konjugierte Anti-CD1a (Valter Occhiena, Torino, Italien, Anti-CD86 (CALTAG,

Burlingame, CA), Anti-CD83 (CALTAG, Burlingame, CA), Anti-CD14 (Becton Dickinson) und Rhodamin konjugierte Anti-CD80 (Becton Dickinson). DCs wurden verwendet, um autologe PBL wie folgt zu starten. DCs wurden mit 10 µM Peptid für 2 Stunden bei 37°C gepulst, mit 30 Gy bestrahlt und autologe PBLs in einem Verhältnis zugesetzt, das von 3:1 bis 6:1 variierte (PBL:DC). PBLs (36×10^6 insgesamt) wurden mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/2 ml Kulturmedium kultiviert (CM: 50% RPMI 1640/50% X-VIVO (BioWhittaker, Walkersville, MA)), ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem, autologem Plasma und 10 ng/ml IL-7 (R & D Systems, Minneapolis, MN), in Gegenwart von autologem, mit Peptid beladenem DCs. Am Tag 10–12 der Kultur wurden die Lymphozyten wieder stimuliert mit bestrahlten (30 Gy), autologen, mit Peptid beladenen Monozyten in CM, das mit 10% hitzeinaktiviertem, autologem Plasma ergänzt war. Nach 24–48 Stunden wurden 10 IU/ml IL-2 (Chiron Co., Emeryville, CA) und 10 ng/ml IL-7 zu dem CM ergänzt. Die Lymphozyten wurden dann wöchentlich auf gleiche Weise wieder stimuliert. Beginnend mit der vierten Runde der Stimulierung, wurde die Spezifität der erzielten T-Zelllinien wöchentlich in einem cytolytischen Test bestimmt. Wenn eine spezifische Aktivität nachgewiesen wurde, wurden die CD8+ T-Zellen aus der Massenkultur durch CD4+ Zellen negative Depletion unter Verwendung von mAb beschichteten Kügelchen (Dyna Dynabeads, Oxoid, Oslo, Norwegen) isoliert und die CTL-Linien wurden in Kultur gehalten in RPMI 1640, 10% menschliches AB-Serum enthaltend und ergänzt mit 50 U/ml IL-2, in Gegenwart von bestrahlten (70 Gy) PBMCs als Wachstumsunterlage.

[0055] Für den Zytokin-Freisetzungstest wurden 10^5 Zielzellen (EBV-transformierte B-Zellen und TAP-/- T2-Zellen) und 10^5 Lymphozyten über Nacht in Mikrotiterplatten mit Rundboden mit 250 µl/Vertiefung Gesamtvolumen von RPMI 1640 inkubiert, ergänzt mit 10% FCS. Die Platten wurden dann zentrifugiert und 200 µl Aliquots des Überstandes wurden dann von jeder Vertiefung entfernt. Die IFN-γ Mengen wurden bestimmt durch ELISA (MABTECH, Nacka, Schweden).

Ergebnisse

[0056] Um ALK-spezifische Lymphozyten zu primen, wurden Peptid-gepulste, autologe, dendritische Zellen (DCs), die von peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMCs) abstammten, verwendet, nachdem ihre in vitro Reifung durch Durchflusszytometrie-Analyse von DC-spezifischen Zelloberflächenmarkern bestätigt worden war. Nach einem 3–4 wöchigen Zyklus der Restimulierung wurde die T-Lymphozytenspezifität für ALK-Peptide durch Bestimmung der Antigen beschränkten Lyse der mit Peptid beladenen T2-Zellen ([Fig. 1A](#)) und der NPM/ALK-positiven Lymphomzelllinien ([Fig. 1B](#)) analysiert.

[0057] Bei wenigstens einem von drei getesteten Spendern wurde gefunden, dass sie auf die Stimulierung mit den Peptiden p280–89 (SEQ ID Nr. 1), p376–85 (SEQ ID Nr. 2), p377–85 (SEQ ID Nr. 5) und p456–65 (SEQ ID Nr. 6) (Spender DG, ZB, SA, PG und BF) ([Fig. 1A](#) und [1B](#)) reagierten. Keine spezifische CD8-Reaktivität wurde in den Zelllinien nachgewiesen, die von Spender-PBLS abstammten, welche mit den Peptiden p281–89 (SEQ ID Nr. 3), p282–90 (SEQ ID Nr. 4) und p621–29 (SEQ ID Nr. 7) (Daten nicht gezeigt) stimuliert waren.

[0058] Versuche zur Erzeugung von Anti-ALK CTLs von reagierenden Spendern führte zu der Etablierung von zwei Zelllinien, die für die Peptide p280–89 (Spender DG und ZB) spezifisch waren und zu einer Linie, die für das Peptid p376–85 (Spender SA) spezifisch war. Die Durchflusszytometrie-Analyse zeigte, dass mehr als 99% der Zellen CD3+, CD8+, CD4– (Daten nicht gezeigt) waren.

[0059] Die Antigen-spezifität der Anti-ALK spezifischen CTLs wurde untersucht. Autologe, EBV-transformierte B-Zellen (LCL) oder T2-Zellen wurden mit dem angezeigten Peptid pre-gepulst und als Ziele unter verschiedenen Bedingungen verwendet ([Fig. 2](#)). CTLs von zwei Spendern, die auf das ALK-Peptid p280–89 reagierten, setzten IFN-γ frei (DG: 750 IU/ml; ZB: 445 IU/ml), wenn sie mit p280–89 beladenen LCL inkubiert wurden. Die Zytokinsekretion war vollständig geblockt in Gegenwart von Anti-HLA-A2 mAb CR11.351. Es wurde keine IFN-γ Produktion beobachtet, wenn CTLs allein mit autologem LCL oder mit LCL-Zellen inkubiert wurden, die mit irrelevantem Peptid beladen waren (Influenzamatric: FLU; [Fig. 2A](#)). Ähnliche Mengen an IFN-γ (674 IU/ml) wurden von CTLs freigesetzt, die von dem Spender SA abstammten und mit p376–85 gepulsten T2-Zellen inkubiert wurden. Kein oder nur beschränkte Mengen von IFN-γ wurden entdeckt nach Inkubation der CTLs in Gegenwart von Anti-HLA-A2 mAb CR11.351 alleine oder mit FLU-gepulsten T2-Zellen ([Fig. 2B](#)).

[0060] Ein Titrationstest wurde durchgeführt, um ferner die Sensitivität und Kompetenz von CTLs hinsichtlich der Erkennung des Antigens zu bestimmen. T2-Zellen wurden mit p280–89, p376–85 oder mit FLU-Peptiden in verschiedenen Konzentrationen gepulst und dann als Stimulatoren in einem Zytokin-Freisetzungstest verwendet. Für p280–89 spezifische CTLs wurde die maximale Produktion von IFN-γ nur mit 10 nM Peptid erreicht, was die hohe Affinität der Erkennung und die von der Antigenkonzentration abhängige IFN-γ Herstellung ([Fig. 3A](#)) anzeigt. Die CTL-Linie von dem Spender SA, die für das ALK-Peptid p376–85 spezifisch ist, zeigte

eine geringe Menge an IFN- γ Freisetzung (maximale Freisetzung bei 100 nM), was die geringere Effizienz der T-Zellstimulation (**Fig. 3B**) anzeigt.

[0061] Im Zusammenhang bedeuten diese Ergebnisse, dass die ALK-Peptide, p280–89 und p376–85, die zuvor hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet wurden, dass sie immunogen in HHD-Mäusen sind, auch in der Lage sind, ein spezifisches CTL-Repertoire in PBLs von gesunden Spendern zu mobilisieren. Ferner zeigen die dosisabhängigen Daten, dass eine hohe und eine moderate Affinität der Erkennung für p280–89 und p376–85 erzeugten CTLs vorliegt, was ein weiterer Hinweis ist, dass die ALK-Kinase immunogen ist und nicht Gegenstand von Toleranzmechanismen ist.

Beispiel 4: Lyse von Tumorzelllinien

[0062] Die cytologische Aktivität wurde in einem konventionellen, 4-stündigen ^{51}Cr -Freisetzungstest gemessen. Ein 10-facher Überschuss an nicht markierten K562 Zellen wurde hinzugesetzt, um die NK-Aktivität auszugleichen. Die Zielzellen und das E:T-Verhältnis sind in jeder Figur gezeigt. Die spezifische Lyse wurde gemäß dem folgenden Schema bestimmt: % spezifische Lyse = $\text{cpm}(\text{Probe} - \text{spontan}) / \text{cpm}(\text{Gesamt} - \text{spontan}) \times 100$. Die HLA-A*0201 Blockade der T-Zellaktivität (Lyse- und/oder Zytokinfreisetzung) wurde durchgeführt durch Vorinkubation der Zielzellen mit Anti-HLA-A2 mAb CR11.351.

[0063] Um zu bestimmen, ob die von ALK abstammenden Peptide, von denen gezeigt wurde, dass sie in vivo und in vitro immunogen sind, auch auf natürliche Weise auf menschlichen Tumorzellen verarbeitet werden, wurde die Fähigkeit von p280–89 spezifischen und von p376–85 spezifischen CTLs bestimmt zur Lyse der HLA-A2.1 + ALCL Lymphomzelllinien, SU-DHL1 und SUP-M2, welche das chimäre Protein NPM/ALK exprimieren. ALK-spezifische CTLs töteten diese Tumorzelllinien und ihre lytische Aktivität wurde gehemmt durch die Gegenwart von Anti-HLA-A2 mAb CR11.351. Keine Lyse oberhalb der Hintergrundkonzentration wurde beobachtet in HLA-A2.1 +/ALK– FM3 (Melanom), HCT-116 (Darmkarzinom), MCF-7 (Brustkarzinom), menschlichen Tumorzelllinien, die irrelevante Antigene (**Fig. 4**) exprimieren. Es kann somit daraus geschlossen werden, dass die ALK-Peptid induzierten CTLs effizient Lymphomziele in einer HLA-A2 beschränkten Weise durch eine relevante Antigen spezifische Erkennung lysieren.

[0064] Eine native ALK-Tyrosinkinase-Expression wurde auch in Zelllinien und Tumoren von neuronalem Ursprung, wie Neuroblastom (Lamant L. et al. (2000) Am. J. Pathol, 156: 1711–1721) gezeigt. Da die p280–89 und p376–85 Peptide innerhalb der Kinasedomäne liegen, die sowohl in nativem als auch transloziertem ALK vorhanden ist, wurden Neuroblastom-Zelllinien als Ziele bei cytotoxischen Experimenten verwendet, um ferner die natürliche Reifung von diesen zwei Epitopen zu untersuchen. Aufgrund der beschränkten Expression der Klasse I MHC Moleküle, die Neuroblastome charakterisieren, was mit der Antigenerkennung durch CTLs interferieren kann, wurden Tumorzellen mit INF- γ vor ihrer Verwendung als Ziele behandelt. p280–89 spezifische und p376–85 spezifische CTLs lysierten effizient die HLA-A2.1 +/ALK+ Neuroblastomzelllinie IMR-32. Es wurde weder für die HLA-A2.1 –/ALK+ Neuroblastomzelllinie SK-N-SH noch für die HLA-A2.1 +/ALK– NB-5 Zelllinie (**Fig. 5**) eine Lyse nachgewiesen.

[0065] Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden p280–89 und p376–85 Epitope effizient verarbeitet und für die CTL-Erkennung an der Zelloberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, so dass sie mögliche Ziele für eine Antigen spezifische Immuntherapie darstellen.

Sequenzliste

<110> Gambacorti-Passerini, Carlo
Passoni, Lorena

<120> Immunogenic ALK Peptides

<130> 045922/241203

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Leu Ala Met Leu Asp Leu Leu His Val
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Ala Met Leu Asp Leu Leu His Val
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Met Leu Asp Leu Leu His Val Ala
1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu
 1 5

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Leu Pro Ile Glu Tyr Gly Pro Leu Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ser Leu Thr Ala Asn Met Lys Glu Val
 1 5

Patentansprüche

1. Das HLA-A*0201-bindende ALK-Peptid SEQ ID No: 2.
2. Monoklonaler oder polyklonaler Antikörper, oder aktives Fragment davon, welcher das ALK-Peptid SEQ ID No: 2 erkennt und bindet.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend das ALK-Peptid nach Anspruch 1 in Kombination mit mindestens einem pharmazeutisch verträglichen Exzipienten.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 3 in Form eines Impfstoffs.
5. Verfahren zur ex vivo-Induktion einer cytotoxischen Antwort gegen Tumorzellen, welche ein ALK-Antigen exprimieren, welches In-Kontakt-Bringen von T-Lymphocyten mit dem Peptid nach Anspruch 1 unter geeigneten Bedingungen für die T-Lymphocyten-Aktivierung umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die T-Lymphocyten gegen das Peptid in Kultur direkt exponiert werden.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Peptid zuvor an das HLA-A*0201-Molekül gebunden wird.
8. Eine ein isoliertes Antigen aufweisende Zelle, die das ALK-Peptid nach Anspruch 1 trägt.
9. Das ein Antigen aufweisende Zelle nach Anspruch 8, wobei die Zelle eine dendritische Zelle ist.
10. Isolierter T-Lymphocyt, welcher selektiv einen Komplex aus einem HLA-Klasse I-Molekül und dem ALK-Peptid der SEQ ID No: 2 bindet.
11. Verwendung des ALK-Peptids der SEQ ID No: 2 oder einer ein Antigen tragenden Zelle, welche dieses

Peptid trägt, oder autologer für Komplexe aus einem HLA-A*0201-Molekül und dem oben angegebenen ALK-Peptid spezifischer T-Lymphocyten zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung von Tumoren, die ein ALK-Antigen exprimieren.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Tumor ausgewählt wird aus der Gruppe, die aus ALK-positiven Lymphom, Neuroblastom und ALK-exprimierender Neoplasie besteht.

13. Isolierte Nukleinsäure, die für das HLA-A*0201-bindende ALK-Peptid der SEQ ID No: 2 kodiert.

14. Chimäres Gen, umfassend die isolierte Nukleinsäure nach Anspruch 13 unter Kontrolle eines heterologen Promoters.

15. Expressionsvektor, umfassend das chimäre Gen nach Anspruch 14.

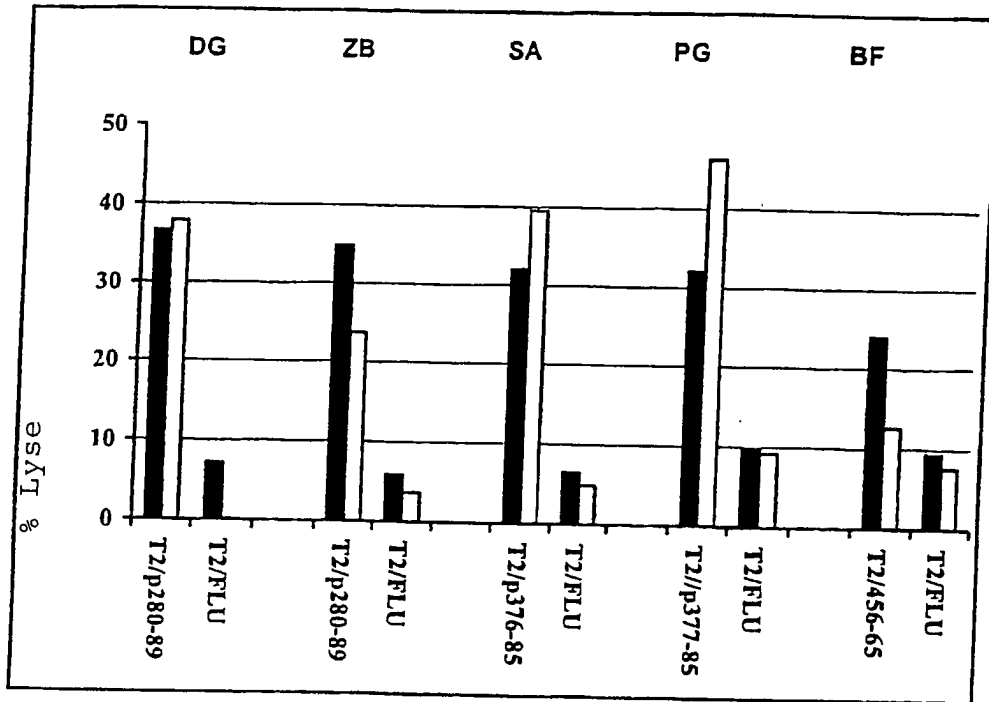
16. Wirtsvektorsystem zur Herstellung eines Peptids, welches den Expressionsvektor aus Anspruch 15 in einer geeigneten Wirtszelle umfasst.

17. Zell-Linie, umfassend das chimäre Gen aus Anspruch 14.

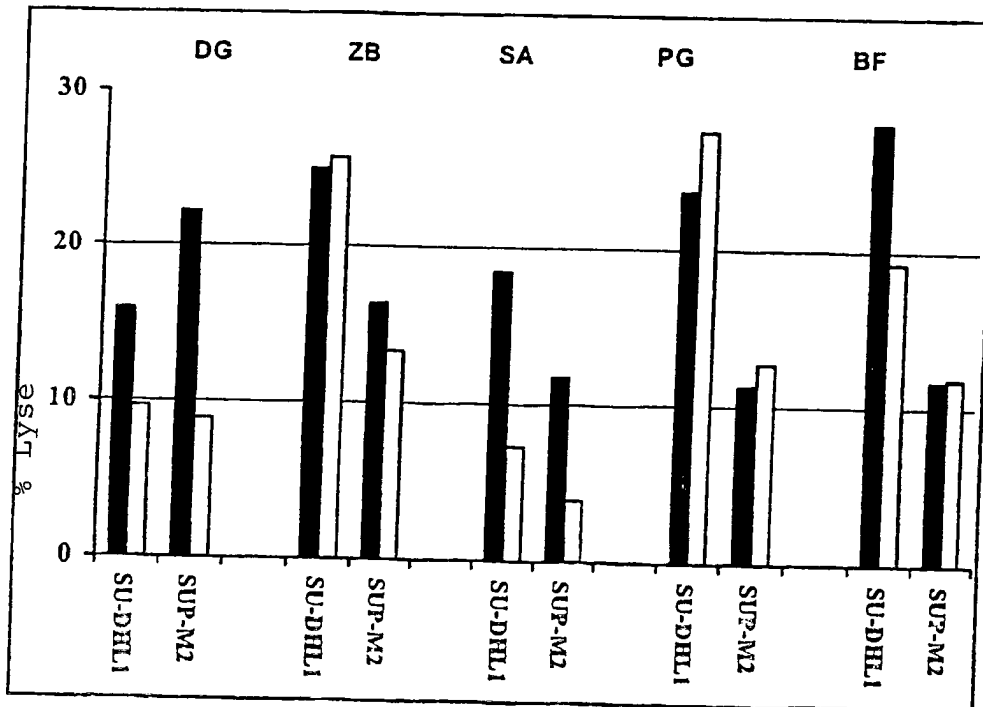
Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1

A

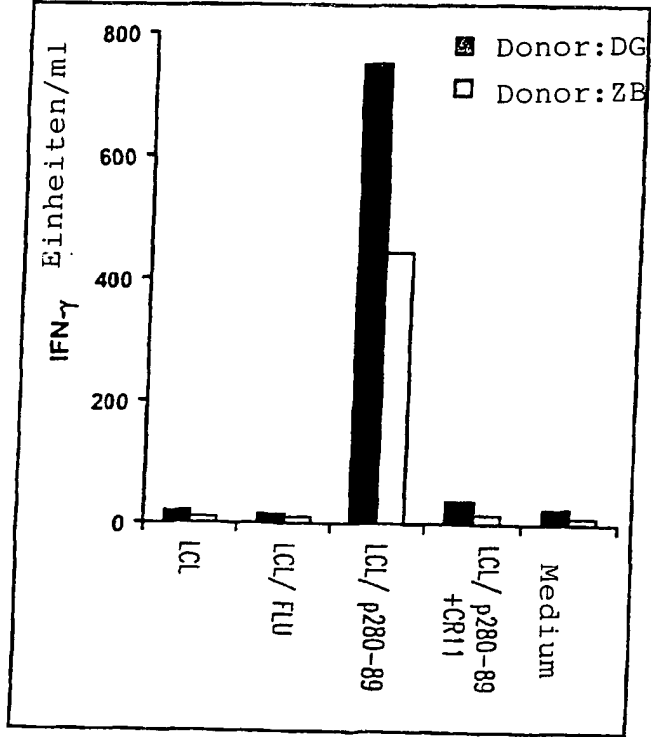


B

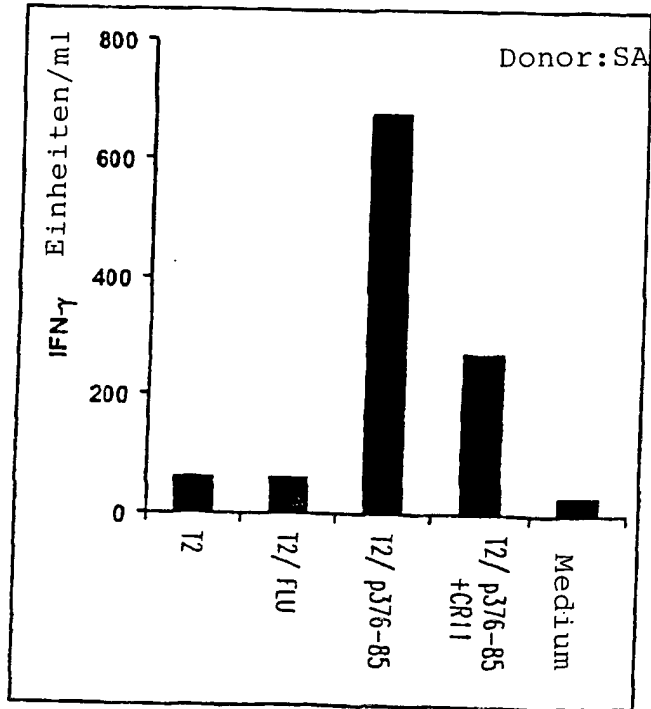


FIGUR 2

A

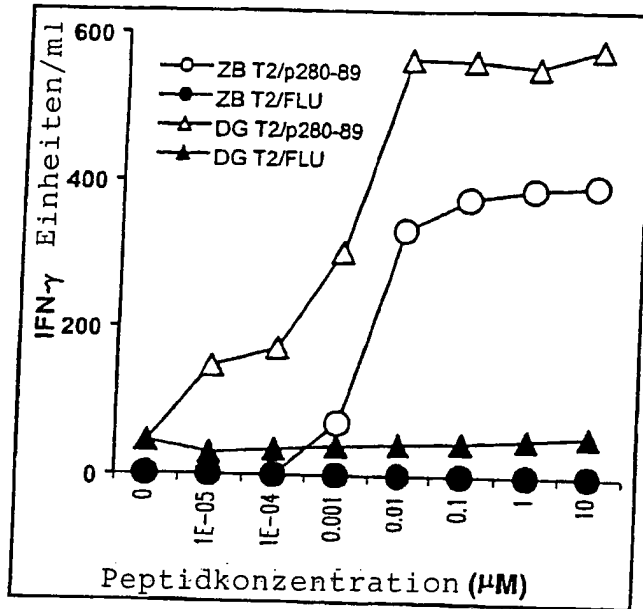


B

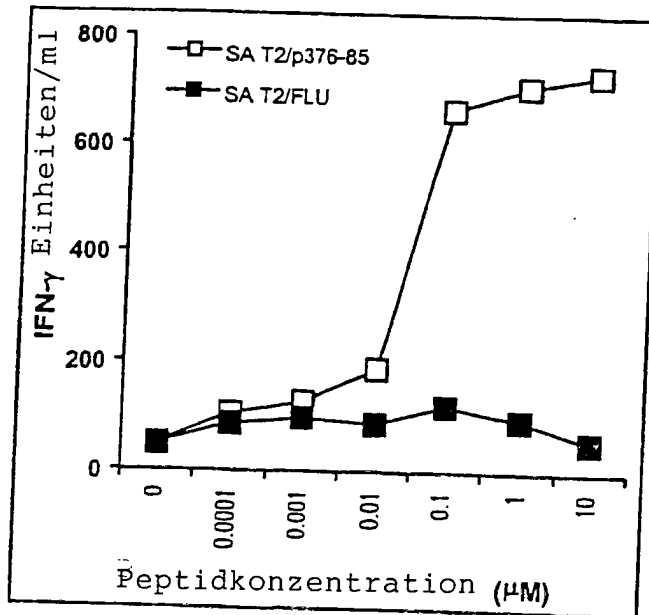


FIGUR 3

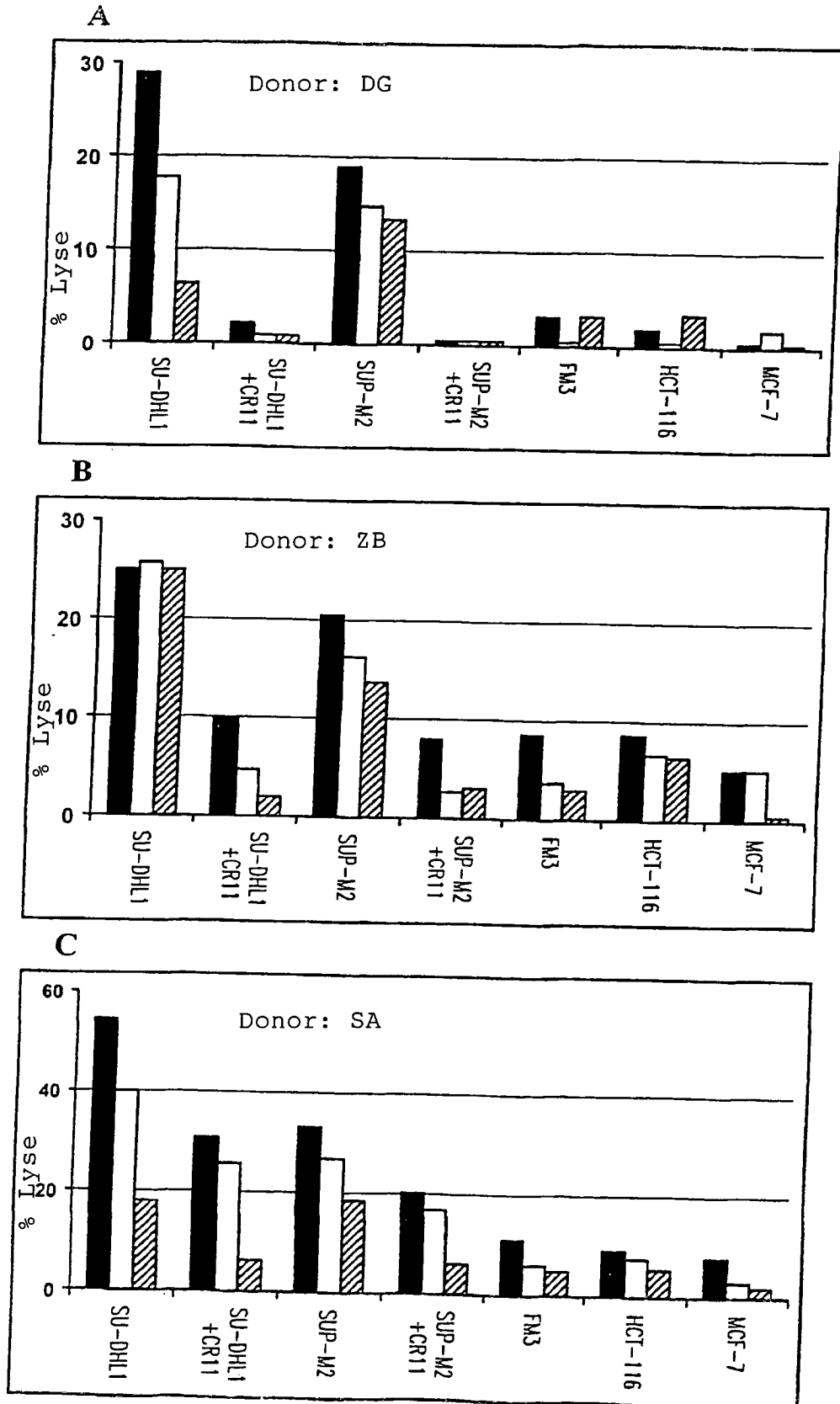
A



B

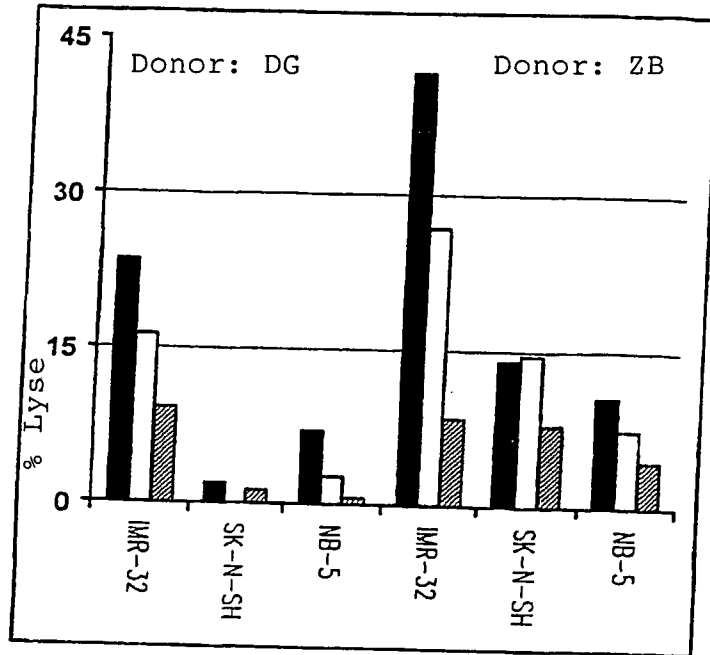


FIGUR 4



FIGUR 5

A



B

