

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4767371号  
(P4767371)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K 35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z
A 6 1 K 35/12	(2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/28	(2006.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	

請求項の数 40 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-525782	(73) 特許権者	511052152
(86) (22) 出願日	平成9年1月17日(1997.1.17)		インペリアル・イノベーションズ・リミテッド
(65) 公表番号	特表2000-503656(P2000-503656A)		イギリス国・SW7・2PG・ロンドン・サウス・ケンジントン・プリンスズ・ゲイト・52
(43) 公表日	平成12年3月28日(2000.3.28)	(74) 代理人	100108453
(86) 国際出願番号	PCT/GB1997/000118		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W01997/026328	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成9年7月24日(1997.7.24)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成15年12月26日(2003.12.26)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	9600878.4		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成8年1月17日(1996.1.17)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	9623471.1		
(32) 優先日	平成8年11月12日(1996.11.12)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞障害性Tリンパ球(CTL)を用いた免疫療法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

異常なポリペプチドまたは異常に上昇した量のポリペプチドを含むまたはそれらと関連し、且つHLAクラスI分子によってその表面に上記ポリペプチドの少なくとも一部を提示できる疾患細胞を含む疾患を有する患者の治療のための、細胞の表面にHLAクラスI分子によって提示される場合、上記ポリペプチドの少なくとも一部を認識する、治療上の有効量の細胞障害性Tリンパ球(CTL)を含む治療剤であって、該細胞障害性Tリンパ球が、上記患者の疾患細胞に含まれるまたはそれと関連する、上記異常なポリペプチドまたは異常に上昇したポリペプチドの少なくとも一部を患者において提示するHLAクラスI分子タイプを持たない健康な個人から由来し、該CTLが前記患者のHLAクラスI分子タイプを有する刺激細胞を使用してin vitroで刺激されており、上記刺激細胞の表面に存在する上記HLAクラスI分子の大集団において上記ポリペプチドの少なくとも一部分を提示することを特徴とする治療剤。

## 【請求項2】

該CTLがCTLのクローン化集団である請求項1記載の治療剤。

## 【請求項3】

該CTLが他の細胞タイプから実質的にフリーである請求項1または2記載の治療剤。

## 【請求項4】

上記ポリペプチドが上記疾患細胞と関連するミュータントポリペプチドである請求項1から3のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項5】

上記ポリペプチドが非疾患細胞と比較して上記疾患細胞においてより高いレベルで存在する請求項1から3のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項6】

該疾患がガンである請求項1から5のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項7】

該ガンが乳ガン;膀胱ガン;肺ガン;前立腺ガン;甲状腺ガン;CML, ALL, AML, PMLのような白血病及びリンパ腫;大腸ガン;グリオーム;セミノーマ;肝臓ガン;膵臓ガン;膀胱ガン;腎臓ガン;子宮ガン;精巣ガン;頭及び首のガン;卵巣ガン;神経芽腫及びメラノーマのいずれか一つである請求項6記載の治療剤。

10

## 【請求項8】

該疾患が慢性ウイルス感染によって引き起こされる請求項1から5のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項9】

該ウイルスがHIV、パピローマウイルス、エプスタインバーウイルス、HTLV-1、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス及びヘルペスウイルスのいずれか一つである請求項8記載の治療剤。

## 【請求項10】

該ウイルスがHIVである請求項9記載の治療剤。

## 【請求項11】

該疾患が異常に上昇した量のホルモンと関連する請求項1から5のいずれか一項記載の治療剤。

20

## 【請求項12】

該疾患が慢性の細菌感染によって引き起こされる細菌疾患である請求項1から5のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項13】

さらにCTLの投与の前に該患者のHLAクラスI分子タイプを測定する工程を含む請求項1から12のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項14】

上記タイプがDNAタイピングを用いて測定される請求項13記載の治療剤。

30

## 【請求項15】

該患者がヒトである請求項1から14のいずれか一項記載の治療剤。

## 【請求項16】

上記細胞障害性Tリンパ球がCTLクローンのライブラリーから選択され、上記ライブラリーは異なるHLAクラスI分子タイプを有する個人から由来する複数のCTLクローンを含み、各上記CTLクローンは上記疾患細胞を認識する請求項13記載の治療剤。

## 【請求項17】

各上記CTLクローンは上記疾患細胞に含まれるまたはそれと関連する同じポリペプチドの少なくとも一部を認識する請求項16記載の治療剤。

## 【請求項18】

選択されたポリペプチドに対して反応性の細胞障害性Tリンパ球のクローン化集団を製造する方法であって、健康な個人由来のCTLまたはその前駆体を含むサンプルを、その表面にHLAクラスI分子を発現し、刺激細胞の表面に存在する上記HLAクラスI分子の大集団において選択されたポリペプチドの少なくとも一部分を提示する刺激細胞と共培養する工程(a)と、上記ポリペプチドの少なくとも一部分が細胞の表面にHLAクラスI分子によって提示される場合、上記選択されたポリペプチドに対して反応性のCTLクローンを選択する工程(b)とを含み、該健康な個人が、刺激細胞上で該選択されたポリペプチドの少なくとも一部分を提示するHLAクラスI分子タイプを持たない、方法。

40

## 【請求項19】

上記CTLまたはその前駆体を含むサンプルがPBMCである請求項18記載の方法。

50

## 【請求項 2 0】

上記選択されたポリペプチドが疾患細胞と関連する異常ポリペプチドであり、または上記ポリペプチドの異常に上昇した量が上記疾患細胞で存在する疾患細胞と関連するポリペプチドである請求項18または19記載の方法。

## 【請求項 2 1】

上記選択されたポリペプチドが疾患細胞と関連するミュータントポリペプチド、または非疾患細胞と比較して上記疾患細胞でより高いレベルで存在するポリペプチドである請求項20記載の方法。

## 【請求項 2 2】

上記疾患細胞がガン細胞、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞及び異常に上昇した量のホルモンを発現する細胞のいずれか一つである請求項20または21記載の方法。

10

## 【請求項 2 3】

該健康な個人がヒトである請求項18から22のいずれか一つの方法。

## 【請求項 2 4】

上記選択されたポリペプチドがサイクリンD1, サイクリンE, mdm2, WT1, EGF-R, erb-B2, erb-B3, FGF-R, インスリン様増殖因子受容体, met, myc, p53, BCL-2, ミュータントRas, ミュータントp53, CML及びALLにおけるBCR/ABLトランスロケーションに関連するポリペプチド, ミュータントCSF-1受容体, ミュータントAPC, ミュータントRET, ミュータントEGFR, PMLにおけるPML/RARAトランスロケーションと関連するポリペプチド, preB白血病及び子供時代の急性白血病におけるE2A-PBX1トランスロケーションと関連するポリペプチド, ヒトパピローマウイルスタンパク質、エプスタインバーウイルスタンパク質、HTLV-1タンパク質、BまたはC型肝炎ウイルスタンパク質、ヘルペス様ウイルスタンパク質及びHIVコードタンパク質のいずれか一つである請求項23記載の方法。

20

## 【請求項 2 5】

さらに健康な個人のHLAクラスIタイプを測定することを含む請求項18から24のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 2 6】

上記HLAクラスIタイプをDNA分析により測定する請求項25記載の方法。

## 【請求項 2 7】

上記刺激細胞がHLAクラスI分子をその表面に持ち、該HLAクラスI分子タイプは健康な個人には存在しない請求項18から26のいずれか一項記載の方法。

30

## 【請求項 2 8】

上記刺激細胞が上記選択されたポリペプチドの少なくとも一部と共に上記HLAクラスI分子を実質的に搭載できない細胞である請求項18から27のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 2 9】

上記細胞がペプチドトランスポーターの発現において欠損のある哺乳動物細胞である請求項28記載の方法。

## 【請求項 3 0】

該哺乳動物細胞がTAPペプチドトランスポーターを欠いているまたはそのレベルが減少している請求項29記載の方法。

40

## 【請求項 3 1】

上記細胞が昆虫細胞である請求項28記載の方法。

## 【請求項 3 2】

上記細胞がDrosophila細胞である請求項31記載の方法。

## 【請求項 3 3】

該刺激細胞が上記HLAクラスI分子を発現可能な核酸分子を用いてトランスフェクトされた宿主細胞である請求項18から32のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 3 4】

トランスフェクション前の上記宿主細胞が実質的に全くHLAクラスI分子を発現しない請求項33記載の方法。

50

## 【請求項35】

上記刺激細胞がT細胞共刺激に重要な分子を発現する請求項18から34のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項36】

T細胞共刺激に重要な分子がB7.1, B7.2, ICAM-1及びLFA3のいずれかである請求項35記載の方法。

## 【請求項37】

上記刺激細胞の表面で発現される実質的に全ての上記HLAクラスI分子が同じタイプである請求項18から36のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項38】

疾患をもつ患者由来の疾患細胞から由来する選択された異常なポリペプチドに対して、または疾患をもつ患者から由来の疾患細胞から由来する選択されたポリペプチドで、上記ポリペプチドの異常に上昇した量が上記疾患細胞に存在するポリペプチドに対して反応性である、健康な個人から由来する細胞障害性Tリンパ球のクローン化集団を含む、疾患をもつ患者の治療剤であって、上記健康な個人は、前記選択されたポリペプチドの提示に関して上記患者に対して異なるHLAタイプを有し、該細胞障害性Tリンパ球が前記患者のHLAクラスI分子タイプを有する刺激細胞を使用してin vitroで刺激されており、上記刺激細胞の表面に存在する上記HLAクラスI分子の大集団において上記ポリペプチドの少なくとも一部分を提示する、治療剤。

10

## 【請求項39】

患者を治療するのに適した細胞障害性Tリンパ球(CTL)を製造する方法であって、請求項18から37のいずれか一項記載の方法によってCTLのクローン化集団を作成し;CTLの上記クローン化集団のT細胞受容体(TCR)、または機能的な同等分子を発現可能な遺伝学的構築物を調製し;そしてCTLまたはその前駆体内に上記遺伝学的構築物を導入し、CTLまたは前駆体が上記患者から由来するものであることを含む方法。

20

## 【請求項40】

異常なポリペプチドまたは異常に上昇した量のポリペプチドを含むまたはそれらと関連し、且つHLAクラスI分子によってその表面に上記ポリペプチドの少なくとも一部を提示できる疾患細胞を含む疾患を有する患者の治療のための、細胞の表面にHLAクラスI分子によって提示される場合、上記ポリペプチドの少なくとも一部を認識する、請求項39に記載の方法によって得られる患者を治療するのに適した細胞障害性Tリンパ球(但し、前記細胞障害性Tリンパ球は請求項39に記載の方法により得られるものに限定される)を含む治療剤。

30

## 【発明の詳細な説明】

本発明は免疫療法に関し、特に細胞障害性Tリンパ球(CTL)を用いた免疫療法に関し、そしてさらに特には借用の免疫療法に関する。

抗腫瘍CTL及び抗ウイルスCTLが、in vivoで重要な役割を演じている証拠が存在する。腫瘍反応性CTLは動物モデル(1)及びヒト(2)において腫瘍抑制を介在することが示されている。同様に、ここ十年の研究により、HIV特異的CTLがin vivoでHIVウイルスの広がりを制限することが示唆されている(3)。

ガンの借用の免疫療法についてin vitroで生産されたCTLを用いることに対しては、多くの興味を持たれている。in vitroで生産されたCTLの潜在的な重要性は、アデノウイルストランスフォームネズミ腫瘍細胞を用いた実験において示唆されている(1)。ヌードマウスを腫瘍細胞を用いて注射し、大きな腫瘍を形成させた。これらのマウスを腫瘍細胞で発現されるトランスフォーミングE1Aタンパク質に特異的なCTLで治療した場合の、腫瘍抑制を観察した。同様に、gp100に対して特異的なin vitroで生産されたCTLがメラノーマ患者に与えられた場合の腫瘍抑制を観察した(2)。それゆえ、限定された特異性を持つTリンパ球の借用のトランスファーはガン患者に対する促進的な治療を代表すると考えられている。同様に、サイトメガロウイルスに対して特異的な借用でトランスファーされたCTLは、骨髄移植を経験している患者においてCMV感染を抑制すると思われる(4)。

40

WO 93/17095は、患者から得たCTLをin vitroで特異的に活性化するMHCクラスI分子の生

50

産法、装填法、及び使用法、そしてそれから治療形態において患者の活性化CTLの返還法を記述する。WO 93/17095は、患者の治療のために用いられるべきは患者自身のCTLであることを特異的に教示する。

Chung等,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,12654-12658は、機能的な3ドメイン単一鎖T細胞受容体の生産を記述する。

Moritz等,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,4318-4322は、ERBB2発現腫瘍細胞に対して接合された認識特異性を持つCTLを記述する。

Roberts等,(1994)Blood 84,2878-2889は、「ユニバーサル」(キメラ)T細胞受容体を装着したCD8<sup>+</sup>Tリンパ球によるHIV感染細胞のターゲティングを記述する。

米国特許第5,359,046号は、「ユニバーサル」(キメラ)T細胞受容体を記述する。

Faber等,(1992)J.Exp.Med.176,1283-1289は、白血病をもつ患者の遺伝子型的にHLA同一な骨髄ドナーからの白血病反応性CTLクローンの生産を記述する。以前の技術の異質遺伝的な骨髄移植では、該物質は健康なドナーから直接由来し、そのため混合した集団であり、クローン化されない。

現在の借用の免疫療法の主要なレートの制限する工程は、それが患者特異的であり、患者自身のTリンパ球プールから特異的CTLの単離及びin vitroの拡大に依存することである。それゆえ各患者に対して、入念な時間のかかる効果なin vitro作業が特異的CTLの十分な数を生産するために必要とされる。さらに患者の中には、免疫系がひどく抑制され、特異的CTLを単離することが不可能な人も存在しよう。

本発明はこれらの限界を打ち破り、患者、特にガン患者の細胞障害性Tリンパ球(CTL)を用いた、より有効な及び潜在的により効果的な借用の免疫療法を提供することを目的とする。

本発明の第一の面として疾患をもつ患者の治療法が提供され、該患者はその細胞が異常な分子または異常に上昇した量の分子を含む、またはそれらと関連した疾患細胞を含み、そして該患者の細胞はHLAクラスI(または同等物)分子によってその表面に上記分子の少なくとも一部を提示させることができる疾患細胞を含み、該方法は該患者に治療上の有効量の細胞障害性Tリンパ球(CTL)を投与することを含み、細胞の表面にHLAクラスI(または同等物)分子によって提示されている場合、CTLは上記分子の少なくとも一部を認識し、細胞障害性Tリンパ球が疾患を持つ該患者から由来しないことを特徴とする方法である。

それゆえ本発明は例えば患者のHLAクラスI分子によって提示させられる選択されたペプチドに対して好ましくは健康な個人からCTLを生産することによって、以前の問題に打ち勝つ。もしCTLドナーがCTL認識ペプチドを提示していないクラスI分子を発現していないならば、これらのCTLは異種制限的であろうしあるいは、もしCTLドナーがCTL認識ペプチドを提示しているクラスI分子を発現しているのであれば、これらのCTLは自己MHC(HLA)制限的であろう。

該患者に投与されるためのCTLは、簡便には以下に記述される本発明の第三の面の方法を用いて作製される。

「HLAクラスI(または同等物分子)」なる語によって、我々はいかなるヒト以外の動物、好ましくは脊椎動物および特に哺乳動物からヒトHLAクラスIまでと同等であるHLAクラスIタンパク質またはいかなるタンパク質をも意味する。例えばマウスにおいて、MHCクラスIタンパク質はヒトHLAクラスIタンパク質と構造において同一であり、及び役割においても同一であることがよく知られている。ヒトHLAクラスI分子と同等なタンパク質は、特に分子生物学的方法を用いて当業者によって他の哺乳動物種において容易に同定され得る。

「上記分子の少なくとも一部分」なる語によって、我々はHLAクラスI(または同等物)分子によって細胞の表面に提示され得る上記分子のいかなる断片をも含める。

「異常に上昇した量の分子」なる語によって、我々は通常細胞と比較して疾患細胞において、該分子が>1.2倍の濃度で提示する;より好ましくは>2倍で;さらにより好ましくは>5倍で;そして最も好ましくは>10倍の濃度で存在することを意味する。異常に上昇した量の分子には、通常(すなわち野生型)分子が該分子を通常発現しない細胞タイプにおいて発現さ

10

20

30

40

50

れる状況も含まれることは明白であろう(すなわち存在v不存在)。また、異常に上昇した量の分子は、細胞において通常発現されないポリペプチドの発現の異常な活性化のためであり、あるいはそれは発現の異常なレベルのためであろうことは明白であろう。

もし患者に投与されるCTLがCTLのクローン化集団であれば特に好ましい。

もし患者に投与されるCTL(好ましくはCTLのクローン化集団)が他の細胞タイプから実質的にフリーであればまた特に好ましい。

該分子は少なくともその一部がHLAクラスI(または同等物)分子によって細胞の表面に提示させられ得るいかなる分子であってもよい。

好ましくは該分子は、糖タンパク質のような炭水化物含有ポリペプチドを含むポリペプチドであり、あるいはペプチド含有炭水化物を含む炭水化物であり、さらにはあるいはペプチド含有素脂質または糖脂質を含む脂質または糖脂質である。

10

以下により詳細に記述されるように、異常分子または異常に上昇した量の分子は、多くの疾患及び疾患細胞と関連する。

該方法が自己タンパク質(例えば疾患細胞で過剰発現されているもの、または同じタイプの通常細胞では発現されていない一方で疾患細胞では発現されているもの)のターゲティングに有効である場合、該方法は特に有利である。

該患者はCTLを受け取った場合、免疫抑制されるまたはされないであろう。もし該患者が免疫抑制されるならば好ましい。

もし上記物質がポリペプチドであればより好ましい。より長いペプチドまたはポリペプチドから由来するペプチド断片が、細胞、特に疾患細胞の表面でHLAクラスI(または同等物)分子によって提示させられることは、免疫学の分野でよく知られている。

20

該CTLは患者が疾患に罹患する前に採取されたサンプル由来の患者である個人に由来するものであろうが、もし該CTLが該患者以外の個人から由来するものであればもっとも好ましい。

もちろん該個人は健康な個人であることが好ましい。「健康な個人」なる語によって、我々は該個人が一般的によい健康状態であり、好ましくは十分な免疫系を持ち、より好ましくは容易に試験され得検出され得るいかなる疾患にも苦しんでいないことを意味する。

特に好ましい実施態様においては、該CTLは上記患者の疾患細胞に含まれるまたは関連する、上記異常分子または異常に上昇した分子の少なくとも一部が患者において提示するHLAクラスI(または同等物)分子タイプを持たない個人から由来する。

30

「タイプ」なる語は伝統的な免疫学的感覚で用いられる。

それゆえ該CTLはそのHLAクラスI(または同等物)分子が患者のものとミスマッチする個人から由来する。それゆえもし該CTLが異種制限的であれば好ましい。

この好ましい実施態様においては、上記異常分子または上記異常に上昇した分子の少なくとも一部で提示するタイプ以外の、HLAクラスI(または同等物)分子タイプは、該患者と該個人の間で同じかまたは異なるであろう。特定の環境の下では、もしそれらが同じであれば好ましい。

以下に詳細に記述されるようなミュータントポリペプチドは、しばしば疾患細胞と関連し、しばしば疾患細胞に対する分子マーカーとして機能する。それゆえもし該ポリペプチドが上記疾患細胞と関連するミュータントポリペプチドであれば好ましい。

40

以下に詳細に記述されるような疾患細胞は、しばしば非疾患細胞と比較して上記疾患細胞においてより高いレベルでポリペプチドの提示と関連する。例えば特定のポリペプチドはある腫瘍細胞で過剰発現されることが知られている。それゆえ非ミュータント自己タンパク質をターゲット化することもまた好ましい。

該ポリペプチドが以下のいずれかのものであれば好ましい:

i) 腫瘍において異常に高いレベルで発現される通常細胞タンパク質;例えば様々な腫瘍におけるサイクリンD1;乳ガンにおけるサイクリンE;様々な腫瘍におけるmdm2;EGF-R,erb-B2,erb-B3,FGF-R,インスリン様増殖因子受容体,Met,myc,p53及びBCL-2は全て様々な腫瘍で発現される。

ii) 腫瘍でミューテートされる通常細胞タンパク質;例えば様々な腫瘍におけるRasミュー

50

テーション;様々な腫瘍におけるp53ミューテーション;CML及びALLにおけるBCR/ABLトランスロケーション;AML及びMDSにおけるCSF-1受容体ミューテーション;大腸ガンにおけるAPCミューテーション;MEN2A, 2B及びFMTCにおけるRETミューテーション;グリオームにおけるEGFRミューテーション;PMLにおけるPML/RARAトランスロケーション;プレB白血病及び小児急性白血病におけるE2A-PBX1トランスロケーション。

iii)ウイルス感染と関連した腫瘍におけるウイルスコードタンパク質;例えば子宮頸ガンにおけるヒトパピローマウイルスタンパク質;B細胞リンパ腫及びHodgkin'sリンパ腫におけるエプスタインバーウイルスタンパク質;成人T細胞白血病におけるHTLV-1タンパク質;肝細胞ガンにおけるB型及びC型肝炎ウイルスタンパク質;カポシ肉腫におけるヘルペス様ウイルスタンパク質。

10

iv)HIV感染患者におけるHIVコードタンパク質。

それゆえ腫瘍反応性CTLによって認識される抗原は、3の主要なカテゴリーに分けられ得る:(i)腫瘍細胞で高レベルで発現される通常自己抗原;(ii)腫瘍細胞で発現されるミュータント自己抗原;(iii)ウイルス感染と関連する腫瘍において発現されるウイルス抗原。カテゴリー(i)が好ましい。

3のサブタイプがカテゴリー(i)に含まれる:

a)過剰発現される通常細胞タンパク質;

b)通常細部では組織特異的に発現され、腫瘍では発現されないタンパク質;及び

c)未発達抗原であり、ほとんどの成人組織では発生しないが、腫瘍においては異常に発現されるタンパク質。

20

b)及びc)の例は以下のものがある:

b)GATA-1, IKAROS, SCLのような腫瘍反応性CTLに対するターゲットとして組織特異的分化抗原(造血系列及び白血病で発現される);及び

免疫グロブリン定常領域(複数ミエローマの治療のため);及び

c)白血病及びWilms腫瘍の治療のためWilms腫瘍抗原1(WT1)、そして肝腫瘍及び小腸腫瘍に対するガン胚抗原(CEA, 胎児タンパク質)。

ヒト腫瘍における原ガン遺伝子コードタンパク質の過剰発現及びヒト腫瘍において発現されるミュータント原ガン遺伝子は、Stauss & Dahl(1995)Tumour Immunology, Dalglish/Browning, 第7章に記述されており、参考としてここで取り込まれる。

それゆえもし治療されるべき疾患がガンであれば好ましい;より好ましくは乳ガン;膀胱ガン;肺ガン;前立腺ガン;甲状腺ガン;CML, ALL, AML, PMLのような白血病及びリンパ腫;大腸ガン;グリオーム;セミノーマ;肝臓ガン;膵臓ガン;膀胱ガン;腎臓ガン;子宮頸ガン;精巣ガン;頭と首のガン;卵巣ガン;神経芽腫及びメラノーマのいずれか一つである。

30

CMLは慢性骨髄性白血病である;ALLは急性リンパ芽球性白血病である;AMLは急性骨髄性白血病である;そしてPMLはプロ骨髄性白血病である。

治療される疾患は病原体、特に細菌、酵母、ウイルス、トリパノソーマ等によって引き起こされるいかなる疾患でもよい。もし該疾患が病原体による慢性的感染によって引き起こされるならば好ましい。もし病原体が宿主免疫系によって容易に排除されないものであればまた好ましい。

もし該疾患がウイルス感染であれば好ましい;より好ましくは疾患はHIV, パピローマウイルス, エプスタインバーウイルス, HTLV-1, B型肝炎ウイルス, C型肝炎ウイルス, ヘルペスウイルスまたは慢性感染を引き起こすいかなるウイルスのいずれか一つによって引き起こされる。もし該ウイルスがHIVであれば特に好ましい。

40

ポリペプチドの異常なグリコシレーションが、ある疾患及び疾患細胞で引き起こされることも知られている。

細胞によって生産される異常に上昇した量のホルモンが、甲状腺疾患の特定のタイプのようである疾患で生ずる。それゆえ本発明の方法は、上昇した量のホルモンを生産する細胞を除去するために通常用いられる。ホルモンそれ自身、または少なくともその一部が、HLAクラスI(または同等物)分子によって提示されない場合でさえ、異常なまたは異常に上昇したのいずれかの細胞において、及びHLAクラスI(または同等物)分子によって提示さ

50

れる細胞において、分子が提示するであろうことは予測されよう。例えば、ホルモンが細胞によって過剰生産される特定の疾患においては、上記ホルモンの合成に関与する生合成酵素が細胞によって過剰生産されるであろう。

細菌感染、特に慢性感染を引き起こすものは、本発明の方法によって通常治療されよう。もし該細菌感染が細胞内感染であれば好ましい。それゆえ該方法は結核を治療するのに有用であろう。

該方法はまたマラリアを治療するためにも用いられ得る。

もし患者のHLAクラス I (または同等物) 分子タイプがCTLの投与前に測定されたならば好ましい。該CTLがそのHLAクラス I (または同等物) 分子が該患者のものとミスマッチする患者以外の個人から由来する場合には、これは特に好ましい。

10

HLAクラス I 系の遺伝学の大変多くの研究のため、そのタイプはDNAタイピングを用いて容易に決定され得る。特にPCRのようなDNA増幅に基づくタイピング系を用いることは簡便である。これらの方法は本分野でよく知られており、唾液サンプルまたは口内上皮細胞を削ぐことによるような小さな組織サンプルで実施され得る。

本発明の方法はヒト、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジまたはブタのようないかなる哺乳動物にも用いられ得ることは予想されよう。

もし該患者がヒトであれば最も好ましい。

患者及びCTLのドナーが同じ種、例えば両者がヒトであると好ましいが、該方法は患者とドナーが異なる種に由来する場合にはも有用であることは考えられよう。言い換えると、本発明の第一の面の方法は、ヒト患者が非ヒトドナーからCTLを与えられ得ることを含む

20

。本発明の方法において使用される細胞障害性Tリンパ球、好ましくはCTLのクローン化集団は、以下に記述する本発明の第三の面の方法を用いて簡便に調製され得る。

本発明の第一の面の好ましい実施態様は、患者のHLAクラス I (または同等物) 分子タイプをCTLの投与前に測定するものであるが、該CTLは患者において上記異常分子の少なくとも一部分で提示する、または上記患者の疾患細胞に含まれるまたは関連する以上に上昇した分子の少なくとも一部分で提示するHLAクラス I (または同等物) 分子タイプを持たない個人から由来し、そして該CTLはCTLクローンのライブラリーから選択され、上記ライブラリーは異なるHLAクラス I (または同等物) 分子タイプを持つ個人からそれぞれ由来するCTLクローンの大多数を含み、上記CTLクローンは上記疾患細胞を認識する。

30

より好ましくは各上記CTLクローンは、上記疾患細胞に含まれるまたはそれと関連する同じ分子の少なくとも一部を認識する。

もし約 $10^8$ から $10^{11}$ のCTL、より好ましくは $10^9$ から $10^{10}$ のCTLが該患者に投与されると好ましい。該細胞はある他の方法によって疾患を治療されている患者に与えられ得る。それゆえ該治療方法は単独で用いられ得るが、それを補助的治療として用いることも望ましい。該CTLは他の治療の前、最中または後に投与し得る。

治療される疾患がガンの場合、もし該ガンが本発明の方法を用いるのと同様に、ありきたりの治療または手術を用いて治療されている、治療される、または治療される予定であれば好ましい。簡便には、治療に依存して、該ガンは放射線治療または化学療法によって治療される。

40

治療される疾患が病原体による感染症である場合、もし該感染症がありきたりの治療または手術を用いて治療されている、治療されるまたは治療される予定であるならば好ましい。

もし治療される患者がHIV感染であるならば、もし本発明の方法がAZTまたは3TCのような逆転写酵素阻害剤を用いた治療に対する補助的なものとして用いられれば好ましい。

本発明の方法が固い腫瘍に対して用いられた場合、もしCTLが最初の手術後の治療として投与されれば好ましい。

本発明の方法が白血病を治療するために用いられた場合、もし該CTLが放射線治療または化学療法後に投与されれば好ましい。もし白血病患者が骨髄移植と組み合わせて該CTLを用いて治療されたならばそれも好ましい。

50

該CTLはありきたりの経路で投与される。もし該CTLが静脈内に投与されれば好ましい。もし該CTLが疾患の部位(腫瘍または局所的なウイルスや細菌の感染のような)に局所的に投与されればまた好ましい。簡便には、該CTLは疾患部位または疾患が局在している組織を供給する動脈内に投与される。

本発明の第二の面として、疾患を持つ患者を治療するための医薬の製品における細胞障害性Tリンパ球(CTL)の使用が提供され、そこでは該患者は異常分子または以上に増大した量の分子を含むまたはそれと関連する疾患細胞、そしてHLAクラスI(または同等物)分子によってその表面上記分子の少なくとも一部を提示することができる疾患細胞を含み、そこで細胞障害性Tリンパ球は、細胞の表面にHLAクラスI(または同等物)分子によって提示される場合、上記分子の少なくとも一部を認識する。

10

本発明の第三の面として、選択された分子に対して反応性の細胞障害性Tリンパ球(または同等物)分子のクローン集団を作成する方法が提供され、該方法は工程(a)その表面にHLAクラスI(または同等物)分子を発現する刺激細胞で、該細胞の表面に提示する占有したHLAクラスI(または同等物)分子の大集団において選択された分子の少なくとも一部を提示する刺激細胞を用いて、健康な個人由来のCTLまたはその前駆体を含むサンプルの共培養すること、及び工程(b)上記分子の少なくとも一部が細胞表面にHLAクラスI(または同等物)分子によって提示されている場合、上記選択された分子に対して反応性のCTLクローンを選択することを含む。

該方法の刺激細胞は、ここで参考として取り込まれるWO 93/17095に記述されている方法を用いて作製され得ることは予測され、該方法の方法工程は本ケースでは該方法は刺激細胞と健康な個人由来のCTLまたはその前駆体を含むサンプルを共培養することを含むという、大変重要な点を除いて、WO 93/17095に記述されたものと本質的に同様であることは予測し得、WO 93/17095の方法は該細胞で治療される患者由来のソースを使用する。加えてWO 93/17095とは対照的に本発明は、異質遺伝的で共同薬的ではないHLAクラスI(または同等物)分子によって提示されるペプチドに対してCTLを向かわせることを好む。

20

特にWO 93/17095の以下の部分は参考として取り込まれる:「発明の詳細な説明」の23頁から52頁11行で、刺激細胞の生産を記述する部分;90頁以後のクラスI分子に対する差別的結合性質を持つペプチドの生産についての部分;そして123頁と124頁に記述されているクラスI分子バンク。

「大集団」なる語によって、我々は占有されたHLAクラスI(または同等物)分子の少なくとも50%を、より好ましくは70%を、さらにより好ましくは少なくとも90%を、最も好ましくは99%を意味する。

30

「CTLまたはその前駆体を含むサンプル」なる語は、いかなる適した該サンプルでもよく、そして特異的には末梢血液単球細胞(PBMC)、へその緒冷蔵血液(それは分化していないT細胞のソースである)、T細胞の侵入を含むいかなる組織、そしてT細胞またはその前駆体を含むいかなる体液をも制限することなく含み、そして胸腺細胞をも含む。

CTLを含むサンプルはin vitroでクローン化されたCTLの培養物でもよく、そうでなくともよい。

好ましくはCTLまたはその前駆体を含む上記サンプルはPBMCである。

好ましくは上記分子はポリペプチドである。

40

適切には上記選択された分子は、疾患細胞と関連した異常分子であり、または上記分子の異常に上昇した量が上記疾患細胞で存在している疾患細胞と関連した分子である。

「疾患細胞と関連した分子」なる語によって、我々は疾患細胞において異常形態で見出され、または疾患細胞において異常に上昇したレベルで見出されるいなる分子をも含める。もちろん、もし上記選択された分子またはより特には刺激細胞上でHLAクラスI(または同等物)分子によって提示されるその部分が、細胞タンパク質(それは細胞内のもの、表面で発現されるもの、分泌されるものなど)のプロセッシングによって、そして該細胞上でHLA関連性提示によって生産されるペプチドの同性的な同等物であれば、簡便である。方法には特に、より大きいペプチドからペプチド配列を選択するためのペプチドモチーフを用いるコンピューターベース法が知られており、即では上記ペプチド配列が特にHLAクラスI

50

分子(または同等物)タイプ二血お具するためのよい候補である。特にもし上記選択された分子が *in vitro* で合成されると好ましい。もし選択された分子の部分がペプチドであり、これが標準的なペプチド合成法で作製されると特に好ましい。ペプチドはLu等,(1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433及びそこでの参考文献に開示されているように固相ペプチド合成のFmocポリアミドモードで合成されよう。一次的なNアミノ基保護は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基によって与えられる。この高ベース不安定保護基の反復的な切断は、N,N-ジメチルホルムアミドにおける20%ピペリジンをを用いて作用される。側鎖機能性はそのブチルエーテル(セリン、スレオニン及びチロシンの場合)、ブチルエステル(グルタミン酸及びアスパラギン酸の場合)、ブチルオキシカルボニル誘導体(リシンおよびヒスチジンの場合)、トリチル誘導体(システインの場合)、及び4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン誘導体(アルギニンの場合)のように保護されるであろう。グルタミンまたはアスパラギンがC末端である場合、使用は側鎖アミノ機能性の保護のため4,4'-ジメトキシベンズヒドリル基から作製される。固相支持体は3のモノマージメチルアクリルアミド(バックボーンモノマー)、ビスアクリロイルエチレンジアミド(架橋剤)及びアキロイルサルコシンメチルエステル(機能性試薬)から構成されるポリジメチル-アクリルアミドに基づく。用いられるペプチド-トゥー樹脂切断可能結合試薬は、酸不安定4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸誘導体である。全てのアミノ酸誘導体は、アスパラギンとグルタミンを除いてその実施される対称無水物誘導体として加えられ、アスパラギンとグルタミンは逆のN,N-ジシクロヘキシル-カルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール介在性カップリング法を用いて加えられる。全てのカップリングと脱保護反応はニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸またはイソチンテスト法を用いてモニターされる。合成の完成に際してペプチドを、50%不純物除去剤ミックスを含む95%トリフルオロ酢酸を用いた処理によって、側鎖保護基の同時除去を用いて、樹脂支持体から切断する。一般的に用いられる不純物除去剤はエタンジチオール、フェノール、アニソール及び水であり、正確な選択は合成されるペプチドの構成アミノ酸に依存する。トリフルオロ酢酸は未消化のペプチドを提供するジエチルエーテルを用いた後の粉碎で、*in vacuo* で蒸発によって除去される。いかなる不純物除去剤を与えても、水相の凍結乾燥により、不純物除去剤のフリーな未消化のペプチドを与える単純な抽出法によって除去される。ペプチド合成のための試薬は、一般的にCalbiochem-Novabiochem(UK)Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UKより入手可能である。精製はサイズ溶出クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー及び(主として)逆相高パフォーマンス液体クロマトグラフィーのような方法のいずれか一つで、またはそれらを組み合わせる実施される。ペプチドの分析は、薄相クロマトグラフィー、逆相高パフォーマンス液体クロマトグラフィー、酸加水分解の後のアミノ酸分析を用いて実施され、高速原子衝撃(FAB)マスペクトロメトリー分析によって、またはMALDI(マトリックスアシストレーザー脱着イオン化)マスペクトロメトリーあるいは電子スプレーマスペクトロメトリーによって実施され得る。

簡便には上記選択された分子は、疾患細胞と関連するミュータントポリペプチド、または非疾患細胞と比較して上記疾患細胞においてより高レベルで提示するポリペプチドである。

好ましくは上記疾患細胞は、ガン細胞、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞及び異常に上昇した量のホルモンを発現している細胞のいずれか一つである。

さらに好ましくは健康な個人はヒトである。CTLが異質遺伝的で共同薬的ではないHLAクラスI(または同等物)分子によって提示されるペプチドに対して向けられることも好ましい。

もし該ポリペプチドが以下のいずれか一つであれば好ましい:

i) 腫瘍において異常に高いレベルで発現される通常細胞タンパク質;例えば様々な腫瘍におけるサイクリンD1;乳ガンにおけるサイクリンE;様々な腫瘍におけるmdm2;EGF-R,erb-B2,erb-B3,FGF-R,インスリン様増殖因子受容体, Met, myc, p53及びBCL-2は全て様々な腫瘍で発現される。

ii) 腫瘍でミューテートされる通常細胞タンパク質;例えば様々な腫瘍におけるRasミュー

10

20

30

40

50

テーション;様々な腫瘍におけるp53ミューテーション;CML及びALLにおけるBCR/ABLトランスロケーション;AML及びMDSにおけるCSF-1受容体ミューテーション;大腸ガンにおけるAPCミューテーション;MEN2A, 2B及びFMTCにおけるRETミューテーション;グリオーマにおけるEGFRミューテーション;PMLにおけるPML/RARAトランスロケーション;プレB白血病及び小児急性白血病におけるE2A-PBX1トランスロケーション。

iii) ウイルス感染と関連した腫瘍におけるウイルスコードタンパク質;例えば子宮頸ガンにおけるヒトパピローマウイルスタンパク質;B細胞リンパ腫及びHodgkin'sリンパ腫におけるエプスタインバーウイルスタンパク質;成人T細胞白血病におけるHTLV-1タンパク質;肝細胞ガンにおけるB型及びC型肝炎ウイルスタンパク質;カポシ肉腫におけるヘルペス様ウイルスタンパク質。

10

iv) HIV感染患者におけるHIVコードタンパク質。

3のサブタイプがカテゴリー(i)に含まれる:

a) 過剰発現される通常細胞タンパク質;

b) 通常細部では組織特異的に発現され、腫瘍では発現されないタンパク質;及び

c) 未発達抗原であり、ほとんどの成人組織では発生しないが、腫瘍においては異常に発現されるタンパク質。

b)及びc)の例は以下のものがある:

b) GATA-1, IKAROS, SCLのような腫瘍反応性CTLに対するターゲットとして組織特異的分化抗原(造血系列及び白血病で発現される);及び

免疫グロブリン定常領域(複数ミエローマの治療のため);及び

20

c) 白血病及びWilms腫瘍の治療のためWilms腫瘍抗原1(WT1)、そして肝腫瘍及び小腸腫瘍に対するガン胚抗原(CEA, 胎児タンパク質)。

特定の好ましい実施態様において、該方法はガン患者またはHIV患者のHLAクラスI分子によって提示されるペプチドを認識するCTLクローンの単離を導く。該CTLは好ましくはHLAミスマッチの健康な個人から単離される。特に、もし該健康な個人が刺激細胞において選択された分子の少なくとも一部を提示するHLAクラスI(または同等物)分子タイプを持っていなければ好ましい。これは、健康な応答者のCTLレパートリーが患者のHLA分子によって提示される選択された分子の部分に耐性ではないであろうことを確認するであろう。これはT細胞耐性が自己HLA制限的であるためである。これは、健康な応答者個人のCTLがその人自身のHLA分子によって提示されるペプチド断片に対してのみ耐性で、患者のミスマッチHLA分子によって提示されるペプチド断片に対しては耐性ではないことを意味する。それゆえもし本発明のこの面を用いて作製されるCTLが異種制限的であり、患者に関して異質遺伝的であれば好ましい。一度単離されると、該CTLは本発明の第一の面の方法に記述されているように適切なHLAクラスIを発現する全ての患者の借用の免疫治療に対して用いられ得る。簡便には本発明のこの第三の面の方法は、異なるHLAクラスI分子によって提示される腫瘍関連性タンパク質またはHIVタンパク質に由来するペプチドを認識するCTLクローンのバンクまたはライブラリーを生産するために用いられる。このCTLクローンのバンクは、適切なHLAクラスI分子を発現する患者から入手可能である。それゆえ借用の免疫治療は、各患者に対する自己由来のCTLクローンの苦心する生産に依存することはもはやなく、異種CTLクローンが「準備でき次第」成し遂げられよう。

30

40

本発明のこの面の方法は特に、腫瘍において異常に高いレベルで発現される自己タンパク質に対して、または腫瘍において及び制限された通常細胞(組織特異的分化抗原)において発現される自己タンパク質に対して、あるいはその発現が腫瘍細胞において活性化される初期の抗原に対して、CTLの生産に適している。ガン患者は頻繁にこれらのタンパク質から由来する自己ペプチドに耐性であり、CTL応答を装備することができないであろう。これはHLAミスマッチ個人においては異なる。そのT細胞レパートリーは、HLAミスマッチガン患者によって発現されるクラスI分子の関係において提示される自己ペプチドに耐性ではなからう。それゆえHLAミスマッチの健康な個人を用いて、ガン患者のクラスI分子によって提示される自己ペプチドを認識するCTLを単離することが可能であろう。本定義によって、該CTLは分子特異的で、通常ペプチド特異的であり、異質遺伝的クラスI分子に

50

よって制限される。これらのCTLはこれらのペプチドを提示する腫瘍細胞を効率的に溶解することが期待され、一方で通常細胞はこれらのペプチドを提示せず、または提示のレベルはCTL溶解を刺激するにはあまりに低い。

異常に発現された自己ペプチドに加えて、ミューテートされた腫瘍遺伝子から由来するミューテートされた自己ペプチド、またはHIVから由来するウイルスペプチドもまた、借用の免疫治療に対するターゲットを代表する。これらのCTLはガン患者またはHIV感染患者のHLAクラスI分子によって提示されるミューテートされたまたはウイルスペプチドに対して特異的である。クラスI対立遺伝子を提示するペプチドは、患者と健康のドナーの間で共有されており、その場合は*in vitro*生産CTLが自己HLA制限的であろう。異種制限的CTLは自己制限的CTLの前駆体頻度及び/または親和力は低い場合には有利であろう。

本発明のこの面の方法は腫瘍関連性タンパク質またはHIVタンパク質から由来する選択されてペプチドに対して異種制限的または自己制限的CTLクローンを生産するのに適している。該CTLはMHCクラスI分子の大集団において腫瘍関連性またはHIVペプチド提示する刺激細胞を用いて健康な個人からPBMCを共培養することによって、*in vitro*で簡便に生産される。これは刺激細胞によって発現される選択された分子プラスMHCクラスI分子の複合体に特異的なCTLクローンの単離を容易にする。該CTLクローンは、それを向かわせているMHCクラスI対立遺伝子を発現する全ての患者の借用の免疫治療に対して有用であろう。CTL特異的異種制限的ペプチドの概念が現在議論されている。

高リガンド密度モデルは異種反応性CTLが異質遺伝的MHC分子密度を認識することを仮定するが、現在ではその支持する決定的な実験証拠は存在しない。対照的に異種反応性CTLクローンが異質遺伝的MHC分子の溝を結合するペプチドにおいて提示される特異的ペプチドを認識するというすばらしい証拠が存在する(8,9)。それゆえこれらのCTLクローンは分子特異的、通常はペプチド特異的であり、認識は異質遺伝的クラスI分子によって制限される。にもかかわらず、異質遺伝的MHCクラスI分子に対して誘導される主要なCTL応答の確固たる特異性は通常未知である。これは様々な細胞タンパク質から由来する非常にたくさんのペプチドがMHCクラスI分子の溝を結合するペプチドにおいて提示されるためである。それゆえ主要な異種制限的CTL応答は本来的にポリ特異的であり、未知の配列の非常にたくさんのMHC結合ペプチドに対して向けられる。これは以前では、望ましいペプチド特異性の異種制限的CTLを誘導することを困難にしていた。この方法的な困難性に加えて、ペプチド特異的、異種制限的CTLを誘導する可能性は以前には、基本的な免疫学的概念に反するため、まじめに研究されていなかった。T細胞レパートリーの選択は、2の鍵となる事象が生じる胸腺で起こっている(10)。ネガティブ選択の間、自己ペプチドを提示する高アフィニティーMHC分子で認識するT細胞受容体(TCR)を発現するT細胞は、レパートリーから脱落される。対照的に、低アフィニティーでMHC/ペプチド複合体を認識するTCRは選択される可能性が存在し、成熟T細胞として末梢に放出される。ポジティブ選択の結果として、成熟T細胞は自己MHC制限的であると考えられる。それゆえ成熟T細胞は、自己MHC分子によって提示されている場合にのみ、免疫原性ペプチドを効率的に認識することが考えられるが、それらが異質遺伝的MHC分子によって提示されている場合にはそうではないと考えられる。

ここで、借用の免疫治療のための健康な個人由来の自己制限的CTLと同様に異種制限的なCTLを用いることが提案される。該CTL認識ペプチドは、その発現が腫瘍において活性化されるタンパク質から、腫瘍において過剰発現されるタンパク質から、腫瘍において発現される組織特異的タンパク質から、ミューテートされたタンパク質から、またはウイルスタンパク質から由来するであろう。以下に記述された実験において、我々はペプチド特異的、異種制限的CTLを単離し得ることを見出した。異種制限的CTLクローンのあるものは、大変低濃度のペプチド(フェムトモル濃度)を認識し得、それはそれらが典型的には認識のためピコモルペプチド濃度を必要とする自己制限的CTLより少なくとも感受性である(おそらくずっと感受性である)ことを示す。我々はまたこれらのCTLがいかなる免疫学的反応(例えばアナフィラキシーまたは過敏感受性)を引き起こすことなく、免疫学的に許容される宿主内に3回注射し得ることを見出した。該異種制限的CTLクローンは、免疫学的に許容

10

20

30

40

50

される患者の短期間の治療により有効であろう。これらのCTLは機能的なホスト免疫応答によって結局除去されるであろうことから、いかなる長期的な副作用をも持たないであろう。

異種制限的CTLは、白血病の治療において特に有用であろう。白血病患者、特にCML患者は、骨髄移植によって頻繁に治療され、該疾患の予測はドナーCTLが受容者の白血病細胞に対して免疫応答を装備し得る場合に改良されるという強い証拠が存在する。骨髄移植受容者においてドナーCTLは、受容者のMHC分子に対して免疫応答を装備し得ることが知られており、それは移植対ホストの疾患(graft versus host disease(GvH))の臨床上的状態を導く。白血病患者においては、低レベルのGvHが長期的な白血病のフリーである生存に相関するので、臨床上好ましい。移植対白血病(GvL)の影響は、受容者白血病細胞を認識し殺傷し得るドナーCTLのためと最もいえそうである(6,7)。GvH及びGvLを介在する異種反応性CTLは、同じCTL集団または異なるCTL集団を表すかどうかは、論争上の争点のままである。これは、GvH及びGvLに關与するCTLのペプチド特異性が一般的に未知であるためである。

ここで記述されるプロトコールはGvHを引き起こさずにGvLを介在するCTLクローンの単離を導き得る。白血病に対して特異性を持つCTLは、白血病細胞において発現され、造血系列の外の細胞においては発現されないペプチドに対して生産され得る。該CTLクローンは白血病患者の借用の免疫治療に対して用いられ得、ここでは該CTLクローンは、白血病細胞、そしておそらくある通常の骨髄由来細胞をも除去するであろう。通常骨髄細胞の欠損の可能性は、これらの患者が健康なドナーから骨髄移植で頻繁に治療されるため、いかなる問題をも引き起こさないと期待される。以下のタンパク質は高白血病CTLクローンに対するターゲットのいくつかである:GATA-1, IKAROS, SCL, WT1。GATA-1及びIKAROSは造血細胞でのみ発現されるジンクフィンガー含有DNA結合タンパク質である。SCLは造血細胞で発現されるが内皮細胞及び脳では発現されないヘリックス-ループ-ヘリックス転写因子である。Wilms腫瘍1(WT1)タンパク質は、急性及び慢性白血病を除いては成人組織では通常発現されない肺分化抗原である。

SCLを除いて、これらのタンパク質は白血病始源細胞では発現されるが、成人において造血系列の外の細胞では発現されない。HLAクラスI分子によって提示されるこれらのタンパク質から由来するペプチドは、ミスマッチHLAクラスI対立遺伝子を発現するドナーから(CTL耐性を回避するため)、またはマッチクラスI対立遺伝子を発現するドナーから(耐性が問題ではない場合には)CTLを得るために用いられる。CTLクローンは単離され、その特異性が白血病細胞及びin vitroの非白血病コントロールに対して分析される。適切な特異性を持つクローンが、CTL制限要素であるHLAクラスI対立遺伝子を発現する全ての白血病患者の治療のために用いられる。

同様に異種制限的CTLクローンは複数のミエローマをもつ患者の治療に対して有用であると考えられる。複数ミエローマ特異的CTLに対する適したターゲットには、免疫グロブリンH鎖およびL鎖の定常領域が含まれる。ペプチドはHLAクラスI分子に結合するH鎖およびL鎖定常領域から選択される。これらのペプチドに対するCTLは、CTL耐性を回避するためにHLAミスマッチドナーから単離される。これらの異種制限的CTLは、借用の免疫治療によって治療される患者におけるミエローマ細胞を溶解するが、通常B細胞は溶解しない。除去されるB細胞は、患者の骨髄において発達する新たなB細胞によって置換されるが、一方でミエローマ細胞の除去は永久的であろう。

特に好ましい実施態様は、HIVタンパク質及び腫瘍関連性タンパク質において周知のエピトープに対する異種制限的CTLの生産である。数多くのCTL認識ペプチドが様々なHIVタンパク質及び腫瘍関連性ペプチドにおいて同定されている。特に、CTLエピトープはHIV env, gag, pol, vif及びnefタンパク質において同定されている(12,13)。また、CTLエピトープは、腫瘍関連性メラノーマタンパク質トリプシナーゼ、mart1/melanA, gp100/pre117, mage及びbageにおいて同定されている(14-21)。これらのCTLエピトープに相当するペプチドの使用は、それらが天然の抗原プロセッシングによって生産されることが知られているという利点を持つ。この方法で生産されたCTLは、内因性で関連したタンパク質を発現するタ

10

20

30

40

50

ターゲット細胞を認識する。周知のCTLエピトープの開発は、数多くのテストペプチドのスクリーニング及び天然で生産されるペプチドの同定を避けるため、かなりの手間を省く。しかしながら、周知のペプチドはイムノドミナントペプチドを表すであろう。本発明の第三の面の方法は、新たなペプチドを同定するために用いられ得、該新たなペプチドはサブドミナントペプチドであろうことから好ましい。サブドミナントペプチドは患者のCTL応答によって免疫学的に選択されることが少ないであろうことから、それらは借用の免疫治療に対するよりよいターゲットを表すであろう。にもかかわらず、周知のCTLエピトープを表すペプチドはin vitroで異種制限的または自己制限的CTLを生産するため、及びin vivoでその抗ウイルスそして抗腫瘍効果を試験するため典型的に活用され得る。

本発明の第三の面の方法は、腫瘍細胞で生産されるペプチドに対して、そしてHIV感染細胞で生産されるペプチドに対して特異的なHLAクラスI制限的CTLクローンの単離を許容する。簡便には、SCIDマウスがこれらのCTLのin vivoでの抗腫瘍及び抗HIV効果を測定するために用いられる。これらのCTLクローンは借用の免疫治療、特にヒトにおいて有用である。

もし本発明の第三の面の方法が、さらに健康な個人のHLAクラスI(または同等物)分子タイプを測定することを含むのであれば好ましい。簡便にはこれは上記開示されているようなDNA分析によってなされる。

もし刺激細胞がHLAクラスI(または同等物)分子タイプが健康な個人において提示されていないその表面でHLAクラスI(または同等物)分子を持つのであれば特に好ましい。

もし上記刺激細胞が、上記選択された分子の少なくとも一部と上記HLAクラスI(または同等物)分子をそれ自身が実質的に装填できない細胞であれば特に好ましい。以下に詳細に記述されるように、該HLAクラスI(または同等物)分子は、in vitroで上記選択された細胞の少なくとも一部と容易に装填されるであろう。

簡便には上記細胞は、上記選択された分子の少なくとも一部がペプチドであれば、上記HLAクラスI(または同等物)分子内に装填されないように、ペプチドトランスポーターの発現において欠失した哺乳動物細胞である。

好ましくは該哺乳動物細胞は、TAPペプチドトランスポーターを欠失しているか、そのレベルが減少しているか、またはその機能が減少している。TAPペプチドトランスポーターが欠失している適した細胞には、T2,RMA-S及びDrosophila細胞が含まれる。TAPはTransporter Associated with antigen Processingである。

それゆえ簡便には該細胞は、Drosophila細胞のような昆虫細胞である。

欠失細胞系T2を搭載したヒトペプチドは、カタログ番号CRL 1992の下でAmerican Type Culture Collection,12301 Parklawn Drive,Rockville,Maryland 20852,USAから入手可能である;Drosophila細胞系Schneider系2は、からログ番号CRL 19863のものでATCCから入手可能である;マウスRMA-S細胞系は、Karre及びLjunggren(1985)J.Exp.Med.162,1745に記述されており、参考としてここで取り込まれる。

好ましい実施態様においては、該刺激細胞は上記HLAクラスI(または同等物)分子を発現可能な核酸分子でトランスフェクトされた宿主細胞(T2,RMA-SまたはDrosophila細胞)である。T2及びRMA-s細胞はトランスフェクションの前はHLAクラスI分子を発現していないが、それらはペプチドで搭載されていない。

哺乳動物細胞は本分野でよく知られた方法によってトランスフェクトし得る。Drosophila細胞はJackson等(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA89,12117に記述されているようにトランスフェクトし得、参考としてここで取り込まれる。

簡便にはトランスフェクションの前に上記宿主細胞は実質的に全くHLAクラスI(または同等物)を発現していない。

もし該刺激細胞がB7.1,B7.2,ICAM-1及びLFA3のいずれかのようなT細胞共刺激に対して重要な分子を発現しているならばそれもまた好ましい。

多数のHLAクラスI(及び同等物)分子、及び共刺激分子の核酸配列が、GenBank及びEMBLデータベースから公に入手可能である。

もし上記刺激細胞の表面で発現される実施的にすべての上記HLAクラスI(または同等物)

10

20

30

40

50

分子が、同じタイプであれば特に好ましい。

ヒトにおけるHLAクラスI、及び他の動物における同等な系は遺伝学的大変複雑である。例えばHLA-Bローカスには少なくとも110の対立遺伝子が存在し、HLA-Aローカスには少なくとも90の対立遺伝子が存在する。いかなるHLAクラスI(または同等物)分子でも本発明のこの面において有用であるが、もし該刺激細胞がヒトの集団においてかなり高頻度で生ずるHLAクラスI分子において選択された分子の少なくとも一部を提示すれば好ましい。HLAクラスI対立遺伝子の頻度はCaucasian, African, Chinese等のような異なる人種の分類の間で変化することはよく知られている。少なくともCaucasian集団に限っては、HLAクラスI分子はHLA-0201対立遺伝子、またはHLA-A1対立遺伝子、またはHLA-A3対立遺伝子またはKLA-B7対立遺伝子によってコードされる。HLA-A0201は特に好ましい。

10

本発明の第三の面の方法がCTLのライブラリーを作製するために用いられた場合、もし該CTLクローンによる認識を制限するHLA対立遺伝子が特定の人種の分類における頻度の基本に選択されたならば簡便である。

その表面にHLAクラスI(または同等物)分子を発現し、上記刺激細胞の表面に提示される占められた上記HLAクラスI(または同等物)分子の大集団において選択された分子の少なくとも一部を提示する刺激細胞が、本発明のさらなる面を形成することは予測されよう。好ましくは選択された分子は異常分子であるか、その量が異常に上昇した分子である。本発明の第四の面として、本発明の第三の面の方法によって得られ得る選択された分子に対して反応性の細胞障害性Tリンパ球のクローン集団が提供される。

本発明の第五の面として、選択された分子に対して反応性の細胞障害性Tリンパ球のクローン集団が提供され、上記CTLは細胞に対して高親和性である。

20

少なくとも異常に上昇した自己分子に対して、および特に高レベルで発現される自己ポリペプチドに対して、本発明の第三の面の方法は、他の方法によって生産されるものよりもずっと高い親和性と感受性のCTLの生産を許容することは予測されよう。該刺激細胞が、HLAクラスI(または同等物)分子タイプが健康な個人において提示されないその表面におけるHLAクラスI(または同等物)分子のタイプを持つ場合に、特に当てはまる。

それゆえ本発明の第三の面の方法は、ガン患者及びヒト免疫不全ウイルスに感染した患者の借用の免疫治療のために用いられ得る、健康な個人由来の細胞障害性Tリンパ球(CTL)を生産するために好ましくは用いられる。該CTLは完全にin vitroで生産され、静脈内に患者に投与され得る。借用の免疫治療のこの形態は、機能的ホスト免疫系に依存しないので、例えばHIV感染の結果として、またはガンの場合には放射線療法及び化学療法の結果として、免疫抑制された患者に特に適していると考えられる。好ましくは全てのペプチド特異的CTLが、健康なドナーから単離され、そして患者由来の血液サンプルは全く必要とされない。

30

ここで記述される異種制限的CTLクローンのホールマークは、それらがMHCクラスI分子によって細胞表面に提示される通常細胞タンパク質から由来するペプチドを認識し得ることである。最も重要なことには、異種制限的CTLクローンのMHC遺伝子型と患者の認識されるターゲット細胞(または他の細胞)のMHC遺伝子型は異なる。遺伝学的相違はゲノムのMHC領域に適用されるだけでなく、他の多形遺伝子にも適用される。それゆえCTLクローン及びターゲット細胞のTCR及びローカスの遺伝子部分に多形が存在するであろう可能性がある。しかしながらこれらの細胞におけるTCR遺伝子は、もしCTL及びターゲット細胞が異なる遺伝学的起源であったとしても同定されるであろう。

40

本発明の第六の面として、医薬への使用のための本発明の第四または第五の面にしたがった細胞障害性Tリンパ球のクローン集団が提供される。

本発明の第七の面として、本発明の第四または第五の面にしたがった細胞障害性Tリンパ球のクローン集団と、製薬学的に許容されるキャリアーを含む製薬学的組成物が提供される。

前述した本発明のCTLまたはその処方、非経口的(例えば皮下のまたは筋肉内の)注射によることを含むいかなる簡便な方法によっても投与され得る。該治療は単一の投与または一定期間の複数の投与より成るであろう。

50

本発明のCTLを単独で投与することが可能である一方で、一つ以上の許容されるキャリアーと共に製薬学的処方としてそれを投与することも可能である。キャリアー(類)は、本発明の化合物と両立可能であるという意味で「許容可能で」なければならない。そしてそれらが受容者に心身に有害であってはならない。典型的には該キャリアーは、滅菌してあり発熱物質のフリーである水または生理食塩水であろう。

本発明の第八の面として、健康な個人から由来し、疾患をもつ患者由来の疾患細胞から由来する選択された異常分子に対して反応性であるか、または異常に上昇した量の上記分子が上記疾患細胞において提示されている疾患をもつ患者由来の疾患細胞から由来する選択された分子に対して反応性である細胞障害性Tリンパ球の、上記健康な個人が上記患者と異なるHLAタイプを持つ場合の該疾患をもつ患者の治療のための医薬の製品における使用を提供する。

10

本発明の第九の面として、CTLクローンのライブラリーが提供され、上記ライブラリーには個人由来の複数のCTLクローンが含まれ、そして各上記CTLクローンは異なるHLAクラスI対立遺伝子によって制限され、選択された疾患に関連する分子を認識する。

該ライブラリーは各CTLクローンが生存力を維持している形態で簡便には貯蔵される。簡便には該ライブラリーは凍結して貯蔵される。

好ましくは該ライブラリーは本発明の第三の面の方法によって作製されているCTLの選択を含む。該ライブラリーは疾患または疾患細胞特異的であり、それはHLAクラスI(または同等物)分子タイプ特異的であろう。好ましい疾患またはHLAクラスI(または同等物)分子タイプは上述されている。

20

有利には、該ライブラリーは異なる疾患に対するCTL、及び/または同じ疾患に対する異なる分子(例えばエピトープ)に対するCTLを含み、それぞれのCTLのクローンは異なるHLAクラスI対立遺伝子によって制限される。個々の患者に対して適切なCTLクローンは、適切なペプチドを参考にして(すなわちその疾患細胞に提示されるもの)、及びCTLが患者のものとは異なるHLAクラスI対立遺伝子を持つようにCTLのHLAクラスI対立遺伝子を参考にして選択される。

本発明の第十の面として、(a)治療される患者のHLAクラスI(または同等物)タイプを測定する手段、及び(b)CTLクローンのライブラリーを含む治療上の系を提供し、上記ライブラリーにはHLAクラスI(または同等物)分子タイプを異ならせる個人由来の複数のCTLクローンを含み、各上記CTLクローンは選択された疾患と関連する分子を認識する。

30

本発明の第一の面の特定の実施態様にしたがった患者を治療する方法は、認識される抗原が自己抗原である場合、借用の免疫治療での使用に特に適した異質遺伝的CTLを使用する。

しかしながらその異質遺伝的性質のため、受容者(患者)はある状況においてトランスファーされたCTLに対する免疫応答を生ずることが期待され、そのことは受容者宿主(患者)におけるその半減期及びその抗腫瘍活性を制限するであろう。しかしながら受容者(患者)の免疫抑制は、該ホストの免疫応答を抑制する一つの方法であり、本発明の第一の面の方法が有用である。

ここで記述される他の可能性は、オリジナルのホストに戻されてトランスファーされた場合非免疫原性である自己CTLを使用することがである。これらの自己CTLは、異種制限的CTLクローンから単離されたTCRを発現するためにin vitroで操作される。

40

本発明の第十一の面として、患者の治療に適した細胞障害性Tリンパ球(CTL)を作成する方法が提供され、該方法は(a)本発明の第三の方法によってCTLのクローン化集団を作製すること;(b)CTLまたは機能的に同等な分子の上記クローン化集団のT細胞受容体(TCR)を発現可能な遺伝学的構築物を調製すること;及び(c)CTLまたは前駆体が上記患者から由来するCTLまたは前駆体内に上記遺伝学的構築物を導入することを含む。

本発明の第三の面の好ましい実施態様の全てが、この方法の工程(a)でCTLのクローン化集団を作製する場合、本発明のこの面で調製される。特に工程(a)で単離されたCTLは、(治療される患者と比較して)HLAミスマッチな健康な個人から好ましく単離される。それゆえもし工程(A)で単離されるCTLが、異種制限的であり、治療される患者の点で異質遺伝的

50

あれば、特に好ましい。

異質遺伝性は同種の異なる個人における同じタンパク質の2以上の異なる対立遺伝子の場合である。

「T細胞受容体と機能的に同等な分子」なる語によって、我々はT細胞受容体と同じ機能を実施し得るいかなる分子をも意味する。特に該分子には、Chung等(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA91,12654-12658に記述された方法によって作製される一般的に加工された3ドメイン単一鎖T細胞受容体が含まれ、参考としてここで取り込まれる。

「T細胞受容体または機能的に同等な分子を発現可能な遺伝学的構築物」なる語によって、我々は患者由来のCTLまたは上記細胞の前駆体内に挿入された場合、T細胞受容体または機能的に同等な分子を発現し得るRNAまたはDNAのいずれかのような、いかなる遺伝学的構築物をも含める。レトロウイルスを含むプラスミドまたはウイルスのようないかなる適したベクターでも、用いられ得るであろう。

遺伝学的構築物は、Sambrook等(1989) "Molecular cloning, a laboratory manual". 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記述されているような本分野でよく知られた方法を用いて作製し得、参考としてここで取り込まれる。TCRまたは機能的に同等な分子をコードするDNAは、適切な宿主内への導入のための広いバラエティーの他のDNA配列に結合し得る(それは患者から由来するCTL、またはその前駆体、あるいはもう一つの宿主細胞であろう)。コンパニオンDNAは宿主の性質、宿主内へのDNAの導入方法、そして細胞質内での維持かインテグレーションが望まれるかに依存するであろう。

一般的に該DNAは、発現のための正しい配向と正しいリーディングフレームで、プラスミド、またはウイルスあるいはレトロウイルスのような発現ベクター内へ挿入される。必要であれば、該DNAは望ましい宿主によって認識される適切な転写及び翻訳調節コントロールヌクレオチド配列にリンクされるが、該コントロールは一般的に発現ベクターにおいて入手可能である。それから該ベクターを周知の方法によって宿主内へ導入する。一般的に宿主の全てが該ベクターでトランスフォームされるわけではない。そのためトランスフォームされた宿主細胞を選択する必要がある。一つの選択法には、抗生物質耐性のようなトランスフォームされた細胞において選択可能な特性に対してコードするいかなる必要なコントロールエレメントを持つDNA配列でも、発現ベクター内へ取り込ませることが含まれる。代わりに該選択可能な特性に対する遺伝子をもう一つのベクターに乗せ得、それを望ましい宿主細胞をコトランスフォームするために用いる。しかしながら患者のCTL、またはその前駆体内に遺伝学的構築物を導入する場合には、もし少なくとも50%のCTLが遺伝学的構築物でトランスフォームまたはトランスフェクトされれば好ましい。より好ましくは少なくとも70%がそのようにトランスフォームまたはトランスフェクトされ、さらにより好ましくは少なくとも90%または少なくとも95%がそれをなされる。

相補的な付着末端を介してベクターにDNAを実施可能にリンクさせる様々な方法が開発されている。例えば相補的なホモポリマー管を、ベクターDNAに挿入すべきDNA部分に加えることができる。それから該ベクター及びDNA部分を、組換えDNA分子を形成するために、相補的ホモポリマーテール間の水素結合によって結合させる。

一つ以上の制限部位を含む合成リンカーが、ベクターに対してDNA部分を結合する代わりにの方法を提供する。上述のようなエンドヌクレアーゼ制限切断によって生産されるDNA部分は、バクテリオファージT4DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼIを用いて処理され、該酵素はその3'-5'-エクソヌクレアーゼ活性で突き出した3'-シングルストランド末端を除去し、そしてポリメラーゼ活性でへこんだ3'-末端をうめる。

それゆえこれらの活性の組み合わせにより、平滑末端DNA部分が生じる。それから該平滑末端部分を、バクテリオファージT4DNAリガーゼのような平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒し得る酵素の存在下で、大モル過剰のリンカー分子と共にインキュベーションする。それゆえ該反応の生産物は、その末端にポリマー性リンカー配列を運ぶDNA部分である。それからこれらのDNA部分を、適切な制限酵素を用いて切断し、DNA部分のものと両立可能な末端を生ずる酵素を用いて切断されている発現ベクターとライゲートする。

10

20

30

40

50

様々な制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USAを含む数多くの業者から商業的に入手可能である。

該DNAを修飾する望ましい方法は、Saiki等(1988)Science239,487-491に開示されているポリメラーゼ連鎖反応を用いることである。

この方法においては、酵素学的に増幅されるDNAを、それら自身が増幅されるDNA内に取り込まれるようになる2の特異的なオリゴヌクレオチドプライマーが位置する。上記特異的プライマーは、本分野で周知の方法を用いて発現ベクター内でクローニングのために用いられ得る制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含むであろう。

特に好ましい方法をここで記述する。

腫瘍において上昇したレベルで提示される自己ペプチドに対して特異的な異種制限的CTLクローンのTCRをクローン化する。異種制限的クローンにおけるTCRの使用は、(i)TCR可変領域特異的モノクローナル抗体及び(ii)V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>遺伝子ファミリーに特異的なプライマーを用いたRT-PCRを用いて決定される。cDNAライブラリーを、異種制限的CTLクローンから抽出したポリAmRNAから調製する。TCR<sub>H</sub>及び鎖のC末端部分、及び同定されたV<sub>H</sub>及び鎖部分のN末端部分に特異的なプライマーを使用する。TCR<sub>H</sub>及び鎖に対する完全なcDNAを、高適合DNAポリメラーゼを用いて増幅し、増幅された産物を適したクローニングベクター内でクローン化する。該クローン化及び鎖遺伝子を、Chung等(1994)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA91,12654-12658に記述されているような方法によって、単一鎖TCR内に集積する。この単一鎖構築物においては、V<sub>H</sub>J部分にV<sub>H</sub>DJ部分が続き、CD3鎖の膜貫通及び細胞質部分が引き続きC<sub>H</sub>部分が引き続き。それからこの単一鎖TCRを、レトロウイルス発現ベクター内に挿入する(ベクターのパネルは、成熟ヒトCD8<sup>+</sup>Tリンパ球に感染し、遺伝子発現を介在できる能力に基づいて用いる:レトロウイルスベクター系Katは、一つの好ましい可能性を持つ(Finer等(1994)Blood83,43参照))。高力価アンフォトロフィック(amphotropic)レトロウイルスが、Roberts等(1994)Blood84,2878-2889に印刷されたプロトコールにしたがって腫瘍患者の末梢血液から単離された精製CD8<sup>+</sup>Tリンパ球を感染するために用いられ、該書類は参考としてここで取り込まれる。抗CD3抗体が精製CD8<sup>+</sup>T細胞の増殖を引き起こすために用いられ、それはレトロウイルスのインテグレーションと単一鎖TCRの安定な発現を容易にする。レトロウイルストランスダクションの効率は、単一鎖TCRに対して特異的な抗体を用いた感染CD8<sup>+</sup>T細胞の染色により測定される。トランスデュースされたCD8<sup>+</sup>T細胞のin vitro分析により、それらが、TCR鎖がもともとクローン化されたもの由来の異種制限的CTLクローンで見られるものと同様な、腫瘍特異的殺傷を示すことが確認される。期待される特異性を持つトランスデュースされたCD8<sup>+</sup>T細胞の集団は、腫瘍患者の借用の免疫治療のため用いられるであろう。患者は10<sup>8</sup>から10<sup>11</sup>の間(最も好ましくは10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup>)で自己のトランスデュースされたCTLで治療されよう。

CTL内に遺伝子を導入するための他の適した系は、Moritz等(1994)Proc.Nat'l.Acad.Sci.US A91,4318-4322に記述されており、参考としてここで取り込まれる。Eshhar等(1993)Proc.Nat'l.Acad.Sci,USA90,720-724及びHwu等(1993)J.Exp.Med.178,361-366もまた、CTLのトランスフェクションを記述する。

それゆえ、本発明の第十二の面として、本発明の第十一の面の方法によって得られ得る患者を治療するための適した細胞障害性Tリンパ球が提供される。

本発明の第十三の面として、疾患をもつ患者の治療方法が提供され、そこでは該患者は疾患細胞を含み、該細胞は異常分子または異常に上昇した量の分子を含む、またはそれに関連しており、また該細胞はHLAクラスI(または同等物)分子によりその細胞表面に上記分子の少なくとも一部を提示することができる。そして該方法は、HLAクラスI(または同等物)分子により細胞の表面に提示されている場合には上記分子の少なくとも一部を認識する治療上有効量の細胞障害性Tリンパ球(CTL)を患者に投与することを含み、該CTLは本発明の第十二の面にしたがったCTLである。

本発明の第十四の面として、疾患をもつ患者を治療するための医薬の製品における細胞障害性Tリンパ球の使用が提供され、そこでは該患者は疾患細胞を含み、該細胞は異常分子または異常に上昇した量の分子を含む、またはそれに関連しており、また該細胞はHLAク

10

20

30

40

50

ラス I (または同等物) 分子によりその細胞表面に上記分子の少なくとも一部を提示することができ、そして該細胞障害性Tリンパ球は、HLAクラス I (または同等物) 分子により細胞の表面に提示されている場合には上記分子の少なくとも一部を認識し、該CTLは本発明の第十二の面にしたがつたCTLである。

投与の好ましい方法、好ましい疾患、及び治療のために投与されるCTLの好ましい量は、本発明の第一の面に対するもののよう、本発明の第十三の面に対するものと同様である。

それぞれ特異的なTCR、または機能的に同等な分子を発現可能な遺伝学的構築物及び遺伝学的構築物のライブラリーが、本発明の第三の面の方法によってCTLのクローン化集団を作製し、CTLまたは上述の機能的に同等な分子の上記クローン化集団のT細胞レパトリーを発現しうる遺伝学的構築物を調製することによって、調製し得ることは予測されよう。もしそれぞれの遺伝学的構築物が周知のHLA遺伝子型の健康な個人由来の特定のCTL由来のTCRに相当するTCR(TCRまたは機能的に同等な分子として)を表し、該CTLがその表面に周知のHLAクラス I (または同等物) 分子を発現する刺激細胞と共培養され、該HLAクラス I または同等物分子がその表面に与えられた分子の少なくとも一部を結合するのであれば特に好ましい。

この方法においては、患者のCTLまたは前駆体内に取り込まれ得る遺伝学的構築物のライブラリーを生産することが可能であり、TCRまたは機能的な同等物を発現し得る該遺伝学的構築物は、患者のHLA遺伝子型及び治療される疾患に基づいて選択し得る。TCRを表す特定の遺伝学的構築物は、T細胞クローンの特異性に基づいて(すなわち患者の疾患細胞、特に腫瘍細胞で発現されるものにしたがつて)選択される。

好ましくは、患者のHLA遺伝子型と、該遺伝学的構築物によって発現されるTCRまたは機能的な同等物分子が由来するCTLのHLA遺伝子型は、ミスマッチする。

一般的には、オリジナルのCTLクローンで発現される限りで、TCRを異種制限的であると定義することは容易である。しかしながら、一度TCR遺伝子を単離し患者のCTL内にトランスフェクトすると、それらを異種制限的であると定義することは困難になる。トランスフェクトされたTCRと内因性TCR遺伝子の配列間の配列比較は、TCR遺伝子において多形が存在する場合に非自己TCR遺伝子としてそれらを同定することを可能にする。しかしながら、非自己TCRは、異種制限的CTLクローンからは必ずしも由来しない。

本発明は以下の実施例及び図面を参考として、より詳細に記述されるであろう。

図1はマウスを $5 \times 10^5$ RMA腫瘍細胞単独と、腫瘍細胞及び $5 \times 10^5$ CTLとで注射した実験の結果を示す。腫瘍容量を毎日測定した。11日後、腫瘍細胞単独を受け取ったマウスを、腫瘍潰瘍形成のため、または大きな腫瘍の負担のため殺傷した。CTLを受け取ったマウスは全て、11日目で腫瘍が検出されなかった。

図2はマウスを-7日目(マイナス7)で $5 \times 10^5$ RMA腫瘍細胞で注射し、 $10^7$ 抗mdm100CTLで静脈内で治療した実験の結果を示す。腫瘍容量を0日目と引き続く各日で測定した。腫瘍容量における相対的な増大が示されている。腫瘍が容量において $3\text{cm}^3$ より大きく潰瘍形成または届いたときに、マウスを殺傷した。

図3はmdm100ペプチドに対して特異的な異種制限的CTLクローンの特性を示す。

(A)mdm100ペプチドに対して特異的な6CTLクローンによるペプチドコートされたT2-K<sup>b</sup>細胞の認識。全部で33のCTLクローンを分析し、16に対するペプチド滴定曲線はクローン3F3F、1F1H及び3F10Aのものと同様である一方で、17クローンはクローン3B11C、6A6G及び6A6Dのものと同様な滴定曲線を示した。(B)及び(C)は代表的な低「親和性」CTLクローン6A6G(B)または代表的な高「親和性」クローン3F3F(C)による、RMA細胞(塗りつぶしていない四角印)、及びmdm100ペプチド(塗りつぶした丸印)またはクラス I 結合コントロールペプチド(塗りつぶしていない丸印)のそれぞれでコートされたRMA-A細胞の溶解を示す。(D)高親和性クローン3F11Aによるmdm100ペプチド(塗りつぶした四角印)またはクラス I 結合コントロールペプチド(塗りつぶしていない四角印)のそれぞれでコートされた樹状細胞の溶解。図4は高「親和性」mdm100特異的CTLによるB16メラノーマ細胞の認識を示す。

代表的な高親和性CTLクローン(1F7E)を、mdm100ペプチド(塗りつぶしていない印)で、ま

10

20

30

40

50

たはMHCクラスI結合コントロールペプチド(塗りつぶした印)のそれぞれでコートされた、非転移性B16-F1メラノーマ変異体(A)及び転移性変異体B16-FF1及びB10-F16細胞に対する、4時間の<sup>51</sup>Cr放出アッセイで分析した。染色実験により、B16-F1はH-2K<sup>b</sup>ネガティブであり、B16-F10細胞は低レベルのH-2K<sup>b</sup>を発現することが明らかにされた(示されていない)。

図5はRMAリンパ腫細胞から抽出された天然で生産されるペプチドのCTL認識を示す。

(A)1 μgの合成ペプチドmdm100のHPLC溶出プロフィール。(B)RMA細胞から抽出された天然で生じるペプチドを含むHPLC画分のCTL認識プロフィール。ペプチドはRMAリンパ腫細胞から実施例1のMaterials and Methodsに記述されているように調製し、(A)と同じ条件を用いてHPLCにより分別した。

10

図6は高親和性、mdm100特異的CTLによる腫瘍成長のコントロールを示す。(A)8のC57BL/10マウスを、10<sup>5</sup>RMAリンパ腫細胞(塗りつぶしていない四角印)または10<sup>6</sup>CTLと共に10<sup>5</sup>リンパ腫細胞(塗りつぶしていない丸印)を用いて皮下に注射した。(B)8のC57BL/10マウスを、5 × 10<sup>5</sup>RMAリンパ腫細胞(塗りつぶしていない四角印)または5 × 10<sup>5</sup>CTLと共に5 × 10<sup>5</sup>リンパ腫細胞(塗りつぶしていない丸印)を用いて同様に皮下に注射した。(C)10のC57BL/10マウスを、10<sup>5</sup>B16-F10メラノーマ細胞(塗りつぶしていない四角印)、または10<sup>6</sup>CTLと共に10<sup>5</sup>B16-F10細胞(塗りつぶしていない丸印)のそれぞれを用いて注射した。個々の高親和性CTLクローンまたはクローンの混合物のそれぞれをこれらの実験で用いた場合にも、同様の結果が得られた。マウスを毎日モニターし、それぞれの個々のマウスに対する腫瘍成長が示されている。+印はマウスが死亡したこと、または大きな腫瘍の負担のため犠牲にしたことを示す。

20

図7(A)はHLA-A0201-結合サイクリンD1ペプチド(101-110)に対して特異的なCTLクローンによる溶解を示す。該CTLクローンはHLA-A2ネガティブPBMCから得られた。図7(B)はHLA-A0201-結合サイクリンD1ペプチド(228-234)に対して特異的なCTLクローンによる溶解を示す。該CTLクローンはHLA-A2ネガティブPBMCから得られた。

実施例1: マウスにおけるCTLを用いた借用の免疫治療

#### 要約

ネズミモデル系において、我々は腫瘍において頻繁に過剰発現される通常自己タンパク質mdm2由来のペプチドに対する異種制限的CTLクローンを生産した。該CTLはin vitroで腫瘍細胞を殺傷する一方で、通常細胞は認識しない。マウスに借用してトランスファーした場合、これらのCTLはin vivoで抗腫瘍効果を示す。

30

2のマウス株、C57BL/10(H-2<sup>b</sup>)及びBALB/c(H-2<sup>d</sup>)はMHCミスマッチであり、それゆえ別々のクラスI分子を発現する。このミスマッチは、それがヒトの場合、すなわちガン患者と健康なT細胞ドナーの間の差異で見出されるHLAミスマッチをまねるため選択された。我々はこれら2のマウス株を、ネズミmdm2タンパク質に対する異種制限的CTLを検出できるかどうかを試験するために用いた。該mdm2タンパク質はp53と関連し得、その生物学的活性を調節し得る。それはヒトのガンで頻繁に過剰発現され、後に借用の免疫治療に対する可能性のあるターゲットを代表する。

上述のネズミモデル系において、我々は以下の問題を検査した:

(i)mdm2ペプチド特異的、H-2K<sup>b</sup>制限的CTLをBALB/cマウス(H-2<sup>d</sup>ハプロタイプ)から単離することが可能か?

40

(ii)BALB/c由来ペプチド特異的、異種制限的CTLは、K<sup>b</sup>クラスI分子を発現する腫瘍細胞を認識できるか?

(iii)BALB/c由来ペプチド特異的、異種制限的CTLは、C57BL/10マウス(H-2<sup>b</sup>ハプロタイプ)における借用の腫瘍免疫治療に対して用いることができるか?

我々は以下の結果を得た。

(i)異質遺伝的H-2K<sup>b</sup>クラスI分子によって提示されるmdm2ペプチドに対して特異的なCTLが単離された。

(ii)CTLクローンは確立され、H-2<sup>b</sup>オリジンのRMA胸腺腫細胞を殺傷することを示した。RMA細胞はC57BL/10マウス(H-2<sup>b</sup>)において高く発癌性であり、我々はBALB/c由来CTLがC57BL/

50

10ホストにおいて抗腫瘍効果を持つかどうかを試験可能であった。

(iii)一つの実験において、8のマウスを $5 \times 10^5$ RMA細胞を用いて皮下に注射した。これらのマウスの4は $5 \times 10^5$ CTLをも注射した。11日後、RMA細胞のみを注射された4のマウスは大きな腫瘍をもち、それゆえ殺傷した一方、RMA及びCTLを受け取った4のマウスは腫瘍が存在しなかった(図1)。もう一つの実験では、8のマウスを $5 \times 10^5$ 腫瘍細胞を用いて皮下に注射した。7日後、全てのマウスが注射部位で腫瘍を形成し、それらの2が $10^7$ BALB/c由来CTLを用いて治療された。非治療マウスでは腫瘍の容量が急速に増大した一方で、CTLを受け取ったものは腫瘍成長は遅れた(図2)。

これらの結果は、細胞障害性T細胞を用いたこの借用の免疫治療が効果的であることを示す。

以下のものがさらに詳細を提供する：

#### 方法

動物:C57BL/6マウス(H-2<sup>b</sup>)及びBALB/c(H-2<sup>d</sup>)マウスを、Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, Londonのブリーディングコロニーから供されたが、このタイプのマウスは様々な商業的な業者から容易に入手可能である。マウスは8から10週齢のものを用いた。

ペプチド:mdm100ペプチドは、ネズミmdm-2タンパク質のアミノ酸100-107(YAMIYRNL; SEQ ID No1)に相当する。このペプチドはH-2K<sup>b</sup>クラスI分子に効率よく結合することが示されている。H-2K<sup>b</sup>またはD<sup>b</sup>クラスI分子に結合することが見出されているmdm2またはサイクリンD1由来の他のペプチドは、コントロールとして機能した。この研究で用いられる全てのペプチドが、Imperial Cancer Research Fund, London, によって、fmoc化学を用いて合成された。ペプチドの質をHPLC分析で評価し、期待される分子量をMALDIマスペクトロメトリーを用いて観察した。該ペプチドを2mMの濃度を与えるためにリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)に溶解し、-20℃で貯蔵した。

細胞系:RMA細胞(H-2<sup>b</sup>)は、Rauscherウイルス誘導C57BL/6N Tリンパ腫から生じた。RMA-S細胞は、エチルメタンスルホン酸を用いたミュータジェネシスの後にRMA細胞から由来し、それにMHCクラスI発現の減少したレベルを持つ細胞を得るために5週の抗H-2異種抗血清を用いた選択と、ウサギの完全な処置が引き続いた(Ljunggren & Karre(1985)J. Exp. Med. 162, 1745-1759)。RMA-S細胞は、TAP2遺伝子のヌクレオチド97でポイントミューテーションを持つことが見出され、それは未成熟ストップコドンを生ずる(Yang等(1992)J. Immunol. 267, 11669-11672)。B16-F1及びB16-F10は、それぞれ低及び高転移能力を持つ、C57BL/6由来メラノーマ細胞系B16の変異体である(Fidler & Nicolson(1976)J. Natl. Cancer Inst. 57, 1199-1202)。ヒト細胞系T2は、Bリンパ芽球腫細胞系及びTリンパ芽球腫細胞の融合ハイブリッドである。これらの細胞はTAPトランスポーター遺伝子を全く持たず、減少したレベルのHLA-A2を発現し、内因性HLA-B5は検出できないレベルのみ発現する(Alexander等(1989)Immunogenetics 29, 380-388)。ネズミH-2K<sup>b</sup>でトランスフェクトされたT2細胞は、HLA-A2のレベルと同様なレベルでK<sup>b</sup>クラスI分子を発現した。該T2-K<sup>b</sup>細胞は、Dr T Elliottからの贈呈であった(John Radcliffe Hospital, Oxford)。

CTL誘導:異種制限的CTLを、ペプチドコートRMA-S及びT2-K<sup>b</sup>刺激細胞を用いた天然のBALB/c脾臓細胞のin vitro刺激によって生産した。 $4 \times 10^6$ BALB/c脾臓細胞を、10%FCS及び500nMペプチドを含む完全RPMI培地でmdm100ペプチドでコートした $4 \times 10^5$ RMA-S細胞を用いて24穴プレートで刺激した。5日後、CTLを10, 100及び1000応答CTL/ウェルで96穴プレートにまいた。それぞれのウェルは、支持として $3 \times 10^5$ 放射BALB/c脾臓細胞、及び以前にmdm100ペプチドと加えた $10^4$ 放射T2-K<sup>b</sup>刺激細胞を含んだ。カルチャー培地は、組換えIL-2を10U/mlの濃度で加えた点を除いて、上述のものと同様である。支持及び刺激細胞を含む新鮮な培地を14日後に加え、さらに5日後各96ウェルをmdm100コートターゲット細胞及びコントロールターゲットに対してCTLアッセイで試験した。mdm特異的殺傷を示すミクロカルチャーを成長させ、0.1, 1及び10CTL/ウェル、支持として $10^5$ BALB/c脾臓細胞、及び $10^4$ T2-K<sup>b</sup>刺激細胞を用いて96ウェル上で限界希釈クローニングのため用いた。CTLクローンを増殖させ記述した実験において用いた。

10

20

30

40

50

CTLアッセイ:細胞障害性活性を、上述したようにmdm100ペプチドまたはMHCクラス I 結合コントロールペプチドを用いてコートしたターゲット細胞に対して4時間の<sup>51</sup>Cr放出アッセイで測定した(Sadovnikova等(1993)Int. Immunol.6,289-296)。いくつかの実験では、樹状細胞をCTLターゲットとして用いた。それらは、記述されているようにプラスチック接着細胞の除去と14.5%(w/v)メトリザミド(metrizamide)の層で遠心分離の後に、C57BL/10脾臓細胞から調製した。

天然のペプチドの単離とHPLC分離:4 × 10<sup>8</sup>RMAリンパ腫細胞を、4mlの水中の2%TFAで溶解した。懸濁液を超ソニケーションでホモゲナイズし、細胞破片をおよそ27000gで4 で1時間の遠心機(Sigma2K15)で遠心分離によって除去した。それから上清をセントリコン10フィルターユニット(Amicon)内に移し、それを5000gで4 で2.5時間遠心した。10kDaより小さいペプチドを含む濾過物を、水中の0.1%TFAをバッファーAとして、アセトニトリル中の0.1%TFAをバッファーBとして用いて、Superpac PepSカラム(Pharmacia)でHPLC分離した。流速は1ml/分であり、バッファーBの濃度を0%から60%まで1%/分で上昇させた。1mlの画分を採取し、Servantスピードバキュームドライヤーで乾燥させ、100 μ lのPBS中に再懸濁した。各HPLC画分の10 μ lを、<sup>51</sup>CrラベルT2-K<sup>b</sup>細胞をコートするために用い、それからそれをmdm100ペプチド特異的CTLに対するターゲットとして機能させた。

### 結果

異種制限的レポーターからの高親和性CTLの単離:H-2K<sup>b</sup>クラス I 分子に効率よく結合するmdm2由来ペプチド(mdm100)を同定した。しかしながらC57BL/6マウス(H-2<sup>b</sup>)では、このペプチドは合成mdm100ペプチドでコートされたターゲット細胞を認識する低親和性CTLのみを刺激し、内因的にmdm2を発現するターゲット細胞は刺激しなかった。一つの可能性のある説明として、低濃度の天然に生ずるペプチドを認識し得る高親和性CTLはH-2<sup>b</sup>マウスのレポーターから欠落しているということがある。耐性はMHC制限的であるので、BALB/cマウス(H-2<sup>d</sup>)のCTLレポーターは、H-2K<sup>b</sup>クラス I 分子によって提示されるmdm100ペプチドに対して耐性であると期待され、高親和性CTLを単離することが可能であるべきである。それゆえ異種制限的CTLを、ペプチドコートRMA-S(H-2<sup>b</sup>)及びT2-K<sup>b</sup>細胞を用いて天然のBALB/c脾臓細胞を刺激することによって生産した。mdm100ペプチドでコートされている場合のみRMA-S及びT2-K<sup>b</sup>細胞を溶解し、他のH-2<sup>b</sup>クラス I 結合ペプチドでコートされている場合には溶解しない33のCD8<sup>+</sup>CTLクローンを単離した(図3B及びC)。共同作用的P815細胞(H-2<sup>d</sup>)は、これらのH-2<sup>d</sup>由来CTLクローンに対してmdm100ペプチドを提示できなかった。ペプチド滴定実験により、16のクローンは半最大ターゲット細胞溶解のため10<sup>-12</sup>から10<sup>-14</sup>モルのペプチド濃度を必要とする高「親和性」であることが明らかにされた(図3A)。対照的に、17のCTLクローンは、10<sup>-8</sup>から10<sup>-9</sup>モルペプチド濃度を必要とする低「親和性」であった(図3A)。

異種制限的CTLは腫瘍細胞を溶解するが、通常細胞はしない:CTLクローンの親和性は腫瘍細胞溶解のレベルを決定するので、機能的に重要である。全ての高親和性CTLクローンはRMAリンパ腫細胞(H-2<sup>b</sup>)を効率よく殺傷する一方で、低親和性CTLクローンによる溶解は非効率的であった(図3B及びC)。高親和性CTLがトランスフォーム細胞と通常細胞を識別し得るかどうかを測定するために、我々は、MHCクラス I 分子と同様にT細胞活性化に重要である共刺激分子を高レベルで発現するため、ターゲットとして樹状細胞を用いた(Steinman(1991)Ann.Rev. Immunol.9,271-296)。DCにおけるmdm2発現レベルは未だ測定されていないが、それらは主に非増殖細胞より成る組織で見出されるものと同様であろう。例えば脳、心臓及び筋肉は、かなりのレベルのmdm2RNAを含む(Fakharzadeh等(1991)EMBO J.10,1565-1569)が、精巣及び胸腺のような高増殖インデックスを持つ組織では該レベルはより高かった。図3Dは、DCにおけるmdm2発現のレベルが高親和性CTLクローンによる溶解を引き起こすためには不十分であることを示す。重要なことは、mdm100ペプチドでコートされたDCは効率的に溶解され、それはこれらの細胞がCTL介在性殺傷には本来的に耐性ではないことを示す(図3D)。これらのin vitro実験は、高親和性CTLがトランスフォームRMA腫瘍細胞と通常樹状細胞を区別し得ることを示す。in vivo実験もまた、3の連続的な日数の10<sup>7</sup>CTLの静脈注射が、H-2K<sup>b</sup>ポジティブC57BL/6マウスによってよく耐性であることから、通常組

10

20

30

40

50

織は高親和性CTLによって攻撃されないことを示唆した。

高親和性CTLによる腫瘍細胞認識は、RMAリンパ腫細胞に限られない、B16メラノーマ細胞でもみられた。しかしながらメラノーマ認識はMHCクラスI発現のレベルに依存した。CTL殺傷はK<sup>b</sup>ポジティブB16-F10メラノーマ変異体に対して観察された一方で、K<sup>b</sup>ネガティブB16-F1変異体はCTL溶解に対して耐性であった(図4A)。RMA(図3C)と比較したC16-F10(図4B)の比較的不十分な溶解は、これらの腫瘍細胞における低及び高レベルのK<sup>b</sup>発現に相関した。mdm100ペプチドを用いたB16-F10細胞のコティングによるK<sup>b</sup>/ペプチドリガンドの密度の増大は、上昇したCTL殺傷を引き起こした(図4B)。

mdm100ペプチドが腫瘍細胞において天然で生じる証拠: 上述された実験は、合成mdm100ペプチドに対して生じたCTLクローンがK<sup>b</sup>ポジティブ腫瘍細胞を認識し得ることを示している。非関連ペプチドの偶然の交差認識が腫瘍細胞のCTL認識を説明するかどうかに注意を向けるために、低分子量ペプチドはRMA細胞から単離し、逆相HPLCによって分別した。個々のHPLC画分を回収し、T2-K<sup>b</sup>細胞をコートするために用い、それからそれをCTLターゲットとして用いた。画分31及び29のみがCTL認識ペプチドを含んだ(図5B)。合成mdm100ペプチドのHPLC分別により、画分31の主要なペプチドピークと画分29のマイナーなピークが明らかにされた(図5A)。マスマスペクトロメトリーにより、画分31がmdm100ペプチド(YAM1YRNL; SEQ ID No1)を含み、画分29が3位で酸化メチオニンを持つ同じペプチドを含むことが明らかにされた。合成及び天然生産ペプチドの共溶出により、RMA腫瘍細胞は天然でmdm100ペプチドを生産することが強く示唆された。このペプチドの酸化バージョンは、おそらく天然では生産されないが、TFA単離法の間でメチオニン酸化の産物であろう。

異種制限的CTLはH-2<sup>b</sup>マウスにおいて腫瘍成長を遅らせ得る: 高親和性CTLについて、*in vivo*でRMAリンパ腫及びB16-F10メラノーマ腫瘍の成長をコントロールする能力を試験した。RMA細胞で注射されたC57BL/6マウスは、9日で腫瘍を形成し、14-15日以内に大きな腫瘍の負担のため死んだ(図6A及びB)。対照的に、RMA細胞とCTLを注射されたマウスでは、腫瘍形成は15-17日間で完全に阻害された。腫瘍保護のレベルは量依存的であり、CTLの大投与量で注射されたマウス(図6A)はCTLの低投与量で注射されたマウス(図6B)と比較して保護はより大きかった。同様な結果は、B16-F10メラノーマを用いても得られた。B16-F10細胞で注射されたマウスのみが8日後に腫瘍を形成し、11-13日後に腫瘍の負担のため死んだ一方、B16-F10細胞とCTLを注射されたマウスは15日まで腫瘍フリーであった(図6C)。注射されたH-2<sup>d</sup>由来CTLクローンに対する受容者H-2<sup>b</sup>マウスの免疫応答は、*in vitro*でのその半減期を制限することが期待され、腫瘍保護が完全でない理由を説明し得る。さらなる実験により、受容者マウスの拡大された免疫抑制がトランスファーされたCTLクローンによる腫瘍保護を増大し得ることが明らかにされるであろう。ここで記述される実験は、通常mdm2タンパク質由来のペプチドに特異的な異種制限的CTLクローンが、*in vivo*でリンパ腫及びメラノーマ腫瘍の成長をコントロールし得ることを確立した。

この研究により、異種制限的CTLレパートリーにおいて存在する利用される特異性によって自己耐性を回避し得ることが示される。非自己H-2K<sup>b</sup>クラスI分子によって提示されるペプチドに対して特異的なCTLクローンは、BALB/cマウスの異種制限的レパートリーから得られた。およそ50%のCTLクローンが高親和性であり、mdm2発現腫瘍細胞を効率よく認識した一方で、低親和性CTLは合成ペプチドでコートされたターゲットを認識するのみであった。高親和性CTLクローンは腫瘍特異性を示し、*in vitro*で樹状細胞またはCon-A刺激T細胞芽を溶解しなかった。高親和性CTLクローンの静脈注射は、H-2<sup>b</sup>受容者マウスによってよく耐性であった。

H-2<sup>b</sup>マウスのレパートリーがmdm100ペプチドに対して特異的な高親和性CTLを欠失していることが見出されている。このペプチドはmdm2発現腫瘍細胞を認識しない低親和性CTLのみ刺激した。それゆえ腫瘍細胞を認識し得るCTLの単離はmdm2タンパク質に対する耐性によって強制された。同様に、腫瘍過剰発現通常p53タンパク質のターゲットングもまた、CTL耐性によって制限された。一連の実験において、HLA-A0201トランスジェニックマウスのCTLレパートリーは、ヒトp53に対する耐性を回避するために用いられた(Theobald等(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA92,11993-11997)。これらのトランスジェニックマウスのCT

10

20

30

40

50

Lレパートリーは、ネズミp53ペプチドに対してのみ耐性である。ヒトとマウスの間の配列差異を持つ2のp53ペプチドは、HLA-A0201ポジティブ腫瘍細胞を認識する高親和性CTLを刺激することが見出されたが、樹状細胞は認識しない。これらの研究により、HLAトランスジェニックマウスはヒト腫瘍過剰発現細胞タンパク質に対するネズミCTLを生ずるために用いられ得ることが示された。このアプローチは、トランスジェニックマウスの入手可能性に依存し、ヒトとネズミの間の配列差異を持つペプチドに対して制限される。ここで記述される該アプローチの利点は、CTLが腫瘍において上昇したレベルで発現されるいかなるペプチドに対しても生じ得ることである。さらに、Theobald等のアプローチは、ヒトとマウスのペプチドの差異に依存する;それはヒトを治療するためにマウス応答T細胞を使用し、ターゲットとしてヒトとマウスの間の差異を持つタンパク質が存在することに依存する。

10

異種制限的CTLクローンは借用の腫瘍免疫治療に対して利用できるであろうか?これらのCTLクローンをを用いた借用の免疫治療は、ガン患者を免疫抑制することにおいて最も効果的でありそうである。例えば、慢性骨髄白血病(CML)をもつ患者は、異種制限的CTLクローンをを用いた免疫治療に理念的には適している。CML患者はしばしば異質遺伝的骨髄移植を受けており、それは骨髄の接ぎ木を容易にするために免疫抑制を必要とする。これらの患者の予後は、ドナー由来Tリンパ球が患者の白血病細胞に対する免疫応答を装備する場合、改良されることがしばらくの間で知られている(Goldman(1989)Bone Marrow Transplant1, 133-134)。しかしながらこの移植対白血病反応は、しばしば有害な移植対宿主疾患と関連している。ここで記述されるネズミの実験により、特異的に白血病細胞を殺傷する異種制限的CTLクローンが生産し得ることが示される。これらの結果は、白血病細胞で上昇したレベルで提示されるペプチドに対して特異的なヒトCTLクローンを単離することが可能であるべきであることを示す。該CTLクローンは、CML患者の借用の免疫治療に対して用いられ得、移植対宿主疾患を引き起こすことなく抗白血病効果を介在するであろう。

20

それゆえこの実施例では我々はCTLが、頻繁に腫瘍において過剰発現される偏在して発現される自己タンパク質、mdm2に対して生じ得るかどうかを調査した。T細胞耐性が自己MHC制限的であるという観察は、非自己MHCクラスI分子によって提示されるmdm2由来ペプチドに対して特異的なCTLを生産するために用いられた。それゆえH-2<sup>d</sup>マウスの異種制限的T細胞レパートリーを、異質遺伝的H-2K<sup>b</sup>クラスI分子によって提示されるmdm100ペプチドに対して特異的なCTLを単離するために用いた。in vitroでこれらのCTLはトランスフォーム細胞及び通常細胞を識別し、K<sup>b</sup>ポジティブメラノーマ及びリンパ球腫瘍を特異的に殺傷するが、K<sup>b</sup>発現樹状細胞は殺傷しなかった。in vivoで該CTLは抗腫瘍活性を示し、H-2<sup>b</sup>受容者マウスにおいてメラノーマと同様にリンパ球腫瘍の成長を遅らせた。これらの実験は、偏在して発現される自己抗原に対するT細胞耐性を回避し得ること、及び構造的に非改変タンパク質の上昇したレベルを発現する腫瘍に対してCTL応答をターゲット化し得ることを示す。

30

実施例2:HIVタンパク質及び腫瘍関連性タンパク質におけるCTLエピトープの同定

CTLとして機能するために、ターゲットペプチドは(i)HLAクラスI分子に結合できなければならない;(ii)CTLを刺激できなければならない;(iii)天然の抗原プロセッシングによって生産されなければならない。これらの3の必要性は実験的に試験される。

40

(i)HLAクラスI分子に結合するHIVタンパク質または腫瘍関連性タンパク質におけるペプチドの同定

ペプチド結合モチーフは、多くの数のHLAクラスI分子に対して同定されている(11)。これらの結合モチーフを、HIVタンパク質または腫瘍関連性タンパク質の配列をスクリーニングするために用いた。モチーフ含有ペプチドを合成し、適切なクラスI対立遺伝子への結合を分析した。ペプチド結合を分析するために、HLAクラスI分子をヒト起源のペプチド搭載ミュタント細胞系T2で発現した。T2細胞は天然でHLA-A0201クラスI分子を発現する。他のHLAクラスI分子(例えばA1,B7等)の発現は、T2細胞内に相当するクラスI遺伝子をトランスフェクトすることによって成し遂げられる。T2細胞はペプチド搭載欠失を持

50

つので、それらはその細胞表面に低レベルのペプチド含有クラス I 分子のみを発現する。しかしながら、もしクラス I 結合ペプチドがカルチャー培地に存在するのであれば、MHC クラス I 発現のレベルは増大される。増大したレベルのクラス I 発現はHLAクラス I 特異的抗体を用いたT2細胞の染色と、それに引き続く蛍光活性化細胞ソーターを用いた分析によりに検出される。ペプチド滴定実験により、個々のペプチドのクラス I 結合の効率が明らかにされる。

記述した完全なT2細胞を用いたペプチド結合アッセイの変わりとして、結合アッセイを細胞溶解物で実施する。代謝的にラベルしたT2細胞の溶解物を、試験ペプチドの存在下で4  
10  
でオーバーナイトでインキュベートした。構造的に正しくフォールディングされたHLA  
クラス I 分子に対して特異的な抗体を免疫沈降のため用いた。構造的にホールディングされ  
たクラス I 分子は、T2細胞溶解物をクラス I 結合ペプチドの不存在下でインキュベート  
した場合は、ほんのわずかのみが検出される。対照的に、試験ペプチドがクラス I 分子に  
結合する場合には、これらその構造を安定化するのである。結果として、ラジオラベルされ  
たクラス I 分子の増大したレベルは、クラス I 結合ペプチドと共にインキュベートされ  
たT2細胞溶解物から免疫沈降される。

放射性活性的にラベルされたMHCクラス I 分子は、ペプチド結合を測定するためには必ず  
しも必要とされない。例えば周知のクラス I 結合ペプチドを、ヨウ素処理またはビオチン  
化によってラベルし得、競合的実験における指標ペプチドとして機能する。それゆえHLA  
クラス I 分子を含むT2細胞由来の溶解物を、様々な濃度の非ラベル試験ペプチドと共にラ  
20  
ベルされた指標ペプチドとインキュベートする。HLAクラス I 分子に結合する試験ペプ  
チドは指標ペプチドの結合を成功して阻害する。これはラベル指標ペプチドを含むHLAクラ  
ス I 分子の減少を引き起こす。それゆえ構造的に正しくホールディングされたクラス I 分  
子に特異的な抗体を用いた免疫沈降によって検出されるラベル指標ペプチドの量は、減少  
する。

T2細胞は結合アッセイに対するHLAクラス I 分子の唯一のソースというわけではない。Dro  
sophila細胞は変わりのソースを代表するものである。Drosophila細胞を、様々なHLAクラ  
ス I 対立遺伝子をコードする遺伝子と接合したヒトベータ2ミクログロブリンでトランス  
フェクトする。Drosophila細胞はペプチドトランスポートに必要とされるTAPタンパク質  
を含まないので、トランスフェクトされたクラス I 対立遺伝子は天然ではトランスポー  
30  
ターを介して搭載されず、そのため表面にペプチドを人工的に搭載し得る。それゆえトラン  
スフェクトされたDrosophila細胞の溶解物におけるクラス I 分子の構造は、HLA結合ペプ  
チドの不存在下では不安定である。Drosophila細胞の溶解物における結合アッセイを、T2  
細胞から調製された溶解物に対して記述されたものと同じ条件の下で実施する。

#### (ii) ペプチド特異的異種制限的CTLの刺激

HLAクラス I 分子に効率的に結合する試験ペプチド(上記参照)を、健康なHLA非関連個人由  
来のCTL応答を刺激するために用いる。試験ペプチド以外のペプチドに対する異種制限的C  
TL応答を避ける。試験ペプチドに対してCTLを刺激する可能性は、もし刺激細胞によって  
40  
発現されるHLA分子の大部分が、結合溝に試験ペプチドを持つのであれば、増大する。そ  
れゆえ、該アプローチは様々なヒト及び非ヒト細胞において同じHLAクラス I 分子をトラン  
スフェクションすることによって表現することと、それらをクラス I 結合試験ペプチド  
を用いて搭載することである。それから細胞に搭載されたこれらのペプチドを、HLA非関  
連健康な個人のPBMC由来のCTLを刺激するために用いる。該PBMCを、同じHLA分子を発現す  
る異なるヒト及び非ヒト細胞タイプを用いて毎1-2週刺激する。これは、異なるヒト及び  
非ヒト細胞タイプがこれらの無関係のペプチドのセットを最も提示しそうであるため、無  
関係のペプチドに対してCTLを刺激する可能性を減少する。

以下の細胞タイプはHLAクラス I 分子の発現及びCTLの刺激に対して適している:ヒト細胞  
系T2及びC1R、マウス細胞系RMA,RMA-S及びP1HTR、及びHLAクラス I 分子を発現するが、B7  
.1,B7.2, ICAM1及びLFA3のようなT細胞共刺激に重要な分子は発現しないためにトランスフ  
50  
フェクトされるDrosophila細胞。

試験ペプチドを用いた高レベルのMHC占有を達成するために、HLSトランスフェクトT2,RMA

-S及びDrosophila細胞が特に好ましい。これらの細胞タイプは機能的TAPペプチドトランスポーター分子を発現せず、結果として外因的に加えられたペプチドで装填され得るMHC分子が不十分な大集団のペプチドを装填し得る。それゆえこれらの細胞を、100  $\mu$ Mの試験ペプチドと共にオーバーナイトでインキュベートし、健康などドナーのPBMCを用いてCTLを刺激するために用いる。通常細胞系C1R, RMA及びP1HTRにおける試験ペプチドを用いた高レベルのMHC占有を達成するために、これらの細胞の表面にMHCクラスI分子を含むペプチドを変性させるために、0.2M酢酸及び0.2M塩化ナトリウムを含むバッファーでおよそ1分、pH3-4でこれらの細胞を処理する。それらが該細胞を、ヒト 2ミクログロブリン及び100-200  $\mu$ Mの試験ペプチドを含む培地で中性pHでインキュベートする。このインキュベーションの間、大集団のHLAクラスI分子は再ホールディングし、その結合溝に試験ペプチドを含む。

CTLカルチャーを、軟膜血液バックから得た $5 \times 10^6$  応答PBMC及び $10^6$ 放射線処理ペプチド搭載刺激細胞/ウェルを用いて24穴プレートで培養する。該カルチャー培地は、RPMI、10%FCS、抗CD4モノクローナル抗体の10%培養上清及び10U/mlの組換えIL-2より成る。1週間後、応答CTLを96穴プレートのマイクロカルチャーで再刺激する。各ウェルは $2 \times 10^5$ 放射線処理自己PBMC食細胞及び $10^5$ 放射線処理ペプチド搭載刺激細胞を含む。およそ $5 \times 10^4$ から $5 \times 10^2$ で始まる様々な数の応答CTLを、マイクロカルチャー当たりまく。該マイクロカルチャーを10-14日後新鮮な放射線処理PBMC及びペプチド搭載刺激細胞で再刺激する。最後の刺激から7日後、個々のマイクロカルチャー由来のCTLを、CTLを生産するために用いられる試験ペプチドを提示する、または無関係なコントロールペプチドを提示する適切なHLAクラスI分子を発現するT2細胞に対して $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイで分析する。無関係なペプチドでコートされたT2細胞に対する試験ペプチドでコートされたT2細胞の選択的な殺傷を示すマイクロカルチャーを、CTL特異性を確認するために増殖させる。同時に、これらのCTLのいくつかを、上述のマイクロカルチャーに対するのと同様な食細胞及び刺激細胞の数を用いて96穴プレートで限界希釈クローニングのため用いる。1~0.5のCTLをウェル当たりまく。CTLクローンの特異性を、関係する及び無関係のペプチドでコートされたT2ターゲット細胞を用いて確認する。

(iii)天然の抗原プロセッシングにより生産されるペプチドの同定

HLAクラスI分子((i)上記)によく結合し、及びCTL応答((ii)上記)を刺激する試験ペプチドが天然の抗原プロセッシングによりより生産されるかどうかを測定する。初めにペプチドを、MHCクラスI結合モチーフの存在下でHIVタンパク質及び腫瘍関連タンパク質の配列をスクリーニングすることによって選択する。上記セクション(i)-(ii)に記述されている研究により、選択された試験ペプチドがクラスI分子に結合し得、ペプチド特異的CTLを刺激し得ることが示される。天然の抗原プロセッシングがこれらのペプチドのMHCクラスI提示を導くかどうかを測定する。ペプチド特異的CTL系及びクローンを、外因性関連HIVタンパク質または腫瘍関連性タンパク質を発現するターゲット細胞に対して試験する。それゆえ、ヒトC1R細胞を、関連HLAクラスI遺伝子及びHIVタンパク質または腫瘍関連性タンパク質をコードする遺伝子を用いて二重にトランスフェクトする。単一でトランスフェクトされた細胞の溶解物の不存在下で、二重にトランスフェクトされたC1Rターゲット細胞のCTL溶解は、内因的に発現されたタンパク質の天然のプロセッシングが、これらのCTLクローンにより認識されるペプチドを生産することを示す。

実施例3:ヒトにおけるCTLを用いた借用の免疫治療

マウスに対する実施例2で記述されたものと同様なin vitro刺激条件で、異種制限的CTLを生産する。HLA-A0201クラスI分子によって提示されるHIVタンパク質または腫瘍関連性タンパク質から由来するペプチドを認識する異種制限的CYLを生産する。(HLA-A1及びHLA-B7によって提示されるペプチドを認識するCTLもまた用いる。)これらの3のHLA対立遺伝子は、Caucasian集団で最も頻繁に存在し、いかなる一人の個人でも3の対立遺伝子の少なくとも一つを発現するであろう高い可能性が存在する。これは、これら3のHLA対立遺伝子によって制限されるCTLクローンは、Caucasian集団の個人の大多数の借用の免疫治療に有用であることを意味する。該CTLクローンはガンの治療における化学療法のアジュバントとし

10

20

30

40

50

て用いられる。

HIV感染個人の借用の免疫治療に対して、HIVコードタンパク質由来のペプチドが用いられる。ウイルス荷重は該CTLの投与に引き続いて抑制される。

図7(A)はHLA-A0201結合サイクリンD1ペプチド(101-110)に対して特異的なCTLクローンの溶解を示す。該CTLクローンはHLA-A2ネガティブPBMCから得られた。

図7(B)はHLA-A0201結合サイクリンD1ペプチド(228-234)に対して特異的なCTLクローンの溶解を示す。該CTLクローンはHLA-A2ネガティブPBMCから得られた。

サイクリンD1由来ペプチドを用いた実験は、MHCミスマッチ抗原提示細胞を用いたPBMCの刺激により、健康なドナーからペプチド特異的CTLを生産することが可能であることを示す。これらのCTLは、CTL刺激に対して用いられる抗原提示細胞によって発現されるHLA-A0201クラスI分子によって提示されるサイクリンD1ペプチドに対して特異的であるが、CTLドナーの細胞によって提示されるものに対しては特異的ではない。それゆえ通常個人からペプチド特異的異種制限的CTLを単離することは明らかに可能である。もし選択されたペプチドが腫瘍細胞で生産されれば、該ペプチド特異的異種制限的CTLは腫瘍細胞殺傷を示す。

参考文献

1. Kast, W.M., R. Offringa, P.J. Peters, A.C. Voordouw, R.H. Meloen, A.J. van der Eb, and C.J. Melief (1989) "Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes" *Cell* 59, No. 4, 603-14.
2. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C.H. Delgado, P.F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J.R. Yannelli, G.J. Adema, T. Miki, and S.A. Rosenberg (1994) "Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with *in vivo* tumor rejection" *Proc Natl Acad Sci USA* 91, No. 14, 6458-62. 10
3. Nowak, M.A., R.M. May, R.E. Phillips, S. Rowland Jones, D.G. Lalloo, S. McAdam, P. Klenerman, B. Koppe, K. Sigmund, C.R. Bangham *et al* (1995) "Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections [see comments]" *Nature* 375, No. 6532, 606-11. 20
4. Riddell, S.R., K.S. Watanabe, J.M. Goodrich, C.R. Li, M.E. Agha, and P.D. Greenberg (1992) "Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones [see comments]" *Science* 257, No. 5067, 238-41.
5. van Lochem, E., B. de Gast, and E. Goulmy (1992) "*In vitro* separation of host specific graft-versus-host and graft-versus-leukemia cytotoxic T cell activities" *Bone-Marrow-Transplant* 10, No. 2, 181-3. 30
6. Faber, L.M., S.A. van Luxemburg Heijs, R. Willemze, and J.H. Falkenburg (1992) "Generation of leukemia-reactive cytotoxic T lymphocyte clones from the HLA-identical bone marrow donor of a patient with leukemia" *J-Exp-Med* 176, No. 5, 1283-9. 40
7. Falkenburg, J.H., L.M. Faber, M. van den Elshout, S.A. van Luxemburg Heijs, A. Hooftman den Otter, W.M. Smit, P.J. Voogt, and R. Willemze (1993) "Generation of donor-derived antileukemic cytotoxic

T-lymphocyte responses for treatment of relapsed leukemia after allogeneic HLA-identical bone marrow transplantation" *J-Immunother* 14, No. 4, 305-9 issn. 1053-8550.

8. Heath, W.R., M.E. Hurd, F.R. Carbone, and L.A. Sherman (1989) "Peptide-dependent recognition of H-2Kb by alloreactive cytotoxic T lymphocytes" *Nature* 341, No. 6244, 749-52.

9. Rojo, S., and J.A. Lopez de Castro (1991) "Peptide-mediated allo-recognition of HLA-B27 by cytotoxic T lymphocytes" *Int J Cancer Suppl* 6, 10-3.

10. von Boehmer, H. (1992) "Thymic selection: a matter of life and death" *Immunol-Today* 13, No. 11, 454-8.

11. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanoviic (1995) "MHC ligands and peptide motifs: first listing" *Immunogenetics* 41, No. 4, 178-228.

12. Walker, B.D., and F. Plata (1990) "Cytotoxic T lymphocytes against HIV" *AIDS* 4, No. 3, 177-84.

13. Nixon, D.F., and A.J. McMichael (1991) "Cytotoxic T-cell recognition of HIV proteins and peptides [editorial]" *AIDS* 5, No. 9, 1049-59.

14. Bakker, A.B.H., M.W.J. Schreurs, A.J. de Boer, Y. Kawakami, S.A. Rosenberg, G.J. Adema, and C.G. Figdor (1994) "Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes" *J Exp Med* 179, 1005-1009.

15. Boel, P., C. Wildmann, M.L. Sensi, R. Brasseur, J.C. Renauld, P. Coulie, T. Boon, and P. van der Bruggen (1995) "BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes" *Immunity* 2, No. 2, 167-75 issn. 1074-7613.

16. Cox, A.L., J. Skipper, Y. Chen, R.A. Henderson, T.L. Darrow, J. Shabanowitz, V.H. Engelhard, D.F. Hunt, and C.L. Slingluff Jr (1994) "Identification of a peptide recognised by five melanoma-specific human

10

20

30

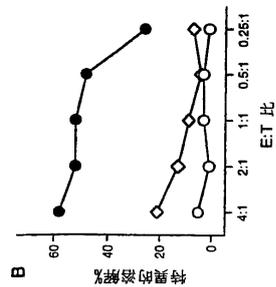
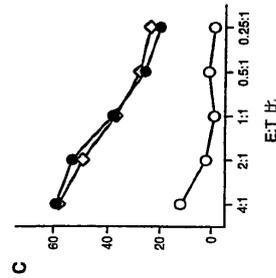
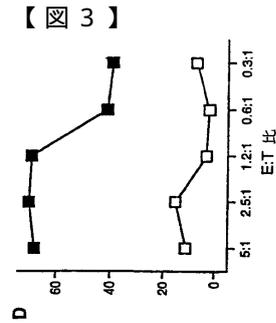
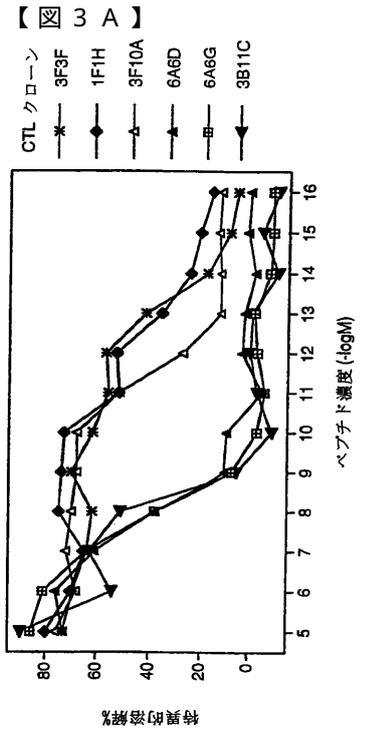
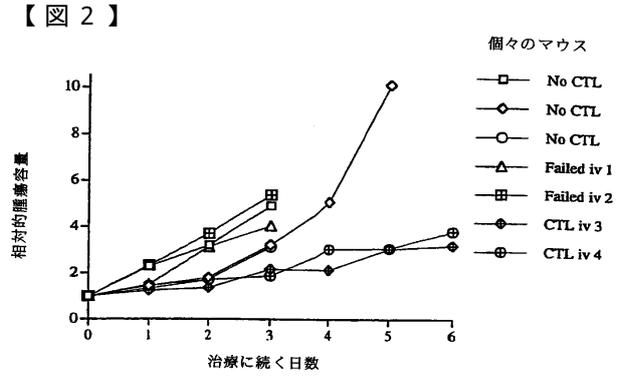
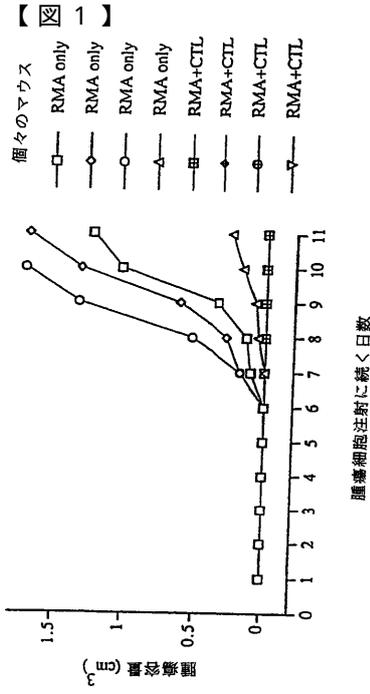
40

- cytotoxic T cell lines" *Science* **264**, 716-719.
17. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C.H. Delgado, P.F. Robbins, L. Rivoltini, S.L. Topalian, T. Miki, and S.A. Rosenberg (1994) "Cloning of the gene coding for a shared human-melanoma antigen recognized by autologous T-cells infiltrating into tumor" *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, No. 9, 3515-3519.
18. Kawakami, Y., S. Eliyahu, K. Sakaguchi, P.F. Robbins, L. Rivoltini, J.R. Yannelli, E. Appella, and S.A. Rosenberg (1994) "Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes" *J Exp Med* **180**, 347-352.
19. Traversari, C., P. van der Bruggen, I.F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Van Pel, E. de Plaen, A. Amar-Costesec, and T. Boon (1992) "A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E" *J. Exp. Med.* **176**, 1453-1457.
20. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. de Plaen, B. van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon (1991) "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma" *Science* **254**, 1643-1647.
21. Wölfel, T., A. Van Pel, V. Brichard, J. Schneider, B. Seliger, K. Meyer zum Büschenfelde, and T. Boon (1994) "Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes" *Eur J Immunol* **24**, 759-764.

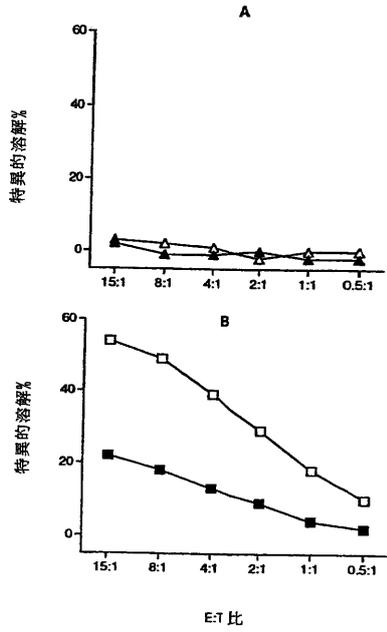
10

20

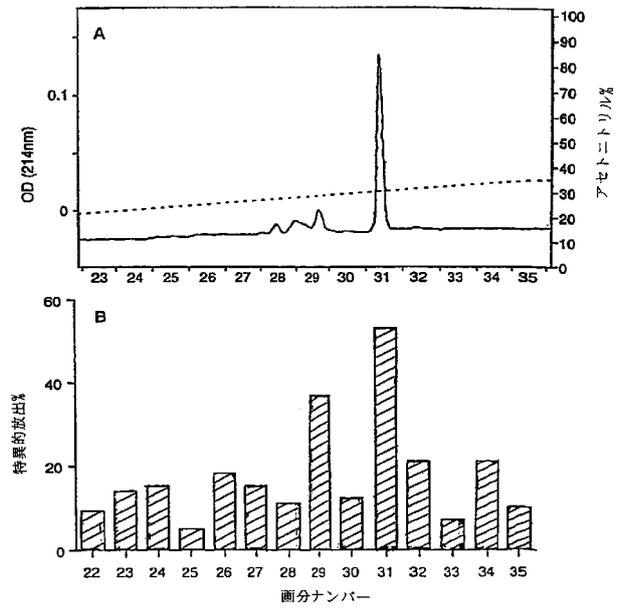
30



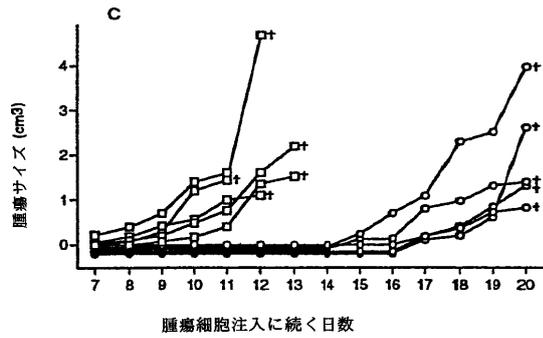
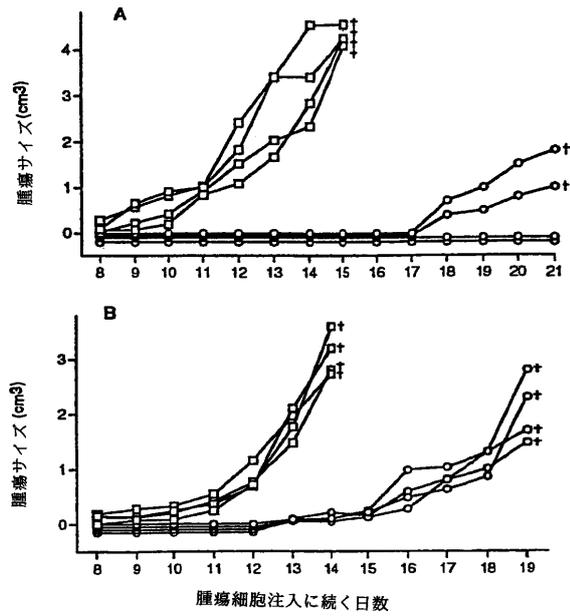
【 図 4 】



【 図 5 】

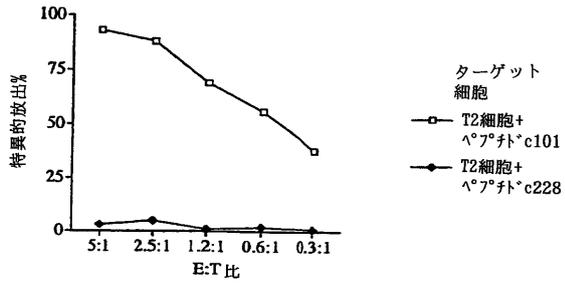


【 図 6 】

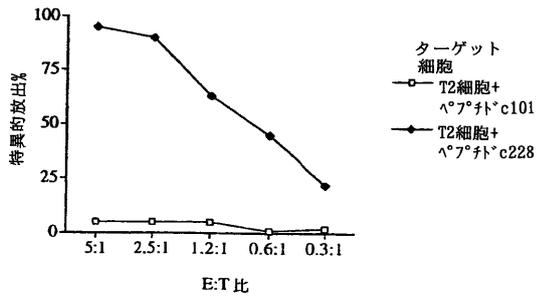


【図7】

HLA-A0201-結合サイクリンD1ペプチドに対して  
特異的なCTLクローンによる溶解(101-110):  
CTLクローンはHLA-A2ネガティブPBMCから得た



HLA-A0201-結合サイクリンD1ペプチドに対して  
特異的なCTLクローンによる溶解(228-234):  
CTLクローンはHLA-A2ネガティブPBMCから得た



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 31/04 (2006.01) A 6 1 P 31/04

(72)発明者 スタウス, ハンス ジョゼフ  
イギリス国 NW3 3 LH ロンドン フェローズ ロード 34

審査官 遠藤 広介

(56)参考文献 特開昭63-119428(JP,A)  
国際公開第95/022561(WO,A1)  
特表平07-503134(JP,A)  
特表平08-511939(JP,A)  
国際公開第95/034320(WO,A1)  
特表平07-504089(JP,A)  
VAN,K.U. et al, Cloned human CD8+ cytotoxic T lymphocytes protect human peripheral blood leukocyte-severe combined immunodeficient mice from HIV-1 infection by an HLA-unrestricted mechanism, J Immunol, 1994年, Vol.153, No.10, p.4826-33

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K 35/00 - 35/76  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed