

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-507582

(P2019-507582A)

(43) 公表日 平成31年3月22日(2019.3.22)

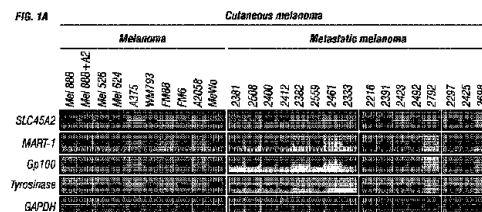
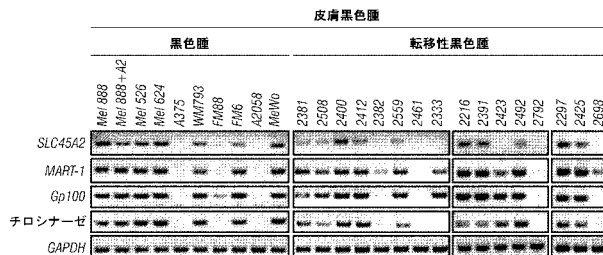
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 7/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-528745 (P2018-528745)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成28年12月2日 (2016.12.2)		ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月26日 (2018.7.26)		アメリカ合衆国 テキサス 78701,
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/064825		オースティン, ウェスト 7ティーエイチ
(87) 国際公開番号	W02017/096304		ストリート 210
(87) 国際公開日	平成29年6月8日 (2017.6.8)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	62/263, 835		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成27年12月7日 (2015.12.7)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	62/263, 189	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成27年12月4日 (2015.12.4)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 免疫療法用の S L C 4 5 A 2 ペプチド

(57) 【要約】

黒色腫細胞または他の抗原提示細胞上のMHC I(HLA-A2)に結合し、T細胞上のT細胞受容体によって認識される、SLC45A2ペプチドを提供する。当該SLC45A2ペプチドは、皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、または転移性黒色腫などのがんを治療するために治療的に使用され得る。SLC45A2を標的とするT細胞の集団を拡大培養するための方法も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

35アミノ酸長以下であり、SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)もしくはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)の配列またはSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)もしくはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、HLA-A2、HLA-A*0201、HLA-A24、またはHLA-A*2402に選択的に結合する、単離されたペプチド。

【請求項2】

30アミノ酸長以下である、請求項1記載のペプチド。

【請求項3】

25アミノ酸長以下である、請求項2記載のペプチド。

10

【請求項4】

20アミノ酸長以下である、請求項3記載のペプチド。

【請求項5】

15アミノ酸長以下である、請求項4記載のペプチド。

【請求項6】

SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)を含むかまたはこれからなり、HLA-A2またはHLA-A*0201に選択的に結合する、請求項1記載のペプチド。

【請求項7】

SLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)を含むかまたはこれからなり、HLA-A24またはHLA-A*2402に選択的に結合する、請求項6記載のペプチド。

20

【請求項8】

薬学的製剤中に含まれている、請求項1～7のいずれか一項記載のペプチド。

【請求項9】

前記薬学的製剤が、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されている、請求項8記載のペプチド。

【請求項10】

リポソーム内、脂質含有ナノ粒子内、または脂質ベース担体内に含まれている、請求項9記載のペプチド。

【請求項11】

前記薬学的製剤が、鼻腔用スプレーとしての吸入または注射用に製剤化されている、請求項10記載のペプチド。

30

【請求項12】

細胞培養培地中に含まれている、請求項1記載のペプチド。

【請求項13】

請求項1～7のいずれか一項記載のペプチドを含む細胞培養培地。

【請求項14】

請求項1～7のいずれか一項記載のペプチドおよび賦形剤を含む薬学的組成物。

【請求項15】

前記薬学的製剤が、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されている、請求項14記載の組成物。

40

【請求項16】

前記ペプチドが、リポソーム内、脂質含有ナノ粒子内、または脂質ベース担体内に含まれている、請求項14記載のペプチド。

【請求項17】

治療的処置において使用するための、請求項1～12のいずれか一項記載のペプチドを含む組成物。

【請求項18】

黒色腫の治療において使用するためのものである、請求項17記載の組成物。

【請求項19】

前記ペプチドが25アミノ酸長以下である、請求項17記載の組成物。

50

【請求項 20】

前記ペプチドが20アミノ酸長以下である、請求項17記載の組成物。

【請求項 21】

前記ペプチドが15アミノ酸長以下である、請求項17記載の組成物。

【請求項 22】

前記ペプチドがSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)を含むかまたはこれからなる、請求項17記載の組成物。

【請求項 23】

前記ペプチドがSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)を含むかまたはこれからなる、請求項22記載の組成物。

10

【請求項 24】

前記ペプチドが薬学的製剤中に含まれている、請求項17記載の組成物。

【請求項 25】

前記薬学的製剤が、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されている、請求項24記載の組成物。

【請求項 26】

前記ペプチドが、リボソーム内、脂質含有ナノ粒子内、または脂質ベース担体内に含まれている、請求項25記載の組成物。

【請求項 27】

前記薬学的製剤が、鼻腔用スプレーとしての吸入または注射用に製剤化されている、請求項26記載の組成物。

20

【請求項 28】

前記ペプチドがペプチド合成によって生成された、請求項18記載のペプチド。

【請求項 29】

前記ペプチドが組換え生産された、請求項18記載のペプチド。

【請求項 30】

前記黒色腫が皮膚黒色腫である、請求項18記載の組成物。

【請求項 31】

前記黒色腫がブドウ膜黒色腫である、請求項18記載の組成物。

【請求項 32】

前記黒色腫が粘膜黒色腫である、請求項18記載の組成物。

30

【請求項 33】

前記黒色腫が転移性黒色腫である、請求項18記載の組成物。

【請求項 34】

有効量の請求項1～12のいずれか一項記載のペプチドを対象へ投与する工程を含む、哺乳動物対象における黒色腫を治療する方法。

【請求項 35】

前記ペプチドが薬学的製剤中に含まれている、請求項34記載の方法。

【請求項 36】

前記薬学的製剤が、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されている、請求項35記載の方法。

40

【請求項 37】

前記対象がヒトである、請求項34記載の方法。

【請求項 38】

前記黒色腫が皮膚黒色腫である、請求項34記載の方法。

【請求項 39】

前記黒色腫がブドウ膜黒色腫である、請求項34記載の方法。

【請求項 40】

前記黒色腫が粘膜黒色腫である、請求項34記載の方法。

【請求項 41】

50

前記黒色腫が転移性黒色腫である、請求項34記載の方法。

【請求項 4 2】

前記対象が第2の抗がん療法を施される、請求項34記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第2の抗がん療法が、化学療法、放射線療法、免疫療法、または手術からなる群より選択される、請求項42記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ペプチドが、前記対象中の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が該対象中のがん性細胞を溶解または殺傷するのを促進するのに有効な量で、該対象へ投与される、請求項42記載の方法。

【請求項 4 5】

T細胞の集団が増殖するように誘導するためのインビトロ方法であって、該T細胞のHLA-A*0201またはHLA-A2に結合して該T細胞のうち1つまたは複数の増殖を促進するのに十分な量の請求項1～12のいずれか一項記載のペプチドと該T細胞とをインビトロで接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項 4 6】

前記T細胞が細胞傷害性Tリンパ球(CTL)である、請求項45記載の方法。

【請求項 4 7】

前記T細胞がCD8+ T細胞である、請求項45記載の方法。

【請求項 4 8】

前記増殖後に前記T細胞を前記対象へ投与する工程をさらに含む、請求項45記載の方法。

【請求項 4 9】

前記対象がヒトである、請求項48記載の方法。

【請求項 5 0】

対象においてSLC45A2に対する免疫応答を促進する方法であって、SLC45A2を選択的に標的とするT細胞の増殖を引き起こすために有効な量の請求項1～12のいずれか一項記載のペプチドを該対象へ投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 5 1】

前記T細胞が細胞傷害性Tリンパ球である、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

前記対象がヒトである、請求項50記載の方法。

【請求項 5 3】

前記対象が黒色腫を有する、請求項50記載の方法。

【請求項 5 4】

前記黒色腫が皮膚黒色腫である、請求項53記載の方法。

【請求項 5 5】

前記黒色腫がブドウ膜黒色腫である、請求項53記載の方法。

【請求項 5 6】

前記黒色腫が粘膜黒色腫である、請求項53記載の方法。

【請求項 5 7】

前記黒色腫が転移性黒色腫である、請求項53記載の方法。

【請求項 5 8】

前記対象ががんを有さない、請求項50記載の方法。

【請求項 5 9】

請求項1～7のいずれか一項記載のペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 6 0】

ミニ遺伝子またはプラスミド中に含まれている、請求項59記載の核酸。

【請求項 6 1】

RNAである、請求項59または60記載の核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 6 2】

請求項59記載の核酸セグメントからなる連続配列を含む、ベクター。

【請求項 6 3】

異種プロモーターをさらに含む、請求項62記載のベクター。

【請求項 6 4】

ミニ遺伝子またはプラスミド中に含まれている、請求項62または63記載のベクター。

【請求項 6 5】

請求項1記載のペプチドに選択的に結合する、単離された抗体。

【請求項 6 6】

モノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗血清中に含まれているか、または抗体断片である、請求項65記載の抗体。 10

【請求項 6 7】

ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項65記載の抗体。

【請求項 6 8】

ペプチド-HLA-A2複合体に選択的に結合する単離された抗体であって、該ペプチド-HLA-A2複合体が、HLA-A2に結合した請求項1～12のいずれか一項記載のペプチドを含む、前記抗体。

【請求項 6 9】

モノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗血清中に含まれているか、または抗体断片である、請求項68記載の抗体。 20

【請求項 7 0】

ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項68記載の抗体。

【請求項 7 1】

融合構築物、可溶性融合構築物、ImmTAC、または免疫毒素中に含まれている、請求項65～70のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 7 2】

容器中に請求項1～12のいずれか一項記載のペプチドを含む、キット。

【請求項 7 3】

前記ペプチドが薬学的製剤中に含まれている、請求項72記載のキット。

【請求項 7 4】

前記薬学的製剤が、非経口投与または吸入用に製剤化されている、請求項73記載のキット。 30

【請求項 7 5】

前記ペプチドが細胞培養培地中に含まれている、請求項72記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2015年12月4日出願された米国仮特許出願第62/263,189号、および2015年12月7日出願された米国仮特許出願第62/263,835号の恩典を主張し、これらの全体は参照により本明細書に組み入れられる。 40

【0 0 0 2】

1. 発明の分野

本発明は全体として、免疫学および医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、T細胞によって認識され、がんを治療するために使用され得る、ペプチド断片に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

2. 関連技術の説明

養子T細胞療法 (ACT; 「養子細胞移入」とも呼ばれる) は、黒色腫を治療するための方法として著しい将来性を示したが; 不運にも、このアプローチはまた、非がん性組織に対する毒性を含む制限によって妨げられた。ACTは、一般に、例えば、がんを治療するため 50

に、多数の自己活性化腫瘍特異的T細胞を患者へ注入することを伴う。ACTは黒色腫患者において治療的臨床応答をもたらした（Yee 2002; Dudley 2002; Yee 2014; Chapuis 2016）。一般に、有効な抗腫瘍T細胞応答を生じさせるために、以下の3つの段階が通常必要とされる：抗原特異的T細胞をプライミングおよび活性化させる段階、活性化されたT細胞を腫瘍部位へ移す段階、ならびに抗原特異的T細胞が腫瘍を認識および殺傷する段階。標的抗原の選択は、有効な抗原特異的T細胞の誘導のために重要である。

【0004】

ACTで黒色腫を治療するために選択されたいくつかの抗原が、著しく有害な自己免疫副作用を示した。標的抗原の選択はまた、有効な抗原特異的T細胞の誘導のために重要である。過去数十年において、MART-1、gp100、およびチロシナーゼが、ヒトPBLまたはTILに由来するT細胞によって認識されるヒト黒色腫分化抗原(MDA)と同定された（Yee 2002, Chapuis 2012; Coulie 1994; Kawakami 1995）。MDAはまた、皮膚および眼におけるメラノサイトのような正常組織によってならびに内耳細胞によって発現される。不運にも、最近の臨床試験の結果によれば、これらのMDAに特異的なT細胞のACTは、正常組織の破壊による望ましくない自己免疫応答を引き起こし、白斑、失明、および内耳毒性をもたらされた（Yee C 2000; Brichard V 1993; Seaman 2012）。黒色腫について、より少ない毒性および最適な効能を有する新たな標的抗原を同定することが望ましい。明らかに、養子T細胞療法において使用され得る新たな抗原標的およびペプチドについての必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、SLC45A2という新たなMHCクラスIエピトープを提供することによって、先行技術における制限を克服する。抗原性SLC45A2ペプチドは、がん療法において、例えば、がんワクチンとしてまたは養子T細胞療法において、使用され得る。1つまたは複数のSLC45A2ペプチドまたはSLC45A2ペプチドと（HLA-A2またはHLA-A24）との結合によって形成される複合体に選択的に結合する抗体（例えば治療用ヒト化抗体）も作製され得る。SLC45A2ペプチドは、黒色腫（例えば、皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、または転移性黒色腫）を治療するために使用され得る。本発明は、細胞内タンパク質SLC45A2のペプチドが腫瘍細胞の表面上のMHC I（HLA-A2またはHLA-A24）によって提示され、これらがT細胞上のT細胞受容体によって認識されるという発見に部分的に基づく。様々な局面において、MHC I（HLA-A2またはHLA-A24）に結合し得、T細胞上のT細胞受容体によって認識され得る、SLC45A2ペプチドを提供する。SLC45A2ペプチドは、がん（例えば、黒色腫）を治療するために治療的に使用され得る。SLC45A2を標的とするT細胞の集団を拡大培養するための方法も提供する。いくつかの局面において、正常なメラノサイトを破壊することなく黒色腫細胞を効果的に殺傷するCD8⁺ T細胞を生じさせるために使用され得るSLC45A2ペプチドを提供する。この非がん性細胞に対する毒性の減少は、黒色腫の治療に特に有用であり得る。

【0006】

下記の実施例において示されるように、黒色腫および正常組織におけるSLC45A2の発現が特徴付けられ、SLC45A2ペプチドであるSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)およびSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)が、それぞれ、HLA-A*0201 (HLA-A2)およびHLA-A*2402 (HLA-A24)に選択的に結合し得る免疫原性エピトープと同定され、これらのペプチドを使用して増殖された細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が、多発性皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、および転移性黒色腫を含む、種々の黒色腫細胞を効率的に殺傷したことが観察された。本発明の様々な態様において使用され得る追加のSLC45A2ペプチドを表4にて提供する。下記の実施例において示されるように、これらのSLC45A2ペプチドは、SLC45A2特異的CD8⁺ T細胞の抗原特異的かつHLA-A*0201またはHLA A*2402拘束性の応答を見せることが示された。SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)および／またはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)は、黒色腫を治療するために様々な免疫療法アプローチにおいて（例えば、治療ワクチンとして、養子T細胞療法において）使用され得る。

【0007】

本発明の一局面は、35アミノ酸長以下であり、かつ、SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)もしくはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)の配列またはSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)もしくはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)に対して少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、HLA-A2、HLA-A*0201、HLA-A24、またはHLA-A*2402に選択的に結合する、単離されたペプチドに関する。いくつかの態様において、ペプチドは、30以下、25以下、20以下、または15以下のアミノ酸長である。いくつかの態様において、ペプチドはSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)を含むかまたはこれからなり、ここで、ペプチドはHLA-A2またはHLA-A*0201に選択的に結合する。いくつかの態様において、ペプチドはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)を含むかまたはこれからなり、ここで、ペプチドはHLA-A24またはHLA-A*2402に選択的に結合する。ペプチドは薬学的製剤中に含まれ得る。いくつかの態様において、薬学的製剤は、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されている。ペプチドは、リボソーム内、脂質含有ナノ粒子内、または脂質ベース担体内に含まれ得る。いくつかの態様において、薬学的製剤は、鼻腔用スプレーとしての吸入または注射用に製剤化されている。いくつかの態様において、ペプチドは細胞培養培地中に含まれている。

10

【0008】

本発明の別の局面は、本発明のまたは上述のペプチドを含む細胞培養培地に関する。

【0009】

本発明のさらに別の局面は、本発明のまたは上述のペプチドおよび賦形剤を含む薬学的組成物に関する。薬学的製剤は、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されていてもよい。いくつかの態様において、ペプチドは、リボソーム内、脂質含有ナノ粒子内、または脂質ベース担体内に含まれている。

20

【0010】

本発明の別の局面は、治療的処置において使用するための、本発明のまたは上述のペプチドを含む組成物に関する。いくつかの態様において、組成物は、黒色腫の治療において使用するためのものである。いくつかの態様において、ペプチドは、25以下、20以下、または15以下のアミノ酸長である。いくつかの態様において、ペプチドはSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SEQ ID NO:1)を含むかまたはこれからなる。いくつかの態様において、ペプチドはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SEQ ID NO:2)を含むかまたはこれからなる。ペプチドは薬学的製剤中に含まれ得る。いくつかの態様において、薬学的製剤は、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されている。ペプチドは、リボソーム内、脂質含有ナノ粒子内、または脂質ベース担体内に含まれていてもよい。いくつかの態様において、薬学的製剤は、鼻腔用スプレーとしての吸入または注射用に製剤化されている。ペプチドはペプチド合成によって生成され得る。ペプチドは組換え生産され得る。黒色腫は、皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、または転移性黒色腫であり得る。

30

【0011】

本発明のさらに別の局面は、有効量の本発明のまたは上述のペプチドを対象へ投与する工程を含む、哺乳動物対象における黒色腫を治療する方法に関する。ペプチドは薬学的製剤中に含まれ得る。薬学的製剤は、非経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、または皮下注射用に製剤化されていてもよい。対象はヒトであり得る。黒色腫は、皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、または転移性黒色腫であり得る。いくつかの態様において、対象は第2の抗がん療法を施される。いくつかの態様において、第2の抗がん療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、または手術からなる群より選択される。いくつかの態様において、対象中の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が対象中のがん性細胞を溶解または殺傷するのを促進するのに有効な量で、ペプチドを対象へ投与する。

40

【0012】

本発明の別の局面は、T細胞の集団が増殖するように誘導するためのインビトロ方法であって、該T細胞のHLA-A*0201またはHLA-A2に結合して該T細胞のうちの1つまたは複数の増殖を促進するのに十分な量の請求項1~12のいずれか一項記載のペプチドとT細胞とをインビトロで接触させる工程を含む、前記方法に関する。T細胞は細胞傷害性Tリンパ球(CTL

50

)であり得る。T細胞はCD8⁺ T細胞であり得る。いくつかの態様において、前記方法は、前記増殖後にT細胞を対象へ投与する工程をさらに含む。対象は哺乳動物対象（例えばヒト）であり得る。

【0013】

本発明のさらに別の局面は、対象においてSLC45A2に対する免疫応答を促進する方法であって、SLC45A2を選択的に標的とするT細胞の増殖を引き起こすために有効な量の本発明のまたは上述のペプチドを対象へ投与する工程を含む、方法に関する。いくつかの態様において、T細胞は細胞傷害性Tリンパ球である。対象はヒトであり得る。いくつかの態様において、対象は黒色腫を有する。黒色腫は、皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、または転移性黒色腫であり得る。いくつかの態様において、対象はがんを有さない。

10

【0014】

本発明の別の局面は、本発明のまたは上述のペプチドをコードする単離された核酸に関する。核酸はDNAまたはRNAであり得る。本発明のさらに別の局面は、核酸セグメントからなる連続配列を含むベクターに関する。いくつかの態様において、ベクターは異種プロモーターをさらに含む。いくつかの態様において、核酸またはベクターは、ミニ遺伝子、プラスミド、またはRNA中に含まれ得；例えば、核酸またはベクターは、例えば、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、人工APC、またはT細胞）におけるエピトープの発現を操作するために、使用され得る。

【0015】

本発明のさらに別の局面は、本発明のまたは上述のペプチドに選択的に結合する単離された抗体に関する。いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗血清中に含まれているか、または抗体断片である。抗体はヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。抗体は、融合構築物、可溶性融合構築物、ImmTAC、または免疫毒素中に含まれ得；例えば、種々の部分が、例えば、Oates et al. (2015)およびLiddy et al. (2012)（これらはディスクリーマーなしで参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる）に記載されているように、追加の治療効果を達成するために抗体へ付加され得る。例えば、いくつかの態様において、抗体は、ヒト化された表面抗原分類3(CD3)特異的単鎖抗体断片(scFv)へ融合され得る。

20

【0016】

本発明の別の局面は、ペプチド-HLA-A2複合体に選択的に結合する単離された抗体に関し、ここで、ペプチド-HLA-A2複合体は、HLA-A2に結合した請求項1~12のいずれか一項記載のペプチドを含む。いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗血清中に含まれているか、または抗体断片である。いくつかの態様において、抗体はヒト抗体またはヒト化抗体である。

30

【0017】

本発明のさらに別の局面は、容器中に本発明のまたは上述のペプチドを含むキットに関する。いくつかの態様において、ペプチドは薬学的製剤中に含まれている。いくつかの態様において、薬学的製剤は、非経口投与または吸入用に製剤化されている。いくつかの態様において、ペプチドは細胞培養培地中に含まれている。

【0018】

本明細書において使用される場合、指定の成分に関して、「本質的に含まない」は、指定の成分が、組成物中に意図的に製剤化されていない、かつ／または、混入物質としてもしくは微量だけ存在することを意味するために本明細書において使用される。組成物の意図しない混入に起因する指定の成分の総量は、従って、0.05%を遥かに下回り、好ましくは0.01%未満である。最も好ましいのは、指定の成分の量が標準的な分析方法によっては検出できない、組成物である。

40

【0019】

HLA-A2は、ヒト白血球抗原血清型A2を指し、また、HLA-A*02とも呼ばれる。HLA-A*0201、*0202、*0203、*0206、*0207、および*0211遺伝子産物を含む、多くのHLA-A*02対立遺伝子の遺伝子産物のいくつかの血清型が周知である。

50

【0020】

HLA-A24は、ヒト白血球抗原血清型A24を指し、また、HLA-A*24とも呼ばれる。HLA-A*2402および*2403遺伝子産物を含む、多くのHLA-A*24対立遺伝子の遺伝子産物のいくつかの血清型が周知である。

【0021】

用語「阻害」、「低減」、もしくは「防止」、またはこれらの用語の任意の変形は、特許請求の範囲および／または明細書において使用される場合、所望の結果を達成するための任意の測定可能な減少または完全な阻害を含む。

【0022】

用語「有効な」は、その用語が明細書および／または特許請求の範囲において使用される場合、所望の、期待される、または意図される結果を達成するのに十分であることを意味する。

10

【0023】

単語「1つの(a)」または「1つの(an)」の使用は、特許請求の範囲および／または明細書において用語「含む」と共に使用される場合、「1つ」を意味し得るが、それはまた、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つを超える」という意味と一致する。

【0024】

本明細書において議論される任意の態様が、本発明の任意の方法または組成物に関して実施され得、逆の場合も同じであることが、意図される。さらに、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するために使用され得る。

20

【0025】

本出願にわたり、用語「約」は、値が、装置の誤差の固有の変動を含むことを示すために使用され、方法は、値、または試験対象間に存在する変動を決定するために用いられる。

【0026】

選択肢のみを表すことが明確に示されている、または選択肢が相互に排他的である場合を除き、特許請求の範囲における用語「または」の使用は、「および／または」を意味するために使用されるが、本開示は、選択肢のみおよび「および／または」を表す定義を支持する。

30

【0027】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単語「含む(comprising)」（および含むの任意の形、例えば、「含む(comprise)」および「含む(comprises)」）、「有する(having)」（および有するの任意の形、例えば、「有する(have)」および「有する(has)」）、「包含する(including)」（および包含するの任意の形、例えば、「包含する(includes)」および「包含する(include)」）または「含有する(containing)」（および含有するの任意の形、例えば、「含有する(contains)」および「含有する(contain)」）は、包括的またはオープンエンドであり、追加の、記載されていない要素または方法段階を排除しない。

【0028】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかし、本発明の精神および範囲内の様々な変更および改変がこの詳細な説明から当業者に明らかとなるために、詳細な説明および具体例は、本発明の好ましい態様を示すものの、例示のためだけに与えられていることが理解されるべきである。

40

【図面の簡単な説明】

【0029】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書に提示される具体的な態様の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの1つまたは複数を参照することによって、よりよく理解され得る。

【0030】

50

【図 1 A】皮膚黒色腫細胞株におけるSLC45A2の発現。RT-PCRによって決定された、24種の皮膚黒色腫細胞株におけるMDA発現を示す結果の要約。

【図 1 B】皮膚黒色腫細胞株におけるSLC45A2の発現。皮膚黒色腫細胞におけるSLC45A2 mRNA発現。SLC45A2 mRNAが、MART-1、gp100およびチロシナーゼなどの他のメラノサイト分化抗原と同様に、RT-PCR分析によって、異なる部位から生じた転移性黒色腫細胞を含むほとんどの黒色腫細胞において検出された。

【図 1 C】高拘束性組織 (high-restricted tissue) におけるSLC45A2の発現。RT-PCR分析による様々な腫瘍タイプの細胞におけるSLC45A2 mRNA発現無し。黒色腫以外の種々のタイプの腫瘍細胞は、SLC45A2を発現していなかった。

【図 2 A - 1】腫瘍由来ペプチドの質量スペクトル。HLA-A*0201拘束性SLC45A2ペプチド。

【図 2 A - 2】腫瘍由来ペプチドの質量スペクトル。HLA-A*0201拘束性SLC45A2ペプチド。

【図 2 A - 3】合成SLC45A2由来ペプチドの質量スペクトル。HLA-A*0201拘束性SLC45A2ペプチド。

【図 2 B - 1】腫瘍由来ペプチドの質量スペクトル。HLA-A*2402拘束性ペプチド。

【図 2 B - 2】腫瘍由来ペプチドの質量スペクトル。HLA-A*2402拘束性ペプチド。

【図 2 B - 3】合成SLC45A2由来ペプチドの質量スペクトル。HLA-A*2402拘束性ペプチド。

【図 2 C】黒色腫細胞株から黒色腫腫瘍特異的ペプチドを同定するための実験戦略。

【図 3 A】図3A~C: HLA A*0201またはA*2402拘束性の健康なドナーのPBMCにおけるSLC45A2特異的CD8 T細胞の作製。図3A: SLC45A2特異的CD8 T細胞の作製スケジュール。

【図 3 B - 1】図3B: SLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞の誘導。HLA A*0201またはA*2402拘束性の健康なドナー由来のPBMCを、それぞれ、SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ペプチドまたはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ペプチドでパルスした自己DCで刺激した。2回刺激後、SLC45A2テトラマー陽性CD8 T細胞をARIAソーターによって選別し (上パネル)、選別されたSLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞を急速拡大培養プロトコル (rapid expansion protocol) (REP) に従って拡大培養した。次いで、拡大培養した細胞をSLC45A2特異的CD8 T細胞として使用した (中央パネル)。SLC45A2特異的CD8 T細胞のTCRレパートリー分析を、24種の異なる特異性に対応するVβ抗体と共にIOtest Beta Mark TCR-Vβレパートリーキットを使用して行った (下パネル)。

【図 3 B - 2】図3B-1の説明を参照。

【図 3 B - 3】図3B-1の説明を参照。

【図 3 B - 4】図3B-1の説明を参照。

【図 3 C】図3C: SLC45A2特異的CD8 T細胞の表現型。REPから14日後に、CD45RA、CCR7、CD62LおよびCD28についての抗体を使用して、フローサイトメトリーによって表現型を試験した。

【図 4 A - 1】図4A~F: SLC45A2特異的CD8 T細胞のエフェクター機能。図4A: 皮膚黒色腫細胞に対するSLC45A2特異的CD8 T細胞 (A*0201拘束性) の殺傷効果。SLC45A2特異的CD8 T細胞は、SLC45A2を内因的に発現するHLA A*0201拘束性黒色腫細胞 (HLA-A*0201+/SLC45A2+: A2が形質導入されたMel888、Mel526、Mel624およびMeWo) を認識および殺傷した。SLC45A2特異的CD8 T細胞は、SLC45A2を発現していたがHLA A*0201を発現していなかった (HLA-A*0201-/SLC45A2+) Mel888、およびHLA A*0201を発現していたがSLC45A2を発現していなかった (HLA-A*0201+/SLC45A2-) A375を殺傷しなかった。SLC45A2特異的CD8 T細胞は、HLA-A*0201およびSLC45A2+を発現する転移性黒色腫に対して殺傷効果を示した。ドナー番号1由来のSLC45A2特異的CD8 T細胞を使用した。細胞傷害活性についての標準的な⁵¹Cr放出アッセイを異なるE:T比で行った。行った少なくとも3つのうちの1つの代表的な実験の結果を示した。

【図 4 A - 2】図4A-1の説明を参照。

【図 4 B】図4B: 皮膚黒色腫細胞に対するSLC45A2特異的CD8 T細胞 (A*2402拘束性) の殺

10

20

30

40

50

傷効果。SLC45A特異的CD8 T細胞 (A*2402拘束性) は、SLC45A2およびHLA A*2402を発現する皮膚黒色腫細胞を殺傷した。細胞傷害活性についての標準的な⁵¹Cr放出アッセイを異なるE:T比で行った。行った少なくとも2つのうちの1つの代表的な実験の結果を示している。

【図4C-1】図4C: SLC45A特異的CD8 T細胞の機能的アビディティ。SLC45A2特異的CD8 T細胞を、様々な濃度 (100、10、1、0.1、0.01、0 nM) のSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ペプチドおよび不適合ペプチドであるMART-1₂₇₋₃₅と共にプレインキュベートされたT2細胞と共に培養した (上パネル)。MART-1またはgp100特異的CD8 T細胞を、示されている濃度のM₂₇₋₃₅ペプチドまたはG₁₅₄₋₁₆₂ペプチドと共にプレインキュベートされたT2細胞と共に培養した (下パネル)。インキュベーションから48時間後、IFN- γ 産生をELISAアッセイによって測定した。SLC45A2、MART-1およびgp100特異的CD8 T細胞のペプチド用量閾値を、抗原特異的CD8 T細胞のペプチド感度の比較のために測定した。

【図4C-2】図4C-1の説明を参照。

【図4D】図4D: 黒色腫異種移植モデルを使用する養子T細胞移入の実験的なタイムラインを示す概略図。

【図4E】図4E: ヒト黒色腫Mel526異種移植片に対する養子移入されたSLC45A2特異的CTLの治療効果を示す腫瘍成長曲線。ヌードマウスに 1×10^7 個のMel526細胞を皮下接種した。腫瘍チャレンジから7日後、SLC45A2特異的CTL (1×10^7 個) を、4週間の間、週1回、静脈内注射し、腫瘍成長をモニタリングした。

【図4F】図4F: ヒト黒色腫Mel526異種移植片に対する養子移入されたMART1特異的CTLの治療効果を示す腫瘍成長曲線。ヌードマウスに 1×10^7 個のMel526細胞を皮下接種した。腫瘍チャレンジから7日後、MART-1特異的CTL (1×10^7 個) を、4週間の間、週1回、静脈内注射し、腫瘍成長をモニタリングした。

【図5A】図5A~D: SLC45A2の発現、およびメラノサイトに対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。図5A: メラノサイトにおける黒色腫分化抗原の発現。2つの異なるメラノサイト4C0197(4C)および3C0661(3C)におけるSLC45A2、MART-1、gp100、およびチロシナーゼのmRNA発現を、RT-PCRによって試験した。SLC45A2 mRNAは両方のメラノサイトにおいて発現されていたが、それは、黒色腫細胞と比較して非常に低いレベルであり、一方、MART-1、gp100およびチロシナーゼのような他の黒色腫分化抗原は、黒色腫と同様のレベルでメラノサイトにおいて発現されていた。行った少なくとも3つのうちの1つの代表的な実験の結果を示している。

【図5B-1】図5B: メラノサイトに対するHLA-A*0201拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。SLC45A2特異的CD8 T細胞は、2種のメラノサイト (HLA-A*0201+) をあまり殺傷しなかったが、黒色腫細胞を高い細胞傷害効果で殺傷した。これに対して、MART-1およびgp100特異的CD8 T細胞は、黒色腫細胞と同様にメラノサイトを殺傷した。HLA-A*0201拘束性SLC45A2、MART-1、およびgp100特異的CD8 T細胞を様々なE:T比で使用して、標準的な⁵¹Cr放出アッセイを行った。Mel526 (HLA-A*0201+/SLC45A2+) およびA375 (HLA-A*0201+/SLC45A2-) を、それぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。

【図5B-2】図5B-1の説明を参照。

【図5C】図5C: メラノサイトに対するHLA-A*2402拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。HLA-A*2402拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞は、メラノサイトであるHLA-A*2402発現性4C0197をあまり殺傷しなかったが、HLA-A*2402+/SLC45A2+発現性黒色腫細胞を殺傷した。Mel526 (HLA-A*2402-/SLC45A2+) を陰性対照として使用している。初代メラノサイト株3Cおよび4Cに、1 μ g/ml SLYSYFQKV (SEQ ID NO:1) ペプチドをパルスし、標準的な⁵¹Cr放出アッセイにおいてHLA-A*0201拘束性SLC45A2特異的CTLについての標的として使用した。

【図5D】図5D: mAb BB7.2での染色およびフローサイトメトリー分析後の、Mel526、A375、ならびに初代メラノサイト3Cおよび4Cにおける表面HLA-A*0201発現の比較。

【図6A】図6A~E: SLC45A2発現、ならびにブドウ膜黒色腫および粘膜黒色腫細胞に対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。図6A: ブドウ膜黒色腫細胞上でのSLC45A2発

現。RT-PCRによってSLC45A2発現を分析したところ、この研究において使用した全てのブドウ膜黒色腫細胞がSLC45A2を発現していた。

【図6B】図6B：ブドウ膜黒色腫細胞に対するSLC45A特異的CD8 T細胞の細胞傷害効果。HLA A*0201拘束性SLC45A特異的CD8 T細胞は、SLC45A2およびHLA A*0201を発現するブドウ膜黒色腫細胞であるOMM1を溶解したが、SLC45A2を発現するがHLA A*0201を発現しないブドウ膜黒色腫細胞である202を溶解しなかった。HLA A*2402拘束性SLC45A特異的CD8 T細胞は、SLC45A2およびHLA A*2402を発現するUPMD2に対して殺傷効果を示した。UPMD2にS₉₃₃₋₄₀₂ペプチドをパルスした場合、より高い細胞傷害性がHLA A*2402拘束性SLC45A特異的CD8 T細胞によって示された。発現がSLC45A2+およびHLA A*2402-であるUPMD1は、HLA A*2402拘束性SLC45A特異的CD8 T細胞によって殺傷されなかった。細胞傷害活性についての標準的な⁵¹Cr放出アッセイを異なるE:T比で行っている。行った少なくとも2つのうちの1つの代表的な実験の結果を示している。

10

【図6C】図6C：HLA A*2402拘束性SLC45A2特異的CTLはブドウ膜黒色腫細胞株に対して溶解活性を示す。

【図6D】図6D：粘膜黒色腫細胞上でのSLC45A2発現。2種の粘膜黒色腫細胞はSLC45A2を発現していた。SLC45A2発現をRT-PCRによって分析した。

【図6E】図6E：粘膜黒色腫細胞に対するSLC45A特異的CD8 T細胞の細胞傷害効果。SLC45A特異的CD8 T細胞は、SLC45A2およびHLA A*0201を発現する粘膜黒色腫細胞である2170を殺傷したが、SLC45A2を発現するがHLA A*0201を発現しない2042を殺傷しなかった。細胞傷害活性についての標準的な⁵¹Cr放出アッセイを異なるE:T比で行っている。行った少なくとも2つのうちの1つの代表的な実験の結果を示している。

20

【図7A】図7A～C：MAPK経路によるSLC45A2発現の制御およびMAPK阻害剤処理後の増強された黒色腫細胞CTL殺傷。図7A：遺伝子発現マイクロアレイ分析によって評価された、GFP、野生型BRAFまたは突然変異BRAF(V600E)を発現するように形質導入された初代メラノサイトにおけるメラノサイト分化抗原発現。非形質導入細胞と比較してのSLC45A2、MART-1、gp100、チロシナーゼ関連タンパク質およびチロシナーゼの相対的発現を示す。

【図7B】図7B：BRAF(V600E)陽性黒色腫細胞株Mel526またはA375を、BRAF(V600E)特異的阻害剤ダブラフェニブ(50nM)、MEK阻害剤トラメチニブ(50nM)、または両方の阻害剤で処理した。48時間後、SLC45A2およびMART-1のmRNA発現を定量的RT-PCRによって分析した。未処理黒色腫細胞を対照として使用した。

30

【図7C】図7C：BRAFi、MEKiまたは両方の阻害剤での48時間処理後の黒色腫細胞株Mel526またはA375のSLC45A2特異的T細胞媒介性細胞傷害殺傷。薬物処理標的に対する標準的な⁵¹Cr放出アッセイ(E:T比 = 20:1)におけるSLC45A2特異的CTLの細胞傷害活性を、未処理標的と比較して示す。

【図8-1】正常組織およびがん組織におけるSLC45A2の発現。正常組織およびがん組織におけるメラノサイト分化抗原の相対的遺伝子発現。正常組織およびがん患者サンプルにおけるメラノサイト分化抗原の遺伝子発現を、それぞれ、Genotype-Tissue Expression(GTEX)ポータルデータおよびThe Cancer Genome Atlas(TCGA)ポータルデータを使用して解析した。SLC45A2は多くの正常組織においてほとんど発現されておらず、一方、MART-1およびgp100遺伝子発現は、それが低レベルであっても、ほとんどの正常組織において観察された。SLC45A2、MART-1、チロシナーゼ、およびgp100遺伝子発現は、他のがん組織と比較して皮膚黒色腫およびブドウ膜黒色腫組織において高発現を示した。

40

【図8-2】図8-1の説明を参照。

【図8-3】図8-1の説明を参照。

【図8-4】図8-1の説明を参照。

【図8-5】図8-1の説明を参照。

【図8-6】図8-1の説明を参照。

【図8-7】図8-1の説明を参照。

【図8-8】図8-1の説明を参照。

【図8-9】図8-1の説明を参照。

50

【図 8 - 1 0】図8-1の説明を参照。

【図 8 - 1 1】図8-1の説明を参照。

【図 8 - 1 2】図8-1の説明を参照。

【図 9】SLC45A2+黒色腫細胞株Mel888におけるHLAの異所性発現。

【図 1 0 - 1】HLA A*0201拘束性の健康なドナーのPBMCにおけるSLC45A2特異的CD8 T細胞の作製。SLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞の誘導。さらに2人のHLA A*0201拘束性の健康なドナー由来のPBMCを、SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ペプチドでパルスした自己DCで刺激した。2回刺激後にSLC45A2テトラマー陽性CD8 T細胞を選別し、選別されたSLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞をREPに従って拡大培養した。拡大培養したSLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞を他の実験のために使用した。SLC45A2特異的CD8 T細胞のTCRレパートリー分析を、24種の異なる特異性に対応するVβ抗体と共にIOTest Beta Mark TCR-Vβレパートリーキットを使用して行った。

【図 1 0 - 2】図10-1の説明を参照。

【図 1 1】メラノサイトにおけるHLA発現。異なる起源を有するメラノサイトである3C0661および4C0197におけるHLA発現を、抗HLA A2抗体および抗HLA A24抗体での染色によって評価した。3C0661はHLA A2およびHLA A24の両方を発現していた。4C0197はHLA A2を発現していたがHLA A24を発現していなかった。

【図 1 2 A】図12A~B：メラノサイトに対する他のHLA-A*0201拘束性ドナー由来のSLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。図12A：メラノサイトに対する他のドナー由来のHLA-A*0201拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。SLC45A2特異的CD8 T細胞は、2種のメラノサイト（HLA-A*0201+）をあまり殺傷しなかったが、黒色腫細胞を高い細胞傷害効果で殺傷した。それに対して、MART-1およびgp100特異的CD8 T細胞は、黒色腫細胞と同様にメラノサイトを殺傷した。HLA-A*0201拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞をE:T= 20:1比で使用して、標準的な⁵¹Cr放出アッセイを行った。Mel526（HLA-A*0201+/SLC45A2+）およびA375（HLA-A*0201+/SLC45A2-）を、それぞれ、陽性対照および陰性対照として使用した。

【図 1 2 B】図12B：メラノサイトに対する他のドナー由来のHLA-A*2402拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性。

【図 1 3】図13A~B：黒色腫および初代メラノサイトにおけるMDA遺伝子発現の比較。図13A：正常組織（GTex Portalデータベース）、皮膚黒色腫およびブドウ膜黒色腫腫瘍（TCG Aデータベース）、黒色腫細胞株（MD Anderson TIL labデータベース）、または初代メラノサイトにおけるMART1、gp100、チロシナーゼ、およびSLC45A2のRNAseq転写物発現。TPM：100万個当たりの転写物（transcripts per million）。図13B：式 {平均腫瘍転写物発現 / 平均初代メラノサイト転写物発現} によって計算される、MART1、gp100、チロシナーゼ、およびSLC45A2についての腫瘍過剰発現指標。

【発明を実施するための形態】

【0031】

例示的な態様の説明

I. SLC45A2ペプチドを使用する免疫療法

本明細書に記載されるSLC45A2ペプチド（例えば、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2を含む）は、がんの免疫療法に使用され得る。例えば、SLC45A2ペプチドは、SLC45A2ペプチドを認識するかまたはこれに結合するT細胞の増殖を誘導するために、T細胞の集団を刺激するために使用され得るかまたはT細胞の集団と接触され得る。他の態様において、本発明のSLC45A2ペプチドは、がんに対する対象の免疫応答を増強するために、対象（例えばヒト患者）へ投与され得る。腫瘍（例えば黒色腫）について、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の養子移入は患者に著しい利益をもたらすことが示されている（Hawkins et al., 2010）。

【0032】

SLC45A2ペプチドは、能動免疫療法（例えば、がんワクチン）または受動免疫療法（例えば、養子免疫療法）に含まれ得る。能動免疫療法は、精製SLC45A2ペプチド抗原または免疫優性SLC45A2ペプチド（天然もしくは改変）で対象を免疫化することを含むか；あるいは、SLC45A2ペプチドでパルスされた（またはSLC45A2抗原をコードする遺伝子でトラン

スフェクトされた) 抗原提示細胞が対象へ投与され得る。SLC45A2ペプチドは、改変され得、または、1つもしくは複数の突然変異(例えば、置換突然変異)を含有し得る。受動免疫療法は養子免疫療法を含む。養子免疫療法は通常、対象への細胞の投与を伴い、ここで、細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)はSLC45A2に対してインビトロで感作されている(例えば、US 7910109を参照のこと)。

【0033】

いくつかの態様において、フローサイトメトリーが、例えば、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)ベースの増殖アッセイと組み合わせてT細胞受容体(TCR) $V\beta$ 抗体を使用することによるヒト腫瘍抗原特異的T細胞クローンの迅速な単離のために、養子免疫療法において使用され得る。例えば、ディスクレーマーなしで参照により組み入れられる、Lee et al. (2008)を参照のこと。いくつかの態様において、例えば、Pollack et alに記載される方法のような、テトラマーガイド細胞選別が使用され得る。また、養子免疫療法について様々な培養プロトコルが公知であり、本発明と共に使用され得；いくつかの態様において、抗原提示細胞の使用を必要としない条件において細胞が培養され得る(例えば、Hida et al., 2002)。他の態様において、T細胞は、抗原提示細胞(例えば樹状細胞)を利用する培養条件下で拡大培養され得(Nestle et al., 1998)、いくつかの態様において、この目的のために人工抗原提示細胞が使用され得る(Maus et al., 2002)。養子免疫療法についてのさらなる方法がDudley et al. (2003)に開示されており、これは本発明と共に使用され得る。様々な方法が公知であり、ヒト抗原特異的T細胞をクローニングおよび拡大培養するために使用され得る(例えば、Riddell et al., 1990を参照のこと)。

【0034】

特定の態様において、以下のプロトコルが、SLC45A2ペプチドを選択的に認識するT細胞を作製するために使用され得る。ペプチド特異的T細胞株は、以前に報告された方法(Hida et al., 2002)を使用してHLA-A2⁺正常ドナーおよび患者から作製され得る。簡潔には、96-ウェルU底微量培養プレート(Corning Incorporated, Lowell, MA)で約200 μ lの培養培地中のPBMC(1×10^5 細胞/ウェル)が、約10 μ g/mlの各ペプチド(4ウェルずつ)で刺激され得る。培養培地は、50% AIM-V培地(Invitrogen)、50% RPMI1640培地(Invitrogen)、10% ヒトAB血清(Valley Biomedical, Winchester, VA)、および100 IU/mlのインターロイキン-2(IL-2)からなり得る。細胞は、約3日毎に対応するペプチドで再刺激され得る。5回の刺激後、各ウェルからのT細胞は、洗浄され得、対応するペプチドの存在または非存在下でT2細胞と共にインキュベートされ得る。約18時間後、上澄み中のインターフェロン(IFN)- γ の産生が、ELISAによって決定され得る。大量のIFN- γ を分泌するT細胞が、急速拡大培養プロトコル(Riddell et al., 1990; Yee et al., 2002b)によってさらに拡大培養され得る。

【0035】

いくつかの態様において、免疫療法は、細胞透過性物質(例えば、リボソームまたは細胞透過性ペプチド(CPP))と相互作用している本発明のSLC45A2ペプチドを利用し得る。ペプチドでパルスされた抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)は、抗腫瘍免疫を増強するために使用され得る(Celluzzi et al., 1996; Young et al., 1996)。リボソームおよびCPPは下記にさらに詳細に記載する。いくつかの態様において、免疫療法は、本発明のSLC45A2ペプチドをコードする核酸を利用し得、ここで、核酸は、例えば、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターで送達される。

【0036】

SLC45A2は黒色腫などのがんにおいて発現される。SLC45A2(溶質キャリアファミリー45、メンバー2(solute carrier family 45, member 2)；膜結合タンパク質、MATPまたはAIM-1としても公知)は、MART-1、gp100、チロシナーゼおよびTRP-1のようなメラノサイト分化タンパク質であり、メラノソーム膜中に局在している輸送タンパク質である(Newton et al 2001)。正確な機能は不明であるが、それは、2つの異なる役割のいずれかにおいてメラニンの産生に恐らく関係している。一方は、メラノソームへのチロシナーゼの適切な

プロセッシングおよび輸送であり (Costin 2003)、他方は、メラノソーム内の特定のpHの維持である (Graf et al., 2005; Lucotte et al., 2010)。SLC45A2は、浅黒い皮膚、髪および眼の色素沈着と関連付けられ、ヒトにおいて、SLC45A2の病原性突然変異は、メラニン合成を混乱させることにより眼皮膚白皮症IV型(OCA4)をもたらす (Fukamachi 2001, Newton2001, du2002)。興味深いことには、突然変異によるSLC45A2バリエーションは、黒色腫リスクと関連付けられ、その遺伝子は、肌が白い集団において黒色腫感受性遺伝子として提案された (Guedj m2008, Fernandes lp 2008, ibarrola 2012)。

【0037】

いくつかの態様において、本発明のSLC45A2ペプチドは、ヒト患者のような哺乳動物対象における黒色腫を治療するために免疫療法において使用され得る。黒色腫は、例えば、皮膚黒色腫、ブドウ膜黒色腫、粘膜黒色腫、または転移性黒色腫であり得る。SLC45A2を発現する任意のがんが、本発明のSLC45A2ペプチドを使用して免疫療法によって治療され得ることが、予測される。

【0038】

メラノサイト抗原 (MART-1、gp100、チロシナーゼ) を認識した循環している腫瘍抗原特異的T細胞が、黒色腫患者において検出され得、テトラマーベースの技術を使用して末梢血単核細胞(PBMC)から単離され得、そして、照射フィーダー細胞と共に抗-CD3およびIL-2を使用して20倍超に拡大培養され得る (Yee 2012)。腫瘍抗原特異的CD8 T細胞は、CTL認識ペプチドエпитープ (peptide recognized CTL epitope) でパルスされた自己樹状細胞(DC)を使用してPBMCを刺激することによって、インビトロで誘導され得る。プライミング中、IL-21の曝露は、抗原特異的CTLの頻度および数を増加させ、メモリー様表現型を有するCTLへ駆動し、これは、長期間のインビボ持続を経験し、腫瘍退縮を媒介した (Li 2005; Chapuis 2013)。養子移入のための強力な腫瘍抗原特異的CTLのエクスピボ作製においてIL-21を使用する戦略は、非常に有用であり、これを、以下の実施例に記載されるように用いた。

【0039】

II. SLC45A2ペプチド

本明細書において使用される場合、用語「ペプチド」は、7~35個のアミノ酸、好ましくは8~35個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは8~25個のアミノ酸、または7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、もしくは35アミノ酸長、またはそれらに由来する任意の範囲を含むアミノ酸鎖を包含する。例えば、本発明のSLC45A2ペプチドは、いくつかの態様において、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2のSLC45A2ペプチドを含むかまたはこれからなり得る。本発明の様々な局面において使用され得る追加のSLC45A2ペプチドを表4にて提供する。本明細書において使用される場合、「抗原性ペプチド」は、脊椎動物中へ導入されると、脊椎動物において抗体の産生を刺激することができる、即ち、抗原性である、ペプチドであり、ここで、抗体は、抗原性ペプチドを選択的に認識しかつ／またはこれに結合することができる。抗原性ペプチドは、免疫反応性SLC45A2ペプチドを含み得、追加の配列を含み得る。追加の配列は、天然抗原に由来し得、異種であり得、そのような配列は、免疫原性であってもよいが、免疫原性である必要はない。いくつかの態様において、SLC45A2ペプチドはHLA-A2またはHLA-A24と選択的に結合することができる。特定の態様において、SLC45A2ペプチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、もしくは35アミノ酸長、またはそれらに由来する任意の範囲である。好ましくは、SLC45A2ペプチドは8~35アミノ酸長である。いくつかの態様において、SLC45A2ペプチドは8~10アミノ酸長である。

【0040】

当業者によって認識されるように、MHC分子は、様々なサイズのペプチドに結合することができるが、典型的に、完全長タンパク質に結合することができない。MHCクラスI分子は8~11アミノ酸長のペプチドに結合することが伝統的に記載されてきたが、15アミノ酸長のペプチドが、結合部位の中央において膨れるかまたはMHCクラスI結合溝から外へ伸び

ることによって、MHCクラスI分子に結合することができることが示された (Guo et al., 1992; Burrows et al., 2006; Samino et al., 2006; Stryhn et al., 2000; Collins et al., 1994; Blanchard and Shastri, 2008)。さらに、最近の研究はまた、より長いペプチドが、より効率的にエンドサイトーシスされ、プロセッシングされ、そして抗原提示細胞によって提示され得ることを実証した (Zwaveling et al., 2002; Bijker et al., 2007; Melief and van der Burg, 2008; Quintarelli et al., 2011)。Zwaveling et al. (2002)において実証されたように、35アミノ酸長までのペプチドが、クラスII MHCに選択的に結合するために使用され得、有効である。当業者によって直ちに認識されるように、天然に存在する完全長SLC45A2は、エンドサイトーシスされそしてT細胞の増殖を生じさせるようにクラスII MHCに選択的に結合するために有用でないだろう。一般に、天然に存在する完全長SLC45A2タンパク質は、これらの特性を示さず、従って、これらの免疫療法目的のために有用でないだろう。

10

【0041】

特定の態様において、SLC45A2ペプチドは免疫原性または抗原性である。下記の実施例において示されるように、本発明の様々なSLC45A2ペプチドは、T細胞の増殖を促進することができる。そのようなペプチドは、ある程度の防御免疫を誘導するために使用され得ることが、予測される。

【0042】

SLC45A2ペプチドは、組換えペプチド、合成ペプチド、精製ペプチド、固定化ペプチド、検出可能に標識されたペプチド、封入ペプチド、またはベクター発現されたペプチド (例えば、核酸へ機能的に連結された異種プロモーターを含むベクター中の核酸によってコードされたペプチド) であり得る。いくつかの態様において、合成SLC45A2ペプチドが、対象において免疫応答を誘導するために、ヒト患者のような対象へ投与され得る。合成ペプチドは、組換え発現されたペプチドと比較した場合、細菌汚染のリスクの減少のような、ある利点を示し得る。SLC45A2ペプチドはまた、哺乳動物対象またはヒト対象への投与用に製剤化されている、例えばワクチン組成物のような、薬学的組成物中に含まれ得る。

20

【0043】

A. 細胞透過性ペプチド

SLC45A2ペプチドは、細胞透過性ペプチド(CPP)と相互作用するかまたはこれと共有結合していてもよい。SLC45A2ペプチドと共有結合し得る細胞透過性ペプチドとしては、例えば、HIV Tat、ヘルペスウイルスVP22、ドロソフィラ・アンテナペディア (*Drosophila Antennapedia*) ホメオボックス遺伝子産物、シグナル配列、融合配列、またはプロテグリンIが挙げられる。CPPとペプチドとの共有結合は、樹状細胞によるペプチドの提示を延長し、従って、抗腫瘍免疫を増強することができる (Wang and Wang, 2002)。いくつかの態様において、本発明のSLC45A2ペプチド (例えば、ペプチドまたはポリエピトープストリング (polyepitope string) 内に含まれる) は、融合タンパク質を作製するためにCPPと (例えば、ペプチド結合によって) 共有結合され得る。他の態様において、SLC45A2ペプチドまたはSLC45A2ペプチドをコードする核酸は、多重膜 (multilamellar) リボソーム、小胞リボソーム、または多小胞リボソームなどのリボソーム内に封入され得るかまたはこれと相互作用し得る。

30

40

【0044】

本明細書において使用される場合、「相互作用」は、物理的相互作用、化学的相互作用または両方を意味する。例えば、相互作用は、共有結合、疎水性相互作用、封入、表面吸着などを伴い得る。

【0045】

本明細書において使用される場合、「細胞透過性物質」は、抗原提示細胞へのペプチド／ポリエピトープストリングの細胞内送達を増強する組成物または化合物を指す。例えば、細胞透過性物質は、ペプチドと相互作用すると、原形質膜を横断するその能力を増強する、脂質であり得る。あるいは、細胞透過性物質はペプチドであり得る。細胞透過性ペプチド(CPP)は当技術分野において公知であり、例えば、HIVのTatタンパク質 (Frankel and

50

Pabo, 1988)、HSVのVP22タンパク質 (Elliott and O'Hare, 1997) および線維芽細胞増殖因子 (Lin et al., 1995) を含む。

【0046】

細胞透過性ペプチド (または「タンパク質導入ドメイン」) は、ドロソフィラ・アンテナペディアルホメオボックス遺伝子 (Antp) の第3ヘリックス、HIV Tat、およびヘルペスウイルスVP22から同定され、これらの全てがアルギニンおよびリジン残基に富んだ正電荷のドメインを含有する (Schwarze et al., 2000; Schwarze et al., 1999)。さらに、シグナル配列に由来する疎水性ペプチドが、細胞透過性ペプチドと同定された (Rojas et al., 1996; Rojas et al., 1998; Du et al., 1998)。これらのペプチドを β -ガラクトシダーゼのようなマーカータンパク質へカップリングすることは、細胞中へのマーカータンパク質の効率的なインターナリゼーションを与えることが示され、これらのペプチドを含有するキメラ的なインフレイム融合タンパク質は、インビトロおよびインビボの両方において広範囲の細胞タイプへタンパク質を送達するために使用された (Drin et al., 2002)。本発明に従うSLC45A2ペプチドへのこれらの細胞透過性ペプチドの融合は、ポリペプチドの細胞取り込みを増強し得る。

【0047】

いくつかの態様において、細胞取り込みは、ポリペプチドへの脂質 (例えば、ステアリン酸エステルまたはミリスチン酸エステル (myristilate)) の付加によって促進される。脂質付加は、細胞中へのペプチドの通過を増強することが示された。脂質部分の付加は、本発明が細胞によるポリペプチド取り込みを増加させる別の方法である。細胞取り込みを下記においてさらに議論する。

【0048】

本発明のSLC45A2ペプチドは、リボソームワクチン組成物中に含まれ得る。例えば、リボソーム組成物は、プロテオリボソーム組成物であり得るかまたはこれを含み得る。本発明と共に使用され得るプロテオリボソーム組成物を製造するための方法は、例えば、Neelapu et al. (2007) およびPopescu et al. (2007) に記載されている。いくつかの態様において、プロテオリボソーム組成物は、黒色腫を治療するために使用され得る。

【0049】

SLC45A2ポリペプチドの取り込みを増強することによって、治療のために必要とされるタンパク質またはペプチドの量を減らすことが可能となり得る。これは、次に、治療費を著しく減らし、治療剤の供給を増加させることができる。より低い投薬量はまた、ペプチドの潜在的な免疫原性を最小限にし、毒性副作用を制限することができる。

【0050】

いくつかの態様において、SLC45A2ペプチドは、ナノ粒子と相互作用し、ナノ粒子-ポリペプチド複合体を形成し得る。いくつかの態様において、ナノ粒子は、リボソーム、または他の脂質ベースのナノ粒子、例えば、脂質ベースの小胞 (例えば、DOTAP: コレステロール小胞) である。他の態様において、ナノ粒子は、酸化鉄ベースの超常磁性ナノ粒子である。直径が約10~100 nmの範囲にある超常磁性ナノ粒子は、脾臓による隔離を回避するのに十分に小さいが、肝臓によるクリアランスを回避するのに十分に大きい。このサイズの粒子は、非常に小さな毛細血管に浸透することができ、体組織中に効果的に分布され得る。超常磁性ナノ粒子-ポリペプチド複合体は、SLC45A2ペプチドを取り込む細胞を同定および追跡するために、MRI造影剤として使用され得る。いくつかの態様において、ナノ粒子は、半導体ナノ結晶または半導体量子ドットであり、これらは両方とも光学イメージングにおいて使用することができる。さらなる態様において、ナノ粒子は、シリカのコア上に金の層を含む、ナノシェルであり得る。ナノシェルの一つの利点は、ポリペプチドが、標準化学を使用して金の層へコンジュゲートされ得ることである。他の態様において、ナノ粒子はフラーレンまたはナノチューブであり得る (Gupta et al., 2005)。

【0051】

ペプチドは、腎臓によって循環から迅速に除去され、また、血清中のプロテアーゼによる分解に敏感である。SLC45A2ペプチドをナノ粒子と相互作用させることによって、本発

明のナノ粒子-ポリペプチド複合体は、分解から保護しかつ／または腎臓によるクリアランスを減少させ得る。これは、ポリペプチドの血清半減期を増加させ、それによって有効な療法のために必要なポリペプチド用量を減少させ得る。さらに、これは、治療費を下げ得、療法の免疫学的な問題および毒性反応を最小限にする。

【0052】

B. ポリエピトープストリング

いくつかの態様において、SLC45A2ペプチドは、ポリエピトープストリング中に包含されるかまたは含まれる。ポリエピトープストリングは、一緒に連結された1つまたは複数の抗原由来の複数の抗原性エピトープを含有するペプチドまたはポリペプチドである。ポリエピトープストリングは、ヒト対象のような対象において免疫応答を誘導するために使用され得る。ポリエピトープストリングは、マラリアおよび他の病原体を標的とするために以前に使用された (Baraldo et al., 2005; Moorthy et al., 2004; Baird et al., 2004)。ポリエピトープストリングは、核酸 (例えば、SLC45A2ペプチドを含む複数の抗原をコードする核酸) またはペプチドもしくはポリペプチド (例えば、SLC45A2ペプチドを含む複数の抗原を含有する) を指し得る。ポリエピトープストリングはがんワクチン組成物中に含まれ得る。

【0053】

C. 生物学的機能的等価物

本発明のSLC45A2ペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24結合領域とのそれぞれの相互作用を変更しないアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含有するように改変され得る。SLC45A2ペプチドのそのような生物学的機能的等価物は、同様のまたはそうでなければ望ましい特徴 (例えば、HLA-A2またはHLA-A24の結合) を有する分子であり得る。非限定的な例として、HLA-A2またはHLA-A24に対する検出可能な不変のペプチド結合によって実証される相互作用能の大幅な減少なしに、本明細書に開示されるSLC45A2ペプチド中においてあるアミノ酸が他のアミノ酸の代わりに用いられ得る。いくつかの態様において、SLC45A2は、位置: 1 (P1)、2 (P2)、および／または9 (P9) のうちの1つ、2つまたは全部における置換突然変異のような、アンカー残基における置換突然変異を有する。従って、配列および／または構造が改変されているが、生物学的な有用性または活性は変わっていない、本明細書に開示されるSLC45A2ペプチド (またはそのようなペプチドをコードする核酸) が、本発明の範囲内に残ることが意図される。

【0054】

生物学的機能的等価ペプチドの定義において本質的であるのは、等価な生物活性の許容されるレベルを依然として維持しながらも、分子の規定の部分内でなされ得る変更の数には限度があるという概念であることがまた、当業者によって十分に理解される。従って、生物学的機能的等価ペプチドは、アミノ酸の大部分または全部ではなく一部が置換され得るペプチドと本明細書において定義される。当然ながら、異なる置換を有する複数の別個のペプチドが、容易に作られ、本発明に従って使用され得る。

【0055】

当業者はまた、ある残基 (例えば、特異的エピトープ中の残基) がペプチドの生物学的または構造的特性に特に重要であることが示される場合、そのような残基は一般に交換されてはならないことを承知している。これは本発明において当てはまり得、何故ならば、本明細書に開示されるSLC45A2ペプチドにおける突然変異は、種特異性の減少をもたらし得、次に、本発明の方法における使用についての結果として生じるペプチドの有用性を低減させ得るためである。従って、抗原性であり (例えば、HLA-A2またはHLA-A24に特異的に結合し) かつ保存的アミノ酸置換を含むペプチドは、本発明中に含まれると理解される。保存的置換は、タンパク質の活性を劇的に変化させる可能性が極めて低い。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸を化学的に類似しているアミノ酸で置き換えること、即ち、無極性アミノ酸を他の無極性アミノ酸で置き換えること; 極性アミノ酸を他の極性アミノ酸で、酸性残基を他の酸性アミノ酸で置換することなどを指す。

【0056】

本明細書に開示されるSLC45A2ペプチドの改変において用いられ得るもののような、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。アミノ酸側鎖置換基のサイズ、形状およびタイプの分析によって、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが全て正電荷の残基であること；アラニン、グリシンおよびセリンが全て同様のサイズであること；ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンが全て概して同様の形状を有することが、明らかにされる。従って、これらの考慮に基づいて、アルギニン、リジンおよびヒスチジン；アラニン、グリシンおよびセリン；ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン；は、本明細書において生物学的機能的等価物と定義される。いくつかの態様において、突然変異は、TCR-pMHC相互作用および／またはペプチド-MHC結合を増強し得る。

10

【0057】

本発明はまた、本明細書に開示されるSLC45A2ペプチドのアイソフォームを意図する。アイソフォームは、本発明のペプチドと同じ数および種類のアミノ酸を含有するが、アイソフォームは異なる分子構造を有する。本発明によって意図されるアイソフォームは、本明細書に記載される本発明のペプチドと同じ特性を有するものである。

【0058】

非標準アミノ酸は、既存のアミノ酸の化学的修飾によって、または本明細書に開示されるペプチドのデノボ合成によって、タンパク質中へ組み込まれ得る。非標準アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされる20種の標準アミノ酸とは化学構造が異なるアミノ酸を指す。

20

【0059】

選択的態様において、本発明は、本明細書に開示されるSLC45A2ペプチドの化学的誘導体を意図する。「化学的誘導体」は、側鎖官能基の反応によって化学的に誘導体化された1つまたは複数の残基を有し、かつ、生物学的活性および有用性を保持する、ペプチドを指す。そのような誘導体化ペプチドとしては、例えば、遊離アミノ基が、特定の塩を形成するように誘導体化されたか、または、アルキル化および／またはアシル化、特に、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基 (t-butyloxycarbonyl group)、クロロアセチル基、ホルミル基またはアセチル基によって誘導体化されたものが挙げられる。遊離カルボキシ基は、有機塩もしくは無機塩、メチルおよびエチルエステルもしくは他のタイプのエステル、またはヒドラジド、好ましくはアミド（第一級もしくは第二級）を形成するように誘導体化され得る。化学的誘導体は、20種の標準アミノ酸の1つまたは複数の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むペプチドを含み得る。例えば、4-ヒドロキシプロリンはセリンの代わりに用いられ得；オルニチンはリジンの代わりに用いられ得る。

30

【0060】

全てのアミノ酸残基配列が、左右方向がアミノ末端からカルボキシ末端の従来の方向である式によって本明細書において示されることが、注意されるべきである。さらに、アミノ酸残基配列の開始または終了でのダッシュは、1つまたは複数のアミノ酸残基のさらなる配列へのペプチド結合を示すことが、注意されるべきである。本明細書に記載されるアミノ酸は、「L」異性体であることが好ましい。しかし、本明細書に記載される所望の機能的特性がタンパク質によって保持される限り、「D」異性体である残基を任意のL-アミノ酸残基の代わりに用いることができる。

40

【0061】

好ましいSLC45A2ペプチドまたはそのアナログは、好ましくは、特異的にまたは優先的にHLA-A2またはHLA-A24に結合する。特定のSLC45A2ペプチドもしくは標識ペプチド、またはそのアナログが、HLA-A2またはHLA-A24に結合することができるかどうかまたはどの程度結合することができるかの決定は、例えば、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、免疫ロット法、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫染色、ラテックス凝集、間接赤血球凝集アッセイ(IHA)、補体結合、間接免疫蛍光アッセイ(indirect immunofluorescent assay) (FA)、比濁法、フローサイトメトリーアッセイ、化学発光アッセイ、ラテラルフ

50

ローイムノアッセイ、u-キャプチャーアッセイ、質量分析アッセイ、粒子ベースのアッセイ、阻害アッセイおよび／またはアビディティアッセイのようなインビトロアッセイを使用して評価することができる。

【0062】

D. SLC45A2ペプチドをコードする核酸

一局面において、本発明は、SEQ ID NO. 1～2のいずれかに対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%配列同一性を有する配列を含む単離SLC45A2ペプチドをコードする核酸を提供し、または、ペプチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2と比較して1、2、3、または4個の点突然変異（例えば、置換突然変異）を有し得る。上述したように、そのようなSLC45A2ペプチドは、例えば、8～35アミノ酸長、またはそれらに由来する任意の範囲であり得る。いくつかの態様において、SLC45A2ペプチドはSLC45A2タンパク質の部分に対応する（NM_016180またはNM_00101250；これらのスプライスバリエーションのいずれを使用してもよい）。用語「核酸」は、DNAおよびRNAを含むように意図され、二本鎖または一本鎖のいずれであってもよい。

【0063】

本発明のいくつかの態様は、HLA-A2またはHLA-A24に特異的に結合することができる組換え産生されたSLC45A2ペプチドを提供する。従って、SLC45A2ペプチドをコードする核酸は、発現ベクターへ機能的に連結され得、ペプチドが、分子生物学の分野において周知の方法を使用して適切な発現系において産生され得る。本明細書に開示されるSLC45A2ペプチドをコードする核酸は、ペプチドの良好な発現を確実にする任意の発現ベクター中へ組み込まれ得る。可能な発現ベクターとしては、ベクターが宿主細胞の形質転換に適している限り、コスミド、プラスミド、または改変ウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

組換え発現ベクターが「宿主細胞の形質転換に適している」は、発現ベクターが、本発明の核酸分子と、核酸分子へ機能的に連結されている、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択された調節配列とを含有することを意味する。用語「機能的に連結された（operatively linked）」または「機能的に連結された（operably linked）」は、交換可能に使用され、核酸が、核酸の発現を可能にする方法で調節配列へ連結されていることを意味するように意図される。

【0065】

従って、本発明は、SLC45A2ペプチドをコードする核酸と、挿入されたタンパク質配列の転写および翻訳のために必要な調節配列とを含む、組換え発現ベクターを提供する。好適な調節配列は、細菌、真菌、またはウイルス遺伝子を含む、種々の供給源に由来し得る（例えば、Goeddel (1990)に記載される調節配列を参照のこと）。

【0066】

適切な調節配列の選択は、一般に、選択される宿主細胞に依存し、当業者によって容易に達成され得る。そのような調節配列の例としては：転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、リボソーム結合配列（翻訳開始シグナルを含む）が挙げられる。さらに、選択される宿主細胞および用いられるベクターに依存して、他の配列、例えば、複製起点、追加のDNA制限部位、エンハンサー、および転写の誘導性を与える配列が、発現ベクター中へ組み込まれ得る。必要な調節配列は、天然タンパク質および／またはその隣接領域によって供給され得ることがまた、認識される。

【0067】

組換え発現ベクターはまた、本明細書に開示される組換えSLC45A2ペプチドで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にする選択マーカー遺伝子を含むし得る。選択マーカー遺伝子の例は、G418およびハイグロマイシンのような、ある薬物に対する耐性を与えるタンパク質、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、またはホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子である。選択マーカー遺伝子の転写は、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェ

ラーゼ、またはホタルルシフェラーゼのような選択マーカータンパク質の濃度の変化によってモニタリングされる。選択マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性のような抗生物質耐性を与えるタンパク質をコードする場合、形質転換細胞はG418で選択され得る。選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生き残り、一方、他の細胞は死滅する。これによって、組換え発現ベクターの発現を可視化およびアッセイすること、特に、発現および表現型に対する突然変異の影響を決定することが、可能となる。選択マーカーが関心対象の核酸とは別のベクター上に導入され得ることが認識される。

【0068】

組換え発現ベクターは、形質転換宿主細胞を作製するために宿主細胞中へ導入され得る。用語「形質転換宿主細胞」は、本発明の組換え発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた原核細胞および真核細胞を含むように意図される。用語「で形質転換された」、「でトランスフェクトされた」、「形質転換」および「トランスフェクション」は、当技術分野において公知の多くの可能な技術のうちの1つによる細胞中への核酸（例えば、ベクター）の導入を包含するように意図される。好適な宿主細胞としては、多種多様の原核および真核宿主細胞が挙げられる。例えば、本発明のタンパク質は、細菌細胞、例えば大腸菌（*E. coli*）、昆虫細胞（バキュロウイルスを使用）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において発現され得る。

【0069】

本発明の核酸分子はまた、標準技術を使用して化学合成され得る。ペプチド合成と同様に市販のDNA合成装置において完全に自動化された固相合成を含む、様々なポリデオキシヌクレオチド化学合成法が公知である（例えば、Itakura et al. 米国特許第4,598,049号；Caruthers et al. 米国特許第4,458,066号；ならびにItakura米国特許第4,401,796号および同第4,373,071号を参照のこと）。

【0070】

III. 抗体

本発明の特定の局面において、1つまたは複数の抗体が、本発明のSLC45A2ペプチド、SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体、またはSLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体に対して、産生され得る。これらの抗体は、例えばがんを治療するために、使用され得、またはがんワクチン中に含まれ得る。いくつかの態様において、SLC45A2ペプチド、SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体、またはSLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体を選択的に認識する抗体を、黒色腫を治療するために、ヒト患者のような対象へ投与し得る。

【0071】

いくつかの態様において、以下を含む、標的化細胞表面ポリペプチドを発現する標的細胞に対する樹状細胞(DC)媒介性細胞殺傷を誘導する方法がある：a)標的細胞を、SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体またはSLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体に選択的に結合する抗体を含むポリペプチドと接触させること；およびb)標的細胞の殺傷を促進する条件下で標的細胞を樹状細胞へ曝露すること。

【0072】

本明細書において使用される場合、用語「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEのような任意の免疫学的結合剤を広く指すように意図される。一般に、IgGおよび／またはIgMがいくつかの態様において好ましく、何故ならば、それらは、典型的に、生理学的状況において最も一般的な抗体であるためであり、また、それらは、実験室設定において容易に作製されるためである。

【0073】

用語「抗体」は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子を指すために使用され、Fab'、Fab、F(ab')₂、単一ドメイン抗体(DAB)、Fv、scFv(単鎖Fv)などのような抗体断片を含む。様々な抗体ベースの構築物および断片を作製および使用するための技術が、当技術分野において周知である。抗体を作製しそして特徴付けるための手段もまた、当技術分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと；参照により本明細書に組み入れられる）。

【0074】

「ミニ抗体」または「ミニボディ」もまた、本発明と共に使用のために意図される。ミニボディは、ヒンジ領域によってsFvから分離された、オリゴマー化ドメインをそれらのC末端で含む、sFvポリペプチド鎖である。Pack et al. (1992)。オリゴマー化ドメインは、追加のジスルフィド結合によってさらに安定化され得る、自己会合性 α -ヘリックス、例えば、ロイシンジッパーを含む。オリゴマー化ドメインは、機能的結合タンパク質へのポリペプチドのインビボフォールディングを容易にすると考えられるプロセスである、膜を横断する一方向性フォールディング (vectorial folding) と適合性であるように設計される。一般に、ミニボディは、当技術分野において周知の組換え法を使用して産生される。例えば、Pack et al. (1992); Cumber et al. (1992)を参照のこと。

10

【0075】

抗体様結合ペプチド模倣体 (antibody like binding peptidomimetic) も本発明において意図される。Liu et al. (2003)は「抗体様結合ペプチド模倣体」(ABiP)を記載し、これらは、短縮抗体 (pared-down antibody) として作用し、より長い血清半減期ならびにあまり厄介でない合成方法という一定の利点を有する、ペプチドである。

【0076】

モノクローナル抗体(MAb)は、一定の利点、例えば、再現性および大規模生産を有することが認識され、それらの使用が一般に好ましい。従って、本発明は、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギおよびさらにはニワトリ起源のモノクローナル抗体を提供する。作製の容易さおよび試薬の入手しやすさに起因して、マウスモノクローナル抗体が好ましいことが多い。

20

【0077】

ヒト定常および／または可変領域ドメインを有する、マウス、ラット、または他の種由来のキメラ抗体、二重特異性抗体、組換えおよび操作抗体ならびにそれらの断片と同様に、「ヒト化」抗体もまた意図される。本明細書において使用される場合、用語「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（通常はマウスまたはラット）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRとを含む免疫グロブリンを指す。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。

30

【0078】

A. モノクローナル抗体を作製するための方法

モノクローナル抗体(MAb)を作製するための方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するためのラインと同じラインに沿って始まる。簡潔には、ポリクローナル抗体は、本発明に従うLEEまたはCEE組成物で動物を免疫化し、その免疫化された動物から抗血清を採取することによって調製される。

【0079】

広範囲の動物種を抗血清の産生のために用いることができる。典型的に、抗血清の産生のために用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。動物を選ぶことは、当業者に公知であるように、操作の容易さ、血清の費用または所望の量に応じて決定される可能性がある。本発明の抗体はまた、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に関してトランスジェニックである哺乳動物または植物の生成、およびそれらから回収可能な形態での抗体の産生を通して遺伝子導入により (transgenically) 産生することができる。哺乳動物におけるトランスジェニック産生に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁において産生され、そこから回収することができる。例えば、米国特許第5,827,690号、同第5,756,687号、同第5,750,172号、および同第5,741,957号を参照のこと。

40

【0080】

同様に当技術分野において周知であるように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる、免疫応答の非特異的刺激剤を用いることによって増強され得る

50

。好適なアジュバントとしては、サイトカイン、ケモカイン、補助因子、毒素、変形体、合成組成物、またはそのようなアジュバントをコードするLEEもしくはCEEのような、全ての受け入れられる免疫刺激化合物が挙げられる。

【0081】

使用され得るアジュバントとしては、IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -インターフェロン、GMCSP、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDPおよびnor-MDPのようなMDP化合物、CGP (MTP-PE)、リピドA、およびモノホスホリルリピドA (MPL) が挙げられる。細菌から抽出した三つの成分を含有するRIBI、MPL、ジミコール酸トレハロース (TDM)、および2%スクアレン/Tween 80乳剤における細胞壁骨格 (CWS) も同様に企図される。MHC抗原でさえも用いてもよい。例示的な、しばしば好ましいアジュバントには、フロイントの完全アジュバント (ヒト結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 死菌を含有する免疫応答の非特異的刺激剤)、フロイントの不完全アジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが含まれる。

【0082】

アジュバントに加えて、T細胞免疫を上方制御する、またはサプレッサー細胞活性を下方制御することが示されている生体反応修飾剤 (BRM) を同時投与することが望ましいことがある。そのようなBRMには、シメチジン (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ)、 γ -インターフェロン、IL-2、もしくはIL-12のようなサイトカイン、またはB-7のような免疫ヘルパー機能に関係するタンパク質をコードする遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。

【0083】

ポリクローナル抗体の産生に用いられる免疫原組成物の量は、免疫のために用いられる動物と共に免疫原の性質に応じて変化する。皮下、筋肉内、皮内、表皮内、静脈内、および腹腔内が含まれるがこれらに限定されない多様な経路を用いて、免疫原を投与することができる。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の様々な時点で免疫した動物の血液を採取することによってモニターしてもよい。

【0084】

第二の追加免疫投与 (例えば、注射剤として提供される) も同様に与えてもよい。適した力価が達成されるまで、追加免疫および力価測定のプロセスを繰り返す。所望のレベルの免疫原性が得られれば、免疫した動物から採血して、血清を単離および保存し、および/または動物を用いてMAbを生成することができる。

【0085】

ウサギポリクローナル抗体を産生するために、耳静脈を通してまたは心穿刺によって動物から採血することができる。採取した血液を凝固させた後、遠心分離して、全細胞および凝血から血清成分を分離する。様々な応用のために血清を用いてもよく、またはそうでなければ所望の抗体分画を、別の抗体、固相マトリクスに結合したペプチドを用いるアフニティークロマトグラフィー、または例えばプロテインAもしくはプロテインGクロマトグラフィーのような周知の方法によって精製してもよい。

【0086】

MAbは、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,196,265号において例示される技術のような周知の技術を用いることを通して容易に調製され得る。典型的に、この技術は、それが野生型または変異型組成物であれば、選択された免疫原組成物、例えば精製または部分精製タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはドメインによって、適した動物を免疫する段階を伴う。免疫組成物は、抗体産生細胞を刺激するために有効な方法で投与される。

【0087】

モノクローナル抗体 (MAb) を生成するための方法は、一般的に、ポリクローナル抗体を調製するためのラインと同じラインに沿って始まる。マウスおよびラットのような齧歯動物は好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、またはカエル細胞を用いることも可能である。ラットを用いることは、一定の長所を提供する可能性があるが (Goding, 1986, pp

10

20

30

40

50

．60 61)、マウスが好ましく、BALB/cマウスは最も慣習的に用いられ、一般的に、安定な融合体のより高いパーセンテージを与えることから、BALB/cマウスが最も好ましい。

【0088】

動物に、一般的に先に記述したように、抗原を注射する。抗原をフロイントの完全または非完全アジュバントのようなアジュバントと混合してもよい。同じ抗原または抗原をコードするDNAの追加免疫投与は、およそ2週間間隔で行われると考えられる。

【0089】

免疫後、抗体を産生する可能性を有する体細胞、具体的にBリンパ球(B細胞)をMAb生成プロトコルにおいて用いるために選択する。これらの細胞は、生検として採取された脾臓、扁桃、もしくはリンパ節から得てもよく、または末梢血試料から得てもよい。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましく、前者はそれらが分裂する形質芽球段階の抗体産生細胞に富む起源であることから、および後者は末梢血が容易にアクセス可能であることから好ましい。

【0090】

しばしば、動物のパネルを免疫して、最高の抗体力価を有する動物の脾臓を採取し、シリンジによって脾臓をホモジナイズすることによって脾臓リンパ球を得る。典型的に、免疫したマウスからの脾臓はリンパ球約 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 個を含有する。

【0091】

次に、免疫した動物からの抗体産生Bリンパ球を、不死化骨髓腫細胞、一般的に免疫した動物と同じ種の細胞と融合させる。ハイブリドーマ産生融合技法において用いるのに適した骨髓腫細胞株は、好ましくは、非抗体産生細胞であり、高い融合効率を有し、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの生育を支持する一定の選択的培地において生育不可能になる酵素欠損を有する。

【0092】

当業者に公知であるように、多くの骨髓腫細胞の任意の一つを用いてもよい(Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984、引用)。例えば、免疫動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、FO、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7、およびS194/5XX0 Bu1を用いてもよく；ラットの場合、R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983Fおよび4B210を用いてもよく；ならびにU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2、およびUC729-6は全て、ヒト細胞融合体に関連して有用である。骨髓腫発現系に関する考察に関しては、Yoo et al. (2002)を参照のこと。

【0093】

一つの好ましいマウス骨髓腫細胞は、NS-1骨髓腫細胞株(P3-NS-1-Ag4-1とも呼ばれる)であり、これは細胞株寄託番号GM3573を要請することによって、NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositoryから容易に入手可能である。用いてもよい別のマウス骨髓腫細胞株は、8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫SP2/0非産生細胞株である。

【0094】

抗体産生脾臓またはリンパ節細胞と骨髓腫細胞とのハイブリッドを生成するための方法は、通常、体細胞と骨髓腫細胞とを2:1の比率で混合する段階を含むが、比率は細胞膜の融合を促進する物質または複数の物質(化学物質または電気物質)の存在下でそれぞれ、約20:1~約1:1まで変化してもよい。センダイウイルスを用いる融合法は、Kohler and Milstein (1975; 1976)によって記述されており、Geftter et al., (1977)による37% (v/v) PEGのようなポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法が記述されている。電氣的に誘発された融合法を用いることも適切である(Goding pp. 71-74, 1986)。

【0095】

融合技法は、通常、低い頻度で、約 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-8}$ の生存ハイブリッドを産生する。しかし、生存融合ハイブリッドは、選択培地において培養することによって、親の非融合細胞(特に、通常無限に分裂し続けると考えられる非融合骨髓腫細胞)から識別されることから、これは問題を提起しない。選択培地は、一般的に、組織培養培地においてヌクレオチドのデノボ合成を遮断する物質を含有する培地である。例示的なおよび好ましい物質

は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成を遮断するが、アザセリンはプリン合成のみを遮断する。アミノプテリンまたはメトトレキセートを用いる場合、ヌクレオチド源としてヒポキサンチンおよびチミジンを培地に補給する（HAT培地）。アザセリンを用いる場合、ヒポキサンチンを培地に補給する。

【0096】

いくつかの態様において、HAT選択培地が使用される。一般に、ヌクレオチドサルベージ経路を操作することができる細胞のみがHAT培地において生存することができる。骨髓腫細胞はサルベージ経路における重要な酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）を欠損し、それらは生存することができない。B細胞はこの経路を操作することができるが、それらは培養において限定された寿命を有し、一般的に約2週間以内に死滅する。したがって、選択培地を生存できる唯一の細胞は、骨髓腫細胞およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

【0097】

この培養は、特異的ハイブリドーマが選択されるハイブリドーマ集団を提供する。典型的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートにおける単一クローン希釈によって細胞を培養する段階の後、個々のクローン上清を所望の反応性に関して試験する（約2〜3週間後）ことによって行われる。アッセイは、放射性免疫測定法、酵素免疫測定法、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどのように、感度がよく、単純かつ迅速であるべきである。

【0098】

次に、選択されたハイブリドーマを連続希釈して、個々の抗体産生細胞株へとクローニングし、MAbを提供するためにクローンを無限に成長させることができる。細胞株を二つの基本的方法でMAb産生のために活用してもよい。第一に、ハイブリドーマの試料を、当初の融合体のための体細胞および骨髓腫細胞を提供するために用いられた組織適合性のタイプの動物（例えば、同系マウス）に注入（しばしば腹腔内に）することができる。任意で、動物を注射前に炭化水素、特にプリスタン（テトラメチルペンタデカン）のような油によってプライミングする。注入された動物は、融合細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。血清または腹水のような動物の体液を採取して、高濃度のMAbを提供することができる。第二に、個々の細胞株をインビトロにおいて培養することができ、そこで、MAbは培養培地に自然と分泌され、そこからMAbを高濃度で容易に得ることができる。

【0099】

さらに、産生細胞株からの本発明の抗体（またはそれに由来する他の部分）の発現を、多数の公知の技術を用いて増強することができる。例えば、グルタミンシンターゼおよびDHFR遺伝子発現系は、一定の条件下で発現を増強するための一般的アプローチである。限界希釈クローニングおよびマイクロドロップ（Microdrop）技術のような通常の技術を用いて、高発現細胞クローンを同定することができる。GS系は、欧州特許第0 216 846号、同第0 256 055号、および同第0 323 997号、ならびに欧州特許出願第89303964.4号に関連して全体または部分的に考察されている。

【0100】

いずれかの手段によって産生されたMAbは、必要に応じて、濾過、遠心分離、およびHPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーのような様々なクロマトグラフィー法を用いてさらに精製してもよい。本発明のモノクローナル抗体の断片は、ペプシンまたはパパインのような酵素による消化を含む方法によって、および／または化学的還元によるジスルフィド結合の切断によって、そのように産生されたモノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、本発明によって包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて合成することができる。

【0101】

同様に、分子クローニングアプローチを用いてモノクローナル抗体を生成してもよいこ

とが企図される。一つの態様において、免疫動物の脾臓から単離したRNAから、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製して、適切な抗体を発現するファージミドを、抗原を発現する細胞および対照細胞を用いるパニングによって選択する。従来のハイブリドーマ技術に対するこのアプローチの長所は、およそ 10^4 倍もの多くの抗体を1回のラウンドで産生およびスクリーニングできる点、ならびにHおよびL鎖の組み合わせによって新しい特異性が生成され、それによって適切な抗体を発見する機会がさらに増加する点にある。別の例において、LEEまたはCEEを用いて無細胞系でインビトロにおいて抗原を産生することができる。これらは、一本鎖抗体ライブラリーを走査するための標的として用いることができる。これは、動物を用いることなく異なる多くの抗体を非常に迅速に同定することができると考えられる。

10

【0102】

本発明の態様において使用され得る抗体を産生するための別の態様は、米国特許第6,091,001号において見い出され、これは、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変免疫グロブリン座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を産生する方法を記載している。方法は、第一のlox部位が部位特異的相同的組換えを通してゲノム配列に挿入されるように、lox部位と、改変領域に変換されるゲノム配列の免疫グロブリン座の領域に隣接する第一のDNA配列と相同なターゲティング配列とを含む相同性ターゲティングベクターを抗体産生細胞に最初にトランスフェクションする段階を伴う。次に、組み込まれたlox部位とのCre媒介組換えに適した第二のlox部位と、免疫グロブリン座の領域を改変領域に変換するための改変配列とを含むloxターゲティングベクターを細胞にトランスフェクション

20

【0103】

あるいは、本発明によって包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて、または大腸菌における完全長の遺伝子もしくは遺伝子断片の発現によって、合成することができる。

【0104】

B. 抗体コンジュゲート

本発明は、抗体コンジュゲートを形成するために少なくとも1つの薬剤へ連結されている、一般にモノクローナルタイプの、本発明のSLC45A2ペプチドまたはSLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体に対する抗体をさらに提供する。診断剤または治療剤としての抗体分子の効能を高めるために、少なくとも1つの所望の分子または部分を連結または共有結合または複合体化することが通常である。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であり得るが、これらに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば、細胞傷害活性を有する分子を含む。抗体へ付加されたエフェクター分子の非限定的な例としては、毒素、抗腫瘍剤、治療用酵素、放射標識ヌクレオチド、抗ウイルス剤、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴ-もしくはポリ-ヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを用いて検出され得る任意の部分と定義される。抗体へコンジュゲートされたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

30

40

【0105】

十分な選択性、特異性、または親和性を有する任意の抗体が、抗体コンジュゲートの基礎として使用され得る。このような特性は、当業者に公知の従来の免疫学的スクリーニング法を用いて評価され得る。抗体分子における生物学的活性分子への結合部位には、標準的な抗原結合部位に加えて、病原体、B細胞スーパー抗原、T細胞補助受容体CD4、およびHIV-1エンベロープに結合できる可変ドメイン内に位置する部位が含まれる (Sasso et al., 1989; Shorki et al., 1991; Silvermann et al., 1995; Cleary et al., 1994; Lerner et al., 1990; Berberian et al., 1993; Kreier et al., 1991)。さらに、可変ド

50

メインは、抗体の自己結合に関与し (Kang et al., 1988)、抗抗体により認識されるエピトープ (イディオトープ) を含む (Kohler et al., 1989)。

【0106】

抗体コンジュゲートの特定の例は、抗体が検出可能な標識へ連結されているコンジュゲートである。「検出可能な標識」とは、それらの特別な機能的特性および／または化学的特徴により検出でき、それらを使用することによって、それらが付加されている抗体を検出および／または必要な場合はさらに定量することができる、化合物および／または要素である。別のそのような例は、細胞傷害剤または抗細胞剤へ連結された抗体を含むコンジュゲートの形成であり、「免疫毒素」と呼ばれ得る。

【0107】

抗体コンジュゲートは、一般に、診断剤としての使用について好ましい。抗体診断法は、一般に、種々のイムノアッセイのような、インビトロ診断法において使用するのためのもの、および／または、「抗体特異的イメージング (antibody-directed imaging)」として一般に知られている、インビボ診断プロトコルにおいて使用するのためのものという、2つのクラスの範囲に入る。

【0108】

多くの適切な画像化剤が当技術分野において公知であり、それらを抗体に付加する方法も公知である (例えば、各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,021,236号; 同第4,938,948号; および同第4,472,509号を参照のこと)。使用される画像化部分は、常磁性イオン; 放射性同位体; 蛍光色素; NMR検出物質; X線イメージングであり得る。

【0109】

常磁性イオンの場合、例として、クロム (III)、マンガン (II)、鉄 (III)、鉄 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、銅 (II)、ネオジム (III)、サマリウム (III)、イッテルビウム (III)、ガドリニウム (III)、バナジウム (II)、テルビウム (III)、ジスプロシウム (III)、ホルミウム (III)、および／またはエルビウム (III) などのイオンが言及され得、ガドリニウムが特に好ましい。他の文脈、例えばX線イメージングにおいて有用なイオンには、ランタン (III)、金 (III)、鉛 (II)、および特にビスマス (III) が含まれるがこれらに限定されない。

【0110】

治療適用および／または診断適用のための放射性同位体の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレン、³⁵硫黄、テクネチウム (technetium) ^{99m}および／またはイットリウム⁹⁰が言及され得る。¹²⁵Iは、特定の態様において使用するのに好ましい場合が多く、テクネチウム^{99m}および／またはインジウム¹¹¹もまた、多くの場合、それらの低エネルギー性および広範囲の検出への適性から好ましい。本発明の放射標識モノクローナル抗体は、当技術分野で周知の方法に従い作製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび／またはヨウ化カリウムならびに化学的酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウム、または酵素的酸化剤、例えばラクトペルオキシダーゼと接触させることによってヨウ素化され得る。本発明に従うモノクローナル抗体は、例えば、第一スズ溶液でペルテクネート (pertechnetate) を還元し、セファデックスカラム上で還元型テクネチウムをキレート化し、抗体をこのカラムに適用することによる、リガンド交換プロセスによって、テクネチウム^{99m}で標識され得る。あるいは、例えば、ペルテクネート、還元剤、例えば SnCl_2 、緩衝溶液、例えばフタル酸ナトリウムカリウム溶液、および抗体をインキュベートすることによる、直接標識技術が使用され得る。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合するためにしばしば使用される中継官能基 (intermediary functional group) は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

【0111】

コンジュゲートとして使用することが意図される蛍光標識には、アレクサ350、アレクサ430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、REG、ローダミンググリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および／またはテキサスレッドが含まれる。

【0112】

本発明において意図される別のタイプの抗体コンジュゲートは、色素形成性の基質との接触によって有色の生成物を生じる酵素（酵素タグ）および／または二次結合性リガンドへ抗体が連結されている、主としてインビトロ用途が意図される抗体コンジュゲートである。好適な酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋ワサビ）水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次結合性リガンドは、ビオチンならびに／またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。このような標識の使用は当業者に周知であり、例えば、各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号および同第4,366,241号に記載されている。

【0113】

抗体への分子の部位特異的付加というさらに別の公知の方法は、抗体とハプテンベースのアフィニティー標識との反応を含む。基本的に、ハプテンベースのアフィニティー標識は、抗原結合部位中のアミノ酸と反応し、それによってこの部位を破壊し、特異的抗原反応をブロックする。しかし、これは、抗体コンジュゲートによる抗原結合の減少を生じさせるために、有利ではない場合がある。

【0114】

アジド基を含む分子もまた、強度の低い紫外線により生じる反応性ニトレン中間体を通じてタンパク質への共有結合を形成するのに使用され得る（Potter & Haley, 1983）。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジドアナログが、粗細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的光プローブとして使用された（Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985）。2-および8-アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするために使用され（Khattoon et al., 1989; King et al., 1989; およびDholakia et al., 1989）、また、抗体結合剤として使用され得る。

【0115】

コンジュゲート部分への抗体の付加またはコンジュゲーションについて、いくつかの方法が当技術分野で公知である。いくつかの付加方法は、抗体へ付加された、例えば、有機キレート剤、例えばジエチレントリアミン五酢酸無水物（DTPA）；エチレントリアミン四酢酸；N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド；および／またはテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコウリル-3を用いる、金属キレート錯体の使用を必要とする（各々参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号）。モノクローナル抗体はまた、カップリング剤、例えばグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩の存在下で酵素と反応され得る。フルオレセインマーカを有するコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下でまたはイソチオシアネートとの反応によって調製される。米国特許第4,938,948号において、胸部腫瘍の画像化がモノクローナル抗体を用いて達成され、検出可能な画像化部分が、メチル-p-ヒドロキシベンゾイミデートまたはN-スクシニミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを用いて抗体に結合されている。

【0116】

他の態様において、抗体結合部位を変化させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる、免疫グロブリンの誘導体化が意図される。この方法に従って作製される抗体コンジュゲートは、改善された長寿命性、特異性、および感度を示すことが開示されている（参照により本明細書に組み入れられる

、米国特許第5,196,066号)。レポーターまたはエフェクター分子がFc領域中の糖残基へコンジュゲートされる、エフェクター分子またはレポーター分子の部位特異的付加もまた、文献に開示されている (O'Shannessy et al., 1987)。このアプローチは、診断上および治療上見込みのある抗体を生成することが報告されており、これらは現在臨床評価の段階にある。

【0117】

本発明の別の態様において、抗-(SLC45A2ペプチド)抗体または抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A-A2)抗体は、米国特許第6,048,616号；同第5,990,479号；同第5,690,807号；同第5,505,928号；同第5,262,357号（これらは全て、それらの全体が本明細書に組み入れられる）；ならびにPCT公開公報第99/26299号（1999年5月27日公開）に記載されるものような半導体ナノ結晶へ連結され得る。特に、本発明の生物学および化学的アッセイにおける半導体ナノ結晶としての使用のための例示的な材料としては、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、GaN、GaP、GaAs、GaSb、InP、InAs、InSb、AlS、AlP、AlSb、PbS、PbSe、GeおよびSiならびにその三級および四級混合物のようなII～VI属、III～V属、およびIV属半導体を含む、先に記述された材料が挙げられるが、これらに限定されない。半導体ナノ結晶を抗体へ連結させるための方法は、米国特許第6,630,307号および同第6,274,323号に記載される。

【0118】

なおさらなる態様において、本発明は、SLC45A2ペプチドまたはSLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体を選択的に結合または認識するT細胞 (T cells or that selectively bind or recognize) のような、生物学的成分を結合、精製、除去、定量、および／またはそうでなければ一般的に検出するための免疫検出法に関する。いくつかの態様において、テトラマーアッセイが本発明と共に使用され得る。テトラマーアッセイは、一般に、抗原特異的Tリンパ球に結合し得る可溶性ペプチド-MHCテトラマーを作製することを伴い、テトラマーアッセイのための方法は、例えば、Altman et al. (1996)に記載されている。使用され得るいくつかの免疫検出法としては、例えば、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫放射線測定法、蛍光免疫測定法、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、テトラマーアッセイ、およびウエスタンブロットが挙げられる。様々な有用な免疫検出法の段階が、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、Doolittle and Ben-Zeev, 1999; Gulbis and Galand, 1993; De Jager et al., 1993; およびNakamura et al., 1987のような科学文献に記載されている。

【0119】

IV. 薬学的製剤

選択的態様において、本発明のSLC45A2ペプチドはワクチン組成物中に含まれ得、SLC45A2を発現するがん（例えば、黒色腫）に対する治療的免疫応答を対象において誘導するために対象へ投与され得ることが意図される。対象における薬学的使用のためのワクチン組成物は、本明細書に開示されるSLC45A2ペプチド組成物と、薬学的に許容される担体とを含み得る。あるいは、SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体に選択的に結合する抗体が、薬学的に許容される担体中に含まれ得る。

【0120】

「薬学的」、「薬学的に許容される」、または「薬理学的に許容される」という句は、例えば適切であればヒトのような動物へ投与される場合に有害な反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応を生じさせない分子実体および組成物を指す。本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」としては、当業者に公知であるように、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗細菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味料、着色料、色素、そのような材料およびそれらの組み合わせが挙げられる（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Pharmaceutical Press, 2011を参照のこと）。活性成分と非適合性である場合を除き、いかなる通常の担体も本

発明のワクチン組成物におけるその使用が意図される。

【0121】

本明細書において使用される場合、「防御免疫応答」は、がんに対する哺乳動物ホストの免疫系による応答を指す。防御免疫応答は、がんの治療についての治療効果、例えば、腫瘍サイズの減少、生存の増加などをもたらし得る。

【0122】

いくつかの態様において、本発明のワクチン組成物は、本発明のSLC45A2ペプチド、抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体)抗体、または抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体)抗体を含み得る。いくつかの態様において、薬学的製剤中に含まれる予定のSLC45A2ペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24に選択的に結合する。SLC45A2ペプチド、またはSLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体もしくはSLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体のいずれかに選択的に結合する抗体を含む、ワクチン組成物は、SLC45A2を発現するがんに対して防御免疫応答を誘導するために使用され得る。

10

【0123】

医学の分野における当業者は、動物またはヒト患者へ投与されるワクチン組成物の実際の投薬量は、体重、状態の重症度、処置される疾患のタイプ、これまでのまたは同時の治療介入、患者の特発疾患、および投与経路のような物理的および生理的要因によって決定され得ることを認識する。投与の責任を有する医師は、いずれにせよ、組成物中の活性成分の濃度および個々の対象についての適切な用量を決定する。

【0124】

特定の態様において、ワクチン組成物は、例えば、少なくとも約0.1%のSLC45A2ペプチド、抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体)抗体、または抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体)抗体を含み得る。他の態様において、活性化化合物は、例えば、単位の重量の約2%~約75%、または約25%~約60%、およびそれらに由来する任意の範囲を含み得る。多くのワクチン組成物と同様に、投与頻度ならびに投薬量は、免疫学の当業者によって予測可能である方法で、動物またはヒトの集団のメンバー間で異なる。非限定的な例として、薬学的組成物およびワクチンは、注射によって（例えば、皮内、筋肉内、静脈内もしくは皮下）、鼻腔内に（例えば、吸引によって）または経口的に、投与され得る。1~3用量が1~36週間の期間の間に投与され得る。好ましくは、3用量が、3~4ヶ月の間隔で投与され、ブースターワクチン接種が、その後定期的に与えられ得る。

20

30

【0125】

いくつかの態様において、「好適な用量」は、上述のように投与されると、免疫化された患者においてがんに対する免疫応答を惹起することができる、SLC45A2ペプチド、抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体)抗体、または抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体)抗体の量である。一般に、好適な用量中に存在する（または用量中の核酸によってインサイチュで生成される）ペプチドの量は、ホスト1 kg当たり約0.01~100 mg、約0.01~100 mg、好ましくは約0.05~50 mg、より好ましくは約0.1~10 mgの範囲であり得る。いくつかの態様において、SLC45A2ペプチドは、各ワクチン用量当たり約0.25 mg~約1 mgの用量で投与され得る。

【0126】

本発明のワクチン組成物は、固体、液体、またはエアロゾル形態で投与されるか否か、および注射のような投与経路のために無菌である必要があるか否かに依存して、異なるタイプの担体を含んでもよい。本明細書に開示されるワクチン組成物は、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜腔内、気管内、鼻腔内、硝子体内、腔内、直腸内、局所、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍帯内、眼内、経口、局所塗布、局所、吸入、注射、注入、持続的注入、洗浄、および局所還流によって投与することができる。ワクチン組成物はまた、カテーテルによって、クリームで、液体組成物で、バリスティック粒子送達 (ballistic particulate delivery) によって、または当業者に公知であるような他の方法もしくは前述の任意の組み合わせによって、対象へ投与され得る（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Remi

40

50

ngton: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2005を参照のこと）。

【0127】

当業者に公知の任意の好適な担体が本発明の薬学的組成物において用いられ得るが、担体のタイプは、投与様式に依存して異なる。皮下注射のような非経口投与について、担体は、好ましくは、水、食塩水、アルコール、脂肪、ろうまたは緩衝液を含む。経口投与について、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、および炭酸マグネシウムのような、任意の上記の担体または固体担体が用いられ得る。生分解性マイクロスフェア（例えば、ポリ乳酸ガラクトド）もまた、本発明の薬学的組成物のための担体として用いられ得る。好適な生分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第4,897,268号および同第5,075,109号に開示されている。

10

【0128】

いくつかの態様において、ワクチン組成物は、微細構造化経皮送達またはバリスティック粒子送達によって投与され得る。ワクチン製剤用の担体としての微細構造体は、ワクチン適用について望ましい構成であり、当技術分野において広く知られている（Gerstel and Place 1976（米国特許第3,964,482号）；Ganderton and McAinsh 1974（米国特許第3,814,097号）；米国特許第5,797,898号、同第5,770,219号および同第5,783,208号、ならびに米国特許出願公開第2005/0065463号）。バリスティック粒子送達用に製剤化されたそのようなワクチン組成物は、支持基体の表面上に固定された本明細書に開示される単離SLC45A2ペプチドを含み得る。これらの態様において、支持基体としては、マイクロカプセル、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ナノカプセル、ナノ粒子、ナノスフェア、またはその組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。

20

【0129】

本明細書に開示されるSLC45A2ペプチド、抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体)抗体、または抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体)抗体用の支持基体として役立つ微細構造体またはバリスティック粒子は、生分解性材料および非生分解性材料から構成され得、そのような支持基体は、合成ポリマー、シリカ、脂質、炭水化物、タンパク質、レクチン、イオン剤、架橋剤、および当技術分野において利用可能な他の微細構造体成分から構成され得る。そのような材料から構成される支持基体への本発明のペプチドの固定化のためのプロトコルおよび試薬は、商業的におよび当技術分野において広く入手可能である。

30

【0130】

他の態様において、ワクチン組成物は、本明細書に開示される固定されたまたは封入されたSLC45A2ペプチド、抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体)抗体、または抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A24複合体)抗体と、支持基体とを含む。これらの態様において、支持基体としては、脂質マイクロスフェア、脂質ナノ粒子、エソソーム、リボソーム、ニオソーム、リン脂質、スフィンゴソーム、界面活性剤、トランスフェロソーム、エマルジョン、またはその組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。リボソームならびに他の脂質ナノ-およびマイクロキャリア製剤の形成および使用は、一般に当業者に公知であり、リボソーム、マイクロ粒子、ナノカプセルなどの使用は、治療薬の送達において広範囲の使用を得た（例えば、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入られる、米国特許第5,741,516号）。ペプチドの封入を含む、潜在的薬物担体としてのリボソームおよびリボソーム様調製物の多数の方法が、概説された（米国特許第5,567,434号；同第5,552,157号；同第5,565,213号；同第5,738,868号および同第5,795,587号；これらの各々は参照によりその全体が具体的に組み入られる）。

40

【0131】

本明細書に記載される送達方法に加えて、多数の代替技術がまた、開示されるワクチン組成物を投与するために意図される。非限定的な例として、ワクチン組成物は、循環系中へのおよび循環系を通しての薬物浸透の速度および効能を増強するために米国特許第5,656,016号において使用および記載されたソノフォレーシス（即ち、超音波）；骨内注射（

50

米国特許第5,779,708号)、またはフィードバック制御送達(米国特許第5,697,899号)によって投与され得、この段落における特許の各々は、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。

【0132】

任意の種々のアジュバントが、免疫応答を非特異的に増強するために本発明のワクチン中に用いられ得る。多くのアジュバントは、抗原を迅速な異化から保護するように設計された物質(例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油)、および免疫応答の非特異的刺激剤(例えば、リピドA、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)またはヒト結核菌)を含有する。好適なアジュバントは、例えば、フロイント不完全アジュバントおよびフロイント完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)ならびにMerck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.)として市販されている。他の好適なアジュバントとしては、ミョウバン、生分解性マイクロスフェア、モノホスホリルリピドAおよびクイルA(quil A)が挙げられる。

【0133】

ペプチドは、組成物に中性または塩形態で製剤化されてもよい。薬学的に許容される塩には、酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基によって形成される)、および例えば塩酸もしくはリン酸のような無機酸によって形成される塩、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸によって形成される塩が含まれる。遊離カルボキシル基によって形成される塩も同様に、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来し得る。

【0134】

いずれの場合においても、組成物は、1つまたは複数の成分の酸化を遅らせるために様々な抗酸化剤を含んでもよい。さらに、パラベン(例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン)、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、またはそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない、様々な抗細菌剤および抗真菌剤のような保存剤によって、微生物の作用の防止をもたらすことができる。

【0135】

滅菌注射液剤は、先に列挙した他の様々な成分と共に適切な溶媒中に必要量の活性ペプチドを組み入れ、必要に応じて、続いて、濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散剤は、基本分散媒および/または他の成分を含有する滅菌ビヒクル中へ様々な滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。滅菌注射液剤、懸濁剤、または乳剤を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、予め濾過滅菌したその液体媒体からの、活性成分+任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥または凍結乾燥技術である。液体媒体は、必要であれば適切には緩衝作用を有するべきであり、液体希釈剤は、注射の前に十分な食塩水またはグルコースによってまず等張にされるべきである。溶媒としてDMSOを用いることによって極めて迅速な浸透が起こると想像され、小さい領域に高濃度の活性物質を送達する、直接注射のための高濃度組成物の調製も同様に企図される。

【0136】

組成物は、製造および保存条件で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保護されなければならない。エンドトキシンの混入は、安全なレベルで、例えば0.5 ng/mgタンパク質未満で、最小限維持されるべきであると認識される。

【0137】

特定の態様において、注射用組成物の持続的な吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、またはそれらの組み合わせのような吸収を遅らせる物質を組成物中に用いることによってもたらされ得る。

【0138】

A. 検出およびワクチン接種キット

本発明のSLC45A2ペプチド、抗-(SLC45A2ペプチド-HLA-A2複合体)抗体、抗-(SLC45A2ペ

10

20

30

40

50

プチド-HLA-A24複合体)抗体、または抗-SLC45A2ペプチド抗体は、キット中に含まれ得る。キット中のSLC45A2ペプチドまたは抗体は、検出可能に標識されていてもよく、または同様にキット中に含まれる支持基体の表面上に固定されていてもよい。SLC45A2ペプチドまたは抗体は、例えば、無菌、凍結乾燥、または両方のような、適切な形態でキット中に提供され得る。

【0139】

本発明のキット中に含まれる支持基体は、行われる方法に基づいて選択され得る。非限定的な例として、支持基体は、マルチウェルプレートもしくはマイクロプレート、膜、フィルター、紙、エマルジョン、ビーズ、マイクロビーズ、マイクロスフェア、ナノビーズ、ナノスフェア、ナノ粒子、エソソーム、リボソーム、ニオソーム、トランスフェロソーム、ディップスティック、カード、セルロイドストリップ、スライドガラス、マイクロスライド、バイオセンサー、ラテラルフロー装置、マイクロチップ、コーム、シリカ粒子、磁性粒子、または自己集合性単層であり得る。

【0140】

行われる方法に適切である場合、キットは、対象への組成物の送達のためのまたは本発明の組成物を他の方法で取り扱うための1つまたは複数の装置をさらに含み得る。非限定的な例として、キットは、注射器、点眼器、バリスティック粒子アプリケーター（例えば、米国特許第5,797,898号、同第5,770,219号および同第5,783,208号、ならびに米国特許出願公開第2005/0065463号に開示されるアプリケーター）、薬さじ、マイクロスライドカバー、テストストリップホルダーまたはカバーなどである装置を含み得る。

【0141】

キットの成分を標識するための検出試薬が、本発明の方法を行うためのキット中に任意で含まれ得る。特定の態様において、標識または検出試薬は、当技術分野において一般的に使用される試薬を含む群より選択され、これらとしては、非限定的に、放射性元素、酵素、UV範囲の光を吸収する分子、ならびにフルオロフォア、例えば、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、AMCAブルーおよびルシファーイエローが挙げられる。他の態様において、1つまたは複数の容器手段と、放射性元素、酵素、UV範囲の光を吸収する分子、およびフルオロフォアを含む群より選択される検出試薬で既に標識されたBSTタンパク質剤とを含む、キットを提供する。

【0142】

キットを構成する試薬および／または成分が凍結乾燥形態（凍結乾燥物（lyophilisate））でまたは乾燥粉末として提供される場合、凍結乾燥物または粉末は、好適な溶媒の添加によって再構成され得る。特定の態様において、溶媒は、無菌の薬学的に許容される緩衝液および／または他の希釈剤であり得る。そのような溶媒もまたキットの一部として提供され得ることが想定される。

【0143】

キットの成分が1つおよび／または複数の液体溶液中に提供される場合、液体溶液は、非限定的な例として、無菌の水溶液であり得る。組成物はまた投与用組成物へ製剤化され得る。この場合、容器手段はそれ自体、注射器、ピペット、局所アプリケーターなどであり得、そこから、製剤が、身体の患部へ適用され得、対象へ注射され得、かつ／またはキットの他の成分へ適用されるかもしくはキットの他の成分と混合され得る。

【実施例】

【0144】

V. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例において開示される技術は、本発明者らによって開発された技術が、本発明の実施において十分に機能することを示し、従って、その実施のための好ましい様式を構成すると考えられ得ることが、当業者に認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示の特定の態様に多くの変更を施し、それでもなお同様または類似の結果を得ることができることを認識すべきである。

【0145】

実施例1

材料および方法

ドナー、細胞株および抗体

末梢血(PB)サンプルを、HLA A*0201およびHLA A*2402を有する健康なドナーから得た。

【0146】

黒色腫細胞株を、4mM L-グルタミン、1mM非必須アミノ酸、10mMピルビン酸ナトリウムならびに50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシンおよび10% FBS (TCB)を含むRPMI 1640中に維持した。ブドウ膜黒色腫を、10% FBS、50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシンを含むRPMI1640で培養した。LCLをフィーダー細胞として使用し、10% FBS、50U/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシンを含有するRPMI 1640で培養した。T細胞培養用のCTL培地は、10% FBS、2mM L-グルタミン、 β -メルカプトエタノール、50U/mlペニシリンおよび50mg/mlストレプトマイシンを含有した。

【0147】

HLA免疫沈降およびタンデム質量分析による結合ペプチドの検出

腫瘍関連ペプチドを、新鮮な腫瘍組織試料または腫瘍細胞株から単離されたHLAクラスI分子から直接溶出した。腫瘍試料(約250 mg)を小片へ切片化し、完全な消化まで無血清RPMI1640培地中の酵素カクテルバッファー中で消化し、次いで洗浄し、溶解された腫瘍細胞および上澄みを回収した。タンパク質濃度を測定した後、腫瘍細胞溶解物を、W6/32抗体(HLA-A、-B、および-Cについて特異的)と共にインキュベートし、次いで、樹脂ビーズを使用して精製した。HLAクラスI結合ペプチドを溶出し、HLAの存在をウエスタンブロット分析によって確認した。陽性溶出フラクションを、下述のように、質量分析によって分析した。

【0148】

発見段階タンデム質量分析(MS/MS)のために、溶出されたMHCクラスI結合ペプチドを高感度HPLCシステム(Dionex 3000 RSLC)上へ注入し、1.8ミクロンC18(Agilent Technologies)上の0.1%ギ酸水-アセトニトリルにおける逆相クロマトグラフィーによって分離し、そして、データ依存取得(data-dependent acquisition)を使用するOrbitrap Elite質量分析計(Thermo Scientific)において分析した。Mascotアルゴリズムは、10 ppm親質量許容差(parent mass tolerance)、0.8 dフラグメントイオン許容差、Met酸化、酵素選択性無しを使用して、SwissProt完全ヒトタンパク質データベースに対して、得られたMS/MSスペクトルを検索した。検索結果を、NetMHC 3.4 [101]を使用して適切なMHC結合特異性と相互参照した。

【0149】

SLC45A2特異的CD8 T細胞の作製および拡大培養

腫瘍抗原特異的CTLを、以前に記載された方法(Li 2005)で作製した。HLA-A*0201について陽性の白血球アフェレーシスPBMCを、腫瘍抗原ペプチドでパルスされた自己DCによって刺激した。樹状細胞の誘導のために、接着性PBMCを、6日間、AIM-V培地(Invitrogen Life Technologies)中でGMCSFおよびIL-4と共に培養し、次いで、成熟のためにIL1b、IL-6、TNF-aおよびPGE2を添加した。1日後、成熟DCを、室温で、4時間、3ug/ml β 2-ミクログロブリン(β 2-microglubulin)の存在下で、1%ヒト血清アルブミン(HAS)/PBSの1ml当たり 2×10^6 細胞にて、40ug/mlペプチドでパルスした。1%HSA/PBSでの洗浄後、DCを、48ウェルプレート中で 1.5×10^6 細胞/ml/ウェルでPBMCと混合した。IL-21(30ng/ml)を、最初に、および培養から3~4日後に添加した。IL-2およびIL-7を、二次刺激から1日後に添加し、活性化特異的T細胞を拡大培養した。

【0150】

二次刺激から6日後、細胞を、SLC45A2382-390ペプチド/MHC-PE-コンジュゲート化テトラマーおよびCD8-APC抗体で染色し、次いで、CD8およびテトラマー陽性細胞をARIA IIによって選別した。選別されたSLC45A2特異的CD8 T細胞を、IL-21下でPBLおよびLCLのフィーダー細胞を用いて急速拡大培養プロトコル(REP)によって拡大培養した。

【0151】

ペプチド-MHCテトラマー染色

SLC45A2特異的CD8 T細胞を、HLA A*0201についてのSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ ペプチド/MHC複合体またはHLA A*2402についてのSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ペプチド/MHC複合体のテトラマーでの染色によって確認した。CD8 T細胞を、20分間、PE-コンジュゲート化テトラマーと共にインキュベートし、洗浄し、次いで、室温にて15分間、APC-コンジュゲート化CD8抗体で染色した。洗浄後、細胞をフローサイトメトリー(LSRFortessa X-20 Analyzer)によって分析した。それぞれSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ SLC45A2₃₉₃₋₄₀₂を含有するHLA-A*0201およびHLA-A*2402のテトラマーを、Fred Hutchinson Cancer Research Centerから購入した。

【0152】

SLC45A2特異的CD8 T細胞のTCRレパートリー分析

TCR V_β レパートリーを評価するために、IOtest Beta Mark TCR-V_β Repertoireキットを使用した。このキットは、TCR-V_β 領域の24種のTCR-V_β 抗原および正常なヒトTCR-V_β レパートリーのおよそ70%をカバーする抗体を含む：V_β 1、V_β 2、V_β 3、V_β 4、V_β 5.1、V_β 5.2、V_β 5.3、V_β 7.1、V_β 7.2、V_β 8、V_β 9、V_β 11、V_β 12、V_β 13.1、V_β 13.2、V_β 13.6、V_β 14、V_β 16、V_β 17、V_β 18、V_β 20、V_β 21.3、V_β 22、およびV_β 23。これらの抗体に、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリトリン(PE)をコンジュゲートした。TCR-V_β レパートリーアッセイを行った場合、抗-CD8アロフィコシアニン(APC)を添加した。

【0153】

⁵¹クロム放出アッセイ

SLC45A2特異的CD8 T細胞を、標準的な⁵¹クロム(⁵¹Cr)放出アッセイを使用して、SLC45A2発現性または非発現性標的の特異的溶解についてアッセイした。標的を100 uCiの⁵¹Crで2時間標識し、3回洗浄後、標識された標的を1ウェル当たり2000個の標的で3ウェルずつ平板培養した(plated triplicated well)。エフェクター細胞を、様々なエフェクター：標的(E:T)比で、標的と共にインキュベートした。4時間後、30ulの上澄みを各ウェルから採取し、⁵¹Crをガンマカウンターによって測定した。特異的溶解のパーセンテージを計算した。

【0154】

ペプチド結合アッセイ

SLC45A2、Mart-1およびgp100特異的CD8 T細胞(1X10⁵細胞)を、様々な濃度(100、10、1、0.1、0.01、0 nM)で、それぞれ、SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀、M₂₇₋₃₅またはG₁₅₄₋₁₆₂ペプチドと共にプレインキュベートされたT2細胞(4X10⁴細胞)と共にインキュベートした。インキュベーションから48時間後、IFN-γ産生をELISAアッセイによって測定した。

【0155】

RT-PCRおよび定量的RT-PCR

メラノサイト分化抗原のmRNA発現の分析のために、RT-PCRを行った。簡潔には、全細胞RNAを、グアニジン-イソチオシアネート/塩化セシウム手順によって抽出した。1ugのRNAからのcDNAを、高容量cDNA逆転写キットで合成し、そして、SLC45A2、MART-1、gp100、およびチロシナーゼについて特異的なプライマーを用いての30サイクルのPCRによって増幅させた。プライマー配列を補足の表1に列挙する。PCR生成物を2%アガロースゲル上で泳動させ、Gel Redによって可視化した。

【0156】

リアルタイムPCRを、Power Syber Green PCRマスターミックス(Applied biosystems life technologies)を使用して、SLC45A2、MART-1、gp100、およびチロシナーゼのプライマーで行った。GAPDHをコードする遺伝子の量によって、値を標準化した。

【0157】

Me1526およびA375(BRAF V600E+)ならびにMeWo(BRAF野生型)をBRAF V600E阻害剤、ダブラフェニブ(50nM)、もしくはMEK阻害剤、トラメチニブ(50nM) (GlaxoSmithKline)、または両方で48時間処理した。未処理黒色腫を対照として使用した。

10

20

30

40

50

【0158】

RNAseq解析

Ribo-Zero Goldを含むIllumina TruSeq Stranded Total RNAキットを使用して、腫瘍サンプルに対して、Whole Transcriptome Seq (RNA-Seq)が、Avera Institute for Human Geneticsによって行われた。およそ2億個のPaired-Endリードが各腫瘍RNAサンプルについて使用された。BCL (Illumina HiSeqの生の出力) ファイルが、逆多重化およびFASTQフォーマットへの変換のためにISIS v2.4.60を使用して処理された。FASTQファイルおよび配列リードが、特定の実行に適したパラメータを使用するBWAを使用して、ゲノム(Hg19)へ整列された(例えば、51塩基シーケンシング実行について最初の40シード領域中に2つを伴う3つのミスマッチ)。整列されたBAMファイルが、次いで、いかなる下流の解析の前にもPicardおよびGATKプログラムを使用するマークデュプリケーション(mark duplication)、再整列、および再校正へ供された。RNASeqデータは、TopHat、TopHat-Fusion、およびCufflinksアルゴリズムを使用して処理された。

10

【0159】

統計解析

GraphPadプリズムバージョン6.0eを使用して、データ解析を行った。正規分布データを、パラメトリック検定(Anovaおよび独立t検定)を使用して解析した。p値が<0.05であった場合、統計的検定差を有意と見なした。

【0160】

実施例2

20

SLC45A2の発現は黒色腫に非常に限定される

SLC45A2の発現を、皮膚黒色腫細胞、ブドウ膜黒色腫細胞および粘膜黒色腫細胞を含む様々な黒色腫細胞において評価した。黒色腫細胞株を含む様々なタイプの腫瘍細胞において、RT-PCRによって、SLC45A2 mRNA発現を分析した(表1)。ほとんどの黒色腫細胞においてSLC45A2 mRNAが検出されたが、他のタイプの腫瘍細胞においては検出されなかった(図1A~C)。SLC45A2の発現を、異なる部位から生じた転移性黒色腫細胞においても調べた(表2)。試験した16種の転移性黒色腫細胞のうちの11種がSLC45A2 mRNAを発現していた(図1A)。様々な黒色腫細胞において、SLC45A2の発現比率を、MART-1、gp100およびチロシナーゼのような他の黒色腫分化抗原(MDA)のそれと比較した。異なる黒色腫分化抗原が、同様の発現比率、78.7~84.8%を示したことがわかった(表3)。黒色腫および初代メラノサイトにおけるMDA遺伝子発現の比較を図13A~Bに示す。

30

【0161】

(表1) RT-PCR用のヒトMDA遺伝子プライマー配列。

遺伝子	センス	アンチセンス	サイズ
SLC45A2	CTGGCCGCCACATCTATAAAT (SEQ ID NO: 3)	GTAGCAGAACTCTCTCCGAAC (SEQ ID NO: 4)	125 bp
MART-1	ACAGTGATCCTGGGAGTCTTAC (SEQ ID NO: 5)	TTGAAGAGACACTTTGCTGTCC (SEQ ID NO: 6)	168 bp
gp100	AGGTGCCTTTCTCCGTGAG (SEQ ID NO: 7)	GCTTCAGCCAGATAGCCACT (SEQ ID NO: 8)	128bp
チロシナーゼ	GCAAAGCATACCATCAGCTCA (SEQ ID NO: 9)	GCAGTGCATCCATTGACACAT (SEQ ID NO: 10)	145bp
GAPDH	AAT CCC ATC ACC ATC TTC CA (SEQ ID NO: 11)	TGG ACT CCA CGA CGT ACT CA (SEQ ID NO: 12)	94bp

40

【0162】

(表2) 黒色腫細胞におけるSLC45A2発現およびHLA型。

50

黒色腫名	SLC45A2 発現	HLA 型
黒色腫		
Mel 888	+	A01/A24
Mel 888+A2	+	A01/A24
Mel 526	+	A02/A03
Mel 624	+	A02/A03
A375	-	A01/A02
WM793	-	A02/A
McWo	+	A02/A
FM88	+	A02/A
FM6	+	A02/A
A2058	+	A02/A
ブドウ膜黒色腫		
202	+	A01/A03
92.1	+	A03
OMM1	+	A02
UPMD1	+	A02
UPMD2	+	A24/A68
粘膜黒色腫		
Mel2170	+	A02/A01
Mel2042	+	A03/A11
黒色腫名	SLC45A2 発現	HLA 型
転移性黒色腫		
Mel2381	+	A02/A68
Mel2508	+	A02/A24

10

20

30

40

50

Mel2400	+	A02/A29
Mel2412	+	A02/A03
Mel2382	+	A02/A26
Mel2559	+	A02/A29
Mel2461	-	A02/A01
Mel2333	-	A02/A68
Mel2216	+	A02/A24
Mel2391	+	A02/A24
Mel2423	-	A03/A24
Mel2492	+	A24/A26
Mel2792	-	A24/A11
Mel2297	+	A03/A11
Mel2425	+	A01/A11
Mel2698	-	A11/A31

10

20

【 0 1 6 3 】

30

(表 3) 黒色腫細胞株におけるMDA発現比率の比較。

mRNA 発現	陽性数	陰性数	合計数	比率 (%)
SLC45A2	26	7	33	78.7
MART-1	28	5	33	84.8
Gp100	28	5	33	84.8
チロシナーゼ	26	7	33	78.7

40

【 0 1 6 4 】

Genotype-Tissue Expression(GTEX)およびThe Cancer Genome Atlas(TCGA)ポータルデータを使用して、正常組織およびがん組織において、SLC45A2の相対的遺伝子発現を解析した。SLC45A2遺伝子の発現は、様々な正常組織において検出されなかったかまたは低レベルで検出されたかのいずれかであった(図8)。しかし、MART-1およびgp100は、多くの

50

正常組織サンプル、特に、正常な皮膚において、有意により高い発現を示した。SLC45A2は、他のMDAと一緒に、皮膚黒色腫およびブドウ膜黒色腫組織において高発現を示した（図8）。SLC45A2は、転移性黒色腫細胞を含む皮膚黒色腫細胞の大部分において発現されたが、他のタイプの腫瘍細胞においては発現されず、これは、SLC45A2の発現が黒色腫特異的であることを示している。

【0165】

実施例3

HLA-A*0201およびA*2402拘束性SLC45A2由来CD8 T細胞エピトープの同定

いくつかのMDACC患者由来黒色腫細胞株および新鮮な黒色腫腫瘍試料を、HLA-A,B,Cの免疫沈降、酸溶出、およびタンデム質量分析(MS/MS)を使用して、表面HLAクラスI結合ペプチドについて分析した。4つの異なるHLA対立遺伝子に結合すると予測された6つの異なるSLC45A2由来ペプチドが、複数の試料から検出され、これは、それらが共通の腫瘍関連抗原を構成することを実証している（表4）。これらのペプチドが天然にプロセッシングおよび提示される追加の証拠を表5に示す：Mel888黒色腫細胞に、HLA-A*0201、A*2402、またはA*0301のいずれかを発現するようにレンチウイルスベクターで形質導入した。免疫ペプチドーム分析を、親Mel888細胞および上述のように形質導入されたMel888細胞に対して行った。この方法で、表4にて特定される6つのペプチドのうちの5つが形質導入細胞においても検出されたが、それらが適切なHLA対立遺伝子を発現した場合においてのみ検出された（表5および図2）。示されるように、新規のSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ (SLYSYFQKV; SEQ ID NO:1) およびSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ (SYIGLKGLYF, SEQ ID NO:2) ペプチドが、MS分析を使用しての、HLA A A*0201またはA*2402が形質導入されたMel888からの溶出によって、確認された。

【0166】

（表4）黒色腫細胞株の質量分光分析によって検出されたSLC45A2由来ペプチド。

SLC45A2ペプチド	ペプチドの位置	ペプチドが検出された黒色腫の数	HLA 拘束 エLEMENT	世界的 HLA 保有率	予測される HLA結合親和性 (nM)
SLYSYFQKV (SEQ ID NO: 1)	382 - 390	6	A*0201	28%	7
RLLGTEFQV (SEQ ID NO: 13)	209 - 217	8			11
SYIGLKGLYF (SEQ ID NO: 2)	393 - 402	3	A*2402	34%	51
VWFLSPILGF (SEQ ID NO: 14)	73 - 82	2			76
ALIANPRRK (SEQ ID NO: 15)	129 - 137	2	A*0301	8%	108
SGQAGRHIY (SEQ ID NO: 16)	5 - 13	2	A*3002	3%	41

【0167】

（表5）HLA形質導入による天然ペプチドプロセッシングおよび提示の確認。

SLC45A2 ペプチド	HLA形質導入SLC45A2 ⁺ 黒色腫細胞株				HLA結合親和性の予測値 (nM)			
	Me1888 親	Me1888 A*0201 Me1888 A*0301 Me1888 A*1101	Me1888 A*2402		A*0101	A*0201 A*0301 A*1101	A*02401	
SLYSYFQKV (SEQ ID NO: 1)	-	20	-	-	19814	7	4450 10314	12016
RLLGTEFQV (SEQ ID NO: 13)	-	27	-	-	21492	11	12802 17100	14058
SYIGLKGLYF (SEQ ID NO: 2)	34	23	31	34	12377	24841 24562 26349	51	
VWFLSPILGF (SEQ ID NO: 14)	-	-	-	-	11843	18995 24560 28804	76	
ALIANPRRK (SEQ ID NO: 15)	-	-	24	-	21477	22597 108	320	30124

表の左側において、特定のHLAが形質導入されたSLC45A2黒色腫細胞株の下に、検出されたペプチドのイオンスコアを列挙している。表中の「-」は、ペプチドが検出されなかったことを示している。

【0168】

実施例4

SLC45A2特異的CD8 T細胞の誘導

HLA-A*0201またはA*2402陽性の自己PBMCを、IL-21で処理されたSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀またはSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ペプチドでパルスした樹状細胞(DC)で刺激することによって、SLC45A2特異的CD8 T細胞を作製した。図3Aに描写されるタイムスケジュールに従って、HLA-A*0201お

10

20

30

40

50

よびA*2402拘束性PBMCを、それぞれIL-21で処理されたSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀およびSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂ペプチドでパルスしたDCによって刺激した。二次刺激後、SLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞が、リンパ球にゲートをかけた集団の約2~25%およびCD8にゲートをかけた集団の6.68~30%の頻度で誘導された（図3B 上パネル）。SLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞を選別し、急速拡大培養プロトコル(REP)によって拡大培養した。REP後、SLC45A2-テトラマー陽性集団の頻度は、リンパ球にゲートをかけた集団の91~99%およびCD8にゲートをかけた集団の97~99%であった（図3B 中央パネル）。SLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞は、これらの健康なドナー-PBMCにおいてほとんど観察されなかった。SLC45A2特異的CD8 T細胞はまた、2つの他のHLA A*0201またはA*2402拘束性の健康なドナーのPBMCから首尾よく誘導された（図10）。

10

【0169】

SLC45A2特異的CD8 T細胞のクローン性を調べるために、TCR V β レパトリーを、24種の異なる特異性に対応するV β 抗体を使用して分析した。各ドナーから誘導されたSLC45A2特異的CD8 T細胞のV β 鎖はV β 3、V β 14、V β 18、V β 21.3、およびV β 23を含んだ（図3B 下パネル、図10）。単一ウェルから選別されREPによって拡大培養された、SLC45A2テトラマー陽性CD8 T細胞は、92~99%の範囲でV β の一つの主要な集団を示した。

【0170】

誘導されたSLC45A2特異的CD8 T細胞の表現型分析について、CD45RA、CCR7、CD62LおよびCD28の発現を、フローサイトメトリーによってSLC45A2-テトラマー陽性CD8 T細胞において試験した。SLC45A2特異的CD8 T細胞はCD45RA、CCR7、およびCD62Lを発現していなかったが、CD28を発現しており、このことは、それらがエフェクターメモリーT細胞と同様の表現型を有することを示唆している（図3C）。

20

【0171】

実施例5

SLC45A2特異的CD8 T細胞の抗原特異的認識および機能

SLC45A2-発現性黒色腫細胞を認識および殺傷するSLC45A2特異的CD8 T細胞の能力を決定するために、様々なE:T比でSLC45A2-発現性黒色腫細胞株を使用して、標準的な⁵¹Cr放出アッセイを行った。SLC45A2およびHLA A*0201の両方を発現する、Mel526、Mel624、FM6、およびMeWo細胞を標的として使用した（表2）。SLC45A2特異的CD8 T細胞は様々な黒色腫細胞株を効果的に殺傷したことがわかった（図4A）。これは、SLC45A2特異的CD8 T細胞が、黒色腫細胞によって内因的にプロセッシングされるSLC45A2エピトープSLYSYFQKV（SEQ ID NO: 1）を認識することができることを示した。対照として、SLC45A2発現について陰性のHLA-A*0201黒色腫細胞(A375)、およびSLC45A2を発現していたがHLA-A*0201陰性であった黒色腫細胞(Mel1888)は、SLC45A2特異的CD8 T細胞によって溶解されなかった。Mel1888細胞にHLA-A*0201の形質導入を行うことは、SLC45A2特異的CD8 T細胞による溶解に対して細胞を感受性にし、これは、SLC45A2特異的CD8 T細胞がHLA-A*0201拘束性応答を有することを示している。SLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性をまた、異なる組織に由来する転移性黒色腫細胞に対して調べた。この研究において使用した全ての転移性黒色腫細胞が、HLA-A*0201について陽性であった。

30

【0172】

さらに、HLA-A*2402拘束性エピトープSYIGLKGLYF（SEQ ID NO: 2）について特異的なT細胞が、HLA-A*2402を発現する一団の黒色腫細胞株を溶解したことがわかった：HLA-A*0201拘束性T細胞と同様に、A*2402拘束性T細胞は、SLC45A2タンパク質を発現するMel1888、Mel2381、Mel2508、Mel2400、Mel2412およびMel2559細胞を効果的に溶解した；しかし、SLC45A2タンパク質を発現していなかったA*2402-陽性Mel2461およびMel2333細胞は、溶解されなかった（図4B）。

40

【0173】

実施例6

SLC45A2特異的CTLの機能的アビディティ

SLC45A2特異的CD8 T細胞の標的認識についての機能的アビディティを評価するために、

50

IFN- γ を産生するSLC45A2特異的CTLの能力を、ELISAアッセイを使用して、様々な濃度でSLC45A2₃₈₂₋₃₉₀ペプチド(SLYSYFQKV, SEQ ID NO: 1)と共にプレインキュベートされたT2細胞の存在下で調べた。HLA-A*0201結合性対照ペプチドMART-1₂₇₋₃₅(AAGIGILTV, SEQ ID NO: 17)およびgp100₁₅₄₋₁₆₂(KTWGQYWQV, SEQ ID NO: 18)と共にプレインキュベートされたT2細胞を使用し、SLC45A2特異的CD8 T細胞のペプチド特異的応答を確認した。それぞれのペプチドの結合能力を、SLC45A2-、MART-1-およびgp100特異的CTL間で比較した(図4C)。興味深いことには、SLC45A2特異的CD8 T細胞は、0.1 μ g/mlほども低いペプチドでパルスされたT2細胞に反応して高いIFN- γ を産生することが可能であり、0.01 μ g/mlのペプチド濃度で減少したIFN-ガンマ産生を示した(図4C 上パネル)。MART-1特異的CD8 T細胞によるIFN- γ 産生は、同じペプチド濃度でのSLC45A2特異的CD8 T細胞によるIFN- γ 産生と比べて有意により少なかった(図4C 下パネル)。さらに、gp100特異的CD8 T細胞の結合親和性は、SLC45A2特異的CD8 T細胞の結合親和性と類似していた。これらのデータは、SLC45A2特異的CD8 T細胞が、SLC45A2を発現する標的に対して高親和性で応答することができることを示唆している。これらの結果は、HLA-A*0201についてのSLC45A2、gp100、およびMART-1ペプチドの予測されるHLA結合親和性と一致しており、これらは、それぞれ、7 nM、9 nM、および2498 nMである。

【0174】

実施例7

SLC45A2の低発現およびメラノサイトに対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の低細胞傷害活性

SLC45A2はメラノサイト分化タンパク質であるため、SLC45A2発現を正常なメラノサイトにおいて調べ、正常なメラノサイトに対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害活性を決定した。ヒト表皮メラノサイト3C0661および4C0197を、色素の少ない新生児皮膚から単離した。3C0661はHLA A*0201およびA*2402の両方を発現し、4C0197はHLA A*0201-陽性かつA*2402-陰性であった(図11)。図5Aに示されるように、SLC45A2がこれらのメラノサイトによって発現されたが、発現は、黒色腫細胞と比較して、メラノサイトにおいて有意により低かった。しかし、MART-1、gp100およびチロシナーゼのような他のメラノサイト分化タンパク質は、黒色腫細胞におけるそれらの発現と同様のレベルでメラノサイトにおいて発現された(図5A)。さらに、SLC45A2、MART-1、gp100およびチロシナーゼのRNA発現レベルを、RNAシーケンシングおよびTCGAデータを使用して、メラノサイトおよび黒色腫細胞間で比較した。SLC45A2の発現は、黒色腫と比較して、メラノサイトにおいてより低く、一方、メラノサイトにおけるMART-1およびgp100の発現は、有意により高く、黒色腫細胞におけるそれらの発現と類似していたことがわかった(表6)。

【0175】

(表6) 黒色腫および正常組織におけるメラノサイト分化抗原発現。

	組織発現 (RNAseq、平均TPM)	PMEL	MART1	TYR	SLC45A2
Gtex 正常 組織	心臓	0.81	0.29	0.05	0.07
	脳	0.15	0.21	0.09	0.27
	皮膚	42.9	11.1	8.63	0.55
細胞株	黒色腫 (SLC45A2 ⁺)	2323	267	386	97
	初代メラノサイト	5354	2804	2268	39
TCGA 腫瘍	皮膚黒色腫	6706	754	675	128
	ブドウ膜黒色腫	8466	1777	393	69

【0176】

SLC45A2⁻、MART-1⁻およびgp100特異的CD8 T細胞の細胞傷害性を、2人のHLA-A*0201-陽性の健康なドナーに由来する初代メラノサイトに対して調べた。MART-1およびgp100特異的CD8 T細胞は、それぞれ、メラノサイトに対して35~42%および55~65%細胞傷害性を示したが、驚くべきことに、SLC45A2特異的CD8 T細胞は、同じメラノサイトに対して8%未満の細胞傷害性を示した（図5B）。さらに、他の健康なドナーから作製されたSLC45A2特異的CD8 T細胞もまた、メラノサイトに対して低い毒性を有した（図12A~B）。さらに、HLA A*2402拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞は、A*2402陽性メラノサイトである3C0661に対して細胞傷害性ではないことがわかった（図5C）。これらの結果は、MART-1およびgp100のような他のMDAとは異なり、SLC45A2特異的CD8 T細胞は、正常なメラノサイトを破壊することなく黒色腫細胞を効果的に殺傷することができることを示唆している。

10

【0177】

実施例8

SLC45A2発現ならびにブドウ膜黒色腫および粘膜黒色腫細胞に対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害性

ブドウ膜黒色腫細胞202、92.1、UPMD1およびUPMD2は原発腫瘍に由来し、OMM1細胞は転移性腫瘍に由来した。この研究において使用した全てのブドウ膜黒色腫細胞がSLC45A2 mRNAを発現していた（図6A）。

【0178】

ブドウ膜黒色腫細胞に対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害性を調べた。SLC45A2について陽性のOMM1細胞および202細胞は、HLA A*0201拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞によって殺傷されることが観察された（図6B）。次に、MART-1⁻およびgp100特異的CD8 T細胞の細胞傷害性（cytotoxicity）を、ブドウ膜黒色腫に対して調べた。MART-1特異的CD8 T細胞は、SLC45A2⁻およびgp100特異的CD8 T細胞と比べて、ブドウ膜黒色腫細胞についてより低い細胞傷害性を示した。A*2402拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞は、SLC45A2およびHLA A*2402を発現するUPMD2細胞を殺傷した。UPMD2細胞にA*2402拘束性ペプチドであるSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂をパルスした場合、SLC45A2特異的CD8 T細胞の細胞傷害性は増加した。SLC45A2について陽性であるがHLA A*2402について陰性であるUPMD1細胞は、A*2402拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞によって溶解されなかった（図6C）。

20

【0179】

粘膜黒色腫において、SLC45A2発現、およびSLC45A2特異的CD8 T細胞による細胞傷害性を試験した。粘膜黒色腫細胞は、他のMDAの発現と同様のレベルでSLC45A2を発現していた（図6D）。A*0201拘束性SLC45A2特異的CD8 T細胞は、SLC45A2およびHLA A*0201を発現する2170粘膜黒色腫細胞を溶解したが、SLC45A2を発現しHLA A*0201を発現しない2042細胞を溶解しなかった（図6E）。粘膜黒色腫細胞に対する細胞傷害活性は、SLC45A2、MART-1およびgp100特異的CD8 T細胞間で類似していた。これらの結果は、SLC45A2特異的CD8 T細胞が、SLC45A2および適切なHLA型を発現するブドウ膜黒色腫細胞および粘膜黒色腫細胞を効果的に殺傷することができることを示している。

30

【0180】

実施例9

MAPK経路阻害剤での処理後の増強されたSLC45A2発現および黒色腫細胞の殺傷

MART-1、gp100およびチロシナーゼのような他のメラノサイト分化タンパク質と同様に、SLC45A2遺伝子はMITF転写因子によって調節される（J Biol Chem, 2002, 277:402-406, Gen Soci Ame, 2008 178:761-769）。MITFタンパク質レベルは、ERK媒介性リン酸化および分解を通して発がん性BRAFによって抑制される（J Cell Biol, 2005, 170:703-708）。従って、次に、BRAFまたはMEK阻害剤がSLC45A2発現を調節することができるかどうかを調べた。黒色腫細胞をBRAF V600Eの特異的阻害剤、ダブラフェニブ(50nM)、もしくはMEK阻害剤、トラメチニブ(50nM)、または両方で48時間処理し、SLC45A2およびMART-1のmRNA発現をRT-PCRによって分析した。図7Aに示されるように、SLC45A2およびMART-1の有意な増加が、BRAFまたはMEK阻害剤での処理後、Me1526細胞（突然変異BRAF V600Eを発現する）

40

50

において観察され、一方、MeWo細胞（野生型BRAFを発現する）は、SLC45A2およびMART-1の増加した発現を示さなかった。BRAFおよびMEK阻害剤での処理後の黒色腫細胞に対するSLC45A2特異的CD8 T細胞の殺傷効果を評価するために、 ^{51}Cr 放出アッセイを、BRAF阻害剤、MEK阻害剤または両方で48時間処理された黒色腫細胞において行った。SLC45A2特異的CD8 T細胞は、未処理黒色腫細胞のそれと比較して、BRAF阻害剤、MEK阻害剤、または両方で処理された黒色腫細胞において増加した細胞傷害性を示した（図7B）。これらのデータは、MAPK経路阻害が、MITFによって調節されるSLC45A2の発現を増加させ、これが、SLC45A2特異的CD8 T細胞の標的認識および細胞傷害性を増強させることを示した。

【0181】

結論：重要なことには、SLC45A特異的CD8 T細胞は、黒色腫細胞を効果的に殺傷したが、正常なメラノサイトを殺傷せず、一方、MART-1およびgp100特異的CD8 T細胞は、メラノサイトおよび黒色腫細胞の両方を殺傷した。さらに、BRAFおよびMEK阻害剤での処理は、黒色腫細胞において、SLC45A発現、SLC45A2特異的CD8 T細胞の標的認識および細胞傷害性を増加させた。まとめると、本研究は、新規のHLA-A*0201およびA*2402拘束性ペプチド、それぞれ、SLC45A2₃₈₂₋₃₉₀およびSLC45A2₃₉₃₋₄₀₂を同定し、また、黒色腫分化抗原としての、SLC45A2が、黒色腫の免疫療法について高い効能および低い毒性を伴う有効な標的であり得ることを示した。黒色腫特異的抗原としてのSLC45A2のこの知見は、養子T細胞免疫療法の開発のために重要であり得る。

【0182】

本明細書において開示および請求された方法の全ては、本開示に照らして過度の実験なしに製作および実行できる。本発明の組成物および方法は、好ましい態様により説明されているものの、本発明の概念、精神および範囲から逸脱せずに、方法および本明細書に記載の方法の段階または段階の順序に変更が適用され得ることが、当業者に明白であろう。より具体的には、化学的および生理学的の両方で関係するある特定の薬剤が本明細書に記載の薬剤に代用される場合がある一方で、同じまたは類似の結果が達成されることが明白であろう。当業者に明白な全てのそのような類似の代用物および改変は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲および概念の範囲内であると見なされる。

【0183】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されるものを補う例示的な手順のまたは他の詳細を提供する程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

U.S. Patent 3,814,097	
U.S. Patent 3,817,837	
U.S. Patent 3,850,752	
U.S. Patent 3,939,350	
U.S. Patent 3,964,482	
U.S. Patent 3,996,345	
U.S. Patent 4,196,265	
U.S. Patent 4,275,149	
U.S. Patent 4,277,437	10
U.S. Patent 4,366,241	
U.S. Patent 4,373,071	
U.S. Patent 4,401,796	
U.S. Patent 4,458,066	
U.S. Patent 4,472,509	
U.S. Patent 4,598,049	
U.S. Patent 4,897,268	
U.S. Patent 4,938,948	20
U.S. Patent 5,021,236	
U.S. Patent 5,075,109	
U.S. Patent 5,196,066	
U.S. Patent 5,262,357	
U.S. Patent 5,505,928	
U.S. Patent 5,552,157	
U.S. Patent 5,565,213	
U.S. Patent 5,567,434	30
U.S. Patent 5,656,016	
U.S. Patent 5,690,807	
U.S. Patent 5,697,899	
U.S. Patent 5,738,868	
U.S. Patent 5,741,516	
U.S. Patent 5,741,957	

- U.S. Patent 5,750,172
- U.S. Patent 5,756,687
- U.S. Patent 5,770,219
- U.S. Patent 5,770,219
- U.S. Patent 5,779,708
- U.S. Patent 5,783,208
- U.S. Patent 5,795,587
- U.S. Patent 5,797,898
- U.S. Patent 5,827,690
- U.S. Patent 5,990,479
- U.S. Patent 6,048,616
- U.S. Patent 6,091,001
- U.S. Patent 6,274,323
- U.S. Patent 6,630,307
- U.S. Patent 7,910,109
- U.S. Patent Appln. 2005/0065463
- Aggarwal *et al.*, *Mod. Pathol.*, 22:206-215, 2008.
- Altman *et al.* *Science* 274(5284):94-6, 1996.
- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
- Baird *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 60(4):363-71, 2004.
- Baraldo *et al.*, *Infect. Immun.*, 73(9):5835-41, 2005.
- Bendandi *et al.*, *Nat. Med.*, 5:1171-1177, 1999.
- Berberian *et al.*, *Science*, 261:1588-1591, 1993.
- Bertinetti *et al.*, *Cancer Res.*, 66:4496-4502, 2006.
- Bijker *et al.*, *J. Immunol.*, 179:5033-5040, 2007.
- Blanchard and Shastri, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:82-88, 2008.
- Burrows *et al.*, *Trends Immunol.*, 27:11-16, 2006.
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Tech. Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.
- Celluzzi *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183 283-287, 1996.
- Chapuis, A. G., *et al.* (2016). "T-Cell Therapy Using IL-21 Primed CTL Combined with CTLA-4 Blockade Results in Longterm Cell Persistence and Durable Tumor Regression " J Clin Oncol, in press.
- Cheson and Leonard, *N. Eng. J. Med.*, 359:613-626, 2008.
- Cleary *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(29):18747-9, 1994.
- Coiffier *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 346:235-242, 2002.

- Collins *et al.*, *Nature*, 371:626-629, 1994.
- Coulie, P. G., *et al.* (1994). "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas [see comments]." *Journal of Experimental Medicine* 180(1): 35-42.
- Cumber *et al.*, *J. Immunol.*, 149B:120-126, 1992.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Di Nicola *et al.*, *Blood*, 113:18-27, 2009.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.
- Drin *et al.*, *AAPS Pharm. Sci.*, 4(4):E26, 2002.
- Du *et al.*, *J. Pept. Res.*, 51:235-243, 1998.
- Dudley *et al.*, *J. Immunol.*, 26(4):332-342, 2003.
- Elliott and O'Hare, *Cell*, 88:23-233, 1997.
- European Patent 0 216 846
- European Patent 0 256 055
- European Patent 0 323 997
- European Patent Appl. 89303964.4
- Frankel and Pabo, *Cell*, 55:189-1193, 1988.
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Goding, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Goeddel, *Methods Enzymol.*, 185:3-7, 1990.
- Gritti *et al.*, *Blood*, 92:368-373, 1998.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.
- Guo *et al.*, *Nature*, 360:364-366, 1992.
- Gupta *et al.*, *Biomaterials*, 26:3995-4021, 2005.
- Hawkins *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 21(6):665-72, 2010.
- Herling *et al.*, *Am. J. Surg. Pathol.*, 31:1123-1129, 2007.
- Herling *et al.*, *Blood*, 114(21):4675-4686, 2009.
- Hida *et al.*, *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 51:219-228, 2002.
- Houot and Levy, *Blood Rev.*, 23:137-142, 2009.
- Hoyer *et al.*, *J. Immunol.*, 175:864-873, 2005.
- Hoyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14392-14397, 2002.
- Inoges *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 98:1292-1301, 2006.
- Irvine *et al.*, *Nature*, 419:845-849, 2002.
- Kang *et al.*, *Blood*, 105:1288-1294, 2005.
- Kang *et al.*, *Science*, 240:1034-1036, 1988.

10

20

30

40

- Kawakami, Y., et al. (1995). "Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression." *Journal of Immunology* 154(8): 3961-3968.
- Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.
- Kohler *et al.*, *Methods Enzymol.*, 178:3, 1989. 10
- Kreier *et al.*, In: *Infection, Resistance and Immunity*, Harper and Row, New York, 1991.
- Kwak *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 327:1209-1215, 1992.
- Laine *et al.*, *Molec. Cell*, 6:395-407, 2000.
- Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 331:13-26, 2008.
- Lenert *et al.*, *Science*, 248:1639-1643, 1990.
- Liddy N. *et al.*, Monoclonal TCR-redirection tumor cell killing. *Nat Med* 18(6):980-7, 2012.
- Lin *et al.*, *Immunol. Cell Biol.*, 86:353-362, 2008.
- Lin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:4255-14258, 1995. 20
- Liu *et al.*, *Cell Mol. Biol.*, 49(2):209-216, 2003.
- Malyguine *et al.*, *J. Transl. Med.*, 2:9, 2004.
- Marcus *et al.*, *Blood*, 105:1417-1423, 2005.
- Maus *et al.*, *Nat. Biotech.*, 20:143-148, 2002.
- McKee *et al.*, *J Transl Med.* 3:35, 2005.
- McLaughlin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 16:2825-2833, 1998.
- Melief and van der Burg, *Nat. Rev. Cancer*, 8:351-360, 2008.
- Moorthy *et al.*, *PLoS Med.*, 1(2):e33, 2004.
- Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987. 30
- Narducci *et al.*, *Cancer Res.*, 57:5452-5456, 1997b.
- Narducci *et al.*, *Cancer Res.*, 60:2095-2100, 2000.
- Narducci *et al.*, *Oncogene*, 15:919-926, 1997a.
- Narducci *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:11712-11717, 2002.
- Navarrete *et al.*, *Blood*, 117:1483-1491, 2011.
- Neelapu *et al.*, *Nat. Med.*, 11:986-991, 2005.
- Neelapu *et al.*, *Blood*, 15:109(12):5160-5163, 2007. 40
- Nestle *et al.*, *Nat. Med.*, 4:328, 1998.
- Oates J. *et al.* ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which (2015) *Mol Immunol.* 2015 Oct;67(2 Pt A):67-74.
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.

- Owens and Haley, *J. Biol. Chem.*, 259, 14843-14848, 1987.
- Pack *et al.*, *Biochem.*, 31:1579-1584, 1992.
- Park and Neelapu, *Br. J. Haemat.*, 142:179-191, 2008.
- PCT Publn. WO 99/26299
- Pekarsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:19643-19648, 2008.
- Pollack, S. M., R. L. Jones, E. A. Farrar, S. R. Riddell, and C. Yee. 2014. Tetramer Guided Cell Sorter Assisted Production of Clinical Grade Autologous NY-ESO-1 Specific CD8+ T Cells. *Journal of Immunotherapy of Cancer* in press.
- Popescu *et al. Blood*, 15:109(12):5407-5410, 2007.
- Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Quintarelli *et al.*, *Blood*, 117:3353-3362, 2011.
- Ramuz *et al.*, *Int. J Oncol.*, 26:151-157, 2005.
- Remington, In: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., Lippincott Williams and Wilkins, 2005.
- Remington, In: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., Pharmaceutical Press, 2011.
- Ribas *et al.*, *Trends Immunol.*, 24:58-61, 2003.
- Riddell *et al.*, *J. Immunol.*, 128(2):189-201, 1990.
- Rojas *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:27456-27461, 1996.
- Rojas *et al.*, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 41:55-56, 1998.
- Said *et al.*, *Lab. Invest.* 81:555-564, 2001.
- Samino *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:6358-6365, 2006.
- Sasso *et al.*, *J. Immunol.*, 142:2778-2783, 1989.
- Seaman BJ, et al. Audiovestibular dysfunction associated with adoptive cell immunotherapy for melanoma. *Otolaryngology--head and neck surgery; Otolaryngol Head Neck Surg* May 17, 2012.
- Schuster *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 29(20):2787-94, 2011.
- Schwarze *et al.*, *Trends in Cell Biol.*, 10:290-295, 2000.
- Schwenzer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:19368-19374, 1999.
- Shorki *et al.*, *J. Immunol.*, 146:936-940, 1991.
- Silvermann *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 96:417-426, 1995.
- Skull and Kemp, *Arch. Dis. Child.*, 74:527-530, 1996.
- Stryhn *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 30:3089-3099, 2000.
- Teitell, *Nat. Rev. Cancer*, 5:640-648, 2005.
- Timmerman *et al.*, *Blood*, 99:1517-1526, 2002.
- Virgilio *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3885-3889, 1998.
- Wakim *et al.*, *Nature*, 471:629-632, 2011.
- Wang and Wang, *Nat. Biotechnol.*, 20:149-154, 2002.
- Yee *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 261(1-2):1-20, 2002.

10

20

30

40

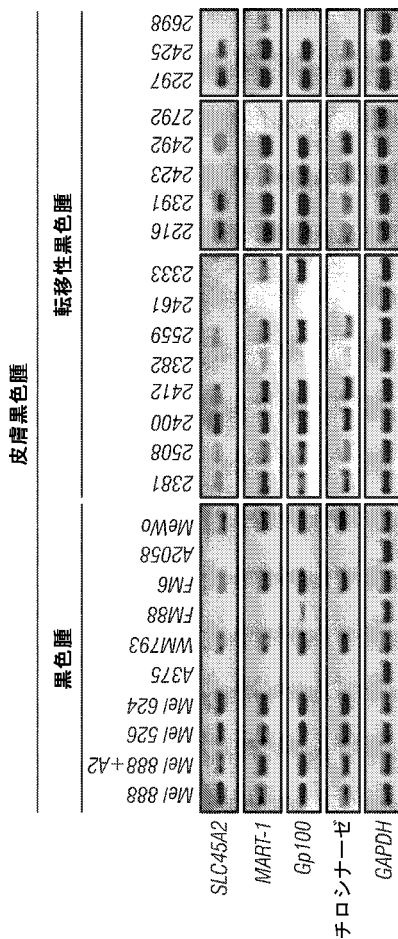
Yee, C., et al., Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16168-16173, 2002b.

Yee *et al.* The use of endogenous T cells for adoptive transfer. *Immunological reviews* 257: 250-263. 2014.

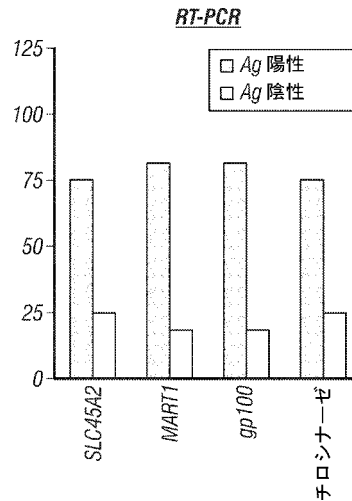
Young *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183:-11, 1996.

Zwaveling *et al.*, *J. Immunol.*, 169:350-358, 2002.

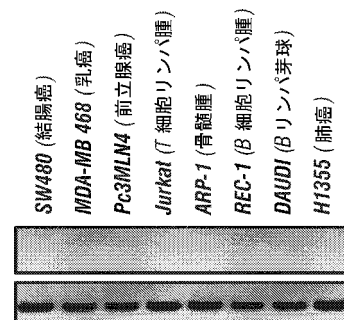
【図 1 A】



【図 1 B】

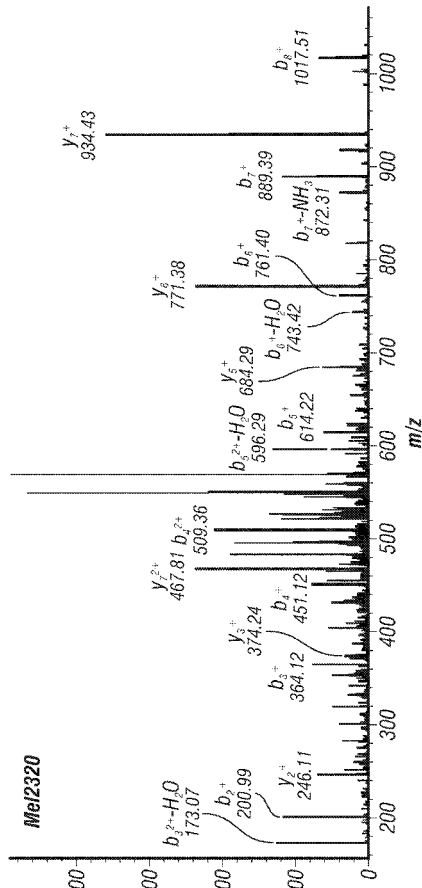


【図 1 C】



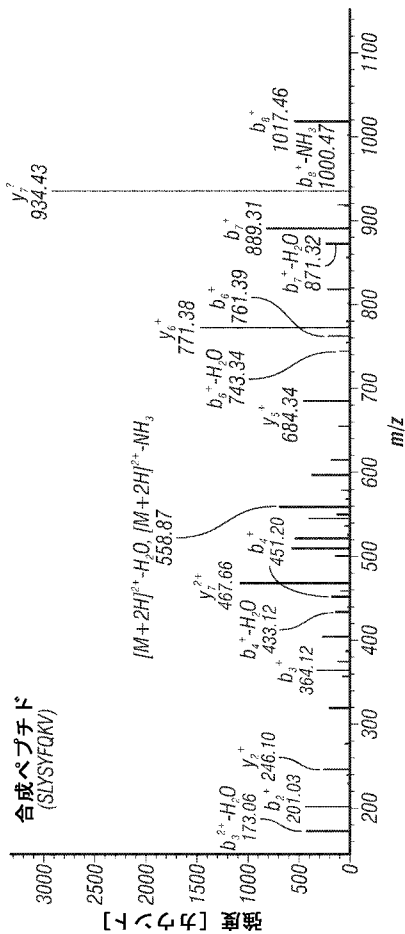
【図 2 A - 1】

以下からの抜粋 : C:\data\2013Q2\June 2013\060513MHC1-2320-control2.raw #1852 RT: 25.55
ITMS, CID@30.00, z = +2, Mono m/z = 567.79547 Da, MH+ = 1134.58367 Da, Match Tol. = 0.8 Da



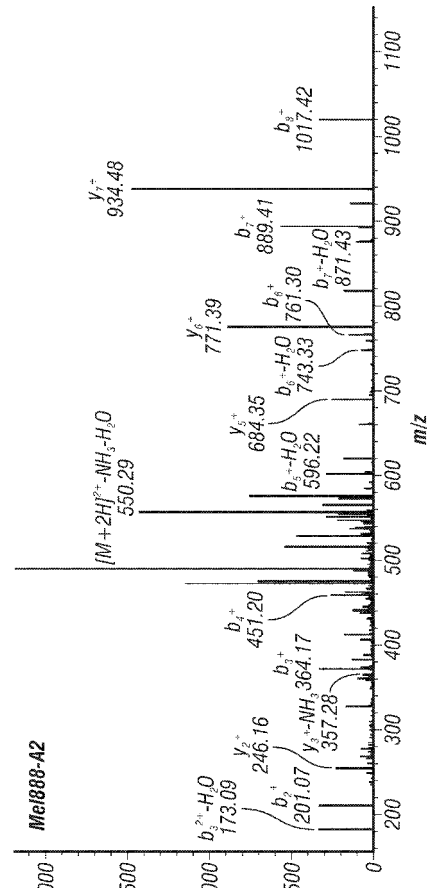
【図 2 A - 3】

以下からの抜粋 : C:\data\2015Q3\August\082415mhc-peps-slc45a2-s.raw #1950 RT: 16.54
ITMS, CID@30.00, z = +2, Mono m/z = 567.79535 Da, MH+ = 1134.58342 Da, Match Tol. = 0.8 Da



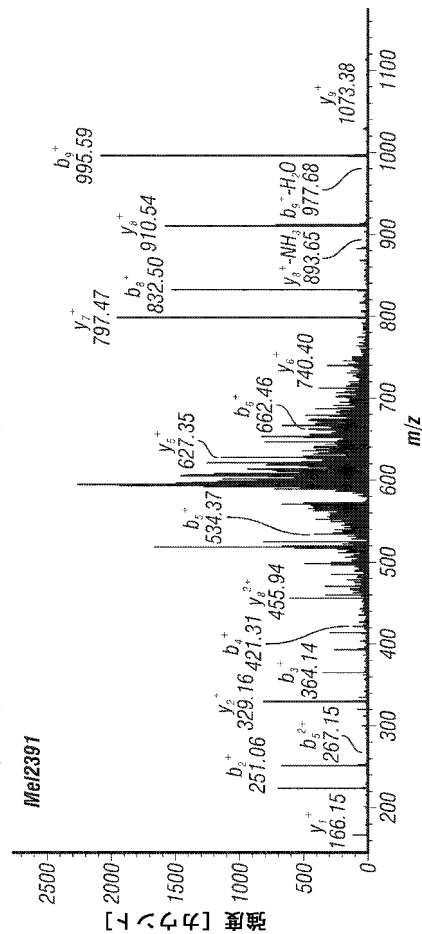
【図 2 A - 2】

以下からの抜粋 : C:\data\2014Q2\April\040114MHC1-Mel888-wt-C.raw #2361 RT: 32.79
ITMS, CID@30.00, z = +2, Mono m/z = 567.79498 Da, MH+ = 1134.58269 Da, Match Tol. = 0.8 Da

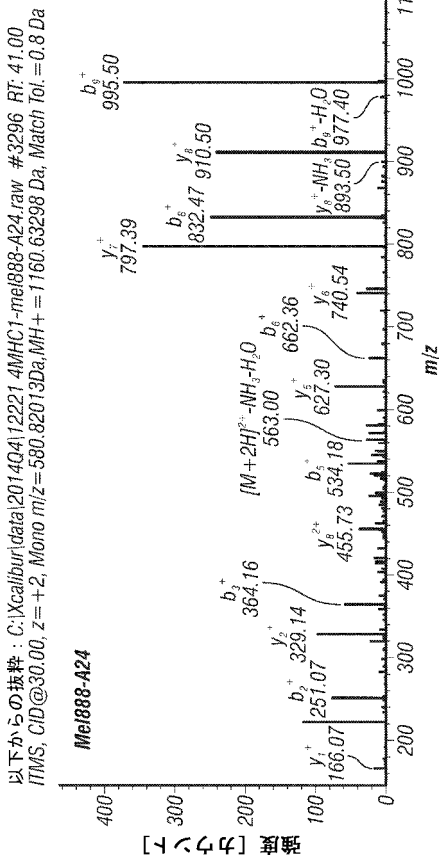


【図 2 B - 1】

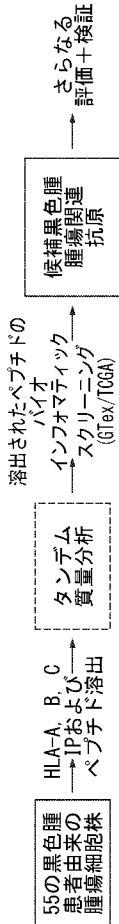
以下からの抜粋 : C:\Xcalibur\data\2014Q3\092514mhc1-MC-2391.raw #3014 RT: 40.59
ITMS, CID@30.00, z = +2, Mono m/z = 580.82178 Da, MH+ = 1160.63628 Da, Match Tol. = 0.8 Da



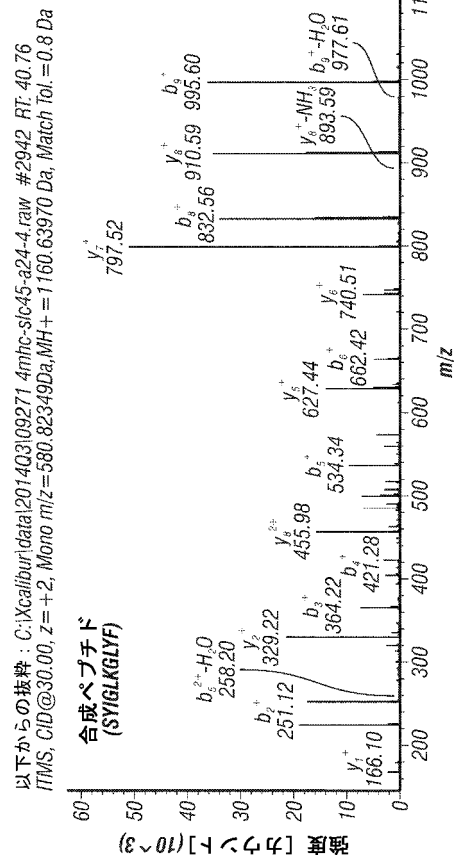
【図 2 B - 2】



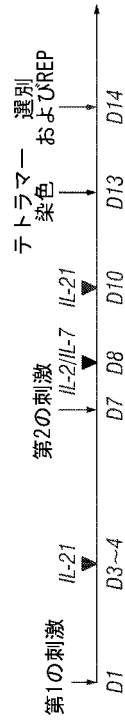
【図 2 C】



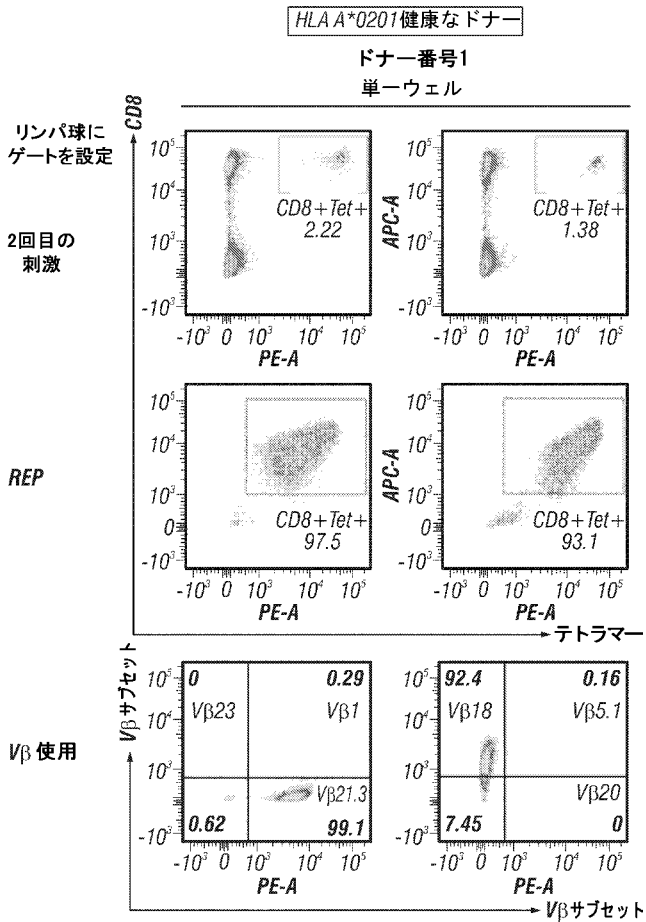
【図 2 B - 3】



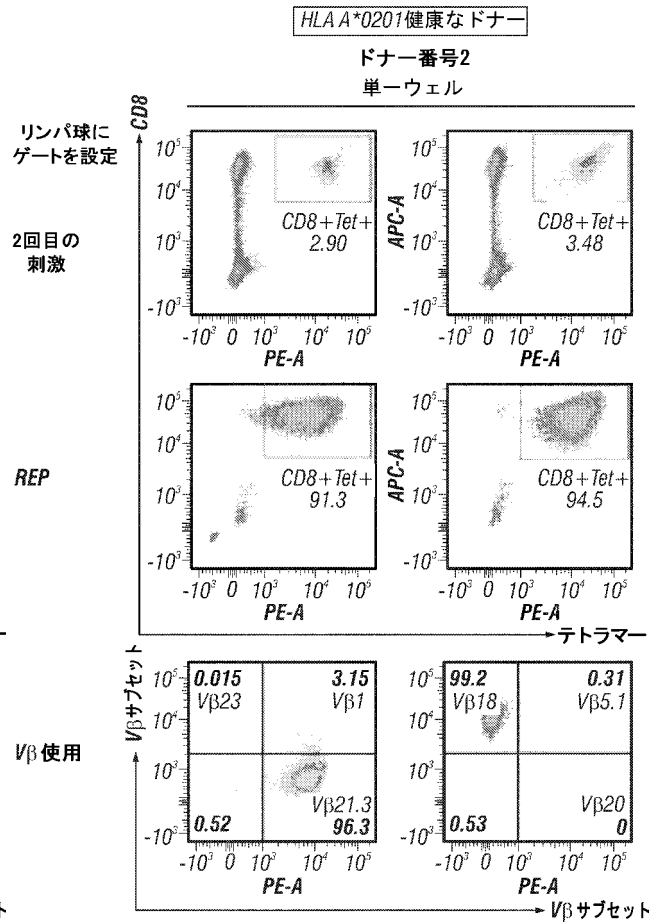
【図 3 A】



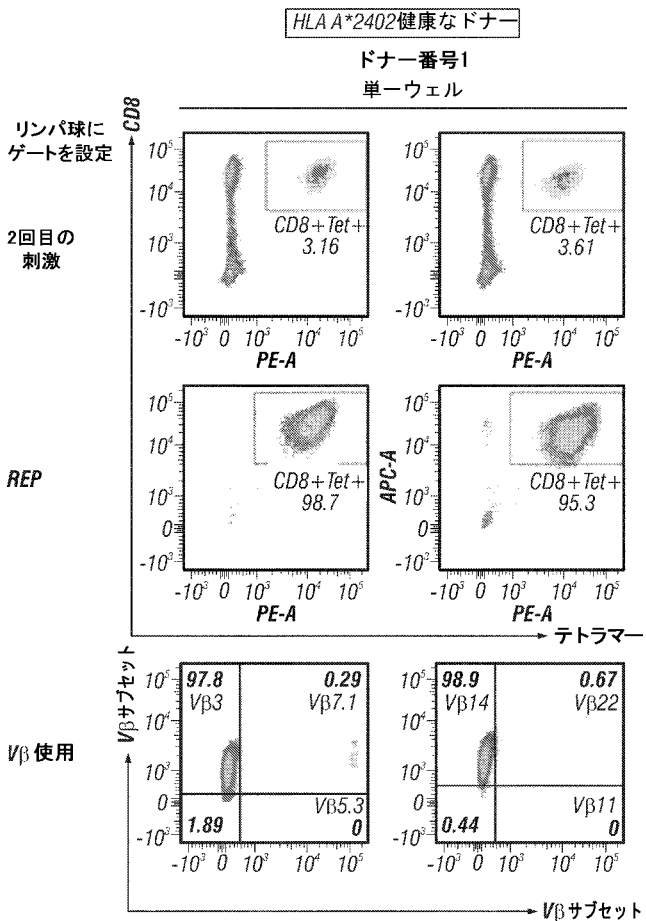
【図 3 B - 1】



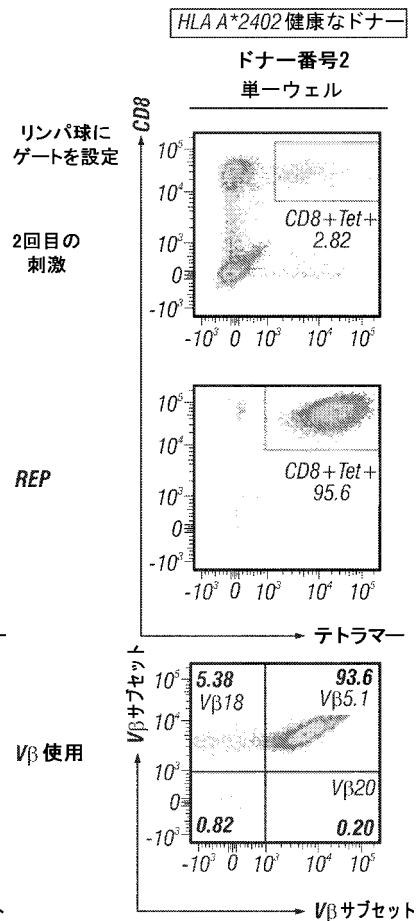
【図 3 B - 2】

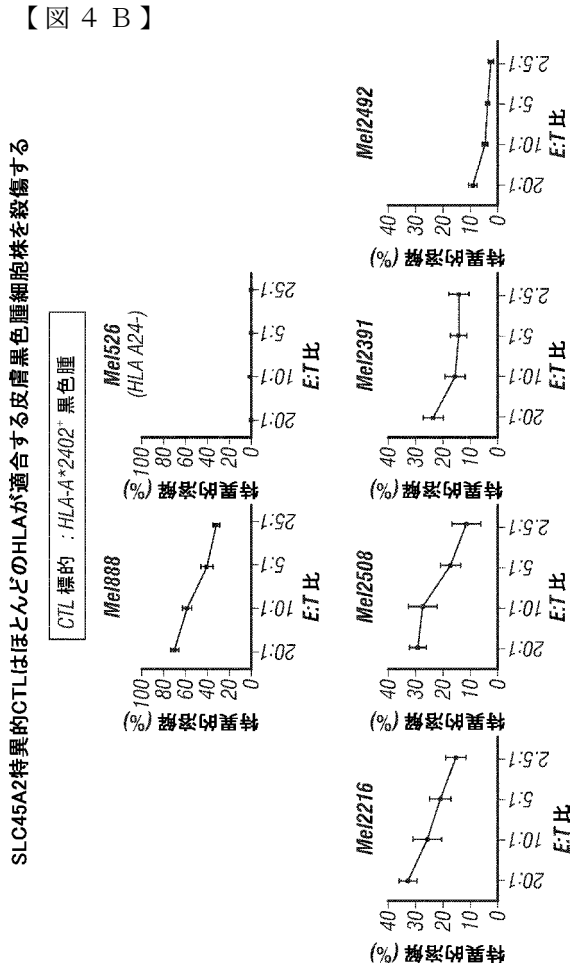
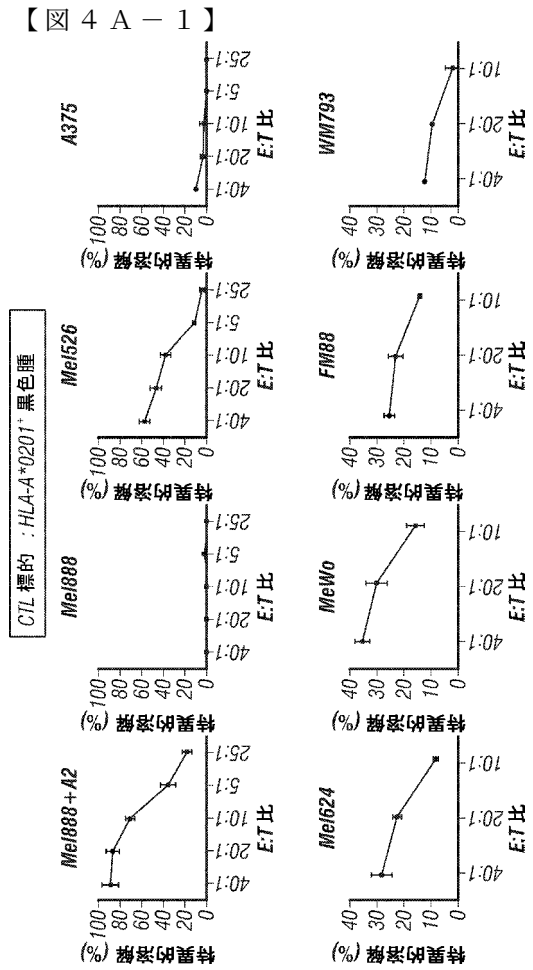
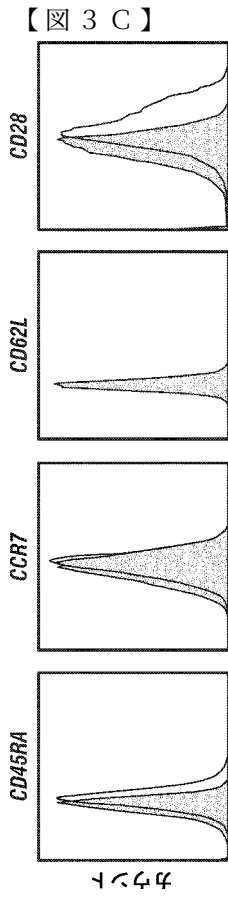


【図 3 B - 3】



【図 3 B - 4】

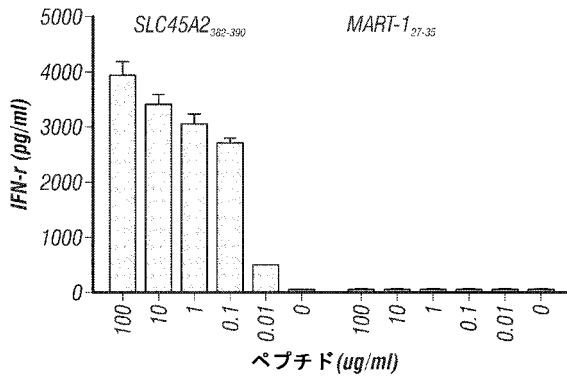




SLC45A2特異的CTLはほとんどのHLAが適合する皮膚黒色腫細胞株を殺傷する

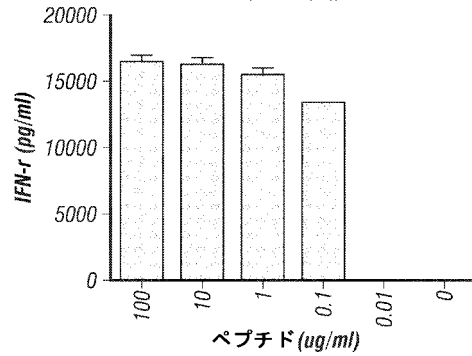
【図 4 C - 1】

滴定されたHLA-A*0201拘束性MDAペプチドに反応しての
MDA-特異的CTLによるIFN-ガンマ放出
SLC45A2T細胞



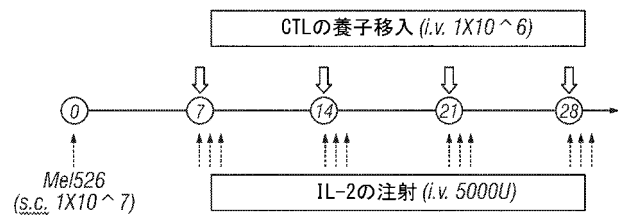
【図 4 C - 2】

Gp100 T細胞

gp100₁₅₄₋₁₆₂

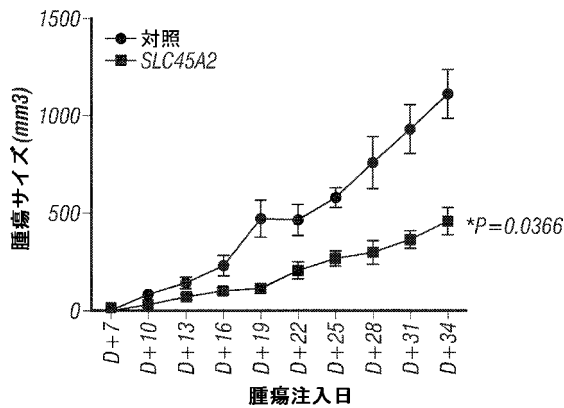
【図 4 D】

SLC45A2特異的CTLはほとんどのHLAが適合する皮膚黒色腫を殺傷する



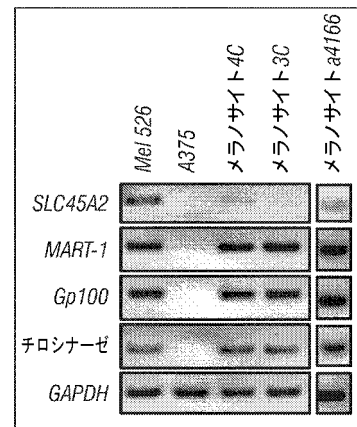
【図 4 E】

SLC45A2-特異的T細胞



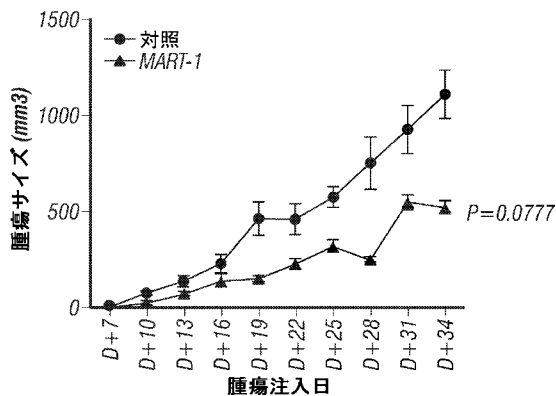
【図 5 A】

RT-PCR



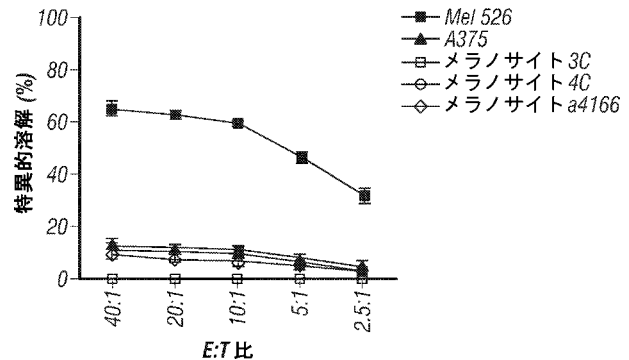
【図 4 F】

MART-1-特異的T細胞

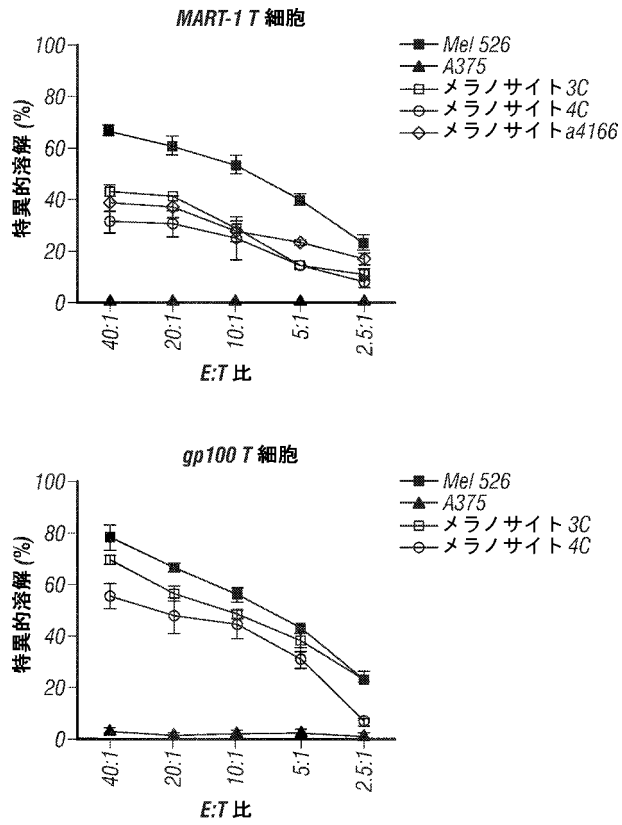


【図 5 B - 1】

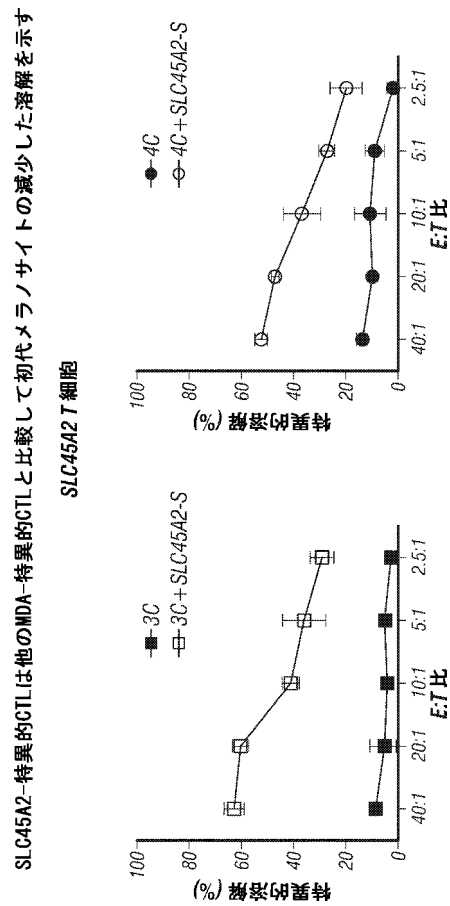
SLC45A2 T細胞



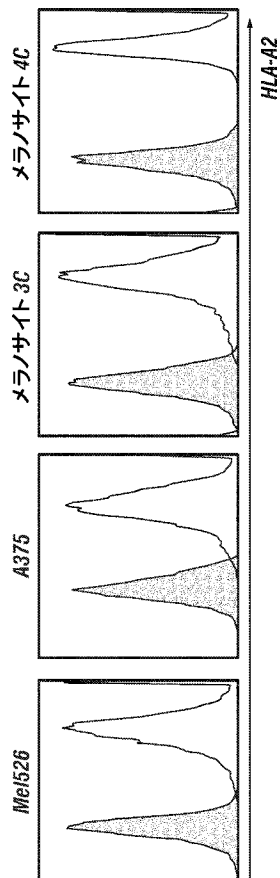
【図 5 B - 2】



【図 5 C】

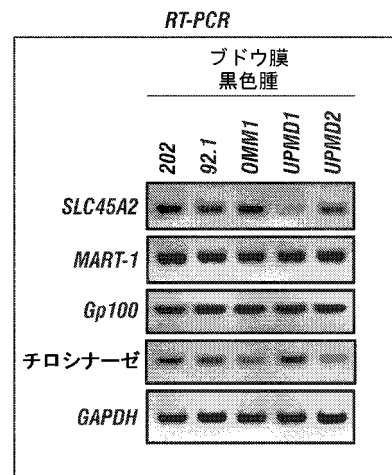


【図 5 D】



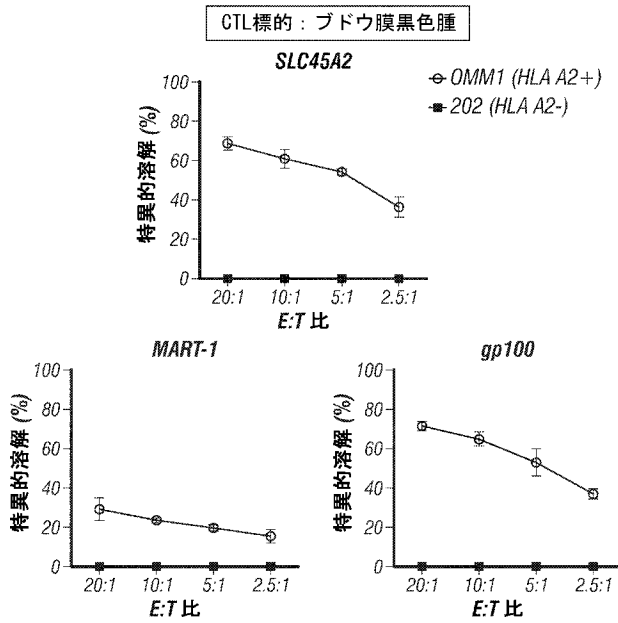
【図 6 A】

SLC45A2-特異的CTLはブドウ膜黒色腫および粘膜黒色腫細胞株に対して溶解活性を示す



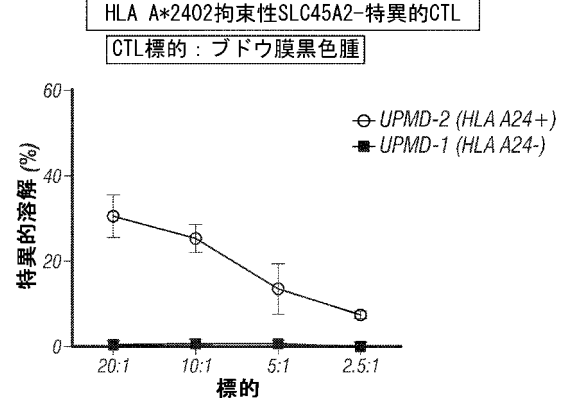
【図 6 B】

SLC45A2-特異的CTLはブドウ膜黒色腫および粘膜黒色腫細胞株に対して溶解活性を示す

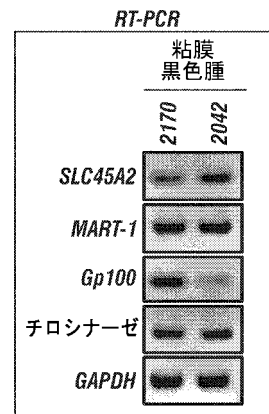


【図 6 C】

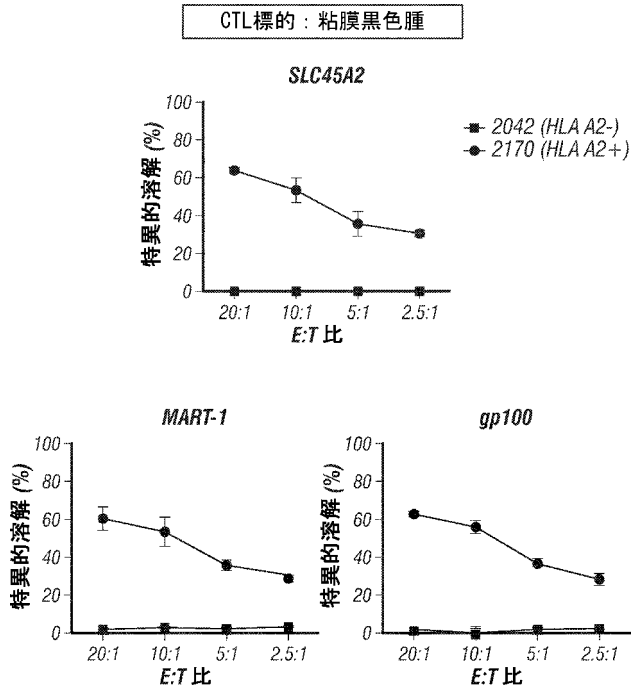
HLA A*2402拘束性SLC45A2-特異的CTLはブドウ膜黒色腫細胞株に対して溶解活性を示す



【図 6 D】

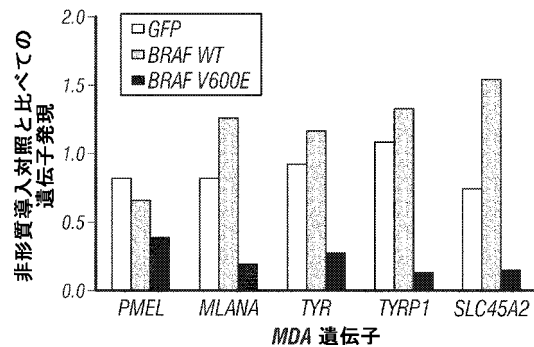


【図 6 E】

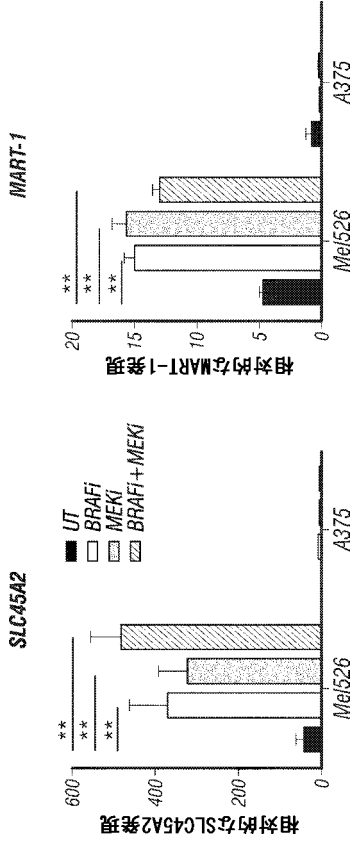


【図 7 A】

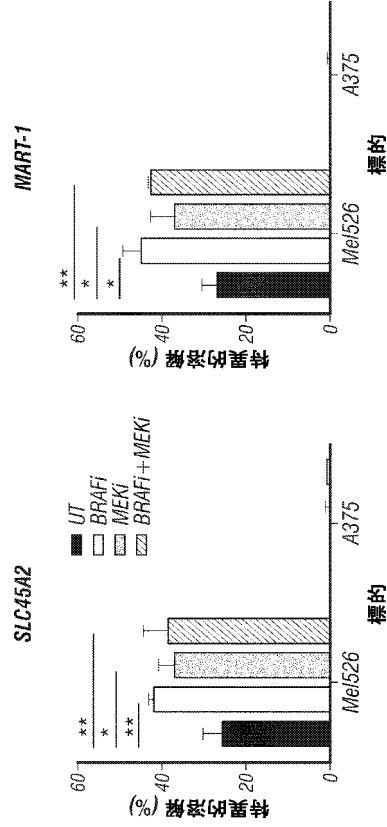
BRAF-形質導入メラノサイト



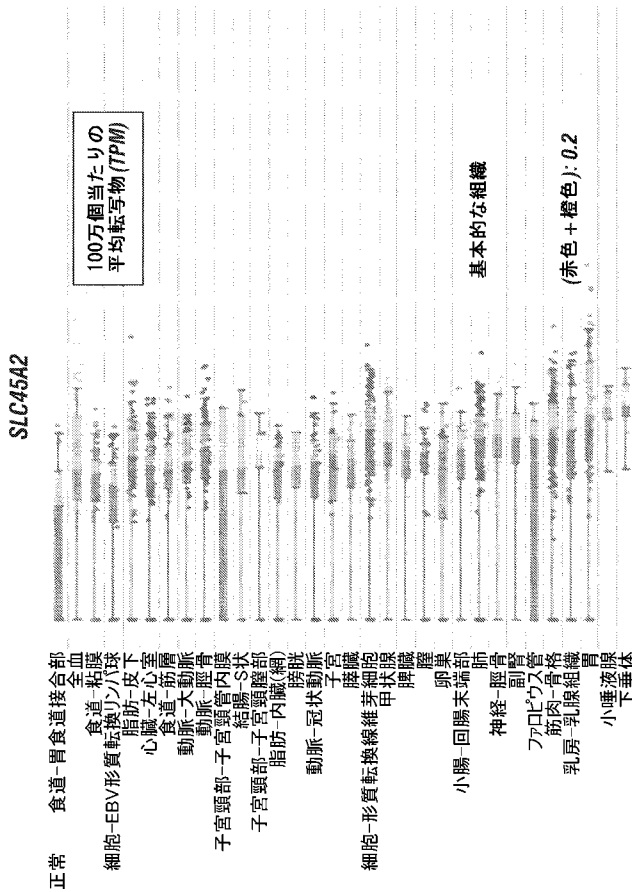
【図 7 B】



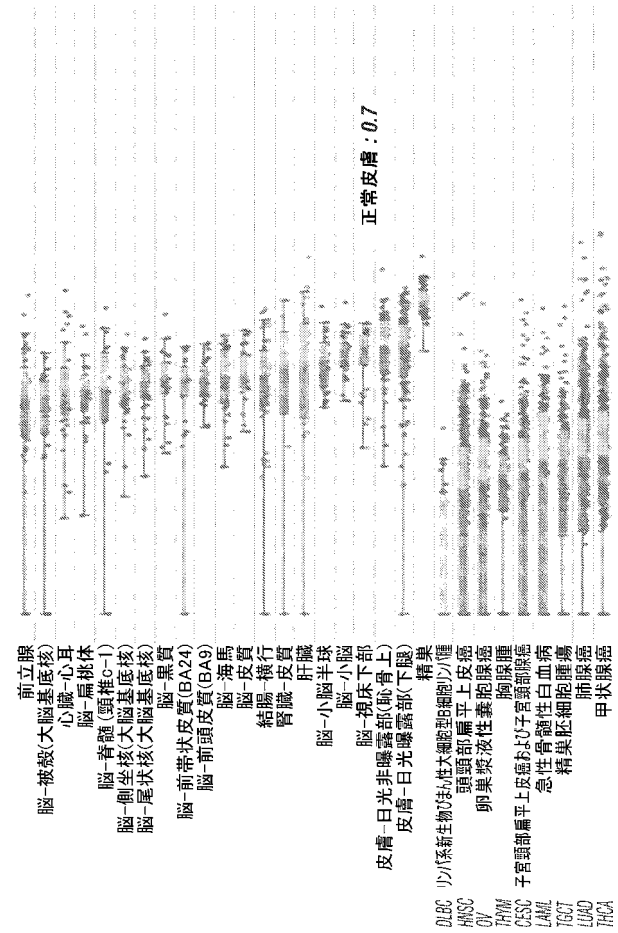
【図 7 C】



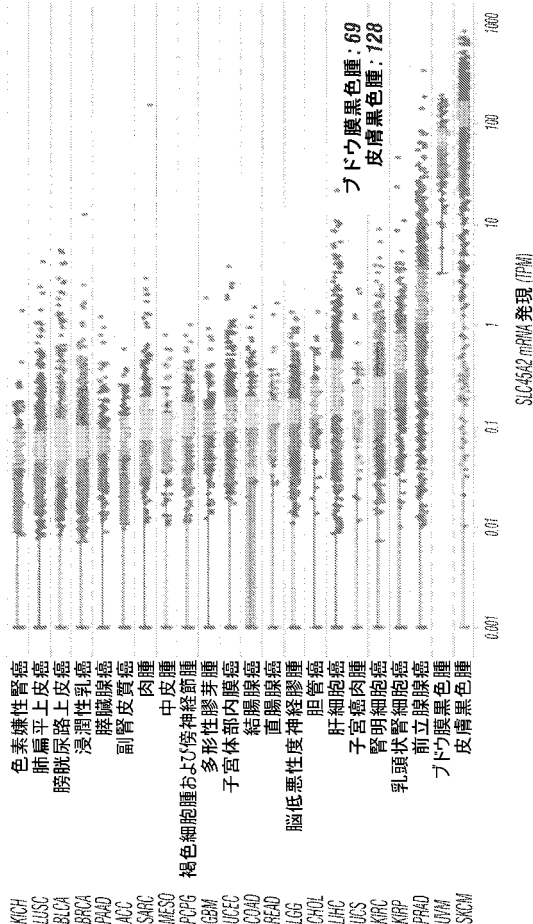
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



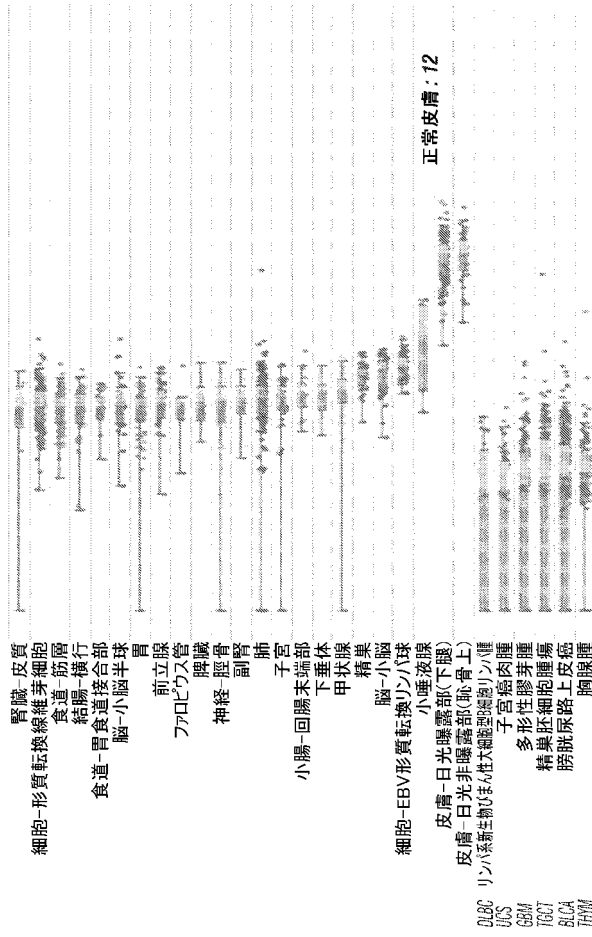
【図 8 - 3】



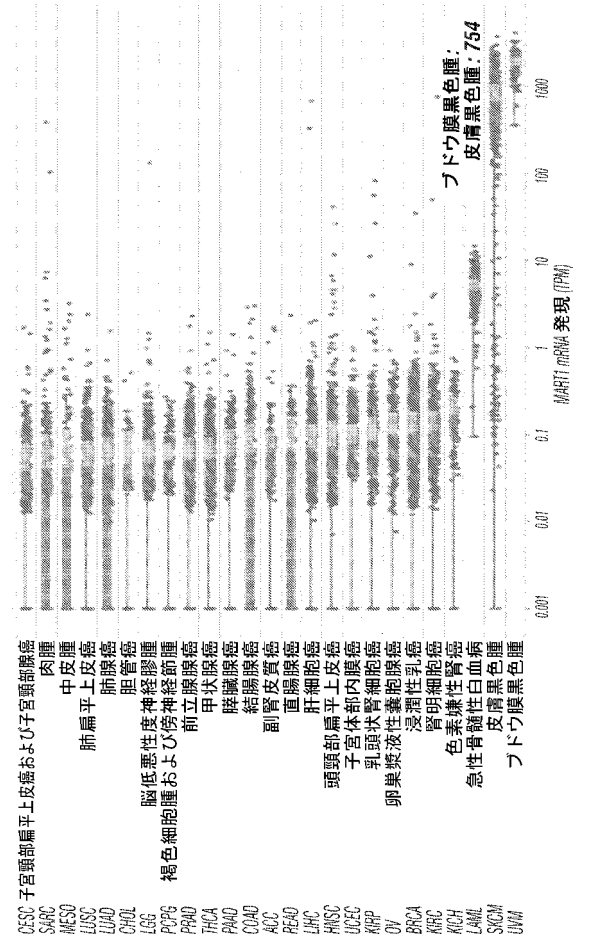
【図 8 - 4】



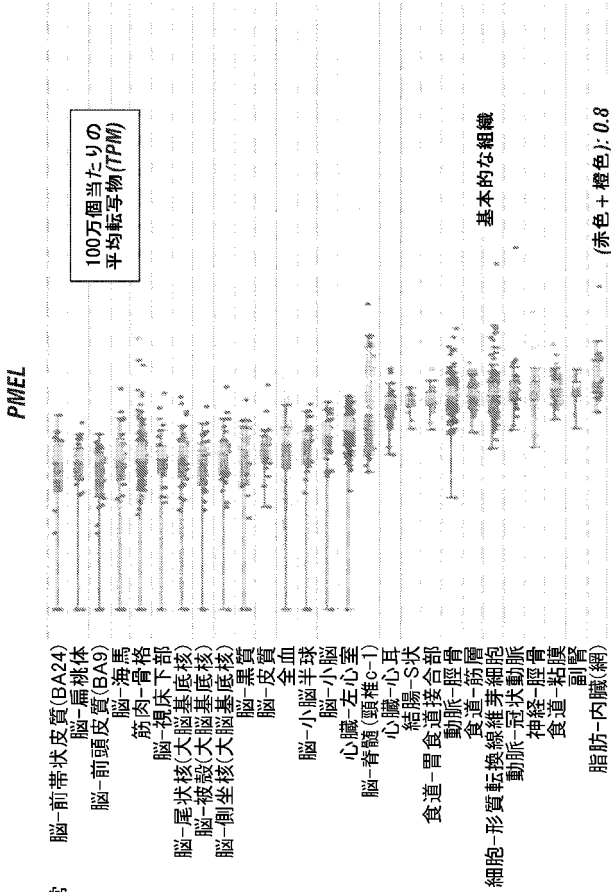
【図 8 - 5】



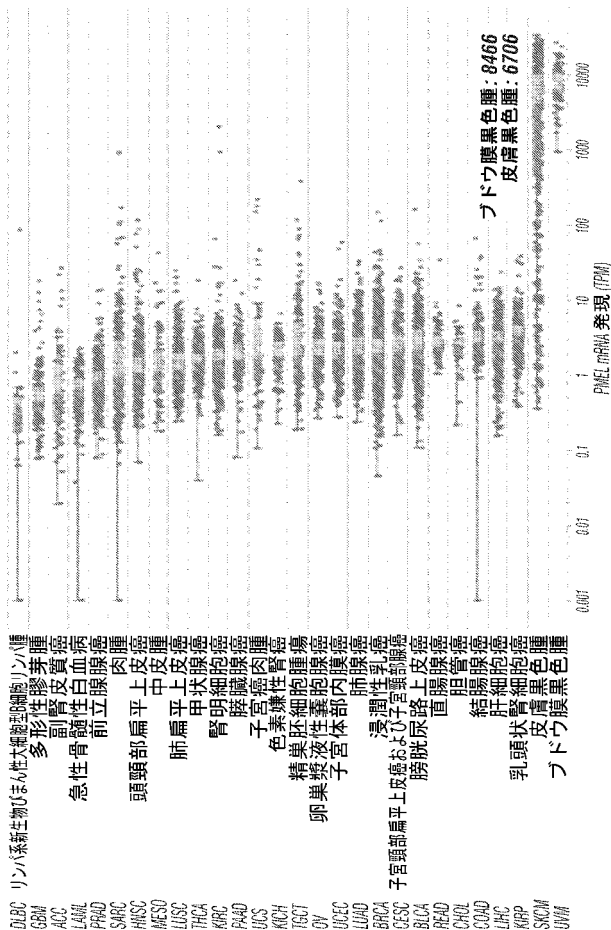
【図 8 - 6】



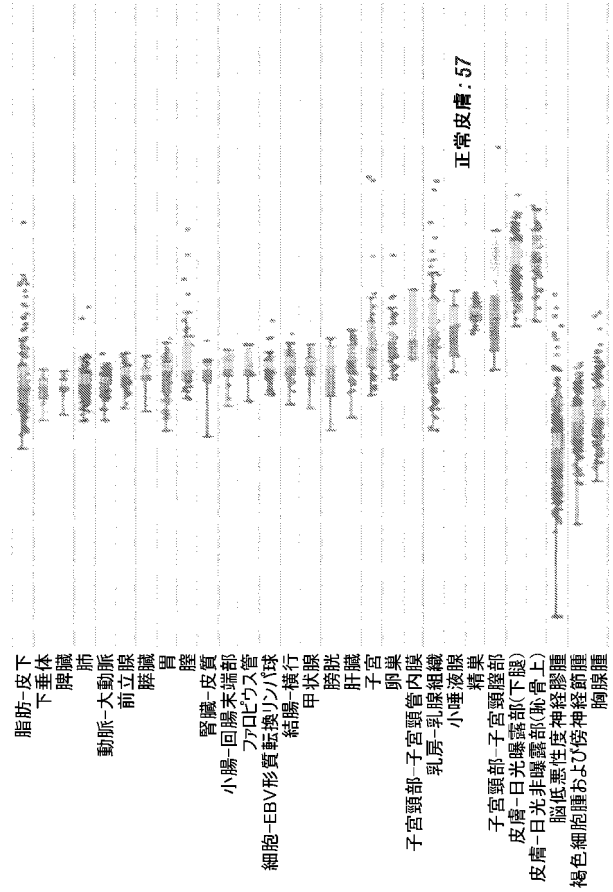
【图 8-7】



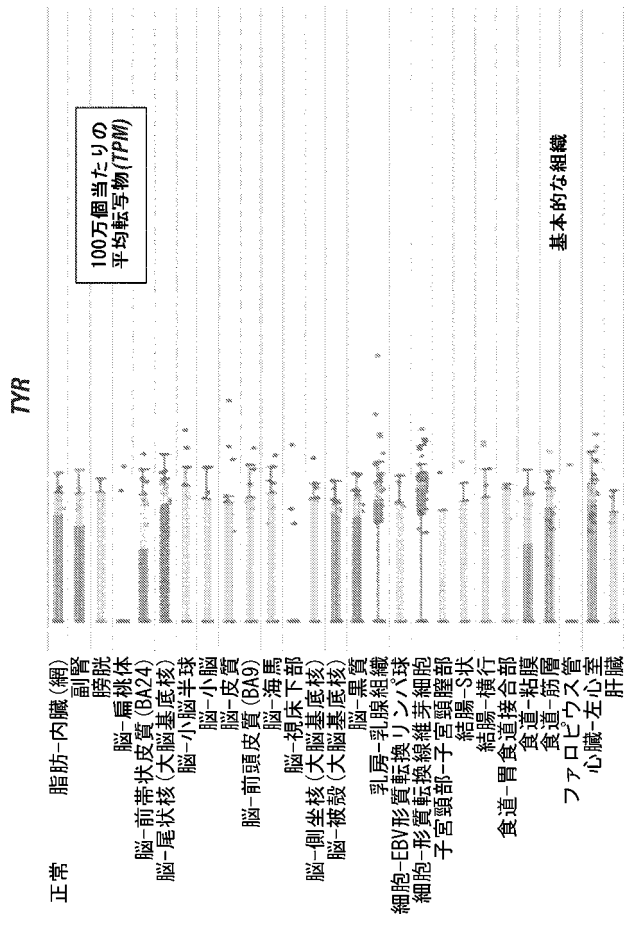
【 図 8 - 9 】



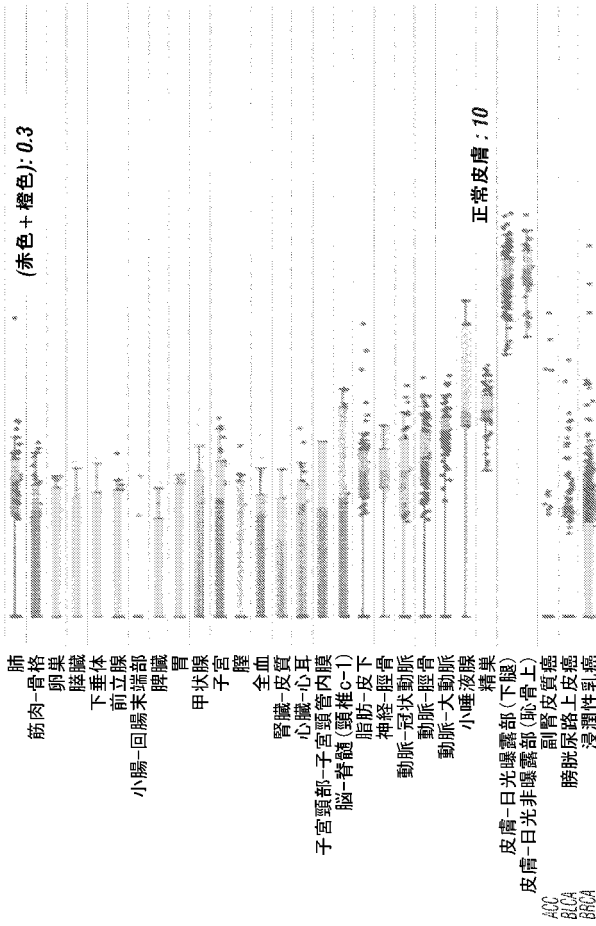
【图 8-8】



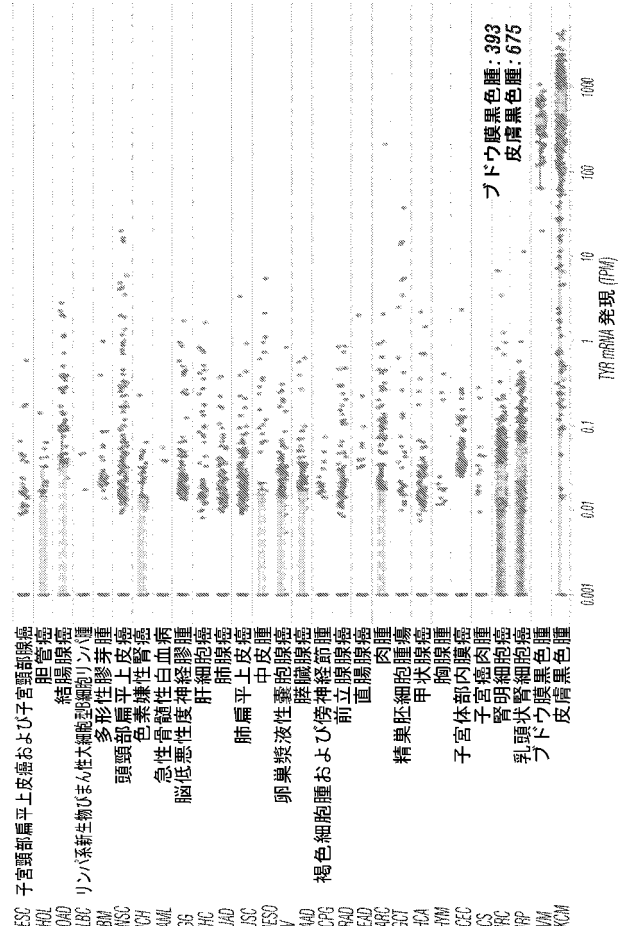
【图 8-10】



【図8-11】

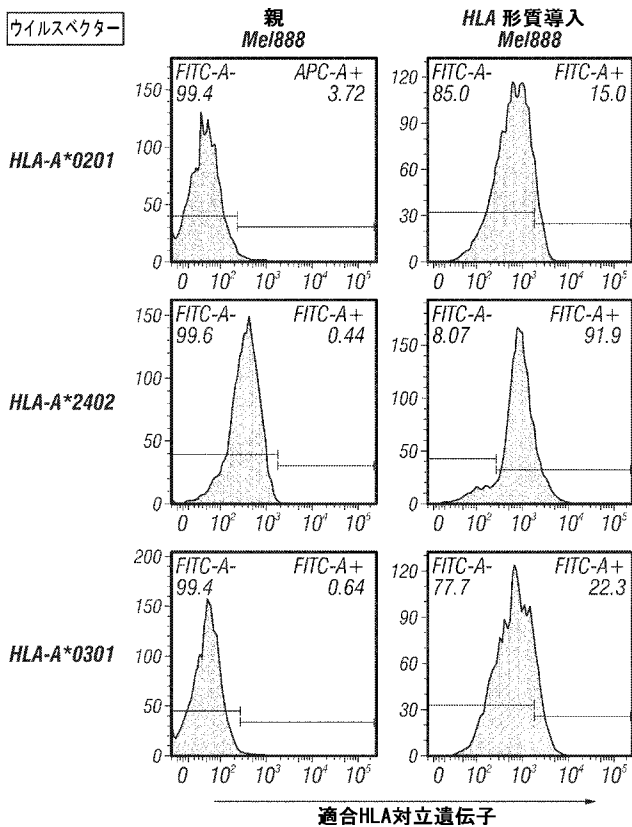


【図8-12】



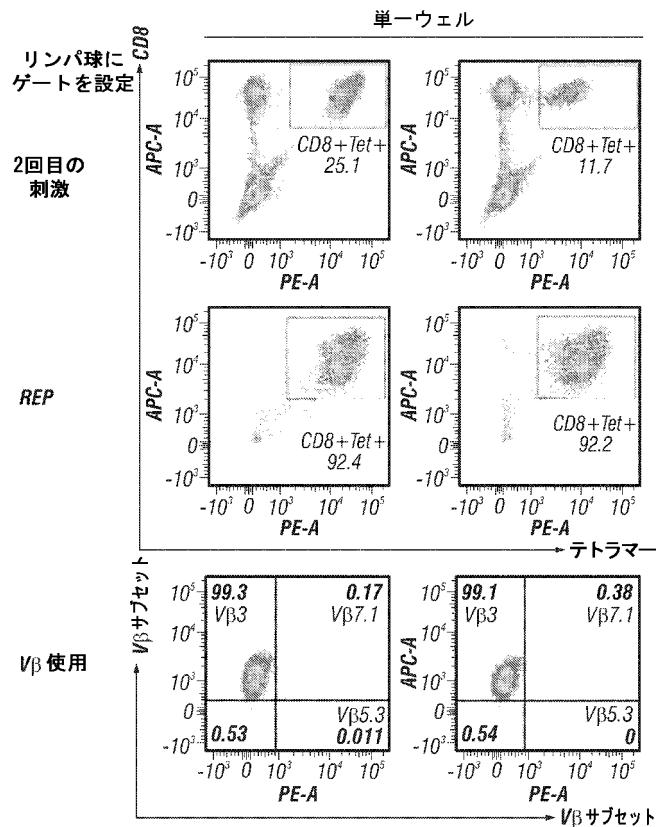
【図9】

ウィルススペクター

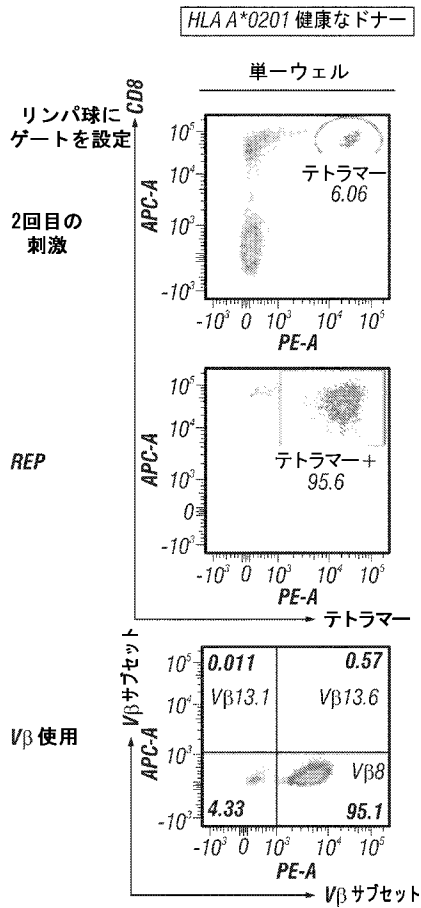


【図10-1】

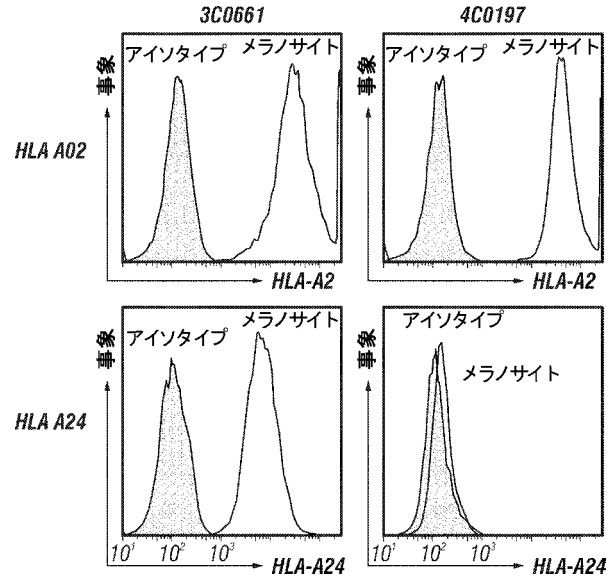
HLA A*0201 健康なドナー



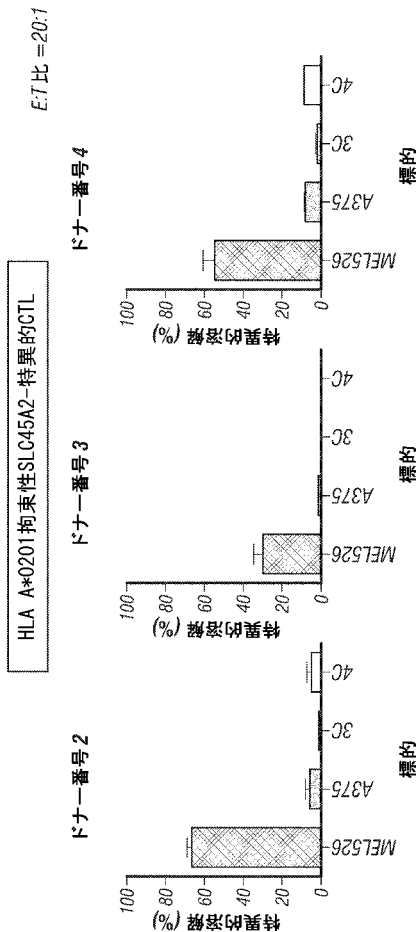
【図 10-2】



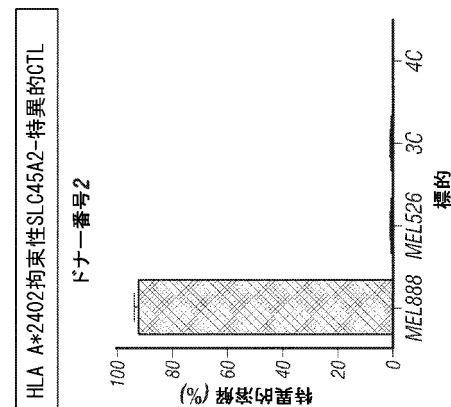
【図 11】



【図 12 A】

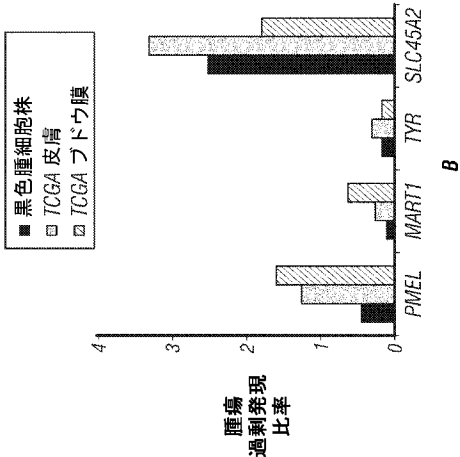


【図 12 B】

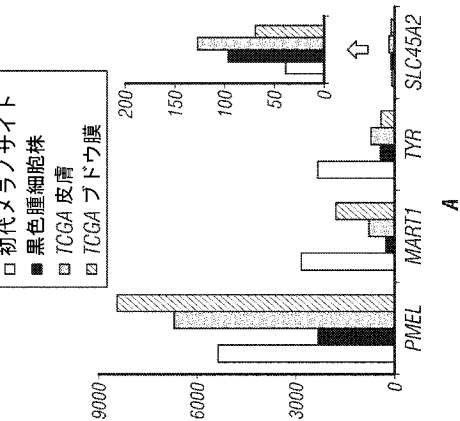


【図 1 3】

黒色腫および初代メラノサイトにおける
MDA遺伝子発現の比較



黒色腫および初代メラノサイトにおける
MDA遺伝子発現の比較



【配列表】

2019507582000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/064825

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1 and 2 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/064825

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 17-58, 61, 68-75
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/064825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/00; A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 11/00; C07K 14/435 (2017.01)

CPC - A61K 38/00; A61K 39/00; C07K 7/00; C07K 14/00 (2017.02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 424/130.1; 435/377; 530/324; 530/326 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20130217116 A1 (CARROLL et al) 22 August 2013 (22.08.2013) entire document	1-16, 59, 60, 62-67
A	US 20140206574 A1 (CHAPMAN et al) 24 July 2014 (24.07.2014) entire document	1-16, 59, 60, 62-67
A	US 20110177042 A1 (HERLYN et al) 21 July 2011 (21.07.2011) entire document	1-16, 59, 60, 62-67
A	US 20110086805 A1 (SOUFIR) 14 April 2011 (14.04.2011) entire document	1-16, 59, 60, 62-67

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 February 2017

Date of mailing of the international search report

03 MAR 2017

Name and mailing address of the ISA/US

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT INSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 C 0 8 7
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 K	38/10	(2006.01)	A 6 1 K 38/10	
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K	9/72	(2006.01)	A 6 1 K 9/72	
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K	9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K 35/17	A
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K	47/55	(2017.01)	A 6 1 K 47/68	
C 1 2 N	15/85	(2006.01)	A 6 1 K 47/55	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z
			C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リジー グレゴリー

アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン アルメダ ロード 9000 アパー

トメント 3301

(72)発明者 イー カシアン

アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン ファンニン ストリート 8181

アパートメント 1332

(72)発明者 フー パトリック

アメリカ合衆国 77005 テキサス州 ヒューストン プラム ストリート 3317

(72)発明者 ロスジク ジャノス

アメリカ合衆国 77054 テキサス州 ヒューストン エル パセオ ストリート 2120

アパートメント 2407

Fターム(参考) 4B064 AG27 AG31 CA10 CA19 CC24 DA05

4B065 AA94X AB01 AC20 BA30 BB19 BD39 CA44

4C076 AA11 AA19 AA24 AA93 BB11 BB13 BB15 BB16 BB27 CC07

CC27 FF11

4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA17 BA18 BA19

BA23 BA41 BA42 CA53 CA59 MA13 MA16 MA24 MA55 MA65

MA66 MA67 NA14 ZB09 ZB26

4C085 AA13 AA14 DD62 EE01 EE03

4C087 AA01 AA02 BB37 MA13 MA16 MA24 MA55 MA65 MA66 MA67

NA14 ZB09 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA10 BA15 CA41 DA76 DA86 EA22 EA28 FA20

FA74