

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-535853
(P2024-535853A)

(43)公表日 令和6年10月2日(2024.10.2)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	7/00 (2006.01)	C 0 7 K	7/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/74 (2006.01)	C 0 7 K	14/74		4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725		4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18		4 C 0 8 7
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全106頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-516885(P2024-516885)	(71)出願人	303055165	ユニヴェルシテ ド モントリオール カナダ エイチ3ティ 1ジェイ4 ケベ ック モントリオール エデュアル モ ンプティ ブールヴァール 2 9 0 0	
(86)(22)出願日	令和4年9月16日(2022.9.16)				
(85)翻訳文提出日	令和6年3月18日(2024.3.18)				
(86)国際出願番号	PCT/CA2022/051377				
(87)国際公開番号	WO2023/039673	(74)代理人	100147485	弁理士 杉村 憲司	
(87)国際公開日	令和5年3月23日(2023.3.23)	(74)代理人	230118913		
(31)優先権主張番号	63/261,315	(74)代理人	弁護士 杉村 光嗣	100230891	
(32)優先日	令和3年9月17日(2021.9.17)	(74)代理人	弁理士 里見 紗弥子		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	クラウド ペロー	カナダ国 エイチ2ブイ 2エックス1 ケベック モントリオール クロードーシ ャンバーニュ アベニュー 7 0	
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 結腸直腸がんに対する新規の腫瘍特異的抗原及びそれらの使用

(57)【要約】

結腸直腸がん（CRC）は、主に作用可能な免疫標的がないため、革新的な免疫療法から恩恵を受けていない。CRC細胞によって発現される新規の腫瘍特異的抗原（TSA）及び腫瘍関連抗原（TAA）が本明細書に記載される。本明細書に記載されるTSAのほとんどは、正常な組織では発現されないイントロン配列及び遺伝子間配列などの異常に発現される非変異ゲノム配列に由来する。これらのTSAに由来する核酸、組成物、細胞、抗体、及びワクチンが記載される。CRCの治療のためのTSA、核酸、組成物、抗体、細胞及びワクチンの使用もまた記載される。

【選択図】 図 1 3

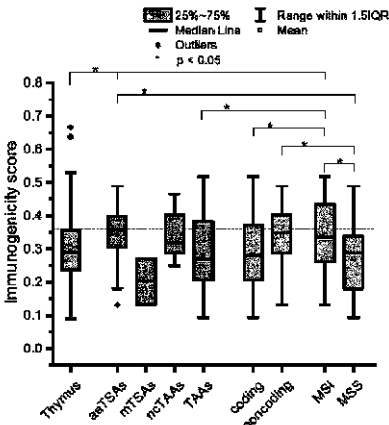


FIG. 13

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のアミノ酸配列：

【表 1】

配列	配列番号	配列	配列番号
SIETVNSL	6	KIGEVIVTK	16
RMLLSHTGK	1	TRSTIILHL	17
LPHRALSGI	2	SILRGSLGK	18
GTNPAAVK	3	RLVSNRVVR	19
LRHKLVLNR	4	SLKNLEPIK	20
RIGGVGVEK	5	RSAGPRAPL	21
TVNTQQYNTK	7	VLYRSVLLK	22
SVSHLHIF	8	KAAGAGAAK	23
TTLENLPQK	9		
AQKLQVRI	10		
GQIELSIYR	11		
HGALSIRSI	12		
RLMKFLPV	13		
SLYISEERK	14		
VQTAVLNV	15		

10

20

のうちの 1 つを含むか、若しくはそれらからなる、腫瘍抗原ペプチド（TAP）、又は前記 TAP をコードする核酸。

【請求項 2】

前記 TAP が、配列番号 6、1～5 及び 6～17 に定義される配列のうちの 1 つを含む、請求項 1 に記載の TAP 又は核酸。

30

【請求項 3】

HLA-A*02:01 分子に結合し、配列番号 6 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の TAP 又は核酸。

【請求項 4】

HLA-A*03:01 分子に結合し、配列番号 1、11、又は 14 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の TAP 又は核酸。

【請求項 5】

HLA-A*03:02 分子に結合し、配列番号 3、5、7、16、又は 23 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の TAP 又は核酸。

【請求項 6】

HLA-A*11:01 分子に結合し、配列番号 9 又は 18 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の TAP 又は核酸。

40

【請求項 7】

HLA-A*30:01 分子に結合し、配列番号 19、20 又は 23 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の TAP 又は核酸。

【請求項 8】

HLA-A*32:01 分子に結合し、配列番号 8 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の TAP 又は核酸。

【請求項 9】

HLA-B*07:02 分子に結合し、配列番号 2 又は 21 の配列を含む、請求項 1 又

50

は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 0】

H L A - B * 1 3 : 0 2 分子に結合し、配列番号 1 3 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 1】

H L A - B * 2 7 : 0 5 分子に結合し、配列番号 4 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 2】

H L A - B * 5 2 : 0 1 分子に結合し、配列番号 1 0、1 2 又は 1 5 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 3】

H L A - C * 0 6 : 0 2 分子に結合し、配列番号 1 7 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 4】

前記 T A P が、ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 5】

前記ゲノムの前記非タンパク質コード領域が、非翻訳転写領域 (U T R) である、請求項 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 6】

前記ゲノムの前記非タンパク質コード領域が、イントロンである、請求項 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 7】

前記ゲノムの前記非タンパク質コード領域が、遺伝子間領域である、請求項 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 8】

前記ゲノムの前記非タンパク質コード領域が、長い非コード R N A である、請求項 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【請求項 1 9】

前記核酸が、m R N A である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 0】

前記核酸が、D N A である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 1】

前記核酸が、ウイルスベクターの成分である、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に定義される T A P 又は核酸のうちの少なくとも 2 つを含む、組み合わせ。

【請求項 2 3】

請求項 1 に定義されるアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む、合成の長いペプチド (S L P)。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の T A P、核酸、組み合わせ、若しくは S L P を含む、小胞又は粒子。

【請求項 2 5】

前記小胞が、脂質ナノ粒子 (L N P) である、請求項 2 4 に記載の小胞又は粒子。

【請求項 2 6】

カチオン性脂質を含む、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の小胞又は粒子。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の T A P、核酸、組み合わせ若しくは S L P、又

10

20

30

40

50

は請求項 24～26 のいずれか一項に記載の小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 28】

請求項 1～23 のいずれか一項に記載の TAP、核酸、組み合わせ若しくは SLP、請求項 24～26 のいずれか一項に記載の小胞若しくは粒子、又は請求項 27 に記載の組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン。

【請求項 29】

単離された主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子であって、そのペプチド結合溝内に、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の TAP を含む、単離された MHC クラス I 分子。

10

【請求項 30】

多量体の形態である、請求項 29 に記載の単離された MHC クラス I 分子。

【請求項 31】

前記多量体が、四量体である、請求項 30 に記載の単離された MHC クラス I 分子。

【請求項 32】

(i) 請求項 1～18 のいずれか一項に記載の TAP、(ii) 請求項 19 に記載の組み合わせ、(iii) 請求項 23 に記載の SLP、又は(iv) 請求項 1～18 のいずれか一項に記載の TAP、請求項 19 に記載の組み合わせ、若しくは請求項 23 に記載の SLP をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを含む、単離された細胞。

20

【請求項 33】

単離された細胞であって、その表面において、主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子を発現し、前記 MHC クラス I 分子が、それらのペプチド結合溝内に、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の TAP 又は請求項 19 に記載の組み合わせを含む、単離された細胞。

【請求項 34】

抗原提示細胞 (APC) である、請求項 33 に記載の細胞。

【請求項 35】

前記 APC が、樹状細胞である、請求項 34 に記載の細胞。

【請求項 36】

請求項 29～31 のいずれか一項に記載の単離された MHC クラス I 分子、及び／又は請求項 32～35 のいずれか一項に記載の細胞の表面において発現された MHC クラス I 分子を特異的に認識する、T 細胞受容体 (TCR)。

30

【請求項 37】

請求項 29～31 のいずれか一項に記載の単離された MHC クラス I 分子、及び／又は請求項 33～35 のいずれか一項に記載の細胞の表面において発現された MHC クラス I 分子に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 38】

二重特異性抗体又はその抗原結合断片である、請求項 37 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 39】

前記二重特異性抗体又はその抗原結合断片が、一本鎖ダイアボディ (scDb) である、請求項 38 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 40】

前記二重特異性抗体又はその抗原結合断片が、T 細胞シグナル伝達分子にも特異的に結合する、請求項 38 又は 39 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 41】

前記 T 細胞シグナル伝達分子が、CD3 鎖である、請求項 40 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 42】

単離された細胞であって、その細胞表面において、請求項 36 に記載の TCR を発現す

50

る、単離された細胞。

【請求項 4 3】

C D 8 ⁺ T リンパ球である、請求項 4 2 に記載の単離された細胞。

【請求項 4 4】

請求項 4 2 又は 4 3 に定義される単離された細胞を少なくとも 0 . 5 % 含む、細胞集団。

【請求項 4 5】

対象において結腸直腸がんを治療する方法であって、前記対象に、有効量の：

(a) 配列番号 1 ～ 2 3 及び 2 5 ～ 5 0 に定義されるアミノ酸配列のうちの 1 つ、若しくは配列番号 1 ～ 2 3 及び 2 5 ～ 5 0 に示される配列のうちの少なくとも 1 つを含む合成の長いペプチド (S L P) を含むか、又はそれらからなる T A P 、

(b) (a) に定義される前記 T A P 、その組み合わせ、又は S L P をコードする、少なくとも 1 つの核酸、

(c) (a) に定義される前記 T A P 、それらの組み合わせ、若しくは S L P 、又は (b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸を含む、小胞又は粒子、

(d) (a) に定義される前記 T A P 、それらの組み合わせ、若しくは S L P 、 (b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸、又は (c) に定義される前記小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物、

(e) (a) に定義される前記 T A P 、それらの組み合わせ、若しくは S L P 、 (b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸、 (c) に定義される前記小胞若しくは粒子、又は (d) に定義される前記組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン、

(f) 細胞であって、その細胞表面において、 (a) に定義される前記 T A P 又はそれらの組み合わせをそれらのペプチド結合溝内に含む主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 分子を発現する、細胞、

(g) 細胞であって、その細胞表面において、 (f) に定義される前記細胞の表面において発現された M H C クラス I 分子を特異的に認識する T 細胞受容体 (T C R) を発現する、細胞、あるいは

(h) (f) に定義される前記細胞の表面で発現された M H C クラス I 分子に特異的に結合する、可溶性 T C R 、抗体、又はその抗原結合断片を投与することを含む、方法。

【請求項 4 6】

前記 T A P 若しくは核酸が、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記組み合わせが、請求項 2 2 に定義されるとおりであり、前記 S L P が、請求項 2 3 に定義されるとおりであり、前記小胞が、請求項 2 4 ～ 2 6 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記組成物が、請求項 2 7 に定義されるとおりであり、前記ワクチンが、請求項 2 8 に定義されるとおりであり、前記細胞が、請求項 3 2 ～ 3 5 、 4 2 、及び 4 3 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記細胞集団が、請求項 4 4 に定義されるとおりであり、かつ／又は前記抗体若しくは抗原結合断片が、請求項 3 7 ～ 4 1 のいずれか一項に定義されるとおりである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 C R C が、結腸がんである、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 C R C が、直腸がんである、請求項 4 5 又は 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法を、前記対象に投与することを更に含む、請求項 4 5 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

対象において結腸直腸がんを治療するための、又は対象において結腸直腸がんを治療す

10

20

30

40

50

るための医薬を製造するための：

(a) 配列番号 1～23 及び 25～50 に定義されるアミノ酸配列のうちの 1 つ、若しくは配列番号 1～23 及び 25～50 に示される配列のうちの少なくとも 1 つを含む合成の長いペプチド (SLP) を含むか、又はそれらからなる TAP、

(b) (a) に定義される前記 TAP、その組み合わせ、又は SLP をコードする、少なくとも 1 つの核酸、

(c) (a) に定義される前記 TAP、それらの組み合わせ、若しくは SLP、又は (b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸を含む、小胞又は粒子、

(d) (a) に定義される前記 TAP、それらの組み合わせ、若しくは SLP、(b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸、又は (c) に定義される前記小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物、

(e) (a) に定義される前記 TAP、それらの組み合わせ、若しくは SLP、(b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸、(c) に定義される前記小胞若しくは粒子、又は (d) に定義される前記組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン、

(f) 細胞であって、その細胞表面において、(a) に定義される前記 TAP 又はそれらの組み合わせをそれらのペプチド結合溝内に含む主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子を発現する、細胞、

(g) 細胞であって、その細胞表面において、(f) に定義される前記細胞の表面において発現された MHC クラス I 分子を特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) を発現する、細胞、あるいは

(h) (f) に定義される前記細胞の表面で発現された MHC クラス I 分子に特異的に結合する、可溶性 TCR、抗体、又はその抗原結合断片、の使用。

【請求項 52】

前記 TAP 若しくは核酸が、請求項 1～21 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記組み合わせが、請求項 22 に定義されるとおりであり、前記 SLP が、請求項 23 に定義されるとおりであり、前記小胞が、請求項 24～26 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記組成物が、請求項 27 に定義されるとおりであり、前記ワクチンが、請求項 28 に定義されるとおりであり、前記細胞が、請求項 32～35、42、及び 43 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記細胞集団が、請求項 44 に定義されるとおりであり、かつ／又は前記抗体若しくは抗原結合断片が、請求項 37～41 のいずれか一項に定義されるとおりである、請求項 55 に記載の使用。

【請求項 53】

前記 CRC が、結腸がんである、請求項 51 又は 52 に記載の使用。

【請求項 54】

前記 CRC が、直腸がんである、請求項 51 又は 52 に記載の使用。

【請求項 55】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法の前記対象への前記使用を更に含む、請求項 51～54 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 56】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、請求項 55 に記載の使用。

【請求項 57】

対象において結腸直腸がんを治療するために使用するための薬剤であって、前記薬剤が：

(a) 配列番号 1～23 及び 25～50 に定義されるアミノ酸配列のうちの 1 つ、若しくは配列番号 1～23 及び 25～50 に示される配列のうちの少なくとも 1 つを含む合成の長いペプチド (SLP) を含むか、又はそれらからなる TAP、

(b) (a) に定義される前記 TAP、その組み合わせ、又は SLP をコードする、少なくとも 1 つの核酸、

(c) (a) に定義される前記 TAP、それらの組み合わせ、若しくは SLP、又は (b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸を含む、小胞又は粒子、

(d) (a) に定義される前記 T A P、それらの組み合わせ、若しくは S L P、(b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸、又は (c) に定義される前記小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物、

(e) (a) に定義される前記 T A P、それらの組み合わせ、若しくは S L P、(b) に定義される前記少なくとも 1 つの核酸、(c) に定義される前記小胞若しくは粒子、又は (d) に定義される前記組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン、

(f) 細胞であって、その細胞表面において、(a) に定義される前記 T A P 又はそれらの組み合わせをそれらのペプチド結合溝内に含む主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 分子を発現する、細胞、

(g) 細胞であって、その細胞表面において、(f) に定義される前記細胞の表面において発現された M H C クラス I 分子を特異的に認識する T 細胞受容体 (T C R) を発現する、細胞、あるいは

(h) (f) に定義される前記細胞の表面で発現された M H C クラス I 分子に特異的に結合する、可溶性 T C R、抗体、又はその抗原結合断片である、薬剤。

【請求項 5 8】

前記 T A P 若しくは核酸が、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記組み合わせが、請求項 2 2 に定義されるとおりであり、前記 S L P が、請求項 2 3 に定義されるとおりであり、前記小胞が、請求項 2 4 ～ 2 6 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記組成物が、請求項 2 7 に定義されるとおりであり、前記ワクチンが、請求項 2 8 に定義されるとおりであり、前記細胞が、請求項 3 2 ～ 3 5、4 2、及び 4 3 のいずれか一項に定義されるとおりであり、前記細胞集団が、請求項 4 4 に定義されるとおりであり、かつ／又は前記抗体若しくは抗原結合断片が、請求項 3 7 ～ 4 1 のいずれか一項に定義されるとおりである、請求項 6 1 に記載の使用するための薬剤。

【請求項 5 9】

前記 C R C が、結腸がんである、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の使用するための薬剤。

【請求項 6 0】

前記 C R C が、直腸がんである、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の使用するための薬剤。

【請求項 6 1】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法の前記対象への前記使用を更に含む、請求項 5 7 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の使用するための薬剤。

【請求項 6 2】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法の、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、請求項 6 1 に記載の使用するための薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、2 0 2 1 年 9 月 1 7 日に出願された米国仮特許出願第 6 3 / 2 6 1 , 3 1 5 号の利益を主張する。

【0 0 0 2】

本開示は、概して、腫瘍学の分野に関し、より具体的には、結腸直腸がんなどのがんの治療に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

結腸直腸がん (C R C) は、世界で 3 番目に多く一般的に診断されているがんであり、がんによる死亡の 2 番目に多い原因であり、2 0 1 8 年だけで 1 8 0 万人を超える症例があり、8 8 1 , 0 0 0 人の死亡が推定されている (1)。C R C の発生率は、世界的な社会経済的変化が起こるにつれて増加すると予想され、2 0 3 0 年までに年間 2 2 0 万人の症例が予測され、1 1 0 万人の死亡が発生する (1、2)。この重大な疾患負荷は、この

10

20

30

40

50

疾患に対する新規かつ効果的な治療法を開発する必要性を強調するものである。

【0004】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の存在量と、結腸がん及び直腸がんの両方における全生存期間の増加との間の正の相関関係は、T細胞が、これらの腫瘍において生物学的に関連する腫瘍抗原を認識することができることを示唆する（3、4）。これらの抗原の潜在的な免疫原性は、免疫チェックポイント阻害（ICI）を、がん患者のための有望な治療にした。しかしながら、CRCにおけるそれらの有効性を評価する初期の臨床試験は、混合された結果が得られた。マイクロサテライト不安定性（MSI）として知られる反復DNA配列（マイクロサテライト）の蓄積を引き起こすミスマッチ修復タンパク質の欠損を特徴とする結腸直腸腫瘍は、抗PD1治療を用いた第I相臨床試験において相対的な成功を示している（5）。対照的に、そのような治療は、CRC症例のおよそ80%を構成する、高い変異負荷を有さないマイクロサテライト安定性（MSS）腫瘍に対する臨床試験において、ほとんど有効性がなかった（5、6）。

10

【0005】

CRCにおける免疫応答の重要性及びICI単独の限定的な成功を考慮すると、近年の研究のための有望な道筋は、ICIの有無にかかわらず使用することができ、理想的には、MSI腫瘍及びMSS腫瘍にわたる治療有効性のギャップを埋めることができる、ネオ抗原ベースのワクチン又はT細胞受容体ベースの療法である。例えば、正常細胞と比較してがん細胞で過剰発現される抗原である腫瘍関連抗原（TAA）は、CRCにおいて以前に特定されている（7、8）。いくつかのTAAは、ワクチン及びCRCに対する第I相臨床試験で試験されているが、ほとんどは、おそらく、胸腺によるそのような抗原の陰性選択に起因して、「限定的な成功」を満たすに過ぎなかった（9）。1つの研究では、遺伝子操作された抗CEA T細胞による転移性CRCの治療は、1名の患者では腫瘍退縮をもたらしたが、全ての患者において「重度の炎症性大腸炎」を引き起こし、有害な自己免疫応答が、TAAを使用することの別のあり得る負の結果であることを示している（10）。

20

【0006】

TAAに対する混合された応答に起因して、効果的なネオ抗原ベースの療法は、単一ヌクレオチドバリエーション、異常に発現された転写産物、又は新規のスプライシングイベントを含むがこれらに限定されない遺伝的変動、エピジェネティック変動及び翻訳後変動によって生成されてもよく、腫瘍によって排他的に発現される、腫瘍特異的抗原（TSA）を利用する可能性が更に高い（11）。CRCにおける単一ヌクレオチドバリエーション、スプライスバリエーション、及びINDEL変異の高い発生率は、腫瘍の主要組織適合複合体（MHC）によって固有の抗原が提示される可能性が高く、その結果、腫瘍特異的な免疫応答を誘発することが可能であり得ることを示唆している（12）。TSAは、近年、CRCにおいて特定されており、第I相及び第II相のワクチン試験でいくつかの成功を示している。MSI-高腫瘍に由来するフレームシフト抗原を使用した2015年のワクチン試験では、全ての患者で有意かつ特異的な免疫応答が示された（13）。しかしながら、本研究では、マイクロサテライト不安定性フレームシフトに由来する抗原を用いたため、これらの知見は、大多数のCRC患者には適用することができない。今日までのCRCにおけるTSAを特定する他の研究は、ゲノムのコード領域に由来する変異体TSA（mTSA）にのみ焦点を当ててきた（13、14）。MSS CRCオルガノイドの調査は、非サイレント変異の0.5%のみがmTSAとして特定されたことを明らかにした。これは、HLA結合予測ソフトウェアによって予測されたものよりも有意に低い割合であった（15）。加えて、以前の研究は、腫瘍細胞上のそれらのTSAの発現を定量化するために質量分析（MS）技術を用いず、これは、所与のTSAを標的とする治療可能性に影響を及ぼし得る情報である（13、14）。

30

40

【0007】

このことを考慮すると、CRCに対する治療的免疫応答を誘発させることができる腫瘍特異的抗原を特定することが急務である。かかる抗原は、ワクチン（±免疫チェックポイ

50

ント阻害剤)として、又はT細胞受容体ベースのアプローチ(細胞療法、二重特異性生物製剤)の標的として使用され得る。

【0008】

本記載には、いくつかの文献を参照し、それらの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0009】

様々な態様及び実施形態では、本開示は、以下の項目1～62を提供する：

【0010】

1. 以下のアミノ酸配列：

【表1】

配列	配列番号	配列	配列番号
SIETVNSL	6	KIGEVIVTK	16
RMLLSHTGK	1	TRSTIHL	17
LPHRALSGI	2	SILRGS LGK	18
GTNP TAAVK	3	RLVSNRVVR	19
LRHKLVLNR	4	SLKNLEPIK	20
RIGGVGVEK	5	RSAGPRAPL	21
TVNTQQYNTK	7	VLYRSVLLK	22
SVSHLHIF	8	KAAGAGAAK	23
TTLENLPQK	9		
AQKLQVRI	10		
GQIELSIYR	11		
HGALSIRSI	12		
RLMKFLPV	13		
SLYISEERK	14		
VQTAVLNV	15		

のうちの1つを含むか、若しくはそれらからなる、腫瘍抗原ペプチド(TAP)、又は当該TAPをコードする核酸。

【0011】

2. TAPが、配列番号6、1～5及び6～17に定義される配列のうちの1つを含む、項目1に記載のTAP又は核酸。

【0012】

3. HLA-A*02:01分子に結合し、配列番号6の配列を含む、項目1又は2に記載のTAP又は核酸。

【0013】

4. HLA-A*03:01分子に結合し、配列番号1、11、又は14の配列を含む、項目1又は2に記載のTAP又は核酸。

【0014】

5. HLA-A*03:02分子に結合し、配列番号3、5、7、16、又は23の配列を含む、項目1又は2に記載のTAP又は核酸。

【0015】

6. HLA-A*11:01分子に結合し、配列番号9又は18の配列を含む、項目1又は2に記載のTAP又は核酸。

【0016】

10

20

30

40

50

7. H L A - A * 3 0 : 0 1 分子に結合し、配列番号 1 9、2 0 又は 2 3 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 1 7】

8. H L A - A * 3 2 : 0 1 分子に結合し、配列番号 8 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 1 8】

9. H L A - B * 0 7 : 0 2 分子に結合し、配列番号 2 又は 2 1 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 1 9】

1 0. H L A - B * 1 3 : 0 2 分子に結合し、配列番号 1 3 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 0】

1 1. H L A - B * 2 7 : 0 5 分子に結合し、配列番号 4 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 1】

1 2. H L A - B * 5 2 : 0 1 分子に結合し、配列番号 1 0、1 2 又は 1 5 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 2】

1 3. H L A - C * 0 6 : 0 2 分子に結合し、配列番号 1 7 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 3】

1 4. T A P が、ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる、項目 1 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 4】

1 5. ゲノムの当該非タンパク質コード領域が、非翻訳転写領域 (U T R) である、項目 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 5】

1 6. ゲノムの当該非タンパク質コード領域が、イントロンである、項目 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 6】

1 7. ゲノムの当該非タンパク質コード領域が、遺伝子間領域である、項目 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 7】

1 8. ゲノムの当該非タンパク質コード領域が、長い非コード R N A である、項目 1 4 に記載の T A P 又は核酸。

【0 0 2 8】

1 9. 核酸が、m R N A である、項目 1 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 0 2 9】

2 0. 核酸が、D N A である、項目 1 ~ 1 8 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 0 3 0】

2 1. 核酸が、ウイルスペクターの成分である、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 つに記載の核酸。

【0 0 3 1】

2 2. 項目 1 ~ 2 1 のいずれか 1 つに定義される T A P 又は核酸のうちの少なくとも 2 つを含む、組み合わせ。

【0 0 3 2】

2 3. 項目 1 に定義されるアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む、合成の長いペプチド (S L P)。

【0 0 3 3】

2 4. 項目 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の T A P、核酸、組み合わせ、若しくは S L

10

20

30

40

50

Pを含む、小胞又は粒子。

【0034】

25. 小胞が、脂質ナノ粒子 (LNP) である、項目24に記載の小胞又は粒子。

【0035】

26. カチオン性脂質を含む、項目24又は25に記載の小胞又は粒子。

【0036】

27. 項目1～23のいずれか1つに記載のTAP、核酸、組み合わせ若しくはSLP、又は項目24～26のいずれか1つに記載の小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【0037】

28. 項目1～23のいずれか1つに記載のTAP、核酸、組み合わせ若しくはSLP、項目24～26のいずれか1つに記載の小胞若しくは粒子、又は項目27に記載の組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン。

【0038】

29. 単離された主要組織適合複合体 (MHC) クラスI分子であって、そのペプチド結合溝内に、項目1～18のいずれか1つに記載のTAPを含む、単離されたMHCクラスI分子。

【0039】

30. 多量体の形態である、項目29に記載の単離されたMHCクラスI分子。

【0040】

31. 当該多量体が、四量体である、項目30に記載の単離されたMHCクラスI分子。

【0041】

32. (i) 項目1～18のいずれか1つに記載のTAP、(ii) 項目19に記載の組み合わせ、(iii) 項目23に記載のSLP、又は(iv) 項目1～18のいずれか1つに記載のTAP、項目19に記載の組み合わせ、若しくは項目23に記載のSLPをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを含む、単離された細胞。

【0042】

33. 単離された細胞であって、その表面において、主要組織適合複合体 (MHC) クラスI分子を発現し、MHCクラスI分子が、それらのペプチド結合溝内に、項目1～18のいずれか1つに記載のTAP又は項目19に記載の組み合わせを含む、単離された細胞。

【0043】

34. 抗原提示細胞 (APC) である、項目33に記載の細胞。

【0044】

35. 当該APCが、樹状細胞である、項目34に記載の細胞。

【0045】

36. 項目29～31のいずれか1つに記載の単離されたMHCクラスI分子及び／又は項目32～35のいずれか1つに記載の細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子を特異的に認識する、T細胞受容体 (TCR)。

【0046】

37. 項目29～31のいずれか1つに記載の単離されたMHCクラスI分子、及び／又は項目33～35のいずれか1つに記載の細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合断片。

【0047】

38. 二重特異性抗体又はその抗原結合断片である、項目37に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【0048】

39. 二重特異性抗体又はその抗原結合断片が、一本鎖ダイアボディ (scDb) である、項目38に記載の抗体又はその抗原結合断片。

10

20

30

40

50

【0049】

40. 二重特異性抗体又はその抗原結合断片が、T細胞シグナル伝達分子にも特異的に結合する、項目38又は39に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【0050】

41. T細胞シグナル伝達分子が、CD3鎖である、項目40に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【0051】

42. 単離された細胞であって、その細胞表面において、項目36に記載のTCRを発現する、単離された細胞。

【0052】

43. CD8⁺Tリンパ球である、項目42に記載の単離された細胞。

【0053】

44. 項目42又は43に定義される単離された細胞を少なくとも0.5%含む、細胞集団。

【0054】

45. 対象においてがん（例えば、結腸直腸がん）を治療する方法であって、対象に、有効量の：

（a）配列番号1～23及び25～50に定義されるアミノ酸配列のうちの1つ、若しくは配列番号1～23及び25～50に示される配列のうちの少なくとも1つを含む合成の長いペプチド（SLP）を含むか、又はそれらからなるTAP、

（b）（a）に定義されるTAP、その組み合わせ、又はSLPをコードする、少なくとも1つの核酸、

（c）（a）に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、又は（b）に定義される少なくとも1つの核酸を含む、小胞又は粒子、

（d）（a）に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、（b）に定義される少なくとも1つの核酸、又は（c）に定義される小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物、

（e）（a）に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、（b）に定義される少なくとも1つの核酸、（c）に定義される小胞若しくは粒子、又は（d）に定義される組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン、

（f）細胞であって、その細胞表面において、（a）に定義されるTAP又はそれらの組み合わせをそれらのペプチド結合溝内に含む主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子を発現する、細胞、

（g）細胞であって、その細胞表面において、（f）に定義される細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子を特異的に認識するT細胞受容体（TCR）を発現する、細胞、あるいは

（h）（f）に定義される細胞の表面で発現されたMHCクラスI分子に特異的に結合する、可溶性TCR、抗体、又はその抗原結合断片を投与することを含む、方法。

【0055】

46. TAP若しくは核酸が、項目1～21のいずれか1つに定義されたとおりであり、組み合わせが、項目22に定義されたとおりであり、SLPが、項目23に定義されたとおりであり、小胞が、項目24～26のいずれか1つに定義されたとおりであり、組成物が、項目27に定義されたとおりであり、ワクチンが、項目28に定義されたとおりであり、細胞が、項目32～35、42、及び43のいずれか1つに定義されたとおりであり、細胞集団が、項目44に定義されたとおりであり、かつ／又は抗体若しくは抗原結合断片が、項目37～41のいずれか1つに定義されたとおりである、項目45に記載の方法。

【0056】

47. CRCが、結腸がんである、項目45又は46に記載の方法。

【0057】

48. CRCが、直腸がんである、項目45又は46に記載の方法。

【0058】

49. 対象に、少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法を投与することを更に含む、項目45～48のいずれか1つに記載の方法。

【0059】

50. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、項目49に記載の方法。

【0060】

51. 対象においてがん（例えば、結腸直腸がん）を治療するための、又は対象においてがん（例えば、結腸直腸がん）を治療するための医薬を製造するための：

10

(a) 配列番号1～23及び25～50に定義されるアミノ酸配列のうちの1つ、若しくは配列番号1～23及び25～50に示される配列のうちの少なくとも1つを含む合成の長いペプチド（SLP）を含むか、又はそれらからなるTAP、

(b) (a)に定義されるTAP、その組み合わせ、又はSLPをコードする、少なくとも1つの核酸、

(c) (a)に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、又は(b)に定義される少なくとも1つの核酸を含む、小胞又は粒子、

(d) (a)に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、(b)に定義される少なくとも1つの核酸、又は(c)に定義される小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物、

20

(e) (a)に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、(b)に定義される少なくとも1つの核酸、(c)に定義される小胞若しくは粒子、又は(d)に定義される組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン、

(f) 細胞であって、その細胞表面において、(a)に定義されるTAP又はそれらの組み合わせをそれらのペプチド結合溝内に含む主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子を発現する、細胞、

(g) 細胞であって、その細胞表面において、(f)に定義される細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子を特異的に認識するT細胞受容体（TCR）を発現する、細胞、あるいは

(h) (f)に定義される前記細胞の表面で発現されたMHCクラスI分子に特異的に結合する、可溶性TCR、抗体、又はその抗原結合断片、の使用。

30

【0061】

52. TAP若しくは核酸が、項目1～21のいずれか1つに定義されたとおりであり、組み合わせが、項目22に定義されたとおりであり、SLPが、項目23に定義されたとおりであり、小胞が、項目24～26のいずれか1つに定義されたとおりであり、組成物が、項目27に定義されたとおりであり、ワクチンが、項目28に定義されたとおりであり、細胞が、項目32～35、42、及び43のいずれか1つに定義されたとおりであり、細胞集団が、項目44に定義されたとおりであり、かつ／又は抗体若しくは抗原結合断片が、項目37～41のいずれか1つに定義されたとおりである、項目55に記載の使用。

40

【0062】

53. CRCが、結腸がんである、項目51又は52に記載の使用。

【0063】

54. CRCが、直腸がんである、項目51又は52に記載の使用。

【0064】

55. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法の対象への使用を更に含む、項目51～54のいずれか1つに記載の使用。

【0065】

56. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、項目55に記載の使用。

50

【0066】

57. 対象においてがん（例えば、結腸直腸がん）を治療する際に使用するための薬剤であって、薬剤が：

（a）配列番号1～23及び25～50に定義されるアミノ酸配列のうちの1つ、若しくは配列番号1～23及び25～50に示される配列のうちの少なくとも1つを含む合成の長いペプチド（SLP）を含むか、又はそれらからなるTAP、

（b）（a）に定義されるTAP、その組み合わせ、又はSLPをコードする、少なくとも1つの核酸、

（c）（a）に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、又は（b）に定義される少なくとも1つの核酸を含む、小胞又は粒子、

（d）（a）に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、（b）に定義される少なくとも1つの核酸、又は（c）に定義される小胞若しくは粒子と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物、

（e）（a）に定義されるTAP、それらの組み合わせ、若しくはSLP、（b）に定義される少なくとも1つの核酸、（c）に定義される小胞若しくは粒子、又は（d）に定義される組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン、

（f）細胞であって、その細胞表面において、（a）に定義されるTAP又はそれらの組み合わせをそれらのペプチド結合溝内に含む主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子を発現する、細胞、

（g）細胞であって、その細胞表面において、（f）に定義される細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子を特異的に認識するT細胞受容体（TCR）を発現する、細胞、あるいは

（h）（f）に定義される細胞の表面で発現されたMHCクラスI分子に特異的に結合する、可溶性TCR、抗体、又はその抗原結合断片である、薬剤。

【0067】

58. TAP若しくは核酸が、項目1～21のいずれか1つに定義されるとおりであり、組み合わせが、項目22に定義されるとおりであり、SLPが、項目23に定義されるとおりであり、小胞が、項目24～26のいずれか1つに定義されるとおりであり、組成物が、項目27に定義されるとおりであり、ワクチンが、項目28に定義されるとおりであり、細胞が、項目32～35、42、及び43のいずれか1つに定義されるとおりであり、細胞集団が、項目44に定義されるとおりであり、かつ／又は抗体若しくは抗原結合断片が、項目37～41のいずれか1つに定義されるとおりである、項目61に記載の使用するための薬剤。

【0068】

59. CRCが、結腸がんである、項目57又は58に記載の使用するための薬剤。

【0069】

60. CRCが、直腸がんである、項目57又は58に記載の使用するための薬剤。

【0070】

61. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法の対象への使用を更に含む、項目57～60のいずれか1つに記載の使用するための薬剤。

【0071】

62. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法の化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、項目61に記載の使用するための薬剤。

【0072】

本開示の他の目的、利点、及び特徴は、添付の図面を参照して例としてのみ与えられる、それらの特定の実施形態の以下の非制限的な説明を読むと、より明らかになるだろう。

【0073】

添付図面において：

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0074】

【図1】結腸直腸がん（CRC）由来細胞株及び一次腫瘍試料の両方における腫瘍特異的抗原（TSA）の発見のためのプロテオゲノミクスワークフローを示す。CRC及び正常な腸に由来する細胞株から生成された試料、並びに6名の個体から得られた一致する一次腫瘍／正常な隣接組織（NAT）の生検を全て、RNA配列決定及び主要組織適合複合体クラスⅠ（MHC-Ⅰ）免疫沈降（IP）の両方のために処理した。RNA配列決定データを、試料のトランスクリプトーム特性決定及びカスタマイズされた全般的ながんプロテオームデータベースの生成の両方のために使用した。各試料について、IPによって単離されたMHC-Ⅰ関連ペプチド（MAP）を、それぞれのデータベースを使用して、LC-MS/MSによって特定した。TSA候補の特定及び腫瘍特異性の両方を検証した後、それらの免疫原性及び腫瘍間分布の両方の予測によって、それらの治療可能性を評価した。BioRender.comにより作成された図。

10

【図2】A～Eは、一次腫瘍／正常な隣接組織のCRC生検のトランスクリプトームプロファイルを示す。図2A：ペアエンドRNA seq及びDESeq2による遺伝子リードカウント正規化の後の各腫瘍／NAT試料の上位500個の様々な遺伝子の主成分分析（PCA）。（MSISensorによって決定される）MSI組織を丸で囲んでいる。図2B：隣接するNATと比較した、CRC組織における上方／下方調節された遺伝子のGO term分析。GO term分析に提出された遺伝子は、 $|\log_2 FC| > 1$ を有するものであり、かつTPM正規化された値を使用して全ての試料において差次的に制御されることが判明したものであった。図2C：MSS NAT、MSI NAT、MSS CRC、及びMSI CRCの平均ESTIMATE免疫スコアを示す棒グラフであり、標準偏差が示されている。図2D：CRC試料に対する、NATにおける5個の別個の転写産物バイオタイプに帰属可能なトランスクリプトームの平均割合を示す積み重ね棒グラフであり、非コード転写産物の割合の差は、NATとCRCとの間で統計的に有意である（ $p = 0.0156$ ）。図2E：平均及び標準誤差の棒グラフを用いて、SNPEffゲノムアノテーションによって決定されるMSS及びMSI CRC組織の非コードRNA転写産物の発現（左）、SNVカウント（中央）及びINDELカウント（右）を示す散布図。

20

【図3】A～Eは、CRC由来細胞株及び組織の免疫ペプチドーム分析の結果を示す。図3A：上パネル：CRC細胞株において特定された固有のペプチドの数を示す積み上げ棒グラフ、及び細胞株当たりのMAPの平均数を示す水平線。下パネル：各細胞株において特定された固有のMAPの数と細胞表面におけるMHC Ⅰの提示との間の相関を示す散布図（ピアソンの $r = 0.96$ ）。図3B：一次組織試料において特定された固有のペプチドの数を示す積み上げ棒グラフ、及び組織試料当たりのMAPの平均数を示す水平線。図3A及び3Bの「全てのペプチド」は、5% FDRにより特定されたペプチドの数を示し、一方、「MHC Ⅰペプチド」は、netpanMHC4.1b予測を使用して、対応するペプチドスコア、8～11アミノ酸長、及びランク溶出リガンド閾値 $\leq 2\%$ で特定されたペプチドの数を示す。図3C：溶出ランク予測を使用して、各試料中の所与のHLAアレルに結合することが予測される固有のMAPの割合を示す棒グラフ。図3D：CRC由来細胞株及び一次組織についてのMAP源遺伝子のGO term分析。この分析において、組織について、4種類以上の組織によって共有される供給源遺伝子のみが含まれた。図3E、左パネル：タンパク質コード、超可変遺伝子（免疫グロブリン若しくはTCR）、又は非コード転写産物、又はアノテーションされていない転写産物に由来する各組織試料中のMAPの割合を示す積み重ね棒グラフ。右パネル：プロセッシングされた転写産物、保持されたイントロン、ノンストップ分解産物、ナンセンス媒介性分解産物、lncRNA、又はアノテーションされていない転写産物を有するものに由来する非コードMAPの割合を示す積み重ねた棒グラフ。

30

40

【図4】A～Eは、CRCにおいて特定された新規のTSAが、主に非コード領域に由来し、一方、TAAの大部分が、エキソンに由来することを示す。図4A：試料ごとに特定されたTSAの数を示す棒グラフ、組織試料ごとのTSAの平均数を水平線で示す。図4

50

B：内側の円にT S Aのゲノム起源を特定し、T S Aのどの割合が変異である（m T S A）か、又は異常に発現している（a e T S A）かを特定する、積み重ね円グラフ。外側の円は、T S Aのどの割合がコード配列又は非コード配列に由来するかを示す。図4 C：試料ごとに特定されたT A Aの数示す棒グラフ。図4 D：内側の円にT A Aのゲノム起源を特定し、T A Aのどの割合がカノニカルであるか、又は非カノニカルであるかを特定する、積み重ね円グラフ。外側の円は、T A Aのどの割合がコード配列又は非コード配列に由来するかを示す。図4 E：C R Cの免疫ペプチドミクスに関する2つの以前の刊行物（8、15）、並びにI E D B及びH L A L i g a n d A t l a s（全ての組織、及び結腸組織のみ）において、推定T S A及びT A Aの存在又は不存在を示すヒートマップ。

【図5】A～Bは、推定T S A及びT A AのRNA発現プロファイルを示す。図5 A：y軸上の一致したN A T、並びに所与の組織試料における平均（mean average）発現（C R C及びN A Tの平均）と比較した、T P M、C R Cにおける転写産物の $\log_2 FC$ を示すMAプロット。強調表示された点は、推定T A A及びT S Aの供給源転写産物を示す。S 4及びS 5プロットは両方とも、別のカノニカルT A A源転写産物と重なるため、見ることができないカノニカルT A A点を有する。図5 B：G e n o t y p e T i s s u e E x p r e s s i o n（G T E x）P o r t a lからの正常組織、及びプールされたT E C試料における、a e T S Aコード配列及びT A Aコード配列（カノニカルT A A（c a n T A A）及び非カノニカルT A A（非c a n T A A）として分けられる）の $\log(rphm+1)$ における平均RNA発現のヒートマップ。M H C低組織には、脳、神経、及び精巣からのものが含まれ、これらはM H C Iを低く発現することが示されている。黒色の輪郭は、平均RNA発現が8.55 rphmを超えることを示す。

【図6】A～Cは、T S A及びT A A候補の検証を示す。図6 A：151個のT C G A C O A D試料における、T S A及びT A Aの $\log(rphm+1)$ における平均RNA発現を示すヒートマップ。プールされたG T E x及びm T E C試料の $\log$ 変換された（ $\log(rphm+1)$ ）平均発現よりも少なくとも10倍高いT S A及びT A A配列を発現するT C G A C O A D試料の割合を左に示す。図6 B：A d a m o p o u l o u e t a l. 2013に報告された推定非免疫原性胸腺ペプチドと比較した、検証されたT S A及びT A Aの様々なグループ分けのr E p i t o p e免疫原性スコア。r E p i t o p eは、M H C Iペプチドの免疫原性の閾値（0.36）を示唆し、これは破線によって示されている。図6 C：米国集団（I E D B）における腫瘍抗原結合性M H CクラスIアレルの予測発生率。

【図7】試料、具体的には、所与の試料に固有であるか、又は2つの試料によって固有に共有されるM A Pの所与の交差に固有のH L Aアレルの数示すアップセットプロットを示す。

【図8】A～Dは、C R C由来細胞株のトランスクリプトームプロファイル、C R C組織における免疫浸潤のs s G S E A分析、及び全ての試料の変異プロファイルを示す。図8 A：ペアエンドRNA seq及びD E S e q 2による遺伝子リードカウント正規化の後のC R C由来細胞株の上位500個の様々な遺伝子及び1つの正常な腸細胞株（H I E C-6）の主成分分析（P C A）。既知のM S I細胞株を丸で囲んでいる。図8 B：D a n a h e r e t a l. 2017に記載の遺伝子及びG S V A Rプログラム（<https://github.com/rcastelo/GSVA>）を使用した、腫瘍及び一致したN A Tにおける免疫浸潤のs s G S E A分析。図8 C：平均及び標準誤差の棒グラフを用いて、S N P E f fゲノムアノテーションによって決定されるM S S及びM S I C R C由来細胞株のS N Vカウント及びI N D E Lカウントを示す散布図。図8 D：平均及び標準誤差の棒グラフを用いて、S N P E f fゲノムアノテーションによって決定される全てのM S S及びM S I試料（細胞株及び組織）のS N Vカウント及びI N D E Lカウントを示す散布図。M S S試料とM S I試料との間のI N D E L変異の数の差は、統計的に有意である（ $p=0.00235$ ）。

【図9】A及びBは、M S I及びM S S一次組織試料のG O t e r m分析の結果を示す。図9 A：隣接するN A Tと比較した、M S I腫瘍における上方／下方調節された遺伝子

のGO term分析。GO term分析に使用された遺伝子は、TPM正規化された値を使用したそれぞれのNATと比較して、 $|\log 2 FC| > 1$ を有するものであり、MSI腫瘍試料の両方において固有に差次的に発現されることが見出されたものであった（すなわち、MSI腫瘍の両方においてのみ上方／下方調節されたが、MSS腫瘍のいずれかにおいて上方／下方調節されなかった遺伝子）。図9B：それらのNATと比較した、MSS腫瘍における上方／下方調節された遺伝子のGO term分析。GO term分析に使用された遺伝子は、TPM正規化された値を使用したそれぞれのNATと比較して、 $|\log 2 FC| > 1$ を有するものであり、MSI腫瘍試料の3種類以上において固有に差次的に発現されることが見出されたものであった（すなわち、少なくとも3種類のMSS腫瘍において上方／下方調節されたが、MSI腫瘍において上方／下方調節されなかった遺伝子）。

10

【図10】A～Dは、CRC由来細胞株及びCRC／NAT組織試料における固有のMAP及び共有されたMAPの概要を提供する。図10A：4種類のCRC由来細胞株のMHC I免疫ペプチドームにおけるMAPの重複を示すベン図。図10B：6種類の一次組織試料のMHC I免疫ペプチドームにおけるMAPの重複を示すベン図。図10C：試料、具体的には、所与の試料に固有であるか、又は2つの試料によって固有に共有されるMAPの所与の交差に固有のMAPの数を示すUp set Rプロット。図10D：任意の2種類の細胞株又は組織試料間のMAPの共有数を示すヒートマップ。

【図11】A～Eは、CRC由来細胞株及びCRC／NAT組織試料における固有のMAP源遺伝子及び共有されたMAP源遺伝子の概要を提供する。図11A：上パネル：試料ごとに特定された固有の供給源遺伝子の数を示す棒グラフ。下パネル：各試料において特定された固有のMAPの数と、対応する固有の供給源遺伝子の数との間の相関を示す散布図（ピアソンの $r = 0.99$ ）。コード配列からのペプチドについて供給源遺伝子を特定し、1つより多い供給源遺伝子にマッピングされた任意のペプチドを除外した。図11B：所与の試料又は交差、具体的には、所与の試料に固有であるか、又は2つの試料によって固有に共有される供給源遺伝子の数を示すUp set Rプロット。図11C：4種類のCRC由来細胞株のMHC I免疫ペプチドームにおける供給源遺伝子の重複を示すベン図。図11D：6種類の一次組織試料のMHC I免疫ペプチドームにおける供給源遺伝子の重複を示すベン図。図11E：任意の2種類の細胞株又は組織試料間の供給源遺伝子の共有数を示すヒートマップ。

20

30

【図12】各試料において特定された固有のMAPの数と、特定及び検証されたTSAの数との間の相関を示す散布図である（ピアソンの $r = 0.76$ ）。

【図13】本明細書に記載のTSA及びTAAの免疫原性スコアを示すグラフである。Adamopoulos et al., 2013に報告された推定非免疫原性胸腺ペプチドと比較した、検証されたTSA及び全てのTAAの様々なグループ分けのrEpiTope免疫原性スコア。rEpiTopeは、MHC Iペプチドの免疫原性の閾値（0.36）を示唆し、これは破線によって示されている。この図は、検証のために選択された9種類だけでなく、この研究で報告された全てのTAAを含むという点で、図6Aとは異なる。

40

【発明を実施するための形態】

【0075】

技術を説明する文脈において（特に、以下の特許請求の範囲の文脈において）、「a」及び「an」及び「the」という用語、並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方を網羅するように解釈されるものである。

【0076】

「含む（comprising）」、「有する」、「含む（including）」、及び「含有する」という用語は、別段注釈が付かない限り、オープンエンド用語（すなわち、「含むが、それに限定されない」を意味する）として解釈されるものである。

【0077】

50

本明細書に記載される全ての方法は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施され得る。

【0078】

本明細書に提供される任意の及び全ての実施例、又は例示的な言語（「例えば」、「など」）の使用は、単に特許請求される技術の実施形態をより良好に例示することを意図しており、別段特許請求されない限り、範囲の限定を提起するものではない。

【0079】

本明細書におけるいかなる言語も、任意の特許請求されていない要素を特許請求される技術の実施形態の実施に不可欠であることを示すものとして解釈されるべきではない。

【0080】

本明細書では、「約」という用語は、その通常の意味を有する。「約」という用語は、ある値が、その値を決定するために用いられるデバイス若しくは方法の誤差についての固有の変動を含むか、又は列挙された値に近似する値、例えば、列挙された値（若しくは値の範囲）の10%以内の値を包含することを示すために使用される。

【0081】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において別段示されない限り、単に、範囲内に含まれる各個別の値を個々に参照する簡略方法として機能することを意図しており、各個別の値は、本明細書に個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。範囲内の値の全てのサブセットもまた、本明細書に個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。

【0082】

本開示の特徴又は態様が、マーカッシュ群又は代替物の一覧の観点から説明される場合、当業者は、本開示がまた、それによってマーカッシュ群又は代替物の一覧の任意の個々の構成要素又は構成要素の部分群の観点からも説明されることを認識するであろう。

【0083】

別段具体的に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味（例えば、幹細胞生物学、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、及び生化学における）と同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【0084】

別段示されない限り、本開示において利用される組換えタンパク質、細胞培養、及び免疫学的技術は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技術は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (編集者), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D. M. Glover and B. D. Hames (編集者), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995及び1996)、及び F. M. Ausubel et al. (編集者), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在に至るまでの全ての改訂版を含む)、Ed Harlow and David Lane (編集者) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、及び J. E. Coligan et al. (編集者) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在に至るまでの全ての改訂版を含む)などの情報源における文献全体を通じて記載及び説明されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載の研究において、本発明者らは、プロテオゲノミクスベースのアプローチを使用して、CRC細胞株及びCRC検体からのTSA及びTAA候補を特定した。これらのTSAの大部分は、非エキソン配列（例えば、イントロン配列及び遺伝子間配列）などの正常な組織では発現されない、異常に発現される非変異ゲノム配列に由来した。本明細書で特定された新規のCRC TSA及びTAA候補は、例えば、例えば、CRC T細胞ベースの免疫療法及びワクチンに有用であり得る。

【 0 0 8 6 】

したがって、一態様では、本開示は、腫瘍抗原ペプチド（TAP）（又は腫瘍特異的ペプチド）、より具体的には、以下のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、又はそれらからなる、CRC TAPなどの単離されたTAPに関する。

【表 2】

配列	配列番号	配列	配列番号
RMLLSHTGK	1	KIGEVIVTK	16
LPHRALSGI	2	TRSTIILHL	17
GTNPAAVK	3	SILRGSLGK	18
LRHKLVLNR	4	RLVSNRVVR	19
RIGGVGVEK	5	SLKNLEPIK	20
SIETVNSL	6	RSAGPRAPL	21
TVNTQQYNTK	7	VLYRSVLLLK	22
SVSHLHIFF	8	KAAGAGAAK	23
TTLENLPQK	9		
AQKLQVRI	10		
GQIELSIYR	11		
HGALSIRSI	12		
RLMKFLPV	13		
SLYISEERK	14		
VQTAVLNV	15		

【 0 0 8 7 】

別の態様では、本開示は更に、がん、より具体的にはCRCの治療のための、以下のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、又はそれらからなるTAP（例えば、単離されたTAP）の使用に関する。

【表 3】

配列	配列番号	配列	配列番号
RMLLSHTGK	1	EYNSDLHQF	26
LPHRALSGI	2	TYKYVDINTF	27
GTNPTAAVK	3	VIDEPVRL	28
LRHKLVLR	4	RYLEKFYGL	29
RIGGVGVEK	5	KRLPSPSLF	30
SIETVNSL	6	KSINEFWNK	31
TVNTQQYNTK	7	RVFHGNETTK	32
SVSHLHIF	8	RIQLPVVSK	33
TTLENLPQK	9	SIFRTPISK	34
AQKLQVRI	10	AEYHSQSRA	35
GQIELSIYR	11	IHNSDQILL	36
HGALSIRSI	12	KMHQSRISY	37
RLMKFLPV	13	QMAGLRDTY	38
SLYISEERK	14	RIKNWGSGMTF	39
VQTAVLNV	15	AQYDQASTKY	40
KIGEVIVTK	16	FVDNQYWRY	41
TRSTIHL	17	QLDSAVKNLY	42
SILRGS LGK	18	EQLKVTTI	43
RLVSNRVR	19	FRSWAVQTF	44
SLKNLEPIK	20	KLYQSIIGY	45
RSAGPRAPL	21	RVAKTNSLR	46
VLYRSVLLK	22	SANVSKVSF	47
KAAGAGAAK	23	SQHDILQMI	48
VEAPHLPSF	25	VAKTPRNTY	49
		RPRLSAILF	50

【0088】

一実施形態では、TAPは、以下のアミノ酸配列：配列番号1～23のうちの1つを含むか、又はそれらからなる。一実施形態では、TAPは、以下のアミノ酸配列：配列番号1～17、22、25、27、29、31、33、38、40、41及び46のうちの1つを含むか、又はそれらからなる。更なる実施形態では、TAPは、以下のアミノ酸配列：配列番号1～17、22、及び25のうちの1つを含むか、又はそれらからなる。更なる実施形態では、TAPは、以下のアミノ酸配列：配列番号1～17及び22のうちの1つを含むか、又はそれらからなる。

【0089】

一般に、HLAクラスIに関連して提示される腫瘍抗原ペプチド（TAP）などのペプチドは、長さが約7若しくは8～約15個、又は好ましくは8～14個のアミノ酸残基である。本開示の方法のいくつかの実施形態では、本明細書に定義されるTAP配列を含む、より長いペプチドは、細胞によってプロセッシングされる抗原提示細胞（APC）などの細胞に人工的に負荷され、TAPは、APCの表面においてMHCクラスI分子によって提示される。この方法では、15個のアミノ酸残基よりも長いペプチド／ポリペプチドをAPCに負荷することができ、提示のために本明細書に定義される対応するTAPを提供

するAPC細胞質中のプロテアーゼによってプロセッシングされる。いくつかの実施形態では、本明細書に定義されるTAPを生成するために使用される前駆体ペプチド／ポリペプチドは、例えば、1000、500、400、300、200、150、100、75、50、45、40、35、30、25、20、又は15個以下のアミノ酸である。したがって、本明細書に記載のTAPを使用する全ての方法及びプロセスは、細胞（APC）によるプロセッシング後の「最終的な」8～14個のTAPの提示を誘導するための、より長いペプチド又はポリペプチド（天然タンパク質を含む）、すなわち、腫瘍抗原前駆体ペプチド／ポリペプチドの使用を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTAPは、約8～14、8～13、又は8～12アミノ酸長（例えば、8、9、10、11、12、又は13アミノ酸長）であり、HLAクラスI分子に直接適合するのに十分小さい。一実施形態では、TAPは、20個以下のアミノ酸、好ましくは15個以下のアミノ酸、より好ましくは14個以下のアミノ酸を含む。一実施形態では、TAPは、少なくとも7個のアミノ酸、好ましくは少なくとも8個又はそれ以下のアミノ酸、より好ましくは少なくとも9個のアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、TAPの合成類似体を調製するためのペプチド化学において使用される天然に存在するアミノ酸並びに他のアミノ酸（例えば、天然に存在するアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、核酸配列によってコードされていないアミノ酸など）のL異性体及びD異性体の両方を含む。天然に存在するアミノ酸の例は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニンなどである。他のアミノ酸としては、例えば、非遺伝子コード形態のアミノ酸、並びにL-アミノ酸の保存的置換が挙げられる。天然に存在する非遺伝子コードアミノ酸としては、例えば、ベターアラニン、3-アミノプロピオン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、アルファ-アミノイソ酪酸（Aib）、4-アミノ酪酸、N-メチルグリシン（サルコシン）、ヒドロキシプロリン、オルニチン（例えば、L-オルニチン）、シトルリン、テブチルアラニン、テブチルグリシン、N-メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン（Nle）、ノルバリン、2-ナフチルアラニン、ピリジルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボン酸、ベター2-チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、L-ホモアルギニン（Hoarg）、N-アセチルリジン、2-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、2,4-ジアミノ酪酸（D-若しくはL-）、p-アミノフェニルアラニン、N-メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン（HoSer）、システイン酸、イプシロン-アミノヘキサ酸、デルター-アミノ吉草酸、又は2,3-ジアミノ酪酸（D-若しくはL-）などが挙げられる。これらのアミノ酸は、生化学／ペプチド化学の分野において周知である。一実施形態では、TAPは、天然に存在するアミノ酸のみを含む。

【0091】

実施形態では、本明細書に記載されるTAPは、本明細書に記載の配列と比較して、機能的に同等のアミノ酸残基の置換を含有する変化した配列を有するペプチドを含む。例えば、配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、機能的等価物として作用する類似の極性（類似の物理化学的特性を有する）の別のアミノ酸と置換することができ、サイレント変更をもたらす。配列内のアミノ酸の置換は、アミノ酸が所属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、正電荷（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、及びヒスチジン（並びにホモアルギニン及びオルニチン）が含まれる。無極性（疎水性）アミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、プロリン、トリプトファン、及びメチオニンが含まれる。非電荷極性アミノ酸には、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれる。負電荷（酸性）アミノ酸には、グルタミン酸及びアスパラギン酸が含まれる。アミノ酸グリシンは、無極性アミノ酸ファミリー又は非電荷（中性）極性アミノ酸ファミリーのいずれかに含まれ得る。ア

ミノ酸のファミリー内で行われた置換は、保存的置換であると一般に理解されている。本明細書に記載のTAPは、あらゆるL-アミノ酸、あらゆるD-アミノ酸、又はL-アミノ酸とD-アミノ酸との混合物を含み得る。一実施形態では、本明細書に記載のTAPは、全てのL-アミノ酸を含む。

【0092】

一実施形態では、配列番号1～23及び25～50の配列のうちの1つを含むか、又はそれらからなるTAPの配列において、T細胞受容体との相互作用に実質的に寄与しないアミノ酸残基は、T細胞の反応性に実質的に影響を与えず、かつ関連するMHCへの結合を排除しない他のアミノ酸で置き換えることによって修飾することができる。

【0093】

TAPはまた、分解を防ぎ、安定性、親和性、及び／又は取り込みを増加させるために、N末端及び／若しくはC末端キャップされてもよく、又は修飾されてもよい。したがって、別の態様では、本開示は、式 Z^1-X-Z^2 の修飾されたTAPを提供し、式中、Xは、配列番号1～23及び25～50のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、又はそれらからなるTAPである。

【0094】

一実施形態では、TAPのアミノ末端残基（すなわち、N末端の遊離アミノ基）は、例えば、部分／化学基（ Z^1 ）の共有結合によって、修飾される（例えば、分解に対する保護のために）。 Z^1 は、1～8個の炭素の直鎖又は分枝鎖アルキル基、又はアシル基（ $R-CO-$ ）であってもよく、式中、Rは、疎水性部分（例えば、アセチル、プロピオニル、ブタニル、イソプロピオニル、若しくはイソブタニル）、又はアロイル基（ $Ar-CO-$ ）であり、式中、Arは、アリール基である。一実施形態では、アシル基は、 $C_1 \sim C_{16}$ 又は $C_3 \sim C_{16}$ アシル基（直鎖又は分枝鎖、飽和又は不飽和）であり、更なる一実施形態では、飽和 $C_1 \sim C_6$ アシル基（直鎖又は分枝鎖）又は不飽和 $C_3 \sim C_6$ アシル基（直鎖又は分枝鎖）、例えば、アセチル基（ CH_3-CO- 、Ac）である。一実施形態では、 Z^1 は存在しない。TAPのカルボキシ末端残基（すなわち、TAPのC末端の遊離カルボキシ基）は、例えば、アミド化（ NH_2 基によるOH基の置き換え）によって修飾されてもよく（例えば、分解に対する保護のために）、したがって、そのような場合、 Z^2 は NH_2 基である。一実施形態では、 Z^2 は、ヒドロキサメート基、ニトリル基、アミド（一級、二級、又は三級）基、メチルアミン、イソブチルアミン、イソバレリルアミン、若しくはシクロヘキシルアミンなどの1～10個の炭素の脂肪族アミン、アニリン、ナフチルアミン、ベンジルアミン、シンナミルアミン、若しくはフェニルエチルアミンなどの芳香族若しくはアリールアルキルアミン、アルコール、又は CH_2OH であり得る。一実施形態では、 Z^2 は存在しない。一実施形態では、TAPは、配列番号1～24及び26～50のアミノ酸配列のうちの1つを含む。一実施形態では、TAPは、配列番号1～24及び26～50のアミノ酸配列のうちの1つからなり、すなわち、 Z^1 及び Z^2 は存在しない。

【0095】

別の態様では、本開示は、配列番号6の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*02:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性（promiscuity）を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*02:05、HLA-A*02:06及び／又はHLA-A*02:07分子に更に結合し得る。

【0096】

別の態様では、本開示は、配列番号1、11、14、38、45若しくは46、好ましくは配列番号1、11、若しくは14の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*03:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*03:02、HLA-A*11:01又はHLA-A*30:01分子に更に結合し得る。

10

20

30

40

50

【0097】

別の態様では、本開示は、配列番号3、5、7、16、23、31、32、33若しくは34、好ましくは配列番号3、5、7、16、若しくは23の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*03:02分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*03:01、HLA-A*11:01又はHLA-A*30:01分子に更に結合し得る。

【0098】

別の態様では、本開示は、配列番号9、18、33若しくは34、好ましくは配列番号9若しくは18の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*11:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*03:01、HLA-A*03:02、HLA-A*31:01及び／又はHLA-A*68:01分子に更に結合し得る。

10

【0099】

別の態様では、本開示は、配列番号29の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*23:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*24:02分子に更に結合し得る。

【0100】

別の態様では、本開示は、配列番号26、27若しくは29の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*24:02分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*23:01分子に更に結合し得る。

20

【0101】

別の態様では、本開示は、配列番号19、20若しくは23の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*30:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-A*30:02及び／又はHLA-B*15:02分子に更に結合し得る。

30

【0102】

別の態様では、本開示は、配列番号8、37若しくは39、好ましくは配列番号8の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-A*32:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-B*57:01及び／又はHLA-B*58:01分子に更に結合し得る。

【0103】

別の態様では、本開示は、配列番号2、21、24若しくは50、好ましくは配列番号2若しくは21の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-B*07:02分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上の特定されたTAPは、HLA-B*35:02、HLA-B*35:03、HLA-B*55:01及び／又はHLA-B*56:01分子に更に結合し得る。

40

【0104】

別の態様では、本開示は、配列番号13若しくは48、好ましくは配列番号13の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-B*13:02分子に結合する、TAPを提供する。

【0105】

別の態様では、本開示は、配列番号25の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-B*18:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため

50

(特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する)、上の特定されたTAPは、HLA-B*40:01、HLA-B*44:02、HLA-B*44:03及び／又はHLA-B*45:01分子に更に結合し得る。

【0106】

別の態様では、本開示は、配列番号4の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-B*27:05分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため(特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する)、上の特定されたTAPは、HLA-B*27:02に更に結合し得る。

【0107】

別の態様では、本開示は、配列番号10、12、15、若しくは43、好ましくは配列番号10、12、若しくは15の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-B*52:01分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため(特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する)、上の特定されたTAPは、HLA-B*51:01に更に結合し得る。

10

【0108】

別の態様では、本開示は、配列番号17若しくは44、好ましくは配列番号17の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-C*06:02分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため(特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する)、上の特定されたTAPは、HLA-B*27:02、HLA-C*07:01及び／又はHLA-C*07:02分子に更に結合し得る。

20

【0109】

別の態様では、本開示は、配列番号47若しくは49の配列を含むか、又はそれらからなる、HLA-C*12:02分子に結合する、TAPを提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため(特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する)、上の特定されたTAPは、HLA-B*46:01、HLA-C*03:02、HLA-C*03:03、HLA-C*03:04、HLA-C*08:01、HLA-C*12:03、HLA-C*15:02、及び／又はHLA-C*16:01分子に更に結合し得る。

【0110】

一実施形態では、TAPは、ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる。一実施形態では、TAPは、非翻訳転写領域(UTR)、すなわち、3'-UTR又は5'-UTR領域に位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、イントロンに位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、遺伝子間領域に位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、エキソンに位置する配列によってコードされ、フレームシフトから生じる。

30

【0111】

本開示のTAPは、TAP(組換え発現)をコードする核酸を含む宿主細胞における発現によって、又は化学合成(例えば、固相ペプチド合成)によって生成され得る。ペプチドは、当該技術分野で周知の手動及び／又は自動化固相手順によって容易に合成することができる。好適な合成は、例えば、「T-boc」又は「Fmoc」手順を利用することによって行うことができる。固相合成のための技術及び手順は、例えば、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, E. Atherton and R. C. Sheppard, IRL, Oxford University Press, 1989に記載されている。代替的に、MiHAペプチドは、例えば、Liu et al., Tetrahedron Lett. 37:933-936, 1996、Baca et al., J. Am. Chem. Soc. 117:1881-1887, 1995、Tam et al., Int. J. Peptide Protein Res. 45:209-216, 1995、Schnolzer and Kent, Science 256:221-225, 1992、Liu and Tam, J. Am. Chem. Soc. 116:4149-4153, 1994、Liu and Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91

40

50

：6584-6588, 1994、及びYamashiro and Li, Int. J. Peptide Protein Res. 31:322-334, 1988)に記載されるように、セグメント凝縮によって調製されてもよい。TAPの合成に有用な他の方法は、Nakagawa et al., J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092, 1985に記載されている。一実施形態では、TAPは、化学的に合成される(合成ペプチド)。本開示の別の実施形態は、天然に存在しないペプチドに関するものであり、当該ペプチドは、本明細書に定義されるアミノ酸配列からなるか、又は本質的になり、薬学的に許容される塩として合成的に生成されている(例えば、合成されている)。本開示によるTAPの塩は、インビボで生成されるペプチドが塩を有しないので、インビボでのそれらの状態(複数可)においてペプチドとは実質的に異なる。非天然塩形態のペプチドは、具体的には、ペプチド、例えば、本明細書に開示されるペプチドワクチンを含む薬学的組成物の文脈において、ペプチドの溶解性を調節することができる。好ましくは、塩は、ペプチドの薬学的に許容される塩である。

10

【0112】

一実施形態では、本明細書に記載のTAPは、単離されているか、又は実質的に純粋である。ペプチド又は核酸などの化合物は、分子の天然環境に存在する成分又は天然に存在する供給源の高分子(例えば、他の核酸、タンパク質、脂質、糖などを含む)から分離されるとき、「単離される」か、又は「実質的に純粋で」ある。典型的に、化合物は、試料中の総材料の重量当たり、少なくとも60%、より一般には、75%、80%、又は85%、好ましくは90%より多く、及びより好ましくは95%より多くであるときに、実質的に純粋である。したがって、例えば、組換え技術によって化学的に合成されるか又は産生されるポリペプチドは、一般に、その天然に関連する成分、例えば、その供給源の高分子の成分を実質的に含まないであろう。核酸分子は、核酸が由来する有機体の天然に存在するゲノムにおいて正常に連続しているコード配列と直後に連続しない(すなわち、共有結合されていない)ときに、実質的に純粋である。実質的に純粋な化合物は、例えば、天然源からの抽出によるか、ペプチド化合物をコードする組換え核酸分子の発現によるか、又は化学合成によって得られ得る。純度は、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、HPLCなどの任意の適切な方法を用いて測定することができる。一実施形態では、TAPは、溶液中にある。別の実施形態では、TAPは、固形形態であり、例えば、凍結乾燥されている。

20

30

【0113】

一実施形態では、TAPは、ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる。一実施形態では、TAPは、遺伝子間領域に位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、非コードRNA(ncRNA)によってコードされる。

【0114】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されるTAPのうちの少なくとも1つを含む合成の長いペプチド(SLP)を更に提供する。一実施形態では、SLPは、少なくとも2個のTAPを含み、TAPのうちの少なくとも1個は、本明細書に記載のTAPである。一実施形態では、SLPは、本明細書に記載されるTAPのうちの少なくとも2、3、4、又は5個を含む。一実施形態では、SLPは、SLPを安定化し、かつ/又はMHC分子によるプロセッシング及び提示を改善する配列又はドメイン、例えば、カテプシンなどの細胞プロテアーゼによって切断可能なモチーフを含む配列など、SLPに所望の特性を付与する1つ以上のアミノ酸配列又はドメインに連結された、本明細書に記載のTAPのうちの少なくとも1つを含む。別の実施形態では、SLPは、本明細書に記載のTAPのうちの少なくとも1つと、MHCクラスII分子に結合するTAPと、を含む。TAPは、互いに直接的に接続し得るか、又は短いアミノ酸リンカーなどのリンカーを介して間接的に接続し得る。実施形態では、リンカーは、約4~約20個のアミノ酸、又は約4~約15個のアミノ酸、例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、若しくは15個のアミノ酸を含む。一実施形態では、リンカーは、グリシン残基、セリン

40

50

残基、プロリン残基、スレオニン残基、又はそれらの混合物を含む。一実施形態では、SLPは、200、150、100、90、80、70、60、又は50個以下のアミノ酸の長さを有する。更なる実施形態では、SLPは、20～50個、45個又は40個のアミノ酸、例えば、20個又は25個のアミノ酸～30個、35個又は40個のアミノ酸の長さを有する。本明細書で使用される場合、「合成」とは、例えば、組換え技術によって、又は化学合成を使用して生成される、その天然源から単離されていないペプチド又は核分子を指す。

【0115】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載のTAP又は腫瘍抗原前駆体ペプチド又はSLPをコードする（例えば、単離された）核酸を更に提供する。一実施形態では、核酸は、約21ヌクレオチド～約45ヌクレオチド、約24～約45ヌクレオチド、例えば、24、27、30、33、36、39、42又は45ヌクレオチドを含む。

【0116】

一実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸（DNA、RNA）は、配列番号51～73及び75～100、又は配列番号51～67、72、75、77、79、81、83、88、90、91及び96、又は配列番号51～67、72及び75（例えば、配列番号51～67及び72）に定義される配列、又は対応するRNA配列（すなわち、チミン核酸塩基（T）がウラシル核酸塩基（U）によって置き換えられている）のうちのいずれか1つを含む。一実施形態では、TAPをコードする核酸は、mRNA分子である。一実施形態では、核酸は、溶液中にある。別の実施形態では、核酸は、固形形態であり、例えば、凍結乾燥されている。

【0117】

本開示の核酸は、本開示のTAP又はSLPの組換え発現のために使用することができ、宿主細胞にトランスフェクトされ得るベクター又はプラスミド、例えば、クローニングベクター又は発現ベクター内に含まれ得る。一実施形態では、本開示は、本開示のTAPをコードする核酸配列を含むクローニングベクター、発現ベクター、若しくはウイルスベクター、又はプラスミドを提供する。代替的に、本開示のTAPをコードする核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。いずれにしても、宿主細胞は、核酸によってコードされるTAP又はタンパク質を発現する。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫又は潜在的子孫を指す。宿主細胞は、本明細書に記載されるTAPを発現することができる任意の原核細胞（例えば、E. coli）又は真核細胞（例えば、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、又は哺乳動物細胞）であり得る。ベクター又はプラスミドは、挿入されたコード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含有し、耐性遺伝子、クローニング部位などの他の構成要素を含有し得る。当業者に周知の方法を使用して、ペプチド又はポリペプチドをコードする配列、及びそれに作動可能に連結された適切な転写及び翻訳制御／調節要素を含む発現ベクターを構築してもよい。これらの方法には、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術、及びインビボでの遺伝子組換えが含まれる。そのような技術は、Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.、及びAusubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y.に記載されている。「作動可能に連結されている」とは、成分、特にヌクレオチド配列の正常な機能を行うことができるようにする成分の並列配置を指す。したがって、調節配列に作動可能に連結されたコード配列は、コード配列が調節配列の調節制御、すなわち、転写及び／又は翻訳制御下で発現され得る、ヌクレオチド配列の構成を指す。本明細書で使用される場合、「調節／制御領域」又は「調節／制御配列」とは、コード核酸の発現の調整にかかわる非コードヌクレオチド配列を指す。したがって、調節領域という用語は、プロモーター配列、調節タンパク質結合部位、上流活性化因子配列などを含む。ベクター（例えば、発現ベクター）は、それぞれの宿主細胞

における効率的な遺伝子転写及び翻訳のための、プロモーター配列（例えば、CMV、PGK、及びEF-1 α プロモーター）、リボソーム認識及び結合TATAボックス、並びに3'UTR AAUAAA転写終結配列などの必要な5'上流及び3'下流の調節要素を有し得る。他の好適なプロモーターとしては、シミアンビムス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳がんウイルス（MMTV）プロモーター、HIVLTRプロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病毒プロモーター、EBV最初期プロモーター、及びRous肉腫ビムスプロモーターの構成的プロモーターが挙げられる。ヒト遺伝子プロモーターも使用され得、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、誘導性プロモーターは、TAPを発現するベクターの一部としても企図される。これは、目的のポリヌクレオチド配列の発現をオンにする、又は発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、又はテトラサイクリンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの例としては、プラスミド、自律複製配列、及び転位要素である。追加の例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体（例えば、酵母人工染色体（YAC））、細菌人工染色体（BAC）、又はPL由来人工染色体（PAC）、バクテリオファージ（例えば、ラムダファージ又はM13ファージ）、及び動物ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターとして有用な動物ウイルスのカテゴリの例としては、限定されないが、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ボックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、及びパポバウイルス（例えば、SV40）が挙げられる。発現ベクターの例は、哺乳動物細胞における発現のためのLenti-X（商標）Bicistronic Expression System（Neo）ベクター（Contech）、pClnéoベクター（Promega）；哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介性遺伝子導入及び発現のためのpLenti4/V5-DEST（商標）、pLenti6/V5-DEST（商標）、及びpLenti6.2N5-GW/LacZ（Invitrogen）である。本明細書に開示されるTAPのコード配列は、哺乳動物細胞におけるTAPの発現のためのそのような発現ベクターにライゲーションすることができる。

10

20

30

【0118】

特定の実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸は、ウイルスベクターにおいて提供される。ウイルスベクターは、アデノウイルス、ワクチニアウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、又はフォーミーウイルスに由来するものであり得る。本明細書で 사용되는場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパッケージングされる能力を有する核酸ベクター構築物を指す。ウイルスベクターは、非必須ウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載の様々なタンパク質のコード配列を含有することができる。別の実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸は、自己増幅又は自己複製RNA（srRNA）ベクターにおいて提供される。srRNAは、構造タンパク質が除去され、目的の異種遺伝子で置き換えられたプラス鎖RNAウイルスに由来する。srRNAは、単一サイクルのウイルスレプリコン粒子（VRP）を作製するために、トランスで構造タンパク質を提供する治療態様の技術を有するフラビウイルス、ノダムラウイルス、ニドウイルス、及びアルファウイルスに由来することに成功している（例えば、Aliahmad et al. Next generation self-replicating RNA vectors for vaccines and immunotherapies. Cancer Gene Ther (2022). <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00435-8>を参照されたい）。ベクター及び／又は粒子は、インビトロ又はインビボのいずれかで、DNA、RNA、又は他の核酸を細胞内に移動する目的で利用することができる。多数の形態のウイルスベクターが当該技術分野で既知である

40

50

。

【0119】

実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸(DNA、RNA)は、脂質小胞(例えば、リボソーム)又は脂質ナノ粒子(LNP)などの小胞若しくはナノ粒子、又は任意の他の好適なビヒクル内に含まれる。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載されるTAPのうちの1つ以上をコードする、mRNAなどの核酸を含む、脂質小胞又はナノ粒子などの小胞又はナノ粒子を提供する。

【0120】

本明細書で使用されるリボソームという用語は、その通常の意味に従って、内部水性媒体を封入するリン脂質の二重層又は任意の同様の両親媒性脂質(例えば、スフィンゴ脂質)から構成される微細な脂質小胞を指す。

【0121】

「脂質ナノ粒子」という用語は、リボソームと同様の内部水性媒体を取り囲む1つ以上の脂質二重層環、又は非水性コア内の分子(例えば、核酸)を封入するミセル様構造を含み得るリボソーム様構造を指す。脂質ナノ粒子は、典型的には、イオン化可能なカチオン性脂質などのカチオン性脂質を含有する。LNPに使用され得るカチオン性脂質の例としては、DOTMA、DOSPA、DOTAP、ePC、DLin-MC3-DMA、C12-200、ALC-0315、cKK-E12、脂質H(SM-102)、OF-Deg-Lin、A2-Iso5-2DC18、306Oi10、BAME-O16B、TT3、9A1P9、FTT5、COATSOME(登録商標)SS-E、COATSOME(登録商標)SS-EC、COATSOME(登録商標)SS-OC、及びCOATSOME(登録商標)SS-OPが挙げられる(例えば、Hou et al., Nature Reviews Materials, volume 6, pages 1078-1094 (2021)、Tenchov et al., ACS Nano, 15, 16982-17015 (2021)を参照されたい。

【0122】

リボソーム及び脂質ナノ粒子は、典型的には、脂質、脂質様材料、並びに安定性、送達有効性、耐容性、及び生体内分布などのリボソーム又はナノ粒子の特性を改善することができるポリマーなどの他の脂質成分を含む。これらには、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)などのリン脂質(例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルグリセロール)並びにDOPE、ステロール(コレステロール及びコレステロール誘導体など)、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2000-DMG)及び1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2000-DSG)などのPEG化脂質(PEG脂質)が含まれる。

【0123】

一実施形態では、本開示による脂質ナノ粒子は、イオン化可能なカチオン性脂質などの1つ以上のカチオン性脂質を含む。イオン化可能なカチオン性脂質の例としては、COATSOME(登録商標)SS-E、COATSOME(登録商標)SS-EC、COATSOME(登録商標)SS-OC、及びCOATSOME(登録商標)SS-OPの商標名で市販されているイオン化可能なカチオン性脂質を包含する、PCT公開第2017/061150号及び同第2019/188867号に列挙されているものが挙げられる。

【0124】

TAPのうちの1つ以上をコードする核酸(例えば、mRNA)は、例えば、安定性を増加させ、かつ/又は免疫原性を低減するように修飾され得る。例えば、5'末端は、(例えば、米国特許第10519189号及びUS10494399に記載されるように)分子を安定化させ、免疫原性を低下させるためにキャップされ得る。mRNAの1つ以上のヌクレオシドは、分子の安定性を増加させるか、又は先天性免疫系による分子の認識を低減するかのいずれかのために、1-メチル偽ウリジンで修飾又は置換されてもよい。修

飾ヌクレオシドの形態は、US 9 3 7 1 5 1 1に記載されている。mRNAに対して行われ得る他のタイプの修飾としては、抗リバースキャップ類似体（ARCA）、5'-メチルシチジン三リン酸塩（m5CTP）、N6-メチルアデノシン-5'-三リン酸塩（m6ATP）、2-チオウリジン三リン酸塩（s2UTP）、プソイドウリジン三リン酸塩、N¹-メチルプソイドウリジン三リン酸塩、又は5-メトキシウリジン三リン酸塩（5moUTP）の組み込みが挙げられる。mRNAはまた、5'及び／又は3'非翻訳領域（UTR）並びにポリアデニル化（ポリA）尾部への追加の修飾を含み得る（例えば、Kim et al., Molecular & cellular toxicology vol. 18, 1 (2022) : 1-8を参照されたい。）TAPをコードする核酸（例えば、mRNA）に対するこれらの修飾及び他の修飾は全て本開示に包含される。

10

【0125】

別の態様では、本開示は、配列番号配列番号1～23及び25～50、好ましくは配列番号1～23、例えば、配列番号1～17及び22のTAPのうちの1つ以上を含む（すなわち、提示するか、又は結合される）MHCクラスI分子を提供する。

【0126】

一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A2分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*02:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A3分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*03:01又はHLA-A*03:02分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A11分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*11:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A23分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*23:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A24分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*24:02分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A30分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*30:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A32分子であり、更なる実施形態では、HLA-A*32:01分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B07分子であり、更なる実施形態では、HLA-B*07:02分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B13分子であり、更なる実施形態では、HLA-B*13:02分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B18分子であり、更なる実施形態では、HLA-B*18:01分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B27分子であり、更なる実施形態では、HLA-B*27:05分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B52分子であり、更なる実施形態では、HLA-B*52:01分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-C06分子であり、更なる実施形態では、HLA-C*06:02分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-C04分子であり、更なる実施形態では、HLA-C*04:01分子である。別の実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-C12分子であり、更なる実施形態では、HLA-C*12:02分子である。

20

30

【0127】

一実施形態では、TAP（例えば、配列番号配列番号1～23及び25～50、好ましくは、配列番号1～23）は、MHCクラスI分子に非共有結合される（すなわち、TAPは、MHCクラスI分子のペプチド結合溝／ポケットに負荷されるか、又は非共有結合される）。別の実施形態では、TAPは、MHCクラスI分子（アルファ鎖）に共有結合／結合される。そのような構築物において、TAP及びMHCクラスI分子（アルファ鎖）は、典型的には短い（例えば、5～20個の残基、好ましくは約8～12個、例えば、10個）可撓性リンカー又はスペーサー（例えば、ポリグリシンリンカー）を有する、合成融合タンパク質として産生される。別の態様では、本開示は、MHCクラスI分子（アルファ鎖）に融合された本明細書に定義されるTAPを含む融合タンパク質をコードする核酸を提供する。一実施形態では、MHCクラスI分子（アルファ鎖）-ペプチド複合体は、多量体化される。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載のTAPで

40

50

負荷された（共有的に又は非共有的に）MHCクラスI分子の多量体を提供する。そのような多量体は、多量体の検出を可能にするタグ、例えば蛍光タグに付着され得る。MHC二量体、四量体、五量体、八量体などを含む、MHC多量体の産生のための多数の戦略が開発されている（Bakker and Schumacher, Current Opinion in Immunology 2005, 17: 428-433に概説されている）。MHC多量体は、例えば、抗原特異的T細胞の検出及び精製に有用である。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAPに特異的なCD8⁺Tリンパ球を検出又は精製（単離、濃縮）するための方法を提供し、TAPで負荷された（共有的に又は非共有的に）MHCクラスI分子の多量体と細胞集団を接触させることと、MHCクラスI多量体によって結合されたCD8⁺Tリンパ球を検出又は単離することと、を含む。MHCクラスI多量体によって結合されたCD8⁺Tリンパ球は、既知の方法、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）又は磁気活性化細胞選別（MACS）を使用して単離され得る。

10

【0128】

また別の態様では、本開示は、細胞（例えば、宿主細胞）を提供し、一実施形態では、本明細書に記載の核酸、ベクター、又は本開示のプラスミド（すなわち、1つ以上のTAPをコードする核酸又はベクター）を含む単離された細胞を提供する。別の態様では、本開示は、細胞であって、その細胞表面において、本開示によるTAPに結合した又はそれを提示するMHCクラスI分子（例えば、上に開示されたアレルのうちの1つのMHCクラスI分子）を発現する、細胞を提供する。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞、細胞株又は不死化細胞である。別の実施形態では、細胞は、抗原提示細胞（APC）である。一実施形態では、宿主細胞は、初代細胞、細胞株又は不死化細胞である。別の実施形態では、細胞は、抗原提示細胞（APC）である。核酸及びベクターは、従来の形質転換又はトランスフェクション技術を介して細胞に導入することができる。「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、マイクロ注入、及びウイルス媒介性トランスフェクションを含む、外来核酸を宿主細胞に導入するための技術を指す。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションするための好適な方法は、例えば、Sambrook et al.（上記）、及び他の実験室マニュアルに見出すことができる。インビボで哺乳動物細胞に核酸を導入する方法も既知であり、遺伝子治療のために本開示のベクター又はプラスミドを対象に送達するために使用され得る。

20

30

【0129】

APCなどの細胞は、当該技術分野で既知の様々な方法を使用して、1つ以上のTAPで負荷され得る。本明細書で使用される場合、TAPで「細胞を負荷する」とは、TAPをコードするRNA若しくはDNA又はTAPが細胞にトランスフェクトされること、あるいは代替的に、APCがTAPをコードする核酸で形質転換されること、を意味する。また、細胞を、細胞表面（例えば、ペプチドでパルスされた細胞）に存在するMHCクラスI分子に直接結合することができる外因性TAPと接触させることによって、細胞が負荷され得る。TAPはまた、MHCクラスI分子によってその提示を促進するドメイン又はモチーフ（例えば、小胞体（ER）回収シグナル、C末端Lys-Asp-Glu-Leu配列（Wang et al., Eur J Immunol. 2004 Dec; 34(12): 3582-94を参照されたい）に融合され得る。

40

【0130】

別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP（又は当該ペプチド（複数可）をコードする核酸）のうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせを含む、組成物又はペプチドの組み合わせ／プールを提供する。一実施形態では、組成物は、本明細書に定義されるTAPの任意の組み合わせ（2、3、4、5、6、7、8、9、10個、若しくはそれ以上のTAPの任意の組み合わせ）、又は当該TAPをコードする核酸の任意の組み合わせを含む。本明細書に定義されるTAPの任意の組み合わせ／部分的組み合わせを含む組

50

成物が本開示に包含される。別の実施形態では、組み合わせ又はプールは、1つ以上の既知の腫瘍抗原を含んでもよい。

【0131】

したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP又はSLP（複数可）（例えば、配列番号1～23及び25～50、好ましくは配列番号1～23、例えば、配列番号1～17、及び22の配列を含むか、又はそれらからなる）のうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせと、MHCクラスI分子（例えば、上に開示されたアレルのうちの1つのMHCクラスI分子）を発現する細胞と、を含む、組成物を提供する。本開示において使用するためのAPCは、特定の型の細胞に限定されるものではなく、CD8⁺Tリンパ球によって認識されるように、それらの細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている、樹状細胞（DC）、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、及びB細胞などのプロフェッショナルAPCを含む。例えば、APCは、末梢血単球からDCを誘導し、次いで、インビトロ、エキスピボ、又はインビボのいずれかで、TAPに接触させる（刺激する）ことによって得ることができる。APCはまた、インビボでTAPを提示するように活性化され得（本開示のTAPのうちの1つ以上が対象に投与される）、TAPを提示するAPCは、対象の体内で誘導される。「APCを誘導する」又は「APCを刺激する」という語句は、細胞を、1つ以上のTAP又はTAPをコードする核酸と接触させるか又はそれらを負荷し、その結果、MHCクラスI分子によって細胞の表面においてTAPが提示されることを含む。本明細書に記載されるように、本開示によると、TAPは、例えば、TAPの配列を含むより長いペプチド／ポリペプチド（天然タンパク質を含む）を使用して間接的に負荷され得、次いで、APCの内部でプロセッシングされて（例えば、プロテアーゼによって）、細胞の表面にTAP／MHCクラスI複合体を生成する。APCをTAPで負荷し、APCにTAPを提示させた後、APCをワクチンとして対象に投与することができる。例えば、エキスピボ投与は、（a）第1の対象からAPCを採取するステップと、（b）ステップ（a）のAPCをTAPと接触させて／を負荷して、APCの表面においてMHCクラスI／TAP複合体を形成するステップと、（c）治療を必要とする第2の対象に、ペプチド負荷APCを投与するステップと、を含むことができる。

【0132】

第1の対象及び第2の対象は、同じ対象（例えば、自己ワクチン）であってもよく、又は異なる対象（例えば、同種ワクチン）であってもよい。代替的に、本開示によると、抗原提示細胞を誘導するための組成物（例えば、薬学的組成物）を製造するための本明細書に記載のTAP（又はその組み合わせ）の使用が提供される。加えて、本開示は、抗原提示細胞を誘導するための薬学的組成物を製造するための方法又はプロセスを提供し、本方法又はプロセスが、TAP、又はその組み合わせを薬学的に許容可能な担体と混合又は配合するステップを含む。本明細書に定義されるTAPのうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせで負荷されたMHCクラスI分子（例えば、上記のHLA分子のうちのいずれか）を発現するAPCなどの細胞は、CD8⁺Tリンパ球、例えば、自己CD8⁺Tリンパ球を刺激／増殖するために使用され得る。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP（又はそれをコードする核酸若しくはベクター）、MHCクラスI分子を発現する細胞、及びTリンパ球、より具体的にはCD8⁺Tリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球を含む細胞集団）、のうちのいずれか1つ、又はそれらの任意の組み合わせを含む組成物を提供する。

【0133】

一実施形態では、組成物は、緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地（例えば、培養培地）を更に含む。更なる実施形態では、緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地は、薬学的に許容される緩衝液（複数可）、賦形剤（複数可）、担体（複数可）、希釈剤（複数可）及び／又は培地（複数可）である。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地」は、生理学的に適合性であり、有効成分（複数可）の生物活性の有効性を妨げず、かつ対象に毒性でない、任

10

20

30

40

50

意及び全ての溶媒、緩衝液、結合剤、潤滑剤、充填剤、増粘剤、崩壊剤、可塑剤、コーティング、バリア層製剤、潤滑剤、安定化剤、放出遅延剤、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤などが含まれる。医薬活性物質のためのそのような培地及び薬剤の使用は、当該技術分野で周知である（Rowe et al., Handbook of pharmaceutical excipients, 2003, 4th edition, Pharmaceutical Press, London UK）。任意の従来の培地又は薬剤が活性化合物（ペプチド、細胞）と不適合である限りを除いて、本開示の組成物におけるそれらの使用が企図される。一実施形態では、緩衝液、賦形剤、担体、及び／又は培地は、天然に存在しない緩衝液、賦形剤、担体、及び／又は培地である。一実施形態では、本明細書に定義されるTAP、又は当該1つ以上のTAPをコードする核酸（例えば、mRNA）のうちの1つ以上は、脂質小胞若しくはリポソーム、例えば、カチオン性脂質小胞若しくはリポソームなどの小胞内（例えば、Vitor MT et al., Recent Pat Drug Deliv Formul. 2013 Aug; 7(2): 99-110を参照されたい）又は他の好適な担体に含まれるか、又はそれらと複合体化される。

10

【0134】

別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP又はSLP（複数可）（例えば、配列番号1～23及び25～50、好ましくは配列番号1～23、例えば、配列番号1～17及び22の配列を含むか、又はそれらからなる）（又は当該ペプチド（複数可）若しくはSLP（複数可）をコードする核酸（複数可））のうちのいずれか1つのうちの多くのうちの1つ、又は任意の組み合わせと、緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地と、を含む組成物を提供する。細胞（例えば、APC、Tリンパ球）を含む組成物について、組成物は、生細胞の維持を可能にする好適な培地を含む。そのような培地の代表的な例としては、生理食塩水、Earlの緩衝塩類溶液（Life Technologies（登録商標））、又はPlasmaLyte（登録商標）（Baxter International（登録商標））が挙げられる。一実施形態では、組成物（例えば、薬学的組成物）は、「免疫原性組成物」、「ワクチン組成物」又は「ワクチン」である。本明細書で使用される場合、「免疫原性組成物」、「ワクチン組成物」、又は「ワクチン」という用語は、1つ以上のTAP又はワクチンベクターを含み、対象に投与された場合、その中に存在する1つ以上のTAPに対して免疫応答を誘発することができる組成物又は配合物を指す。哺乳動物における免疫応答を誘導するためのワクチン又はワクチンベクターの使用は、ワクチン分野で既知の任意の従来の経路によって、例えば、粘膜（例えば、眼、鼻腔内、肺、経口、胃、腸、直腸、膣、又は尿路）表面を介して、非経口（例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、又は腹腔内）経路を介して、又は局所投与（例えば、パッチなどの経皮送達システムを介して）によって投与されるワクチン又はワクチンベクターを含む。一実施形態では、TAP（又はその組み合わせ）は、TAP（複数可）の免疫原性を増加させるために担体タンパク質にコンジュゲートされる（コンジュゲートワクチン）。したがって、本開示は、TAP（若しくはその組み合わせ）又はTAPをコードする核酸（若しくはその組み合わせ）と、担体タンパク質と、を含む組成物（コンジュゲート）を提供する。例えば、TAP（複数可）又は核酸（複数可）は、Toll様受容体（TLR）リガンド（例えば、Zom et al., Adv Immunol. 2012, 114: 177-201を参照されたい）又はポリマー／デンドリマー（例えば、Liu et al., Biomacromolecules. 2013 Aug 12; 14(8): 2798-806を参照されたい）にコンジュゲート又は複合体化されてもよい。一実施形態では、免疫原性組成物又はワクチンは、アジュバントを更に含む。「アジュバント」とは、抗原（本開示によるTAP、核酸、及び／又は細胞）などの免疫原性剤に添加された場合、混合物への曝露時に、宿主において薬剤に対する免疫応答を非特異的に増強又は強化する物質を指す。現在ワクチンの分野で使用されているアジュバントの例としては、（1）鉱物塩（リン酸アルミニウム及び水酸化アルミニウムなどのアルミニウム塩、リン酸カルシウムゲル）、スクアレン、（2）油ベースのアジュバント（油エマル

20

30

40

50

ション及び界面活性剤ベースの配合物など）、例えば、MF59（マイクロ流動化洗剤安定化水中油型エマルション）、QS21（精製サポニン）、AS02 [SBAS2]（水中油型エマルション+MPL+QS-21）、（3）粒子状アジュバント、例えば、ピロソーム（インフルエンザヘマグルチニンを組み込んだ単層リポソームビヒクル）、AS04（MPLを含む [SBAS4] アルミニウム塩）、ISCOMS（サポニン及び脂質の構造複合体）、ポリラクチドコグリコリド（PLG）、（4）微生物誘導体（天然及び合成）、例えば、モノホスホリルリピドA（MPL）、Detox（MPL+M. Phle i 細胞壁骨格）、AGP [RC-529]（合成アシル化単糖類）、DC-Chol（リポソームへと自己構築することができるリポイド免疫促進物質）、OM-174（リピドA誘導体）、CpGモチーフ（免疫促進性CpGモチーフを含有する合成オリゴヌクレオチド）、改変LT及びCT（非毒性アジュバント効果を提供するために遺伝子修飾した細菌毒素免疫組織化体）、（5）内因性ヒト免疫調節剤、例えば、hGM-CSF若しくはhIL-12（タンパク質若しくはコードされるプラスミドのいずれかとして投与されるサイトカイン）、Immudaptin（C3dタンデムアレイ）、並びに／又は（6）金粒子などの不活性ビヒクルなどが挙げられる。

10

【0135】

一実施形態では、TAP（複数可）又はSLP（複数可）（例えば、配列番号1～23及び25～50、好ましくは配列番号1～23の配列を含むか、若しくはそれらからなる）（又は当該ペプチド（複数可）をコードするmRNAなどの核酸）、又はそれを含む組成物は、凍結乾燥された形態である。別の実施形態では、TAP（複数可）、SLP（複数可）、核酸（複数可）、又はそれらを含む組成物は、液体組成物である。更なる実施形態では、TAP（複数可）、SLP（複数可）、又は核酸（複数可）は、組成物中で約0.01 µg/mL～約100 µg/mLの濃度である。更なる実施形態では、TAP（複数可）、SLP（複数可）、又は核酸（複数可）は、組成物中で約0.2 µg/mL～約50 µg/mL、約0.5 µg/mL～約10、20、30、40、又は50 µg/mL、約1 µg/mL～約10 µg/mL、又は約2 µg/mLの濃度である。

20

【0136】

本明細書に記載されるように、本明細書に定義されるTAPのうちのいずれか1つ、又はそれらの任意の組み合わせで負荷された又はそれらに結合されたMHCクラスI分子を発現するAPCなどの細胞は、インビボ又はエキスピボでCD8⁺Tリンパ球を刺激／増殖するために使用され得る。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載のMHCクラスI分子／TAP複合体と相互作用又は結合することができるT細胞受容体（TCR）分子、及びそのようなTCR分子をコードする核酸分子、及びそのような核酸分子を含むベクターを提供する。本開示によるTCRは、MHCクラスI分子に負荷される又はそれによって提示されるTAPと、好ましくはインビトロ又はインビボで生細胞の表面において、特異的に相互作用又は結合することができる。

30

【0137】

本明細書で使用されるTCRという用語は、可変結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通領域、及び短い細胞質尾部を有する免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーを指し（例えば、Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照）、MHC受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合することができる。TCRは、細胞の表面に見出され得、一般に、α鎖及びβ鎖（それぞれTCRα及びTCRβとしても知られる）を有するヘテロ二量体からなる。免疫グロブリンと同様に、TCR鎖（例えば、α鎖、β鎖）の細胞外部分は、2つの免疫グロブリン領域、可変領域（例えば、TCR可変α領域又はVα、及びTCR可変β領域又はVβ；典型的には、N末端におけるRabat番号付けに基づくアミノ酸1～116）と、細胞膜に隣接する1つの定常領域（例えば、TCR定常ドメインα又はCα、及び典型的には、Rabatに基づくアミノ酸117～259、TCR定常ドメインβ又はCβ、典型的には、Rabatに基づく

40

50

くアミノ酸 117～295) と、を含有する。また、免疫グロブリンと同様に、可変ドメインは、フレームワーク領域 (FR) によって分離された相補性決定領域 (各鎖における CDR3) を含む。特定の実施形態では、TCR は、T 細胞 (又は T リンパ球) の表面に見出され、CD3 複合体と会合する。

【0138】

TCR 及び具体的には本開示の TCR をコードする核酸を適用して、例えば、T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球) 又は MHC クラス I / TAP 複合体を特異的に認識する新規の T リンパ球クローンを生成する他のタイプのリンパ球を、遺伝子的に形質転換／修飾することができる。特定の実施形態では、患者から得られた T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球) は、TAP を認識する 1 つ以上の TCR を発現するように形質転換され、形質転換された細胞が、患者に投与される (自己細胞輸血)。特定の実施形態では、ドナーから得られた T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球) は、TAP を認識する 1 つ以上の TCR を発現するように形質転換され、形質転換された細胞が、レシピエントに投与される (同種細胞輸血)。別の実施形態では、本開示は、TAP 特異的 TCR をコードするベクター又はプラスミドによって形質転換／トランスフェクトされた T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球) を提供する。更なる実施形態では、本開示は、TAP 特異的 TCR で形質転換された自己細胞又は同種細胞で患者を治療する方法を提供する。特定の実施形態では、TCR は、例えば、CRISPR、TALEN、ジンクフィンガー、又は他の標的化破壊システムを使用して、内因性遺伝子座 (例えば、内因性 TRAC 及び／又は TRBC 遺伝子座) を置き換えることによって、初代 T 細胞 (例えば、細胞傷害性 T 細胞) において発現される。

10

20

【0139】

別の実施形態では、本開示は、上述の TCR をコードする核酸を提供する。更なる実施形態では、核酸は、上記のベクターなどのベクターに存在する。更なる実施形態では、核酸は、mRNA 分子である。

【0140】

なお更なる実施形態では、がん (例えば、結腸直腸がん) の治療のための自己細胞又は同種細胞の製造における腫瘍抗原特異的 TCR の使用が提供される。

【0141】

いくつかの実施形態では、本開示の組成物 (例えば、薬学的組成物) で治療される患者は、抗腫瘍剤及び／又は免疫療法 (例えば、CAR 療法) での治療の前又は後に治療される。本開示の組成物には、TAP に対してエキスピボで活性化された同種 T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球)、TAP で負荷された同種若しくは自己 APC ワクチン、TAP ワクチン、及び同種若しくは自己 T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球)、又は腫瘍抗原特異的 TCR で形質転換されたリンパ球が含まれる。本開示による TAP を認識することができる T リンパ球クローンを提供するための方法は、対象 (例えば、移植片レシピエント)、例えば、ASCT 及び／又はドナーリンパ球輸注 (DLI) レシピエントにおいて、TAP を発現する腫瘍細胞のために生成され得、それを特異的に標的化し得る。したがって、本開示は、TAP / MHC クラス I 分子複合体を特異的に認識するか、又はそれに結合することができる T 細胞受容体をコード及び発現する CD8⁺ T リンパ球を提供する。当該 T リンパ球 (例えば、CD8⁺ T リンパ球) は、組換え (操作された) 又は自然選択された T リンパ球であり得る。したがって、本明細書は、本開示の CD8⁺ T リンパ球を産生するための少なくとも 2 つの方法を提供し、T 細胞活性化及び T 細胞増殖の誘発に資する条件下で、未分化リンパ球を (典型的には、APC などの細胞の表面において発現される) TAP / MHC クラス I 分子複合体と接触させるステップを含み、これは、インビトロ又はインビボで (すなわち、APC が TAP で負荷される APC ワクチンを投与された患者において、又は TAP ワクチンで治療された患者において) 行うことができる。MHC クラス I 分子に結合した TAP の組み合わせ又はプールを使用して、複数の TAP を認識することができる CD8⁺ T リンパ球の集団を生成することが可能である。代替的に、腫瘍抗原特異的 T リンパ球又は標的 T リンパ球は、MHC クラス I 分子 / T

30

40

50

A P 複合体（すなわち、操作又は組換え C D 8 + T リンパ球）に特異的に結合する T C R（より具体的には、アルファ鎖及びベータ鎖）をコードする 1 つ以上の核酸（遺伝子）をクローニングすることによって、インビトロで、又はエクスビボで産生／生成することができる。本開示の T A P 特異的 T C R をコードする核酸は、当該技術分野で既知の方法を使用して、エクスビボで T A P に対して活性化された T リンパ球から（例えば、T A P で負荷された A P C により）、又はペプチド／M H C 分子複合体に対して免疫応答を示す個体から、得ることができる。本開示の T A P 特異的 T C R は、移植片レシピエント又は移植片ドナーから得られた宿主細胞及び／又は宿主リンパ球において組換え発現され、任意選択的に、インビトロで分化させて、細胞傷害性 T リンパ球（C T L）を提供することができる。T C R アルファ鎖及びベータ鎖をコードする核酸（複数可）（導入遺伝子（複数可））は、トランスフェクション（例えば、電気穿孔）又は形質導入（例えば、ウイルスベクターを使用する）などの任意の好適な方法を使用して、T 細胞（例えば、治療される対象又は別の個体由来の）に導入され得る。T A P に特異的な T C R を発現する操作された C D 8 + T リンパ球は、周知の培養方法を使用して、インビトロで増殖させることができる。

10

【0142】

本開示は、本明細書に記載される T C R を発現する免疫エフェクター細胞を作製するための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、免疫エフェクター細胞が本明細書に記載される 1 つ以上の T C R を発現するように、免疫エフェクター細胞、例えば、結腸直腸がん（例えば、結腸がん、直腸がん）を有する対象などの対象から単離された免疫エフェクター細胞をトランスフェクト又は形質導入することを含む。特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、個体から単離され、更にインビトロで操作することなく遺伝子修飾される。そのような細胞は、次いで、個体に直接再投与することができる。更なる実施形態では、免疫エフェクター細胞は、最初に活性化され、インビトロで増殖するように刺激した後、T C R を発現するように遺伝子修飾される。これに関して、免疫エフェクター細胞は、遺伝子修飾される前又は遺伝子修飾された後に培養され得る（すなわち、本明細書に記載される T C R を発現するように形質導入又はトランスフェクトされる）。

20

【0143】

本明細書に記載の免疫エフェクター細胞のインビトロ操作又は遺伝子修飾の前に、細胞源を、対象から得ることができる。特に、本明細書に記載される T C R とともに使用するための免疫エフェクター細胞は、T 細胞を含む。T 細胞は、末梢血単核細胞（P B M C）、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺問題、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、いくつかの供給源から得ることができる。特定の実施形態では、T 細胞は、F I C O L L（商標）分離などの当業者に既知の任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液の単位から得ることができる。一実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエレーシスによって得ることができる。アフエレーシス生成物は、典型的には、リンパ球を含有し、T 細胞、単球、顆粒球、B 細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板が含まれる。一実施形態では、アフエレーシスによって採取された細胞は、洗浄して血漿画分を除去し、その後のプロセッシングのために細胞を適切な緩衝液又は培地中に入れることができる。本発明の一実施形態では、細胞は、P B S で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠いてもよく、又は全てではないが多くの二価カチオンを欠いてもよい。当業者によって理解されるであろうが、洗浄ステップは、例えば、半自動フロースルー遠心分離を使用することによって、当業者に既知の方法によって達成され得る。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性の緩衝液又は緩衝液を含む若しくは含まない他の生理食塩水に再懸濁され得る。特定の実施形態では、アフエレーシス試料の望ましくない成分は、培地に直接再懸濁された細胞において除去され得る。特定の実施形態では、T 細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって（例えば、P E R C O L L（商標）勾配を介した遠心分離によって）、末梢血単核細胞（P B M C）から単離される。C D 2 8 +、C D 4 +、C D 8 +、C D 4 5 R A +、及び C D 4 5 R O + T 細胞などの T 細胞の特定の亜集団は、ポジティブ又はネガティブ選択技術によ

30

40

50

って更に単離され得る。例えば、ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択された細胞に固有の表面マーカーを対象とする抗体の組み合わせによって達成することができる。本明細書で使用するための1つの方法は、負の磁気免疫付着又はフローサイトメトリーによる細胞選別及び／又は選択であり、これは、ネガティブ選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーを対象とするモノクローナル抗体のカクテルを使用する。例えば、ネガティブ選択によってCD8⁺細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD4に対する抗体を含む。フローサイトメトリー及び細胞選別を使用して、本開示で使用するための目的の細胞集団を単離することもできる。PBMCは、本明細書に記載される方法を使用して、TCRによる遺伝子修飾のために直接使用することができる。特定の10
実施形態では、PBMCの単離後、Tリンパ球は更に単離され、特定の実施形態では、遺伝子修飾及び／又は増殖の前又は後のいずれかで、細胞傷害性Tリンパ球及びヘルパーTリンパ球の両方を、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜集団に選別することができる。

【0144】

本開示は、TAP（すなわち、細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子に結合したTAP）、又はTAPの組み合わせによって、特異的に誘導、活性化、及び／又は増幅（増殖）される単離された免疫細胞（例えば、CD8⁺Tリンパ球）を提供する。本開示はまた、本開示によるTAP又はその組み合わせ（すなわち、MHCクラスI分子に結合した1つ以上のTAP）及び当該TAP（複数可）を認識することができるCD8⁺20
Tリンパ球を含む組成物を提供する。別の態様では、本開示は、本明細書に記載される1つ以上のMHCクラスI分子／TAP複合体を特異的に認識するCD8⁺Tリンパ球において濃縮された細胞集団又は細胞培養（例えば、CD8⁺Tリンパ球集団）を提供する。そのような濃縮された集団は、本明細書に開示されるTAPのうちの1つ以上で負荷された（例えば、これらを提示する）MHCクラスI分子を発現するAPCなどの細胞を使用して、特異的Tリンパ球のエキスビボ増殖を行うことによって得ることができる。本明細書で使用される「濃縮」とは、集団中の腫瘍抗原特異的CD8⁺Tリンパ球の割合が、天然細胞集団、すなわち、特定のTリンパ球のエキスビボ増殖のステップに供されていない集団と比較して有意に高いことを意味する。更なる実施形態では、細胞集団におけるTAP特異的CD8⁺Tリンパ球の割合は、少なくとも約0.5%、例えば、少なくとも約1%、1.5%、2%、又は3%である。いくつかの実施形態では、細胞集団におけるTAP特異的CD8⁺Tリンパ球の割合は、約0.5～約10%、約0.5～約8%、約0.5～約5%、約0.5～約4%、約0.5～約3%、約1%～約5%、約1%～約4%、約1%～約3%、約2%～約5%、約2%～約4%、約2%～約3%、約3%～約5%、又は約3%～約4%である。目的の1つ以上のMHCクラスI分子／ペプチド（TAP）複合体を特異的に認識するCD8⁺Tリンパ球で濃縮されそのような細胞集団又は培養物（例えば、CD8⁺Tリンパ球集団）は、以下に詳細に記載されるように、腫瘍抗原ベ30
ースのがん免疫療法において使用され得る。いくつかの実施形態では、TAP特異的CD8⁺Tリンパ球の集団は、例えば、本明細書に定義されるTAP（複数可）で負荷された（共有的に又は非共有的に）MHCクラスI分子の多量体などの親和性に基づくシステムを使用して、更に濃縮される。したがって、本開示は、TAP特異的CD8⁺Tリンパ球の精製又は単離された集団を提供し、例えば、TAP特異的CD8⁺Tリンパ球の割合は、少なくとも約50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%である。

【0145】

別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるHLA分子などのHLA分子に結合した本明細書に記載のTAPを含む複合体に特異的に結合する抗体若しくはその抗原結合断片、又は可溶性TCRを提供する。そのような抗体は、一般的に、TCR様抗体と称される。本明細書で使用する用語「抗体又はその抗原結合断片」は、所望の抗原特異性／結合活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナ40

ル抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、CDR-グラフト抗体、キメラ抗体、及び抗体断片を含むあらゆる種類の抗体／抗体断片を指す。抗体断片は、全長抗体の一部、一般には抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片、ダイアボディ、線形抗体、一本鎖抗体分子（例えば、一本鎖Fv、scFv）、単ドメイン抗体（例えば、ラクダ科由来）、サメNAR単ドメイン抗体、並びに抗体断片、一本鎖ダイアボディ（scDb）、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）、二重親和性リターゲティング分子（DART）、二価scFv-Fc、及び三価scFv-Fcから形成された多重特異性抗体が挙げられる。抗体断片は、V_H領域（V_H、V_H-V_H）、アンチカリン、ペプボディ、抗体-T細胞エプトー融合体（トロイボディ）、又はペプチボディなど、CDRや抗原結合ドメインを含む結合部位を指す場合もあるが、これらに限定されない。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、一本鎖抗体、好ましくは一本鎖Fv（scFv）である。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメイン、例えば、軽鎖及び／若しくは重鎖の定常ドメイン、又はその断片を含む。更なる実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、抗体の定常重鎖の断片結晶化可能な（Fc）断片を含む。一実施形態では、抗体又は抗原結合断片は、Fc断片（scFv-Fc）を含むscFvである。一実施形態では、scFv成分は、リンカー、例えば、ヒンジによってFc断片に接続される。Fc領域の存在は、腫瘍細胞に対する補体依存性細胞傷害性（CDC）又は抗体依存性細胞傷害性（ADCC）応答を誘導するのに有用である。

10

20

【0146】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、二重特異性抗体又はその抗原結合断片などの多重特異性抗体又はその抗原結合断片であり、多重特異性抗体又は抗体断片の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、HLA分子に結合した本明細書に記載のTAPを含む複合体を認識する。一実施形態では、多重特異性抗体又は抗体断片の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫細胞エフェクター分子を認識する。「免疫細胞エフェクター分子」という用語は、免疫細胞によって発現され、その多重特異性抗体又は抗体断片による係合が免疫細胞の活性化をもたらす分子（例えば、タンパク質）を指す。免疫細胞エフェクター分子の例としては、CD8⁺T細胞などのT細胞におけるCD3シグナル伝達複合体、及びNK細胞上の様々な活性化受容体（NKG2D、KIR2DS、NKp44など）が挙げられる。更なる実施形態では、多重特異性抗体又は抗体断片の抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つは、T細胞（例えば、抗CD3）中のCD3シグナル伝達複合体を認識し、係合する。更なる実施形態では、多重特異性抗体又は抗体断片は、一本鎖ダイアボディ（scDb）である。更なる実施形態では、scDbは、HLA分子に結合した本明細書に記載されるTAPを含む複合体に結合する第1の抗体断片（例えば、scFv）と、T細胞内のCD3シグナル伝達複合体（例えば、抗CD3-scFv）などの免疫細胞エフェクター分子に結合し、係合する第2の抗体断片（例えば、scFv）と、を含む。そのような構築物は、例えば、多重特異性抗体又は抗体断片によって認識される腫瘍抗原／MHC複合体を発現する腫瘍細胞の細胞傷害性T細胞媒介性殺傷を誘導するために使用され得る。抗体又はその抗原結合断片は、CAR⁺T細胞、CAR⁺NK細胞などを産生するためのキメラ抗原受容体（CAR）としても使用され得る。CARは、所望の抗原（例えば、MHC／TAP複合体）に対して特異性を提供するリガンド結合ドメイン（例えば、抗体又は抗体断片）を、T細胞又はNK細胞活性化ドメインなどの活性化細胞内ドメイン（又はシグナル伝達ドメイン）部分と組み合わせ、一次活性化シグナルを提供する。腫瘍細胞によって発現される分子に結合することができる抗体、より具体的にはscFvの抗原結合断片は、CARにおけるリガンド結合ドメインとして一般的に使用される。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載される抗体又は抗体断片（例えば、scFv）を発現する、宿主細胞、好ましくはT細胞又はNK細胞などの免疫細胞を提供する。

30

40

【0147】

一実施形態では、可溶性TCRは、可溶性治療二重特異的TCRである（例えば、Ro

50

binson et al., FEBS J. 2021 Nov; 288 (21): 6159-6173、Dilchert et al., Antibodies (Basel). 2022 May 10; 11 (2): 34を参照されたい)。

【0148】

本開示は、上記の免疫細胞(CD8⁺Tリンパ球、CAR T細胞)又はTAP特異的CD8⁺Tリンパ球の集団を含む薬学的組成物又はワクチンに更に関する。そのような薬学的組成物又はワクチンは、上記のように、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤及び／又はアジュバントを含み得る。

【0149】

本開示は、本開示による任意のTAP又はSLP(例えば、配列番号1~23及び25~50、好ましくは配列番号1~23、例えば、配列番号1~17及び22の配列のうちのいずれかを含むか、又はそれらからなる)、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、抗体／抗体断片、細胞(例えば、Tリンパ球、APC CAR T細胞)、及び／若しくは組成物、又はそれらの任意の組み合わせの、医薬としての使用又は医薬の製造における使用に更に関する。一実施形態では、医薬は、がんの治療のためのものであり、例えば、がんワクチンである。本開示は、がんの治療における、例えば、がんワクチンとして使用するための、本開示による任意のTAP、SLP、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、抗体／抗体断片、細胞(例えば、Tリンパ球、APC)、及び／若しくは組成物(例えば、ワクチン組成物)、又はそれらの任意の組み合わせに関する。本明細書で特定されるTAP配列は、i) 腫瘍患者に注射される腫瘍抗原特異的T細胞のインビトロ刺激及び増殖のために使用される、及び／又はii) がん患者(例えば、CRC患者)における抗腫瘍T細胞応答を誘導若しくは増強するためのワクチンとして使用される、合成ペプチドの産生のために使用され得る。一実施形態では、がん(例えば、CRC)は、本明細書に記載されるTAPのうちの1つ以上を発現する。

【0150】

別の態様では、本開示は、対象において、CRCなどのがんを治療するためのワクチンとして、本明細書に記載のTAP(例えば、配列番号1~23及び25~50、好ましくは配列番号1~23、例えば、配列番号1~17及び22)、又はそれらの組み合わせ(例えば、ペプチドプール)、又はTAP(複数可)をコードする1つ以上の核酸の使用を提供する。本開示はまた、対象において、CRCなどのがんを治療するためのワクチンとして使用するための、本明細書に記載のTAP、又はその組み合わせ(例えば、ペプチドプール)、又はTAP(複数可)をコードする1つ以上の核酸のものを提供する。一実施形態では、対象は、TAP特異的Tリンパ球(例えば、CD8⁺Tリンパ球)のレシピエントである。したがって、別の態様では、本開示は、CRCなどのがんを治療する(例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷する)方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象に、有効量の、(APCなどの細胞の表面に発現される)1つ以上のMHCクラスI分子／TAP複合体を認識する(すなわち、それらに結合するTCRを発現する)Tリンパ球(例えば、CD8⁺Tリンパ球)を投与(注入)することを含む。一実施形態では、本方法は、当該CD8⁺Tリンパ球の投与／注入後、当該対象に、有効量のTAP若しくはその組み合わせ、又はTAP(複数可)をコードする1つ以上の核酸のもの、及び／又はTAP(複数可)で負荷されたMHCクラスI分子(複数可)を発現する細胞(例えば、樹状細胞などのAPC)を投与することを更に含む。なお更なる実施形態では、本方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の1つ以上のTAPで負荷された樹状細胞を投与することを含む。なお更なる実施形態では、本方法は、それを必要とする患者に、治療有効量の、MHCクラスI分子によって提示されるTAPに結合する組換えTCRを発現する同種又は自己細胞を投与することを含む。

【0151】

別の態様では、本開示は、対象においてCRCなどのがんを治療する(例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷する)ための、TAPで負荷された(これを提示する)1つ以上のMHCクラスI分子を認識するTリンパ球(例えば、CD8⁺Tリンパ球)

、又はその組み合わせの使用を提供する。別の態様では、本開示は、対象においてCRCなどのがんを治療する（例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷する）ための医薬の調製／製造のための、TAPで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を認識するTリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球）、又はその組み合わせの使用を提供する。別の態様では、本開示は、対象においてCRCなどのがんの治療（例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷する）に使用するための、TAPで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を認識するTリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球）、又はその組み合わせを提供する。更なる実施形態では、本使用は、当該TAP特異的CD8⁺Tリンパ球の使用後、有効量のTAP（若しくはその組み合わせ）、及び／又はTAPで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を発現する細胞（例えば、APC）の使用を更に含む。

10

【0152】

本開示はまた、対象において本明細書に開示されるTAP（例えば、配列番号1～23及び25～50、好ましくは配列番号1～23、例えば、配列番号1～17及び22）のうちのいずれか、又はその組み合わせで負荷されたヒトクラスI MHC分子を発現する腫瘍細胞（例えば、結腸直腸がん細胞）に対する免疫反応を作成する方法を提供し、この方法は、TAP又はTAPの組み合わせで負荷されたクラスI MHC分子を特異的に認識する細胞傷害性Tリンパ球を投与することを含む。本開示はまた、TAP又はその組み合わせで負荷されたヒトクラスI MHC分子を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するための、本明細書に開示されるTAPのうちのいずれか又はTAPの組み合わせで負荷されたクラスI MHC分子を特異的に認識する細胞傷害性Tリンパ球の使用を提供する。

20

【0153】

一実施形態では、がんは、結腸直腸がんである。更なる実施形態では、がんは、結腸がんである。別の実施形態では、がんは、直腸がんである。一実施形態では、結腸直腸がんは、マイクロサテライト不安定性（MSI）を特徴とする。一実施形態では、結腸直腸がんは、マイクロサテライト安定性（MSS）を特徴とする。一実施形態では、結腸直腸がんは、RAS（例えば、KRAS）及び／又はRAF変異を特徴とする。別の実施形態では、結腸直腸がんは、化学療法に対して耐性／難治性である。別の実施形態では、結腸直腸がんは、EGFR阻害剤に対して耐性／難治性である。

30

【0154】

一実施形態では、本明細書に記載の方法又は使用は、治療／使用の前に、患者によって発現されるHLAクラスIIアレルを決定することと、患者によって発現されるHLAクラスIIアレルのうちの1つ以上に結合するTAPを投与又は使用することと、を更に含む。例えば、患者がHLA-A2*01及びHLA-B07*02を発現すると決定された場合、配列番号6のTAP（HLA-A2*01に結合するもの）及び／又は配列番号2、21、24、及び／若しくは50のTAP（HLA-B07*02に結合するもの）の組み合わせが、患者に投与又は使用され得る。

【0155】

一実施形態では、本開示によるTAP、SLP、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、抗体／抗体断片、細胞（例えば、Tリンパ球、CAR T若しくはNK細胞、APC）、及び／若しくは組成物、又はそれらの任意の組み合わせは、がん（例えば、CRC）を治療するための1つ以上の追加の活性剤又は療法、例えば、化学療法（例えば、ビンカルカロイド、微小管形成を妨げる薬剤（例えば、コルヒチン及びその誘導体）、抗血管新生剤、治療用抗体、EGFR標的化剤、チロシンキナーゼ標的化剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、遷移金属錯体、プロテアソーム阻害剤、代謝拮抗剤（例えば、ヌクレオシド類似体）、アルキル化剤、白金系薬剤、アントラサイクリン抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、マクロライド、レチノイド（例えば、オールトランスレチノイン酸又はその誘導体）、ゲルダナマイシン又はその誘導体（例えば、17-AAG）、手術、免疫チェックポイント阻害剤若しくは免疫療法剤（例えば、抗PD-1／PD-L1抗体などのPD

40

50

ー 1 / P D - L 1 阻害剤、抗 C T L A - 4 抗体などの C T L A - 4 阻害剤、抗 B 7 - 1 / B 7 - 2 抗体などの B 7 - 1 / B 7 - 2 阻害剤、抗 T I M 3 抗体などの T I M 3 阻害剤、抗 B T L A 抗体などの B T L A 阻害剤、抗 C D 4 7 抗体などの C D 4 7 阻害剤、抗 G I T R 抗体などの G I T R 阻害剤)、腫瘍抗原に対する抗体(例えば、抗 C D 1 9、抗 C D 2 2 抗体)、細胞ベースの療法(例えば、C A R T 細胞、C A R N K 細胞)、並びにサイトカイン(例えば、I L - 2、I L - 7、I L - 2 1、I L - 1 5)と組み合わせて使用することができる。一実施形態では、本開示による T A P、核酸、発現ベクター、T 細胞受容体、細胞(例えば、T リンパ球、A P C)、及び/又は組成物は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与/使用される。一実施形態では、本開示による T A P、核酸、発現ベクター、T 細胞受容体、細胞(例えば、T リンパ球、A P C)、及び/又は組成物は、C R C の治療に使用される 1 つ以上の療法(例えば、手術、化学療法(例えば、5 - フルオロウラシル、カペシタビン、オキサリプラチン、イリノテカン、ラルチトレキセド、トリフルリジン、チピラシルを使用)、放射線療法、ペバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、レゴラフェニブを組み合わせて投与/使用される。

10

【0156】

追加の療法は、本開示による、T A P、S L P、核酸、発現ベクター、T 細胞受容体、抗体/抗体断片、細胞(例えば、T リンパ球、C A R T 若しくは N K 細胞、A P C)、及び/又は組成物の投与前、投与と同時に、又は投与後に投与され得る。

【実施例】

【0157】

20

本開示は、以下の非限定的な例によって更に詳細に例示される。

【0158】

実施例 1: 実験手順

細胞株。4 種類の結腸直腸がん細胞株細胞株 [C O L O 2 0 5 (A T C C (登録商標) C C L - 2 2 2 (商標))、H C T 1 1 6 (A T C C (登録商標) C C L - 2 4 7 (商標))、R K O (A T C C (登録商標) C R L - 2 5 7 7 (商標))、S W 6 2 0 [S W - 6 2 0] (A T C C (登録商標) C C L - 2 2 7 (商標))] 及び 1 種類の正常な胎児小腸細胞株 [H I E C 6 (A T C C (登録商標) C R L 3 2 6 6 (商標))] を、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) から得た。C O L O 2 0 5、H C T 1 1 6、及び S W 6 2 0 を、1 0 % のウシ胎児血清 (F B S) を補充した R P M I - 1 6 4 0 (G i b c o) 中で成長させ、R K O を、1 0 % の F B S を補充したイーグル最小必須培地 (E M E M) (A T C C (登録商標)) 中で成長させ、H I E C - 6 を、2 0 m M の H E P E S (G i b c o)、1 0 m M の G l u t a M A X (登録商標) (G i b c o)、1 0 n g / m L の上皮成長因子 (E G F) (G i b c o)、及び最終濃度 4 % になるまでの F B S を補充した O p t i M E M (登録商標) 1 R e d u c e d S e r u m M e d i u m (G i b c o) 中で成長させた。全ての細胞を 3 7 ° C、5 % C O 2 で維持した。収集のために、細胞を、温かい P B S ですすいだ後、3 7 ° C、5 % C O 2 で 5 ~ 1 5 分間かけて T r y p L E (商標) E x p r e s s E n z y m e (1 X) (G i b c o) によりトリプシン処理した。次に、収穫した材料を 1 0 0 0 r p m で 5 分間回転させ、暖かい P B S で 1 回すすぎ、次に氷冷 P B S に再懸濁させた。細胞カウントの後、 2×10^8 個の C R C 細胞の複製物をペレット化し、更なる使用まで - 8 0 ° C で凍結させた。C R C 細胞株の M H C クラス I 表面密度は、製造業者の指示に従って、W 6 / 3 2 抗 H L A クラス I 抗体 (B i o X C e l l) を使用して Q i f i k i t (商標) (A g i l e n t) によって決定した。

30

40

【0159】

一次組織。一致した結腸腺がん腫瘍及び正常な隣接組織 (N A T) からなる 6 対の一次ヒト試料を T i s s u e S o l u t i o n s から購入した。組織試料を、治療のファーストラインとして手術を受けた患者から採取し、液体窒素中で急速凍結させた。一次組織試料に関する更に多くの情報は、表 2 中に見出すことができる。

【0160】

50

RNA抽出。細胞株のRNA抽出のために、100万～200万個の細胞を収集し、氷冷PBSで1回洗浄した。次に、細胞をTrizol（商標）（Invitrogen）に再懸濁させた。細胞株及び一次組織試料について、製造業者によって推奨されるようにAllPrep（商標）DNA/RNA/miRNA Universalキット（Qiagen）又はRNeasy（商標）Miniキット（Qiagen）を使用して、全RNAを単離した。

【0161】

RNA配列決定。500ngの全RNAをライブラリー調製に使用した。RNA品質制御を、2100 Bioanalyzer（商標）システム（Agilent Technologies）上のBioanalyzer（商標）RNA 6000 Nanoアッセイにより評価し、全ての試料が8を超えるRINを有していた。KAPA mRNA seq Hyperprep（商標）キット（Roche）により、ライブラリーを調製した。ライゲーションを、IlluminaデュアルインデックスUMI（IDT）により行った。Bioanalyzer（商標）DNA1000チップ上で検証され、Qubit及びqPCRによって定量化された後、ライブラリーを等モル濃度までプールし、Nextseq（商標）High Output 150（2×75bp）サイクルキットを使用して、Illumina Nextseq500により配列決定した。細胞株及び組織試料について、それぞれ平均で1億2900万回及び9500万回のペアエンドPFリードを生成した。ライブラリー調製及び配列決定は、Institute for Research in Immunology and Cancer（IRIC）のGenomic Platformで行った。

【0162】

バイオインフォマティクス分析。配列を、Trimmomaticバージョン0.35を使用してトリミングし（17）、STARバージョン2.7.1aを使用して、参照ヒトゲノムバージョンGRCh38（Ensembl 99に基づく、Gencode version 33からの遺伝子アノテーション）にアラインメントした（18）。遺伝子発現は、これらの鎖状RNAライブラリーについて、TPM値において、正規化された遺伝子及び転写産物レベル発現を得るために、STARから直接的にリードカウントとして得られ、及びRSEMを使用して計算された（19）。

【0163】

HLA遺伝子型決定。OptiType（<https://github.com/FRED-2/OptiType>）を使用して、細胞株及び組織のHLA遺伝子型決定を行った（20）。

【0164】

マイクロサテライト不安定性予測。一次腫瘍試料のMSIステータスは、対になった腫瘍及びNATを使用して、MSI sensorプログラムを使用して予測された（<https://github.com/ding-lab/msisensor>）（21）。

【0165】

差次的発現分析。DESeq2バージョン1.22.2（22）を使用して、遺伝子リードカウントを正規化し、腫瘍試料と正常試料との間の差次的発現を計算した。主成分分析（PCA）を、最初の2つの最も重要な成分について正規化されたlogリードカウントを使用して生成した。細胞株の差次的発現分析のために、正常細胞株（HIEC-6）と比較した、4種類のCRC細胞株の平均発現間の倍率変化を計算した。有意に差次的に発現された遺伝子（DEG）は、（0.05未満のpadjを有するもの）であり、Metascapeツールを使用して、GO termについて|log2倍率変化|>1であるとみなされるものであった（23）。組織の対応あり差次的発現分析のために、TPM正規化された値を使用して、腫瘍／NAT対を比較した。調整されたp値によってフィルタリングするのではなく、組織の単回複製のみを配列決定したため、|log2倍率変化|>1を有するGO term分析について6名全ての対象において有意に差次的に発現された遺伝子のみを選択した。MSS組織とMSI組織との間で差次的に発現した遺伝

子を調べるとき、同じ倍率変化閾値を適用した。MSI DEGのGO term分析のために、両方のMSI組織において排他的に差異的に発現された（すなわち、任意のMSS組織におけるDEGとはみなされなかった）遺伝子を選択した。MSS DEGのGO term分析については、遺伝子が3つ以上のMSS組織において差異的に発現された場合に、その遺伝子が考慮された。

【0166】

組織試料のトランスクリプトーム分析。組織試料のトランスクリプトームにおける様々なバイオタイプの割合を、以前に記載されているように決定した（24）。簡潔に述べると、Kallisto（19）によるEnsemblアノテーション付き転写産物の定量化及びアラインメントの後、転写産物及び反復要素を、USCS Table Browser GRCh38リピートマスカデータベースからの遺伝子リピート特定を追加したEnsemblアノテーション付き転写産物を含むKallistoインデックスを使用してアノテーションした（25）。

【0167】

変異プロファイル／「遺伝子バリエーション」。SNPEff（<https://pcingola.github.io/SnpEff/#snpeff>）を使用して、細胞株及び一次生検の両方について、遺伝子バリエーションコーリングを実施した（26）。

【0168】

データベース生成。全般的ながんデータベースを、以前に記載されているように構築した（16）。簡潔に述べると、RNA-seqリードを、Trimmomaticバージョン0.35を使用してトリミングし（17）、STARバージョン2.7.1aを使用して、参照ヒトゲノムバージョンGRCh38（Ensembl 99に基づく、Gencode version 33からの遺伝子アノテーション）にアラインメントした（18）。Kallisto（<https://pachterlab.github.io/kallisto>）を使用して、TPMにおける転写産物発現を定量化した（19）。試料特異的エキソームは、Freebayes（<https://github.com/ekg/freebayes>）で特定された単一ヌクレオチドバリエーション（品質>20）をPyGenoに組み込むことによって構築された（27）。次いで、TPM>0を有するアノテーション付きオープンリーディングフレームを、インシリコで翻訳し、fastaフォーマットでカノニカルプロテオームに追加した。がん特異的プロテオームを生成するために、RNA-seqリードを、kmerとして知られる33個のヌクレオチド配列に切断し、mTECにおいて2未満で存在するkmerのみ、又は細胞株及び組織について一致したNATをそれぞれ保存した。重複するkmerをコンティグに組み立て、次いで3フレームをインシリコで翻訳した。注目すべきことに、kmerアプローチによって生成された短いペプチド配列を、次いで、およそ1万個のアミノ酸のより長い配列に連結した。これらのペプチドを、セパレータとして「JJ」配列を使用して連結し、これをPeaksX+ソフトウェアによって内部的に認識し、この配列の出現時に配列を分割した。次いで、カノニカルプロテオーム及びがん特異的プロテオームを連結して、全般的ながんデータベースを作成した。細胞株データベースは、平均で 3.38×10^6 個の配列からなっていた。

【0169】

MAPの単離。CRC細胞株ペレット試料（複製物当たり 2×10^8 個の細胞、細胞株当たり4個の複製物）を最大2mLのPBSで再懸濁させ、次いで、2mLの氷冷2倍溶解緩衝液（1%w/vのCHAPS）を添加することによって可溶化した。腫瘍及び正常な隣接組織試料（455mg～693mg）を小片（立方体、サイズ約3mm）に切断し、タンパク質阻害剤カクテル（Sigma、カタログ番号P8340-5ml）を含有する氷冷PBS 5mlを添加した。最初に、速度20000rpmに設定したUltra Turrax T25ホモジナイザ（IKA-Labortechnik）を使用して20秒間、次いで、速度25000rpmに設定したUltra Turrax T8ホモ

ジナイザ (I K A - L a b o r t e c h n i k) を使用して 20 秒間、2 回均質化した。次いで、550 μ l の氷冷 10 倍溶解緩衝液 (5 % w / v の C H A P S S) を各試料に添加した。4 $^{\circ}$ C でタンプリングしながら 60 分間インキュベーションした後、組織試料及び C R C 細胞株試料を 10000 g で、4 $^{\circ}$ C にて 30 分間遠心分離した。上清を、1 mg の W 6 / 3 2 抗体共有結合架橋タンパク質 A 磁気ビーズを含有する新しいチューブに移し、M A P を前述のように免疫沈降させた (28)。次いで、M A P 抽出物を、S p e e d - V a c を使用して乾燥させ、M S 分析の前に凍結したままにした。

【0170】

T M T 標識。M A P 抽出物を 200 mM の H e p e s 緩衝液 (p H 8 . 1) に再懸濁させた。無水アセトニトリル中の 50 μ g の T M T 試薬 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を、以下のように試料に添加した。C R C 細胞株複製物を、T M T 6 p l e x (ロット番号 U G 2 8 7 1 6 6) チャンネル T M T 6 - 1 2 6 - 1 2 9 で標識し、組織試料を、T M T 10 p l e x (ロット番号 U H 2 8 5 2 2 8) - 1 2 6 (N A T) 及び - 1 2 7 N (腫瘍) で標識した。試料を穏やかにボルテックスし、室温で 1 . 5 時間反応させた。次いで、試料を、50 % ヒドロキシルアミンを用いて室温で 30 分間クエンチし、次いで、4 % F A / H 2 O で希釈した。C R C 細胞株複製物及び個々の N A T 腫瘍対を組み合わせた。次いで、試料を自家製の C 1 8 膜 (E m p o r e) カラム上で脱塩し、注入まで - 20 $^{\circ}$ C で保存した。一次組織試料中の目的の M A P を定量化するために、0 . 7 5 ~ 1 9 2 f m o l e の濃度の合成ペプチドを、T M T 10 p l e x チャンネル - 1 2 8 N、- 1 2 8 C、- 1 2 9 N、- 1 2 9 C、- 1 3 0 N、- 1 3 0 C、- 1 3 1 で標識し、一方、N A T 組織及び C R C 組織を、それぞれ - 1 2 6 及び 1 2 7 N で標識した。チャンネル間の汚染を評価するために、チャンネル - 1 2 7 C を空のままにしたことに留意されたい。

【0171】

液体クロマトグラフィー-タンデム M S 分析。乾燥ペプチド抽出物を、4 % の F A に再懸濁させ、E A S Y - n L C I I システム上で、0 % ~ 30 % の A C N (0 . 2 % F A) からの 106 分間の勾配及び流速 600 nL / 分を用いて、自家製の C 1 8 分析カラム (C 1 8 J u p i t e r P h e n o m e n e x を充填した 20 cm $\times$ 内径 150 μ m) にロードした。試料を、O r b i t r a p E x p l o r i s 480 分光計 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) により、2 . 8 k V の N a n o f l e x 源を有する陽イオンモードで分析した。240,000 分解能で取得された各々の完全 M S スペクトルの後に、20 個の M S / M S スペクトルが続き、30,000 の分解能、100 % の自動ゲイン制御ターゲット、700 ms の注入時間、及び 40 % の衝突エネルギーを用いた M S / M S 配列決定のために、最も豊富な多重荷電イオンを選択した。

【0172】

M A P 特定。P e a k s X + ソフトウェア (B i o i n f o r m a t i c s S o l u t i o n s I n c .) を使用して、データベース検索を行った (29)。前駆体質量及び断片イオンのエラー耐性を、それぞれ 10 . 0 p p m 及び 0 . 01 D a に設定した。非特異的ダイジェストモードを使用した。T M T 6 p l e x 又は 10 p l e x を、固定 P T M として設定し、可変修飾には、リン酸化 (S T Y)、酸化 (M)、脱アミド化 (N Q)、及び T M T 6 p l e x 又は 10 p l e x S T Y が含まれていた。次いで、ピーク検索を M A P D P にロードし (30)、これを使用して、以下のフィルタを適用した。5 % F D R を使用して、N e t M H C p a n - 4 . 1 b 予測に基づいてランク溶出リガンド閾値 $\leq$ 2 % を有する、8 ~ 11 アミノ酸長のペプチドを選択する。

【0173】

R N A - S e q データにおける M A P コード配列の定量化。M A P コード配列 (M C S) を、以前に記載されているように R N A - s e q データで定量化した (31)。簡潔に述べると、M C S を、当施設の p y t h o n スクリプトを用いて全ての可能なヌクレオチド配列に逆翻訳した (Z e n o d o に D O I : 3739257 で寄託)。次いで、ヌクレオチド配列を、G S N A P を用いてゲノム上にマッピングして (32)、所与の M A P を

コードすることができる全ての可能なゲノム位置を決定した。MCSはまた、MAPが重複するスプライス部位を説明するためにトランスクリプトーム上にマッピングされ、次いで、これらのMAPに対応するトランスクリプトームの部分もまた、GSNAPを用いて参照ゲノム上にマッピングされた。目的のMAPについて、MCSを含む全てのリードのゲノムアラインメントを行った。GSNAPの出力をフィルタリングして、配列と参照との間の完全な一致のみを保持して、所与のMAPをコードすることができる全ての可能なゲノム領域を含有するファイルを得た。STARにより参照ゲノム上にアラインメントされた、各々の所望のRNA-Seq試料(CRC及びNAT、GTEX、又はTCGA試料など)におけるそれぞれのゲノム位置でMCSを含有するリードの数を合計した。最後に、所与のMAPの全てのリードカウントを合計し、目的の各試料において配列決定されたリードの総数に対して正規化し、1億当たりのリード(RPHM)カウントを得た。

10

【0174】

MAP源転写産物の決定。どの割合の組織試料MAPが特定の転写産物バイオタイプに由来するかを調べるために、1億当たりのkmer(KPHM)定量化に基づく最も豊富な推定供給源転写産物を決定した。がん特異的(kmer)データベースからのペプチドについては、MCSを全ての可能なヌクレオチド配列に逆翻訳し、所与のMAPをコードすることができる全ての可能なゲノム領域を特定した(上の「RNA-SeqデータにおけるMAPコード配列の定量化」を参照されたい)。最後に、Kallistoを使用して、その位置で最も多く発現された転写産物を決定し、次いで、これを、所与のペプチドについての最も可能性の高い転写産物として割り当てた。1つより多い推定供給源転写産物を有するペプチドは、分析から除外した。

20

【0175】

TSA候補の特定。TSA候補は、厳格なTSA特定パイプラインによって特定した。まず、MAPは、タンパク質データベースからペプチド配列アクセッションを検索し、これを使用して各ペプチドのヌクレオチド配列を抽出する、ペプチド分類を受けた。各々のがん組織及び正常組織からのRNA-Seqデータを、Jellyfish 2.2.3(-Cオプションを使用する)によって24ヌクレオチド長kmerデータベースに変換し、これを使用して、各TSA候補コード配列の24ヌクレオチド長kmerセットを照会した。所与のペプチドコード配列と完全に重複するリードの数を、kmerセットの最小出現数(kmin)を使用して推定した。一般に、1つのkmerは、常に単一のRNA-Seqリードに由来する。次いで、このkmin値を、以下の式 $kphm = (kmin \times 10^8) \cdot r_{tot}$ (式中、 r_{tot} は、所与のRNA-Seq実験で配列決定されたリードの総数を表している)を使用して、配列決定された 10^8 個のリード当たり検出されたいくつかのkmer(kphm)に変換した。ペプチドのRNAコード配列が、正常(細胞株についてはプールされたmTEC試料、組織については一致したNAT)よりも、がんにおいて少なくとも10倍高く発現し、正常において2KPHM未満を発現した場合にのみ、ペプチドを保持した。その後のフィルタリングにより、区別することができないイソロイシン/ロイシンバリエーションを有するペプチドを除去した。ILバリエーションを有するペプチドは、最も多く発現したバリエーションが上述の基準を満たす場合にのみ、保持された。上述のように、残りのペプチドのMCSをRNA-seqデータで定量化し、それらの発現がmTEC及び他の正常組織(GTEX)において8.55RPHM未満である場合にのみ保持した。各ペプチドのゲノム局在化は、BLAT(<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>, Kent WJ. BLAT - the BLAST-like alignment tool. Genome Res. 2002 Apr;12(4):656-64. PMID: 11932250)を使用して、各MCSを含有するリードを、参照ゲノム(GRCh38.99)にマッピングすることによって割り当てられた。ゲノム位置が不明な場合、又はそれらが超可変領域(HLA、Ig、又はT細胞受容体(TCR)遺伝子)にマッピングされた場合、ペプチドを除外した。最後に、残りの候補のMS/MSスペクトルを手動で検証した。ペプチドは、それらのアミノ酸配列が参照と異なる場合、及び変異が既知の生殖細胞

30

40

50

多型でない場合、mTSAとして分類された。ペプチドは、腫瘍中で正常と比較して10倍以上過剰発現され、mTEC（及び組織の場合はNAT）中で0.2KPHM以下であった場合、aeTSAとして分類され、がんにおいて10倍以上過剰発現されたが、mTEC及び／又はNATにおける発現が0.2KPHMより大きかった場合、TAAとして分類された。最終的に、各TSA／TAAの起源転写産物は、kallisto定量化ファイルからの最も多く発現したペプチド重複転写産物を選択することによって帰属された（データベース生成のセクションを参照されたい）。

【0176】

腫瘍間共有。他のCRC腫瘍におけるTSA及びTAA配列の腫瘍間分布を調べるために、TCGAからの151個の結腸腺がん（COAD）試料におけるペプチドコード配列のlog（RPHM+1）発現を決定した（「RNA-SeqデータにおけるMAPコード配列の定量化」を参照されたい）。

【0177】

免疫原性予測。目的のMAPの予測免疫原性は、R package Repitope v3.0.1（<https://github.com/masato-ogishi/Repitope>）により決定された（34）。

【0178】

TSAペプチド候補の検証。TSA及び選択されたTAA配列の合成ペプチドは、Genscriptから得た。合成ペプチドをDMSO中で1nmol/μLの濃度まで可溶化し、全ての合成ペプチドを10pmol/μLの濃度でストック溶液中で組み合わせた。ストック溶液を、自家製C18膜（Empore）カラム上で150pmolのアリコートで脱塩し、Speed-Vacを使用して乾燥させた。乾燥したペプチド抽出物を、記載されているようにTMT10plexチャンネルで標識し（「TMT標識」のセクションを参照されたい）、脱塩し、Speed-Vacで乾燥させた。標識した合成ペプチドを、4%のFAに再懸濁させ、1pmolの各合成ペプチドを、EASY-nLC IIシステム上で、0%～30%のACN（0.2%FA）からの76分間の勾配及び流速600nL/分を用いて、自家製のC18分析カラム（C18 Jupiter Phenomenexを充填した20cm×内径150μm）にロードした。試料を、Orbitrap Exploris 480分光計（Thermo Fisher Scientific）により、2.8kVのNanoflex源を有する陽イオンモードで分析した。各々の完全MSスペクトルは、120000分解能で取得され、包含リストを使用して、40%の衝突エネルギー及び1m/zの単離ウィンドウによる断片化のためのイオンを選択した。30000の分解能でMS/MSを取得した。MS/MS相関を、以前に記載されているように計算した（17）。簡潔に述べると、予想されるペプチド断片をpyteomics v4.0.1（<https://bitbucket.org/levitsky/pyteomics>）により計算し、再現可能に検出されたペプチド断片を特定した。これらの断片のルートスケールの強度は、内因性ペプチドスキャン対と合成ペプチドスキャン対との間で相関し、Scipy v1.2.1（<https://www.scipy.org/>）を使用して、ピアソン相関係数、p値、及び信頼区間を計算した。最も低いp値を有するスキャン対のミラープロットを、spectrum_utils v0.2.1（https://github.com/bittremieux/spectrum_utils）を使用して、各ペプチドについて生成した。

【0179】

相対定量化。一次組織試料中の目的のMAPを相対的に定量化するために、それぞれTMT 10plex-129N、130N、及び131Nで標識された10、100、又は1000fmolの濃度の合成ペプチドを、それぞれTMT10plex-126及び127Nで標識されたNAT及びCRC組織試料からの残りの精製MAPにスパイクした。汚染を評価するために、チャンネルTMT 10plex-127Cを空のままにしたことに留意されたい。試料を、Orbitrap Fusion Tribrid分光計（Thermo Fisher Scientific）により、2.4kVのNanof

10

20

30

40

50

Lex 源を有する陽イオンモードで分析した。同期前駆体選択 MS3 (SPS-MS3) について、目的のペプチドの包含リストを使用して、300~1000 m/z の範囲、120000 の Orbitrap 分解能、5.0e5 の自動ゲイン制御 (AGC)、及び 50 ms の最大注入時間で、完全 MS スキャンを取得した。MS2 のための 3 s 最高速度アプローチを、0.4 m/z の単離ウィンドウ、35 % の衝突誘導性解離、「正常な」イオントラップスキャンレートモード、2.0e4 の AGC ターゲット、及び 50 ms の最大注入時間で、イオントラップで使用した。これに続いて、MS3 取得のための 8 つの同期前駆体イオンの選択が行われ、これは、110~500 m/z のスキャン範囲、50000 の Orbitrap 分解能、1.0e5 の AGC、300 ms の最大注入時間、2.0 m/z の分離ウィンドウ、及び 65 % の HCD 衝突エネルギーにより行われた。LC-MS 機器は、Xcalibur バージョン 4.4 (Thermo Fisher Scientific, Inc) を使用して制御された。前駆体質量及び断片イオンのエラー耐性を、それぞれ 10.0 ppm 及び 0.5 Da に設定した。非特異的ダイジェストモードを使用した。TMT10plex を、固定 PTM として設定し、可変修飾には、リン酸化 (STY)、酸化 (M)、脱アミド化 (NQ)、及び TMT10plex STY が含まれていた。定量化のために、PSM をフィルタリングして、TMT10plex-127C チャンネル内に汚染を有するものを除外して、70 番目の強度パーセンタイル内のものを選択した。全ての関連チャンネルの MS2 前駆体プロファイル及び強度プロファイルを手動で精査して、定量化のためのペプチドを選択した。各ペプチドの強度比は、良好な品質の PSM の平均 TMT10plex-127N 及び TMT10plex-126 強度を使用して計算された。

10

20

【0180】

データ分析及び視覚化。図 1 は、BioRender.com. により生成した。他の図の大部分は、Python v3.7.6、R v3.6.3、又は Origin (Pro) 2019b で作成された。R package には、Repitope v3.0.1 (<https://github.com/masato-ogishi/Repitope>) (34)、UpsetR v1.4.0 (<https://github.com/hms-dbmi/UpSetR>) (35)、GSVA v1.38.2 (<https://github.com/rcastelo/GSVA>) (36)、ESTIMATE v1.0.13 (<https://bioinformatics.mdanderson.org/estimate/>) (37) が含まれる。

30

【0181】

実験設計及び統計的根拠。結腸直腸がんの MHC I 免疫ペプチドームを効果的に解明するために、4 種類の CRC 細胞株を選択し、一致した腫瘍及び正常な隣接組織 (NAT) の両方からなるヒト対象からの 6 個の試料を取得した。NAT は、各々のそれぞれの腫瘍について最も効果的な対照であるため、健康な組織の近似として使用した。細胞株については、一致した試料を利用することができなかったため、6 個の mTEC 試料のプールを全般的ながんデータベースの作成に使用して、およそその正常な RNA 発現の幅広い余地を得た。全ての場合の p 値は、免疫原性スコアの有意性の決定を除き、2 つの試料の t 検定を使用して決定される。免疫原性スコアの有意性の決定の場合には、シャピロ検定によって決定されるように、データが正規分布を有していなかったため、マン・ホイットニ検定が使用された。t 検定の場合、f 検定を実施して、データセットが有意な変動を有していたかどうかを決定した。有意な変動を有していた場合、変動を想定した t 検定が使用され、そうでない場合には、変動がないと仮定した t 検定が使用された。CRC 由来細胞株について、 2×10^8 個の細胞の 4 個の技術的複製物を調製し、これらを TMT 標識し、注入前に多重化した。組織材料が限られていることに起因して、一次試料からの精製 MAP の半分を注入して、全体的な免疫ペプチドミクスデータを取得し、全般的な免疫ペプチドームデータを得て、残りの試料を合成ペプチドを用いた標的分析に使用して、推定 TSA 及び選択された TAA の配列及び存在量を確認した。定量化のために高品質の PSM を選択するために、空の TMT チャンネル内の低強度のもの又は汚染を伴うものを除外した

40

50

。更に、好ましいMS2前駆体及び強度プロファイルを有するペプチドのみを定量化した。

【0182】

実施例2：プロテオゲノミクスアプローチを使用した免疫ペプチドーム分析

結腸直腸がんの免疫ペプチドームの組成を決定するために、一致した腫瘍及び正常な隣接組織からなる、4種類の結腸直腸がん由来細胞株及び6セットの一次腺がん試料から構成される試料の集合を分析した（表1及び2）。ペアエンドRNA配列決定（RNA-seq）は、任意のゲノム起源からの非カノニカル配列を包含するために3つのリーディングフレームに翻訳されるがん特異的kmerの生成によって作成される、カノニカルがんプロテオーム、及び各試料についてのがん特異的プロテオームからなる全般的ながんデータベースの作成を可能にした（図1）。髄質胸腺上皮細胞（mTEC）は、胸腺内に末梢抗原を提示し、自己反応性T細胞の陰性選択を媒介する（38）。CRC由来細胞株の場合、健康な組織におけるこれらの配列の発現に近似するmTEC由来配列を減算した後、がん特異的kmerを得た。一次組織試料については、一致したNATからの配列を減算した後、がん特異的kmerを生成した。このアプローチは、腫瘍において発現され、同じ個体の健康な結腸組織において観察されない配列の決定を可能にした。データベース構築に加えて、GO term分析、免疫浸潤の調査、変異プロファイリング、及び転写産物存在量の決定を含む、トランスクリプトーム分析にもRNA-seqデータを使用した（図1）。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 1. CRC 由来細胞株の説明。

細胞株	組織	形態	疾患	バイオマーカー	MHC I 分子/細胞	HLA 遺伝子型決定	目的の変異
Colo205	結腸;転移部位由来:腹水	上皮型	デュークス D 型、結腸直腸腺がん	MSS、CIMP	$1.44 \times 10^5 \pm 0.00282 \times 10^5$	HLA-A*01:01 HLA-A*02:01 HLA-B*07:02 HLA-B*08:01 HLA-C*07:01 HLA-C*07:02	BRAF(V600E)、SMAD4、TP53
HCT116	結腸	上皮	結腸直腸がん	MSI、CIMP	$5.07 \times 10^5 \pm 0.30 \times 10^5$	HLA-A*01:01 HLA-A*02:01 HLA-B*18:01 HLA-B*45:01 HLA-C*05:01 HLA-C*07:01	RAS(G13D)、PI3CA、CDKN2A、CTNNB1 (B-カテニン)
RKO	結腸	上皮	がん腫	MSI、CIMP	$2.82 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$	HLA-A*03:01 HLA-B*18:01 HLA-C*07:01	BRAF(V600E)、PI3CA
SW620	結腸;転移部位由来:リンパ節	上皮型	デュークス C 型、結腸直腸腺がん	MSS、CIN	$1.69 \times 10^5 \pm 0.0017 \times 10^5$	HLA-A*02:01 HLA-A*24:02 HLA-B*07:02 HLA-B*15:18 HLA-C*07:02 HLA-C*07:04	APC、RAS(G12V)、SMAD4、TP53

10

20

30

40

【表 5】

表 2. 一次腫瘍及び一致したNATの説明					
試料 ID	性別	年齢	民族的背景	マントリック背景	診断
S1_N				結腸	NAT
S1_T	F	73	白人	盲腸	がん
S2_N				結腸	NAT
S2_T	M	60	白人	S 状結腸	がん
S3_N				結腸	NAT
S3_T	F	63	白人	S 状結腸	がん
S4_N				結腸	NAT
S4_T	F	85	白人	S 状結腸	がん
S5_N				結腸	NAT
S5_T	F	43	白人	上行結腸	がん
S6_N				結腸	NAT
S6_T	F	48	白人	S 状結腸	がん

【表 6】

試料 ID	組織学的診断	ステージ	腫瘍含有量%	目的の変異	HLA	
S1_N					HLA-A*24:02 HLA-B*07:02 HLA-B*35:01 HLA-C*04:01 HLA-C*07:02	10
S1_T	腺がん	IIC	100	KRAS G12D		
S2_N					HLA-A*02:01 HLA-A*03:02 HLA-B*27:05 HLA-B*58:01 HLA-C*02:02 HLA-C*07:01	20
S2_T	腺がん	IIA	95			30
S3_N					HLA-A*01:01 HLA-A*32:01 HLA-B*38:01 HLA-B*50:01 HLA-C*06:02 HLA-C*12:03	40

S3_T	腺 が ん	IIA	100	KRAS Q61H
S4_N				HLA- A*01:01 HLA- A*11:01 HLA- B*15:01 HLA- B*57:01 HLA- C*03:03 HLA- C*06:02
S4_T	腺 が ん	IIA	100	KRAS G12D
S5_N				HLA- A*03:01 HLA- A*30:01 HLA- B*13:02 HLA- B*52:01 HLA- C*06:02 HLA- C*12:02
S5_T	腺 が ん	IIA	95	
S6_N				HLA- A*03:01 HLA- A*23:01 HLA- B*07:02 HLA- B*18:01 HLA- C*07:01 HLA- C*07:02
S6_T	腺 が ん	IIA	95	

10

20

30

40

【 0 1 8 3 】

M H C I : ペプチド複合体を免疫沈降によって単離し、溶出した M H C I 関連ペプチド (M A P) をタンデム質量タグ (T M T) 等圧標識試薬で標識した。 T M T 標識は、近年、それらの電荷状態及び疎水性を増加させることによって、 M A P の検出を強化することが示されたからである (3 7) 。次いで、 M A P を配列決定し、 R N A - s e q によって生成された個別化されたがんデータベースを使用して、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (L C - M S / M S) によって分析した。次いで、特定した M A P は、推定 T S A 及び T A A を特定するために、一連の厳格な分類及び検証を受けた。次いで、 C R C 組織において特定された腫瘍抗原を検証し、合成ペプチドで定量して、それらが腫瘍の

50

細胞表面でどの程度過剰発現されたかを決定し、それらの予測された免疫原性及び腫瘍間分布も調べ、それらの臨床的可能性の感覚を得た（図1）。

【0184】

本研究では、表1にまとめられるように、異なるアレル及び特徴を有する4種類のCRC由来細胞株を使用した。HCT116及びRKOは、一次腫瘍に由来し、マイクロサテライト不安定性(MSI)を特徴とするが、一方、Colo205及びSW620は、それぞれ、腹水及びリンパ節の転移に由来し、両方ともマイクロサテライト安定性(MSS)である。これらの細胞株は、 $1.44 \times 10^5 \sim 5.07 \times 10^5$ 個のMHC I分子／細胞及びHLAアレルの多様性の範囲の幅広いMHC I表面発現を有する。4種類の細胞株の中には、BRAF、RAS、SMAD4、TP53、及びPI3CAなどのいくつかの重要な遺伝子の変異がある。これらの細胞株は、Qifikitによって決定されるように、 $1.44 \times 10^5 \sim 5.07 \times 10^5$ 個のMHC I分子／細胞の範囲の様々なMHC I表面発現、試料のHLAアレルを予測するためのRNA-Seqデータを使用するHLA遺伝子型決定ツールであるOptiTypeを使用して特定されたHLAアレルの多様性を、文献に示されたこれらの細胞株についてのHLAアレルと組み合わせて有する（表1）（22）。

【0185】

一次腫瘍試料の全ては、腫瘍グレード及びTNM（腫瘍結節転移）分類においてわずかに変化する、ステージIIの腺がん由来する（表2）。一次試料は、95～100%の腫瘍含有量を有しており、0.6625グラムの平均質量を有していた。腫瘍は、S1（盲腸）及びS5（上行結腸）を除き、全てS字結腸に由来する。S2を除く全ての患者が女性であり、患者の年齢は43～85歳の範囲であり、平均年齢は62歳である。細胞株と同様に、組織試料も様々なHLAアレルを有する。細胞株及び組織試料に固有の、又はそれらに共有されるHLAアレルの数の視覚化は、図7で利用可能である。それぞれ、細胞株及び組織当たり平均で1.3及び3.2の固有のアレルが存在する。

【0186】

実施例3：CRC試料のトランスクリプトーム特性決定

所与の疾患ステージ内のCRC患者の転帰は、腫瘍の分子特徴に基づいて大きく異なるため（40、41）、RNA配列決定データを使用して、試料の分子不均一性を特性決定した。診療所で治療上の決定及び予後を導くために一般的に使用される主要なバイオマーカー（KRAS、NRAS、又はBRAFなど）の変異ステータスを最初に調べた後（40、41）（表1）、細胞株及び一次試料のマイクロサテライトステータスを、それぞれ文献から決定し（42、43）、MSI sensorパッケージ（46）を使用して、これらの試料の分子特徴の知識を広げた。MSIは、CRC腫瘍の限られたサブセット（すなわち、散发性CRCの15%及び非ポリポーシス結腸直腸がんの90%）に見出されるが（47）、本研究では、腫瘍発生性細胞株の50%及び一次生検の33%が、この表現型を示す（表3）。文献のいくつかの要素は、MSI腫瘍及びMSS腫瘍が免疫学的に異なることを示唆しているが（5、11、48、49）、本研究は、免疫ペプチドームレベルでのMSI及びMSS結腸直腸腫瘍の比較を提供する。

10

20

30

40

50

【表 7】

表 3 : CRC 一次組織の MSI Sensor 結果。

試料	総部位数	十分なカバレッジを有する部位の数	十分なカバレッジを有する部位の数(%)	MSI 部位の数(体細胞)	MSI 部位の数(体細胞)(%)	クラス(MSI>3.5%)
S1	1011195	111243	11	226	0.20	MSS
S2	1011195	69004	7	197	0.29	MSS
S3	1011195	56779	6	104	0.18	MSS
S4	1011195	45848	5	177	0.39	MSS
S5	1011195	78340	8	8267	10.55	MSI
S6	1011195	60715	6	3085	4.08	MSI

10

【0187】

正常生検試料と腫瘍生検試料との間の上位 500 個の様々な遺伝子の主成分分析（図 2 A）又は細胞株図 9 A）は、それらの異なるトランスクリプトームプロファイルを確認する。したがって、CRC 由来細胞株及び生検試料の両方の経路及びプロセス濃縮分析は、それらの腫瘍発生ステータスに関連する観点から濃縮されたトランスクリプトームプロファイルを明らかにした。最も有意に上方調節された GO term 及び下方調節された GO term は、それぞれ、細胞増殖（図 2 B の上パネル）並びに筋肉表現型及び収縮性（図 2 B の下パネル）に関連する。増殖及び細胞周期に関連する GO term の濃縮は、がんの一般的な特徴であるが（50、51）、筋肉関連経路の下方調節は、CRC に固有であり、低分化腫瘍領域と高収縮性 NAT との間の機能的二項対立から生じる。本明細書で使用するデータセットの腫瘍試料の中で、腫瘍間トランスクリプトームの差を説明するように思われるのは、MSI / MSS ステータスである（図 2 A 及び 9 A）。MSI 試料は、まとまってしっかりとクラスター化する傾向があるが、MSS 腫瘍は、より分散しているように見え、したがって、トランスクリプトーム的に、より不均一である。機能的には、別々に分析すると、MSS 及び MSI CRC 試料は、非常に異なる遺伝子セットで濃縮される。対応する NAT と比較すると、MSI 腫瘍は、様々な免疫関連 GO term の有意な上方調節を特徴とし（図 9 A）、一方、MSS 腫瘍は、Wnt 及び PI3K-Akt シグナル伝達の両方に関連する遺伝子の発現の増加の方に、より関連する（図 9 B）。これら 2 つのシグナル伝達経路と CRC との関連は既知であるが（52）、CRC におけるそれらの寄与が MSS 腫瘍と MSI 腫瘍の間で異なる可能性があることを裏付ける参考文献は見つからなかった。

20

30

【0188】

次に、各試料の免疫浸潤の程度を、ESTIMATE パッケージ（37）からの免疫浸潤スコアを使用して（図 2 C）、また、単一試料の Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA)（54）に基づく既知の腫瘍浸潤性白血球（TIL）マーカー（53）の濃縮スコアを用いた、2 つのアプローチによって推定した（図 8 B）。全ての NAT 試料は、同様のレベルの免疫浸潤を示したが、MSI 腫瘍及び MSS 腫瘍は、それぞれ、増加した免疫浸潤スコア及び減少した免疫浸潤スコアを特徴としていた（図 2 C 及び図 8 B）。そのような差は、MSI 腫瘍がそれらの MSS 相同体よりも免疫原性が高い可能性があることを示唆している（48、55～58）。

40

【0189】

TSA は、広範囲のがん特異的イベント / 調節不全から生じる可能性があり（11、12）、各々の抗原供給源の免疫ペプチド寄与は、悪性腫瘍間で有意に異なる（11）ため、RNA 配列決定データも使用して、試料においてどの TSA クラスが濃縮され得る

50

かを知らせた。転写産物のゲノム起源を見ることによって、非コードポリアデニル化RNAの割合及び絶対的存在量の両方が、NATと比較して、腫瘍において有意に増加していることが観察された（図2D）。平均して、絶対的存在量の増加は25%に制限されるが、データは、非コード転写産物の腫瘍特異的増加が、MSI腫瘍においてMSSよりも高い可能性があることを示唆する。この比較は、MSI試料の数が少ない（ $n=2$ ）ことに起因して、制限されたままであるが、MSI試料中の非コード転写産物に由来するa e T S Aの数は、MSSよりも多く特定されることが予想され得る。同様に、全てのCRC試料は、同等の単一ヌクレオチドバリエーション（SNV）負荷を示し、したがって、同様の数のm T S Aを有することが予想されるが（図2E）、挿入／欠失（インデル）負荷は、MSSと比較してMSI試料で顕著に増加し、この観察は、細胞株についても注目される（図8C）。実際に、細胞株及び組織試料の両方を一緒に考慮すると、MSS試料とMSI試料との間のINDEL変異の数に統計的有意差が生じた（ $p=0.00235$ ）（図8D）。MSI及びINDEL蓄積の両方が、DNAミスマッチ修復（MMR）経路の欠陥から生じる（59）ため、試料中で特定されたINDEL由来T S A（最も可能性が高いフレームシフト由来抗原）の数は、そのMSIレベルに比例するという仮説を立てることができる。

10

【0190】

実施例4：免疫ペプチドーム分析は、CRC抗原の多様性を強調する

CRC由来細胞株のMHC I免疫ペプチドームを解明するために、 2×10^8 個の細胞の4つの複製物からのMAPを各株について免疫沈降させ、各複製物を、細胞株については別個のTMT6plexチャネル（126、127、128、129）、又は一次NAT及び組織試料についてはそれぞれTMT10plex-126及び-127Nにより誘導体化した。各細胞株の4つの複製物、及び各対象からのそれぞれのNAT及び腫瘍MAPの半分を多重化し、LC-MS/MSによって分析した。細胞株及び組織試料の標識効率の中央値は、それぞれ72.4%又は87.8%であった。細胞株における標識の効率の低さは、わずかなMAP収量に起因していた。5281個及び27583個の固有のMAPを、それぞれ、細胞株及び組織データセットにおいて特定し、平均で、細胞株当たり1433個、及び組織当たり5855個の固有のMAPを有していた（図3A、上パネル、及び図3B）。特定は、各株間で様々であるが、特定されたMAPの数は、細胞当たりのMHC I分子の存在量と強く相関する（図3A、下パネル、ピアソンの $r=0.96$ ）。

20

30

【0191】

細胞株と組織試料と一緒に採取した場合、合計30485個の固有のMAPが特定された。各試料のMAPレパートリー内では、ペプチドの32~68%が試料特異的であり、細胞株又は一次試料のみを比較する場合であっても、共有されるMAPは非常に少ない（図10A~B）。この固有のMAPの大部分は、どのペプチドが細胞表面に提示され得るかに影響を及ぼす主要な要因である、試料間のHLAアレルの多様性に起因し得る（図3C、図7）。平均して、任意の2種類の細胞株又は任意の2種類の組織試料によって共有されるMAPの数は、それぞれ、59個又は640個のMAPである。注目すべき外れ値が存在する。組織試料S1及びS6は、2079個のMAPを共有し（そのうちの1673個は、これらの試料に固有である（図10C））、それらのそれぞれのMHC I免疫ペプチドームの3分の1より多くを表している（図10D）。2種類の組織間のMAPレパートリーにおける次に近い類似性は、それらのレパートリーの21%に対応する、2種類のMSI組織（S5及びS6）によって共有される1328個のMAPである。細胞株におけるMAP特定の減少は、これらの比較を、より顕著ではないものにする。例えば、HCT116及びRKOは、ほとんどのMAPを共有するが、これらのペプチドは、それらのMAPの10%未満を表し、それらのより大きなペプチドレパートリーの特徴である可能性が高い（図10C）。対照的に、COLO205及びSW620は、それらの免疫ペプチドームのほぼ5分の1である152個のMAPを共有する。

40

【0192】

50

これらの比較を文脈に当てはめるために、試料のHLAアレルを再び考慮することができる。S1及びS6によって共有される2079個のMAPのうち、1542個のMAPは、両方の試料において同じアレルに結合すると予測され、これらの症例の93%より多くにおいて、そのアレルは、HLA-B*07:02である。同様に、COLO205及びSW620によって共有される152個のMAPのうち136個は、同じアレルによって結合されており、そのアレルは、これらの症例のうちの113症例において、HLA-A*02:01である。したがって、試料のMHC I免疫ペプチドームは、主にHLAレパートリーによって影響を受ける。

【0193】

遺伝子レベルでは、8000個を超える固有の供給源遺伝子に由来するペプチドが特定され、それぞれ、細胞株及び組織試料当たり平均1014個及び3168個の供給源遺伝子を有していた(図11A、上のパネル)。各試料において特定された供給源遺伝子の数は、特定されたMAPの数と高度に相関する(図11A、下パネル)。所与の免疫ペプチドームにおける供給源遺伝子のおよそ6~14%は、試料特異的であり(図11B)、これは、試料特異的な生物学的特徴に起因し得るか、又は免疫ペプチドームの不完全なサンプリングを反映し得る(図11E)。細胞表面に提示される全てのMAPを特定することは期待されておらず、各試料における供給源遺伝子の大部分は、単一のMAPにのみ帰属可能であるため、追加の供給源遺伝子がMAPレパートリーに寄与し、単に検出されないことは、ほぼ確実である。任意の2種類の組織試料を比較する場合、それらは平均して48%の供給源遺伝子を共通しているが、任意の2種類の細胞株を比較すると、平均して24%の遺伝子が共有される(図11C~E)。したがって、異なる細胞株は、供給源遺伝子レベルでは、あまり均質ではないようである。これは、組織試料がNAT、間質、浸潤細胞などに由来する供給源遺伝子を有し、一方、細胞株が単一の細胞型のみからなるため、試料組成の差を反映している可能性が高い。加えて、細胞株のMHC Iの提示が低下し、結果としてMAPの特定が減少したことは、より少ない供給源遺伝子が試料であったことを意味し、重複の可能性が低下する。それにもかかわらず、全ての試料は、免疫ペプチドームレベルと比較して、供給源遺伝子レベルの方がより類似しており、試料特異的MAPは、共有された供給源遺伝子に由来している。

【0194】

MHC I免疫ペプチドームのゲノム起源の概要を取得し、供給源遺伝子の共有性質を調査するために、細胞株において特定された全ての供給源遺伝子、及び4種類以上の組織で特定されたものに対してGO term分析を行った。細胞株と組織との間のいくつかの共通の特徴は、RNA代謝、リボ核タンパク質複合体バイオジェネシス、翻訳、及びストレスに対する細胞応答に関与する遺伝子の有意な濃縮を含め、免疫ペプチドームレベルで検出可能である(図3D)。したがって、ペプチドレパートリーに大きな影響を与えるHLAアレルの大きな多様性、及び細胞株における低いMAP特定を含む、細胞株と組織試料との間の両方の不均一性にもかかわらず、どの遺伝子がMHC I免疫ペプチドームに寄与しているかという点で著しい類似性がある。

【0195】

組織試料由来のMAPのどの割合が非コード転写産物由来であったかを調べるために、まず、各ペプチドについて、最も豊富な推定供給源転写産物を決定した(Ensembl Annotation 99)。がん特異的データベースからのペプチドについて、MCSをゲノム上にマッピングし、その位置で最も多く発現された転写産物を決定した(方法セクションの「RNA-SeqデータにおけるMAPコード配列の定量化」を参照されたい)。したがって、平均して、組織試料由来のMAPの95.3%がタンパク質コード転写産物(すなわち、UTR又はCDR)由来であることが判定された(図3E、左パネル)。これらのペプチドは、遺伝子間配列に由来する可能性が高いため、アノテーションされていないRNA転写産物に由来するペプチドの2.8%が含まれる場合、ペプチドのおよそ4.2%は、非コード領域に由来する。全ての非コードMAPのおよそ3分の1(アノテーションされていない転写産物からのものを含む)は、ナンセンス媒介性分解転写産

物に由来し、それらの1%未満は、lncRNA、ノンストップ分解産物、保持されたイントロン、又はプロセシングされた転写産物（オープンリーディングフレームを含まない転写産物）に由来する（図3E、右パネル）。

【0196】

実施例5：CRCにおける腫瘍特異的抗原及び腫瘍関連抗原の特定

30,000個を超える固有のMAPの特定の後、ペプチドコード配列をフィルタリングして、それぞれ細胞株及び一次試料について、がんにおいて少なくとも10倍過剰発現され、プールされたmTEC試料又は一致したNATにおいて2rpm未満発現されたものを選択した。急性骨髄性白血病（AML）における最近の免疫ペプチドーム研究は、RPHM<8.55のMCSが、MAPを生成する確率が5%未満であることを示した（18）。次いで、RNAデータにおけるMAPコード配列を定量化し、mTEC及び他の正常組織（GTEX）において8.55rpm未満で発現したもののみを保持した。残りのペプチドの手動の検証に続いて、ペプチドは、腫瘍において少なくとも10倍過剰発現され、mTEC（及び組織の場合にはNAT）において0.2kphm未満発現された場合、異常に発現したTSA（aeTSA）として分類された。MAPもまた、がんにおいて少なくとも10倍過剰発現されたが、mTEC及び／又はNATにおけるそれらの発現が0.2kphmを超えていた場合、TAAとして分類された。

【0197】

CRC由来細胞株におけるTSA特定は、おそらく部分的には低いMAP特定に起因して、相対的に不十分であったが、一次組織試料当たり平均して3個のTSAが特定された（図4A）。全体として、CRC由来細胞株で1個の推定TSAが特定され、一次組織で18個の推定TSAが特定され、各試料からのTSA収量は、特定されたMAPの数と相関した（ピアソンの $r=0.76$ ）（図12）。これらのうち、およそ3分の1は、コード領域に由来したが、特定された推定TSAの大部分は、非コード領域に由来した（図4B）。コード領域由来のTSAのうち、2つは、エキソフレームシフト配列に由来する非カノニカルリーディングフレーム由来であり、別の2つは、MSS組織S2及びS3において特定された変異TSAであった（図4A及び4B）。非コードTSAのうち、全てが異常に発現し、大部分は、イントロン又は遺伝子間領域に由来し、より少ない数が、5'UTR、3'UTR、又はlncRNAに由来する（図4B）。9個のaeTSA（5個のイントロン、3個の遺伝子間、1個のlncRNA）の配列は、ERE配列と重複する（表4）。EREのユビキタスな性質に起因して、異常なERE発現に由来するTSAは、腫瘍によって潜在的に共有され、免疫原性であることが示されている（61、62）。注目すべきことに、推定TSAのいずれも、共有されるMAPの割合が高い試料であっても、複数の試料間で共有されなかった。しかしながら、COL11A1の同じ転写産物（1つのエキソフレームシフト及び1つの5'UTR）に由来する異なる組織で2つの固有のTSAが特定され、これは最近、CRCの発症及び予後に役割を果たすことが示された（63）。他のTSA源遺伝子の大部分は、CRCにおいて生物学的に関連することも示されている（表5）。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 4：本研究において特定された T S A 及び T A A の特徴

ペプチド配列(配 列番号)	試料	クラス	供給元	遺伝子記号	転写産物 ID
RMLLSHTGK(1)	RKO	aeTSA	遺伝子間	なし	なし
LPHRALSGI(2)	S1	aeTSA	イントロン	NKDI(WNT 経 路の阻害剤)	ENST00000268459.6
GTNPTAAVK(3)	S2	aeTSA	エキソン	HKDC1	ENST00000354624.6
LRHKLVLNR(4)	S2	aeTSA	3' UTR	GRIN2B	ENST00000609686.3
RIGGVGVVEK(5)	S2	aeTSA	エキソンフ レームシフ ト	LY6G6F- LY6G6D リード スルー	ENST00000503322.1
SIHETVNSL(6)	S2	aeTSA	イントロン	IPP	ENST00000396478.4
TVNTQQYNTK(7)	S2	aeTSA	イントロン	CYP39A1	ENST00000275016.3
SVSHLHIFF(8)	S3	aeTSA	遺伝子間	なし	なし
TTLENLPQK(9)	S4	aeTSA	エキソンフ レームシフ ト	COL11A1	ENST00000370096.9
AQKLQVRI(10)	S5	aeTSA	遺伝子間	なし	なし
GQIELSIYR(11)	S5	aeTSA	イントロン	PATJ	ENST00000371158.6
HGALSIRSI(12)	S5	aeTSA	イントロン	DHP6	ENST00000561411.1
RLMKFLPV(13)	S5	aeTSA	遺伝子間	なし	なし
SLYISEERK(14)	S5	aeTSA	lncRNA	TRPC6	ENST00000526713.1
VQTAVLNV(15)	S5	aeTSA	遺伝子間	なし	なし
RNRQVATAL(16)	S6	aeTSA	エキソン	SUCNR1	ENST00000362032.6
VEAPHLPSF(17)	S6	aeTSA	5' UTR	COL11A1	ENST00000370096.9
KIGEVIVTK(18)	S2	mTSA	エキソン	HSPD1	ENST00000388968.8
TRSTIHL(19)	S3	mTSA	エキソン	PLK1	ENST00000300093.9
SILRGSLGK(20)	S4	ncTAA	遺伝子間	なし	なし
RLVSNRVVR(21)	S5	ncTAA	イントロン	IDO2	ENST00000518237.6
SLKNLEPIK(22)	S5	ncTAA	遺伝子間	なし	なし
RSAGPRAPL(23)	S6	ncTAA	遺伝子間 (転写産物 のアンチセ ンス)	なし	なし
VLYRSVLLLK(24)	S6	ncTAA	イントロン	FANCA	ENST00000389301.8

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

EYNSDLHQF(25)	S1	TAA	エキソン	BUB1	ENST00000302759.11
TYKYVDINTF(26)	S1	TAA	エキソン	MMP12	ENST00000571244.3
VIDEPVRL(27)	S1	TAA	エキソン	MKI67	ENST00000368653.7
RYLEKFYGL(28)	S1、 S6	TAA	エキソン	MMP12	ENST00000571244.3
KRLPSPSLF(29)	S2	TAA	エキソン	MGAM2	ENST00000550469.6
KSINEFWNK(30)	S2	TAA	エキソン	SPC25	ENST00000282074.7
RVFHGNETTK(31)	S2	TAA	エキソン	CENPE	ENST00000265148.8
RIQLPVVSK(32)	S2、 S4	TAA	エキソン	MKI67	ENST00000368653.7
SIFRTPISK(33)	S2、 S4	TAA	エキソン	ASPM	ENST00000367409.9
KAAGAGAAK(34)	S2、 S5、 S6	TAA	エキソン	HI-5	ENST00000331442.4
AEYHSQSRA(35)	S3	TAA	エキソン	ASPM	ENST00000367409.9
IHNSDQILL(36)	S3	TAA	エキソン	MACC1	ENST00000400331.10
KMHQSRISY(37)	S3	TAA	エキソン	ASPM	ENST00000367409.9
QMAGLRDTY(38)	S3	TAA	エキソン	SPC25	ENST00000282074.7
RIKNWGSMTF(39)	S3	TAA	エキソン	NOS2	ENST00000313735.11
AQYDQASTKY(40)	S4	TAA	エキソン	CENPF	ENST00000366955.8
FVDNQYWRY(41)	S4	TAA	エキソン	MMP12	ENST00000571244.3
QLDSAVKNLY(42)	S4	TAA	エキソン	ZNF215	ENST00000414517.6
EQLKVTTI(43)	S5	TAA	エキソン	MCM10	ENST00000378714.7
FRSWAVQTF(44)	S5	TAA	エキソン	NOS2	ENST00000313735.11
KLYQSIIGY(45)	S5	TAA	エキソン	DIAPH3	ENST00000400324.9
SANVSKVSF(46)	S5	TAA	エキソン	ASPM	ENST00000367409.9
SQHDILQMI(47)	S5	TAA	エキソン	MKI67	ENST00000368653.7

【表 8 - 3】

VAKTPRNTY(48)	S5	TAA	エキソン	MKI67	ENST00000368654.8
RPRLSAILF(49)	S6	TAA	エキソン	DIAPH3	ENST00000400324.9
RVAKTNSLR(50)	S5	TAA	エキソン	CDCA8	ENST00000327331.2

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

ペプチド配列	遺伝子 ID	ERE 重複	場所	鎖	予測される HLA アレル
RMLLSHTGK(1)	なし	なし	chr8:127209405-127209431	(-)	HLA-A*03:01
LPHRALSGI(2)	ENSG00000140807	アンチセンス miRc 重複	chr16:50564443-50564469	(+)	HLA-B*07:02
GTNPATAVK(3)	ENSG00000156510	なし	chr10:69227303-69227329	(+)	HLA-A*03:02
LRHKLVLNR(4)	ENSG00000273079	なし	chr12:13549419-13549445	(-)	HLA-B*27:05
RIGGVGVVEK(5)	ENSG00000250641	なし	chr6:31717798-31717824	(+)	HLA-A*03:02
SIETVNSL(6)	ENSG00000197429	LIMEf 重複	chr1:45713038-45713064	(-)	HLA-A*02:01
TVNTQQYNTK(7)	ENSG00000146233	L1MD1 重複	chr6:46644986-46645015	(-)	HLA-A*03:02
SVSHLHIF(8)	なし	アンチセンス L1MB3 重複	chr17:65462740-65462766	(+)	HLA-A*32:01
TTLENLPQK(9)	ENSG00000060718	なし	chr1:103078698-103078724	(-)	HLA-A*11:01
AQKLQVRI(10)	なし	なし	chr3:29988327-29988304	(-)	HLA-B*52:01
GQIELSIYR(11)	ENSG00000132849	なし	chr1:61808366-61808392	(+)	HLA-A*03:01
HGALSIRSI(12)	ENSG00000134146	L2a 重複	chr15:35525008-35525034	(-)	HLA-B*52:01
RLMKFLPV(13)	なし	なし	chr2:170700443-170700466	(-)	HLA-B*13:02
SLYISEERK(14)	ENSG00000137672	LIME1 重複	chr11:101656906-101656932	(-)	HLA-A*03:01
VQTAVLNV(15)	なし	なし	chr4:93906720-93906697	(-)	HLA-B*52:01
RNRQVATAL(16)	ENSG00000198829	なし	chr3:151881192-151881218	(+)	HLA-B*07:02
VEAPHLPSF(17)	ENSG00000060718	なし	chr1:103108448-103108474	(-)	HLA-B*18:01
KIGEVIVTK(18)	ENSG00000144381	なし	chr2:197489161-197489188	(-)	HLA-A*03:02
TRSTIHL(19)	ENSG00000166851	なし	chr16:23689617-23689643	(+)	HLA-C*06:02

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

SILRGS LGK(20)	なし	CRI_Mam 重複	chr7:140260497- 140260523	(-)	HLA-A*11:01
RLVSNRVVR(21)	ENSG00000131203	なし	chr8:39917585- 39917611	(+)	HLA-A*30:01
SLKNLEPIK(22)	なし	MSTA 重 複	chr15:97429857- 97429883	(+)	HLA-A*30:01
RSAGPRAPL(23)	なし	なし	chr1:145096230- 145096256	(-)	HLA-B*07:02
VLYRSVLLK(24)	ENSG00000187741	なし	chr16:89798385- 89798414	(-)	HLA-A*03:01
EYNSDLHQF(25)	ENSG00000169679	なし	chr2:110672828- 110672854	(-)	HLA-A*24:02
TYKYVDINTF(26)	ENSG00000262406	なし	chr11:102867951- 102867980	(-)	HLA-A*24:02
VIDEPVRL(27)	ENSG00000148773	なし	chr10:128122922- 128122945	(-)	HLA-C*04:01
RYLEKFYGL(28)	ENSG00000262406	なし	chr11:102873086- 102873112	(-)	HLA- A*24:02,HLA- A*23:01
KRLPSPSLF(29)	ENSG00000257743	なし	chr7:142131535- 142131561	(+)	HLA-C*07:01
KSINEFWNK(30)	ENSG00000152253	なし	chr2:168889463- 168889489	(-)	HLA-A*03:02
RVFHGNETTK(31)	ENSG00000138778	なし	chr4:103196221- 103196250	(-)	HLA-A*03:02
RIQLPVVSK(32)	ENSG00000148773	なし	chr10:128123124- 128123150	(-)	HLA- A*03:02,HLA- A*11:01
SIFRTPISK(33)	ENSG00000066279	なし	chr1:197139840- 197139866	(-)	HLA- A*03:02,HLA- A*11:01
KAAGAGAAK(34)	ENSG00000184357	なし	chr6:27867425- 27867451	(-)	HLA- A*03:02,HLA- A*30:01,HLA- A*03:01
AEYHSQSRA(35)	ENSG00000066279	なし	chr1:197100800- 197100826	(-)	HLA-B*50:01
IHNSDQILL(36)	ENSG00000183742	なし	chr7:20159866- 20159892	(-)	HLA-B*38:01
KMHQSRIY(37)	ENSG00000066279	なし	chr1:197102843- 197102869	(-)	HLA-A*32:01
QMAGLRDTY(38)	ENSG00000152253	なし	chr2:168889412- 168889438	(-)	HLA-A*01:01
RIKNWGS GMTF(39)	ENSG00000007171	なし	chr17:27788839- 27788871	(-)	HLA-A*32:01

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

AQYDQASTKY(40)	ENSG00000117724	なし	chr1:214622255-214629048	(+)	HLA-B*15:01
FVDNQYWRY(41)	ENSG00000262406	なし	chr11:102864249-102865798	(-)	HLA-A*01:01
QLDSAVKNLY(42)	ENSG00000149054	なし	chr11:6943137-6943166	(+)	HLA-A*01:01
EQLKVTTI(43)	ENSG00000065328	なし	chr10:13172417-13172440	(+)	HLA-B*52:01
FRSWAVQTF(44)	ENSG00000007171	なし	chr17:27768980-27769006	(-)	HLA-C*06:02
KLYQSIIGY(45)	ENSG00000139734	なし	chr13:59833182-59833208	(-)	HLA-A*03:01
SANVSKVSF(46)	ENSG00000066279	なし	chr1:197143439-197143465	(-)	HLA-C*12:02
SQHDILQMI(47)	ENSG00000148773	なし	chr10:128112176-128112202	(-)	HLA-B*13:02
VAKTPRNTY(48)	ENSG00000148773	なし	chr10:128109293-128109319	(-)	HLA-C*12:02
RPRLSAILF(49)	ENSG00000139734	なし	chr13:59879421-59879447	(-)	HLA-B*07:02
RVAKTNSLR(50)	ENSG00000134690	なし	chr1:37692715-37692741	(+)	HLA-A*03:01

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

表 5. CRCにおけるTSA源遺伝子の生物学的関連性。

供給源遺伝子	参照	CRCにおける生物学的関連性	
NKD1-裸のキューティクルホモログ 1	PMID : 25446263; PMID : 19956716	Wnt 経路の陰性フィードバック調節因子、マウスにおける腸腫瘍マーカー;NKD1 の変異は、Wnt シグナル伝達を変化させる	10
ANTXR1-炭疽毒素受容体 1	PMID : 31977138; PMID : 22340594	上方調節され、胃がんの予後不良と関連し、mTOR 経路を活性化する;ANTXR1 の遮断は、CRC における血管新生を予防する	
HKDC1-ヘキソキナーゼドメイン含有タンパク質 1	PMID : 30005951	HKDC1 は、CRC 細胞の代謝、増殖、及び転移の増加に寄与する	20
GRIN2B-グルタミン酸イオンチャネル型受容体 NMDA 型サブユニット 2B	PMID : 27243824	ステージ II の CRC への進行に関与する非ドライバース遺伝子として特定された	
LY6G6F-LY6G6D リードスルー-リンパ球抗原 6 ファミリーメンバー-G6F 及び G6D	PMID : 26894861	CRC で過剰発現される LY6G6D/F、潜在的な細胞表面マーカー	
IPP(KLHL27)-大槽内 A 粒子促進ポリペプチド	Human Protein Atlas(PMID:28818916)	結腸直腸がんにおける良好な予後マーカー;腎がん及び肝がんにおいて好ましくない	30
CYP39A1-イトクロム (cytochrome)P450、ファミリー 39、サブファミリーA、ポリペプチド 1	PMID : 27341022	発現は、予後不良の CRC において増加する	
COL11A1-コラーゲン XI 型アルファ 1	PMID : 33597969	CRC(mRNA)において上方調節される、予後不良のマーカー、CRC の発達における役割	
PATJ-PALS1 関連タイトジャンクションタンパク質		既知の関連はない	
DPH6-ジフタミン生合成 6		既知の関連はない	40
TRPC6-一過性(Transient)受容体電位型カチオンチャネルサブファミリーC メンバー6	PMID : 26422106	正常組織よりも CRC で低い TRPC6 の mRNA 発現は、腫瘍発生に寄与する可能性がある	

【表 10-2】

SUCNR1-コハク酸受容体 1 PMID : 32365557

SUCNR1 活性化は、
Wnt リガンド発現を
誘導し、CRC 由来細
胞株における WNT シ
グナル伝達及び EMT
を活性化する

POF1B-早発卵巣不全タンパ
ク質 1B PMID : 29484395;
PMID:25084053

CRC 細胞遊走におけ
る ATP5J 機能との関
与の可能性;腸細胞株
における接着を調節
する

10

HSPD1-ヒートショックタ
ンパク質ファミリー
D(Hsp60)メンバー1 PMID : 28261350;
PMID:29246022

CRC において差次的
に発現され、診断の
ための潜在的なバイ
オマーカー;CRC にお
ける推定診断及び予
後バイオマーカーと
して同定されたエク
ソソーム HSPD1

20

PLK1-セリン/スレオニン-タ
ンパク質キナーゼ
PLK1/polo 様キナーゼ 1
MATR3-Matrin3 PMID : 22648245
PMID : 28580901

CRC において過剰発
現し、転移及び浸潤
に関連する

MATR3 は、PINCR
lncRNA 及び p53 との
相互作用を介して、
DNA 損傷に応答し
て、CRC 由来細胞の
生存促進活性に関与
することが示された

30

【0198】

主な目的は、CRC における推定 TSA を特定することであったが、CRC 組織試料に
おいて平均で 6.33 個の TAA も特定されたが、CRC 由来細胞株においては特定され
なかった (図 4C)。主に非コード推定 TSA とは対照的に、特定された TAA の大部分
は、カノニカルコードエキソン配列に由来し、少数のみが、イントロン、遺伝子間配列、
又は lncRNA に由来していた (図 4D)。2つの非カノニカル TAA を、ERE 配列
によって重複させた (表 4)。注目すべきことに、4つの別個の TAA が、1つより多い
試料において特定され、1つの TAA が、3つの組織において特定された。これらの繰り
返された TAA は全て、カノニカルエキソンに由来し、供給源転写産物は、ASPM、M
KI67、DIAPH3、MMP12、NOS2、及び SPC25 に由来し、これらの全
てが、がんとの関連性を示されている (表 6)。

40

【表 1 1 - 1】

表 6. CRCにおけるTAA源遺伝子の生物学的関連性。

遺伝子記号	参照	CRCにおける生物学的関連性	
MMP12-マトリックスメタロペプチダーゼ 12	PMID : 27431388	対照と比較した CRC における過剰発現、CRC における陰性予後マーカー	
MKI67-増殖マーカーKi-67	PMID : 26281861; PMID: 27855388; PMID : 30727976	CRC における望ましい予後マーカー、IHC 染色(2016);ステージ III 及び IV の CRC における望ましい予後マーカー、IHC 染色(2016);データベースメタ分析に基づく、CRC における不良な予後マーカー(2019)	10
BUB1-有糸分裂性紡錘体チェックポイントキナーゼ	PMID : 23747338; PMID:11782350	早期発症 CRC に関連する BUB1 の変異;不活性化は、CRC における転移及び進行を促進する可能性がある	
DIAPH3-Diaphanous 関連ホルミン 3	Human Protein Atlas(PMID:28818916)	DIAPH3 は、予後的であり、高発現は、結腸直腸がんにおいて好ましい	
MGAM2-マルターゼグルコアミラーゼ 2	PMID : 30996822	消化管がんで発現(TCGA データ)	20
SPC25(キネトコアタンパク質)	PMID : 32351050; Human Protein Atlas(PMID:28818916)	(他のがんの中で特に)CRC において高発現;肝臓がん、子宮内膜がん、及び肺がんにおいて、望ましくない予後マーカー	
CENPE-セントロメア関連タンパク質 E		既知の関連はない	
ASPM-異常紡錘小頭症に関連	PMID : 31966766; Human Protein Atlas(PMID:28818916)	CRC において過剰発現;望ましくない予後マーカー(有糸分裂、細胞周期、腫瘍形成に関与)であることが示唆されている;肝臓、肺、子宮内膜、膵臓がんにおいて、望ましくない予後マーカーであることが知られている	30
HI-5-H1.5 リンカーヒストン、クラスターメンバー	PMID : 16959974	CRC において頻繁に変異する	
MACC1-結腸がんにおける転移関連	PMID : 27424982; PMID:25003996	結腸直腸がんの成長及び転移を促進する;B-カテニンシグナル伝達と EMT 移動による発がん性に関連する	40

【表 1 1 - 2】

NOS2-一酸化窒素シンターゼ 2	Human Protein Atlas (PMID:28818916)	がん増強(結腸直腸がん);RNA データ	
CENPF-セントロメアタンパク質 F	PMID : 30550624	CRC 悪性腫瘍に関連するリン酸化の変化;他のがんにおける望ましくない予後マーカー(肝臓、腎臓など;human protein atlas)	
ZNF215-ジンクフィンガータンパク質 215	Human Protein Atlas(PMID:28818916)	胃腸管及びリンパ系組織において、最も豊富な免疫細胞のサブセットにおける細胞質発現(タンパク質データ)	10
MCM10-ミニ染色体維持 10 複製開始因子	PMID : 32597491	正常組織と比較して、結腸及び直腸の腺がん試料における mRNA 発現の低下	
CDCA8-細胞分裂周期関連 8	PMID : 25260804	CRC において過剰発現、がんの進行に関連する	
IDO2-インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ 2	PMID : 18418598;	CRC における上方調節された発現	
UNG-ウラシル DNA グリコシラーゼ	PMID : 17029639	CRC 患者における頻繁な生殖細胞変異	20
FANCA-ファンコニ貧血 A 群タンパク質	PMID : 27165003; PMID:21286667	ファンコニ貧血は、特定のがんを素因とする;FA 経路における遺伝子は、CRC の病因に関与する(HR 修復に関与する)	

【 0 1 9 9 】

MSI 組織において、TSA 及び TAA の両方の平均を上回る数を特定することが当初期待された。このことは S5 では当てはまったが、他の MSI 組織では当てはまらなかった (図 4 A 及び 4 C)。このことは、MSI sensor の結果に反映されるように、S6 が、より低い「程度」の不安定性を有することに起因する可能性がある (表 3)。更に、特定された TSA の最多数を有する試料は、S2 (MSS 組織) であった。したがって、試料当たりの TSA 及び TAA の収量は、MSI ステータスに関係なく、本研究の範囲外の腫瘍の他の固有の生物学的特徴に起因する可能性があるようである。

【 0 2 0 0 】

推定 TSA 又は TAA のうちのいずれかが以前に特定されているかどうかを決定するために、ペプチド配列が、Immune Epitope Database (IEDB)、HLA Ligand Atlas (64)、及び Loeffler et al. 2018 (8) 及び Newey et al. 2019 (15) から CRC における腫瘍抗原を特定しようと試みた 2 つの以前の刊行物で報告されたかどうかを検証した。注目すべきことに、推定 a e TSA、m TSA、又は非カノニカル TAA のいずれも、これらの資料のいずれにおいても以前に報告されていない。特定された 26 個の推定カノニカル TAA のうち、24 個が、IEDB、Loeffler et al 2018 (PXD009602)、Newey et al 2019 (PXD014017)、又はこれら 3 つのいくつかの組み合わせで報告されていた (図 4 E)。これらのうちの 8 個は、HLA Ligand Atlas でも報告されており、そのうちの 1 個は、健康な結腸組織において具体的に示されている。興味深いことに、これらの以前の刊行物で以前に特定された TAA はいずれも腫瘍抗原として報告されておらず、逆に、Loeffler et al. で報告された目的の 12 の腫瘍抗原のうちの 6 個は、本研究の免疫ペプチドームでも特定されたが、それらは、ほとんどの場合、NAT における高い発現に起因して、TSA 又は TAA とみなされるための特定パイプラインで確立された閾値を超えるものではな

10

20

30

40

50

った（表 7 A）。したがって、主に非コード領域に由来する新規の結腸直腸がん T S A、及び主にコード T A A の選択（そのうちのいくつかは、M A P として以前に報告されているが、T A A としてのそれらの生物学的関連性の文脈では報告されていない）が、本研究で特定されている。表 7 B 及び 7 C は、本研究でそれぞれ特定された T S A 及び T A A を示す。

【表 1 2】

表 7 A : L o f f l e r e t a l . 2 0 1 8 の腫瘍抗原の除外の正当な理由。

ペプチド(配列番号)	Loffler et al. 2018 の分類	Loffler et al. 2018 の HLA 制限	試料	除外の理由
RLASRPLLL(101)	ワクチン候補	B*07	S5	がんと NAT と の間の FC<10
YRNSYEIEY(102)	ワクチン候補	C*07	S1、S2、 S6	NAT におい て、MCS 発現 >2KPHM
APTPARPVL(103)	更なる検証が必要 なワクチン候補	B*07	S1	mTEC におい て、MCS 発現 8.55RPHM
RLAEPSQMLK(104)	更なる検証が必要 なワクチン候補	A*03	S6	NAT におい て、MCS 発現 >2KPHM
SPKATGVFTTL(105)	更なる検証が必要 なワクチン候補	B*07	S1、S6	NAT におい て、MCS 発現 >2KPHM
SVLTQPPSV(106)	証拠不明のワクチ ン候補	A*02	S2	NAT におい て、MCS 発現 >2KPHM

10

20

30

40

50

【表 13】

表 7 B : 本研究で特定された T S A

配列(アミノ酸及びヌクレオチド)	配列 番号	予測される HLA アレル ¹	ステータス ²
RMLLSHTGK AGGATGTTACTGAGCCACACAGGAAAA	1 51	HLA-A*03:01	新規
LPHRALSGI CTTCCTCACAGGGCTTTGTCAGGCATT	2 52	HLA-B*07:02	新規
GTNPAAVK GGCACCAACCCACGGCTGCAGTGAAG	3 53	HLA-A*03:02	新規
LRHKLVLNR TTAAGGCATAAGTTAGTTCTGAACAGA	4 54	HLA-B*27:05	新規
RIGGVGVEK CGGATAGGGGAGTAGGAGTAGAGAAG	5 55	HLA-A*03:02	新規
SIETVNSL TCTATAATAGAACTGTAAATTCTCTT	6 56	HLA-A*02:01	新規
TVNTQQYNTK ACTGTCAACACTCAACAATATAATACAAAA	7 57	HLA-A*03:02	新規
SVSHLHIF TCTGTAGCCATTTGCATATCTTCTTT	8 58	HLA-A*32:01	新規
TTLENLPQK ACCACACTGGAAAACCTGCCCCAGAAG	9 59	HLA-A*11:01	新規
AQKLQVRI GCACAAAAATTGCAAGTGAGGATT	10 60	HLA-B*52:01	新規
GQIELSIYR GGTCAAATAGAGTTATCAATATATAGG	11 61	HLA-A*03:01	新規
HGALSIRSI CATGGTGCCCTGTCCATAAGAAGTATT	12 62	HLA-B*52:01	新規
RLMKFLPV AGACTGATGAAATTCCTTCCAGTT	13 63	HLA-B*13:02	新規
SLYISEERK TCTCTGTATATCTCAGAAGAAAGGAAA	14 64	HLA-A*03:01	新規
VQTAVLNV GTTCAAACCTGCTGTTTTAAATGTG	15 65	HLA-B*52:01	新規
KIGEVIVTK AAAATTGGAGAGGTCATTGTGACCAAA	16 66	HLA-A*03:02	新規
TRSTIHLHL ACCCGCAGCACCATCATCCTGCACCTC	17 67	HLA-C*06:02	新規
RNRQVATAL AGGAATAGGCAGGTGCTACTGCTCTG	24 74	HLA-B*07:02	US2022/0002374 で以前に報告され た
VEAPHLPSF GTGGAAGCCCCTCATCTGCCTTCATTC	25 75	HLA-B*18:01	WO2020/131586 で 以前に報告された

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 7 C : 本研究で特定された T A A

配列	配列番号	予測される HLA アレル	ステータス
SILRGS LGK TCGATTTTACGTGGATCTCTAGGAAA	18 68	HLA-A*11:01	新規
RLVSNRVVR AGATTGGTTTCAAATAGAGTAGTCAGG	19 69	HLA-A*30:01	新規
SLKNLEPIK AGCCTGAAAAACCTTGAGCCAATTAA A	20 70	HLA-A*30:01	新規
RSAGPRAPL CGCTCTGCGGGTCCG CGGGCCCCTCTC	21 71	HLA-B*07:02	新規
VLYRSVLLK GTGTTGTACCGTTCG GTACTTTTACTGAAA	22 72	HLA-A*03:01	新規
KAAGAGAAK AAGGCTGCCGCGCC GGCGCTGCTAAG	23 73	HLA-A*03:02,HLA-A*30:01,HLA-A*03:01	新規
EYNSDLHQF GAGTACAACAGTGACCTCCATCAATT	26 76	HLA-A*24:02	IEDB 及び PXD014017 で以前に報告された ²
TYKYVDINTF ACCTACAAATATGTTG ACATCAACACATT	27 77	HLA-A*24:02	US2022/0175898A 1 で以前に報告された
VIDEPVRL GTTATTGATGAGCCTGTACGGCTA	28 78	HLA-C*04:01	IEDB、 PXD009602、 PXD014017、HLA Ligand Atlas で以前に報告された ²
RYLEKFYGL AGATACTTAGAAAAATTTATGGCCTT	29 79	HLA-A*24:02,HLA-A*23:01	PXD009602 で以前に報告された ²
KRLPSPSLF AAAAGGTTGCCATCACCATCTCTGTTT	30 80	HLA-C*07:01	PXD014017 で以前に報告された ²
KSINEFWNK AAAAGCATAAATGAATTTTGAATAA A	31 81	HLA-A*03:02	IEDB、 PXD014017、及び HLA Ligand Atlas で以前に報告された ²

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

RVFHGNETTK CGTGICTTTTCATGGT AATGAAACTACCAAA	32 82	HLA-A*03:02	IEDB 及び PXD014017 で以 前に報告された ²
RIQLPVVSK CGTATCCAGCTTCCTGTTGTGTCAAAA	33 83	HLA-A*03:02,HLA- A*11:01	IEDB 及び PXD014017 で以 前に報告された ²
SIFRTPISK TCAATATTCAGAACTCCAATTTCTAAA	34 84	HLA-A*03:02,HLA- A*11:01	IEDB 及び PXD014017 で以 前に報告された ²
AEYHSQSRA GCAGAGTATCATTCTCAAAGTAGGGCT	35 85	HLA-B*50:01	IEDB で以前に報 告された ²
IHNSDQILL ATACATAACTCTGACCAGATCCTACTA	36 86	HLA-B*38:01	IEDB で以前に報 告された ²
KMHQSRISY AAAATGCATCAGTCAAGAATAAGTTAC	37 87	HLA-A*32:01	IEDB 及び PXD014017 で以 前に報告された ²
QMAGLRDTY CAGATGGCGGGACTAAGAGATACCTAC	38 88	HLA-A*01:01	IEDB、 PXD009602 及び PXD014017 で以 前に報告された ²
RIKNWGSMTF AGGATCAAAAACCTGGGGCAGC GGGATGACTTTC	39 89	HLA-A*32:01	PXD014017 で以 前に報告された ²
AQYDQASTKY GCACAATACGACCAG GCGTCAACCAAGTA	40 90	HLA-B*15:01	IEDB 及び HLA Ligand Atlas で以 前に報告された ²
FVDNQYWRY TTTGTAGATAACCAGTATTGGAGGTAT	41 91	HLA-A*01:01	PXD009602 で以 前に報告された ²
QLDSAVKNLY CAACTGGACTCTGCTGT AAAGAACCTGTAC	42 92	HLA-A*01:01	IEDB 及び HLA Ligand Atlas で以 前に報告された ²
EQLKVTTI GAGCAGCTAAAAGTAACAACAATT	43 93	HLA-B*52:01	IEDB で以前に報 告された ²
FRSWAVQTF TTCCGCAGCTGGGCCGTGCAAACCTTC	44 94	HLA-C*06:02	IEDB 及び PXD009602 で以 前に報告された ²
KLYQSIIGY AAGTTATACCAGAGTATAATAGGATAC	45 95	HLA-A*03:01	IEDB、 PXD009602 及び PXD014017 で以 前に報告された ²

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

SANVSKVSF AGTGCCAACGTTTCAAAAGTTTCTTTT	47 97	HLA-C*12:02	IEDB、 PXD014017、及 び HLA Ligand Atlas で以前に報 告された ²
SQHDILQMI AGTCAACATGATATTTTACAGATGATA	48 98	HLA-B*13:02	IEDB、 PXD009602、及 び HLA Ligand Atlas で以前に報 告された ²
VAKTPRNTY GTAGCAAAAACGCCAGGAACACCTAC	49 99	HLA-C*12:02	IEDB で以前に報 告された ²
RPRLSAILF CGGCCACGGCTCAGTGCTATTCTCTTT	50 100	HLA-B*07:02	IEDB、 PXD009602、及 び HLA Ligand Atlas で以前に報 告された ²
RVAKTNSLR CGGGTGGCCAAGACCAACTCCTTACGG	46 96	HLA-A*03:01	IEDB、 PXD009602 及び PXD014017 で以 前に報告された ²

¹ 1 つより多い試料中で特定されたペプチドは、複数の予測アレルを有し得る。

² 腫瘍抗原として特定されていない

IEDB=免疫エピトープデータベース、PXD=ProteomeXchangeをによっ
て発表されたデータセット

【0 2 0 1】

実施例 6：推定腫瘍特異的抗原及び腫瘍関連抗原の検証

推定 T S A 及び T A A の特定に続いて、全ての T S A 及び 1 1 個の T A A のサブセット
の検証が行われ、これらは、合成ペプチドによる検証の前に、マッチした N A T に対する
、がんにおける良好な初期 T M T 強度比及び前駆体イオン割合に基づいて選択された。ま
ず、T P M において、一致した N A T と比較した、それらのそれぞれの腫瘍試料における
供給源転写産物の発現、及び C R C / N A T 試料におけるその転写産物の平均 (m e a n
a v e r a g e) を研究した (図 5 A)。この分析は、当然、遺伝子間領域に由来するペ
プチドを含まない。それらが特定された試料中の推定 T S A 及び T A A の供給源転写産物
の平均 l o g 2 F C は、それぞれ 3 . 6 及び 3 . 2 であった。a e T S A の供給源転写産物
が腫瘍よりも N A T においてより豊富であるいくつかの場合 (S 2、S 6) が存在する
が、これは、転写産物全体の全体的な豊富さのみを反映しており、ペプチドコード配列は
、実際には、がんの方がより豊富である。これは、ペプチドコード領域が完全に不存在で
あるか、又は N A T において低い発現であるが、がん組織においてより高度に発現される
、a e T S A についても当てはまった。

【0 2 0 2】

推定腫瘍抗原の特異性を評価するために、G e n o t y p e - T i s s u e E x p r
e s s i o n プロジェクト (G T E x) によって提供される健康な組織の大規模なデー
タセットにおけるペプチドコード配列の平均発現を決定した (図 5 B)。T S A 配列は、精
巢において閾値を上回って発現される S 2 で特定される a e T S A である R I G G V G V

E Kを除いて、任意の健康な組織において8.55 r p h mを上回って発現されない(図5 B)。このことは、このT S Aが、雄性生殖細胞で発現されるが、がんでも異常に発現され得るa e T S Aの一種であるがん精巣抗原(C T A)としても分類され得ることを示唆する。精巣にM H C Iが存在しないことに起因して、これらの抗原も、がん免疫療法の有望な候補である(65)。この推定T S Aは、L Y 6 G 6 F-L Y 6 G 6 Dエキソンフレームシフトである。これらの遺伝子は、以前にC T Aとして報告されていないが、同じ遺伝子ファミリーの別のメンバーであるL Y 6 Kは、肺がん及び食道がんにおけるC T Aとして報告されている(66)。T A A発現は、健康な組織において閾値未満であったが、食道及び横行結腸においてより高くなる傾向があった。これらのペプチドのうちの7つはまた、精巣において閾値を上回って発現した。

10

【0203】

実施例7：T S A及びT A Aのがん特異性及び免疫原性

推定T S A及びT A Aを、それらに対応する合成ペプチドを用いてM Sによって検証した。これらのT A Aを、一致したN A Tに対する、がんにおける望ましい初期T M T強度比及び前駆体イオン割合に基づいて選択した。これらの候補は全て、合成ペプチドのM S/M Sと十分に相関したM S/M Sを有し、ピアソン相関スコアは0.6以上であった。合成ペプチドを、それぞれ10、100、及び1000 f m o lの濃度でT M T 10 p l e x-129 N、130 N、及び131で標識し、T M T 126(N A T)及び127 N(C R C)で標識した組織試料からの残りの精製M A Pにスパイクした。次いで、S P S-M S 3を使用して、これらの試料において目的のペプチドを定量化した。S P S-M S 3の感受性の低下にもかかわらず、7個のT S A及び7個のT A Aを定量化することが可能であった。良好な品質のP S Mを定量化のために選択し、全てが、N A Tと比較して、それぞれのC R Cにおいて、より豊富であった(表8)。T M T 126ペプチドと比較したT M T 127 Nペプチドの強度の比を決定すると、T S Aは、N A Tと比較して、C R Cにおいて16.96の中央値強度の倍率変化を有し、T A Aは、6.93の倍率変化を有することが明らかになった。加えて、配列R Y L E K F Y G Lを有するT S Aは、S 1腫瘍においても過剰発現したが、S 6についてだけ、トランスクリプトーム閾値を超えた。したがって、本研究で使用されたT S A特定方法が、N A Tのものよりもがん細胞の表面においてより高度に存在するT S A及びT A A配列を成功裏に特定したことを示すことが可能であった。合成ペプチドで検証されたT S A及びT A A候補は、表9 A~9 Bに列挙されている。

20

30

40

50

【表 15 - 1】

表 8 : C R Cにおける検証された腫瘍抗原の相対定量比。

配列	抗原の 性質	試料	内因性 試料比	平均強度	SPS-MS3 比 (127N/126)	合成校 正曲線 R ²
RMLLSHTGK	aeTSA	RKO	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
LPHRALSGI	aeTSA	S1	-0.364	N.D.	N.D.	N.D.
GTNPTAAVK	aeTSA	S2	2.095	7238.425242	12.174	1.000
LRHKLVLNR	aeTSA	S2	0.307	N.D.	N.D.	N.D.
RIGGVGVVEK	aeTSA	S2	1.965	29256.45	6.740	1.000
SIETVNSL	aeTSA	S2	0.288	N.D.	N.D.	N.D.
TVNTQQYNTK	aeTSA	S2	-0.021	N.D.	N.D.	N.D.
SVSHLHIFF	aeTSA	S3	-1.100	N.D.	N.D.	N.D.
TILENLPQK	aeTSA	S4	0.134	3140.8875	3.783	0.999
AQKLQVRI	aeTSA	S5	0.793	N.D.	N.D.	N.D.
GQIELSIYR	aeTSA	S5	0.328	N.D.	N.D.	N.D.
HGALSIRSI	aeTSA	S5	0.777	N.D.	N.D.	N.D.
RLMKFLPV	aeTSA	S5	0.171	N.D.	N.D.	N.D.
SLYISEERK	aeTSA	S5	0.046	N.D.	N.D.	N.D.
VQTAVLVN	aeTSA	S5	1.089	N.D.	N.D.	N.D.
VEAPHLPSF	aeTSA	S6	1.059	43782.84192	41.318	1.000
RNRQVATAL	aeTSA	S6	1.090	12174.6625	5.722	1.000
RNRQVATAL	割り当 てなし	S1	0.890	15514.2375	3.507	1.000
KIGEVIVTK	mTSA	S2	2.506	70659.6	13.637	1.000
TRSTIHL	mTSA	S3	1.381	34365.32187	48.807	0.997
VLRSVLLLK	非カノ ニカル TAA	S6	0.997	N.D.	N.D.	N.D.
TYKYVDINTF	カノニ カル TAA	S1	1.969	29834.36875	8.226	0.998
RYLEKIFYGL	カノニ カル TAA	S1	2.840	27614.24286	7.661	0.997
RYLEKIFYGL	カノニ カル TAA	S6	2.970	106928.2875	16.090	0.999
KSINEFWNK	カノニ カル TAA	S2	2.212	56110.11667	5.238	0.999
RIQLPVVSK	カノニ カル TAA	S4	1.083	7612.378571	2.073	0.999

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 2】

QMAGLRDTY	カノニカル	S3	1.140	36090.60294	2.884	0.999
	TAA					
AQYDQASTKY	カノニカル	S4	1.452	N.D.	N.D.	N.D.
	TAA					
FVDNQYWRY	カノニカル	S4	0.721	5853.986533	10.954	1.000
	TAA					
SANVSKVSF	カノニカル	S5	1.114	12780.925	2.321	0.999
	TAA					

【 0 2 0 4】

表 9 A 及び 9 B は、合成ペプチドで検証された T S A 及び T A A 候補を示す。

【表 1 6】

表 9 A : 合成ペプチドで検証された T S A のリスト

配列	配列番号
RMLLSHTGK	1
LPHRALSGI	2
GTNPTAAVK	3
LRHKLVLR	4
RIGGVGVEK	5
SIETVNSL	6
TVNTQQYNTK	7
SVSHLHIF	8
TTLENLPQK	9
AQKLQVRI	10
GQIELSIYR	11
HGALSIRSI	12
RLMKFLPV	13
SLYISEERK	14
VQTAVLNV	15
KIGEVIVTK	16
TRSTIHL	17
RNRQVATAL	24
VEAPHLPSF	25

【表 17】

表 9 B：合成ペプチドで検証された TAA のリスト

配列	配列番号
VLRSVLLLK	22
TYKYVDINTF	27
RYLEKFYGL	29
KSINEFWNK	31
RIQLPVVSK	33
QMAGLRDTY	38
AQYDQASTKY	40
FVDNQYWRY	41
SANVSKVSF	47

10

【0205】

他の CRC 腫瘍におけるこれらの TSA 及び TAA の腫瘍間分布を調べるために、The Cancer Genome Atlas (TCGA) からの 151 個の結腸腺がん試料におけるペプチドコード配列の $\log(RPHM+1)$ 発現をプロットした (図 6 A) 。抗原の共有可能性を評価するために、目的の各ペプチドについて、プールされた GTE x (n=2442) 及び mTEC (n=8) 試料の $\log$ 変換された ($\log(rphm+1)$) 値の平均を最初に計算した。全体として、9 個の TSA (53%) 及び 9 個の TAA (100%) は、TCGA COAD 腫瘍の少なくとも 5% において、対応する平均した GTE x / mTEC 値より 10 倍以上高い発現を有していた。このことは、TAA が、それらの TSA 対応物よりも COAD TCGA 腫瘍の間でより頻繁に共有されることを示す。しかし、このことはまた、ほとんどの TSA が、これらの試料で高度に共有されていることを意味する。

20

【0206】

腫瘍抗原の特定における別の重要な考慮事項は、これらのペプチドが有効な抗腫瘍免疫応答を誘発することができるかどうかである。免疫原性のレピトープ予測は、aeTSA が、非免疫原性であると推定される 1 セットの胸腺ペプチドよりも有意に高い免疫原性であると予測されることを明らかにした (67) (図 6 B) 。加えて、aeTSA は、カノニカル TAA 及びコード TAA 全体 (コード領域に由来する TSA 及び TAA) と比較して、有意により高い免疫原性スコアを有していた。実際に、これらの予測によれば、カノニカル領域由来の TAA は、胸腺ペプチドよりも有意に免疫原性が低かった ($p < 0.01$) 。これは、検証された TAA の数が少ないことに部分的に起因する可能性がある。これらの予測を 31 個の TAA のセット全体で考慮した場合、このことはもはや当てはまらない (図 13) 。31 個の TAA 全てを考慮すると、MSI TA は、胸腺ペプチドよりも免疫原性が高いと予測される一方で、MSS と比較して、MSI 組織に由来する TA の予測される免疫原性の統計学的に有意な増加も存在する。

30

40

【0207】

最後に、腫瘍抗原に結合し、提示すると予測されるアレルを有する個体の割合の近似を求めた (図 6 C) 。試料中の抗原の多くはかなり存在量が多く、IEDB 集団カバレッジ ツールを用いた推定は、米国の人口の 80.64% が、本研究で特定された TA に関連するアレルの少なくとも 1 つを発現すると予測した。

【0208】

本発明は、本明細書に上述の特定の実施形態によって説明されてきたが、添付の特許請求の範囲に定義される主題発明の趣旨及び性質から逸脱することなく、変更され得る。特許請求の範囲では、「含む」という単語は、「含むが、それに限定されない」という語句と実質的に等価である、オープンエンド用語として使用される。「a」、「an」、及び

50

「the」という単数形は、別段文脈が明らかに指示しない限り、対応する複数の対象物を含む。

【0209】

参考文献

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424
2. Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017) Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683–691
3. Eriksen, A. C., Sorensen, F. B., Lindebjerg, J., Hager, H., dePont Christensen, R., Kjaer-Frifeldt, S., and Hansen, T. F. (2018) The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Stage II Colon Cancer. A Nationwide Population-Based Study. *Transl Oncol* 11, 979–987
4. Zhao, Y., Ge, X., He, J., Cheng, Y., Wang, Z., Wang, J., and Sun, L. (2019) The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer differs by anatomical subsite: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol* 17, 85
5. Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhajee, F., Huebner, T., Hruban, R. H., Wood, L. D., Cuka, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Zhou, S., Cornish, T. C., Taube, J. M., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., and Diaz, L. A., Jr. (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372, 2509–2520
6. Fabrizio, D. A., George, T. J., Jr., Dunne, R. F., Frampton, G., Sun, J., Gowen, K., Kennedy, M., Greenbowe, J., Schrock, A. B., Hezel, A. F., Ross, J. S., Stephens, P. J., Ali, S. M., Miller, V. A., Fakih, M., and Klemperner, S. J. (2018) Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may respond to immune checkpoint inhibition. *J Gastroi*

10

20

30

40

50

ntest Oncol 9, 610–617

7. Wagner, S., Mullins, C. S., and Linnebacher, M. (2018) Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens. World J Gastroenterol 24, 5418–5432

8. Loffler, M. W., Kowalewski, D. J., Backert, L., Bernhardt, J., Adam, P., Schuster, H., Dengler, F., Backes, D., Kopp, H. G., Beckert, S., Wagner, S., Konigsrainer, I., Kohlbacher, O., Kanz, L., Konigsrainer, A., Rammensee, H. G., Stevanovic, S., and Haen, S. P. (2018) Mapping the HLA Ligandome of Colorectal Cancer Reveals an Imprint of Malignant Cell Transformation. Cancer Res 78, 4627–4641 10

9. Picard, E., Verschoor, C. P., Ma, G. W., and Pawelec, G. (2020) Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer. Front Immunol 11, 369

10. Parkhurst, M. R., Yang, J. C., Langan, R. C., Dudley, M. E., Nathan, D. A., Feldman, S. A., Davis, J. L., Morgan, R. A., Merino, M. J., Sherry, R. M., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Phan, G. Q., Lim, R. M., Wank, S. A., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Laurencot, C. M., and Rosenberg, S. A. (2011) T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. Mol Ther 19, 620–626 20

11. Minati, R., Perreault, C., and Thibault, P. (2020) A Roadmap Toward the Definition of Actionable Tumor-Specific Antigens. Front Immunol 11, 583287 30

12. Smith, C. C., Selitsky, S. R., Chai, S., Armistead, P. M., Vincent, B. G., and Serody, J. S. (2019) Alternative tumour-specific antigens. Nat Rev Cancer 19, 465–478

13. Kloor, M., Reuschenbach, M., Karbach, J., Rafiyan, M., Al-Batran, S.-E., Pauligk, C., Jaeger, E., and Doeberitz, M. v. K. (2015) Vaccination of MSI-H colorectal cancer patients with frameshift peptide antigens: A phase I/IIa clinical trial. Journal of Clinical Oncology 33, 3020–3020 40

14. van den Bulk, J., Verdegaal, E. M. E., Ruan, D., Ijsselstein, M. E., Visser, M., van der Breggen, R., Duhén, T., van der Ploeg, M., de Vries, N. L., Oosting, J., Peeters, K., Weinberg, A. D., Farina-Sarasqueta, A., van der Burg, S. H., and de Miranda, N. (2019) Neoantigen- 50

- specific immunity in low mutation burden colorectal cancers of the consensus molecular subtype 4. *Genome Med* 11, 87
15. Newey, A. , Griffiths, B. , Michaux, J. , Pak, H. S. , Stevenson, B. J. , Woolston, A. , Semiannikova, M. , Spain, G. , Barber, L. J. , Matthews, N. , Rao, S. , Watkins, D. , Chau, I. , Coukos, G. , Racle, J. , Gfeller, D. , Starling, N. , Cunningham, D. , Bassani-Sternberg, M. , and Gerlinger, M. (2019) Immunopeptidomics of colorectal cancer organoids reveals a sparse HLA class I neoantigen landscape and no increase in neoantigens with interferon or MEK-inhibitor treatment. *J Immunother Cancer* 7, 309
16. Laumont, C. M. , Vincent, K. , Hesnard, L. , Audemard, E. , Bonneil, E. , Laverdure, J. P. , Gendron, P. , Courcelles, M. , Hardy, M. P. , Cote, C. , Durette, C. , St-Pierre, C. , Benhammadi, M. , Lanoix, J. , Vobecky, S. , Haddad, E. , Lemieux, S. , Thibault, P. , and Perreault, C. (2018) Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med* 10
17. Zhao, Q. , Laverdure, J. P. , Lanoix, J. , Durette, C. , Cote, C. , Bonneil, E. , Laumont, C. M. , Gendron, P. , Vincent, K. , Courcelles, M. , Lemieux, S. , Millar, D. G. , Ohashi, P. S. , Thibault, P. , and Perreault, C. (2020) Proteogenomics Uncovers a Vast Repertoire of Shared Tumor-Specific Antigens in Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res* 8, 544–555
18. Ehx, G. , Larouche, J. D. , Durette, C. , Laverdure, J. P. , Hesnard, L. , Vincent, K. , Hardy, M. P. , Theriault, C. , Rulleau, C. , Lanoix, J. , Bonneil, E. , Feghaly, A. , Apavaloaei, A. , Noronha, N. , Laumont, C. M. , Delisle, J. S. , Vago, L. , Hebert, J. , Sauvageau, G. , Lemieux, S. , Thibault, P. , and Perreault, C. (2021) Atypical acute myeloid leukemia-specific transcripts generate shared and immunogenic MHC class-I-associated epitopes. *Immunity*
19. Bolger, A. M. , Lohse, M. , and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120
20. Dobin, A. , Davis, C. A. , Schlesinger, F. , Drenkow, J. , Zaleski, C. , Jha, S. , Batut, P. , Chaisson, M. , and Gingeras, T. R. (2013) STAR:ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21

21. Bray, N. L. , Pimentel, H. , Melsted, P. , and Pachter, L. (2016) Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34, 525–527
22. Szolek, A. , Schubert, B. , Mohr, C. , Sturm, M. , Feldhahn, M. , and Kohlbacher, O. (2014) OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 30, 3310–3316
23. Jia, P. , Yang, X. , Guo, L. , Liu, B. , Lin, J. , Liang, H. , Sun, J. , Zhang, C. , and Ye, K. (2020) MSIsensor-pro: Fast, Accurate, and Matched-normal-sample-free Detection of Microsatellite Instability. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 18, 65–71 10
24. Love, M. I. , Huber, W. , and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550
25. Zhou, Y. , Zhou, B. , Pache, L. , Chang, M. , Khodabakhshi, A. H. , Tanaseichuk, O. , Benner, C. , and Chanda, S. K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10, 1523 20
26. Hardy, M. P. , Audemard, E. , Migneault, F. , Feghaly, A. , Brochu, S. , Gendron, P. , Boilard, E. , Major, F. , Dieude, M. , Hebert, M. J. , and Perreault, C. (2019) Apoptotic endothelial cells release small extracellular vesicles loaded with immunostimulatory viral-like RNAs. *Sci Rep* 9, 7203 30
27. Karolchik, D. , Hinrichs, A. S. , Furey, T. S. , Roskin, K. M. , Sugnet, C. W. , Haussler, D. , and Kent, W. J. (2004) The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res* 32, D493–496
28. Cingolani, P. , Platts, A. , Wang le, L. , Coon, M. , Nguyen, T. , Wang, L. , Land, S. J. , Lu, X. , and Ruden, D. M. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6, 80–92 40
29. Daouda, T. , Perreault, C. , and Lemieux, S. (2016) pyGeno: A Python package for precision medicine and proteogenomics. *F1000Res* 5, 381
30. Lanoix, J. , Durette, C. , Courcelles, M. , Cossette, E. , Comtois-Marotte, S. , Hardy, M. P. , 50

- Cote, C. , Perreault, C. , and Thibault, P. (2018) Comparison of the MHC I immunopeptidome repertoire of B-cell lymphoblasts using two isolation methods. *Proteomics* 18, e1700251
31. Ma, B. , Zhang, K. , Hendrie, C. , Liang, C. , Li, M. , Doherty-Kirby, A. , and Lajoie, G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 2337–2342 10
32. Courcelles, M. , Durette, C. , Daouda, T. , Laverdure, J. P. , Vincent, K. , Lemieux, S. , Perreault, C. , and Thibault, P. (2020) MAPDP: A Cloud-Based Computational Platform for Immunopeptidomics Analyses. *J Proteome Res* 19, 1873–1881
33. Wu, T. D. , Reeder, J. , Lawrence, M. , Becker, G. , and Brauer, M. J. (2016) GMAP and GSNAP for Genomic Sequence Alignment: Enhancements to Speed, Accuracy, and Functionality. *Methods Mol Biol* 1418, 283–334 20
34. Ogishi, M. , and Yotsuyanagi, H. (2019) Quantitative Prediction of the Landscape of T Cell Epitope Immunogenicity in Sequence Space. *Front Immunol* 10, 827
35. Conway, J. R. , Lex, A. , and Gehlenborg, N. (2017) UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33, 2938–2940
36. Hanzelmann, S. , Castelo, R. , and Guinney, J. (2013) GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 14, 7 30
37. Yoshihara, K. , Shahmoradgol, M. , Martinez, E. , Vegesna, R. , Kim, H. , Torres-Garcia, W. , Trevino, V. , Shen, H. , Laird, P. W. , Levine, D. A. , Carter, S. L. , Getz, G. , Stemke-Hale, K. , Mills, G. B. , and Verhaak, R. G. (2013) Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun* 4, 2612 40
38. Chan, A. Y. , and Anderson, M. S. (2015) Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator. *Ann N Y Acad Sci* 1356, 80–89
39. Pfammatter, S. , Bonneil, E. , Lanoix, J. , Vincent, K. , Hardy, M. P. , Courcelles, M. , Perreault, C. , and Thibault, P. (2020) Extending the Comprehensiveness of Immunopeptidome Analyses Using Isobaric Peptide Labeling. 50

Anal Chem 92, 9194–9204

40. Pira, G., Uva, P., Scanu, A. M., Rocca, P. C., Murgia, L., Uleri, E., Piu, C., Porcu, A., Carru, C., Manca, A., Persico, I., Muronì, M. R., Sanges, F., Serra, C., Dolei, A., Angius, A., and De Miglio, M. R. (2020) Landscape of transcriptome variations uncovering known and novel driver events in colorectal carcinoma. Sci Rep 10, 432

41. Kawakami, H., Zaanani, A., and Sinicrope, F. A. (2015) Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. Curr Treat Options Oncol 16, 30

42. Jimeno, A., Messersmith, W. A., Hirsch, F. R., Franklin, W. A., and Eckhardt, S. G. (2009) KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. J Clin Oncol 27, 1130–1136

43. Van Cutsem, E., Kohne, C. H., Lang, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S., Schlichting, M., Zubel, A., Celik, I., Rougier, P., and Ciardiello, F. (2011) Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J Clin Oncol 29, 2011–2019

44. Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknaes, M., Hektoen, M., Lind, G. E., and Lothe, R. A. (2013) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis 2, e71

45. Berg, K. C. G., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L. A., Eknaes, M., Lind, G. E., Myklebost, O., Skotheim, R. I., Sveen, A., and Lothe, R. A. (2017) Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines – a resource for biomedical studies. Mol Cancer 16, 116

46. Niu, B., Ye, K., Zhang, Q., Lu, C., Xie, M., McLellan, M. D., Wendl, M. C., and Ding, L. (2014) MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. Bioinformatics 30, 1015–1016

10

20

30

40

50

47. Aaltonen, L. A. , Peltomaki, P. , Mecklin, J. P. , Jarvinen, H. , Jass, J. R. , Green, J. S. , Lynch, H. T. , Watson, P. , Tallqvist, G. , Juhola, M. , and et al. (1994) Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 54, 1645–1648
48. Llosa, N. J. , Cruise, M. , Tam, A. , Wicks, E. C. , Hechenbleikner, E. M. , Taube, J. M. , Blosser, R. L. , Fan, H. , Wang, H. , Lubber, B. S. , Zhang, M. , Papadopoulos, N. , Kinzler, K. W. , Vogelstein, B. , Sears, C. L. , Anders, R. A. , Pardoll, D. M. , and Housseau, F. (2015) The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 5, 43–51 10
49. Le, D. T. , Durham, J. N. , Smith, K. N. , Wang, H. , Bartlett, B. R. , Aulakh, L. K. , Lu, S. , Kemberling, H. , Wilt, C. , Lubber, B. S. , Wong, F. , Azad, N. S. , Rucki, A. A. , Laheru, D. , Donehower, R. , Zaheer, A. , Fisher, G. A. , Crocenzi, T. S. , Lee, J. J. , Gretten, T. F. , Duffy, A. G. , Ciombor, K. K. , Eyring, A. D. , Lam, B. H. , Joe, A. , Kang, S. P. , Holdhoff, M. , Danilova, L. , Cope, L. , Meyer, C. , Zhou, S. , Goldberg, R. M. , Armstrong, D. K. , Bever, K. M. , Fader, A. N. , Taube, J. , Housseau, F. , Spetzler, D. , Xiao, N. , Pardoll, D. M. , Papadopoulos, N. , Kinzler, K. W. , Eshleman, J. R. , Vogelstein, B. , Anders, R. A. , and Diaz, L. A. , Jr. (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409–413 20
50. Hanahan, D. , and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70
51. Hanahan, D. , and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674 30
52. Prossomariti, A. , Piazzzi, G. , Alquati, C. , and Ricciardiello, L. (2020) Are Wnt/beta-Catenin and PI3K/AKT/mTORC1 Distinct Pathways in Colorectal Cancer? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 10, 491–506 40
53. Danaher, P. , Warren, S. , Dennis, L. , D'Amico, L. , White, A. , Disis, M. L. , Geller, M. A. , Oduisi, K. , Beechem, J. , and Fling, S. P. (2017) Gene expression markers of Tumor Infiltrating Leukocytes. *J Immunother Cancer* 5, 18
54. Barbie, D. A. , Tamayo, P. , Boehm, J. S. , Kim, S. Y. , Moody, S. E. , Dunn, I. F. , Schinzel, A. C. , 50

- Sandy, P. , Meylan, E. , Scholl, C. , Frohling, S. , Chan, E. M. , Sos, M. L. , Michel, K. , Mermel, C. , Silver, S. J. , Weir, B. A. , Reiling, J. H. , Sheng, Q. , Gupta, P. B. , Wadlow, R. C. , Le, H. , Hoersch, S. , Wittner, B. S. , Ramaswamy, S. , Livingston, D. M. , Sabatini, D. M. , Meyerson, M. , Thomas, R. K. , Lander, E. S. , Mesirov, J. P. , Root, D. E. , Gilliland, D. G. , Jacks, T. , and Hahn, W. C. (2009) Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 462, 108–112 10
55. Kim, H. , Jen, J. , Vogelstein, B. , and Hamilton, S. R. (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 145, 148–156
56. Smyrk, T. C. , Watson, P. , Kaul, K. , and Lynch, H. T. (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 91, 2417–2422 20
57. Dolcetti, R. , Viel, A. , Doglioni, C. , Russo, A. , Guidoboni, M. , Capozzi, E. , Vecchiato, N. , Macri, E. , Fornasarig, M. , and Boiocchi, M. (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 154, 1805–1813 30
58. Phillips, S. M. , Banerjee, A. , Feakins, R. , Li, S. R. , Bustin, S. A. , and Dorudi, S. (2004) Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg* 91, 469–475
59. Boland, C. R. , Koi, M. , Chang, D. K. , and Carethers, J. M. (2008) The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 7, 41–52 40
60. Sarkizova, S. , Klaeger, S. , Le, P. M. , Li, L. W. , Oliveira, G. , Keshishian, H. , Hartigan, C. R. , Zhang, W. , Braun, D. A. , Ligon, K. L. , Bachiredy, P. , Zervantonakis, I. K. , Rosenbluth, J. M. , Ouspenskaia, T. , Law, T. , Justesen, S. , Stevens, J. , Lane, W. J. , Eisenhaure, T. , Lan Zhang, G. , Clauser, K. R. , Hacohen, N. , Carr, S. A. , Wu, C. J. , and Keskin, D. B. (2020) A large pept 50

idome dataset improves HLA class I epitope prediction across most of the human population. *Nat Biotechnol* 38, 199–209

61. Larouche, J. D., Trofimov, A., Hesnard, L., Ehx, G., Zhao, Q., Vincent, K., Durette, C., Gendron, P., Laverdure, J. P., Bonneil, E., Cote, C., Lemieux, S., Thibault, P., and Perreault, C. (2020) Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues. *Genome Med* 12, 40

62. Cherkasova, E., Scrivani, C., Doh, S., Weisman, Q., Takahashi, Y., Harashima, N., Yokoyama, H., Srinivasan, R., Linehan, W. M., Lerman, M. I., and Childs, R. W. (2016) Detection of an Immunogenic HERV-E Envelope with Selective Expression in Clear Cell Kidney Cancer. *Cancer Res* 76, 2177–2185

63. Patra, R., Das, N. C., and Mukherjee, S. (2021) Exploring the Differential Expression and Prognostic Significance of the COL11A1 Gene in Human Colorectal Carcinoma: An Integrated Bioinformatics Approach. *Front Genet* 12, 608313

64. Marcu, A., Bichmann, L., Kuchenbecker, L., Kowalewski, D. J., Freudenmann, L. K., Backert, L., Muehlenbruch, L., Szolek, A., Luebke, M., Wagner, P., Engler, T., Matovina, S., Wang, J., Hauri-Hohl, M., Martin, R., Kapolou, K., Walz, J. S., Velz, J., Moch, H., Regli, L., Silginer, M., Weller, M., Loeffler, M. W., Erhard, F., Schlosser, A., Kohlbacher, O., Stevanovic, S., Ramensee, H.-G., and Neidert, M. C. (2020) The HLA Ligand Atlas – A resource of natural HLA ligands presented on benign tissues. *bioRxiv*, 778944

65. Gjerstorff, M. F., Andersen, M. H., and Ditzel, H. J. (2015) Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* 6, 15772–15787

66. Ishikawa, N., Takano, A., Yasui, W., Inai, K., Nishimura, H., Ito, H., Miyagi, Y., Nakayama, H., Fujita, M., Hosokawa, M., Tsuchiya, E., Kohno, N., Nakamura, Y., and Daigo, Y. (2007) Cancer-testis antigen lymphocyte antigen 6 complex locus K is a serologic biomarker and a therapeutic target for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 67, 11601–11611

67. Adamopoulou, E., Tenzer, S., Hillen, N., Klug, P., Rota, I. A., Tietz, S., Gebhardt, M., Ste

10

20

30

40

50

- vanovic, S. , Schild, H. , Tolosa, E. , Melms, A. , and Stoeckle, C. (2013) Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus. *Nat Commun* 4, 2039
68. Kote, S. , Pirog, A. , Bedran, G. , Alfaro, J. , and Dapic, I. (2020) Mass Spectrometry-Based Identification of MHC-Associated Peptides. *Cancers (Basel)* 12
69. Lin, A. , Zhang, J. , and Luo, P. (2020) Cross talk Between the MSI Status and Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer. *Front Immunol* 11, 2039 10
70. Bonaventura, P. , Shekarian, T. , Alcazer, V. , Valladeau-Guilemond, J. , Valsesia-Wittmann, S. , Amigorena, S. , Caux, C. , and Depil, S. (2019) Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol* 10, 168
71. Shihab, H. A. , Gough, J. , Cooper, D. N. , Stenson, P. D. , Barker, G. L. , Edwards, K. J. , Day, I. N. , and Gaunt, T. R. (2013) Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat* 34, 57–65 20
72. Rentzsch, P. , Witten, D. , Cooper, G. M. , Shendure, J. , and Kircher, M. (2019) CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 47, D886–D894
73. Sherry, S. T. , Ward, M. , and Sirotkin, K. (1999) dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res* 9, 677–679 30
74. Tate, J. G. , Bamford, S. , Jubb, H. C. , Sondka, Z. , Beare, D. M. , Bindal, N. , Boutselakis, H. , Cole, C. G. , Creatore, C. , Dawson, E. , Fish, P. , Harsha, B. , Hathaway, C. , Jupe, S. C. , Kok, C. Y. , Noble, K. , Ponting, L. , Ramshaw, C. C. , Rye, C. E. , Speedy, H. E. , Stefancsik, R. , Thompson, S. L. , Wang, S. , Ward, S. , Campbell, P. J. , and Forbes, S. A. (2019) COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* 47, D941–D947 40
75. Ehx, G. , and Perreault, C. (2019) Discovery and characterization of actionable tumor antigens. *Genome Med* 11, 29
76. Vogel, C. , and Marcotte, E. M. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13, 227–232
77. Xiang, B. , Snook, A. E. , Magee, M. S. , and Wa 50

- ldman, S. A. (2013) Colorectal cancer immunotherapy. *Discov Med* 15, 301–308
78. Gold, P., and Freedman, S. O. (1965) Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* 121, 439–462
79. Zhou, F. (2009) Molecular mechanisms of IFN- γ to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol* 28, 239–260
80. Deutsch, E. W., Bandeira, N., Sharma, V., Perez-Riverol, Y., Carver, J. J., Kundu, D. J., Garcia-Seisdedos, D., Jarnuczak, A. F., Hewapathirana, S., Pullman, B. S., Wertz, J., Sun, Z., Kawano, S., Okuda, S., Watanabe, Y., Hermjakob, H., MacLean, B., MacCoss, M. J., Zhu, Y., Ishihama, Y., and Vizcaino, J. A. (2020) The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling 'big data' approaches in proteomics. *Nucleic Acids Res* 48, D1145–D1152
81. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Perez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., and Vizcaino, J. A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* 47, D442–D450.

10

20

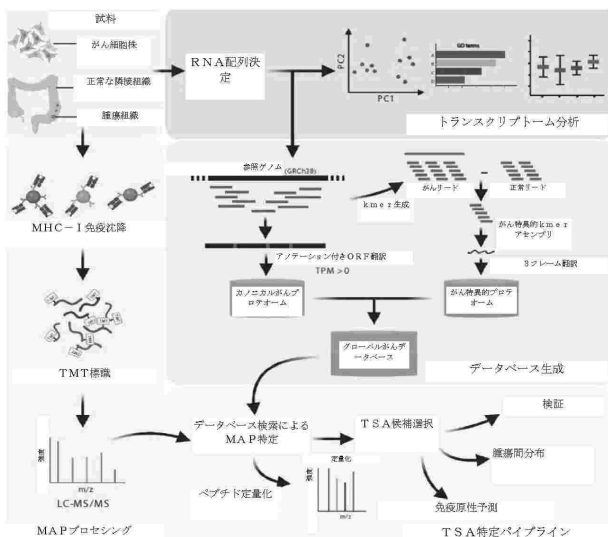
30

40

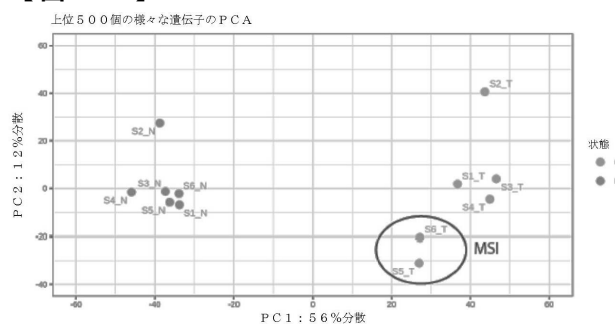
50

【図面】

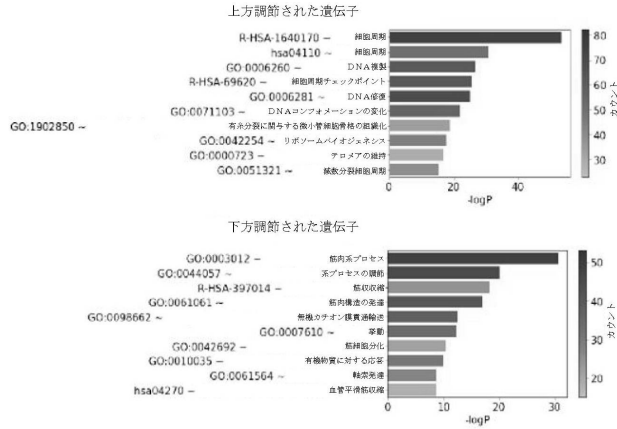
【図1】



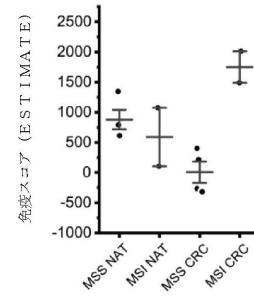
【図2A】



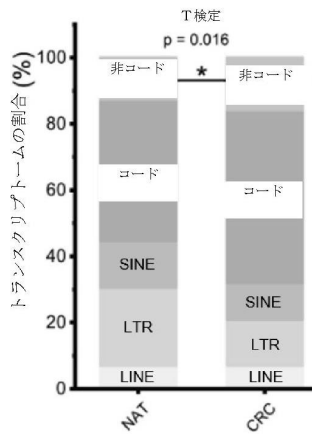
【図 2 B】



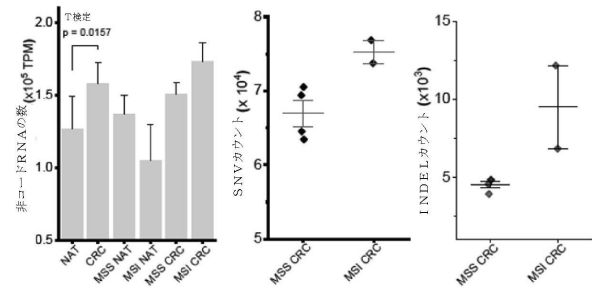
【図 2 C】



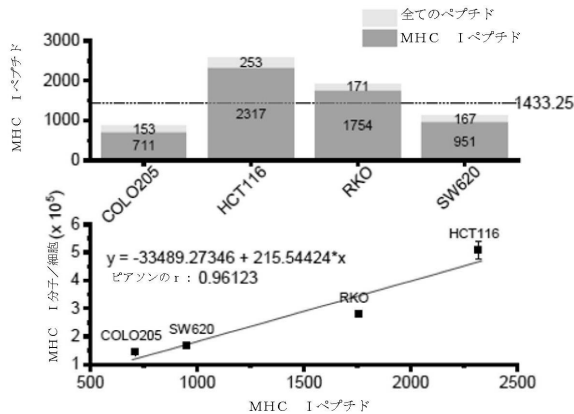
【図 2 D】



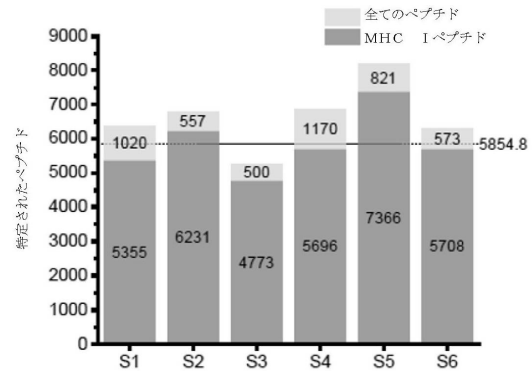
【図 2 E】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

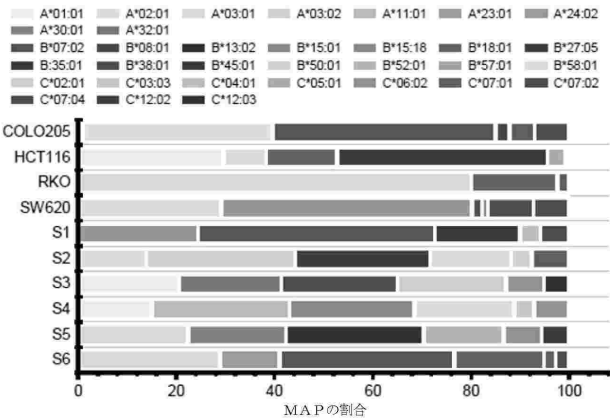
20

30

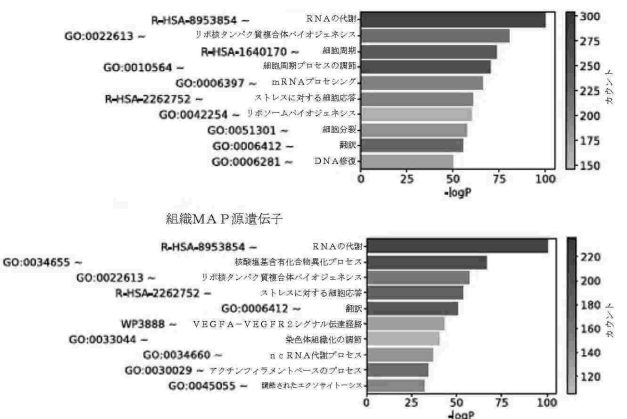
40

50

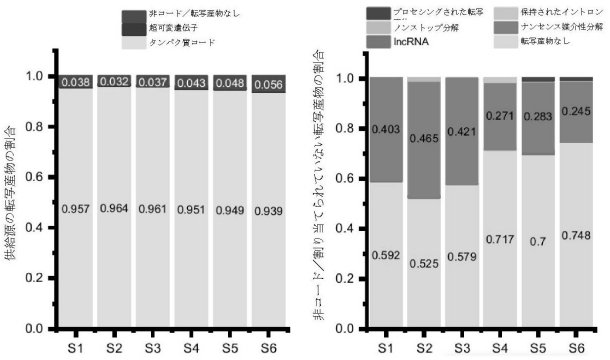
【図 3 C】



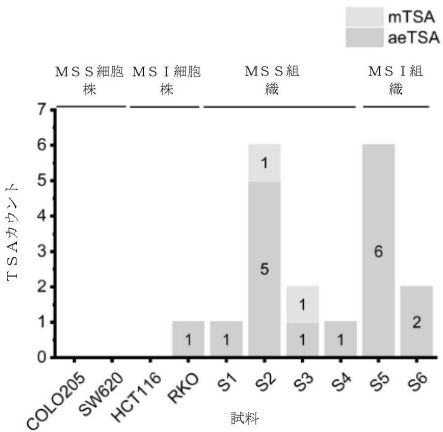
【図 3 D】



【図 3 E】



【図 4 A】



10

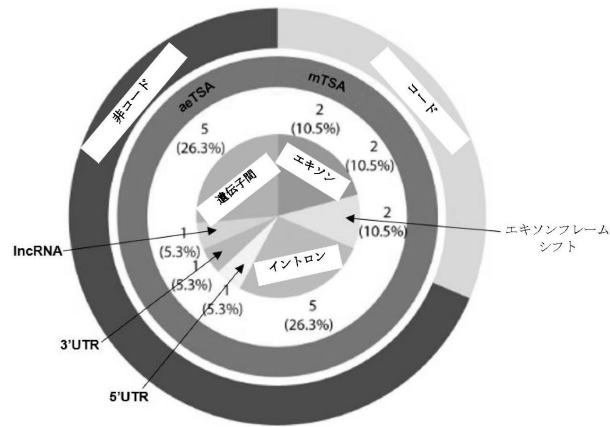
20

30

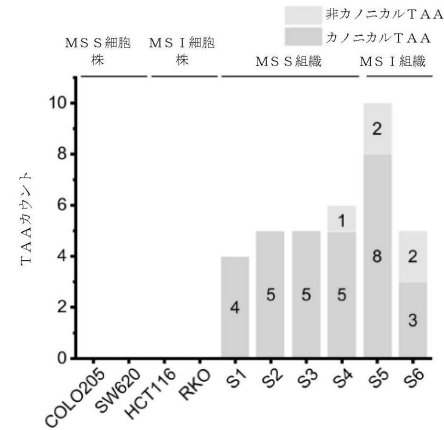
40

50

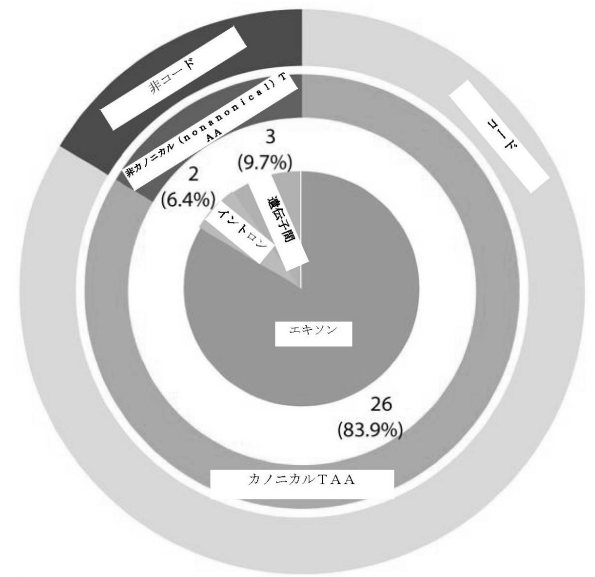
【図 4 B】



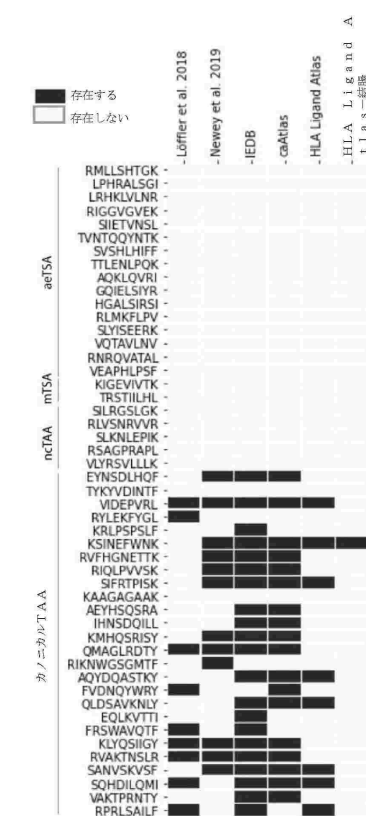
【図 4 C】



【図 4 D】



【図 4 E】



10

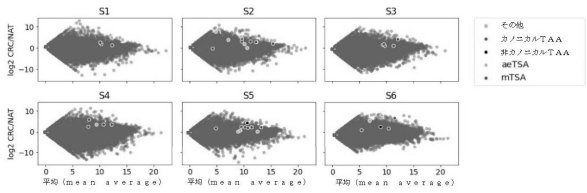
20

30

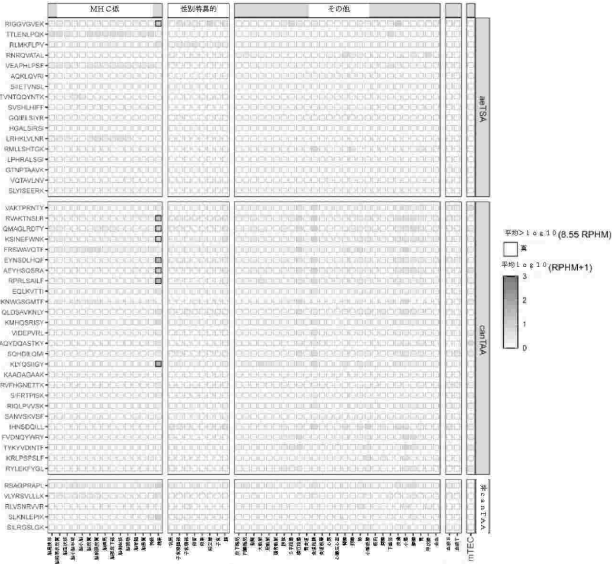
40

50

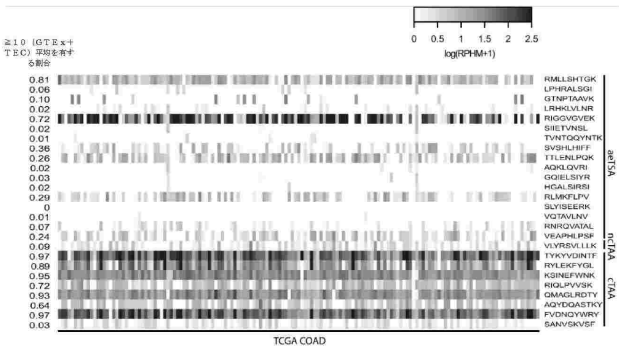
【図 5 A】



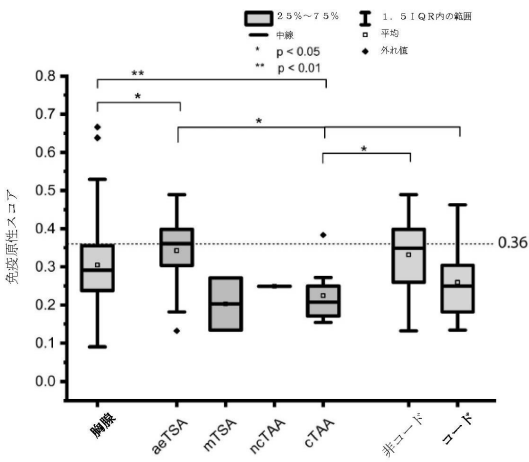
【図 5 B】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

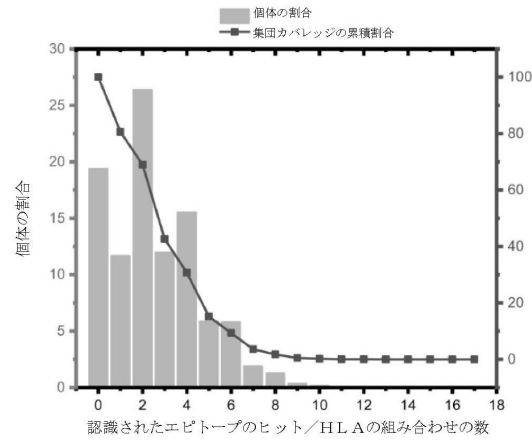
20

30

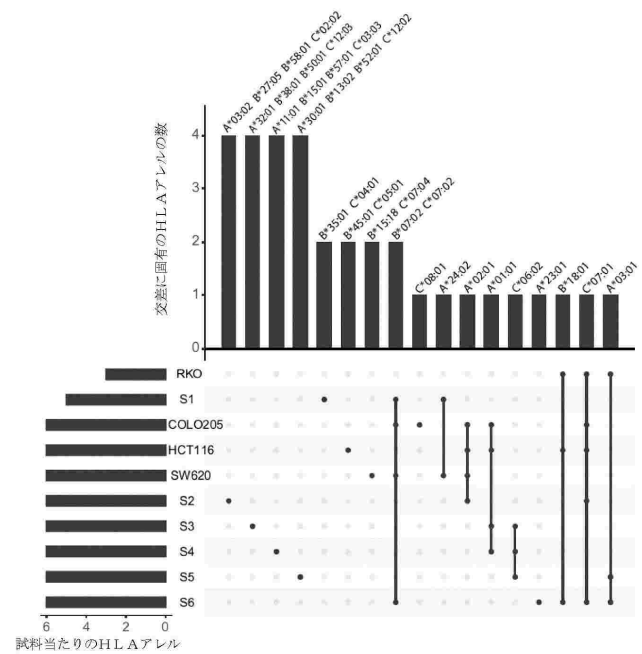
40

50

【図 6 C】



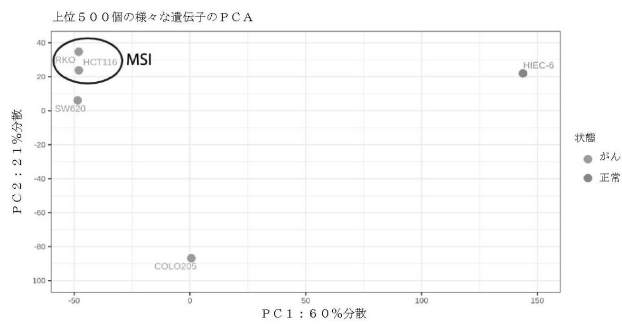
【図 7】



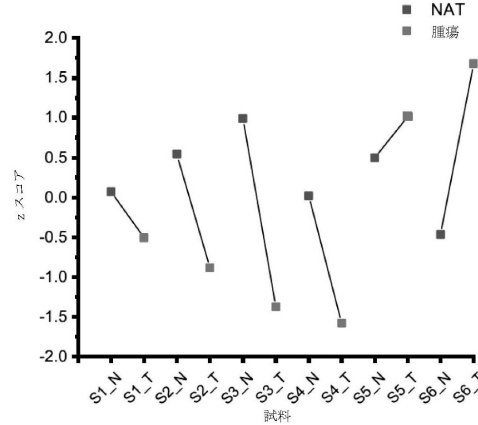
10

20

【図 8 A】



【図 8 B】

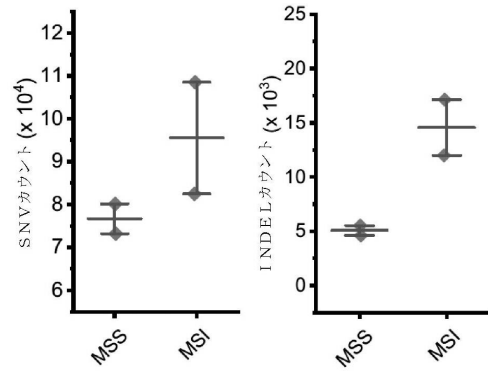


30

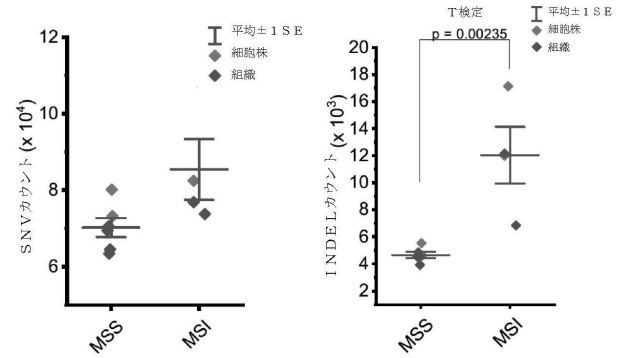
40

50

【図 8 C】



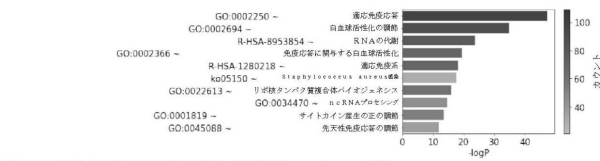
【図 8 D】



10

【図 9 A】

MSI 上方調節された遺伝子 (855 個の遺伝子、828 個の Metascape ID)

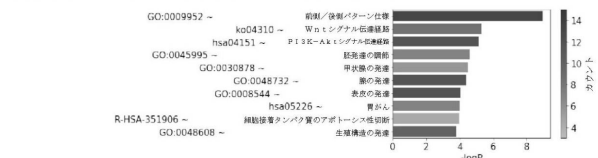


MSI 下方調節された遺伝子 (54 個の遺伝子、53 個の Metascape ID)



【図 9 B】

MSS 上方調節された遺伝子 (70 個の遺伝子、60 個の Metascape ID)



MSS 下方調節された遺伝子 (160 個の遺伝子、156 個の Metascape ID)



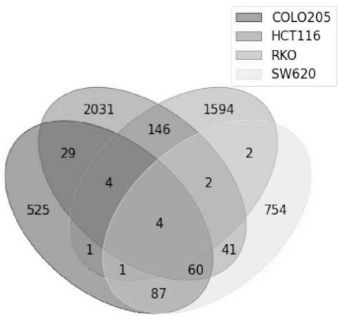
20

30

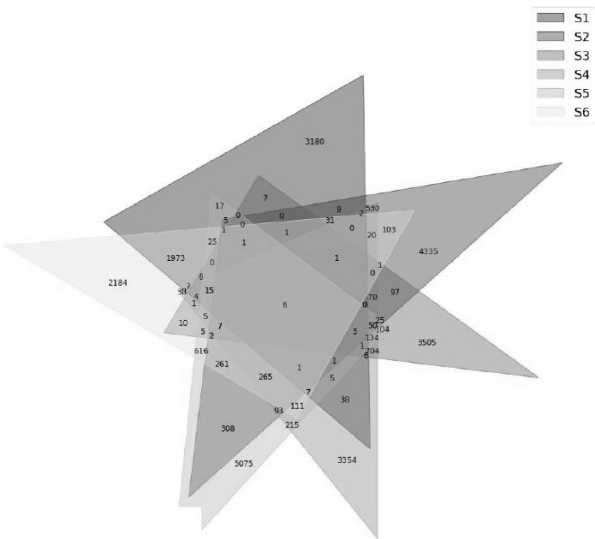
40

50

【図 10 A】

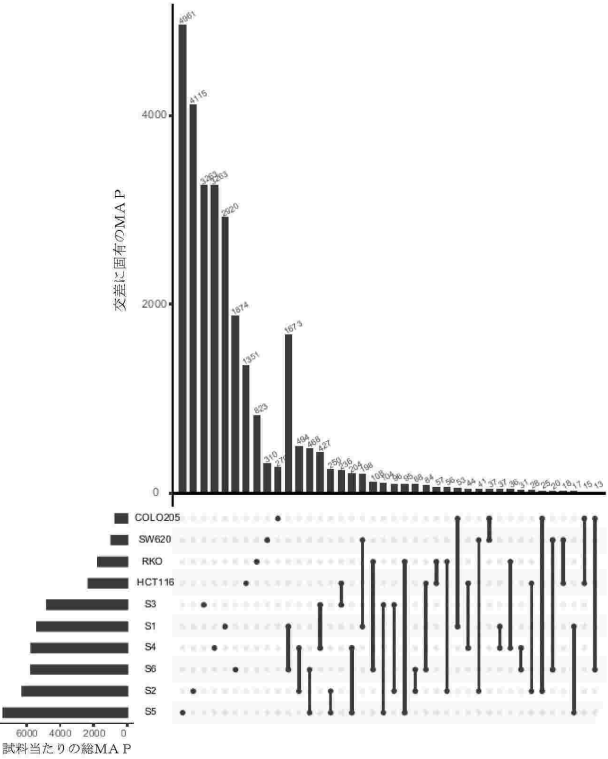


【図 10 B】

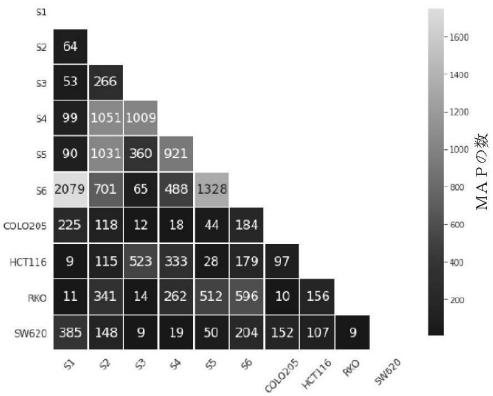


10

【図 10 C】



【図 10 D】

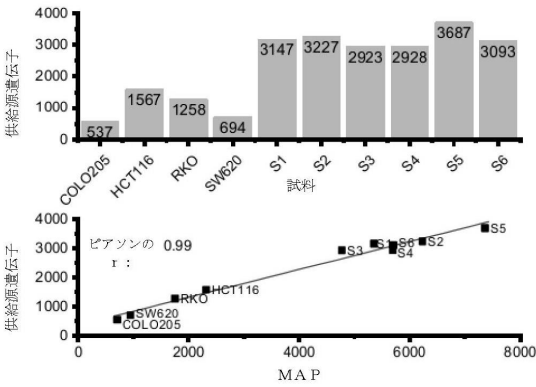


30

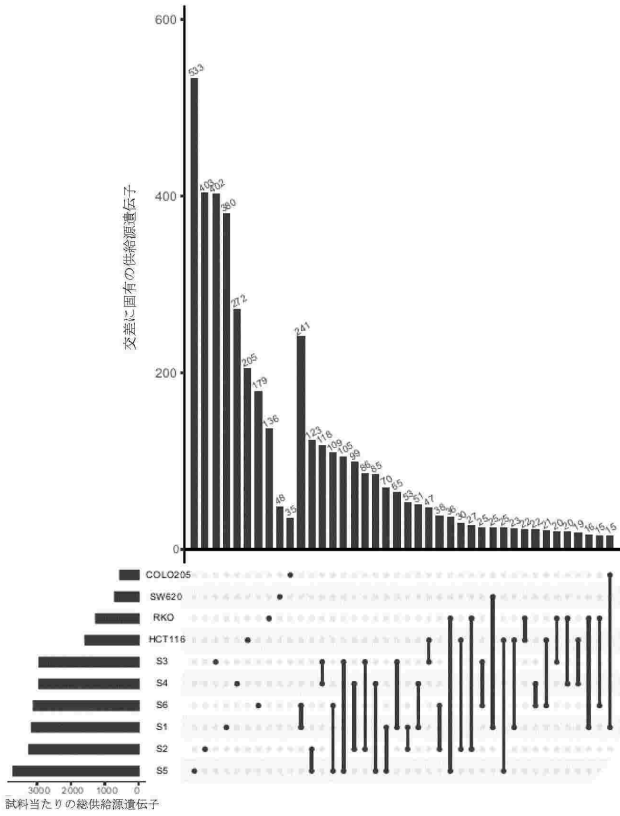
40

50

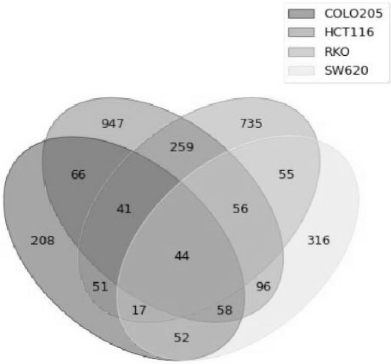
【図 1 1 A】



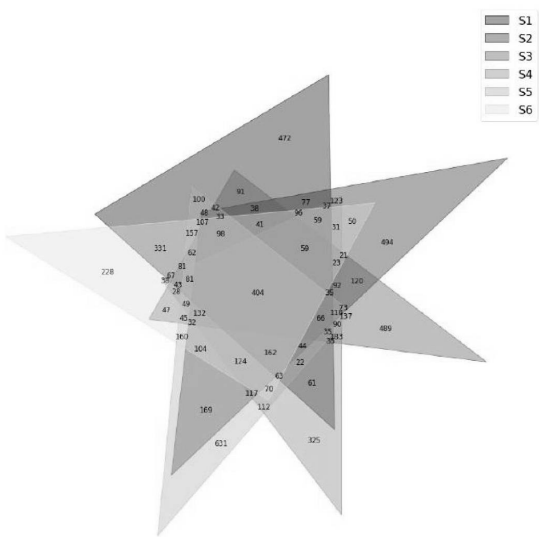
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



10

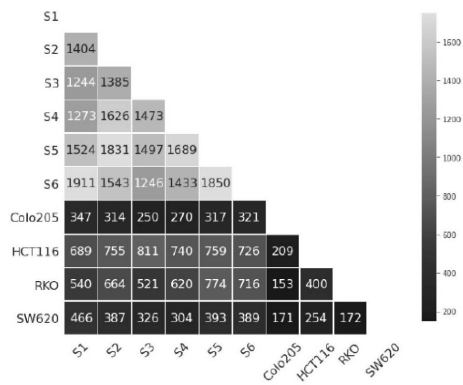
20

30

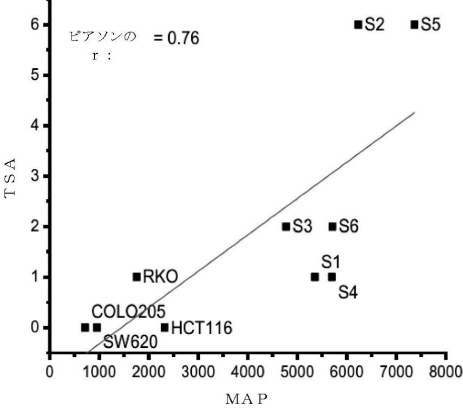
40

50

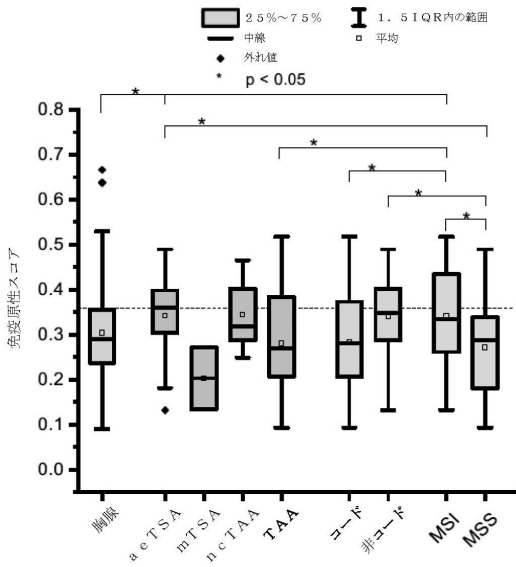
【図 1 1 E】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

2024535853000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/051377
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 14/705</i> (2006.01), <i>A61K 38/20</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>C07K 7/06</i> (2006.01), <i>C07K 14/00</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) CPC: <i>C07K 14/70539</i> (2020.01), <i>A61K 38/20</i> (2020.01), <i>A61K 39/00</i> (2020.01), <i>A61P 35/00</i> (2020.01), <i>C07K 7/06</i> (2020.01), <i>C07K 14/00</i> (2020.01) (more CPCs on the last page) 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) IPC: <i>C07K 14/705</i> , <i>A61K 38/20</i> , <i>A61K 39/00</i> , <i>A61P 35/00</i> , <i>C07K 7/06</i> , <i>C07K 14/00</i> , <i>C12N 5/07</i> , <i>C12N 5/078</i> , <i>C12N 5/0783</i> , <i>C12N 5/0784</i> , <i>C12N 15/12</i> , <i>C12Q 1/6809</i> , <i>G01N 33/48</i> , <i>G01N 33/68</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Scopus, Canadian Patent Database, GQ Protein/Nucleotide, Genbank, PDB, Genpept, Registry, CaPlus, Medline, Biosis. Keywords: tumor antigen peptide, tumor-associated, antigen, peptide, colorectal, cancer, HLA, vaccine, therapy, Universite de Montreal, PERREAULT CLAUDE, THIBAUT PIERRE, CLEYLE JENNA, HARDY MARIE-PIERRE.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021/0104294 A1 (HACOHEN et al.) 8 April 2021 (08-04-2021)	1-62
A	APALOAEI et al., "The Origin and Immune Recognition of Tumor-Specific Antigens". CANCERS, 12 September 2020 (12-09-2020), Vol. 12(2607), pp. 1-13, [online] [retrieved on 12 September 2022 (12-09-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3390/cancers12092607>	1-35, 44-48, 51-54 & 57-60
A	WO 2020/041876 A1 (LAUMONT et al.) 5 March 2020 (05-03-2020)	1-44
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 08 November 2022 (08-11-2022)		Date of mailing of the international search report 22 December 2022 (22-12-2022)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Serisha Moodley (819) 353-9056

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/051377
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. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051377**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim 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. ☐ Claim Nos.:
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:

Continued on extra sheet.

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 claim 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 claim Nos.:
1, 2, 14, 16 and 20-62 (partially) and 3 (wholly) directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, as well as related subject matter.

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/CA2022/051377

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/162110 A1 (SCHUSTER et al.) 29 August 2019 (29-08-2019)	1-62
P, X	CLEYLE et al., "Immunopeptidomic Analyses of Colorectal Cancers With and Without Microsatellite Instability". <i>Molecular & Cellular Proteomics</i> , 1 April 2022 (01-04-2022), Vol. 21(5), pp. 1-23, [online] [retrieved on 8 November 2022 (08-11-2022)]. Retrieved from the Internet: < https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100228 >	1-35, 44-48, 51-54 & 57-60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2022/051377

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2021104294A1	08 April 2021 (08-04-2021)	None	
WO2020041876A1	05 March 2020 (05-03-2020)	AU2019330487A1 BR112021002394A2 CA3109716A1 CN112639136A EP3844172A1 EP3844172A4 IL280651A JP2021534830A KR20210049150A SG11202100528YA US2021253638A1	04 February 2021 (04-02-2021) 11 May 2021 (11-05-2021) 05 March 2020 (05-03-2020) 09 April 2021 (09-04-2021) 07 July 2021 (07-07-2021) 10 August 2022 (10-08-2022) 25 March 2021 (25-03-2021) 16 December 2021 (16-12-2021) 04 May 2021 (04-05-2021) 25 February 2021 (25-02-2021) 19 August 2021 (19-08-2021)
WO2019162110A1	29 August 2019 (29-08-2019)	AR115254A1 AR119861A2 AU2019225879A1 AU2019225879B2 AU2020204568A1 AU2020204568B2 AU2022202512A1 AU2022202520A1 AU2022202522A1 BR112020014272A2 BR122020014377A2 CA3086916A1 CL2020002123A1 CL2020002387A1 CL2021000841A1 CL2021000842A1 CN112920257A CN114040921A CO2020009869A2 CR20200365A DE102018107224A1 EA202091754A1 EA202091833A1 EP3755708A1 IL276845A IL276987A JP2021514178A JP2022050398A KR20200116527A KR20200123134A MA51890A PE20210376A1 PE20211300A1 PH12020551295A1 SG10202010171VA SG11202006630RA TW201936630A TW202043257A US2020038446A1 US10695373B2 US2020038447A1 US10695374B2 US2020038448A1	16 December 2020 (16-12-2020) 19 January 2022 (19-01-2022) 09 July 2020 (09-07-2020) 27 January 2022 (27-01-2022) 30 July 2020 (30-07-2020) 03 February 2022 (03-02-2022) 12 May 2022 (12-05-2022) 12 May 2022 (12-05-2022) 12 May 2022 (12-05-2022) 15 December 2020 (15-12-2020) 29 December 2020 (29-12-2020) 29 August 2019 (29-08-2019) 16 October 2020 (16-10-2020) 12 February 2021 (12-02-2021) 03 September 2021 (03-09-2021) 03 September 2021 (03-09-2021) 08 June 2021 (08-06-2021) 11 February 2022 (11-02-2022) 21 August 2020 (21-08-2020) 18 September 2020 (18-09-2020) 22 August 2019 (22-08-2019) 08 February 2021 (08-02-2021) 25 November 2020 (25-11-2020) 30 December 2020 (30-12-2020) 29 October 2020 (29-10-2020) 29 October 2020 (29-10-2020) 10 June 2021 (10-06-2021) 30 March 2022 (30-03-2022) 12 October 2020 (12-10-2020) 28 October 2020 (28-10-2020) 30 December 2020 (30-12-2020) 02 March 2021 (02-03-2021) 20 July 2021 (20-07-2021) 12 July 2021 (12-07-2021) 27 November 2020 (27-11-2020) 29 September 2020 (29-09-2020) 16 September 2019 (16-09-2019) 01 December 2020 (01-12-2020) 06 February 2020 (06-02-2020) 30 June 2020 (30-06-2020) 06 February 2020 (06-02-2020) 30 June 2020 (30-06-2020) 06 February 2020 (06-02-2020)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2022/051377

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
		US10695375B2	30 June 2020 (30-06-2020)
		US2020085873A1	19 March 2020 (19-03-2020)
		US10695376B2	30 June 2020 (30-06-2020)
		US2020085874A1	19 March 2020 (19-03-2020)
		US10695377B2	30 June 2020 (30-06-2020)
		US2020093862A1	26 March 2020 (26-03-2020)
		US10702553B2	07 July 2020 (07-07-2020)
		US2020108097A1	09 April 2020 (09-04-2020)
		US10709736B2	14 July 2020 (14-07-2020)
		US2020163996A1	28 May 2020 (28-05-2020)
		US10709737B2	14 July 2020 (14-07-2020)
		US2020155604A1	21 May 2020 (21-05-2020)
		US10709738B2	14 July 2020 (14-07-2020)
		US2020179454A1	11 June 2020 (11-06-2020)
		US10751369B2	25 August 2020 (25-08-2020)
		US2020155605A1	21 May 2020 (21-05-2020)
		US10772915B2	15 September 2020 (15-09-2020)
		US2020261504A1	20 August 2020 (20-08-2020)
		US10780122B2	22 September 2020 (22-09-2020)
		US2020261505A1	20 August 2020 (20-08-2020)
		US10780123B2	22 September 2020 (22-09-2020)
		US2020222465A1	16 July 2020 (16-07-2020)
		US10780124B2	22 September 2020 (22-09-2020)
		US2020197441A1	25 June 2020 (25-06-2020)
		US10792307B2	06 October 2020 (06-10-2020)
		US2020261506A1	20 August 2020 (20-08-2020)
		US10792308B2	06 October 2020 (06-10-2020)
		US2020179453A1	11 June 2020 (11-06-2020)
		US10799537B2	13 October 2020 (13-10-2020)
		US2020171091A1	04 June 2020 (04-06-2020)
		US10813953B2	27 October 2020 (27-10-2020)
		US2020268799A1	27 August 2020 (27-08-2020)
		US10869890B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020268800A1	27 August 2020 (27-08-2020)
		US10869891B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020323907A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10869892B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020297770A1	24 September 2020 (24-09-2020)
		US10869893B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020297771A1	24 September 2020 (24-09-2020)
		US10869894B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020306308A1	01 October 2020 (01-10-2020)
		US10869895B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020323909A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10869896B2	22 December 2020 (22-12-2020)
		US2020268798A1	27 August 2020 (27-08-2020)
		US10874695B2	29 December 2020 (29-12-2020)
		US2020297772A1	24 September 2020 (24-09-2020)
		US10874696B2	29 December 2020 (29-12-2020)
		US2020206268A1	02 July 2020 (02-07-2020)
		US10888582B2	12 January 2021 (12-01-2021)
		US2020306305A1	01 October 2020 (01-10-2020)
		US10888583B2	12 January 2021 (12-01-2021)
		US2020323910A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10888584B2	12 January 2021 (12-01-2021)
		US2020323911A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10888585B2	12 January 2021 (12-01-2021)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2022/051377

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
		US2020306311A1	01 October 2020 (01-10-2020)
		US10888586B2	12 January 2021 (12-01-2021)
		US2019255112A1	22 August 2019 (22-08-2019)
		US10894064B2	19 January 2021 (19-01-2021)
		US2020323913A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10898518B2	26 January 2021 (26-01-2021)
		US2020323915A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10898519B2	26 January 2021 (26-01-2021)
		US2020360433A1	19 November 2020 (19-11-2020)
		US10905719B2	02 February 2021 (02-02-2021)
		US2020323918A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US10905720B2	02 February 2021 (02-02-2021)
		US2019255110A1	22 August 2019 (22-08-2019)
		US10993962B2	04 May 2021 (04-05-2021)
		US2021052651A1	25 February 2021 (25-02-2021)
		US10993964B2	04 May 2021 (04-05-2021)
		US2020323906A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US11013766B2	25 May 2021 (25-05-2021)
		US2021052652A1	25 February 2021 (25-02-2021)
		US11013768B2	25 May 2021 (25-05-2021)
		US2021052653A1	25 February 2021 (25-02-2021)
		US11013769B2	25 May 2021 (25-05-2021)
		US2020323914A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US11020433B2	01 June 2021 (01-06-2021)
		US2020323919A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US11020434B2	01 June 2021 (01-06-2021)
		US2021052654A1	25 February 2021 (25-02-2021)
		US11026977B2	08 June 2021 (08-06-2021)
		US2019255164A1	22 August 2019 (22-08-2019)
		US11033583B2	15 June 2021 (15-06-2021)
		US2020323916A1	15 October 2020 (15-10-2020)
		US11033585B2	15 June 2021 (15-06-2021)
		US2021060074A1	04 March 2021 (04-03-2021)
		US11040069B2	22 June 2021 (22-06-2021)
		US2021069251A1	11 March 2021 (11-03-2021)
		US11052113B2	06 July 2021 (06-07-2021)
		US2021060077A1	04 March 2021 (04-03-2021)
		US11052114B2	06 July 2021 (06-07-2021)
		US2021113619A1	22 April 2021 (22-04-2021)
		US11058727B2	13 July 2021 (13-07-2021)
		US2021060078A1	04 March 2021 (04-03-2021)
		US11065279B2	20 July 2021 (20-07-2021)
		US2019255113A1	22 August 2019 (22-08-2019)
		US11077142B2	03 August 2021 (03-08-2021)
		US2021100845A1	08 April 2021 (08-04-2021)
		US11103535B2	31 August 2021 (31-08-2021)
		US2021213064A1	15 July 2021 (15-07-2021)
		US11141437B2	12 October 2021 (12-10-2021)
		US2021145886A1	20 May 2021 (20-05-2021)
		US11147838B2	19 October 2021 (19-10-2021)
		US2021145887A1	20 May 2021 (20-05-2021)
		US11147839B2	19 October 2021 (19-10-2021)
		US2021137985A1	13 May 2021 (13-05-2021)
		US11154576B2	26 October 2021 (26-10-2021)
		US2021244765A1	12 August 2021 (12-08-2021)
		US11179418B2	23 November 2021 (23-11-2021)
		US2021260120A1	26 August 2021 (26-08-2021)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/CA2022/051377

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
		US11197892B2	14 December 2021 (14-12-2021)
		US2022000922A1	06 January 2022 (06-01-2022)
		US11357797B2	14 June 2022 (14-06-2022)
		US2021401892A1	30 December 2021 (30-12-2021)
		US11369636B2	28 June 2022 (28-06-2022)
		US2021330708A1	28 October 2021 (28-10-2021)
		US11376281B2	05 July 2022 (05-07-2022)
		US2021137986A1	13 May 2021 (13-05-2021)
		US2021145888A1	20 May 2021 (20-05-2021)
		US2021338734A1	04 November 2021 (04-11-2021)
		US2021338735A1	04 November 2021 (04-11-2021)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2022/051377

Continuation of: Box No. III

Reference is made to the following documents:

D1 US 2021/0104294 A1 (HACOHEN et al.) 08 April 2021 (08-04-2021),

D2 APAVALOAEI et al., Cancers, 12 September 2020 (12-09-2020), Vol. 12(2607), pp. 1-13, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3390/cancers12092607>

D1 discloses methods for predicting and identifying isolated peptides that bind to HLA molecules for use in generating effective neoantigen vaccines as immune therapeutics (paragraphs [0079]-[0118]). D1 further discloses the generation and use of peptides, nucleic acids, mRNA, vectors, vaccines, immunological compositions, such as antibodies raised against the antigen and further comprising anticancer agents, and cells for the treatment of cancer, including colorectal cancer (paragraphs [0128]-[0472]). D1 also discloses peptides (SEQ ID NOs: 30045, 32338, 33660, 110448, 143659, 145451, 146575, 153867, 171927, 172620, 26700, 29253, 25096, 28094, 23161, 25324, 28241, 23302, 25469, 28343, 93079, 95616, 40391, 43303, 78851, 43628, 74425, 75490, 79842, 120122, 23022, 74106, 78850, 74833, 113703, 137395, 157286, 71014, 157481 and 113811) that are 100% identical to peptides having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 26, 28, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 43, 45, 47, 48 and 49 of the instant application.

D2 is a review article that discloses the common general knowledge regarding tumor-specific antigens (TSAs) also known as MHC-associated peptides (MAPs), including their characteristics, identification and use in cancer immunotherapeutics (pages 1-7).

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

- Group 1 - Claims 1, 2, 14, 16 and 20-62 (partially) and 3 (wholly) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 6, as well as related subject matter;
- Group 2 - Claims 1, 2, 4, 14, 17 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, as well as related subject matter;
- Group 3 - Claims 1, 2, 9, 14, 16 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, as well as related subject matter;
- Group 4 - Claims 1, 2, 5, and 19-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 3, as well as related subject matter;
- Group 5 - Claims 1, 2, 14, 15 and 20-62 (partially) and 11 (wholly) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 4, as well as related subject matter;
- Group 6 - Claims 1, 2, 5 and 19-62 (partially) are directed to TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 5, as well as related subject matter;
- Group 7 - Claims 1, 2, 5, 14, 16 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 7, as well as related subject matter;
- Group 8 - Claims 1, 2, 14, 17 and 20-62 (partially) and 8 (wholly) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, as well as related subject matter;
- Group 9 - Claims 1, 2, 6, and 19-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 9, as well as related subject matter;
- Group 10 - Claims 1, 2, 12, 14, 17 and 20-62 (partially) are directed to TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, as well as related subject matter;
- Group 11 - Claims 1, 2, 4, 14, 16 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 11, as well as related subject matter;
- Group 12 - Claims 1, 2, 12, 14, 16 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, as well as related subject matter;
- Group 13 - Claims 1, 2, 14, 17 and 20-62 (partially) and 10 (wholly) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, as well as related subject matter;
- Group 14 - Claims 1, 2, 4, 14, 18 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14, as well as related subject matter;
- Group 15 - Claims 1, 2, 12, 14, 17 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 15, as well as related subject matter;
- Group 16 - Claims 1, 2 and 19-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 16, as well as related subject matter;
- Group 17 - Claims 1, 2, 14, 15 and 20-62 (partially) and 13 (wholly) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 17, as well as related subject matter;
- Group 18 - Claims 1, 2, 6 and 19-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 18, as well as related subject matter;

Continued on next sheet.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2022/051377

Group 19 - Claims 1, 7, and 19-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 19, as well as related subject matter;

Group 20 - Claims 1, 7, 14, 17 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 20, as well as related subject matter;

Group 21 - Claims 1, 2, 9, 14, 16 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 21, as well as related subject matter;

Group 22 - Claims 1, 14, 17 and 20-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 22, as well as related subject matter;

Group 23 - Claims 1, 5, 7, 14, 17 and 19-62 (partially) are directed to a TAP comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 23, as well as related subject matter; and

Groups 24-49 - Claims 45-62 (partially) are directed to a method of treating colorectal cancer with a TAP or a TAP comprising or encoding product, use of a TAP and an agent comprising or encoding a TAP for use in treating colorectal cancer, wherein the TAP comprises or consists of one of the amino acid sequence defined by SEQ ID NOs: 25-50.

Groups 1-49 relate to structurally and functionally distinct peptides, nucleic acids, vesicles, vaccines, MHC class I molecules and antibodies that bind said peptides for use in treating colorectal cancer. It is noted that the TAP having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 25 has been "Previously reported in WO2020/131586" as disclosed in Table 7B (page 61) of the instant application. WO2020/131586 discloses neoantigens that encode peptides and related subject matter for use in the treatment of cancer, including colorectal carcinoma (Table 3A and paragraphs [0246] and [0315]). Further TAPs and related subject matter, such as nucleic acids, vesicles, vaccines, MHC class I molecules, antibodies and cells for use as cancer immunotherapeutics and for the treatment of colorectal cancer appear to be known (see D1 and D2), and the subject-matter of the claims is not linked as to form a single general inventive concept that defines a contribution over the prior art. Therefore the claims lack unity *a priori* and *a posteriori*.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051377

IPC:

C12N 5/07 (2010.01), *C12N 5/078* (2010.01), *C12N 5/0783* (2010.01), *C12N 5/0784* (2010.01),
C12N 15/12 (2006.01), *C12Q 1/6809* (2018.01), *G01N 33/48* (2006.01), *G01N 33/68* (2006.01)

10

CPC:

C07K 14/7051 (2020.01), *C12N 5/0602* (2020.01), *C12N 5/0634* (2020.01), *C12N 5/0636* (2020.01),
C12N 5/0639 (2020.01), *C12Q 1/6809* (2020.01), *G01N 33/48* (2020.01), *G01N 33/68* (2020.01)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
	C 1 2 N 15/86	Z
	C 1 2 N 15/63	Z

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,N
E,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,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,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,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PYTHON

(72)発明者 ピエール ティボー

カナダ国 エイチ２エム ２エム８ ケベック モントリオール リュ ジョセフ カントル ８５６０

(72)発明者 ジェナ クライル

カナダ ティー９ケー ２エヌ３ アルバータ フォート マクマレー キャンベル クレセント １０６

(72)発明者 マリーーピエール ハーディ

カナダ国 ジェイ６ワイ ０エイ５ ケベック テルボンヌ リュ デ ベチュジー ６１８

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA45

4C084 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC75

4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 CC32 EE01 EE03 EE06 FF24

4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA04 CA12 MA02 NA05 NA14 ZB26

ZC75

4H045 AA10 AA11 AA30 DA50 DA76 DA86 EA31 FA74 GA21