

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-508181

(P2018-508181A)

(43) 公表日 平成30年3月29日(2018.3.29)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 6 3	
C 07 K 7/04 (2006.01)	C 07 K 7/04		4 B 0 6 5	
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10		4 C 0 8 4	
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19		4 C 0 8 5	
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15		4 C 0 8 7	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-518379 (P2017-518379)	(71) 出願人	502240113 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成27年12月4日 (2015.12.4)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月5日 (2017.4.5)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 國際出願番号	PCT/JP2015/006029	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02016/092787	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成28年6月16日 (2016.6.16)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	特願2014-248759 (P2014-248759)	(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(32) 優先日	平成26年12月9日 (2014.12.9)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T h 1 細胞のための G P C 3 エピトープペプチドおよびこれを含有するワクチン

(57) 【要約】

T h 1 細胞誘導能を有する単離された G P C 3 由来のエピトープペプチドが本明細書において開示される。そのようなペプチドは、M H C クラス I I 分子によって認識され、T h 1 細胞を誘導することができる。好ましい態様では、本発明のそのようなペプチドは、M H C クラス I I 分子にプロミスキヤスに結合することができ、T h 1 細胞に加えて G P C 3 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) を誘導することができる。そのようなペプチドは、したがって、対象において免疫応答を増強するのに使用することに適しており、したがってがん免疫療法において、特にがんワクチンとして使用することができる。前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド、そのようなペプチドによって誘導される A P C および T h 1 細胞ならびにそれに関連する誘導の方法も本明細書で開示される。前記成分のいずれかを有効成分として含有する医薬組成物は、例えば肝細胞がんおよびメラノーマを含むがんまたは腫瘍の治療および / または予防において使用される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10 ~ 30 アミノ酸長を有し、配列番号：9 または 11 のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列から選択される 9 アミノ酸を超える長さを有する連続するアミノ酸配列；ならびに

(b) (a) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / または付加されているアミノ酸配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、Tヘルパー1型 (T h 1) 細胞を誘導する能力を有する、ペプチド。

10

【請求項 2】

前記ペプチドまたはその断片が少なくとも 2 種類の MHC クラス II 分子に結合する能力を有する、請求項 1 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 3】

前記 MHC クラス II 分子が、HLA - DR8、HLA - DR52b、HLA - DR14、HLA - DR9、HLA - DR13、HLA - DR15、HLA - DP2 および HLA - DP5 からなる群より選択される、請求項 2 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

GPC3 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離されたペプチド。

20

【請求項 5】

(a) 配列番号：1 から 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(b) (a) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / または付加されているアミノ酸配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

(i) T h 1 細胞、

30

(ii) CTL、

(iii) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 (APC)、および

(iv) CTL を誘導する能力を有する APC

からなる群より選択される細胞の少なくとも 1 つを誘導するための組成物であって、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 8】

(a) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) 請求項 6 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の APC；

40

(d) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する APC を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ
からなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有し、かつ

(i) がんの治療、

(ii) がんの予防、

(iii) がんにおける術後再発の予防、および

(iv) 上記 (i) から (iii) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ
からなる群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

50

【請求項 9】

MHC クラス II 分子として HLA - DR 8、HLA - DR 52b、HLA - DR 14、HLA - DR 9、HLA - DR 13、HLA - DR 15、HLA - DP 2 および HLA - DP 5 からなる群より選択される少なくとも 1 つを有する対象への投与用に製剤化されている、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

CTL 誘導能を有する 1 つまたは複数のペプチドをさらに含有する、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

MHC クラス II 分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、
 (a) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のペプチド；
 (b) 請求項 6 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の APC；
 (d) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する APC を認識する 1 つまたは複数の Th1 細胞；および
 (e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ
 からなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する、組成物。

【請求項 12】

Th1 細胞を誘導する能力を有する APC を誘導するための方法であって、APC を請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階を含む、方法。

【請求項 13】

CTL を誘導する能力を有する APC を誘導するための方法であって、
 (a) APC を請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階；および
 (b) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを APC に導入する段階
 からなる群より選択される段階を含む、方法。

【請求項 14】

Th1 細胞を誘導するための方法であって、
 (a) CD4 陽性 T 細胞を、MHC クラス II 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する APC と共に培養する段階；および
 (b) 両方の T 細胞受容体 (TCR) サブユニットをコードするポリヌクレオチド、または TCR サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを CD4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで TCR が、細胞表面に提示される MHC クラス II 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階
 からなる群より選択される段階を含む、方法。

【請求項 15】

CTL を誘導するための方法であって、
 (a) CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の両方を、請求項 4 または 5 に記載のペプチドと接触させた APC と共に培養する段階；ならびに
 (b) CD8 陽性 T 細胞を、請求項 4 または 5 に記載のペプチドと接触させた APC と共に培養する段階
 からなる群より選択される段階を含む、方法。

【請求項 16】

MHC クラス II 分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、
 (a) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のペプチド；

10

20

30

40

50

(b) 請求項 6 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C；
 (d) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および
 (e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項 17】

M H C クラス I I 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離された A P C。

【請求項 18】

請求項 12 または 13 に記載の方法によって誘導される A P C。

【請求項 19】

A P C の表面に提示された請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離された T h 1 細胞。

【請求項 20】

請求項 14 に記載の方法によって誘導される T h 1 細胞。

【請求項 21】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、

(a) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のペプチド；
 (b) 請求項 6 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C；
 (d) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および
 (e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する組成物を前記対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項 22】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

【請求項 23】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 25】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 6 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 22 に記載の抗体を含む、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物科学の分野、より詳細にはがん療法の分野に関する。特に、本発明は、がんワクチンとして極めて有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬剤に関する。

【0002】

優先権

本出願は、2014年12月9日出願の日本特許出願第2014 248759号の恩典を主張し、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0003】

CD8陽性細胞傷害性Tリンパ球（CTL）は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子上で見いだされる腫瘍関連抗原（TAA）に由来するエピトープペプチドを認識し、その後腫瘍細胞を死滅させることが示されている。TAAの最初の例として黒色腫抗原（MAGE）ファミリーが発見されて以来、多くの他のTAAが、主として免疫学的アプローチを通して、発見されてきた（非特許文献1、2）。これらのTAAのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発が進められている。

【0004】

がん細胞の増殖および生存に不可欠なTAAは、免疫療法のための標的として有用である。なぜなら、そのようなTAAの使用は、治療的に行われる免疫選択の結果としてのTAAの欠失、突然変異または下方制御に起因するがん細胞の免疫回避の広く記述されている危険性を最小限に抑え得るからである。したがって、強力で特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができる新規TAAの同定はさらなる発展を保証する。そこで、様々なタイプのがんに対するペプチドワクチン戦略の臨床適用が進行中である（非特許文献3～10）。現在までに、これらの腫瘍関連抗原由来ペプチドを使用した臨床試験のいくつかの報告がある。残念ながら、これまでのところ、これらのがんワクチンの治験は、今までにこれらのがんワクチン治験で認められてきた低い客観的奏効率しかもたらしていない（非特許文献11～13）。したがって、免疫療法標的としての使用に適する新規TAAが当分野において依然として必要である。

10

20

【0005】

近年、本発明者らは、ゲノムワイドcDNAマイクロアレイ解析を用いることにより、肝細胞がん（HCC）、メラノーマおよび様々な他の悪性腫瘍において高頻度で過剰発現するがん胎児抗原、グリピカン3（GPC3）を同定した（非特許文献14～17）。本発明者らはまた、HCC患者の末梢血单核細胞（PBMC）からHLA-A2（A*02：01）拘束性CTLおよびHLA-A24（A*24：02）拘束性CTLを誘導することができる、高い免疫原性を示すGPC3由来短鎖ペプチド（SP）を同定した（特許文献1、2）。GPC3由来SPを用いた、進行HCC患者のためのがん免疫療法第I相臨床試験において、これらのペプチドワクチンが耐性良好であり、重要な免疫応答および抗腫瘍効果を誘導することを示している（非特許文献18～20）。それらはまた、高GPC3特異的CTLの頻度が、GPC3-SPワクチンを接種した進行HCC患者において、長期全生存率と相関関係があることを示している。上記2つのGPC3-SPを用いた、治癒手術を受けたHCC患者のためのアジュvantがん免疫療法の第II相臨床試験が進行中である（非特許文献20）。

30

【0006】

腫瘍特異的CD4⁺ヘルパーT（Th）細胞、特にTh1型（Th1）細胞は、CTL媒介性抗腫瘍免疫の効率的な誘導に重要な役割を果たす（非特許文献21）。Th1細胞によって主として產生されるIFN-

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

50

【特許文献 1】WO2004/018667

【特許文献 2】WO2007/018199

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

【非特許文献 2】Boon T and van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

【非特許文献 3】Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55

【非特許文献 4】Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

【非特許文献 5】Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

10

【非特許文献 6】van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14

【非特許文献 7】Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8

【非特許文献 8】Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

【非特許文献 9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66

【非特許文献 10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94

【非特許文献 11】Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80

【非特許文献 12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

【非特許文献 13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15

【非特許文献 14】Okabe H, et al., Cancer Res 2001; 61:2129-37.

【非特許文献 15】Sung YK, et al., Cancer Sci 2003; 94:259-62

20

【非特許文献 16】Nakatsura T, et al., Biochem Biophys Res Commun 2003; 306:16-2

5

【非特許文献 17】Midorikawa Y, et al., Int J Cancer 2003; 103:455-65

【非特許文献 18】Nakatsura T, et al., Clin Cancer Res 2004; 10:8630-40

【非特許文献 19】Komori H, et al. Clin Cancer Res 2006; 12:2689-97

【非特許文献 20】Sawada Y, et al. Clin Cancer Res 2012; 18:3686-96

【非特許文献 21】Chamoto K et al. Cancer Res 2004;64: 386-90

【非特許文献 22】Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004;4: 595-602

【非特許文献 23】Shedlock DJ and Shen H. Science 2003;300: 337-9

【非特許文献 24】Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7

30

【非特許文献 25】Bos R, and Sherman LA. Cancer Res;70: 8368-77

【非特許文献 26】Melial CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60

【発明の概要】

【0009】

本発明に関連して、本発明者らは、がん免疫療法のための理想的なペプチドワクチンは、両者が互いに天然で近位である、CTLとTh1細胞の両方のエピトープを含む単一ポリペプチドを含むものであると考えた (Kenter GG et al. N Engl J Med 2009; 361: 1838-47)。

【0010】

そのために、本発明者らは、プロミスキヤスな (promiscuous) HLAクラスII分子との関連で認識され、CTLエピトープを含む、新規GPC3由来Th1細胞エピトープを同定する戦略を設計し、そのようにして特徴づけられたエピトープがより効率的なT細胞媒介性腫瘍免疫を誘導するという仮定の下で研究を進めた。HLAクラスII結合ペプチドを予測するコンピュータアルゴリズムおよびHLA-A24 (A*24:02) またはHLA-A2 (A*02:01) 拘束性CTLによって認識される公知のCTLエピトープ配列を使用して、候補となる、CTLエピトープを含有するプロミスキヤスなHLAクラスII拘束性Th1細胞エピトープを選択した。

【0011】

本発明は、少なくとも部分的には、Th1細胞応答を誘導するための免疫療法の標的として役立つ適切なエピトープペプチドの発見に基づく。GPC3遺伝子は、HCCおよび

50

メラノーマを含む多くのがん型で上方制御されることが認められているので、本発明は、G P C 3 遺伝子の遺伝子産物、より詳細には G e n B a n k アクセッション番号 N M _ 0 0 1 1 6 4 6 1 7 . 1 (配列番号: 9) またはアクセッション番号 N M _ 0 0 4 4 8 4 . 3 (配列番号: 1 1) の遺伝子によってコードされる配列番号: 8 または 1 0 に例示的に示すポリペプチドをさらなる解析のための標的とする。対応する分子に特異的な T h 1 細胞を誘発するエピトープペプチドを含む G P C 3 遺伝子産物をさらなる試験のために特に選択した。例えば、健常ドナーから得られた末梢血単核細胞 (P B M C) を、ヒト G P C 3 に由来するプロミスキャスな H L A - D R および / または D P 結合ペプチドを用いて刺激した。それぞれの候補ペプチドでパルスした H L A - D R または D P 陽性標的細胞を認識する T h 1 細胞を樹立し、 G P C 3 に対する強力で特異的な免疫応答を誘導することができる H L A - D R および / または D P 拘束性エピトープペプチドを同定した。これらの結果は、 G P C 3 が強力な免疫原性をもち、そのエピトープは T h 1 細胞応答を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを明らかにする。付加的な試験は、少なくとも 1 つの C T L エピトープを含むプロミスキャスな H L A - D R および / または D P 結合ペプチドが、同じドナーにおいて G P C 3 特異的に C T L 応答を刺激できることも明らかにした。これらの結果は、 G P C 3 が強い免疫原性を示すこと、ならびに T h 1 細胞エピトープおよび C T L エピトープの両方を含むその G P C 3 由来ペプチドが、 T h 1 細胞応答および C T L 応答の両方を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを裏付ける。

10

20

30

それゆえ、 T h 1 細胞誘導能ならびに配列番号: 1 から 5 の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供することが本発明の 1 つの目的である。本発明は、改変されたペプチド、すなわち最大 3 0 アミノ酸までの長さであり、配列番号: 6 (G P C 3) のアミノ酸配列から選択される連続するアミノ酸配列を有する、 T h 1 細胞誘導能を備えたペプチド、ならびにその機能的等価物を企図する。あるいは、本発明はまた、 T h 1 細胞誘導能および C T L 誘導能の両方を有するペプチドも提供する。いくつかの態様において、本発明のペプチドは、配列番号: 1 から 5 のアミノ酸配列または、 T h 1 細胞を誘導する能力を維持しつつ、 1 、 2 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / もしくは付加されている、その改変型に対応する。

40

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、好ましくは 1 つまたは複数の抗原提示細胞の表面に提示され、次にこれが T h 1 細胞を誘導する。本発明のペプチドが少なくとも 1 つの C T L エピトープをさらに含む場合、そのような A P C はまた、本発明のペプチドから生成される C T L エピトープを提示し、したがってそれぞれのペプチドを標的とする C T L を誘導するようにペプチドをプロセシングする。それゆえ、本発明のペプチドのいずれかまたはその断片を提示する抗原提示細胞、ならびに抗原提示細胞を誘導するための方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

50

【 0 0 1 4 】

本発明の 1 つもしくは複数のペプチドまたはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはそのようなペプチドまたはその断片を提示する抗原提示細胞の投与は、強力な抗腫瘍免疫応答の誘導をもたらす。したがって、以下の 1 つまたは複数を有効成分として含有する薬剤または医薬組成物を提供することが本発明のさらにもう 1 つの目的である：

- (a) 本発明の 1 つまたは複数のペプチド、
- (b) そのようなペプチドをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、および
- (c) 本発明の 1 つまたは複数の抗原提示細胞。

そのような本発明の薬剤または医薬組成物は、ワクチンとして特に有用である。

50

【 0 0 1 5 】

がん (すなわち腫瘍) の治療および / もしくは予防 (p r o p h y l a x i s) (すなわち予防 (p r e v e n t i o n)) 、ならびに / またはその術後再発の予防のための方

法を提供することが本発明のなおさらなる目的である。本発明の1つもしくは複数のペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示細胞または薬剤もしくは医薬組成物を投与する段階を含む、T h 1 細胞を誘導するまたは抗腫瘍免疫を誘導するための方法もまた企図される。さらに、本発明のT h 1 細胞はがんに対するワクチンとしても使用され、がんの例には、H C C およびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。

【0016】

本発明の特に企図される目的の例には以下が含まれる：

[1] 10～30アミノ酸長を有し、配列番号：9または11のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1、2、3、4または5のアミノ酸配列から選択される9アミノ酸を超える長さを有する連続するアミノ酸配列；ならびに

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、Tヘルパー1型(T h 1)細胞を誘導する能力を有する、ペプチド。

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド。

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-D R 8、HLA-D R 5 2 b、HLA-D R 1 4、HLA-D R 9、HLA-D R 1 3、HLA-D R 1 5、HLA-D P 2 およびHLA-D P 5 からなる群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド。

[4] G P C 3 特異的細胞傷害性Tリンパ球(C T L)誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1]から[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド。

[5]

(a) 配列番号：1から5からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の単離されたペプチド。

[6] [1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

[7]

(i) T h 1 細胞、

(i i) C T L、

(i i i) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞(A P C)、および

(i v) C T Lを誘導する能力を有するA P C

からなる群より選択される細胞の少なくとも1つを誘導するための組成物であって、[1]から[5]のいずれか1つに記載の1つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物、または

(i) T h 1 細胞、

(i i) C T L、

(i i i) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞(A P C)、および

(i v) C T Lを誘導する能力を有するA P C

からなる群より選択される少なくとも1種類の細胞を誘導するための組成物であって、[1]から[5]のいずれか1つに記載の1つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

[8]

(a) [1]から[5]のいずれか1つに記載の1つまたは複数のペプチド；

(b) [6]に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のA P C；

(d) [1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P Cを認識する1つまたは複数のT h 1 細胞；および

10

20

30

40

50

(e) 上記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有し、かつ

- (i)がんの治療、
- (ii)がんの予防、

(iii)がんにおける術後再発の予防、および

(iv)上記(i)から(iii)の任意の2つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

[9] MHCクラスII分子としてHLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2およびHLA-DP5からなる群より選択される少なくとも1つを有する対象への投与のために製剤化されている[8]に記載の医薬組成物、またはHLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2およびHLA-DP5からなる群より選択される少なくとも1つのMHCクラスII分子を有する対象への投与用に製剤化されている[8]に記載の医薬組成物。

[10] CTL誘導能を有する1つまたは複数のペプチドをさらに含有する、[8]または[9]に記載の医薬組成物。

[11] MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、

(a) [1]から[5]のいずれか1つに記載の1つまたは複数のペプチド；

(b) [6]に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のAPC；

(d) [1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPCを認識する1つまたは複数のTh1細胞；および

(e) 上記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有する、組成物。

[12] Th1細胞を誘導する能力を有するAPCを誘導するための方法であって、APCを[1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階を含む、方法。

[13] CTLを誘導する能力を有するAPCを誘導するための方法であって、

(a) APCを[1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階；および

(b) [1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階

からなる群より選択される段階を含む、方法。

[14] Th1細胞を誘導するための方法であって、

(a) CD4陽性T細胞を、MHCクラスII分子と[1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示するAPCと共に培養する段階；および

(b) 両方のT細胞受容体(TCR)サブユニットをコードするポリヌクレオチド、またはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをCD4陽性T細胞に導入する段階であって、ここでTCRが、細胞表面に提示されるMHCクラスII分子と[1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階

からなる群より選択される段階を含む、方法、または、Th1細胞を誘導するための方法であって、

(a) CD4陽性T細胞を、MHCクラスII分子と[1]から[5]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示するAPCと共に培養する段階；および

(b) 両方のT細胞受容体(TCR)サブユニットをコードする単一ポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド、または各々が別々のT C R サブユニットをコードする複数のポリヌクレオチドをC D 4 陽性T 細胞に導入する段階であって、ここでT C R が、A P Cの細胞表面に提示されるM H C クラスI I 分子と[1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階
からなる群より選択される段階を含む、方法。

[15] C T L を誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性T 細胞およびC D 8 陽性T 細胞の両方を、[4] または[5] に記載のペプチドと接触させたA P C と共に培養する段階；ならびに

(b) C D 8 陽性T 細胞を、[4] または[5] に記載のペプチドと接触させたA P C と共に培養する段階
10
からなる群より選択される段階を含む、方法。

[16] M H C クラスI I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、

(a) [1] から[5] のいずれか1 つに記載の1 つまたは複数のペプチド；

(b) [6] に記載の1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1 つまたは複数のA P C ；

(d) [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P C を認識する1 つまたは複数のT h 1 細胞；および
20

(e) 上記(a) から(d)

の任意の2 つまたはそれ以上の組合せ

からなる群より選択される少なくとも1 つの有効成分を対象に投与する段階を含む、方法。
。

[17] M H C クラスI I 分子と[1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離されたA P C 。

[18] [12] または[13] に記載の方法によって誘導されるA P C 。

[19] A P C の表面に提示された[1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離されたT h 1 細胞。

[20] [14] に記載の方法によって誘導されるT h 1 細胞。

[21] がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であつて、
30

(a) [1] から[5] のいずれか1 つに記載の1 つまたは複数のペプチド；

(b) [6] に記載の1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1 つまたは複数のA P C ；

(d) [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P C を認識する1 つまたは複数のT h 1 細胞；および
40

(e) 上記(a) から(d) の任意の2 つまたはそれ以上の組合せ

からなる群より選択される少なくとも1 つの有効成分を含有する組成物を前記対象に投与する段階を含む、方法。

[22] [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

[23] [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

[24] [23] に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

[25] [1] から[5] のいずれか1 つに記載のペプチド、[6] に記載のポリヌクレオチドまたは[22] に記載の抗体を含む、診断キット。

【 0 0 1 7 】

上記に加えて、本発明の他の目的および特徴は、以下の詳細な説明を付属の図面および

50

実施例と併せて読めばより十分に明らかになる。しかしながら、本発明の前記概要および以下の詳細な説明はどちらも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、ここでいくつかの特定の態様を参照して本発明を説明するが、説明は本発明を例証するものであり、本発明の限定とは解釈されないことが認識される。様々な変更および適用が、付属の特許請求の範囲に記載されている本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者に想起され得る。同様に、本発明の他の目的、特徴、利益および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかであり、また当業者には容易に明白である。そのような目的、特徴、利益および利点は、単独でまたは本明細書に組み込まれる参考文献を考慮して、付属の実施例、データ、図面およびそれらから引き出されるすべての妥当な推論と併せて上記から明らかとなるであろう。

10

【図面の簡単な説明】

【0018】

本発明の様々な局面および適用は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明とその好ましい態様を考慮した上で当業者に明らかになるであろう。

【0019】

【図1A】図1は、健常ドナーからのG P C 3 - L P特異的ヘルパーT細胞の誘導を示す。図に示すように、G P C 3特異的ヘルパー(T h)細胞を、単離されたC D 4⁺T細胞をG P C 3 - L Pで刺激することによって、健常ドナー(H D)から生成した。生成されたT h細胞は、G P C 3 - L Pでパルスされた自己P B M Cによって再刺激された。I F N - 産生T h細胞の数はE L I S P O Tアッセイによって解析された。同様の結果を示した少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのH L AクラスI I遺伝子型をパネル上部に示す。下線の引かれたH L A - クラスI Iアリルは、図2から取り入れられるT h細胞にペプチドを提示したH L A - クラスI I分子をコードする。(A) H L A - D R拘束性G P C 3 - L P 1特異的T h細胞を、H L A - D R B 1^{*}0 7 : 0 1 / 1 3 : 0 2⁺健常ドナー(H D 1 0、左パネル)のP B M CおよびH L A - D R B 1^{*}0 4 : 0 5 / 0 9 : 0 1⁺健常ドナー(H D 5、右パネル)のP B M Cから生成した。

20

【図1B】(B) H L A - D R拘束性G P C 3 - L P 2特異的T h細胞を、H D 1 0(上左パネル)、H L A - D R B 1^{*}0 8 : 0 3 / 1 4 : 0 5⁺健常ドナー(H D 4、下左パネル)およびH L A - D R B 1^{*}0 9 : 0 1 / 1 4 : 5 4⁺健常ドナー(H D 1 1、下右パネル)のP B M Cから生成した。H L A - D P拘束性G P C 3 - L P 2特異的T h細胞を、H L A - D R B 1^{*}0 2 : 0 1 / 0 4 : 0 2⁺健常ドナー(H D 5、上右パネル)のP B M Cから生成した。

30

【図1C】(C) H L A - D R拘束性G P C 3 - L P 3特異的T h細胞を、H D 1 0(左パネル)およびH D 5(右パネル)のP B M Cから生成した。

【図1D】(D) H L A - D R拘束性G P C 3 - L P 4特異的T h細胞を、H L A - D R B 1^{*}0 8 : 0 2 / 1 5 : 0 2⁺健常ドナー(H D 3、左パネル)およびH D 1 0(右パネル)のP B M Cから生成した。

【図1E】(E) H L A - D R拘束性G P C 3 - L P 5特異的T h細胞を、H D 1 0(左パネル)およびH D 5(右パネル)から生成した。

40

【図2A】図2は、G P C 3特異的T h細胞の拘束H L AクラスI I分子の正確な同定を示す。G P C 3特異的ヘルパー(T h)細胞は、図1に示されるように、磁気ビーズ単離されたC D 4⁺T細胞をG P C 3 - L Pで刺激することによって健常ドナー(H D)から生成された。H Dから生成されたT h細胞を、個々のG P C 3 - L Pでパルスした自己P B M Cまたは同種異系のP B M CまたはL細胞で再刺激した。I F N - 産生T h細胞の数はE L I S P O Tアッセイによって解析された。同様の結果を示した少なくとも2つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのH L AクラスI I遺伝子型をパネル上部に示す。下線の引かれたH L A - クラスI Iアリルは、ペプチドをT h細胞に提示したH L A - クラスI I分子をコードする。(A) H L A - D R 5 2 bおよびD R 9拘束性

50

G P C 3 - L P 1 特異的 T h 細胞は、H D 1 0 (左パネル) および H D 5 (右パネル) の P B M C から生成された。

【図 2 B】(B) H L A - D R 5 2 b および D P 2 拘束性 G P C 3 - L P 2 特異的 T h 細胞は、H D 1 0 (左パネル) および H D 5 (右パネル) の P B M C から生成された。

【図 2 C】(C) H L A - D R 7 / 5 3 および D R 9 拘束性 G P C 3 - L P 3 特異的 T h 細胞は、H D 1 0 (上パネル) および H D 5 (下パネル) の P B M C から生成された。

【図 2 D】(D) H L A - D R 1 5 / 5 1 および D R 1 3 拘束性 G P C 3 - L P 4 特異的 T h 細胞は、H D 3 (上パネル) および H D 1 0 (下パネル) の P B M C から生成された。
。

【図 2 E】(E) H L A - D R 1 3 および D R 9 拘束性 G P C 3 - L P 5 特異的 T h 細胞は、H D 1 0 (上パネル) および H D 5 (下パネル) の P B M C から生成された。 10

【図 3 A】図 3 は G P C 3 - L P 1、2 および 4 特異的 T 細胞クローニングによって產生されたサイトカインプロファイルを示す。コグネイトペプチドでパルスした自己 P B M C との T h 細胞の 24 時間の共培養後、培養上清を回収し、B i o - P l e x アッセイシステムを用いてサイトカイン (I F N - 、T N F - 、I L - 2、G M - C S F および M I P 1 -) の濃度を測定した。データは 2 連のアッセイの平均 ± S D として提示している。

【図 3 B】図 3 (続き)

【図 3 C】図 3 (続き)

【図 4】図 4 は、組換えヒト G P C 3 タンパク質をロードした D C による G P C 3 - L P の天然プロセシングおよび提示を示す。(A) ドナー H D 1 0 から樹立した H L A - D R 5 2 b (H L A - D R B 3 * 0 2 : 0 2) 拘束性および G P C 3 - L P 2 特異的 T h クローンが、組換えヒト G P C 3 タンパク質をロードした自己 D C を認識した。同様の結果を示す、2 連で行った 2 つの独立した実験からの代表的なデータを示す。(B) ドナー H D 1 0 から樹立した H L A - D R 5 2 b 拘束性 G P C 3 - L P 1 特異的 T h クローンが、組換えヒト G P C 3 タンパク質をロードした自己 D C を認識した。(C) ドナー H D 1 0 から樹立した H L A - D R 1 3 拘束性および G P C 3 - L P 4 特異的 T h クローンが、組換えヒト G P C 3 タンパク質をロードした自己 D C を認識した。同様の結果を示した、2 連で行った 3 つの独立した実験からの代表的なデータを示す。(D) ドナー H D 1 0 から樹立した H L A - D R 1 3 拘束性および G P C 3 - L P 5 特異的 T h 細胞が、組換えヒト G P C 3 タンパク質をロードした自己 D C を認識した。 20

【図 5 A】図 5 は、D C が、インビトロで A 2 - G P C 3 1 4 4 - 1 5 2 - S P 特異的および H L A - A 2 拘束性 C T L に対する G P C 3 - L P 2 の効率的な交差提示および H L A - A 2 T g m においてインビボでクロスプライミングを誘導することを示す。(A) 健常ドナーである H D 5 (H L A - A 2 + および H L A - D P 2 +) から樹立された A 2 - G P C 3 1 4 4 - 1 5 2 S P 特異的 C T L は、インビトロにおいて、リポソームに封入された G P C 3 - L P 2 (L i p - G P C 3 - L P 2)、リポソームに封入された I M P 3 5 0 7 - 5 2 7 L P (L i p - c o n t r o l L P)、リポソームおよび水溶性の G P C 3 - L P 2 (L i p + G P C 3 - L P 2) またはリポソーム単独 (L i p) でパルスされた自己 D C によって刺激された。同様の結果を示した 3 つの独立した実験からの代表的なデータを示す。(B ~ D) H L A - A 2 T g m マウスは、I F A (S P - I F A - P B S) で乳化された A 2 - G P C 3 1 4 4 - 1 5 2 S P、G P C 3 - L P 2 (L P 2 - I F A - P B S) または I F A (I F A - P B S) で乳化された P B S で免疫された。2 回目の免疫から 7 日後、マウス C D 4 + / C D 8 + T 細胞をプールされた鼠径リンパ節から単離し、エクスピボで G P C 3 - L P 2 もしくは G P C 3 - L P 5 (対照 L P) および A 2 - G P C 3 1 4 4 - 1 5 2 S P、A 2 - C D C A 1 - S P または A 2 - H I V - S P でパルスした B M D C で刺激した。I F N - 産生マウス C D 4 + / C D 8 + T 細胞の数はエクスピボ E L I S P O T によって解析された。同様の結果を示す、2 連または 3 連で行った、少なくとも 2 ~ 4 つの独立した実験 (各々のグループにおいて 2 から 3 匹のマウス) からの代表的なデータを示す。 30

【図 5 B】(B) 等量の S P と L P 分子が、免疫化のために使用された。

【図 5 C】(C) G P C 3 - L P 2 または G P C 3 - L P 5 が、免疫化のために使用された。

【図 5 D】(D) A 2 - G P C 3 1 4 4 - 1 5 2 S P または A 2 - C D C A 1 - S P が、免疫化のために使用された。

【図 5 E】(E) A 2 - H I V - S P が、免疫化のために使用された。

【図5C】(C)等モル用量のペプチドを用いた場合、G P C 3 - L P 2免疫は、インビボでG P C 3 - A 2 - S Pの免疫化と比較してS P特異的C T L応答の増加を誘導した。

【図5D】(D)同じプールされた鼠径リンパ節から単離されたG P C 3 - L P 2特異的C D 4⁺T h細胞の応答。

【図6A】図6は、G P C 3 - S Pをワクチン接種した肝細胞がん(H C C)患者のP B M CにおけるG P C 3 - L P特異的T h細胞の存在を示す(A~C)。G P C 3 - S P(表3)をワクチン接種したH C C患者由来の凍結末梢血単核細胞(P B M C)をインビトロでG P C 3 - L P 1、2、3、4および5の混合物ならびにI L - 2およびI L - 7で刺激した。7日後、(A)で要約されるように、個々のG P C 3 - L P特異的T細胞の頻度を、I F N - E L I S P O Tアッセイで検出した。T h細胞応答は、試験した18人のH C C患者のうち11人で観察された。G P C 3 - L P特異的T h細胞のH L AクラスI I拘束は、H L A - D R、D QまたはD P特異的モノクローナル抗体を使用したブロッキングアッセイによって決定された。

【図6B】G P C 3 - L P 2特異的T h細胞応答。

【図6C】G P C 3 - L P 3特異的T h細胞応答。

【図6D】G P C 3 - L P 4特異的T h細胞応答。

【図6E】G P C 3 - L P 5特異的T h細胞応答。

【図7A】図7は、コンピュータアルゴリズムによって予測された、C T Lエピトープを網羅したG P C 3由来およびプロミスキャスなH L AクラスI I結合ペプチドを示す。(A)図7Aにおいて、矢印はアスパラギンまたはセリンにおいてグリコシル化の可能性がある部位を示し、そのアミノ酸位置は、1 2 4、2 4 1、4 1 8、4 9 5および5 0 9である。

【図7B】ヒトG P C 3タンパク質のアミノ酸配列を、アルゴリズム(http://tools.immuneepitope.org/mhcii/)を用いて解析した。横軸の数字は、G P C 3由来の15merペプチドのN末端のアミノ酸位置を示す。小さく番号付けられたコンセンサスパーセンタイル順位は、H L AクラスI I分子への高い結合親和性を示す。候補ペプチドの選択のため、アスパラギンおよびセリンにおける潜在的なグリコシル化部位を含む領域を避けた(http://www.uniprot.org/uniprot/P51654)。(B)複数のH L AクラスI Iアリル産物(D R B 1^{*}0 9:0 1、D R B 1^{*}0 4:0 5、D R B 1^{*}0 7:0 1、D R B 1^{*}1 3:0 2、D R B 1^{*}1 5:0 2、D P B 1^{*}0 2:0 1およびD R B 1^{*}0 5:0 1)について高いコンセンサスパーセンタイル順位を有し、かつH L A - A 2または-A 2 4拘束性C T Lによって認識される9merペプチド(A 2 - G P C 3_{1 4 4 - 1 5 2}、A 2 4 - G P C 3_{2 9 8 - 3 0 6})を有する、L P、G P C 3 - L P 1; G P C 3_{9 2 - 1 1 6}(25-mer)、G P C 3 - L P 2; G P C 3_{1 3 7 - 1 6 1}(25-mer)、G P C 3 - L P 3; G P C 3_{2 8 9 - 3 1 3}(25-mer)、G P C 3 - L P 4; G P C 3_{3 8 6 - 4 1 2}(27-mer)およびG P C 3_{5 5 6 - 5 7 6}(21-mer)を個々に(A)では棒で示し、(B)では太字下線を引いて示す。

【図8A】図8は、健常ドナーからのG P C 3 - L P特異的T h細胞の誘導を示す。G P C 3 - L Pによる刺激によって、健常ドナーのP B M CからG P C 3 - L P特異的T h細胞を生成した。生成されたT h細胞を、G P C 3 - L Pでパルスした自己P B M Cまたは同種異系のP B M Cで再度刺激した。I F N - 産生T h細胞の数はE L I S P O Tアッセイによって解析された。同様の結果を示した少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのH L AクラスI I遺伝子型をパネル上部に示す。下線の引かれたH L A - クラスI Iアリルは、ペプチドをT h細胞に提示したH L A - クラスI I分子をコードする。(A)H L A - D R拘束性G P C 3 - L P 3特異的T h細胞を、H L A - D R 9 / 1 4⁺健常ドナー(H D 1 1)から生成した(図1に関連する)。

【図8B】(B)H L A - D R 1 3 / 5 2 b拘束性G P C 3特異的T h細胞を、H L A - D R 7 / 1 3⁺健常ドナー(H D 1 0)のP B M Cから生成した。H D 1 0は、L細胞を用いて、H L A - D R 5 2 bであることが後ほど確認された。

10

20

30

40

50

【図 8 C】(C) HLA - DP2 拘束性 GPC3 - LP2 特異的 Th 細胞を、HLA - DP2⁺ 健常ドナー (HD5) の PBMC から生成した。

【図 8 D】(D) HLA - DR8 拘束性 GPC3 - LP2 特異的 Th 細胞を、HLA - DRB1^{*}08 : 03 / 14 : 05⁺ 健常ドナー (HD4) から生成した ((B) から (D) は、図 2 に関連する)。

【図 8 E】(E) HLA - DR8 拘束性 GPC3 - LP2 特異的 Th 細胞を、HLA - DRB1^{*}08 : 03 / 14 : 05⁺ 健常ドナー (HD4) から生成した。

【図 9】図 9 は、GPC3 - LP2 の免疫化が、等モルのペプチド用量を使用した場合に、A2 - GPC3 - SP の免疫化と比較して、インビボにおいて SP 特異的 CTL 応答の増大を誘導することを示す。HLA - A2 / (I - A^b) Tg m (3マウス/グループ) を、IFA 中に乳化した等モル用量の A2 - GPC3 - SP (SP - IFA - PBS 50 μg)、GPC3 - LP2 (LP2 - IFA - PBS、132.5 μg) または PBS (IFA - PBS) のみにて 7 日間隔で 2 回免疫した。(A) 2 回目の免疫の 7 日後に、マウス CD8⁺ T 細胞を磁気ビーズ (陽性選択) を用いて、3 匹のマウスのプールされた鼠径リンパ節から単離し、エクスピボにて、A2 - GPC3 - SP または A2 - CDCA1 - SP でパルスした BMDC で刺激した。(B) 同じプールされた鼠径リンパ節から単離した CD4⁺ T 細胞を GPC3 - LP2 または GPC3 - LP5 でパルスした BMDC で刺激した (対照 LP)。IFN - 産生マウス CD8⁺ または CD4⁺ T 細胞の数をエクスピボ ELISPOT によって解析した。同様の結果を示した、3 連で行った 2 つの独立した実験 (3マウス/グループ) からの代表的なデータを示す。

【図 10 A - 1】図 10 は、GPC3 - SP をワクチン接種した HCC 患者の PBMC における、GPC3 - LP 特異的 Th 細胞の存在を示す (A ~ C)。GPC3 - SP (表 3) をワクチン接種した HCC 患者由来の凍結末梢血单核球 (PBMC) を、インビトロにおいて、GPC3 - LP1、2、3、4 および 5 の混合物ならびに IL - 2 および IL - 7 で刺激した。7 日後、個々の GPC3 - LP 特異的 Th 細胞の頻度を IFN - ELISPOT アッセイによって検出した。GPC3 - LP2 特異的 (A)、LP3 特異的 (B)、LP4 特異的 (C)、LP5 特異的 (D) Th 細胞応答が、HCC 患者で観察された。GPC3 - LP 特異的 Th 細胞の HLA クラス II 拘束は、HLA - DR、DQ または DP 特異的モノクローナル抗体を用いたプロッキングアッセイによって決定した。

【図 10 A - 2】図 10 A (続き)

【図 10 B】GPC3 - LP3 特異的 Th 細胞応答。

【図 10 C】GPC3 - LP4 特異的 Th 細胞応答。

【図 10 D】GPC3 - LP5 特異的 Th 細胞応答。

【発明を実施するための形態】

【0020】

態様の説明

本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似または等価の任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をここに記述する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本発明が本明細書で述べる特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコル等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。また、本記載で用いる用語は、特定のバージョンまたは態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図されず、本発明の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

【0021】

本明細書で言及する各々の公報、特許または特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。しかしながら、本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によるそのような開示に先行する権利がないことの承認と解釈されるべきではない。

【0022】

10

20

30

40

50

I. 定義

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。しかしながら、矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。

【0023】

本明細書で使用する「1つの(a)」、「1つの(a n)」、および「その(the)」という語は、特に明確に示されない限り「少なくとも1つの」を意味する。

【0024】

ある物質(例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等)に関して使用する「単離された」および「精製された」という用語は、その物質が、さもなければ天然源中に含まれ得る少なくとも1つの物質を実質的に含まないことを指示する。したがって、単離されたまたは精製されたペプチドは、そのペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの糖質、脂質もしくは他の混入タンパク質などの細胞材料を実質的に含まない、または化学合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。

10

【0025】

「細胞物質を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、そのペプチドが単離されたまたは組換え生産された細胞の細胞成分から切り離されている、ペプチドの調製物を包含する。したがって、細胞物質を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%または5%(乾燥重量)未満の異種タンパク質(本明細書では「混入タンパク質」とも称する)を有するポリペプチドの調製物を包含する。ペプチドが組換え生産される場合は、ペプチドは、好ましくは培地も実質的に含まず、ペプチド調製物の容積の約20%、10%または5%未満の培地を含むペプチドの調製物を包含する。ペプチドが化学合成によって生産される場合は、ペプチドは、好ましくは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、そのペプチドの合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容積の約30%、20%、10%または5%(乾燥重量)未満含むペプチドの調製物を包含する。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドを含むことは、例えばタンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の単一バンドの出現およびゲルのクマシーブリリアントブルー染色等によって示され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは単離または精製されている。

20

【0026】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書ではアミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。本用語は、天然のアミノ酸ポリマーに加えて、1つもしくは複数のアミノ酸残基が変更された残基であるアミノ酸ポリマー、または対応する天然のアミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基にも適用される。

30

【0027】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびに細胞内で翻訳後に修飾されたもの(例えばヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリン)である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造(水素、カルボキシ基、アミノ基およびR基に結合した炭素)を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格(例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチルメチオニンスルホニウム)を有する化合物を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様に機能する化合物を指す。

40

【0028】

アミノ酸は、本明細書ではIUPAC-IUB生化学命名法委員会によって推奨される、一般に公知の3文字表記、または1文字表記によって言及され得る。

【0029】

50

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、一般に受け入れられている1文字コードによって言及される。

「剤」および「組成物」という用語は、本明細書では、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組合せから直接または間接的に生じる任意の生成物を指すために互換的に使用される。医薬組成物に関するそのような用語は、有効成分、および担体を構成する不活性成分を含む生成物、ならびに成分の任意の2つもしくはそれ以上の組合せ、錯体形成もしくは凝集から、または成分の1つもしくは複数の解離から、または成分の1つもしくは複数の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図されている。したがって、本発明の医薬組成物は、本発明の化合物と医薬的または生理学的に許容される担体とを混合することによって作製される任意の組成物を包含する。

【0030】

「有効成分」という用語は、本明細書では生物学的または生理学的に活性な組成物中の物質を指す。特に、医薬組成物に関する「有効成分」という用語は、目的の薬理学効果を示す成分物質を指す。例えば、がんの治療または予防における使用のための医薬組成物の場合、組成物中の有効成分は、直接または間接的にがん細胞および/または組織に対する少なくとも1つの生物学的または生理学的作用をもたらし得る。好ましくは、そのような作用は、がん細胞増殖を低減するまたは阻害すること、がん細胞および/または組織を損傷するまたは死滅させること等を含み得る。典型的には、有効成分の間接的な作用は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答の誘導である。製剤化される前は、「有効成分」は「バルク」、「原薬」または「原体」とも称され得る。本明細書で使用する「医薬的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体增量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料を含むがこれらに限定されない、医薬的または生理学的に許容される材料、組成物、物質またはビヒクルを意味する。

【0031】

特に定義されない限り、「がん」という用語は、例えばHCCおよびメラノーマを含む、GPC3遺伝子を発現するがんを指す。GPC3遺伝子を発現するがんはまた、GPC3を発現するがんまたは、GPC3をコードする遺伝子を発現するがんとも称される。

【0032】

特に定義されない限り、「Tリンパ球」および「T細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0033】

特に定義されない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」および「CTL」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に指示されない限り、非自己細胞（例えば腫瘍細胞、ウイルス感染細胞）を認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球のサブグループを指す。CTLは、CD8⁺Tリンパ球と区別され、MHCクラスI分子によって提示されるペプチドを認識することができる。

【0034】

特に定義されない限り、「HLA-A24」という用語は、サブタイプを含むHLA-A24型を指し、その例には、HLA-A^{*}24:01、HLA-A^{*}24:02、HLA-A^{*}24:03、HLA-A^{*}24:04、HLA-A^{*}24:07、HLA-A^{*}24:08、HLA-A^{*}24:20、HLA-A^{*}24:25およびHLA-A^{*}24:88が含まれるが、これらに限定されない。

【0035】

特に定義されない限り、本明細書で使用する「HLA-A2」という用語は、典型的にはサブタイプを指し、その例には、HLA-A^{*}02:01、HLA-A^{*}02:02、HLA-A^{*}02:03、HLA-A^{*}02:04、HLA-A^{*}02:05、HLA-A^{*}02:06、HLA-A^{*}02:07、HLA-A^{*}02:10、HLA-A^{*}02:11、HLA-A^{*}02:13、HLA-A^{*}02:16、HLA-A^{*}02:18、

10

20

30

40

50

HLA - A * 02 : 19、HLA - A * 02 : 28 および HLA - A * 02 : 50 が含まれるが、これらに限定されない。

【0036】

特に定義されない限り、「Tヘルパー1型細胞」および「Th1細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドを認識することができ、細胞性免疫に関連するCD4⁺Tリンパ球のサブグループを指す。特に定義されない限り、「Th細胞」、「CD4⁺T細胞」および「CD4⁺ヘルパーT細胞」という用語も本明細書では互換的に使用される。Th1細胞は、細胞性免疫に関する他の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ）の活性化および/または刺激を助けるために様々なサイトカイン（例えばIFN- γ 、IL-2、TNF- α 、GM-CSF、TNF- β 等）を分泌する。
10

【0037】

特に定義されない限り、「HLA - DR8」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB1 * 08 : 01、HLA - DRB1 * 08 : 02、HLA - DRB1 * 08 : 03、HLA - DRB1 * 08 : 04、HLA - DRB1 * 08 : 05、HLA - DRB1 * 08 : 06、HLA - DRB1 * 08 : 07、HLA - DRB1 * 08 : 08、HLA - DRB1 * 08 : 11 および HLA - DRB1 * 08 : 12 が含まれるが、これらに限定されない。

【0038】

特に定義されない限り、「HLA - DR9」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB1 * 09 : 01、HLA - DRB1 * 09 : 02、HLA - DRB1 * 09 : 03、HLA - DRB1 * 09 : 04、HLA - DRB1 * 09 : 05、HLA - DRB1 * 09 : 06、HLA - DRB1 * 09 : 07、HLA - DRB1 * 09 : 08 および HLA - DRB1 * 09 : 09 が含まれるが、これらに限定されない。
20

【0039】

特に定義されない限り、「HLA - DR13」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB1 * 13 : 01、HLA - DRB1 * 13 : 08 および HLA - DRB1 * 13 : 10 が含まれるが、これらに限定されない。

【0040】

特に定義されない限り、「HLA - DR14」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB1 * 14 : 01、HLA - DRB1 * 14 : 02、HLA - DRB1 * 14 : 03、HLA - DRB1 * 14 : 04、HLA - DRB1 * 14 : 05、HLA - DRB1 * 14 : 06、HLA - DRB1 * 14 : 07、HLA - DRB1 * 14 : 08 および HLA - DRB1 * 14 : 10 が含まれるが、これらに限定されない。
30

【0041】

特に定義されない限り、「HLA - DR52b」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB3 * 02 : 02 が含まれるが、これらに限定されない。

【0042】

特に定義されない限り、「HLA - DR8」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB1 * 08 : 01、HLA - DRB1 * 08 : 02、HLA - DRB1 * 08 : 03、HLA - DRB1 * 08 : 04、HLA - DRB1 * 08 : 05、HLA - DRB1 * 08 : 06、HLA - DRB1 * 08 : 07、HLA - DRB1 * 08 : 08、HLA - DRB1 * 08 : 11 および HLA - DRB1 * 08 : 12 が含まれるが、これらに限定されない。
40

【0043】

特に定義されない限り、「HLA - DR15」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB1 * 15 : 01、HLA - DRB1 * 15 : 02、HLA - DRB1 * 15 : 03、HLA - DRB1 * 15 : 04、HLA - DRB1 * 15 : 05、HLA - DRB1 * 15 : 06、HLA - DRB1 * 15 : 07、HLA - DRB1 * 15 : 08、HLA - DRB1 * 15 : 09、HLA - DRB1 * 15 : 10 および HLA - DRB1 * 15 : 10
50

R B 1 * 1 5 : 1 1 が含まれるが、これらに限定されない。

【0044】

特に定義されない限り、「HLA-DP2」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA-DPB1*02:01およびHLA-DPB1*02:02が含まれるが、これらに限定されない。

【0045】

特に定義されない限り、「HLA-DP5」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA-DPB1*05:01が含まれるが、これに限定されない。

【0046】

特に定義されない限り、「MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答」という語句は、MHCクラスII分子によるペプチドの提示によって誘導される免疫応答を指す。本明細書では、「MHCクラスII抗原によって媒介される免疫応答」は、CD4⁺T細胞、特にTh1細胞によって誘導される免疫応答を含む。そのような免疫応答の例には、サイトカイン（例えばIFN- γ 、IL-2、TNF- α 、GM-CSF、TNF- β 等）の産生ならびに他の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ等）の活性化および/または刺激が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0047】

特に定義されない限り、「GPC3に特異的なTh1細胞」という語句は、GPC3に由来するペプチドを提示する抗原提示細胞によって特異的に活性化されるが、他の抗原提示細胞では活性化されないTh1細胞を指す。

20

【0048】

特に定義されない限り、「GPC3特異的CTL」という語句は、GPC3を発現する標的細胞に対して特異的に細胞傷害性を示すCTLを指す。

【0049】

特に定義されない限り、ペプチドに関連して使用される場合、「CTL誘導能」という語句は、抗原提示細胞上に提示された場合にCTLを誘導するペプチドの能力を指す。

30

【0050】

特に定義されない限り、本明細書で使用する「キット」という用語は、試薬と他の材料の組合せに関して用いられる。キットは、マイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが本明細書で企図される。「キット」という用語は、試薬および/または材料の特定の組合せに限定されることを意図しない。

30

【0051】

本発明に関連して、「抗体」という用語は、指定されるタンパク質またはそのペプチドに特異的に反応性のある免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体は、ヒト抗体、靈長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射性標識に融合した抗体、および抗体断片を含み得る。さらに、本明細書における抗体はその最も広い意味で使用され、特にインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えばIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）を指す。

40

【0052】

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0053】

I I . ペプチド

以下で詳細に説明する本発明のペプチドは、「GPC3ペプチド」または「GPC3ポリペプチド」と称され得る。

GPC3に由来するペプチドがThヘルパー1型（Th1）細胞によって認識される抗原として機能することを明らかにするため、GPC3に由来するペプチド（配列番号：9または11）を、これらがMHCクラスII分子によってプロミスキヤスに拘束される抗原工

50

ピトープであるかどうかを判定するために分析した。G P C 3 に由来するプロミスキヤスなM H C クラスII結合ペプチドの候補を、H L A - D R 8、H L A - D R 5 2 b、H L A - D R 1 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 3、H L A - D R 1 5、H L A - D P 2 およびH L A - D P 5への結合親和性に基づいて同定した。これらのペプチドをロードした樹状細胞 (D C) によるC D 4⁺ T 細胞のインビトロ刺激後、以下のペプチドの各々を用いてT h 1 細胞を成功裏に樹立した：

G P C 3_{9 2 - 1 1 6} - L P / L L Q S A S M E L K F L I I Q N A A V F Q E A F E (配列番号：1)、

G P C 3_{1 3 7 - 1 6 1} - L P / L T P Q A F E F V G E F F T D V S L Y I L G S D I (配列番号：2)、

G P C 3_{2 8 9 - 3 1 3} - L P / V V E I D K Y W R E Y I L S L E E L V N G M Y R I (配列番号：3)

G P C 3_{3 8 6 - 4 1 2} - L P / S R R R E L I Q K L K S F I S F Y S A L P G Y I C S H (配列番号：4)、および

G P C 3_{5 5 6 - 5 7 6} - L P / G N V H S P L K L L T S M A I S V V C F F (配列番号：5)。

【0054】

上述したこれらの樹立されたT h 1 細胞は、それぞれのペプチドでパルスした抗原提示細胞の刺激に応答して強力な特異的T h 1 細胞活性を示した。さらに、前記ペプチドは、日本人において高頻度に認められるいくつかのH L A - D R およびH L A - D P 分子（例えばH L A - D R 8、H L A - D R 5 2 b、H L A - D R 1 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 3、H L A - D R 1 5、H L A - D P 2 およびH L A - D P 5）によって拘束されるT h 1 細胞を刺激することができた。本明細書におけるこれらの結果は、G P C 3 がT h 1 細胞によって認識される抗原であること、およびペプチドが、いくつかのH L A クラスII分子（例えばH L A - D R 8、H L A - D R 5 2 b、H L A - D R 1 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 3、H L A - D R 1 5、H L A - D P 2 およびH L A - D P 5）によってプロミスキヤスに拘束されるG P C 3 のエピトープペプチドであることを明らかにする。

【0055】

上記で同定したペプチドのいくつかは、G P C 3 に特異的なC T L を誘導する能力を有するC T L エピトープのアミノ酸配列を附加的に含み、本明細書で明らかにするように、そのようなペプチドは、T h 1 細胞に加えてG P C 3 に特異的なC T L も誘導することができる。したがって、これらのペプチドは、G P C 3 を発現するがんに対する免疫応答の誘導のための適切なペプチドであり得る。G P C 3 遺伝子は、例えばH C C およびメラノーマを含む大部分のがん組織で過剰発現されるので、免疫療法のための良好な標的である。

【0056】

したがって、本発明は、G P C 3 に特異的なT h 1 細胞を誘導する能力を有するペプチドを提供する。本発明のペプチドは、少なくとも1つのM H C クラスII分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。あるいは、本発明のペプチドの断片は、少なくとも1つのM H C クラスII分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。ペプチドのこれらの断片は、抗原提示細胞内でのプロセシングによって生成され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドまたはその断片は、2またはそれ以上の種類のM H C クラスII分子（例えばH L A - D R 8、H L A - D R 5 2 b、H L A - D R 1 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 3、H L A - D R 1 5、H L A - D P 2 およびH L A - D P 5）に結合する能力を有する。言い換えると、本発明のペプチドは、2またはそれ以上の種類のM H C クラスII分子によって拘束されるT h 1 細胞を誘導する能力を有し得る。別の態様では、本発明のペプチドは、G P C 3 特異的C T L 誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む。G P C 3 特異的C T L 誘導能を有するそのようなペプチドの典型的な例には、配列番号：6または7のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

10

20

30

40

50

【0057】

MHCクラスII分子における結合溝は両端で開いているので、MHCクラスII結合ペプチドはその長さに柔軟性を有し得る。MHCクラスII分子についてのコア結合モチーフは9個のアミノ酸残基から成り、MHCクラスII結合ペプチドは一般に、コア結合モチーフと隣接する他のアミノ酸残基を有する。隣接アミノ酸残基の数は限定されない。したがって、配列番号：1、2、3、4または5のすべてのアミノ酸残基がMHCクラスII分子に結合するために必ずしも必要ではない。したがって、本発明のペプチドは、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチドであり得、そのようなペプチドは以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：

(a) 配列番号：1、2、3、4または5のアミノ酸配列からの9個より多い連続するアミノ酸を有するアミノ酸配列；および 10

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されている(a)のアミノ酸配列。

MHCクラスII結合ペプチドの長さは一般に10～30アミノ酸である。配列番号：1から5のアミノ酸配列はGPC3のアミノ酸配列（配列番号：9または11）の一部からなるので、本発明のペプチドは以下の[1]～[5]に記載のペプチドであり得る：

[1] 10～30アミノ酸長を有し、配列番号：9または11のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1、2、3、4または5のアミノ酸配列から選択される9アミノ酸を超える長さを有する連続するアミノ酸配列；および 20

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されている(a)のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチド；

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド；

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2およびHLA-DP5からなる群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド；

[4] 前記ペプチドが、GPC3特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1]から[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド；ならびに 30

[5]

(a) 配列番号：1から5からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されている(a)のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の単離されたペプチド。

【0058】

本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞はGPC3に特異的である。それゆえ、いくつかの態様において、本発明は、配列番号：9または11のアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなる30アミノ酸残基未満のペプチドであって、配列番号：1、2、3、4または5のアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。 40

【0059】

一般に、インターネット上で現在利用可能なソフトウェアプログラム、例えばWang et al. 2008. PLoS Comput Biol. 4(4): e1000048. 11: 568；およびWang et al. 2010. BMC Bioinformatics. 10: 296.；Nielsen M and Lund O. 2009. BMC Bioinformatics. 10: 296.；Nielsen M et 50

al. 2007. BMC Bioinformatics. 8: 238. Bui HH, et al. 2005. Immunogenetics. 57: 304-314. Sturniolo T et al. 1999. Nat Biotechnol. 17 (6): 555-561 および Nielsen M et al. 2008. PLoS Comput Biol. 4 (7) e1000107 に記載されているように測定することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムを用いて同定された HLA 抗原と結合すると決定された GPC3 のペプチドを包含する。

【0060】

上述したように、MHC クラス II 結合ペプチドはその長さに柔軟性があるので、配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列は、生じるペプチドが必要な Th1 細胞誘導能を保持する限り、場合により付加的なアミノ酸残基と隣接していてもよい。Th1 細胞誘導能を有するそのようなペプチドは、典型的には約 30 アミノ酸未満、しばしば約 29 アミノ酸未満、通常は約 28 または 27 アミノ酸未満である。配列番号：1 から 5 の中より選択されるアミノ酸配列に隣接する特定のアミノ酸配列は、そのような隣接アミノ酸配列がもとのペプチドの Th1 細胞誘導能を損なわない限り、限定されず、任意の種類のアミノ酸で構成され得る。典型的な態様では、そのような隣接アミノ酸配列は、配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列に隣接する配列番号：9 または 11 のアミノ酸配列の中から選択され得る；しかし、本発明はそれに限定されない。そこで、本発明はまた、Th1 細胞誘導能ならびに配列番号：1 から 5 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

10

20

30

【0061】

他方で、MHC クラス II 分子についてのコア結合モチーフは 9 個のアミノ酸残基からなるので、配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列の必ずしも全長が、MHC クラス II 分子に結合するためおよび Th1 細胞の誘導のために必要であるというわけではない。したがって、本発明のペプチドは、必要な Th1 細胞誘導能を保持することを条件として、配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列から 9 個より多い連続するアミノ酸を有するペプチドの形態をとることができる。Th1 細胞誘導能を有するペプチドは、典型的には約 10 より多いアミノ酸、しばしば 11 または 12 より多いアミノ酸、通常は 13 または 14 より多いアミノ酸である。したがって、本発明のペプチドは、Th1 細胞誘導能を有し、かつ配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列からの 9、10、11、12、13 または 14 個より多い連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、ペプチドであり得る。

【0062】

タンパク質中の 1、2 またはそれ以上のアミノ酸の改変はタンパク質の機能に影響を及ぼさず、一部の場合にはもとのタンパク質の所望の機能を増強することさえあることは一般に公知である。実際に、改変されたペプチド（すなわちもとの参照配列と比較して 1、2 または数個のアミノ酸残基が改変されている（すなわち置換、付加、欠失または挿入されている）アミノ酸配列からなるペプチド）が、もとのペプチドの生物学的活性を保持することは知られている（Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadi - McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13）。したがって、1 つの態様では、本発明のペプチドは、Th1 細胞誘導能ならびに配列番号：1 から 5 の中から選択されるアミノ酸配列の両方を有し得、この配列において、1、2 またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、挿入、欠失および / または置換されている。あるいは、本発明のペプチドは、Th1 細胞誘導能ならびに配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が付加、挿入、欠失および / または置換されているアミノ酸配列の両方を有し得る。すなわち、いくつかの態様において、本発明のペプチドは、Th1 細胞誘導能ならびに配列番号：1、2、3、4 または 5 のアミノ酸配列に対して、付加、挿入、欠失およ

40

50

び置換からなる群より選択される 1、2 または数個の改変が行われたアミノ酸配列を有し得る。

【0063】

当業者は、単一アミノ酸または小さな割合のアミノ酸を改変するアミノ酸配列への個々の付加または置換は、もとのアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識する。そこで、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、タンパク質の改変は、もとのタンパク質と類似の機能を有する改変されたタンパク質を生じさせる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野において周知である。アミノ酸側鎖の特性の例は、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および以下の共通する官能基または特徴を有する側鎖：脂肪族側鎖 (G、A、V、L、I、P)；ヒドロキシル基含有側鎖 (S、T、Y)；硫黄原子含有側鎖 (C、M)；カルボン酸およびアミド含有側鎖 (D、N、E、Q)；塩基含有側鎖 (R、K、H)；ならびに芳香族含有側鎖 (H、F、Y、W) である。加えて、以下の 8 群は各々相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、トレオニン (T)；および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)（例えば Creighton, Proteins 1984 参照）。

【0064】

そのような保存的に改変されたペプチドも本発明のペプチドとみなされる。しかし、本発明のペプチドはそれらに限定されず、改変されたペプチドがもとのペプチドの Th1 細胞誘導能を保持する限り、非保存的改変も含み得る。さらに、改変されたペプチドは、GPC3 の多型変異体、種間相同体およびアリルの Th1 細胞誘導性ペプチドを除外すべきではない。

【0065】

必要な Th1 細胞誘導能を保持するために、少数の（例えば 1、2 もしくは数個）または低い割合のアミノ酸を改変する（挿入、付加、欠失および／または置換する）ことができる。本明細書では、「数個」という用語は、5 またはそれ以下のアミノ酸、例えば 4 または 3 またはそれ以下のアミノ酸を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは 20% もしくはそれ以下、より好ましくは 15% もしくはそれ以下、さらに一層好ましくは 10% もしくは 8% もしくはそれ以下、または 1 ~ 5% である。

【0066】

本発明の好ましいペプチド、すなわち配列番号：1 から 5 (G P C 3₉ 2 - 1 1 6 - L P、G P C 3₁ 3 7 - 1 6 1 - L P、G P C 3₂ 8 9 - 3 1 3 - L P、G P C 3₃ 8 6 - 4 1 2 - L P および G P C 3₅ 5 6 - 5 7 6 - L P) のホモロジー解析は、これらのペプチドが他の公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドと有意の相同性を有さないことを確認する。したがって、免疫療法に使用した場合、これらのペプチドが未知のまたは望ましくない免疫応答を生じる可能性は有意に低い。したがって、これらのペプチドは、がん患者において GPC3 に対する免疫を誘発するために極めて有用であると期待される。

【0067】

免疫療法に関連して使用する場合、本発明のペプチドまたはその断片は、抗原提示細胞の表面に、好ましくは HLA クラス I I 抗原との複合体として、提示されなければならぬ。それゆえ、Th1 細胞を誘導するだけでなく、HLA クラス I I 抗原に高い結合親和性も有するペプチドを選択することが好ましい。そのために、ペプチドをアミノ酸残基の

10

20

30

40

50

置換、挿入、欠失および／または付加によって改変し、改善された結合親和性を有する改変されたペプチドを生成することができる。

【0068】

本発明はまた、上述したペプチドのN末端および／またはC末端への1～2個のアミノ酸の付加を企図する。高いHLA抗原結合親和性を有し、Th1細胞誘導能を保持するそのような改変ペプチドも本発明に含まれる。

【0069】

例えば、本発明は、HLAクラスII抗原に結合し、Th1細胞誘導能を有し、配列番号：1から5からなる群より選択されるアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列を含む、31、30、29、28、27または26未満のアミノ酸長の単離されたペプチドを提供する。
10

【0070】

これらのペプチドはまた、APCと接触するかまたはAPCに導入された場合、APC中でプロセシングされて、プロセシングされた断片をその上に提示し得る。例えば、本発明のペプチドは、APCの表面に提示される通常11～26（典型的には15～25）アミノ酸残基からなる断片にプロセシングされ得る。

【0071】

しかしながら、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫疾患および／または特定の物質に対するアレルギー症状などの負の副作用を誘導し得る。それゆえ、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列とマッチする状況を回避するために、利用可能なデータベースを用いて最初にホモロジー検索を実施することが望ましいと考えられる。目的のペプチドと比較して同一のペプチドまたは1もしくは2個のアミノ酸相違を有するペプチドが自然界に存在しないことがホモロジー検索から明らかになった場合は、そのような副作用の危険性を伴わずにHLA抗原とのその結合親和性を高めるためならびに／またはそのTh1細胞および／もしくはCTL誘導能を高めるために目的のペプチドを改変することができる。
20

【0072】

上述したHLAクラスII抗原に高い結合親和性を有するペプチドは極めて有効であると期待されるが、指標として高い結合親和性の存在に従って選択した候補ペプチドを、Th1細胞誘導能の存在に関してさらに検討する。本明細書では、「Th1細胞誘導能」という語句は、APCと接触した場合、Th1細胞を誘導する能力をAPCに付与するペプチドの能力を示す。さらに、「Th1細胞誘導能」は、Th1細胞の活性化および／またはTh1細胞の増殖を誘導する、IFN- γ 産生を含むTh1細胞媒介性サイトカイン産生を促進して他の細胞（例えばCTL、マクロファージ）を助けるおよび／または刺激する、ペプチドの能力を含む。
30

【0073】

Th1細胞誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を担持する抗原提示細胞（例えばBリンパ球、マクロファージおよび樹状細胞（DC））、好ましくはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、ペプチドで刺激した後、CD4陽性T細胞（CD4 $^{+}$ T細胞）と混合して、次にCD4 $^{+}$ T細胞によって産生され、放出されたIFN- γ を測定することによって達成できる。あるいは、ペプチドのTh1細胞誘導能は、Th1細胞によるCTL活性化に基づいて評価することができる。例えば、CD4 $^{+}$ T細胞を試験ペプチドで刺激したDCと共に培養し、次にCTLおよびCTLの標的細胞と混合する。標的細胞は、 ^{51}Cr などで放射性標識することができ、Th1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化されたCTLの細胞傷害活性を、標的細胞から放出された放射能から算出することができる。あるいは、Th1細胞誘導能は、試験ペプチドで刺激した抗原提示細胞（APC）の存在下でTh1細胞によって産生され、放出されたIFN- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻害領域を可視化することによって評価できる。
40

【0074】

上述した改変に加えて、本発明のペプチドはまた、生じる結合ペプチドがもとのペプチ

10

20

30

40

50

ドのT h 1 細胞誘導能を保持する限り、他の物質に結合することもできる。適切な物質の例には、例えばペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成ポリマー等が含まれる。本発明のペプチドは、修飾がもとのペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化等のような修飾を含み得る。これらの種類の修飾は、付加的な機能（例えば標的化機能および送達機能）を付与するまたはペプチドを安定化するために実施できる。

【0075】

例えば、ペプチドのインビオでの安定性を高めるために、D - アミノ酸、アミノ酸模倣体または非天然アミノ酸を導入することは当技術分野において公知である；この概念は本発明のペプチドにも適合させ得る。ペプチドの安定性は多くの方法で評価することができる。例えば、ペプチダーゼならびにヒト血漿および血清などの様々な生物学的媒質を用いて安定性を試験することができる（例えばVerhoeft et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 1986, 11: 291-302参照）。

10

【0076】

本発明のペプチドは、HLAクラスII抗原と組み合わせた複合体としてAPCの表面に提示され、その後T h 1 細胞を誘導し得る。それゆえ、APCの表面でHLAクラスII抗原と複合体を形成するペプチドも本発明に含まれる。本発明のペプチドを提示するAPCをワクチンとして接種することができる。

20

【0077】

上記複合体に含まれるHLA抗原の型は、治療および／または予防を必要とする対象の型とマッチしなければならない。例えば、日本人においては、HLA - DR8、HLA - DR52b、HLA - DR14、HLA - DR9、HLA - DR13、HLA - DR15、HLA - DP2およびHLA - DP5が一般的であり、それゆえ日本人患者の治療に適する。典型的には、臨床において、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を前もって検査し、これにより特定のHLAクラスII抗原への結合能力を有するペプチドの適切な選択が可能になる。好ましい態様では、本発明のペプチドはT h 1 細胞をプロミスキヤスに誘導することができる。本明細書では、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって拘束されるT h 1 細胞を誘導することができる場合、このペプチドのT h 1 細胞誘導能は「プロミスキヤス」である。言い換えると、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される場合、そのような抗原認識は「プロミスキヤス」とみなされる。ペプチドに関連して使用する場合、「少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される」という語句は、ペプチドまたはその断片が少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子に結合できることを示す。例えば、G P C 3_{9,2-116} - L P（配列番号：1）は、HLA - DR52bおよびHLA - DR9によって認識され、かつG P C 3₁₃₇₋₁₆₁ - L P（配列番号：2）は、HLA - DR52b、HLA - DP2、HLA - DR8、HLA - DR9、HLA - DR14、HLA - DR8、HLA - DR15およびHLA - DP5によって認識され、G P C 3₂₈₉₋₃₁₃ - L P（配列番号：3）は、HLA - DR9によって認識され、G P C 3₃₈₆₋₄₁₂ - L P（配列番号：4）は、HLA - DR13によって認識され、G P C 3₅₅₆₋₅₇₆ - L P（配列番号：5）は、HLA - DR13およびHLA - DR9によって認識される。それゆえ、これらのペプチドは「プロミスキヤス」なエピトープの典型的な例である。

30

【0078】

HLA - DR52bまたはHLA - DR9陽性APCを使用する場合は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。HLA - DR52b、HLA - DP2、HLA - DR8、HLA - DR9、HLA - DR14、HLA - DR8、HLA - DR15またはHLA - DP5陽性APCを使用する場合は、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。HLA - DR9陽性APCを使用する場合は、配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。HLA

40

50

- D R 1 3 陽性 A P C を使用する場合は、配列番号：4 のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。H L A - D R 1 3 または H L A - D R 9 陽性 A P C を使用する場合は、配列番号：5 のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。

【 0 0 7 9 】

したがって、好ましい態様では、配列番号：1 のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前に H L A - D R 5 2 b または H L A - D R 9 を有すると同定された対象において、T h 1 細胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号：2 のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前に H L A - D R 5 2 b 、 H L A - D P 2 、 H L A - D R 8 、 H L A - D R 9 、 H L A - D R 1 4 、 H L A - D R 8 、 H L A - D R 1 5 または H L A - D P 5 を有すると同定された対象において、T h 1 細胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号：3 のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前に H L A - D R 9 を有すると同定された対象において、T h 1 細胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号：4 のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前に H L A - D R 1 3 を有すると同定された対象において、T h 1 紵胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号：5 のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前に H L A - D R 1 3 または H L A - D R 9 を有すると同定された対象において、T h 1 細胞の誘導のために使用し得る。

10

【 0 0 8 0 】

I I I . G P C 3 ペプチドの調製

本発明のペプチドは周知の技術を用いて調製することができる。例えば、本発明のペプチドは、組換え D N A 技術または化学合成を用いて、合成によって調製することができる。本発明のペプチドは、個別にまたは2もしくはそれ以上のペプチドからなるより長いポリペプチドとして合成することができる。本発明のペプチドを、次に、他の天然の宿主細胞タンパク質およびその断片、または他の何らかの化学物質を実質的に含まないようにするために、単離する、すなわち精製することができる。

20

【 0 0 8 1 】

本発明のペプチドは、修飾がもとの参照ペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシリ化、側鎖酸化またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、D - アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の組み込みが含まれる。これらの修飾は、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために使用できる

30

【 0 0 8 2 】

本発明のペプチドは、選択したアミノ酸配列に基づく化学合成を通して得ることができる。この合成に適合させ得る従来のペプチド合成法の例には以下が含まれる：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;
- (ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
- (iii) 「ペプチド合成」(日本語)、丸善、1975 ;
- (iv) 「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語)、丸善、1985 ;
- (v) 「医薬品の開発」(日本語)、続第14巻(ペプチド合成)、広川書店、；
- (vi) 国際公開第99/67288号; および
- (vii) Barany G. & Merrifield R. B., Peptides Vol. 2, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1980, 100 - 118.

40

【 0 0 8 3 】

あるいは、本発明のペプチドは、ペプチドを作製するための任意の公知の遺伝子工学的方法を適合させて得ることができる(例えばMorrison J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62)。例えば、最初に、発現可能な形態で(例えばプロモーター配列に対応する調節配列の下流に)目的のペプチドをコードするポリヌクレオチ

50

ドを保有する適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に形質転換する。次に宿主細胞を培養して関心対象のペプチドを生産させる。本発明のペプチドはまた、インビトロ翻訳系を採用してインビトロで作製することもできる。

【0084】

I V . ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明の前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供する。これらには、天然のG P C 3 遺伝子 (Gen Bank アクセッション番号 N M _ 0 0 1 1 6 4 6 1 7 . 1 (配列番号: 8) または N M _ 0 0 4 4 8 4 . 3 (配列番号: 1 0)) に由来するポリヌクレオチド、ならびにその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書では、「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重に起因して、数多くの機能的に同一の核酸が所与のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A 、 G C C 、 G C G および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって特定されるあらゆる位置で、コドンを、コードされるペプチドを変化させることなく前述した対応するコドンのいずれかに変化させることができる。そのような核酸変異は、保存的に改変された変異の一種である、「サイレント変異」である。ペプチドをコードする本明細書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレント変異も表す。当業者は、核酸中の各々のコドン (通常メチオニンの唯一のコドンである A U G 、および通常トリプトファンの唯一のコドンである T G G を除く) を、機能的に同一の分子を生じるように改変できることを認識する。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、各々の開示される配列において暗黙のうちに表現される。

10

20

20

30

【0085】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA 、 RNA およびそれらの誘導体で構成され得る。当技術分野において周知のように、DNA は A 、 T 、 C および G などの塩基で適切に構成され、 T は、RNA では U に置き換えられる。当業者は、非天然の塩基もポリヌクレオチドに含まれ得ることを認識する。

【0086】

本発明のポリヌクレオチドは、その間に介在アミノ酸配列を含んでまたは含まずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在アミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位 (例えば酵素認識配列) を提供することができる。さらに、ポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードするコード配列に加えて任意の付加的な配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであり得るか、またはマークー遺伝子などを含む発現ベクター (プラスミド) であり得る。一般に、そのような組換えポリヌクレオチドは、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを使用する従来の組換え技術を通じたポリヌクレオチドの操作によって調製することができる。

【0087】

組換えおよび化学合成の両方の技術が、本発明のポリヌクレオチドを作製するために使用できる。例えば、ポリヌクレオチドは適切なベクターへの挿入によって作製でき、これをコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現させ得る。あるいは、PCR 技術または適切な宿主における発現を用いてポリヌクレオチドを増幅することができる (例えば Sambrook et al. , Molecular Cloning: A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory , New York , 1989 参照)。あるいは、ポリヌクレオチドは、Beaucage SL & Iyer RP , Tetrahedron 1992 , 48 : 2223 - 311 ; Matthes et al. , EMBO J 1984 , 3 : 801 - 5 に記載されているように、固相技術を用いて合成することができる。

40

40

【0088】

V . 抗原提示細胞 (APC)

50

本発明はまた、H L A クラス I I 抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞 (A P C) も提供する。本発明のペプチドと接触させることによって得られる A P C は、治療および / または予防の対象である患者に由来することができ、それだけでまたは本発明のペプチド、 T h 1 細胞または C T L を含む他の薬剤と組み合わせてワクチンとして投与することができる。

【 0 0 8 9 】

A P C は特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるためにタンパク質性抗原をその細胞表面に提示することが知られている、樹状細胞 (D C) 、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、 B 細胞および活性化 T 細胞を含む。 D C は A P C の中で最も強力な T h 1 細胞誘導活性を有する代表的な A P C であるので、 D C は本発明の A P C として有用である。

10

【 0 0 9 0 】

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、 M H C クラス I I 抗原によって媒介される T h 1 細胞応答と同様に、 M H C クラス I 抗原によって媒介される C T L 応答を誘導することもできる。一般に、 M H C クラス I 抗原によって認識されるエピトープの長さは、 M H C クラス I I 抗原のもの (15 またはそれ以上のアミノ酸残基) より短い (例えは 8 ~ 10 アミノ酸残基) ことが周知である。それゆえ、本発明のペプチドのプロセシングされた産物は C T L の誘導をもたらすであろう。実際に、 G P C 3 _{1 3 7 - 1 6 1} - L P (配列番号 : 2) は断片 (F V G E F F T D : 配列番号 : 6) を認識する C T L を誘導し、 G P C 3 _{2 8 9 - 3 1 3} - L P (配列番号 : 3) は断片 (E Y I L S L E E L : 配列番号 : 7) を認識する C T L を誘導する。したがって、本発明のペプチドは、 T h 1 細胞を誘導するだけでなく、 A P C 内でのプロセシング後に C T L も誘導することができる。言い換えると、本発明の上記ペプチドと接触した A P C は、 M H C クラス I I 抗原と共にそのようなペプチドを提示し、同時に M H C クラス I 抗原と共にそれらの断片を提示する。その結果として、 T h 1 細胞と C T L の両方が、本発明の上記のペプチドを使用することによって誘導され得る。

20

【 0 0 9 1 】

例えは、 A P C は、末梢血単核細胞から D C を誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボまたはインビボで本発明のペプチドと接触させる (刺激する) ことによって得られる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドまたはその断片を提示する A P C が対象の体内で誘導される。本明細書では、「 A P C を誘導する」という語句は、 A P C を本発明のペプチドと接触させて (で刺激して) 、 H L A クラス I I 抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体を A P C の表面に提示させることを含む。あるいは、本発明のペプチドを A P C に導入して、本発明のペプチドまたはその断片を A P C に提示させた後、 A P C をワクチンとして対象に投与することができる。例えは、エクスピボ投与は：

30

(a) 第 1 の対象から A P C を回収する段階、

(b) 段階 (a) の A P C を本発明のペプチドと接触させる段階、および

(c) ペプチドをロードした段階 (b) の A P C を第 2 の対象に投与する段階を含みうる。

40

【 0 0 9 2 】

第 1 の対象と第 2 の対象は同じ個体であってもよく、または異なる個体でもよい。あるいは、本発明によれば、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、前記方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。段階 (b) によって得た A P C をワクチンとして対象に投与することができる。

【 0 0 9 3 】

本発明の 1 つの側面として、本発明の A P C は高レベルの T h 1 細胞誘導能を有する。

50

本明細書では、「高レベルの Th 1 細胞誘導能」という語句において、高レベルとは、ペプチドと接触していない APC、または Th 1 細胞を誘導することができないペプチドと接触した APC による Th 1 細胞誘導能のレベルと比較したものである。本明細書では、APC に関連して使用する場合、「Th 1 細胞誘導能」という語句は、CD 4⁺ T 細胞と接触した場合に Th 1 細胞を誘導する APC の能力を示す。高レベルの Th 1 紵胞誘導能を有するそのような APC は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをインビトロで APC に移入する段階を含む方法によって調製することができる。導入する遺伝子は DNA または RNA の形態であり得る。導入のための方法の例には、特に限定されることはなく、この分野で従来実施されている様々な方法が含まれ、例えばリポフェクション、エレクトロボレーションおよびリン酸カルシウム法などが使用できる。より詳細には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第 2000-509281 号に記載されているように実施することができる。遺伝子を APC に移入することにより、遺伝子は細胞内で転写、翻訳などを受け、その後得られたタンパク質は MHC クラス I またはクラス II によってプロセシングされて、提示経路を通してペプチドの提示へと進む。あるいは、本発明の APC は、APC を本発明のペプチドと接触させる段階を誘導する方法によって調製することができる。

10

【0094】

好ましい態様では、本発明の APC は、HLA - DR 52b および HLA - DR 9 から選択される MHC クラス II 分子と本発明のペプチド（配列番号：1 のアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示する APC であり得る。別の態様において、本発明の APC は、HLA - DR 52b、HLA - DP 2、HLA - DR 8、HLA - DR 9、HLA - DR 14、HLA - DR 8、HLA - DR 15 および HLA - DP 5 の中から選択される MHC クラス II 分子と本発明のペプチド（配列番号：2 のアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示する APC であり得る。別の態様において、本発明の APC は、HLA - DR 9 の MHC クラス II 分子と本発明のペプチド（配列番号：3 のアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示する APC であり得る。別の態様において、本発明の APC は、HLA - DR 13 の MHC クラス II 分子と本発明のペプチド（配列番号：4 のアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示する APC であり得る。別の態様において、本発明の APC は、HLA - DR 13 および HLA - DR 9 の中から選択される MHC クラス II 分子と本発明のペプチド（配列番号：5 のアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示する APC であり得る。好ましくは、HLA - DR 8、HLA - DR 52b、HLA - DR 9、HLA - DR 13、HLA - DR 14、HLA - DR 15、HLA - DP 2 および HLA - DP 5 は、それぞれ HLA - DRB1*08:03、HLA - DRB3*02:02、HLA - DR1*09:01、HLA - DR1*13:02、HLA - DR1*14:05、HLA - DR1*15:02、HLA - DPB1*02:01 および HLA - DPB1*05:01 であり得る。

20

【0095】

VII. Thヘルパー-1型細胞 (Th 1 細胞)

本発明のペプチドのいずれかに対して誘導される Th 1 細胞は、インビボでがん細胞を標的とする CTL を含むエフェクター細胞のいずれかの免疫応答を強化し、したがってペプチド自体と同様の方法で、ワクチンとして役立つ。そこで、本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかによって特異的に誘導されるまたは活性化される単離された Th 1 細胞も提供する。

30

【0096】

そのような Th 1 細胞は、（1）1つまたは複数の本発明のペプチドを対象に投与し、対象から Th 1 細胞を回収すること、（2）APC および CD 4⁺ T 細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ（で刺激し）、その後 Th 1 細胞を単離すること、（3）CD 4⁺ T 細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明の APC と接触させること、または（4）両方の T 細胞受容体（TCR）サブユニットを

40

50

コードするポリヌクレオチドもしくはT C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをC D 4⁺ T 細胞に導入すること (T C R はM H C クラスI I 分子と本発明のペプチドの複合体に結合することができる) 、によって得ることができる。 (3) の方法のためのそのようなA P C は上述した方法によって調製することができる。 (4) の方法の詳細は、以下の「V I I . T 細胞受容体 (T C R) 」の章で述べる。

【 0 0 9 7 】

本発明のA P C での刺激によって誘導されたT h 1 細胞は、治療および / または予防の対象である患者に由来してもよく、作用を調節するために単独でまたは本発明のペプチドを含む他の薬剤と組み合わせて投与することができる。得られたT h 1 細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞 (例えばC T L 、マクロファージ) を活性化するおよび / または刺激することができる。本発明のT h 1 細胞によって活性化され得るそのような免疫細胞には、がん細胞などの標的細胞に対して細胞傷害性を示すC T L が含まれる。例えば、そのようなC T L の標的細胞は、内因性にG P C 3 を発現する細胞 (例えばがん細胞) 、またはG P C 3 遺伝子をトランスフェクトされた細胞であり得る。好ましい態様では、本発明のペプチドは、C T L エピトープペプチドの少なくとも1 つのアミノ酸配列を含むことができ、T h 1 細胞に加えて、がん細胞などのG P C 3 発現細胞に対するC T L も誘導することができる。この場合、本発明のペプチドは、T h 1 細胞およびC T L をインビボで同時にまたは連続的に誘導することができ、誘導されたT h 1 細胞は、誘導されたC T L を有効に活性化することができる。したがって、C T L エピトープペプチドの少なくとも1 つのアミノ酸配列を含むそのようなペプチドは、がん免疫療法のための適切なペプチドである。

10

20

20

【 0 0 9 8 】

さらに、本発明のT h 1 細胞は、他の標的細胞に対するいずれのC T L も抗原非依存的に活性化するおよび / または刺激する様々なサイトカイン (例えばI F N -) を分泌する。したがって、本発明のT h 1 細胞は、G P C 3 以外の腫瘍関連抗原 (T A A) を発現する細胞を標的とするC T L 活性を増強することにも寄与し得る。したがって、本発明のT h 1 細胞は、本発明のペプチドおよびA P C と同様に、G P C 3 を発現する腫瘍だけでなく、他のT A A を発現する腫瘍のための免疫療法にも有用である。

【 0 0 9 9 】

いくつかの態様において、本発明のT h 1 細胞は、H L A - D R またはH L A - D P 抗原と本発明のペプチドの複合体を提示する細胞を認識するT h 1 細胞である。T h 1 細胞に関連して、「細胞を認識する」という語句は、そのT C R を介して細胞表面のM H C クラスI I 分子と本発明のペプチドの複合体の結合し、抗原特異的に活性化されることを指す。本明細書では、「抗原特異的に活性化される」という語句は、特定のM H C クラスI I 分子とペプチドに応答して活性化されることを指し、活性化されたT h 1 細胞からのサイトカイン産生が誘導される。好ましい態様では、H L A - D R およびH L A - D P は、H L A - D R 8 、H L A - D R 5 2 b 、H L A - D R 1 4 、H L A - D R 9 、H L A - D R 1 3 、H L A - D R 1 5 、H L A - D P 2 およびH L A - D P 5 からなる群より選択され得る。

30

【 0 1 0 0 】

40

V I I . T 細胞受容体 (T C R)

本発明はまた、T 細胞受容体 (T C R) のサブユニットを形成することができる1 つまたは複数のポリペプチドをコードする1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する組成物、およびこれを使用する方法を提供する。そのようなT C R サブユニットは、G P C 3 ペプチドを提示するA P C に対するC D 4⁺ T 細胞にG P C 3 に対する特異性を付与するT C R を形成する能力を有する。当技術分野において公知の方法を用いることにより、本発明のペプチドによって誘導されるT h 1 細胞のT C R サブユニットとして 鎖および鎖の核酸を同定することができる (国際公開第2 0 0 7 / 0 3 2 2 5 5 号およびM o r g a n e t a l . , J Immunol , 1 7 1 , 3 2 8 8 (2 0 0 3)) 。誘導体T C R は、G P C 3 ペプチドを提示するA P C に高い結合力で結合することができ、場合に

50

より効率的なサイトカインを媒介することができる。

【0101】

TCRサブユニットをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド（すなわち両方のTCRサブユニットをコードする単一ポリヌクレオチドまたは各々が別々のTCRサブユニットをコードする複数のポリヌクレオチド）を適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは当技術分野において周知である。ポリヌクレオチドまたはそれらを含むベクターは、CD4⁺T細胞、例えば患者由来のCD4⁺T細胞に有用に移入することができる。好都合には、本発明は、患者自身のT細胞（または別の哺乳動物のT細胞）の速やかな改変を可能にし、優れたがん細胞死滅特性を有する改変されたT細胞を迅速かつ容易に生産する、すぐに入手可能な組成物を提供する。

10

【0102】

本発明はさらに、両方のTCRサブユニットをコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドでの形質導入によって調製されるTh1細胞を提供し、ここで、TCRサブユニットはGPC3ペプチド（例えばHLA-DR52bもしくはHLA-DR9に関しては配列番号：1、HLA-DR52b、HLA-DR2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15もしくはHLA-DP5に関しては配列番号：2、HLA-DR9に関しては配列番号：3、HLA-DR13に関しては配列番号：4およびHLA-DR13もしくはHLA-DR9に関しては配列番号：5）に結合することができる。形質導入されたTh1細胞は、インビオでがん細胞にホーミングすることができ、インビトロで周知の培養方法によって増殖させることができる（例えばKawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)）。上述したように調製したTh1細胞は、治療または予防を必要とする患者においてがんを治療するまたは予防する上で有用な免疫原性組成物を形成するために使用できる。

20

【0103】

VII. 薬剤または医薬組成物

本発明の方法および組成物ががんの「治療」に関連して有用性を有する限り、治療が臨床上の利益、例えばGPC3遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、広がりあるいは転移能の低減を導く場合、治療は「有効」とみなされる。治療が予防的に適用される場合、「有効」は、がんの形成を遅延させるもしくは予防するまたはがんの臨床症状を予防するもしくは軽減することを意味する。有効性は、特定の腫瘍型を診断するまたは治療するための任意の公知の方法に関連して決定される。

30

本発明の方法および組成物ががんの「予防」（preventionおよびprophylaxis）に関連して有用性を有する限り、そのような用語は、本明細書では、疾患による死亡率または罹患率の負荷を低減させる任意の行為を指すために互換的に使用される。予防（preventionおよびprophylaxis）は、「一次、二次および三次予防レベルで」行われ得る。一次予防（preventionおよびprophylaxis）は疾患の発生を回避し、一方二次および三次レベルの予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患の進行および症状の出現の予防（preventionおよびprophylaxis）、ならびに機能を回復させ、疾患に関連する合併症を減少させることによって既存の疾患の負の影響を低減することを目指す活動を包含する。あるいは、予防（preventionおよびprophylaxis）は、特定の障害の重症度を軽減すること、例えば腫瘍の増殖および転移を低減すること、血管新生を減少させることを目指す広範囲の予防的治療を含む。

40

【0104】

本発明に関連して、がんの治療および／もしくは予防、ならびに／またはその術後再発の防止は、以下の段階、例えばがん細胞の外科的除去、がん性細胞の成長の阻害、腫瘍の退縮または後退、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退行、ならびに転移の低減または阻害などの段階のいずれかを含む。がんの有効な治療および／または予防は、がんを

50

有する個体の死亡率を低下させ、予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、がんに伴う検出可能な症状を軽減する。例えば、有効な治療および/または予防を構成する症状の低減または改善は、10%、20%、30%もしくはそれ以上の低減または安定な疾患を含む。

【0105】

上述したように、本発明のペプチドによって誘導されるT h 1 細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞を助けることができる。T h 1 細胞によって分泌されるサイトカインは抗原非依存的にC T Lに影響を及ぼし得るので、そのような免疫細胞には、G P C 3 を発現するがん細胞に対するC T Lだけでなく、他のT A A を発現するがん細胞に対するC T Lも含まれる。したがって、本発明は、少なくとも1つの本発明のペプチドを含有する薬剤または医薬組成物を提供する。薬剤または医薬組成物において、そのようなペプチドは治療的または医薬的に有効な量で存在する。

10

【0106】

本発明の薬剤または組成物によって誘導されるT h 1 細胞は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞に影響を及ぼすサイトカインを分泌することができるので、本発明の薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞（例えばC T L、マクロファージ）を助ける、刺激するおよび/または増強するために有用である。それゆえ、本発明の薬剤または組成物は、C T Lを含むそのような免疫細胞によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するあらゆる目的に有用である。例えば、本発明の薬剤または組成物は、そのような免疫細胞によって媒介されるがんまたは腫瘍に対する免疫応答を増強するまたは促進することができるので、本発明は、がんの治療および/または予防における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物を提供する。そのような薬剤または組成物中のペプチドの量は、G P C 3 を発現するがんを担持する対象において免疫応答を有意に増強するまたは刺激するのに有効な量であり得る。

20

【0107】

本発明はまた、H L A - A 2 およびH L A - A 2 4 などのM H C クラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物も提供する。別の態様では、本発明はさらに、M H C クラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物を製造するための本発明のペプチドの使用を提供する。

30

【0108】

好ましい態様において、本発明の過程で同定されたG P C 3 由来ペプチドは、T h 1 細胞ならびにG P C 3 発現細胞に対するC T Lを誘導することができる。したがって、本発明はまた、G P C 3 を発現するがんまたは腫瘍に対するC T Lの誘導における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物も提供する。

【0109】

さらに、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物は、M H C クラスI I 分子によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するのに使用することができる。

【0110】

G P C 3 の発現は、正常組織と比較して、H C C およびメラノーマを含むいくつかのがん型において特異的に上昇する（国際公開第2004/031413号、国際公開第2007/013665号、国際公開第2007/013671号、Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8 および本発明者らのマイクロアレイデータ（データは示さず））、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の防止のために使用することができる。したがって、本発明は、本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの1つまたは複数を有効成分として含有する、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の防止のための薬剤または医薬組成物を提供する。あるいは、本発明のペ

40

50

ペプチドを、薬剤または医薬組成物としての使用のために、A P Cなどの前記細胞のいずれかの表面で発現させることができる。加えて、前記T h 1細胞も、本発明の薬剤または医薬組成物の有効成分として使用することができる。

【0111】

別の態様では、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤の製造における：

- (a) 本発明のペプチド、
- (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
- (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P C、および
- (d) 本発明のT h 1細胞

の中から選択される有効成分の使用を提供する。

【0112】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するのに使用するための、
(a) 本発明のペプチド、
(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P C、および
(d) 本発明のT h 1細胞

の中から選択される有効成分を提供する。

【0113】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、有効成分として、

- (a) 本発明のペプチド、
- (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
- (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P C、および
- (d) 本発明のT h 1細胞

の中から選択される有効成分と医薬的または生理学的に許容される担体を製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

【0114】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、

- (a) 本発明のペプチド、
- (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
- (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P C、および
- (d) 本発明のT h 1細胞

の中から選択される有効成分を医薬的または生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程も提供する。

【0115】

あるいは、本発明の医薬組成物または薬剤は、がんまたは腫瘍の予防およびその術後再発の防止のいずれかまたは両方のために使用し得る。

【0116】

本発明の薬剤または医薬組成物はワクチンとして使用される。本発明に関連して、「ワクチン」(免疫原性組成物とも称される)という語句は、動物に接種した場合抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する組成物を指す。

【0117】

本発明の薬剤または医薬組成物は、対象または患者においてがんもしくは腫瘍を治療するおよび／もしくは予防する、ならびに／またはその術後再発もしくは転移性再発を防止

10

20

30

40

50

するために使用できる。そのような対象の例には、ヒトならびに、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒヒおよびチンパンジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含むがこれらに限定されない他の哺乳動物が含まれる。

【0118】

本発明の過程で、配列番号：1から5の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、いくつかのHLA-DRおよび/またはHLA-DP分子（例えばHLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2およびHLA-DP5）によって拘束されるプロミスキヤスなTh1細胞エピトープであることが見出され、これらは、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答に起因する、がんに対する強力で特異的な免疫応答を誘導することができる候補であり得る。それゆえ、配列番号：1から5のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含む本発明の薬剤または医薬組成物は、MHCクラスII分子としてHLA-DR8、HLA-DR52b、HLA-DR14、HLA-DR9、HLA-DR13、HLA-DR15、HLA-DP2およびHLA-DP5の中から選択される少なくとも1つを有する対象への投与に特に適する。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む薬剤または医薬組成物にも当てはまる。

10

【0119】

あるいは、好ましい態様では、本発明の過程で同定されたペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24を有する対象に適用された場合、GPC3に特異的なCTLを誘導することもできる。たがって、本発明のペプチドの投与を通して、Th1細胞の誘導に加えてGPC3を発現するがんに対するCTL応答が誘導され得ることがさらに期待される。さらに、本発明のペプチドは、GPC3発現細胞に対するCTL応答を、そのプロセシングを介して誘導することができるだけでなく、それによって媒介されるTh1細胞誘導により、CTL応答を増強することもできる。したがって、同じ対象においてTh1細胞およびGPC3特異的CTLの両方の誘導を達成するために、例えば、治療される対象は、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを投与する場合は、好ましくはMHCクラスII分子としてHLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14、HLA-DR8、HLA-DR15およびHLA-DP5を有し、およびMHCクラスI分子としてHLA-A2を有する。したがって、同じ対象においてTh1細胞およびGPC3特異的CTLの両方の誘導を達成するために、例えば、治療される対象は、配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドを投与する場合は、好ましくはMHCクラスII分子としてHLA-DR9を有し、およびMHCクラスI分子としてHLA-A24を有する。

20

30

【0120】

本発明において、本発明のペプチドが、MHCクラスII抗原によって媒介される免疫応答を促進すること、具体的には、以下に示すような組み合わせにおけるHLA型拘束様式で促進することが確認された：

GPC3-LP1 : HLA-DR52bおよびHLA-DR9

GPC3-LP2 : HLA-DR52b、HLA-DP2、HLA-DR8、HLA-DR9/14およびHLA-DR8/15

40

GPC3-LP3 : HLA-DR9

GPC3-LP4 : HLA-DR13およびHLA-DR51

GPC3-LP5 : HLA-DR13およびHLA-DR9

【0121】

したがって、GPC3-LP1、-LP2、-LP3、-LP4および-LP5ならびに配列番号1から5のアミノ酸配列のいずれか1つを含むペプチドは、上記組み合わせに示される、それらに一致するHLAサブタイプから選択される、少なくとも1つのHLAアリルを有する患者において、GPC3を発現するがんの治療に有用である。あるいは、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんの治療のための医薬組成物を提供し、そ

50

の組成物は本発明のペプチドからなる群から選択されるペプチドのいずれか1つを含み、患者は、上記組み合わせで示される、当該ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する。

【0122】

さらに、本発明はまた、上記の組み合わせに示される、ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する患者においてGPC3を発現するがんの治療用組成物の製造のための、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドの使用を提供する。さらに、いくつかの態様において、本発明は、上記の組み合わせに示される、ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する患者においてGPC3を発現するがんの治療において使用するために、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドを提供する。さらなる態様において、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんを治療するための方法を提供し、その方法は、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドを、上記の組み合わせにある、当該ペプチドのHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する患者に投与する段階を含む。

10

【0123】

加えて、いくつかの態様において、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんを治療するための医薬組成物の製造または製剤化のための方法を提供し、その組成物は本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドのいずれか1つを含み、患者は、上記の組み合わせで示される、当該ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する。本発明の方法は、例えば、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドのいずれか1つおよび医薬的に許容される担体を混合するまたは製剤化するための段階を含み得る。

20

【0124】

前述の通り、Th1細胞は、腫瘍を有する宿主における有効な腫瘍免疫の誘導のために重要であることは周知である。本発明のペプチドは、HLA拘束性様式でTh1細胞誘導能を有しており、本発明のそれぞれのペプチドの特異的HLA拘束パターンは上記に示している。したがって、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんに対するTh1細胞応答を促進するまたは増強する組成物を提供し、その組成物は、本発明のペプチドからなる群から選択されるペプチドのいずれか1つを含み、患者は、上記に示される、当該ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する。

30

【0125】

さらに、本発明はまた、患者においてGPC3を発現するがんに対するTh1細胞応答を促進するまたは増強するための組成物を製造するための、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドの使用を提供し、その患者は、上記組み合わせに示される、当該ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する。さらに、いくつかの態様において、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんに対するTh1細胞応答を促進するまたは増強することにおける使用のための、本発明のペプチドからなる群より選択されたペプチドを提供し、その患者は、上記組み合わせに示される、当該ペプチドに対応するHLAサブタイプから選択された少なくとも1つのHLAアリルを有する。さらなる態様において、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんに対するTh1細胞応答を促進するまたは増強するための方法を提供し、その方法は、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドを、上記の組み合わせにある、当該ペプチドのHLAサブタイプから選択される少なくとも1つのHLAアリルを有する患者に投与する段階を含む。

40

【0126】

加えて、いくつかの態様において、本発明は、患者においてGPC3を発現するがんに対するTh1細胞応答を促進するまたは増強するための医薬組成物を製造するまたは製剤化するための方法を提供し、その組成物は、本発明のペプチドからなる群より選択される

50

ペプチドのいずれか1つを含み、患者は、上記組み合わせに示される、当該ペプチドに対応するH L Aサブタイプから選択される少なくとも1つのH L Aアリルを有する。本発明の方法は、例えば、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドのいずれか1つおよび医薬的に許容される担体を混合するまたは製剤化するための段階を含みうる。

【0127】

別の態様では、本発明は、T h 1細胞誘導に依存するがん免疫療法を提供する。本発明によって提供される治療戦略は、T h 1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化される免疫細胞が目的のがん細胞を標的とする限り、G P C 3発現とは無関係に任意のがんに適用でき、有効である。

【0128】

本発明の薬剤または医薬組成物によって治療されるべきがんまたは腫瘍には、例えばH C Cおよびメラノーマが含まれるがこれらに限定されないG P C 3を発現する任意の種類のがんまたは腫瘍が含まれる。

【0129】

本発明の薬剤または医薬組成物は、前記有効成分に加えて、T h 1細胞またはC T Lを誘導する能力を有する他のペプチド、前記他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、前記他のペプチドまたはその断片を提示する他の細胞等を含有し得る。T h 1細胞またはC T Lを誘導する能力を有するそのような「他の」ペプチドの例には、がん特異抗原（例えば同定されたT A A）に由来するペプチドが含まれるが、これに限定されない。

【0130】

必要に応じて、本発明の薬剤または医薬組成物は、有効成分、例えば本発明のペプチドのいずれかの抗腫瘍作用を他の治療物質が阻害しない限り、場合により他の治療物質を附加的な有効成分として含んでもよい。例えば、製剤は、抗炎症薬、鎮痛剤、化学療法剤等を含み得る。医薬自体に他の治療物質を含めることに加えて、本発明の医薬を1つまたは複数の他の薬理的剤と連続的にまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理的剤の量は、例えば、使用される薬理的剤の種類、治療される疾患、および投与のスケジュールおよび投与経路に依存する。

【0131】

当業者は、本明細書で特に言及する成分に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物が、対象となる製剤の種類を考慮して当技術分野において慣例的な他の剤（例えば增量剤、結合剤、希釈剤、賦形剤等）も含み得ることを認識する。

【0132】

本発明の1つの態様では、本発明の薬剤または医薬組成物を、治療する疾患、例えばがんの病的状態を治療するために有用な材料を含む製品およびキットに含めることができる。前記製品は、ラベルを付した本発明の薬剤または医薬組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器上のラベルは、剤が疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防に使用されることが示されるべきである。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

【0133】

上述した容器に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物を含むキットは、場合により医薬的に許容される希釈剤を収容する第二の容器をさらに含んでもよい。第二の容器は、使用のための指示書と共に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0134】

薬剤または医薬組成物は、所望する場合は、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置中に包装することができる。パックは、例えば、ブリスター・パックなどの金属またはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与のための指示書が添付され得る。

【0135】

10

20

30

40

50

(1) ペプチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明のペプチドは、薬剤もしくは医薬組成物として直接投与することができるか、または必要な場合は、従来の製剤方法によって製剤化される。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬剤に通常使用される担体、賦形剤などが、特に制限されることなく適宜含まれ得る。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれるが、これらに限定されない。さらに、薬剤または医薬組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、防腐剤、界面活性剤などを含有し得る。本発明の薬剤または医薬組成物は抗がん目的に用いることができる。

【0136】

本発明のペプチドは、インビボで Th1 細胞を誘導する本発明のペプチドの 2 つまたはそれ以上で構成される、組合せとして調製することができる。ペプチドの組合せはカクテルの形態をとってもよく、または標準的な技術を用いて互いに複合化し得る。例えば、ペプチドを化学的に連結するかまたは単一融合ポリペプチド配列として発現させることができる。組合せ中のペプチドは、同じであってもよくまたは異なっていてもよい。

【0137】

本発明のペプチドを投与することにより、ペプチドまたはその断片が APC 上の HLA クラス II 抗原によって高密度で提示され、次に提示されたペプチドと HLA クラス II 抗原との間で形成された複合体に対して特異的に反応する Th1 細胞が誘導される。あるいは、対象から APC (例えは DC) を取り出し、次に本発明のペプチドによって刺激して、本発明のペプチドまたはその断片のいずれかを自らの表面に提示する APC を得る。これらの APC を対象に再投与して、対象において Th1 細胞を誘導することができ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

【0138】

本発明のペプチドを有効成分として含む、がんまたは腫瘍の治療および / または予防のための薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫を有効に樹立することが公知のアジュバントも含み得る。あるいは、薬剤または医薬組成物は、他の有効成分と共に投与することができ、または顆粒に製剤化することによって投与できる。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に (または連続的に) 投与した場合、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。本明細書で企図されるアジュバントには、文献 (Clin Microbiol Rev 1994, 7 : 277 - 89) に記載されているものが含まれる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミヨウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、不完全フロイントアジュバント (IFA) 、完全フロイントアジュバント (CFA) 、 ISCOMatrix 、 GM-CSF 、 CpG 、水中油型エマルション等が含まれるが、これらに限定されない。

【0139】

さらに、リポソーム製剤、ペプチドが直径数マイクロメートルのビーズに結合している顆粒製剤、および脂質がペプチドに結合している製剤を好都合に使用し得る。

【0140】

本発明の別の態様では、本発明のペプチドはまた、医薬的に許容される塩の形態で投与し得る。好ましい塩の例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸 (例えは酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸等) との塩、および無機酸 (例えは塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等) との塩が含まれる。本明細書で使用する場合、「医薬的に許容される塩」という語句は、化合物の生物学的有効性および特性を保持し、無機酸または無機塩基、例えは塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、サリチル酸等との反応によって得られる塩を指す。

【0141】

いくつかの態様において、本発明の薬剤または医薬組成物は、 Th1 細胞および場合により CTL をプライミングする成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してイ

10

20

30

40

50

ンビボで T_{h1} 細胞および場合により CTL をプライミングすることができる剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリシン残基の - アミノ基および - アミノ基に結合し、次に本発明のペプチドに連結することができる。その後、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子中で直接投与する、リポソーム中に組み込む、またはアジュバント中に乳化することができる。 T_{h1} 細胞および場合により CTL 応答の脂質プライミングの別の例として、トリパルミトイル - S - グリセリルシスティニルセリル - セリン (P3CSS) などの大腸菌 (E. coli) リポタンパク質が、適切なペプチドに共有結合した場合、 T_{h1} 細胞および場合により CTL をプライミングするために使用できる (例えば Derez et al., Nature 1989, 342: 561-4 参照)。

10

【0142】

適切な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹腔内および静脈内注射など、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与 (すなわち直接注入) が含まれるが、これらに限定されない。投与は、単回投与によって実施でき、または反復投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量のペプチドを、GPC3 を発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、 T_{h1} 細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および / または GPC3 を発現するがんもしくは腫瘍に対する CTL を誘導するのに十分な量の本発明のペプチドを、GPC3 を発現するがんを担持する対象に投与することができる。本発明のペプチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は 0.001 mg ~ 1000 mg、例えば 0.01 mg ~ 100 mg、例えば 0.1 mg ~ 10 mg、例えば 0.5 mg ~ 5 mg であり、数日から数ヶ月に 1 回投与することができる。当業者は、適切で最適な用量を容易に決定することができる。

20

【0143】

(2) ポリヌクレオチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明の薬剤または医薬組成物はまた、本明細書で開示するペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチドを含有し得る。本明細書では、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞内に導入された場合、抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてインビボで発現されることを意味する。例示的な態様では、関心対象のポリヌクレオチドの核酸配列は、ポリヌクレオチドの発現に必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムへの安定な組み込みを達成するのに必要なものを備え得る (相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えば Thomas KR & Capocchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 参照)。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 米国特許第 5,580,859 号; 同第 5,589,466 号; 同第 5,804,566 号; 同第 5,739,118 号; 同第 5,736,524 号; 同第 5,679,647 号; および国際公開第 98/04720 号参照。DNA に基づく送達技術の例には、「裸の DNA」、促進 (ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性) 送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性 (「遺伝子銃」) または圧力媒介性送達が含まれる (例えば米国特許第 5,922,687 号参照)。

30

【0144】

本発明のペプチドは、ウイルスベクターまたは細菌ベクターによっても発現され得る。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。このアプローチは、例えば本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するベクターとしての、ワクシニアウイルスの使用を含む。宿主への導入後、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を惹起する。免疫プロトコルに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第 4,722,848 号に記載されている。別のベクターは BCG (カルメット・ゲラン桿菌) である。BCG ベクターは、Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60 に記載されている。治療的投与または免疫のために有用である多種多様な

40

50

他のベクター、例えばアデノウイルスベクターおよびアデノ隨伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌 (*Salmonella typhi*) ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えば Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85 参照。

【0145】

対象へのポリヌクレオチドの送達は、直接的であってもよく、この場合対象はポリヌクレオチドを担持するベクターに直接暴露され、または間接的であってもよく、この場合は最初にインビトロで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次に細胞を対象に移植する。これら2つのアプローチは、それぞれインビボおよびエクスビボ遺伝子治療として公知である。

【0146】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215 参照)。本発明にも使用できる、組換えDNA技術の分野で一般に公知の方法は、eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; および Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990 に記載されている。

【0147】

ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与は、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内および/または腹腔内注射などによって実施してよく、全身投与もしくは標的部位の近傍への局所投与も使用される。投与は、単回投与によって実施でき、または複数回投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量の本発明のポリヌクレオチドを、GPC3を発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはGPC3を発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のポリヌクレオチドを、GPC3を発現するがんを担持する対象に投与することができる。適切な担体または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mg であり、数日ごとに1回から数ヶ月ごとに1回投与することができる。当業者は、適切で最適な投与量を容易に決定することができる。

【0148】

I X . ペプチド、APC または Th1 細胞を使用する方法

本発明のペプチドおよびそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のAPCおよびTh1細胞を誘導するために使用できる。本発明のAPCはまた、本発明のTh1細胞を誘導するためにも使用できる。ペプチド、ポリヌクレオチドおよびAPCは、任意の他の化合物がこれらのTh1細胞誘導能を阻害しない限り、任意の他の化合物と組み合わせて使用することができる。したがって、本発明の前記薬剤または医薬組成物のいずれかを、Th1細胞を誘導するために使用でき、それに加えて、ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものも、以下で論じるようにAPCを誘導するために使用できる。

10

20

30

40

50

【0149】

(1) 抗原提示細胞 (A P C) を誘導する方法 :

本発明は、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して A P C を誘導する方法を提供する。A P C の誘導は、「V. 抗原提示細胞」の章で上述したように実施することができる。本発明はまた、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するための方法も提供し、前記 A P C の誘導は、「V. 抗原提示細胞」、前出の項目でも言及されている。

【0150】

あるいは、本発明は、T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 (A P C) を調製するための方法であって、以下の段階 :

(a) A P C を本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階 ; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階の 1 つを含み得る方法を提供する。

あるいは、本発明は、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するための方法であって、

(a) A P C を本発明のペプチドと接触させる段階 ; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階からなる群より選択される段階を含む方法を提供する。

【0151】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。好ましい態様では、T h 1 細胞誘導能を有する A P C の誘導のために使用する A P C は、好ましくは M H C クラス I I 分子として H L A - D R 8 、 H L A - D R 5 2 b 、 H L A - D R 1 4 、 H L A - D R 9 、 H L A - D R 1 3 、 H L A - D R 1 5 、 H L A - D P 2 および H L A - D P 5 の中から選択される少なくとも 1 つを発現する A P C であり得る。そのような A P C は、M H C クラス I I 分子として H L A - D R 8 、 H L A - D R 5 2 b 、 H L A - D R 1 4 、 H L A - D R 9 、 H L A - D R 1 3 、 H L A - D R 1 5 、 H L A - D P 2 および H L A - D P 5 の中から選択される少なくとも 1 つを有する対象から得た末梢血単核細胞 (P B M C) から、当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導される A P C は、本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原 (例えば H L A - D R 8 、 H L A - D R 5 2 b 、 H L A - D R 1 4 、 H L A - D R 9 、 H L A - D R 1 3 、 H L A - D R 1 5 、 H L A - D P 2 および H L A - D P 5) の複合体を自らの表面に提示する A P C であり得る。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために、本発明の方法によって誘導された A P C を対象に投与する場合、対象は、好ましくは A P C が由来するのと同じ対象である。しかし、対象が A P C ドナーと同じ H L A 型を有する限り、対象は A P C ドナーとは異なる対象であってもよい。

【0152】

別の態様では、本発明は、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するのに使用するための剤または組成物を提供し、そのような剤または組成物は、本発明の 1 つまたは複数のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

【0153】

別の態様では、本発明は、A P C を誘導するために製剤化される剤または組成物の製造における、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。

【0154】

あるいは、本発明はさらに、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するのに使用するための本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリペプチドを提供する。

【0155】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、T h 1 応答を誘導するだけでなく、A P C に

10

20

30

40

50

おいてプロセシングされた後に C T L 応答も誘導する。したがって、好ましい態様では、本発明の方法によって調製される A P C は、がん細胞を含む、G P C 3 発現細胞に対する C T L を誘導するためにも有用であり得る。例えば、配列番号：6 のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、H L A - A 2 を発現する A P C が G P C 3 特異的 C T L を誘導するのに適する。あるいは、配列番号：7 のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、H L A - A 2 4 を発現する A P C が G P C 3 特異的 C T L を誘導するのに適する。

【 0 1 5 6 】

(2) T h 1 細胞を誘導する方法 :

さらに、本発明は、本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは本発明のペプチドもしくはその断片を提示する A P C を用いて T h 1 細胞を誘導するための方法を提供する。本発明はまた、本発明のペプチドと H L A クラス I I 抗原の複合体を認識する T 細胞受容体 (T C R) サブユニットを形成することができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して T h 1 細胞を誘導するための方法も提供する。好ましくは、T h 1 細胞を誘導するための方法は：

(a) C D 4 陽性 T 細胞を、H L A クラス I I 抗原と本発明のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞と接触させる段階、および

(b) T C R が本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原の複合体を認識するまたは複合体に結合することができる、両方の T C R サブユニットをコードするポリヌクレオチドまたは T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階

からなる群より選択される少なくとも 1 つの段階を含む。

【 0 1 5 7 】

本発明のペプチドを対象に投与した場合、対象の体内で T h 1 細胞が誘導され、M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答（例えばがん細胞を標的とする免疫応答）が増強される。あるいは、本発明のペプチドおよび本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをエクスピボ治療法に使用することができ、この治療法では、対象由来の A P C および C D 4 陽性細胞、または末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ（本発明のペプチドで刺激し）、T h 1 細胞を誘導した後、活性化した T h 1 細胞を対象に戻す。例えば、前記方法は：

(a) 対象から A P C を回収する段階；

(b) 段階 (a) の A P C を本発明のペプチドと接触させる段階；

(c) 段階 (b) の A P C を C D 4 ⁺ T 細胞と混合し、T h 1 細胞を誘導するために共培養する段階；および

(d) 段階 (c) の共培養物から C D 4 ⁺ T 細胞を回収する段階。

を含み得る。

さらに、T h 1 細胞は、T C R が本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原の複合体に結合することができる、両方の T C R サブユニットをコードするポリヌクレオチドまたは T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入することによって誘導できる。そのような形質導入は、「V I I . T 細胞受容体 (T C R)」の章で上述したように実施することができる。

【 0 1 5 8 】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。T h 1 細胞の誘導のために使用する C D 4 陽性 T 細胞は、対象から得た P B M C から当技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様では、C D 4 陽性 T 細胞のドナーは、M H C クラス I I 分子として H L A - D R 8 、 H L A - D R 5 2 b 、 H L A - D R 1 4 、 H L A - D R 9 、 H L A - D R 1 3 、 H L A - D R 1 5 、 H L A - D P 2 および H L A - D P 5 の中から選択される少なくとも 1 つを有する対象であり得る。本発明の方法によって誘導される T h 1 紵胞は、本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗

10

20

30

40

50

原の複合体を自らの表面に提示する A P C を認識することができる T h 1 細胞であり得る。対象においてがんに対する免疫応答（または M H C クラス I 分子によって媒介される免疫応答）を誘導するために、本発明の方法によって誘導された T h 1 細胞を対象に投与する場合、対象は、好ましくは C D 4 陽性 T 細胞が由来するのと同じ対象である。しかし、対象が C D 4 陽性 T 細胞ドナーと同じ H L A 型を有する限り、対象は C D 4 陽性 T 細胞ドナーとは異なる対象であってもよい。

【 0 1 5 9 】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、 G P C 3 発現細胞に対する C T L ならびに T h 1 細胞を誘導することができる。それゆえ、本発明はさらに、 C T L を誘導するための方法であって：

(a) C D 4 陽性 T 細胞および C D 8 陽性 T 細胞の両方を、本発明のペプチドと接触させた A P C と共に培養する段階；ならびに

(b) C D 8 陽性 T 細胞を本発明のペプチドと接触させた A P C と共に培養する段階。からなる群より選択される少なくとも 1 つの段階を含む方法を提供する。

【 0 1 6 0 】

C T L を誘導するそのような方法では、本発明のペプチドは A P C 内でプロセシングされて C T L エピトープペプチドを生成し、生成された C T L エピトープペプチドは A P C の表面に提示される。

【 0 1 6 1 】

あるいは、本発明によれば、 T h 1 細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、 T h 1 細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、 T h 1 細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。

【 0 1 6 2 】

本発明の方法によって誘導される C D 4 + T 細胞は、ワクチンとして対象に投与することができる。

【 0 1 6 3 】

本発明に関連して、 G P C 3 を過剰発現するがんをこれらの有効成分で治療することができる。そのようながんの例には、 H C C およびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。したがって、有効成分を含有するワクチンまたは医薬組成物の投与の前に、治療されるがん細胞または組織における G P C 3 の発現レベルが同じ器官の正常細胞と比較して増大しているかどうかを確認することが好ましい。したがって、 1 つの態様では、本発明は、 G P C 3 を（過剰）発現するがんを治療するための方法であって：

i) 治療されるべきがんを有する対象から得たがん細胞または組織における G P C 3 の発現レベルを測定する段階；

i i) G P C 3 の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

i i i) 上記 (a) ~ (d) からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分を、正常対照と比較して G P C 3 を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

を含み得る方法を提供する。

【 0 1 6 4 】

あるいは、本発明は、 G P C 3 を過剰発現するがんを有する対象に投与するのに使用するための、上記 (a) ~ (d) からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分を含有するワクチンまたは医薬組成物を提供し得る。言い換えると、本発明はさらに、本発明の G P C 3 ポリペプチドで治療されるべき対象を同定するための方法であって、対象由来のがん細胞または組織における G P C 3 の発現レベルを測定する段階を含み、遺伝子の正常対照レベルと比較したレベル上昇が、対象が本発明の G P C 3 ポリペプチドで治療し得るがんを有することを示す方法を提供する。本発明のがんを治療する方法を以下により詳細に説明する。

【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

50

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドを投与する前に対象の H L A 型を同定し得る。例えば、配列番号：1 のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 5 2 b または H L A - D R 9 を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：2 のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 5 2 b 、 H L A - D P 2 、 H L A - D R 8 、 H L A - D R 9 、 H L A - D R 1 4 、 H L A - D R 8 、 H L A - D R 1 5 、または H L A - D P 5 を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：3 のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 9 を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：4 のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 1 3 を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：5 のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 1 3 および H L A - D R 9 を有すると同定された対象に投与する。

10

【 0 1 6 6 】

目的の G P C 3 の転写または翻訳産物を含む限り、任意の対象由来の細胞または組織を G P C 3 発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、血液、唾液および尿などの体組織および体液が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、対象由来の細胞または組織試料は、上皮細胞、より好ましくはがん性上皮細胞またはがん性であることが疑われる組織由来の上皮細胞を含む細胞集団を含有する。さらに、必要な場合は、得られた体組織および体液から細胞を精製し、その後対象由来試料として使用してもよい。

【 0 1 6 7 】

本発明の方法によって治療される対象は、好ましくは哺乳動物である。例示的な哺乳動物には、例えばヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマおよびウシが含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 6 8 】

本発明によれば、対象から得たがん細胞または組織における G P C 3 の発現レベルを測定する。発現レベルは、当技術分野において公知の方法を用いて、転写（核酸）産物レベルで測定することができる。例えば、G P C 3 の m R N A は、ハイブリダイゼーション法（例えばノーザンハイブリダイゼーション）によりプローブを用いて定量化し得る。検出はチップまたはアレイ上で実施し得る。G P C 3 の発現レベルを検出するにはアレイの使用が好ましい。当業者は、G P C 3 の配列情報を利用してそのようなプローブを調製することができる。例えば、G P C 3 の c D N A をプローブとして使用し得る。必要な場合は、プローブを色素、蛍光物質および同位体などの適切な標識で標識化してもよく、遺伝子の発現レベルをハイブリダイズした標識の強度として検出し得る。

30

【 0 1 6 9 】

さらに、G P C 3 の転写産物（例えば配列番号：8 または 1 0 ）は、増幅に基づく検出方法（例えば R T - P C R ）によってプライマーを使用して定量化し得る。そのようなプライマーは、利用可能な遺伝子の配列情報に基づいて調製し得る。

【 0 1 7 0 】

詳細には、本発明の方法に使用するプローブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件下、中等度にストリンジェントな条件下または低ストリンジェントな条件下で G P C 3 の m R N A にハイブリダイズする。本明細書で使用する場合、「ストリンジェントな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高温で認められる。一般に、ストリンジェントな条件の温度は、規定のイオン強度および p H で特定の配列の熱融解温度（ T m ）よりも約 5 低くなるように選択される。 T m とは、（規定のイオン強度、 p H および核酸濃度下で）標的配列に相補的なプローブの 5 0 % が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である。標的配列は一般に過剰に存在するので、 T m では、プローブの 5 0 % が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、塩濃度が p H 7 . 0 ~ 8 . 3 で約 1 . 0 M 未満のナトリウムイオン、典型的には約 0 . 0 1 ~ 1 . 0 M のナトリウム

40

50

イオン（または他の塩）であり、および温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば10～50ヌクレオチド）については少なくとも約30であり、より長いプローブまたはプライマーの場合は少なくとも約60である条件である。ストリングエントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によっても達成し得る。

【0171】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出してもよい。例えば、G P C 3 タンパク質（配列番号：9または11）の量を測定し得る。翻訳産物としてのタンパク質の量を測定するための方法には、タンパク質を特異的に認識する抗体を使用する免疫測定法が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変抗体がG P C 3 タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型（例えばキメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ')₂、F v等）を検出に使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。

10

【0172】

翻訳産物に基づきG P C 3 遺伝子の発現レベルを検出する別の方法として、G P C 3 タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学分析を介して染色の強度を測定し得る。すなわち、この測定では、強い染色は、タンパク質の存在／レベルの増大、および同時に、G P C 3 遺伝子の高い発現レベルを指す。

20

【0173】

がん細胞における標的遺伝子、例えばG P C 3 遺伝子の発現レベルは、標的遺伝子の対照レベル（例えば正常細胞におけるレベル）から、例えば10%、25%もしくは50%増大している場合、または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超もしくはそれ以上に増大している場合、増大していると決定され得る。

30

【0174】

対照レベルは、疾患状態（がん性または非がん性）が既知である対象から以前に採取され、保存されていた試料を使用することによって、がん細胞と同時に測定し得る。加えて、治療されるべきがんを有する器官の非がん性領域から得た正常細胞を正常対照として使用してもよい。あるいは、疾患状態が既知である対象由来の試料において以前に測定されたG P C 3 遺伝子の発現レベルを分析することによって得られた結果に基づき、統計学的の方法によって対照レベルを決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験した細胞からの発現パターンのデータベースから導き出すことができる。さらに、本発明の1つの態様によれば、生物学的試料におけるG P C 3 遺伝子の発現レベルを、複数の参照試料から決定した複数の対照レベルと比較し得る。対象由来の生物学的試料のものと類似の組織型に由来する参照試料から決定した対照レベルを使用することが好ましい。さらに、疾患状態が既知である集団におけるG P C 3 遺伝子の発現レベルの標準値を使用することが好ましい。標準値は当技術分野において公知の任意の方法によって入手し得る。例えば、平均±2 S . D . または平均±3 S . D . の範囲を標準値として使用し得る。

30

【0175】

本発明に関連して、非がん性であることが既知の生物学的試料から決定した対照レベルを「正常対照レベル」と称する。他方で、対照レベルをがん性生物学的試料から決定した場合は、それを「がん性対照レベル」と称する。試料の発現レベルと対照レベルの差は、発現レベルが細胞のがん性または非がん性状態に依存して異なることが公知の対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して基準化することができる。例示的な対照遺伝子には、- アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼおよびリボソームタンパク質P 1 が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0176】

G P C 3 遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比べて増大しているか、またはがん性対照レベルと類似／同等である場合、対象は、治療されるべきがんを有すると診断され得る。

50

【0177】

より詳細には、本発明は、(i) 対象が治療されるべきがんを有するか否かを診断する、および/または(ii)がん治療のための対象を選択する方法であって：

(a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるG P C 3 の発現レベルを測定する段階；

(b) G P C 3 の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；

(c) G P C 3 の発現レベルが正常対照レベルと比較して増大している場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

(d) 段階(c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階。

を含む方法を提供する。

10

【0178】

あるいは、そのような方法は：

(a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるG P C 3 の発現レベルを測定する段階；

(b) G P C 3 の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；

(c) G P C 3 の発現レベルががん性対照レベルと類似または同等である場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

(d) 段階(c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階。

20

を含む。

【0179】

いくつかの態様において、そのような方法は、上記で定義した段階(a)～(d)の後または前に、HLA - DR 8、HLA - DR 5 2 b、HLA - DR 1 4、HLA - DR 9、HLA - DR 1 3、HLA - DR 1 5、HLA - DP 2 およびHLA - DP 5 からなる群より選択されるHLAを有する対象を同定する段階をさらに含み得る。本発明によるがん療法は、G P C 3 を過剰発現するがんに罹患しており、ならびにHLA - DR 8、HLA - DR 5 2 b、HLA - DR 1 4、HLA - DR 9、HLA - DR 1 3、HLA - DR 1 5、HLA - DP 2 およびHLA - DP 5 のいずれか1つを有する対象にとって好ましい。HLA タイピングの方法は当技術分野において周知である。例えば、HLAアリルをタイピングするためのPCRに基づく方法は周知である。各々のHLA分子に特異的な抗体も、対象のHLA型を同定するための適切なツールである。

30

【0180】

本発明はまた、本発明のG P C 3 ポリペプチドで治療することができるがんに罹患している対象を決定するためのキットも提供し、そのようなキットは、特定のがん療法、より詳細には、がん免疫療法の効果を評価するおよび/またはモニタリングするのにも有用であり得る。適切ながんの説明例には、HCC およびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。より詳細には、キットは、好ましくは対象由来のがん細胞におけるG P C 3 遺伝子の発現を検出するための少なくとも1つの試薬を含み、そのような試薬は、

(a) G P C 3 遺伝子のm R N A を検出するための試薬；

(b) G P C 3 タンパク質を検出するための試薬；および

(c) G P C 3 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬、からなる群から選択される。

40

【0181】

G P C 3 遺伝子のm R N A を検出するのに適した試薬の例には、G P C 3 m R N A に特異的に結合するまたはG P C 3 m R N A を同定する核酸、例えばG P C 3 m R N A の一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、G P C 3 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製し得る。必要な場合は、G P C 3 m R N A を検出するための試薬を固体マトリック

50

ス上に固定化し得る。さらに、G P C 3 mRNAを検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

【0182】

他方で、G P C 3タンパク質を検出するのに適した試薬の例には、G P C 3タンパク質に対する抗体が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変された抗体がG P C 3タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型（例えばキメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b')₂、F v等）を試薬として使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。さらに、直接結合または間接標識技術により、抗体をシグナル生成分子で標識してもよい。標識、ならびに抗体を標識し、その標的への抗体の結合を検出するための方法は当分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明のために利用し得る。さらに、G P C 3タンパク質を検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

10

【0183】

キットは、前記試薬の複数を含んでもよい。例えば、がんを有さないまたはがんに罹患している対象から得た組織試料は、有用な対照試薬として役立ち得る。本発明のキットは、使用のための指示書と共に、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書（例えば書面、テープ、C D - R O M等）を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。これらの試薬などは、ラベルを付した容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

20

【0184】

本発明の1つの態様として、試薬がG P C 3 mRNAに対するプローブである場合、少なくとも1つの検出部位を形成するために試薬を多孔性ストリップなどの固体マトリックス上に固定化し得る。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、各々が核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。試験ストリップはまた、陰性対照および/または陽性対照のための部位を含んでもよい。あるいは、対照部位は、試験ストリップから隔てられたストリップ上に配置し得る。場合により、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含んでもよく、すなわち、第一検出部位ではより高い量を含み、それに続く部位ではより少ない量を含んでもよい。試験試料の添加後、検出可能なシグナルを提示する部位の数により、試料中に存在するG P C 3 mRNAの量の定量的指標が提供される。検出部位は、任意の適切な検出可能形状に構成することができ、典型的には、試験ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

30

【0185】

本発明のキットは、陽性対照試料またはG P C 3標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、G P C 3陽性試料を採取し、次にそのG P C 3レベルを検定することによって調製し得る。あるいは、精製されたG P C 3タンパク質またはポリヌクレオチドを、G P C 3を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはG P C 3標準試料を形成してもよい。本発明では、精製G P C 3は組換えタンパク質であり得る。陽性対照試料のG P C 3レベルは、例えばカットオフ値を上回る。

40

【0186】

X. 抗体：

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、本発明のペプチドに特異的に結合し、他のペプチドには結合しない（または弱く結合する）。あるいは、抗体は、本発明のペプチドならびにそのホモログに結合する。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断アッセイおよび予後判定アッセイならびに画像化法において使用され得る。同様に、そのような抗体は、G P C 3ががん患者において発現されるまたは過剰発現される限り、他のがんの治療、診断および/または予後判定において使用され得る。さらに、細胞内で発現される抗体（例えば一本鎖抗体）は、G P C 3の発現が関

50

とするがんを処置する際に治療的に使用され得、その例には、HCCおよびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。

【0187】

本発明はまた、配列番号：1から5の中から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むGPC3タンパク質（配列番号：9または11）またはその断片の検出および/または定量化のための様々な免疫学的アッセイも提供する。そのようなアッセイは、適宜に、GPC3タンパク質またはその断片を認識し、結合することができる1つまたは複数の抗GPC3抗体を含み得る。本発明において、GPC3ポリペプチドに結合する抗GPC3抗体は、好ましくは他のペプチドを排除して、好ましくは配列番号：1から5の中から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は阻害試験で確認することができる。すなわち、分析する抗体と全長GPC3ポリペプチドの間の結合が配列番号：1から5の中から選択されるアミノ酸配列を有する任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、抗体は断片に「特異的に結合する」とみなされる。本発明に関連して、そのような免疫学的アッセイは、様々なタイプの放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィ技術、酵素結合免疫検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光検定法（ELIFA）等を含むがこれらに限定されない、当技術分野において周知の様々な免疫学的アッセイ形式内で実施される。

10

【0188】

本発明の関連する免疫学的であるが抗体を使用しないアッセイには、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）ならびにMHC結合アッセイも含まれ得る。加えて、本発明の標識抗体を用いたラジオシンチグラフィ画像化法を含むがこれに限定されない、GPC3を発現するがんを検出することができる免疫学的画像化法も本発明によって提供される。そのようなアッセイは、GPC3を発現するがんの検出、モニタリングおよび予後判定において臨床的に使用することができ、そのようながんの例には、HCCおよびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0189】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体も提供する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で使用することができ、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ヒト抗体ならびに遺伝的組換えによって作製されるヒト化抗体を包含する。

30

【0190】

抗体を得るための抗原として使用する本発明のペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくはヒト、マウスまたはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のペプチドは、本明細書で開示するヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手し得る。

本発明によれば、本発明のポリペプチドの完全なペプチドおよび部分ペプチドは免疫化抗原として役立ち得る。適切な部分ペプチドの例には、例えば本発明のペプチドのアミノ（N）末端断片またはカルボキシ（C）末端断片が含まれる。

40

【0191】

本明細書では、抗体は、全長GPC3ペプチドまたはGPC3ペプチドの断片のいずれかと反応するタンパク質と定義される。好ましい態様では、本発明の抗体は、配列番号：1から5の中から選択されるアミノ酸配列を有するGPC3の断片ペプチドを認識することができる。オリゴペプチドを合成する方法は当技術分野において周知である。合成後、ペプチドを、場合により免疫原として使用する前に精製してもよい。本発明では、オリゴペプチド（例えば24merまたは26mer）を、免疫原性を増強するために担体と複合化または連結してもよい。キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）は担体として周知である。KLHとペプチドを複合化する方法も当技術分野において周知である。

【0192】

あるいは、本発明のペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター

50

に挿入してもよく、次にそれを使用して本明細書で述べるような宿主細胞を形質転換する。所望のペプチドまたはその断片を任意の標準的な方法によって宿主細胞の外部または内部から回収することができ、その後抗原として使用し得る。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体またはその溶解物または化学合成したペプチドを抗原として使用してもよい。

【0193】

任意の哺乳動物を抗原で免疫し得るが、好ましくは細胞融合のために使用する親細胞との適合性を考慮に入れる。一般に、げっ歯目 (Rodentia)、ウサギ目 (Lagomorpha) または霊長目 (Primate) 科の動物を使用し得る。げっ歯目科の動物には、例えばマウス、ラットおよびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目科の動物には、例えばカニクイザル (Macaca fascicularis)、アカゲザル、マントヒビおよびチンパンジーなどの狭鼻下目 (Catarrhini) のサル (旧世界ザル) が含まれる。

10

【0194】

抗原で動物を免疫する方法は当技術分野において公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射が哺乳動物の免疫のための標準的な方法である。より詳細には、抗原を適切な量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、生理食塩水等に希釈し、懸濁し得る。所望する場合は、抗原懸濁液を適切な量の標準的なアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化して、その後哺乳動物に投与してもよい。好ましくは、それに続いて、適切な量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を 4 ~ 21 日ごとに数回投与する。適切な担体も免疫のために使用し得る。上記のように免疫した後、血清を、所望抗体の量の増加に関して標準的な方法によって検査し得る。

20

【0195】

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望抗体の増加に関して検査した免疫哺乳動物から血液を採取し、任意の従来の方法で血液から血清を分離することによって調製し得る。ポリクローナル抗体には、ポリクローナル抗体を含有する血清、ならびに血清から単離し得るポリクローナル抗体を含有する画分が含まれる。免疫グロブリン G または M は、例えば本発明のペプチドと結合したアフィニティカラムを用いて本発明のペプチドだけを認識する画分から調製することができ、プロテイン A またはプロテイン G カラムを用いてこの画分をさらに精製し得る。

30

【0196】

本発明に関する使用のためのモノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を採取し、上述したように血清中の所望抗体のレベル上昇を検査して、細胞融合に供する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記免疫細胞と融合させる他の好ましい親細胞には、例えば哺乳動物の骨髄腫細胞、より好ましくは薬剤による融合細胞の選択のための獲得特性を有する骨髄腫細胞が含まれる。上記免疫細胞と骨髄腫細胞を公知の方法に従って、例えば Milstein et al. の方法 (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3 - 46 (1981)) に従って融合させることができる。

【0197】

生じる細胞融合によって得られたハイブリドーマは、それらを標準的な選択培地、例えば HAT 培地 (ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン含有培地) で培養することによって選択し得る。細胞培養を、典型的には数日間から数週間、すなわち所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞 (非融合細胞) を死滅させるのに十分な時間、HAT 培地中で継続する。その後、標準的な限界希釈を実施して、所望の抗体を產生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、クローン化し得る。

40

【0198】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記方法に加えて、ヒトリンパ球、例えば EB ウィルスに感染したものをインビトロでペプチド、ペプチド発現細胞またはそれらの溶解物で免疫し得る。次に、免疫したリンパ球を、U266 などの無限に分裂することができるヒト由来骨髄腫細胞と融合させて、ペプチドに結合することができる

50

きる所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを生成し得る(特開昭63-17688号)。

【0199】

得られたハイブリドーマを、その後マウスの腹腔に移植し、腹水を抽出し得る。得られたモノクローナル抗体を、例えば硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、D E A Eイオン交換クロマトグラフィまたは本発明のペプチドを結合させたアフィニティカラムによって精製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドの精製および検出に使用できるだけでなく、本発明のペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても用いることができる。

あるいは、抗体を産生する、免疫リンパ球などの免疫細胞をがん遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体を調製するために使用してもよい。

【0200】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子工学技術を用いて組換えによって調製することもできる(例えばBorrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)参照)。例えば、抗体をコードするDNAを免疫細胞、例えば抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫リンパ球などからクローニングし、適切なベクターに挿入して、宿主細胞に導入し、組換え抗体を調製し得る。本発明はまた、上述したように調製される組換え抗体も提供する。

【0201】

本発明の抗体は、抗体の断片または改変された抗体が本発明のペプチドの1つまたは複数に結合する限り、抗体の断片または改変された抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、F_{ab}、F(ab')₂、Fv、またはH鎖とL鎖からのFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であり得る(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-83 (1988))。より詳細には、抗体断片は、抗体をパパインまたはペプシンなどの酵素で処理することによって生成し得る。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入して、適切な宿主細胞において発現させてもよい(例えばCo et al., J Immunol 152:2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178:476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178:497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121:652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9:132-7 (1991)参照)。

【0202】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)などの様々な分子との結合によって修飾し得る。本発明はそのような修飾された抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得られ得る。これらの修飾方法は当技術分野において慣例的である。

【0203】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常領域を含むヒト化抗体として入手し得る。そのような抗体は公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、げっ歯動物のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置き換えることによって実施できる(例えばVerhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988))。したがって、そのようなヒト化抗体は、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ない部分が非ヒト種からの対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。

10

20

30

40

50

【0204】

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えてヒト可変領域を含む完全ヒト抗体も使用できる。そのような抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を用いて作製することができる。例えば、インピトロ法は、バクテリオファージ上に提示されるヒト抗体断片の組換えライブラリの使用を含む（例えばHoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991) 参照）。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスに導入することによって作製できる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号；同第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号に記載されている。10

【0205】

上述したようにして得られた抗体を均一に精製し得る。例えば、抗体の分離および精製は、一般的なタンパク質に用いられる分離および精製方法に従って実施できる。例えば、抗体を、アフィニティクロマトグラフィ、フィルター、限外ろ過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動などの、しかしこれらに限定されないカラムクロマトグラフィの適切に選択し、組み合わせた使用によって分離および単離し得る（Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)）。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティカラムとして使用することができる。使用される例示的なプロテインAカラムには、例えばHyper D、POROSおよびSephadex G-200（Pharmacia）が含まれる。20

【0206】

適切なクロマトグラフィ技術の例には、アフィニティクロマトグラフィを除いて、例えばイオン交換クロマトグラフィ、疎水性クロマトグラフィ、ゲルろ過、逆相クロマトグラフィ、吸着クロマトグラフィ等が含まれる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marschak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)）。クロマトグラフィ手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィによって実施することができる。30

【0207】

例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫検定法（ELISA）、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）および/または免疫蛍光法（IF）を用いて本発明の抗体の抗原結合活性を測定し得る。ELISAでは、本発明の抗体をプレートに固定化し、本発明のペプチドをプレートに塗布して、次に所望の抗体を含有する試料、例えば抗体産生細胞の培養上清または精製抗体を適用する。その後、一次抗体を認識する、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体を適用し、プレートをインキュベートする。次に、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。C末端またはN末端断片などのペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として使用し得る。BIAcore（Pharmacia）を、本発明による抗体の活性を評価するために使用してもよい。40

【0208】

上記方法は、本発明の抗体を、本発明のペプチドを含むと推測される試料に曝露し、抗体とペプチドによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のペプチドの検出または測定を可能にする。

本発明によるペプチドの検出または測定の方法は、ペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法はペプチドを用いる様々な実験で使用することができる。例えば、患者から得られたがん細胞または組織において、本発明のペプチドが検出され50

る場合、それらに対する T h 1 細胞（または C T L 細胞）が、がん免疫療法において効果的なツールであることが期待される。

【 0 2 0 9 】

X I . ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドを導入するベクターおよび宿主細胞も提供する。本発明のベクターは、本発明のペプチドを発現するためまたは遺伝子治療のために本発明のヌクレオチドを投与するための、宿主細胞における本発明のヌクレオチド、特に D N A の担体として有用である。

【 0 2 1 0 】

大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌（例えば J M 1 0 9 、 D H 5 、 H B 1 0 1 または X L 1 B l u e ）において大量に増幅し、生産する場合、ベクターは、大腸菌における増幅に適した「複製起点（ o r i ）」および形質転換した大腸菌を選択するのに適したマーカー遺伝子（例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等のような薬剤によって選択される薬剤耐性遺伝子）を有するべきである。例えば、 M 1 3 シリーズのベクター、 p U C シリーズのベクター、 p B R 3 2 2 、 p B l u e s c r i p t 、 p C R - S c r i p t 等が使用できる。加えて、 p G E M - T 、 p D I R E C T および p T 7 も、上述したベクターと同様に、 c D N A をサブクローニングし、抽出するために使用できる。本発明のタンパク質を生産するためにベクターを使用する場合は、発現ベクターが使用できる。例えば、大腸菌で発現される発現ベクターは、大腸菌において増幅される上記特徴を有するべきである。 J M 1 0 9 、 D H 5 、 H B 1 0 1 または X L 1 B l u e などの大腸菌を宿主細胞として使用する場合、ベクターは、大腸菌において所望の遺伝子を効率的に発現することができるプロモーター、例えば lac Z プロモーター（ W a r d e t a l . , N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 6 (1 9 8 9) ； F A S E B J 6 : 2 4 2 2 - 7 (1 9 9 2) ）、 a r a B プロモーター（ B e t t e r e t a l . , S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 4 1 - 3 (1 9 8 8) ）、 T 7 プロモーター等を有するべきである。その点に関して、 p G E X - 5 X - 1 (P h a r m a c i a) 、「 Q I A e x p r e s s s y s t e m 」 (Q i a g e n) 、 p E G F P および p E T (この場合、宿主は、好ましくは T 7 R N A ポリメラーゼを発現する B L 2 1 である) が、例えば、上記ベクターの代わりに使用できる。加えて、ベクターはまた、ペプチド分泌のためのシグナル配列も含み得る。ペプチドが大腸菌のペリプラズムに分泌されるように指令する例示的なシグナル配列は、 p e l B シグナル配列である (L e i e t a l . , J B a c t e r i o l 1 6 9 : 4 3 7 9 (1 9 8 7)) 。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

【 0 2 1 1 】

大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば p c D N A 3 (I n v i t r o g e n) および p E G F - B O S (N u c l e i c A c i d s R e s 1 8 (1 7) : 5 3 2 2 (1 9 9 0)) 、 p E F 、 p C D M 8 ）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「 B a c - t o - B A C バキュロウイルス発現系」 (G I B C O B R L) 、 p B a c P A K 8 ）、植物由来の発現ベクター（例えば p M H 1 、 p M H 2 ）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば p H S V 、 p M V 、 p A d e x L c w ）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば p Z I p n e o ）、酵母由来の発現ベクター（例えば「 P i c h i a E x p r e s s i o n K i t 」 (I n v i t r o g e n) 、 p N V 1 1 、 S P - Q 0 1 ）ならびに枯草菌（ B a c i l l u s s u b t i l i s ）由来の発現ベクター（例えば p P L 6 0 8 、 p K T H 5 0 ）が、本発明のポリペプチドを产生するために使用できる。

【 0 2 1 2 】

C H O 、 C O S または N I H 3 T 3 細胞などの動物細胞においてベクターを発現するために、ベクターは、そのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えば S V 4 0 プロモーター（ M u l l i g a n e t a l . , N a t u r e 2 7 7 : 1 0 8 (1 9

10

20

30

40

50

79)) 、 M M L V - L T R プロモーター、 E F 1 プロモーター (M i z u s h i m a et al. , N u c l e i c A c i d s R e s 18 : 5322 (1990)) 、 C M V プロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子 (例えば、薬剤 (例えばネオマイシン、 G 418) によって選択される薬剤耐性遺伝子) を担持すべきである。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えば p M A M 、 p D R 2 、 p B K - R S V 、 p B K - C M V 、 p O P R S V および p O P 13 が含まれる。

【 0213 】

以下では、特定の実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。しかし、以下の実験材料、方法および実施例は、当業者が本発明の特定の態様を作製し、使用することを助けるのに役立ち得るが、本発明の態様を例示することだけを意図し、したがっていかなる意味でも本発明の範囲を限定するものではない。当業者は容易に認識するように、本明細書で述べるものと類似または等価の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

10

【 実施例 】

【 0214 】

材料および方法

細胞株

抗原提示細胞 (A P C) として、 D R 4 (D R B 1 * 0 4 : 0 5) 、 L - D R 4 ; D R 8 (D R B 1 * 0 8 : 0 3) 、 L - D R 8 ; D R 13 (D R B 1 * 1 3 : 0 2) 、 L - D R 13 または D R 15 (D R B 1 * 1 5 : 0 2) 、 L - D R 15 ; および D P 5 (D P A 1 * 0 2 : 0 2 / D P B 1 * 0 5 : 0 1) 、 L - D P 5 を発現するように遺伝的に操作されたマウス線維芽細胞株 (L 細胞) を使用した。これらの L 細胞は、インビトロにおいて 10 % F C S を加えた D M E M にて維持された。 D R 7 (D R B 1 * 0 7 : 0 1) 、 L - D R 7 ; D R 13 (D R B 1 * 1 3 : 0 1) 、 L - D R 13 ; D R 5 2 a (D R B 3 * 0 1 : 0 1) 、 L - D R 5 2 a ; D R 5 2 b (D R B 3 * 0 2 : 0 2) 、 R M 3 - D R 5 2 b ; D R 15 (D R B 1 * 1 5 : 0 1) 、 L - D R 15 ; D P 2 (D P A 1 * 0 1 : 0 3 / D P B 1 * 0 2 : 0 1) 、 L - D P - 2 を発現する L 細胞および D P 4 (D P A 1 * 0 1 : 0 3 / D P B 1 * 0 4 : 0 1) を発現する R M 3 細胞は、アメリカ、カルフォルニアの La Jolla Institute for Allergy and Immunology の Alessandro Sette 博士のご厚意により提供された (M c Kinney D M , et al. , Immunogenetics 2013 ; 65 : 357 - 70) 。 La Jolla Institute 由来のトランスフェクトされた細胞株は、 2 m M のグルタミン、 1 % (v / v) 非必須アミノ酸、 1 % (v / v) ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン (50 U / m L) 、ストレプトマイシン (50 μ g / m L) (すべてライフテクノロジー) および、 10 % 熱失活させたウシ胎児血清 (R 10) と最終濃度 200 μ g / m l の G - 418 硫酸塩 (和光) を加えた R P M I 1640 培地において培養された。 R M 3 形質転換体株は、最終濃度 700 μ g / m l の G - 418 および 12 μ g / m l のブラストサイジン (シグマ) を加えた R 10 中で培養された (M c K i nney D M , et al. , Immunogenetics 2013 ; 65 : 357 - 70) 。

20

【 0215 】

H L A クラス I I 結合ペプチドの予測

潜在的なプロミスキャス H L A クラス I I に結合するヒト G P C 3 由来ペプチドを予測するため、近年開発されたコンピュータアルゴリズム (I E D B 解析リソース、 I E D B 推奨法、 tools . i mmune p i t o p e . org / m h c i i /) でヒト G P C 3 タンパク質のアミノ酸配列を解析した (Wang P et al. B M C B i o i n f o r m a t i c s 2010 ; 11 : 568 . Wang P et al. P L o S C o m p u t B i o l 2008 ; 4 : e 1000048) 。プログラムは、タンパク質全体を包含する 15 アミノ酸長配列のオフセットを解析した。 D P B 1 * 0 5 : 0

30

40

50

1、D R B 1 * 0 7 : 0 1、D R B 1 * 0 8 : 0 3、D R B 1 * 0 9 : 0 1、D R B 1 * 1 3 : 0 2またはD R B 1 * 1 5 : 0 2アリルによってコードされる複数のH L AクラスII分子についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセンタイル順位を有する5つのG P C 3 - L P s、G P C 3 9 2 - 1 1 6 (L P 1)、G P C 3 1 3 7 - 1 6 1 (L P 2)、G P C 3 2 8 9 - 3 1 3 (L P 3)、G P C 3 3 8 6 - 4 1 2 (L P 4)、G P C 3 5 5 6 - 5 7 6 (L P 5)を選択した(図7および表1)。

【0 2 1 6】

IEDBにより推奨されるコンセンサス法を使用して得られた、GPC3由来ペプチドのHLAクラスII結合順位スコア

アミノ酸残基	GPC3-LP1	HLA-DR4		HLA-DR7		HLA-DR8		HLA-DR9		HLA-DR13		HLA-DR14		HLA-DR15		HLA-DP2		HLA-DP5	
		(DRB1*04:05)	(DRB1*07:01)	(DRB1*08:03)	(DRB1*09:01)	(DRB1*09:03)	(DRB1*13:02)	(DRB1*14:05)	(DRB1*15:02)	(DRB1*15:05)	(DRB1*17:02)	(DRB1*17:05)	(DRB1*19:01)	(DRB1*19:02)	(DRB1*20:01)	(DPB1*02:01)	(DPB1*05:01)		
92-106	23.48	1.1	56	5.4	17.81	45.49	3.6	0.54	3.6	20.99	0.55	0.53	0.53	0.53	6.79	6.79			
93-107	17.71	49.19	43.84	33.73	71.13	39.91	25.81	9.96	9.96	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	6.62	6.62			
94-108	5.31	64.58	27.59	32.75	57.12	12.79	12.79	9.96	9.96	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	6.02	6.02			
95-109	5.04	40.87	13.78	32.75	57.47	3.36	4.03	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	6.02	6.02			
96-110	0.78	2.72	5.42	1.17	1.17	2.43	2.43	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	7.09	7.09			
97-111	0.56	2.89	4.12	1.11	1.02	1.02	1.02	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	9.29	9.29			
98-112	0.65	3.41	3.76	1.09	0.89	1.55	1.55	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	10.11	10.11			
99-113	0.84	4.9	4.56	1.12	0.88	1.73	1.73	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	13.64	13.64			
100-114	1.23	5.87	4.94	1.15	0.95	1.83	1.83	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	17.36	17.36			
101-115	4.27	7.28	6.24	4.43	1.02	2.14	2.14	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	22.79	22.79			
102-116	4.44	7.39	16.66	4.92	1.09	6.96	6.96	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	15.7	15.7			
コンセンサス/セントイル順位																			
アミノ酸残基		GPC3-LP2		HLA-DR4		HLA-DR7		HLA-DR8		HLA-DR9		HLA-DR13		HLA-DR14		HLA-DR15		HLA-DP5	
137-151	36.54	34.58	84.97	56.04	80.98	87.13	8.84	3.11	3.11	82.62	5.83	0.02	0.02	0.02	2.32	2.32			
138-152	17.16	33.04	81.65	33.39	80.03	81.13	5.83	0.01	0.01	81.60	5.83	0.01	0.01	0.01	2.81	2.81			
139-153	16.19	37.04	81.46	28.03	20.75	75.65	71.65	74.17	74.17	44.70	1.37	0.02	0.02	0.02	2.78	2.78			
140-154	16.03	26.04	81.25	81.25	32.05	20.75	20.75	20.75	20.75	11.92	33.74	1.37	1.37	1.37	3.27	3.27			
141-155	16.61	27.73	76.57	41.58	8.44	8.44	8.44	8.44	8.44	11.92	11.92	11.92	11.92	11.92	3.75	3.75			
142-156	6.74	5.39	4.96	34.55	8.33	10.35	10.35	10.35	10.35	11.92	11.92	11.92	11.92	11.92	4.73	4.73			
143-157	6.74	4.96	7.71	32.16	32.16	27.57	27.57	27.57	27.57	11.92	11.92	11.92	11.92	11.92	4.72	4.72			
144-158	6.74	10.48	30.49	19.99	19.99	23.67	23.67	23.67	23.67	11.92	11.92	11.92	11.92	11.92	4.38	4.38			
145-159	6.74	13.07	32.86	24.24	24.24	28.53	28.53	28.53	28.53	11.92	11.92	11.92	11.92	11.92	4.57	4.57			
146-160	6.74	10.95	32.80	33.31	33.31	32.84	32.84	32.84	32.84	11.92	11.92	11.92	11.92	11.92	4.56	4.56			
147-161	6.74														7.62	7.62			

表示されるHLAクラスII分子に対するペプチド結合アルゴリズムスコアは各15mer GPC3ペプチドに関して示されている

IEDBにより推奨されるコンセンサス法を使用して得られた、GPC3由来ペプチドのHLAクラスII結合順位スコア

GPC3-LP3		コンセンサスペーパー-セントイル順位						HLA-DP5 (DPB1*05:01)					
	アミノ酸残基	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP5 (DPB1*05:01)		
289-303	14.24	11.46	19.34	40.53	32.56	20.63	3.9	2.14	6.03				
290-304	5.32	11.69	24.49	25.27	33.05	31.16	3.9	2.08	6.81				
291-305	5.19	11.65	31.28	23.93	47.64	35.77	3.9	2.14	5.2				
292-306	5.19	11	35.34	23.31	47.63	36.27	3.9	2.18	4.63				
293-307	2.44	9.46	44.42	4.16	15.47	35.01	3.9	2.46	4.55				
294-308	2.29	9.46	45.22	3.83	15.47	30.77	3.9	2.84	4.84				
295-309	3.26	9.46	53.89	4.31	15.72	32.22	3.9	4.92	12.15				
296-310	3.75	42.56	56.47	4.6	15.49	28.19	5.03	12.92	12.15				
297-311	6.69	42.49	57.31	6.06	18.14	30.23	14.56	13.3	12.15				
298-312	11.11	49.12	60.21	8.43	28.19	38.61	14.56	15.98	18.5				
299-313	12.64	48.59	55.91	14.48	25.13	39.02	14.56	13.64	24.32				
GPC3-LP4		コンセンサスペーパー-セントイル順位						HLA-DP5 (DPB1*05:01)					
	アミノ酸残基	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP5 (DPB1*05:01)		
386-400	4.51	11.33	1.2	3.91	26.62	1.73	3.92	33.14	2.66				
387-401	4.44	11.03	0.75	3.76	26.46	0.68	3.92	32.19	1.53				
388-402	4.33	10.65	0.6	3.76	26.06	0.37	3.92	26.2	6.41				
389-403	1.38	7.81	0.6	0.87	26.14	0.48	0.5	14.3	0.9				
390-404	1.38	8.84	1.25	0.89	37.94	1.44	0.5	14.3	0.89				
391-405	1.38	4.14	1.98	0.89	39.07	2.24	0.5	7.51	0.93				
392-406	0.3	4.14	3.94	0.07	43.64	5.4	0.5	6.33	1.06				
393-407	0.36	4.14	4.93	8.11	30.3	6.72	0.5	7.07	1.14				
394-408	0.38	4.14	5.58	7.99	30.69	5.86	0.5	6.63	4.18				
395-409	0.39	0.5	3.95	0.48	12.65	4.27	0.5	6.53	5.71				
396-410	0.62	0.59	6.63	0.03	12.45	5.45	2.03	7.24	14.61				
397-411	1.49	0.74	10.07	0.1	14.11	7.26	2.03	8.62	21.78				
398-412	2.2	1.06	15.69	0.11	16.03	10.3	2.03	9.28	25.47				

表示されるHLAクラスII分子に対するペプチド結合アルゴリズムスコアは各15mer GPC3ペプチドに関して示されている

IEDBにより推奨されるコンセンサス法を使用して得られた、GPC3由来ペプチドのHLAクラスII結合順位スコア

GPC3-LP5 アミノ酸残基	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR7 (DRB1*07:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR13 (DRB1*13:02)	HLA-DR14 (DRB1*14:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)	HLA-DP5 (DPB1*05:01)
556-570	1.25	0.56	4.85	1.21	6.63	5.19	0.4	38.86	33.92
557-571	1.23	0.68	3.6	1.07	6.6	3.51	0.4	12.73	23.87
558-572	1.13	0.68	2.32	0.86	3.42	2.73	0.4	12.73	23.87
559-573	0.99	0.76	2.93	0.94	3.42	2.58	0.4	12.73	23.87
560-574	1.02	1.2	5.78	1.38	3.42	5.38	0.4	12.73	23.87
561-575	2.36	1.26	9.94	2.47	3.42	9.79	0.4	13.87	23.87
562-576	2.43	1.26	23.43	4.64	3.42	29.45	0.4	12.73	23.87

表示されるHLAクラスII分子に対するペプチド結合アルゴリズムスコアは各15mer GPC3ペプチドに関して示されている

【 0 2 1 7 】

合成ペプチドおよび組換えタンパク質

H L A - A 2 (A 2 - G P C 3 1 4 4 - 1 5 2 ; A 2 - G P C 3 - S P) または H L A - A 2 4 (A 2 4 - G P C 3 2 9 8 - 3 0 6 ; A 2 4 - G P C 3 - S P) によって提示さ

れる2つのヒトG P C 3由来S Pおよび5つのG P C 3-L P (G P C 3₉₂₋₁₁₆; 137-161; 289-313; 386-412; 556-576)を合成した(M B L、名古屋、日本；純度>95%；図7B)。H L A - A 2に結合するヒト免疫不全ウイルス(H I V)-S P (A 2-H I V)およびC D C A 1由来S P (A 2-C D C A 1)を陰性対照S Pとして使用した(T o m i t a Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8; T o m i t a Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 697-705)。しばしば、I M P 3₅₀₇₋₅₂₇-L Pは対照L Pとして使用される。ペプチドを10mg/mLの濃度でジメチルスルホキシドに溶解し、-80で保管した。組換え全長G P C 3タンパク質はR & D S y s t e m s社(ミネアポリス、アメリカ；純度>90%)から購入し、0.2%F C Sを含んだ滅菌P B Sで1mg/mLに再構成した。組換えヒト全長C D C A 1タンパク質を前述の通り対照として使用した(T o m i t a Y, et al. Cancer Sci 2011; 102: 697-705)。G P C 3-L P 2: G P C 3₁₃₇₋₁₆₁および対照としてのI M P-3₅₀₇₋₅₂₇-L Pを搭載したリポソームは、前記の通り生成された(Y u b a E, et al., Biomaterials 2013; 34: 3042-52;)。

10

20

30

【0218】

健常ドナーからの抗原特異的C D 4⁺ T細胞の生成

健常ドナーからP B M Cを採取し、使用するための研究プロトコルは、熊本大学の治験審査委員会によって承認された。11名の健常ドナーからのP B M Cは書面によるインフォームドコンセントを得た。H L A - A、D R B 1およびD P B 1アリルの遺伝子型判定はH L A研究所(京都、日本)で行われた(表2)。抗原特異的C D 4⁺ T細胞の誘導を、いくつか変更を加えて、以前に述べられているように行った(Z a r o u r H M, et al., Cancer Res 2000; 60: 4946-52)。C D 4⁺ T細胞を、磁気マイクロビーズを用いて陽性選択によってP B M Cから精製した(M i l t e n y i l B i o t e c, Auburn, CA, U S A)(I n o u e M, et al., I n t J Cancer 2010; 127: 1393-403)。単球由来の樹状細胞(D C)を、以前に述べられているように(H a r a o M, et al. I n t J Cancer 2008; 123: 2616-25)インビトロ培養によってC D 14⁺細胞から生成し、抗原提示細胞(A P C)として使用して、前記のように抗原特異的C D 4⁺ T細胞を誘導した(T o m i t a Y, et al. Clin Cancer Res 2013; 19: 4508-20)。場合によっては、T細胞は、以前に述べられているように、さらなる研究のために限界希釈によってクローニングした(T a b a t a H, et al., Hum Immunol 1998; 59: 549-60)。

30

【0219】

【表2】

健常ドナーのHLA-A、-DR、および-DP遺伝子型		HLA-A遺伝子型	HLA-DRB1遺伝子型	HLA-DPB1遺伝子型
ドナーID ^a	HLA-A遺伝子型			
HD1		DRB1*04:05 / DR53		DPB1*05:01 / -
HD2	A*02:01 / 24:02	DRB1*08:03 / 15:02		DPB1*02:01 / 09:01
HD3	A*11:01 / 31:01	DRB1*08:02 / 15:02		DPB1*05:01 / 09:01
HD4	A*24:02 / -	DRB1*08:03 / 14:05		DPB1*02:02 / 05:01
HD5	A*24:02 / 31:01	DRB1*04:05 / 09:01/DR53 ^c		DPB1*02:01 / 04:02
HD6	A*02:01 / 02:06	DRB1*04:06 / 08:03/DR53		DPB1*02:01 / 04:02
HD7	n.t. ^b	DRB1*04:05 / 13:02/DR53		DPB1*04:01 / 09:01
HD8	A*26:01 / 33:03	DRB1*04:10 / 08:02/DR53		DPB1*02:01 / 05:01
HD9	A*26:01 / -	DRB1*09:01 / 13:02/DR53		DPB1*03:01 / 04:01
HD10	A*31:01 / 33:03	DRB1*07:01 / 13:02/DR53/DR52b ^d		DPB1*02:01 / 04:01
HD11	A*01:01 / 68:01	DRB1*09:01 / 14:54/DR53		DPB1*04:02 / 05:01

^a 健常ドナー (HD1～HD11) に由来するPBMCは誘導アッセイにおいて使用した ; ^bn.t. 試験していない ;

^c DR53の遺伝子型は DRB4*01:03 であり、^d DR52bの遺伝子型は DRB3*02:02 である。

【 0 2 2 0 】

ペプチドおよびタンパク質に対するT細胞応答の評価

ペプチド (10 μg / ml) またはタンパク質 (10 μg / ml) でパルスした抗原提

示細胞 (A P C) に対する T h 細胞の免疫応答を、以前に述べられているように (Tomita Y et al. Cancer Sci 2011; 102: 697 - 705) IFN - 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイ (BD Biosciences) によって評価した。簡単に述べると、ペプチドでパルスした P B M C (3 × 10⁴) での刺激後の 3 × 10⁴ のバルク C D 4⁺ T 細胞、またはペプチドでパルスした H L A - D R を発現する L 細胞 (5 × 10⁴ 個 / ウェル) もしくは R M 3 (5 × 10⁴ 個 / ウェル) での刺激後の 1 × 10⁴ のバルク C D 4⁺ T 細胞当たりの、IFN - を産生するペプチド特異的 C D 4⁺ T 細胞の頻度を前期の通りに分析した (Tosolini M, et al. Cancer Res 2011; 71: 1263 - 71)。

【0221】

10

サイトカインアッセイ

G P C 3 - L P 特異的バルク T h 細胞または T h 細胞クローン (3 × 10⁴ 個 / ウェル) を、96 ウェル培養プレートにおいて、コグネイトペプチドでパルスした自己 P B M C の存在下で培養した。24 時間後、培養上清を採取し、サイトカイン (IFN - 、 T N F - 、 I L - 2、 G M - C S F 、 および M I P 1) レベルを、 B i o - P l e x システム (B i o - R a d) を製造者の使用説明書に従って使用して測定した。

【0222】

20

インビトロクロスプライミングアッセイ

Y u b a r a (Y u b a E, et al., Biomaterials 2013; 34: 3042 - 52) は、 D C の交差提示の効率を高めるため腫瘍抗原を含む改変された p H 感受性リポソームを開発した。G P C 3 - L P 2 : G P C 3₁₃₇ - 1₆₁ の交差提示を評価するために、リポソームに封入された L P でパルスされた D C を利用した。リポソームは以前に述べられているように調整した (Y u b a E, et al., Biomaterials 2013; 34: 3042 - 52)。簡単に述べると、N、N-ジメチルホルムアミドまたは脱イオン水 (5 m g / m L) に溶解したペプチド (0.22 μ m o l) を E Y P C / C H e x P G - P E (97/3, m o l / m o l; 6.25 μ m o l) の乾燥した薄いメンブレンに加え、その後溶媒は真空下で 3 時間以上除去した。得られた脂質とペプチドの混合物を、浴槽タイプのソニケーターを用いて P B S (500 μ L) 中に 2 分間の超音波処理で分散させ、ペプチド含有リポソーム懸濁液をもたらした。リポソーム懸濁液は、凍結および融解することによってさらに水和し、100 n m の孔サイズのポリカルボネートメンブレンを通して押し出した。遊離したペプチドを除去するために、リポソーム懸濁液に対し 4 、 55, 000 r p m で 1.5 時間の遠心分離を 2 回行った。脂質およびペプチドの濃度は、リン脂質 C (和光) およびマイクロ B C A プロテインアッセイ (Thermo Scientific) によって各々決定した。

30

【0223】

未成熟 D C は、ポジティブ単離した C D 14⁺ 細胞から調製した (0 日目)。C D 14⁺ 細胞は、 I L - 4 (10 n g / m l) および G M - C S F (100 n g / m l) の存在下で培養された。未成熟 D C は、5 日目に剥離され、リポソームに封入された L P (L P 20 μ g / m L と同量) で 4 時間パルスされた。リポソームに封入された G P C 3 - L P 2 でロードした D C に対する応答における、IFN - 産生 A 2 - G P C 3₁₄₄ - 1₅₂ - S P 特異的バルク C T L の数を E L I S P O T アッセイによって計数した。S P をパルスした D C は、陽性対照として使用され、パルスされていない D C 、リポソーム単独、溶解した G P C 3 - L P 2 と混合したリポソームをパルスした D C 、およびリポソームに封入された I M P 3₅₀₂ - 5₂₇ - L P でパルスされた D C は、陰性対照として使用された。

40

【0224】

50

インビトロクロスプライミングおよび L P 特異的マウス C D 4⁺ T 細胞の誘導

H L A - A 2 (H D D) トランスジェニックマウス (T g m) は、 F . A . L e m o n n i e r 博士の厚意により提供された (P a s c o l o S, et al., J E x p M e d 1997; 185: 2043 - 51)。マウスに、7 日の間隔で、不完全フロ

インドアジュバント (I F A) 中に乳化した G P C 3 - L P 2 溶液または A 2 - G P C 3 - S P 溶液 (H L A - A 2 T g m, 5 0 μ g / マウスまたは 0 . 5 m M / 1 0 0 μ L) を尾基底部へ皮下注射した。 S P および L P 2 の等モル (0 . 5 m M / 1 0 0 μ L) の投与は、それらの免疫原性との比較に用いられる。 I F A - P B S は、陰性対象として使用され、前述したように分析された (Tomita Y, et al. Clin Cancer Res 2013; 19: 4508 - 20; Tosolini M, et al. Cancer Res 2011; 71: 1263 - 71; Tomita Y, et al., Oncoimmunology 2014; 3: e28100 - 15)。

【0225】

A 2 または A 2 4 - G P C 3 - S P で免疫した H C C 患者における G P C 3 - L P 特異的 C D 4 $^{+}$ T 細胞応答の評価

H C C 患者から単離した凍結 P B M C を解凍後、5 % ヒト補体除去血漿を添加した最終量 2 m l の A I M - V において 5 つの G P C 3 - L P (各々 1 0 μ g / m L) の混合液と共に細胞を 3 7 $^{\circ}$ で培養した (2 \times 1 0 6 個 / ウェル、2 4 穴プレート) ; I L - 2 と I L - 7 は、0 日目と 2 日目に加えられた。細胞培養の 1 週間後、細胞を回収し、洗浄し、および個々の G P C 3 - L P または対照 L P と共に E L I S P O T プレートにおいて 1 8 時間培養した (1 \times 1 0 5 個 / ウェル)。 G P C 3 - L P 特異的 T h 細胞の数は前述の通りに評価した (Tomita Y, et al., Int J Cancer 2014; 134: 352 - 66)。

【0226】

統計解析

本発明者らは、データを、両側スチュードント t 検定 (棒グラフ)、またはノンパラメトリックのマン - ホイットニー U 検定 (散布図) によって比較した。すべての検定に関して P 値 < 0 . 0 5 の差を統計的に有意とみなした。

【0227】

結果

潜在的なプロミスキャス H L A クラス I I 結合 G P C 3 - L P の予測および選択

G P C 3 の潜在的かつプロミスキャスな H L A クラス I I 結合 T h 細胞エピトープを同定するため、G P C 3 のアミノ酸配列を、近年開発されたコンピュータアルゴリズムを用いて最初に調べた (図 7 A および表 1) (Wang P, et al. B M C B i o i n f o r m a t i c s 2 0 1 0 ; 1 1 : 5 6 8 . Wang P, et al. P L o S C o m p u t B i o l 2 0 0 8 ; 4 : e 1 0 0 0 0 4 8)。コンピュータアルゴリズムによって強力なプロミスキャス H L A クラス I I 結合ペプチドであると予測された、2 つの領域である G P C 3 - L P 2 : G P C 3_{1 3 7 - 1 6 1} および G P C 3 - L P 3 : G P C 3_{2 8 9 - 3 1 3} が、H L A - A 2 または A 2 4 拘束性 C T L によって認識される既知の 9 マーまたは 1 0 マーの C T L エピトープに近位であると同定された。 (図 7 B)。3 つの L P (G P C 3 - L P 1 : G P C 3_{9 2 - 1 1 6}、G P C 3 - L P 4 : G P C 3_{8 6 - 4 1 2} および G P C 3 - L P 5 : G P C 3_{5 5 6 - 5 7 6}) もまた、既知の C T L エピトープ配列に含まれない強力なプロミスキャス H L A クラス I I 結合ペプチドと予測された。すべての 5 つのペプチドが、その後の分析で合成された。

【0228】

プロミスキャスな G P C 3 由来 T h 細胞エピトープの同定

健常ドナーの P B M C から単離した C D 4 $^{+}$ T 細胞を、週 1 回の間隔で、G P C 3 - L P でパルスした自己 D C および P B M C で刺激した。少なくとも 3 回の刺激後、C D 4 $^{+}$ T 細胞の G P C 3 - L P 特異的応答を I F N - E L I S P O T アッセイによって調べた。

G P C 3 - L P 1 : G P C 3_{9 2 - 1 1 6} は、H L A - D R 依存的に健常ドナー (H D 1 0) D R B 1 * 0 7 : 0 1 / 1 3 : 0 2 / D R 5 3 / D R 5 2 から抗原特異的 T h 細胞を生成することができる (図 1 A)。G P C 3 - L P 1 もまた、H L A - D R 依存的に H D 5 : D R B 1 * 0 4 : 0 5 / 0 9 : 0 1 / D R 5 3 から抗原特異的 T h 細胞を生成するこ

10

20

30

40

50

とができる(図1A)。

【0229】

HD10:D RB1*07:01/13:02/DR53/DR52由来のGPC3-LP2:GPC3₁₃₇₋₁₆₁誘導Th細胞は、GPC3-LP2でパルスしたPBM¹⁰Cに応答してHLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1B)。他のHLAクラスII分子によって拘束されるTh細胞において、GPC3-LP2が応答を誘導するかどうかを調べるために、HLA-DR13陰性健常ドナーからのCD4 $^{+}$ T細胞を試験した。HD5:D PB1*02:01/04:02から生成されたTh細胞は、GPC3-LP2でパルスしたPBM²⁰Cに応答してHLA-DP依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1B)。GPC3-LP2が、健常ドナー、HD4:D RB1*08:03/14:05(図1B)およびHD11:D RB1*09:01/14:54/DR53(図1B)から、特異的Th細胞をHLA-DR依存的に生成させたこともまた、認められた。HD3:D RB1*08:02/15:02からのPBM³⁰Cにおけるペプチド特異的応答もまた検出された(データ示さず)。

【0230】

次に、我々はGPC3-LP3;GPC3₂₈₉₋₃₁₃がペプチド特異的Th細胞を生成することができるかどうかについて評価した。HD10:D RB1*07:01/13:02/DR53/DR52から生成されたTh細胞は、GPC3-LP3でパルスしたPBM²⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1C)。HD5:D RB1*04:05/09:01/DR53から產生されたTh細胞は、GPC3-LP3でパルスしたPBM²⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1C)。HD11:D RB1*09:01/14:54/DR53から產生されたTh細胞もまた、GPC3-LP3でパルスしたPBM²⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図8A)。

【0231】

抗原特異的Th細胞を生成するGPC3-LP4;GPC3₃₈₆₋₄₁₂の能力についてもまた評価した。HD3:D RB1*08:02/15:02から生成されたTh細胞は、GPC3-LP4でパルスしたPBM³⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1D)。HD10:D RB1*07:01/13:02/DR53/DR52から生成されたTh細胞は、GPC3-LP4でパルスしたPBM³⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1D)。

【0232】

次に、抗原特異的Th細胞を生成するGPC3-LP5;GPC3₅₅₆₋₅₇₆の能力について評価した。HD10:D RB1*07:01/13:02/DR53/DR52から生成されたTh細胞は、GPC3-LP5でパルスしたPBM⁴⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1E)。HD5:D RB1*04:05/09:01/DR53から生成されたTh細胞は、GPC3-LP5でパルスしたPBM⁴⁰C応答において、HLA-DR依存的に有意な量のIFN- γ を產生した(図1E)。

【0233】

GPC3特異的Th細胞の拘束HLAクラスII分子の正確な同定

HD10:D RB1*07:01/13:02/DR53/DR52由来のバルクGPC3-LP1特異的Th細胞は、GPC3-LP1でパルスされたRM3-DR52b細胞(図2A)をHLA-DR依存的に特異的に認識したが(データ示さず)、しかし、L-DR7、L-DR13、L-DR53、L-DR52aでパルスしたGPC3-LP1は認識しなかった。HD5:D RB1*04:05/09:01/DR53由来の他のバルクGPC3-LP1特異的Th細胞は、GPC3-LP1でパルスされたL-DR9細胞をHLA-DR依存的に特異的に認識したが、しかし、L-DR8またはL-DR53でパルスされたGPC3-LP1は認識しなかった(図2A)。これらの結果は、GPC3-LP1が少なくともHLA-DR52bおよびHLA-DR9によって提示されてい

10

20

30

40

50

50

ることを示している。

【0234】

HD10 : DRB1^{*}07 : 01 / 13 : 02 / DR53 / DR52 から生成されたバルク GPC3 - LP2 特異的 Th 細胞の拘束 HLA クラス II 分子を同定するために、Th 細胞クローニング (Th クローニング) を生成した。Th クローニング細胞は、GPC3 - LP2 でパルスした HLA - DR52b (HLA - DRB3^{*}02 : 02) がトランスフェクションされた RM3 細胞株および 2 人の HLA - DR13⁺DR7⁻ 健常ドナーからの同種異系 PBMC を特異的に認識した (図 2B、図 8B)。これらの結果は、GPC3 - LP2 が HLA - DR52b によって提示されたことを示している。HD5 : DRB1^{*}02 : 01 / 04 : 02 から生成された、GPC3 - LP2 特異的 Th 細胞からの Th クローニングは、10 GPC3 - LP2 でパルスされた、L - DP 細胞、および共通の HLA - DP2 分子を有する同種異系 PBMC を特異的に認識することができるが、GPC3 をパルスした RM3 - DP4 細胞も HLA - DP2 がない同種異系 PBMC も認識しない。GPC3 - LP2 は HLA - DP2 拘束性 Th 細胞を誘導することが確認された (図 2B、図 8C)。GPC3 - LP2 は、APC としての同種異系 PBMC および L 細胞トランスフェクタントの両方によって確認される、HLA - DR8 - (DRB1^{*}08 : 03) 拘束性 Th 細胞を生成した (図 8D、図 8E)。したがって、GPC3 - LP2 が HLA - DR52b、HLA - DP2、HLA DR8、HLA - DR9 / 14 および HLA - DR8 / 15 と結合すること (データ示さず) は、GPC3 - LP2 が、いくつかの高頻度 HLA クラス II 分子 (Saito S, et al., *Tissue Antigens* 2000; 56: 522 - 9; Mack SJ, et al., *Tissue Antigens* 2000; 55: 383 - 400) によって提示されるプロミスキャスな Th 細胞エピトープであることを示唆する。

【0235】

HD10 : DRB1^{*}07 : 01 / 13 : 02 / DR53 / DR52 から生成された GPC3 - LP3 特異的バルク Th 細胞は、2 人の HLA - DR13⁺ ドナー (HD7、HD9) からの同種異系 PBMC を認識することができず、GPC3 - LP3 が HLA - DR7 または DR53 拘束性 Th 細胞を生成することが結論付けられた (図 2C)。HD5 : DRB1^{*}04 : 05 / 09 : 01 / DR53 からの GPC3 - LP3 特異的バルク Th 細胞は、GPC3 - LP3 でパルスした L - DR9 細胞を HLA - DR 依存的に特異的に認識するが、GPC3 - LP3 でパルスした L - DR4 または L - DR53 細胞は認識しなかった (図 2C)。これらの結果は、GPC3 - LP3 が、HLA - DR9 によって提示されることを示す。

【0236】

GPC3 - LP4 反応性 Th クローニングは、HD3 : DRB1^{*}08 : 02 / 15 : 02 から生成されたバルク Th 細胞から確立された。次に、同種異系 PBMC は、共通の HLA - DR 分子による拘束を決定するための APC として用いられた。GPC3 - LP4 は HLA - DR15 または DR51 拘束性 Th 細胞を生成することが確認された (図 2D)。GPC3 - LP4 反応性 Th クローニングはまた、HD10 : DRB1^{*}07 : 01 / 13 : 02 / DR53 / DR52 から樹立された。GPC3 - LP4 反応性 Th クローニングは、L - DR13 を特異的に認識し、GPC3 - LP4 でパルスした L - DR7 を認識しなかった。GPC3 - LP4 が HLA - DR13 拘束性 Th 細胞を生成することが結論付けられた (図 2D)。

【0237】

HD10 : DRB1^{*}07 : 01 / 13 : 02 / DR53 / DR52 由来の GPC3 - LP5 反応性 Th クローニングは L - DR13 を認識することができたが (図 2E)、GPC3 - LP5 でパルスした L - DR7、L - DR53、L - DR52a 細胞も RM3 - DR52b 細胞も認識できなかった。もう一つの HD5 : DRB1^{*}04 : 05 / 09 : 01 / DR53 由来の GPC3 - LP5 反応性 Th クローニングは L - DR9 を認識することができたが、GPC3 - LP5 でパルスした L - DR - 4 細胞も L - DR53 細胞を認識する

10

20

5

30

40

50

ことができなかった。したがって、G P C 3 - L P 5 は H L A - D R 1 3 および H L A - D R 9 拘束性 T h 細胞を生成すると結論付けられた（図 2 E）。

【0238】

G P C 3 - L P は、T h 1 型 C D 4 ⁺ T 細胞を刺激する

G P C 3 - L P に反応する T h 細胞を特徴づけるために、培養液中でコグネイトペプチドでパルスされた自己 P B M C による刺激に応答した T h 細胞によって分泌されたサイトカインのレベルを測定した。H D 1 0 から生成された G P C 3 - L P 1 、 L P 2 、 L P 4 特異的 T 細胞クローニは、コグネイトペプチドでの再刺激後に、大量の I F N - 、 T N F - 、 I L - 2 、 G M - C S F および M I P 1 を産生し、このことは、T h 1 分極特性を示した（図 3）。

10

【0239】

D C による G P C 3 - L P の天然のプロセシングおよび提示の可能性

D C が G P C 3 タンパク質を取り込み、プロセシングして、L P による刺激によって生成された G P C 3 - L P 特異的 T h 細胞を刺激するかどうかを評価した。組換え G P C 3 タンパク質をロードした D C を調製し、I F N - E L I S P O T アッセイにおける A P C として使用した（Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8.）；Hara o M, et al., Int J Cancer 2008; 123: 2616-25.）。H D 1 0 : D R B 1 * 0 7 : 0 1 / 1 3 : 0 2 / D R 5 3 / D R 5 2 から生成された 4 つの G P C 3 - L P (G P C 3 - L P 1 、 3 、 4 および 5) 反応性 T h 細胞は、G P C 3 タンパク質をロードした D C を効率よく認識したが、対照タンパク質をロードした D C は認識せず、このことは、これらのエピトープが、G P C 3 タンパク質から天然にプロセシングされることを示している（図 4）。この結果は G P C 3 - L P 1 、 3 、 4 および 5 が G P C 3 タンパク質から天然にプロセシングされ、D C によって提示されることを示唆している。

20

【0240】

ヒト D C を用いたインビトロクロスプレゼンテーションアッセイ

C T L エピトープを担持する G P C 3 - L P 2 が、A 2 - G P C 3 - S P 特異的 C T L を刺激できるかどうかを評価した。A 2 - G P C 3 - S P 特異的 C T L を刺激する G P C 3 - L P 2 の能力を、「材料および方法」の項に記載の通りに I F N - E L I S P O T アッセイで調べた。図 5 A に示すように、H L A - A 2 ⁺ ドナー由来の A 2 - G P C 3 - S P 特異的バルク C T L は、リポソームに封入された G P C 3 - L P 2 でロードした D C で刺激した応答において、I F N - を産生したが、リポソームに封入された対照 L P でロードした D C では産生しなかった。特異的 I F N - 産生は、抗 H L A クラス I m A b の添加によって特異的に阻害されたが、抗 H L A - D R m A b では阻害されず、したがって、このことは A 2 - G P C 3 - S P 反応性 C T L はインビトロにおいて、D C による G P C 3 - L P 2 の交差提示を通して刺激されたことを示唆する。

30

【0241】

H L A - A 2 トランスジェニックマウスを用いたインビオクロスプライミングアッセイ

A 2 - G P C 3 - S P 特異的 C T L をプライミングする G P C 3 - L P 2 の能力を、エクスピボ I F N - E L I S P O T アッセイで調べた。H L A - A 2 T g m を、I F A 中に乳化した G P C 3 - L P 2 で 2 回免疫した。G P C 3 - L P 2 でワクチン接種した H L A - A 2 T g m の C D 8 ⁺ T 細胞は、A 2 - G P C 3 - S P でパルスした B M - D C での刺激に応答して I F N - を特異的に産生した（図 5 B）。これらの結果は、G P C 3 - L P 2 の取込み後、A P C が H L A - A 2 T g m においてインビボで A 2 - G P C 3 - S P 特異的 C T L をクロスプライミングすることができることを示唆する。

40

【0242】

G P C 3 - L P 2 による C T L のインビボでの増加および C D 4 ⁺ T 細胞の誘導

等モルの A 2 - G P C 3 - S P および G P C 3 - L P 2 を上記のようにマウスを免疫化するために用いた場合、単離した C D 8 ⁺ 細胞において、I F N - E L I S P O T アッセイによって評価した A 2 - G P C 3 - S P 特異的 C T L の数は、A 2 - G P C 3 - S

50

Pで免疫化したマウスと比較して、G P C 3 - L P 2で免疫したマウスで増加した(図5C)。G P C 3 - L P 2特異的T h細胞をプライミングするG P C 3 - L P 2の能力を、エクスピボIFN-ELISPOTアッセイで調べた。CD 4⁺T細胞は、磁気ビーズを用いて、G P C 3 - L P 2を用いて免疫化したH L A - A 2 T g mから単離した。これらCD 4⁺T細胞は、G P C 3 - L P 2(図5D)でパルスしたマウスB M D Cの刺激に応答してIFN- γ を特異的に産生したが、対照G P C 3 - L P 5では産生しなかった。これらの結果は、G P C 3 - L P 2もまた、H L A - A 2 T g mにおいて、インビボでG P C 3 - L P 2特異的に、およびおそらくはI - A^b拘束性T h細胞をプライミングすることができることを示唆する。

【0243】

10

A 2 - G P C 3 - S PまたはA 2 4 - G P C 3 - S Pをワクチン接種したH C C患者におけるG P C 3特異的CD 4⁺T h細胞の存在

拘束性エピトープをワクチン接種したがん患者はしばしばワクチン内には存在しないT細胞応答を生じる(Corbier e V, et al. Cancer Res 2011; 71: 1253 - 62; Ribas A, et al., Trends Immunol 2003; 24: 58 - 61; Hunder NN, et al. N Engl J Med 2008; 358: 2698 - 703)。がん患者におけるG P C 3 - L P特異的T h細胞応答を検出するために、A 2 - G P C 3 - S PまたはA 2 4 - G P C 3 - S Pをワクチン接種したH C C患者から単離されたP B M Cを回収した。ドナーの特性を表3に要約する。インビトロでのG P C 3 - L Pを用いたP B M Cの刺激の7日後、各々のG P C 3 - L P特異的T細胞の頻度を、IFN-ELISPOTアッセイによって検出した(図6A ~ E)。応答は、IFN- γ 分泌細胞の数が上記の陰性対照よりも少なくとも2倍増加したときに陽性とみなされた。G P C 3 - L P特異的免疫応答は、ワクチン接種した患者18人中11人で観察された(図6および表3)。T細胞によるG P C 3 - L P特異的IFN- γ 産生は、抗H L AクラスI I m A bの添加によって有意に阻害されたが(図6、図10)、しかし抗H L AクラスI I m A bでは阻害されなかつた(データ示さず)。これらの結果は、G P C 3 - L P特異的IFN- γ 産生が抗原特異的CD 4⁺T細胞由来であることを明確に示している。

20

【0244】

【表3】

A2-GPC3-SPまたはA24-GPC3-SPを用いてワクチン接種されたHCC患者から単離されたPBMCのGPC3-LP特異的応答および患者のHLA遺伝子型

患者 ID	GPC3-LPの特異性	HLA-クラスII拘束	ワクチン接種のNo.	HLA-A*	HLA-DRB1*	HLA-DPB1*
Ph-I-16	GPC3-LP2	DP	7	02:01	04:05	16:02 02:01 05:01
Ph-I-20	(-)	-	5	24:02	04:07	15:02 02:01 09:01
Ph-I-24	GPC3-LP2	DP	5	02:07	04:05	08:03 05:01 -
Ph-I-25	GPC3-LP2	DR	5	02:06	08:02	14:54 02:02 04:02
Ph-II-6	GPC3-LP3	DR	3	24:02	15:02	16:02 05:01 09:01
Ph-II-7	GPC3-LP2	DR	3	24:02	14:54	15:01 03:01 05:01
Ph-II-12	(-)	-	3	24:02	04:05	13:02 04:01 04:02
Ph-II-20	(-)	-	3	24:02	04:05	09:01 02:01 03:01
Ph-II-26	GPC3-LP2, LP4, LP5	DR	3	24:02	04:03	09:01 02:01 05:01
Ph-II-30	GPC3-LP2, LP4, LP5	DR	3	02:07	08:03	11:01 02:02 14:01
Ph-II-36	GPC3-LP2	DP	3	02:01/24:02	01:01	04:05 02:01 04:02
Ph-II-42	GPC3-LP2	DP	3	02:06/24:02	14:54	15:01 02:01 02:02
Ph-II-45	(-)	-	3	24:02	15:02	- 02:01 09:01
Ph-II-47	(-)	-	3	02:01	04:05	14:03 05:01 -
Ph-II-48	(-)	-	3	24:02	04:05	09:01 02:01 -
Ph-II-49	(-)	-	3	24:02	04:01	04:05 02:01 05:01
Ph-II-52	GPC3-LP2	DP	3	02:06	04:05	04:06 02:01 04:02
Ph-II-53	GPC3-LP3	DR	3	24:02	04:05	08:02 04:02 05:01
Ph-II-55			3	24:02	09:01	15:02 05:01 09:01
Ph-II-56			3	02:06	08:02	09:01 03:01 05:01

(-), 陰性の応答 ; No., 数 ; Ph-I, 第1相試験 ; Ph-II, 第2相試験

【0245】

GPC3-SPに基づいたがん免疫療法の臨床試験 (Y u S a w a d a , e t a l , 2 0 1 2) に登録されている 20 名の患者由来の CD4⁺ Th 細胞の GPC3-LP 特異的免疫応答が以下のように試験された。 GPC3-LP 特異的 Th 細胞応答は、 IFN - E L I S P O T アッセイによって測定された。要約すると、患者由来の PBMC を、示された GPC3-LP で刺激した。応答は、 IFN - スポットの平均数が 15 を超え、かつバックグラウンドに対して 2 倍を超えた場合に陽性として評価した。

【0246】

考察

GPC3 由来 SP は、進行期の HCC 患者において SP 特異的 CTL を誘発することができた (S a w a d a Y , e t a l . C l i n C a n c e r R e s 2 0 1 2 ; 1 8 : 3 6 8 6 - 9 6)。これらのメモリー CTL の誘導と維持は、腫瘍特異的 CD4⁺ Th 細胞の助けを誘導することによって改善することができる。したがって本研究は、ヒト GPC3 タンパク質由来の CD4⁺ Th 細胞エピトープの同定に焦点を当てた。

【0247】

本発明の重要所見は、以下の通りである。

(1) LP 特異的 Th 1 型 CD4⁺ Th 細胞応答を誘発しうる 5 つのプロミスキャスな免疫原性の GPC3-LP が同定され、そのうちの 4 つは、インビトロで、 DC によって GPC3 タンパク質から天然にプロセシングされ、1 つはインビボで天然にプロセシングされることが示された。(2) 天然の HLA - A 2 拘束性 CTL エピトープを有する GPC3-LP 2 は、リポソームに封入された場合に首尾良く交差提示される。 IFN 中に乳化されたこのペプチドはさらに、 HLA - A 2 T g m で免疫された場合、インビボで効率

10

20

30

40

50

的にクロスプライミングされる。(3)IFAに乳化されたA2-GPC3-SPを含むGPC3-LP2によるHLA-A2-Tgmの免疫化は、IFA中に乳化されたA2-GPC3-SPによる免疫と比較して、SP特異的CTLを誘発する点で優れていた。(4)この増大した応答の一部は、免疫化したHLA-A2-TgmにおいてGPC3-LP2特異的CD4⁺Th細胞応答が観察されたため、CD4⁺T細胞の助けに起因する可能性がある。および、(6)GPC3-LP特異的CD4⁺Th細胞応答の存在は、GPC3-SPでワクチン接種されたがん患者において観察された。

【0248】

MHCクラスIIタンパク質は、高度に多型性である。それゆえ、多数の人に有用であることが可能であるように、天然においてプロミスキヤスであることはペプチドまたはペプチドカクテルにとって重要である。本研究では、5つのペプチドが少なくとも2つの異なるHLAクラスII拘束性CD4⁺Th細胞を誘導可能であることが見出された(表4、図2)。限定された数の健常ドナーで免疫原性を確認したところ、5つのペプチドが日本人集団においてより広い適用範囲を示した。これらの5つのペプチドは、少なくとも7つの異なるHLAクラスII拘束性Th細胞を誘導することができ(表4)、それは日本人の人口の70%以上をカバーする(表5)(Fumiaki Nakajima JN, et al., MHC 2001; 8: 1-32)。そのうえ、大部分がオーバーラップするペプチドを共有するいくつかの一般的なHLA-DR型が存在する(Southwood S, et al. J Immunol 1998; 160: 3363-73)。それらは、オーバーラップするコグネイトペプチドによって3つにグループ化できる。1つ目のグループ: DRB1*01:01、DR5*01:01、DRB1*15:01、DRB1*04:01、DRB1*13:02、DRB1*07:01、DRB1*09:01、2つ目のグループ: DRB1*04:05、DRB1*08:02、DRB1*13:02、3つ目のグループ: DRB1*12:01およびDRB1*03:01。上記データは、ほんの3つのペプチドが、世界人口において存在するHLAクラスIIアリルのほとんどをカバーし得ることを示している。長鎖ペプチドの特性を考慮すると、この研究で研究された5つのペプチドは、抗腫瘍特性を有するペプチド特異的Th1細胞を誘導するために多くの人口をカバーする可能性があると結論付けることができる。

【0249】

10

20

■ CTLエピトープを含む、GPC3に由来するプロミスキヤスなCD4⁺Thヘルパー細胞エプトープの同定

【表 4】
長鎖ペプチド アミノ酸残基 (LP)の位置 配列 アミノ酸の長さ T細胞 ドナー HLA/マウスマHC 免疫応答 拘束分子 天然のプロセシング

長鎖ペプチド (LP)の名称	アミノ酸残基 (LP)の位置	配列	アミノ酸の長さ	T細胞 ドナー	HLA/マウスマHC	免疫応答	拘束分子	天然のプロセシング
GPC3-LP1	92-116	LLQSASMELKF ¹¹ QNAAVFQEAEF	25	HD3	DRB1*08:02/15:02	陰性	DRB3*02:02 (L)	インビトロで陽性
				HD10	DRB1*07:01/13:02	陽性	DRB1*09:01(L)	n.t.
GPC3-LP2	137-161	LTPQ ¹⁴ AFEEFV ¹⁵ GEEFFT ¹⁶ D ¹⁷ V ¹⁸ SLY ¹⁹ LGSD ²⁰	25	HD3	DRB1*08:02/15:02	陽性	DRB3*02:02 (L, allo)	インビトロで陽性
		^b CTL epitope:A2-GPC3 ₁₄₄₋₁₆₂		HD10	DRB1*07:01/13:02	陽性	DPB1*02:01(L, allo)	n.t.
				HD5	DPB1*02:01/04:02	陽性	DRB1*08:03(L, allo)	n.t.
				HD4	DRB1*08:03/14:05	陽性		
				HD11	DRB1*09:01/14:54	陽性		n.t.
				Tgm	I-A ^b	陽性		I-A ^b
GPC3-LP3	289-313	V ¹ E ² ID ³ KY ⁴ W ⁵ R ⁶ E ⁷ Y ⁸ I ⁹ L ¹⁰ S ¹¹ L ¹² E ¹³ E ¹⁴ L ¹⁵ V ¹⁶ N ¹⁷ G ¹⁸ M ¹⁹ Y ²⁰ R ²¹	25	HD3	DRB1*08:02/15:02	陰性		
		^c CTL epitope:A24-GPC3 ₂₉₈₋₃₀₆		HD10	DRB1*07:01/13:02	陽性	DRB1*09:01(L)	インビトロで陽性 (患者中)
				HD5	DRB1*04:05/09:01	陽性		
				HD4	DRB1*08:03/14:05	陰性		
				HD11	DRB1*09:01/14:54	陽性		
GPC3-LP4	386-412	SRRR ¹ QKL ² KSF ³ ISFY ⁴ SALPG ⁵ Y ⁶ ICS ⁷ H	27	HD3	DRB1*08:02/15:02	陽性	DRB1*15:02(allo)	n.t.
				HD10	DRB1*07:01/13:02	陽性	DRB1*13:02 (L)	インビトロで陽性
				HD5	DRB1*04:05/09:01	陰性		
GPC3-LP5	556-576	GNVHSPLKLLT ¹ SM ² ASV ³ WCFF	21	HD3	DRB1*08:02/15:02	陰性	DRB1*13:02 (L)	インビトロで陽性
				HD10	DRB1*07:01/13:02	陽性	DRB1*09:01(L)	n.t.
				HD5	DRB1*04:05/09:01	陽性		

^aドナーのHLAアリルの詳細は表 2に示されている；下線が引かれた太字の配列はCTLエピトープである (^bKomori H, et al., 2006, ^cNakatsura T et al., 2004); ^{aa}, アミノ酸; ^{bb}, n.t., 試験していない；^{cc}, 拘束 HLAクラスII分子は単一のHLAクラスII分子を発現するL細胞株によって確認した；^{allo}, HLAクラスIIアリルのうちの少なくとも1つをドナーと共有する同種異系PBMNCによって確認した；Tgm, トランシジェニックマウス。

【表5】

日本人人口における5つのGPC3-LPの提示に関する
HLAクラスII分子の頻度 (<http://www/hla.or.jp/>)

HLA型	抗原頻度	頻度の順位	提示ペプチド
DR9	26.6%	3	GPC3-LP1, LP3, LP5
DR15	33.3%	2	GPC3-LP4
DR8	23.5%	4	GPC3-LP2
DR13	12.6%	6	GPC3-LP4, LP5
DRB3*02:02 ^a	25.4%	3	GPC3-LP1, LP2
DP2	42.4%	2	GPC3-LP2
DP5	62.1%	1	GPC3-LP2

^a Nakajima et al. MHC 2001; 8:1-32.

【0251】

がん性組織に Th1 細胞の強い浸潤を有するがん患者は、長く CTL 応答を維持し続けることによって長期の無病生存率 (Tosolini M, et al., Cancer Res 2011; 71: 1263-71) を示すことが報告されている (Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004; 4: 595-602)。我々の実験データは、GPC3-LP が、Th1 様細胞を誘導する可能性を有することを示しており (図3)、そして、ペプチドに基づいたがん免疫療法によって誘導された抗腫瘍免疫の強化の助けになるかもしれないことを示している。

【0252】

組換えGPC3タンパク質でパルスされた DC に応答することにより、5つのペプチド特異的 T 細胞のうち 4 つが IFN- γ を分泌することも見出した。これらの観察は、LP によって刺激されたことにより生成されたこれら Th 細胞が、GPC3タンパク質から DC によって天然にプロセシングされたペプチドを認識し得ることを示している (図3)。GPC3-LP3 特異的 CD4 $^{+}$ T 細胞応答は、インビトロでのこのペプチドによる PBM C の刺激の 1 週間後に HCC 患者から単離された PBM C で観察された (図6C)。この応答は、ペプチドで PBM C を刺激した 1 週間後に観察されたので、二次免疫応答である可能性が最も高い。したがって、患者の CD4 $^{+}$ T 細胞は、HLA クラスII分子との関連において、HCC 細胞から放出された GPC3タンパク質を GPC3-LP の提示のために天然でプロセシングした DC によって、インビトロにおいて感作されたことを示唆する。

【0253】

CTL 誘導の増加と関連している抗腫瘍免疫の誘導は、おそらく長期および DC 集中的な抗原提示に起因することが報告されている (Bijker M, et al., Eur J Immunol 2008; 38: 1033-42)。GPC3-LP2 でパルスされた DC はインビトロの試験で CTL エピトープを交差提示できないので、GPC3-LP2 のインビトロにおける交差提示能力を評価するために、リポソームに封入された LP が使用された。pH 感受性リポソームは、卵黄ホスファチジルコリンリポソームの表面を 3-メチルグルタリル化残基を有する pH 感受性デキストラン誘導体 (MGLu-Dex) で修飾することによって產生された。MGLu-Dex で修飾したリポソームは、樹状細胞によって効率的に取り込まれ、封入されたオボアルブミン (OVA) 分子をサイトゾルへ送達すると報告されている (Yuba E, et al., Biomaterials 2013; 34: 3042-52)。GPC3-LP2 は、このリポソームに封

10

20

30

40

50

入された場合、十分に交差提示した。これはまた、HLA-A2 TgmがGPC3-LP2およびIFAを用いて免疫化された場合、インビボにおいて、GPC3-SP特異的CTLを効果的にクロスプライミングすることも見出された(図5A、図5B)。次に、SP; A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂を包含する等モル用量のGPC3-LP2またはGPC3-LP2が、免疫応答の誘導において、よりよい効果を有するかどうかを評価した。GPC3-LP2のアミノ酸配列；GPC3₁₃₇₋₁₆₁は、マウスおよびヒトの間で完全に保存されていた。GPC3-LP2で免疫化されたマウスにおいては、SP単独で免疫化された場合と比較して、SP特異的CTLが増加していることが見出された(図5C)。この増大した応答の一部は、CD4⁺T細胞応答の助けに起因する可能性がある。なぜならGPC3-LP2は、インビボにおいてGPC3-LP2特異的マウスCD4⁺T細胞応答を刺激したからである(図5D)。HLA-A2 TgmはたったひとつのMHCクラスII分子、I-A^bのみを発現するので、GPC3-LP2はI-A^b分子によってマウスCD4⁺T細胞に提示されることが、強く示唆された。

【0254】

拘束性エピトープをワクチン接種したがん患者において、ワクチンに含まれないペプチドに対するT細胞応答がしばしば産生された(Corbiere V, et al., Cancer Res 2011; 71: 1253-62; Ribas A, et al., Trends Immunol 2003; 24: 58-61)。GPC3-LP特異的CD4⁺Th細胞応答の存在が、エピトープ拡大および予測されるGPC3-LPの天然の存在の可能性に対処するために確認された。興味深いことに、GPC3-LP特異的応答は、試験した18人の患者のうち11人に見られた。また、患者のほとんどがGPC3-LP2に対する応答を示した(図6、図10)。このことは、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の両方において、GPC3-LP2がプロミスキヤスな応答を誘導する単一のペプチドとして用いられ得ることを示唆している。がん患者におけるGPC3-LP特異的応答は、ワクチンとしてのLPの使用が、GPC3-SPに基づいたがん免疫療法の効果を改善するであろうことを示している。

LPの使用は、最小のCTLエピトープペプチドよりもいくつかの利点を有する(Srinivasan M, et al., Eur J Immunol 1993; 23: 1011-6; Zwaveling S, et al. J Immunol 2002; 169: 350-8; Janssen EM, et al. Nature 2005; 434: 88-93; Kenter GG, et al. N Engl J Med 2009; 361: 1838-47)。A2-GPC3₁₄₄₋₁₅₂SPおよびA24-GPC3₂₉₈₋₃₀₆SPを用いた第I相臨床試験の結果は、末梢血におけるGPC3ペプチド特異的CTLの存在を示している(Sawada Y, et al., Clin Cancer Res 2012; 18: 3686-96)。GPC3-SPをワクチン接種した後、強力な特異的CTL反応を示した患者において、顕著な抗腫瘍効果が観察されたにもかかわらず、進行性HCCの唯一の治療としてGPC3-SPが使用された場合に、完全奏功ではないことが観察された(Sawada Y, et al. Hum Vaccin Immunother 2013; 9)。CD4⁺およびCD8⁺T細胞エピトープの両方を有するGPC3-LP、またはGPC3-SPおよびLPワクチンの組み合わせの使用は、GPC3ペプチドに基づくがん免疫療法を改善し得ることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0255】

本発明は、強力な抗腫瘍免疫応答を誘導することができ、したがって多種多様ながん型に適用可能性を有する、GPC3由来のTh1細胞エピトープペプチドを記述する。そのようなペプチドは、がん、特にGPC3を発現するがんに対するペプチドワクチンとしてのさらなる開発に値する。本発明のペプチドは、Th1細胞応答を誘導することができ、したがって、Th1細胞によって分泌されるサイトカインが、抗原非依存的に細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞を助けるかまたは活性化することができる。それゆえ、本発明

10

20

30

30

40

50

によって提供される免疫治療戦略は、疾患がMHCクラスII分子によって媒介される免疫応答によって改善され得る限り、がんを含む任意の疾患に適用することができる。特に、本発明のTh1細胞は、CTLによって惹起される免疫応答を改善することができる。それゆえ、本発明のペプチドは、対象においてがんを含む疾患に対するCTL応答を増強するのに有益である。

【0256】

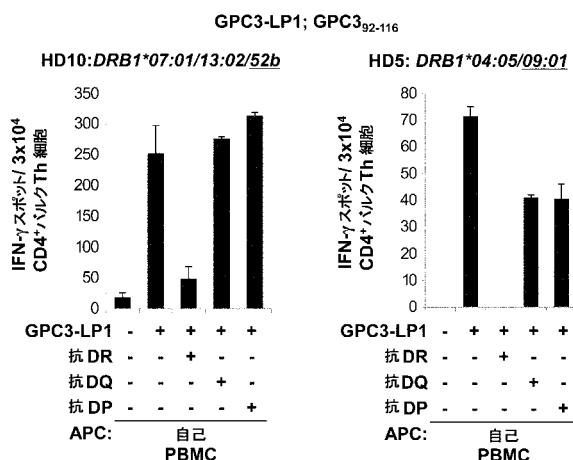
さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、Th1細胞だけでなく、GPC3発現細胞に対するCTLも誘導することができる。本発明のそのようなペプチドは、GPC3に関連する疾患、例えばGPC3を発現するがん、より詳細にはHCCおよびメラノーマの治療のためにも有用であり得る。

10

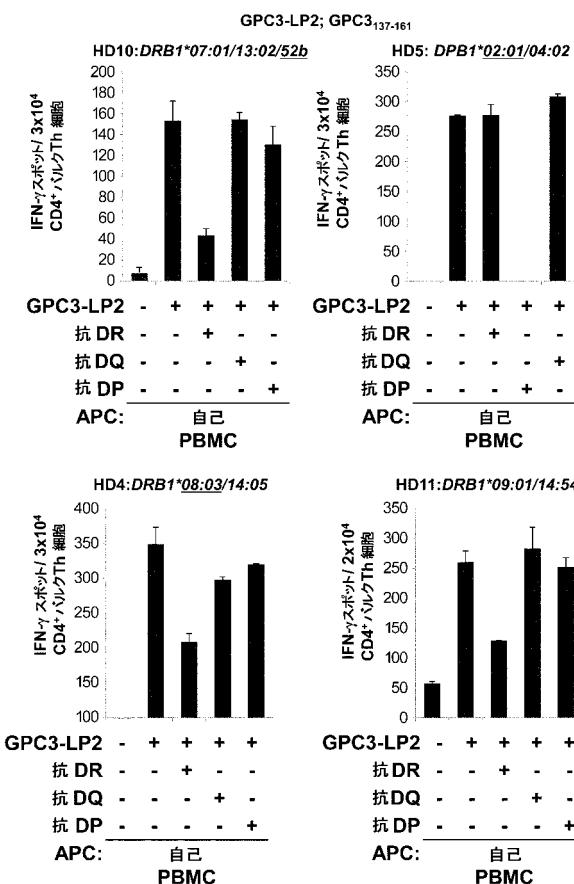
【0257】

本発明を、詳細におよびその特定の態様を参照して本明細書で説明したが、前記説明は本質的に例示的および説明的であり、本発明とその好ましい態様を例証することを意図する。日常的な実験を通して、当業者は、その境域および境界が添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされ得ることを容易に認識するであろう。

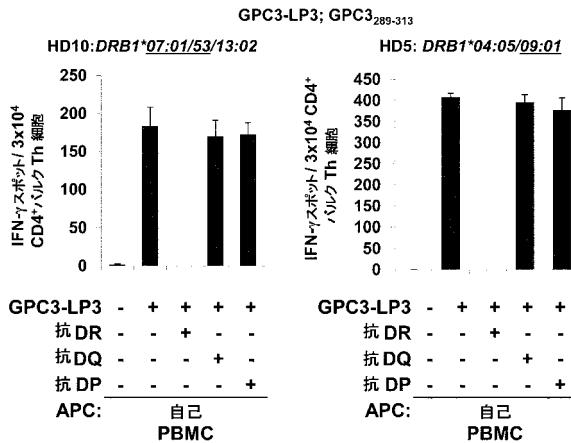
【図1A】



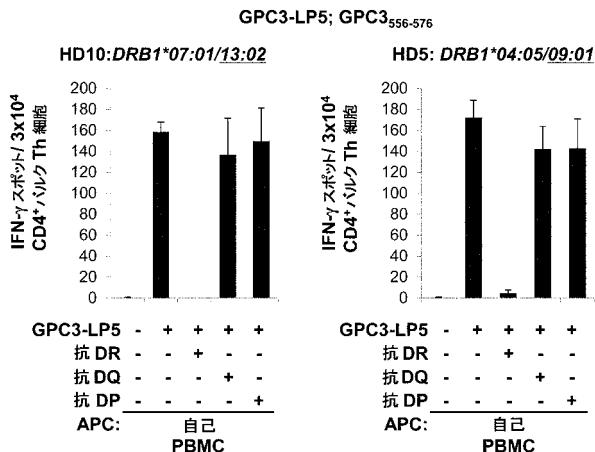
【図1B】



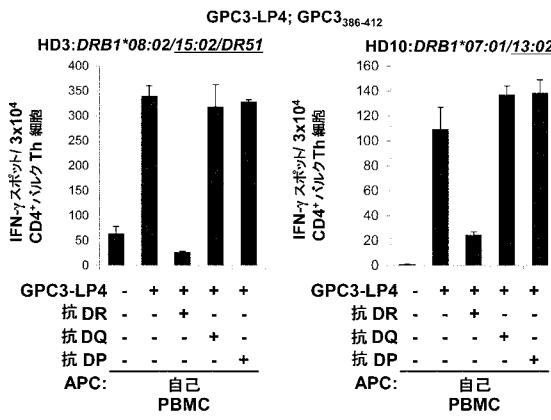
【図 1 C】



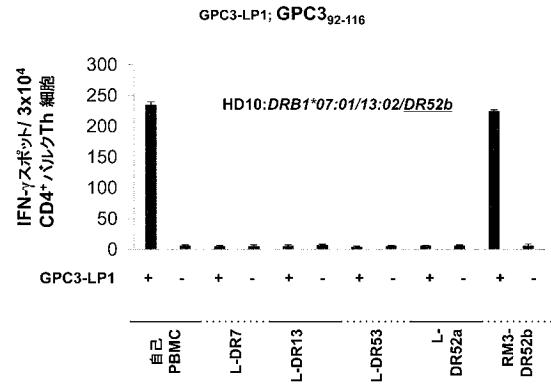
【図 1 E】



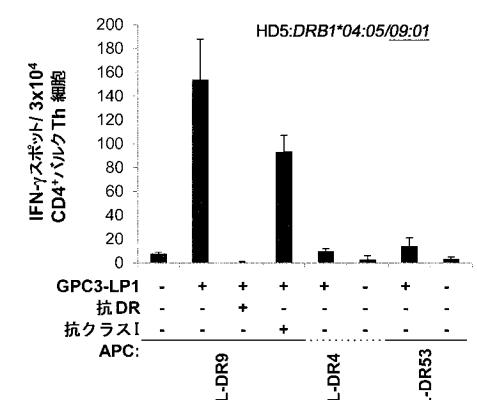
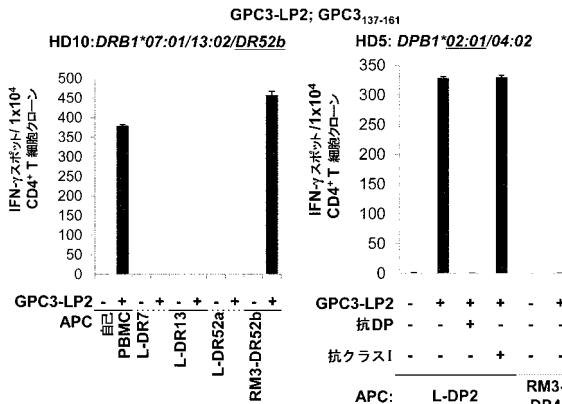
【図 1 D】



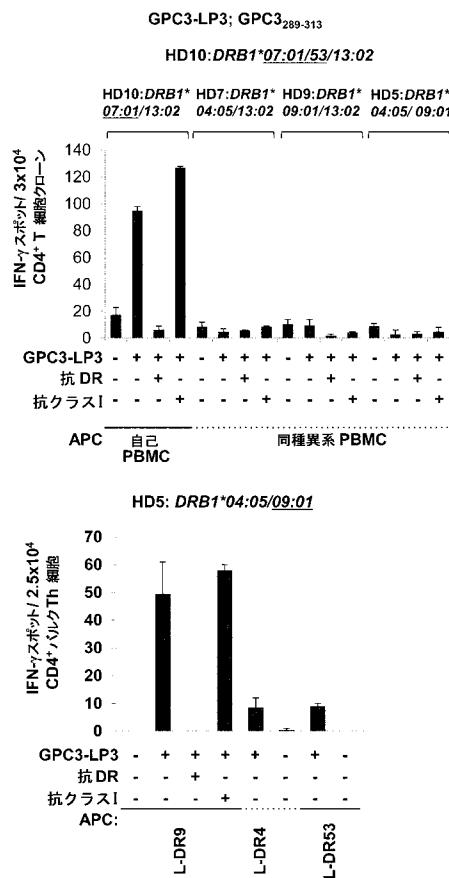
【図 2 A】



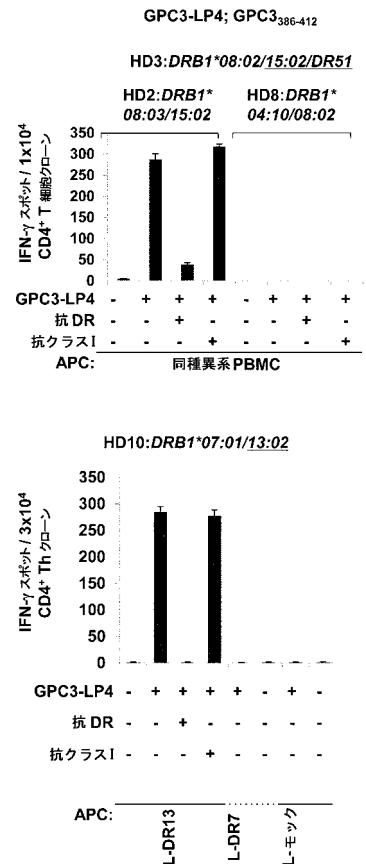
【図 2 B】



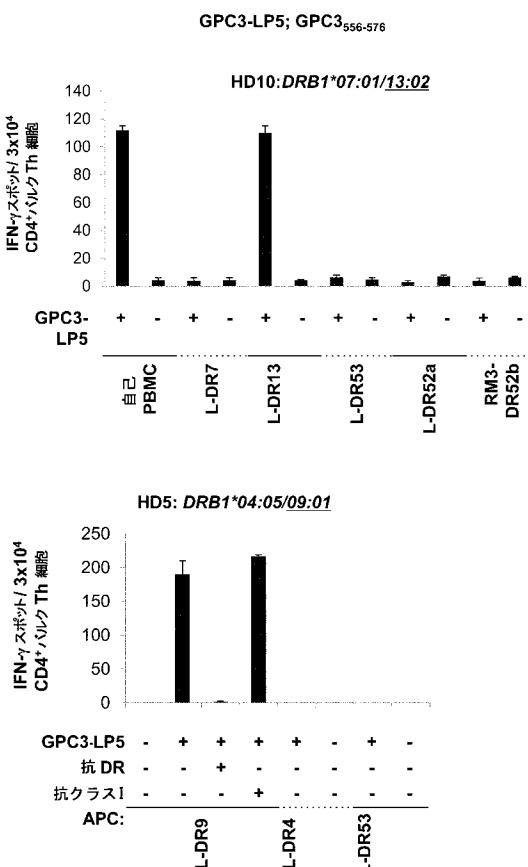
【 2 C 】



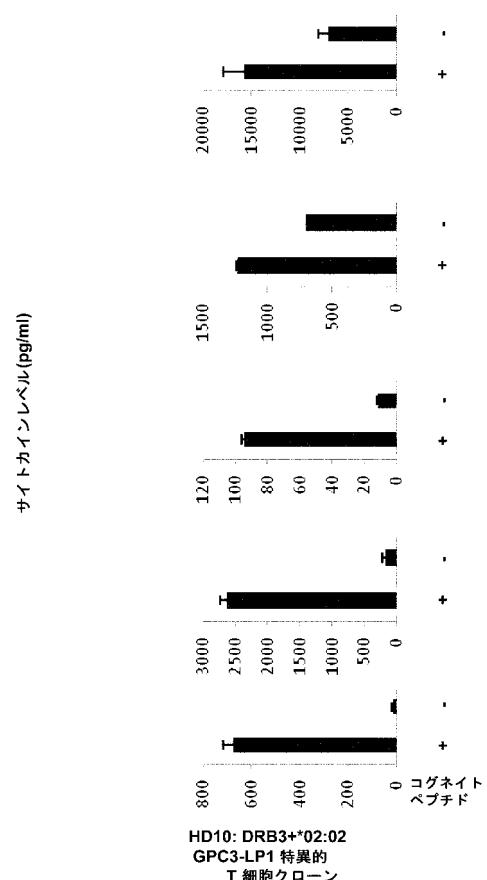
〔 図 2 D 〕



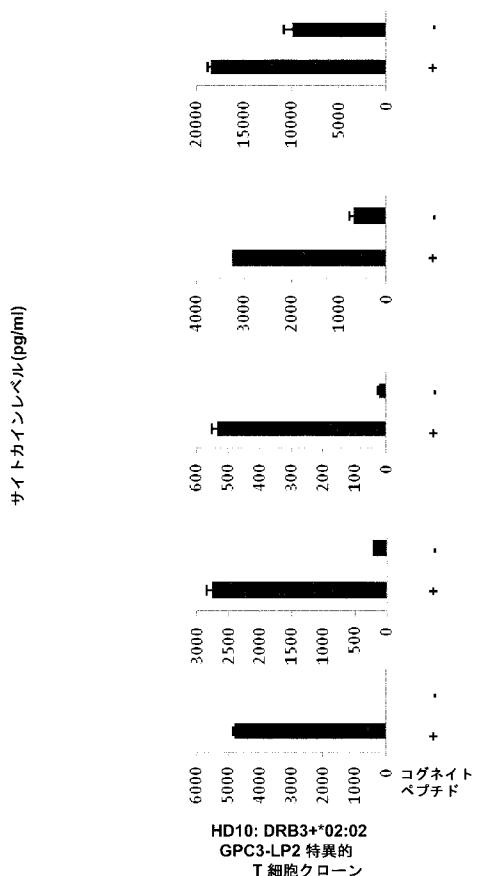
【 図 2 E 】



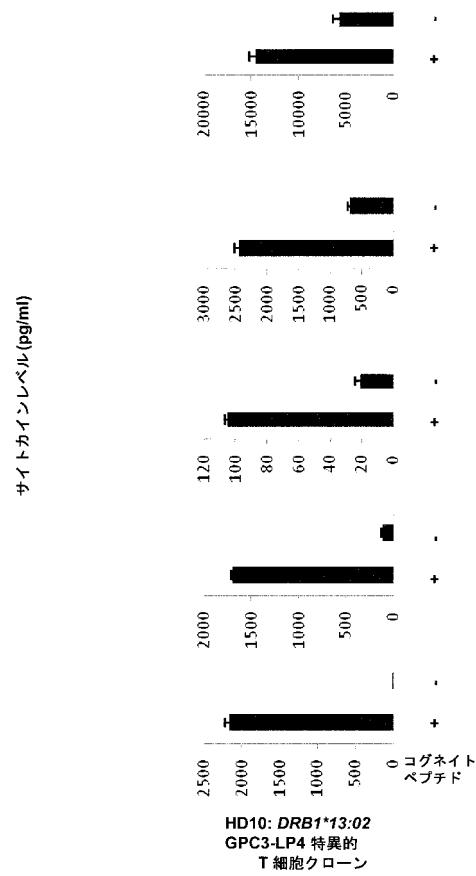
【図3A】



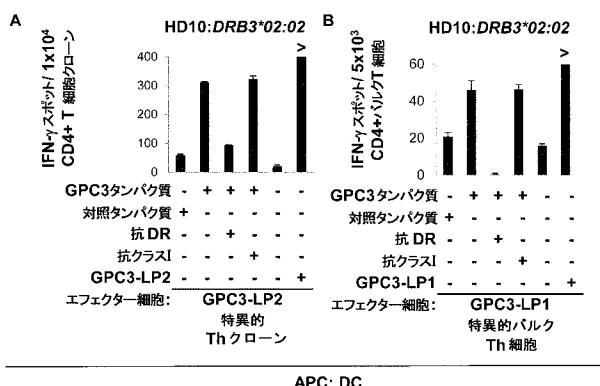
【図 3 B】



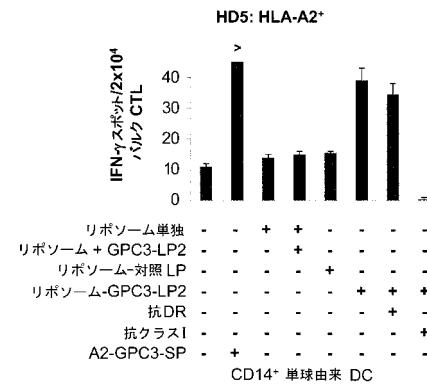
【図 3 C】



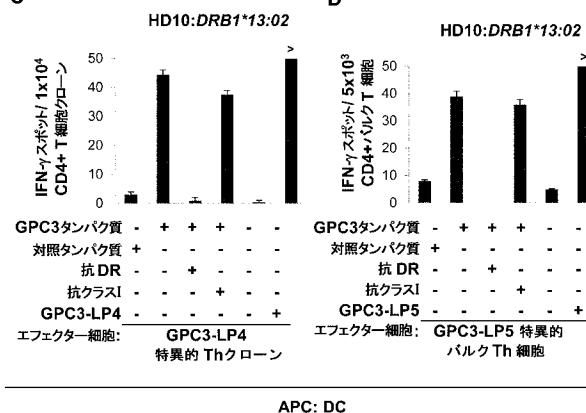
【図 4】



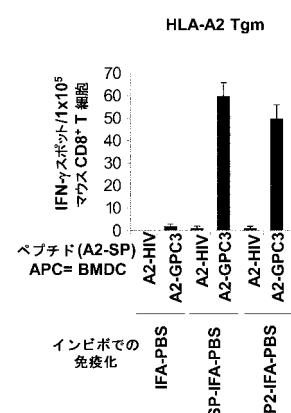
【図 5 A】



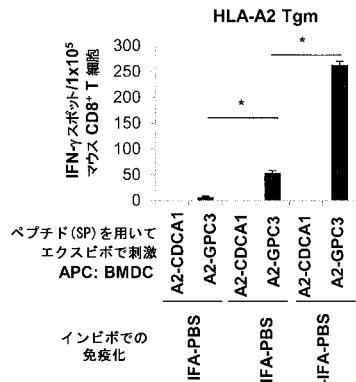
C



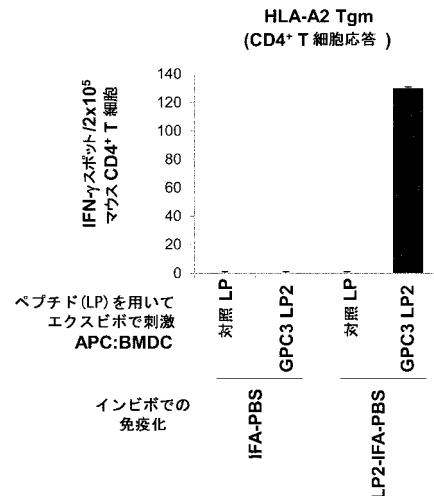
【図 5 B】



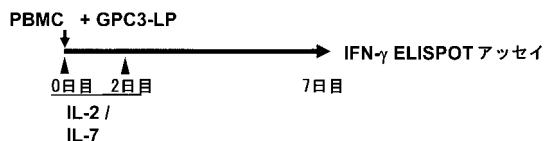
【図 5 C】



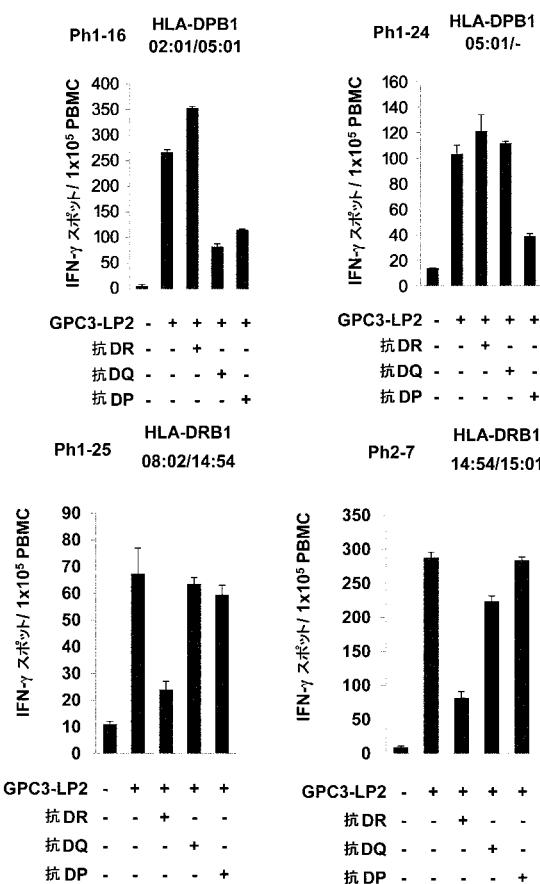
【図 5 D】



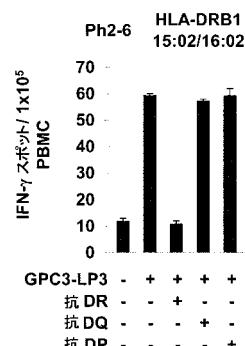
【図 6 A】



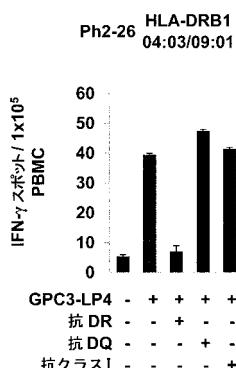
【図 6 B】



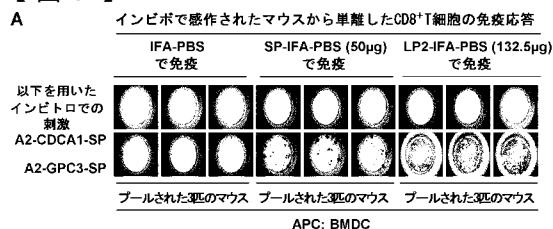
【図 6 C】



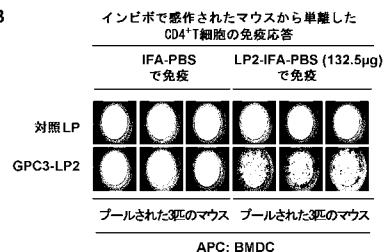
【図 6 D】



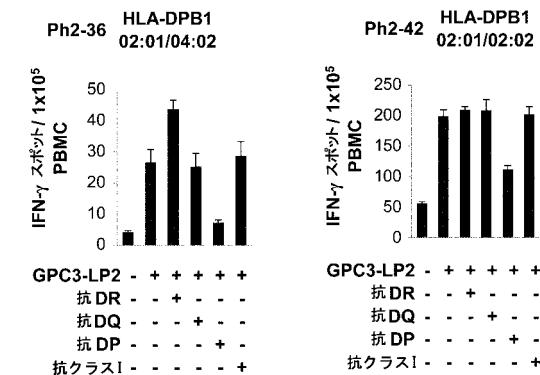
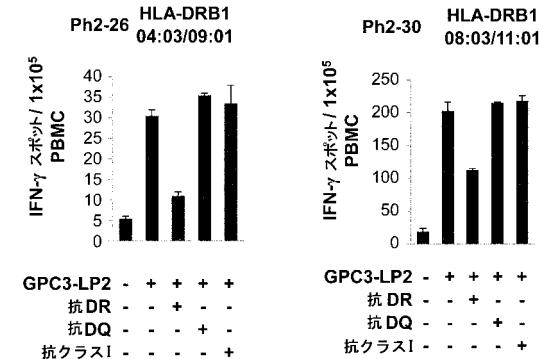
【図9】



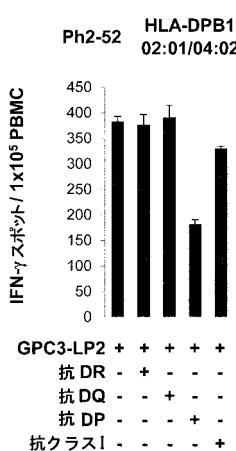
B



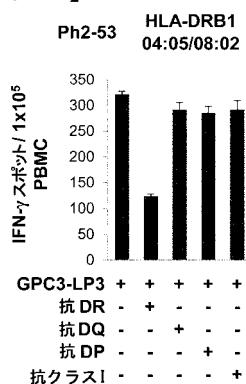
【図10A-1】



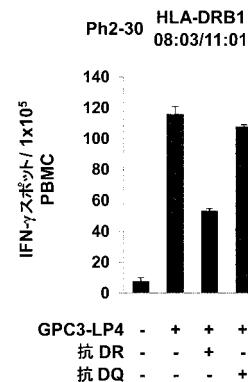
【図10A-2】



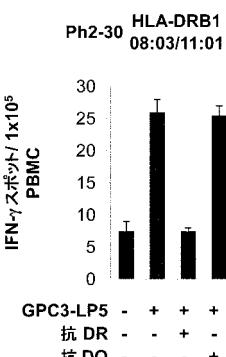
【図10B】



【図10C】



【図10D】



【配列表】

2018508181000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/006029
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. See extra sheet 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) Int.Cl. C07K7/06, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2016 Registered utility model specifications of Japan 1996-2016 Published registered utility model applications of Japan 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTplus/JMEDplus/JST/580 (JDreamIII) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAWADA Y. et al., Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival., Clinical Cancer Research, 2012, vol.18, no.13, pp.3686-3696, p.3687 left column	1-25
Y	WO 2009/069302 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.06.04, Abstract, Claims & JP 2011-504875 A & US 2011/0052614 A1 & EP 2247725 A1	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "B" 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 17.02.2016		Date of mailing of the international search report 01.03.2016
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer FUKUMA Nobuko Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488
4N 3539		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2015/006029
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/126413 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2008.10.23, Abstract, Claims & JP 2010-523471 A & JP 5320544 B & US 2012/0093843 A1 & EP 2155872 A1	1-25
Y	WO 2011/125334 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011.10.13, Abstract, Claims & JP 2013-523084 A & US 2013/0108664 A1 & EP 2556084 A1	1-25
A	WO 2014/097648 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2014.06.26, & US 2015/0285806 A1 & EP 2937697 A1	1-25
A	WO 2004/018667 A1 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) 2004.03.04, & AU 2003254950 A & TW 200413406 A	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/006029

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i,
G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 西村 泰治

熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72) 発明者 富田 雄介

熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72) 発明者 大沢 龍司

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR35 QR42

QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

4B065 AA94X AA99Y AB01 AC14 BA02 BA03 CA24 CA45

4C084 AA13 NA14 ZB261

4C085 AA03 BA01 EE01 EE03

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 NA14 ZB26

4H045 AA11 AA30 BA10 BA18 CA41 DA76 DA86 EA22 EA28 FA33

FA74