

(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2015-528443

(P2015-528443A)

(43) 公表日 平成27年9月28日 (2015.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C O 7 K 14/74 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/74	2 G O 4 1
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 5
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-526842 (P2015-526842)	(71) 出願人	503256265 ユニヴェルシテ・ドゥ・モンリオール カナダ・ケベック・H3C・3A7・モン トリオール・エドワール・モンペ・ブルバ ード・2900
(86) (22) 出願日	平成25年7月25日 (2013.7.25)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月12日 (2015.3.12)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86) 国際出願番号	PCT/CA2013/050580	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 国際公開番号	W02014/026277	(72) 発明者	クロード・ペロー カナダ・H2V・2X1・ケベック・ウト ルモン・クロード・ジャンパーニュ・70
(87) 国際公開日	平成26年2月20日 (2014.2.20)	最終頁に続く	
(31) 優先権主張番号	61/683,361		
(32) 優先日	平成24年8月15日 (2012.8.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/818,040		
(32) 優先日	平成25年5月1日 (2013.5.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 新規マイナー組織適合抗原を同定するための方法

## (57) 【要約】

ヒトマイナー組織適合抗原 (M i H A) 発見のための新規方法、本方法を用いて同定される新規 M i H A、および新規 M i H A の使用について記載する。新規方法の特徴の 1 つは、個別化した翻訳されたトランスクリプトームおよび / またはエクソームの、質量分光測定法 (M S) によるペプチド同定に使用されるデータベースへの組み込みである。候補 M i H A は、個別化したトランスクリプトームおよび / またはエクソームを、参照ゲノムならびに / または H L A が適合する対象のおよび / もしくはトランスクリプトームおよび / またはエクソームと比較することによって同定される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

マイナー組織適合抗原 ( M i H A ) 候補を同定する方法であって、

( a ) 第 1 の対象由来の第 1 の細胞試料中の M H C 関連ペプチド ( M A P ) を単離および配列決定することと、

( b ) 前記第 1 の対象から得られた第 2 の細胞試料に対して全トランスクリプトームおよび / またはエクソーム配列決定を行うことと、

( c ) 前記配列決定された全トランスクリプトームおよび / またはエクソームを参照ゲノムと比較し、前記第 1 の対象の前記トランスクリプトームおよび / またはエクソームと前記参照ゲノムとの間の単一ヌクレオチド変異 ( S N V ) を同定することと、

( d ) 前記同定された S N V を含有する配列を i n s i l i c o で翻訳し、前記 S N V によって引き起こされる少なくとも 1 つの非同義変異を含むペプチド配列を同定することと、

( e ) ( a ) で単離された前記 M A P の配列を ( d ) で同定された前記ペプチド配列と比較することと、

( f ) 前記比較に基づいて M i H A 候補を同定することと、を含む、方法。

## 【請求項 2】

マイナー組織適合抗原 ( M i H A ) 候補を同定する方法であって、

( a ) 第 1 および第 2 の対象由来の第 1 の細胞試料中の M H C 関連ペプチド ( M A P ) を単離および配列決定することであって、前記第 1 および第 2 の対象は、ヒト白血球抗原 ( H L A ) 適合性である、単離および配列決定することと、

( b ) 前記第 1 および第 2 の対象から得られた第 2 の細胞試料に対して全トランスクリプトームおよび / またはエクソーム配列決定を行うことと、

( c ) 前記配列決定された全トランスクリプトームおよび / またはエクソームを比較し、前記第 1 および第 2 の対象の前記トランスクリプトームおよび / またはエクソーム間の単一ヌクレオチド変異 ( S N V ) を同定することと、

( d ) 前記同定された S N V を含有する配列を i n s i l i c o で翻訳し、前記 S N V によって引き起こされる少なくとも 1 つの非同義変異を含むペプチド配列を同定することと、

( e ) ( a ) で単離された前記 M A P の配列を ( d ) で同定された前記ペプチド配列と比較することと、

( f ) 前記比較に基づいて M i H A 候補を同定することと、を含む、方法。

## 【請求項 3】

前記 M i H A 候補は、その配列が、前記参照ゲノムから翻訳された対応する配列と比較して少なくとも 1 つの変異を含む M A P である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 M i H A 候補は、前記第 1 の対象由来の前記第 1 の細胞試料中には存在するが、前記第 2 の対象由来の前記第 1 の細胞試料中には存在しない M A P である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記参照ゲノムは、G e n o m e R e f e r e n c e C o n s o r t i u m H u m a n B u i l d 3 7 ( G R C h 3 7 ) である、請求項 1 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1 および / または第 2 の細胞試料は、末梢血細胞試料である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記末梢血細胞試料は、不死化末梢血細胞試料である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記不死化末梢血細胞試料は、エプスタイン・バーウイルス ( E B V ) で形質転換した B リンパ芽球様細胞株である、請求項 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9】

前記 M A P を単離することは、( i ) 弱酸処理により前記細胞試料から前記 M A P を放出させることと、( i i ) 前記放出させた M A P をクロマトグラフィーに供することと、を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記方法は、前記クロマトグラフィーの前に、サイズ排除カラムを用いて前記放出させたペプチドを濾過することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記サイズ排除カラムは、約 3 0 0 0 D a のカットオフを有する、請求項 10 に記載の方法。

10

## 【請求項 12】

前記クロマトグラフィーは、陽イオン交換クロマトグラフィーである、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

( d ) の前記ペプチド配列は、12 アミノ酸以下の長さを有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

( d ) の前記ペプチド配列は、8 ~ 11 アミノ酸の長さを有する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記比較することは、( a ) で単離された前記 M A P を質量分析に供することと、( d ) で同定された前記ペプチド配列から得られた M S スペクトルを比較することと、を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 16】

( f ) で同定された前記 M i H A 候補の主要組織適合複合体 ( M H C ) クラス I 分子への結合を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 17】

配列

## 【化 1】



30

( 式中、

$Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

$X^1$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$X^2$  は、L または S であり、

$X^3$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない) を含む、50 アミノ酸以下のペプチド。

## 【請求項 18】

前記ペプチドは、8 ~ 12 アミノ酸の長さを有する、請求項 17 に記載のペプチド。

40

## 【請求項 19】

$X^1$  は、酸性アミノ酸である、請求項 17 または 18 に記載のペプチド。

## 【請求項 20】

$X^1$  は、グルタミン酸 ( E ) である、請求項 19 に記載のペプチド。

## 【請求項 21】

$X^3$  は、アミノ酸である、請求項 17 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 22】

$X^3$  は、疎水性アミノ酸である、請求項 21 に記載のペプチド。

## 【請求項 23】

$X^3$  は、ロイシン ( L ) である、請求項 22 に記載のペプチド。

50

## 【請求項 24】

Z<sup>1</sup> は、存在しない、請求項 17 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 25】

Z<sup>2</sup> は、存在しない、請求項 17 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 26】

X<sup>2</sup> は、L である、請求項 17 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 27】

X<sup>2</sup> は、S である、請求項 17 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 28】

前記ペプチドは、E L Q E K F L S L ( 配列番号 15 ) である、請求項 26 に記載のペプチド。 10

## 【請求項 29】

前記ペプチドは、E L Q E K F S S L ( 配列番号 16 ) である、請求項 27 に記載のペプチド。

## 【請求項 30】

請求項 17 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、核酸。

## 【請求項 31】

請求項 17 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - B \* 0801 対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体 ( M H C ) クラス I 分子。 20

## 【請求項 32】

その表面に、請求項 17 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - B \* 0801 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する、単離された細胞。

## 【請求項 33】

癌を治療する方法であって、請求項 17 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - B \* 0801 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を認識する有効量の C D 8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

## 【請求項 34】

前記対象が、ヒト C E N P F の核酸配列 ( 図 1 A ~ 1 D、N C B I 参照配列: N M \_ 016343.3 ) 中のヌクレオチド 4409 に対応する位置に T もしくは C を含む C E N P F 核酸、および / またはヒト C E N P F のタンパク質配列 ( 図 1 E、N C B I 参照配列: N P \_ 057427.3 ) 中の残基 1412 に対応する位置にロイシンもしくはセリン残基を含む C E N P F ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、 30

( a ) 前記対象が、ヒト C E N P F の前記核酸配列中のヌクレオチド 4409 に対応する位置に T を含む C E N P F 核酸、および / またはヒト C E N P F の前記タンパク質配列中の残基 1412 に対応する位置にロイシン残基を含む C E N P F ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>2</sup> は L であり、

( b ) 前記対象が、ヒト C E N P F の前記核酸配列中のヌクレオチド 4409 に対応する位置に C を含む C E N P F 核酸、および / またはヒト C E N P F の前記タンパク質配列中の残基 1412 に対応する位置にセリン残基を含む C E N P F ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>2</sup> は S である、請求項 33 に記載の方法。 40

## 【請求項 35】

前記決定することは、C E N P F 核酸を配列決定することを含む、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記 C D 8 T リンパ球は、i n v i t r o で増殖させた C D 8 T リンパ球である、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 37】

( i ) 前記対象が ( a ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 17 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X<sup>2</sup> 50

は L である)を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト C E N P F の前記核酸配列中のヌクレオチド 4 4 0 9 に対応する位置に C、および / またはヒト C E N P F の前記タンパク質配列中の残基 1 4 1 2 に対応する位置にセリン残基を含む C E N P F ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( i i ) 前記対象が ( b ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X<sup>2</sup> は S である ) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト C E N P F の前記核酸配列中のヌクレオチド 4 4 0 9 に対応する位置に T、および / またはヒト C E N P F の前記タンパク質配列中の残基 1 4 1 2 に対応する位置にロイシン残基を含む C E N P F ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、をさらに含む、請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 3 8】

前記対象は、同種幹細胞移植 ( A S C T ) のレシピエントである、請求項 3 3 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 3 9】

T 細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖させる方法であって、

( a ) 候補ドナーが、ヒト C E N P F の核酸配列 ( 図 1 A ~ 1 D、N C B I 参照配列 : N M \_ 0 1 6 3 4 3 . 3 ) 中のヌクレオチド 4 4 0 9 に対応する位置に T もしくは C を含む C E N P F 核酸、および / またはヒト C E N P F のタンパク質配列 ( 図 1 E、N C B I 参照配列 : N P \_ 0 5 7 4 2 7 . 3 ) 中の残基 1 4 1 2 に対応する位置にロイシンもしくはセリン残基を含む C E N P F ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

( b ) ( i ) 前記候補ドナーが、ヒト C E N P F の前記核酸配列中のヌクレオチド 4 4 0 9 に対応する位置に T を含む C E N P F 核酸、および / またはヒト C E N P F の前記タンパク質配列中の残基 1 4 1 2 に対応する位置にロイシン残基を含む C E N P F ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X<sup>2</sup> は S である ) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからの C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( b ) ( i i ) 前記候補ドナーが、ヒト C E N P F の前記核酸配列中のヌクレオチド 4 4 0 9 に対応する位置に C を含む C E N P F 核酸、および / またはヒト C E N P F の前記タンパク質配列中の残基 1 4 1 2 に対応する位置にセリン残基を含む C E N P F ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X<sup>2</sup> は L である ) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからの C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む、方法。

#### 【請求項 4 0】

配列

#### 【化 2】



( 式中、

Z<sup>1</sup> は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

X<sup>4</sup> は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

X<sup>5</sup> は、G または R であり、

X<sup>6</sup> は、アミノ酸であるか、または存在せず、

X<sup>7</sup> は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

Z<sup>2</sup> は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、5 0 アミノ酸以下のペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 1】

前記ペプチドは、8～12アミノ酸の長さを有する、請求項 4 0 に記載のペプチド。

## 【請求項 4 2】

X<sup>4</sup> は、グルタミン (Q) である、請求項 4 0 または 4 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 4 3】

X<sup>6</sup> は、アミノ酸である、請求項 4 0 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 4 4】

X<sup>6</sup> は、塩基性アミノ酸である、請求項 4 3 に記載のペプチド。

## 【請求項 4 5】

X<sup>6</sup> は、リジン (K) である、請求項 4 4 に記載のペプチド。

10

## 【請求項 4 6】

X<sup>7</sup> は、アミノ酸である、請求項 4 0 ～ 4 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 4 7】

X<sup>7</sup> は、ロイシン (L) である、請求項 4 6 に記載のペプチド。

## 【請求項 4 8】

Z<sup>1</sup> は、存在しない、請求項 4 0 ～ 4 7 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 4 9】

Z<sup>2</sup> は、存在しない、請求項 4 0 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 5 0】

X<sup>5</sup> は、G である、請求項 4 0 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

20

## 【請求項 5 1】

X<sup>5</sup> は、R である、請求項 4 0 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 5 2】

前記ペプチドは、Q E L D G V F Q K L (配列番号 17) である、請求項 5 0 に記載のペプチド。

## 【請求項 5 3】

前記ペプチドは、Q E L D R V F Q K L (配列番号 18) である、請求項 5 1 に記載のペプチド。

## 【請求項 5 4】

請求項 4 0 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、核酸。

30

## 【請求項 5 5】

請求項 4 0 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - B<sup>\*</sup> 4 4 0 3 対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 分子。

## 【請求項 5 6】

その表面に、請求項 4 0 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - B<sup>\*</sup> 4 4 0 3 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する、単離された細胞。

## 【請求項 5 7】

癌を治療する方法であって、請求項 4 0 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - B<sup>\*</sup> 4 4 0 3 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を認識する有効量の C D 8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

40

## 【請求項 5 8】

前記対象が、ヒト Z W I N T の核酸配列 (図 2 A、N C B I 参照配列: N M\_\_0 0 7 0 5 7 . 3) 中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に A もしくは G を含む Z W I N T 核酸、および / またはヒト Z W I N T のタンパク質配列 (図 2 B、N C B I 参照配列: N P\_\_0 0 8 9 8 8 . 2) 中の残基 1 8 7 に対応する位置にアルギニンもしくはグリシン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、

(a) 前記対象が、ヒト Z W I N T の前記核酸配列中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に A を含む Z W I N T 核酸、および / またはヒト Z W I N T の前記タンパク質配列中の残基 1 8 7 に対応する位置にアルギニン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は、R であり、

50

(b) 前記対象が、ヒト Z W I N T の前記核酸配列中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に G を含む Z W I N T 核酸、および / またはヒト Z W I N T の前記タンパク質配列中の残基 1 8 7 に対応する位置にグリシン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は、G である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記決定することは、ヒト Z W I N T を配列決定することを含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記 C D 8 T リンパ球は、i n v i t r o で増殖させた C D 8 T リンパ球である、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6 1】

(i) 前記対象が (a) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 4 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は R である) を負荷した H L A - B \* 4 4 0 3 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト Z W I N T の前記核酸配列中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に G、および / またはヒト Z W I N T の前記タンパク質配列中の残基 1 8 7 に対応する位置にグリシン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、または

(i i) 前記対象が (b) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 4 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は G である) を負荷した H L A - B \* 4 4 0 3 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト Z W I N T の前記核酸配列中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に A、および / またはヒト Z W I N T の前記タンパク質配列中の残基 1 8 7 に対応する位置にアルギニン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養することをさらに含む、請求項 5 8 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6 2】

前記対象は、同種幹細胞移植 (A S C T) のレシピエントである、請求項 5 7 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

T 細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法であって、

30

(a) 候補ドナーが、ヒト Z W I N T の核酸配列 (図 2 A、N C B I 参照配列: N M \_ 0 0 7 0 5 7 . 3) 中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に A もしくは G を含む Z W I N T 核酸、および / またはヒト Z W I N T のタンパク質配列 (図 2 B、N C B I 参照配列: N P \_ 0 0 8 9 8 8 . 2) 中の残基 1 8 7 に対応する位置にアルギニンもしくはグリシン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

(b) (i) 前記候補ドナーが、ヒト Z W I N T の前記核酸配列中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に A を含む Z W I N T 核酸、および / またはヒト Z W I N T の前記タンパク質配列中の残基 1 8 7 に対応する位置にアルギニン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 4 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は G である) を負荷した H L A - B \* 4 4 0 3 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または

40

(b) (i i) 前記候補ドナーが、ヒト Z W I N T の前記核酸配列中のヌクレオチド 5 9 6 に対応する位置に G を含む Z W I N T 核酸、および / またはヒト Z W I N T の前記タンパク質配列中の残基 1 8 7 に対応する位置にグリシン残基を含む Z W I N T ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 4 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は R である) を負荷した H L A - B \* 4 4 0 3 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む、方法。

【請求項 6 4】

50

## 配列

## 【化 3】



(式 中、

$Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

$X^8$  は、1～43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$X^9$  は、P または A であり、

$X^{10}$  は、1～43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50 アミノ酸以下のペプチド。 10

## 【請求項 65】

前記ペプチドは、8～12 アミノ酸の長さを有する、請求項 64 に記載のペプチド。

## 【請求項 66】

$X^8$  は、セリン (S) である、請求項 64 または 65 に記載のペプチド。

## 【請求項 67】

$X^{10}$  は、アミノ酸である、請求項 64～66 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 68】

$X^{10}$  は、芳香族アミノ酸である、請求項 67 に記載のペプチド。

## 【請求項 69】

$X^{10}$  は、フェニルアラニン (F) である、請求項 68 に記載のペプチド。 20

## 【請求項 70】

$Z^1$  は、存在しない、請求項 64～69 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 71】

$Z^2$  は、存在しない、請求項 64～70 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 72】

$X^9$  は、P である、請求項 64～71 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 73】

$X^9$  は、A である、請求項 64～71 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 74】

前記ペプチドは、SLFFRKVPF (配列番号 19) である、請求項 50 に記載のペプチド。 30

## 【請求項 75】

前記ペプチドは、SLFFRKVAF (配列番号 20) である、請求項 51 に記載のペプチド。

## 【請求項 76】

請求項 64～75 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、核酸。

## 【請求項 77】

請求項 64～75 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した HLA-B\*0801 対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子。 40

## 【請求項 78】

その表面に、請求項 64～75 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した HLA-B\*0801 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を発現する、単離された細胞。

## 【請求項 79】

癌を治療する方法であって、請求項 64～75 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した HLA-B\*0801 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を認識する有効量の CD8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

## 【請求項 80】

前記対象が、ヒト M T C H 2 の核酸配列 (図 3 A、N C B I 参照配列: NM\_\_014342.3) 中のヌクレオチド 1057 に対応する位置に C もしくは G を含む M T C H 50



2 核酸、および / またはヒト M T C H 2 のタンパク質配列 ( 図 3 B、N C B I 参照配列 : N P \_ 0 5 5 1 5 7 . 1 ) 中の 2 9 0 残基に対応する位置にプロリンもしくはアラニン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、

( a ) 前記対象が、ヒト M T C H 2 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 7 に対応する位置に C を含む M T C H 2 核酸、および / またはヒト M T C H 2 の前記タンパク質配列中の残基 2 9 0 に対応する位置にプロリン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X <sup>9</sup> は P であり、

( b ) 前記対象が、ヒト M T C H 2 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 7 に対応する位置に G を含む M T C H 2 核酸、および / またはヒト M T C H 2 の前記タンパク質配列中の残基 2 9 0 に対応する位置にアラニン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X <sup>5</sup> は A である、請求項 7 9 に記載の方法。

10

#### 【請求項 8 1】

前記決定することは、ヒト M T C H 2 核酸を配列決定することを含む、請求項 8 0 に記載の方法。

#### 【請求項 8 2】

前記 C D 8 T リンパ球は、i n v i t r o で増殖させた C D 8 T リンパ球である、請求項 7 9 に記載の方法。

#### 【請求項 8 3】

( i ) 前記対象が ( a ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 6 4 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>9</sup> は P である ) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト M T C H 2 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 7 に対応する位置に G、および / またはヒト M T C H 2 の前記タンパク質配列中の残基 2 9 0 に対応する位置にアラニン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、または

20

( i i ) 前記対象が ( b ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 6 4 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>9</sup> は A である ) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト M T C H 2 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 7 に対応する位置に C、および / またはヒト M T C H 2 の前記タンパク質配列中の残基 2 9 0 に対応する位置にプロリン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養することをさらに含む、請求項 8 0 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

#### 【請求項 8 4】

前記対象は、同種幹細胞移植 ( A S C T ) のレシピエントである、請求項 7 9 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 8 5】

T 細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法であって、

( a ) 候補ドナーが、ヒト M T C H 2 の核酸配列 ( 図 3 A、N C B I 参照配列 : N M \_ 0 1 4 3 4 2 . 3 ) 中のヌクレオチド 1 0 5 7 に対応する位置に C もしくは G を含む M T C H 2 核酸、および / またはヒト M T C H 2 のタンパク質配列 ( 図 3 B、N C B I 参照配列 : N P \_ 0 5 5 1 5 7 . 1 ) 中の残基 2 9 0 に対応する位置にプロリンもしくはアラニン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

40

( b ) ( i ) 前記候補ドナーが、ヒト M T C H 2 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 7 に対応する位置に C を含む M T C H 2 核酸、および / またはヒト M T C H 2 の前記タンパク質配列中の残基 2 9 0 に対応する位置にプロリン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 6 4 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>9</sup> は A である ) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( b ) ( i i ) 前記候補ドナーが、ヒト M T C H 2 の前記核酸配列中のヌクレオチ

50

ド 1 0 5 7 に対応する位置に G を含む M T C H 2 核酸、および / またはヒト M T C H 2 の前記タンパク質配列中の残基 2 9 0 に対応する位置にアラニン残基を含む M T C H 2 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 6 4 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド（前記ペプチド中の X<sup>9</sup> は P である）を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む、方法。

【請求項 8 6】

配列

【化 4】



10

（式中、

Z<sup>1</sup> は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

X<sup>1 1</sup> は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

X<sup>1 2</sup> は、S または T であり、

X<sup>1 3</sup> は、アミノ酸であるか、または存在せず、

X<sup>1 4</sup> は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

Z<sup>2</sup> は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない）を含む、5 0 アミノ酸以下のペプチド。

【請求項 8 7】

20

前記ペプチドは、8 ~ 1 2 アミノ酸の長さを有する、請求項 8 6 に記載のペプチド。

【請求項 8 8】

X<sup>1 1</sup> は、存在しない、請求項 8 6 または 8 7 に記載のペプチド。

【請求項 8 9】

X<sup>1 3</sup> は、アミノ酸である、請求項 8 6 ~ 8 8 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9 0】

X<sup>1 3</sup> は、セリンである、請求項 8 9 に記載のペプチド。

【請求項 9 1】

X<sup>1 4</sup> は、アミノ酸である、請求項 8 6 ~ 9 0 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9 2】

30

X<sup>1 4</sup> は、塩基性アミノ酸である、請求項 9 1 に記載のペプチド。

【請求項 9 3】

X<sup>1 4</sup> は、リジン（K）である、請求項 9 2 に記載のペプチド。

【請求項 9 4】

Z<sup>1</sup> は、存在しない、請求項 8 6 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9 5】

Z<sup>2</sup> は、存在しない、請求項 8 6 ~ 9 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9 6】

X<sup>1 2</sup> は、S である、請求項 8 6 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9 7】

40

X<sup>1 2</sup> は、T である、請求項 8 6 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 9 8】

前記ペプチドは、S V L K P G N S K（配列番号 2 1）である、請求項 9 6 に記載のペプチド。

【請求項 9 9】

前記ペプチドは、T V L K P G N S K（配列番号 2 2）である、請求項 9 7 に記載のペプチド。

【請求項 1 0 0】

請求項 8 6 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、核酸。

【請求項 1 0 1】

50

請求項 86 ~ 99 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体 ( M H C ) クラス I 分子。

【請求項 102】

その表面に、請求項 86 ~ 99 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する、単離された細胞。

【請求項 103】

癌を治療する方法であって、請求項 86 ~ 99 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を認識する有効量の C D 8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 104】

前記対象が、ヒト E L F 1 の核酸配列 ( 図 4 A および 4 B 、 N C B I 参照配列 : N M \_ 1 7 2 3 7 3 . 3 ) 中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A もしくは T を含む E L F 1 核酸、および / または E L F 1 タンパク質配列 ( 図 4 C 、 N C B I 参照配列 : N P \_ 7 5 8 9 6 1 . 1 ) 中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニンもしくはセリンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、

( a ) 前記対象が、ヒト E L F 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A を含む E L F 1 核酸、および / またはヒト E L F 1 の前記タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニン残基を含む E L F 1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X <sup>1 2</sup> は T であり、

( b ) 前記対象が、ヒト E L F 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に T を含む E L F 1 核酸、および / またはヒト E L F 1 の前記タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にセリン残基を含む E L F 1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X <sup>1 2</sup> は S である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記決定することは、ヒト E L F 1 核酸の配列決定を含む、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

前記 C D 8 T リンパ球は、i n v i t r o で増殖させた C D 8 T リンパ球である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 107】

( i ) 前記対象が ( a ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 86 ~ 99 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>1 2</sup> は T である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト E L F 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に T、および / またはヒト E L F 1 の前記タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にセリン残基を含む E L F 1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( i i ) 前記対象が ( b ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 86 ~ 99 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>1 2</sup> は S である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト E L F 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A、および / またはヒト E L F 1 の前記タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニン残基を含む E L F 1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養することをさらに含む、請求項 104 ~ 106 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

前記対象は、同種幹細胞移植 ( A S C T ) のレシピエントである、請求項 103 ~ 107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

T 細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 候補ドナーが、ヒト E L F 1 の核酸配列 (図 4 A および 4 B、N C B I 参照配列: N M \_ 1 7 2 3 7 3 . 3) 中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A もしくは T を含む E L F 1 核酸、および / または E L F 1 タンパク質配列 (図 4 C、N C B I 参照配列: N P \_ 7 5 8 9 6 1 . 1) 中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニンもしくはセリンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

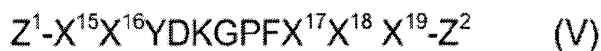
(b) (i) 前記候補ドナーが、ヒト E L F 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A を含む E L F 1 核酸、および / または前記 E L F 1 タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 8 6 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の  $X^{12}$  は S である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または

(b) (ii) 前記候補ドナーが、ヒト E L F 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に T を含む E L F 1 核酸、および / または前記 E L F 1 タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にセリンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 8 6 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の  $X^{12}$  は T である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む、方法。

【請求項 110】

配列 (V)

【化 5】



(式中、

$Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

$X^{15}$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$X^{16}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、

$X^{17}$  は、R または W であり、

$X^{18}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、

$X^{19}$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない) を含む、50 アミノ酸以下のペプチド。

【請求項 111】

前記ペプチドは、8 ~ 12 アミノ酸の長さを有する、請求項 110 に記載のペプチド。

【請求項 112】

$X^{16}$  は、アミノ酸である、請求項 110 または 111 に記載のペプチド。

【請求項 113】

$X^{16}$  は、メチオニン (M) である、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

$X^{15}$  は、アミノ酸である、請求項 110 ~ 113 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 115】

$X^{15}$  は、アラニンである、請求項 114 に記載のペプチド。

【請求項 116】

$X^{18}$  は、アミノ酸である、請求項 110 ~ 115 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 117】

$X^{18}$  は、セリン (S) である、請求項 116 に記載のペプチド。

【請求項 118】

$X^{19}$  は、アミノ酸である、請求項 110 ~ 117 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 119】

$X^{19}$  は、塩基性アミノ酸である、請求項 118 に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 0】

X<sup>1 9</sup> は、リジン（K）である、請求項 1 1 9 に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 1】

Z<sup>1</sup> は、存在しない、請求項 1 1 0 ~ 1 2 0 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 2】

Z<sup>2</sup> は、存在しない、請求項 1 1 0 ~ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 3】

X<sup>1 7</sup> は、R である、請求項 1 1 0 ~ 1 2 2 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 4】

X<sup>1 7</sup> は、W である、8 6 ~ 9 5 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

10

## 【請求項 1 2 5】

前記ペプチドは、A M Y D K G P F R S K（配列番号 2 3）である、請求項 1 2 3 に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 6】

前記ペプチドは、A M Y D K G P F W S K（配列番号 2 4）である、請求項 1 2 4 に記載のペプチド。

## 【請求項 1 2 7】

請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、核酸。

## 【請求項 1 2 8】

請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体（M H C）クラス I 分子。

20

## 【請求項 1 2 9】

その表面に、請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する、単離された細胞。

## 【請求項 1 3 0】

癌を治療する方法であって、請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を認識する有効量の C D 8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

## 【請求項 1 3 1】

前記対象が、ヒト N Q 0 1 の核酸配列（図 5 A、N C B I 参照配列：N M \_\_ 0 0 0 9 0 3 . 2）中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に C もしくは T を含む N Q 0 1 核酸、および / または N Q 0 1 タンパク質配列（図 5 B、N C B I 参照配列：N P \_\_ 0 0 0 8 9 4 . 1）中の残基 1 3 9 に対応する位置にアルギニンもしくはトリプトファンを有する N Q 0 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、

30

（a）前記対象が、ヒト N Q 0 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に C を含む N Q 0 1 核酸、および / またはヒト N Q 0 1 の前記タンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にアルギニン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>1 7</sup> は R であり、

（b）前記対象が、ヒト N Q 0 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に T を含む N Q 0 1 核酸、および / またはヒト N Q 0 1 の前記タンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にトリプトファン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>1 7</sup> は W である、請求項 1 3 0 に記載の方法。

40

## 【請求項 1 3 2】

前記決定することは、ヒト N Q 0 1 核酸を配列決定することを含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 3】

前記 C D 8 T リンパ球は、i n v i t r o で増殖させた C D 8 T リンパ球である、請求項 1 3 1 または 1 3 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 4】

（i）前記対象が（a）の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件

50

下において、請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド（前記ペプチド中の  $X^{17}$  は R である）を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト N Q 0 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に T、および / またはヒト N Q 0 1 の前記タンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にトリプトファン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( i i ) 前記対象が ( b ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド（前記ペプチド中の  $X^{17}$  は W である）を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト N Q 0 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に C、および / またはヒト N Q 0 1 の前記タンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にアルギニン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、をさらに含む、請求項 1 3 1 ~ 1 3 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 1 3 5】

前記対象は、同種幹細胞移植（A S C T）のレシピエントである、請求項 1 3 0 ~ 1 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 1 3 6】

T 細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法であって、

( a ) 前記対象が、ヒト N Q 0 1 の核酸配列（図 5 A、N C B I 参照配列：N M \_ 0 0 0 9 0 3 . 2）中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に C もしくは T を含む N Q 0 1 核酸、および / または N Q 0 1 タンパク質配列（図 5 B、N C B I 参照配列：N P \_ 0 0 0 8 9 4 . 1）中の残基 1 3 9 に対応する位置にアルギニンもしくはトリプトファンを有する N Q 0 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

( b ) ( i ) 前記候補ドナーが、ヒト N Q 0 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に C を含む N Q 0 1 核酸、および / またはヒト N Q 0 1 の前記タンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にアルギニン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド（前記ペプチド中の  $X^{17}$  は W である）を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( b ) ( i i ) 前記候補ドナーが、ヒト N Q 0 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に T を含む N Q 0 1 核酸、および / またはヒト N Q 0 1 の前記タンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にトリプトファン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 1 0 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド（前記ペプチド中の  $X^{17}$  は R である）を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む、方法。

#### 【請求項 1 3 7】

配列（V I）

#### 【化 6】



（式中、

$Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

$X^{20}$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$X^{21}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、

$X^{22}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、

$X^{23}$  は、G または R であり、

$X^{24}$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

10

20

30

40

50

Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチド。

【請求項138】

前記ペプチドは、8～12アミノ酸の長さを有する、請求項137に記載のペプチド。

【請求項139】

X<sup>22</sup>は、アミノ酸である、請求項137または138に記載のペプチド。

【請求項140】

X<sup>22</sup>は、バリン(V)である、請求項139に記載のペプチド。

【請求項141】

X<sup>21</sup>は、アミノ酸である、請求項137～140のいずれか1項に記載のペプチド。 10

【請求項142】

X<sup>21</sup>は、アルギニン(R)である、請求項141に記載のペプチド。

【請求項143】

Z<sup>1</sup>は、存在しない、請求項137～142のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項144】

Z<sup>2</sup>は、存在しない、請求項137～143のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項145】

X<sup>23</sup>は、Gである、請求項137～144のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項146】

X<sup>23</sup>は、Rである、請求項137～144のいずれか1項に記載のペプチド。 20

【請求項147】

前記ペプチドは、RVSLPTSPG(配列番号25)である、請求項145に記載のペプチド。

【請求項148】

前記ペプチドは、RVSLPTSPR(配列番号26)である、請求項146に記載のペプチド。

【請求項149】

請求項137～148のいずれか1項に記載のペプチドをコードする、核酸。

【請求項150】

請求項137～148のいずれか1項に記載のペプチドを負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子。 30

【請求項151】

その表面に、請求項137～148のいずれか1項に記載のペプチドを負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する、単離された細胞。

【請求項152】

癌を治療する方法、であって、請求項137～148のいずれか1項に記載のペプチドを負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を認識する有効量のCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項153】

前記対象が、ヒトKIAA0226Lの核酸配列(図6Aおよび6B、NCBI参照配列:NM\_025113.2)中のヌクレオチド1059に対応する位置にGもしくはAを含むKIAA0226L核酸、および/またはKIAA0226Lタンパク質配列(図6C、NCBI参照配列:NP\_079389.2)中の残基152に対応する位置にグリシンもしくはアルギニンを有するKIAA0226Lポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、 40

(a)前記対象が、ヒトKIAA0226Lの前記核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にGを含むKIAA0226L核酸、および/またはヒトKIAA0226Lの前記タンパク質配列中の残基152に対応する位置にグリシン残基を含むKIAA0226Lポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>23</sup>は、Gであり、

(b)前記対象が、ヒトKIAA0226Lの前記核酸配列中のヌクレオチド10 50

59に対応する位置にAを含むK I A A 0 2 2 6 L 核酸、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記タンパク質配列中の残基152に対応する位置にアルギニン残基を含むK I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>2 3</sup>は、Rである、請求項152に記載の方法。

【請求項154】

前記決定することは、ヒトK I A A 0 2 2 6 L 核酸を配列決定することを含む、請求項153に記載の方法。

【請求項155】

前記C D 8 Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたC D 8 Tリンパ球である、請求項153または154に記載の方法。

【請求項156】

(i) 前記対象が(a)の対象である場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項137~148のいずれか1項に記載のペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2 3</sup>はGである)を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子のM H C クラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記核酸配列中のヌクレオチドヌクレオチド1059に対応する位置にA、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記タンパク質配列中の残基152に対応する位置にアルギニン残基を含むK I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを含む第2の対象からC D 8 Tリンパ球を培養すること、または

(ii) 前記対象が(b)の対象である場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項137~148のいずれか1項に記載のペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2 3</sup>はRである)を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子のM H C クラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にG、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記タンパク質配列中の残基152に対応する位置にグリシン残基を含むK I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを含む第2の対象からC D 8 Tリンパ球を培養すること、をさらに含む、請求項153~155のいずれか1項に記載の方法。

【請求項157】

前記対象は、同種幹細胞移植(A S C T)のレシピエントである、請求項152~156のいずれか1項に記載の方法。

【請求項158】

T細胞養子免疫療法のためにC D 8 Tリンパ球を増殖する方法であって、

(a) 候補ドナーが、ヒトK I A A 0 2 2 6 L の核酸配列(図6Aおよび6B、N C B I 参照配列: N M \_ \_ 0 2 5 1 1 3 . 2)中のヌクレオチド1059に対応する位置にGもしくはAを含むK I A A 0 2 2 6 L 核酸、および/またはK I A A 0 2 2 6 L タンパク質配列(図6C、N C B I 参照配列: N P \_ \_ 0 7 9 3 8 9 . 2)中の残基152に対応する位置にグリシンもしくはアルギニンを有するK I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

(b) (i) 前記候補ドナーが、ヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にGを含むK I A A 0 2 2 6 L 核酸、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記タンパク質配列中の残基152に対応する位置にグリシン残基を含むK I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現する場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項137~148のいずれか1項に記載のペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2 3</sup>はRである)を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子のM H C クラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからC D 8 Tリンパ球を培養すること、または

(b) (ii) 前記対象が、ヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にAを含むK I A A 0 2 2 6 L 核酸、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 L の前記タンパク質配列中の残基152に対応する位置にアルギニン残基を含むK I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現する場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項137~148のいずれか1項に記載のペプチド(前記ペプチ

10

20

30

40

50



ド中の  $X^{2\ 3}$  は G である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、を含む、方法。

【請求項 1 5 9】

配列 ( V I I )

【化 7】



( 式中、

$Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、

$X^{2\ 5}$  は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$X^{2\ 6}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、

$X^{2\ 7}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、

$X^{2\ 8}$  は、K または N であり、

$X^{2\ 9}$  は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

$Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない ) を含む、5 0 アミノ酸以下のペプチド。

【請求項 1 6 0】

前記ペプチドは、8 ~ 1 2 アミノ酸の長さを有する、請求項 1 5 9 に記載のペプチド。

【請求項 1 6 1】

$X^{2\ 7}$  は、アミノ酸である、請求項 1 5 9 または 1 6 0 に記載のペプチド。

【請求項 1 6 2】

$X^{2\ 7}$  は、メチオニン ( M ) である、請求項 1 6 1 に記載のペプチド。

【請求項 1 6 3】

$X^{2\ 6}$  は、アミノ酸である、請求項 1 5 9 ~ 1 6 2 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 6 4】

$X^{2\ 6}$  は、バリン ( V ) である、請求項 1 4 1 に記載のペプチド。

【請求項 1 6 5】

$Z^1$  は、存在しない、請求項 1 5 9 ~ 1 6 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 6 6】

$Z^2$  は、存在しない、請求項 1 5 9 ~ 1 6 4 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 6 7】

$X^{2\ 8}$  は、K である、請求項 1 5 9 ~ 1 6 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 6 8】

$X^{2\ 8}$  は、N である、請求項 1 5 9 ~ 1 6 6 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 1 6 9】

前記ペプチドは、V M G N P G T F K ( 配列番号 2 7 ) である、請求項 1 6 7 に記載のペプチド。

【請求項 1 7 0】

前記ペプチドは、V M G N P G T F N ( 配列番号 2 8 ) である、請求項 1 6 8 に記載のペプチド。

【請求項 1 7 1】

請求項 1 5 9 ~ 1 7 0 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、核酸。

【請求項 1 7 2】

請求項 1 5 9 ~ 1 7 0 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の、単離された主要組織適合複合体 ( M H C ) クラス I 分子。

【請求項 1 7 3】

その表面に、請求項 1 5 9 ~ 1 7 0 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する、単離された細胞。

【請求項 1 7 4】

10

20

30

40

50

癌を治療する方法であって、請求項 159 ~ 170 のいずれか 1 項に記載のペプチドを負荷した HLA - A \* 0301 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を認識する有効量の CD8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 175】

ヒト RMDN1 の核酸配列 (図 7A、NCBI 参照配列: NM\_\_016033.2) 中のヌクレオチド 316 に対応する位置に A もしくは C を含む RMDN1 核酸、および / または RMDN1 タンパク質配列 (図 7B、NCBI 参照配列: NP\_\_057117.2) 中の残基 52 に対応する位置にリジンもしくはアスパラギンを有する RMDN1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、

(a) 前記対象が、ヒト RMDN1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 316 に対応する位置に A を含む RMDN1 核酸、および / または / ヒト RMDN1 の前記タンパク質配列中の残基 52 に対応する位置にリジン残基を含む RMDN1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>28</sup> は、K であり、

(b) 前記対象が、ヒト RMDN1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 316 に対応する位置に C を含む RMDN1 核酸、および / または / ヒト RMDN1 の前記タンパク質配列中の残基 52 に対応する位置にアスパラギン残基を含む RMDN1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の X<sup>28</sup> は、N である、請求項 174 に記載の方法。

【請求項 176】

前記決定することは、ヒト KIAA0226L 核酸を配列決定することを含む、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 177】

前記 CD8 T リンパ球は、*in vitro* で増殖させた CD8 T リンパ球である、請求項 174 ~ 176 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 178】

(i) 前記対象が (a) の対象である場合、CD8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 159 ~ 170 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の X<sup>28</sup> は K である) を負荷した HLA - A \* 0301 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト RMDN1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 316 に対応する位置に C、および / またはヒト RMDN1 の前記タンパク質配列中の残基 52 に対応する位置にアスパラギン残基を含む RMDN1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から CD8 T リンパ球を培養すること、または

(ii) 前記対象が (b) の対象である場合、CD8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 159 ~ 170 のいずれか 1 項に記載のペプチド (前記ペプチド中の X<sup>28</sup> は N である) を負荷した HLA - A \* 0301 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト RMDN1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 316 に対応する位置に A、および / またはヒト RMDN1 の前記タンパク質配列中の残基 52 に対応する位置にリジン残基を含む RMDN1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から CD8 T リンパ球を培養することをさらに含み、請求項 175 ~ 177 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 179】

前記対象は、同種幹細胞移植 (ASCT) のレシピエントである、請求項 174 ~ 178 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 180】

T 細胞養子免疫療法のために CD8 T リンパ球を増殖する方法であって、

(a) 候補ドナーが、ヒト RMDN1 の核酸配列 (図 7A、NCBI 参照配列: NM\_\_016033.2) 中のヌクレオチド 316 に対応する位置に A もしくは C を含む RMDN1 核酸、および / または RMDN1 タンパク質配列 (図 7B、NCBI 参照配列: NP\_\_057117.2) 中の残基 52 に対応する位置にリジンもしくはアスパラギンを有する RMDN1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、

(b) (i) 前記対象が、ヒト RMDN1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 316

に対応する位置に A を含む R M D N 1 核酸、および / またはヒト R M D N 1 の前記タンパク質配列中の残基 5 2 に対応する位置にリジン残基を含む R M D N 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 5 9 ~ 1 7 0 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>2 8</sup> は N である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからの C D 8 T リンパ球を培養すること、または

( b ) ( i i ) 前記対象が、ヒト R M D N 1 の前記核酸配列中のヌクレオチド 3 1 6 に対応する位置に C を含む R M D N 1 核酸、および / またはヒト R M D N 1 の前記タンパク質配列中の残基 5 2 に対応する位置にアスパラギン残基を含む R M D N 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 1 5 9 ~ 1 7 0 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の X <sup>2 8</sup> は R である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからの C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して組織適合性抗原に関し、より具体的には、マイナー組織適合抗原 ( M i H A ) 、その同定および使用に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年8月15日に提出された米国仮特許出願第61/683,361号、および2013年5月1日に提出された米国仮特許出願第61/818,040号の利益を主張するものであり、これらは、参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

組織適合性抗原は、Tリンパ球によって認識され、それによって、移植後に移植片拒絶反応または移植片対宿主病 ( G V H D ) を引き起こす細胞膜同種抗原の群である ( 1 ) 。免疫遺伝学の初期には、主要組織適合複合体 ( M H C ) 抗原の同定は、マウスのコンジュニク系統と耐性系統との間の皮膚移植実験における、抗原の強力な免疫原性に基づいていた。他のあまり強力でない抗原は、マイナー組織適合抗原 ( M i H A ) と称される。M H C 抗原の中には弱い免疫原であるものもあり、また中には「弱くも小さくもない」と考えられる M i H A もあるため、免疫原性のみに基づく主要抗原とマイナー抗原との識別は不正確であることがすぐに明らかになった ( 2 ; 3 ) 。現在では、M H C 抗原 ( H L A 抗原とも称される ) は、ヒトの第 6 染色体に位置する密接に関連した多型遺伝子座によってコードされる膜貫通型糖タンパク質であることが分かっている。これらの主な役割は、内在性ペプチドおよび T 細胞によって精査される外来性ペプチドに結合することである。M H C ( または H L A ) 分子は、ヒト細胞の表面に何千というペプチドを提示する ( 4 ; 5 ) 。これらの M H C 関連ペプチド ( M A P ) は、免疫ペプチドームと称され、プロテアソームプロセッシングおよび内在性タンパク質のさらなるプロセッシングから生じる ( 6 - 8 ) 。双生児 ( 同系対象とも称される ) の免疫ペプチドームは同一である。対照的に、H L A が同一な非同系対象の細胞に存在する M A P は、2つのカテゴリーに分類される：i) 所与の H L A 型を有する全ての対象に存在する不変 M A P 、および ii) ある対象には存在するが、他の対象には存在しない M A P である M i H A ( 9 ) 。M H C が同一である宿主に T 細胞を移植すると、それらは、非自己であると認識した宿主特異的 M i H A に対して素早くかつ特異的に反応する。M i H A は、本質的に、T 細胞に対して免疫原性を示す遺伝的多型である。M i H A は、差次的 M A P ディスプレイへと移行する任意の形態の遺伝的変異の蓄積の結果である ( 3 ; 9 - 13 ) 。

【0004】

癌免疫療法にはワクチン接種および T 細胞養子免疫療法 ( A T C I ) の 2 つの主要な戦略を用いることができる。「A T C I」という用語は、患者 ( 自家 ) 、遺伝学的に同一で

10

20

30

40

50

ある双生児（同系）、非同ードナー（同種）といった異なる種類のドナーに由来し得るＴリンパ球の輸血を指す。これまで、ＡＴＣＩは、ワクチンよりもはるかに高い癌の寛解率および治癒率をもたらしてきており、最も広く使用されている形態の癌のＡＴＣＩは、同種造血幹細胞移植（ＡＨＣＴ）（１７－２２）である。同種ＡＨＣＴによって誘導される移植片対腫瘍（ＧＶＴ）効果は、主として宿主ＭｉＨＡに対するＴ細胞応答に起因する：ドナーが一卵性双生児（レシピエントにＭｉＨＡの相違が認められない）である場合、またはＴ細胞を枯渇させた移植片の場合、ＧＶＴは無効となる（２０；２３）。血液系腫瘍の治療を受ける２００，０００人を超える個体の生命が、ＭｉＨＡに依存するＧＶＴ効果の恩恵を受けており、このことは、ヒト免疫系が新形成を根絶させる能力の最も顕著な証拠を示している（１８；２４－２８）。同種ＧＶＴ効果は、本質的に血液系腫瘍に罹患する患者を治療するために用いられるが、予備的証拠は、該効果が固形腫瘍の治療にも効果的であり得ることを示唆している（２９－３３）。それにもかかわらず、ＭｉＨＡを標的とする癌免疫療法の非常に高い潜在性は、医学において適切に活用されてこなかった。最新医療では、ＭｉＨＡに基づくＡＴＣＩは、「従来の」ＡＨＣＴ、すなわち、同種ＨＬＡが適合するドナー由来の造血細胞の注入に限定されている。そのような同種リンパ球の非選択的注入は、ＭｉＨＡを標的とする治療の非常に原始的な形態である。第一に、該注入は特異性が欠落しており、したがって毒性が高い：非選択の同種Ｔ細胞は、多数の宿主ＭｉＨＡに対して反応し、したがってレシピエントの６０％にＧＶＨＤを誘導する。ＧＶＨＤは、常に身体の一部を奪うものであり、また致死性であることが多い（３４－３８）。第二に、ドナーＴ細胞が、患者への注入前に、癌細胞上に発現される特異的ＭｉＨＡに対して初回刺激（予備活性化）されないため、従来のＡＨＣＴは、減弱型のＧＶＴ反応しか誘導しない。初回刺激されたＴ細胞は耐性誘導に抵抗性を示すため、ナイーブＴ細胞を腫瘍細胞によって寛容化することができる（３９－４２）。

10

20

30

40

50

#### 【０００５】

ＡＨＣＴのマウスモデルにおいて、非選択のドナーリンパ球を、単一ＭｉＨＡに対して初回刺激したＣＤ８　Ｔ細胞に置き換えることによって、ＧＶＨＤまたはいずれかの有害作用を引き起こすことなく、白血病および固形腫瘍を治療することが可能であることが実証されている（３３；４３；４４）。成功は２つの主要な点に依存する：新生細胞上に発現される免疫優性（免疫原性が高い）ＭｉＨＡの選択、およびＡＨＣＴ前の、標的ＭｉＨＡに対するドナーＣＤ８　Ｔ細胞の初回刺激。最近の論文（２０）が、ＭｉＨＡを標的とするＡＴＣＩがなぜそんなに効果的なのか、および臨床におけるこのアプローチへの転換が、癌免疫療法にいかに関与するかについて記載している。ヒトにおけるＭｉＨＡを標的とするＡＴＣＩの実施は、主に分子的に定義されたヒトＭｉＨＡの不足によって制限されてきた。そのため、白血病に罹患する患者のわずか３３％のみが、ＭｉＨＡに基づくＡＴＣＩに適格とされていた（１５）。

#### 【０００６】

ヒトＭｉＨＡは、還元主義的なＴ細胞に基づく方法を用いて発見された。ＨＬＡが同一である別の対象の細胞に反応性を示す個体の細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）から出発して、研究者は、これらのＴ細胞によって認識されるＭｉＨＡを試験して同定した。それを行うために異なる方法が用いられた。最初に、ＭｉＨＡ陽性細胞から溶出したＭＡＰで被覆したＭｉＨＡ陰性細胞上でＣＴＬをテストした。ＭＡＰ溶出液を分取し、最終的に、ＣＴＬによって認識されたＭｉＨＡを質量分析（ＭＳ）により配列決定した（４８－５３）。次に、ＣＴＬを用いて、ｃＤＮＡライブラリーで形質転換したＭｉＨＡ陰性細胞をスクリーニングし、ＭｉＨＡをコードする転写物を同定した（１６；５４－５９）。最後に、多くの対象からのリンパ芽球様細胞株上でＣＴＬをテストし、ＣＴＬによって認識された株または認識されなかった株に対する連鎖解析（例えば、全ゲノム関連スキャンまたはＨａｐＭａｐリソースに基づく）を行った（６０－６７）。

#### 【０００７】

ＭｉＨＡを発見するために用いられた種々の方法は、重要な警告を提示する。第一に、これらは、ハイスループットなＭｉＨＡの発見にはあまり適していない：ＭｉＨＡの発見

は、1つ1つ行われ、CTL株の利用可能性に依存する。第二に、生細胞から溶出し、MSによって同定されたMiHAのみを、有効であると見なすことができる（直接同定）。他の場合（間接同定）には、細胞表面上に自然に提示されるMiHAの正確な構造に関して不確実性が残る（MiHAを標的とする免疫療法の重要な基準）。曖昧性は、主として2つの要因に起因する：i）T細胞は著しく交差反応性であり、1つより多くのペプチドを認識することができる（68）、ii）一般的にMAP、特にMiHAの同定に使用される生物情報学ツールは、直接的なプロテオミクス同定に取って代わるだけの十分な信頼性を有しない（69 - 71）。

【0008】

したがって、MiHAを同定するための新規アプローチの必要性が存在する。

10

【0009】

本明細書は、多数の文書に言及するが、それらの内容全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】TYKODI, S. et al. "C19orf48 encodes a minor histocompatibility antigen recognized by CD8 cytotoxic T cells from renal cell carcinoma patients". Clin. Cancer Res. 2008. vol. 14, pp 5260-5269 ISSN: 1078-0432

【発明の概要】

20

【0011】

第1の態様において、本発明は、マイナー組織適合抗原（MiHA）候補を同定する方法を提供し、該方法は、（a）第1の対象由来の第1の細胞試料中のMHC関連ペプチド（MAP）を単離および配列決定することと、（b）前記第1の対象から得られた第2の細胞試料に対して全トランスクリプトームおよび/またはエクソーム配列決定を行うことと、（c）配列決定された全トランスクリプトームおよび/またはエクソームを参照ゲノムと比較し、前記第1の対象のトランスクリプトームおよび/またはエクソームと参照ゲノムとの間の単一ヌクレオチド変異（SNV）を同定することと（d）同定されたSNVを含有する配列をin silicoで翻訳し、前記SNVによって引き起こされる少なくとも1つの非同義変異を含むペプチド配列を同定することと、（e）（a）で単離されたMAPの配列を（d）で同定されたペプチド配列と比較することと、（f）前記比較に基づいてMiHA候補を同定することと、を含む。

30

【0012】

別の態様において、本発明は、マイナー組織適合抗原（MiHA）候補を同定する方法を提供し、該方法は、（a）第1および第2の対象由来の第1の細胞試料中のMHC関連ペプチド（MAP）を単離および配列決定することであって、前記第1および第2の対象は、ヒト白血球抗原（HLA）適合性である、単離および配列決定することと、（b）前記第1および第2の対象から得られた第2の細胞試料に対して全トランスクリプトームおよび/またはエクソーム配列決定を行うことと、（c）配列決定された全トランスクリプトームおよび/またはエクソームを比較し、前記第1および第2の対象のトランスクリプトームおよび/またはエクソーム間の単一ヌクレオチド変異（SNV）を同定することと、（d）同定されたSNVを含有する配列をin silicoで翻訳し、前記SNVによって引き起こされる少なくとも1つの非同義変異を含むペプチド配列を同定することと、（e）（a）で単離されたMAPの配列を（d）で同定されたペプチド配列と比較することと、（f）前記比較に基づいてMiHA候補を同定することと、を含む。

40

【0013】

一実施形態において、上記MiHA候補は、その配列が、参照ゲノムから翻訳された対応する配列と比較して少なくとも1つの変異を含むMAPである。

【0014】

一実施形態において、上記MiHA候補は、前記第1の対象由来の第1の細胞試料中に

50

は存在するが、前記第 2 の対象由来の第 1 の細胞試料中には存在しない M A P である。

【 0 0 1 5 】

一実施形態において、上記参照ゲノムは、Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) である。

【 0 0 1 6 】

一実施形態において、上記第 1 および / または第 2 の細胞試料は、末梢血細胞試料である。さらなる実施形態において、上記末梢血細胞試料は、不死化末梢血細胞試料である。さらなる実施形態において、上記不死化末梢血細胞試料は、エプスタイン・バーウイルス (EBV) で形質転換した B リンパ芽球様細胞株である。

【 0 0 1 7 】

一実施形態において、上記 M A P を単離することは、( i ) 弱酸処理により前記細胞試料から前記 M A P を放出させることと、( i i ) 放出させた M A P をクロマトグラフィーに供することと、を含む。

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、上記方法は、前記クロマトグラフィーの前に、サイズ排除カラムを用いて放出させたペプチドを濾過することをさらに含む。さらなる実施形態において、上記サイズ排除カラムは、約 3 0 0 0 D a のカットオフを有する。一実施形態において、上記クロマトグラフィーは、陽イオン交換クロマトグラフィーである。

【 0 0 1 9 】

一実施形態において、( d ) の上記ペプチド配列は、12 アミノ酸以下の長さを有する。さらなる実施形態において、( d ) の上記ペプチド配列は、8 ~ 1 1 アミノ酸の長さを有する。

【 0 0 2 0 】

一実施形態において、上記比較することは、( a ) で単離された M A P を質量分析に供することと、( d ) で同定されたペプチド配列から得られた M S スペクトルを比較することと、を含む。

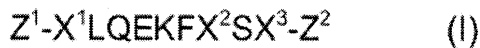
【 0 0 2 1 】

一実施形態において、上記方法は、( f ) で同定された M i H A 候補の主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子への結合を決定することをさらに含む。

【 0 0 2 2 】

別の態様において、本発明は、配列 ( I )

【 化 1 】



(式中、 $Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^1$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^2$  は、L または S であり、 $X^3$  は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない) を含む、50 アミノ酸以下のペプチドを提供する。一実施形態において、 $X^1$  は、酸性アミノ酸であり、さらなる実施形態においてグルタミン酸 (E) である。一実施形態において、 $X^3$  は、アミノ酸であり、さらなる実施形態において疎水性アミノ酸であり、より具体的にはロイシン (L) である。一実施形態において、 $X^2$  は L である。別の実施形態において、 $X^2$  は S である。一実施形態において、ペプチドは配列 E L Q E K F L S L (配列番号 15) を含み、さらなる実施形態において、ペプチドは E L Q E K F L S L (配列番号 15) である。別の実施形態において、ペプチドは配列 E L Q E K F S S L (配列番号 16) を含み、さらなる実施形態において、ペプチドは E L Q E K F S S L (配列番号 16) である。

【 0 0 2 3 】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記ペプチド (I) を負荷した H L A - B \* 0 8 0 1 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を認識する有効量の C D 8 T リンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。一実施形態に

10

20

30

40

50

において、上記方法は、前記対象が、ヒトCENPFの核酸配列（図1A～1D、NCBI参照配列：NM\_\_016343.3）中のヌクレオチド4409に対応する位置にTもしくはCを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列（図1E、NCBI参照配列：NP\_\_057427.3）中の残基1412に対応する位置にロイシンもしくはセリン残基を含むCENPFポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、（a）前記対象が、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にTを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にロイシン残基を含むCENPFポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はLであり、（b）前記対象が、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にCを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にセリン残基を含むCENPFポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はSである。

10

#### 【0024】

一実施形態において、上記決定することは、CENPF核酸を配列決定することを含む。一実施形態において、上記CD8 Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたCD8 Tリンパ球である。

#### 【0025】

一実施形態において、上記方法は、（i）前記対象が（a）の対象である場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（I）（前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はLである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にC、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にセリン残基を含むCENPFポリペプチドを含む第2の対象からCD8 Tリンパ球を培養すること、または

20

（ii）前記対象が（b）の対象である場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（I）（前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はSである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にT、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にロイシン残基を含むCENPFポリペプチドを含む第2の対象からCD8 Tリンパ球を培養すること、をさらに含む。

30

#### 【0026】

一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植（ASCT）のレシピエントである。

#### 【0027】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8 Tリンパ球を増殖させる方法を提供し、前記方法は、（a）候補ドナーが、ヒトCENPFの核酸配列（図1A～1D、NCBI参照配列：NM\_\_016343.3）中のヌクレオチド4409に対応する位置にTもしくはCを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列（図1E、NCBI参照配列：NP\_\_057427.3）中の残基1412に対応する位置にロイシンもしくはセリン残基を含むCENPFポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、（b）（i）前記候補ドナーが、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にTを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にロイシン残基を含むCENPFポリペプチドを発現する場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（I）（前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はSである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからのCD8 Tリンパ球を培養すること、または（b）（ii）前記候補ドナーが、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にCを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にセリ

40

50

ン残基を含むC E N P Fポリペプチドを発現する場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(I) (前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はLである)を負荷したH L A - B \* 0 8 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからのC D 8 Tリンパ球を培養することと、を含む。

【0028】

別の態様において、本発明は、配列(I I)

【化2】



(式中、Z<sup>1</sup>は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>4</sup>は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>5</sup>は、GまたはRであり、X<sup>6</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>7</sup>は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチドを提供する。

【0029】

一実施形態において、X<sup>4</sup>は、グルタミン(Q)である。一実施形態において、X<sup>6</sup>は、アミノ酸であり、さらなる実施形態において塩基性アミノ酸であり、より具体的にはリジン(K)である。一実施形態において、X<sup>7</sup>は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてロイシン(L)である。一実施形態において、X<sup>5</sup>は、Gである。別の実施形態において、X<sup>5</sup>は、Rである。一実施形態において、ペプチドは配列Q E L D G V F Q K L (配列番号17)を含む。さらなる実施形態において、ペプチドはQ E L D G V F Q K L (配列番号17)である。別の実施形態において、ペプチドは配列Q E L D R V F Q K L (配列番号18)を含む。さらなる実施形態において、ペプチドはQ E L D R V F Q K L (配列番号18)である。

【0030】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記ペプチド(I I)を負荷したH L A - B \* 4 4 0 3対立遺伝子のM H CクラスI分子を認識する有効量のC D 8 Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0031】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトZ W I N Tの核酸配列(図2 A、N C B I参照配列: N M \_ 0 0 7 0 5 7 . 3)中のヌクレオチド596に対応する位置にAもしくはGを含むZ W I N T核酸、および/またはヒトZ W I N Tのタンパク質配列(図2 B、N C B I参照配列: N P \_ 0 0 8 9 8 8 . 2)中の残基187に対応する位置にアルギニンもしくはグリシン残基を含むZ W I N Tポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトZ W I N Tの核酸配列中のヌクレオチド596に対応する位置にAを含むZ W I N T核酸、および/またはヒトZ W I N Tのタンパク質配列中の残基187に対応する位置にアルギニン残基を含むZ W I N Tポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>5</sup>は、Rであり、(b)前記対象が、ヒトZ W I N Tの核酸配列中のヌクレオチド596に対応する位置にGを含むZ W I N T核酸、および/またはヒトZ W I N Tのタンパク質配列中の残基187に対応する位置にグリシン残基を含むZ W I N Tポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>5</sup>は、Gである。

【0032】

一実施形態において、上記決定することは、ヒトZ W I N Tを配列決定することを含む。一実施形態において、上記C D 8 Tリンパ球は、i n v i t r oで増殖させたC D 8 Tリンパ球である。

【0033】

一実施形態において、上記方法は、(i)前記対象が(a)の対象である場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(I I) (前記ペプチド中のX<sup>5</sup>はRである)を負荷したH L A - B \* 4 4 0 3対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現

10

20

30

40

50



する細胞の存在下で、ヒト ZWINT の核酸配列中のヌクレオチド 596 に対応する位置に G、および / またはヒト ZWINT のタンパク質配列中の残基 187 に対応する位置にグリシン残基を含む ZWINT ポリペプチドを含む第 2 の対象から CD8<sup>+</sup> T リンパ球を培養すること、または ( i i ) 前記対象が ( b ) の対象である場合、CD8<sup>+</sup> T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド ( I I ) ( 前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は G である ) を負荷した HLA - B \* 4403 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト ZWINT の核酸配列中のヌクレオチド 596 に対応する位置に A、および / またはヒト ZWINT のタンパク質配列中の残基 187 に対応する位置にアルギニン残基を含む ZWINT ポリペプチドを含む第 2 の対象から CD8<sup>+</sup> T リンパ球を培養することをさらに含む。一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植 ( A S C T ) のレシピエントである。

10

#### 【 0 0 3 4 】

別の態様において、本発明は、T 細胞養子免疫療法のために CD8<sup>+</sup> T リンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、( a ) 候補ドナーが、ヒト ZWINT の核酸配列 ( 図 2 A、NCBI 参照配列 : NM\_007057.3 ) 中のヌクレオチド 596 に対応する位置に A もしくは G を含む ZWINT 核酸、および / またはヒト ZWINT のタンパク質配列 ( 図 2 B、NCBI 参照配列 : NP\_008988.2 ) 中の残基 187 に対応する位置にアルギニンもしくはグリシン残基を含む ZWINT ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、( b ) ( i ) 前記候補ドナーが、ヒト ZWINT の核酸配列中のヌクレオチド 596 に対応する位置に A を含む ZWINT 核酸、および / またはヒト ZWINT のタンパク質配列中の残基 187 に対応する位置にアルギニン残基を含む ZWINT ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド ( I I ) ( 前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は G である ) を負荷した HLA - B \* 4403 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから CD8<sup>+</sup> T リンパ球を培養すること、または ( b ) ( i i ) 前記候補ドナーが、ヒト ZWINT の核酸配列中のヌクレオチド 596 に対応する位置に G を含む ZWINT 核酸、および / またはヒト ZWINT のタンパク質配列中の残基 187 に対応する位置にグリシン残基を含む ZWINT ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド ( I I ) ( 前記ペプチド中の X<sup>5</sup> は R である ) を負荷した HLA - B \* 4403 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから CD8<sup>+</sup> T リンパ球を培養することと、を含む。

20

30

#### 【 0 0 3 5 】

別の態様において、本発明は、配列 ( I I I )

#### 【 化 3 】



( 式中、Z<sup>1</sup> は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>8</sup> は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>9</sup> は、P または A であり、X<sup>10</sup> は、1 ~ 43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup> は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない ) を含む、50 アミノ酸以下のペプチドを提供する。一実施形態において、X<sup>8</sup> はセリン ( S ) である。一実施形態において、X<sup>10</sup> は、アミノ酸であり、さらなる実施形態において芳香族アミノ酸であり、より具体的にはフェニルアラニン ( F ) である。一実施形態において、X<sup>9</sup> は P である。別の実施形態において、X<sup>9</sup> は A である。一実施形態において、ペプチドは配列 S L F F R K V P F ( 配列番号 19 ) を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは S L F F R K V A F ( 配列番号 20 ) を含む。別の実施形態において、ペプチドは S L F F R K V A F ( 配列番号 20 ) である。

40

#### 【 0 0 3 6 】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記ペプチドを負荷した HLA - B \* 0801 対立遺伝子の MHC クラス I 分子を認識する有効量の C

50

D 8 Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0037】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトM T C H 2の核酸配列(図3 A、N C B I参照配列: N M \_ 0 1 4 3 4 2 . 3)中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にCもしくはGを含むM T C H 2核酸、および/またはヒトM T C H 2のタンパク質配列(図3 B、N C B I参照配列: N P \_ 0 5 5 1 5 7 . 1)中の2 9 0残基に対応する位置にプロリンもしくはアラニン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトM T C H 2の核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にCを含むM T C H 2核酸、および/またはヒトM T C H 2の前記タンパク質配列中の残基2 9 0に対応する位置にプロリン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを発現する場合、ペプチド中のX<sup>9</sup>はPであり、(b)前記対象が、ヒトM T C H 2の核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にGを含むM T C H 2核酸、および/またはヒトM T C H 2の前記タンパク質配列中の残基2 9 0に対応する位置にアラニン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを発現する場合、ペプチド中のX<sup>5</sup>はAである。

10

【0038】

一実施形態において、上記決定することは、ヒトM T C H 2核酸を配列決定することを含む。一実施形態において、上記C D 8 Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたC D 8 Tリンパ球である。

【0039】

一実施形態において、上記方法は、(i)前記対象が(a)の対象である場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(III)(前記ペプチド中のX<sup>9</sup>はPである)を負荷したH L A - B \* 0 8 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトM T C H 2の核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にG、および/またはヒトM T C H 2のタンパク質配列中の残基2 9 0に対応する位置にアラニン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを含む第2の対象からC D 8 Tリンパ球を培養すること、(ii)前記対象が(b)の対象である場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(III)(前記ペプチド中のX<sup>9</sup>はAである)を負荷したH L A - B \* 0 8 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトM T C H 2の核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にC、および/またはヒトM T C H 2のタンパク質配列中の残基2 9 0に対応する位置にプロリン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを含む第2の対象からC D 8 Tリンパ球を培養することをさらに含む。

20

30

【0040】

一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植(A S C T)のレシピエントである。

【0041】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにC D 8 Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、(a)候補ドナーが、ヒトM T C H 2の核酸配列(図3 A、N C B I参照配列: N M \_ 0 1 4 3 4 2 . 3)中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にCもしくはGを含むM T C H 2核酸、および/またはヒトM T C H 2のタンパク質配列(図3 B、N C B I参照配列: N P \_ 0 5 5 1 5 7 . 1)中の残基2 9 0に対応する位置にプロリンもしくはアラニン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i)前記候補ドナーが、ヒトM T C H 2の核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にCを含むM T C H 2核酸、および/またはヒトM T C H 2のタンパク質配列中の残基2 9 0に対応する位置にプロリン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを発現する場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(III)(前記ペプチド中のX<sup>9</sup>はAである)を負荷したH L A - B \* 0 8 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからC D 8 Tリンパ球を培養すること、または(b)(ii)前記候補ドナーが、ヒトM T C H 2の核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 7に対応する位置にGを含むM T C H 2核酸、および/

40

50

またはヒトM T C H 2のタンパク質配列中の残基290に対応する位置にアラニン残基を含むM T C H 2ポリペプチドを発現する場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド( I I I ) ( 前記ペプチド中のX<sup>9</sup>はPである ) を負荷したH L A - B \* 0 8 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからC D 8 Tリンパ球を培養することと、を含む。

【0042】

別の態様において、本発明は、配列( I V )

【化4】



( 式中、Z<sup>1</sup>は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>11</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>12</sup>は、SまたはTであり、X<sup>13</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>14</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない ) を含む、50アミノ酸以下のペプチドを提供する。一実施形態において、X<sup>11</sup>は存在しない。一実施形態において、上記X<sup>13</sup>は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてセリン( S )である。一実施形態において、X<sup>14</sup>は、アミノ酸であり、さらなる実施形態において塩基性アミノ酸であり、より具体的にはリジン( K )である。一実施形態において、X<sup>12</sup>はSである。別の実施形態において、X<sup>12</sup>はTである。一実施形態において、上記ペプチドは配列S V L K P G N S K ( 配列番号21 ) を含む。さらなる実施形態において、ペプチドはS V L K P G N S K ( 配列番号21 ) である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列T V L K P G N S K ( 配列番号22 ) を含む。さらなる実施形態において、ペプチドはT V L K P G N S K ( 配列番号22 ) である。

【0043】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記ペプチド( I V ) を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を認識する有効量のC D 8 Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0044】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトE L F 1の核酸配列( 図4 A および4 B、N C B I 参照配列：N M \_ 1 7 2 3 7 3 . 3 ) 中のヌクレオチド1400に対応する位置にAもしくはTを含むE L F 1核酸、および/またはE L F 1タンパク質配列( 図4 C、N C B I 参照配列：N P \_ 7 5 8 9 6 1 . 1 ) 中の残基343に対応する位置にスレオニンもしくはセリンを有するE L F 1ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、( a ) 前記対象が、ヒトE L F 1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にAを含むE L F 1核酸、および/またはヒトE L F 1のタンパク質配列中の残基343に対応する位置にスレオニン残基を含むE L F 1ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>12</sup>はTであり、( b ) 前記対象が、ヒトE L F 1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にTを含むE L F 1核酸、および/またはヒトE L F 1のタンパク質配列中の残基343に対応する位置にセリン残基を含むE L F 1ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>12</sup>はSである。

【0045】

一実施形態において、上記決定することは、ヒトE L F 1核酸を配列決定することを含む。一実施形態において、上記C D 8 Tリンパ球は、i n v i t r oで増殖させたC D 8 Tリンパ球である。

【0046】

一実施形態において、上記方法は、( i ) 前記対象が( a ) の対象である場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項86～99のいずれか1項に記載のペプチド( 前記ペプチド中のX<sup>12</sup>はTである ) を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトE L F 1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にT、および/またはヒトE L F 1のタンパク質配列中の

10

20

30

40

50

残基 3 4 3 に対応する位置にセリン残基を含む E L F 1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養すること、または ( i i ) 前記対象が ( b ) の対象である場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 8 6 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド ( 前記ペプチド中の  $X^{12}$  は S である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、ヒト E L F 1 の核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A、および / またはヒト E L F 1 のタンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニン残基を含む E L F 1 ポリペプチドを含む第 2 の対象から C D 8 T リンパ球を培養することをさらに含む。

#### 【 0 0 4 7 】

一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植 ( A S C T ) のレシピエントである。

10

#### 【 0 0 4 8 】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、( a ) 候補ドナーが、ヒト E L F 1 の核酸配列 ( 図 4 A および 4 B、N C B I 参照配列 : N M \_ 1 7 2 3 7 3 . 3 ) 中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A もしくは T を含む E L F 1 核酸、および / または E L F 1 タンパク質配列 ( 図 4 C、N C B I 参照配列 : N P \_ 7 5 8 9 6 1 . 1 ) 中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニンもしくはセリンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、( b ) ( i ) 前記候補ドナーが、ヒト E L F 1 の核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に A を含む E L F 1 核酸、および / または E L F 1 タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にスレオニンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド ( I V ) ( 前記ペプチド中の  $X^{12}$  は S である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または ( b ) ( i i ) 前記候補ドナーが、ヒト E L F 1 の核酸配列中のヌクレオチド 1 4 0 0 に対応する位置に T を含む E L F 1 核酸、および / または E L F 1 タンパク質配列中の残基 3 4 3 に対応する位置にセリンを有する E L F 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド ( I V ) ( 前記ペプチド中の  $X^{12}$  は T である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む。

20

30

#### 【 0 0 4 9 】

別の態様において、本発明は、配列 V

#### 【 化 5 】



( 式中、 $Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{15}$  は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{16}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{17}$  は、R または W であり、 $X^{18}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{19}$  は、1 ~ 4 3 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない ) を含む、5 0 アミノ酸以下のペプチドを提供する。一実施形態において、上記  $X^{16}$  は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてメチオニン ( M ) である。一実施形態において、 $X^{15}$  は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてアラニン ( A ) である。一実施形態において、 $X^{18}$  は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてセリン ( S ) である。一実施形態において、 $X^{19}$  は、アミノ酸であり、さらなる実施形態において塩基性アミノ酸であり、より具体的にはリジン ( K ) である。一実施形態において、 $X^{17}$  は R である。別の実施形態において、 $X^{17}$  は W である。一実施形態において、上記ペプチドは配列 A M Y D K G P F R S K ( 配列番号 2 3 ) を含む。一実施形態において、上記ペプチドは A M Y D K G P F R S K ( 配列番号 2 3 ) である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列 A M Y D K G P F W S K ( 配列番号 2 4 ) を

40

50

含む。一実施形態において、上記ペプチドはAMYDKGPFWSK（配列番号24）である。

【0050】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記ペプチド（V）を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を認識する有効量のCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0051】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトNQ01の核酸配列（図5A、NCBI参照配列：NM\_000903.2）中のヌクレオチド615に対応する位置にCもしくはTを含むNQ01核酸、および/またはNQ01タンパク質配列（図5B、NCBI参照配列：NP\_000894.1）中の残基139に対応する位置にアルギニンもしくはトリプトファンを有するNQ01ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、a)前記対象が、ヒトNQ01の核酸配列中のヌクレオチド615に対応する位置にCを含むNQ01核酸、および/またはヒトNQ01のタンパク質配列中の残基139に対応する位置にアルギニン残基を含むNQ01ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>17</sup>はRであり、(b)前記対象が、ヒトNQ01の核酸配列中のヌクレオチド615に対応する位置にTを含むNQ01核酸、および/またはヒトNQ01のタンパク質配列中の残基139に対応する位置にトリプトファン残基を含むNQ01ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>17</sup>はWである。

【0052】

一実施形態において、上記決定することは、ヒトNQ01核酸を配列決定することを含む。一実施形態において、上記CD8<sup>+</sup> Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたCD8<sup>+</sup> Tリンパ球である。

【0053】

一実施形態において、上記方法は、(i)前記対象が(a)の対象である場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（V）（前記ペプチド中のX<sup>17</sup>はRである）を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトNQ01の核酸配列中のヌクレオチド615に対応する位置にT、および/またはヒトNQ01のタンパク質配列中の残基139に対応する位置にトリプトファン残基を含むNQ01ポリペプチドを含む第2の対象からCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、または(ii)前記対象が(b)の対象である場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（V）（前記ペプチド中のX<sup>17</sup>はWである）を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトNQ01の核酸配列中のヌクレオチド615に対応する位置にC、および/またはヒトNQ01のタンパク質配列中の残基139に対応する位置にアルギニン残基を含むNQ01ポリペプチドを含む第2の対象からCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、をさらに含む。

【0054】

一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植(ASCT)のレシピエントである。

【0055】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、(a)前記対象が、ヒトNQ01の核酸配列（図5A、NCBI参照配列：NM\_000903.2）中のヌクレオチド615に対応する位置にCもしくはTを含むNQ01核酸、および/またはNQ01タンパク質配列（図5B、NCBI参照配列：NP\_000894.1）中の残基139に対応する位置にアルギニンもしくはトリプトファンを有するNQ01ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i)前記候補ドナーが、ヒトNQ01の核酸配列中のヌクレオチド615に対応する位置にCを含むNQ01核酸、および/またはヒトNQ01のタンパク質配列中の残基139に対応する位置にアルギニン残基を含むNQ01ポリペプチドを発現する

場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(V) (前記ペプチド中のX<sup>1 7</sup>はWである)を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからC D 8 Tリンパ球を培養すること、または(b)(i i)前記候補ドナーが、ヒトN Q 0 1の核酸配列中のヌクレオチド6 1 5に対応する位置にTを含むN Q 0 1核酸、および/またはヒトN Q 0 1のタンパク質配列中の残基1 3 9に対応する位置にトリプトファン残基を含むN Q 0 1ポリペプチドを発現する場合、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド(V) (前記ペプチド中のX<sup>1 7</sup>はRである)を負荷したH L A - A \* 0 3 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからC D 8 Tリンパ球を培養することと、を含む。

10

【0056】

別の態様において、本発明は、配列V I

【化6】



(式中、Z<sup>1</sup>は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>2 0</sup>は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>2 1</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>2 2</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>2 3</sup>は、GまたはRであり、X<sup>2 4</sup>は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチドを提供する。一実施形態において、ペプチドは、8~12アミノ酸の長さを有する。一実施形態において、X<sup>2 2</sup>は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてバリン(V)である。一実施形態において、X<sup>2 1</sup>は、アミノ酸であり、さらなる実施形態においてアルギニン(R)である。一実施形態において、X<sup>2 3</sup>は、グリシン(G)であり、別の実施形態において、X<sup>2 3</sup>は、アルギニン(R)である。一実施形態において、上記ペプチドは配列R V S L P T S P G (配列番号25)を含む。一実施形態において、上記ペプチドはR V S L P T S P G (配列番号25)である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列R V S L P T S P R (配列番号26)を含む。一実施形態において、上記ペプチドはR V S L P T S P R (配列番号26)である。

20

【0057】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記配列V Iペプチドを負荷したH L A - A \* 0 3 0 1対立遺伝子のM H CクラスI分子を認識する有効量のC D 8 Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

30

【0058】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトK I A A 0 2 2 6 Lの核酸配列(図6Aおよび6B、N C B I参照配列: N M \_ 0 2 5 1 1 3 . 2)中のヌクレオチド1 0 5 9に対応する位置にGもしくはAを含むK I A A 0 2 2 6 L核酸、および/またはK I A A 0 2 2 6 Lタンパク質配列(図6C、N C B I参照配列: N P \_ 0 7 9 3 8 9 . 2)中の残基1 5 2に対応する位置にグリシンもしくはアルギニンを有するK I A A 0 2 2 6 Lポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトK I A A 0 2 2 6 Lの核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 9に対応する位置にGを含むK I A A 0 2 2 6 L核酸、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 Lのタンパク質配列中の残基1 5 2に対応する位置にグリシン残基を含むK I A A 0 2 2 6 Lポリペプチドを発現する場合、配列V Iの前記ペプチド中のX<sup>2 3</sup>は、Gであり、(b)前記対象が、ヒトK I A A 0 2 2 6 Lの核酸配列中のヌクレオチド1 0 5 9に対応する位置にAを含むK I A A 0 2 2 6 L核酸、および/またはヒトK I A A 0 2 2 6 Lのタンパク質配列中の残基1 5 2に対応する位置にアルギニン残基を含むK I A A 0 2 2 6 Lポリペプチドを発現する場合、配列V Iの前記ペプチド中のX<sup>2 3</sup>は、Rである。

40

【0059】

別の実施形態において、前記決定することは、ヒトK I A A 0 2 2 6 L核酸を配列決定

50

することを含む。一実施形態において、上記CD8 Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたCD8 Tリンパ球である。

#### 【0060】

一実施形態において、上記方法は、(i)前記対象が上記(a)の対象である場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIのペプチド(前記ペプチド中の $X^{23}$ はGである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトKIAA0226Lの核酸配列中のヌクレオチドヌクレオチド1059に対応する位置にA、および/またはヒトKIAA0226Lのタンパク質配列中の残基152に対応する位置にアルギニン残基を含むKIAA0226Lポリペプチドを含む第2の対象からCD8 Tリンパ球を培養すること、または(ii)前記対象が上記(b)の対象である場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIのペプチド(前記ペプチド中の $X^{23}$ はRである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトKIAA0226Lの核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にG、および/またはヒトKIAA0226Lのタンパク質配列中の残基152に対応する位置にグリシン残基を含むKIAA0226Lポリペプチドを含む第2の対象からCD8 Tリンパ球を培養すること、をさらに含む。

10

#### 【0061】

一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植(ASCT)のレシピエントである。

20

#### 【0062】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8 Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、(a)候補ドナーが、ヒトKIAA0226Lの核酸配列(図6Aおよび6B、NCBI参照配列:NM\_025113.2)中のヌクレオチド1059に対応する位置にGもしくはAを含むKIAA0226L核酸、および/またはKIAA0226Lタンパク質配列(図6C、NCBI参照配列:NP\_079389.2)中の残基152に対応する位置にグリシンもしくはアルギニンを有するKIAA0226Lポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i)前記候補ドナーが、ヒトKIAA0226Lの核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にGを含むKIAA0226L核酸、および/またはヒトKIAA0226Lのタンパク質配列中の残基152に対応する位置にグリシン残基を含むKIAA0226Lポリペプチドを発現する場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIのペプチド(前記ペプチド中の $X^{23}$ はRである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8 Tリンパ球を培養すること、または(b)(ii)前記対象が、ヒトKIAA0226Lの核酸配列中のヌクレオチド1059に対応する位置にAを含むKIAA0226L核酸、および/またはヒトKIAA0226Lのタンパク質配列中の残基152に対応する位置にアルギニン残基を含むKIAA0226Lポリペプチドを発現する場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIのペプチド(前記ペプチド中の $X^{23}$ はGである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8 Tリンパ球を培養することと、を含む。

30

40

#### 【0063】

別の態様において、本発明は、配列VII

#### 【化7】



(式中、 $Z^1$ は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{25}$ は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{26}$ は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{27}$ は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{28}$ は、KまたはNであり、 $X^{29}$ は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$ は、カルボキシ末端修

50

飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチドを提供する。一実施形態において、ペプチドは、8~12アミノ酸の長さを有する。一実施形態において、 $X^{27}$ は、アミノ酸であり、より具体的にはメチオニン(M)である。一実施形態において、 $X^{26}$ は、アミノ酸であり、より具体的にはバリン(V)である。一実施形態において、 $X^{28}$ はKである。別の実施形態において、 $X^{28}$ はNである。一実施形態において、ペプチドは配列VMGNPGTFK(配列番号27)を含む。さらなる実施形態において、ペプチドはVMGNPGTFK(配列番号27)である。別の実施形態において、ペプチドは配列VMGNPGTFN(配列番号28)である。一実施形態において、ペプチドはVMGNPGTFN(配列番号28)である。

【0064】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記配列VIIペプチドを負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を認識する有効量のCD8 Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0065】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトRMDN1の核酸配列(図7A、NCBI参照配列:NM\_016033.2)中のヌクレオチド316に対応する位置にAもしくはCを含むRMDN1核酸、および/またはRMDN1タンパク質配列(図7B、NCBI参照配列:NP\_057117.2)中の残基52に対応する位置にリジンもしくはアスパラギンを有するRMDN1ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトRMDN1の核酸配列中のヌクレオチド316に対応する位置にAを含むRMDN1核酸、および/またはヒトRMDN1のタンパク質配列中の残基52に対応する位置にリジン残基を含むRMDN1ポリペプチドを発現する場合、配列VIIの前記ペプチド中の $X^{28}$ は、Kであり、(b)前記対象が、ヒトRMDN1の核酸配列中のヌクレオチド316に対応する位置にCを含むRMDN1核酸、および/またはヒトRMDN1のタンパク質配列中の残基52に対応する位置にアスパラギン残基を含むRMDN1ポリペプチドを発現する場合、配列VIIの前記ペプチド中の $X^{28}$ は、Nである。

【0066】

別の実施形態において、決定することは、ヒトRMDN1核酸を配列決定することを含む。一実施形態において、上記CD8 Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたCD8 Tリンパ球である。

【0067】

一実施形態において、上記方法は、(i)前記対象が(a)の対象である場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIIのペプチド(前記ペプチド中の $X^{28}$ はKである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトRMDN1の核酸配列中のヌクレオチド316に対応する位置にC、および/またはヒトRMDN1のタンパク質配列中の残基52に対応する位置にアスパラギン残基を含むRMDN1ポリペプチドを含む第2の対象からCD8 Tリンパ球を培養すること、または(ii)前記対象が上記(b)の対象である場合、CD8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIIのペプチド(前記ペプチド中の $X^{28}$ はNである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、ヒトRMDN1の核酸配列中のヌクレオチド316に対応する位置にA、および/またはヒトRMDN1のタンパク質配列中の残基52に対応する位置にリジン残基を含むRMDN1ポリペプチドを含む第2の対象からCD8 Tリンパ球を培養することをさらに含む。

【0068】

一実施形態において、上記対象は、同種幹細胞移植(ASCT)のレシピエントである。

【0069】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8 Tリンパ球を増殖

10

20

30

40

50



する方法を提供し、前記方法は、(a)候補ドナーが、ヒトRMDN1の核酸配列(図7A、NCBI参照配列:NM\_\_016033.2)中のヌクレオチド316に対応する位置にAもしくはCを含むRMDN1核酸、および/またはRMDN1タンパク質配列(図7B、NCBI参照配列:NP\_\_057117.2)中の残基52に対応する位置にリジンもしくはアスパラギンを有するRMDN1ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i)前記対象が、ヒトRMDN1の核酸配列中のヌクレオチド316に対応する位置にAを含むRMDN1核酸、および/またはヒトRMDN1のタンパク質配列中の残基52に対応する位置にリジン残基を含むRMDN1ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIIのペプチド(前記ペプチド中のX<sup>28</sup>はNである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからのCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、または(b)(ii)前記対象が、ヒトRMDN1の核酸配列中のヌクレオチド316に対応する位置にCを含むRMDN1核酸、および/またはヒトRMDN1のタンパク質配列中の残基52に対応する位置にアスパラギン残基を含むRMDN1ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、配列VIIのペプチド(前記ペプチド中のX<sup>28</sup>はRである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからのCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養することと、を含む。

10

#### 【0070】

一実施形態において、上記ペプチド(I)~(VII)中のZ<sup>1</sup>は、存在しない。一実施形態において、上記ペプチド(I)~(VII)中のZ<sup>2</sup>は、存在しない。

20

#### 【0071】

別の態様において、本発明は、上記方法によって同定されるMiHAを提供する。一実施形態において、MiHAは、本明細書に定義される配列(I)~(VII)のペプチドである。

#### 【0072】

別の態様において、本発明は、上記ペプチド(I)~(VII)をコードする核酸を提供する。

#### 【0073】

別の態様において、本発明は、ペプチド(I)~(VII)を負荷した、単離された主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子を提供する。別の態様において、本発明は、その表面に、上記ペプチド(I)~(VII)を負荷したMHCクラスI分子を発現する単離された細胞を提供する。

30

#### 【0074】

一実施形態において、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子は、HLA-A\*0301、HLA-B\*0801、またはHLA-B\*4403対立遺伝子の分子である。さらなる実施形態において、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子は、HLA-A\*0301対立遺伝子の分子である。別の実施形態において、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子は、HLA-B\*0801対立遺伝子の分子である。別の実施形態において、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子は、HLA-B\*4403対立遺伝子の分子である。

40

#### 【0075】

本発明の他の目標、利点、および特徴は、添付の図面を参照して例としてのみ提供される、以下に記載するその特定の実施形態の非限定的な説明を読むことで、より明白になるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0076】

【図1A】ヒトセントロメアタンパク質F、350/400kDa(マイトシン)(CENPF)cDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。コード領域を斜体で示す。

【図1B】ヒトセントロメアタンパク質F、350/400kDa(マイトシン)(CENPF)cDNAのヌクレオチド配列(配列番号2)を示す。コード領域を斜体で示す。

50

N P F ) c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 1 C】ヒトセントロメアタンパク質 F、350 / 400 k D a ( マイトシン ) ( C E N P F ) c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 1 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 1 D】ヒト C E N P F ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 2 ) を示す。

【図 2 A】ヒト Z W 1 0 相互作用物質 ( Z W I N T ) c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 3 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 2 B】ヒト Z W I N T ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 4 ) を示す。

【図 3 A】ヒトミトコンドリア輸送体相同体 2 ( M T C H 2 ) c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 5 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 3 B】ヒト M T C H 2 ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 6 ) を示す。

【図 4 A】E L F 1 [ E 7 4 様因子 1 ( e t s ドメイン転写因子 ) ] c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 7 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 4 B】E L F 1 [ E 7 4 様因子 1 ( e t s ドメイン転写因子 ) ] c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 7 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 4 C】ヒト E L F 1 ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 8 ) を示す。

【図 5 A】ヒト N Q 0 1 [ N A D ( P ) H 脱水素酵素、キノリン 1 ] c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 9 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 5 B】ヒト N Q 0 1 [ N A D ( P ) H 脱水素酵素、キノリン 1 ] c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 9 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 5 C】ヒト N Q 0 1 ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 10 ) を示す。

【図 6 A】ヒト K I A A 0 2 2 6 L c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 11 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 6 B】ヒト K I A A 0 2 2 6 L c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 11 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 6 C】ヒト K I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 12 ) を示す。

【図 7 A】ヒト R M D N 1 c D N A のヌクレオチド配列 ( 配列番号 13 ) を示す。コード領域を斜体で示す。

【図 7 B】ヒト R M D N 1 ポリペプチドのアミノ酸配列 ( 配列番号 14 ) を示す。

【発明を実施するための形態】

【0077】

発明の開示

本明細書で使用される遺伝学、分子生物学、生化学、および核酸の用語および記号は、当該技術分野の標準的な論文およびテキスト、例えば、Kornberg and Baker, DNA Replication, Second Edition (W. H. Freeman, New York, 1992); Lehninger, Biochemistry, Second Edition (Worth Publishers, New York, 1975); Strachan and Read, Human Molecular Genetics, Second Edition (Wiley-Liss, New York, 1999); Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach (Oxford University Press, New York, 1991); Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984) 等のものに従う。全ての用語は、関連技術において確立されたそれらの典型的な意味を有するものと理解されたい。

【0078】

冠詞「a」および「an」は、本明細書において、その冠詞の文法上の対象のうちの1つまたは1つより多く (すなわち、少なくとも1つ) を指すために使用される。例として、「要素 (an element)」は、1つの要素または1つより多くの要素を意味す

10

20

30

40

50

る。本明細書を通して、内容上別途要求されない限り、「含む ( c o m p r i s e ) 」、「含む ( c o m p r i s e s ) 」、および「含む ( c o m p r i s i n g ) 」という語は、記載されるステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群の包含を暗示するが、いずれか他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群を除外は暗示しないと理解されたい。

【 0 0 7 9 】

ヒト M i H A 発見のための新規方法、本方法を用いて同定される新規 M i H A、および新規 M i H A の使用が、本明細書に記載される。本方法の特徴の 1 つは、個別化した翻訳されたトランスクリプトームおよび / またはエクソームの、質量分光測定法 ( M S ) によるペプチド同定に使用されるデータベースへの組み込みである。候補 M i H A は、個別化したトランスクリプトームおよび / またはエクソームを、参照ゲノムならびに / または H L A が適合する対象 ( 例えば、H L A が同一である同胞 ) の参照ゲノムおよび / もしくはトランスクリプトームおよび / またはエクソームと比較することによって同定される。

10

【 0 0 8 0 】

したがって、第 1 の態様において、本発明は、マイナー組織適合抗原 ( M i H A ) 候補を同定する方法を提供し、該方法は、( a ) 第 1 の対象由来の第 1 の細胞試料中の M H C 関連ペプチド ( M A P ) の配列を単離および配列決定することと、( b ) 前記第 1 の対象から得られた第 2 の細胞試料に対して全トランスクリプトームおよび / またはエクソーム配列決定を行うことと、( c ) 配列決定された全トランスクリプトームおよび / またはエクソームを参照ゲノムと比較し、前記第 1 の対象のトランスクリプトームおよび / またはエクソームと参照ゲノムとの間の単一ヌクレオチド変異 ( S N V ) を同定することと、( d ) 同定された S N V を含有する配列を i n s i l i c o で翻訳し、前記 S N V によって引き起こされる少なくとも 1 つの非同義変異を含むペプチド配列を同定することと、( e ) ( a ) で単離された M A P の配列を ( d ) で同定されたペプチド配列と比較することと、( f ) 前記比較に基づいて M i H A 候補を同定することと、を含む。

20

【 0 0 8 1 】

一実施形態において、M i H A 候補は、その配列が、参照ゲノムから翻訳された対応する配列と比較して少なくとも 1 つの変異を含む M A P である。

【 0 0 8 2 】

別の態様において、本発明は、マイナー組織適合抗原 ( M i H A ) 候補を同定する方法を提供し、該方法は、( a ) 第 1 および第 2 の対象由来の第 1 の細胞試料中の M H C 関連ペプチド ( M A P ) を単離することと、前記第 1 および第 2 の対象は、ヒト白血球抗原 ( H L A ) 適合性である、単離することと、( b ) 前記第 1 および第 2 の対象から得られた第 2 の細胞試料に対して全トランスクリプトームおよび / またはエクソーム配列決定を行うことと、( c ) 配列決定された全トランスクリプトームおよび / またはエクソームを比較し、前記第 1 および第 2 の対象のトランスクリプトームおよび / またはエクソーム間の単一ヌクレオチド変異 ( S N V ) を同定することと、( d ) 同定された S N V を含有する配列を i n s i l i c o で翻訳し、前記 S N V によって引き起こされる少なくとも 1 つの非同義変異を含むペプチド配列を同定することと、( e ) ( a ) で単離された M A P の配列を ( d ) で同定されたペプチド配列と比較することと、( f ) 前記比較に基づいて M i H A 候補を同定することと、を含む。一実施形態において、M i H A 候補は、前記第 1 の対象由来の第 1 の細胞試料中には存在するが、前記第 2 の対象由来の第 1 の細胞試料中には存在しない M A P である。

30

40

【 0 0 8 3 】

本明細書で使用される「参照ゲノム」という用語は、文献において報告されるヒトゲノムアセンブリを指し、例えば、Genome Reference Consortium Human Build 37 ( G R C h 3 7 、 Genome Reference Consortium ; The International Human Genome Sequencing Consortium . Nature . 2 0 0 4 ; 4 3 1 : 9 3 1 - 9 4 5 ) , H s \_ C e l e r a \_ W G S A ( C e l e r a Genomics

50

; I s t r a i l S . e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 2 0 0 4 F e b 1 7 ; 1 0 1 ( 7 ) : 1 9 1 6 - 2 1 ) . E p u b 2 0 0 4 F e b 9 ) , H u R e f a n d H u R e f P r i m e ( J . C r a i g V e n t e r I n s t i t u t e ; L e v y S , e t a l . P L o S B i o l o g y . 2 0 0 7 ; 5 : 2 1 1 3 - 2 1 4 4 ) , Y H 1 a n d B G I A F ( B e i j i n g G e n o m i c s I n s t i t u t e ; L i R , e t a l . G e n o m e R e s e a r c h . 2 0 1 0 ; 2 0 : 2 6 5 - 2 7 2 ) 、 お よ び H s a p A L L P A T H S I ( B r o a d I n s t i t u t e ) を 含 む 。 一 実 施 形 態 に お い て 、 参 照 ゲ ノ ム は G R C h 3 7 である。

#### 【 0 0 8 4 】

10

種々の実施形態において、上述の第1の試料は、対象由来の組織または体液、例えば、血液、血清、免疫細胞（例えば、リンパ球）、血液細胞（例えば、P B M C もしくはそのサブセット）、組織、または初代細胞に由来する細胞株等を含む、M H C クラス I 分子を発現する細胞を含有するいずれの源に由来してもよい。一実施形態において、第1の試料は、血液細胞試料、例えば、P B M C 試料、またはP B M C 等の血液細胞に由来する細胞株（例えば、不死化細胞株）である。初代細胞から細胞株を作製するための方法、または初代細胞を不死化する方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（T E R T）の組換え発現による初代細胞の不死化（B a r s o v E V , C u r r P r o t o c I m m u n o l . 2 0 1 1 N o v ; C h a p t e r 7 : U n i t 7 . 2 1 B）、サルウイルス40（S V 4 0）T抗原、アデノウイルスE 1 A およびE 1 B、ヒトパピローマウイルス（H P V）E 6 およびE 7、ならびにエプスタイン・バーウイルス（E B V）等のウイルス遺伝子の組換え発現による不死化、さらにはp 5 3 またはR b等の腫瘍抑制遺伝子の不活性化を含む。E B VによるBリンパ球の不死化のための方法は、T o s a t o G a n d C o h e n J l . C u r r P r o t o c I m m u n o l . 2 0 0 7 F e b ; C h a p t e r 7 : U n i t 7 . 2 2 に記載されている。哺乳動物細胞を不死化するための製品/試薬は、例えば、A T C C（商標）から市販されている。一実施形態において、第1の試料は、対象から得られた初代細胞由来の不死化細胞株であり、さらなる実施形態において、E B Vで形質転換したBリンパ芽球様細胞株（B - L C L）等の不死化B細胞株である。

20

#### 【 0 0 8 5 】

30

細胞試料からM H C 関連ペプチド（M A P）を単離するための方法は、当該技術分野で周知である。最も一般的に使用される技術は、F o r t i e r e t a l . ( J . E x p . M e d . 2 0 5 ( 3 ) : 5 9 5 - 6 1 0 , 2 0 0 8 ) に記載されるように、生細胞からのM H C 関連ペプチドの弱酸溶出（M A E）である。別の技術は、ペプチド-M H C クラス I 複合体の免疫沈降または親和性精製に続くペプチド溶出である（例えば、G e b r e s e l a s s i e e t a l . , H u m I m m u n o l . 2 0 0 6 N o v e m b e r ; 6 7 ( 1 1 ) : 8 9 4 - 9 0 6 を参照のこと）。後者に基づく2つのハイスループット戦略が実施されてきた。第1の戦略は、可溶性の分泌されたM H C（機能的膜貫通ドメインを欠く）をコードする発現ベクターによる細胞株のトランスフェクション、および分泌されたM H Cに関連するペプチドの溶出に基づいている（B a r n e a e t a l . , E u r J I m m u n o l . 2 0 0 2 J a n ; 3 2 ( 1 ) : 2 1 3 - 2 2 ; a n d H i c k m a n H D e t a l . , J I m m u n o l . 2 0 0 4 M a r 1 ; 1 7 2 ( 5 ) : 2 9 4 4 - 5 2）。第2のアプローチは、M H C 関連ペプチドの定量的プロファイルを提供するための化学標識および代謝標識に依存する（W e i n z i e r l A O e t a l . , M o l C e l l P r o t e o m i c s . 2 0 0 7 J a n ; 6 ( 1 ) : 1 0 2 - 1 3 . E p u b 2 0 0 6 O c t 2 9 ; L e m m e l C e t a l . , N a t B i o t e c h n o l . 2 0 0 4 A p r ; 2 2 ( 4 ) : 4 5 0 - 4 . E p u b 2 0 0 4 M a r 7 ; M i l n e r E , M o l C e l l P r o t e o m i c s . 2 0 0 6 F e b ; 5 ( 2 ) : 3 5 7 - 6 5 . E p u b 2 0 0 5 N o v 4 ) 。

40

50

## 【0086】

溶出されたMAPは、さらなる分析の前に、サイズ排除クロマトグラフィーもしくは限外濾過（約5000Da、例えば約3000Daのカットオフを有するフィルタを使用）、および/またはイオン交換クロマトグラフィー（例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー）を含む任意の精製/濃縮ステップに供されてもよい。溶出されたMAPの配列は、質量分光測定法（後に記載されるような）およびエドマン分解反応等のペプチド/タンパク質を配列決定するための当該技術分野で既知の任意の方法を用いて決定することができる。

## 【0087】

種々の実施形態において、上述の第2の試料は、ゲノムのDNA、RNA、および/またはタンパク質を含有するいずれの源に由来してもよく、例えば、対象由来の組織または体液、例えば、血液、血清、免疫細胞（例えば、リンパ球）、血液細胞（例えば、PBM C）、組織、または初代細胞に由来する細胞株（後に記載されるような）等に由来してもよい。一実施形態において、第2の試料は、対象から得られた初代細胞由来の不死化細胞株であり、さらなる実施形態において、EBVで形質転換したBリンパ芽球様細胞株（B-LCL）等の不死化B細胞株である。細胞試料は、核酸（ゲノムDNA、mRNA）および/またはタンパク質における濃縮のために一般的に使用される単離および/または精製技術に供されてもよい。

## 【0088】

一実施形態において、トランスクリプトームライブラリーは、試料から得られたRNAから作製/構築される。トランスクリプトームライブラリーの構築は、以下のステップのうちの1つ以上を含み得る：ポリA mRNAの濃縮/精製；RNA断片化およびcDNA合成のための初回刺激；逆転写（RT）（ランダムプライマーを使用）；二本鎖cDNAを作製するための第2ラウンドのRT、cDNA精製；断片化cDNAの末端修復、3'末端のアデニル化、アダプターのライゲーション、およびアダプター分子を含有するDNA断片の濃縮。トランスクリプトームライブラリー構築に適したキットは、例えば、Life Technologies（Ambion（登録商標）RNA-Seq Library Construction Kit）、Applied Biosystems（AB Library Builder（商標）Whole Transcriptome Core Kit）、Qiagen（Quantitect（商標）Whole Transcriptome Kit）、およびSigma-Aldrich（Transplex（登録商標）Complete Whole Transcriptome Amplification Kit）から市販されている。

## 【0089】

一実施形態において、ゲノムライブラリーは、試料から得られたゲノムDNAから作製/構築される。ゲノムライブラリーの構築は、以下のステップのうちの1つ以上を含み得る：DNA剪断、DNA末端修復、3'末端アデニル化、アダプターのライゲーション、アダプター分子を含有するDNA断片を濃縮するためのライゲーション産物の精製および増幅（例えば、PCR）。ゲノムライブラリー構築に適したキットは、例えば、Illumina（TruSeq（商標）DNA Sample Preparation Kit（v2）（カタログ番号FC-930-1021）、Life Technologies（SOLID（登録商標）Fragment Library Construction Kit）、およびNew England Biolabs（NEBNext（登録商標）DNA Library Preparation）から市販されている。

## 【0090】

別の実施形態において、ゲノム（DNA-Seq）ライブラリーは、ヒトゲノムのコード部分（エクソーム）のみを配列決定するために濃縮ステップに供される。エクソーム濃縮に適したキットは、例えば、Illumina（TruSeq（商標）exome enrichment kit、FC-930-1012）、Life Technologies（TargetSeq（商標）Exome and Custom Enric

10

20

30

40

50

hment System、A14060 - A14063)、FlexGen (Flexome whole exome enrichment kit v2)、Roche NimbleGen (SeqCap EZ Human Exome Library v2.0)、およびAgilent Technologies (SureSelect All Exon kits) から市販されている。

#### 【0091】

全トランスクリプトームまたはエクソーム配列決定 (RNA-Seq) を行うための方法は、当該技術分野で既知である (例えば、Wang et al., Nature Reviews Genetics 10, 57-63, January 2009; Genome Biology 2011, 12(9), Exome sequencing special issue を参照)。Illumina Genome Analyzer プラットフォーム、Applied Biosystems (ABI) の Solid (商標) 配列決定プラットフォーム、またはLife Scienceの454配列決定プラットフォーム (Roche) 等の全トランスクリプトーム/エクソーム配列決定を行うための種々のプラットフォームが存在する。

10

#### 【0092】

2つ以上の配列の間の、例えば、(i) 1人の対象と1つの参照ゲノムとの間のトランスクリプトームおよび/もしくはエクソーム、ならびに/または(ii) 2つの異なる対象の間のトランスクリプトームおよび/またはエクソームにおける単一ヌクレオチド変異 (SNV) または単一ヌクレオチド多型 (SNP) の同定は、IlluminaのSNP呼び出しプログラムCasava (商標)、SNPdetector (Zhang et al., PLoS Comput Biol. 2005 October; 1(5): e53)、Golden HelixのSNP&Variation Suite、AffymetrixのゲノムワイドなヒトSNPアレイ、Mass GenomicsのSAMtools mpileup等を含む、いずれの配列比較/SNP同定方法またはツールを用いて行われてもよい。

20

#### 【0093】

核酸配列のタンパク質配列へのin silico翻訳は、ExpASy Translate tool、Vector NTI (商標) (Life Technologies)、pyGeno (Granados et al., 2012)、Virtual Ribosome (CBS, University of Denmark) 等を含むいずれの適切なソフトウェアまたはツールを使用してもよい。トランスクリプトームおよび/またはエクソームのin silico翻訳は、SNVによって引き起こされる少なくとも1つの非同義変異を含むペプチド配列の同定を可能にする。一実施形態において、少なくとも1つの非同義変異を含む15アミノ酸以下 (実施形態において、14、13、12、11アミノ酸以下) の全ての可能なアミノ酸 (aa) 配列変異体を算出し、リストし、比較ステップ (e) において使用する。したがって、SNVによって引き起こされる各非同義変異の場合、多型位置の各1つの周囲の90bp (84、78、72、または66bp) のウィンドウを算出し、これらの90bp (84、78、72、または66bp) (30、28、26、24、または22aa) のウィンドウによって定義されるあらゆる可能なアミノ酸 (aa) 配列変異体のリストを得る。このようにして、非同義多型による影響を受ける多くても15aa (実施形態において、14、13、12、11aa) の最も可能なaa配列のリストを得ることができる。MHCクラスII関連MAP (より長い場合がある、最大約30アミノ酸) の同定の場合、少なくとも1つの非同義変異を含む、例えば30アミノ酸以下 (実施形態において、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12アミノ酸以下) の全ての可能なアミノ酸 (aa) 配列変異体を算出し、リストし、比較ステップ (e) において使用する。したがって、SNVによって引き起こされる各非同義変異の場合、多型位置の各1つの周囲の180bpのウィンドウを算出し、これらの180bp (60aa) のウィンドウによって定義されるあらゆる可能なアミノ酸 (aa) 配列変異体のリストを得る。このようにして、非同義多型に

30

40

50

よる影響を受ける多くても30 aaの最も可能なaa配列のリストを得ることができる。

【0094】

一実施形態において、少なくとも1つの非同義変異を含む12または11アミノ酸以下の全ての可能なアミノ酸(aa)配列変異体を算出し、リストし、比較ステップ(e)において使用する。したがって、SNVによって引き起こされる各非同義変異の場合、多型位置の各1つの周囲の72または66bpのウィンドウを算出し、これらの72または66bp(24または22aa)のウィンドウによって定義されるあらゆる可能なアミノ酸(aa)配列変異体のリストを得る。このようにして、非同義多型による影響を受ける多くても12または11の最も可能なaa配列のリストを得ることができる。

【0095】

実施形態において、上述のペプチド配列は、約7～約15アミノ酸(例えば、7、8、9、10、11、12、13、14、または15)の長さを有し、さらなる実施形態において、約8または9～約11または12アミノ酸(例えば、8、9、10、11、または12)の長さを有する。

【0096】

一実施形態において、第1の試料から単離されたMAPの配列と、上記同定されたトランスクリプトームおよび/またはエクソームに由来するペプチド配列(すなわち、SNVによって引き起こされる少なくとも1つの非同義変異を含む)との比較は、単離されたMAPを質量分析に供することと、得られたMSスペクトルをトランスクリプトームおよび/またはエクソームに由来するペプチド配列と比較することを含む。一実施形態において、質量分析は、液体クロマトグラフィー-質量分析(LC-MS)であり、さらなる実施形態において、ペプチドマスフィンガープリンティングと併せたLC-MS(LC-MS/MS)である。

【0097】

一実施形態において、方法は、同定されたMiHA候補のMHCクラスI分子への結合を決定することをさらに含む。結合は、ペプチドの対立遺伝子産物に対する予測結合親和性(IC<sub>50</sub>)であってもよく、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCcons/>等のツールを使用して得ることができる(Karosiene et al., 2011)。種々の利用可能なMHCクラスIペプチド結合ツールの概要は、Peters B et al., PLoS Comput Biol 2006, 2(6):e65; Trost et al., Immunome Res 2007, 3(1):5; Lin et al., BMC Immunology 2008, 9:8)に提供される。

【0098】

一実施形態において、50nM未満の予測IC<sub>50</sub>を有するペプチドは、強い結合剤と見なされ、約50～約500nMのIC<sub>50</sub>を有するペプチドは、弱い結合剤と見なされる。

【0099】

同定されたMiHA候補のMHCクラスI分子への結合は、他の既知の方法、例えばT2ペプチド結合アッセイを用いて決定してもよい。T2細胞株は、TAPが不足しているが、それでもなお少量のMHCクラスIを細胞表面上に発現する。T2結合アッセイは、T2細胞株の表面上でMHCクラスI複合体を安定化するペプチドの能力に基づいている。T2細胞を特定のペプチド(例えば、候補MiHA)とともにインキュベートし、汎用HLAクラスI抗体を用いて安定化したMHCクラスI複合体を検出し、(例えば、フローサイトメトリーにより)分析を実行し、未結合の陰性対照と関連させて結合を評価する。表面における安定化したペプチド/MHCクラスI複合体の存在が、そのペプチド(例えば、候補MiHA)がMHCクラスI分子に結合することの指標となる。

【0100】

また、対象となるペプチド(例えば、候補MiHA)のMHCへの結合は、放射標識プ

10

20

30

40

50

ローブペプチドがMHC分子への結合を阻害する能力に基づいてアッセイすることもできる。MHC分子を界面活性剤で可溶化し、親和性クロマトグラフィーで精製する。次いで、プロテアーゼ阻害剤カクテルの存在下、それらを阻害剤ペプチド（例えば、候補MiHA）および過剰な放射標識プローブペプチドとともに、2日間室温でインキュベートする。インキュベーション期間の終了時に、サイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーによりMHCペプチド複合体を未結合放射標識ペプチドから分離し、結合放射活性のパーセントを決定する。特定のペプチドのMHC分子に対する結合親和性は、種々の用量の非標識競合ペプチドのMHC分子および標識プローブペプチドとの共インキュベーションにより決定してもよい。標識ペプチドの結合を50%阻害するために必要な非標識ペプチドの濃度（IC50）は、用量対阻害%をプロットすることにより決定することができる（例えば、Current Protocols in Immunology（1998）18.3.1-18.3.19, John Wiley & Sons, Inc.を参照のこと）。

10

## 【0101】

同定されたMiHA候補のMHCクラスI分子への結合は、ProImmune REVEAL & Prove（登録商標）エピトープ探索システム等のエピトープ探索システムを使用して決定してもよい。

## 【0102】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載される配列（I）～（VII）を含む50アミノ酸以下のペプチド（例えば、単離されたまたは合成されたペプチド）を提供する。

20

## 【0103】

別の態様において、本発明は、配列（I）

## 【化8】



（式中、Z<sup>1</sup>は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>1</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>2</sup>は、LまたはSであり、X<sup>3</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない）を含む、50アミノ酸以下のペプチド（例えば、単離されたまたは合成されたペプチド）を提供する。

30

## 【0104】

別の態様において、本発明は、配列（II）

## 【化9】



（式中、Z<sup>1</sup>は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>4</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>5</sup>は、GまたはRであり、X<sup>6</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>7</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない）を含む、50アミノ酸以下のペプチド（例えば、単離されたまたは合成されたペプチド）を提供する。

40

## 【0105】

別の態様において、本発明は、配列（III）

## 【化10】



（式中、Z<sup>1</sup>は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、X<sup>8</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、X<sup>9</sup>は、PまたはAであり、X<sup>10</sup>は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、Z<sup>2</sup>は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない）を含む、50アミノ酸以下のペプチド（例えば、単離されたまたは合成されたペプチド）を提供する。

50



## 【0106】

別の態様において、本発明は、配列 (IV)

## 【化11】



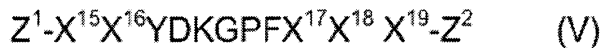
(式中、 $Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{11}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{12}$  は、SまたはTであり、 $X^{13}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{14}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチド(例えば、単離されたまたは合成されたペプチド)を提供する。

10

## 【0107】

別の態様において、本発明は、配列 (V)

## 【化12】



(式中、 $Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{15}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{16}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{17}$  は、RまたはWであり、 $X^{18}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{19}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチド(例えば、単離されたまたは合成されたペプチド)を提供する。

20

## 【0108】

別の態様において、本発明は、配列 (VI)

## 【化13】



(式中、 $Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{20}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{21}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{22}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{23}$  は、GまたはRであり、 $X^{24}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチド(例えば、単離されたまたは合成されたペプチド)を提供する。

30

## 【0109】

別の態様において、本発明は、配列 (VII)

## 【化14】



(式中、 $Z^1$  は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{25}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{26}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{27}$  は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{28}$  は、KまたはNであり、 $X^{29}$  は、1～43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$  は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチド(例えば、単離されたまたは合成されたペプチド)を提供する。

40

## 【0110】

別の態様において、本発明は、本明細書に定義される配列 (I)～(VII)のいずれか1つを含む50アミノ酸以下のペプチドを提供する。

## 【0111】

一般に、HLAクラスIに関連して提示されるペプチドは、約7～約15アミノ酸残基の様々な長さであり、より長いペプチド(例えば、50アミノ酸以下)は、酵素的に処理してそのような長さのペプチドにすることができる。実施形態において、ペプチドは、4

50

5、40、35、30、25、20、または15アミノ酸以下である。本発明によって提供される上述の配列／モチーフを含むペプチドは、典型的には、少なくとも7アミノ酸長であるが、好ましくは少なくとも8または9アミノ酸である。本発明によって提供されるペプチドの長さの上限は、15アミノ酸以下であるが、好ましくは約13、12、または11アミノ酸長以下である。実施形態において、上記ペプチドは、約8～12アミノ酸長（例えば、8、9、10、11、または12アミノ酸長）であり、HLAクラスI分子に直接適合するのに十分に小さいが、12～約20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸とそれより大きくてもよく、細胞取り込み、およびプロテアソームによる細胞内プロセシングの後にのみHLA分子によって提示され、MHC分子の溝内に提示される前に輸送される。

10

#### 【0112】

本明細書で使用される「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸のL異性体およびD異性体と、ペプチドの合成類似体を調製するためにペプチド化学において使用される他のアミノ酸（例えば、天然に存在するアミノ酸、天然には存在しないアミノ酸、核酸配列によってコードされないアミノ酸等）の両方を含む。天然に存在するアミノ酸の例は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン等である。

#### 【0113】

他のアミノ酸は、例えば、遺伝的にコードされていない形態のアミノ酸だけではなく、L-アミノ酸の保存的置換も含む。天然の遺伝的にコードされていないアミノ酸は、例えば、 $\beta$ -アラニン、3-アミノ-プロピオン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、 $\beta$ -アミノイソ酪酸（Aib）、4-アミノ-酪酸、N-メチルグリシン（サルコシン）、ヒドロキシプロリン、オルニチン（例えば、L-オルニチン）、シトルリン、t-ブチルアラニン、t-ブチルグリシン、N-メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン（Nle）、ノルバリン、2-ナブチルアラニン、ピリジルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボキシリキス酸、 $\beta$ -2-チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、L-ホモアルギニン（Hoarg）、N-アセチルリジン、2-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、2,4,6-ジアミノ酪酸（D-もしくはL-）、p-アミノフェニルアラニン、N-メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン（Hoser）、システイン酸、 $\beta$ -アミノヘキサ酸、 $\beta$ -アミノ吉草酸、または2,3-ジアミノ酪酸（D-もしくはL-）等を含む。これらのアミノ酸は、生化学／ペプチド化学の技術分野で周知である。

20

30

#### 【0114】

実施形態において、本発明のペプチドは、上記配列と比較して機能的に同等である、アミノ酸残基の置換を含有する改変配列を有するペプチドを含む。例えば、配列内の1つ以上のアミノ酸残基を、機能的均等物として作用する同様の極性の（同様の物理化学的特性を有する）別のアミノ酸で置換して、サイレント改変をもたらすことができる。配列内におけるアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、正に荷電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジン、およびヒスチジン（ならびにホモアルギニンおよびオルニチン）を含む。非極性（疎水性）アミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、プロリン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。非荷電極性アミノ酸は、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含む。負に荷電した（酸性）アミノ酸は、グルタミン酸およびアスパラギン酸を含む。アミノ酸グリシンは、非極性アミノ酸ファミリーまたは非荷電（中性）極性アミノ酸ファミリーのいずれに含まれてもよい。アミノ酸のファミリー内で行われる置換は、概して保存置換であると理解されたい。

40

#### 【0115】

上記ペプチドは、全てのL-アミノ酸、全てのD-アミノ酸、またはL-およびD-アミ

50

ノ酸の混合物を含み得る。一実施形態において、上記ペプチドは、全ての L - アミノ酸を含む。

【0116】

また、分解を防止し、安定性または取り込みを増加させるために、ペプチドの N 末端および/または C 末端をキャッピングするかまたは修飾することもできる。一実施形態において、ペプチドのアミノ末端残基（すなわち、N 末端の遊離アミノ基）が、例えば、部分/化学基（ $Z^1$ ）の共有結合的付着によって（例えば、分解から保護するために）修飾される。 $Z^1$  は、1 ~ 8 個の炭素の直鎖もしくは分岐のアルキル基、またはアシル基（ $R - CO -$ ）（式中、R は疎水性部分（例えば、アセチル、プロピオニル、ブタニル、イソ - プロピオニル、もしくはイソ - ブタニル）である）、またはアリール基（ $Ar - CO -$ ）（式中、Ar はアリール基である）であり得る。一実施形態において、アシル基は、 $C_1 - C_{16}$  もしくは  $C_3 - C_{16}$  アシル基（直鎖もしくは分岐、飽和もしくは不飽和）であり、さらなる実施形態において、飽和  $C_1 - C_6$  アシル基（直鎖もしくは分岐）または不飽和  $C_3 - C_6$  アシル基（直鎖もしくは分岐）、例えば、アセチル基（ $CH_3 - CO -$ 、Ac）である。一実施形態において、 $Z^1$  は存在しない。

10

【0117】

ペプチドのカルボキシ末端残基（すなわち、ペプチドの C 末端の遊離カルボキシル基）を、例えばアミド化（OH 基の  $NH_2$  基による置換）によって（例えば、分解から保護するために）修飾してもよく、そのような場合、 $Z^2$  は  $NH_2$  基である。一実施形態において、 $Z^2$  は、ヒドロキサメート基、ニトリル基、アミド（一級、二級、または三級）基、1 ~ 10 個の炭素の脂肪族アミン、例えば、メチルアミン、イソ - ブチルアミン、イソ - バレリルアミンもしくはシクロヘキシルアミン等、芳香族アミンまたはアリールアルキルアミン、例えば、アニリン、ナブチルアミン、ベンジルアミン、シンナミルアミン、またはフェニルエチルアミン、アルコールもしくは  $CH_2OH$  等であり得る。一実施形態において、 $Z^2$  は存在しない。

20

【0118】

一実施形態において、ペプチドは配列 E L Q E K F L S L（配列番号 15）を含み、さらなる実施形態において、ペプチドは E L Q E K F L S L（配列番号 15）である。別の実施形態において、ペプチドは配列 E L Q E K F S S L（配列番号 16）を含み、さらなる実施形態において、ペプチドは E L Q E K F S S L（配列番号 16）である。

30

【0119】

一実施形態において、ペプチドは配列 Q E L D G V F Q K L（配列番号 17）を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは Q E L D G V F Q K L（配列番号 17）である。別の実施形態において、ペプチドは配列 Q E L D R V F Q K L（配列番号 18）を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは Q E L D R V F Q K L（配列番号 18）である。

【0120】

一実施形態において、ペプチドは配列 S L F F R K V P F（配列番号 19）を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは S L F F R K V P F（配列番号 19）である。別の実施形態において、ペプチドは配列 S L F F R K V A F（配列番号 20）を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは S L F F R K V A F（配列番号 20）である。

40

【0121】

一実施形態において、上記ペプチドは配列 S V L K P G N S K（配列番号 21）を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは S V L K P G N S K（配列番号 21）である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列 T V L K P G N S K（配列番号 22）を含む。さらなる実施形態において、ペプチドは T V L K P G N S K（配列番号 22）である。

【0122】

一実施形態において、上記ペプチドは配列 A M Y D K G P F R S K（配列番号 23）を含む。一実施形態において、上記ペプチドは A M Y D K G P F R S K（配列番号 23）である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列 A M Y D K G P F W S K（配列番号 24）を含む。一実施形態において、上記ペプチドは A M Y D K G P F W S K（配列番号 2

50

4) である。

【0123】

一実施形態において、上記ペプチドは配列RVSLPTSPG（配列番号25）を含む。一実施形態において、上記ペプチドはRVSLPTSPG（配列番号25）である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列RVSLPTSPR（配列番号26）を含む。一実施形態において、上記ペプチドはRVSLPTSPR（配列番号26）である。

【0124】

一実施形態において、上記ペプチドは配列VMGNPGTFK（配列番号27）を含む。一実施形態において、上記ペプチドはVMGNPGTFK（配列番号27）である。別の実施形態において、上記ペプチドは配列VMGNPGTFN（配列番号28）を含む。一実施形態において、上記ペプチドはVMGNPGTFN（配列番号28）である。

【0125】

本発明のペプチドは、ペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞における発現（組換え発現）によって、または化学合成（例えば、固相ペプチド合成）によって生成することができる。ペプチドは、手動および/または当該技術分野で周知の自動固相手順によって容易に合成することができる。適切な合成は、例えば、「T-boc」または「Fmoc」手順を利用して実行することができる。固相合成のための技術および手順は、例えば、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, by E. Atherton and R. C. Sheppard、IRL, Oxford University Press出版（1989）に記載されている。代替として、ペプチドは、例えば、Liu et al., Tetrahedron Lett. 37: 933-936, 1996; Baca et al., J. Am. Chem. Soc. 117: 1881-1887, 1995; Tam et al., Int. J. Peptide Protein Res. 45: 209-216, 1995; Schnolzer and Kent, Science 256: 221-225, 1992; Liu and Tam, J. Am. Chem. Soc. 116: 4149-4153, 1994; Liu and Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6584-6588, 1994; および Yamashiro and Li, Int. J. Peptide Protein Res. 31: 322-334, 1988) に記載されるようなセグメント縮合によって調製されてもよい。ペプチドを合成するために有用な他の方法は、Nakagawa et al., J. Am. Chem. Soc. 107: 7087-7092, 1985 に記載される。

【0126】

遺伝暗号によってコードされる天然に存在するアミノ酸を含むペプチドも、標準的な方法を用いる組換えDNA技術を使用して調製することができる。

【0127】

したがって、別の態様において、本発明はさらに、配列I~VIIの上記ペプチドをコードする（単離された）核酸を提供する。一実施形態において、核酸は、全長CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、またはRMDN1ポリペプチドをコードしない。一実施形態において、核酸は、150ヌクレオチド以下の長さを有し、さらなる実施形態において、135、120、105、90、75、60、45、42、または39ヌクレオチド以下の長さを有する。他の実施形態において、核酸は、約21ヌクレオチド~約45ヌクレオチド、約24~約36ヌクレオチド、例えば、24、27、30、33、または36ヌクレオチドを含む。

【0128】

「単離された」は、本明細書で使用される場合、巨大分子（他の核酸、タンパク質、脂質、糖類等）の天然の源に存在する他の構成要素から分離されたペプチドまたは核酸分子を指す。「合成の」は、本明細書で使用される場合、例えば、組換え技術によって、または化学合成を用いて生成される、その天然の源から単離されていないペプチドまたは核酸分子を指す。

10

20

30

40

50

## 【0129】

一実施形態において、上記ペプチドは本質的に純粋である。化合物は、天然の状態ですれに付随する構成要素から分離された場合に「本質的に純粋」である。典型的には、化合物は、試料中の全材料の少なくとも60重量%、より一般的には、75重量%、80重量%、または85重量%、好ましくは90重量%超、より好ましくは95重量%超である場合に本質的に純粋である。よって、例えば、組換え技術によって化学的に合成または生成されたポリペプチドは、一般的に、その天然の状態に関連している構成要素を本質的に含まない。核酸分子は、その核酸が由来する生物に天然に存在するゲノム内で通常は近接しているコード配列と、直接的に近接していない（すなわち、共有結合的に連結している）場合に本質的に純粋である。本質的に純粋な化合物は、例えば、天然の源からの抽出によ

10

## 【0130】

って、ペプチド化合物をコードする組換え核酸分子の発現によって、または化学合成によって得ることができる。純度は、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、HPLC等の任意の適切な方法を用いて測定することができる。

核酸は、宿主細胞にトランスフェクトされ得るクローニングベクターまたは発現ベクター等のベクター中に存在してもよい。代替として、核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれてもよい。いずれの場合も、宿主細胞は、核酸を発現し、一方で、コードされたペプチドを発現する。本発明はまた、上記核酸を含むベクターまたはプラスミドも提供する。ベクターまたはプラスミドは、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要な要素を含有し、また、耐性遺伝子、クローニング部位等の他の構成要素を含有し得る。当業者に周知の方法を用いて、ペプチドまたはポリペプチドをコードする配列と、そこに作動的に連結された適切な転写および翻訳制御/調節因子とを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えを含む。そのような技術は、Sambrook, et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., および Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. に記載されている。

20

## 【0131】

「作動的に連結された」とは、構成要素の正常な機能が行われ得るような、構成要素、特にヌクレオチド配列の並置を指す。したがって、調節配列に作動的に連結されたコード配列は、コード配列を調節制御下、すなわち、転写および/または翻訳制御下で発現させることができる、ヌクレオチド配列の構成を指す。「調節/制御領域」または「調節/制御配列」は、本明細書で使用される場合、コード核酸の発現の調節に関与する非コードヌクレオチド配列を指す。したがって、調節領域という用語は、プロモーター配列、調節タンパク質結合部位、上流アクチベーター配列等を含む。

30

## 【0132】

別の態様において、本発明は、上記ペプチドを負荷したMHCクラスI分子を提供する。一実施形態において、MHC分子はHLA-B\*0801分子であり、さらなる実施形態において、HLA-B\*0801分子である。一実施形態において、ペプチドは、MHCクラスI分子に非共有結合している（すなわち、ペプチドは、ペプチド結合溝/ポケット内に負荷されが、MHCクラスI分子には共有結合的に付着しない）。別の実施形態において、ペプチドは、MHCクラスI分子に共有結合的に付着/結合している。そのような構築物において、ペプチドとMHCクラスI分子は、典型的には短い（例えば、5~20残基、好ましくは約10）可動性リンカーまたはスペーサー（例えば、ポリグリシンリンカー）を有する融合タンパク質として生成される。別の態様において、本発明は、ペプチド-MHCクラスI融合タンパク質をコードする核酸を提供する。一実施形態において、MHCクラスI分子-ペプチド複合体は、多量体化される。したがって、別の態様において、本発明は、上記ペプチドを（共有結合的にまたはそうではなく）負荷したMHCクラスI分

40

50

子の多量体を提供する。MHCの二量体、三量体、五量体、八量体を含むMHC多量体の生成のために多数の戦略が開発されている(Bakker and Schumacher, Current Opinion in Immunology 2005, 17: 428-433に概説される)。MHC多量体は、例えば、抗原特異的T細胞の検出および精製に有用である。

#### 【0133】

さらに別の態様において、本発明は、細胞(例えば、宿主細胞)を提供し、一実施形態において、上記核酸またはベクターを含む単離された細胞を提供する。別の態様において、本発明は、その細胞表面に上記ペプチドを負荷したMHC分子(例えば、HLA-B\*0801分子等のHLA-B8分子、および/またはHLA-A\*0301分子等のHLA-A3分子、および/またはHLA-B\*4403等のHLA-B44対立遺伝子)を発現する細胞を提供する。一実施形態において、宿主細胞は、初代細胞、細胞株、または不死化細胞である。別の実施形態において、細胞は、抗原提示細胞(APC)である。

10

#### 【0134】

核酸およびベクターは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術によって細胞に導入することができる。「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、マイクロインジェクション、およびウイルス媒介性トランスフェクションを含む、外来性核酸を宿主細胞に導入するための技術を指す。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、例えば、Sa

20

#### 【0135】

別の実施形態において、本発明は、上記MHC分子/ペプチド(MiHA)複合体と相互作用することが可能なT細胞受容体(TCR)分子と、そのようなTCR分子をコードする核酸分子とを提供する。本発明によるTCRは、好ましくは、in vitroまたはin vivoの生細胞表面において、MHC分子上に負荷された本発明のMiHAと特異的に相互作用することが可能であることが好ましい。T細胞受容体と、具体的には本発明によるTCRをコードする核酸とは、例えば、あるT細胞から別のT細胞にTCRを移動させ、MiHAを特異的に認識することが可能な新しいT細胞クローンを作製するために適用されてもよい。このTCRクローニング法によって、本質的に同種ドナー、例えばリンパ球のドナーの遺伝子構造であるT細胞クローンを提供することができる。本発明によるMiHAを認識することが可能なT細胞クローンを提供するための方法は、移植片のレシピエント、好ましくはASCTおよび/またはドナーリンパ球輸注(DLI)のレシピエント対象においてMiHAを発現する腫瘍細胞のために作成されてもよく、またそれを特異的に標的とすることができる。したがって、本発明は、上記ペプチド/MHC分子複合体と相互作用することが可能なT細胞受容体をコードするおよび発現するCD8 Tリンパ球を提供する。前記Tリンパ球は、組換え型または天然に選択されたTリンパ球であり得る。本発明のCD8 Tリンパ球はまた、方法および薬学的組成物に使用することもできる(下記参照)。よって、本明細書は、免疫応答を引き起こす助けとなる条件下で、未分化リンパ球をペプチド/MHC分子複合体(典型的には、APC等の細胞の表面に発現される)と接触させるステップを含む、本発明のCD8 Tリンパ球を生成するための少なくとも2つの方法を提供し、該ステップは、例えば、移植片を受ける患者において、in vitroまたはin vivoで行われ得る。代替として、これは、前の方法から得られた細胞からまたはペプチド/MHC分子複合体に対する免疫応答を示す対象から採取され得る、ペプチド/MHC分子複合体との相互作用に特異的なTCRをコードする遺伝子を、移植片のレシピエントまたは移植片のドナーから得られた宿主細胞および/または宿主リンパ球にクローニングし、任意選択的に細胞傷害性Tリンパ球(CTL)に分化させることによって実行されてもよい。

30

40

50

## 【0136】

M i H Aに基づく癌免疫療法の潜在的な影響は重大である。血液癌（例えば、白血病）の場合、抗 M i H A T細胞の使用は、G V H Dを引き起こすことなく非常に優れた抗白血病活性を提供し得るため、従来 of A H C Tに取って代わることができる。当然の帰結として、これは、リスク/利益（G V H D / G V T）比が高すぎるために従来 of A H C Tによる治療を受けることができない血液系腫瘍に罹患する多くの患者に有益であり得る。最後に、マウスにおける実験において、M i H Aに基づく免疫療法が固形腫瘍の治療に有効であり得ることが示されているため、M i H Aに基づく癌免疫療法は、固形腫瘍等の非血液癌の M i H Aを標的とする治療に使用され得る。

## 【0137】

腫瘍を根絶することが可能な結合活性の高いT細胞応答は、同種設定において作製することができる。血液系腫瘍において、同種H L Aが適合する造血幹細胞移植（A S C T）は、T細胞によって媒介される移植片対腫瘍（G V T）免疫応答の誘導に起因する同種免疫療法のためのプラットフォームを提供する。ドナー起源のT細胞は、レシピエントの自己抗原に対する低い反応性のために選択されないという事実に基づいて、同種設定における免疫療法は、効率的なT細胞応答の誘導を可能にする。したがって、腫瘍特異的抗原またはレシピエント特異的抗原に対する親和性が高いT細胞は、A S C Tの間または後に患者に投与されるT細胞接種材料中に見出すことができる。腫瘍反応性T細胞応答の主な標的は、ドナーとレシピエントが異なる多型タンパク質、すなわちM i H Aである。本明細書において特定されるM i H Aペプチド配列は、i ) i n v i t r o初回刺激、および移植片（A H C T）のレシピエントに注入されるM i H A特異的T細胞の増殖のために使用される、および/またはi i ) 移植後に、M i H A特異的T細胞のレシピエントにおける移植片対腫瘍効果（G V T E）を促進するためのワクチンとして使用される、合成ペプチドの生成に使用することができる。

## 【0138】

別の態様において、本発明は、癌の免疫療法における配列（I）～（V I I）の上記ペプチドの使用を提供する。

## 【0139】

したがって、別の態様において、本発明は、癌を治療する方法を提供し、前記方法は、上記ペプチドを負荷したM H CクラスI分子を認識する有効量のC D 8 Tリンパ球を、それを必要とする対象に投与することを含む。

## 【0140】

別の態様において、本発明は、対象における癌を治療するための、上記ペプチドを負荷したM H CクラスI分子を認識するC D 8 Tリンパ球の使用を提供する。別の態様において、本発明は、対象における癌を治療するための薬物の調製/製造のために、上記ペプチドを負荷したM H CクラスI分子を認識するC D 8 Tリンパ球の使用を提供する。一実施形態において、対象は、移植片（例えば、A H C T）のレシピエントである。

## 【0141】

一実施形態において、上記方法または使用は、前記対象が、ヒトC E N P Fの核酸配列（図1 A～1 C、N C B I参照配列：N M\_\_0 1 6 3 4 3 . 3）中のヌクレオチド4 4 0 9に対応する位置にTもしくはCを含むC E N P F核酸、および/またはヒトC E N P Fのタンパク質配列（図1 D、N C B I参照配列：N P\_\_0 5 7 4 2 7 . 3）中の残基1 4 1 2に対応する位置にロイシンもしくはセリン残基を含むC E N P Fポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、（a）前記対象が、ヒトC E N P Fの核酸配列中のヌクレオチド4 4 0 9に対応する位置にTを含むC E N P F核酸、および/またはヒトC E N P Fのタンパク質配列中の残基1 4 1 2に対応する位置にロイシン残基を含むC E N P Fポリペプチドを発現する場合、ペプチド中のX<sup>2</sup>はLであり、（b）前記対象が、ヒトC E N P Fの核酸配列中のヌクレオチド4 4 0 9に対応する位置にCを含むC E N P F核酸、および/またはヒトC E N P Fのタンパク質配列中の残基1 4 1 2に対応する位置にセリン残基を含むC E N P Fポリペプチドを発現する場合、ペプチド中のX<sup>2</sup>は

10

20

30

40

50

Sである。

【0142】

一実施形態において、上記方法または使用は、前記対象が、ヒトZWIN Tの核酸配列(図2A、NCBI参照配列:NM\_\_007057.3)中のヌクレオチド596に対応する位置にAもしくはGを含むZWIN T核酸、および/またはヒトZWIN Tのタンパク質配列(図2B、NCBI参照配列:NP\_\_008988.2)中の残基187に対応する位置にアルギニンもしくはグリシン残基を含むZWIN Tポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトZWIN Tの核酸配列中のヌクレオチド596に対応する位置にAを含むZWIN T核酸、および/またはヒトZWIN Tのタンパク質配列中の残基187に対応する位置にアルギニン残基を含むZWIN Tポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>5</sup>は、Rであり、(b)前記対象が、ヒトZWIN Tの核酸配列中のヌクレオチド596に対応する位置にGを含むZWIN T核酸、および/またはヒトZWIN Tのタンパク質配列中の残基187に対応する位置にグリシン残基を含むZWIN Tポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>5</sup>は、Gである。

10

【0143】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトMTCH 2の核酸配列(図3A、NCBI参照配列:NM\_\_014342.3)中のヌクレオチド1057に対応する位置にCもしくはGを含むMTCH 2核酸、および/またはヒトMTCH 2のタンパク質配列(図3B、NCBI参照配列:NP\_\_055157.1)中の290残基に対応する位置にプロリンもしくはアラニン残基を含むMTCH 2ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトMTCH 2の核酸配列中のヌクレオチド1057に対応する位置にCを含むMTCH 2核酸、および/またはヒトMTCH 2の前記タンパク質配列中の残基290に対応する位置にプロリン残基を含むMTCH 2ポリペプチドを発現する場合、ペプチド中のX<sup>9</sup>はPであり、(b)前記対象が、ヒトMTCH 2の核酸配列中のヌクレオチド1057に対応する位置にGを含むMTCH 2核酸、および/またはヒトMTCH 2の前記タンパク質配列中の残基290に対応する位置にアラニン残基を含むMTCH 2ポリペプチドを発現する場合、ペプチド中のX<sup>5</sup>はAである。

20

【0144】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトELF 1の核酸配列(図4Aおよび4B、NCBI参照配列:NM\_\_172373.3)中のヌクレオチド1400に対応する位置にAもしくはTを含むELF 1核酸、および/またはELF 1タンパク質配列(図4C、NCBI参照配列:NP\_\_758961.1)中の残基343に対応する位置にスレオニンもしくはセリンを有するELF 1ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a)前記対象が、ヒトELF 1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にAを含むELF 1核酸、および/またはヒトELF 1のタンパク質配列中の残基343に対応する位置にスレオニン残基を含むELF 1ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>12</sup>はTであり、(b)前記対象が、ヒトELF 1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にTを含むELF 1核酸、および/またはヒトELF 1のタンパク質配列中の残基343に対応する位置にセリン残基を含むELF 1ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中のX<sup>12</sup>はSである。

30

40

【0145】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトNQ 01の核酸配列(図5A、NCBI参照配列:NM\_\_000903.2)中のヌクレオチド615に対応する位置にCもしくはTを含むNQ 01核酸、および/またはNQ 01タンパク質配列(図5B、NCBI参照配列:NP\_\_000894.1)中の残基139に対応する位置にアルギニンもしくはトリプトファンを有するNQ 01ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、a)前記対象が、ヒトNQ 01の核酸配列中のヌクレオチド615に対応する位置にCを含むNQ 01核酸、および/またはヒトNQ 01のタンパク質配列中の残基139に対応する位置にアルギニン残基を含むNQ 01ポリペプチドを発現する場合、

50



前記ペプチド中の  $X^{17}$  は R であり、(b) 前記対象が、ヒト NQ01 の核酸配列中のヌクレオチド 615 に対応する位置に T を含む NQ01 核酸、および / またはヒト NQ01 のタンパク質配列中の残基 139 に対応する位置にトリプトファン残基を含む NQ01 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の  $X^{17}$  は W である。

#### 【0146】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒト KIAA0226L の核酸配列 (図 6A および 6B、NCBI 参照配列: NM\_025113.2) 中のヌクレオチド 1059 に対応する位置に G もしくは A を含む KIAA0226L 核酸、および / または KIAA0226L タンパク質配列 (図 6C、NCBI 参照配列: NP\_079389.2) 中の残基 152 に対応する位置にグリシンもしくはアルギニンを有する KIAA0226L ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a) 前記対象が、ヒト KIAA0226L の前記核酸配列中のヌクレオチド 1059 に対応する位置に G を含む KIAA0226L 核酸、および / またはヒト KIAA0226L の前記タンパク質配列中の残基 152 に対応する位置にグリシン残基を含む KIAA0226L ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の  $X^{23}$  は、G であり、(b) 前記対象が、ヒト KIAA0226L の前記核酸配列中のヌクレオチド 1059 に対応する位置に A を含む KIAA0226L 核酸、および / またはヒト KIAA0226L の前記タンパク質配列中の残基 152 に対応する位置にアルギニン残基を含む KIAA0226L ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の  $X^{23}$  は、R である。

#### 【0147】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒト RMDN1 の核酸配列 (図 7A、NCBI 参照配列: NM\_016033.2) 中のヌクレオチド 316 に対応する位置に A もしくは C を含む RMDN1 核酸、および / または RMDN1 タンパク質配列 (図 7B、NCBI 参照配列: NP\_057117.2) 中の残基 52 に対応する位置にリジンもしくはアスパラギンを有する RMDN1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することをさらに含み、(a) 前記対象が、ヒト RMDN1 の核酸配列中のヌクレオチド 316 に対応する位置に A を含む RMDN1 核酸、および / または / ヒト RMDN1 のタンパク質配列中の残基 52 に対応する位置にリジン残基を含む RMDN1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の  $X^{28}$  は、K であり、(b) 前記対象が、ヒト RMDN1 の核酸配列中のヌクレオチド 316 に対応する位置に C を含む RMDN1 核酸、および / または / ヒト RMDN1 のタンパク質配列中の残基 52 に対応する位置にアスパラギン残基を含む RMDN1 ポリペプチドを発現する場合、前記ペプチド中の  $X^{28}$  は、N である。

#### 【0148】

対象となる核酸および / またはタンパク質 (例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、または RMDN1) における上述の多型 (ヌクレオチド変異) は、当該技術分野で既知の多数の方法によって検出することができる。核酸レベルの改変を検出するのに適した方法の例として、対象となる核酸 (例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、または RMDN1) の核酸配列の配列決定; 多型 (第 1 の対立遺伝子) を含む対象となる核酸 (例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、または RMDN1) には特異的にハイブリダイズすることができるが、多型 (第 2 の対立遺伝子) を含まない対応する核酸にはハイブリダイズできない (またはより少ない程度でハイブリダイズする) 核酸プローブのハイブリダイゼーション (ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件等の同等のハイブリダイゼーション条件下で)、またはその逆; 制限酵素断片長多型 (RFLP); 増幅断片長多型 PCR (AFLP-PCR); 対立遺伝子のうちの 1 つに特異的なプライマーを使用した核酸断片の増幅 (対立遺伝子が存在する場合はプライマーが増幅産物を産生し、他の対立遺伝子が増幅の鋳型として使用される場合 (例えば、対立遺伝子特異的 PCR) は同じ増幅産物を産生しない) が挙げられる。他の方法として、in situ ハイブリダイゼーション分析および一本鎖高次構造多型分析が挙げられる。さらに、対象となる核酸 (例えば、CENPF、ZWINT

10

20

30

40

50

、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、またはRMDN1核酸)は、本明細書に記載される検出法の前にまたはそれと同時に、既知の方法(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応[PCR])を用いて増幅してもよい。そのような増幅のための種々のプライマーは、当該技術分野において既知である。核酸(mRNA)はまた、分析前にcDNAに逆転写することもできる。

#### 【0149】

ポリペプチドレベルの改変/多型を検出するのに適した方法の例として、対象となるポリペプチド(例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、またはRMDN1)の配列決定;ポリペプチドの消化に続くペプチド断片の質量分析またはHPLC分析(対象となるポリペプチド(例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、またはRMDN1)の改変/多型は、対象となる天然のポリペプチド(例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、またはRMDN1)と比較して改変された質量分析またはHPLCスペクトルをもたらす;および、例えば、アミノ酸変化を含むエピトープを標的とすることによる、改変(第2の対立遺伝子)を含まない対応する天然のポリペプチドと比べて改変(第1の対立遺伝子)を含むポリペプチドに改変された免疫反応性を示す免疫学的測定用試薬(例えば、抗体、リガンド)を使用した免疫検出が挙げられる。免疫検出は、抗タンパク質抗体または抗タンパク質抗体に結合する二次抗体のいずれかに付着させた酵素標識、色力学的(chromodynamic)標識、放射性標識、磁性標識、または発光標識の使用により、ポリペプチド分子と抗タンパク質抗体との間の結合の量を測定することができる。さらに、他の高親和性リガンドが使用されてもよい。使用することのできる免疫測定法は、例えば、ELISA、ウェスタンブロット、および当業者に既知の他の技術を含む(Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999 and Edwards R, Immunodiagnosics: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford; England, 1999を参照のこと)。

#### 【0150】

これらの検出技術は全て、マイクロアッセイ、タンパク質アレイ、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、電子バイオチップ、またはタンパク質チップに基づく技術の形式にも利用することもできる(Schena M., Microarray Biochip Technology, Eaton Publishing, Natick, Mass., 2000を参照のこと)。

#### 【0151】

さらに、対象となる核酸(例えば、CENPF、ZWINT、MTCH2、ELF1、NQ01、KIAA0226L、またはRMDN1核酸)は、本明細書に記載される検出法の前にまたはそれと同時に、既知の方法(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応[PCR])を用いて増幅してもよい。そのような増幅のための種々のプライマーは、当該技術分野において既知である。

#### 【0152】

一実施形態において、上記決定することは、対象由来の生物試料中で、(i)ヒトCENPF核酸のヌクレオチド4409(配列番号1)、(ii)ヒトZWINT核酸の核酸中のヌクレオチド596(配列番号3)、(iii)ヒトMTCH2核酸の核酸中のヌクレオチド1057(配列番号5)、(iv)ヒトELF1核酸の核酸中のヌクレオチド1400(配列番号7)、(v)ヒトNQ01核酸の核酸中のヌクレオチド615(配列番号9)、(vi)ヒトKIAA0226L核酸の核酸中のヌクレオチド1059(配列番号11)、および/または(vii)ヒトRMDN1核酸の核酸中のヌクレオチド316(配列番号13)を包含する領域に対応する核酸の領域を配列決定することを含む。

#### 【0153】

10

20

30

40

50

一実施形態において、上記CD8<sup>+</sup> Tリンパ球は、*in vitro*で増殖させたCD8<sup>+</sup> Tリンパ球である。増殖させたCD8<sup>+</sup> Tリンパ球は、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球の増殖および/または分化を許容する条件下で初代CD8<sup>+</sup> Tリンパ球（ドナー由来）を培養することによって得ることができる。そのような条件は、典型的には、成長因子ならびに/またはサイトカイン、例えば、IL-2、IL-7、および/もしくはIL-15等の存在下で、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球を、表面にペプチド/MHC複合体を発現しているAPC等の細胞と接触させることを含む（例えば、Montes et al., Clin Exp Immunol. 2005 Nov; 142(2): 292-302を参照のこと）。そのような増殖させたCD8<sup>+</sup> Tリンパ球は、次いで、例えば、点滴静注によってレシピエントに投与される。

#### 【0154】

一実施形態において、対象は、同種幹細胞移植（ASCT）またはドナーリンパ球輸注（DLI）のレシピエントである。

#### 【0155】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、（a）候補ドナーが、ヒトCENPFの核酸配列（図1A~1D、NCBI参照配列：NM\_016343.3）中のヌクレオチド4409に対応する位置にTもしくはCを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列（図1E、NCBI参照配列：NP\_057427.3）中の残基1412に対応する位置にロイシンもしくはセリン残基を含むCENPFポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、（b）（i）前記候補ドナーが、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にTを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にロイシン残基を含むCENPFポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はSである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからのCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、または（b）（ii）前記候補ドナーが、ヒトCENPFの核酸配列中のヌクレオチド4409に対応する位置にCを含むCENPF核酸、および/またはヒトCENPFのタンパク質配列中の残基1412に対応する位置にセリン残基を含むCENPFポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（前記ペプチド中のX<sup>2</sup>はLである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからのCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養することと、を含む。

#### 【0156】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、（a）候補ドナーが、ヒトZWINTの核酸配列（図2A、NCBI参照配列：NM\_007057.3）中のヌクレオチド596に対応する位置にAもしくはGを含むZWINT核酸、および/またはヒトZWINTのタンパク質配列（図2B、NCBI参照配列：NP\_008988.2）中の残基187に対応する位置にアルギニンもしくはグリシン残基を含むZWINTポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、（b）（i）前記候補ドナーが、ヒトZWINTの核酸配列中のヌクレオチド596に対応する位置にAを含むZWINT核酸、および/またはヒトZWINTのタンパク質配列中の残基187に対応する位置にアルギニン残基を含むZWINTポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（II）（前記ペプチド中のX<sup>5</sup>はGである）を負荷したHLA-B\*4403対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、または（b）（ii）前記候補ドナーが、ヒトZWINTの核酸配列中のヌクレオチド596に対応する位置にGを含むZWINT核酸、および/またはヒトZWINTのタンパク質配列中の残基187に対応する位置にグリシン残基を含むZWINTポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下におい

10

20

30

40

50

て、上記ペプチド（ⅠⅠ）（前記ペプチド中の $X^5$ はRである）を負荷したHLA-B\*4403対立遺伝子のMHCクラスⅠ分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養することと、を含む。

#### 【0157】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、（a）候補ドナーが、ヒトMTC H2の核酸配列（図3A、NCBI参照配列：NM\_\_014342.3）中のヌクレオチド1057に対応する位置にCもしくはGを含むMTC H2核酸、および／またはヒトMTC H2のタンパク質配列（図3B、NCBI参照配列：NP\_\_055157.1）中の残基290に対応する位置にプロリンもしくはアラニン残基を含むMTC H2ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、（b）（i）前記候補ドナーが、ヒトMTC H2の核酸配列中のヌクレオチド1057に対応する位置にCを含むMTC H2核酸、および／またはヒトMTC H2のタンパク質配列中の残基290に対応する位置にプロリン残基を含むMTC H2ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項64～75のいずれか1項に記載のペプチド（前記ペプチド中の $X^9$ はAである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスⅠ分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、または（b）（ii）前記候補ドナーが、ヒトMTC H2の核酸配列中のヌクレオチド1057に対応する位置にGを含むMTC H2核酸、および／またはヒトMTC H2のタンパク質配列中の残基290に対応する位置にアラニン残基を含むMTC H2ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項64～75のいずれか1項に記載のペプチド（前記ペプチド中の $X^9$ はPである）を負荷したHLA-B\*0801対立遺伝子のMHCクラスⅠ分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養することと、を含む。

#### 【0158】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、（a）候補ドナーが、ヒトELF1の核酸配列（図4Aおよび4B、NCBI参照配列：NM\_\_172373.3）中のヌクレオチド1400に対応する位置にAもしくはTを含むELF1核酸、および／またはELF1タンパク質配列（図4C、NCBI参照配列：NP\_\_758961.1）中の残基343に対応する位置にスレオニンもしくはセリンを有するELF1ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、（b）（i）前記候補ドナーが、ヒトELF1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にAを含むELF1核酸、および／またはELF1タンパク質配列中の残基343に対応する位置にスレオニンを有するELF1ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（ⅠⅤ）（前記ペプチド中の $X^{12}$ はSである）を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスⅠ分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養すること、または（b）（ii）前記候補ドナーが、ヒトELF1の核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にTを含むELF1核酸、および／またはELF1タンパク質配列中の残基343に対応する位置にセリンを有するELF1ポリペプチドを発現する場合、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド（ⅠⅤ）（前記ペプチド中の $X^{12}$ はTである）を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスⅠ分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を培養することと、を含む。

#### 【0159】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のためにCD8<sup>+</sup> Tリンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、（a）前記対象が、ヒトNQ01の核酸配列（図5A、NCBI参照配列：NM\_\_000903.2）中のヌクレオチド615に対応する位置にCもしくはTを含むNQ01核酸、および／またはNQ01タンパク質配列（図5B、NCBI参照配列：NP\_\_000894.1）中の残基139に対応する位置にアルギニン

もしくはトリプトファンを有する N Q 0 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i) 前記候補ドナーが、ヒト N Q 0 1 の核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に C を含む N Q 0 1 核酸、および / またはヒト N Q 0 1 のタンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にアルギニン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド (V) (前記ペプチド中の X<sup>1 7</sup> は W である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または (b)(ii) 前記候補ドナーが、ヒト N Q 0 1 の核酸配列中のヌクレオチド 6 1 5 に対応する位置に T を含む N Q 0 1 核酸、および / またはヒト N Q 0 1 のタンパク質配列中の残基 1 3 9 に対応する位置にトリプトファン残基を含む N Q 0 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド (V) (前記ペプチド中の X<sup>1 7</sup> は R である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0160】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、(a) 前記対象が、ヒト K I A A 0 2 2 6 L の核酸配列 (図 6 A および 6 B、N C B I 参照配列: N M \_\_ 0 2 5 1 1 3 . 2) 中のヌクレオチド 1 0 5 9 に対応する位置に G もしくは A を含む K I A A 0 2 2 6 L 核酸、および / または K I A A 0 2 2 6 L タンパク質配列 (図 6 C、N C B I 参照配列: N P \_\_ 0 7 9 3 8 9 . 2) 中の残基 1 5 2 に対応する位置にグリシンもしくはアルギニンを有する K I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i) 前記候補ドナーが、ヒト K I A A 0 2 2 6 L の核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 9 に対応する位置に G を含む K I A A 0 2 2 6 L 核酸、および / またはヒト K I A A 0 2 2 6 L のタンパク質配列中の残基 1 5 2 に対応する位置にグリシン残基を含む K I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド (V I) (前記ペプチド中の X<sup>2 3</sup> は R である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養すること、または (b)(ii) 前記候補ドナーが、ヒト K I A A 0 2 2 6 L の核酸配列中のヌクレオチド 1 0 5 9 に対応する位置に A を含む K I A A 0 2 2 6 L 核酸、および / またはヒト K I A A 0 2 2 6 L のタンパク質配列中の残基 1 5 2 に対応する位置にアルギニン残基を含む K I A A 0 2 2 6 L ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド (V I) (前記ペプチド中の X<sup>2 3</sup> は G である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーから C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む。

#### 【0161】

別の態様において、本発明は、T細胞養子免疫療法のために C D 8 T リンパ球を増殖する方法を提供し、前記方法は、(a) 前記対象が、ヒト R M D N 1 の核酸配列 (図 7 A、N C B I 参照配列: N M \_\_ 0 1 6 0 3 3 . 2) 中のヌクレオチド 3 1 6 に対応する位置に A もしくは C を含む R M D N 1 核酸、および / または R M D N 1 タンパク質配列 (図 7 B、N C B I 参照配列: N P \_\_ 0 5 7 1 1 7 . 2) 中の残基 5 2 に対応する位置にリジンもしくはアスパラギンを有する R M D N 1 ポリペプチドを発現するかどうかを決定することと、(b)(i) 前記候補ドナーが、ヒト R M D N 1 の核酸配列中のヌクレオチド 3 1 6 に対応する位置に A を含む R M D N 1 核酸、および / またはヒト R M D N 1 のタンパク質配列中の残基 5 2 に対応する位置にリジン残基を含む R M D N 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド (V I I) (前記ペプチド中の X<sup>2 8</sup> は N である) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからの C D 8 T リンパ球を培養すること、または、(b)(ii) 前記候補ドナーが、ヒト R M D N 1 の核酸配列中のヌクレオチド 3 1 6 に対応する位置に C を含む R M D N 1 核酸、および / またはヒト R M

D N 1 のタンパク質配列中の残基 5 2 に対応する位置にアルギニン残基を含む R M D N 1 ポリペプチドを発現する場合、C D 8 T リンパ球増殖に適した条件下において、上記ペプチド ( V I I ) ( 前記ペプチド中の X <sup>2 8</sup> は K である ) を負荷した H L A - A \* 0 3 0 1 対立遺伝子の M H C クラス I 分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからの C D 8 T リンパ球を培養することと、を含む。

【 0 1 6 2 】

一実施形態において、上記癌は、C E N P F、Z W I N T、M T C H 2、E L F 1、N Q 0 1、K I A A 0 2 2 6 L、および / または R M D N 1 を発現する腫瘍細胞を含む。

【 0 1 6 3 】

一実施形態において、上記癌は、C E N P F を発現する腫瘍細胞を含み、白血病、リンパ腫、もしくは骨髄腫等の血液癌であるか、または頭頸部扁平上皮癌、乳癌、非ホジキンリンパ腫、または消化器癌等の固形腫瘍である。

【 0 1 6 4 】

別の実施形態において、上記癌は、Z W I N T を発現する腫瘍細胞を含み、乳癌、前立腺癌、または膀胱癌である。

【 0 1 6 5 】

別の実施形態において、上記癌は、M T C H 2 を発現する腫瘍細胞を含み、固形腫瘍 / 癌であり、さらなる実施形態において、肺癌、甲状腺癌、肝癌、食道癌、結腸癌、もしくは乳癌、または骨肉腫である。

【 0 1 6 6 】

別の実施形態において、上記癌は、E L F 1 を発現する腫瘍細胞を含み、白血病、肺癌 ( 例えば、非小細胞肺癌 )、乳癌、または卵巣癌である。

【 0 1 6 7 】

別の実施形態において、上記癌は、N Q 0 1 を発現する腫瘍細胞を含み、肺癌 ( 例えば、非小細胞肺癌 )、皮膚癌、乳癌、肝癌 ( 例えば、肝内胆管癌 ) 消化管癌、例えば、結腸直腸癌、または膵癌等である。

【 0 1 6 8 】

別の実施形態において、上記癌は、K I A A 0 2 2 6 L を発現する腫瘍細胞を含み、リンパ腫 ( 例えば、パーキットリンパ腫 )、皮膚癌、乳癌、肝癌 ( 例えば、肝内胆管癌 )、消化管癌、例えば、結腸直腸癌、または膵癌等である。

【 0 1 6 9 】

これまで、本発明をその特定の実施形態によって説明してきたが、添付の特許請求の範囲に定義されるような主題の発明の主旨および性質から逸脱することなく、これを変更することができる。特許請求の範囲において、「～を含むが、これらに限定されない」という句と実質的に同等である「含む ( c o m p r i s i n g ) 」という語が、非限定的な用語として用いられる。単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈上、別途明らかに指示のない限り、対応する複数の指示対象を含む。

【実施例】

【 0 1 7 0 】

発明を実施するための最良の形態

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに詳細に例示される。

【 0 1 7 1 】

実施例 1 : 材料および方法

細胞培養 2 つの H L A が同一である同胞の血液試料から末梢血単核球 ( P B M C ) を単離した。記載されるように ( T o s a t o a n d C o h e n , 2 0 0 7 )、F i c o l l - P a q u e ( 商標 ) P l u s ( A m e r s h a m ) を用いて、エプスタイン・バーウイルス ( E B V ) で形質転換した B リンパ芽球様細胞株 ( B - L C L ) を P B M C から誘導した。確立された B - L C L を、10 % ウシ胎仔血清、25 m M H E P E S、2 m M L - グルタミン、およびペニシリン - ストレプトマイシン ( 全て I n v i t r o g e n から ) を補充した R P M I 1 6 4 0 培地中に維持した。

## 【0172】

HLAタイピング      *Maison neuve - Rosemont Hospital* で高解像度HLA遺伝子型解析を行った。対象のHLA遺伝子型は、HLA-A\*0301/2902、HLA-B\*0801/\*4403、HLA-C\*0701/\*1601、およびHLA-DRB1\*0301/\*0701であった。

## 【0173】

RNA抽出      製造者の指示に従ってDNase I処理を含むRNeasy (商標) Mini Kit (Qiagen) を使用して、500万個のB-LCLから全RNAを単離した。NanoDrop (商標) 2000 (Thermo Scientific) を使用して全RNAを定量化し、2100 Bioanalyzer (商標) (Agilent Technologies) を用いてRNAの品質を評価した。

10

## 【0174】

トランスクリプトームライブラリーの調製      製造者のプロトコルに従ってTruSeq (商標) RNA Sample Prep Kit (v2) (RS-930-1021、Illumina) を使用して、1µgの全RNAからトランスクリプトームライブラリーを作製した。端的に述べると、2ラウンドの精製を用いて、ポリTオリゴを付着させた磁気ビーズを使用してポリA mRNAを精製した。ポリA RNAの2回目の溶出中に、RNAを断片化し、cDNA合成のために初回刺激した。ランダムプライマーおよびSuperScript (商標) II (InvitroGene) を使用して第1の鎖の逆転写 (RT) を行った。二本鎖cDNAを作製するために第2ラウンドのRTも行い、次いで、Agencourt AMPure (商標) XP PCR精製システム (Beckman Coulter) を使用して精製した。製造者のプロトコルに従って、断片化cDNAの末端修復、3'末端のアデニル化、およびアダプターのライゲーションを行った。15サイクルのPCR増幅、ならびにIllumina (商標) PCRミックスおよびプライマーカクテルを使用して、両端にアダプター分子を含有するDNA断片の濃縮を行った。

20

## 【0175】

DNA抽出      製造者の指示に従ってPureLink (商標) Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) を使用して、500万個のB-LCLからゲノムDNAを抽出した。NanoDrop (商標) 2000 (Thermo Scientific) を使用してDNAを定量化し、品質を評価した。

30

## 【0176】

ゲノムDNAライブラリーの調製およびエクソームの濃縮      製造者のプロトコルに従ってTruSeq (商標) DNA Sample Preparation Kit (v2) (FC-930-1021、Illumina) を使用して、1µgのゲノムDNAからゲノムライブラリーを構築した。これは、以下のステップを含んでいた: Covaris (商標) S2機器を使用したDNA剪断、DNA末端修復、3'末端アデニル化、アダプターのライゲーション、アダプター分子を有するDNA断片を濃縮するためのライゲーション産物の精製およびPCR増幅。

40

## 【0177】

DNA-Seqライブラリーを濃縮ステップに供し、ヒトゲノムのコード部分 (エクソーム) のみを配列決定した。製造者の指示に従ってTruSeq (商標) Exome Enrichment Kit (FC-930-1012、Illumina) を用いたハイブリッド選択に基づくエクソームの濃縮には、500ngのDNA-Seqライブラリーを使用した。

## 【0178】

全トランスクリプトーム配列決定 (RNA-Seq) およびエクソーム配列決定      TruSeq (商標) v3化学物質を流したIllumina HiSeq 2000 (商標) 機を使用してペアエンド (2×100bp) シーケンスを行った。クラスター密度は、約600~800kクラスター/mm<sup>2</sup>を標的とした。2つのRNA-Seqライブラリ

50

ーまたは4つのエクソームライブラリーをレーンごとに配列決定した(スライド当たり8レーン)。Illuminaシーケンス技術の詳細は、<http://www.illumina.com/applications/detail/sequencing/dna-sequencing-ilmn>に見出すことができる。端的に述べると、DNAまたはRNAライブラリーを8個の個別レーンを有する流体フローセル設計に組み込む。フローセルの表面には捕捉オリゴヌクレオチドアンカーが密集しており、シーケンスライブラリーの適切に修飾されたDNAセグメントにハイブリダイズする。「ブリッジ増幅」と称されるプロセスにより、捕捉されたDNAテンプレートが、フローセル内で「弧を描いて」曲り、近傍のアンカーオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイズすることにより増幅される。アダプター配列に相補的なプライマーとハイブリダイズさせ、次いで、DNAポリメラーゼ、および4つの異なる色の蛍光可逆色素ターミネーターの混合物をフローセル内の捕捉されたDNAに周期的に加えることによってシーケンス反応を行う。このアプローチを用いることにより、未修飾のDNA断片および組み込まれていないヌクレオチドが洗い流される一方で、捕捉されたDNA断片が、1度にヌクレオチド1つ分伸長される。各ヌクレオチド結合周期が起こった後、フローセルを走査してデジタル画像を取得し、蛍光標識されたヌクレオチド組み込みの位置を記録する。撮像後、次のヌクレオチド結合周期の前に、蛍光色素および3'末端ブロッカーをDNAから化学的に除去する。

10

#### 【0179】

リードマッピング Illumina Casava (商標) 1.8.1およびElan (商標) v2マッピングソフトウェアを使用して、ヒト参照ゲノム(hg19)に配列データをマッピングした。最初に、\*.bclファイルを圧縮FASTQファイルに変換した後、別個の多重化シーケンスランをインデックスごとに逆多重化した。次いで、マルチシード(multiseed)およびギャップアライメント法を用いて単一リードをヒト参照ゲノムにアラインした。マルチシードアライメントは、32塩基の最初のシードと連続的なシードを別個にアラインすることによって機能する。ギャップアライメントは、各候補アライメントをリードの全長まで伸長させ、最大10塩基のギャップを許容する。以下の基準が適用される：i) リードは、多くても2つのミスマッチと一致する少なくとも1つのシードを有しなければならず、そのシードにはギャップが許容されない、ii) 少なくとも5つの下流のミスマッチを補正する限り、全リードには任意の数のギャップが許容される。各候補アライメントについて、確率スコアを算出した。このスコアは、配列決定する塩基の品質値およびミスマッチの位置に基づいている。Phredスケールで表されるリードのアライメントスコアは、候補アライメントの確率スコアから計算した。所与のリードの最良のアライメントは、最も高い確率スコアを有する候補アライメントと一致しており、アライメントスコアが閾値を超えた場合に選択された。2ヶ所以上の位置でマッピングしたリード(マルチリード)は、さらなる分析には含めなかった。スプライスジャンクションおよび混入物(ミトコンドリアおよびリボソームRNA)に対してさらなるアライメントを行った。

20

30

#### 【0180】

単一ヌクレオチド変異の同定 このプロセスの最初のステップは、参照ゲノム(GRCh37.p2, NCBI)と、各々の対象の配列決定されたトランスクリプトームとの間に観察される全ての単一ヌクレオチド変異(SNV)のリストを検索することからなる。これは、IlluminaのSNP呼び出しプログラムCasava (商標) v1.8.2を使用して行われた(<http://support.illumina.com/sequencing/sequencing-software/casava-ilmn>)。Casavaは、位置、参照塩基、各塩基の生カウント値、最も可能性の高い遺伝子型(max\_\_gt)、および最も可能性の高い遺伝子型の確率(Qmax\_\_gt)を含む、観察されるあらゆるSNVに関する統計値を算出して検索する。Casava (商標)によって呼び出されたSNVの中で、高い信頼度(Qmax\_\_gt値>20)を有するもののみが検討される。この閾値未満のQmax\_\_gt値を有するSNVには、代わり

40

50



に参照塩基が割り当てられる。この戦略は、各々の対象と参照ゲノムとの間で、SNVを転写レベルで同定するために使用された。

#### 【0181】

In silicoで翻訳されたトランスクリプトーム 各個体の同定されたSNVを含有する配列をさらに処理した。各配列について、Ensemblに報告されている全ての転写物 (<http://useast.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>, Flicek et al., Ensembl 2012, Nucleic Acids Research 2012 40 Database issue: D84-D90)を検索し、自社内ソフトウェアPyGenoを使用して、それらの各々をタンパク質にin silicoで翻訳した(Granados et al., 2012)。in silicoで翻訳したトランスクリプトームは、所与の位置に1つより多くの非同義対立遺伝子が見られる例を含んでいた。多型位置が上流または下流の11mer以下のペプチドに影響を及ぼし得ると仮定して、これらの多型位置の各1つの周囲の66bpのウィンドウを検討し、これらの66bp(または22aa)ウィンドウによって定義されるあらゆる可能なアミノ酸(aa)配列変異体を算出した。このようにして、非同義多型による影響を受ける多くても11aaの最も可能性の高いaa配列のリストを得た。ファイルのサイズを制限するために、1つの非同義多型によって影響を受けるaa配列の数を10240までに限定した。翻訳した全ての配列を単一FASTAファイルにコンパイルし、MHCクラスI関連ペプチドの同定のためのデータベースとして使用した(「MS/MS配列決定およびペプチドクラスター形成」の項目を参照のこと)。

#### 【0182】

質量分析およびペプチド配列決定  $4 \times 10^8$  の指数関数的に増殖するB-LCLの3つの生物学的複製物を各対象から調製した。弱酸処理によりMHCクラスI関連ペプチドを放出させ、HLBカートリッジで脱塩することにより前処理し、3000Daカットオフカラムで濾過し、依然に記載されたように(Fortier et al., 2008)オフライン1100シリーズのバイナリLCシステム(Agilent Technologies)を使用して陽イオン交換クロマトグラフィー(SCX)により分離した。SCXバルク材料(Polysulfoethyl A(商標)、PolyLC)を充填した自家製の強陽イオン交換(SCX)カラム(内径0.3mm×長さ50mm)にペプチドを8uL/分で負荷した。25分で0~25%Bの線形勾配(溶媒A:5mMギ酸アンモニウム、15%アセトニトリル、ACN pH 3.0);溶媒B:2Mギ酸アンモニウム、15%ACN pH 3.0)を用いてペプチドを5つの画分に分離し、Speedvacを使用して乾燥させた。

#### 【0183】

MHCクラスI関連ペプチドの画分を2%水性ACN(0.2%ギ酸)に再懸濁し、LTQ-Orbitrap(商標)質量分析計(Thermo Electron)に連結したEksigent(商標)LCシステムを使用してLC-MS/MSにより分析した(Fortier et al., 2008; de Verteuil et al., 2010; Caron et al., 2011)。69分で3~60%の水性ACN(0.2%ギ酸)の線形勾配を用いて、特別仕様のC<sub>18</sub>逆相カラム(内径150μm×100mm、Jupiter Proteo(商標)4μm、Phenomenex)内で、600nL/分の流速でペプチドを分離した。60000(m/z 400)の分解能で動作するOrbitrap(商標)分析器を用いて完全な質量スペクトルを取得し、衝突活性化分解によるタンデム質量スペクトルは、線形イオントラップ型分析器を用いてデータ依存モードで取得した。質量キャリブレーションには内部ロックマス(プロトン化(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O))<sub>6</sub>; m/z 445.120029)を用い、ペプチド測定値の質量精度は5ppm未満であった。

#### 【0184】

MS/MS配列決定およびペプチドクラスター形成 Xcalibur(商標)ソフ

トウェアを使用して質量スペクトルを分析し、Mascot (商標) 蒸留器バージョン 2.1.1 (Matrix Science、<http://www.matrixscience.com>) を使用してピークリストを作成した。ヒトの非冗長 UniProt データベース (110,361 個の配列を含有、2011 年 7 月 28 日公開) (Cambridge (UK) 近隣の Hinxton に所在の Wellcome Trust Genome Campus 内の教育研究施設 European Bioinformatics Institute (EBI) (European Molecular Biology Laboratory の一部) から入手可能な UniProt Gene Ontology Annotation のバージョン 101; <http://www.ebi.ac.uk/lnformation/>; Magrane et al., Database Vol. 2011, Article ID bar009; The UniProt Consortium, Nucleic Acids Res. 2011 January; 39 (Database issue): D214-D219) に対して、および Mascot (バージョン 2.3、Matrix Science) を使用して各個体に特異的なデータベースに対して、データベース検索を行った (「in silico で翻訳されたトランスクリプトーム」の項目を参照)。Ensembl ヒト参照ゲノムデータベースのフォワードおよびリバースバージョンの組み合わせ、ならびに各対象特異的データベースからなる、連鎖状の標的 / デコイデータベースに対する Mascot 検索。15 を超えるカットオフスコア閾値を有する非冗長ペプチド配列を選択した。前駆体および断片の質量値の許容誤差は、それぞれ 0.02 および 0.05 ダルトンに設定した。酵素特異性、ならびに酸化 (Met) および脱アミド (Asn、Gln) について可変修正なしで検索を行った。自社製ソフトウェア (Proteoprofile) を使用して、生データファイルを m/z 値、荷電状態、保持時間、および 8000 カウントの閾値を超える検出された全てのイオンの強度を含むペプチドマップに変換した (Fortier et al., 2008; de Verteuil et al., 2010; Caron et al., 2011)。ペプチドマップを一緒にアラインし、各マップのペプチドイオン (配列決定されていないイオンを含む) をそれらの対応する Mascot による同定物質に集約させ、ペプチドの存在量プロファイルを作成する。Mascot による複数の同定物質が同じイオンに関連している場合、最も高いスコアを有するもののみを維持した。次いで、同一のペプチド配列について強度カウントを合計し、同定されたペプチド配列の非冗長存在量プロファイルをもたらした。

#### 【0185】

MiHA 候補の選択と MiHA のタンパク質源の同定 ペプチドを長さによってふるいにかけ、古典的な MHC I 関連ペプチドの長さ (典型的には 8 ~ 11 mer) を有するペプチドを維持した。ペプチドは、対象当たり 3 つの複製物中に存在しない場合に、検出されない / 発現されないと見なし、対象当たり少なくとも 2 つの複製物中に同定された場合に、検出された / 発現されたと見なした。NetMHCcons バージョン 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCcons/>) を使用してペプチドの対立遺伝子産物に対する予測結合親和性 ( $IC_{50}$ ) を得て (Karosiene et al., 2011)、MHC I ペプチドを分類するために用いた。50 nM 未満の  $IC_{50}$  を有するペプチドを強い結合剤と見なし、50 ~ 約 500 nM の  $IC_{50}$  を有するペプチドを弱い結合剤と見なした。

#### 【0186】

以下の基準に従って MiHA ペプチドを選択した：

i) 2 人の対象のうちの 1 人において対応するペプチド (複数可) の排他的表面発現を生じさせる、ペプチドコード領域内における 2 人の対象間の非同義 SNV の存在。これらは、対象間の MiHA の違いを構成する。

ii) ペプチド (複数可) の表面発現を生じさせる、対象のペプチドコード領域内における報告された非同義 SNP の存在。これらは、対象と、報告された SNP に対する代替の対立遺伝子を内部に有する他の個体との間の MiHA の違いを構成する。

## 【0187】

Integrative Genomics Viewer v2.0 (The Broad Institute) を使用して、MiHA 候補をコードする RNA (cDNA) および DNA 配列を手動で検査した。UCSC の Repeat Masker による追跡を含めることにより反復領域に対応する候補を破棄した。報告された SNP に対応する MiHA - en コード領域内でこれらの SNV を同定するために、dbSNP (ビルド 135) による追跡も用いた。MiHA 候補を質量精度についてさらに検査し、Xcalibur (商標) ソフトウェア (Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48 バージョン) を使用して MS / MS スペクトルを手動で確認した。

## 【0188】

実施例 2 : ヒト MiHA の発見のための新規ハイスループット法

MiHA は、その存在が遺伝的多型に依存する i) ペプチド ii) であるため、ハイスループット MiHA の発見は、MS と、個別化した全トランスクリプトームおよび / またはエクソーム配列決定との組み合わせに関与するであろうと判断した。遺伝子内で遺伝的多型が同定されたとしても、i) 発現されたペプチドのわずか 0.1% しか細胞表面で MAP として提示されず、ii) トランスの多型の影響は予測することができないため、ゲノムデータ単独では MiHA の発見には不十分である (5 ; 6)。MS 分析では、Masscot 等のソフトウェアを用いたデータベース検索を介してペプチドが同定される。これらのデータベースは、参照となる翻訳されたゲノムを含有しており、遺伝的多型は含まない。MiHA は、遺伝的多型の結果であるため、標準的な MS のみによってそれらを見出すことはできない。

## 【0189】

ヒト MiHA 発見のための新規方法を開発した。この方法の重要な要素の 1 つは、個別化した翻訳されたトランスクリプトームの、MS によるペプチド同定に使用されるデータベースへの組み込みである。

## 【0190】

2 つの HLA が同一である同胞 (HLA - A \* 0301 / 2902、HLA - B \* 0801 / \* 4403、HLA - C \* 0701 / \* 1601) の血液試料から PBMC を単離した。Ficoll - Paque (商標) Plus (Amersham) を用いて、エプスタイン・バーウイルス (EBV) で形質転換した B リンパ芽球様細胞株 (B - LCL) を PBMC から誘導した。4 × 10<sup>8</sup> の指数関数的に増殖する B - LCL の 3 つの生物学的複製物を各対象から調製した。弱酸処理により MAP を放出させ、陽イオン交換クロマトグラフィーによって分離し、MAP 画分を LC - MS / MS により分析した。

## 【0191】

各対象に対して全エクソームおよびトランスクリプトーム配列決定を行い、変異体を同定した。各対象ごとの変異体のリストおよびヒト転写物アノテーションに基づいて、アノテートされた転写物を翻訳することによって、対象特異的タンパク質配列の完全なレパートリーを生成した。全エクソーム配列決定が、コード領域における多型の包括的同定を提供する一方で、RNA - seq は、i) 2 人の対象間の違いを転写レベルで強調することが可能であり (例えば、プロモーター領域内の多型によって)、かつ ii) アノテートされない遺伝子またはエクソーム捕捉プロトコルによってカバーされない偽遺伝子をカバーするため、最も有用な補完的データセットを提供した。後者の遺伝子は、MAP の源となることができ、MiHA の展望に大きく寄与し得る。翻訳されたエクソーム - トランスクリプトームは、次いで、個別化した Masscot タンパク質配列データベースとして使用され、変異体位置と重複する MAP を検索するのに役立ち、最も重要なことに、HLA が同一である同胞の MAP レパートリーにおける違いを立証する : 2 つの HLA が同一である同胞のうちの 1 つのみ存在する MAP が、MiHA である。

## 【0192】

実施例 3 : 同定された新規 MiHA

アミノ酸配列 E L Q E K F L S L 対 E L Q E K F S S L を含む対立遺伝子 MiHA が同

10

20

30

40

50

定されている。これらのMiHAは、MHCクラスI対立遺伝子HLA-B\*0801によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、MHC分子（ヒトにおけるHLA）によって提示される十分に特徴付けられた全ペプチドのレパートリーを含むImmune Epitope Database (Vita et al., 2010)には記載されていない。これらのMiHAは、セントロメアタンパク質F、350/400kDa（マイトシン）（CENPF）遺伝子中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベースにはrs3795517として記載されている（Sherry et al., 2001）（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>）。2つの対立遺伝子が、この遺伝子座に見られる：一方は、ELQEKFLSL配列を含有するCENPFタンパク質をコードし、他方は、ELQEKFLSL配列を有するCENPFタンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、ヒトCENPFの核酸配列（図1A～1D、NCBI参照配列：NM\_016343.3）中のヌクレオチド4409に対応する位置におけるTからCへの置換に対応し、CENPFタンパク質配列（図1E、NCBI参照配列：NP\_057427.3）中の残基1412に対応する位置においてロイシンからセリンへの置換をもたらす。CENPFは、細胞分化において複数の役割を果たす一過性の動原体タンパク質である。CENPFの発現はG2相で増加するが、有糸分裂の終了時に急速にタンパク質分解される。頭頸部扁平上皮癌（de la Guardia et al., 2001）、乳癌（O'Brien et al., 2007）、非ホジキンリンパ腫（Bencimon et al., 2005）、および消化器癌（Chen et al., 2011）を含む種々の血液癌および固形腫瘍においてCENPFの過剰発現が認められている。また、EMBL-EBI Gene Expression Atlas（Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40 (D1): D1077-D1081）によれば、肉腫（平滑筋肉腫）、神経膠芽腫、肺腺癌、結腸直腸癌/結腸癌、前立腺癌、膀胱癌、リンパ腫（末梢性T細胞リンパ腫）、および白血病（急性リンパ性白血病、T細胞生急性リンパ芽球性白血病白血病）においてCENPFの過剰発現が検出されている。したがって、一実施形態において、本明細書に記載される配列（I）のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され得る。【0193】

本明細書で同定された別の対のMiHAのアミノ酸配列は、QELDGVFQKL対QELDRVVFQKLである。これらのMiHAは、HLA-B\*4403分子によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、Immune Epitope Database (Vita et al., 2010)には記載されていない。これらのMiHAは、ZWINT（ZW10相互作用物質）遺伝子中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベースにはrs2241666として記載されている（Sherry et al., 2001）。2つの対立遺伝子が、この遺伝子座に見られる：一方は、QELDGVFQKL配列を含有するZWINTタンパク質をコードし、他方は、QELDRVVFQKL配列を有するZWINTタンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、ヒトZWINTの核酸配列（図2A、NCBI参照配列：NM\_007057.3）中のヌクレオチド596に対応する位置におけるAからGへの置換に対応し、ZWINTタンパク質配列（図2B、NCBI参照配列：NP\_008988.2）中の残基187に対応する位置においてアルギニンからグリシン置換への置換をもたらす。ZWINTは、有糸分裂紡錘体チェックポイントに必要とされる動原体複合体の既知の構成要素である。ZWINTの過剰発現は、数種類の癌（特に、乳癌、前立腺癌、および膀胱癌）において観察されており、癌細胞増殖の増加と相関している（Endo et al., 2012; Ho et al., 2012; Urbanucci et al., 2012）。また、EMBL-EBI Gene Expression Atlas（Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40 (D1): D1077-D1081）によれば、肺癌（腺癌）、頭頸部扁平上皮癌、結腸直腸癌/結腸癌、腎癌、およびリンパ腫（粘膜関連リンパ組織リンパ腫

、末梢性T細胞リンパ腫)においてZWINTの過剰発現が検出されている。したがって、一実施形態において、本明細書に記載される配列(II)のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され得る。

【0194】

本明細書で同定された3番目の対のMiHAのアミノ酸配列は、SLFFRKVPF対SLFFRKVAFである。これらのMiHAは、HLA-B\*0801分子によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、Immune Epitope Database (Vita et al., 2010)には記載されていない。これらのMiHAは、MTCH2(ミトコンドリア輸送体相同体2)遺伝子中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベースにはrs1064608として記載されている(Sherry et al., 2001)。2つの対立遺伝子が、この遺伝子座に見られる:一方は、SLFFRKVAF配列を含有するMTCH2タンパク質をコードし、他方は、SLFFRKVPF配列を有するMTCH2タンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、MTCH2の核酸配列(図3A、NCBI参照配列:NM\_014342.3)中のヌクレオチド1057に対応する位置におけるCからGへの置換に対応し、MTCH2タンパク質配列(図3B、NCBI参照配列:NP\_055157.1)中の残基290に対応する位置においてプロリンからアラニンへの置換をもたらす。MTCH2は、アポトーシス促進性の切断されたBIDと相互作用し、それによってアポトーシスを調節し、特に固形腫瘍(肺、甲状腺、肝臓、食道、結腸、乳癌)および骨肉腫といった数種類の癌において上方制御される/関与している(Yu et al., 2008; Grinberg et al., 2005; Katz et al., 2012)。また、EMBL-EBI Gene Expression Atlas (Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40(D1):D1077-D1081)によれば、リンパ腫、白血病、および骨髄腫においてMTCH2の過剰発現が検出されている。したがって、一実施形態において、本明細書に記載される配列(III)のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され得る。

【0195】

本明細書で同定された4番目の対のMiHAのアミノ酸配列は、SVLKPGNSK対TVLKPGNSKである。これらのMiHAは、HLA-A\*0301分子によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、Immune Epitope Database (Vita et al., 2010)には記載されていない。これらのMiHAは、ELF1[E74様因子1(et sドメイン転写因子)]遺伝子中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベースにはrs1056820として記載されている(Sherry et al., 2001)。2つの対立遺伝子が、この遺伝子座に見られる:一方は、SVLKPGNSK配列を含有するELF1タンパク質をコードし、他方は、TVLKPGNSK配列を有するELF1タンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、ヒトELF1の核酸配列(図4Aおよび4B、NCBI参照配列:NM\_172373.3)中のヌクレオチド1400に対応する位置におけるAからTへの置換に対応し、ELF1タンパク質配列(図4C、NCBI参照配列:NP\_758961.1)中の残基343に対応する位置においてスレオニンからセリンへの置換をもたらす。ELF1は、白血病、非小細胞肺癌、乳癌および卵巣癌等の癌細胞における発癌経路の転写活性化に関与する転写因子である(Andrews et al., 2008; Xiang et al., 2010; Yang et al., 2010)。また、EMBL-EBI Gene Expression Atlas (Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40(D1):D1077-D1081)によれば、肉腫(例えば、骨肉腫)、神経膠芽腫、膀胱癌、および白血病(急性骨髄性白血病)、リンパ腫(バーキットリンパ腫)においてELF1の過剰発現が検出されている。したがって、一実施形態において、本明細書に記載される配列(IV)のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され

10

20

30

40

50

得る。

#### 【0196】

別の対のMiHAのアミノ酸配列は、AMYDKGPFRSK対AMYDKGPFW SKである。これらのMiHAは、HLA-A\*0301によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、Immune Epitope Database (Vita et al., 2010)には記載されていない。これらのMiHAは、NQ01 [NAD (P)H脱水素酵素、キノリン1] 遺伝子中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベースにはrs1131341として記載されている (Sherry et al., 2001)。2つの対立遺伝子が、この遺伝子座に見られる：一方は、AMYDKGPFRSK配列を含有するNQ01タンパク質をコードし、他方は、AMYDKGPFW SK配列を有するNQ01タンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、ヒトNQ01の核酸配列 (図5A、NCBI参照配列：NM\_000903.2) 中のヌクレオチド615に対応する位置におけるCからTへの置換に対応し、NQ01タンパク質配列 (図5B、NCBI参照配列：NP\_000894.1) 中の残基139に対応する位置においてアルギニンからトリプトファンへの置換をもたらす。NQ01は、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補因子として用いて、種々のキノンの還元を触媒する細胞質酵素である。このタンパク質の酵素活性は、ラジカル種の産生をもたらすキノンの1つの電子の還元を防止する。このNQ01における突然変異は、種々の形態の癌に対する感受性と関連付けられており、非小細胞肺癌、皮膚癌 (例えば、黒色腫)、乳癌、肝癌 (例えば、肝内胆管癌)、および結腸直腸癌等の消化管癌を含む多くの腫瘍において、このNQ01タンパク質の発現変化が認められている (Kolesar et al., 2011; Wakai et al., 2011; Jamieson et al., 2011; Ding et al., 2012; Yang et al., 2012; Patrick and Jaiswal, 2012)。最近、NQ01基質は、膀胱癌細胞および肺癌細胞等の幅広い癌細胞に対する強力な抗腫瘍活性を有することが示された (Huang et al., 2012)。また、EMBL-EBI Gene Expression Atlas (Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40 (D1): D1077-D1081) によれば、リンパ腫 (ホジキンリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫) および脳癌 (神経膠芽腫、上衣下巨細胞性星状細胞腫) においてNQ01の過剰発現が検出されている。一実施形態において、本明細書に記載される配列 (V) のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され得る。

#### 【0197】

別の対のMiHAのアミノ酸配列は、RVSLPTSPG対RVSLPTSPRである。これらのMiHAは、HLA-A\*0301によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、MHC分子 (ヒトにおけるHLA) によって提示される十分に特徴付けられた全ペプチドのレパートリーを含むImmune Epitope Database (Vita et al., 2010)には記載されていない。

#### 【0198】

これらのMiHAは、KIAA0226様遺伝子 (C13orf18としても知られる) 中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベースにはrs1408184として記載されている (Sherry et al., 2001)。2つの対立遺伝子が、この遺伝子座に見られる：一方は、RVSLPTSPG配列を含有するKIAA0226Lタンパク質をコードし、他方は、RVSLPTSPR配列を有するKIAA0226Lタンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、ヒトKIAA0226Lの核酸配列 (図6A、NCBI参照配列：NM\_025113.2) 中のヌクレオチド1059に対応する位置におけるGからAへの置換に対応し、KIAA0226Lタンパク質配列 (図6B、NCBI参照配列：NP\_079389.2) 中の残基152に対応する位置においてグリシンからアルギニンへの置換をもたらす。KIAA0226Lの機能の大部分は未知であり、BioGPSデータベースによれば、K

10

20

30

40

50

I A A 0 2 2 6 L は、B リンパ球およびパーキットリンパ腫細胞において上方制御される。また、EMBL - EBI Gene Expression Atlas (Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40 (D1): D1077 - D1081) によれば、結腸癌 (細胞腫)、神経膠芽腫、および未分化大細胞リンパ腫において、K I A A 0 2 2 6 L の過剰発現が検出されている (Chowdary D et al., J Mol Diagn. 2006 Feb; 8 (1): 31 - 9; Ancona N et al., BMC Bioinformatics. 2006 Aug 19; 7: 387; Freije WA et al., Cancer Res. 2004 Sep 15; 64 (18): 6503 - 10; Sun et al., Cancer Cell. 2006 Apr; 9 (4): 287 - 300; Piccaluga et al., J Clin Invest. 2007 Mar; 117 (3): 823 - 34. Epub 2007 Feb 15)。一実施形態において、本明細書に記載される配列 (V I) のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され得る。

10

#### 【0199】

別の対のMiHAのアミノ酸配列は、VMGNPGTFK対VMGNPGTFNである。これらのMiHAは、HLA - A \* 0301によって細胞表面に提示される。これらのペプチドは、MHC分子 (ヒトにおけるHLA) によって提示される十分に特徴付けられた全ペプチドのレパートリーを含むImmune Epitope Database (Vita et al., 2010) には記載されていない。

20

#### 【0200】

これらのMiHAは、RMDN1 (微小管動態の調節因子1) 遺伝子 (FAM82Bとしても知られる) 中の単一ヌクレオチド多型に由来する。この単一ヌクレオチド多型は、dbSNPデータベース中にrs6980476としてリストされている (Sherry et al., 2001)。この遺伝子座には、VMGNPGTFK配列を含有するRMDN1タンパク質をコードするもの、およびVMGNPGTFN配列を有するRMDN1タンパク質をコードするものの2つの対立遺伝子が見られる。単一ヌクレオチド多型は、ヒトRMDN1の核酸配列 (図7A、NCBI参照配列: NM\_016033.2) 中のヌクレオチド316に対応する位置におけるAからCへの置換に対応し、タンパク質配列 (図7B、NCBI参照配列: NP\_057117.2) 中のRMDN1中の残基52に対応する位置においてリジンからアスパラギンへの置換をもたらす。RMDN1は、エレガンス線虫の染色体分離に関与する微小管関連タンパク質である (Oishi et al., J Cell Biol. 179, 1149 - 1162, 2007)。BioGPSデータベースによれば、RMDN1は、Bリンパ芽球およびパーキットリンパ腫細胞中で上方制御される。また、EMBL - EBI Gene Expression Atlas (Kapushesky et al., Nucl. Acids Res. (2012) 40 (D1): D1077 - D1081) によれば、平滑筋肉腫 (Perot et al., Cancer Res. 2009 Mar 15; 69 (6): 2269 - 78; Chibon et al., Nat Med. 2010 Jul; 16 (7): 781 - 7)、乳癌 / 侵襲性腺管癌等の細胞腫 (Chen et al., Breast Cancer Res Treat. 2010 Jan; 119 (2): 335 - 46; Cheng et al., Cancer Res. 2008 Mar 15; 68 (6): 1786 - 96)、神経膠芽腫および星状細胞腫等の脳癌 (上衣下巨細胞性星状細胞腫 (Sun et al., Cancer Cell. 2006 Apr; 9 (4): 287 - 300; Tyburczy et al., Am J Pathol. 2010 Apr; 176 (4): 1878 - 90) においてRMDN1の過剰発現が検出される。したがって、一実施形態において、本明細書に記載される配列 (V I I) のペプチドは、これらの癌のうちの1つ以上の免疫療法に使用され得る。

30

40

#### 【0201】

これまで、本発明をその特定の実施形態によって説明してきたが、添付の特許請求の範

50

囲に定義されるような主題の発明の主旨および性質から逸脱することなく、これを修正することができる。特許請求の範囲において、「～を含むが、これらに限定されない」という句と実質的に同等である「含む ( c o m p r i s i n g ) 」という語が、非限定的な用語として用いられる。単数形の「 a 」、「 a n 」、および「 t h e 」は、文脈上、別途明らかに指示のない限り、対応する複数の指示対象を含む。

【 0 2 0 2 】

#### 参考文献

1. Sykes,M., K.Woods, and D.H.Sachs. 2008. Transplantation Immunology. In Fundam  
ental Immunology. W.E.Paul, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 10  
1426-1488.
2. Loveland.B. and E.Simpson. 1986. The non-MHC transplantation antigens - neith  
er weak nor minor. Immunol. Today 7:223-229.
3. Perreault,C., F,Decary, S,Brochu, M,Gyger, R,Belanger, and D,Roy. 1990. Minor  
histocompatibility antigens. Blood 76:1269-1280.
4. Perreault,C. 2010. The origin and role of MHC class I-associated self-peptide  
s. Prog.Mol Biol.Transl.Sci. 92:41-60. 20
5. de Verteuil.D., D.P.Granados, P.Thibault, and C.Perreault. 2012. Origin and p  
lasticity of MHC I-associated self peptides. Autoimmun.Rev. Epub November 2011.
6. Yewdell,J.W., E.Reits, and J.Neefjes. 2003. Making sense of mass destruction:  
quantitating MHC class I antigen presentation. Nature Rev.Immunol. 3:952-961.
7. Neefjes,J., M.L.M.Jongsma, P.Paul, and O.Bakke. 2011. Towards a systems under  
standing of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat.Rev.Immunol.  
11:823-836. 30
8. Yewdell,J.W. 2011. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC c  
lass I antigen processing. Trends Immunol. 32:548-558.
9. Roopenian,D., E.Y.Choi, and A.Brown. 2002. The immunogenomics of minor histoc  
ompatibilty antigens. Immunol. Rev. 190:86-94.
10. Spierings,E., M.Hendriks, L.Absi, A.Canossi, S.Chhaya, J.Crowley, H.Dolstra,  
J.F.Eliaou, T.Ellis, J.Enczmann, M.E.Fasano, T.Gervais, C.Gorodezky, B.Kircher,  
D.Laurin, M.S.Leffell, P.Loiseau, M.Malkki, M.Markiewicz, M.Martinetti, E.Maruy 40  
a, N.Mehra, F.Oguz, M.Oudshoorn, N.Pereira, R.Rani, R.Sergeant, J.Thomson, T.H.T  
ran, H.Turpeinen, K.L.Yang, R.Zunec, M.Carrington, P.de Knijff, and E.Goulmy. 20  
07. Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display  
significant differences among populations. PLoS. Genet. 3:e103.
11. Perreault,C. and S.Brochu. 2002. Adoptive cancer immunotherapy: discovering  
the best targets. J.Mol.Med. 80:212-218.
12. Mullally,A. and J.Ritz. 2007. Beyond HLA: the significance of genomic variat  
ion for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 109:1355-1362. 50



13. Feng,X., K.M.Hui, H.M.Younes, and A.G.Brickner. 2008. Targeting minor histocompatibility antigens in graft versus tumor or graft versus leukemia responses. *Trends Immunol.* 29:624-632.
14. Brickner,A.G. 2006. Mechanisms of minor histocompatibility antigen immunogenicity: the role of infinitesimal versus structurally profound polymorphisms. *Immunol. Res.* 36:33-41.
15. Bleakley,M. and S.R.Riddell. 2011. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol. Cell Biol.* 89:396-407.
16. Kawase,T., Y.Akatsuka, H.Torikai, S.Morishima, A.Oka, A.Tsujimura, M.Miyazaki, K.Tsujimura, K.Miyamura, S.Ogawa, H.Inoko, Y.Morishima, Y.Kodera, K.Kuzushima, and T.Takahashi. 2007. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood* 110:1055-1063.
17. Rosenberg,S.A., J.C.Yang, and N.P.Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10:909-915.
18. Bleakley,M. and S.R.Riddell. 2004. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat.Rev.Cancer* 4:371-380.
19. Rosenberg,S.A., J.C.Yang, R.M. Sherry, U.S.Kammula, M.S.Hughes, G.Q.Phan, D.E.Citrin, N.P.Restifo, P.F.Robbins, J.R.Wunderlich, K.E.Morton, C.M.Laurencot, S.M.Steinberg, D.E.White, and M.E.Dudley. 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 17:4550-4557.
20. Vincent,K., D.C.Roy, and C.Perreault. 2011. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* 118:2951-2959.
21. Rezvani,K. and A.J.Barrett. 2008. Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 21:437-453.
22. Barrett,A.J. 2008. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br.J. Haematol.* 142:877-888.
23. Horowitz,M.M., R.P.Gale, P.M.Sondel, J.M.Goldman, J.Kersey, H.J.Kolb, A.A.Rimm, O.Ringden, C.Rozman, B.Speck, and . 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75:555-562.
24. Thomas,E.D. 2005. Foreword. In *Graft-vs.-host disease*. J.L.M.Ferrara, K.R.Cooke, and H.J.Deeg, editors. Marcel Dekker, New York, iii-iv.
25. Molldrem,J.J. and W.D.Shlomchik. 2005. Graft-vs.-leukemia effects. In *Graft-vs.-host disease*. J.L.M.Ferrara, K.R.Cooke, and H.J.Deeg, editors. Marcel Dekker

, New York. 155-194.

26. O'Reilly, R.J., T.Dao, G.Koehne, D.Scheinberg, and E.Doubrovina. 2010. Adoptive transfer of unselected or leukemia-reactive T-cells in the treatment of relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Semin. Immunol.* 22:162-172.
27. Kolb, H.J., A.Schattenberg, J.M.Goldman, B.Hertenstein, N.Jacobsen, W.Arcese, P.Ljungman, A.Ferrant, L.Verdonck, and D.Niederwieser. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Cancer Cell* 86:2041-2050. 10
28. Kolb, H.-J. 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112:4371-4383.
29. Childs, R.W. and J.Barrett. 2004. Nonmyeloablative allogeneic immunotherapy for solid tumors. *Annu.Rev.Med.* 55:459-475.
30. Tykodi, S.S., E.H.Warren, J.A.Thompson, S.R.Riddell, R.W.Childs, B.E.Otterud, M.F.Leppert, R.Storb, and B.M.Sandmaier. 2004. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for metastatic renal cell carcinoma after nonmyeloablative conditioning: toxicity, clinical response, and immunological response to minor histocompatibility antigens. *Clin. Cancer Res.* 10:7799-7811. 20
31. Bishop, M.R., D.H.Fowler, D.Marchigiani, K.Castro, C.Kasten-Sportes, S.M.Steinberg, J.C.Gea-Banacloche, R.Dean, C.K.Chow, C.Carter, E.J.Read, S.Leitman, and R.Gress. 2004. Allogeneic lymphocytes induce tumor regression of advanced metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 22:3886-3892. 30
32. Takahashi, Y., N.Harashima, S.Kajigaya, H.Yokoyama, E.Cherkasova, J. P. McCoy, K.I.Hanada, O.Mena, R.Kurlander, T.Abdul, R.Srinivasan, A.Lundqvist, E.Malinza, N.Geller, M.I.Lerman, and R.W.Childs. 2008. Regression of human kidney cancer following allogeneic stem cell transplantation is associated with recognition of an HERV-E antigen by T cells. *J.Clin. Invest.* 118:1099-1109.
33. Meunier, M.C., J.S.Delisle, J.Bergeron, V.Rineau, C. Baron, and C.Perreault. 2005. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nat.Med.* 11:1222-1229. 40
34. Shlomchik, W.D. 2007. Graft-versus-host disease. *Nat.Rev.Immunol.* 7:340-352.
35. Ferrara, J.L., J.E.Levine, P.Reddy, and E. Holler. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373:1550-1561.
36. Socie, G. and B.R.Blazar. 2009. Acute graft-versus-host disease; from the bench to the bedside. *Blood* 114:4327-4336.
37. Greinix, H.T., C.Loddenkemper, S.Z.Pavletic, E. Holler, G.Socie, A.Lawitschka, J.Halter, and D.Wolff. 2011. Diagnosis and staging of chronic graft-versus-host 50

t disease in the clinical practice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17:167-175.

38. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy. 2003. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu. Rev. Med.* 54: 29-52.

39. Inaba, M., K. Kurasawa, M. Mamura, K. Kumano, Y. Saito, and I. Iwamoto. 1999. Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J. Immunol.* 163:1315-1320.

10

40. Yang, J., M.O. Brook, M. Carvalho-Gaspar, J. Zhang, H.E. Ramon, M.H. Sayegh, K.J. Wood, L.A. Turka, and N.D. Jones. 2007. Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:19954-19959.

41. Massague, J. 2008. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* 134:215-230.

42. Hanahan, D. and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

43. Fontaine, P., G. Roy-Proulx, L. Knafo, C. Baron, D.C. Roy, and C. Perreault. 2001. Adoptive transfer of T lymphocytes targeted to a single immunodominant minor histocompatibility antigen eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7:789-794.

20

44. Meunier, M.C., C. Baron, and C. Perreault. 2009. Two host factors regulate persistence of H7a-specific T cells injected in tumor bearing mice. *PLoS One* 4:e4116.

45. Fortier, M.H., E. Caron, M.P. Hardy, G. Voisin, S. Lemieux, C. Perreault, and P. Thibault. 2008. The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J. Exp. Med.* 205:595-610.

30

46. de Verteuil, D., T.L. Muratore-Schroeder, D.P. Granados, M.H. Fortier, M.P. Hardy, A. Bramouille, E. Caron, K. Vincent, S. Mader, S. Lemieux, P. Thibault, and C. Perreault. 2010. Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol. Cell Proteomics* 9:2034-2047.

47. Caron, E., K. Vincent, M.H. Fortier, J.P. Laverdure, A. Bramouille, M.P. Hardy, G. Voisin, P. Roux, S. Lemieux, P. Thibault, and C. Perreault. 2011. The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol. Syst. Biol.* 7:533.

40

48. den Haan, J.M., N.E. Sherman, E. Blokland, E. Huczko, F. Koning, J.W. Drijfhout, J. Skipper, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, and E. Goulmy. 1995. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 268:1476-1480.

49. den Haan, J.M., L.M. Meadows, W. Wang, J. Pool, E. Blokland, T.L. Bishop, C. Reinhard, J. Shabanowitz, R. Offringa, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, and E. Goulmy. 1998. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid

50

cid polymorphism. *Science* 279:1054-1057.

50. Brickner, A.G., E.H. Warren, J.A. Caldwell, Y. Akatsuka, T.N. Golovina, A.L. Zarling, J. Shabanowitz, L.C. Eisenlohr, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, and S.R. Riddell. 2001. The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results from differential antigen processing. *J. Exp. Med.* 193:195-205.

51. Spierings, E., A.G. Brickner, J.A. Caldwell, S. Zegveld, N. Tatsis, E. Blokland, J. Pool, R.A. Pierce, S. Mollah, J. Shabanowitz, L.C. Eisenlohr, V.P. van, F. Ossendorp, D.F. Hunt, E. Goulmy, and V.H. Engelhard. 2003. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis (Lbc) oncoprotein. *Blood* 102:621-629.

52. Brickner, A.G., A.M. Evans, J.K. Mito, S.M. Xuereb, X. Feng, T. Nishida, L. Fairfull, R.E. Ferrell, K.A. Foon, D.F. Hunt, J. Shabanowitz, V.H. Engelhard, S.R. Riddell, and E.H. Warren. 2006. The PANE1 gene encodes a novel human minor histocompatibility antigen that is selectively expressed in B-lymphoid cells and B-CLL. *Blood* 107:3779-3786.

53. van Bergen, C.A.M., M.G.D. Kester, I. Jedema, M.H.M. Heemskerk, S.A.P. van Luxemburg-Heijs, F.M. Kloosterboer, W.A.E. Marijt, A.H. de Ru, M.R. Schaafsma, R. Willemze, P.A. van Veelen, and J.H.F. Falkenburg. 2007. Multiple myeloma-reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene. *Blood* 109:4089-4096.

54. Slager, E.H., M.W. Honders, E.D. Van Der Meijden, S.A. Van Luxemburg-Heijs, F.M. Kloosterboer, M.G. Kester, I. Jedema, W.A. Marijt, M.R. Schaafsma, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 2006. Identification of the angiogenic endothelial-cell growth factor-1/thymidine phosphorylase as a potential target for immunotherapy of cancer. *Blood* 107:4954-4960.

55. Dolstra, H., H. Fredrix, F. Maas, P.G. Coulie, F. Brasseur, E. Mensink, G.J. Adema, T.M. de Witte, C.G. Figdor, and E. van de Wiel-van Kemenade. 1999. A human minor histocompatibility antigen specific for B cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* 189:301-308.

56. Murata, M., E.H. Warren, and S.R. Riddell. 2003. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J. Exp. Med.* 197:1279-1289.

57. Warren, E.H., N.J. Vigneron, M.A. Gavin, P.G. Coulie, V. Stroobant, A. Dalet, S.S. Tykodi, S.M. Xuereb, J.K. Mito, S.R. Riddell, and B.J. Van Den Eynde. 2006. An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science* 313:1444-1447.

58. Griffioen, M., E.D. Van Der Meijden, E.H. Slager, M.W. Honders, C.E. Rutten, S.A. Van Luxemburg-Heijs, P.A. von dem Borne, J.J. van Rood, R. Willemze, and J.H. Falkenburg. 2008. Identification of phosphatidylinositol 4-kinase type II beta as HLA class II-restricted target in graft versus leukemia reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:3837-3842.

59. Stumpf, A.N., E.D. Van Der Meijden, C.A. Van Bergen, R. Willemze, J.H. Falkenburg, and M. Griffioen. 2009. Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity. *Blood* 114:3684-3692.
60. Akatsuka, Y., T. Nishida, E. Kondo, M. Miyazaki, H. Taji, H. Iida, K. Tsujimura, M. Yazaki, T. Naoe, Y. Morishima, Y. Koderu, K. Kuzushima, and T. Takahashi. 2003. Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.* 197:1489-1500. 10
61. Rijke, B.D., A. Horssen-Zoetbrood, J.M. Beekman, B. Otterud, F. Maas, R. Woestenenk, M. Kester, M. Leppert, A.V. Schattenberg, T. de Witte, van de Wiel-van Kemenade, and H. Dolstra. 2005. A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Invest* 115:3506-3516.
62. Kawase, T., Y. Nannya, H. Torikai, G. Yamamoto, M. Onizuka, S. Morishima, K. Tsujimura, K. Miyamura, Y. Koderu, Y. Morishima, T. Takahashi, K. Kuzushima, S. Ogawa, and Y. Akatsuka. 2008. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood* 111:3286-3294. 20
63. Kamei, M., Y. Nannya, H. Torikai, T. Kawase, K. Taura, Y. Inamoto, T. Takahashi, M. Yazaki, S. Morishima, K. Tsujimura, K. Miyamura, T. Ito, H. Togari, S.R. Riddell, Y. Koderu, Y. Morisima, T. Takahashi, K. Kuzushima, S. Ogawa, and Y. Akatsuka. 2009. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood* 113:5041-5048.
64. Van Bergen, C.A., C.E. Rutten, E.D. Van Der Meijden, S.A. Van Luxemburg-Heijs, E. G. Lurvink, J.J. Houwing-Duistermaat, M.G. Kester, A. Mulder, R. Willemze, J.H. Falkenburg, and M. Griffioen. 2010. High-throughput characterization of 10 new minor histocompatibility antigens by whole genome association scanning. *Cancer Res.* 70:9073-9083. 30
65. Spaapen, R.M., H.M. Lokhorst, K. van den Oudenalder, B.E. Otterud, H. Dolstra, M. F. Leppert, M.C. Minnema, A.C. Bloem, and T. Mutis. 2008. Toward targeting B cell cancers with CD4+ CTLs: identification of a CD19-encoded minor histocompatibility antigen using a novel genome-wide analysis. *J Exp. Med* 205:2863-2872. 40
66. Spaapen, R.M., R.A. de Kort, K. van den Oudenalder, E.M. van, A.C. Bloem, H.M. Lokhorst, and T. Mutis. 2009. Rapid identification of clinical relevant minor histocompatibility antigens via genome-wide zygoty-genotype correlation analysis. *Clin. Cancer Res.* 15:7137-7143.
67. Warren, E.H., N. Fujii, Y. Akatsuka, C.N. Chaney, J.K. Mito, K.R. Loeb, T.A. Gooley, M.L. Brown, K.K. Koo, K.V. Rosinski, S. Ogawa, A. Matsubara, F.R. Appelbaum, and S.R. Riddell. 2010. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplant with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* 115:3869-3878. 50

68. Mason,D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* 19:395-404.
69. Kessler,J.H. and C.J.Melief. 2007. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia* 21:1859-1874.
70. Popovic,J., L.P.Li, P.M.Kloetzel, M.Leisegang, W.Uckert, and T.Blankenstein. 2011. The only proposed T-cell epitope derived from the TEL-AML1 translocation is not naturally processed. *Blood* 118:946-954. 10
71. Schreiber,H., J.D.Rowley, and D.A.Rowley. 2011. Targeting mutations predictably. *Blood* 118:830-831.
72. Granados,D.P., W.Yahyaoui, C.M.Laumont, T.Daouda, T.L.Muratore-Schroeder, C. Cote, J.P.Laverdure, S.Lemieux, P.Thibault, and C.Perreault. 2012. MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA recognition elements. *Blood Epub March 21, 2012.*
73. Karosiene,E., Lundegaard,C., Lund,O., and Nielsen,M. (2011). NetMHCcons: a consensus method for the major histocompatibility complex class I predictions. *Immunogenetics.* 20
74. Tosato,G. and Cohen,J.I. (2007). Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 7, Unit.*
75. Bencimon,C., Salles,G., Moreira,A., Guyomard,S., Coiffier,B., Bienvenu,J., and Fabien,N. (2005). Prevalence of anticentromere F protein autoantibodies in 347 patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1050, 319-326. 30
76. Chen,W.B., Cheng,X.B., Ding,W., Wang,Y.J., Chen,D., Wang,J.H., and Fei,R.S. (2011). Centromere protein F and survivin are associated with high risk and a poor prognosis in colorectal gastrointestinal stromal tumours. *J Clin. Pathol.* 64, 751-755.
77. de la Guardia,C., Casiano,C.A., Trinidad-Pinedo.J., and Baez,A. (2001). CENP-F gene amplification and overexpression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 23, 104-112.
78. O'Brien,S.L., Fagan,A., Fox,E.J., Millikan,R.C., Culhane,A.C., Brennan,D.J., McCann,A.H., Hegarty,S., Moyna,S., Duffy,M.J., Higgins,D.G., Jirstrom,K., Landberg,G., and Gallagher,W.M. (2007). CENP-F expression is associated with poor prognosis and chromosomal instability in patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 120, 1434-1443. 40
79. Sherry,S.T., Ward,M.H., Kholodov.M., Baker.J., Phan.L., Smigielski,E.M., and Sirotkin,K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29, 308-311.
80. Vita,R., Zarebski,L., Greenbaum,J.A., Emami,H., Hoof,I., Salimi,N., Damle,R. 50

- , Sette,A., and Peters,B. (2010). The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.* 38, D854-D862.
81. Endo,H., Ikeda,K., Urano,T., Horie-Inoue,K., and Inoue,S. (2012). Terf/TRIM17 stimulates degradation of kinetochore protein ZWINT and regulates cell proliferation. *J. Biochem.* 151, 139-144.
82. Ho,J.R., Chapeaublanc,E., Kirkwood,L., Nicolle,R., Benhamou,S., Lebret,T., Allory,Y., Southgate,J., Radvanyi,F., and Goud,B. (2012). Deregulation of rab and rab effector genes in bladder cancer. *PLoS. ONE.* 7, e39469. 10
83. Urbanucci,A, Sahu,B., Seppala,J., Larjo,A, Latonen,L.M., Waltering,K.K., Tamela,T.L, Vessella,R.L, Lahdesmaki,H., Janne,OA., and Visakorpi,T. (2012). Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer. *Oncogene* 31, 2153-2163.
84. Grinberg,M., Schwarz,M., Zaltsman,Y., Eini,T., Niv,H., Pietrokovski,S., and Gross,A. (2005). Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell Biol.* 25, 4579-4590. 20
85. Katz,C Zaltsman-Amir,Y., Mostizky,Y., Kollet,N., Gross,A., and Friedler,A. (2012). Molecular basis of the interaction between proapoptotic truncated BID (tBID) protein and mitochondrial carrier homologue 2 (MTCH2) protein: key players in mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 15016-15023.
86. Yu,K., Ganesan,K., Tan,L.K., Laban,M., Wu,J., Zhao,X.D., Li,H., Leung,C.H., Zhu,Y., Wei,C.L., Hooi,S.C., Miller,L., and Tan,P. (2008). A precisely regulated gene expression cassette potently modulates metastasis and survival in multiple solid cancers. *PLoS. Genet.* 4, e1000129. 30
87. Andrews,P.G., Kennedy,M.W., Popadiuk,C.M., and Kao,K.R. (2008). Oncogenic activation of the human Pygopus2 promoter by E74-like factor-1. *Mol. Cancer Res.* 6, 259-266.
88. Xiang,P., Lo,C., Argiropoulos,B., Lai,C.B., Rouhi,A., Imren,S., Jiang,X., Mager,D., and Humphries,R.K. (2010). Identification of E74-like factor 1 (ELF1) as a transcriptional regulator of the Hox cofactor MEIS1. *Exp. Hematol.* 38, 798-8, 808.
89. Yang,D.X., Li,N.E., Ma,Y., Han,Y.C, and Shi,Y. (2010). Expression of Elf-1 and survivin in non-small cell lung cancer and their relationship to intratumoral microvessel density. *Chin J. Cancer* 29, 396-402. 40
90. Ding,R., Lin,S., and Chen,D. (2012). Association of NQO1 rs1800566 polymorphism and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Int. J Colorectal Dis.* 27, 885-892.
91. Jamieson,D., Cresti,N., Bray,J., Sludden,J., Griffin,M.J., Hawsawi,N.M., Farnie,E., Mould,E.V., Verrill,M.W., May,F.E., and Boddy,A.V. (2011). Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant do 50

xorubicin and cyclophosphamide therapy. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 808-819.

92. Kolesar, J.M., Dahlberg, S.E., Marsh, S., McLeod, H.L., Johnson, D.H., Keller, S.M., and Schiller, J.H. (2011). The NQO1\*2/\*2 polymorphism is associated with poor overall survival in patients following resection of stages II and IIIa non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 25, 1765-1772.

93. Patrick, B.A. and Jaiswal, A.K. (2012). Stress-induced NQO1 controls stability of C/EBP $\alpha$  against 20S proteasomal degradation to regulate p63 expression with implications in protection against chemical-induced skin cancer. *Oncogene*. 2012 Jan 16. doi: 10.1038/onc.2011.600. [Epub ahead of print]. 10

94. Wakai, T., Shirai, Y., Sakata, J., Matsuda, Y., Korita, P.V., Takamura, M., Ajioka, Y., and Hatakeyama, K. (2011). Prognostic significance of NQO1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int. J Clin. Exp Pathol.* 4, 363-370.

95. Yang, F.Y., Guan, Q.K., Cui, Y.H., Zhao, Z.Q., Rao, W., and Xi, Z. (2012). NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) genetic C609T polymorphism is associated with the risk of digestive tract cancer: a meta-analysis based on 21 case-control studies. *Eur. J Cancer Prev.* 2012 Sep;21 (5):432-41. 20

96. Huang X, Dong Y, Bey EA, Kilgore JA, Bair JS, Li LS, Patel M, Parkinson EI, Wang Y, Williams NS, Gao J, Hergenrother PJ, Boothman DA. *Cancer Res.* 2012 Jun 15;72(12):3038-47. Epub 2012 Apr 24.

97. Oishi, K., Okano, H., and Sawa, H. (2007). RMD-1, a novel microtubule-associated protein, functions in chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 179, 1149-1162.



【図 1 A】

1 gagaacagaa ggggggaat tgggacggc tggcgctgc gggcgcttg aattagactc  
61 tgggctcag ccggcggaag ccggcgaga actgactct ccgagaggtc gtttccctc  
121 ccccgagagc tggagctgact acaattgttc gatttcaatg gtttcaatg agaaagagc  
181 tgggttttg aagattgaa aagaagggcg ccttcagag acttcagaa aattcaagc  
241 cttgaagagc aggttgacaa actgaagag aagaaagagc aaagcgactt toagctggc  
301 agtctcagc ccgctgcga gaagcaaaaa cagaaggttg aatttgaaaa aacttgaaga  
361 acaactctga aaagagagaa tcaaatgttg atgtaaatat gtgaagagc ggaacaaact  
421 aagcagagaa tttctaatc actcaactc aaggtacac aagtgaatt ccagagagga  
481 caactgaatt ccgcaaaaa acaaatgaa aactggaac agactgata aaggtgttaa  
541 tctgaggtt aaagagcga aaagctgag cagtgctgag atgctcttg gattcgac  
601 aatcacccc aaaaattttt tacaactca ctacacaaa gtcaatatta tagtgttcc  
661 aagttagag atcctaaaa aaaaataat aaagaggtg aagaagaaa aagattagag  
721 gcaagagttt aagctctgca ggtcaaaaa gaaagcaga actctccaa agccacatg  
781 aatcacggc aagtgccgc gtaactggc tcaactcgt tgttctcag gaagcagag  
841 aagacccaa gctattcttc actcaattt caaagaactc caattagag agattctct  
901 gacttactat tttctggga aagaaagtg actcaactc gatcaactt coaatgaag  
961 aaagagatg ctatlagag tttcttgac aattctaga gtctctctt ttgttgaa  
1021 ttaaaagc agaatcaga gataaaca aagattaat agttgaa actgcgtgaa  
1081 ggaatgaa aagaattgaa agggcaagt atcaatttc aagaactcc actcaaatg  
1141 ggaagcga aagtgaact acttgaasa gagaagttt tgaacaaat taggttaga  
1201 ctatgagaa caacagcga atacagcag ggtcacaac agtactcgt attgacaa  
1261 aactgaaa aattgacga agatttgat tgcacgagc aaaaagcga aagtgcaga  
1321 tgtctctg aacwaaaat taagwaaaa gaaagagat tcaagagaa gctctccgt  
1381 caacaggt cttccaaa actgacagc ggtgctcct agatgaagc cagactcac  
1441 caggagtac agaacgaa gaatacac aactcagc aggtcagc gataaactc  
1501 acatcagta aagaacagt aaaaactt ttggaagt tgaagaaa gttgtcaga  
1561 gctgaacag cgttcaggc gactcagc aagagagat agtgagagc aagctgagc  
1621 gaactgagc aagaacaaa cttcttag agtccctg agaaagagc aagaagatc  
1681 tgcacctg aggaacac caagaactc aaaaaggtt taactcagc coagatttt  
1741 gcaagaaa gaaagcaga gaataact caggaacaa ttgtaaga tcttcagaa  
1801 aaaaatac actctgctc ttgaaaac ttgaagctg tgtgtcgt  
1861 cttgaagagc aggtgaatt tctcaagc acttgaaga aagaagaaa tcaactgat  
1921 caacttaag taagttaag caagacagc aagaagctc aagctgct gagtcttta  
1981 gagttaaaa aagaagata tgaagatg taagagaaa aaaaactgtt tcttgttg  
2041 aaagtga aaaaactc tttaactag atggaatcg aaaaagaaa cttcagag  
2101 aaaaatac acttgaac ttgtctag acacagaaa taaaagtca tgaatacac  
2161 gagaagtaa gaactgaga gatggcaga gaaaactaa gttcgagat caaagaact  
2221 caacaggt tagacagta gtcaggtg gtagagac aagaagac taktatgag  
2281 ctacagcag aagtgagtt ctacgtcg aactcagc aagaagaaa aactatgt  
2341 ttgaagac ctcagctac ttggaact ttggaactg aaaaacagt cagttatg  
2401 tcaatgaa taagtga aagccgtgt tacaagat tgaactgca atgatagag  
2461 ctcaggtat gtttaaatc caaagtgt ctaactgt caatgaga aactcagc  
2521 agtcttttg ttttgata gaaactgct atgactaact ctttgcaaa tataatttga  
2581 gaacagaga coactctc agagagagt gaatgctt tagaagca coaaactcg  
2641 aaaaattg coactctca aaaaatagt gatcaactt aatttact agactcaga  
2701 aaaaatga actcagact caaaagag ttgaaggt gtagagc aactcagc  
2761 atagaagaa actcattga agaacagc atgactaaa tttgttgc tgaacagat  
2821 caggtcatt gaagttaa ggaacagt ctcgctcgt tctgtgtg tctgtaaac  
2881 ttaagtcgc ttgaagaaa gtaaaagag ctaacttt taacttga aaaaactc  
2941 gggcagagc atgactaga ataaaaagc agcaactc taactgaga cttctaaag  
3001 gactcaca tttatcga aacctaac ttggaaga aaaaatag tctcatcgt  
3061 tctcaata aagagaaat tgaagatg actcaagaa actggctgt caagtaaat  
3121 aatgactc taactaga gaagtga ttatcaga aggtgtct tcaactgc  
3181 tatatagc aagaagaaa aagacttca gattatct atgactaaa gaagaaaaa  
3241 ctattttac tacaagagc tgaagaaac ggaagctat atgaggtct tagtcaaaa  
3301 tacaagagc cttgaagaa gaattcaa ttgaatgt ttgaatga atgactgt  
3361 ctttgttaa tacaagaaa agtttgaga cagtaaaag aagcattg aagaagac  
3421 caagattct tacaataat agactgtt gagaagaaa atgaactgt gatgtagag  
3481 ttggagagc tgaagcagc tctgaactt gagtgcagc ataacaaa caatttaag

FIG. 1A

【図 1 B】

3541 agcgaggtg gttgtttaa gcaagaact atgactttaa aggaagaaa aaaaanaatg  
3601 caaaggaag ttaactgact atacaagag aatgacagc tptagagt aatgagat  
3661 aaaaagaa gttcaaatc agatcaga caattaga actcttga agaaagagc  
3721 agtgagaaa atcaattga ttttaaac cagatgac toagattt  
3781 ctatagatt ataatgca gttgtgaa ttgaagct tctcaaaa taaggaatc  
3841 aaaaactc aagtgagaa aagaagaaa gttgtgagc atgactga gactatga  
3901 ggaactctt aaacagaaa ttggaagc atgactac aagaattg tggcttaa  
3961 gactgtgaa tagtgagga aagaagatc atttcagggc cttatggt gtcaacagt  
4021 caaagaaa atgcacact toagactct ctgaaacaa caatgaaa cttgactgag  
4081 ctacagaaa atgcaaat actcgctg gaggaaatc tgcacagaa aaaaactc  
4141 gattcaagt cagaatgat caagcaact aggaatagc cagaagagt aggaacata  
4201 tcaaatga taaaattt aatgatgac agtgtctc toaatgtc atgtatgaa  
4261 gactacagc gagtgaat tgtgacaa coaatgac agacacct gttcttgg  
4321 caatgagc agatgaatc tgcacagc tptcactgt cagcaagaa agtcaaat  
4381 caatttgcg aactgaga gaaattctc tottcaaa gtagcaaaa aatttaact  
4441 gatcagact gtcagatg ctaaaaatg tcaagctgt agactatg tgaactata  
4501 aagcagaaa atttgcct gtcaacaa ctcaaaact ctcaagctc cttgtgag  
4561 aagatgagc tgggttga ggaaggttc gttccatc tgcactc ttgtgtgct  
4621 gacagctc cttctagagc ttggagagc tctctctt acagactgt tttagagag  
4681 aagagata tctctttt gatttata gaaggggtg tttcagaa cagatgag  
4741 ctatgagc ttttgcag cagctgag gaggaaatc tgcacagaa aaaaactc  
4801 tggccagc cagaaggtg tgaagagt gactcctt gtaggtta cagagactc  
4861 ctggaagc tagaagaa atggaactc aagggata tgaanaata gaaactaa  
4921 gactcagc agtatagc ttctgaagc cagaagctg actcactag gaaagatg  
4981 ttgcagaa atgactgag ccaagagc ctcaacagc tgaactga gttgtgctc  
5041 aagttgagc cagaagaa aagacgaa caactgac atgactga agactgaa  
5101 ctccagact aaggtctga ctaagtct cgttcttg tttgactga cagaagat  
5161 gttattcag ggaagaa gactgagc atcaaaa acaactc actcaactc  
5221 aagaacac caaagatga tttctagc atttgtga agactgaa cagagctc  
5281 actataga ttgaataat aactgagc ggtgagta aacacagc agagtgtc  
5341 ggggaact ccaagatc caattagc actcagag actcagagc cagagctc  
5401 ctgaagta tttctgact gttcttct gttcttct cttgtctc tatgtctc  
5461 ctgggagc aggaagtat coactatc coactgagc taaaagagc atcaatag  
5521 aatttagat taactatg gatagagc cttgacagc acttgaag tttgttaat  
5581 gaaatgaa aatgactc aaaaactc taagagc taactaat gaaactaa  
5641 gaactga tagaattga aaaaattg ggggaacta aagaanaaa ctgactga  
5701 agtgaataat tgaattat tcttgtat cacaagat tactcaag atgaataat  
5761 tctgaagc tcaattctg ttgaagat cttgagta aatcagta tgaattat  
5821 ggaatagt tggcaggt ggaaggtg ggaaggtg gttgagat gttgagat  
5881 gactgata gactcagc ggaagact agatgagc atgaagct cactgagc  
5941 gctgact aggtatga aagagagc ctatgttg aagaagaa tgaataag  
6001 cagaagta ttgtcagc ttgaagaa cttcagtg tcaacagc tgaactga  
6061 cttgtgag aattgata tatgcaaa aaaaacagc tgaactga gttgtctc  
6121 aaaaagag agaacaaa agactgag tctcaaaa agagtgtc coactgag  
6181 caggtgagc aggaaggt gaagaaaac aagcaactc tcaagattt gctctgat  
6241 ctgaagta ttgtcagc tgaagaa caagagat agtgcagc tttgtgag  
6301 gactcagc actgtctt gaaaactc gactgtga aaaaactc coactgag  
6361 aagaagaa aattgctg aagaactc gaaactgt agactgag actgagat  
6421 gatcagaa agtgactc ctaagagc ttgagagc cactgtga aagaagat  
6481 ttgactga ttgaagaa caagagat aacacagc agtgcagc agtgcagc  
6541 aaaaagag ttgactga ggcagtag aagaagagc tgaactgag aagaagat  
6601 aagaagagc agggagaa tgaactat aagaataa tgaagatc tgaagagat  
6661 ttgagagc ttgaagaa caagagat aacacagc agtgcagc agtgcagc  
6721 gaatgaga ctaaaaaa acaaatga agatgaga aagactgag aagactgag  
6781 ttgactgag ttgactgag atgcaaaa gaaatgta caaaaactc aagaagaa  
6841 cagactgag tgcagatc cttctctat cttctctat tgaagatc gtagaagat  
6901 aagagagc gtagaagc gtagaagc gtagaagc gtagaagc gtagaagc  
6961 aatcagta aggaagta tgaagta gactgtgt gttgtgaga aagaattg

FIG. 1B

【図 1 C】

7021 aagggcagc aagagatct agaccaca atagagagc agactcagc pagaaatagc  
7081 attgaagagc tgaagctct cttgaaggt gatgaagc agtgaagctg gttgagctg  
7141 caactgaag aagtgaaga tcatgagc ttacttaag gtagagta gaaacttgaa  
7201 agagagtagc agatagcagc gaaacaaa gactgagc ctttgagc aagaactcc  
7261 aagaagagc tagagactct aaaaagaaa atagagagc ttgaagagc cttgagagc  
7321 ctgaatagc attgtgctc taataggt atagagta actcaaaa tgaattgaa  
7381 aagaagcagc agcgaatc tgaattaga ataatcaat catcattc aaaaatttg  
7441 aagaagagc agcagagaa agtcaagct aagaataat caactgagc aaatgttg  
7501 cttcaaacat taataaaga gtcactagc agatgagc coactgata tcaactgaa  
7561 gactgaagc coaagagca gaactcagc agtcaagc agtcttga acttgagag  
7621 gctcagtc tcaagagct tgaagagc tgaagagc aaaaatct acatgttt gaaacttca  
7681 gtagagc tcaactga agtagagc ggaagagc aactgagaa gaagtagaa  
7741 gaactcagc gactgaaa taaattca gtaacagc aggtgtct tcaactgc  
7801 cagtgagc agagacaca actttgagc ttggaagc tagaactgaa aatctgaca  
7861 ggaagagc agcagagc coagctga caatcaaaa agcctctc gaaagcaga  
7921 ttgaagagc tgaagagc ttgaagagc ctgaagat aggtgact coactgata tcaactgaa  
7981 gcaaaagt cttgttgc taaagttaac aaaaagctc caaagaa tgaagtag  
8041 aggaagagc atgagagc aagaagaa cgaagagc aagaagac cagtgagag  
8101 aaaaagc tagtgagc gtagagc cttgtgagc aagaagagc aagtagagc  
8161 caactgaagc agtcaactc aaaaatgt gaactgaa agcagagc tgaagagc  
8221 aagaagagc tgaagagc aggaagct agagagaa tagctgata tgaactgag  
8281 cttatgagc tgaagagc aagaagagc tttgttgc acaacaaa aactgagc  
8341 gtagagc agtagagc agtagagc ctgaagat aggtgact coactgata tcaactgaa  
8401 aggtgagc tagacttt aagtctagc aagaagagc toaactaa attgaagc  
8461 actcagc ttgaagc attgagaa acaagagc acaagagc acaatgaa atagaaat  
8521 cagtgagc agtagagc agtgcagc ggaagagc aggttgc acaactga  
8581 aaaaagc agtagagc agtagagc agtagagc cttctaat tgaactgag  
8641 cagtagagc aagaagagc tagctgtg tagcagagc toagtagc acaactgag  
8701 atcaagagc tgaagagc tttgagc aaaaagagc agcagagc atactgag  
8761 agtactgt cttgtgagc agtagagc ctgaagat aggtgact coactgata tcaactgaa  
8821 acaagagc coactgt ttcagagc tcaaaaagc attccagc agtctgag  
8881 ctatgagc tttgtgagc acaactcga atccctgt tcaactgaa gattgata  
8941 tctgcaaaa atagagc agtagagc aagaagagc ggaagagc agtagagc  
9001 agtagagc acaactgagc tttcaaaa aagaagagc aagaagagc  
9061 agtctgagc acaactgagc agtagagc gtagagc tgaagagc ggaactgag  
9121 aaggtgagc tgaagagc tgaagagc tgaagagc agtagagc atactcga  
9181 gtagagc ctagagc tgaagagc ctagagc ctagagc gtagagc  
9241 tcaactgag ctagagc aaaaactc gtagagc coaactgag agtctgag  
9301 agtagagc aagaagagc agtctgag ctagagc coaactgag agtctgag  
9361 gtagagc coaactgag agtctgag coaactgag agtctgag coaactgag  
9421 agtagagc agtctgag gtagagc gtagagc coaactgag coaactgag  
9481 ctgagagc agtctgag gtagagc gtagagc coaactgag coaactgag  
9541 coactgagc agtctgagc tagagagc agtctgagc tagagagc cttgtgagc  
9601 agtctgagc tagagagc tagagagc atctgagc agtctgagc atctgagc  
9661 ctgagagc coactgagc gtagagc aagttagc gtagagc gtagagc  
9721 tgaactgagc tgaactgagc tagagagc ataaagagc gtagagc cttgtgagc  
9781 atctgagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
9841 caactgagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
9901 atctgagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
9961 tctgagagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
10021 caactgagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
10081 tagagagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
10141 tctgagagc tagagagc tagagagc ataaagagc gtagagc gtagagc  
10201 tttttagc tttttagc tagagagc tagagagc tagagagc tagagagc  
10261 gttttagc aaaaagagc cttgtgagc tagagagc aaaaagagc aaaaagagc

FIG. 1C

【図 1 D】

1 nswalewke giptraigkl qelagldkl kskqgrgq idlaawkl gkqkvenkt  
61 gktnkrng rlnkale rlnkale gkqkgrng gktnkrng gktnkrng  
121 okeleraag aqasvaln pntpkift tptgagys gkyedek nykvear  
181 leawkaiga kkaatgipa tmndrlnh gassvfwl gktpshls nsgtprlr  
241 faayfagc wtparavlt lgrdnars ftnssphl gkagpkl rlnkalelr  
301 lghwagc qnklqkl gkewali ekwlnkr dervrtay gkactkyl  
361 gkplkited lscqmae arcalgkl ekexfgeel srqsfstl dceklmkr  
421 ltelqkqn nhvqlael kltvqgle nleefkgl cnaefgagc gkwnlrs  
481 meekeml khaeagc ewleek nklngc nfeemkag gkwnlrs  
541 qkngene lteklklav alskedrc gdlkrehn leglnklk tekeskls  
601 alekktey ekexkfls kwnkexnl tmeseknl sklnhltc lktgkshc  
661 ynwrtlm drcnlswlr nhwldks vewtqgl mlqkagcs dkhkshln  
721 nklrktglt gredlekl llnleldd tcyghlwy esrlklk dslvndh  
781 qrelldqg pnhshfn lqegwmpc rcorleag spknsaln rvdlele  
841 skqmsldl kqcewlvk geienlnk eqmgsfva tskrlklk dshagvva  
901 etlsalek kqlglnkv etqekgl kshlnhls lklgldet lskkemes  
961 llnknele kltgklt elnslngk mlqkagc aynderec lskldkyl  
1021 eklllqre etgnyedls qkykaqcn skcllnkc tlnckrnc leklkeaf  
1081 shgftklk faeernqlc leltvqal ractndhpn skesaglk leltkegn  
1141 kmkernld kqeglnkv kkkcncplc seplrvskc rseengcn kpmlelv  
1201 lldsyngal vqlsmrln elklqesek kclgltet lrdetlcn qdmgqslg  
1261 lkdceidne kysghels tagnhdhlg clstlmkl nekicell kqeylvte  
1321 lndersct atkrmaevg klnelkln dshgllgh vedlpggfv egngpghc  
1381 lglndeny ehllldcv qhlaelq fjlqelkl lhhghcra kmeqlyrv  
1441 skanelvl tnlrfgdl vxeagglee gvlpslsc vpsdlsel cagstfyal  
1501 etgdelms nleqvana cvedfesc lqenlrkc tpaapagc elsklcvr  
1561 gkleelek egkmlnke lqelavls argldolr glaneegvc gkltlcm  
1621 oklaekky gkdelavc arlgldgl sallglldc edlsgnrc cktlshke  
1681 ttertkphv hqldckag dlnldict etgavkpte cagagpdtc yepgdktl  
1741 gscaciles fagpalnvp dfgmdhln nqlrvets nenrlhvl edrkvswl  
1801 lnmekdel lhpvgvln kscleek lvgelkne dneklys cshg lgrv  
1861 etaglnel ehndksre dglmvnag dwkerfnd enelrize kasilbaly  
1921 lndevlvt ekleklede nkvkvile ewlvvtr rqlrldtlc kstlaldgl  
1981 sekmevte lshgveln ctgaaevk ekteklgtl sdvskldk tklgklgl  
2041 ekdgalst keclengag lmkellvk eesglgls esdyklns kalsalek  
2101 gfarlrat qewhqlrv lsklrvtla deklghla klkerend skldkve  
2161 relgseeng elvlidans kaevctktg leamrklv feldlvtrs ekentkldg  
2221 ekhplnd klldfkl ekexagvl kseektava lqglklne avagllg  
2281 lmkategld plleehqlr nleklrkl adekklv lqglkeseh alklgrvn  
2341 lreleart nehaalee nkvvetlk alktggl rglldvrt rseklntne  
2401 lqkgrlre lelnsfen lqkagvkv gkukstam enlqkglc nekvalnd  
2461 gskaktem lasepcel ekadlpd ekwnrvlg smvllgcv edskklsk  
2521 deaslrnk lqdgqelq lqveghql wkeplrn ltleaglk vlgknaag  
2581 clvqlvay knlelel kmdksfvk vnkataek lqemhnaq ktaalels  
2641 gekrlagel qlleeksk kglkeltle nsklkald nhkdvskc kvrelvay  
2701 lrhaekkh galldnkg veyvltg ktskeels sgklldlk skeeklnl  
2761 katgtleel ktkmdnly vnlkener agkmlkcl skokleeek klkelsq  
2821 asekgtgt vndkvtel teikelkl sektaede ldkvklkl hekkekem  
2881 lskvclhes gskgskrc pllgvpgv slpvtvtr lsgnkagc krgsklve  
2941 ngrcptpt eafkaka vmsghpad tefetepg lpykvkfga dtpktapy  
3001 lrrrtmtr tprlaqlk alslpklc naesekpa gskrvskc agsrpavst  
3061 lreptvav pvmbrperv tdspegrlv krglvapq aksjengen ckrv

FIG. 1D

## 【 図 2 A 】

1 gatttgagg aggcagctga actcggcgc tggaaaagt gaggcagcgg agacagaggg  
61 gaaagctga ggcacagag tootggctga ggtgcagcg atcttggaac ctgtagcgt  
121 gaggagag ggcacagct ggcacagag cctgtgtgag ttgtgtggg actccagaa  
181 gaaagagag ctgctctga ggcacctga ggtacagat ttcttgaga aactctcgg  
241 tccagagag actgctagg gtctgcacc ctgtgtctt gaagaacaga gcgcagagaa  
301 ggcactgga gctaaagaa atagaaaga gctgaagcc actcaaggg agcaactga  
361 ggcactaaa atgtgctca ccaagacct gactcagtg gaaagagcc agagaaagc  
421 gacacactc cgggaagct ttgacagct ccaaggcag aaacaatgg ccatggaga  
481 agcagagga gtccagaaat ggcacagct gcaacagag aagcatctg agcatctgg  
541 ggggtgtct gcagagtgga gggagctaa gacagagct cagcagggc ttgacaggt  
601 gtctcagaa ctggaacac tgaagcaga ggcgaacag gacgggaaa agotgcagag  
661 gtatcagac ttctccagc ttctgtatc cctcagaggt aagctgtgtc tocttaggc  
721 tgaagctga gcagaaatct tccagatga taacacacag cagcagactc gacccagga  
781 gcagctgca ggaagacaa tggggagga cctgtgtgtc toctccagc ctgtgtctc  
841 acaactcgt ggaatgtaa atttgcact actctctga ggaacagc atggagaag  
901 atctcagaa aggcctctga ctctccacc ctccacaca toattacag aaagactgt  
961 aactcagag ttacgttga ttctgacta ctccacaga agctctgga ttgtgtgtc  
1021 aaactcctg gatctctgc agttgtgat ttgtctact toatagtct gcagaaaca  
1081 ctattatcc agatctcag aagcaataa catgacaga gctggagctc gtttgaacac  
1141 aggtgtgga gatggggag ggttctggc cttgggctc ctatgatga gacactgtg  
1201 atttactca agagagaga gaactgtta gggagctgt tatatgtgg agatlaatt  
1261 tattctgga tocaattgt ttgttgact ttctttgtc ctgaagttc tgcgtgga  
1321 cagaataa acagtgctc catgtactg tttagagag taacagatg tgttaactt  
1381 ctgtgtact ttgtgtgtc tatctaac acttctgat cagctgttc agtgtctct  
1441 ttattatct cttttcagc actcagag ttgctttct ctactcatc tgtatgttt  
1501 gtttactga cctcagtg taactgtga ttcttcact toctttgtg gattgagaa  
1561 gatgactct ttgttgaca toctactct atagactat caactcagc atttgactt  
1621 ttattgttt toctcaata attttagg ttactactt aaactaaaa aaaaaaaa  
1681 aaaaaa

FIG. 2A

## 【 図 2 B 】

1 meaaetaaa aaeviaeva gilepvlgc epakpily efvvdgkdk kliscqlva  
61 dflglilae dtkldpila aderkakal atyrehvial klglkltla  
121 neaqrkttg lraezglia kcgmanekr avngedqlg ekhlgilaev aaevrctgt  
181 tqqldvzvg klnglkqae qerdklqry tflqilynt klilpseaa eaelndpdk  
241 qgtrpqqe tgdtrgdpk vakfagvlg agdvnp

FIG. 2B

## 【 図 3 A 】

1 gaagcctgc cgtttctgg gggcagacg gggggcggg actggcggg gaagcctgc  
61 ctgtcgtgc cgtgcggcg cgcgcggcg ggcacagtg aacgcggcg cctggcagc  
121 gactaagac aggtgcacg ggtcttggg ttgtctcgg tccggcgcg tccggcgcg  
181 ggtgcacac ttggcagcg ggcacagc ggtcctggt gtcctggtc tccactctg  
241 tccagcggc toatgtact gaaatgctc atcaggtgt gatatgacg tctctctca  
301 acaatagac gaaatattt ttggcgaaa gttgtgcag gttcctggt cttgttatc  
361 actcaaca ttccagat cgtatggcg cgtgtgtgt tccagaggt aactcaaga  
421 ctgtgttgg ggtcctggc aactgtgct catgtaaa ttctacaga ttacagag  
481 agtcaagag gtgagaggt aggcctgga aatgcagaa agaaagctc atctctctt  
541 aacacgtta tcaagaaac aactcagag atgactgct gttctgctc tcaactcct  
601 acaactcct tccatgtgt caactcgga tctatgtac agttcattg cagagatcc  
661 aagactgtg gactttgta tccataata acaactcct ttggagggg cactctaga  
721 ttctctggg gttctgttc tgcctctca ggtgacatc ttctttgtg gctgtgtga  
781 cctgtgtgt tctgtgcca tcaactatga cctggagtg aggtttctc ctatgaga  
841 atgaagatt attctcaag tgcacaga ttitttoga gttgtgac ctatccctt  
901 ggtgtgtct ccaactatt ggtctcaac aactgtgtc ttgtgtgtg atgcctcct  
961 tactcccaa tatatagc ttggatagc ttgtgtgca tgcacaaa agagaggt  
1021 atggcggcg gaaatagct attttccgg aaggtgctc ttgggaac ttattgtgt  
1081 gactgaaaa tgttaattg aagatgtgg gcagggacag tgcattctg gttctccag  
1141 atgcacaga ttatggaga gaattgtc ttctataga ttgtgcggc ttitttata  
1201 aacttaatt cttgggaaa ttacgtgtt tgtgtgtgc ctttttgtt cttctctca  
1261 gcaacata acttaactc gatactccc cttaagatt ttgtgaatg gatattttg  
1321 ctccaaatc ttattttact taacagag ggaaaaaag ttgtatttc ctgaagcac  
1381 aggcactgt cactgtatt ttgtgtctc aatttaagg ttgttaaat gaagataga  
1441 attccagaa aatggagaa taattttga aaactaaa aaactcaaa attaactat  
1501 atggagagtt atgaattact ttttttggg tagacocaa atgtcagta gactgaaca  
1561 gaactgact ccaattagc ttotaagac atttactga cttgttgtc cactactaa  
1621 gaaaagaa gtaactgt acttaactc agaaactgt ttgtgagtc tgcctctca  
1681 gctgttatt gaaagtaat aaactgac ctacagagg cctctgacc tactagtt  
1741 caagagctc cctgaaaaa ataaatag ataaaggtc agcaacaaa aagaanaaga  
1801 caactaga aataagaa gatttgaaa ggaagtata tggacttt ttctcaag  
1861 gaattttg tttaacaa aatatgaa agaatgact gcaagctaa ccccttctt  
1921 taagagcaa gattttgca gtgtaaat taacacata agtttaatt atataact  
1981 ttgttgtt cagttttg ttgttttc ttitttgt ttgttoga gttgaatgt  
2041 ttgtactc ttgtagag cttgaaag atatttga cctactgtt gttatgca  
2101 acccaagc aactgtgtc ttgacatgc aacccatc atgocaa cctagtag  
2161 catgtlaaa ttatagag gaasaaact actttggag aaataaat taactcag  
2221 caataagct cttgtactc aggcctcaa aaagacagt taactgctc taactaga  
2281 aagctgtgca ttatctact ttatctact ttatctact ttatctact ttatctact  
2341 taattcgtc ttctgtact ttctgtca ttctgtca aaacccc actgaata ttgactga  
2401 agagagca ggggtctct cctccctgtc gggtttga agtcagatc gactgctgt  
2461 taactgtc ttgtgtct ttctgtct ttctgtct ttcaaatg atactact  
2521 ttcaacta ctctgtct ttgtttat ataaaaat ttgtgtca cttttctc  
2581 ccaaaaact tttaagtaa gatgtctg gaaatgtc catgtta

FIG. 3A

## 【 図 3 B 】

1 madaasvll ggltilagp lmykvllqv gyeplptg knfgrqvq lplfsyagh  
61 lallogrgl fglpolic gvtgvnhk vlnyqeadk geelgpnvq kevaaevdh  
121 kettrema reatrlth fvltlrmv flgrsqsc glodistly reepliffa  
181 glvrlpldi lailensia ylvntayds gvatmenks ysqvgtffa smityvlv  
241 snlmavnng lagggpyap lytkwidow mlqegmnr gnelfrkvg fktgyodlk  
301 nil

FIG. 3B

## 【 図 4 A 】

1 agaaacact gtttctatg atactccta agtgaagca agaacacac tocccaact  
61 taccaggagc attttaacg ctaaaactg toagattgt ttattttto aagtcacaa  
121 gacatagag aagaactact tgaagcaga gacagtgag aagaagaaa ttgcagaaa  
181 atgtctoca atgtctgga ggcacctga ggtacagat ttcttgaga aactctcgg  
241 aaactctgg tacaacta ctccacagc agagctagg gtttttacc caactcact  
301 actgtatttt gctgcctat actgtactt ttgtgaatt ttctctatg gacttaagg  
361 gaaactgct atattgtgtc cttgtgtca acagaagac ctgattttg aattgtctg  
421 taactgtc gactgtgact gactgtgact ttgtgtgtc ttgtgtgtc gactgtgact  
481 ggaactgct cctgtgtg actatctca tagttatgc cgtctagct gttgtgaaga  
541 gcoraactg atgattatg aggtctact gactgtgtc gaagaagaa toatagaqa  
601 ggtgagat gacatcacc ttacagtga actactctg ctatgaggy atgaactat  
661 taaactatc gactcagat agaacactc caattgact toactgtgc ctatgtctg  
721 tgaanaaga ataaactaa atatatagg ttaactgaa gatgacag ttgttgcacc  
781 atgacactc gttcctgca cattaagag gactctgaa gactgtgaa caagagact  
841 gcaagaaaa cctgcagctc cccgggggc ctactcaca gaaacacta agaaagaaa  
901 aggaagaaa actaaacac cagcagaca tctccacca actacgcaa atatatctg  
961 gaagaagaa acaaaagatg gaaagggaaa caactattt cttggaggt tttaactgc  
1021 actgctcag gacaagcta cttgtctaa ataatcag ttgcacagc gagaagag  
1081 ctttttaa ttgtggatt ctgaagctg gttcaggtg ttggggagc acaaaacaa  
1141 actgtatg aattatgga ccaatggag agactcag tactattac aaagggtat  
1201 tctgacaaa gtggaagtc aggtgtgtc gtatcattt aaapaatgc aaagaactc  
1261 tatataata aatgatgag atccagtic cagctagag ttctcagtc catcctatc  
1321 ttactcagc actcaaaa ggaactaac agacgtctg agatattct caactcag  
1381 ggtaaaaa ggcacactc cagttcaa acagggaa tttaaggtc caaacacaaa  
1441 agactcgtg gaattgac aactcaga agttttgag agatgagc cccagactc  
1501 tcaactcc actgactct tccagctgt cttatgata cagcagac aggtgtcgc  
1561 agggagga gactgaga ccaactcag gactgaga aacttaact cttcctgtc  
1621 gagattag actatagc actccacaa agtccgtc ttgtgtctc atgatatca  
1681 gactgtgact agtcaaac tccaaactc gcccactca cagttagtc cagcagga  
1741 tcaactaga gtaactgat ctcaaggtc tatttcaaa gaaactcag caactcagc  
1801 catgacgta ctgaagaaa atgtcatg gactcagaa agggcggct ctctctctc  
1861 aattgtctg ggcctgcc aggtcaga gttcctact agaatgtc agaatgtc  
1921 caatggaac gtaagtgag ctctctctc atctctcag gtaactgac cttgtgtgc  
1981 cttttctc cgaacttc agactgtgc toaccactc ggaactgaa toactcag  
2041 tatcaaatc caapaacaa aaactctac acaggaaga ggaagagag aactcaga  
2101 toattgaa gagaacact gaaagaga gacagcaga accactatg tgaattgat  
2161 gtcagctc aattgttta ctctcaggt agtatgaa caaaagaa accctcaga  
2221 caactctt tagttaat accaaactt atgaataat gttgttaat tgaactgat  
2281 caattatg cagactgct gattcaga taactttaa ggggtgtc aatttgtta  
2341 ttgttaaaa tagatttat ttgtcttg tttagagag gaagaagc caactgttc  
2401 ttgtttat cttaattgt cagactcaa ttgtgaaa aagcgatt tactatga  
2461 agactctt ttgaattt lattttgt gatactat aagatttt aagtttctt  
2521 tctaattt aactgtat agatttctc attcttctt aaacagaa ctlaactaga  
2581 agaacagc aatcttat agaatatt ttactctc ttgttagt taactgtt  
2641 ctctcaaa tgaagaaa atgtcatg gactcagaa agggcggct ctctctctc  
2701 gactttagt cctgacta tataatag aactagat atgagata acatgaaa  
2761 ttggaggtc gttgtatg gtagcctg ttccagag aggtatga aaagagaa  
2821 gctaagat gaaactoca ctactcag atgaactt gacttctg aacttagtt  
2881 cctccata aaggaaga ttattgat tagactat gatacaact ttctctcta  
2941 gttcaatt tttaactc atactcata ttctaaagt atgcaata atactatc  
3001 aggttatt ctatgtag aatgacaa ttctcaga gaagaaag acccaaaa  
3061 atattact cttgtatgg taagctgc ataaactc toctaaaa ttgttact  
3121 aactcttg ccaactgtc ttgtgtcct attagaac gttgttgt aagtcaaa  
3181 cagactatg ctactagg agactcaga cctctcta agggagaa agacagaa  
3241 aggtctgg aactctgt agactcag ttataaag atactgtc tatattgt  
3301 atcaatttt actggggg gacttggg ggtgtgaa caaagaaa atatatcc  
3361 aactctga atgaagtc tttagata cttcttcaa tgaataat gtaacttaa  
3421 tgcacaga aaagatgc ttctgaat ttctgact aaacaaat ttgtatgt  
3481 aaaaaata ttatttag aggtactat ctatgttc atatacaga gtaactgt

FIG. 4A

## 【 図 4 B 】

3541 attataaaa aaactaaat tttaaatcc totaanaatt ttgttatct taattgttt  
3601 atataaact aaactata aaacttca gttgttgt ttccagaaa gttctttaa  
3661 gataaggt gcagata ttactagc atccagat cttatgct ataatatc  
3721 tctatagt agattgtga aaaaaaaa aaaaaaaa

FIG. 4B

## 【 図 5 B 】

1861 caactcctg aactcaggt atccgtctc ctacgtccc caaagtgt ggaatacgg  
1921 cgtgacac cacactcgt cctgcaatc ttactatta agttttgag actcaaac  
1981 ataaacac accgtactc ttactatga attcaaaa gnaataga cctcaactc  
2041 taanaatg acttccaaa aaactatt ttactata ttactaga ttccaggt  
2101 tattttctt atactgta actatgac ttactagg atggctca gtccatgc  
2161 cttgggact aattgaaa ctatgatt atcaatttg ttacagtt ttgcatat  
2221 actcaatt tactgtca atctcaca tcaactgt gattatat attcaagaa  
2281 gactatag aaactcgc cttgtgtg gactgaag aagactgag aactgaga  
2341 aagtttgt gaaatagt agacactc tacttcca agaaatga gggatgag  
2401 cagctgga accctctt accagatc gactgact ggtgttt gctctgaca  
2461 gtacacaa tagtagag cgttgttt cagttaaa atttttgt gctctact  
2521 tcaatgact ttgtgaaa ttctcaag actgaata aataatana atctctct  
2581 acagacccc aaaaaaaa a

FIG. 5B

## 【 図 5 C 】

1 mvgralrllvl ahsertsfny emkeaaanaa kkkgeverves dlyamfnpi larkditgkl  
61 kdpamfypa esvlayekh larpdivaek kleadavilv dflqlvfyvp alikwferfv  
121 fifevlayta **angdyvffza** klavislitqo qagmyvalog lghdvnllv plnglilnfe  
181 dfovlqepit vsilqtpda rldzlewdk rleniwedtp lyfapaldf infqzgfink  
241 kevqdeoknk kfqlavqhl gksipdnqk kark

FIG. 5C

## 【 図 6 A 】

1 ggattttctag gaggacogge aagagcgoge atagytgcgt ggtgtggggc ccaggcgogcg  
61 oggacocogyt gtagaggego gaaotocooa agtttcttco atcgagggaa ogctctogtg  
121 cctcgogcgog gaocggogct ttgcttccct gagagagctc tagagagcta oggtgqccoc  
181 cgtgtggagc cgggggggoc tgagcgocgc oggocctcgc ttccocctcc togtagctc  
241 tccctccctcc cctttctgtc gtacccggga gggcgctggc caaggaaagc tgcccgagagc  
301 cggcgagggg agpacocgac ggcggagggc taccagcggc aggtgtccac cgtocgggtt  
361 cgggtggata aataaasaa tggggatatt gacctccgt cactacgca tggactttga  
421 tggtttcoaa toattacttt cctctctgtg toaatctgoc tottcogaaa attocactc  
481 ctgaatagct ctoagagccc ccagctggoc agtgggtgag ttcagggccc aaataagta  
541 gtacagaaa toagggaact cctatctgt tggatgysa tcaacaagac caaagctcag  
601 gaagatggt gtccaaatct acagtcaagg agatattccc tgggagagcc tgggaaggya  
661 toagpatca cttcggaact attgatggtt ogccagagct cctggaacct gaacatctc  
721 otggcaatt agactcagc cctatgggc aaaaagtgct ctgattaac ccccaagatg  
781 tgcagcaaaa gcgcagagc ttgcaatctc agytgcagc agcagggaac agtgggaccc  
841 attttgtgac agatgctgc toctccctag gccctccacc ttgtpgctc ggggactccc  
901 tggagagac aagttgtgtc gaggatacaa cagactccgt tggcagpct tctcccaagt  
961 gctcagtpga aagatgagc agttctctc tgtctcaac agaggtcaac atggtcgck  
1021 oagataactc toatcggtg ttctggocaa oagccctggg gattttggcc aactccact  
1081 atctgagac tgacatgct ttttttggc ottccactc gaactctgt gctgatgaag  
1141 gtctgtttaa agtcaataga agaacattt ottcgaatt ctttccaaa gaggatttg  
1201 tptgtcgtg tgnatgaga aagpaaatg cccactttta tptgtgagat atgattatat  
1261 oagcaatgga gaaatgaag tgaacattc tgnatcaaca gaaagacag agctggagta  
1321 aaagatcag tgggtactt cgggtgagtc agctgagtc tgaatgact ttgtatcaa  
1381 acataaaga agtctctggy tottctactc cttataaag tggatgaaa gytgtggtg  
1441 tgttaacgtc oagccoaagt actgaanaac gtaactaaca tgnatgaaa gaggatttga  
1501 aatgcgatgt tgnatgaatt gtatttttag agotggaga ttttaagat atacagaaa  
1561 cctgtagctg tctcgagac tootcaaga ggttcaatta tgaagagagc ttaactctg  
1621 cagactaat agcaaaaag ctgacacggy tglfcaaaa gttgtgaaa ctgacagag  
1681 ttaacttoca gctggagag tootgagtg oagctgctc gatagtcga aatgaagaa  
1741 gtgtccgaaa agactttga tccagatga atgtatgaca ggaattaaa tttagtgata

FIG. 6A

## 【 図 7 A 】

1 aaacactagg ggggaagag gtgtgggca ggaggggaa gagggtcgtc gcaaggaggg  
61 gggggggcgt gcttcttccg gaagatgta atctcotta gccocggocg cctcctgagc  
121 tggctgact agtgcaggtt cagccogaaa gtggagac at-gggctgt cctcctgact  
181 tggcgccct ctgacttcc gactgtgagc gcccocggg tctcgctcc ctcgggggac  
241 ttcgggcagc ctcggggaatt cgggcocctg togtatccgc ggtctgagp taatgggaaa  
301 ccagaggaact tcaagagag gcttttact ctacgcttg togtattcg gttttgaaa  
361 ttacaggtt atctcgaag gttctgtgt togtgocaa gccoaaggt aagaataact  
421 tgaacaagca gactacgtgt atgaagcggg agaaacagaa aaactttatc agttgatac  
481 coaatcaag gaaatgaag atgcagattt actgtggcgt tggocaggg catocgtga  
541 tgnatgacg cttagagaaa cttcaagaa ggagaaaaag ctatgtgtt atagagccct  
601 agagtatga aagagagac taaaaaaaa tgaatcaagt ttgactctc atagtggtga  
661 tgaactcgc cttagtgtg ttgagatta tgaaggtcct aaggtcaaaa ttgcaatgc  
721 atatatcctc aaggagact ttgagaagc aattgaactt aaactaaag agtactcct  
781 aattcactc aggtacttt ggtgtatac atttgccga atgcctggp atcaaggaag  
841 aattgtaaa atcgttttg aaactctcc tagtccaac tatgagaag cttaggota  
901 otttccagc gcaagaacaag tggatccaaa ottctacagc aaaaactaac tcttttagt  
961 aagaactaac tgaactaac aaaaacaaa gcttgtcgtc ttgcttca tgaagacaaa  
1021 ggaacttcca gaaacacag aggagataa acatagacag acagagagtg ctaactgct  
1081 tacaagttc agtgaagaat tttagagaact tttagagaa gatttatgaa atagctata  
1141 aaacttgctt ttcttttaa ttccaaactt aaatatgaa ctataactg tctaggtctt  
1201 tttaagtgta atcggtttta atataaaaa ttctgaactt cttccaaaa  
1261 aatagggtaa atataaatt cgcataaga gtgtgagaaa taaatctcca tggctcagc  
1321 aagagatta ttgtcatcc tggataccag caatgcaaaa tggattaga ttctaaaga  
1381 tgtatcaact tggagtggga gatcaagaaa agaatattt tgaagaggg gaaatggat  
1441 ctatagga tatccaggy gttgatttt caaattgat tgnatcaag ttgaacttt  
1501 gaagagagg ttgtgtgaca gtgttagga ttgttggtt toctgacata aagtagttaa  
1561 atgatatac ttggagataa cctgtgtgaag taaagaacta agtaaggaga tgactaaaaa  
1621 tggagtagtt tccattttta ttitttttag acagagctc acttttgctc cagagtggtt  
1681 gtgcagtg acactctgg ccaactggag cctccgctc cgggttcaa gattctcc  
1741 tgcctagcc toctgagtg ctgggattac aggttgtac caccacactc ggtcaacttt  
1801 tgaattttg tgaagatgy gttttgcca tgttgtgag cgtgtgtcca aactcctggc  
1861 ctaagtagt cgcgcgctc tggctcca aattgtggy ataacaggy tggccacag  
1921 cactcgcca gtttaactta aatgtgtgt agtctatgy taaactgaat ttgtctcag  
1981 atgcaaatgt ctattcccta atggaaagg aggaacaaa aacttaagag tgaatggaa  
2041 tactaagat ttttaataa ggcagagcta tgaatactac ttgagctgy agtgcacaa  
2101 ctgcaaaact ttttaagt ttgtaaaaag gactctgtt aatcaacta gataaagca  
2161 gactgtgtg tgaagtgaat ttttccaaa gattttgga atgttaagt tacaatgaac  
2221 tgtatgata tgtttgcat gtaactttc aaacaaaaa gaaactgaa agtagtatc  
2281 ttgtataac cactcttag attcagpat ttgttatat aggtgtgga tccctatct  
2341 gaaactactg ggaactagag aagactctg gatttggat gttttccaa attttggaat  
2401 actgctaac acacaatag atattotgga gatgggaccc aagttaaac acaaatcacc  
2461 ttgtttccta taaactaat gaaactagc tgaagtgaac ttcaataac attaatttta  
2521 ataatttgt gnatggagc caagttgga tccctgac catcagaag caaagttgt  
2581 atattctcag ccaactatgt gggtaatttg tggttggtt atgcacact catctcagc  
2641 tgaattgata tgcataact aagcagttat ttctttaac ttatctagc ataatgact  
2701 aacatgaaa atagtgaat aactgcaga ggaacagaa tggcaaaaa aaatataga  
2761 cacaacacg atcaatgaa aaataatgt tgcagaga gaaagacac atagataga  
2821 ccagaaactc gtatcagctg ttaaacggca acaaatggy caggtttcca gttcccaact  
2881 taatgatcgt gatatitaaa aggtatttg atactgaa ttatttttg taaggaaga  
2941 gaaacagag cagctgaag gcaagagat gggctcttc agggatggy catctcgtg  
3001 gatgctgtt taaataggt ttittcttt agggagccg aataaacct gttgtgccc  
3061 tga

FIG. 7A

## 【 図 7 B 】

1 malaarlwl lpfrrgaap srlpagsgs rghgogorfr gfvwvmpgt fkglllsal  
61 sylvfetygy isgarvhat akveilega dylpsekte klylltqyk esedaellw  
121 laraardvag larteneek llvyaalea kraleknea fahkwyalc ladvdyvgy  
181 kaxianayii kehfeakael npkdatsih mlywcyfae spwgyriak mlfatpset  
241 yekalgfhr aeqvdpnfy knlllqtky klkhkklaa fwlmkakdy ahteedkqk  
301 taaqlltsf sek

FIG. 7B

## 【 図 6 B 】

1801 ggatacagag gactgaagac tgggtctctc ctgattttca aatcatattt aatatcacc  
1861 caccactcaa gagggaacct gtgtgggag cccgaattt ttgtgtgoc ggtgtggaa  
1921 ctacagtaga gctcaagttt gtaagagggc toogtatctg cpatactca gggagatatt  
1981 tctgtgact gtccactca tatgacaggt cgtgcatccc tgcocgaatc ctgtgatgt  
2041 gggacttcaa gaagtactac gtocgaatt ttccaaaca gctgtcgac agaatatgyc  
2101 accagccaa tttaactgt ctgagatgt gtaagagcct gtatcgaaa gccaaaggg  
2161 tgaacaagat gaagaattt cagagcagc tctccatat caaaagatgt tgaacact  
2221 gtatgtttgc taacagtga taaagagat tgcagcaggt gccgggacac ttgactgat  
2281 agtccaaact gttctccct gtaagacctg toagpatcaa gaaagygct ctgacacot  
2341 caacaaagga catctcaaa gttccctgt cactgtgpc atgtgtgag ctgtgcag  
2401 gaagaggyct tatttggaaa ttttcgaga atagactgt catctccca tttcagagc  
2461 caaatgtag aagatgttaa gytgcaggg cttgcttca caaacatgc ttcactcct  
2521 ccagatgccc ccggtgtggy aggatcacag ccaggagaaa attctggaa agtgtgccc  
2581 ctgagaaac atgatgccc tgaatgact gaaaaagact gttcaactg ccttatgta  
2641 acacagattt gtctclatta ttgtgacat tgtttagat attggattt gatatlaag  
2701 gaaaagatgt gttatctatc totttattg atactactaa tgttcaaaa gaatcgagat  
2761 tctgtgttta agcaaggygc tgaatggtt gttttgttt acaatgttgc tgttttgt  
2821 gctattggtt tttaaagag gtttttata ctttgtlat tgaatagtta tgttcaact  
2881 atgtgagcc agttttgat ttgtgata tatgtgaat gtaactgaca agatgaata  
2941 ctacagttct ttcttclaa agdtgttg atgaactgy ttgctctct cagtgacaa  
3001 aaatagacc ccaactctg ttgtctggy ttttttct tcaagagca gacttcaat  
3061 taaatgcat ttgtgtgtg tgcataact acacatttta tttactcag agttgaata  
3121 gagagtaac atttctctg cagatttat tcatgatgy ttbgatgic ttagcaggg  
3181 gtgtggtcc cttgaagtg cagtttgag caactgctt tgaatgccc totttcagt  
3241 ggcacaact gactgtat ttgtcactc tgttccaac actgcaatg caaggatgc  
3301 agagtagagt gaactcaat cctgcctct gaggatgtg ctttaacag tgaataactg  
3361 aacataagt atttgagat taaagacac tgggggaat aatgaacat gttactgat  
3421 taataacat aaatcatag actgattga ataaagttat atgatcaca aaactctat  
3481 gaatttctt ttctataag tcttatag ttittctga acactgagc ctattcttt  
3541 tctctcaat tctatatac ttctccccc ttgagaaag ggcctggag cttggccct  
3601 tcatgtata ctttagact gaacgtttg caactaggy cttggagct acactccct  
3661 gnatcaact gccaacta aactcaact gattttcca gcaagagag acttcaat  
3721 aaggtcaaa gattgcccc taaccactc cagcactgtg tatgagtg ttattctaa  
3781 tggatagta ctgaacacat gaagaagt aatgactct gtaactctc ttctatgct  
3841 tctctcaat ctgcaagt ttctctac cgcagtcct ctgcagpac tgtgtcca  
3901 tcaattatt aagcagact tttctaat atataag ttgtaggca catagataa  
3961 ataaaacag acttcaaaaa aaaaaaaaa aaa

FIG. 6B

## 【 図 6 C 】

1 mvagatvrqd spvevpegia dhsqldisp rllntdhhpc qldirimhk awvnpqdv  
61 qggqlgqv psagstgth vdsagpdp spagldela attlledtth evagaspaga  
121 sacastala stvnmvpt yshvrelpa pglatagpp etdafpaa nltsadega  
181 vqsrtilss nafapevfl pvdekenah fyvadmlia mekmcnlla qgtesake  
241 vsqldsgdp dsmftfntl kqesgstas ysgyepawl qvaytetr yndvkeicc  
301 dvedvllil gdfndtctc acasakav lyeypfnase llakeyyvf qkwilavv  
361 aqlaglsaa gavlvmecv rkdfesannv vqkfkxri rtdewapri lqifnlhnp  
421 lkrdlvaaq nffcagotp vepfkvkr lyeylkyfc dcchysaac lparilmmd  
481 rkxyvnsa qldlshwq pirlnlisg alyakakeld rvaieqgl hkkllkcr  
541 fanaalkfa qgphldel hlfledlv rkhqllapl kdlklshah vqgclgk  
601 gficefcpnt tvlfpqat crccacrac fhkqctqase opcaritar rxllseasa  
661 at

FIG. 6C

【配列表】

2015528443000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/CA2013/050580
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: <i>C07K 14/74</i> (2006.01), <i>A61K 35/14</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>C07K 7/06</i> (2006.01), <i>C12N 15/12</i> (2006.01), <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>G01N 33/48</i> (2006.01) and <i>G06F 19/22</i> (2011.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/74 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Total Patent, Canadian Patent Database, PubMed (keywords: minor, histocompatibility, antigen, immunotherapy, CD8, peptide, adoptive, transcriptome, polymorph, HLA, screen, Perreault, C, Thibault, P, Lemieux, S., Granados, DP, Dev, S., Daouda, T. and Caron-Lozotte, O.) and GenomeQuest (SEQ ID NO:15-28)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2010116375A1 (YEDA RESEARCH & DEVELOPMENT CO. LTD. and YISSUM RESEARCH COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD.) 14 October 2010 SEQ ID NO: 12 and 23	64, 67, 70-72, 74 and 76
X	NUSBAUM, C. et al. "DNA sequence and analysis of human chromosome 8". Nature. 2006. vol. 439, pp 331-335 ISSN: 0028-0836. UniProtKB/TrEMBL# E5RJC7	159, 165-167, 169 and 171
A	HOMBRINK, P. et al. "High-throughput identification of potential minor histocompatibility antigens by MHC tetramer-based screening: feasibility and limitations." PLoS ONE. 2011. vol. 6, pp 1-11 ISSN: 1932-6203	
A	TYKODI, S. et al. "C19orf48 encodes a minor histocompatibility antigen recognized by CD8 cytotoxic T cells from renal cell carcinoma patients". Clin. Cancer Res. 2008. vol. 14, pp 5260-5269 ISSN: 1078-0432	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 05 September 2013 (05-09-2013)		Date of mailing of the international search report 22 October 2013 (22-10-2013)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer  Philip Marshall 819-997-2838

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2013/050580
--

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

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

1. ☒ Claim Nos. : 33-39, 57-63, 79-85, 103-109, 130-136, 152-158 and 174-180  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :  
  
Claims 33-39, 57-63, 79-85, 103-109, 130-136, 152-158 and 174-180 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged uses defined in said claims.
2. ☐ Claim Nos. :  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. ☐ Claim Nos. :  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Claims 1-180 of the present application lack unity *a priori*. Said claims can be divided into groups I-VII because each group is directed to a peptide with a distinctive structure and to a method of using said peptide for treating cancer. Therefore each group is considered a separate invention. Claims 1-16 can go with any group.

(continued on page 6)

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

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA2013/050580

continuation of box III

Therefore claims of the present application should be divided as follows:

Group I is defined by claims 1-16 (partially) and 17-39 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^1\text{-LQEKFX}^2\text{SX}^3\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide;

Group II is defined by claims 1-16 (partially) and 40-63 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^1\text{-ELDX}^2\text{VFQX}^3\text{X}^4\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide;

Group III is defined by claims 1-16 (partially) and 64-85 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^1\text{-LFFRKVX}^2\text{X}^3\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide;

Group IV is defined by claims 1-16 (partially) and 86-109 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^1\text{-X}^{12}\text{-VLKPGNX}^{13}\text{X}^{14}\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide;

Group V is defined by claims 1-16 (partially) and 110-136 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^1\text{X}^{15}\text{VDKGPFX}^{17}\text{X}^{18}\text{X}^{19}\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide;

Group VI is defined by claims 1-16 (partially) and 137-158 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^{20}\text{X}^{21}\text{X}^{22}\text{SLPTSPX}^{23}\text{X}^{24}\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide; and

Group VII is defined by claims 1-16 (partially) and 159-180 which are directed to a method for identifying a minor histocompatibility antigen candidate, a peptide of 50 amino acids or less comprising the sequence  $Z^1\text{-X}^{25}\text{X}^{26}\text{X}^{27}\text{GNPGTFX}^{28}\text{X}^{29}\text{-Z}^2$ , a nucleic acid encoding said peptide, an isolated major histocompatibility complex MHC class I molecule, an isolated cell expressing at its surface an MHC class I molecule, a method of treating cancer using said peptide, a method of expanding CD8 T lymphocytes for adoptive immunotherapy using said peptide.

International application No.  
PCT/CA2013/050580

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2010116375A1	14 October 2010 (14-10-2010)	None	



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>		<b>C 1 2 Q 1/68</b>	<b>A</b>	<b>4 H 0 4 5</b>
<b>G 0 1 N 30/14 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 30/14</b>	<b>A</b>	
<b>G 0 1 N 30/02 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 30/02</b>	<b>B</b>	
<b>G 0 1 N 30/72 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 30/72</b>	<b>G</b>	
<b>G 0 1 N 27/62 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 27/62</b>	<b>V</b>	
<b>G 0 1 N 33/566 (2006.01)</b>		<b>G 0 1 N 33/566</b>		
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 35/00</b>		
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 37/04</b>		
<b>A 6 1 K 35/17 (2015.01)</b>		<b>A 6 1 K 35/17</b>	<b>A</b>	
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>		<b>A 6 1 P 35/02</b>		

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

(72)発明者 ピエール・ティボー

カナダ・H 9 C・1 N 8・ケベック・イル・ビザール・デ・エラブル・2 8 8

(72)発明者 セバスチャン・ルミュ

カナダ・H 8 R・4 C 6・ケベック・ラザル・リュ・ドゥ・フォール・レミ・2 7 1

(72)発明者 ディアナ・パオラ・グラナドス

カナダ・H 4 C・0 B 3・ケベック・モントリオール・リュ・フィリップ・ラロンド・5 2 3 1・  
アパートメント・# 3

(72)発明者 スリランガナダン・デーヴ

カナダ・H 1 Y・2 S 5・ケベック・モントリオール・サンキエーム・アヴニユ・5 1 3 8

(72)発明者 モハメド・タリク・ダウダ

カナダ・H 2 L・1 J 6・ケベック・モントリオール・リュ・シェルブルーク・エスト・1 4 0・  
アパートメント・# 1 0 6

(72)発明者 オリヴィエ・カロン・リゾッテ

カナダ・J 4 M・1 G 2・ケベック・ロンゲール・ベルティエ・1 1 9 5

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA12 GA08 GA09 HA01 LA06

4B024 AA01 CA04 CA20 DA03 EA04 GA11

4B063 QA01 QA18 QQ03

4B065 AA93X AB01 BA01 CA44

4C087 AA01 AA02 BB43 NA14 ZB09 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA15 BA16 CA40 DA51 EA20

FA74 GA22 GA23 HA03