

(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 1	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/74</b> (2006.01)	C07K 14/74	2 G 04 1
<b>C12N 15/09</b> (2006.01)	C12N 15/00	A 4 B 02 4
<b>C12N 15/00</b> (2006.01)	C12N 15/00	Z N A 4 B 06 3
<b>C12N 5/10</b> (2006.01)	C12N 5/00	1 O 1 4 B 06 5
<b>C12Q 1/02</b> (2006.01)	C12Q 1/02	4 C 08 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・モントリオール 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) 國際出願番号	PCT/CA2013/050580	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 國際公開番号	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-シャンパニユ・70
(87) 國際公開日	平成26年2月20日 (2014.2.20)		
(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)		

最終頁に続く

(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考ゲノムと比較し、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考ゲノムとの間の单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 *in silico* 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单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 *in silico* 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、前記参考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】

前記参考ゲノムは、Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) 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、(ii)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3000Da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。

20

## 【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MS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。

## 【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<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。

## 【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<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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<sup>3</sup>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<sup>3</sup>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<sup>3</sup>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 2 4】

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 2 5】

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 2 6】

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 2 7】

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 2 8】

前記ペプチドは、ELQEKFLSL（配列番号15）である、請求項26に記載のペプチド。 10

## 【請求項 2 9】

前記ペプチドは、ELQEKFSSL（配列番号16）である、請求項27に記載のペプチド。

## 【請求項 3 0】

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 3 1】

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HLA-B<sup>\*</sup>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。

## 【請求項 3 2】

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HLA-B<sup>\*</sup>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。 20

## 【請求項 3 3】

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HLA-B<sup>\*</sup>0801対立遺伝子のMHCクラスI分子を認識する有効量のCD8T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 3 4】

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、 30

（a）前記対象が、ヒトCENPF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CENPF核酸、および/またはヒトCENPF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CENPF核酸、および/またはヒトCENPF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、請求項33に記載の方法。 40

## 【請求項 3 5】

前記決定することは、CENPF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 3 6】

前記CD8Tリンパ球は、in vitroで増殖させたCD8Tリンパ球である、請求項34に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

（i）前記対象が（a）の対象である場合、CD8T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の前記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

(i) 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>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の前記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、請求項34~36のいずれか1項に記載の方法。  
10

#### 【請求項38】

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33~37のいずれか1項に記載の方法。

#### 【請求項39】

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であって、

(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、  
20

(b) (i) 前記候補ドナーが、ヒトCENPF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CENPF核酸、および/またはヒトCENPF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、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>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  
30

(b) (ii) 前記候補ドナーが、ヒトCENPF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CENPF核酸、および/またはヒトCENPF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、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>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 Tリンパ球を培養することと、を含む、方法。  
30

#### 【請求項40】

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、1~43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。  
40

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40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40または41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40～42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43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44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40～45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46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40～47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40～48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40～49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40～49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50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51に記載のペプチド。

## 【請求項 5 4】

請求項40～53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40～53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>4403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40～53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>4403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40～53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>4403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2A、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2B、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の前記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、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

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58に記載の方法。

【請求項60】

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57～59のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項61】

(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40～53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596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40～53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596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58～60のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項62】

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57～61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

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2A、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2B、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の前記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、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項40～53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の前記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、C D 8 Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項40～53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64】

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。

20

## 【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。

## 【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】

30

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

## 【請求項75】

30

前記ペプチドは、SLFFFRKVAF(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】

40

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。

## 【請求項78】

40

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】

40

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CD8T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】

50

前記対象が、ヒトMTC2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MTC2

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3B、N C B I 参照配列：N P \_ 0 5 5 1 5 7 . 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1057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290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1057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、前記ペプチド中のX<sup>5</sup>はAである、請求項79に記載の方法。  
10

【請求項81】

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80に記載の方法。

【請求項82】

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79に記載の方法。

【請求項83】

（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<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1057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

（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<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1057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290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80～82のいずれか1項に記載の方法。  
30

【請求項84】

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79～83のいずれか1項に記載の方法。

【請求項85】

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3A、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1057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3B、N C B I 参照配列：N P \_ 0 5 5 1 5 7 . 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1057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290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<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。

【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CD8T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をさらに含み、

(a) 前記対象が、ヒトELF1の前記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/またはヒトELF1の前記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ELF1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ELF1の前記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/またはヒトELF1の前記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ELF1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ELF1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CD8Tリンパ球は、in vitroで増殖させたCD8T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、CD8T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ELF1の前記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ELF1の前記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ELF1ポリペプチドを含む第2の対象からCD8T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、CD8T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ELF1の前記核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にA、および/またはヒトELF1の前記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ELF1ポリペプチドを含む第2の対象からCD8T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(ASCT)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CD8T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、

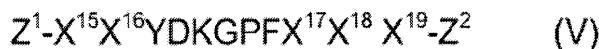
(b) (i) 前記候補ドナーが、ヒトELF1の前記核酸配列中のヌクレオチド1400に対応する位置にAを含むELF1核酸、および/または前記ELF1タンパク質配列中の残基343に対応する位置にスレオニンを有するELF1ポリペプチドを発現する場合、CD8-Tリンパ球増殖に適した条件下において、請求項86~99のいずれか1項に記載のペプチド(前記ペプチド中のX<sup>1~2</sup>はSである)を負荷したHLA-A\*0301対立遺伝子のMHCクラスI分子を発現する細胞の存在下で、前記候補ドナーからCD8-Tリンパ球を培養すること、または

(b) (ii) 前記候補ドナーが、ヒトELF1の前記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/または前記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-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、方法。

【請求項110】

配列(V)

【化5】



(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>1~5</sup>は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

X<sup>1~6</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、

X<sup>1~7</sup>は、RまたはWであり、

X<sup>1~8</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、

X<sup>1~9</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。

【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<sup>1~6</sup>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<sup>1~6</sup>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<sup>1~5</sup>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<sup>1~5</sup>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<sup>1~8</sup>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<sup>1~8</sup>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<sup>1~9</sup>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<sup>1~9</sup>は、塩基性アミノ酸である、請求項118に記載のペプチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 120】

X<sup>1 9</sup>は、リジン（K）である、請求項119に記載のペプチド。

## 【請求項 121】

Z<sup>1</sup>は、存在しない、請求項110～120のいずれか1項に記載のペプチド。

## 【請求項 122】

Z<sup>2</sup>は、存在しない、請求項110～121のいずれか1項に記載のペプチド。

## 【請求項 123】

X<sup>1 7</sup>は、Rである、請求項110～122のいずれか1項に記載のペプチド。

## 【請求項 124】

X<sup>1 7</sup>は、Wである、86～95のいずれか1項に記載のペプチド。

10

## 【請求項 125】

前記ペプチドは、AMYDKGPFRSK（配列番号23）である、請求項123に記載のペプチド。

## 【請求項 126】

前記ペプチドは、AMYDKGPFWSK（配列番号24）である、請求項124に記載のペプチド。

## 【請求項 127】

請求項110～126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 128】

請求項110～126のいずれか1項に記載のペプチドを負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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。

20

## 【請求項 129】

その表面に、請求項110～126のいずれか1項に記載のペプチドを負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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 130】

癌を治療する方法であって、請求項110～126のいずれか1項に記載のペプチドを負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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 131】

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\_000944.1）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、

30

（a）前記対象が、ヒトNQ01の前記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の前記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>1 7</sup>はRであり、

（b）前記対象が、ヒトNQ01の前記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の前記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>1 7</sup>はWである、請求項130に記載の方法。

40

## 【請求項 132】

前記決定することは、ヒトNQ01核酸を配列決定することを含む、請求項131に記載の方法。

## 【請求項 133】

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131または132に記載の方法。

## 【請求項 134】

（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

50

下において、請求項 110～126 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>17</sup> は R である）を負荷した HLA-A<sup>\*</sup>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 の前記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 の前記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 T リンパ球を培養すること、または

(i) 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 110～126 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>17</sup> は W である）を負荷した HLA-A<sup>\*</sup>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 の前記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 の前記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 T リンパ球を培養すること、をさらに含む、請求項 131～133 のいずれか 1 項に記載の方法。  
10

#### 【請求項 135】

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 130～134 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 136】

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) 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\_00894.1）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、  
20

(b) (i) 前記候補ドナーが、ヒト NQ01 の前記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 の前記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、CD8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 110～126 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>17</sup> は W である）を負荷した HLA-A<sup>\*</sup>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  
30

(b) (ii) 前記候補ドナーが、ヒト NQ01 の前記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 の前記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、CD8 T リンパ球増殖に適した条件下において、請求項 110～126 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>17</sup> は R である）を負荷した HLA-A<sup>\*</sup>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、方法。  
30

#### 【請求項 137】

配列 (VI)

#### 【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>20</sup> は、1～43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、

X<sup>21</sup> は、アミノ酸であるか、または存在せず、

X<sup>22</sup> は、アミノ酸であるか、または存在せず、

X<sup>23</sup> は、G または R であり、

X<sup>24</sup> は、1～43 アミノ酸の配列であるか、または存在せず、  
40

$Z^2$  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 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】

$X^{2^2}$  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】

$X^{2^2}$  は、バリン(V)である、請求項139に記載のペプチド。

【請求項 141】

$X^{2^1}$  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】

$X^{2^1}$  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】

$Z^1$  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】

$Z^2$  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】

$X^{2^3}$  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】

$X^{2^3}$  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 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、

(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 $X^{2^3}$ 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<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KIAA0226L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153または154に記載の方法。

10

【請求項156】

(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、請求項153~155のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項157】

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152~156のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項158】

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、

(b) (i) 前記候補ドナーが、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、CD8 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

40

(b) (ii) 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、CD8 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

50

ド中の  $X^{2,3}$  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、方法。

## 【請求項 159】

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、  
 $X^{2,5}$  は、1 ~ 43 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 ~ 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 160】

前記ペプチドは、8 ~ 12 アミノ酸の長さを有する、請求項 159 に記載のペプチド。

## 【請求項 161】

 $X^{2,7}$  は、アミノ酸である、請求項 159 または 160 に記載のペプチド。

20

## 【請求項 162】

 $X^{2,7}$  は、メチオニン (M) である、請求項 161 に記載のペプチド。

## 【請求項 163】

 $X^{2,6}$  は、アミノ酸である、請求項 159 ~ 162 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 164】

 $X^{2,6}$  は、バリン (V) である、請求項 141 に記載のペプチド。

## 【請求項 165】

 $Z^1$  は、存在しない、請求項 159 ~ 163 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 166】

 $Z^2$  は、存在しない、請求項 159 ~ 164 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

30

## 【請求項 167】

 $X^{2,8}$  は、K である、請求項 159 ~ 166 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 168】

 $X^{2,8}$  は、N である、請求項 159 ~ 166 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

## 【請求項 169】

前記ペプチドは、VMGNPGTFK (配列番号 27) である、請求項 167 に記載のペプチド。

## 【請求項 170】

前記ペプチドは、VMGNPGTFN (配列番号 28) である、請求項 168 に記載のペプチド。

40

## 【請求項 171】

請求項 159 ~ 170 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 172】

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、単離された主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子。

## 【請求項 173】

その表面に、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 分子を発現する、単離された細胞。

## 【請求項 174】

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 、 NCB1 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 、 NCB1 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む、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 、 NCB1 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 、 NCB1 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

10

20

30

40

50

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。  
10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

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。

【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 2 年 8 月 1 5 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 6 8 3 , 3 6 1 号、および 2 0 1 3 年 5 月 1 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 8 1 8 , 0 4 0 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】

【0 0 0 3】

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、マウスのコンジェニッ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シングおよび内在性タンパク質のさらなるプロセシングから生じる（ 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变 M A P 、および i i ) 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、差次の 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 - 1 3 ）。

【0 0 0 4】

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（AHC）（17-22）である。同種AHCによって誘導される移植片対腫瘍（GV）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、GV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GV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GV効果は、本質的に血液系腫瘍に罹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」AHC、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子的な形態である。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、常に身体の自由を奪うものであり、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AHCは、減弱型のGV効果しか誘導しない。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）。

#### 【0005】

AHC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癒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AHC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大きな影響を与え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

10

20

30

40

50

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

20

## 【発明の概要】

## 【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单-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单-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MAPである。

【0015】

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。

【0016】

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、エピスタン・バーウィルス (EBV) で形質転換したBリンパ芽球様細胞株である。

【0017】

一実施形態において、上記MAP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MAPを放出させることと、(ii)放出させたMAPをクロマトグラフィーに供することと、を含む。

【0018】

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3000Da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。

【0019】

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、8~11アミノ酸の長さを有する。

【0020】

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MAP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MSスペクトルを比較することと、を含む。

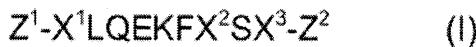
【0021】

一実施形態において、上記方法は、(f)で同定されたMHC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。

【0022】

別の態様において、本発明は、配列(I)

【化1】



(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を提供する。一実施形態において、X<sup>1</sup>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<sup>3</sup>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<sup>2</sup>はLである。別の実施形態において、X<sup>2</sup>はSである。一実施形態において、ペプチドは配列ELQEKFLSL (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ELQEKFSL (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ELQEKFSSL (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ELQEKFSSL (配列番号16) である。

【0023】

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。一実施形態に

10

20

30

40

50

おいて、上記方法は、前記対象が、ヒトC E N P Fの核酸配列（図1A～1D、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1E、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、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、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、C E N P F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CD 8 Tリンパ球は、in vitroで増殖させたCD 8 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、CD 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HLA - B<sup>\*</sup>0 8 0 1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、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ポリペプチドを含む第2の対象からCD 8 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、CD 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Sである）を負荷したHLA - B<sup>\*</sup>0 8 0 1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、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ポリペプチドを含む第2の対象からCD 8 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CD 8 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C E N P Fの核酸配列（図1A～1D、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1E、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、CD 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Sである）を負荷したHLA - B<sup>\*</sup>0 8 0 1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CD 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

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2A、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2B、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、(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。

【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、in vitro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 Tリンパ球を培養すること、または(iii)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(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、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 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(ASCT)のレシピエントである。

10

## 【0034】

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 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 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 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 Tリンパ球を培養することと、を含む。

20

## 【0035】

別の態様において、本発明は、配列(III)



(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SLFFRKVPF(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SLFFRKVPF(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SLFFRKVAF(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SLFFRKVAF(配列番号20)である。

40

## 【0036】

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。

【 0 0 3 7 】

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。

【 0 0 3 8 】

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、i n v i t r o で増殖させたC D 8 T リンパ球である。

【 0 0 3 9 】

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 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、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（I I I ）（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。

【 0 0 4 0 】

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。

【 0 0 4 1 】

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（I I I ）（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／

10

20

30

40

50

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。

## 【0 0 4 2】

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>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を提供する。一実施形態において、X<sup>1 1</sup> は存在しない。一実施形態において、上記X<sup>1 3</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>1 4</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>1 2</sup> はS である。別の実施形態において、X<sup>1 2</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2 1 ）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2 1 ）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2 2 ）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2 2 ）である。

10

20

30

40

## 【0 0 4 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 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。

## 【0 0 4 4】

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。

30

40

## 【0 0 4 5】

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。

## 【0 0 4 6】

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<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 のタンパク質配列中の

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<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<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、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<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、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<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 5</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 6</sup> は、アミノ酸であるか、または存在せず、 X<sup>1 7</sup> は、 R または W であり、 X<sup>1 8</sup> は、アミノ酸であるか、または存在せず、 X<sup>1 9</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、 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、上記 X<sup>1 6</sup> 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<sup>1 5</sup> 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<sup>1 8</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>1 9</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>1 7</sup> は R である。別の実施形態において、 X<sup>1 7</sup> 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 A M Y D K G P F W S K (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 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。

10

【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 T リンパ球は、in vitro で増殖させた CD8 T リンパ球である。

20

【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 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 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、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 T リンパ球を培養すること、をさらに含む。

30

【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。

40

【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 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

50

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) 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、1~4 3 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、1~4 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を提供する。一実施形態において、ペプチドは、8~1 2 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 2 5) 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 2 5) 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 2 6) 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 2 6) 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 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V Iのペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2</sup>~<sup>3</sup>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V Iのペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2</sup>~<sup>3</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V Iのペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2</sup>~<sup>3</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V Iのペプチド(前記ペプチド中のX<sup>2</sup>~<sup>3</sup>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

【0063】

別の態様において、本発明は、配列V II

【化7】



(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</sup>~<sup>5</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>~<sup>6</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>2</sup>~<sup>7</sup>は、アミノ酸であるか、または存在せず、X<sup>2</sup>~<sup>8</sup>は、KまたはNであり、X<sup>2</sup>~<sup>9</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

40

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<sup>2</sup><sup>7</sup>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<sup>2</sup><sup>6</sup>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<sup>2</sup><sup>8</sup>はKである。別の実施形態において、X<sup>2</sup><sup>8</sup>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】

10

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CD8T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<sup>2</sup><sup>8</sup>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<sup>2</sup><sup>8</sup>は、Nである。

20

## 【0066】

20

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CD8Tリンパ球は、in vitroで増殖させたCD8Tリンパ球である。

30

## 【0067】

30

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、CD8T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>2</sup><sup>8</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CD8T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、CD8T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>2</sup><sup>8</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CD8Tリンパ球を培養することをさらに含む。

40

## 【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】

50

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CD8T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 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>2-8</sup>はNである)を負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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 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 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>2-8</sup>はRである)を負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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 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<sup>\*</sup>0301、HLA-B<sup>\*</sup>0801、またはHLA-B<sup>\*</sup>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<sup>\*</sup>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<sup>\*</sup>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<sup>\*</sup>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)(CE-NPF)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)(CE

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 、 3 5 0 / 4 0 0 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。 10

【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 1 0 ）を示す。 20

【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 1 1 ）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 1 1 ）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 1 2 ）を示す。 20

。【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 1 3 ）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 1 4 ）を示す。

【発明を実施するための形態】 30

【 0 0 7 7 】

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。 40

【 0 0 7 8 】

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 ( a n element ) 」は、 1 つの要素または 1 つより多くの要素を意味す

る。本明細書を通して、内容上別途要求されない限り、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、および「含む (comprising)」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。

#### 【0079】

ヒトMiHA発見のための新規方法、本方法を用いて同定される新規MiHA、および新規MiHA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(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。候補MiHA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HLAが適合する対象(例えば、HLA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

#### 【0080】

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(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)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单-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。

20

#### 【0081】

一実施形態において、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。

#### 【0082】

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单-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。一実施形態において、MiHA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MAPである。

30

#### 【0083】

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 (GRCh37, Genome Reference Consortium; The International Human Genome Sequencing Consortium. Nature. 2004; 431: 931-945), Hs\_Celera\_WGSA (Celera Genomics

40

50

; Istrail S. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2004 Feb 17; 101(7): 1916-21. Epub 2004 Feb 9, HuRef and HuRef Prime (J. Craig Venter Institute; Levy S, et al. PLoS Biology. 2007; 5: 2113-2144), YH1 and BGIAF (Beijing Genomics Institute; Li R, et al. Genome Research. 2010; 20: 265-272)、およびHsapALLPATHSI (Broad Institute) を含む。一実施形態において、参照ゲノムはGRCh37である。

## 【0084】

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、PBMC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、MHCクラスI分子を発現する細胞を含有するいざ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、PBMC試料、またはPBMC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（TERT）の組換え発現による初代細胞の不死化（Barssov EV, Curr Protoc Immunol. 2011 Nov; Chapter 7: Unit 7.21B）、サルウイルス40（SV40）T抗原、アデノウイルスE1AおよびE1B、ヒトパピローマウイルス（HPV）E6およびE7、ならびにエプスタイン・バーウイルス（EBV）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p53またはRb等の腫瘍抑制遺伝子の不活性化を含む。EBVによるBリンパ球の不死化のための方法は、Tosato G and Cohen J I. Curr Protoc Immunol. 2007 Feb; Chapter 7: Unit 7.22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、ATCC（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、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。

## 【0085】

30

細胞試料からMHC関連ペプチド（MAP）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、Fortier et al. (J. Exp. Med. 2005 (3): 595-610, 2008)に記載されるように、生細胞からのMHC関連ペプチドの弱酸溶出（MAE）である。別の技術は、ペプチド-MHC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、Gebr eselassie et al., Hum Immunol. 2006 Novemb er; 67 (11): 894-906を参照のこと）。後者に基づく2つのハイスクループ戦略が実施してきた。第1の戦略は、可溶性の分泌されたMHC（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MHCに関連するペプチドの溶出に基づいている（Barnea et al., Eur J Immunol. 2002 Jan; 32 (1): 213-22; and Hickman HD et al., J Immunol. 2004 Mar 1; 172 (5): 2944-52）。第2のアプローチは、MHC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（Weinzierl AO et al., Mol Cell Proteomics. 2007 Jan; 6 (1): 102-13. Epub 2006 Oct 29; Lemmel C et al., Nat Biotechnol. 2004 Apr; 22 (4): 450-4. Epub 2004 Mar 7; Milner E, Mol Cell Proteomics. 2006 Feb; 5 (2): 357-65. Epub 2005 Nov 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。

10

## 【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。

20

30

## 【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（NEBNex）（登録商標）DNA Library Preparation）から市販されている。

40

## 【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 Enrich

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。

【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单一ヌクレオチド変異(SNV)または单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)、SNP detector(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、MassGenomicsのSAM tools 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。

【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行われてもよい。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

10

20

30

30

40

50

よる影響を受ける多くても30aa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(  $IC_{50}$  )であってもよく、NetMHCconsソフトウェアバージョン1.0(<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  $IC_{50}$  を有するペプチドは、強い結合剤と見なされ、約50～約500nMの  $IC_{50}$  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

30

40

50

ロープペプチドが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プペプチドとともに、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filtration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プ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】

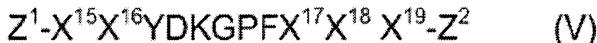


(式中、 $Z^1$ は、アミノ末端修飾基であるか、または存在せず、 $X^{11}$ は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $X^{12}$ は、SまたはTであり、 $X^{13}$ は、アミノ酸であるか、または存在せず、 $X^{14}$ は、1~43アミノ酸の配列であるか、または存在せず、 $Z^2$ は、カルボキシ末端修飾基であるか、または存在しない)を含む、50アミノ酸以下のペプチド(例えば、単離されたまたは合成されたペプチド)を提供する。 10

## 【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

10

20

30

40

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、D-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、D-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、D-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（Hargin）、N-アセチルリジン、2-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、2,4,-ジアミノ酪酸（D-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（Hosser）、システイン酸、D-アミノヘキサン酸、D-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

40

## 【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。

## 【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<sup>1</sup>)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<sup>1</sup>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<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>もしくはC<sub>3</sub>-C<sub>16</sub>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<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アシル基(直鎖もしくは分岐)または不飽和C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>アシル基(直鎖もしくは分岐)、例えば、アセチル基(CH<sub>3</sub>-CO-、Ac)である。一実施形態において、Z<sup>1</sup>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<sub>2</sub>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<sup>2</sup>はNH<sub>2</sub>基である。一実施形態において、Z<sup>2</sup>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-バニリルアミンもしくはシクロヘキシリルアミン等、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、ナプチルアミン、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<sub>2</sub>OH等であり得る。一実施形態において、Z<sup>2</sup>は存在しない。  
20

【0118】

一実施形態において、ペプチドは配列ELQEKFLSL(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ELQEKFLSL(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ELQEKFSSL(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ELQEKFSSL(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QELDGVFQKL(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QELDGVFQKL(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QELDRVFQKL(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QELDRVFQKL(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SLFFRKVPF(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SLFFRKVPF(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SLFFRKVAF(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SLFFRKVAF(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SVLKPGNSK(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SVLKPGNSK(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TVLKGPGNSK(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TVLKGPGNSK(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AMYDKGPFRSK(配列番号23)を含む。一実施形態において、上記ペプチドはAMYDKGPFRSK(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AMYDKGPFWSK(配列番号24)を含む。一実施形態において、上記ペプチドはAMYDKGPFWSK(配列番号25)である。  
50

4 ) である。

【 0 1 2 3 】

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。

【 0 1 2 4 】

一実施形態において、上記ペプチドは配列 V M G N P G T F K (配列番号 27) を含む。一実施形態において、上記ペプチドは V M G N P G T F K (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 V M G N P G T F N (配列番号 28) を含む。一実施形態において、上記ペプチドは V M G N P G T F N (配列番号 28) である。

【 0 1 2 5 】

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 - b o c」または「F m o c」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。

【 0 1 2 6 】

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。

【 0 1 2 7 】

したがって、別の態様において、本発明はさらに、配列 I ~ V I I 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 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 、または R M D N 1 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。

【 0 1 2 8 】

「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、天然の状態でそ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、その天然の状態で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。

10

## 【0130】

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】

30

「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。

## 【0132】

40

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-B8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

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<sup>\*</sup>0801分子等のHLA-B8分子、および/またはHLA-A<sup>\*</sup>0301分子等のHLA-A3分子、および/またはHLA-B<sup>\*</sup>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、Sambrook et al.（上記参照）および他の実験マニュアルに見出すことができる。核酸を哺乳動物細胞に in vivoで導入するための方法が知られており、遺伝子療法のために本発明のベクターDNAを対象に送達するために用いられてもよい。

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ます。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ができる（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】

MiHA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MiHA-T細胞の使用は、GVHD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、従来のAHCCT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（GVHD／GVCT）比が高すぎるために従来のAHCCT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、MiHA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、MiHAに基づく癌免疫療法は、固形腫瘍等の非血液癌のMiHA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HLAが適合する造血幹細胞移植（ASCT）は、T細胞によって媒介される移植片対腫瘍（GVT）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、ASCT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MiHAである。本明細書において特定されるMiHAペプチド配列は、i) in vitro初回刺激、および移植片（AHCCT）のレシピエントに注入されるMiHA特異的T細胞の増殖のために使用される、および/またはii)移植後に、MiHA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（GVTE）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。

10

20

## 【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）～（VII）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。

30

## 【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MHCクラスI分子を認識するCD8-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MHCクラスI分子を認識するCD8-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、AHCCT）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CENPFの核酸配列（図1A～1C、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1D、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、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、ペプチド中のX<sup>2</sup>は

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Z W I N 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。

【0143】

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1057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290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1057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、ペプチド中のX<sup>5</sup>はAである。

【0144】

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E L F 1核酸、および/またはE L F 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。

【0145】

一実施形態において、上記方法は、前記対象が、ヒトN Q 0 1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N Q 0 1核酸、および/またはN Q 0 1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をさらに含み、a)前記対象が、ヒトN Q 0 1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139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、

10

20

30

40

50

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、前記ペプチド中の X<sup>1 7</sup> は W である。

【 0 1 4 6 】

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 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をさらに含み、(a) 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 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 の前記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、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 の前記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 の前記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、前記ペプチド中の X<sup>2 3</sup> は、R である。

10

【 0 1 4 7 】

一実施形態において、上記方法は、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をさらに含み、(a) 前記対象が、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、前記ペプチド中の X<sup>2 8</sup> は、K であり、(b) 前記対象が、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、前記ペプチド中の X<sup>2 8</sup> は、N である。

20

30

【 0 1 4 8 】

対象となる核酸および / またはタンパク質(例えば、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、または R M D N 1)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、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、または R M D N 1)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、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、または R M D N 1)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(R F L P)；增幅断片長多型 P C R (A F L P - P C R)；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增幅(対立遺伝子が存在する場合はプライマーが増幅産物を产生し、他の対立遺伝子が増幅の鑄型として使用される場合(例えば、対立遺伝子特異的 P C R)は同じ増幅産物を产生しない)が挙げられる。他の方法として、i n s i t u 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、C E N P F、Z W I N T

40

50

、 M T C H 2 、 E L F 1 、 N Q 0 1 、 K I A A 0 2 2 6 L 、 または R M D N 1 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 [ P C R ] ) 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 ( m R N A ) はまた、 分析前に c D N A に逆転写することもできる。

【 0 1 4 9 】

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、 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 、 または R M D N 1 ) 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 H P L C 分析 ( 対象となるポリペプチド ( 例えば、 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 、 または R M D N 1 ) の改変 / 多型は、 対象となる天然のポリペプチド ( 例えば、 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 、 または R M D N 1 ) と比較して改変された質量分析または H P L C 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 ( c h r o m o d y n a m i c ) 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、 E L I S A 、 ウエスタンプロット、 および当業者に既知の他の技術を含む ( Har low and Lane , A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 9 9 a n d E d w a r d s R , I m m u n o d i a g n o s t i c s : A P r a c t i c a l A p p r o a c h , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , O x f o r d ; E n g l a n d , 1 9 9 9 を参照のこと ) 。

【 0 1 5 0 】

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 ( S c h e n a M . , M i c r o a r r a y B i o c h i p T e c h n o l o g y , E a t o n P u b l i s h i n g , N a t i c k , M a s s . , 2 0 0 0 を参照のこと ) 。

【 0 1 5 1 】

さらに、 対象となる核酸 ( 例えば、 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 、 または R M D N 1 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 [ P C R ] ) 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。

【 0 1 5 2 】

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 C E N P F 核酸のヌクレオチド 4 4 0 9 ( 配列番号 1 ) 、 ( i i ) ヒト Z W I N T 核酸の核酸中のヌクレオチド 5 9 6 ( 配列番号 3 ) 、 ( i i i ) ヒト M T C H 2 核酸の核酸中のヌクレオチド 1 0 5 7 ( 配列番号 5 ) 、 ( i v ) ヒト E L F 1 核酸の核酸中のヌクレオチド 1 4 0 0 ( 配列番号 7 ) 、 ( v ) ヒト N Q 0 1 核酸の核酸中のヌクレオチド 6 1 5 ( 配列番号 9 ) 、 ( v i ) ヒト K I A A 0 2 2 6 L 核酸の核酸中のヌクレオチド 1 0 5 9 ( 配列番号 1 1 ) 、 および / または ( v i i ) ヒト R M D N 1 核酸の核酸中のヌクレオチド 3 1 6 ( 配列番号 1 3 ) 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。

【 0 1 5 3 】

10

20

30

40

50

一実施形態において、上記 CD 8 T リンパ球は、*in vitro* で増殖させた CD 8 T リンパ球である。増殖させた CD 8 T リンパ球は、CD 8 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 CD 8 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、CD 8 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 CD 8 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。

10

## 【 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 CD 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 CENPF の核酸配列（図 1 A ~ 1 D、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 1 E、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、CD 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（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 CD 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 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、CD 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（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 CD 8 T リンパ球を培養することと、を含む。

20

## 【 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 CD 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 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、CD 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（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 CD 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 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、CD 8 T リンパ球増殖に適した条件下におい

30

40

50

て、上記ペプチド(II)(前記ペプチド中のX<sup>5</sup>はRである)を負荷したHLA-B<sup>\*</sup>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 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 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>核酸、および/またはヒトMTC<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>核酸、および/またはヒトMTC<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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、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<sup>9</sup>はAである)を負荷したHLA-B<sup>\*</sup>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 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>核酸、および/またはヒトMTC<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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、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<sup>9</sup>はPである)を負荷したHLA-B<sup>\*</sup>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 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 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ELF<sub>1</sub>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<sub>1</sub>核酸、および/またはELF<sub>1</sub>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<sub>1</sub>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ELF<sub>1</sub>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<sub>1</sub>核酸、および/またはELF<sub>1</sub>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ELF<sub>1</sub>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(IV)(前記ペプチド中のX<sup>1~2</sup>はSである)を負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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)前記候補ドナーが、ヒトELF<sub>1</sub>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<sub>1</sub>核酸、および/またはELF<sub>1</sub>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ELF<sub>1</sub>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(IV)(前記ペプチド中のX<sup>1~2</sup>はTである)を負荷したHLA-A<sup>\*</sup>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。

【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 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

10

20

30

40

50

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) (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

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) (i 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) (i 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</sup> <sup>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 】

—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 】

—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、または胰癌等である。

## 【 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、バーキットリンパ腫）、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、または胰癌等である。

## 【 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 」、「 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。

## 【 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 and 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・バーウィルス（ 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、 1 0 % ウシ胎仔血清、 2 5 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。

10

20

30

40

50

## 【0172】

HLAタイピング Maisonneuve - 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<sup>\*</sup>0301 / 2902、HLA - B<sup>\*</sup>0801 / <sup>\*</sup>4403、HLA - C<sup>\*</sup>0701 / <sup>\*</sup>1601、およびHLA - DRB1<sup>\*</sup>0301 / <sup>\*</sup>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RNasey (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、1 μg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アmRNAを精製した。ポリア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 (Invitrogen) を使用して第1の鎖の鎖の逆転写 (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 (Bectman 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、1 μg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 × 100 bp) シーケンスを行った。クラスター密度は、約 600 ~ 800 k 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](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、一度にヌクレオチド1つ伸長される。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'末端プロッカーを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E1a  
nd(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、\*.bcf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](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/functional/ftp/index.html>, Flieck 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のウインドウを検討し、これらの66bp(または22aa)ウイ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  $4 \times 10^8$  の指數関数的に増殖する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(Polysulfone(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、ACNpH3.0);溶媒B:2Mギ酸アンモニウム、15%ACNpH3.0)を用いてペプチドを5つの画分に分画し、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 Verneuil 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、衝突活性化解離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

10

20

30

40

50

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/information/>；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（Proteo profile）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）。ペプチドマップと一緒にアラインし、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と関連している場合、最も高いスコアを有するものを維持した。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8～11mer）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<sub>50</sub>）を得て（Karosiene et al.，2011）、MHC Iペプチドを分類するため用いた。50nM未満のIC<sub>50</sub>を有するペプチドを強い結合剤と見なし、50～約500nMのIC<sub>50</sub>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。

10

20

30

40

50

## 【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 (ビルト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、Masscort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発見することはできない。

## 【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、エピスタイン・バーウィルス (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Masscort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 对 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）遺伝子中の单一ヌクレオチド多型に由来する。この单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、ELQEKFSSL配列を有するCENPFタンパク質をコードする。单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（Bencimont 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体腫瘍において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QELDRVFQKL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）遺伝子中の单一ヌクレオチド多型に由来する。この单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、QELDRVFQKL配列を有するZWINTタンパク質をコードする。单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關している（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

10

20

20

30

40

50

、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)遺伝子中の单一ヌクレオチド多型に由来する。この单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。单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、特に固体腫瘍(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(etsドメイン転写因子)]遺伝子中の单一ヌクレオチド多型に由来する。この单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。单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、脳癌、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得る。

得る。

【0196】

別の対のMiHAのアミノ酸配列は、A M Y D K G P F R S K対A M Y D K G P F W S K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、A M Y D K G P F R S K配列を含有するNQ01タンパク質をコードし、他方は、A M Y D K G P F W S K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、ラジカル種の產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、肺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、R V S L P T S P G対R V S L P T S P R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、K I A A 0 2 2 6 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、R V S L P T S P G配列を含有するK I A A 0 2 2 6 Lタンパク質をコードし、他方は、R V S L P T S P R配列を有するK I A A 0 2 2 6 Lタンパク質をコードする。単一ヌクレオチド多型は、ヒトK I A A 0 2 2 6 L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、K I A A 0 2 2 6 L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。K I A A 0 2 2 6 L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 リンパ球およびバ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 (Kapusheksky 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; Freijje 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(VI)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)中の单一ヌクレオチド多型に由来する。この单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。单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に対応する位置にいわ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リンパ芽球およびバ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 (Kapusheksky 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; Tyburszky 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。  
30

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(VII)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。  
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

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（comprising）」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。

【0202】

参考文献

1. Sykes, M., K. Woods, and D.H. Sachs. 2008. *Transplantation Immunology*. In *Fundamental Immunology*. W.E. Paul, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 10 1426-1488.
2. Loveland, B. and E. Simpson. 1986. The non-MHC transplantation antigens - neither 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-peptides. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 92:41-60. 20
5. de Verteuil, D., D.P. Granados, P. Thibault, and C. Perreault. 2012. Origin and plasticity 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 understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 30 11:823-836.
8. Yewdell, J.W. 2011. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol.* 32:548-558.
9. Roopenian, D., E.Y. Choi, and A. Brown. 2002. The immunogenomics of minor histocompatibility 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. Maruya, N. Mehra, F. Oguz, M. Oudshoorn, N. Pereira, R. Rani, R. Sergeant, J. Thomson, T.H. Tran, H. Turpeinen, K.L. Yang, R. Zunec, M. Carrington, P. de Knijff, and E. Goulmy. 2007. 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 variation 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. 10
15. Bleakley,M. and S.R.Riddell. 2011. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol. Cell Biol.* 89:3 96-407.
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 HMDS 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. 20
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. 30
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. 40
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. Moidrem,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 50

, 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.* 22:1 62-172.
27. Kolb,H.J., A.Schattenberg, J.M.Goldman, B.Hertenstein, N.Jacobsen, W.Arcece, 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.
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.Malinzak, 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. 30
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.
34. Shlomchik,W.D. 2007. Graft-versus-host disease. *Nat.Rev.Immunol.* 7:340-352. 40
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-hos 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.

20

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.

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.Reinhardt, 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 a

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. 10
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. 20
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. 30
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. 40
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. 50

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. 10
60. Akatsuka,Y., T.Nishida, E.Kondo, M.Miyazaki, H.Taji, H.Iida, K.Tsujimura, M.Yazaki, T.Naoe, Y.Morishima, Y.Kodera, 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. 20
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.Kodera, 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.Kodera, 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 zygosity-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.Blanckenstein. 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., Lundsgaard,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 Sirotnik,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/EBPalpha against 20S proteasomal degradation to regulate p63 expression with implications in protection against chemical-induced skin cancer. *Oncogene*. 10 2012 Jan 16. doi: 10.1038/onc.2011.600. [Epub ahead of print].

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 】

【 図 1 B 】

**FIG. 1A**

【図1C】

【 図 1 D 】

1 nawaaleewee giptarlaicole kiegaklejg kkekgrrgqg ldsiaalqek gqveleek  
61 egtnakrge giptarlaicole tkigkishe qkpgesnggq tptlpgqyys gqveleek  
121 ckseleqsggq aqgsadwsn pntpgqklt tptlpgqyys gqveleek yneveekr  
181 leaevalgk qksgsdlpg tnmurhik dgnqkqslpg gqkpgesnggq gqkpgesnggq  
241 fssafyqeqg evtpqslpg lqkrdansf dgnqkqslpg dgnqkqslpg rknkialel  
301 lgqhsqeqg qkpgesnggq lqkrdansf ekevlakqslpg dgnqkqslpg dgnqkqslpg  
361 lgqhsqeqg qkpgesnggq lqkrdansf ekevlakqslpg dgnqkqslpg dgnqkqslpg  
421 lgqhsqeqg mnvhpqslpg lktvsgqslpg mnvhpqslpg qkpgesnggq gqkpgesnggq  
481 neemekcnl hleeksgak evhcakqslpg nikkchnggq nqcaeqfngs qkpgesnggq  
541 qekingensn ltekkleakqslpg adleksqslpg qdkllkreh qdlnkldkst tekekkals  
601 alelkkeye ekevlakqslpg cwscknsl tmskeeksl qekhnlkst lktqgkishe  
661 ymptqeqg qkpgesnggq llnkdlkst vngqkqslpg qkpgesnggq gqkpgesnggq  
721 qsslladqg bgnashfsl qkpgesnggq rscrclleads spksnalsn rvdslfsls  
841 sqkgnmdqg qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq dtsahngvq  
871 eftalslenke lqkrlndkq eteqaegel kqkhsnalsn lqkrlndkq lselekkens  
931 lsiislnkreis eltngqkqslpg elnasmngq mllqkqslpg anyderexks dlyedqkq  
101 eftllkllreis etngqkqslpg qkpgesnggq lkeclscne qkpgesnggq lkeclscne  
151 qkpgesnggq lkeclscne qkpgesnggq lkeclscne qkpgesnggq lkeclscne  
211 kgqkpgesnggq lkeclscne qkpgesnggq lkeclscne qkpgesnggq lkeclscne  
1201 lsdlyspqslpg vqleamnqslpg lqksgsdlpg kchelkqslpg tptlpgqslpg qkpgesnggq  
1261 kldkrcdse kyslqphs lqksgsdlpg qslqtmhklqslpg kchelkqslpg qkpgesnggq  
1321 lndrsreclt akratvkeey kllnkevllqslpg lqksgsdlpg lndrsreclt vqleamnqslpg  
1381 lapldeasny ehltidkqslpg qkpgesnggq fllsgekqslpg lndqkqslpg qkpgesnggq  
1441 alpdlvysp qkpgesnggq lndqkqslpg qkpgesnggq fllsgekqslpg lndqkqslpg qkpgesnggq  
1611 qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq  
1671 qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq  
1731 gssceisels qkpgesnggq dfngqkqslpg nqirvlkrs nqirvlkrs edrdkws  
1891 inmdeqslpg qkpgesnggq lnsieclqslpg lqksgsdlpg lqkrdansf qkpgesnggq lqkrdansf  
1951 lndqkqslpg qkpgesnggq lndqkqslpg qkpgesnggq lndqkqslpg qkpgesnggq lndqkqslpg  
1971 leadlevvgt qkclkeclqslpg nckvclqslpg lseleutvrt nqirvlkrs skttalndq  
1991 sekmskxktg leehsgbchqslpg cgvayeqgq eketlqslpg lqkrdansf tkhsgkqslpg  
2041 ekdgsalst kclenglakqslpg lnekkvlqslpg cwscknsls edskvlnks kalcavleks  
2101 gefalriss qevhngqrr lkrtrvrtq dkekkhlnks lkekerernd skdkvlnks  
2161 rdgseengq elvldakqslpg kaevkellqslpg lnekkvlqslpg fdlvrlzs ekenktqg  
2221 rdgseengq elvldakqslpg kaevkellqslpg lnekkvlqslpg fdlvrlzs ekenktqg  
2281 inqeklqslpg pthseebqslpg nskkvetl adeketqkqslpg lqksgsdlpg addklpxn  
2341 lqkrdakqslpg nqkhsalnqslpg nskkvetl adeketqkqslpg lqkrdakqslpg rskcnklns  
2401 lqkgekeris leislnfssn lqkgekeris gmkckstam emlqrgkqslpg nqirvlkrs  
2461 qeakckqslpg lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris gmkckstam emlqrgkqslpg nqirvlkrs  
2521 gqkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris gmkckstam emlqrgkqslpg nqirvlkrs  
2581 qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris gmkckstam emlqrgkqslpg nqirvlkrs  
2641 geknklqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
2701 lrlhbaekqslpg vqleamnqslpg ktektkqslpg lqkrdansf qkpgesnggq lqkrdansf qkpgesnggq  
2761 kattqgeel kkkhdnkyk vnlkekkqslpg agmkmlkk qkpgesnggq lqkgekeris lqkgekeris  
2821 aqeqkqkgtg wmdkvdlysl tpekekkel tpekekkel qkpgesnggq lqkqslpg lqkqslpg  
2881 lqeqkqkgtg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
2941 qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq  
3001 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3061 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3121 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3181 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3241 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3301 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3361 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3421 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3481 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3541 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3601 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3661 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3721 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3781 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3841 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3901 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
3961 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4021 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4081 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4141 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4201 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4261 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4321 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4381 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4441 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4501 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4561 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4621 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4681 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4741 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4801 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4861 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4921 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
4981 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5041 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5101 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5161 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5221 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5281 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5341 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5401 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5461 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5521 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5581 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5641 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5701 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5761 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5821 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5881 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
5941 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6001 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6061 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6121 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6181 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6241 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6301 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6361 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6421 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6481 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6541 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6601 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6661 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6721 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6781 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6841 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6901 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
6961 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7021 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7081 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7141 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7201 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7261 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7321 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7381 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7441 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7501 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7561 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7621 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7681 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7741 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7801 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7861 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7921 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
7981 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8041 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8101 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8161 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8221 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8281 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8341 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8401 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8461 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8521 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8581 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8641 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8701 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8761 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8821 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8881 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
8941 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9001 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9061 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9121 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9181 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9241 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9301 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9361 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9421 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9481 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9541 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9601 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9661 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9721 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9781 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9841 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9901 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris  
9961 lrrttrtqslpg qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris qkpgesnggq lqkgekeris

**FIG. 1D**

FIG. 1C

【 図 2 A 】

**FIG. 2A**

【 図 2 B 】

```
1 maaestaae aalevlavaa gilepvgjle esalpakiy effvdsqgkdl kllcsgqya
 6 dlflgnilage dtskgplda setdsrqkla aakeqwgkelx styrheves kiglktalgx
121 maaeqgkrr lreaefqlga kkgmamekrr avnqngewlgqq ekhlqhlavae saevrerktg
181 tqgqldwvqg klglnqkqac gerdkllyrqg tflqlylityq kglfpcoaca eacnlpddkp
241 qgptprqegs tgdtnrdpgs wfskavqgqg agdnip
```

**FIG. 2B**

### 【図3A】

FIG. 3A

〔 図 3 B 〕

1 madaasqyl gsgltisq p hmlvnlvlgq gysplptg rniifrqcgvq lpgifysqah  
61 isieddrgrgl ftglptrcs gvlqvhvqgq vlyqhesdgvq gqfghqgvqgk vkeffsdvah  
121 iktetremra rsaatilhp fwhtrlsrvyq qfgrqesryk gicdsidtq reeqigfqa smlytpfvlv  
21 gylprqlqdi lslwlcnsha lyvntlyrd svqstnemks yqasvgtqfqa  
241 snlhmavncg laggccpypsp iytswidcw mlqkegnmr qaslftrkyp gfktyccodik  
301 mil

**FIG. 3B**

【 図 4 A 】

FIG. 4A

〔 4 B 〕

3541 atttaaacaa aatatttaaat ttggaaatcc ttaaaaccatt ttgtatctt taattggttt  
3601 attttttaaat aatccatata aaaaatttcga gtgtctgtt tcaggcaaaa gttttcttaaa  
3661 gaataatgtt ggaaatggaa ttactagatc atccaggatca cttatgtttt ataaataat  
3721 ttccatgttc aagatggca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

**FIG. 4B**

【 図 4 C 】

**FIG. 4C**

【 図 5 A 】

**FIG. 5A**

【 図 5 B 】

**FIG. 5B**

【図 5 C】

```
1 mvgrraliv ahertsfnv amkeaaal Kkkgwewvves dlyamnfpi isrkdtigkl
61 kdpafanpva esvlaykgh lspdvaewk klaedalvq qfplwfgvpv allkwgfvferv
121 figeafyta amdykgpfrs Kkavslitvq gsgsmylls lghdmvnlh picgslifhlc
181 qfvglepvtq yzsgphtd qzrilegwnkq hnlriwdep tlyfassplfd lnfqagflmk
241 kevvdgeeknk kfqlsvqvhhl qksiptwngki kark
```

**FIG. 5C**

〔 図 6 A 〕

FIG. 6A

【 図 6 B 】

**FIG. 6B**

【 図 6 C 】

**FIG. 6C**

【図 7 A】

**FIG. 7A**

【 図 7 B 】

1 malaar111 lpfrgaaq srplags3s rgbcperfrf gngpnt fkrllslas  
2 slyfetqyq isqavahwt akveeileqa dlysegete klylgltqyq  
3 larasrdav lsrtsewah vlyaleyaq kralekness fashkywic  
4 kanyakaii hkehfaekel npkdataihl mngwcytewa mwgryqriak  
5 keyalgkyh aeqvdnpfys knillgkty lkhnkklia fwlmkakdyp  
6 teaaqlstfs sekn

**FIG. 7B**

【配列表】

2015528443000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2013/050580															
<p><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</p>																	
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b>            Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  <i>C07K 14/74</i> (2006.01)</p>																	
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched            None</p>																	
<p>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-Lozette, O.) and GenomeQuest (SEQ ID NO:15-28)</p>																	
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO2010116375A1 (YEDA RESEARCH &amp; DEVELOPMENT CO. LTD. and YISSUM RESEARCH COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD.) 14 October 2010 SEQ ID NO: 12 and 23</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">64, 67, 70-72, 74 and 76</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">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</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">159, 165-167, 169 and 171</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">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</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">TYKODI, S. et al. "<i>C19orf48</i> 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</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;"></td> </tr> </tbody> </table>			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. " <i>C19orf48</i> 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	
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. " <i>C19orf48</i> 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.															
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 2px;">           * Special categories of cited documents :                       "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                       "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                       "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                       "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                       "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; padding: 2px;">           "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                       "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																
Date of the actual completion of the international search 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, Québec 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  $Z^1-X^1-LQEKFXX^3X^4-Z^2$ , 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  $Z^1-X^1-ELDX^2VFQXX^3X^4-Z^2$ , 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  $Z^1-X^1-LFFRKVXX^3X^4-Z^2$ , 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  $Z^1-X^1-X^2-VLKPGNX^3X^4-Z^2$ , 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  $Z^1-X^1-X^2-YDKGPFX^3X^4-Z^2$ , 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  $Z^1-X^2X^2X^2-SLPTSPX^3X^4-Z^2$ , 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  $Z^1-X^2X^2X^2-GNPGBTFX^3X^4-Z^2$ , 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 SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

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

(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,R,S,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,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・アブニユ・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