

(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2017-504324

(P2017-504324A)

(43) 公表日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>C 12 Q 1/68</b> (2006.01)	C 12 Q	1/68	2 G 04 5
<b>G 01 N 33/68</b> (2006.01)	G 01 N	33/68	4 B 06 3
<b>A 61 K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K	45/00	4 C 08 4
<b>A 61 K 39/395</b> (2006.01)	A 61 K	39/395	4 C 08 5
<b>A 61 P 35/00</b> (2006.01)	A 61 K	39/395	T

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-544613 (P2016-544613)	(71) 出願人	500213834 メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー — 1275
(86) (22) 出願日	平成26年12月23日 (2014.12.23)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月19日 (2016.8.19)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/072125	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02015/103037	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成27年7月9日 (2015.7.9)		
(31) 優先権主張番号	61/923,183		
(32) 優先日	平成26年1月2日 (2014.1.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/066,034		
(32) 優先日	平成26年10月20日 (2014.10.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/072,893		
(32) 優先日	平成26年10月30日 (2014.10.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫療法に対する癌応答の決定因子

## (57) 【要約】

免疫療法に対する癌応答の分子決定因子が記載されており、また免疫療法に応答する可能性が高い癌を同定及び/または特徴決定するためのシステム及びツールも記載されている。本発明は、癌免疫療法に対する好ましい応答の可能性を予測することができるという発見を含む。本発明はさらに、癌細胞が非自己として、患者の免疫系によって認識できるネオエピトープ(neopeptide)をもたらす体細胞変異を保有し得るという発見を含む。癌サンプル中の1つまたは複数のネオエピトープの同定は、どの癌患者が免疫療法に、特に免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好ましく応答する可能性が高いかを判定するのに有用である。

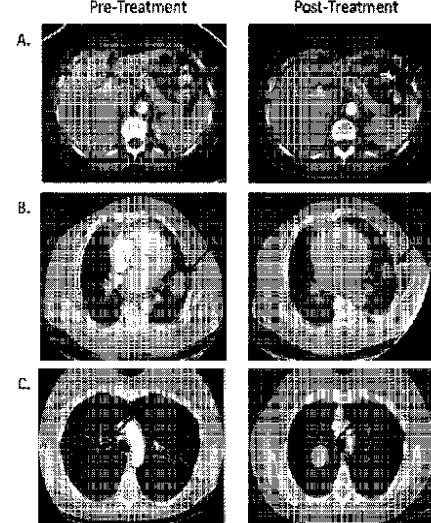


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象由来の癌サンプルにおける体細胞変異を検出するステップ；及び  
前記対象を免疫チェックポイントモジュレーターによる治療の候補として同定するステップ  
を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記検出するステップが、前記癌サンプル由来の1つまたは複数のエクソームを配列決定することを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記体細胞変異が、T細胞によって認識されるネオエピトープ(neoepitope)を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

変異を有さない対応するエピトープと比較して、前記ネオエピトープが、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に対するより高い結合親和性を有する、請求項2に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記体細胞変異が、体細胞変異を有さない同じ細胞型において発現していない四量体を含むネオエピトープを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記ネオエピトープが、感染性病原体とコンセンサス配列を共有する、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記四量体が、表1に示されるものから選択される配列である、請求項5に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記癌が黒色腫であるかまたは黒色腫を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記免疫チェックポイントモジュレーターが、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA4)、プログラム死1(programmed death 1)(PD-1)もしくはそのリガンド、リンパ球活性化遺伝子-3(lymphocyte activation gene-3)(LAG3)、B7ホモログ3(B7-H3)、B7ホモログ4(B7-H4)、インドールアミン(2,3)-ジオキシゲナーゼ(IDO)、アデノシンA<sub>2a</sub>受容体、ニューリチン(neuritin)、B及びTリンパ球アテニュエーター(B-and T-lymphocyte attenuator)(BTLA)、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質3(T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3)(TIM-3)、誘導性T細胞共刺激分子(ICOS)、CD27、CD28、CD40、CD137、またはそれらの組合せと相互作用する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記免疫チェックポイントモジュレーターが抗体作用物質である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記抗体作用物質が、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片であるか、またはモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片を含む、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記抗体がイピルミマブ(ipilimumab)である、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記対象が以前に癌治療法で治療されていない、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 4】**

前記対象が以前に癌免疫治療法で治療されていない、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 5】**

前記対象にイピルミマブを投与するステップをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 6】**

対象由来の癌サンプルにおける体細胞変異を検出するステップ；及び

前記対象を免疫チェックポイントモジュレーターによる治療の不十分な候補として同定するステップ

を含む、方法。

**【請求項 1 7】**

前記対象が、免疫チェックポイントモジュレーターを投与された場合に 1 つまたは複数の自己免疫性合併症を患う可能性が高いとして同定される、請求項 1 6 に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

前記自己免疫性合併症が甲状腺機能低下症である、請求項 1 7 に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

表 1 からの四量体を含むネオエピトープを含む体細胞変異を含む癌を対象が有すると判定するステップ、及び

前記対象のために、免疫チェックポイントモジュレーターを含む癌治療を選択するステップ

を含む、方法。

**【請求項 2 0】**

前記癌が黒色腫を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

**【請求項 2 1】**

前記免疫チェックポイントモジュレーターが、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 ( C T L A 4 )、プログラム死 1 ( P D - 1 )もしくはそのリガンド、リンパ球活性化遺伝子 - 3 ( L A G 3 )、B 7 ホモログ 3 ( B 7 - H 3 )、B 7 ホモログ 4 ( B 7 - H 4 )、インドールアミン ( 2 , 3 ) - ジオキシゲナーゼ ( I D O )、アデノシン A 2 a 受容体、ニューリチン、B 及び T リンパ球アテニュエーター ( B T L A )、キラー免疫グロブリン様受容体 ( K I R )、T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質 3 ( T I M - 3 )、誘導性 T 細胞共刺激分子 ( I C O S )、C D 2 7 、C D 2 8 、C D 4 0 、C D 1 3 7 、またはそれらの組合せと相互作用する、請求項 1 9 に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

前記免疫チェックポイントモジュレーターが抗体作用物質である、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

前記抗体作用物質が、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片であるか、またはモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

前記抗体がイピルミマブである、請求項 2 3 に記載の方法。

**【請求項 2 5】**

前記対象が以前に癌治療法で治療されていない、請求項 1 9 に記載の方法。

**【請求項 2 6】**

前記対象が以前に癌免疫治療法で治療されていない、請求項 1 9 に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

T 細胞によって認識されるネオエピトープを含む 1 つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると以前に同定された対象を、免疫チェックポイントモジュレーターで治療する方法。

**【請求項 2 8】**

前記癌が黒色腫を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

10

20

30

40

50

前記免疫チェックポイントモジュレーターが、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA4）、プログラム死1（PD-1）もしくはそのリガンド、リンパ球活性化遺伝子-3（LAG3）、B7ホモログ3（B7-H3）、B7ホモログ4（B7-H4）、インドールアミン（2,3）-ジオキシグナーゼ（IDO）、アデノシンA2a受容体、ニューリチン、B及びTリンパ球アテニュエーター（BTLA）、キラー免疫グロブリン様受容体（KIR）、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質3（TIM-3）、誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）、CD27、CD28、CD40、CD137、またはそれらの組合せと相互作用する、請求項27に記載の方法。

【請求項30】

前記免疫チェックポイントモジュレーターが抗体作用物質である、請求項27に記載の方法。 10

【請求項31】

前記抗体作用物質が、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片であるか、またはモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記抗体がイピルミマブである、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記対象が以前に癌治療法で治療されていない、請求項27に記載の方法。

【請求項34】

前記対象が以前に癌免疫治療法で治療されていない、請求項27に記載の方法。 20

【請求項35】

免疫チェックポイントモジュレーターによる癌治療の有効性を改善する方法であって、前記治療を受けることについて、T細胞によって認識されるネオエピトープを含む1つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると同定された対象を選択するステップを含む、方法。

【請求項36】

免疫チェックポイントモジュレーター療法を施すことによって癌を治療する方法における、

T細胞によって認識されるネオエピトープを含む1つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると同定された対象に、前記療法を施すステップを含む改善。 30

【請求項37】

癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、またはリンパ腫からなる群から選択される癌を治療する方法であって、

T細胞によって認識されるネオエピトープを含む1つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると同定された対象に、免疫チェックポイントモジュレーター療法を施すステップを含む、方法。

【請求項38】

前記癌が黒色腫であるかまたは黒色腫を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

免疫チェックポイントモジュレーター療法に関する応答シグネチャーを定義する方法であって、

その存在が免疫チェックポイントモジュレーター療法に対する共通応答特徴に関連または相關する遺伝子配列要素が、比較によって定義されるように、前記共通応答特徴を共有するサンプルを含む第1の複数の腫瘍サンプル由来の遺伝子配列情報を、第1のセットのサンプルに対して前記共通応答特徴を共有しないがその他の点では同等であるサンプルを含む第2の複数の腫瘍サンプルから得られた遺伝子配列情報と比較するステップ；及び

定義された前記遺伝子配列要素のいずれがネオエピトープを生成するかを判定するステップ；及び

前記ネオエピトープの存在を前記共通応答特徴に関するシグネチャーとして定義するス 50

ステップ

を含む、方法。

【請求項 4 0】

前記ネオエピトープのいずれがペプチド - MHC 結合強度を変化させるかを判定するステップ

をさらに含み、

前記共通応答特徴に関するシグネチャーとして定義する前記ステップが、前記シグネチャーとして、ペプチド - MHC 結合強度を変化させると判定された前記ネオエピトープの少なくとも 1 つを定義することを含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記共通応答特徴に関するシグネチャーとして定義する前記ステップが、前記シグネチャーとして、ペプチド - MHC 結合強度を変化させると判定された前記ネオエピトープのセットを定義することを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ネオエピトープが四量体であるかまたは四量体を含む、請求項 3 9 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記ネオエピトープが、表 1 に記載の四量体であるか、または表 1 に記載の四量体を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ネオエピトープのセットが、表 1 に記載の複数のネオエピトープを含むか、または表 1 に記載の複数のネオエピトープからなる、請求項 4 4 に記載の方法。

それは複数の腫瘍サンプルを分析する共通応答特徴を共有しないので、本発明者らは、腫瘍を分析し、かつ、全エクソーム配列決定を使用して血液DNAとマッチさせた。発見セットでは、少なくとも  $10 \times$  深度までカバーされた 90 % 超の標的配列、及び  $103 \times$  の平均エクソームカバレッジ (図 5) を用いて、6.4 GB のマッピングされた配列を作製した。サンプルの間での広範囲の変異負荷 (図 2 A 及び 2 B)、及び再発変異 (図 6 A) は、文献と一致していた。

本発明者らは、患者に特異的な HLA 型を使用して、体細胞ネオエピトープのサブセットがペプチド - MHC 結合の強度を変えるかどうかを試験した。本発明者らは最初に、全野生型ペプチドに対する全変異体ペプチドの全体的な抗原性傾向を比較した。興味深いことに、全体として、変異体ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも高い親和性で MHC クラス I に結合することが予測された (図 10 A 及び 10 B)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年1月2日出願された米国仮特許出願番号 61/923,183; 2014年10月20日に出願された米国仮特許出願番号 62/066,034; 及び 2014年10月30日に出願された米国仮特許出願番号 62/072,893、のそれぞれに優先権を主張し、それぞれの全内容は、参照により本明細書に組込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

癌免疫療法は、患者の免疫系による癌細胞の攻撃を含む。T リンパ球の調節及び活性化は、T 細胞受容体によるシグナル伝達、及び活性化のために正または負のシグナルを送達する受容体の共シグナル伝達にも依存する。T 細胞による免疫応答は、免疫チェックポイントと呼ばれる、共刺激シグナルと阻害シグナルのバランスによって制御される。

【0003】

免疫チェックポイント阻害剤を用いた免疫療法は、癌治療に革命を起こしている。例え

10

20

30

40

50

ば、特定の黒色腫患者においては、抗 C T L A 4 抗体及び抗 P D 1 抗体は、転移性の設定における長期疾患制御のための顕著な機会を提供する。

【発明の概要】

【0 0 0 4】

概要

本発明は、癌免疫療法に対する好ましい応答の可能性を予測することができるという発見を包含する。本発明はさらに、癌細胞が非自己として、患者の免疫系によって認識できるネオエピトープ (neoepitope) をもたらす体細胞変異を保有し得るという発見を含む。癌サンプル中の1つまたは複数のネオエピトープの同定は、どの癌患者が免疫療法に、特に免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好ましく応答する可能性が高いかを判定するのに有用である。

10

【0 0 0 5】

いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に応答する可能性が高い対象を同定するための方法を提供する。

【0 0 0 6】

いくつかの実施形態では、その方法は、対象由来の癌サンプルにおける体細胞変異を検出するステップ、及び前記対象を免疫チェックポイントモジュレーターによる治療の候補として同定するステップを含む。いくつかの実施形態では、対象は、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好適に応答する可能性が高いと同定される。

20

【0 0 0 7】

いくつかの実施形態では、体細胞変異を検出することは、癌サンプル由来の1つまたは複数のエクソームを配列決定することを含む。いくつかの実施形態では、体細胞変異は、T細胞によって認識されるネオエピトープを含む。

【0 0 0 8】

いくつかの実施形態では、変異を有さない対応するエピトープと比較して、ネオエピトープは、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子に対するより高い結合親和性を有する。

【0 0 0 9】

いくつかの実施形態では、体細胞変異は、体細胞変異を有さない同じ細胞型において発現していない四量体を含むネオエピトープを含む。

30

【0 0 1 0】

いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、感染性病原体とコンセンサス配列を共有する。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、細菌とコンセンサス配列を共有する。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、ウイルスとコンセンサス配列を共有する。

【0 0 1 1】

いくつかの実施形態では、体細胞変異は、表1の四量体を含むネオエピトープを含む。

【0 0 1 2】

いくつかの実施形態では、癌サンプルは、黒色腫であるかまたは黒色腫を含む。

【0 0 1 3】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、1つまたは複数の細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA4)、プログラム死1 (programmed death 1) (PD-1) もしくはそのリガンド、リンパ球活性化遺伝子-3 (lymphocyte activation gene-3) (LAG3)、B7ホモログ3 (B7-H3)、B7ホモログ4 (B7-H4)、インドールアミン (2,3)-ジオキシゲナーゼ (IDO)、アデノシンA2a受容体、ニューリチン (neuritin)、B及びTリンパ球アテニュエーター (B- and T-lymphocyte attenuator) (BTLA)、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR)、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3) を含む。

40

50

n 3 ) ( T I M - 3 ) 、誘導性 T 細胞共刺激分子 ( I C O S ) 、 C D 2 7 、 C D 2 8 、 C D 4 0 、 C D 1 3 7 、またはそれらの組合せと相互作用する。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、抗体もしくはその抗原結合断片であるか、または抗体もしくはその抗原結合断片を含む。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターはイピルミマブ ( i p i l u m i m a b ) である。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターはトレメリムマブであるかまたはトレメリムマブを含む。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターはニボルマブであるかまたはニボルマブを含む。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターはランプロリズマブであるかまたはランプロリズマブを含む。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターはペンプロリズマブであるかまたはペンプロリズマブを含む。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、本発明は、対象を免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に応答する可能性が高いと同定するため方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、以前に癌免疫治療法で治療されていない対象を免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に応答する可能性が高いと同定するための方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、本発明は、対象由来の癌サンプルにおける体細胞変異を検出し、かつ前記対象を免疫チェックポイントモジュレーターによる治療の不十分な候補として同定するための方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターを投与された場合に 1 つまたは複数の自己免疫性合併症を患う可能性が高いとして対象を同定するための方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、自己免疫性合併症は、腸炎、肝炎、皮膚炎（中毒性表皮壊死症を含む）、神経障害及び／または内分泌障害であるかまたはそれらを含む。いくつかの実施形態では、自己免疫性合併症は甲状腺機能低下症であるか、または甲状腺機能低下症を含む。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、対象が、表 1 からの四量体を含むネオエピトープを含む体細胞変異を含む癌を有すると判定し、かつ前記対象のために、免疫チェックポイントモジュレーターを含む癌治療を選択するための方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、T 細胞によって認識されるネオエピトープを含む 1 つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると以前に同定された対象を、免疫チェックポイントモジュレーターで治療するための方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターによる癌治療の有効性を改善するための方法であって、前記治療を受けることについて、T 細胞によって認識されるネオエピトープを含む 1 つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると同定された対象を選択するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターを投与することによって癌を治療する方法に対する改善を提供し、ここで改善は、T 細胞によって認識されるネオエピトープを含む 1 つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると同定された対象に、療法を施すことを含む。いくつかの実施形態では、長期的な臨床的有用性は、 C T L A - 4 遮断（例えば、イピリムマブまたはトレメリムマブを介して）治療後に観察される。

## 【0023】

いくつかの実施形態では、本発明は、癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、またはリンパ腫からなる群から選択される癌を治療するための方法であって、T細胞によって認識されるネオエピトープを含む1つまたは複数の体細胞変異を伴う癌を有すると同定された対象に、免疫チェックポイントモジュレーター療法を施すステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、癌は黒色腫である。いくつかの実施形態では、癌は、非小細胞肺癌(N S C L C)である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0024】

添付の図面は、例示のみを目的として提示され、限定することを意図するものではない

10

。 (図1) 図1(図1A～1Cから構成される)は、療法からの長期的な臨床的有用性を示した患者(図1A、1/2/2011及び8/26/2013)；(図1B、9/6/2011及び1/14/2013)並びに有用性なし/進行性疾患を有する患者(図1C、8/13/2009及び1/9/2010)からの治療前後のスキャンの対を示す。

(図2) 図2(図2A～2Iから構成される)は、イピリムマブ治療からの異なる臨床的有用性を示す患者からの腫瘍の変異状況を示す。図2Aは、臨床的有用性によって分類される変異負荷(エクソーム1個あたりの非同義変異の数)を示す。図2Bは、イピリムマブからの変異負荷と有用性の関係を示す。LB、長期的な臨床的有用性グループ；NB、最少の有用性または有用性なしのグループ；P = 0.01(長期的な臨床的有用性を示す患者と示さない患者間の中央値変異負荷の差に対するマンホイットニー両側t検定比較中央値)。図2Cは、臨床サブグループによる遷移(Ti)とトランスバージョン(Tv)の割合を示す。図2Dは、発見と検証のセットにおけるヌクレオチド変化を示す。変異スペクトルは、以前の黒色腫遺伝子の研究と一致する。19図2Eは、発見セットにおいてエクソーム1個あたり100個(ログランク検定でP = 0.041)超または未満の非同義コーディング変異を有する患者に対する全体的な生存率のカプランマイヤー曲線を描いている。図2Fは、イピリムマブからの変異負荷と有用性の関係を示す。LB、長期的な臨床的有用性グループ；NB、最少の有用性または有用性なしのグループ；P = 0.01(長期的な臨床的有用性を示す患者と示さない患者間の中央値変異負荷の差に対するマンホイットニー両側t検定比較中央値)。図2Gは、発見セットにおいてエクソーム1個あたり100個(ログランク検定でP = 0.041)超または未満の非同義コーディング変異を有する患者に対する全体的な生存率のカプランマイヤー曲線を描いている。図2Hは、検証セットにおいてエクソーム1個あたり100個(ログランク検定でP = 0.010)超または未満の非同義コーディング変異を有する患者に対する全体的な生存率のカプランマイヤー曲線を描いている。図2Iは、臨床サブグループによる遷移(Ti)とトランスバージョン(Tv)の割合を示す。

20

30

40

(図3) 図3(図3A～3Hから構成される)は、ネオエピトープシグネチャーがイピリムマブに臨床的有用性を定義することを示す。補足方法で説明されるように、候補ネオエピトープは、変異解析により同定した。図3Aは、発見セット(n = 25)において長期的な臨床的有用性を示す患者(LB)または最少の臨床的有用性もしくは臨床的有用性なしの患者(NB)によって共有される候補テトラペプチドネオエピトープのヒートマップを示す。各行は、ネオエピトープを表わす。赤い線は、応答に関連するテトラペプチドシグネチャーを示す。それらが発生する正確なテトラペプチド、染色体遺伝子座、並びに野生型及び変異九量体は、表4及び図19に記載されている。図3Bは、検証セット(N = 15)に対する同じ情報を示す。図3Cは、単離された非応答性の腫瘍を除き、ネオエピトープシグネチャー正(青線)または負(赤線)によって、発見セットに対するカプランマイヤー曲線を示す。シグネチャーを有する患者対シグネチャーを有さない患者のログランク検定によりP < 0.0001。図3Dは、検証セットに対する同じデータを示す。ログランクによりp = 0.049。図3Eは、発見セット(n = 25)において長期的な臨床的有用性を示す患者(LB)または最少の臨床的有用性もしくは臨床的有用性なし

50

の患者（N B）によって共有される候補テトラペプチドネオエピトープのヒートマップを示す。各行は、ネオエピトープを表わす。赤い線は、応答に関連したテトラペプチドシグネチャーを示す。それらが発生する正確なテトラペプチド、染色体遺伝子座、並びに野生型及び変異九量体は、表4及び図19に記載されている。図3Fは、検証セット（n=15）に対する同じ情報を示す。図3Gは、単離された非応答性の腫瘍を除き、ネオエピトープシグネチャー正（青線）または負（赤線）によって、発見セットに対するカプランマイヤー曲線を示す。シグネチャーを有する患者対シグネチャーを有さない患者のログランク検定により  $P < 0.0001$ 。図3Hは、検証セットに対するデータを示す。ログランクにより  $P = 0.049$ 。

（図4）図4（図4A～4Fから構成される）は、ネオエピトープがイピリムマブ治療された患者由来のT細胞を活性化することを示す。図4Aは、ゲノム位置の関数としてのネオエピトープの生成の多様性を示す。3つの代表的なLBの患者由来のネオエピトープが、ゲノム位置の関数としてプロットされている。シグネチャーにおける候補ネオエピトープは、異なる遺伝子によって生成され得る。ネオエピトープの染色体位置がx軸に沿ってプロットされている。ピークの高さは、発見と検証のセットにおいて、何人の患者がそのアミノ酸配列を共有しているかを示す。図4Bは、トキソプラズマ原虫のテトラペプチドサブストリングの例を示す。それぞれの場合において、変異を含む九量体が結合すると予測され、患者特異的HLAによって提示される。図4Cは、TESPFEQHI対野生型ペプチドTKSPFEQHIに対する多官能性T細胞応答を示す。図4Dは、TESPFEQHI対野生型ペプチドTKSPFEQHIに対する二重陽性（IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\alpha$ ）CD8+T細胞応答並びに経時IFN- $\gamma$ +T細胞の増加を示す。図4Eは、GLEEREGFTF対野生型ペプチドGLERGGFTFに対する二重陽性（IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\alpha$ ）CD8+T細胞応答を示し、ベースラインに対する、イピリムマブによる治療開始後24週のペプチド特異的T細胞の増加を示す。図4Fは、ヒトサイトメガロウイルス前初期エピトープのテトラペプチドサブストリングの例を示す。それぞれの場合において、変異を含む九量体が結合すると予測され、患者特異的HLAによって提示される。

（図5）図5は発見セットに関する解析パイプラインを示しており、ここで、10×以下の範囲の変異は除外し、35×未満の範囲の候補を統合ゲノミクスビューア（IGV）を使用して手動でレビューした。

（図6）図6は（図6A～6Dから構成される）、各臨床サブグループにおいて最も一般的に変異した遺伝子の代表的なリストを示す。候補変異は、Ion Torrent配列決定法またはMiSeqなどの直交配列決定法により検証した。図6Aは、発見と検証のセットにおいて反復的に変異した遺伝子の代表的なリストを示す。図6Bは、発見と検証のセットにおけるサンプル全体の変異型の分布を示す。図6Cは、発見と検証のセットで反復的に変異した遺伝子の代表的なリストを示す。図6Dは、発見と検証のセットにおけるサンプル全体の変異型の分布を示す。

（図7）図7（図7A～7Fから構成される）は、長期的な有用性の患者及び最少の有用性または有用性なしの患者に対するドライバーと変異負荷を示す。図7Aは、発見セット内の各臨床グループの腫瘍における公知の黒色腫ドライバー遺伝子の変異の発生を示す。図7Bは、検証セットの各臨床グループの腫瘍における公知の黒色腫ドライバー遺伝子の変異を示す。図7Cは、検証セットのサンプル1個あたりのエクソンミスセンス変異の数を示す。図7Dは、検証セットのサンプル1個あたりのエクソンミスセンス変異の中央値の比較を示す。図7Eは、疾患のX線証拠なし（NED）、6ヶ月超の疾患の制御（1人を除くすべての患者で進行中）、6ヶ月未満の疾患の制御、及び応答なし（NR）の患者のサブグループの変異負荷を示す。NEDを有する患者と応答がない患者間の差に対し  $P = 0.03$ （マンホイットニー両側t検定比較中央値）。図7Fは、疾患の証拠となるX線写真なし（NED）、6ヶ月超の疾患の制御（1人を除くすべての患者で進行中）、6ヶ月未満の疾患の制御、及び応答なし（NR）の患者のサブグループの変異負荷を示す。NEDを有する患者と応答がない患者間の差に対し  $P = 0.03$ （マンホイットニー

10

20

30

40

50

両側 t 検定比較中央値)。

(図 8) 図 8 は、ネオエピトープ解析バイオラインを示す。すべてのステップは、予測された野生型及び変異に対して実行される。MHC クラス I 予測は NetMHCv3.4 及び / または RANKPEP による。HLA 特異的アミノ酸をマスクするIEDB プログラムによる T 細胞免疫原性予測 (<http://tools.immuneepitope.org/immunogenicity/>)。

(図 9) 図 9 (図 9A ~ 9C から構成される) は、治療前後の発見セットの患者からの代表的なスキャンを示す。図 9A は、疾患の X 線証拠のない 1 人の患者からの 2 つの部位 (5/1/08 と 5/30/13) を示す。図 9B は、6 ヶ月超の臨床的有用性を示す患者からのスキャンを示す。トップは 9/6/11 と 1/14/13 からである。ボトムは 9/19/07 と 1/15/09 からである。図 9C は、療法に対する応答がない患者からのスキャンを示す。トップは 5/27/10 と 12/21/10 からである。ボトムは 3/3/11 と 11/18/11 からである。

(図 10) 図 10 (図 10A ~ 10K から構成される) は、ペプチド解析、発見及び検証を示す。図 10A は、発見セット内のすべてのサンプルにわたって示し、変異体ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも MHC クラス I に結合する可能性が高い。図 10B は、検証セット内のすべてのサンプルにわたって示し、変異体ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも MHC クラス I に結合する可能性が高い。図 10C 及び 10D は、LB と NB グループにおける共通のテトラペプチド中のアミノ酸の頻度を示す。各文字の高さは、その位置で所定のアミノ酸の頻度を反映する。位置 3 及び 4 のフェニルアラニン (F) は、NB グループでは見られない。図 10E は、そのテトラペプチドが、臨床グループによる、サブストリングを含む公知の抗原を示す。保存されたテトラペプチドネオエピトープは、T 細胞活性化に対するインビトロでの証拠を有する感染性病原体由来の抗原のサブストリングを構成する。図 10F は、MART-1 及び EKLS サブストリングを示す。図 10G は、発見セット内のすべてのサンプルにわたって示し、変異体ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも MHC クラス I に結合する可能性が高い。図 10H は、検証セット内のすべてのサンプルにわたって示し、変異体ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも MHC クラス I に結合する可能性が高い。図 10I 及び 10J は、LB と NB グループにおける共通のテトラペプチド中のアミノ酸の頻度を示す。各文字の高さは、その位置で所定のアミノ酸の頻度を反映する。図 10K は、そのテトラペプチドが、臨床グループによって配置された、サブストリングを含む公知の抗原を示す。保存されたテトラペプチドネオエピトープは、T 細胞活性化に対するインビトロでの証拠を有する感染性病原体由来の抗原のサブストリングを構成する。

(図 11) 図 11 は、60 週血液サンプルでペプチドプール A、B、及び C で検出された多官能性の CD8+ T 細胞応答を示す。患者 CR1509、CR9699 及び CR9306 由来の冷凍 PBMC を解凍し、方法に記載されるように、ペプチドプール A、B、及び C でそれぞれ再刺激した。細胞内サイトカイン染色 (ICS) を、以下の条件で 10 日目に行った：刺激なし (陰性対照)、ブドウ球菌エンテロトキシン B (SEB、陽性対照) 及び 対応するペプチドプール。CD8+IFN- +、CD8+IFN- + TNF- + 及び CD8+IFN- + CD107a+ T 細胞の代表的なドットプロットを、図 11A (患者 CR1509 用プール A)、図 11B (患者 CR9699 用プール B) 及び 図 11C (患者 CR9306 用プール C) に示した。図 11D は、野生型

**GLERGGFTF**

と比較した、変異体ペプチド

**GLEREGFTF**

で刺激した場合のパーセント CD8+IFN- 、 TNF- 、 CD-107a 及び MIP-1 デュアル陽性細胞を示す。

(図 12) 図 12 は、シグネチャーが、実際のデータの並べ替え、またはシミュレートされたデータセットのいずれかの、異なるデータセットから生じたであろうという帰無仮説を試験するためのシミュレーションのフローチャートを示す。

10

20

30

40

50

(図13) 図13は、変異体ペプチドと野生型ペプチドのいずれも3人の健康なドナーにCD8+IFN-応答を誘発しなかったことを示す。

(図14) 図14は、新抗原の生成がゲノム位置の関数であり得ることを示す。3つの代表的なLBの患者由来の新抗原が、ゲノム位置の関数としてプロットされている。シグネチャーにおける候補ネオエピトープが異なる遺伝子で生成されている。ネオエピトープの染色体の位置が、x軸に沿ってプロットされている。ピークの高さは、発見と検証のセットにおいて、何人の患者がそのアミノ酸配列を共有しているかを示す。テトラペプチドは、ゲノム全体の多様な遺伝子の変異によってコードされた。

(図15) 図15は、検証セットに関するエクソーム解析パイプラインを示す。

(図16) 図16は、LCA(白血球共通抗原)、CD8、及びFOXP3に対して染色した腫瘍生検を示す。図16Aによると、臨床的有用性なしのもの(NB; A~E)では、長期的な有用性を示すもの(LB; F~J)に比べて、LCA(B、G、200×倍率、矢印先端は陽性細胞をマーク)、CD8(C、H、200×倍率、矢印先端は陽性細胞をマーク)、またはFOXP3(D、I、200×倍率、矢印先端は陽性細胞をマーク)による染色細胞のパーセントに有意差はなかった。NB患者とLB患者の両方に由来する腫瘍は壊死(E、J、100×倍率)を示し、壊死を示す腫瘍のパーセントはグループ(O)間で有意に異なる( $P = 0.034$ )が、この知見は、単一の外れ値の包含に依存する(除外される場合 $P = 0.683$ )。図16Bによると、NBグループに比べて、LBグループにおけるCD8:FOXP3比(C)に有意の増加( $P = 0.028$ )がある。LCA(白血球共通抗原)はLBグループの上位に現れるが、統計的に有意ではない。

(図17) 図17は、検証セットにおける患者の詳細な特性を示す。

(図18) 図18は、発見と検証のセットに対する腫瘍1個あたりの非同義エクソンの変異を示す。

(図19) 図19は、応答シグネチャーにおけるテトラペプチドの状況、遺伝子及び遺伝子座を示す。

(図20) 図20は、TCGAのRNA-seqのデータセットからの応答シグネチャーに存在するテトラペプチドにつながる変異をコードする遺伝子の発現を示す。発現のない腫瘍を除いた後、各遺伝子について平均SEM値が示されている。遺伝子がいずれのサンプルでも発現していない場合、ゼロが示されている。

(図21) 図21は、各患者サンプルに対するサンプル部位、サンプルサイズ、及び生検のタイプを示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0025】

##### 定義

本発明がより容易に理解されるために、特定の用語を以下に定義する。当業者は、特定の用語の定義は、本明細書の他の個所に提供されてもよく、かつ/または状況から明らかになるであろうということを認識するであろう。

##### 【0026】

**投与**：本明細書で使用される場合、用語「投与」は、対象への組成物の投与を指す。投与は、任意の適切な経路によってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、投与は、気管支、(気管支点滴注入によるものを含む)、口腔、経腸、皮膚間、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、髄腔内、静脈内、脳室内、経粘膜、経鼻、経口、直腸、皮下、舌下、局所、気管内(気管内注入によるものを含む)、経皮、腔及び硝子体であってもよい。

##### 【0027】

**親和性**：当該分野で公知のように、「親和性」は、特定のリガンドがそのパートナーに結合する堅固さの尺度である。親和性は、異なる方法で測定することができる。いくつかの実施形態では、親和性は、定量的アッセイによって測定される。いくつかのそのような実施形態では、結合パートナーの濃度は、生理学的条件を模倣するように、リガンド濃度

10

20

30

40

50

を超えるように固定し得る。あるいはまたは追加的に、いくつかの実施形態では、結合パートナーの濃度及び／またはリガンド濃度を変化させ得る。いくつかのそのような実施形態では、親和性は、同等の条件（例えば、濃度）下で基準と比較することができる。

【0028】

アミノ酸：本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、その最も広い意味において、ポリペプチド鎖に組込まれ得る任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造  $H_2N - C(H)(R) - COOH$  を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は合成アミノ酸であり；いくつかの実施形態では、アミノ酸は  $d$  - アミノ酸であり；いくつかの実施形態では、アミノ酸は  $L$  - アミノ酸である。「標準アミノ酸」は、天然に存在するペプチドに通常見られる 20 種標準  $L$  - アミノ酸のうちの任意のものを指す。「標準的でないアミノ酸」とは、それが合成的に調製されるかまたは天然の供給源から得られるかにかかわらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。本明細書で使用される場合、「合成アミノ酸」は、塩、アミノ酸誘導体（アミドなど）及び／または置換体を含むがこれらに限定されない、化学的に修飾されたアミノ酸を包含する。ペプチドにおけるカルボキシ末端及び／またはアミノ末端のアミノ酸を含むアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化、保護基、及び／またはそのペプチドの活性に悪影響を及ぼすことなくその循環半減期を変化させ得る他の化学基による置換によって修飾され得る。アミノ酸は、ジスルフィド結合に関与し得る。アミノ酸は、1つまたは複数の化学物質（例えば、メチル基、酢酸基、アセチル基、リン酸基、ホルミル部分、イソプレノイド基、硫酸基、ポリエチレングリコール部分、脂質部分、炭水化物部分、ビオチン部分、など）との会合などの、1つまたは翻訳後の修飾を含み得る。用語「アミノ酸」は、「アミノ酸残基」と交換可能に使用され、遊離アミノ酸及び／またはペプチドのアミノ酸残基を指し得る。その用語が遊離アミノ酸を指すのかまたはペプチドの残基を指すのかは、その用語が使用されている状況から明らかになるであろう。

【0029】

抗体作用物質：本明細書で使用される場合、用語「抗体作用物質」は、特定の抗原に特異的に結合する作用物質を指す。いくつかの実施形態では、該用語は、特異的結合を付与するのに十分な免疫グロブリン構造要素を有する任意のポリペプチドを包含する。好適な抗体剤としては、ヒト抗体、靈長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、結合体化抗体（すなわち、他のタンパク質、放射標識、細胞毒素に結合体化または融合された抗体）、小モジュラー免疫薬剤（Small Modular ImmunoPharmaceuticals）（「SMIPs（商標）」）、一本鎖抗体、ラクダ科抗体及び抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、用語「抗体剤」は、完全なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一ドメイン抗体（例えば、サメの単一ドメイン抗体（例えば、IgNAR またはその断片））、少なくとも 2 つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び、それらが所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片、も含む。いくつかの実施形態では、該用語は、ステープルされたペプチドを包含する。いくつかの実施形態では、該用語は、1 つ以上の抗体様結合ペプチド模倣物を包含する。いくつかの実施形態では、該用語は、1 つまたは複数の抗体様結合足場タンパク質を包含する。いくつかの実施形態では、該用語は、モノボディまたはアドネクチンを包含する。多くの実施形態では、抗体剤は、そのアミノ酸配列が当業者によって相補性決定領域（CDR）として認識される 1 つまたは複数の構造要素を含むポリペプチドであるかまたはそれを含む；いくつかの実施形態では、抗体剤は、そのアミノ酸配列が参照抗体に見られる CDR と実質的に同一である少なくとも 1 つの CDR（例えば、少なくとも 1 つの重鎖 CDR 及び／または少なくとも 1 つの軽鎖 CDR）を含むポリペプチドであるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、含まれる CDR は、配列が同一であるかまたは参照 CDR と比較して 1 ~ 5 個のアミノ酸置換を含むということにおいて、参照 CDR と実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含まれる CDR は、それが、参照 CDR と少なくとも 85%、86%、87%、88%、

10

20

30

40

50

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を示すということにおいて、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含まれるCDRは、それが、参照CDRと少なくとも96%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を示すということにおいて、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含まれるCDRは、その含まれるCDR内の少なくとも1つのアミノ酸が、参照CDRと比較して欠失、付加または置換されているが、その含まれるCDRは、その他の点では参照CDRのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有するということにおいて、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含まれるCDRは、含まれるCDR内の1～5個のアミノ酸が、参照CDRと比較して欠失、付加または置換されているが、その含まれるCDRが、その他の点では参照CDRと同一であるアミノ酸配列を有するということにおいて、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含まれるCDRは、その含まれるCDR内の少なくとも1つのアミノ酸が、参照CDRと比較して置換されているが、その含まれるCDRが、その他の点では参照CDRのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有するということにおいて、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、含まれるCDRは、その含まれるCDR内の1～5個のアミノ酸が、参照CDRと比較して欠失、付加または置換されているが、その含まれるCDRが、その他の点では参照CDRのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有するということにおいて、参照CDRと実質的に同一である。いくつかの実施形態では、抗体剤は、そのアミノ酸配列が当業者によって免疫グロブリン可変ドメインとして認識される構造要素を含むポリペプチドであるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体剤は、免疫グロブリン結合ドメインと相同であるかまたはほぼ相同である結合ドメインを有するポリペプチドタンパク質である。

10

20

30

40

**【0030】**  
抗体ポリペプチド：本明細書で使用される場合、互換的に使用することができる用語「抗体ポリペプチド」または「抗体」または「その抗原結合断片」は、エピトープに結合することができるポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、全長抗体であり、いくつかの実施形態では、全長未満であるが、少なくとも1つの結合部位（抗体「可変領域」の構造を有する少なくとも1つの、好ましくは少なくとも2つの配列を含む）を含む。いくつかの実施形態では、用語「抗体ポリペプチド」は、免疫グロブリン結合ドメインと相同であるか、またはほぼ相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を包含する。特定の実施形態では、「抗体ポリペプチド」は、免疫グロブリン結合ドメインと少なくとも99%の同一性を示す結合ドメインを有するポリペプチドを包含する。いくつかの実施形態では、「抗体ポリペプチド」は、免疫グロブリン結合ドメイン、例えば、参照免疫グロブリン結合ドメインと少なくとも70%、80%、85%、90%、または95%の同一性を示す結合ドメインを有する任意のタンパク質である。含まれる「抗体ポリペプチド」は、天然の供給源に見出される抗体のものと同一のアミノ酸配列を有することができる。本発明による抗体ポリペプチドは、例えば、天然の供給源もしくは抗体ライブラリーからの単離、宿主系内での、もしくはこれを用いた組換え生産、化学合成など、またはこれらの組合せを含めた任意の使用可能な手段によって調製することができる。抗体ポリペプチドは、モノクローナルまたはポリクローナルであることができる。抗体ポリペプチドは、ヒトクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEの任意のものを含む任意の免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。特定の実施形態では、抗体は、IgG免疫グロブリンクラスのメンバーであり得る。本明細書で使用される場合、用語「抗体ポリペプチド」または「抗体の特徴的な部分」は、互換的に使用され、対象とするエピトープに結合する能力を有する抗体の任意の誘導体を指す。特定の実施形態では、「抗体ポリペプチド」は、全長抗体の特異的結合能の少なくとも有意の部分を保持する抗体断片である。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Fv、dsFv二重特異性抗体、及びFd断片が挙げられるが、これらに限定されない。あるいはまたは追加的に、抗体断片は、例えば、ジスルフィド連結によって一緒に連結

50

された複数の鎖を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、ヒト化抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体ポリペプチドは、ヒト化され得る。含有するヒト化抗体ポリペプチドは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最少配列を含有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、または抗体ポリペプチド (Fv、Fab、Fab'、F(ab')2、もしくは抗体の他の抗原結合性部分配列など) であり得る。一般に、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域 (CDR) に由来する残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種 (ドナー抗体)、例えば、マウス、ラット、またはウサギなどのCDRに由来する残基によって置換されているヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) である。特定の実施形態では、本発明に従って使用する抗体ポリペプチドは、免疫チェックポイント分子上の特定のエピトープに結合する。

10

### 【0031】

**抗原**：「抗原」は、抗体が結合する分子または物質である。いくつかの実施形態では、抗原は、ポリペプチドまたはその一部であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗原は、抗体によって認識される感染性病原体の一部である。いくつかの実施形態では、抗原は、免疫応答を誘発する作用物質；及び／または(iii)T細胞受容体によって結合される (例えば、MHC分子によって提示された場合) か、または生物に露出もししくは投与された場合に抗体 (例えば、B細胞によって産生される) に結合する、作用物質である。いくつかの実施形態では、抗原は、生物内に体液性応答を誘発する (例えば、抗原特異的抗体の産生を含む)。あるいはまたは追加的に、いくつかの実施形態では、抗原は、生物内に細胞応答 (例えば、受容体が抗原と特異的に相互作用するT細胞を含む) を誘発する。当業者によって、特定の抗原は、標的生物種のすべてのメンバーにおいてではなく、標的生物 (例えば、マウス、ウサギ、靈長類、ヒト) の1つまたはいくつかのメンバーにおいて、免疫応答を誘発し得ることが、理解されるであろう。いくつかの実施形態では、抗原は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の標的生物種のメンバーにおいて免疫応答を誘発する。いくつかの実施形態では、抗原は、抗体及び／またはT細胞受容体に結合し、並びに生物における特定の生理学的応答を誘導してもしなくてよい。いくつかの実施形態では、例えば、そのような相互作用がインビボで起るかどうかによらず、抗原はインビトロで抗体に及び／またはT細胞受容体に結合することができる。一般に、抗原は、任意の化学物質、例えば、小分子、核酸、ポリペプチド、炭水化物、脂質、ポリマー [生物学的ポリマー以外 (例えば、核酸またはアミノ酸ポリマー以外) のいくつかの実施形態における] など、であり得るかまたはそれらを含み得る。いくつかの実施形態では、抗原はポリペプチドであるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗原はグリカンであるか、またはそれを含む。当業者は、一般に、抗原は、単離されたまたは純粋な形態で提供され得るか、または、あるいは粗形態 (例えば、例えば、抗原含有源の細胞抽出物または他の比較的粗な調製物などの抽出物における、他の材料と一緒に) で提供され得ることを、理解するであろう。いくつかの実施形態では、本発明に従って用いられる抗原は、粗形態で提供される。いくつかの実施形態では、抗原は組換え抗原であるか、またはそれを含む。

20

### 【0032】

**およそ**：本明細書で使用される場合、1つまたは複数の目的の値に適用される用語「およそ」または「約」は、述べられている参照値に類似の値を指す。特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、特に明記されていないかまたは特に状況から明らかでない限り (そのような数が可能性のある値の100%を超える場合を除き)、述べられている参照値のいずれの方向 (超または未満) においても、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下に入る値の範囲を指す。

30

### 【0033】

**併用療法**：用語「併用療法」は、本明細書で使用される場合、対象が同時に両方の薬剤

40

50

に暴露されるように、2つ以上の異なる剤が重複するレジメンで投与される状況を指す。併用療法で使用される場合、2つ以上の異なる剤は同時にまたは別々に投与され得る。この併用投与は、同じ剤形での2つ以上の剤の同時投与、別個の剤形での同時投与、及び個別投与を含むことができる。すなわち、2つ以上の剤は、同じ剤形で一緒に製剤化することができ、同時に投与することができる。あるいは、別々の製剤で存在する2つ以上の剤を同時に投与することができる。別の代替案では、第1の剤を投与し、すぐ続いて1つまたは複数の追加の剤を投与することができる。別個の投与プロトコルでは、2つ以上の剤は、数分間隔で、または数時間間隔で、または数日間隔で投与され得る。

#### 【0034】

同等の：用語「同等の」は、得られた結果または観察された事象の比較を可能にするのに、互いに十分類似している2つ（またはそれ以上）のセットの条件、状況、固体または集団を記述するために、本明細書では使用される。いくつかの実施形態では、条件、状況、固体、または集団の同等のセットは、複数の実質的に同一の特徴及び1つまたは少數の変化する特徴を特徴とする。当業者は、異なる条件セットの状況、固体または集団の下で、またはそれらによって得られた結果または観察された事象の差異が、変化するこれらの特徴の変動によって引き起されるかまたはその変動を示唆するという合理的な結論を保証するのに十分な数及びタイプの実質的に同一の特徴を特徴とする場合、状況、固体または集団のセットは互いに同等であることを認識するであろう。当業者は、本明細書内で使用される相対的な言語（例えば、強化された、活性化された、減少した、阻害された、など）は、典型的には、同等の条件下でなされた比較を指すことを認識するであろう。

10

#### 【0035】

コンセンサス配列：本明細書で使用される場合、用語「コンセンサス配列」は、生理学的現象（例えば、免疫応答）を誘発または駆動するコア配列を指す。感染性病原体の抗原を有する「コンセンサス配列」を共有する癌細胞は、MHC分子に対する抗原の結合親和性（直接またはアロステリックに）影響を与え、及び／またはT細胞受容体による認識を容易にするアミノ酸配列の一部を共有することが、当業者によって理解されるべきである。いくつかの実施形態では、コンセンサス配列はテトラペプチドである。いくつかの実施形態では、コンセンサス配列はノナペプチドである。いくつかの実施形態では、コンセンサス配列は、長さが4～9個の間のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、コンセンサス配列の長さは9個のアミノ酸より大きい。

20

#### 【0036】

診断情報：本明細書で使用される場合、診断情報あるいは診断で使用するための情報は、患者が疾患または病態を有するかどうかを判定すること、及び／あるいは、疾患または病態を、表現型カテゴリー、または疾患もしくは病態の予後、または疾患もしくは病態の治療（一般的の治療もしくは任意の特定の治療）に対する可能な応答に関して有意性を有する任意のカテゴリーに分類することにおいて、有用である任意の情報である。同様に、診断は、対象が疾患もしくは病態（癌など）を有する可能性が高いかどうか、対象に顕在化した疾患もしくは病態の状態、病期、もしくは特徴、腫瘍の性質もしくは分類に関する情報、予後に関する情報、及び／または適切な治療の選択に有用な情報を含むがこれらに限定されない、任意のタイプの診断情報を提供することを指す。治療の選択としては、特定の治療（例えば、化学療法）剤、もしくは手術、照射などの他の治療法の選択、療法を保留するか提供するかについての選択、投薬レジメン（例えば、1つもしくは複数の特定の治療用物質または治療用物質の併用の頻度またはレベル）に関する選択などを挙げることができる。

30

#### 【0037】

投薬レジメン：「投薬レジメン」（または「治療レジメン」）は、その用語が本明細書で使用される場合、一般に時間の期間で区切られて、対象に個別に投与される単位用量のセット（典型的には複数）である。いくつかの実施形態では、所与の治療用物質は、1つまたは複数の用量を含み得る、推奨される投薬レジメンを有する。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、それぞれが同じ長さの時間期間によって互いに区切られた複数の用

40

50

量を含む；いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、複数の用量、及び個々の投薬を区切る少なくとも2つの異なる時間を含む。いくつかの実施形態では、投薬レジメンは、患者の集団全体に投与される場合、所望の治療転帰であるか、またはそれと相關していた。

【0038】

好ましい応答：本明細書で使用される場合、用語、好ましい応答は、疾患の病態生理学における症状の軽減、完全もしくは部分的な寛解、または他の改善を指す。特定の疾患、障害または病態の1つまたは複数の症状が大きさ（例えば、強度、重篤度、など）、及び／または頻度が低下すると症状が軽減される。明確にするために、特定の症状の発症の遅延は、その症状の頻度を低減させる一形態と考えられる。より小さい腫瘍を有する多くの癌患者は症状がない。症状が除去される場合にのみ本発明を限定することは意図していない。本発明は特に、1つまたは複数の症状が、完全に排除されなくても、軽減される（及び対象の病態が、それにより「改善される」）ように、治療を意図する。いくつかの実施形態では、好ましい応答は、関連する集団全体に投与されたときに特定の治療レジメンが、統計学的に有意な効果を示す場合に確立され；特定の固体における特定の結果の証拠が必要とされないことがある。従って、いくつかの実施形態では、特定の治療レジメンは、その投与が関連する所望の効果に相關している好ましい応答を有するように決定される。

10

【0039】

相同性：本明細書中で使用される場合、用語「相同性」は、ポリマー分子間、例えば、核酸分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。いくつかの実施形態において、ポリマー分子は、それらの配列が、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%同一である場合、互いに「相同」であると考えられる。いくつかの実施形態で、ポリマー分子は、それらの配列が、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%類似である場合、互いに「相同」であると考えられる。

20

【0040】

同一性：本明細書で使用される場合、用語「同一性」は、ポリマー分子間、例えば、核酸分子（例えば、DNA分子及び／またはRNA分子）間及び／またはポリペプチド分子間の全体的な関連性を指す。例えば、2つの核酸配列のパーセント同一性の計算は、最適な比較目的のための2つの配列をアラインメントさせることによって行うことができる（例えば、最適なアラインメントのために第1及び第2の核酸配列の一つまたは両方にギャップを導入することができ、非同一性配列は、比較目的のために無視することができる）。特定の実施形態では、比較目的でアラインメントされる配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または実質的に100%である。次いで、対応するヌクレオチドの位置におけるヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じヌクレオチドによって占められる場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮すると、それらの配列によって共有される同一である位置の数の関数である。2つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。例えば、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、PAM120重み付き残基表、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を使用する、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組込まれた、Meyers及びMillerのアルゴリズム（CABIOS, 1989, 4: 11-17）を用いて決定することができる。あるいは、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、NWGapDNA.CMPマトリックスを用いたGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを用いて決定することができる。

30

40

【0041】

50

免疫チェックポイントモジュレーター：本明細書で使用される場合、用語「免疫チェックポイントモジュレーターは、免疫チェックポイントと直接的または間接的に相互作用する作用物質を指す。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、例えばT細胞活性化のための陽性シグナルを刺激することにより、免疫エフェクター応答（例えば、細胞傷害性T細胞応答）を増加させる。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、例えばT細胞の活性化のための陰性シグナルを阻害すること（例えば阻害剤除去）により、免疫エフェクター応答（例えば、細胞傷害性T細胞応答）を増加させる。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、T細胞アネルギーのためのシグナル伝達と干渉する。いくつかの実施形態では、チェックポイントモジュレーターは、1つまたは複数の抗原に対する免疫寛容を低減、削除、または防止する。 10

#### 【0042】

長期的な有用性：一般に、用語「長期的な有用性」は、例えば、特定の治療または関心対象の療法の実施後に観察される望ましい臨床転帰を指し、それは臨床的に関連する時間の期間維持される。いくつかの実施形態では、ほんの一例を挙げると、癌治療の長期的な有用性は、（1）疾患の証拠がないこと（「NED」、例えばX線撮影評価で）及び／または（2）安定したもしくは減少した疾患の体積、であるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態では、臨床的に関連する時間の期間は、少なくとも1ヶ月、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも5ヶ月またはそれ以上ある。いくつかの実施形態では、臨床的に関連する時間の期間は、少なくとも6ヶ月である。いくつかの実施形態では、臨床的に関連する時間の期間は、少なくとも1年である。 20

#### 【0043】

マーカー：マーカーは、本明細書で使用される場合、その存在またはレベルが、特定の腫瘍もしくはそれらの転移性疾患の特徴である作用物質を指す。例えば、いくつかの実施形態では、その用語は、特定の腫瘍、腫瘍サブクラス、腫瘍の病期、などの特徴である遺伝子発現産物を指す。あるいはまたは追加的に、いくつかの実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、例えば、腫瘍の特定のクラスの特徴であり得る特定のシグナル伝達経路の活性（または活性レベル）に相關する。マーカーの存在または非存在の統計的有意性は、特定のマーカーに応じて変化し得る。いくつかの実施形態では、マーカーの検出は、マーカーが、腫瘍が特定のサブクラスのものである高い確率を反映するということにおいて高度に特異的である。このような特異性は、感度を犠牲にして生じ得る（すなわち、腫瘍が、そのマーカーを発現すると予想される腫瘍であっても、負の結果が起り得る）。反対に、高度の感度を有するマーカーは、より低い感度を有するものより特異的が低くなり得る。本発明によれば、有用なマーカーは、100%の精度で特定のサブクラスの腫瘍を区別する必要はない。 30

#### 【0044】

モジュレーター：用語「モジュレーター」は、目的の活性が観察される系におけるその存在が、モジュレーターが存在しない場合にその他の点では同等の条件下で観察されるものと比較して、その活性のレベル及び／または性質の変化と相關する実態を指すのに使用される。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、モジュレーターが存在しない場合にその他の点では同等の条件下で観察されるものと比較して、その存在において活性が増加するという点で、アクチベーターである。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、モジュレーターが存在しない場合にその他の点では同等の条件下で観察されるものと比較して、その存在において活性が減少するという点で、阻害剤である。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、その活性が目的である標的実体と直接相互作用する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、その活性が目的である標的実体と間接的に（すなわち、標的実体と相互作用する中間剤と直接）相互作用する。いくつかの実施形態では、モジュレーターは、目的の標的実体のレベルに影響を与えるか；代替的にまたは追加的に、いくつかの実施形態では、モジュレーターは、標的実体のレベルに影響を与えることなく、目的の標的実体の活性に影響を与える。いくつかの実施形態では、モジュレーターは 40

目的の標的実体のレベルと活性の両方に影響を与えるので、観察される活性の差は、観察されるレベルの差によって完全には説明されないか、または観察されるレベルの差と等しくはない。

【0045】

ネオエピトープ：「ネオエピトープ」は、特定の事象（例えば、例えば、感染症、癌、癌の病期、などの特定の疾患、障害または病態の発症または進行）への暴露またはその発生の後に、対象に出現または発症するエピトープを指すと当該技術分野で理解されている。本明細書で使用される場合、ネオエピトープは、その存在及び／またはレベルが事象への暴露またはその発生と相關するものである。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、事象を発現する（例えば、関連するレベルで）細胞に対する免疫応答を引き起すものである。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、事象を発現する細胞を死滅させるかまたはそうでなければ破壊する（例えば、関連するレベルで）免疫応答を引き起すものである。いくつかの実施形態では、ネオエピトープを動作させる関連する事象は、細胞内の体細胞変異であるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、免疫応答（例えば、ネオエピトープを発現する癌細胞を標的にするのに十分な免疫応答）を引き起す及び／もしくはサポートするレベルに並びに／または方法で、非癌細胞では発現されない。

10

【0046】

有用性なし：本明細書で使用される場合、語句「有用性なし」は、検出可能な臨床的有用性（例えば、目的の特定の療法または治療の実施に応答して）がないことを指すのに使用される。いくつかの実施形態では、臨床的有用性がないことは、特定の疾患、障害、または病態の任意の特定の症状または特徴の統計的に有意な変化が存在しないことを指す。いくつかの実施形態では、臨床的有用性がないことは、例えば、約6ヶ月未満、約5ヶ月未満、約4ヶ月未満、約3ヶ月未満、約2ヶ月未満、約1ヶ月未満、またはそれ以下のほんの短い時間期間持続する、疾患、障害、または病態の1つまたは複数の症状または特徴の変化を指す。

20

【0047】

患者：本明細書において、用語「患者」または「対象」は、提供される組成物が、例えば、実験、診断、予防、美容、及び／または治療の目的で投与されるか、または投与され得る任意の生物を指す。典型的な患者は動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及び／またはヒトなどの哺乳動物）を含む。いくつかの実施形態では、患者はヒトである。いくつかの実施形態では、患者は、1つまたは複数の障害または病態に罹患しているかまたはかかりやすい。いくつかの実施形態では、患者は、障害または病態の1つまたは複数の症状を示す。いくつかの実施形態では、患者は、1つまたは複数の障害または病態と診断されたことがある。いくつかの実施形態では、障害または病態は、癌または1つもしくは複数の腫瘍の存在であるか、またはこれらを含む。いくつかの実施形態では、障害または病態は、転移性癌である。

30

【0048】

ポリペプチド：本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」は、一般的に言えば、ペプチド結合によって互いに結合した少なくとも2つのアミノ酸のストリングである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも3～5個のアミノ酸を含むことができ、それらのアミノ酸のそれぞれは、少なくとも1つのペプチド結合によって他のアミノ酸に結合している。当業者は、ポリペプチドが、「非天然の」アミノ酸、または、それにもかかわらず、任意選択でポリペプチド鎖に組み込むことができる他の実体を含むことがあることを認識するであろう。

40

【0049】

予後情報及び予測情報：本明細書で使用される場合、用語予後情報及び予測情報は、治療の非存在下または存在下で、疾患または病態の過程の任意の態様を示すのに使用され得る任意の情報を指すのに互換的に使用される。そのような情報としては、患者の平均寿命、患者が所与の量の時間（例えば、6ヶ月、1年、5年など）生存する可能性、患者が疾

50

患から治癒される可能性、患者の疾患が特定の療法に応答する可能性（応答は、様々な方法の任意のもので定義され得る）を挙げることができるが、これらに限定されない。予後情報及び予測情報は、診断情報の広いカテゴリー内に含まれる。

【0050】

タンパク質：本明細書で使用される場合、用語「タンパク質」は、ポリペプチドを指す（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも2つのアミノ酸のストリング）。タンパク質は、アミノ酸以外の部分を含んでもよく（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカン、などであってもよい）、及び／または他の方法で処理または修飾されてもよい。「タンパク質」は、（シグナル配列の有無によらず）細胞によって産生される完全なポリペプチド鎖であり得るか、またはその特徴的部分であり得ることを、当業者は理解するであろう。タンパク質は、例えば1つまたは複数のジスルフィド結合によって連結された、または他の手段によって結合された複数のポリペプチド鎖を含むこともあることを、当業者は理解するであろう。ポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または両方を含んでもよく、当該技術分野で公知の様々なアミノ酸修飾または類似体の任意のものを含んでもよい。有用な修飾には、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化、などが含まれる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、及びそれらの組合せを含み得る。用語「ペプチド」は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すのに使用される。

10

【0051】

参照サンプル：本明細書で使用される場合、参照サンプルは以下の任意のものまたは全てを含むことができるが、これらに限定されない：細胞または複数の細胞、組織の一部、血液、血清、腹水、尿、唾液、お呼び他の体液、分泌物、排泄物。用語「サンプル」は、そのようなサンプルを処理することによって誘導される任意の材料も含む。誘導されたサンプルは、サンプルから抽出されるか、または増幅またはmRNAの逆転写、などの技法にサンプルを供することによって得られるヌクレオチド分子またはポリペプチドを含み得る。

20

【0052】

応答：本明細書において、治療に対する応答は、治療の結果して生じる、または治療と関連する対象の病態の任意の有益な変化を指すことができる。そのような変化としては、病態の安定化（例えば、治療の非存在下で生じたであろう悪化の防止）、病態の症状の寛解及び／または病態の治癒に対する見通しの改善などを挙げることができる。それは、対象の応答または腫瘍の応答を指し得る。腫瘍または対象の応答は、臨床基準及び客観的基準を含む多様な基準によって測定することができる。応答を評価するための技法としては、臨床検査、陽電子放出断層撮影、胸部X線CTスキャン、MRI、超音波、内視鏡検査、腹腔鏡検査、対象から得られるサンプル中の腫瘍マーカーの存在もしくはレベル、細胞学的検査、及び／または組織診断が挙げられるが、これらに限定されない。治療に対する応答を評価するための方法及び指針は、Therasse et al., "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors", European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada, J. Natl. Cancer Inst., 2000, 92(3): 205-216で議論されている。正確な応答基準は、腫瘍及び／または患者のグループを比較する場合、比較されるグループは、反応速度を決定するための同じまたは同等の基準に基づいて評価されるという条件で、任意の適切な方法で選択することができる。当業者は、適切な基準を選択することができるであろう。

30

40

【0053】

サンプル：本明細書で使用される場合、対象から得られるサンプルとしては、以下の任

50

意のものまたはすべてを挙げることができるが、これらに限定されない：細胞または複数の細胞、組織の一部、血液、血清、腹水、尿、唾液、及び他の体液、分泌物、または排泄物。用語「サンプル」は、そのようなサンプルを処理することによって誘導される任意の材料も含む。誘導されたサンプルは、サンプルから抽出されるか、または増幅またはmRNAの逆転写、などの技法にサンプルを供することによって得られるスクレオチド分子またはポリペプチドを含み得る。

#### 【0054】

特異的結合：本明細書で使用される場合、用語「特異的結合」または「～に対して特異的な」または「～に特異的な」は、標的実体（例えば、標的タンパク質またはポリペプチド）と結合物質（例えば、提供される抗体などの抗体）の間の相互作用（一般に非共有結合性）を指す。当業者は理解するであろうが、相互作用は、これが代替の相互作用の存在下で有利である場合、「特異的」と考えられる。多くの実施形態では、相互作用は一般に、結合分子によって認識される抗原決定基またはエピトープなどの標的分子の特定の構造的特徴の存在に依存する。例えば、抗体がエピトープAに対して特異的である場合、遊離標識A及びそれに対する抗体の両方を含有する反応物中に、エピトープAを含有するポリペプチドが存在するか、または遊離非標識Aが存在すると、抗体に結合する標識Aの量が低減するであろう。特異性は、絶対的である必要はないことが理解されるべきである。例えば、多数の抗体は、標的分子中に存在するものに加えて、他のエピトープと交差反応することが当該技術分野で周知である。そのような交差反応性は、抗体が使用される用途に応じて許容され得る。特定の実施形態では、受容体チロシンキナーゼに対して特異的な抗体は、プロテアーゼ阻害剤（例えば、ACT）に結合した受容体チロシンキナーゼと10%未満の交差反応性を有する。当業者は、任意の所与の用途（例えば、標的分子を検出するため、治療目的のため、など）において適切に実施するのに十分な程度の特異性を有する抗体を選択することができるであろう。特異性は、結合分子の標的分子に対する親和性対結合分子の他の標的（例えば、競合相手）に対する親和性などの追加の要因の状況において評価することができる。結合分子が、検出することが望まれている標的分子に対して高い親和性、及び非に対して低い親和性を示す場合。

10

20

30

40

#### 【0055】

癌の病期：本明細書で使用される場合、用語「癌の病期」は癌の進行レベルの定性的または定量的評価を指す。癌の病期を決定するのに使用される基準としては、腫瘍のサイズ及び転移の程度（例えば、局部的または遠位）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0056】

対象：本明細書で使用される場合、用語「対象」または「患者」は、例えば、実験、診断、予防、及び／または治療の目的のために、本発明の実施形態が、使用または投与され得る、任意の生物を指す。典型的な対象は、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及びヒトなどの哺乳動物；昆虫；虫；など）を含む。

#### 【0057】

実質的に：本明細書において、用語「実質的に」は、対象とする特徴または特性の総合的またはほぼ総合的な程度もしくは度合いを示す定性的条件を指す。生物学的技術分野の当業者は、生物学的及び化学的現象は、まれに、もしあれば、完了まで進み、及び／または完全性まで進行し、または絶対的な結果を達成もしくは回避することを理解するであろう。したがって、用語「実質的に」は、本明細書では、多くの生物学的及び化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を捕捉するために使用される。

#### 【0058】

に罹患している：疾患、障害、または病態（例えば、癌）「に罹患している」個体は、疾患、障害、または病態の1つまたは複数の症状を有する、及び／またはそれらを示すと診断されている。いくつかの実施形態では、癌に罹患している個体は癌を有するが、癌の症状を何ら示さず、及び／または癌を有すると診断されていない。

#### 【0059】

にかかりやすい：疾患、障害または病態（例えば、癌）「にかかりやすい」個体は、そ

50

の疾患、障害または病態を発症するリスクがある。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態にかかりやすい個体は、その疾患、障害または病態のいかなる症状も示さない。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態にかかりやすい個体は、その疾患、障害及び／または病態と診断されたことがない。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態にかかりやすい個体は、その疾患、障害または病態の発症に関連する条件を示す個体である。いくつかの実施形態では、疾患、障害及び／または病態を発症するリスクは、集団ベースのリスクである。

【0060】

標的細胞または標的組織：本明細書で使用される場合、用語「標的細胞」または「標的組織」は、本明細書に記載の病態によって影響を受け、治療される任意の細胞、組織、もしくは生物、または本明細書に記載の病態に関与するタンパク質が発現される任意の細胞、組織、もしくは生物を指す。いくつかの実施形態では、標的細胞、標的組織、または標的生物は、免疫チェックポイントシグナル伝達及び／または活性の検出可能な量が存在している細胞、組織、または生物を含む。いくつかの実施形態では、標的細胞、標的組織、または標的生物は、疾患関連の病状、症状、または機能を示す細胞、組織または生物を含む。

10

【0061】

治療レジメン：本明細書で使用される場合、用語「治療レジメン」は、特定の疾患、障害及び／または病態の1つまたは複数の症状または特徴を、部分的または完全に、軽減し、改善し、緩和し、阻害し、防止し、その発症を遅らせ、その重症度を減少させ、及び／またはその発生率を低下させるために使用される任意の方法を指す。それは、特定の効果、例えば、癌などの有害な病態または疾患の減少または除去、を達成するように設計された治療または一連の治療を含み得る。治療は、同一または異なる時間の量に対して、同時に、逐次的にまたは異なる時点でのいずれかで、1つまたは複数の化合物を投与することを含み得る。あるいは、または追加的に、治療は、放射線照射、化学療法剤、ホルモン療法、または手術を含み得る。さらに、「治療レジメン」は、遺伝子由来mRNAの特定の遺伝子または翻訳の発現を減少させることが知られている遺伝子治療、遺伝子アブレーションまたは他の方法などの遺伝学的方法を含み得る。

20

【0062】

治療用物質：本明細書で使用される場合、語句「治療用物質」は、対象に投与された場合に、治療効果を有し、並びに／または所望の生物学的及び／もしくは薬理学的効果を誘発する任意の作用物質を指す。

30

【0063】

治療有効量：本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」は、任意の医学的治療に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比で、治療される対象に治療効果を付与する作用物質（例えば、免疫チェックポイントモジュレーター）の量を指す。治療効果は、客観的（すなわち、何らかの試験またはマーカーによって測定可能）または主観的（すなわち、対象が効果の指標を与えるかまたは効果を感じる）であり得る。特に、「治療有効量」は、疾患に関連する症状を改善すること、疾患の発症を予防または遅延させること、及び／または疾患の症状の重症度または頻度を軽減することによるなど、所望の疾患または状態を治療、改善、もしくは予防するのに、または検出可能な治療効果もしくは予防効果を示すのに有効な治療用物質または組成物の量を指す。治療有効量は、通常、複数の単位用量を含み得る投与レジメンで投与される。任意の特定の治療用物質の場合、治療有効量（及び／または有効な投与レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路、他の薬剤との併用に応じて、変化し得る。また、任意の特定の患者に対する具体的な治療有効量（及び／または単位用量）は、治療される障害及びその障害の重症度；使用される特定の薬剤の活性；使用される特定の組成物；対象の年齢、体重、一般的な健康状態、性別及び食事；使用される特定の融合タンパク質の投与時間、投与経路及び／または排泄速度もしくは代謝速度；治療の期間；並びに医学分野で周知の類似の因子を含む様々な因子に依存し得る。

40

50

## 【0064】

治療：本明細書で使用される場合、用語「治療」（「治療する」または「治療している」も）は、特定の疾患、障害及び／または病態（例えば、癌）の1つまたは複数の症状、特徴及び／または原因を、部分的または完全に軽減する、改善する、回復させる、緩和する、阻害する、その発生を遅延させる、その重症度を低下させる、及び／またはその発生率を低下させる物質（例えば、提供される組成物）の任意の投与を指す。そのような治療は、関連する疾患、障害及び／もしくは病態の徴候を示さない対象並びに／またはその疾患、障害及び／もしくは病態の初期徴候のみを示す対象の治療であり得る。あるいはまたは追加的に、そのような治療は、関連する疾患、障害及び／または病態の1つまたは複数の確立された徴候を示す対象の治療であり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害及び／または病態に罹患していると診断された対象の治療であり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害及び／または病態の発症のリスクの増加と統計的に相関する1つまたは複数の罹病性因子を有すると知られている対象の治療であり得る。

10

## 【0065】

野生型：本明細書で使用される場合、用語「野生型」は、「正常な」（変異体、病的なもの、変化したものなどと対照される）状態または状況において天然に見られるような構造及び／または活性を有する実体を指す、当該技術分野で理解されている意味を有する。当業者は、野生型の遺伝子及びポリペプチドは、複数の異なる形態（例えば、対立遺伝子）で存在することが多いことを認識するであろう。

20

## 【0066】

特定の実施形態の詳細な説明

本発明は、腫瘍変異の結果として形成されるその高い変異負荷及び体細胞ネオエピトープが、免疫チェックポイントモジュレーターの抗腫瘍免疫応答に寄与するという発見を包含する。

## 【0067】

とりわけ、本開示は、癌細胞中のネオエピトープは、MHCクラスI分子及び／または細胞傷害性T細胞による改善された認識に対する結合親和性の増加と関連していることを、具体的に示す。

30

## 【0068】

本発明は、とりわけ、癌細胞中に存在する体細胞ネオエピトープを検出し、かつ／またはそのようなネオエピトープと免疫に対する応答の間のまたは間での関連を確立するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫療法による（例えば、免疫チェックポイントモジュレーターによる）治療に好適に応答する可能性が高い癌患者を同定するため、及び／もしくはそのような免疫療法を受け入れるべき患者を選択するための方法並びに／または試薬を提供する。あるいはまたはさらに、本発明は、体細胞ネオエピトープを保有する癌を有すると同定されている免疫チェックポイントモジュレーターによって患者を治療するための方法及び／または試薬を提供する。

## 【0069】

## 体細胞変異

体細胞変異は、非生殖系列細胞におけるDNAの変化を含み、一般的に癌細胞内で起る。本明細書では、癌細胞における特定の体細胞変異は、いくつかの実施形態では、アミノ酸の伸長を「自己」として認識されていることから「非自己」へ移行させるような、ネオエピトープの発現をもたらすということが発見されている。本発明によれば、「非自己」抗原を保有する癌細胞は癌細胞に対する免疫応答を誘発する可能性が高い。癌細胞に対する免疫応答は、免疫チェックポイントモジュレーターにより増強され得る。本発明は、ネオエピトープを発現している癌は免疫チェックポイントモジュレーターを用いた治療に対してより応答することができることを教示する。とりわけ、本発明は、治療を受け入れるべき患者の同定及び／または選択を可能にすることによって癌治療を改善するためのストラテジーを提供する。本発明は、ネオエピトープまたはそのセットを定義する技術も提供

40

50

し、その存在は、目的の特定の臨床転帰を示す（例えば、例えば特定の免疫チェックポイントモジュレーターによる、療法に対する応答性、及び／または療法の特定の望ましくない副作用を発症する危険性）。本発明は、免疫チェックポイントモジュレーター療法に対する有益な（または望ましくない）応答に関連する1つまたは複数のネオエピトープ「シグネチャー」を定義するか、またはその定義を可能にする。

【0070】

いくつかの実施形態では、体細胞変異は、新抗原またはネオエピトープをもたらす。とりわけ、本開示は体細胞変異に起因するネオエピトープの存在を示しており、その存在は免疫チェックポイントモジュレーター療法に対する特定の応答に関連する。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、例えば、MHCクラスI分子に対する結合親和性の増加及び／または免疫系の細胞（すなわちT細胞）による「非自己」としての認識に寄与する、テトラペプチドであるかまたはそれを含む。いくつかの特定の実施形態では、体細胞変異は、表1に記載されたテトラペプチドを含むネオエピトープをもたらす。いくつかの実施形態では、ネオエピトープは、感染性病原体由来の抗原とコンセンサス配列を共有する。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、本発明による目的のネオエピトープシグネチャーは、ネオエピトープまたはそのセットであるかまたはそれを含み、腫瘍サンプル中のその存在は特定の臨床転帰と相關する。本開示は、そのようなネオエピトープシグネチャーの効果的な定義を示す。いくつかの実施形態では、有用なシグネチャーは、表1に見出される1つまたは複数のコンセンサステトラペプチド体細胞ネオエピトープであるかまたはそれらを含む；いくつかの実施形態では、有用なシグネチャーは、表2で下線をつけた1つまたは複数のテトラペプチド体細胞ネオエピトープであるかまたはそれらを含む；いくつかの実施形態では、有用なシグネチャーは、表2に見出される1つまたは複数の九量体ペプチドであるかまたはそれらを含む。いくつかの実施形態では、有用なシグネチャーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、7-、71、72、73、74、75個、またはそれ以上のネオエピトープであるかまたはそれらを含む。いくつかの実施形態では、本開示は、ネオエピトープシグネチャー、及び特に免疫チェックポイントモジュレーター療法に関連するものを定義並びに／または検出するための技術を提供する。

20

【0072】

とりわけ、本開示は、免疫チェックポイントモジュレーター療法の特定の応答または応答特徴（例えば、療法に対する応答性または副作用のリスク）に関連したネオエピトープ及びネオエピトープシグネチャーの定義を示す。本明細書に提示される特定の例では、このような定義は、その存在が免疫チェックポイントモジュレーター療法に対する共通応答特徴と関連または関連する遺伝子配列要素が、比較によって定義されるように、共通応答特徴を共有するサンプルを含む第1の複数の腫瘍サンプルからの遺伝子配列情報を、共通応答特徴を共有しないがその他の点では第1のセットのサンプルと同等である第2の複数の腫瘍サンプルから得られた遺伝子配列情報と比較することによって達成される。本開示は、変異負荷の増加が応答特徴（例えば、療法に対する応答性）と関連することができるることを具体的に示すばかりでなく、そのような変異負荷の増加単独では応答特徴を予測するのに十分ではないであろうということを示す。本開示は、そのような体細胞変異がネオエピトープを生成する場合、応答特徴に関連した有用なネオエピトープシグネチャーを定義し得ることを示す。本開示は、そのようなシグネチャーを定義し、用いるための具体的な技術を提供する。

30

【0073】

40

50

いくつかの実施形態では、ネオエピトープを含む癌細胞は、癌、肉腫、黒色腫、骨髄腫、白血病、またはリンパ腫から選択される。いくつかの実施形態では、ネオエピトープを含む癌細胞は黒色腫である。いくつかの実施形態では、ネオエピトープを含む癌細胞は、非小細胞肺癌である。

## 【 0 0 7 4 】

(表1) 黒色腫における例示的なコンセンサス特朗ペチド体細胞ネオエピトープ

四量体	SEQ ID NO.
AARA	1
ALLN	2

ALSV	3	
AVLS	4	
DSSE	5	
EADL	6	
KEEF	7	10
LERE	8	
LSLA	9	
LSSV	10	
PNSS	11	
SLGL	12	
SSGL	13	20
SSVL	14	
EKLS	15	
FLGS	16	
FSLN	17	
KKIL	18	
LSLL	19	30
LTAT	20	
QLPP	21	
SASA	22	
SSAF	23	
VLSS	24	
DKSL	25	40
EVLL	26	

LAPE	27
LKEL	28
LLFL	29
LLQL	30
LPPL	31
LSPG	32
PPLL	33
RGSS	34
SPPP	35
SPSS	36
SSLE	37
SSRS	38
VAAL	39
EEEE	40
LAAL	41
LGSL	42
LKKK	43
LLLL	44
LLLV	45
LSSL	46
LPPP	47
LSSL	48
SSLA	49
VTKE	50

10

20

30

40

ELEE	51
KIKA	52
KILS	53
KLGI	54
KLPA	55
LSKA	56
PPSQ	57
QKLG	58
SLLA	59
VSFV	60
EDLL	61
EILE	62
LENF	63
VLEE	64
GPSP	65
GSFS	66
LFGN	67
LKKR	68
PFLP	69
PPPP	70
RKLS	71
LSLS	72
LLKK	126
ESSA	127

10

20

30

40

## 【 0 0 7 5 】

(表2) C T L A - 4 遮断(例えば、イピリムマブ治療を介する)に対する応答に関連したネオエピトープのセット

各九量体におけるテトラペプチドネオエピトープは下線が引かれている。

CRシグネチャー				CR+長SDシグネチャー			
テトラ ペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO	テトラ ペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO
AARA	1	RTAARA <u>VSP</u>	73	EKLS	15	REKLSILCT	126
		QGAARAR <u>VL</u>	74			QE <u>KLSIRQG</u>	127
		EEAARAVDD	75			KPNNE <u>KLST</u>	128
ALLN	2	RLV <u>ALLNHI</u>	76			QE <u>QEEKLSF</u>	129
		SLS <u>ALLNIF</u>	77			RYTTIE <u>KLS</u>	130
		<u>ALLNLSSRC</u>	78	FLGS	16	<u>FLGSLGAEG</u>	131
ALSV	3	VP <u>ALSVITD</u>	79			GSSDF <u>LGSG</u>	132
		<u>ALSVSGKRE</u>	80			GNVV <u>FLGSA</u>	133
		SQQY <u>QALSV</u>	81			SEKTC <u>FLGS</u>	134
AVLS	4	<u>LAVLSSLFL</u>	82			NSCIL <u>FLGS</u>	135
		<u>SRAVLSSFS</u>	83			LPPDN <u>FLGS</u>	136
		NTSA <u>VLSSQS</u>	84	FSLN	17	VSIL <u>FSLNL</u>	137
		<u>AVLSLPGAQ</u>	85			V <u>FSLNPDGTG</u>	138

10

20

30

CR シグネチャー				CR+長SDシグネチャー			
テトラ ペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO	テトラ ペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO
DSSE	5	<u>GDSSEDSSG</u>	86			<u>KFSLNGGYW</u>	139
		<u>DSSEIGAVL</u>	87			<u>GWANFSLNP</u>	140
		<u>ALGDSSERV</u>	88			<u>QFSLNRGCK</u>	141
EADL	6	<u>AEILEADLQ</u>	89	KKIL	18	<u>SLKAIKKIL</u>	142
		<u>DAEADLVGR</u>	90			<u>VHGKKILRT</u>	143
		<u>VEADLTAVG</u>	91			<u>VKSMKKKIL</u>	144
KEEF	7	<u>NIAVKEEFN</u>	92			<u>SATKKILIV</u>	145
		<u>IKEEFDYIS</u>	93			<u>LKRKKKKILS</u>	146
		<u>QGEEIKEEF</u>	94	LSLL	19	<u>LLSLLVTTS</u>	147
LERE	8	<u>EEDALEREG</u>	95			<u>HKVLSLLWN</u>	148
		<u>GLEREGFTF</u>	96			<u>IGRLSLLNP</u>	149
		<u>REIVXLERE</u>	97			<u>SFLSLLFFC</u>	150
LSLA	9	<u>KRLLSLATT</u>	98	LTAT	20	<u>KGETLTATP</u>	151
		<u>ISYLSLAHM</u>	99			<u>AHNLCLTAT</u>	152
		<u>GDVMFLSLA</u>	100			<u>VPDSLTTATT</u>	153
		<u>LFNDHLSLA</u>	101			<u>NLTATEVVV</u>	154

10

20

30

40

CR シグネチャー				CR+長SDシグネチャー			
テトラ ペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO	テトラ ペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO
LSSV	10	<u>LSSVFFVEV</u>	102	QLPP	21	<u>KSPSNQLPP</u>	155
		<u>ISPLLSSVL</u>	103			<u>KSPSNQLPP</u>	156
		<u>LLSSVDGVS</u>	104			<u>SVGDCQLPP</u>	157
PNSS	11	<u>CNPNSSGLN</u>	105			<u>FLSQNQLPP</u>	158
		<u>FMYLQPNSS</u>	106	SASA	22	<u>SASATHQAD</u>	159
		<u>PVGPNSSKG</u>	107			<u>VCSASAGRN</u>	160
SLGL	12	<u>FLDSSLGLC</u>	108			<u>YMDLMSASA</u>	161
		<u>KLSSLGLRG</u>	109			<u>SSKGLSASA</u>	162
		<u>GPASLGLPA</u>	110	SSAF	23	<u>GTVSSSAFL</u>	163
SSGL	13	<u>CNPNSSGLN</u>	111			<u>YPFSSSAFN</u>	164
		<u>PGLFSSGLY</u>	112			<u>ESSAFLLNS</u>	165
		<u>GPASSGLPA</u>	113			<u>LSSAFRRSC</u>	166
		<u>EFRGSSGLL</u>	114	VLSS	24	<u>DYVLSSEYY</u>	167
SSLA	49	<u>FSTNSSLAK</u>	115			<u>LAVLSSLFL</u>	168
		<u>QGMPSSLAQ</u>	116			<u>SRAVLSSFS</u>	169
		<u>SVLPSSLA</u>	117			<u>VLSSLEGNI</u>	170

10

20

30

40

CRシグネチャー				CR+長SDシグネチャー			
テトラペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO	テトラペプチド	SEQ ID NO	変異9mer	SEQ ID NO
SSLE	37	<u>EDILNSSLE</u>	118			<u>AVLSSPGAQ</u>	171
		<u>SGSSLEKEL</u>	119			<u>VMQGIVLSS</u>	172
		<u>KQKSSLETP</u>	120				
		<u>VLSSLEGNI</u>	121				
		<u>YTTSSLECG</u>	122				
SSVL	14	<u>ISPLLSSVL</u>	123				
		<u>SPSSVLFH</u>	124				
		<u>SSVLPVNGK</u>	125				

## 【0076】

## 免疫チェックポイントモジュレーション

免疫チェックポイントは、自己寛容を維持し、生理的免疫応答の持続時間及び振幅を調節する原因となる免疫系の阻害経路を指す。

## 【0077】

特定の癌細胞は、特に、腫瘍抗原に特異的なT細胞に対して、免疫耐性の主要なメカニズムとして免疫チェックポイント経路を利用して成長する。例えば、特定の癌細胞は、細胞傷害性T細胞応答を阻害する原因となる1つまたは複数の免疫チェックポイント蛋白質を過剰発現し得る。従って、免疫チェックポイントモジュレーターは、阻害シグナルを克服し、癌細胞に対する免疫攻撃を可能にし、及び/または増強するために投与され得る。免疫チェックポイントモジュレーターは、負の免疫応答調節因子（例えば、CTLA-4）によるシグナル伝達を減少、阻害、または抑止することにより、癌細胞に対する免疫細胞応答を促進し得るか、または免疫応答（例えば、CD28）の正の調節因子のシグナル伝達を刺激または増強し得る。

## 【0078】

免疫チェックポイントモジュレーターを標的とする免疫療法剤は、癌細胞を標的とする免疫攻撃を促進するために投与され得る。免疫療法剤は、免疫チェックポイントモジュレーターを標的とする抗体作用物質（例えば、特定の特異的であるもの）であるか、またはそれを含み得る。免疫療法剤の例としては、1つまたは複数のCTLA-4、PD-1、PD-L1、GITR、OX40、LAG-3、KIR、TIM-3、CD28、CD40、；及びCD137を標的とする抗体作用物質が挙げられる。

## 【0079】

抗体作用物質の具体例としては、モノクローナル抗体を含み得る。免疫チェックポイントモジュレーターを標的とする特定のモノクローナル抗体が使用可能である。例えば、イピルミマブはCTLA-4を標的とし；トレメリムマブはCTLA-4を標的とし；ベンプロリズマブはPD-1を標的とする、など。

10

20

30

40

50

## 【0080】

## ネオエピトープの検出

癌は、様々な公知の技術の任意のものを使用して、ネオエピトープを検出するためにスクリーニングされ得る。いくつかの実施形態では、ネオエピトープ、またはその発現は、核酸レベルで（例えば、DNAまたはRNAにおいて）検出される。いくつかの実施形態では、ネオエピトープ、またはその発現は、タンパク質レベルで検出される（例えば、癌細胞由来のポリペプチドを含むサンプルにおいて、そのサンプルは、ポリペプチド複合体または細胞、組織、または器官を含むがこれらに限定されない他の高次構造であるかまたはそれらを含む）。

## 【0081】

いくつかの特定の実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープの全エクソーム配列決定によって検出される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープは免疫測定法によって検出される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープはマイクロアレイによって検出される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープは、大規模並列エクソームシーケンシング配列決定を用いて検出され得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープはゲノム配列決定によって検出され得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープはRNA配列決定によって検出され得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープは、標準的なDNAまたはRNA配列決定によって検出され得る。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープは質量分析によって検出され得る。

10

20

30

40

50

## 【0082】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープは、次世代配列決定（DNA及び/またはRNA）を使用して核酸レベルで検出され得る。いくつかの実施形態では、次のネオエピトープ、またはその発現は、ゲノム配列決定、ゲノム再配列決定、標的配列決定パネル、トランスクリプトームプロファイリング（RNA-Seq）、DNA-タンパク質相互作用（ChIP配列決定）、及び/またはエピゲノムの特性評価を使用して検出され得る。のいくつかの実施形態では、患者のゲノムの再配列決定が、例えばゲノムの変化を検出するために、用いられ得る。

## 【0083】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のネオエピトープは、ELISA、Western Transfer、免疫測定法、質量分析法、マイクロアレイ解析、などの手法を使用して検出され得る。

## 【0084】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または等価の方法及び材料が本発明の実施または試験において使用され得るが、好適な方法及び材料は、本明細書に記載されている。

## 【0085】

## 治療方法

いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好適に応答する可能性が高い癌患者を同定するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好適に応答する可能性が高い癌患者を同定して免疫チェックポイントモジュレーターで患者を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好適に応答する可能性が高いと以前に同定された癌患者を免疫チェックポイントモジュレーターで治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療に好適に応答しない可能性が高い癌患者を同定し、免疫チェックポイントモジュレーターで癌患者を治療しないための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターを投与された場合に1つまたは複数の自己免疫性合併症を患う可能性が高い癌患者を同定

するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、免疫チェックポイントモジュレーターで治療された場合、1つまたは複数の自己免疫性合併症を患う可能性が高いと以前に同定された癌患者を免疫抑制剤で治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、免疫チェックポイントモジュレーターの前またはそれと一緒に患者に投与される。

【0086】

免疫チェックポイントモジュレーターの投与

本発明の特定の方法によれば、免疫チェックポイントモジュレーターは個体に投与されるか、または投与されている。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療は単独療法として用いられる。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療は、1つまたは複数の他の治療法と併用して使用される。

10

【0087】

当業者は、適切な処方、適応症、及び投与レジメンは、典型的には分析して、米国のFood and Drug Administrationなどの政府の規制当局によって分析され、承認されることを認識するであろう。例えば、実施例5は、イビルミマブ、抗CTL-4抗体に対する特定の承認投薬情報を提示する。多くの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、そのような承認されたプロトコルに従って、本発明に従って投与される。しかし、本開示は、免疫チェックポイントモジュレーターが望ましい投与され得る特定の患者を同定、特徴決定、及び／または選択するための特定の技術を提供する。いくつかの実施形態では、本開示によって提供される知見は、本明細書に記載のように同定された両方の個体（例えば、ネオエピトープを発現している個体と他の個体）を含む集団研究に基づいて推奨または承認される用量に対して、より高い頻度及び／またはより多い個別の用量で（例えば、望ましくない効果に対する感度の低下及び／またはその発生または強度に依存して）所与の免疫チェックポイントモジュレーターを投与することを許容する。いくつかの実施形態では、本開示によって提供される知見は、本明細書に記載のように同定された両方の個体（例えば、ネオエピトープを発現している個体と他の個体）を含む集団研究に基づいて推奨または承認される用量に対して、より低い頻度及び／またはより少ない個別の用量で（例えば、応答性の増加に依存して）所与の免疫チェックポイントモジュレーターを投与することを許容する。

20

【0088】

いくつかの実施形態では、免疫系のモジュレーターは、生理学的に許容される担体または賦形剤も含む薬学的組成物で投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は無菌である。多くの実施形態では、薬学的組成物は、特定の投与モードに対して処方される。

30

【0089】

適切な薬学的に許容される担体としては、水、塩溶液（例えば、NaCl）、生理食塩水、緩衝食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトースなどの炭水化物、アミロースまたはデンプン、例えば、マンニトール、スクロース、またはその他の糖、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、など、並びにそれらの組合せ、が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的製剤は、所望されれば、活性化合物と有害に反応しないまたはそれらの活性と干渉しない1つまたは複数の補助剤（例えば、潤滑剤、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩、緩衝剤、着色剤、香料及び／または芳香物質など）含むことができる。いくつかの実施形態では、静脈内投与に適した水溶性担体が使用される。

40

【0090】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物または医薬は、所望されれば、ある量（典型的には少量）の湿潤剤もしくは乳化剤、及び／またはpH緩衝剤を含むことができる。いく

50

つかの実施形態では、薬学的組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤、または粉末であり得る。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤及び担体とともに、坐剤として製剤化され得る。経口製剤は、薬学的グレードのマンニトール、ラクトース、デンブン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、などの標準的な担体を含むことができる。

【0091】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、ヒトへの投与に適した薬学的組成物として常法に従って製剤化され得る。例えば、いくつかの実施形態では、静脈内投与のための組成物は典型的には、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物は注射部位の痛みを和らげるための可溶化剤及び局所麻酔剤を含むこともできる。一般に、成分は、例えば、活性物質の量を示すアンプルまたは小袋などの密封容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、別々にまたは単位剤形で一緒に混合して、供給される。組成物が注入によって投与される場合、それは、滅菌薬学的グレードの水、生理食塩水またはデキストロース／水を含む注入ボトルで分配され得る。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。

10

【0092】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは中性形態で製剤化され得；いくつかの実施形態では、それは塩の形態で製剤化され得る。薬学的に許容される塩としては、等、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸、などに由来するものなどの遊離アミノ基で形成されるもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイインなどに由来するものなどの遊離カルボキシル基で形成されるものが挙げられる。

20

【0093】

本発明に従って使用するための薬学的組成物は、任意の適切な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は皮下に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、心臓や筋肉（例えば、筋肉内）、または神経系（例えば、脳への直接注射；脳室内に；髄腔内に）などの、標的組織への直接投与により投与される。あるいはまたは追加的に、いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、非経口的に、経皮的に、または経粘膜的に（例えば、経口でまたは経鼻で）投与される。所望であれば、複数の経路を同時に使用することができる。

30

【0094】

免疫チェックポイントモジュレーター（または免疫チェックポイントモジュレーターを含む組成物または医薬）は、単独で、または他の免疫チェックポイントモジュレーターと併用して投与することができる。用語「併用して」は、第1の免疫チェックポイントモジュレーターが、別の免疫チェックポイントモジュレーターの前に、それとほぼ同時に、またはそれに続いて投与されることを示す。例えば、第1の免疫チェックポイントモジュレーターは1つまたは複数の異なる免疫チェックポイントモジュレーターを含む組成物に混合することができ、それによって同時に投与され得るか；あるいは、作用物質は混合せず、同時に投与され得る（例えば、それによって免疫チェックポイントモジュレーターも投与される、静脈ライン上への作用物質の「ピギーバッキング」送達によって、またはその逆）。別の例では、免疫チェックポイントモジュレーターは別々に（例えば、混合されず）、しかし免疫チェックポイントモジュレーターの投与の短い時間枠内（例えば、24時間以内）で投与され得る。

40

【0095】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターで治療される対象は、1つまたは複数の免疫抑制剤を投与される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の

50

免疫抑制剤は、自己免疫応答（例えば、腸炎、肝炎、皮膚炎（中毒性表皮壊死症を含む）、神経障害及び／または内分泌障害）、例えば、甲状腺機能低下症を、減少させ、阻害し、または、予防するために投与される。例示的な免疫抑制剤は、ステロイド、抗体、免疫グロブリン融合タンパク質、などを含む。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤は、B細胞活性を阻害する（例えばリツキシマブ）。いくつかの実施形態では、免疫抑制剤はおりポリペプチド抗原である。

【0096】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーター（または免疫チェックポイントモジュレーターを含む組成物または医薬）は、治療有効量（例えば、関連する集団に投与される場合、癌に関連する症状を改善する、癌の発症を予防または遅延させる、及び／または、癌の症状の重症度または頻度も軽減するなどによって、癌を治療するのに十分であると示されている、投薬量及びまたは投与レジメンに従って）で投与される。いくつかの実施形態では、長期的な臨床的有用性は、例えば、イピルミマブまたはトレメリムマブ、及び／または他の剤などのCTLA-4遮断薬、を含む、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療の後に観察される。当業者は、所与の患者の癌の治療に対して治療的に有効な用量は、癌の性質及び程度に、少なくともある程度、依存し得るものであり、標準臨床技術によって決定され得ることを認識するであろう。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のインピトロまたはインピボのアッセイは、任意選択で、最適な用量範囲の同定に役立つように使用され得る。いくつかの実施形態では、所与の個体の治療において使用される特定の用量は、投与経路、癌の程度、依存することができる、及び／または患者の状況に照らして、医師の判断で関連するとみなされる1つまたは複数の他の因子に依存し得る。されているようにいくつかの実施形態では、有効用量は、インピトロまたは動物モデル試験システムから得られる用量・応答曲線から外挿することができる（例えば、the U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, and Center for Drug Evaluation and Researchによって、"Guidance for Industry: Estimating Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers", Pharmacology and Toxicology, July 2005に記載されているように）。

【0097】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターの治療有効量は、例えば、約0.01mg/kg超、約0.05mg/kg超、約0.1mg/kg超、約0.5mg/kg超、約1.0mg/kg超、約1.5mg/kg超、約2.0mg/kg超、約2.5mg/kg超、約5.0mg/kg超、約7.5mg/kg超、約10mg/kg超、約12.5mg/kg超、約15mg/kg超、約17.5mg/kg超、約20mg/kg超、約22.5mg/kg超、または約25mg/kg超体重であることができる。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約0.01～25mg/kg、約0.01～20mg/kg、約0.01～15mg/kg、約0.01～10mg/kg、約0.01～7.5mg/kg、約0.01～5mg/kg、約0.01～4mg/kg、約0.01～3mg/kg、約0.01～2mg/kg、約0.01～1.5mg/kg、約0.01～1.0mg/kg、約0.01～0.5mg/kg、約0.01～0.1mg/kg、約1～20mg/kg、約4～20mg/kg、約5～15mg/kg、約5～10mg/kg体重であることができる。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約0.01mg/kg、約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1.0mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、約1.5mg/kg、約1.6mg/kg、約1.7mg/kg、約1.8mg/kg

10

20

30

40

50

、約1.9mg/kg、約2.0mg/kg、約2.5mg/kg、約3.0mg/kg、約4.0mg/kg、約5.0mg/kg、約6.0mg/kg、約7.0mg/kg、約8.0mg/kg、約9.0mg/kg、約10.0mg/kg、約11.0mg/kg、約12.0mg/kg、約13.0mg/kg、約14.0mg/kg、約15.0mg/kg、約16.0mg/kg、約17.0mg/kg、約18.0mg/kg、約19.0mg/kg、約20.0mg/kg、体重、またはそれ以上であることができる。いくつかの実施形態では、治療有効量は、約30mg/kg以下、約20mg/kg以下、約15mg/kg以下、約10mg/kg以下、約7.5mg/kg以下、約5mg/kg以下、約4mg/kg以下、約3mg/kg以下、約2mg/kg以下、または約1mg/kg以下体重またはそれ以下である。

10

## 【0098】

いくつかの実施形態では、特定の固体に対して投与される用量は、その固体のニーズに応じて、時間に対して変化させる（例えば、増加または減少）。

## 【0099】

さらに別の実施例では、治療組成物の負荷用量（例えば、初期のより高い用量）は治療の経過の始めに与えられ、続いて、治療組成物の減少した維持用量（例えば、後続のより少ない用量）が投与される。

## 【0100】

任意の理論に拘束されることを望むものではないが、負荷用量は、細胞（例えば、肝臓の）における、初期の、及びいくつかのケースでは大量の、望ましくない物質（例えば、脂肪性物質及び/または腫瘍細胞、など）の蓄積を除去することができ、維持容量は、初期の除去後の脂肪性物質の蓄積を遅延させ、低減し、または防止し得ることが意図されている。

20

## 【0101】

治療の負荷用量量及び維持用量量、間隔並びに持続時間は、本明細書に例示されたものと、当該技術分野で公知のものなど、任意の使用可能な方法によって決定され得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、負荷用量量は、約0.01~1mg/kg、約0.01~5mg/kg、約0.01~10mg/kg、約0.1~10mg/kg、約0.1~20mg/kg、約0.1~25mg/kg、約0.1~30mg/kg、約0.1~5mg/kg、約0.1~2mg/kg、約0.1~1mg/kg、または約0.1~0.5mg/kg体重である。いくつかの実施形態では、維持用量量は、約0~10mg/kg、約0~5mg/kg、約0~2mg/kg、約0~1mg/kg、約0~0.5mg/kg、約0~0.4mg/kg、約0~0.3mg/kg、約0~0.2mg/kg、約0~0.1mg/kg体重である。いくつかの実施形態では、負荷用量は、所与の時間期間（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月以上）及び/または所与の数の用量（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30用量以上）に対し、一定間隔で個体に投与され、続いて維持投与がなされる。いくつかの実施形態では、維持用量は、0~2mg/kg、約0~1.5mg/kg、約0~1.0mg/kg、約0~0.75mg/kg、約0~0.5mg/kg、約0~0.4mg/kg、約0~0.3mg/kg、約0~0.2mg/kg、または約0~0.1mg/kg体重である。いくつかの実施形態では、維持用量は、約0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、または2.0mg/kg体重である。いくつかの実施形態では、維持投与は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月以上投与される。いくつかの実施形態では、維持投与は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年以上投与される。いくつかの実施形態では、維持投与は（例えば、一生涯）無期限に投与される。

30

## 【0102】

治療有効量の免疫チェックポイントモジュレーターは、1回用量として投与され得るか、または癌の性質と程度に応じて、間隔的に、及び継続的に投与され得る。「間隔」での

40

50

投与は、本明細書で使用される場合、治療有効量が定期的に（1回用量と区別されるように）投与されることを示す。間隔は、標準的な臨床技術によって決定され得る。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントモジュレーターは、隔月、毎月、月2回、3週間毎、隔週、毎週、週2回、週3回、または毎日投与される。単一の個体に対する投与間隔は、固定間隔である必要はなく、個体のニーズ及び回復速度に応じて、時間に対して変化させることができる。

#### 【0103】

本明細書で使用される場合、用語「隔月」は2ヶ月あたり1回（すなわち、2ヶ月毎に1回）の投与を意味し；用語「毎月」は1ヶ月あたり1回の投与を意味し；用語「3週間毎」は3週間あたり1回（すなわち、3週間毎に1回）の投与を意味し；用語「隔週」は2週間あたり1回（すなわち、2週間毎に1回）の投与を意味する。用語「毎週」は、1週間あたり1回の投与を意味する。用語「毎日」は、1日あたり1回の投与を意味する。

10

#### 【0104】

本発明はさらに、本明細書に記載されるように、癌の治療のための組成物の投与に対する指示を含むラベルを有する容器（例えば、静脈内投与、シリンジ、などのためのバイアル、瓶、袋）内に免疫チェックポイントモジュレーターを含む薬学的組成物に関する。

#### 【実施例】

#### 【0105】

以下の実施例は、当業者に本発明の方法及び組成物をいかに作製し使用するかを説明するように提供され、本発明者らが発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。

20

#### 【0106】

#### 概説

免疫チェックポイント遮断は、転移性黒色腫、非小細胞肺癌癌、及び他の腫瘍型を有する患者における耐性抗腫瘍効果に導いた新しい治療パラダイムであるが、患者が応答するかどうか判定することはわかりにくいままである。<sup>1~5</sup> これは癌の免疫療法の分野におけるもっとも重要な未解決の問題の1つである。完全なヒトモノクローナル抗体イピリムマブ及びトレメリムマブは細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）を遮断し、T細胞の活性化をもたらす。<sup>4,6</sup> ペンブロリズマブは、転移性黒色腫の治療としてプログラム細胞死1（PD-1）受容体を標的とする薬物である。多くの研究が、イピリムマブに対する転帰と、末梢血リンパ球数、抗原特異的免疫、T細胞活性化のマーカー、<sup>7,8</sup> 「炎症性」微小環境<sup>9~12</sup>、及び高周波のTCRクローン型の維持<sup>6,9</sup>との間の相関を、確立している。

30

#### 【0107】

しかしながら、腫瘍の遺伝子プロファイルが、CTLA-4遮断に対する応答（例えば、イピリムマブを経由して）を決定するかどうかは不明である。腫瘍の遺伝的状況、変異の負荷、及び治療からの有用性の間の関係が、調査の課題であった。非同義黒色腫の変異に起因する免疫原性がマウスモデルで示されており、<sup>1,3</sup> ヒト黒色腫の腫瘍の抗原性の多様性がコンピューターでモデル化されている。<sup>1,4</sup> 制御性T細胞の枯渇のように<sup>1,8</sup>、エフェクター、ヘルパーT細胞の機能と制御性T細胞の枯渇が抗CTLA-4の有効性に対して必要であるが、<sup>1,5~1,7</sup> 特定のHLA型と臨床的有用性の間の関連は観察されていない。<sup>2,6</sup> 黒色腫は、任意の固体腫瘍の最大の変異負荷を有する（1メガベースあたり0.5~100個超）。<sup>1,9~2,0</sup> 体細胞変異はネオエピトープを生じさせることができ<sup>2,1,2,2</sup>、これらは前臨床モデル及び患者において新抗原として作用し得る<sup>2,3~2,5</sup> ことを、研究が示している。イピルミマブ応答は、腫瘍細胞のゲノムによって決定されるという仮説が関連する。これまでの研究は、特定のHLA型とイピリムマブ応答の間の関連性の欠如を示している。<sup>2,6</sup> 本研究では、腫瘍の遺伝的状況がCTLA-4遮断に対する臨床応答を決定するかどうかを調べる（例えば、イピリムマブまたはトレメリムマブなどの剤による治療を経由して）。<sup>1,8</sup>

40

#### 【0108】

50

この仮説を調査するために、発見セットに対して、本発明者らは腫瘍由来のDNAの全エクソーム塩基配列決定を行い、25人のイピリムマブ治療患者の正常な血液（表3）、続いて検証として、そのうちの5人がトレメリムマブで治療された追加の39人の腫瘍と対応させた。本発明者らは、より高い変異負荷がCTLA-4遮断（例えばイピリムマブまたはトレメリムマブ経由）からの強い臨床的有用性と相關しているが、それだけで予測するには不十分であることを見出した。その代わりに、CTLA-4遮断からの臨床的有用性を示す患者由来の腫瘍における変異は、共通の体細胞ネオエピトープ保有していた。ここで、本発明者らは、免疫チェックポイント阻害に対する臨床応答の遺伝的基礎を示し、療法に対する応答の根底にあるネオエピトープの状況を定義する。

## 【0109】

10

本開示を読む当業者は、本明細書に含まれる特定の実施例は、代表的なものであり限定的なものではないことを認識するであろう。例えば、当業者は、以下に詳細に提供される、黒色腫におけるイピリムマブ応答のデータをレビューして、概念実証を表し、ネオエピトープ変異シグネチャーが免疫チェックポイントモジュレーターに対する応答を予測し得ることを確立する。本開示を読む当業者は、該アプローチは癌及び免疫チェックポイントモジュレーター療法全体に広く適用可能であることを認識し理解するであろう。

## 【0110】

実施例1. イピリムマブに対する多様な臨床転帰を有する患者の黒色腫の変異状況

この実施例は、癌の遺伝的状況の分析を示し、免疫チェックポイントモジュレーターに対して好適にまたは不十分に反応する患者の有用な特徴を定義することにおけるその有効性を示す。該実施例は、特にCTLA-4遮断（例えば、イピリムマブ）で治療された黒色腫患者の分析を例示し、そのような患者における例示的な遺伝的特性を定義する。

20

## 【0111】

CTLA-4遮断剤で治療された黒色腫患者は、全体の生存優位性と多様な応答を示す。<sup>1</sup>、<sup>2</sup> <sup>7</sup> ~ <sup>2</sup> <sup>9</sup> ベースライン患者特性は表3に記載されている。

## 【0112】

（表3）発見セット及び検証セットにおける患者の臨床的特徴

	発見セット	検証セット		
	長期的な有用性	最小の有用性または有用性なし	長期的な有用性	最小の有用性または有用性なし
合計	11	14	25	14
治療開始年齢 (中央値、範囲)	63 (39-70)	59.5 (48-79)	66(33-90)	57 (18-74)
性 (n, %)				
F (n, %)	3 (27)	8 (57)	9 (36)	5 (36)
M (n, %)	8 (73)	6 (43)	16(64)	9 (64)
疾患源 (n, %)				
肢端	0 (0)	3 (21)	1 (4)	1 (7)

30

40

ブドウ膜	0 (0)	0 (0)	1 (4)	0 (0)
皮膚	10 (82)	8 (57)	15 (60)	11 (79)
原発不明	1 (9)	3 (21)	3 (0.12)	0 (0)
使用不可	0 (0)	0 (0)	5 (20)	2 (14)

## BRAF変異またはNRAS変異(n, %)

非存在	1 (9)	6 (43)	17 (68)	11 (79)
存在	10 (91)	8 (57)	8 (32)	3 (21)

## 療法開始時のLDH (n, %)

正常	8 (73)	8 (57)	8 (32)	9 (64)
正常を超える	2 (18)	5 (33)	3 (12)	3 (21)
使用不可	1 (9)	1 (7)	14 (56)	2 (14)

応答の持続期間  
(中央値 週, 範囲)  
59 (42-361+)

14 (11-23)

130 (64-376)

11 (3-29)

以前の療法  
(中央値 回数, 範囲)\*

1 (0-3)

0 (0-2)

0 (0-3)

## 診断の病期 (n, %)

IIC	0 (0)	0 (0)	3 (12)	0 (0)
M1a	0 (0)	1 (7)	4 (16)	1 (7)
M1b	5 (45)	1 (7)	2 (8)	3 (21)
M1c	6 (55)	12 (86)	16 (64)	10 (71)

全生存期間  
(中央値 年, 範囲)  
4.4 (2-6.9)

0.9 (0.4-2.7)

3.3 (1.6-7.2)

0.8 (0.2-2.1)

【 0 1 1 3 】

この研究には、長期的な臨床的有用性ありまたは長期的な臨床的有用性なしの患者が含まれる。ここで、本発明者らは、長期的な臨床的有用性を、(1) X線写真で疾患がない患者 (C T L A - 4 遮断剤単独からまたは単離された安定したもしくは非応答性の病変の摘除により) ; (2) > 6 ヶ月で、安定したまたは減少した体積の疾患の証拠を有する患者、のいずれかとして定義する。本発明者らは、臨床的有用性がないことを、治療開始後のすべてのスキャンにおける腫瘍の増殖 (有用性なしまたは応答なし) 、または < 6 ヶ月持続する一時的な臨床的有用性もしくは応答 (最少の有用性) (代表的スキャン、図 1 A ~ C 及び図 9 A ~ C) として定義する。

【 0 1 1 4 】

C T L A - 4 遮断薬からの応答の遺伝的状況を決定するために、本発明者らは、腫瘍を分析し、かつ、全エクソーム配列決定を使用して血液DNAとマッチさせた。発見セットでは、少なくとも 10 × 深度までカバーされた 90 % 超の標的配列、及び 103 × の平均

10

20

30

40

50

エクソームカバレッジ（図5）を用いて、6.4 GBのマッピングされた配列を作製した。検証セットの結果は図15に示されている。サンプルの間での広範囲の変異負荷（図2 A及び2 B）、並びに再発変異及びドライバー変異（図6 A及び6 C）は、文献と一致していた。<sup>30~34</sup>

#### 【0115】

発見と検証のセットにおいては、同様の遷移対転換の比率（図2 C、2 I）、並びに変異型及びヌクレオチド変化（図2 D並びに図6 B及び6 D）があった。<sup>19</sup>有用性を得た応答者または患者全体で、遺伝子は普遍的変異しなかった。既知の、再発性の黒色腫ドライバー遺伝子における変異は、各グループで観察され（図7 A及び7 B）、応答は多様なドライバー変異を伴う黒色腫で見られた。<sup>35</sup>

10

#### 【0116】

#### 実施例2. 治療有効性に関連する体細胞ネオエピトープ

この実施例は、体細胞ネオエピトープが、免疫チェックポイントモジュレーターによる治療の有効性と関連していることを示し、とりわけ、特定の例示的なモジュレーター（すなわち、イピリムマブ）に対する応答に関連するネオエピトープシグネチャーを定義する。

#### 【0117】

変異負荷は臨床的有用性と相關しているが単独では転帰を予測するのに十分ではない

本発明者らは、転移性黒色腫サンプルにおける変異負荷の増加が、CTL A-4遮断に対する（例えば、イピリムマブ、トレメリムマブ、などの剤による治療に対する）応答と関連するであろうと仮定した。発見セット（図2 B、マンホイットニー検定、 $p = 0.013$ ）、及び検証セット（図7 C及び7 D、マンホイットニー検定、 $p = 0.009$ ）における、CTL A-4遮断剤からの長期的な臨床的有用性（LB）を有する患者対、最少の有用性または臨床的有用性のない（NB）患者の間には変異負荷に有意差があった。発見セットでは、変異負荷は、改善された全生存期間と相關し（図2 E、ログランク検定、 $p = 0.041$ ）、検証セットでは生存率の改善に向けて推移した（図2 E、及び図2 H）。後者のセットは、そうでなければ、突然変異負荷と生存の間の関係を混乱させ得る全身性疾患制御が行われる患者から摘除した非応答性の腫瘍を含んでいた。4つの臨床のカテゴリーへのさらなる細分化は、発見セットにおける用量応答を示唆した（図7 E）。これらのデータは、高い変異負荷がCTL A-4遮断剤（例えば、イピリムマブ）からの臨床的有用性と相關するが、応答しない高い変異負荷を有する腫瘍があるので、単独では臨床応答を付与するのに十分ではないことを示している。

20

#### 【0118】

応答する腫瘍に共通する体細胞ネオエピトープは抗CTL A-4の有用性と関連している

MHCクラスI提示及び細胞傷害性T細胞認識は、イピリムマブ活性に対して必要とされる。<sup>15</sup>変異負荷単独ではイピリムマブに対する臨床的応答を説明しなかったので、本発明者らは特定の腫瘍新生抗原の存在が様々な治療応答を説明するであろうと仮定した。そのようなネオエピトープを同定するために、MHCクラスI結合予測、T細胞受容体結合のモデル化、患者に特異的なHLA型及びエピトープ相同性の解析（図8及び方法）を取り入れて、最先端のバイオインフォマティクスピライインを開発した。

30

#### 【0119】

MHCクラスIによる腫瘍抗原提示は、T細胞による認識のために重要である。<sup>36</sup>、<sup>37</sup>本発明者らは、すべての非同義のミスセンス変異を変異体及び野生型ペプチドに変換するために、計算アルゴリズムを作成したNASEek、方法、及び図8）。本発明者らは、患者に特異的なHLA型を使用して、体細胞ネオエピトープのサブセットがペプチド-MHC結合の強度を変えるかどうかを試験した。本発明者らは最初に、全野生型ペプチドに対する全変異体ペプチドの全体的な抗原性傾向を比較した。興味深いことに、全体として、変異体ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも高い親和性でMHCクラスIに結合することが予測された（図10 A及び10 B、図10 F及び10 G）。

40

#### 【0120】

50

MHC クラス I ( I C 5 0 5 0 0 n M ) に結合すると予測されたペプチドのストリングのみを使用して、本発明者らは、テトラペプチドに重点を置いて、複数の腫瘍によって共有されるアミノ酸の保存されたストレッチを探索した。これらは、タンパク質中に比較的まれに発生し、典型的には機能を反映するので、ゲノム系統発生のモデル化で使用される。<sup>3 8</sup> 本発明者らは、コンセンサス配列を同定するために、標準的な機械学習、階層的クラスタリング、及びシグネチャー導出アプローチを使用した。本発明者らは、応答者によって共有されるが、非応答者には完全に存在しない、多くのテトラペプチド配列を同定した。(図 3 A 及び 3 B)。最近公開された画期的な論文では、短いアミノ酸ストリングは、T 細胞受容体 ( T C R ) によって認識される抗原を横切って保存される領域を含むことが示された。<sup>3 9</sup> エピトープの T C R 認識はコンセンサステトラペプチドによって駆動され、交差反応する T C R エピトープ内のテトラペプチドは、抗原性及び T 細胞増殖を駆動するのに必要かつ十分であった。このポリペプチドの長さは、T C R による認識を駆動するのに十分であるという強力な証拠がある。<sup>4 0 ~ 4 2</sup>

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 1 】

テトラペプチドは、T 細胞に M H C クラス I 分子によって提示されるノナペプチドのコアを形成することができ、または横方向に配置され得る。<sup>4 3</sup> テトラペプチドは、タンパク質中に比較的まれに発生し、典型的には機能を反映するので、ゲノム系統発生のモデル化で使用される。本発明者らは、設定発見セットを、候補ネオエピトープから予測シグネチャーを生成するのに使用した。各グループ ( 候補ネオエピトープ ) に共通のテトラペプチドは、発見セット内で臨床的有用性を示す患者の中で、独占的に共有される 1 0 1 を含んだ。これは、検証セットで独立して観察された ( 図 3 A 、 3 B 、 3 E 及び 3 F 並びに図 1 2 )。このセットは、非常に統計的に有意である ( P < 0 . 0 0 1 、 フィッシャーの正確確率検定 ) 、 C T L A - 4 遮断からの有用性を得るために関連付けられるネオエピトープシグネチャーを定義する ( 例えば、イピリムマブ経由 ) ( 図 3 A 及び 3 B 、赤線 )。

## 【 0 1 2 2 】

重要なことには、共有テトラペプチドネオエピトープはより高い変異負荷から単純には生じなかつた。例えば、発見セットで、最大数の変異を有する ( 1 0 2 8 個の変異を有する S D 7 3 5 7 ) N B 患者 ( 非応答者 ) は、テトラペプチドシグネチャーのいずれも共有しなかつた ( 図 3 A )。この概念は、1 0 0 0 個を超える変異を伴う腫瘍 ( N R 9 5 2 1 と N R 4 6 3 1 ) でも応答しない検証セットにおいて再び示された ( 図 3 B 及び図 7 C )。5 つの異なるモデルを用いたシミュレーション・テストは、本発明者らのシグネチャーは、高度に統計学的に有意であり、偶然によってお飲み生じた可能性は低いによって生じている可能性は低い ( 方法 a ~ d に対して p < 0 . 0 0 1 及び方法 e に対して p + 0 . 0 0 2 ) ( 図 1 2 ) ことを示した。高い変異負荷は確率を高めるが、有用性に関連するネオエピトープの形成を保証するものではないように見える。コンセンサス分析は、ネオエピトープはランダムではないことを明らかにした。有用性のあるグループ内でテトラペプチドを構成するアミノ酸の頻度は、有用性のないグループで観察されたものとは異なつた ( 図 1 0 C 、 1 0 D 、 1 0 I 及び 1 0 J )。

## 【 0 1 2 3 】

発見セット由来のネオエピトープシグネチャーは、検証セットにおける生存率と強く相関し ( 図 3 C 及び 3 D 、 p < 0 . 0 0 0 1 ) 、識別転帰において変異負荷よりも効率的であった ( 図 2 D 、 2 B 、 2 E 、 2 H )。本発明者らは、組織及び適合する血液を所有するイピリムマブで治療した黒色腫患者の独立したコホート ( n = 1 5 ) を分析し、シグネチャーはこの独立したセットで検証された ( 図 3 D )。

## 【 0 1 2 4 】

これらのテトラペプチドは、ゲノムを横切る多様な遺伝子の変異によりコードされた ( 図 4 A 、 図 1 4 、 図 1 9 、 及び表 4 )。癌ゲノムアトラス ( T C G A ) 由来の R N A S e q データを使用して、本発明者らは、本発明者らの体細胞ネオエピトープを保有する遺伝子が黒色腫で広く発現されることを確認した。いくつかのケースでは、体細胞変異をもたらすアミノ酸の変化は、テトラペプチド自体の変化をもたらした。他では、記載されてい

るよう<sup>3</sup>に、変異アミノ酸は、テトラペプチドから分離されて、MHC結合を変えた。<sup>8</sup>  
<sup>4</sup><sub>0</sub>、<sup>4</sup><sub>4</sub>～<sup>4</sup><sub>6</sub>さらに、各臨床グループに共通の候補ネオエピトープを、免疫エピトープデータベース（IEDB）を使用して分析した。これは、実験的に検証され、公開され、及び精選された抗原の最も包括的なデータベースであり、高精度で抗原を同定するためのアルゴリズムを開発するのに使用してきた。<sup>2</sup><sup>3</sup>本発明者らは、有用性を得た者に共通の候補ネオエピトープは、他の臨床グループよりも、IEDBにおけるより多くのウイルス及び細菌抗原に相当することを見出した（図10E、図10K）。

## 【0125】

（表4）応答シグネチャーにおけるテトラペプチドの状況、遺伝子、及び遺伝子座  
<sup>4mer</sup> = 共通のテトラペプチドアミノ酸配列。Mut = 変異体の位置。WTSeq = 予測された野生型9アミノ酸ペプチド。MTSeq = 予測された変異体9アミノ酸ペプチド

4mer	サンプル	遺伝子	Mut	WTSeq	MTSeq	染色体	位置
AATA	CR4880	FAM48B1	c.G1507A	aiaaaAaaa	aiaaaTaaa	chrX	24382384
AATA	CR9699	C22orf42	c.C121T	etvaataPa	etvaataSa	chr22	32555082
AATA	LSD3484	ZNF335	c.C3047T	saataaSkk	saataaLkk	chr20	44580928
AATA	SD1494	DIDO1	c.C1874T	apaaataaS	apaaataaF	chr20	61528063
AFPS	LSD4691	LPP	c.241C>T	aLpsisgnf	aFpsisgnf	chr3	188202427
AFPS	CR9699	ARID5B	c.C3542T	afpssqlsS	afpssqlsF	chr10	63852764
AFPS	SD1494	VWDE	c.C2279T	fplfafps	fplfafps	chr7	12409653
ATAA	CR4880	FAM48B1	c.G1507A	aiaaaAaaa	aiaaaTaaa	chrX	24382384
ATAA	LSD3484	ZNF335	c.C3047T	saataaSkk	saataaLkk	chr20	44580928
ATAA	SD1494	DIDO1	c.C1874T	apaaataaS	apaaataaF	chr20	61528063

10

20

ATAA	SD6336	TDRD5	c.G3011A	ipRstataa	ipQstataa	chr1	179659981	
DLFF	CR1509	TBC1D23	c.C680T	dPffiyfilm	dUffiyfilm	chr3	100014010	
DLFF	LSD3484	UBN2	c.C2282T	dsldediSf	dsldediFf	chr7	138967933	
DLFF	CR9306	TMEM181	c.C1088T	lyndPffpl	lyndLffpl	chr6	159029368	
DLFF	CR9699	WDR78	c.C1201T	kfHqdlffm	kfYqdlffm	chr1	67313257	
DSAS	SD1494	UBQLN3	c.A1358G	gigdsaNrv	gigdsasrv	chr11	5529431	
DSAS	CR4880	FAT1	c.A4985G	tiadNaspk	tiadSaspk	chr4	187542755	
DSAS	LSD3484	CNTNAP2	c.C3730T	dsasadfPy	dsasadfSy	chr7	148106497	
DSAS	LSD4744	KIAA1244	c.C872T	eSdsaspvg	eLdsaspvg	chr6	138576674	
ESPF	CR9306	FAM3C	c.A577G	tKspfeqhi	tEspfeqhi	chr7	120991214	
ESPF	SD1494	TET3	c.C1828T	lpaPespfa	lpaSespfa	chr2	74275277	10
ESPF	CR4880	PRUNE2	c.G5509A	eGrriespf	eRrriespf	chr9	79321681	
ESSF	LSD0167	EGF	c.C1880T	npriessSl	npriessFl	chr4	110897218	
ESSF	CR9306	KIR2DL4	c.C691T	tePsfktgi	teSsfktgi	chr19	55320323	
ESSF	SD1494	RLF	c.C5297T	Pmgfessfl	Lmgfessfl	chr1	40705671	
FFYV	CR9699	AP2M1	c.C169T	artsffHvk	artsffYvk	chr3	183896739	
FFYV	LSD0167	OR9A4	c.C772T	cifLyvkpk	cifFyvkpk	chr7	141619447	
FFYV	SD1494	GJB5	c.C436T	svdiafLyv	svdiaffyv	chr1	35223367	
FLGL	CR9699	WRAP53	c.C1043T	grSglyaw	grFiglyaw	chr17	7605749	
FLGL	SD0346	WEE2	c.C971T	illqiSigi	illqiFlgl	chr7	141423024	
FLGL	SD1494	ITGB3	c.C950T	Slglmtekl	Flglmtekl	chr17	45367057	
FLGL	CR4880	SLTRK1	c.G322A	aflglqlVlk	aflglqlMlk	chr13	84455321	20
FPGP	CR9699	CCBE1	c.C733T	tyLpgppgl	tyFpgppgl	chr18	57115257	
FPGP	CR6126	WDR46	c.C289T	dPfpfpapv	dSfpfpapv	chr6	33256462	
FPGP	LSD3484	MSR1	c.C902T	fpgpigPpg	fpgpigLpg	chr8	16007817	
IFFA	CR1509	SCN10A	c.C5410T	hcdiLfaf	hcdiPfaf	chr3	38739301	
IFFA	CR9699	EMR3	c.C1550T	ifSanlvif	ifFanlvif	chr19	14744049	
IFFA	SD1494	ZDHHC22	c.C464T	ifFahplaf	ifFahplaf	chr14	77605618	
IFFA	CR4880	OR5B2	c.T623C	ifFVilvif	ifFAllvif	chr11	58190112	
KLLK	CR6126	SPTA1	c.G6097A	kllEkqlpl	kllKqlpl	chr1	158592796	
KLLK	SD1494	CEACAM3	c.G694A	Ellkhdtni	Kllkhdtni	chr19	42315210	
KLLK	SD0346	LRRIQ3	c.G811A	kllkDiffk	kllkNiffk	chr1	74575134	
KTPF	CR9699	EYS	c.G4169A	rraRtpfim	rraKtpfim	chr6	65301591	30
KTPF	SD0346	HMHA1	c.C41T	lmktpSisk	lmktpFisk	chr19	1067445	
KTPF	CR6126	SLC13A5	c.C1180T	ktpfypPpl	ktpfypSpl	chr17	6596458	
KYFQ	CR1509	CXorf23	c.C554T	eekySqstr	eekyFqstr	chrX	19984255	
KYFQ	CR3665	IGSF10	c.G6163T	vlhgkDfqv	vlhgkYfqv	chr3	151156186	
KYFQ	LSD4691	KCNH6	c.1282G>A	leEYfqhaw	leKyfqhaw	chr17	61615575	
LAIF	CR6126	JPH2	c.C2068T	laiLfvhll	laiFfvhill	chr20	42743459	
LAIF	LSD3484	OR51S1	c.C470T	kislaiSfr	kislaiFfr	chr11	4869969	
LAIF	LSD4744	KRIT1	c.C1585T	ledplailI	ledplailF	chr7	91844070	
LAIF	SD0346	DDX1	c.C1850T	rmglaiSlv	rmglaiFlv	chr2	15768938	
LATL	LSD0167	PIGO	c.C1630T	rplatlfPi	rplatlfSi	chr9	35092254	
LATL	LSD3484	EIF3A	c.C967T	llatlisi	flatlisi	chr10	120825066	40
LATL	SD6336	EVC	c.C1964T	nAlatltqm	nVlatltqm	chr4	5798826	
LEEK	CR9699	ANK3	c.G1487A	evleGkpiy	evleEkpiy	chr10	61843365	
LEEK	LSD0167	TRPS1	c.A2360G	kleekDglik	kleekGglik	chr8	116599568	

LEEK	SD0346	PADI4	c.C1853T	cleekvcSI	cleekvcfl	chr1	17690111	
LFFV	CR6126	LRRC55	c.C302T	cssqrifSv	cssqriffv	chr11	56949669	
LFFV	CR9699	KLB	c.C1049T	mrkkifSvI	mrkkifFvI	chr4	39436053	
LFFV	CR0095	PPP2R1A	c.C455T	glfSvcypr	glfFvcypr	chr19	52714697	
LLKK	CR6126	SPTA1	c.G6097A	kllEkqlpl	kllKqlpl	chr1	158592795	
LLKK	SD2056	FANCB	c.G1246A	lrqhllkE	lrqhllkK	chrX	14871241	
LLKK	CR4880	CDH26	c.G643A	isqtpllkE	isqtpllkK	chr20	58559795	
LLKK	CR0095	ARHGAP6	c.G1411A	aallkEfI	aallkKflr	chrX	11197491	
LPLA	LSD3484	CST6	c.C28A	lplaLglal	lplaMglal	chr11	65779543	
LPLA	SD2056	ACSL6	c.C986T	Sflplahmf	Fflplahmf	chr5	131310626	
LPLA	SD6336	ALAD	c.C836T	lplavyhvS	lplavyhvF	chr9	116151352	10
LSRS	CR6126	SRSF11	c.C1109T	klsrspSpr	klsrspFpr	chr1	70715721	
LSRS	LSD0167	EPHA7	c.G1267A	sDlsrsqrl	sNlsrsqrl	chr6	94066492	
LSRS	LSD3484	MYH3	c.A3899T	lvSqlsrsk	lvLqlsrsk	chr17	10539128	
LSSV	CR9699	ZFHX4	c.C1532T	plSssvIkf	plLssvIkf	chr8	77617855	
LSSV	LSD4744	AMBN	c.C1126T	glPsvtpaa	glSvtpaa	chr4	71472229	
LSSV	CR1509	FAT3	c.C3074T	rpvsllsvS	rpvsllsvF	chr11	92088352	
LSSV	CR6126	C7orf63	c.T1271C	halatIsv	haTatIsv	chr7	89909106	
LVAF	CR1509	CACNA1B	c.C3689T	vvsgAlvaf	vvsgVlvaf	chr9	140943746	
LVAF	LSD3484	FAM135B	c.G1729A	lvafnaqhE	lvafnaqhK	chr8	139164989	
LVAF	CR9306	PLCB1	c.C344T	iShlnlvaf	iFhlnlvaf	chr20	8609038	
LVAL	CR9699	OVCH1	c.C3041T	wrlvaPlnh	wrlvalnh	chr12	29596410	20
LVAL	LSD3484	MNAT1	c.C578T	ssdIPvall	ssdIlvall	chr14	61285456	
LVAL	CR3665	MAP4K1	c.G119A	kvsGdval	kvsEdlval	chr19	39108246	
LVAL	SD0346	ABCA12	c.T5954A	sldilval	sldilval	chr2	215823164	
MGLA	LSD3484	CST6	c.C28A	lplaLglal	lplaMglal	chr11	65779543	
MGLA	SD0346	DDX1	c.C1850T	rmglaiSlv	rmglaiFlv	chr2	15768938	
MGLA	SD6336	DCAF4	c.C575T	climglaetP	climglaetL	chr14	73418535	
PVFF	LSD3484	PREX2	c.C4219T	hpvLfaqal	hpvFfaqal	chr8	69058575	
PVFF	SD1494	TRPC4	c.C1031T	glfpvfSv	glfpvfPv	chr13	38266339	
PVFF	CR9306	CAPN13	c.C1267T	fPpvffsf	fSpvffsf	chr2	30966427	
QKGV	CR6126	SEMG2	c.G1270A	gekDvqkvg	gekNvqkvg	chr20	43851543	
QKGV	LSD3484	FAM116A	c.A1272C	qlqkvgQqk	qlqkvgHqk	chr3	57619073	30
QKGV	CR4880	SELRC1	c.A656G	lhKeqqkvg	lhReqqkvg	chr1	53153432	
RSQR	CR4880	THSD4	c.G607A	srhsrsqGa	srhsrsqRa	chr15	71535130	
RSQR	CR9699	CCDC64B	c.A1412G	lrsqrqkEl	lrsqrqkGl	chr16	3078222	
RSQR	SD0167	EPHA7	c.G1267A	sDlsrsqrl	sNlsrsqrl	chr6	94066492	
SAPS	CR9306	ATP10D	c.C3478T	lftsapPvi	lftsapSvi	chr4	47578901	
SAPS	CR1509	RYR2	c.C2300G	lsapsiSfr	lsapsiWfr	chr1	237664107	
SAPS	SD0167	DOCK3	c.G5265A	thsapsqMi	thsapsqli	chr3	51400077	
SAPS	SD0346	CTBP2	c.C1217T	rPssapsqh	rissapsqh	chr10	126715112	
SAPS	SD1494	T	c.C1184T	hpvsapsSs	hpvsapsFs	chr6	166571927	
SDSY	LSD4691	SRRT	c.271C>T	ssdPyhsgy	ssdSyhsgy	chr7	100479299	
SDSY	CR4880	UNC13D	c.C400T	fsdPyclig	fsdSyclig	chr17	73838683	40
SDSY	CR9699	TBC1D8	c.G952A	GrmfasdSY	RrmfasdSY	chr2	101656723	
SLGF	CR6126	SLC10A2	c.G709A	aGyslgfil	aSyslgfil	chr13	103703659	
SLGF	CR9699	HHAT	c.C62T	slghfhySf	slghfhyff	chr1	230522381	

SLGF	CR9306	HHAT	c.C62T	slgfhfysf	slgfhfyyff	chr1	210522381	
SLSV	CR6126	FSCB	c.C1127T	aeksPsvel	aeksLsvel	chr14	44975064	
SLSV	CR9699	PREX2	c.C3433T	delPisvri	delSisvri	chr8	69031678	
SLSV	SD1494	GPR158	c.C2690T	Smlqkslsv	Lmlqkslsv	chr10	25887245	
SPLY	CR1509	NEUROD1	c.C689T	lpspPygtm	lpspLygtm	chr2	182542899	
SPLY	CR6126	OR4L1	c.C158T	rStihsply	rLtihsplly	chr14	20528361	
SPLY	SD1494	ANGEL1	c.C1312T	nsvPdspliy	nsvSdspliy	chr14	77272827	
SPRS	LSD4744	C7orf29	c.G382A	spIqsprGI	spIqsprSI	chr7	150027875	
SPRS	SD0346	IRF2BP2	c.A1175G	spHsnrrtp	spRsnrrtp	chr1	234743424	
SPRS	CR4880	SHISA7	c.C1291T	Pprspalpp	Sprspalpp	chr19	55944849	
SPRS	SD0346	BCL11A	c.C413T	glSsprsah	glSsprsah	chr2	60695941	10
SPRS	CR9306	GPR137B	c.G994A	Gfsprsyff	Rfsprsyff	chr1	236368453	
SPSA	SD0346	ADH7	c.C943T	vvvgPpsak	vvvgSpsak	chr4	100340221	
SPSA	LSD0167	TEAD4	c.G502A	apspsappA	apspsappT	chr12	3129847	
SPSA	LSD3484	TBC1D4	c.C2345T	Spmnkspsa	Fpmnkspsa	chr13	75886912	
SPSA	CR4880	C2orf71	c.C3058A	rpaQpspsa	rpaKpspsa	chr2	29294070	
SRLK	SD2056	PCDHGA4	c.G2266A	rrwhksrIL	rrwhksrIK	chr5	140737033	
SRLK	CR4880	LRRC37B	c.C448T	alvqlPrIk	alvqlSrIk	chr17	30348613	
SRLK	CR6126	MCM3	c.T2375A	esrikaFkv	esrikaKkv	chr6	52129438	
SRSQ	CR9306	PTK6	c.G1150A	hemfsrGqv	hemfsrSqv	chr20	62161449	
SRSQ	LSD0167	EPHA7	c.G1267A	sDlsrsqrl	sNlsrsqrl	chr6	94066492	
SRSQ	CR4880	THSD4	c.G607A	srhhsrsqGa	srhhsrsqRa	chr15	71535130	20
SRSQ	CR4880	BCLAF1	c.C56T	srsksrsqS	srsksrsqF	chr6	136600949	
SSPL	CR6126	CLCNKA	c.C1130T	mtqnsspP	mtqnsspL	chr1	16355697	
			w	w				
SSPL	CR4880	LINS	c.G2040T	sleppsRpl	sleppsSpl	chr15	101109677	
SSPL	LSD3484	C10orf26	c.C521T	Sqgaqsspl	Fqgaqsspl	chr10	104572517	
SSTL	SD1494	OR10K2	c.C685T	ailqfpstl	ailqfpstl	chr1	158389972	
SSTL	LSD4691	CROCC	c.1568T>A	csdsstlaL	csdsstlaQ	chr1	17265597	
SSTL	CR0095	MUC16	c.C27467T	sSspvsstl	sFspvsstl	chr19	9059979	
SSTT	LSD4691	CDR2	c.1246C>T	ssPtppey	ssStppey	chr16	22358405	
SSTT	SD0346	KCNH6	c.G607A	hrsssttEI	hrsssttKi	chr17	61607835	
SSTT	CR4880	MUC16	c.A23768C	IDtssttsl	IAtssttsl	chr19	9063678	30
STLA	CR4880	MUC16	c.A21187G	stiTqrfph	stiAqrfph	chr19	9066259	
STLA	LSD4691	CROCC	c.1568T>A	csdsstlaL	csdsstlaQ	chr1	17265597	
STLA	CR9306	CLEC5A	c.G302A	kGkgstlai	kEkgstlai	chr7	141635657	
STSF	CR1509	CLN8	c.C511T	lllemstpf	lllemstsf	chr8	1719731	
STSF	LSD3484	TTN	c.C11368T	eseelPtsf	eseelStsf	chr2	179615759	
STSF	SD1494	SYNDIG1	c.C668T	dlhqastsS	dlhqastsF	chr20	24646031	
STSF	SD0346	MUC16	c.C25700T	Spamtstsf	Lpamtstsf	chr19	9061746	
SVLY	CR9699	LRRK2	c.C1771T	svlHtlqmy	svlYtlqmy	chr12	40668499	
SVLY	LSD3484	OR6Y1	c.G835A	kvVsvlytv	kvIsvlytv	chr1	158517061	
SVLY	SD1494	CERS4	c.G449A	fvgGlsvly	fvgDlsvly	chr19	8320744	
TKSF	CR6126	KITLG	c.C544T	vsvtkPfml	vsvtkSfml	chr12	88909371	40
TKSF	CR9306	RGR	c.T539A	lftMsffnf	lftKsffnf	chr10	86014108	
TKSF	LSD4691	IL18R1	c.446G>A	tGgtdtksf	tEgtdtksf	chr2	103003422	
TLAQ	LSD4691	CROCC	c.1568T>A	csdsstlaL	csdsstlaQ	chr1	17265597	

TLAQ	CR4880	MUC16	c.A21187G	stlTqrph	stlAqrph	chr19	9066259	
TLAQ	CR6126	GATSL3	c.C403T	viHtlaqef	viYtlaqef	chr22	30683246	
TQSA	LSD0167	RNPEPL1	c.G707A	lmsatRsay	lmsatQsay	chr2	241512564	
TQSA	LSD4691	SDK1	c.6559A>C	Ttqsaggvy	Ptqsaggvy	chr7	4304933	
TQSA	CR4880	ZNF536	c.C2378T	gtqsaSlky	gtqsaSlky	chr19	31038904	
TSFK	CR1509	NCKAP5	c.C3242T	eplemtsSk	eplemtsFk	chr2	133541142	
TSFK	CR6126	DNAH8	c.C12685T	itllqtsLk	itllqtsFk	chr6	38942156	
TSFK	SD0346	MYO3A	c.G3826A	laEnetsfk	laKnetsfk	chr10	26463019	
TTSS	CR6126	OR2C3	c.T233G	ttsIvpqll	ttsSvpqll	chr1	247695581	
TTSS	SD6336	MUC4	c.C10381A	lpvtDtssa	lpvtTtssa	chr3	195508070	
TTSS	SD0346	MUC16	c.C35105A	pvSrttssf	pvYrttssf	chr19	9046526	10
TTSS	CR4880	SPHKAP	c.C2471T	sStattssk	sStattssk	chr2	228883099	
VDSL	CR6126	GPRIN1	c.C655T	kvdPicsk	kvdSicsk	chr5	176026181	
VDSL	SD1494	GRIN2B	c.C1270T	vivesvdPl	vivesvdSl	chr12	13769447	
VDSL	CR6126	PKN2	c.G2092A	EvdsImcek	KvdsImcek	chr1	89273448	
VDSL	CR9699	CDC23	c.C418T	etvdslgPl	etvdslgSl	chr5	137537135	
VILS	CR6126	CLEC4G	c.G136A	vlwAvitsi	vlwTvitsi	chr19	7796577	
VILS	LSD3484	PCDHB1	c.T2099A	vilsFlfll	vilsYlfll	chr5	140433154	
VILS	SD1494	TMEM74	c.A754T	vilsclImM	vilsclImL	chr8	109796574	
VVLL	CR1509	ZP1	c.C41T	ypvAlllv	ypvVlllv	chr11	60635075	
VVLL	LSD3484	PRRG3	c.C254T	yvvvPllgv	yvvvLllgv	chrX	150869063	
VVLL	LSD4744	ANK3	c.C518T	ghdqvvSll	ghdqvvLll	chr10	62023723	20
VVLL	CR0095	SLC17A4	c.C491T	gvAllivlr	gvVllivlr	chr6	25770488	
VVLL	CR0095	NOP56	c.C818T	rvvSiseyr	rvvUiseyr	chr20	2636301	
YPSS	CR1509	HOXB1	c.C334T	Hpsyygaql	Ypsyygaql	chr17	46607933	
YPSS	CR4880	POU2F3	c.C1169A	Rpsspgsgl	Ypsspgsgl	chr11	120187971	
YPSS	LSD0167	ATG13	c.C655T	rPypssspm	rSypssspm	chr11	46679132	

## 【 0 1 2 6 】

例えば、表 5 と図 2 1 に示される分析は、テトラペプチドサブストリング E S S A は有用性のあるグループ内の患者によって共有されていて（図 4 F も参照）、ヒトサイトメガロウイルス即時早期エピトープ（M E S S A K R K M D P D N P D）に相当することを示す。さらに、テトラペプチドサブストリング L L K K は、L B グループ内の患者によって共有され得；このサブストリングは、トキソプラズマ顆粒抗原の正確な抗原性部分（R S F K D L L K K、図 4 B）に相当する。<sup>4 7</sup>、<sup>4 8</sup> これらのデータは、C T L A - 4 遮断からの強い臨床的有用性を示す患者（例えば、イピリムマブ及びトレメリムマブに対する強い応答を有する患者）のネオエピトープは、T 細胞が認識するように運動されている病原体由来のエピトープに似ることを示唆する。

## 【 0 1 2 7 】

全エクソーム配列決定アプローチを使用して、本発明者らは全体の予測された抗原ペプチドスペースを特徴決定した（方法参照）。本発明者らの研究のさらなる検証として、本発明者らは T 細胞によって認識される黒色腫抗原（M A R T - 1、M e l a n A としても知られる）、実験的に検証されたメラニン細胞抗原を「再発見した」（図 1 0 F）。<sup>3 7</sup>、<sup>4 9</sup> ~ <sup>5 1</sup> 完全かつ長期的な応答者によって共有された E K L S は、M A R T - 1 M H C クラス I I エピトープのコアアミノ酸を含み、ホスホ - セリン部分は T 細胞受容体（T C R）認識に重要である。<sup>5 1</sup>、<sup>5 2</sup>

## 【 0 1 2 8 】

（表 5 ）サンプルの部位、サイズ、及びタイプ

<u>患者ID</u>	<u>サンプル部位</u>	<u>最大寸法</u>	<u>生検タイプ</u>
CR1509	臀部病変	2.5cm	摘除
CR9306	鳥口病変	4.7cm	摘除
CR0095	鼠径部病変	0.8cm	摘除
CR4880	鼠径部病変	0.6cm	摘除
CR7623	副腎	1cm	摘除
CR3665	乳房病変	21x16cm	摘除
CR9699	門脈リンパ節	記録なし	摘除
SD0346	腋窩軟部組織	5cm	切除生検
SD6336	臀部病変	記録なし	摘除
SD1494	頭頂部腫瘍	2.1cm	摘除
SD2056	肺転移	1.5cm	摘除
SD2051	鼠径部リンパ節	0.5 ~ 3cm	摘除
SD5038	上背部病変	6.5cm	切除生検
SD5934	腹部腫瘍結節	4.5cm	切除生検
SD5118	肘病変	3cm	切除生検
SD6494	小腸転移	10cm	摘除
SD7357	皮膚転移及び 乳房転移	12 cm	摘除
NR3156	臀部病変	1.4mm	切除生検
NR5784	腋窩リンパ節	2cm	摘除
NR8727	腋窩リンパ節	0.2 ~ 2.2cm	摘除
NR4949	頭頂部転移	1.2cm	摘除
NR1867	鼠径部リンパ節	0.3 ~ 4cm	摘除
NR3549	肩径部リンパ節	3.2cm	切除生検
NR9341	皮膚結節	1.2cm	摘除
NR4810	小腸転移	4.5x3.5x3cm	摘除

## 【0129】

## 実施例3. 免疫原性ペプチドのインビトロ分析

この実施例は、免疫原性ペプチドのインビトロ分析を示す。

## 【0130】

ペプチド予測のインビトロ検証への次世代配列決定の翻訳は、非常に低い公開検証率により、専門家の手においても挑戦的であることを証明した。<sup>2-4</sup> インビトロアッセイは、患者材料の不足、凍結／解凍プロセスに対する保存された細胞の感受性、患者材料中の抗新生抗原のT細胞の低頻度、及び複雑なインビオ免疫原性微小環境の非存在下でのインビトロでのT細胞の非常に低い感度、によって妨げられている。

## 【0131】

本発明者らのシステムは、複数の高スループットのアプローチを統合することにより予測を最適化することを試みた(図8)。本発明者らの予測アルゴリズムに基づいて、本発明者らはペプチドのプールを生成し、本発明者らが十分なリンパ球を有する患者のためのT細胞活性化アッセイを行った(方法参照)。陽性プールは5人の患者のうちの3人について観察された(図11A～C)。本発明者らは、適切な末梢血単核細胞(PBMC)により、患者の正確なペプチドを同定した。本発明者らは、その野生型の対応物TKSPFEQH Iと比較して、患者CR9306(図4C)によるペプチドTESPFEQH Iに対する多官能性T細胞応答を発見した。この応答は治療開始後60週でピークに達した(図4D)。T細胞応答は、健康なドナーからは存在しなかった(図13)。このペプチドは、TKSPFEQH Iに対する18323nMと比較して、472nMのB4402に対して予測されたMHCクラスIの親和性を有した。ESP Fは応答シグネチャーに見出される一般的なテトラペプチドであり、D型肝炎ウイルス大デルタエピトープp27(P

10

20

30

40

50

ESPFAとESPFA R)のサブストリング(位置176~179)である。<sup>53</sup>、<sup>54</sup> TESPFEQH Iは、FAM3C(c.A577G;p.K193E)、黒色腫で高度に発現される遺伝子、における変異から生じる。

#### 【0132】

本発明者らは、野生型GLERGGFTFと比較して、ペプチドGLEREGFTFは、患者CR0095において多官能性T細胞応答(図4E及び図11D)を誘発することも見出した。この応答は、治療後24週間でピークに達した(図4E)。GLEREGFTFはCSMD1(c.G10337A;p.G3446E)における変異から生じ、これは、黒色腫においても高度に発現され、公知の類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*)抗原(IEDB参照ID:1027043)に80%の相同意を有する。重要なことに、インビトロアッセイは、上記のように感度がすべて制限されるので、T細胞活性化の欠如は、所与の新生抗原を排除し得ない。<sup>10</sup>

#### 【0133】

#### 実施例4. 実施例1~3の材料と方法

本実施例は、本明細書で実施例1~3に提示した作業の詳細な材料及び方法を提供する。<sup>11</sup>

#### 【0134】

本発明者らは、イピリムマブで治療された黒色腫患者から腫瘍組織を得た。これらのサンプルは、長期的な有用性(LB)、または最少の有用性/有用性なし(NB)を経験した、イピリムマブで治療された患者由来のものであった。これらの腫瘍で全エクソーム配列決定を行い、正常な血液にマッチさせた。これらの変異から生成された体細胞変異及び候補体細胞新生抗原を同定および特徴決定した。<sup>20</sup>

#### 【0135】

#### 患者データ

発見セットと検証セットに、臨床サブグループ及びその他のパラメータを割り当てるために、チャートは、2人の研究者によって独立してレビューされた。全生存期間は、死亡または問責の日付と抗CTLA4療法(発見セットにおけるイピリムマブまたは検証セットにおけるイピリムマブもしくはトレメリムマブ)の最初の投与の間の差として計算された。発見セットのすべての患者は、ステージIV黒色腫を有し、2006年と2012年の間に治療された;サンプルは2007年と2012年の間に収集された。検証セットの患者は、2006年~2013年に治療され、サンプルは2005年と2013年の間に収集された。患者は、市販のイピリムマブ(Yervoy)またはNCT00796991、NCT00495066、NCT00920907、NCT00324155、NCT00162123、NCT0140045、NCT00289640;NCT00495066、NCT00636168、NCT01515189、NCT00086489、及びNCT00471887を含む臨床試験のいずれかで治療された。患者は、3または10mg/kgで、様々な用量とレジメンのイピリムマブを受け、2人の患者はダカルバジンまたはベムラフェニブで同時治療された(図17参照)。検証セットの4人の患者は、10mg/kg×6(1患者)または15mg/kg×4(3患者)の用量でトレメリムマブで治療された。これらの4人の患者のうち3人は、ステージIICの疾患を有した;含まれる他のすべての患者は、ステージM1a~cを有した。患者は、分析のために凍結された組織から単離されたDNAを有し、イピリムマブの少なくとも2回の投与を受け、及び最初の治療後少なくとも12週間で1回の放射線評価を有する患者が含まれていた。LBグループ内の2人の患者は、無疾患にするために、摘除された、単離された病変を有した。1つの進行する病変(CR7623)がトレーニングセットで配列決定された。検証セットでは、8つの腫瘍が、そうでなければ長期的な有用性を示した患者の非応答性病変を示す。これらはCRNR4941、LSDNR1650、CRNR2472、LSDNR1120、CRNR0244、LSDNR9298、LSDNR3086、及びPR03803を含む。進行したすべての腫瘍は、「有用性なし」の腫瘍として分子分析を受ける。<sup>30</sup>

## 【0136】

研究で生成された患者データは、以下に詳述する一連の表にまとめられた：検証セットの患者の臨床的特徴；発見セットの患者の詳細な臨床的特徴；発見セット変異リスト；変異から得られた予測ペプチドがNetMHCv3.4による500nm未満の結合親和性を有する遺伝子座；シグネチャーのためのTCGA RNASEq；応答シグネチャーにおけるテトラペプチドの状況、遺伝子及び遺伝子座；検証セット変異リスト；HLAタイプ、発見セット及び検証セット；並びにサンプル部位、サイズ、及びタイプ。

## 【0137】

## DNAの単離と全エクソーム配列決定

原発腫瘍サンプル及びマッチした正常な検体（末梢血）が、承認された治験審査委員会（IRB）のプロトコルごとの同意書とともに得られた。すべての検体は切除生検またははっきりと目に見える病変の摘除であった。すべての検体は高い腫瘍細胞性を含んでいた。検体は、外科的切除後または生検後に液体窒素中で凍結し、-80°で保存した。ヘマトキシリン及びエオシンで染色した切片を調製し、診断は皮膚病理専門医によって確認された。DNAはQIAamp DNAミニキット及びQIAamp DNA血液ミニキット（Qiagen）を使用して抽出された。

10

## 【0138】

エクソンキャプチャーは、SureSelect Human All Exon 50MB（Agilent）を使用して行った。濃縮されたエクソームライブラリーはHiSeq 2000プラットフォーム（Illumina）で>100×カバレッジまで配列決定した（MSKCC Genomics Core and Broad Institute, Cambridge, MA）。アラインメント、ベース品質スコアの再キャリブレーション及び重複読み除去を行い、生殖細胞系列変異体は除外し、変異に注釈をつけ、及び上述のようにインデルを評価した（図9A）。<sup>70</sup>腫瘍カバレッジ10×のサンプルは除外した。中位の確信度の読み（11~34×）を、Integrated Genomics Viewer（IGV）v2.1を使用して手動で再レビューした。<sup>71</sup>候補変異の配列決定に対する検証率は、カバレッジ10×に対し97%以上であった。<sup>72</sup>

20

<sup>0</sup> 臨床グループ間の変異数の中央値は、フィッシャー検定を使用して比較した。

## 【0139】

TCGA RNASEq遺伝子発現はRSEMによって正規化し、その遺伝子を発現する腫瘍に対して平均発現を計算した（図18参照）。

30

## 【0140】

## HLAタイピング

HLAタイピングは、低から中間解像度のポリメラーゼ連鎖反応配列特異的プライマー（PCR-SSP）法または高解像度SeCore HLA配列ベースのタイピング法（HLA-SBT）（Invitrogen）のいずれかにより、MSKCC HLA typing labまたはNew York Blood Centerで行われた。ATHLATES（<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/viral-genomics/athlates>）<sup>73</sup>も、HLAタイピング及び確認のために使用された。

40

## 【0141】

## 免疫原性の分析

NAseekと呼ばれるバイオインフォマティクスツールが作成された。このプログラムは、2つの機能を実行する：各変異を囲むストレッチの翻訳、及び相同性に関する得られたペプチドとの間の比較。まず、NAseekはエクソームの中のすべての変異を翻訳し、それにより変異に起因するアミノ酸が中央に位置する、17アミノ酸のストリングが、予測された野生型及び変異のために生成された。MHCクラスI結合を評価するために、完全な応答者に共通のテトラペプチドを含む野生型及び変異九量体が、スライディングウィンドウ法を用いて、患者特異的HLAタイプに対し、NetMHC v3.4（ht

50

tp : // www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) または RANKPEP (http://imed.med.ucm.es/Tools/rank pep.html) に入力された。本発明者らは、スライディングウィンドウ法及びノナペプチドにおける改変されたアミノ酸の位置を使用した。これらのプログラムは、予測されたMHCクラスI結合強度を生成した。患者特異的MHCクラスIによって提示されると予測された九量体は次に、互いに類似性について評価された。アミノ酸の頻度のロゴプロットは、デフォルトパラメーターを有するWebLogo (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) を使用して実行された。文字の高さは、その位置における対応するアミノ酸の相対頻度を反映する。インピトロでの試験のための予測九量体をさらに絞り込むために、患者特異的HLAタイプ (http://tools.immuneptope.org/immunogenicity/) または CTLPred (http://www.imttech.res.in/raghava/ctlpred/) を有するIEDB免疫原性予測装置を使用して、T細胞受容体への推定結合部位について評価した。

#### 【0142】

既知の病原体の抗原に対するT細胞の活性化と相同性を評価するために、保存されたテトラペプチドを、免疫エピトープデータベース (www.iedb.org) を使用して分析し、ホモサピエンス宿主における陽性T細胞応答のためのデータベース内の免疫原のサブストリングとして評価した。本発明者らは、予測T細胞応答がないまたは排他的に抗自己のまたはアレルゲン特性を有するペプチドを除外した。「新抗原シグネチャー」は、長期的な有用性を示す患者に共通のペプチドを含む九量体から生成された（表4及び図19参照）。共有テトラペプチドの総数に対するカイ二乗検定を、NBグループに対してLBグループについて行った。ロジスティック回帰分析が続く、教師なし階層的クラスタリングを用いたシグネチャー導出のための標準的な方法を、発見セットのデータのみに基づいて予測モデルを決定するために使用した。このモデルは、全てのテトラペプチドは発見セット内に少なくとも2倍存在しなければならない、及び3倍未満存在する任意のテトラペプチドは、インピトロでT細胞応答を誘発することが示されている既知の抗原の共通のサブストリングを含んでいなければならないというコアルールに基づいていた。次いで、最良適合シグネチャーが検証セットに適用された。

#### 【0143】

本発明者らは、新抗原シグネチャーが偶然に起因する可能性は非常に低いことを示すために厳密なシミュレーション／順列テストを実施した。発見されたシグネチャーが偶然によるものであるという帰無仮説を評価するために、新しいデータセットを有する2つと、本発明者らのデータセットの順列を使用する2つの、5つの個別のシミュレーションモデルを評価した。シミュレーションを、(a) SwissProtデータベースから引出された九量体 (b) TCGA黒色腫のデータセットからの変異 (c) ランダムに生成された九量体 (d) 本発明者らのデータで見出された変異の再分配 (e) 本発明者らのデータセットで提示されると予測された各九量体内の9アミノ酸の並べ替え、を使用して実行した。各シミュレーションでは、九量体はランダムに及び本発明者らのデータに比例して分布していた（例えば、実際のサンプルがMHCクラスIを結合すると予測された150九量体を保有した場合、次いで、「仮想」サンプルが150九量体に割り当てられた）。シミュレーション試験は、次いで、この仮想データセットに適用される実際のデータに使用したのと同じ繰返しモデルを適用し、このプロセスを1,000回繰返し、p値を決定するために実際のシグネチャーより大きいシグネチャーの頻度を記録することによって、行った。P値は、繰返と、臨床集団の分離を正しく分類した大きい方のシグネチャーとの比を、1,000回の繰返しで割って算出された。

#### 【0144】

##### 細胞内サイトカイン染色 (ICS)

イピリムマブで治療された5人の黒色腫患者由来の末梢血単核細胞 (PBMC) を、IRB承認の制度的プロトコルの下で複数の時点で収集した。全エクソーム／トランスクリ

10

20

30

40

50

プトーム解析から同定されたこれらの患者に対する候補新抗原ペプチドを合成した (GenScript Piscataway, NJ)。 $2.5 \times 10^6$  の患者の PBMC 試料を、サイトカイン IL-15 (10 ng/ml) 及び IL-2 (10 IU/ml) を補充した 10 % のプールヒト血清 (PHS) RPMI 1640 培地中で、1 プールあたり 30 ~ 50 ペプチドのプールでパルスした  $2.5 \times 10^6$  照射自己 PBMC によって培養した。培地は 1 日おきに交換し、10 日目に細胞を収穫した。<sup>73</sup> 細胞はブレフェルジン A 及びモネンシン (BD Bioscience) の存在下で 6 時間、新抗原ペプチドを加えて再刺激した。次いで、細胞を以下の抗体で染色した: Pacific Blue - CD3 (クローンOKT3)、APC - AF750 - CD8 (クローンSK1、eBioscience) 及び ECD - CD4 (クローンSFC12T4D11、Beckman Coulter)。その後の洗浄及び透過化の際に、以下の抗体を使用して細胞を染色した: PE - Cy5 - CD107a (クローンH4A3)、APC - IL-2 (クローンMQ1-17H12) PE - MIP-1 (クローンD21-1351)、FITC - IFN- (クローンB27) (BD Pharmingen) 及び PE - Cy7 - TNF- (クローンMAB11 eBioscience)。データは、CYAN フローサイトメーターと Summit ソフトウェア (Dako Cytomation California Inc., Carpinteria, CA) を使用して取得した。フロー分析は、FlowJo ソフトウェア v9.7.5 (TreeStar, Inc.) を用いて行った。可能な場合、無刺激対照に対するサイトカイン応答の誘導を引き起したプールは、それらのコンポーネント個々のペプチドにデコンボリューションした。上記のプロセスを、個々のペプチドについて繰返し、対応する予測野生型九量体と比較した。ブドウ球菌エンテロトキシン B (SEB) は T 細胞応答のための陽性対照として機能した。

#### 【0145】

##### 免疫組織化学

免疫組織化学的及びヘマトキシリン及びエオシン染色スライドを、Aperto スライドスキャナーを使用してスキャンした。スライド上に含まれるすべての壊死領域の同定に続いて、パーセント腫瘍壊死を、Aperto イメージングソフトウェアを用いて判定した。免疫染色されたスライドは、それぞれについて手動で校正され検証される Aperto 画像解析アルゴリズム (細胞核の及び細胞質の v9) を使用して、皮膚病理専門医によって定量された。最低 3000 細胞を、腫瘍の領域に限定されるカウントでカウントされる全細胞あたりの免疫染色陽性細胞として報告される結果による 3 つの代表的な領域の和を表わす場合ごとにカウントした。セクションを、以下に対する抗体で染色した: LCA ( $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、DAKO、クローン 2B11 + PD7/26)、CD8 ( $0.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、DAKO、クローン C8/144B) 及び Foxp3 ( $2.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 、Abcam、クローン 236A/E7)。

#### 【0146】

##### 統計的方法

マンホイットニー検定を、臨床グループ (発見セット及び検証セット内の LB 及び NB それぞれ) 間の非同義変異エクソン負荷を比較するのに使用した。ログランク検定を、発見セット及び検証セットにおける全生存期間に関するカプランマイヤー曲線を比較するのに使用した。前述のように、本発明者らが発見したサイズのシグネチャーが偶然に生じたのかどうかを判定するために、すべてのテトラペプチドは臨床的有用性に同程度に寄与するという帰無仮説によって、シミュレーション試験を使用した。

#### 【0147】

##### 実施例 5 . イピルミマブによる治療

この実施例は、転移性黒色腫の治療に対して United States Food & Drug Administration によって承認されている、抗体免疫療法 (イピルミマブ) による癌 (黒色腫) の治療の指針を提供する。いくつかの実施形態では、長期的な臨床的有用性は、イピルミマブ治療後に観察される。本発明によれば、この実施例に記載のプロトコルは、いくつかの実施形態では、望ましくは体細胞変異を有すると同

10

20

30

40

50

定された1人または複数の対象に投与され得る。

【0148】

静脈内注入の米国の初期承認：2011に適した、YERVOY（商標）注射

【0149】

警告：免疫介在性有害反応

完全な枠組み警告の全処方情報参照。

【0150】

YERVOYはT細胞活性化及び増殖に起因する重大かつ致命的な免疫介在性有害反応をもたらし得る。これらの免疫介在性反応は、任意の器官系を含むことができるが；しかし、最も一般的な重度の免疫介在性有害反応は、腸炎、肝炎、（中毒性表皮壊死症を含む）、皮膚炎、神経障害、及び内分泌障害である。これらの免疫介在反応の大部分は、最初は治療中に現われた；しかし、少数はYERVOYの中止後数週間から数ヶ月で発生した。

10

【0151】

YERVOYを恒久的に中止し、重度の免疫介在性反応のための全身高用量コルチコステロイド療法を開始する。（2.2）

【0152】

腸炎、皮膚炎、神経障害、及び内分泌障害の徵候や症状について患者を評価し、ベースラインにおける肝機能検査及び甲状腺機能検査を含みかつ各投与の前に臨床化学を評価する。（5.1、5.2、5.3、5.4、5.5）

20

【0153】

適応及び使用

YERVOYは、切除不能または転移性黒色腫の治療に適応したヒト細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）遮断性抗体である。（1）

【0154】

用量及び投与

・全4回の投与で、YERVOY 3mg/kgが3週間毎に90分かけて静脈内に投与される。（2.1）

・重度の有害反応に対しては恒久的に中止する。（2.2）

【0155】

全処方情報

警告：免疫介在性有害反応

YERVOYはT細胞活性化及び増殖に起因する重大かつ致命的な免疫介在性有害反応をもたらし得る。これらの免疫介在性反応は、任意の器官系を含むことができるが；しかし、最も一般的な重度の免疫介在性有害反応は、腸炎、肝炎、（中毒性表皮壊死症を含む）、皮膚炎、神経障害、及び内分泌障害である。これらの免疫介在反応の大部分は、最初は治療中に現われた；しかし、少数はYERVOYの中止後数週間から数ヶ月で発生した。

30

【0156】

YERVOYを恒久的に中止し、重度の免疫介在反応のための全身高用量コルチコステロイド療法を開始する。[用量及び投与（2.2）参照]

40

【0157】

腸炎、皮膚炎、神経障害、及び内分泌障害の徵候や症状について患者を評価し、ベースラインにおける肝機能検査及び甲状腺機能検査を含みかつ各投与の前に臨床化学を評価する。[警告及び使用上の注意（5.1、5.2、5.3、5.4、5.5）参照]

【0158】

1 適応及び使用

YERVOY（イピリムマブ）は、切除不能または転移性黒色腫の治療に適応している。

50

【0159】

## 2 用量及び投与

### 2.1 推奨用量

YERVOYの推奨用量は、全4回の投与で、3週間毎に90分かけて静脈内に投与される3mg/kgである。

#### 【0160】

### 2.2 推奨用量変更

任意の中程度の免疫介在性有害反応のためまたは微候性内分泌障害のために予定の用量のYERVOYを差し控える。有害反応の完全または部分的な解決（グレード0～1）を有し、1日あたり7.5mg未満のプレドニゾンまたは等価物を受けている患者については、3週間毎に3mg/kgの用量ですべての4回の計画された用量まで、または初回投与から16週間のいずれか早い方で、YERVOYを再開する。

#### 【0161】

以下の任意のものに対してはYERVOYを恒久的に中止する。

- ・永続的な中程度の有害反応またはできることは、1日あたり7.5mgのプレドニゾンまたは等価物にコルチコステロイドの投与量を減らすことができない。
- ・最初の用量の投与から16週間以内に全治療コースを完了できない。
- ・以下の任意のものを含む重度または生命を脅かす、有害反応：

腹痛、発熱、イレウス、または腹膜徴候を伴う大腸炎；排便回数の増加（7回以上のペースライン）、便失禁、24時間超にわたる静脈内水分補給の必要性、消化管出血、及び消化管穿孔、

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）またはアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）>正常の上限の5倍または総ビリルビン>正常の上限の3倍、

スティーブンスジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、または全層皮膚潰瘍が合併した発疹、または壊死、水疱、または出血性症状、

重度の運動または感覚神経障害、ギランバレー症候群、または重症筋無力症、

任意の臓器系が関与する重度の免疫介在性反応（例えば、腎炎、肺炎、膵炎、非感染性心筋炎）、

局所免疫抑制療法に応答しない免疫介在性眼疾患。

#### 【0162】

### 2.3 調製及び投与

- ・製品を振らない。
- ・投与前に粒子状物質や変色について視覚的に、非経口薬物製品を検査する。溶液が濁っている、顕著な変色（溶液が淡黄色を有していてもよい）がある、または半透明から白色の、アモルファス粒子以外の粒子状異物がある場合、バイアルを廃棄する。

#### 【0163】

### 溶液の調製

- ・注入準備前約5分間バイアルを室温で放置する。
- ・YERVOYの必要量を回収し、静脈内バッグに移す。
- ・0.9%塩化ナトリウム注射液、USPまたは5%デキストロース注射液、USPで希釈して、1mg/mL～2mg/mLの範囲の最終濃度の希釈溶液を調製する。穏やかな反転により希釈溶液を混合する。
- ・冷凍下（2°C～8°C、36°F～46°F）または室温で（20°C～25°C, 68°F～77°F）24時間以内希釈溶液を保存する。
- ・YERVOYの部分的に使用したバイアルまたは空のバイアルを廃棄する。

#### 【0164】

### 投与指針

- ・YERVOYを、他の医薬品と混合しない、または他の医薬品とともに注入として投与しない。
- ・各投与後、0.9%塩化ナトリウム注射液、USPまたは0.5%ブドウ糖注射液、USPで静脈ラインを洗い流す。

10

20

30

40

50

・滅菌、非発熱性、低タンパク質結合インラインフィルターを含む静脈ラインを介して90分かけて希釈液を投与する。

【0165】

3 剤形及び強度

50mg / 10mL (5mg / mL)。200mg / 40mL (5mg / mL)。

【0166】

4 禁忌

なし。

【0167】

5 警告及び使用上の注意

YERVOYはT細胞活性化及び増殖に起因する重大かつ致命的な免疫介在性作用をもたらし得る。

【0168】

等価物

本発明はその詳細な説明に関連して説明してきたが、前述の説明は、例示的なものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものではないことを意図していることが理解されるべきである。他の態様、利点、及び修飾は、添付の特許請求の範囲内にある。

【0169】

参考文献

10

20

1. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711-23.
2. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:122-33.
3. Prieto PA, Yang JC, Sherry RM, et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:2039-47. 10
4. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134-44.
5. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443-54.
6. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. The antitumor immunity of ipilimumab: (T-cell) memories to last a lifetime? *Clin Cancer Res* 2012;18:1821-3. 20
7. Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, et al. Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. *Clin Cancer Res* 2010;16:2861-71.
8. Ku GY, Yuan J, Page DB, et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 2010;116:1767-75. 30
9. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1019-31.
10. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res* 2009;69:3077-85. 40

11. Gajewski TF, Louahed J, Brichard VG. Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. *Cancer J* 2010;16:399-403.
12. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* 2011;9:204.
13. Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 2012;72:1081-91. 10
14. Srivastava N, Srivastava PK. Modeling the repertoire of true tumor-specific MHC I epitopes in a human tumor. *PLoS One* 2009;4:e6094.
15. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* 2009;206:1717-25. 20
16. Chambers CA, Kuhns MS, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8603-8.
17. Chambers CA, Sullivan TJ, Truong T, Allison JP. Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 1998;28:3137-43. 30
18. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 2013.
19. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415-21. 40

20. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499:214-8.
21. Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, et al. Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68:889-92.
22. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004;21:137-48. 10
23. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 2012;482:400-4.
24. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, et al. Tumor Exome Analysis Reveals Neoantigen-Specific T-Cell Reactivity in an Ipilimumab-Responsive Melanoma. *J Clin Oncol* 2013. 20
25. Tran E, Turcotte S, Gros A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* 2014;344:641-5.
26. Wolchok JD, Weber JS, Hamid O, et al. Ipilimumab efficacy and safety in patients with advanced melanoma: a retrospective analysis of HLA subtype from four trials. *Cancer Immun* 2010;10:9. 30
27. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010;11:155-64.
28. O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V, et al. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol* 2010;21:1712-7. 40

29. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011;364:2517-26.
30. Gartner JJ, Parker SC, Prickett TD, et al. Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13481-6.
31. Furney SJ, Turajlic S, Fenwick K, et al. Genomic characterisation of acral melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:488-92. 10
32. Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 2011;43:442-6.
33. Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012;485:502-6.
34. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012;44:1006-14. 20
35. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012;150:251-63.
36. Almunia C, Bretaudeau M, Held G, et al. Bee Venom Phospholipase A2, a Good "Chauffeur" for Delivering Tumor Antigen to the MHC I and MHC II Peptide-Loading Compartments of the Dendritic Cells: The Case of NY-ESO-1. *PLoS One* 2013;8:e67645. 30
37. Ray S, Chhabra A, Chakraborty NG, et al. MHC-I-restricted melanoma antigen specific TCR-engineered human CD4+ T cells exhibit multifunctional effector and helper responses, in vitro. *Clin Immunol* 2010;136:338-47.
38. Stuart GW, Moffett K, Leader JJ. A comprehensive vertebrate phylogeny using vector representations of protein sequences from whole genomes. *Mol Biol Evol* 2002;19:554-62. 40

39. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, et al. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*;157:1073-87.
40. Morita D, Yamamoto Y, Suzuki J, Mori N, Igarashi T, Sugita M. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J Virol* 2013;87:482-8.
41. Rahman AK, Herfst CA, Moza B, et al. Molecular basis of TCR selectivity, cross-reactivity, and allelic discrimination by a bacterial superantigen: integrative functional and energetic mapping of the SpeC-Vbeta2.1 molecular interface. *J Immunol* 2006;177:8595-603. 10
42. Binkowski TA, Marino SR, Joachimiak A. Predicting HLA class I non-permissive amino acid residues substitutions. *PLoS One* 2012;7:e41710.
43. Piepenbrink KH, Blevins SJ, Scott DR, Baker BM. The basis for limited specificity and MHC restriction in a T cell receptor interface. *Nat Commun* 2013;4:1948. 20
44. Aleksic M, Dushek O, Zhang H, et al. Dependence of T cell antigen recognition on T cell receptor-peptide MHC confinement time. *Immunity* 2010;32:163-74.
45. Insaidoo FK, Borbulevych OY, Hossain M, Santhanagopalan SM, Baxter TK, Baker BM. Loss of T cell antigen recognition arising from changes in peptide and major histocompatibility complex protein flexibility: implications for vaccine design. *J Biol Chem* 2011;286:40163-73. 30
46. Sliz P, Michelin O, Cerottini JC, et al. Crystal structures of two closely related but antigenically distinct HLA-A2/melanocyte-melanoma tumor-antigen peptide complexes. *J Immunol* 2001;167:3276-84.
47. Cong H, Mui EJ, Witola WH, et al. Human immunome, bioinformatic analyses using HLA supermotifs and the parasite genome, binding assays, studies of human T cell responses, and immunization of HLA-A\*1101 transgenic mice including novel adjuvants provide a 40

foundation for HLA-A03 restricted CD8+T cell epitope based, adjuvanted vaccine protective against *Toxoplasma gondii*. *Immunome Res* 2010;6:12.

48. Tan TG, Mui E, Cong H, et al. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine* 2010;28:3977-89.

49. Wong R, Lau R, Chang J, et al. Immune responses to a class II helper peptide epitope in patients with stage III/IV resected melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5004-13. 10

50. Ekeruche-Makinde J, Clement M, Cole DK, et al. T-cell receptor-optimized peptide skewing of the T-cell repertoire can enhance antigen targeting. *J Biol Chem* 2012;287:37269-81.

51. Li Y, Depontieu FR, Sidney J, et al. Structural basis for the presentation of tumor-associated MHC class II-restricted phosphopeptides to CD4+ T cells. *J Mol Biol* 2010;399:596-603. 20

52. Voelter V, Rufer N, Reynard S, et al. Characterization of Melan-A reactive memory CD8+ T cells in a healthy donor. *Int Immunol* 2008;20:1087-96.

53. Wang JG, Jansen RW, Brown EA, Lemon SM. Immunogenic domains of hepatitis delta virus antigen: peptide mapping of epitopes recognized by human and woodchuck antibodies. *J Virol* 1990;64:1108-16. 30

54. Poisson F, Baillou F, Dubois F, Janvier B, Roingeard P, Goudeau A. Immune response to synthetic peptides of hepatitis delta antigen. *J Clin Microbiol* 1993;31:2343-9.

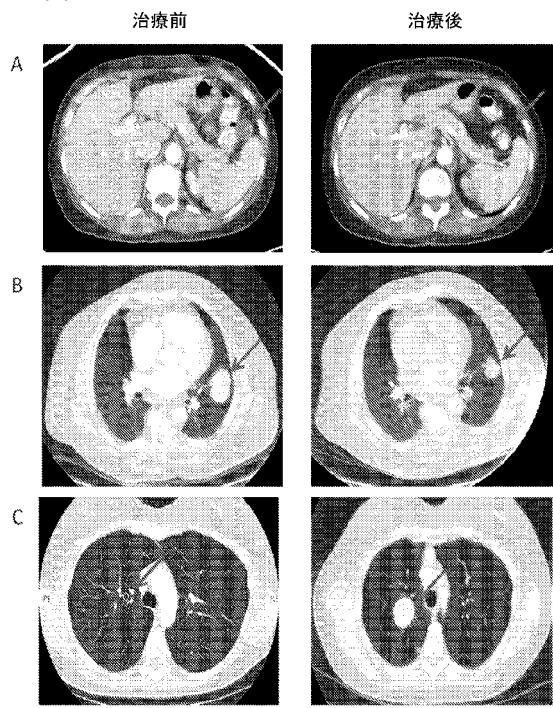
55. Monach PA, Meredith SC, Siegel CT, Schreiber H. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity* 1995;2:45-59.

56. Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC, et al. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *J Exp Med* 1997;185:695-705. 40

57. Noguchi Y, Chen YT, Old LJ. A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3171-5.
58. Ikeda H, Ohta N, Furukawa K, et al. Mutated mitogen-activated protein kinase: a tumor rejection antigen of mouse sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6375-9.
59. Matsutake T, Srivastava PK. The immunoprotective MHC II epitope of a chemically induced tumor harbors a unique mutation in a ribosomal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3992-7. 10
60. Allen PM, Matsueda GR, Evans RJ, Dunbar JB, Jr., Marshall GR, Unanue ER. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature* 1987;327:713-5.
61. Abrahmsen L, Dohlsten M, Segren S, Bjork P, Jonsson E, Kalland T. Characterization of two distinct MHC class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A. *EMBO J* 1995;14:2978-86. 20
62. Sant'Angelo DB, Robinson E, Janeway CA, Jr., Denzin LK. Recognition of core and flanking amino acids of MHC class II-bound peptides by the T cell receptor. *Eur J Immunol* 2002;32:2510-20. 30
63. Anderson MW, Gorski J. Cutting edge: TCR contacts as anchors: effects on affinity and HLA-DM stability. *J Immunol* 2003;171:5683-7.
64. Donermeyer DL, Weber KS, Kranz DM, Allen PM. The study of high-affinity TCRs reveals duality in T cell recognition of antigen: specificity and degeneracy. *J Immunol* 2006;177:6911-9.
65. Postow MA, Luke JJ, Bluth MJ, et al. Ipilimumab for patients with advanced mucosal melanoma. *Oncologist* 2013;18:726-32. 40

66. Luke JJ, Callahan MK, Postow MA, et al. Clinical activity of ipilimumab for metastatic uveal melanoma: A retrospective review of the Dana-Farber Cancer Institute, Massachusetts General Hospital, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, and University Hospital of Lausanne experience. *Cancer* 2013;119:3687-95.
67. Del Vecchio M, Di Guardo L, Ascierto PA, et al. Efficacy and safety of ipilimumab 3mg/kg in patients with pretreated, metastatic, mucosal melanoma. *Eur J Cancer* 2013. 10
68. Srivastava PK, Duan F. Harnessing the antigenic fingerprint of each individual cancer for immunotherapy of human cancer: genomics shows a new way and its challenges. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:967-74.
69. Cha E, Klinger M, Hou Y, et al. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med* 2014; 6:238ra70. 20
70. Ho AS, Kannan K, Roy DM, et al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet* 2013;45:791-8.
71. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 2011;29:24-6.
72. Liu C, Yang X, Duffy B, et al. ATHLATES: accurate typing of human leukocyte antigen through exome sequencing. *Nucleic Acids Res* 2013;41:e142.
73. Lin Y, Gallardo HF, Ku GY, et al. Optimization and validation of a robust human T-cell culture method for monitoring phenotypic and polyfunctional antigen-specific CD4 and CD8 T cell responses. *Cytotherapy* 2009;11:912-22. 30

【図1】



C

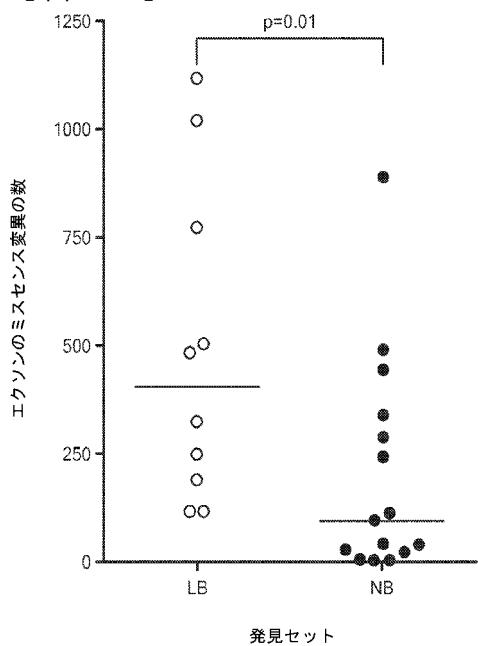


【図2 A】

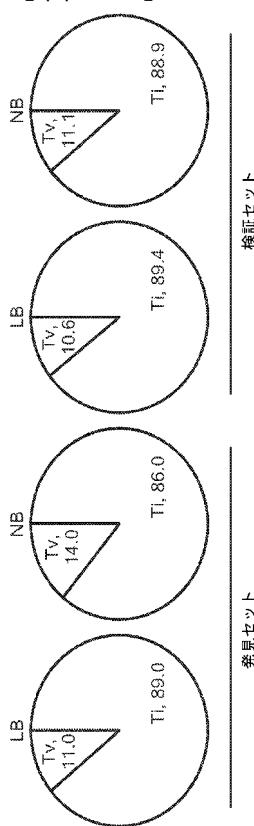
サンプル	変異
SD2056	115
CR3665	120
CR0095	198
CR6336	256
CR1509	344
CR4880	527
SD0346	540
SD1494	858
CR9699	1188
CR9306	1304

サンプル	変異
NR8727	1
NR3156	2
NR5784	3
NR9341	19
NR1867	28
NR5118	39
SD2051	39
CR7623	99
SD5934	112
SD5038	245
NR4810	307
NR3549	364
NR4949	484
SD6494	529
SD7357	1028

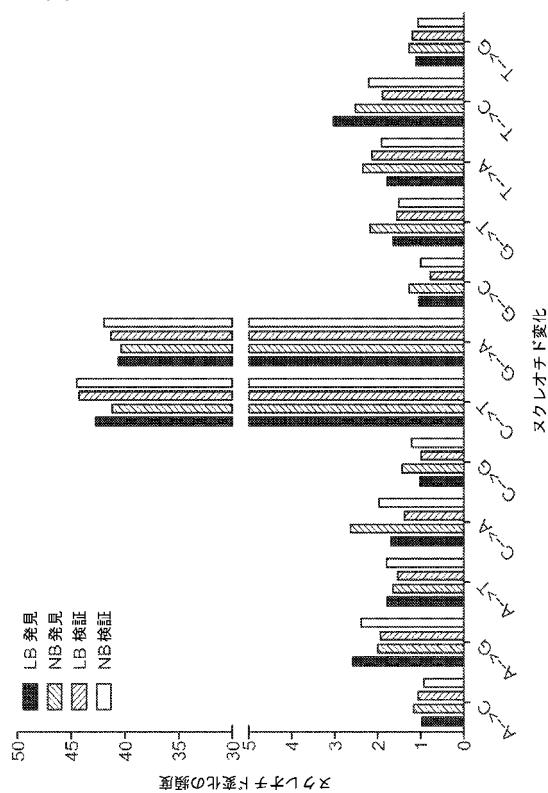
【図2 B】



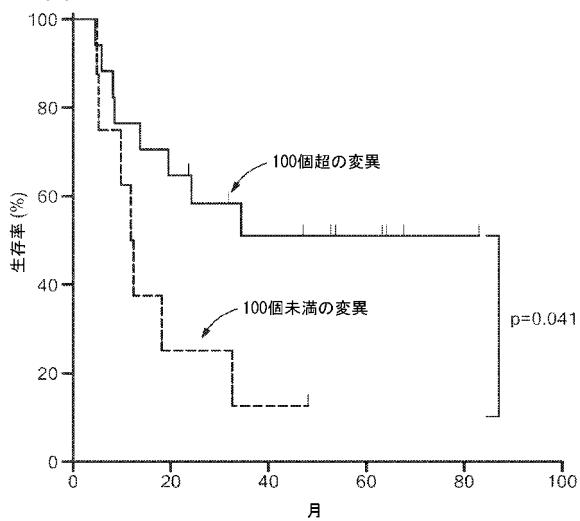
【図2 C】



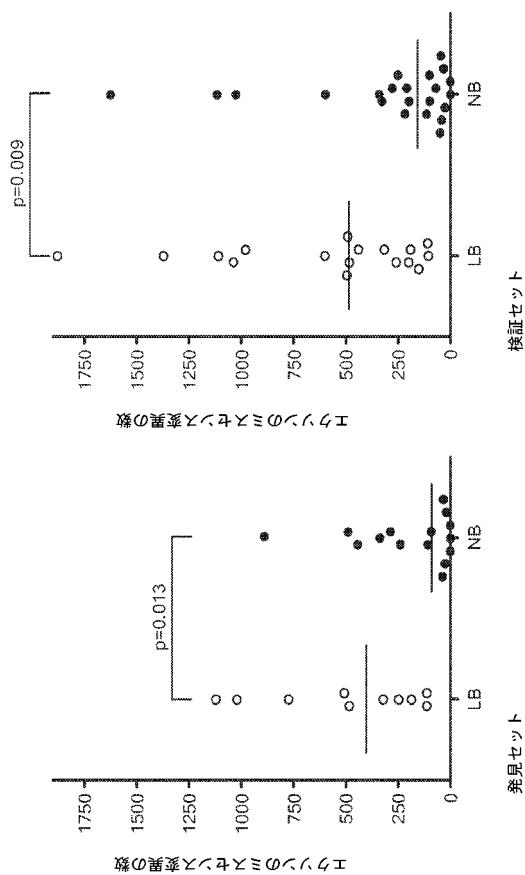
【図 2 D】



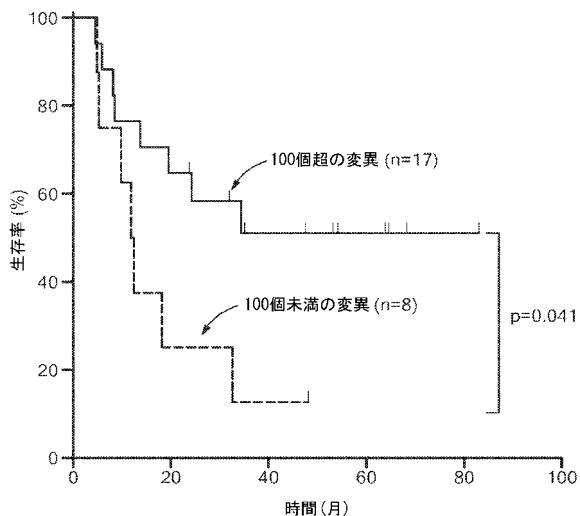
【図 2 E】

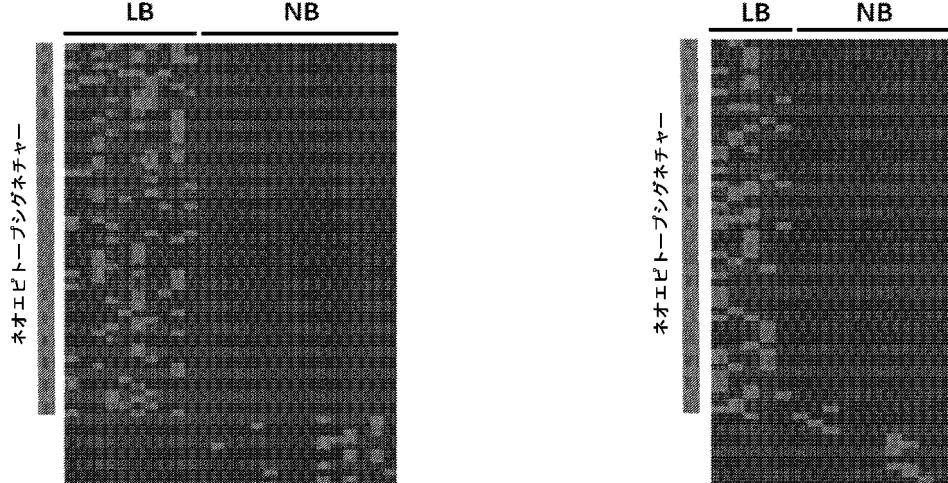
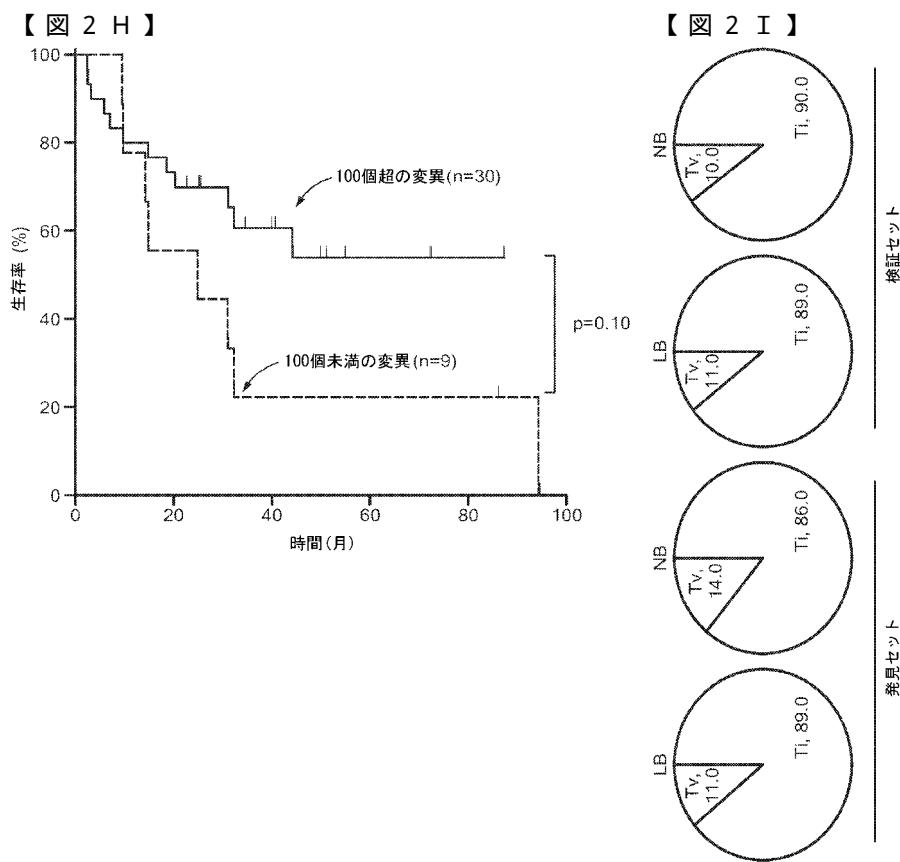


【図 2 F】

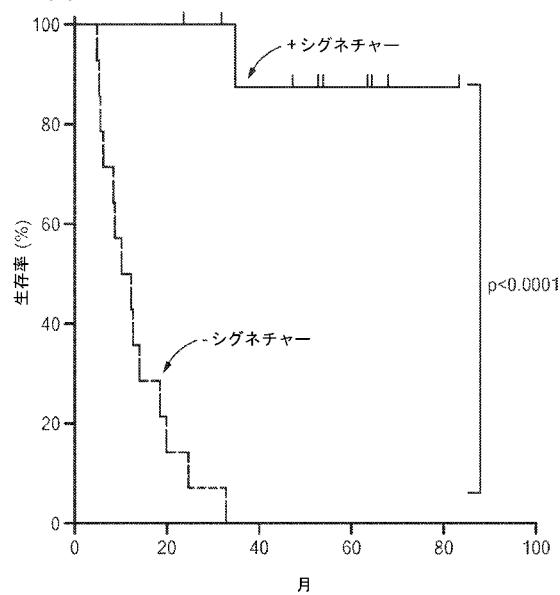


【図 2 G】

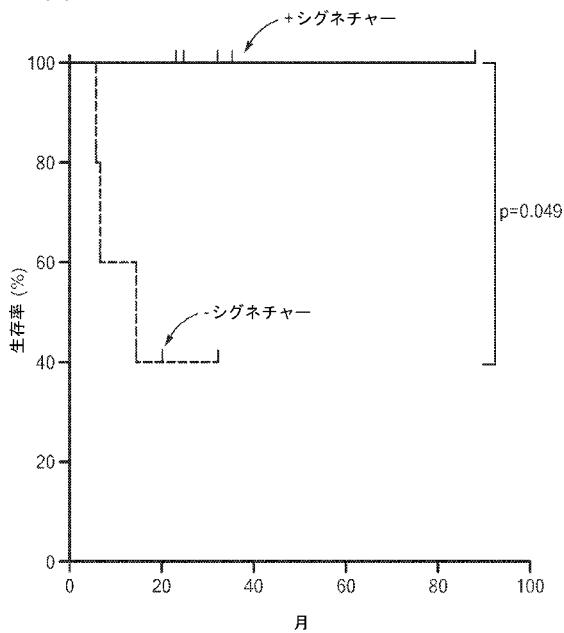




【図 3 C】



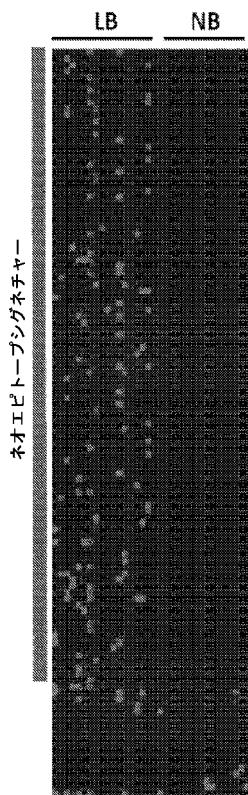
【図 3 D】

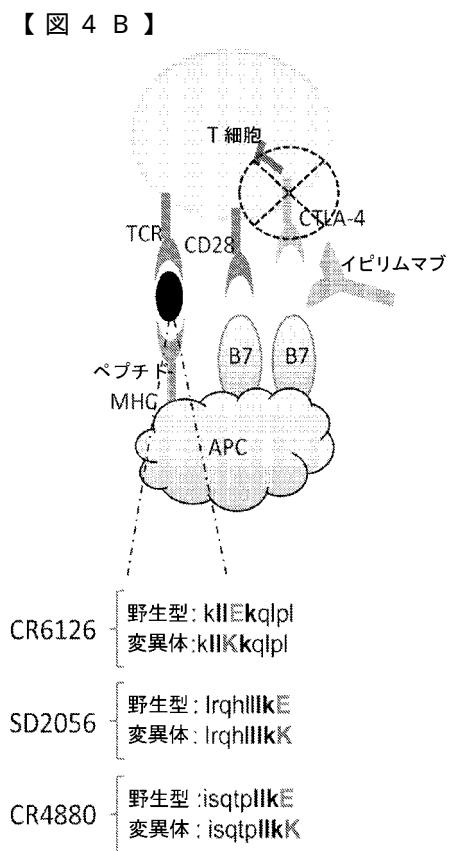
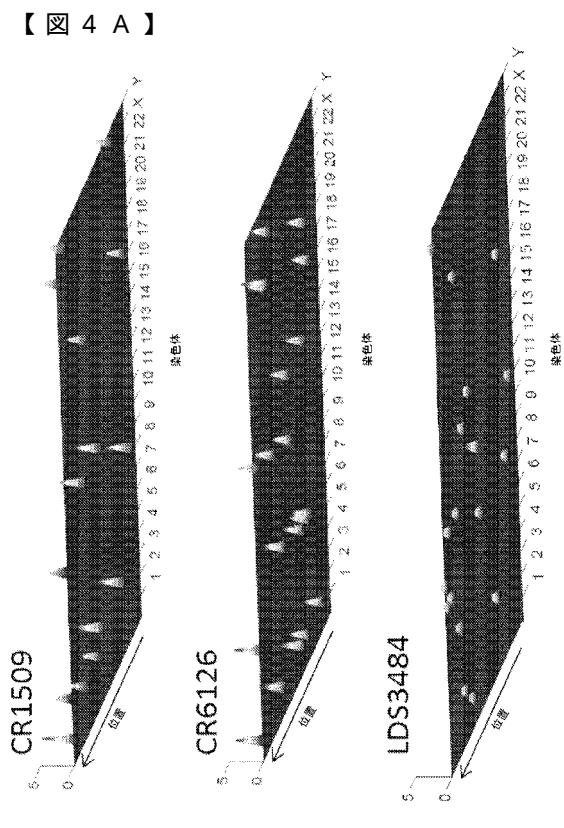
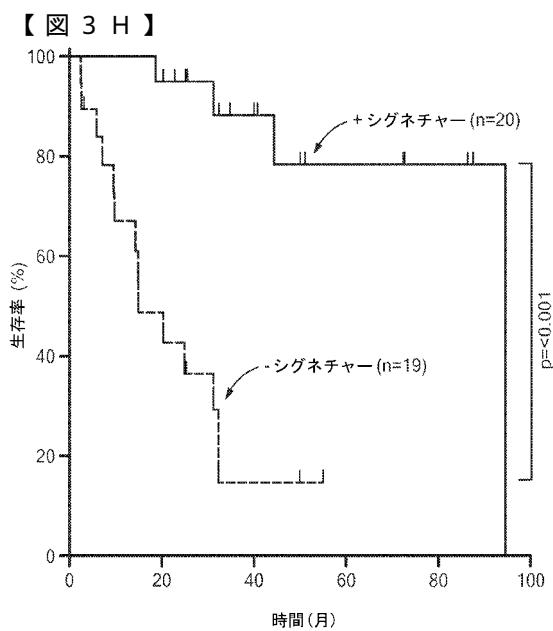
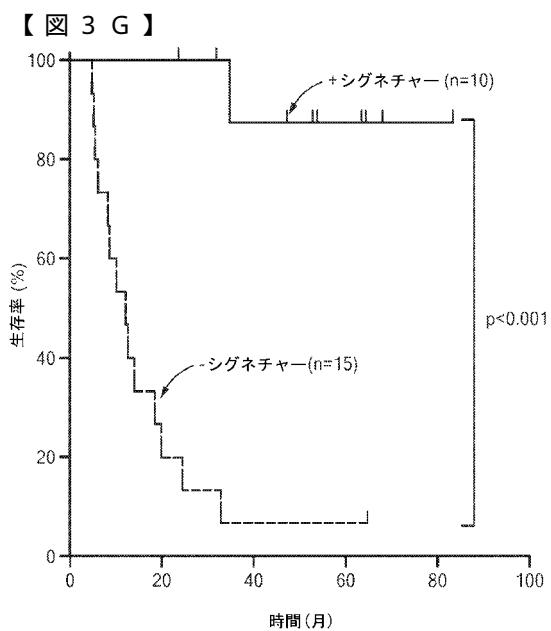


【図 3 E】

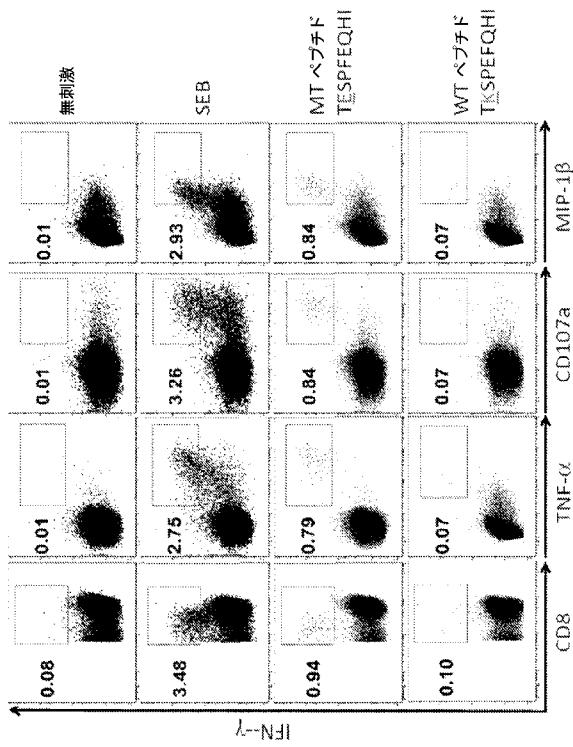


【図 3 F】

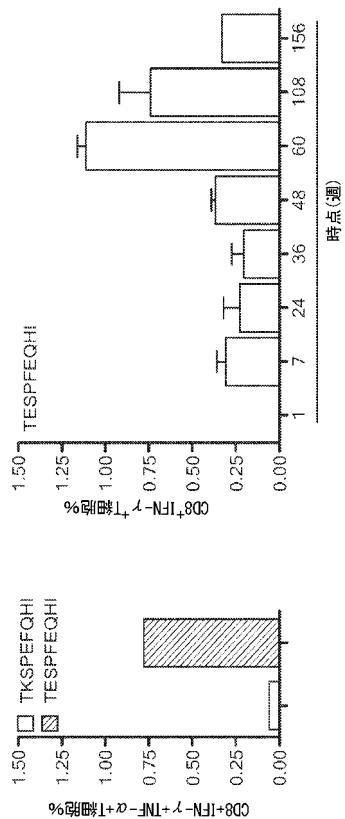




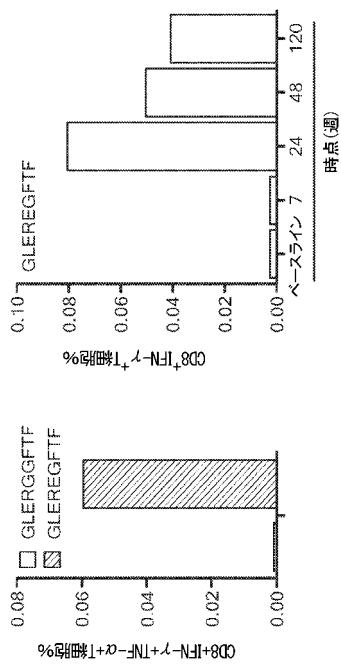
【図 4 C】



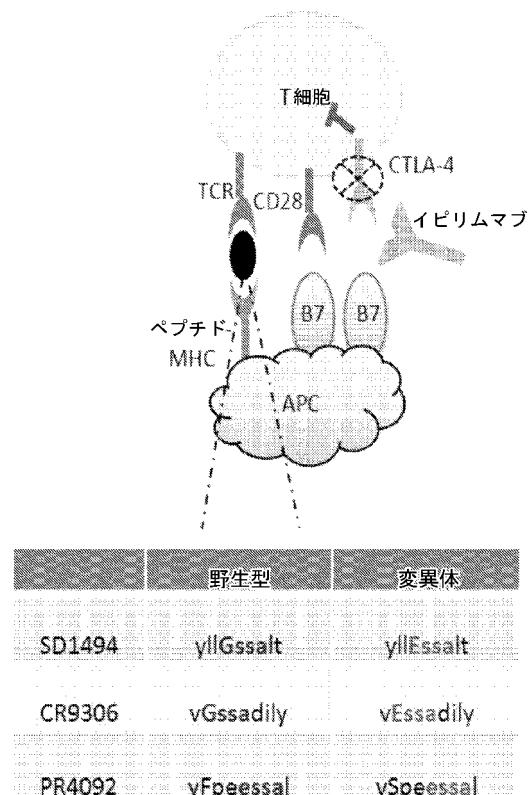
【図 4 D】



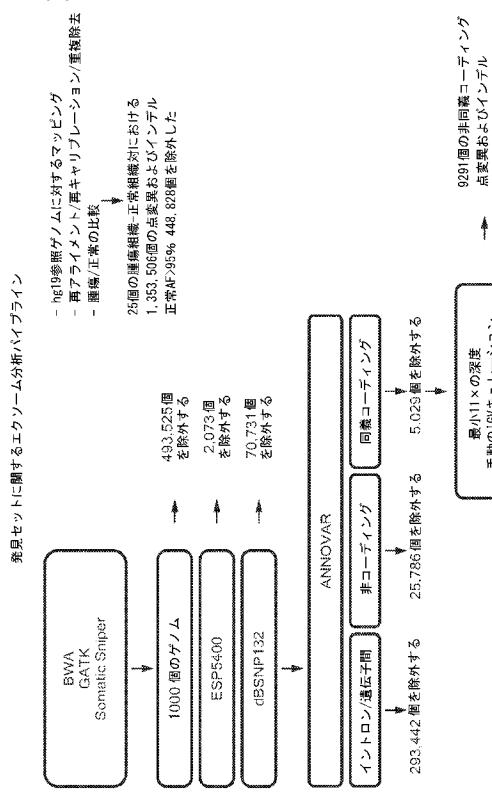
【図 4 E】



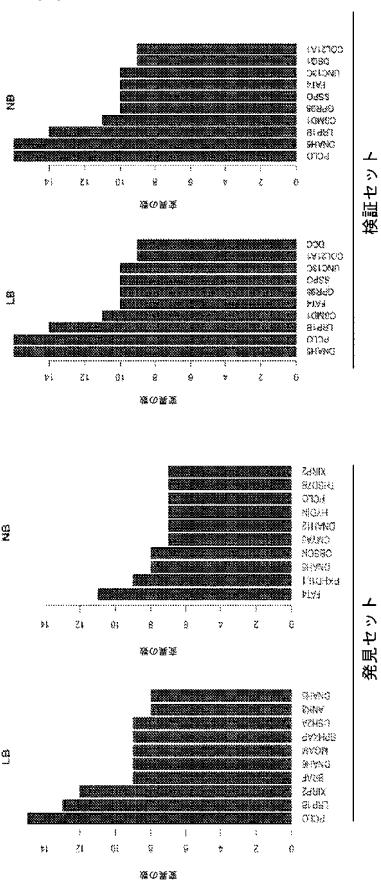
【図 4 F】



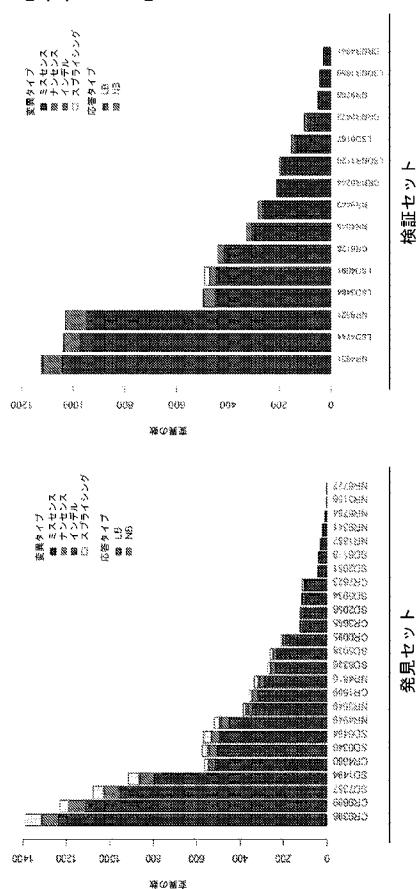
【図5】



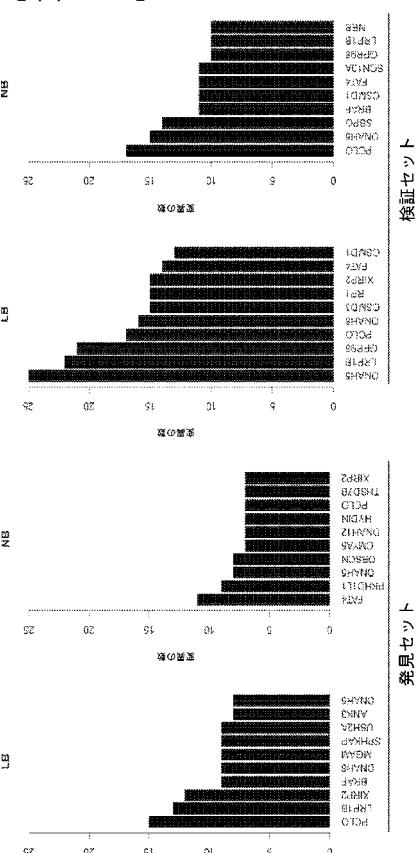
【 図 6 A 】



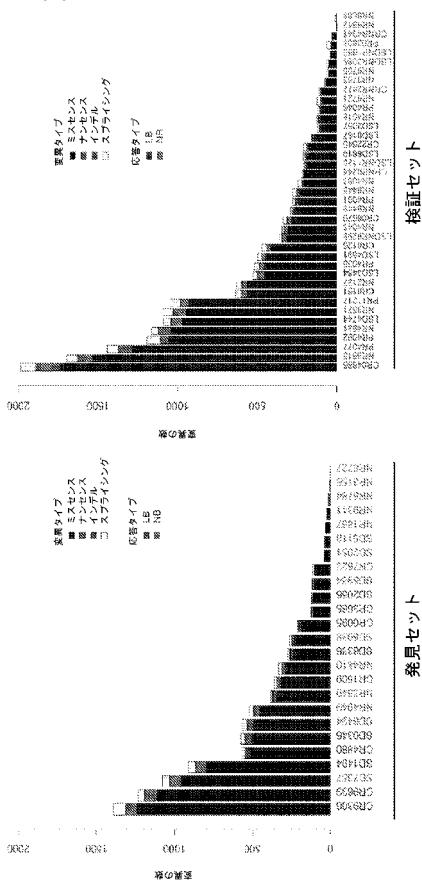
【 図 6 B 】



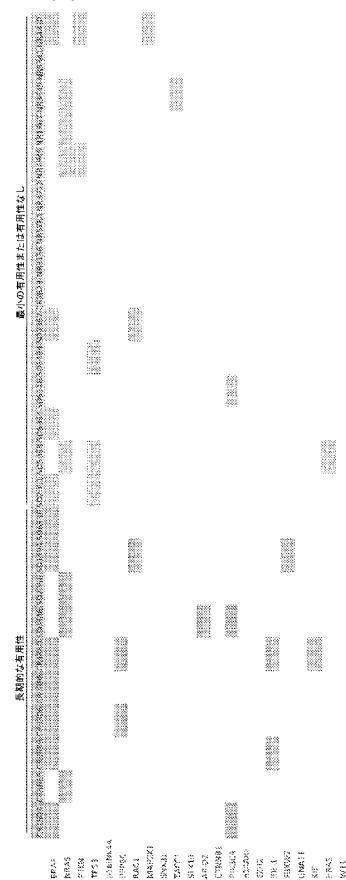
### 【 図 6 C 】



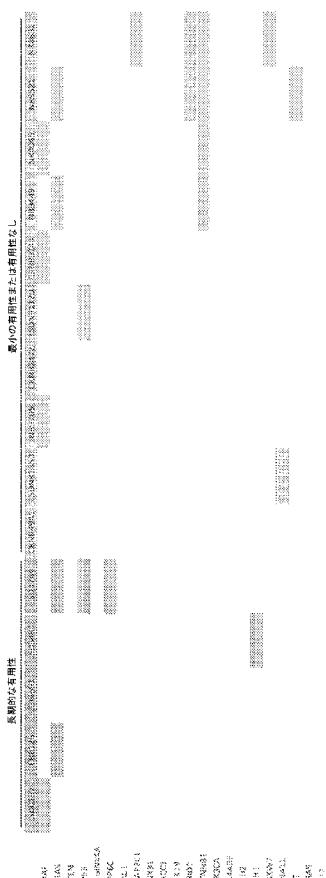
【図 6 D】



【図 7 A】



【図 7 B】

【図 7 C】  
サンプル 変異

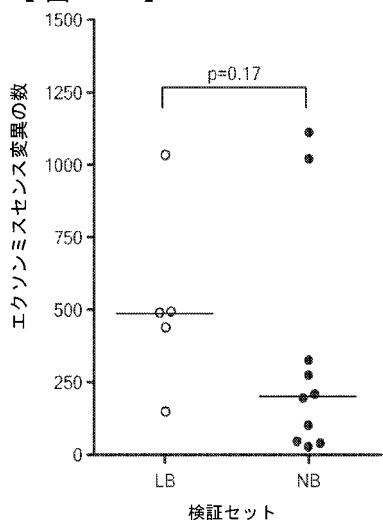
## 長期的な有用性

LSD0167	152
CR6126	442
LSD4691	491
LSD3484	495
LSD4744	1037

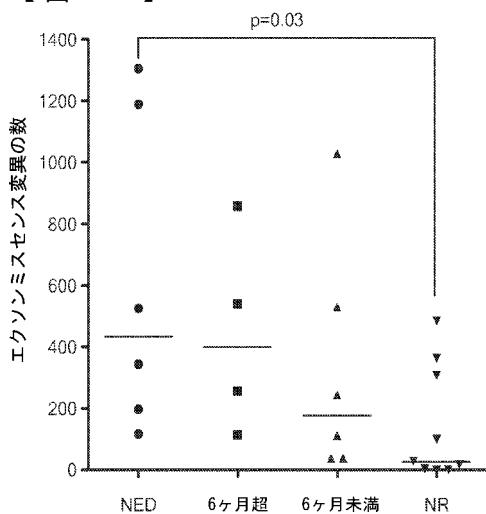
## 最小の有用性または有用性なし

CRNR4941	29
LSDNR1650	42
NR9705	49
CRNR2472	102
LSDNR1120	198
CRNR0244	211
NR9449	278
NR4045	330
NR9521	1026
NR4631	1116

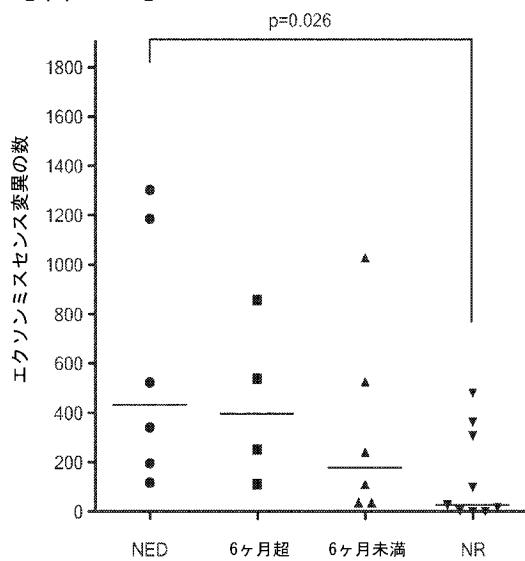
【図 7 D】



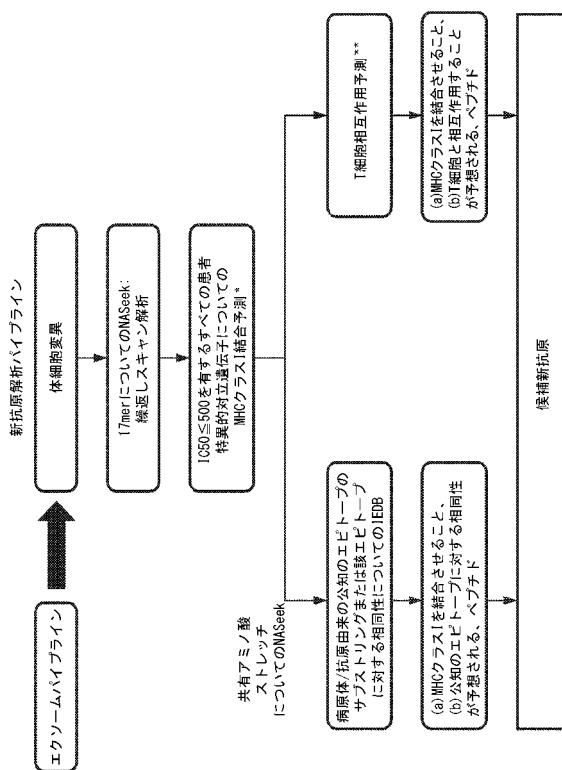
【図 7 E】



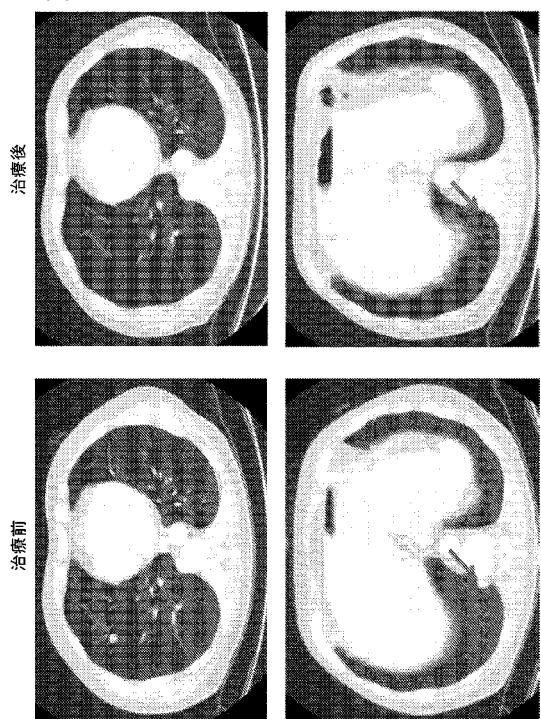
【図 7 F】



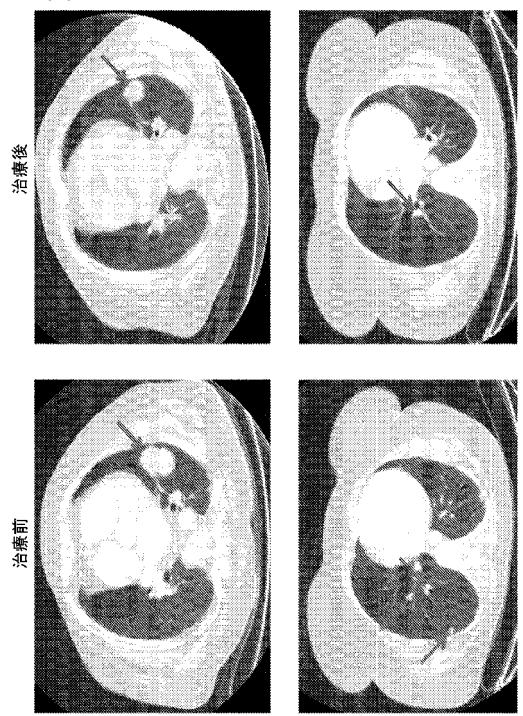
【図 8】



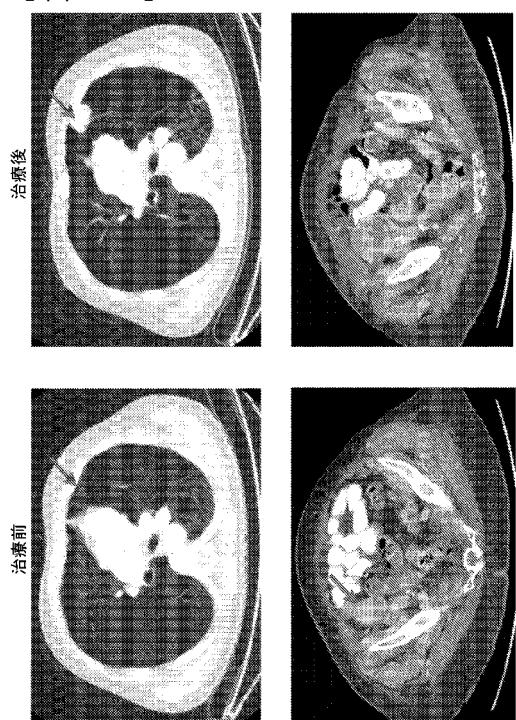
【図 9 A】



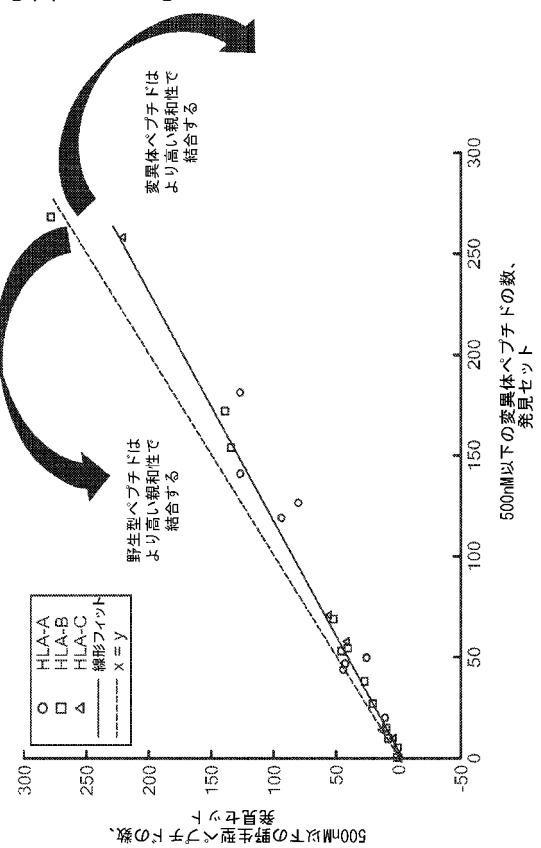
【図 9 B】



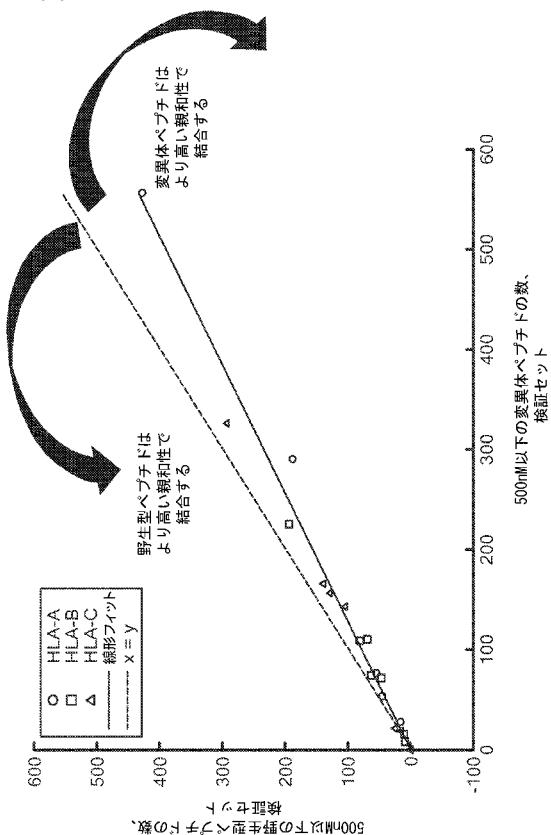
【図 9 C】



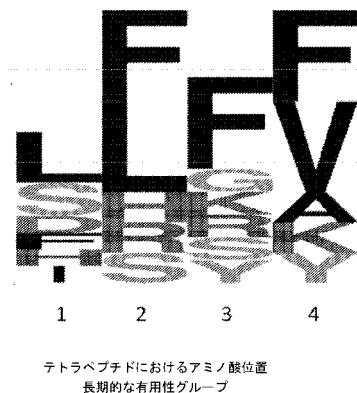
【図 10 A】



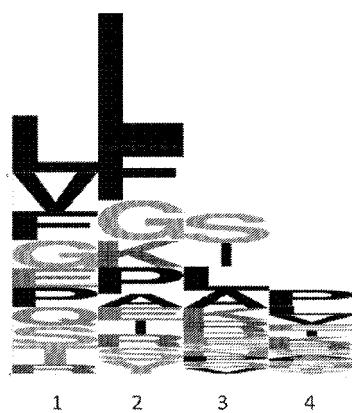
【図 10 B】



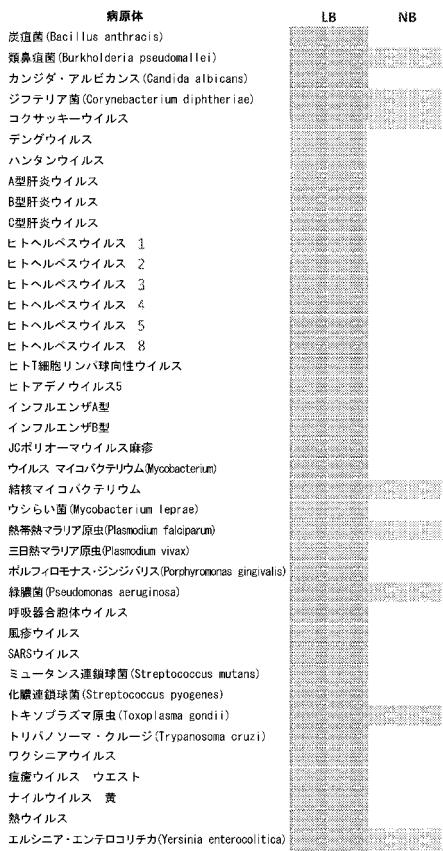
【図 10 C】



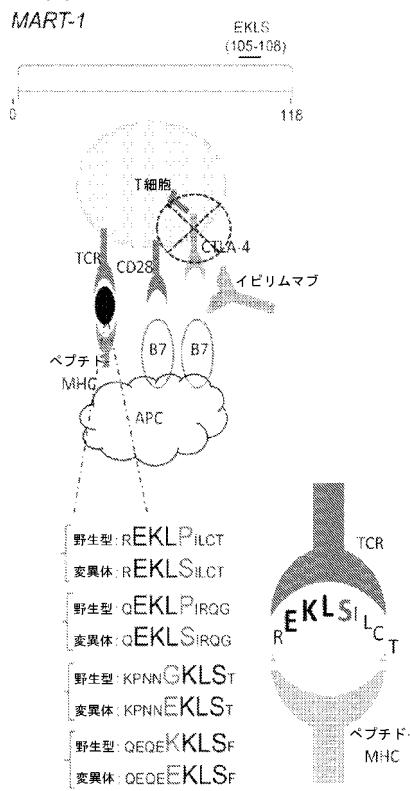
【図 10 D】



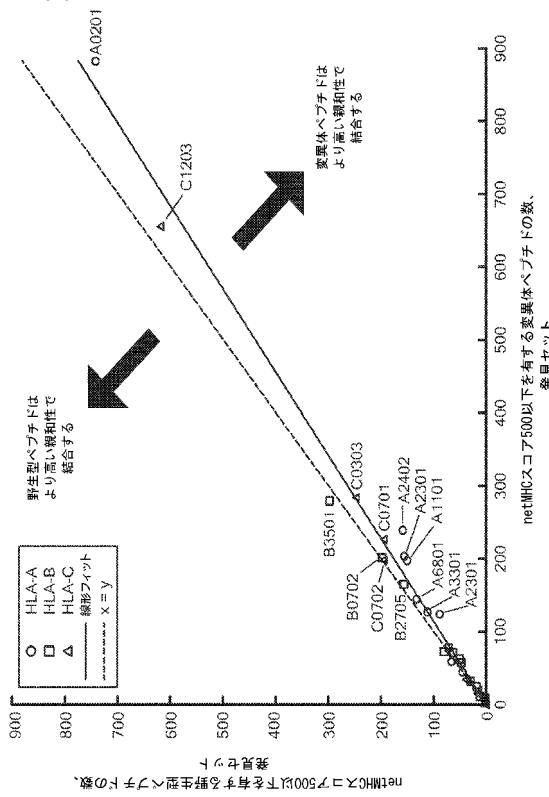
【図 10 E】



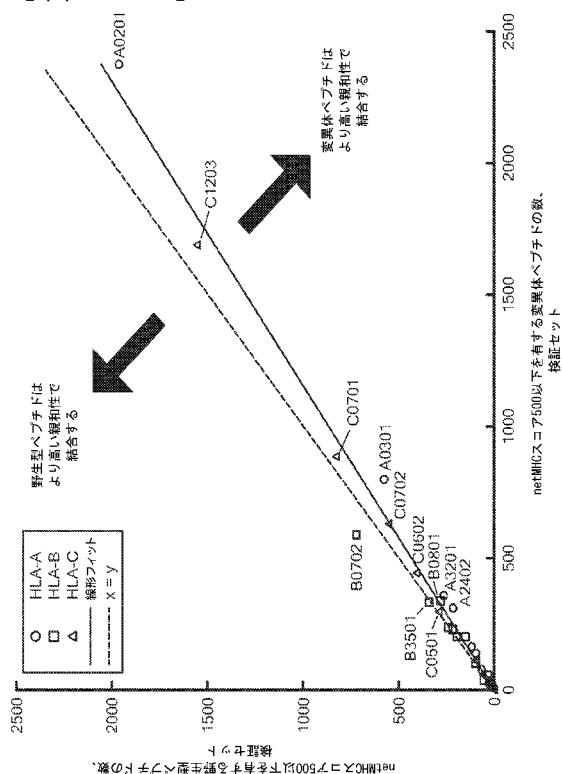
【図 10 F】



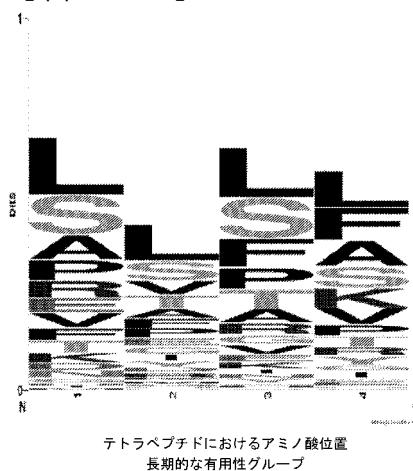
【図 10 G】



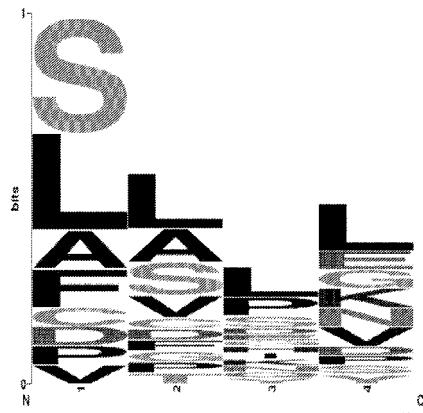
【図 10 H】



【図 10 I】



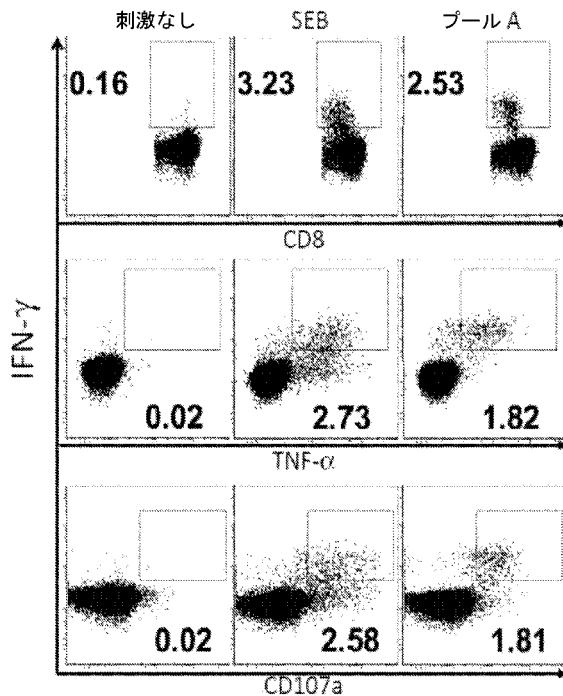
【図 10 J】

テトラペプチドにおけるアミノ酸位置  
最小の有用性または有用性なしのグループ

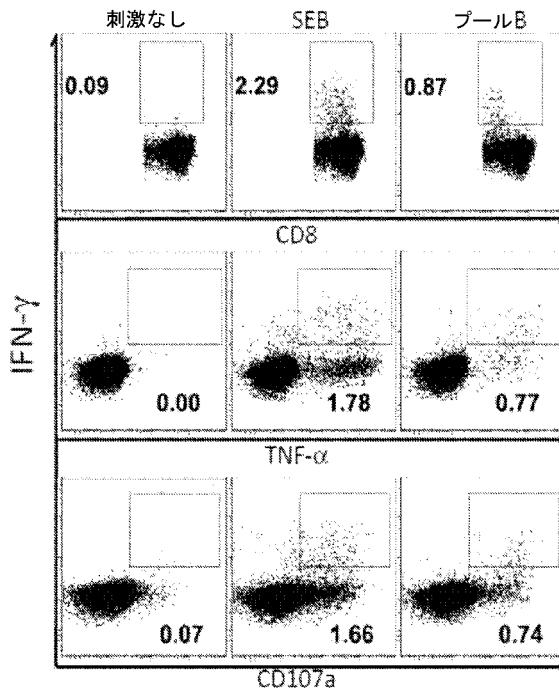
【図 10 K】

病原体	LB	NB
アデノ臓住ウイルス2		
アデノウイルス		
アスペルギルス・フミガーツ (Aspergillus fumigatus)		
炭疽菌		
BKボルオーマウイルス		
百日咳 (Bordetella pertussis)		
ボリニア・ブルグドルフェリ (Borrelia burgdorferi)		
細胞衣膜		
ジストリック菌		
C. テトニ (C. tetani)		
C. ドラコニタス (C. trachomatis)		
カジンダ・アルビカクス		
コサッキーウイルスB4		
デンクウイルス		
野猪熱菌 (Francisella tularensis)		
グループI溶細菌		
H. ピロリ (H. pylori)		
ヒトタンニウイルス		
ヒト肝炎ウイルス		
ヒト肝炎ウイルス		
ヒト肝炎ウイルス		
ヒトヘルペスウイルス 1		
ヒトヘルペスウイルス 2		
ヒトヘルペスウイルス 3		
ヒトヘルペスウイルス 4		
ヒトヘルペスウイルス 5		
ヒトヘルペスウイルス 6		
ヒトヘルペスウイルス 7		
ヒトヘルペスウイルス 8		
ヒトヘルペスウイルス 9		
ヒトヘルペスウイルス 10		
ヒトヘルペスウイルス 13		
ヒトヘルペスウイルス 16		
ヒトヘルペスウイルス 18		
ヒトヘルペスウイルス 26		
ヒトヘルペスウイルス 50		
ヒトヘルペスウイルス		
日本細泡ウイルス		
ヒトリノーラウイルス		
リソノ結合性弱膜炎ウイルス		
M. ボビス (M. bovis)		
シラカバ		
生葉ブリオントンシニア質		
麻疹ウイルス		
改造テクニニアアンカラウイルス		
M. ツバクロシス (M. tuberculosis)		
ミューバビロウイルス		
エニマーマウイルス		
熱病熱マラリア原虫		
二日酔マラリア原虫		
ガルバロモニス・ジジバリス		
リババレー熱ウイルス		
風疹ウイルス		
MRSAロカウイルス		
シングルブイリス		
化膿性細菌		
ミュータンス・連鎖球菌		
ダニ媒介性紅斑ウイルス		
トクテノウイルス		
トキソフルスマ原虫		
トリノノーマ・ブルージ		
フクニニアウイルス		
小佐菌		
ウカストナイルウイルス		
黄熱病ウイルス		
エルシニア・エンテロコリチカ		

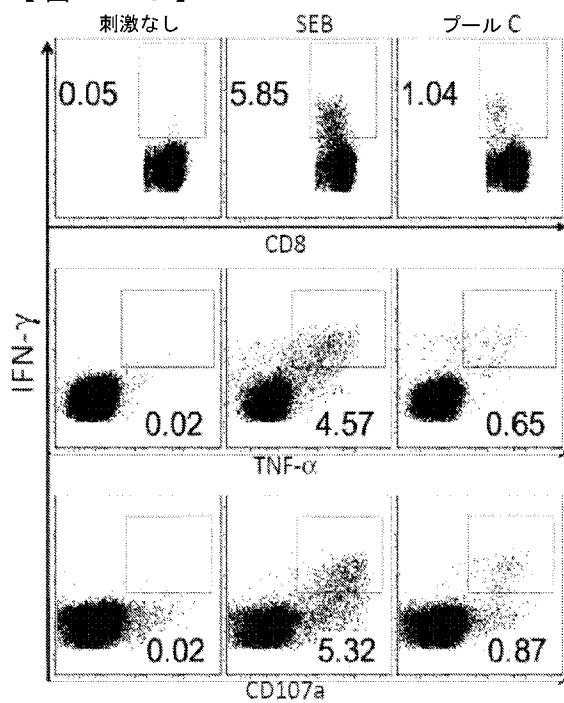
【図 11 A】



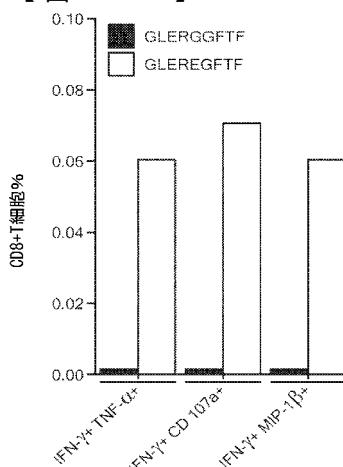
【図 11 B】



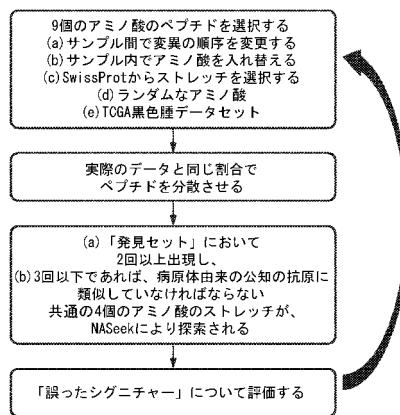
【図 1 1 C】



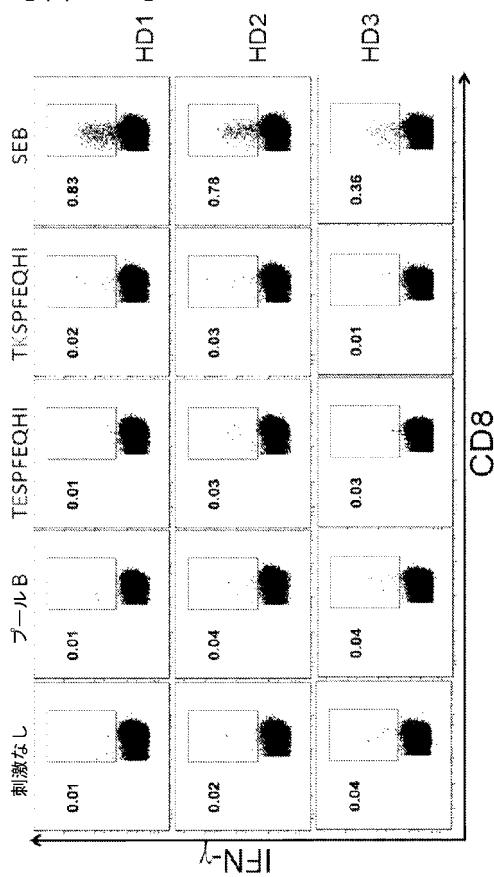
【図 1 1 D】



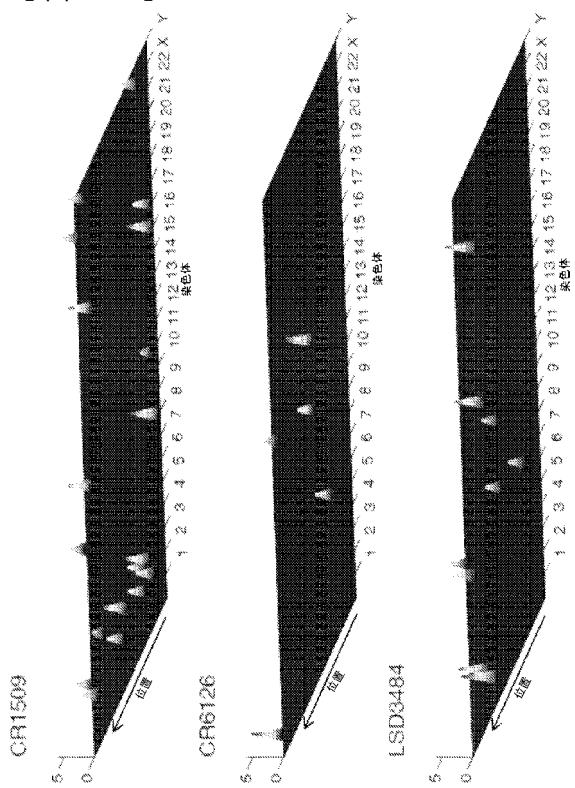
【図 1 2】



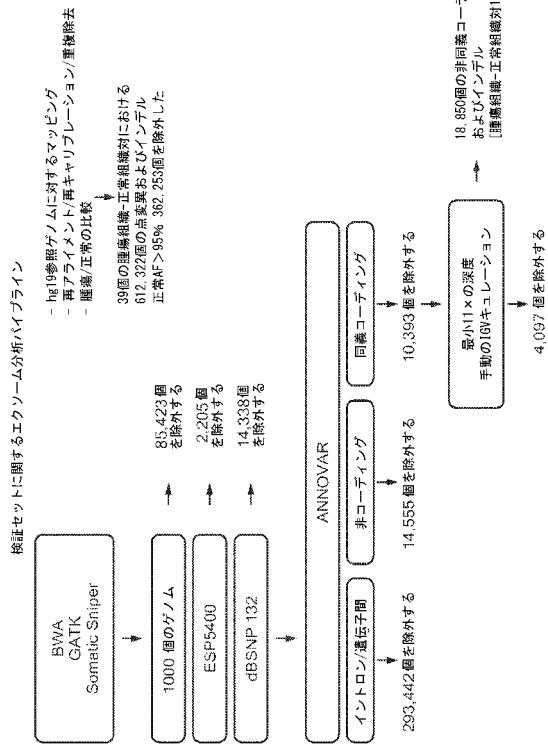
【図 1 3】



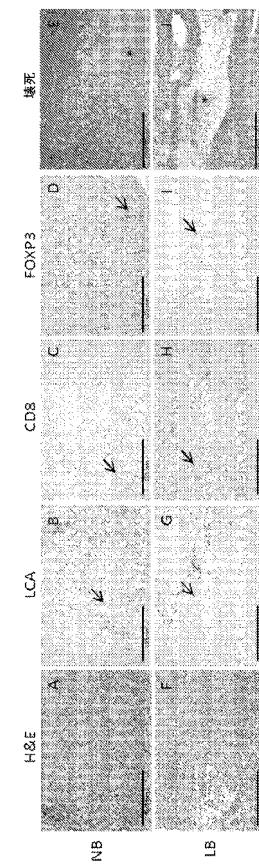
【図 1 4】



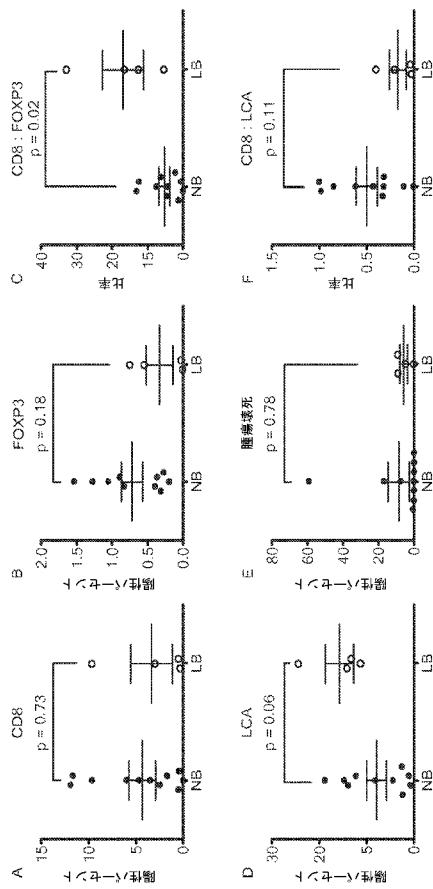
【 図 1 5 】



【図16A】



【図16B】



【 図 17 】

【図18】

桑原セット	
サンプル	変異
長期的な有用性	
SD2056	115
CR3665	120
CR0095	198
CR6336	256
CR13503	344
CR4880	527
SD0346	540
SD1494	858
CR9699	1188
CR9906	1304
サンプル	変異
最小の有用性または有用性なし	
NR8727	1
NR3156	2
NR5784	3
NR9341	19
NR1867	28
NR5118	39
SD2051	39
CR7623	99
SD5934	112
SD5038	245
NR4810	307
NR3549	364
NR4949	484
SD6494	529
SD7357	1028
サンプル	変異
最小の有用性または有用性なし	
NR6869	3
NR6842	3
CRNR4941	29
PR03803	34
LDSDNR1650	42
LDSDNR3096	48
NR9705	49
NR9765	70
NR6721	95
CRNR2472	102
NR4018	114
LDSDNR1120	198
CRNR0244	211
NR4083	218
NR9445	250
NR9440	278
NR4085	330
LDSDNR9290	342
NR2137	598
NR9521	1026
NR4631	1116
NR8815	1625

検証セット	
サンプル	変異
長期的な有用性	
PR4046	106
LDSD057	109
LDSD0167	152
CR22640	192
LDSD6819	200
PR4091	259
CR06670	315
CR6126	442
PR4035	485
LDSD4691	491
LDSD3464	495
CR6161	603
PR11217	980
LDSD4744	1037
PR4092	1108
PR4077	1371
CR04885	1875
サンプル	変異
最小の有用性または有用性なし	
NR8727	1
NR3156	2
NR5784	3
NR9341	19
NR1867	28
NR5118	39
SD2051	39
CR7623	99
SD5934	112
SD5038	245
NR4810	307
NR3549	364
NR4949	484
SD6494	529
SD7357	1028
サンプル	変異
最小の有用性または有用性なし	
NR6869	3
NR6842	3
CRNR4941	29
PR03803	34
LDSDNR1650	42
LDSDNR3096	48
NR9705	49
NR9765	70
NR6721	95
CRNR2472	102
NR4018	114
LDSDNR1120	198
CRNR0244	211
NR4083	218
NR9445	250
NR9440	278
NR4085	330
LDSDNR9290	342
NR2137	598
NR9521	1026
NR4631	1116
NR8815	1625

【図19A】

4mer	サンプル	染色体	位置	遺伝子	変異	アミノ酸	WTSeq	MTSeq
AALL	CR9699	chrX	14708901	SLRA2	c.G1000A	p.E334K	fvaallfEy	fvaallfKy
AALL	SD1494	chr9	94486131	ROR2	c.C2645T	p.S882F	Smadraall	Fmadrall
AALL	CR0095	chrX	11197491	ARHGAP6	c.G1411A	p.F471K	aslkfKf	aslkfKf
AALL	CR04885	chr19	8385389	KANK3	c.G2326A	p.D776N	Devaaflha	Nevaslha
AALL	PR11217	chr19	50209623	CPT1C	c.C1795T	p.S432L	tpaaafslay	tpaaafslay

AATA	CR9699	chr22	32555082	C22orf42	c.C121T	p.P41S	ctvaaatp2a	ctvaaatp5a
AATA	SD1494	chr20	61528063	SLC10A1	c.C1874T	p.S625F	apeaaataa5	apeaaataa5
AATA	CR4880	chrX	24362584	PMAM48B1	c.G1507A	p.A503T	aaeaaAaaAaa	aaeaaAaaAaa
AATA	SD3484	chr20	44580928	TFN335	c.C3047T	p.S1016L	saataaSkk	saataaSkk

AFPS	CR9699	chr10	63852764	ARID5B	c.C3542T	p.S1181F	afpsqsl5	afpsqsl5
AFPS	SD1494	chr7	12409553	VWDE	c.C2279T	p.P260L	fphfslps	fphfslps
AFPS	SD6491	chr3	168204247	LP	c.C2147T	p.L81F	alpsqsf	alpsqsf
AFPS	PR4092	chr2	227076596	GBX2	c.C197	p.P75	aafpSlmn	aafpSlmn

AGAA	CR9699	chr14	94905083	SERPINA11	c.C1125T	p.L377F	teagaaasgl	teagaaasgl
AGAA	SD1494	chr19	10948863	TME1	c.G3A	p.M11	Mmaagaaale	Mmaagaaale
AGAA	SD3484	chr7	27282856	EVX1	c.G247A	p.E83K	Epooyaaam	Epooyaaam

ALLK	CR0699	chrX	14708901	SLRA2	c.G1000A	p.E334K	fvaallfEy	fvaallfEy
ALLK	CR0095	chrX	11197491	ARHGAP6	c.G1411A	p.F471K	aslkfKf	aslkfKf
ALLK	CR04885	chrX	122801093	THOC2	c.G1048A	p.E50K	gllfalki	gllfalki

ALLN	CR9699	chr12	29596410	QVHL1	c.C3041T	p.P1014L	wrvlaahh	wrvlaahh
ALLN	SD0346	chr19	11132542	SMARCA4	c.G2758A	p.F920L	flwvalnl	flwvalnl
ALLN	CR0095	chr7	142638364	XEL	c.C214T	p.P225L	gallflssr	gallflssr

ALPA	SD0346	chr1	228480244	OBSCN	c.G10624A	p.E3542K	ralpafkE	ralpafkE
ALPA	SD1494	chr10	55887247	PCDH15	c.G1060A	p.A1354I	alpakaPav	alpakaPav
ALPA	CR04885	chr14	73958585	C14orf169	c.C863T	p.P288L	alpaaewvl	alpaaewvl

ANLA	CR9699	chr10	115388765	NRAP	c.G2056A	p.D86EN	ykaDlaawmk	ykaDlaawmk
ANLA	PR4092	chr7	309494240	GRNK1	c.C1949T	p.S650F	Syntaaaf	Syntaaaf
ANLA	PR4092	chr7	36445925	ANLN	c.C623T	p.T208L	rlanlaaTl	rlanlaaTl

ASHL

FAGV	SD0346	chr3	33134448	TMPPF	c.B296	p.L277V	llnffagl	llnffagv
FAGV	SD1494	chr17	55068515	SCPEP1	c.C502T	p.S201F	fagvalgdS	fagvalgdF
FAGV	PR11217	chr6	137243796	SLC35D3	c.C303T	p.S77F	slarflsagv	slarflsagv

FHFY	CR3665	chr17	80047175	FASN	c.C2053T	p.S684F	gmnafhSym	gmnafhSym
FHFY	CR9699	chr1	210522381	HHAT	c.C62T	p.S21F	slgfflyf	slgfflyf
FHFY	CR9699	chr1	210522381	HHAT	c.C62T	p.S21F	slgfflyf	slgfflyf
FHFY	CR306	chr15	83456063	SLC10A1	c.A80T	p.Y27F	fhfymndf	fhfymndf

FLGL	CR9699	chr17	7605749	WNAP53	c.C3043T	p.S348F	grSighayw	grSighayw
FLGL	SD0346	chr7	141423024	WE2	c.C971T	p.S324F	ilfslgfl	ilfslgfl
FLGL	SD1494	chr17	45367057	YTB3	c.C505T	p.S317F	slgntekl	slgntekl
FLGL	CR4880	chr13	44855321	SLTR1	c.G322A	p.V109M	afglqlMk	afglqlMk

FLNL	CR1509	chr11	96707646	CYP2C9	c.A592T	p.M198L	qfnfMexi	qfnfMexi
FLNL	PR4092	chr10	15139408	C10orf111	c.C416T	p.P130L	yPoffnl	yPoffnl

FYFF	CR9699	chr1	210522381	HHAT	c.C62T	p.S21F	slgfflyf	slgfflyf
FYFF	CR9699	chr1	210522381	HHAT	c.C62T	p.S21F	slgfflyf	slgfflyf
FYFF	CR04885	chrX	106085412	BC1218B	c.C565T	p.S189F	fslyffll	fslyffll
FYFF	PR11217	chr14	20565925	OR11G2	c.C431T	p.S144F	lqfifffl	lqfifffl

GOPA	SD0346	chr18	34850797	CELF4	c.C1
------	--------	-------	----------	-------	------

## 【図19D】

KLLS	CR04885	chr11	55620709	TCN1	c.G1207A	p.E403K	Elsggepl	Klbggepl	
KLLS	PR4077	chr1	196459820	KCN12	c.1273G	p.L75V	slkflscu	slkflscv	
KVLR									
KVLR	CR1509	chr17	685413	GLO04	c.G53A	p.G28E	dvfGnkplr	dvfEnkplr	
KVLR	SD0346	chr6	158923106	TULP4	c.C2411T	p.A804V	kvfKptpl	kvfLptpl	
KVLR	CR0095	chr11	51915771	INCENP	c.C2281T	p.A743V	lgeferKhr	lgeferKhr	
KYFQ									
KYFQ	CR1509	chrX	19984259	CKOR123	c.C554T	p.S185F	ekyksqtr	ekykgstr	
KYFQ	CR3665	chr3	151156186	IGSF10	c.G6163T	p.D205S	vhkgfQav	vhkgYfQav	
KYFQ	LSD1691	chr1	17	6161575	KCNH6	c.1282G>A	p.E428K	leyfghaw	leyfghaw
LAIV									
LAIV	SD1494	chr2	202074201	CASP10	c.C1331T	p.P444L	flglatP	flglatV	
LAIV	SD6336	chr12	208742872	SLC10C1	c.G855A	p.A2891	glglbAv	glglbAv	
LAIV	CR04885	chr2	1938848046	NCKAP1	c.C1087T	p.L363F	lakelatv	lakelatv	
LDKK									
LDKK	CR4880	chr14	23857401	MYH6	c.C432T	p.A1441V	aaAaaldkk	aaAaaldkk	
LDKK	CR0095	chr19	133948561	AKMP13	c.G855A	p.E289K	qdqfEkdr	qdqfEkdr	
LDKK	LSD4744	chr12	56638497	TRAK3	c.G1036A	p.v346M	fdkfkVpc	fdkfkVpc	
LDKK	CR6161	chrX	105449361	MUM111	c.G136A	p.E46K	lslslKkl	lslslKkl	
LDKK	CR04885	chrX	140984916	MAGEC3	c.G1372A	p.E458K	aldekkvai	aldekkvai	
LDPL									
LDPL	CR9699	chr15	56981272	2NF280D	c.C742T	p.H248Y	lfnnldpl	lfnnldpl	
LDPL	SD0346	chr12	127551389	GRIA3	c.C1637T	p.S546L	gvfRdfpl	gvfRdfpl	
LDPL	PR11217	chr9	131018635	SMV15	c.L191T	p.P64L	lalplapl	lalplapl	
LDTL									
LDTL	SD2056	chr2	1201859	SNF62	c.C6261	c.S221F	krwldtbs	krwldtbs	
LDTL	SD1494	chr1	201190860	IGFN1	c.C1018T	p.A396V	salddtvc	salddtvc	
LDTL	CR04885	chr2	45895336	FLDN	c.A2621	p.R88Y	vlqfctg	vlqfctg	
LDTL	PR11217	chr2	228883477	SPHKAP	c.C093T	p.S698L	hlwpldt	hlwpldt	
LEEK									
LEEK	CR9699	chr10	51843365	ANK3	c.G187A	p.G496E	evteGkpl	evteGkpl	
LEEK	SD0346	chr1	170901111	PAD4	c.C1853T	p.S618F	clenkVsl	clenkVsl	
LEEK	LSD0167	chr8	116593958	TRPS1	c.A236G	p.D787G	kleekGgk	kleekGgk	
LEEK									
LEEK	CR1509	chr18	5125797	SERPINB3	c.C119T	p.P140L	fanaPeers	fanaPeers	
LEEK	SD2056	chr11	66472841	SP1BN2	c.C1906T	p.R636W	rraWleer	rraWleer	
LEEK	CR05670	chr16	24826503	TNRCC6	c.C4708T	p.P1570S	friesSfv	friesSfv	
LEEK	PR4035	chr10	26822440	APB1B1P	c.C890T	p.S297F	Silesfcg	Silesfcg	
LEKL									
LEKL	CR1509	chr11	120202563	GRK4	c.C514T	p.L172F	Uniklkr	Uniklkr	
LEKL	CR9699	chr10	96767646	CYP2C9	c.A592T	p.M198L	uflnKmeki	uflnKmeki	
LEKL	PR4091	chr1	355440404	POON	c.G1309A	p.E437K	felEnly	felEnly	
LEKL	PR4092	chr1	569053990	CLCA2	c.G136A	p.F455K	saaplekt	saaplekt	
LEFFV									
LEFFV	CR9699	chr4	39436053	KLB	c.C1049T	p.S360F	mrkklfsv	mrkklfsv	
LEFFV	CR0095	chr19	52174697	PBP2R1A	c.C555T	p.S152F	glfSvcsy	glfSvcsy	
LEFFV	CR6126	chr11	569456691	RBC55	c.C302T	p.S101F	cssrfsv	cssrfsv	

## 【図19E】

LFLN									
LFLN	SD0346	chr5	115323615	AQPF6	c.G1085A	p.S362M	clMnSyl	clMnSyl	
LFLN	SD0336	chr17	40639291	ATP5V0A1	c.G929T	p.C320I	tlhcnGv	tlhcnGv	
LFLN	PR11217	chr8	39645760	ADAM2	c.C653T	p.S218L	vsfnmlil	vsfnmlil	
LGST									
LGST	CR9699	chr13	89896757	NAALAD2	c.G1250A	p.G417E	flflgsteW	flflgsteW	
LGST	SD0256	chr8	116504694	PKHD1L1	c.A1029G	p.S340G	nhkdLstt	nhkdLstt	
LGST	LSD2057	chr7	142749763	OR6V6	c.C326T	p.S109F	slgsfsl	slgsfsl	
LGST	PR4092	chr11	123909399	OR1067	c.C310T	p.H104Y	HflgsteF	HflgsteF	
LLPK									
LLPK	CR9699	chr9	27197325	TEK	c.C1637T	p.P546L	Rightlplk	Rightlplk	
LLPK	SD2056	chr1	22028644	ARS2	c.C1706T	p.P560L	lPepqlpk	lPepqlpk	
LLPK	LSD4744	chr12	124821593	NCOR2	c.C532T	p.R1941W	lPkpacRv	lPkpacRv	
LLPK	PR11217	chr3	33106995	GLB1	c.C422T	p.P141L	vlpkcmkP	vlpkcmkP	
LLUN									
LLUN	LLR1	SD0346	chr11	63137755	SLC22A9	c.C227T	p.S76F	alflsSpl	alflsSpl
LLUN	LLR1	CR9036	chr19	83231888	CERS4	c.C658T	p.S223F	Sysanflt	Sysanflt
LLUN	LLR1	SD6161	chr20	25398764	GIN81	c.G263A	p.R88K	tlRklrw	tlRklrw
LLSE									
LLSE	CR4880	chr16	84522897	RIAA109	c.C516G	p.D172E	aaqlsDmk	aaqlsDmk	
LLSE	CR4880	chr4	55956220	KDR	c.G3695A	p.R1032Q	aKn1tsk	aKn1tsk	
LLSE	CR0095	chr20	2636301	NOP56	c.C818T	p.P273L	rvvSlekyr	rvvSlekyr	
LLSP									
LLSP	CR3665	chr19	2095897	ZNF596	c.G1428A	p.M476L	klspissM	klspissM	
LLSP	CR9036	chr17	62049773	SCM44	c.C313T	p.L111F	lvilspisv	lvilspisv	
LLSP	PR11217	chr4	95572017	DICER1	c.A300T	p.T1001S	rlnf1Pph	rlnf1Pph	
LMPR									
LMPR	CR1509	chr2	46761515	CLSR1	c.C3872T	p.S2791T	epds5Smpl	epds5Smpl	
LMPR	SD1494	chr8	2824146	SMC1U	c.A9046C	p.T3016P	glmPhcta	glmPhcta	
LMPR	CR4880	chr9	9068409	MUC16	c.C1903T	p.S6346L	tsmpressam	tsmpressam	
LRFL									
LRFL	CR9699	chr11	111796877	CT1hrf52	c.L326T	p.P1091	lfPqatP	lfPqatP	
LRFL	CR4880	chr4	46995366	GABA4	c.C76A	p.L26M	fallflcM	fallflcM	
LRFL	PR4091	chr9	27949714	LNG02	c.G956A	p.G319E	hsfGflf	hsfGflf	
LRPT									
LRPT	SD0346	chr2	15892306	TULP4	c.C341T	p.A804V	kAfrptpl	kAfrptpl	
LRPT	SD1494	chr1	152733398	KPRP	c.G1334A	p.R445Q	algrptPpv	algrptPpv	
LRPT	PR4097	chr2	70917932	ADD2	c.G835A	p.G279R	lGptcklv	lGptcklv	
LSFA									
LSFA	CR9699	chr5	178392595	ZNF454	c.C1190T	p.S397L	frdnSfar	frdnSfar	
LSFA	SD0346	chr10	71962359	MTH1	c.A1137G	p.T578A	tsfAtdsll	tsfAtdsll	
LSFA	LSD4744	chr12	178392595	ZNF454	c.C1190T	p.S397L	tsfahrhki	tsfahrhki	
LSVL									
LSVL	SD0346	chr11	123676589	OR6M1	c.C459T	p.P157S	lSvldPq	lSvldPq	
LSVL	SD1494	chr13	83207448	CERS4	c.G449A	p.G150D	lvG0sVly	lvG0sVly	
LSVL	PR11217	chr9	151900311	MAGE12	c.G670A	p.E224K	kiweLtsv	kiweLtsv	
LSVL	PR4092	chr2	135199369	MG415	c.C1191T	p.A637V	vnwppplsAI	vnwppplsAI	

## 【図19G】

PPGP	SD0346	chr1	103463577	COL11A1	c.C2299G	p.P267A	gpssppgPl	gpssqqgAi
PPGP	CR0095	chr19	41133045	TPBP4	c.C4150T	p.P1584S	Pypppgpl	Sppppgpl
PPGP	PR4092	chr11	67267538	PTPNM11	c.C899T	p.S300F	eappgpdas	eappgpdaf
PPSY								
PPSY	SD1494	chr11	60482334	MS448B	c.G700A	p.E234K	EpvpppP	KpvtpppP
PPSY	SD0336	chr19	40151057	KLNG15	c.G344A	p.R115Q	lvfQpppP	lvQpppP
PPSY	CR4880	chr12	57181053	HD176	c.T881C	p.Z294P	ffflptsl	ffflptsl
PSLL								
PSLL	SD1494	chr2	239033956	BPSPN1	c.C1033T	p.P245S	ffffpflat	ffffpflat
PSLL	CR9306	chr12	48919977	OR851	c.C963T	p.S186F	empplp1S	empplp1P
PSLL	PR4092	chr3	126291705	TXNRD3B	c.C182T	p.P611L	fgugppl	fgugppl
PVFF								
PVFF	SD1494	chr13	38266339	TRPC4	c.C1031T	p.S344F	glflptsv	glflptsv
PVFF	CR9305	chr2	30966427	CAPN13	c.C1267T	p.P423S	ffppffss	ffppffss
PVFF	LSD3484	chr2	69058575	PENX2	c.C219T	p.L1407F	hpvfaqsl	hpvfaqsl
PVTS								
PVTS	CR1509	chr5	195510797	MUC4	c.L744L	p.S258P	lpvtsissa	lpvtsissa
PVTS	SD0346	chr6	39315572	KIF6	c.T2341A	p.S781T	ipkrpwsS	ipkrpwsS
PVTS	SD1494	chr11	60482334	MS448B	c.G700A	p.E234K	EptvpppP	KpvtpppP
RILK								
RILK	CR9699	chr9	8131050	FBN3	c.G8173A	p.E2725K	graenlEl	graenlEl
RILK	SD1493	chr20	47991193	KNCB1	c.G989A	p.R803Q	nlrlirkli	nlrlirkli
RILK	PR11217	chr2	40056427	SLC8A1	c.G994A	p.C32K	rlNKLlk	rlNKLlk
RILK								
RILK	SD1494	chr2	179584548	TTN	c.A1193C	p.G647L	rlfleopm	rlfleopm
RILK	CR4880	chr9	79321581	PRUNE2	c.G509A	p.G1837R	eBrliespf	eBrliespf
RILK	LSD4744	chr1	207639988	CR2	c.G176A	p.G59E	rlGnkll	rlGnkll
RPPS								
RPPS	SD0346	chr10	19568102	SHKBP1	c.C1373T	p.S458F	grpppsqS	grpppsqS
RPPS	CR9306	chr12	123969975	TAC2	c.C269T	p.Q90L	Pfrpphsf	Pfrpphsf
RPPS	PR4077	chr11	56258054	ORM8	c.G793A	p.L255K	rpsskEsv	rpsskEsv
RPPR								
RPPR	CR9699	chr11	92623974	FAT3	c.C1336T	p.H455Y	rrppfips	rrppfips
RPPR								

## 【図19H】

RYLL	CR9306	chr17	73585885	RECOL5	c.C445T	p.H149Y	hHslyvv	hHslyvv
RYLL	PR4092	chr4	8229546	SH3TC1	c.T2125C	p.C709R	wisdkyli	wisdkyli
SESP								
SESP	SD1494	chr2	74275277	TET3	c.C1828T	p.P610S	ipaPespfa	ipaPespfa
SESP	CR9306	chr1	9100180	SLC2A5	c.C640T	p.P214S	pesprylf	pesprylf
SESP	CR06570	chr3	184039531	HTF4G1	c.C898T	p.P300S	cPespypf	cPespypf
SIFL								
SIFL	SD0246	chr1	158326292	CD1E	c.T725A	p.Y249N	mrgeyvifl	mrgeyvifl
SIFL	CR4880	chr15	79586810	ANKRD34C	c.C1184T	p.S395F	rsiflengk	rsiflengk
SIFL	CR06570	chr1	53547956	PODN	c.A767T	p.N256I	bsNfiflv	bsNfiflv
SIFL	PR4091	chr16	75563506	CHST5	c.G379A	p.D127N	slifcdmNv	slifcdmNv
SIFL								
SLGF	CR0695	chr1	210522381	HHTA	c.C62T	p.S21F	slgftyf	slgftyf
SLGF	CR9306	chr1	210522381	HHTA	c.C62T	p.S21F	slgftyf	slgftyf
SLGF	CR5126	chr13	103703659	SLC10A2	c.G709A	p.G237S	aGyslgfl	aGyslgfl
SLRF								
SLRF	CR1509	chr4	153691936	TIGD4	c.C221T	p.P74L	csifldPkr	esifldlk
SLRF	CR1509	chr4	153691937	TIGD4	c.C220T	p.P74S	esifldPkr	esifldlk
SLRF	SD1494	chr12	10962382	TAS2R9	c.T292C	p.W98R	fanissiWf	fanissiWf
SLSV								
SLSV	CR9699	chr8	69316795	PREX2	c.C343T	p.P145S	colPkwvi	colPkwvi
SLSV	SD1494	chr10	25887245	GPR158	c.C2690T	p.S807L	Smqkslev	Smqkslev
SLSV	CR6126	chr4	44954706	FSC1	c.C122T	p.P76L	jeekskewl	jeekskewl
SLSV	CR6151	chr12	7528442	CD161U	c.G2540A	p.G847E	slifwdhf	slifwdhf
SLSV	CR04885	chr14	64408423	SYNE2	c.C152T	p.P51L	arhtisPwi	arhtisPwi
SLVC								
SLVC	CR9699	chr1	235316029	BBM34	c.C649T	p.R217C	vriflvcf	vriflvcf
SLVC	SD2056	chr3	193182748	ATP13A4	c.A1442G	p.N481S	olNbrsik	olNbrsik
SLVC	SD1494	chr4	110447532	SEC24B	c.C2942T	p.A981V	slifctfai	slifctfai
SLYL								
SLYL	CR9699	chr2	178095680	NFE2L2	c.C1582T	p.H528Y	gerdkslH	gerdkslH
SLYL	CR9306	chr3	621805758	PTPRK	c.C1241T	p.S341L	ysocialf	ysocialf
SLYL	PR4035	chr4	125600025	ANKRD50	c.C11T	p.P4L	Pkqsllyf	Pkqsllyf
SMSS								
SMSS	CR3699	chr12	57431379	MYO1A	c.C2008A	p.L670I	gefmsggf	gefmsggf
SMSS	SD2056	chr6	105563561	BVE5	c.C958T	p.H320Y	gtssmslf	gtssmslf
SMSS	PR4035	chr2	182766556	SFA2	c.G806A	p.G769E	crfFmsssv	crfFmsssv
SPRS								
SPRS	SD0346	chr1	23473424	IRF2BP2	c.A1175G	p.H392N	spifhsnrtip	spifhsnrtip
SPRS	SD0346	chr2	60695941	BCL11A	c.C413T	p.S138F	spifhsrash	spifhsrash
SPRS	CR4880	chr2	55944849	SH3A7	c.C1291T	p.P431S	Pprspalpp	Pprspalpp
SPRS	CR9306	chr19	236268139	GPR1378	c.G994A	p.G322R	Gkpxsifl	Gkpxsifl
SPRS	SD4744	chr7	150327875	C7orf29	c.G382A	p.G128S	spifspcgl	spifspcgl
SPRS	CR04885	chr1	38018280	SNIP1	c.G293A	p.R89Q	spifsknfs	spifsknfs
SPSA								
SPSA	SD0346	chr4	100340723	ADH7	c.C943T	p.P315S	vvvgvPpk	vvvgvPpk
SPSA	CR4880	chr2	29294070	C2orf71	c.C3058A	p.G1020K	tpuQpkpsa	tpuQpkpsa

## 【図19I】

SPSA	SD0167	chr12	3129847	TEAD4	c.G502A	p.A168T	soospaapA	soospaapA
SPSA	SD5474	chr13	75868912	TRC134	c.C234T	p.S782F	Spumkspu	Spumkspu
SPSA	PR4035	chr1	5832735	FUT6	c.A344G	p.N115S	vmyNpsaql	vmyNpsaql
SITI								
SITI	SD0346	chr17	61607835	KCN16	c.G607A	p.E203K	hressstEi	hressstEi
SITI	CR4880	chr19	9063678	MUC16	c.A23768C	p.D7923A	lDtsstsl	lDtsstsl
SITI	SD4651	chr16	22358405	CDR2	c.T1246C	p.F416S	ssPtppey	ssPtppey
SITI	PR11237	chr11	61026248	WVCE	c.C2767T	p.P923S	rvsPttsr	rvsPttsr
SITL								
SITL	CR4880	chr19	9066259	MUC15	c.A21187G	p.T7063A	stfQfph	stfQfph
SITL	CR9306	chr7	14163505	CLECSA	c.G302A	p.G101E	kekgstai	kekgstai
SITL	SD4651	chr1	17265597	CROCC	c.I568T	p.L523O	csdsstsl	csdsstsl
SITL	CR04885	chr11	59210760	08541	c.C119G	p.T40S	yfTewnl	yfTewnl
STSF								
STSF	CR1509	chr8	1719731	C118	c.C511T	p.P171S	ileemstf	ileemstf
STSF	SD0346	chr19	9061746	MUC15	c.C570T	p.S8567L	Spantsstf	Spantsstf
STSF	SD1494	chr20	24646031	SYND1G1	c.G68T	p.S223F	dlbqassf	dlbqassf
STSF	SD03484	chr2	179615759	TTN	c.C1138T	p.P3790S	esel1stxf	esel1stxf
STSF	CR04885	chr2	179616637	TTN	c.C1049T	p.S3497F	stswpypf	stswpypf
SVLY								
SVLY	CR9699	chr12	40668499	LRRK2	c.C1771T	p.H591Y	svlrlqmv	svlrlqmv
SVLY	SD1494	chr19	8720744	CER54	c.G49A	p.G159D	fugGolvly	fugGolvly
SVLY	SD3048	chr1	158517061	OR6Y1	c.G935A	p.V279I	kvtsvlyt	kvtsvlyt
SVLY	CR04885	chr1	17559161	PAD1	c.C319G	p.R107G	algGvdyl	algGvdyl
SVLY	PR4077	chr9	21141329	FNWAV1	c.C41T	p.HR1Y	kahvmsvH	kahvmsvH
SVLY	PR4091	chr7	10006830	094P1	c.C148C	p.H49EY	tekekeivH	tekekeivH
SVTF								
SVTF	CR0699	chr2	17420125	DCAT1	c.C940T	p.L314T	rrsrsstf	rrsrsstf
SVTF	SD1494	chr2	11725930	GR1B1	c.G1058A	p.G1538E	Gpavsfv	Gpavsfv
SVTF	SD4744	chr19	59029194	C27A9	c.G409A	p.G137R	Rpgagsvtf	Rpgagsvtf
SYSG								
SYSG	CR0295	chr10	124396739	DMBT1	c.C4642T	p.P1548S	Pysgctfk	Pysgctfk
SYSG	CR6163	chr5	170321552	RAHEP17	c.C1429T	p.P477S	Pysgvtfd	Pysgvtfd
SYSG	CR6163	chr10	124396739	DMBT1	c.C694T	p.P2156S	Pysgctf	Pysgctf
SYSG	CR6161	chr20	23064942	C093	c.T1888G	p.W630G	naadsysWv	naadsysGv
TAAF								
TAAF	CR0699	chr9	94495705	ROR2	c.G636A	p.M212I	nrtaafM	nrtaafM
TAAF	SD1494	chr20	61528063	DDO1	c.C1874T	p.S625F	apaaataf5	apaaataf5
TAAF	SD1494	chr9	11871244	TAR/M41	c.C508T	p.P189L	vttaafm1P	vttaafm1P
TLKF								
TLKF	SD1494	chr1	36940677	AGBL1	c.G2317A	p.E773K	wvmlkgHE	wvmlkgHE
TLKF	CR4880	chr3	19308112	ATP13A5	c.C287A	p.S59Y	Stklypsk	Stklypsk
TLKF	CR04885	chr4	170954369	ADAT	c.C572T	p.P191L	utklypsv	utklypsv
TORL								
TORL	CR1509	chr3	49662598	BSN	c.C113T	p.S138L	dsrtergr	dsrtergr
TORL	SD0346	chr8	22323474	PPB3CC	c.C57A	p.S19R	ysfpptgr	ysfpptgr
TORL	CR04885	chr3	4476017	TNF501	c.C104T	p.S35L	vtfrqrsi	vtfrqrsi

## 【図20A】

遺伝子名 平均表現量

AADAT		111.43
AAK1		854.00
ACVR2A		257.69
ADAM2		0.00
ADD2		103.07
ADH7		35.97
AGBL1		104.73
ANK3		164.70
ANKRD34C		16.36
ANKRD50		1391.51
ANLN		1316.31
APPB1IP		369.96
APOB		45.58
AQPEP		335.50
ARHGPAP6		142.42
ARID5B		1790.27
ATP13A4		68.88
ATP13A5		48.97
ATP9V0A1		3337.35
AXIN1		1121.68
BCL11A		128.48
BLM		317.51
BSN		71.81
BVES		310.79
C10orf111		11.64
C10orf115		0.00
C10orf152		30.42
C10orf133		568.74
C14orf169		520.01
C20orf42		0.00
C2orf71		24.45
C7orf29		168.21
CACNA1B		80.52
CAPN12		29.03
CASP10		209.01
CCDC64B		145.70
CD163L1		112.19
CD1E		43.83

## 【図19J】

VAIC	CR9699	chr12	35957729	OR252	c.C367T	p.R123C	Rywalcnpl	Cyvalcnpl
VAIC	SD1494	chr1	24575665	OR21T10	c.C385T	p.P129S	vaichshy	vaichshy
VAIC	CR9306	chr14	20389150	DR45K	c.C385T	p.P129S	vaichshy	vaichshy
VAIC	SD6819	chr11	4543021	DR51F2	c.C4061T	p.R138C	fdchvacy	fdchvacy
VEV1	SD1494	chr12	13769447	GRIN2B	c.C1127T	p.P424S	viveswp1	viveswp1
VEV1	CR9306	chr8	123812420	CSDM3	c.G1823A	p.G608R	desvGsvf	desvGsvf
VEV1	SD46744	chr6	106292699	PPA2	c.C644T	p.S235L	desvGsvfS	desvGsvfS
VGSI	SD1494	chr14	77917664	C14orf133	c.C209T	p.S70F	epwgslw	epwgslw
VGSI	CR0095	chr9	153035987	PLXNB3	c.C1969T	p.R657C	Racvyswir	Cacvyswir
VGSI	CR06679	chr12	297817178	TMT1	c.C108CT	p.P344S	wvqgslsiv	wvqgslsiv
VLEP								
VLEP	CR1509	chr2	33759460	NASGP3	c.C1154T	p.S385T	lepepnk	lepepnk
VLEP	SD1494	chr6	29342932	OR12D3	c.G133A	p.V45N	Vnvlwqlpl	Mvnvlwqlpl
VLEP	SD4744	chr2						

## 【図20B】

CD93	1064.01
CDC23	768.52
CDCA7	336.40
CDH26	23.52
CDR2	545.50
CELF4	40.86
CELSR1	1394.02
CERS4	882.04
CHST5	18.71
CLCA2	911.37
CLEC5A	71.69
CLN8	473.46
COL11A1	1821.15
COL21A1	46.50
CPO	15.23
CPT1C	133.77
CR2	1144.47
CROCC	672.58
CSMD1	322.88
CSMD3	101.10
CSNK2A1	1555.32
CST6	715.66
CXorf23	133.04
CYP2C9	0.00
DCAF4	374.38
DDX1	2462.15
DICER1	1233.93
DIDO1	1942.29
DMBT1	197.41
DMGDH	56.59
DNAH8	37.79
EGLAM	208.77
EHD2	1826.37
EIF4G1	11246.04
EMR3	15.78
EPHA7	162.78
ESPNL	55.43
EVX1	26.22
F8	262.78
FAM135B	167.90
FAM161A	178.10
FAM3C	1595.78
FAM4831	0.00
FASN	13421.22
FAT3	156.77
FBP1	204.96
FBX3	475.81

## 【図20C】

FERMT1	162.99
FLT3	43.27
FRAS1	388.32
FSCB	0.00
FSO2	0.00
FUT6	30.16
FZD7	1017.65
GABRA4	195.53
GBX2	44.73
GINS1	381.96
GLB1	1643.12
GLOD4	1371.07
GLRA2	178.97
GLTSCR1	379.81
GP1BA	125.30
GPBAR1	30.70
GPR137B	2631.83
GPR158	261.25
GPR33	0.00
GREB1	1863.39
GRIA3	41.99
GRK1	169.56
GRK4	54.25
GRIN2B	33.82
GUCLY1A2	38.30
HHAT	330.93
HSD17B5	26.93
IARS2	3896.80
IFNA1	0.00
IGFN1	100.98
IGSF10	53.49
INCENP	1142.15
IRAK3	206.35
IRFBP2	3241.75
ITGA3	8376.46
ITGB3	3026.49
JAK1MP3	24.57
JMJD4	762.69
KANK3	83.94
KCNB1	37.24
KCNH6	0.00
KCNT2	41.36
KDR	629.82
KEL	77.69
KIAA1109	1136.49
KIAA1609	407.46
KIAA1841	139.85

## 【図20D】

KIF6	142.75
KL8	27.25
KPRP	1938.99
LCES5A	74.63
LGAL15	0.00
LHX2	121.59
LNGO2	69.01
LPP	219.05
LRRC4C	43.26
LRRC55	51.73
LRRK2	407.38
LTBP4	1753.76
LY75-CD302	0.00
MAGEA12	821.95
MAGEC3	50.55
MCM3AP	2533.18
MGAT5	504.37
MLL16	562.96
MS4A6B	194.28
MST4	167.95
MUC16	68.38
MUC1	53.37
MUM111	216.16
MYH6	23.28
MYO1A	18.51
MYO3A	85.80
NAALAD2	57.31
NCKAP1	3490.43
NCKAPS	165.96
NCKAPS1	1401.73
NCOR2	5198.49
NFE2L2	2775.35
NDP56	3568.72
NPAS4	0.00
NRAP	60.56
NUP214	2006.26
NYAP1	55.52
O35CN	388.46
OR10G7	0.00
OR11G2	0.00
OR11L1	0.00
OR12D3	0.00
OR1C1	0.00
OR2C3	86.18
OR2S2	0.00
OR2T10	0.00
OR4K5	0.00

## 【図20E】

OR51F2	0.00
OR5A1	0.00
OR5B2	0.00
OR5W8	33.98
OREC1	0.00
OR6M1	0.00
OREV1	0.00
OR6Y1	0.00
OR8S1	40.63
OVCH1	15.89
PADI1	59.14
PADI4	29.03
PARP14	2304.96
PCDH15	72.32
PITPNM1	968.15
PKHD1L1	122.73
PLCB1	225.64
PLDN	1467.10
PLXDC2	200.62
PLXNB3	1684.27
FODN	358.43
PPA2	734.41
PPP1R3D	311.16
PPP2R1A	7106.96
PPP3CC	404.09
PREX2	39.11
PRUNE2	796.48
PSKH12	0.00
PTH2	0.00
PTPN13	1014.73
PTPRG	1140.13
RABEP2	516.11
RANBP17	150.79
RASGRP3	276.12
RDL1	276.87
RBMS4	727.77
RECQL5	704.21
RERE	3249.22
RNF17	231.35
RNF207	148.02
ROR2	122.56
RP1	68.86
RUNX2	269.40
SCN10A	21.81
SCN4A	34.67
SCPEP1	1760.51
SC24B	972.42

【図20F】

SERPINB11	36.31
SERPINB3	1423.56
SH3KBP1	2469.86
SH3TC1	812.89
SHISA7	35.45
SIX4	68.59
SLC10A2	0.00
SLC22A9	21.60
SLC27A5	139.95
SLC2A5	230.84
SLC35D3	17.36
SLC8A1	169.62
SLC01C1	55.93
SLC06A1	26.11
SLTRK1	139.93
SMARCA4	4755.57
SNIP1	285.13
SNTG2	0.00
SPHKAP	112.68
SPTBN2	864.10
SSFA2	3427.29
SWI5	411.83
SYNDIG1	43.79
SYNE2	2231.28
TACC2	385.20
TAMM41	180.46
TAS2R4	10.94
TAS2R9	0.00
TBC1D23	738.15
TBC1D4	1742.64
TBC1D8B	176.52
TCN1	784.20
TDRD5	52.31
TEAD4	477.70
TEK	132.25
TET3	615.54
THOC2	1269.42
THSD4	129.76
TIGD4	25.48
TMED1	791.99
TMEM181	1171.25
TMEM57	701.28
TMPPE	59.09
TNTC1	483.47
TNRC6A	1075.38
TRPC4	37.93
TRPS1	336.45

【図20G】

TSGA10P	46.11
TP5EAR	39.10
TTN	149.00
TULP4	1299.44
TXNRD3NB	186.51
U86AA	1558.99
UBN2	512.76
UR61	1812.42
VWCE	36.54
WVDE	48.84
WDR7	543.47
WDR78	45.53
WEE2	0.00
WIRAF53	335.35
XIRP2	102.24
ZDHHC22	52.66
ZNF280D	489.78
ZNF335	661.91
ZNF454	32.23
ZNF501	66.30
ZNF536	226.14
ZNF746	674.59

【図21】

部位ID	サンプル部位	最大寸法(cm)	生検タイプ
CP110G	腎臓転移	2.5	摘除
CR330F	扁平転移	2.7	摘除
CS099C	扁桃転移	0.8	摘除
CS099D	扁桃転移	0.6	摘除
CS099E	扁桃転移	1	摘除
CS099F	乳頭転移	1.5±0.5	摘除
CS099G	門脈リッパ節転移	如ほなし	摘除
CS099H	腎臓転移(腎臓腫瘍)	5	切除
CG133E	腎臓転移	如ほなし	摘除
CG133F	腎臓部転移	2.1	摘除
CG133G	腎臓部転移	1.5	摘除
CG133H	腎臓部転移	0.5±~3	摘除
CG133I	腎臓部リッパ節転移	0.5	切除
CG133J	上腹部転移	6.5	切除
CG133K	腎臓部転移	1.5	切除
CG133L	肝転移	3	切除
CG133M	小腸転移	10	摘除
CG133N	左頸部転移及び乳房転移	12	摘除
NP125E	腎臓転移	14mm	切除
NR578A	腎臓リッパ節	2	摘除
NR578B	腎臓リッパ節	0.2~~2.2	摘除
NR643	頭頸部転移	1.2	摘除
NR643F	頭頸部リッパ節	0.5~~2	摘除
NR643G	頭頸部リッパ節	3.2	摘除
NR643H	頭頸部リッパ節	0.5	摘除
NR643I	乳頭転移	1.5	摘除
NR643J	小腸転移	3.5±0.5	摘除
NR643K	左頭頂部転移	0.5±0.2±0.1	切除
NR643L	リッパバード転移	2.7±0.7	切除
NR643M	皮膚転移	0.6	切除
NR643N	骨頭転移	1.6±0.8±1.1	切除
NR643O	骨頭高むし病転移	2.0±0.1±1.5	切除
NR643P	左腋窩リッパ節	1.8±0.6±0.5	切除
NR643Q	右腋窩リッパ節	2.1±0.3±0.3	切除
NR643R	骨頭高むし病転移	2.2±0.4±1.5	切除
NR643S	骨頭転移	3.5±0.5	切除
NR643T	骨頭高むし病転移	0.6±0.4±0.3	切除
NR643U	右腋窩リッパ節転移	0.3±~1.5	切除
NR643V	左腋窩リッパ節	0.1~~1	切除
NR643W	肺転移	1.1	摘除
NR643X	骨頭転移	0.6	穿孔
NR643Y	左大腸に転移	1.4	切除
NR643Z	頭頸部リッパ節	1	切除
CR010C	左乳頭部転移	0.5	シーリング
CR010D	頭頸部転移	0.5	切除
CR010E	リッパバード	0.5	切除
CR010F	リッパ節	0.5	切除
CR010G	皮膚転移	0.5	切除
CR010H	左頭頂部転移	0.5	切除
CR010I	右頭頂部転移	0.5	切除
CR010J	皮膚転移	0.5	切除
CR010K	左頭頂部転移	0.5	切除
CR010L	右頭頂部転移	0.5	切除
CR010M	皮膚転移	0.5	切除
CR010N	左頭頂部転移	0.5	切除
CR010O	右頭頂部転移	0.5	切除
CR010P	皮膚転移	0.5	切除
CR010Q	頭頸部リッパ節転移	2.2±0.7±2.2	切除
CR010R	脳花管脳膜腫転移	3.1±1.2±1.2	切除
CR010S	脳花管脳膜腫転移	2.1±2.0±0.9	切除
CR010T	脳花管脳膜腫転移	3.3±0.5±1.5	切除
CR010U	脳花管脳膜腫転移	3.1±1.2±0.8	切除
CR010V	脳花管脳膜腫転移	3.0±0.5±0.4	穿孔
CR010W	肝転移	1.0±5	切除
CR010X	小腸転移(乳頭転移)	2.8±0.5	切除
CR010Y	リッパバード	0.5~~1.5	切除
CR010Z	左腋窩リッパ節転移	2.7±2.7±2	切除
CR010A	公衆高むし病転移	3.1±3.1±3	切除
CR010B	小腸高むし病	0.0~~1.1	切除
CR010C	左腋窩高むし病	0.5~~1.7	切除
CR010D	皮膚(胸壁)転移	5.2±0.5±0.7	切除

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月2日(2016.9.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017504324000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/072125
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68 (2015.01) CPC - C12Q 1/6886 (2015.07) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/395; A61P 35/00; C12Q1/68 (2015.01) CPC - C07K 16/18, 16/30; C12Q 1/68, 1/6883, 1/6886; G01N 33/6878, 2800/52 (2015.07)  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C07K 16/18, 16/30; C12Q 1/68, 1/6883, 1/6886; G01N 33/6878, 2800/52 (2015.07) (keyword delimited) USPC - 424/ 184.1, 185.1, 277.1		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, Proquest, PubMed Search terms used:cancer mutation neoepitope tetramer immune checkpoint modulator anti-CTLA-4 anti-PD-1 anti-PD-L1 anti-GITR anti-OX40 anti-LAG-3 anti-KIR anti-TIM-3 anti-CD28 anti-CD40 anti-CD137 ipilimumab		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0293637 A1 (HACOHEN et al) 01 December 2011 (01.12.2011) entire document	1-15,19-44
A	VAN ROOIJ et al. "Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma," J Clin Oncol. 16 September 2013 (16.09.2013), Vol. 31, Pgs. e439-e442, entire document	1-15,19-44
A	US 2013/0122027 A1 (TAINSKY et al) 16 May 2013 (16.05.2013) entire document	1-15,19-44
A	ALEXANDROV et al. "Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer," Cell Rep. 10 January 2013 (10.01.2013), Vol. 3, Pgs. 1-24 [Original Pgs. 246-259]. entire document	1-15,19-44
A	MATSUSHITA et al. "Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting," Nature. 08 February 2012 (08.02.2012), Vol. 462, Pgs. 1-17 [Original Pgs. 400-404]. entire document	1-15,19-44
A	SEGAL et al. "Epitope landscape in breast and colorectal cancer," Cancer Res. 01 February 2008 (01.02.2008), Vol. 68, Pgs. 889-892. entire document	1-15,19-44
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 21 August 2015	Date of mailing of the international search report 11 SEP 2015	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/072125

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

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

## a. (means)

- on paper  
 in electronic form

## b. (time)

- in the international application as filed  
 together with the international application in electronic form  
 subsequently to this Authority for the purposes of search.

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

## 3. Additional comments:

SEQ ID NOs:1 and 16 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2014/072125

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

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

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: 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:

see Extra Sheet(s).

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-15 and 19-44 restricted to a neopeptope comprising a tetramer, wherein the tetramer is SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:16.
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/072125

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-44 are drawn to a methods of treating a subject with an immune checkpoint modulator comprising detecting a somatic mutation.

The first Invention of Group I+ is restricted to methods of treating a subject with an immune checkpoint modulator comprising detecting a somatic mutation, wherein the somatic mutation comprises a neopeptide comprising a tetramer, wherein the tetramer is a sequence selected to be AARA (SEQ ID NO:1 (first to appear in Table 1). It is believed that claims 1-15 and 19-44 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on a tetramer selected to be AARA (SEQ ID NO: 1).

Applicant is invited to elect additional tetramers and their corresponding SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be methods of treating a subject with an immune checkpoint modulator comprising detecting a somatic mutation, wherein the somatic mutation comprises a neopeptide comprising a tetramer, wherein the tetramer is a sequence selected to be AALN (SEQ ID NO: 2). Additional tetramers and their corresponding SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The Inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for the neopeptide tetramer, "wherein the somatic mutation comprises a neopeptide comprising a tetramer from Table 1."

The Groups I+ share the technical features of a method comprising steps of: detecting a somatic mutation in a cancer sample from a subject; and identifying the subject as a candidate for treatment with an immune checkpoint modulator; and identifying the subject as a poor candidate for treatment with an immune checkpoint modulator; determining a subject has a cancer comprising a somatic mutation, wherein the somatic mutation comprises a neopeptide comprising a tetramer and selecting for the subject a cancer treatment comprising an immune checkpoint modulator, a method of treating a subject with an immune checkpoint modulator wherein the subject has previously been identified to have a cancer with one or more somatic mutations, wherein the one or more somatic mutations comprises a neopeptide recognized by a T cell; a method of improving efficacy of cancer therapy with an immune checkpoint modulator, the method comprising a step of: selecting for receipt of the therapy a subject identified as having a cancer with one or more somatic mutations comprising a neopeptide recognized by a T cell; a method of treating cancer by administering immune checkpoint modulator therapy, the improvement that comprises: administering the therapy to a subject identified as having a cancer with one or more somatic mutations comprising a neopeptide recognized by a T cell; a method of treating a cancer selected from the group consisting of carcinoma, sarcoma, myeloma, leukemia, or lymphoma, the method comprising a step of: administering immune checkpoint modulator therapy to a subject identified as having a cancer with one or more somatic mutations comprising a neopeptide recognized by a T cell; and a method of defining a response signature for an immune checkpoint modulator therapy, the method comprising steps of: comparing genetic sequence information from a first plurality of tumor samples, which first plurality contains samples that share a common response feature to immune checkpoint modulator therapy, with that obtained from a second plurality of tumor samples, which second plurality contains samples that do not share the common response feature but are otherwise comparable to those of the first set, so that the comparison-defined genetic sequence elements whose presence is associated or correlates with the common response feature; and determining which of the defined genetic sequence elements generate a neopeptide; and defining as a signature for the common response feature presence of the neopeptide. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically US 2011/0293637 A1 to Hacohen et al. discloses a method (a method of identifying tumor specific neoantigens, Abstract) comprising steps of: detecting a somatic mutation in a cancer sample from a subject (we observe that the total number of nonsilent gene alterations in CLL ranged from 17-155 per individual, the majority of which were somatically altered point mutations, Para. [0038]; sequencing of tumor versus matched germline samples from each patient, Para. [0050]); and identifying the subject as a candidate for treatment with an immune checkpoint modulator (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]; the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]); and identifying the subject as a poor candidate for treatment with an immune checkpoint modulator (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]; the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]); determining a subject has a cancer comprising a somatic mutation (We observe that the total number of nonsilent gene alterations in CLL ranged from 17-155 per individual, the majority of which were somatically altered point mutations, Para. [0038]; sequencing of tumor versus matched germline samples from each patient, Para. [0050]), wherein the somatic mutation comprises a neopeptide comprising a tetramer (We observe that the total number of nonsilent gene alterations in CLL ranged from 17-155 per individual, the majority of which were somatically altered point mutations, Para. [0038]; sequencing of tumor versus matched germline samples from each patient, Para. [0050]; mutated proteins generate neopeptides that are present only in tumor cells and provide the greatest level of specificity, Para. [0034]; cells were also tetramer+, Para. [0045]) and selecting for the subject a cancer treatment comprising an immune checkpoint modulator (We observe that the total number of nonsilent gene alterations in CLL ranged from 17-155 per individual, the majority of which were somatically altered

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/072125

point mutations; Para. [0038]; sequencing of tumor versus matched germline samples from each patient, Para. [0050]; For example, the subject is further administered an anti-CTLA antibody, Para. [0139]), a method of treating a subject with an immune checkpoint modulator wherein the subject has previously been identified to have a cancer with one or more somatic mutations (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]; the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]; For example, the subject is further administered an anti-CTLA antibody, Para. [0139]), wherein the one or more somatic mutations comprises a neoepitope recognized by a T cell (mutated proteins generate neoepitopes that are present only in tumor cells and provide the greatest level of specificity, Para. [0034]; cells were also tetramer+, Para. [0045]; The peptide may be any suitable peptide that gives rise to an appropriate T-cell response, Para. [0131]); a method of improving efficacy of cancer therapy with an immune checkpoint modulator (can be used to treat chronic tumors in patients that do not respond to other conventional forms of therapy, Para. [0163]), the method comprising a step of: selecting for receipt of the therapy a subject identified as having a cancer with one or more somatic mutations comprising a neoepitope recognized by a T cell (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]); the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]; For example, the subject is further administered an anti-CTLA antibody, Para. [0139]; The peptide may be any suitable peptide that gives rise to an appropriate T-cell response, Para. [0131]); a method of treating cancer by administering immune checkpoint modulator therapy (a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]; For example, the subject is further administered an anti-CTLA antibody, Para. [0139]), the improvement that comprises: administering the therapy to a subject identified as having a cancer with one or more somatic mutations comprising a neoepitope recognized by a T cell (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]); the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]; For example, the subject is further administered an anti-CTLA antibody, Para. [0139]; The peptide may be any suitable peptide that gives rise to an appropriate T-cell response, Para. [0131]); a method of treating a cancer selected from the group consisting of carcinoma, sarcoma, myeloma, leukemia, or lymphoma (including acute myelogenous leukemia, Para. [0135]), the method comprising a step of: administering immune checkpoint modulator therapy to a subject identified as having a cancer with one or more somatic mutations comprising a neoepitope recognized by a T cell (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]); the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]; For example, the subject is further administered an anti-CTLA antibody, Para. [0139]; The peptide may be any suitable peptide that gives rise to an appropriate T-cell response, Para. [0131]); and a method of defining a response signature for an immune checkpoint modulator therapy (a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]; We observe that the total number of nonsilent gene alterations in CLL ranged from 17-155 per individual, the majority of which were somatically altered point mutations, Para. [0038]; sequencing of tumor versus matched germline samples from each patient, Para. [0050]), the method comprising steps of: comparing genetic sequence information from a first plurality of tumor samples, which first plurality contains samples that share a common response feature to immune checkpoint modulator therapy (generate a set of candidate T cell epitopes that may bind patient HLA alleles and are based on non-silent mutations present in tumors, Para. [0050]); the invention provides a method of vaccinating or treating a subject by identifying a plurality of tumor specific mutations in the genome of a subject, Para. [0052]), with that obtained from a second plurality of tumor samples, which second plurality contains samples that do not share the common response feature but are otherwise comparable to those of the first set (these mutations are present in the genome of cancer cells of a subject having cancer but not in normal tissue from the subject, Para. [0072]; To detect tumor-specific mutations (that are not present in normal tissues), samples were collected from tumors and from normal tissues of each patient, Para. [0178]), so that the comparison defines genetic sequence elements whose presence is associated or correlates with the common response feature (We considered the 20 most common mutations that evolve in patients with resistance to imatinib, and predicted the binding of 9- and 10-mer peptides tiled around each mutation, Para. [0185]); and determining which of the defined genetic sequence elements generate a neoepitope (Finally, mutated proteins generate neoepitopes that are present only in tumor cells and provide the greatest level of specificity, Para. [0034]; monitoring of the natural immune response of cancer patients to these identified neoepitopes; (3) determining whether cytotoxic T cells that recognize these peptides in the context of patient HLA, Para. [0054]); and defining as a signature for the common response feature presence of the neoepitope (We considered the 20 most common mutations that evolve in patients with resistance to imatinib, and predicted the binding of 9- and 10-mer peptides tiled around each mutation, Para. [0185]; This strategy addresses several fundamental questions related to how the immune system of cancer patients interacts with tumor neoepitopes, Para. [0054]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	A 6 1 P 35/02	
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74) 代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一  
 (74) 代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
 (74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
 (74) 代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
 (74) 代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
 (74) 代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
 (74) 代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘  
 (74) 代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥  
 (72) 発明者 チャン ティモシー  
アメリカ合衆国 10065 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1275  
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内  
 (72) 発明者 ウォルチョク ジェッド  
アメリカ合衆国 10065 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1275  
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内  
 (72) 発明者 スナイダー チャレン アレキサンドラ  
アメリカ合衆国 10065 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1275  
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内  
 (72) 発明者 マカロフ ウラディミール  
アメリカ合衆国 10065 ニューヨーク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー 1275  
メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター内

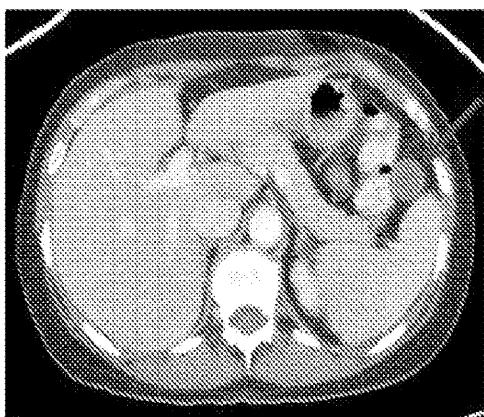
F ターム(参考) 2G045 AA26

4B063 QA13 QA17 QA19 QQ03 QQ42 QR08 QR42 QR50 QR57 QR62  
QS16 QS25 QX01  
4C084 AA17 NA14 ZB262 ZB272  
4C085 AA13 AA14 BB01 CC22 CC23 EE01

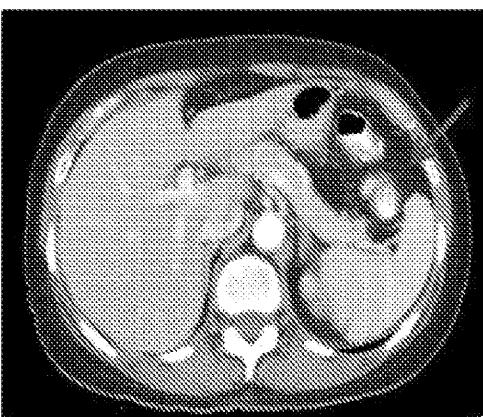
【要約の続き】

治療前

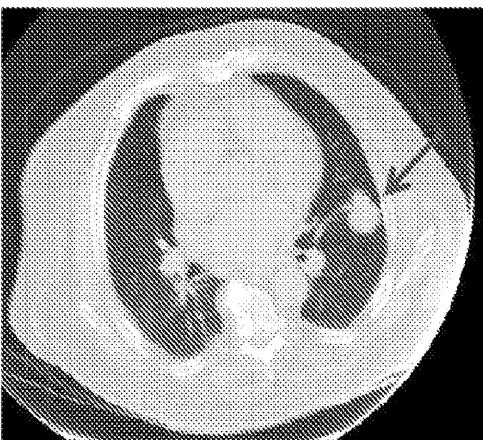
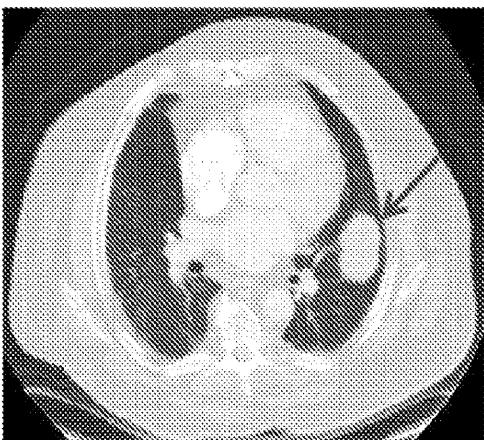
A



治療後



B



C

