(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6484558号
(P6484558)

(45)発行日　平成31年3月13日(2019.3.13)　(24)登録日　平成31年2月22日(2019.2.22)

(51)Int.Cl.　　F I
A61K 39/00 (2006.01)　　A61K 39/00 ZNAH
A61K 31/7088 (2006.01)　　A61K 31/7088
A61P 35/00 (2006.01)　　A61P 35/00

請求項の数 8　(全 97 頁)

(21)出願番号　特願2015-544376(P2015-544376)
(86)(22)出願日　平成25年11月26日(2013.11.26)
(65)公表番号　特表2016-501870(P2016-501870A)
(43)公表日　平成28年1月21日(2016.1.21)
(86)国際出願番号　PCT/EP2013/003559
(87)国際公開番号　WO2014/082729
(87)国際公開日　平成26年6月5日(2014.6.5)
審査請求日　平成28年11月18日(2016.11.18)
(31)優先権主張番号　12008007.2
(32)優先日　平成24年11月28日(2012.11.28)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者　515145032
バイオエヌテック　エールエヌアー　ファーマシューティカルズ　ゲーエムベーハー
ＢＩＯＮＴＥＣＨ　ＲＮＡ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ　ＧＭＢＨ
ドイツ連邦共和国　５５１３１　マインツ　アン　デア　ゴルトグルーベ　１２
An der Goldgrube 12 55131 Mainz Germany

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌ワクチンの組み合せ物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者においてメラノーマを予防するまたは処置するための癌ワクチンの組み合せ物であって、
当該癌ワクチンの組み合せ物は、
（ｉ）前記患者において１つ以上の共通腫瘍抗原に対する第一免疫応答を誘導するためのワクチンであって、前記第一免疫応答が、前記患者の癌細胞中に存在する癌特異的体細胞突然変異に特異的ではなく、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を含み、前記第一免疫応答を誘導するためのワクチンは、共通腫瘍抗原の組み合わせもしくは共通腫瘍抗原の組み合わせの１つ以上のＴ細胞エピトープを含むペプチドもしくはポリペプチド、または前記ペプチドもしくは前記ポリペプチドをコードする核酸を含み、前記組み合わせは、ＤＣＴ（アイソフォーム１）と、ＴＹＲと、ＴＰＴＥとを含む、第一免疫応答を誘導するためのワクチン、および
（ｉｉ）前記患者において１つ以上の腫瘍抗原に対する第二免疫応答を誘導するためのワクチンであって、前記第二免疫応答が、前記患者の癌細胞のエクソーム中に存在する非同義癌特異的体細胞突然変異に特異的であり、ＣＤ４＋細胞応答を含み、前記第二免疫応答を誘導するためのワクチンは、５つ以上の突然変異に基づくネオエピトープを含むポリペプチドまたは前記ポリペプチドをコードする核酸を含む、第二免疫応答を誘導するためのワクチン、
を含む、癌ワクチンの組み合せ物。

【請求項２】
前記患者が前記１つ以上の共通腫瘍抗原について陽性である、請求項１に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【請求項３】
前記突然変異に基づくネオエピトープを含むポリペプチドが、３０までの突然変異に基づくネオエピトープを含む、請求項１または２に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【請求項４】
前記ポリペプチドが、癌細胞によって発現される癌特異的体細胞突然変異を含まないエピトープをさらに含む、請求項３に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【請求項５】
前記エピトープが、ワクチン配列を形成するように、天然に存在するタンパク質でも前記エピトープに隣接するアミノ酸配列に隣接し、前記ワクチン配列が３０アミノ酸長である、請求項３または４に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【請求項６】
前記ネオエピトープ、エピトープおよび／またはワクチン配列が、頭－尾方向に並んでいるおよび／またはリンカーによって分離されている、請求項３から５のいずれか一項に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【請求項７】
前記第一免疫応答を誘導するためのワクチンおよび／または前記第二免疫応答を誘導するためのワクチンが、ＲＮＡワクチンである、請求項１から６のいずれか一項に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【請求項８】
前記腫瘍抗原が腫瘍関連抗原である、請求項１から７のいずれか一項に記載の使用のための癌ワクチンの組み合せ物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、腫瘍抗原、特に共通腫瘍抗原の個別発現パターン、および個別の腫瘍突然変異を標的とする患者特異的腫瘍治療に関する。
【背景技術】
【０００２】
癌は、すべての死亡の４件に１件を占める、主要な死亡原因である。癌の治療は伝統的に平均の法則、すなわち最大数の患者に最もよく効くものに基づいてきた。しかし、癌における分子多様性のために、認可されている治療法から恩恵を受けるのはしばしば治療された個人の２５％未満である。患者に特化した治療に基づく個別化医療は、医薬品開発の革新のための低い有効性と高いコストに対する潜在的な解決策とみなされている。
【０００３】
抗原特異的免疫療法は、患者における特異的免疫応答を増強または誘導することを目的とし、癌疾患を抑制するために成功裏に使用されてきた。Ｔ細胞は、ヒトおよび動物での細胞媒介性免疫において中心的役割を果たす。特定の抗原の認識および結合は、Ｔ細胞の表面に発現されるＴ細胞受容体（ＴＣＲ）によって媒介される。Ｔ細胞のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子に結合し、標的細胞の表面に提示された免疫原性ペプチド（エピトープ）と相互作用することができる。ＴＣＲの特異的結合は、Ｔ細胞内でシグナルカスケードを始動させ、増殖および成熟エフェクターＴ細胞への分化をもたらす。
【０００４】
ますます多くの病原体関連抗原および腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）が同定されることにより、免疫療法のための適切な標的の幅広いコレクションがもたらされた。これらの抗原に由来する免疫原性ペプチド（エピトープ）を提示する細胞は、能動または受動免疫戦略のい

ずれかによって特異的に標的化することができる。能動免疫は、病的細胞を特異的に認識し、死滅させることができる抗原特異的Ｔ細胞を患者において誘導し、増殖させる傾向があり得る。種々の抗原形式を腫瘍ワクチン接種のために使用することができ、これには全癌細胞、タンパク質、ペプチドまたは患者への導入後にＤＣをパルスすることによってインビボまたはインビトロで直接適用することができるＲＮＡ、ＤＮＡもしくはウイルスベクターなどの免疫ベクターが含まれる。

【０００５】

癌は、ゲノム突然変異および後成的変化の蓄積から生じると考えられ、その一部が原因としての役割を果たし得る。腫瘍関連抗原に加えて、ヒト癌は平均して１００～１２０の非同義突然変異を担持し、その多くはワクチンによって標的可能である。腫瘍における突然変異の９５％以上は固有であり、患者特異的である（Ｗｅｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．２００８：Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３１，１８０－１８８）。腫瘍特異的Ｔ細胞エピトープを生じさせ得る、タンパク質を変化させる体細胞突然変異の数は３０～４００の範囲内である。患者１人当たり４０～６０の腫瘍特異的体細胞突然変異に由来するＨＬＡクラスＩ拘束エピトープが存在することがコンピュータで予測されている（Ａｚｕｍａ　ｅｔ　ａｌ．１９９３：Ｎａｔｕｒｅ　３６６，７６－７９）。さらに、新たな免疫原性ＨＬＡクラスＩＩ拘束エピトープも腫瘍関連突然変異からもたらされる可能性が高いが、これらの数は未だ不明である。

【０００６】

特に、一部の非同義突然変異は悪性形質転換に原因として関与し、発癌表現型を維持するのに不可欠であり（ドライバー突然変異）、癌細胞の潜在的な「アキレス腱」であり得る。原発性腫瘍で認められる突然変異は転移においても存在し得る。しかし、いくつかの試験は、患者の転移性腫瘍は個々の腫瘍進化の間にしばしば臨床的に意味のあるさらなる遺伝的変異を獲得することを実証した（Ｓｕｚｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．２００７：Ｍｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１（２），１７２－１８０：Ｃａｍｐｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１０：Ｎａｔｕｒｅ　４６７（７３１９），１１０９－１１１３）。さらに、多くの転移の分子特性も原発性腫瘍のものから有意に逸脱する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｗｅｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．２００８：Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３１，１８０－１８８

【非特許文献２】Ａｚｕｍａ　ｅｔ　ａｌ．１９９３：Ｎａｔｕｒｅ　３６６，７６－７９

【非特許文献３】Ｓｕｚｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．２００７：Ｍｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１（２），１７２－１８０

【非特許文献４】Ｃａｍｐｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１０：Ｎａｔｕｒｅ　４６７（７３１９），１１０９－１１１３

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

腫瘍の不均一性は、現在利用可能な治療法の効果にとって大きな障害物であると考えられる。本発明の基礎となる技術的な課題は、腫瘍の不均一性に関連する既存のアプローチの障害物を克服する極めて有効な癌ワクチン接種戦略を提供することである。

【０００９】

本発明は、個人の疾患遺伝学を統合し、腫瘍学においてカスタマイズされた治療法を創製するという個別化された治療概念に関する。ヒト癌は様々な免疫原性共通腫瘍抗原を発現し、数ダースから数百の非同義突然変異を担持しており、その多くはＴ細胞によって標的可能である。これらは中枢性免疫寛容を受けないので、これらの突然変異はワクチン開発のための理想的な候補物である。本発明は、腫瘍抗原の個別発現パターンおよび個別腫

瘍突然変異を標的とする、個別化ワクチン、特にＲＮＡワクチンを使用する。本発明の概念は、遺伝的腫瘍変化に妨げられるのではなく、患者のために遺伝的腫瘍変化を利用するのである。

【００１０】

標的化のために多くの患者における共通の分子学的分母を探索する代わりに、本発明は各個別患者の抗原標的レパートリーを利用する。平均のために設計された治療を提供することによる相殺取引を受け入れるのではなく、本発明は各々個々の患者にとって最良の組合せを提供する。これは単なるパラダイムシフトではなく、幅広い個体間の変動性および腫瘍内のクローン不均一性などの現在の癌薬剤開発における重要な問題を解決する新しい可能性を開く。本発明は、患者における抗原レパートリーの最適な利用を可能にする。

【００１１】

具体的には、本願は、非変異腫瘍抗原および変異腫瘍抗原の両方を含む、各個別癌患者において認められる個別腫瘍抗原レパートリー全体の多重特異的標的化に関する。非変異腫瘍抗原を標的化するには、大きな割合の患者をカバーする腫瘍抗原標的ポートフォリオ（倉庫）を用いることができる。この倉庫は、「在庫」の製造前ワクチンのためおよびこれらを個々の患者における使用のためにワクチンカクテルと組み合わせるための薬剤保管場所である。ミュータノーム解析に基づいて作られたワクチンと合わせると、これは患者における抗原レパートリーの最適な利用を可能にする。

【００１２】

本発明は、患者特異的な癌突然変異の同定および患者の個々の癌突然変異の「シグネチャー」を標的化することを含む。患者の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子に提示されるアミノ酸変化をもたらす非同義点突然変異の同定は、患者の癌に特異的であるが患者の正常細胞中では認められない新規エピトープ（ネオエピトープ）を提供する。血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの癌細胞から突然変異のセットを収集することにより、遺伝的に異なるサブ集団ならびに腫瘍転移を含む場合でも潜在的に原発性腫瘍を標的とする免疫応答を誘導するワクチンの提供が可能となる。ワクチン接種のために、本願に従って同定されるそのようなネオエピトープは、好ましくは前記ネオエピトープを含むポリペプチドの形態で患者に提供され、適切なプロセシングとＭＨＣ分子による提示後、適切なＴ細胞を刺激するためにネオエピトープが患者の免疫系に表示される。

【００１３】

好ましくは、本発明によれば、免疫応答が誘導されるべき１つ以上の免疫原性エピトープを含む免疫原性遺伝子産物、例えばペプチドまたはポリペプチドをコードするＲＮＡを投与することにより、免疫応答が患者において誘導される。そのような免疫原性遺伝子産物は、免疫応答が誘導されるべき腫瘍抗原全体を含み得るか、またはＴ細胞エピトープなどのその一部分を含み得る。インビトロ転写ＲＮＡ（ＩＶＴ－ＲＮＡ）を種々の免疫化経路によって患者に直接注入する戦略は、様々な動物モデルにおいて試験され、成功を収めている。ＲＮＡはトランスフェクト細胞において翻訳され得、発現産物はプロセシング後に細胞の表面のＭＨＣ分子に提示されて免疫応答を誘発し得る。

【００１４】

ＲＮＡを一種の可逆的遺伝子療法として用いることの利点には、一過性の発現および形質転換しないという特性が含まれる。ＲＮＡは、発現されるために核内に入る必要がなく、さらに宿主ゲノムに取り込まれることができないため、それにより発現の危険性が排除される。ＲＮＡで達成可能なトランスフェクション率は比較的高い。さらに、達成されるタンパク質の量は生理的発現におけるものに対応する。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

本発明は、共通腫瘍抗原などの腫瘍抗原の個別発現パターンを標的とする癌ワクチンを投与すること、および個別腫瘍突然変異を標的とする癌ワクチンを投与することにより、癌患者において効率的で特異的な免疫応答を誘導するための方法に関する。好ましくは、本発明に従って患者に投与される癌ワクチンは、患者の腫瘍に特異的な、ＭＨＣによって

提示されるエピトープが由来する抗原（共通腫瘍抗原および患者特異的突然変異を有する抗原）を発現する細胞に対するＴ細胞を刺激する、プライムするおよび／または増殖させるのに適した、患者の腫瘍に特異的なＭＨＣ提示エピトープを提供する。したがって、本明細書で述べるワクチンは、好ましくはクラスＩ　ＭＨＣによる１つ以上の癌発現抗原の提示を特徴とする癌疾患に対する細胞性応答、好ましくは細胞傷害性Ｔ細胞活性を誘導するまたは促進することができる。本発明に従って投与されるワクチンはまた、癌特異的突然変異を標的とするので、患者の腫瘍に特異的である。

【００１６】

１つの態様では、本発明は、患者において癌を予防するまたは治療するための方法であって、

（ｉ）患者において１つ以上の腫瘍抗原に対する第一免疫応答を誘導する工程、および

（ｉｉ）患者において１つ以上の腫瘍抗原に対する第二免疫応答を誘導する工程であって、前記第二免疫応答が、患者の癌細胞中に存在する癌特異的体細胞突然変異に特異的である工程、を含む方法に関する。

【００１７】

（ｉ）第一免疫応答を誘導する工程および（ｉｉ）第二免疫応答を誘導する工程は、同時にまたは連続的に実施し得る。前記工程を連続的に実施する場合、工程（ｉｉ）は、好ましくは工程（ｉ）の後に実施する。工程（ｉ）と（ｉｉ）を同時に実施する場合は、第一免疫応答を誘導するためのワクチンを、好ましくは第二免疫応答を誘導するためのワクチンの投与と同時に投与する。工程（ｉ）と（ｉｉ）を連続的に実施する場合は、第一免疫応答を誘導するためのワクチンを、好ましくは第二免疫応答を誘導するためのワクチンの投与の前に投与する。

【００１８】

１つの実施形態では、第一および／または第二免疫応答は、１つ以上の適切なワクチン、特にＲＮＡワクチンを投与することによって誘導される。１つの実施形態では、腫瘍抗原は腫瘍関連抗原である。

【００１９】

１つの実施形態では、第一および／または第二免疫応答は細胞性応答である。１つの実施形態では、第一免疫応答はＣＤ８＋Ｔ細胞応答を含む。１つの実施形態では、第二免疫応答はＣＤ４＋Ｔ細胞応答を含む。

【００２０】

１つの実施形態では、第一免疫応答は、患者の癌細胞中に存在する腫瘍抗原発現パターン（すなわち腫瘍抗原のコレクション）に特異的である。この実施形態では、第一免疫応答は、好ましくは患者の癌細胞中で発現される腫瘍抗原のコレクションに対する免疫応答を含む。１つの実施形態では、第一免疫応答は、患者の癌細胞中に存在する癌特異的体細胞突然変異に特異的ではない。１つの実施形態では、第一免疫応答は、共通腫瘍抗原である１つ以上の腫瘍抗原に対して誘導される。１つの実施形態では、第一免疫応答を誘導するためのワクチンは、癌患者の大部分の癌細胞において発現される腫瘍抗原に特異的な免疫応答を誘導し、前記癌患者は、本発明に従って治療される癌などの同じ型の癌または異なる型の癌を有する。本発明によれば、第一免疫応答は、共通腫瘍抗原またはそのエピトープなどの腫瘍抗原のコレクションを患者に提供することによって誘導され得、前記エピトープは、これらのエピトープを含有するポリエピトープポリペプチド（本明細書では多価ポリペプチドとも称される）の形態で提供され得る。前記抗原またはエピトープは、好ましくは前記抗原またはエピトープをコードする核酸、特にＲＮＡを投与することによって患者に提供される。適切なプロセシングとＭＨＣ分子による提示後、適切なＴ細胞を刺激するためにエピトープが患者の免疫系に表示される。

【００２１】

エピトープは、ワクチン配列の形態でポリエピトープポリペプチド中に存在し得る、すなわち、例えば天然に存在するタンパク質中でも前記エピトープに隣接（ｆｌａｎｋ）するアミノ酸配列に隣接した、それらの天然配列状況に存在し得る。そのようなフランキン

グ配列は、各々５個以上、１０個以上、１５個以上、２０個以上、および好ましくは５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのアミノ酸を含んでよく、Ｎ末端および／またはＣ末端でエピトープ配列に隣接し得る。したがって、ワクチン配列は、２０個以上、２５個以上、３０個以上、３５個以上、４０個以上、および好ましくは５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのアミノ酸を含み得る。１つの実施形態では、エピトープおよび／またはワクチン配列はポリペプチド中で頭部から尾部の方向に並んでいる。１つの実施形態では、エピトープおよび／またはワクチン配列はリンカーによって分離されている。そのようなリンカーは以下でさらに説明する。第一免疫応答を誘導するために、好ましくは患者の個別腫瘍抗原発現パターンを決定せずに投与される製造前ポリエピトープポリペプチドを使用しようとする場合、ポリエピトープポリペプチドは、実験データに基づき、患者の癌細胞によって発現される１つ以上の腫瘍抗原を標的とする免疫応答を誘導する可能性が最も高いエピトープを含むことが好ましい。これは、同じおよび／または異なる型の腫瘍試料の最大数を標的とするように選択したポリエピトープポリペプチド中にエピトープを含めることによって達成できる。しかし、エピトープの数はできるだけ少なく抑えることが望ましい。このために、３つの異なる腫瘍抗原だけの特定のセットが、分析するメラノーマ転移患者試料の８８％をカバーするのに十分であることを実施例で明らかにする。言い換えると、メラノーマ転移患者の８８％は、３つの異なる腫瘍抗原だけの前記特定セットの中の少なくとも１つの抗原を発現する。したがって、前記３つの異なる腫瘍抗原の各々からの少なくとも１つのエピトープをポリエピトープポリペプチドに含めることにより、メラノーマ転移患者の８８％において第一免疫応答が誘導されると予想される。これらの抗原のコレクションは、ポリエピトープポリペプチド中のエピトープの数をできるだけ少なく抑えつつ、必ずしも最大数の腫瘍患者をカバーするように補完的である必要はないので、ポリエピトープポリペプチドは必ずしも最大割合の腫瘍患者において共有される抗原からのエピトープを含まなくてもよいことが理解されるべきである。むしろ、そのようなセットのエピトープは、ポリエピトープポリペプチド中のエピトープの数をできるだけ少なく抑えつつ、（ｉ）最大割合の腫瘍患者によって共有される抗原および（ｉｉ）最大数の腫瘍患者をカバーする抗原に関して最適化される。

【００２２】

１つの実施形態では、第一免疫応答を誘導するためのワクチン生成物は、（ｉ）各々のペプチドもしくはポリペプチドが１つ以上の腫瘍抗原を含む、１つ以上のペプチドもしくはポリペプチド、（ｉｉ）各々のペプチドもしくはポリペプチドが１つ以上の腫瘍抗原の１つ以上のＴ細胞エピトープを含む、１つ以上のペプチドもしくはポリペプチド、または（ｉｉｉ）（ｉ）もしくは（ｉｉ）に含まれる１つ以上のペプチドもしくはポリペプチドをコードする核酸、好ましくはＲＮＡを含有する。１つの実施形態では、免疫のために使用されるポリペプチドは３０までのエピトープを含む。１つの実施形態では、エピトープは、ワクチン配列を形成するようにそれらの天然配列状況に存在する。１つの実施形態では、ワクチン配列は約３０アミノ酸長である。１つの実施形態では、エピトープおよび／またはワクチン配列は、頭部から尾部の方向に並んでいる。１つの実施形態では、エピトープおよび／またはワクチン配列はリンカーによって分離されている。

【００２３】

１つの実施形態では、第一免疫応答を誘導するために投与されるワクチン生成物は、治療される癌において一般的であるおよび／または種々の癌において一般的である腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する。好ましくは、第一免疫応答の誘導に関与する腫瘍抗原は共通腫瘍抗原である。１つの実施形態では、患者は、第一免疫応答が誘導される１つ以上の腫瘍抗原について陽性である。１つの実施形態では、患者は、第一免疫応答が誘導されるすべての腫瘍抗原について陽性である。本発明によれば、「患者は腫瘍抗原について陽性である」という用語は、患者の癌細胞が腫瘍抗原を発現することを意味する。

【００２４】

１つの実施形態では、第一免疫応答は、製造前ワクチン生成物、特に腫瘍抗原またはＴ

細胞エピトープなどのその免疫原性フラグメントを含むペプチドまたはポリペプチドをコードするＲＮＡを含むセットから選択される１つ以上のワクチン生成物を投与することによって誘導され、各々の製造前ワクチン生成物は腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する。１つの実施形態では、セットは、少なくとも３つの腫瘍抗原、少なくとも５つの腫瘍抗原、少なくとも８つの腫瘍抗原、少なくとも１０の腫瘍抗原、少なくとも１５の腫瘍抗原、少なくとも２０の腫瘍抗原、少なくとも２５の腫瘍抗原、少なくとも３０の腫瘍抗原、またはさらにそれ以上のような種々の腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導するワクチン生成物を含む。

【００２５】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異は患者の癌細胞のエクソーム中に存在する。１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異は非同義突然変異である。１つの実施形態では、癌細胞は血中循環腫瘍細胞である。１つの実施形態では、第二免疫応答は、突然変異に基づくネオエピトープを含むポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードする核酸、好ましくはＲＮＡを含有するワクチンを投与することによって誘導される。１つの実施形態では、ポリペプチドは３０個までの突然変異に基づくネオエピトープを含む。１つの実施形態では、ポリペプチドは、癌細胞によって発現される癌特異的体細胞突然変異を含まないエピトープをさらに含む。１つの実施形態では、エピトープは、ワクチン配列を形成するようにそれらの天然配列状況に存在する。１つの実施形態では、ワクチン配列は約３０アミノ酸長である。１つの実施形態では、ネオエピトープ、エピトープおよび／またはワクチン配列は、頭部から尾部の方向に並んでいる。１つの実施形態では、ネオエピトープ、エピトープおよび／またはワクチン配列はリンカーによって分離されている。

【００２６】

本発明によれば、第一免疫応答を誘導するためのワクチンは、

（ａ）癌患者の腫瘍標本中で発現される腫瘍抗原、特に共通腫瘍抗原を同定する工程；および

（ｂ）好ましくは、各々の製造前ワクチン生成物が好ましくは共通腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する、製造前ワクチン生成物を含むセットからワクチン生成物を選択することによって、工程（ａ）で得られた腫瘍抗原プロフィール、特に共通腫瘍抗原プロフィールを特徴とするワクチンを提供する工程、を含む方法によって提供され得る。

【００２７】

本発明によれば、「共通腫瘍抗原」という用語は、癌の大部分、例えば同じ型の癌の大部分、例えば本発明に従って治療される癌型の大部分によって、および／または異なる型の癌の大部分によって発現される腫瘍抗原に関する。したがって、「共通腫瘍抗原」という用語は、同じ癌型および／または異なる癌型を有する種々の患者の大部分によって共有される腫瘍抗原に関する。好ましくは、そのような腫瘍抗原は、少なくとも１つの免疫原性Ｔ細胞エピトープを担持する腫瘍抗原である。「大部分」という用語は、好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、特に少なくとも９５％を意味する。そのような共通腫瘍抗原を標的とすることにより、癌患者の大部分に適用できる、限られた数のワクチン生成物を使用することが本発明に従って可能である。本発明によれば「同じ型の癌」という用語は、同じ器官または組織の癌のような同じ医学的分類の癌に関する。さらに、本発明によれば「異なる型の癌」という用語は、異なる器官または組織の癌のような異なる医学的分類の癌に関する。

【００２８】

本発明によれば、「腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する」とは、好ましくは、患者に投与した場合、共通腫瘍抗原などの腫瘍抗原に対する免疫応答、または共通腫瘍抗原などの腫瘍抗原を発現するおよび／もしくは提示する癌細胞などの細胞に対する免疫応答、好ましくはＴ細胞応答を誘導する能力に関する。したがって、共通腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導するためのワクチンは、（ｉ）共通腫瘍抗原を含むペプチドもしくはポリペプチ

ド、または（ｉｉ）共通腫瘍抗原の１つ以上のＴ細胞エピトープを含むペプチドもしくはポリペプチドを含有し得る。１つの特に好ましい実施形態では、本発明による共通腫瘍抗原を含むペプチドもしくはポリペプチド、または（ｉｉ）本発明による共通腫瘍抗原の１つ以上のＴ細胞エピトープを含むペプチドもしくはポリペプチドは、抗原提示細胞などの患者の細胞において発現されて、前記ペプチドまたはポリペプチドを生成し得る核酸、好ましくはインビトロ転写ＲＮＡまたは合成ＲＮＡなどのＲＮＡの形態で患者に投与される。

【００２９】

本発明によれば、第一免疫応答を誘導するためのワクチンは、好ましくは、供給前ＲＮＡワクチン倉庫などの供給前ワクチン倉庫から選択される。このアプローチは、本明細書では「在庫」とも称される。そのような供給前ワクチン倉庫は、各々の製造前ワクチン生成物が共通腫瘍抗原などの腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する、製造前ワクチン生成物を含むセットに関する。本発明によれば、そのような倉庫は、好ましくは、同じ型の癌を有する癌患者の大部分および／または異なる型の癌を有する癌患者の大部分に適用できるように設計された限られた数のワクチン生成物を含む。したがって、本発明に従って使用されるワクチン倉庫は、好ましくは癌患者の大部分に適用できるワクチン生成物のセットを含む。例えば、一般的な腫瘍抗原のセットが特定の癌型に関して公知である場合、セット中のワクチン生成物が前記の一般的な腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する、ワクチン生成物のセットを含むそのような供給前ワクチン倉庫を作製することが可能である。そのようなワクチン倉庫は患者の大部分に適用できるように選択されるので、治療される特定の患者の癌細胞において発現される１つ以上の腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導し、したがって、治療される患者のために特に設計されたさらなるワクチン生成物を提供することを必要とせずにそれぞれの患者の腫瘍抗原プロフィールを標的とする、１つ以上のワクチン生成物を前記供給前ワクチン倉庫から選択することが可能である。そのような選択は、患者を腫瘍抗原発現に関して試験し、次に患者の癌細胞によって発現される前記腫瘍抗原を標的とする供給前ワクチン倉庫から適切なワクチン生成物を選択することによって実施できる。そのような選択は、患者の腫瘍のトランスクリプトーム／ペプチドーム解析に基づいて行うことができる。例えば、適格患者からの腫瘍試料を腫瘍抗原シグネチャーに関して分析することができる。共通腫瘍抗原プロフィールは、定量的マルチプレックスＲＴ－ＰＣＲおよびＩＨＣによって決定することができ、それぞれのワクチン生成物を倉庫から選択することができる。治療される特定の患者の癌細胞において発現される１つ以上の腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導し、したがって、それぞれの患者の腫瘍抗原プロフィールを標的とする、１つ以上のワクチン生成物を前記供給前ワクチン倉庫から選択することは、実験データに基づき患者の癌細胞によって発現される１つ以上の腫瘍抗原を標的とする可能性が最も高い供給前ワクチン倉庫からワクチン生成物を無作為に選択することによっても実施できる。

【００３０】

本発明によれば、製造前ワクチン生成物のセットは、腫瘍試料のカバー範囲およびそれらの腫瘍抗原発現パターンに関して最適化される。特に、前記セットは、セット中のワクチン生成物の数をできるだけ少なく抑えつつ、同じおよび／または異なる型の腫瘍試料の最大数を標的とするように選択されたワクチン生成物を含む。このために、３つの異なる腫瘍抗原だけの特定のセットが、分析するメラノーマ転移患者試料の８８％をカバーするのに十分であることを実施例で明らかにする。言い換えると、メラノーマ転移患者の８８％は、３つの異なる腫瘍抗原だけの前記特定セットの中の少なくとも１つの抗原を発現する。これらの抗原のコレクションは、倉庫中のワクチン生成物の数をできるだけ少なく抑えつつ、必ずしも最大数の腫瘍患者をカバーするように補完的である必要はないので、そのようなセットは必ずしも最大割合の腫瘍患者において共有される抗原を含まなくてもよいことが理解されるべきである。むしろ、ワクチン生成物のそのようなセットは、好ましくは、倉庫中のワクチン生成物の数をできるだけ少なく抑えつつ、（ｉ）最大割合の腫瘍患者によって共有される抗原および（ｉｉ）最大数の腫瘍患者をカバーする抗原に関して

最適化される。

【００３１】

１つの実施形態では、腫瘍抗原、好ましくは共通腫瘍抗原のワクチン倉庫は、特定の腫瘍型を有する患者の少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも９０％、特に少なくとも９５％を標的とするのに適する。

【００３２】

本発明によれば、「腫瘍抗原プロフィール」という用語は、患者の癌細胞中に存在する腫瘍抗原のコレクション、すなわち患者の１つ以上の癌細胞中に存在する（すなわち発現され、好ましくは提示された）共通腫瘍抗原などのすべての腫瘍抗原または患者の１つ以上の癌細胞中に存在する腫瘍抗原の一部分を指す。好ましくは、そのような腫瘍抗原プロフィールまたは腫瘍抗原のコレクションは、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、および好ましくは３０個まで、２０個までまたは１５個までの腫瘍抗原を含む。したがって、本発明は、患者の１つ以上の癌細胞中に存在するすべての共通腫瘍抗原の同定を含み得るか、または患者の１つ以上の癌細胞中に存在する共通腫瘍抗原の一部分だけの同定を含み得る。一般に、共通腫瘍抗原の数は、ワクチンによって標的とされる十分な数の共通腫瘍抗原を提供する癌患者の腫瘍標本中で同定され得る。

【００３３】

第一免疫応答を誘導するためのワクチンは、患者に投与された場合、好ましくは、共通腫瘍抗原などの腫瘍抗原のコレクション、例えば２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、および好ましくは３０個まで、２０個までまたは１５個までの腫瘍抗原のコレクションからのＭＨＣ提示エピトープのコレクションを提供する。患者の細胞、特に抗原提示細胞によるこれらのエピトープの提示は、好ましくは、ＭＨＣに結合した場合エピトープを標的とする、したがって、ＭＨＣ提示エピトープが由来する抗原を発現し、腫瘍細胞の表面に同じエピトープを提示する患者の腫瘍、好ましくは原発性腫瘍ならびに腫瘍転移を標的とするＴ細胞を生じさせる。

【００３４】

本発明によれば、第二免疫応答を誘導するためのワクチンは、

（ａ）癌患者の腫瘍標本中で癌特異的体細胞突然変異を同定し、患者の癌突然変異シグネチャーを提供する工程；および

（ｂ）工程（ａ）で得られた癌突然変異シグネチャーを特徴とするワクチンを提供する工程、を含む方法によって提供され得る。

【００３５】

１つの実施形態では、本発明の方法は、

ｉ）癌患者からの腫瘍標本および、好ましくは癌患者に由来する、非腫瘍形成性標本を提供する工程；

ｉｉ）腫瘍標本のゲノム、エクソームおよび／またはトランスクリプトームと非腫瘍形成性標本のゲノム、エクソームおよび／またはトランスクリプトームとの間の配列相違を同定する工程；

ｉｉｉ）工程（ｉｉ）で決定された配列相違を組み込んだエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを設計する工程；

ｉｖ）工程（ｉｉｉ）で設計されたペプチドもしくはポリペプチドまたは前記ペプチドもしくはポリペプチドをコードする核酸、好ましくはＲＮＡを提供する工程；ならびに

ｖ）工程（ｉｖ）で提供されたペプチドまたはポリペプチドまたは核酸を含有するワクチンを提供する工程、を含み得る。

【００３６】

本発明によれば、腫瘍標本は、腫瘍または癌細胞を含むまたは含むと予想される患者に由来する身体試料などの任意の試料に関する。身体試料は、血液、原発性腫瘍からもしくは腫瘍転移から得られた組織試料、または腫瘍もしくは癌細胞を含む任意の他の試料など

の任意の組織試料であり得る。好ましくは、身体試料は血液であり、癌特異的体細胞突然変異または配列相違は、血液中に含まれる１つ以上の血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）において決定される。別の実施形態では、腫瘍標本は、血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの１つ以上の単離された腫瘍もしくは癌細胞、または血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの１つ以上の単離された腫瘍もしくは癌細胞を含む試料に関する。

【００３７】

非腫瘍形成性標本は、患者または、好ましくは患者と同じ種の別の個体、好ましくは腫瘍もしくは癌細胞を含まないもしくは含まないと予想される健常個体に由来する身体試料などの任意の試料に関する。身体試料は、血液または非腫瘍形成性組織からの試料などの任意の組織試料であり得る。

【００３８】

本発明によれば、「癌突然変異シグネチャー」という用語は、患者の１つ以上の癌細胞中に存在するすべての癌突然変異を表し得るか、または患者の１つ以上の癌細胞中に存在する癌突然変異の一部分だけを表し得る。したがって、本発明は、患者の１つ以上の癌細胞中に存在するすべての癌特異的突然変異の同定を含み得るか、または患者の１つ以上の癌細胞中に存在する癌特異的突然変異の一部分だけの同定を含み得る。一般に、本発明は、ワクチンに含めるのに十分な数のネオエピトープを提供する多くの突然変異の同定を提供する。「癌突然変異」は、癌細胞中に含まれる核酸と正常細胞中に含まれる核酸との間の配列相違に関する。

【００３９】

好ましくは、本発明に従って同定される突然変異は、非同義突然変異、好ましくは腫瘍または癌細胞中で発現されるタンパク質の非同義突然変異である。

【００４０】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異または配列相違は、腫瘍標本のゲノム、好ましくはゲノム全体において決定される。したがって、本発明は、１つ以上の癌細胞のゲノム、好ましくはゲノム全体の癌突然変異シグネチャーを同定することを含み得る。１つの実施形態では、癌患者の腫瘍標本中の癌特異的体細胞突然変異を同定する工程は、全ゲノム癌突然変異プロフィールを同定することを含む。

【００４１】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異または配列相違は、腫瘍標本のエクソーム、好ましくはエクソーム全体において決定される。エクソームは、発現される遺伝子のコード部分であるエクソンによって形成される生物のゲノムの一部である。エクソームは、タンパク質および他の機能的遺伝子産物の合成において使用される遺伝的青写真を提供する。これはゲノムの機能的に最も重要な部分であり、それゆえ、生物の表現型に寄与する可能性が最も高い。ヒトゲノムのエクソームは全ゲノムの１．５％を占めると推定されている（Ｎｇ，ＰＣ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｇｅｎ．，４（８）：１－１５，２００８）。したがって、本発明は、１つ以上の癌細胞のエクソーム、好ましくはエクソーム全体の癌突然変異シグネチャーを同定することを含み得る。１つの実施形態では、癌患者の腫瘍標本中の癌特異的体細胞突然変異を同定する工程は、全エクソーム癌突然変異プロフィールを同定することを含む。

【００４２】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異または配列相違は、腫瘍標本のトランスクリプトーム、好ましくはトランスクリプトーム全体において決定される。トランスクリプトームは、１個の細胞または細胞集団において産生されるｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡおよび他の非コードＲＮＡを含む、すべてのＲＮＡ分子のセットである。本発明に関連して、トランスクリプトームは、特定の時点で所与の個体の１個の細胞、細胞集団、好ましくは癌細胞集団、またはすべての細胞において産生されるすべてのＲＮＡ分子のセットを意味する。したがって、本発明は、１つ以上の癌細胞のトランスクリプトーム、好ましくはトランスクリプトーム全体の癌突然変異シグネチャーを同定することを含み得る。１つの実施形態では、癌患者の腫瘍標本中の癌特異的体細胞突然変異を同定する工程は、全

トランスクリプトーム癌突然変異プロフィールを同定することを含む。

【００４３】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異を同定するまたは配列相違を同定する工程は、１個以上、好ましくは２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個またはさらにそれ以上の癌細胞の単一細胞シークエンシングを含む。したがって、本発明は、前記１つ以上の癌細胞の癌突然変異シグネチャーを同定することを含み得る。１つの実施形態では、癌細胞は血中循環腫瘍細胞である。血中循環腫瘍細胞などの癌細胞は、単一細胞シークエンシングの前に単離し得る。

【００４４】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異を同定するまたは配列相違を同定する工程は、次世代シークエンシング（ＮＧＳ）を用いることを含む。

【００４５】

１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異を同定するまたは配列相違を同定する工程は、腫瘍標本のゲノムＤＮＡおよび／またはＲＮＡをシークエンシングすることを含む。

【００４６】

癌特異的体細胞突然変異または配列相違を明らかにするため、腫瘍標本から得られた配列情報を、好ましくは、患者または異なる個体のいずれかから入手し得る生殖系列細胞などの正常な非癌性細胞のＤＮＡまたはＲＮＡなどの核酸をシークエンシングすることから得られる配列情報などの参照と比較する。１つの実施形態では、正常なゲノム生殖系列ＤＮＡは末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から得られる。

【００４７】

第二免疫応答を誘導するためのワクチンは、患者に投与された場合、好ましくは、同定された突然変異または配列相違に基づく配列変化を組み込んだ、ＭＨＣによって提示されるエピトープのコレクション、例えば２個以上、５個以上、１０個以上、１５個以上、２０個以上、２５個以上、３０個以上、および好ましくは６０個まで、５５個まで、５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのＭＨＣ提示エピトープのコレクションを提供する。そのような同定された突然変異または配列相違に基づく配列変化を組み込んだＭＨＣ提示エピトープは、本明細書では「ネオエピトープ」とも称される。患者の細胞、特に抗原提示細胞によるこれらのエピトープの提示は、好ましくは、ＭＨＣに結合した場合エピトープを標的とする、したがって、ＭＨＣ提示エピトープが由来する抗原を発現し、腫瘍細胞の表面に同じエピトープを提示する患者の腫瘍、好ましくは原発性腫瘍ならびに腫瘍転移を標的とするＴ細胞を生じさせる。

【００４８】

第二免疫応答を誘導するためのワクチンを提供するために、本発明は、十分な数のネオエピトープ（好ましくはコード核酸の形態）をワクチン中に恣意的に組み込むことを含み得るか、または癌ワクチン接種のためのエピトープ中の同定された突然変異の有用性を決定するさらなる工程を含み得る。したがってこのさらなる工程は、以下の１つ以上を含み得る：（ｉ）配列変化が公知のまたは予測されるＭＨＣ提示エピトープ中に位置するかどうかを評価すること、（ｉｉ）配列変化がＭＨＣ提示エピトープ中に位置するかどうかをインビトロおよび／またはインシリコで試験すること、例えば配列変化がＭＨＣ提示エピトープへとプロセシングされるおよび／またはＭＨＣ提示エピトープとして提示されるペプチド配列の一部であるかどうかを試験すること、ならびに（ｉｉｉ）想定される突然変異エピトープが、特にそれらの天然配列状況で存在する場合、例えば天然に存在するタンパク質中でも前記エピトープに隣接するアミノ酸配列に隣接している場合、および抗原提示細胞中で発現された場合、所望の特異性を有する患者のＴ細胞を刺激することができるかどうかをインビトロで試験すること。そのようなフランキング配列は、各々３個以上、５個以上、１０個以上、１５個以上、２０個以上、および好ましくは５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのアミノ酸を含んでよく、Ｎ末端および

／またはＣ末端でエピトープ配列に隣接し得る。
【００４９】
本発明に従って決定される突然変異または配列相違は、癌ワクチン接種のためのエピトープとしてのそれらの有用性に関して順位付けし得る。したがって、１つの態様では、本発明は、同定された突然変異を、提供されるそれぞれのワクチンにおけるそれらの有用性に関して分析し、選択する手動またはコンピュータに基づく分析処理を提供する。好ましい実施形態では、前記分析処理はコンピュータアルゴリズムに基づく処理である。
【００５０】
好ましくは、前記分析処理は、以下の工程：
－例えば転写産物を分析することによって、発現されたタンパク質改変突然変異を同定する工程；
－潜在的に免疫原性である突然変異を同定する、すなわち得られたデータを、確認されている免疫原性エピトープの利用可能なデータセット、例えばｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｍｕｎｏｅｐｉｔｏｐｅ．ｏｒｇのＩＭＭＵＮＥ　ＥＰＩＴＯＰＥ　ＤＡＴＡＢＡＳＥ　ＡＮＤ　ＡＮＡＬＹＳＩＳ　ＲＥＳＯＵＲＣＥなどの公共免疫エピトープデータベースに含まれるものと比較することによって同定する工程；
の１つ以上、好ましくは全部を含む。
【００５１】
潜在的に免疫原性である突然変異を同定する工程は、ＭＨＣ結合能力、好ましくはＭＨＣクラスＩ結合能力の予測に従ってエピトープを決定するおよび／または順位付けることを含み得る。
【００５２】
別の実施形態では、エピトープは、タンパク質影響、関連遺伝子発現、配列固有性、予測される提示可能性、および癌遺伝子との関連などのさらなるパラメータを用いることによって選択するおよび／または順位付けることができる。
【００５３】
複数のＣＴＣ分析も、突然変異の選択と優先順位付けを可能にする。例えば、より大きな割合のＣＴＣにおいて認められる突然変異は、より少ない割合のＣＴＣで認められる突然変異よりも高く優先順位付けられ得る。
【００５４】
同定され、第二免疫応答を誘導するためのワクチンによって提供される、突然変異に基づくネオエピトープのコレクションは、好ましくは前記ネオエピトープを含むポリペプチド（ポリエピトープポリペプチド）または前記ポリペプチドをコードする核酸、特にＲＮＡの形態で存在する。さらに、ネオエピトープは、例えば天然に存在するタンパク質中でも前記エピトープに隣接するアミノ酸配列に隣接した、ワクチン配列の形態でポリペプチド中に存在し得る、すなわちそれらの天然配列状況で存在し得る。そのようなフランキング配列は、各々５個以上、１０個以上、１５個以上、２０個以上、および好ましくは５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのアミノ酸を含んでよく、Ｎ末端および／またはＣ末端でエピトープ配列に隣接し得る。したがって、ワクチン配列は、２０個以上、２５個以上、３０個以上、３５個以上、４０個以上、および好ましくは５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのアミノ酸を含み得る。１つの実施形態では、ネオエピトープおよび／またはワクチン配列は、ポリペプチド中で頭部から尾部の方向に並んでいる。
【００５５】
１つの実施形態では、ネオエピトープおよび／またはワクチン配列は、リンカー、特に中性リンカーによって分離されている。本発明による「リンカー」という用語は、エピトープまたはワクチン配列などの２つのペプチドドメインの間に、前記ペプチドドメインを連結するために付加されたペプチドに関する。リンカー配列に関して特に制限はない。しかし、リンカー配列は、２つのペプチドドメイン間の立体障害を低減し、良好に翻訳され、エピトープのプロセシングを支持するまたは許容することが好ましい。さらに、リンカ

ーは、免疫原性配列要素を全く有さないかまたはわずかしか有さないべきである。リンカーは、好ましくは、望ましくない免疫反応を生じさせ得る、近接ネオエピトープ間の接合部縫合から生じるもののような非内因性ネオエピトープを生成するべきではない。それゆえ、ポリエピトープワクチンは、好ましくは、望ましくないＭＨＣ結合性接合エピトープの数を低減することができるリンカー配列を含むべきである。Ｈｏｙｔ　ｅｔ　ａｌ．（ＥＭＢＯ　Ｊ．２５（８），１７２０－９，２００６）およびＺｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７９（１０），８６３５－４１，２００４）は、グリシンリッチ配列がプロテアソームプロセシングを低下させ、したがってグリシンリッチリンカー配列の使用は、プロテアソームによってプロセシングされ得るリンカーに含まれるペプチドの数を最小限に抑えるように働くことを示した。さらに、グリシンは、ＭＨＣ結合溝位置で強力な結合を阻害することが観察された（Ａｂａｓｔａｄｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１（７），３５６９－７５，１９９３）。Ｓｃｈｌｅｓｓｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，６１（１），１１５－２６，２００５）は、アミノ酸配列中に含まれるアミノ酸グリシンおよびセリンが、より効率的に翻訳され、プロテアソームによってプロセシングされて、コードされるネオエピトープへのより良好なアクセスを可能にする、より柔軟性のあるタンパク質をもたらすことを見出した。リンカーは、各々３個以上、６個以上、９個以上、１０個以上、１５個以上、２０個以上、および好ましくは５０個まで、４５個まで、４０個まで、３５個までまたは３０個までのアミノ酸を含み得る。好ましくは、リンカーはグリシンおよび／またはセリンアミノ酸が富化されている。好ましくは、リンカーのアミノ酸の少なくとも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％、または少なくとも９５％はグリシンおよび／またはセリンである。１つの好ましい実施形態では、リンカーは実質的にアミノ酸グリシンおよびセリンから成る。１つの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列$(GGS)_a(GSS)_b(GGG)_c(SSG)_d(GSG)_e$を含み、ここでａ、ｂ、ｃ、ｄおよびｅは、独立して０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０から選択される数であり、ａ＋ｂ＋ｃ＋ｄ＋ｅは０ではなく、好ましくは２以上、３以上、４以上または５以上である。１つの実施形態では、リンカーは、配列ＧＧＳＧＧＧＧＳＧなどの実施例に記載するリンカー配列を含む、本明細書で述べる配列を含む。

【００５６】

別の実施形態では、同定され、第二免疫応答を誘導するためのワクチンによって提供される、突然変異に基づくネオエピトープのコレクションは、好ましくは、各々が、重複することもできる１つ以上のネオエピトープを含む、種々のペプチド上の前記ネオエピトープを含むペプチドのコレクション、または前記ペプチドをコードする核酸、特にＲＮＡのコレクションの形態で存在する。

【００５７】

第二免疫応答を誘導するためのワクチンの投与は、ＭＨＣ提示エピトープが由来する抗原を発現する細胞に対してＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞応答を誘発することができる、ＭＨＣクラスＩＩ提示エピトープを提供し得る。あるいはまたは加えて、第二免疫応答を誘導するためのワクチンの投与は、ＭＨＣ提示エピトープが由来する抗原を発現する細胞に対してＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘発することができる、ＭＨＣクラスＩ提示エピトープを提供し得る。さらに、第二免疫応答を誘導するためのワクチンの投与は、１つ以上のネオエピトープ（公知のネオエピトープおよび本発明に従って同定されるネオエピトープを含む）、ならびに癌特異的体細胞突然変異を含まないが、癌細胞によって発現され、好ましくは癌細胞に対する免疫応答、好ましくは癌特異的免疫応答を誘導する１つ以上のエピトープを提供し得る。１つの実施形態では、第二免疫応答を誘導するためのワクチンの投与は、ＭＨＣクラスＩＩ提示エピトープであるおよび／またはＭＨＣ提示エピトープが由来する抗原を発現する細胞に対してＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞応答を誘発することができるネオエピトープ、ならびにＭＨＣクラスＩ提示エピトープであるおよび／またはＭＨＣ提示エピトープが由来する抗原を発現する細胞に対してＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘発することができる

、癌特異的体細胞突然変異を含まないエピトープを提供する。１つの実施形態では、癌特異的体細胞突然変異を含まないエピトープは腫瘍抗原に由来する。１つの実施形態では、ネオエピトープおよび癌特異的体細胞突然変異を含まないエピトープは、癌の治療において相乗効果を有する。好ましくは、第二免疫応答を誘導するためのワクチンは、細胞傷害性応答および／またはヘルパーＴ細胞応答のポリエピトープ刺激のために有用である。

【００５８】

１つの特に好ましい実施形態では、本発明によるポリエピトープポリペプチドなどのワクチン接種のためのペプチドまたはタンパク質を、ペプチドまたはタンパク質を生成させるために抗原提示細胞などの患者の細胞中で発現させ得る核酸、好ましくはインビトロ転写ＲＮＡまたは合成ＲＮＡなどのＲＮＡの形態で患者に投与する。本発明はまた、本発明の目的上「ポリエピトープポリペプチド」という用語に包含される１つ以上のマルチエピトープポリペプチドを、好ましくは１つ以上のポリペプチドを生成させるために抗原提示細胞などの患者の細胞中で発現させ得る核酸の形態で、好ましくはインビトロ転写ＲＮＡまたは合成ＲＮＡなどのＲＮＡの形態で投与することも想定する。２つ以上のマルチエピトープポリペプチドを投与する場合、異なるマルチエピトープポリペプチドによって提供されるネオエピトープは、異なっていてもよくまたは部分的に重複していてもよい。ひとたび抗原提示細胞などの患者の細胞中に存在すると、ペプチドまたはタンパク質はプロセシングされて、ネオエピトープなどの免疫原性エピトープを生成する。

【００５９】

本発明の特に好ましい態様は、（ｉ）それぞれの患者の共通腫瘍抗原プロフィールを標的とする供給前ＲＮＡ倉庫からの「在庫」ＲＮＡを含有するインビトロ転写ポリヌクレオチドＲＮＡワクチンカクテルおよび（ｉｉ）患者特異的突然変異に由来するネオエピトープをコードする、要求に応じて作製されるＲＮＡワクチンを含む。

【００６０】

本明細書で述べるワクチンは、医薬的に許容される担体を含んでよく、場合により１つ以上のアジュバント、安定剤等を含んでもよい。ワクチンは、治療ワクチンまたは予防ワクチンの形態であり得る。

【００６１】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で述べる治療の方法において使用するため、特に癌の治療または予防において使用するための本明細書で述べるワクチンを提供する。

【００６２】

本明細書で述べる癌の治療は、外科的切除および／または放射線および／または伝統的な化学療法と組み合わせることができる。

【００６３】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００６４】

【図１】図１上：バルク腫瘍試料中の起こり得る免疫原性体細胞突然変異を発見し、優先順位付ける工程。図１下：Ｂ１６およびＢｌａｃｋ６系に適用される工程。

【図２】図２：Ｋｉｆ１８ｂにおける実証された突然変異の例。　サンガーシークエンシングによって確認された、ＮＧＳエクソームシークエンシングによりＫｉｆ１８ｂ遺伝子中で同定された突然変異。野生型細胞では、配列はＴ／Ｔである。腫瘍細胞では、この配列はＴ／Ｇの混合物である。

【図３】図３：突然変異配列に対する免疫反応性。　マウス（ｎ＝５）を突然変異ペプチド配列（１００μｇ＋ＰｏｌｙＩ：Ｃ　５０μｇ；ｓ．ｃ．）で２回（０日目、７日目）免疫した。１２日目にマウスを犠死させ、脾細胞を採取した。５×１０^{5}脾細胞／ウェルをエフェクターとし、ペプチドを負荷した（２μｇ／ｍｌを３７℃および５％CO_2で２時間）５×１０^{4}骨髄樹状細胞を標的細胞として使用してＩＦＮγ　ＥＬＩＳｐｏｔを実施した。エフェクター脾細胞を突然変異ペプチド、野生型ペプチドおよびコントロールペ

プチド（水疱性口内炎ウイルスヌクレオタンパク質、ＶＳＶ－ＮＰ、アミノ酸５２－５９）に対して試験した。すべてのマウスについてＶＳＶ－ＮＰに対するバックグラウンドスポットを差し引いた、測定された平均スポット数を示す（白い丸：野生型ペプチドで免疫したマウス；黒い四角：突然変異ペプチドで免疫したマウス）。データを各々のマウスについて示し、平均±ＳＥＭで表している。

【図４】図４：新たに同定された突然変異ペプチド配列でワクチン接種したマウスについての生存上の恩恵。　Ｂ１６Ｆ１０細胞（７．５×１０^{4}）を０日目に皮下的に接種した。マウスにペプチド３０（Ｊｅｒｉｎｉ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｂｅｒｌｉｎ）；ペプチド１００μｇ＋ＰｏｌｙＩ：Ｃ　５０μｇ　ｓ．ｃ．（Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ））を－４日目、＋２日目、＋９日目にワクチン接種した。コントロール群にはＰｏｌｙ　Ｉ：Ｃ（５０μｇ　ｓ．ｃ．）だけを与えた。腫瘍成長を＋１６日目まで観測し、ログランク（マンテル・コックス）検定で＊、ｐ＜０．０５であった。

【図５】図５Ａ：安定性および翻訳効率に関して最適化されたＲＮＡによる増強されたタンパク質発現の例（左：ｅＧＦＰ、右：ルシフェラーゼ）。　図５Ｂ：有効な抗原経路に関して最適化されたＲＮＡによる抗原特異的ＣＤ８$^{+}$およびＣＤ４＋Ｔ細胞のポリエピトープ拡大の例（参考文献、Ｋｒｅｉｔｅｒ，Ｋｏｎｒａｄ，Ｓｅｓｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５６：１５７７－１５８７，２００７参照）。　図５Ｃ：単一エピトープ（ＯＶＡ－ＳＩＩＮＦＥＫＬ）をコードするＲＮＡワクチンを使用したＢ１６黒色モデルにおける抗腫瘍効果の前臨床実証の例。ワクチン単独またはアジュバントと組み合わせたワクチンで処置したマウスに関して生存率データを得た。　図５Ｄ：個別化されたポリネオエピトープワクチンの設計。ワクチンビヒクルには、発現の増大および免疫原性の最適化のための機能的要素が組み込まれている。リンカーによって分離された３０個までの突然変異エピトープを、各分子についてそれらの天然配列状況で組み込むことができる。

【図６】図６：構築物の設計。　図６Ａ：ＲＮＡポリエピトープ構築物の概略図。キャップ；キャップ類似体；５'ＵＴＲ：５'非翻訳領域；Ｌ：リンカー；配列１：突然変異アミノ酸を含むペプチドをコードするＲＮＡ配列；３'ＵＴＲ：３'非翻訳配列；ポリＡ：ポリＡ尾部。　図６Ｂ：Ｂ１６Ｆ１０からの突然変異アミノ酸を含む２つのアミノ酸配列をコードするＲＮＡ構築物の配列。開始および終結コドンならびにシグナルペプチドおよびＭＩＴＤ配列は概略図の一部ではなく、"....."の記号で表されている。

【図７】図７：ＲＮＡポリエピトープの機能性。　５×１０^{5}脾細胞／ウェルをエフェクターとし、５×１０^{4}ＢＭＤＣを標的細胞として用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳｐｏｔのデータ。ＢＭＤＣは、ペプチドを負荷するか（２μｇ／ｍｌを３７℃および５％CO_2で２時間）またはエレクトロポレーションによってＲＮＡ（２０μｇ）でトランスフェクトした。コントロールＲＮＡは、ｅＧＦＰ（左のパネル）またはリンカーによって分離された突然変異アミノ酸を含む２つの無関係なペプチドをコードするＲＮＡ構築物であった。データは平均±ＳＥＭで示している。　図７Ａ：突然変異ペプチド３０、野生型ペプチド３０ならびに突然変異３０および３１をコードするＲＮＡについてのデータを示す。　図７Ｂ：突然変異ペプチド１２、野生型ペプチド１２ならびに突然変異１２および３９をコードするＲＮＡについてのデータを示す。　図７Ｃ：図７Ｂに示す読み出しの単一マウスからの代表的なＥＬＩＳｐｏｔスキャンを示す。

【図８】図８：接合エピトープを示すＲＮＡポリネオエピトープワクチンの２つの実施形態　ＲＮＡワクチンは、突然変異をコードするペプチドの間にリンカーを置いて（上）またはリンカーなしで（下）構築することができる。良好なエピトープには、体細胞突然変異（"＊"）を含有し、ＭＨＣ分子に結合するものが含まれる。不良エピトープには、ＭＨＣ分子に結合するが、２つのペプチドのいずれかの一部（下）またはペプチドの一部とリンカー配列（上）を含むエピトープが含まれる。

【図９Ａ】図９：「Ｔ細胞ドラッガブルミュータノーム」の発見および特性付け　図９Ａ：フローチャートは、Ｂ１６Ｆ１０およびＣ５７ＢＬ／６試料から出発するＥＬＩＳＰＯＴ読み出しまでの実験手順の概略を示す。

【図９Ｂ】図９Ｂ：各評価段階についてのヒットの数ならびにＤＮＡ検証および免疫原性試験のための突然変異の選択の工程を示す。検証および免疫原性試験のために選択した突然変異は、免疫原性であり、遺伝子中でＲＰＫＭ＞１０で発現されると予測されたものであった。

【図９Ｃ】図９Ｃ：Ｔ細胞ドラッガブルミュータノームをＢ１６Ｆ１０のゲノムにマッピングした。外側から内側への環は以下のサブセット：（１）三つ組すべてに存在する、（２）ＦＤＲ＜０．０５を有する、（３）タンパク質コード領域内に位置する、（４）非同義変化を引き起こす、（５）発現された遺伝子中に局在する、および（６）実証されたセット中にある、を表す。マウス染色体（外側の円）、遺伝子密度（緑色）、遺伝子発現（緑色（低）／黄色／赤色（高））、および体細胞突然変異（橙色）。

【図１０Ａ】図１０：突然変異を表す長い合成ペプチドでのマウスのワクチン接種によってインビボで誘発される免疫応答　図１０Ａ、Ｂ：突然変異コードペプチドでワクチン接種したマウス由来のＴ細胞エフェクターのＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ分析。柱は各群につき５匹のマウスの平均（±ＳＥＭ）を表す。星印は、突然変異ペプチドおよび野生型ペプチドに対する反応性の統計的に有意の差を示す（スチューデントｔ検定；ｐ値＜０．０５）。　図１０Ａ：ワクチン接種したマウスの脾細胞を、ワクチン接種のために使用した突然変異をコードするペプチド、対応する野生型ペプチドおよび無関係なコントロールペプチド（ＶＳＶ－ＮＰ）でトランスフェクトしたＢＭＤＣで再刺激した。

【図１０Ｂ】図１０Ｂ：内因的にプロセシングされた突然変異に対するＴ細胞反応性の分析のために、ワクチン接種したマウスの脾細胞を、コントロールＲＮＡ（ｅＧＦＰ）または指示されている突然変異をコードするＲＮＡでトランスフェクトしたＢＭＤＣで再刺激した。

【図１０Ｃ】図１０Ｃ：突然変異３０（遺伝子Ｋｉｆ１８Ｂ、タンパク質Ｑ６ＰＦＤ６、突然変異ｐ．Ｋ７３９Ｎ）。サンガーシークエンシングトレースおよび突然変異の配列（上）。タンパク質ドメインおよび突然変異の位置（下）。

【図１１】図１１：攻撃的に成長するＢ１６Ｆ１０腫瘍を有するマウスにおける突然変異ペプチドワクチンの抗腫瘍作用。　図１１Ａ：Ｃ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝７）に、7.5×10^{4}　Ｂ１６Ｆ１０細胞をマウスの側腹部に皮下的に接種した。腫瘍接種後３日目および１０日目に、マウスをＭＵＴ３０もしくはＭＵＴ４４ペプチド１００μｇ＋ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）５０μｇまたはアジュバント単独でワクチン接種した。　図１１Ｂ：Ｃ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝５）に、－４日目にＭＵＴ３０ペプチド１００μｇ＋ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）５０μｇの１回の免疫を実施した。０日目に、7.5×10^{4}　Ｂ１６Ｆ１０細胞をマウスの側腹部に皮下的に接種した。ＭＵＴ３０ペプチド（＋ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ））での追加免疫を２日目と９日目に行った。カプラン・マイヤー生存率プロット（左）。腫瘍成長動態（右）。

【図１２】図１２：突然変異をコードするＲＮＡによるワクチン接種はＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞応答をもたらす。　突然変異をコードするＲＮＡでワクチン接種したマウス由来のＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞エフェクター中のＩＦＮ－γに関する細胞内サイトカイン染色分析データ。ＲＮＡは、１つ（モノエピトープ、上の列）、２つ（バイエピトープ、真ん中の列）または１６（ポリエピトープ、下の列）の異なる突然変異をコードしていた。ドットは各群につき３匹のマウスの平均を表す。星印は、突然変異ペプチドおよびコントロールペプチド（ＶＳＶ－ＮＰ）に対する反応性の統計的に有意の差を示す（スチューデントｔ検定；ｐ値＜０．０５）。ＦＡＣＳプロットは、各々の突然変異について最も高いＩＦＮ－γ分泌動物からのエフェクターを示し、Ｔ細胞応答の表現型を指示する。

【図１３】図１３：突然変異をコードするポリエピトープＲＮＡによるワクチン接種はいくつかの突然変異に対するＴ細胞応答をもたらす。　１６の異なる突然変異を含む、突然変異をコードするポリエピトープでワクチン接種したマウス由来のＴ細胞エフェクター中のＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ分析。柱は各群につき３匹のマウスの平均（±ＳＥＭ）を表す。写真は、指示されているペプチドで再刺激した１匹の例示動物からの細胞の三つ組

のウェルを示す。
【図１４】図１４：１個のＲＮＡによってコードされる５つの異なるモデルエピトープによるワクチン接種はコードされるすべてのエピトープに対する免疫応答をもたらす。　図１４Ａ：５つの異なるモデルエピトープ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ、Ｔｒｐ２、ＶＳＶ－ＮＰ、Ｉｎｆ－ＮＰ、ＯＶＡクラスＩＩ）を含む、突然変異をコードするモデルポリエピトープでワクチン接種したマウス由来のＴ細胞エフェクター中のＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ分析。脾細胞を指示されているペプチドで再刺激した。スポットは各群につき５匹のマウスからの三つ組のウェルの平均を表す。　図１４Ｂ：１匹のコントロールマウスおよびモデルポリエピトープで免疫した１匹のマウスの血液リンパ球の五量体染色。Ｉｎｆ－ＮＰ五量体で染色したＣＤ８$^{+}$細胞はＩｎｆ－ＮＰペプチドに特異的である。
【図１５Ａ】図１５：突然変異を誘導するＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞エピトープとの相乗作用でＢ１６Ｆ１０メラノーマへの強力な抗腫瘍作用を誘導することができる　Ｃ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝８）に、１×１０^{5}　Ｂ１６Ｆ１０細胞をマウスの側腹部に皮下的に接種した。腫瘍接種後３、１０および１７日目に、マウスをＭＵＴ３０、Ｔｒｐ２または両方のペプチド１００μｇ＋ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）５０μｇでワクチン接種した。　図１５Ａ：各群の平均腫瘍成長動態を示す。２８日目に、単一処置群および未処置動物と併用群との間の平均値は統計的に異なる（マン・ホイットニー検定、ｐ値＜０．０５）。
【図１５Ｂ】図１５Ｂ：種々の群のカプラン・マイヤー生存率プロット。ＭＵＴ３０およびＭＵＴ３０＋Ｔｒｐ２でワクチン接種したマウスの生存率曲線は統計的に異なる（ログランク検定、ｐ値＝０．００２９）。
【図１６】図１６：Ｂ１６における体細胞突然変異を見出すための工程の概要。　個々の段階に関する数を、１つのｂｌａｃｋ６試料と比較した、１つのＢ１６試料についての一例として示す。「エクソン」は、タンパク質をコードするすべてのＲｅｆＳｅｑ転写産物によって定義されるエクソン座標を指す。
【図１７】図１７：それぞれ個別、２つまたは３つすべてのソフトウェアツールによって見出された、タンパク質をコードするエクソン中の体細胞変異の数を示すベン図。　数はフィルタリング後に計算し、３つすべての試料コンセンサスを表す。
【図１８Ａ】図１８Ａ：見出された一塩基変異の例：３つすべてのＢ１６試料で見出された体細胞突然変異（左）、すべてのＢ１６およびｂｌａｃｋ６試料で見出された非体細胞突然変異（中央）および１つのｂｌａｃｋ６試料でのみ見出された突然変異（右）。
【図１８Ｂ】図１８Ｂ：実証された突然変異を選択したデータセットについての計算されたＦＤＲ分布；分布を平均推定ＲＯＣ曲線として視覚化し、灰色のバーは、均一サンプリング位置での両方の次元の平均についての９５％信頼区間を示す。平均は、すべての可能な１８の組合せについてのＦＤＲの推定ＲＯＣ曲線の分布から得た（本文参照）。
【図１９】図１９Ａ：３つの異なるソフトウェアツールの比較のための推定ＲＯＣ曲線（二つ組、カバレッジ３８ｘ）。　図１９Ｂ：種々の平均シークエンシング深度の比較のための推定ＲＯＣ曲線（ｓａｍｔｏｏｌｓ、複製なし）。３８ｘは実験によって得られたカバレッジを示し、他のカバレッジはこのデータから出発してダウンサンプリングした。
図１９Ｃ：実験複製の作用を視覚化する推定ＲＯＣ曲線（カバレッジ３８ｘ、ｓａｍｔｏｏｌｓ）。　図１９Ｄ：種々のシークエンシングプロトコルについての推定ＲＯＣ曲線（ｓａｍｔｏｏｌｓ、複製なし）。曲線は２×１００ヌクレオチドライブラリの結果を用いて計算した。
【図２０】図２０Ａ：２３９６変異の最終セットからの最適パラメータセットを用いて選択した最も低いＦＤＲを有する１０の実証された突然変異。これらの突然変異のいずれもがｄｂＳＮＰ中には存在しない（バージョン１２８；ゲノムアセンブリｍｍ９）。　図２０Ｂ：データセット中のすべての変異および実証された突然変異について別々にプロットした、所与のＦＤＲカットオフ値に関してＡと同じデータセットで見出された変異の相対量。視覚的明瞭さのために、０～１０％ＦＤＲの値だけを示す。
【図２１】図２１：突然変異をコードするポリエピトープＲＮＡワクチンの抗腫瘍活性。

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝１０）に、１×１０^{5}　Ｂ１６Ｆ１０細胞をマウスの側腹部に皮下的に接種した。腫瘍接種後３、６、１０、１７および２１日目に、マウスを、ポリトープＲＮＡを配合したリポソームＲＮＡトランスフェクション試薬でワクチン接種した。コントロール群にはＲＮＡなしのリポソームを与えた。図は、種々の群のカプラン・マイヤー生存率プロットを示す。生存率曲線は統計的に異なる（ログランク検定、ｐ値＝０．０００８）。

【図２２】図２２：癌治療のための標的としての腫瘍抗原の組合せの選択。　ＤＣＴ、ＴＹＲおよびＴＰＴＥの３つの腫瘍抗原だけの組合せが、分析したメラノーマ転移試料の８８％を示すのに十分である。

【発明を実施するための形態】

【００６５】

本発明を以下で詳細に説明するが、本発明は、本明細書で述べる特定の方法、プロトコルおよび試薬に限定されず、これらは異なり得ることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術および学術用語は、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。

【００６６】

以下において、本発明の要素を説明する。これらの要素を特定の実施形態と共に列挙するが、それらを任意の方法および任意の数で組み合わせて付加的な実施形態を創製し得ることが理解されるべきである。様々に説明される実施例および好ましい実施形態は、本発明を明確に説明される実施形態だけに限定すると解釈されるべきではない。この説明は、明確に説明される実施形態を、多くの開示されるおよび／または好ましい要素と組み合わせた実施形態を裏付け、包含することが理解されるべきである。さらに、本願で述べるすべての要素の任意の順序および組合せが、文脈によって特に指示されない限り、本願の説明によって開示されるとみなされるべきである。例えば、１つの好ましい実施形態においてＲＮＡが１２０ヌクレオチドから成るポリ（Ａ）尾部を含み、別の好ましい実施形態では前記ＲＮＡ分子が５'キャップ類似体を含む場合、好ましい実施形態では、前記ＲＮＡは、１２０ヌクレオチドから成るポリ（Ａ）尾部および５'キャップ類似体を含む。

【００６７】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、"Ａ ｍｕｌｔｉｌｉｎｇｕａｌ ｇｌｏｓｓａｒｙ ｏｆ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｔｅｒｍｓ：（ＩＵＰＡＣ Ｒｅｃｏｍｍｅｎｄａｔｉｏｎｓ）", Ｈ．Ｇ．Ｗ．Ｌｅｕｅｎｂｅｒｇｅｒ，Ｂ．Ｎａｇｅｌ，ａｎｄ Ｈ．Ｋｏｌｂｌ，Ｅｄｓ．，Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ，ＣＨ－４０１０ Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ，（１９９５）に記載されているように定義される。

【００６８】

本発明の実施は、特に指示されない限り、当該分野の文献中で説明される生化学、細胞生物学、免疫学および組換えＤＮＡ技術の従来の方法を用いる（例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２^{ｎｄ} Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ １９８９参照）。

【００６９】

本明細書および以下の特許請求の範囲全体を通して、文脈上特に必要とされない限り、「含む」という語および「含むこと」などの変形は、記述される成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群の包含を意味し、いかなる他の成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群の排除も意味しないが、一部の実施形態では、そのような他の成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群が排除され得る、

すなわち主題が、記述される成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群の包含に存することが理解される。本発明の説明に関連して（特に特許請求の範囲に関連して）使用される「１つの」および「その」という用語および同様の言及は、本明細書で特に指示されない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を含むと解釈されるべきである。本明細書中の数値の範囲の列挙は、単に範囲内に属する各々別々の数値を個別に言及することの簡略化した方法としての役割を果たすことが意図されている。本明細書で特に指示されない限り、各々個別の数値は、本明細書で個別に列挙されるがごとくに本明細書に組み込まれる。

【００７０】

本明細書で述べるすべての方法は、本明細書で特に指示されない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例または例示的な言語（例えば「など」）の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図し、本発明の範囲または特許請求の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、特許請求されていない要素が本発明の実施に必須であると指示するものとして解釈されるべきではない。

【００７１】

いくつかの資料が本明細書の本文全体にわたって引用される。上記または下記で、本明細書において引用される資料の各々は（すべての特許、特許出願、学術出版物、製造者の仕様書、指示書等を含む）、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明を理由にそのような開示に先行する権利を有さないことの承認と解釈されるべきではない。

【００７２】

本明細書で述べるワクチンは、好ましくは組換えワクチンである。

【００７３】

本発明に関連して「組換え」という用語は、「遺伝子操作を通して作製された」ことを意味する。好ましくは、本発明に関連して組換えポリペプチドなどの「組換え実体」は、天然に存在せず、好ましくは天然では組み合わされないアミノ酸配列または核酸配列などの実体の組合せの結果である。例えば、本発明に関連して組換えポリペプチドは、ネオエピトープまたは、例えばペプチド結合もしくは適切なリンカーによって一緒に融合された異なるタンパク質もしくは同じタンパク質の異なる部分に由来するワクチン配列などの、いくつかのアミノ酸配列を含み得る。

【００７４】

本明細書で使用される「天然に存在する」という用語は、ある物体が自然界で見出すことができるという事実を指す。例えば、生物（ウイルスを含む）中に存在し、天然源から単離することができ、実験室内で人の手によって意図的に改変されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在する。

【００７５】

本発明によれば、「ワクチン」という用語は、投与時に、病原体または癌細胞などの異常細胞を認識し、攻撃する免疫応答、特に細胞性免疫応答を誘導する医薬調製物（医薬組成物）または生成物に関する。ワクチンは、疾患の予防または治療のために使用し得る。「個別化癌ワクチン」という用語は特定の癌患者に関し、癌ワクチンが個々の癌患者の必要性または特有の状況に適合されていることを意味する。

【００７６】

「免疫応答」という用語は、抗原に対する統合された身体応答を指し、好ましくは細胞性免疫応答または細胞性ならびに体液性免疫応答を指す。免疫応答は、保護的／防止的／予防的および／または治療的であり得る。

【００７７】

「免疫応答を誘導する」とは、誘導前は特定の抗原に対する免疫応答が存在しなかったことを意味し得るが、誘導前に特定の抗原に対する一定レベルの免疫応答が存在し、誘導後に前記免疫応答が増強されることも意味し得る。したがって、「免疫応答を誘導する」

はまた、「免疫応答を増強する」ことも包含する。好ましくは、被験体において免疫応答を誘導した後、前記被験体は癌疾患などの疾患を発症することから保護される、または免疫応答を誘導することによって疾患状態が改善される。例えば、腫瘍発現抗原に対する免疫応答を、癌疾患を有する患者または癌疾患を発症する危険性がある被験体において誘導し得る。この場合免疫応答を誘導することは、被験体の疾患状態が改善されること、被験体が転移を発症しないこと、または癌疾患を発症する危険性がある被験体が癌疾患を発症しないことを意味し得る。

【００７８】

本発明によれば、「腫瘍抗原に対する免疫応答」という用語は、腫瘍抗原または腫瘍抗原を提示する細胞に対する細胞性応答などの免疫応答に関し、腫瘍抗原を発現して提示する癌細胞などの細胞に対する免疫応答を含む。

【００７９】

「細胞性免疫応答」、「細胞性応答」、「抗原に対する細胞性応答」または同様の用語は、ＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩによる抗原の提示を特徴とする細胞に対する細胞性応答を含むことが意図されている。細胞性応答は、「ヘルパー」または「キラー」のいずれかとして働くＴ細胞またはＴリンパ球と呼ばれる細胞に関する。ヘルパーＴ細胞（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とも称される）は、免疫応答を調節することによって中心的な役割を果たし、キラー細胞（細胞傷害性Ｔ細胞、細胞溶解性Ｔ細胞、ＣＤ８＋Ｔ細胞またはＣＴＬとも称される）は、癌細胞などの異常細胞を死滅させ、さらなる異常細胞の産生を防止する。好ましい実施形態では、本発明は、１つ以上の腫瘍発現抗原を発現し、好ましくはそのような腫瘍発現抗原をクラスＩ　ＭＨＣと共に提示する腫瘍細胞に対する抗腫瘍ＣＴＬ応答の刺激を含む。

【００８０】

本発明による「抗原」は、免疫応答を誘発する任意の物質を包含する。特に、「抗原」は、抗体またはＴリンパ球（Ｔ細胞）と特異的に反応する任意の物質、好ましくはペプチドまたはタンパク質に関する。本発明によれば、「抗原」という用語は、少なくとも１つのエピトープを含む任意の分子を包含する。好ましくは、本発明に関連して抗原は、場合によりプロセシング後に、好ましくは抗原（抗原を発現する細胞を含む）に特異的な免疫反応を誘導する分子である。本発明によれば、免疫反応の候補物である任意の適切な抗原を使用してよく、ここで免疫反応は、好ましくは細胞性免疫反応である。本発明の実施形態に関連して、抗原は、好ましくは細胞によって、好ましくは異常細胞、特に癌細胞を含む抗原提示細胞によって、ＭＨＣ分子に関連して提示され、これは抗原に対する免疫反応をもたらす。抗原は、好ましくは天然に存在する抗原に対応するまたは天然に存在する抗原に由来する生成物である。そのような天然に存在する抗原には腫瘍抗原が含まれる。

【００８１】

好ましい実施形態では、抗原は、腫瘍抗原、すなわち細胞質、細胞表面または細胞核に由来し得る腫瘍細胞中で発現されるタンパク質またはペプチドなどの腫瘍細胞の一部、特に主として腫瘍細胞の細胞内にまたは表面抗原として存在するものである。例えば、腫瘍抗原には、癌胎児性抗原、α１－フェトプロテイン、イソフェリチンおよび胎児性スルホグリコプロテイン、α２－Ｈ－鉄タンパク質およびγ－フェトプロテインが含まれる。本発明によれば、腫瘍抗原は、好ましくは、腫瘍または癌においてならびに腫瘍細胞または癌細胞において発現され、場合により型および／または発現レベルに関して腫瘍または癌に特有のならびに腫瘍細胞または癌細胞に特有の任意の抗原を含む。１つの実施形態では、「腫瘍抗原」または「腫瘍関連抗原」という用語は、正常条件下では、限られた数の組織および／もしくは器官中でまたは特定の発生段階で特異的に発現されるタンパク質に関し、例えば腫瘍抗原は、正常条件下では、胃組織中、好ましくは胃粘膜中、生殖器官中、例えば精巣中、栄養膜組織中、例えば胎盤中、または生殖系列細胞中で特異的に発現され得、１つ以上の腫瘍または癌組織中で発現または異常発現される。これに関連して、「限られた数」は、好ましくは３以下、より好ましくは２以下を意味する。本発明に関連して腫瘍抗原には、例えば分化抗原、好ましくは細胞型特異的分化抗原、すなわち正常条件下

では特定の発生段階で特定の細胞型中で特異的に発現されるタンパク質、癌／精巣抗原、すなわち正常条件下では精巣中および時として胎盤中で特異的に発現されるタンパク質、ならびに生殖系列特異的抗原が含まれる。好ましくは、腫瘍抗原または腫瘍抗原の異常発現は癌細胞を同定する。本発明に関連して、被験体、例えば癌疾患に罹患している患者において癌細胞によって発現される腫瘍抗原は、好ましくは前記被験体における自己タンパク質である。好ましい実施形態では、本発明に関連して腫瘍抗原は、正常条件下では必須ではない組織もしくは器官、すなわち免疫系によって損傷された場合に被験体の死をもたらさない組織もしくは器官中で、または免疫系によってアクセスされないもしくはほとんどアクセスされない身体の器官もしくは構造体中で特異的に発現される。

【００８２】

本発明によれば、「腫瘍抗原」、「腫瘍発現抗原」、「癌抗原」および「癌発現抗原」という用語は等価であり、本明細書中で互換的に使用される。

【００８３】

「免疫原性」という用語は、免疫反応を誘導するための抗原の相対的有効性に関する。

【００８４】

本発明による「抗原ペプチド」は、好ましくは、抗原に対する、または抗原の発現を特徴とする、好ましくは異常細胞、特に癌細胞などの抗原の提示を特徴とする細胞に対する免疫応答、好ましくは細胞性応答を刺激することができる抗原の一部分またはフラグメントに関する。好ましくは、抗原ペプチドは、クラスＩ　ＭＨＣによる抗原の提示を特徴とする細胞に対する細胞性応答を刺激することができ、好ましくは抗原応答性細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を刺激することができる。好ましくは、本発明による抗原ペプチドは、ＭＨＣクラスＩおよび／もしくはクラスＩＩ提示ペプチドであるか、またはＭＨＣクラスＩおよび／もしくはクラスＩＩ提示ペプチドを生成するようにプロセシングされ得る。好ましくは、抗原ペプチドは、抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む。好ましくは、抗原の前記フラグメントはＭＨＣクラスＩおよび／またはクラスＩＩ提示ペプチドである。好ましくは、本発明による抗原ペプチドは、そのようなフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含み、そのようなフラグメント、すなわち抗原由来のＭＨＣクラスＩおよび／またはクラスＩＩ提示ペプチドを生成するようにプロセシングされる。

【００８５】

ペプチドが直接、すなわちプロセシングされずに、特に切断されずに提示される場合、そのペプチドは、ＭＨＣ分子、特にクラスＩ　ＭＨＣ分子に結合するのに適した長さを有し、好ましくは７～２０アミノ酸長、より好ましくは７～１２アミノ酸長、より好ましくは８～１１アミノ酸長、特に９または１０アミノ酸長である。

【００８６】

ペプチドが、付加的な配列を含むより大きな実体、例えばワクチン配列またはポリペプチドの一部であり、プロセシング後に、特に切断後に提示される場合、プロセシングによって生成されるペプチドは、ＭＨＣ分子、特にクラスＩ　ＭＨＣ分子に結合するのに適した長さを有し、好ましくは７～２０アミノ酸長、より好ましくは７～１２アミノ酸長、より好ましくは８～１１アミノ酸長、特に９または１０アミノ酸長である。好ましくは、プロセシング後に提示されるペプチドの配列は抗原のアミノ酸配列に由来し、すなわちその配列は抗原のフラグメントに実質的に対応し、好ましくは完全に同一である。したがって、本発明による抗原ペプチドまたはワクチン配列は、１つの実施形態では、抗原のフラグメントに実質的に対応し、好ましくは完全に同一である、７～２０アミノ酸長、より好ましくは７～１２アミノ酸長、より好ましくは８～１１アミノ酸長、特に９または１０アミノ酸長の配列を含み、抗原ペプチドまたはワクチン配列のプロセシング後に、提示されるペプチドを形成する。本発明によれば、プロセシングによって生成されるそのようなペプチドは、同定された配列変化を含む。

【００８７】

本発明によれば、抗原ペプチドまたはエピトープは、２つ以上の抗原ペプチドまたはエ

ピトープを含むワクチン配列および／またはポリペプチドなどのより大きな実体の一部としてワクチン中に存在し得る。提示される抗原ペプチドまたはエピトープは、適切なプロセシング後に生成される。

【００８８】

クラスＩ　ＭＨＣによって提示されるペプチドの配列に実質的に対応するアミノ酸配列を有するペプチドは、クラスＩ　ＭＨＣによって提示されるペプチドのＴＣＲ認識のためまたはＭＨＣへのペプチド結合のために必須ではない１つ以上の残基において異なっていてもよい。そのような実質的に対応するペプチドは、抗原応答性ＣＴＬを刺激することもでき、免疫学的に等価とみなされ得る。ＴＣＲ認識には影響を及ぼさないが、ＭＨＣへの結合の安定性を改善する残基において提示ペプチドとは異なるアミノ酸配列を有するペプチドは、抗原ペプチドの免疫原性を改善することができ、本明細書では「最適化ペプチド」と称され得る。これらの残基のいずれが、ＭＨＣまたはＴＣＲのいずれかへの結合に影響を及ぼす可能性がより高いと考えられるかについての既存の知識を利用して、実質的に対応するペプチドの設計への合理的なアプローチを使用し得る。生じる機能性のペプチドは抗原ペプチドとして企図される。

【００８９】

抗原ペプチドは、ＭＨＣによって提示された場合、Ｔ細胞受容体によって認識可能であるべきである。好ましくは、抗原ペプチドは、Ｔ細胞受容体によって認識された場合、適切な共刺激シグナルの存在下で、抗原ペプチドを特異的に認識するＴ細胞受容体を担持するＴ細胞のクローン増殖を誘導することができる。好ましくは、抗原ペプチドは、特にＭＨＣ分子に関連して提示された場合、それらが由来する抗原、または抗原の発現を特徴とする、好ましくは抗原の提示を特徴とする細胞に対する免疫応答、好ましくは細胞性応答を刺激することができる。好ましくは、抗原ペプチドはクラスＩ　ＭＨＣによる抗原の提示を特徴とする細胞に対する細胞性応答を刺激することができ、好ましくは抗原応答性ＣＴＬを刺激することができる。そのような細胞は、好ましくは標的細胞である。

【００９０】

「抗原プロセシング」または「プロセシング」は、ポリペプチドまたは抗原などのペプチドまたはタンパク質の、前記ペプチドまたはタンパク質のフラグメントであるプロセシング産物への分解（例えばポリペプチドのペプチドへの分解）、および細胞、好ましくは抗原提示細胞による特異的Ｔ細胞への提示のための、ＭＨＣ分子とこれらのフラグメントの１つ以上との会合（例えば結合による）を指す。

【００９１】

「抗原提示細胞」（ＡＰＣ）は、その細胞表面にＭＨＣ分子と会合したタンパク質抗原のペプチドフラグメントを提示する細胞である。一部のＡＰＣは抗原特異的Ｔ細胞を活性化し得る。

【００９２】

プロフェッショナル抗原提示細胞は、食作用または受容体媒介性エンドサイトーシスのいずれかによって抗原をインターナライズし、その後ＭＨＣクラスＩＩ分子に結合した抗原のフラグメントをその膜上に提示することにおいて非常に効率的である。Ｔ細胞は、抗原提示細胞の膜上の抗原－ＭＨＣクラスＩＩ分子複合体を認識し、これと相互作用する。次に、さらなる共刺激シグナルが抗原提示細胞によって生成され、Ｔ細胞の活性化をもたらす。共刺激分子の発現はプロフェッショナル抗原提示細胞の決定的な特徴である。

【００９３】

プロフェッショナル抗原提示細胞の主な種類は、最も広範囲の抗原提示を有し、おそらく最も重要な抗原提示細胞である樹状細胞、マイクロファージ、Ｂ細胞、および特定の活性化上皮細胞である。

【００９４】

樹状細胞（ＤＣ）は、末梢組織中で捕獲された抗原を、ＭＨＣクラスＩＩおよびクラスＩの両方の抗原提示経路によってＴ細胞に提示する白血球集団である。樹状細胞が免疫応答の強力な誘導物質であり、これらの細胞の活性化が抗腫瘍免疫の誘導のために必須の段

階であることは周知である。

【００９５】

樹状細胞は、「未成熟」細胞および「成熟」細胞として好都合に分類され、２つの十分に特性付けられた表現型を区別する簡単な方法として使用することができる。しかし、この命名法は分化のすべての可能な中間段階を除外すると解釈されるべきでない。

【００９６】

未成熟樹状細胞は、抗原の取込みおよびプロセシングのための高い能力を有する抗原提示細胞として特性付けられ、前記能力はＦｃγ受容体およびマンノース受容体の高発現と相関する。成熟表現型は、典型的にはこれらのマーカーのより低い発現を特徴とするが、ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩ、接着分子（例えばＣＤ５４およびＣＤ１１）ならびに共刺激分子（例えばＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６および４－１ＢＢ）などのＴ細胞活性化の責任を担う細胞表面分子の高発現によっても特徴付けられる。

【００９７】

樹状細胞の成熟は、そのような抗原提示樹状細胞がＴ細胞のプライミングをもたらす樹状細胞活性化の状態と称されるが、未成熟樹状細胞による提示は寛容を生じさせる。樹状細胞の成熟は、主として、先天的受容体によって検出される微生物特徴を有する生体分子（細菌ＤＮＡ、ウイルスＲＮＡ、内毒素等）、炎症誘発性サイトカイン（ＴＮＦ、ＩＬ－１、ＩＦＮ）、ＣＤ４０Ｌによる樹状細胞表面上のＣＤ４０の連結、およびストレス性細胞死を受けた細胞から放出される物質によって引き起こされる。樹状細胞は、骨髄細胞を、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）および腫瘍壊死因子αなどのサイトカインと共にインビトロで培養することによって誘導することができる。

【００９８】

非プロフェッショナル抗原提示細胞は、ナイーブＴ細胞との相互作用に必要なＭＨＣクラスＩＩタンパク質を構成的に発現しない；これらは、ＩＦＮγなどの特定のサイトカインによる非プロフェッショナル抗原提示細胞の刺激後にのみ発現される。

【００９９】

「抗原提示細胞」は、ペプチドまたは提示されるべきペプチドを含むポリペプチドをコードする核酸、好ましくはＲＮＡ、例えば抗原をコードする核酸を細胞に形質導入することによってＭＨＣクラスＩ提示ペプチドを負荷することができる。

【０１００】

一部の実施形態では、樹状細胞または他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子送達ビヒクルを含有する医薬組成物を患者に投与して、インビボで起こるトランスフェクションを生じさせ得る。樹状細胞のインビボトランスフェクションは、例えば、国際公開第９７／２４４４７号に記載されているものまたはＭａｈｖｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　７５：４５６－４６０，１９９７によって記述されている遺伝子銃アプローチなどの当分野で公知の任意の方法を用いて一般に実施し得る。

【０１０１】

本発明によれば、「抗原提示細胞」という用語は標的細胞も包含する。

【０１０２】

「標的細胞」は、細胞性免疫応答などの免疫応答の標的である細胞を意味するものとする。標的細胞には、抗原または抗原エピトープ、すなわち抗原に由来するペプチドフラグメントを提示する細胞が含まれ、癌細胞などの任意の望ましくない細胞が含まれる。好ましい実施形態では、標的細胞は、本明細書で述べる抗原を発現し、好ましくは前記抗原をクラスＩ　ＭＨＣと共に提示する細胞である。

【０１０３】

「エピトープ」という用語は、抗原などの分子中の抗原決定基、すなわち、特にＭＨＣ分子に関連して提示された場合、免疫系によって認識される、例えばＴ細胞によって認識される分子中の一部または分子のフラグメントを指す。腫瘍抗原などのタンパク質のエピトープは、好ましくは前記タンパク質の連続的または不連続的な一部分を含み、好ましく

は５～１００、好ましくは５～５０、より好ましくは８～３０、最も好ましくは１０～２５アミノ酸長であり、例えばエピトープは、好ましくは９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５アミノ酸長であり得る。本発明に関連してエピトープは、Ｔ細胞エピトープであることが特に好ましい。

【０１０４】

本発明によれば、エピトープは、細胞の表面上のＭＨＣ分子などのＭＨＣ分子に結合することができ、したがって「ＭＨＣ結合ペプチド」または「抗原ペプチド」であり得る。「ＭＨＣ結合ペプチド」という用語は、ＭＨＣクラスＩおよび／またはＭＨＣクラスＩＩ分子に結合するペプチドに関する。クラスＩ　ＭＨＣ／ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは、典型的には８～１０アミノ酸長であるが、より長いまたはより短いペプチドが有効であり得る。クラスＩＩ　ＭＨＣ／ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは、典型的には１０～２５アミノ酸長であり、特に１３～１８アミノ酸長であるが、より長いおよびより短いペプチドが有効であり得る。

【０１０５】

「エピトープ」、「抗原ペプチド」、「抗原エピトープ」、「免疫原性ペプチド」および「ＭＨＣ結合ペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用され、好ましくは、抗原に対するまたは抗原を発現するもしくは含む、好ましくは提示する細胞に対する免疫応答を誘発することができる、抗原の不完全な形態に関する。好ましくは、この用語は抗原の免疫原性部分に関する。好ましくは、これは、特にＭＨＣ分子に関連して提示された場合、Ｔ細胞受容体によって認識される（すなわち特異的に結合される）抗原の一部分である。好ましいそのような免疫原性部分は、ＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩ分子に結合する。本明細書で使用される場合、免疫原性部分は、当分野で公知の任意のアッセイを用いてそのような結合が検出可能である場合、ＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩ分子に「結合する」といわれる。

【０１０６】

本明細書で使用される場合、「ネオエピトープ」という用語は、正常な非癌性細胞または生殖系列細胞などの参照物中には存在しないが癌細胞中で認められるエピトープを指す。これには、特に、正常な非癌性細胞または生殖系列細胞中で対応するエピトープが認められるが、癌細胞中の１つ以上の突然変異のために、エピトープの配列がネオエピトープを生じるように変化している状況が含まれる。

【０１０７】

「一部分」（ｐｏｒｔｉｏｎ）という用語は画分を指す。アミノ酸配列またはタンパク質などの特定の構造に関して、その「一部分」という用語は、前記構造の連続的または不連続的な画分を表し得る。好ましくは、アミノ酸配列の一部分は、前記アミノ酸配列のアミノ酸の少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、好ましくは少なくとも５０％、より好ましくは少なくとも６０％、より好ましくは少なくとも７０％、さらに一層好ましくは少なくとも８０％、最も好ましくは少なくとも９０％を含む。好ましくは、一部分が不連続的な画分である場合、前記不連続的な画分は構造の２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個またはそれ以上の部分から構成され、各々の部分は構造の連続的な要素である。例えば、アミノ酸配列の不連続的な画分は、前記アミノ酸配列の２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個またはそれ以上、好ましくは４個以下の部分から構成され得、ここで各々の部分は、好ましくはアミノ酸配列の少なくとも５個の連続的なアミノ酸、少なくとも１０個の連続的なアミノ酸、好ましくは少なくとも２０個の連続的なアミノ酸、好ましくは少なくとも３０個の連続的なアミノ酸を含む。

【０１０８】

「一部」（ｐａｒｔ）および「フラグメント」という用語は、本明細書では互換的に使用され、連続的な要素を指す。例えばアミノ酸配列またはタンパク質などの構造の一部とは、前記構造の連続的な要素を指す。構造の一部分、一部またはフラグメントは、好まし

くは前記構造の１つ以上の機能的特性を含む。例えばエピトープ、ペプチドまたはタンパク質の一部分、一部またはフラグメントは、好ましくはそれが由来するエピトープ、ペプチドまたはタンパク質と免疫学的に等価である。本発明に関連して、アミノ酸配列などの構造の「一部」は、構造全体またはアミノ酸配列全体の少なくとも１０％、少なくとも２０％、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８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９６％、少なくとも９８％、少なくとも９９％を好ましくは含み、好ましくはこれらから成る。

【０１０９】

本発明に関連して「免疫反応性細胞」という用語は、免疫反応の間にエフェクター機能を及ぼす細胞に関する。「免疫反応性細胞」は、好ましくは抗原または抗原もしくは抗原に由来する抗原ペプチドの提示を特徴とする細胞に結合することができ、免疫応答を媒介することができる。例えばそのような細胞は、サイトカインおよび／またはケモカインを分泌し、抗体を分泌し、癌性細胞を認識し、および場合によりそのような細胞を排除する。例えば、免疫反応性細胞には、Ｔ細胞（細胞傷害性Ｔ細胞、ヘルパーＴ細胞、腫瘍浸潤性Ｔ細胞）、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、マクロファージおよび樹状細胞が含まれる。好ましくは、本発明に関連して、「免疫反応性細胞」はＴ細胞、好ましくはＣＤ４$^{+}$および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞である。

【０１１０】

好ましくは、「免疫反応性細胞」は、抗原または抗原に由来する抗原ペプチドを、特に抗原提示細胞または癌細胞などの異常細胞の表面上などにＭＨＣ分子に関連して提示された場合、ある程度の特異性で認識する。好ましくは、前記認識は、抗原または前記抗原に由来する抗原ペプチドを認識する細胞が応答性または反応性になることを可能にする。細胞が、ＭＨＣクラスＩＩ分子に関連して抗原または抗原に由来する抗原ペプチドを認識する受容体を担持するヘルパーＴ細胞（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）である場合、そのような応答性または反応性は、サイトカインの放出ならびに／またはＣＤ８$^{+}$リンパ球（ＣＴＬ）および／もしくはＢ細胞の活性化を含み得る。細胞がＣＴＬである場合、そのような応答性または反応性は、ＭＨＣクラスＩ分子に関連して提示される細胞、すなわちクラスＩ　ＭＨＣによる抗原の提示を特徴とする細胞の、例えばアポトーシスまたはパーフォリン媒介性細胞溶解による排除を含み得る。本発明によれば、ＣＴＬ応答性には、持続的なカルシウム流、細胞分裂、ＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－αなどのサイトカインの産生、ＣＤ４４およびＣＤ６９などの活性化マーカーの上方調節、ならびに抗原を発現する標的細胞の特異的細胞溶解性死滅が含まれ得る。ＣＴＬ応答性はまた、ＣＴＬ応答性を正確に示す人工レポーターを使用しても決定し得る。抗原または抗原に由来する抗原ペプチドを認識し、応答性または反応性であるＣＴＬは、本明細書では「抗原応答性ＣＴＬ」とも称される。細胞がＢ細胞である場合、そのような応答性は免疫グロブリンの放出を含み得る。

【０１１１】

「Ｔ細胞」および「Ｔリンパ球」という用語は、本明細書では互換的に使用され、Ｔヘルパー細胞（ＣＤ４＋Ｔ細胞）および細胞溶解性Ｔ細胞を含む細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ、ＣＤ８＋Ｔ細胞）を含む。

【０１１２】

Ｔ細胞は、リンパ球として公知の白血球の群に属し、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たす。これらは、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）と呼ばれるその細胞表面上の特殊な受容体の存在によって、Ｂ細胞およびナチュラルキラー細胞などの他のリンパ球型から識別され得る。胸腺はＴ細胞の成熟の責任を担う主要な器官である。各々が異なる機能を有する、Ｔ細胞のいくつかの異なるサブセットが発見されている。

【０１１３】

Ｔヘルパー細胞は、数ある機能の中でも特に、Ｂ細胞の形質細胞への成熟ならびに細胞傷害性Ｔ細胞およびマクロファージの活性化を含む免疫学的過程において他の白血球を助ける。これらの細胞は、その表面にＣＤ４タンパク質を発現するため、ＣＤ４＋Ｔ細胞と

しても公知である。ヘルパーＴ細胞は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面に発現されるＭＨＣクラスＩＩ分子によってペプチド抗原と共に提示された場合に活性化する。ひとたび活性化すると、これらは速やかに分裂し、能動免疫応答を調節するまたは助けるサイトカインと呼ばれる小さなタンパク質を分泌する。

【０１１４】

細胞傷害性Ｔ細胞は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、移植片拒絶反応にも関与する。これらの細胞は、その表面にＣＤ８糖タンパク質を発現するので、ＣＤ８＋Ｔ細胞としても公知である。これらの細胞は、身体のほぼあらゆる細胞の表面上に存在する、ＭＨＣクラスＩと会合した抗原に結合することによってその標的を認識する。

【０１１５】

Ｔ細胞の大部分は、いくつかのタンパク質の複合体として存在するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を有する。実際のＴ細胞受容体は、独立したＴ細胞受容体アルファおよびベータ（ＴＣＲαおよびＴＣＲβ）遺伝子から産生され、α－ＴＣＲ鎖およびβ－ＴＣＲ鎖と呼ばれる２つの別々のペプチド鎖から成る。γδＴ細胞（ガンマデルタＴ細胞）は、その表面に異なるＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を有するＴ細胞の小さなサブセットである。しかし、γδＴ細胞では、ＴＣＲは１本のγ鎖と１本のδ鎖で構成される。このＴ細胞の群はαβＴ細胞よりもはるかにまれである（全Ｔ細胞の２％）。

【０１１６】

Ｔ細胞の活性化における最初のシグナルは、Ｔ細胞受容体が別の細胞上の主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）によって提示された短いペプチドに結合することによって与えられる。これは、そのペプチドに特異的なＴＣＲを有するＴ細胞だけが活性化されることを確実にする。パートナー細胞は、通常はプロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）であり、ナイーブ応答の場合は通常樹状細胞であるが、Ｂ細胞およびマクロファージは重要なＡＰＣであり得る。ＭＨＣクラスＩ分子によってＣＤ８＋Ｔ細胞に提示されるペプチドは、典型的には８～１０アミノ酸長である；ＭＨＣクラスＩＩ分子の結合溝の末端は開いているので、ＭＨＣクラスＩＩ分子によってＣＤ４＋Ｔ細胞に提示されるペプチドは、典型的にはより長い。

【０１１７】

本発明によれば、Ｔ細胞受容体は、標準的なアッセイにおいてあらかじめ定められた標的に有意の親和性を有し、前記あらかじめ定められた標的に結合する場合、前記あらかじめ定められた標的に結合することができる。「親和性」または「結合親和性」は、しばしば平衡解離定数（K_D）によって測定される。Ｔ細胞受容体は、標準的なアッセイにおいて標的に有意の親和性を有さず、前記標的に有意に結合しない場合、前記標的に（実質的に）結合することができない。

【０１１８】

Ｔ細胞受容体は、好ましくはあらかじめ定められた標的に特異的に結合することができる。Ｔ細胞受容体は、あらかじめ定められた標的に結合することができるが、他の標的には（実質的に）結合することができない、すなわち標準的なアッセイにおいて他の標的に有意の親和性を有さず、他の標的に有意に結合しない場合、前記あらかじめ定められた標的に特異的である。

【０１１９】

細胞傷害性Ｔリンパ球は、抗原または抗原ペプチドをインビボで抗原提示細胞に組み込むことによってインビボで生成し得る。抗原または抗原ペプチドは、タンパク質として、ＤＮＡとして（例えばベクター内で）またはＲＮＡとして存在し得る。抗原は、ＭＨＣ分子のペプチドパートナーを生成するようにプロセシングされ得るが、そのフラグメントはさらなるプロセシングを必要とせずに提示され得る。特にこれらがＭＨＣ分子に結合することができる場合、後者が当てはまる。一般に、皮内注射による患者への投与が可能である。しかし、注射は、リンパ節内への結節内注射によっても実施し得る（Ｍａｌｏｙ ｅｔ ａｌ．（２００１），Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９８：３２９９－３０３）。生じる細胞は関心対象の複合体を提示し、自己細胞傷害性Ｔリンパ球に

よって認識され、前記自己細胞傷害性Ｔリンパ球はその後増殖する。

【０１２０】

ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の特異的活性化は様々な方法で検出し得る。特異的Ｔ細胞活性化を検出する方法には、Ｔ細胞の増殖、サイトカイン（例えばリンホカイン）の産生、または細胞溶解活性の発生を検出することが含まれる。ＣＤ４＋Ｔ細胞に関しては、特異的Ｔ細胞活性化を検出するための好ましい方法は、Ｔ細胞の増殖の検出である。ＣＤ８＋Ｔ細胞に関しては、特異的Ｔ細胞活性化を検出するための好ましい方法は、細胞溶解活性の発生の検出である。

【０１２１】

「主要組織適合遺伝子複合体」という用語および「ＭＨＣ」という略語は、ＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩ分子を含み、すべての脊椎動物中に存在する遺伝子の複合体に関する。ＭＨＣタンパク質または分子は、免疫反応においてリンパ球と抗原提示細胞または異常細胞との間のシグナル伝達のために重要であり、ここでＭＨＣタンパク質または分子はペプチドと結合し、Ｔ細胞受容体による認識のためにそれらを提示する。ＭＨＣによってコードされるタンパク質は細胞の表面上に発現され、自己抗原（細胞自体からのペプチドフラグメント）および非自己抗原（例えば侵入微生物のフラグメント）の両方をＴ細胞に表示する。

【０１２２】

ＭＨＣ領域は、クラスＩ、クラスＩＩおよびクラスＩＩＩの３つのサブグループに分けられる。ＭＨＣクラスＩタンパク質はα鎖およびβ２ミクログロブリン（１５番染色体によってコードされるＭＨＣの一部ではない）を含む。これらは抗原フラグメントを細胞傷害性Ｔ細胞に提示する。大部分の免疫系細胞、特に抗原提示細胞上で、ＭＨＣクラスＩＩタンパク質はα鎖およびβ鎖を含み、抗原フラグメントをＴヘルパー細胞に提示する。ＭＨＣクラスＩＩＩ領域は、補体成分およびサイトカインをコードする一部の成分などの他の免疫成分をコードする。

【０１２３】

ヒトにおいて、細胞表面上の抗原提示タンパク質をコードするＭＨＣ領域中の遺伝子はヒト白血球抗原（ＨＬＡ）遺伝子と称される。しかし、ＭＨＣという略語は、しばしばＨＬＡ遺伝子産物を指すために用いられる。ＨＬＡ遺伝子には、９つのいわゆる古典的ＭＨＣ遺伝子：ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＡおよびＨＬＡ－ＤＲＢ１が含まれる。

【０１２４】

本発明のすべての態様の１つの好ましい実施形態では、ＭＨＣ分子はＨＬＡ分子である。

【０１２５】

「抗原の提示を特徴とする細胞」または「抗原を提示する細胞」または同様の表現により、ＭＨＣ分子、特にＭＨＣクラスＩ分子に関連して、その細胞が発現する抗原または前記抗原に由来するフラグメントを、例えば抗原のプロセシングによって提示する異常細胞、例えば癌細胞、または抗原提示細胞などの細胞が意味される。同様に、「抗原の提示を特徴とする疾患」という用語は、特にクラスＩ　ＭＨＣによる、抗原の提示を特徴とする細胞を含む疾患を表す。細胞による抗原の提示は、抗原をコードするＲＮＡなどの核酸で細胞をトランスフェクトすることによって実施し得る。

【０１２６】

「提示される抗原のフラグメント」または同様の表現により、フラグメントが、例えば抗原提示細胞に直接加えられた場合、ＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩ、好ましくはＭＨＣクラスＩによって提示され得ることが意味される。１つの実施形態では、フラグメントは、抗原を発現する細胞によって天然に提示されるフラグメントである。

【０１２７】

「免疫学的に等価」という用語は、免疫学的に等価の分子、例えば免疫学的に等価のア

ミノ酸配列が、例えば体液性および／もしくは細胞性免疫応答の誘導などの免疫学的作用の種類、誘導される免疫反応の強さおよび／もしくは持続期間、または誘導される免疫反応の特異性に関して、同じもしくは基本的に同じ免疫学的特性を示すおよび／または同じもしくは基本的に同じ免疫学的作用を及ぼすことを意味する。本発明に関連して、「免疫学的に等価」という用語は、好ましくは免疫のために用いられるペプチドの免疫学的作用または特性に関して使用される。例えば、アミノ酸配列が被験体の免疫系に暴露されたとき参照アミノ酸配列と反応する特異性を有する免疫反応を誘導する場合、前記アミノ酸配列は参照アミノ酸配列と免疫学的に等価である。

【０１２８】

本発明に関連して「免疫エフェクター機能」という用語は、例えば腫瘍細胞の死滅、または腫瘍の播種および転移の阻害を含む腫瘍増殖の阻害および／もしくは腫瘍発生の阻害をもたらす、免疫系の成分によって媒介される任意の機能を包含する。好ましくは、本発明に関連して免疫エフェクター機能は、Ｔ細胞媒介性エフェクター機能である。そのような機能には、ヘルパーＴ細胞（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）の場合は、Ｔ細胞受容体によるＭＨＣクラスＩＩ分子に関連した抗原または抗原に由来する抗原ペプチドの認識、サイトカインの放出ならびに／またはＣＤ８$^{+}$リンパ球（ＣＴＬ）および／もしくはＢ細胞の活性化が含まれ、ＣＴＬの場合は、Ｔ細胞受容体によるＭＨＣクラスＩ分子に関連した抗原または抗原に由来する抗原ペプチドの認識、ＭＨＣクラスＩ分子に関連して提示される細胞、すなわちクラスＩ　ＭＨＣによる抗原の提示を特徴とする細胞の、例えばアポトーシスまたはパーフォリン媒介性細胞溶解による排除、ＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－αなどのサイトカインの産生ならびに抗原を発現する標的細胞の特異的細胞溶解性死滅が含まれる。

【０１２９】

「ゲノム」という用語は、生物または細胞の染色体中の遺伝情報の総量に関する。「エクソーム」という用語はゲノムのコード領域を指す。「トランスクリプトーム」という用語は、すべてのＲＮＡ分子のセットに関する。

【０１３０】

「核酸」は、本発明によれば、好ましくはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）、より好ましくはＲＮＡ、最も好ましくはインビトロ転写ＲＮＡ（ＩＶＴ　ＲＮＡ）または合成ＲＮＡである。核酸には、本発明によれば、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、組換え産生された分子および化学合成分子が含まれる。本発明によれば、核酸は一本鎖または二本鎖の直鎖状または共有結合閉環状分子として存在し得る。核酸は、本発明によれば、単離することができる。「単離された核酸」という用語は、本発明によれば、核酸が、（ｉ）インビトロで、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって増幅された、（ｉｉ）クローニングによって組換え産生された、（ｉｉｉ）例えば切断およびゲル電気泳動による分離によって精製された、または（ｉｖ）例えば化学合成によって合成されたことを意味する。核酸は、細胞への導入、すなわち細胞のトランスフェクションのために、特にＤＮＡ鋳型からインビトロ転写によって調製することができるＲＮＡの形態で使用することができる。前記ＲＮＡは、適用の前に配列の安定化、キャッピングおよびポリアデニル化によってさらに修飾することができる。

【０１３１】

「遺伝物質」という用語は、ＤＮＡもしくはＲＮＡのいずれかの単離された核酸、二重らせんの一部、染色体の一部、または生物もしくは細胞のゲノム全体、特にそのエクソームもしくはトランスクリプトームを指す。

【０１３２】

「突然変異」という用語は、参照と比較した核酸配列の変化または相違（ヌクレオチドの置換、付加または欠失）を指す。「体細胞突然変異」は、生殖細胞（精子および卵子）を除く身体のいずれの細胞においても起こり得、それゆえ子には伝わらない。これらの変化は（常にではないが）、癌または他の疾患を引き起こし得る。好ましくは、突然変異は非同義突然変異である。「非同義突然変異」という用語は、翻訳産物中にアミノ酸置換などのアミノ酸変化を生じさせる突然変異、好ましくはヌクレオチド置換を指す。

【０１３３】
本発明によれば、「突然変異」という用語は、点突然変異、インデル（Ｉｎｄｅｌ）、融合、クロモスリプシスおよびＲＮＡ編集を包含する。
【０１３４】
本発明によれば、「インデル」（Ｉｎｄｅｌ）という用語は、共局在する挿入と欠失およびヌクレオチドの正味の増加または減少をもたらす突然変異と定義される、特殊な突然変異クラスを表す。ゲノムのコード領域では、インデルの長さが３の倍数でない限り、これはフレームシフト突然変異を生じさせる。インデルは点突然変異と対比させることができる；インデルが配列からヌクレオチドを挿入および欠失させる場合、点突然変異はヌクレオチドの１個を置き換える置換の１つの形態である。
【０１３５】
融合は、それまでは別々の２つの遺伝子から形成されたハイブリッド遺伝子を生成することができる。これは、転座、中間部欠失または染色体逆位の結果として起こり得る。しばしば、融合遺伝子は癌遺伝子である。発癌性融合遺伝子は、２つの融合パートナーから新しいまたは異なる機能を有する遺伝子産物をもたらし得る。あるいは、癌原遺伝子が強力なプロモーターに融合し、それにより強力なプロモーターが引き起こす上流の融合パートナーの上方調節によって発癌機能が作動し始める。発癌性融合転写物は、トランススプライシングまたはリードスルー事象によっても引き起こされ得る。
【０１３６】
本発明によれば、「クロモスリプシス」という用語は、単一の破壊事象によってゲノムの特定領域が崩壊し、その後一緒に縫合される遺伝的現象を指す。
【０１３７】
本発明によれば、「ＲＮＡ編集」または「ＲＮＡエディティング」という用語は、ＲＮＡ分子中の情報内容が塩基組成の化学的変化を通して改変される分子過程を指す。ＲＮＡエディティングには、シチジン（Ｃ）からウリジン（Ｕ）へおよびアデノシン（Ａ）からイノシン（Ｉ）への脱アミノ化、ならびに非鋳型ヌクレオチド付加および挿入などのヌクレオシド修飾が含まれる。ｍＲＮＡにおけるＲＮＡエディティングは、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を、ゲノムＤＮＡ配列によって予測されるものと異なるように有効に改変する。
【０１３８】
「癌突然変異シグネチャー」という用語は、非癌性参照細胞と比較した場合に癌細胞中に存在する突然変異のセットを指す。
【０１３９】
本発明によれば、「参照」は、腫瘍標本から本発明の方法で得られた結果を関連付け、比較するために使用し得る。典型的には、「参照」は、患者または１つ以上の異なる個体、好ましくは健常個体、特に同じ種の個体から得られた、１つ以上の正常標本、特に癌疾患による影響を受けていない標本に基づいて入手し得る。「参照」は、十分に多数の正常標本を試験することによって経験的に決定することができる。
【０１４０】
任意の適切なシークエンシング法を本発明に従って使用することができ、次世代シークエンシング（ＮＧＳ）技術が好ましい。第三世代シークエンシング法は、方法のシークエンシング工程を迅速化するために将来はＮＧＳ技術にとって代わる可能性がある。明確化のために、本発明に関連して「次世代シークエンシング」または「ＮＧＳ」という用語は、サンガー法として公知の「従来の」シークエンシング法に対して、ゲノム全体を小片に分割することにより核酸鋳型をゲノム全体に沿って並行してランダムに読み取る、すべての新規ハイスループットシークエンシング技術を意味する。そのようなＮＧＳ技術（超並列シークエンシング技術としても公知である）は、全ゲノム、エクソーム、トランスクリプトーム（ゲノムのすべての転写配列）またはメチローム（ゲノムのすべてのメチル化配列）の核酸配列情報を非常に短期間、例えば、１～２週間以内、好ましくは１～７日間以内、または最も好ましくは２４時間未満内に送達することができ、原理上は、単一細胞シ

ークエンシングアプローチを可能にする。市販されているかまたは文献中で言及されている複数のＮＧＳプラットフォーム、例えばＺｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１１：Ｔｈｅ ｉｍｐａｃｔ ｏｆ ｎｅｘｔ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｏｎ ｇｅｎｏｍｉｃｓ．Ｊ．Ｇｅｎｅｔ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ３８（３），９５－１０９；またはＶｏｅｌｋｅｒｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．２００９：Ｎｅｘｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ：Ｆｒｏｍ ｂａｓｉｃ ｒｅｓｅａｒｃｈ ｔｏ ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５５，６４１－６５８に詳述されているものを本発明に関連して使用することができる。そのようなＮＧＳ技術／プラットフォームの非限定的な例は以下のとおりである：

１）例えば、Ｒｏｎａｇｈｉ ｅｔ ａｌ．１９９８：Ａ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｍｅｔｈｏｄ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ｐｙｒｏｐｈｏｓｐｈａｔｅ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８１（５３７５），３６３－３６５に最初に記載された、Ｒｏｃｈｅ関連会社である４５４ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｂｒａｎｆｏｒｄ，Ｃｏｎｎｅｃｔｉｃｕｔ）のＧＳ－ＦＬＸ ４５４ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ（登録商標）において実行されるピロシークエンス法として公知の「合成によるシークエンシング」技術。この技術は、一本鎖ＤＮＡ結合ビーズが、激しくボルテックスすることにより、エマルジョンＰＣＲ増幅のために油に取り囲まれたＰＣＲ反応物を含有する水性ミセル中に被包される、エマルジョンＰＣＲを用いる。ピロシークエンシング工程中、ポリメラーゼがＤＮＡ鎖を合成するにつれて、ヌクレオチド組込みの間にリン酸分子から放出される光が記録される。

２）可逆的色素－ターミネータに基づく、例えばＩｌｌｕｍｉｎａ／Ｓｏｌｅｘａ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ（登録商標）およびＩｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ２０００ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ（登録商標）において実行される、Ｓｏｌｅｘａ（現在はＩｌｌｕｍｉｎａ Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａの一部）によって開発された「合成によるシークエンシング」アプローチ。この技術では、４つすべてのヌクレオチドを、ＤＮＡポリメラーゼと共にフローセルチャネル中のオリゴプライミングしたクラスターフラグメントに同時に添加する。架橋増幅は、シークエンシングのために４つすべての蛍光標識ヌクレオチドを有するクラスター鎖を伸長させる。

３）例えばＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（現在はＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ．Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）のＳＯＬｉｄ（登録商標）プラットフォームにおいて実行される、「ライゲーションによるシークエンシング」アプローチ。この技術では、固定された長さのすべての可能なオリゴヌクレオチドのプールを配列決定された位置に従って標識する。オリゴヌクレオチドをアニーリングし、連結する；配列をマッチさせるためのＤＮＡリガーゼによる選択的なライゲーションは、その位置のヌクレオチドの情報を与えるシグナルをもたらす。シークエンシングの前に、ＤＮＡをエマルジョンＰＣＲによって増幅する。各々同じＤＮＡ分子のコピーだけを含有する、生じたビーズをスライドガラス上に載せる。２番目の例として、Ｄｏｖｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｓａｌｅｍ，Ｎｅｗ Ｈａｍｐｓｈｉｒｅ）のＰｏｌｏｎａｔｏｒ（登録商標）Ｇ．００７プラットフォームも、ランダムに配置したビーズに基づくエマルジョンＰＣＲを使用して並列シークエンシングのためにＤＮＡフラグメントを増幅することによる、「ライゲーションによるシークエンシング」アプローチを用いる。

４）例えばＰａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）のＰａｃＢｉｏ ＲＳシステムまたはＨｅｌｉｃｏｓ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）のＨｅｌｉＳｃｏｐｅ（登録商標）プラットフォームにおいて実行されるような、単一分子シークエンシング技術。この技術の明らかな特徴は、単一分子リアルタイム（ＳＭＲＴ）ＤＮＡシークエンシングと定義される、単一ＤＮＡまたはＲＮＡ分子を増幅せずに配列決定するその能力である。例えばＨｅｌｉＳｃｏｐｅは、各々のヌクレオチドが合成されると共にそれを直接検出する高感度蛍光検出システムを用いる。蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）に基づく同様のアプローチがＶｉｓｉｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｈｏｕｓｔｏｎ，Ｔｅ

ｘａｓ）から開発されている。他の蛍光に基づく単一分子技術は、Ｕ．Ｓ．Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（ＧｅｎｅＥｎｇｉｎｅ（登録商標））およびＧｅｎｏｖｏｘｘ（ＡｎｙＧｅｎｅ（登録商標））からのものである。

５）例えば複製中の一本鎖上のポリメラーゼ分子の動きを観測するためにチップ上に配置された様々なナノ構造を用いる、単一分子シークエンシングのためのナノ技術。ナノ技術に基づくアプローチの非限定的な例は、Ｏｘｆｏｒｄ Ｎａｎｏｐｏｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ）のＧｒｉｄＯＮ（登録商標）プラットフォーム、Ｎａｂｓｙｓ（Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｅ，Ｒｈｏｄｅ Ｉｓｌａｎｄ）によって開発されたハイブリダイゼーション支援ナノポアシークエンシング（ＨＡＮＳ（登録商標））プラットフォーム、およびコンビナトリアルプローブアンカーライゲーション（ｃＰＡＬ（登録商標））と呼ばれるＤＮＡナノボール（ＤＮＢ）技術を用いた、特許保護されているリガーゼに基づくＤＮＡシークエンシングプラットフォームである。

６）単一分子シークエンシングのための電子顕微鏡検査に基づく技術、例えばＬｉｇｈｔＳｐｅｅｄ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）およびＨａｌｃｙｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ（Ｒｅｄｗｏｏｄ Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）によって開発されたもの。

７）ＤＮＡの重合の間に放出される水素イオンの検出に基づくイオン半導体シークエンシング。例えばＩｏｎ Ｔｏｒｒｅｎｔ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）は、この生化学的工程を超並列的に実施するために微細機械加工したウェルの高密度アレイを使用する。各々のウェルは異なるＤＮＡ鋳型を保持する。ウェルの下にはイオン感受性層があり、その下には特許保護されているイオンセンサーがある。

【０１４１】

好ましくは、ＤＮＡおよびＲＮＡ調製物はＮＧＳのための出発物質としての役割を果たす。そのような核酸は、生物学的物質などの試料から、例えば新鮮、急速冷凍もしくはホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織（ＦＦＰＥ）から、または新たに単離された細胞から、または患者の末梢血中に存在するＣＴＣから容易に入手することができる。正常な非突然変異ゲノムＤＮＡまたはＲＮＡは正常な体組織から抽出することができるが、生殖系列細胞が本発明に関連して好ましい。生殖系列ＤＮＡまたはＲＮＡは、非血液学的悪性腫瘍を有する患者における末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から抽出される。ＦＦＰＥ組織または新鮮単離された単一細胞から抽出された核酸は高度に断片化されているが、これらはＮＧＳ適用に適する。

【０１４２】

エクソームシークエンシングのためのいくつかの標的ＮＧＳ法が文献に記載されており（総説については、例えばＴｅｅｒ ａｎｄ Ｍｕｌｌｉｋｉｎ ２０１０：Ｈｕｍａｎ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ １９（２），Ｒ１４５－５１参照）、それらのすべてが本発明と共に使用することができる。これらの方法の多くは（例えばゲノム捕捉、ゲノム分配、ゲノム濃縮等として記述されている）ハイブリダイゼーション技術を使用し、アレイに基づく（例えばＨｏｄｇｅｓ ｅｔ ａｌ．２００７：Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．３９，１５２２－１５２７）および液体に基づく（例えばＣｈｏｉ ｅｔ ａｌ．２００９：Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ １０６，１９０９６－１９１０１）ハイブリダイゼーションアプローチを含む。また、ＤＮＡ試料の調製およびその後のエクソーム捕獲のための市販のキットも入手可能である；例えばＩｌｌｕｍｉｎａ Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）は、ＴｒｕＳｅｑ（登録商標）ＤＮＡ Ｓａｍｐｌｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ｋｉｔ）およびＴｒｕＳｅｑ（登録商標）Ｅｘｏｍｅ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ Ｋｉｔを提供している。

【０１４３】

例えば腫瘍試料の配列を生殖系列試料の配列などの参照試料の配列と比較する場合、癌特異的体細胞突然変異または配列相違を検出する際に偽陽性所見の数を低減するために、これらの試料種の一方または両方のレプリケート中の配列を決定することが好ましい。し

たがって、生殖系列試料の配列などの参照試料の配列を２回または３回またはそれ以上決定することが好ましい。あるいはまたは加えて、腫瘍試料の配列を２回または３回またはそれ以上決定する。また、生殖系列試料の配列などの参照試料の配列および／または腫瘍試料の配列を、ゲノムＤＮＡ中の配列を少なくとも１回決定し、前記参照試料および／または前記腫瘍試料のＲＮＡ中の配列を少なくとも１回決定することによって２回以上決定することも可能であり得る。例えば、生殖系列試料などの参照試料のレプリケート間の変異を決定することにより、統計的量としての体細胞突然変異の予想される偽陽性率（ＦＤＲ）を推定することができる。１つの試料の技術的反復は同一の結果を生じるはずであり、この「対同一物比較」（ｓａｍｅ　ｖｓ．ｓａｍｅ　ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ）において検出されるいずれの突然変異も偽陽性である。特に、参照試料と比較して腫瘍試料における体細胞突然変異検出についての偽発見率を決定するため、参照試料の技術的反復を、偽陽性の数を推定するための参照として用いることができる。さらに、様々なクオリティ関連測定基準（例えばカバレッジまたはＳＮＰクオリティ）を、機械学習アプローチを用いて単一クオリティスコアに組み合わせ得る。所与の体性変異に関して、上回るクオリティスコアを有するすべての他の変異を計数することができ、これはデータセット中のすべての変異の順位付けを可能にする。

【０１４４】

本発明によれば、ハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定法を適用することができる。

【０１４５】

ハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定の１つの実施形態では、Ｆｌｕｉｄｉｇｍプラットフォームを使用し得る。そのようなアプローチは以下の工程を含み得る：

１．所与の患者から腫瘍組織／細胞および健常組織を採取する。

２．遺伝物質を癌性および健常細胞から抽出し、次に標準的な次世代シークエンシング（ＮＧＳ）プロトコルを用いてそのエクソーム（ＤＮＡ）を配列決定する。ＮＧＳのカバレッジは、少なくとも５％の頻度を有するヘテロ接合体対立遺伝子を検出できる範囲である。トランスクリプトーム（ＲＮＡ）も癌細胞から抽出し、ｃＤＮＡに変換して、配列決定し、いずれの遺伝子が癌細胞によって発現されるかを決定する。

３．発現された非同義一塩基変異（ＳＮＶ）を本明細書で述べるように同定する。健常組織中のＳＮＰである部位をフィルタリング除去する。

４．（３）からのＮ＝９６の突然変異を種々の頻度にわたって選択する。蛍光検出に基づくＳＮＰ遺伝子型決定アッセイをこれらの突然変異について設計し、合成する（そのようなアッセイの例には、Ｌｉｆｅ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＴａｑＭａｎに基づくＳＮＰアッセイまたはＦｌｕｉｄｉｇｍによるＳＮＰｔｙｐｅアッセイが含まれる）。アッセイは、所与のＳＮＶを含むアンプリコンを増幅するための特異的標的増幅（ＳＴＡ）プライマーを含む（これはＴａｑＭａｎおよびＳＮＰｔｙｐｅアッセイにおいて標準的である）。

５．個々の細胞をレーザーマイクロダイセクション（ＬＭＤ）または単細胞懸濁液への分離のいずれかによって腫瘍および健常組織から単離し、次いで以前に記述されているように（Ｄａｌｅｒｂａ　Ｐ．ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２９：１１２０－１１２７）選別する。細胞を事前選択せずに（すなわち偏りなく）選択することができるか、あるいは癌性細胞を濃縮することができる。濃縮方法には、特異的染色、細胞の大きさによる選別、ＬＭＤ中の組織学的検査等が含まれる。

６．個々の細胞を、マスターミックスとＳＴＡプライマーを含むＰＣＲ管中で単離し、ＳＮＶを含むアンプリコンを増幅する。あるいは単一細胞のゲノムを、以前に記述されているように（Ｆｒｕｍｋｉｎ　Ｄ．ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　６８：５９２４）全ゲノム増幅（ＷＧＡ）によって増幅する。９５℃の加熱工程または専用の溶解緩衝液のいずれかによって細胞溶解を達成する。

７．ＳＴＡ増幅した試料を希釈し、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子型決定アレイに負荷する。

８．健常組織からの試料を陽性コントロールとして使用し、ホモ接合体対立遺伝子クラ

スター（突然変異なし）を決定する。ＮＧＳデータはホモ接合体突然変異が極めてまれであることを示すので、典型的には２つのクラスター：ＸＸおよびＸＹだけが予測され、Ｘ＝健常である。

９．実行し得るアレイの数は制限されず、実際には約１０００個までの単一細胞を検定することが可能である（約１０個のアレイ）。３８４プレートで実施した場合、試料調製を数日間に短縮することができる。

１０．次に各々の細胞についてのＳＮＶを決定する。

【０１４６】

ハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定の別の実施形態では、ＮＧＳプラットフォームを使用し得る。そのようなアプローチは以下の工程を含み得る：

１．上記の工程１から６は、Ｎ（検定されるＳＮＶの数）が９６よりはるかに大きくてもよいことを除き、同一である。ＷＧＡの場合は、その後に数サイクルのＳＴＡを実施する。ＳＴＡプライマーは、各プライマー上に２つの万能タグ配列を含む。

２．ＳＴＡ後、バーコードプライマーをアンプリコンへとＰＣＲ増幅する。バーコードプライマーは、固有のバーコード配列と上記万能タグ配列を含む。したがって各々の細胞は固有のバーコードを含む。

３．すべての細胞からのアンプリコンを混合し、ＮＧＳによって配列決定する。多重化できる細胞数への実際的な制限は、調製できるプレートの数である。試料を３８４プレートで調製することができるので、実際的な制限は約５０００個の細胞である。

４．配列データに基づき、個々の細胞のＳＮＶ（または他の構造的異常）を検出する。

【０１４７】

抗原の優先順位を決定するために、単一細胞遺伝子型決定に基づく腫瘍系統発生的再構築（「系統発生的抗原優先順位付け」）を本発明に従って使用し得る。発現、突然変異の種類（非同義対他の突然変異）、ＭＨＣ結合特性などの基準に基づく抗原の優先順位付け以外に、腫瘍内および腫瘍間の不均一性ならびに生検のバイアスに対処するように設計された優先順位付けのさらなる次元を、例えば以下で述べるように使用することができる。

【０１４８】

１．最も豊富な抗原の同定

ハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定法に関連して上述した単一細胞アッセイに基づき、各々のＳＮＶの頻度を正確に推定することができ、存在する最も豊富なＳＮＶを、癌の個別化ワクチン（ＩＶＡＣ）を提供するために選択することができる。

【０１４９】

２．根付き木解析に基づく一次基底抗原の同定

腫瘍からのＮＧＳデータは、ホモ接合体突然変異（両方の対立遺伝子でヒット）がまれな事象であることを示唆する。それゆえ、ハプロタイピングの必要はなく、腫瘍体細胞突然変異の系統樹を単一細胞ＳＮＶデータセットから作成することができる。生殖系列配列を使用して系統樹を根付かせる。祖先配列を再現するためのアルゴリズムを使用して、系統樹の根に近い節の配列を再現する。これらの配列は、原発性腫瘍中に存在すると予測される最初期の突然変異（本明細書では一次基底突然変異／抗原と定義される）を含む。２つの突然変異がゲノム上の同じ位置の同じ対立遺伝子で起こる確率は低いため、祖先配列における突然変異は腫瘍中で固定されていると予測される。

【０１５０】

一次基底抗原を優先順位付けることは、生検中の最も頻度の高い突然変異を優先順位付けることと等価ではない（ただし、一次基底突然変異は生検中の最も頻度が高いものの１つであると予想される）。その理由は以下のとおりである：例えば２つのＳＮＶが生検に由来するすべての細胞中に存在する（したがって同じ頻度、すなわち１００％を有する）と思われるが、一方の突然変異は基底であり、他方はそうではない場合、基底突然変異がＩＶＡＣのために選択されるべきである。これは、基底突然変異は腫瘍のすべての領域中に存在する可能性が高いが、後者の突然変異は、生検が採取された領域に偶然固定されたより最近の突然変異であり得るためである。加えて、基底抗原は、原発性腫瘍に由来する

転移性腫瘍中に存在する可能性が高い。それゆえＩＶＡＣのために基底抗原を優先することにより、ＩＶＡＣが腫瘍の一部だけでなく腫瘍全体を根絶することができる可能性を大きく高め得る。

【０１５１】

二次性腫瘍が存在し、これらも採取された場合、すべての腫瘍の進化樹を推定することができる。これは系統樹の頑健性を改善することができ、すべての腫瘍の基底となる突然変異の検出を可能にする。

【０１５２】

３．腫瘍に最大限にまたがる抗原の同定

すべての腫瘍部位を最大限にカバーする抗原を得るための別のアプローチは、腫瘍からいくつかの生検を採取することである。１つの戦略は、ＮＧＳ分析によってすべての生検中に存在すると同定された抗原を選択することである。基底突然変異を同定する確率を改善するために、すべての生検からの単一細胞突然変異に基づく系統発生分析を実施することができる。

【０１５３】

転移の場合は、すべての腫瘍からの生検を得ることができ、すべての腫瘍に共通する、ＮＧＳによって同定された突然変異を選択することができる。

【０１５４】

４．転移を阻害する抗原を優先順位付けるためのＣＴＣの使用

転移性腫瘍は単一細胞に由来すると考えられている。それゆえ所与の患者の種々の腫瘍から抽出した個々の細胞を遺伝子型決定することと併せて患者の血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を遺伝子型決定することにより、癌の進化の歴史を再構築することができる。原発性腫瘍に由来するＣＴＣのクレードを通してもとの腫瘍から進化する転移性腫瘍を観測することが期待される。

【０１５５】

以下（ＣＴＣを同定し、計数して、遺伝子プローブするためのバイアスのない方法）では、ＣＴＣのバイアスのない単離およびゲノム解析のための、上述したハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定法の拡張を述べる。上述した分析を用いて、次にプライマー腫瘍、ＣＴＣおよび転移から生じる二次性腫瘍（存在する場合）の系統樹を再構築することができる。この系統樹に基づき、ＣＴＣが最初に原発性腫瘍から切り離された時点またはその直後に起こった突然変異（パッセンジャーまたはドライバー）を同定することができる。原発性腫瘍から生じるＣＴＣのゲノムは、二次性腫瘍ゲノムよりも原発性腫瘍ゲノムに進化的により類似することが予想される。さらに、原発性腫瘍から生じるＣＴＣのゲノムは、二次性腫瘍中に固定されている、または将来二次性腫瘍が形成された場合に固定される可能性が高い、固有の突然変異を含むことが予想される。これらの固有の突然変異を、転移を標的とする（または予防する）ＩＶＡＣのために優先することができる。

【０１５６】

ＣＴＣ突然変異と一次基底突然変異を優先順位付けることの利点は、ＣＴＣに由来する抗原が、転移を特異的に標的とするためにＴ細胞を動員することができ、それゆえ原発性腫瘍を標的とするＴ細胞とは独立した武器となる（異なる抗原を使用する）ことである。加えて、二次性腫瘍がほとんど（または全く）存在しない場合、腫瘍回避の確率は所与の抗原を担持する癌細胞の数に対応するはずであるので、ＣＴＣ由来抗原からの免疫回避の可能性はより低いと予想される。

【０１５７】

５．同じ細胞上に共起する抗原の同定（「カクテル」ＩＶＡＣ）

腫瘍は、免疫系および治療法の選択圧に起因する突然変異を抑制するように進化すると考えられている。同じ細胞上に共起し、腫瘍中でも高頻度である複数の抗原を標的とする癌ワクチンは、腫瘍回避機構を無効にするより大きな可能性を有し、それゆえ再発の可能性を低減する。そのような「カクテルワクチン」は、ＨＩＶ陽性患者のための抗レトロウイルス併用療法に類似する。共起する突然変異は、系統発生分析によってまたはすべての

細胞のＳＮＶアラインメントを検査することによって同定できる。

【０１５８】

さらに、本発明によれば、ＣＴＣを同定し、計数して、遺伝子プローブするためのバイアスのない方法を使用することができる。そのようなアプローチは以下の工程を含み得る：

１．腫瘍の生検を入手し、体細胞突然変異の地図を決定する。

２．選択肢１：これまでに確立された優先順位付けスキームに基づくさらなる検討のためにＮ≧９６の突然変異を選択する。

選択肢２：単一細胞アッセイ（上述したハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定法参照）、次いで系統発生分析を実施し、多様性を最大化するためにＮ≧９６の一次基底突然変異および場合により最近の突然変異を選択する。前者の突然変異はＣＴＣを同定するために（以下参照）、および後者は系統発生分析を行うために有用である（「同じ細胞上に共起する抗原の同定（「カクテル」ＩＶＡＣ）」の章参照）。

３．癌患者から全血を得る。

４．赤血球を溶解する。

５．ＣＤ４５$^{+}$細胞を枯渇させる（例えば選別、抗ＣＤ４５抗体に結合した磁気ビーズ等による）ことによって白血球を除去し、ＣＴＣを濃縮する。

６．ＤＮＡアーゼ消化によって遊離ＤＮＡを除去する。遊離ＤＮＡの起源は、血液中に存在するＤＮＡまたは死細胞からのＤＮＡであり得る。

７．残りの細胞をＰＣＲ管に選別し、ＳＴＡを実施して（選択した突然変異に基づく）、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ（上述したハイスループット全ゲノム単一細胞遺伝子型決定法）でスクリーニングする。ＣＴＣは、一般に複数のＳＮＶについて陽性であるはずである。

８．次に、スクリーニングしたＳＮＶのパネルに基づき、癌性と同定された細胞（＝ＣＴＣ）を系統発生的にさらに分析することができる（「同じ細胞上に共起する抗原の同定（「カクテル」ＩＶＡＣ）」の章参照）。

【０１５９】

また、この方法を、単離されたＣＴＣについてのこれまでに確立された方法と組み合わせることも可能である。例えば、ＥｐＣＡＭ＋細胞、またはサイトケラチンについて陽性の細胞を選別することができる（Ｒａｏ　ＣＧ．ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｏｎｃｏｌｏｇｙ　２７：４９；Ａｌｌａｒｄ　ＷＪ．ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　１０：６８９７－６９０４）。次に、これらの推定上のＣＴＣをＦｌｕｉｄｉｇｍ／ＮＧＳで検証／プロファイリングし、その突然変異を導き出すことができる。

【０１６０】

この方法を用いてＣＴＣを計数することができる。この方法は、癌細胞によって発現され得るまたは発現されないと考えられる１つの特定のマーカーに頼るではなく、患者に固有の癌体細胞突然変異の突然変異プロフィールに基づくので、これはＣＴＣを検出し、数えるためのバイアスのない方法である。

【０１６１】

本発明によれば、ドライバー突然変異を濃縮するための単一細胞遺伝子型決定に基づく腫瘍系統発生的再構築を含むアプローチ（「系統発生的フィルタリング」）を使用し得る。

【０１６２】

このアプローチの１つの実施形態では、ドライバー突然変異を回復するための汎腫瘍系統発生分析を実施する。

【０１６３】

例えば、ｎ＝１の腫瘍からのドライバー突然変異を検出し得る。

【０１６４】

上記「根付き木解析に基づく一次基底抗原の同定」の章では、祖先配列を回復するおよび／または樹の根に近い配列を有する細胞を同定するための方法を述べている。定義によ

りこれらは樹の根に近い配列であるので、これらの配列中の突然変異の数は癌のバルク試料中の突然変異の数より有意に少ないと予想される。それゆえ、樹の根に近い配列を選択することにより、多くのパッセンジャー突然変異が「系統発生的にフィルタリング」除去されると予想される。この手順はドライバー突然変異を大きく濃縮する可能性を有する。ドライバー突然変異は、その後患者の治療を同定／選択するのに使用することができるかまたは新規治療法のための糸口として用いることができる。

【０１６５】

別の例では、所与の種類のｎ＞１の腫瘍からのドライバー突然変異を検出し得る。

【０１６６】

特定の種類の多くの腫瘍から一次基底突然変異を再構築することにより、ドライバー突然変異を検出する可能性を大きく高めることができる。樹の根に近い基底配列は多くのパッセンジャー突然変異をフィルタリング除去するので、ドライバー突然変異を検出する際のシグナル対ノイズ比は大きく上昇すると予想される。そのためこの方法は、（１）より頻度の低いドライバー突然変異、（２）より少ない試料からの高頻度のドライバー突然変異を検出する可能性を有する。

【０１６７】

ドライバー突然変異を濃縮するための単一細胞遺伝子型決定に基づく腫瘍系統発生的再構築を含むアプローチ（「系統発生的フィルタリング」）の別の実施形態では、ドライバー突然変異を引き起こす転移を回復するための系統発生分析を実施する。

【０１６８】

上記「転移を阻害する抗原を優先順位付けるためのＣＴＣの使用」の章では、ＣＴＣ関連突然変異を検出する方法を述べている。この方法は、転移をもたらすドライバー突然変異を濃縮するためにも使用することができる。例えば、プライマー腫瘍、二次性腫瘍およびＣＴＣの組み合わせた系統発生をマッピングすることにより、原発性腫瘍に由来するＣＴＣは原発性と二次性腫瘍のクレードの間を連結するはずである。そのような系統発生分析は、プライマー腫瘍と二次性腫瘍との間のこの移行部における固有の突然変異を正確に特定するのを助けることができる。これらの突然変異の１つの画分がドライバー突然変異であり得る。さらに、同じ癌の異なる事例（すなわちｎ＞１の腫瘍）からの固有のＣＴＣ突然変異を比較することにより、転移を引き起こす固有のドライバー突然変異をさらに濃縮することができる。

【０１６９】

本発明によれば、原発性腫瘍対二次性腫瘍を同定するための系統発生分析を使用し得る。

【０１７０】

転移の場合、すべての腫瘍を採取した場合は、根付き木を使用して腫瘍が出現した時間的順序、すなわちいずれの腫瘍が原発性腫瘍（樹の根に最も近い節）であり、いずれの腫瘍が最新のものであるかを予測することができる。これは、いずれの腫瘍が原発性であるかを決定することが困難な場合に有用であり得る。

【０１７１】

本発明に関連して、「ＲＮＡ」という用語は、リボヌクレオチド残基を含み、好ましくは完全にまたは実質的にリボヌクレオチド残基から成る分子に関する。「リボヌクレオチド」は、β－Ｄ－リボフラノシル基の２'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドに関する。「ＲＮＡ」という用語は、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分的または完全に精製されたＲＮＡなどの単離されたＲＮＡ、基本的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、ならびに１個以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または変化によって天然に存在するＲＮＡとは異なる修飾ＲＮＡなどの組換え作製されたＲＮＡを含む。そのような変化には、例えばＲＮＡの１または両末端へのまたは内部での、例えばＲＮＡの１個以上のヌクレオチドにおける非ヌクレオチド物質の付加が含まれ得る。ＲＮＡ分子中のヌクレオチドには、天然には存在しないヌクレオチドまたは化学合成ヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドなどの、非標準ヌクレオチドも含まれ得る。これらの変化したＲＮＡは、類似体また

は天然に存在するＲＮＡの類似体と称され得る。

【０１７２】

本発明によれば、「ＲＮＡ」という用語は、「ｍＲＮＡ」を包含し、好ましくは「ｍＲＮＡ」に関する。「ｍＲＮＡ」という用語は「メッセンジャーＲＮＡ」を意味し、ＤＮＡ鋳型を使用することによって作製され、ペプチドまたはタンパク質をコードする「転写産物」に関する。典型的には、ｍＲＮＡは、５'－ＵＴＲ、タンパク質コード領域および３'－ＵＴＲを含む。ｍＲＮＡは、細胞中およびインビトロで限られた半減期しか有さない。本発明に関連して、ｍＲＮＡはＤＮＡ鋳型からインビトロ転写によって作製され得る。インビトロ転写の方法は当業者に公知である。例えば、様々なインビトロ転写キットが市販されている。

【０１７３】

本発明によれば、ＲＮＡの安定性および翻訳効率は必要に応じて改変し得る。例えば、ＲＮＡの安定化作用を有するおよび／または翻訳効率を高める１つ以上の修飾によってＲＮＡを安定化し、その翻訳効率を高め得る。そのような修飾は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＥＰ２００６／００９４４８号に記載されている。本発明に従って使用されるＲＮＡの発現を増大させるために、コード領域内、すなわち発現されるペプチドまたはタンパク質をコードする配列内で、好ましくは発現されるペプチドまたはタンパク質の配列を変化させずに、ＧＣ含量を増大させてｍＲＮＡの安定性を高め、コドン最適化を実施し、したがって細胞中での翻訳を増強するようにＲＮＡを修飾し得る。

【０１７４】

本発明で使用されるＲＮＡに関連して「修飾」という用語は、前記ＲＮＡ中に天然では存在しないＲＮＡの任意の修飾を包含する。

【０１７５】

本発明の１つの実施形態では、本発明に従って使用されるＲＮＡは、キャップされていない５'－三リン酸を有さない。そのようなキャップされていない５'－三リン酸の除去は、ＲＮＡをホスファターゼで処理することによって達成できる。

【０１７６】

本発明によるＲＮＡは、その安定性を高めるおよび／または細胞傷害性を低下させるために修飾されたリボヌクレオチドを有し得る。例えば、１つの実施形態では、本発明に従って使用されるＲＮＡ中で、シチジンを５－メチルシチジンで部分的または完全に、好ましくは完全に置換する。あるいはまたは加えて、１つの実施形態では、本発明に従って使用されるＲＮＡ中で、ウリジンをプソイドウリジンで部分的または完全に、好ましくは完全に置換する。

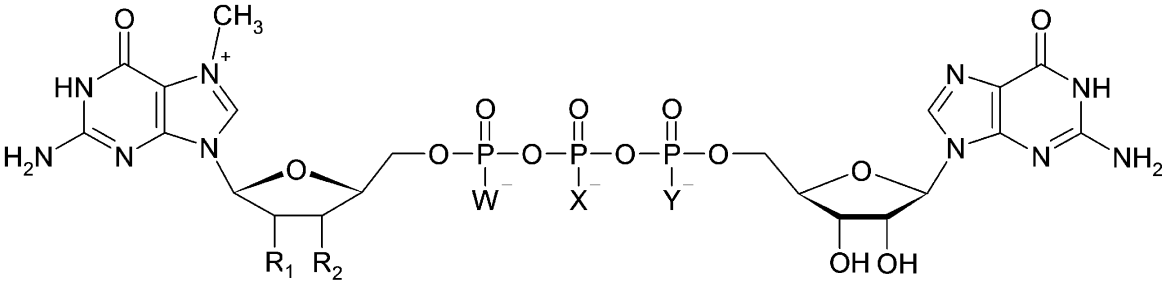
【０１７７】

１つの実施形態では、「修飾」という用語は、ＲＮＡに５'－キャップまたは５'－キャップ類似体を提供することに関する。「５'－キャップ」という用語は、ｍＲＮＡ分子の５'末端に認められるキャップ構造を指し、一般に独特の５'－５'三リン酸結合によってｍＲＮＡに連結されたグアノシンヌクレオチドから成る。１つの実施形態では、このグアノシンは７位でメチル化されている。「従来の５'－キャップ」という用語は、天然に存在するＲＮＡの５'－キャップ、好ましくは７－メチルグアノシンキャップ（m^7G）を指す。本発明に関連して、「５'－キャップ」という用語には、ＲＮＡキャップ構造に類似し、好ましくはインビボおよび／または細胞中で、ＲＮＡに結合した場合ＲＮＡを安定化するおよび／またはＲＮＡの翻訳を増強する能力を有するように修飾されている５'－キャップ類似体が含まれる。

【０１７８】

好ましくは、ＲＮＡの５'末端は、以下の一般式：

【化１】



［式中、R_1およびR_2は、独立してヒドロキシまたはメトキシであり、ならびにW^-、X^-およびY^-は、独立して酸素、硫黄、セレンまたはBH_3である］
を有するキャップ構造を含む。好ましい実施形態では、R_1およびR_2はヒドロキシであり、ならびにW^-、X^-およびY^-は酸素である。さらなる好ましい実施形態では、R_1およびR_2の一方、好ましくはR_1はヒドロキシであり、他方はメトキシであり、ならびにW^-、X^-およびY^-は酸素である。さらなる好ましい実施形態では、R_1およびR_2はヒドロキシであり、ならびにW^-、X^-およびY^-の１つ、好ましくはX^-は硫黄、セレンまたはBH_3、好ましくは硫黄であり、その他は酸素である。さらなる好ましい実施形態では、R_1およびR_2の一方、好ましくはR_2はヒドロキシであり、他方はメトキシであり、ならびにW^-、X^-およびY^-の１つ、好ましくはX^-は硫黄、セレンまたはBH_3、好ましくは硫黄であり、その他は酸素である。

【０１７９】

上記式中、右側のヌクレオチドは、その３'基を介してＲＮＡ鎖に結合されている。

【０１８０】

W^-、X^-およびY^-の少なくとも１つが硫黄である、すなわちホスホロチオエート部分を有するキャップ構造は、種々のジアステレオ異性体の形態で存在し、それらのすべてが本明細書に包含される。さらに、本発明は、上記式のすべての互変異性体および立体異性体を包含する。

【０１８１】

例えば、R_1がメトキシであり、R_2がヒドロキシであり、X^-が硫黄であり、ならびにW^-およびY^-が酸素である上記構造を有するキャップ構造は、２つのジアステレオ異性体形態（ＲｐおよびＳｐ）で存在する。これらは逆相ＨＰＬＣによって分離することができ、逆相ＨＰＬＣカラムからの溶出順序に従ってＤ１およびＤ２と命名される。本発明によれば、$m_2^{7,2'-O}GppspG$のＤ１異性体が特に好ましい。

【０１８２】

ＲＮＡに５'－キャップまたは５'－キャップ類似体を提供することは、前記５'－キャップまたは５'－キャップ類似体の存在下でのＤＮＡ鋳型のインビトロ転写によって達成でき、前記５'－キャップを作製されたＲＮＡ鎖に同時転写によって組み込むか、またはＲＮＡを、例えばインビトロ転写によって作製し、キャッピング酵素、例えばワクシニアウイルスのキャッピング酵素を用いて５'－キャップを転写後にＲＮＡに結合し得る。

【０１８３】

ＲＮＡはさらなる修飾を含み得る。例えば、本発明で使用されるＲＮＡのさらなる修飾は、天然に存在するポリ（Ａ）尾部の伸長もしくは末端切断、または前記ＲＮＡのコード領域に関連しない非翻訳領域（ＵＴＲ）の導入などの５'ＵＴＲもしくは３'ＵＴＲの変化、例えばグロビン遺伝子、例えばα２グロビン、α１グロビン、βグロビン、好ましくはβグロビン、より好ましくはヒトβグロビンに由来する３'ＵＴＲの１コピー以上、好ましくは２コピーと既存の３'ＵＴＲの交換もしくは前記グロビン遺伝子由来の３'ＵＴＲの１コピー以上、好ましくは２コピーの挿入であり得る。

【０１８４】

マスクされていないポリＡ配列を有するＲＮＡは、マスクされたポリＡ配列を有するＲＮＡよりも効率的に翻訳される。「ポリ（Ａ）尾部」または「ポリＡ配列」という用語は

、典型的にはＲＮＡ分子の３'末端に位置するアデニル（Ａ）残基の配列に関し、「マスクされていないポリＡ配列」は、ＲＮＡ分子の３'末端のポリＡ配列がポリＡ配列のＡで終了し、ポリＡ配列の３'末端側、すなわち下流に位置するＡ以外のヌクレオチドが後続していないことを意味する。さらに、約１２０塩基対の長いポリＡ配列は、ＲＮＡの最適な転写産物安定性および翻訳効率をもたらす。

【０１８５】

それゆえ、本発明に従って使用されるＲＮＡの安定性および／または発現を増大させるために、好ましくは１０～５００、より好ましくは３０～３００、さらに一層好ましくは６５～２００、特に１００～１５０個のアデノシン残基の長さを有するポリＡ配列と共に存在するようにＲＮＡを修飾し得る。特に好ましい実施形態では、ポリＡ配列は約１２０個のアデノシン残基の長さを有する。本発明に従って使用されるＲＮＡの安定性および／または発現をさらに増大させるために、ポリＡ配列を脱マスク化することができる。

【０１８６】

加えて、ＲＮＡ分子の３'非翻訳領域（ＵＴＲ）内への３'非翻訳領域の組込みは、翻訳効率の上昇をもたらすことができる。２つ以上のそのような３'非翻訳領域を組み込むことによって相乗効果を達成し得る。３'非翻訳領域は、それらが導入されるＲＮＡに対して自己または異種であってよい。１つの特定の実施形態では、３'非翻訳領域はヒトβグロビン遺伝子に由来する。

【０１８７】

上述した修飾、すなわちポリＡ配列の組込み、ポリＡ配列の脱マスク化および１つ以上の３'非翻訳領域の組込みの組合せは、ＲＮＡの安定性および翻訳効率の上昇に相乗的影響を及ぼす。

【０１８８】

ＲＮＡの「安定性」という用語は、ＲＮＡの「半減期」に関する。「半減期」は、分子の活性、量または数の半分を除去するのに必要な期間に関する。本発明に関連して、ＲＮＡの半減期は前記ＲＮＡの安定性の指標である。ＲＮＡの半減期は、ＲＮＡの「発現の持続期間」に影響を及ぼし得る。長い半減期を有するＲＮＡは長期間発現されると予想することができる。

【０１８９】

言うまでもなく、本発明によれば、ＲＮＡの安定性および／または翻訳効率を低下させることが望ましい場合、ＲＮＡの安定性および／または翻訳効率を上昇させる上述した要素の機能を妨げるようにＲＮＡを修飾することが可能である。

【０１９０】

「発現」という用語は、本発明によればその最も一般的な意味で使用され、例えば転写および／または翻訳による、ＲＮＡおよび／またはペプチドもしくはポリペプチドの産生を含む。ＲＮＡに関して、「発現」または「翻訳」という用語は、特にペプチドまたはポリペプチドの産生に関する。また、核酸の部分的発現も含む。さらに、発現は一過性または安定であり得る。

【０１９１】

本発明によれば、発現という用語には、「異所発現」または「異常発現」も含まれる。「異所発現」または「異常発現」は、本発明によれば、参照、例えば特定のタンパク質、例えば腫瘍抗原の異所または異常発現に関連する疾患を有していない被験体の状態と比較して、発現が変化している、好ましくは増大していることを意味する。発現の増大は、少なくとも１０％、特に少なくとも２０％、少なくとも５０％または少なくとも１００％またはそれ以上の増大を指す。１つの実施形態では、発現は罹患組織においてのみ認められ、健常組織中での発現は抑制されている。

【０１９２】

「特異的に発現される」という用語は、タンパク質が、基本的に特定の組織または器官中でのみ発現されることを意味する。例えば、胃粘膜中で特異的に発現される腫瘍抗原は、前記タンパク質が主として胃粘膜中で発現され、他の組織では発現されないまたは他の

組織または器官型では有意の程度に発現されないことを意味する。したがって、胃粘膜の細胞中で排他的に発現され、精巣などの他の組織では有意に低い程度に発現されるタンパク質は、胃粘膜の細胞中で特異的に発現される。一部の実施形態では、腫瘍抗原はまた、正常条件下では２以上の組織型または器官、例えば２または３の組織型または器官中で、しかし好ましくは３以下の異なる組織または器官型中で特異的に発現され得る。この場合、腫瘍抗原はこれらの器官中で特異的に発現される。例えば、腫瘍抗原が、正常条件下では、好ましくは肺と胃においてほぼ同程度に発現される場合、前記腫瘍抗原は肺および胃中で特異的に発現される。

【０１９３】

本発明に関連して、「転写」という用語は、ＤＮＡ配列中の遺伝暗号がＲＮＡに転写される過程に関する。その後、ＲＮＡはタンパク質へと翻訳され得る。本発明によれば、「転写」という用語は「インビトロ転写」を含み、ここで「インビトロ転写」という用語は、ＲＮＡ、特にｍＲＮＡが、好ましくは適切な細胞抽出物を使用して、無細胞系においてインビトロ合成される過程に関する。好ましくは、クローニングベクターを転写産物の作製に適用する。これらのクローニングベクターは一般に転写ベクターと称され、本発明によれば「ベクター」という用語に包含される。本発明によれば、本発明で使用されるＲＮＡは、好ましくはインビトロ転写ＲＮＡ（ＩＶＴ　ＲＮＡ）であり、適切なＤＮＡ鋳型のインビトロ転写によって入手し得る。転写を制御するためのプロモーターは、任意のＲＮＡポリメラーゼについての任意のプロモーターであり得る。ＲＮＡポリメラーゼの特定の例は、Ｔ７、Ｔ３およびＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼである。好ましくは、本発明によるインビトロ転写はＴ７またはＳＰ６プロモーターによって制御される。インビトロ転写のためのＤＮＡ鋳型は、核酸、特にｃＤＮＡをクローニングし、それをインビトロ転写のための適切なベクターに導入することによって入手し得る。ｃＤＮＡはＲＮＡの逆転写によって入手し得る。

【０１９４】

本発明による「翻訳」という用語は、メッセンジャーＲＮＡの鎖が、ペプチドまたはポリペプチドを作製するようにアミノ酸の配列のアセンブリを指令する、細胞のリボソーム中の過程に関する。

【０１９５】

本発明によれば、核酸と機能的に連結し得る発現制御配列または調節配列は、核酸に関して同種または異種であってよい。コード配列および調節配列は、コード配列の転写または翻訳が調節配列の制御下または影響下にあるように一緒に共有結合されている場合、「機能的に」一緒に連結されている。コード配列と調節配列の機能的連結により、コード配列が機能性タンパク質に翻訳される場合、調節配列の誘導は、コード配列の読み枠シフトを引き起こすことなくまたはコード配列が所望のタンパク質もしくはペプチドに翻訳されることを不可能にすることなく、コード配列の転写をもたらす。

【０１９６】

「発現制御配列」または「調節配列」という用語は、本発明によれば、核酸の転写または誘導されたＲＮＡの翻訳を制御する、プロモーター、リボソーム結合配列および他の制御要素を含む。本発明の特定の実施形態では、調節配列を制御することができる。調節配列の正確な構造は、種または細胞型に応じて異なり得るが、一般に転写または翻訳の開始に関与する５'非転写配列ならびに５'および３'非翻訳配列、例えばＴＡＴＡボックス、キャッピング配列、ＣＡＡＴ配列等を含む。特に、５'非転写調節配列は、機能的に結合した遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列が含まれるプロモーター領域を含む。調節配列はまた、エンハンサー配列または上流活性化配列も含み得る。

【０１９７】

好ましくは、本発明によれば、細胞中で発現されるべきＲＮＡを前記細胞に導入する。本発明による方法の１つの実施形態では、細胞に導入されるべきＲＮＡは、適切なＤＮＡ鋳型のインビトロ転写によって得られる。

【０１９８】

本発明によれば、「発現することができるＲＮＡ」および「コードするＲＮＡ」などの用語は、本明細書では互換的に使用され、特定のペプチドまたはポリペプチドに関して、ＲＮＡが、適切な環境中、好ましくは細胞内に存在する場合、発現されて前記ペプチドまたはポリペプチドを産生できることを意味する。好ましくは、本発明によるＲＮＡは、細胞の翻訳機構と相互作用して、ＲＮＡが発現することができるペプチドまたはポリペプチドを提供することができる。

【０１９９】

「移入する」、「導入する」または「トランスフェクトする」などの用語は、本明細書では互換的に使用され、核酸、特に外因性または異種核酸、特にＲＮＡの細胞への導入に関する。本発明によれば、細胞は、器官、組織および／または生物の一部を形成し得る。本発明によれば、核酸の投与は、裸の核酸としてまたは投与試薬と組み合わせて達成される。好ましくは、核酸の投与は裸の核酸の形態である。好ましくは、ＲＮＡは、ＲＮアーゼ阻害剤などの安定化物質と組み合わせて投与される。本発明はまた、長期間の持続的発現を可能にするための細胞への核酸の反復導入も想定する。

【０２００】

ＲＮＡが、例えばＲＮＡと複合体を形成するかまたはＲＮＡが封入もしくは被包された小胞を形成することによって結合し、裸のＲＮＡと比較してＲＮＡの増大した安定性をもたらすことができる任意の担体を用いて細胞をトランスフェクトすることができる。本発明による有用な担体には、例えば脂質含有担体、例えばカチオン性脂質、リポソーム、特にカチオン性リポソーム、ミセル、およびナノ粒子が含まれる。カチオン性脂質は、負に荷電した核酸と複合体を形成し得る。任意のカチオン性脂質を本発明に従って使用し得る。

【０２０１】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドをコードするＲＮＡの、細胞、特にインビボで存在する細胞への導入は、細胞中での前記ペプチドまたはポリペプチドの発現をもたらす。特定の実施形態では、特定の細胞への核酸の標的化が好ましい。そのような実施形態では、細胞への核酸の投与に適用される担体（例えばレトロウイルスまたはリポソーム）は標的化分子を示す。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体または標的細胞上の受容体のリガンドなどの分子を核酸担体中に組み込み得るかまたは核酸担体に結合し得る。核酸をリポソームによって投与する場合は、標的化および／または取り込みを可能にするために、エンドサイトーシスに関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質をリポソーム製剤に組み込み得る。そのようなタンパク質は、特定の細胞型に特異的なキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、インターナライズされるタンパク質に対する抗体、細胞内の位置を標的とするタンパク質等を包含する。

【０２０２】

本発明によれば、「ペプチド」という用語は、ペプチド結合によって共有結合で連結された２個以上、好ましくは３個以上、好ましくは４個以上、好ましくは６個以上、好ましくは８個以上、好ましくは１０個以上、好ましくは１３個以上、好ましくは１６個以上、好ましくは２１個以上、および好ましくは８、１０、２０、３０、４０または５０個、特に１００個までのアミノ酸を含む物質を指す。「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、大きなペプチド、好ましくは１００個を超えるアミノ酸残基を有するペプチドを指すが、一般に「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は同義語であり、本明細書では互換的に使用される。

【０２０３】

本発明によれば、ペプチドまたはタンパク質に関する「配列変化」という用語は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体およびアミノ酸置換変異体、好ましくはアミノ酸置換変異体に関する。本発明によるこれらの配列変化はすべて、潜在的に新しいエピトープを生成し得る。

【０２０４】

アミノ酸挿入変異体は、特定のアミノ酸配列における１個または２個以上のアミノ酸の

挿入を含む。
【０２０５】
アミノ酸付加変異体は、１個以上のアミノ酸、例えば１、２、３、４または５個以上のアミノ酸のアミノ末端および／またはカルボキシ末端融合物を含む。
【０２０６】
アミノ酸欠失変異体は、配列からの１個以上のアミノ酸の除去、例えば１、２、３、４または５個以上のアミノ酸の除去を特徴とする。
【０２０７】
アミノ酸置換変異体は、配列内の少なくとも１個の残基が除去され、別の残基がその位置に挿入されていることを特徴とする。
【０２０８】
「由来する」という用語は、本発明によれば、特定の実体、特に特定の配列が、それが由来する対象物、特に生物または分子中に存在することを意味する。アミノ酸配列、特に特定の配列領域の場合、「由来する」は特に、関連アミノ酸配列が、その配列がその中に存在するアミノ酸配列から誘導されることを意味する。
【０２０９】
「細胞」または「宿主細胞」という用語は、好ましくは無傷の細胞、すなわち酵素、細胞小器官または遺伝物質などのその正常な細胞内成分が放出されていない無傷の膜を有する細胞である。無傷の細胞は、好ましくは生存可能な細胞、すなわちその正常な代謝機能を遂行することができる生細胞である。好ましくは、前記用語は、本発明によれば、外因性核酸で形質転換またはトランスフェクトすることができる任意の細胞に関する。「細胞」という用語は、本発明によれば、原核細胞（例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））または真核細胞（例えば樹状細胞、Ｂ細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、Ｋ５６２細胞、ＨＥＫ２９３細胞、ＨＥＬＡ細胞、酵母細胞および昆虫細胞）を包含する。外因性核酸は、細胞の内部で（ｉ）それ自体で自由に分散して、（ｉｉ）組換えベクターに組み込まれて、または（ｉｉｉ）宿主細胞ゲノムまたはミトコンドリアＤＮＡに組み入れられて認められ得る。ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギおよび霊長動物由来の細胞などの哺乳動物細胞が特に好ましい。細胞は多くの組織型に由来してよく、初代細胞および細胞株を包含する。特定の例には、ケラチノサイト、末梢血白血球、骨髄幹細胞および胚性幹細胞が含まれる。さらなる実施形態では、細胞は抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球またはマクロファージである。
【０２１０】
核酸分子を含む細胞は、好ましくは前記核酸によってコードされるペプチドまたはポリペプチドを発現する。
【０２１１】
「クローン増殖」という用語は、特定の実体が増加する過程を指す。本発明に関連して、この用語は、好ましくは、リンパ球が抗原によって刺激され、増殖して、前記抗原を認識する特定のリンパ球が増幅される免疫応答に関連して使用される。好ましくは、クローン増殖はリンパ球の分化をもたらす。
【０２１２】
「低減する」または「阻害する」などの用語は、好ましくは５％以上、１０％以上、２０％以上、より好ましくは５０％以上、最も好ましくは７５％以上のレベルの全体的な減少を生じさせる能力に関する。「阻害する」または同様の語句は、完全なまたは基本的に完全な阻害、すなわちゼロまたは基本的にゼロへの低減を包含する。
【０２１３】
「増大させる」、「増強する」、「促進する」または「延長する」などの用語は、好ましくは、およそ少なくとも１０％、好ましくは少なくとも２０％、好ましくは少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、好ましくは少なくとも５０％、好ましくは少なくとも８０％、好ましくは少なくとも１００％、好ましくは少なくとも２００％、特に少なくとも３００％の増大、増強、促進または延長に関する。これらの用語はまた、ゼロまた

は測定不能もしくは検出不能のレベルからゼロを上回るレベルまたは測定可能もしくは検出可能なレベルへの増大、増強、促進または延長にも関し得る。

【０２１４】

本明細書で述べる作用物質、組成物および方法は、疾患、例えば抗原を発現し、抗原ペプチドを提示する異常細胞の存在を特徴とする疾患を有する被験体を治療するために使用することができる。特に好ましい疾患は癌疾患である。本明細書で述べる作用物質、組成物および方法はまた、本明細書で述べる疾患を防止するための免疫またはワクチン接種にも使用し得る。

【０２１５】

本発明によれば、「疾患」という用語は、癌疾患、特に本明細書で述べる癌疾患の形態を含む、任意の病的状態を指す。

【０２１６】

「正常」という用語は、健常被験体または組織における健常状態または状況、すなわち非病的状態を指し、ここで「健常」は、好ましくは非癌性を意味する。

【０２１７】

「抗原を発現する細胞を含む疾患」は、本発明によれば、異常組織または器官の細胞において抗原の発現が検出されることを意味する。異常組織または器官の細胞における発現は、健常組織または器官における状態と比較して増大し得る。増大は、少なくとも１０％、特に少なくとも２０％、少なくとも５０％、少なくとも１００％、少なくとも２００％、少なくとも５００％、少なくとも１０００％、少なくとも１００００％またはさらにそれ以上の増大を指す。１つの実施形態では、発現は罹患組織においてのみ認められ、健常組織中での発現は抑制されている。本発明によれば、抗原を発現する細胞を含むまたは抗原を発現する細胞に関連する疾患には、癌疾患が含まれる。

【０２１８】

癌（医学用語：悪性新生物）は、一群の細胞が制御されない成長（正常限界を超えた分裂）、浸潤（隣接する組織への侵入およびその破壊）ならびに時として転移（リンパまたは血液を介した身体の他の場所への拡大）を示す疾患のクラスである。癌のこれら３つの悪性特性により、自己限定性で、浸潤しないまたは転移しない良性腫瘍とは区別される。大部分の癌は腫瘍を形成するが、白血病のような一部の癌は腫瘍を形成しない。

【０２１９】

悪性腫瘍は、基本的に癌と同義である。悪性疾患、悪性新生物および悪性腫瘍は、基本的に癌と同義である。

【０２２０】

本発明によれば、「腫瘍」または「腫瘍疾患」という用語は、好ましくは腫脹または病巣を形成する細胞（新生細胞、腫瘍形成性細胞または腫瘍細胞と呼ばれる）の異常増殖を指す。「腫瘍細胞」とは、急速で制御されない細胞増殖によって成長し、新たな成長を開始させた刺激が停止した後も成長し続ける異常細胞を意味する。腫瘍は、構造機構および正常組織との機能的協調の部分的または完全な欠如を示し、通常は、良性、前悪性または悪性のいずれかであり得る、明確な組織塊を形成する。

【０２２１】

良性腫瘍は、癌の悪性特性の３つすべてを欠く腫瘍である。したがって、定義により、良性腫瘍は、無制限の、攻撃的な方法で成長することはなく、周囲の組織に浸潤せず、非隣接組織に拡大（転移）しない。

【０２２２】

新生物は、新形成の結果としての異常な組織塊である。新形成（ギリシャ語で新たな成長の意）は細胞の異常増殖である。細胞の成長は、その周りの正常組織の成長を上回り、それらの組織と協調しない。成長は、刺激の停止後も同じ過剰な方法で持続する。これは通常、しこりまたは腫瘍を引き起こす。新生物は良性、前悪性または悪性であり得る。

【０２２３】

本発明による「腫瘍の成長」または「腫瘍成長」は、腫瘍がその大きさを増大する傾向

および／または腫瘍細胞が増殖する傾向に関する。

【０２２４】

本発明の目的上、「癌」および「癌疾患」という用語は、「腫瘍」および「腫瘍疾患」という用語と互換的に使用される。

【０２２５】

癌は、腫瘍に類似する細胞の種類によって、それゆえその腫瘍の起源であると推定される組織によって分類される。これらは、それぞれ組織学および場所である。

【０２２６】

本発明による「癌」という用語は、白血病、セミノーマ、メラノーマ、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、直腸癌、子宮内膜癌、腎癌、副腎癌、甲状腺癌、血液癌、皮膚癌、脳の癌、子宮頸癌、腸癌、肝癌、結腸癌、胃癌、腸癌、頭頸部癌、胃腸の癌、リンパ節癌、食道癌、結腸直腸癌、膵癌、耳、鼻および咽喉（ＥＮＴ）癌、乳癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌および肺癌ならびにそれらの転移を含む。その例は、肺癌腫、乳癌腫、前立腺癌腫、結腸癌腫、腎細胞癌腫、子宮頸癌腫または上記で述べた癌型または腫瘍の転移である。本発明による「癌」という用語は、癌転移および癌の再発も含む。

【０２２７】

肺癌の主な種類は小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）および非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。非小細胞肺癌には３つの主要なサブタイプ：扁平上皮肺癌扁平上皮肺癌、腺癌および大細胞肺癌がある。腺癌は肺癌の約１０％を占める。この癌は通常肺の末梢部で認められ、これに対し小細胞肺癌および扁平上皮肺癌は、どちらもより中心部に位置する傾向がある。

【０２２８】

皮膚癌は、皮膚上の悪性増殖物である。最も一般的な皮膚癌は、基底細胞癌、扁平上皮癌およびメラノーマである。悪性メラノーマは重篤な種類の皮膚癌である。悪性メラノーマは、メラノサイトと呼ばれる色素細胞の制御されない増殖に起因する。

【０２２９】

本発明によれば、「癌腫」は上皮細胞に由来する悪性腫瘍である。この群は、一般的な形態の乳癌、前立腺癌、肺癌および結腸癌を含む、最も一般的な癌である。

【０２３０】

「細気管支癌腫」は、終末細気管支の上皮に由来すると考えられる肺の癌腫であり、終末細気管支では、新生物組織が肺胞壁に沿って伸び、肺胞内で小塊として成長する。ムチンが細胞の一部および肺胞内の物質中で明らかにされることがあり、これには剥離細胞も含まれる。

【０２３１】

「腺癌」は、腺組織から発生する癌である。この組織は、上皮組織として知られるより大きな組織カテゴリーの一部でもある。上皮組織には、皮膚、腺ならびに体腔および身体の器官の内側を覆う様々な他の組織が含まれる。上皮は、発生学的には外胚葉、内胚葉および中胚葉に由来する。腺癌として分類されるために、細胞は、それらが分泌特性を有する限り、必ずしも腺の一部である必要はない。この形態の癌腫は、ヒトを含む一部の高等哺乳動物において発生し得る。十分に分化した腺癌は、それらが由来する腺組織に類似する傾向があるが、十分に分化していないものはその傾向がない場合もある。生検からの細胞を染色することにより、病理学者は腫瘍が腺癌であるかまたは何らかの他の型の癌であるかを決定する。腺癌は、体内の腺の遍在性のゆえに身体の多くの組織で生じ得る。各々の腺が同じ物質を分泌しているとは限らないが、細胞への外分泌機能が存在する限り、腺とみなされ、それゆえその悪性形態は腺癌と命名される。悪性腺癌は他の組織を浸潤し、転移するのに十分な時間があればしばしば転移する。卵巣腺癌は最も一般的な型の卵巣癌である。これには漿液性および粘液性腺癌、明細胞腺癌および類内膜腺癌が含まれる。

【０２３２】

腎細胞癌または腎細胞腺癌としても知られる腎細胞癌腫は、血液をろ過し、老廃物を除去する腎臓内の非常に小さな管である、近位尿細管の内層で発生する腎癌である。腎細胞癌腫は、成人における群を抜いて最も一般的な型の腎癌であり、すべての尿生殖器腫瘍の

うちで最も致死的である。腎細胞癌腫の異なるサブタイプは、明細胞腎細胞癌および乳頭状腎細胞癌である。明細胞腎細胞癌は最も一般的な形態の腎細胞癌腫である。顕微鏡下で見た場合、明細胞腎細胞癌を構成する細胞は非常に色が薄いかまたは透明に見える。乳頭状腎細胞癌は２番目に多いサブタイプである。これらの癌は、腫瘍の、大部分ではないにせよ一部では、小指様の突起（乳頭と呼ばれる）を形成する。

【０２３３】

リンパ腫および白血病は、造血（血液形成）細胞に由来する悪性疾患である。

【０２３４】

芽球性腫瘍または芽細胞腫は、未熟組織または胚組織に類似する腫瘍（通常は悪性）である。これらの腫瘍の多くは、小児において最も一般的である。

【０２３５】

「転移」とは、そのもとの部位から身体の別の部分への癌細胞の拡大を意味する。転移の形成は非常に複雑な過程であり、原発性腫瘍からの悪性細胞の分離、細胞外マトリックスの侵襲、体腔および脈管に侵入するための内皮基底膜の貫入、ならびに次に、血液によって運ばれた後の、標的器官の浸潤に依存する。最後に、標的部位における新たな腫瘍、すなわち二次性腫瘍または転移性腫瘍の成長は、血管新生に依存する。腫瘍転移はしばしば原発性腫瘍の除去後でも起こり、これは、腫瘍細胞または腫瘍成分が残存し、転移能を発現し得るからである。１つの実施形態では、本発明による「転移」という用語は「遠隔転移」に関し、これは原発性腫瘍および所属リンパ節系から遠く離れた転移に関する。

【０２３６】

二次性または転移性腫瘍の細胞はもとの腫瘍における細胞に類似する。これは、例えば卵巣癌が肝臓に転移した場合、二次性腫瘍は異常な肝細胞ではなく異常な卵巣細胞で構成されることを意味する。その場合、肝臓における腫瘍は、肝癌ではなく転移性卵巣癌と呼ばれる。

【０２３７】

卵巣癌では、転移は以下のようにして起こり得る：直接接触または拡大によって。転移は、卵巣の近くまたは周囲に位置する隣接組織または器官、例えばファローピウス管、子宮、膀胱、直腸等に浸潤することができる；卵巣癌が広がる最も一般的な方法である、腹腔内への播種または脱落によって。癌細胞は卵巣塊の表面を突き破り、肝臓、胃、結腸または横隔膜などの腹部内の他の構造体へと「落下する」；卵巣塊から離脱し、リンパ管に侵入して、次に身体の他の領域または肺もしくは肝臓などの遠隔器官へと移動することによって；卵巣塊から離脱し、血液系に侵入して、身体の他の領域または遠隔器官へと移動することによって。

【０２３８】

本発明によれば、転移性卵巣癌には、ファローピウス管の癌、腹部の器官における癌、例えば腸の癌、子宮の癌、膀胱の癌、直腸の癌、肝臓の癌、胃の癌、結腸の癌、横隔膜の癌、肺の癌、腹部または骨盤（腹膜）の内層における癌、および脳の癌が含まれる。同様に、転移性肺癌は、肺から体内の遠隔部位および／またはいくつかの部位に広がった癌を指し、これには肝臓の癌、副腎の癌、骨の癌、および脳の癌が含まれる。

【０２３９】

「血中循環腫瘍細胞」または「ＣＴＣ」という用語は、原発性腫瘍または腫瘍転移から分離しており、血流中を循環する細胞に関する。ＣＴＣは、異なる組織におけるさらなる腫瘍（転移）のその後の成長の種を構成し得る。血中循環腫瘍細胞は、転移性疾患を有する患者において全血１ｍＬ当たりほぼ１～１０個程度のＣＴＣという頻度で認められる。ＣＴＣを単離するための検査方法が開発されている。ＣＴＣを単離するためのいくつかの検査方法が当分野で記述されており、例えば上皮細胞が、正常な血球中には存在しない細胞接着タンパク質ＥｐＣＡＭを一般的に発現するという事実を利用する技術がある。免疫磁気ビーズに基づく捕獲法は、磁性粒子と結合したＥｐＣＡＭに対する抗体で血液標本を処理し、次いで磁場で標識細胞を分離することを含む。次に単離された細胞を、まれなＣＴＣを混入白血球から区別するために、もう１つの上皮マーカーであるサイトケラチンな

らびに共通の白血球マーカーＣＤ４５に対する抗体で染色する。この堅固で半自動化されたアプローチは、約１個のＣＴＣ／ｍＬの平均収率および０．１％の純度でＣＴＣを同定する（Ａｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．，２００４：Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ １０，６８９７－６９０４）。ＣＴＣを単離するための２番目の方法は、マイクロフルイディクスに基づくＣＴＣ捕獲装置を使用し、これは、ＥｐＣＡＭに対する抗体で被覆することによって機能性にした８０，０００個のマイクロポストを包埋したチャンバーを通して全血を流すことを含む。次にＣＴＣをサイトケラチンまたは組織特異的マーカー、例えば前立腺癌におけるＰＳＡまたは乳癌におけるＨＥＲ２に対する二次抗体で染色し、三次元座標に沿った複数の平面でのマイクロポストの自動走査によって視覚化する。ＣＴＣチップは、患者において５０細胞／ｍｌの平均収率および１～８０％の範囲の純度でサイトケラチン陽性血中循環腫瘍細胞を同定することができる（Ｎａｇｒａｔｈ ｅｔ ａｌ．，２００７：Ｎａｔｕｒｅ ４５０，１２３５－１２３９）。ＣＴＣを単離するための別の可能性は、Ｖｅｒｉｄｅｘ，ＬＬＣ（Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪ）からのＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ Ｔｕｍｏｒ Ｃｅｌｌ（ＣＴＣ） Ｔｅｓｔを使用することであり、これは血液チューブ中でＣＴＣを捕獲し、同定し、計数する。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムは、全血中のＣＴＣの計数のための米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認された方法であり、免疫磁気標識と自動デジタル顕微鏡法の組合せに基づく。その他にも文献中で記述されているＣＴＣを単離するための方法があり、そのすべてが本発明と共に使用することができる。

【０２４０】

再発または回帰は、人が過去に罹患した状態に再び罹患する場合に起こる。例えば、患者が腫瘍疾患に罹患したことがあり、前記疾患の治療を受けて成功したが、前記疾患を再び発症した場合、前記新たに発症した疾患は再発または回帰とみなされ得る。しかし、本発明によれば、腫瘍疾患の再発または回帰は、もとの腫瘍疾患の部位でも起こり得るが、必ずしもそうとは限らない。したがって、例えば、患者が卵巣腫瘍に罹患し、治療を受けて成功したことがある場合、再発または回帰は、卵巣腫瘍の発生であり得るかまたは卵巣とは異なる部位における腫瘍の発生であり得る。腫瘍の再発または回帰は、腫瘍がもとの腫瘍の部位とは異なる部位で起こる状況ならびにもとの腫瘍の部位で起こる状況も含む。好ましくは、患者が治療を受けたことがあるもとの腫瘍は原発性腫瘍であり、もとの腫瘍の部位とは異なる部位における腫瘍は二次性または転移性腫瘍である。

【０２４１】

「治療する」とは、被験体において腫瘍の大きさもしくは腫瘍の数を低減することを含む、疾患を予防するもしくは排除するため；被験体において疾患を停止させるもしくは疾患の進行を遅らせるため；被験体において新たな疾患の発症を阻害するもしくは遅らせるため；現在疾患を有しているもしくは以前に疾患を有していたことがある被験体において症状および／もしくは再発の頻度もしくは重症度を低下させるため；ならびに／または被験体の生存期間を延長させる、すなわち増大させるために、本明細書で述べる化合物または組成物を被験体に投与することを意味する。特に、「疾患の治療」という用語は、疾患またはその症状を治癒する、期間を短縮する、改善する、予防する、進行もしくは悪化を緩徐化するもしくは阻害する、または発症を予防するもしくは遅延させることを含む。

【０２４２】

「危険性がある」とは、一般集団と比較して、疾患、特に癌を発症する可能性が通常より高いと同定される被験体、すなわち患者を意味する。加えて、疾患、特に癌を有していたことがあるまたは現在有している被験体は、そのような被験体は引き続き疾患を発症する可能性があるので、疾患を発症する危険性が高い被験体である。現在癌を有しているまたは癌を有していたことがある被験体は、癌転移の危険性も高い。

【０２４３】

「免疫療法」という用語は、特異的免疫反応の活性化を含む治療に関する。本発明に関連して、「防御する」、「予防する」、「予防的」、「防止的」または「防御的」などの用語は、被験体における疾患の発症および／または伝播の予防または治療またはその両方

、特に被験体が疾患を発症する可能性を最小限に抑えることまたは疾患の発症を遅延させることに関する。例えば、上述したように、腫瘍の危険性がある人は、腫瘍を予防するための治療法の候補である。

【０２４４】

免疫療法の予防的投与、例えば本明細書で述べる組成物の予防的投与は、好ましくは疾患の発症から受容者を保護する。免疫療法の治療的投与、例えば本明細書で述べる組成物の治療的投与は、疾患の進行／成長の阻害をもたらし得る。これは、好ましくは疾患の排除をもたらす、疾患の進行／成長の減速、特に疾患の進行の停止を含む。

【０２４５】

免疫療法は、本明細書で提供される作用物質が患者から異常細胞を除去するように機能する、様々な技術のいずれかを用いて実施し得る。そのような除去は、抗原または抗原を発現する細胞に特異的な患者における免疫応答を増強するまたは誘導することの結果として起こり得る。

【０２４６】

特定の態様内で、免疫療法は能動免疫療法であり得、この場合の治療は、免疫応答調節物質（本明細書で提供されるポリペプチドおよび核酸など）の投与による、異常細胞に対して反応する内因性宿主免疫系のインビボ刺激に基づく。

【０２４７】

本明細書で提供される作用物質および組成物は、単独でまたは従来の治療レジメン、例えば手術、放射線、化学療法および／もしくは骨髄移植（自家、同系、同種異系もしくは無関係）と組み合わせて使用し得る。

【０２４８】

「免疫」または「ワクチン接種」という用語は、治療的または予防的理由から免疫応答を誘導することを目的として被験体を治療する過程を表す。

【０２４９】

「インビボ」という用語は、被験体における状況に関する。

【０２５０】

「被験体」、「個体」、「生物」または「患者」という用語は互換的に使用され、脊椎動物、好ましくは哺乳動物に関する。例えば、本発明に関連して哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長動物、家畜、例えばイヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、ウマ等、実験動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット等、ならびに動物園の動物などの捕らわれている動物である。本明細書で使用される「動物」という用語はヒトも包含する。「被験体」という用語は、患者、すなわち動物、好ましくは疾患を有するヒト、好ましくは本明細書で述べる疾患を有するヒトも包含し得る。

【０２５１】

「自家」という用語は、同じ被験体に由来するものを表すために使用される。例えば「自家移植」は、同じ被験体に由来する組織または器官の移植を指す。そのような手順は、さもなければ拒絶反応をもたらす免疫学的障壁を乗り越えるので、好都合である。

【０２５２】

「異種」という用語は、複数の異なる要素から成るものを表すために使用される。一例として、ある個体の骨髄の異なる個体への移入は異種移植を構成する。異種遺伝子は、その被験体以外の供給源に由来する遺伝子である。

【０２５３】

免疫またはワクチン接種のための組成物の一部として、好ましくは本明細書で述べる１つ以上の作用物質を、免疫応答を誘導するためまたは免疫応答を増大させるために１つ以上のアジュバントと共に投与する。「アジュバント」という用語は、免疫応答を延長するまたは増強するまたは促進する化合物に関する。本発明の組成物は、好ましくはアジュバントの添加なしでその作用を及ぼす。それでもやはり、本出願の組成物は任意の公知のアジュバントを含有し得る。アジュバントには、油性エマルジョン（例えばフロイントアジュバント）、無機化合物（ミョウバンなど）、細菌生成物（百日咳菌毒素など）、リポソ

ームおよび免疫刺激性複合体などの不均一な群の化合物が含まれる。アジュバントの例は、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ　ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　Ｂｅｅｃｈａｍ）、サポニン、例えばＱＳ２１（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　Ｂｅｅｃｈａｍ）、ＤＱＳ２１（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　Ｂｅｅｃｈａｍ；国際公開第９６／３３７３９号）、ＱＳ７、ＱＳ１７、ＱＳ１８およびＱＳ－Ｌ１（Ｓｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌｓ　７：１７８－１８６）、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、ビタミンＥ、モンタニド、ミョウバン、ＣｐＧオリゴヌクレオチド（Ｋｒｉｅｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｎａｔｕｒｅ　３７４：５４６－５４９）、ならびにスクアレンおよび／またはトコフェロールなどの生分解性油から調製される様々な油中水型エマルジョンである。

【０２５４】

患者の免疫応答を刺激する他の物質も投与し得る。例えばサイトカインを、それらのリンパ球への調節特性のゆえに、ワクチン接種において使用することが可能である。そのようなサイトカインには、ワクチンの防御作用を増大することが示された（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６８：１４３２－１４３４，１９９５参照）インターロイキン１２（ＩＬ－１２）、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－１８が含まれる。

【０２５５】

免疫応答を増強し、それゆえワクチン接種において使用し得る多くの化合物がある。前記化合物には、Ｂ７－１およびＢ７－２（それぞれＣＤ８０およびＣＤ８６）などのタンパク質または核酸の形態で提供される共刺激分子が含まれる。

【０２５６】

本発明によれば、「腫瘍標本」は、血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの腫瘍細胞もしくは癌細胞を含有する身体試料、特に体液を含む組織試料、および／または細胞試料などの試料である。本発明によれば、「非腫瘍形成性標本」は、血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの腫瘍細胞もしくは癌細胞を含有しない身体試料、特に体液を含む組織試料、および／または細胞試料などの試料である。そのような身体試料は従来の方法で、例えばパンチ生検を含む組織生検によって、および血液、気管支吸引液、痰、尿、糞便または他の体液を採取することによって入手し得る。本発明によれば、「試料」という用語は、生物学的試料の分画または単離物、例えば核酸または細胞単離物などの加工された試料も包含する。

【０２５７】

本明細書で述べる治療活性物質、ワクチンおよび組成物は、注射または注入を含む、任意の従来の経路によって投与し得る。投与は、例えば経口的、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下的または経皮的に実施し得る。１つの実施形態では、投与は、リンパ節への注射などによって節内に実施する。他の形態の投与は、本明細書で述べる核酸による樹状細胞などの抗原提示細胞のインビトロトランスフェクション、それに続く抗原提示細胞の投与を想定する。

【０２５８】

本明細書で述べる作用物質は有効量で投与される。「有効量」は、単独でまたはさらなる投与と併せて、所望の反応または所望の作用を達成する量を指す。特定の疾患または特定の状態の治療の場合、所望の反応は、好ましくは疾患の進行の阻害に関する。これは、疾患の進行を遅らせる、特に疾患の進行を妨げるまたは逆転させることを含む。疾患または状態の治療における所望の反応はまた、前記疾患または前記状態の発症の遅延または発症の防止であり得る。

【０２５９】

本明細書で述べる作用物質の有効量は、治療される状態、疾患の重症度、年齢、生理的状態、大きさおよび体重を含む患者の個別パラメータ、治療の期間、併用療法の種類（存在する場合）、特定の投与経路ならびに同様の因子に依存する。したがって、本明細書で述べる作用物質の投与される用量はそのような様々なパラメータに依存し得る。初期用量で患者における反応が不十分である場合、より高用量（または異なる、より限局された投与経路によって達成される効果的により高い用量）を使用し得る。

【０２６０】
本明細書で述べる医薬組成物は、好ましくは滅菌であり、所望の反応または所望の作用を生じさせるために有効量の治療活性物質を含有する。
【０２６１】
本明細書で述べる医薬組成物は、一般に医薬的に適合性の量でおよび医薬的に適合性の調製物中で投与される。「医薬的に適合性」という用語は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない非毒性物質を指す。この種の調製物は通常、塩、緩衝物質、防腐剤、担体、アジュバントなどの補足的な免疫増強物質、例えばＣｐＧオリゴヌクレオチド、サイトカイン、ケモカイン、サポニン、ＧＭ－ＣＳＦおよび／またはＲＮＡ、ならびに、適切な場合は、他の治療活性化合物を含有し得る。薬剤中で使用される場合、塩は医薬的に適合性であるべきである。しかし、医薬的に適合性でない塩は、医薬的に適合性の塩を調製するために使用されることがあり、本発明に包含される。この種の薬理学的および医薬的に適合性の塩には、非限定的に、以下の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸等から調製されるものが含まれる。医薬的に適合性の塩は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩としても調製され得る。
【０２６２】
本明細書で述べる医薬組成物は、医薬的に適合性の担体を含有し得る。「担体」という用語は、適用を容易にするために活性成分が組み合わされる、天然または合成の有機または無機成分を指す。本発明によれば、「医薬的に適合性の担体」という用語は、患者への投与に適する、１つ以上の適合性の固体もしくは液体充填剤、希釈剤または被包物質を含む。本明細書で述べる医薬組成物の成分は、通常、所望の医薬的効果を実質的に損なう相互作用が起こらないものである。
【０２６３】
本明細書で述べる医薬組成物は、適切な緩衝物質、例えば塩の状態の酢酸、塩の状態のクエン酸、塩の状態のホウ酸および塩の状態のリン酸を含有し得る。
【０２６４】
医薬組成物は、適切な場合は、適切な防腐剤、例えば塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサールも含有し得る。
【０２６５】
医薬組成物は、通常、単位投与形態で提供され、それ自体公知の方法で製造し得る。本明細書で述べる医薬組成物は、例えばカプセル、錠剤、ロゼンジ、溶液、懸濁液、シロップ、エリキシルまたは乳剤の形態であり得る。
【０２６６】
非経口投与に適する組成物は、通常、好ましくは受容者の血液と等張である、活性化合物の滅菌水性または非水性調製物を含む。適合性担体および溶媒の例は、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、通常は滅菌固定油を溶液または懸濁液媒質として使用する。
【０２６７】
本発明を以下の図面および実施例によって詳細に説明するが、これらは説明のためにのみ使用されるものであり、限定を意図しない。説明および実施例により、同様に本発明に包含されるさらなる実施形態が当業者にアクセス可能である。
以下、参考形態の例を付記する。
１．　患者において癌を予防するまたは処置するための方法であって、
（ｉ）前記患者において１つ以上の腫瘍抗原に対する第一免疫応答を誘導する工程、および
（ｉｉ）前記患者において１つ以上の腫瘍抗原に対する第二免疫応答を誘導する工程であって、前記第二免疫応答が、前記患者の癌細胞中に存在する癌特異的体細胞突然変異に特異的である、工程、
を含む方法。

２．　前記第一および／または第二免疫応答が細胞性応答である、１．に記載の方法。
３．　前記第一免疫応答がＣＤ８＋Ｔ細胞応答を含む、１．または２．に記載の方法。
４．　前記第二免疫応答がＣＤ４＋Ｔ細胞応答を含む、１．から３．のいずれかに記載の方法。
５．　前記第一免疫応答が、前記患者の癌細胞中に存在する癌特異的体細胞突然変異に特異的ではない、１．から４．のいずれかに記載の方法。
６．　前記第一免疫応答が製造前ワクチン生成物のセットから選択される１つ以上のワクチン生成物を投与することによって誘導され、各々の製造前ワクチン生成物が腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導し、前記セットが好ましくは異なる腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導するワクチン生成物を含む、１．から５．のいずれかに記載の方法。
７．　投与される前記ワクチン生成物が、処置される癌において一般的である腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する、６．に記載の方法。
８．　前記セットが、種々の癌において一般的である腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導するワクチン生成物を含む、６．または７．に記載の方法。
９．　前記患者が前記１つ以上の腫瘍抗原について陽性である、１．から８．のいずれかに記載の方法。
１０．　前記癌特異的体細胞突然変異が、前記患者の癌細胞のエクソーム中に存在するおよび／または非同義突然変異である、１．から９．のいずれかに記載の方法。
１１．　前記第二免疫応答が、突然変異に基づくネオエピトープを含むポリペプチドまたは前記ポリペプチドをコードする核酸を含有するワクチンを投与することによって誘導され、前記ポリペプチドが好ましくは３０までの突然変異に基づくネオエピトープを含む、１．から１０．のいずれかに記載の方法。
１２．　前記ポリペプチドが、癌細胞によって発現される癌特異的体細胞突然変異を含まないエピトープをさらに含む、１１．に記載の方法。
１３．　前記エピトープが、ワクチン配列を形成するようにそれらの天然配列状況に存在し、前記ワクチン配列が好ましくは約３０アミノ酸長である、１１．または１２．に記載の方法。
１４．　前記ネオエピトープ、エピトープおよび／またはワクチン配列が、頭－尾方向に並んでいるおよび／またはリンカーによって分離されている、１１．から１３．のいずれかに記載の方法。
１５．　前記第一および／または第二免疫応答が、ＲＮＡワクチンを投与することによって誘導される、１．から１４．のいずれかに記載の方法。
１６．　前記腫瘍抗原が腫瘍関連抗原である、１．から１５．のいずれかに記載の方法。

【実施例】

【０２６８】

本明細書で使用される技術および方法は、本明細書において説明されるかまたはそれ自体公知のようにおよび、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．に記載されているように実施される。キットおよび試薬の使用を含むすべての方法は、特に指示されない限り製造者の情報に従って実施される。

【０２６９】

（実施例１）

突然変異の検出および優先順位付け

我々は、最初に、バイアスのない方法で体細胞突然変異を同定するための腫瘍試料および正常試料の配列プロファイリングを明らかにする。我々はこれをバルク腫瘍試料に関して明らかにするだけでなく、初めて、個々の血中循環腫瘍細胞から突然変異を同定する能力も実証する。次に、突然変異の予測される免疫原性に基づきポリネオエピトープワクチンに含めるための突然変異を優先順位付け、同定された突然変異が実際に免疫原性である

ことを実証する。

【０２７０】

突然変異の検出

ＣＴＣを使用する論理的根拠：癌患者の末梢血からの血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の検出は、腫瘍の臨床経過についての広く認められている独立した予後マーカーである（Ｐａｎｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｍｏｌ　Ｍｅｄ　２０１０；１６（９）：３９８－４０６）。長年にわたって、ＣＴＣの臨床的重要性は腫瘍学における熱心な学術および臨床研究の主題となってきた。転移性乳癌、前立腺癌および結腸直腸癌を有する患者の血液中のＣＴＣの検出は予後と関連性があり、従来の画像化技術および他の予後腫瘍バイオマーカーに付加的な情報を提供することが示されている。治療薬による処置（全身的または標的化）の前、初期段階中および処置後に患者から採取した連続的な血液試料は、処置の応答／失敗に関する情報を提供する。薬剤耐性ＣＴＣの分子分析は、個々の患者における耐性機構（例えば特定のシグナル伝達経路における突然変異または標的発現の喪失）へのさらなる洞察を提供し得る。ＣＴＣのプロファイリングおよび遺伝的特性付けからのさらなる可能性は、新しい標的療法の開発のための新規癌標的の同定である。この新しい診断戦略は「液体腫瘍生検」と称される。このプロファイリングは迅速で繰り返し行うことができ、患者の血液しか必要とせず、手術は不要であるので、腫瘍の状態の「リアルタイム」表示を提供する。

【０２７１】

腫瘍細胞からの突然変異：我々は、Ｂ１６メラノーマ細胞、タンパク質コード領域を抽出するためのエクソーム捕獲、我々のＨｉＳｅｑ　２０００を用いた次世代シークエンシング、次いで我々の「ｉＣＡＭ」ソフトウェアパイプラインを用いたバイオインフォマティクス解析を使用して突然変異を同定する我々の能力を明らかにする（図１）。我々は２４４８の非同義突然変異を同定し、確認のために５０を選択した。５０の体細胞突然変異全部を確認することができた。

【０２７２】

以下は、Ｂ１６メラノーマ細胞中の発見された体細胞突然変異のタンパク質影響の一例である：

【化２】

Kif18b, NM_197959, エクソン 3

突然変異　(+15 aa)
SPSKPSFQEFVDWE**N**VSPELNSTDQPFLPS
野生型　(+15 aa)
SPSKPSFQEFVDWE**K**VSPELNSTDQPFLPS

【０２７３】

個々の血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）からの突然変異：次に、我々は、１個のＣＴＣからのＲＮＡのＮＧＳプロファイリングから、腫瘍特異的体細胞突然変異を同定することができた。標識したＢ１６メラノーマ細胞をマウスの尾部に静脈内注射し、マウスを犠死させて、心臓から血液を採取し、細胞を選別して標識血中循環Ｂ１６細胞（ＣＴＣ）を回収し、ＲＮＡを抽出して、ＳＭＡＲＴに基づくｃＤＮＡ合成および非特異的増幅を実施し、次いでＮＧＳ　ＲＮＡ－Ｓｅｑアッセイおよびサブ配列データ解析（下記）を行った。

【０２７４】

我々は８個の個別ＣＴＣをプロファイリングし、体細胞突然変異を同定した。さらに、８個の細胞中８個で、以前に同定された体細胞突然変異を同定した。複数の場合に、データは個別細胞レベルで不均一性を示した。例えば、２番染色体上の位置１４４０７８２２７（アセンブリｍｍ９）で、遺伝子Ｓｎｘ１５において、２個の細胞は参照ヌクレオチド（Ｃ）を示し、２個の細胞は突然変異ヌクレオチド（Ｔ）を示した。

【０２７５】

これは、我々が、「リアルタイム」ｉＶＡＣ（個別化ワクチン）への基本的な道筋であ

る、個々のＣＴＣをプロファイリングして体細胞突然変異を同定することができることを実証し、「リアルタイム」ｉＶＡＣでは、患者を繰り返しプロファイリングし、その結果は、より早い時点の患者の状態ではなく現在の患者の状態を反映する。さらにこれは、我々が、腫瘍細胞のサブセット中に存在する不均一な体細胞突然変異を同定することができ、主要な突然変異とまれな突然変異の同定などのために、突然変異頻度の評価を可能にすることを明らかにする。

【０２７６】

（方法）

試料：プロファイリング実験のために、試料は、Ｃ５７ＢＬ／６マウスからの５～１０ｍｍの尾部試料（「Ｂｌａｃｋ６」）およびもともとはＢｌａｃｋ６マウスに由来する、高度に攻撃的なＢ１６Ｆ１０マウスメラノーマ細胞（「Ｂ１６」）を含んだ。

【０２７７】

蛍光標識したＢ１６メラノーマ細胞を使用して血中循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を作製した。Ｂ１６細胞をＰＢＳ中に再懸濁し、等容量の新鮮調製したＣＦＳＥ溶液（ＰＢＳ中５μＭ）を細胞に添加した。試料をボルテックスによって穏やかに混合し、次いで室温で１０分間インキュベートした。標識化反応を停止させるために、２０％ＦＳＣを含有する等量のＰＢＳを試料に添加し、ボルテックスによって穏やかに混合した。室温で２０分間のインキュベーション後、ＰＢＳを使用して細胞を２回洗浄した。最後に、細胞をＰＢＳに再懸濁し、マウスに静脈内（ｉ．ｖ．）注射した。３分後、マウスを犠死させ、血液を採取した。

【０２７８】

血液試料からの赤血球を、血液１００μｌにつき新鮮調製したＰｈａｒｍＬｙｓｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）１．５ｍｌを添加することによって溶解した。１回の洗浄工程後、７－ＡＡＤを試料に添加し、室温で５分間インキュベートした。インキュベーションに続いて２回の洗浄を実施し、試料をＰＢＳ　５００μｌ中に再懸濁した。

【０２７９】

ＣＦＳＥ標識した血中循環Ｂ１６細胞をＡｒｉａ　Ｉセルソーター（ＢＤ）で選別した。単一細胞を、ＲＬＴ緩衝液（Ｑｕｉａｇｅｎ）５０μｌ／ウェルで調製した９６ウェルのｖ底プレート上で選別した。選別を終了した後、核酸抽出および試料調製を開始するまでプレートを－８０℃で保存した。

【０２８０】

核酸抽出および試料調製：Ｂ１６細胞からの核酸（ＤＮＡおよびＲＮＡ）ならびにＢｌａｃｋ６尾部組織（ＤＮＡ）を、Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　Ｔｉｓｓｕｅキット（ＤＮＡ）およびＱｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｃｒｏキット（ＲＮＡ）を用いて抽出した。

【０２８１】

個々の選別したＣＴＣについて、ＲＮＡを抽出し、ＳＭＡＲＴに基づくｃＤＮＡ合成および非特異的増幅を実施した。選別したＣＴＣ細胞からのＲＮＡを、供給者の指示に従ってＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｃｒｏ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で抽出した。改変ＢＤ　ＳＭＡＲＴプロトコルをｃＤＮＡ合成のために使用した：Ｍｉｎｔ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（Ｅｖｒｏｇｅｎ，Ｍｏｓｃｏｗ，Ｒｕｓｓｉａ）を、第一鎖合成反応のプライミングのための長いオリゴ（ｄＴ）－Ｔ－プライマーならびに逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性による伸長した鋳型の生成および鋳型スイッチを可能にするためにオリゴ（リボＧ）配列を導入するＴＳ－ｓｈｏｒｔ（Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃ　Ｓ．Ａ．，Ｓｅｒａｉｎｇ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）と組み合わせた［Ｃｈｅｎｃｈｉｋ，Ａ．，Ｙ．　ｅｔ　ａｌ．１９９８．Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｈｉｇｈ　ｑｕａｌｉｔｙ　ｃＤＮＡ　ｆｒｏｍ　ｓｍａｌｌ　ａｍｏｕｎｔｓ　ｏｆ　ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　ｂｙ　ＳＭＡＲＴ　ＰＣＲ．Ｉｎ　Ｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　ａｎｄ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｂｙ　ＲＴ－ＰＣＲ．Ｐ．Ｌ．Ｊ．Ｓ

ｉｅｂｅｒｔ，ｅｄ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｂｏｏｋｓ，ＭＡ，Ｎａｔｉｃｋ．３０５－３１９］。製造者の指示に従って合成した第一鎖ｃＤＮＡを、ｄＮＴＰ ２００μＭの存在下でＰｆｕＵｌｔｒａ Ｈｏｔｓｔａｒｔ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＤＮＡ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ 5Ｕ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）およびＴＳ－ＰＣＲプライマー０．４８μＭを用いて３５サイクルの増幅に供した（サイクリング条件：９５℃で２分、９４℃で３０秒、６５℃で３０秒、７２℃で１分、７２℃で６分の最終伸長）。アクチンおよびＧＡＰＤＨを観測する特異的プライマーでＣＴＣ遺伝子の増幅の成功を制御した。

【０２８２】

次世代シークエンシング、ＤＮＡシークエンシング：この場合はすべてのマウスタンパク質コード領域を捕獲するように設計された、Ａｇｉｌｅｎｔ Ｓｕｒｅ－Ｓｅｌｅｃｔ ｓｏｌｕｔｉｏｎに基づく捕獲アッセイ［Ｇｎｉｒｋｅ Ａ ｅｔ ａｌ：Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｈｙｂｒｉｄ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ｗｉｔｈ ｕｌｔｒａ－ｌｏｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｆｏｒ ｍａｓｓｉｖｅｌｙ ｐａｒａｌｌｅｌ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００９，２７：１８２－１８９］を用いてＤＮＡリシークエンシングのためのエクソーム捕獲を実施した。

【０２８３】

簡単に述べると、精製ゲノムＤＮＡ ３μｇを、Ｃｏｖａｒｉｓ Ｓ２超音波装置を用いて１５０～２００ｂｐに断片化した。ｇＤＮＡフラグメントを、Ｔ４ ＤＮＡポリメラーゼ、クレノウＤＮＡポリメラーゼを使用して末端修復し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを使用して５'リン酸化した。平滑末端ｇＤＮＡフラグメントを、クレノウフラグメントを使用して３'アデニル化した（３'－５'エキソマイナス）。単一の３'Ｔオーバーハング Ｉｌｌｕｍｉｎａペアエンドアダプタを、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼを使用してアダプタ対ゲノムＤＮＡインサートの１０：１モル比でｇＤＮＡフラグメントに連結した。アダプタ連結ｇＤＮＡフラグメントを捕獲前に濃縮し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＰＥ ＰＣＲプライマー１．０および２．０ならびにＨｅｒｃｕｌａｓｅ ＩＩポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して４回のＰＣＲサイクルを用いてフローセル特異的配列を付加した。

【０２８４】

アダプタ連結し、ＰＣＲ濃縮したｇＤＮＡフラグメント５００ｎｇをＡｇｉｌｅｎｔのＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔビオチン化マウス全エクソームＲＮＡライブラリベイトに６５℃で２４時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズしたｇＤＮＡ／ＲＮＡベイト複合体を、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを用いて取り出した。ｇＤＮＡ／ＲＮＡベイト複合体を洗浄し、ＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔ溶出緩衝液中での溶出の間にＲＮＡベイトを切断して、捕獲したアダプタ連結・ＰＣＲ濃縮ｇＤＮＡフラグメントを残した。ｇＤＮＡフラグメントを、捕獲後にＨｅｒｃｕｌａｓｅ ＩＩ ＤＮＡポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ）およびＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔ ＧＡ ＰＣＲプライマーを１０サイクル使用してＰＣＲ増幅した。

【０２８５】

すべての清浄化は１．８倍容量のＡＭＰｕｒｅ ＸＰ磁気ビーズ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ）を使用して行った。すべてのクオリティ管理はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＱｕｂｉｔ ＨＳアッセイを用いて実施し、フラグメントサイズはＡｇｉｌｅｎｔの２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ ＨＳ ＤＮＡアッセイを用いて決定した。

【０２８６】

エクソーム濃縮したｇＤＮＡライブラリを、７ｐＭを使用してＴｒｕｓｅｑ ＳＲクラスターキットｖ２．５を用いてｃＢｏｔでクラスター化し、５０ｂｐを、Ｔｒｕｓｅｑ ＳＢＳキット－ＨＳ ５０ｂｐを使用してＩｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ２０００で配列決定した。

【０２８７】

次世代シークエンシング、ＲＮＡシークエンシング（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）：バーコード化

されたｍＲＮＡ－ｓｅｑ　ｃＤＮＡライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｍＲＮＡ－ｓｅｑプロトコルの修正版を用いて全ＲＮＡ　５μｇから調製した。Ｓｅｒａｍａｇ　Ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）磁気ビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してｍＲＮＡを単離した。単離したｍＲＮＡを、二価カチオンと熱を用いて断片化し、１６０～２２０ｂｐの範囲のフラグメントを生じさせた。断片化したｍＲＮＡを、ランダムプライマーとＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてｃＤＮＡに変換し、次いでＤＮＡポリメラーゼＩおよびＲＮａｓｅＨを使用して第二鎖を合成した。ｃＤＮＡを、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、クレノウＤＮＡポリメラーゼを使用して末端修復し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを使用して５'リン酸化した。平滑末端ｃＤＮＡフラグメントを、クレノウフラグメントを使用して３'アデニル化した（３'－５'エキソマイナス）。単一の３'Ｔオーバーハング Ｉｌｌｕｍｉｎａマルチプレックス特異的アダプタを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを使用してアダプタ対ｃＤＮＡインサートの１０：１モル比で連結した。

【０２８８】

ｃＤＮＡライブラリを精製し、Ｅ－Ｇｅｌ　２％　ＳｉｚｅＳｅｌｅｃｔゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて２００～２２０ｂｐでサイズ選択した。濃縮、Ｉｌｌｕｍｉｎａ６塩基インデックス配列およびフローセル特異的配列の付加を、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｆｉｎｎｚｙｍｅｓ）を使用してＰＣＲによって実施した。すべての清浄化は１．８倍容量のＡｇｅｎｃｏｕｒｔＡＭＰｕｒｅ　ＸＰ磁気ビーズを使用して行った。すべてのクオリティ管理はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＱｕｂｉｔ　ＨＳアッセイを用いて実施し、フラグメントサイズはＡｇｉｌｅｎｔの２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ　ＨＳ　ＤＮＡアッセイを用いて決定した。

【０２８９】

バーコード化されたＲＮＡ－Ｓｅｑライブラリを、７ｐＭを使用してＴｒｕｓｅｑ　ＳＲクラスターキットｖ２．５を用いてｃＢｏｔでクラスター化し、Ｔｒｕｓｅｑ　ＳＢＳキット－ＨＳ　５０ｂｐを使用してＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ２０００で５０ｂｐを配列決定した。

【０２９０】

ＣＴＣ：ＣＴＣのＲＮＡ－Ｓｅｑプロファイリングのために、このプロトコルの修正版を使用し、この場合ＳＭＡＲＴ増幅したｃＤＮＡ　５００～７００ｎｇを用いて、ペアエンドアダプタを連結し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＰＥ　ＰＣＲプライマー１．０および２．０を使用してＰＣＲ濃縮を行った。

【０２９１】

ＮＧＳデータ解析、遺伝子発現：発現値を決定するために、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ　２０００から出力されたＲＮＡ試料からの配列リードをＩｌｌｕｍｉｎａ標準プロトコルに従って前処理した。これは、低クオリティリードのフィルタリングおよびデマルチプレックス化を含む。ＲＮＡ－Ｓｅｑトランスクリプトーム解析のために、ｂｏｗｔｉｅ（バージョン０．１２．５）［Ｌａｎｇｍｅａｄ　Ｂ．ｅｔ　ａｌ．Ｕｌｔｒａｆａｓｔ　ａｎｄ　ｍｅｍｏｒｙ－ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　ｏｆ　ｓｈｏｒｔ　ＤＮＡ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｔｏ　ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ｇｅｎｏｍｅ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ　１０：Ｒ２５］を用いて、ゲノムアラインメントには「－ｖ２－ｂｅｓｔ」パラメータおよび転写産物アラインメントについてはデフォルトパラメータを使用して、配列リードを参照ゲノム配列に整列させた［Ｍｏｕｓｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ．Ｉｎｉｔｉａｌ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ａｎｄ　ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｍｏｕｓｅ　ｇｅｎｏｍｅ．Ｎａｔｕｒｅ，４２０，５２０－５６２（２００２）］。アラインメント座標をＲｅｆＳｅｑ転写産物のエクソン座標と比較し［Ｐｒｕｉｔｔ　ＫＤ．ｅｔ　ａｌ．ＮＣＢＩ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ（ＲｅｆＳｅｑ）：ａ　ｃｕｒａｔｅｄ　ｎｏｎ－ｒｅｄｕｎｄａｎｔ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｄａｔａｂａｓｅ　ｏｆ　ｇｅｎｏｍｅｓ，ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｓ　ａｎｄ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２００５　Ｊａｎ　１；３３（Ｄａｔａｂａｓｅ　ｉｓｓｕｅ）：Ｄ５０１－４］

、各転写産物についてオーバーラップアラインメントのカウントを記録した。ゲノム配列に整列可能でない配列リードは、ＲｅｆＳｅｑ転写産物のすべての可能なエクソン－エクソン接合部配列のデータベースに整列させた。スプライス接合部に整列されるリードのカウントを、前の段階で得られたそれぞれの転写産物カウントと合計し、各転写産物についてＲＰＫＭ（百万個のマッピングされたリード当たりのエクソンモデルのキロベースごとにマッピングされるリードの数（ｎｕｍｂｅｒ ｏｆ ｒｅａｄｓ ｗｈｉｃｈ ｍａｐ ｐｅｒ ｋｉｌｏｂａｓｅ ｏｆ ｅｘｏｎ ｍｏｄｅｌ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ ｍａｐｐｅｄ ｒｅａｄｓ））［Ｍｏｒｔａｚａｖｉ，Ａ．ｅｔ ａｌ．（２００８）．Ｍａｐｐｉｎｇ ａｎｄ ｑｕａｎｔｉｆｙｉｎｇ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅｓ ｂｙ ｒｎａ－ｓｅｑ．Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ，５（７）：６２１－６２８］）に正規化した。遺伝子発現値およびエクソン発現値の両方を、それぞれ各遺伝子またはエクソンにオーバーラップするリードの正規化された数に基づいて計算した。

【０２９２】

突然変異の発見、バルク腫瘍：Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ２０００からの５０ヌクレオチドのシングルエンドリードを、ｂｗａ（バージョン０．５．８ｃ）［Ｌｉ Ｈ．ａｎｄ Ｄｕｒｂｉｎ Ｒ．（２００９）Ｆａｓｔ ａｎｄ ａｃｃｕｒａｔｅ ｓｈｏｒｔ ｒｅａｄ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｗｉｔｈ Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，２５：１７５４－６０］を用いて、デフォルトオプションを使用して参照マウスゲノムアセンブリｍｍ９に整列させた。曖昧なリード－ゲノムの複数箇所にマッピングされるリードを除去し、残りのアラインメントを選別して、インデックス化し、バイナリ圧縮フォーマット（ＢＡＭ）に変換して、シェルスクリプトを用いてリードクオリティスコアをＩｌｌｕｍｉｎａ標準ｐｈｒｅｄ＋６４から標準サンガークオリティスコアに変換した。

【０２９３】

各シークエンシングレーンについて、ｓａｍｔｏｏｌｓ（バージョン０．１．８）［Ｌｉ Ｈ．Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ＳＮＰ ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ｂｙ ｂａｓｅ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｑｕａｌｉｔｙ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ．２０１１ Ａｐｒ １５；２７（８）：１１５７－８．Ｅｐｕｂ ２０１１ Ｆｅｂ １３］、ＧＡＴＫ（バージョン１．０．４４１８）［ＭｃＫｅｎｎａ Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｔｏｏｌｋｉｔ：ａ ＭａｐＲｅｄｕｃｅ ｆｒａｍｅｗｏｒｋ ｆｏｒ ａｎａｌｙｚｉｎｇ ｎｅｘｔ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｄａｔａ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１０ Ｓｅｐ；２０（９）：１２９７－３０３．Ｅｐｕｂ ２０１０ Ｊｕｌ １９］、およびＳｏｍａｔｉｃＳｎｉｐｅｒ（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｏｍｅ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／ｓｏｍａｔｉｃｓｎｉｐｅｒ）を含む３つのソフトウェアプログラムを用いて突然変異を同定した。ｓａｍｔｏｏｌｓについては、１回目のフィルタリング、最大カバレッジ２００を含む、作成者が推奨するオプションおよびフィルタリング基準を使用した。ｓａｍｔｏｏｌｓの２回目のフィルタリングについては、インデル最低限クオリティスコアは５０であり、点突然変異最低限クオリティは３０であった。ＧＡＴＫ突然変異コーリングについては、我々は、ＧＡＴＫユーザーマニュアル（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｇｓａ／ｗｉｋｉ／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ／Ｔｈｅ＿Ｇｅｎｏｍｅ＿Ａｎａｌｙｓｉｓ＿Ｔｏｏｌｋｉｔ）に提示されている作成者が設計した最良実施ガイドラインに従った。バリアントスコアの再キャリブレーション段階を省き、ハードフィルタリングオプションに置き換えた。ＳｏｍａｔｉｃＳｎｉｐｅｒ突然変異コーリングに関しては、デフォルトオプションを使用し、３０以上の「体細胞スコア」を有する予測突然変異だけをさらに検討した。

【０２９４】

突然変異の発見、ＣＴＣ：バルク腫瘍ｉＣＡＭ工程のとおりに、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ２０００からの５０ヌクレオチドのシングルエンドリードを、ｂｗａ（バージョン０．５．８ｃ［５］）を用いて、デフォルトオプションを使用して参照マウスゲノム

アセンブリmm９に整列させた。ＣＴＣ　ＮＧＳリードがＲＮＡ－Ｓｅｑアッセイから誘導されたので、リードを、ｂｏｗｔｉｅ（上記）を用いて、エクソン－エクソン接合部を含むトランスクリプトーム配列に対しても整列させた。すべてのアラインメントを使用して、リードからのヌクレオチド配列を参照ゲノムおよびバルク腫瘍由来のＢ１６突然変異の両方と比較した。同定された突然変異を、ｐｅｒｌスクリプトを使用して、ならびにｓａｍｔｏｏｌｓソフトウェアプログラムおよび結果を画像化するためにＩＧＶ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｖｉｅｗｅｒ）を使用して手作業で評価した。

【０２９５】

「突然変異の発見」のアウトプットは、試料からＮＧＳデータ、突然変異のリストへの、腫瘍細胞中の体細胞突然変異の同定である。Ｂ１６試料中で、我々はエクソームリシークエンシングを用いて２４４８の体細胞突然変異を同定した。

【０２９６】

突然変異の優先順位付け

次に、我々は、ワクチンに含めるための突然変異の優先順位付けパイプラインの可能性を明らかにする。「個別癌突然変異検出パイプライン」（ｉＣＡＭ）と呼ばれるこの方法は、複数の最先端アルゴリズムとバイオインフォマティクスの方法を組み込んだ一連の工程を通して体細胞突然変異を同定し、優先順位付ける。この工程のアウトプットは、可能性の高い免疫原性に基づいて優先順位付けられた、体細胞突然変異のリストである。

【０２９７】

体細胞突然変異の同定：Ｂ１６およびＢｌａｃｋ６試料の両方に関して、３つの異なるアルゴリズムを用いて突然変異を同定する（突然変異の発見、上記）。最初のｉＣＡＭ工程は、各アルゴリズムからのアウトプットリストを組み合わせて体細胞突然変異の高信頼度リストを作成することである。ＧＡＴＫおよびｓａｍｔｏｏｌｓは、参照ゲノムと比較して１つの試料中の変異を報告する。所与の試料（すなわち腫瘍または正常）に関して偽陽性がほとんどない高信頼度突然変異を選択するために、すべてのレプリケート中で同定された突然変異を選択する。次に、腫瘍試料中には存在するが正常試料中には存在しない変異を選択する。ＳｏｍａｔｉｃＳｎｉｐｅｒは、腫瘍データと正常データの対から潜在的な体細胞変異を自動的に報告する。我々は、レプリケートから得られた結果のインターセクションを通して結果をさらにフィルタリングした。できるだけ多くの偽陽性細胞を除去するために、３つすべてのアルゴリズムおよびすべてのレプリケートの使用から導かれる突然変異のリストをインターセクトさせた。各々の体細胞突然変異についての最終段階は、カバレッジの深度、ＳＮＰクオリティ、コンセンサスクオリティおよびマッピングクオリティに基づき各突然変異に信頼値（ｐ値）を割り当てることである。

【０２９８】

突然変異の影響：フィルタリングしたコンセンサス体細胞突然変異の影響を、ｉＣＡＭ突然変異パイプライン内でスクリプトによって決定する。最初に、複数の箇所に整列される配列リードは除外されるので、一部のタンパク質パラログおよび偽遺伝子に関して起こるような、ゲノム内の固有でないゲノム領域で起こる突然変異は解析から除外する。第二に、突然変異が転写産物中で起こるかどうかを決定する。第三に、突然変異がタンパク質コード領域内で起こるかどうかを決定する。第四に、アミノ酸配列の変化が存在するかどうかを決定するために転写産物配列を突然変異と共におよび突然変異なしで翻訳する。

【０２９９】

突然変異の発現：ｉＣａＭパイプラインは、腫瘍細胞中で発現される遺伝子およびエクソンにおいて見出される体細胞突然変異を選択する。発現レベルは腫瘍細胞のＮＧＳ　ＲＮＡ－Ｓｅｑを通して決定される（上記）。遺伝子とエクソンにオーバーラップするリードの数が発現レベルを指示する。これらのカウントをＲＰＫＭ（百万個のマッピングされたリード当たりのエクソンモデルのキロベース当たりのリード（Ｒｅａｄｓ　Ｐｅｒ　Ｋｉｌｏｂａｓｅ　ｏｆ　ｅｘｏｎ　ｍｏｄｅｌ　ｐｅｒ　Ｍｉｌｌｉｏｎ　ｍａｐｐｅｄ　ｒｅａｄｓ））［Ｍｏｒｔａｚａｖｉ　Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｍａｐｐｉｎｇ　ａｎｄ　ｑｕａｎｔｉｆｙｉｎｇ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅｓ　ｂｙ　Ｒ

ＮＡ－Ｓｅｑ．Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００８　Ｊｕｌ；５（７）：６２１－８．Ｅｐｕｂ　２００８　Ｍａｙ　３０］）に正規化し、１０ＲＰＫＭを上回って発現されるものを選択する。

【０３００】

ＭＨＣ結合：突然変異ペプチドを含むエピトープがＭＨＣ分子に結合する可能性を決定するために、ｉＣＡＭパイプラインは、Ｉｍｍｕｎｅ　Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｅｄｂ．ｏｒｇ／）からのＭＨＣ予測ソフトウェアの修正版を実行する。ローカルインストールは、アルゴリズムを通してデータフローを最適化するための変更を含む。Ｂ１６およびＢｌａｃｋ６データに関して、それぞれのペプチド長についてすべての使用可能なｂｌａｃｋ６　ＭＨＣクラスＩ対立遺伝子およびすべてのエピトープを使用して予測を実行した。ＩＥＤＢトレーニングデータ（ｈｔｔｐ：／／ｍｈｃｂｉｎｄｉｎｇｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎｓ．ｉｍｍｕｎｅｅｐｉｔｏｐｅ．ｏｒｇ／ｄａｔａｓｅｔ．ｈｔｍｌ）の予測スコア分布の９５パーセンタイルに順位付けられるエピトープに含まれる突然変異を選択し、突然変異にオーバーラップするすべてのＭＨＣ対立遺伝子およびすべての潜在的なエピトープを検討する。

【０３０１】

突然変異選択基準：体細胞突然変異は、以下の基準：ａ）固有の配列内容を有する、ｂ）３つすべてのプログラムによって同定される、ｃ）高い突然変異信頼度、ｄ）非同義タンパク質変化、ｅ）高い転写産物発現、およびｆ）良好なＭＨＣクラスＩ結合予測によって選択する。

【０３０２】

この工程のアウトプットは、可能性の高い免疫原性に基づいて優先順位付けられた、体細胞突然変異のリストである。Ｂ１６メラノーマ細胞中に、２４４８の体細胞突然変異が存在する。これらの突然変異のうち１２４７が遺伝子転写産物中で認められる。これらのうちで、７３４は非同義タンパク質変化を引き起こす。これらのうちで、１４９は腫瘍細胞において発現される遺伝子中に存在する。これらのうちで、これらの発現される非同義突然変異のうち１０２は、ＭＨＣ分子上に提示されると予測される。次にこれら１０２の可能性の高い免疫原性突然変異を突然変異の確認（下記）へと進める。

【０３０３】

突然変異の確認

ＤＮＡエクソームリシークエンシングからの体細胞突然変異を２つの方法、すなわち突然変異領域のリシークエンシングおよびＲＮＡ－Ｓｅｑ分析のいずれかによって確認した。

【０３０４】

リシークエンシングによる突然変異の確認のために、突然変異を含むゲノム領域を、腫瘍ＤＮＡおよび正常コントロールＤＮＡのどちらも５０ｎｇから標準的なＰＣＲによって増幅した。増幅産物のサイズは１５０～４００ヌクレオチドの範囲であった。Ｑｉａｘｅｌ装置（Ｑｉａｇｅｎ）にＰＣＲ産物を負荷することによって反応の特異性を制御した。ｍｉｎＥｌｕｔｅ　ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＰＣＲ産物を精製した。特異的ＰＣＲ産物を、標準的なサンガーシークエンシング法（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ）、次いでエレクトロフェログラム解析を用いて配列決定した。

【０３０５】

突然変異の確認は、腫瘍ＲＮＡの検査を通しても達成された。腫瘍遺伝子およびエクソン発現値を、転写産物にマッピングされ、カウントされるヌクレオチド配列を作製する、ＲＮＡ－Ｓｅｑ（ＲＮＡのＮＧＳ）から生成した。我々は、腫瘍試料中の突然変異を同定するために配列データ自体を検討し［Ｂｅｒｇｅｒ　ＭＦ．ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｔｅｇｒａｔｉｖｅ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｍｅｌａｎｏｍａ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｍｅ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．２０１０　Ａｐｒ；２０（４）：４１３－２７．Ｅｐｕｂ　２０１０　Ｆｅｂ　２３］、ＤＮＡから導かれる同定された体細胞突然変異の独立した確認を提供した。

表１：５０の実証された突然変異を含む遺伝子のリスト

５０の同定され、確認された体細胞突然変異を含む遺伝子、ならびに遺伝子記号、遺伝子名および予測される局在と機能に関するアノテーション

【表１】

ID	記号	Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子名	場所
NM_021895	ACTN4	アクチニン、α４	細胞質
NM_028840	ARMC1	アルマジロリピート含有１	不明
NM_029291	ASCC2	活性化シグナルコインテグレーター１複合体サブユニット２	不明
NM_024184	ASF1B	ＡＳＦ１抗サイレンシング機能１ホモログＢ（Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ))	核
NM_138679	ASH1L	ａｓｈ１（ａｂｓｅｎｔ，ｓｍａｌｌ，ｏｒ ｈｏｍｅｏｔｉｃ）様（ショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ))	核
NM_015804	ATP11A	ＡＴＰアーゼ、クラスＶＩ、１１Ａ型	形質膜
NM_009730	ATRN	アトラクチン	細胞外間隙
NM_028020	CPSF3L	切断およびポリアデニル化特異的因子３様	核
NM_010017	DAG1	ジストログリカン１（ジストロフィン関連糖タンパク質１）	形質膜
NM_015735	DDB1	損傷特異的ＤＮＡ結合タンパク質１、１２７ｋＤａ	核
NM_001080981	DDX23	ＤＥＡＤ（Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ａｓｐ）ボックスポリペプチド２３	核
NM_054046	DEF8	ＦＤＣＰ　８ホモログ（マウス）中で区別的に発現される	不明
NM_019965	DNAJB12	ＤｎａＪ（Ｈｓｐ４０）ホモログ、サブファミリーＢ、成員１２	細胞質
NM_011262	DPF2	Ｄ４、ジンクおよびダブルＰＨＤフィンガーファミリー２	核
NM_007907	EEF2	真核生物翻訳伸長因子２	細胞質
NM_001081286	FAT1	ＦＡＴ腫瘍サプレッサーホモログ１（ショウジョウバエ）	形質膜
NM_173182	FNDC3B	フィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン含有３Ｂ	不明
NM_008057	FZD7	フリズルドホモログ７（ショウジョウバエ）	形質膜
NM_201617	GNAS	ＧＮＡＳ複合体遺伝子座	形質膜
NM_030035	GOLGB1	ゴルジンＢ１	細胞質
NM_011365	ITSN2	インターセクチン２	細胞質
NM_029841	KIAA2013	ＫＩＡＡ２０１３	不明
NM_197959	KIF18B	キネシンファミリー成員１８Ｂ	不明
NM_145479	KLHL22	ｋｅｌｃｈ様２２（ショウジョウバエ）	不明
NM_018810	MKRN1	マコリンリングフィンガータンパク質１	不明
NM_001170785	MTHFD1L	メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ（ＮＡＤＰ$^+$依存性）１様	細胞質
NM_133947	NUMA1	核有糸分裂装置タンパク質１	核
NM_178884	OBSL1	オブスキュリン様１	不明
NM_008765	ORC2	起源認識複合体、サブユニット２	核
NM_023209	PBK	ＰＤＺ結合キナーゼ	細胞質
NM_033594	PCDHGA11	プロトカドヘリンγサブファミリーＡ、１１	形質膜
NM_025951	PI4K2B	ホスファチジルイノシトール４－キナーゼタイプ２β	細胞質
NM_011961	PLOD2	プロコラーゲン－リシン、２－オキソグルタル酸５－ジオキシゲナーゼ２	細胞質
NM_023200	PPP1R7	プロテインホスファターゼ１、調節（阻害剤）サブユニット７	核
NM_008986	PTRF	ポリメラーゼＩおよび転写産物放出因子	核
NM_011240	RANBP2	ＲＡＮ結合タンパク質２	核
NM_009438	RPL13A	リボソームタンパク質Ｌ１３ａ	細胞質
NM_009113	S100A13	Ｓ１００カルシウム結合タンパク質Ａ１３	細胞質
NM_001081203	SBNO1	ストロベリーノッチホモログ１（ショウジョウバエ）	不明
NM_009153	SEMA3B	セマドメイン、免疫グロブリンドメイン（Ｉｇ）、短い塩基性ドメイン、分泌、（セマフォリン）３Ｂ	細胞外間隙
NM_026912	SNX15	ソーティングネキシン１５	細胞質
NM_024225	SNX5	ソーティングネキシン５	細胞質
NM_008188	THUMPD3	ＴＨＵＭＰドメイン含有３	不明
NM_133352	TM9SF3	膜貫通９スーパーファミリー成員３	細胞質
NM_177296	TNPO3	トランスポーチン３	細胞質
NM_011640	TP53	腫瘍タンパク質ｐ５３	核
NM_023279	TUBB3	チューブリン、β３	細胞質
NM_029896	WDR82	ＷＤリピートドメイン８２	不明
NM_025830	WWP2	ＷＷドメイン 含有Ｅ３ユビキチンタンパク質リガーゼ２	細胞質
NM_001081056	XPOT	エクスポーチン、ｔＲＮＡ（ｔＲＮＡについての核外輸送受容体）	核

【０３０６】
（実施例２）
ＩＶＡＣ選択アルゴリズムは免疫原性突然変異の検出を可能にする
Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞からの確認された突然変異に対して特異的Ｔ細胞応答が誘導され得るかどうかを検討するため、ナイーブＣ５７ＢＬ／６マウス（ｎ＝５／ペプチド）を、突然変異または野生型アミノ酸配列（表２参照）のいずれかを含むペプチド１００μｇ（＋アジュバントとしてＰｏｌｙＩ：Ｃ　５０μｇ）で皮下的に２回（０日目、７日目）免疫した。すべてのペプチドは２７アミノ酸の長さで、中心位置に突然変異／野生型アミノ酸を有していた。１２日目にマウスを犠死させ、脾細胞を採取した。読み出し法として、5×10^{5}脾細胞／ウェルをエフェクターとし、ペプチド（２μｇ／ｍｌ）を負荷した5×10^{4}骨髄樹状細胞を標的細胞として使用して、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳｐｏｔを実施した。エフェクター脾細胞を突然変異ペプチド、野生型ペプチドおよびコントロールペプチド（水疱性口内炎ウイルスヌクレオタンパク質、ＶＳＶ－ＮＰ）に対して試験した。
【０３０７】
試験した４４の配列に関して、これらのうちの６つは突然変異配列に対してのみＴ細胞免疫を誘導するが、野生型ペプチドに対しては免疫を誘導しないことを認めた（図３）。
【０３０８】
データは、同定され、優先順位付けられた突然変異が、抗原ナイーブマウスにおいてペプチドワクチンとして使用された後、腫瘍特異的Ｔ細胞免疫を誘導するために使用できることを実証する。
表２：突然変異ペプチド対野生型ペプチドに特異的なＴ細胞反応性を誘導した突然変異配列の一覧表。アミノ酸交換に下線を付して示している。
【表２】

番号	RefSeq ID	配列型	ペプチド配列	Ｔ細胞反応性（マウス）
12	NM_00107750, NM_010309, NM_201618, NM_201617	突然変異	TPPPEEAMPFEFN<u>G</u>PAQGDHSQPPLQV	5/5
16	NM_008188	野生型	TPPPEEAMPFEFN<u>E</u>PAQGDHSQPPLQV	0/5
		突然変異	RVTCNRAGEKHCF<u>S</u>SNEAARDFGGAIQ	3/5
		野生型	RVTCNRAGEKHCF<u>T</u>SNEAARDFGGAIQ	0/5
20	NM_023279	突然変異	FRRKAFLHWYTGE<u>A</u>MDEMEFTEAESNM	5/5
		野生型	FRRKAFLHWYTGE<u>G</u>MDEMEFTEAESNM	1/5
30	NM_197959	突然変異	PSKPSFQEFVDWE<u>N</u>VSPELNSTDQPFL	5/5
		野生型	PSKPSFQEFVDWE<u>K</u>VSPELNSTDQPFL	1/5
34	NM_145479	突然変異	HLTQQLDTYILKN<u>V</u>VAFSRTDKYRQLP	3/5
		野生型	HLTQQLDTYILKN<u>F</u>VAFSRTDKYRQLP	0/5
36	NM_133352	突然変異	CGTAFFINFIAIY<u>H</u>HASRAIPFGTMVA	5/5
		野生型	CGTAFFINFIAIY<u>Y</u>HASRAIPFGTMVA	0/5

【０３０９】
（実施例３）
同定された突然変異は治療的抗腫瘍免疫を提供することができる
同定された突然変異が、ナイーブマウスへのワクチン接種後に抗腫瘍免疫を付与する潜在能を有するかどうかを検証するため、突然変異選択的Ｔ細胞反応性を誘導することが示された突然変異番号３０についてのペプチドを用いてこの問題を検討した。Ｂ１６Ｆ１０細胞（7.5×10^{4}）を０日目に皮下的に接種した。マウスにペプチド３０（表１参照；ペプチド１００μｇ＋ＰｏｌｙＩ：Ｃ　５０μｇ　ｓ．ｃ．）を－４日目、＋２日目および＋９日目にワクチン接種した。コントロール群にはＰｏｌｙ　Ｉ：Ｃ（５０μｇ　ｓ

．ｃ．）だけを与えた。腫瘍成長を１日おきに観測した。＋１６日目に、ペプチドワクチン群の５匹のマウスのうち１匹だけが腫瘍を発症し、コントロール群では５匹のマウスのうち４匹が腫瘍成長を示した。

【０３１０】

データは、Ｂ１６Ｆ１０特異的突然変異を組み込んだペプチド配列が、腫瘍細胞を効率的に破壊することができる抗腫瘍免疫を付与し得ることを実証する（図４参照）。Ｂ１６Ｆ１０は高度に攻撃的な腫瘍細胞株であるので、突然変異を同定し、優先順位付けるために適用された方法が、最終的に、それ自体既にワクチンとして強力である突然変異の選択をもたらしたという所見は、工程全体についての重要な概念実証である。

【０３１１】

（実施例４）

ポリエピトープ抗原提示を裏付けるデータ

患者のタンパク質コード領域からの実証された突然変異は、ＲＮＡワクチンのＧＭＰ製造のための前駆物として使用されるポリネオエピトープワクチン鋳型のアセンブリの候補物をその中から選択することができるプールを構成する。ワクチン骨格として適切なベクターカセットは既に記述されている（Ｈｏｌｔｋａｍｐ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１０８：４００９－４０１７，２００６；Ｋｒｅｉｔｅｒ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，５６：１５７７－１５８７，２００７；Ｋｒｅｉｔｅｒ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８０：３０９－３１８，２００８）。好ましいベクターカセットは、コード領域および非翻訳領域（ＵＴＲ）において修飾されており、長期間にわたってコードされるタンパク質の最大化された翻訳を確実にする（Ｈｏｌｔｋａｍｐ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，１０８：４００９－４０１７，２００６；Ｋｕｈｎ，Ａ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，１７：９６１－９７１，２０１０）。さらに、ベクター骨格は、細胞傷害性Ｔ細胞ならびにヘルパーＴ細胞の同時増殖のための抗原経路指定モジュールを含む（Ｋｒｅｉｔｅｒ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，５６：１５７７－１５８７，２００７；Ｋｒｅｉｔｅｒ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８０：３０９－３１８，２００８；Ｋｒｅｉｔｅｒ，Ｓ．ｅｔａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，７０（２２），９０３１－９０４０，２０１０）（図５）。重要な点として、我々は、そのようなＲＮＡワクチンが複数のＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩエピトープを同時に提示するために使用できることを実証した。

【０３１２】

ＩＶＡＣポリネオエピトープＲＮＡワクチン配列は、中心部に突然変異を含む３０個までのアミノ酸のストレッチから構築される。これらの配列を短いリンカーによって頭部から尾部へと連結し、３０までまたはそれ以上の選択された突然変異およびそれらのフランキング領域をコードするポリネオエピトープワクチンを形成する。これらの患者特異的な個別に誂えられたインサートをコドン最適化し、上述したＲＮＡ骨格にクローニングする。そのような構築物の品質管理には、機能的転写および翻訳の検証のためのインビトロ転写および細胞中での発現が含まれる。翻訳の分析は、Ｃ末端標的ドメインに対する抗体を用いて実施する。

【０３１３】

（実施例５）

ＲＮＡポリネオエピトープ構築物についての科学的概念実証

ＲＮＡポリネオエピトープの概念は、リンカー配列によって連結された、突然変異ペプチドをコードする連続的に配置された配列から成る長いインビトロ転写ｍＲＮＡに基づく（図６参照）。コード配列は非同義突然変異から選択され、常に、もとの配列状況からの３０～７５塩基対の領域に隣接された突然変異アミノ酸についてのコドンで構築される。リンカー配列は、細胞の抗原プロセシング機構によって選択的にプロセシングされないアミノ酸をコードする。

【０３１４】

インビトロ転写構築物は、Ｔ７プロモーター、タンデムβグロビン３'ＵＴＲ配列および１２０ｂｐのポリ（Ａ）尾部を含むｐＳＴ１－Ａ１２０ベクターに基づいており、これらはＲＮＡの安定性および翻訳効率を高め、それによりコードされる抗原のＴ細胞刺激能力を増強することが示されている（Ｈｏｌｔｋａｍｐ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　２００６；ＰＭＩＤ：１６９４０４２２）。加えて、ＭＨＣクラスＩシグナルペプチドフラグメントならびにエピトープをクローニングするためのポリリンカー配列に隣接する終結コドン（ＭＨＣクラスＩ輸送シグナルまたはＭＩＴＤ）を含む膜貫通ドメインおよびサイトゾルドメインを挿入した（Ｋｒｅｉｔｅｒ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８０：３０９－３１８，２００８）。後者は、抗原提示を増大させ、それにより抗原特異的ＣＤ８$^{+}$およびＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を増強して、エフェクター機能を改善することが示されている。

【０３１５】

最初の概念実証のために、バイエピトープベクター、すなわち２つの突然変異エピトープを含む１つのポリペプチドをコードするベクターを使用した。上述したようにｐＳＴ１に基づく構築物にクローニングするための制限エンドヌクレアーゼの適切な認識部位に隣接した、（ｉ）２０～５０アミノ酸の突然変異エピトープ、（ｉｉ）グリシン／セリンリッチリンカー、（ｉｉｉ）２０～５０アミノ酸の２番目の突然変異エピトープ、および（ｉｖ）付加的なグリシン／セリンリッチリンカーをコードするコドン最適化配列を設計し、これを商業的供給者（Ｇｅｎｅａｒｔ，Ｒｅｇｅｎｓｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）によって合成させた。配列の検証後、これらをｐＳＴ１に基づくベクター骨格にクローニングし、図６に示す構築物を得た。

【０３１６】

上述したｐＳＴ１－Ａ１２０に基づくプラスミドをクラスＩＩ制限エンドヌクレアーゼで線状化した。線状化プラスミドＤＮＡをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿によって精製した。線状化ベクターＤＮＡを分光光度法で定量し、基本的にＰｏｋｒｏｖｓｋａｙａとＧｕｒｅｖｉｃｈ（１９９４，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２０：４２０－４２３）によって記述されたようにインビトロ転写に供した。キャップ類似体を転写反応に加え、対応して修飾された５'キャップ構造を有するＲＮＡを得た。反応物中に、ＧＴＰは１．５ｍＭで存在し、キャップ類似体は６．０ｍＭで存在した。すべての他のＮＴＰは７．５ｍＭで存在した。転写反応の終了時に、線状化ベクターＤＮＡを０．１Ｕ／μｌ　ＴＵＲＢＯ　ＤＮａｓｅ（Ａｍｂｉｏｎ，Ａｕｓｔｉｎ／ＴＸ，ＵＳＡ）で３７℃にて１５分間消化した。ＭＥＧＡｃｌｅａｒ　Ｋｉｔ（Ａｍｂｉｏｎ，Ａｕｓｔｉｎ／ＴＸ，ＵＳＡ）を製造者のプロトコルのとおりに使用してＲＮＡをこれらの反応物から精製した。ＲＮＡの濃度および品質を分光光度法および２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ，ＵＳＡ）での分析によって評価した。

【０３１７】

突然変異アミノ酸を組み込み、５'および３'でリンカー配列に隣接されている配列が、プロセシングされ、提示されて、抗原特異的Ｔ細胞によって認識され得ることを証明するために、我々は、ペプチドワクチン接種したマウス由来のＴ細胞をエフェクター細胞として使用した。ＩＦＮγ　ＥＬＩＳｐｏｔにおいて、上述したペプチドワクチン接種によって誘導されたＴ細胞が、ペプチドでパルスするか（２μｇ／ｍｌ、３７℃および５％CO_2で２時間）またはエレクトロポレーションによってＲＮＡ（上述したように生成した２０μｇ）でトランスフェクトした標的細胞（骨髄樹状細胞、ＢＭＤＣ）を認識することができるかどうかを試験した。突然変異１２および３０（表２参照）に関して図７に例示するように、我々は、ＲＮＡ構築物が突然変異特異的Ｔ細胞によって認識されるエピトープを生じさせることができることを観察できた。

【０３１８】

提供されるデータにより、我々は、グリシン／セリンリッチリンカーを含むポリネオエピトープをコードするＲＮＡが抗原提示細胞中で翻訳され、プロセシングされて、抗原特異的Ｔ細胞によって認識される正しいエピトープの提示をもたらすことができることを実

証できた。

【０３１９】

（実施例６）

ポリネオエピトープワクチンの設計－リンカーの関連性

ポリネオエピトープＲＮＡ構築物は、リンカーペプチド配列で連結された複数の体細胞突然変異コードペプチドが配置される骨格構築物を含む。コドン最適化ならびに骨格によるＲＮＡ安定性および翻訳効率の増大に加えて、ＲＮＡポリネオエピトープワクチンの１つの実施形態は、抗原ペプチドのＭＨＣクラスＩおよびＩＩ提示を増大させ、有害なエピトープの提示を減少させるように設計されたリンカーを含む。

【０３２０】

リンカー：リンカー配列を、複数の突然変異含有ペプチドを連結するように設計した。リンカーは、突然変異エピトープの生成と提示を可能にし、隣接ペプチド間またはリンカー配列と内因性ペプチドとの間の接合部縫合で生成されるような有害なエピトープの生成を妨げるべきである。これらの「接合」エピトープは、細胞表面に提示されるべき意図するエピトープと競合して、ワクチンの効果を低下させ得るだけでなく、望ましくない自己免疫反応も生じさせ得る。したがって、我々は、ａ）ＭＨＣ分子に結合する「接合」ペプチドを生成することを回避する、ｂ）「接合」ペプチドを生成するプロテアソームプロセシングを回避する、ｃ）プロテアソームによって効率的に翻訳され、プロセシングされるように、リンカー配列を設計した。

【０３２１】

ＭＨＣ分子に結合する「接合」ペプチドの生成を回避するため、我々は種々のリンカー配列を比較した。例えばグリシンは、ＭＨＣ結合溝位置での強力な結合を阻害する［Ａｂａｓｔａｄｏ ＪＰ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９３ Ｏｃｔ １；１５１（７）：３５６９－７５］。我々は複数のリンカー配列および複数のリンカー長を検討し、ＭＨＣ分子に結合する「接合」ペプチドの数を計算した。Ｉｍｍｕｎｅ Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｄａｔａｂａｓｅ（ＩＥＤＢ，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｍｕｎｅｅｐｉｔｏｐｅ．ｏｒｇ／）からのソフトウェアツールを用いて、所与のペプチド配列がＭＨＣクラスＩ分子に結合するリガンドを含む尤度を計算した。

【０３２２】

Ｂ１６モデルにおいて、ＭＨＣクラスＩ分子上に提示されると予測される１０２の発現された非同義体細胞突然変異を同定した。５０の確認された突然変異を使用して、リンカーなしの使用または異なるリンカー配列の使用を含む、種々のワクチン構築物をコンピュータで設計し、ＩＥＤＢアルゴリズムを用いて有害な「接合」ペプチドの数をコンピュータで計算した（図８）。

【０３２３】

表５は、いくつかの異なるリンカー、異なるリンカー長、ならびにリンカーなしおよび５つのリンカーの使用の結果を示す。ＭＨＣに結合する接合ペプチドの数は、９アミノ酸および１０アミノ酸エピトープ予測について２～９１の範囲である（上および中央）。リンカーのサイズは接合ペプチドの数に影響を及ぼす（下）。この配列に関して、最も少ない９アミノ酸エピトープが７アミノ酸リンカー配列ＧＧＳＧＧＧＧについて予測される。

【０３２４】

実験的に試験したＲＮＡポリネオエピトープワクチン構築物において使用したリンカー１およびリンカー２（下記参照）も、予測される接合ネオエピトープの数が良好に低かった。これは九量体および十量体の予測にも当てはまる。

【０３２５】

これは、リンカーの配列が、望ましくないＭＨＣ結合エピトープの生成にとって極めて重要であることを明らかにする。さらに、リンカー配列の長さは望ましくないＭＨＣ結合エピトープの数に影響を及ぼす。我々は、Ｇに富む配列がＭＨＣ結合リガンドの生成を妨げることを認める。

表３：リンカーの影響（１０アミノ酸エピトープ）。各々のペプチドリンカーについて

の、接合配列を含むＭＨＣクラスＩ結合エピトープと定義される、望ましくないエピトープの予測される数。ここでは、１０アミノ酸エピトープを検討している。グリシンリッチリンカーは最も少ない接合エピトープを有する。

【表３】

リンカー	望ましくないエピトープ (10 aa) の数
なし	14
TSLNALLNAH	54
SIINFEKL	65
SSSSSSSSSS	85
GGGGGGGGGG	6
GGSGGGGSGG (リンカー1)	8
GGSGGGSGGG (リンカー2)	9

表４：リンカー部分の影響（９アミノ酸エピトープ）。各々のペプチドリンカーについての、接合配列を含むＭＨＣクラスＩ結合エピトープと定義される、望ましくないエピトープの予測される数。ここでは、９アミノ酸エピトープを検討している。グリシンリッチリンカーは最も少ない接合エピトープを有する。

【表４】

リンカー	望ましくないエピトープ (9 aa) の数
なし	17
TSLNALLNAH	83
SIINFEKL	64
SSSSSSSSS	33
GGGGGGGGG	2
GGSGGGGSGG (リンカー1)	4
GGSGGGSGGG (リンカー2)	3

表５：リンカー部分の影響。各々のペプチドリンカーについての、接合配列を含むＭＨＣクラスＩ結合エピトープと定義される、望ましくないエピトープの予測される数。ここでは、９アミノ酸エピトープを検討している。上：リンカーなしおよび５つのそれぞれ異なるリンカーについての９アミノ酸接合エピトープの数。中央：リンカーなしおよび５つのそれぞれ異なるリンカーについての１０アミノ酸接合エピトープの数。下：異なる長さの類似のリンカーについての９９アミノ酸接合エピトープの数。グリシンリッチリンカーは最も少ない接合エピトープを有する。

【表５】

リンカー配列	接合エピトープ (9aa) の数
なし	17
TSLNALLNA	91
SIINFEKL	64
SSSSSSSSS	33
GGGGGGGGG	2
GGSGGGGSG	4

リンカー配列	接合エピトープ (10aa)の数
なし	14
TSLNALLNA	63
SIINFEKL	65
SSSSSSSSS	85
GGGGGGGGG	6
GGSGGGSGG	9

リンカー配列	接合エピトープ (9aa)の数
GGSGG	5
GGSGGG	4
GGSGGGG	2
GGSGGGGS	7
GGSGGGGSG	4
GGSGGGGSGG	4

【０３２６】

「接合」ペプチドを生成し得るプロテアソームプロセシングを回避するため、我々はリンカー中で異なるアミノ酸を使用することを検討した。グリシンリッチ配列はプロテアソームプロセシングを減少させる［Ｈｏｙｔ ＭＡ ｅｔ ａｌ．（２００６）．ＥＭＢＯ Ｊ ２５（８）：１７２０－９；Ｚｈａｎｇ Ｍ．ａｎｄ Ｃｏｆｆｉｎｏ Ｐ．（２００４）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７９（１０）：８６３５－４１］。したがってグリシンリッチリンカー配列は、プロテアソームによってプロセシングされ得るリンカー含有ペプチドの数を最小限に抑えるように働く。

【０３２７】

リンカーは、突然変異含有ペプチドが効率的に翻訳され、プロテアソームによってプロセシングされることを可能にするべきである。アミノ酸グリシンおよびセリンは柔軟性がある［Ｓｃｈｌｅｓｓｉｎｇｅｒ Ａ ａｎｄ Ｒｏｓｔ Ｂ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ．２００５ Ｏｃｔ １；６１（１）：１１５－２６］；これらをリンカーに含めることはより柔軟性のあるタンパク質をもたらす。我々は、タンパク質の柔軟性を高めるためにグリシンおよびセリンをリンカーに組み込んでおり、これは、より効率的な翻訳およびプロテアソームによるプロセシングを可能にし、それが次にはコードされる抗原性ペプチドへのより良好なアクセスを可能にするはずである。

【０３２８】

したがって、リンカーは、ＭＨＣに結合する望ましくないエピトープの生成を妨げるためにグリシンリッチであるべきであり、リンカーペプチドをプロセシングするプロテアソ

ームの能力を妨げるべきであり（グリシンを含めることによって達成され得る）、ならびに突然変異含有ペプチドへのアクセスを増大させるために柔軟であるべき（グリシンとセリンアミノ酸の組合せによって達成され得る）である。それゆえ、本発明のワクチン構築物の１つの実施形態では、配列ＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧおよびＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳがリンカー配列として好ましく含まれる。

【０３２９】

（実施例７）

ＲＮＡポリネオエピトープワクチン

ＲＮＡポリネオエピトープワクチン構築物は、Ｔ７プロモーター、タンデムβグロビン３'ＵＴＲ配列および１２０ｂｐのポリ（Ａ）尾部を含むｐＳＴ１－Ａ１２０ベクターに基づいており、これらはＲＮＡの安定性および翻訳効率を高め、それにより、コードされる抗原のＴ細胞刺激能力を増強することが示されている（Ｈｏｌｔｋａｍｐ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　２００６；ＰＭＩＤ：１６９４０４２２）。加えて、ＭＨＣクラスＩシグナルペプチドフラグメントならびにエピトープをクローニングするためのポリリンカー配列に隣接する終結コドン（ＭＨＣクラスＩ輸送シグナルまたはＭＩＴＤ）を含む膜貫通ドメインおよびサイトゾルドメインを挿入した（Ｋｒｅｉｔｅｒ　Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８０：３０９－３１８，２００８）。後者は、抗原提示を増大させ、それにより抗原特異的ＣＤ８$^{+}$およびＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を増強して、エフェクター機能を改善することが示されている。

【０３３０】

Ｂ１６Ｆ１０の５０の同定され、実証された突然変異についてのＲＮＡポリネオエピトープ構築物を提供するため、３つのＲＮＡ構築物を作製した。構築物は、（ｉ）２５アミノ酸の突然変異エピトープ、（ｉｉ）グリシン／セリンリッチリンカー、（ｉｉｉ）突然変異エピトープ配列とそれに続くグリシン／セリンリッチリンカーの反復、をコードするコドン最適化配列から成る。突然変異エピトープ含有配列とリンカーの鎖は、上述したｐＳＴ１に基づく構築物にクローニングするための制限エンドヌクレアーゼの適切な認識部位に隣接している。ワクチン構築物を設計し、ＧＥＮＥＡＲＴによって合成させた。配列の検証後、これらをｐＳＴ１に基づくベクター骨格にクローニングし、ＲＮＡポリネオエピトープワクチン構築物を得た。

【０３３１】

臨床アプローチの説明

臨床適用は以下の工程を含む：

・適格患者が次世代シークエンシングによるＤＮＡ分析に同意しなければならない。

・通常の診断手順から得られる腫瘍標本（パラフィン包埋し、ホルマリン固定した組織）および末梢血細胞を入手し、上述した突然変異分析のために使用する。

・発見された突然変異を確認する。

・優先順位付けに基づき、ワクチンを設計する。ＲＮＡワクチンのために、遺伝子合成およびクローニングによってマスタープラスミド鋳型を作製する。

・プラスミドを、臨床グレードのＲＮＡの作製、ＲＮＡワクチンの品質管理および放出のために使用する。

・ワクチン薬剤製品を、臨床適用のためにそれぞれの治験施設に送付する。

・ＲＮＡワクチンは、製剤緩衝液中で裸のワクチンとしてまたは例えばリンパ節への直接注射、皮下、静脈内、筋肉内注射のためにナノ粒子もしくはリポソーム中に封入して使用することができる。あるいは、ＲＮＡワクチンは、例えば養子移入のための樹状細胞の、インビトロトランスフェクションに使用することができる。

【０３３２】

臨床工程全体で６週間未満しか要しない。患者のインフォームドコンセントと薬剤の入手可能性との間の「遅滞期」は、臨床試験プロトコルによって慎重に対処され、これには臨床試験用医薬品が入手可能になるまで標準的な治療レジメンが継続されるのを可能にすることが含まれる。

【０３３３】
（実施例８）
腫瘍転移の同定および腫瘍ワクチン接種のためのその利用
我々は、Ｂ１６Ｆ１０マウスメラノーマ細胞株における突然変異発見のためにＮＧＳエクソームリシークエンシングを適用し、９６２の非同義体細胞点突然変異を同定し、５６３を発現遺伝子中で同定した。潜在的なドライバー突然変異は、古典的腫瘍サプレッサー遺伝子（Ｐｔｅｎ、Ｔｒｐ５３、Ｔｐ６３、Ｐｍｌ）ならびに細胞増殖（例えばＭｄｍ１、Ｐｄｇｆｒａ）、細胞接着および移動（例えばＦｄｚ７、Ｆａｔ１）またはアポトーシス（Ｃａｓｐ９）を制御する癌原遺伝子シグナル伝達経路に関与する遺伝子において起こる。さらに、Ｂ１６Ｆ１０は、ヒトメラノーマにおいて頻繁に変化すると以前に記述されたＡｉｍ１およびＴｒｒａｐの突然変異も保有する。
【０３３４】
５０の実証された突然変異の免疫原性および特異性を、突然変異エピトープをコードする長いペプチドで免疫したＣ５７ＢＬ／６マウスを使用して検定した。これらの３分の１（１６／５０）は免疫原性であることが示された。これらのうちで、６０％は、野生型配列と比較して、突然変異配列に対して選択的に免疫応答を誘発した。
【０３３５】
我々は、腫瘍移植モデルにおいて仮説を試験した。ペプチドによる免疫は防御的および治療的設定でインビボ腫瘍抑制を与え、単一アミノ酸置換を含む突然変異エピトープを有効なワクチンとみなした。
【０３３６】
動物
Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）をＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｍａｉｎｚにおいて動物研究に関する連邦および州政府の政策に従って飼育した。
【０３３７】
細胞
Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞株を２０１０年にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから購入した（製品：ＡＴＣＣ ＣＲＬ－６４７５、ロット番号：５８０７８６４５）。初期（３代目、４代目）継代の細胞を腫瘍実験に使用した。通常はマイコプラスマ属（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ）に関して細胞を試験した。受領時以降に細胞の再確認は実施しなかった。
【０３３８】
次世代シークエンシング
核酸抽出および試料調製：バルクＢ１６Ｆ１０細胞からのＤＮＡおよびＲＮＡならびにＣ５７ＢＬ／６尾部組織からのＤＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ ＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅキット（ＤＮＡ用）およびＱｉａｇｅｎ ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｃｒｏキット（ＲＮＡ用）を使用して三つ組で抽出した。
【０３３９】
ＤＮＡエクソームシークエンシング：ＤＮＡリシークエンシングのためのエクソーム捕獲を、すべてのマウスタンパク質コード領域を捕獲するように設計された、Ａｇｉｌｅｎｔ Ｓｕｒｅ－Ｓｅｌｅｃｔ ｍｏｕｓｅ ｓｏｌｕｔｉｏｎに基づく捕獲アッセイ（Ｇｎｉｒｋｅ Ａ ｅｔ ａｌ.，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２００９；２７：１８２－９）を用いて三つ組で実施した。精製ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）３μｇを、Ｃｏｖａｒｉｓ Ｓ２超音波装置を用いて１５０～２００ｂｐに断片化した。フラグメントを、製造者の指示に従って末端修復し、5'リン酸化して、3'アデニル化した。Ｉｌｌｕｍｉｎａペアエンドアダプタを、アダプタ対ｇＤＮＡの１０：１モル比を用いてｇＤＮＡフラグメントに連結した。捕獲前に濃縮し、４回のＰＣＲサイクルのためにＩｌｌｕｍｉｎａ ＰＥ ＰＣＲプライマー１．０および２．０を使用してフローセル特異的配列を付加した。アダプタ連結し、ＰＣＲ濃縮したｇＤＮＡフラグメント５００ｎｇをＡｇｉｌｅｎｔの

ＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔビオチン化マウス全エクソームＲＮＡライブラリベイトに６５℃で２４時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズしたｇＤＮＡ／ＲＮＡベイト複合体を、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを用いて取り出し、洗浄して、ＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔ溶出緩衝液中での溶出の間にＲＮＡベイトを切断した。これらの溶出したｇＤＮＡフラグメントを捕獲後に１０サイクルＰＣＲ増幅した。エクソーム濃縮したｇＤＮＡライブラリを、７ｐＭを使用してＴｒｕｓｅｑ　ＳＲクラスターキットｖ２．５を用いてｃＢｏｔでクラスター化し、Ｔｒｕｓｅｑ　ＳＢＳキット－ＨＳ　５０ｂｐを用いてＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ２０００で５０ｂｐを配列決定した。

【０３４０】

ＲＮＡ遺伝子発現、「トランスクリプトーム」プロファイリング（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）：バーコード化されたｍＲＮＡ－ｓｅｑ　ｃＤＮＡライブラリを、全ＲＮＡ　５μｇから三つ組で調製した（修正Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｍＲＮＡ－ｓｅｑプロトコル）。Ｓｅｒａｍａｇ　Ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）磁気ビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してｍＲＮＡを単離し、二価カチオンと熱を用いて断片化した。生じたフラグメント（１６０～２２０ｂｐ）を、ランダムプライマーとＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してｃＤＮＡに変換し、次いでＤＮＡポリメラーゼＩおよびＲＮａｓｅＨを使用して第二鎖を合成した。ｃＤＮＡを製造者の指示に従って末端修復し、５'リン酸化して、３'アデニル化した。単一の３'Ｔオーバーハング Ｉｌｌｕｍｉｎａマルチプレックス特異的アダプタを、アダプタ対ｃＤＮＡインサートの１０：１モル比を用いてＴ４ＤＮＡリガーゼで連結した。ｃＤＮＡライブラリを精製し、２００～２２０ｂｐでサイズ選択した（Ｅ－Ｇｅｌ　２％　ＳｉｚｅＳｅｌｅｃｔゲル、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）。濃縮、Ｉｌｌｕｍｉｎａ６塩基インデックス配列およびフローセル特異的配列の付加を、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｆｉｎｎｚｙｍｅｓ）を使用してＰＣＲによって実施した。この工程までのすべての清浄化は１．８倍容量のＡｇｅｎｃｏｕｒｔＡＭＰｕｒｅ　ＸＰ磁気ビーズで行った。すべての品質管理はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＱｕｂｉｔ　ＨＳアッセイを用いて実施し、フラグメントサイズはＡｇｉｌｅｎｔの２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ　ＨＳ　ＤＮＡアッセイを用いて決定した。バーコード化されたＲＮＡ－Ｓｅｑライブラリを上述したようにクラスター化し、配列決定した。

【０３４１】

ＮＧＳデータ解析、遺伝子発現：ＲＮＡ試料からの出力された配列リードをＩｌｌｕｍｉｎａ標準プロトコルに従って前処理し、これは低クオリティリードのフィルタリングを含んだ。配列リードを、ｂｏｗｔｉｅ（バージョン０．１２．５）（Ｌａｎｇｍｅａｄ Ｂ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ ２００９；１０：Ｒ２５）を用いてｍｍ９参照ゲノム配列（Ｗａｔｅｒｓｔｏｎ ＲＨ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２００２；４２０：５２０－６２）に整列させた。ゲノムアラインメントに関して、２つのミスマッチを許容し、最適アラインメント（「－ｖ２－ｂｅｓｔ」）だけを記録した；トランスクリプトームアラインメントについてはデフォルトパラメータを使用した。ゲノム配列に整列可能でないリードは、ＲｅｆＳｅｑ転写産物のすべての可能なエクソン－エクソン接合部配列のデータベースに整列させた（Ｐｒｕｉｔｔ ＫＤ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２００７；３５：Ｄ６１－Ｄ６５）。リード座標をＲｅｆＳｅｑ転写産物のものとインターセクトさせることによって発現値を決定し、オーバーラップするエクソンと接合部リードをカウントして、ＲＰＫＭ発現単位（百万個のマッピングされたリード当たりのエクソンモデルのキロベースごとにマッピングされるリード（Ｒｅａｄｓ ｗｈｉｃｈ ｍａｐ ｐｅｒ Ｋｉｌｏｂａｓｅ ｏｆ ｅｘｏｎ ｍｏｄｅｌ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ ｍａｐｐｅｄ ｒｅａｄｓ））（Ｍｏｒｔａｚａｖｉ Ａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２００８；５：６２１－８）に正規化した。

【０３４２】

ＮＧＳデータ解析、体細胞突然変異の発見：体細胞突然変異を実施例９で述べるように同定した。５０ヌクレオチドのシングルエンドリードを、ｂｗａ（デフォルトオプション、バージョン０．５．８ｃ）（Ｌｉ Ｈ ａｎｄ Ｄｕｒｂｉｎ Ｒ，Ｂｉｏｉｎｆｏｒ

ｍａｔｉｃｓ ２００９；２５：１７５４－６０）を用いてmm９参照マウスゲノムに整列させた。ゲノムの複数箇所にマッピングされる曖昧なリードを除去した。３つのソフトウェアプログラム：ｓａｍｔｏｏｌｓ（バージョン０．１．８）（Ｌｉ Ｈ，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２０１１；２７：１１５７－８）、ＧＡＴＫ（バージョン１．０．４４１８）（ＭｃＫｅｎｎａ Ａ ｅｔ ａｌ，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ ２０１０；２０：１２９７－３０３）、およびＳｏｍａｔｉｃＳｎｉｐｅｒ（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｏｍｅ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／ｓｏｍａｔｉｃｓｎｉｐｅｒ）（Ｄｉｎｇ Ｌ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ ２０１０；１９：Ｒ１８８－Ｒ１９６）を用いて突然変異を同定した。すべてのＢ１６Ｆ１０三つ組において同定された潜在的な変異に「偽発見率」（ＦＤＲ）の信頼値を割り当てた（実施例９参照）。

【０３４３】

突然変異の選択、実証および機能

選択：突然変異は、選択されるには以下の基準を満たさねばならなかった：（ｉ）すべてのＢ１６Ｆ１０三つ組中に存在し、すべてのＣ５７ＢＬ／６三つ組中に存在しない、（ｉｉ）ＦＤＲ≦０．０５、（ｉｉｉ）Ｃ５７ＢＬ／６中で均一、（ｉｖ）ＲｅｆＳｅｑ転写産物中で生じる、および（ｖ）真の突然変異とスコアされる非同義変化を引き起こす。実証および免疫原性試験のための選択は、突然変異が発現された遺伝子であることを必要とした（レプリケート全体にわたって平均ＲＰＫＭ＞１０）。

【０３４４】

実証：ＤＮＡ由来の突然変異を、サンガーシークエンシングまたはＢ１６Ｆ１０ ＲＮＡ－Ｓｅｑリードのいずれかによって確認された場合に実証されたと分類した。すべての選択した変異体を、Ｂ１６Ｆ１０細胞およびＣ５７ＢＬ／６尾部組織由来のＤＮＡ ５０ｎｇから隣接プライマーを使用して増幅し、精製物を視覚化して（ＱＩＡｘｃｅｌシステム、Ｑｉａｇｅｎ）、精製した（ＱＩＡｑｕｉｃｋ ＰＣＲ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ，Ｑｉａｇｅｎ）。予想されたサイズのアンプリコンをゲルから切り出し、精製して（ＱＩＡｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ，Ｑｉａｇｅｎ）、ＰＣＲ増幅のために使用した正プライマーを用いてサンガーシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ ＭＷＧ Ｏｐｅｒｏｎ，Ｅｂｅｒｓｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に供した。

【０３４５】

機能的影響：タンパク質ドメインの場所および異種間配列保存に基づきタンパク質機能へのアミノ酸の機能的重要性を予測するプログラム、ＳＩＦＴ（Ｋｕｍａｒ Ｐ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ ２００９；４：１０７３－８１）およびＰＯＬＹＰＨＥＮ－２（Ａｄｚｈｕｂｅｉ ＩＡ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１０；７：２４８－９）を用いて、選択した突然変異の影響を評価した。Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ ＩＰＡツールを使用して遺伝子機能を推測した。

【０３４６】

合成ペプチドおよびアジュバント

オボアルブミンクラスＩ（$OVA_{258-265}$）、クラスＩＩ（ＯＶＡクラスＩＩ$_{330-338}$）、インフルエンザヌクレオタンパク質（$Inf-NP_{366-374}$）、水疱性口内炎ウイルスヌクレオタンパク質（$VSV-NP_{52-59}$）およびチロシナーゼ関連タンパク質２（$Trp2_{180-188}$）を含むすべてのペプチドをＪｅｒｉｎｉ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から購入した。合成ペプチドは２７アミノ酸長で、１４位に突然変異（ＭＵＴ）または野生型（ＷＴ）アミノ酸を有していた。ポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ），ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）を皮下注射用アジュバントとして使用した。$Inf-NP_{366-374}$ペプチドに特異的なＭＨＣ五量体をＰｒｏＩｍｍｕｎｅ Ｌｔｄ．から購入した。

【０３４７】

マウスの免疫

年齢をマッチさせた雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、ＰＢＳ中に製剤化したペプチド１００μｇおよびｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）５０μｇ（総容量２００μｌ）を側腹部に皮下注射した

（各群につき５匹のマウス）。すべての群を０日目と７日目に２つの異なる突然変異コードペプチドで免疫し、一方の側腹部につき１つのペプチドとした。初回注射の１２日後にマウスを犠死させ、免疫学的試験のために脾細胞を単離した。

【０３４８】

あるいは、年齢をマッチさせた雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、総注射容量２００μｌでＰＢＳ中にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）２０μｌと共に製剤化したインビトロ転写ＲＮＡ ２０ μｇを静脈内注射した（各群につき３匹のマウス）。すべての群を０、３、７、１４および１８日目に免疫した。初回注射の２３日後にマウスを犠死させ、免疫学的試験のために脾細胞を単離した。１つ（モノエピトープ）、２つ（バイエピトープ）または１６（ポリエピトープ）の突然変異を示すＤＮＡ配列を、２５位に突然変異を有する５０アミノ酸（バイエピトープ）または１４位に突然変異を有する２７アミノ酸（モノおよびポリエピトープ）を使用して構築し、９アミノ酸のグリシン／セリンリンカーによって分離して、ｐＳＴ１－２ＢｇＵＴＲ－Ａ１２０骨格にクローニングした（Ｈｏｌｔｋａｍｐ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ２００６；１０８：４００９－１７）。この鋳型からのインビトロ転写および精製は以前に記述されている（Ｋｒｅｉｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２００７；５６：１５７７－８７）。

【０３４９】

酵素結合免疫スポットアッセイ

酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）アッセイ（Ｋｒｅｉｔｅｒ Ｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１０；７０：９０３１－４０）および刺激因子としての同系骨髄由来樹状細胞（ＢＭＤＣ）の生成は以前に記述されている（Ｌｕｔｚ ＭＢ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ １９９９；２２３：７７－９２）。ＢＭＤＣを、ペプチドでパルスするか（２μｇ／ｍｌ）、または指示される突然変異もしくはコントロールＲＮＡ（ｅＧＦＰ－ＲＮＡ）をコードするインビトロ転写（ＩＶＴ）ＲＮＡでトランスフェクトした。各々が２５位に突然変異を有する５０アミノ酸を含み、９アミノ酸のグリシン／セリンリンカーによって分離された２つの突然変異を示す配列をｐＳＴ１－２ＢｇＵＴＲ－Ａ１２０骨格にクローニングした（Ｈｏｌｔｋａｍｐ Ｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ ２００６；１０８：４００９－１７）。この鋳型からのインビトロ転写および精製は以前に記述されている（Ｋｒｅｉｔｅｒ Ｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２００７；５６：１５７７－８７）。アッセイのために、５×１０^{4}ペプチドまたはＲＮＡ操作したＢＭＤＣを、抗ＩＦＮ－γ抗体（１０μｇ／ｍＬ、クローンＡＮ１８；Ｍａｂｔｅｃｈ）で被覆したマイクロタイタープレート中で５×１０^{5}の新鮮単離した脾細胞と共に同時インキュベートした。３７℃で１８時間後、サイトカイン分泌を抗ＩＦＮ－γ抗体（クローンＲ４－６Ａ２；Ｍａｂｔｅｃｈ）で検出した。スポット数をカウントし、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ（登録商標）Ｓ５ Ｖｅｒｓａ ＥＬＩＳＰＯＴ Ａｎａｌｙｚｅｒ、ＩｍｍｕｎｏＣａｐｔｕｒｅ（登録商標）Ｉｍａｇｅ ＡｃｑｕｉｓｉｔｉｏｎソフトウェアおよびＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ（登録商標）Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェアバージョン５で解析した。統計解析はスチューデントｔ検定およびマン・ホイットニー検定（ノンパラメトリック検定）によって行った。検定でｐ値＜０．０５が与えられるか、平均スポット数が＞３０スポット／５×１０^{5}エフェクター細胞である場合、応答を有意とみなした。反応性は平均スポット数によって評価した（－：＜３０；＋：＞３０；＋＋：＞５０；＋＋＋＞２００スポット／ウェル）。

【０３５０】

細胞内サイトカインアッセイ

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ用に調製した脾細胞のアリコートを、細胞内フローサイトメトリによるサイトカイン産生の分析に供した。このために各試料につき２ ×１０^{6}脾細胞を、９６ウェルプレート中でゴルジ阻害剤ブレフェルジンＡ（１０μｇ／ｍＬ）を添加した培地（ＲＰＭＩ＋１０％ＦＣＳ）に塗布した。各動物からの細胞を、２× １０^{5}のペ

プチドパルスしたＢＭＤＣで３７℃にて５時間再刺激した。インキュベーション後、細胞をＰＢＳで洗浄し、ＰＢＳ　５０μｌ中に再懸濁して、以下の抗マウス抗体：抗ＣＤ４　ＦＩＴＣ、抗ＣＤ８　ＡＰＣ－Ｃｙ７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で４℃にて２０分間細胞外染色した。インキュベーション後、細胞をＰＢＳで洗浄し、その後外膜の透過処理のためにＣｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）溶液１００μＬ中に４℃にて２０分間再懸濁した。透過処理後、細胞をＰｅｒｍ／Ｗａｓｈ－Ｂｕｆｆｅｒ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）で洗浄し、Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ－Ｂｕｆｆｅｒ中に５０μＬ／試料で再懸濁し、以下の抗マウス抗体：抗ＩＦＮ－γ　ＰＥ、抗ＴＮＦ－α　ＰＥ－Ｃｙ７、抗ＩＬ２　ＡＰＣ（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）で４℃にて３０分間細胞内染色した。Ｐｅｒｍ／Ｗａｓｈ－Ｂｕｆｆｅｒで洗浄した後、フローサイトメトリ分析のために１％パラホルムアルデヒドを含有するＰＢＳ中に細胞を再懸濁した。ＢＤ　ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（登録商標）ＩＩ血球計算器およびＦｌｏｗＪｏ（バージョン７．６．３）を用いて試料を分析した。

【０３５１】

Ｂ１６メラノーマ腫瘍モデル

腫瘍ワクチン接種実験のために、７．５×１０^{4}　Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞をＣ５７ＢＬ／６マウスの側腹部に皮下的に接種した。予防的設定で、突然変異特異的ペプチドでの免疫を腫瘍接種の４日前および腫瘍接種後２日目と９日目に実施した。治療的実験のために、ペプチドワクチンを腫瘍注射後３日目と１０日目に投与した。腫瘍サイズを３日ごとに測定し、腫瘍径が１５ｍｍに達したときにマウスを犠死させた。

【０３５２】

あるいは、腫瘍ワクチン接種実験のために、１×１０^{5}　Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞を、年齢をマッチさせた雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスの側腹部に皮下的に接種した。ペプチドワクチン接種を、腫瘍接種後３、１０および１７日目に、ＰＢＳ中に製剤化したペプチド１００μｇおよびｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）５０μｇ（総容量２００μｌ）を側腹部に皮下注射して実施した。ＲＮＡ免疫を、総注射容量２００μｌでＰＢＳ中にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（登録商標）ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）２０μｌと共に製剤化した、突然変異をコードするインビトロ転写ＲＮＡ　２０μｇを使用して実施した。コントロールとして、１つの群の動物にＰＢＳ中のＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を注射した。動物を腫瘍接種後３、６、１０、１７および２１日目に免疫した。カリパスを用いて腫瘍サイズを３日ごとに測定し、腫瘍径が１５ｍｍに達したときにマウスを犠死させた。

【０３５３】

Ｂ１６Ｆ１０マウスメラノーマにおける非同義突然変異の同定

我々の目的は、Ｂ１６Ｆ１０マウスメラノーマにおける潜在的に免疫原性の体細胞点突然変異をＮＧＳによって同定し、これらをマウスのペプチドワクチン接種によってインビボ免疫原性に関して試験し、誘発されるＴ細胞応答をＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって測定することであった（図９Ａ）。我々は、Ｃ５７ＢＬ／６野生型バックグラウンドゲノムおよびＢ１６Ｆ１０細胞のエクソームを、それぞれ三つ組で抽出し、捕獲して、配列決定した。各試料について、１億個を超えるシングルエンド５０ヌクレオチドリードが生成された。これらのうち８０％がマウスｍｍ９ゲノムに特異的に整列し、４９％が標的上に整列して、標的の濃縮が成功したことを明らかにし、三つ組試料の各々において標的ヌクレオチドの７０％について２０倍以上のカバレッジをもたらした。同じく三つ組でプロファイリングしたＢ１６Ｆ１０細胞のＲＮＡ－Ｓｅｑは、平均３０００万個のシングルエンドの５０ヌクレオチドリードを生成し、このうち８０％がマウストランスクリプトームに整列する。

【０３５４】

Ｂ１６Ｆ１０およびＣ５７ＢＬ／６からのＤＮＡリード（エクソーム捕獲）を分析し、体細胞突然変異を同定した。コピー数の差異分析（Ｓａｔｈｉｒａｐｏｎｇｓａｓｕｔｉ　ＪＦ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　２０１１；２７：２６４８－５

４）は、Ｂ１６Ｆ１０におけるＤＮＡ増幅および腫瘍サプレッサーＣｄｋｎ２ａ（サイクリン依存性キナーゼ阻害剤２Ａ、ｐ１６Ｉｎｋ４Ａ）のホモ接合性欠失を含む欠失を明らかにした。可能性のある免疫原性突然変異を同定するために点突然変異に焦点を合わせて、我々は３５７０の体細胞点突然変異をＦＤＲ≦０．０５で同定した（図９Ｂ）。最も頻度の高いクラスの突然変異は、典型的には紫外線から生じる、Ｃ＞Ｔ／Ｇ＞Ａトランジションであった（Ｐｆｅｉｆｅｒ ＧＰ ｅｔ ａｌ．，Ｍｕｔａｔ Ｒｅｓ ２００５；５７１：１９－３１）。これらの体細胞突然変異のうちで、１３９２は転写産物中で起こり、１２６の突然変異は非翻訳領域で起こる。コード領域中の１２６６の突然変異のうちで、９６２は非同義タンパク質変化を引き起こし、これらのうちの５６３は発現された遺伝子中で起こる（図９Ｂ）。

【０３５５】

同定された突然変異のキャリア遺伝子への割り当ておよび実証

注目すべき点として、突然変異遺伝子の多く（非同義体細胞点突然変異を含む９６２の遺伝子）が、これまでに癌表現型に関連付けられている。突然変異は、Ｐｔｅｎ、Ｔｒｐ５３（ｐ５３とも呼ばれる）およびＴｐ６３を含む、確立された腫瘍サプレッサー遺伝子中で認められた。最も広く確立された腫瘍サプレッサーであるＴｒｐ５３中で（Ｚｉｌｆｏｕ ＪＴ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｅｒｓｐｅｃｔ Ｂｉｏｌ ２００９；１：ａ００１８８３）、タンパク質位置１２７におけるアスパラギンのアスパラギン酸への突然変異（ｐ．Ｎ１２７Ｄ）は、ＤＮＡ結合ドメイン内に局在し、ＳＩＦＴによって機能を変化させると予測されている。Ｐｔｅｎは２つの突然変異（ｐ．Ａ３９Ｖ、ｐ．Ｔ１３１Ｐ）を含み、どちらもタンパク質機能に有害な影響を及ぼすと予測される。ｐ．Ｔ１３１Ｐ突然変異は、ホスファターゼ活性を低下させることが示された突然変異（ｐ．Ｒ１３０Ｍ）に隣接する（Ｄｅｙ Ｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００８；６８：１８６２－７１）。さらに、突然変異は、ＤＮＡ修復経路に関連する遺伝子、例えばＢｒｃａ２（乳癌２、若年性）、Ａｔｍ（毛細管拡張性運動失調症の変異）、Ｄｄｂ１（損傷特異的ＤＮＡ結合タンパク質１）およびＲａｄ９ｂ（ＲＡＤ９ホモログＢ）中で認められた。さらに、突然変異は他の腫瘍関連遺伝子中でも起こり、これにはＡｉｍ１（腫瘍サプレッサー「アブセントインメラノーマ１」）、Ｆｌｔ１（癌遺伝子Ｖｅｇｒ１、ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１）、Ｐｍｌ（腫瘍サプレッサー「前骨髄球性白血病」）、Ｆａｔ１（「ＦＡＴ腫瘍サプレッサーホモログ１」）、Ｍｄｍ１（ＴＰ５３結合核タンパク質）、Ｍｔａ３（転移関連１ファミリー、成員３）、およびＡｌｋ（未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ）が含まれる。我々は、以前に腫瘍中で同定された、ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路の細胞膜結合受容体チロシンキナーゼ、Ｐｄｇｆｒａ（血小板由来増殖因子受容体αポリペプチド）（Ｖｅｒｈａａｋ ＲＧ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ２０１０；１７：９８－１１０）中のｐ．Ｓ１４４Ｆにおける突然変異を認めた。突然変異は、Ｃａｓｐ９（カスパーゼ９、アポトーシス関連システインペプチダーゼ）中のｐ．Ｌ２２２Ｖで起こる。ＣＡＳＰ９は、ポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）をタンパク質分解によって切断し、アポトーシスを調節し、いくつかの癌に関連付けられている（Ｈａｊｒａ ＫＭ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ２００４；９：６９１－７０４）。我々が認めた突然変異は潜在的にＰＡＲＰおよびアポトーシスシグナル伝達に影響を及ぼす。最も興味深い点として、Ｂｒａｆ、ｃ－Ｋｉｔ、ＫｒａｓまたはＮｒａｓでは突然変異が認められなかった。しかし、Ｒａｓｓｆ７（ＲＡＳ関連タンパク質）（ｐ．Ｓ９０Ｒ）、Ｋｓｒ１（ｒａｓ １のキナーゼサプレッサー）（ｐ．Ｌ３０１Ｖ）、およびＡｔｍ（ＰＩ３Ｋ経路）（ｐ．Ｋ９１Ｔ）中で突然変異が同定され、そのすべてがタンパク質機能に有意の影響を及ぼすと予測される。Ｔｒｒａｐ（形質転換／転写ドメイン関連タンパク質）は、今年になって新規潜在的メラノーマ標的としてヒトメラノーマ標本中で同定された（Ｗｅｉ Ｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ ２０１１；４３：４４２－６）。Ｂ１６Ｆ１０では、Ｔｒｒａｐ突然変異はｐ．Ｋ２７８３Ｒで起こり、オーバーラップするホスファチジルイノシトールキナーゼ（ＰＩＫ）関連キナーゼＦＡＴドメインを障害すると予測される。

【０３５６】

ＮＧＳを用いて同定された９６２の非同義突然変異から、我々は、ＦＤＲ＜０．０５を有する４１突然変異を含む５０の突然変異を、ＰＣＲに基づく実証と免疫原性試験のために選択した。選択基準は、発現された遺伝子中の位置（ＲＰＫＭ＞１０）および予測される免疫原性であった。注目すべきは、我々は５０の突然変異すべてを実証することができた（表６、図９Ｂ）。

表６：実証のために選択した突然変異。左から：割り当てたＩＤ、遺伝子記号、アミノ酸置換および位置、遺伝子名、予測される細胞内局在および種類（Ｉｎｇｅｎｕｉｔｙ）

【表６】

ID	記号	変化	Entrez遺伝子名	細胞内局在	種類
MUT1	*Fzd7*	p.G304A	フリズルドファミリー受容体7	形質膜	Gタンパク質共役受容体
MUT2	*Xpot*	p.I830S	エクスポーチン、tRNA(tRNAについての核外輸送受容体)	核	その他
MUT3	*Ranbp2*	p.Q2871H	RNA結合タンパク質2	核	酵素
MUT4	*Dnajb12*	p.P54T	DnaJ(Hsp40)ホモログ、サブファミリー8、成員12	細胞質	その他
MUT5	*Eef2*	p.G795A	真核生物翻訳伸長因子2	細胞質	翻訳調節因子
MUT6	*Ptrf*	p.D382G	ポリメラーゼIおよび転写産物放出因子	核	転写調節因子
MUT7	*Trp53*	p.N128D	腫瘍タンパク質p53	核	転写調節因子
MUT8	*Ddx23*	p.V602A	DEAD(Asp－Glu－Ala－Asp)ボックスポリペプチド23	核	酵素
MUT9	*Golgb1*	p.E2855D	ゴルジンB1	細胞質	その他
MUT10	*Pcdhga11*	p.G82R	プロトカドヘリンγサブファミリーA、11	形質膜	その他
MUT11	*Snx15*	p.E211G	ソーティングネキシン15	細胞質	輸送体
MUT12	*Gnas*	p.S112G	GNAS(グアニンヌクレオチド結合タンパク質α刺激性)複合体遺伝子座	形質膜	酵素
MUT13	*Fndc3b*	p.C561W	フィブロネクチンIII型ドメイン含有3B	細胞質	その他
MUT14	*Sbno1*	p.P309T	ストロベリーノッチホモログ1(ショウジョウバエ)	不明	酵素
MUT15	*Pi4k2b*	p.R344Q	ホスファチジルイノシトール4－キナーゼタイプ 2β	細胞質	キナーゼ
MUT16	*Thumpd3*	p.T243S	THUMPドメイン含有3	不明	その他
MUT17	*Tnpo3*	p.G504A	トランスポーチン3	細胞質	その他
MUT18	*Numa1*	p.Q447K	核有糸分裂装置タンパク質1	核	その他
MUT19	*Wwp2*	p.E742K	WWドメイン含有E3ユビキチンタンパク質リガーゼ 2	細胞質	酵素
MUT20	*Tubb3*	p.G402A	チューブリン、β3	細胞質	その他
MUT21	*Atp11a*	p.R522S	ATPアーゼ、クラスVI、11A型	形質膜	輸送体
MUT22	*Asf1b*	p.A141P	ASF1抗サイレンシング機能1ホモログB(S. セレビシエ)	核	その他
MUT23	*Wdr82*	p.I221L	WDリピートドメイン82	核	その他
MUT24	*Dag1*	p.P425A	ジストログリカン1(ジストロフィン関連糖タンパク質1)	形質膜	膜貫通受容体
MUT25	*Plod2*	p.F530V	プロコラーゲン-リシン、2-オキソグルタル酸5-ジオキシゲナーゼ2	細胞質	酵素
MUT26	*Orc2*	p.F278V	起源認識複合体、サブユニット2	核	その他
MUT27	*Obsl1*	p.T1764M	オブスキュリン様1	不明	その他
MUT28	*Ppp1r7*	p.L170P	プロテインホスファターゼ1、調節(阻害剤)サブユニット7	核	ホスファターゼ
MUT29	*Mthfd1l*	p.F294V	メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ(NADP+依存性)1様	細胞質	酵素
MUT30	*Kif18b*	p.K739N	キネシンファミリー成員18B	不明	その他
MUT31	*Ascc2*	p.A59G	活性化シグナルコインテグレーター1複合体サブユニット2	不明	その他
MUT32	*Itsn2*	p.S1551R	インターセクチン2	細胞質	その他
MUT33	*Pbk*	p.V145D	PDZ結合キナーゼ	細胞質	キナーゼ
MUT34	*Klhl22*	p.F179V	kelch様22(ショウジョウバエ)	不明	その他
MUT35	*Ddb1*	p.L438I	損傷特異的DNA結合タンパク質1、127kDa	核	その他
MUT36	*Tm9sf3*	p.Y382H	膜貫通9スーパーファミリー成員3	細胞質	輸送体
MUT37	*Dpf2*	p.F275V	D4、ジンクおよびダブルPHDフィンガーファミリー2	核	その他
MUT38	*Atm*	p.S745N	アトラクチン	細胞外間隙	その他
MUT39	*Snx5*	p.R373Q	ソーティングネキシン5	細胞質	輸送体
MUT40	*Armc1*	p.S85I	アルマジロリピート含有1	細胞質	その他
MUT41	*Ash1l*	p.L632I	ash1(absent, small, or homeotic)様(ショウジョウバエ)	核	転写調節因子
MUT42	*S100a13 2510039O18*	p.S18C	S100カルシウム結合タンパク質A13	細胞質	その他
MUT43	*Rik*	p.E391K	KIAA2013	不明	その他
MUT44	*Cpsf3l*	p.D314N	切断およびポリアデニル化特異的因子3様	核	その他
MUT45	*Mkrn1*	p.N346Y	マコリンリングフィンガータンパク質1	不明	その他
MUT46	*Actn4*	p.F835V	アクチニン、α4	細胞質	その他
MUT47	*Rpl13a*	p.A24G	リボソームタンパク質L13a	細胞質	その他
MUT48	*Def8*	p.R255G	FDCP 8ホモログ(マウス)中で区別的に発現される	不明	その他
MUT49	*Fat1*	p.I1940M	FAT腫瘍サブレッサーホモログ1(ショウジョウバエ)	形質膜	その他
MUT50	*Sema3b*	p.L663V	セマドメイン、免疫グロブリンドメイン(Ig)、短い塩基性ドメイン、分泌、(セマフォリン)3B	細胞外間隙	その他

【０３５７】

図９Ｃは、Ｂ１６Ｆ１０染色体の位置、遺伝子密度、遺伝子発現、突然変異、およびフィルタリングされた突然変異（内側の環）を示す。

【０３５８】

突然変異を示す長いペプチドに関する免疫原性試験のインビボ試験

これらの突然変異の免疫原性試験用の抗原を提供するため、我々は、免疫のために他のペプチドに比べて多くの利点を有する長いペプチドを使用した（Ｍｅｌｉｅｆ ＣＪ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｂｕｒｇ ＳＨ，Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ ２００８；８：３５１－６０）。長いペプチドは抗原特異的ＣＤ８$^{+}$およびＣＤ４＋Ｔ細胞を誘導することができる（Ｚｗａｖｅｌｉｎｇ Ｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００２；６２：６１８７－９３；Ｂｉｊｋｅｒ ＭＳ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００７；１７９：５０３３－４０）。さらに、長いペプチドは、ＭＨＣ分子に提示されるためにはプロセシングを必要とする。そのような取込みは、強力なＴ細胞応答をプライミングするのに最適な、樹状細胞によって最も効率的に行われる。適合するペプチドは、これに対し、トリミングを必要とせず、非活性化Ｂおよびｔ細胞を含む、ＭＨＣ分子を発現するすべての細胞上に外因的に負荷され、免疫学的寛容とフラトリサイドの誘導をもたらす（Ｔｏｅｓ ＲＥ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９６；１５６：３９１１－８；Ｓｕ ＭＷ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９３；１５１：６５８－６７）。５０の実証された突然変異の各々について、我々は、中心部に位置する突然変異または野生型アミノ酸を有する２７アミノ酸長のペプチドを設計した。したがって、突然変異を担持する８～１４アミノ酸長の任意の潜在的ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩエピトープをこの前駆体ペプチドからプロセシングすることができた。ペプチドワクチン接種のためのアジュバントとして、交差提示を促進し、ワクチン効果を高めることが公知であるｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）を使用した（Ｄａｔｔａ ＳＫ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００３；１７０：４１０２－１０；Ｓｃｈｕｌｚ Ｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２００５；４３３：８８７－９２）。５０の突然変異をＴ細胞の誘導に関してマウスにおいてインビボで試験した。印象的な点として、５０の突然変異をコードするペプチドの中から１６が、免疫マウスにおいて免疫応答を誘発することが認められた。誘導されたＴ細胞は種々の反応性パターンを示した（表７）。

表７：突然変異をコードするペプチドでのワクチン接種に続いて測定されたＴ細胞反応性の要約。統計解析はスチューデントｔ検定およびマン・ホイットニー検定（ノンパラメトリック検定）によって行った。検定でｐ値＜０．０５が与えられるか、平均スポット数が＞３０スポット／５×１０^{5}エフェクター細胞である場合、応答を有意とみなした。反応性は平均スポット数によって評価した。－：＜３０；＋：＞３０；＋＋：＞５０；＋＋＋＞２００スポット／ウェル）。

【表７】

突然変異	遺伝子記号	突然変異に対する反応性	野生型に対する反応性	突然変異	遺伝子記号	突然変異に対する反応性	野生型に対する反応性
MUT01	*Fzd7*	-	-	MUT26	Orc2	-	-
MUT02	*Xpot*	-	-	MUT27	Obsl1	-	-
MUT03	*Ranbp2*	-	-	MUT28	Ppp1r7	+	+
MUT04	*Dnajb12*	-	-	MUT29	Mthfd1l	+	-
MUT05	*Eef2*	+++	+++	MUT30	Kif18b	+++	-
MUT06	*Ptrf*	-	-	MUT31	Ascc2	-	-
MUT07	*Trp53*	-	-	MUT32	Itsn2	-	-
MUT08	*Ddx23*	-	-	MUT33	Pbk	-	-
MUT09	*Golgb1*	-	-	MUT34	Klhl22	-	-
MUT10	*Pcdhga11*	-	-	MUT35	Ddb1	-	-
MUT11	*Snx15*	-	-	MUT36	Tm9sf3	+	-
MUT12	*Gnas*	+	-	MUT37	Dpf2	-	-
MUT13	*Fndc3b*	-	-	MUT38	Atrn	-	-
MUT14	*Sbno1*	-	-	MUT39	Snx5	-	-
MUT15	*Pi4k2b*	-	-	MUT40	Armc1	-	-
MUT16	*Thumpd3*	-	-	MUT41	Ash1l	-	-
MUT17	*Tnpo3*	+++	++	MUT42	S100a13	-	-
MUT18	*Numa1*	-	-	MUT43	Rik	-	-
MUT19	*Wwp2*	-	-	MUT44	Cpsf3l	+++	++
MUT20	*Tubb3*	+++	-	MUT45	Mkrn1	++	++
MUT21	*Atp11a*	-	-	MUT46	Actn4	++	+
MUT22	*Asf1b*	++	++	MUT47	Rpl13a	-	-
MUT23	*Wdr82*	-	-	MUT48	Def8	++	++
MUT24	*Dag1*	++	+	MUT49	Fat1	-	-
MUT25	*Plod2*	+++	++	MUT50	Sema3b	+++	++

【０３５９】

１１のペプチドが、突然変異エピトープを選択的に認識する免疫応答を誘導した。これは、突然変異３０（ＭＵＴ３０、Ｋｉｆ１８ｂ）および３６（ＭＵＴ３６、Ｐｌｏｄ２）で免疫したマウスに関して例示されている（図１０Ａ）。ＥＬＩＳＰＯＴ試験は、野生型ペプチドまたは無関係なコントロールペプチド（ＶＳＶ－ＮＰ）に対する交差反応性を伴わない強力な突然変異特異的免疫応答を明らかにした。突然変異０５（ＭＵＴ０５、Ｅｅｆ２）および２５（ＭＵＴ２５、Ｐｌｏｄ２）を含む５つのペプチドにより（図１０Ａ）、突然変異ペプチドと野生型ペプチドの両方を同等に認識する免疫応答が得られた。突然変異ペプチドの大部分は、突然変異０１（ＭＵＴ０１、Ｆｚｄ７）、０２（ＭＵＴ０２、Ｘｐｏｔ）および０７（ＭＵＴ０７、Ｔｒｐ５３）に例示されるように有意のＴ細胞応答を誘導することができなかった。発見された突然変異のいくつかによって誘導される免疫応答は、十分に、陽性コントロールとしてマウスメラノーマ腫瘍抗原チロシナーゼ関連タンパク質２（$Trp2_{180-188}$、図１０Ａ）からの記述されているＭＨＣクラスＩエピトープでマウスを免疫することによって生じる免疫原性（５００スポット／5×10^5細胞）の範囲内であった（Ｂｌｏｏｍ ＭＢ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ Ｍｅｄ １９９７；１８５：４５３－９；Ｓｃｈｒｅｕｒｓ ＭＷ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０００；６０：６９９５－７００１）。強力な突然変異特異的Ｔ細胞応答を誘導する選択されたペプチドに関して、我々は独立したアプローチによって免疫認識を確認した。長いペプチドの代わりに、突然変異ペプチドフラグメントＭＵＴ１７、ＭＵＴ３０およびＭＵＴ４４をコードするインビトロ転写ＲＮＡ（ＩＶＴ ＲＮＡ）を免疫学的読み出しのために使用した。ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて、突然変異をコードするＲＮＡまたは無関係なＲＮＡでトランスフェクトしたＢＭＤＣを抗原提示細胞（ＡＰＣ）として使用し、免疫マウスの脾細胞をエフェクター細胞集団として使用した。ＭＵＴ１７、ＭＵＴ３０およびＭＵＴ４４をコードするｍＲＮＡでトランスフェクトしたＢＭＤＣは、それぞれの

長いペプチドで免疫したマウスの脾細胞によって特異的におよび強力に認識された（図１０Ｂ）。コントロールＲＮＡでトランスフェクトＢＭＤＣに対しては有意に低い反応性が記録され、これはおそらく一本鎖ＲＮＡによるＢＭＤＣの非特異的活性化に起因すると考えられる（スチューデントｔ検定；ＭＵＴ１７：ｐ＝０．００２４、ＭＵＴ３０：ｐ＝０．０１２２、ＭＵＴ４４：ｐ＝０．００７５）。これらのデータは、誘導される突然変異特異的Ｔ細胞が内因的にプロセシングされたエピトープを実際に認識することを確認する。突然変異エピトープの好ましい認識を誘導する２つの突然変異は、遺伝子Ａｃｔｎ４およびＫｉｆ１８ｂ中に存在する。ＡＣＴＮ４（アクチニン、α４）中の体細胞突然変異は、カルシウム結合「ＥＦハンド」タンパク質ドメイン内のｐ．Ｆ８３５Ｖに位置する。ＳＩＦＴおよびＰＯＬＹＰＨＥＮの両方がタンパク質機能へのこの突然変異の有意の影響を予測するが、この遺伝子は確立された癌遺伝子ではない。しかし、ＡＣＴＮ４に対する突然変異特異的Ｔ細胞は、最近、患者の良好な結果に関連付けられている（Ｅｃｈｃｈａｋｉｒ Ｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００１；６１：４０７８－８３）。ＫＩＦ１８Ｂ（キネシンファミリー成員１８Ｂ）は、微小管運動活性ならびに細胞分裂の調節に関与するＡＴＰおよびヌクレオチド結合を有するキネシンである（Ｌｅｅ ＹＭ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ２０１０；４６６：１６－２５）（図１０Ｃ）。ｐ．Ｋ７３９をコードする位置のＤＮＡ配列は参照Ｃ５７ＢＬ／６中で均一であるが、Ｂ１６Ｆ１０ＤＮＡリードはヘテロ接合性体細胞突然変異を明らかにする。両方のヌクレオチドがＢ１６Ｆ１０ ＲＮＡ－Ｓｅｑリード中で検出され、サンガーシークエンシングによって実証された。ＫＩＦ１８Ｂはこれまで癌表現型には関連付けられていなかった。突然変異ｐ．Ｋ７３９Ｎは、公知の機能的または保存されたタンパク質ドメインには局在せず（図１０Ｃ、下）、したがってドライバー突然変異ではなくパッセンジャー突然変異である可能性が最も高い。これらの例は、突然変異を認識する免疫応答を誘導する能力と機能的または免疫学的関連性との間に相関がないことを示唆する。

【０３６０】

ワクチン候補物の抗腫瘍活性のインビボ評価

インビボで誘発される免疫応答が腫瘍担持マウスにおける抗腫瘍作用につながるかどうかを評価するため、我々はＭＵＴ３０（Ｋｉｆ１８ｂ中の突然変異）およびＭＵＴ４４を例として選択した。これらの突然変異は、突然変異ペプチドに対して選択的に強力な免疫反応を誘導し、内因的にプロセシングされることが示されていた（図１０Ａ、Ｂ）。突然変異ペプチドでワクチン接種することの治療的潜在能を、７．５×10^5 Ｂ１６Ｆ１０の移植の３日後および１０日後にＭＵＴ３０またはＭＵＴ４４のいずれかとアジュバントでマウスを免疫することによって検討した。腫瘍の成長は、コントロール群と比較して両方のペプチドワクチン接種によって阻害された（図１１Ａ）。Ｂ１６Ｆ１０は非常に攻撃的に成長する腫瘍であるので、我々は防御的免疫応答も試験した。マウスをＭＵＴ３０ペプチドで免疫し、４日後に７．５×10^5 Ｂ１６Ｆ１０細胞を皮下的に接種して、腫瘍攻撃誘発の２日後および９日後にＭＵＴ３０で追加免疫した。ＭＵＴ３０で処置したマウスの完全な腫瘍防御および４０％の生存が認められ、一方コントロール処置群のすべてのマウスは４４日以内に死亡した（図１１Ｂ、左）。ＭＵＴ３０での免疫にもかかわらず腫瘍を発症したマウスでは、腫瘍の成長がより緩やかであり、コントロール群と比較して６日間の平均生存期間の延長をもたらした（図１１Ｂ、右）。これらのデータは、単一突然変異に対するワクチン接種が既に抗腫瘍作用を付与することができることを示唆する。

【０３６１】

突然変異をコードするＲＮＡでの免疫

Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞株からの５０の実証された突然変異を用いて種々のＲＮＡワクチンを構築した。１つ（モノエピトープ）、２つ（バイエピトープ）または１６（ポリエピトープ）の異なる突然変異を示すＤＮＡ配列を、２５位に突然変異を有する５０アミノ酸（バイエピトープ）または１４位に突然変異を有する２７アミノ酸（モノおよびポリエピトープ）を使用して構築し、９アミノ酸のグリシン／セリンリンカーによって分離した。これらの構築物をｍＲＮＡのインビトロ転写のためにｐＳＴ１－２ＢｇＵＴＲ－Ａ

１２０骨格にクローニングした（Ｈｏｌｔｋａｍｐ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　２００６；１０８：４００９－１７）。

【０３６２】

種々のＲＮＡワクチンに対するＴ細胞応答を誘導するインビボ能力を試験するため、３匹のＣ５７ＢＬ／６マウスの群を、ＲＮＡとＲＮＡｉＭＡＸリポフェクタミンの製剤化およびその後の静脈内注射によって免疫した。５回の免疫後、マウスを犠死させ、対応する突然変異コードペプチドまたはコントロールペプチド（ＶＳＶ－ＮＰ）での再刺激後に、脾細胞を、細胞内サイトカイン染色およびＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ分析を用いて突然変異特異的Ｔ細胞応答に関して分析した。

【０３６３】

図１２は、各々のワクチン設計についての一例を示す。上での列では、マウスを、ＭＵＴ３０（Ｋｉｆ１８ｂ中の突然変異）をコードするモノエピトープ－ＲＮＡでワクチン接種し、これはＭＵＴ３０特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞を誘導する（例示ＦＡＣＳプロット参照）。中央の列では、グラフおよびＦＡＣＳプロットは、ＭＵＴ３３およびＭＵＴ０８をコードするバイエピトープでの免疫後にＭＵＴ０８（Ｄｄｘ２３中の突然変異）特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞の誘導を示す。下の列では、マウスを、ＭＵＴ０８、ＭＵＴ３３およびＭＵＴ２７を含む１６の異なる突然変異をコードするポリエピトープで免疫した（表８参照）。グラフおよびＦＡＣＳプロットは、ＭＵＴ２７反応性Ｔ細胞がＣＤ８表現型であることを例示する。

表８：モノエピトープ、バイエピトープおよびポリエピトープＲＮＡワクチンによってコードされる突然変異および遺伝子名の概略

【表８】

構築物	コードされる突然変異	遺伝子アノテーション
モノエピトープ	MUT30	*Kif18b*
バイエピトープ	MUT33	*Pbk*
	MUT08	*Ddx23*
ポリエピトープ	MUT01	*Fzd7*
	MUT02	*Xpot*
	MUT03	*Ranbp2*
	MUT04	*Dnajb12*
	MUT05	*Eef2*
	MUT06	*Ptrf*
	MUT07	*Trp53*
	MUT08	*Ddx23*
	MUT26	*Orc2*
	MUT27	*Obsl1*
	MUT28	*Ppp1r7*
	MUT29	*Mthfd1l*
	MUT30	*Kif18b*
	MUT31	*Ascc2*
	MUT32	*Itsn2*
	MUT33	*Pbk*

【０３６４】

同じポリエピトープを使用して、図１３に示すデータを作成した。グラフは、コントロール（ＶＳＶ－ＮＰ）、ＭＵＴ０８、ＭＵＴ２７およびＭＵＴ３３ペプチドによる脾細胞の再刺激後のＥＬＩＳＰＯＴデータを示しており、ポリエピトープワクチンがいくつかの異なる突然変異に対する特異的Ｔ細胞応答を誘導することができることを証明する。

【０３６５】

合わせて考慮すると、データは、モノエピトープ、バイエピトープおよびポリエピトープをコードするＲＮＡを使用して突然変異特異的Ｔ細胞を誘導する可能性を示す。さらに、データは、１つの構築物からのＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８＋Ｔ細胞の誘導およびいくつかの異なる特異性の誘導を示す。

【０３６６】

モデルエピトープによる免疫

ポリエピトープＲＮＡワクチン設計をさらに特性付けるため、１つのＭＨＣクラスＩＩエピトープ（オボアルブミンクラスＩ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ）、クラスＩＩ（ＯＶＡクラスＩＩ）、インフルエンザヌクレオタンパク質（Ｉｎｆ－ＮＰ）、水疱性口内炎ウイルスヌクレオタンパク質（ＶＳＶ－ＮＰ）およびチロシナーゼ関連タンパク質２（Ｔｒｐ２））

を含む５つの異なる公知のモデルエピトープを含有するＤＮＡ配列を構築した。突然変異ポリエピトープのために使用した９アミノ酸の同じグリシン／セリンリンカーでエピトープを分離した。この構築物をｍＲＮＡのインビトロ転写のためにｐＳＴ１－２ＢｇＵＴＲ－Ａ１２０骨格にクローニングした。

【０３６７】

インビトロ転写ＲＮＡを使用して、節内免疫（鼠径部リンパ節内へのＲＮＡ　２０μｇによる４回の免疫）によって５匹のＣ５７ＢＬ／６マウスにワクチン接種した。最後の免疫の５日後に、血液試料と脾細胞を分析のためにマウスから採取した。図１４Ａは、指示されているペプチドで再刺激した脾細胞のＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴ分析を示す。３つすべてのＭＨＣクラスＩエピトープ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ、Ｔｒｐ２およびＶＳＶ－ＮＰ）が非常の高い数の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を誘導することが明らかに認められる。ＭＨＣクラスＩＩエピトープＯＶＡクラスＩＩも強力なＣＤ４＋Ｔ細胞応答を誘導する。４番目のＭＨＣクラスＩエピトープは、蛍光標識五量体ＭＨＣペプチド複合体（五量体）でＩｎｆ－ＮＰ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を染色することによって分析した。（図１４Ｂ）。

【０３６８】

これらのデータは、異なる免疫原性ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩエピトープを分離するためにグリシン／セリンリンカーを使用するポリエピトープ設計が、その免疫優性に関わりなく、すべてのコードされるエピトープに対する特異的Ｔ細胞を誘導することができることを証明する。

【０３６９】

突然変異をコードするポリエピトープＲＮＡワクチンによる治療後の抗腫瘍応答

免疫原性に関して図１３で分析した同じポリエピトープを使用して、Ｂ１６Ｆ１０腫瘍細胞に対する突然変異コードＲＮＡの抗腫瘍活性を検討した。詳細には、Ｃ５７ＢＬ／６マウスの群（ｎ＝１０）に、1×10^{5}　Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞を側腹部に皮下的に接種した。３、６、１０、１７および２１日目に、リポソームトランスフェクション試薬を用いてポリエピトープＲＮＡでマウスを免疫した。コントロール群にはリポソームだけを注射した。

【０３７０】

図２１は両群の生存率曲線を示し、コントロール群における１８．５日の平均生存期間と比較して２７日という強く改善された平均生存期間を明らかにし、１０匹のマウスのうち１匹は腫瘍なしで生存した。

【０３７１】

突然変異ペプチドと正常ペプチドの組合せによる治療後の抗腫瘍応答

実証された突然変異の抗腫瘍活性を、ＭＵＴ３０をペプチドワクチンとして使用して治療的インビボ腫瘍実験によって評価した。詳細には、Ｃ５７ＢＬ／６マウスの群（ｎ＝８）に、1×10^{5}　Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞を側腹部に皮下的に接種した。３、１０および１７日目に、ｐｏｌｙＩ：Ｃをアジュバントとして使用してＭＵＴ３０、チロシナーゼ関連タンパク質２（$Trp2_{180-188}$）または両方のペプチドの組合せでマウスを免疫した。Ｔｒｐ２は、Ｂ１６Ｆ１０メラノーマ細胞によって発現される公知のＣＤ8^{+}エピトープである。

【０３７２】

図１５Ａは各群の平均腫瘍成長を示す。公知のＣＤ８＋Ｔ細胞エピトープとＣＤ４＋Ｔ細胞を誘導するＭＵＴ３０の組合せで免疫した群では、２８日目まで腫瘍成長がほぼ完全に阻害されることが明らかに認められる。公知のＴｒｐ２エピトープ単独では、この設定で良好な抗腫瘍作用を提供するには十分でないが、両方の単一治療群（ＭＵＴ３０およびＴｒｐ２）が、実験の開始から２５日目まで未処置群と比較してまだ腫瘍成長の阻害を提供する。これらのデータは、図１５Ｂに示す生存率曲線によって裏付けられる。明らかに、単一ペプチドを注射したマウスによって平均生存率が上昇し、Ｔｒｐ２でワクチン接種した群では１／８のマウスが生存した。加えて、両方のペプチドで処置した群はさらに良好な生存率を示し、２／８のマウスが生存した。

【０３７３】
合わせて考慮すると、２つのエピトープは強力な抗腫瘍作用を提供するように相乗作用的に働く。
【０３７４】
（実施例９）
信頼度に基づく体細胞突然変異検出のためのフレームワークおよびＢ１６Ｆ１０メラノーマ細胞への適用
ＮＧＳは、ゲノム全体またはタンパク質コードエクソンなどの標的領域内で変異の高スループット発見を可能にするという点でバイアスがない。
【０３７５】
しかし、画期的ではあるが、ＮＧＳプラットフォームはまだ誤った変異コールを導くエラーを生じやすい。さらに、結果の品質は実験計画のパラメータおよび解析方法に依存する。変異コールは、典型的には真の変異をエラーから区別するように設計されたスコアを含むが、これらのスコアの有用性は十分に理解されておらず、実験の最適化に関するその解釈も同様である。これは、組織状態を比較する、すなわち体細胞突然変異に関して腫瘍組織と正常組織を比較する場合に特に当てはまる。結果として、研究者は、突然変異を選択するための実験パラメータおよび恣意的なフィルタリング閾値を決定するにあたって個人的な経験に頼らざるを得ない。
【０３７６】
我々の研究は、ａ）体細胞突然変異を同定するパラメータおよび方法を比較するための枠組みを確立することならびにｂ）同定された突然変異に信頼値を割り当てることを目指す。我々は、Ｃ５７ＢＬ／６マウスおよびＢ１６Ｆ１０メラノーマ細胞株からの三つ組試料を配列決定する。これらのデータを使用して、その後既存の突然変異発見ソフトウェアおよび実験プロトコルを評価するのに用いる尺度である、検出された体細胞突然変異の偽発見率を策定する。
【０３７７】
様々な実験およびアルゴリズム因子が、ＮＧＳによって見出された変異についての偽陽性率に寄与する［Ｎｏｔｈｎａｇｅｌ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．２０１１　Ｆｅｂ　２３［Ｅｐｕｂ　ａｈｅａｄ　ｏｆ　ｐｒｉｎｔ］］。エラーソースには、ＰＣＲアーティファクト、プライミングのバイアス［Ｈａｎｓｅｎ，Ｋ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．３８，ｅ１３１（２０１０）；Ｔａｕｂ，Ｍ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｍｅｄ．２，８７（２０１０）］および標的濃縮におけるバイアス［Ｂａｉｎｂｒｉｄｇｅ，Ｍ．Ｎ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．１１，Ｒ６２（２０１０）］、配列の影響［Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（２０１１）ｆｉｒｓｔ　ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｏｎｌｉｎｅ　Ｍａｙ　１６，２０１１　ｄｏｉ：１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｒ３４４］、配列エラーを引き起こすベースコーリング［Ｋｉｒｃｈｅｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．１０，Ｒ８３（２００９）．Ｅｐｕｂ　２００９　Ａｕｇ　１４］ならびにさらなる下流解析、例えばインデルの周囲の変異コーリング［Ｌｉ，Ｈ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　２７，１１５７－１１５８（２０１１）］に影響を及ぼすカバレッジの変動およびシークエンシングエラーを生じさせるリードアラインメント［Ｌａｓｓｍａｎｎ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　２７，１３０－１３１（２０１１）］が含まれる。
【０３７８】
体細胞突然変異コールへの種々のエラーソースの影響を説明する一般的な統計モデルは記述されていない；個別の局面だけがすべてのバイアスを除去することなくカバーされている。偽陽性突然変異コールの予想量を測定するための最近のコンピュータ法には、変異のセットのトランジション／トランスバージョン比の利用［Ｚｈａｎｇ，Ｚ．，Ｇｅｒｓｔｅｉｎ，Ｍ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３１，５３３８－５３４８（２００３）；ＤｅＰｒｉｓｔｏ，Ｍ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ

４３，４９１－４９８（２０１１）］、機械学習［ＤｅＰｒｉｓｔｏ，Ｍ．Ａ．ｅｔａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４３，４９１－４９８（２０１１）］および家族ゲノムに関して［Ｅｗｅｎ，Ｋ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．６７，７２７－７３６（２０００）］またはプールされた試料に関して［Ｄｒｕｌｅｙ，Ｔ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ６，２６３－２６５（２００９）；Ｂａｎｓａｌ，Ｖ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２６，３１８－３２４（２０１０）］作業する場合の継承エラーが含まれる。最適化のために、Ｄｒｕｌｅｙら［Ｄｒｕｌｅｙ，Ｔ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ６，２６３－２６５（２００９）］は短いプラスミド配列フラグメントを利用したが、これらは試料を代表していない可能性があった。一塩基変異（ＳＮＶ）のセットおよび選択された実験について、他の技術によって同定されたＳＮＶとの比較が実行可能である［Ｖａｎ Ｔａｓｓｅｌｌ，Ｃ．Ｐ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ５，２４７－２５２（２００８）］が、新規体細胞突然変異に関して評価することは困難である。

【０３７９】

一例としてエクソームシークエンシングプロジェクトを使用して、我々は、ＮＧＳデータだけに基づいて偽発見率（ＦＤＲ）を計算することを提案する。この方法は、診断および治療標的の選択と優先順位付けに適用できるだけでなく、我々が類似の実験について信頼度駆動推奨を定義することを可能にすることにより、アルゴリズムおよび方法の開発も支援する。

【０３８０】

突然変異を発見するため、３匹のＣ５７ＢＬ／６（ｂｌａｃｋ６）マウス（同腹子）の尾部組織からのＤＮＡおよびＢ１６Ｆ１０（Ｂ１６）メラノーマ細胞からのＤＮＡを、三つ組で、タンパク質コードエクソンに関して個別に濃縮し（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｓｕｒｅ Ｓｅｌｅｃｔ Ｗｈｏｌｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｘｏｍｅ）、６つの試料を得た。ＲＮＡをＢ１６細胞から三つ組で抽出した。シングルエンド５０ヌクレオチド（１×５０ｎｔ）リードおよびペアエンド１００ヌクレオチド（２×１００ｎｔ）リードをＩｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ２０００で生成した。各試料を個別のレーンに負荷し、各レーンにつき平均１億４００万リードを生じた。ＤＮＡリードをｂｗａ［Ｌｉ，Ｈ．Ｄｕｒｂｉｎ，Ｒ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２５，１７５４－１７６０（２００９）］を使用してマウス参照ゲノムに整列させ、ＲＮＡリードをｂｏｗｔｉｅ［Ｌａｎｇｍｅａｄ，Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ．１０，Ｒ２５（２００９）］を使用して整列させた。標的領域の９７％の３８倍の平均カバレッジが１×５０ｎｔライブラリに関して達成され、２×１００ｎｔ実験は標的領域の９８％の１６５倍の平均カバレッジを生じた。

【０３８１】

体細胞変異を、ソフトウェアパッケージＳＡＭｔｏｏｌｓ［Ｌｉ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２５，２０７８－２０７９（２００９）］、ＧＡＴＫ［ＤｅＰｒｉｓｔｏ，Ｍ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４３，４９１－４９８（２０１１）］およびＳｏｍａｔｉｃＳＮｉＰｅｒ［Ｄｉｎｇ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ（２０１０）ｆｉｒｓｔ ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ １５，２０１０］を使用して（図１６）、Ｂ１６試料中で見出された一塩基変異をｂｌａｃｋ６試料中の対応する遺伝子座と比較することによって（Ｂ１６細胞はもともとｂｌａｃｋ６マウスに由来した）独立して同定した。潜在的突然変異を、それぞれのソフトウェアの作成者（ＳＡＭｔｏｏｌｓおよびＧＡＴＫ）による推奨に従ってまたはＳｏｍａｔｉｃＳＮｉＰｅｒの体細胞スコアに関する適切な下限閾値を選択することによって、それぞれフィルタリングした。

【０３８２】

突然変異発見に関する偽発見率（ＦＤＲ）を作成するため、我々は最初に突然変異部位をインターセクトさせ、１，３５５の高品質体細胞突然変異を３つのプログラムすべてにおけるコンセンサスとして得た（図１７）。しかし、適用したソフトウェアツールの結果において認められた差異は実質的である。誤った結論を避けるため、我々は、レプリケー

トを使用して各突然変異にＦＤＲを割り当てる方法を開発した。サンプルの技術的反復は同一の結果を生じるはずであり、この「対同一物比較」における検出された突然変異は偽陽性である。したがって、正常試料と比較して腫瘍試料中の体細胞突然変異検出に関する偽発見率を決定するために（「腫瘍比較」）、我々は、偽陽性の数を推定するための参照として正常試料の技術的反復を使用することができる。

【０３８３】

図１８Ａは、参照に対する体細胞突然変異（左）、非体細胞変異（中央）および可能性のある偽陽性（右）を含む、ｂｌａｃｋ６／Ｂ１６データ中で見出された変異の例を示す。各体細胞突然変異をクオリティスコアＱと関連付けることができる。腫瘍比較における偽陽性の数は、対同一物比較における偽陽性の数を示す。したがって、腫瘍比較で検出されたクオリティスコアＱを有する所与の突然変異に関して、我々は、Ｑまたはより良好なスコアを有する腫瘍比較で見出された突然変異の全体数に対する、Ｑまたはより良好なスコアを有する対同一物突然変異の比率をコンピュータで計算することによって偽発見率を推定する。

【０３８４】

大部分の突然変異検出フレームワークは複数のクオリティスコアを計算するので、Ｑを定義するうえで問題が生じる。ここで我々は、複数のスコアを組み合わせて単一のクオリティスコアＱにするためにランダムフォレスト分類器［Ｂｒｅｉｍａｎ，Ｌ．，Ｓｔａｔｉｓｔ．Ｓｃｉ．１６，１９９－２３１（２００１）］を適用する。クオリティスコアおよびＦＤＲ計算の詳細に関しては方法の章を参照されたい。

【０３８５】

比較法における潜在的なバイアスは差分カバレッジである；我々は、したがって、カバレッジに関して偽発見率を正規化する：

【数１】

$$FDR(Q) = \frac{\text{スコア}\geq Q\text{を有する対同一物ＳＮＶの数}}{\text{スコア}\geq Q\text{を有する腫瘍ＳＮＶの数}} x \frac{\text{腫瘍比較の共通カバレッジの数}}{\text{対同一物比較の共通カバレッジの数}}$$

【０３８６】

我々は、腫瘍試料と正常試料の両方によってまたは両方の「対同一物」（ｓａｍｅ　ｖｓ．ｓａｍｅ）試料によってそれぞれカバーされる参照ゲノムのすべてのベースをカウントすることによって共通カバレッジを計算する。

【０３８７】

各々のＦＤＲで偽陽性および陽性の数を推定することにより（「方法」参照）、受信者操作特性（ＲＯＣ）曲線を作成し、各突然変異発見法についてＡＵＣ（曲線下面積）を計算し、したがって突然変異発見のための戦略の比較を可能にする（図１８Ｂ）。

【０３８８】

さらに、参照データの選択はＦＤＲの計算に影響を及ぼし得る。使用可能なｂｌａｃｋ６／Ｂ１６データを使用して、１８のトリプレット（ｂｌａｃｋ６対ｂｌａｃｋ６およびｂｌａｃｋ６対ｂ１６の組合せ）を生成することが可能である。体細胞突然変異のセットに関して生じたＦＤＲ分布を比較した場合、結果は一致する（図１８Ｂ）。

【０３８９】

偽発見率のこの定義を用いて、我々は、生じる体細胞突然変異のセットへの数多くの実験およびアルゴリズムパラメータの影響を評価するための一般的フレームワークを確立した。次に、体細胞突然変異同定へのソフトウェアツール、カバレッジ、ペアエンドシークエンシングおよび技術的レプリケートの数の影響を検討するためにこのフレームワークを適用する。

【０３９０】

第一に、ソフトウェアツールの選択は同定される体細胞突然変異に明らかな影響を及ぼす（図１９Ａ）。試験したデータに関して、ＳＡＭｔｏｏｌｓは、ＦＤＲによって順位付けられる体細胞突然変異のセット中の真陽性の最も高い濃縮を生じる。しかし、我々は、すべてのツールが個々の突然変異に関して多くのパラメータおよびクオリティスコアを提

供することに留意する。ここで我々は、アルゴリズム開発者によって指定されたデフォルト設定を使用した；我々は、パラメータを最適化することができると予想しており、ここで定義されるＦＤＲフレームワークがそのような最適化を実行し、評価するために設計されていることを強調する。

【０３９１】

前述したＢ１６シークエンシング実験のために、我々は個々のフローセルレーン中の各試料を配列決定し、個々の試料について３８倍の標的領域平均ベースカバレッジを達成した。しかし、このカバレッジは体細胞突然変異の等しく良好なセットを得るには必要でないと考えられ、おそらくコストを低減する。また、全ゲノムＳＮＶ検出へのカバレッジの深度の影響が最近論じられている［Ａｊａｙ，Ｓ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．２１，１４９８－１５０５（２０１１）］。エクソン捕獲データへのカバレッジの影響を検討するため、我々は、すべての１×５０ｎｔライブラリについて整列された配列リードの数をダウンサンプルし、それぞれ５、１０および２０倍の近似カバレッジを生成して、次に突然変異コールアルゴリズムを再適用した。予想されたように、より高いカバレッジはより良好な（すなわち偽陽性がより少ない）体細胞突然変異セットをもたらすが、２０倍のカバレッジから最大値までの改善はわずかである（図１９Ｂ）。

【０３９２】

使用可能なデータとフレームワークを使用して種々の実験設定をシミュレートし、順位付けることが正攻法である。二つ組を三つ組と比較すると、三つ組は二つ組に比べて利益を与えない（図１９Ｃ）が、二つ組はレプリケートなしの試験に比べて明らかな改善を提供する。所与のセット中の体細胞突然変異の比率に関して、我々は、５％のＦＤＲで、二つ組についてはレプリケートなしでの実行に関して２４．２％から７１．２％への濃縮および三つ組については８５．８％の濃縮を認める。濃縮にもかかわらず、三つ組のインターセクションを使用すると、より低いＲＯＣ　ＡＵＣおよび曲線の左側へのシフトによって示されるように（図１９Ｃ）、高いＦＤＲを有する突然変異よりも低いＦＤＲを有する突然変異をより多く除去する：特異性は、より低い感受性という代償を払ってわずかに上昇する。

【０３９３】

付加的に配列決定した２×１００ｎｔライブラリを使用して、２番目のリードならびに／またはリードの３'および５'末端をインシリコで除去することにより、１×１００ｎｔ、２つの２×５０ｎｔおよび２つの１×５０ｎｔライブラリをそれぞれシミュレートし、合計５つのシミュレートしたライブラリを作製した。これらのライブラリを、予測される突然変異の計算したＦＤＲを用いて比較した（図１９Ｄ）。はるかに高い平均カバレッジ（７７以上対３８）にもかかわらず、２×５０ｎｔ　５'および１×１００ｎｔライブラリを使用して見出された体細胞突然変異はより低いＲＯＣ　ＡＵＣを有し、したがって１×５０ｎｔライブラリより劣るＦＤＲ分布を有する。この現象は、見出された低ＦＤＲ突然変異のセットが高度に類似しているため、低カバレッジ領域に高ＦＤＲ突然変異が蓄積することから生じる。その結果として、最適シークエンシング長は、配列決定された塩基が捕獲プローブ配列の付近に集中するように小さいか（カバーされない領域中の体細胞突然変異状態に関する情報が潜在的に失われるが）またはカバレッジギャップを有効に埋める、フラグメント長に近くなければならない（我々の場合は約２５０ｎｔフラグメントについて２×１００ｎｔ＝全長２００ｎｔ）。これは、２×５０ｎｔ　３'ライブラリ（２×１００ｎｔライブラリの３'末端だけを使用することによってシミュレートした）のＲＯＣ　ＡＵＣが、３'リード末端のより低いベースクオリティにもかかわらず、２×５０ｎｔ　５'ライブラリ（２×１００ｎｔライブラリの５'末端だけを使用することによってシミュレートした）のものより高いことによっても裏付けられる。

【０３９４】

これらの観察から、体細胞突然変異の発見のための最良の実施手順を定義することが可能となる。すべての評価パラメータ全体にわたって、両方の試料における２０倍のカバレッジおよび技術的な二つ組を使用することにより、コストも考慮しつつ、これらの比較的

均質な試料中で最適に近い結果が達成される。約１億個のリードを生じる１×５０ｎｔライブラリがこのカバレッジを達成するための最も実際的な選択であると思われる。これはすべての可能なデータセット対にわたって当てはまる。我々は、これらのパラメータ設定を回顧的に適用し、生変異コールの付加的なフィルタリングを使用せずに、図１７に示す３つの方法すべてのインターセクションからの５０の選択突然変異についてＦＤＲを計算した。すべての突然変異をサンガーリシークエンシングとＢ１６　ＲＮＡ－Ｓｅｑ配列リードの組合せによって確認した。これらの突然変異のうち４４は５％のＦＤＲカットオフ値を使用して見出されたはずである（図２０）。陰性コントロールとして、高いＦＤＲ（＞５０％）を有する４４の予測された突然変異の遺伝子座を再配列決定し、ＲＮＡ－Ｓｅｑデータ中のそれぞれの配列を検討した。我々は、これらの突然変異のうち３７が実証されず、潜在的突然変異の残りの７つの遺伝子座はＲＮＡ－Ｓｅｑリードによってカバーされず、シークエンシング反応も生じないことを認めた。

【０３９５】

我々は４つの特定の問題へのフレームワークの適用を示すが、決してこれらのパラメータに限定されるわけではなく、すべての実験またはアルゴリズムパラメータの影響、例えばアラインメントソフトウェアの影響、突然変異測定基準の選択、またはエクソーム選択のための販売者の選択の影響を検討するために適用することができる。

【０３９６】

我々は、すべての実験をＢ１６メラノーマ細胞実験のセットに関して実施した；しかし、この方法はこれらのデータに限定されない。唯一の必要条件は、「対同一物」参照データセットが使用できることであり、少なくとも非腫瘍試料の１回の技術的反復が各々の新しいプロトコルに関して実施されるべきであることを意味する。我々の実験は、この方法が一定の範囲内で技術的反復の選択に関して堅固であることを示すが、そのためあらゆる単一実験において反復が必ずしも必要とされるわけではない。しかし、この方法は、様々なクオリティ評価尺度が参照データセットと残りのデータセットの間で同等であることを必要とする。

【０３９７】

この寄与度の範囲内で、我々は体細胞突然変異の偽発見率駆動検出のための統計的フレームワークを開発した。このフレームワークは、診断または治療標的選択に適用できるだけでなく、生成された疑似真値データに関する実験プロトコル工程とコンピュータプロトコル工程の一般的比較を可能にする。ここで、我々は、ソフトウェアツール、カバレッジ、レプリケートならびにペアエンドシークエンシングに関してプロトコルを決定するのにこの発想を適用した。

【０３９８】

方法

ライブラリの捕獲およびシークエンシング

次世代シークエンシング、ＤＮＡシークエンシング：この場合はすべての公知のマウスエクソンを捕獲するように設計された、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｓｕｒｅ－Ｓｅｌｅｃｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎに基づく捕獲アッセイ［Ｇｎｉｒｋｅ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２７，１８２－１８９（２００９）］を用いてＤＮＡリシークエンシングのためのエクソーム捕獲を実施した。

【０３９９】

精製ゲノムＤＮＡ　３μｇを、Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｓ２超音波装置を用いて１５０～２００ｎｔに断片化した。ｇＤＮＡフラグメントを、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、クレノウＤＮＡポリメラーゼを使用して末端修復し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを使用して5'リン酸化した。平滑末端ｇＤＮＡフラグメントを、クレノウフラグメントを使用して3'アデニル化した（3'－5'エキソマイナス）。単一の3'Ｔオーバーハング Ｉｌｌｕｍｉｎａペアエンドアダプタを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを使用してアダプタ対ゲノムＤＮＡインサートの１０：１モル比を用いてｇＤＮＡフラグメントに連結した。アダプタ連結ｇＤＮＡフラグメントを捕獲前に濃縮し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＰＥ　ＰＣＲプライマー１．０

および２．０ならびにＨｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して４回のＰＣＲサイクルを用いてフローセル特異的配列を付加した。

【０４００】

アダプタ連結し、ＰＣＲ濃縮したｇＤＮＡフラグメント５００ｎｇをＡｇｉｌｅｎｔのＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔビオチン化マウス全エクソームＲＮＡライブラリベイトに６５℃で２４時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズしたｇＤＮＡ／ＲＮＡベイト複合体を、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを用いて取り出した。ｇＤＮＡ／ＲＮＡベイト複合体を洗浄し、ＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔ溶出緩衝液中での溶出の間にＲＮＡベイトを切断して、捕獲したアダプタ連結・ＰＣＲ濃縮ｇＤＮＡフラグメントを残した。ｇＤＮＡフラグメントを、捕獲後にＨｅｒｃｕｌａｓｅ　ＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ａｇｉｌｅｎｔ）およびＳｕｒｅＳｅｌｅｃｔ　ＧＡ　ＰＣＲプライマーを１０サイクル使用してＰＣＲ増幅した。

【０４０１】

清浄化は１．８倍容量のＡＭＰｕｒｅ　ＸＰ磁気ビーズ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ）を使用して実施した。品質管理のために我々はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＱｕｂｉｔ　ＨＳアッセイを使用し、フラグメントサイズはＡｇｉｌｅｎｔの２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ　ＨＳ　ＤＮＡアッセイを用いて決定した。

【０４０２】

エクソーム濃縮したｇＤＮＡライブラリを、７ｐＭを使用してＴｒｕｓｅｑ　ＳＲクラスターキットｖ２．５を用いてｃＢｏｔでクラスター化し、Ｔｒｕｓｅｑ　ＳＢＳキットを使用してＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ２０００で配列決定した。

【０４０３】

エクソームデータ解析

配列リードを、ｂｗａ（バージョン０．５．８ｃ）［Ｌｉ，Ｈ．Ｄｕｒｂｉｎ，Ｒ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　２５，１７５４－１７６０（２００９）］を用いて、デフォルトオプションを使用して参照マウスゲノムアセンブリｍｍ９［Ｍｏｕｓｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ，Ｎａｔｕｒｅ　４２０，５２０－５６２（２００２）］に整列させた。曖昧なリード－ｂｗａ出力によって提供されるようなゲノムの複数箇所にマッピングされるリードを除去した。残りのアラインメントを選別し、インデックス化して、バイナリ圧縮フォーマット（ＢＡＭ）に変換し、シェルスクリプトを用いてリードクオリティスコアをＩｌｌｕｍｉｎａ標準ｐｈｒｅｄ＋６４から標準サンガークオリティスコアに変換した。

【０４０４】

各シークエンシングレーンについて、３つのソフトウェアプログラム：ＳＡＭｔｏｏｌｓ（バージョン０．１．８）［Ｌｉ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　２５，２０７８－２０７９（２００９）］、ＧＡＴＫ（バージョン１．０．４４１８）［ＤｅＰｒｉｓｔｏ，Ｍ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　４３，４９１－４９８（２０１１）］、およびＳｏｍａｔｉｃＳｎｉｐｅｒ［Ｄｉｎｇ，Ｌ．ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ（２０１０）ｆｉｒｓｔ　ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｏｎｌｉｎｅ　Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ　１５，２０１０］を用いて突然変異を同定した。ＳＡＭｔｏｏｌｓについては、１回目のフィルタリング、最大カバレッジ２００を含む、作成者が推奨するオプションおよびフィルタリング基準を使用した（ｈｔｔｐ：／／ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔ／ａｐｐｓ／ｍｅｄｉａｗｉｋｉ／ＳＡＭｔｏｏｌｓ／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ？ｔｉｔｌｅ＝ＳＡＭ＿ＦＡＱ；２０１１年９月にアクセス）。ＳＡＭｔｏｏｌｓの２回目のフィルタリングについては、インデル最低限クオリティスコアは５０であり、点突然変異最低限クオリティは３０であった。ＧＡＴＫ突然変異コーリングについては、我々は、ＧＡＴＫユーザーマニュアル（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｒｏａｄｉｎｓｔｉｔｕｔｅ．ｏｒｇ／ｇｓａ／ｗｉｋｉ／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ／Ｔｈｅ＿Ｇｅｎｏｍｅ＿Ａｎａｌｙｓｉｓ＿Ｔｏｏｌｋｉｔ；２０１０年１０月にアクセス）に提示されている作成者が設計した最良実施ガイドラインに従った。各々の試料について、インデル部位

の付近のローカルリアラインメント、次いでベースクオリティの再キャリブレーションを実施した。生じたアラインメントデータファイルにＵｎｉｆｉｅｄＧｅｎｏｔｙｐｅｒモジュールを適用した。必要な場合は、ｄｂＳＮＰ［Ｓｈｅｒｒｙ，Ｓ．Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２９，３０８－３１１（２００９）］（ｍｍ９用のバージョン１２８）の公知の多型を個々の工程に供給した。バリアントスコアの再キャリブレーション工程を省き、ハードフィルタリングオプションに置き換えた。ＳｏｍａｔｉｃＳｎｉｐｅｒ突然変異コーリングに関しては、デフォルトオプションを使用し、３０以上の「体細胞スコア」を有する予測突然変異だけをさらに検討した。加えて、各々の潜在的変異遺伝子座について、正常組織におけるノンゼロカバレッジを必要とし、マウスゲノムアセンブリｍｍ９のためのＵＣＳＣ　Ｇｅｎｏｍｅ　ＢｒｏｗｓｅｒのＲｅｐｅａｔＭａｓｋｅｒトラックによって定義される反復配列中に位置するすべての突然変異を除去した［Ｆｕｊｉｔａ，Ｐ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３９，８７６－８８２（２０１１）］。

【０４０５】

ＲＮＡ－Ｓｅｑ

バーコード化されたｍＲＮＡ－ｓｅｑｃＤＮＡライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ｍＲＮＡ－ｓｅｑプロトコルの修正版を用いて全ＲＮＡ　５μｇから調製した。ＳｅｒａｍａｇＯｌｉｇｏ（ｄＴ）磁気ビーズ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してｍＲＮＡを単離した。単離したｍＲＮＡを、二価カチオンと熱を用いて断片化し、１６０～２００ｂｐの範囲のフラグメントを生じさせた。断片化したｍＲＮＡを、ランダムプライマーとＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてｃＤＮＡに変換し、次いでＤＮＡポリメラーゼＩおよびＲＮａｓｅＨを使用して第二鎖を合成した。ｃＤＮＡを、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、クレノウＤＮＡポリメラーゼを使用して末端修復し、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼを使用して５'リン酸化した。平滑末端ｃＤＮＡフラグメントを、クレノウフラグメントを使用して３'アデニル化した（３'－５'エキソマイナス）。単一の３'Ｔオーバーハング Ｉｌｌｕｍｉｎａマルチプレックス特異的アダプタを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼを使用してｃＤＮＡフラグメントに連結した。ｃＤＮＡライブラリを精製し、Ｅ－Ｇｅｌ　２％　ＳｉｚｅＳｅｌｅｃｔゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて３００ｂｐでサイズ選択した。濃縮、Ｉｌｌｕｍｉｎａ６塩基インデックス配列およびフローセル特異的配列の付加を、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｆｉｎｎｚｙｍｅｓ）を使用してＰＣＲによって行った。すべての清浄化は１．８倍容量のＡｇｅｎｃｏｕｒｔ　ＡＭＰｕｒｅ　ＸＰ磁気ビーズを使用して実施した。

【０４０６】

バーコード化されたＲＮＡ－Ｓｅｑライブラリを、７ｐＭを使用してＴｒｕｓｅｑ　ＳＲクラスターキットｖ２．５を用いてｃＢｏｔでクラスター化し、Ｔｒｕｓｅｑ　ＳＢＳキットを使用してＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ２０００で配列決定した。

【０４０７】

ＨｉＳｅｑからの生出力データを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ標準プロトコルに従って処理し、これには低クオリティリードの除去およびデマルチプレックス化が含まれた。次に配列リードを、ｂｏｗｔｉｅ［Ｌａｎｇｍｅａｄ，Ｂ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．１０，Ｒ２５（２００９）］を用いて参照ゲノム配列に整列させた［Ｍｏｕｓｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ，Ｎａｔｕｒｅ　４２０，５２０－５６２（２００２）］。アラインメント座標をＲｅｆＳｅｑ転写産物のエクソン座標と比較し［Ｐｒｕｉｔｔ，Ｋ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３３，５０１－５０４（２００５）］、各転写産物についてオーバーラップアラインメントのカウントを記録した。ゲノム配列に整列されない配列リードは、ＲｅｆＳｅｑ転写産物のすべての可能なエクソン－エクソン接合部配列のデータベースに整列させた［Ｐｒｕｉｔｔ，Ｋ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．３３，５０１－５０４（２００５）］。アラインメント座標をＲｅｆＳｅｑエクソン座標および接合部座標と比較し、リードをカウントして、各転写産物についてＲＰＫＭ（百万個のマッピン

グされたリード当たりの転写産物のヌクレオチドキロベースごとにマッピングされるリードの数（ｎｕｍｂｅｒ ｏｆ ｒｅａｄｓ ｗｈｉｃｈ ｍａｐ ｐｅｒ ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｋｉｌｏｂａｓｅ ｏｆ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ ｐｅｒ ｍｉｌｌｉｏｎ ｍａｐｐｅｄ ｒｅａｄｓ））［Ｍｏｒｔａｚａｖｉ，Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ５，６２１－６２８（２００８）］）に正規化した。

【０４０８】

ＳＮＶの検証

我々は、サンガーリシークエンシングおよびＲＮＡによる検証のためにＳＮＶを選択した。３つすべてのプログラムによって予測され、非同義であり、最低限１０ＲＰＫＭを有する転写産物中で見出されるＳＮＶを同定した。これらのうちで、プログラムによって提供される最も高いＳＮＰクオリティスコアを有する５０を選択した。陰性コントロールとして、５０％以上のＦＤＲを有し、１つの細胞株試料中だけに存在し、１つの突然変異コーリングプログラムによってのみ予測される４４のＳＮＶを選択した。ＤＮＡを使用して、選択した変異を、ＤＮＡ ５０ｎｇを使用した領域のＰＣＲ増幅、次いでサンガーシークエンシング（Ｅｕｒｏｆｉｎｓ ＭＷＧ Ｏｐｅｒｏｎ，Ｅｂｅｒｓｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）によって検証した。反応は、陽性および陰性コントロールの５０遺伝子座と３２遺伝子座についてそれぞれ成功であった。腫瘍ＲＮＡ－Ｓｅｑリードの検査によっても検証を行った。

【０４０９】

ＦＤＲの計算および機械学習

ランダムフォレストクオリティスコア計算：一般的に使用される突然変異コーリングアルゴリズム（ＤｅＰｒｉｓｔｏ，Ｍ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ４３，４９１－４９８（２０１１），Ｌｉ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２５，２０７８－２０７９（２００９），Ｄｉｎｇ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ（２０１０）ｆｉｒｓｔ ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ １５，２０１０）は複数のスコアを出力し、それらすべてが潜在的に突然変異コールのクオリティに影響を及ぼす。これらには、装置によって割り当てられる関心対象のベースクオリティ、この位置についてのクオリティアラインメント、この位置をカバーするリードの数またはこの位置で比較した２つのゲノム間の相違についてのスコアが含まれるが、これらに限定されない。偽発見率の計算のためには、突然変異の順位付けを必要とするが、様々なクオリティスコアから矛盾する情報が得られ得るので、これをすべての突然変異について直接実行できるわけではない。

【０４１０】

我々は、完全な順位付けを達成するために以下の戦略を用いる。第一工程では、突然変異がすべてのカテゴリーにおいて上回る場合かつその場合に限り、突然変異が別の突然変異よりも良好な品質を有すると仮定することによって有意性の非常に厳密な定義を適用する。そのため、品質特性Ｓ＝（s_1，...，s_n）のセットは、すべてのｉ＝１，...，ｎについて$s_i > t_i$である場合かつその場合に限り、Ｔ＝（t_1，...，t_n）より好ましく、Ｓ＞Ｔで表される。我々は中間ＦＤＲ（ＩＦＤＲ）を以下のように定義する：

【数２】

$$IFDR(T) = \frac{\text{スコアS＞Tを有する対同一物SNVの数}}{\text{スコアS＞Tを有する腫瘍SNVの数}} \times \frac{\text{腫瘍比較の共通カバレッジの数}}{\text{対同一物比較の共通カバレッジの数}}$$

【０４１１】

しかし、多くの密接に関連する場合に、比較が実行可能ではなく、したがって膨大な量の利用可能なデータから利益を得られないので、我々はＩＦＤＲを単に中間段階とみなす。したがって、我々は、ランダムフォレスト回帰［Ｂｒｅｉｍａｎ，Ｌ．，Ｓｔａｔｉｓｔ．Ｓｃｉ．１６，１９９－２３１（２００１）］の良好な一般化特性を利用し、Ｒで実装されているランダムフォレストを学習する（Ｒ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｃｏｒｅ Ｔｅａｍ．Ｒ：Ａ ｌａｎｇｕａｇｅ ａｎｄ ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ ｆｏｒ ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ．Ｒ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｓｔａ

ｔｉｓｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ，Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ，２０１０，Ｌｉａｗ，Ａ．，Ｗｉｅｎｅｒ，Ｍ．，Ｒ Ｎｅｗｓ ２，１８－２２（２００２））。

【０４１２】

それぞれｎ個の品質特性を有するｍ個の突然変異について、各特性の値範囲を決定し、ｐ個までの値をこの範囲から均一な間隔でサンプリングした；品質特性についての値のセットがｐより小さい場合、このセットをサンプルセットの代わりに使用した。次に、ｎ次元品質スペースにおいて「p^n」データ点の最大値をもたらす、サンプリングしたまたは選択した品質値のそれぞれの可能な組合せを作成する。これらの点の１％のランダムなサンプルおよび対応するＩＦＤＲ値を、ランダムフォレストトレーニングのためにそれぞれ予測子および応答として使用した。

【０４１３】

生じる回帰スコアが、我々の一般化したクオリティスコアＱである：これは個々のクオリティスコアの局所的に加重された組合せとみなすことができる。これは、任意の２つの突然変異の直接の単一値比較および実際の偽発見率の計算を可能にする：

【数３】

$$FDR(Q)=\frac{\text{スコア}\geq Q\text{を有する対同一物ＳＮＶの数}}{\text{スコア}\geq Q\text{を有する腫瘍ＳＮＶの数}}\times\frac{\text{腫瘍比較の共通カバレッジの数}}{\text{対同一物比較の共通カバレッジの数}}$$

【０４１４】

この研究の結果を作成するために使用されるランダムフォレストモデルのトレーニングのために、ランダムな１％サブセットを選択する前にすべての試料の体細胞突然変異に関するサンプルＩＦＤＲを計算する。これは、使用可能なクオリティスペース全体をＦＤＲ値にマッピングすることを確実にする。我々は、クオリティ特性「ＳＮＰクオリティ」、「カバレッジ深度」、「コンセンサスクオリティ」および「ＲＭＳマッピングクオリティ」（ＳＡＭｔｏｏｌｓ、ｐ＝２０）；「ＳＮＰクオリティ」、「カバレッジ深度」、「バリアントの信頼度／フィルタリングしていない深度」および「ＲＭＳマッピングクオリティ」（ＧＡＴＫ、ｐ＝２０）；または「ＳＮＰクオリティ」、「カバレッジ深度」、「コンセンサスクオリティ」、「ＲＭＳマッピングクオリティ」および「体細胞スコア」（ＳｏｍａｔｉｃＳＮｉＰｅｒ、ｐ＝１２）をそれぞれ使用した。ｐの種々の値は、比較可能な大きさのセットサイズを確実にする。

【０４１５】

共通カバレッジの計算：可能な突然変異コールの数は、偽発見率の定義に重要なバイアスを導入し得る。我々の腫瘍比較および対同一物比較のために突然変異が起こる可能な位置の数が同じである場合にのみ、コールされる突然変異の数は比較可能であり、偽発見率計算のための基礎として用いることができる。この潜在的なバイアスを補正するために、我々は共通カバレッジ比を使用する。共通カバレッジとして、我々は、突然変異コーリングに使用される両方の試料中の少なくとも１つのカバレッジに関するベースの数を定義する。腫瘍比較および対同一物比較のために共通カバレッジを個別に計算する。

【０４１６】

ＲＯＣの推定

受信者操作特性（ＲＯＣ）曲線および対応する曲線下面積（ＡＵＣ）は、分類器を構成し、それらのパフォーマンスを視覚化するために有用である［Ｆａｗｃｅｔｔ，Ｔ．，Ｐａｔｔｅｒｎ Ｒｅｃｏｇｎ．Ｌｅｔｔ．２７，８６１－８７４（２００６）］。我々は、実験および計算手順のパフォーマンスを評価するためにこの概念を拡大適用する。しかし、ＲＯＣグラフをプロットするには、通常は与えられず、高スループットデータ（ＮＧＳデータなど）に関しては確立することが困難な情報である、データセット中のすべての真陽性および偽陽性（ＴＰおよびＦＰ）例の知識を必要とする。したがって、我々は、それぞれのＴＰおよびＦＰ率を推定するために計算したＦＤＲを使用し、ＲＯＣグラフをプロットして、ＡＵＣを計算する。中心となる概念は、データセット中の単一突然変異のＦＤＲが、この突然変異がＴＰ／ＦＰ突然変異の合計にそれぞれどの程度寄与するかの割合を与えることである。また、ＴＰおよびＦＰへのランダムな割り当てのリストに関して、

生じるＲＯＣ　ＡＵＣは、我々の方法では０．５に等しく、完全にランダムな予測を示す。

【０４１７】

我々は、２つの条件：

【数４】

$$FDR = \frac{FPR}{FPR + TPR} \qquad [1]$$

および

$$FPR + TPR = 1 \qquad [2]$$

から開始し、ＦＰＲおよびＴＰＲは、所与の突然変異についてそれぞれ必要な偽陽性真陽性比であり、ＲＯＣスペース中の対応する点を定義する。［１］および［２］は、

【数５】

$$TPR = 1 - FPR \qquad [3]$$

および

$$FPR = FDR \qquad [4]$$

に並べ替えることができる。

【０４１８】

推定ＲＯＣ曲線を得るために、データセット中の突然変異をＦＤＲによって選別し、各々の突然変異について、それぞれすべてのＴＰＲおよびＴＰＲ値の合計で除した、この突然変異までの累積ＴＰＲおよびＦＰＲ値に点をプロットする。曲線とｘ軸の間のすべての連続する台形の面積を合計することによってＡＵＣを計算する。

【０４１９】

（実施例１０）

癌治療のための標的としての腫瘍抗原の組合せの選択

この実施例では、大きな割合の腫瘍患者によって少なくとも部分的に共有され、その中で広いスペクトルの癌患者に適用できるワクチン生成物のセットを提供することができる腫瘍抗原のセットを確立することが可能であるかどうかを評価した。

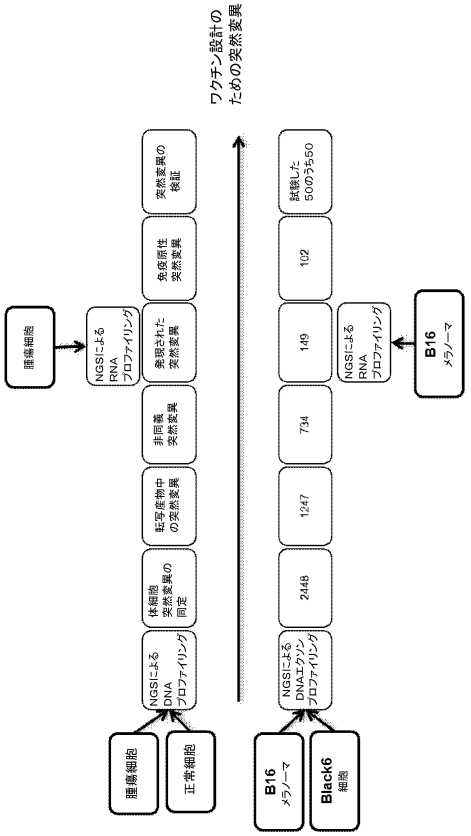
【０４２０】

このために、ＲＮｅａｓｙ　Ｌｉｐｉｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してメラノーマ転移試料からＲＮＡを抽出した。ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）およびオリゴｄＴを使用してｃＤＮＡ合成を実施した。ＢｉｏＭａｒｋ（登録商標）ＨＤ　Ｓｙｓｔｅｍシステム（Ｆｌｕｉｄｉｇｍ）を用いて発現を分析し、ＨＰＲＴをハウスキーピング遺伝子として使用して相対発現を計算した。

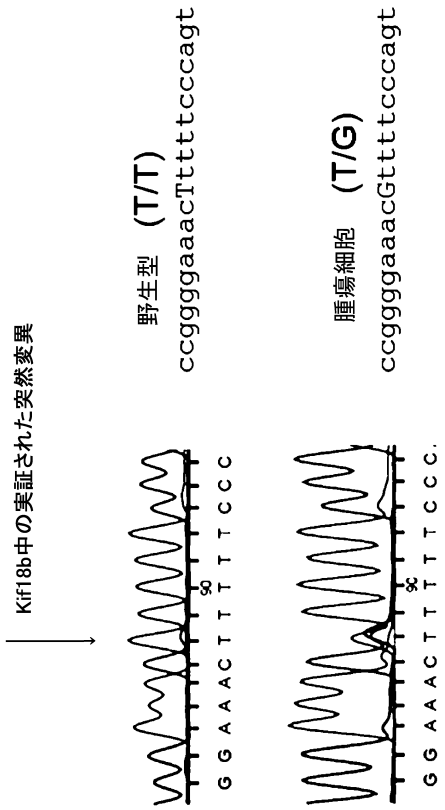
【０４２１】

このようにして、メラノーマ試料中のＤＣＴ（＝ＴＲＰ２）、ＴＹＲおよびＴＰＴＥを含むいくつかの遺伝子の相対発現を検出することができた。さらに、３つの腫瘍抗原だけ、すなわちＤＣＴ（アイソフォーム１）、ＴＹＲおよびＴＰＴＥの組合せが、分析した患者試料の８８％を示すのに十分であると確認することができた（図２２）。

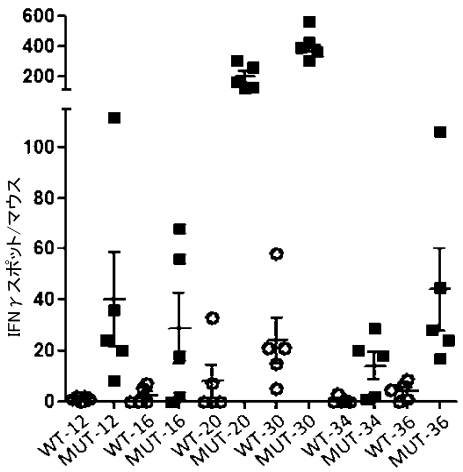
【図１】


腫瘍細胞
NGSによる RNA プロファイリング
発現された突然変異
免疫原性突然変異
突然変異の検証
ワクチン設計のための突然変異
非同義突然変異
転写産物中の突然変異
体細胞突然変異の同定
NGSによる DNA プロファイリング
腫瘍細胞
正常細胞
B16 メラノーマ
NGSによる DNAとRNA プロファイリング
Black6 細胞
2448
1247
734
149
102
試験した500万550
NGSによる RNA プロファイリング
B16 メラノーマ

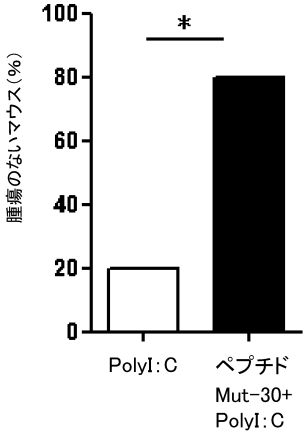
【図２】


Kif18b中の実証された突然変異
野生型 (T/T)
ccggggaaacTttttcccagt
G G A A A C T T T T C C C
腫瘍細胞 (T/G)
ccggggaaacGttttcccagt
G G A A A C T T T T C C C.

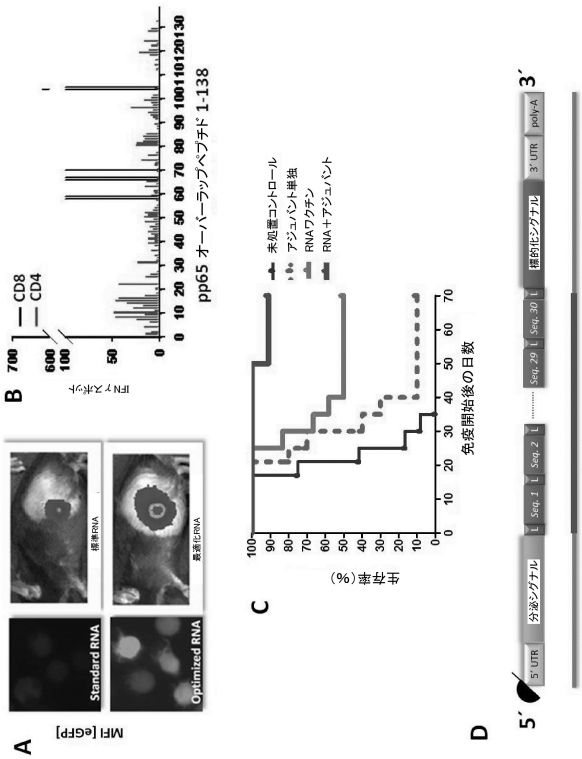
【図３】


IFNγスポット/マウス
600
400
200
100
80
60
40
20
0
WT-12
MUT-12
WT-16
MUT-16
WT-20
MUT-20
WT-30
MUT-30
WT-34
MUT-34
WT-36
MUT-36

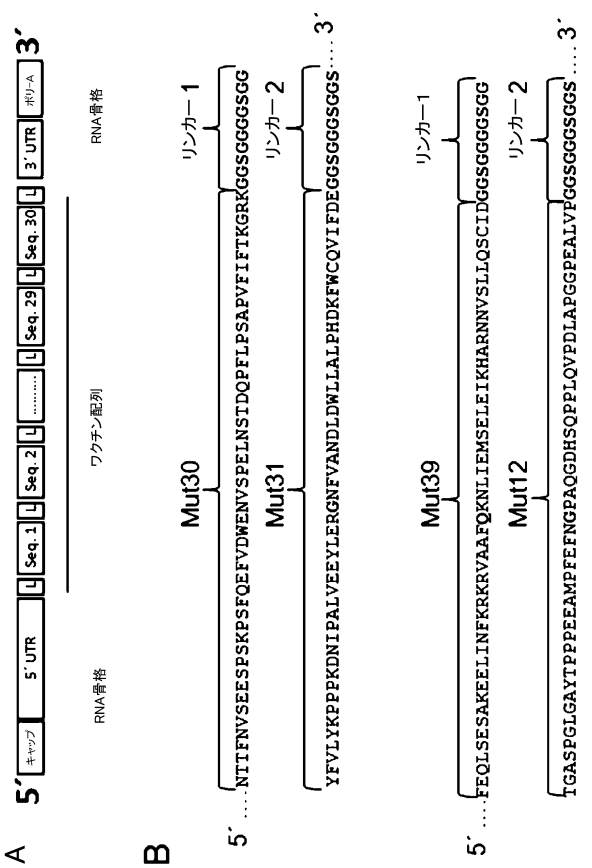
【図４】


腫瘍のないマウス(%)
100
80
60
40
20
0
*
PolyI:C
ペプチド
Mut-30+
PolyI:C

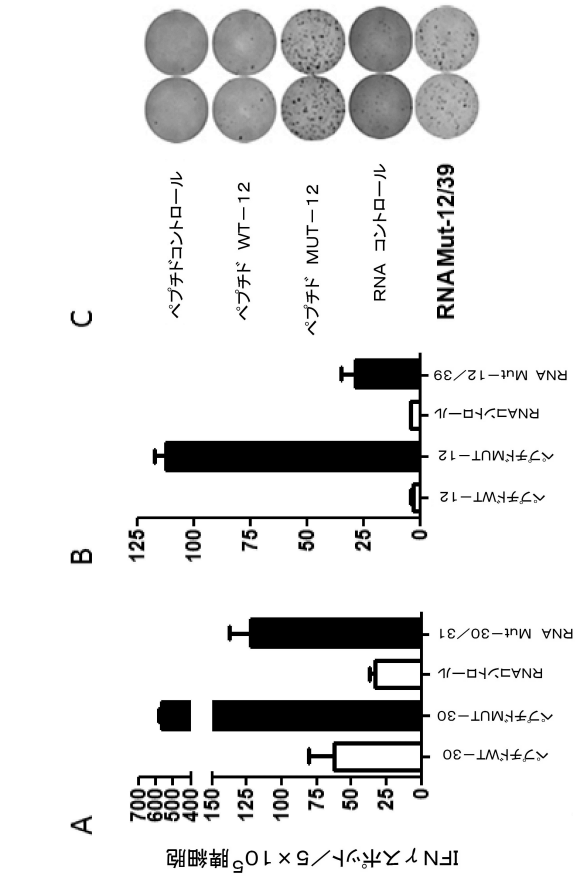
【図５】


A
MFI [eGFP]
Standard RNA
Optimized RNA
標準RNA
最適化RNA
B
CD8
CD4
IFNγスポット
ppp65 オーバーラップペプチド 1-138
C
生存率(%)
免疫開始後の日数
未処置コントロール
アジュバント単独
RNAワクチン
RNA+アジュバント
D
5′
5′ UTR
分泌シグナル
Seq. 1
Seq. 2
Seq. 29
Seq. 30
蛋白化シグナル
3′UTR
poly-A
3′
RNA骨格
ワクチン配列

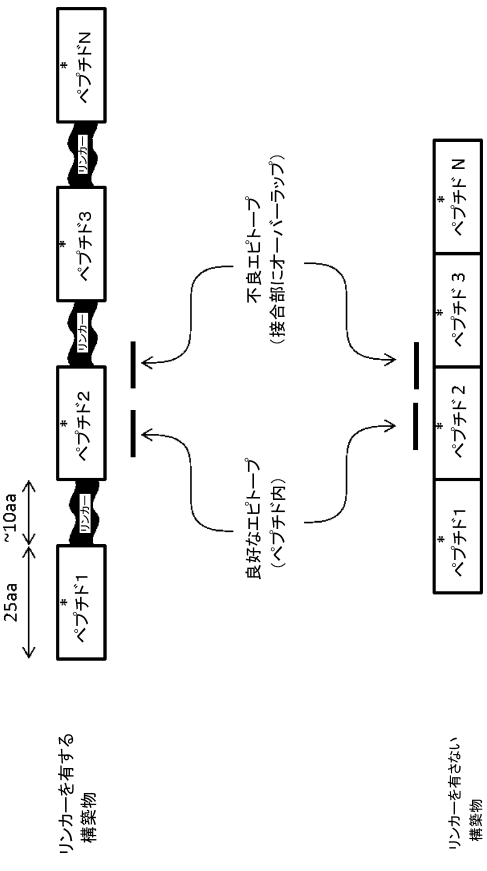
【図６】


A
5′
キャップ
5′ UTR
Seq. 1
Seq. 2
Seq. 29
Seq. 30
3′UTR
ポリA
3′
RNA骨格
ワクチン配列
RNA骨格
B
Mut30
リンカー1
リンカー2
5′ ….NTIFNVSEESPSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFLPSAPVFIFTKGRKGSGGGGSGG
Mut31
YFVLYKPPPKDNIPALVEEYLERGNFVANDLDWLLALPHDKFWCQVIFDEGGSGGGSGGS….3′
Mut39
リンカー1
5′ ….FEQLSESAKEELINFKRKRVAAFQKNLIEMSELEIKHARNNVSLLQSCIDGGSGGGGSGG
Mut12
リンカー2
TGASPGLGAYTPPPEAMPFEFNGPAQGDHSQPPLQVPDLAPGGPEALVPGGSGGGSGGS….3′

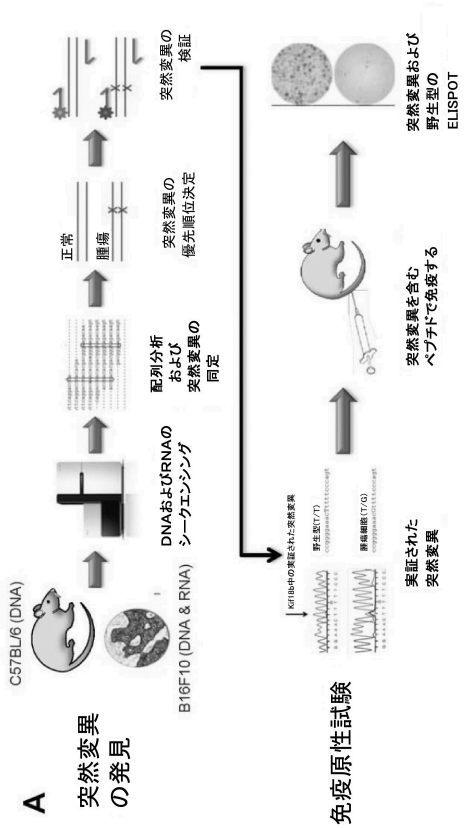
【図７】


A
IFNγスポット/5×10⁵脾細胞
ペプチドWT−30
ペプチドMUT−30
RNAコントロール
RNA Mut−30/31
B
ペプチドWT−12
ペプチドMUT−12
RNAコントロール
RNA Mut−12/39
C
ペプチドコントロール
ペプチド WT−12
ペプチド MUT−12
RNA コントロール
RNAMut-12/39

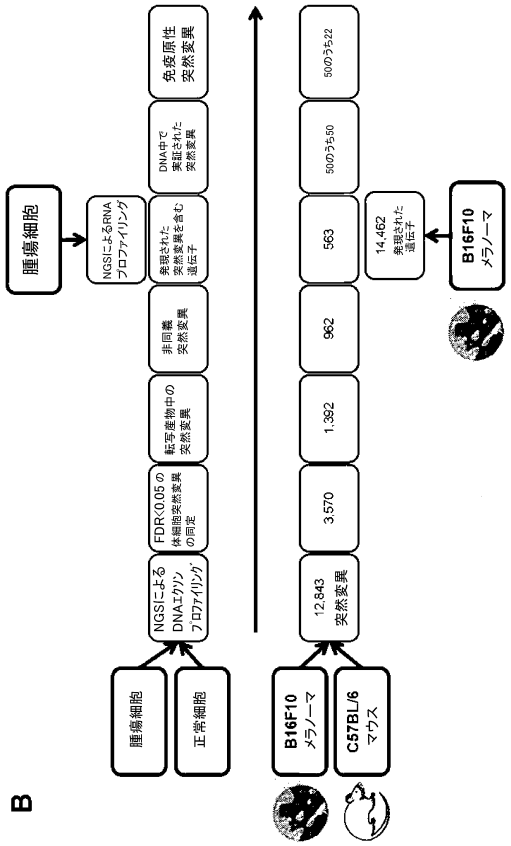
【図８】


リンカーを有する構築物
25aa
~10aa
ペプチド1
ペプチド2
ペプチド3
ペプチドN
リンカー
良好なエピトープ
（ペプチド内）
不良エピトープ
（接合部にオーバーラップ）
リンカーを有さない構築物
ペプチド1
ペプチド2
ペプチド3
ペプチドN

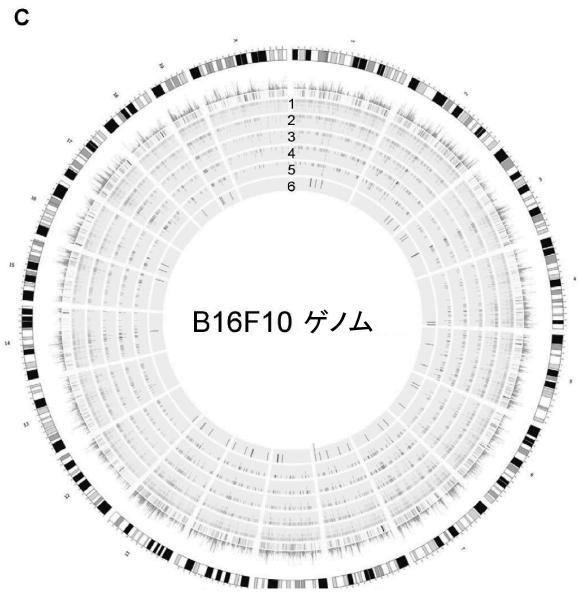
【図９Ａ】



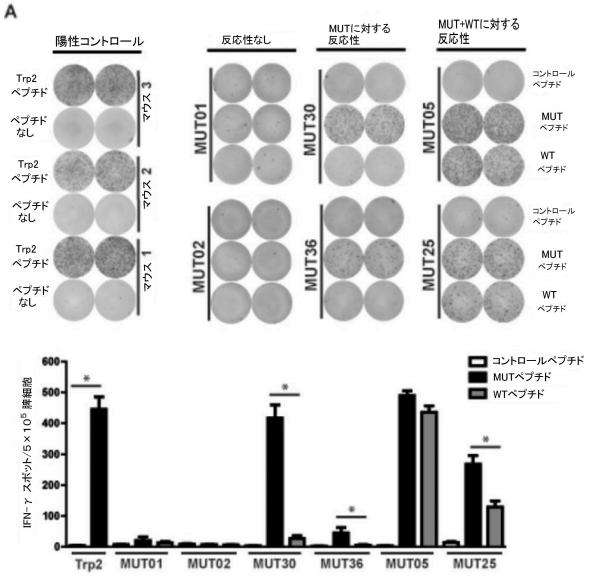
【図９Ｂ】



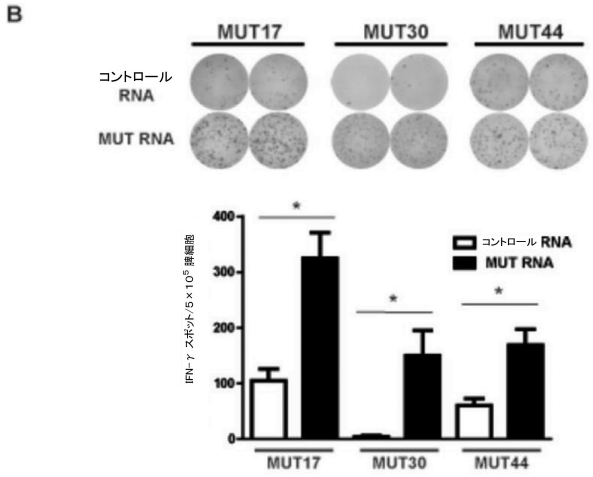
【図９Ｃ】



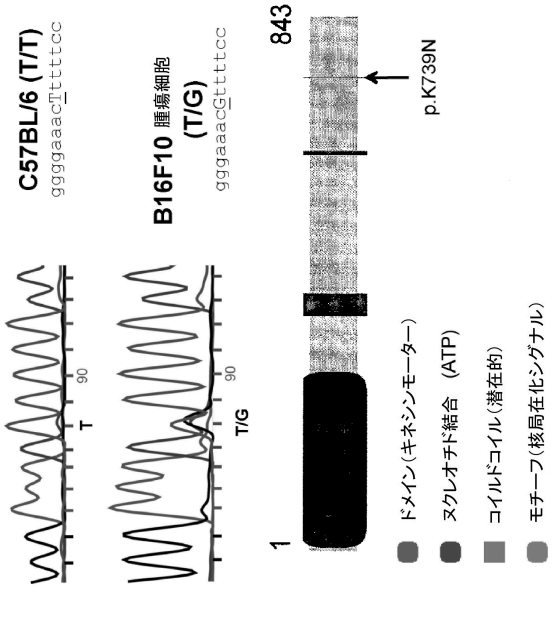
【図１０Ａ】



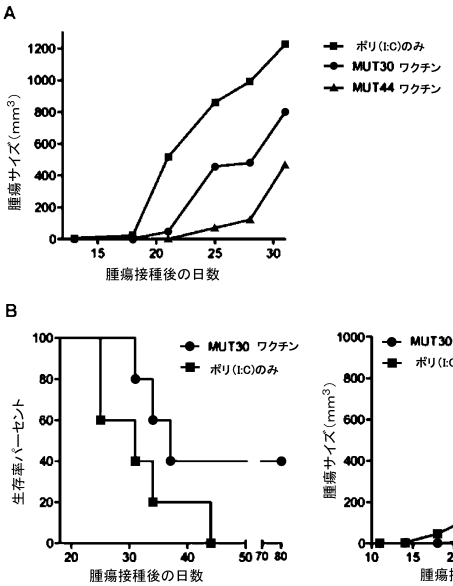
【図１０Ｂ】



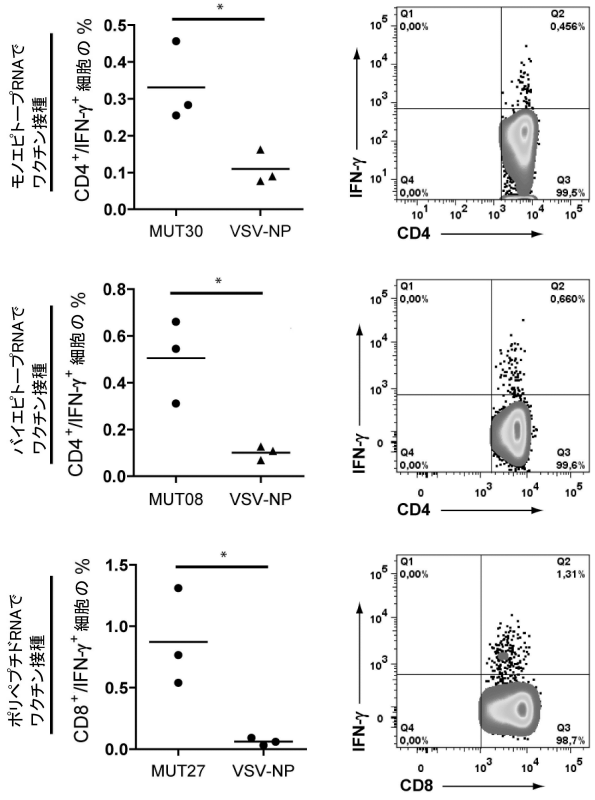
【図１０Ｃ】



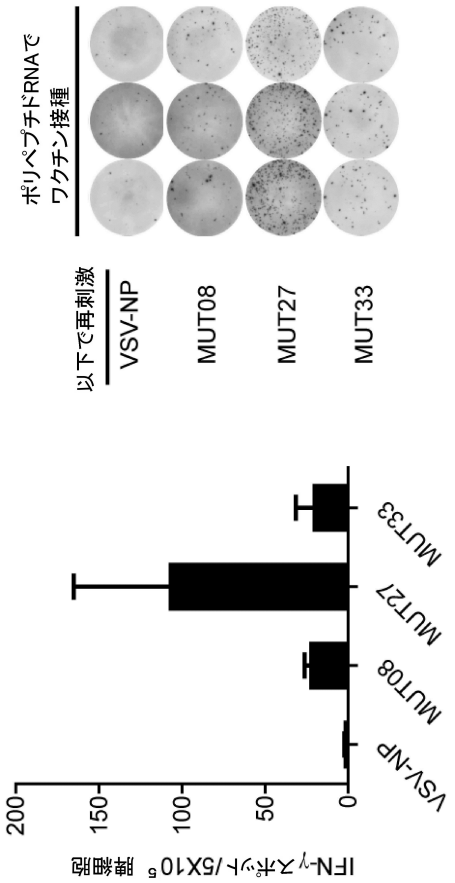
【図１１】



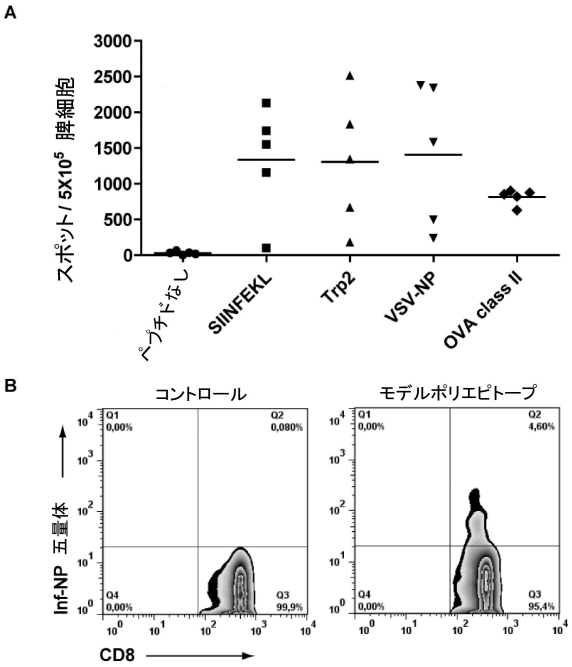
【図１２】



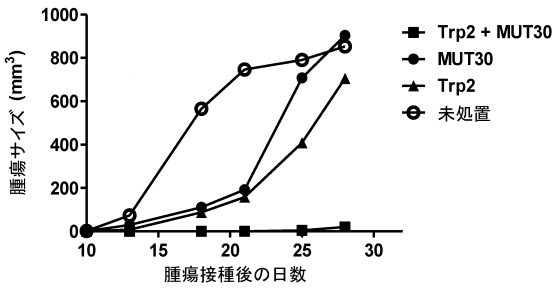
【図１３】



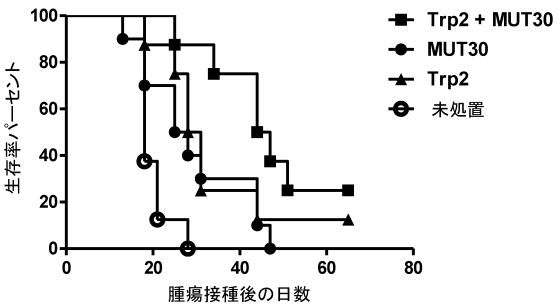
【図１４】



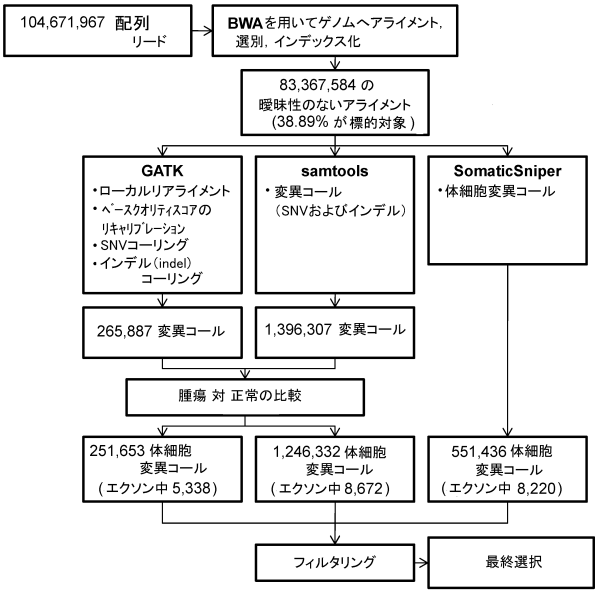
【図１５Ａ】



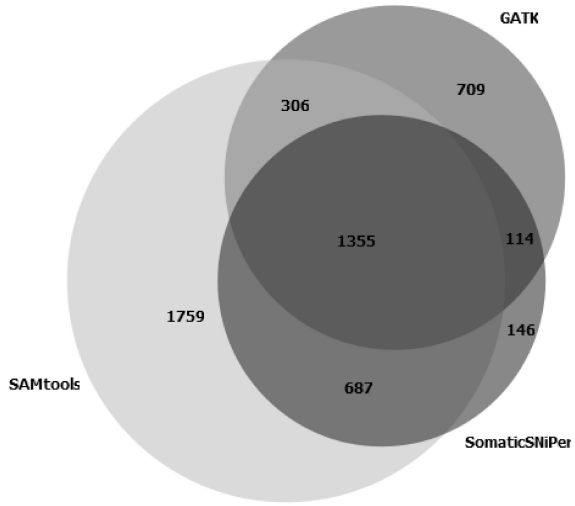
【図１５Ｂ】



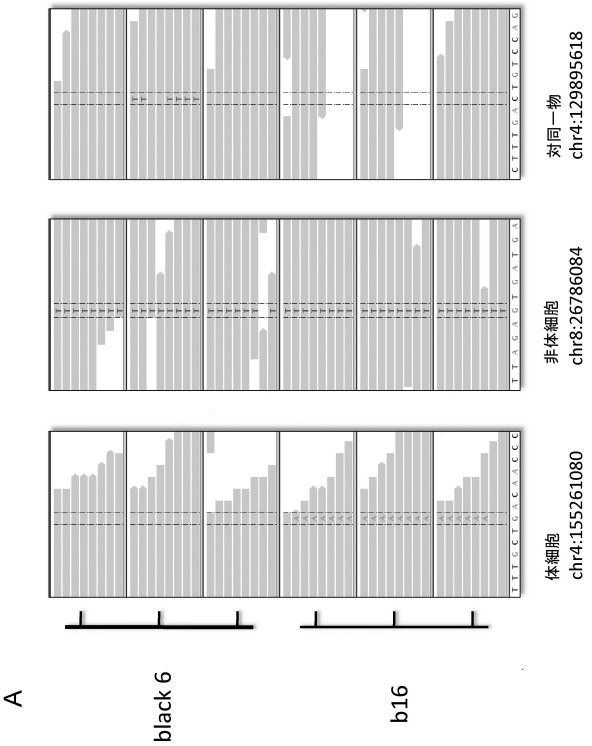
【図１６】



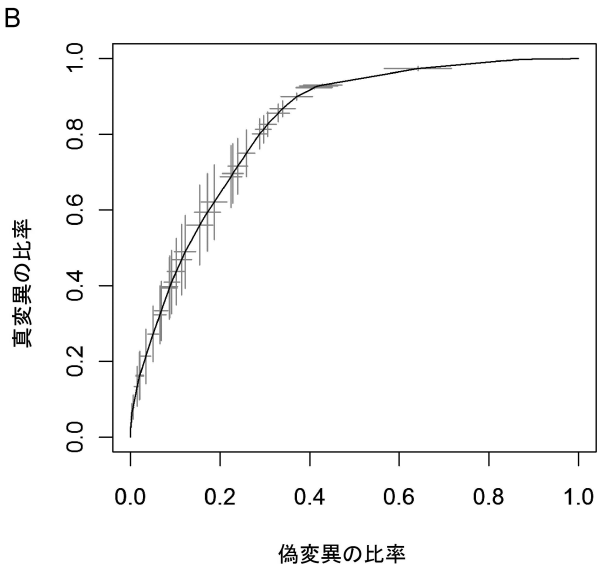
【図１７】



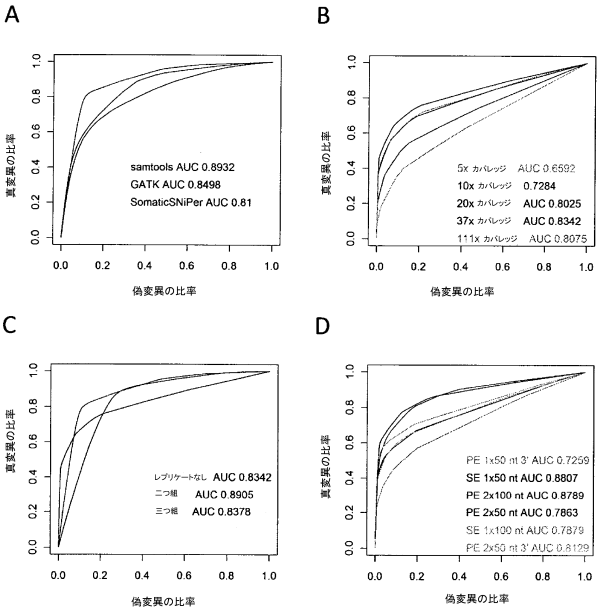
【図１８Ａ】



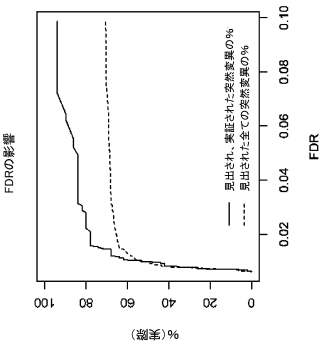
【図１８Ｂ】



【図１９】



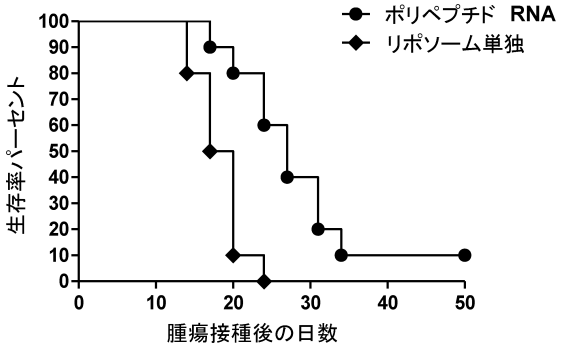
【図２０】



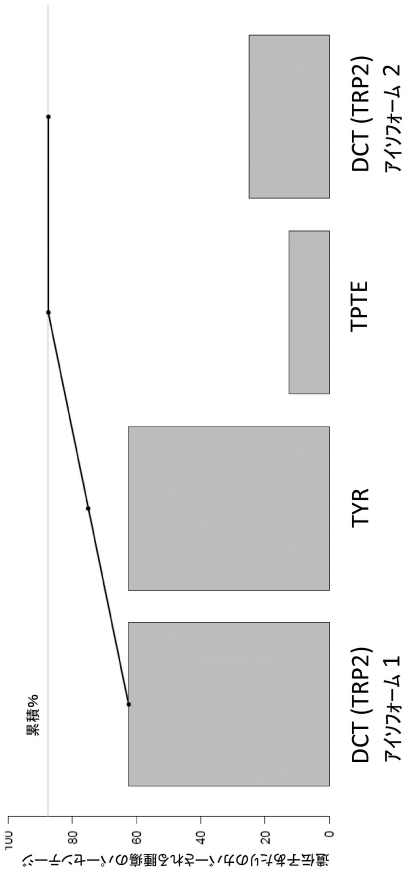
A

染色体位置	参照対立遺伝子	サンプル対立遺伝子		相対順位[%]	FDR [%]
8	110078987	G	R	3,2	0,6
1	59540714	G	S	7,6	0,7
5	124854313	G	K	7,8	0,7
10	59352802	C	M	8,3	0,7
16	36919828	A	M	9,8	0,7
2	144078227	C	Y	10,1	0,7
8	12834637	G	S	10,9	0,7
19	6121411	T	Y	11,4	0,7
1	58533360	A	M	12,1	0,7
15	98478052	A	R	13,6	0,7

【図２１】



【図２２】



【配列表】
0006484558000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 515123258
トロンー トランスラショナル オンコロジー アン デア ウニヴェリジテーツメディツィン デア ヨハネス グーテンベルクーウニヴェルシテート マインツ ゲマインニューツィゲ ゲーエムベーハー
TRON- Translationale Onkologie an der Universitaetsmedizin der Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz gemeinnuetzige GmbH
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ フライリグラートシュトラーセ １２
Freiligrathstr. 12 55131 Mainz Germany
(74)代理人 100110928
弁理士 速水 進治
(72)発明者 サヒン, ウグル
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ フィリップーフォンーツァベルンープラッツ １
(72)発明者 パレット, クラウディア
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ ホッホゲザントシュトラーセ １
(72)発明者 フォルムブロック, キルステン
ドイツ連邦共和国 ５５１１８ マインツ ボップシュトラーセ １４
(72)発明者 ベンダー, クリスティアン
ドイツ連邦共和国 ５５１２０ マインツ テゥルムシュトラーセ ７９
(72)発明者 ディークマン, ヤン
ドイツ連邦共和国 ５５１２８ マインツ ホルンダーヴェーク ４５

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 国際公開第２０１２／１５９７５４（WO, Ａ１）
国際公開第２０１２／１４１９８４（WO, Ａ１）
Cancer Research, ２０１２年 3月, Vol.72, No.5, p.1081-1091
The Journal of Immunology, ２００８年, Vol.181, p.3422-3431
Cancer Research, ２００４年, Vol.64, p.1595-1599
The Journal of Immunology, ２００３年, Vol.170, p.6363-6370
Clinical and Vaccine Immunology, ２０１１年, Vol.18, No.1, p.23-34
Cancer Immunol Immunother, ２００５年, Vol.54, p.187-207
J Immunother, ２００３年, Vol.26, No.4, p.349-356

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／００
Ａ６１Ｋ ３１／７０８８
Ａ６１Ｐ ３５／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）