

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成24年7月26日(2012.7.26)

【公表番号】特表2011-523937(P2011-523937A)

【公表日】平成23年8月25日(2011.8.25)

【年通号数】公開・登録公報2011-034

【出願番号】特願2010-548687(P2010-548687)

【国際特許分類】

C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 1 2 N	5/09	(2010.01)
C 1 2 N	5/078	(2010.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 0 7 K	14/82	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/00	(2006.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/711	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	7/06	Z N A
C 1 2 N	5/00	2 0 2 U
C 1 2 N	5/00	2 0 2 J
C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 0 7 K	14/82	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/711	
A 6 1 K	37/02	

【手続補正書】

【提出日】平成24年6月8日(2012.6.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を有するペプチドであって、

(a) SEQ ID NO: 7、2、4、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63、67、75、85、99、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148および150；または

(b) 1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失、または付加されている、
 SEQ ID NO: 7、2、4、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63、67、75、85、99、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148および150

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 2】

SEQ ID NO : 7、2、4、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63 および 67 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが、以下の特徴の一方または両方を有する、請求項1記載のペプチド：
(a) 該 SEQ ID NO のアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸であるかまたはその群より選択されるアミノ酸に改変されている、および
(b) 該 SEQ ID NO のアミノ酸配列の C 末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されるか、またはその群より選択されるアミノ酸に改変されている。

【請求項 3】

SEQ ID NO : 85、99、75、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148 および 150 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが、以下の特徴の一方または両方を有する、請求項1記載のペプチド：

(a) 該 SEQ ID NO のアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸である、またはその群より選択されるアミノ酸に改変されている、および
(b) 該 SEQ ID NO のアミノ酸配列の C 末端のアミノ酸がバリンもしくはロイシンからなる群より選択されるアミノ酸である、またはその群より選択されるアミノ酸に改変されている。

【請求項 4】

SEQ ID NO : 7、85、99、2、4、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63、67、75、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148 および 150 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項2または3記載のペプチド。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

以下からなる群より選択される目的のために製剤化される、薬理学的に許容される担体と組み合わされた、請求項1～4の 1 種もしくは複数種のペプチド、またはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む薬学的組成物：

- (i) 腫瘍の治療、
- (ii) 腫瘍の予防、
- (iii) 腫瘍の術後再発の予防、および
- (iv) それらの組み合わせ。

【請求項 7】

H LA 抗原が H LA - A 24 または H LA - A 02 である対象への投与のために製剤化されている、請求項6記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

がんの治療のために製剤化されている、請求項7記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

ワクチンを含む、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドと H LA 抗原とを組み合わせて含む複合体をその表面上に提示するエキソソーム。

【請求項 11】

H L A 抗原が H L A - A 2 4 である、請求項 1 0 記載のエキソソーム。

【請求項 1 2】

H L A 抗原が H L A - A 2 4 0 2 である、請求項 1 1 記載のエキソソーム。

【請求項 1 3】

H L A 抗原が H L A - A 0 2 である、請求項 1 0 記載のエキソソーム。

【請求項 1 4】

H L A 抗原が H L A - A 0 2 0 1 である、請求項 1 3 記載のエキソソーム。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチドを用いることによる、高い C T L 誘導能を有する抗原提示細胞をインピトロで誘導するための方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチドを用いることによる、C T L をインピトロで誘導するための方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 記載の高い C T L 誘導能を有する抗原提示細胞 (A P C) をインピトロで誘導するための方法であって、以下からなる群より選択される段階を含む方法：

(a) A P C を、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチドと、インピトロで接触させる段階；および

(b) 請求項 1 ~ 4 記載のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、A P C に導入する段階。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 記載の C T L をインピトロで誘導するための方法であって、以下からなる群より選択される段階を含む方法：

(a) C D 8 陽性 T 細胞を、請求項 1 5 または 1 7 記載の方法によって調整された A P C と混合し、共培養する段階、および

(b) 請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチドに結合する T 細胞受容体 (T C R) サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、T 細胞に導入する段階。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 4 記載のペプチドのいずれかを標的とする、単離された細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチドを用いることによって誘導される、単離された細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 2 1】

請求項 1 6 または 1 8 記載の方法によって誘導される、請求項 1 9 または 2 0 記載の細胞傷害性 T 細胞。

【請求項 2 2】

H L A 抗原と請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体をその表面上に提示する、単離された抗原提示細胞。

【請求項 2 3】

請求項 1 5 または請求項 1 7 記載の方法によって誘導される、請求項 2 2 記載の抗原提示細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチド、免疫学的に活性なその断片、またはそのようなペプチドもしくは断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを含む、がんに対する免疫誘導剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 5

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0015】**

上記に加え、本発明のその他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことによって、より十分に明らかになるであろう。しかしながら、前述の本発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、本明細書において本発明はいくつかの特定の態様を参照しながら説明されるが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが理解されよう。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に思い至ることができる。同様に、本発明のその他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかになると考えられ、当業者には容易に明白であろう。そのような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図面、およびそれらから引き出されるすべての妥当な推論と併せて上記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

[本発明1001]

細胞傷害性T細胞誘導能を有する単離されたノナペプチドまたはデカペプチドであって、SEQ ID NO:154のアミノ酸配列より選択されるアミノ酸配列を含む、ノナペプチドまたはデカペプチド。

[本発明1002]

SEQ ID NO:2、4、7、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63、67、75、85、99、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148および150からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001のノナペプチドまたはデカペプチド。

[本発明1003]

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を有するペプチドであって、
(a) SEQ ID NO:2、4、7、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63、67、75、85、99、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148および150；または
(b) 1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失、または付加されている、SEQ ID NO:2、4、7、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63、67、75、85、99、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148および150
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

[本発明1004]

SEQ ID NO:2、4、7、21、25、29、32、35、37、40、49、53、55、56、57、62、63 および67からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが、以下の特徴の一方または両方を有する、本発明1003のペプチド：

(a) 該SEQ ID NOのアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸であるかまたはその群より選択されるアミノ酸に改変されている、および
(b) 該SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されるか、またはその群より選択されるアミノ酸に改変されている。

[本発明1005]

SEQ ID NO:75、85、99、101、111、114、121、125、130、139、140、141、142、143、145、148および150からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが、以下の特徴の一方または両方を有する、本発明1003のペプチド：
(a) 該SEQ ID NOのアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸である、またはその群より選択されるア

ミノ酸に改変されている、および

(b) 該SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端のアミノ酸がバリンもしくはロイシンからなる群より選択されるアミノ酸である、またはその群より選択されるアミノ酸に改変されている。

[本発明1006]

以下からなる群より選択される目的のために製剤化される、薬理学的に許容される担体と組み合わされた、本発明1001～1005の1種もしくは複数種のペプチド、またはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む薬学的組成物：

(i) 腫瘍の治療、

(ii) 腫瘍の予防、

(iii) 腫瘍の術後再発の予防、および

(iv) それらの組み合わせ。

[本発明1007]

HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A02である対象への投与のために製剤化されている、本発明1006の薬学的組成物。

[本発明1008]

がんの治療のために製剤化されている、本発明1007の薬学的組成物。

[本発明1009]

ワクチンを含む、本発明1008の薬学的組成物。

[本発明1010]

本発明1001～1005のいずれかのペプチドとHLA抗原とを組み合わせて含む複合体をその表面上に提示するエキソソーム。

[本発明1011]

HLA抗原がHLA-A24である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1012]

HLA抗原がHLA-A2402である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1013]

HLA抗原がHLA-A02である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1014]

HLA抗原がHLA-A0201である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1015]

本発明1001～1005のいずれかのペプチドを用いることによる、高いCTL誘導能を有する抗原提示細胞を誘導するための方法。

[本発明1016]

本発明1001～1005のいずれかのペプチドを用いることによる、CTLを誘導するための方法。

[本発明1017]

本発明1001～1005のいずれかのペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、抗原提示細胞に導入する段階を含む、本発明1015の高いCTL誘導能を有する抗原提示細胞を誘導するための方法。

[本発明1018]

本発明1001～1005のペプチドのいずれかを標的とする、単離された細胞傷害性T細胞。

[本発明1019]

本発明1001～1005のいずれかのペプチドを用いることによって誘導される、単離された細胞傷害性T細胞。

[本発明1020]

HLA抗原と本発明1001～1005のいずれかのペプチドとの複合体をその表面上に提示する、単離された抗原提示細胞。

[本発明1021]

本発明1015または本発明1017の方法によって誘導される、本発明1020の抗原提示細胞。

[本発明1022]

本発明1001～1005のいずれかのペプチド、免疫学的に活性なその断片、またはそのようなペプチドもしくは断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを対象に投与する段階を含む、対象においてがんに対する免疫応答を誘導する方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

【図1A】図1Aおよび図1Bは、一連の写真(a)～(s)を含み、IQGAP3由来のペプチドによって誘導されたCTLについてのIFN-ELISAアッセイの結果を示している。IQGAP3-A24-9-955(SEQ ID NO:2)(a)によって刺激されたウェル番号#3および#6、IQGAP3-A24-9-1167(SEQ ID NO:4)(b)による#5、IQGAP3-A24-9-779(SEQ ID NO:7)(c)による#7、IQGAP3-A24-9-74(SEQ ID NO:21)(d)による#2、IQGAP3-A24-9-26(SEQ ID NO:25)(e)による#8、IQGAP3-A24-9-137(SEQ ID NO:29)(f)による#4、IQGAP3-A24-9-63(SEQ ID NO:32)(g)による#8、IQGAP3-A24-10-1600(SEQ ID NO:35)(h)による#8、IQGAP3-A24-10-1507(SEQ ID NO:37)(i)による#2、IQGAP3-A24-10-139(SEQ ID NO:40)(j)による#2、IQGAP3-A24-10-1097(SEQ ID NO:49)(k)による#5、IQGAP3-A24-10-345(SEQ ID NO:53)(l)による#7、IQGAP3-A24-10-1614(SEQ ID NO:55)(m)による#1、IQGAP3-A24-10-314(SEQ ID NO:57)(o)による#5、IQGAP3-A24-10-1363(SEQ ID NO:62)(p)による#5、IQGAP3-A24-10-1114(SEQ ID NO:63)(q)による#7ならびにIQGAP3-A24-10-1207(SEQ ID NO:67)(r)による#2のCTLは、それぞれ対照と比較して強力なIFN-産生能を示した。対照的に、ペプチドパルスした標的細胞に対して、IQGAP3-A24-9-417(SEQ ID NO:6)で刺激したCTLからは、特異的なIFN-産生は検出されなかった(s)。長方形の囲みで示したウェル中の細胞を増殖させて、CTL株を樹立した。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN-産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN-産生を示す。図中においては、「+」はウェルの中の細胞が適当なペプチドでパルスされたことを示し、「-」は細胞がペプチドによってパルスされなかったことを示す。

【図1B】図1Bは、図1Aの続きである。

【図2A】図2A、BおよびCは、一連の折れ線グラフ(a)～(s)を含み、IFN-ELISAアッセイによる、様々なIQGAP3ペプチド即ちSEQ ID NO:2(a)、SEQ ID NO:4(b)、SEQ ID NO:7(c)、SEQ ID NO:21(d)、SEQ ID NO:25(e)、SEQ ID NO:29(f)、SEQ ID NO:32(g)、SEQ ID NO:35(h)、SEQ ID NO:37(i)、SEQ ID NO:40(j)、SEQ ID NO:49(k)、SEQ ID NO:53(l)、SEQ ID NO:55(m)、SEQ ID NO:56(n)、SEQ ID NO:57(o)、SEQ ID NO:62(p)、SEQ ID NO:63(q)およびSEQ ID NO:67(r)によって刺激を受けたCTL株の樹立を示している。結果から、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株は、対照と比較して強力なIFN-産生を示したことが実証される。対照的に、SEQ ID NO:6によ

って樹立された C T L 株からは、ペプチドパルス標的細胞に対する特異的な I F N - の產生は観察されなかった (s)。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する I F N - 產生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する I F N - 產生を示す。

【図 2 B】図 2 B は図 2 A の続きである。

【図 2 C】図 2 C は図 2 B の続きである。

【図 3】図 3 は、I Q G A P 3 および H L A - A * 2 4 0 2 を外因的に発現する標的細胞に対する特異的な C T L 活性を示す折れ線グラフである。H L A - A * 2 4 0 2 遺伝子または全長の I Q G A P 3 遺伝子をトランスフェクションした C O S 7 細胞を対照として調製した。I Q G A P 3 - A 2 4 - 9 - 7 7 9 (S E Q I D N O : 7) で樹立された C T L 株は、I Q G A P 3 および H L A - A * 2 4 0 2 の双方をトランスフェクションした C O S 7 細胞に対して特異的な C T L 活性を示した (黒い菱形)。対照的に、H L A - A * 2 4 0 2 (三角) または I Q G A P 3 (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対して特異的な有意な C T L 活性は検出されなかった。

【図 4 A】図 4 A および図 4 B は、一連の写真 (a) ~ (r) からなり、I Q G A P 3 由来のペプチドによって誘導された C T L についての I F N - E L I S P O T アッセイの結果を示している。I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 4 6 (S E Q I D N O : 7 5) (a) によって刺激されたウェル番号 # 6 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3 (S E Q I D N O : 8 5) (b) による # 6 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 7 5 6 (S E Q I D N O : 1 0 1) (c) による # 1 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 6 1 (S E Q I D N O : 1 1 1) (d) による # 7 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 7 0 (S E Q I D N O : 1 1 4) (e) による # 7 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4 (S E Q I D N O : 1 2 2) (f) による # 5 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 5 4 8 (S E Q I D N O : 1 2 5) (g) による # 8 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 0 3 (S E Q I D N O : 1 3 0) (h) による # 1 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 5 3 (S E Q I D N O : 1 3 9) (i) による # 2 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 5 9 0 (S E Q I D N O : 1 4 0) (j) による # 2 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 2 4 (S E Q I D N O : 1 4 1) (k) による # 2 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 4 1 6 (S E Q I D N O : 1 4 2) (l) による # 2 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 6 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) (m) による # 4 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 6 1 (S E Q I D N O : 1 4 5) (n) による # 6 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 8 4 2 (S E Q I D N O : 1 4 8) (o) による # 5 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 8 9 7 (S E Q I D N O : 1 5 0) (p) による # 3 、ならびに I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 2 3 4 (S E Q I D N O : 9 9) (q) による # 5 の C T L は、対照に比して各々強力な I F N - 產生能を示した。対照的に、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 8 6 8 (S E Q I D N O : 1 1 3) によって刺激を受けた C T L からは、ペプチドをパルスした標的細胞に対する特異的な I F N - 產生は認められなかった (r)。長方形で囲んで示されるウェルの細胞を増殖させ、C T L 株を樹立した。図中、「+」は適當なペプチドをパルスした標的細胞に対する I F N - 產生を示し、「-」は細胞がペプチドによってパルスされなかつことを示す。

【図 4 B】図 4 B は図 4 A の続きである。

【図 5 A】図 5 A および図 5 B は、一連の折れ線グラフ (a) ~ (q) を含み、I F N - E L I S A アッセイにより検出された、様々な I Q G A P 3 ペプチド即ち I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 4 6 (S E Q I D N O : 7 5) (a) 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3 (S E Q I D N O : 8 5) (b) 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 7 5 6 (S E Q I D N O : 1 0 1) (c) 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 6 1 (S E Q I D N O : 1 1 1) (d) 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 7 0 (S E Q I D N O : 1 1 4) (e) 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4 (S E Q I D N O : 1 2 1) (f) 、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 5 4 8 (S E Q I D N O : 1 2 5) (g) 、I Q G A P 3

- A 0 2 - 1 0 - 9 0 3 (S E Q I D N O : 1 3 0) (h) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 5 3 (S E Q I D N O : 1 3 9) (i) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 5 9 0 (S E Q I D N O : 1 4 0) (j) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 2 4 (S E Q I D N O : 1 4 1) (k) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 4 1 6 (S E Q I D N O : 1 4 2) (l) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 6 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) (m) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 6 1 (S E Q I D N O : 1 4 5) (n) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 8 4 2 (S E Q I D N O : 1 4 8) (o) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 8 9 7 (S E Q I D N O : 1 5 0) (p) および I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 2 3 4 (S E Q I D N O : 9 9) (q) によって刺激を受けた C T L 株の I F N - 産生を示している。結果から、各ペプチドによって刺激を受けた C T L 株は、対照と比して強力な I F N - 産生を示したことが実証される。図中において「+」は適當なペプチドをパルスした標的細胞に対する I F N - 産生を示し、「-」はいずれのペプチドをもパルスしていない標的細胞に対する I F N - 産生を示す。

【図 5 B】図 5 B は図 5 A の続きである。

【図 5 C】図 5 C は図 5 B の続きである。

【図 6】図 6 は、一連の折れ線グラフ (a) ~ (f) からなり、様々な I Q G A P 3 ペプチド即ち I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 4 6 (S E Q I D N O : 7 5) (a) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3 (S E Q I D N O : 8 5) (b) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4 (S E Q I D N O : 1 2 1) (c) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 0 3 (S E Q I D N O : 1 3 0) (d) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 6 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) (e) および I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 6 1 (S E Q I D N O : 1 4 5) (f) により刺激を受けた C T L 株から限界希釈法によって樹立された C T L クローンの I F N - 産生を示している。結果から、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 4 6 (S E Q I D N O : 7 5) (a) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3 (S E Q I D N O : 8 5) (b) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4 (S E Q I D N O : 1 2 1) (c) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 0 3 (S E Q I D N O : 1 3 0) (d) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 6 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) (e) および I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 6 1 (S E Q I D N O : 1 4 5) (f) による刺激によって樹立された C T L クローンは、対照と比して強力な I F N - 産生を示したことが実証される。図中において「+」は I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 4 6 (S E Q I D N O : 7 5) (a) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3 (S E Q I D N O : 8 5) (b) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4 (S E Q I D N O : 1 2 1) (c) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 0 3 (S E Q I D N O : 1 3 0) (d) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 6 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) (e) および I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 6 1 (S E Q I D N O : 1 4 5) (f) をパルスした標的細胞に対する I F N - 産生を示し、「-」はいずれのペプチドをもパルスしていない標的細胞に対する I F N - 産生を示す。

【図 7】図 7 は、 I Q G A P 3 および H L A - A * 0 2 0 1 を外因的に発現する標的細胞に対する特異的な C T L 活性を示す折れ線グラフである。H L A - A * 0 2 0 1 遺伝子または全長 I Q G A P 3 遺伝子をトランスフェクションした C O S 7 細胞を対照として調製した。I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3 (S E Q I D N O : 8 5) (a) および I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 2 3 4 (S E Q I D N O : 9 9) (b) によって樹立した C T L クローンは、 I Q G A P 3 および H L A - A * 0 2 0 1 の双方をトランスフェクションした C O S 7 細胞に対する特異的な C T L 活性を示した（黒い菱形）。一方、H L A - A * 0 2 0 1 (三角) または I Q G A P 3 (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対して特異的な有意な C T L 活性は検出されなかった。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 7

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0107】****インビトロでのC T L誘導**

単球由来の樹状細胞(D C)を抗原提示細胞(A P C)として用いて、ヒト白血球抗原(H L A)上に提示されたペプチドに対する細胞傷害性Tリンパ球(C T L)応答を誘導した。他所に記載されているように、D Cをインビトロで作製した(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。具体的には、F i c o l l - P l a q u e (P h a r m a c i a)溶液によって健常なボランティア(H L A - A^{*}2402陽性またはH L A - A^{*}0201陽性)から単離した末梢血单核細胞(P B M C)を、プラスチック製の組織培養ディッシュ(B e c t o n D i c k i n s o n)へ付着させることによって分離し、それらを単球画分として濃縮した。2%の加熱非効化した自己血清(A S)を含むA I M - V培地(I n v i t r o g e n)中で、1 0 0 0 U / m lの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)(R & D S y s t e m)および1 0 0 0 U / m lのインターロイキン(I L) - 4(R & D S y s t e m)の存在下で、単球が濃縮した集団を培養した。培養7日後、サイトカインで誘導したD Cに、A I M - V培地中で3時間、3 7にて、3 m c g / m lの2 - ミクログロブリンの存在下で2 0 m c g / m lの各合成ペプチドをパルスした。作製した細胞は、その細胞表面上に、C D 8 0、C D 8 3、C D 8 6、およびH L AクラスI IなどのD C関連分子を発現しているようであった(データは示さず)。次いで、ペプチドパルスしたこれらのD Cを、マイトイシンC(M M C)で不活化し(3 0 m c g / m lで3 0分間)、C D 8 P o s i t i v e I s o l a t i o n K i t(D y n a l)を用いた陽性選択によって得られた自己C D 8 + T細胞と1 : 2 0の比率で混合した。これらの培養物を4 8ウェルプレート(C o r n i n g)中に準備し;各ウェルは、0 . 5 m lのA I M - V / 2% A S培地中に、1 . 5 × 1 0⁴個のペプチドパルスしたD C、3 × 1 0⁵個のC D 8 + T細胞、および1 0 n g / m lのI L - 7(R & D S y s t e m)を含んだ。3日後、これらの培養物に、I L - 2(C H I R O N)を最終濃度2 0 I U / m lまで補充した。7日目および1 4日目に、ペプチドパルスした自己D CでT細胞をさらに刺激した。該D Cは上記と同じ方法によって毎回調製した。2 1日目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたA 2 4 L C L細胞またはT 2細胞に対してC T Lを試験した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9;Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7;Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86;Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9;Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

【手続補正5】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 1 2 3****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0123】****H L A - A^{*}0 2 0 1拘束性I Q G A P 3由來の予測されたペプチドを用いたC T Lの誘導**

I Q G A P 3に由来するペプチドに対するC T Lを、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。I F N - E L I S P O Tアッセイによって、ペプチド特異的なC T L活性を測定した(図4 a ~ q)。結果は、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1 4 6(S E Q I D N O : 7 5)(a)によって刺激されたウェル番号#6I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 5 5 3(S E Q I D N O : 8 5)(b)による# 6、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 7 5 6(S E Q I D N O : 1 0 1)(c)による# 1、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 6 1(S E Q I D N O : 1 1 1)(d)による# 7、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 7 0(S E Q I D N O : 1 1 4)(e)による#7I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4(S E Q I D N O : 1 2 1)(f)による# 5、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0

- 5 4 8 (SEQ ID NO: 125) (g) による#8、IQGAP3-A02-10
- 9 0 3 (SEQ ID NO: 130) (h) による#1、IQGAP3-A02-10
- 9 5 3 (SEQ ID NO: 139) (i) による#2、IQGAP3-A02-10
- 1 5 9 0 (SEQ ID NO: 140) (j) による#2、IQGAP3-A02-1
0 - 1 4 2 4 (SEQ ID NO: 141) (k) による#2、IQGAP3-A02-
1 0 - 4 1 6 (SEQ ID NO: 142) (l) による#2、IQGAP3-A02-
1 0 - 6 7 (SEQ ID NO: 143) (m) による#4、IQGAP3-A02-1
0 - 1 4 6 1 (SEQ ID NO: 145) (n) による#6、IQGAP3-A02-
1 0 - 8 4 2 (SEQ ID NO: 148) (o) による#5、IQGAP3-A02-
1 0 - 8 9 7 (SEQ ID NO: 150) (p) による#3、ならびにIQGAP3-
A 0 2 - 9 - 1 2 3 4 (SEQ ID NO: 99) (q) による#5が、対照ウェルと比
較して強力なIFN- γ 産生を示したことを示す。一方、表2に示された他のペプチドに
よる刺激によっては、それらのペプチドがHLA-A*0201に対する潜在的な結合活性を有していたにも関わらず、強力なIFN- γ 産生は全く検出できなかった。典型的な
ネガティブデータとして、IQGAP3-A02-10-868 (SEQ ID NO: 113) によって刺激したCTLからは、ペプチドをパルスした標的細胞に対する特異的な
IFN- γ 産生は全く認められなかった(r)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

IQGAP3ペプチド特異的なCTL株およびCTLクローニング樹立

IQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO: 75) (a) によって刺激した
ウェル番号#6 IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b) に
による#6、IQGAP3-A02-9-756 (SEQ ID NO: 101) (c) によ
る#1、IQGAP3-A02-10-961 (SEQ ID NO: 111) (d) によ
る#7、IQGAP3-A02-10-70 (SEQ ID NO: 114) (e) によ
る#7 IQGAP3-A02-10-1174 (SEQ ID NO: 121) (f) によ
る#5、IQGAP3-A02-10-548 (SEQ ID NO: 125) (g) によ
る#8、IQGAP3-A02-10-903 (SEQ ID NO: 130) (h) によ
る#1、IQGAP3-A02-10-953 (SEQ ID NO: 139) (i) によ
る#2、IQGAP3-A02-10-1590 (SEQ ID NO: 140) (j) によ
る#2、IQGAP3-A02-10-1424 (SEQ ID NO: 141) (k) によ
る#2、IQGAP3-A02-10-416 (SEQ ID NO: 142) (l) によ
る#2、IQGAP3-A02-10-67 (SEQ ID NO: 143) (m) によ
る#4、IQGAP3-A02-10-1461 (SEQ ID NO: 145) (n) によ
る#6、IQGAP3-A02-10-842 (SEQ ID NO: 148) (o) によ
る#5、IQGAP3-A02-10-897 (SEQ ID NO: 150) (p) によ
る#3 ならびにIQGAP3-A02-9-1234 (SEQ ID NO: 99) によ
る#5における、IFN- γ ELISPOTアッセイによって検出されたペプチド特異的なCTL活性を示した細胞を増殖させ、CTL株を樹立した。IFN- γ ELISAアッセイによ
り、それらのCTL株のCTL活性を決定した(図5a~q)。全てのCTL株が、ペプチドをパルスしていない標的細胞と比較して、対応するペプチドをパルスした標的細胞に対する強力なIFN- γ 産生を示すことが示された。さらに、CTL株からの限界希釈法によってCTLクローニングを樹立し、IFN- γ ELISAアッセイによってペ
プチドをパルスした標的細胞に対するCTLクローニングからのIFN- γ 産生を測定した。
図6において示されるように、IQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO:
75) (a)、IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b)、

I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 1 7 4 (S E Q I D N O : 1 2 1) (c) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 9 0 3 (S E Q I D N O : 1 3 0) (d) 、 I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 6 7 (S E Q I D N O : 1 4 3) (e) および I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 1 4 6 1 (S E Q I D N O : 1 4 5) (f) で刺激された C T L クローンからは強力な I F N - 産生が測定された。