

【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 (C T L) 誘導能を有するペプチドであって、

(a) S E Q I D N O : 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、
S E Q I D N O : 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せられた、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 L A 抗原が H L A - A 2 4 または H L A - A 0 2 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 L A 抗原とを組み合わせる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 インビトロ 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 インビトロ 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) をインビ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、インビ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 をインビ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 S E Q I D N O 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、薬理的に許容される担体と組み合わせられた、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、

(i i) 腫瘍の予防、

(i i i) 腫瘍の術後再発の予防、および

(i v) それらの組み合わせ。

[本発明1007]

H L A 抗原が H L A - A 24 または H L A - A 02 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 H L A 抗原とを組み合わせる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]

H L A 抗原が H L A - A 24 である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1012]

H L A 抗原が H L A - A 2402 である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1013]

H L A 抗原が H L A - A 02 である、本発明1010のエキソソーム。

[本発明1014]

H L A 抗原が H L A - A 0201 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 C T L 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、C T L 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 C T L 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]

H L A 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- γ ELISPOT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-A24-10-191 (SEQ ID NO: 56) (n)による#3、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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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CTL株からは、ペプチドパルス標的細胞に対する特異的なIFN- γ の産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IFN- γ 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- γ 産生を示す。

【図2B】図2Bは図2Aの続きである。

【図2C】図2Cは図2Bの続きである。

【図3】図3は、IQGAP3およびHLA-A*2402を外因的に発現する標的細胞に対する特異的なCTL活性を示す折れ線グラフである。HLA-A*2402遺伝子または全長のIQGAP3遺伝子をトランスフェクションしたCOS7細胞を対照として調製した。IQGAP3-A24-9-779 (SEQ ID NO: 7)で樹立されたCTL株は、IQGAP3およびHLA-A*2402の双方をトランスフェクションしたCOS7細胞に対して特異的なCTL活性を示した(黒い菱形)。対照的に、HLA-A*2402(三角)またはIQGAP3(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CTL活性は検出されなかった。

【図4A】図4Aおよび図4Bは、一連の写真(a)~(r)からなり、IQGAP3由来のペプチドによって誘導されたCTLについてのIFN- γ ELISPOTアッセイの結果を示している。IQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO: 75) (a)によって刺激されたウェル番号#6、IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b)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) (q)による#5のCTLは、対照に比して各々強力なIFN- γ 産生能を示した。対照的に、IQGAP3-A02-10-868 (SEQ ID NO: 113)によって刺激を受けた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、CTL株を樹立した。図中、「+」は適当なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 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IFN- γ 産生を示す。図中において「+」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4B】図4Bは図4Aの続きである。

【図5A】図5Aおよび図5Bは、一連の折れ線グラフ(a)~(q)を含み、IFN- γ ELISAアッセイにより検出された、様々なIQGAP3ペプチド即ちIQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO: 75) (a)、IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b)、IQGAP3-A02-9-756 (SEQ ID NO: 101) (c)、IQGAP3-A02-10-961 (SEQ ID NO: 111) (d)、IQGAP3-A02-10-70 (SEQ ID NO: 114) (e)、IQGAP3-A02-10-1174 (SEQ ID NO: 121) (f)、IQGAP3-A02-10-548 (SEQ ID NO: 125) (g)、IQGAP3

- A02-10-903 (SEQ ID NO: 130) (h)、IQGAP3-A02-10-953 (SEQ ID NO: 139) (i)、IQGAP3-A02-10-1590 (SEQ ID NO: 140) (j)、IQGAP3-A02-10-1424 (SEQ ID NO: 141) (k)、IQGAP3-A02-10-416 (SEQ ID NO: 142) (l)、IQGAP3-A02-10-67 (SEQ ID NO: 143) (m)、IQGAP3-A02-10-1461 (SEQ ID NO: 145) (n)、IQGAP3-A02-10-842 (SEQ ID NO: 148) (o)、IQGAP3-A02-10-897 (SEQ ID NO: 150) (p) および IQGAP3-A02-9-1234 (SEQ ID NO: 99) (q) によって刺激を受けたCTL株のIFN- γ 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CTL株は、対照と比して強力なIFN- γ 産生を示したことが実証される。図中において「+」は適当なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 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IFN- γ 産生を示す。

【図5B】図5Bは図5Aの続きである。

【図5C】図5Cは図5B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IQGAP3ペプチド即ちIQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO: 75) (a)、IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b)、IQGAP3-A02-10-1174 (SEQ ID NO: 121) (c)、IQGAP3-A02-10-903 (SEQ ID NO: 130) (d)、IQGAP3-A02-10-67 (SEQ ID NO: 143) (e) および IQGAP3-A02-10-1461 (SEQ ID NO: 145) (f) により刺激を受けたCTL株から限界希釈法によって樹立されたCTLクローンのIFN- γ 産生を示している。結果から、IQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO: 75) (a)、IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b)、IQGAP3-A02-10-1174 (SEQ ID NO: 121) (c)、IQGAP3-A02-10-903 (SEQ ID NO: 130) (d)、IQGAP3-A02-10-67 (SEQ ID NO: 143) (e) および IQGAP3-A02-10-1461 (SEQ ID NO: 145) (f) による刺激によって樹立されたCTLクローンは、対照と比して強力なIFN- γ 産生を示したことが実証される。図中において「+」はIQGAP3-A02-9-146 (SEQ ID NO: 75) (a)、IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (b)、IQGAP3-A02-10-1174 (SEQ ID NO: 121) (c)、IQGAP3-A02-10-903 (SEQ ID NO: 130) (d)、IQGAP3-A02-10-67 (SEQ ID NO: 143) (e) および IQGAP3-A02-10-1461 (SEQ ID NO: 145) (f) をパルスした標的細胞に対するIFN- γ 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IFN- γ 産生を示す。

【図7】図7は、IQGAP3およびHLA-A*0201を外因的に発現する標的細胞に対する特異的なCTL活性を示す折れ線グラフである。HLA-A*0201遺伝子または全長IQGAP3遺伝子をトランスフェクションしたCOS7細胞を対照として調製した。IQGAP3-A02-9-553 (SEQ ID NO: 85) (a) および IQGAP3-A02-9-1234 (SEQ ID NO: 99) (b) によって樹立したCTLクローンは、IQGAP3およびHLA-A*0201の双方をトランスフェクションしたCOS7細胞に対する特異的なCTL活性を示した(黒い菱形)。一方、HLA-A*0201(三角)またはIQGAP3(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CTL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】0107

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0107】

インビトロでのCTL誘導

単球由来の樹状細胞（DC）を抗原提示細胞（APC）として用いて、ヒト白血球抗原（HLA）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（CTL）応答を誘導した。他所に記載されているように、DC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、Ficoll-Plaque（Pharmacia）溶液によって健常なボランティア（HLA-A*2402陽性またはHLA-A*0201陽性）から単離した末梢血単核細胞（PBMC）を、プラスチック製の組織培養ディッシュ（Becton Dickinson）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%の加熱非働化した自己血清（AS）を含むAIM-V培地（Invitrogen）中で、1000 U/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）（R&D System）および1000 U/mlのインターロイキン（IL）-4（R&D System）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DCに、AIM-V培地中で3時間、37℃にて、3 mcg/mlの2-ミクログロブリンの存在下で20 mcg/ml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、CD80、CD83、CD86、およびHLAクラスIIなどのDC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DCを、マイトマイシンC（MMC）で不活化し（30 mcg/mlで30分間）、CD8 Positive Isolation Kit（Dyna1）を用いた陽性選択によって得られた自己CD8+ T細胞と1:20の比率で混合した。これらの培養物を48ウェルプレート（Corning）中に準備し；各ウェルは、0.5 mlのAIM-V/2% AS培地中に、 1.5×10^4 個のペプチドパルスしたDC、 3×10^5 個のCD8+ T細胞、および10 ng/mlのIL-7（R&D System）を含んだ。3日後、これらの培養物に、IL-2（CHIRON）を最終濃度20 IU/mlまで補充した。7日目および14日目に、ペプチドパルスした自己DCでT細胞をさらに刺激した。該DCは上記と同じ方法によって毎回調製した。21日目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたA24LC1細胞またはT2細胞に対してCTL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】0123

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0123】

HLA-A*0201拘束性IQGAP3由来の予測されたペプチドを用いたCTLの誘導

IQGAP3に由来するペプチドに対するCTL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。IFN- γ ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を測定した（図4a~q）。結果は、IQGAP3-A02-9-146（SEQ ID NO: 75）（a）によって刺激されたウェル番号#6、IQGAP3-A02-9-553（SEQ ID NO: 85）（b）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、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0
 - 903 (SEQ ID NO: 130) (h) による # 1、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0
 - 953 (SEQ ID NO: 139) (i) による # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0
 - 1590 (SEQ ID NO: 140) (j) による # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1
 0 - 1424 (SEQ ID NO: 141) (k) による # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 -
 10 - 416 (SEQ ID NO: 142) (l) による # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 -
 10 - 67 (SEQ ID NO: 143) (m) による # 4、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1
 0 - 1461 (SEQ ID NO: 145) (n) による # 6、I Q G A P 3 - A 0 2 -
 10 - 842 (SEQ ID NO: 148) (o) による # 5、I Q G A P 3 - A 0 2 -
 10 - 897 (SEQ ID NO: 150) (p) による # 3、ならびに I Q G A P 3 -
 A 0 2 - 9 - 1234 (SEQ ID NO: 99) (q) による # 5 が、対照ウェルと比
 較して強力な I F N - 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 H L A - A * 0 2 0 1 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 I F N - 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、I Q G A P 3 - A 0 2 - 1 0 - 868 (SEQ ID NO: 1
 13) によって刺激した 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 - 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】

I Q G A P 3 ペプチド特異的な C T L 株および C T L クローンの樹立

I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 146 (SEQ ID NO: 75) (a) によって刺激した
 ウェル番号 # 6 I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 553 (SEQ ID NO: 85) (b) に
 よる # 6、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 756 (SEQ ID NO: 101) (c) によ
 る # 1、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 961 (SEQ ID NO: 111) (d) によ
 る # 7、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 70 (SEQ ID NO: 114) (e) による
 # 7 I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 1174 (SEQ ID NO: 121) (f) による
 # 5、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 548 (SEQ ID NO: 125) (g) による
 # 8、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 903 (SEQ ID NO: 130) (h) による
 # 1、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 953 (SEQ ID NO: 139) (i) による
 # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 1590 (SEQ ID NO: 140) (j) によ
 る # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 1424 (SEQ ID NO: 141) (k) に
 よる # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 416 (SEQ ID NO: 142) (l) に
 よる # 2、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 67 (SEQ ID NO: 143) (m) によ
 る # 4、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 1461 (SEQ ID NO: 145) (n) に
 よる # 6、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 842 (SEQ ID NO: 148) (o) に
 よる # 5、I Q G A P 3 - A 0 2 - 10 - 897 (SEQ ID NO: 150) (p) に
 よる # 3 ならびに I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 1234 (SEQ ID NO: 99) によ
 る # 5 における、I F N - E L I S P O T アッセイによって検出されたペプチド特異的
 な C T L 活性を示した細胞を増殖させ、C T L 株を樹立した。I F N - E L I S A アッ
 セイによって、それらの C T L 株の C T L 活性を決定した (図 5 a ~ q)。全ての C T L
 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 I F N - 産生を示すことが示された。さらに、C T L 株からの
 限界希釈法によって C T L クローンを樹立し、I F N - E L I S A 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 C T L クローンからの I F N - 産生を測定した。
 図 6 において示されるように、I Q G A P 3 - A 0 2 - 9 - 146 (SEQ ID NO:
 75) (a)、I Q G A P 3 - A 0 2 - 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。