

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-539157

(P2022-539157A)

(43)公表日 令和4年9月7日(2022.9.7)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/869 (2006.01)	C 1 2 N 15/869	Z 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全53頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-577431(P2021-577431)	(71)出願人	518151434
(86)(22)出願日	令和2年6月26日(2020.6.26)		ザ フランス クリック インスティテュート リミティッド
(85)翻訳文提出日	令和4年2月21日(2022.2.21)		イギリス国 エヌダブリュ1 1エーティ
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/051557		ー, グレーター ロンドン, ロンドン,
(87)国際公開番号	WO2020/260897		ミッドランド ロード 1
(87)国際公開日	令和2年12月30日(2020.12.30)	(71)出願人	521165426
(31)優先権主張番号	19183318.5		エナラ バイオ リミテッド
(32)優先日	令和1年6月28日(2019.6.28)		イギリス国 オックスフォードシャー オ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ーエックス4 4ジーエー オックスフォ
(31)優先権主張番号	20170163.8		ード ロバート ロビンソン アヴェニュー
(32)優先日	令和2年4月17日(2020.4.17)		1 ザ オックスフォード サイエンス パ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ーク マグダレン センター
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100097456
	最終頁に続く		弁理士 石川 徹
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な癌抗原及び方法

(57)【要約】

ポリペプチド及びそのポリペプチドをコードする核酸が特に開示されており、これらは、癌、特にメラノーマ、特別には皮膚メラノーマ及びブドウ膜メラノーマの治療、予防及び診断に有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (a) 配列番号1の配列;並びに、
- (b) (a)の配列の変異体;及び
- (c) (a)の配列の免疫原性断片、

から選ばれる配列を含む、単離ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、又は該配列からなる、請求項1に記載の単離ペプチド。

【請求項 3】

請求項1又は請求項2に記載の単離ポリペプチドであって、(i)請求項1若しくは請求項2に記載の、1以上の他のポリペプチド、(ii)メラノーマ関連抗原である他のポリペプチド、(iii)免疫応答を増強可能なポリペプチド配列(即ち、免疫賦活配列)、及び、(iv)例えばユニバーサルCD4ヘルパーエпитープを含み、抗原エピトープへのCD8+T細胞応答を増加させる強力なCD4+補助を提供することのできるポリペプチド配列、から選ばれる第二のポリペプチド又は更なるポリペプチドへ融合されている、前記単離ポリペプチド。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 5】

DNAである、請求項4に記載の核酸。

【請求項 6】

配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、又は該配列からなる請求項5に記載の核酸。

【請求項 7】

ヒト宿主細胞内での発現のために最適化されたコドンである、請求項6に記載の核酸。

【請求項 8】

RNAである、請求項4に記載の核酸。

【請求項 9】

人工核酸配列である、請求項4、5、7又は8に記載の核酸。

【請求項 10】

請求項4～9のいずれか1項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 11】

ヒト宿主細胞において翻訳的に活性なRNA分子の転写を可能にするのに適した調節エレメントをコードするDNAを含む、請求項10に記載のベクター。

【請求項 12】

ウイルスベクターである、請求項10又は請求項11に記載のベクター。

【請求項 13】

アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、アレナウイルス、麻疹ウイルス、ポックスウイルス、パラミクソウイルス、レンチウイルス及びラブドウイルスベクターである、請求項12に記載のベクター。

【請求項 14】

請求項1～13のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸又はベクターを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む、免疫原性医薬組成物。

【請求項 15】

請求項1～13のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸又はベクターを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む、ワクチン組成物。

【請求項 16】

1以上の免疫賦活剤を含む、請求項14又は請求項15に記載の組成物。

【請求項 17】

前記免疫賦活剤は、アルミニウム塩、サポニン、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、水中油型エマルジョン、アミノアルキルグルコサミニド4-リン酸、リポ多糖類及びその誘導体及び他のTLR4リガンド、TLR7リガンド、TLR8リガンド、TLR9リガンド、IL-12、並びにインターフェロン、から選ばれる、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

非経口投与に適した無菌組成物である、請求項14～17のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項19】

医薬で使用するための、請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物。

【請求項20】

ヒトにおける免疫応答を上昇させる方法であって、該ヒトへ請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項21】

前記免疫応答は、配列番号1並びにその変異体及び免疫原性断片から選ばれる配列を発現する癌性腫瘍に対して、上昇される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

ヒトにおける免疫応答の上昇に使用するための、請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物。

【請求項23】

前記免疫応答は、配列番号1及びその免疫原性断片又は変異体から選ばれる対応する配列を発現する癌性腫瘍に対して、上昇される、請求項22に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物。

【請求項24】

癌に罹患しているヒト患者を治療する方法であって、該癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、該癌は配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、請求項1～18のいずれか1項に記載の、対応するポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を該ヒトへ投与することを含む、前記方法。

【請求項25】

前記癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する、ヒト癌の治療又は予防に使用するための請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物。

【請求項26】

癌に罹患しているヒト由来のT細胞を生体外での刺激及び／又は増幅に使用するのための、請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物であって、該刺激及び／又は増幅されたT細胞を、次に、該ヒトの癌を治療するために該ヒトへ再導入するための、前記ポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物。

【請求項27】

ヒトの癌の治療方法であって、該癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現し、該方法は、該ヒトから、任意で抗原提示細胞と共に、少なくともT細胞を含む白血球集団を取り出すこと、該T細胞を、請求項1～18のいずれか1項に記載の対応するポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物の存在下で、刺激及び／又は増幅すること、並びに、該白血球の一部又は全てである、少なくとも刺激及び／又は増幅されたT細胞を、該ヒトへ再導入すること、を含む、前記方法。

【請求項28】

前記癌は、メラノーマ、例えば、皮膚メラノーマである、請求項21及び23～27のいずれか1項に記載の方法、又は、使用のためのポリペプチド、核酸、ベクター若しくは組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する癌細胞に対して細胞傷害性であるT細胞集団を調製するためのプロセスであって、(a)T細胞を、任意で抗原提示細胞と共に、癌患者から得ること、並びに、(ii)生体外で該T細胞集団を、請求項1～18のいずれか1項に記載の対応するポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物で刺激及び増幅すること、を含む、前記プロセス。

【請求項 30】

請求項29に記載のプロセスから得ることのできる、T細胞集団。

【請求項 31】

請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物で刺激された、T細胞。 10

【請求項 32】

請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター若しくは組成物を生体外でロードして改変された、又は請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現するように遺伝子操作された、抗原提示細胞。

【請求項 33】

樹状細胞である、請求項32の抗原提示細胞。

【請求項 34】

請求項1～18のいずれか1項に記載のポリペプチド、核酸、ベクター若しくは組成物をロードした細胞から産生されたポリペプチドでロードされた、又は請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現するように遺伝子操作された、エクソソーム。 20

【請求項 35】

請求項30～34のいずれか1項に記載のT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞又はエクソソームを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む、医薬組成物。

【請求項 36】

医薬で使用するための、請求項30～34のいずれか1項に記載のT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞又はエクソソーム。

【請求項 37】

癌に罹患しているヒトを治療するための方法であって、該癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、該癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、請求項30～35のいずれか1項に記載のT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム又は組成物を該ヒトへ投与することを含む、前記方法。 30

【請求項 38】

前記癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する、ヒト癌の治療又は予防に使用するための請求項30～35のいずれか1項に記載のT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム又は組成物。

【請求項 39】

前記癌は、メラノーマ、例えば、皮膚メラノーマである、請求項29、37及び38のいずれか1項に記載の、プロセス、方法、又は、使用のためのT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム若しくは組成物。 40

【請求項 40】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドに対して免疫特異的である、単離された抗原結合ポリペプチド。

【請求項 41】

モノクローナル抗体又はその断片である、請求項40に記載の抗原結合ポリペプチド。

【請求項 42】

細胞傷害性成分と結合している、請求項40又は請求項41に記載の抗原結合ポリペプチド。 50

【請求項 4 3】

医薬で使用するための、請求項 40～42 のいずれか 1 項に記載の抗原結合ポリペプチド。

【請求項 4 4】

請求項 40～42 のいずれか 1 項に記載の抗原結合ポリペプチドを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む医薬組成物。

【請求項 4 5】

癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、該癌の細胞が配列番号 1 並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、該癌の細胞が配列番号 1 並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、請求項 40～42 及び 44 のいずれか 1 項に記載の抗原結合ポリペプチド又は組成物を該ヒトへ投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 4 6】

前記癌の細胞が配列番号 1 及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する、ヒト癌の治療又は予防に使用するための請求項 40～42 及び 44 のいずれか 1 項に記載の抗原結合ポリペプチド又は組成物。

【請求項 4 7】

前記癌は、メラノーマ、例えば、皮膚メラノーマである、請求項 45 又は請求項 46 に記載の方法、抗原結合ポリペプチド若しくは組成物。

20

【請求項 4 8】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又はその一部である HLA 結合ポリペプチドに免疫特異的な、単離された抗原結合ポリペプチド。

【請求項 4 9】

T 細胞受容体又はその断片である、請求項 48 に記載の抗原結合ポリペプチド。

【請求項 5 0】

対象内の細胞傷害性細胞又は他の免疫コンポーネントへ結合可能な別のポリペプチドへ結合される、請求項 48 又は請求項 49 に記載の抗原結合ポリペプチド。

【請求項 5 1】

その表面上に、請求項 48～50 のいずれか 1 項に記載の抗原結合ポリペプチドを発現するように操作された、細胞傷害性細胞。

30

【請求項 5 2】

T 細胞である、請求項 51 に記載の細胞傷害性細胞。

【請求項 5 3】

医薬で使用するための、請求項 51 又は請求項 52 に記載の細胞傷害性細胞。

【請求項 5 4】

請求項 51 又は請求項 52 に記載の細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 5 5】

癌に罹患しているヒト患者を治療する方法であって、該癌の細胞が配列番号 1 並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、該癌は配列番号 1 並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、請求項 51 又は請求項 52 に記載の細胞を該ヒトへ投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 5 6】

前記癌の細胞が配列番号 1 及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する、ヒト癌の治療又は予防に使用するための請求項 51 又は請求項 52 に記載の細胞傷害性細胞。

【請求項 5 7】

ヒトが癌に罹患していることを診断する方法であって：

該癌の細胞が配列番号 1 及びその免疫原性断片若しくは変異体から選ばれるポリペプチ

50

ド配列、又は該ポリペプチド配列をコードする核酸を発現するかどうかを決定するステップ、並びに、

該ポリペプチド若しくは対応する核酸が該癌細胞内で過剰発現している場合に、該ヒトが癌に罹患していると診断するステップ、を含む、前記方法。

【請求項 58】

皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマである癌に、ヒトが罹患していることを診断する方法であって、

該癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片若しくは変異体から選ばれるポリペプチド配列、又は該ポリペプチド配列をコードする核酸を発現するかどうかを決定するステップ、並びに、

該ポリペプチド若しくは対応する核酸が該癌細胞内で過剰発現している場合に、該ヒトが皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマである癌に罹患していると診断するステップ、を含む、前記方法。

【請求項 59】

癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、

(a) 該癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片若しくは変異体から選ばれるポリペプチド配列、又は該ポリペプチドをコードする核酸(例えば、配列番号3及び4の配列から選ばれる)を発現するかどうかを決定するステップ;並びに、もし発現するならば、

(b) 該ヒトへ、請求項1〜18、30〜35、40〜42、44、50、51及び53のいずれか1項に記載の、対応するポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、T細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム、抗原結合ポリペプチド又は細胞傷害性細胞を投与するステップ、を含む、前記方法。

【請求項 60】

癌に罹患しているヒトの腫瘍から単離された、

(a) 配列番号1の配列;若しくは

(b) (a)の配列の変異体;及び、

(c) (a)の配列の免疫原性断片、

から選ばれる配列を含むポリペプチドの使用、又は該ポリペプチドをコードする核酸の使用であって、該ヒトが、請求項1〜18、30〜35、40〜42、44、51、52及び54のいずれか1項に記載の、対応するポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、T細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム、抗原結合ポリペプチド又は細胞傷害性細胞を含むワクチンによる治療に適しているであろうかどうかを決定するためのバイオマーカーとしての、前記使用。

【請求項 61】

前記癌は、メラノーマ、例えば、皮膚メラノーマである、請求項59又は請求項60に記載の方法又は使用。

【請求項 62】

前記ポリペプチドは、

(a) 配列番号1の配列;並びに、

(b) (a)の配列の変異体;及び

(c) (a)の配列の免疫原性断片、から選ばれる配列を含み、例えば、該ポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、若しくは該配列からなり、例えば、前記核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、若しくは該配列からなり;並びに

前記癌はブドウ膜メラノーマである、請求項21及び23〜27のいずれか1項に記載の方法、又は、使用のためのポリペプチド、核酸、ベクター若しくは組成物。

【請求項 63】

前記ポリペプチドは、

(a) 配列番号1の配列;並びに、

10

20

30

40

50

(b) (a)の配列の変異体;及び

(c) (a)の配列の免疫原性断片、から選ばれる配列を含み、例えば、該ポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、若しくは該配列からなり、例えば、前記核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、若しくは該配列からなり;並びに

前記癌はブドウ膜メラノーマである、請求項45に記載の方法、又は請求項46に記載の使用のための抗原結合ポリペプチド若しくは組成物。

【請求項64】

前記ポリペプチドは、

(a) 配列番号1の配列;並びに、

(b) (a)の配列の変異体;及び

(c) (a)の配列の免疫原性断片、から選ばれる配列を含み、例えば、該ポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、若しくは該配列からなり、例えば、前記核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、若しくは該配列からなり;並びに

前記癌は、ブドウ膜メラノーマである、請求項29、37及び38のいずれか1項に記載のプロセス、方法、又は、使用のためのT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム若しくは組成物。

【請求項65】

前記ポリペプチドは、

(a) 配列番号1の配列;並びに、

(b) (a)の配列の変異体;及び

(c) (a)の配列の免疫原性断片、から選ばれる配列を含み、例えば、該ポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、若しくは該配列からなり、例えば、前記核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、若しくは該配列からなり;並びに

前記癌は、ブドウ膜メラノーマである、請求項59又は請求項60に記載の方法又は使用

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、癌の治療又は予防に使用するための、特にメラノーマ(例えば、皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマ)の治療又は予防に使用するための、抗原性ポリペプチド及び対応するポリヌクレオチドに関する。本発明は更に、特に、前記核酸及びポリペプチド、前記ポリペプチド及びポリヌクレオチドをロードされ、及び/又はそれらにより刺激された免疫細胞、前記ポリペプチドに特異的な抗体、並びに前記ポリペプチドを認識する分子で遺伝子操作された、(自己又はそれ以外から由来する)細胞を含む、医薬組成物及び免疫原性組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

病原性微生物に対する正常な免疫監視の一環として、全ての細胞は、細胞内タンパク質を分解してペプチドを産生し、そのペプチドは主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子上にロードされ、その分子は全細胞の表面上に発現される。宿主細胞から由来するこれらのペプチドのほとんどは、自己として認識され、適応免疫系には認識されずに存在し続ける。一方、外来(非自己)ペプチドは、ナイーブCD8+T細胞の増殖を刺激することができ、それはMHC I-ペプチド複合体をしっかりと結合するT細胞受容体(TCR)をエンコードする。この増殖されたT細胞集団は、外来抗原タグ付き細胞を排除できるエフェクターCD8+T細胞(細胞傷害性Tリンパ球、CTLを含む)を産生でき、更に、外来抗原タグ付き細

10

20

30

40

50

胞がその動物の一生において後に現れた場合に、再増幅されることができるメモリーCD8+T細胞も産生できる。

【0003】

MHCクラスII分子の発現は、通常、樹状細胞(DC)等のプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に限定されており、MHCクラスII分子は通常、細胞外の環境から内部に取り込まれたペプチドと共にロードされる。T細胞接着分子(CD54、CD48)及び共刺激分子(CD40、CD80、CD86)を含む様々な因子の存在下で、ナイーブCD4+T細胞からの相補的TCRがMHCII-ペプチド複合体へ結合すると、CD4+T細胞のエフェクター細胞(例えば、 T_H1 、 T_H2 、 T_H17 、 T_{FH} 、 T_{reg} 細胞)への成熟が誘導される。これらのエフェクターCD4+T細胞は、B細胞の抗体分泌型形質細胞への分化を促進できると共に、抗原特異的なCD8+CTLの分化を促進でき、それによって短期間のエフェクター機能及び長期間の免疫記憶の両方を含む、外来抗原に対する適応免疫応答の誘導を助ける。DCは、外因性由来の抗原(病原体又は腫瘍細胞から放出されたペプチド又はタンパク質等)をそれらのMHC I分子上に送達することによって、ペプチド抗原のクロスプレゼンテーションプロセスを実行することができ、ナイーブCD8+T細胞の増殖を刺激するための代替的な経路を提供することにより、免疫記憶の生成に貢献する。

10

【0004】

免疫記憶(具体的には抗原特異的B細胞/抗体及び抗原特異的CTL)は、微生物感染を制御する上で重要な役割を果たし、免疫記憶は重要な病原性微生物によって引き起こされる疾患を予防する多数のワクチンを開発するために利用されてきた。免疫記憶は又、腫瘍形成の制御に重要な役割を果たすことが知られているが、有効な癌ワクチンはほとんど開発されていない。

20

【0005】

癌は罹患率で2番目に多い原因であり、世界の全死亡原因の6分の1近くを占めている。2015年での880万人の癌による死亡のうち、最も多くの命を奪った癌の由来は、肺(169万人)、肝臓(788,000人)、結腸直腸(774,000人)、胃(754,000人)及び乳(571,000人)の癌腫であった。2010年での癌の経済的影響は、1兆1,600億米ドルと推定され、新しい症例数は今後20年間で約70%増加すると予想されている(世界保健機関、癌のファクト、2017年)。

【0006】

現在の皮膚メラノーマの療法は多様であり、腫瘍の位置及び疾患の病期に大きく依存している。非転移性メラノーマの主な治療法は、腫瘍及び周辺組織を切除する手術である。後期メラノーマには、リンパ節郭清、放射線療法、又は化学療法を含む治療が必要な場合がある。免疫チェックポイント阻害戦略はPD-1/PD-L1及びCTLA4等の負の免疫調節因子を標的とする抗体の使用を含むものであり、最近、メラノーマを含む様々な悪性腫瘍の治療に革命をもたらした(Ribas,A.及びWolchok,J. D.の文献、(2018)Science, 359:1350-1355)。チェックポイント阻害療法の並外れた価値、及び、その臨床的利益と患者自身の癌抗原に対する患者の適応免疫応答(特にT細胞ベースの免疫応答)とのよく知られた関連性は、効果的な癌ワクチン、ワクチンモダリティ及び癌ワクチン抗原の探索を活発にした。

30

40

【0007】

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)は、外因性感染性レトロウイルスが先祖代々の生殖系列へ組み込まれてきた遺物である。HERVは、ウイルスゲノムに隣接する長い末端反復(LTR)の存在を特徴とする内因性レトロエレメントのグループに属する。このグループは又、哺乳類の見かけのLTRレトロトランスポゾン(MaLR)も含むため、まとめてLTRエレメントとして知られる(本明細書では、全てのLTRエレメントを意味するためにまとめてERVと称する)。ERVは哺乳類ゲノムのかなりの割合(8%)を構成し、配列相同性に基づいて約100のファミリーにグループ分けできる。多くのERV配列は欠陥のあるプロウイルスをコードし、それらは、LTRに隣接するgag、pro、pol及びenv遺伝子からなるプロトタイプ型レトロウイルスゲノム構造を共有する。いくつかのインタクトなERV ORF

50

は、HIV-1等の外因性感染性レトロウイルスによってコードされるタンパク質と特徴を共有する、レトロウイルスタンパク質を産生する。このようなタンパク質は、強力な免疫応答を誘導する抗原として作用する可能性があり(Hurst及びMagiorkinisの文献、2015, J. Gen. Virol 96:1207-1218)、それは、ERVによってコードされたポリペプチドは、T細胞及びB細胞受容体の選択プロセス並びに中枢性及び末梢性トレランス(免疫寛容)を回避できることを示唆する。ERV産物に対する免疫反応性は、感染症や癌で自発的に発生する可能性があり、ERV産物はいくつかの自己免疫性疾患の原因として関係づけられている(Kassiotis及びStoyeの文献、2016, Nat. Rev. Immunol. 16:207-219)。

【0008】

進化における突然変異及び組換え事象の蓄積により、ほとんどのERVは、それらの遺伝子の一部又は全ての機能的なオープンリーディングフレームを失い、その結果、感染性ウイルスを産生するその能力を失っている。しかし、これらのERVエレメントは、他の遺伝子と同様に生殖系列DNA内に維持されており、少なくともそれらの遺伝子のいくつかからタンパク質を産生する潜在的能力を持っている。実際、HERVがコードするタンパク質が、様々なヒト癌で検出されている。例えば、HERV-K env遺伝子のスプライス変異体であるRec及びNp9は、悪性精巣胚細胞内にのみ見られ、健康細胞内では発見されない(Ruprechtらの文献、2008, Cell Mol Life Sci 65:3366-3382)。前立腺癌等の癌内でも又、健康組織と比較してHERV転写産物のレベル上昇が観察されている(Wang-Johanningの文献、2003, Cancer 98:187-197; Anderssonらの文献、1998, Int. J. Oncol. 12:309-313)。更に、HERV-E及びHERV-Hの過剰発現は免疫抑制的であることが示されており、これらも又、癌の進行に寄与することができるであろう(Maugeneyらの文献、2001, J. Gen. Virol. 82:2515-2518)。しかし、HERVが癌の進行又は病原性に寄与することのできる実際のメカニズムは未だ不明である。

【0009】

周囲の隣接する宿主遺伝子の発現を調節解除することに加えて、ERV調節エレメントの新しいゲノム部位への活性及び転位は、新規な転写産物の生成につながる可能性があり、それらのいくつかは発癌性を有する可能性がある(Babaian及びMagerの文献、Mob. DNA, 2016、Lockらの文献、PNAS、2014、111:3534-3543)。

【0010】

幅広い範囲のワクチンモダリティが公知である。よく説明されているアプローチの1つは、免疫応答(B細胞及びT細胞応答を含む)を高め、免疫記憶を刺激することを目ざして、対象へ抗原性ポリペプチドを直接送達することを含む。或いは、ポリヌクレオチドを、そのポリヌクレオチドにコードされた免疫原性ポリペプチドがインビボで発現するように、ベクターによって対象へ投与してもよい。ウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクターの使用は、癌に対する予防的ワクチン接種戦略及び治療的処置戦略の両方において、抗原の送達のためによく探究されてきた(Woldらの文献、Current Gene Therapy, 2013, 「遺伝子治療、ワクチン接種及び癌遺伝子治療用のアデノウイルスベクター(Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy)」13:421-433)。免疫原性のペプチド、ポリペプチド、又はそれらをコードするポリヌクレオチドも又、患者由来の抗原提示細胞(APC)をロードするために使用でき、次にそれらを治療的又は予防的免疫応答を惹起するワクチンとしてその対象に注入することができる。このアプローチの例は、Provengeであり、FDAが承認した現在唯一の抗癌ワクチンである。

【0011】

癌抗原は又、それらを使用して様々な非ワクチン治療のモダリティを作成するための、癌の治療及び予防に利用され得る。これらの療法は、1)抗原結合型生物製剤、2)養子細胞療法の2つの異なるクラスに分類される。

【0012】

抗原結合型生物製剤は、通常、抗原で修飾された癌細胞を認識し、それらの破壊を促進

10

20

30

40

50

するように操作された多価のポリペプチドで構成される。これらの生物製剤の抗原結合コンポーネントは、TCRベースの生物製剤からなるものでもよく、それは様々な技術によって作製された(モノクローナル抗体技術に基づくものを含む)、TCR、高親和性TCR及びTCR模倣物を含むがこれらに限定されない。これらの種類の多価の生物製剤の細胞溶解性成分は、細胞傷害性化学物質、生物毒素、免疫細胞の標的指向化及び活性化を促進する標的指向化モチーフ及び/又は免疫賦活性モチーフからなるものでもよく、いずれも腫瘍細胞の治療的破壊を促進するものである。

【0013】

養子細胞療法は、患者自身のT細胞をベースにしてもよく、それは、取りだされてワクチン抗原調製物により生体外で刺激される(細胞性及び無細胞性成分を含む他の因子の存在下又は非存在下に、T細胞と共に培養される)(Yossefらの文献、JCI Insight. 2018年10月、4;3(19) pii:122467. doi:10.1172/jci.insight.122467)。或いは、養子細胞療法は、癌抗原を認識する抗原結合ポリペプチドを発現するように計画的に操作された細胞(患者由来又は非患者由来の細胞を含む)をベースにすることもできる。これらの抗原結合ポリペプチドは、抗原結合型生物製剤について前記記載したものと同じクラスに分類される。従って、癌抗原結合ポリペプチドを発現するように遺伝子操作された(自己由来又は非自己由来)リンパ球は、患者の癌を治療するための養子細胞療法としてその患者へ投与することができる。

【0014】

癌に対する効果的な免疫応答を上昇させるためのERV由来抗原の使用は、癌のネズミモデルにおいて腫瘍の退縮を促進し、より好ましい予後診断をもたらす有望な結果を示した(Kershawらの文献、2001, Cancer Res. 61:7920-7924;Slanskyらの文献、2000, Immunity 13:529-538)。従って、特定された腫瘍特異的ERV抗原の厳しい制限のために、ある程度研究の進展が制限されているにもかかわらず、HERV抗原を中枢とした免疫治療トライアルがヒトにおいて検討されている(Sachaらの文献、2012, J. Immunol 189:1467-1479)。

【0015】

WO 2005/099750は、感染性病原体に対する既存のワクチンのアンカー配列を特定しており、これらは共通して、HERV-K Mel腫瘍抗原に対する交差反応性の免疫応答を高め、メラノーマへの保護を与えるものである。

WO 00/06598は、メラノーマで優先的に発現されるHERV-AVL3-B腫瘍関連遺伝子の特定、並びにその遺伝子の発現を特徴とする症状を診断して治療するための方法及び製品に関する。

WO 2006/119527は、メラノーマ関連の内因性レトロウイルス(MERV)に由来する抗原性ポリペプチド、並びに、メラノーマの検出及び診断、及びこの疾患の予後診断のためのそれらの使用を提供する。抗癌ワクチンとしての抗原性ポリペプチドの使用も又開示されている。

【0016】

WO 2007/137279は、例えば、癌細胞増殖を予防又は阻害するためのHERV-K+結合抗体を使用して、HERV-K+癌を検出、予防及び治療するための方法及び組成物を開示している。

WO 2006/103562は、その中でHERV-Kのenv遺伝子からの免疫抑制的Np9タンパク質が発現される癌を、治療又は予防するための方法を開示している。この発明は又、そのタンパク質の活性を阻害できる核酸若しくは抗体を含む医薬組成物、又はそのタンパク質に対する免疫応答を誘導できる免疫原又はワクチン組成物に関する。

WO 2007/109583は、腫瘍細胞上のHERV-E抗原に反応する、富化された免疫細胞集団を含む組成物を提供することにより、哺乳類対象の新生物性疾患を予防又は治療するための組成物及び方法を提供する。

【0017】

Humer Jらの文献、2006, Canc. Res., 66:1658-63は、メラノーマに関連する

10

20

30

40

50

内因性レトロウイルス由来のメラノーママーカーを特定している。

癌、特にメラノーマ、更には皮膚メラノーマ及びブドウ膜メラノーマの免疫療法に使用できる、更なるHERV関連の抗原配列を特定することが求められている。

【発明の概要】

【0018】

(発明の概要)

本発明者らは、驚くべきことに、LTRエレメントを含むか、又はLTRエレメントに隣接するゲノム配列に由来し、皮膚メラノーマ細胞では高レベルで見られるが、正常で(normal)健康な組織では検出不能か、又は非常に低レベルで見られる、ある種のRNA転写産物を発見した(実施例1を参照)。本明細書ではそのような転写産物を、癌特異的LTR-エレメントスパニング転写産物(CLT)と称する。更に、本発明者らは、これらのCLTの1つによりコードされている特別で潜在的なポリペプチド配列(即ち、オープンリーディングフレーム(ORF))が、癌細胞内で翻訳され、抗原プロセッシング装置のコンポーネントによりプロセッシングされ、そして、クラスI及びクラスII主要組織適合性複合体(MHCクラスI及びMHCクラスII)並びにクラスI及びクラスIIヒト白血球抗原(HLAクラスI、HLAクラスII)分子と結合して、腫瘍組織内で見られる細胞表面上に提示されることを示した(実施例2を参照)。これらの所見は、このポリペプチド(本明細書ではCLT抗原と称する)が事実上、抗原性であることを示す。従って、このCLT抗原の癌細胞提示は、これらの細胞が、このCLT抗原に対する同族T細胞受容体(TCR)を有するT細胞による排除を受けやすくすることが期待され、そして、これら同族TCRを有するT細胞を増幅するCLT抗原ベースのワクチン接種方法/レジメンは、癌細胞(及びそれを含む腫瘍)、特にメラノーマ、特別には皮膚メラノーマの腫瘍に対する免疫応答を惹起することが期待される。実際に、メラノーマ対象からのT細胞は本明細書に開示されるCLT抗原由来ペプチドに反応する(実施例3を参照)。本発明者らは、CLT抗原に特異的なT細胞が中枢性トレランスによって正常な対象のT細胞レパートリーから削除されないことを確認した(実施例4を参照)。最後に、qRT-PCR研究により、CLTは、非メラノーマ細胞株と比較して、メラノーマ細胞株から抽出されたRNA内に特異的に発現されていることが確認された(実施例5を参照)。

【0019】

本発明者らは又、驚くべきことに、ある種のCLT抗原をコードするCLTが、皮膚メラノーマで過剰発現されるだけでなく、ブドウ膜メラノーマでも又過剰発現されることを発見した。このCLTによりコードされるCLT抗原ポリペプチド配列は、ブドウ膜メラノーマ細胞及びそれを含む腫瘍に対する免疫応答を惹起することが期待される。

【0020】

本発明の対象であるCLT及びCLT抗原は、癌ゲノムアトラスに見られる公知の腫瘍ゲノム配列から容易に由来できるカノニカル配列ではない。このCLTは、ERV起源の転写制御配列によって駆動される、複合体転写及びスプライシング事象から生じる転写産物である。このCLTは高レベルで発現されるため、かつCLT抗原ポリペプチド配列は正常なヒトタンパク質の配列ではないため、強力で特異的な免疫応答を惹起できるであろうから、癌免疫治療状況での治療的使用に適していることが期待される。

【0021】

腫瘍細胞を特徴付ける高度に発現された転写産物中に発見されたこのCLT抗原は、本発明以前には、ヒト体内に存在してタンパク質産物を産生することが知られていなかったものであり、幾つかの形式で使用可能である。第一に、本発明のCLT抗原ポリペプチドは、腫瘍細胞に対する治療的又は予防的免疫応答を惹起するワクチンとして、対象に直接送達することができる。第二に、本発明の核酸は、それらがコードするCLT抗原の発現を増強するためにコドン最適化することができ、腫瘍細胞に対する治療的若しくは予防的な免疫応答を惹起するワクチンとして、直接投与、又はその代わりに、インビボ送達のためにベクターに挿入して、コードされたタンパク質産物を対象内で産生させることが可能である。第三に、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドは、患者由来の抗原提示細胞(APC)をロードするために使用でき、次にそれを、腫瘍細胞に対する治療的

若しくは予防的な免疫応答を惹起するワクチンとして、対象体内に注入することができる。第四に、本発明のポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドは、対象のT細胞を生体外で刺激するために使用可能であり、刺激されたT細胞調製物が作製され、それは癌の治療法として対象へ投与できる。第五に、MHC I分子と複合体を形成しているCLT抗原を認識し、癌細胞を死滅(又は死滅を促進)させるように更に改変されているT細胞受容体(TCR)又はTCR模倣物等の生物学的分子を、癌の治療法として対象へ投与してもよい。第六に、MHC細胞と複合体を形成しているCLT抗原を認識する生物学的分子のキメラバージョンを、(自己由来、又は非自己由来)T細胞へ導入してもよく、導入後の細胞を、癌の治療法として対象へ投与してもよい。これら及びその他の応用について、より詳細に下記に説明する。

10

【0022】

以上より、本発明は特に：

- (a) 配列番号1の配列;並びに、
- (b) (a)の配列の変異体;及び
- (c) (a)の配列の免疫原性断片、

から選ばれる配列を含む単離ポリペプチド(これ以降、「本発明のポリペプチド」と称する)を提供する。

本発明は又、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子(これ以降、「本発明の核酸」と称する)を提供する。

【0023】

20

本発明のポリペプチド及び本発明の核酸、並びに本発明の関連する態様は、より詳細に下記で説明されるとおり、癌の免疫治療及び予防、特にメラノーマの免疫治療及び予防での実施態様の分野で有用であると期待される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

(図面の説明)

【図1】図1：患者Mel-29の腫瘍サンプルから得られた配列番号2のペプチドのスペクトル。上のパネルは患者の腫瘍サンプルから得られたペプチドの抽出MS/MSスペクトルを(割り当てられた断片イオンと共に)示し、下のパネルはスペクトルのレンダリングを示すものであり、断片イオンにマッピングされた直鎖(linear)ペプチド配列の位置を表示する。

30

【図2】図2：患者Mel-29の腫瘍サンプルから得られた配列番号2のペプチドのスペクトル。図は、患者の腫瘍サンプルから得られたペプチドのネイティブMS/MSスペクトルの、同じ配列に対応する合成ペプチドのネイティブスペクトルへのアラインメントを示す。

【図3】図3は、CLT抗原1からのHLA-A*03:01-拘束ペプチド(配列番号6)に対する、正常な献血者からのCD8 T細胞の応答を示す。

【図4】図4は、CLT抗原1をコードするCLT(配列番号3)の転写を評価するqRT-PCRアッセイ結果を示す。

【0025】

40

(配列の説明)

配列番号1は、CLT抗原1のポリペプチド配列である。

配列番号2は、CLT抗原1由来ペプチド配列である。

配列番号3は、CLT抗原1をコードするCLTのcDNA配列である。

配列番号4は、CLT抗原1をコードするcDNA配列である。

配列番号5は、CLT抗原1由来ペプチド配列である。

配列番号6は、CLT抗原1由来ペプチド配列である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

(発明の詳細な説明)

50

(ポリペプチド)

用語「タンパク質」、「ポリペプチド」及び「ペプチド」は、本明細書では互換的に使用され、長さ、翻訳時修飾又は翻訳後修飾に関係なく、ペプチド結合したアミノ酸鎖のいずれかを指す。

【0027】

用語「アミノ酸」は、天然起源のアミノ酸、並びに、天然起源のアミノ酸に類似する様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物のいずれか1つを指す。天然起源のアミノ酸は、遺伝子コードによってコードされている20個のL-アミノ酸、及び、後に修飾されたアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸及びO-ホスホセリン、である。用語「アミノ酸類似体」は、天然起源のアミノ酸と同じ基本的な化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合している α 炭素を有する化合物であるが、天然アミノ酸と比較して、修飾されたR基又は修飾されたペプチド骨格を有するものを指す。その例には、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム及びノルロイシンが含まれる。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を持っているが、天然起源のアミノ酸に類似する様式で機能する化学的化合物を指す。好適には、アミノ酸は、天然起源のアミノ酸又はアミノ酸類似体であり、特に天然起源のアミノ酸であり、更には遺伝子コードによってコードされる20個のL-アミノ酸のうちの1つである。

【0028】

本明細書ではアミノ酸は、一般的に公知の三文字記号、又は一文字記号のいずれかであって、IUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)が推奨するものによって表されることがある。ヌクレオチドも同様に、一般的に認められた一文字コードによって表されることがある。

【0029】

従って、本発明は:

- (a) 配列番号1の配列;並びに、
- (b) (a)の配列の変異体;及び
- (c) (a)の配列の免疫原性断片、から選ばれる配列を含む単離ポリペプチドを提供する。

【0030】

本発明は又:

- (a) 配列番号1の配列から最初のメチオニン残基を除いたもの;並びに、
- (b) (a)の配列の変異体;及び
- (c) (a)の配列の免疫原性断片、から選ばれる配列を含む単離ポリペプチドを提供する。

【0031】

一般的に、本発明のポリペプチド配列の変異体は、それに対して高度の配列同一性を有する配列を含む。例えば、変異体は、関係する参照配列の全長に対して、好ましくは少なくとも約80%同一性、より好ましくは少なくとも約85%同一性、及び最も好ましくは少なくとも約90%同一性(少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%等)を有する。

【0032】

好適には、変異体は免疫原性変異体である。一の変異体は、参照配列(即ち、その変異体が一の変異体である配列)の活性の、少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%、及び、特に少なくとも75%(少なくとも90%等)である応答を惹起する免疫原性変異体であると考えられる。この応答は、例えば、抗原としてポリペプチドを用いたPBMC又は全血のインビトロ再刺激アッセイ(例えば、数時間から最大1年、最大6ヶ月等、1日から1ヶ月、又は1~2週間の期間をかけた再刺激)において、リンパ球増殖(例えば、T細胞増殖)を介した細胞の賦活化、培養上清中のサイトカイン(例えば、IFN- γ)の産生(ELISA等で測定)、又は、T細胞応答の特性評価を、細胞内及び細胞外染色(例えば、CD3、CD4、C

D8、IL2、TNF- α 、IFN γ 、1型IFN、CD40L、CD69等の免疫マーカーに特異的な抗体を使用)及び、それに続くフローサイトメーターでの分析によって測定する。

【0033】

変異体は例えば、保存的に修飾された変異体でも良い。「保存的に修飾された変異体」は、その改変が、機能的に類似するアミノ酸でのアミノ酸の置換、又は、変異体の生物学的機能に実質的に影響を及ぼさない、残基の置換/欠失/付加を生じるものである。通常、そのような変異体の生物学的機能は、メラノーマ、例えば皮膚メラノーマ癌抗原に対する免疫応答を誘導するであろう。

機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当分野で周知である。変異体は、他の種で見られるポリペプチドのホモログを含むことができる。

10

【0034】

本発明のポリペプチドの変異体は、多数の置換、例えば、参照配列と比較して保存的な置換(例えば1~25、1~10等、特に1~5、そして特に1個のアミノ酸残基が改変されていてもよい)を含む場合もある。置換の数、例えば、保存的な置換の数は、参照配列の残基数の最大で20%、例えば最大で10%、例えば最大で5%、例えば最大1%でもよい。一般的に、保存的な置換は、下記で特定されるアミノ酸分類の1つに含まれるであろうが、場合によっては、抗原の免疫原性特性に実質的な影響を与えない限り、他の置換もあり得る。次の8個のグループには、それぞれ通常は相互に保存的な置換物であるアミノ酸が含まれる。

【0035】

20

- 1)アラニン(A)、グリシン(G);
- 2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E);
- 3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q);
- 4)アルギニン(R)、リシン(K);
- 5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V);
- 6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W);
- 7)セリン(S)、トレオニン(T);及び
- 8)システイン(C)、メチオニン(M)

(例えば、Creightonの文献、Proteins 1984を参照)。

【0036】

30

好適には、そのような置換は、エピトープの免疫学的構造を改変せず(例えば、それら置換は一次配列にマッピングされるエピトープ領域内では起こらない)、そのため、抗原の免疫原性特性に有意な影響を及ぼさない。

【0037】

ポリペプチド変異体は又、参照配列と比較して追加的なアミノ酸が挿入されるものを含み、例えば、そのような挿入は、1~10の位置(例えば1~5の位置、好適には1又は2の位置、特に1の位置)で発生してもよく、その挿入は例えば、各位置に50個以下(例えば20個以下、特に10個以下、更には5個以下)のアミノ酸付加を含むことができる。好適には、そのような挿入は、エピトープ領域では発生せず、そのため抗原の免疫原性特性に有意な影響を及ぼさない。挿入物の一例には、目的の抗原の発現及び/又は精製を補助するためのヒスチジン残基の短いストレッチ(例えば、2~6残基)が含まれる。

40

【0038】

ポリペプチド変異体は、参照配列と比較してアミノ酸が削除されたものを含み、例えば、そのような欠失は、1~10の位置(例えば1~5の位置、好適には1又は2の位置、特に1の位置)で発生してもよく、その欠失は例えば、各位置に50個以下(例えば20個以下、特に10個以下、更には5個以下)のアミノ酸欠失を含むことができる。好適には、そのような欠失は、エピトープ領域では発生せず、そのため抗原の免疫原性特性に有意な影響を及ぼさない。

【0039】

当業者は、特別なタンパク質変異体は、置換、欠失及び付加(又はそれらの任意の組み

50

合わせ)を含み得ることを認識するであろう。例えば、置換/欠失/付加は、所望の患者のHLA分子への結合を増強し(又はニュートラル効果を与え)、免疫原性を高める(又は免疫原性を変更されないまま維持する)可能性がある。

【0040】

本発明の免疫原性断片は、CLT抗原の長さに応じて、全長ポリペプチド配列からの、通常は少なくとも9(例えば、少なくとも9又は10)個の連続アミノ酸、少なくとも12個の連続アミノ酸(例えば、少なくとも15個又は少なくとも20個の連続アミノ酸)等、特に少なくとも50個の連続アミノ酸、少なくとも100個の連続アミノ酸(例えば、少なくとも200個の連続アミノ酸)等、を含むであろう。好適には、この免疫原性断片は、全長ポリペプチド配列の長さの少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば少なくとも50%、例えば少なくとも70%、又は少なくとも80%であろう。

10

【0041】

免疫原性断片は、通常、少なくとも1つのエピトープを含む。エピトープは、B細胞及びT細胞エピトープを含み、好適には、免疫原性断片は、CD4+又はCD8+T細胞エピトープ等の少なくとも1つのT細胞エピトープを含む。

【0042】

T細胞エピトープは、HLA分子に結合したときにT細胞(例えば、CD4+又はCD8+T細胞)によって認識される、アミノ酸の短い連続的ストレッチである。T細胞エピトープの特定は、当業者に周知のエピトープマッピング実験により達成してもよい(例えば、Paulの文献、Fundamental Immunology, 第3版、243-247(1993);Beißbarthらの文献、2005、Bioinformatics,21(増補1):i29-i37を参照)。

20

【0043】

癌におけるT細胞応答の決定的な関与の結果として、少なくとも1つのT細胞エピトープを含む配列番号1の全長ポリペプチドの断片は、免疫原性である可能性があり、免疫防御に寄与する可能性があることは、非常に明白である。

【0044】

ヒト等の、多様な非近交系集団では、異なるHLAタイプとは、特定のエピトープが集団の全メンバーによって認識されるわけではないことを意味することが理解されるであろう。その結果、あるポリペプチドに対する免疫応答の認識及び規模のレベルを最大化するために、一般的には、免疫原性断片は全長配列からの複数のエピトープ(好適には、CLT抗原内の全てのエピトープ)を含むことが望ましい。

30

【0045】

有用であり得る配列番号1のポリペプチドの特定の断片は、少なくとも1つのCD8+T細胞エピトープ、好適には少なくとも2つのCD8+T細胞エピトープ、更には全てのCD8+T細胞エピトープを含むもの、特に複数のHLAクラスI対立遺伝子と関連するもの、例えば、2、3、4、5又はそれを超える対立遺伝子と関連するもの)を含む。有用であり得る配列番号1のポリペプチドの特別な断片は、少なくとも1つのCD4+T細胞エピトープ、好適には少なくとも2つのCD4+T細胞エピトープ、更には全てのCD4+T細胞エピトープを含むもの、(特に複数のHLAクラスII対立遺伝子と関連するもの、例えば、2、3、4、5又はそれを超える対立遺伝子と関連するもの)を含む。しかし、ワクチン設計分野の当業者は、外因性のCD4+T細胞エピトープを本発明のCD8+T細胞エピトープと組み合わせて、本発明のCD8+T細胞エピトープに対する所望の応答を達成できるであろう。

40

【0046】

全長ポリペプチドの個々の断片が使用される場合、そのような一の断片は、参照配列(即ち、その断片が一の断片である配列)の活性の、少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%、特に少なくとも75%(少なくとも90%等)である応答を惹起する場合、免疫原性であると考えられる。この応答は、例えば、抗原としてポリペプチドを用いたPBMC又は全血のインビトロ再刺激アッセイ(例えば、数時間から最大1年、最大6ヶ月等、1日から1ヶ月、又は1~2週間の期間をかけた再刺激)における活性を、リンパ球増殖(例えば、T細胞増殖)を介した細胞の賦活化、培養上清中のサイトカイン(例えば、IFN-γ

50

)の産生(ELISA等で測定)、又は、T細胞応答の特性評価を、細胞内及び細胞外染色(例えば、CD3、CD4、CD8、IL2、TNF- α 、IFN- γ 、1型IFN、CD40L、CD69等の免疫マーカーに特異的な抗体を使用)及び、それに続くフローサイトメーターでの分析によって測定する。

【0047】

場合によっては、全長ポリペプチドの複数の断片(重複する場合もしない場合もあり、全長配列全体にわたる場合もそうでない場合もある)を使用して、全長配列自体に対するのと同様な生物学的応答を得ることもできる。例えば、前記の少なくとも2個(3、4、又は5等)の免疫原性断片が組み合わされて、PBMC又は全血のインビトロ再刺激アッセイ(例えば、T細胞増殖及び／又はIFN- γ 産生アッセイ)において、参照配列の少なくとも50%、好ましくは少なくとも75%、更には少なくとも90%の活性を提供する。

10

【0048】

配列番号1のポリペプチドの免疫原性断片の例、従って本発明のペプチドの例は、配列番号2の配列を含むか、又はその配列からなるポリペプチドを含む。本発明のペプチドの他の例は、配列番号5の配列を含むか、又はその配列からなるポリペプチドを含む。本発明のペプチドの他の例は、配列番号6の配列を含むか、又はその配列からなるポリペプチドを含む。配列番号2の配列は、免疫ペプチドーム分析でHLAクラスI分子に結合していることが確認された(実施例2を参照)。配列番号5及び6の配列は、NetMHCソフトウェアによりHLAクラスI分子へ結合していると予測され、免疫学的検証アッセイで使用された(実施例4を参照)。

20

【0049】

(核酸)

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする単離された核酸(本発明の核酸と称する)を提供する。例えば、本発明の核酸は、配列番号3及び4から選ばれる配列を含むか、又はその配列からなる。

【0050】

用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、本明細書においては互換的に使用され、ヌクレオチドモノマー、特にデオキシリボヌクレオチドモノマー又はリボヌクレオチドモノマーから作製されるポリマー性高分子を指す。この用語は、公知のヌクレオチド類似体又は修飾された骨格残基若しくは結合を含む核酸を包含するものであり、それらは天然起源のもの及び非天然起源のものであり、参照核酸と類似の特性を有し、参照ヌクレオチドと類似の様式で代謝されることを意図されるか、又は系内での半減期を延長することを意図されている核酸までをも含む。そのような類似体の例は、これらに限定されるものではないが、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)が含まれる。好適には、用語「核酸」は、デオキシリボヌクレオチドモノマー又はリボヌクレオチドモノマーの天然起源のポリマーを指す。好適には、本発明の核酸分子は組換え体である。組換え体とは、核酸分子が、クローニング、制限処理若しくはライゲーションステップ、又は自然界に見られる核酸分子からは区別される核酸分子(例えば、cDNAの場合)を生じる他の操作、の少なくとも1つの産物であることを意味する。1の実施態様では、本発明の核酸は、人工核酸配列(例えば、非天然コドン利用を含むcDNA配列又は核酸配列)である。1の実施態様では、本発明の核酸はDNAである。或いは、本発明の核酸はRNAである。

30

40

【0051】

DNA(デオキシリボ核酸)及びRNA(リボ核酸(ribonucleic acid))は、それぞれデオキシリボシル成分及びリボシル成分である糖成分骨格を有する核酸分子を指す。この糖成分は、4つの天然塩基(DNA中のアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、及び、RNA中のアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)及びウラシル(U))である塩基に結合していてもよい。本明細書で使用される場合、「対応するRNA」は、参照DNAと同じ配列であるが、DNAのチミン(T)がRNAではウラシル(U)で置換されている配列を有するRNAである。糖成分は又、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒド

50

ロウリジン及び5-メチルシチジン等の非天然塩基に結合していてもよい。糖(デオキシリボシル/リボシル)成分間の天然のリン酸ジエステル結合は、任意でホスホロチオエート結合で置換されていてもよい。好適には、本発明の核酸は、糖成分間のリン酸ジエステル結合を有するデオキシリボシル又はリボシル糖骨格へ結合した天然塩基からなる。

【0052】

1の実施態様では、本発明の核酸はDNAである。例えば、この核酸は、配列番号3及び4から選ばれる配列を含むか、又はその配列からなる。同様に提供されるのは、配列番号3及び4から選ばれる配列の変異体を含むか、又はそれからなる核酸であって、その変異体は同じアミノ酸配列をコードするが、遺伝コードの縮重に基づいた異なる核酸を有するものである。

【0053】

従って、遺伝子コードの縮重のために、非常に数多くの異なるが機能的に同一の核酸が、任意の所与のポリペプチドをコードできる。例えば、コドンGCA、GCC、GCG及びGCUは全て、アミノ酸であるアラニンをコードする。そのため、アラニンが1のコドンによって特定されている全ての位置において、そのコドンは、そのコードされたポリペプチドを改変することなく、その対応する前記コドンのいずれかへ改変できる。そのような核酸変異は、「サイレント」(「縮重型」又は「同義的」と称されることもある)変異体をもたらし、それは、保存的に修飾された変異体の1種である。1のポリペプチドをコードしている、本明細書に開示された全ての核酸配列では又、その核酸で可能性のある全てのサイレント変異が可能である。当業者は、核酸内の各コドン(通常はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、及び通常はトリプトファンに対する唯一のコドンであるUGGを除く)を改変して、機能的に同一な分子を作製できることを認識するであろう。従って、1のポリペプチドをコードする核酸のサイレント変異のそれぞれは、記載された各配列中に黙示されており、本発明の1の態様として提供されている。

【0054】

縮重コドン置換は又、1以上の(又は全ての)選ばれたコドンの第3位置が、混合された塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによっても達成できるであろう(Batznerらの文献、1991、Nucleic Acid Res. 19:5081;Ohtsukaらの文献、1985、J. Biol. Chem. 260:2605-2608;Rossoliniらの文献、1994、Mol. Cell. Probes 8:91~98)。

【0055】

配列番号3及び4から選ばれる配列を含むか、又はその配列からなる本発明の核酸は、参照配列と比較して多くのサイレント変異体(例えば1~50、1~25等、特に1~5、更には1個のコドンが改変されていてもよい)を含むことができる。

【0056】

本発明の核酸は、メチオニン用の最初のコドン(即ち、ATG若しくはAUG)を除く配列番号4又は前記記載のようなその変異体から選ばれる配列を含むか、又はその配列からなることもある。

【0057】

1の実施態様では、本発明の核酸はRNAである。提供されるRNA配列は、本明細書で提供されたDNA配列に対応し、デオキシリボヌクレオチド骨格の代わりにリボヌクレオチド骨格を有し、かつ側鎖塩基はチミン(T)の代わりにウラシル(U)を有するものである。

【0058】

従って、本発明の核酸は、配列番号3及び4から選ばれるcDNA配列のRNA等価物を含むか、又はそれらからなり、かつ、参照配列と比較して多くのサイレント変異体(例えば1~50、1~25等、特に1~5、更には1個のコドンが改変されていてもよい)を含むことができる。「RNA等価物」とは、参照cDNA配列と同じ遺伝情報を含む(即ち、デオキシリボヌクレオチド骨格の代わりにリボヌクレオチド骨格を有し、かつ側鎖塩基はチミン(T)の代わりにウラシル(U)を有する同一のコドンを含む)RNA配列を意味する。

【0059】

本発明は又、前記cDNA及びRNA配列に相補的な配列を含む。

1の実施態様では、本発明の核酸は、ヒト宿主細胞内での発現のために最適化されたコドンである。

本発明の核酸は、DNA核酸の場合には転写されて本発明のポリペプチドに翻訳されることができ、RNA核酸の場合には本発明のポリペプチドに翻訳されることができる。

【0060】

(ポリペプチド及び核酸)

好適には、本発明で使用されるポリペプチド及び核酸は、単離されている。「単離された」ポリペプチド又は核酸は、その元の環境から取り出されたものである。例えば、天然起源のポリペプチド又は核酸は、それが自然系で共存する物質の幾つか又は全てから分離された場合に、単離される。核酸は、例えば、それがその天然の環境の一部ではないベクター内へクローン化された場合、単離されたと見なされる。

【0061】

「天然起源の」とは、ポリペプチド又は核酸配列に関して使用される場合、自然界に見出され、合成的に修飾されていない配列を意味する。

「人工の」とは、ポリペプチド又は核酸配列に関して使用される場合、例えば、天然の配列の合成修飾であるか、又は非天然配列を含む、自然界には見られない配列を意味する。

【0062】

用語「異種の」とは、1の核酸又はポリペプチドと別の核酸又はポリペプチドとの関係に関して使用される場合、2以上の配列が、自然界では(in nature)互いに同じ関係では見出されないことを示す。「異種の」配列は又、宿主生物内に見出される天然起源の核酸又はポリペプチド配列から、単離されず、由来せず、又はそれらをベースにしていない配列を意味することもできる。

【0063】

前記の通り、ポリペプチド変異体は、関係する参照配列の全長に対して、好ましくは少なくとも約80%同一性、より好ましくは少なくとも約85%同一性、及び最も好ましくは少なくとも約90%同一性(例えば、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%)を有する。

【0064】

2つの密接に関連するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を比較する目的で、第一の配列と第二の配列との間の「配列同一性%」を算出してもよい。その全長にわたって100%の配列同一性を有する場合、そのポリペプチド配列は、他方のポリペプチド配列と同一又は等しいと言える。配列中の残基は、左から右へ、即ちポリペプチドのN末端からC末端へ番号が付けられる。用語「同一」又はパーセント「同一性」は、2以上のポリペプチド配列の文脈において、比較ウィンドウ上で最大限対応するように、比較されてアラインメントされた場合に、同一であるか、又は同一であるアミノ酸残基を特定のパーセント有する(即ち、特定された領域内で70%同一性、任意で75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%同一性の)2以上の配列又はサブ配列を指す。好適には、この比較は参照配列の全長に対応するウィンドウ上で実行される。

【0065】

配列比較では、1の配列が、試験配列が比較されるための参照配列として働く。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じてサブ配列座標を指定し、更に配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用しても、代替的パラメータを指定してもよい。次に、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に関して試験配列の配列同一性パーセンテージを算出する。

【0066】

本明細書で使用される「比較ウィンドウ」は、その中で、1の配列及び、同じ数の連続する位置の参照配列を比較することのできるセグメントを指し、その比較はこの2つの配

10

20

30

40

50

列が最適にアラインされた後に行われる。比較のための配列アラインメント法は、当分野で周知である。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith及びWatermanのローカル相同性アルゴリズム、1981、Adv. Appl. Math. 2:482により、Needleman及びWunschの相同性アラインメントアルゴリズム、1970, J. Mol. Biol. 48:443により、Pearson及びLipmanの類似性検索法、1988、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444により、これら(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、マディソン、WI)のアルゴリズムのコンピューター化実装により、又は手動アラインメント及び目視検査(例えば、「分子生物学の最新プロトコル」(Current Protocols in Molecular Biology)、Ausubelら編、1995年増補、を参照)により、実施

10

【0067】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、プログレッシブなペアワイズアラインメントを使用して、関連配列群から多重配列アラインメントを作成し、それらの関係及び配列同一性パーセントを示す。これは又、アラインメントを作成するために使用されるクラスタリング関係を示すツリー又は樹状図をプロットする。PILEUPは、Feng及びDoolittleのプログレッシブアラインメント法(1987, J. Mol. Evol. 35:351-360)の単純化を使用する。使用される方法は、Higgins及びSharpの文献、1989, C ABIOS 5:151-153に記載された方法と類似する。このプログラムは、それぞれの最大長が5,000ヌクレオチド又はアミノ酸で、最大300個の配列を整列させることができる。この多重配列アラインメント手順は、初めに2つの最も類似する配列のペアワイズアラインメントを行い、2つのアラインされた配列のクラスターを作成する。次にこのクラスターを、最も関連性の高い配列又はアラインされた配列のクラスターにアラインする。2つの配列クラスターを、2つの個々の配列のペアワイズアラインメントの単純な伸長によってアラインさせる。最終アラインメントは、一連のプログレッシブなペアワイズアラインメントにより達成される。このプログラムは、特定の配列、及び、配列比較領域のためのそれらのアミノ酸座標を指定することにより、そして、プログラムパラメータを指定することにより実行される。PILEUPを使用して、参照配列を他方の試験配列と比較して、下記パラメータ：デフォルトのギャップ重み(3.00)、デフォルトのギャップ長重み(0.10)、及び重み付けされたエンドギャップ、を用いて配列同一性関係のパーセントを決定

20

30

【0068】

配列の同一性及び配列の類似性のパーセントを決定するために好適なアルゴリズムの別の例は、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、それぞれ、Altschulらの文献、1977, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、及びAltschulらの文献、1990, J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(www.ncbi.nlm.nih.gov/のウェブサイト)を介して公衆利用が可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードにアラインさせた場合、幾つかの正の値の閾値スコアTと一致するか、又はそれを満たす、クエリー配列中の短いワード長Wを特定することによって、高スコアリング配列対(HSP)を最初に特定することを含む。Tは、近傍のワードスコア閾値を指す(Altschulらの文献、上掲)。これらの最初の近傍ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを発見する検索を開始するための種として働く。ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増大し得る限り、それぞれの配列に沿って両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列に関してパラメータM(一致する残基対のためのリワードスコア；常に>0)及びN(不一致の残基のためのペナルティスコア；常に<0)を用いて算出される。アミノ酸配列のためには、スコアリングマトリックスを用いて累積スコアが算出される。それぞれの方向でのワードヒットの伸長が停止するのは：累積アラインメン

40

50

トスコアが、その最大達成値からX量下落した;累積スコアが、1以上の負のスコアリング残基アラインメント累積のために0以下になった;又は、いずれかの配列の末端に達した、場合である。アミノ酸配列のためには、BLASTPプログラムはデフォルトとして、ワード長は3及び期待値(E)は10、並びにBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff及びHenikoffの文献、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照)アラインメント(B)は50、期待値(E)は10、M=5、N=-4を用い、そして両鎖の比較を用いる。

【0069】

BLASTアルゴリズムは又、2つの配列間の類似性の統計分析も行う(例えば、Karlin及びAltschulの文献、1993、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小和確率(P(N))であり、これは2つのヌクレオチド配列間又は2つのアミノ酸配列間の一致が偶然に生じる確率の指標を提供する。

10

【0070】

配列間の「差異」は、第一の配列と比較して、第二の配列の一つの位置での1の残基の挿入、欠失又は置換を指す。2つの配列は、一つ、二つ又はそれ以上のこのような差異を含むことができる。それ以外は第一の配列と同一な(100%配列同一性)第二の配列中の挿入、欠失又は置換は、配列同一性%の低下をもたらす。例えば、同一配列が9残基長の場合は、第二の配列中の1の置換は、88.9%の配列同一性を生じる。同一配列が17アミノ酸残基長の場合は、第二の配列中の2つの置換は、88.2%の配列同一性を生じる。

20

【0071】

或いは、第一の参照配列を第二の比較配列と比較する目的で、第二の配列を生成するために第一の配列に対して行われた付加、置換及び／又は欠失の数を確認してもよい。1の付加とは、第一の配列への1つの残基の付加である(第一の配列のどちらかの末端における付加を含む)。1の置換とは、第一の配列中の1つの残基を、異なる1つの残基で置換することである。1の欠失とは、第一の配列から1つの残基を欠失させることである(第一の配列のどちらかの末端における欠失を含む)。

【0072】

(本発明のポリペプチドの生成)

本発明のポリペプチドは、例えば、Green及び Sambrookの文献、2012「分子クローニング：実験マニュアル」(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第4版、Cold Spring Harbour Laboratory Pressに開示されている技術を使用して取得及び操作することができる。特に、人工的な遺伝子合成技術を使用してポリヌクレオチドを生成することもでき(Nambiarらの文献、1984, Science, 223:1299-1301、Sakamar及びKhoranaの文献、1988, Nucl. Acids Res., 14:6361-6372、Wellsらの文献、1985, Gene, 34:315-323、及びGrundstromらの文献、1985, Nucl. Acids Res., 13:3305-3316)、その後好適な生物内で発現させてポリペプチドを産生してもよい。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、例えば、固相DNA合成法によって合成的に作製できる。遺伝子全体を、前駆体テンプレートDNAを必要とせずに、デノボで合成してもよい。所望のオリゴヌクレオチドを得るためには、ビルディングブロックを、生成物の配列によって必要とされる順序に、成長オリゴヌクレオチド鎖へ逐次的に結合する。鎖アセンブリが完了すると、生成物を固相から溶液に放出し、脱保護して回収する。生成物を高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で単離して、所望のオリゴヌクレオチドを高純度で得ることができる(Verma及びEcksteinの文献、1998, Annu. Rev. Biochem. 67:99-134)。これらの比較的短いセグメントは、様々な遺伝子増幅法(Methods Mol Biol., 2012;834:93-109)を使用して、より長いDNA分子へと容易に組み立てられ、それらは数えきれない数の組換えDNAベース発現系での使用に好適である。本発明の文脈において、当業者は、本発明に記載のポリペプチド抗原をコードするポリヌクレオチド配列が、例えば、ウイルスベクターを含む様々なワクチン生産システムにおいて容易に使用できることを理解するであろう。

30

40

50

【0073】

本発明のポリペプチドを(例えば、細菌性又は真菌性)微生物宿主内で産生させる目的のために、本発明の核酸は、好適な調節配列及び制御配列(プロモーター、終結シグナル等を含む)、並びに宿主内でのタンパク質産生に好適なポリペプチド分泌を促進するための配列を含むであろう。同様に、本発明のポリペプチドは、真核細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞又はショウジョウバエ属S2細胞)の培養物を、本発明の核酸であって、好適な調節配列及び制御配列(プロモーター、終結シグナル等を含む)並びにこれら細胞内でタンパク質産生に適したポリペプチド分泌を促進するための配列と組み合わせたもので、形質導入することによって生成できるであろう。

【0074】

組換え手法によって生成された本発明のポリペプチドの単離の改善は、任意で、ポリペプチドの一端に向かってヒスチジン残基のストレッチ(一般的にHisタグとして知られる)を付加することによって促進されるであろう。

ポリペプチドは又、合成的に調製してもよい。

【0075】

(ベクター)

追加的な実施態様において、本発明の核酸の1以上を含む遺伝子構築物は、インビボで細胞に導入され、本発明のポリペプチドがインビボ産生されて免疫応答を惹起する。この核酸(例えば、DNA)は、核酸発現系、細菌、及び幾つかのウイルス発現系を含む、当業者に公知の任意の様々な送達系内に存在し得る。多数の遺伝子送達技術が当分野で周知であり、例えばRollandの文献、1998, Crit. Rev. Therap. 「薬物キャリアシステム」(Drug Carrier Systems)15:143-198、及びそれに引用された参考文献に記載されたもの等がある。これらのアプローチの幾つかを、例示を目的として下記に概説する。

【0076】

上記より、本発明の核酸分子を含むベクター(本明細書では又「DNA発現用構築物」若しくは「構築物」とも称する)が提供される。

好適には、このベクターは、ヒト宿主細胞において翻訳的に活性なRNA分子の転写を可能にするのに適した調節エレメント(好適なプロモーター及び終結シグナル等)をコードする核酸を含む。「翻訳的に活性なRNA分子」とは、ヒト細胞の翻訳装置によってタンパク質へと翻訳可能なRNA分子である。

上記より、本発明の核酸を含むベクター(本明細書ではこれ以降、「本発明のベクター」と称する)が提供される。

【0077】

特に、このベクターはウイルスベクターでもよい。ウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)(例えば、AAV5型及び2型)、アルファウイルス(例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)、シンドビスウイルス(SIN)、セムリキ森林ウイルス(SFV))、ヘルペスウイルス、アレナウイルス(例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV))、麻疹ウイルス、ポックスウイルス(改変ワクシニアンカラ(MVA)等)、パラミクソウイルス、レンチウイルス、又はラブドウイルス(水疱性口内炎ウイルス(VSV)等)ベクターでもよく、即ち、このベクターは、前記ウイルスのいずれかに由来することができる。アデノウイルスは、その、中型ゲノムサイズ、操作容易性、高力価、広い標的細胞範囲、及び高い感染力のために、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に好適である。このウイルスゲノムの両端には、100~200塩基対の逆方向反復(ITR)が含まれ、それらはウイルスDNAの複製及びパッケージングに必要なシスエレメントである。このゲノムの初期(E)領域及び後期(L)領域には異なる転写ユニットが含まれ、それらはウイルスDNA複製の開始によって分割される。E1領域(E1A及びE1B)は、ウイルスゲノム及び幾つかの細胞遺伝子の転写の調節に関与するタンパク質をコードする。E2領域(E2A及びE2B)の発現は、ウイルスDNA複製用のタンパク質の合成を生じる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子の発現、及び宿主細胞遮断に関与している(Renanの文献、1990年)。ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含む後期遺伝子の産物は、主要な後期プロモ

10

20

30

40

50

ーター (MLP) によって生じる単一の一次転写産物の重要なプロセッシング後にのみ発現される。MLPは感染後期では特に効率が高く、このプロモーターから転写された全てのmRNAは、5'-トリパートイト(tripartite)リーダー(TPL)配列を保有するため、翻訳に好ましいmRNAとなっている。初期遺伝子の1以上が欠失したウイルスゲノムから作製される、複製欠失アデノウイルスは特に有用であり、その理由は、それらはワクチン接種された宿主内での複製が制限されており、病原拡散の可能性が低く、そしてワクチン接種された宿主の病原性接触の可能性も少ないためである。

【0078】

(他のポリヌクレオチド送達)

本発明のある種の実施態様では、1以上のポリヌクレオチド配列を含む発現構築物は、単純にネイキッドな組換えDNAプラスミドのみからなることもある。Ulmerらの文献、1993、Science 259:1745-1749及びそれをレビューしているCohenの文献、1993、Science 259:1691-1692を参照されたい。この構築物の導入は、例えば、細胞膜を物理的又は化学的に透過可能にするいずれかの方法によって実施することができる。これは特にインビトロでの導入に適用可能であるが、インビボでの使用にも同様に適用できる。目的の遺伝子をコードするDNAも又、同様の様式でインビボで導入されて、遺伝子産物を発現し得ることが想定される。DNA分子を動物モデルやヒトへ送達するために、多数の送達システムが使用されてきた。この技術に基づく幾つかの製品は動物での使用が認可されており、ヒトにおいて第II相及び第III相臨床試験中の他のものもある。

【0079】

(RNA送達)

本発明の他の実施態様では、1以上のポリヌクレオチド配列を含む発現用構築物は、ネイキッドな組換えDNA由来RNA分子からなるものでもよい(Ulmerらの文献、2012、Vaccine 30:4414-4418)。DNAベースの発現用構築物のために、様々な方法が、RNA分子をインビトロ又はインビボで細胞内へ導入するために使用できる。RNAベースの構築物は、単純なメッセンジャーRNA(mRNA)分子を模倣して、導入された生物学的分子が宿主細胞の翻訳機構によって直接翻訳され、それが導入された細胞内でそれがコードするポリペプチドを産生するように設計できる。或いは、RNA分子は、ウイルス性RNA依存性RNAポリメラーゼのためにその構造遺伝子中に組み込むことにより、それらが導入された細胞内でそれらが自己増幅することが可能な様式に設計してもよい。このように、自己増幅型mRNA(SAM(商標))分子(Geallらの文献、2012、PNAS、109:14604-14609)として公知のこの種のRNA分子は、幾つかのRNAベースのウイルスベクターと特性を共有する。mRNAベースRNA又はSAM(商標)RNAのいずれかを(例えば、それらの配列の改変によって、又は修飾ヌクレオチドの使用によって)更に改変して、安定性及び翻訳を増強することができ(Schlakeらの文献、RNA Biology、9:1319-1330)、そして、両方の種類のRNAは製剤化(例えば、エマルジョンに(Britoらの文献、Molecular Therapy、2014 22:2118-2129)又は脂質ナノ粒子に(Kranzらの文献、2006、Nature、534:396-401))して、インビトロ若しくはインビボでの、安定性及び/又は細胞への侵入を促進してもよい。改変された(及び非改変の)RNAのMyriad製剤は、動物モデル及びヒトにおいてワクチンとして試験されてきており、多数のRNAベースのワクチンが進行中の臨床試験で使用されている。

【0080】

(医薬組成物)

本発明のポリペプチド、核酸及びベクターは、免疫原性組成物及びワクチン組成物等の医薬組成物(これ以降は全て「本発明の組成物」)内で、送達するために製剤化されてもよい。本発明の組成物は、好適には、本発明のポリペプチド、核酸又はベクターを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む。

従って、1の実施態様では、本発明のポリペプチド、核酸又はベクターを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む免疫原性医薬組成物が提供される。

【0081】

10

20

30

40

50

別の実施態様では、本発明のポリペプチド、核酸又はベクターを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む、ワクチン組成物が提供される。医薬組成物の調製は一般的には、例えばPowell及びNewman編、「ワクチン設計(サブユニット及びアジュバントアプローチ)」(Vaccine Design(the subunit and adjuvant approach))、1995に記載されている。本発明の組成物は又、生物学的に活性でも不活性でもよい他の化合物を含むことができる。好適には、本発明の組成物は、非経口投与に適した無菌組成物である。

【0082】

本発明のある種の好ましい実施態様では、本発明の医薬組成物は、医薬として許容し得るキャリアと組み合わせた1以上の(例えば1つの)本発明のポリペプチドを含むものとして提供される。

10

本発明のある種の好ましい実施態様では、本発明の組成物は、医薬として許容し得るキャリアと組み合わせた、1以上の(例えば1つの)本発明の核酸又は1以上の(例えば1つの)本発明のベクターを含むものとして提供される。

【0083】

1の実施態様では、本発明の組成物は、1以上の(例えば1つの)ポリヌクレオチド及び1以上の(例えば1つの)ポリペプチドコンポーネントを含むことができる。或いは、この組成物は、1以上の(例えば1つの)ベクター及び1以上の(例えば1つの)ポリペプチドコンポーネントを含むことができる。或いは、この組成物は、1以上の(例えば1つの)ベクター及び1以上の(例えば1つの)ポリヌクレオチドコンポーネントを含むことができる。このような組成物は、免疫応答を増強するために提供されてもよい。

20

【0084】

(医薬として許容し得る塩)

本発明の組成物が、本明細書で提供される核酸又はポリペプチドの医薬として許容し得る塩を含むことができることは、明らかであろう。そのような塩は、医薬として許容し得る非中毒性塩基から調製することができ、その塩基は有機塩基(例えば、一級、二級及び第三級アミン、及び塩基性アミノ酸の塩)並びに無機塩基からの塩(例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム及びマグネシウムの塩)を含むものである。

【0085】

(医薬として許容し得るキャリア)

当業者に公知の多くの医薬として許容し得るキャリアを本発明の組成物に使用することもできるが、使用されるキャリアの最適な種類は、投与様式に応じて変化するであろう。本発明の組成物は、任意の好適な投与様式のために製剤化されてもよく、それは例えば、非経口、局所的、経口、経鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下又は筋肉内經由での投与、好ましくは非経口、例えば、筋肉内、皮下又は静脈内投与を含む。非経口投与のために、キャリアは好ましくは水を含み、そしてpH調製用バッファ、安定剤(例えば、界面活性剤及びアミノ酸)、並びに等張性調節剤(例えば、塩及び糖類)を含むことができる。この組成物を、使用時希釈用の凍結乾燥形態で提供しようとする場合、製剤は、凍結乾燥保護剤、例えばトレハロース等の糖類を含むことができる。経口投与のために、前記キャリア類又は固体キャリアのいずれか、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、及び炭酸マグネシウム等、を使用することができる。

30

40

【0086】

従って、本発明の組成物は、バッファ(例えば、中性緩衝生理食塩水若しくはリン酸塩緩衝生理食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、スクロース若しくはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、若しくはグリシン等のアミノ酸、抗酸化剤、静菌剤、EDTA若しくはグルタチオン等のキレート剤、製剤をレシピエントの血液と等張、低張若しくは弱高張にする溶質、懸濁剤、増粘剤、及び/又は防腐剤を含むことができる。或いは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化してもよい。

【0087】

50

(免疫賦活剤)

本発明の組成物は又、1以上の免疫賦活剤を含むことができる。免疫賦活剤は、外因性抗原に対する(抗体介在性及び／又は細胞介在性)免疫応答を増強又は強化させるいずれの物質でもよい。免疫賦活剤は、ワクチン製剤の文脈ではしばしばアジュバントと称され、その例には、水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)又はリン酸アルミニウム等のアルミニウム塩、QS21等のサポニン、CPG等の免疫賦活性オリゴヌクレオチド、水中油型エマルジョン(例えば、油がスクアレンの場合)、アミノアルキルグルコサミニド4-リン酸、リポ多糖類若しくはその誘導体(例えば3-脱-O-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL(登録商標))及び他のTLR4リガンド、TLR7リガンド、TLR8リガンド、TLR9リガンド、IL-12、並びにインターフェロンが含まれる。上記より、本発明の組成物の1以上の免疫賦活剤は、好適には、アルミニウム塩、サポニン、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、水中油型エマルジョン、アミノアルキルグルコサミニド4-リン酸、リポ多糖類及びそれらの誘導体、並びに他のTLR4リガンド、TLR7リガンド、TLR8リガンド及びTLR9リガンドから選ばれる。免疫賦活剤は又、他の免疫コンポーネントと特異的に相互作用するモノクローナル抗体、例えばPD-1及びCTLA4を含む免疫チェックポイント受容体の相互作用を遮断するモノクローナル抗体を含むこともできる。

10

【0088】

組換え核酸送達方法(例えば、DNA、RNA、ウイルスベクター)の場合は、タンパク質ベースの免疫賦活剤をコードする遺伝子を、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子と一緒に簡便に送達してもよい。

20

【0089】

(持続的放出)

本明細書に記載された組成物は、投与後に化合物の徐放的／持続的放出を生じる徐放製剤(即ち、(例えば多糖類からなる)カプセル、スポンジ、パッチ又はゲル等の製剤)の一部として投与することができる。

【0090】

(貯蔵及び梱包)

本発明の組成物は、密封されたアンプル又はバイアル等の単位用量又は複数用量の容器で提供されてもよい。そのような容器は、密閉して封印し、使用するまで製剤の無菌性を維持することが好ましい。製剤は一般的に、油性又は水性ビヒクル中に、懸濁液、溶液又はエマルジョンとして保存してもよい。或いは、本発明の組成物は、凍結乾燥状態で保存して、使用直前に無菌液体キャリア(注射用の水又は生理食塩水等)を添加することのみを必要とするものでもよい。

30

【0091】

(投薬用量)

本発明の各組成物中の核酸、ポリペプチド又はベクターの量は、治療的又は予防的使用のための好適な投薬量が得られるような方法で調合されてもよい。溶解性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品貯蔵寿命等の要因、並びに他の薬理学的考慮事項が、そのような組成物を調製する当業者によって考慮され、そのために、様々な投薬量及び治療レジメンが望ましいとされるであろう。

40

【0092】

通常、治療的又は予防的な有効量を含む組成物は、投与あたり約0.1 μ g～約1000 μ gの本発明のポリペプチド、より典型的には、投与あたり約2.5 μ g～約100 μ gのポリペプチドを送達する。短い合成鎖ペプチドの形で送達する場合、投薬量は1～200 μ g/ペプチド/用量の範囲でもよい。ポリヌクレオチド組成物に関しては、これらは通常、投与あたり約10 μ g～約20mgの本発明の核酸、より典型的には投与あたり約0.1mg～約10mgの本発明の核酸を送達する。

【0093】

(治療又は予防される疾患)

明細書のどこにでも記載されているように、配列番号1は、皮膚メラノーマで過剰発現

50

しているCLT抗原に対応するポリペプチド配列である。

1の実施態様では、本発明は、医薬で使用するための、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を提供する。

【0094】

本発明の更なる態様は、ヒトにおける免疫応答を上昇させる方法であって、そのヒトへ本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を投与することを含む、前記方法に関する。

本発明は又、ヒトにおける免疫応答の上昇に使用するための本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を提供する。

ヒトにおける免疫応答の上昇に使用する医薬品の製造のための、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物の使用も又、提供される。

【0095】

好適には、この免疫応答は、配列番号1及びその変異体並びにその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する癌性腫瘍に対して、上昇されるものである。本文脈においての「対応する」は、腫瘍が、例えば、配列番号1若しくはその変異体又はその免疫原性断片を発現する場合、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物及びそれらを含む医薬品は、配列番号1若しくはその変異体又はその免疫原性断片に基づくであろうことを意味する。

【0096】

好適には、免疫応答は、CD8+T細胞応答、CD4+T細胞応答及び/又は抗体応答、特にCD8+細胞溶解性T細胞応答及びCD4+ヘルパーT細胞応答を含む。

好適には、免疫応答は、腫瘍、特に配列番号1及びその変異体並びにその免疫原性断片から選ばれる配列を発現するものに対して引き起こされる。

【0097】

好ましい実施態様では、腫瘍はメラノーマ腫瘍、例えば皮膚メラノーマ腫瘍である。

この腫瘍は、原発性腫瘍、又は転移性腫瘍でもよい。

【0098】

本発明の更なる態様は、癌に罹患しているヒト患者を治療する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、その癌は配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、対応する本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物をそのヒトへ投与することを含む、前記方法に関する。

【0099】

本発明は又、ヒトの癌の治療又は予防に使用するための本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物であって、その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する、前記ポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を提供する。

【0100】

配列番号3に対応する転写産物は又、ブドウ膜メラノーマで過剰発現された。従って、別の実施態様では、腫瘍は、ブドウ膜メラノーマ腫瘍及び/又は配列番号1の配列を発現する腫瘍である。

【0101】

従って、本発明は、本発明の方法、又は、使用のためのポリペプチド、核酸、ベクター若しくは組成物であって、そのポリペプチドは下記から選ばれる配列を含み：

(a) 配列番号1の配列;並びに

(b) (a)の配列の変異体;及び

(c) (a)の配列の免疫原性断片、

かつ例えば、そのポリペプチドは、配列番号2、配列番号5及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、又はその配列からなり、かつ例えば、その核酸は、配列番号3及び4の

10

20

30

40

50

いずれか1つから選ばれる配列を含むか、又はその配列からなり;そして、その癌はブドウ膜メラノーマである、前記方法又は使用のためのポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物を提供する。

用語「防止」及び「予防」は、本明細書においては互換的に使用される。

【0102】

(治療及びワクチン接種レジメン)

治療的レジメンは、(i)本発明のポリペプチド、核酸若しくはベクターと、(ii)1以上の更なる本発明のポリペプチド、核酸若しくはベクター及び／又は(iii)様々な他の治療的に有用な化合物若しくは抗原性タンパク質等の分子その他の更なるコンポーネントとを、任意でアジュバントとの同時投与で、同じ時に(同時投与等)又は逐次的に(プライムブースト等)送達することのいずれかを含むことができる。同時投与の例には、同じ外側部位への同時投与、及び、相対する反対側部位への同時投与が含まれる。「同時」投与は、好適には、全てのコンポーネントが同じ治療回中に送達されることを指す。好適には、全てのコンポーネントは同時に投与される(DNA及びタンパク質の両方の同時投与等)が、1のコンポーネントが数分以内(例えば、同じ診察予約又は医師の往診時に)又は数時間以内に投与されてもよい。

10

【0103】

幾つかの実施態様では、本発明のポリペプチド、核酸又はベクターの「プライミング」又は第一の投与に続いて、本発明のポリペプチド、核酸又はベクターの1以上の「ブースト」又は追加投与が行われる(「プライム及びブースト」法)。1の実施態様では、本発明のポリペプチド、核酸又はベクターが、1つのプライムブーストワクチン接種レジメンで使用される。1の実施態様では、プライム及びブーストの両方が本発明のポリペプチドであり、それぞれの場合に本発明の同一のポリペプチドである。1の実施態様では、プライム及びブーストの両方が、本発明の核酸又はベクターであり、それぞれの場合に本発明の同一の核酸又はベクターである。或いは、プライムを本発明の核酸又はベクターを使用して実施して、ブーストを本発明のポリペプチドを使用して実施してもよく、プライムを本発明のポリペプチドを使用して実施して、ブーストを本発明の核酸又はベクターを使用して実施してもよい。通常は、第一の又は「プライミング」投与と、第二の又は「ブースト」投与は、約1~12週、又は最大で4~6か月の間をあけた後に行う。その次の「ブースター」投与は、1~6週毎の頻度で行ってもよく、又はそれよりも後に(最大で数年後に)行ってもよい。

20

30

【0104】

(抗原の組み合わせ)

本発明のポリペプチド、核酸又はベクターは、1以上の本発明の他のポリペプチド若しくは核酸又はベクターと組み合わせ使用でき、及び／又は、メラノーマ、例えば皮膚性メラノーマ若しくはブドウ膜メラノーマに対して起こる免疫応答を引き起こす他の抗原性ポリペプチド(若しくはそれをコードするポリヌクレオチド若しくはベクター)と組み合わせ使用できる。これら他の抗原性ポリペプチドは、多様な供給源に由来してもよく、その供給源はGPR143、PRAME、MAGE-A3又はpMel(gp100)等の詳しく記述されているメラノーマ関連抗原を含むことができる。或いは、それらは他の種のメラノーマ抗原を含むことができ、それらには、患者特異的な新抗原(Laussらの文献、(2017) Nature Communications, 8(1), 1738. <http://doi.org/10.1038/s41467-017-01460-0>)、保持されたイントロン新抗原(Smartらの文献、(2018) Nature Biotechnology. <http://doi.org/10.1038/nbt.4239>)、スプライス変異体新抗原(Hoyosらの文献、Cancer Cell, 34(2), 181-183. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.008>; Kahlesらの文献、(2018), Cancer Cell, 34(2), 211-224.e6. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001>)、損傷したペプチドプロセッシングと関連するT細胞エピトープをコードする抗原として知られているカテゴリーに属するメラノーマ抗原(TIEPPs; Gigoux, M.及びWolchokの文献、J.(2018), JEM, 215, 2233, Marijtらの文献、(2018), JEM 215, 2325)、又は発見されるであろう新抗原(CLT抗原を

40

50

含む)が含まれる。更に、これら様々な供給源に由来する抗原性ペプチドは又、(i)非特異的免疫賦活剤／アジュバント種、及び／又は、(ii)例えば、ユニバーサルCD4ヘルパーエピトープを含み、強力なCD4ヘルパーT細胞を惹起することが公知の、抗原(ポリペプチドとして、又はこれらCD4抗原をコードするポリヌクレオチド若しくはベクターとして送達される)と組み合わせて、同時投与された抗原により惹起される抗メラノーマ特異的応答を増幅することもできるであろう。

【0105】

異なるポリペプチド、核酸又はベクターは、同一製剤又は別々の製剤として製剤化してもよい。或いは、ポリペプチドは、その中で本発明のポリペプチドが第二の又は更なるポリペプチドへ融合されている融合タンパク質として提供されてもよい(下記を参照)。

10

核酸は、前記融合タンパク質をコードするものとして提供されてもよい。

【0106】

更に一般的に、2以上のコンポーネントを組み合わせて使用する場合、そのコンポーネントは、例えば、

(1)2以上の個々の抗原性ポリペプチドコンポーネントとして、

(2)両方の(若しくは更なる)ポリペプチドコンポーネントを含む融合タンパク質として、

、

(3)1以上のポリペプチド及び1以上のポリヌクレオチドコンポーネントとして、

(4)2以上の個々のポリヌクレオチドコンポーネントとして、

(5)2以上の個々のポリペプチドコンポーネントをコードする単一ポリヌクレオチドとして、又は、

20

(6)両方の(若しくは更なる)ポリペプチドコンポーネントを含む融合タンパク質をコードする単一ポリヌクレオチドとして、

存在することができるであろう。

【0107】

便宜上、多くのコンポーネントが存在する場合、それらが単一の融合タンパク質又は単一の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド内に含まれることが、多くの場合に望ましい(下記を参照)。本発明の1の実施態様では、全てのコンポーネントはポリペプチドとして(例えば、単一の融合タンパク質内で)提供される。本発明の別の実施態様では、全てのコンポーネントはポリヌクレオチド(例えば、単一の融合タンパク質をコードするものの等の単一のポリヌクレオチド)として提供される。

30

【0108】

(融合タンパク質)

抗原組み合わせに関する前記議論の実施態様として、本発明は又、個々の抗原をコードする配列と一緒に融合する核酸構築物を作製することにより、本発明の第二の又は更なるポリペプチドへ融合された本発明の単離ポリペプチド(これ以降、「本発明の組み合わせポリペプチド」と称する)を提供する。本発明の組み合わせポリペプチドは、本発明のポリペプチドのために本明細書に記載された有用性を有することが予測され、かつ優れた免疫原性若しくはワクチン活性、又は、予防若しくは治療効果(応答の範囲及び深さの増大を含む)の利点を有する可能性があり、そして非近交系集団で特に価値が高いであろう。本発明のポリペプチドの融合は又、ワクチン抗原及び／又はベクター化ワクチン(核酸ワクチンを含む)の構築及び製造の効率を高める利点も提供するであろう。

40

【0109】

前記「抗原の組み合わせ」項目に記載のように、本発明のポリペプチド並びに本発明の組み合わせポリペプチドは又、本発明のポリペプチドではないポリペプチド配列であって、1以上の下記を含むものへ融合されてもよい。

(a) メラノーマ関連抗原であって、そのためワクチン内の免疫原性配列として有用な可能性のある他のポリペプチド(例えば、上記言及されたGPR143、PRAME、MAGE-A3及びpMel(gp100));及び

(b) 免疫応答を増強可能なポリペプチド配列(即ち、免疫賦活配列)。

50

(c) 例えば、ユニバーサルなCD4ヘルパーエпитープを含み、強力なCD4+補助を提供可能であり、CLT抗原エпитープに対するCD8+T細胞応答を増大させることのできるポリペプチド配列。

【0110】

本発明は又、前記融合タンパク質をコードする核酸、及び、本発明のポリペプチドに関して必要な変更を加えた本発明の他の態様(ベクター、組成物、細胞等)を提供する。

【0111】

(CLT抗原結合ポリペプチド)

腫瘍発現性抗原に対して免疫特異的である抗原結合ポリペプチド(本発明のポリペプチド)は、細胞溶解性細胞を、抗原修飾された腫瘍細胞へ動員してその破壊を媒介するように設計してもよい。そのような抗原結合ポリペプチドによる細胞溶解性細胞の動員のメカニズムの1つは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)として公知である。従って、本発明は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的な抗原結合ポリペプチドを提供する。モノクローナル抗体及びその断片、例えばドメイン抗体、Fab断片、Fv断片及びVHH断片等の、抗体を含む抗原結合ポリペプチドは、非ヒト動物種(例えば、げっ歯類又はラクダ類)内で産生されてヒト化されてもよく、又は、非ヒト種(例えば、ヒトの免疫系を持つように遺伝子操作されたげっ歯類)内で産生されてもよい。

【0112】

抗原結合ポリペプチドは、当業者に周知の方法によって作製できる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を利用して、特異的抗体産生B細胞を、組織培養での増殖能力のため及び抗体鎖合成の欠如のために選択された骨髓腫(B細胞癌)細胞と融合することによって生成できる(Kohler及びMilsteinの文献、1975, Nature 256(5517):495-497及びNelsonらの文献、2000年(6月)、Mol Pathol. 53(3):111-7は、引用によりそれら全体が本明細書に組み込まれている)。

【0113】

所望の抗原に対するモノクローナル抗体は、例えば：

- a) 所望の抗原で予め免疫化/曝露された動物(ヒトを含む)の末梢血から得られたリンパ球を、不死細胞で、好ましくは骨髓腫細胞で不死化して、ハイブリドーマを形成し、
 - b) 形成された不死化細胞(ハイブリドーマ)を培養し、所望の特異性を有する抗体を産生する細胞を回収すること、
- によって得ることができる。

【0114】

モノクローナル抗体は、以下のステップを含むプロセスによって得ることができる：

- a) ベクター、特にファージ、更に特別に繊維状バクテリオファージへの、(好適には、予め所望の抗原で免疫化した)動物のリンパ球、特に末梢血リンパ球から得られたDNA又はcDNA配列のクローニングステップ
- b) 原核細胞を、上記ベクターで、抗体産生可能な条件下で形質転換するステップ、
- c) それらを抗原親和性選択にかけることにより、抗体を選択するステップ、
- d) 所望の特異性を有する抗体を回収するステップ、
- e) 抗原に曝露された患者、又は実験室的に抗原で免疫化された動物のB細胞から得られた、抗体コード化核酸分子を発現するステップ。

選択された抗体は、次に、従来の組換えタンパク質生産技術を使用して(例えば、遺伝子操作されたCHO細胞から)生成されてもよい。

【0115】

本発明は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的な、単離された抗原結合ポリペプチドを提供する。好適には、抗原結合ポリペプチドは、モノクローナル抗体又はその断片である。

ある種の実施態様では、抗原結合ポリペプチドは細胞傷害性成分と結合している。この細胞傷害性成分の例は、抗体のFcドメインを含み、それはADCCを促進するFc受容体保有細胞を動員するであろう。或いは、抗原結合ポリペプチドは、生物毒素、又は細胞傷害

10

20

30

40

50

性化学物質と連結されてもよい。

【0116】

抗原結合ポリペプチドの別の重要な種類は、本発明の抗原のHLA提示断片に結合するT細胞受容体(TCR)由来分子を含む。この実施態様では、腫瘍細胞表面上のCLT抗原(又はその誘導体)を認識するTCRベースの生物製剤(患者から直接由来するTCR、又は特異的に操作された高親和性TCRを含む)は又、T細胞(又は、別の種類の免疫細胞)上においてこれらの免疫細胞を腫瘍に引き付けるコンポーネントを認識する標的指向化成分を含むことができ、治療的効果を提供し得る。幾つかの実施態様では、この標的指向化成分は又、リダイレクトされた免疫細胞の有益な活性(細胞溶解活性を含む)を刺激することもある。

【0117】

従って、1の実施態様では、抗原結合ポリペプチドは本発明のポリペプチドであるか、又はその一部であるHLA結合ポリペプチドに対して免疫特異的である。例えば、抗原結合ポリペプチドはT細胞受容体である。

1の実施態様では、本発明の抗原結合ポリペプチドは、対象内の細胞傷害性細胞又は他の免疫コンポーネントへ結合可能な、別のポリペプチドへ結合されてもよい。

【0118】

1の実施態様では、抗原結合ポリペプチドは、医薬で使用するためのものである。

1の実施態様では、本発明の抗原結合ポリペプチドを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む、医薬組成物が提供される。そのような組成物は、非経口投与に適した無菌組成物でもよい。例えば、上掲の医薬組成物の開示を参照されたい。

【0119】

本発明により、癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、本発明の抗原結合ポリペプチド又はその抗原結合ポリペプチドを含む組成物をそのヒトへ投与することを含む、前記方法が提供される。

【0120】

1の実施態様では、ヒトの癌の治療又は予防に使用するための、細胞傷害性成分と結合していてもよい本発明の抗原結合ポリペプチド、又はこの本発明の抗原結合ポリペプチドを含む組成物であって、その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現するものである、前記抗原結合ポリペプチド又は組成物が提供される。

【0121】

好適には、前記実施態様のいずれかでは、癌は、メラノーマ、特に皮膚メラノーマである。

【0122】

1の実施態様では、本発明の方法、又は、使用のための抗原結合ポリペプチド若しくは組成物であって、そのポリペプチドは下記から選ばれる配列を含み:

(a) 配列番号1の配列;並びに

(b) (a)の配列の変異体;及び、

(c) (a)の配列の免疫原性断片、

かつ例えば、そのポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、又はその配列からなり、かつ例えば、その核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、又はその配列からなり;そして、その癌はブドウ膜メラノーマである、前記方法又は使用のための抗原結合ポリペプチド若しくは組成物が提供される。

【0123】

抗原結合ポリペプチド(抗体又はその断片等)は、例えば5~1000 mg、例えば25~500 mg、例えば100~300 mg、例えば、約200 mgの用量で投与してもよい。

【0124】

(インビボでの抗原提示を促進する細胞療法)

様々な細胞送達ビヒクルのいずれかを医薬組成物内で使用して、抗原特異的免疫応答の発生を促進してもよい。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを生体外でロードすることによって改変された、又は本発明のポリペプチドを発現するように遺伝子操作された、単離された抗原提示細胞である細胞(これ以降、「本発明のAPC」と称する)を提供する。抗原提示細胞(APC)、例えば樹状細胞、マクロファージ、B細胞、単球、及び、効率的なAPCになるように操作されていてもよい他の細胞等。そのような細胞は、必ずしもその必要はないが、抗原提示能力を高め、T細胞応答の活性化及び/若しくは持続性を改良し、並びに/又は受容体と免疫適合性のある(即ち、HLAハプロタイプが一致する)ように遺伝子改変されてもよい。APCは、一般的に様々な体液及び器官のいずれかから単離でき、かつ自己、同種異系、同系又は異種の細胞でもよい。

10

【0125】

ある種の好ましい本発明の実施態様では、樹状細胞又はその前駆体をAPCとして使用する。従って、1の実施態様では、本発明のAPCは樹状細胞である。樹状細胞は非常に強力なAPCであり(Banchereau及びSteinmanの文献、1998, Nature, 392:245-251)、予防的又は治療的免疫を惹起するための生理学的アジュバントとして有効であることが示されている(Timmerman及びLevyの文献、1999, Ann. Rev. Med. 50:507-529を参照)。一般的に、樹状細胞は、その典型的な形状(in situで星状であり、インビトロで視認可能な顕著な細胞質突起(樹状突起)を有する)、高効率で抗原を取り込んでプロセッシングして提示する能力、及び、ナイーブT細胞の応答を活性化する能力に基づいて特定してもよい。樹状細胞は、もちろん、インビボ又は生体外で通常は樹状細胞上に見られない、特定の(specific)細胞表面受容体又はリガンドを発現するように操作されてもよく、そのような改変された樹状細胞も、本発明により意図される。樹状細胞の代わりに、抗原ロードされた分泌小胞(エクソソームと称される)を免疫原性組成物内で使用してもよい(Zitvogelらの文献、1998, Nature Med. 4:594-600を参照)。従って、1の実施態様では、本発明のポリペプチドがロードされたエクソソームが提供される。

20

【0126】

樹状細胞及び前駆細胞は、末梢血、骨髓、リンパ節、脾臓、皮膚、臍帯血又はその他の適切な組織若しくは体液から得てもよい。例えば、樹状細胞は、末梢血から採取した単球の培養物へ、GM-CSF、IL-4、IL-13、及び/又はTNF α 等のサイトカインの組み合わせを加えることにより、生体外で分化させてもよい。或いは、末梢血、臍帯血又は骨髓から採取したCD34陽性細胞を、GM-CSF、IL-3、TNF α 、CD40リガンド、LPS、flt3リガンド、並びに/又は、樹状細胞の分化、成熟及び増殖を誘導する他の化合物、の組み合わせ培養液へ加えることにより、樹状細胞へ分化させてもよい。

30

【0127】

樹状細胞は「未成熟」細胞と「成熟」細胞とに便利にカテゴリー分類されており、これにより2つのよく特徴付けられたフェノタイプを簡単に区別することができる。しかし、この命名法は、分化で可能な全ての中間体段階を排除するものと解釈するべきではない。未成熟な樹状細胞は、抗原の取り込み能及びプロセッシング能が高いAPCとして特徴付けられ、それはFc γ 受容体及びマンノース受容体の高発現と相関する。成熟したフェノタイプは通常、これらマーカーの発現は低い、クラスI及びクラスII MHC等のT細胞活性化に関与する細胞表面分子、接着分子(例えば、CD54及びCD11)、並びに共刺激分子(例えば、CD40、CD80、CD86及び4-1BB)の高発現を特徴とする。

40

【0128】

又、APCを遺伝子操作して、例えば、タンパク質(若しくはその一部又はそれらの他の変異体)をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトして、そのポリペプチドが細胞表面に発現するようにしてもよい。そのようなトランスフェクションは、生体外で行われてもよく、次にそのトランスフェクトした細胞を含む医薬組成物を、本明細書に記載されるように使用できる。或いは、樹状細胞又は他の抗原提示細胞を標的とする遺伝子導入ビヒクルを患者に投与して、トランスフェクションをインビボで生じさせてもよい。イン

50

ビボ及び生体外での樹状細胞のトランスフェクションは、例えば、WO97/24447に記載されている方法、又はMahviらの文献、1997、Immunology and Cell Biology 75:456-460に記載されている遺伝子銃アプローチ等の、一般的に当分野で公知の任意の方法を使用して実施してもよい。樹状細胞への抗原ローディングは、樹状細胞又は前駆細胞をポリペプチド、DNA(例えば、プラスミドベクター)又はRNAと共に;又は、抗原を発現する組換え細菌又はウイルス(例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)(例えば、AAV5型及び2型)、アルファウイルス(例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)、シンドビスウイルス(SIN)、セムリキ森林ウイルス(SFV)、ヘルペスウイルス、アレナウイルス(例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV))、麻疹ウイルス、ポックスウイルス(改変ワクシニアンカラ(MVA)若しくは鶏痘等)、パラミクソウイルス、レンチウイルス、又はラブドウイルス(水疱性口内炎ウイルス(VSV)等)と共に、インキュベートすることにより達成してもよい。ポリペプチドをロードする前に、そのポリペプチドを、T細胞補助を提供する免疫学的パートナー(例えば、キャリア分子)へ共有結合させてもよい。或いは、樹状細胞を、非コンジュゲート型の免疫学的パートナーで、個別に、又はポリペプチド若しくはベクターの存在下で、パルスしてもよい。

10

20

30

40

50

【0129】

本発明は、ポリペプチド抗原の、特異的に設計された短く化学合成されたエピトープコード化断片を、抗原提示細胞へ送達するために提供する。当業者は、この種の分子が、成長鎖ペプチド(SLP)として知られており、本発明の抗原性ポリペプチドを使用してインビトロで細胞を刺激(又は細胞にロード)するための(Gornatiらの文献、2018, Front. Imm, 9:1484)、又はインビボでポリペプチド抗原を抗原提示細胞内に導入する方法としての(Melief及びvan der Burgらの文献、2008, Nat Rev Cancer, 8:351-60)治療用プラットフォームを提供することを理解するであろう。

【0130】

1の実施態様では、本発明の抗原提示細胞、好適には樹状細胞を、医薬として許容し得るキャリアと共に含む医薬組成物が提供される。そのような組成物は、非経口投与に適した無菌組成物でもよい。例えば、上掲の医薬組成物の開示を参照されたい。

1の実施態様では、医薬で使用するための、本発明の抗原提示細胞、好適には樹状細胞が提供される。

【0131】

同様に、癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、本発明の抗原提示細胞、好適には樹状細胞、又は本発明のその抗原提示細胞を含む組成物をそのヒトへ投与することを含む、前記方法が提供される。

【0132】

1の実施態様では、ヒトの癌の治療又は予防に使用するための本発明の抗原提示細胞、好適には樹状細胞、又は本発明のその抗原提示細胞を含む組成物であって、その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現するものである、前記抗原提示細胞又はその組成物が提供される。

【0133】

1の実施態様では、本発明のエクソソームを、医薬として許容し得るキャリアと共に含む医薬組成物が提供される。そのような組成物は、非経口投与に適した無菌組成物でもよい。例えば、上掲の医薬組成物の開示を参照されたい。組成物は、任意で免疫賦活剤を含むこともできる。上掲の免疫賦活剤の開示を参照されたい。

1の実施態様では、医薬で使用するための本発明のエクソソームが提供される。

【0134】

同様に、癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、その癌細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌

の罹患から予防する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、本発明のエクソソーム又は本発明のエクソソームを含む組成物をそのヒトへ投与することを含む、前記方法が提供される。

【0135】

1の実施態様では、ヒトの癌の治療又は予防に使用するための本発明のエクソソーム又はそのエクソソームを含む本発明の組成物であって、その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現するものである、前記エクソソーム又は組成物が提供される。

前記実施態様のいずれか1つでは、適切には、癌はメラノーマ、特に皮膚メラノーマである。

【0136】

(刺激されたT細胞による療法)

本発明のポリペプチドに免疫特異的なT細胞の、インビボ又は生体外でのAPC介在性生成に加え、自己由来又は非自己由来T細胞を、対象から、例えば、末梢血、臍帯血から及び／又はアフエレーシスにより単離し、APC細胞のMHC分子(シグナル1)上にロードされた腫瘍関連抗原の存在下で刺激し、この抗原に免疫特異的なTCRを有するT細胞の増殖を誘導してもよい。

【0137】

T細胞活性化を成功させるには、共刺激性表面分子B7及びCD28が、それぞれ抗原提示細胞及びT細胞上に結合する必要がある(シグナル2)。最適なT細胞活性化を達成するには、シグナル1及び2の両方が必要である。それに対して、共刺激(シグナル2)がない場合の抗原性ペプチド刺激(シグナル1)は、完全なT細胞活性化を誘導できず、T細胞トレランスを生じる可能性がある。共刺激分子の他に、CTLA-4及びPD-1等の阻害的分子が存在し、T細胞の活性化を阻害するためのシグナルを誘導する。

【0138】

従って、自己由来又は非自己由来T細胞を、本発明のポリペプチドの存在下で刺激し、増殖し、そして、その癌細胞が対応する本発明のポリペプチドを発現するような癌に罹患するリスクのある患者又はその癌に罹患している患者へ再導入してもよいが、それは、その抗原特異的なTCRが、患者のMHCにより提示された抗原を認識し、その対応するポリペプチドを発現する癌細胞を標的とし、その細胞の死滅を誘導するであろう場合に限られる。

【0139】

1の実施態様では、癌に罹患しているヒト由来のT細胞の生体外での刺激及び／又は増幅に使用するための、次に、その刺激及び／又は増幅したT細胞を、そのヒトの癌を治療するためにそのヒトへ再導入するための、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物が提供される。

【0140】

本発明は、ヒトの癌の治療方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現し、その方法は、そのヒトから、任意で抗原提示細胞と共に、少なくともT細胞を含む白血球集団を取り出すこと、そのT細胞を、対応する本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物の存在下で、刺激及び／又は増幅すること、並びに、少なくとも刺激及び／又は増幅されたT細胞を含むその白血球の一部又は全てを、そのヒトへ再導入すること、を含む、前記方法を提供する。

【0141】

前記実施態様のいずれか1つでは、適切には、癌はメラノーマ、特に皮膚メラノーマである。

【0142】

1の実施態様では、配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する癌細胞に対して細胞傷害性であるT細胞集団を調製するためのプロセスであって

10

20

30

40

50

、(a)T細胞及び抗原提示細胞を癌患者から得ること、並びに、(ii)生体外でそのT細胞集団を、本発明の対応するポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物で刺激及び増幅すること、を含む、前記プロセスが提供される。

【0143】

本文脈においての「対応する」とは、癌細胞が、配列番号1若しくはその変異体又はその免疫原性断片を発現する場合に、T細胞集団が、ポリペプチド、核酸若しくはベクター、又は前記の一つを含む組成物の形の配列番号1若しくはその変異体又はその免疫原性断片により、生体外で刺激及び増幅されることを意味する。

【0144】

例えば、そのようなプロセスでは、培養及び増殖は樹状細胞の存在下で行われる。その樹状細胞は、本発明の核酸分子又はベクターでトランスフェクトされて、本発明のポリペプチドを発現するであろう。

【0145】

本発明は、前記プロセスのいずれかによって取得可能なT細胞集団(これ以降、本発明のT細胞集団と称する)を提供する。

1の実施態様では、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター又は組成物で刺激されたT細胞である細胞(これ以降、本発明のT細胞と称する)が提供される。

【0146】

1の実施態様では、本発明のT細胞集団又はT細胞を、医薬として許容し得るキャリアと共に含む、医薬組成物が提供される。そのような組成物は、例えば、非経口投与に適した無菌組成物でもよい。

1の実施態様では、医薬で使用するための本発明のT細胞集団又はT細胞が提供される。

【0147】

同様に、癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、本発明のT細胞集団若しくはT細胞又は本発明のそのT細胞集団若しくはT細胞を含む組成物をそのヒトへ投与することを含む、前記方法が提供される。

【0148】

1の実施態様では、ヒトの癌の治療又は予防に使用するための本発明のT細胞集団、本発明のT細胞、又は本発明のそのT細胞集団若しくはT細胞を含む組成物であって、その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現する、本発明のT細胞集団、本発明のT細胞又は本発明のT細胞集団若しくはT細胞を含む組成物が提供される。前記実施態様のいずれか1つでは、適切には、癌はメラノーマ、特に皮膚メラノーマである。

【0149】

1の実施態様では、本発明の使用のためのプロセス、方法、又はT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム若しくは組成物であって、そのポリペプチドが下記から選ばれる配列を含み：

(a) 配列番号1の配列;並びに

(b) (a)の配列の変異体;及び、

(c) (a)の配列の免疫原性断片、

かつ例えば、そのポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、又はその配列からなり、かつ例えば、その核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、又はその配列からなり;そして

その癌はブドウ膜メラノーマである、前記調製方法、方法、又はT細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、エクソソーム若しくは組成物が提供される。

【0150】

(遺伝子操作した免疫細胞による療法)

前記の全ての種類のCLT抗原結合ポリペプチドの誘導体は、ヒトHLA分子と複合体を形成したCLT抗原由来ペプチドを認識するTCR又はTCR模倣物(Dubrovskyらの文献、2016, Oncoimmunologyを参照)を含み、遺伝子操作して(自己由来又は非自己由来)T細胞の表面上に発現させ、次にそれを癌治療のための養子T細胞療法として投与してもよい。

【0151】

これらの誘導体は、「キメラ抗原受容体(CAR)」カテゴリーに分類され、本明細書で使用される場合、例えば、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、又はキメラ免疫受容体を指すこともあり、人工的な特異性を特別な免疫エフェクター細胞へ与えるよう操作された受容体を含み得る。CARを、T細胞ヘモノクローナル抗体の特異性を付与するために使用してもよく、それによって、例えば養子細胞療法で使用するための多数の特異的T細胞が生成可能となる。CARは、細胞の特異性を、HLAと結合している本発明のポリペプチドである腫瘍関連抗原に対して向けるであろう。

10

【0152】

患者の癌を治療するための別のアプローチは、腫瘍細胞上に発現される抗原を標的とするようにT細胞を遺伝子的に改変することであり、キメラ抗原受容体(CAR)の発現を介する。この技術は、Wendell及びJuneの文献、2017, Cell, 168:724-740(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)でレビューされている。

【0153】

このようなCAR T細胞は、T細胞又はT細胞前駆体を含む細胞サンプルを、対象から、例えば、末梢血、臍帯血から及び／又はアフエーシスにより得て、その細胞を、HLAと結合している本発明のポリペプチドに免疫特異的であるキメラT細胞受容体(CAR)をコードする核酸で、トランスフェクトする方法により作製してもよい。そのような核酸は、細胞のゲノム内に組み込むことができるであろうし、その細胞の有効量をその対象へ投与して、本発明のポリペプチドを発現する細胞に対してT細胞応答を提供することもできる。例えば、その対象から細胞サンプルを採取してもよい。

20

【0154】

前記CAR発現T細胞を作製するために使用される細胞は、自己由来でも非自己由来でもよいことが理解される。

遺伝子導入CAR発現T細胞は、内因性T細胞受容体の不活性化及び／又は内因性HLAの不活性化を示すものでもよい。例えば、細胞を、内因性 α/β T細胞受容体(TCR)の発現を排除するように操作してもよい。

30

【0155】

細胞のトランスフェクション方法は当分野で周知であるが、エレクトロポレーション等の非常に効率的なトランスフェクション法を使用することもできる。例えば、CAR構築物を発現する本発明の核酸又はベクターは、「ヌクレオフェクション(nucleofection)」装置を使用して細胞に導入してもよい。

【0156】

CAR発現T細胞のための細胞集団を、細胞のトランスフェクション後に富化してもよい。例えば、CAR発現細胞を、CARによって結合された抗原又はCAR結合抗体の使用により、発現しない細胞から(例えば、FACSにより)選別できる。それとは別な富化ステップには、非T細胞を枯渇させることや、CAR発現しない細胞を枯渇させることも含まれる。例えば、CD56+細胞を、培養集団から枯渇させることができる。

40

【0157】

遺伝子導入CAR発現細胞の集団を、CAR発現T細胞の増殖を選択的に増強する培地内で、生体外培養してもよい。従って、CAR発現T細胞を生体外増殖することができる。

【0158】

CAR細胞のサンプルを、保存(又は培養物で維持)してもよい。例えば、サンプルは、後の増殖又は分析のために凍結保存してもよい。

CAR発現T細胞は、他の治療法、例えばPD-L1アンタゴニストを含むチェックポイント

50

ト阻害剤と組み合わせて使用してもよい。

【0159】

1の実施態様では、その表面上に前記抗原結合ポリペプチドのいずれかを発現するように操作された細胞傷害性細胞が提供される。適切には、細胞傷害性細胞はT細胞である。

【0160】

1の実施態様では、医薬で使用するための、その表面上に前記抗原結合ポリペプチドのいずれかを発現するように操作された、好適にはT細胞である細胞傷害性細胞が提供される。

本発明は、好適にはT細胞である、本発明の細胞傷害性細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0161】

癌に罹患しているヒト患者を治療する方法であって、その癌の細胞が配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現する、前記方法、又は、ヒトを癌の罹患から予防する方法であって、その癌は配列番号1並びにその免疫原性断片及び変異体から選ばれる配列を発現するであろう、前記方法であって、本発明の細胞傷害性細胞、好適にはT細胞をそのヒトへ投与することを含む、前記方法が提供される。

【0162】

1の実施態様では、本発明の細胞傷害性細胞、好適にはT細胞は、ヒトの癌の治療又は予防に使用するためのものであり、その癌の細胞は配列番号1及びその免疫原性断片から選ばれる対応する配列を発現するものである。

【0163】

(併用療法)

本発明の癌の治療方法は、他の療法、特にチェックポイント阻害剤及びインターフェロンと組み合わせて行ってもよい。

ポリペプチド、核酸、ベクター、抗原結合ポリペプチド、及び(APC及びT細胞ベースの)養子細胞療法は、それらの免疫原性を高める(例えば、惹起する免疫応答の大きさ及び/又は範囲を改善する)ために、又は他の活性(例えば、先天性免疫応答若しくは適応免疫応答の他の態様の活性化、又は腫瘍細胞の破壊等)を提供するために操作された他のコンポーネントと組み合わせて使用できる。

【0164】

従って、本発明は、本発明の組成物(即ち、免疫原性の、ワクチン若しくは医薬組成物)、又は、それら幾つかの組成物のキットであって、医薬として許容し得るキャリアと一緒に本発明のポリペプチド、核酸、又はベクター、並びに;(i)1以上の更なる免疫原性若しくは免疫賦活ポリペプチド(例えば、インターフェロン、IL-12、チェックポイント阻害分子若しくはそれをコードする核酸、若しくはその核酸を含むベクター)、(ii)小分子(例えば、HDAC阻害剤又は、癌細胞の後生的なプロファイルを変更する他の薬剤)又は生物製剤(ポリペプチド若しくはそれをコードする核酸、若しくはその核酸を含むベクターとして送達される)であって、本発明の対象であるポリペプチド産物の翻訳及び/又は提示を増強するもの、を含むものを提供する。

【0165】

チェックポイント阻害剤は、癌細胞上の正常なタンパク質、又は、それらに応答するT細胞上のタンパク質をブロックするものであり、それら阻害剤が免疫系の攻撃に対する癌の主要な防御の1つを克服しようとするために、CLT抗原ベースの療法と組み合わせるための特に重要な種類の薬剤となり得る。

【0166】

従って、本発明の1の態様は、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、抗原結合ポリペプチド、組成物、T細胞、T細胞集団、又は抗原提示細胞を、チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与することを含む。チェックポイント阻害剤の例は、ペンブロリズマブ、(キイトルーダ)及びニボルマブ(オブジーボ)等のPD-1阻害剤、アテゾリズマブ(テセントリク)、アベルマブ(バベンシオ)及びデュルバルマブ(イミフィンジ)等のPD-L1阻害剤

10

20

30

40

50

、並びにイピリムマブ(ヤーボイ)等のCTLA-4阻害剤から選ばれる。

【0167】

インターフェロン(α 、 β 及び γ 等)は、身体がごく少量産生するタンパク質ファミリーである。インターフェロンは、癌細胞分裂を遅延又は停止させ、癌細胞が免疫系から自分自身を守る能力を低下させ、及び/又は、適応免疫系の複数の態様を強化し得る。インターフェロンは、通常、例えば大腿部又は腹部に皮下注射で投与される。

【0168】

従って、本発明の1の態様は、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、抗原結合ポリペプチド又は組成物の、インターフェロン、例えばインターフェロン α と組み合わせた投与を含む。

【0169】

又、本発明の異なる様式を組み合わせてもよく、例えば、本発明のポリペプチド、核酸及びベクターを、本発明のAPC、T細胞又はT細胞集団と組み合わせてもよい(下記に記載される)。

本発明の1以上の様式は又、従来の抗癌化学療法及び/又は放射線療法と組み合わせてもよい。

【0170】

(診断)

別の態様では、本発明は、癌、特にメラノーマ、例えば皮膚メラノーマを診断するために、又は、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、抗原結合ポリペプチド、養子細胞療法、若しくは組成物によって治療するのに適したヒト対象を診断するために、1以上の本発明のポリペプチド又は核酸を使用する方法を提供する。

【0171】

従って、本発明は、ヒトが癌に罹患していることを診断する方法であって、その癌の細胞が、配列番号1及びその免疫原性断片若しくは変異体から選ばれるポリペプチド配列(例えば、配列番号2、配列番号5若しくは配列番号6のいずれか1つの配列)、又はそのポリペプチド配列をコードする核酸(例えば、配列番号3及び4の配列から選ばれる)を発現するかどうかを決定するステップ、並びに、そのポリペプチド若しくは対応する核酸がその癌細胞内で過剰発現している場合に、そのヒトが癌に罹患していると診断するステップを含む、前記方法を提供する。

本明細書で使用される、癌細胞内で「過剰発現している」とは、癌細胞内の発現レベルが正常細胞内より高いことを意味する。

【0172】

本発明は、皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマである癌に、ヒトが罹患していることを診断する方法であって、その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片若しくはその変異体から選ばれるポリペプチド配列、又はそのポリペプチド配列をコードする核酸を発現するかどうかを決定するステップ、並びに、そのポリペプチド若しくは対応する核酸がその癌細胞内で過剰発現している場合に、そのヒトが皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマである癌に罹患していると診断するステップ、を含む、前記方法を提供する。

【0173】

過剰発現は、癌を有さないことがわかっている対照ヒト対象内の、本発明の核酸又はポリペプチドのレベルを参照することによって決定できる。従って、過剰発現は、本発明の核酸又はポリペプチドが、対照対象よりも試験対象において有意に高いレベル(例えば、30%、50%、100%又は500%高いレベル)で検出されることを示す。対照ヒト対象が本発明の核酸又はポリペプチドを検出不能なほど低いレベルで有する場合、本発明の核酸又はポリペプチドの検出時点で診断ができる。

【0174】

本発明は又、癌に罹患しているヒトを治療する方法であって:

(a) その癌の細胞が配列番号1及びその免疫原性断片若しくはその変異体から選ばれるポリペプチド配列(例えば、配列番号2、配列番号5及び配列番号6のいずれかの配列)

10

20

30

40

50

、又はそのポリペプチドをコードする核酸(例えば、配列番号3及び4の配列から選ばれる)を発現するかどうかを決定するステップ;並びに、もし発現するならば、

(b) そのヒトへ、本発明の対応するポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、T細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、抗原結合ポリペプチド又は細胞傷害性細胞を投与するステップ、を含む、前記方法を提供する。

【0175】

同様に、癌に罹患しているヒトの腫瘍から単離された、

(a) 配列番号1の配列;若しくは

(b) (a)の配列の変異体;及び、

(c) (a)の配列の免疫原性断片、

から選ばれる配列を含むポリペプチドの使用、又はそのポリペプチドをコードする核酸の使用であって、そのヒトが、本発明の対応するポリペプチド、核酸、ベクター、組成物、T細胞集団、T細胞、抗原提示細胞、抗原結合ポリペプチド又は細胞傷害性細胞を含むワクチンによる治療に適しているであろうかどうかを決定するためのバイオマーカーとしての、前記使用が提供される。

適切には、癌はメラノーマ、特に皮膚メラノーマである。

【0176】

本発明は又、ポリペプチドが下記から選ばれる配列を含み:

(a) 配列番号1の配列;並びに

(b) (a)の配列の変異体;及び

(c) (a)の配列の免疫原性断片、

かつ例えば、そのポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、及び配列番号6のいずれか1つの配列を含むか、又はその配列からなり、かつ例えば、その核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を含むか、又はその配列からなり;そしてその癌はブドウ膜メラノーマである、本発明の方法又は使用を提供する。

【0177】

好適には、本発明のポリペプチドは、配列番号1、又はその免疫原性断片等の断片(例えば、配列番号2、配列番号5及び配列番号6のいずれか1つの配列)から選ばれる配列を有する。

好適には、本発明の核酸は、配列番号3及び4のいずれか1つから選ばれる配列を有するか含む。

【0178】

核酸の存在を検出するためのキットは周知である。例えば1つのポリヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むキットを、リアルタイムPCR(RT-PCR)反応で使用してもよく、特定の核酸の検出及び半定量化が可能になる。このようなキットは、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)の結果としての蛍光シグナルの発生によって(例えば、TaqMan(登録商標)キット)又は二本鎖DNAの結合において(例えば、SYBR(登録商標)Greenキット)、PCR産物の検出を可能にするであろう。幾つかのキット(例えば、標的DNAの複数のエクソンをスパンするTaqMan(登録商標)プローブを含むもの)は、mRNA、例えば本発明の転写産物コード化核酸の検出及び定量化を可能にする。ある種のキットを使用するアッセイは、マルチプレックス形式で設定されて、1の反応内で同時に複数の核酸を検出するであろう。活性なDNA(即ち、発現を示す特別な後成的特徴を有するDNA)を検出するためのキットも又、使用してもよい。そのようなキット内に存在し得る追加的コンポーネントには、本発明の核酸の検出を容易にする診断用試薬又はレポーターが含まれる。

【0179】

本発明の核酸は又、患者からの血液サンプルを使用して、液体生検で検出してもよい。このような手順は、外科的生検に代わる非侵襲的生検を提供する。そのような血液サンプルからの血漿を単離して、本発明の核酸の存在について分析することができる。

【0180】

本発明のポリペプチドは、ELISA型アッセイにおいて抗原特異的抗体を使用して検出してもよく、それは、患者の腫瘍サンプルをホモジェナイズした調製物中の本発明のポリペプチドを検出するものである。或いは、本発明のポリペプチドは、免疫組織化学的分析によって検出してもよく、それは、適切に標識した抗体調製物を使用して染色した患者腫瘍サンプルの切片を、光学顕微鏡を使用して検査して、ポリペプチド抗原の存在を同定するものである。更なる代替としては、本発明のポリペプチドは、免疫組織化学的分析によって検出してもよく、それは、適切に標識した抗体調製物を使用して染色した患者腫瘍サンプルの切片を、光学顕微鏡を使用して検査して、ポリペプチド抗原の存在を同定するものである。

【0181】

本発明のポリペプチドは又、それらが、そのポリペプチドに対する反応性を上昇させたT細胞を刺激できるかどうかを決定することによって検出してもよい。

【0182】

ヒトの癌、特にメラノーマ、例えば皮膚メラノーマの治療方法は、(i)本発明の核酸又はポリペプチドの存在を検出すること、及び(ii)その対象へ、本発明の核酸、ポリペプチド、ベクター、細胞、T細胞若しくはT細胞集団又は組成物を投与すること、(好ましくは、検出されたものと同じ核酸若しくはポリペプチド又はその断片を投与すること)を含む。

【0183】

ヒトの癌、特にメラノーマ、例えば皮膚メラノーマの治療方法は又、(好ましくは、同じ)本発明の核酸又はポリペプチドの存在が検出されている対象へ、本発明の核酸、ポリペプチド、ベクター、細胞、T細胞若しくはT細胞集団又は組成物を投与することを含む。

【0184】

特に、診断され、かつ可能であれば、治療される癌は、メラノーマ、例えば皮膚メラノーマである。

配列番号1又はその断片である本発明のポリペプチドが検出された場合、その癌は皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマの可能性がある。

【0185】

(特別な実施態様)

1の実施態様では、CLT抗原ポリペプチドは配列番号1を含むか、又はそれからなる。断片の例示は、配列番号配列番号2、配列番号5及び配列番号6のいずれか1つを含むか、又はそれからなる。そのポリペプチド配列をコードする核酸の例示は、配列番号3又は4を含むか、又はそれからなる。上掲の、対応する核酸(例えば、DNA又はRNA)、T細胞、T細胞集団、細胞傷害性(cytocotic)細胞、抗原結合ポリペプチド、抗原提示細胞及びエクソソームが提供される。この核酸(例えば、DNA又はRNA)、T細胞、T細胞集団、細胞傷害性細胞、抗原結合ポリペプチド、抗原提示細胞及びエクソソームは、癌、特にメラノーマ、例えば、皮膚メラノーマ又はブドウ膜メラノーマの治療に使用され得る。関連する診断方法も又、提供される。

【実施例】

【0186】

(実施例)

(実施例1-CLT特定)

この目的は、完全に又は部分的にLTRエレメントからなる癌特異的転写産物を特定することであった。

第一ステップとして、包括的な癌種横断的トランスクリプトームをデノボでアセンブリ解析した。これを達成するために、癌ゲノムアトラス(TCGA)コンソーシアムから入手し、多種多様な癌種(それぞれ32の癌種(31の原発性及び1の転移性メラノーマ)に由来する、性別バランスの取れた24個のサンプル;表S1)を代表する、768個の患者サンプルからのRNAシーケンシングリードを、ゲノムガイドアセンブリに使用した。この性別バランスの取れた(性固有組織を除く)サンプルを、アダプターとして、cutadapt(v1.13)(Ma

10

20

30

40

50

rcel Mの文献、2011, EMBnet J., 17:3)を使用して、品質(Q20)トリムして長さフィルタ処理し(リードは両方共、35以上のヌクレオチド対)、そしてkhmer(v2.0)(Crusoeらの文献、2015, F1000Res., 4:900)を使用して、最大及び最小深度がそれぞれ200及び3であるkmer正規化(k=20)を行った。リードを、TCGA全体で使用されるものと同じ設定でSTAR(2.5.2b)を使用してGRCh38にマッピングし、Trinity(v2.2.0)(Trinity, Grabherr, M.G.らの文献、2011, Nat. Biotechnol., 29:644-52)にかけて、組み込まれているインシリコ深度正規化を無効化してゲノムガイドアセンブリを行った。アセンブリプロセスの大部分は、32コアHPCノード上の256GB RAM内で完了し、失敗したプロセスは1.5TB RAMノードを使用して再実行した。得られたコンティグを、ポリ(A)トリムし(SeqClean v110222のtrimpoly使用)、エントロピーフィルタ処理(≥ 0.7)して、低品質で人工的なコンティグ(BBMap v36.2内のbbduk)を除去した。癌種ごとに、元の24のサンプルをSalmon(v0.8.2又はv0.9.2)(Patro,R.らの文献、2017, Nat. Methods, 14:417-419)を使用してクリーンにしたアセンブリへ、準マッピングし、100万あたりの転写産物(TPM)<0.1の発現しか見られなかったコンティグを削除した。残りのものを、GMAP(v161107)(Wuらの文献、2005, Bioinf., 21:1859-1875)を使用してGRCh38へマッピングし、その長さの85%以上にわたって85%以上の同一性を持ってアラインしないコンティグをアセンブリから削除した。最後に、全ての癌種と一緒にしたアセンブリを平坦化し、gffread (Cufflinks v2.2.1)(Trapnellらの文献、2010, Nat. Biotech., 28:511-515)を使用してマージし、最長の連続転写産物とした。このアセンブリプロセスは反復エレメントの評価を可能にするように特別に設計したので、モノエクソン性転写産物は保持されたがフラグ付けされた。転写産物アセンブリの完全性及び品質を、GENCODE v24basic及びMiTranscriptome1(Iyerらの文献、2015, Nat. Genet., 47:199-208)との比較によって評価した。GENCODEで示された固有のスプライス部位のリストをコンパイルし、そのスプライス部位が2ヌクレオチド猶予ウィンドウ内で、トランスクリプトームアセンブリ内に存在するかどうかを検査した。このプロセスにより、1,001,931個の転写産物を特定し、そのうち771,006個がスプライシングされ、230,925個がモノエクソン性である結果を得た。

【0187】

これとは別に、アセンブリしたコンティグをゲノム反復配列アノテーションで重ねて、LTRエレメントを含む転写産物を特定した。LTR及び非LTRエレメントを、既に記載されている通りアノテーションした(Attigらの文献、2017, Front. In Microbiol., 8:2489)。簡略に説明すると、公知のヒト反復ファミリーを表す隠れマルコフモデル(HMM)を使用し(Dfam 2.0ライブラリv150923)、RepeatMasker Open-3.0(Smit, A., R. Hubley及びP. Greenの文献、<http://www.repeatmasker.org>,1996-2010)を使用してGRCh38をアノテーションし、nhmmerで構成した(Wheelerらの文献、2013, Bioinform., 29:2487-2489)。HMMベースのスキャンは、BLASTベースの方法(Hubleyらの文献、2016, Nuc. Acid. Res., 44:81-89)と比較してアノテーション精度を向上させる。RepeatMaskerは、LTR及び内部領域を別々にアノテーションするため、表形式の出力を解析して、同じエレメントのために隣接するアノテーションをマージした。このプロセスで、1以上の完全な又は部分的なLTRエレメントを含む181,967個の転写産物を得た。

【0188】

Salmonを使用して全ての転写産物の100万あたりの転写産物(TPM)量を推定し、各癌種内の発現を、811個の健康な組織サンプル(利用可能な場合はTCGAから、それ以外はGTEx (The Genotype-Tissue Expression Consortium, 2015, Science, 348:648-60)から入手した、全ての癌種用の、組織が一致する健康対照)における発現と比較した。転写産物は、いずれかのサンプル内で1 TPMを超えて検出された場合は癌内で発現されていると見なし、そして下記基準が満たされる場合は癌特異的であると見なし:(i)各癌種の24サンプル中、6以上で発現する;(ii)全ての健康な組織サンプルの90%以上では、10TPM未満で発現する;(iii)標的の癌種では、任意の対照組織種での発現中央

10

20

30

40

50

値の3倍以上で発現する;及び、(iv)標的の癌種では、それぞれの入手可能な健康組織の第90パーセンタイルの3倍以上で発現する。

【0189】

次に、癌特異的転写産物のリストを、完全な又は部分的なLTRエレメントを含む転写産物のリストと交差させて、全ての基準を満たす5,923個の転写産物のリストを作成した(癌特異的LTRエレメント-スパンニング転写産物のためのCLTと称する)。

【0190】

更にキュレーションを、メラノーマで特異的に発現する403個のCLTで行い、ミスアセンブリされた可能性のあるコンティグ及び細胞遺伝子のアセンブリに対応するものを除外した。追加的なマニユアル評価を実施して、スプライシングパターンが、元のRNAシーケンシングリードによってサポートされていたことを確認した。CLTを更にトリアー

10

ジして、いずれかのGTEx正常組織での発現中央値が1TPMを超えたものを廃棄した。皮膚メラノーマに関する403個のCLT中、97個のCLTがこれらのフィルタを通過した。

【0191】

(実施例2-免疫ペプチドーム分析)

質量分析(MS)-ベースの免疫ペプチドーム分析は、HLA分子(HLAp)に関連し、細胞表面に提示されている特定の(specific)ペプチドの直接的検出を可能にする強力な技術である。この技術は、細胞又は組織等の生物学的サンプルからの、抗HLA抗体捕捉によるHLApのアフィニティ精製からなる。単離されたHLA分子及び結合されたペプチドは、次に互いに分離され、溶出したペプチドをナノ超高速液体クロマトグラフィ質量分析(nUPLC-MS)により分析する(Freudenmannらの文献、2018, Immunology 154(3):331-345)。質量分析では、定義された電荷対質量比(m/z)を持つ特定のペプチドを選択し、単離し、断片化し、その後2回目の質量分析(MS/MS)にかけて、検出された断片イオンのm/zを得る。次に、この断片化スペクトル(MS/MS)を照合すると、検出された断片イオンを発生させた選択されたペプチドのアミノ酸配列を正確に同定することができる。

20

【0192】

MS/MSスペクトル解釈及びそれに続くペプチド配列の特定は、実験データと、参照データベース中に含まれるペプチド配列から作製される理論的スペクトルとが一致することに依存している。公知のトランスクリプトーム、それどころかゲノム全体に由来する全てのオープンリーディングフレーム(ORF)に対応する、既に定義されたリストを使用してMSデータを検索することは可能であるが(Nesvizhskiiらの文献、2014, Nat. Methods 11:1114-1125)、これらの超巨大な配列データベースの照合は、非常に高い誤検出率(FDR)につながるため、提示されたペプチドの特定が制限される。更に、技術的問題(例えば、ロイシン質量=イソロイシン質量)、及び理論的問題(例えば、ペプチドスプライシング(Liepeらの文献、2016, Science 354(6310):354-358))は、公知のトランスクリプトーム又はゲノム全体から作成されたデータベース等の、超巨大データベースの使用に関連する制限を増大させる。従って、実際上は、可能性のあるポリペプチド配列の明確に定義されたセットを参照せずに、正確な免疫ペプチドーム分析を実行して新規な抗原を特定することは非常に困難である(Liらの文献、2016, BMC Genomics 17 (増補13):1031)。

30

【0193】

従って、本発明者らは、実施例1の97個の皮膚メラノーマCLTに由来する10残基以上の全ての予測されたポリペプチド配列(ORF)のデータベースを構築した。これにより、長さ10~207アミノ酸の範囲の2,269個のORFを得た。

【0194】

Bassani-Sternbergらは、25人の皮膚メラノーマ患者から由来するHLA結合ペプチドサンプルから収集されたMS/MSデータを、ヒトプロテオーム全体について報告されたポリペプチドに対して照合した(Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Commun., 7:13404; データベースリンク: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/p>

50

rojects/PXD004894)。これらの分析により、公知のヒトタンパク質と一致する数万のペプチドが明らかになった。予測された通り、これらのペプチドは、PRAME、MAGE A3、及びTRPM1(メラスタチン)を含む、複数の腫瘍関連抗原(TAA)内で発見されるペプチドを含むものであった。

【0195】

免疫ペプチドーム評価の詳細な知識を適用することにより、本発明者らは、PEAKS(商標)ソフトウェア(v8.5及びvX、Bioinformatics Solutions Inc)を使用して、ヒトプロテオーム(UniProt)内で見つかる全てのポリペプチド配列と並べてPXD004894 HLAクラスIデータセットからのスペクトルを照合した。細胞内に見られるクラスI HLA結合ペプチドの大部分は、恒常的に発現されるタンパク質に由来するため、これらデータベースのUniProtプロテオームとの同時照合は、本発明者らのCLT ORF配列のMS/MSスペクトルへの割り当てが正しいことを確認するのに役立つ。PEAKSソフトウェアは、他のMS/MS照合ソフトウェアと同様に、スペクトルの各割り当てに有意確率(p値)(-10lg P;表1参照)を割りふって、その割り当てを定量化する。

【0196】

これらの研究の結果は50を超える個々のペプチドを特定したが、それらはBassani-Sternbergらによって検査された25人の患者由来の腫瘍サンプルから免疫沈降させたHLAクラスI分子に関連し、これらは、CLT由来ORFのアミノ酸配列に対応し、公知のヒトプロテオーム(UniProt)内に存在するポリペプチド配列には対応しないものであった。

【0197】

PEAKSソフトウェアによって割り当てられたペプチドスペクトルを更にマニュアル評価し、その評価をCLT由来ORFにマッピングされたペプチドへのスペクトルの割り当てを確認するために使用し、その結果CLT抗原として定義した。1のペプチドが、45-コドンORFにマッピングされたBassani-SternbergのMS/MSデータセット中に反復的に観察され、CLT抗原1として定義した(表1;配列番号1)。

【0198】

HLAクラスI分子に関連するこれらのペプチドの反復的検出は、CLT抗原1(配列番号1)がメラノーマ組織内で翻訳され、HLAクラスI経路を介してプロセッシングされ、最後にHLAクラスI分子との複合体として免疫系へ提示されることを示すものである。表1は、3人の患者で検出され、このCLT抗原にマッピングされたペプチドの特性を示す。図1は、表1に示すペプチドを含む、1の患者サンプルから得られた代表的なMS/MSスペクトルを示す。図1の上のパネルは、MS/MSペプチド断片プロファイルを、標準的MS/MSアノテーションと共に示す(b:N末端断片イオン;y:C末端断片イオン;-H₂O:水損失;-NH₃:アンモニア損失;[2+]:二価帯電ペプチドイオン;pre:断片化されていない前駆体ペプチドイオン;a_n-n:内部断片イオン)。図1の上のパネルは、最も豊富な断片イオンピークの抽出を示し、それはPEAKSソフトウェアにより割り当てられ、PRIDE データベース(Bassani-Sternberg et al., 2016, Nature Commun., 7: 13404; データベースリンク: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>)から得られた。図1の下のパネルは、断片イオンへマッピングされた線形ペプチド配列の位置を示すスペクトルのレンダリングを示す。表1のペプチドに割り当てられた高い-10lgPスコアと矛盾しないので、このスペクトルは、これら分析で発見されたペプチド配列(配列番号2)と正確に一致する多数の断片を含む。

【0199】

表1のHLAクラスIに関連して検出されたペプチドを、NetMHCpan 4.0予測ソフトウェア(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>)を使用して評価し、患者のHLAクラスIタイプA分子及びタイプBへの結合の予測強度を決定した。これらの予測研究の結果は、このペプチドが、両方のタイプの患者に見られるHLAクラスI B07:02対立遺伝子への強い結合が検出されることを示した(表2を参照)。このCLT抗原由来ペプチドが、両方のタイプの患者に見られたHLA対立遺伝子の一つへ結合すると予想された事実は、それらの検出結果と矛盾しない。

10

20

30

40

50

【0200】

腫瘍組織由来MSスペクトルの、本発明者らが発見したペプチド配列への割り当ての更なる確実性を提供するために、この発見した配列を有するペプチドを合成し、元の研究の腫瘍サンプルへ適用したのと同じ条件を使用してnUPLC-MS²にかけた(Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Commun., 7: 13404)。この合成ペプチド及び選択した内因性ペプチドのスペクトル比較を図2に示す。この図中、上のスペクトルは腫瘍サンプルに対応し(PRIDEデータベースより(Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Commun., 7: 13404; データベースリンク: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>))、下のスペクトルは同じ配列の合成的に調製したペプチドに対応する。検出されたイオン断片の選択したm/z値は、これらMS/MSスペクトルの上/下の各断片ピークに示される。この図は、断片の正確なアラインメントを明白にし(腫瘍由来及び合成ペプチド由来の断片イオン間の実験的に決定されたm/z値間のわずかな違いは、<0.05ダルトンの断片許容範囲内に収まっている)、腫瘍組織由来スペクトルのCLTコード化されたペプチドスペクトルに対する割り当ての信憑性を確認する。

10

【0201】

まとめると、表1及び2、並びに図1～2に示されるデータは、メラノーマ患者内の対応するCLT抗原の翻訳、プロセッシング及び提示の非常に強力なサポートを提供する。

【0202】

このCLTの癌特異性を更に確認するために、本発明者らは、37個の正常組織サンプル(10個の正常皮膚、9個の正常肺及び18個の正常乳房組織)を処理し、免疫ペプチドーム分析用に調製した。本発明者らは、これら正常組織サンプルからのHLAクラスIデータセットのスペクトルを照合し、CLT抗原1のポリペプチド配列に由来する、全ての可能なペプチド配列を検索した。CLT抗原1由来のペプチドは、正常組織サンプルのセット内で検出されず(表3)、このCLTが癌特異的発現を示すことを追加的に確認した。

20

【0203】

要約すると、予測されたORFに由来する、免疫ペプチドームのペプチドの反復的特定は、このCLT(配列番号3)が腫瘍組織内でポリペプチド(配列番号1;CLT抗原1と称する)へ翻訳されることを示す。よって、この抗原は細胞の免疫監視装置によりプロセッシングされ、ペプチドコンポーネント(例えば、配列番号2)はHLAクラスI分子にロードされ、生じたペプチド/クラスI複合体を認識するT細胞により、その細胞が細胞溶解の標的となることを可能とする。従って、CLT抗原1及びその断片は、その腫瘍がこれらの抗原を発現する患者のメラノーマの治療のための、様々な治療的モダリティにおいて有用であることが予測される。

30

【0204】

(表1:SKCM腫瘍サンプルの免疫ペプチドーム分析によって特定されたペプチドのリスト、並びに、CLT抗原名及び配列番号との相互参照)

【表1】

ペプチド配列 ¹	ペプチド配列番号	CLT抗原番号	CLT抗原配列番号	患者番号 ²	ペプチド質量 ³	ペプチド長さ	-10lgP ⁴	スペクトル数 ⁵	Ppm ⁶
LPRTPRPDLIL	配列番号2	1	配列番号1	Mel 8	1289.7819	11	22.53	2	2.3
LPRTPRPDLIL	配列番号2	1	配列番号1	Mel 16	1289.7819	11	28.23	5	7
LPRTPRPDLIL	配列番号2	1	配列番号1	Mel 29	1289.7819	11	28.79	1	-1.4

40

¹:質量分析により特定されたHLAクラスIペプチド。

²:Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Comm., 7: 13404。

50

3:算出ペプチド質量。

4: PEAKS(商標)プログラム-10lgP値は、1を超える検出スペクトルが得られたペプチド/患者と最も高く一致するペプチドについて示す。

5:ペプチドが検出されたスペクトルの数。

6:観測質量及び算出質量の間の偏差; 1を超えるスペクトルが得られたペプチドについて、選択したppm値を示す。

【0205】

(表2:質量分析で特定されたペプチドの、患者のHLAタイプへの予測されたNetMHCpan4.0結合)

【表2】

ペプチド	患者 ¹	A1 対立遺伝子 ¹	ランク スコア ²	A2 対立遺伝子	ランク スコア ²	B1 対立遺伝子	ランク スコア ²	B2 対立遺伝子	ランク スコア ²
LPRTPRPDLIL	Mel8	A01:01	25.34	A03:01	45.75	B07:02	0.18	B08:01	4.50
LPRTPRPDLIL	Mel16	A01:01	25.34	A24:01	23.32	B07:02	0.18	B08:01	4.50
LPRTPRPDLIL	Mel29	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-

¹:Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Comm., 7: 13404; NA = 該当なし

²:NetMHCpan 4.0からの予測ランクスコア(%); 0.5%≧未満のスコアは、強い結合を予測する。

【0206】

(表3:正常組織サンプルセット中の、CLT抗原1~8由来のペプチドの数)

【表3】

抗原	皮膚	肺	乳
CLT抗原1	0/10	0/9	0/18

【0207】

本明細書の実施例1及び2に示された結果の全体又は一部は、癌ゲノムアトラス(TCGA)研究ネットワーク(<http://cancergenome.nih.gov/>)及び遺伝子型-組織発現(GTEX)プロジェクト(国立衛生研究所(NIH)所長室の共通基金、並びにNCI、NHGRI、NHLBI、NIDA、NIMH及びNINDSによってサポートされている)によって生成されたデータに基づいている。

【0208】

(実施例3-メラノーマ患者内のCLT抗原に対するT細胞特異性を示すためのアッセイ)

(a) CLT抗原ペプチドペンタマーでの反応性T細胞の染色)

メラノーマ患者内のCLT抗原に特異的な循環性CD8T細胞の存在及び活性は、HLAクラスI/ペプチドペンタマー(「ペンタマー」)染色及び/又はインビトロ殺傷アッセイを使用して測定できる。従って、実施例1及び2(表1~3、図1~2)で説明された方法を使用して発見されたCLT抗原へのこれらの手法の適用は、癌患者内のCLT抗原に対する治療関連T細胞応答の存在を示すために使用できる。

【0209】

これらの研究のために、患者の血液から単離したCD8 T細胞を、様々な培養方法、例えば抗CD3及び抗CD28コーティングされた微小ビーズ並びにインターロイキン-2を使用して増殖する。増殖した細胞は次に、CLTペプチドペンタマーを使用して、そのT細胞受容体の特異的なCLT抗原反応性のために染色することができ、それは、HLA分子のペプチド結合溝内の関連CLT抗原ペプチドに結合する、HLAクラスI分子のペンタマーからなるものである。結合は、ペンタマー構造のコイルドコイル多量体化ドメインに特異的な、フィコエリトリン又はアロフィコシアニンがコンジュゲートした抗体断片を用いた検出

10

20

30

40

50

によって測定する。このペンタマー染色に加えて更に、メモリーマーカーCD45RO及びリソソーム放出マーカーCD107a等の表面マーカーで、照合することができる。ペンタマーと特定の(specific)表面マーカーとの積極的な結合性は、ペンタマー反応性T細胞集団の数及び状態(メモリーVSナイーブ/幹)の両方を推測するために使用できる。

【0210】

ペンタマー染色した細胞は又、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して選別及び精製してもよい。選別した細胞は次に、インビトロ殺傷アッセイで、それらが標的細胞を殺傷する能力について更に試験することもできる。これらのアッセイは、CD8T細胞集団及び、蛍光標識された標的細胞集団を含む。この場合、CD8集団は、CLT抗原特異的細胞又はCD8 T細胞であって、ペンタマー選別され、Mart-1等の強力な殺傷応答を誘導することが知られている陽性対照抗原に特異的である。これらの研究の標的とする細胞は、ペプチドパルスされたHLA-A*02を発現するT2細胞、ペプチドパルスされ、HLA-A*02、03若しくはB*07でトランスフェクトされたC1R細胞、又はCLT/CLT抗原を発現することが既に示されているメラノーマ細胞株、又は、患者の腫瘍細胞を含むことができる。T2細胞又はC1R細胞をパルスするために使用されるペプチドには、CLT抗原ペプチド又は陽性対照ペプチドが含まれる。標的細胞は、健康な細胞の核に取り込まれる赤色の核染色剤(nuclight rapid red)等のバイタル色素で二重に標識してもよい。特異的なT細胞による標的細胞の攻撃の追加的な証拠は、カスパーゼ3/7介在性アポトーシスを示す緑色カスパーゼ3/7活性インジケータによって示すことができる。このように、CD8 T細胞が介在するアポトーシスによって標的細胞が殺されると、アポトーシスに固有のカスパーゼ3/7活性により、標的細胞はその赤色蛍光を失い、緑色蛍光を発する。従って、ペンタマー選別されたCLT抗原特異的CD8 T細胞へのそのような殺傷アッセイの適用は、メラノーマ患者T細胞の生体外培養におけるCLT抗原特異的T細胞の細胞傷害性活性を示すために使用できる。

【0211】

(b) メラノーマ患者におけるT細胞特異性のHERVfest分析

特異的T細胞の機能拡充(fest)技術は、チェックポイント阻害療法に反応する患者の腫瘍細胞に見られる「突然変異関連新抗原」(MANA)レパートリー中に存在する、特異的腫瘍由来エピトープを同定するために使用されてきた(Anagnostouらの文献、Cancer Discovery 2017;Leらの文献、Science 2017)。実施例1及び2(表1及び2、図1〜2)で説明された方法を使用して発見されたCLT抗原へこの技術を適用すると、癌患者中のCLT抗原に対する治療関連T細胞応答の存在を確認できる。

【0212】

免疫曝露を受けた対象内のエピトープ特異的T細胞を特定するための他のアッセイ(例えば、ELISPOT)と同様に、「fest」技術は、抗原提示細胞及び好適な抗原性ペプチドを含む生体外培養内で、同族T細胞を増殖することによりその特異性を引き出す。この技術が他の免疫学的アッセイと異なるのは、これらの増幅された培養物内に存在するT細胞受容体(TCR)mRNAの次世代シーケンシング(具体的には、TCR-VβCDR3領域を標的とするTCRseq)を利用して、(標準HLA結合アルゴリズムを使用して、患者のHLAタイプと一致するように予め選択された)標的ペプチドで培養された細胞内で増殖された、特異的なTCRを検出する点においてである。チェックポイント阻害療法の成功後に採取した、同じ患者の腫瘍組織へのTCRseqの適用は、その次に、生体外でペプチド刺激された培養物内で検出されたどのTCR/T細胞が、癌の免疫抑制部位に同様に存在するかを決定するために使用することができる。MANAfestの場合、この方法は、各患者の腫瘍で産生され、又患者の腫瘍内のT細胞内で検出されるMHC提示された新抗原ペプチドを認識する特異的TCRを特定するために使用され、正常組織及び各患者からの腫瘍組織の全エクソームシーケンシングによって発見される数千の可能な変異ペプチドの中から、機能的に関連する新抗原ペプチドを特定することを可能とする(Leらの文献、Science 2017)。

【0213】

MANAfest技術(Anagnostouらの文献、2017, Cancer Discovery)のCLT抗原へ

の適用は、下記のとおり実施する。ステップ1：選択したHLAスーパータイプを効率的に結合するエピトープを含むと予測されるペプチドを、CLT抗原内で特定する。ステップ2：適切な患者からのPBMCを選択し、HLAタイプによって、ステップ1で選択したペプチドライブラリと一致させる。ステップ4：これらの患者からのPBMCをT細胞画分及び非T細胞画分に分離する。非T細胞を(増殖防止のために)放射線処理し、患者のT細胞へ戻し、次に20～50サンプルに分割し、T細胞増殖因子及び(ステップ1で選択した)個々のCLT特異的合成ペプチドで10～14日間増殖させる。ステップ4：TCRseq(エピトープ特異的TCR-V β CDR3配列のシーケンシング)を全てのウェルについて実行し、試験ペプチドの存在下で増幅された同族T細胞/TCRを特定する。これらTCRの特異性を、増幅しなかったT細胞/増幅したT細胞中に検出されたTCRを、TCRseqを使用して比較することにより決定する。このステップから得られたデータにより、どのペプチドが患者の免疫応答を惹起したかを確認できる。ステップ5：TCRseqを腫瘍サンプルで実行して、特異的に増幅されたTCRのいずれが、チェックポイント阻害療法に応答した患者の腫瘍にホーミングしたかを決定し、このTCRを有するT細胞が、チェックポイント阻害療法の有効性に寄与する可能性を持つ証拠を提供する。

10

【0214】

(実施例4—CLT抗原に特異的な高親和性T細胞が、正常な対象のT細胞レパートリーから削除されていないことを示すためのアッセイ)

ELISPOTアッセイは、CLT抗原特異的CD8 T細胞が健常者の正常T細胞レパートリー内に存在することを示すために使用してもよいので、それがこれら患者のナイーブ及び胸腺組織内での癌特異的CLT抗原の発現による中枢性トレランスによって削除されていないことを示すためにも使用できる。この種のELISPOTアッセイは、複数のステップを含む。ステップ1：CD8 T細胞及びCD14単球を、正常な献血者の末梢血から単離し、これら細胞をHLAタイプ分けして、試験する特定のCLT抗原に一致させることができる。CD8 T細胞は、メモリーマーカーCD45ROに対する磁気標識抗体を使用して、ナイーブサブタイプ及びメモリーサブタイプに更に細分化できる。ステップ2：CD14単球を、個々の又はプールしたCLT抗原ペプチドで3時間パルス後、CD8 T細胞と14日間共培養する。ステップ3：増殖したCD8 T細胞をこれらの培養物から単離し、ペプチドでパルスした新鮮単球で一晩再刺激する。これらのペプチドには、個々のCLT抗原ペプチド、無関係な対照ペプチド、又は感染性(例えば、CMV、EBV、インフルエンザ、HCV)若しくは自己(例えば、MART-1)抗原に対して強力な応答を惹起することが公知のペプチドが含まれてもよい。再刺激は、抗インターフェロンガンマ(IFN γ)抗体でコーティングされたプレート上で行われる。この抗体は、ペプチド刺激されたT細胞によって分泌されるいずれのIFN γ も捕捉する。一晩活性化の後、細胞をプレートから洗い流し、プレートに捕捉されたIFN γ を更なる抗IFN γ 抗体及び標準的な比色分析用色素で検出する。IFN γ 産生細胞が初めからプレート上に存在した場所には、ダークスポットが残る。このアッセイから得られるデータには、スポット数、スポットサイズの中央値、及びスポット強度の中央値が含まれる。これらは、IFN γ 産生T細胞の頻度及び細胞あたりのIFN γ 量の測定値である。そして更に、CLT抗原に対する応答の大きさの測定値は、スポット数又はスポットサイズ中央値として測定された特異的応答を、特異的ペプチドを含まない単球に対するバックグラウンド応答で割ったものであるところの刺激指数(SI)から導き出すことができる。刺激強度の評価基準は、スポット数の刺激指数にスポット強度の刺激指数を掛けることによって導き出す。この方法により、CLT抗原に対する応答及び対照抗原に対する応答の比較を使用すると、ナイーブ対象がCLT抗原反応性T細胞の強力なレパートリーを含むことを示すことができ、それはCLT抗原ベースの免疫原性製剤でのワクチン接種によって増大される。表4は、HLAが一致した正常な献血者からの、有意なCD8T細胞応答を誘導したCLT抗原由来ペプチドのリストを提供する。代表的な結果を図3に示す。横棒はデータの平均値を表す。M+tは、ペプチド無しの陰性対照(単球及びT細胞)を示す。CEFは、陽性対照(23個のCMV、EBV及びインフルエンザペプチドの混合物)を示す。統計的有意性は、クラスカル・ウォリス検定の一元配置分散分析法を使用して測定し、ダン

20

30

40

50

補正で反復測定を補正した。図3は、CLT抗原1(配列番号6; 図3のRPDLILLQL CLT001)からのHLA-A*03:01-拘束ペプチドに対する、正常な献血者からの有意なCD8T細胞応答の実施例を提供する。

【0215】

(表4:HLAが一致した正常献血者からの有意なCD8 T細胞応答を誘導するCLT抗原由来ペプチド)

【表4】

参照 CLT 抗原	配列番号	ペプチド 配列	ペプチドのHLAタイプ(NetMHC による予測)
5	配列番号5	TPRPDLILL	HLA-A*03:01
5	配列番号6	RPDLILLQL	HLA-B*07:02

10

【0216】

(実施例5-メラノーマ細胞内でのCLT発現の検証アッセイ)

a)メラノーマ細胞内でのCLT発現のqRT-PCR検証

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)は、所与の生物学的サンプルから抽出されたRNA中に存在する特定の転写産物量を決定するための広く普及した技術である。特定の核酸プライマー配列を目的の転写産物に対して設計し、次に(subsequently)プライマー間領域を一連のサーマルサイクリング反応を通して増幅し、インターカラー色素(SYBR Green)を使用して蛍光的に定量化する。プライマーペアをCLTに対して操作し、メラノーマ細胞株から抽出したRNAに対してアッセイした。非メラノーマ細胞株を陰性対照として利用した。具体的には、メラノーマ細胞株COLO 829(ATCC参照番号CRL-1974)、MeWo(ATCC参照番号HTB-65)、SH-4(ATCC参照番号CRL-7724)及び対照細胞株HepG2(肝細胞性癌種、ATCC参照番号HB-8065)、Jurkat(T細胞白血病、ATCC参照番号TIB152)及びMCF7(腺癌、ATCC参照番号HTB-22)をインビトロで増殖し、RNAを 1×10^6 個の瞬間凍結細胞から抽出し、cDNAに逆転写した。標準的技術に従い、SYBR Green検出を伴うqRT-PCR分析を、各CLTの2つの領域、及び参照遺伝子に対して設計したプライマーを使用して実施した。相対的定量値(RQ)を次のように算出した:

20

30

$RQ = 2^{[Ct(\text{参照}) - Ct(\text{標的})]}$

【0217】

これらの実験結果を図4に示す。図4は、プライマーセット(88+89)を使用したqRT-PCRアッセイの結果であり、3個のメラノーマ細胞株及び3個の非メラノーマ細胞株から抽出したRNA上のCLT抗原1をコードするCLT(配列番号3)を標的としたものを示す。これらの結果は、非メラノーマ細胞と比較して、メラノーマ細胞株から抽出したRNA中でCLTが特異的に発現することを確認した。このCLTは、試験したメラノーマ細胞株の2/3で検出された。

【0218】

b)in situメラノーマ細胞内でのCLT発現のRNAScope検証

40

in situハイブリダイゼーション(ISH)法での転写産物の発現分析は、標本の病理組織学的状況下で所与の転写産物の存在及び発現レベルの視覚化を可能にする。従来のRNA ISHアッセイにも、所望のRNA配列の短鎖に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用して、ネイティブRNA分子をin situで認識することが含まれており、それは、抗体又は酵素をベースにした比色反応の組み合わせによって生成されるシグナルによって視覚化されるものである。RNAScopeは、最近開発された、より高度なプローブケミストリーを備えたin situハイブリダイゼーションに基づく技術であり、生成されるシグナルの特異性を確保し、かつ標的転写産物を高感度で単分子的に視覚化(visualization)可能にする(Wangらの文献、2012 J Mol Diagn. 14(1):22-29)。転写産物分子を陽性染色すると、所与の細胞内に小さな赤点が現れ、複数の点は複数の転写物が存在することを示

50

す。

【0219】

RNAScopeプローブを、CLTに対して設計し、12個のホルマリン固定パラフィン包埋した皮膚メラノーマ腫瘍コアの切片をアッセイした。発現シグナルのスコアリングは、下記のとおりであり、各コアからの代表的画像上で行った：

- ・CLTプローブの陽性染色での細胞%の評価は、最も近い10に切り上げ
- ・所与の切片全体にわたる発現の細胞あたりの評価レベルは次の通り：
 - ・0＝染色なし
 - ・1＝細胞あたり1～2ドット
 - ・2＝細胞あたり2～6ドット
 - ・3＝細胞あたり6～10ドット
 - ・4＝細胞あたり10を超えるドット。

10

【0220】

各CLTの発現は、多数の異なる患者の腫瘍コアで検出され、それぞれ独立して腫瘍由来RNAseqデータからの発見を検証し、所定のサンプル全体にわたって腫瘍組織内の発現の相対的均一性を確認し、そして又、複数の患者にわたる存在をハイライトした(表5)。

【0221】

(表5－メラノーマ患者の組織コア内でのRNAScopeのスコアリング)

【表5】

20

組織	コア	CLT 抗原 1 (配列番号 3)	
		陽性(+)ve細胞%	スコア
メラノーマ	61	30	2
メラノーマ	62	20	1
メラノーマ	63	10	1
メラノーマ	64	70	2
メラノーマ	65	10	1
メラノーマ	66	80	3
メラノーマ	67	100	4
メラノーマ	68	30	2
メラノーマ	69	10	1
メラノーマ	70	10	1
メラノーマ	71	50	3
メラノーマ	72	90	3

30

【0222】

本明細書及び下記特許請求の範囲を通じて、文脈上別段の定めがない限り、用語「含む」、並びに「含んだ」及び「含んでいる」等の変形は、記載された整数、ステップ、整数群又はステップ群を含むが、任意の他の整数、ステップ、整数群又はステップ群を除外するものではないことを意味すると理解されるであろう。

40

【0223】

本発明の明細書において挙げられている全ての特許、特許出願及び参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

本発明は、上記で列挙された、好ましい及びより好ましい群、及び、好適な及びより好適な群、並びに実施態様の群の全ての組み合わせを包含するものである。

【0224】

(配列表)

50

【化 1】

配列番号 1 (CLT抗原1のポリペプチド配列)

MLPRTPRPDLILLQLLPAGLRQLLQTSGPDNEQPIEQDLICNVC

配列番号 2 (CLT抗原1由来ペプチド配列)

LPRTPRPDLIL

配列番号 3 (CLT抗原1をコードするCLTのcDNA配列)

CTTTCATCTTTAATTTGACCAAAATGGAAACCAGGATCATGAGAATTCCTCGGG
GCTGGTGTTGAAAGGAATTTCCCCTGCTCTTGCCAGAGTCTCGAGGGGTGGCC
TCCTTCCACGGGTGAGTAACCACAAGTCCATGTGACCGAACAAACAGCATATTC
TTTTGTTCAAAGAGAAAAACAACATTGAAGGAAATCAGCTGAAGAAAATTGAGA
TGAAAGCCAGTCCACGCCTCAGCATCCTGAGGAAATGTTCTTCCTTGATGCTCT
GAGCTCTCTAAGAAGTTACCACAAAACCAAACCCATCAGAAGTTTGCAGGACGT
CCTTGTTTAGAGCTGGGAAATAAACACGAAACAGCGCAAAGGAGAGTCCAGG
CCTGCCAATGCTTCCGCGAACTCCTCGCCCCGACCTCATCCTTCTCCAGCTCCT
ACCTGCAGGCCTCAGACAACCTTTTGCAGACCTCTGGTCCGGACAATGAACAAC
CCATAGAACAAGATCTGATTTGTAATGTTTGCTGATCTCCAAAGTGTAATACTC
CCACCATGACCAATTGGAAGCCACTGACAAGTCCTCACTAAATGCAGAATTGAG
AAGAAACACGAATAGCACATCATTGTATGGTATTTCCACTCTACCAATGGATGTG
AATAACCTCAAGAACACATAATGTTGAGATGTGGAAAAATCATCAGGAAGCCTC
TCCCCTTACCCCTGCAGTGTCTCTGCAATGCTGGTAGAGTGGGCTGGCACAGC
CCCCGCCTCTGGCCTGGTCCGGGTCCAACCTGCCTGCCTCCTGGGGCAGCAG
CTCCCTGAACGAAGAGCCGCGGAGACCGAAGAACTCAGTGAATCAGCAGTTCT
CCCAGATGAAACGCTGGCCTGAAAGCAGCCTCAAGAGCTTTGGCCCGTCACCT
TGCCCTTGCCCTTCTCTTCCTTCCTCGTCCTCTGTTTGTTTCATCTTTCCTGAAAAAT
TAAGTCAGCTGTTCCCTTAACCAATTTCCCTGGCATTCTGAAGGGTAGGCCAC
ATGGCCACCTGCCAGCTACTCCACCTGCCAAGCCTTCCTGACTATATTTACC
CTGGTACTCCCATGTCCCGGGGCTGCTTCAGCAGAGCCAAGGACACACCCAG
GTGTTTGTTTTCTAGGTCAGATTTCTCAGCCATGGGTGTATCTGTGCTTGTCCC
TCAAATCCTCATAGCTCCTTTCCCCACCCCAACTTCCAGGCCAGACGGGGTTC
AGGGGTGTCTCAGCTAAGGTTCCCCTGAAGCAGACACAAATTAGTACAAAAGG
GACTTATTAGGAGGTGATCCTTAAAAATTTGGGCAGGAGAATGGAAAGGGTGG
ACACAGACAAAAAGGATGCCAAGTGAGAATGTGATGATTACTGCTGCAGTTTTT
TACAGCTGCCTGTCAAACCTATCCCAACACAGTGGCATTGACCAGCAGCCATTTT
CGCTATGCCACAGCTTCTGTGGGTGAGGCGTTTGGACAGGGCAATGGGAACA
GCTTGTTTCTGTTCCATAGTGTGTGAGGGAGGCCTCAACTGGAAACTCAAAGA
CCGGGGTGGCTTGATGACTGGAGGCTGGAACCATCCGGAAGCTTCTTGAAGCT
GGGTTGACTTACATGTGGTCTTGCATGTGAGTTGGGCTTTTACATCATGGCTG
TTGGGTTCCAAGAGGCAGTGTCTGGGGAACAAGAGTTCCAAGACACCAAGGCA
GAAGCTGCTAGACCTTTTTTGGACCTCGCTTCGGATGTCAGCAATGAAGTTCTGT

10

20

30

40

50

GGATTCAACTGCATTCTATTGGTTACCAGCAGTCGCTTGAATCTGATTAGCTCC
AAAAGTGAAGTGAAGCCTCTGGCAAGAGTGCATTGCAGAAGGGGCACATCCAATGA
GAGGCGCTGCTGTAGTAACAGGGACCTCTCCAATGGCCTGTTTGAGTGCTCTC
AGAATATGGCACCTGGGTTCCCTCCAGAGCAAGTGATCTGAGAGAGAGCAAGGA
GAAGGCCACTCTGCCTTTTCATGACTCATCTCAGAAGTCACACACTATCACAGGT
TCTGTTCTGTTTCATTGGAAGTGAGTCATGAAGTCCGGCCCCACACTCAAGAGAAA
GGAAATTATGCTCCTTCTTTTGAATGAGTGTAAGAAAGTAAAACCTTTGTCAAAT
GTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTG

10

配 列 番 号 4 (CLT抗原1をコードするcDNA配列)

ATGCTTCCGCGAACTCCTCGCCCCGACCTCATCCTTCTCCAGCTCCTACCTGCA
GGCCTCAGACAACTTTTGCAGACCTCTGGTCCGGACAATGAACAACCCATAGAA
CAAGATCTGATTTGTAATGTTTGCTGA

20

配 列 番 号 5 (CLT抗原1由来ペプチド配列)

TPRPDLILL

配 列 番 号 6 (CLT抗原1由来ペプチド配列)

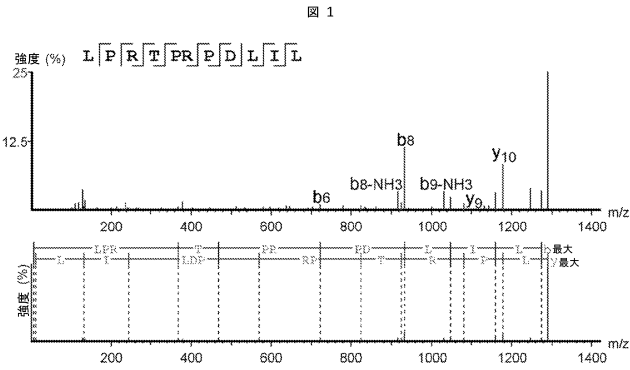
RPDLILLQL

30

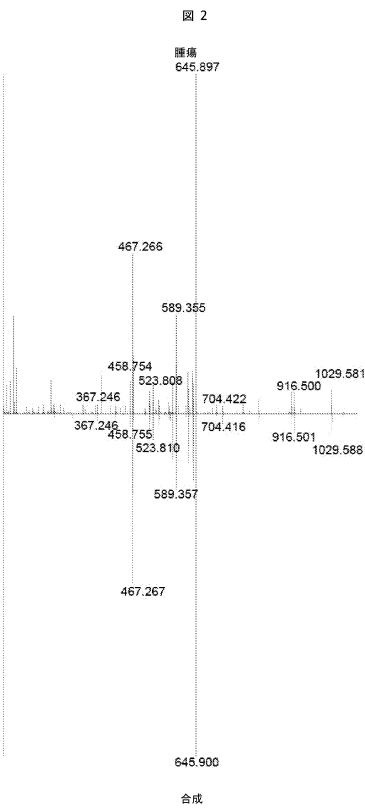
40

50

【図面】
【図 1】



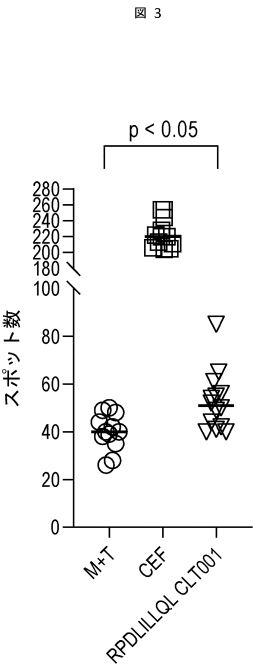
【図 2】



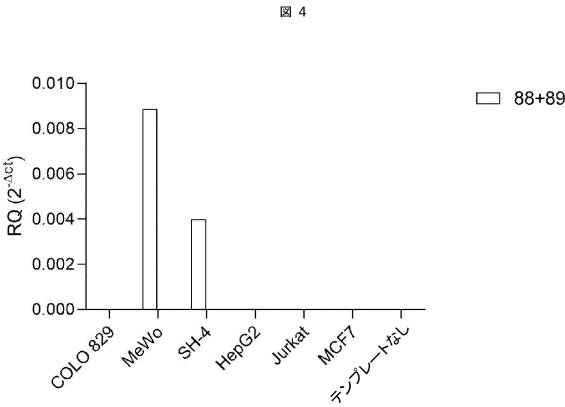
10

20

【図 3】



【図 4】



30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/051557

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61P35/00 C07K14/47 ADD.												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C07K												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	WO 2009/039244 A2 (GENIZON BIOSCIENCES INC [CA]; RAEISON JOHN VERNER [CA] ET AL.) 26 March 2009 (2009-03-26) sequences #1139, #1140 -----	1,2										
X	JP 2003 304877 A (KEIO GIJUKU) 28 October 2003 (2003-10-28) the whole document -----	1-65										
A	WO 00/06598 A1 (LUDWIG INST CANCER RES [US]) 10 February 2000 (2000-02-10) cited in the application the whole document -----	1-65										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*Z* document member of the same patent family
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
E earlier application or patent but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means												
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*Z* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 14 September 2020		Date of mailing of the international search report 22/09/2020										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, Veerle										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2020/051557

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009039244 A2	26-03-2009	NONE	
JP 2003304877 A	28-10-2003	NONE	
WO 0006598 A1	10-02-2000	EP 1100817 A1	23-05-2001
		JP 2002521051 A	16-07-2002
		US 6770456 B1	03-08-2004
		WO 0006598 A1	10-02-2000

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/86 (2006.01)
 C 1 2 N 15/863 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0783 (2010.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 38/08 (2019.01)
 A 6 1 K 38/16 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 15/86 Z
 C 1 2 N 15/863 Z
 C 1 2 N 5/0783
 C 1 2 N 5/10
 C 0 7 K 19/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 38/08
 A 6 1 K 38/16
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 K 39/00 H
 C 1 2 P 21/08

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
 MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
 RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジョージ カシオティス

イギリス国 エヌダブリュ1 1エーティー ロンドン ミッドランド ロード 1 シー／オーザ
 フランシス クリック インスティテュート リミティッド

(72)発明者 ジョージ ヤング

イギリス国 エヌダブリュ1 1エーティー ロンドン ミッドランド ロード 1 シー／オーザ
 フランシス クリック インスティテュート リミティッド

(72)発明者 ジャン アッティグ

イギリス国 エヌダブリュ1 1エーティー ロンドン ミッドランド ロード 1 シー／オーザ
 フランシス クリック インスティテュート リミティッド

(72)発明者 ファビオ マリノ

イギリス国 オーエックス4 4ジーエー オックスフォード ロバート ロビンソン アヴェニュー
 1 ザ オックスフォード サイエンス パーク マグダレン センター シー／オー エナラ バイオ
 リミテッド

F ターム (参考)

4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA02 CA24 CA25
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 BA01 BA08 BA18 BA19 BA23 MA37
 MA52 NA14 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262
 4C085 AA02 GG08
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 CA41 DA75 DA76
 DA86 EA20 FA74