

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520653

(P2018-520653A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018. 8. 2)

| | | |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01) | C 1 2 N 15/12 Z N A | 2 G 0 4 5 |
| C 0 7 K 14/82 (2006.01) | C 0 7 K 14/82 | 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 N 5/0784 (2010.01) | C 1 2 N 5/0784 | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 5/0783 (2010.01) | C 1 2 N 5/0783 | 4 C 0 8 4 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2017-560907 (P2017-560907)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月21日 (2016. 6. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月22日 (2017. 11. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/064317
 (87) 国際公開番号 W02016/207164
 (87) 国際公開日 平成28年12月29日 (2016. 12. 29)
 (31) 優先権主張番号 62/184, 500
 (32) 優先日 平成27年6月25日 (2015. 6. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 1511191.7
 (32) 優先日 平成27年6月25日 (2015. 6. 25)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

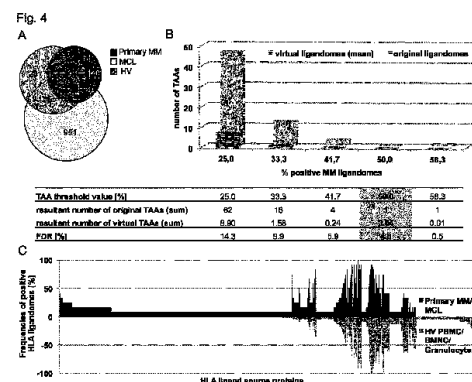
(71) 出願人 506258073
 イマティクス バイオテクノロジー ギ
 ーエムペーハー
 ドイツ, 72076 テュービンゲン, パ
 ウルーエンリヒェシュトラッセ 15
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100163544
 弁理士 平田 緑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨髄腫およびその他のがんの免疫療法において使用するための新規細胞エпитープおよび細胞エ
 ピトープ組み合わせ

(57) 【要約】

本発明は、免疫療法において使用するためのペプチド、タンパク質、核酸、および細胞に関する。特に、本発明は、がん、特に骨髄腫の免疫療法に関する。本発明は、単独のまたはその他の腫瘍関連ペプチドと組み合わせられた、腫瘍関連T細胞ペプチドエピトープにさらに関し、それは、例えば、抗腫瘍免疫応答を刺激し、または生体外でT細胞を刺激して患者に移入する、ワクチン組成物の活性医薬品成分の役割を果たし得る。主要組織適合性複合体 (MHC) の分子と結合しているペプチド、またはペプチドそれ自体もまた、抗体、可溶性T細胞受容体、およびその他の結合分子の標的になり得る。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8、および配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 と少なくとも 8 8 % 相同的なその変異配列の群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドおよびその薬学的に許容可能な塩であって、前記変異体が主要組織適合性複合体 (MHC) 分子と結合し、および / または T 細胞を前記変異体ペプチドと交差反応させ ; 前記ペプチドが完全長ポリペプチドでない、ペプチド。

【請求項 2】

MHC クラス I または II 分子に結合する能力を有し、前記 MHC に結合すると、CD 4 および / または CD 8 T 細胞によって認識されることができるようになる、請求項 1 に記載のペプチド。

10

【請求項 3】

そのアミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 のいずれか 1 つに記載の一続きのアミノ酸を含んでなる、請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたはその変異体。

【請求項 4】

前記ペプチドまたはその変異体が、8 ~ 1 0 0、好ましくは 8 ~ 3 0、より好ましくは 8 ~ 1 6 のアミノ酸の全長を有し、最も好ましくは前記ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体。

【請求項 5】

前記ペプチドが、修飾され、および / または非ペプチド結合を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体。

20

【請求項 6】

前記ペプチドが、特に HLA - DR 抗原関連不変鎖 (I i) の N 末端アミノ酸を含んでなる融合タンパク質の一部である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体をエンコードする核酸であって、任意選択的に異種プロモーター配列と結合する、核酸。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を発現する能力がある、発現ベクター。

30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 7 に記載の核酸または請求項 8 に記載の発現ベクターを含んでなり、好ましくは樹状細胞などの抗原提示細胞である、組換え宿主細胞。

【請求項 1 0】

医療において使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体、請求項 7 に記載の核酸、請求項 8 に記載の発現ベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドを提示する、または請求項 7 に記載の核酸を発現する、または請求項 8 に記載の発現ベクターを有する、請求項 9 に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記ペプチドまたはその変異体を前記宿主細胞またはその培養液から単離するステップとを含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体を製造する方法。

40

【請求項 1 2】

T 細胞を、適切な抗原提示細胞の表面に、または抗原提示細胞を模倣する人工コンストラクトの表面に発現される抗原負荷ヒトクラス I または II MHC 分子に、前記 T 細胞を抗原特異的様式で活性化するのに十分な時間にわたり、生体外で接触させるステップを含んでなり、前記抗原が、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドである、活性化

50

Tリンパ球を製造するインビトロ法。

【請求項 13】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを提示する細胞を選択的に認識する、請求項 12 に記載の方法によって製造される活性化 Tリンパ球。

【請求項 14】

請求項 13 で定義される活性 T細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる、その標的細胞が、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを提示する患者において、標的細胞を死滅させる方法。

【請求項 15】

抗体、特に、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその異変体を、好ましくは、MHC 分子と結合すると請求項 1～5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体を、特異的に認識する可溶性または膜結合抗体であって、前記抗体が、任意選択的に免疫刺激ドメインまたは毒素などのさらなるエフェクター機能を保有する、抗体。

【請求項 16】

がんを治療するためのまたはがん治療薬の製造における、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 7 に記載の核酸、請求項 8 に記載の発現ベクター、請求項 9 に記載の細胞、請求項 13 に記載の活性化 Tリンパ球、または請求項 15 に記載の抗体の使用。

【請求項 17】

がんが、それに配列番号 1～配列番号 228 が由来する、ペプチドの過剰発現を示す、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんおよびその他の腫瘍の群から選択される、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

(a) 請求項 1～6 のいずれか一項に記載のペプチド変異体、請求項 7 に記載の核酸、請求項 8 に記載の発現ベクター、請求項 10 に記載の細胞、請求項 13 に記載の活性化 Tリンパ球、または請求項 15 に記載の抗体を含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる容器；

(b) 任意選択的に、前記凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第 2 の容器；

(c) 任意選択的に、配列番号 1～配列番号 228 からなる群から選択される少なくとももう 1 つのペプチド、および

(d) 任意選択的に、(i) 前記溶液の使用、または (ii) 前記凍結乾燥製剤の再構成および / または使用のための取扱説明書を含んでなるキット。

【請求項 19】

(iii) 緩衝液、(iv) 希釈剤、(V) フィルター、(vi) 針、または (V) シリンジの 1 つまたは複数をさらに含んでなる、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記ペプチドが、配列番号 1～配列番号 228 からなる群から選択される、請求項 18 または 19 に記載のキット。

【請求項 21】

a) 前記個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される、腫瘍関連ペプチド (TUMAP) を同定するステップと；

b) a) で同定された前記ペプチドを、正常組織との比較で腫瘍における免疫原性および / または過剰提示について予備選別されたペプチド貯蔵庫と比較するステップと；

c) 少なくとも 1 つのペプチドを、前記患者において同定された TUMAP と一致する前記貯蔵庫から選択するステップと；

d) ステップ c) に基づいて、個別化ワクチンを調合するステップと

10

20

30

40

50

を含んでなる、個別化抗がんワクチンを製造する方法。

【請求項 2 2】

前記 T U M A P が、

a 1) 前記腫瘍サンプルからの発現データを前記腫瘍サンプルの組織型に対応する正常組織サンプルからの発現データと比較して、前記腫瘍サンプルにおいて過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質を同定するステップと；

a 2) 前記発現データを、前記腫瘍サンプル中の M H C クラス I / またはクラス I I 分子と結合している M H C リガンドの配列と相関させて、前記腫瘍によって過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質に由来する M H C リガンドを同定するステップと
によって同定される、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 3】

結合ペプチドを前記腫瘍サンプルから単離された M H C 分子から溶出させて、前記溶出したリガンドを配列決定することで、M H C リガンドの配列が同定される、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記腫瘍サンプルの組織型に対応する前記正常組織が、前記同一患者から得られる、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記貯蔵庫に包含される前記ペプチドが、

a a . 正常組織または組織群と比較して悪性組織で過剰発現される遺伝子を同定するステップを含んでなる、マイクロアレイまたは配列決定ベース発現プロファイリングなどの高度並列法によって、ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸 (m R N A) 発現解析を実施するステップと；

20

a b . ステップ a a で検出された、選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、ペプチドを選択するステップと；

a c . 健常ドナーまたは前記患者からのヒト T 細胞を使用した生体外免疫原性アッセイを含んでなる、前記選択されたペプチドによる生体内 T 細胞応答の誘導を判定するステップ；または

b a . H L A リガンドを前記腫瘍サンプルから質量分析を使用して同定するステップと；

30

b b . 正常組織または組織群と比較して悪性組織で過剰発現される遺伝子を同定するステップを含んでなる、マイクロアレイまたは配列決定ベース発現プロファイリングなどの高度並列法によって、ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸 (m R N A) 発現解析を実施するステップと；

b c . 前記同定された H L A リガンドを前記遺伝子発現データと比較するステップと；

b d . ステップ b c で検出された、選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、ペプチドを選択するステップと；

b e . ステップ b d から選択された T U M A P を腫瘍組織上で再検出し、健常組織上の検出欠如または希な検出が、m R N A レベルにおける過剰発現の関連性を裏付けるステップと；

40

b f . 健常ドナーまたは前記患者からのヒト T 細胞を使用した生体外免疫原性アッセイを含んでなる、前記選択されたペプチドによる生体内 T 細胞応答の誘導を判定するステップと

に基づいて同定される、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記貯蔵庫に包含される前記ペプチドの免疫原性が、生体外免疫原性アッセイ、個々の H L A 結合についての患者免疫モニタリング、M H C 多量体染色、E L I S P O T アッセイおよび / または細胞内サイトカイン染色を含んでなる方法によって判定される、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

50

前記貯蔵庫が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 からなる群から選択される複数のペプチドを含んでなる、請求項 2 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記個々の患者からの正常な対応する組織と比較して前記腫瘍サンプルに特有の少なくとも 1 つの変異を同定するステップと、前記ワクチンに包含するために、または細胞療法を作成するために、前記変異に関連があるペプチドを選択するステップとをさらに含んでなる、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記少なくとも 1 つの変異が、全ゲノム配列決定によって同定される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

T 細胞受容体、好ましくは可溶性または膜結合 T 細胞受容体であって、H L A リガンドと反応性であり、前記リガンドが配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 7 5 % の同一性を有する、T 細胞受容体。

【請求項 3 1】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 と少なくとも 8 8 % 同一である、請求項 3 0 に記載の T 細胞受容体。

【請求項 3 2】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 のいずれかからなる、請求項 3 0 または 3 1 に記載の T 細胞受容体。

【請求項 3 3】

前記 T 細胞受容体が可溶性分子として提供され、任意選択的に、免疫刺激ドメインまたは毒素などのさらなるエフェクター機能を保有する、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の T 細胞受容体。

【請求項 3 4】

請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の T C R をエンコードする核酸であって、任意選択的に異種プロモーター配列と結合する、核酸。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の核酸を発現する能力がある、発現ベクター。

【請求項 3 6】

請求項 3 4 に記載の核酸、または請求項 1 5 に記載の抗体をコードする核酸、または請求項 3 5 に記載の発現ベクターを含んでなる、好ましくは T 細胞または N K 細胞である、宿主細胞。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記 T 細胞受容体を前記宿主細胞および / またはその培養液から単離するステップとを含んでなる、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の T 細胞受容体を製造する方法。

【請求項 3 8】

a) 配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 からなる群から選択されるペプチド、または薬学的に許容可能なその塩；

b) a) に記載のペプチドおよび / またはペプチド M H C 複合体と反応性の T 細胞受容体；

c) a) に記載のペプチドと、H L A - D R 抗原関連不変鎖 (I i) の N 末端のアミノ酸 1 ~ 8 0 とを含んでなる融合タンパク質；

d) a) ~ c) のいずれかをコードする核酸、または前記核酸を含んでなる発現ベクター；

e) d) の発現ベクターを含んでなる宿主細胞；

f) T 細胞を、抗原特異的様式で T 細胞を活性化するのに十分な時間にわたり、適切な抗原提示細胞の表面に発現される a) に記載のペプチドと生体外で接触させるステップを含んでなる方法、ならびにこれらの活性化 T 細胞を自己または他の患者に移入する方法に

10

20

30

40

50

よって得られる、活性化Ｔリンパ球；

g) a) に記載のペプチドおよび／またはペプチド－ＭＨＣ複合体および／または a) に記載のペプチドを提示する細胞と反応性であり、例えば、免疫活性化ドメインまたは毒素との融合によって潜在的に修飾される、抗体、または可溶性Ｔ細胞受容体；

h) 配列番号１～配列番号２２８からなる群から選択されるペプチドを認識し、および／または配列番号１～配列番号２２８からなる群から選択されるペプチドとＭＨＣ分子との複合体を認識する、アダプター；

i) a) ～ h) のいずれか一項に記載のコンジュゲートまたは標識されたペプチドまたはスキャフォールド

からなる群から選択される、少なくとも１つの活性成分と、薬学的に許容できる担体と、任意選択的に、薬学的に許容可能な賦形剤および／または安定剤とを含んでなる医薬組成物。

【請求項３９】

請求項１～５のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体、好ましくはＭＨＣ分子と結合している請求項１～５のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体の特異的に認識する、アダプター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、免疫療法において使用するためのペプチド、タンパク質、核酸、および細胞に関する。特に、本発明は、がんの免疫療法に関する。本発明は、単独のまたはその他の腫瘍関連ペプチドと組み合わせられた、腫瘍関連Ｔ細胞ペプチドエピトープにさらに関し、それは、例えば、抗腫瘍免疫応答を刺激し、または生体外でＴ細胞を刺激して患者に移入する、ワクチン組成物の活性医薬品成分の役割を果たし得る。主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）の分子と結合しているペプチド、またはペプチドそれ自体もまた、抗体、可溶性Ｔ細胞受容体、およびその他の結合分子の標的になり得る。

【０００２】

本発明は、ヒト腫瘍細胞のＨＬＡクラスＩおよびＩＩ分子に由来する、いくつかの新規ペプチド配列およびそれらの変異型に関し、それらは抗腫瘍免疫応答を引き起こすためのワクチン組成物中で、または薬理的／免疫学的活性化合物および細胞の開発のための標的として、使用され得る。

【背景技術】

【０００３】

低悪性度Ｂ細胞リンパ腫である多発性骨髄腫（ＭＭ）は、骨髄における悪性形質細胞の増殖によって特徴付けられる〔１４〕。高用量化学療法と、それに続く自己幹細胞移植、新規免疫調節薬、およびプロテアソーム阻害剤をはじめとする近年の治療法の進歩にもかかわらず、ＭＭは依然としてほとんど不治のままである〔１５、１６〕。これは、高い再発比をもたらす、微小残存病変（ＭＲＤ）の持続性に主に起因する〔１７、１８〕。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

がんの治療に伴う重度の副作用および費用を考慮すると、がん全般、そして特に骨髄腫の治療に使用し得る要素を同定する必要がある。がんのより良い診断、予後の評価、および治療成功の予測につながる、がん全般、特に骨髄腫のためのバイオマーカーに相当する要素を同定する必要性もまたある。

【０００５】

抗原特異的免疫療法は、臨床的に有効な抗がんＴ細胞応答を誘導する可能性を秘めており、将来の併用試験でがん免疫療法の特異性を導き、増大させるために活用されるかもし

10

20

30

40

50

れない[3]。この目的を達成するために、腫瘍関連 / 特異的 T 細胞エピトープの正確な知識が重要である。数十年にわたる過剰発現した腫瘍抗原の研究の後、より最近では、変異由来新生抗原の患者個別化同定に焦点が移っている[4 , 5]。これらの新たな研究の有望な知見[6 - 8]によって、ネオエピトープは、抗がん免疫応答の主要標的と見なされるようになった[9 - 11]。

【 0 0 0 6 】

しかし、血液学的悪性腫瘍のアンチゲノムを分析することで、本発明者らは、最近、非変異抗原が自発的抗白血病 T 細胞応答の妥当な標的であることを実証した[12 , 13]。これらの研究で実施された戦略は、質量分析法によって、健康および疾患における血液学的細胞の自然に提示された H L A リガンドームを示差的にマッピングし、妥当な腫瘍関連抗原を効率的に同定することが分かった。

10

【 0 0 0 7 】

これまでのところ、MM に対する唯一の確立された免疫療法アプローチは、同種異系幹細胞移植であるが、これは、高い罹患率および死亡率を伴い、患者のごく一部のための選択肢に留まっている[19 ~ 21]。抗原特異的 T 細胞に基づく免疫療法は[22、23]、特に、好ましいエフェクター対標的比によって特徴付けられる一群の M R D において、効果的で低副作用の選択肢を提示するかもしれない[24]。

【 0 0 0 8 】

腫瘍関連抗原 (T A A) の現行の分類は、次の主要群を含んでなる：

a) がん精巣抗原：T 細胞によって認識され得る、これまでに同定された最初の T A A はこのクラスに属し、元々はがん精巣 (C T) 抗原と称されたが、それは、そのメンバーが組織学的に異なるヒト腫瘍において発現し、正常組織では精巣の精母細胞 / 精原細胞のみに存在し、時として胎盤に存在するためであった。精巣の細胞は、クラス I および I I H L A 分子を発現しないので、これらの抗原は正常組織の T 細胞によって認識され得ず、したがって免疫学的に腫瘍特異的と見なされる。C T 抗原の周知の例は、M A G E ファミリーメンバーおよび N Y - E S O - 1 である。

20

b) 分化抗原：これらの T A A は、腫瘍と、それから腫瘍が生じる正常組織との間で共有される。既知の分化抗原のほとんどは、メラノーマおよび正常メラノサイトに見いだされる。これらのメラノサイト系関連タンパク質の多くは、メラニン合成に関与し、したがって腫瘍特異的でないが、それでもなおがん免疫療法のために広く利用されている。例としては、メラノーマに対するチロシナーゼと M e l a n - A / M A R T - 1、または前立腺がんに対する P S A が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

c) 過剰発現 T A A : 広範に発現される T A A をエンコードする遺伝子は、組織学的に異なる型の腫瘍において検出され、多数の正常組織においても概してより低い発現レベルで検出されている。正常組織によってプロセスされて潜在的に提示され得るエピトープの多くは、T 細胞認識の閾値レベル未満であり得る一方で、腫瘍細胞におけるそれらの過剰発現は、以前確立された免疫寛容を破壊することにより、抗がん応答を始動し得る。このクラスの T A A の顕著な例は、H e r - 2 / n e u、サバイビン、テロメラゼまたは W T 1 である。

d) 腫瘍特異的抗原：これらのユニークな T A A は、正常な遺伝子 (- カテニン、C D K 4 など) の変異から生じる。これらの分子変化のいくつかは、腫瘍性形質転換および / または進行に関連している。腫瘍特異的抗原は、通常、正常組織に対する自己免疫反応のリスクなしに、強力な免疫応答を誘導できる。他方、これらの T A A は、ほとんどの場合、その上でそれらが同定されたまさにその腫瘍のみと関係があり、通常は、多くの個々の腫瘍間で共有されない。腫瘍特異的 (関連) イソ型を有するタンパク質では、ペプチドの腫瘍特異性 (または関連性) はまた、ペプチドが腫瘍 (関連) エクソンに由来する場合に生じてよい。

40

e) 異常な翻訳後修飾から生じる T A A : このような T A A は、特異的でなく腫瘍において過剰発現もされないタンパク質から生じてよいが、それでもなお、腫瘍において主に活性である翻訳後プロセスによって腫瘍関連になる。このクラスの例は、腫瘍に M U C 1

50

のような新規エピトープをもたらす改変グリコシル化パターン、または腫瘍特異的であってもなくてもよい分解中のタンパク質スプライシングのような事象から生じる。

f) オンコウイルスタンパク質：これらのTAAはウイルスタンパク質であり、それらは発がん過程において重要な役割を果たしてもよく、外来性である（ヒト由来でない）ため、それらはT細胞応答を誘起し得る。このようなタンパク質の例は、子宮頸がんにおいて発現されるヒト乳頭腫16型ウイルスタンパク質E6およびE7である。

【0009】

T細胞に基づく免疫療法は、主要組織適合性複合体(MHC)の分子によって提示される、腫瘍関連または腫瘍特異的タンパク質由来ペプチドエピトープを標的とする。腫瘍特異的Tリンパ球によって認識される抗原、すなわちそれらのエピトープは、酵素、受容体、転写因子などの全てのタンパク質クラスに由来する分子であり得て、それはそれぞれの腫瘍細胞において発現されて、同一起源の非改変細胞と比較して、通常、上方制御される。

10

【0010】

MHC分子には、MHCクラスIおよびMHCクラスIIの2つのクラスがある。MHCクラスI分子は重鎖および2ミクログロブリンから構成され、MHCクラスII分子は軽鎖および鎖から構成される。それらの三次元立体構造は、ペプチドとの非共有結合相互作用のために使用される結合溝をもたらす。

【0011】

MHCクラスI分子は、ほとんどの有核細胞上に見いだされる。それらは、主に内因性タンパク質、欠陥リボソーム産物(DRIP)、およびより大型のペプチドのタンパク質切断から得られる、ペプチドを提示する。しかし、エンドソームコンパートメントまたは外因性起源に由来するペプチドもまた、MHCクラスI分子上に頻繁に見いだされる。この非古典的様式のクラスI提示は、文献中で交差提示と称される(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990)。MHCクラスII分子は、大部分はプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に見いだされ、例えば、エンドサイトーシス中にAPCに取り込まれて引き続きプロセッシングされる、外因性または膜貫通タンパク質のペプチドを主に提示する。

20

【0012】

ペプチドとMHCクラスIの複合体が、適切なT細胞受容体(TCR)を有するCD8陽性T細胞によって認識される一方で、ペプチドとMHCクラスII分子の複合体は、適切なTCRを有するCD4陽性ヘルパーT細胞によって認識される。その結果、TCR、ペプチド、およびMHCは、化学量論的に1:1:1の量で存在することが良く知られている。

30

【0013】

CD4陽性ヘルパーT細胞は、CD8陽性細胞傷害性T細胞による、効果的な応答の誘導と維持において重要な役割を果たす。腫瘍関連抗原(TAA)に由来するCD4陽性T細胞エピトープの同定は、抗腫瘍免疫応答を始動させる医薬品の開発に非常に重要である(Gnjatic et al., 2003)。腫瘍部位では、Tヘルパー細胞が、細胞毒性T細胞(CTL)親和的サイトカイン環境を維持して(Mortara et al., 2006)、例えば、CTL、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、および顆粒球などのエフェクター細胞を引きつける(Hwang et al., 2007)。

40

【0014】

炎症不在下では、MHCクラスII分子の発現は、免疫系細胞、特に、例えば、単球、単球由来細胞、マクロファージ、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に主に限定される。がん患者においては、腫瘍細胞がMHCクラスII分子を発現することが判明している(Dengjel et al., 2006)。

【0015】

伸長された本発明のペプチドは、MHCクラスII活性エピトープとして作用し得る。

50

【0016】

MHCクラスIIエピトープによって活性化されたTヘルパー細胞は、抗腫瘍免疫におけるCTLのエフェクター機能を統合するのに重要な役割を果たす。TH1型のTヘルパー細胞応答を始動するTヘルパー細胞エピトープは、それらの細胞表面に腫瘍関連ペプチド/MHC複合体を提示する腫瘍細胞に向けられた細胞傷害機能をはじめとする、CD8陽性キラーT細胞のエフェクター機能を支持する。このようにして腫瘍関連Tヘルパー細胞ペプチドエピトープは、単独で、またはその他の腫瘍関連ペプチドとの組み合わせで、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の活性医薬品成分の役割を果たし得る。

【0017】

例えば、マウスなどの哺乳類動物モデルにおいて、CD8陽性Tリンパ球の不在下であっても、インターフェロン（IFN）の分泌による血管新生阻害を通じて腫瘍発現を阻害するには、CD4陽性T細胞で十分であることが示された（Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999）。CD4 T細胞が、直接抗腫瘍エフェクターであるという証拠がある（Braumüller et al., 2013; Tran et al., 2014）。

10

【0018】

HLAクラスII分子の構成的発現は、通常、免疫細胞に限定されるので、原発性腫瘍からクラスIIペプチドを直接単離する可能性があり得るとは、これまで考えられなかった。しかし、Dengjel et al. は、いくつかのMHCクラスIIエピトープを腫瘍から直接、成功裏に同定した（国際公開第2007/028574号パンフレット、欧州特許第1760088B1号明細書）。

20

【0019】

CD8およびCD4依存性の双方のタイプの応答は、抗腫瘍効果に共同して相乗的に寄与するので、CD8+T細胞（リガンド：MHCクラスI分子+ペプチドエピトープ）、またはCD4陽性Tヘルパー細胞（リガンド：MHCクラスII分子+ペプチドエピトープ）のどちらかによって認識される、腫瘍関連抗原の同定および特性解析は、腫瘍ワクチンの開発にとって重要である。

【0020】

MHCクラスIペプチドが、細胞性免疫応答を始動（惹起）するためには、それはまた、MHC分子に結合しなくてはならない。この過程は、MHC分子の対立遺伝子と、ペプチドのアミノ酸配列の特定の多形性とに依存する。MHCクラスI結合ペプチドは、通常は8～12アミノ酸残基長であり、通常は、MHC分子の対応する結合溝と相互作用するそれらの配列中に、2つの保存残基（「アンカー」）を含有する。このようにして、各MHC対立遺伝子は、どのペプチドが結合溝と特異的に結合し得るかを決定する、「結合モチーフ」を有する。

30

【0021】

MHCクラスI依存免疫反応においては、ペプチドは腫瘍細胞によって発現される特定のMHCクラスI分子に結合できるだけでなく、それらはまた、引き続いて特異的T細胞受容体（TCR）を有するT細胞によって認識されなくてはならない。

【0022】

40

タンパク質が、Tリンパ球によって腫瘍特異的または腫瘍関連抗原として認識され、治療で利用されるためには、特定の必要条件が満たされなくてはならない。抗原は、主に腫瘍細胞によって発現され、健常組織によって発現されず、または比較的少量発現されるべきである。好ましい実施形態では、ペプチドは、腫瘍細胞によって、健常組織と比較して過剰提示されるべきである。それぞれの抗原は、ある種の腫瘍に存在するだけでなく、高い濃度（すなわち、それぞれのペプチド細胞当たりのコピー数）で存在することもさらに望ましい。腫瘍特異的および腫瘍関連抗原は、例えば、細胞周期調節またはアポトーシス抑制における機能のために、正常細胞から腫瘍細胞への形質転換に直接関与するタンパク質に由来することが多い。さらに、形質転換の直接原因となるタンパク質の下流標的が、上方制御されてもよく、（und）したがって間接的に腫瘍関連であってもよい。このよ

50

うな間接的腫瘍関連抗原もまた、ワクチン接種アプローチの標的であってもよい (Singh - Jasuja et al., 2004)。このようなペプチド (「免疫原性ペプチド」) が、腫瘍関連抗原に由来して、生体外または生体内 T 細胞応答をもたらすことを確実にするためには、抗原のアミノ酸配列内にエピトープが存在することが必須である。

【0023】

基本的に、MHC 分子に結合できるあらゆるペプチドが、T 細胞エピトープとして機能してもよい。生体外または生体内 T 細胞応答誘導のための必要条件是、対応する TCR を有する T 細胞の存在、およびこの特定のエピトープに対する免疫寛容の不在である。

【0024】

したがって、TAA は、腫瘍ワクチンをはじめとするが、これに限定されるものではない、T 細胞に基づく治療法開発の出発点である。TAA を同定し特性決定する方法は、通常は、患者または健常人から単離され得る T 細胞の使用に基づき、またはそれらは、腫瘍および正常組織間の示差的転写プロファイル、または示差的ペプチド発現パターンの生成に基づく。しかし、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株において過剰発現され、またはこのような組織または細胞株において選択的に発現される遺伝子の同定は、免疫療法においてこれらの遺伝子から転写される抗原の使用に関する、正確な情報を提供しない。これは、これらの抗原のエピトープの個々の亜集団のみが、このような用途に適するためであり、その理由は、対応する TCR を有する T 細胞が存在しなくてはならず、この特定のエピトープに対する免疫寛容が不在または最小でなくてはならないからである。したがって本発明の非常に好ましい実施形態では、それに対する機能性および / または増殖性 T 細胞が見いだされる、過剰にまたは選択的に提示されるペプチドのみを選択することが、重要である。このような機能性 T 細胞は、特異的抗原による刺激時にクローン増殖され得て、エフェクター機能を果たすことができる T 細胞 (「エフェクター T 細胞」) と定義される。

【0025】

本発明による特異的 TCR (例えば、可溶性 TCR) および抗体またはその他の結合分子 (スキャフォールド) によってペプチド MHC を標的化する場合、基礎となるペプチドの免疫原性は二次的である。これらの場合には、提示が決定要因である。

【0026】

一連の骨髄腫関連 T 細胞抗原が、以前の研究で報告されている [25 - 35]。これらの抗原のほとんどは、遺伝子発現分析および逆免疫学に基づいて同定された。これらの抗原 (WT1 [36, 37]、RHAMM [38, 39]、hTERT [40]、およびサイピン [40, 41]) のいくつかは、既に臨床試験まで進んでおり、単一患者における特異的 T 細胞応答ならびに臨床的奏効の誘導の観点から、有望な結果を示している。しかし、広範な臨床効果は、依然として達成されていない。これらの以前の研究は、非常に少数の HLA アロタイプおよび単一抗原 / エピトープに限定されており [42]、この治療アプローチに適格な患者の集団と、誘導性腫瘍特異的 T 細胞応答の範囲の双方を制限する。注目すべきことに、最近の研究は、これらの腫瘍抗原のいくつかについて、トランスクリプトームレベル [43] と重要なことには HLA 拘束性提示レベル [12, 13] との双方で、腫瘍結合の程度が欠如していることを実証している。

【0027】

Kowalewski et al. (in: Kowalewski et al. Carfilzomib alters the HLA-presented peptidome of myeloma cells and impairs presentation of peptides with aromatic C-termini. Blood Cancer J. 2016 Apr 8) は、多発性骨髄腫が、抗原特異的 T 細胞免疫療法によって効果的に標的化されるかもしれない免疫原性疾患であることを開示する。4780 個の異なる HLA リガンドの相対提示レベルが、MM.1S および U266 骨髄腫細胞のカルフィルゾミブ処置を用いた生体外モデルで定量化され、それは、HLA 提示ペプチドームのかなりの部分の有意な調節を明らかにした。これらの知見は、カルフィルゾミブが、HLA リガンドのプロセッシングおよび提示に対して、直接

のペプチドモチーフ特異的阻害効果を媒介することを意味する。実質的に、これは、カルフィルゾミブ治療を受けている患者における抗原特異的治療アプローチの実施に対して、広範な意味合いを有してもよい。

【0028】

がんの免疫療法は、がん細胞を特異的に標的化しながら副作用を最小化する選択肢に相当する。がん免疫療法は、腫瘍関連抗原の存在を利用する。したがって、本発明の目的は、がん、特に骨髄腫の免疫療法において使用される新規エピトープを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0029】

本発明の第1の態様では、本発明は、配列番号1～配列番号228、または配列番号1～配列番号228と少なくとも77%、好ましくは少なくとも88%相同的な（好ましくは少なくとも77%または少なくとも88%同一の）その変異配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドに関し、その中で前記変異体は、MHCと結合し、および/またはT細胞と前記ペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩との交差反応を誘導し、その中で前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

【0030】

MMの抗原性の景観をHLAリガンドレベルで直接分析することにより、本発明者らは、本明細書で、抗原特異的免疫療法に適した新規骨髄腫関連エピトープのパネルを提供する。

【0031】

本発明は、配列番号1～配列番号228、または配列番号1～配列番号228と少なくとも77%、好ましくは少なくとも88%相同的な（好ましくは少なくとも77%または少なくとも88%同一の）その変異体からなる群から選択される配列を含んでなる、本発明のペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたはその変異型は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14アミノ酸の全長を有する。

【0032】

続く表は、本発明によるペプチド、それらの各配列番号、HLA結合、およびそれらのペプチドの潜在的な供給源（基礎）遺伝子を示す。

【0033】

表1:本発明によるペプチド

10

20

30

【表 1 - 1】

表1:本発明によるペプチド

| 配列番号 | 配列 | HLA | 遺伝子名 |
|------|------------------------------|---------|---------|
| 1 | AASPVVAEY | A*24 | LIME1 |
| 2 | AENAPSKEVL | B*40 | SLC1A5 |
| 3 | AEQEIARLVL | B*40:01 | CREB3 |
| 4 | AFIQAGIFQEF | A*23:01 | RAD1 |
| 5 | AHSEQLQAL | B*39 | TXNDC11 |
| 6 | AIILEAVNLPVDH | クラス I I | SLC1A5 |
| 7 | AKRFDVSGY | B*15 | PDIA4 |
| 8 | ALDPLADKILI | A*02:01 | CRLS1 |
| 9 | ALKKPIK GK | A*03 | SETD8 |
| 10 | ALWGRTTLK | A*03 | DAP3 |
| 11 | APFQGDQRSL | B*07 | IRF9 |
| 12 | APKYGSYNVF | B*42:01 | MOGS |
| 13 | APRHPSTNSL | B*07 | NDUFAF4 |
| 14 | APRHPSTNSLL | B*07 | NDUFAF4 |
| 15 | APVGI _m FLVAGKIV | クラス I I | SLC1A5 |
| 16 | APVGI _m FLVAGKIVE | クラス I I | SLC1A5 |

10

20

【表 1 - 2】

| | | | |
|----|---------------------|---------|----------|
| 17 | ASNPSNPRPSK | A*30:01 | WHSC1 1 |
| 18 | AVFIAQLSQSLDF | クラス I I | SLC1A5 |
| 19 | DALGAGILHHL | A*02 | SLC1A4 |
| 20 | DEVLLQKL | B*18 | PPP2R3C |
| 21 | DGDDVIIIGVFKGESDPAY | クラス I I | PDIA4 |
| 22 | DIKDTDVImKR | A*33 | MB21D1 |
| 23 | DIQDPGVPR | A*33 | SEMA4A |
| 24 | DLFRYNPYLKR | A*03 | NBN |
| 25 | DLLDGFAR | A*03 | CRLS1 |
| 26 | DLNFPEIKR | A*03 | NOC2L |
| 27 | DLRPATDYHVR | A*33 | FNDC3B |
| 28 | DRYLLGTSL | B*27 | ASS1 |
| 29 | DSFERSNSL | A*68:02 | TBC1D4 |
| 30 | DTQSGSLLFIGR | A*03 | SERPINH1 |
| 31 | DVAEPYKVY | A*25 | IRF9 |
| 32 | DVNNIGKYR | A*03 | LAP3 |
| 33 | DVPDHIIAY | A*03 | KIAA1217 |
| 34 | EGNPLLKHYRGPAGDA | クラス I I | SLC1A5 |
| 35 | EGNPLLKHYRGPAGDAT | クラス I I | SLC1A5 |
| 36 | EIIKKNFDY | A*26 | TMEM126B |
| 37 | EIIKKNFDYLR | A*03 | TMEM126B |
| 38 | EITEVALEY | A*26 | TXNDC11 |
| 39 | ENGVLVLNDANFDNFV | クラス I I | PDIA4 |
| 40 | EQLYDLTLEY | B*39 | NOC2L |
| 41 | ERFEKTFQL | B*39 | MOGS |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

| | | | | |
|----|--------------------|---------|-----------|----|
| 42 | EYGHIPSF | A*24:02 | ARHGAP11A | |
| 43 | FAQIISVALI | A*02 | DOLK | |
| 44 | FAYPAIRYL | A*02 | DAP3 | |
| 45 | FFKPHWDEKF | A*24 | SERPINH1 | |
| 46 | FISGHTSEL | A*02 | MOGS | 10 |
| 47 | FKSPAASSF | B*15 | NUPL2 | |
| 48 | FLFQLLQLL | A*02 | SEMA4A | |
| 49 | FLWDEGFHQL | A*02:01 | MOGS | |
| 50 | FNFLRNVSL | B*08:01 | ARHGAP11A | |
| 51 | FVFPGELLL | A*02:01 | SLC1A5 | |
| 52 | GAKASTTSL | C*03:03 | CMTR1 | |
| 53 | GELIEVVHL | B*40 | NUDT14 | 20 |
| 54 | GETAFAFHL | B*40:01 | SLX1A | |
| 55 | GEVAPSMFL | B*40:01 | NPC1 | |
| 56 | GEVQDLLVRL | B*40 | BAZ2B | |
| 57 | GKVQENSAY | B*15 | NOC2L | |
| 58 | GKYIFASIL | B*15 | SLC1A4 | |
| 59 | GNPLLKHRYGPAGDA | クラス I I | SLC1A5 | 30 |
| 60 | GPFSQFIKA | B*55 | FNDC3B | |
| 61 | GPRPITQSEL | B*07 | UBL7 | |
| 62 | GRYPGVSNY | B*27 | NAE1 | |
| 63 | GYPTIKILKKGQAVDYE | クラス I I | PDIA4 | |
| 64 | GYPTIKILKKGQAVDYEG | クラス I I | PDIA4 | |
| 65 | HPKQPEPSA | B*42:01 | TXNDC11 | 40 |
| 66 | HPKQPEPSAT | B*42:01 | TXNDC11 | |

【表 1 - 4】

| | | | | |
|----|----------------|---------------------|------------|----|
| 67 | HSMDFVAYR | A*03 | CYC1 | |
| 68 | IADPFFRSA | C*03:04 | BTN3A1 | |
| 69 | IEHPSMSVY | B*18 | TP53INP1 | |
| 70 | IESHDPNAL | B*40 | NAE1 NEDD8 | |
| 71 | IEVEAVRF | B*18 | KIAA1217 | |
| 72 | IHILDVLVL | B*15 | CMTR1 | 10 |
| 73 | IIFDRPLLY | A*03 | DOLK | |
| 74 | ILRDGITAGK | A*03:01 | BTN3A1 | |
| 75 | ILWETVPSM | A*02:01 | FNDC3B | |
| 76 | IPAKPPVSF | B*07:02, B*42:01 | TXNDC11 | |
| 77 | IPAKPPVSFF | B*07:02 | TXNDC11 | 20 |
| 78 | IQAGIFQEF | B*15 | RAD1 | |
| 79 | IQILHQVL | B*15 | NPC1 | |
| 80 | IVDRTTTVNVEG | クラス I I | SLC1A4 | |
| 81 | IVDRTTTVNVEGDA | クラス I I | SLC1A4 | |
| 82 | KAMEAASSL | A*02 | WHSC1 | |
| 83 | KAVNPGRSL | A*02 | BFAR | |
| 84 | KDARKGPLVP | B*07 | SETD8 | 30 |
| 85 | KEENGVLVL | B*40 | PDIA4 | |
| 86 | KEFAAIVDV | B*40 | TXNDC11 | |
| 87 | KEGLILPETL | B*40:01 | CREB3 | |
| 88 | KILKPVKKK | A*03 | CSNK2A1 | |
| 89 | KLWLSSMTK | A*03 | COG1 | |
| 90 | KLPLPLPPRL | B*07 | HSH2D | 40 |

【表 1 - 5】

| | | | | |
|-----|------------|----------|-----------|----|
| 91 | KLRELTQRY | A*03 | SPATC1L | |
| 92 | KLSSLIILM | A*02:01 | SERPINH1 | |
| 93 | KPKDPLKISL | B*07 | PPP2R3C | |
| 94 | KPQPRPQTL | B*07 | DYRK4 | |
| 95 | KPRPPQGL | B*07:02, | | |
| | | B*42:01 | MOGS | 10 |
| 96 | KPRPPQGLVR | B*07 | MOGS | |
| 97 | KPSTKALVL | B*07 | RAD1 | |
| 98 | KYPNSEAARA | B*55 | CYC1 | |
| 99 | KQHGIPIPV | B*27 | ASS1 | |
| 100 | KTEVHIRPK | A*03:01 | LAP3 | |
| 101 | KTQLLPTSK | A*33 | ARHGAP11A | 20 |
| 102 | KVMLSALGML | A*02 | CYC1 | |
| 103 | KYESIRLLF | A*24 | SNX14 14 | |
| 104 | KYPDSHLPTL | A*24 | KIAA1217 | |
| 105 | LAALPGVSL | A*02 | LIME1 | |
| 106 | LADHTVHVL | A*02:01 | ARHGAP11A | |
| 107 | LAFPGEMLL | A*02 | SLC1A4 | |
| 108 | LAHVGPRL | A*02:01 | SLX1A | 30 |
| 109 | LEKEGLIL | B*40 | CREB3 | |
| 110 | LKIPISIEF | B*15 | MOGS | |
| 111 | LLFPYILPPK | A*02 | SNX14 | |
| 112 | LLRFSQDNA | A*02:01 | LAP3 | |
| 113 | LPAEHGVL | B*07 | CREB3 | |
| 114 | LPKDVSTQA | B*55 | COG1 | 40 |

【表 1 - 6】

| | | | | |
|-----|-------------------|------------|---------------|----|
| 115 | LPPPPHVPL | B*07:02 | SLX1A | |
| 116 | LPQLHSLVL | B*07 | LRRC47 | |
| 117 | LPVLLSYIGPSVNK | クラス I I | NPC1 | |
| 118 | LRFSQDNA | C*07 | LAP3 | |
| 119 | LYDVAGQGYL | B*24:02 | PPP2R3C | |
| 120 | MDLQPGNALKR | 該当なし | LRRC47 | 10 |
| 121 | MHGQPSPSL | B*15 | TMEM126B | |
| 122 | mNIFRLTGDLSH | クラス I I | KDEL2 | |
| 123 | mPDDSYmVDYFKSISQ | クラス I I | NPC1 | |
| 124 | mPDDSYmVDYFKSISQY | クラス I I | NPC1 | |
| 125 | MRLSLPLLL | B*27 | MZB1 | |
| 126 | MRLSLPLLLL | B*27 | MZB1 | |
| 127 | NEDFSFHY | B*18 | P49770 EIF2B2 | 20 |
| 128 | NEFPVFDEF | B*18:01 | MB21D1 | |
| 129 | NEVIMTIGF | B*18:01 | P49770 EIF2B2 | |
| 130 | NGVLVLNDANFDNFV | クラス I I | PDIA4 | |
| 131 | NIGQKEDFEEA | A*02 | ASS1 | |
| 132 | NMDLMRADM | A*02 | LAP3 | |
| 133 | NPLLKHYRGPAGDA | クラス I I | SLC1A5 | 30 |
| 134 | NPLLKHYRGPAGDAT | クラス I I | SLC1A5 | |
| 135 | PELGPLPAL | B*18, B*40 | LRRC47 | |
| 136 | PTENFSLPVL | A*02 | ZBTB21 | |
| 137 | PVLLSYIGPSVNK | クラス I I | NPC1 | |
| 138 | QHYQQQQQV | B*15:10 | BHLHA15 | |
| 139 | RAKDVIIPAK | A*03 | TXNDC11 | 40 |

【表 1 - 7】

| | | | | |
|-----|------------|---------|---------------|----|
| 140 | RALDVDSGPL | A*02 | LIME1 | |
| 141 | REEGTPLTL | B*40:01 | NOC2L | |
| 142 | RKDEDRKQF | B*15 | NOC2L | |
| 143 | RKLAYRPPK | B*15 | CYC1 | |
| 144 | RLGPPKRPPR | A*30 | MRPS12 | |
| 145 | RLKPFYLVPK | A*03 | MB21D1 | 10 |
| 146 | RLQSKVTAK | A*03 | ASS1 | |
| 147 | RPFHGWTSL | B*07:02 | MOGS | |
| 148 | RPGPPTRPL | B*07:02 | FNDC3B | |
| 149 | RPHGGKSL | B*07, | | |
| | | B*42:01 | TXNDC11 | |
| 150 | RPKAQPTTL | B*07; | | |
| | | B*42:01 | MED27 | 20 |
| 151 | RPQLKGVVL | B*07 | MRPS12 | |
| 152 | RPRAPGPQ | B*07 | WFS1 | |
| 153 | RPRKAFLLLL | B*07, | | |
| | | B*42:01 | PDIA4 | |
| 154 | RPRPPVLSV | B*07 | ZBTB21 | |
| 155 | RQFWTRTKK | A*03:01 | MRPL55 | |
| 156 | RQYPEVIKY | B*39 | BAZ2B | 30 |
| 157 | RVAKTNSLR | A*03:01 | Q53HL2 CDCA8 | |
| 158 | RVFPYSVFY | A*03:01 | NPC1 | |
| 159 | RVNKVIIGTK | A*03:01 | P49770 EIF2B2 | |
| 160 | RYFKGPELL | A*24 | CSNK2A1 | |
| 161 | RYLDLFTSF | A*24:02 | KDEL2 | |

【表 1 - 8】

| | | | | |
|-----|-----------------|----------|-----------|----|
| 162 | RYNPYLKR | A*33 | NBN | |
| 163 | RYSPLSRF | A*24:02 | COG1 | |
| 164 | RYSTQIHSF | A*24:02 | BHLHA15 | |
| 165 | SEFDFFERL | B*18:01, | | |
| | | B*40 | SEMA4A | |
| 166 | SELVYTDVL | B*40 | MZB1 | 10 |
| 167 | SESLPVRTL | B*40:01 | FNDC3B | |
| 168 | SFDDAFKADS | 該当なし | CMTR1 | |
| 169 | SFLDLARNIF | A*24:02 | SLC1A5 | |
| 170 | SHITRAFTV | B*15 | NPC1 | |
| 171 | SHSHVGYTL | B*39 | HSH2D | |
| 172 | SHTPWIVII | B*15 | NAE1 | |
| 173 | SIRRGFQVYK | A*03 | CYC1 | 20 |
| 174 | SIYRGPSHTYK | A*03 | FNDC3B | |
| 175 | SKDEARSSF | B*15 | ARHGAP11A | |
| 176 | SLGGKATTASQAKAV | クラス I I | SERPINH1 | |
| 177 | SLLEQGLVEA | A*02 | WHSC1 | |
| 178 | SMNVQGDYEPT | A*02 | ASS1 | |
| 179 | SPAHPKQTL | B*07 | BAZ2B | |
| 180 | SPALKRLDL | B*07:02 | COG1 | 30 |
| 181 | SPALPGLKL | B*07 | TNFRSF13B | |
| 182 | SPKSNDSDL | B*42:01 | FNDC3B | |
| 183 | SPMPGTLTAL | B*07 | RAD1 | |
| 184 | SPPPPPPPP | B*07 | KIAA1217 | |
| 185 | SPQAETREA | B*55 | NOC2L | |

【表 1 - 9】

| | | | | |
|-----|---------------|------------|-----------|----|
| 186 | SPRLSLLYL | B*07 | BFAR | |
| 187 | SPRQALTDf | B*07:02 | COG1 | |
| 188 | SPTKLPSI | B*55 | NBN | |
| 189 | SPYLRPLTL | B*07:02 | NUDT14 | |
| 190 | SRGDFVVEY | C*07 | SETD8 | |
| 191 | SVYSPVKKK | A*03 | NUPL2 | 10 |
| 192 | SYLNSVQRL | A*24:02 | NUPL2 | |
| 193 | TASPLVKSV | C*12 | ARHGAP11A | |
| 194 | TEAQPQGHL | B*40 | BHLHA15 | |
| 195 | TEVIFKVAL | B*18, B*40 | TBC1D4 | |
| 196 | TFLPFIHTI | A*23:01 | BFAR | |
| 197 | THAAEDIVYTL | B*39:01 | FNDC3B | |
| 198 | TKFGGIVVL | B*15 | NPC1 | 20 |
| 199 | TLKSGDGITF | B*15 | NBN | |
| 200 | TPAVGRLEV | B*07; | | |
| | | B*42:01 | Q53HL2 | |
| 201 | TPEQQAAIL | B*07 | IRF9 | |
| 202 | TPSSRPASL | B*07 | UBL7 | |
| 203 | TRIGLAPVL | B*15 | CRSL1 | |
| 204 | TVKATGPAL | A*02 | MRPL55 | 30 |
| 205 | VAALAAHTTF | A*24 | TP53INP1 | |
| 206 | VDNIFILVQ | 該当なし | NPC1 | |
| 207 | VFDVLDGEEM | A*24 | CMTR1 | |
| 208 | VGGLSFLVNHDFS | クラス I I | KDELRL2 | |
| 209 | VPAEGVRTA | B*55 | MOGS | |

【表 1 - 1 0】

| | | | | |
|-----|-------------------|---------|----------|----|
| 210 | VPLPPKGRVL | B*42:01 | TMEM126B | |
| 211 | VPLTRVSGGAA | B*42:01 | SEMA4A | |
| 212 | VPVGGLSFLVNHDF | クラス I I | KDEL2 | |
| 213 | VPVGGLSFLVNHDFS | クラス I I | KDEL2 | |
| 214 | VPVGGLSFLVNHDFS | クラス I I | KDEL2 | |
| 215 | VPVGGLSFLVNHDFSPL | クラス I I | KDEL2 | 10 |
| 216 | VPVGGLSFLVNHDFSPL | クラス I I | KDEL2 | |
| 217 | VDGKEVLL | A*02 | MOGS | |
| 218 | YHAPPLSAITF | B*15 | ZBTB21 | |
| 219 | YILDPKQAL | A*02 | TXNDC11 | |
| 220 | YLFVNIKL | A*02 | CMTR1 | |
| 221 | YLYITKVLK | A*03:01 | KDEL2 | 20 |
| 222 | YPDSKDLTM | B*07 | DYRK4 | |
| 223 | YPTIKILKKQAVD | クラス I I | PDIA4 | |
| 224 | YPTIKILKKQAVDY | クラス I I | PDIA4 | |
| 225 | YPTIKILKKQAVDYE | クラス I I | PDIA4 | |
| 226 | YPVFRILTL | B*07 | BTN3A1 | |
| 227 | YVFPGVTRL | A*02 | SPATC1L | |
| 228 | YYLNEIQSF | A*24 | SPATC1L | 30 |

【0 0 3 4】

略語は次のとおり：TXNDC11 = チオレドキシンドメイン含有11、MOGS = マンノシル - オリゴ糖グルコシダーゼ、FNDC3B = フィブロネクチンIII型ドメイン含有3B、NUDT14 = nudix (ヌクレオシドニリン酸結合部分X)型モチーフ14、SLC1A5 = 溶質輸送体ファミリー1 (中性アミノ酸輸送体)、メンバー5、ARHGAP11A = Rho GTPアーゼ活性化タンパク質11A、BHLHA15 = 塩基性ヘリックスループヘリックスファミリー、メンバーa15、LRRC47 = ロイシン富化リピート含有47、PPP2R3C = タンパク質ホスファターゼ2、調節サブユニットB'、'、SLX1A = SLX1構造特異的エンドヌクレアーゼサブユニットホモログA (S.セレビスエ (S. cerevisiae)、BAZ2B = 亜鉛フィンガードメイン隣接プロモドメイン、2B、NOC2L = 核小体複合体関連2ホモログ (S.セレビスエ (S. cerevisiae)、BTN3A1 = ブチロフィリン、サブファミリー3、メンバーA1、TNFRSF13B = 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー13B、NPC1 = ニーマン・ピック病、C1型、MRPS12 = ミトコンドリアリボソームタンパク質S12、NUP12 = ヌクレオポリン様2、CREB3 = cAMP応答因子結合タンパク質3、TBC1D4 = TBC1ドメインファミリー、メンバー4、RAD1 = RAD1チェックポイントDNAエキソヌクレアーゼ、NBN = ニブリン、WFS1 = ウォルフラム症候群1、WHS1 = ウォルフ・ヒルショルン症候群候補1、ASS1

40

50

= アルギノコハク酸シンターゼ 1、CYC 1 = チトクローム c - 1、PDI A 4 = タンパク質ジスルフィドイソメラーゼファミリー A、メンバー 4、LAP 3 = ロイシンアミノペプチダーゼ 3、KDEL R 2 = KDEL (Lys - Asp - Glu - Leu) 小胞体タンパク質保持受容体、SLC 1 A 4 = 溶質輸送体ファミリー 1 (グルタミン酸 / 中性アミノ酸輸送体)、メンバー 4、P49770 = EIF 2 B 2 = 真核生物翻訳開始因子 2 B、サブユニット 2、39 kDa、SERPIN H 1 = セルピンペプチダーゼインヒビター、分岐群 H (熱ショックタンパク質 47)、メンバー 1、DAP 3 = 細胞死関連タンパク質 3、IRF 9 = インターフェロン調節因子 9、NAE 1 = NEDD 8 活性化酵素 E 1 サブユニット 1、Q53HL2 = CDC A 8 = 細胞分裂周期関連 8、KIAA 1217、MED 27 = 媒介物複合体サブユニット 27、MRPL 55 = ミトコンドリアリボソームタンパク質 L 55、TMEM 126B = 膜貫通タンパク質 126B、CMTR 1 = cap メチルトランスフェラーゼ 1、MB 21D1 = Mab - 21 ドメイン含有 1、CSNK 2 A 1 = カゼインキナーゼ 2、1 ポリペプチド、COG 1 = 構成要素 of オリゴマーゴルジ装置 1、MZB 1 = 辺縁帯 B および B 1 細胞特異的タンパク質、TP53INP 1 = 腫瘍タンパク質 p 53 誘導性核タンパク質 1、HSH 2D = 造血 SH 2 ドメイン含有、UBL 7 = ユビキチン様 7、SPATC 1 L = 精子形成および中心粒関連 1 様、SEMA 4 A = sema ドメイン、免疫グロブリンドメイン (Ig)、膜貫通ドメイン (TM) および短い細胞質ドメイン、(セマフォリン) 4 A、LIME 1 = Lck 相互作用膜貫通アダプター 1、SETD 8 = SET ドメイン含有 (リジンメチルトランスフェラーゼ) 8、DYRK 4 = 二重特異性チロシン - (Y) - リン酸化制御キナーゼ 4、BFAR = 二機能性アポトーシス調節因子、NDUFAF 4 = NADH デヒドロゲナーゼ (ユビキノン) 複合体 I、集合因子 4、ZBTB 21 = ジンクフィンガーおよび BTB ドメイン含有 21、DOLK = ドリコールキナーゼ、SNX 14 = ソーティングネキシン 14、NPC 1 = ニーマン・ピック病、C 1 型。

10

20

30

40

【0035】

本発明は、さらに、がんなどの増殖性疾患の治療において使用するための本発明によるペプチドに一般に関し、前記がんは、それからペプチド配列番号 1 ~ 配列番号 228 タンパク質 (protein from which a peptide SEQ ID No. 1 to SEQ ID No. 228) の過剰発現を示す、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんおよびその他の腫瘍、および特に骨髄腫の群から選択される。

【0036】

特に好ましいのは、以下の表 2 に記載の配列番号からなる群から選択される、単独のまたは組み合わされた本発明によるペプチドであり、そしてがんなどの増殖性疾患の免疫療法におけるそれらの使用であり、前記がんは、それからペプチド配列番号 1 ~ 配列番号 228 タンパク質 (protein from which a peptide SEQ ID No. 1 to SEQ ID No. 228) の過剰発現を示す、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんおよびその他の腫瘍、および特に骨髄腫の群から選択される。

【0037】

表2-好ましい本発明のペプチド

【表 2 - 1】

表2-好ましい本発明のペプチド

| 配列番号 | 配列 | HLA | 遺伝子名 |
|------|------------------------|---------|----------|
| 1 | AASPVVAEY | A*24 | LIME1 |
| 2 | AENAPSKEVL | B*40 | SLC1A5 |
| 4 | AFIQAGIFQEF | A*23:01 | RAD1 |
| 5 | AHSEQLQAL | B*39 | TXNDC11 |
| 6 | AIILEAVNLPVDH | クラス I I | SLC1A5 |
| 7 | AKRFDVSGY | B*15 | PDIA4 |
| 12 | APKYGSYNVF | B*42:01 | MOGS |
| 15 | APVGImFLVAGKIV | クラス I I | SLC1A5 |
| 16 | APVGImFLVAGKIVE | クラス I I | SLC1A5 |
| 17 | ASNPSNPRPSK | A*30:01 | WHSC1 1 |
| 18 | AVFIAQLSQSLDF | クラス I I | SLC1A5 |
| 19 | DALGAGILHHL | A*02 | SLC1A4 |
| 20 | DEVLLQKL | B*18 | PPP2R3C |
| 21 | DGDDV I I IGVFKGESDPAY | クラス I I | PDIA4 |
| 22 | DIKDTDVImKR | A*33 | MB21D1 |
| 23 | DIQDPGVPR | A*33 | SEMA4A |
| 24 | DLFRYNPYLKR | A*03 | NBN |
| 25 | DLLDGFAR | A*03 | CRSL1 |
| 26 | DLNFPEIKR | A*03 | NOC2L |
| 27 | DLRPATDYHVR | A*33 | FNDC3B |
| 28 | DRYLLGTSL | B*27 | ASS1 |
| 29 | DSFERSNSL | A*68:02 | TBC1D4 |
| 30 | DTQSGSLLFIGR | A*03 | SERPINH1 |
| 32 | DVNNIGKYR | A*03 | LAP3 |

10

20

30

40

【表 2 - 2】

| | | | | |
|----|--------------------|---------|-----------|----|
| 33 | DVPDHIIAY | A*03 | KIAA1217 | |
| 34 | EGNPLLKHYRGPAGDA | クラス I I | SLC1A5 | |
| 35 | EGNPLLKHYRGPAGDAT | クラス I I | SLC1A5 | |
| 37 | EIIKKNFDYLR | A*03 | TMEM126B | |
| 38 | EITEVALEY | A*26 | TXNDC11 | |
| 39 | ENGVLVLDANFDNFV | クラス I I | PDIA4 | 10 |
| 40 | EQLYDLTLEY | B*39 | NOC2L | |
| 42 | EYGHIPSF | A*24:02 | ARHGAP11A | |
| 46 | FISGHTSEL | A*02 | MOGS | |
| 47 | FKSPAASSF | B*15 | NUPL2 | |
| 48 | FLFQLQLL | A*02 | SEMA4A | |
| 50 | FNFLRVSL | B*08:01 | ARHGAP11A | 20 |
| 52 | GAKASTTSL | C*03:03 | CMTR1 | |
| 53 | GELIEVVHL | B*40 | NUDT14 | |
| 54 | GETAFAFHL | B*40:01 | SLX1A | |
| 55 | GEVAPSMFL | B*40:01 | NPC1 | |
| 56 | GEVQDLLVRL | B*40 | BAZ2B | |
| 57 | GKVQENSAY | B*15 | NOC2L | |
| 58 | GKYIFASIL | B*15 | SLC1A4 | 30 |
| 59 | GNPLLKHYRGPAGDA | クラス I I | SLC1A5 | |
| 60 | GPFSQFIKA | B*55 | FNDC3B | |
| 63 | GYPTIKILKKGQAVDYE | クラス I I | PDIA4 | |
| 64 | GYPTIKILKKGQAVDYEG | クラス I I | PDIA4 | |
| 65 | HPKQPEPSA | B*42:01 | TXNDC11 | |
| 66 | HPKQPEPSAT | B*42:01 | TXNDC11 | 40 |

【表 2 - 3】

| | | | | |
|-----|-----------------|---------|-----------|----|
| 68 | IADPFFRSA | C*03:04 | BTN3A1 | |
| 69 | IEHPSMSVY | B*18 | TP53INP1 | |
| 72 | IHILDVLVL | B*15 | CMTR1 | |
| 79 | IQILHQVL | B*15 | NPC1 | |
| 80 | IVDRTTTVVNVEG | クラス I I | SLC1A4 | |
| 81 | IVDRTTTVVNVEGDA | クラス I I | SLC1A4 | 10 |
| 84 | KDARKGPLVP | B*07 | SETD8 | |
| 85 | KEENGVLVL | B*40 | PDIA4 | |
| 86 | KEFAAIVDV | B*40 | TXNDC11 | |
| 87 | KEGLILPETL | B*40:01 | CREB3 | |
| 89 | KLGLSSMTK | A*03 | COG1 | |
| 94 | KPQPRPQTL | B*07 | DYRK4 | |
| 96 | KPRPPQGLVR | B*07 | MOGS | 20 |
| 98 | KYPNSEAARA | B*55 | CYC1 | |
| 99 | KQHGIPIPV | B*27 | ASS1 | |
| 101 | KTQLLPTSK | A*33 | ARHGAP11A | |
| 102 | KVMLSALGML | A*02 | CYC1 | |
| 104 | KYPDSHLPTL | A*24 | KIAA1217 | |
| 106 | LADHTVHVL | A*02:01 | ARHGAP11A | |
| 107 | LAFPGEMLL | A*02 | SLC1A4 | 30 |
| 108 | LAHVGPRL | A*02:01 | SLX1A | |
| 109 | LEKEGLIL | B*40 | CREB3 | |
| 110 | LKIPISIEF | B*15 | MOGS | |
| 112 | LLRFSQDNA | A*02:01 | LAP3 | |
| 113 | LPAEHGVL | B*07 | CREB3 | |

【表 2 - 4】

| | | | | |
|-----|-------------------|---------|---------------|----|
| 114 | LPKDVSTQA | B*55 | COG1 | |
| 117 | LPVLLSYIGPSVKN | クラス I I | NPC1 | |
| 118 | LRFSQDNA | C*07 | LAP3 | |
| 119 | LYDVAGQGYL | B*24:02 | PPP2R3C | |
| 120 | MDLQPGNALKR | 該当なし | LRRC47 | |
| 122 | mNIFRLTGDLSH | クラス I I | KDEL2 | 10 |
| 123 | mPDDSYmVDYFKSISQ | クラス I I | NPC1 | |
| 124 | mPDDSYmVDYFKSISQY | クラス I I | NPC1 | |
| 126 | MRLSLPLLLL | B*27 | MZB1 | |
| 127 | NEDFSFHY | B*18 | P49770 EIF2B2 | |
| 128 | NEFPVFDEF | B*18:01 | MB21D1 | |
| 130 | NGVLVLNDANFDNFV | クラス I I | PDIA4 | 20 |
| 131 | NIGQKEDFEEA | A*02 | ASS1 | |
| 132 | NMDLMRADM | A*02 | LAP3 | |
| 133 | NPLLKHRYGPAGDA | クラス I I | SLC1A5 | |
| 134 | NPLLKHRYGPAGDAT | クラス I I | SLC1A5 | |
| 136 | PTENFSLPVL | A*02 | ZBTB21 | |
| 137 | PVLLSYIGPSVKN | クラス I I | NPC1 | |
| 138 | QHYQQQQQV | B*15:10 | BHLHA15 | 30 |
| 139 | RAKDVIIPAK | A*03 | TXNDC11 | |
| 140 | RALDVDSGPL | A*02 | LIME1 | |
| 142 | RKDEDRKQF | B*15 | NOC2L | |
| 143 | RKLAYRPPK | B*15 | CYC1 | |
| 145 | RLKPFYLVPK | A*03 | MB21D1 | |
| 148 | RPGPPTRPL | B*07:02 | FNDC3B | 40 |

【表 2 - 5】

| | | | | |
|-----|-----------------|------------------|-----------|----|
| 149 | RPHGGKSL | B*07, B*42:01 | TXNDC11 | |
| 152 | RPRAPGPQ | B*07 | WFS1 | |
| 158 | RVFPYSVFY | A*03:01 | NPC1 | |
| 161 | RYLDLFTSF | A*24:02 | KDEL2 | |
| 162 | RYNPYLKR | A*33 | NBN | 10 |
| 166 | SELVYTDVL | B*40 | MZB1 | |
| 168 | SFDDAFKADS | 該当なし | CMTR1 | |
| 169 | SFLDLARNIF | A*24:02 | SLC1A5 | |
| 170 | SHITRAFTV | B*15 | NPC1 | |
| 172 | SHTPWIVII | B*15 | NAE1 | |
| 175 | SKDEARSSF | B*15 | ARHGAP11A | 20 |
| 176 | SLGGKATTASQAKAV | クラス I I | SERPINH1 | |
| 178 | SMNVQGDYEPT | A*02 | ASS1 | |
| 185 | SPQAETREA | B*55 | NOC2L | |
| 188 | SPTKLPSI | B*55 | NBN | |
| 193 | TASPLVKSV | C*12 | ARHGAP11A | |
| 194 | TEAQPQGH | B*40 | BHLHA15 | |
| 196 | TFLPFIHTI | A*23:01 | BFAR | 30 |
| 197 | THAAEDIVYTL | B*39:01 | FNDC3B | |
| 198 | TKFGGIVVL | B*15 | NPC1 | |
| 203 | TRIGLAPVL | B*15 | CRLS1 | |
| 204 | TVKATGPAL | A*02 | MRPL55 | |
| 205 | VAALAAHTTF | A*24 | TP53INP1 | |
| 206 | VDNIFILVQ | 該当なし | NPC1 | 40 |

【表 2 - 6】

| | | | |
|-----|------------------|---------|----------|
| 207 | VFDVLDGEEM | A*24 | CMTR1 |
| 208 | VGGLSFLVNHDFS | クラス I I | KDELR2 |
| 209 | VPAEGVRTA | B*55 | MOGS |
| 210 | VPLPPKGRVL | B*42:01 | TMEM126B |
| 211 | VPLTRVSGGAA | B*42:01 | SEMA4A |
| 212 | VPVGGLSFLVNHD | クラス I I | KDELR2 |
| 213 | VPVGGLSFLVNHD | クラス I I | KDELR2 |
| 214 | VPVGGLSFLVNHD | クラス I I | KDELR2 |
| 215 | VPVGGLSFLVNHD | クラス I I | KDELR2 |
| 216 | VPVGGLSFLVNHD | クラス I I | KDELR2 |
| 218 | YHAPPLSAITF | B*15 | ZBTB21 |
| 219 | YILDPKQAL | A*02 | TXNDC11 |
| 222 | YPDSKDLTM | B*07 | DYRK4 |
| 223 | YPTIKILKKGQAVD | クラス I I | PDIA4 |
| 224 | YPTIKILKKGQAVDY | クラス I I | PDIA4 |
| 225 | YPTIKILKKGQAVDYE | クラス I I | PDIA4 |

10

20

【0038】

本発明によるペプチドの多くは、その他の腫瘍型にも見いだされ、したがって、その他の適応症の免疫療法においても使用され得る。

【0039】

したがって、本発明の別の態様は、好ましくは、がんの群から選択される増殖性疾患の併用治療のための、本発明によるペプチドの使用に関し、前記がんは、それからペプチド配列番号1～配列番号228タンパク質 (protein from which a peptide SEQ ID No. 1 to SEQ ID No. 228) の過剰発現を示す、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんおよびその他の腫瘍、および特に骨髄腫の群から選択される。

30

【0040】

本発明は、ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I または II 分子に結合する能力、または長さ変異体などの伸長形態では MHC クラス II に結合する能力を有する、本発明によるペプチドにさらに関する。

40

【0041】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは (それぞれ) 配列番号1～配列番号228に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる。

【0042】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、修飾され、および/または非ペプチド結合を含む。

【0043】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、特に HLA - DR 抗原関連不変鎖 (I i) の N 末端アミノ酸に融合した、または例えば樹状細胞に対して特異的な抗体などの抗体 (またはその配列中) に融合した、融合タンパク質の一部である。

50

【 0 0 4 4 】

本発明は、本発明によるペプチドをエンコードする核酸にさらに関する。本発明は、DNA、cDNA、PNA、RNA、またはそれらの組み合わせである、本発明による核酸にさらに関する。

【 0 0 4 5 】

本発明は、本発明による核酸を発現でき、および/または発現する、発現ベクターにさらに関する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、疾患の治療においてそして医療において、特にがんの治療において使用するための本発明によるペプチド、本発明による核酸または本発明による発現ベクターにさらに関する。

10

【 0 0 4 7 】

本発明は、本発明によるペプチドに、または前記本発明によるペプチドとMHCの複合体に、特異的に対抗する抗体と、それらを製造する方法とにさらに関する。

【 0 0 4 8 】

本発明は、自己由来または同種異系T細胞に組み込まれた、T細胞受容体(TCR)、特に可溶性TCR(sTCR)、およびクローン化TCR、そしてこれらを製造する方法、ならびに前記TCRを有するまたは前記TCRと交差反応する、NK細胞またはその他の細胞を製造する方法にさらに関する。

【 0 0 4 9 】

20

抗体およびTCRは、本発明によるペプチドの免疫療法用途の追加的な実施形態である。

【 0 0 5 0 】

本発明は、前述のような本発明による核酸または発現ベクターを含んでなる、宿主細胞にさらに関する。本発明は、抗原提示細胞であり、好ましくは樹状細胞である、本発明による宿主細胞にさらに関する。

【 0 0 5 1 】

本発明は、本発明による宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、本発明によるペプチドを製造する方法にさらに関する。

30

【 0 0 5 2 】

本発明は、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞または人工抗原提示細胞の表面に発現されるクラスIまたはII MHC分子上に抗原が負荷される、本発明による方法にさらに関する。

【 0 0 5 3 】

本発明は、抗原提示細胞が、配列番号1～配列番号228を含有する、好ましくは少なくとも1つの表2に記載の配列番号、または変異アミノ酸配列を含有する、前記ペプチドを発現する能力がありまたは発現する、発現ベクターを含んでなる、本発明による方法にさらに関する。

【 0 0 5 4 】

40

本発明は、本発明による方法によって製造される活性化T細胞にさらに関し、前記T細胞は、本発明によるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを発現する細胞を選択的に認識する。

【 0 0 5 5 】

本発明は、本発明によって製造されるT細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる、患者において、本発明による任意のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する標的細胞を死滅させる方法にさらに関する。

【 0 0 5 6 】

本発明は、薬剤としてのまたは薬剤の製造における、記載される任意のペプチド、本発明による核酸、本発明による発現ベクター、本発明による細胞、本発明による活性化Tリ

50

ンパ球、T細胞受容体または抗体またはその他のペプチド - および / またはペプチド - MHC - 結合分子の使用にさらに関する。好ましくは、前記薬剤は、がんに対して有効である。

【0057】

好ましくは、前記薬剤は、可溶性TCRまたは抗体に基づく、細胞療法、ワクチンまたはタンパク質である。

【0058】

本発明は、本発明による使用にさらに関し、前記がん細胞は、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、脾臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がん細胞、および好ましくは骨髄腫細胞である。

10

【0059】

本発明は、がん、好ましくは骨髄腫の診断において使用され得る、本明細書で「標的」と称される、本発明によるペプチドをベースとするバイオマーカーにさらに関する。マーカーは、ペプチドそれ自体の過剰提示、または対応遺伝子の過剰発現であり得る。マーカーはまた、好ましくは免疫療法、最も好ましくはバイオマーカーによって同定されるのと同じ標的を標的とする免疫療法である、治療の成功確率を予測するのに使用されてもよい。例えば、抗体または可溶性TCRを使用して腫瘍切片が染色され、MHCと複合体形成する目的ペプチドの存在が検出され得る。

【0060】

20

任意選択的に、抗体は、免疫刺激ドメインまたは毒素などのさらなるエフェクター機能を保有する。

【0061】

本発明はまた、がん治療の文脈におけるこれらの新規標的の使用に関する。

【0062】

追加的ながん性疾患に対する治療的および診断的使用の双方が、本発明によるペプチドの基本的発現産物（ポリペプチド）に関する、以下のより詳細な説明で開示される。

【発明を実施するための形態】

【0063】

免疫応答の刺激は、宿主免疫系によって外来性として認識される抗原の存在に依存する。腫瘍関連抗原の存在の発見は、宿主の免疫系を用いて腫瘍成長に介入する可能性を高めた。免疫系の体液性および細胞性アームの双方を活用する様々な機構が、がん免疫療法のために目下探求されている。

30

【0064】

細胞性免疫応答の特定の要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からのT細胞の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、細胞質ゾル内に位置するタンパク質または欠陥リボソーム産物（DRIPS）に由来する、通常は8～10アミノ酸残基の主要組織適合性複合体（MHC）保有ペプチドのクラスI分子を認識するCD8陽性T細胞が、この応答において重要な役割を果たす。ヒトのMHC分子はまた、ヒト白血球抗原（HLA）とも称される。

40

【0065】

本明細書の用法では、別段の記載がない限り、全ての用語は下述のとおり定義される。

【0066】

「T細胞応答」という用語は、生体外または生体内でペプチドによって誘導される、エフェクター機能の特異的増殖および活性化を意味する。MHCクラスI拘束性細胞毒性T細胞では、エフェクター機能は、ペプチドパルスされた、ペプチド前駆体パルスされたまたは天然ペプチド提示標的細胞の溶解；好ましくはペプチドによって誘導されるインターフェロン - 、TNF - 、またはIL - 2であるサイトカインの分泌；好ましくはペプチドによって誘導されるグランザイムまたはパーフォリンであるエフェクター分子の分泌

50

；または脱顆粒であってもよい。

【0067】

「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の - アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。ペプチドは、好ましくは9アミノ酸長であるが、8アミノ酸長程度に短くあり得て、10、11、12アミノ酸長またはそれ以上にさえ長くあり得て、MHCクラスIIペプチド（例えば、本発明のペプチドの伸長された変種）の場合、それらは15、16、17、18、19、20または23アミノ酸長以上に長くあり得る。

【0068】

さらに「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の - アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基の塩を含むものとする。好ましくは、塩は、例えば、塩化物塩または酢酸塩（トリフルオロ酢酸塩）などの、ペプチドの薬学的に許容可能な塩である。ペプチドは生体内においては塩ではないので、本発明によるペプチドの塩は、それらの生体内の状態が、ペプチドと実質的に異なることに留意すべきである。

【0069】

「ペプチド」という用語は、「オリゴペプチド」もまた含むものとする。「オリゴペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の - アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。オリゴペプチドの長さは、その中で正しいエピトープまたはエピトープが保持されれば、本発明には重要でない。オリゴペプチドは、典型的に、約30アミノ酸残基長未満であり、約15アミノ酸長を超える。

【0070】

「ポリペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の - アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を指す。正しいエピトープが保持されれば、ポリペプチドの長さは本発明にとって重要でない。ペプチドまたはオリゴペプチドという用語とは対照的に、ポリペプチドという用語は、約30を超えるアミノ酸残基を含有する分子を指すことが意図される。

【0071】

ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質またはこのような分子をコードするポリヌクレオチドは、免疫応答を誘導できれば「免疫原性」である（したがって本発明における「免疫原」である）。本発明では、免疫原性は、より具体的には、T細胞応答を誘導する能力と定義される。したがって「免疫原」は、免疫応答を誘導できる分子であり、本発明では、T細胞応答を誘導できる分子である。別の態様では、免疫原は、それに対する特異的抗体またはTCRを生じさせるのに使用される、ペプチド、ペプチドとMHCの複合体、オリゴペプチド、および/またはタンパク質であり得る。

【0072】

クラスI T細胞「エピトープ」は、クラスI MHC受容体に結合している短いペプチドを必要とし、三成分複合体（MHCクラスI鎖、 β -2-ミクログロブリン、およびペプチド）を形成し、それは、適切な親和性でMHC/ペプチド複合体に結合する適合T細胞受容体を保有するT細胞によって、認識され得る。MHCクラスI分子に結合するペプチドは、典型的に8~14アミノ酸長であり、最も典型的には9アミノ酸長である。

【0073】

ヒトにおいては、MHCクラスI分子（ヒト白血球抗原（HLA）ともまた称されるヒトのMHC分子）をコードする、3つの異なる遺伝子座、HLA-A、HLA-B、およびHLA-Cがある。HLA-A*01、HLA-A*02、およびHLA-B*07は、これらの遺伝子座から発現され得る、異なるMHCクラスI対立遺伝子の例である。

【0074】

表3:HLA-A*02およびHLA-A*24の発現頻度F、および最も高頻度のHLA-DR血清型。頻度は、ハーディ・ワインベルグ式、 $F=1-(1-Gf)^2$ を用いて、Mori et al. (Mori et al., 1997)

10

20

30

40

50

から適応された、米国人母集団内のハプロタイプ頻度Gfから推定される。連鎖不均衡のために、A*02またはA*24と特定のHLA-DR対立遺伝子との組み合わせは、それらの単一頻度から予測されるよりも、豊富でありまたは低頻度であるかもしれない。詳細については、Chanock et al. (Chanock et al., 2004)を参照されたい。

【表 3 - 1】

| 対立遺伝子 | 母集団 | 対立遺伝子出現頻度から計算された表現型 |
|-------|--------------|---------------------|
| A*02 | 白人(北米) | 49.1% |
| A*02 | アフリカ系米国人(北米) | 34.1% |
| A*02 | アジア系米国人(北米) | 43.2% |
| A*02 | ラテン系米国人(北米) | 48.3% |
| DR1 | 白人(北米) | 19.4% |
| DR2 | 白人(北米) | 28.2% |
| DR3 | 白人(北米) | 20.6% |
| DR4 | 白人(北米) | 30.7% |
| DR5 | 白人(北米) | 23.3% |
| DR6 | 白人(北米) | 26.7% |
| DR7 | 白人(北米) | 24.8% |
| DR8 | 白人(北米) | 5.7% |
| DR9 | 白人(北米) | 2.1% |
| DR1 | アフリカ系(北)米人 | 13.20% |
| DR2 | アフリカ系(北)米人 | 29.80% |
| DR3 | アフリカ系(北)米人 | 24.80% |
| DR4 | アフリカ系(北)米人 | 11.10% |
| DR5 | アフリカ系(北)米人 | 31.10% |
| DR6 | アフリカ系(北)米人 | 33.70% |
| DR7 | アフリカ系(北)米人 | 19.20% |
| DR8 | アフリカ系(北)米人 | 12.10% |
| DR9 | アフリカ系(北)米人 | 5.80% |
| DR1 | アジア系(北)米人 | 6.80% |
| DR2 | アジア系(北)米人 | 33.80% |
| DR3 | アジア系(北)米人 | 9.20% |
| DR4 | アジア系(北)米人 | 28.60% |
| DR5 | アジア系(北)米人 | 30.00% |
| DR6 | アジア系(北)米人 | 25.10% |
| DR7 | アジア系(北)米人 | 13.40% |
| DR8 | アジア系(北)米人 | 12.70% |
| DR9 | アジア系(北)米人 | 18.60% |
| DR1 | ラテン系(北)米人 | 15.30% |
| DR2 | ラテン系(北)米人 | 21.20% |

10

20

30

【表 3 - 2】

| 対立遺伝子 | 母集団 | 対立遺伝子出現頻度から計算された表現型 |
|---------|-----------|---------------------|
| DR3 | ラテン系(北)米人 | 15.20% |
| DR4 | ラテン系(北)米人 | 36.80% |
| DR5 | ラテン系(北)米人 | 20.00% |
| DR6 | ラテン系(北)米人 | 31.10% |
| DR7 | ラテン系(北)米人 | 20.20% |
| DR8 | ラテン系(北)米人 | 18.60% |
| DR9 | ラテン系(北)米人 | 2.10% |
| A*24 | フィリピン | 65% |
| A*24 | ロシアネネツ | 61% |
| A*24:02 | 日本 | 59% |
| A*24 | マレーシア | 58% |
| A*24:02 | フィリピン | 54% |
| A*24 | インド | 47% |
| A*24 | 韓国 | 40% |
| A*24 | スリランカ | 37% |
| A*24 | 中国 | 32% |
| A*24:02 | インド | 29% |
| A*24 | オーストラリア西部 | 22% |
| A*24 | 米国 | 22% |
| A*24 | ロシアサマラ | 20% |
| A*24 | 南米 | 20% |
| A*24 | 欧州 | 18% |

40

50

【 0 0 7 5 】

本発明のペプチドは、好ましくは、本明細書に記載される本発明のワクチンに含まれる場合、HLA-A*02に好ましくは結合する。ワクチンはまた、汎結合MHCクラスIIペプチドを含んでもよい。したがって、本発明のワクチンを使用して、A*02陽性の患者においてがんを治療し得る一方で、これらのペプチドの汎結合特性のために、MHCクラスIIアロタイプを選択する必要はない。

【 0 0 7 6 】

本発明のA*02ペプチドが、例えばA*24などの別の対立遺伝子に結合するペプチドと組み合わせられた場合、MHCクラスI対立遺伝子のいずれか単独による対処と比較して、任意の患者集団のより高い割合を治療し得る。大多数の母集団では、対立遺伝子のいずれか単独によって、50%未満の患者が対処され得る一方で、HLA-A*24およびHLA-A*02エピトープを含んでなるワクチンは、任意の妥当な母集団で、少なくとも60%の患者を治療し得る。具体的には、様々な地域において、以下の百分率の患者が、これらの対立遺伝子の少なくとも1つについて陽性である：米国61%、西欧62%、中国75%、韓国77%、日本86%(www.allele-frequencies.netから計算された)。

【 0 0 7 7 】

好ましい実施形態では、「ヌクレオチド配列」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのヘテロ重合体を指す。

【 0 0 7 8 】

特定のペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、天然起源であってもよく、またはそれらは合成的に構築されてもよい。一般に、本発明のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質をエンコードするDNA断片は、cDNAフラグメントと短いオリゴヌクレオチドリンカーから構築され、またはひと続きのオリゴヌクレオチドから構築されて、微生物またはウイルスオペロンに由来する調節因子を含んでなる、組換え転写単位で発現できる合成遺伝子が提供される。

【 0 0 7 9 】

本明細書の用法では「ペプチドをコーディング(またはコード)するヌクレオチド」という用語は、配列が、例えば、TCRの製造に有用な樹状細胞または別の細胞株によって発現される生体系と適合性である、人工(人造)開始および停止コドンを含むペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を指す。

【 0 0 8 0 】

本明細書の用法では、核酸配列への言及は、一本鎖および二本鎖の核酸の双方を含む。したがって、例えば、特異的配列は、文脈上明らかに別の意味が示唆されない限り、このような配列の一本鎖DNA、このような配列とその補体との二本鎖(二本鎖DNA)、およびこのような配列の補体を指す。

【 0 0 8 1 】

「コード領域」という用語は、その天然ゲノム環境内で、遺伝子の発現産物を天然にまたは正常にコードする遺伝子の部分、すなわち、遺伝子の天然発現産物を生体内でコードする領域を指す。

【 0 0 8 2 】

コード領域は、非変異(「正常」)、変異または改変遺伝子に由来し得て、またはDNA合成技術の当業者に周知の方法を使用して実験室で完全に合成された、DNA配列または遺伝子にさえ由来し得る。

【 0 0 8 3 】

「発現産物」という用語は、遺伝子の、そして遺伝コード縮重に起因する同等物をコードし、したがって同一アミノ酸をコードする任意の核酸配列の天然翻訳産物である、ポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

【 0 0 8 4 】

コード配列に言及する場合、「フラグメント」という用語は、その発現産物が、完全コ

10

20

30

40

50

ード領域の発現産物と本質的に同一の生物学的機能または活性を保つ、完全未満のコード領域を含んでなるDNAの部分を意味する。

【0085】

「DNA断片」という用語は、別々のフラグメントの形態の、またはより大型のDNAコンストラクトの構成要素としての、DNAポリマーを指し、それは、実質的に純粋な、すなわち、混入内因性物質を含まない形態で、例えばクローニングベクターを使用した標準生化学的方法によって、断片およびその構成ヌクレオチド配列が同定、操作、および回収できる量または濃度で、少なくとも1回単離されたDNAに由来する。このような断片は、典型的に真核生物遺伝子内に存在する内部非翻訳配列またはイントロンによって中断されていない、読み取り枠の形態で提供される。非翻訳DNA配列は、それがコード領域の操作または発現を妨げない、読み取り枠下流に存在してもよい。

10

【0086】

「プライマー」という用語は、短い核酸配列を意味し、それはDNAの1本鎖と対合し得て、DNAポリメラーゼがそこでデオキシリボヌクレオチド鎖合成を開始する、遊離3'-OH末端を提供する。

【0087】

「プロモーター」という用語は、転写を開始するためのRNAポリメラーゼ結合に関与する、DNAの領域を意味する。

【0088】

「単離」という用語は、物質が、その元の環境（例えば、それが天然起源であれば天然環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然システムで共存する物質の一部または全部から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得て、および/またはこのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であり得るが、このようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部でないという意味では、なおも単離されている。

20

【0089】

本発明によって開示されるポリヌクレオチド、および組換えまたは免疫原性ポリペプチドは、「精製」形態であってもよい。「精製」という用語は、完全に純粋である必要はなく；むしろ、それは相対的定義であることが意図されて、これらの用語が当業者によって理解されるように、高度に精製された調製物、または部分的にのみ精製された調製物を含み得る。例えば、cDNAライブラリーから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一に、従来法で精製されている。少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁までの、出発原料または天然物質の精製が明示的に検討される。さらに、重量基準で、好ましくは99.999%、または少なくとも99.99%または99.9%；さらに望ましくは99%以上の純度を有する、特許請求されるポリペプチドが明示的に包含される。

30

【0090】

本発明によって開示される核酸およびポリペプチド発現産物、ならびにこのような核酸および/またはこのようなポリペプチドを含有する発現ベクターは、「富化形態」であってもよい。本明細書の用法では、「富化」という用語は、物質濃度が、（例えば）その天然濃度の少なくとも約2、5、10、100、または1000倍であることを意味し、有利には重量基準で0.01%、好ましくは重量基準で少なくとも約0.1%である。重量基準で約0.5%、1%、5%、10%、および20%の富化調製物もまた、検討される。本発明を構成する、配列、コンストラクト、ベクター、クローン、およびその他の物質は、有利には、富化または単離形態であり得る。「活性フラグメント」という用語は、通常は、単独で、または任意選択的に適切なアジュバントと共に、またはベクター中で、例えば、ウサギまたはマウスのようなそしてまたヒトをはじめとする哺乳類などの動物に投与すると免疫応答を生じる（すなわち、免疫原性を有する）ペプチド、ポリペプチドまた

40

50

は核酸配列のフラグメントを意味し、このような免疫応答は、ヒトなどのレシピエント動物内でT細胞応答を刺激する形態を取る。代案としては、「活性フラグメント」はまた、生体外T細胞応答を誘導するのに使用されてもよい。

【0091】

本明細書の用法では、ポリペプチドとの関連で使用される場合、「部分」、「断片」、および「フラグメント」という用語は、アミノ酸残基などの連続する残基の配列を指し、その配列は、より大型の配列の部分集合を形成する。例えば、ポリペプチドが、トリプシンまたはキモトリプシンなどの一般的エンドペプチダーゼのいずれかによって処理されれば、このような処理から得られるオリゴペプチドは、出発ポリペプチドの部分、断片またはフラグメントに相当するであろう。ポリヌクレオチドに関して使用される場合、これらの用語は、いずれかのエンドヌクレアーゼによる前記ポリヌクレオチドの処理によって生じる生成物を指す。

【0092】

本発明によると、配列に言及する場合、「同一性百分率」または「パーセント同一」という用語は、比較される配列（「比較配列」）と、記載されまたは特許請求される配列（「参照配列」）とのアライメント後に、配列が、特許請求されまたは記載される配列と比較されることを意味する。次に同一性百分率は、次式に従って判定される：

$$\text{同一性百分率} = 100 [1 - (C / R)]$$

式中、Cは、参照配列と比較される配列との間のアライメント長にわたる、参照配列と比較配列の間の差異の数であり、

(i) 比較配列中に対応する整列塩基またはアミノ酸を有しない、参照配列中の各塩基またはアミノ酸、および

(ii) 参照配列中の各ギャップ、および

(iii) 比較配列中の整列塩基またはアミノ酸と異なる、参照配列中の各整列塩基またはアミノ酸が差異を構成して、

(iiii) アライメントは、整合配列の1位から開始しなくてはならず；

Rは、比較配列とのアライメント長にわたる参照配列中の塩基またはアミノ酸の数であり、参照配列中に生じる任意のギャップもまた、塩基またはアミノ酸として数えられる。

【0093】

比較配列と、それに対して同一性百分率が上のように計算される参照配列との間に、特定の最小同一性百分率とほぼ同じまたはそれを上回るアライメントが存在すれば、その中に、上記のように計算された同一性百分率が特定の同一性百分率未満であるアライメントが存在したとしても、比較配列は、参照配列との特定の最小同一性百分率を有する。

【0094】

したがって上述したように、本発明は、配列番号1～配列番号228、または配列番号1～配列番号228と88%相同的であるその変異体、またはT細胞を前記ペプチドと交差反応させるその変異体からなる群から選択される配列を含んでなる、ペプチドを提供する。本発明のペプチドは、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子または前記ペプチドの伸長バージョンをクラスIIに結合する能力を有する。

【0095】

本発明では、「相同的」という用語は、2つのアミノ酸配列、すなわちペプチドまたはポリペプチド配列の配列間の同一性の程度を指す(上の同一性百分率を参照されたい)。前述の「相同性」は、比較される配列にわたり、最適条件下でアライメントされた2つの配列を比較することで判定される。このような配列相同性は、例えばClustalWアルゴリズムを使用してアライメントを作成することで、計算され得る。一般に利用できる配列解析ソフトウェア、より具体的には、Vector NTI、GENETYXまたはその他のツールが、公共データベースによって提供される。

【0096】

当業者は、特定のペプチドの変異体によって誘導されるT細胞が、ペプチドそれ自体と交差反応できるかどうかを評価できるであろう(Appay et al., 2006；

10

20

30

40

50

Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997)。

【0097】

所与のアミノ酸配列の「変異型」によって、本発明者らは、ペプチドが、配列番号1～配列番号228からなる所与のアミノ酸配列からなるペプチドと実質的に同様に、HLA分子となおも結合できるように、(例えば、それらを別の天然アミノ酸残基の側鎖で、またはその他の側鎖で置換することにより)例えば、アミノ酸の1つまたは2つの残基の側鎖が変化することを意味する。例えば、ペプチドは、それがHLA-A*02または-D Rなどの適切なMHC分子の結合溝と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、活性化CTLのTCRに結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。

10

【0098】

これらのT細胞は、引き続いて細胞と交差反応して、本発明の態様で定義される同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を殺滅し得る。学術文献およびデータベース(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)から誘導され得るように、HLA結合ペプチドの特定の位置は、典型的に、アンカー残基であり、結合溝を構成するポリペプチド鎖の極性、電気物理的、疎水性、および空間特性によって画定されるHLA受容体の結合モチーフと適合する、コア配列を形成する。したがって、当業者は、既知のアンカー残基を保つことで、配列番号1～配列番号228に記載されるアミノ酸配列を修飾でき、このような変異型がMHCクラスIまたはII分子に結合する能力を維持するかどうかを判定できるであろう。本発明の変異型は、活性化T細胞のTCRに結合する能力を維持し、それは引き続いて、本発明の態様で定義されるような同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞と交差反応して、それを殺滅し得る。

20

【0099】

本明細書で開示される元の(未修飾)ペプチドは、特に明記されない場合は、ペプチド鎖内の異なる、おそらくは選択的な部位における、1つまたは複数の残基の置換によって修飾され得る。好ましくはこれらの置換は、アミノ酸鎖の末端に位置する。このような置換は、保存的性質であってもよく、例えば、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸によって置換されるなど、構造および特徴の類似したアミノ酸によってアミノ酸が置換される。さらにより保存的な置換は、ロイシンのイソロイシンによる置換などの、同一または類似サイズおよび化学的性質のアミノ酸の置換である。天然起源相同タンパク質ファミリーの配列多様性の研究では、特定のアミノ酸置換は、他よりも耐容されることが多く、これらは、元のアミノ酸とその置換物の間のサイズ、電荷、極性、および疎水性の類似性との相関を示すことが多く、これが「保存的置換」の定義の基礎である。

30

【0100】

保存的置換は、本明細書では、以下の5つのグループの1つの中の交換として定義される: グループ1 - 小型脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基(Ala、Ser、Thr、Pro、Gly); グループ2 - 極性の負に帯電した残基およびそれらのアミド(Asp、Asn、Glu、Gln); グループ3 - 極性の正に帯電した残基(His、Arg、Lys); グループ4 - 大型脂肪族非極性残基(Met、Leu、Ile、Val、Cys); およびグループ5 - 大型芳香族残基(Phe、Tyr、Trp)。

40

【0101】

より保存的でない置換は、アラニンのイソロイシン残基による置換などの、類似した特徴を有するがサイズがいくらか異なる別のアミノ酸による置換を伴うかもしれない。高度に非保存的な置換は、極性アミノ酸の、または塩基性アミノ酸の酸性アミノ酸による置換を伴うかもしれない。しかし化学効果は完全に予測可能でなく、過激な置換が、単純な化学的原理から予測できない偶然の効果を生じさせる可能性があるので、このような「過激な」置換を潜在的に無効であるとして却下し得ない。

【0102】

50

もちろんこのような置換には、通常の L - アミノ酸以外の構造体が関与してもよい。したがって D - アミノ酸が、本発明の抗原性ペプチドに通常見いだされる L - アミノ酸を置換するかもしれず、依然として本明細書の開示に包含される。さらに、非標準アミノ酸（すなわち、一般的な天然タンパク質新生アミノ酸以外）もまた置換目的で使用して、本発明による免疫原および免疫原性ポリペプチドが製造されてもよい

【0103】

2つ以上の位置における置換が、以下に定義されるように実質的に同等のまたはそれを超える抗原活性のあるペプチドをもたらすことが判明した場合、これらの置換の組み合わせを試験して、置換の組み合わせが、ペプチドの抗原性に相加または相乗効果をもたらすかどうか判定される。最大でも、ペプチド内の4つ以上の位置を超えて同時に置換されることはない。

10

【0104】

本明細書で示されるようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドは、非修飾ペプチドと比較すると、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II 分子に結合する能力が、実質的に変化したり悪影響を受けたりすることなく交換される、1つまたは2つの非アンカーアミノ酸を有し得る（アンカーモチーフについては下記を参照されたい）。別の実施形態では、本明細書で示されるようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドにおいては、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II 分子に結合する能力が非修飾ペプチドと比較して実質的に変化したり悪影響を受けることなく、1つまたは2つのアミノ酸が、それらの保存的交換パートナー（以下を参照されたい）で交換され得る。

20

【0105】

T細胞受容体との相互作用に実質的に寄与しないアミノ酸残基は、その組み込みが、T細胞反応性に実質的に影響を及ぼさず、関連MHCとの結合を排除しない、その他のアミノ酸での置換によって修飾され得る。したがって与えられた但し書きを除いて、本発明のペプチドは、与えられたようなアミノ酸配列またはそれらの部分または変異体を含む、任意のペプチド（本発明者らは、その用語にオリゴペプチドまたはポリペプチドを含める）であってもよい。

【0106】

より長い（伸長された）ペプチドもまた、適切であってもよい。MHCクラス I エピトープは、通常は8～11アミノ酸長であるが、実際のエピトープを含むより長いペプチドまたはタンパク質から、ペプチドプロセッシングによって作製することが可能である。実際のエピトープ側面に位置する残基は、プロセッシング中に実際のエピトープを曝露させるのに必要なタンパク質分解切断に、実質的に影響を及ぼさない残基であることが好ましい。

30

【0107】

本発明のペプチドは、最大4個のアミノ酸によって伸長させ得て、すなわち4：0～0：4の間のあらゆる組み合わせで、どちらかの末端に1、2、3または4個のアミノ酸が付加され得る。本発明による伸長の組み合わせは、表4にある。

【0108】

40

表4：本発明のペプチドの伸長の組み合わせ

【表 4】

表4: 本発明のペプチドの伸長の組み合わせ

| C末端 | N末端 |
|-----|-------------------|
| 4 | 0 |
| 3 | 0または1 |
| 2 | 0または1または2 |
| 1 | 0または1または2または3 |
| 0 | 0または1または2または3または4 |
| N末端 | C末端 |
| 4 | 0 |
| 3 | 0または1 |
| 2 | 0または1または2 |
| 1 | 0または1または2または3 |
| 0 | 0または1または2または3または4 |

10

【0109】

伸長／延長のためのアミノ酸は、元のタンパク質配列のペプチドまたは任意のその他のアミノ酸であり得る。伸長を利用して、ペプチドの安定性または溶解度を高め得る。

【0110】

したがって本発明のエピトープは、天然起源腫瘍関連または腫瘍特異的エピトープと同一であってもよく、またはそれらが実質的に同一の抗原活性を有しさえすれば、4つ以下の残基が参照ペプチドと異なるエピトープを含んでもよい。

【0111】

代案の実施形態では、ペプチドは、4つを超えるアミノ酸で、好ましくは最大30アミノ酸の全長まで、片側または両側で伸長される。これは、MHCクラスII結合ペプチドをもたらしてもよい。MHCクラスIIへの結合は、当該技術分野で公知の方法によって試験される得る。

20

【0112】

したがって、本発明は、MHCクラスIIエピトープのペプチドおよび変異型を提供し、ペプチドまたは変異型は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14、すなわち8、9、10、11、12、13、14アミノ酸の全長を有し、伸長されたクラスII結合ペプチドの場合、長さはまた、15、16、17、18、19、20、21または22または23アミノ酸であり得る。

30

【0113】

もちろん、本発明によるペプチドまたは変異型は、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIまたはIIの分子に結合する能力を有する。ペプチドまたは変異体のMHC複合体への結合は、当該技術分野で既知の方法によって試験されてもよい。

【0114】

好ましくは、本発明によるペプチドに特異的なT細胞を置換ペプチドについて試験する場合、置換ペプチドが背景に対して最大溶解増加の半分を達成するペプチド濃度は、約1mM以下、好ましくは約1μM以下、より好ましくは約1nM以下、さらにより好ましくは約100pM以下、最も好ましくは約10pM以下である。置換ペプチドが、2人以上、少なくとも2人、より好ましくは3人の個人からのT細胞によって認識されることもまた好ましい。

40

【0115】

本発明の特に好ましい実施形態では、ペプチドは、配列番号に1～配列番号228に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる。

【0116】

「から本質的になる」は、本発明によるペプチドが、配列番号1～配列番号228のいずれかに記載の配列またはその変異体に加えて、MHC分子エピトープのエピトープとして機能するペプチドの一部を必ずしも構成しない、追加的なNおよび／またはC末端に位置するアミノ酸の一連の配列を含有することを意味するものとする。

【0117】

50

それでもなお、これらの一連の配列は、本発明によるペプチドの細胞への効率的な導入を提供するのに重要であり得る。本発明の一実施形態では、ペプチドは、例えば、NCBI、GenBank 受入番号 X00497 に由来する、HLA-DR 抗原関連不変鎖 (p33、以下の「Ii」) の 80 個の N 末端アミノ酸を含んでなる、融合タンパク質の一部である。その他の融合物においては、本発明のペプチドは、本明細書に記載されるような抗体、またはその機能的部分に、特に抗体の配列に、前記抗体によって特異的に標的化されるように融合し得て、または例えば、本明細書に記載されるような樹状細胞に対して特異的な抗体に、またはその中に融合し得る。

【0118】

さらにペプチドまたは変異型は、より強力な免疫応答を引き起こすために、安定性および/または MHC 分子への結合を改善するようにさらに修飾されてもよい。ペプチド配列のこのような最適化方法は当該技術分野で周知であり、例えば、逆ペプチド結合または非ペプチド結合の導入が挙げられる。

【0119】

逆ペプチド結合においては、アミノ酸残基はペプチド (-CO-NH-) 結合によって連結せず、ペプチド結合が逆転する。このようなレトロ-インベルソペプチド模倣剤は、例えば、参照により本明細書に援用される、Mezriere et al (1997) (Mezriere et al., 1997) に記載されるものなどの当該技術分野で既知の方法を使用して製造されてもよい。このアプローチは、側鎖の方向でなく主鎖に関与する変化を含有する、擬ペプチドの生成を伴う。Mezriere et al. (Mezriere et al., 1997) は、MHC 結合および T ヘルパー細胞応答のために、これらの擬ペプチドが有用であることを示す。CO-NH ペプチド結合の代わりに NH-CO 結合を含有するレトロインバースペプチドは、タンパク質分解に対してはるかにより高い耐性がある。

【0120】

非ペプチド結合は、例えば、-CH₂-NH、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、および -CH₂SO- である。米国特許第 4,897,445 号明細書は、標準手順によって合成されるポリペプチド、および NaCNBH₃ の存在下でアミノアルデヒドとアミノ酸を反応させることで合成される非ペプチド結合が関与する、ポリペプチド鎖中の非ペプチド結合 (-CH₂-NH) を固相合成する方法を提供する。

【0121】

上述の配列を含んでなるペプチドは、それらのアミノおよび/またはカルボキシ末端に存在する追加的な化学基と共に合成して、ペプチドの安定性、生物学的利用能、および/または親和性を高めてもよい。例えば、カルボベンゾキシル、ダンシル、または t-ブチルオキシカルボニル基などの疎水性基が、ペプチドのアミノ末端に付加されてもよい。同様に、アセチル基または 9-フルオレニルメトキシ-カルボニル基が、ペプチドのアミノ末端に配置されてもよい。さらに、疎水性基、t-ブチルオキシカルボニル、またはアミド基が、ペプチドのカルボキシ末端に付加されてもよい。

【0122】

さらに、本発明のペプチドは、それらの立体配置を改変するように合成されてもよい。例えば、通常の L 異性体でなく、ペプチドの 1 つまたは複数のアミノ酸残基の D 異性体が使用されてもよい。なおもさらに、本発明のペプチドのアミノ酸残基の少なくとも 1 つは、周知の非天然起源アミノ酸残基の 1 つで置換されてもよい。これらのような変化は、本発明のペプチドの安定性、生物学的利用能および/または結合作用の増大に役立ってもよい。

【0123】

同様に、本発明のペプチドまたは変異体は、ペプチド合成の前または後のどちらかに、特定のアミノ酸を反応させることで化学的に修飾されてもよい。このような修飾の例は、当該技術分野で周知であり、例えば、参照により本明細書に援用される、R. Lundb

10

20

30

40

50

lad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004) に要約される。アミノ酸の化学修飾としては、これに限定されるものではないが (although without limitation thereto)、アシル化、アミジン化、リジンのピリドキシル化、還元アルキル化、2, 4, 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) によるアミノ基のトリニトロベンジル化、システインのシステイン酸への過ギ酸酸化によるカルボキシル基のアミド修飾およびスルフヒドリル修飾、水銀誘導体形成、その他のチオール化合物との混合ジスルフィド形成、マレイミドとの反応、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化、およびアルカリ性 pH でのシアネートによるカルバモイル化による修飾が挙げられるが、これに限定されるものではない (is not limited to)。この点において、当業者は、タンパク質の化学修飾に関するより詳細な手順について、Chapter 15 of Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995 - 2000) (Coligan et al., 1995) を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0124】

簡単に述べると、例えばタンパク質中のアルギニル残基の修飾は、付加体を形成するためのフェニルグリオキサル、2, 3 - ブタンジオン、および 1, 2 - シクロヘキサジオンなどの隣接するジカルボニル化合物の反応に基づくことが多い。別の実施例は、メチルグリオキサルとアルギニン残基の反応である。システインは、リジンおよびヒスチジンなどのその他の求核性部位の同時の修飾なしに修飾され得る。その結果、システイン修飾のために多数の試薬が利用可能である。Sigma - Aldrich などの会社のウェブサイト (<http://www.sigma-aldrich.com>) が、特定の試薬に関する情報を提供する。

【0125】

タンパク質中のジスルフィド結合の選択的還元もまた、一般的である。ジスルフィド結合は、生物医薬品の加熱処理中に形成されて酸化され得る。ウッドワード試薬 K を使用して、特定のグルタミン酸残基が修飾されてもよい。N - (3 - (ジメチルアミノ) プロピル) - N' - エチルカルボジイミドを利用して、リジン残基とグルタミン酸残基の間に分子内架橋が形成され得る。例えば、ジエチルピロ炭酸は、タンパク質中のヒスチジル残基修飾のための試薬である。ヒスチジンはまた、4 - ヒドロキシ - 2 - ノネナールを使用して修飾され得る。リジン残基およびその他の - アミノ基の反応物は、例えば、ペプチドの表面への結合またはタンパク質 / ペプチド架橋で有用である。リジンはポリ (エチレン) グリコールの付着部位であり、タンパク質のグリコシル化の主要な修飾部位である。タンパク質中のメチオニン残基は、例えば、ヨードアセトアミド、プロモエチルアミン、およびクロラミン T によって修飾され得る。

【0126】

テトラニトロメタンおよび N - アセチルイミダゾールを使用して、チロシル残基が修飾され得る。ジチロシンの形成を通じた架橋は、過酸化水素 / 銅イオンによって達成され得る。

【0127】

トリプトファンの修飾に関する最近の研究では、N - プロモサクシニミド、臭化 2 - ヒドロキシ - 5 - ニトロベンジルまたは 3 - プロモ - 3 - メチル - 2 - (2 - ニトロフェニルメルカプト) - 3 H - インドール (BPNS - スカトール) が使用されている。

【0128】

PEG による治療用タンパク質およびペプチドの成功裏の修飾が、循環半減期の延長に関連することが多い一方で、タンパク質と、グルタルアルデヒド、ポリエチレングリコールジアクリレート、およびホルムアルデヒドとの架橋は、ハイドロゲル調製のために使用される。免疫療法のためのアレルゲンの化学修飾は、カリウムシアネートでのカルバミル化によって達成されることが多い。

【0129】

ペプチドが修飾されまたは非ペプチド結合を含む、ペプチドまたは変異体は、本発明の好ましい実施形態である。一般に、ペプチドおよび変異体（少なくともアミノ酸残基間にペプチド結合を含有するもの）は、Lukas et al. (Lukas et al., 1981) およびその中で引用される参考文献によって開示される、Fmoc-ポリアミド様式の固相ペプチド合成によって合成されてもよい。一時的なN-アミノ基保護は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基によってもたらされる。この高度に塩基不安定性の保護基の反復性切断は、N,N-ジメチルホルムアミド中の20%ピペリジンを使用して実施される。側鎖官能基は、それらのブチルエーテル(セリン、スレオニン、およびチロシンの場合)、ブチルエステル(グルタミン酸およびアスパラギン酸の場合)、ブチルオキシカルボニル誘導体(リジンおよびヒスチジンの場合)、トリチル誘導体(システインの場合)、および4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン誘導体(アルギニンの場合)として保護されてもよい。グルタミンまたはアスパラギンがC末端残基である場合、側鎖アミド官能基を保護するために、4,4'-ジメトキシベンズヒドリル基が活用される。固相担体は、ジメチルアクリルアミド(主鎖単量体)、ビスアクリロイルエチレンジアミン(架橋剤)、およびアクリロイルサルコシメチルエステル(機能化因子)の3つの単量体から構成される、ポリジメチル-アクリルアミドポリマーをベースとする。使用されるペプチド-対-樹脂の切断可能な結合因子は、酸不安定性4-ヒドロキシメチル-フェノキシ酢酸誘導体である。逆転N,N-ジシクロヘキシル-カルボジイミド/1ヒドロキシベンゾトリアゾール媒介共役手順を使用して付加されるアスパラギンおよびグルタミンを除いて、全てのアミノ酸誘導体は、それらのあらかじめ形成された対称的な無水物誘導体として付加される。全ての共役および脱保護反応は、ニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸またはイサチン(isotitin)試験手順を使用してモニターされる。合成完了時に、ペプチドは樹脂担体から切断され、同時に、50%スカベンジャー混合物を含有する95%トリフルオロ酢酸での処理によって、側鎖保護基が除去される。一般に使用されるスカベンジャーとしては、エタンジチオール、フェノール、アニソール、および水が挙げられ、正確な選択は、合成されるペプチドの構成アミノ酸に左右される。ペプチドの合成のための固相法と溶液相法の組み合わせもまた、可能である(例えば、(Bruckdorfer et al., 2004)、およびその中で引用される参考文献を参照されたい)。

10

20

30

【0130】

トリフルオロ酢酸は、真空蒸発によって除去され、引き続くジエチルエーテルを用いた磨砕は、粗製ペプチドをもたらす。存在する任意のスカベンジャーは、単純な抽出手順によって除去され、それは水相の凍結乾燥時に、スカベンジャーを含まない粗製ペプチドを与える。ペプチド合成のための試薬は、通常、例えば、Calbiochem-Novabiochem(Nottingham, UK)から入手できる。

【0131】

精製は、再結晶化、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、および(通常は)例えばアセトニトリル/水勾配分離を使用した逆相高速液体クロマトグラフィーなどの技術の任意の1つまたは組み合わせによって、実施されてもよい。

40

【0132】

ペプチドの分析は、薄層クロマトグラフィー、電気泳動法、特にキャピラリー電気泳動法、固相抽出(CSPE)、逆相高速液体クロマトグラフィー、酸加水分解後のアミノ酸分析を使用して、高速原子衝撃(FAB)質量分光分析によって、ならびにMALDIおよびESI-Q-TOF質量分光分析によって、実施されてもよい。

【0133】

過剰提示ペプチドを選択するために、中央値サンプル提示ならびに反復試験変動を示す、提示プロファイルが計算される。プロファイルは、目的腫瘍実体のサンプルを正常なサンプルのベースラインに並置させる。次に、線形混合効果モデルのp値を計算し(Pin

50

heiro et al., 2015)、偽発見率によって複数試験について補正することで (Benjamini and Hochberg, 1995)、これらの各プロフィールが過剰提示スコアに統合され得る。

【0134】

質量分析によるHLAリガンドの同定と相対的定量化のために、衝撃凍結サンプルからのHLA分子が精製されて、HLA関連ペプチドが単離された。単離ペプチドを分離し、オンラインナノエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 実験によって配列を同定した。得られたペプチド配列は、骨髓腫サンプルから記録された天然TUMAPの断片化パターンを、同一配列の対応する合成参照ペプチドの断片化パターンと比較することで、確認された。ペプチドは、原発性腫瘍のHLA分子のリガンドとして直接、同定されたので、これらの結果は、骨髓腫患者から入手された原発性がん組織上における、同定されたペプチドの天然プロセッシングおよび提示の直接的証拠を提供する。

10

【0135】

発見パイプラインXPRESIDENT (登録商標) v2.1 (例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第2013-0096016号明細書を参照されたい) は、いくつかの異なる非がん性組織および臓器と比較されたがん組織上のHLA拘束性ペプチドレベルの直接相対定量化に基づく、妥当な過剰提示ペプチドワクチン候補の同定と選択を可能にする。これは、独自仕様のデータ解析パイプラインで処理された獲得LC-MSデータを使用して、配列同定のためのアルゴリズム、スペクトルクラスタリング、イオン計数、滞留時間アライメント、電荷状態のデコンボリューション、および正規化を組み合わせる、無標識差定量化の開発によって達成された。

20

【0136】

各ペプチドおよびサンプルの誤差推定値を含む、提示レベルが確立された。腫瘍組織上で排他的に提示されるペプチド、および腫瘍において過剰提示されるペプチドが、非がん性の組織および臓器との比較で同定されている。

【0137】

骨髓腫サンプルからのHLAペプチド複合体は精製されて、HLA結合ペプチドが単離され、LC-MSによって分析された (実施例を参照されたい)。本出願に含まれる全てのTUMAPは、このアプローチによって原発性骨髓腫サンプル上で同定され、骨髓腫上におけるそれらの提示が確認された。

30

【0138】

複数の骨髓腫および正常組織上で同定されたTUMAPは、無標識LC-MSデータのイオン計数を使用して定量化された。方法は、ペプチドのLC-MSシグナル面積が、サンプル中のその存在量と相関すると仮定する。様々なLC-MS実験におけるペプチドの全ての定量的シグナルは、中心傾向に基づいて正規化され、サンプル当たりで平均化されて、提示プロフィールと称される棒グラフにマージされた。提示プロフィールは、タンパク質データベース検索、スペクトルクラスタリング、電荷状態デコンボリューション (除電)、および滞留時間アライメントおよび正規化のような、異なる解析法を統合する。

40

【0139】

本発明は、本発明のペプチドを過剰にまたは排他的に提示する、好ましくは骨髓腫である、がん/腫瘍を治療するのに有用なペプチドを提供する。これらのペプチドは、ヒト骨髓腫サンプル上で、HLA分子によって天然に提示されることが、質量分析法によって示された。

【0140】

それにペプチドが由来する起源遺伝子/タンパク質 (「完全長タンパク質」または「基礎タンパク質」とも称される) の多くは、正常組織と比較してがんにおいて高度に過剰発現されることが示されて、起源遺伝子の高度な腫瘍関連性の実証され、「正常組織」は、本発明との関連で、健康な形質細胞またはその他の正常組織細胞のどちらかを意味するものとする。さらに、ペプチドそれ自体は、腫瘍組織上で強く過剰提示されるが正常組織上

50

では過剰提示されず、「腫瘍組織」は本発明との関連で、骨髓腫に罹患している患者に由来するサンプルを意味するものとする。

【0141】

H L A 結合ペプチドは、免疫系、特に T リンパ球によって認識され得る。T 細胞は、例えば、誘導ペプチドを提示する骨髓腫細胞などの、認識された H L A / ペプチド複合体を提示する細胞を破壊し得る。

【0142】

本発明のペプチドは、T 細胞応答を刺激でき、および / または過剰提示されることが示されており、したがって本発明に従って、抗体および / または可溶性 T C R などの T C R の製造のために使用され得る。さらに、ペプチドは、それぞれの M H C と複合体化した場合に、本発明による抗体および / または T C R、特に T C R 製造のためにも使用され得る。それぞれの方法は当業者に良く知られており、それぞれの参考文献にもまた見られる。したがって本発明のペプチドは、それによって腫瘍細胞が破壊され得る、患者における免疫応答を生じさせるのに有用である。患者における免疫応答は、理想的には免疫原性を増強する薬剤（すなわちアジュバント）との組み合わせで、記載されるペプチド、または適切な前駆物質（例えば伸長ペプチド、タンパク質、またはこれらのペプチドをコードする核酸）を患者に直接投与することで、誘導され得る。本発明の標的ペプチドは、正常組織上では同等のコピー数で提示されないもので、このような治療的ワクチン接種から生じる免疫応答は、腫瘍細胞に対して高度に特異的であることが予測され得て、患者の正常細胞に対する望まれない自己免疫反応のリスクを防止する。

10

20

【0143】

本明細書は、鎖および a 鎖（「 / T C R」）を含んでなる T 細胞受容体（T C R）にさらに関する。M H C 分子によって提示された際に、T C R および抗体に結合できる H A V C R 1 - 0 0 1 ペプチドもまた提供される。本明細書はまた、本明細書の T C R およびペプチドを発現するための核酸、ベクター、および宿主細胞；そしてそれを使用する方法にも関する。

【0144】

「T 細胞受容体」（T C R と略記される）という用語は、ポリペプチド鎖（鎖）および a ポリペプチド鎖（鎖）を含んでなるヘテロ二量体分子を指し、ヘテロ二量体受容体は、H L A 分子によって提示されるペプチド抗原と結合できる。本用語は、いわゆる / T C R もまた含む。

30

【0145】

一実施形態では、本明細書は、本明細書に記載されるような T C R を製造する方法を提供し、方法は、T C R の発現を促進するのに適した条件下で T C R を発現できる、宿主細胞を培養するステップを含んでなる。

【0146】

本明細書の別の態様では、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞または人工抗原提示細胞の表面に発現されるクラス I または I I M H C 分子上に、抗原が負荷され、または抗原 / クラス I または I I M H C 複合体モノマーを四量体化することで、クラス I または I I M H C 四量体上に抗原が負荷される、本明細書に記載の方法に関する。

40

【0147】

/ T C R の および 鎖、そして / T C R の および 鎖は、一般にそれぞれ 2 つの「領域」、すなわち可変および定常領域を有すると見なされる。可変領域は、可変領域（V）の連結と、連結領域（J）とからなる。可変領域はまた、リーダー領域（L）を含んでもよい。および 鎖はまた、多様性領域（D）を含んでもよい。および 定常領域はまた、および 鎖を細胞膜に固着させる C 末端膜貫通（T M）領域を含んでもよい。

【0148】

/ T C R に関して、「T C R 可変領域」という用語は、本明細書の用法ではリー

50

ダー領域 (L) のない T C R V (T R G V) 領域と T C R J (T R G J) 領域との連結を指し、T C R 定常領域という用語は、細胞外 T R G C 領域を指し、または C 末端トランケート型 T R G C 配列を指す同様に「T C R 可変領域」という用語は、リーダー領域 (L) のない T C R V (T R D V) 領域と T C R D / J (T R D D / T R D J) 領域との連結を指し、「T C R 定常領域」という用語は、細胞外 T R D C 領域を指し、または C 末端トランケート型 T R D C 配列を指す。

【 0 1 4 9 】

本明細書の T C R は、好ましくは、約 1 μ M 以下、約 0 0 1 μ M 以下、約 2 5 μ M 以下、または約 1 0 μ M 以下の結合親和性 (K D) で、H A V C R 1 - 0 0 1 ペプチド - H L A 分子複合体に結合する。より好ましいのは、約 1 μ M 以下、約 1 0 0 n M 以下、約 5 0 n M 以下、約 2 5 n M 以下の結合親和性を有する、高親和性 T C R である。本発明の T C R の好ましい結合親和性範囲の非限定的例としては、約 1 n M ~ 約 1 0 n M ; 約 1 0 n M ~ 約 2 0 n M ; 約 2 0 n M ~ 約 3 0 n M ; 約 3 0 n M ~ 約 4 0 n M ; 約 4 0 n M ~ 約 5 0 n M ; 約 5 0 n M ~ 約 6 0 n M ; 約 6 0 n M ~ 約 7 0 n M ; 約 7 0 n M ~ 約 8 0 n M ; 約 8 0 n M ~ 約 9 0 n M ; および約 9 0 n M ~ 約 1 0 0 n M が挙げられる。

10

【 0 1 5 0 】

本明細書の用法では、本明細書の T C R との関連で、「特異的結合」およびそれらの文法的変種は、H A V C R 1 - 0 0 1 ペプチド - H L A 分子複合体に対して、1 μ M 以下の結合親和性 (K D) を有する T C R を意味するために使用される。

20

【 0 1 5 1 】

本明細書の / ヘテロ二量体 T C R は、それらの定常領域の間に導入された、ジスルフィド結合を有してもよい。このタイプの好ましい T C R としては、T R A C 定常領域配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常領域配列とを有するものが挙げられるが、ただし、T R A C の T h r 4 8 および T R B C 1 または T R B C 2 の S e r 5 7 は、システイン残基によって置換されており、前記システインは、T C R の T R A C 定常領域配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常領域配列との間に、ジスルフィド結合を形成する。

30

【 0 1 5 2 】

上述の導入された鎖間結合の存在下または不在下で、本明細書の / ヘテロ二量体 T C R は、T R A C 定常領域配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常領域配列とを有してもよく、T C R の T R A C 定常領域配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常領域配列とが、T R A C のエクソン 2 の C y s 4 と、T R B C 1 または T R B C 2 のエクソン 2 の C y s 2 との間の天然ジスルフィド結合によって連結されてもよい。

【 0 1 5 3 】

本明細書の T C R は、放射性核種、フルオロフォア、およびビオチンからなる群から選択される、検出可能な標識を含んでなってもよい。本明細書の T C R は、放射性核種、化学療法剤、または毒素などの治療的活性薬剤にコンジュゲートされてもよい。

【 0 1 5 4 】

一実施形態では、鎖に少なくとも 1 つの変異を有し、および / または鎖に少なくとも 1 つの変異を有する本明細書の T C R は、非変異 T C R と比較して修飾されたグリコシル化を有する。

40

【 0 1 5 5 】

一実施形態では、T C R 鎖および / または T C R 鎖に少なくとも 1 つの変異を含んでなる T C R は、H A V C R 1 - 0 0 1 ペプチド - H L A 分子複合体に対して、非変異 T C R 鎖および / または非変異 T C R 鎖を含んでなる T C R の少なくとも倍の結合親和性および / または結合半減期を有する。腫瘍特異的 T C R の親和性増大とその利用は、最適 T C R 親和性のウィンドウの存在に依存する。このようなウィンドウの存在は、H L A - A 2 拘束性病原体に対して特異的な T C R が、H L A - A 2 拘束性腫瘍関連自己抗原に対して特異的な T C R と比較して、一般に約 1 0 分の 1 の K D 値を有するという観察に基づく。腫瘍抗原は免疫原性である可能性を有するが、腫瘍は個人自身の細胞から生じるので、改変された翻訳プロセッシングのある変異型タンパク質またはタンパク質のみが、免

50

疫系によって異質と見なされることが今や知られている。上方制御されまたは過剰発現される抗原（いわゆる自己抗原）は、腫瘍に対する機能性免疫応答を必ずしも誘導しない。これらの抗原に対して高度に反応性の TCR を発現する T 細胞は、中枢性免疫寛容として知られている過程、すなわち自己抗原に対する低親和性 TCR を有する T 細胞のみが残留する過程によって、胸腺において負選択される。したがって、H A V C R 1 - 0 0 1 に対する本明細書の TCR または変異体の親和性は、当技術分野で周知の方法によって高め得る。

【0156】

本明細書は、本明細書に従って TCR を同定して単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 0 2 陰性健常ドナーからの P B M C を A 2 / H A V C R 1 - 0 0 1 モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞選別 (F A C S) C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

10

【0157】

本明細書は、本明細書に従って TCR を同定して単離する方法にさらに関し、前記方法は、その T 細胞がマウス TCR 欠損を補う多様なヒト TCR レパートリーを発現する、全ヒト TCR 遺伝子遺伝子座 (1.1 および 0.7 M b) を有する遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを H A V C R 1 - 0 0 1 で免疫化するステップと、四量体フィコエリトリン (P E) を有する遺伝子組換えマウスから得られた P B M C をインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞選別 (F A C S) C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

20

【0158】

一態様では、本明細書の TCR を発現する T 細胞を得るために、本明細書の TCR - および / または TCR - 鎖をコードする核酸が、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの発現ベクターにクローン化される。組換えウイルスが生成され、次に、抗原特異性および機能性結合活性などの機能について試験される。次に、最終生成物のアリコートを使用して、標的 T 細胞集団（一般に患者の P B M C から精製される）が形質導入され、それは患者への輸液前に増殖される。

【0159】

別の態様では、本明細書の TCR を発現する T 細胞を得るために、例えば、生体外転写システム (s y s - t e m s) などの当該技術分野で公知の技術によって、TCR R N A が合成される。次に生体外で合成された TCR R N A は、健常ドナーから得られた原発性 C D 8 + T 細胞内に電気穿孔によって導入され、腫瘍特異的 TCR - および / または TCR - 鎖が再発現される。

30

【0160】

発現を増加させるために、本明細書の TCR をコードする核酸は、レトロウイルス長末端反復 (L T R)、サイトメガロウイルス (C M V)、マウス幹細胞ウイルス (M S C V) U 3、ホスホグリセリン酸キナーゼ (P G K)、 β -アクチン、ユビキチン、およびシミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) / C D 4 3 複合プロモーター、伸長因子 (E F) - 1 a、および脾臓フォーカス形成ウイルス (S F F V) プロモーターなどの強力なプロモーターと作動可能に連結されてもよい。好ましい実施形態では、プロモーターは、発現される核酸に対して異種である。

40

【0161】

強力なプロモーターに加えて、本明細書の TCR 発現カセットは、レンチウイルスコンストラクトの核転座を促進する、中央ポリプリントラクト (c P P T) (F o l l e n z i e t a l . , 2 0 0 0)、および R N A 安定性を増大させることで導入遺伝子発現のレベルを高める、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子 (w P R E) (Z u f f e r e y e t a l . , 1 9 9 9) をはじめとする、導入遺伝子発現を高め得る追加的な要素を含有してもよい。

【0162】

50

本発明のTCRの および 鎖は、別々のベクターにある核酸によってコードされてもよく、または同一ベクターにあるポリヌクレオチドによってコードされてもよい。

【0163】

高レベルのTCR表面発現の達成には、導入されたTCRのTCR - およびTCR - 鎖の双方が、高レベルで転写される必要がある。これを行うために、本明細書のTCR - およびTCR - 鎖は、この障害を克服できることが示されている、単一ベクター内のバイシストロニックコンストラクトにクローン化されてもよい。TCR - およびTCR - 鎖の間のウイルス配列内リボソーム進入部位の使用は、双方の鎖の協調発現をもたらすが、これはTCR - およびTCR - 鎖が、翻訳中に2つのタンパク質に分かれる単一転写物から生成されて、等モル比のTCR - およびTCR - 鎖の生成が確実になるためである。(Schmitt et al., 2009)。

10

【0164】

本明細書のTCRをコードする核酸はコドン最適化されて、宿主細胞からの発現が増加されてもよい。遺伝コードの重複は、いくつかのアミノ酸が2つ以上のコドンによってコードされるようにするが、特定のコドンは、適合tRNAの相対可用性ならびにその他の要因のために、他のものよりも「最適(optimal)」でない(Gustafsson et al., 2004)。各アミノ酸が、哺乳類遺伝子発現のための最適コドンによってコードされるように、TCR - およびTCR - 遺伝子配列を修飾すること、ならびにmRNA不安定モチーフまたは潜在的スプライス部位を除去することは、TCR - およびTCR - 遺伝子発現を有意に高めることが示されている(Scholtzen et al., 2006)。

20

【0165】

さらに、導入TCR鎖と内因性TCR鎖の間の誤対合は、自己免疫に重大なリスクをもたらす特異性の獲得を引き起こすこともある。例えば、混合TCR二量体の形成は、適切に対合するTCR複合体を形成するために利用できるCD3分子の数を減少させてもよく、ひいては導入TCRを発現する細胞の機能性結合活性を顕著に低下させ得る(Kuball et al., 2007)。

【0166】

誤対合を減少させるために、本明細書の導入TCR鎖のC末端領域は、鎖間親和性を高めながら導入鎖が内因性TCRと対形成する能力を低下させるために、修飾されてもよい。これらの戦略は、ヒトTCR - およびTCR - のC末端領域をそれらのマウス対応物(マウス化C末端領域)で置換する；導入TCRのTCR - およびTCR - 鎖の双方に第2のシステイン残基を導入することで、C末端領域に第2の鎖間ジスルフィド結合を作製する(システイン修飾)；TCR - およびTCR - 鎖C末端領域内の相互作用残基を交換する(「ノブ・イン・ホール」)；およびTCR - およびTCR - 鎖の可変領域をCD3 に直接融合させる(CD3 融合)ことを含んでもよい(Schmitt et al., 2009)。

30

【0167】

一実施形態では、宿主細胞は、本細書のTCRを発現するように遺伝子操作される。好ましい実施形態では、宿主細胞は、ヒトT細胞またはT細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞またはT細胞前駆細胞は、がん患者から得られる。その他の実施形態では、T細胞またはT細胞前駆細胞は、健常ドナーから得られる。本明細書の宿主細胞は、治療される患者に関して、同種異系または自己由来であり得る。一実施形態では、宿主は、 / TCRを発現するように形質転換された / T細胞である。

40

【0168】

「医薬組成物」は、医学的状況においてヒトへの投与に適する組成物である。好ましくは、医薬組成物は無菌であり、GMPガイドラインに準拠して製造される。

【0169】

医薬組成物は、遊離形態または薬学的に許容可能な塩の形態のどちらかのペプチドを含んでなる(上記もまた参照されたい)。本明細書の用法では、「薬学的に許容可能な塩」

50

は、開示されたペプチドの誘導体を指し、ペプチドは、薬剤の酸性または塩基性塩を生成することで修飾される。例えば、酸性塩は、適切な酸との反応を伴って、遊離塩基から調製される（典型的に、その中で薬剤の中性形態が中性NH₂基を有する）。酸性塩を調製するための適切な酸としては、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などの有機酸、ならびに例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸リン酸などの無機酸の双方が挙げられる。逆に、ペプチド上に存在してもよい酸部分の塩基性塩の調製物は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリメチルアミンなどの薬学的に許容可能な塩基を使用して調製される。

10

【0170】

特に好ましい一実施形態では、医薬組成物は、酢酸（酢酸塩）、トリフルオロ酢酸または塩酸（塩化物）の塩としてのペプチドを含んでなる。

【0171】

好ましくは、本発明の薬剤は、ワクチンなどの免疫療法剤である。それは、患者に直接、罹患臓器に、または全身的に、i.d.、i.m.、s.c.、i.p.、およびi.v.投与され、または生体外で患者またはヒト細胞株に由来する細胞に適用されて、それが引き続いて患者に投与され、あるいは生体外で使用されて患者に由来する免疫細胞の亜集団が選択され、次にそれが患者に再投与されてもよい。核酸が、生体外で細胞に投与される場合、インターロイキン2などの免疫刺激サイトカインを同時発現させるように、細胞を形質移入することが有用であってもよい。ペプチドは、実質的に純粋であり、または免疫刺激アジュバント（下記参照）と組み合わせられ、または免疫賦活性サイトカインと組み合わせ使用され、または例えば、リポソームなどの適切な送達系によって投与されてもよい。ペプチドはまた、キーホールリンペットヘモシニアン（KLH）またはマンナンなどの適切な担体に共役されてもよい（国際公開第95/18145号パンフレットおよび（Longenecker et al., 1993）を参照されたい）。ペプチドはまた、標識されてもよく、融合タンパク質であってもよく、またはハイブリッド分子であってもよい。その配列が本発明に記載されるペプチドは、CD4またはCD8 T細胞を刺激することが予測される。しかし、CD8 T細胞の刺激は、CD4 Tヘルパー細胞によって提供される援助の存在下で、より効率的である。したがって、CD8 T細胞を刺激するMHCクラスIエピトープでは、ハイブリッド分子の融合パートナーまたはセクションは、適切にはCD4陽性T細胞を刺激するエピトープを提供する。CD4およびCD8刺激エピトープは、当該技術分野で周知であり、本発明で同定されたものが挙げられる。

20

30

【0172】

一態様では、ワクチンは、配列番号1～配列番号228に記載されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのペプチドと、少なくとも1つの追加的なペプチド、好ましくは2～50、より好ましくは2～25、なおもより好ましくは2～20、最も好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18個のペプチドとを含んでなる。ペプチドは、1つまたは複数の特異的TAAから誘導されてもよく、MHCクラスI分子に結合してもよい。

40

【0173】

本発明のさらなる態様は、本発明のペプチドまたはペプチド変異体をエンコードする核酸（例えばポリヌクレオチド）を提供する。ポリヌクレオチドは、それがペプチドをコードしさえすれば、例えば、単鎖および/または二本鎖のいずれかのDNA、cDNA、PNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってもよく、または例えば、ホスホロチオエート主鎖を有するポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドの未変性または安定化形態であってもよく、それはイントロンを含有してもまたはしなくてもよい。もちろん、天然起源ペプチド結合によって連結する天然アミノ酸残基を含有するペプチドのみが、ポリヌクレオチドによってエンコードされ得る。本発明のなおもさらなる態様は、本発明によるボ

50

リペプチドを発現できる発現ベクターを提供する。

【0174】

例えば、相補的付着端を通じて、ポリヌクレオチド、特にDNAをベクターに連結する、多様な方法が開発されている。例えば、ベクターDNAに挿入されるDNA断片に、相補的ホモポリマー配列が付加され得る。次に、相補的ホモポリマー尾部間の水素結合によって、ベクターおよびDNA断片が連結されて組換えDNA分子が形成する。

【0175】

1つまたは複数の制限酵素認識部位を含有する合成リンカーは、DNA断片をベクターに連結する代替え方法を提供する。多様な制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する合成リンカーは、International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, USAをはじめとするいくつかの供給元から商業的に入手できる。

【0176】

本発明のポリペプチドをコードするDNAを修飾する望ましい方法は、Saiki R K, et al. (Saiki et al., 1988)で開示されるようなポリメラーゼ連鎖反応を用いる。この方法は、例えば適切な制限酵素認識部位を改変することで、DNAを適切なベクターに導入するために使用されてもよく、またはそれは、当該技術分野で既知のその他の有用な様式でDNAを修飾するために使用されてもよい。ウイルスベクターを使用するのであれば、ボックスウイルスまたはアデノウイルスベクターが好ましい。

【0177】

次に、DNA（またはレトロウイルスベクターの場合はRNA）を適切な宿主において発現させ、本発明のペプチドまたは変異体を含んでなるポリペプチドが製造されてもよい。このようにして、本明細書に含まれる教示を考慮して適切に修正された既知の技術に従って、本発明のペプチドまたは変異体をコードするDNAを使用して、発現ベクターが構築されてもよく、次にそれを使用して、本発明のポリペプチドの発現および製造のために、適切な宿主細胞が形質転換される。このような技術としては、例えば、米国特許第4,440,859号明細書、米国特許第4,530,901号明細書、米国特許第4,582,800号明細書、米国特許第4,677,063号明細書、米国特許第4,678,751号明細書、米国特許第4,704,362号明細書、米国特許第4,710,463号明細書、米国特許第4,757,006号明細書、米国特許第4,766,075号明細書、および米国特許第4,810,648号明細書で開示されるものが挙げられる。

【0178】

本発明の化合物を構成するポリペプチドをエンコードするDNA（またはレトロウイルスベクターの場合はRNA）は、適切な宿主への導入のために、多種多様なその他のDNA配列に連結されてもよい。コンパニオンDNAは、宿主の性質、DNAの宿主への導入様式、およびエピソームの維持または組み込みが所望されるかどうかに左右されるであろう。

【0179】

一般に、DNAは、発現のための適切な方向および正しい読み枠で、プラスミドなどの発現ベクターに挿入される。必要ならば、DNAは、所望の宿主によって認識される適切な転写および翻訳調節ヌクレオチド配列に連結されてもよいが、このような制御は、一般に発現ベクター中で利用できる。次に、標準的な技術を通じて、ベクターが宿主に導入される。一般に、全ての宿主がベクターによって形質転換されるわけではない。したがって、形質転換された宿主細胞を選択することが必要になる。一選択技術は、抗生物質耐性などの形質転換細胞内で選択可能な形質をコードする、任意の必要な制御因子を有するDNA配列を発現ベクター内に組み込むことを伴う。

【0180】

代案としては、このような選択可能な形質の遺伝子は、所望の宿主細胞を同時形質転換するのに使用される、別のベクター上にあり得る。

【0181】

次に、本明細書で開示される教示を考慮して、当業者に知られている適切な条件下で十分な時間にわたり、本発明の組換えDNAによって形質転換された宿主細胞が培養されてポリペプチドが発現され、次にそれが回収され得る。

【0182】

細菌（例えば大腸菌（*E. coli*）およびバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、酵母（例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、糸状菌（例えばアスペルギルス属（*Aspergillus*））、植物細胞、動物細胞、および昆虫細胞をはじめとする多数の発現系が知られている。好ましくは、発現系は、ATCC Cell Biology Collectionから入手できるCHO細胞などの哺乳類細胞であり得る。

10

【0183】

構成的発現のための典型的な哺乳類細胞ベクタープラスミドは、適切なポリA尾部と、ネオマイシンなどの耐性マーカーとを有する、CMVまたはSV40プロモーターを含んでなる。一例は、Pharmacia, Piscataway, NJ, USAから入手できるpSVLである。誘導性哺乳類発現ベクターの一例であるpMSGもまた、Pharmaciaから入手できる。有用な酵母プラスミドベクターは、pRS403-406およびpRS413-416であり、通常、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから入手できる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405、およびpRS406は、酵母組み込みプラスミド（YIps）であり、酵母の選択可能なマーカーHIS3、TRP1、LEU2、およびURA3が組み込まれている。プラスミドpRS413-416は、酵母セントロメアプラスミド（Ycps）である。CMVプロモーターベースのベクター（例えばSigma-Aldrich製）は、一過性または安定性発現、細胞質内発現または分泌、およびFRAG、3xFLAG、c-mycまたはMATの様々な組み合わせにおける、N末端またはC末端標識付けを提供する。これらの融合タンパク質は、組換えタンパク質を検出、精製、および分析できるようにする。二重標識融合物は、検出に融通性を与える。

20

【0184】

強力なヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター調節領域は、COS細胞において、構成タンパク質発現レベルを1mg/L程度の高さに駆動する。効力がより低い細胞株では、タンパク質レベルは、典型的に約0.1mg/Lである。SV40複製起点の存在は、SV40複製許容COS細胞における高レベルのDNA複製をもたらす。CMVベクターは、例えば、細菌細胞におけるpMB1（pBR322の誘導体）複製起点、細菌におけるアンピシリン耐性選択のためのb-ラクタマーゼ遺伝子、hGHポリA、およびf1起点を含有し得る。プレプロトリプシンリーダー（PPT）配列を含有するベクターは、抗FRAG抗体、樹脂、およびプレートを使用した精製のために、培養液中へのFRAG融合タンパク質分泌を誘導し得る。多様な宿主細胞において使用するためのその他のベクターおよび発現系が、当該技術分野で周知である。

30

【0185】

別の実施形態では、本発明の2つ以上のペプチドまたはペプチド変異型がコードされ、したがって順次発現される（「数珠玉構造」コンストラクトに類似する）。その際に、ペプチドまたはペプチド変異型は、例えばLLLLLLなどの一続きのリンカーアミノ酸によって、共に連結または融合されてもよく、またはそれらの間のいかなる追加的なペプチドもなしに連結されてもよい。これらのコンストラクトはまた、がん療法のために使用され得て、MHC IとMHC IIの双方が関与する免疫応答を誘導してもよい。

40

【0186】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドベクターコンストラクトで形質転換された宿主細胞にも関する。宿主細胞は、原核または真核生物のどちらかであり得る。細菌細胞は、いくつかの状況では、好ましい原核宿主細胞であってもよく、典型的には、例えば、Bethesda Research Laboratories Inc., Bethe

50

sda, MD, USAから入手できる大腸菌(E. coli) DH5株、および米国微生物系統保存機関(ATCC) Rockville, MD, USAから入手できるRR1(ATCC番号31343)などの大腸菌(E. coli)株である。好ましい真核宿主細胞としては、酵母、昆虫、および哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒト線維芽および結腸細胞株に由来するものなどの脊椎動物細胞が挙げられる。酵母宿主細胞としては、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから一般に入手できる、YPH499、YPH500、およびYPH501が挙げられる。好ましい哺乳類宿主細胞としては、ATCCからCCL61として入手できるチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ATCCからCRL1658として入手できるNIH Swissマウス胚細胞NIH/3T3、ATCCからCRL1650として入手できるサル腎臓由来COS-1細胞、およびヒト胎児由来腎細胞である293細胞が挙げられる。好ましい昆虫細胞は、バキュロウイルス発現ベクターで形質移入され得るSf9細胞である。発現のための適切な宿主細胞の選択に関する概説は、例えば、Paulina BalbasおよびArgelia Lorenceの教科書"Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, および当業者に知られているその他の文献にある。

10

【0187】

本発明のDNAコンストラクトによる適切な細胞宿主の形質転換は、典型的に使用されるベクターのタイプに左右される周知の方法によって達成される。原核宿主細胞の形質転換に関しては、例えば、Cohen et al. (Cohen et al., 1972) および(Green and Sambrook, 2012)を参照されたい。酵母細胞の形質転換は、Sherman et al. (Sherman et al., 1986)に記載される。Beggs (Beggs, 1978)の方法もまた有用である。脊椎動物細胞に関しては、このような細胞を形質移入するのに有用な、例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストランまたはリボソーム製剤などの試薬が、Stratagene Cloning Systems、またはLife Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USAから入手できる。電気穿孔もまた、細胞を形質転換および/または形質移入するのに有用であり、酵母細胞、細菌細胞、昆虫細胞、および脊椎動物細胞を形質転換するための技術分野で周知である。

20

30

【0188】

成功裏に形質転換された細胞、すなわち本発明のDNAコンストラクトを含有する細胞は、PCRなどの周知の技術によって同定され得る。代案としては、抗体を使用して、上清中のタンパク質の存在が検出され得る。

【0189】

例えば、細菌、酵母、および昆虫細胞などの本発明の特定の宿主細胞は、本発明のペプチドの調製において有用であることが理解されるであろう。しかしその他の宿主細胞が、特定の治療法において有用であってもよい。例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞は、それらが適切なMHC分子中に負荷されてもよいように、本発明のペプチドを発現するために有用に使用されてもよい。したがって、本発明は、本発明による核酸または発現ベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。

40

【0190】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞または抗原提示細胞である。前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)を含有する組換え融合タンパク質が負荷されたAPCは、無症候性または微小症候性転移性HRPCを治療するために、米国食品医薬品局(FDA)によって2010年4月20日に認可された(シプロイセルT)(Rini et al., 2006; Small et al., 2006)。

【0191】

50

本発明のさらなる態様は、宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる。ペプチドまたはその変異型を製造する方法を提供する。

【0192】

別の実施形態では、本発明のペプチド、核酸または発現ベクターは、医療において使用される。例えば、ペプチドまたはその変異体は、静脈内 (i.v.) 注射、皮下 (s.c.) 注射、皮内 (i.d.) 注射、腹腔内 (i.p.) 注射、筋肉内 (i.m.) 注射のために調合されてもよい。ペプチド注射の好ましい方法としては、s.c.、i.d.、i.p.、i.m.、および i.v. が挙げられる。DNA 注射の好ましい方法としては、i.d.、i.m.、s.c.、i.p.、および i.v. が挙げられる。例えば、50 μg ~ 1.5 mg、好ましくは 125 μg ~ 500 μg のペプチドまたは DNA の用量が投与されてもよく、それぞれのペプチドまたは DNA に左右される。この範囲の用量は、以前の治験で成功裏に使用された (Walter et al., 2012)。

10

【0193】

活性ワクチン接種のために使用されるポリヌクレオチドは、実質的に純粋であってもよく、または適切なベクターまたは送達系に含有されてもよい。核酸は、DNA、cDNA、PNA、RNA またはそれらの組み合わせであってもよい。このような核酸をデザインして導入する方法は、当該技術分野で周知である。概説は、例えば、Teufel et al. (Teufel et al., 2005) によって提供される。ポリヌクレオチドワクチンは調製が容易であるが、免疫応答誘導におけるこれらのベクターの作用機序は、完全には分かっていない。適切なベクターおよび送達系としては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、または2つ以上のウイルスの構成要素を含有するハイブリッドベースのシステムなどのウイルスDNA および / または RNA が挙げられる。非ウイルス送達系としては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマーが挙げられ、DNA 送達技術分野において周知である。「遺伝子銃」などを通じた物理的送達もまた、使用されてもよい。核酸によってコードされるペプチド (単数) またはペプチド (複数) は、例えば、上述のように、それぞれの逆CDRのT細胞を刺激する、エピトープとの融合タンパク質であってもよい。

20

【0194】

本発明の薬剤は、1つまたは複数のアジュバントもまた含んでもよい。アジュバントは、免疫応答 (例えば、CD8 陽性T細胞およびヘルパーT (TH) 細胞によって媒介される抗原に対する免疫応答を非特異的に促進または増強する物質であり、したがって本発明の薬剤中で有用であると見なされる。適切なアジュバントとしては、1018 ISS、アルミニウム塩、AMPLIVAX (登録商標)、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyA、dSLIM、フラジェリンまたはフラジェリン由来TLR5リガンド、FLT3リガンド、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド (ALDARA (登録商標))、レンチモド、ImuFact IMP321、IL-2やIL-13やIL-21などのインターロイキン、インターフェロン - または - またはそれらのPEG化誘導体、ISパッチ、ISS、ISCOMATRIX、ISCOM、JuviImmune (登録商標)、LipoVac、MALP2、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタニドIMS1312、モンタニドISA206、モンタニドISA50V、モンタニドISA-51、油中水型および水中油型エマルション、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel (登録商標) ベクター系、ポリ (ラクチドコグリコリド) [PLG] ベースおよびデキストラン微粒子、タラクトフェリンSRL172、ピロソームおよびその他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、- グルカン、Pam3Cys、サポニンに由来するAquila's QS21 stimulon、マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁模倣体、およびRibix DetoxまたはQuilまたはSuperfosなどのその他の独自仕様の補助剤が挙げられるが、これに限定されるものではない。フロイントまたはGM-CSFなどのアジュバントが好ましい。樹状細胞およびそ

30

40

50

これらの調製物に対して特異的な、いくつかの免疫学的アジュバント（例えばMF59）が、以前記載されている（Allison and Krummel, 1995）。サイトカインもまた使用されてもよい。数種のサイトカインは、樹状細胞のリンパ組織（例えばTNF-）への移動に影響を与えること、Tリンパ球（例えば、GM-CSF、IL-1、およびIL-4）のための効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速すること（その内容全体が参照により本明細書に具体的に援用される、米国特許第5,849,589号明細書）、および免疫増強剤（例えば、IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN-、IFN-）として作用することと、直接関連付けられている（Gabrilovich et al., 1996）。

【0195】

CpG免疫賦活性オリゴヌクレオチドもまた、ワクチン環境において、アジュバント効果を増強することが報告されている。理論により拘束されることなく、CpGオリゴヌクレオチドは、Toll様受容体（TLR）、主にTLR9を通じた、内在的（非適応性）免疫系の活性化によって作用する。CpG誘導性TLR9活性化は、ペプチドまたはタンパク質抗原、生きたまたは死滅ウイルス、樹状細胞ワクチン、自己細胞ワクチン、そして予防的および治療的ワクチンの双方における多糖コンジュゲートをはじめとする、多種多様な抗原に対する、抗原特異的体液性および細胞性応答を増強する。より重要なことには、それは樹状細胞の成熟と分化を増強し、CD4 T細胞援助の不在下であってさえも、TH1細胞の活性化の促進、および強力な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）生成をもたらす。TLR9刺激によって誘導されるTH1バイアスは、通常はTH2バイアスを促進するミョウバンまたは不完全フロイントアジュバント（IFA）などのワクチンアジュバント存在下であってさえも、維持される。CpGオリゴヌクレオチドは、その他のアジュバントと調合されまたは同時投与された際に、または微粒子、ナノ粒子、脂質エマルションなどの配合物、または類似配合物中で、なおもより高いアジュバント活性を示し、それは、抗原が比較的弱い場合、強力な応答を誘導するのに特に必要である。それらは免疫応答もまた加速し、いくつかの実験では、CpGなしのワクチン総量と同等の抗体応答で、抗原用量のほぼ2桁分の低減を可能にする（Krieg, 2006）。米国特許第6,406,705 B1号明細書は、抗原特異的免疫応答を誘導するためのCpGオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバント、および抗原の併用を記載する。CpG TLR9拮抗薬は、本発明の医薬組成物の好ましい構成要素である、Mollogen（Berlin, Germany）製のdSLIM（二重ステムループ免疫調節剤）である。RNA結合TLR7、TLR8および/またはTLR9などのその他のTLR結合分子もまた、使用されてもよい。

【0196】

有用なアジュバントその他の例としては、化学修飾CpG（例えば、CpR、Idera）；ポリ（I:C）などのdsRNAアナログおよびそれらの誘導體（例えばAmpligen（登録商標）、Hiltonol（登録商標）、ポリ（ICLC）、ポリ（IC-R）、ポリ（I:C12U）、非CpG細菌DNAまたはRNA；ならびにシクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ（登録商標）、セレブレックス、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ、テモゾロマイド、テムシロリムス、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗CTLA4などの免疫活性小型分子および抗体；免疫系の重要な構造体を標的にするその他の抗体（例えば、抗CD40、抗TGF-、抗TNF受容体）；SC58175が挙げられるが、これに限定されるものではなく、これらは治療的におよび/またはアジュバントとして作用してもよい。本発明の文脈で有用なアジュバントおよび添加剤の量と濃度は、過度の実験を実施することなく、当業者によって容易に判定され得る。

【0197】

好ましいアジュバントは、抗CD40、イミキモド、レシキモド、GM-CSF、シクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、インターフェロン、CpGオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドおよび誘導体、ポリ(I:C)および誘導体、RNA、シルデナフィル、およびPLGまたはピロソーム微粒子調合物である。

【0198】

本発明による薬剤組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、サルグラモスチム)、シクロホスファミド、イミキモド、レシキモド、およびインターフェロンなどのコロニー刺激因子からなる群から選択される。

【0199】

本発明による医薬組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、サルグラモスチム)、シクロホスファミド、イミキモド、およびレシキモドなどのコロニー刺激因子からなる群から選択される。本発明による薬剤組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、シクロホスファミド、イミキモドまたはレシキモドである。なおもより好ましいアジュバントは、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 20、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、ポリICLC(Hiltonol(登録商標))、および抗CD40mAbまたはそれらの組み合わせである。

【0200】

この組成物は、皮下、皮内、筋肉内などの非経口投与、または経口投与のために使用される。このためには、ペプチドおよび任意選択的にその他の分子が、薬学的に許容可能な、好ましくは水性担体に溶解され、または懸濁される。さらに組成物は、緩衝液、結合剤、プラスチック剤、希釈剤、風味、潤滑剤などの賦形剤を含有し得る。ペプチドはまた、サイトカインなどの免疫刺激物質と共に投与され得る。このような組成物中で使用され得る賦形剤の詳細な一覧は、例えば、A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000)から採用され得る。組成物は、腺腫様(adenomatous)またはがん性疾患の阻止、予防法および/または治療法のために使用され得る。例示的調合物は、例えば、欧州特許第2112253号明細書にある。

【0201】

本発明によるワクチンによって引き起こされる免疫応答は、異なる細胞分裂期および異なる発生段階のがんを攻撃することを理解することが重要である。さらに、異なるがん関連シグナル伝達経路が攻撃される。これは、1つまたは少数の標的のみに対処して、攻撃に対する腫瘍の容易な適応(腫瘍エスケープ)を引き起こすこともある、ワクチンに優る利点である。さらに個々の腫瘍の全てが、同一パターンの抗原を発現するとは限らない。したがって、いくつかの腫瘍関連ペプチドの組み合わせによって、ありとあらゆる腫瘍が標的の少なくとも一部を有することが確実になる。組成物は、それぞれの腫瘍が抗原のいくつかを発現することを予期して設計され、腫瘍の増殖と維持に必要ないくつかの独立した経路をカバーする。したがって、ワクチンは、より大きな患者集団のために、容易に「出来合」で使用され得る。これは、ワクチンで治療される患者の予備選択が、HLAタイピングに限定され得て、抗原発現に関する任意の追加的なバイオマーカーアセスメントを必要としないことを意味するが、いくつかの標的が誘導免疫応答によって同時に攻撃されることはなおも確実であり、これは有効性にとって重要である(Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012)。

【0202】

本明細書の用法では、「スキャフォールド」という用語は、(例えば、抗原性)決定因子に特異的に結合する分子を指す。一実施形態では、スキャフォールドはまた、それが付着する実体(例えば、(第2の)抗原結合部分)を例えば、抗原決定基(例えば本出願書に記載のペプチドとMHCの複合体)を有する特異的腫瘍細胞または腫瘍間質などの型標的部位に誘導できる。別の実施形態では、キャフォールドは、例えば、T細胞受容体複合体抗原などのその標的抗原を介して、シグナル伝達を活性化できる。スキャフォールドとしては、抗体およびそれらのフラグメント、抗体重鎖可変領域および抗体軽鎖可変領域を

10

20

30

40

50

含んでなる抗体の抗原結合ドメイン、少なくとも1つのアンキリンリピートモチーフと単一ドメイン抗原結合 (S D A B) 分子とを含んでなる結合タンパク質、アプタマー、(可溶性) T C R、および同種または自己由来 T 細胞などの(改変)細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。分子が標的に結合するスキャフォールドであるかどうかを評価するために、結合アッセイが実施され得る。

【0203】

「特異的」結合は、特異的標的を保有する細胞を殺滅できる活性分子を装備したスキャフォールドが、特異的標的がないがその他のペプチド-M H C 複合体を提示する別の細胞を殺滅できない程度に、スキャフォールドがその他の天然ペプチド-M H C - 複合体よりもさらに良好に、目的ペプチド-M H C - 複合体に結合することを意味する。交差反応性ペプチド-M H C のペプチドが天然に存在せず、すなわち、ヒト H L A - ペプチドームに由来しない場合、その他のペプチド-M H C 複合体への結合は無関係である。標的細胞死滅を評価する試験は、当該技術分野で周知である。それらは、非改変ペプチド-M H C 提示を有する標的細胞(初代細胞または細胞株)、または天然に存在するペプチド-M H C レベルに達するようにペプチドを負荷された細胞を使用して、実施されるべきである。

10

【0204】

各スキャフォールドは標識を含んでなり得て、それは、標識によって提供されるシグナルの存在または不在を判定することで、結合スキャフォールドが検出され得ることを提供する。例えば、スキャフォールドは、蛍光染料または任意のその他の適用可能な細胞マーカー分子で標識され得る。このようなマーカー分子は、当該技術分野で周知である。例えば、蛍光染料によって提供される蛍光標識は、蛍光またはレーザー走査顕微鏡またはフローサイトメトリーによる、結合アプタマーの視覚化を提供し得る。

20

【0205】

各スキャフォールドは、例えば、I L - 2 1、抗 - C D 3、抗 - C D 2 8 などの第2の活性分子にコンジュゲートされ得る。

【0206】

ポリペプチドスキャフォールドに関するさらなる情報については、例えば国際公開第2014/071978A1号パンフレットの背景セクション、およびその中で引用された参考文献を参照されたい。

【0207】

本発明は、アプタマーにさらに関する。アプタマー(例えば、国際公開第2014/191359号パンフレット、およびその中で引用される文献を参照されたい)は、短い一本鎖核酸分子であり、それは、所定の三次元構造に折り畳まれて、特異的標的構造体を認識し得る。それらは、標的療法を開発するための適切な代案のようであった。アプタマーは、高い親和性および特異性で、多様な複合体標的と選択的に結合することが示されている。

30

【0208】

細胞表面に位置する分子を認識するアプタマーは、過去10年以内に同定されており、診断および治療的アプローチを開発する手段を提供する。アプタマーは、毒性および免疫原性がほぼ皆無であることが示されているので、それらは生物医学的用途のための有望な候補である。確かに、例えば、前立腺特異的膜抗原認識アプタマーなどのアプタマーは、標的療法のために成功裏に用いられており、異種移植片生体内モデルにおいて機能できることが示されている。さらに、特異的腫瘍細胞株を認識するアプタマーが同定されている。

40

【0209】

D N A アプタマーは、様々ながん細胞、特に固形腫瘍に由来するものに対して広域スペクトル認識特性を示す一方で、非腫瘍形成性および主要健常細胞を認識しないように選択され得る。同定されたアプタマーが、特異的腫瘍サブタイプを認識するだけでなく、むしろ一連の腫瘍と相互作用する場合、これは、アプタマーをいわゆる広域スペクトル診断薬および治療薬として応用可能にする。

【0210】

50

さらに、フローサイトメトリーによる細胞結合挙動の研究は、アプタマーが、ナノモル濃度範囲内の非常に良好な見かけの親和性を見せたことを示した。

【0211】

アプタマーは、診断および治療目的で有用である。さらに、アプタマーの一部は腫瘍細胞に取り込まれ、したがって腫瘍細胞内への siRNA などの抗がん剤の標的化送達のための分子ビヒクルとして、機能し得ることが示され得た。

【0212】

アプタマーは、細胞 S E L E X (試験管内進化法) 技術を使用して、細胞および組織などの複合体標的に対して、および本発明による配列番号 1 ~ 配列番号 228 のいずれかに記載の配列と MHC 分子とを含んでなり、好ましくはそれからなるペプチド複合体などに対して、選択され得る。

10

【0213】

本発明のペプチドを使用して、MHC / ペプチド複合体に対する特異的抗体が生成され、開発され得る。これらは、毒素または放射性物質を患部組織に標的化する治療法のために、使用され得る。これらの抗体の別の用途は、PET などのイメージング目的の放射性核種の患部組織への標的化であり得る。この用途は、小規模な転移の検出、または病的組織のサイズと正確な位置確認の判定を助け得る。

【0214】

したがって HLA 拘束性抗原と複合体化した、ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I または II と特異的に結合する、組換え抗体を製造する方法を提供することが、本発明のさらなる態様であり、方法は、前記ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I または II を発現する細胞を含んでなる、遺伝子操作された非ヒト哺乳類を前記 HLA 拘束性抗原と複合体化した可溶性形態の MHC クラス I または II 分子によって免疫化するステップと； mRNA 分子を前記非ヒト哺乳類の抗体産生細胞から単離するステップと；前記 mRNA 分子によってコードされるタンパク質分子を提示する、ファージディスプレイライブラリーを作製するステップと；少なくとも 1 つのファージを前記ファージディスプレイライブラリーから単離するステップとを含んでなり、前記少なくとも 1 つのファージは、前記 HLA 拘束性抗原と複合体化した前記ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I または II と特異的に結合する、前記抗体を提示する。

20

【0215】

HLA 拘束性抗原と複合体化したヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I または II と特異的に結合する抗体を提供することも、本発明のさらなる態様であり、その中で抗体は、好ましくは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体および/またはキメラ抗体である。

30

【0216】

このような抗体および一本鎖クラス I 主要組織適合性複合体を製造するそれぞれの方法、ならびにこれらの抗体を製造するためのその他のツールは、本発明の目的で、その内容全体が参照により全て明示的に援用される、国際公開第 03 / 068201 号パンフレット、国際公開第 2004 / 084798 号パンフレット、国際公開第 01 / 72768 号パンフレット、国際公開第 03 / 070752 号パンフレット、および文献 (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003) で開示される。

40

【0217】

好ましくは、抗体は、20 ナノモル濃度未満、好ましくは 10 ナノモル濃度未満の結合親和性で複合体に結合し、それは本発明の文脈で「特異的」とも見なされる。

【0218】

本発明は、配列番号 1 ~ 配列番号 228 からなる群から選択される配列、または配列番号 1 ~ 配列番号 228 と少なくとも 88 % 相同的な (好ましくは同一の) その変異体を含んでなるペプチド、または T 細胞を前記ペプチドと交差反応させるその変異体に関し、前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

50

【 0 2 1 9 】

本発明は、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 からなる群から選択される配列、または、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 と少なくとも 8 8 % 相同的な（好ましくは同一の）その変異体を含んでなるペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたは変異体は、8 ~ 1 0 0、好ましくは 8 ~ 3 0、最も好ましくは 8 ~ 1 4 アミノ酸の全長を有する。

【 0 2 2 0 】

本発明は、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II の分子に結合する能力を有する、本発明によるペプチドにさらに関する。

【 0 2 2 1 】

本発明は、ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる、本発明によるペプチドにさらに関する。

10

【 0 2 2 2 】

本発明は、ペプチドが（化学的に）修飾された、および/または非ペプチド結合を含む、本発明によるペプチドにさらに関する。

【 0 2 2 3 】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、ペプチドは、融合タンパク質の一部であり、特に HLA - DR 抗原関連不変鎖（I i）の N 末端アミノ酸を含んでなり、またはペプチドは、例えば樹状細胞特異的抗体などの抗体に（またその中に）融合する。

【 0 2 2 4 】

本発明は、本発明によるペプチドをエンコードする核酸にさらに関するが、ただしペプチドは完全（完全長）ヒトタンパク質でない。

20

【 0 2 2 5 】

本発明は、DNA、cDNA、PNA、RNA またはそれらの組み合わせである、本発明による核酸にさらに関する。

【 0 2 2 6 】

本発明は、本発明による核酸を発現できる、発現ベクターにさらに関する。

【 0 2 2 7 】

本発明は、医療において、特に骨髄腫の治療において使用される、本発明によるペプチド、本発明による核酸または本発明による発現ベクターにさらに関する。

【 0 2 2 8 】

本発明は、本発明による核酸または本発明による発現ベクターを含んでなる、宿主細胞にさらに関する。

30

【 0 2 2 9 】

本発明は、抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞である、本発明による宿主細胞にさらに関する。

【 0 2 3 0 】

本発明は、本発明による宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、本発明によるペプチドを製造する方法にさらに関する。

【 0 2 3 1 】

本発明は、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞の表面に発現されるクラス I または II MHC 分子上に、抗原が負荷される、本発明による方法にさらに関する。

40

【 0 2 3 2 】

本発明は、抗原提示細胞が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 8 または前記異アミノ酸配列を含有する、前記ペプチドを発現できる、発現ベクターを含んでなる、本発明による方法にさらに関する。

【 0 2 3 3 】

本発明は、本発明による方法によって製造される活性化 T 細胞にさらに関し、前記 T 細胞は、本発明によるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する細胞を選択

50

的に認識する。

【0234】

本発明は、本発明によるT細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる、患者において、本発明による任意のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する標的細胞を死滅させる方法にさらに関する。

【0235】

本発明は、記載される任意のペプチド、本発明による核酸、本発明による発現ベクター、本発明による細胞、または本発明による活性化細胞傷害性Tリンパ球の、薬剤としての、または薬剤の製造における、使用にさらに関する。本発明は、薬剤ががんに対して有効である、本発明による使用にさらに関する。

10

【0236】

本発明は、薬剤がワクチンである、本発明による使用にさらに関する。本発明は、薬剤ががんに対して有効である、本発明による使用にさらに関する。

【0237】

本発明は、前記がん細胞が骨髄腫細胞またはその他の固形または血液学的腫瘍細胞である、本発明による使用にさらに関する。

【0238】

本発明は、骨髄腫診断および/または予後診断において使用され得る、本明細書で「標的」と称される、本発明によるペプチドベースの特定の標識タンパク質およびバイオマーカーにさらに関する。本発明はまた、がん治療のためのこれらの新規標的の使用に関する。

20

【0239】

「抗体（単数）」または「抗体（複数）」という用語は、本明細書では広義に使用され、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の双方を含む。無処理または「完全」免疫グロブリン分子に加えて、「抗体」という用語には、本発明による所望の特性（例えば、骨髄腫マーカー（ポリ）ペプチドの特異的結合、がんマーカー遺伝子を増大レベルで発現する骨髄腫細胞への毒素の送達、および/または骨髄腫マーカーポリペプチドの活性阻害）のいずれかを示しさえすれば、フラグメント（例えば、CDR、Fv、Fab、およびFcフラグメント）、またはこれらの免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子ヒト化バージョンのポリマーもまた含まれる。

30

【0240】

可能な場合は常に、本発明の抗体は、商業的供給元から購入されてもよい。また本発明の抗体は、周知の方法を使用して生成されてもよい。当業者は、本発明の抗体を製造するために、完全長骨髄腫マーカーポリペプチドまたはそのフラグメントのどちらを使用してもよいことを理解するであろう。本発明の抗体を製造するために使用されるポリペプチドは、天然原料から部分的にまたは完全に精製されてもよく、または組換えDNA技術を使用して製造されてもよい。

【0241】

例えば、配列番号1～配列番号228ポリペプチドに記載のペプチドなどの本発明によるペプチドをコードするcDNA；またはその変異体またはフラグメントが、原核細胞（例えば、細菌）または真核細胞（例えば、酵母、昆虫、または哺乳類細胞）で発現され得て、その後、組換えタンパク質が精製されて、本発明による抗体を生成するために使用される、骨髄腫マーカーポリペプチドに特異的に結合する、モノクローナルまたはポリクローナル抗体製剤を生成するために使用され得る。

40

【0242】

当業者は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の2つ以上の異なるセットの生成が、その目的の用途（例えば、ELISA、免疫組織化学的検査、生体内イメージング、免疫毒素療法）に必要な特異性および親和性を有する抗体を得る可能性を最大化することを理解するであろう。抗体は、それに対して抗体が使用される目的に従って、既知の方法によりそれらの所望の活性について試験される（例えば、ELISA、免疫組織化学的検

50

査、免疫療法など；抗体の生成および試験のさらなるガイダンスについては、例えば、Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014) を参照されたい。例えば、抗体は、ホルマリン固定肺がんまたは冷凍組織切片のELISAアッセイ、またはウエスタンブロット、免疫組織化学染色で試験されてもよい。それらの最初の生体外特性解析後、治療または生体内診断用途を意図した抗体が、既知の臨床試験法によって試験される。

【0243】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書の用法では、実質的に均質な抗体集団から入手される抗体を指し；すなわち、母集団を構成する個々の抗体は、微量で存在してもよい可能な自然発生的変異以外は同一である。本明細書では、「モノクローナル抗体」は、それらが所望の拮抗活性を示しさえすれば、その中で重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来しまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する、抗体中の対応する配列と同一または相同的である一方、鎖の残部は、別の種に由来しまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同的である、「キメラ」抗体、ならびにこのような抗体のフラグメントを特に含む（その内容全体が本明細書に援用される、米国特許第4,816,567号明細書）。

10

【0244】

本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を使用して調製されてもよい。ハイブリドーマ法においては、マウスまたはその他の適切な宿主動物が免疫剤によって典型的に免疫化されて、免疫剤と特異的に結合する抗体を産生するまたは産生できるリンパ球を生じさせる。代案としては、リンパ球は生体外で免疫化されてもよい。

20

【0245】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号明細書に記載されるものなどの組換えDNA法によって製造されるものであってもよい。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することで）、容易に単離および配列決定され得る。

【0246】

インビトロ法もまた、一価の抗体を調製するのに適する。抗体フラグメント、特にFabフラグメントを作製するための抗体の消化は、当該技術分野で既知の通例の技術を使用して達成され得る。例えば、消化は、パバインを使用して実施され得る。パバイン消化の例は、国際公開第94/29348号パンフレットおよび米国特許第4,342,566号明細書に記載される。抗体のパバイン消化は、それぞれ単一抗原結合部位を有するFabフラグメントと称される2つの同一の抗原結合フラグメントと、残りのFcフラグメントとを典型的に生じる。ペプシン処理は、F(ab')₂フラグメントおよびpFc'フラグメントをもたらす。

30

【0247】

抗体フラグメントは、その他の配列に付着するかどうかに関わりなく、フラグメントの活性が非修飾抗体または抗体フラグメントと比較して顕著に変化せずまたは損なわれないという条件で、特定領域または特定アミノ酸残基の挿入、欠失、置換、またはその他の選択された修飾もまた含み得る。これらの修飾は、ジスルフィド結合できるアミノ酸の除去/付加、そのパイオ寿命増大、その分泌特性改変などのいくつかの追加的な特性を提供し得る。いずれにしても、抗体フラグメントは、結合活性、結合領域における結合調節などの生理活性特性を有しなくてはならない。抗体の機能性または活性領域は、タンパク質の特定領域の変異誘発と、それに続く発現と、発現したポリペプチドの試験によって同定されてもよい。このような方法は、当該技術分野の熟練した実務家には容易に分かり、抗体フラグメントをエンコードする核酸の部位特異的変異誘発を含み得る。

40

【0248】

本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含んでなってもよい。非ヒト（例えばマウス）抗体などのヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有

50

する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（抗体のF_v、F_ab、F_ab'またはその他の抗原結合部分配列など）である。ヒト化抗体としては、その中でレシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト生物種（ドナー抗体）のCDRからの残基によって置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が挙げられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのF_vフレームワーク（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体または移入CDRまたはフレームワーク配列のどちらにも見いだされない、残基を含んでなくてもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つおよび典型的に2つの可変領域の実質的に全てを含んでなり、その中では、CDR領域の全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン共通配列のものである。ヒト化抗体は、至適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部もまた含んでなる。

10

20

30

40

50

【0249】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野で周知である。通常、ヒト化抗体は、非ヒト起源から導入された、1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と称され、それは典型的に「移入」可変領域から得られる。ヒト化は、齧歯類CDR（複数）またはCDR（単数）配列に対応するヒト抗体配列によって置換することで、基本的には実施され得る。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第4,816,567号明細書）であり、その中では、実質的に非損傷ヒト可変領域未満が、非ヒト生物種からの対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的にヒト抗体であり、その中ではいくつかのCDR残基と、おそらくはいくつかのFR残基とが、齧歯類抗体中の類似部位からの残基によって置換される。

【0250】

免疫化に際して、内因性免疫グロブリン生成不在下で、ヒト抗体の完全レパートリーを産生できる遺伝子組換え動物（例えばマウス）を用い得る。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける、抗体重鎖連結領域遺伝子のホモ接合型欠失が、内因性抗体生成の完全阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖細胞系変異マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの転写は、抗原チャレンジに際してヒト抗体の産生をもたらす。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー中でも産生され得る。

【0251】

本発明の抗体は、好ましくは薬学的に許容できる担体中で、対象に投与される。典型的に、製剤中で適量の薬理的に許容可能な塩が使用されて、製剤を等張にする。薬理的に許容可能な担体の例としては、生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液が挙げられる。溶液のpHは、好ましくは約5～約8、より好ましくは約7～約7.5である。さらなる担体としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックス徐放性製剤が挙げられ、そのマトリックスは、例えば、フィルム、リボソームまたは微粒子などの造形品の形態である。当業者には、例えば、投与される抗体の投与経路と濃度次第で、特定の担体がより好ましくあってもよいことが明らかであろう。

【0252】

抗体は、注射（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内）によって、またはその有効形態での血流への送達を確実にする輸液などのその他の方法によって、対象、患者、または細胞に投与され得る。抗体はまた、腫瘍内または腫瘍周囲経路によって投与されて、局所性ならびに全身性の治療効果を発揮してもよい。局所注射または静脈注射が好ましい。

【0253】

抗体を投与するための有効投与量およびスケジュールは、経験的に判定されてもよく、このような測定の実施は、当該技術分野の技術範囲内である。当業者は、投与しなくてはならない抗体用量が、例えば、抗体を投与される対象、投与経路、使用される特定の抗体

型、および投与されるその他の薬剤次第で変動することを理解するであろう。単独使用される抗体の典型的な1日量は、上述の要素次第で、1日当たり約1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 最大100 mg/kg 体重またはそれ以上の範囲に及ぶかもしれない。好ましくは骨髄腫を治療するための抗体投与に続いて、治療用抗体の効力は、熟練した実務家に良く知られている様々な方法で評価され得る。例えば、標準腫瘍イメージング技術を使用して、治療を受ける対象における肺がんのサイズ、数、および/または分布をモニターしてもよい。抗体投与不在下で起こるであろう疾患経過と比較して、腫瘍成長を停止させ、腫瘍収縮をもたらす、および/または新規腫瘍の発症を予防する、治療的に投与された抗体は、肺がん治療のための有効な抗体である。

【0254】

特異的ペプチド-MHC複合体を認識する可溶性T細胞受容体(sTCR)を製造する方法を提供することもまた、本発明のさらなる態様である。このような可溶性T細胞受容体は、特異的T細胞クローンから生成され得て、それらの親和性は、相補性決定領域を標的とする変異誘発によって増大させ得る。T細胞受容体の選択目的で、ファージディスプレイを利用し得る(米国特許第2010/0113300号明細書、(Liddy et al., 2012))。ファージディスプレイ中に、そして薬剤として実用する際に、T細胞受容体を安定化させる目的で、例えば、非天然ジスルフィド結合、その他の共有結合(一本鎖T細胞受容体)、または二量体化ドメインによって、および鎖を連結させ得る(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T細胞受容体は、標的細胞上で特定機能を発揮させるために、毒素、薬剤、サイトカイン(例えば、米国特許第2013/0115191号明細書を参照されたい)、および抗CD3ドメインのようなエフェクター細胞動員ドメインなどに連結させ得る。さらにそれは、養子免疫伝達のために使用されるT細胞において発現され得る。さらなる情報は、国際公開第2004/033685A1号パンフレットおよび国際公開第2004/074322A1号パンフレットにある。TCRの組み合わせは、国際公開第2012/056407A1号パンフレットに記載される。さらなる製造法は、国際公開第2013/057586A1号パンフレットで開示される。

【0255】

さらに本発明のペプチドおよび/またはTCRまたは抗体またはその他の結合分子を使用して、病理学者の生検サンプルに基づくがん診断を確認し得る。

【0256】

抗体またはTCRはまた、生体内診断アッセイのために使用されてもよい。通常、抗体は、免疫シンチグラフィ(immunoscintigraphy)を使用して腫瘍が位置確認され得るように、放射性ヌクレオチド(^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S など)で標識される。一実施形態では、抗体またはそれらのフラグメントは、上述のタンパク質からなる群から選択されるタンパク質の2つ以上の標的の細胞外ドメインに結合し、親和性(Kd)は $1 \times 10 \mu\text{M}$ 未満である。

【0257】

診断用の抗体は、様々なイメージング法による検出に適するプローブで標識されてもよい。プローブの検出方法としては、蛍光、光学、共焦点および電子顕微鏡検査; 磁気共鳴画像法および分光法; 蛍光透視法、コンピュータ断層撮影および陽電子放射型断層撮影法が挙げられるが、これに限定されるものではない。適切なプローブとしては、フルオレセイン、ローダミン、エオジンおよびその他のフルオロフォア、放射性同位体、金、ガドリニウムおよびその他のランタニド、常磁性鉄、フッ素18およびその他の陽電子放出放射性核種が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに、プローブは二官能価または多官能価であってもよく、列挙される方法の2つ以上によって検出可能であってもよい。これらの抗体は、前記プローブで直接または間接的に標識されてもよい。特に十分に技術分野で承認されている、プローブの抗体への付着としては、プローブの共有結合、プローブの抗体への組み込み、およびプローブ結合のためのキレート化合物の共有結合が挙げられる。免疫組織化学的検査では、疾患組織サンプルは、新鮮または冷凍であってもよ

10

20

30

40

50

く、またはパラフィン包埋されてホルマリンなどの保存料で固定されてもよい。サンプルを含有する固定または包埋切片は、標識一次抗体および二次抗体と接触されて、抗体を使用して原位置タンパク質発現が検出される。

【0258】

本発明の別の態様は、活性化T細胞を製造するインビトロ法を含み、方法は、生体外T細胞を、適切な抗原提示細胞の表面に発現される抗原負荷ヒトMHC分子に、T細胞を抗原特異的様式で活性化するのに十分な時間にわたり接触させるステップを含んでなり、抗原は本発明によるペプチドである。好ましくは、抗原提示細胞と共に十分な量の抗原が使用される。

【0259】

好ましくは、哺乳類細胞は、TAPペプチド輸送体のレベルまたは機能が皆無でありまたは低下している。TAPペプチド輸送体が欠如している適切な細胞としては、T2、RMA-S、およびショウジョウバエ細胞が挙げられる。TAPは、抗原処理に関連する輸送体である。

【0260】

ヒトペプチド負荷欠損細胞株T2は、12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USAの米国微生物系統保存機関からカタログ番号CRL1992の下に入手でき；ショウジョウバエ細胞株Schneider株2は、カタログ番号CRL19863の下にATCCから入手でき；マウスRMA-S細胞株は、Ljunggren et al. (Ljunggren and Kärre, 1985)に記載される。

【0261】

好ましくは、移入前に、宿主細胞はMHCクラスI分子を実質的に発現しない。刺激因子細胞が、B7.1、B7.2、ICAM-1、およびLFA3のいずれかなどのT細胞のための共刺激シグナルを提供するのに重要な分子を発現することもまた好ましい。多数のMHCクラスI分子および共刺激因子分子の核酸配列は、GenBankおよびEMBLデータベースから公的に入手可能である。

【0262】

MHCクラスIエピトープが抗原として使用される場合、T細胞はCD8陽性T細胞である。

【0263】

抗原提示細胞が、このようなエピトープを発現するために形質移入される場合、好ましくは、細胞は、配列番号1～配列番号228、またはその変異アミノ酸配列を含有するペプチドを発現する能力がある発現ベクターを含んでなる。

【0264】

生体外でT細胞を製造するために、その他のいくつかの方法が使用されてもよい。例えば、自己由来腫瘍浸潤性リンパ球が、CTLを生成するために使用され得る。Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995)は、T細胞の調製において、自己由来末梢血リンパ球(PLB)を利用した。さらに、樹状細胞をペプチドまたはポリペプチドでパルス処理する、または組換えウイルスで感染させることによる、自己由来T細胞の製造も可能である。B細胞もまた、自己由来T細胞の製造において使用され得る。さらに、ペプチドまたはポリペプチドでパルス処理された、または組換えウイルスで感染されたマクロファージが、自己CTLの調製において使用されてもよい。S. Walter et al. (Walter et al., 2003)は、人工抗原提示細胞(aAPC)を使用したT細胞の生体外プライミングを記載し、それはまた、選択されたペプチドに対するT細胞を製造するための適切な方法でもある。本発明では、ピオチン：ストレプトアビジン生化学によって、あらかじめ形成されたMHC：ペプチド複合体を表面ポリスチレン粒子(マイクロビーズ)に共役することで、aAPCが生成された。このシステムは、aAPC上のMHC密度の正確な調節を可能にし、それは、血液サンプルから高効率で、高または低結合活性の抗原特異的T細胞応答を選択的に引き起こす

10

20

30

40

50

ことを可能にする。MHC：ペプチド複合体の他に、aAPCは、それらの表面に共役する、抗CD28抗体のような共刺激活性を有するその他のタンパク質を保有すべきである。さらにこのようなaAPCベースのシステムは、例えばサイトカイン様インターロイキン12などの適切な可溶性因子の付加を要することが多い。

【0265】

同種異系細胞はまた、T細胞の調製において使用されてもよく、方法は、参照により本明細書に援用される、国際公開第97/26328号パンフレットで詳述される。例えば、ショウジョウバエ細胞およびT2細胞に加えて、その他の細胞を使用して、CHO細胞、バキュロウイルス感染昆虫細胞、細菌、酵母、ワクシニア感染標的細胞などの抗原を提示してもよい。さらに植物ウイルスが使用されてもよい（例えば、外来性ペプチド提示のための高収率システムとしてのササゲモザイクウイルス開発を記載するPorta et al. (Porta et al., 1994)を参照されたい）。

10

【0266】

本発明のペプチドに向けられた活性化T細胞は、治療法において有用である。したがって、本発明のさらなる態様は、前述の本発明の方法によって入手可能な活性化T細胞を提供する。

【0267】

上記方法によって製造される活性化T細胞は、配列番号1～配列番号228のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する細胞を選択的に認識する。

【0268】

好ましくは、T細胞は、そのTCRを通じた、HLA/ペプチド複合体（例えば結合）との相互作用によって、細胞を認識する。T細胞は、その標的細胞が、本発明のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する患者において、標的細胞を死滅させる方法で有用であり、患者には有効数の活性化T細胞が投与される。患者に投与されるT細胞は、患者に由来して、上述のように活性化されてもよい（すなわち、それらは自己T細胞である）。代案としては、T細胞は、患者でなく別の個人に由来する。もちろん、個人が健常人であれば、それが好ましい。「健常人」によって、本発明者らは、個人が概して健康良好であり、好ましくは有能な免疫系を有して、より好ましくは容易に検査され検出され得るいかなる疾患にも罹患していないことを意味する。

20

【0269】

生体内で、本発明によるCD8陽性T細胞の標的細胞は、（時にMHCクラスIIを発現する）腫瘍細胞であり得て、および/または（時にMHCクラスIIもまた発現する；（Dengjel et al., 2006））腫瘍（腫瘍細胞）周囲の間質細胞であり得る。

30

【0270】

本発明のT細胞は、治療用組成物の活性成分として使用されてもよい。したがって、本発明は、その標的細胞が、本発明のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する患者において、標的細胞を死滅させる方法もまた提供し、方法は、上で定義されるようなT細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる。

【0271】

「異常に発現される」によって、本発明者らは、正常な発現レベルと比較して、ポリペプチドが過剰発現されること、または腫瘍がそれに由来する組織においては遺伝子がサイレントであるが、腫瘍においてはそれが発現されることもまた意味する。「過剰発現」によって、本発明者らは、ポリペプチドが、正常組織に存在するレベルの少なくとも1.2倍のレベルで；好ましくは正常組織に存在するレベルの少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍または10倍のレベルで存在することを意味する。

40

【0272】

T細胞は、例えば上で記載されるものなどの当該技術分野で公知の方法によって得られてもよい。

【0273】

50

T細胞のこのいわゆる養子免疫伝達のためのプロトコルは、当該技術分野で周知である。概説は、G a t t i o n i e t a l . a n d M o r g a n e t a l . (G a t t i n o n i e t a l . , 2 0 0 6 ; M o r g a n e t a l . , 2 0 0 6) にある。

【0274】

本発明の別の態様は、その核酸がクローン化されて、好ましくはT細胞である宿主細胞に導入されるT細胞受容体を生成するための、MHCと複合体形成するペプチドの使用を含む。次に、この遺伝子操作T細胞は、がん治療のために患者に移入され得る。

【0275】

本発明の任意の分子、すなわちペプチド、核酸、抗体、発現ベクター、細胞、活性化T細胞、T細胞受容体またはそれをエンコードする核酸は、免疫応答を逃れた細胞によって特徴付けられる障害の治療に有用である。したがって本発明の任意の分子は、薬剤として、または薬剤の製造において使用されてもよい。分子は、単独で、または本発明のその他の分子または既知の分子との組み合わせで、使用されてもよい。

【0276】

本発明は、

(a) 溶液中のまたは凍結乾燥形態の上述の医薬組成物を含有する容器；

(b) 任意選択的に、凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第2の容器；および

(c) 任意選択的に、(i) 溶液の使用、または(ii) 凍結乾燥製剤の再構成および / または使用のための取扱説明書
を含んでなるキットをさらに目的とする。

【0277】

キットは、(iii) 緩衝液、(iv) 希釈剤、(V) 濾過、(vi) 針、または(V) シリンジの1つまたは複数をさらに含んでなってもよい。容器は、好ましくは、ボトル、バイアル、シリンジまたは試験管であり；それは、多回使用容器であってもよい。医薬組成物は、好ましくは凍結乾燥される。

【0278】

本発明のキットは、好ましくは、適切な容器内の本発明の凍結乾燥製剤と、その再構成および / または使用のための取扱説明書とを含んでなる。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル（例えば二重チャンバーバイアル）、シリンジ（二重チャンバーシリンジなど）、および試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成されてもよい。好ましくは、キットおよび / または容器は、容器上の、または容器に付随する、取扱説明を含み、それは再構成および / または使用上の指示を示す。例えば、ラベルは、凍結乾燥製剤が、上述されるようなペプチド濃度に再構成されることを表示してもよい。ラベルは、製剤が皮下投与に有用であり、または皮下投与用であることをさらに表示してもよい。

【0279】

製剤を収容する容器は、多回使用バイアルであってもよく、それは再構成製剤の反復投与（例えば2～6回の投与）を可能にする。キットは、適切な希釈剤（例えば、炭酸水素ナトリウム溶液）を含んでなる、第2の容器をさらに含んでなってもよい。

【0280】

希釈剤と凍結乾燥製剤の混合時に、再構成製剤中の最終ペプチド濃度は、好ましくは少なくとも0.15 mg / mL / ペプチド (= 75 μg) であり、好ましくは3 mg / mL / ペプチド (= 1500 μg) 以下である。キットは、その他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および取扱説明が掲載されるパッケージインサートをはじめとする、商業的および使用者観点から望ましい、その他の物品をさらに含んでもよい。

【0281】

本発明のキットは、その他の構成要素（例えば、その他の化合物またはこれらのその他の化合物の医薬組成物）が添加されたまたは添加されない、本発明による医薬組成物製剤

10

20

30

40

50

を含有する単回容器を有してもよく、または各構成要素のための別個の容器を有してもよい。

【0282】

好ましくは、本発明のキットは、第2の化合物（アジュバント（例えばGM-CSF）、化学療法剤、天然物、ホルモンまたは拮抗薬、抗血管新生因子または阻害剤、アポトーシス誘導剤またはキレート剤など）またはその医薬組成物の同時投与と合わせて使用するためにパッケージされた、本発明の製剤を含む。キットの構成要素は、あらかじめ混合されてもよく、または各構成要素は、患者への投与前に別個の異なる容器内にあってもよい。キットの構成要素は、1つまたは複数の液体溶液、好ましくは水溶液、より好ましくは無菌水溶液中で、提供されてもよい。またキットの構成要素は、固体として提供されてもよく、それは、好ましくは別の異なる容器内に提供される、適切な溶媒の添加によって液体に変換されてもよい。

10

【0283】

治療用キットの容器は、バイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または固体または液体を封入するその他のあらゆる手段であってもよい。通常、2つ以上の構成要素がある場合、キットは、第2のバイアルまたはその他の容器を含有して、別々の投薬を可能にする。キットは、薬学的に許容可能な液体のための別の容器もまた、含有してもよい。好ましくは、治療用キットは、装置（例えば、1本または複数本の針、シリンジ、点眼器、ピペットなど）を含有して、本キットの構成要素である本発明の作用物質の投与を可能にする。

20

【0284】

本製剤は、経口（腸内）、経鼻、眼、皮下、皮内、筋肉内、静脈内または経皮などの任意の許容できる手段によるペプチド投与に適するものである。好ましくは、投与はs.c.であり、最も好ましくはi.d.投与であり、輸液ポンプによってもよい。

【0285】

本発明のペプチドは、骨髄腫から単離されたので、本発明の薬剤は、好ましくは骨髄腫を治療するために使用される。

【0286】

本発明は、予備スクリーニングTUMAPの貯蔵庫から選択される少なくとも1つのペプチドを含んでなる、医薬組成物を製造するステップを含んでなる、個々の患者のための個別化医薬品を製造する方法にさらに関し、医薬組成物中で使用される少なくとも1つのペプチドは、個々の患者における適切さについて選択される。一実施形態では、医薬組成物はワクチンである。方法はまた、TCR単離などの下流用途、または可溶性抗体、およびその他の治療選択肢のためのT細胞クローンを製造するためにも適応され得る。

30

【0287】

「個別化医薬品」は、積極的個別化がんワクチンおよび自己由来患者組織を使用した養子細胞療法をはじめとする、このような個々の患者の治療のためにのみ使用される、一個人の患者のために特に調整された治療法を意味するものとする。

【0288】

本明細書の用法では、「貯蔵庫」という用語は、特定の腫瘍型における免疫原性および/または過剰提示について予備スクリーニングされている、一群のまたは一組のペプチドを指すものとする。「貯蔵庫」という用語は、ワクチンに含まれる特定のペプチドが、予備製造されて物理的設備内で貯蔵されることを暗示することは意図されないが、その可能性も検討される。ペプチドは、製造される各個別化ワクチンのために新規に製造されてもよく、または予備製造されて貯蔵されてもよいことが、明示的に検討される。貯蔵庫（例えば、データベースの形態）は、様々なHLA-AHLA-BおよびHLA-C対立遺伝子がある患者の骨髄腫細胞内で高度に過剰発現される、腫瘍関連ペプチドから構成される。それは、MHCクラスIおよびMHCクラスIIペプチドまたは伸長MHCクラスIペプチドを含有してもよい。いくつかの骨髄腫組織から採取された腫瘍関連ペプチドに加えて、貯蔵庫は、HLA-A*02およびHLA-A*24標識ペプチドを含有してもよい

40

50

。これらのペプチドは、TUMAPによって誘導されるT細胞免疫の規模を定量的に比較できるようにし、したがって抗腫瘍応答を引き起こすワクチンの能力について、重要な結論が導かれるようにする。第2に、それらは、患者において、「自己」抗原に由来するTUMAPに対するいかなるワクチン誘導T細胞応答も観察されない症例において、「非自己」抗原に由来する重要な陽性対照ペプチドとして機能する。第3に、それは、患者の免疫能力状態に関する結論が導かれるようにしてもよい。

【0289】

貯蔵庫のためのTUMAPは、遺伝子発現解析、質量分析、およびT細胞免疫学を組み合わせた、統合ゲノム機能解析アプローチ(XPresident(登録商標))を使用して同定される。アプローチは、高い割合の腫瘍上に真に存在するが、正常組織上では発現されず、または最小限にのみ発現されるTUMAPだけが、さらなる分析のために選択されることを保証する。最初のペプチド選択のために、患者に由来する骨髓腫サンプルおよび健常ドナーに由来する血液を段階的アプローチで分析した：

1. 悪性物質からのHLAリガンドを質量分析法によって同定した
2. ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸(mRNA)発現解析を使用して、一連の正常器官および組織と比較して骨髓腫における遺伝子過剰発現を同定した
3. 同定されたHLAリガンドを遺伝子発現データと比較した。好ましくは、ステップ2で検出されたような選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、腫瘍組織上で過剰提示されまたは選択的に提示されるペプチドが、多重ペプチドワクチンのための適切なTUMAP候補と見なされた。

4. 同定されたペプチドのTUMAPとしての妥当性を支持する追加的な証拠を同定するために、文献調査を実施した

5. mRNAレベルでの過剰発現の関連性をステップ3からの選択されたTUMAPの腫瘍組織上における再検出と、健常組織における検出の欠如(またはまれな)検出によって確認した。

6. 選択されたペプチドによる生体内T細胞応答の誘導が可能かどうかを評価するために、健常ドナーならびに骨髓腫患者からのヒトT細胞を使用して、生体外免疫原性アッセイを実施した。

【0290】

一態様では、貯蔵庫に含める前に、ペプチドは免疫原性について予備スクリーニングされる。制限を意図しない一例として、貯蔵庫に包含されるペプチドの免疫原性は、ペプチド/MHC複合体および抗CD28抗体が負荷された人工抗原提示細胞による、健常ドナーからのCD8+T細胞の反復刺激を通じた、生体外T細胞プライミングを含んでなる方法によって判定される。

【0291】

この方法は、稀ながんに、そして稀な発現プロファイルを有する患者にとって、好ましい。一定組成を有する多重ペプチド混合物とは対照的に、現在開発されている貯蔵庫は、腫瘍における抗原の実際の発現とワクチンとの顕著により高いマッチングを可能にする。多標的アプローチでは、各患者のために、選択された単一のまたは組み合わされた数種の「既製」ペプチドが利用される。理論上は、例えば50個の抗原性ペプチドのライブラリーからの5個の異なる抗原性ペプチドの選択に基づくアプローチは、それだけでおよそ1700万個の可能な医薬品(DP)組成物をもたらす。

【0292】

一態様では、ペプチドは、本明細書に記載される、または以下のような本発明による方法に基づく、個々の患者に対するそれらの適切さに基づいて、ワクチンへの包含のために選択される。

【0293】

HLA表現型、トランスクリプトミクスおよびペプチドミクスデータが、患者の腫瘍材料および血液サンプルから収集されて、「貯蔵庫」および患者に特有の(すなわち変異)TUMAPを含有する、各患者に対して最も適切なペプチドが同定される。患者の腫瘍に

において選択的にまたは過剰発現されて、可能であれば、患者の個々のP B M Cと共に試験すると、強力な生体外免疫原性を示すペプチドが選択される。

【0294】

好ましくは、ワクチンに含まれるペプチドは、(a) 個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される腫瘍関連ペプチド(T U M A P)を同定するステップと；(b) (a) で同定されたペプチドを上記のペプチド貯蔵庫と比較するステップと；(c) 少なくとも1つのペプチドを患者において同定された腫瘍関連ペプチドに関連がある貯蔵庫(データベース)から選択するステップとを含んでなる方法によって同定される。例えば、腫瘍サンプルによって提示されるT U M A Pは、(a 1) 前記腫瘍サンプルからの発現データを前記腫瘍サンプルの組織型に対応する正常組織サンプルからの発現データと比較して、前記腫瘍サンプルにおいて過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質を同定するステップと；(a 2) 発現データを腫瘍サンプル中のM H CクラスIおよび/またはクラスII分子と結合しているM H Cリガンドの配列と相関させて、腫瘍によって過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質に由来するM H Cリガンドを同定するステップとによって同定される。好ましくは、M H Cリガンドの配列は、腫瘍サンプルから単離されたM H C分子から結合ペプチドを溶出させて、溶出したリガンドを配列決定することで同定される。好ましくは、腫瘍サンプルおよび正常組織は、同一患者から入手される。

10

【0295】

貯蔵庫(データベース)モデルを使用してペプチドを選択するのに加えて、またはその代案として、T U M A Pを患者において新規に同定し、次に、ワクチンに含めてもよい。一実施例として、(a 1) 前記腫瘍サンプルからの発現データを前記腫瘍サンプルの組織型に対応する正常組織サンプルからの発現データと比較して、前記腫瘍サンプルにおいて過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質を同定するステップと；(a 2) 発現データを腫瘍サンプル中のM H CクラスIおよび/またはクラスII分子と結合しているM H Cリガンドの配列と相関させて、腫瘍によって過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質に由来するM H Cリガンドを同定するステップとによって、候補T U M A Pが患者において同定されてもよい。別の実施例として、個々の患者からの正常な対応組織と比較して、腫瘍サンプルに特有の変異を含有するタンパク質が同定されてもよく、特異的に変異を標的とするT U M A Pが同定され得る。例えば、腫瘍のゲノム、および対応する正常組織のゲノムは、全ゲノム配列決定によって配列決定され得る。遺伝子のタンパク質コード領域における非同義の変異を発見するために、ゲノムDNAおよびRNAが腫瘍組織から抽出され、正常な非変異ゲノム生殖細胞系DNAが末梢血単核細胞(P B M C)から抽出される。適用されたNGSアプローチは、タンパク質コード領域の再配列決定(エクソーム再配列決定)に限定される。この目的で、供給業者が提供する標的富化キットを使用して、ヒトサンプルからのエクソンDNAが捕捉され、例えば、HiSeq2000(Illumina)による配列決定がそれに続く。それに加えて、遺伝子発現の直接定量化と、変異遺伝子が患者の腫瘍において発現されることの妥当性評価とのために、腫瘍mRNAが配列決定される。結果として得られる数百万の配列読み取りは、ソフトウェアアルゴリズムを通じて処理される。出力一覧は、変異および遺伝子発現を含有する。P B M C由来生殖細胞系の多様性と比較することで腫瘍特異的体細胞突然変異が判定され、優先順位がつけられる。次に、新規に同定されたペプチドは、貯蔵庫について上述した免疫原性について試験され得て、適切な免疫原性を保持する候補T U M A Pが、ワクチンへの包含のために選択される。

20

30

40

【0296】

例示的一実施形態では、ワクチンに包含されるペプチドは、(a) 個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される腫瘍関連ペプチド(T U M A P)を上記の方法(方法)によって同定するステップと；(b) a) で同定されたペプチドに対応する正常組織との比較で腫瘍における免疫原性および過剰提示について予備選別されたペプチドの貯蔵庫と比較するステップと；(c) 少なくとも1つのペプチドを患者において同定された腫瘍関連ペプチドに関連がある貯蔵庫から選択するステップと；(d) 任意選択的に、(a) で新

50

規に同定された少なくとも1つのペプチドを選択して、その免疫原性を確認するステップとによって同定される。

【0297】

例示的一実施形態では、ワクチンに包含されるペプチドは、(a)個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される腫瘍関連ペプチド(TUMAP)を同定するステップと；(b)(a)で新規に同定された少なくとも1つのペプチドを選択して、その免疫原性を確認するステップとによって同定される。

【0298】

ひとたび個別化ペプチドベースのワクチンのためのペプチドを選択したら、ワクチンを製造する。ワクチンは、好ましくは、約33%DMSOなどの20~40%DMSO、好ましくは約30~35%DMSOに溶解された、個々のペプチドからなる液体製剤である。

10

【0299】

製品に包含される各ペプチドは、DMSOに溶解される。単一ペプチド溶液の濃度は、製品に包含されるペプチド数に応じて選択されなくてはならない。単一ペプチドDMSO溶液は等量で混合され、ペプチド当たり約2.5mg/mlの濃度で製品に包含される全てのペプチドを含有する溶液が得られる。次に、混合溶液は注射用水で1:3に希釈され、33%DMSO中でペプチド当たり0.826mg/mlの濃度が得られる。希釈溶液は、0.22µmの無菌フィルターを通して濾過される。最終バルク溶液が得られる。

【0300】

最終バルク溶液はバイアルに充填され、使用時まで-20で保存される。1本のバイアルは、0.578mgの各ペプチドを含有する700µLの溶液を含有する。この内、500µL(ペプチド当たりおよそ400µg)が皮内注射のために適用される。

20

【0301】

がんを治療するために有用であるのに加えて、本発明のペプチドは、診断法としてもまた有用である。ペプチドは骨髄腫から生成されたので、そしてこれらのペプチドは正常組織には存在せずまたはより低レベルで存在すると判定されたので、これらのペプチドを利用してがんの存在が診断され得る。

【0302】

特許請求されるペプチドの血液サンプル中の組織生検上の存在は、がん診断において病理学者を補佐し得る。抗体、質量分析法またはその他の当該技術分野で公知の方法の手段による特定のペプチドの検出は、組織サンプルが悪性または炎症性または概して病的であることを病理学者に告げ得て、または骨髄腫のバイオマーカーとして利用され得る。ペプチド基の存在は、病的組織の分類または下位分類を可能にし得る。

30

【0303】

患部組織検体上のペプチドの検出は、特にTリンパ球が作用機序に関与することが知られておりまたは予測される場合に、免疫系が関与する治療法の利点を判定できるようにする。MHC発現の喪失は、それによって感染悪性細胞が免疫監視を逃れる、十分に説明された機序である。したがってペプチドの存在は、この機序が、分析した細胞によって活用されていないことを示す。

40

【0304】

本発明のペプチドは、ペプチドまたはMHC分子と複合体化したペプチドに対するT細胞応答または抗体応答などの、これらのペプチドに対するリンパ球応答を分析するのに使用されるかもしれない。これらのリンパ球応答は、さらなる治療段階を決定するための予後マーカーとして使用され得る。これらの応答はまた、例えば、タンパク質、核酸、自己材料のワクチン接種や、リンパ球の養子免疫伝達などの異なる手段によるリンパ球応答の誘導を目指す、免疫療法アプローチにおける代理応答マーカーとして使用され得る。遺伝子治療の設定では、副作用の評価において、ペプチドに対するリンパ球応答が考慮され得る。リンパ球応答のモニタリングはまた、例えば移植片対宿主病および宿主対移植片病の検出など、移植治療の経過観察検査のための有益な手段かもしれない。

50

【0305】

標的細胞上のHLA発現の喪失または下方制御は、T細胞に基づく免疫療法の有効性を極度に妨害するかもしれないので、本発明者らは、HV骨髄に由来する自己由来造血細胞および形質細胞と比較して、原発性骨髄腫細胞上におけるHLAクラスIおよびII表面分子カウントを定量化した。MM患者(n=20)においては、HLAクラスI発現は、不均一であることが判明し、CD38⁺CD138⁺骨髄腫細胞上の平均発現レベルは、416,000±54,500であり、それは、自己由来正常CD19⁺CD20⁺B細胞(198,500±20,500、P=0.001)、CD3⁺T細胞(167,500±15,500、P=0.0002)、およびCD34⁺CD38⁻HPC(204,000±32,500、P=0.002、図1A)と比較して、有意により高いことが判明した。さらに、原発性MM細胞上のHLAクラスI発現上は、HVのCD38⁺CD138⁺形質細胞上におけるよりも有意に高いことも判明した(n=15、291,500±25,500、P<0.05;図1C)。MM患者の正常B細胞、T細胞、およびHPCと、HVの対応する細胞集団とを比較した際に、HLAクラスI発現に有意差は観察されなかった(補足図1B)。骨髄腫細胞のHLA-DR発現レベルは、一般に、HLAクラスIレベルよりもはるかに低いことが判明した。骨髄腫細胞上の平均HLA-DR表面分子数(27,000±7,000)は、自己由来HPC(35,000±5,000)およびT細胞(18,000±13,000)またはHVの形質細胞(39,500±5,000)と比較して、有意差を示さなかった(図1BおよびD)。MM患者CD19⁺CD20⁺B細胞のHLA-DR発現(104,000±7,000)は、骨髄腫細胞と比較して有意に高かった(P<0.0001)。骨髄腫細胞上のHLA表面発現と、性別、年齢、病期、リスク分類または前治療などの患者の特徴との相関は観察されなかった。

10

20

【0306】

10人の骨髄腫患者HLAクラスIリガンドと、5個のMCLとをマッピングすることにより、本発明者らは、7,574個の起源タンパク質に相当する合計17,583個の異なるペプチドを同定し、達成可能な最大カバー範囲の>80%を達成した(図2A)。ユニークなペプチド同定の平均数は、原発性骨髄腫サンプルでは1,059ID、MCLでは2,243IDであった。全体として、20個の異なるHLA-Aおよび-Bアロタイプによって拘束されるペプチドが、この研究において同定され、白人集団の99.3%をカバーした([52]に従って計算された)。

30

【0307】

対照として、本発明者らは、45個のHV由来サンプル(30個のPBMC、10個のBMNC、および5個の顆粒球検体)のHLAクラスIリガンドを分析し、7,729個の起源タンパク質に相当する合計20,171個の異なるペプチドを同定した。HVコホートにおけるHLAアロタイプ分布は、MMサンプルコホートのHLA-Aおよび-B対立遺伝子の>80%をカバーした[53]。HLAクラスIリガンドの分析が、7人のMM患者および5個のMCLに対して実施された。1,743個の起源タンパク質に相当する、合計6,076個のユニークなペプチドが同定された。HLAクラスII HVコホート(13個のPBMC、5個のBMNC、5個の顆粒球検体)は、889個の原タンパク質に相当する2,899個の異なるペプチドをもたらした。

40

【0308】

骨髄腫関連抗原を同定するために、本発明者らは、MMサンプルのHLAリガンドと、HVコホートとを起源タンパク質レベルで比較分析した。HLAリガンド供給源タンパク質の重複分析は、MMサンプルのHLAリガンドにおいて排他的に表示される2,412個のタンパク質(マッピングされたMM HLA起源プロテオームの31.8%に相当する)を同定した。これらのMM限定的起源タンパク質の内、68.3%はMCLサンプル上でのみ同定された一方で、13.2%のタンパク質は、MCLおよび原発性MMサンプルの双方の上で提示されることが判明した。骨髄腫限定的起源タンパク質の18.5%の一部は、原発性MMサンプルに限定されることが判明した(図2B)。広範に提示さ

50

れる腫瘍関連抗原を同定するために、限定的供給源タンパク質が、MMサンプルコホートにおけるその表現頻度に従って格付けされた(図2C)。抗原同定のストリンジエンシーを統計学的に評価して最適化するために、本発明者らは、コンピュータを用いて無作為化された仮想リガンドームをシミュレートして、異なる表現頻度で得られる擬陽性TAA数を計算した(図2D)。本発明者らは、HLAクラスI腫瘍関連抗原(「TAA」)定義の頻度閾値を骨髓腫限定的抗原提示の>25%に設定し、推定偽発見率(FDR)4.1%で58個のTAAを得た。頻繁に提示される骨髓腫関連抗原のこの新規パネルは、197個のユニークなHLAクラスIリガンドによって表わされる、マッピングされ骨髓腫HLAリガンド起源プロテオームの0.8%を構成する。これらの抗原のKEGG経路分析[54]およびそれらの生物学的機能に関する機能注解クラスタリング(GO Term BP, FAT, [55])は、統計学的に有意に過剰提示された、経路または機能性クラスターを同定しなかった。特に、プロトオンコジーンMMSETはTAAとして同定され、MM患者リガンドームの33%における表示を示し、3つの異なるHLAリガンド(ASNPSNPRPSK(HLA-A*30:01)(配列番号17)、KAMEAASSL(A*02:01)(配列番号82)、SLLLEQLVEA(A*02:01)(配列番号177))によって表示されることが判明した。さらに、MMSETは、発がん性転座t(4;14)を有する2人のMM患者の双方で検出されたが、この逸脱のない患者では1/6(17%)のみで検出された。

【0309】

HLAクラスIリガンドームにおける、確立された骨髓腫関連抗原の表示
本発明者らの広範囲に及ぶHLAリガンドームデータセットに基づいて、本発明者らは、異なるサンプルコホート内に確立された骨髓腫関連抗原の提示を調べた。本発明者らは、以前記載された骨髓腫抗原[42]の22/25(88%)を表示する、73個の異なるHLAリガンドを同定した。本発明者らは、22個の検出可能な抗原の内9個(41%)がMMサンプル上で限定的に提示され、10/22(45.5%)の抗原がMMおよびHVサンプルの双方の上で表示され、3/22(13.6%)がHV由来サンプル上で限定的に提示されることを見いだした(図3A)。注目すべきことに、7/9(77.8%)のMM限定的抗原は、MCL上でのみ検出可能であった。これらのMM限定的抗原HLAリガンドの2/9(22.2%)のみが、原発性MM患者サンプル上で検出された(図3B)。参考として、新たに定義された骨髓腫抗原の7/58(12.1%)のみがMCL上で限定的提示を示した一方で、51/58の大部分の抗原もまた原発性MM患者サンプル上で提示され、これは、臨床標的抗原としての可能性を示している(図3C)。

【0310】

さらに、HLAリガンドームにおける起源タンパク質提示の教師なしクラスタリングは、MCLのクラスターが原発性MMサンプルとは非常に異なることを明らかにした(補足図2)。

【0311】

候補HLAクラスIIリガンドームの分析は、潜在的に相乗的なワクチン候補を同定する。

腫瘍制御におけるCD4⁺T細胞の直接関与が確立されているので[56]、本発明者らは、HLAクラスII抗原を同定することをさらに目指した。HLAクラスIIリガンド起源タンパク質の重複分析は、1,135個の骨髓腫限定的抗原を同定した(図4A)。HLAクラスIIリガンドームの比較プロファイリングは、FDR<5%で、MM限定的提示を示す、67個のHLAクラスIIリガンドによって表示される単一抗原(TFRC)を同定した(図4B、C)。IFN- γ ELISPOTによる最も豊富なTFRCペプチド(NSVIVDKNGRLV)(配列番号237)の機能特性解析は、2/5MM患者における記憶T細胞応答を明らかにした。

【0312】

CD4⁺T細胞は、抗原特異的CD8⁺T細胞応答の誘導および維持において中心的役割を果たすので[57-59]、本発明者らは、HLAクラスII TAA由来の潜在的に

10

20

30

40

50

相乗的なHLAクラスII拘束性ペプチドを同定する第2のアプローチを実施した。58個のHLAクラスII抗原と、1,135個のHLAクラスII提示MM限定的タンパク質との重複分析は、31個のペプチドによって表示される、6クラスに及ぶ抗原のパネルを同定した(図4D,E;補足表5)。相乗的HLAクラスIIリガンドの機能特性解析は、3/5の試験されたペプチドについて、骨髄腫患者におけるペプチド特異的T細胞応答を明らかにした(図4E)。

【0313】

MMサンプルのHLAクラスIおよびIIリガンドームの総合比較は、HLAクラスII提示タンパク質の80%(1,622)が、HLAクラスI上でも提示されることを明らかにした(図4F)。機能アノテーションクラスタリング(DAVIDを用いたGO Term CCクラスタリング[55])が、各HLAクラスの最も頻繁に提示された上位500個のタンパク質上で実施され、これらのタンパク質が由来する細胞コンパートメントが同定された。クラスI上で提示された抗原は、核タンパク質ならびにリボソーム、細胞骨格、および小胞由来タンパク質について、非常に豊富なクラスターを示した。注目すべきことに、このパターンは、小胞由来タンパク質のより高い格付けとほぼ3倍高い富化にもかかわらず、双方のHLAクラスI上で提示されたタンパク質のクラスタリングにおいて再現された。HLAクラスII提示抗原は、原形質膜タンパク質、小胞由来タンパク質、およびリソソームタンパク質について、中程度の濃縮を示した(補足表6)。

【0314】

HLAクラスI TAAは、骨髄腫患者における自発的T細胞応答によって標的化される

新規骨髄腫抗原の機能特性解析は、MMSET由来の2個のHLA-A*02リガンドをはじめとする、11個のHLA-A*02および2個のHLA-B*07拘束性ペプチドのパネルにおいて実施された(図5A)。骨髄腫関連ペプチドは、MM患者およびHVから得られたPBMCを用いた12日間免疫復活IFN- γ ELISPOTアッセイで評価された。本発明者らは、図5Cに例示的に示されるように、骨髄腫患者において5/11 A*02リガンドおよび1/2 B*07リガンドのIFN- γ 分泌を観察した。MMSET由来の双方のペプチド(P₁およびP₂)は、それぞれ、MM患者の2/16(13%)および1/8(13%)において特異的T細胞認識を示した。重要なことに、骨髄腫ペプチド特異的IFN- γ 分泌は、10人のHLA適合健常対照において観察されなかった(図5B)。注目すべきことに、T細胞応答は、原発性骨髄腫サンプル(10/13)上で同定された骨髄腫関連ペプチドでのみ観察され、MCL上でのみ同定された3/13ペプチドでは決して観察されなかった。ELISPOTによってMM患者において検出されたペプチド特異的T細胞応答の頻度は、一般に、MM患者のアロタイプマッチさせたりガンドームにおける各ペプチドの提示頻度と同じ範囲内であった(図5A)。分析に利用できる細胞数が制限されていたために、対応する抗原を発現する標的細胞を用いたさらなる対照は実施し得なかった。したがって、本発明者らは、T細胞反応性が、合成ペプチドバッチに含有された不純物に向けられた可能性を排除し得なかった。確かに、合成ペプチドが、例えば、保護基で修飾されたペプチドなどの不純物を含有して、これらの不純物が免疫原性であることは良く知られている。しかし、本研究中の全てのELISPOTで使用された良性組織由来のHLA-A*02および-B*07拘束性抑制ペプチド(HV排他的HLAリガンド)は、決して有意なIFN- γ 放出を引き起こさなかった(図5C)。

【0315】

抗原特異的T細胞は、MM患者またはHVの未感作T細胞から、生体外で誘導され得る。

骨髄腫抗原特異的T細胞応答が、生体外で未感作T細胞から誘導され得るかどうかを評価するために、本発明者らは、CD8⁺T細胞を1人の健常人および1人のMM患者から単離した。本発明者らは、MMSET由来ペプチドSLLEQLVEA(配列番号177)(P₂)を用いて、aAPCプライミングを実施した。HV由来のCD8⁺T細胞を用いた生体外プライミング後に、0.403%のP₂四量体陽性CD8⁺T細胞の集団が検

10

20

30

40

50

出された。0.1%を超える四量体陽性T細胞の母集団は、生体外で検出可能でなかった。(12日間免疫復活IFN-ELISPOTおよび生体外四量体染色によって検出される)P₂に対する以前のT細胞反応性を有しないMM患者に由来するT細胞のプライミング後、本発明者らは、0.236%P₂四量体陽性CD8⁺T細胞の小規模集団の誘導を検出した(図5E)。重要なことには、関連染色で使用されるのと同じウェルからの細胞上で、非関連A*02対照ペプチドを含有するA*02四量体の対照染色の実施(control stainings performed)が並行して実施され(were performed)、いかなる特異的四量体陽性T細胞集団も生じなかった(図5D)。

【0316】

骨髄腫患者および健常ボランティアの骨髄内の異なる細胞集団上のHLA表面発現の定量化は、以前の治療を受けた患者においてさえ、悪性形質細胞上のHLA喪失または下方制御が重要でないことを実証した。のこれらの細胞集団HLAリガンドームの比較分析は、明確な抗原性シグネチャを明らかにし、骨髄腫関連抗原のパネルを同定した。

【0317】

重要なことには、確立された骨髄腫抗原のかなり大きな割合が、原発性骨髄腫ではまれにしか提示されないか、または最適以下の程度の骨髄腫特異性を示すことが判明した。注目すべきことに、これらの抗原の大部分は骨髄腫細胞株で選択的に検出されたが、一次サンプルでは検出されず、病態生理学的に関連する抗原の選択は原発腫瘍サンプルの分析に基づくべきであることが示唆された。

【0318】

注目に値する例外は、確立された骨髄腫関連タンパク質MMSETであり、予後不良t(4;14)骨髄腫患者の治療の標的として現在研究されている[73-76]。MMSET由来ペプチドは、t(4;14)骨髄腫サンプル上で頻繁に同定されたが、本発明者らは、t(4;14)陰性患者および1人のt(4;14)陰性MCL(U266)においても、HLAリガンドーム中にMMSETペプチドを検出した。際だったことに、ELISPOTによる機能特性解析は、骨髄腫患者においてのみこれらのMMSET由来エпитープを標的とする記憶T細胞応答を明らかにし、HV患者においては明らかにしなかった。これは、MM患者における生体内抗MMSET T細胞応答の骨髄腫依存性プライミングを示唆し、それはこの抗原の病態生理学的関連性を強調する。HLAリガンドミクス(ligandomics)データに従って、本発明者らは、これらのT細胞応答がt(4;14)骨髄腫患者に限定されないことを見いだした。プライミングの結果は、MMSET特異的CD8⁺T細胞応答が、健常人において、そして重要なことには限られた規模ではあるが骨髄腫患者においても、未感作T細胞から誘導され得ることを示唆する。小分子またはsiRNAによるMMSETの阻害に焦点を当てた現行の戦略により[77, 78]、本発明者らの骨髄腫限定的MMSET由来T細胞エпитープの同定は、T細胞に基づく免疫療法によるMMSETの標的化のための新たな選択肢を提供する。注目すべきことに、本発明者らは、MMSET提示および免疫認識を変異状態に関わりなく観察したので、この治療戦略は必ずしもt(4;14)骨髄腫に限定されなくてもよい。これは、遺伝子発現とHLA拘束性抗原提示の歪んだ相関によって、ならびに骨髄腫細胞内のt(4;14)のサブクロナル分布、および疾患経過中に起こるゲノムの柔軟性によって、説明されるかもしれない[72, 79]。

【0319】

総合して、本発明者らの知見は、HLAリガンドミクス(ligandomics)に誘導される抗原同定がどのように新規MM関連T細胞エпитープを特定し得るかを例証し、患者コホートにおける抗原分布パターンを直接評価できるようにする。MMSETに関する本発明者らの知見と並行して、本発明者らの研究は、骨髄腫またはがん全般にこれまで関連付けられていなかった新規抗原の広範なパネルを特徴とする。本発明者らは、MMSETと同様に、骨髄腫患者においてこれらの標的のかなり大きな割合に対する既存のT細胞応答を検出し、関連するMM関連抗原の高度富化を示した。結論として、本発明者ら

10

20

30

40

50

のリガンドームを中心とする研究は、多発性骨髄腫における将来の抗原特異的 T 細胞免疫療法設計を導いてもよい。

【0320】

本発明をここで、その好ましい実施形態を描写する以下の実施例において、添付図面を参照して説明するが、それでもなお、それらには限定されないものとする。本発明の目的で、本明細書で引用される全ての参考文献は、その内容全体が参照により援用される。

【図面の簡単な説明】

【0321】

【図1】図1A～D：骨髄腫患者およびHV骨髄細胞上におけるHLAクラスI & II表面発現を示す。HLA表面発現の定量化は、ビーズベースのフローサイトメトリーアッセイを用いて実施された。自己由来CD34⁺CD38⁻造血前駆細胞、CD19⁺CD20⁺B細胞、およびCD3⁺T細胞と比較した、CD38⁺CD138⁺原発性骨髄腫細胞上における(A)HLAクラスI、および(B)HLA-DR発現。HVの骨髄由来形質細胞と比較した、原発性MM細胞上における(C)HLAクラスIおよび(D)HLA-DR発現。略称：MM、多発性骨髄腫；HV、健常ボランティア；n.s.、有意でない；* P < 0.05；** P < 0.01；*** P < 0.001

【図2】図2A-D：比較HLAリガンドームプロファイリングおよび骨髄腫関連抗原の同定を示す。(A)MM患者におけるHLAクラスIリガンド起源タンパク質同定の飽和分析。10人のMM患者における、累積HLAリガンド起源タンパク質同定の関数としてのユニークなHLAリガンド起源タンパク質同定の数。指数回帰は、異なる起源タンパク質同定(破線)の最大達成可能数のロバストな計算($R^2 = 0.99$)を可能にした。点線は、本発明者らのMM患者コホートから得られた起源プロテオームカバー範囲を描写する。(B)原発性MMサンプル(n = 10)、MCL(n = 5)、およびHVサンプル(合計n = 45：PBMCL(n = 30)、BMNC(n = 10)、顆粒球(n = 5))のHLAクラスIリガンド起源タンパク質の重複分析。(C)MMおよびHVリガンドームにおけるHLA拘束性提示の頻度に基づく、HLAリガンド起源タンパク質の比較プロファイリング。それぞれの起源タンパク質のHLA拘束性提示(x軸)に対して、MM/HV陽性の頻度がy軸上に示される。左のボックスは、骨髄腫サンプルの>25%においてMM限定的提示を示す、骨髄腫関連抗原のサブセットを強調表示する。(D)異なる閾値における、擬陽性骨髄腫抗原同定の統計学的評価。MMおよびHVコホートの分析に基づいて同定されたオリジナルのTAAの数は、ランダム仮想TAAと比較された。仮想MMおよびHVサンプルは、双方のオリジナルのコホートにおけるタンパク質同定全体からのランダム加重サンプリングに基づいて、コンピュータを用いて作製された。規定サイズ(n = 957個のタンパク質、分析された全サンプルにおけるタンパク質同定の平均数)のこれらのランダム化された仮想リガンドを用いて、45個のHVサンプルに対する15個のMMのシミュレートされたコホートに基づくTAAが定義された。タンパク質ランダム化、コホート構築、およびTAA同定のプロセスは1,000回反復され、得られた仮想TAAの平均値が計算されて異なる閾値に対してプロットされた。選択されたTAA閾値に対応する偽発見率は、x軸の下に列挙される。略称：ID、同定；MM、多発性骨髄腫；MCL、骨髄腫細胞株；HV、健常ボランティア；PBMCL、末梢単核血液細胞；BMNC、骨髄単核細胞；TAA、腫瘍関連抗原；sum、合計；FDR、偽発見率。

【図3】図3A-C：MMおよびHVのHLAリガンドームにおいて確立された、骨髄腫関連抗原の表示を示す。(A)HLAクラスIリガンドームにおいて以前記載されている、MM関連抗原の表示。バーは、原発性MMサンプル、MCLサンプル、およびHVサンプル上におけるHLAクラスIリガンドによる各抗原の相対的表示[%]を示す。点線は抗原のMM結合の程度に応じて、抗原を4つのグループに分ける(MMおよびMCL限定的、MCL限定的、混合提示、HV限定的)。(B、C)MCL(白色)およびMM/MCL(網掛け)上における、(B)以前記載された抗原、および(C)リガンドーム定義腫瘍関連抗原に対する、骨髄腫限定的抗原提示の分布。略称：MM、多発性骨髄腫；MCL、骨髄腫細胞株；HV、健常ボランティア。

10

20

30

40

50

【図4】図4A - F：相乗的HLAクラスII拘束性骨髄腫関連抗原の同定を示す。原発性MMサンプル（ $n = 7$ ）、MCL（ $n = 5$ ）、およびHVサンプル（合計 $n = 23$ ：PBM C（ $n = 13$ ）、BMNC（ $n = 5$ ）、顆粒球（ $n = 5$ ））のHLAクラスIIリガンド起源タンパク質の重複分析。（B）図2に記載される異なる閾値における、擬陽性骨髄腫抗原同定の統計解析。ランダム化された仮想リガンドームサイズは226個のタンパク質に設定され、TAAは23個のHVサンプルと対比して12個のMMの疑似コホートに基づいて定義された。（C）MMおよびHVリガンドームにおけるHLAクラスII拘束性提示の頻度に基づく、HLAリガンド起源タンパク質の比較プロファイリング。それぞれの起源タンパク質のHLA拘束性提示（ x 軸）に対して、MM / HV陽性の頻度が y 軸上に示される。（D）HLAクラスII TAA（ $n = 58$ ）およびHLAクラスII MM限定的抗原（ $n = 1135$ ）の重複分析。（E）潜在的に相乗的HLAクラスIIリガンドをもたらすHLAクラスII TAA。（F）MMサンプルの全HLAクラスIIおよびIIリガンド起源プロテオームを含んでなる重複分析。略称：MM、多発性骨髄腫；MCL、骨髄腫細胞株；HV、健常ボランティア；PBM C、末梢単核血液細胞；BMNC、骨髄単核細胞；TAA、腫瘍関連抗原；sum、合計；FDR、偽発見率。rep、表示。

【図5】図5A - E：骨髄腫関連抗原の機能特性解析を示す。（A）対応するHLA拘束性を有する骨髄腫関連T細胞エピトープ、およびIFN - ELISPOTアッセイにおける骨髄腫患者由来T細胞による免疫認識頻度。（B）HVPBM Cを用いたIFN - ELISPOTにおいて評価された、骨髄腫関連T細胞エピトープの例。頻繁に認識されるペプチドBRLF109 - 117 YVLDHLIVV（ A^*02 ）（配列番号229）およびEBNA3247 - 255 RPPIFIRRL（配列番号230）（ B^*07 ）を含有するEBVエピトープ混合物が、陽性対照の役割を果たした。良性組織由来ペプチドKLF EKVK EV（配列番号231）（HLA - A^*02 ）およびKPSEKIQVL（ B^*07 ）（配列番号232）が、陰性対照の役割を果たした。（C）MM患者PBM C（ $n = 3$ ）を用いたIFN - ELISPOTにおいて評価された、骨髄腫関連T細胞エピトープの例。結果は、免疫反応性ペプチドについてのみ示される。5つの頻繁に認識されるペプチド[BRLF109 - 117 YVLDHLIVV（ A^*02 ）（配列番号229）、EBNA3471 - 479 RLRAEAQVK（ A^*03 ）（配列番号233）、EBNA3247 - 255 RPPIFIRRL（ B^*07 ）（配列番号230）、BZLF1190 - 197 RAKFKQLL（ B^*08 ）（配列番号234）、EBNA6162 - 171 AEGGVGWRHW（ B^*44 ）（配列番号235）]を含有するEBVエピトープ混合物が、陽性対照として使用された。良性組織由来ペプチドKLF EKVK EV（配列番号231）（HLA - A^*02 ）およびKPSEKIQVL（ B^*07 ）（配列番号232）が、陰性対照の役割を果たした。（D、E）（D）健常人および（E）骨髄腫患者由来のT細胞を用いた3サイクルのaAPCベースの生体外ブライミング後における、CD8⁺T細胞の四量体染色：1番目のカラム：P₂ - aAPCs（SLL ELQGLVEA、 A^*02 （配列番号177））でブライミングされたCD8⁺T細胞のP₂四量体染色；2番目のカラム：CD8⁺T細胞の生体外P₂四量体染色；3番目のカラム：1番目のカラムで示されるT細胞と同じ集団に由来するCD8⁺T細胞における、非関連 A^*02 拘束性対照ペプチド（KAMEAASSL、 A^*02 （配列番号82））を含有する A^*02 四量体による対照染色。4番目のカラム：陽性対照：（NLVPMVATV、 A^*02 （配列番号236））でブライミングされたCD8⁺T細胞の四量体染色。略称：MM、多発性骨髄腫；UPN、画一患者番号neg、陰性；pos、陽性。

【図6】AB：骨髄腫以外の組織上における、ペプチド配列番号107および177の提示を示す。A）ペプチドに関して陰性と試験された正常組織は、次のとおりであった：6脂肪組織、8副腎、24血液細胞サンプル、15血管、10骨髄、13脳、7乳房、9食道、2眼、3胆嚢、16心臓、17腎臓、25大腸、24肝臓、49肺、7リンパ節、12神経、3卵巣、13脾臓、6副甲状腺腺、1腹膜、6脳下垂体、7胎盤、1胸膜、4前

立腺、7 唾液腺、9 骨格筋、11 皮膚、9 小腸、11 脾臓、8 胃、5 精巣、3 胸腺、5 甲状腺腺、16 気管、7 尿管、8 膀胱、6 子宮。MMに加えて、ペプチドは、以下の上で提示されることが判明した：1 細胞株（メラノーマ）、1 正常組織（脾臓）、5 がんサンプル（AML、2 胆嚢がん、1 肝細胞がん、1 メラノーマ）。B）ペプチドに関して陰性と試験された正常組織は、次のとおりであった：6 脂肪組織、8 副腎、24 血液細胞サンプル、15 血管、10 骨髄、9 脳、7 乳房、9 食道、2 眼、3 胆嚢、16 心臓、17 腎臓、23 大腸、24 肝臓、49 肺、7 リンパ節、10 神経、3 卵巣、13 膵臓、6 副甲状腺腺、1 腹膜、6 脳下垂体、7 胎盤、1 胸膜、3 前立腺、7 唾液腺、9 骨格筋、11 皮膚、8 小腸、11 脾臓、8 胃、5 精巣、3 胸腺、5 甲状腺腺、15 気管、7 尿管、8 膀胱、6 子宮。MMに加えて、ペプチドは、以下の上で提示されることが判明した：6 細胞株（5 白血病、1 腎臓がん）、4 脳、1 中枢神経、2 結腸、1 末梢神経、1 前立腺、1 小腸、1 脾臓、1 気管、1 胆管がん、12 脳がん、2 乳がん、3 結腸がん、4 食道がん、3 胆嚢がん、4 頭頸部がん、2 腎臓がん、2 肝臓がん、19 肺がん、2 NHL、1 AML、8 卵巣がん、2 前立腺がん、1 直腸がん、4 皮膚がん、2 膀胱がん、6 子宮がん。

10

【実施例】

【0322】

材料と方法

患者、血液および骨髄サンプル

診断時または治療前再発時のMM患者からの骨髄単核細胞（BMNC）および末梢血単核細胞（PBMC）、ならびに健常ボランティア（HV）のPBMC、BMNC、および顆粒球は、密度勾配遠心分離（Biocoll、Biochrom GmbH）および赤血球溶菌（EL buffer、Qiagen）によって単離した。告知に基づく同意は、ヘルシンキプロトコルの宣言に従って得られた。治験は、地域倫理委員会の指針（142/2013BO2）に従って実施された。患者の特徴は、表1に提供される。HLAタイピングは、Department of Hematology and Oncology, Tubingen, Germanyによって実施された。

20

【0323】

骨髄腫細胞株（MCL）

HLAリガンド解析のために、骨髄腫細胞株（MCL：U266、RPMI8226、JJN3、LP-1、MM.1S）を、10%/20%ウシ胎仔血清、100IU/Lペニシリン、100mg/Lストレプトマイシン、および2mmol/Lグルタミンを添加した推奨される細胞培地（RPMI1640、Gibco/IMDM、Lonza）中において、37 °Cおよび5%CO₂で培養した。MCLであるRPMI8226、JJN3、MM.1S、およびLP-1は、Department of Hematology and Oncology, Tubingenから得られた。

30

【0324】

HLA表面発現の定量化

CD38⁺CD138⁺骨髄腫細胞/形質細胞、CD19⁺CD20⁺B細胞、CD3⁺T細胞、およびCD34⁺CD38⁻造血前駆細胞（HPC）をはじめとする、MM患者およびHV骨髄細胞上におけるHLA表面発現を、以前記載されたように製造会社の使用説明書に従ってQIFIKITビーズベースの定量的フローサイトメトリーアッセイ（Dako）を用いて分析した[12]。手短に述べると、試験サンプルを汎HLAクラスI特異的モノクローナル抗体（mAb）W6/32、HLA-DR特異的mAbL243（社内作製）またはIgGアイソタイプ対照（BioLegend）で、それぞれ染色した。表面マーカー染色は、直接標識CD138、抗-、抗-、CD19、CD20（BioLegend）およびCD38、CD3、およびCD34（BD）抗体を用いて実施した。LSR Fortessa（BD）上のフローサイトメトリー分析の直前に、7-AAD（BioLegend）を生存マーカーとして添加した。

40

【0325】

一次サンプルおよびMCLからのHLAリガンドの隔離

50

H L A クラス I および I I 分子は、p a n - H L A クラス I 特異的 m A b W 6 / 3 2、p a n - H L A クラス I I 特異的 m A b T u 3 9 および H L A - D R 特異的 m A B L 2 4 3 (社内作製) を用いて、記載されたような標準イムノアフィニティー精製 [4 4] を用いて単離した。

【 0 3 2 6 】

L C - M S / M S による H L A リガンド解析

H L A リガンド抽出物は、以前記載されたように [1 3] 5 連の技術的反復試験で分析した。手短に述べると、ペプチドサンプルを、5 0 μ m x 2 5 c m P e p M a p R S L C カラム (T h e r m o F i s h e r) および 2 . 4 ~ 3 2 . 0 % アセトニトリルの範囲の勾配を使用して、n a n o f l o w H P L C (R S L C n a n o , T h e r m o F i s h e r) で 9 0 分かけて分離した。溶出ペプチドは、トップ 5 C I D (衝突誘起解離) フラグメンテーション法を用いて、オンライン結合 L T Q O r b i t r a p X L 質量分光計 (T h e r m o F i s h e r) 内で分析した。

10

【 0 3 2 7 】

データベース検索およびスペクトルアノテーション

データ処理は、以前記載されたように [1 3] 実施した。手短に述べると、M a s c o t 検索エンジン (M a s c o t 2 . 2 . 0 4 ; M a t r i x S c i e n c e , L o n d o n , U K) を実装して、酵素的制限なしに、S w i s s - P r o t データベース (2 0 , 2 7 9 検体の審査済みタンパク質配列、2 0 1 3 年 9 月) に含まれるヒトプロテオームを検索した。C O S M I C データベース (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) に列挙される単一アミノ酸変異体 (S A V) を含有するタンパク質と連鎖したヒトプロテオームタンパク質を含むデータベースを実装して、潜在的に変異した H L A リガンドを検索した。2 つ以上の血液学的起源のサンプルにおいて記載される、再発性の S A V のみを含めた。酸化メチオニンは、動的修飾として許容された。偽発見率は P e r c o l a t o r アルゴリズム [4 5] を用いて推定され、5 % に設定された。ペプチドの長さは、H L A クラス I では 8 ~ 1 2 アミノ酸、H L A クラス I I では 1 2 ~ 2 5 アミノ酸に限定された。タンパク質の推論は無効化され、ペプチドの複数のタンパク質アノテーションを可能にした。H L A アノテーションは、S Y F P E I T H I [4 6] または拡張自社内データベースを使用して実施した。ペプチド同定および H L A アノテーションの実験的検証は、ペプチドのサブセットに対する合成ペプチドの質量分析および機能特性解析によって実施した。

20

30

【 0 3 2 8 】

ペプチドおよび H L A ペプチド単量体合成

自動ペプチド合成装置 E P S 2 2 1 (A b i m e d) を用いて、9 - フルオレニルメチル - オキシカルボニル / t e r t - ブチル (F m o c / t B u) ストラテジー [4 7] を使用して、ペプチドを合成した。L C - M S / M S 同定の検証のため、ならび機能性実験のために、合成ペプチドを使用した。ピオチン化組み換え H L A 分子および蛍光 M H C - ペプチド四量体は、以前記載されたようにして製造した [4 8] 。

【 0 3 2 9 】

ペプチド特異的 T 細胞の増幅

M M 患者および H V 由来の P B M C は、以前記載されたように培養した [1 2 , 1 3] 。手短に述べると、C D 8 + T 細胞刺激のために、ペプチドあたり 1 μ g / m l で P B M C をパルス処理して、0 日目および 1 日目に L - 4 および I L - 7 を、3 日目、5 日目、7 日目、および 9 日目に I L - 2 を添加して、1 2 日間培養した。良性組織 (H V 限定的 H L A リガンド) 由来の H L A - A * 0 2 (K L F E K V K E V) (配列番号 2 3 1) および B * 0 7 (K P S E K I Q V L) (配列番号 2 3 2) 拘束性対照ペプチドが、陰性対照の役割を果たした。ペプチド刺激された P B M C は、E L I S P O T アッセイによって 1 2 日目に分析した。C D 4 + T 細胞刺激では、培養は、次の 2 つの修正以外は、C D 8 + T 細胞について記載されたようにして実施した：パルス処理は 1 0 μ g / m l の H L A クラス I I ペプチドを用いて実施し、I L - 4 または I L - 7 は添加しなかった。

40

50

【0330】

IFN ELISPOTアッセイ

IFN ELISPOTアッセイは、以前記載されたようにして実施した[49]。手短に述べると、96ウェルニトロセルロースプレート(Millipore)を1mg/mlのIFN mAb(Mabtech)でコーティングし、4で一晩インキュベートした。プレートは、10%ヒト血清を用いて37で2時間ブロックした。2.5×10⁵個の細胞/ウェルの予備刺激PBMCを1μg/ml(HLAクラスI)または2.5μg/ml(HLAクラスII)ペプチドでパルス処理して、24~26時間培養した。読み取りは、製造会社の使用説明書に従って実施した。PHAを陽性対照として使用した。良性組織(HV限定的HLAリガンド)由来のHLA-A*02(KLFEEKVKEV)(配列番号231)およびB*07(KPSEKIQVL)(配列番号232)拘束性対照ペプチドが、陰性対照の役割を果たした。ImmunoSpot S5分析器(CTL)を用いて、スポットを計数した。>10スポット/ウェルが計数され、ウェル当たりの平均スポットカウントが、陰性対照ウェルの平均スポット数よりも少なくとも3倍高ければ、T細胞応答は陽性と見なされた(がん免疫ガイディングプログラム(CIP)ガイドライン[50]に準拠する)。

10

【0331】

ペプチド特異的T細胞のaAPCブライミング

抗原提示細胞(aAPC)を作製するために、1mlあたり4×10⁶個のストレプトアビジン被覆ポリスチレン粒子(Bangs Laboratories)を、200pMビオチン化MHC-ペプチドおよび20nM抗ヒトビオチン化CD28抗体を含有するPBE(PBS/BSA/ETDA、Gibco/SigmaAldrich/Lonza)に再懸濁し、室温で30分間インキュベートした。洗浄後、aAPCは、使用に先だって4で貯蔵した[51]。MM患者およびHV由来のCD8⁺T細胞は、磁気細胞選別(Miltenyi Biotec)を用いた正の選択によって濃縮した。5ng/mlのヒトIL-12(PromoKine)を補った200μlのT細胞培地中において、1×10⁶個のT細胞および2×10⁵個のaAPCを含む、96ウェルプレート内で刺激を開始した。65U/μlのIL-2(R&D Systems)を5日目に添加した。10日目に、aAPC刺激を合計3サイクル繰り返した。

20

【0332】

四量体染色

以前に記載されたように、抗CD8(Biolegend)およびHLA:ペプチド-四量体-PEで染色することにより、FACS Canto II血球計数器(BD Bioscience)上で、ペプチド特異的CD8⁺T細胞の頻度を判定した[51]。CMV pp65A*02ペプチドNLVPMVATV(配列番号236)を含有する四量体を用いた染色が、陽性対照の役割を果たし、無関係の非ブライミングA*02拘束性対照ペプチドを含有する四量体が、陰性対照の役割を果たした。ペプチド特異的CD8⁺T細胞の頻度が生存細胞の>0.1%であり、陰性対照におけるペプチド特異的CD8⁺T細胞の頻度よりも少なくとも3倍高ければ、ブライミングは成功したと見なされた。

30

【0333】

ソフトウェアおよび統計解析

フローサイトメトリデータ解析は、FlowJo 7.2(TreeStar)を用いて実施した。TAA偽発見率の分析における仮想リガンドームの作製および仮想TAA(腫瘍関連抗原)の定義のために、そしてTAA平坦域回帰分析のために、自社内RおよびPythonスクリプトを使用した。HLAリガンド源タンパク質の教師なしクラスター分析のために、標準R heatmap.2Rスクリプトを使用した。統計解析のために、GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software)を使用した。HLA表面発現の統計解析は、不對t検定に基づいた。

40

【0334】

プロテアソーム阻害薬療法中のHLAクラスIIリガンド提示。

50

本発明者らは、プロテアソーム阻害薬療法中のHLAクラスIリガンド提示を定量的に評価した。カーフィルゾミブによる処置後に、HLAクラスIリガンドームのかかなりの柔軟性が観察され、t 24 hにおいて、模擬処置対照と比較して、 $17.9 \pm 1.1\%$ のMM.1Sリガンドおよび $11.2 \pm 0.7\%$ のU266リガンド（3回の生物学的反復試験±標準偏差の平均）が、有意な調節（変化倍数 4、Benjamini-Hochberg補正後 $P=0.01$ ）を示した。簡潔に述べると、培養されたMCL（MM.1SおよびU266）および原発性骨髄腫サンプルを、プロテアソーム阻害剤の一例としてカーフィルゾミブ（ 100 nM 、Kyprolis（登録商標）、例えばOnyx Pharmaceuticals, Inc.から入手可能）と共に1時間インキュベートし、それにPBS（Gibco）での3回の洗浄と、さらに24時間または48時間の再培養が続いた。対照は、ビヒクル対照（グルコース5%）と共に1時間インキュベートし、同一の洗浄と24または48時間の培養がそれに続いた。実験は、特に断りのない限り、3回の生物学的反復実験で行った。結果は、以下の表に示される。

10

【0335】

表5A: MM.1S細胞上で検出された骨髄腫関連ペプチドおよびカーフィルゾミブ処置時のそれらの調節

【表5A】

| 骨髄腫LiTAP | HLA | 配列番号 | 24#1 | 24#2 | 24#3 | 48#1 | 48#2 | 48#3 |
|-------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| RYLDLFTSF | A*24:02 | 161 | -1 | -1 | -1 | 0 | -1 | -1 |
| AFIQAGIFQEF | A*23:01 | 4 | -1 | 0 | -1 | 0 | 0 | -1 |
| SEFDFFERL | C*12:03 | 165 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 |
| YVFPGVTRL | C*12:03 | 227 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 |
| TFLPFIHTI | A*23:01 | 196 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RYFKGPELL | A*24:02 | 160 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RYSPLSRF | A*24:02 | 163 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RYSTQIHSF | A*24:02 | 164 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SYLNSVQRL | A*24:02 | 192 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| YYLNEIQSF | A*24:02 | 228 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NEFPVFDEF | B*18:01 | 128 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

20

30

【0336】

表5B: U266細胞上で検出された骨髄腫関連ペプチドおよびカーフィルゾミブ処置時のそれらの調節

【表 5 B】

| | | | | | | | | |
|-------------|---------|-----|---|---|---|---|---|---|
| IPAKPPVSF | B*42:01 | 76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RPHGGKSL | B*42:01 | 149 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RPQLKGVVL | B*42:01 | 151 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SPALPGLKL | B*42:01 | 181 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TPAVGRLEV | B*42:01 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FAQIISVALI | C*12:03 | 43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FAYPAIRYL | C*12:03 | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FVFPGEILL | C*12:03 | 51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VPLPPKGRVL | C*12:03 | 210 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LAFFGEMLL | A*02:01 | 107 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| APRHPSTNSL | B*42:01 | 13 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| RPKAQPTTL | B*42:01 | 150 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| TASPLVKS | C*12:03 | 193 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| NEVIMTIGF | B*18:01 | 129 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| EYGHIPSF | A*24:02 | 42 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TPSSRPASL | B*42:01 | 202 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| KPQPRPQTL | C*12:03 | 94 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| KPRPPQGL | B*42:01 | 95 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| IEHPSMSVY | B*18:01 | 69 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| VPLTRVSGGAA | B*42:01 | 211 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

10

20

30

凡例: 24#1 - カーフィルゾミブ処置/生物学的反復試験後の時間

-1 有意に下方制御された

0 有為でない/検出されない

1 有意に上方制御された

【表 6 C】

| | | | | | | | | |
|-------------|---------|----|---|---|---|---|---|---|
| FVFPGEILL | A*02:01 | 51 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| APFQGDQRSL | B*07:02 | 11 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| KPRPPQGL | B*07:02 | 95 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| APRHPSTNSLL | B*07:02 | 14 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| APRHPSTNSL | B*07:02 | 13 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

40

凡例: 24#1 - カーフィルゾミブ処置/生物学的反復試験後の時間

-1 有意に下方制御された

0 有為でない/検出されない

1 有意に上方制御された

【 0 3 3 7 】

50

次に、MM . 1 Sモデルを使用して、全ての時点および条件にわたって定量的情報が利用可能であった14 / 31 骨髓腫ペプチドの存在量を、縦断的に追跡した。これらの標的の大部分(10 / 14、71 . 4%)について、本研究者らはt 24 hにおける調節のピークと、それに続くt 48 hにおける基線レベルに向かう漸進的低下を観察した。4 / 14のペプチド(28 . 6%)のみが、t 48 hにおいてさえも持続性の調節を示し、そのうち3つは、処置後に進行性の抑制的調節を示した。

【0338】

特に、配列番号42は、2 / 3の生物学的反復実験において、カーフィルゾミブ処置の24時間後に、MM . 1 s細胞上で有意な上方制御を示した。対照的に、配列番号107および配列番号228では、カーフィルゾミブ処置に際して、MM . 1 S上で有意な調節は見いだされなかった。

【0339】

参考文献

1. Small, E.J., et al., Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2006. 24(19): p. 3089-94.
2. Walter, S., et al., Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med*, 2012.
3. Perez-Gracia, J.L., et al., Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr Opin Immunol*, 2014. 27: p. 89-97.
4. van Rooij, N., et al., Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol*, 2013. 31(32): p. e439-42.
5. Robbins, P.F., et al., Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med*, 2013. 19(6): p. 747-52.
6. Tran, E., et al., Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*, 2014. 344(6184): p. 641-5.
7. Schumacher, T., et al., A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumor immunity. *Nature*, 2014. 512(7514): p. 324-7.
8. Snyder, A., et al., Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*, 2014. 371(23): p. 2189-99.
9. Snyder, A. and T.A. Chan, Immunogenic peptide discovery in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev*, 2015. 30C: p. 7-16.
10. Rizvi, N.A., et al., Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 2015.
11. Linnemann, C., et al., High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med*, 2015. 21(1): p. 81-5.
12. Berlin, C., et al., Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia*, 2014.
13. Kowalewski, D.J., et al., HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014.
14. Kuehl, W.M. and P.L. Bergsagel, Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(3): p. 175-87.
15. Rolig, C., S. Knop, and M. Bornhauser, Multiple myeloma. *Lancet*, 2014.
16. Barlogie, B., et al., Long-term outcome results of the first tandem auto

transplant trial for multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2006. 135(2): p. 158-64.

17. Ferrero, S., et al., Long-term results of the GIMEMA VEL-03-096 trial in MM patients receiving VTD consolidation after ASCT: MRD kinetics' impact on survival. *Leukemia*, 2014.

18. Martinez-Lopez, J., et al., Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*, 2014. 123(20): p. 3073-9.

19. Bjorkstrand, B., et al., Tandem autologous/reduced-intensity conditioning allogeneic stem-cell transplantation versus autologous transplantation in myeloma: long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 2011. 29(22): p. 3016-22.

20. El-Cheikh, J., et al., Long-term outcome after allogeneic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with multiple myeloma. *Am J Hematol*, 2013. 88(5): p. 370-4.

21. Koehne, G. and S. Giralt, Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: curative but not the standard of care. *Curr Opin Oncol*, 2012. 24(6): p. 720-6.

22. Riley, J.L., Combination checkpoint blockade--taking melanoma immunotherapy to the next level. *N Engl J Med*, 2013. 369(2): p. 187-9.

23. Perez, S.A., et al., A new era in anticancer peptide vaccines. *Cancer*, 2010. 116(9): p. 2071-80.

24. Rosenblatt, J., et al., Immunotherapy for multiple myeloma. *Expert Rev Hematol*, 2014. 7(1): p. 91-6.

25. Brossart, P., et al., The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*, 2001. 61(18): p. 6846-50.

26. Zhou, F.L., et al., Peptide-based immunotherapy for multiple myeloma: current approaches. *Vaccine*, 2010. 28(37): p. 5939-46.

27. Hundemer, M., et al., Identification of a new HLA-A2-restricted T-cell epitope within HM1.24 as immunotherapy target for multiple myeloma. *Exp Hematol*, 2006. 34(4): p. 486-96.

28. Jalili, A., et al., Induction of HM1.24 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by using peripheral-blood stem-cell harvests in patients with multiple myeloma. *Blood*, 2005. 106(10): p. 3538-45.

29. Chiriva-Internati, M., et al., Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood*, 2003. 102(9): p. 3100-7.

30. Rew, S.B., et al., Generation of potent antitumor CTL from patients with multiple myeloma directed against HM1.24. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(9): p. 3377-84.

31. van Rhee, F., et al., NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*, 2005. 105(10): p. 3939-44.

32. Schubert, P.C., et al., Effector memory and central memory NY-ESO-1-specific re-directed T cells for treatment of multiple myeloma. *Gene Ther*, 2013. 20(4): p. 386-95.

33. Bae, J., et al., Novel epitope evoking CD138 antigen-specific cytotoxic T lymphocytes targeting multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Br J Haematol*, 2011. 155(3): p. 349-61.

34. Bae, J., et al., Identification of novel myeloma-specific XBP1 peptides

10

20

30

40

50

- able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma. *Leukemia*, 2011. 25(10): p. 1610-9.
35. Bae, J., et al., Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(17): p. 4850-60.
 36. Oka, Y., et al., WT1 peptide vaccine as a paradigm for "cancer antigen-derived peptide"-based immunotherapy for malignancies: successful induction of anti-cancer effect by vaccination with a single kind of WT1 peptide. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009. 9(7): p. 787-97.
 37. Kuball, J., et al., Pitfalls of vaccinations with WT1-, Proteinase3- and MUC1-derived peptides in combination with MontanideISA51 and CpG7909. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. 60(2): p. 161-71. 10
 38. Greiner, J., et al., High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma. *Hematologica*, 2010. 95(7): p. 1191-7.
 39. Schmitt, M., et al., RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood*, 2008. 111(3): p. 1357-65.
 40. Rapoport, A.P., et al., Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. *Blood*, 2011. 117(3): p. 788-97. 20
 41. Hobo, W., et al., Immunogenicity of dendritic cells pulsed with MAGE3, Survivin and B-cell maturation antigen mRNA for vaccination of multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother*, 2013. 62(8): p. 1381-92.
 42. Wang, L., et al., T cell-based targeted immunotherapies for patients with multiple myeloma. *Int J Cancer*, 2014.
 43. Goswami, M., et al., Expression of putative targets of immunotherapy in acute myeloid leukemia and healthy tissues. *Leukemia*, 2014. 28(5): p. 1167-70.
 44. Kowalewski, D.J. and S. Stevanovic, Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands. *Methods Mol Biol*, 2013. 960: p. 145-57. 30
 45. Kall, L., et al., Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods*, 2007. 4(11): p. 923-5.
 46. Schuler, M.M., M.D. Nastke, and S. Stevanovic, SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction. *Methods Mol Biol*, 2007. 409: p. 75-93.
 47. Sturm, T., et al., Mouse urinary peptides provide a molecular basis for genotype discrimination by nasal sensory neurons. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 1616.
 48. Garboczi, D.N., D.T. Hung, and D.C. Wiley, HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(8): p. 3429-33. 40
 49. Widenmeyer, M., et al., Promiscuous survivin peptide induces robust CD4+ T-cell responses in the majority of vaccinated cancer patients. *Int J Cancer*, 2012. 131(1): p. 140-9.
 50. Britten, C.M., et al., The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(3): p. 289-302.
 51. Rudolf, D., et al., Potent costimulation of human CD8 T cells by anti-4-1BB and anti-CD28 on synthetic artificial antigen presenting cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. 57(2): p. 175-83.
 52. Bui, H.H., et al., Predicting population coverage of T-cell epitope-base 50

d diagnostics and vaccines. BMC Bioinformatics, 2006. 7: p. 153.

53. Schipper, R.F., et al., Minimal phenotype panels. A method for achieving maximum population coverage with a minimum of HLA antigens. Hum Immunol, 1996. 51(2): p. 95-8.

54. Kanehisa, M. and S. Goto, KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res, 2000. 28(1): p. 27-30.

55. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc, 2009. 4(1): p. 44-57.

56. Braumuller, H., et al., T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature, 2013. 494(7437): p. 361-5. 10

57. Schoenberger, S.P., et al., T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature, 1998. 393(6684): p. 480-3.

58. Janssen, E.M., et al., CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. Nature, 2003. 421(6925): p. 852-6.

59. Greiner, J., et al., Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4(+) and CD8(+) T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. Blood, 2012. 120(6): p. 1282-9.

60. Wolchok, J.D., et al., Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med, 2013. 369(2): p. 122-33. 20

61. Topalian, S.L., et al., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med, 2012. 366(26): p. 2443-54.

62. Hodi, F.S., et al., Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med, 2010. 363(8): p. 711-23.

63. Robert, C., et al., Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. Lancet, 2014. 384(9948): p. 1109-17.

64. Brahmer, J.R., et al., Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med, 2012. 366(26): p. 2455-65.

65. Hamid, O., et al., Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. N Engl J Med, 2013. 369(2): p. 134-44. 30

66. Motzer, R.J., et al., Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. J Clin Oncol, 2014.

67. Lynch, T.J., et al., Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. J Clin Oncol, 2012. 30(17): p. 2046-54.

68. Ansell, S.M., et al., Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res, 2009. 15(20): p. 6446-53. 40

69. Ansell, S.M., et al., PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med, 2015. 372(4): p. 311-9.

70. Bassani-Sternberg, M., et al., Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. Mol Cell Proteomics, 2015. 14(3): p. 658-73.

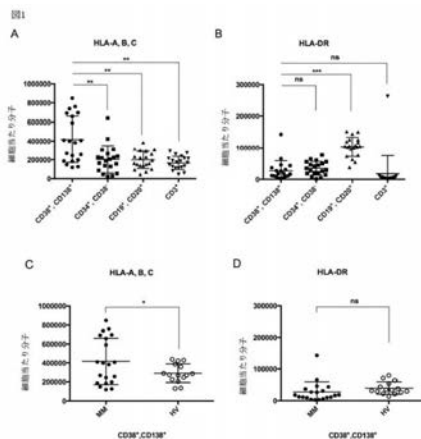
71. Stickel, J.S., et al., HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(9): p. 1407-17.

72. Weinzierl, A.O., et al., Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. Mol Cell Proteomics, 2007. 6(1): p. 102-13. 40

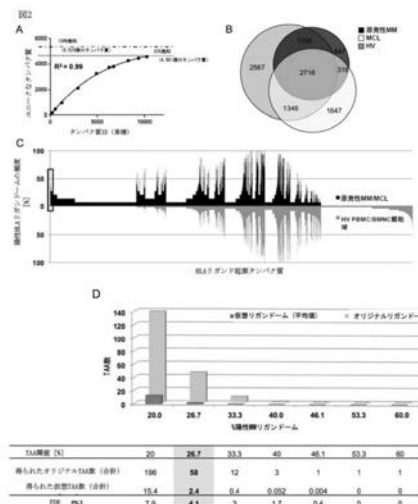
73. Min, D.J., et al., MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC. *Leukemia*, 2013. 27(3): p. 686-94.
74. Martinez-Garcia, E., et al., The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*, 2011. 117(1): p. 211-20.
75. Keats, J.J., et al., Overexpression of transcripts originating from the MMSET locus characterizes all t(4;14)(p16;q32)-positive multiple myeloma patients. *Blood*, 2005. 105(10): p. 4060-9.
76. Brito, J.L., et al., MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*, 2009. 94(1) : p. 78-86.
77. Smith, E.M., K. Boyd, and F.E. Davies, The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2010. 148(5): p. 702-13.
78. Xie, Z., et al., Plasma membrane proteomics identifies biomarkers associated with MMSET overexpression in T(4;14) multiple myeloma. *Oncotarget*, 2013. 4(7): p. 1008-18.
79. Hebraud, B., et al., The translocation t(4;14) can be present only in minor subclones in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(17): p. 4634-7.

10

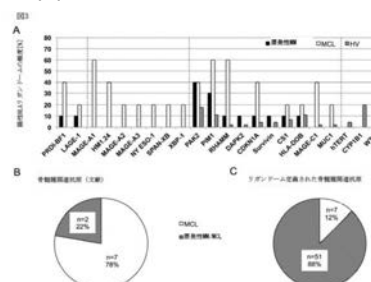
【図 1】



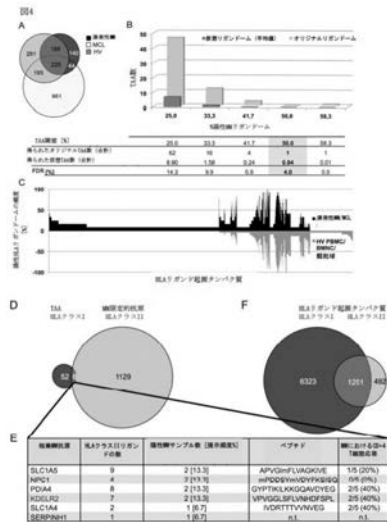
【図 2】



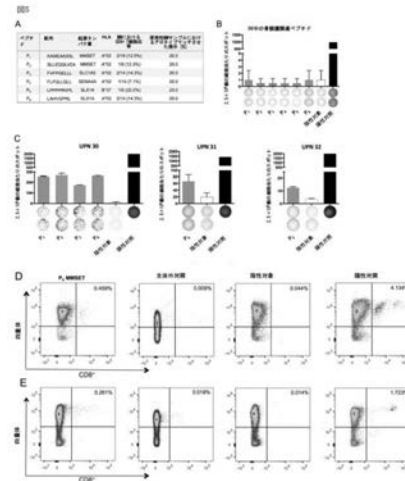
【図 3】



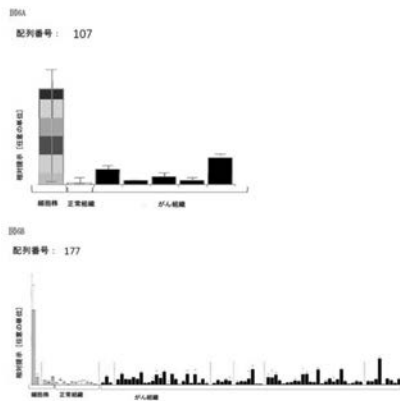
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

2018520653000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/064317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K7/06 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/574 A61K38/00
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)

G01N C07K A61K C12N

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, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| X A | US 2013/177525 A1 (SINGH HARPREET [DE] ET AL) 11 July 2013 (2013-07-11) claims 1-15 | 38 1-20, 27-37,39 |
| X | ----- WO 2014/200910 A2 (IOGENETICS LLC [US]) 18 December 2014 (2014-12-18) claims 59-69; sequence 15886 | 30-39 |
| X | ----- WO 2008/009004 A2 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY INC [US]; HORNBECK PETER [US]; GOSS VALERIE) 17 January 2008 (2008-01-17) claim 13; sequence 444 ----- -/-- | 1-5, 7-15,39 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 2016

Date of mailing of the international search report

21/12/2016

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

Fleitmann, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/064317

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| X | WO 2011/119484 A1 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 29 September 2011 (2011-09-29) claims 117-158,163-176; sequences 311730,280641 ----- | 1-20, 27-39 |
| X | US 2007/037206 A1 (ROSEN CRAIG A [US] ET AL) 15 February 2007 (2007-02-15) claims 1-32; sequence 9439 ----- | 1-11,15, 18-20, 38,39 |
| X | WO 2005/061537 A2 (VAECGENE BIOTECH GMBH [DE]; GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT [DE]; GIRES O) 7 July 2005 (2005-07-07) claims 1-25,27,28,29; sequence 18 ----- | 1-20,27, 30-39 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/064317**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-20, 27-39(all partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2016/ 064317

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-20, 27-39(all partially)

A peptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO.1, nucleic acid encoding said peptide, expression vector, host cell related to said peptide, medical use of said peptide, T cell activated by this peptide, methods for killing target cells presenting said peptide, antibodies or aptamers recognizing said peptide, kits comprising said peptide , T cell receptors reactive to said peptide, pharmaceutical compositions comprising said peptide

2-228. claims: 1-20, 27-39(all partially)

A peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.2 -228 to , nucleic acid encoding said peptide, expression vector, host cell related to said peptide, medical use of said peptide, T cell activated by this peptide, methods for killing target cells presenting said peptide, antibodies or aptamers recognizing said peptide, kits comprising said peptide , T cell receptors reactive to said peptide, pharmaceutical compositions comprising said peptide

229. claims: 21-26(completely); 27-29(partially)

Method for producing a personalized anti cancer vaccine according to claim 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/064317

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|-------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| US 2013177525 A1 | 11-07-2013 | AU 2011260277 A1 CA 2793601 A1 CN 102971003 A EA 201291195 A1 EP 2575850 A1 JP 2013536157 A KR 20130089175 A NZ 601677 A SG 185353 A1 US 2012027684 A1 US 2013177525 A1 WO 2011151403 A1 | 30-08-2012 08-12-2011 13-03-2013 30-06-2014 10-04-2013 19-09-2013 09-08-2013 30-01-2015 28-12-2012 02-02-2012 11-07-2013 08-12-2011 |
| WO 2014200910 A2 | 18-12-2014 | US 2016132631 A1 WO 2014200910 A2 | 12-05-2016 18-12-2014 |
| WO 2008009004 A2 | 17-01-2008 | US 2010009463 A1 WO 2008009004 A2 | 14-01-2010 17-01-2008 |
| WO 2011119484 A1 | 29-09-2011 | EP 2550529 A1 US 2013330335 A1 WO 2011119484 A1 | 30-01-2013 12-12-2013 29-09-2011 |
| US 2007037206 A1 | 15-02-2007 | NONE | |
| WO 2005061537 A2 | 07-07-2005 | DE 10360456 A1 EP 1697408 A2 US 2007009501 A1 WO 2005061537 A2 | 28-07-2005 06-09-2006 11-01-2007 07-07-2005 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード (参考) |
|-------------|------------------|---------|----------|---------------|
| C 1 2 P | 21/02 (2006.01) | C 1 2 P | 21/02 C | 4 C 0 8 5 |
| C 0 7 K | 16/32 (2006.01) | C 0 7 K | 16/32 | 4 C 0 8 7 |
| C 1 2 Q | 1/6809 (2018.01) | C 1 2 Q | 1/6809 Z | 4 H 0 4 5 |
| C 1 2 Q | 1/04 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/04 | |
| C 0 7 K | 14/725 (2006.01) | C 0 7 K | 14/725 | |
| C 1 2 N | 15/85 (2006.01) | C 1 2 N | 15/85 Z | |
| C 1 2 N | 15/115 (2010.01) | C 1 2 N | 15/115 Z | |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 37/04 (2006.01) | A 6 1 P | 37/04 | |
| A 6 1 P | 35/02 (2006.01) | A 6 1 P | 35/02 | |
| A 6 1 K | 35/17 (2015.01) | A 6 1 K | 35/17 Z | |
| A 6 1 K | 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 N | |
| A 6 1 K | 38/08 (2006.01) | A 6 1 K | 38/08 | |
| A 6 1 K | 38/10 (2006.01) | A 6 1 K | 38/10 | |
| A 6 1 K | 39/00 (2006.01) | A 6 1 K | 39/00 H | |
| A 6 1 K | 38/17 (2006.01) | A 6 1 K | 38/17 | |
| G 0 1 N | 33/53 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 D | |
| G 0 1 N | 33/50 (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 Y | |
| G 0 1 N | 33/15 (2006.01) | G 0 1 N | 33/50 Z | |
| | | G 0 1 N | 33/15 Z | |

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

- (72)発明者 ランメンゼー, ハンス - ゲオルク
ドイツ, 7 2 0 7 0 テュービンゲン, ゾンマーハルデ 3
- (72)発明者 スティックел, ユリアーネ
ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, クヴェンシュテットシュトラッセ 2 8
- (72)発明者 コバレフスキ, ダニエル
ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, デンツェンベルグシュトラッセ 2 9
- (72)発明者 ステヴァノヴィッチ, シュテファン
ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, アウフデアブルク 3
- (72)発明者 ヴァルツ, シモン
ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, クヴェンシュテットシュトラッセ 2 8

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 DA78 FB03
4B063 QA07 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QS34
4B064 AG01 AG20 CA10 CA19 CC24 DA05
4B065 AA92X AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 BA01 BA02 BA17 BA18 BA19 BA20 BA23 BA41 CA27
CA59
4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB11
4C087 AA01 AA02 BB37 CA12 NA05 ZB09 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 CA41 DA50 DA76 EA20 FA74