(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2017-528143
(P2017-528143A)
(43)公表日　平成29年9月28日(2017.9.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B063
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39		4C084
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4C085
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/00	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 43 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-514558 (P2017-514558)
(86)(22)出願日　平成27年9月3日 (2015.9.3)
(85)翻訳文提出日　平成29年3月9日 (2017.3.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/048345
(87)国際公開番号　WO2016/040110
(87)国際公開日　平成28年3月17日 (2016.3.17)
(31)優先権主張番号　62/048,561
(32)優先日　平成26年9月10日 (2014.9.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)

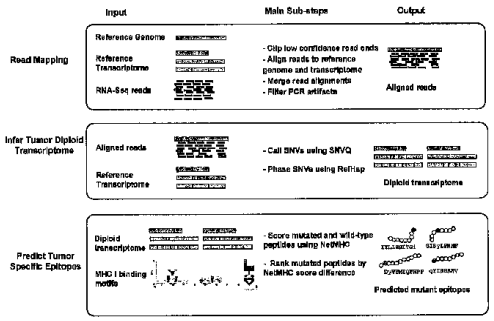
(71)出願人　501315876
ザ　ユニバーシティ　オブ　コネチカット
アメリカ合衆国　コネチカット　０６０３　０－６２０７　ファーミントン　ファーミントン・アベニュー　２６３
(71)出願人　517084771
ユニバーシティ　オブ　ノートル　ダム　デュ　ラック
アメリカ合衆国　インディアナ　サウス　ベンド　アンジェラ　ブールバード　１４００　イースト
(74)代理人　110001210
特許業務法人ＹＫＩ国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌の治療のための免疫防御ネオエピトープ同定

(57)【要約】
生物物理学的原理ならびにバイオインフォマティクス技術を使用して、癌患者の癌組織ＤＮＡから免疫防御ネオエピトープを同定する方法が本明細書で記載される。免疫防御ネオエピトープの同定は、ヒト癌の個別化されたゲノミクス駆動型免疫療法に好適な限られた数の腫瘍特異的ペプチドを有する医薬組成物を提供する。特定的には、癌患者からの腫瘍由来の推定ネオペプチドセットにおけるペプチドの免疫原性を予測するために、ＭＨＣタンパク質－結合溝におけるエピトープの立体構造安定性を使用する方法が本明細書で開示される。医薬組成物および投与方法もまた含まれる。

Figure 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌患者における免疫防御ネオエピトープを同定する方法であって、
複数の推定ネオエピトープを含む推定ネオエピトープセットを提供する工程と、
ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された前記推定ネオエピトープセットにおいて、各推定ネオエピトープおよびその対応する野生型エピトープの少なくとも一部の立体構造安定性を決定する工程と、
前記推定ネオエピトープセットから免疫防御ネオエピトープを選択する工程であって、前記免疫防御ネオエピトープは、前記ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合されると、対応する野生型エピトープに比べてより高い立体構造安定性を有する、工程と、
任意で、薬学的に許容される担体と、１つ以上の免疫防御ネオエピトープペプチド、前記免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または前記１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドとを含む医薬組成物を生成させる工程と、ならびに
任意で、前記医薬組成物を前記癌患者に投与する工程と、
を含む、方法。
【請求項２】
前記立体構造安定性は、前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープのＣ末端部分、前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープの中心部分、前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープのＮ末端部分、または前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープの全体に対して測定される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された前記推定ネオエピトープセットにおいて、各推定ネオエピトープおよびその対応する野生型エピトープのα－炭素の少なくとも一部の立体構造安定性を決定する工程は、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された前記推定ネオエピトープセットにおいて、各推定ネオエピトープおよびその対応する野生型エピトープの少なくとも一部の二乗平均平方根ゆらぎを決定することを含み、前記免疫防御ネオエピトープは、それらの対応する野生型エピトープに比べて、低減された立体構造ゆらぎを有する、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記二乗平均平方根ゆらぎは、前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープのＣ末端部分、前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープの中心部分、前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープのＮ末端部分、または前記推定ネオエピトープおよびそれらの対応する野生型エピトープの全体に対して決定される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記免疫防御ネオエピトープは、１００ｎＭを超える、または５００ｎＭを超える、Ｈ－２Ｋ^{d}またはＨＬＡに対する測定されたＩＣ５０を有する、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記癌患者のＲＮＡまたはＤＮＡの少なくとも一部を健常組織および癌組織の両方においてシークエンシングし、健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列および癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列を生成させる工程と、
前記健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列および前記癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列を比較し、前記健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列と前記癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列との間の差分を同定して、差分ＤＮＡマーカセットを生成させる工程と、
前記差分ＤＮＡマーカセットを分析して、腫瘍特異的エピトープセットを生成させる工程であって、前記腫瘍特異的エピトープセットは１つ以上の腫瘍特異的エピトープを含む、工程と、

前記腫瘍特異的エピトープセットにおける各エピトープに対して差分アグレトープ指数と呼ばれる数値スコアを提供する工程であって、前記差分アグレトープ指数は、正常エピトープに対するスコアを前記腫瘍特異的エピトープに対するスコアから減算することにより計算される、工程と、ならびに

前記腫瘍特異的エピトープセットを前記差分アグレトープ指数に従いランク付けし、前記ランク付けに基づき、前記腫瘍特異的エピトープセットから推定ネオエピトープセットを選択する工程と、

を含む方法により、前記推定ネオエピトープセットを同定する工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項７】

前記ＭＨＣタンパク質は、ＭＨＣ　Ｉタンパク質であり、前記免疫応答は、ＣＤ８＋応答である、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８】

前記ＭＨＣタンパク質は、ＭＨＣ　ＩＩタンパク質であり、前記免疫応答は、ＣＤ４＋応答である、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

シークエンシングは、トランスクリプトームシークエンシングである、請求項６に記載の方法。

【請求項１０】

ＤＮＡまたはＲＮＡシークエンシングは、ハイスループットシークエンシングである、請求項６に記載の方法。

【請求項１１】

前記差分ＤＮＡマーカセットを分析して腫瘍特異的エピトープセットを生成させる工程は、１つ以上の腫瘍特異的エピトープが発癌経路に関連するかどうかに依存しない、請求項６に記載の方法。

【請求項１２】

前記差分ＤＮＡマーカセットを分析して腫瘍特異的エピトープセットを生成させる工程は、エピトープペプチドのＭＨＣ分子への結合を決定する予測アルゴリズムを使用して、ＭＨＣに限定される腫瘍特異的エピトープセットを生成させることを含む、請求項６に記載の方法。

【請求項１３】

前記医薬組成物は、１から１００の免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、１から１００の免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または１から１００の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１４】

前記医薬組成物は、３から２０の免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のペプチド、３から２０の免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または３から２０の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１５】

前記医薬組成物は、アジュバントをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１６】

前記医薬組成物は、１つ以上の免疫調整剤をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項１７】

前記免疫調整剤は、ＴＬＲリガンドまたは抗体である、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記癌患者は、固形または液性癌を患う、請求項１に記載の方法。

【請求項１９】

前記癌患者を放射線療法、化学療法、外科手術、またはそれらの組み合わせで治療する

工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
投与は、前記１つ以上の免疫防御ネオエピトープペプチド、前記免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または前記１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを、前記癌患者由来の細胞と混合またはパルス処理し、前記混合またはパルス処理された細胞を前記癌患者に投与することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
請求項１から２０に記載の方法により生成される医薬組成物。
【請求項２２】
薬学的に許容される担体と、１つ以上の免疫防御ネオエピトープペプチド、免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または前記１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドとを含む医薬組成物であって、前記１つ以上の免疫防御ネオエピトープは、推定ネオエピトープセットから選択され、前記推定ネオエピトープセットは、公知の発癌経路由来のエピトープを含まず、前記推定ネオエピトープセットは、癌患者由来の腫瘍に特異的であり、分子モデリングまたは実験により決定される、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された各免疫防御ネオエピトープの前記立体構造安定性は対応する野生型エピトープに比べて高い、医薬組成物。
【請求項２３】
前記立体構造安定性は、前記免疫防御ネオエピトープのＣ末端部分、前記免疫防御ネオエピトープの中心部分、前記免疫防御ネオエピトープのＮ末端部分、または前記免疫防御ネオエピトープの全体に対して決定される、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項２４】
前記免疫防御ネオエピトープは、１００ｎＭを超える、または５００ｎＭを超える、Ｈ－２Ｋ^{d}に対する測定されたＩＣ５０を有する、請求項２２または２３に記載の医薬組成物。
【請求項２５】
前記ＭＨＣタンパク質は、ＭＨＣ　Ｉタンパク質であり、前記免疫応答は、ＣＤ８＋応答である、請求項２２から２４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２６】
前記ＭＨＣタンパク質は、ＭＨＣ　ＩＩタンパク質であり、前記免疫応答は、ＣＤ４＋応答である、請求項２２から２４のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項２７】
前記医薬組成物は、１から１００の免疫防御ネオエピトープペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項２８】
アジュバントをさらに含む、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項２９】
前記医薬組成物は、１つ以上の免疫調整剤をさらに含む、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項３０】
前記免疫調整剤は、ＴＬＲリガンドまたは抗体である、請求項２９に記載の医薬組成物。
【請求項３１】
前記癌患者は、固形または液性癌を患う、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項３２】
請求項２２から３１のいずれか一項に記載の組成物を前記癌患者に投与する工程を含む、癌患者を治療する方法。
【請求項３３】
前記癌患者を放射線療法、化学療法、外科手術、またはそれらの組み合わせで治療する

工程をさらに含む、請求項３２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、免疫防御腫瘍特異的エピトープを同定する方法、免疫防御腫瘍特異的エピトープペプチドを含むワクチン組成物などの医薬組成物、そのようなペプチドをコードする核酸分子、および癌の免疫療法におけるそのようなペプチドまたは核酸の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
癌の生物学の理解における重大な進歩にもかかわらず、成人の最も一般的な癌、例えば乳房、前立腺、肺、結腸、卵巣などの癌の治療は満足には程遠いままである。疑いなく、大きな進歩が存在し、同様に疑いなく、非常に大きな医学的必要性が未だ対処されていないままである。任意の疾患の治療の成功には、その疾患について特有のものの明確な理解が、続いて、その特有性の点で疾患を攻撃する方法を見出すことが必要とされる。この原理は医学における全ての主な成功の基礎となっている。
【０００３】
癌は、細菌感染と対照的に、例えば、外来性実体ではなく、それらは、我々自身に由来する。癌と我々の健常な組織の間の圧倒的な共通性のために、癌は、癌が使用し、かつ、我々の正常な身体の使用がより少ない生物学的経路を見出そうとする、すなわち、特異性とは対照的に選択性を目標にしようとすることにより取り組まれてきた。化学療法により例示されるこのアプローチは、今日、癌治療への主な非外科的アプローチである。これは幾分有効であるが、効力は特異性ではなく、選択性に基づいているため、化学療法は同様に正常な組織を攻撃し、治療のよく知られた副作用に至らしめ、これがまた、使用を制限している。
【０００４】
近年、化学療法はますます複雑化したツールとなってきているが、化学療法は癌に特異的ではなく、それに対して選択的にすぎないという基本的な問題は残ったままであり、よって、数十年そのままであった。
【０００５】
規則を証明する例外はイマチニブ、一般的な成人白血病に対する治療である。この種の白血病、慢性骨髄性白血病またはＣＭＬは、血液細胞の非常に特異的な変化に起因する。その変化は知られており、その変化は白血病細胞においてのみであることも知られている。薬物イマチニブは、特異的にこの変化を標的にし、ＣＭＬに対して極めて有効である。不運なことに、ＣＭＬは、かなり特有な例のままであり、この場合、特異性は規定することができ、そうされてきており、幸いにも、これはまた、特異性の定義により、非常に有効な癌治療が得られ得るという事実の最も重要な例である。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
必要なのは、癌特異性の基礎を決定し、その後、この特異性を適用して、成功する、無毒性療法を開発する方法である。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
１つの態様では、癌患者において免疫防御ネオエピトープを同定する方法は、推定ネオエピトープセットを提供する工程と、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された、推定ネオエピトープセットにおける各推定ネオエピトープの少なくとも一部の立体構造安定性を決定する工程と、推定ネオエピトープセットから免疫防御ネオエピトープを選択する工程であって、免疫防御ネオエピトープは、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合されると、対応する野生型エピトープに比べてより高い立体構造安定性を有する工程と、任意で、薬学的に許容される担体と、１つ以上の免疫防御ネオエピトープペ

プチド、免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む医薬組成物を生成させる工程と、ならびに
任意で、医薬組成物を癌患者に投与する工程とを含む。
【０００８】
特定の態様では、推定ネオエピトープセットは、本明細書で記載される差分アグレトープ指数（Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　Ａｇｒｅｔｏｐｉｃ　Ｉｎｄｅｘ）を使用して決定される。
【０００９】
別の特定の態様では、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された、推定ネオエピトープセットにおける各推定ネオエピトープの少なくとも一部の立体構造安定性を決定する工程は、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された推定ネオエピトープセットにおける各エピトープの立体構造ゆらぎを決定することを含む。
【００１０】
別の態様では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体と、１つ以上の免疫防御ネオエピトープペプチド、免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含み、ここで、１つ以上の免疫防御ネオエピトープは、推定ネオエピトープセットから選択され、ここで、推定ネオエピトープセットは、公知の発癌経路由来のエピトープを含まず、ここで、推定ネオエピトープセットは、癌患者由来の腫瘍に特異的であり、ここで、分子モデリングまたは実験により決定された、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された各免疫防御ネオエピトープの立体構造安定性は、各対応する野生型エピトープと比べて、より高い。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】ＲＮＡ－Ｓｅｑリードから腫瘍特異的エピトープを同定するために用いられる、Ｅｐｉ－Ｓｅｑバイオインフォマティクスパイプラインの概略図を示す。
【図２】３つのＭｅｔｈ　Ａ　ＲＮＡ－Ｓｅｑレーンに対するリード位置ミスマッチ分析を示す。リードをＢＡＬＢ／ｃゲノムおよびトランスクリプトームに対してマッピングした後、ミスマッチの数を全てのアラインメントにわたって各リード位置でカウントする。統計を、ＨａｒｄＭｅｒｇｅから得られるアラインメントに対して収集する。ａ-ｃ：Ｍｅｔｈ　Ａシークエンシングレーン１－３に対するミスマッチ統計、右ヒストグラム：ゲノムアラインメント、中央：トランスクリプトーム、および左：ＨａｒｄＭｅｒｇｅ。リードの端での高いミスマッチ率は、ライブラリ調製およびシークエンシング中に導入される系統誤差により引き起こされる。リードの５’端での高いミスマッチ率は、おそらく、ライブラリ調製においてｃＤＮＡ合成を刺激するためにランダム六量体を使用した結果であり、一方、３’端へのミスマッチ率の増加は、クローン的に増幅させた鋳型分子の合成時解読（ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ－ｂｙ－ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）におけるデフェージング効果のためのシグナル・ノイズ比を軽減することにより引き起こされる。位置２９でのミスマッチ率の増加は、リードマッピングに対して２８塩基のシード長を使用し、シードにおけるミスマッチの数の上限を決めることにより起因する。同様のミスマッチパターンがＣＭＳ５に対して観察された。各アラインメントされたリードからの最初の２つおよび最後の１０個の塩基のクリッピングにより、ＨａｒｄＭｅｒｇｅアラインメントに対し、全ての塩基にわたって＜１％のミスマッチ率が得られる。
【図３】点変異により生じたエピトープの免疫原性を示す。（Ａ）応答無し、腫瘍特異的（すなわち、変異ペプチド特異的）応答、または腫瘍／自己交差反応性応答を惹起した変異ペプチドの代表例。右の円グラフは、Ｍｅｔｈ　Ａ（ｎ＝３９）およびＣＭＳ５（ｎ＝２７）由来の変異ペプチドにより惹起されたＴ細胞応答の型の％を示す。（Ｂ）応答無し、未変異ペプチド特異的応答、または交差反応性機能的ＣＤ８応答（Ａと同様）を惹起した選択した変異ペプチドの未変異対応物の代表例。右の円グラフは、両方の腫瘍由来の未

変異ペプチドにより惹起されたＴ細胞応答の型の％を示す。（Ｃ）マウスは、１００μｇの指示されたペプチドで１回（プライム）、または２９日間隔で２回（ブースト）免疫化させた。最終免疫化の７日後、流入領域膝窩ＬＮを、細胞内サイトカインアッセイのために採取した。リンパ球を、１０μｇ／ｍｌ同族ペプチドで１６時間刺激し、または刺激なしとし、ＣＤ４、ＣＤ８およびＣＤ４４に対し染色し、続いて透過処理し、ＩＦＮγに対して染色した。ペプチド（Ｐｅｐ）で刺激した、またはペプチド刺激なし（ｐｅｐなし）の総ＣＤ８＋細胞のパーセントＣＤ４４＋ＩＦＮγ＋細胞が示される。エラーバーはＳＥＭを表す。各ペプチドの免疫原性を各々、２から４匹のマウスにおいて試験し、実験を４から６回実施した。ＦＡＣＳゲーティング戦略および代表的な主要データについては図９を参照されたい。

【図４】腫瘍特異的ペプチドにより惹起された防御腫瘍免疫の状況を示す。（Ａ）ＣＭＳ５およびＭｅｔｈ Ａに対する、上位ＤＡＩスコアを有する変異エピトープの腫瘍防御活性。マウスを、指示されたペプチドで免疫化し、生腫瘍細胞でチャレンジ（ｃｈａｌｌｅｎｇｅ）し、腫瘍増殖を、実験手順で記載されるようにモニタした。各個々の腫瘍増殖曲線に対する曲線下面積（ＡＵＣ）を計算し、ナイーブ群を、水平線によって示されている１００という値に設定することにより正規化した。統計的に有意な腫瘍防御免疫原性を示すペプチドに対応するバーは塗りつぶされており、星印により指示される（．０１５と．０３の間のｐ値）。（ＣＭＳ５ネオエピトープＦａｒｓＢのうちの１つは、このパネルにおいて腫瘍増殖からの著しい防御を示すが、しかしながら、この結果は明確に再現することはできず、これにより、我々は、これを、腫瘍増殖からの防御に関し、陰性ネオエピトープとして割り当てる。）ペプチドを、活性が減少する順に、ＤＡＩスコアによるそれらのランク付けの順ではなく、配置する。ＤＡＩによるペプチドのランク付けについては表３を参照されたい。円グラフは、腫瘍チャレンジからの防御を惹起しなかった（黒色）、および惹起した（灰色）、試験したネオエピトープのパーセンテージを示す。（Ｂ）未処置マウス（ナイーブ）およびＣＭＳ５由来の指示された変異ペプチドで免疫化されたマウスにおける腫瘍増殖曲線の例。Ｓｔａｕ１．２は防御免疫を惹起しない代表的なネオエピトープであり、一方、Ａｔｘｎ１０．１およびＡｌｋｂｈ６．２は惹起する代表的なネオエピトープである。Ａｔｘｎ１０．１およびＡｌｋｂｈ６．２については、ネオエピトープならびにＷＴ対応物による免疫化の結果が示される。各系統は、単一のマウスにおける腫瘍増殖の動力学を示す。実験を３回実施した。

【図５】腫瘍特異的ペプチドにより惹起された防御腫瘍免疫はＣＤ８依存性であることを示す。（Ａ）マウスは表５で列挙される、変異ペプチドＡｌｋｂｈ６．２、Ｓｌｉｔ３およびＡｔｘｎ１０．１、Ａｔｘｎ１０．２およびｃｄｃ１３６により免疫化した。ｄＬＮは刺激せず、またはインビトロで、同族ペプチドを用いて２０時間刺激し、エリスポットにより分析した。Ａｌｋｂｈ６．２、Ｓｌｉｔ３およびＡｔｘｎ１０．１ペプチドにより免疫化されたマウスに対するデータを示す。Ａｔｘｎ１０．２およびｃｄｃ１３６で免疫化したマウスは、表６でも指示される検出可能なＣＤ８応答を惹起しなかった。（Ｂ）ナイーブマウスまたは２回、指示されたペプチド（Ａｌｋｂｈ６．２、Ｓｌｉｔ３、Ａｔｘｎ１０．１、Ａｔｘｎ１０．２およびｃｄｃ１３６）で免疫化したマウスを、皮内で３００，０００生ＣＭＳ５腫瘍細胞によりチャレンジし、腫瘍増殖をモニタした。免疫化マウスは、実験手順において指示され、記載されるように、ＣＤ８またはＣＤ４細胞が枯渇しなかった（ＮＴ）、ＣＤ８またはＣＤ４細胞が枯渇した。各系統は、単一のマウスにおける腫瘍増殖の動力学を示す。実験を３回実施した。

【図６】構造安定性を免疫原性と相関するものとして示す。（Ａ）ネオエピトープ内の変異は、ここでは、Ｈ－２Ｋ^{d}に結合された変異およびＷＴ Ｔｎｐｏ３．１エピトープのシミュレーションから構造スナップショットで示されるように、ペプチドバックボーンにわたって構造変化を引き起こす。（Ｂ）高くＤＡＩランク付けされた九量体に対する構造的差異の概要。差異を、分子動力学シミュレーションから平均ペプチド立体構造を重ね、全ての共通の原子に対する平均二乗偏差を計算することにより定量化した。上部および下部バーは、それぞれ、陽性または陰性免疫学的応答を引き起こしたエピトープを示す。Ｈ

ＢＶコアバーは、免疫原性ＨＢＶコアエピトープに対する対照計算に対する結果を示す。（Ｃ）構造変化に加えて、変異は、ここでは、Ｔｎｐｏ３．１エピトープに対して示されるように、Ｈ－２Ｋ^{d}ペプチド結合溝内のペプチドの立体構造安定性を増加させることができる。変異ペプチドは、分子動力学シミュレーション中のペプチドα炭素の二乗平均平方根ゆらぎにより証明されるように、より立体構造的に安定である。説明文中の数字は、各ペプチドの９つのアミノ酸に対する平均ＲＭＳＦを与え、右にあるものはＣ末端α炭素のみに対する値を与える。変異アミノ酸は、ｘ軸におけるより低い場合により指示される。（Ｄ）全ての九量体の立体構造安定性に対する変異の効果、変異体とＷＴペプチドの平均ＲＭＳＦの間の差として計算される。（Ｅ）ペプチドＣ末端でのゆらぎは、免疫原性の改善された指標である。垂直破線は全ての変異九量体に対する平均を示す。黄色バーは、ＨＢＶコアエピトープ対照のＣ末端安定性を示す。エラーバーは平均値の標準誤差を与える。

【図７】構造モデリングからの全ての上位ＤＡＩランク九量体のα炭素に対する二乗平均平方根ゆらぎを示す。

【図８】ネオエピトープＴｎｐｏ３の抗原提示ならびにそれにより惹起された免疫応答および腫瘍防御を示す。（Ａ）マウスを、変異Ｔｎｐｏ３ペプチドで免疫化した。ｄＬＮを短時間、エクスビボで、ＷＴまたは変異Ｔｎｐｏ３ペプチドなしで（ｐｅｐなし）、またはこれを用いて刺激し（左パネル）、または毎週１μＭ変異Ｔｎｐｏ３ペプチドによるインビトロ刺激で刺激した（右パネル）。５日後、細胞を、変異Ｔｎｐｏ３でパルス処理された細胞（Ｔｎｐｏ３）またはＭｅｔｈ　Ａ細胞（Ｍｅｔｈ　Ａ）に対する応答性について試験した。ＩＦＮγ＋ＣＤ４４＋ＣＤ８＋Ｔ細胞を計数した。（Ｂ）マウスを２回、卵白アルブミンペプチド（ＳＩＩＮＦＥＫＬ、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）またはＴｎｐｏ３変異ペプチドで免疫化した。２回目の免疫化後６日に、両方の群由来の脾細胞を、Ｋ^{d}／ＳＹＭＬＱＡＬＣＩ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）四量体で染色した。四量体陽性細胞をＣＤ８＋ゲートにおいて計数した。（Ｃ）マウスを、被照射Ｍｅｔｈ　Ａ細胞で免疫化した。左では、６日後、鼠径部ＬＮ細胞を、一晩ペプチドなしで、無関係のＰｒｐｆ３１ペプチドまたはＴｎｐｏ３ペプチド刺激した。％活性化エフェクタＣＤ８＋細胞が示される。右では、脾細胞を、インビトロで、複数ラウンドにおいて、１μＭの指示されたペプチドで、合計１９日間刺激した。Ｐｒｐｆ３１由来の無関係のペプチドを、対照として使用した。刺激後５日に、細胞を、指示されたペプチドに対する応答性について試験した。典型的には、各サンプルに対し、１５０，０００のリンパ球、または少なくとも１９，０００のＣＤ８＋ＣＤ４－細胞を取得した。＜０．１％のＴｎｐｏ３特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は本当に小さな応答であるが、我々はそれを真実であると考える。というのも、エクスビボ応答は弱くなることが避けられないからである。応答は統計的に有意であり、増強されたＴｎｐｏ３特異的応答（＞１．２％）が毎週のＴｎｐｏ３ペプチドによるインビトロ刺激後に検出された（右パネル）。ＦＡＣＳゲーティング戦略および代表的な主要データについては図１０を参照されたい。（Ｄ）マウスに、２００，０００のＭｅｔｈ　Ａ細胞を右の側腹部に注射した。２１日後、腫瘍－流入領域ＬＮおよび対側ＬＮを採取し、それぞれ、抗ＣＤ８抗体およびＴｎｐｏ３およびＮｆｋｂ１四量体Ｋ^{d}／ＳＹＭＬＱＡＬＣＩ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）およびＫ^{d}／ＧＹＳＶＬＨＬＡＩ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）で染色した（左および中央パネル）。脾細胞を使用してＣＤ８＋細胞を精製し、変異Ｔｎｐｏ３でパルス処理された細胞（Ｔｎｐｏ３）またはＭｅｔｈ　Ａ細胞（Ｍｅｔｈ　Ａ）に対する応答性をエリスポットアッセイにより、ペプチドなし（ｐｅｐなし）刺激を陰性対照として用い評価した（右パネル）。（Ｅ）ナイーブマウスまたはＴｎｐｏ３－変異ペプチド－免疫化マウスをＭｅｔｈ　Ａ細胞を用いてチャレンジした。加えて、ナイーブおよび免疫化マウスを、抗ＣＤ２５抗体または抗ＣＴＬＡ－４抗体を用いて指示された通り処置した。各群に対するＡＵＣをプロットし、全ての群におけるマウス全てに対する完全腫瘍増殖曲線を示す。一群あたり４から６匹の間のマウスを各実験で使用し、各実験を３から５回の間繰り返した。

【図９】図１に対するＦＡＣＳゲーティング戦略および代表的な主要データを示す。同族

ペプチドで刺激した、リンパ球系細胞、ＣＤ８＋ＣＤ４－細胞およびＩＦＮγ＋ＣＤ４４＋細胞に対するゲーティング戦略。０．０９７％の特異的応答を有する免疫原性ペプチド（Ｆａｒｓｂ）および０．００６４％の１０倍少ないバックグラウンドを有する非免疫原性ペプチド（Ｍａｐｋ１．３）の例もまた示す。どちらの場合も、ペプチド刺激のない細胞を陰性対照として使用した。各サンプルに対し、合計９５，０００－１２９，０００のリンパ球、または１４，５００－１７，０００のＣＤ８＋ＣＤ４－細胞を取得した。

【図１０】図８Ｃに対するＦＡＣＳゲーティング戦略および代表的な主要データを示す（左パネル）。リンパおよびＣＤ８＋ＣＤ４－細胞に対するゲーティング戦略（上２つのパネル）およびｐｅｐなし、対照ペプチドＰｒｐｆ３１およびＴｎｐｏ３ペプチドに対する応答についての代表的なＦＡＣＳプロット（下部３つのパネル）。刺激の欠如における、および無関係のペプチド対照による刺激に応じた応答は同一であり、Ｔｎｐｏ３に対する応答はバックグラウンドよりも５－７倍高いことに注意されたい。各サンプルに対し、合計１５０，０００のリンパ球、または最低１９，０００ＣＤ８＋ＣＤ４－細胞を取得した。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

腫瘍細胞においてランダム変異により生成されるネオエピトープは、個々に特異腫瘍抗原または特有抗原と呼ばれ、腫瘍の免疫原性の原因となるという考えは、２０年以上前から存在している。ネオエピトープは、本明細書で、元の抗原の改変により生成された抗原の変異領域として規定される。マウスおよびヒト腫瘍におけるそれらの存在および活性については強い実験的証拠が存在し、数学モデリングは個々のヒト腫瘍における数十～数百ものネオエピトープの存在を予測した。ハイスループットＤＮＡシークエンシングおよび付随的なバイオインフォマティクスアプローチにおける最近の革命は、最終的に、個々の癌において個々に特異的ネオエピトープを実際に同定することを可能にした。この方法を使用して、ヒト乳癌および結腸癌ならびに慢性骨髄性白血病は、数十もの推定変異ネオエピトープを有することが示されている。マウスメラノーマにおいてそのようなネオエピトープを同定するためのゲノム／バイオインフォマティクス的アプローチはまた、数百ものネオエピトープの同定につながった。同様のアプローチは、免疫無防備状態マウスでのメチルコラントレン誘発肉腫におけるネオエピトープの同定につながり、この腫瘍の免疫応答性動物への移植は、エピトープ依存性腫瘍退縮につながった。ヒト研究では、疾患の有利な臨床経過の変異ネオエピトープへの主要免疫応答との関連が証明されている。これらの数が増えている研究により、変異ネオエピトープに対する宿主免疫応答は、腫瘍増殖からの宿主の防御において主要な役割を果たすことが強く示唆される。

【００１３】

個々のヒト腫瘍由来の膨大な数の推定ネオエピトープを同定する機会は対応する問題を発生させる：どのようにして、インシリコで同定された多数の推定ネオエピトープの中から、実際の腫瘍防御ネオエピトープを区別して、同定するか？問題は、規模的に困難であり、というのも、腫瘍トランスクリプトームの検査およびそれらのＴＣＧＡデータベースにおける正常エクソームとの比較は、多くの腫瘍は数百もの推定ネオエピトープを有していることを示しているからである。おそらく、これらの仮想ネオエピトープのほんのわずかのみが癌に対して免疫防御性である。

【００１４】

この疑問は、ウイルス系において以前取り組まれており、この場合、ワクチニアウイルスの推定および現実エピトープの体系的分析が実施されている。この研究により問題の大きさが明らかになった：ワクチニアゲノムによりコードされる全ての可能な９－１０のアミノ酸のペプチドから開始して、２．５％だけが、あるＨＬＡアレルに対する高親和性バインダとなる。高親和性バインダのうち、半分がＣＤ８応答を惹起する。これらのうち、１５％のみが、自然に処理され、提示される。最後に、エピトープの優位性、ＨＬＡ－ペプチド親和性、ＨＬＡ－ペプチド安定性、ＴＣＲ結合活性、または処理されたエピトープの量の間でほとんど相関は観察されなかった。よって、Ｔ細胞応答からの情報の利益なし

では、ワクチニアゲノムから開始して、有用なエピトープを同定することはできないであろう。

【００１５】

問題は、癌ゲノム由来の有用なエピトープを同定するにはより複雑な桁である。というのも、哺乳類ゲノムは、ワクチニアのものよりもかなり大きいからである。その上、ウイルスゲノムは完全に非自己であるが、癌ゲノムは、変異自己であり、よって、ネオエピトープは、自己と交差反応性である可能性があり、寛容性または抑制メカニズムが関与する可能性が高い。

【００１６】

腫瘍のトランスクリプトームおよびＣＤ８イムノームの体系的分析、および、変異により生成されたネオエピトープの免疫原性および腫瘍防御能力を支配する規則が本明細書で記載される。この努力により、ウイルスエピトープからネオエピトープの認識を区別するＭＨＣ　Ｉ－ペプチド相互作用に関する驚くべき観察、およびインビボで翻訳可能な推定変異ネオエピトープの部分は、ウイルス系の対応する部分よりもずっと小さいという認識につながった。

【００１７】

特定的には、ＷＯ２０１４／０５２７０７号（腫瘍特異的エピトープの決定のその教示のために参照により本明細書に組み込まれる）では、差分アグレトープ指数（ＤＡＩ）と呼ばれる新規指数が記載された。ＤＡＩは腫瘍特異的エピトープの選択におけるＮｅｔＭＨＣなどのアルゴリズム上での改善であるが、しかしながら、選択した腫瘍特異的エピトープの多くが、予測よりも低い免疫原性を有することが見出された。本出願の発明者らは、ペプチドがＭＨＣタンパク質に結合された時のペプチドの立体構造安定性は、免疫学的転帰の強力な予測因子となることを見出した。特定的には、免疫原性ネオエピトープは、予想外に、対応する野生型配列よりも高い立体構造安定性を有することが見出された。すなわち、野生型ペプチドに比べてペプチドのより高い立体構造安定性をもたらす変異は免疫原性となる可能性がより高い。

【００１８】

本明細書で提示される結果により、複数の腫瘍特異的抗原エピトープが明らかになる。本明細書で報告された新規ツールを使用して、腫瘍増殖に対する免疫学的防御を本当に惹起する少数のネオエピトープ（膨大な数の可能性のあるネオエピトープの中で）を同定した。方法の適用は、２つの独立した腫瘍に対して本明細書で記載される。推定ネオエピトープセットの選択はＤＡＩアルゴリズムを使用して説明されているが、本明細書で開示される方法は、このアルゴリズムを使用して同定されるエピトープセットに制限されないことが示されている。実際上、ＤＡＩアルゴリズムを含むパイプラインを最初に、Ｍｅｔｈ Ａ腫瘍からのデータ上で経験的に誘導し、その後ＣＭＳ５上で試験した。ＤＡＩアルゴリズムから予測される抗腫瘍活性はＭｅｔｈ　Ａにおいてよりもｃｍｓ５において著しく強く、この変動は十中八九、Ｍｅｔｈ　Ａ腫瘍に特有な免疫抑制メカニズムを反映したものであり、よって、ＤＡＩアルゴリズムそれ自体の利点に無関係である。ＤＡＩアルゴリズムは以来、さらに別のマウス腫瘍、Ｂ１６メラノーマにおいて試験されており、その上、この系統におけるＴ細胞応答に関するデータは、ＮｅｔＭＨＣ単独を超えるＤＡＩの著しい優位性と一致する。現在の研究は、ＣＤ８　Ｔ細胞のＭＨＣ　Ｉに限定されるエピトープの同定に焦点があてられているが、分析はまた、ＣＤ４　Ｔ細胞のＭＨＣ　ＩＩに限定されるエピトープに拡張することができる。

【００１９】

Ｔ細胞は、癌免疫において一義的に中心的役割を果たすが、それらはこれまで免疫防御性エピトープの同定に対し不十分なプローブであった。Ｍｅｔｈ　ＡおよびＣＭＳ５肉腫のＴ細胞により規定される腫瘍特異抗原の大規模な、骨の折れる分析は、長年にわたって何とか、合計５つのエピトープを取得し、そのいずれも、特に強い腫瘍拒絶を惹起せず、対照的に、この単一研究はほぼ１２の、これら２つの腫瘍の強力な腫瘍防御エピトープを明らかにした。この食い違いに対する理由を熟考することは有益である。Ｔ細胞のプロー

ブとしての使用は、本質的にＴ細胞株またはクローンの作製を必要とし、これはそれ自体、非常に選択的なプロセスである。理論に固執しないが、インビボでのエフェクタＴ細胞の多様性はＴ細胞株またはインビトロで生成されたクローンにより容易に捕獲されず、歪められた、かつ低密度の、腫瘍のＴ細胞イムノームの観点に至ると考えられる。本明細書で記載されるイムノームのゲノミクス駆動分析はＴ細胞の選択における偏りを切り抜け、よって、ネオエピトープの全領域に光を当てる。

【００２０】

１つの態様では、本明細書で特定的に記載されるように、ＤＡＩスコア（変異エピトープおよびその未変異対応物のＮｅｔＭＨＣスコアの間の数値差）は、ＮｅｔＭＨＣアルゴリズムにより同定される数百もの推定ネオエピトープの中からの、非常に少数の本当に免疫防御性のネオエピトープに対する著しい濃縮を可能にする。ＤＡＩスコアの証明された有用性は、その前提の妥当性を浮き彫りにする：腫瘍防御免疫応答は、その野生型対応物とは異なるネオエピトープを必要とし、ＤＡＩスコアは、そのような差分を定量し、ランクづけする手段である。当然ながら、免疫原性についての既存の考えは完全にウイルスおよびモデル抗原の研究に由来し、それらは自己対応物を有さず、それらの研究のためにＤＡＩを考案する必要はなかった。下記の通り、ＮｅｔＭＨＣアルゴリズムの設計から、主アンカ残基でのアミノ酸置換は、ＤＡＩへの最大寄与に役立つ。実際、高いＤＡＩランク付けを有する全てのネオエピトープは、アスパラギン酸をチロシンと位置２で、またはＣ末端のプロリン／アルギニンをロイシンで置き換える。構造的考察から、これらの置換は、ペプチド結合に著しく影響を与えると予想されるであろう。というのも、Ｐ２のチロシンおよびペプチドＣ末端のロイシンは最も最適なK^dアンカ残基であるからである（実際、Ｐ２のアスパラギン酸またはＣ末端のアルギニンは、実質的な電荷反発のためにかなり不利になると予想される）。ペプチド立体構造安定性は、分子動力学シミュレーション中に観察されるゆらぎとして表されるが、また、他の計算および実験技術によっても決定可能であり、免疫原性との新しい相関を示唆する別のツールとなる。大部分の高いＤＡＩランク付けを有するネオエピトープは、それらの野生型対応物よりも安定な様式でＭＨＣと相互作用すると予測され、これらの場合、アンカ残基の変化により、よりリジッドに結合されたペプチドが得られる。ペプチド立体構造安定性に対するアンカ改変の効果は以前にも有名であり、特に、増加したペプチド可撓性は、免疫原性の損失と相関する。これは、Ｔ細胞受容体との生産的相互作用に対する機会を低減させる、またはＭＨＣ結合ペプチドの寿命を増加させることにより起こり得る。当然、ＤＡＩ以外の方法を使用して、推定ネオエピトープセットを決定することができ、分子動力学シミュレーション中に観察されるゆらぎではない他の方法を使用して、ネオエピトープの立体構造安定性を評価することができる。

【００２１】

本明細書で提供される研究から明らかになる最も驚くべき観察は、防御免疫を惹起する１０／１０ネオエピトープが、ＮｅｔＭＨＣにより、K^dのノンバインダとして分類されることである（８．７２のカットオフ値）。それに応じて、K^dに対する８／１０ネオエピトープの親和性は、よく１００ｎＭまたは５００ｎＭ（ウイルスエピトープのＭＨＣＩ分子との実りある相互作用に対する伝統的な閾値）を超える。試験した３つの場合の３つにおいて、これらの推定される「ノンバインダ」は、古典的ＣＤ８　Ｔ細胞依存性腫瘍免疫を惹起する。この観察結果は、ＭＨＣ　Ｉ－ペプチド－Ｔ細胞受容体相互作用についての我々の基本的な仮定のいくつかに挑み、これまで想定されたものではない可能性のあるネオ抗原のずっと広い世界を露呈させる。

【００２２】

検出可能なＣＤ８応答と、腫瘍増殖からの免疫防御性（表６）の間の観察された解離はコメントに値する。免疫防御性を惹起するネオエピトープおよびＣＤ８応答は率直なものであり、コメントは必要ではない。免疫防御性を惹起するネオエピトープ（検出可能なＣＤ８応答ではない）（図５）はまた、惹起されたＣＤ８応答は弱すぎてエリスポットアッセイにより検出できないという説明で、理解され得、よって、ＣＤ８細胞およびそれらの

活性に対するより高感度なアッセイを開発する必要性が強調される。しかしながら、エピトープは、強力なＣＤ８応答を惹起するが、免疫防御性ではなく、理解するのは難しい。しかしながら、表６におけるいくつかのデータは、この解離について考える時にガイダンスを提供することができる。表６におけるＭｅｔｈ　Ａに対するネオエピトープＴｎｐｏ３．１、３．２、３．３および３．４に注意されたい。それらは同じＮ末端変異（ｓｙ／ＬＤ）を共有するが、Ｃ末端上でのそれらの伸長の程度が異なる。最初の３つは強いＣＤ８応答を惹起するが、Ｔｎｐｏ３．４はそうではない。より興味深いことに、免疫原性となる３つのネオエピトープのうち、１つのみ、Ｔｎｐｏ３．１が腫瘍増殖からの防御を惹起する。Ｔｎｐｏ３．１は自然に提示される唯一のネオエピトープであり、他はそうではないと考えられる。この完全に検証可能な仮説は、Ｔ細胞応答と免疫防御性の間の解離を試験するためのフレームワークを提供する。

【００２３】

予想外に、試験した１００を超えるものの（表５および６に列挙される６６のエピトープ、ならびに３５を超える追加のエピトープ）うち１つのＷＴエピトープも測定可能な、増幅可能なＣＤ８免疫応答を惹起しなかった。免疫応答は、最初の免疫化後に検出された場合、２回目の免疫化後に、増強されずに、抑制され、末梢的に寛容化された応答であることと一致した。この研究は、そのような多数の自己エピトープに対する免疫応答が体系的に試験される最大を表し、負の選択および末梢性寛容のメカニズムの強力な範囲の著しい証拠となる。

【００２４】

ハイスループットで安価なＤＮＡシークエンシングの出現とともに、現在では、各癌患者の癌および正常組織のエクソームをルーチン的にシークエンシングし、その２つを比較して癌特異的ミスセンス変異を同定することが可能である。ＮｅｔＭＨＣまたは他のそのような一般に入手可能なアルゴリズムをその後に使用して、各患者の３～６のＨＬＡ　Ｉアレルの各々に対し、ミスセンス変異により生成された可能性のあるネオエピトープを同定することができる。ネオエピトープに対応するペプチドはその後、化学的に合成することができ、患者を免疫化するために使用することができる。しかしながら、可能性のあるネオエピトープの数は膨大である可能性があり、患者をそのような膨大な数のペプチドで免疫化することは実際的でない。ＮｅｔＭＨＣアルゴリズムを、本明細書で同定される、ＤＡＩおよびＣ末端安定性アルゴリズムと組み合わせると、今や、多数の可能性のあるネオエピトープをずっと小さな数の本当に免疫原性のエピトープに低減することが可能になり、これを使用して、今や、患者を現実的な様式で免疫化することができる。

【００２５】

一実施形態では、癌患者において免疫防御ネオエピトープを同定する方法は、推定ネオエピトープセットを提供する工程と、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された、推定ネオエピトープセットにおける各推定ネオエピトープの少なくとも一部の立体構造安定性を決定する工程と、推定ネオエピトープセットから免疫防御ネオエピトープを選択する工程であって、免疫防御ネオエピトープは、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合されると、対応する野生型エピトープと比べてより高い立体構造安定性を有する、工程と、任意で、薬学的に許容される担体と、１つ以上の免疫防御ネオエピトープペプチド、免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドとを含む医薬組成物を生成させる工程と、ならびに任意で、医薬組成物を癌患者に投与する工程と、を含む。

【００２６】

推定ネオエピトープセットは、本明細書で記載されるＤＡＩを用いて同定することができ、またはＮｅｔＭＨＣスコア、ペプチド－ＭＨＣタンパク質オンレート（ｏｎ－ｒａｔｅ）、ペプチド－ＭＨＣタンパク質オフレート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）、ペプチド溶解度および／またはペプチドの他の物理的および／または化学的特性を用いて決定することができる。

【００２７】

Ｔ細胞免疫応答はクラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣタンパク質により提示されるペプチドのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）認識に依存する。本明細書では、ＭＨＣタンパク質は、クラスＩ　ＭＨＣではＭＨＣ重鎖およびβ２－ミクログロブリンを構成する１つ以上のポリペプチドであり、または、クラスＩＩ　ＭＨＣではαおよびβ鎖を構成するポリペプチド、またはその活性断片である。本明細書で説明されるように、ＭＨＣペプチド－結合溝におけるエピトープの立体構造安定性は免疫原性を予測するのを助けるために使用することができる。

【００２８】

クラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣ結合溝におけるペプチドでは、立体構造は、排他的ではなく一般的にＸ線結晶解析により決定される、または計算的モデリングにより検査される、ペプチドが溝内で採用する構造である（例えば、ｐｍｉｄ１７７１９０６２を参照されたい）。安定性は、立体構造がこの立体構造の周りで変動する（または移動する）程度として規定され、熱力学、分光、計算、結晶学的、または水素交換技術を用いて測定または推定することができる。安定性はまた、エントロピならびに他の動力学過程を含むことができる。熱力学技術としては、熱量測定、ファント・ホッフ分析、またはアイリング分析によるペプチド結合エントロピ変化の測定が挙げられるが、それらに限定されない（例えば、ｐｍｉｄ１２７１８５３７を参照されたい）。分光技術としては、核磁気共鳴、蛍光、または赤外分光法によるペプチド運動の検査が挙げられるが、それらに限定されない（例えば、ｐｍｉｄ１９７７２３４９を参照されたい）。計算技術としては、分子動力学シミュレーションまたはモンテカルロサンプリングが挙げられるが、それらに限定されない（例えば、ｐｍｉｄ２１９３７４４７を参照されたい）。結晶学的技術としては、同じペプチド－ＭＨＣ複合体の複数のＸ線構造の比較、電子密度の検査、結晶学的温度因子の検査、または１つのＸ線構造で存在する別のペプチド立体構造の検査が挙げられるが、それらに限定されない（例えば、ｐｍｉｄ１７７１９０６２を参照されたい）。水素交換技術としては、ＮＭＲまたは質量分析による、所定の時間点での水素交換速度または交換の程度の測定が挙げられるが、それらに限定されない。

【００２９】

本明細書では、立体構造ゆらぎという用語は、構造周りの運動の振幅または頻度のいずれかを示す。そのため、より高い立体構造安定性を有するほど、エピトープはより少ない構造周りのゆらぎを有する。立体構造ゆらぎを説明する等価の方法は、より高い立体構造安定性を有するほど、ペプチドの運動が少なくなるというものである。ゆらぎという用語は、運動、エントロピまたはペプチドにおける動力学的運動を説明する他の用語と同じ意味で使用することができる。

【００３０】

立体構造安定性は生体分子認識に影響することはよく確立されている（ｐｍｉｄ２０３８３１５３）。立体構造安定性が低いと、エントロピが高くなる。認識部位において（例えば、ＭＨＣ結合溝におけるペプチドにおいて）より高いエントロピが存在する場合、これは生体分子認識を妨害する。というのも、結合のためのエントロピペナルティを増加させるからである。この原理はペプチド／ＭＨＣのＴ細胞受容体認識において証明されている（ｐｍｉｄ２００６４４４７）。よって、立体構造安定性を増加させることは、ペプチド／ＭＨＣへのＴ細胞受容体結合を強化する（すなわち、Ｔ細胞受容体結合平衡定数の大きさを増加させ、または結合のＧｉｂｂｓ自由エネルギを低下させる）手段となる。多くの場合、ペプチド／ＭＨＣへのＴ細胞受容体結合が強いほど、免疫応答が強くなる（例えばｐｍｉｄ１０４３５５７８を参照されたい）。よって、本発明者らは、野生型ペプチドと比べて変異ペプチド立体構造安定性を増加させると、推定エピトープの免疫原性が改善することを発見した。

【００３１】

ペプチド、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）相補性決定領域ループ、およびＭＨＣタンパク質におけるアミノ酸配列可変性は、ＴＣＲは様々な親和性、熱力学、および動力学でペプチド／ＭＨＣ複合体に結合することを意味する（ｐｍｉｄ１８４９６８３９、９５９７１４０

）。これは、ひいては、生体分子認識を支配する基本の化学的および物理的原理の寄与（水素結合および他の静電気、疎水性、ファンデルワールス相互作用、および配位エントロピ）は、ＴＣＲ、ペプチド、およびＭＨＣ化学および構造特性と共に変動するためである。よって、変化立体構造安定性の正確な影響は、異なるネオエピトープおよびエピトープ対と共に異なるであろう。しかしながら、生体分子認識に対する立体構造安定性の効果の文献例に基づき、立体構造安定性の意味ある低減の例は下記となる：

【００３２】

より高い立体構造安定性の上記測定値のいずれか一つを使用して、変異ペプチドが、野生型ペプチドよりも高い立体構造安定性を有することを決定することができる。野生型配列と比べた場合の、ネオエピトープに対するより高い立体構造安定性の定量化はこのように、立体構造安定性を決定するために使用される技術に依存する。しかしながら、そのような技術は当技術分野でよく知られており、当業者であれば、特定の技術を使用して、変異エピトープが野生型エピトープよりも高い立体構造安定性を有するかどうか容易に決定することができる。

【００３３】

よって、推定ネオエピトープセットの中のどのネオエピトープが、免疫原性である最高確率を有するか決定するために、推定ネオエピトープの立体構造安定性を対応する野生型エピトープと比較する。前提は、ペプチド立体構造安定性が大きいほど（または同等に、リジッド性が大きいほど）、ＴＣＲとの生産的相互作用に対する確率が高くなるということである。この前提は、生体分子相互作用の根底にある基本の構造的および生物物理学的原理に基づいている（例えば、結合エントロピ変化および形状／化学相補性）。よって、野生型とネオエピトープの間の立体構造安定性の相対評価は、ＴＣＲにより生産的に結合され、免疫応答を開始する確率が高いそれらのネオエピトープを予測するために使用することができる。推定エピトープセットの立体構造安定性は、実験的に、限定はされないが、熱量測定、ＮＭＲ、蛍光、ＩＲ分光法、または質量分析などの実験技術により、あるいは計算的に、限定はされないが、分子動力学シミュレーションまたはモンテカルロサンプリングなどの技術により評価され得る。

【００３４】

立体構造安定性はエピトープ全体または特定の領域（例えば、ペプチド中心、Ｎ－またはＣ末端、など）に対して決定することができる。

【００３５】

特定の実施形態では、推定ネオエピトープセットが選択されるとすぐに、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された推定ネオエピトープセットにおける各エピトープの少なくとも一部の二乗平均平方根ゆらぎ（ＲＭＳＦ）が、ペプチドの立体構造安定性の測定値として決定される。二乗平均平方根ゆらぎが、ペプチドのＣ末端部分、ペプチドの中心部分、ペプチドのＮ末端部分、またはペプチド全に対して決定される。予想外に、免疫学的応答を惹起することができない変異ペプチドは高い不安定性、特にＣ末端不安定性を有することが見出された。本明細書で提示される研究において、平均Ｃ末端ＲＭＳＦは０．９Åであり、この値より低いＣ末端ＲＭＳＦを有するペプチドは免疫原性であった。特定の実施形態では、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された推定ネオエピトープセットにおける各エピトープのα－炭素の少なくとも一部の二乗平均平方根ゆらぎは２Å未満、１．５Å未満、１．２Å未満、または０．９Å未満であることが好ましい。よって、Ｃ末端安定性は、免疫原性の予測因子である。免疫防御ネオエピトープは、推定エピトープセットから、２Å未満、１．５Å未満１．２Å未満、または０．９Å未満の二乗平均平方根ゆらぎを有するエピトープとして選択される。

【００３６】

１つの態様では、ＭＨＣタンパク質はＭＨＣ　Ｉタンパク質であり、免疫応答はＣＤ８＋応答である。例示的なＭＨＣ　Ｉタンパク質としては、マウスＨ－２ｋ^{d}、Ｈ－２ｋ^{b}およびＨ－２Ｄ^{d}ペプチドならびにヒトＨＬＡタンパク質、例えばＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ、特定的にはＨＬＡ－Ａ＊０２０１が挙げられる。よって、１つの態

様では、方法はさらに、ネオエピトープのＣＤ８　Ｔ細胞応答をアッセイする工程を含む。

【００３７】

別の態様では、ＭＨＣペプチドはＭＨＣ　ＩＩタンパク質であり、応答はＣＤ４＋応答である。例示的なＭＨＣ　ＩＩタンパク質としてはＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱが挙げられる。よって、１つの態様では、方法はさらに、ネオエピトープのＣＤ４　Ｔ細胞応答をアッセイする工程を含む。

【００３８】

さらに別の態様では、免疫防御ネオエピトープは、Ｈ－２Ｋ^{d}またはＨＬＡに対し、１００ｎＭを超える、または５００ｎＭを超える、測定されたＩＣ５０を有する。

【００３９】

１つの実施形態では、推定ネオエピトープセットは、下記方法によって決定されるＤＡＩを用いて決定される：

癌患者のＲＮＡまたはＤＮＡの少なくとも一部を健常組織および癌組織の両方においてシークエンシングし、健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列および癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列を生成させる工程と、健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列および癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列を比較し、健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列と癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列との間の差分を同定し、差分ＤＮＡマーカセットを生成させる工程と、差分ＤＮＡマーカセットを分析して、腫瘍特異的エピトープセットを生成させる工程、であって、腫瘍特異的エピトープセットは１つ以上の腫瘍特異的エピトープを含む、工程と、腫瘍特異的エピトープセットにおける各エピトープに対し差分アグレトープ指数と呼ばれる数値スコアを提供する工程であって、差分アグレトープ指数は、正常エピトープに対するスコアを腫瘍特異的エピトープに対するスコアから減算することにより計算される工程と、ならびに腫瘍特異的エピトープセットを差分アグレトープ指数に従いランク付けし、ランク付けに基づき、腫瘍特異的エピトープセットから推定ネオエピトープセットを選択する工程。

【００４０】

本明細書で記載される方法では、腫瘍特異的エピトープセットは差分アグレトープ指数に従いランク付けされ、推定ネオエピトープセットは、ランク付けに基づき、腫瘍特異的エピトープセットから選択される。１つの態様では、上位５０％、４０％、３０％、２０％または１０％のエピトープが選択される。

【００４１】

医薬組成物は任意で、アジュバントまたは免疫調整剤をさらに含む。

【００４２】

１つの実施形態では、癌患者のＲＮＡまたはＤＮＡの少なくとも一部を健常組織および癌組織の両方においてシークエンシングする工程は、トランスクリプトームシークエンシング、ゲノムシークエンシング、またはエクソームシークエンシングを含む。トランスクリプトームシークエンシングは、細胞由来のメッセンジャーＲＮＡまたは転写物をシークエンシングすることである。トランスクリプトームはＲＮＡに転写される小さなパーセンテージのゲノム（ヒトでは５％未満）である。ゲノムシークエンシングは、生物のゲノムの全ＤＮＡ配列をシークエンシングすることである。エクソームシークエンシングは、ゲノムのタンパク質コード部分シークエンシングすることである。特定の実施形態では、シークエンシングはトランスクリプトームシークエンシングであり、これは、腫瘍において発現されている変異の同定を可能にする。

【００４３】

別の態様では、シークエンシングの深度が変更され得る。次世代シークエンシングにおいては、対象となるＤＮＡサンプルのオーバラップする断片が生成され、シークエンシングされる。オーバラップする配列はその後アラインメントされ、アラインメントされた配列リードの完全なセットが生成される。シークエンシングの深度は、シークエンシングのカバレッジとも呼ばれ、アセンブリの一部分に寄与するヌクレオチドの数を示す。ゲノム的には、シークエンシング深度は、各塩基がシークエンシングされた回数を示す。例えば

、３０×までシークエンシングされたゲノムは、配列中の各塩基が、３０個のシークエンシングリードによりカバーされたことを意味する。ヌクレオチド的には、シークエンシングの深度は、単一のヌクレオチドに関する情報を加えた配列の数を示す。

【００４４】

１つの態様では。ＲＮＡまたはＤＮＡは、腫瘍および健常組織から、ポリＡ＋ＲＮＡを組織から単離して、ｃＤＮＡを調製し、標準プライマを用いてｃＤＮＡをシークエンシングすることにより単離される。そのような技術は当技術分野でよく知られている。また、患者のゲノムの全てまたは一部のシークエンシングは、当技術分野でよく知られている。ハイスループットＤＮＡシークエンシング法は当技術分野で知られており、例えば、イルミナ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）（登録商標）シークエンシング技術によるＨｉＳｅｑ（商標）２０００システムが挙げられ、これは、大規模パラレル合成時解読アプローチを使用して、数十億の塩基の高品質ＤＮＡ配列を１つのランあたりに生成させる。

【００４５】

ある一定の実施形態では、癌患者のゲノムの特定の部分が、例えば、腫瘍によって、シークエンシングされる。ほとんどの場合、全ゲノム／トランスクリプトームをシークエンシングすることが好ましく、ゲノムは、浅い深度または深い深度までシークエンシングされ、ゲノム／トランスクリプトームのより少ないまたはより多い部分のカバレッジを可能にし得る。

【００４６】

特定の実施形態では、差分ＤＮＡまたはＲＮＡマーカセットを分析して腫瘍特異的エピトープセットを生成させる工程は、エピトープペプチドのＭＨＣ分への結合を決定する予測アルゴリズムを使用することを含む。任意で、腫瘍特異的エピトープセットは精製され、ＭＨＣに限定される腫瘍特異的エピトープセットが提供される。例えば、Ｋ、ＤまたはＬアレルのＭＨＣ　Ｉに限定されるエピトープが、提供され得る。ＭＨＣに限定されるエピトープセットは、ＭＨＣ－アレル特異的タンパク質への、エピトープを含有するペプチドの結合を決定することにより生成させることができる。そのようなアルゴリズムの１つの例はＮｅｔＭＨＣ－３．２であり、これは、人工ニューラルネットワーク（ＡＮＮ）および重み行列を用いて、多くの異なるＨＬＡアレルへのペプチドの結合を予測する。

【００４７】

具体的には、健常組織と癌組織の間のＤＮＡ（またはＲＮＡ）配列差分は、哺乳類のＭＨＣ組成物と組み合わせて、ＮｅｔＭＨＣなどのエピトープ予測アルゴリズムにより分析される。このアルゴリズムは、この個々の哺乳類に対する可能性のある腫瘍特異的エピトープのリストを生成し、各エピトープに数値スコアを与える。現在の最先端では、高いスコアはエピトープが免疫化することができる良好な確率を示し、低い（負も含む）スコアは、エピトープが免疫化することができる確率が低いことを示す。

【００４８】

方法は、腫瘍特異的エピトープセットまたはＭＨＣに限定される腫瘍特異的エピトープセットにおける各エピトープに対して数値スコアを提供する工程をさらに含み、ここで、数値スコアは、正常エピトープに対するスコア（非変異）を腫瘍特異的エピトープに対するスコア（変異）から減算することにより計算される。正常エピトープに対する数値スコアは、変異癌エピトープに対する数値スコアから減算され、差分に対する数値が得られる－エピトープに対する差分アグレトープ指数（ＤＡＩ）。推定エピトープはＤＡＩに基づいてランク付けされ得る。このランク付けにおいては、大まかに言って、所定のエピトープに対する差分が高いほど、それによる免疫化が腫瘍に対して防御性となる確率が高くなる。特定の実施形態では、最高ランク付けされたエピトープが個体を免疫化するために使用される。さらに、方法は、腫瘍特異的エピトープセットまたはＭＨＣに限定される腫瘍特異的エピトープセットを、セット内の各エピトープに対する差分アグレトープ指数によりランク付けする工程を含み得る。１つの態様では、方法は、差分アグレトープ指数（ＤＡＩ）によるランク付けを用いて、１０から５０個の上位ランクの腫瘍特異的エピトープのサブセットを同定する工程をさらに含む。上位ランクは最も好ましいＤＡＩを有するエ

ピトープを意味する。

【００４９】

一例として、癌中の変異ＤＮＡが、所定の部位で、ＧＹＳＶＬＨＬＡＩＩ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．４）のアミノ酸配列をコードし、正常組織中の対応する非変異配列がＧＤＳＶＬＨＬＡＩＩ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）である場合。予測アルゴリズム（この場合ＮｅｔＭＨＣ）は、癌配列には＋７．３の数値スコア、正常配列には－４．３のスコアを与える。ＤＡＩは１１．６である。このＤＡＩは、このエピトープをランク付けするために使用される。

【００５０】

現在の先端技術において、ＮｅｔＭＨＣなどの予測アルゴリズムにより与えられる変異エピトープの数値スコアは、免疫化のための主な、または唯一の指針となり、そのような従来のアルゴリズムにより与えられるスコアが高いほど、ペプチドはより優良であると予想される。我々の分析では、これは、腫瘍防御に対する予測の良好な方法ではない。便宜的に、本明細書で開示される方法により、（ａ）非変異対応物に対するスコアを予測するための従来のアルゴリズム（例えばＮｅｔＭＨＣ）、および（ｂ）変異および非変異エピトープの間の差分が、ペプチドエピトープの抗腫瘍免疫原性を予測するための指針として使用される。

【００５１】

特定の実施形態では、差分ＤＮＡマーカセットを分析して、腫瘍特異的エピトープセットを生成させる工程は、１つ以上の腫瘍特異的エピトープが発癌経路と関連するかどうかに依存しない。癌患者のＤＮＡを分析するための従来の方法は、癌を引き起こす、または癌を駆り立てる遺伝的メカニズムに焦点を当てていたが、本アプローチはその問題について不可知論的である。本明細書で記載されるアプローチは、正常とは異なる任意の点において、その差分が癌を引き起こす原因となるかどうかにかかわらず、癌を攻撃することを目標としている。この差分の主な結果は、他のプローチは主として各患者にどの既存の（または将来の）薬を使用するかを決定することに頼っており、各患者のための薬を設計することに頼っていないということである。本方法は特定の腫瘍を治療するための薬を設計することに焦点を当てる。

【００５２】

本明細書で記載される方法の１つの利点は、癌に特異的なＤＮＡ配列の差分に合わせられた焦点である。対照的に、少数の著名な例外（ｒａｓ、ｐ５３、ｂｃｒ－ａｂｌ転座など）はあるが、癌を引き起こす遺伝的メカニズムの大部分は真に癌特異的であるわけではなく、その代わりに、何らかの正常な状況下にある正常細胞もそれらを使用している。よって、それらは癌選択的であり、正常細胞よりも癌細胞対して好ましく結合するが、癌特異的ではなく、癌細胞および正常細胞の両方に結合する。本明細書で記載されるアプローチは、癌特異的なエピトープに焦点を当てている。癌選択的マーカではなく癌特異的マーカを使用する明らかな利点は、製造されるワクチンの低減された毒性である。さらなる利点としては、薬物療法とは対照的に免疫療法を使用することを含み、これは、患者の実際の癌に対して特異性を有するワクチンの作製を可能にする。

【００５３】

健常組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列と癌組織ＲＮＡまたはＤＮＡ配列の間の差分を同定して、差分ＤＮＡマーカセットを生成させる工程は、当技術分野で知られているバイオインフォマティクス技術を用いて実施することができる。１つの実施形態では、最初のスクリーニングは、癌患者のゲノムにおける全ての同定可能な変化を含む。変化は、同義的な変化（コードされるアミノ酸を変化させない）および非同義的な変化（コードされるアミノ酸を変化させる）の両方を含む。実施例において説明されるように、免疫エディティングは、予測されるパーセンテージと比較して、非同義的な変異の数の低減をもたらす。１つの態様では、ＤＮＡマーカの変化は一ヌクレオチドバリアント（ＳＮＶ）である。

【００５４】

本明細書では、腫瘍エピトープまたは腫瘍抗原は、腫瘍細胞により生成されるペプチド

抗原である。多くの腫瘍抗原がヒトならびにマウスにおいて同定されており、例えば、ｒａｓおよびｐ５３の様々な異常産物が様々な腫瘍において見出されている。腫瘍の異なる型において一般に見出される腫瘍抗原に加えて、本発明者らは、腫瘍サイズおよび遺伝的不安定性の程度によって、ヒト腫瘍は、数十～数百もの真に腫瘍特異的なエピトープを有し得ることを認識した。本明細書では、腫瘍特異的エピトープは特定の腫瘍に特異的であり、腫瘍抗原として一般に認識されないエピトープである。

【００５５】

本明細書には、本明細書で開示される方法により同定される単離された免疫防御ネオエピトープペプチドも含まれる。「単離された」または「精製された」ペプチドは、当該タンパク質が由来する細胞または組織源からの細胞材料または他の汚染ポリペプチドを実質的に含まず、または化学的に合成されたときには化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、ポリペプチドが単離され、または組換えにより作られた元の細胞の細胞成分から、ポリペプチドが分離された、ポリペプチドの調製物を含む。免疫防御ネオエピトープペプチドは一般に、７から２５のアミノ酸、特定的には８から１５のアミノ酸、より特定的には８から１０アミノ酸の長さを有する。

【００５６】

免疫防御ネオエピトープとして同定される個々のペプチドは、当技術分野で知られている方法を使用して免疫原性について試験することができる。

【００５７】

１つの実施形態では、各免疫防御ネオエピトープに対応するペプチドが採用される。別の実施形態では、２つ以上の免疫防御ネオエピトープを含有するポリペプチドが採用される。非エピトープリンカーにより任意で離間された複数の免疫防御ネオエピトープを含有する１つのポリペプチドが採用され得る。そのようなポリペプチドは、当業者により容易に設計され得る。

【００５８】

ある一定の実施形態では、免疫防御ネオエピトープペプチドの代わりに、医薬組成物は、ペプチドをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む。ペプチドは全て、同じポリヌクレオチド分子から、または複数のポリヌクレオチド分子から発現され得る。

【００５９】

１つの態様では、ネオエピトープペプチドは、ペプチドの５’３または３’端のネオエピトープまたは１つ以上のヌクレオチドに対し、ネオエピトープにおいて見出されていない少なくとも１つの置換改変を含有する。別の態様では、検出可能な標識がネオエピトープに付着される。

【００６０】

「ポリヌクレオチド」または「核酸配列」は、少なくとも５塩基の長さのヌクレオチドのポリマ形態を示す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはいずれかのヌクレオチドの改変形態とすることができる。ポリヌクレオチドは、１つまたは複数の組換え発現ベクタに挿入することができる。「組換え発現ベクタ」という用語は、ペプチド遺伝子配列の挿入または組み込みによって操作された、プラスミド、ウイルス、または当技術分野で知られている他の手段を示す。「プラスミド」という用語は一般に、本明細書では、当業者に周知の標準命名規則にしたがい、大文字および／または数字を前置および／または後置された小文字「ｐ」により指定される。本明細書で開示されるプラスミドは市販され、無制限に公的に入手可能であり、または入手可能なプラスミドから、よく知られた、公表された手順のルーチン適用により構築可能である。多くのプラスミドならびに他のクローニングおよび発現ベクタはよく知られており、容易に入手可能であり、または当業者は、使用に好適な、任意の数の他のプラスミドを容易に構築することができる。これらのベクタは、好適な宿主細胞に形質転換され、ポリペプチドの生成のための宿主細胞ベクタ系が形成され得る。

【００６１】

ペプチドコードポリヌクレオチドは、細菌、酵母、昆虫、両生類、または哺乳類細胞における発現のために適合されたベクタに挿入することができ、これはペプチドをコードする核酸分子に機能的に連結された、細菌、酵母、昆虫、両生類、または哺乳類細胞における核酸分子の発現に必要な調節エレメントをさらに含む。「機能的に連結された」は、そのように記載される構成要素が、それらの所期の様式で機能することを可能にする関係となる並列を示す。コード配列に機能的に連結された発現制御配列は、ライゲートされ、よって、コード配列の発現が発現制御配列と適合可能な条件下で達成される。本明細書では、「発現制御配列」という用語は、それが機能的に連結されている核酸配列の発現を調節する、核酸配列を示す。発現制御配列は、発現制御配列が、核酸配列の転写、および必要に応じて、翻訳を制御し、調節する時には、核酸配列に機能的に連結されている。よって、発現制御配列は、適切なプロモータ、エンハンサ、転写ターミネータ、タンパク質コード遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ＡＴＧ）、イントロンのためのスプライシングシグナル（イントロンが存在する場合）、ｍＲＮＡの適正な翻訳を可能にするためのその遺伝子の正しい読み枠の維持、および終止コドンを含むことができる。「制御配列という用語は、少なくとも、その存在が発現に影響し得る構成要素を含むことが意図されており、および、その存在が有利である追加の構成要素、例えば、リーダ配列および融合パートナ配列も含むことができる。発現制御配列はプロモータを含むことができる。「プロモータ」により、転写に向かわせるのに十分な最小配列が意味される。プロモータ依存性遺伝子発現を、細胞型特異的、組織特異的、または外部シグナルまたは作用物質により誘導可能にするために制御可能にするのに十分なプロモータエレメントもまた、含まれ、そのようなエレメントは、遺伝子の５’または３’領域に位置し得る。構成的および誘導性プロモータの両方が含まれる。

【００６２】

医薬組成物（例えば、ワクチン）は、少なくとも１つの単離された免疫防御ネオエピトープペプチド（またはそのようなエピトープペプチドをコードするＲＮＡまたはＤＮＡ）と、薬学的に許容される担体とを含む。薬学的に許容される賦形剤は、例えば、希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤およびアジュバントを含む。本明細書では、「薬学的に許容される賦形剤」は当業者によく知られている。１つの実施形態では、医薬組成物は、活性成分の局所送達、例えば、腫瘍部位への直接送達を可能にする。

【００６３】

特定の実施形態では、医薬組成物は、１から１００の免疫防御ネオエピトープペプチド、特定的には、３から２０の免疫防御ネオエピトープペプチドを含む。別の実施形態では、医薬組成物は、１から１００の免疫防御ネオエピトープ、特定的には３から２０の免疫防御ネオエピトープを含有するポリペプチドを含む。別の態様では、医薬組成物は、１から１００の免疫防御ネオエピトープ、特定的には３から２０の腫瘍特異的免疫防御ネオエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む。

【００６４】

１つの実施形態では、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経鼻、経口、直腸、膣内、または腹腔内投与に好適な医薬組成物は、都合良く、活性成分の、レシピエントの血液と好ましくは等張な溶液との無菌水溶液を含む。そのような製剤は、都合良く、ペプチドを、生理的に適合可能な物質、例えば塩化ナトリウム（例えば、０．１－２．０Ｍ）、グリシン、などを含有し、生理条件と適合可能な緩衝されたｐＨを有する水に溶解し、水溶液を生成させ、前記溶液を無菌にすることにより調製することができる。これらは、単位または複数用量容器、例えば、密封されたアンプルまたはバイアル中に存在し得る。

【００６５】

追加の製薬方法が採用され、作用期間を制御することができる。放出制御調製物は、ペプチドまたは核酸を複合体化し、または吸収するポリマの使用により達成することができる。制御送達は、適切な巨大分子（例えばポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、または硫酸プロタミン）および巨大分子の濃度ならびに組み込みの方法を、放出を制御

するように選択することにより実施することができる。放出制御調製物により作用期間を制御するための別の可能な方法は、タンパク質、ペプチドおよびそれらの類似体を、ポリマ材料、例えばポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ乳酸）またはエチレンビニルアセテートコポリマの粒子中に組み込むことである。あるいは、これらの作用物質をポリマ粒子中に組み込む代わりに、これらの材料を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合により調製されたマイクロカプセル中、例えば、それぞれ、ヒドロキシ－メチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中、コロイド薬物送達系、例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル中、またはマクロエマルジョン中に封入することが可能である。

【００６６】

疾患部位への局所投与は、当技術分野で知られている手段、例えば、限定はされないが、局所適用、注射、およびペプチドを組換えにより発現する細胞を含有する多孔性装置の埋め込み、ペプチドが含有されている多孔性装置の埋め込みにより達成することができる。

【００６７】

１つの実施形態では、免疫防御ネオエピトープペプチドまたはポリヌクレオチドは、癌患者の細胞と、例えば、混合またはパルス処理により混合され、その後、混合またはパルス処理された細胞が癌患者に投与される。

【００６８】

１つの実施形態では、ワクチン組成物は、免疫調整剤をさらに含む。例示的な免疫調整剤は、ＴＬＲリガンド、例えば、ＣｐＧオリゴヌクレオチドＤＮＡ（ＴＬＲ９リガンド）、リポペプチドおよびリポタンパク質（ＴＬＲ１およびＴＬＲ２リガンド）、ポリＩ：Ｃおよび二本鎖ＲＮＡ（ＴＬＲ３リガンド）、リポ多糖（ＴＬＲ４リガンド）、ジアシルリポペプチド（ＴＬＲ６リガンド）、イミキモド（ＴＬＲ７リガンド）、およびＴＬＲリガンドの組み合わせを含む。別の例示的な免疫調整剤は、抗体、例えば抗細胞傷害性Ｔリンパ球抗原－４抗体（抗ＣＴＬＡ－４）、またはＰｒｏｇｒａｍｍｅｄ　Ｄｅａｔｈ　１（ＰＤ１）もしくはＰＤ１リガンドをブロックする抗体である。

【００６９】

免疫調整剤の組み合わせもまた企図される。例は、ワクチンと、ＴＬＲリガンドおよび抗ＣＴＬＡ４抗体、またはＣｐＧおよびＰＤ１をブロックする抗体との組み合わせである。

【００７０】

免疫原性組成物は、任意でアジュバントを含む。アジュバントは一般に、宿主の免疫応答を非特異的様式でブーストする物質を含む。アジュバントの選択は、ワクチン接種される被験体に依存する。好ましくは、薬学的に許容されるアジュバントが使用される。例えば、ヒトのためのワクチンは、完全および不完全フロインドアジュバントを含む、油または炭化水素エマルジョンアジュバントを回避しなければならない。ヒトとの使用に好適なアジュバントの１つの例はミョウバン（アルミナゲル）である。

【００７１】

１つの実施形態では、医薬組成物は、１つ以上の免疫防御ネオエピトープペプチド、免疫防御ネオエピトープを含む１つ以上のポリペプチド、または１つ以上の免疫防御ネオエピトープをコードする１つ以上のポリヌクレオチドと、薬学的に許容される担体とを含み、推定ネオエピトープセットは、公知の発癌経路由来のエピトープを含まず、推定ネオエピトープセットは、癌患者由来の腫瘍に特異的であり、計算または実験により決定される、ＭＨＣ　ＩまたはＭＨＣ　ＩＩタンパク質に結合された各免疫防御ネオエピトープの立体構造安定性は、各対応する野生型エピトープに比べて高い。

【００７２】

本明細書では、患者は哺乳類、例えばマウスまたはヒト、特定的にはヒト患者である。

【００７３】

本明細書で記載される組成物および方法は全ての癌に適用可能であり、固形腫瘍癌、例えば、乳房、前立腺、卵巣、肺および脳のもの、ならびに液性癌、例えば白血病およびリンパ腫が含まれる。

【００７４】

本明細書で記載される方法は、追加の癌療法、例えば放射線療法、化学療法、外科手術、およびそれらの組み合わせとさらに組み合わせることができる。

【００７５】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに説明される。

【実施例】

【００７６】

［材料および方法］

マウスおよび腫瘍．ＢＡＬＢ／ｃＪマウス（６－８週齢雌）を、ジャクソン研究所（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）（バーハーバー、ＭＥ）から購入した。マウスをコネチカット大学ヘルスセンターのウイルスを含まないマウス施設で維持した。

【００７７】

サンプル調製．サンプルを「ｍＲＮＡのシークエンシングのためのサンプル調製（“Ｐｒｅｐａｒｉｎｇ　Ｓａｍｐｌｅｓ　ｆｏｒ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｏｆ　ｍＲＮＡ”）」（品番１００４８９８Ｒｅｖ．Ａ　２００８年９月）で概説されたイルミナ（登録商標）プロトコルを用いて調製した。プロトコルは、２つの部分から構成される：ｃＤＮＡ合成およびペアエンドライブラリ調製。最初に、ｍＲＮＡを磁性オリゴ（ｄＴ）ビーズを用いて全ＲＮＡから精製し、その後、二価カチオンを用いて高温下において断片化した。ｃＤＮＡを、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩ（インビトロジェン）を用いて断片化ｍＲＮＡから合成し、続いて第２鎖合成を実施した。ｃＤＮＡ断片端を、Ｋｌｅｎｏｗ、Ｔ４ＤＮＡポリメラーゼおよびＴ４ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、修復し、リン酸化させた。次に、「Ａ」塩基を平滑化された断片の３’端に付加し、続いてＴ－Ａ媒介ライゲーションによるイルミナ（登録商標）ペアエンドアダプタのライゲーションを実施した。ライゲートされた産物を、ゲル精製によりサイズ選択し、その後、イルミナ（登録商標）ペアエンドプライマを用いてＰＣＲ増幅させた。ライブラリサイズおよび濃度は、アジレントバイオアナライザを用いて決定した。

【００７８】

ＧＡＩＩ実行条件．ＲＮＡ－ｓｅｑライブラリをフローセル上に８ｐＭでシーディングし、およそ２８２Ｋ～３８４Ｋクラスタ／タイルを得た。ライブラリを６１サイクルの化学およびイメージングを用いてシークエンシングした。

【００７９】

シークエンシングデータの解析．初期データ処理およびベースコールは、クラスタ強度の抽出を含めて、ＲＴＡ（ＳＣＳバージョン２．６およびＳＣＳバージョン２．６１）を用いて実施した。配列品質フィルタリングスクリプトは、イルミナ（登録商標）ＣＡＳＡＶＡソフトウェア（ｖｅｒ１．６．０、イルミナ（登録商標）、ヘイワード、ＣＡ）において実施した。

【００８０】

Ｅｐｉ－Ｓｅｑバイオインフォマティクスパイプライン．ハイスループットｍＲＮＡシークエンシングデータ（ＲＮＡ－Ｓｅｑ）から腫瘍特異的エピトープを同定するために使用される、バイオインフォマティクスパイプラインの高レベル表現が図１で示される。パイプラインは、ＲＮＡ－Ｓｅｑリードを、サンガーマウスゲノムプロジェクトからダウンロードされた系統特異的ゲノム配列およびＣＣＤＳアノテーションに由来する系統特異的一倍体転写物ライブラリに対してマッピングすることにより開始する。ＣＭＳ５およびＭｅｔｈ　Ａ細胞株に対するＢＡＬＢ／ｃゲノム／トランスクリプトーム配列を使用した。データベースＳＮＰ多型は除去した。ｍｍ９参照ゲノムと比較する代わりに、そうしてｄｂＳＮＰ内のＳＮＰを排除し、我々は、系統ＳＮＶをｍｍ９参照ゲノムに適用することにより系統特異的ゲノムを作製した。ＳＮＶをマウスゲノムからダウンロードした。作製し

たゲノムを使用して、リードをマッピングし、変異をコールした。リードを、Ｂｏｗｔｉｅを使用し、デフォルトシード長２８、シード中の最大ミスマッチ２、およびミスマッチ位置におけるｐｈｒｅｄ品質スコアの最大合計１２５を用いてマッピングした。マッピングの最初のラウンド後に、ミスマッチ統計を各リード位置および各サンプルに対して計算した（Ｍｅｔｈ　Ａサンプルに対しては図２）。この分析に基づいて、５’端から２塩基および３’端から１０塩基を全てのアラインメントされたリードからクリッピングした。得られたリードアラインメントを、ＨａｒｄＭｅｒｇｅアルゴリズムを用いてマージさせた。ＨａｒｄＭｅｒｇｅは、ゲノムおよび／またはトランスクリプトーム中の複数の位置にアラインメントするリード、ならびに両方に対して一意的であるが、一致しない位置でアラインメントするリードを棄却する。ライブラリ調製中、ＰＣＲ増幅により導入されるバイアスの影響を低減するために、同じゲノム位置でアラインメントが開始する複数のリードをそれらのコンセンサスと置き換えた。ＳＮＶＱアルゴリズムをその後使用して、アラインメントされたリードのフィルタリングされたセットから、一ヌクレオチドバリアント（ＳＮＶ）をコールした。ＳＮＶＱはベイズルールを使用して、塩基品質スコアを考慮に入れながら、最高確率を有する遺伝子型をコールする。高信頼度のＳＮＶを、それぞれコールされた遺伝子型に対する最小ｐｈｒｅｄ品質スコア５０、別のアレルを支持する最低３リードを、各鎖上での少なくとも１つのリードマッピングと共に要求することにより選択した。コールされたＳＮＶ遺伝子型のハプロタイプ推論を、リードの証拠を使用して、近位ＳＮＶのブロックをフェージングする、ＲｅｆＨａｐ単一個体ハロタイピングアルゴリズムを用いて実施した。これらの実験に用いられた近交系マウスにおける残存するヘテロ接合性は低いと予測されるので、特有のヘテロ接合性ＳＮＶは、新規体細胞変異だと考えられた。同じゲノムバックグラウンドを有する１を超える腫瘍に共通のホモ接合性ＳＮＶならびにヘテロ接合性ＳＮＶは、生殖系列変異であると想定し、特有のヘテロ接合性ＳＮＶの近傍に位置していない限り、エピトープ予測には使用しなかった。各特有のヘテロ接合性ＳＮＶに対し、参照および別のペプチド配列を、２つの推論されたハプロタイプに基づいて各ＣＣＤＳ転写物対して作製した。作製したアミノ酸配列にはその後、ＮｅｔＭＨＣ３．０エピトープ予測プログラムを実行し、プロファイル重み行列（ＰＷＭ）アルゴリズムを使用し、デフォルト検出閾値を用いてスコア付けした。

【００８１】

結合アッセイ．ペプチドのＨ－２Ｋ^{d}に対する結合を、放射標識された標準ペプチドの精製ＭＨＣ分子に対する結合の阻害に基づく定量的アッセイを用いて、本質的に前に記載される通りに決定した。ペプチドを典型的には、１００，０００倍用量範囲をカバーする６つの異なる濃度で、３つ以上の独立したアッセイで試験した。用いられた条件下では、［標識］＜［ＭＨＣ］およびIC_{50}≧［ＭＨＣ］であり、測定されたＩＣ５０値は、解離定数値の合理的な近似値である。

【００８２】

ＦＡＣＳおよびエリスポットによる細胞内ＩＦＮ－γアッセイ．リンパ球を１－１０μｇ／ｍｌペプチド有りまたは無しでインキュベートした。ＧｏｌｇｉＰｌｕｇ（商標）（ＢＤバイオサイエンス、サンノゼ、ＣＡ）を１時間後に添加した。１２から１６時間のインキュベーション後、細胞を、ＣＤ４４（クローンＩＭ７）、ＣＤ４（クローンＧＫ１．５）およびＣＤ８（クローン５３－６．７）（ＢＤバイオサイエンス、サンノゼ、ＣＡ）について染色し、Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍ（商標）キット（ＢＤバイオサイエンス、サンノゼ、ＣＡ）を用いて固定および透過処理し、細胞内ＩＦＮ－γについてフィコエリトリン結合抗マウスＩＦＮ－γ（クローンＸＭＧ１．２、ＢＤバイオサイエンス、サンノゼ、ＣＡ）を用いて染色した。細胞を、１μｌ抗体／１００万細胞により、５０μｌ染色緩衝液（１％ウシ血清アルブミンを有するＰＢＳ）中で染色し、２０分間４℃で暗闇にて、または製造者の指示に従いインキュベートした。ペプチド刺激のない細胞を陰性対照として使用した。これらの対照に対する値は陰性対照ペプチドで見られる値と非常に近似した。典型的には、９５，０００－１２９，０００リンパ球（１４，５００－１７，０００ＣＤ８＋ＣＤ４－細胞）を取得した。バックグラウンドは一貫して非常に低い（シ

グナルの１０％）。

【００８３】

エリスポットアッセイでは、陰性対照をペプチド刺激のない免疫化マウス由来のＣＤ８＋細胞とした。ペプチド刺激したウェルからのスポットが、マン・ホイットニ検定により、同族ペプチド刺激なしのウェルと比較して著しく高い場合、ペプチドは陽性または免疫原性であると考えた。応答の大きさを１００万ＣＤ８＋細胞あたりの平均スポット数により評価した：５－１０（＋）、１１－２０（＋＋）、２１－５０（＋＋＋）、５１－１００（＋＋＋＋）および＞１００（＋＋＋＋＋）。

【００８４】

腫瘍チャレンジおよび腫瘍増殖の表現．腫瘍増殖を測定するためのツールとしてのＡＵＣが前に記載されている。簡単に言うと、ＡＵＣは、Ｐｒｉｓｍ５．０（ＧｒａｐｈＰａｄソフトウェア社（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，　Ｉｎｃ．）、ラホーヤ、ＣＡ）を用いて、「曲線と回帰（Ｃｕｒｖｅｓ＆Ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ）」を選択し、その後「曲線下面積（Ａｒｅａ　ｕｎｄｅｒ　ｃｕｒｖｅ）」を「分析（ａｎａｌｙｚｅ）」ツールから選択することにより、計算した。グラブス検定を使用し、最大１つまでの外れ値を各群から除去した。

【００８５】

Ｔ細胞サブセットの枯渇．免疫化マウスを、抗ＣＤ８ラットＩｇＧ２ｂモノクローナル抗体２．４３）を使用してＣＤ８細胞を枯渇させ、または抗ＣＤ４ラットＩｇＧ２ｂモノクローナル抗体ＧＫ１．５を使用してＣＤ４細胞を枯渇させた。枯渇性抗体をＰＢＳ中で、腹腔内で、腫瘍チャレンジ２日前に、実験の期間の間７日毎に与えた。枯渇性抗体の最初の３回の注射は、マウス一匹あたり２５０μｇとし、後に、注射を、マウス一匹あたり５００μｇとした。アンタゴニスト抗体による処置では、マウスを抗ＣＤ２５抗体（クローンＰＣ６１、２５０μｇ、腫瘍チャレンジ２日前）または抗ＣＴＬＡ－４抗体（クローン９Ｄ９、１００μｇ、腫瘍チャレンジ７日前およびチャレンジ後３日毎）で処置した。適切なＴ細胞サブセットは９５％超枯渇した。

【００８６】

ペプチド／Ｈ－２Ｋ^{d}複合体のモデリング．ペプチド／Ｈ－２Ｋ^{d}複合体のモデルを、免疫原性エピトープを同定するために使用されるコリンズ（Ｃｏｌｌｉｎｓ）および同僚による前の方法を適合させることにより構築した。ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に基づいて開発されたが、アプローチは、一般に、一般的なクラスＩ　ＭＨＣ構造特徴を利用して、クラスＩ　ＭＨＣタンパク質に概して適用可能である。

【００８７】

各複合体の最初のモデルをＭＯＤＥＬＬＥＲにより作製し、「構築変異体」機能性をアクセルリスディスカバリースタジオ（Ａｃｃｅｌｒｙｓ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｔｕｄｉｏ）において実行した。プロトコルはタンパク質の重原子表現を使用し、エネルギ最小化および分子動力学／シミュレートアニーリングと組み合わされたホモロジ由来の制限を含む。Ｈ－２Ｋ^{d}に結合されたＦｌｕペプチドの構造を鋳型として使用した。各変化した残基の４．５Å以内の原子は、モデリング中にリパックさせることができた。各ｐＭＨＣでは、１００の最初のモデルを作製し、この最初のセットからの最低エネルギモデルを、より徹底的な、第二相の完全原子シミュレートアニーリングおよび分子動力学に供した。第二相では、水素を添加した後、構造を１５００Ｋまで、２００ｐｓのシミュレーションにわたって加熱し、続いて３００Ｋまで８００ｐｓにわたって冷却した。アニールされた構造をその後、５つの独立した１０ｎｓ分子動力学ランに、３００Ｋで供し、各時間は、第二相アニーリング工程から得られた構造と共に開始した。

【００８８】

第二相動力学計算は全て、Ｎｖｉｄｉａ　ＧＰＵアクセラレータ上で実行するＡＭＢＥＲ１２を用いて実施した。ｆｆ９９ＳＢ力場を２ｆｓ時間工程と共に使用した。溶媒を暗に一般化ボルンモデルを使用して処理し、サンプリングを加速させた。ＳＨＡＫＥアルゴリズムを使用して、水素への全ての結合を制約した。２０ｋｃａｌ／ｍｏｌ調和制限を、

α１およびα２ヘリックス（残基５６－８５および１３８－１７５）に適用した。２つの追加の２０ｋｃａｌ／ｍｏｌ距離制限をペプチドのＮおよびＣ末端の水素結合に適用した。第１はＰ１バックボーン酸素と、Ｈ－２Ｋ^{d}のＴｙｒ１５９のヒドロキシルの間であった。第２は、Ｐ８バックボーン酸素とＨ－２Ｋ^{d}のＴｒｐ１４７の環窒素の間であった。陽性対照として、手順のシミュレートアニーリングおよび分子動力学工程をＫ^{d}により提示されたＨＢＶペプチドの構造に対して実施した。図６Ｂおよび４Ｄにおいて示されるように、ウイルスペプチドは、Ｋ^{d}結合溝内で比較的リジッドであると予測した。

【００８９】

図６Ｂのデータでは、平均ペプチド構造を、各ｐＭＨＣに対し５０ｎｓのシミュレーションデータから計算し、変異およびＷＴペプチドの対の全ての共通の原子を重ね合わせ、ＲＭＳＤを作製した。図６Ｃ－Ｅおよび図９のデータでは、二乗平均平方根ゆらぎを、５０ｎｓのシミュレーションから、ペプチドのα炭素に対して計算した。

【００９０】

統計解析．群比較のためのＰ値を、両側ノンパラメトリックマン・ホイットニ検定を用い、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ５．０（ＧｒａｐｈＰａｄソフトウェア社、ラホーヤ、ＣＡ）を用いて計算した。腫瘍拒絶アッセイについては、グラブス検定を使用し、最大１つまでの外れ値を各群から除去した。フィッシャ直接確率法を使用して、カテゴリパラメータの対間の関係を試験した。ピアソン相関係数の統計学的有意性を当技術分野で知られている両側スチューデントｔ検定を用いて計算した。

【００９１】

図９および１０は、それぞれ、図３および図８Ｃに対する、ＦＡＣＳゲーティング戦略および代表的な主要データを示す。

【００９２】

［結果］

トランスクリプトームからイムノームへ．メチルコラントレン誘発線維肉腫、ＣＭＳ５（ＢＡＬＢ／ｃ、ｄハプロタイプ）を、主要ワークホースとして使用し、結果を様々な程度まで、別の化学的に誘発した（Ｍｅｔｈ　Ａ）マウス腫瘍ならびにいくつかのヒト癌と、交差試験した。ＣＭＳ５肉腫は、この腫瘍が最初に生じた一次宿主であるとして、よく特徴付けされている。同系宿主において致死的となるのは漸進的に増殖する腫瘍である。ＣＭＳ５系統に対するＣＴＬは、単一の免疫原性および腫瘍防御ネオエピトープの同定に導いた。

【００９３】

ＣＭＳ５およびＭｅｔｈ　Ａにおいて発現される遺伝子の変異を特定的に同定するために、ゲノムまたはエクソームシークエンシングではなく、トランスクリプトームシークエンシングを選択した。大まかに言って、得られたｃＤＮＡ配列を正常マウス配列と比較し、一ヌクレオチドバリアント（ＳＮＶ）を同定した（表１）。図１はバイオインフォマティクス的パイプラインを示し、図２および表２は、この分析のために作成された品質管理工程を示す。このパイプラインは、Ｅｐｉ－Ｓｅｑと名付けられ、ｈｔｔｐ：／／ｄｎａ．ｅｎｇｒ．ｕｃｏｎｎ．ｅｄｕ／ｓｏｆｔｗａｒｅ／Ｅｐｉ－Ｓｅｑにおいてアクセス可能である。ＳＮＶを、ＮｅｔＭＨＣアルゴリズムを使用して、マウスＨ－２Ｋ、ＤまたはＬアレルのＭＨＣ　Ｉに限定されるエピトープを生成させるそれらの可能性について分析した。エピトープの完全リストを、それぞれ、Ｋ^{d}、Ｄ^{d}、およびＬ^{d}に対して、８．７２、８．０８、および８．１９の、弱いバインダに対するデフォルトＮｅｔＭＨＣ３．０ＰＷＭペプチド結合スコア閾値に基づきフィルタリングした。これらの閾値を使用して、ＣＭＳ５およびＭｅｔｈ　Ａが、それぞれ、１１２および８２３の可能性のあるエピトープを有することを観察し（データ示さず）、これらの２つの系統で同定されたエピトープの数の差は、それらのトランスクリプトームがシークエンシングされた深度の反映である（表１）。推定ネオエピトープは、全ゲノムにわたってランダムに分散される。

【００９４】

【表１】

表1. トランスクリプトームシークエンシングおよびバイオインフォマティクス的分析から推定された、腫瘍系統および原発腫瘍の一ヌクレオチドバリアントおよび予測されたエピトープ

マウス系統	BALB/c	
腫瘍型	Meth A	CMS5
RNA-Seq リード(100万)	105.8	23.4
マッピングされたゲノム	75%	54%
マッピングされたトランスクリプトーム	83%	59%
マッピングされた HardMerge	65%	48%
PCR 増幅フィルタリング後	18%	22%
HardMerge およびフィルタリングされた、マッピングされた塩基(Gb)	1.15	0.24
CCDS エクソンにおける高品質ヘテロ接合型 SNV*	1,528	208
腫瘍特異的	1,504	191
非同義的	77.1%	78.5%
ミスセンス	1,096	146
ナンセンス	63	4
終止コドンなし	1	–
NetMHC により予測されたエピトープ**	823	112
H2 K^d に限定	203	15
H2 D^d に限定	328	58
H2 L^d に限定	292	39

*同定された変異の数はシークエンシング深度に依存する。

**それぞれ、K^d、D^d、およびL^dアレルに対して、8. 72、8. 08、および8. 19の、弱いバインダに対する、デフォルトNetMHC3. 0PWMペプチド結合スコア閾値に基づく。

【００９５】

【表２】

表2. Meth A RNA－Seqリードの3つのレーンに対する、SNVのマッピング、およびNetMHCにより予測されたエピトープの統計

RNA-Seq レーンの番号	1	2	3
RNA-Seq リード(100 万)	35.9	62.9	105.8
マッピングされたゲノム	75%	86%	75%
マッピングされたトランスクリプトーム	83%	95%	83%
マッピングされた HardMerge	66%	75%	65%
PCR 増幅フィルタリング後	27%	24.89%	18%
HardMerge およびフィルタリングされた、マッピングされた塩基(Gb)	0.59	0.94	1.15
CCDS エクソンにおける高品質ヘテロ接合型 SNV	958	1,342	1,504
非同義的	75.9%	76.5%	77.1%
ミスセンス	691	971	1,096
ナンセンス	35	55	63
終止コドンなし	1	1	1
NetMHC により予測されたエピトープ	537	729	823
H2 K^d に限定	116	182	203
H2 D^d に限定	222	280	328
H2 L^d に限定	199	267	292

【００９６】

これらのマウス腫瘍におけるＭＨＣ　Ｉに限定されるネオエピトープの数が、実際の原発性ヒト腫瘍において予想される範囲内にあるかどうかを決定するための試みがなされた。いくつかのヒトメラノーマのエクソーム配列の分析およびそれらの、バイオインフォマティクス的パイプラインによる対応する正常配列との比較は、メラノーマあたり数百もの推定ネオエピトープを明らかにする（表３）。同様に、１４のヒト前立腺癌および正常組織のトランスクリプトームシークエンシングに由来する変異のリストにより、一般的なＨＬＡアレルに対する１４の推定エピトープ（範囲２－８２）の中央値の同定が得られた（表４）。前立腺癌におけるより少ない数のネオエピトープは、それらがメラノーマと比べて比較的少ない数の変異を有するという事実と関連する。自然起源のＢ１６メラノーマ系統に対する公表されたデータもまた、１００を超えるＭＨＣ　Ｉに限定されるネオエピトープの存在を明らかにする。これらの測定により、それらのマウスまたはヒト起源に関係なく、かつ原因に関係なく、腫瘍はかなりの数の候補のＭＨＣ　Ｉに限定されるネオエピトープを有することが示される。

【００９７】

【表３】

表3. ヒトメラノーマに対する腫瘍特異的多型およびエピトープ*

サンプル	Weiら2011(13)において報告された体細胞変異						NetMHCにより予測されたエピトープ**			
	UCSCアノテーションにおいて同義的/非同義的		CCDSコーディング領域内の非同義的変異(A)のサブセット				合計	A0101	A0201	A0301
	同義的	非同義的 (A)	合計	非同義的*	ミスセンス	ナンセンス				
01T	160	304	292	291	272	12	473	26	262	185
05T	56	115	106	106	100	6	175	12	116	47
09T	39	83	81	80	76	4	131	5	77	49
12T	427	741	706	705	656	49	1193	50	657	486
18T	91	190	179	179	168	11	286	15	144	127
22T	69	126	116	115	108	7	181	20	94	67
24T	163	397	381	379	358	21	625	26	263	336
35T	13	34	32	32	31	1	68	1	44	23
43T	68	94	91	91	86	5	175	4	90	81
51T	51	136	126	126	117	9	229	7	148	74
60T	67	129	121	120	112	8	209	14	91	104
91T	99	215	209	209	196	13	329	18	176	135
93T	54	130	125	124	116	8	184	6	105	73
96T	68	118	112	112	103	9	192	10	101	81

*Weiら2011により公表された変異データから計算され、図S1において概要が示されたEpi－Seqパイプラインのエピトープ予測工程を使用して、変異データに基づいてエピトープをコールした。

**最も一般的なHLAアレルをそのようなアレルの公表された頻度に従い、選択した。

【００９８】

【表４】

表4. ヒト前立腺癌に対する腫瘍特異的多型およびエピトープ
*Renら2012(14)により公表された変異データから計算され、図S1において概要が示されたEpi－Seqパイプラインのエピトープ予測工程を使用して、変異データに基づいてエピトープをコールした。

腫瘍サンプル	Renら2012(14)において報告された体細胞変異						NetMHC により予測されたエピトープ			
	UCSC アノテーションにおいて同義的/非同義的		CCDS コーディング領域内の非同義的変異のサブセット				合計	A1101	A2402	A0201
	同義的	非同義的	合計	ヘテロ接合型	ミスセンス	ナンセンス				
1T	7	10	10	10	9	1	9	4	0	5
2T	4	3	2	2	2	0	4	4	0	0
3T	7	4	3	3	3	0	10	5	1	4
4T	5	3	3	3	3	0	2	2	0	0
5T	4	7	7	7	7	0	18	12	2	4
6T	3	5	5	5	4	1	3	1	0	2
7T	2	3	2	2	2	0	2	1	1	0
8T	20	44	40	40	38	2	82	42	7	33
9T	13	22	18	18	16	2	30	13	0	17
10T	20	32	29	29	28	1	36	20	3	13
11T	6	13	9	9	9	0	17	8	2	7
12T	3	11	10	10	10	0	28	13	5	10
13T	2	5	5	5	5	0	9	2	3	4
14T	19	32	29	29	24	5	53	25	8	20

【００９９】

ネオエピトープの不均一さ．Ｍｅｔｈ　Ａ細胞をクローン化し、３０の別々のクローンを、ランダムに選んだ４つのＳＮＶについて試験した（Ｔｎｐｏ３、ＮＦｋｂ１、Ｐｒｐ３１およびＰｓｇ１７）。予想外に、単一のＳＮＶ以外の全てがクローン全てにおいて検出され、単一のＳＮＶは試験した２９／３０クローンにおいて検出された。理論に固執しないが、抗原不均一さのこの明らかな欠如は、シークエンシングの比較的浅い深度に帰せられる。癌細胞株は原発腫瘍よりも低い抗原不均一さを示すこともあり得る。最も重要なことには、これらの結果から、癌細胞の間で最も広く分配されているネオエピトープを同定する方法として、比較的浅いシークエンシングを使用することが可能であることが示唆される。

【０１００】

インシリコで同定されたネオエピトープの免疫原性．分析の複雑さを低減させるために、注意を全３つのアレルに対する９３５の合計リストから、２１８のＫ^{d}に限定されるエピトープ（組み合わせたＭｅｔｈ　ＡおよびＣＭＳ５に対する）に向けた（表３）。免疫学的分析のために使用された変異は全て、個々にサンガーシークエンシングにより確認した。

【０１０１】

ネオエピトープを、Ｋ^{d}－結合に対するそれらのＮｅｔＭＨＣスコアの降順でランク付けした。ＣＭＳ５からの上位７つのネオエピトープおよびＭｅｔｈ　Ａからの上位１１を表５に示す。この表はまた、ネオエピトープに対応する野生型（ＷＴ）ペプチドのＮｅｔＭＨＣスコアを示す。これらの１８の推定ネオエピトープおよびそれらのＷＴ対応物に対応するペプチドを合成し、全てのペプチドのＫ^{d}に対する親和性（ＩＣ５０値）を、方法

において記載されるように、実験的に決定した。（ＮｅｔＭＨＣスコアおよび実験的に決定したＩＣ５０値は著しく相関した、ｒ＝－０．４４、両側ｔ検定Ｐ＜０．００１）。１８の上位ランクのネオエピトープうちの１０（５６％）は５００ｎＭまたはそれより良好な親和性でＫ^{d}に結合し、および７／１８（３９％）は、１００ｎＭまたはそれより良好な親和性で結合した。

【０１０２】

【表５】

表4. 最高NetMHCPWMスコアを有するCMS5およびMeth Aエピトープ

最高NetMHCスコアを有するCMS5エピトープ

遺伝子	Mut/WT 配列	SEQ ID NO:	Mut/WT スコア	K^dに対する測定されたIC50(Mut/WT)	ICS	エリスポット	腫瘍拒絶
Ssx2ip	CYAK(v/L)KEQL	6/7	14.5/14.1	26/3.2	−	−	−
Mapk1.1	(q/K)YIHSANVL	8/9	13.2/12.4	57/0.2	−	−	−
Farsb	HY(v/L)HIIESKPL	10/11	13/13.6	423/52	+	−	−
Ncoa3	(h/Q)YLQYKQEDL	12/13	11.5/11.7	2162/54074	−	−	−
Mapk1.2	(q/K)YIHSANV	14/15	11.4/10.7	2135/295	−	−	−
Mapk1.3	LYQILRGL(q/K)YI	16/17	11.3/11	110/333	−	+++++	−
Serinc1	NYLLSLVAV(m/V)L	18/19	11/10.2	2679/20861	−	+++++	−

【０１０３】

【表６】

最高NetMHCスコアを有するMeth Aエピトープ

遺伝子	Mut/WT 配列	SEQ ID NO:	Mut/WT スコア	K^dに対する測定されたIC50(Mut/WT)	ICS	エリスポット	腫瘍拒絶
Usp12	SY(I/R)VVFPL	20/21	14.2/12.3	6835/1155	−	+++++	−
Tfdp1	QYSGS(w/R)VETPV	22/23	14.2/15.3	−*/603	−	−	−
Ufsp2	HYINM(i/S)LPI	24/25	14.2/14.5	0.23/+++**	+	+++++	−
Apc	AYCETCWE(I/W)	26/27	14/8.1	23/60	+	+++++	−
Hspg2	SY(I/Q)LGSGEARL	28/29	14/14.4	2623/79	−	−	−
Ccdc85c	TYIRP(f/L)ETKV	30/31	13.5/13.1	6155/118	−	−	−
Pacs2	HYLS(s/A)ILRL	32/33	13.4/12.7	41/1269	−	−	−
Alms1.1	(I/S)YLDSKSDTTV	34/35	13.3/15.2	79/16	+	−	−
Alms1.2	YYVPLLKRVP(I/S)	36/37	13.3/7.3	421/1485	−	++	−
Ckap5	K(y/D)MSMLEERI	38/39	13.2/1.7	17/7686	+	−	−
Abr	GYFVSKAKT(s/R)V	40/41	13.1/12.8	958/570	+	−	−

IC50についての注意：*－はIC50＞70，000nMを示し、**＋＋＋－はIC50＜0．1nMを示す

エリスポット結果についての注意：1－9スポット／10^6CD8＝＋、10－20スポット／10^6CD8＝＋＋、21－50スポット／10^6CD8＝＋＋＋、51－100スポット／10^6CD8＝＋＋＋＋、＞100スポット／10^6CD8＝＋＋＋＋＋

【０１０４】

１８のペプチド全てを使用して、ＢＡＬＢ／ｃマウスを免疫化した。免疫化マウスの流入領域リンパ節（ｄＬＮ）を、単一免疫化後１週間で採取し、細胞をインビトロで１６時間の間、追加のペプチド、免疫化のために使用した変異ペプチド、または対応する野生型ペプチドなしで刺激した。ＣＤ８＋細胞を活性化（ＣＤ４４＋）およびエフェクタ機能（細胞内ＩＦＮγ＋）について分析した。（ＦＡＣＳ分析の詳細に関する材料および方法を参照されたい）。免疫－反応性の全ての可能なパターンを観察した（図３Ａ）：免疫応答なし（１２／１８）、変異ペプチド特異的、すなわち腫瘍特異的免疫応答（５／１８）、

および変異ペプチドと対応する野生型ペプチドの間の交差反応性応答（１／１８）。結局、インシリコで同定された、ネオエピトープ候補の６／１８または３３％が実際に、機能的エフェクタＴ細胞をインビボで惹起した。ＩＦＮγエリスポットアッセイにより分析すると、３つの追加のネオエピトープが免疫原性を示し、合計、９／１８または５０％となった。

【０１０５】

５００ｎＭまたはそれより良好なＫ^{d}－結合親和性を有する１０のペプチドのうち、５または５０％を、実験的に免疫原性であると決定した。１００ｎＭまたはそれより良好なＫ^{d}－結合親和性を有する７のペプチドのうち、４または５７％が免疫原性であった。５００ｎＭまたはそれより悪いＫ^{d}－結合親和性を有する１つのペプチドのみが免疫原性であった。

【０１０６】

ＷＴペプチドの免疫原性の欠如．ネオエピトープの免疫原性について試験したが、それらのＷＴ対応物も同様に試験した（図３Ｂ）。驚いたことに、変異ネオエピトープと同様に（図３Ａ）、免疫－反応性の全ての可能なパターンを観察した（図３Ｂ）：免疫応答なし（１１／１８）、ＷＴペプチド特異的免疫応答（５／１８）、および変異ペプチドと対応する野生型ペプチドの間の交差反応性応答（２／１８）。結局、インシリコで同定されたネオエピトープ候補のＷＴ対応物の７／１８または３９％が機能的エフェクタＴ細胞をインビボで惹起した（Ａｌｍｓ１．１、Ａｌｍｓ１．２、Ａｂｒ、Ｃｃｄｃ８５ｃ、Ｆａｒｓｂ、Ｍａｐｋ１．２、Ｕｆｓｐ２、表５を参照されたい）。

【０１０７】

これは、Ｔ細胞レパートリのスカルプティングにおける負の選択の強い役割を考慮すると、依然として驚いたことに大部分の自己反応性ペプチドである。免疫原性であるＷＴペプチドが、エクスビボアッセイでは免疫原性を示しているが、機能的に寛容化されている可能性を試験した。理論に固執しないが、ごく一部の低親和性自己反応性Ｔ細胞が負の選択を免れた場合、それらは依然として自己ペプチドによる免疫化での程度までクローン的に拡張され得るが、そのような拡張は、自己限定的であることを証明するであろうことを仮定した。よって、ナイーブマウスを、ペプチドで免疫化し、続いて２回目の免疫化を実施し、ナイーブマウス、１回免疫化マウス、および２回免疫化マウスにおける応答を比較した。卵白アルブミン由来Ｋ^{b}－結合エピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）を陽性対照として使用し、実際、抗ＳＩＩＮＦＥＫＬ　ＣＤ８応答の大きさは２回目の免疫化により増幅された（図３Ｃ）。この同じ現象を、変異ネオエピトープＴｎｐｏ３で観察した。しかしながら、試験された４／４ＷＴペプチドによる２回目の免疫化は、応答の増幅を惹起しなかった。実際に、２回目の免疫化後に検出された応答は、最初の免疫化後の応答と比べて、著しく減少された。このストリンジェントな判断基準により、１つのＷＴペプチドも、免疫原性であると観察されなかった。

【０１０８】

最強Ｋ^{d}－結合ネオエピトープの免疫防御活性の欠如．１８のネオエピトープ全て（表５）を、それらのＣＭＳ５またはＭｅｔｈ　Ａの腫瘍拒絶を惹起する能力について試験した。ＢＡＬＢ／ｃマウスを、個々のペプチドで免疫化し、適切な腫瘍で、最終免疫化の１週間後にチャレンジした。いずれのペプチドも腫瘍拒絶を惹起しなかった（図４Ａ）。興味深いことに、我々により同定されたネオエピトープの１つ、Ｍａｐｋ１（表４においてＭａｐｋ１．１、１．２および１．３として列挙される）はまた、ＣＭＳ５肉腫において、腫瘍拒絶抗原として先行技術により同定された。それによる免疫化は、原論文で惹起しなかったのと全く同じように、我々の方法では腫瘍拒絶を惹起しない。原論文の著者は、「ＩＬ－１２治療は、この系において抗腫瘍免疫を示すためには必須であり、というのも、外因性ＩＬ－１２なしで、９ｍでパルス処理された脾臓細胞を用いてワクチン接種されたマウスはＣＭＳ５チャレンジに対する抵抗性を示さなかった」ことを指摘した。これは我々のパイプラインの意図的でない妥当性確認となり、また、非常にストリンジェントな腫瘍拒絶アッセイを我々の分析で使用したという事実を強調する。

【０１０９】
差分アグレトープ性（Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ａｇｒｅｔｏｐｉｃｉｔｙ）．上記結果から、ＮｅｔＭＨＣスコアは免疫原性または腫瘍拒絶の有益な予測因子ではないことが明らかである。表５におけるデータの徹底的な検査により根底にある可能性が示唆される：各エントリに対し、ネオ抗原およびそのＷＴ対応物はどちらも高親和性ペプチド結合の同様のＮｅｔＭＨＣスコア特性を有する。その上、実験ＩＣ５０値を調べると、ＣＭＳ５の４／７ＷＴペプチドおよびＭｅｔｈ　Ａの７／１１ＷＴペプチドは、変異ペプチドよりもＫ^{d}に対し強い親和性を有する。よって、変異がＴＣＲ接触またはＫ^{d}結合溝におけるペプチドの構造特性を変化させない限り、ネオエピトープに対し潜在的に反応性であるＴ細胞は、中心的に除去され、または末梢的に寛容化され得る。

【０１１０】
そのため、我々は新しいアルゴリズムを作成し、この場合、予測された変異エピトープの未変異対応物のＮｅｔＭＨＣスコアを、変異エピトープの対応するＮｅｔＭＨＣスコアからそれらを減算することにより、考慮した。我々は、エピトープのこの新しい特性を差分アグレトープ指数（ＤＡＩ）と呼び、我々は、ネオエピトープのペプチド－結合決定因子がそれらのＷＴ対応物のものとは異なる程度を反映すると予想する。ウイルスまたは他の明確に非自己のエピトープの免疫原性に対する規則の捜査において、そのようなパラメータは必要ではなく、可能でもなく、そのため、決して求められてもこなかった。推定エピトープを、ＤＡＩに基づいてランク付けした（表６）。両方の腫瘍に対するこのＤＡＩ－ランク付けリストの再考により、不思議なことに、この新しいランク付けにおけるネオエピトープはすべて、位置２またはＣ末端で２つの主アンカ残基の１つで変異されていることが示される（我々は、両方のアンカ残基の変化を有するネオエピトープを同定しなかった）。構造分析から収集したＫ^{d}優先度と一致して、これらの変異はすべて、位置２でのアスパラギン酸→チロシン、またはＣ末端でのプロリン／アルギニン→ロイシンを含む。ＤＡＩは、この結果のために作成したものではなかったが、これは、後の判断では、完全に合理的な結果となっている。

【０１１１】

【表７】

表6. 最高DAIスコアを有するCMS5およびMeth Aエピトープ

CMS5エピトープ

遺伝子	Mut/WT 配列	SEQ ID NO:	Mut/WT スコア	DAI	K^dに対する測定された IC50(Mut/WT)	ICS	エリスポット	腫瘍拒絶
Dhx8.1	P(y/D)LTQYAIIML	42/43	9.3/−2.3	11.6	2192/1653	−	+++++	−
Alkbh6.1	D(y/D)VPMEQP	44/45	4.3/−7.3	11.6	60858/−	−	−	−
Dhx8.2	P(y/D)LTQYAI	46/47	9.9/−1.6	11.5	−*/−	−	+++++	−
Dhx8.3	P(y/D)LTQYAII	48/49	9.3/−2.2	11.5	244/1418	+	+++++	−
Alkbh6.2	D(y/D)VPMEQPR	50/51	6.8/−4.7	11.5	−/51229	−	++	+
Dhx8.4	P(y/D)LTQYAIIM	52/53	6.6/−4.9	11.5	6571/6256	−	+++	−
Alkbh6.3	D(y/D)VPMEQPRP	54/55	4.8/−6.7	11.5	−/23570	−	−	−
Alkbh6.4	D(y/D)VPMEQPRPP	56/57	4.7/−6.8	11.5	47053/2957	−	−	−
Rangap1	SEDKIKAI(I/P)	58/59	1.4/−5.4	6.8	−/5108	−	+++++	−
Stau1.1	LKSEEKT(I/P)	60/61	0.6/−6.2	6.8	−/−	−	−	−
Stau1.2	KPALKSEEKT(I/P)	62/63	0.1/−6.7	6.8	−/−	−	−	−
Stau1.3	PALKSEEKT(I/P)	64/65	1.3/−5.4	6.7	69546/−	−	−	−
Stau1.4	ALKSEEKT(I/P)	66/67	1.2/−5.5	6.7	−/−	−	−	+
9430016 H08Rik	SWSSRRSLLG(I/R)	68/69	5.9/−0.6	6.5	−/−	−	+++++	−
Slit3	GFHGCIHEV(I/R)	70/71	4.7/−1.8	6.5	51640/−	+	+++	+
Atxn10.1	QVFPGLME(I/R)	72/73	3.4/−3.1	6.5	−/7054	+	+++	+
Sipa1l3	TTTPGGRPPY(I/R)	74/75	2.7/−3.8	6.5	−/−	−	++++	−
Atxn10.2	VFPGLME(I/R)	76/77	2.5/−4	6.5	−/1107	−	−	+
Ccdc136	ELQGLLEDE(I/R)	78/79	2.4/−4.1	6.5	−/4537	−	−	+
Mast2	KLQRQYRSPR(I/R)	80/81	2.2/−4.3	6.5	10107/8511	−	−	−

IC50についての注意：*－はIC50＞70，000nMを示し、**＋＋＋－はIC50＜0．1nMを示す

エリスポット結果についての注意：1－9スポット／10^6CD8＝＋、10－20スポット／10^6CD8＝＋＋、21－50スポット／10^6CD8＝＋＋＋、51－100スポット／10^6CD8＝＋＋＋＋、＞100スポット／10^6CD8＝＋＋＋＋＋

【０１１２】

【表８】

Meth Aエピトープ

遺伝子	Mut/WT 配列	SEQ ID NO:	Mut/WT スコア	DAI	K^dに対する測定されたIC50(Mut/WT)	ICS	エリスポット	腫瘍拒絶
Tnpo3.1	(sy/LD)MLQALCI	82/83	8.2/-5.2	13.4	82/146	+	+++++	+
Tnpo3.2	(sy/LD)MLQALCIPT	84/85	7.1/-6.3	13.4	9964/85	+	+++	=
Tnpo3.3	(sy/LD)MLQALCIP	86/87	3/-10.4	13.4	67/111	+	+++++	=
Tnpo3.4	(sy/LD)MLQALC	88/89	5.9/-7.4	13.3	14927/89	-	-	-
Trim26.1	A(y/D)ILAALTKL	90/91	12.8/1.2	11.6	622/1.1	-	+++++	-
Nus1	P(y/D)LVLKFGPV	92/93	10.5/-1.1	11.6	2359/1.9	-	-	-
Tpst2.1	L(y/D)EAGVTDEV	94/95	10.3/-1.3	11.6	60/-	-	+++	-
Fiz1	H(y/D)LQGSNA	96/97	10.3/-1.3	11.6	2473/-	-	-	-
Kdm4b	L(y/D)HTRPTAL	98/99	10/-1.6	11.6	264/-	-	-	-
Dis3l2.1	I(y/D)GVVARNRAL	100/101	9.3/-2.3	11.6	143/-	+	+	-
Ube4a.1	A(y/D)AKQFAAI	102/103	9.3/-2.3	11.6	12/-	+	+	-
Ncdn	S(y/D)CEPALNQA	104/105	8.9/-2.7	11.6	664/-	+	-	-
Gapdh	V(y/D)LTCRLEKPA	106/107	8.9/-2.7	11.6	1150/-	-	-	-
Ckap5	K(y/D)MSMLEER	108/109	8.1/-3.5	11.6	58/-	-	+++	-
Prrc2a	P(y/D)KRLKAEPA	110/111	7.9/-3.7	11.6	1450/261	-	-	-
Tmx3	D(y/D)IIEFAHRV	112/113	7.3/-4.3	11.6	7941/351	-	-	-
Nfkb1	G(y/D)SVLHLAI	114/115	6.9/-4.6	11.5	0.26/1615	+	-	+
Dis3l2.2	I(y/D)GVVARNRA	116/117	6.9/-4.7	11.6	1342/262	-	-	-
Ugdh	L(y/D)YERIHKKML	118/119	6.4/-5.2	11.6	600/12	-	-	-
Mll2	S(y/D)RLPSSRKK	120/121	5.9/-5.7	11.6	6673/17	-	+	-
Galnt1	L(y/D)VSKLNGP	122/123	5.6/-6	11.6	27086/-	-	-	-
Tpst2.2	L(y/D)EAGVTDE	124/125	5.5/-6.1	11.6	-/-	-	+++	-
Cpsf2	L(y/D)DVDAAF	126/127	5.3/-6.3	11.6	1410/-	-	+++	+
Zfp236.1	E(y/D)LDLQTQ	128/129	5.3/-6.3	11.6	1641/-	-	+++	+
Trim26.2	A(y/D)ILAALTKLQ	130/131	4.9/-6.7	11.6	17599/-	-	-	-
Zfp236.2	E(y/D)LDLQTQG	132/133	4.9/-6.7	11.6	10028/-	-	++++	-
Ube4a.2	A(y/D)AKQFAA	134/135	4.7/-6.9	11.6	28583/-	-	-	-
Dcaf6	A(y/D)RLEGDRS	136/137	3.7/-7.9	11.6	-/-	-	-	-

IC50についての注意：*－はIC50＞70，000nMを示し、**＋＋＋－はIC50＜0．1nMを示す
エリスポット結果についての注意：1－9スポット／10^6CD8＝＋、10－20スポット／10^6CD8＝＋＋、21－50スポット／10^6

【０１１３】

ＣＭＳ５の上位ＤＡＩ－ランク２０のエピトープおよびＭｅｔｈ　Ａの２８のエピトープを腫瘍拒絶アッセイにおいて試験した。結果（図４Ｂ）により、６／２０または３０％のＣＭＳ５エピトープおよび４／２８または１４％のＭｅｔｈ　Ａエピトープが、統計的に有意な腫瘍防御免疫原性を示したことが示される。６つのＣＭＳ５ネオエピトープは、それらが致死的腫瘍チャレンジからほぼ完全または完全な防御を惹起したという点で特に印象的である。図４Ｃは、表６からの２つの防御および１つの非防御ＣＭＳ５エピトープの代表的な腫瘍拒絶曲線を示す。対応するＷＴペプチドは腫瘍拒絶を媒介しなかった。（Ｍｅｔｈ　Ａネオエピトープ Ｔｎｐｏ３により惹起された腫瘍拒絶に関する詳細なデータを図８に示す）。抗腫瘍防御免疫を予測する際の、片側フィッシャ直接確率法を使用する、ＮｅｔＭＨＣ単独対ＤＡＩアルゴリズムの統計学的比較は、ＤＡＩがずっと優れていることを示す（それぞれ、ＮｅｔＭＨＣおよびＤＡＩについて０／１８対１０／４８、片側フィッシャ直接確率法ｐ＝０．０３１）。

【０１１４】

ＤＡＩアルゴリズムでは、最高ＮｅｔＭＨＣまたはＭＨＣ－結合スコアを頼りにするよりも、ずっと豊富な腫瘍防御エピトープの収集が得られたが、ＤＡＩにより同定されたほとんどのエピトープは依然として、腫瘍防御を惹起することができない。さらに、腫瘍増殖からの防御を惹起する、ＤＡＩ－ランク付けされたネオエピトープ（表５）は、ＤＡＩでは必ずしも最高ランクではない。明らかに、推定エピトープの他の特性（考察を参照されたい）が個々のネオエピトープの腫瘍拒絶活性に寄与している。その不完全性にもかかわらず、ＤＡＩは腫瘍防御免疫原性の統計的に有意な、新規予測因子となり、より重要なことには、インビボでの、抗腫瘍免疫原性に対する他の可能性のある判断基準の精査を可能にする。

【０１１５】

ＤＡＩアルゴリズムはまた、基本的有意性の新しいパラドックスを明らかにする。ＣＭＳ５に対する防御を惹起する６つのネオエピトープは全て６．８と１．２の間のＮｅｔＭＨＣスコアを有し、これらは８．７２、K^dに対する弱いバインダについてのＰＷＭペプチド結合スコア閾値より十分低い（ＮｅｔＭＨＣ３．０）。その観察と一致して、K^dへの結合に対するそれらの測定されたＩＣ５０値は＞７０，０００ｎＭである（Ｓｌｉｔ３（これについては、ＩＣ５０はおよそ５０，０００ｎＭである）を除く全てに対し）。この観察は驚くべきである。というのも、エピトープは典型的には、＜１００ｎＭ、または少なくとも＜５００ｎＭのＩＣ５０値を有する場合、良好なＭＨＣ　Ｉ－バインダであると考えられるからである。ＣＭＳ５ネオエピトープのＩＣ５０値は非常に高い（すなわち、それらのK^dへの結合は非常に低い）ので、これらのネオエピトープは、単にそれらのK^d－結合特性に基づいては、エピトープである好適な候補とは決して考えられない。同様にＭｅｔｈ　Ａでは、腫瘍免疫を惹起する４つのネオエピトープは全て、K^dに対して弱いバインダの８．７２閾値より低いＮｅｔＭＨＣを有し、４つのＭｅｔｈ　Ａネオエピトープのうちの２つのみの測定されたK^d－結合親和性が＜１００ｎＭである。これらのネオエピトープが別のアレル、D^dまたはL^dに結合し得る可能性を探索するために、６つのＣＭＳ５に対し腫瘍防御を惹起するネオエピトープを、直接ペプチド－結合研究により、これらの２つのアレルへの結合について試験し、いずれのペプチドも有意な結合を示さなかった（未公表データ）。というのも、＜５００ｎＭであるＭＨＣ　Ｉ結合に対する要求がそのように定着しているからである。腫瘍チャレンジからの防御の惹起において強力であるとして同定されるペプチドが（図６Ｂ、Ｃ）、非免疫学的手段により、そうすることができる可能性を調査した。

【０１１６】

腫瘍防御のＣＤ８依存性．ＣＭＳ５の６つのネオエピトープのうちの５つ（Ａｌｋｂｈ６．２、Ｓｌｉｔ３、Ａｔｘｎ１０．１、Ａｔｘｎ１０．２およびｃｄｃ１３６）により免疫化したマウスを、免疫原性について試験した。表６に示されるように、Ａｌｋｂｈ６．２、Ｓｌｉｔ３およびＡｔｘｎ１０．１は、細胞内サイトカインアッセイにより検出不能であったが、エリスポットアッセイよってのみ検出可能であった穏やかなＣＤ８　Ｔ細胞応答を惹起し（図５Ａ）、一方、Ａｔｘｎ１０．２およびｃｄｃ１３６は検出可能な応答を全く惹起しなかった。免疫化マウスはエフェクタ相のみ（すなわち、免疫化後であるが、腫瘍チャレンジ前）でＣＤ８またはＣＤ４細胞が枯渇し、これを、図４のようにＣＭＳ５細胞でチャレンジした。結果（図５Ｂ）から、ナイーブマウスと比べて、各変異ペプチドは強力な腫瘍拒絶を惹起したことが示される。ＣＤ８細胞のＷＴ枯渇は、各ペプチドの腫瘍拒絶能力を完全に抑制した。ＣＤ４細胞の枯渇はそのような効果を有さなかった。これらのデータから、腫瘍拒絶を惹起するＣＭＳ５ネオエピトープは、特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の惹起によりそうするのであり、非免疫学的手段によってではないことが示される。しかしながら、データは、ＣＤ４＋Ｔ細胞は腫瘍拒絶において役割を果たしていないことを暗示せず、腫瘍拒絶の動力学の検査は、ＣＤ４＋細胞がない場合、腫瘍は実際、免疫化マウスのほとんど全てにおいて増殖し始めるが、７－１０日までに退縮し始めることを示す。

【０１１７】

免疫原性の指標としての立体構造安定性．それらの制限アレルに対する低い予測され、測定された親和性を有するネオエピトープのＣＤ８－依存性により、我々は、免疫原性の他の決定因子を求めることとなった。ＤＡＩアルゴリズムは主アンカ位置で、ペプチド－ＭＨＣ結合親和性を改変する変異を選択するが、変異が、上記のように、結合溝におけるペプチドの構造特性を変化させない限り、潜在的に応答性のＴ細胞が中心的にまたは末梢的に寛容化され得る。研究により、アンカ改変は、ＭＨＣ結合ペプチドに対してある範囲の効果を有することができることが示され、場合によっては明らかな影響を有さず、他の場合には、構造および運動特性における変化が引き起こされる。

【０１１８】

アンカ改変の結果を調べるために、計算的モデリングを使用して、K^dに結合された変異およびＷＴペプチドの対の構造特性を調べた。ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に結合されたペプチドの構造をモデリングするために最近使用されるアプローチを、ウイルスペプチド／Ｈ－２K^d複合体の結晶学的構造を鋳型として使用して改変させた。材料および方法で記載されるように、ワークフローは、ホモロジモデリング、シミュレーティド・アニーリング、および構造特性を予測するための分子動力学シミュレーションを含んだ。ＭＨＣ　Ｉタンパク質におけるペプチドバックボーンの立体構造はペプチド長と共にかなり変動するので、モデリングは、鋳型構造におけるペプチドの長さに合わせて、表６における九量体の対に制限された。この制限は、我々のモデリング分析における、表６におけるより免疫原性で防御性のネオエピトープのいくつかの非含有へとつながり、単にそれらは８または１０量体であり、９量体ではないという理由である。モデリング手順を、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１からＨ－２K^dにどれだけうまく移すことができるか確認するために、モデリング手順を免疫優性および高免疫原性ＨＢＶコアペプチドのK^dとの複合体、結晶学的構造が当技術分野で知られている複合体に適用した。

【０１１９】

変異ペプチドとＷＴペプチド間の構造的差異を同定した。各場合において、Ｈ－２K^dに結合された変異およびＷＴ　ペプチドの予測される立体構造の間には差が存在した。全ての場合において、これらの差は、変異の部位から伝播した（図６Ａで示される例）。これらの観察は驚くべきではなく、というのも、変異は全てかなり劇的であったからであり、クラスＩ　ＭＨＣ提示ペプチドアンカ残基での保存的変異であっても、下流立体構造に影響を与え得る。

【０１２０】

しかしながら、Ｔ細胞受容体は、ペプチド立体構造の変化に感受性が高い可能性があるが、ペプチド免疫原性（陽性エリスポットまたはＩＣＳ結果を有する、または腫瘍拒絶に導くものとして規定される）は、各ペプチド対の全ての共通原子を重ね合わせた時にオングストロームの平均二乗偏差（ＲＭＳＤ）として表される構造的差異の大きさと相関しなかった（図６Ｂ）。しかしながら、モデリングデータをより厳密に調べると、不完全ではあるが、立体構造安定性との相関が明らかになった。１４の場合のうち１０において、変異ペプチドはよりリジッドであり、モデリングの分子動力学相中により少ない立体構造がサンプリングされ、各ペプチドの９個全てのα炭素の平均の二乗平均平方根ゆらぎ（ＲＭＳＦ）として表された（図６Ｃ－Ｄおよび図７）。変異ペプチドがよりリジッドであった１０の例のうち、これらのうちの８が、陽性ＩＣＳまたはエリスポット結果を有した。ＷＴペプチドがよりリジッドであった４つの例のうち、１つでは陽性の免疫学的転帰が得られなかった。結局、より大きな構造安定性は、１４のうちの９、または九量体の、高ＤＡＩランクネオエピトープの６５％で免疫原性の予測因子となった。

【０１２１】

しかし、場合によっては、変異ペプチドとＷＴペプチドの間のゆらぎ差は非常に小さかった（例えば、Ｃｋａｐ５、Ｄｈｘ８．３、およびＺｆｐ２３６．２は差£±０．０３Åを有する）。これにより、我々は、平均ＲＭＳＦの予測ツールとしての忠実度に疑問を持った。全てのペプチドについてデータをより厳密に調べると、我々は、ペプチドＣ末端における、特にＷＴペプチドにおける高い構造不安定性に対する傾向を観察した（図６Ｃお

よび図７）。前の研究により、弱い結合ペプチドは、ＭＨＣ　Ｉタンパク質からＣ末端で脱離および解離できることが示されており、これらの場合、高い構造不安定性は少なくとも部分的なペプチド解離を反映することが示唆される。しかしながら、変異ペプチドのいくつかもまた、Ｃ末端で高い不安定性を有した。中でも注目すべきことに、免疫学的応答を惹起することができなかった３つ全ての変異ペプチドは高いＣ末端不安定性を有した。これを定量化するために、我々は、全ての変異ペプチドに対して平均Ｃ末端ＲＭＳＦを計算した。非免疫原性ペプチドのＣ末端ＲＭＳＦは全てこの平均値を超えた（図６Ｅ）。１４の免疫原性ペプチドうちの３つのみが、平均を超えるＣ末端ＲＭＳＦ値を有した（Ｓｔａｕ１．４、Ｄｈｘ８．３、およびＴｐｓｔ２．２）。よって、Ｃ末端不安定性の有無は、１４のうちの１１、または九量体高ＤＡＩランクネオエピトープの７９％で免疫学的転帰の予測因子となった。（我々は、免疫原性ウイルスペプチドから予測されるように、ＨＢＶ対照ペプチドはK^d結合溝でかなり安定であり、１．０Åの平均ＲＭＳＤおよび０．５７Åの平均Ｃ末端ＲＭＳＦを有したことに注目する）。

【０１２２】

ネオエピトープの自然提示．エピトープｓｙＭＬＱＡＬＣＩ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）（野生型ＬＤＭＬＱＡＬＣＩ、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３８）、変異Ｔｒａｎｓｐｏｒｔｉｎ３（Ｔｎｐｏ３）由来エピトープ、Ｍｅｔｈ　Ａの最高ランク（ＤＡＩによる）エピトープ（表６）の腫瘍防御免疫原性をより詳細に調査した。Ｔｎｐｏ３は、核内移行受容体であり、これまで報告されたいずれの腫瘍型に対してもドライバタンパク質ではない。変異Ｔｎｐｏ３エピトープは、変異Ｔｎｐｏ３－免疫化マウスの、エクスビボではＷＴペプチドでなく変異ペプチドに対する、またはインビトロでの刺激後での、強い腫瘍特異的ＣＤ８＋、ＣＤ４４＋、ＩＦＮγ＋応答を示す能力により示されるように、厳密に腫瘍特異的なＣＤ８＋免疫応答を惹起することが示された（図８Ａ）。Ｔｎｐｏ３特異的免疫応答もまた、エクスビボで、細胞のＴｎｐｏ３特異的四量体による染色で検出可能であった（図８Ｂ）。反対に、Ｍｅｔｈ　Ａ細胞により免疫化されたマウスから単離されたＣＤ８＋ＣＤ４４＋ＩＦＮγ＋細胞は、変異Ｔｎｐｏ３でパルス処理された細胞を認識するが、無関係のK^d結合ペプチドＰｒｐｆ３１によりエクスビボでパルス処理された細胞、ならびにインビトロでの刺激後は認識しない（図８Ｃ）。おもしろいことに、担Ｍｅｔｈ　Ａ腫瘍マウス（接種後第２１日）は、腫瘍－流入領域ＬＮにおいて、２つのK^d－結合ペプチドを認識する低頻度のＴ細胞（Ｔｎｐｏ３およびＮｆｋｂ１、四量体染色により測定）を有する（図８Ｄ）。これらの観察から、変異Ｔｎｐｏ３ペプチドは、Ｍｅｔｈ　Ａ細胞により自然に提示され、また、それに対する免疫応答は、全腫瘍細胞による免疫化で、ならびに担腫瘍マウスにおいて惹起されることが確認される。Ｍｅｔｈ　AからのＭＨＣ　Ｉ溶離ペプチドの質量分光分析によりこの変異ペプチドを同定する試みは成功しなかったが、おそらく、質量分析と比べてＴ細胞アッセイの感度がより高いためであった。構造モデリングは、変異Ｔｎｐｏ３ペプチドは、ペプチドの中心を横切って、実質的により安定であることを予測する（図６）。

【０１２３】

免疫モジュレータによるネオエピトープの腫瘍防御性の増強．変異ネオエピトープによる免疫化の組み合わせをＭｅｔｈ　Ａネオエピトープ Ｔｎｐｏ３を用いて試験した。このネオエピトープは単独療法において中程度にしか腫瘍防御性ではなく、よって、併用療法による増強された効果の試験にあたってより広いダイナミックレンジが可能となる。変異Ｔｎｐｏ３による免疫化のＣＤ２５に対するアンタゴニスト抗体（制御性Ｔ細胞を標的にすることが示されている）との組み合わせは相乗作用を示し、抗ＣＤ２５単独は、全てのマウスにおいて完全退縮を示し（ｐ＝０．００８）、Ｔｎｐｏ３単独もまた、著しい防御を惹起した（ｐ＝０．０３）。組み合わせは、いずれの作用物質単独よりも、より著しい防御を示し（ｐ＝０．０１６、図８Ｅ、左パネル）：腫瘍は、最終的には両方の群における全てのマウスにおいて退縮したが、腫瘍退縮の動力学は、組み合わせ群において著しくより急であった。同様の結果が抗ＣＴＬＡ４抗体（Ｔ細胞をチェックポイント遮断から開放する）でも得られた。各作用物質は単独で、統計的に有意な防御を惹起し、組み合わせ

はＴｎｐｏ３単独（ｐ＝０．０４）または抗ＣＴＬＡ４抗体単独（ｐ＝０．０４）よりも著しくより有効であった（図８Ｅ、右パネル）。単一の腫瘍のみが抗ＣＴＬＡ４抗体群で退縮し、腫瘍は、Ｔｎｐｏ３単独群では退縮せず（が、腫瘍増殖は非常に著しく妨害された）、組み合わせ群は、２つの腫瘍の完全退縮、ならびに２つの追加の腫瘍において退縮に向かう持続した傾向を示した。

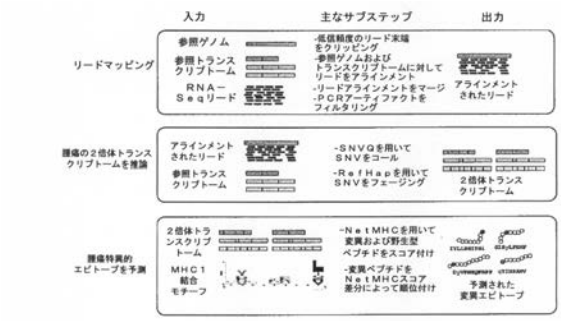
【０１２４】

「１つの（ａ、ａｎ）」または「その（ｔｈｅ）」という用語および同様の指示対象の使用は（とりわけ下記特許請求の範囲との関連で）、本明細書で別記されない限り、または文脈により明確に否定されない限り、単数形および複数形の両方を包含すると解釈されるべきものである。第１、第２などという用語は、本明細書では、いずれの順番を示すことも意味しておらず、単に便宜上、複数の、例えば層を示すものである。「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「包含する（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、および「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」という用語は、別記されない限り、オープンエンドの用語（すなわち、「含むが、限定はされない」を意味する）として解釈されるべきである。値の範囲の記載は、本明細書で別記されない限り、当該範囲に属する個々の値をそれぞれ挙げることの簡略な方法としての役を果たすことを意図されているにすぎず、個々の値は、それが個々に本明細書で列挙されたかのように、本明細書に組み込まれる。全ての範囲の端点は、当該範囲に含まれ、独立して組み合わせ可能である。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において別記されない限り、または別に文脈により明確に反対されない限り、好適な順序で実施することができる。任意および全ての例、または例示的な用語（例えば「～などの」）の使用は、本発明をより良く説明することを意図するものにすぎず、別段の定めのない限りは、発明の範囲に制限を加えるものではない。明細書に含まれるいかなる用語も、本明細書において用いられる場合、任意の請求されていない要素が本発明の実施に必須であることを示していると解釈されるべきものではない。

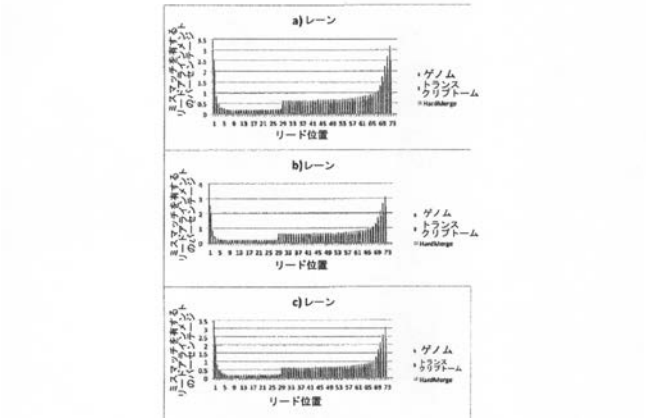
【０１２５】

本発明について、好ましい実施形態を参照して説明してきたが、当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、種々の変更がなされ得、それらの要素に代えて等価物が代用され得ることが理解されるであろう。加えて、その必須の範囲から逸脱することなく、特定の状況または材料を本発明の教示に適合させるために多くの改変が可能である。したがって、本発明は、この発明を実施するために企図される最良の形態として開示された特定の実施形態には限定されず、本発明は、添付の特許請求の範囲に属する全ての実施形態を含むことが意図される。

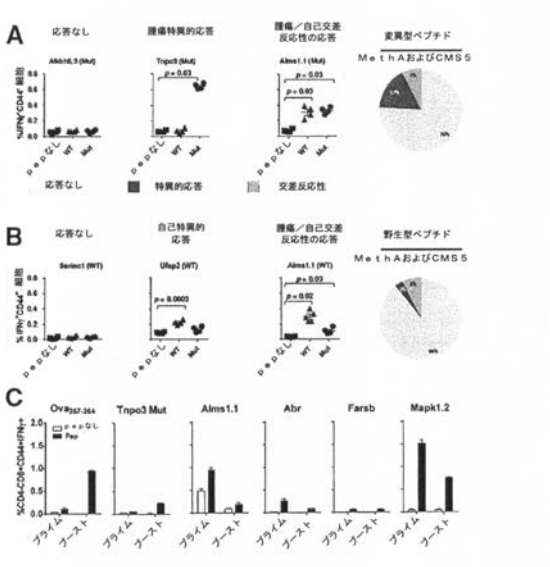
【図１】


入力
主なサブステップ
出力
リードマッピング
参照ゲノム
参照トランスクリプトーム
RNA－Seqリード
-低信頼度のリード末端をクリッピング
-参照ゲノムおよびトランスクリプトームに対してリードをアラインメント
-リードアラインメントをマージ
-PCRアーティファクトをフィルタリング
アラインメントされたリード
腫瘍の2倍体トランスクリプトームを推論
アラインメントされたリード
参照トランスクリプトーム
-SNVQを用いてSNVをコール
-RefHapを用いてSNVをフェージング
2倍体トランスクリプトーム
腫瘍特異的エピトープを予測
2倍体トランスクリプトーム
MHC1結合モチーフ
-NetMHCを用いて変異および野生型ペプチドをスコア付け
-変異ペプチドをNetMHCスコア差分によって順位付け
予測された変異エピトープ

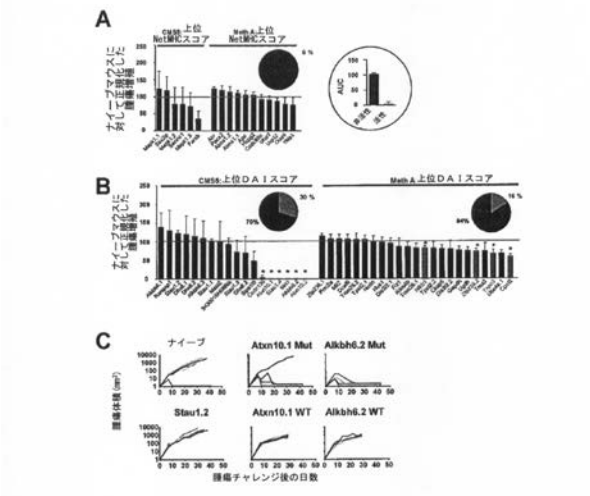
【図２】


a)レーン
b)レーン
c)レーン
リード位置
ゲノム
トランスクリプトーム

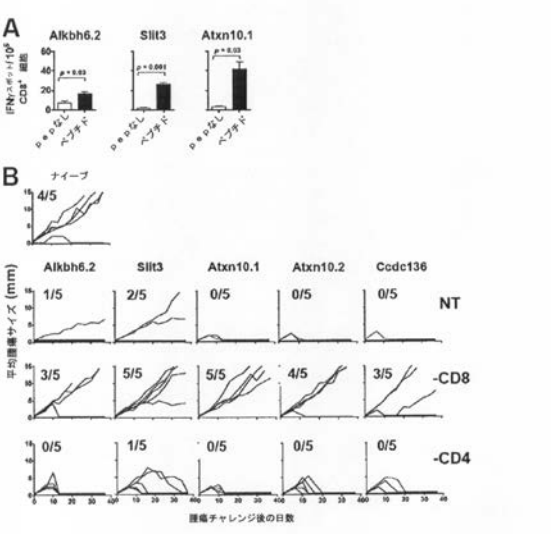
【図３】


A
応答なし
腫瘍特異的応答
腫瘍／自己交差反応性の応答
変異型ペプチド
MethAおよびCMS5
応答なし
特異的応答
交差反応性
B
応答なし
自己特異的応答
腫瘍／自己交差反応性の応答
野生型ペプチド
MethAおよびCMS5
C
Ova257-264
Tnpo3 Mut
Almts1.1
Abr
Farsb
Mapk1.2
プライム
ブースト

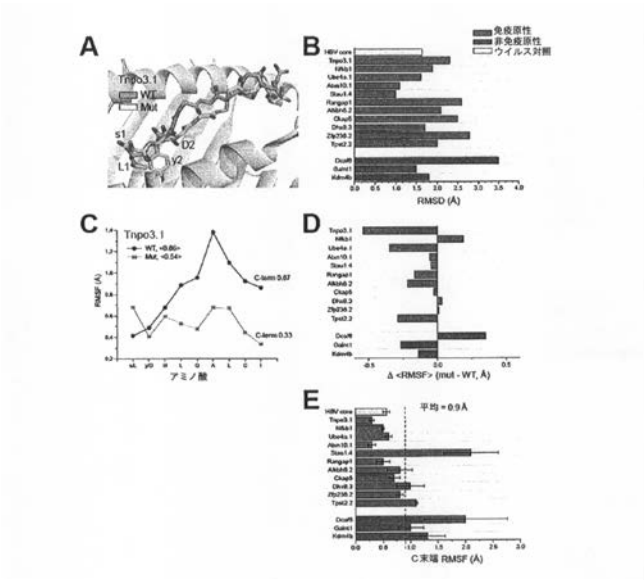
【図４】


A
CMS5-上位Net MHCスコア
MethA-上位Net MHCスコア
ナイーブマウスに対して腫瘍形成した
AUC
B
CMS5-上位DAIスコア
MethA-上位DAIスコア
C
ナイーブ
Atxn10.1 Mut
Alkbh6.2 Mut
Stau1.2
Atxn10.1 WT
Alkbh6.2 WT
腫瘍体積 (mm³)
腫瘍チャレンジ後の日数

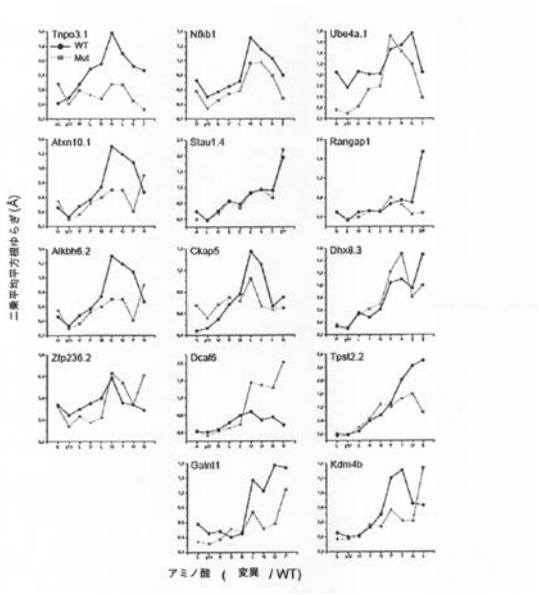
【図５】


A
Alkbh6.2
Slit3
Atxn10.1
ペプチド
B
ナイーブ
Alkbh6.2
Slit3
Atxn10.1
Atxn10.2
Ccdc136
1/5
2/5
0/5
0/5
0/5
NT
3/5
5/5
5/5
4/5
3/5
-CD8
0/5
1/5
0/5
0/5
0/5
-CD4
平均腫瘍サイズ (mm)
腫瘍チャレンジ後の日数

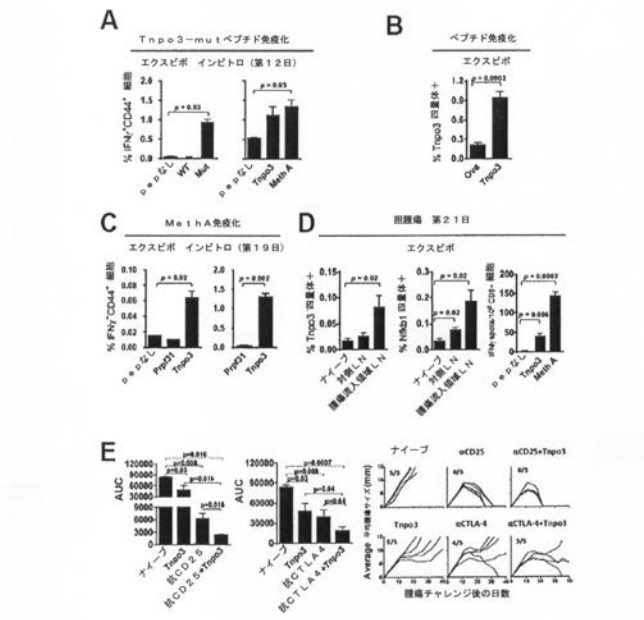
【図６】



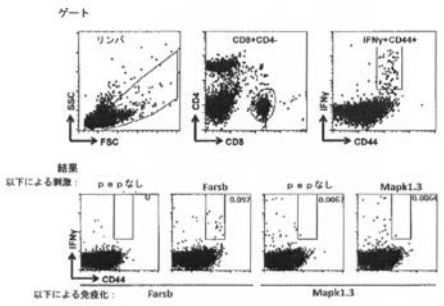
【図７】



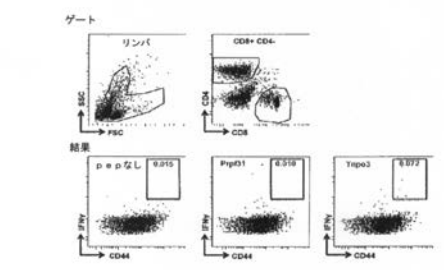
【図８】



【図９】



【図１０】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/048345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K39/00 (2015.01)
CPC - A61K39/0011 (2015.11)
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)
IPC(8) - A61K 39/00; G01N 33/68 (2015.01)
CPC - A61K 39/00, 39/0011; G06F 19/10, 19/18 (2015.11)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 39/00, 39/0011; G06F 19/10, 19/18 (2015.11) (keyword delimited)
USPC - 424/184.1, 277.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google, ProQuest, PubMed

Search terms used: neo-epitope neoepitope MHC HLA conformation conformational stability cancer tumor immunologically protective

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DUAN et al. "Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity," J Exp Med. 22 September 2014 (22.09.2014), Vol. 211, Pgs. 2231-2248. entire document	1
A	CASTLE et al. "Exploiting the mutanome for tumor vaccination," Cancer Res. 11 January 2012 (11.01.2012), Vol. 72, Pgs. 1081-1091. entire document	1-6, 9-20, 22-24, 27-31
A	SRIVASTAVA et al. "Modeling the repertoire of true tumor-specific MHC I epitopes in a human tumor," PLoS One.10 July 2009 (10.07.2009), Vol. 4, e6094, Pgs. 1-7 entire document	1-6, 9-20, 22-24, 27-31
A	SEGAL et al. "Epitope landscape in breast and colorectal cancer," Cancer Res. 01 February 2008 (01.02.2008), Vol. 68, Pgs. 889-892. entire document	1-6, 9-20, 22-24, 27-31
A	ASSARSSON et al. "A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection," J Immunol. 15 June 2007 (15.06.2007), Vol. 178, Pgs. 7890-7901. entire document	1-6, 9-20, 22-24, 27-31
A	WO 2014/052707 A2 (THE UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 03 April 2014 (03.04.2014) entire document	1-6, 9-20, 22-24, 27-31

☐ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 November 2015	15 DEC 2015
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/048345

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/048345

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.: 7, 8, 21, 25, 26, 32, 33
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:

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 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.:

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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ｃ１２Ｑ　1/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
		Ｃ１２Ｑ	1/02	

(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　スリバスタバ　プラモッド　ケイ
アメリカ合衆国　コネチカット　エイボン　フェザント　ラン　７０
(72)発明者　ベイカー　ブライアン　エム
アメリカ合衆国　インディアナ　グランガー　タディントン　ドライブ　１４２７０

Ｆターム(参考) 4B063 QA05 QA20 QQ08 QQ36 QR48 QR72 QS33 QX02
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB262 ZC752
4C085 AA03 AA13 AA14 CC23 DD86 EE03 EE06