

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-522198

(P2023-522198A)

(43)公表日 令和5年5月29日(2023.5.29)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 15/869 (2006.01)	C 1 2 N 15/869 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全111頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-562788(P2022-562788)	(71)出願人	518151434
(86)(22)出願日	令和3年4月19日(2021.4.19)		ザ フランス クリック インスティテュート リミティッド
(85)翻訳文提出日	令和4年12月12日(2022.12.12)		イギリス国 エヌダブリュ1 1エーティ
(86)国際出願番号	PCT/US2021/028029		ー, グレーター ロンドン, ロンドン,
(87)国際公開番号	WO2021/212123		ミッドランド ロード 1
(87)国際公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)	(71)出願人	521165426
(31)優先権主張番号	20170174.5		エナラ バイオ リミテッド
(32)優先日	令和2年4月17日(2020.4.17)		イギリス国 オックスフォードシャー オ
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ーエックス4 4ジーエー オックスフォ
(81)指定国・地域	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, 最終頁に続く	(74)代理人	100097456 弁理士 石川 徹 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 黒色腫を治療するためのC T L抗原の融合タンパク質

(57)【要約】

とりわけ、癌、特に、黒色腫、とりわけ、皮膚黒色腫及びブドウ膜黒色腫の治療及び予防において有用である融合タンパク質及び該融合タンパク質をコードする核酸が開示されている。

【選択図】図67

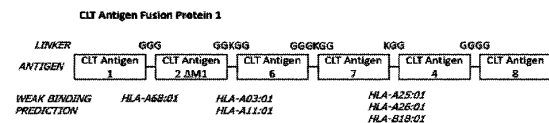


FIG. 87

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

6つの抗原性ポリペプチド(a)～(f)を含む融合タンパク質であって、該抗原性ポリペプチド(a)～(f)が、アミノ酸配列:

(a) 配列番号1もしくはそのバリエーション又は配列番号1もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(b) 配列番号2もしくはそのバリエーション又は配列番号2もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(c) 配列番号6もしくはそのバリエーション又は配列番号6もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(d) 配列番号7もしくはそのバリエーション又は配列番号7もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(e) 配列番号4もしくはそのバリエーション又は配列番号4もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;及び

(f) 配列番号8もしくはそのバリエーション又は配列番号8もしくはそのバリエーションの免疫原性断片

を有する、前記融合タンパク質。

【請求項 2】

前記タンパク質が抗原性ポリペプチド(g)及び(h)から選択される1又は2つのさらなる抗原性ポリペプチドをさらに含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(g)及び(h)が、アミノ酸配列:

(g) 配列番号3もしくはそのバリエーション又は配列番号3もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;及び

(h) 配列番号5もしくはそのバリエーション又は配列番号5もしくはそのバリエーションの免疫原性断片

を有する、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

前記タンパク質が6つの抗原性ポリペプチド(a)～(f)を含む、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

前記抗原性ポリペプチド(a)～(f)が、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、及び(f)の順にNからCへ配置されている、請求項3記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記抗原性ポリペプチド(a)～(f)が、(c)、(f)、(d)、(b)、(e)、及び(a)の順にNからCへ配置されている、請求項3記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記タンパク質が8つの抗原性ポリペプチド(a)～(h)を含む、請求項2記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

前記抗原性ポリペプチド(a)～(h)が、(a)、(b)、(g)、(d)、(e)、(h)、(c)、及び(f)の順にNからCへ配置されている、請求項3記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記抗原性ポリペプチド(a)～(h)が、(c)、(g)、(a)、(h)、(e)、(f)、(d)、及び(b)の順にNからCへ配置されている、請求項3記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが1以上のペプチドリンカーによって接続されている、請求項1～8のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記1以上のリンカーが、ポリペプチド:

(i) (a)と(b)、(b)と(c)、(c)と(d)、(d)と(e)、(e)と(f);

10

20

30

40

50

(ii)(c)と(f)、(f)と(d)、(d)と(b)、(b)と(e)、(e)と(a);
(iii)(a)と(b)、(b)と(g)、(g)と(d)、(d)と(e)、(e)と(h)、(h)と(c)、(c)と(f);又は
(iv)(c)と(g)、(g)と(a)、(a)と(h)、(h)と(e)、(e)と(f)、(f)と(d)、(d)と(b)
の間に位置付けられる、請求項9記載の融合タンパク質。

【請求項11】

前記リンカーが、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、及び配列番号84から選択される配列を含むか、又は該配列からなる、請求項9～10のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項12】

配列番号76、配列番号77、配列番号78、及び配列番号79から選択される配列を含むか、又は該配列からなる、請求項1記載の融合タンパク質。

10

【請求項13】

前記融合タンパク質が、(i)黒色腫関連抗原である他のポリペプチド;(ii)免疫応答を増強することができるポリペプチド配列(すなわち、免疫刺激配列);及び(iii)例えば、抗原エピトープに対するCD8+ T細胞応答の増大を助ける強いCD4+を提供することができる普遍的CD4ヘルパーエピトープを含むポリペプチド配列から選択される第二の又はさらなるポリペプチドに融合している、請求項1～12のいずれか一項記載の融合タンパク質。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項15】

前記核酸がDNAである、請求項14記載の核酸。

20

【請求項16】

前記核酸がヒト宿主細胞での発現のためにコドン最適化されている、請求項15記載の核酸。

【請求項17】

前記核酸がRNAである、請求項14記載の核酸。

【請求項18】

前記核酸が人工的な核酸配列である、請求項14～17のいずれか一項記載の核酸。

【請求項19】

請求項14～18のいずれか一項記載の核酸を含むベクター。

30

【請求項20】

ヒト宿主細胞内で翻訳的に活性なRNA分子の転写を可能にするのに好適な調節エレメントをコードするDNAを含む、請求項19記載のベクター。

【請求項21】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項19～20のいずれか一項記載のベクター。

【請求項22】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、アレナウイルス、麻疹ウイルス、ポックスウイルス、パラミクソウイルス、レンチウイルス、又はラブドウイルスベクターである、請求項21記載のベクター。

40

【請求項23】

前記ウイルスベクターがポックスウイルス(例えば、MVA)である、請求項22記載のベクター。

【請求項24】

前記ウイルスベクターがアデノウイルスである、請求項22記載のベクター。

【請求項25】

請求項1～24のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、又はベクター及び医薬として許容し得る担体を含む、免疫原性医薬組成物。

【請求項26】

50

請求項1～24のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、又はベクター及び医薬として許容し得る担体を含む、ワクチン組成物。

【請求項27】

前記組成物又はワクチンが1以上の免疫刺激物質をさらに含む、請求項25及び26のいずれか一項記載の組成物。

【請求項28】

前記免疫刺激物質が、アルミニウム塩、サポニン、免疫刺激オリゴヌクレオチド、水中油型エマルジョン、アミノアルキルグルコサミニド 4-ホスフェート、リポ多糖及びその誘導体、並びに他のTLR4リガンド、TLR7リガンド、TLF9リガンド、IL-12、並びにインターフェロンから選択される、請求項27記載の組成物。

10

【請求項29】

前記組成物又はワクチンが非経口投与に好適な滅菌組成物である、請求項25～28のいずれか一項記載の組成物。

【請求項30】

医薬で使用するための、請求項1～29のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物。

【請求項31】

ヒトで免疫応答を惹起する方法であって、該ヒトに、請求項1～29のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項32】

前記免疫応答が、抗原性ポリペプチド(a)～(f)、任意に(g)及び(h)から選択される配列を発現する癌に対して惹起される、請求項31記載の方法。

20

【請求項33】

ヒトで免疫応答を惹起する際に使用するための、請求項1～29のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物。

【請求項34】

前記免疫応答が、抗原性ポリペプチド(a)～(f)、任意に(g)及び(h)から選択される配列を発現する癌に対して惹起される、請求項33記載の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物。

【請求項35】

癌の細胞が抗原性ポリペプチド(a)～(h)から選択される配列を発現する癌に罹患しているヒト患者を治療するか、又は該癌がポリペプチド(a)～(h)から選択される配列を発現する癌に罹患しているヒトを予防する方法であって、該ヒトに、請求項1～29のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物を投与することを含む、前記方法。

30

【請求項36】

前記癌の細胞がポリペプチド(a)～(h)から選択される配列を発現するヒトにおける癌を治療又は予防する際に使用するための、請求項1～29のいずれか一項記載の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物。

【請求項37】

前記癌が、黒色腫、例えば、皮膚黒色腫又はブドウ膜黒色腫、特に、皮膚黒色腫である、請求項32、34～36のいずれか一項記載の使用のための方法又は融合タンパク質、核酸、ベクター、もしくは組成物。

40

【請求項38】

癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、
(a)該癌の細胞がポリペプチド(a)～(h)から選択されるポリペプチド配列又は該ポリペプチドをコードする核酸を発現するかどうかを決定する工程;及びそうである場合、
(b)該ヒトに、請求項1～29のいずれか一項記載の対応する融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物を投与する工程
を含む、前記方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、癌の治療又は予防において使用するための、特に、黒色腫(例えば、皮膚黒色腫又はブドウ膜黒色腫)の治療又は予防において使用するための、融合タンパク質及びその対応するポリヌクレオチドに関する。本発明はさらに、とりわけ、該融合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物及び免疫原性組成物、該医薬組成物及び免疫原性組成物の医学的使用、並びに該医薬組成物及び免疫原性組成物を投与することを含む治療方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

病原性微生物に対する通常の免疫監視の一環として、全ての細胞は、細胞内タンパク質を分解して、全ての細胞の表面上に発現される主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子上にローディングされるペプチドを産生する。宿主細胞に由来するこれらのペプチドのほとんどは、自己として認識され、適応免疫系で認識されないままである。しかしながら、外来(非自己)ペプチドは、MHC I-ペプチド複合体にしっかりと結合するT細胞受容体(TCR)をコードするナイーブCD8+ T細胞の拡大を刺激することができる。この拡大されたT細胞集団は、外来抗原タグ付き細胞を排除することができるエフェクターCD8+ T細胞(細胞傷害性Tリンパ球、CTLを含む)だけでなく、外来抗原タグ付き細胞がその動物の生涯において後に現れたときに再増幅されることができるメモリーCD8+ T細胞も産生することができる。

20

【0003】

その発現が、通常、樹状細胞(DC)などのプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に制限されているMHCクラスII分子は、通常、細胞外環境から内部に取り込まれたペプチドとともにローディングされる。T細胞接着分子(CD54、CD48)及び共刺激分子(CD40、CD80、CD86)を含む様々な因子の存在下で、ナイーブCD4+ T細胞由来の相補的TCRがMHCII-ペプチド複合体に結合すると、CD4+ T細胞のエフェクター細胞(例えば、 T_H1 、 T_H2 、 T_H17 、 T_{FH} 、 T_{reg} 細胞)への成熟が誘導される。これらのエフェクターCD4+ T細胞は、B細胞の抗体分泌形質細胞への分化を促進するだけでなく、抗原特異的CD8+ CTLの分化も促進し、それにより、短期のエフェクター機能と長期の免疫記憶の両方を含む、外来抗原に対する適応免疫応答の誘導を助けることができる。DCは、外因的由来の抗原(例えば、病原体又は腫瘍細胞から放出されたペプチド又はタンパク質)を、そのMHC I分子上に送達することにより、ペプチド抗原の交差提示プロセスを実行し、ナイーブCD8+ T細胞の拡大を刺激するための代替経路を提供することにより、免疫記憶の生成に寄与することができる。

30

【0004】

免疫記憶(特に抗原特異的B細胞/抗体及び抗原特異的CTL)は、微生物感染の制御において重要な役割を果たし、免疫記憶は、重要な病原性微生物によって引き起こされる疾患を予防する多数のワクチンを開発するために利用されている。免疫記憶は、腫瘍形成の制御において重要な役割を果たすことも知られているが、有効な癌ワクチンはほとんど開発されていない。

40

【0005】

癌は、2番目に多い死亡率の原因であり、世界の全死亡の6分の1近くを占めている。2015年に癌が原因で起こった880万件の死亡のうち、最も多くの命を奪った癌は、肺癌(169万件)、肝臓癌(788,000件)、結腸直腸癌(774,000件)、胃癌(754,000件)、及び乳癌(571,000件)であった。2010年における癌の経済的影響は、1兆1,600億米ドルと推定され、新しい症例数は、今後20年間で約70%増加すると予想されている(世界保健機関、癌の事実(World Health Organisation Cancer Facts)、2017年)。

50

【0006】

現行の皮膚黒色腫の療法は様々であり、腫瘍の位置及び疾患の病期に大きく依存している。非転移性黒色腫の主な治療は、腫瘍及び周辺組織を除去する手術である。後期黒色腫は、リンパ節郭清、放射線療法、又は化学療法を含む治療を必要とする場合がある。PD-1/PD-L1及びCTLA4などの負の免疫調節因子を標的とする抗体の使用を含む免疫チェックポイント遮断戦略は、最近、黒色腫を含む種々の悪性腫瘍の治療に革命をもたらした(Ribas, A.及びWolchok, J. D.の文献(2018) Science, 359:1350-1355)。チェックポイント遮断療法の並外れた価値、及びその臨床的利益と患者自身の癌抗原に対する患者の適応免疫応答(特に、T細胞ベースの免疫応答)との十分に認識されている関連性は、効果的な癌ワクチン、ワクチンモダリティ、及び癌ワクチン抗原の探索を再活性化した。

10

【0007】

ヒト内在性レトロウイルス(HERV)は、外因性感染性レトロウイルスの祖先生殖系列への組み込みの名残である。HERVは、ウイルスゲノムに隣接する長い末端反復(LTR)の存在を特徴とする内因性レトロエレメントのグループに属する。このグループは、哺乳動物の見かけのLTRレトロトランスポゾン(MaLR)も含み、それゆえ、まとめてLTRエレメントとして知られる(ここでは、全てのLTRエレメントを意味するためにERVと総称する)。ERVは、哺乳動物ゲノムのかなりの割合(8%)を構成し、配列相同性に基いて約100のファミリーにグループ分けすることができる。多くのERV配列は、LTRに隣接するgag、pro、pol、及びenv遺伝子からなるプロトタイプ型レトロウイルスゲノム構造を共有する欠陥のあるプロウイルスをコードする。いくつかの無傷のERV ORFは、HIV-1などの外因性感染性レトロウイルスによってコードされるタンパク質と特徴を共有するレトロウイルスタンパク質を産生する。そのようなタンパク質は、強力な免疫応答を誘導する抗原として作用する可能性があり(Hurst及びMagiorkinisの文献、2015, J. Gen. Virol 96:1207-1218)、ERVによってコードされたポリペプチドがT細胞及びB細胞受容体の選択プロセス並びに中枢性及び末梢性寛容を回避することができることを示唆している。ERV産物に対する免疫反応性は、感染症又は癌で自然発生する可能性があり、ERV産物は、いくつかの自己免疫性疾患の原因として関係があるとされている(Kassiotis及びStoyeの文献、2016, Nat. Rev. Immunol. 16:207-219)。

20

【0008】

進化における突然変異及び組換え事象の蓄積が原因で、ほとんどのERV由来配列は、それらの遺伝子の一部又は全ての機能的なオープンリーディングフレームを失い、それゆえ、感染性ウイルスを産生するその能力を失っている。しかしながら、これらのERVエレメントは、他の遺伝子と同様に生殖系列DNA中に維持されており、それらの遺伝子の少なくともいくつかからタンパク質を産生する潜在的能力を有している。実際、HERVがコードするタンパク質が、種々のヒト癌で検出されている。例えば、HERV-K env遺伝子のスプライスバリエントであるRec及びNp9は、悪性精巣生殖細胞にのみ見られ、健常細胞では見られない(Ruprechtらの文献、2008, Cell Mol Life Sci 65:3366-3382)。健常組織と比較して、HERV転写産物のレベルの上昇は、前立腺癌などの癌でも観察されている(Wang-Johanningの文献、2003, Cancer 98:187-197; Anderssonらの文献、1998, Int. J. Oncol, 12:309-313)。さらに、HERV-E及びHERV-Hの過剰発現は、免疫抑制的であることが示されており、これも、癌の発生に寄与し得る(Maugeneyらの文献、2001, J. Gen. Virol. 82:2515-2518)。しかしながら、HERVが癌の発生又は病原性に寄与し得る実際のメカニズムは、依然として不明である。

30

40

【0009】

周囲の隣接する宿主遺伝子の発現を調節解除することに加えて、ERV調節エレメントの活性及び新しいゲノム部位への転位は、そのうちのいくつかが発癌性を有し得る新規の転写産物の産生をもたらす可能性がある(Babaian及びMagerの文献、Mob. DNA, 2016, Lockらの文献、PNAS, 2014, 111:3534-3543)。

【0010】

幅広いワクチンモダリティが公知である。1つの十分に説明されているアプローチは、

50

免疫応答(B細胞及びT細胞応答を含む)を惹起し、免疫記憶を刺激するために、抗原性ポリペプチドを対象に直接送達することを含む。或いは、ポリヌクレオチドを、そのポリヌクレオチドにコードされた免疫原性ポリペプチドがインビボで発現されるように、ベクターによって対象に投与することができる。ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターの使用は、癌に対する予防的ワクチン接種戦略と治療的処置戦略の両方における抗原の送達のために十分に探索されてきた(Woldらの文献、Current Gene Therapy, 2013, Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy, 13:421-433)。免疫原性ペプチド、ポリペプチド、又はそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて、患者由来の抗原提示細胞(APC)をローディングすることもでき、その後、これを、治療的又は予防的免疫応答を誘発するワクチンとして、対象に注入することができる。このアプローチの例は、現在FDAによって承認されている唯一の抗癌ワクチンであるProvengeである。

10

【0011】

癌抗原は、それを用いて、種々の非ワクチン治療モダリティを作出することにより、癌の治療及び予防に利用することもできる。これらの療法は、1)抗原結合生物製剤、2)養子細胞療法:という2つの異なるクラスに分類される。

【0012】

抗原結合生物製剤は、通常、抗原で修飾された癌細胞を認識し、その破壊を促進する多価改変ポリペプチドからなる。これらの生物製剤の抗原結合成分は、限定されないが、TCR、高親和性TCR、及び様々な技術によって産生されるTCR模倣物(モノクローナル抗体技術に基づくものを含む)を含む、TCRベースの生物製剤からなるものであってもよい。これらのタイプの多価生物製剤の細胞溶解性部分は、細胞傷害性化学物質、生物毒素、免疫細胞の標的化及び活性化を促進する標的化モチーフ及び/又は免疫刺激モチーフからなるものであってもよく、これらはいずれも、腫瘍細胞の治療的破壊を促進する。

20

【0013】

養子細胞療法は、除去されて、ワクチン抗原調製物によりエクスピボで刺激される(細胞及び無細胞成分を含む、他の因子の存在下又は非存在下でT細胞とともに培養される)患者自身のT細胞をベースにしてもよい(Yossefらの文献、JCI Insight, 2018年10月4日;3(19). pii:122467. doi:10.1172/jci.insight.122467)。或いは、養子細胞療法は、癌抗原を認識する抗原結合ポリペプチドを発現するよう意図的に改変された細胞(患者由来又は非患者由来の細胞を含む)をベースにすることができる。これらの抗原結合ポリペプチドは、抗原結合生物製剤について上で記載したものと同一クラスに分類される。したがって、癌抗原結合ポリペプチドを発現するように遺伝子操作された(自己由来又は非自己由来)リンパ球は、その癌を治療するための養子細胞療法として患者に投与することができる。

30

【0014】

癌に対する効果的な免疫応答を惹起するためのERV由来抗原の使用は、癌のマウスモデルで腫瘍退縮を促進し、より好ましい予後をもたらす有望な結果を示した(Kershawらの文献、2001, Cancer Res. 61:7920-7924; Slanskyらの文献、2000, Immunity 13:529-538)。したがって、HERV抗原中心の免疫療法トライアルがヒトで企図されているが(Sachaらの文献、2012, J.Immunol 189:1467-1479)、1つには、腫瘍特異的ERV抗原の特定の厳しい制約が原因で、進展は制限されている。

40

【0015】

WO 2005/099750号は、HERV-K Mel腫瘍抗原に対する交差反応性免疫応答を惹起する際によく見られ、かつ黒色腫に対する防御を付与する、感染性病原体に対する既存のワクチンのアンカー配列を同定している。

【0016】

WO 00/06598号は、黒色腫で優先的に発現されるHERV-AVL3-B腫瘍関連遺伝子の同定、並びに該遺伝子の発現を特徴とする状態を診断及び治療するための方法及び製品に関する。

50

【0017】

WO 2006/119527号は、黒色腫関連の内因性レトロウイルス(MERV)に由来する抗原性ポリペプチド、並びに黒色腫の検出及び診断及び該疾患の予後判定のためのその使用を提供する。抗癌ワクチンとしての抗原性ポリペプチドの使用も開示されている。

【0018】

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

【0019】

WO 2006/103562号は、HERV-Kのenv遺伝子由来の免疫抑制性Np9タンパク質が発現される癌を治療又は予防するための方法を開示している。この発明は、該タンパク質の活性を阻害することができる核酸もしくは抗体を含む医薬組成物、又は該タンパク質に対する免疫応答を誘導することができる免疫原又はワクチン組成物に関する。

【0020】

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

【0021】

Humer Jらの文献、2006, Canc. Res., 66:1658-63は、黒色腫関連の内因性レトロウイルスに由来する黒色腫マーカーを特定している。

【0022】

癌、特に、黒色腫、とりわけ、皮膚黒色腫及びブドウ膜黒色腫の免疫療法において使用することができるHERV関連抗原性配列を含む新規の融合タンパク質を特定することが必要である。

【発明の概要】

【0023】

(発明の概要)

本発明者らは、驚くべきことに、LTRエレメントを含むか又はLTRエレメントに隣接するゲノム配列に由来し、皮膚黒色腫細胞では高レベルで見られるが、正常な健常組織では検出不能であるか又は非常に低レベルで見られる、特定のRNA転写産物を発見した(実施例1を参照)。そのような転写産物を本明細書では癌特異的LTR-エレメントスパニング転写産物(CLT)と称する。さらに、本発明者らは、これらのCLTによってコードされる潜在的なポリペプチド配列のサブセット(すなわち、オープンリーディングフレーム(ORF))が、癌細胞で翻訳され、抗原プロセッシング装置の構成要素によってプロセッシングされ、クラスI及びクラスII主要組織適合性複合体(MHCクラスI及びMHCクラスII)並びにクラスI及びクラスIIヒト白血球抗原(HLAクラスI、HLAクラスII)分子と関連して、腫瘍組織に見られる細胞の表面に提示されることを示した(実施例2を参照)。これらの発見は、これらのポリペプチド(本明細書において、CLT抗原と称される)が、事実上、抗原性であることを示している。したがって、CLT抗原の癌細胞提示は、これらの細胞がCLT抗原に対する同族T細胞受容体(TCR)を有するT細胞による排除を受けやすくすると考えられ、これら同族TCRを有するT細胞を増幅させるCLT抗原ベースのワクチン接種方法/レジメンは、癌細胞(及びそれを含む腫瘍)、特に、黒色腫、特に、皮膚黒色腫の腫瘍に対する免疫応答を誘発すると考えられる。黒色腫対象由来のT細胞は、実際、本明細書に開示されるCLT抗原に由来するペプチドに対して反応性であり、T細胞を増幅させ、かつT細胞受容体配列を増幅させる(実施例3を参照)。本発明者らは、CLT抗原に特異的なT細胞が中枢性寛容によって正常な対象のT細胞レパトリーから消去されないことを確認した(実施例4を参照)。健常ドナーT細胞のエクスピボ培養物におけるCLT抗原特異的T細胞の存在及び殺傷活性が決定された(実施例5を参照)。さらに、qRT-PCR及びRNA Scope研究により、CLTは、非黒色腫細胞株又は組織と比較して、黒色腫細胞株又は黒色腫腫瘍組織から抽出されたRNAで特異的に発現されることが確認された(実施例6を参照)。本

10

20

30

40

50

発明者らは、ワクチン送達のための独特のCLT抗原を含む融合タンパク質も産生した(実施例8)。

【0024】

本発明者らはまた、驚くべきことに、特定のCLT抗原をコードするCLTが、皮膚黒色腫で過剰発現されるだけでなく、ブドウ膜黒色腫でも過剰発現されることを発見した。これらのCLTによってコードされるCLT抗原ポリペプチド配列及びそれを含有する融合タンパク質は、ブドウ膜黒色腫細胞及びそれを含有する腫瘍に対する免疫応答を誘発すると考えられる。

【0025】

CLT及びCLT抗原は、癌ゲノムアトラスに見られる公知の腫瘍ゲノム配列から容易に得ることができるカノニカル配列ではない。このCLTは、ERV起源の転写制御配列によって駆動される複雑な転写及びスプライシング事象によって生じる転写産物である。CLTは高レベルで発現されるため、かつCLT抗原ポリペプチド配列は正常なヒトタンパク質の配列ではないため、それらは、強力で特異的な免疫応答を誘発することができ(実際に立証されている通り—実施例3～5及び10参照)、したがって、癌免疫療法の状況における治療的使用に好適であると考えられる。

【0026】

ヒトに存在してタンパク質産物を産生することも、免疫応答を刺激することも以前は知られていなかった、腫瘍細胞を特徴付ける高発現転写産物中に発見されたCLT抗原は、いくつかの形式で 사용할 ことができる。例えば、CLT抗原ポリペプチドを含む本発明の対象である融合タンパク質を腫瘍細胞に対する治療的又は予防的免疫応答を誘発するワクチンとして、対象に直接送達することもできる。さらに、CLT抗原をコードする核酸がそのコードされたCLT抗原の発現を増強するようにコドン最適化され得る本発明の融合タンパク質をコードする核酸を直接投与するか、又は他の方法でインビボ送達用のベクターに挿入して、コードされたタンパク質産物を腫瘍細胞に対する治療的もしくは予防的免疫応答を誘発するワクチンとして対象で産生させることができる。これら及びその他の用途は、以下でより詳細に説明されている。

【0027】

したがって、本発明は、とりわけ、6つの抗原性ポリペプチド(a)～(f)を含む融合タンパク質であって、該抗原性ポリペプチド(a)～(f)が、アミノ酸配列:

(a)配列番号1もしくはそのバリエーション又は配列番号1もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(b)配列番号2もしくはそのバリエーション又は配列番号2もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(c)配列番号6もしくはそのバリエーション又は配列番号6もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(d)配列番号7もしくはそのバリエーション又は配列番号7もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(e)配列番号4もしくはそのバリエーション又は配列番号4もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;及び

(f)配列番号8もしくはそのバリエーション又は配列番号8もしくはそのバリエーションの免疫原性断片

を有する、融合タンパク質(以後、「本発明の融合タンパク質」と称する)を提供する。

【0028】

本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする核酸分子(以後、「本発明の核酸」と称する)も提供する。

【0029】

本発明の融合タンパク質及び本発明の核酸、並びに本発明の関連する態様は、より詳細に下記で説明される通り、癌の免疫治療及び予防、特に黒色腫の免疫治療及び予防での広範な実施態様において有用であると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

(図面の説明)

図1～38の各々は、患者の腫瘍試料から得られたペプチドの抽出MS/MSスペクトルを(割り当てられた断片イオンとともに)及び断片イオンにマッピングされた線形ペプチド配列の位置を示すスペクトルのレンダリングを示す下のパネル又は表形式で示された同様のデータのいずれかを示している。

【図1】図1。患者Mel-3の腫瘍試料から得られた配列番号9のペプチドのスペクトル。

【図2】図2。患者Mel-3の腫瘍試料から得られた配列番号10のペプチドのスペクトル。

【図3】図3。患者Mel-3の腫瘍試料から得られた配列番号10のペプチドのスペクトル。

【図4】図4。患者2MT3の腫瘍試料から得られた配列番号10のペプチドのスペクトル。

【図5】図5。患者Mel-5の腫瘍試料から得られた配列番号11のペプチドのスペクトル。

【図6】図6。患者Mel-16の腫瘍試料から得られた配列番号11のペプチドのスペクトル。

【図7】図7。患者Mel-16の腫瘍試料から得られた配列番号11のペプチドのスペクトル。

【図8】図8。患者2MT3の腫瘍試料から得られた配列番号11のペプチドのスペクトル。

【図9】図9。患者2MT10の腫瘍試料から得られた配列番号11のペプチドのスペクトル。

【図10】図10。患者Mel-5の腫瘍試料から得られた配列番号12のペプチドのスペクトル。

【図11】図11。患者Mel-26の腫瘍試料から得られた配列番号18のペプチドのスペクトル。

【図12】図12。患者Mel-20の腫瘍試料から得られた配列番号19のペプチドのスペクトル。

【図13】図13。患者Mel-20の腫瘍試料から得られた配列番号19のペプチドのスペクトル。

【図14】図14。患者2MT4の腫瘍試料から得られた配列番号19のペプチドのスペクトル。

【図15】図15。患者Mel-35の腫瘍試料から得られた配列番号31のペプチドのスペクトル。

【図16】図16。患者2MT3の腫瘍試料から得られた配列番号31のペプチドのスペクトル。

【図17】図17。患者1MT1の腫瘍試料から得られた配列番号32のペプチドのスペクトル。

【図18】図18。患者Mel-3の腫瘍試料から得られた配列番号36のペプチドのスペクトル。

【図19】図19。患者Mel-3の腫瘍試料から得られた配列番号36のペプチドのスペクトル。

【図20】図20。患者2MT3の腫瘍試料から得られた配列番号36のペプチドのスペクトル。

【図21】図21。患者2MT1の腫瘍試料から得られた配列番号36のペプチドのスペクトル。

【図22】図22。患者Mel-40の腫瘍試料から得られた配列番号37のペプチドのスペクトル。

【図23】図23。患者Mel-41の腫瘍試料から得られた配列番号37のペプチドのスペクトル。

【図24】図24。患者2MT3の腫瘍試料から得られた配列番号37のペプチドのスペクトル。

【図25】図25。患者Mel-27の腫瘍試料から得られた配列番号38のペプチドのスペク

10

20

30

40

50

トル。

【図 26】図 26。患者 Mel-39 の腫瘍試料から得られた配列番号 38 のペプチドのスペクトル。

【図 27】図 27。患者 2MT12 の腫瘍試料から得られた配列番号 39 のペプチドのスペクトル。

【図 28】図 28。患者 Mel-29 の腫瘍試料から得られた配列番号 45 のペプチドのスペクトル。

【図 29】図 29。患者 Mel-41 の腫瘍試料から得られた配列番号 48 のペプチドのスペクトル。

【図 30】図 30。患者 Mel-41 の腫瘍試料から得られた配列番号 49 のペプチドのスペクトル。

【図 31】図 31。患者 Mel-41 の腫瘍試料から得られた配列番号 50 のペプチドのスペクトル。

【図 32】図 32。患者 Mel-41 の腫瘍試料から得られた配列番号 51 のペプチドのスペクトル。

【図 33】図 33。患者 Mel-21 の腫瘍試料から得られた配列番号 52 のペプチドのスペクトル。

【図 34】図 34。患者 2MT3 の腫瘍試料から得られた配列番号 52 のペプチドのスペクトル。

【図 35】図 35。患者 Mel-27 の腫瘍試料から得られた配列番号 53 のペプチドのスペクトル。

【図 36】図 36。患者 Mel-27 の腫瘍試料から得られた配列番号 54 のペプチドのスペクトル。

【図 37】図 37。患者 2MT4 の腫瘍試料から得られた配列番号 54 のペプチドのスペクトル。図 38～53 の各々は、患者腫瘍試料から得られたペプチドのネイティブ MS/MS スペクトル(上)と同じ配列に対応する合成ペプチドのネイティブスペクトル(下)とのアラインメントを示している。

【図 38】図 38 は、配列番号 10 に帰属する患者 2MT3 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 39】図 39 は、配列番号 11 に帰属する患者 2MT3 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 40】図 40 は、配列番号 19 に帰属する患者 2MT4 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 41】図 41 は、配列番号 31 に帰属する患者 2MT3 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 42】図 42 は、配列番号 32 に帰属する患者 1MT1 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 43】図 43 は、配列番号 36 に帰属する患者 2MT3 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 44】図 44 は、配列番号 37 に帰属する患者 2MT3 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 45】図 45 は、配列番号 39 に帰属する患者 2MT12 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 46】図 46 は、配列番号 45 に帰属する患者 Mel-29 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 47】図 47 は、配列番号 48 に帰属する患者 Mel-41 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 48】図 48 は、配列番号 49 に帰属する患者 Mel-41 の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図 49】図 49 は、配列番号 50 に帰属する患者 Mel-41 の免疫ペプチドーム解析から得

10

20

30

40

50

られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図50】図50は、配列番号51に帰属する患者Mel-41の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図51】図51は、配列番号52に帰属する患者Mel-21の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図52】図52は、配列番号53に帰属する患者Mel-27の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図53】図53は、配列番号54に帰属する患者Mel-27の免疫ペプチドーム解析から得られたペプチド断片の質量分析スペクトルを示している。

【図54】図54のパネルA～Cは、特定の腫瘍抗原由来ペプチドとの培養に応答した患者PBMC培養物からの腫瘍抗原特異的T細胞の増幅を示している。

【図55】図55のパネルA～Dは、黒色腫患者PBMC由来の特異的TCR保有T細胞を増幅することができたCLT抗原由来ペプチド(配列番号11、13～15、19～29、33～35、40～42)のまとめを提供している。

【図56】図56は、CLT抗原1由来のHLA-A*02:01-拘束ペプチド(配列番号16)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図57】図57は、CLT抗原2由来のHLA-A*02:01-拘束ペプチド(配列番号30)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図58】図58は、CLT抗原4由来のHLA-A*02:01-拘束ペプチド(配列番号43)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図59】図59は、CLT抗原5由来のHLA-A*03:01-拘束ペプチド(配列番号47)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図60】図60は、CLT抗原6由来のHLA-B*07:02-拘束ペプチド(配列番号50)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図61】図61は、CLT抗原7由来のHLA-A*03:01-拘束ペプチド(配列番号52)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図62】図62は、CLT抗原8由来のHLA-A*02:01-拘束ペプチド(配列番号55)に対する正常な血液ドナーからのCD8 T細胞応答を示している。

【図63】図63のパネルA～Dは、同じドナー由来のナイーブCD45RO陰性CD8 T細胞と比較したときのメモリーCD45RO陽性CD8 T細胞における、それぞれ、CLT抗原1及びCLT抗原4由来のHLA-B*07:02拘束ペプチド(配列番号17及び44)に対する応答性を示している。

【図64】図64は、増幅され、ペンタマーで選別されたCD8 T細胞がCLT抗原4に由来するペプチド(配列番号44)でパルスされたC1RB7標的細胞を殺傷することを示している。

【図65】図65は、増幅され、ペンタマーで選別されたCD8 T細胞が、CLT抗原8(配列番号8)のオープンリーディングフレームでトランスフェクトされたCaSki細胞を殺傷することを示している。

【図66】図66のパネルA～Gは、黒色腫瘍細胞株又は初代組織試料におけるCLT抗原1をコードするCLT(配列番号56)、CLT抗原2をコードするCLT(配列番号57)、CLT抗原3及び4をコードするCLT(配列番号58)、CLT抗原5をコードするCLT(配列番号59)、CLT抗原6をコードするCLT(配列番号60)、CLT抗原7をコードするCLT(配列番号61)、並びにCLT抗原8をコードするCLT(配列番号62)の転写を確認するためのqRT-PCRアッセイ結果を示している。

【図67】図67は、CLT抗原融合タンパク質1(配列番号76)の構造、CLT抗原間のリンカー配列、及び起こり得るリンカー由来エピトープのHLA結合を模式的に示している。FP=融合タンパク質。

【図68】図68は、CLT抗原融合タンパク質2(配列番号77)の構造、CLT抗原間のリンカー配列、及び起こり得るリンカー由来エピトープのHLA結合を模式的に示している。FP=融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【図 6 9】図 69 は、CLT 抗原融合タンパク質 3 (配列番号 78) の構造、CLT 抗原間のリンカー配列、及び起こり得るリンカー由来エピトープの HLA 結合を模式的に示している。FP = 融合タンパク質。

【図 7 0】図 70 は、CLT 抗原融合タンパク質 4 (配列番号 79) の構造、CLT 抗原間のリンカー配列、及び起こり得るリンカー由来エピトープの HLA 結合を模式的に示している。FP = 融合タンパク質。

【図 7 1】図 71 は、CLT 抗原融合タンパク質 1 (配列番号 76) 及び CLT 抗原融合タンパク質 2 (配列番号 77) を裏付けるマウス免疫原性データの模式的説明を提供している。

【0031】

(配列の説明)

10

配列番号 1 は、CLT 抗原 1 のポリペプチド配列である。

配列番号 2 は、CLT 抗原 2 のポリペプチド配列である。

配列番号 3 は、CLT 抗原 3 のポリペプチド配列である。

配列番号 4 は、CLT 抗原 4 のポリペプチド配列である。

配列番号 5 は、CLT 抗原 5 のポリペプチド配列である。

【0032】

配列番号 6 は、CLT 抗原 6 のポリペプチド配列である。

配列番号 7 は、CLT 抗原 7 のポリペプチド配列である。

配列番号 8 は、CLT 抗原 8 のポリペプチド配列である。

配列番号 9 ~ 17 は、CLT 抗原 1 由来のペプチド配列である。

20

配列番号 18 ~ 30 は、CLT 抗原 2 由来のペプチド配列である。

【0033】

配列番号 31 ~ 35 は、CLT 抗原 3 由来のペプチド配列である。

配列番号 36 ~ 44 は、CLT 抗原 4 由来のペプチド配列である。

配列番号 45 ~ 47 は、CLT 抗原 5 由来のペプチド配列である。

配列番号 48 ~ 51 は、CLT 抗原 6 由来のペプチド配列である。

配列番号 52 は、CLT 抗原 7 由来のペプチド配列である。

【0034】

配列番号 53 ~ 55 は、CLT 抗原 8 由来のペプチド配列である。

配列番号 56 は、CLT 抗原 1 をコードする CLT の cDNA 配列である。

30

配列番号 57 は、CLT 抗原 2 をコードする CLT の cDNA 配列である。

配列番号 58 は、CLT 抗原 3 及び 4 をコードする CLT の cDNA 配列である。

配列番号 59 は、CLT 抗原 5 をコードする CLT の cDNA 配列である。

【0035】

配列番号 60 は、CLT 抗原 6 をコードする CLT の cDNA 配列である。

配列番号 61 は、CLT 抗原 7 をコードする CLT の cDNA 配列である。

配列番号 62 は、CLT 抗原 8 をコードする CLT の cDNA 配列である。

配列番号 63 は、CLT 抗原 1 をコードする cDNA 配列である。

配列番号 64 は、CLT 抗原 2 をコードする cDNA 配列である。

【0036】

40

配列番号 65 は、CLT 抗原 3 をコードする cDNA 配列である。

配列番号 66 は、CLT 抗原 4 をコードする cDNA 配列である。

配列番号 67 は、CLT 抗原 5 をコードする cDNA 配列である。

配列番号 68 は、CLT 抗原 6 をコードする cDNA 配列である。

配列番号 69 は、CLT 抗原 7 をコードする cDNA 配列である。

【0037】

配列番号 70 は、CLT 抗原 8 をコードする cDNA 配列である。

配列番号 71 ~ 75 は、CLT 抗原融合タンパク質を構築するために使用されたリンカー配列である。

配列番号 76 は、CLT 抗原融合タンパク質 1 のポリペプチド配列である。

50

配列番号77は、CLT抗原融合タンパク質2のポリペプチド配列である。

配列番号78は、CLT抗原融合タンパク質3のポリペプチド配列である。

配列番号79は、CLT抗原融合タンパク質4のポリペプチド配列である。

【0038】

配列番号80は、CLT抗原融合タンパク質1をコードするcDNA配列である。

配列番号81は、CLT抗原融合タンパク質2をコードするcDNA配列である。

配列番号82は、CLT抗原融合タンパク質3をコードするcDNA配列である。

配列番号83は、CLT抗原融合タンパク質4をコードするcDNA配列である。

配列番号84は、CLT抗原融合タンパク質を構築するために使用されたリンカー配列である。

配列番号85～87は、図54に示されているTCR VB CDR3 AA配列である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

(発明の詳細な説明)

(融合タンパク質)

「融合タンパク質」という用語は、タンパク質合成を通じて、ペプチド結合によって接続された少なくとも2つのポリペプチドを含む任意のタンパク質を指す。融合タンパク質は、単一のタンパク質を産生する単一のユニットとして転写及び翻訳されるように接続されている別々のポリペプチドをコードする2以上の遺伝子の接続によって生成され得る。

【0040】

本発明は、個々のポリペプチドをコードする配列を融合させる核酸コンストラクトを作出することにより、各々のポリペプチドが第二の又はさらなるポリペプチドに融合されている少なくとも6つのポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。本発明の融合タンパク質は、本明細書に記載される有用性を有すると考えられ、かつ個々の成分ポリペプチドと比較して、優れた免疫原性活性もしくはワクチン活性又は予防的もしくは治療的効果(応答の幅及び深さを増大させることを含む)の利点を有し得、かつ非近交系集団においてとりわけ価値があり得る。本発明の融合タンパク質は、ワクチン抗原及び/又はベクター化ワクチン(核酸ワクチンを含む)の構築及び製造の効率を増大させるという利点も提供する。

【0041】

したがって、本発明は、6つの抗原性ポリペプチド(a)～(f)を含む融合タンパク質であって、該抗原性ポリペプチド(a)～(f)が、アミノ酸配列:

(a) 配列番号1もしくはそのバリエーション又は配列番号1もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(b) 配列番号2もしくはそのバリエーション又は配列番号2もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(c) 配列番号6もしくはそのバリエーション又は配列番号6もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(d) 配列番号7もしくはそのバリエーション又は配列番号7もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;

(e) 配列番号4もしくはそのバリエーション又は配列番号4もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;及び

(f) 配列番号8もしくはそのバリエーション又は配列番号8もしくはそのバリエーションの免疫原性断片

を有する、融合タンパク質を提供する。

【0042】

本発明の融合タンパク質は、抗原性ポリペプチド(g)及び(h)から選択される1以上の追加の抗原性ポリペプチドをさらに含むことができ、ここで、該抗原性ポリペプチド(g)及び(h)は、アミノ酸配列:

(g) 配列番号3もしくはそのバリエーション又は配列番号3もしくはそのバリエーションの免疫原性

10

20

30

40

50

断片;及び

(h)配列番号5もしくはそのバリエーション又は配列番号5もしくはそのバリエーションの免疫原性断片

を有する。

【0043】

一実施態様において、融合ポリペプチドは、6つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)を含む。
一実施態様において、融合ポリペプチドは、8つの抗原性ポリペプチド(a)~(h)を含む。
一実施態様において、融合ポリペプチドは、7つの抗原性ポリペプチド(a)~(g)を含む。
一実施態様において、融合ポリペプチドは、7つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)及び(h)を含む。

10

【0044】

抗原性ポリペプチド(a)~(f)のうちの1つ又は複数(例えば、抗原性ポリペプチド(a)~(f)のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は6つ全て)は、N-末端メチオニンアミノ酸残基を欠く配列を含むか又は該配列からなり得る。例えば、抗原性ポリペプチド(a)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号1の配列を有し得、かつ/又は抗原性ポリペプチド(b)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号2の配列を有し得、かつ/又は抗原性ポリペプチド(c)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号3の配列を有し得、かつ/又は抗原性ポリペプチド(d)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号4の配列を有し得、かつ/又は抗原性ポリペプチド(e)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号5の配列を有し得、かつ/又は抗原性ポリペプチド(f)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号6の配列を有し得る。存在する場合、抗原性ポリペプチド(g)及び(h)のうちの1つ又は複数(例えば、いずれか1つ又は両方)は、N-末端メチオニンアミノ酸残基を欠く配列を含むか又は該配列からなり得る。例えば、抗原性ポリペプチド(g)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号7の配列を有し得、かつ/又は抗原性ポリペプチド(h)は、N-末端メチオニンアミノ酸が除去されている配列番号8の配列を有し得る。

20

【0045】

したがって、本発明は、6つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)を含む融合タンパク質であって、該抗原性ポリペプチド(a)~(f)が、アミノ酸配列:

(a)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号1もしくはそのバリエーション又は配列番号1もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;
(b)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号2もしくはそのバリエーション又は配列番号2もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;
(c)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号6もしくはそのバリエーション又は配列番号6もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;
(d)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号7もしくはそのバリエーション又は配列番号7もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;
(e)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号4もしくはそのバリエーション又は配列番号4もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;及び
(f)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号8もしくはそのバリエーション又は配列番号8もしくはそのバリエーションの免疫原性断片
を有する、融合タンパク質を提供する。

30

40

【0046】

本発明の融合タンパク質は、抗原性ポリペプチド(g)及び(h)から選択される1以上の追加の抗原性ポリペプチドをさらに含むことができ、ここで、該抗原性ポリペプチド(g)及び(h)は、アミノ酸配列:

(g)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号3もしくはそのバリエーション又は配列番号3もしくはそのバリエーションの免疫原性断片;及び
(h)N-末端メチオニン残基を有するもしくはN-末端メチオニン残基を有さない配列番号5もしくはそのバリエーション又は配列番号5もしくはそのバリエーションの免疫原性断片

50

を有する。

【0047】

一実施態様において、本発明の融合タンパク質は、配列番号2からN-末端メチオニン残基を除いたアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチドを含む。一実施態様において、本発明の融合タンパク質は、配列番号6からN-末端メチオニン残基を除いたアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチドを含む。一実施態様において、本発明の融合タンパク質は、配列番号5からN-末端メチオニン残基を除いたアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチドを含む。一実施態様において、本発明の融合タンパク質は、配列番号2からN-末端メチオニン残基を除いたアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチド、配列番号6からN-末端メチオニン残基を除いたアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチド、及び配列番号5からN-末端メチオニン残基を除いたアミノ酸配列を有する抗原性ポリペプチドを含む。

10

【0048】

好適には、本発明の融合タンパク質は、6つの抗原性ポリペプチド(a)～(f)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)～(f)は、アミノ酸配列：

- (a) 配列番号1；
- (b) 配列番号2からN-末端メチオニン残基を除いたもの；
- (c) 配列番号6；
- (d) 配列番号7；
- (e) 配列番号4；及び
- (f) 配列番号8

20

を有する。

【0049】

好適には、本発明の融合タンパク質は、8つの抗原性ポリペプチド(a)～(h)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)～(h)は、アミノ酸配列：

- (a) 配列番号1；
- (b) 配列番号2からN-末端メチオニン残基を除いたもの；
- (c) 配列番号6からN-末端メチオニン残基を除いたもの；
- (d) 配列番号7；
- (e) 配列番号4；
- (f) 配列番号8；
- (g) 配列番号3；及び
- (h) 配列番号5からN-末端メチオニン残基を除いたもの

30

を有する。

【0050】

好適には、本発明の融合タンパク質は、8つの抗原性ポリペプチド(a)～(h)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)～(h)は、アミノ酸配列：

- (a) 配列番号1；
- (b) 配列番号2からN-末端メチオニン残基を除いたもの；
- (c) 配列番号6；
- (d) 配列番号7；
- (e) 配列番号4；
- (f) 配列番号8；
- (g) 配列番号3；及び
- (h) 配列番号5

40

を有する。

【0051】

本発明の融合タンパク質の抗原性ポリペプチドは、N末端からC末端へと様々な順序で配置することができる。本発明の融合タンパク質中のポリペプチドの設計及び順序は、実施例8に記載されている。特に、融合タンパク質中のポリペプチドの順序が重要であるが、それは、そのような順序が、ある場合には、ポリペプチドの望ましい免疫原性ペプチド

50

領域の優れたプロセッシング及び提示をもたらすことができ、他の場合には、天然の癌特異的CLT抗原間の接合から得られる非天然免疫原性ペプチドが、ワクチン接種の間に、表面提示されたクラスI HLA分子上に提示され、それにより、望ましくないT細胞応答を誘発し得るという可能性を低下させるための最適な融合設計に必要となるからである。

【0052】

本発明の融合タンパク質は、成分CLT抗原に対する強い抗原性応答をもたらす(実施例9及び10を参照)、その接合領域に対する最小限の抗原性応答を誘発すると考えられる(実施例8を参照)。

【0053】

一実施態様において、融合タンパク質が6つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)を含む場合、該6つの抗原性ポリペプチドは、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、及び(f)の順にNからCへ配置される。

【0054】

1つの好適な実施態様において、6つの抗原性ポリペプチドは、配列番号1~2、4、6~8の配列を有し、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号7、配列番号4、及び配列番号8の順にNからCへ配置される。N-末端メチオニンが削除されている対応する配列は、上で説明されているように任意に使用され得る。したがって、好適には、配列番号1がN末端に存在し、配列番号8がC末端に存在する。好適には、配列番号2のN-末端メチオニンは削除される。本発明の一実施態様において、融合タンパク質は、配列番号76の配列を有する。

【0055】

別の実施態様において、融合タンパク質が6つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)を含む場合、該6つの抗原性ポリペプチドは、(c)、(f)、(d)、(b)、(e)、及び(a)の順にNからCへ配置される。

【0056】

1つの好適な実施態様において、6つの抗原性ポリペプチドは、配列番号1~2、4、6~8の配列を有し、かつ配列番号6、配列番号8、配列番号7、配列番号2、配列番号4、及び配列番号1の順にNからCへ配置される。N-末端メチオニンが削除されている対応する配列は、上で説明されているように任意に使用され得る。したがって、好適には、配列番号6がN末端に存在し、配列番号1がC末端に存在する。好適には、配列番号2のN-末端メチオニンは削除される。本発明の一実施態様において、融合タンパク質は、配列番号77の配列を有する。

【0057】

別の実施態様において、融合タンパク質が8つの抗原性ポリペプチド(a)~(h)を含む場合、該8つの抗原性ポリペプチドは、(a)、(b)、(g)、(d)、(e)、(h)、(c)、及び(f)の順にNからCへ配置される。

【0058】

1つの好適な実施態様において、8つの抗原性ポリペプチドは、配列番号1~8の配列を有し、かつ配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号4、配列番号5、配列番号6、及び配列番号8の順にNからCへ配置される。N-末端メチオニンが削除されている対応する配列は、上で説明されているように任意に使用され得る。好適には、配列番号1がN末端に存在し、配列番号8がC末端に存在する。好適には、配列番号2のN-末端メチオニンは削除される。好適には、配列番号6のN-末端メチオニンは削除される。好適には、配列番号5のN-末端メチオニンは削除される。本発明の一実施態様において、融合タンパク質は、配列番号78の配列を有する。

【0059】

別の実施態様において、融合タンパク質が8つの抗原性ポリペプチド(a)~(h)を含む場合、該8つの抗原性ポリペプチドは、(c)、(g)、(a)、(h)、(e)、(f)、(d)、及び(b)の順にNからCへ配置される。

【0060】

10

20

30

40

50

1つの好適な実施態様において、8つの抗原性ポリペプチドは、配列番号1～8の配列を有し、かつ配列番号6、配列番号3、配列番号1、配列番号5、配列番号4、配列番号8、配列番号7、及び配列番号2の順にNからCへ配置される。N-末端メチオニンが削除されている対応する配列は、上で説明されているように任意に使用され得る。好適には、配列番号6がN末端に存在し、配列番号2がC末端に存在する。好適には、配列番号2のN-末端メチオニンは削除される。本発明の一実施態様において、融合タンパク質は、配列番号79の配列を有する。

【0061】

本発明の融合タンパク質は、(i) 黒色腫関連抗原である他のポリペプチド;(ii) 免疫応答を増強することができるポリペプチド配列(すなわち、免疫刺激配列);及び(iii) 例えば、抗原エピトープに対するCD8⁺ T細胞応答の増大を助ける強いCD4⁺を提供することができる普遍的CD4ヘルパーエピトープを含むポリペプチド配列から選択される第二の又はさらなるポリペプチドに融合させることができる。

10

【0062】

本発明は、本発明のポリペプチドに関して必要な変更を加えて、前述の融合ポリペプチドをコードする核酸及び本発明の他の態様(ベクター、組成物、細胞など)も提供する。

【0063】

(ポリペプチド)

「タンパク質」、「ポリペプチド」、及び「ペプチド」という用語は、本明細書において互換的に使用され、長さ、共翻訳又は翻訳後修飾に関係なく、任意のペプチド結合アミノ酸鎖を指す。

20

【0064】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸、並びに天然に存在するアミノ酸に類似する様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物のいずれか1つを指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝コードによってコードされた20種のL-アミノ酸、並びに後に修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸、及びO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」という用語は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的な化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合しているα炭素を有するが、天然アミノ酸と比較して修飾されたR基又は修飾されたペプチド骨格を有する化合物を指す。例としては、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム、及びノルロイシンが挙げられる。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸に類似する様式で機能する化学的化合物を指す。好適には、アミノ酸は、天然に存在するアミノ酸又はアミノ酸類似体、とりわけ、天然に存在するアミノ酸、特に、遺伝コードによってコードされた20種のL-アミノ酸のうちの1つである。

30

【0065】

アミノ酸は、本明細書において、その一般的に知られている3文字記号によるか、又はIUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)によって推奨される1文字記号によるかのいずれかによって表される場合がある。ヌクレオチドも同様に、その一般的に認められた1文字コードによって表される場合がある。

40

【0066】

一般に、本発明の融合タンパク質のポリペプチド配列のバリエーションは、それに対する高度の配列同一性を有する配列を含む。例えば、バリエーションは、その全長にわたって、関連する参照配列と、好適には、少なくとも約80%の同一性、より好ましくは、少なくとも約85%の同一性、及び最も好ましくは、少なくとも約90%の同一性(例えば、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%)を有する。

【0067】

好適には、バリエーションは、免疫原性バリエーションである。バリエーションは、ポリペプチドを抗原として用いるPBMC又は全血のインビトロ再刺激アッセイ(例えば、数時間から最大1年、例えば、最大6カ月、1日～1カ月、又は1～2週間の再刺激)において、参照配列(

50

すなわち、そのバリエーションがバリエーションである配列)の活性の少なくとも20%、好ましくは、少なくとも50%、とりわけ、少なくとも75%(例えば、少なくとも90%)である応答を誘発する免疫原性バリエーションであると考えられ、このアッセイでは、例えば、リンパ球増殖(例えば、T細胞増殖)を介する細胞の活性化、培養上清中での(ELISAなどによって測定される)サイトカイン(例えば、IFN- γ)の産生、又は細胞内及び細胞外染色(例えば、CD3、CD4、CD8、IL2、TNF- α 、IFN γ 、1型IFN、CD40L、CD69などの免疫マーカーに特異的な抗体を使用)によるT細胞応答の特徴解析と、それに続くフローサイトメーターによる解析が測定される。

【0068】

バリエーションは、例えば、保存的に修飾されたバリエーションであってもよい。「保存的に修飾されたバリエーション」は、その改変が機能的に類似するアミノ酸によるアミノ酸の置換又はバリエーションの生物学的機能に実質的に影響を及ぼさない残基の置換/欠失/付加をもたらすものである。通常、バリエーションのそのような生物学的機能は、黒色腫、例えば、皮膚黒色腫の癌抗原に対する免疫応答を誘導することになる。

【0069】

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

【0070】

本発明の融合タンパク質は、いくつかの置換、例えば、参照配列と比較したとき保存的な置換を含有するバリエーション配列を有するポリペプチドを含み得る(例えば、1~25、例えば、1~10、特に、1~5、とりわけ、1個のアミノ酸残基を改変し得る)。置換の数、例えば、保存的な置換の数は、参照配列の残基数の最大で20%、例えば、最大で10%、例えば、最大で5%、例えば、最大1%であり得る。一般に、保存的な置換は、以下に指定されているアミノ酸分類のうちの1つに含まれるが、場合によっては、抗原の免疫原性特性に実質的な影響を及ぼすことなく、他の置換が可能となる場合もある。次の8つのグループは各々、通常は互いにとっての保存的な置換であるアミノ酸を含有する:

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

(例えば、Creightonの文献、Proteins 1984を参照)。

【0071】

好適には、そのような置換は、エピトープの免疫学的構造を変化させず(例えば、該置換は、一次配列にマッピングされるエピトープ領域内では生じない)、それゆえ、抗原の免疫原性特性に顕著な影響を及ぼさない。

【0072】

ポリペプチドバリエーションは、参照配列と比較して追加のアミノ酸が挿入されているものも含み、例えば、そのような挿入は、1~10個の位置(例えば、1~5個の位置、好適には、1又は2個の位置、特に、1個の位置)で生じることができ、かつ例えば、各々の位置に50個以下のアミノ酸(例えば、20個以下、特に、10個以下、とりわけ、5個以下)の付加を含むことができる。好適には、そのような挿入は、エピトープ領域では生じないため、抗原の免疫原性特性に顕著な影響を及ぼさない。挿入物の1つの例としては、目的の抗原の発現及び/又は精製を補助するためのヒスチジン残基の短いストレッチ(例えば、2~6残基)が挙げられる。

【0073】

ポリペプチドバリエーションは、参照配列と比較してアミノ酸が欠失しているものを含み、

例えば、そのような欠失は、1～10個の位置(例えば、1～5個、好適には、1又は2個、特に、1個の位置)で生じることができ、かつ例えば、各々の位置に50個以下のアミノ酸(例えば、20個以下、特に、10個以下、とりわけ、5個以下)の欠失を含むことができる。好適には、そのような欠失は、エピトープ領域では生じないため、抗原の免疫原性特性に顕著な影響を及ぼさない。

【0074】

当業者は、特定のタンパク質バリエーションが、置換、欠失、及び付加(又はこれらの任意の組合せ)を含み得ることを認識しているであろう。例えば、置換/欠失/付加は、所望の患者HLA分子への結合を増強し(又は中立的な効果を有し)、免疫原性を増大させる(又は免疫原性を変化させないでおく)可能性がある。

【0075】

本発明による融合タンパク質のポリペプチド配列の免疫原性断片は、CLT抗原の長さに応じて、通常、全長ポリペプチド配列由来の少なくとも9個の連続アミノ酸(例えば、少なくとも9又は10個)、例えば、少なくとも12個の連続アミノ酸(例えば、少なくとも15個又は少なくとも20個の連続アミノ酸)、特に、少なくとも50個の連続アミノ酸、例えば、少なくとも100個の連続アミノ酸(例えば、少なくとも200個の連続アミノ酸)を含む。好適には、該免疫原性断片は、全長ポリペプチド配列の長さの少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、例えば、少なくとも50%、例えば、少なくとも70%又は少なくとも80%である。

【0076】

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

【0077】

T細胞エピトープは、HLA分子に結合したときにT細胞(例えば、CD4+又はCD8+ T細胞)によって認識されるアミノ酸の短い連続するストレッチである。T細胞エピトープの特定は、当業者に周知であるエピトープマッピング実験によって達成することができる(例えば、Paulの文献、Fundamental Immunology, 第3版、243-247(1993); Bei Barthらの文献、2005, Bioinformatics, 21(Suppl. 1):i29-i37を参照)。

【0078】

癌におけるT細胞応答の決定的な関与の結果として、少なくとも1つのT細胞エピトープを含有する配列番号1～8の全長ポリペプチドの断片は免疫原性である可能性があり、かつ免疫保護に寄与する可能性があることが容易に明らかである。

【0079】

ヒトなどの多様な非近交系集団において、異なるHLAタイプとは、特定のエピトープが集団の全員には認識されない可能性があることを意味することが理解されるであろう。その結果、ポリペプチドに対する免疫応答の認識及び規模のレベルを最大化するために、免疫原性断片が全長配列由来の複数のエピトープ(好適には、CLT抗原内の全てのエピトープ)を含有することが一般的に望ましい。

【0080】

有用であり得る配列番号1～8の抗原性ポリペプチドの特定の断片は、少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープ、好適には、少なくとも2つのCD8+ T細胞エピトープ、とりわけ、全てのCD8+ T細胞エピトープを含有するもの、特に、複数のHLAアレルと関連するもの、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれより多くのアレルと関連するもの)を含む。有用であり得る配列番号1～8の抗原性ポリペプチドの特定の断片は、少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープ、好適には、少なくとも2つのCD4+ T細胞エピトープ、とりわけ、全てのCD4+ T細胞エピトープを含有するもの(特に、複数のHLAアレルと関連するもの、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、又はそれより多くのアレルと関連するもの)を含む。しかしながら、ワクチン設計の専門家は、外因性のCD4+ T細胞エピトープをCD8+ T細胞エピトープと組み合わせ、CD8+ T細胞エピトープに対する所望の応答を

10

20

30

40

50

達成することができるだろう。

【0081】

全長ポリペプチドの個々の断片が使用される場合、そのような断片は、ポリペプチドを抗原として用いるPBMC又は全血のインビトロ再刺激アッセイ(例えば、数時間から最大1年、例えば、最大6カ月、1日~1カ月、又は1~2週間の再刺激)において、参照配列(すなわち、その断片が断片である配列)の活性の少なくとも20%、好ましくは、少なくとも50%、とりわけ、少なくとも75%(例えば、少なくとも90%)である応答を誘発する場合、免疫原性であると考えられ、このアッセイでは、例えば、リンパ球増殖(例えば、T細胞増殖)を介する細胞の活性化、培養上清中での(ELISAなどによって測定される)サイトカイン(例えば、IFN- γ)の産生、又は細胞内及び細胞外染色(例えば、CD3、CD4、CD8、IL2、TNF- α 、IFN γ 、1型IFN、CD40L、CD69などの免疫マーカーに特異的な抗体を使用)によるT細胞応答の特徴解析と、それに続くフローサイトメーターによる解析が測定される。

10

【0082】

場合によっては、全長ポリペプチドの複数の断片(重複する場合も重複しない場合もあり、全長配列の全体にわたる場合もそうでない場合もある)を用いて、全長配列自体と同等の生物学的応答を得ることもできる。例えば、上記の少なくとも2つ(例えば、3つ、4つ、又は5つ)の免疫原性断片が組み合わさって、PBMC又は全血のインビトロ再刺激アッセイ(例えば、T細胞増殖及び/又はIFN- γ 産生アッセイ)において、参照配列の少なくとも50%、好ましくは、少なくとも75%、とりわけ、少なくとも90%の活性を提供する。

20

【0083】

配列番号1~8の抗原性ポリペプチドの免疫原性断片の例、したがって、本発明の融合タンパク質の成分ペプチドの例としては、配列番号9~55の配列を含むか又は該配列からなるポリペプチドが挙げられる。配列番号9~12、18~19、30、31~32、及び37~39、45、48~54の配列は、HLAクラスI分子に結合していることが免疫ペプチドーム解析から確認された(実施例2を参照)。配列番号13~17、20~29、33~35、40~44の配列は、NetMHCソフトウェアによってHLAクラスI分子に結合していると予測され、免疫学的検証アッセイで使用された(実施例3、4及び5を参照)。

【0084】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(a)は、配列番号1もしくはそのバリエーション又は配列番号1もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号9~12のいずれか1つを含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号9~12のうちの2つ、3つ、又は4つを含む。さらなる例示的な断片は、配列番号13~17のいずれか1つを含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号9~17の全てを含む(任意の重複配列が複数回存在する必要がないように、可能な配列が考慮される)。

30

【0085】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(b)は、配列番号2もしくはそのバリエーション又は配列番号2もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号18もしくは配列番号19を含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号18及び配列番号19を含む。さらなる例示的な断片は、配列番号20~30のいずれか1つを含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号18~30の全てを含む(任意の重複配列が複数回存在する必要がないように可能な配列が考慮される)。

40

【0086】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(c)は、配列番号6もしくはそのバリエーション又は配列番号6もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号48~51を含むか又はこれらからなる。

【0087】

50

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(d)は、配列番号7もしくはそのバリエーション又は配列番号7もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号52を含むか又はこれらからなる。

【0088】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(e)は、配列番号4もしくはそのバリエーション又は配列番号4もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号36を含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号37もしくは配列番号38を含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号39を含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号40～44のいずれか1つを含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号36及び配列番号37又は配列番号38のいずれかを含む。さらなる例示的な断片は、配列番号39及び配列番号37又は配列番号38を含む。さらなる例示的な断片は、配列番号36～44の全てを含む(任意の重複配列が複数回存在する必要がないように可能な配列が考慮される)。

10

【0089】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(f)は、配列番号8もしくはそのバリエーション又は配列番号8もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号53～55を含むか又はこれらからなる。

【0090】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(g)は、配列番号3もしくはそのバリエーション又は配列番号3もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号31を含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号31を含む。さらなる例示的な断片は、配列番号32～35のいずれか1つを含むか又はこれらからなる。さらなる例示的な断片は、配列番号31及び配列番号32を含む。さらなる例示的な断片は、配列番号31～35の全てを含む(任意の重複配列が複数回存在する必要がないように可能な配列が考慮される)。

20

【0091】

融合タンパク質の抗原性ポリペプチド成分(h)は、配列番号5もしくはそのバリエーション又は配列番号5もしくはそのバリエーションの免疫原性断片を含み得るか又はこれらからなり得る。例示的な断片は、配列番号45～47のいずれか1つを含むか又はこれらからなる。

30

【0092】

(リンカー)

本発明は、融合タンパク質の抗原性ポリペプチドが1以上のペプチドリinkerによって接続されている融合タンパク質を提供する。本発明の一実施態様において、本発明の融合タンパク質の抗原性ポリペプチドは、1以上のリンカー(例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、又は7つのリンカー)によって接続されている。リンカーは、融合タンパク質の抗原性ポリペプチドの各々を分離し得る。リンカーは、「内部のもの」であり得る、すなわち、リンカーは、融合タンパク質の最初のポリペプチドのN末端及び最後のポリペプチドのC末端に存在しない。本発明の一実施態様において、1以上のリンカーは、抗原性ポリペプチド(a)と(b)、(b)と(c)、(c)と(d)、(d)と(e)、(e)と(f)の間に位置付けられる。本発明の別の実施態様において、1以上のリンカーは、抗原性ポリペプチド(c)と(f)、(f)と(d)、(d)と(b)、(b)と(e)、(e)と(a)の間に位置付けられる。本発明のさらなる実施態様において、リンカーは、抗原性ポリペプチド(a)と(b)、(b)と(g)、(g)と(d)、(d)と(e)、(e)と(h)、(h)と(c)、(c)と(f)の間に位置付けられる。本発明のまたさらなる実施態様において、リンカーは、抗原性ポリペプチド(c)と(g)、(g)と(a)、(a)と(h)、(h)と(e)、(e)と(f)、(f)と(d)、(d)と(b)の間に位置付けられる。

40

【0093】

リンカーは、リンカーペプチド配列、又はコードされたペプチドをコードするcDNAであってもよい。リンカーは、リンカー配列がある抗原性ポリペプチドのC末端と次の抗原性ポリペプチドのN末端の間に挿入される単一のコンストラクトを作出し、それにより、

50

融合タンパク質の抗原性ポリペプチドを1つに連結させることにより、本発明の各々の融合タンパク質の個々の抗原の間に配置される。融合タンパク質中で使用される個々のリンカーは、同じ配列を有していてもよく、又は該リンカーは、異なる配列を有していてもよい。本発明の一実施態様において、リンカーは、配列番号71～75及び84から選択される配列を含むか又は該配列からなる。

【0094】

本発明の実施態様において、融合タンパク質は、配列番号76～79から選択される配列を含むか又は該配列からなる。

【0095】

リンカーは、グリシンベースのリンカーであってもよく、これは、長さが3～6アミノ酸のコネクター中に、リジンも含み得る(配列番号71～75及び84を参照)。本発明のリンカーは、リンカー自体を含有する望まれない免疫原性エピトープを導入するリスクを低下させ;それは、個々の抗原性ポリペプチドの直接的な融合によって作出される望まれないエピトープも妨げる。

【0096】

本発明の融合タンパク質は、別々の抗原性ポリペプチド配列と結果として得られるオープンリーディングフレームが単一のタンパク質を産生する単一のユニットとして転写及び翻訳されるように接続されているリンカーをコードするcDNAとをコードする6以上(例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個)の遺伝子の接続によって作出され得る。本発明の融合タンパク質をコードする核酸は、配列番号80～83から選択される配列を含むか又は該配列からなり得る。

【0097】

(核酸)

本発明は、本発明の融合タンパク質をコードする単離された核酸(本発明の核酸と称する)を提供する。

【0098】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において互換的に使用され、ヌクレオチドモノマー、特に、デオキシリボヌクレオチドモノマー又はリボヌクレオチドモノマーから作られるポリマー性高分子を指す。この用語は、公知のヌクレオチド類似体又は修飾された骨格残基もしくは結合を含有する核酸を包含し、該核酸は、天然に存在するもの及び天然に存在しないものであり、参照核酸と類似の性質を有し、かつ参照ヌクレオチドと類似の様式で代謝されることが意図されるか、又は系内での半減期が延長されることが意図される。そのような類似体の例としては、限定されるものではないが、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が挙げられる。好適には、「核酸」という用語は、デオキシリボヌクレオチドモノマー又はリボヌクレオチドモノマーの天然に存在するポリマーを指す。好適には、本発明の核酸分子は、組換え体である。組換え体とは、核酸分子が、クローニング、制限処理もしくはライゲーション工程、又は自然界に見られる核酸分子と異なる核酸分子(例えば、cDNAの場合)を生じる他の手順のうちの少なくとも1つの産物であることを意味する。ある実施態様において、本発明の核酸は、人工核酸配列(例えば、天然に存在しないコドン利用を有するcDNA配列又は核酸配列)である。一実施態様において、本発明の核酸は、DNAである。或いは、本発明の核酸は、RNAである。

【0099】

DNA(デオキシリボ核酸)及びRNA(リボ核酸)は、それぞれ、デオキシリボシル及びリボシル成分である糖部分の骨格を有する核酸分子を指す。この糖部分は、4つの天然塩基(DNA中のアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、並びにRNA中のアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、及びウラシル(U))である塩基に連結されていてもよい。本明細書で使用される場合、「対応するRNA」は、DNA中のチミン(T)がRNA中ではウラシル(U)で置換されていることを別にすれば、参照DNAと同じ配列を有するR

NAである。糖部分はまた、イノシン、キサントシン、7-メチルグアノシン、ジヒドロウリジン、及び5-メチルシチジンなどの非天然塩基に連結されてもよい。糖(デオキシリボシル/リボシル)部分間の天然のリン酸ジエステル結合は、任意にホスホロチオエート結合と置き換えられていてもよい。好適には、本発明の核酸は、糖部分間のリン酸ジエステル結合を有するデオキシリボシル又はリボシル糖骨格に結合した天然塩基からなる。

【0100】

一実施態様において、本発明の核酸は、DNAである。例えば、核酸は、配列番号56～62及び63～70から選択される配列を含むか又はこれらの配列からなる。同じく提供されるのは、配列番号56～62もしくは63～70から選択される配列のバリエーションを含むか又はこれらからなる核酸であり、このバリエーションは、同じアミノ酸配列をコードするが、遺伝コードの縮重に基づいて、異なる核酸を有する。

10

【0101】

したがって、遺伝コードの縮重のために、異なるが、機能的に同一である多数の核酸が、任意の所与のポリペプチドをコードすることができる。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、及びGCUは全て、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって規定される全ての位置において、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変化させることなく、記載された対応するコドンのいずれかに改変することができる。そのような核酸バリエーションは、「サイレント」(「縮重型」又は「同義的」と称されることもある)バリエーションをもたらす、それは、保存的に修飾されたバリエーションの1種である。ポリペプチドをコードする本明細書に開示される全ての核酸配列はまた、該核酸の全てのあり得るサイレントバリエーションを可能にする。当業者は、核酸中の各々のコドン(通常はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG及び通常はトリプトファンに対する唯一のコドンであるUGGを除く)を修飾して、機能的に同一な分子を生じさせることができることを認識しているだろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各々のサイレントバリエーションは、記載された各々の配列中で潜在的であり、本発明の態様として提供されている。

20

【0102】

縮重コドン置換は、1以上の選択された(又は全ての)コドンの3番目の位置が混合された塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成させることにより達成することもできる(Batzerらの文献、1991, Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsukaらの文献、1985, J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Rossoliniらの文献、1994, Mol. Cell. Probes 8:91~98)。

30

【0103】

配列番号56～62及び63～70から選択される配列を含むか又はこれらの配列からなる本発明の核酸は、参照配列と比較したとき、多くのサイレントバリエーションを含有し得る(例えば、1～50個、例えば、1～25個、特に、1～5個、とりわけ、1個のコドンが改変され得る)。

【0104】

一実施態様において、本発明の核酸は、RNAである。本明細書に提供されるDNA配列に対応し、かつデオキシリボヌクレオチド骨格の代わりにリボヌクレオチド骨格を有し、かつチミン(T)の代わりに側鎖塩基ウラシル(U)を有するRNA配列が提供される。

40

【0105】

したがって、本発明の核酸は、配列番号56～62及び63～70から選択されるcDNA配列のRNA等価物を含むか又はこれらからなり、かつ参照配列と比較したとき、多くのサイレントバリエーションを含有し得る(例えば、1～50個、例えば、1～25個、特に、1～5個、とりわけ、1個のコドンが改変され得る)。「RNA等価物」とは、参照cDNA配列と同じ遺伝情報を含む(すなわち、デオキシリボヌクレオチド骨格の代わりにリボヌクレオチド骨格を有し、かつチミン(T)の代わりに側鎖塩基ウラシル(U)を有する同じコドンを含む)RNA配列を意味する。

【0106】

50

本発明は、前述のcDNA及びRNA配列に相補的である配列も含む。

【0107】

一実施態様において、本発明の核酸は、ヒト宿主細胞内での発現のために最適化されたコドンである。

【0108】

本発明の核酸は、DNA核酸の場合は、転写されて、本発明の融合タンパク質に翻訳されることができ、RNA核酸の場合は、本発明の融合タンパク質に翻訳されることができ

る。

【0109】

(ポリペプチド及び核酸)

好適には、本発明で使用される核酸は、単離されている。「単離された」核酸は、そのもとの環境から取り出されたものである。例えば、天然に存在する核酸は、それが自然系で共存する物質の一部又は全てから分離されている場合、単離されている。核酸は、例えば、それがその天然の環境の一部ではないベクター中にクローン化されている場合、単離されていると考えられる。

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

「異種」という用語は、ある核酸又はポリペプチドと別の核酸又はポリペプチドとの関係に関して使用される場合、2以上の配列が、自然界では互いに同じ関係では見出されないことを示す。「異種」配列は、宿主生物体に見出される天然に存在する核酸又はポリペプチド配列から単離されていない、該配列に由来していない、又は該配列をベースにしていない配列を意味することもできる。

【0113】

上記の通り、本発明の融合タンパク質は、バリエーション配列を有する、好ましくは、その全長にわたって、関連する参照配列との少なくとも約80%の同一性、より好ましくは、少なくとも約85%の同一性、及び最も好ましくは、少なくとも約90%の同一性(例えば、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%)を有するポリペプチドを含み得る。

【0114】

2つの密接に関連するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を比較するために、第一の配列と第二の配列との間の「配列同一性%」を算出することができる。その全長にわたって100%の配列同一性を共有する場合、ポリペプチド配列は、他のポリペプチド配列と同じ又は同一であると言われる。配列中の残基は、左から右に、すなわち、ポリペプチドのN末端からC末端へ番号が付けられる。「同一」又はパーセンテージ「同一性」という用語は、2以上のポリペプチド配列の文脈において、比較ウィンドウにわたる最大限の一致を求めて比較し、整列させた場合に、同じであるか、又は特定のパーセンテージの同じ(すなわち、特定の領域にわたる70%の同一性、任意に、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%の同一性)であるアミノ酸残基を有する2以上の配列又はサブ配列を指す。好適には、この比較は、参照配列の全長に対応するウィンドウにわたって実施される。

【0115】

配列比較では、1つの配列が試験配列が比較される参照配列として働く。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて、サブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルト

10

20

30

40

50

トのプログラムパラメータを使用することができ、又は代わりのパラメータを指定することができる。次に、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセンテージを算出する。

【0116】

本明細書で使用される「比較ウィンドウ」は、配列及び同じ数の連続する位置の参照配列を最適に整列させた後に、この2つの配列を比較し得るセグメントを指す。比較のための配列アラインメント法は、当技術分野において周知である。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズム、1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482によるか、Needleman及びWunschの相同性アラインメントアルゴリズム、1970, *J. Mol. Biol.* 48:443によるか、Pearson及びLipmanの類似性検索法、1988, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444によるか、コンピュータによるこれらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science, Dr., Madison, WI)の実施によるか、又は手動アラインメント及び目視検査(例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubelら編、1995年増補)を参照)によって実行することができる。

【0117】

有用なアルゴリズムの1つの例は、PILEUPである。PILEUPは、累進的ペアワイズアラインメントを用いて、関連配列群から多重配列アラインメントを作成し、関係及び配列同一性パーセントを示す。これは、アラインメントを作成するために使用されるクラスタリング関係を示すツリー又は樹状図をプロットする。PILEUPは、Feng及びDoolittleの累進的アラインメント法(1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360)の簡略化を使用する。使用される方法は、Higgins及びSharpの文献、1989, *CABIOS* 5:151-153に記載された方法と類似している。このプログラムは、各々の最大長が5,000ヌクレオチド又はアミノ酸である、最大300個の配列を整列させることができる。この多重配列アラインメント手順は、2つの最も類似する配列のペアワイズアラインメントから始めて、2つの整列した配列のクラスターを作成する。その後、このクラスターを、次に最も関連性の高い配列又は整列した配列のクラスターに対して整列させる。2つの配列クラスターを、2つの個々の配列のペアワイズアラインメントの単純な伸長によって整列させる。最終アラインメントは、一連の累進的ペアワイズアラインメントによって達成される。このプログラムは、配列比較の領域について特定の配列及びそのアミノ酸座標を指定することにより、並びにプログラムパラメータを指定することにより実行される。PILEUPを使用することにより、参照配列を他の試験配列と比較して、以下のパラメータ:デフォルトのギャップ加重(3.00)、デフォルトのギャップ長加重(0.10)、及び加重エンドギャップを用いて配列同一性関係のパーセントを決定する。PILEUPは、GCG配列分析ソフトウェアパッケージ、例えば、バージョン7.0(Devereauxらの文献、1984, *Nuc. Acids Res.* 12:387-395)から入手することができる。

【0118】

配列同一性パーセント及び配列類似性パーセントを決定するために好適なアルゴリズムの別の例は、BLAST及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschulらの文献、1977, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402及びAltschulらの文献、1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(www.ncbi.nlm.nih.gov/のウェブサイト)から公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させたときに、いくつかの正の値の閾値スコアTと一致するか又はそれを満たす、クエリー配列中の長さWの短いワードを特定することにより、高スコアリング配列対(HSP)を最初に特定することを伴う。Tは、近隣ワードスコア閾値と称される(Altschulらの文献、上記)。これらの最初の近隣ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを発見する検索を開始するための種として働く。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増大させることができる限り、各々の配列に沿って

両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合、パラメータM(一致する残基対のリワードスコア;常に >0)及びN(一致しない残基のペナルティスコア;常に <0)を用いて算出する。アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを用いて、累積スコアを算出する。各々の方向におけるワードヒットの伸長は:累積アラインメントスコアがその最大達成値からX量下落した場合;累積スコアが1以上の負のスコアリング残基アラインメント累積のために0以下になった場合;又はどちらかの配列の末端に達した場合、停止される。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長及び10の期待値(E)、並びに50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff及びHenikoffの文献、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照)アラインメント(B)、10の期待値(E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、並びに両鎖の比較を用いる。

10

【0119】

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

【0120】

配列間の「違い」は、第一の配列と比較した第二の配列の位置における単一の残基の挿入、欠失、又は置換を指す。2つの配列は、1つ、2つ、又はそれより多くのそのような違いを含有することができる。それ以外は第一の配列と同一(100%配列同一性)である第二の配列中の挿入、欠失、又は置換は、配列同一性%の低下をもたらす。例えば、同一の配列が9残基長である場合、第二の配列中の1つの置換は、88.9%の配列同一性をもたらす。同一の配列が17アミノ酸残基長である場合、第二の配列中の2つの置換は、88.2%の配列同一性をもたらす。

20

【0121】

或いは、第一の参照配列を第二の比較配列と比較するために、第二の配列を生じさせるために第一の配列に対して行われた付加、置換、及び/又は欠失の数を確認することができる。付加とは、第一の配列中への1つの残基の付加である(第一の配列のどちらかの末端への付加を含む)。置換とは、第一の配列中の1つの残基と1つの異なる残基との置換である。欠失とは、第一の配列からの1つの残基の欠失である(第一の配列のどちらかの末端での欠失を含む)。

30

【0122】

(本発明の融合タンパク質の産生)

本発明の融合タンパク質は、例えば、Green及び Sambrookの文献、2012 Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版、Cold Spring Harbour Laboratory Pressに開示されている技術を用いて取得及び操作することができる。特に、人工的遺伝子合成を用いて、ポリヌクレオチドを産生し(Nambiarらの文献、1984, Science, 223:1299-1301、Sakamar及びKhoranaの文献、1988, Nucl. Acids Res., 14: 6361-6372、Wellsらの文献、1985, Gene, 34:315-323、及びGrundstromらの文献、1985, Nucl. Acids Res., 13:3305-3316)、その後、好適な生物で発現させて、ポリヌクレオチドを産生することができる。本発明の融合タンパク質のポリペプチドをコードする遺伝子は、例えば、固相DNA合成によって合成的に産生することができる。遺伝子全体は、前駆体鋳型DNAを必要とせずに、デノボで合成することができる。所望のオリゴヌクレオチドを得るために、ビルディングブロックを、産物の配列によって必要とされる順序で、成長するオリゴヌクレオチド鎖に順次カップリングさせる。鎖アセンブリが完了すると、生成物を固相から溶液に遊離させ、脱保護し、収集する。産物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって単離し、所望のオリゴヌクレオチドを高純度で得ることができる(Verma及びEcksteinの文献、1998, Annu. Rev. Biochem. 67: 99-134)。これらの比較的短いセグメントは、種々の遺伝子増幅法(Methods Mol Biol., 2012;834:93-109)を用いて、無数の組換えDNAベースの発現系での使用に好適な

40

50

、より長いDNA分子へと容易に組み立てられる。本発明との関連において、当業者であれば、本発明に記載される融合タンパク質のポリペプチド抗原をコードするポリヌクレオチド配列を、例えば、ウイルスベクターを含む、種々のワクチン生産系において容易に使用することができることを理解するであろう。

【0123】

微生物宿主(例えば、細菌又は真菌)内で本発明の融合タンパク質を産生するために、本発明の核酸は、好適な調節配列及び制御配列(プロモーター、終結シグナルなどを含む)並びに宿主内でのタンパク質産生に好適なポリペプチド分泌を促進するための配列を含む。同様に、本発明の融合タンパク質は、真核細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞又はショウジョウバエS2細胞)の培養物を、好適な調節配列及び制御配列(プロモーター、終結シグナルなどを含む)並びにこれら細胞内でタンパク質産生に好適なポリペプチド分泌を促進するための配列と組み合わせられている本発明の核酸で形質導入することにより産生することができる。

【0124】

組換え手段によって産生された本発明の融合タンパク質の単離の改善は、該タンパク質の一方の末端に向かってヒスチジン残基のストレッチ(一般的に、Hisタグとして知られる)を付加することにより、任意に促進することができる。

【0125】

融合タンパク質は、合成的に調製することもできる。

【0126】

(ベクター)

さらなる実施態様において、本発明の融合タンパク質がインビボで産生されて、免疫応答を誘発するように、本発明の核酸のうちの1つ又は複数を含む遺伝子コンストラクトをインビボで細胞に導入することができる。核酸(例えば、DNA)は、核酸発現系、細菌、及びいくつかのウイルス発現系を含む、当業者に公知の種々の送達系のいずれかに存在し得る。例えば、Rollandの文献、1998, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198及びその中で引用されている参考文献に記載されているものを含む、多数の遺伝子送達技法が当技術分野において周知である。これらのアプローチのいくつかを、例示を目的として、以下で概説する。

【0127】

したがって、本発明の核酸分子を含むベクター(本明細書において、「DNA発現コンストラクト」又は「コンストラクト」とも称する)が提供される。

【0128】

好適には、ベクターは、ヒト宿主細胞内で翻訳的に活性なRNA分子の転写を可能にするのに好適な調節エレメント(例えば、好適なプロモーター及び終結シグナル)をコードする核酸を含む。「翻訳的に活性なRNA分子」とは、ヒト細胞の翻訳装置によってタンパク質へと翻訳されることができるRNA分子である。

【0129】

したがって、本発明の核酸を含むベクター(以後、「本発明のベクター」)が提供される。

【0130】

特に、ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。ウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)(例えば、AAV 5型及び2型)、アルファウイルス(例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)、シンドビスウイルス(SIN)、セムリキ森林ウイルス(SFV))、ヘルペスウイルス、アレナウイルス(例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV))、麻疹ウイルス、ポックスウイルス(例えば、改変ワクシニアアンカラ(MVA))、パラミクソウイルス、レンチウイルス、又はラブドウイルス(例えば、水疱性口内炎ウイルス(VSV))ベクターであってもよい、すなわち、ベクターは、前述のウイルスのいずれかに由来することができる。本発明の一実施態様において、ウイルスベクターは、アデノウイルスである。本発明の別の実施態様において、ウイルスベクターは、ポック

スウイルス、例えば、MVAである。

【0131】

アデノウイルスは、その中間サイズのゲノム、操作の容易さ、高力価、幅広い標的細胞範囲、及び高い感染力のために、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に好適である。ウイルスゲノムの両端は、ウイルスDNAの複製及びパッケージングに必要なcisエレメントである100~200塩基対の逆方向反復(ITR)を含有する。ゲノムの初期(E)領域及び後期(L)領域は、ウイルスDNA複製の開始によって分割される異なる転写ユニットを含有する。E1領域(E1A及びE1B)は、ウイルスゲノム及びいくつかの細胞遺伝子の転写の調節に関与するタンパク質をコードする。E2領域(E2A及びE2B)の発現は、ウイルスDNA複製のタンパク質の合成をもたらす。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子の発現、及び宿主細胞遮断に関与している(Renanの文献、1990)。ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含む後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター(MLP)によって生じる単一の一次転写産物の顕著なプロセッシングの後にのみ発現される。MLPは、感染の後期に特に効率的であり、このプロモーターから転写された全てのmRNAは、3つの部分からなる5'-リーダー(TPL)配列を保有するため、翻訳に好ましいmRNAとなる。初期遺伝子のうちの1つ又は複数が欠失しているウイルスゲノムから作出される複製欠失アデノウイルスは、複製が制限されており、かつワクチン接種された宿主内での病原性拡散の可能性及びワクチン接種された宿主との接触の可能性が少ないので、特に有用である。

【0132】

(他のポリヌクレオチド送達)

1以上のポリヌクレオチド配列を含む発現コンストラクトは、単に裸の組換えDNAプラスミドからなってもよい。Ulmerらの文献、1993, Science 259:1745-1749及びCohenの文献、1993, Science 259:1691-1692による総説を参照されたい。該コンストラクトの転移は、例えば、細胞膜を物理的又は化学的に透過する任意の方法によって実施することができる。これは、特に、インビトロでの転移に適用されるが、それは、インビボでの使用にも同様に適用される。対象となる遺伝子をコードするDNAがインビボでも同様の様式で転移され、遺伝子産物を発現することが想定される。DNA分子を動物モデルに及びヒトに送達するために、複数の送達系が使用されている。この技術に基づくいくつかの製品は、動物での使用について認可されており、その他のものは、ヒトでの第2相及び第3相臨床試験中である。

【0133】

(RNA送達)

1以上のポリヌクレオチド配列を含む発現コンストラクトは、裸の組換えDNA由来RNA分子からなってもよい(Ulmerらの文献、2012, Vaccine 30:4414-4418)。DNAベースの発現コンストラクトに関しては、種々の方法を利用して、RNA分子をインビトロ又はインビボで細胞内に導入することができる。導入された生物学的分子が宿主細胞の翻訳機構によって直接翻訳されて、そのコードされたポリペプチドが導入された細胞内で産生されるように、RNAベースのコンストラクトを、単純なメッセンジャーRNA(mRNA)分子を模倣するように設計することができる。或いは、RNA分子を、ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼのためのその構造遺伝子に組み込むことにより、それらが導入される細胞内でそれらが自己増幅することが可能になるように設計することができる。このように、自己増幅型mRNA(SAM(商標))分子(Geallらの文献、2012, PNAS, 109:14604-14609)として知られる、このタイプのRNA分子は、いくつかのRNAベースのウイルスベクターと特性を共有する。mRNAベースのRNA又はSAM(商標)RNAのどちらかを(例えば、その配列の改変によるか、又は修飾ヌクレオチドの使用によって)さらに改変して、安定性及び翻訳を増強することができ(Schlakeらの文献、RNA Biology, 9:1319-1330)、両方のタイプのRNAを製剤化して(例えば、エマルジョン中(Britoらの文献、Molecular Therapy, 2014 22:2118-2129)又は脂質ナノ粒子中(Kranzらの文献、2006, Nature, 534:396-401))、インビトロ又はインビボでの安定性及び/又は細胞への侵入を促進することができる。修飾された(及び修飾されていない)RNAの多種

多様な製剤は、動物モデル及びヒトでワクチンとして試験されており、複数のRNAベースのワクチンが進行中の臨床試験で使用されている。

【0134】

(医薬組成物)

本発明の融合タンパク質、核酸、及びベクターは、免疫原性組成物及びワクチン組成物などの医薬組成物(以後、全て「本発明の組成物」)中での送達のために製剤化され得る。本発明の組成物は、好適には、本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターを医薬として許容し得る担体とともに含む。

【0135】

したがって、ある実施態様において、本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターを医薬として許容し得る担体とともに含む免疫原性医薬組成物が提供される。 10

【0136】

別の実施態様において、本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターを含むワクチン組成物が医薬として許容し得る担体とともに提供される。医薬組成物の調製は、通常、例えば、Powell及びNewman編、ワクチン設計(サブユニット及びアジュバントアプローチ)(Vaccine Design(the subunit and adjuvant approach)), 1995に記載されている。本発明の組成物は、生物学的に活性又は不活性であり得る他の化合物を含有することもできる。好適には、本発明の組成物は、非経口投与に好適な滅菌組成物である。

【0137】

本発明のある好ましい実施態様において、本発明の1以上(例えば、1つ)の融合タンパク質を医薬として許容し得る担体との組合せで含む、本発明の医薬組成物が提供される。 20

【0138】

本発明のある好ましい実施態様において、本発明の融合タンパク質をコードする1以上(例えば、1つ)の核酸又は本発明の1以上(例えば、1つ)のベクターを医薬として許容し得る担体との組合せで含む、本発明の組成物が提供される。

【0139】

本発明の組成物は、1以上(例えば、1つ)のポリヌクレオチド及び1以上(例えば、1つ)の融合タンパク質成分を含み得る。或いは、該組成物は、1以上(例えば、1つ)のベクター及び1以上(例えば、1つ)の融合タンパク質成分を含み得る。或いは、該組成物は、1以上(例えば、1つ)のベクター及び1以上(例えば、1つ)のポリヌクレオチド成分を含み得る。そのような組成物は、増強された免疫応答を提供し得る。 30

【0140】

(医薬として許容し得る塩)

本発明の組成物が、本明細書で提供される核酸又は融合タンパク質の医薬として許容し得る塩を含有し得ることは明らかであろう。そのような塩は、有機塩基(例えば、第1級、第2級、及び第3級アミン並びに塩基性アミノ酸の塩)並びに無機塩基(例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム及びマグネシウムの塩)を含む、医薬として許容し得る非毒性塩基から調製することができる。

【0141】

(医薬として許容し得る担体)

当業者に公知の多くの医薬として許容し得る担体を本発明の組成物中で利用することができるが、使用される担体の最適なタイプは、投与様式に応じて異なる。本発明の組成物は、例えば、非経口、局所的、経口、経鼻、静脈内、頭蓋内、腹腔内、皮下、又は筋肉内投与、好ましくは、非経口、例えば、筋肉内、皮下、又は静脈内投与を含む、任意の好適な投与様式のために製剤化することができる。非経口投与のために、担体は、好ましくは、水を含み、かつpH制御用のバッファー、安定剤、例えば、界面活性剤及びアミノ酸、並びに等張性調節剤、例えば、塩及び糖を含有することができる。組成物が使用の時点で希釈するための凍結乾燥形態で提供されることが意図される場合、製剤は、凍結乾燥保護剤、例えば、トレハロースなどの糖を含有することができる。経口投与のために、上記の担体又は固体担体のいずれか、例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリ 40 50

ン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、及び炭酸マグネシウムを利用することができる。

【0142】

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

【0143】

(免疫刺激物質)

本発明の組成物は、1以上の免疫刺激物質を含むこともできる。免疫刺激物質は、外因性抗原に対する免疫応答(抗体媒介性及び/又は細胞媒介性)を増強又は強化する任意の物質であることができる。ワクチン製剤との関連においてアジュバントと呼ばれることが多い免疫刺激物質の例としては、水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)又はリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩、QS21を含むサポニン、CPGなどの免疫刺激性オリゴヌクレオチド、水中油型エマルジョン(例えば、油がスクアレンの場合)、アミノアルキルグルコサミニド4-リン酸、リポ多糖もしくはその誘導体、例えば、3-脱-O-アシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL(登録商標))、及び他のTLR4リガンド、TLR7リガンド、TLR8リガンド、TLR9リガンド、IL-12、並びにインターフェロンが挙げられる。したがって、本発明の組成物の1以上の免疫刺激物質は、好適には、アルミニウム塩、サポニン、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、水中油型エマルジョン、アミノアルキルグルコサミニド4-リン酸、リポ多糖及びその誘導体、及び他のTLR4リガンド、TLR7リガンド、TLR8リガンド、並びにTLR9リガンドから選択される。免疫刺激物質としては、他の免疫成分と特異的に相互作用するモノクローナル抗体、例えば、PD-1及びCTLA4を含む、免疫チェックポイント受容体の相互作用を遮断するモノクローナル抗体を挙げることができる。

【0144】

組換え核酸による送達方法(例えば、DNA、RNA、ウイルスベクター)の場合、タンパク質ベースの免疫刺激物質をコードする遺伝子を、本発明の融合タンパク質をコードする遺伝子と一緒に容易に送達することができる。

【0145】

(持続性放出)

本明細書に記載される組成物は、投与後に化合物の緩徐性/持続性放出をもたらす持続性放出製剤(すなわち、(例えば、多糖から構成される)カプセル、スポンジ、パッチ、又はゲルなどの製剤)の一部として投与することができる。

【0146】

(保存及び包装)

本発明の組成物は、密閉されたアンプル又はバイアルなどの単位用量又は複数用量の容器に入れて提供することができる。そのような容器は、好ましくは、使用するまで製剤の滅菌性を維持するために密閉される。一般に、製剤は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、又はエマルジョンとして保存することができる。或いは、本発明の組成物は、使用直前の滅菌液体担体(例えば、注射用の水又は生理食塩水)の添加のみを必要とするフリーズドライ状態で保存することができる。

【0147】

(投薬量)

本発明の各々の組成物中の核酸、融合タンパク質、又はベクターの量は、治療的又は予防的使用のための好適な投与量が得られるように調製することができる。溶解性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品貯蔵寿命などの因子、及び他の薬理学的検討事項は、そのような組成物を調製する当業者によって想定され、したがって、種

10

20

30

40

50

々の投薬量及び治療レジメンが望ましいものとなり得る。

【0148】

典型的には、治療的又は予防的有効量を含む組成物は、本発明の組成物中、投与当たり約0.1ug～約1000ugの本発明の融合タンパク質、より典型的には、投与当たり約2.5ug～約100ugの融合タンパク質を送達する。短い合成鎖ペプチドの形態で送達する場合、投与量は、1～200ug/ペプチド/用量の範囲に及び得る。ポリヌクレオチド組成物に関して、これは、典型的には、投与当たり約10ug～約20mgの本発明の核酸、より典型的には、投与当たり約0.1mg～約10mgの本発明の核酸を送達する。

【0149】

(治療又は予防されるべき疾患)

別所に記載されている通り、配列番号1～8は、皮膚黒色腫で過剰発現される本発明の融合タンパク質のCLT抗原に対応するポリペプチド配列である。

【0150】

一実施態様において、本発明は、医薬で使用するための本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物を提供する。

【0151】

本発明のさらなる態様は、ヒトにおける免疫応答を惹起する方法であって、該ヒトに、本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0152】

本発明は、ヒトにおける免疫応答を惹起する際に使用するための、本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物も提供する。

【0153】

癌に対するヒトでの免疫応答を惹起する際の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物の使用は、対応する抗原性配列(又はこれらの1つもしくは複数)が癌によって発現されることに依存する。したがって、融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物の設計と癌が発現する又は発現する可能性が高い抗原性配列の間には関連がある。好適には、免疫応答は、(a)～(f)、任意に、(g)及び(h)から選択される対応する配列又はこれらのバリエーションもしくは免疫原性断片を発現する癌に対して惹起される。これに関連して、「対応する」とは、腫瘍が、例えば、配列番号A(Aは配列番号1～8のうちの1つである)又はそのバリエーションもしくは免疫原性断片を発現する(又は発現する可能性が高い)場合、本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物及びこれらを含む医薬品が配列番号A又はそのバリエーションもしくは免疫原性断片を含むことを意味する。いくつかの抗原配列の包含は、癌に対するより大きな免疫応答又はより広範囲の患者における癌に対する免疫応答を潜在的に可能にし得る。

【0154】

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

【0155】

好適には、免疫応答は、腫瘍、特に、(a)～(f)、任意に(g)及び(h)から選択される配列又はこれらのバリエーションもしくは免疫原性断片を過剰発現する腫瘍に対して惹起される。

【0156】

好ましい実施態様において、腫瘍は、黒色腫、例えば、皮膚黒色腫である。

【0157】

腫瘍は、原発性腫瘍又は転移性腫瘍であることができる。

【0158】

本発明のさらなる態様は、癌の細胞が配列番号1～8から選択される配列並びにそのいずれか1つの免疫原性断片及びバリエーションを発現する癌に罹患しているヒト患者を治療するか、又は癌が配列番号1～8から選択される配列並びにそのいずれか1つの免疫原性断

10

20

30

40

50

片及びバリエーションを発現する癌に罹患しているヒトを予防する方法であって、該ヒトに、本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物を投与することを含む、方法に関する。

【0159】

本発明は、癌の細胞が配列番号1～8から選択される対応する配列並びにそのいずれか1つの免疫原性断片を発現するヒトにおける癌を治療又は予防する際に使用するための、本発明の融合タンパク質、核酸、ベクター、又は組成物も提供する。

【0160】

本発明は、癌に罹患しているヒトを治療する方法であって、(a)該癌の細胞が抗原性ポリペプチド(a)～(h)から選択されるポリペプチド配列或いは該抗原性ポリペプチド又はそのバリエーションもしくは免疫原性断片をコードする核酸を発現するかどうかを決定すること;及びそうである場合、(b)該ヒトに、本発明による対応する融合タンパク質、核酸、ベクター、組成物を投与することを含む、方法も提供する。

【0161】

配列番号14及び20に対応する転写産物は、ブドウ膜黒色腫でも過剰発現された。結果として、代替の実施態様において、腫瘍は、ブドウ膜黒色腫であり、かつ/又は腫瘍は、配列番号1、3、及び4から選択される配列を発現する。したがって、本発明の融合タンパク質は、それゆえ、ブドウ膜癌を有する対象において適応となり得る。

【0162】

「予防(prevention)」及び「予防(prophylaxis)」という語は、本明細書において互換的に使用される。

【0163】

(治療及びワクチン接種体制)

治療レジメンは、(i)本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターと、(ii)本発明の1以上のさらなる融合タンパク質、核酸、もしくはベクター、及び/又は(iii)種々の他の治療的に有用な化合物もしくは分子、例えば、任意にアジュバントと同時に投与される抗原性タンパク質などのさらなる成分との同時送達(例えば、共投与)又は逐次送達(例えば、プライム-ブースト)のいずれかを伴うことができる。共投与の例としては、同側性共投与及び対側性共投与が挙げられる。「同時」投与は、好適には、同じ治療ラウンドで送達されている全ての成分を指す。好適には、全ての成分を同時に投与する(例えば、DNAとタンパク質の同時投与)が、1つの成分を数分以内に(例えば、同じ診察予約又は往診に)又は数時間以内に投与することができる。

【0164】

本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターの「プライミング」投与又は1回目の投与に続いて、本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターの1以上の「ブースティング」投与又は後続の投与を行うことができる(「プライム及びブースト」法)。本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターは、プライム-ブーストワクチン接種レジメンで使用することができる。プライムとブーストが両方とも、本発明の融合タンパク質であってもよく、各々の場合、同じ本発明の融合タンパク質である。プライムとブーストが両方とも、本発明の融合タンパク質であってもよく、その場合、異なる本発明の融合タンパク質が各々の場合に使用される。プライムとブーストが両方とも、本発明の核酸又はベクターであってもよく、各々の場合、同じ本発明の核酸又はベクターである。プライムとブーストが両方とも、本発明の核酸又はベクターであってもよく、その場合、異なる本発明の核酸又はベクターが各々の場合に使用される。或いは、プライムが本発明の核酸又はベクターを用いて行われ、ブーストが本発明の融合タンパク質を用いて行われてもよく、又はプライムが本発明の融合タンパク質を用いて行われ、ブーストが本発明の核酸又はベクターを用いて行われてもよい。通常、1回目の投与又は「プライミング」投与及び2回目の投与又は「ブースティング」投与は、約1～12週間後、又は最大4～6カ月後まで施される。後続の「ブースター」投与は、1～6週間おきの頻度で施されてもよく、又はずっと後(最大で数年後)に施されてもよい。

10

20

30

40

50

【0165】

好適には、プライム融合タンパク質は、6つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)~(f)は、CLT抗原融合タンパク質1(配列番号76)において例示されているように、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、及び(f)の順にNからCへ配置される。好適には、ブースト融合タンパク質は、6つの抗原性ポリペプチド(a)~(f)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)~(f)は、CLT抗原融合タンパク質2(配列番号77)において例示されているように、(c)、(f)、(d)、(b)、(e)、及び(a)の順にNからCへ配置される。好ましくは、(a)はプライムのNに存在し、(f)はプライムのC末端に存在し、(c)はブーストのNに存在し、(a)はブーストのC末端に存在する。

【0166】

より好適には、プライム融合タンパク質は、8つの抗原性ポリペプチド(a)~(h)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)~(h)は、CLT抗原融合タンパク質3(配列番号78)において例示されているように、(a)、(b)、(g)、(d)、(e)、(h)、(c)、及び(f)の順にNからCへ配置される。好適には、ブースト融合タンパク質は、8つの抗原性ポリペプチド(a)~(h)を含み、ここで、該抗原性ポリペプチド(a)~(h)は、CLT抗原融合タンパク質4(配列番号79)において例示されているように、(c)、(g)、(a)、(h)、(e)、(f)、(d)、及び(b)の順にNからCへ配置される。好ましくは、(a)はプライムのNに存在し、(f)はプライムのC末端に存在し、(c)はブーストのNに存在し、(b)はブーストのC末端に存在する。

【0167】

(抗原組合せ)

本発明の融合タンパク質、核酸、又はベクターは、免疫応答を、黒色腫、例えば、皮膚黒色腫又はブドウ膜黒色腫に対して惹起させる1以上の他の抗原性ポリペプチド(又はそれをコードするポリヌクレオチドもしくはベクター)と組み合わせて使用することができる。これらの他の抗原性ポリペプチドは、多様な源から得ることができ、これらには、十分に説明されている黒色腫関連抗原、例えば、GPR143、PRAME、MAGE-A3、又はpMel(gp100)が含まれ得る。或いは、これらには、患者特異的新生抗原(Laussらの文献(2017)、Nature Communications, 8(1), 1738.<http://doi.org/10.1038/s41467-017-01460-0>)、保持型イントロン新生抗原(Smartらの文献(2018)、Nature Biotechnology.<http://doi.org/10.1038/nbt.4239>)、スプライシングバリエーション新生抗原(Hoyosらの文献、Cancer Cell, 34(2), 181-183.<http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.008>; Kahlesらの文献(2018)、Cancer Cell, 34(2), 211-224.e6.<http://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.001>)、ペプチドプロセッシングの障害と関連するT細胞エピトープをコードする抗原として知られるカテゴリーに収まる黒色腫抗原(TIEPPs; Gigoux, M.及びWolchok, J.の文献(2018)、JEM, 215, 2233、Marijtらの文献(2018)、JEM 215, 2325)、又は発見されることになる新生抗原(CLT抗原を含む)を含む、他のタイプの黒色腫抗原が含まれ得る。さらに、これらの様々な源に由来する抗原性ペプチドは、(i)非特異的免疫刺激物質/アジュバント種及び/又は(ii)例えば、共投与された抗原によって誘発される抗黒色腫特異的応答を増幅させるように、強いCD4ヘルパーT細胞を誘発することが知られている、普遍的CD4ヘルパーエピトープを含む抗原(ポリペプチドとして、又はこれらのCD4抗原をコードするポリヌクレオチドもしくはベクターとして送達される)と組み合わせることもできる。

【0168】

前述のタンパク質をコードする核酸及びそれを含むベクターを提供することができる。

【0169】

異なるタンパク質、核酸、又はベクターを、同じ製剤中又は別々の製剤中で製剤化することができる。

【0170】

より一般的には、2以上の成分が組み合わせて利用される場合、該成分は、例えば：

(1) 2以上の個々の及び/又は別々の抗原性ポリペプチド成分として；

10

20

30

40

50

- (2)両方の(もしくはさらなる)ポリペプチド成分を含む融合タンパク質として;
 - (3)1以上のポリペプチド及び1以上のポリヌクレオチド成分として;
 - (4)2以上の個々のポリヌクレオチド成分として;
 - (5)2以上の個々のポリペプチド成分をコードする単一のポリヌクレオチドとして;又は
 - (6)両方の(もしくはさらなる)ポリペプチド成分を含む融合タンパク質をコードする単一のポリヌクレオチドとして
- 提示されることができる。

【0171】

便宜上、いくつかの成分が存在する場合、それらは、単一の融合タンパク質又は単一の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド中に含まれることが望ましいことが多い(下記を参照)。全ての成分を単一の融合タンパク質内で提供することができる。或いは、全ての成分をポリヌクレオチド(例えば、単一のポリヌクレオチド、例えば、単一の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド)として提供することができる。

【実施例】

【0172】

(実施例)

(実施例1-CLT同定)

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

【0173】

最初の工程として、本発明者らは、包括的な汎癌トランスクリプトームをデノボアセンブリさせた。これを達成するために、多種多様な癌タイプ(32の癌タイプ(原発性黒色腫31及び転移性黒色腫1)の各々に由来する性別のバランスが取れた24の試料;表S1)を代表する癌ゲノムアトラス(The Cancer Genome Atlas)(TCGA)コンソーシアムから入手した、768の患者試料由来のRNA-シーケンシングリードをゲノムガイドアセンブリに使用した。この性別のバランスが取れた試料(性別特異的な試料を除く)を、cutadapt(v1.13)(Marcel M.の文献、2011, EMBnet J., 17:3)を用いて、アダプタートリミング及びクオリティ(Q20)トリミング並びに長さフィルタリングし(ペアの両方のリード ≥ 35 ヌクレオチド)、それぞれ、200及び3の最大深度及び最小深度になるようにkhmer(v2.0)(Crusoeらの文献、2015, F1000Res., 4:900)を用いて、kmer正規化した($k=20$)。リードを、TCGA全体で使用されるものと同じの設定でSTAR(2.5.2b)を用いて、GRCh38に対してマッピングし、Trinity(v2.2.0)(Trinity, Grabherr, M.G.らの文献、2011, Nat.Biotechnol., 29:644-52)にかけて、組み込まれているインシリコ深度正規化を無効化して、ゲノムガイドアセンブリを行った。アセンブリプロセスの大部分は、32-コアHPCノード上の256GB RAM内で完了し、失敗したプロセスは、1.5TB RAMノードを用いて再実行した。得られたコンティグをポリ(A)トリミング(SeqClean v110222内のtrimpoly)及びエントロピーフィルタリング(≥ 0.7)して、低品質かつアーティファクトのコンティグ(BBMap v36.2内のbbduk)を除去した。癌タイプ毎に、もとの24の試料を、Salmon(v0.8.2又はv0.9.2)(Patro, R.らの文献、2017, Nat. Methods, 14:417-419)を用いて、クリーンにしたアセンブリに対して擬似マッピングし、0.1未満の100万当たり転写産物(TPM)の発現が見られたコンティグを除去した。残りのものを、GMAP(v161107)(Wuらの文献、2005, Bioinf., 21:1859-1875)を用いて、GRCh38に対してマッピングし、その長さの85%以上にわたって85%以上の同一性で整列しないコンティグをアセンブリから除去した。最後に、全ての癌タイプのアセンブリをまとめてフラットニングし、gffread(Cufflinks v2.2.1)(Trapnellらの文献、2010, Nat.Biotech., 28:511-515)を用いて、最長の連続転写産物へと統合した。このアセンブリプロセスは、反復エレメントの評価を可能にするように特別に設計されているので、単一エキソンの転写産物は保持されたが、フラグが付された。転写産物アセンブリの完全性及び品質は、GENCODE v24basic及びMiTranscriptome1(Iyerらの文献、2015, Nat.Genet., 47: 199-208)との比較によって評価した。本発明者ら

は、GENCODE内に表示されるユニークなスプライス部位のリストを編集し、このスプライス部位が2-ヌクレオチドgraceウィンドウ内のトランスクリプトームアセンブリ内に存在するかどうかを試験した。このプロセスにより、1,001,931個の転写産物が同定され、そのうちの771,006個はスプライシングされ、230,925個は単一エキソンのものであった。

【0174】

これとは別に、アセンブルされたコンティグを、ゲノム反復配列アノテーションを用いて重ね合わせて、LTRエレメントを含有する転写産物を同定した。LTRエレメント及び非LTRエレメントを以前に記載されている通りにアノテーションした(Attigらの文献、2017, *Front. In Microbiol.*, 8:2489)。簡潔に述べると、既知のヒト反復ファミリー(Dfam 2.0ライブラリーv150923)を表す隠れマルコフ(Markov)モデル(HMMs)を用いて、nhmmer(Wheelerらの文献、2013, *Bioinform.*, 29:2487-2489)で構成された、RepeatMasker Open-3.0(Smit, A., R.Hubley, 及びP.Green, <http://www.repeatmasker.org>, 1996-2010)を用いて、GRCh38をアノテーションした。HMMベースのスキニングは、BLASTベースの方法と比較して、アノテーションの精度を高める(Hubleyらの文献、2016, *Nuc. Acid. Res.*, 44:81-89)。RepeatMaskerは、LTR及び内部領域を別々にアノテーションし、その結果、表形式の出力が解析されて、同じエレメントについての隣接したアノテーションが統合された。このプロセスにより、1以上の完全な又は部分的なLTRエレメントを含有する181,967個の転写産物が得られた。

【0175】

Salmonを用いて、100万当たりの転写産物(TPM)を全転写産物について推定し、各々の癌タイプ内の発現を811の健常組織試料(入手可能な場合はTCGAから、及びそれとは別に、GTEx(遺伝子型-組織発現コンソーシアム(The Genotype-Tissue Expression Consortium)、2015, *Science*, 348:648-60)からの、全ての癌タイプについての健常組織マッチ対照にわたる発現と比較した。転写産物は、任意の試料中で1よりも大きいTPMで検出された場合、癌で発現されるとみなし、かつ以下の基準を満たした場合、癌特異的であるとみなした: i、各々の癌タイプの24の試料のうちの6以上で発現される; ii、全ての健常組織試料の90%以上において10 TPM未満で発現される; iii、対象となる癌タイプにおいて、任意の対照組織型における発現中央値の3倍以上で発現される; 及びiv、対象となる癌タイプにおいて、それぞれの健常組織(入手可能な場合)の90番目のパーセンタイルの3倍以上で発現される。

【0176】

その後、癌特異的転写産物のリストを、完全な又は部分的なLTRエレメントを含有する転写産物のリストと交差させて、全ての基準を満たす5,923の転写産物(癌特異的LTRエレメントスキニング転写産物を表すCLTと称される)のリストを作成した。

【0177】

さらなるキュレーションを黒色腫で特異的に発現される403のCLTに対して実行して、誤ってアセンブルされた可能性のあるコンティグ及び細胞性遺伝子のアセンブリに対応するコンティグを除外した。手作業によるさらなる評価を実施して、スプライシングパターンが黒色腫由来のもとのRNA-シーケンシングリードによって裏付けられることを保証した。任意のGTEx正常組織における発現中央値が1 TPMを超えるものを捨てるように、CLTをさらに選別した。

【0178】

皮膚黒色腫についての403のCLTのうち、97のCLTがこれらのフィルターを通過した。

【0179】

(実施例2-免疫ペプチドーム解析)

質量分析(MS)ベースの免疫ペプチドミクス解析は、HLA分子と関連し、かつ細胞表面に提示される特異的ペプチド(pHLA)の直接的な同定を可能にする強力な技術である。こ

10

20

30

40

50

の技法は、抗HLA抗体捕捉による細胞又は組織などの生物学的試料からのpHLAの親和性精製からなる。その後、単離されたHLA分子及び結合したペプチドを互いに分離し、質量分析にカップリングされたナノ超高速液体クロマトグラフィー(nUPLC-MS)によって、溶出したペプチドを解析した(Freudenmannらの文献、2018, *Immunology* 154(3):331-345)。質量分析計において、規定の電荷対質量比(m/z)の特異的ペプチドを選択し、単離し、断片化し、その後、第二ラウンドの質量分析(MS/MS)に供して、得られる断片イオンの m/z を明らかにした。その後、断片化スペクトル(MS/MS)を調べて、検出された断片イオンを生じる選択されたペプチドのアミノ酸配列を正確に同定することができる。

【0180】

MS/MSスペクトル解釈及びその後のペプチド配列同定は、実験データと参照データベース中に見られるペプチド配列から作出された理論的スペクトルとの間の一致に依存する。既知のトランスクリプトーム又はさらにはゲノム全体に由来する全てのオープンリーディングフレーム(ORF)に対応する予め定義されたリストを使用することにより、MSデータを検索することは可能であるが(Nesvizhskiiらの文献、2014, *Nat. Methods* 11:1114-1125)、これらの非常に大きい配列データベースの照合は、提示されたペプチドの同定を制限する非常に高い偽発見率(FDR)につながる。さらなる技術的問題(例えば、ロイシンの質量=イソロイシンの質量)、及び理論的問題(例えば、ペプチドスプライシング(Liepeらの文献、2016, *Science* 354(6310):354-358))により、既知のトランスクリプトーム又はゲノム全体から作成されたデータベースなどの非常に大きいデータベースの使用に関連する制限が増加する。したがって、実際上は、明確に定義された潜在的なポリペプチド配列のセットを参照することなく、正確な免疫ペプチドーム解析を実施して、新規の抗原を同定することは非常に困難である(Liらの文献、2016, *BMC Genomics* 17(Suppl 13):1031)。

【0181】

Bassani-Sternbergら(Bassani-Sternbergらの文献、2016, *Nature Commun.*, 7: 13404;データベースリンク: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>)は、25人の皮膚黒色腫患者に由来するHLA結合ペプチド試料から収集されたMS/MSデータを、ヒトプロテオーム全体について報告されたポリペプチド配列に対して照合した。これらの解析により、既知のヒトタンパク質に一致する数万個のペプチドが明らかになった。予想された通り、これらのペプチドには、PRAME、MAGEA3、及びTRPM1(メラスタチン)を含む、複数の腫瘍関連抗原(TAA)内に見られるペプチドが含まれた。

【0182】

本発明者らは、黒色腫と診断された6人の患者から凍結腫瘍組織を入手した。0.05~1gの試料をホモジナイズし、ライセートを高速で遠心分離し、清澄なライセートを抗ヒトHLAクラスIモノクローナル抗体(W6/32)に共有結合したプロテインA(ProA)ビーズと混合した。混合物を4℃で一晩インキュベートして、抗体に対するHLAクラスI分子の結合を向上させた(Ternetteらの文献、2018 *Proteomics* 18, 1700465)。10%酢酸を使用することにより、HLAクラスI結合ペプチドを抗体から溶出させ、その後、逆相カラムクロマトグラフィーを用いて、ペプチドを他の高分子質量成分から分離した(Ternetteらの文献、2018)。精製された溶出ペプチドをnUPLC-MSに供し、規定の電荷対質量比(m/z)の特異的ペプチドを質量分析計内で選択し、単離し、断片化し、第二ラウンドの質量分析(MS/MS)に供して、得られた断片イオンの m/z を明らかにし(Ternetteらの文献、2018)、これらの腫瘍試料の各々についての免疫ペプチドームに対応するMS/MSデータセットを作成した。

【0183】

免疫ペプチドミクス評価の詳細な知識を適用することにより、本発明者らは、25人の黒色腫患者についてのPXD004894 HLAクラスIデータセット由来のスペクトル(Bassani-Sternbergらの文献、2016)及び(実施例1の)CLT由来ORFを用いて本発明者らによ

10

20

30

40

50

って用意された6人の黒色腫患者についてのHLA-クラスIデータセットのスペクトルを照合した。3種類の解析を実行した:

- ・解析A:実施例1で同定されたものに由来する約1ダースのCLTのサブセット由来の23アミノ酸残基を超える予測ORFを連結して、各々のCLTについての単一のポリペプチドファイルとし、これらの連結されたORFポリペプチドを、PEAKS(商標)ソフトウェア(v8.5、Bioinformatics Solutions社)を使用することにより、ヒトプロテオーム(UniProtデータベース)中に見られる全てのポリペプチドとともに、25人の黒色腫患者のPXD004894 HLAクラスIデータセットに対して照合した。

- ・解析B:実施例1で同定されたものに由来する約1ダースのCLTのサブセット由来の23アミノ酸残基を超える予測ORFの各々からなるポリペプチドファイルを、Mascotソフトウェアを使用することにより、ヒトプロテオーム(UniProt及びmasDBデータベース)中に見られる全てのポリペプチドとともに、25人の黒色腫患者のPXD004894 HLAクラスIデータセットに対して照合した。

- ・解析C:長さ10以上のアミノ酸残基の実施例1で同定された97のCLTに由来する全ての予測ORFを、PEAKS(商標)ソフトウェア(v8.5及びvX、Bioinformatics Solutions社)を使用することにより、ヒトプロテオーム(UniProt)に見られる全てのポリペプチドとともに、25人の黒色腫患者のPXD004894 HLAクラスIデータセット及び本発明者らの6人の黒色腫患者のHLAクラスIデータセットに対して照合した。

【0184】

細胞内で見られるクラスI HLA結合ペプチドの大部分は、構成的に発現されるタンパク質に由来するので、これらのデータベースとUniProtプロテオームとの同時照合は、本発明者らのCLT ORF配列のMS/MSスペクトルへの割当てが正しいことを保証するのに役立つ。PEAKSソフトウェアは、他のMS/MS照合ソフトウェアと同様に、確率値(-10lgP;表1を参照)を各々のスペクトル割当てに割り当てて、割当てを定量した。

【0185】

これらの研究の結果は、CLT由来ORFのアミノ酸配列に対応し、かつ既知のヒトプロテオーム(UniProt及び/又はmasDB)内に存在するポリペプチド配列には対応しない、Bassani-Sternbergらによって検討された25人の患者由来の腫瘍試料及び本発明者らのデータセット中の6つの黒色腫患者試料から免疫沈降されたHLAクラスI分子と関連する>50個のペプチドを同定した。

【0186】

PEAKSソフトウェアによって割り当てられたペプチドスペクトルの手作業によるさらなる見直しを用いて、8つのCLT由来ORFにマッピングされ、その結果、CLT抗原(表1;配列番号1~8)として定義されたペプチドへのスペクトルの割当てを確認した。

【0187】

HLAクラスI分子と関連するこれらのペプチドの検出は、それが由来した8つのORFがまず黒色腫組織内で翻訳され、HLAクラスI経路を介してプロセッシングされ、最後に、HLAクラスI分子との複合体として免疫系に提示されることを裏付けている。表1は、CLT抗原中に見られるペプチドの特性を示している。図1~37は、表1に示されているペプチドの各々からの代表的なMS/MSスペクトルを示している。これらの図は、nUPLC-MS²によって個々の患者SKCM腫瘍(PEAKS(商標)ソフトウェアによって、本発明者らの内部データセットから又はPRIDEに保存されたBassani-Sternbergらのデータセットから抽出された画像)で検出された表示されたペプチド配列の断片スペクトルを示している。検出された断片は全て、スペクトルの上のペプチド配列中表示されており、最も存在量の多い断片イオンが各々のスペクトル中に割り当てられている。図1~2、4~6、8~9、11~12、14~37において、図の下のパネルは、MS/MSスペクトルに割り当てられたペプチド配列を示しており、一方、同様のデータが、図3、7、10、13、及び19の右側に、表形式で示されている。断片イオンは、次のようにアノテーションされる: b: N-末端断片イオン; y: C-末端断片イオン; -H₂O:水損失; -NH₃:アンモニアの損失; [2+]:二重荷電ペプチドイオン; pre:断片化されていない前駆体ペプチドイオン。表1のペプチ

10

20

30

40

50

ドに割り当てられた高い $-10\lg P$ スコアと一致して、これらのスペクトルは、本発明者らがこれらの解析で発見したペプチドの配列(配列番号9~12、18~19、31~32、36~39、45、48~54)と正確に一致する多数の断片を含有する。

【0188】

NetMHCpan 4.0予測ソフトウェア(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>)を使用することにより、長さ9アミノ酸残基以上である表1のHLAクラスI分子と関連して検出された全てのペプチドを評価して、HLAクラスIタイプA及びBスーパータイプに対するその予測される結合の強度を決定した。これらの予測研究の結果から、17のペプチド(又は各々の完全配列に含まれる9-mer)の全てが試験されたスーパータイプのうちの少なくとも1つに結合すると予測されることが示された(表2を参照)。これらのうち、該配列の多くは、検討されたHLAクラスIスーパータイプ内の特定のタイプに高い信頼度(低いランクスコア%)で結合すると予測された。検出されたペプチドの全てがHLAタイプの標準セットに結合すると予想されたという事実によって、それらの検出に関するさらなる妥当性確認がもたらされる。さらに、本発明者らのデータセット由来の腫瘍試料中で発見される全てのペプチドは、本発明者らが患者試料中で検出したHLAタイプのうちの1つに結合することがNetMHCpan 4.0によって予測された。HLAタイプは、本発明者らが発見したペプチドと関連する全ての患者について、Bassani-Sternbergらの文献(2016, Nature Commun., 7: 13404)により報告されているわけではないが、これが報告されている場合、本発明者らは、既知のHLAタイプと予測されるHLAタイプとの間に一致を見出した。

【0189】

本発明者らが発見したペプチド配列への腫瘍組織由来MSスペクトルの割当てのさらなる確実性を提供するために、これらの発見された配列を有するペプチドを合成し、もとの研究で腫瘍試料に適用された同じ条件を用いるnUPLC-MS²に供した(Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Commun., 7: 13404;本発明者らのデータ)。選択されたペプチドのスペクトルの比較は、図39~54に示されている。各々の図において、上のスペクトルは、腫瘍試料に対応し(PRIDEデータベース(Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Commun., 7: 13404;データベースリンク: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD004894>又は本発明者らのデータベース中)、下のスペクトルは、同じ配列の合成産生ペプチドに対応する。検出されたイオン断片の選択された m/z 値は、これらのMS/MSスペクトル中の各々の断片ピークの上/下に示されている。これらの図は、断片の正確なアラインメントを明らかにし(腫瘍由来断片イオンと合成ペプチド由来断片イオンの間の実験的に決定された m/z 値のわずかな違いは、十分に <0.05 ダルトンの m/z 許容値の範囲内である)、腫瘍組織由来スペクトルの各々のCLTコードペプチドへの割当ての正確さを裏付けている。

【0190】

まとめると、表1及び2並びに図1~53に示されているデータは、黒色腫患者における対応するCLT抗原の翻訳、プロセッシング、及び提示についての非常に強力な裏付けを提供している。

【0191】

これらのCLTの癌特異性をさらに裏付けるために、本発明者らは、37の正常組織試料(10の正常皮膚組織、9つの正常肺組織、及び18の正常乳房組織)をプロセッシングし、免疫ペプチドーム解析用に調製した。本発明者らは、これらの正常組織試料由来のHLA-クラスIデータセットのスペクトルを照合し、Peaks(商標)ソフトウェア(V8.5及びX)を用いて、ヒトプロテオーム(UniProt)中に見られる全てのポリペプチドとともに、CLT抗原1、2、3、4、5、6、7、及び8のポリペプチド配列に由来する全てのあり得るペプチド配列を探索した。CLT抗原1、2、3、4、5、6、7、及び8に由来するペプチドは、正常組織試料のセット(表3)中で検出されず、CLTが癌特異的発現を有するというさらなる証拠を提供した。

【0192】

要約すると:予測されたORFに由来する免疫ペプチドームペプチドの同定は、これらのCLTが腫瘍組織内でポリペプチド(配列番号1~8;CLT抗原と称される)に翻訳されることを示している。その後、これらは、細胞の免疫監視装置によってプロセッシングされ、成分ペプチドは、HLAクラスI分子上にローディングされ、細胞が、結果として生じるペプチド/HLAクラスI複合体を認識するT細胞による細胞溶解の標的になることが可能となる。したがって、これらCLT抗原及びその断片は、その腫瘍がこれら抗原を発現する患者における黒色腫の治療のための種々の治療的モダリティにおいて有用であると考えられる。

表1: CLT抗原名及び配列番号の相互参照を付した、黒色腫試料の免疫ペプチドーム解析によって同定されたペプチドのリスト

【表1】

ペプチド 配列 ¹	ペプチド 配列番号	CLT 抗原番号	CLT 抗原配列 番号	解析の タイプ	患者# ²	ペプチド 質量 ³	- 101g P ⁴	スペク トルの# ⁵	Ppm ⁶
VQGGWFPP R	配列番号 9	1	配列番号 1	A	Me1-3	1163.59	15.5 4	1	9.4
VVRGGAGF AAR	配列番号 10	1	配列番号 1	A	Me1-3	1059.59	49.1 2	8	5.1
VVRGGAGF AAR	配列番号 10	1	配列番号 1	B	Me1-3	1059.59	na	1	na
VVRGGAGF AAR	配列番号 10	1	配列番号 1	C	2MT3	1059.594	42.4 9	6	-0.9
HLADRKLS L	配列番号 11	1	配列番号 1	A	Me1-5	1051.61	20.7 5	2	-1.1
HLADRKLS L	配列番号 11	1	配列番号 1	A	Me1-16	1051.61	33.2 2	30	5.1
HLADRKLS L	配列番号 11	1	配列番号 1	B	Me1-16	1051.61	-	3	
HLADRKLS L	配列番号 11	1	配列番号 1	C	2MT3	1051.61	28.1 1	2	-1.4
HLADRKLS L	配列番号 11	1	配列番号 1	C	2MT10	1051.61	21.2 1	1	3.4
ARLQGSVT L	配列番号 12	1	配列番号 1	B	Me1-5	985.56	na	1	na
ADSLILDF	配列番号 18	2	配列番号 2	A	Me1-26	892.45	16.6 8	1	0.9
SSFSTLAS LDK	配列番号 19	2	配列番号 2	A	Me1-20	1154.58	42.3 8	2	-6.7
SSFSTLAS LDK	配列番号 19	2	配列番号 2	B	Me1-20	1154.58	na	2	na
SSFSTLAS LDK	配列番号 19	2	配列番号 2	C	2MT4	1154.582	35.8 8	1	0.9
NTPNIVSL R	配列番号 31	3	配列番号 3	A	Me1-35	1012.57	20.9 1	2	3.8
NTPNIVSL R	配列番号 31	3	配列番号 3	C	2MT3	1012.567	18.0 9	1	-2.8
RPLRIKGV F	配列番号 32	3	配列番号 3	C	1MT1	1084.686 9	26.2 8	7	0
KTKGSLSV FR	配列番号 36	4	配列番号 4	A	Me1-3	1121.66	26.9 1	3	4.8
KTKGSLSV FR	配列番号 36	4	配列番号 4	B	Me1-3	1121.66	na	2	na
KTKGSLSV FR	配列番号 36	4	配列番号 4	C	2MT3	1121.655 6	40.4 6	6	-0.7

ペプチド 配列 ¹	ペプチド 配列番号	CLT 抗原番号	CLT 抗原配列 番号	解析の タイプ	患者 # ²	ペプチド 質量 ³	- 10lg P ⁴	スペク トルの# ⁵	Ppm ⁶
KTKGSLSV FR	配列番号 36	4	配列番号 4	C	2MT1	1121.655 6	35.7 3	2	-0.7
AAFDRAVH F	配列番号 37	4	配列番号 4	A	Mel-40	1032.51	17.2 4	1	0.3
AAFDRAVH F	配列番号 37	4	配列番号 4	A	Mel-41	1032.514	26.1 1	3	7.8
AAFDRAVH F	配列番号 37	4	配列番号 4	C	2MT3	1032.514	18.7 3	1	-1.3
AFDRAVHF	配列番号 38	4	配列番号 4	A	Mel-27	961.4769	20.6	3	7.9
AFDRAVHF	配列番号 38	4	配列番号 4	A	Mel-39	961.47	27.4 9	3	2.6
KTKGSLSV F	配列番号 39	4	配列番号 4	C	2MT12	965.555	27.8 4	1	1.2
LPRTPRPD LIL	配列番号 45	5	配列番号 5	C	Mel-8	1289.781 9	22.5 3	2	2.3
LPRTPRPD LIL	配列番号 45	5	配列番号 5	C	Mel-16	1289.781 9	28.2 3	5	7
LPRTPRPD LIL	配列番号 45	5	配列番号 5	C	Mel-29	1289.781 9	28.7 9	1	-1.4
ATIFDPFW LLK	配列番号 48	6	配列番号 6	C	Mel-41	1299.722 7	36.8 9	3	8.5
FFFYKDTV L	配列番号 49	6	配列番号 6	C	Mel-41	1128.585 4	31.3 2	5	8.3
FFFYKDTV LL	配列番号 50	6	配列番号 6	C	Mel-41	1241.669 6	29.3 6	1	9.2
TIFPDPWL LK	配列番号 51	6	配列番号 7	C	Mel141	1228.685 5	31.9	3	8.9
IVLDAPVT K	配列番号 52	7	配列番号 7	C	Mel-21	954.575	19.9 5	1	8.7
IVLDAPVT K	配列番号 52	7	配列番号 7	C	Mel-36	954.575	22.3 6	2	1.6
IVLDAPVT K	配列番号 52	7	配列番号 7	C	Mel-39	954.575	20.1 1	2	1.3
IVLDAPVT K	配列番号 52	7	配列番号 7	C	2MT3	954.575	24.7 7	7	0.3
GHIHNEAV	配列番号 53	8	配列番号 8	C	Mel-27	875.4249	21.3 2	2	7.9
SLYGHIN EAV	配列番号 54	8	配列番号 8	C	Mel-27	1238.604 4	35.1 1	1	8.5
SLYGHIN EAV	配列番号 54	8	配列番号 8	C	2MT4	1238.604	56.3 4	2	4.7

10

20

30

40

50

¹ 質量分析によって同定されたHLAクラスIペプチド。

² Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Comm., 7: 13404 (Mel-3、Mel-5、Mel-8、Mel1-6、Mel-21、Mel-27、Mel-29、Mel-30、Mel-36、Mel-39、Mel-41); 本発明者らのデータセット (1MT1、2MT1、2MT3、2MT4、2MT10、2MT12)。

³ 計算ペプチド質量。

⁴ PEAKS (商標) プログラム - 複数のスペクトル検出が得られたペプチド / 患者の最大一致となるようなペプチドについての10lgP値が示されている。Mascotソフトウェアを用いて実施された解析Bによって同定されたペプチドについての値は入手できない(na)。

⁵ ペプチドが検出されたスペクトルの数。

⁶ 観測質量と計算質量の間の偏差; 複数のスペクトルが得られたペプチドについての選択されたppm値が示されている。解析Bによって同定されたペプチドについての値は入手できない(na)。

表2: CLT抗原名及び配列番号の相互参照を付した、質量分析によって同定されたペプチド (長さ≥9残基) の18のHLAクラスIスーパータイプアレル (HLA-A01:01、HLA-A02:01、HLA-A03:01、HLA-A11:01、HLA-A24:02、HLA-A25:01、HLA-A26:01、HLA-A68:01、HLA-B07:02、HLA-B08:01、HLA-B15:01、HLA-B18:01、HLA-B27:05、HLA-B35:01、HLA-B35:03、HLA-B40:01、HLA-B40:02、HLA-B51:01) への予測されるNetMHCpan4.0結合。

【表 2】

18のヒトHLA クラスI A 及びB スーパータイプ に結合すると 予測される ¹	ペプチド配列	≤5%の ランク スコアを 有する アレルの数 ²	≤2%の ランク スコアを 有する アレルの数 ³	≤0.5%の ランク スコアを 有する アレルの数 ⁴	ペプチド 配列番号	CLT 抗原番号	患者 # ⁵
YES	VQQGWFFPR	3/18	0/18	0/18	配列番号 9	1	Mel-3
YES	VVRGGFAGFAAR	4/18	0/18	0/18	配列番号 10	1	Mel-3 2MT3
YES	HLADRKLSL	10/18	7/18	2/18	配列番号 11	1	Mel-5 Mel-16 2MT3 2MT10
YES	ARLQGSVTL	10/18	3/18	1/18	配列番号 12	1	Mel-5
YES	SSFSTLASLDK	3/18	2/18	0/18	配列番号 19	2	Mel-20 2MT4
YES	NTPNIVSLR	6/18	3/18	1/18	配列番号 31	3	Mel-35 2MT3
YES	RPLRIKGVF	6/18	4/18	1/18	配列番号 32	3	2MT1
YES	KTKGSLSVFR	4/18	3/18	0/18	配列番号 36	4	Mel-3 2MT1 2MT3
YES	AAFDRAVHF	18/18	10/18	5/18	配列番号 37	4	Mel-40 Mel-41 2MT3
YES	KTKGSLSVF	9/18	4/18	2/18	配列番号 39	4	2MT12
YES	LPRTPRPDLIL	4/18	1/18	1/18	配列番号 45	5	Mel-8 Mel-16 Mel-29
YES	ATIFPDPWLLK	4/18	3/18	2/18	配列番号 48	6	Mel-41
YES	FPPYKDTVLL	10/18	7/18	5/18	配列番号 49	6	Mel-41
YES	FPPYKDTVLL	8/18	6/18	4/18	配列番号 50	6	Mel-41
YES	TIFPDPWLLK	6/18	3/18	3/18	配列番号 51	6	Mel-41
YES	IVLDAPVTK	3/18	3/18	3/18	配列番号 52	7	Mel-21, Mel-34, Mel-39
YES	SLYGHINHNEAV	1/18	1/18	1/18	配列番号 54	8	Mel-27

10

20

30

40

¹ ≤5.0%スコアのランクスコアでの照合されたHLAクラスIスーパータイプへの予測される結合。

² ≤5.0%のランクスコアで結合すると予測された18のHLAクラスIスーパータイプの数。

³ ≤2.0%のランクスコアで結合すると予測された18のHLAクラスIスーパータイプの数。

⁴ ≤0.5%のランクスコアで結合すると予測された18のHLAクラスIスーパータイプの数。

⁵ Bassani-Sternbergらの文献、2016, Nature Comm., 7: 13404(Mel-3、Mel-8、Mel-16、Mel-21、Mel-27、Mel-29、Mel-30、Mel-36、Mel-39、Mel-41); 本発明者らのデータセット(1MT1、2MT1、2MT3、2MT4、2MT10、2MT12)。

表3 正常組織試料のセット中のCLT抗原1～8に由来するペプチドの数。

【表 3】

抗原	皮膚	肺	乳房
CLT 抗原 1	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 2	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 3	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 4	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 5	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 6	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 7	0/10	0/9	0/18
CLT 抗原 8	0/10	0/9	0/18

10

【0193】

本明細書の実施例1及び2において示されている結果は、全体として又は部分的に、癌ゲノムアトラス(TCGA)研究ネットワーク(<http://cancergenome.nih.gov/>);及び遺伝子型-組織発現(GTEX)プロジェクト(米国立衛生研究所所長室の共通基金(Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health))によって、並びにNCI、NHGRI、NHLBI、NIDA、NIMH、及びNINDSによって支援されている)によって作成されたデータに基づいている。

【0194】

(実施例3-HERVFEST)

特異的T細胞の機能拡大(FEST)技術は、MANAエピトープに反応する患者T細胞の検出に基づいて、癌患者の腫瘍細胞に見られる「突然変異関連新生抗原」(MANA)レパトリ-中に存在する治療関連腫瘍由来エピトープを同定するために使用されている(Anagnostouらの文献、Cancer Discovery 2017; Leらの文献、Science 2017; Fordeらの文献、NEJM 2018; Danilovaらの文献、Cancer Immunol. Res. 2018)。実施例1及び2(表1〜3、図1〜53)で説明された方法を用いて発見されたCLT抗原へのFEST技術の適用は、癌患者におけるCLT抗原に対する治療関連T細胞応答を確認するために使用することができる。

20

【0195】

免疫曝露を受けた対象のエピトープ特異的T細胞を同定するための他のアッセイ(例えば、ELISPOT)と同様に、「FEST」技術は、抗原提示細胞及び好適な抗原性ペプチドを含むエクスピボ培養物中で同族T細胞を活性化/拡大することにより、その特異性を引き出す。この技術は、これらの増幅された培養物中に存在するT細胞受容体(TCR)DNA配列(具体的には: TCR-V β CDR3領域を標的とするTCRseq)の次世代シーケンシングを利用して、1つの抗原(又は複数の抗原)に由来する標的ペプチドのパネル由来の個々のペプチドとともに培養された細胞で拡大される特異的なTCRを検出するという点において、他の免疫学的アッセイと異なる。同じ患者の腫瘍組織へのTCRseqの適用を用いて、エクスピボでペプチド刺激された培養物中で検出されたTCR/T細胞がインサイチュで癌組織中に見られる腫瘍浸潤リンパ球内にも存在するかどうかを示すこともできる。したがって、MANAFESTは、癌患者由来の正常組織及び腫瘍組織の全エキソームシーケンシングによって見出された多数の突然変異体ペプチド中の機能的に関連するMANAペプチドの同定を可能にする、患者T細胞によって認識されるMANAエピトープを同定するための強力な技術であることが証明されている(Leらの文献、Science 2017; Fordeらの文献、NEJM 2018; Danilovaらの文献、Cancer Immunol. Res. 2018; Smithらの文献、J Immunother Cancer 2019)。

30

40

【0196】

MANAFEST法(Danilovaらの文献、Cancer Immunol. Res. 2018)のCLT抗原への適用は、次の通りに実施した。本発明者らがHERVFESTと称するこの方法は、以下の工程からなる:工程1:選択されたHLAクラスIアレルに効率的に結合するエピトープを含有すると予測されるペプチドをCLT抗原中で同定した。工程2:好適な黒色腫瘍患者由来のPBMCを、HLAクラスIタイプ別に、工程1で選択されたペプチドライブラリーに一致させ

50

た。工程3:これらの患者由来のPBMCをT細胞画分及び非T細胞画分に分離した。非T細胞を患者のT細胞に加えて戻し、その後、20～50個のウェル(培養物当たり250,000個のT細胞を含有する)に分け、様々なT細胞成長因子及び個々のCLT抗原由来合成ペプチド(工程1/2で選択された)とともに10日間増殖させた。工程4:TCRseq(TCR-Vβ CDR3配列のシーケンシング)を全てのウェルに対して実施し、個々のCLT抗原由来ペプチドの存在下で増幅された(ただし、対照ペプチドの存在下又はペプチド刺激の非存在下では増幅されなかった)TCR-Vβ CDR3配列を同定した。したがって、アッセイの個々のウェル中の増幅されたTCR-Vβ CDR3配列の存在により、黒色腫患者で免疫応答を誘発したCLT抗原由来ペプチドが同定される。工程5:TCRseqを腫瘍試料に対して実施して、CLT抗原によって増幅されたTCRを有するT細胞が患者腫瘍にホーミングするかどうかを決定し、これらのTCRを有するT細胞が患者の腫瘍内のCLT抗原由来ペプチドを認識するというさらなる証拠を提供することもできる。

10

【0197】

HERVFESTアッセイを、CLT抗原1～4(配列番号1～4)に由来するペプチドを用いて実施した。これらの研究に使用されたペプチドのパネル(上記の工程1を参照)は、本発明者らの解析に利用可能な患者腫瘍試料中で一般に見られる8つのHLAクラスIタイプに強く結合すると予測されるCLT抗原由来ペプチドのNetMHC予測を基にした。これらのHERVFESTアッセイで1以上のTCRを増幅させたCLT抗原由来ペプチドが表4に示されている。表4は、各々の患者のPBMC由来培養物を用いて試験されたCLT抗原ペプチドのHLAクラスIタイプも示している。そのPBMCがこれらの研究で試験され、このアッセイで1

20

【0198】

図54のパネルAは、NSCLC患者特異的なMANAペプチドによるTCR増幅を示す公開データを示している(Fordeらの文献、NEJM 2018)。縦軸は、横軸に掲載されているMANAペプチド又は対照ペプチドの存在下で培養された細胞のウェルについての各々の表示されたTCR-Vβ CDR3 AAの普及を示している。MANA7を含有するウェル中での増幅は、患者のT細胞レパートリーがこのペプチドに反応するT細胞を含むことを示している。図54のパネルB及びCは、表示されたCLT抗原ペプチド及び対照ペプチドの存在下でインキュベートされた2人の黒色腫患者由来のPBMCからの代表的なTCR増幅データを示している。パネルAと同様、パネルB及びCで観察された特異的な増幅は、これら黒色腫患者のT細胞レパートリーが特異的なCLT抗原由来ペプチドと反応するT細胞を含むことを示している。パネルBは、CLT抗原1、2、及び4由来の15個のクラスI HLA-A*02ペプチドのパネルで刺激された全てのウェルにおいて、黒色腫患者222B由来のPBMCのLMSSFSTLASL刺激されたウェルで検出されたTCRの頻度を示している。3つのTCR配列が増幅された。

30

【化1】

LMSSFSTLASL(配列番号23)

は、CLT抗原2に由来するHLA-A*02結合ペプチドである。パネルCは、CLT抗原1、2、及び4由来の15個のクラスI HLA-A*02ペプチド、並びにCLT抗原1、2、3及び4由来の24個のクラスI HLA-A*03ペプチドのパネルで刺激された全てのウェルにおいて、黒色腫患者224B由来のPBMCのMVACRIKTFR刺激されたウェルで検出されたTCRの頻度を示している。1つのTCR配列が増幅された。

40

【化2】

MVACRIKTFR(配列番号26)

は、CLT抗原2に由来するHLA-A*03結合ペプチドである。

【0199】

これら実験で使用された対照ペプチド/条件は、次の通りである: CEF=CMV、EBV、

50

及びインフルエンザペプチドの混合物; SL9、TV9、及びQK1=HIV-1対照ペプチド; ペプチドなし=ペプチドの非存在下での培養; ベースライン=培養前のT細胞。

【0200】

図55は、これらの患者を用いて完結した研究において1以上のTCRを増幅させたCLT抗原1~4に対する全てのCLT抗原ペプチドのまとめを示している。各々のパネルは、免疫ペプチドーム解析によって検出されたペプチドを重ね合わせたCLT抗原1~4のアミノ酸配列を示している(破線の下線付き文字又は太文字で示されている; 実施例2を参照)。これらの配列の下に、HERVFESTで検出されたペプチド(図54を参照)を、それらが検出された黒色腫患者の識別番号(表5)及び標的としたHLAクラスIタイプとともに表示している。

10

【0201】

各々のHERVFEST検出の特性は、次の通りに定義される:

- ・標準文字: 単一のTCRの顕著な増幅
- ・太文字: 複数のTCRの顕著な増幅
- ・下線付き斜体文字: 他のウェルで検出された単一のTCRの顕著な増幅
- ・下線付き太文字: そのうちの少なくとも1つが他のウェルで検出された複数のTCRの顕著な増幅。

【0202】

これらの結果は、CLT抗原1~4が黒色腫患者に存在すること及びこれらCLT抗原に由来するペプチドがこれらの黒色腫患者における特異的T細胞応答を誘発することの強力な証拠を提供し、黒色腫を治療するための治療的介入の標的としてのこれらCLT抗原の価値を裏付けている。

20

表4: HERVFESTアッセイにおいて1以上のTCRを増幅させたCLT抗原由来ペプチド

30

40

50

【表 4】

参照 CLT抗原	配 列 番 号	ペプチド配列	ペプチドの HLAクラスIタイプ (NetMHCによる 予測)	HERVFEST パネル参照
1	配 列 番 号 13	VPANTYNALK	HLA-A*03:01	37
1	配 列 番 号 14	RLGGCQAWWR	HLA-A*03:01	41
1	配 列 番 号 15	ANTYNALKSR	HLA-A*11:01	60
1	配 列 番 号 11	HLADRKLSL	HLA-B*07:02	109
2	配 列 番 号 20	LVTDMVACRI	HLA-A*01:01	8
2	配 列 番 号 21	LILDFQPLQL	HLA-A*01:01	13
2	配 列 番 号 22	MSSFSTLASL	HLA-A*01:01	15
2	配 列 番 号 21	LILDFQPLQL	HLA-A*02:01	25
2	配 列 番 号 23	LMSSFSTLASL	HLA-A*02:01	27
2	配 列 番 号 24	LMSSFSTLA	HLA-A*02:01	23
2	配 列 番 号 25	QLMSSFSTLA	HLA-A*02:01	26
2	配 列 番 号 26	MVACRIKTFR	HLA-A*03:01	46
2	配 列 番 号 19	SSFSTLASLDK	HLA-A*03:01	45
2	配 列 番 号 26	MVACRIKTFR	HLA-A*11:01	67
2	配 列 番 号 27	VTDMVACRIK	HLA-A*11:01	69
2	配 列 番 号 28	SPADSLIL	HLA-B*07:02	119
2	配 列 番 号 29	SLILDFQPL	HLA-A*02:01	20
3	配 列 番 号 33	NTPNIVSLRA	HLA-A*01:01	18
3	配 列 番 号 34	VLLMRPLRIK	HLA-A*11:01	78
3	配 列 番 号 35	MRPLRIKGVF	HLA-B*07:02	124
4	配 列 番 号 40	FLFLELWL	HLA-A*02:01	30
4	配 列 番 号 41	SVFRELHPA	HLA-A*02:01	29
4	配 列 番 号 42	SPPSSTAPL	HLA-B*07:02	132

10

20

表 5: HERVFESTアッセイにおいて使用される黒色腫患者PBM Cの特徴解析

【表 5】

患者	HLA アレル A1	HLA アレル A2	HLA アレル B1	HLA アレル B2	HLA アレル C1	HLA アレル C2	HERVFEST 研究で 標的とされた HLA
204B	A*01:01	A*25:01	B*03:01	B*16:01	C*07:01	C*12:03	A*01
222B	A*02:01	A*30:02	B*44:02	不明	C*05:01	B*18:01	A*02
224B	A*02:01	A*03:01	B*35:01	B*40:02	C*04:01	C*02:02	A*02, A*03
293B	A*02:01	A*30:01	B*13:02	B*44:02	C*06:02	C*05:01	A*02
254C	A*11:01	A*32:01	B*15:01	B*56:01/ 56:55	C*01:02	C*03:03	A*11
188B	A*02:01	A*11:01	B*7:02	B*14:02	C*07:02	C*08:02	A*11, B*07
271B	A*01:01	A*01:01	B*08:01	B*08:01	C*07:01	C*07:01	A*01
225B	A*02:01	A*03:01	B*07:02	B*51:01	C*07:02	C*14:02	A*03, B*07

30

40

【 0 2 0 3 】

(実施例4－CLT抗原に特異的な高親和性T細胞が正常対象のT細胞レパートリーから欠失していないことを示すためのアッセイ)

ELISPOTアッセイを用いて、CLT抗原特異的CD8 T細胞が健常個人の正常T細胞レパートリー中に存在し、したがって、これらの患者のナイーブ及び胸腺組織内での癌特異的

50

CLT抗原の発現による中枢性寛容によって欠失していないことを示してもよい。この種のELISPOTアッセイは、複数の工程を含む。工程1: CD8 T細胞及びCD14単球を、正常な血液ドナーの末梢血から単離し、これらの細胞をHLAクラスIでタイピングして、試験されている特定のCLT抗原にマッチさせる。CD8 T細胞は、メモリーマーカーCD45ROに対する磁気標識抗体を用いて、ナイーブサブタイプ及びメモリーサブタイプにさらに細分化することができる。工程2: CD14単球を、個々の又はプールしたCLT抗原ペプチドで3時間パルスし、その後、CD8 T細胞と14日間共培養する。工程3: 増殖したCD8 T細胞をこれらの培養物から単離し、ペプチドでパルスした新鮮な単球で一晩再刺激する。これらのペプチドには;個々のCLT抗原ペプチド、無関係な対照ペプチド、又は感染性(例えば、CMV、EBV、インフルエンザ、HCV)もしくは自己(例えば、MART-1)抗原に対して強力な応答を惹起することが知られているペプチドが含まれてもよい。再刺激は、抗インターフェロンガンマ(IFN γ)抗体でコーティングされたプレート上で実施される。この抗体は、ペプチド刺激されたT細胞によって分泌されるIFN γ を捕捉する。一晩の活性化の後、細胞をプレートから洗い流し、プレートに捕捉されたIFN γ をさらなる抗IFN γ 抗体及び標準的な発色色素で検出する。IFN γ 産生細胞が初めからプレート上に存在していた場合、黒いスポットが残る。そのようなアッセイから得られるデータには、スポット数、スポットサイズ中央値、及びスポット強度中央値が含まれる。これらは、IFN γ 産生T細胞の頻度及び細胞当たりのIFN γ 量の尺度である。さらに、CLT抗原に対する応答の大きさの尺度は、スポット数又はスポットサイズ中央値で測定された特異的応答を、特異的ペプチドを含まない単球に対するバックグラウンド応答で割ったものである、刺激指数(SI)から導き出すことができる。刺激強度の評価基準は、スポット数の刺激指数にスポット強度の刺激指数を掛けることによって導き出す。このように、CLT抗原に対する応答と対照抗原に対する応答の比較を用いて、ナイーブ対象が、CLT抗原ベースの免疫原性製剤のワクチン接種によって拡大することができるCLT抗原反応性T細胞の強力なレパートリーを含むことを示すことができる。表6は、HLAマッチした正常な血液ドナーからの顕著なCD8 T細胞応答を誘導したCLT抗原由来ペプチドのリストを提供している。結果は、図56~63に示されている。横棒は、データの平均を表している。M+tは、ペプチドなし、陰性対照(単球及びT細胞)を示している。CEFは、陽性対照(23個のCMV、EBV、及びインフルエンザペプチドの混合物)を示している。統計的有意性は、クラスカル・ウォリス検定の一元配置Anovaを用いて測定し、ダン補正で反復測定を補正した。図56は、CLT抗原1(図中のCLT001)由来のHLA-A*02:01拘束ペプチドに対する正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を示している。図57に示されている例は、同じくHLA-A*02:01によって拘束されたCLT抗原2(図中のCLT002)に由来するペプチドに対する正常なドナーからのCD8応答を示している。図58は、CLT抗原4(図中のCLT004)からのHLA-A*02:01拘束ペプチドに対する正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を示している。図59は、CLT抗原5(図中のCLT005)由来のHLA-A*03:01-拘束ペプチドに対する正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を示している。図60は、CLT抗原6(図中のCLT006)由来のHLA-B*07:02-拘束ペプチドに対する正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を示している。図61は、CLT抗原7(図中のCLT007)由来のHLA-A*03:01-拘束ペプチドに対する正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を示している。図62は、CLT抗原8(図中のCLT008)由来のHLA-A*02:01-拘束ペプチドに対する正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を示している。図63は、メモリーCD45RO陽性CD8 T細胞におけるCLT抗原1及び4(図中のCLT001及びCLT004)由来のHLA-B*0702拘束ペプチドに対する応答の欠如を示している(パネルA及びC)。対照的に、同じドナーからのナイーブCD45RO陰性CD8 T細胞は、CLT001とCLT004の両方に由来するペプチドに対して有意に応答した(図63、パネルB及びD)。

表6: HLAマッチした正常な血液ドナーからの有意なCD8 T細胞応答を誘導したCLT抗原由来ペプチド

10

20

30

40

50

【表 6】

参照 CLT 抗原	配列番号	ペプチド配列	ペプチドのHLA-タイプ (NetMHCによる予測)
1	配 列 番 号 16	RLQGSVTLV	HLA-A*02:01
1	配 列 番 号 17	VPANTYNAL	HLA-B*07:02
2	配 列 番 号 30	QLMSSFSTL	HLA-A*02:01
4	配 列 番 号 43	FLELWLPEPML	HLA-A*02:01
4	配 列 番 号 44	APLLGSEPL	HLA-B*07:02
5	配 列 番 号 46	TPRPDLILL	HLA-A*03:01
5	配 列 番 号 47	RPDLILLQL	HLA-B*07:02
6	配 列 番 号 50	FPFYKDTVLL	HLA-B*07:02
7	配 列 番 号 52	IVLDAPVTK	HLA-A*03:01
8	配 列 番 号 55	SLYGHIIHNEA	HLA-A*02:01

10

【0204】

(実施例5-CLT抗原ペプチドペンタマーによる反応性T細胞の染色及びそれらによるペプチドをパルスされた又はCLTを発現する標的細胞の殺傷の実証)

健常ドナー及び黒色腫患者におけるCLT抗原に特異的な循環CD8 T細胞の存在及び活性は、HLAクラスI/ペプチドペンタマー(「ペンタマー」)染色及び/又はインビトロ殺傷アッセイを用いて測定することができる。したがって、実施例1及び2(表1～3、図1～53)で説明された方法を用いて発見されたCLT抗原へのこれらの方法の適用を用いて、癌患者におけるCLT抗原に対する治療関連T細胞応答の存在を示すことができる。

20

【0205】

これらの研究のために、健常ドナー又は患者の血液から単離されたCD8 T細胞を、様々な培養方法、例えば、抗CD3及び抗CD28でコーティングされた微細ビーズ+インターロイキン-2を用いて増殖させる。その後、増殖した細胞を、HLA分子のペプチド結合溝内で関連CLT抗原ペプチドに結合しているHLAクラスI分子のペンタマーからなるCLTペプチドペンタマーを用いて、そのT細胞受容体の特異的なCLT抗原反応性について染色することができる。結合は、ペンタマー構造のコイルドコイル多量体化ドメインに特異的なフィコエリスリン又はアロフィコシアニンがコンジュゲートされた抗体断片を用いる検出によって測定される。ペンタマー染色に加えて、メモリーマーカーCD45RO及びリソソーム放出マーカーCD107aなどのさらなる表面マーカーを調べることができる。ペンタマー陽性と特異的な表面マーカーとの関連を用いて、ペンタマー反応性T細胞集団の数と表現型(メモリー対ナイーブ/幹)の両方を推測することができる。

30

【0206】

ペンタマー染色された細胞は、蛍光活性化セルソーター(FACS)を用いて選別及び純化することもできる。その後、選別された細胞は、インビトロ殺傷アッセイで、標的細胞を殺傷するその能力についてさらに試験することができる。これらのアッセイは、CD8 T細胞集団及び蛍光標識された標的細胞集団を含む。この場合、CD8集団は、CLT抗原特異的なものであるもの、又はペンタマー選別され、かつMart-1などの強力な殺傷応答を誘導することが知られている陽性対照抗原に特異的なCD8 T細胞のいずれかである。これらの研究のための標的細胞には、HLA-A*02を発現するペプチドパルスされたT2細胞、HLA-A*02、03、もしくはB*07でトランスフェクトされたペプチドパルスされたC1R細胞、又はCLT/CLT抗原を発現することが以前に示されている黒色腫細胞株、患者腫瘍細胞、又はCLTオープンリーディングフレームでトランスフェクトされたCaSkiなどの細胞株が含まれ得る。T2又はC1R細胞をパルスするために使用されるペプチドには、CLT抗原ペプチド又は陽性対照ペプチドが含まれる。標的細胞死は、7AADの取り込みによって示される。このように、CD8 T細胞によって媒介されるアポトーシスによって殺されると、標的細胞は、赤色蛍光を獲得する。したがって、ペンタマー選別されたCLT抗原特

40

50

異的CD8 T細胞へのこの殺傷アッセイの適用を用いて、黒色腫患者又は健常ドナーT細胞のエキスポ培養物におけるCLT抗原特異的T細胞の細胞傷害性活性を数え上げることができる。

【0207】

図64は、CLT抗原4に由来するペプチドであるペプチド

【化3】

APPLGSEPL

による健常ドナーCD8 T細胞のHLAペンタマー染色を示している(上のパネル)。下のパネルは、これらのCD8 T細胞によるペプチドパルスされたC1R.B7標的細胞の抗原特異的殺傷を示している。インビトロ殺傷アッセイの陰性対照には、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に由来する無関係なペプチド及びペプチドなしが含まれる。図65は、ペンタマー陽性細胞の蛍光活性化細胞選別並びに抗CD3及び抗CD28でコーティングされたビーズ+IL-2を用いた14日間の増殖の後のCLT抗原8に由来するペプチドであるペプチド

【化4】

SLYGHIHNEA

による健常ドナーCD8 T細胞のHLAペンタマー染色を示している。右側のパネルは、これらのCD8 T細胞によるペプチドパルスされたA2標的細胞の非常に弱い抗原特異的殺傷を示すが、CLT抗原8のオープンリーディングフレームでトランスフェクトされたCaSki細胞の効果的な抗原特異的殺傷を示している。このインビトロ殺傷アッセイの陰性対照には、ペプチドなしの無関係なT2細胞が含まれる及びトランスフェクトされていないCaSki細胞が含まれる。

【0208】

(実施例6－黒色腫細胞におけるCLT発現を検証するためのアッセイ)

a) 黒色腫細胞株におけるCLT発現のqRT-PCR検証

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)は、所与の生物学的試料から抽出されたRNA中に存在する特定の転写産物の量を決定するための広く普及した技法である。特異的な核酸プライマー配列を対象となる転写産物に対して設計し、次に、プライマー間領域を一連の熱サイクル反応を介して増幅させ、インターカレート色素(SYBR Green)の使用によって蛍光的に定量する。プライマーペアをCLTに対して設計し、黒色腫細胞株又は初代患者組織から抽出されたRNAに対してアッセイした。非黒色腫細胞株を陰性対照として利用した。使用された黒色腫細胞株には、COLO 829(ATCC参照番号CRL-1974)、MeWo(ATCC参照番号HTB-65)、SH-4(ATCC参照番号CRL-7724)、並びに対照細胞株のHepG2(肝細胞癌、ATCC参照番号HB-8065)、Jurkat(T細胞白血病、ATCC参照番号TIB152)、及びMCF7(腺癌、ATCC参照番号HTB-22)が含まれた。患者由来黒色腫組織は、全て少なくともステージIICの疾患を有する患者に由来する6つの一次病変及び6つの転移から得られた。RNAを各々の試料から抽出し、標準的な手順に従って、cDNAに逆転写した。標準的技法に従うSYBR Green検出を伴うqRT-PCR解析を、各々のCLTの2つの領域と参照遺伝子に対して設計されたプライマーを用いて実施した。相対的定量値(RQ)は、次のように計算した:

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

【0209】

これらの実験の結果は、図66に示されている。パネルAは、3つの黒色腫細胞株及び4つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原1をコードするCLT(配列番号56)の異なる領域を標的とする2つのプライマーセット(1+2及び3+4)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。パネルBは、3つの黒色腫細胞株及び4つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原2をコードするCLT(配列番号57)の異なる領域を標的

とする2つのプライマーセット(5+6及び7+8)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。パネルCは、3つの黒色腫細胞株及び4つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原3/4をコードするCLT(配列番号58)の異なる領域を標的とする2つのプライマーセット(9+10及び11+12)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。パネルDは、3つの黒色腫細胞株及び4つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原5をコードするCLT(配列番号59)を標的とする1つのプライマーセット(88+89)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。パネルEは、12の黒色腫組織試料及び1つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原6をコードするCLT(配列番号60)の異なる領域を標的とする2つのプライマーセット(76+77及び78+79)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。パネルFは、12の黒色腫組織試料及び1つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原7をコードするCLT(配列番号61)の異なる領域を標的とする2つのプライマーセット(44+45及び46+47)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。パネルGは、12の黒色腫組織試料及び1つの非黒色腫細胞株から抽出されたRNA上のCLT抗原8をコードするCLT(配列番号62)の異なる領域を標的とする2つのプライマーセット(80-81及び82-83)を用いたqRT-PCRアッセイの結果を示している。これらの結果から、非黒色腫細胞と比較して、黒色腫細胞株又は組織試料から抽出されたRNA中のCLTの特異的発現が確認された。各々のCLTは、解析された2以上の細胞株又は組織試料で検出され、非黒色腫対照細胞株では、発現がほとんど又は全く検出されなかった。

10

20

30

40

50

【0210】

b)インサイチュの黒色腫細胞におけるCLT発現のRNAScope検証

インサイチュハイブリダイゼーション(ISH)法による転写産物発現解析により、所与の転写産物の存在及び発現レベルを標本の病理組織学的状況下で可視化することが可能になる。従来のRNA ISHアッセイは、抗体又は酵素ベースの比色反応の組合せにより生成されるシグナルによって可視化される、所望のRNA配列の短いストレッチに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたインサイチュでのネイティブRNA分子の認識を伴う。RNAScopeは、生成されるシグナルの特異性を確保し、かつ標的転写産物の高感度の単一分子可視化を可能にするより高度なプローブケミストリーを備えた、最近開発されたインサイチュハイブリダイゼーションベースの技法である(Wangらの文献、2012 J Mol Diagn. 14(1):22-29)。転写産物分子の陽性染色は、所与の細胞における小さな赤い点として現れ、複数の点は、複数の転写物が存在することを示す。

【0211】

RNAScopeプローブをCLTに対して設計し、12のホルマリン固定パラフィン包埋皮膚黒色腫コアの切片上でアッセイした。発現シグナルのスコアリングは、各々のコアからの代表的な画像上で、次の通りに実施した:

- ・CLTプローブの陽性染色による推定細胞%は、最も近い10に切り上げ
- ・所与の切片にわたる細胞発現当たりの推定レベルは、次の通りとする:
- ・0=染色なし
- ・1=細胞当たり1~2個のドット
- ・2=細胞当たり2~6個のドット
- ・3=細胞当たり6~10個のドット
- ・4=細胞当たり10個を上回るドット

【0212】

各々のCLTの各々の発現をいくつかの異なる患者腫瘍コアにわたって検出し、独立に、腫瘍由来RNAseqデータからのCLTの発見を検証し、かつ特定の試料にわたって腫瘍組織内の発現の均一性を確認し、また、解析された各々の患者のコアにおける少なくとも1つのCLTの存在を強調した。

表10-黒色腫患者組織コアにおけるRNAScopeのスコアリング

【表 7】

組織	コア	CLT 抗原 1 (配列番号56)		CLT 抗原 2 (配列番号57)		CLT 抗原 3/4 (配列番号58)	
		(+)ve細胞 の%	スコア	(+)ve細胞 の%	スコア	(+)ve細胞 の%	スコア
黒色腫	61	10	1	80	4	10	1
黒色腫	62	80	2	80	2	100	4
黒色腫	63	100	4	0	0	100	4
黒色腫	64	0	0	0	0	100	3
黒色腫	65	70	3	0	0	80	4
黒色腫	66	100	3	50	2	90	3
黒色腫	67	100	3	100	4	50	2
黒色腫	68	0	0	0	0	100	3
黒色腫	69	90	3	100	4	100	4
黒色腫	70	0	0	0	0	70	3
黒色腫	71	0	0	0	0	80	4
黒色腫	72	100	3	100	4	60	2

10

組織	コア	CLT 抗原 5 (配列番号59)		CLT 抗原 6 (配列番号60)		CLT 抗原 7 (配列番号61)		CLT 抗原 8 (配列番号62)	
		(+)ve細胞 の%	スコア	(+)ve細胞 の%	スコア	(+)ve細胞 の%	スコア	(+)ve細胞 の%	スコア
黒色腫	61	30	2	0	0	0	0	10	1
黒色腫	62	20	1	90	3	20	1	10	1
黒色腫	63	10	1	100	4	0	0	80	2
黒色腫	64	70	2	50	1	0	0	40	2
黒色腫	65	10	1	50	2	30	2	50	2
黒色腫	66	80	3	100	4	50	1	50	n/a
黒色腫	67	100	4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
黒色腫	68	30	2	40	1	0	0	50	1
黒色腫	69	10	1	80	3	80	1	50	1
黒色腫	70	10	1	10	1	20	1	10	1
黒色腫	71	50	3	0	0	0	0	10	1
黒色腫	72	90	3	100	3	0	0	10	1

20

30

【0213】

(実施例7-CLT抗原又はCLT抗原融合タンパク質のプールを用いるT細胞のエキスピボ刺激)

40

健常ドナー又は所与の癌を有する患者由来のT細胞を体外(エキスピボ)で刺激して、特定のCLT抗原を認識するT細胞クローンを活性化させ、その後、速やかに増殖させて、多数のCLT反応性T細胞を生成させることができ、その場合、結果として生じる抗腫瘍活性を見込むことができる。この方法を利用するために、いくつかの工程が含まれる。

【0214】

A)関連する患者免疫細胞の単離

ドナー(健常者又は癌患者)由来のT細胞を単離しなければならないだけでなく、自己抗原提示細胞(APC)を必要とし得る。免疫細胞の源は、採血又はアフエレーシスによって、末梢血から得ることができる。或いは、T細胞を新鮮な生検又は患者の腫瘍の切除から得られた腫瘍浸潤リンパ球(TIL)から単離することができる。APCは、CD14陽性単球、

50

又はその代わりに、アフエーシス産物の単球画分から得られる樹状細胞(DC)であってもよい。DCは、CD14捕捉(例えば、磁気ビーズにコンジュゲートされた抗CD14抗体、この場合、CD14陽性細胞は、ビーズで標識され、磁気カラムに捕捉されている)による陽性単離又はその接着特性、例えば、単球の接着を可能にする4~48時間の末梢血単核細胞(PBMC)と細胞培養皿とのインキュベーションによる組織培養プラスチックへの接着による単離などの方法によって生成させることができる。DCは、限定されないが、GM-CSF、IL-4、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、プロスタグランジンE2:などのサイトカインを利用する十分に説明されている方法によって、CD14陽性又は接着免疫細胞画分から生成させることができる。そのようなサイトカインとの2~7日間にわたるインキュベーションは、CD14+単球から、通常、CD14の発現を喪失し、かつ例えば、CD11c、高レベルのMHCクラスIIなどのDCマーカーの発現が上方調節されるDCへの分化を可能にする。選択及び/又は刺激用のT細胞の性質は、PBMCの単球除去画分(アフエーシス起源のT細胞の場合)、CD3などのマーカーの発現、又は特異的T細胞サブセット、例えば、限定されないが、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CCR7、CD62L、CD27などのマーカーの存在もしくは不在に基づく単離技法を用いる汎T細胞単離であり得る。

10

【0215】

B) CLT抗原認識T細胞の選択

APCによる刺激の前にT細胞を選択する方法を利用することができる。そのような方法は、所与のpHLAを認識するTCRを発現するT細胞を標識するための、テトラマー、ペンタマー、デキストラマー、又は類似物などの、ペプチド-HLA(pHLA)多量体アプローチを含む。そのようなpHLAは、実施例2に記載されている質量分析(MS)実験、及び/又は予測アルゴリズムに基づいて特異的なHLAアロタイプに結合することが予測されるペプチドに基づいて定義される。多量体は、蛍光活性化選別を用いて又は磁気ビーズにコンジュゲートされた抗PE抗体を介して単離され得るフィコエリスリン(PE)などのタグを保有することができる。或いは、タグに対する抗体は、磁気ビーズに直接コンジュゲートすることができる。異なるCLT抗原由来の異なるpHLAを認識する異なるT細胞を単離するために、多量体を同じもしくは異なるタグ付きで生成させることができるか、又は異なる多量体を磁気ビーズにコンジュゲートすることができる。

20

【0216】

C) T細胞の刺激

CLT抗原に対する癌患者からの既存の(メモリー)T細胞応答を増強するか又は新しい(ナイーブ)T細胞応答を刺激するために、患者のT細胞を、クラスI及びクラスII HLA複合体との関連で表面にCLT抗原に由来するペプチドを提示しているAPCに曝露させることができる。これは、患者のアフエーシス産物から作製された自己DCなどのAPCへの複数のCLT抗原(患者の腫瘍によって発現されると予想される)の導入を伴うことができる。CLT抗原の導入は、複数のCLT抗原の連結されたポリペプチドの送達によるもの、例えば、ウイルスベクター送達、又は個々のプールされたCLT抗原としてのもの、例えば、mRNAに基づく送達方法であり得る。安定化された成熟mRNAのAPCへの送達方法(すなわち、トランスフェクション)は、細胞内への核酸送達のためのポリエチレンジアミン(PEI)又はリン酸カルシウムなどの従来の試薬を含むことができる。或いは、効率的なトランスフェクションは、APCへのトランスフェクションのための脂質ベースの試薬を用いて達成することができる。これらのトランスフェクション反応では、脂質複合体、例えば、脂質ナノ粒子(LNP)又は(mRNAと脂質試薬との単なる混合によって形成される)脂質ベースのリボプレックス中に製剤化されたインビトロ転写反応(IVT)由来の合成mRNAが使用される。これらのmRNAを作出するために、ファージT7 DNA依存性RNAポリメラーゼ用の十分に説明されているプロモーターエレメントと、それに続く、安定性の高いmRNA 5'UTRをコードするcDNA、CLT抗原のコドン最適化オープンリーディングフレーム(ORF)をコードするcDNA、安定性の高いmRNA 3'UTRをコードするcDNA、>20ヌクレオチドのポリ-A配列、及び機能的ポリAテールを放出するように設計されたユニークな制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する組換えDNAコンストラクトを、好適なCLT抗原を

30

40

50

コードするmRNAのインビトロ転写(IVT)の鋳型として使用することができる。IVT mRNAをコードする抗原を発現するヒトAPCを作出するために、Cafriらの文献、Nat.Com m.2019に記載されているものに類似したリポプレックス法を使用することができる。簡潔に述べると、APC(単球又はDC)を組織培養フラスコにプレーティングして、70~90%のコンフルエンスを達成する。脂質ベースのトランスフェクション試薬(例えば、Lip otectamine(商標)、MessengerMAX(商標)、又はFuGENE(登録商標) HD、又は類似品)をOpti-MEM(商標)などの無血清培地に適切に希釈し、混合し、CLT抗原をコードするmRNAとともにインキュベートする。これは、APCへのCLT抗原の組合せのトランスフェクション用の複数のCLT抗原mRNAを用いて行うことができる。mRNAと脂質試薬とのインキュベーション時間は短く(5~10分)、かつ室温である。得られるmRNA-脂質複合体をAPCに添加し、37℃/5%CO₂で、CLTをコードするmRNA分子からの翻訳ペプチドの提示のための最適な時点に応じて、16~72時間インキュベートする。

10

【0217】

記載されているそのような方法によるAPCへのCLT抗原の送達は、APCの細胞質内でのCLT抗原ポリペプチドの発現をもたらすはずであり、これがさらに、クラスI及びクラスII HLA分子上での提示のための該ポリペプチドからのペプチド断片の細胞プロセッシングをもたらすことになる。T細胞((b)に記載されているように選択されたもの、又はアフエーシスもしくはTIL源由来の選択されていないT細胞のいずれか)を細胞表面でCLT抗原由来ペプチド-HLA複合体を発現するAPCと共培養すると、所与のpHLAに対する特異性を有するTCRを保有するT細胞は、APC由来の共刺激分子及びシグナルに加えて、pHLA複合体とエンゲージすることにより刺激される。これは、エンゲージされたT細胞の活性化、分化、及び増殖をもたらす。例えば、CLT抗原をコードするIVT mRNAを上記の方法でAPCにトランスフェクションするのに成功した後、単離された自己CD3+ T細胞を、サイトカイン含有培地(例えば、使用された基本培地中にIL-6及びIL-12又は他のサイトカインを補充したもの)中、過剰なT細胞対APC、例えば、10個のT細胞/1個のAPC(10:1)の比で、APCと共培養する。この細胞を、わずか一晚又は最大1週間、しかし、典型的には、18~48時間共培養して、T細胞を刺激し、その後、必要であれば、T細胞を増幅の前に濃縮することができる。

20

【0218】

D) 刺激されたT細胞の濃縮

30

CLT抗原を発現しているAPCによって刺激されたT細胞は、必要であれば、増幅工程の前にさらに濃縮することができる。T細胞活性化のマーカー(例えば、CD137、CD107a、CD69、OX40、もしくは活性化状態と関連する他の表面マーカー)又はT細胞の機能的応答(例えば、TNF α もしくはIFN γ などのサイトカインを分泌するT細胞)を選択し、T細胞集団をCLT抗原特異的であり得る細胞について濃縮することができる。そのような濃縮方法は、FACSによる細胞選別又は例えば、磁気ビーズにコンジュゲートされているCD137に対する抗体もしくは類似物を用いるビーズに基づく捕捉方法を含むことができる。複数の濃縮戦略を、同時(例えば、CD137とCD69が二重陽性の細胞)又は逐次(例えば、CD137が陽性の細胞を選択し、その後、CD69が陽性のCD137+細胞を選択する)のいずれかで利用することができる。そのような陽性選択は、CLT抗原を発現するAPCによって刺激されない可能性が高いT細胞を除去するはずである。

40

【0219】

E) 刺激されたT細胞の急速拡大

CLT抗原がその中に導入されたAPCによるT細胞の刺激の後、バルク又は濃縮された(上記の(D)を参照)T細胞を、最適化のための潜在的な修飾を伴う文献に記載されている方法(例えば、Jinらの文献、J Immunother, 2012)に基づく方法を用いて急速に拡大して、 $>10^8$ 個の全細胞数を達成することができる。そのような方法では、IL-2などのサイトカイン及び抗CD3などの刺激抗体、並びにPBMC由来の潜在的な放射線照射自己細胞(「フィーダー」細胞と呼ばれる)が使用される。或いは、CD3及びCD28に対する刺激抗体を用いて、フィーダー細胞の使用を回避することができる。このプロセスは、特殊な

50

ガス透過性フラスコ(例えば、G-Rexフラスコ)又は密閉増殖システム(例えば、WAVEバイオリアクター)を用いて、さらに自動化又は増強することができる。T細胞の顕著な増殖(100~1000倍)は、開始時のT細胞の数に応じて、わずか7~14日で達成することができる。

【0220】

F)CLT抗原免疫原性の証拠のための拡大されたT細胞の試験

エキスピボ自己刺激プロセスがCLT抗原を発現する標的細胞(腫瘍細胞を含む)を認識するT細胞を拡大したことを示すために、特異的CLT抗原ペプチド-HLA(pHLA)複合体に対応する多量体を用いて、特定のCLT抗原pHLAに対する反応性を有するT細胞の存在を検出することができる。CLT抗原の組合せに由来する複数のpHLAを異なる標識とともに用いて、エキスピボ刺激されたT細胞による複数のCLT抗原の認識を示すことができる。

10

【0221】

機能アッセイは、CLT抗原由来のペプチドを提示する標的細胞に応答するエキスピボで免疫されたT細胞の能力も示す。これは、種々のアプローチによって達成することができる。まず、サイトカイン放出アッセイを行って、エキスピボ刺激されたT細胞と標的細胞との共培養によるT細胞活性化を試験することができる(例えば、IFN γ ELISpotアッセイ)。或いは、標的細胞のT細胞媒介性殺傷を、細胞傷害性アッセイ、例えば、T細胞と共培養された標的細胞の細胞死を(例えば、7-AAD測定によって)評価するFACSベースの方法、又は他の方法、例えば、標的細胞のアポトーシスのマーカーをモニタリングするもしくは特殊な表面にプレーティングされた接着標的細胞のインピーダンス(細胞生存の電気的尺度)を測定する方法で測定することができる。

20

【0222】

種々の方法を用いて、そのようなアッセイのための標的細胞を作出することができる。例えば、エキスピボ刺激で使用されるAPCとマッチするHLAを有する適当なヒト細胞をクラスI HLA分子上に提示されることが知られているCLT抗原(質量分析実験からデコンボリューションしたとき—実施例2を参照)に由来するペプチドでパルスすることができる。さらに、APCのHLAタイプにマッチする腫瘍細胞株を評価することもできる。最後に、原発性腫瘍細胞(特に、このプロセスに使用した出発T細胞及びAPCが得られた同じ患者ドナー由来の腫瘍細胞)を評価することができる。

30

【0223】

結論として、これらの方法を用いて、ヒトT細胞をエキスピボでCLT抗原により「免疫」して、免疫学的に反応性/細胞溶解性のT細胞を産生することができることを示すことができ、これにより、1以上のCLT抗原を用いた癌患者のワクチン接種が癌の制御における治療的価値を有する可能性が裏付けられる。

【0224】

(実施例8—CLT抗原融合タンパク質設計の方法)

ベクター化ワクチンを介する複数のポリペプチド抗原の混合物の送達を容易にするために、成分抗原の遺伝子を単一のORFになるように組み合わせ、抗原性融合タンパク質の合成をもたらすことが極めて望ましい。さらに、成分ポリペプチドを直接連結するのではなく、これらをペプチドリンカー領域によって接続して: 1) 正常なヒトタンパク質を模倣した融合接合部における新規のエピトープを生成させる潜在的なリスクを低下させ(安全性の増加)、かつ2) 融合体/リンカーに隣接するCLT抗原T細胞エピトープが、腫瘍組織によってコードされる個々のORFから発現されたときに、その提示を模倣する様式でプロセッシングされることを保証する(有効性の増大)ことができる。安全でかつ効果的な融合タンパク質の設計を容易にするための連結を達成するために、アルゴリズムを開発した。単純な短いリンカーが上述の目的を達成するのに優れているので、これらをこのアルゴリズムで使用する。この目的のために、Glyベースの複数のリンカーを選択し、そのうちのいくつかは、正常なヒトタンパク質との同一性を消失させ、かつ成分CLT抗原の末端

40

【化 5】

(GGG, GGGG, KGG, GKGKG, GGGKGG, GKG;それぞれ、配 列 番 号 71~75, 84)

におけるプロセッシングを容易にするためのLys残基も含有していた。

【0225】

本実施例のために、アルゴリズムをCLT抗原1、2、4、6、7、及び8 (CLT抗原融合タンパク質1及び2) 及びCLT抗原1~8 (CLT抗原融合タンパク質3及び4) という2つの異なるCLT抗原の組に適用した。

【0226】

上記の必要性を達成するために、4つの個々の融合タンパク質(6つのCLT抗原のワクチンレジメンのためのCLT抗原融合タンパク質1/CLT抗原融合タンパク質2及び8つのCLT抗原のワクチンレジメンのためのCLT抗原融合タンパク質3/CLT抗原融合タンパク質4)の各々の設計において、6つの基準を考慮した。これらを1つずつ適用し、その後、必要な場合、逐次的に反復して、最終的な融合タンパク質候補が全ての基準を満たすことを保証した。

【0227】

第一に、Standalone Blast ver2.9.0(AltSchulらの文献、J.Mol.Biol.1990)によって実施されるblastp検索によって決定したとき、リンカーペプチドの任意の部分を含む9-merペプチドがヒトプロテオームと同一であることができないように、融合タンパク質配列を設計した。完全を期すために、このblastp検索を、Ensembleデータベース(www.ensembl.org)から抽出された3つのプロテオームサブデータベース; SwissProtヒトプロテオーム、Trembl Ensemblヒトup000005640プロテオーム、及びTrembl全ヒトプロテオーム(2019年8月14日作成)に対して実施した。

【0228】

第二に、リンカーペプチドの任意の部分を含む9-merペプチドがNetMHCpan 4.0(Andreatta及びNielsenの文献、Bioinformatics 2016)によるMHCクラスIスーパータイプ(下記参照)の予測される強いバインダー(ランク ≤ 0.5)となることができないように、融合タンパク質配列を設計した。黒色腫療法での使用に好適なCLT抗原をコードする融合タンパク質の作製のために、黒色腫患者の標的集団に重要なMHC HLAクラスIタイプは、以下のスーパータイプ: HLA-A*01:01、HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-A*11:01、HLA-A*24:02、HLA-A*25:01、HLA-A*26:01、HLA-A*68:01、HLA-B*07:02、HLA-B*08:01、HLA-B*18:01、HLA-B*27:05、HLA-B*35:01、HLA-B*35:03、HLA-B*40:01、HLA-B*40:02、HLA-B*51:01、HLA-C*07:01、HLA-C*07:02の選択をもたらす、重要なドライバーである。

【0229】

第三に、HLA結合ペプチドがそのC-末端と正確に整列することが見出されたCLT抗原(実施例2を参照)が、C-末端アンカー残基(腫瘍組織で発現されたときに、通常、終止コドンによって放出される)が融合タンパク質の状況において同様に産生されるようにするのを助ける融合タンパク質設計のC-末端での位置付けのために優先されるように、融合タンパク質配列を設計した。C-末端配置がそのようなCLT抗原のために不可能であるとき、リンカー配列をNetChop 3.1サーバー(Nielsenらの文献、Immunogenetics 2005)で行われたプロテアソーム切断部位予測に基づいてさらに最適化して、本物の(終止コドンによって生成された)CTA抗原ポリペプチド中に見られるC-末端を生じると考えられるリンカー配列を選択した。

【0230】

第四に、選択されたMHCクラスIスーパータイプ(上記を参照)の弱いバインダー(ランクスコア ≤ 2.0)であると予測されるリンカーペプチドの任意の部分を含む全ての9-merペプチド配列が改変されて、リンカーを調節することによるか、又は場合によっては、N-末端メチオニンを成分CLT抗原から除去することによって結合を消失又は低下さ

せるように、融合タンパク質配列を設計した。メチオニンは、MHCクラスI結合ペプチドのN-末端位置にめったに見られないので(Abelinらの文献、Immunity 2017; Alvarezらの文献、Molecular & Cellular Proteomics 2019)、N-末端メチオニンの切断も、選択されたMHCクラスI分子に弱く結合すると予測された9-merを消失させるための戦略として採用した。高頻度のHLAクラスIタイプ(HLA-A*02:01、HLA-A*03:01、HLA-B*07:02)の弱いバインダーであると予測されたペプチド配列の消失/低下を改変のために優先した。可能な場合、同じ手順を使用することにより、他の全ての選択されたスーパータイプ(上記を参照)に対する弱いバインダーであると予測されたペプチド配列の消失/低下を達成した。

【0231】

第五に、融合タンパク質カセットの1つの用途は、プライム/ブーストレジメンにおけるものである。CLT抗原接合を直接反復させて、エピトープ反復を低下させないように、この目的で使用する融合タンパク質設計のペアを設計した。

【0232】

第六に、融合タンパク質のペアを改良して、プライムコンストラクトとブーストコンストラクトの間で反復される予測された弱い結合エピトープを除去した(CLT抗原融合タンパク質3及び4について履行された)。これは、N-末端メチオニン残基を除去することによるか(N-末端メチオニン除去について上で記載されている論拠を参照)、又は別のリンカーの使用(上記を参照)によるかのいずれかによって達成された。

【0233】

(CLT抗原の設計の履行)

上記の融合タンパク質設計戦略の結果は、図67~70に模式的な形式で示されている4つのコンストラクト(CLT抗原融合タンパク質1(配列番号76)、CLT抗原融合タンパク質2(配列番号77)、CLT抗原融合タンパク質3(配列番号78)、CLT抗原融合タンパク質4(配列番号79))であった。

【0234】

(実施例9-融合タンパク質の抗原性)

実施例8に記載されているように設計されたCLT抗原融合タンパク質は、翻訳され、細胞質ゾル内でタンパク質分解的にプロセッシングされ、かつHLAクラスI分子と関連して細胞表面に提示されると考えられる。融合タンパク質カセットをコードするcDNAコンストラクトをヒト細胞内に形質導入し、HLAクラスI分子を免疫沈降し、CLT抗原の発見について実施例2に記載されているMS解析にかけた。これは、CLT抗原融合タンパク質カセットが腫瘍組織内で以前に同定された成分CLT抗原の同様の抗原提示特性(実施例2に示されている)を維持していたことを示すために行われる。

【0235】

MSベースの免疫ペプチドーム解析は、HLAクラスI分子と関連する特定のペプチドの直接的な検出を可能にする強力な技術である。しかしながら、個々のペプチドを検出する能力は、その生物物理学的な特性による影響を受け、これは、細胞内に存在するタンパク質分解活性及びこれらの研究に使用される細胞株で発現されるHLAアレルによって制限される。したがって、この方法は、組織又は細胞試料中の以前に同定されたHLA結合ペプチドの全てを発見する可能性は低い。それでもやはり、検出されるHLAクラスI結合ペプチドのレパートリーは、CLT抗原由来のペプチドエピトープの送達において試験される融合タンパク質設計の価値を確認するものである。

【0236】

融合タンパク質設計に関するMSベースの研究を遂行するために、培養ヒト細胞を、CLT抗原融合タンパク質カセットをコードするプラスミドDNAで好適なpolIIプロモーター並びに5'及び3'UTRの制御下で形質導入する。拡大後、CLT抗原融合タンパク質カセットをコードする培養細胞を溶解させ、HLAクラスI-ペプチド複合体を抗HLAクラスI抗体捕捉によって親和性精製する。その後、単離されたHLA分子及び結合したペプチドを互いから分離し、溶出したペプチドをnUPLC-MS/MSによって解析する。その後、これ

10

20

30

40

50

らのHLAクラスIプルダウンから獲得されたMS/MSスペクトルを、PEAKS(商標)ソフトウェア(v8.5及びvX、Bioinformatics Solutions社)を使用することにより調べる。MS/MSの解釈のために、このソフトウェアは、関連する融合タンパク質のポリペプチドを有するヒトプロテオームに含まれるポリペプチドの全ての理論上のスペクトルを並列で評価する。これらの研究について、細胞内で見られるクラスI HLA結合ペプチドの大半は構成的に発現されたタンパク質に由来するので、解析された配列のレパートリーが関連するCLT抗原融合タンパク質コンストラクト及びヒトプロテオームの配列を含有することが不可欠である。

【0237】

これらの研究の結果は、形質導入された細胞のHLAクラスIレパートリーによってプロセッシング及び提示される個々のCLT抗原融合タンパク質由来ペプチドを同定している。これらのデータの解析を用いて、設計が個々のCLT抗原由来のペプチドの効果的な提示をもたらしていることを示す。さらに、これらの研究の結果は、試験されたタンパク質融合体のリンカー領域に由来するエピトープがCLT抗原融合タンパク質cDNAを形質導入された細胞において効率的に提示されないことを示している。

【0238】

まとめると、これらのデータは、CLT抗原融合タンパク質コンストラクト由来のCLT抗原エピトープの翻訳、プロセッシング、及び提示の強い支持を提供することができる。したがって、患者に見られる腫瘍上のCLT抗原ペプチド/HLAクラスI複合体を認識するT細胞を誘発するように設計されたワクチン(又は他の治療モダリティ)におけるこれらのCLT抗原融合タンパク質の使用を可能にする。

【0239】

(実施例10 融合タンパク質を発現する細胞株の殺傷)

CLT抗原融合タンパク質オープンリーディングフレームを発現する細胞から得られる抗原の免疫原性を、実施例5に記載されているCLT-ペプチド反応性T細胞と組み合わせたトランスフェクトされた細胞株を用いて示すことができる。CLT抗原特異的CD8 T細胞によるCLT抗原融合タンパク質がトランスフェクトされた細胞株の殺傷を用いて、癌患者におけるCLT抗原の連結された組合せに対する治療的に関連するT細胞応答の存在を示す。

【0240】

実施例8及び9に記載されているCLT抗原融合タンパク質1、2、3、又は4(配列番号76~79)をコードするコンストラクトでトランスフェクトされたCaSki細胞を実施例5に記載されている殺傷アッセイの標的として使用する。CLT抗原1、2、3、4、5、6、7、及び8に由来するHLA-ペンタマーを用いて健常ドナー及び黒色腫患者から単離されたCD8 T細胞株を、これらのCLT抗原融合タンパク質がトランスフェクトされた標的細胞の殺傷能力について個々に試験する。陰性対照細胞は、トランスフェクトされていないCaSki又は無関係なコンストラクトでトランスフェクトされたCaSki細胞である。

【0241】

(実施例11 マウス免疫原性研究)

実施例8に記載されている融合タンパク質コンストラクト内の個々の成分CLT抗原の免疫原性を示すために、マウスに、プライミングCLT抗原融合タンパク質配列(CLT抗原融合タンパク質1又はCLT抗原融合タンパク質3;図67及び69;配列番号76及び配列番号78)をコードするChAdOx1ベクター(複製欠損チンパンジーアデノウイルスベクター)によるプライミング免疫を投与し、かつブースティングCLT抗原融合タンパク質配列(それぞれ、CLT抗原融合タンパク質2又はCLT抗原融合タンパク質4;図68及び70、配列番号77及び配列79)をコードするMVAベクター(複製欠損改変ワクシニアアンカラベクター)によるブースター免疫を投与することができる。

【0242】

これらの研究のために、非近交系マウス(多様な主要組織適合性クラスI及びII分子を有する集団から得られた実験用マウス)を用いて、ヒトの非近交性をより厳密に模倣する。

さらに、上で言及されているように、この実験は、プライミングベクター(CLT抗原融合タンパク質1、CLT抗原融合タンパク質3;図67及び69;配列番号76及び配列番号78)及びブースティングベクター(CLT抗原融合タンパク質2、CLT抗原融合タンパク質4;図68及び70、配列番号77及び配列番号79)を用いて、プライム/ブースト臨床応用における融合タンパク質抗原の使用を模倣する。

【0243】

ヒトで使用するための設計の有用性にもかかわらず(実施例8を参照)、ヒトプロテオームと一致するリンカー由来配列の消失、及びヒトHLAクラスI分子に結合すると予測されるリンカー由来配列の消失/低下を含む、この設計の多くの態様は、マウス免疫モデルで試験することができない。それでもなお、マウス細胞及びヒト細胞における抗原プロセッシング機構が類似しているため、マウス研究の重点をCLT抗原それ自体に対する免疫応答に置くことにより、これらの研究は、融合タンパク質の設計及びプロセッシングに関する有用な情報を実際に提供する(Kumanovics A、Takada T、Lindahl KFの文献、哺乳動物MHCのゲノム編成(Genomic organization of the mammalian MHC). *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 629-57. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.090501.080116. Madi A、Poran A、Shifrut Eらの文献、マウス及びヒトのT細胞受容体レパートリーは保存された公的CDR3配列の周辺の類似性ネットワークにクラスター化される(T cell receptor repertoires of mice and humans are clustered in similarity networks around conserved public CDR3 sequences). *eLife* 2017;6:e22057. DOI: 10.7554/eLife.22057)。

10

20

【0244】

ワクチン接種動物における癌関連免疫原性を評価するために、IFN γ ELISPOTアッセイを使用することにより、ワクチン接種マウスから採取された免疫細胞をCLT抗原特異的T細胞の存在について試験する(Mennuniらの文献、*Int.J.Cancer*, 2005)。簡潔に述べると、上記のようにワクチン接種されたマウスを人道的に安楽死させ、これらの動物から調製された脾臓細胞を、真正のCLT抗原のうちの1つ又は複数の配列に対応する重複するペプチドの存在下(又は非存在下)、マウスIFN γ に対するモノクローナル抗体で誘導体化されたマルチウェルディッシュのウェルにロードした(図71の模式図を参照)。

【0245】

好適なインキュベーション時間(例えば、16~24時間)の後、ペプチドで活性化されたT細胞によって分泌される固定化されたIFN γ を(固定化モノクローナル抗体の存在下でIFN γ を特異的に選択するように選択された)第二の抗IFN γ モノクローナル抗体で染色し、ウェルにロードされたCLT抗原ペプチドを認識するワクチンで誘発されたマウスT細胞の存在を示す細胞/スポットの数え上げを可能にする。刺激CLT抗原ペプチドプールに対する特異的免疫応答を計算するために、スポット数を、ペプチドの非存在下でインキュベートされた同じ動物由来の脾臓細胞のウェルに見られるIFN γ 染色スポットの数に対して正規化する。

30

【0246】

これらの研究からのデータは、マウスにワクチン接種するために使用される融合タンパク質コンストラクト中に存在するCTL抗原の免疫原性を示しており、その成分CLT抗原に対する免疫応答のプライミング及びブースティングにおけるこれらの融合タンパク質の有用性を裏付けている。

40

【0247】

(配列表)

配列番号1(CLT抗原1のポリペプチド配列)

【化 6】

MWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCPSPCSLHAAGALP
GTGRQRWRVELAHLADRKLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGAGFAARLQGSV
TLVQQGWFFPRLGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTS

配列番号2 (CLT抗原2のポリペプチド配列)

【化 7】

MTGVLIRRGDLVTDMVACRIKTFRGHTEKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPLQLM
SSFSTLASLDK

10

配列番号3 (CLT抗原3のポリペプチド配列)

【化 8】

MNTPNIVSLRAHQPEVGIIPSVLLMRPLRIKGVFHIIHSPLHGENQGFTLCLQGAPPSSS
V

配列番号4 (CLT抗原4のポリペプチド配列)

【化 9】

MAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPPSSTAPLLGSEPLRHW
EASLSR

20

配列番号5 (CLT抗原5のポリペプチド配列)

【化 10】

MLPRTPRPDLILLQLLPAGLRQLLQTSGPDNEQPIEQDLICNVC

配列番号6 (CLT抗原6のポリペプチド配列)

【化 11】

MWNSLEARSPKSRCCSTGPWEAVQENLLWASLLAPGGATIFDPWLLKASPSSLPHL
HRTSPCACLCPNFFFYKDTVLLHQGPR

30

配列番号7 (CLT抗原7のポリペプチド配列)

【化 12】

MAMGQRTPSLAELRKSSATFLTCNLGAQAEKRSRAPGKLTYVSTIVLDAPVTKLEQGL
VMKRYKIVTQGFDYTSVES

40

配列番号8 (CLT抗原8のポリペプチド配列)

【化 13】

MCALQGRGASPAGAGLFHWMTMSPFLLGSLYGHIHNEAV

配列番号9 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)

【化 14】

VQQGWFFPR

50

配列番号10 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化15】

VVRGGAGFAAR

配列番号11 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化16】

HLADRKLSL

配列番号12 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化17】

ARLQGSVTL

配列番号13 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化18】

VPANTYNALK

配列番号14 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化19】

RLGGCQAWWR

配列番号15 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化20】

ANTYNALKSR

配列番号16 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化21】

RLQGSVTLV

配列番号17 (CLT抗原1に由来するペプチド配列)
【化22】

VPANTYNAL

配列番号18 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化23】

ADSLILDF

配列番号19 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化24】

SSFSTLASLDK

10

20

30

40

50

配列番号20 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化25】

LVTDMVACRI

配列番号21 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化26】

LILDFQPLQL

配列番号22 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化27】

MSSFSTLASL

10

配列番号23 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化28】

LMSSFSTLASL

配列番号24 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化29】

LMSSFSTLA

20

配列番号25 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化30】

QLMSSFSTLA

配列番号26 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化31】

MVACRIKTFR

30

配列番号27 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化32】

VTDMVACRIK

配列番号28 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化33】

SPADSLIL

40

配列番号29 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)
【化34】

SLILDFQPL

配列番号30 (CLT抗原2に由来するペプチド配列)

50

【化 3 5】

QLMSSFSTL

配列番号 31 (CLT 抗原 3 に由来するペプチド配列)

【化 3 6】

NTPNIVSLR

配列番号 32 (CLT 抗原 3 に由来するペプチド配列)

【化 3 7】

RPLRIKGVF

10

配列番号 33 (CLT 抗原 3 に由来するペプチド配列)

【化 3 8】

NTPNIVSLRA

配列番号 34 (CLT 抗原 3 に由来するペプチド配列)

【化 3 9】

VLLMRPLRIK

20

配列番号 35 (CLT 抗原 3 に由来するペプチド配列)

【化 4 0】

MRPLRIKGVF

配列番号 36 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 1】

KTKGSLSVFR

30

配列番号 37 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 2】

AAFDRAVHF

配列番号 38 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 3】

AFDRAVHF

40

配列番号 39 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 4】

KTKGSLSVF

配列番号 40 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

50

【化 4 5】

FLFLELWL

配列番号 41 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 6】

SVFRELHPA

配列番号 42 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 7】

SPPSSTAPL

10

配列番号 43 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 8】

FLELWLPEPML

配列番号 44 (CLT 抗原 4 に由来するペプチド配列)

【化 4 9】

APLLGSEPL

20

配列番号 45 (CLT 抗原 5 に由来するペプチド配列)

【化 5 0】

LPRTPRPDLIL

配列番号 46 (CLT 抗原 5 に由来するペプチド配列)

【化 5 1】

TPRPDLILL

30

配列番号 47 (CLT 抗原 5 に由来するペプチド配列)

【化 5 2】

RPDLILLQL

配列番号 48 (CLT 抗原 6 に由来するペプチド配列)

【化 5 3】

ATIFPDPWLLK

40

配列番号 49 (CLT 抗原 6 に由来するペプチド配列)

【化 5 4】

FPFYKDTVL

配列番号 50 (CLT 抗原 6 に由来するペプチド配列)

50

【化 5 5】

FPFYKDTVLL

配列番号 51 (CLT 抗原 6 に由来するペプチド配列)

【化 5 6】

TIFPDPWLLK

配列番号 52 (CLT 抗原 7 に由来するペプチド配列)

【化 5 7】

IVLDAPVTK

10

配列番号 53 (CLT 抗原 8 に由来するペプチド配列)

【化 5 8】

GHIHNEAV

配列番号 54 (CLT 抗原 8 に由来するペプチド配列)

【化 5 9】

SLYGHIHNEAV

20

配列番号 55 (CLT 抗原 8 に由来するペプチド配列)

【化 6 0】

SLYGHIHNEA

配列番号 56 (CLT 抗原 1 をコードする CLT の cDNA 配列)

30

40

50

【化 6 1】

CGGGGCCAGTCTTTCCCGTGCTATTCTCGTGATAGTGAATAAGTCTCACAAGATCT
GATGGGTTTATCAGGGGTTTTTCATTTTGCTTCTTCCTCATTTTCTTTTGCTGCTGTAA
TGTAAGAAACGCCTTTTGCCTCCTGCCATAATTCTGAGGCCTCACAGCCATGTGGA
ACTTCTTCAGGAGAGAATTAACATCCAATGGATTCCCAGAAAACCTTTTCCCTCGATG
TACCAGCAAACACCTACAATGCCCTGAAAAGCCGCCTCTGCGACCCCAATGCAGA
TCACACGTCCTGTCCCAGCCCCTGCAGCCTCCACGCGGCGGGTGCACTGCCAGG
CACGGGAAGGCAGCGCTGGCGAGTAGAACTGGCCCATCTCGCAGATAGGAAGCT 10
GAGCCTCAGGGACGTTTCACGCCTTCGTCAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGAT
TGCCGTGAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGGTTTGCTGCCCGACTTCAGGGATC
TGTCACCCTCGTCCAGCAGGGTTGGTTCTTCCCGAGGCTGGGAGGATGCCAAGCC
TGGTGGAGGATGGGGGCGGTGGTGTGGTGTGGGGAGCTTCTGACTTGACATCC
TGAGGGAACCTTCTGCAGCTGATGTGTGAACTGGACCCAGGCCGTGCCTCCGAG
GAATCCCCAAGGCTATGGCCCCTCAGGTCCTGCTGGGGTGTTGGCCCCCACCTCT
GCCTCAGAATGCAGGGGTTCTGCAGGGAAGCCGCAGACCAGCCTGCTGCCTTGG 20
GCCCTAGGGACACTGCAGCCCCAGAAAGTACTGTGGGGGACAAAAGAGTTGTTTC
TCGGGGGAGAAAACACCTGTGAGGAAATGCAGGTGCCACAGAGGGAAATCCTCCT
GGGGAGGAGGGTACCTGTTCCATCCTCGGCCGACACGGGACTGCCTGGTGCCTG
GTACCCACAGCCGCTACCTGCCGCACGCATCTCTCCATGGTTTGCTAATTACTTCC
ATTAGTTTTAAACAACTTGACAAGAGACAGAAGGGTCCAGAGAGAAATTAAATCTA
ACTGTTTAAACATGT

配列番号 57 (CLT 抗原 2 をコードする CLT の cDNA 配列)

10

20

30

40

50

【化 6 2】

CACCTCCATCACTGCGAATTATAATTTCGACATGAGATTTGGGAGATGACACAAAAC
CAAACCATATCAGTCTTTAAAGAGTTAAGTTAAAATAAGCTCTTTAAAGTGGGCCCT
AATCCAGTATGACTGGTGTTCTTATAAGAAGAGGAGATTTGGTCACAGACATGGTT
GCATGCAGAATAAAGACTTTTCGAGGACACACTGAGAAGGCAGCCATCTGCAAAA
CAAGGAAAGAGTCCTCAGCAGAAACCAGTCCTGCAGACTCCTTGATCTTGGACTTC
CAGCCACTGCAATTGATGTCAAGCTTCAGCACCCCTTGCATCTCTGGATAAATGAAA
TGTCACCCCAGCTGCCGTCCTTGTTTCAGATCTGTGCAATAAAGAGCAAAGCATAAA
ACCAAGTCAAGGCTTTGAGGGAGTGACCTACAAAATGCATAATGTGAAACAATGCA
AAAGCGAAAGGTGCAAAAATCCCCATCAAAGAGCTGGAGGCTGACAGATGCGCCAG
TGATAATTCCCATCTTCCAACACAGGAGCACAGCTTCCATTTTCCATAACAGAACAA
CAGCCAGAGCAGCTGGAAGGCAGGGCCGCATCCCAGACTTCCACCAACAATGGG
ATGAGACTTGACATCTGGAATCACAACCACAACAGACCTGAGAGACCCACCAGCTT
GATGACAAGCTTCTTCTTTCAAAGAAAGGTATCAGTCTGGGGGACCTAGTGCTGCA
AACCATGACAAATTAAGTGTGGCATCCCTCACTTGCATAATGGAAGTCAAGTATATT
TTTTAATTAACAAGAGTTATTTTTATGTAAGCTTCTCTCATTCCCTCCACTGTGCGTGC
TCGGGGGCTGGTGGTGAGGAAAAAGAAAACAGCTGTGCGGGAAGCATCAAGAAA

10

20

30

40

50

AGGCAAGTCATGAAGTCTTAGAGATCAGTGACATGTAAGAAAAAGAGTGAGGAGAA
AAATATTCCTACTAAAGTTTTCCATTTGTTTACCTTCCTTGTCACATAGACTTCCAAG
AGTTAGAAGTCTAGGATTTGATCTCCAAATCTTCCTGGCAGATTACTCATCTTCATT
TCATTCATATAGTCCAGGGGTTTGTACAAAGGAAGATGCCAGTTCTTCCCCAATCA
TAACTAAGATATCAAGAGATATTCTTTTGAAATGTAACAAAGGAGATCTGAAGTTCA
TCTGAAAAAATAAATGGTTTTAGGCGGTCATGACCATGGGATGCTGGACCAGGAT
GGTAAGCTTCAGGAAACAGAATCTGGAGAATGCCCAGCTGCTCCCACAGGAAGCA
TCAGGGAAGAAGAAGAAGAGGTGTGAAGTCTGCCTTCTGCTCTGCTGGGATCCCT
TTCACATCTCCTTTGCCTCCAGGCAGTTTTGGTTCTGCGCCATTTCCAGGTGTGAC
TCACTCAGGATGGTAAGCATCTTCTCTCCTACCCAGAGTAGAGGATGAAGACCTCA
TCTCAGAGGTTGAAGGGAGCTCCAGAGAGAGGTCTCAAACCTCCAGCATTAACTG
CTAAAGAAGCTTCATGAGCTGCTGGAGAACCTGGGAAATGACCAATTATAGGGACA
GAGCTCAAATACTCTGGGACACTCTAGTAGCTGAGAAAGTTCCAACTCCAGGGTGA
TAGAGGACTGCCTGGCAAACCATCATCAAAGCAGAAGACCTGATACTAACATCACA
GGCTATGGTTTATTACTGAAGATCAGTGCTTACACCCTGCCAGAGGTTCAGAAGCA
AACTTATCATTGTTCTCCCTGGAGATGTTGGCCACATTCTGAAAAGTGTGGTCAG
TAGTAGCAACAGAAAGCAATTGTGCTTGCCAAGCACAATGTCACTGTCCCCAGCCC
TTCCCCAACACAACCCAGTAGGTGCTTCCTGGCTGCAAACCTGGGAAAGTCACTT
GACCTGTCTGAGGTTCCACTTCCTAATCTGGCCTGGCGAAGATAAGAAAAACAGTT
TATTTAAAGTGTCTAGCAAAGTGCTTGGACCAAATAGGACCTCTGAAATGGTTATG
GTAGTGCTGTAAAGGTGATGTTTTAAGTGCTGATGAGCACAAAGATGGGTAAGATA
TTCCTTCTGTAAAAATCTACAGTCTAATGAGAGAGAACAAGATGAATGCACAATAAC
TGTCATTCAGAACAGGATTATGAGAAGGTGTGAATTTCTGTGAAAAATCAGAACAG
GGAGTAATATGATCCCAGGTGATTGGCAGGGGGTGGGGGTCTGGATTCAACTGGA
GAGGGAGCTGGCAGGGAAGGCTTCCTGGAGGATGAGAGTTCAACAAGGGGCAGG
TGTAGGATGTGGGTGGCCAAGTGAAGTGGCAGAGGAGCTGCAGAAGTAAGACC
CCAAATCAGGAAGACAAGGGCCTGCTGAGAAACACGAGCTACAAAGTGCAAGTGC
AGGAAGAGTTGGGATGAGATTAGAAGGGGGTCTGGGGCCAGACTGTGGAAGGCC
CAAATGCCGGGCTAAGGAGTTTGTACTTAATTCAGTGGTCAACGGGGAGTCATTG
GAGGCTGTTGAGCAGGAGAGTTGCTTTCTTTACAGCTGTGCCAGACTAAATTAAC
CTAAACAGTACTTTATAGCTGGAAAGGGAAGGCCAGGAATAGCTCTTGAAGTCAAG
AACAGGCATTGGGGAAGGTAATGAGAAACAGCCGTGACTGATCAAAGCAGAGAGG
TTAATTAAATTTGTAATTATTGTAAAGGCCATTAAAAACCCTAGTTCACTAGAGATA
ACTGCTCTAGTGGGGCTTCAAAGACAAACGCTTCTTTAACCTTGAATAGGGGGAT
GTTTGCTTCTCTGTGGAGGAGATATGATTAAGATACTTAATAAATGGTAGATAAACA

10

20

30

40

配列番号58 (CLT抗原3及び4をコードするCLTのcDNA配列)

【化 6 3】

AAACACACTAAGGGCTTTGTTATGGACTGAAATGTGTCCTCTCCCCAGAGTCACAG
GATTATGAAGCCATAATCCTCAATGTGACTATATTTGGAGCAGGGGCCTTTACAGA
CATAATTAAATTAAATGAGGTCATAAGAGTGGGGCCCTAGTCTGATAGGACTGGTG
TCCTTACAAGAAGAGGGGAGAGTCCTCAGAGAGTCCTCTCTCTCGGCATGGACACA
AAAGAAAAGCCATGTGAGGACACAGAGAGAAGGTGGCTGTCTACGAGCTAGGAAG
AAAGGCCTCACCGGAAACCAACCCTCACAGCAGCTCCATCTTGGACTTCCAGCCT
CCGGAACGTGTGAGAAAATAAATGTTTGCAATTCAGGTCGGTTGTATTTTGTGAAGG
CCATCCTAGCAAATGAATACTCCTAACATTGTCTCTTTAAGAGCTCACCAGCCTGA
GGTAGGAATCATTCCATCTGTGTTACTAATGAGACCGCTGAGGATCAAAGGGGTTT
TCCACCACATCCACTCACCTCTACATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTT
CAGGGAGCTCCACCCAGCAGCAGCGTTTGACAGAGCTGTTCACTTCCCTCTTCCTG
GAGCTGTGGCTTCCAGAGCCCATGCTCAGCAGTTCCTCTCTTCGACTGCTC
CTCTCTTAGGCTCAGAGCCACTCAGACATTGGGAAGCAAGTTTGTCAAGATGACAG
AGAACCGAGGTAATGGATTGAGTGATGAAACAGGAAGTTCATTCATGAGTTTTTG
GCCACACCTCCAAAGTGACGACTTAGCCAGAAATGGGATAACTGGGTTTCCCTACT
TCTCTTTTATCATCCTCAATGAGAGTGACCAAATATTAGAGCTAGATGGAACCTTAG
TGAAAATCTGGCTACTCGTCCCGTCCCACCAGCCTGCCACCCATTTCAAGTTTGAA
GAGACAAAGACACATGGACCTTATGTAATTACTGGGGATTACCCCAGGAGTCTGTG
GCAAAAAGTCAGCTTCTTCCCTCCCTGCTTCCCCGCCCTGTCTCTGGTACTTTCTAC
CAACACTGGGCTGTTTCTGTGATCACACTTAAGCGTACCTAACCTGCGAATGCTGT
ATAGAAGGTGCTAATGAACATGATTTAGCTTTAACTCAGTTTTCTAAAGGGACAC
GTGGGGGCAGCAAATGTTTAGGCAAAAACAATTCCAGTTCTAGCCTCTACTGTCTA
CATATGTGTATACATTTGGGAAACGTTTGGGAAAGGGATATTTGAGAGCTTCTTTTT
CTTTTTGTGGTTTAGTTATTTGATGATATTGAGATTGTTTCTGAGCCATGTGCTTCA
ACATCGGATTGGGGATTTGAGAAAAAGTTTTAGTCACTGTGATTCCATTTAGCTTCC
AAATGTGTCTCTGCTAAGAGACTTAAAGCACTCATAAATAGCACGTGTGTCTTCTT
TGCAGTGTGTGCTAATTTTGTGTCACATCTTTTTAGAAAATCATGAGATTTGGTGTC
ACAGAGACTGGAATAAATATAGTCAAACCTATTGGTGAAGATTTCTTTAGCTGTTT
TCATAATCCATTTCCATTGTTATGATTATTGATGAATAAAACATTTTCTTTAGGTAGA
TACTTCTTTTTTCCCCCACCTTGATTTAATGTTTCCACTCTTATTGTCAAGTTTCTT
ATTACTCCCTAATAACTCTCAATAAAATAATGATTCCTGGGAGATTATTCCTGCTTTC
CTACTATCACCTGTTGATTTGAAAAGACAGAACAAATACCGTAGAAGCTTCACTAATA
CATTGAAAGATAAAATGATAATACTAAATACTAAATATGAAAAGTGATACTAAAAGT

10

20

30

40

50

GGAGTCCTGGCACTAGTATTTTTTTTTTTGAGTCTTTAAATTTTATTTATTTATTTTGG
AATTTTTTAAAATTATATGTTATGTTCTGGGATACATGTGCAGAACGTGCAGGTTTTG
TTACATAGGTATACAGGTCTGGCACTAGTATTTTGTGCCCACAAAATATCAAGCATG
TATCCAAACTGCTCAAGACACATTAAAGACACAGGTAATCTGTAGGCATATTCAGG
CTTGTAGTTTGCATTTTTTTGGTTTTCTTGTGGCTTTTCAGTGCAAGTTGAGGTAATTC
ATGGGAAACAGTCACCAAAGAAGTGCCAGTATTAGAAATCCAAGAGCCATTTCTCT
AGCTTCTTCCAGAATCAAGACTTTAGAGGTAATTTCTATCAACACTGGACATTTCTCT
GTCTGCAATTAACAATGAACACATAGCATTATGTTTAATTGCAACCTGTTTAAAGCA
GATTGGATGCTAAGGTTTAAGAACACTCTTCAGTCAAAAAGGTCTTTTAATCAGGTT
TTTAATCTTGAGCACAATCTAGGACACAGCATCATAGACTAACTCATTGAGAATAG
GTGTTGTCATCTAATCCTAACCACCCCCACCACCAACAAGCTGAATAGCTCTGGGC
TCAGTATATACATTTGTACTGGGCTCAGTACACACACCTAAGCTGGGTTTCAGTATAT
GCCACTTTATAGTGAGAGGCATTTTGTAAATGAGAGCTCTGGGTTCACTATATACATT
TGTAATGAGGCTCA

10

20

配列番号59 (CLT抗原5をコードするCLTのcDNA配列)

【化64】

CTTTCATCTTTAATTTGACCAAAATGGAAACCAGGATCATGAGAATTCCTCGGGGCT
GGTGTTGAAAGGAATTTCCCCTGCTCTTGCCAGAGTCTCGAGGGGTGGCCTCCTT
CCACGGGTGAGTAACCACAAGTCCATGTGACCGAACAAACAGCATATTCTTTTGT
CAAAAGAGAAAAACAACATTGAAGGAAATCAGCTGAAGAAAATTGAGATGAAAGCC
AGTCCACGCCTCAGCATCCTGAGGAAATGTTCTTCCTTGATGCTCTGAGCTCTCTA
AGAAGTTACCACAAAACCAACCCATCAGAAGTTTGCAGGACGTCCTTGTTTAGAG
CTGGGAAATAAACCACGAAACAGCGCAAAGGAGAGTCCAGGCCTGCCAATGCTTC
CGCGAACTCCTCGCCCCGACCTCATCCTTCTCCAGCTCCTACCTGCAGGCCTCAG
ACAACCTTTTGCAGACCTCTGGTCCGGACAATGAACAACCCATAGAACAAGATCTGA
TTTGTAATGTTTGCTGATCTCCAAAGTGTAATACTCCCACCATGACCAATTGGAAG
CCACTGACAAGTCCTCACTAAATGCAGAATTGAGAAGAAACACGAATAGCACATCA
TTGTATGGTATTTCCACTCTACCAATGGATGTGAATAACCTCAAGAACACATAATGT
TGAGATGTGGAAAAATCATCAGGAAGCCTCTCCCCTTCACCCTGCAGTGTCTCTGC
AATGCTGGTAGAGTGGGCTGGCACAGCCCCCGCCTCTGGCCTGGTCCGGGTCCA
ACCTGCCTGCCTCCTGGGGCAGCAGCTCCCTGAACGAAGAGCCGCGGAGACCGA
AGAACTCAGTGAATCAGCAGTTCTCCCAGATGAAACGCTGGCCTGAAAGCAGCCT
CAAGAGCTTTGGCCCGTCACCTTGCTTGCTTCTCTTCCCTCCTCGTCCTCTGTT
TGTTTCATCTTTCCTGAAAAAATTAAGTCAGCTGTTCCCCTTAACCAATTTCCCTGGC
ATTCTGAAGGGTAGGCCACATGGCCACCTGCCAGCTACTCCCACCTGCCAAGCC

30

40

50

TTCCTGACTATATTTACCCTGGTACTCCCATGTCCCGGGGCTGCTTCAGCAGAGCC
AAGGACACACCCAGGTGTTTGTCTTAGGTCAGATTTCTCAGCCATGGGTGTAT
CTGTGCTTGTCCCTCAAATCCTCATAGCTCCTTTCCCCACCCCAACTTCCAGGCC
AGACGGGGTTCAGGGGTGTCTCAGCTAAGGTTCCCCTGAAGCAGACACAAATTAG
TACAAAAGGGACTTATTAGGAGGTGATCCTTAAAAATTTGGGCAGGAGAATGGAAA
GGGTGGACACAGACAAAAAGGATGCCAAGTGAGAATGTGATGATTACTGCTGCAG
TTTTCTACAGCTGCCTGTCAAATATCCCAACACAGTGGCATTGACCAGCAGCCAT
TTTCGCTATGCCACAGCTTCTGTGGGTCAGGCGTTTGGACAGGGCAATGGGAAC
AGCTTGTTTCTGTTCCATAGTGTGTGAGGGAGGCCTCAACTGGAAAACTCAAAGAC
CGGGGTGGCTTGATGACTGGAGGCTGGAACCATCCGGAAGCTTCTTGAAGCTGG
GTTGACTTACATGTGGTCTTGCATGTGAGTTGGGCTTTTCACATCATGGCTGTTGG
GTTCCAAGAGGCAGTGTCTGGGGAACAAGAGTTCCAAGACACCAAGGCAGAAGCT
GCTAGACCTTTTTTGGACCTCGCTTCGGATGTCAGCAATGAAGTTCTGTGGATTCAA
CTGCATTCTATTGGTTACCAGCAGTCGCTTGAATCTGATTAGCTCCAAAAGT
GAGCCTCTGGCAAGAGTGCATTGCAGAAGGGCACATCCAATGAGAGGCGCTGCT
GTAGTAACAGGGACCTCTCCAATGGCCTGTTTGAAGTGTCTCAGAATATGGCACCT
GGGTTCCCTCCAGAGCAAGTGATCTGAGAGAGAGCAAGGAGAAGGCCACTCTGCCT
TTCATGACTCATCTCAGAAGTCACACACTATCACAGGTTCTGTTCTGTTTATTGGAA
GTGAGTCATGAAGTCCGGCCCCACACTCAAGAGAAAGGAAATTATGCTCCTTCTTTT
GAAATGAGTGTAAGAAAGTAAACTTTGTCAAATGTGTATGTGTGTGTGTGTGT
G

10

20

30

配列番号60 (CLT抗原6をコードするCLTのcDNA配列)

【化65】

GAGGCCTCACAGCCATGTGGAAGTCTCTGGAGGCCAGAAAGTCCAAAATCAAGATG
TTGCAGCACTGGTCCCTGGGAGGCTGTGCAGGAGAATCTGCTCTGGGCGTCTCTC
CTGGCTCCTGGTGGTGCCACAATCTTCCCTGATCCTTGGCTTTTGAAGGCATCCCC
CAGCTCTCTGCCTCATCTTCACAGGACTTCTCCCTGTGCCTGTCTGTGCCCAAATT
TCCCCTTCTATAAGGACACAGTCCTACTGCATCAGGGCCCCACGCTAATCACTTCTT
CTTCACTAATTACATCGGCAAACCCCTATTTCCAAGTTAAGTCATGTTCTGAGGTT
AGGATTTCAATACCTGAATTTTAGGGGACATAGTTTCAAGCCAAAGGACCTGGGGG
GACAGAAACACCCAGGAAAGTCCACAGGTCAGCGCCTGGACCCGCCTGGCCGTG
GGACATTGCTCGGCCGAGTTCATCCTCATAAACGCTGACGTGTGCTAGAAGATACA
ATATTAGTTTCATAAACAACAGTTTCTTTTTTTGCAAACCATACCCACAGGTCCTATT
GCCACTTTTCAGTGCTGCAGCAGCTAGTCAGATGACAACTGGGTGAGAGCTTGGT
CTCGAGTGTTTCTGTGAGGCCAGAAATATTGCTCTGATTCTCAGGGGTGACTCAG

40

50

CCCTCCGGTGGGAAATATGTGACCTCATTTGCATTTCTAATTGAATTGCTATCAGC
TTTCCTGCAAGACTGCACCAAAAAACAGTTCTTCCAGATTCCAGCACTGCCTGCAT
TGCCACAGAAAGGCTGCTTTTAAATAGTTGCTAAGAGAGGGCGACAAAAGAAGG
AGAAAAGTTGCCAAATTTTTATGGTTCATCTAACTGTAAAGCTGTCAGTTTTACCCA
GCTCCCCAGAGTCGCTAAAATAATGGACAGAGGAGGCGGCACTTGAAGAAACCTC
GACATAAGAGAAATGAAATTTACAGAACCAGGAAATTAGGGGTCCCCATGCACCTG
CCCTGGCAGAATCTGCTTCCAGGCTCCTCTCAATAAACACTGCCCTGGGACTCCC
AGCGCTCTGTAACTGATGCTTTGAAGGAGGCCATTTGTTTCTCCAGAACCTTCTG
CCAGCAGAACTCTTGCTTACCACGTGCCCCATCAGAACTCCCACCTTCTCTAAAC
ACAGTTAGGTAGCCCTCTGCATGCATTTGTTTAAAAAATTAAATTGTGAGTAATAG
ACTATAAGTACAACAGCGTACAGAACACCAGCTAAAAAATGATGGCAGAATGAGC
ACCTGTCTTGCCACAAGACTCCCTCCCACCCTCTGGTGTCCCCCAGCATGGCTTC
CTGCTGCCCCCTGAAAGGAACCTCAACCGACTGTAACCTGCACCTCAGTGCCA
CCCGAATTTGGACTTCATGGGAGTGCGGTCACTCGGCTGACACGTGTTCTGCTG
CCAGGCACCTGCCTGCTCTCCTTCTTTGGTCTGTTTGTGAGATTCGCTGGCTTTGT
TGCTTCTAGCTGCAGTTTGTTCACTTTTACTGCCGTATAATATCCACTTTAGGAGC
CCACTGCAATTTATTGACTCATTGCAATGGTGAGGGCATGTGTGTTGTTTCCAGCT
TTTGGTGATTATGCGTAAGATTTCTCTTAACGTCCCGTACAGAGTTCTTGGTATTAC
CTGCCTATACTGCTATGGGCATACCAAAAAACGAGGCATATGTATATTTGACTTTA
ATAGTAATTCTGAATTGCTGTCTAAAGTGTTTGTACCATTGTACACTCCCATCAAGA
GTATACGAGTGCTGCAAATGTCCTTTCCAGACTCTGCCTTATTGTCTCATTTTTAA
GATATATGTTTTGATGATCAGAAGTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACAGGCTTTT
GCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCTCAGCTCACTGCAACCTCT
ACCTCTCGGGCTCAAGTGATTCTCCTGTTTGAGACTCCCTAGTAGCTGGGATTACA
GGTGTGCACCACCATGCCTAGCTAATTTTTGTATTTTAGTGGAGACAGGGTTTCA
CCATGTTAGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTTGGGTGATCTGCCACCTTG
GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCACCTGGCAGAAAGTTCT
TATTTTAAATAAAGTCCAGTGATCATTCTTCCCGTGTTTCACGCTTCACGTGCCAT
GTGCGAGGAAGCTTTCCACACCCGGGGTCAAGTTCACTCCCAGCTGCATTGCTTT
GCCTTTCCTGTTTAGGTTTTAGTCCACCTCAAATGGATTTTGGTTGTGGTGTGAG
GTAGGGGTCAATTTACTTTTTCTTAAAGATGCCCCATTGGCCCAGCATCATTTATT
GAAAAGACAGTCTTTCCTCTGTTGTTTCTGTAGAAATGGGCAAACCTTCCCCAAAT
GGCCAGATGGTAAATATTTTAGGCATCTCAGGTTAAGGGGCAAAATTGAGGACATC
GTATAGGTACTTACATAACCTTTTAAATGGAACCATTTAAAAATGTAAAAACCAGT
CTTAGCTTGCTGGCCATAAAAGGCCTGTGGGCTACAGCATGCTGGCACCTGCTCT

10

20

30

40

50

ACAGCACTGCTCTTATAATAAAAAATCAAGCGTCTGCACCCTGGGCATTTGACAAG
GCTCATCAGATTGTAAAGATGAACTGGGTGGATTTTGTAGTATGAGAGTTATACGT
CCATGAAGCTGATTTTTAAACACATTACATGTCTTTTTCTGGGCTCATTATTTTTGTT
CCAAGTGTCTATCTAATCATCTTTGCTTCAAAATGACACCGTTTTAATGGCTGTAGT
TCAGTGGTTCTCAAAGGGGGCAGTTTTGCCCCCAGGGAACATTTGGCAGTGGC
TGGAAAGAGCTTTGGTTGCATATGGAGGTTATGGGGCTTTACCTGGCGTTTAGTGG
GTAGAGGCCAGGAGTCTGGCTTACTATCCTGTAGCACACAGGACAGCCCCAACAA
CTTGTCTGGAAGGATGTGTCCTCCCATCTTTTTCTTGTTCTAGGCTACCTTCGCCCT
TTCCATTTCCATTAAAAAAT

10

配列番号61 (CLT抗原7をコードするCLTのcDNA配列)

20

30

40

50

【化 6 6】

GTGTGCCCTTTGCAGCAAAGAGCGTGGTTCCCTCCTCTTCCTGGGTGTAACTGCG
ATTCAAAAAGCCAGGTGGGAAGCCCTGTAGTAGGGACTCTGGCTTTGTCCCTGTTT
CCCCCTTTTCTTCCTCTTCACCCACTAAAACCCTGTTTTACTCACGGTTCAAATTGT
TTGGCAGCCTGAATTTTCATGGCCATGGGACAAAGAACCCCGTCTTTAGCTGAATT
AAGGAAAAGTTCTGCAACATTTTTGACGTGCAACTTGGGGGCTCAAGCGGAGAAG
CGAAGCAGAGCCCCTGGAAAACTCACATATGTGTCAACAATAGTCCTTGATGCCCC
TGTAACAAAACTTGAGCAAGGCCTGGTGATGAAGAGATACAAGATTGTCACCCAAG
GATTTGATTATACCTCTGTTGAAAGTTAATGCACACTCAACCGAATATGGCAATTGG
TACTCTCAATTCTATATTCTCAACAATTACAGTGAAGATACAAGTAGAATACAATCAC
TGCCACATTTTTTTGAAATTCTGTGTAACTGTAATATTCTGTCAACATTAATGACATT
TGAAGTGCCTGTCAAAAACATTGCAGCTACTTTATGTATAAAACATATTAAATAGG
CTCATCCAACCTTGCAATTCTTTATTAAGCTTATTTTCATATTTTTTCCTATGGATGAAC
TAAAAATAATTTTGTTCCTTAATTAAGATTCTATGCATGAAGATGCTGAATAATTTAA
GACAATTGTTCAATTCAAATAGTTGCTAATTACACCCTCCTGGCATAGTTATTGTATTA
TACTACATTTAGGAATAATATGCTGTACTACTTGGACTTGAAAATGTTTCTGACATT
TTAATGAACACACTACTTAGTTATATTTTACAAGGGTTTTTCAGTGAACCACAGAGGA
TAAAAAATGTCATTCAAGGGTTGTAGATAATTAACTGACTGAATATAAGAAGCCT
CATATGGAAGTGAATAATTATGTATGAATTTTGTGAGCTGGAAATGTGTTTTACTAA
ATGACTTCAGATTTGTACTTTTAAATACAAGATGAAGGGAATCAAGGGGATACTTT
CTTCTCACCTCAATTTGTTCCATTTGCATAAGCTATTTTATCTTTCAATATCCCTTTT
GATATTTTCATTTTGGCCCTTGAATACACTAAAGATTATTTAAAATAAAATAAATGTTGA
CTTTGAAATACTGCTATATATATTCATTGCAATACATCAGGTGGGAAATTGGTGCAA
TTCAGTCACACACACAACCTCATAGATCAGATTTCCAGTTAAGTTTTAATAGAAAGA
GATTTTAGATAGACATGACTTTCAATAAAATGGAAGAATTTTTATTAGTTTCAAATA
ATGATTTTACTTGCTTATCAACACAGTTGACCTTTCCCCACAGTACTATGATCTTCTT
AGTACCTCTGCTATAATTATATTAATGTCTTCCTATATCTAGAAATTTGATTATTATTC
TATTTTTATGGATCATTAAATTTTTCTATTCAAGAATGATCCCTATAGTCAACTTCCT
GAGGGATTTCTGCTTGCTATTTTCTGTTTCAATTGTGTGCATTTTCATTTTACTATTA
AAGATTTTAAATAATGACACATTGTTTAAGCGGTTGTAAGTCTGATTGTTATAAAGCT
CTCTGGAGAATTCTGTAAGCTTTCACATCTGATGGAGAACTTCAATGAGAACATCTT
TAATGTGGAATTCTTGGACAAGAACTACAGATTATCCATGGTTCAGAAGATATGAT
GAATTAGTAACTATTTTTCCGTACATAAAAAAGTCAATCTTCCTAACCAAGTTTGTGTT
TTAGCTAAATGAATCGGTCAAATATTTTAGTTATATTAGCAATATTTTGTCTCTAAAA
TATCTTGACATAAAAC

10

20

30

40

配列番号62 (CLT抗原8をコードするCLTのcDNA配列)

50

【化 6 7】

GGGTCCCTGGCTCGGCTCTACCCCCATGGATCTAGGTGAGGACAGGCGCTCCTG
CTTTCCCGCCCAAATGTTGTATTTTCCAAGCCTACCCTTGCCGGCCACGCCCCCAA
CCTGGGCCTATAAAAACCGCCCCCGCAGGCCCTAGCGGGCAGACACACTGAAG
TCGCTAGACATTTGAGGAACACATCCGGGGAAGAAGACACAGGTGGCTGGTCATG
GAGAGCCCGCTGGGGGAAGAGCACACAGACAGGCACCGGCAGGCCATTGACCAG
CGGGACAAGGTGGAGTTTGGCTGGGGCAGTGGGAGGAGAGCTGGGGCCGCCGA
GCTGCCCTACTCCAGGGGAAAACACCTCCCTTCTCGCTCCCCCATCACCGGAGA
GCTACTTCCACTCAATACAACCTTTGCACTCATTCTCCAAGCCACGTGTGACCAATTT
TTCCGGTACACCAAGGCGAGAAATCCGGGGATACAGAAAGCCCTCTGTCCTTGCG
ATAAGGTAGAGGGTCCAATTGAGCTAACACAAGCTGCCTATAGACGGCAAATAAG
AGAGCACCCAGTAACACACGCCTGCTGGGGCTTCAGGAGCACACACGTCCACTG
GGGCTTCGGGAGCTGTAAACAGTCAGCCCTAGACACTGTCTGTGGGATCGGAGCC
CCACAGCCTGCCTGTCTGTATGCTCCTCTAGAGGTCTGAGCAGCGGGGCGCTGAA
GAAACGAGCCACACTCCCATCACACGCCCTGAGAGGAGGACAAGGGAACCCGTA
CCGTTTCACTTGTGATAGAGATAAAGTTATTATTGTTGTAATTTTAACTTATAGAACT
ATAATATAATGGTACAATGATATATATTGACAATATTCCTCTTTCACCCACATTTTGT
ATCTGTGTTCAAGATTAAATGAAAAAGGATATTCTCAAAAAGCTAGCAAAACCAAAA
GCAAGACGTTATGCCAAATGTAAACATATTTCTGTTTAGCAAATAGCAGGAGTGTAT
AAAACATTTCTCTTTTCACATAACAGAATGTTCTATGCTTACTGTATTAGTTAACAAA
TTCAAGTCTGTTTATTTTGTGTTGAAATTCCACTTCATCCATAAATTACAGCATTACAC
AATAACACCAGAAGGACAATATCACCATTGTTTGCTTTTACAGTCATCTCAGCCCAC
AAAATGCTTCCCATTGTCAGCTTGCTATCATCAAGCTATTGTTGTTTTCTCTTTCTG
GGGTCTTGTATTAATATCATTCAAATTATTTAGACACTCAACAGTGTTTTTGCTATCA

10

20

30

40

50

GTGCAAACCTCTAAAGAGCTGGAGCCCCAGCGTGATGACCAAATAACCCTTGACT
ATTTATCTTGCCGTAAGTCATTATTTCTGAGGCCCTGGAGAAGCTGTGTTGCCAT
GTGTGCACTGCAGGGACGGGGAGCTTCTCCTGCCGGAGCTGGTTTGTTCCACTG
GACAATGAGCCCTTTTCTGCTTGGCTCTCTGTATGGGCACATACACAATGAGGCGG
TTTAGGGAAGAGGGGTGATGTGGGTCAATTGATAACAACAATCCCCGAACCTTTAA
AGAATTGTTGAGCCCCCTAAAAATATGTTGTCTTTATGAATTATCCTTAACCCTTTTT
AATTGCATAAAAACTTCAGGCACTTGAAAAAATTAAAAAACGAAAAGTAAGTCTGT
CTCTAGTATCCCTCTTCTCCTTTGTAGAATTACATCCTTTATTCACCTGCCACTATT
TATTATGTGCCTCCTGTGTGTAAGACATACTGTTAGTCATTGGAAATACAGAAATGA
ATGGGACAGACACACTTCTTGCCCTCATGGAACCTTAGGGCCTAATGGGAGATACAA
TGTTAAGGTTGTTTCTAGTGTTTTTTTTTTTTTTAAGAATATGTTCTACATGTATACA
TGTAATATGTATTCTCTCCCATTTTTAAAAACATAAATGGTGGTTTACTATGTGTAC
GCTTTTTGGTTTTGCATTATTCTTTTAACAGTATGTAGAGGATGCATTTTCTACTGTA
TAGTGTTCTGTCCCCCTTAAATAGCACTCTGATTTTATTTGGGGGGGAATCACGA
CTTTCTAATTTTGCATACTCCTTGTTGGGATTGTAAATCAGGTCCCCTGTCCTCAAGT
AGCCAATGGTTAGGTATGCAACCCAGCTTATCTCTCTTTAGACTCAATCTCAAGCA
GATCCAGAGTTACTCAGGATCAGAACAATATTTGAAAGGCATTACCAGAATCCAGA
CAAGATGATGGAGCAATACCTGATGCCCAGTGGTCTAGGGTAGCCGATTCTGT
CTGCTCTCCAGGCTCCTGTCCATTCTGTGGATCAACTCATATTGCTCCAATTCATTT
TGTTTTGCTTGCATAAGCCAGAATTAACCTTCTGTTGCTTGTAACAAAGAGAGTTAA
CCAAAGACATACAGTATATCAGAGTATAGAGACCTACTTTACTCTCGGTCATTGCCT
GCATGAGTCTTCTTTATATGGATGTATCACAGTTTATTTAACCCTCCCTTGTAAGT
GGACATTTAAGTCTAGTGTTCTGTAAATAAAAGGTCAGAATATACGTCTGTATACAG
TATATATTCTTGCATATCCACCTTTGGACAGATGTGTGAATGTGTTTTGTAGAAATA
CATTTGTAGAAATGCAACTGCTGGGTCAAAGAATTAGTAGATTTTAAATAACATCAA
ACAGCGTTGAAGGCCCCCATATAAGAATAACAACCTACTGACTGAAGACATAACTAA
TTAAAAAATTAATTACAGCTTATTTGTAATAACTTCTTATTGTCACTGAGTGAAAAG
GTAATTCTCGTTGAATTTACGAAAAGTGACTAATAGGAAATTTAGAAAACCTCAGAGA
ATATATAAAAAACACAAAGAAAAGCCAGCCACCAAGTCGCTTATAATTCTCTCACCAA
CAGTGGCAGAATTACATTTAGTCATCATCATTATTCTTACATCCAGTTTTATAGTTAT
TTTTGAAGAGGATTATTATCAACTATCAACTCTGTCATAGCTGGAAGTAGAGGCCAC
TAAACAGATTTCTTAAACTCCAAGTACTGTATATGGATTTTCTAC

10

20

30

40

配列番号63 (CLT抗原1をコードするcDNA配列)

【化 6 8】

ATGTGGAACCTTCTTCAGGAGAGAATTAACATCCAATGGATTCCCAGAAAACTTTTCC
CTCGATGTACCAGCAAACACCTACAATGCCCTGAAAAGCCGCCTCTGCGACCCCA
ATGCAGATCACACGTCCTGTCCCAGCCCCTGCAGCCTCCACGCGGCGGGTGCAC
TGCCAGGCACGGGAAGGCAGCGCTGGCGAGTAGAACTGGCCCATCTCGCAGATA
GGAAGCTGAGCCTCAGGGACGTTTCACGCCTTCGTCAAGGTGGTGAGAGGAGGA
GCGGGATTGCCGTGAAGGTGGTGAGAGGAGGAGCGGGGTTTGCTGCCCCGACTTC
AGGGATCTGTCACCCTCGTCCAGCAGGGTTGGTTCTTCCCGAGGCTGGGAGGATG
CCAAGCCTGGTGGAGGATGGGGGCGGTGGTGTGGTGTGGGGAGCTTCTGACTTG
CACATCC

10

配列番号 64 (CLT 抗原 2 をコードする cDNA 配列)

【化 6 9】

ATGACTGGTGTCTTATAAGAAGAGGAGATTTGGTCACAGACATGGTTGCATGCAG
AATAAAGACTTTTCGAGGACACACTGAGAAGGCAGCCATCTGCAAAACAAGGAAAG
AGTCCTCAGCAGAAACCAGTCCTGCAGACTCCTTGATCTTGGACTTCCAGCCACTG
CAATTGATGTCAAGCTTCAGCACCTTGCATCTCTGGATAAA

20

配列番号 65 (CLT 抗原 3 をコードする cDNA 配列)

【化 7 0】

ATGAATACTCCTAACATTGTCTCTTTAAGAGCTCACCAGCCTGAGGTAGGAATCATT
CCATCTGTGTTACTAATGAGACCGCTGAGGATCAAAGGGGTTTTCCACCACATCCA
CTCACCTCTACATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTTCAGGGAGCTCCAC
CCAGCAGCAGCGTT

30

配列番号 66 (CLT 抗原 4 をコードする cDNA 配列)

【化 7 1】

ATGGCGAAAACCAAGGGTTCACTCTCTGTCTTCAGGGAGCTCCACCCAGCAGCAG
CGTTTGACAGAGCTGTTCACTTCCTCTTCCTGGAGCTGTGGCTTCCAGAGCCCATG
CTCAGCAGTTCCCCTCCTTCTTCGACTGCTCCTCTCTTAGGCTCAGAGCCACTCAG
ACATTGGGAAGCAAGTTTGTCAAGA

40

配列番号 67 (CLT 抗原 5 をコードする cDNA 配列)

【化 7 2】

ATGCTTCCGCGAACTCCTCGCCCCGACCTCATCCTTCTCCAGCTCCTACCTGCAG
GCCTCAGACAACTTTTGACAGACCTCTGGTCCGGACAATGAACAACCCATAGAACAA
GATCTGATTTGTAATGTTTGCTGA

配列番号 68 (CLT 抗原 6 をコードする cDNA 配列)

50

【化 7 3】

ATGTGGAAGCTCTCTGGAGGCCAGAAGTCCAAAATCAAGATGTTGCAGCACTGGTC
CCTGGGAGGCTGTGCAGGAGAATCTGCTCTGGGCGTCTCTCCTGGCTCCTGGTG
GTGCCACAATCTTCCCTGATCCTTGGCTTTTGAAGGCATCCCCCAGCTCTCTGCCT
CATCTTCACAGGACTTCTCCCTGTGCCTGTCTGTGCCCAAATTTCCCTTCTATAAG
GACACAGTCCTACTGCATCAGGGCCCCACGCTAA

配列番号 69 (CLT 抗原 7 をコードする cDNA 配列)

10

【化 7 4】

ATGGCCATGGGACAAAGAACCCCGTCTTTAGCTGAATTAAGGAAAAGTTCTGCAA
CATTTTTGACGTGCAACTTGGGGGCTCAAGCGGAGAAGCGAAGCAGAGCCCCTGG
AAACTCACATATGTGTCAACAATAGTCCTTGATGCCCTGTAACAAAAGTTGAGCA
AGGCCTGGTGATGAAGAGATACAAGATTGTCACCCAAGGATTTGATTATACCTCTG
TTGAAAGTTAA

配列番号 70 (CLT 抗原 8 をコードする cDNA 配列)

20

【化 7 5】

ATGTGTGCACTGCAGGGACGGGGAGCTTCTCCTGCCGGAGCTGGTTTGTTCCTACT
GGACAATGAGCCCTTTTCTGCTTGGCTCTCTGTATGGGCACATACACAATGAGGCG
GTTTAG

配列番号 71 (CLT 抗原融合タンパク質 1、2、3、及び 4 で使用されたリンカー配列)

【化 7 6】

GGG

30

配列番号 72 (CLT 抗原融合タンパク質 1、2、及び 4 で使用されたリンカー配列)

【化 7 7】

GGGG

配列番号 73 (CLT 抗原融合タンパク質 1 及び 3 で使用されたリンカー配列)

【化 7 8】

KGG

40

配列番号 74 (CLT 抗原融合タンパク質 1、3、及び 4 で使用されたリンカー配列)

【化 7 9】

GGKGG

配列番号 75 (CLT 抗原融合タンパク質 1、2、3、及び 4 で使用されたリンカー配列)

【化 8 0】

GGGKGG

50

配列番号76 (CLT抗原融合タンパク質1のポリペプチド配列)

【化81】

MWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCSPCSLHAAGALP
GTGRQRWRVELAHLADRKLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGAGFAARLQGSV
TLVQQGWFFPRLGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTSGGGTGVLIRRGDLVTDMVAC
RIKTFRGHTTEKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPLQLMSSFSTLASLDKGGKGGMW
NSLEARSPKSRCCSTGPWEAVQENLLWASLLAPGGATIFPDPWLLKASPSSLPHLHRT
SPCACLCNPFYKDTVLLHQGPRGGGKGGMAMGQRTPSLAELRKSSATFLTCNLGA
QAEKRSRAPGKLTIVSTIVLDAPVTKLEQGLVMKRYKIVTQGFDTYSVESKGGMAKTK
GSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPSSTAPLLGSEPLRHWEASLS
RGGGGMCALQGRGASPAGAGLFHWTMSPFLLGSLYGHIHNEAV

10

配列番号77 (CLT抗原融合タンパク質2のポリペプチド配列)

【化82】

MWNSLEARSPKSRCCSTGPWEAVQENLLWASLLAPGGATIFPDPWLLKASPSSLPHL
HRTSPCACLCNPFYKDTVLLHQGPRGGGKGGMCALQGRGASPAGAGLFHWTMS
PFLLGSLYGHIHNEAVGGGKGGMAMGQRTPSLAELRKSSATFLTCNLGAQAEKRSRA
PGKLTIVSTIVLDAPVTKLEQGLVMKRYKIVTQGFDTYSVESGGGGTGVLIRRGDLVTD
MVACRIKTFRGHTTEKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPLQLMSSFSTLASLDKGGG
MAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPSSTAPLLGSEPLRHW
EASLSRGGGGMWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCSP
CSLHAAGALPGTGRQRWRVELAHLADRKLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGA
GFAARLQGSVTLVQQGWFFPRLGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTS

20

30

配列番号78 (CLT抗原融合タンパク質3のポリペプチド配列)

【化83】

MWNFFRRELTSNGFPENFSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCSPCSLHAAGALP
GTGRQRWRVELAHLADRKLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGAGFAARLQGSV
TLVQQGWFFPRLGGCQAWWRMGAVVWCGELLTCTSGGKTGVLIRRGDLVTDMVAC
RIKTFRGHTTEKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPLQLMSSFSTLASLDKGGGMNTP
NIVSLRAHQPEVGIIPSVLLMRPLRIKGVFHHSPLHGENQGFTLCLQGAPPSSSVGG
KGGMAMGQRTPSLAELRKSSATFLTCNLGAQAEKRSRAPGKLTIVSTIVLDAPVTKLE
QGLVMKRYKIVTQGFDTYSVESKGGMAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWL
PEPMLSSSPSSTAPLLGSEPLRHWEASLSRKGGLPRTPRPDILLQLLPAGLRQLLQT
SGPDNEQPIEQDLICNVCGGGWNSLEARSPKSRCCSTGPWEAVQENLLWASLLAPG
GATIFPDPWLLKASPSSLPHLHRTSPCACLCNPFYKDTVLLHQGPRGGGKGGMCA
LQGRGASPAGAGLFHWTMSPFLLGSLYGHIHNEAV

40

配列番号79 (CLT抗原融合タンパク質4のポリペプチド配列)

50

【化 8 4】

MWNSLEARSPKSRCCSTGPWEAVQENLLWASLLAPGGATIFPDPWLLKASPSSLPHL
HRTSPCACLCPNFFFYKDTVLLHQGPRGGGGMNTPNIVSLRAHQPEVGIIPSVLLMRP
LRIKGVFHHIHSPLHGENQGFTLCLQGAPPSSSVGGGKGGMWNNFFRRELTSNGFPEN
FSLDVPANTYNALKSRLCDPNADHTSCSPCSLHAAGALPGTGRQRWRVELAHLADR
KLSLRDVSRLRQGGERRSGIAVKVVRGGAGFAARLQGSVTLVQQGWFFPRLGGCQA
WWRMGAVVWCGELLTCTSGGGGMLPRTPRPDLILLQLLPAGLRQLLQTSGPDNEQPI
EQDLICNVCGGGGMAKTKGSLSVFRELHPAAAFDRAVHFLFLELWLPEPMLSSSPSS
TAPLLGSEPLRHWEASLSRGGGGMCALQGRGASPAGAGLFHWTMSPFLLGSLYGHI
HNEAVGGGKGGMAMGQRTPSLAELRKSSATFLTCLGAQAEKRSRAPGKLTIVSTIV
LDAPVTKLEQGLVMKRYKIVTQGFDTYTSVESGGGGTGVLIRRGDLVTDMVACRIKTFR
GHTEKAAICKTRKESSAETSPADSLILDFQPLQLMSSFSTLASLDK

10

配列番号 80 (CLT 抗原融合タンパク質 1 をコードするコドン最適化 cDNA 配列)

20

30

40

50

【化 8 5】

ATGTGGAATTTCTTCCGGCGCGAGCTGACCAGCAACGGCTTCCCTGAGAACTTCA
GCCTGGACGTGCCCCGCCAACACCTACAATGCCCTGAAGTCCAGACTGTGCGACCC
CAACGCCGATCACACCAGCTGTCCATCTCCATGTTCTCTGCATGCCGCTGGCGCT
CTGCCTGGAACAGGCAGACAAAGATGGCGCGTGGAAGTGGCCCATCTGGCCGAT
AGAAAGCTGAGCCTGAGGGATGTGTCCCGGCTGAGACAAGGCGGCGAGAGAAGA
TCTGGAATCGCCGTGAAGGTCGTCAGAGGCGGAGCTGGATTTGCCGCTAGACTGC
AGGGAAGCGTGACCCTGGTTCAGCAAGGCTGGTTCTTCCCTAGACTCGGCGGTTG
TCAAGCCTGGTGGCGAATGGGAGCTGTTGTTTGGTGCGGCGAGCTGCTGACCTGT
ACATCTGGCGGAGGAACAGGCGTGCTGATCAGAAGAGGCGACCTGGTCACAGAC
ATGGTGGCCTGCAGAATCAAGACCTTCAGAGGCCACACAGAGAAGGCCGCCATCT
GCAAGACCCGGAAAGAGTCTAGCGCCGAGACAAGCCCTGCCGACTCTCTGATCCT
GGACTTCCAGCCTCTGCAGCTGATGAGCAGCTTTAGCACACTGGCTAGCCTGGAC
AAAGGCGGAAAAGGCGGCATGTGGAACAGCCTGGAAGCCAGATCTCCCAAGAGC
CGGTGTTGTAGCACAGGCCCTTGGGAAGCTGTGCAAGAGAATCTGCTGTGGGCCT
CTCTGCTTGCTCCTGGCGGAGCCACCATCTTTCCAGATCCTTGGCTGCTGAAGGC
TAGCCCCAGCTCTCTGCCTCATCTGCACAGAACAAAGCCCCTGCGCCTGCCTGTGT
CCTAACTTCCCATTCTACAAGGACACCGTGCTGCTGCATCAGGGCCCTAGAGGTG
GTGGAAAAGGTGGAATGGCCATGGGCCAGAGAACACCTTCTCTGGCTGAGCTGAG
AAAGAGCAGCGCCACCTTCCTGACCTGCAATCTGGGAGCCCAGGCCGAGAAGAG
ATCTAGAGCCCCTGGCAAGCTGACCTACGTGTCCACCATTGTGCTGGACGCCCT
GTGACCAAGCTCGAACAGGGACTCGTGATGAAGCGGTACAAGATCGTGACCCAGG
GCTTCGACTACACCAGCGTGGAATCTAAAGGCGGAATGGCTAAGACCAAGGGCAG
CCTGAGCGTGTTTCAGAGAACTGCATCCTGCCGCCGCTTTTCGACAGAGCCGTGCAC
TTCCTGTTTCTGGAAGTGTGGCTGCCCCAGCCTATGCTGTCTAGCAGCCCTCCTAG
CTCTACAGCCCCTCTGCTGGGATCTGAGCCTCTGAGACACTGGGAAGCCAGCCTG
TCTAGAGGCGGTGGCGGAATGTGTGCTCTGCAAGGCAGAGGCGCTTCTCCTGCT
GGTGCCGGACTGTTCCACTGGACAATGAGCCCATTCTGCTGGGGAGCCTGTACG
GCCACATCCACAATGAGGCCGTCTGA

10

20

30

40

配列番号 81 (CLT 抗原融合タンパク質 2 をコードするコドン最適化 cDNA 配列)

50

【化 8 7】

ATGTGGAATTTCTTCCGGCGCGAGCTGACCAGCAACGGCTTCCCTGAGAACTTCA
GCCTGGACGTGCCCCGCAACACCTACAATGCCCTGAAGTCCAGACTGTGCGACCC
CAACGCCGATCACACCAGCTGTCCATCTCCATGTTCTCTGCATGCCGCTGGCGCT
CTGCCTGGAACAGGCAGACAAAGATGGCGCGTGGAAGTGGCCCATCTGGCCGAT
AGAAAGCTGAGCCTGAGGGATGTGTCCCGCTGAGACAAGGCGGCGAGAGAAGA
TCTGGAATCGCCGTGAAGGTCGTCAGAGGCGGAGCTGGATTTGCCGCTAGACTGC
AGGGAAGCGTGACCCTGGTTCAGCAAGGCTGGTTCTTCCCTAGACTCGGCGGTTG
TCAAGCCTGGTGGCGAATGGGAGCTGTTGTTTGGTGGCGGAGCTGCTGACATGT
ACAAGCGGCGGAAAAACCGGCGTGCTGATCAGAAGAGGCGACCTGGTCACAGAC
ATGGTGGCCTGCAGAATCAAGACCTTCAGAGGCCACACAGAGAAGGCCGCCATCT
GCAAGACCCGGAAAGAGTCTAGCGCCGAGACAAGCCCTGCCGACTCTCTGATCCT
GGACTTCCAGCCTCTGCAGCTGATGAGCAGCTTTAGCACACTGGCTAGCCTGGAC
AAAGGCGGCGGAATGAACACCCCTAACATCGTGTCCCTGAGAGCCCACCAGCCTG
AAGTGGGAATCATCCCTAGCGTGCTGCTGATGCGGCCCTGAGAATCAAAGGCGT
GTTCCACCACATTCACAGCCCTCTGCACGGCGAGAATCAGGGCTTCACCTTGTGT
CTGCAAGGCGCCCCTCCTAGCAGTTCTGTTGGTGGCAAAGGCGGAATGGCCATG
GGCCAGAGAACACCATCTCTGGCCGAGCTGAGAAAGAGCAGCGCCACCTTCCTGA
CCTGTAACCTGGGAGCCCAGGCCGAGAAGAGATCTAGAGCCCCTGGCAAGCTGA
CCTACGTGTCCACCATTGTGCTGGACGCCCTGTGACCAAGCTCGAACAGGGACT
CGTGATGAAGCGGTACAAGATCGTGACCCAGGGCTTCGACTACACCAGCGTGGA
TCTAAAGGTGGCATGGCCAAGACCAAGGGCAGCCTGTCCGTGTTGAGAGAGCTGC
ATCCTGCCGCGCTTTGATAGAGCCGTGCACTTCCTGTTTCTGGAAGTGTGGCT
GCCCAGGCCTATGCTGTCTAGCAGCCCTCCATCTAGCACAGCCCCACTGCTGGGA
TCTGAGCCTCTGAGACACTGGGAAGCCAGCCTGAGCAGAAAAGGCGGCCTGCCT
AGAACACCCAGACCTGACCTGATTCTGCTGCAGCTGCTGCCTGCTGGACTGAGAC
AACTGCTGCAGACAAGCGGCCCTGACAACGAGCAGCCTATCGAGCAGGACCTGAT
CTGCAATGTGTGCGGAGGCGGCTGGAACAGCCTGGAAGCCAGATCTCCTAAGAG
CCGGTGCTGTAGCACAGGCCCTTGGGAAGCTGTGCAAGAGAATCTGCTGTGGGC
CTCTCTGCTTGCTCCTGGCGGAGCCACCATCTTTCCAGATCCTTGGCTGCTGAAG
GCTAGCCCCTCTAGCCTGCCTCATCTGCACAGAACAAGCCCCTGCGCCTGCCTGT
GTCCTAACTTCCCATTCTACAAGGACACAGTGCTGCTGCATCAGGGCCCTCGAGG
TGGCGGAAAAGGTGGAATGTGTGCCCTTCAAGGCAGAGGCGCTTCTCCTGCTGGT
GCCGGAAGTGTCCACTGGACAATGAGCCATTTCTGCTGGGGAGCCTGTACGGCC
ACATCCACAATGAAGCCGTCTGA

10

20

30

40

配列番号 83 (CLT 抗原融合タンパク質 4 をコードするコドン最適化 cDNA 配列)

50

【化 8 8】

ATGTGGAACCTCCCTAGAAGCGAGATCCCCGAAATCTAGATGTTGTTCTACTGGACC
GTGGGAAGCCGTACAAGAAAATCTACTATGGGCCTCTCTACTAGCACCAGGTGGT
GCAACAATTTTTCCAGATCCGTGGCTATTGAAGGCCTCGCCATCTTCTTTACCGCA
TCTACACAGAACATCCCCGTGTGCTTGTCTATGTCCGAACTTTCCGTTCTACAAGG
ACACCGTACTACTACATCAAGGACCAAGAGGTGGTGGTGAATGAATACTCCGAA
CATCGTATCTCTAAGAGCGCATCAACCGGAAGTTGGAATTATCCCGTCCGTCCTAC
TAATGAGACCGCTAAGAATCAAGGGAGTGTTCCACCATATCCACTCTCCACTACAC
GGAGAAAACCAGGGATTACCCCTATGTTTACAAGGTGCTCCACCGTCCTCTAGTGT
TGGAGGTGGAAAAGGTGGAATGTGGAATTTCTTCAGAAGAGAGCTAACCTCCAAC
GGATTCCCCGAGAACTTCTCTTTAGATGTACCGGCGAACACCTACAACGCGCTAAA
GTCTAGATTGTGTGATCCGAACGCGGACCATACTTCTTGTCCATCTCCATGTTCTC
TACATGCTGCTGGTGTCTTACCTGGAACCTGGTAGACAAAGATGGAGAGTAGAACTA
GCGCACCTAGCGGACAGAAAAGCTATCCCTAAGAGATGTCTCCAGACTAAGACAAG
GTGGAGAGAGAAGATCTGGAATCGCGGTCAAAGTAGTTAGAGGTGGTGCAGGATT
TGCGGCGAGATTACAAGGATCTGTAACCCTAGTACAGCAAGGATGGTTCTTCCCAA
GACTTGAGGATGTCAAGCTTGGTGGAGAATGGGAGCTGTAGTTTGGTGC GGAGA
ACTACTAACATGTACCTCTGGTGGTGGTGGGAATGCTACCAAGAACACCAAGACCG
GACCTAATCCTACTACAATACTACTACCAGCGGGATTGAGACAGCTACTACAAACATC
TGGACCGGATAACGAACAGCCGATCGAACAGGATCTAATCTGTAACTATGCGGA
GGTGGTGGGAATGGCGAAAACAAAGGGATCCTTGTCCGTGTTTCAGAGAACTACATC
CAGCTGCGGCTTTTTGATAGAGCGGTACACTTCCTATTCTAGAGCTATGGCTACCG
GAACCGATGTTATCTTCTTCCCCACCATCTTCTACAGCGCCGTTATTAGGATCTGAA
CCGTTGAGACATTGGGAAGCGAGTCTATCTAGAGGTGGTGGTGGGAATGTGTGCGT
TACAAGGAAGAGGTGCTAGTCCAGCTGGTGCCGGATTATTTTCATTGGACAATGTCC
CCGTTCTACTAGGATCTCTATACGGACACATCCACAACGAAGCTGTCCGGTGGTG
GAAAAGGTGGAATGGCTATGGGACAAAGAACACCATCTCTAGCGGAGCTAAGAAA
GTCCTCTGCGACATTCTAACCTGTAACCTTGGGAGCGCAAGCGGAGAAAAAGATCT
AGAGCACCTGGAAAGCTAACCTATGTCTCCACCATAGTACTAGATGCGCCGGTCA
CAAAGCTAGAACAGGGACTAGTAATGAAGAGATACAAGATCGTCACGCAGGGATT
CGACTACACCTCTGTAGAATCCGGTGGTGGTGGTACAGGTGTCCTAATTAGAAGA
GGAGATCTAGTACCGATATGGTCGCGTGTAGAATCAAGACATTCAGAGGACATAC
AGAGAAGGCGGCGATCTGCAAGACAAGAAAAGAATCTTCTGCGGAAACCTCTCCG
GCGGACTCTCTAATCTTAGATTTTCAGCCGCTACAGCTAATGTCCTCCTTCTCTACT
TTGGCCTCCTTGGATAAGTGA

10

20

30

40

配列番号 84 (CLT 抗原融合タンパク質 3 で使用されたリンカー配列)

【化 8 9】

GGK

配列番号 85 (TCR VB CDR3 AA 配列)

【化 9 0】

CASSLTGGYTGELFF

50

配列番号 86 (TCR VB CDR3 AA 配列)
【化 9 1】

CASNKLGYPQHF

配列番号 87 (TCR VB CDR3 AA 配列)
【化 9 2】

CASSLLENQPQHF

【図面】
【図 1】

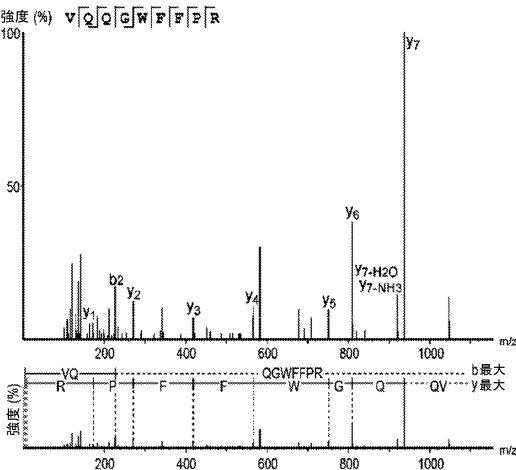


図 1

【図 2】

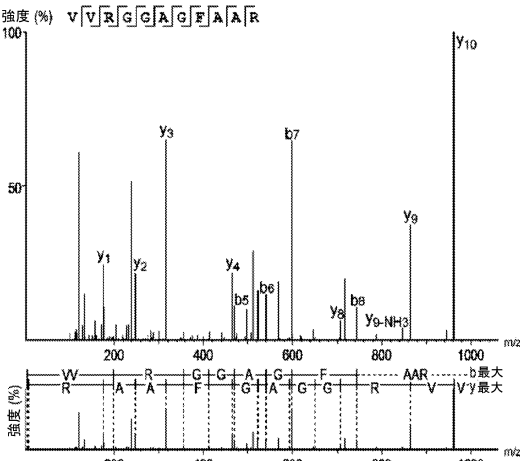


図 2

10

20

30

40

50

【図 7】

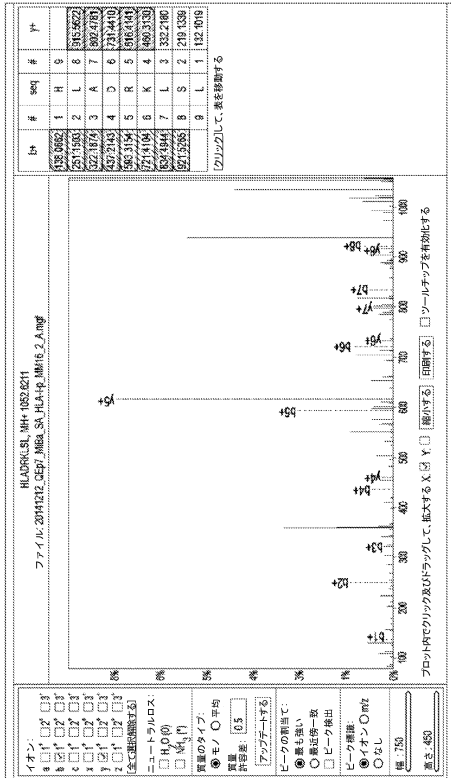


図 7

【図 8】

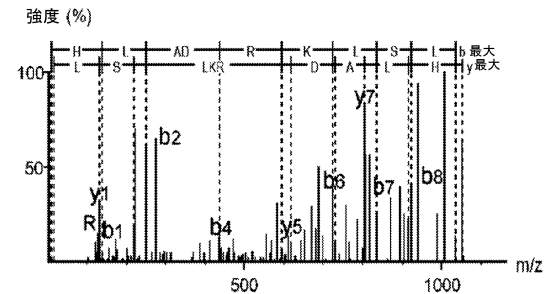
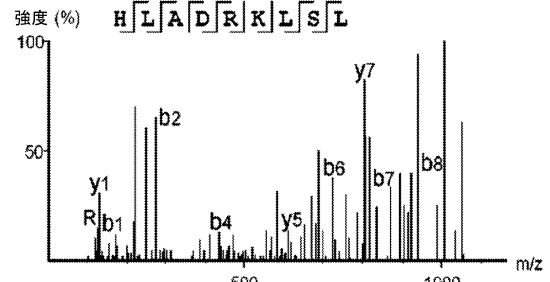


図 8

【図 9】

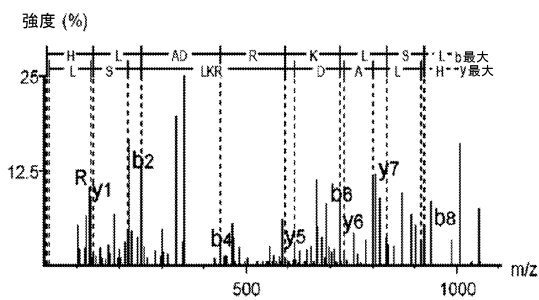
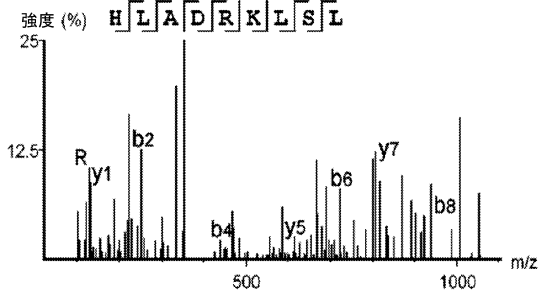


図 9

【図 10】

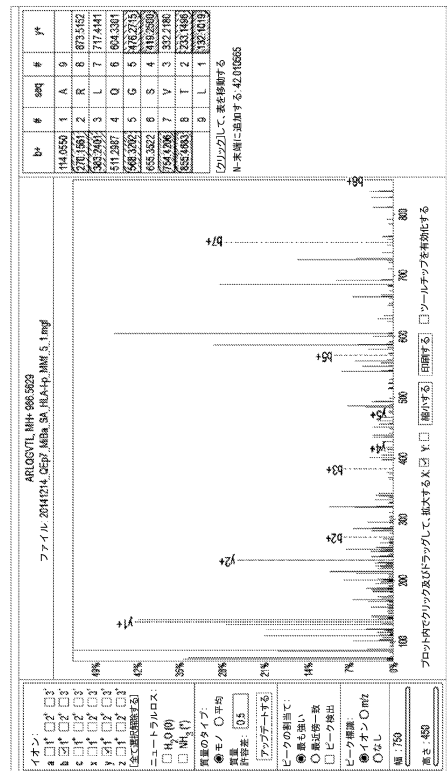


図 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

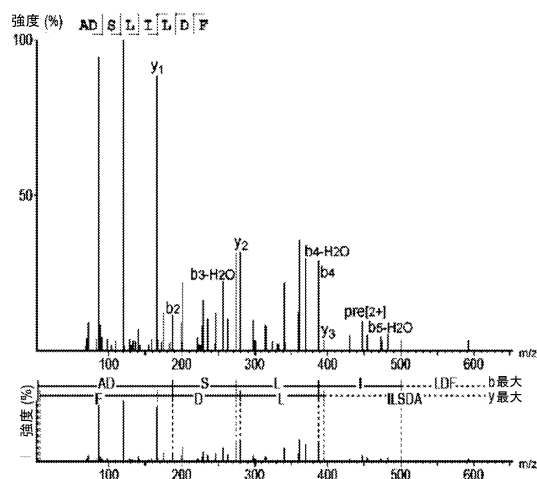


图 11

【圖 12】

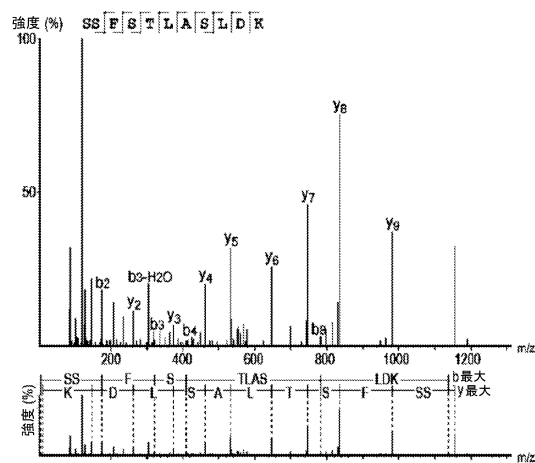


图 12

10

20

【図 13】

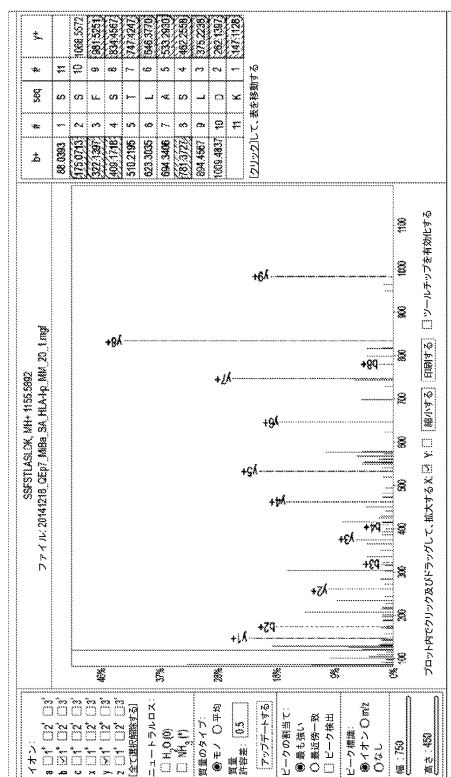


图 13

【圖 14】

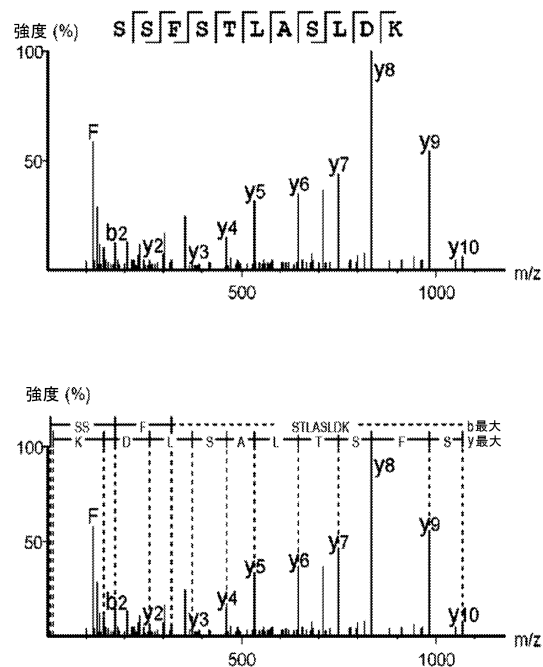


图 14

30

40

【図 15】

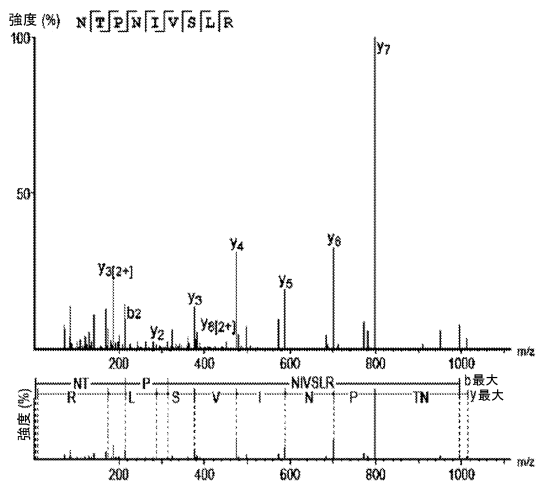


図 15

【図 16】

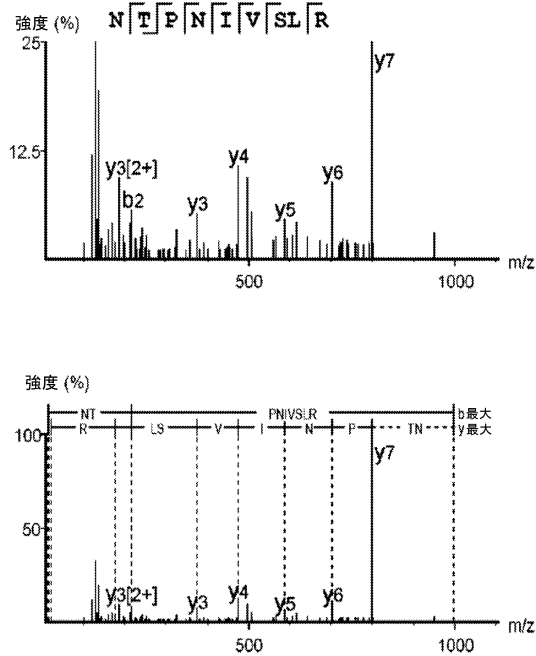


図 16

【図 17】

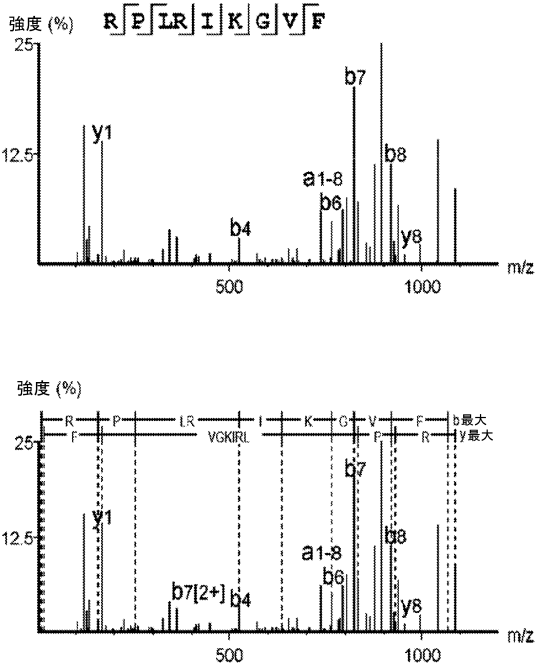


図 17

【図 18】

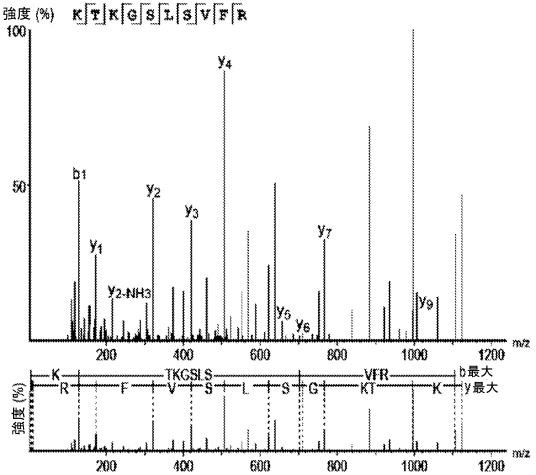


図 18

10

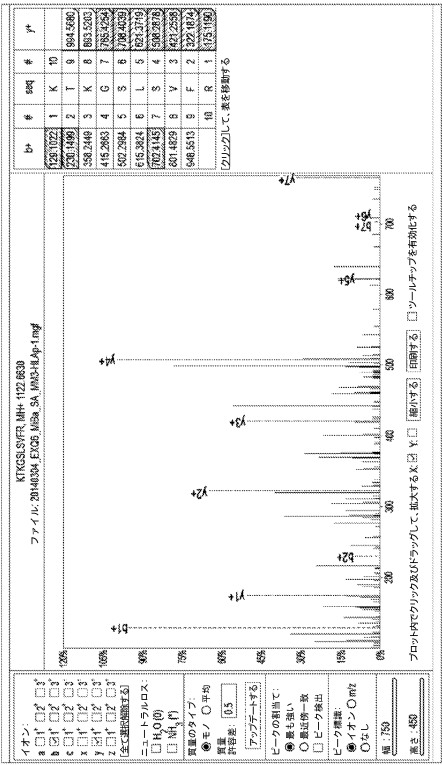
20

30

40

50

【図 19】



【図 2 3】

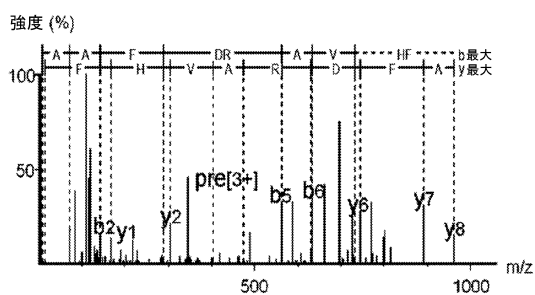
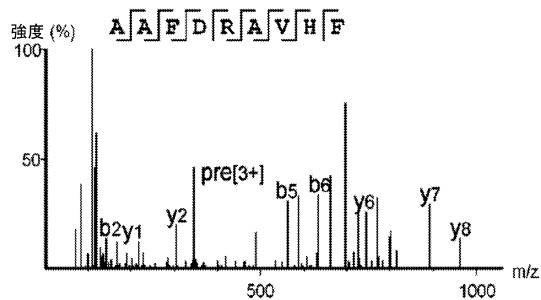


図 23

【図 2 4】

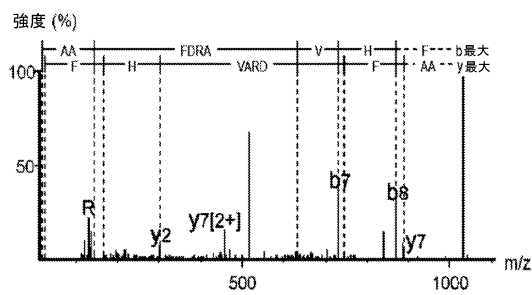
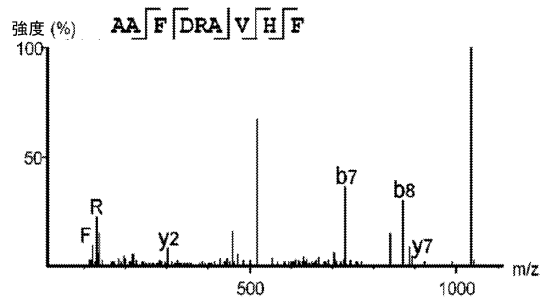


図 24

【図 2 5】

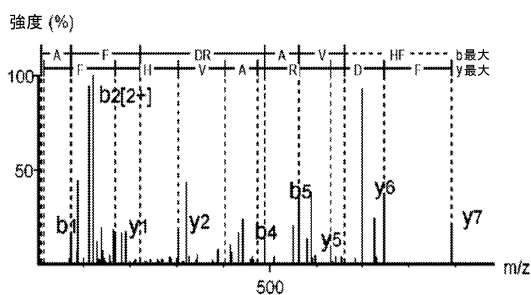
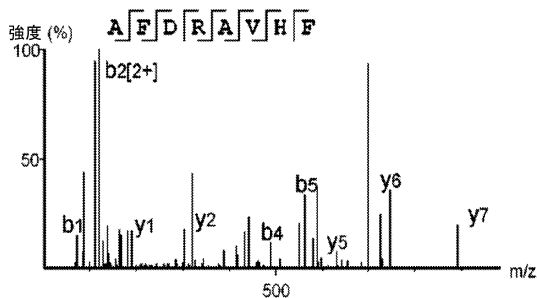


図 25

【図 2 6】

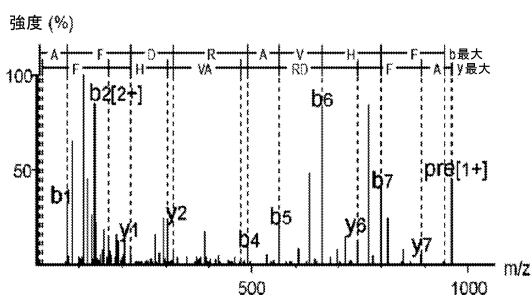
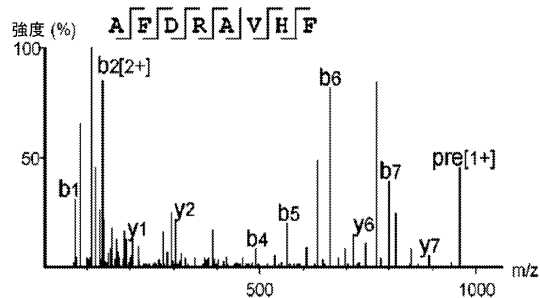


図 26

10

20

30

40

50

【図 27】

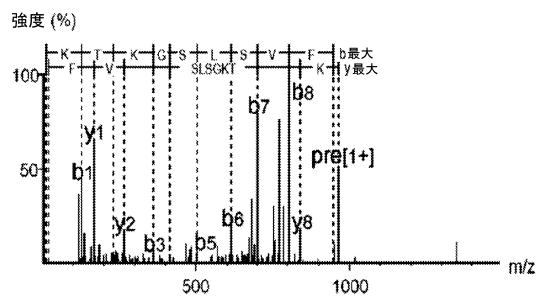
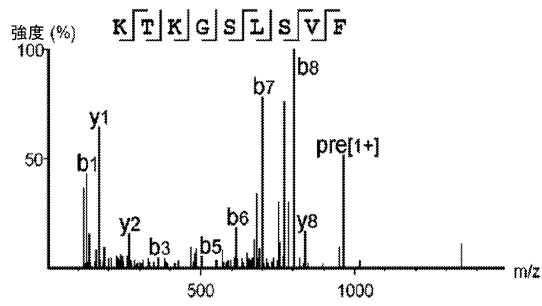


図 27

【図 28】

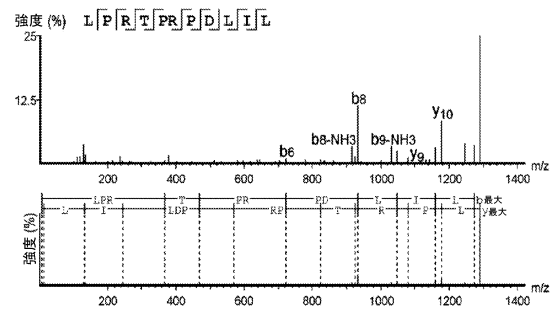


図 28

10

20

【図 29】

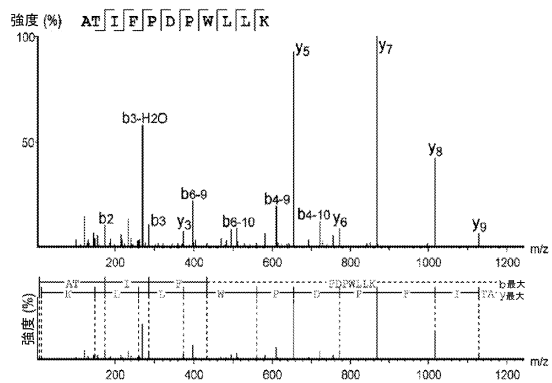


図 29

【図 30】

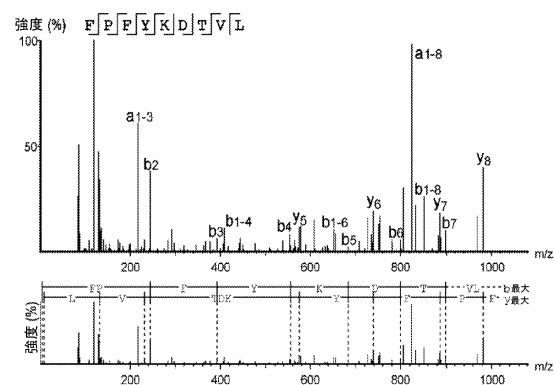


図 30

30

40

50

【図 3 1】

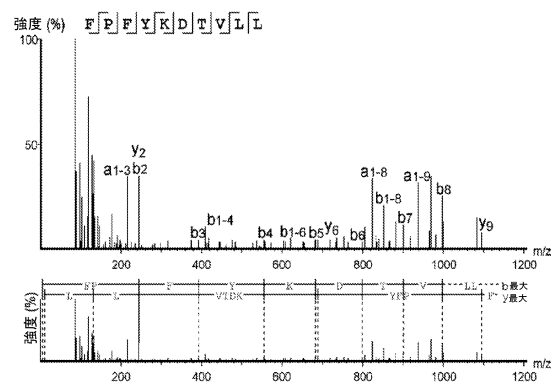


図 31

【図 3 2】

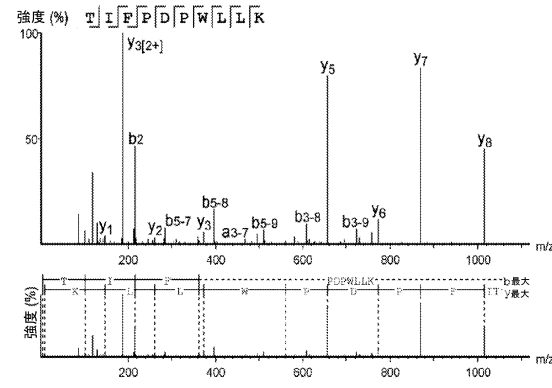


図 32

【図 3 3】

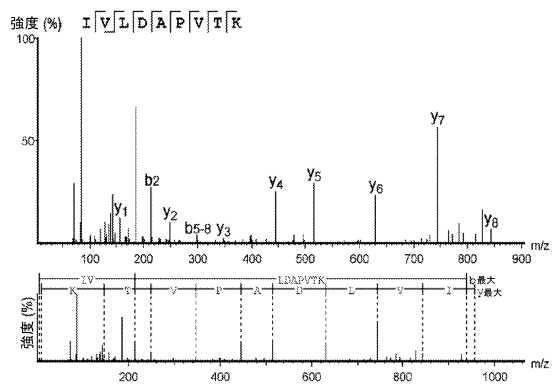


図 33

【図 3 4】

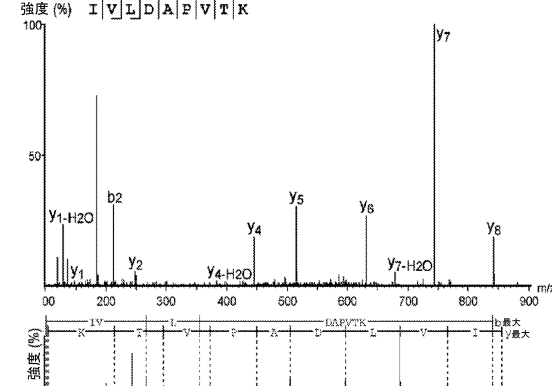


図 34

10

20

30

40

50

【図 3 5】

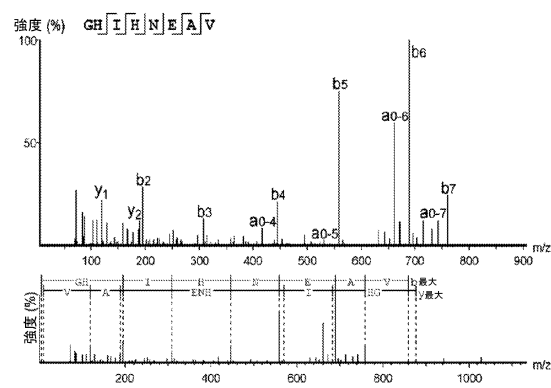


図 35

【図 3 6】

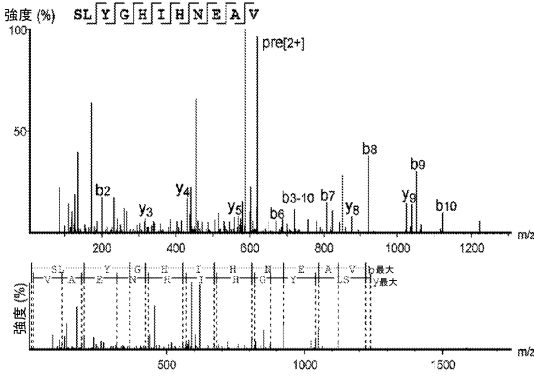


図 36

【図 3 7】

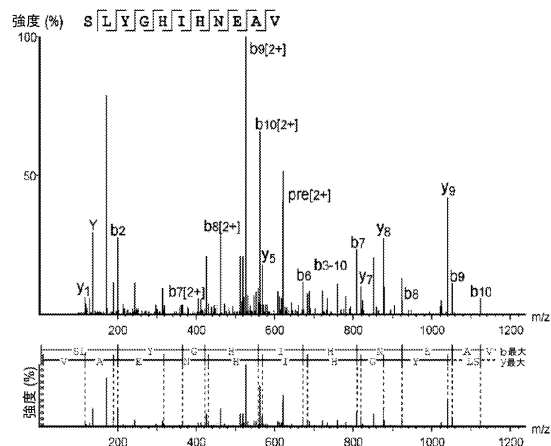


図 37

【図 3 8】

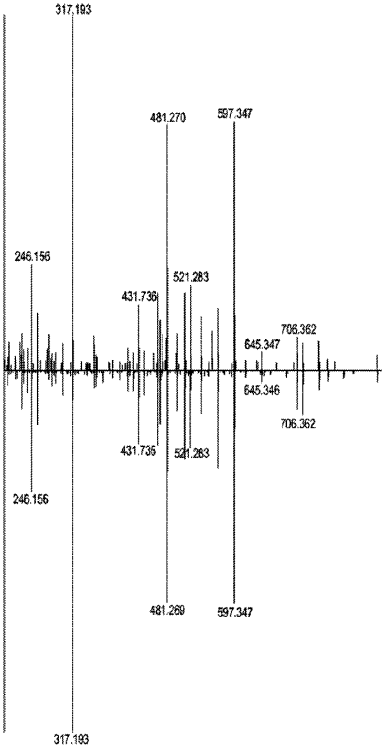


Fig. 38

10

20

30

40

50

【図 3 9】

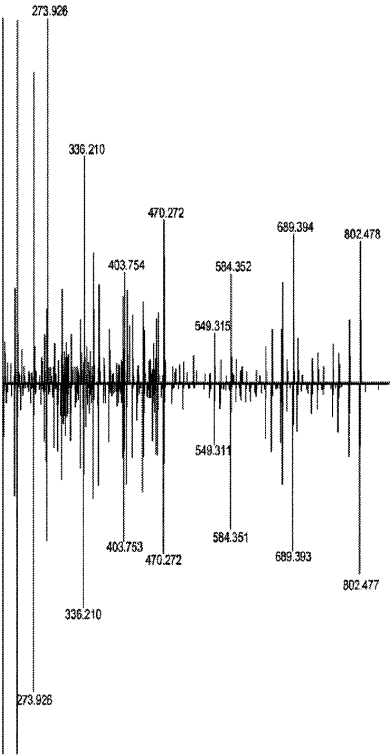


FIG. 39

【図 4 0】

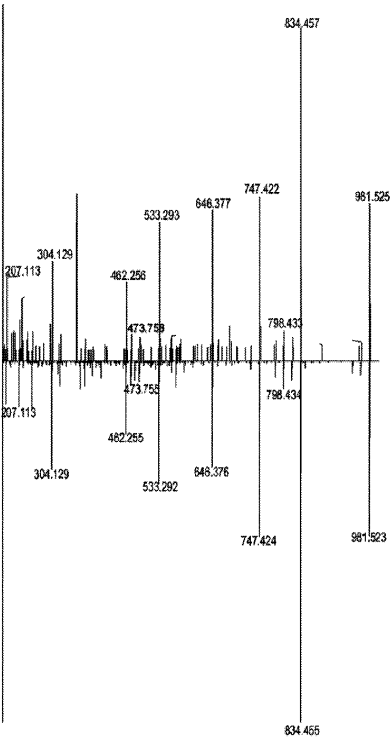


FIG. 40

【図 4 1】

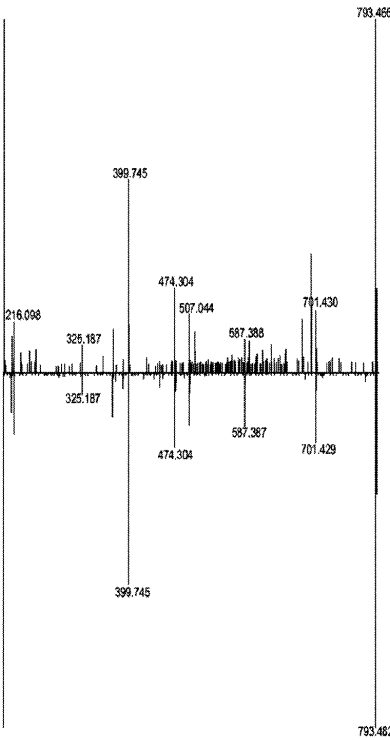


FIG. 41

【図 4 2】

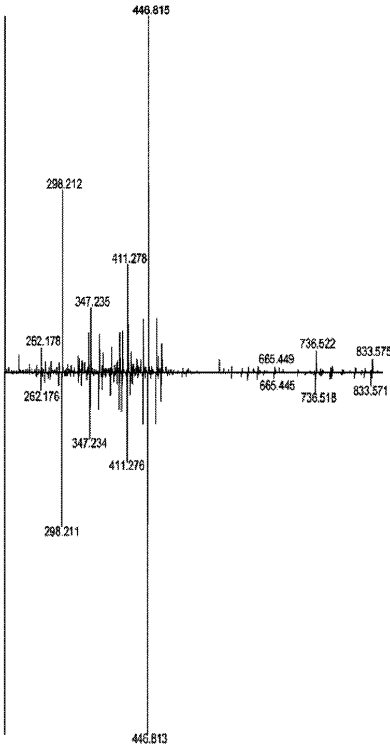


FIG. 42

【 図 4 3 】

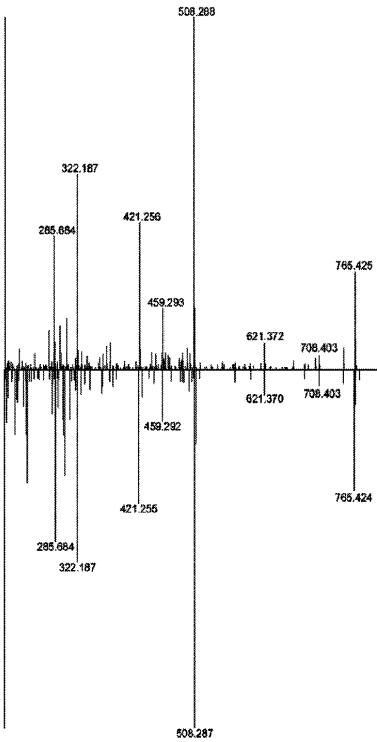


FIG. 43

【 図 4 4 】

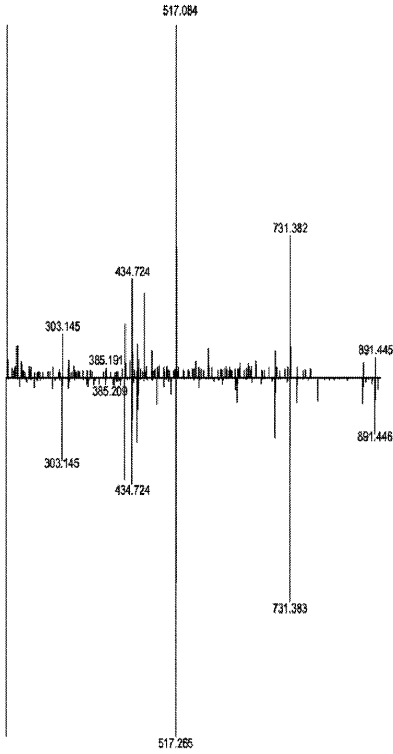


FIG. 44

【 図 4 5 】

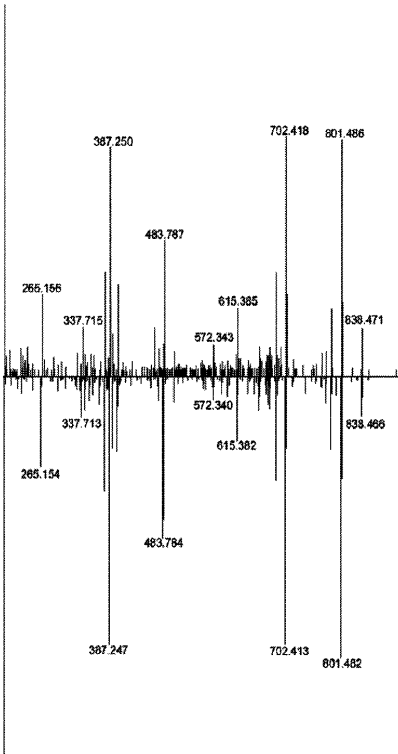


FIG. 45

【 図 4 6 】

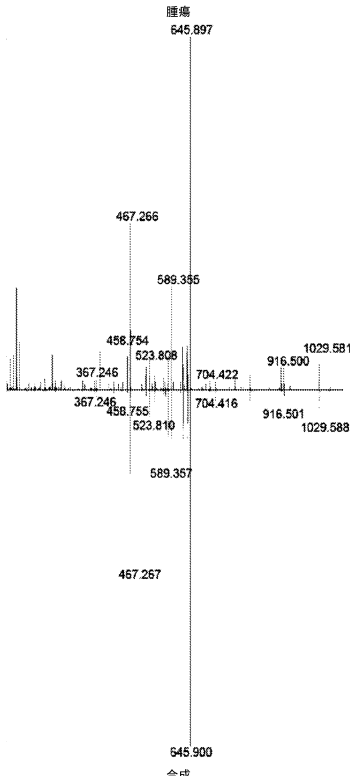


図 46

10

20

30

40

50

【図 4 7】

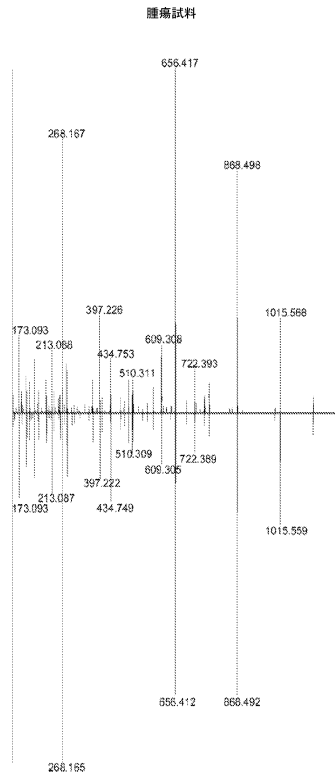


図 47

【図 4 8】

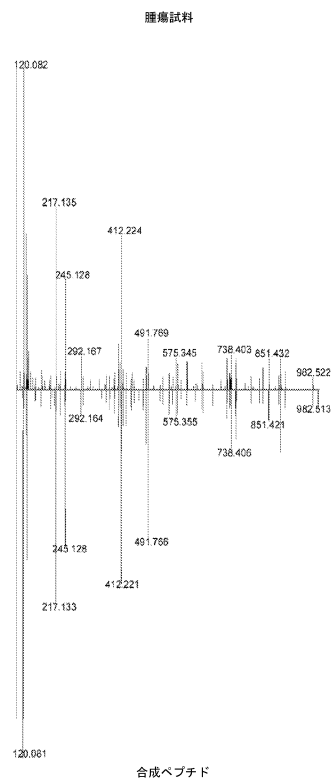


図 48

【図 4 9】

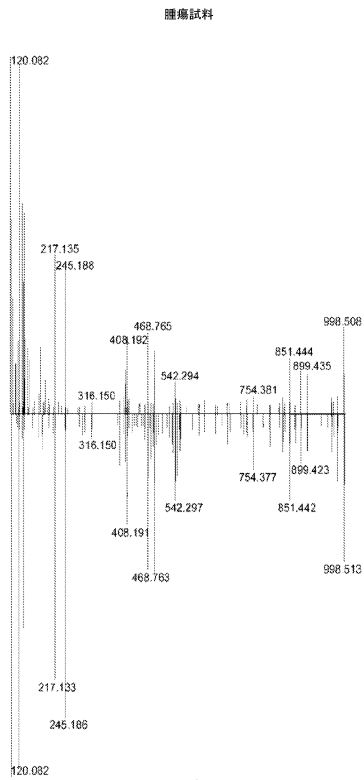


図 49

【図 5 0】

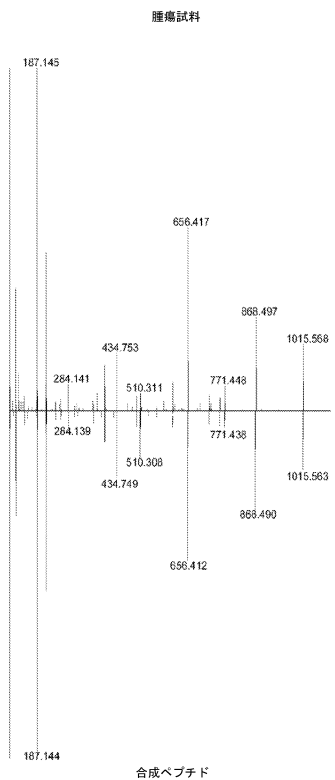


図 50

10

20

30

40

50

【図 5 1】

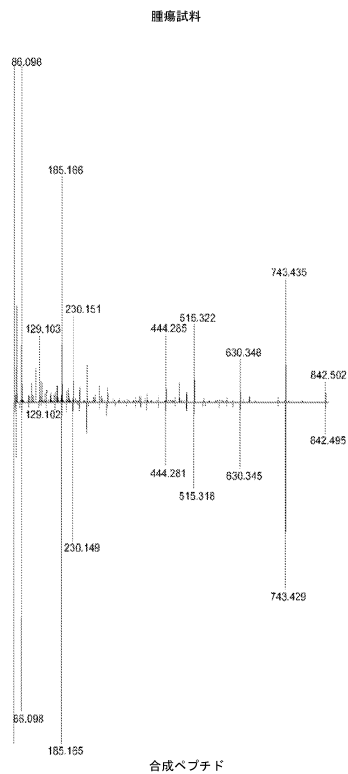


図 51

【図 5 2】

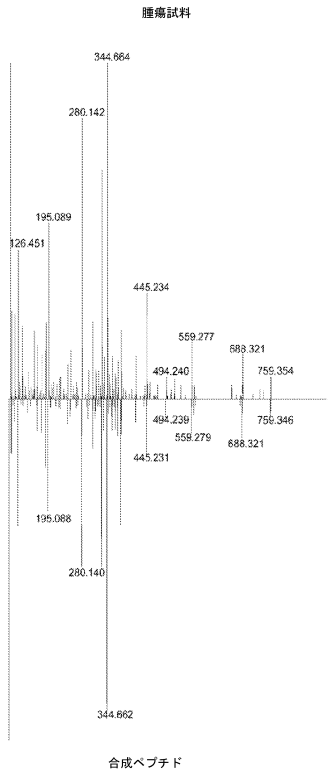


図 52

【図 5 3】

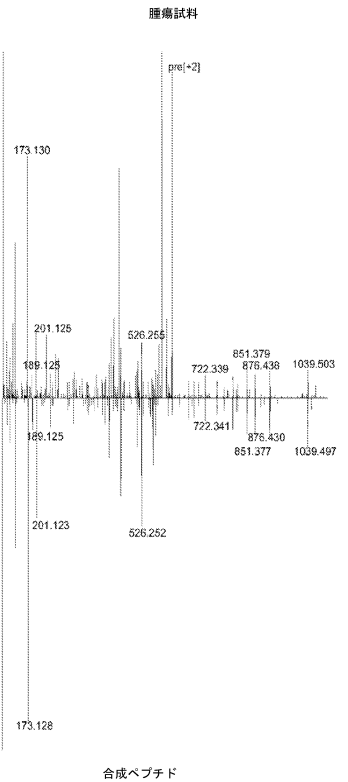


図 53

【図 5 4 - 1】

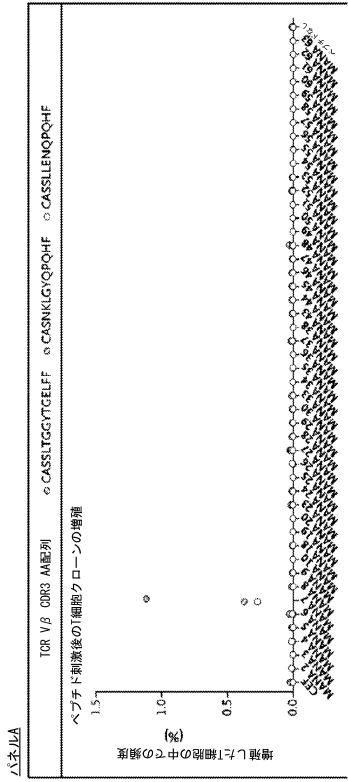


図 54

【図 5 4 - 2】

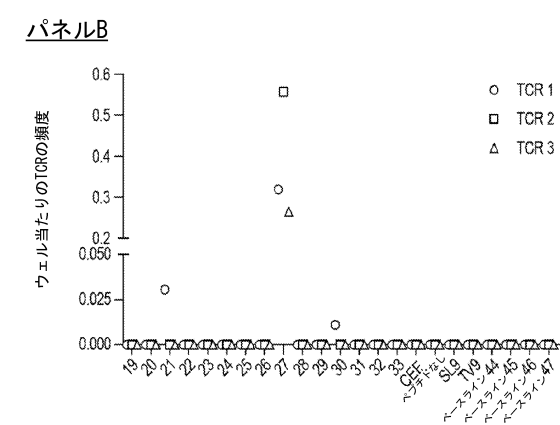


図 54 (続き)

【図 5 4 - 3】

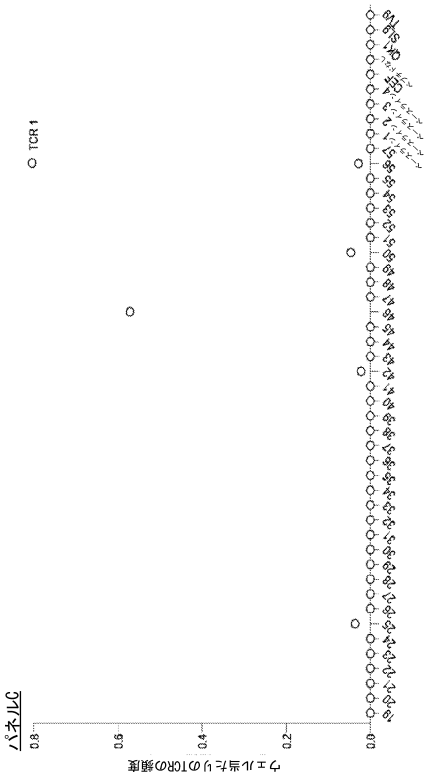


図 54 (続き)

【図 5 5 - 1】

パネルA: Q1抗原の配列(質量分析によって発見されたペプチドでアノテーションされている)とその下のHERFESTによって検出されたペプチド

Q1 Ant 1 > MNFFRELITNSGPPENTSLDVPANTYNAKSLQDPEADHTSCPSLIHAAGALPGTGRVRYELAHLDKLSLRDYSRLRG
Pat. 188B
Pat. 188B
Pat. 224B
Q1 Ant 1 > GERRSGIAKVVYRGAGFAARLQGSVTLWQGHFFRLGCGQAWRGAIVWCGELLTQTS
Pat. 224B
Pat. 224B
Q1 Ant 2 > MTGVILIRGDLVTDWVACRIKTFGHTERAAIKTRKSSAETSPADSLIDFQPLQLMSSFSTLASLIDK
Pat. 222B
Pat. 222B
Pat. 222B
Pat. 224B
Pat. 224B
Pat. 224B
Pat. 224B
Pat. 254C
Pat. 254C
Pat. 225B
Pat. 225B
Pat. 225B
Pat. 271B
Pat. 271B
Pat. 188B
Pat. 293B

図 55

【図 5 5 - 2】

パネルB: Q1抗原の配列(質量分析によって発見されたペプチドでアノテーションされている)とその下のHERFESTによって検出されたペプチド

Q1 Ant 2 > MTGVILIRGDLVTDWVACRIKTFGHTERAAIKTRKSSAETSPADSLIDFQPLQLMSSFSTLASLIDK
Pat. 222B
Pat. 222B
Pat. 222B
Pat. 224B
Pat. 224B
Pat. 224B
Pat. 224B
Pat. 254C
Pat. 254C
Pat. 225B
Pat. 225B
Pat. 225B
Pat. 271B
Pat. 271B
Pat. 188B
Pat. 293B

図 55 (続き)

10

20

30

40

50

【図 55 - 3】

ハネルC: QLT抗原3の配列(質量分析によって発見されたペプチドでアノテーションされている)とその下のHERFESTによって検出されたペプチド
CIT Ait. 3 > <u>N</u> NTPTVSLRAHQPEVGITPSVLLMRPLRIK <u>GV</u> PHHISPLHGENQCFITCLQGAPSSSV
Pat. 254C VLLMRPLRIK (A*11)
Pat. 225B MRPLRIKGV (B*07)
Pat. 271B NTPNIVSLRA (A*01)
ハネルD: QLT抗原4の配列(質量分析によって発見されたペプチドでアノテーションされている)とその下のHERFESTによって検出されたペプチド
CIT Ait. 4 > <u>N</u> AKTKGSLSVFRELHPA <u>AF</u> DRVHFLFLELPPRLSSPPSPSTAPLIGSEFLRWIASLR
Pat. 222B FLELNL (A*02)
Pat. 222B SVFRELHPA (A*02)
Pat. 224B FLELNL (A*02)
Pat. 225B SPSPSTAPL (B*07)

図 55 (続き)

【図 56】

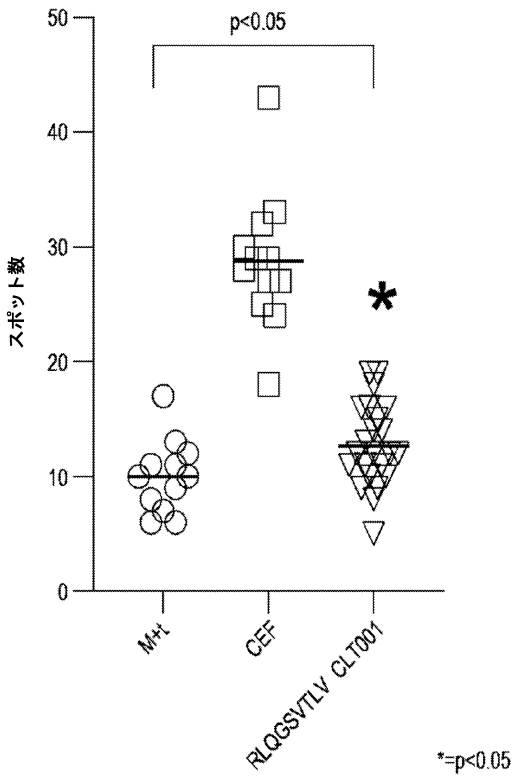


図 56

【図 57】

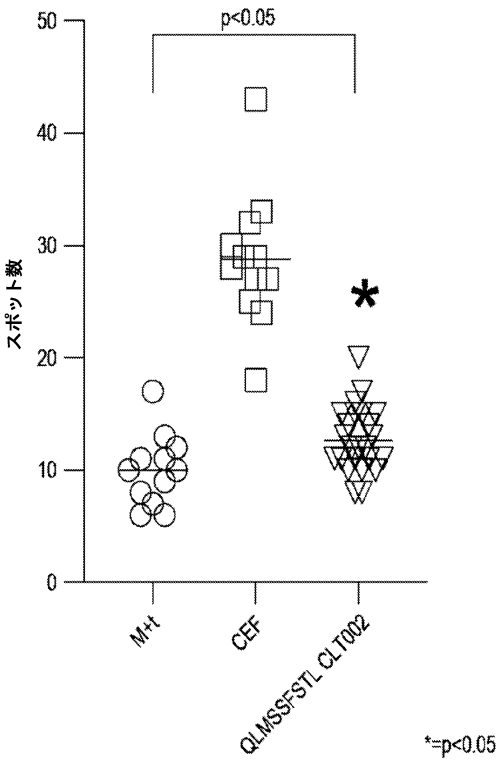


図 57

【図 58】

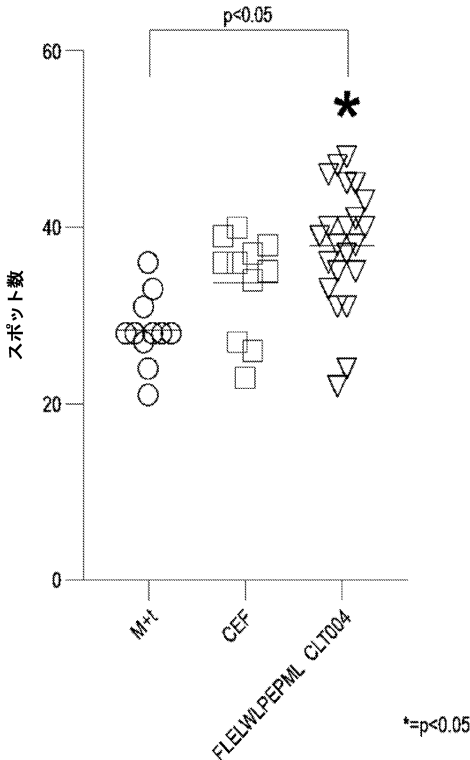


図 58

10

20

30

40

50

【図 59】

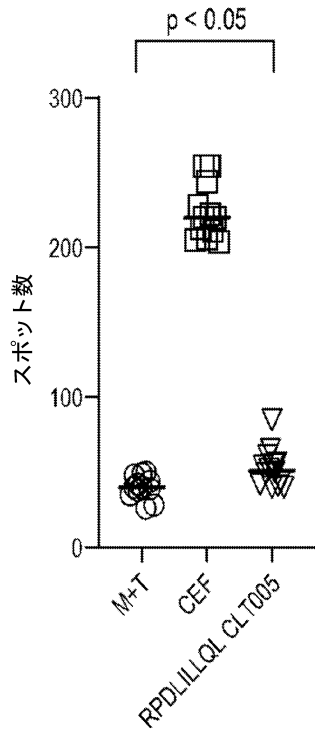


図 59

【図 60】

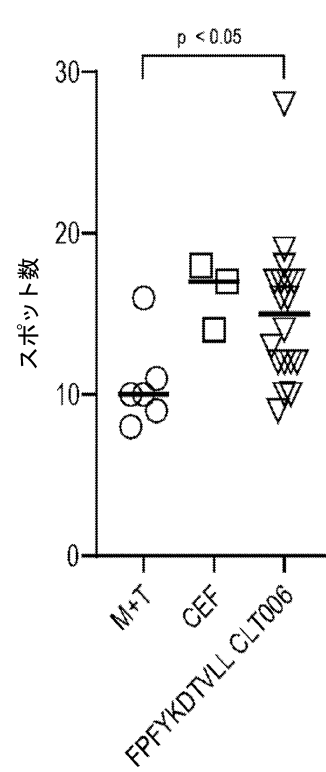


図 60

【図 61】

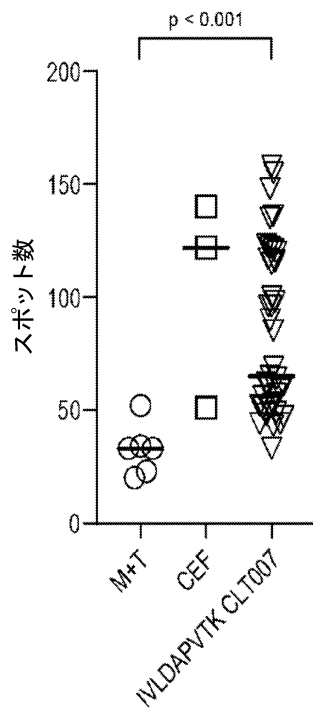


図 61

【図 62】

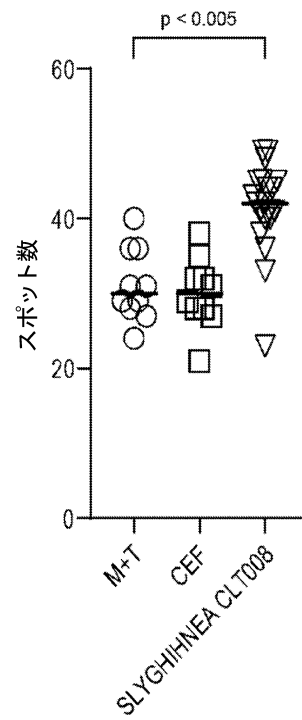


図 62

10

20

30

40

50

【図 6 3】

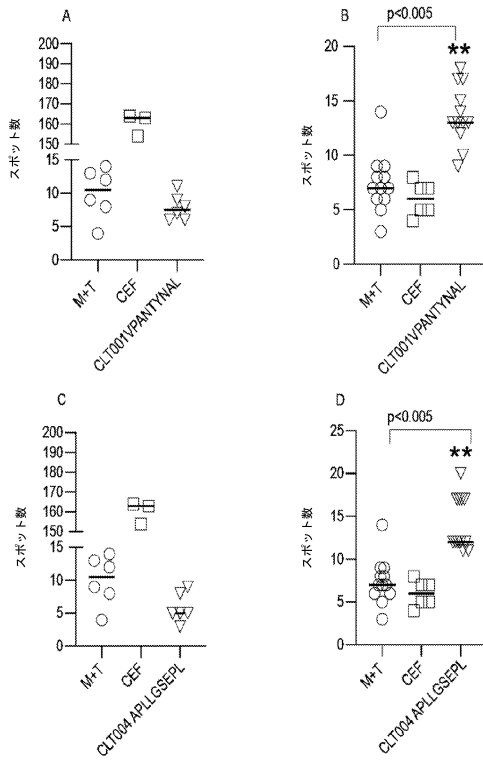


図 63

【図 6 4】

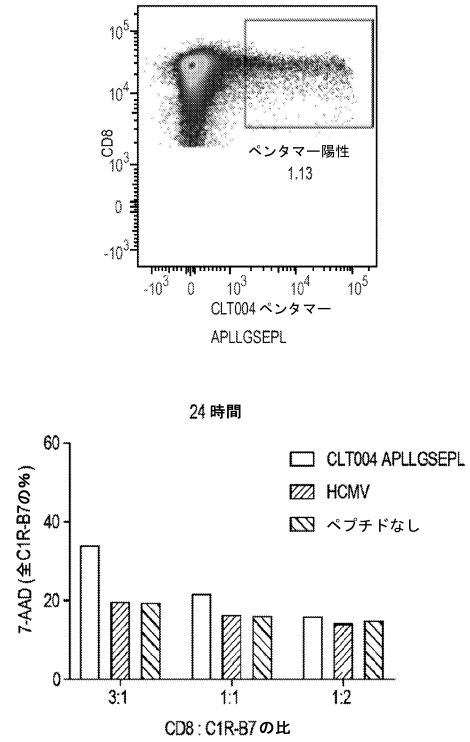


図 64

【図 6 5】

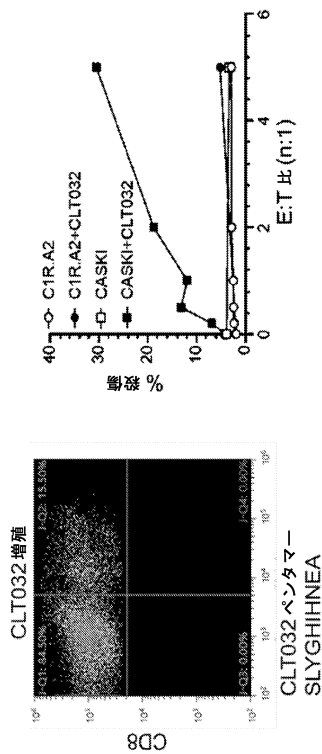


図 65

【図 6 6 - 1】

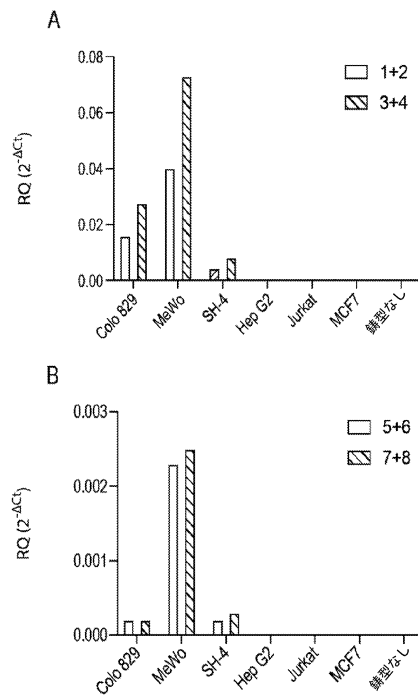


図 66

10

20

30

40

50

【図 66 - 2】

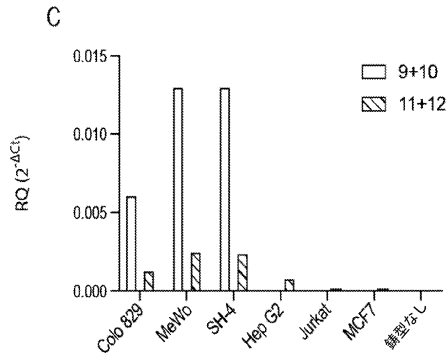


図 66 (続き)

【図 66 - 3】

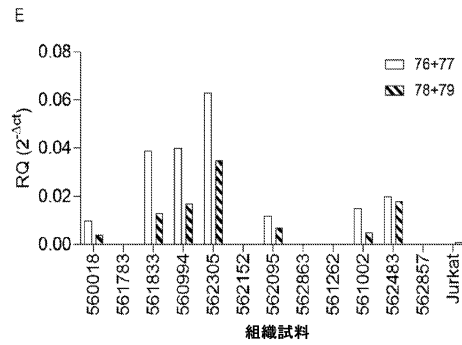
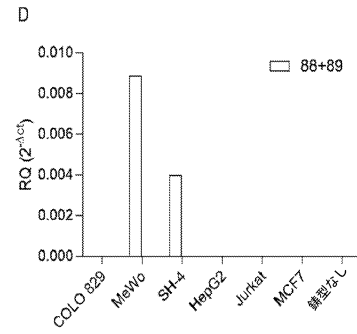


図 66 (続き)

【図 66 - 4】

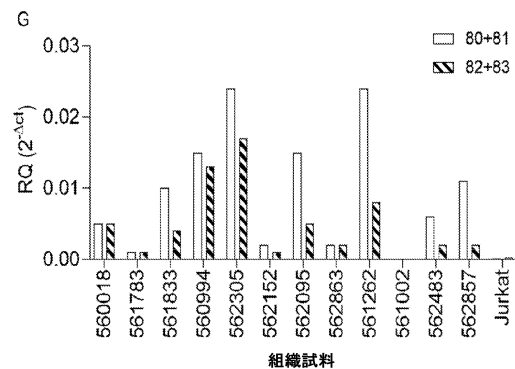
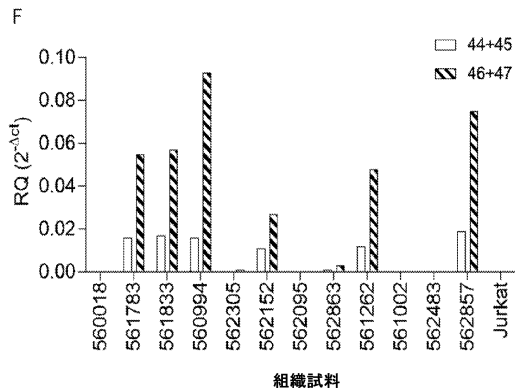


図 66 (続き)

【図 67】

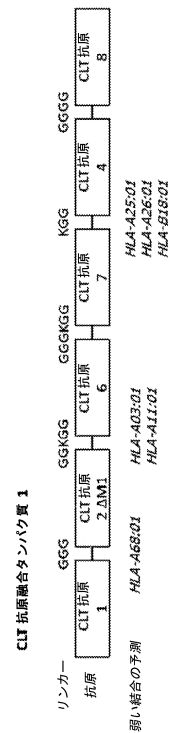


図 67

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年1月24日(2023.1.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2023522198000001.app

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2021/028029

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 13ter.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 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.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:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/028029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/47 A61K39/00 A61P35/00
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)

C07K A61K A61P

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, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, IBM-TDB, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ATTIG JAN ET AL: "LTR retroelement expansion of the human cancer transcriptome and immunopeptidome revealed by de novo transcript assembly", GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, UNITED STATES, vol. 29, no. 10, 19 September 2019 (2019-09-19), pages 1578-1590, XP002795956, ISSN: 1549-5469, DOI: 10.1101/GR.248922.119 the whole document Abstract, Fig. 6, p. 1580-1583 Supplemental Figures S8, S13-S15. -/--	1-11, 13-38

☒ 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

26 July 2021

Date of mailing of the international search report

09/08/2021

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

Madruga, Jaime

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/028029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& Attig Jan ET AL: "Supplemental Figures to: LTR retroelement expansion of the human cancer transcriptome and immunopeptidome revealed by de novo transcript assembly", Genome Research, 19 September 2019 (2019-09-19), XP055827023, DOI: 10.1101/gr.248922.119 Retrieved from the Internet: URL:https://genome.cshlp.org/content/suppl/2019/09/13/gr.248922.119.DC1/Supplemental_Figures.pdf [retrieved on 2021-07-22] Supplemental Figures S8, S13-S15. the whole document	1-11, 13-38
X	----- WO 2006/119527 A2 (GREENHILLS BIOTECHNOLOGY RES D [AT]; MAYER BERND [AT] ET AL.) 16 November 2006 (2006-11-16) cited in the application p.1 par.2, 3, p.3 par.2 - p.4 par.1, p.5 par.2,3, p.6 par.5 - p.7 par.3, p.8 par.3, p.9 par.3-5; the whole document	1-11, 13-38
X	----- WO 2005/099750 A1 (UNIV GOETTINGEN GEORG AUGUST [DE]; KRONE BERND [DE] ET AL.) 27 October 2005 (2005-10-27) cited in the application the whole document page 17, lines 8-9; claims; examples	1-11, 13-38
X	----- SCHIAVETTI FRANCESCA ET AL: "A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 62, no. 19, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 5510-5516, XP002304883, ISSN: 0008-5472 the whole document	1-11, 13-38
X	----- LUCA CEGOLON ET AL: "Human endogenous retroviruses and cancer prevention: evidence and prospects", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 13, no. 1, 3 January 2013 (2013-01-03), page 4, XP021135406, ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-13-4 the whole document	1-11, 13-38
	----- -/--	

1

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

page 2 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/028029

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2020/079448 A1 (THE FRANCIS CRICK INSTITUTE LTD [GB]; ERVAXX LTD [GB]) 23 April 2020 (2020-04-23) the whole document page 1; claims; examples claims 67-72; sequences 1-4,11-14,55, 56, 57, 73, 74 -----	1-11, 13-38
X,P	WO 2020/260897 A1 (THE FRANCIS CRICK INSTITUTE LTD [GB]; ENARA BIO LTD [GB]) 30 December 2020 (2020-12-30) the whole document examples 1-4; sequences 1-6 -----	1-11, 13-38
X,P	WO 2021/005338 A2 (THE FRANCIS CRICK INSTITUTE LTD [GB]; ENARA BIO LTD [GB]) 14 January 2021 (2021-01-14) the whole document claims; examples; sequences 2, 3, 13, 15, 20 -----	1-11, 13-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/028029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006119527	A2	16-11-2006	AT 502292 A2 15-02-2007
		AU 2006246342 A1 16-11-2006	
		CA 2605006 A1 16-11-2006	
		EP 2001507 A2 17-12-2008	
		NZ 564153 A 27-08-2010	
		US 2009130129 A1 21-05-2009	
		US 2010285509 A1 11-11-2010	
		WO 2006119527 A2 16-11-2006	

WO 2005099750	A1	27-10-2005	AT 533503 T 15-12-2011
		AU 2005232396 A1 27-10-2005	
		CA 2564115 A1 27-10-2005	
		EP 1586330 A1 19-10-2005	
		EP 1740205 A1 10-01-2007	
		US 2011229503 A1 22-09-2011	
		WO 2005099750 A1 27-10-2005	

WO 2020079448	A1	23-04-2020	AU 2019360427 A1 18-03-2021
		CA 3112427 A1 23-04-2020	
		CN 112867501 A 28-05-2021	
		KR 20210080372 A 30-06-2021	
		WO 2020079448 A1 23-04-2020	

WO 2020260897	A1	30-12-2020	NONE

WO 2021005338	A2	14-01-2021	NONE

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/863 (2006.01)	C 1 2 N	15/863	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	

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,N
 E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジョージ カシオティス

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

(72)発明者 ジョージ ヤング

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

(72)発明者 ジャン アッティグ

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

(72)発明者 アンブロジウス スナイデルス

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

(72)発明者 デイビッド パーキンス

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

(72)発明者 ファビオ マリノ

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

(72)発明者 レイ ジュップ

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

(72)発明者 マグダリーナ ボン エッセン

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

(72)発明者 ピーター メイソン

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

(72)発明者 ニコラ ターネット

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

F ターム (参考) 4C084 AA13 NA14 ZB091 ZB261

Fターム (参考)	4C085	AA03 AA38 DD62 DD86 EE01 EE06 FF01 FF11 FF14 FF21
	4H045	AA11 AA30 BA41 CA41 DA86 EA22 EA28 FA72 FA74