

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7514189号
(P7514189)

(45)発行日 令和6年7月10日(2024.7.10)

(24)登録日 令和6年7月2日(2024.7.2)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
請求項の数 20 (全297頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-570442(P2020-570442)	(73)特許権者	518344612
(86)(22)出願日	令和1年6月19日(2019.6.19)		ビオンテック ユーエス インコーポレイ
(65)公表番号	特表2021-527655(P2021-527655		テッド
	A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(43)公表日	令和3年10月14日(2021.10.14)		1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト
(86)国際出願番号	PCT/US2019/038061		リート 4 0, スイート 1 1 0
(87)国際公開番号	WO2019/246315	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和1年12月26日(2019.12.26)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和4年6月17日(2022.6.17)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	62/687,191		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	平成30年6月19日(2018.6.19)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 飯田 貴敏
	米国(US)	(74)代理人	100181641
(31)優先権主張番号	62/702,567		弁理士 石川 大輔
(32)優先日	平成30年7月24日(2018.7.24)	(74)代理人	230113332
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ネオ抗原およびそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペプチド：MHC複合体に特異的なT細胞受容体（TCR）を含むT細胞の集団を調製する方法であって、

前記ペプチド：MHC複合体の前記ペプチドが、PGRPLQTHVLPEPHLALQPLQPHADHAHADAPAIQPVLWTTTPPLQHGHRRHGLEPCSMLTGPPARVPAPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC LCSNH（配列番号2）の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む変異型GATA3ペプチド配列であり、

前記方法が、前記変異型GATA3ペプチド配列を含むポリペプチドと免疫細胞の集団とを接触させること、または免疫細胞の集団において前記変異型GATA3ペプチド配列を含むポリペプチドを発現させることを含み；

前記免疫細胞の集団が、CD14およびCD25を発現する細胞の枯渇した免疫細胞の集団であり、前記免疫細胞の集団が、FMS様チロシンキナーゼ3受容体リガンド（FLT3L）で刺激された抗原提示細胞（APC）の集団とT細胞の集団とを含む、方法。

【請求項2】

前記方法が、CD14およびCD25を発現する免疫細胞の集団を枯渇させて、これにより、CD14およびCD25を発現する細胞の枯渇した前記免疫細胞の集団を生成することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記免疫細胞の集団が、末梢血単核細胞（P B M C）を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む前記ポリペプチドが、以下の配列：

(a) T L Q R S S L W C L (配列番号 3 7 5 3)、V L P E P H L A L (配列番号 3 7 5 4)、H V L P E P H L A L (配列番号 3 7 5 5)、A L Q P L Q P H A (配列番号 3 7 5 6)、A I Q P V L W T T (配列番号 3 7 5 7)、A P A I Q P V L W T T (配列番号 3 7 5 8)、S M L T G P P A R V (配列番号 3 7 5 9)、M L T G P P A R V (配列番号 3 7 6 0)、および／または Y M F L K A E S K I (配列番号 3 7 6 1)；ならびに／あるいは

(b) M F L K A E S K I (配列番号 3 7 6 2) および／または Y M F L K A E S K I (配列番号 3 7 6 3)

(c) V L W T T P P L Q H (配列番号 3 7 6 4)、Y M F L K A E S K (配列番号 3 7 6 5)、および／または K I M F A T L Q R (配列番号 3 7 6 6)；ならびに／あるいは

(d) F A T L Q R S S L (配列番号 3 7 6 7)、E P H L A L Q P L (配列番号 3 7 6 8)、Q P V L W T T P P L (配列番号 3 7 6 9)、G P P A R V P A V (配列番号 3 7 7 0)、M F A T L Q R S S L (配列番号 3 7 7 1)、K P K R D G Y M F (配列番号 3 7 7 2)、および／または K P K R D G Y M F L (配列番号 3 7 7 3)、ならびに／あるいは

(e) I M K P K R D G Y M (配列番号 3 7 7 4)、M F A T L Q R S S L (配列番号 3 7 7 5)、F L K A E S K I M F (配列番号 3 7 7 6)、L H F C R S S I M (配列番号 3 7 7 7)、E P H L A L Q P L (配列番号 3 7 7 8)、F A T L Q R S S L (配列番号 3 7 7 9)、E S K I M F A T L (配列番号 3 7 8 0)、F L K A E S K I M (配列番号 3 7 8 1)、および／または Y M F L K A E S K I (配列番号 3 7 8 2)

の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む前記ポリペプチドが、以下の配列：

(a) T L Q R S S L W C L (配列番号 3 7 8 3)、V L P E P H L A L (配列番号 3 7 8 4)、H V L P E P H L A L (配列番号 3 7 8 5)、A L Q P L Q P H A (配列番号 3 7 8 6)、A I Q P V L W T T (配列番号 3 7 8 7)、A P A I Q P V L W T T (配列番号 3 7 8 8)、S M L T G P P A R V (配列番号 3 7 8 9)、M L T G P P A R V (配列番号 3 7 9 0)、および／または Y M F L K A E S K I (配列番号 3 7 9 1)；ならびに／あるいは

(b) M F L K A E S K I (配列番号 3 7 9 2) および／または Y M F L K A E S K I (配列番号 3 7 9 3)；ならびに／あるいは

(c) V L W T T P P L Q H (配列番号 3 7 9 4)、Y M F L K A E S K (配列番号 3 7 9 5)、および／または K I M F A T L Q R (配列番号 3 7 9 6)；ならびに／あるいは

(d) F A T L Q R S S L (配列番号 3 7 9 7)、E P H L A L Q P L (配列番号 3 7 9 8)、Q P V L W T T P P L (配列番号 3 7 9 9)、G P P A R V P A V (配列番号 3 8 0 0)、M F A T L Q R S S L (配列番号 3 8 0 1)、K P K R D G Y M F (配列番号 3 8 0 2)、および／または K P K R D G Y M F L (配列番号 3 8 0 3)、ならびに／あるいは

(e) I M K P K R D G Y M (配列番号 3 8 0 4)、M F A T L Q R S S L (配列番号 3 8 0 5)、F L K A E S K I M F (配列番号 3 8 0 6)、L H F C R S S I M (配列番号 3 8 0 7)、E P H L A L Q P L (配列番号 3 8 0 8)、F A T L Q R S S L (配列番号 3 8 0 9)、E S K I M F A T L (配列番号 3 8 1 0)、F L K A E S K I M (配列番号 3 8 1 1)、および／または Y M F L K A E S K I (配列番号 3 8 1 2)

の少なくとも 2 つを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む前記ポリペプチドが、E S K I M F A T L Q

10

20

30

40

50

R S S L (配列番号 3 8 1 3)、K P K R D G Y M F L K A E S K I (配列番号 3 8 1 4)、S M L T G P P A R V P A V P F D L H (配列番号 3 8 1 5)、E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H (配列番号 3 8 1 6)、L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I (配列番号 3 8 1 7)、G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D (配列番号 3 8 1 8)、および K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H (配列番号 3 8 1 9) からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む前記ポリペプチドが、P G R P L Q T H V L P E P H L A L Q P L Q P H A D H A H A D A P A I Q P V L W T T P P L Q H G H R H G L (配列番号 3)、または E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H (配列番号 4) を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む前記ポリペプチドが、配列番号 2 を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ペプチド：M H C 複合体に特異的な T 細胞受容体 (T C R) を含む T 細胞の集団を含む組成物であって、

前記ペプチド：M H C 複合体の前記ペプチドが、P G R P L Q T H V L P E P H L A L Q P L Q P H A D H A H A D A P A I Q P V L W T T P P L Q H G H R H G L E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H (配列番号 2) の少なくとも 8 個の連続するアミノ酸を含む変異型 G A T A 3 ペプチド配列であり、

20

前記組成物が、C D 1 4 および C D 2 5 を発現する細胞の枯渇した免疫細胞の集団を含み、前記免疫細胞の集団が、F M S 様チロシンキナーゼ 3 受容体リガンド (F L T 3 L) で刺激された抗原提示細胞 (A P C) の集団を含む、組成物。

【請求項 10】

対象におけるがんの処置のための医薬の製造における、請求項 9 に記載の組成物の使用。

【請求項 11】

30

前記がんが乳がんであり；

必要に応じて、前記乳がんが再発または転移性乳がんであり；

必要に応じて、前記乳がんが抗エストロゲン療法に対して抵抗性である、M S I 乳がんである、転移性乳がんである、H e r 2 陰性乳がんである、H e r 2 陽性乳がんである、E R 陰性乳がんである、E R 陽性乳がん、P R 陽性乳がん、P R 陰性乳がんまたはこれらの任意の組合せである、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記対象が、C D K 4 / 6 阻害剤と組み合わせての内分泌療法後に疾患進行を経験したことがある；または前記対象が、以前に全身療法を受けたことがない、請求項 11 に記載の使用。

40

【請求項 13】

前記組成物が、少なくとも 1 つの追加の治療剤または治療法をさらに含む、請求項 9 ～ 12 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤または治療法が、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T 細胞、ベクター、A P C、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、抗 P D - 1 剤および抗 P D - L 1 剤、抗 C T L

50

A-4 剤、抗 CD40 剤、レトロゾール、フルベストラント、PI3 キナーゼ阻害剤、および／または CDK4／6 阻害剤である、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、パルボシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、セリシクリブ、ジナシクリブ、ミルシクリブ、ロニシクリブ、アツベシクリブ、ブリシクリブ、リビシクリブ、セリシクリブ、トリラシクリブ、ボルシクリブまたはこれらの任意の組合せである、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 17】

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、パルボシクリブ (PD0332991) ; アベマシクリブ (LY2835219) ; リボシクリブ (LEE 011) ; ボルシクリブ (P1446A-05) ; ファスカプリシン ; アルシリアフラビン ; 2-ブロモ-12, 13-ジヒドロ-5H-インドロ [2, 3-a] ピロロ [3, 4-c] カルバゾール-5, 7 (6H) -ジオン ; 3-アミノチオアクリドン (3-ATA) 、trans-4- ((6- (エチルアミノ) -2- ((1- (フェニルメチル) -1H-インドール-5-イル) アミノ) -4-ピリミジニル) アミノ) -シクロヘキサノ (CINK4) ; 1, 4-ジメトキシアクリジン-9 (10H) -チオン (NSC 625987) ; 2-メチル-5- (p-トリルアミノ) ベンゾ [d] チアゾール-4, 7-ジオン (リュウビジン) ; フラボピリドール (アルボシジブ) ; セリシクリブ ; ジナシクリブ ; ミルシクリブ ; ロニシクリブ ; アツベシクリブ ; ブリシクリブ ; リビシクリブ ; トリラシクリブ (G1T28) ; またはこれらの任意の組合せである、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコン C、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ (BYL719) 、ウムブラリシブ、(TGR1202) 、コパンリシブ (BAY80-6946) 、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ (SAR245409、XL765) 、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ (GDC-0941) 、XL147 (SAR245408) 、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477 または AEZS-13 である、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 19】

前記対象により発現される HLA アレルが、前記組成物による処置の時点で不明である、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 20】

対象におけるがんの処置のための、請求項 9 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本願は、2018 年 6 月 19 日に提出した米国特許仮出願第 62/687, 191 号、2018 年 7 月 24 日に提出した米国特許仮出願第 62/702, 567 号、2018 年 9 月 4 日に提出した米国特許仮出願第 62/726, 804 号、2019 年 1 月 7 日に提出した米国特許仮出願第 62/789, 162 号、2019 年 2 月 6 日に提出した米国特許仮出願第 62/801, 981 号、2019 年 2 月 4 日に提出した米国特許仮出願第 62/800, 700 号、および 2019 年 2 月 4 日に提出した米国特許仮出願第 62/800, 792 号の利益を主張するものであり、これらの出願の各々は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

がん免疫療法は、がんを処置するための免疫系の使用である。免疫療法は、がん細胞が、自体の表面に免疫系により検出され得る分子を有することが多いという事実を活用し、これらの分子は、腫瘍抗原として公知であり、タンパク質または他の巨大分子（例えば、炭水化物）であることが多い。能動免疫療法は、腫瘍抗原を標的化することにより腫瘍細胞を攻撃するように免疫系を方向付ける。受動免疫療法は、既存の抗腫瘍応答を増強するものであり、モノクローナル抗体、リンパ球およびサイトカインの使用を含む。腫瘍ワクチンは、腫瘍細胞を認識して溶解する抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）を誘導するために共に働く、腫瘍抗原および免疫刺激分子（例えば、アジュバント、サイトカインまたはTLRリガンド）で概して構成されている。根治的かつ腫瘍特異的な免疫療法の開発に対する深刻な障害の1つは、自己免疫を回避するための高特異的な限定された腫瘍抗原の同定および選択である。

10

【0003】

悪性細胞内の遺伝子変化（例えば、逆位、転座、欠失、ミスセンス突然変異、スプライス部位突然変異など）の結果として生じる腫瘍ネオ抗原は、腫瘍特異性が最も高い抗原クラスの代表であり、患者特異的であることもあり、または共有されることもある。腫瘍ネオ抗原は、突然変異およびその対応するタンパク質がその腫瘍にのみ存在するので、腫瘍細胞に特有である。それらはまた、中枢性寛容を回避し、したがって、免疫原性である可能性がより高い。したがって、腫瘍ネオ抗原は、体液性免疫と細胞免疫の両方によるものを含む免疫認識の優れた標的を提供する。しかし、腫瘍ネオ抗原は、それらの同定、最適化された抗原の選択、およびワクチンまたは免疫原性組成物に使用するためのネオ抗原の産生が技術的に困難であるため、がんワクチンまたは免疫原性組成物にはほとんど使用されていない。したがって、さらなるがん治療薬の開発が依然として必要とされている。

20

参照による組み込み

【0004】

本明細書で言及される全ての公表文献、特許および特許出願は、個々の公表文献、特許または特許出願各々が参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、（a）第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドもしくはその薬学的に許容される塩であって、（i）第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、（ii）第1の突然変異型GATA3ペプチド配列のC末端配列が、第2の突然変異型GATA3ペプチド配列のN末端配列とオーバーラップしており、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列：PGRPLQTHVLPEPHLALQPLQPHADHAHADAPAIQPVLWTTPLQHGRHGLEPCSMLTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH（配列番号2）の少なくとも1個のアミノ酸を含む、少なくとも1つのポリペプチドもしくはその薬学的に許容される塩、または（b）少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、医薬組成物が、本明細書で提供される。

30

40

【0006】

一部の実施形態では、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列は、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型ペプチド配列は、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。

【0007】

一部の実施形態では、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸は、配列：PG

50

R P L Q T H V L P E P H L A L Q P L Q P H A D H A H A D A P A I Q P V L W T T P
P L Q H G H R H G L (配列番号3) の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。

【0008】

一部の実施形態では、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸は、配列：E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H (配列番号4) の少なくとも1個のアミノ酸を含む。

【0009】

一部の実施形態では、第1の突然変異型G A T A 3ペプチド配列および第2の突然変異型G A T A 3ペプチド配列の少なくとも一方は、少なくとも14個の突然変異型アミノ酸を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、少なくとも3つの突然変異型G A T A 3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、少なくとも2つのポリペプチドを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、第3の突然変異型G A T A 3ペプチド配列をさらに含み、第3の突然変異型G A T A 3ペプチド配列は、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸は、配列番号2の配列の少なくとも1個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、第3のG A T A 3突然変異型ペプチドは、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。

【0010】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルおよび／またはH L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される少なくとも1つの突然変異型G A T A 3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、(a) H L A - A 0 2 : 0 1 アレルおよびH L A - A 2 4 : 0 2 アレル、(b) H L A - A 0 2 : 0 1 アレルおよびH L A - B 0 8 : 0 1 アレル、(c) H L A - A 2 4 : 0 2 アレルおよびH L A - B 0 8 : 0 1 アレル、または(d) H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレルおよびH L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される少なくとも1つの突然変異型G A T A 3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、(a) 第1の突然変異型G A T A 3ペプチド配列は、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルまたはH L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合し、または結合すると予測され；(b) 第2のG A T A 3ペプチド配列は、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルまたはH L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合し、または結合すると予測され；第1の突然変異型G A T A 3ペプチド配列は、第2の突然変異型G A T A 3ペプチド配列とは異なるH L A アレルによりコードされるタンパク質に結合する、または結合すると予測される。

【0011】

一部の実施形態では、第1の突然変異型G A T A 3ペプチド配列および第2の突然変異型G A T A 3ペプチド配列の少なくとも一方は、H L A アレルによりコードされるタンパク質に500nM未満の親和性で結合する。

【0012】

一部の実施形態では、第1の突然変異型G A T A 3ペプチド配列および第2の突然変異型ペプチド配列の少なくとも一方は、H L A アレルによりコードされるタンパク質に1時間より長く安定して結合する。

【0013】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、以下の配列：(a) T L Q R S S L W C L、V L P E P H L A L、H V L P E P H L A L、A L Q P L Q P H A、A I Q P V L W T T、A P A I Q P V L W T T、S M L T G P P A R V、M L T G P P A R V

、および／またはYMFLKAESKI、(b) MFLKAESKIおよび／またはYMFLKAESKI、(c) VLWTTPLQH、YMFLKAESKおよび／またはKIMFATLQR、(d) FATLQRSSL、EPHLALQPL、QPVLWTTPL、GPPARVPVAV、MFATLQRSSL、KPKRDGYMFおよび／またはKPKRDGYMFL、ならびに／あるいは(e) IMKPKRDGYM、MFATLQRSSL、FLKAESKIMF、LHFCRSSIM、EPHLALQPL、FATLQRSSL、ESKIMFATL、FLKAESKIMおよび／またはYMFLKAESKIのうちの少なくとも1つを含む。

【0014】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、以下の配列：(a) TLQRSSLWCL、VLPEPHLAL、HVLPEPHLAL、ALQPLQPHA、AIQPVLWTT、APAIQPVLWTT、SMLTGPPARV、MLTGPPARV、および／またはYMFLKAESKI、(b) MFLKAESKIおよび／またはYMFLKAESKI、(c) VLWTTPLQH、YMFLKAESKおよび／またはKIMFATLQR、(d) FATLQRSSL、EPHLALQPL、QPVLWTTPL、GPPARVPVAV、MFATLQRSSL、KPKRDGYMFおよび／またはKPKRDGYMFL、ならびに／あるいは(e) IMKPKRDGYM、MFATLQRSSL、FLKAESKIMF、LHFCRSSIM、EPHLALQPL、FATLQRSSL、ESKIMFATL、FLKAESKIMおよび／またはYMFLKAESKIのうちの少なくとも2つを含む。

【0015】

一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列は、(a) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(b)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(b) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(c)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(c) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(d)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(d) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(e) (b)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(c)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(f) (b)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(d)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(g) (b)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(h) (c)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(d)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；(i) (c)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列；または(j) (d)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。

【0016】

一部の実施形態では、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列、および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列は、表5および／または表6のペプチドを含む。一部の実施形態では、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列は、GATA3タンパク質の第1のネオエピトープを含み、第2のペプチド突然変異型GATA3ペプチド配列は、突然変異型GATA3タンパク質の第2のネオエピトープを含み、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列は、第2の突然変異型GATA3ペプチド配列とは異なり、第1のネオエピトープは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、第2のネオエピトープは、同じ突然変異型アミノ酸を含む。

【0017】

一部の実施形態では、少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々は、 $[Xaa]_F - [Xaa]_N - [Xaa]_C$ または $[Xaa]_N - [Xaa]_C - [Xaa]_F$ の式

10

20

30

40

50

で表され、式中、各 Xaa は、アミノ酸であり、 $[Xaa]_N$ および $[Xaa]_C$ 各々は、GATA3 遺伝子の異なる部分によりコードされるアミノ酸配列を含み、 $[Xaa]_F$ は、任意のアミノ酸配列であり、 $[Xaa]_N$ は、GATA3 遺伝子の非野生型リーディングフレームにコードされ、 $[Xaa]_C$ は、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、GATA3 遺伝子の非野生型リーディングフレームにコードされ、 N は、0～100の整数であり、 C は、1～100の整数であり、 F は、0～100の整数であり、 N と M の和は、少なくとも8である。

【0018】

一部の実施形態では、 $[Xaa]_F$ の各 Xaa は、リシン残基であり、 F は、1～100、1～10、9、8、7、6、5、4、3、2または1の整数である。一部の実施形態では、 F は、3、4または5である。

【0019】

一部の実施形態では、突然変異型 GATA3 ペプチド配列の各々は、少なくとも $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在する。一部の実施形態では、第1の突然変異型 GATA3 ペプチド配列および第2の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、表1または表2の配列を含む。一部の実施形態では、組成物は、免疫調節剤またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、ポリ I C L C である。

【0020】

一態様では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列を含む医薬組成物であって、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列が、E S K I M F A T L Q R S S L、K P K R D G Y M F L K A E S K I、S M L T G P P A R V P A V P F D L H、E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H、L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I、G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D、および K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H からなる群から選択される配列を含む、医薬組成物が提供される。

【0021】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、E S K I M F A T L Q R S S L である。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、K P K R D G Y M F L K A E S K I である。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、S M L T G P P A R V P A V P F D L H である。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H である。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I である。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D である。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型 GATA3 ペプチド配列は、K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H である。

【0022】

一部の実施形態では、医薬組成物は、0.1 mM～1 mM の濃度で存在する pH 調整剤を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、1 mM～10 mM の濃度で存在する pH 調整剤を含む。

【0023】

一態様では、GATA3 ペプチドを合成する方法であって、ペプチドが、 $Xaa-Cys$ 、 $Xaa-Ser$ 、および $Xaa-Thr$ （これらの式中の Xaa は、任意のアミノ酸である）からなる群から選択される少なくとも2個の連続するアミノ酸の配列を含み、（a）少なくとも1つのジペプチドまたはその誘導体を、GATA3 ペプチドまたはその誘導体のアミノ酸またはその誘導体とカップリングさせて、GATA3 ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを得るステップであって、ジペプチドまたはその誘導体が、シュードプロリン部分を含む、ステップ、（b）1つまたは複数の選択されたアミノ酸、小ペプチドまたはその誘導体を、GATA3 ペプチドまたはその誘導体を含有する

10

20

30

40

50

シュードプロリンとカップリングさせるステップ、および(c) GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを樹脂から切断するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを脱保護するステップを含む。

【0024】

一部の実施形態では、少なくとも1つのジペプチドまたはその誘導体がカップリングされるアミノ酸またはその誘導体は、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、Tyr、His、およびValからなる群から選択される。一部の実施形態では、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンと必要に応じてカップリングされる1つまたは複数の選択されたアミノ酸、小ペプチドまたはその誘導体は、Fmoc-Ala-OH・H₂O、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OMpe)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-His(Trt)-OHおよびFmoc-His(Boc)-OHを含む。

【0025】

一部の実施形態では、GATA3ペプチドまたはその誘導体のN末端アミノ酸またはその誘導体は、Fmoc-Ala-OH・H₂O、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OMpe)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-His(Trt)-OHおよびFmoc-His(Boc)-OHからなる群から選択される。

【0026】

一部の実施形態では、シュードプロリン部分は、(a) Fmoc-Ser(tBu)-Ser(ψ(Me, Me)pro)-OH、(b) Fmoc-Ala-Thr(ψ(Me, Me)pro)-OH、(c) Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(ψ(Me, Me)pro)-OH、(d) Fmoc-Leu-Thr(ψ(Me, Me)pro)-OH、(e) Fmoc-Leu-Cys(ψ(Dmp, H)pro)-OHである。一部の実施形態では、(a) Xaa-Serは、Ser-Serであり、(b) Xaa-Serは、Glu-Serであり、(c) Xaa-Thrは、Ala-Thrであり、(d) Xaa-Thrは、Leu-Thrであり、または(e) Xaa-Cysは、Leu-Cysである。

【0027】

一態様では、がんを有する対象を処置する方法であって、上記の態様のいずれか1つの医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0028】

一態様では、がんを有する対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、HLA-A*02:01アレル、HLA-A*24:02アレル、HLA-A*03:01アレル、HLA-B*07:02アレルおよび／またはHLA-B*08:01アレルによりコードされるタンパク質を発現する者として対象を同定するステップを含み；治療薬が、(a) 1つもしくは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチド

10

20

30

40

50

であって、1つもしくは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々が、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、がん細胞の G A T A 3 遺伝子の突然変異から生じる突然変異型 G A T A 3 タンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸の断片である、少なくとも1つのポリペプチド；または（b）少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み；1つもしくは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々またはその一部分が、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルおよび／もしくは H L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合するものである、方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、治療薬を対象に投与するステップをさらに含む。

【0029】

一態様では、がんを有する対象を処置する方法であって、医薬組成物を対象に投与するステップを含み；医薬組成物が、（a）第1の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列および第2の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、（i）第1の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列および第2の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、（i i）第1の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列のC末端配列が、第2の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列のN末端配列とオーバーラップしており、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列 P G R P L Q T H V L P E P H L A L Q P L Q P H A D H A H A D A P A I Q P V L W T T P P L Q H G H R H G L E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H（配列番号2）の少なくとも1個のアミノ酸を含む、少なくとも1つのポリペプチド；または（b）少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み；対象により発現される H L A アレルが投与の時点で不明である、方法が、本明細書で提供される。

【0030】

一部の実施形態では、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸は、配列：P G R P L Q T H V L P E P H L A L Q P L Q P H A D H A H A D A P A I Q P V L W T T P P L Q H G H R H G L E P C S M L T G P P A R V P A V P F D L H F C R S S I M K P K R D G Y M F L K A E S K I M F A T L Q R S S L W C L C S N H（配列番号2）の少なくとも1個のアミノ酸を含む。

【0031】

一部の実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣がん、肺がん、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、および慢性リンパ球性白血病（C L L）からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象は、抗エストロゲン療法に対して抵抗性である、M S I 乳がんである、転移性乳がんである、H e r 2 陰性乳がんである、H e r 2 陽性乳がんである、E R 陰性乳がんである、E R 陽性乳がんである、P R 陽性乳がんである、P R 陰性乳がんまたはこれらの任意の組合せである、乳がんを有する。

【0032】

一部の実施形態では、乳がんは、突然変異を有するエストロゲン受容体を発現する。一部の実施形態では、上記の態様の方法は、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法は、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T細胞、ベクター、およびA P C、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、抗P D - 1 剤および抗P D - L 1 剤、抗C T L A - 4 剤、抗C D 4 0 剤、レトロゾール、フルベストラント、P I 3 キナーゼ阻害剤、および／またはC D K 4 / 6 阻害剤である。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、パルボシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、セリシクリブ、ジナシクリブ、ミルシクリブ、ロニシクリブ、アツベシクリブ、ブリシクリブ、リビシクリブ、セリシクリブ、トリ

ラシクリブ、ボルシクリブまたはこれらの任意の組合せである。

【0033】

一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、パルボシクリブ（PD0332991）；アベマシクリブ（LY2835219）；リボシクリブ（LEE 011）；ボルシクリブ（P1446A-05）；ファスカプリシン；アルシリアフラビン；2-ブロモ-12, 13-ジヒドロ-5H-インドロ[2, 3-a]ピロロ[3, 4-c]カルバゾール-5, 7(6H)-ジオン；3-アミノチオアクリドン（3-ATA）、trans-4-((6-(エチルアミノ)-2-((1-(フェニルメチル)-1H-インドール-5-イル)アミノ)-4-ピリミジニル)アミノ)-シクロヘキサノ（CINK4）；1, 4-ジメトキシアクリジン-9(10H)-チオン（NSC 625987）；2-メチル-5-(p-トリルアミノ)ベンゾ[d]チアゾール-4, 7-ジオン（リュウビジン）；フラボピリドール（アルボシジブ）；セリシクリブ；ジナシクリブ；ミルシクリブ；ロニシクリブ；アツベシクリブ；ブリシクリブ；リビシクリブ；トリラシクリブ（G1T28）；またはこれらの任意の組合せである。

10

【0034】

一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパリリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウムブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477またはAEZS-136である。

20

【0035】

一部の実施形態では、がんは、再発または転移性乳がんである。一部の実施形態では、対象は、CDK4/6阻害剤と組み合わせての内分泌療法後に疾患進行を経験したことがある、または対象が、以前に全身療法を受けたことがない。一部の実施形態では、方法は、対象の細胞のエストロゲン受容体遺伝子の突然変異状態を判定するステップを含む。一部の実施形態では、細胞は、単離された細胞であるか、またはエストロゲン受容体の発現が増された細胞である。

30

【0036】

態様では、1つもしくは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、1つもしくは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、がん細胞のGATA3遺伝子の突然変異から生じる突然変異型GATA3タンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸の断片である、少なくとも1つのポリペプチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドを含む1つもしくは複数のAPCを含むか；またはHLAタンパク質との複合体を形成している、少なくとも1つのポリペプチドのネオエピトープに特異的なT細胞受容体（TCR）を含む、組成物が、本明細書で提供される。

40

【0037】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列は、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々は、配列番号1または2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。

【0038】

態様では、2つもしくはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、2つもしくはそれより多くの突然変異型GATA3

50

ペプチド配列の各々が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、第1のGATA3ペプチド配列のC末端配列が、第2のGATA3ペプチド配列のN末端配列とオーバーラップしている、少なくとも1つのポリペプチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドを含む1つもしくは複数のAPCを含むか；またはHLAタンパク質との複合体を形成している、少なくとも1つのポリペプチドのネオエピトープに特異的なT細胞受容体(TCR)を含む、組成物が、本明細書で提供される。

【0039】

一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列は、がん細胞のGATA3遺伝子のフレームシフト突然変異から生じる突然変異型GATA3タンパク質の断片を含む。一部の実施形態では、少なくとも8個の連続するアミノ酸は、GATA3ネオORF配列によりコードされる少なくとも1個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、がん細胞のGATA3遺伝子の突然変異は、フレームシフト突然変異である。一部の実施形態では、がん細胞のGATA3遺伝子の突然変異は、ミスセンス突然変異、スプライス部位突然変異、または遺伝子融合突然変異である。一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列の各々は、少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の突然変異型アミノ酸を含む。

【0040】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9または10の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、少なくとも2つのポリペプチドを含み、または少なくとも1つのポリヌクレオチドは、少なくとも2つのポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、1つもしくは複数のGATA3ペプチド配列の少なくとも1つ、または2つもしくはそれより多くのGATA3ペプチド配列のうちの少なくとも1つは、GATA3タンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、GATA3ペプチド配列のうちの少なくとも2つは、GATA3タンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。

【0041】

一部の実施形態では、GATA3ペプチド配列の各々は、GATA3タンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列のうちの少なくとも1つは、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列のうちの少なくとも3、4、5、6、7、8、9または10は、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列のうちのものの各々は、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列のうちの少なくとも1つは、配列番号3の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む。

【0042】

一部の実施形態では、少なくとも8個の連続するアミノ酸のうちの少なくとも1個は、配列番号4のアミノ酸である。一部の実施形態では、少なくとも8個の連続するアミノ酸のうちのある連続するアミノ酸は、配列番号4のアミノ酸でない。一部の実施形態では、

少なくとも1つのポリペプチドは、HLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B07:02アレルおよび／またはHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される少なくとも1つの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLA-A02:01アレルおよびHLA-A24:02アレル、HLA-A02:01アレルおよびHLA-B08:01アレル、HLA-A24:02アレルおよびHLA-B08:01アレル、またはHLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレルおよびHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される少なくとも1つの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。

10

【0043】

一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列は、HLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B07:02アレルまたはHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される第1の突然変異型GATA3ペプチド配列と、HLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B07:02アレルまたはHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される第2のGATA3ペプチド配列とを含み、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列は、第2の突然変異型GATA3ペプチド配列とは異なるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、または結合すると予測される。

20

【0044】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLAアレルによりコードされるタンパク質に10μM未満、1μM未満、500nM未満、400nM未満、300nM未満、250nM未満、200nM未満、150nM未満、100nM未満、または50nM未満の親和性で結合する、少なくとも1つの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLAアレルによりコードされるタンパク質に24時間より長く、12時間より長く、9時間より長く、6時間より長く、5時間より長く、4時間より長く、3時間より長く、2時間より長く、1時間より長く、45分より長く、30分より長く、15分より長く、または10分より長く安定して結合する、少なくとも1つの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、HLAアレルは、HLA-A02:01、HLA-A24:02、HLA-A03:01、HLA-B07:02、HLA-B08:01およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

30

【0045】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、以下の配列：TLQRSSLWCL、VLPEPHLAL、HVLPEPHLAL、ALQPLQPHA、AIQPVLTWT、APAIQPVLTWT、SMLTGPPARV、MLTGPPARV、および／またはYMFLKAESKI；および／またはMFLKAESKIおよび／またはYMFLKAESKI、VLWTTPLQH、YMFLKAESKおよび／またはKIMFATLQR；および／またはFATLQRSSL、EPHLALQPL、QPVLWTTPL、GPPARVPAV、MFATLQRSSL、KPKRDGYMFおよび／またはKPKRDGYMFLおよび／またはIMKPKRDGYM、MFATLQRSSL、FLKAESKIMF、LHFCRSSIM、EPHLALQPL、FATLQRSSL、ESKIMFATL、FLKAESKIMおよび／またはYMFLKAESKIのうちの少なくとも1つを含む。

40

【0046】

一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列は、以下の配列：TLQRSSLWCL、VLPEPHLAL、HVLPEPHLAL、ALQPLQPHA、AIQPVLTWT、APAIQPVLTWT、SMLTGPPAR

50

V、MLTGPPARV、および／またはYMFLKAESKI；および／またはMFLKAESKIおよび／またはYMFLKAESKI、VLWTTPLQH、YMFLKAESKおよび／またはKIMFATLQR；および／またはFATLQRSSL、EPHLALQPL、QPVLWTTPL、GPPARVPAV、MFATLQRSSL、KPKRDGYMFおよび／またはKPKRDGYMFLおよび／またはIMKPKRDGYM、MFATLQRSSL、FLKAESKIMF、LHFCRSSIM、EPHLALQPL、FATLQRSSL、ESKIMFATL、FLKAESKIMおよび／またはYMFLKAESKIのうちの少なくとも2つを含む。

【0047】

一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列は、以下の配列：EPCSM L TGPPARVP AVPFDLH、SMLTGPPARVP AVPFDLH、GPPARVP AVPFDLHF CRSSIMKPKRD、DLHF CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI、KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH、FLKAESKIMFATLQRS、およびKPKRDGYMFLKAESKIのうちの少なくとも2つを含む。

【0048】

一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列は、表5および／または表6の少なくとも2つの配列を含む。一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型GATA3ペプチド配列の第1の突然変異型GATA3ペプチド配列は、GATA3タンパク質の第1のネオエピトープを含み、第2のペプチド突然変異型GATA3ペプチド配列は、突然変異型GATAタンパク質の第2のネオエピトープを含み、第1の突然変異型GATA3ペプチド配列は、突然変異型GATA3ペプチド配列とは異なり、第1のネオエピトープは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、第2のネオエピトープは、同じ突然変異型アミノ酸を含む。

【0049】

態様では、1つまたは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを含む組成物であって、少なくとも1つのポリペプチドが、

【0050】

$[Xaa]_F - [Xaa]_N - [Xaa]_C$ の式で表され、式中、各Xaaは、独立して、任意のアミノ酸であり、 $[Xaa]_N - [Xaa]_C$ は、1つまたは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列を表し、 $[Xaa]_N$ および $[Xaa]_C$ 各々は、GATA3遺伝子の異なる部分によりコードされる連続するアミノ酸配列を含み、 $[Xaa]_N$ は、非野生型リーディングフレームにコードされ、 $[Xaa]_C$ は、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、非野生型リーディングフレームにコードされ、Nは、0～100の整数であり、Cは、1～100の整数であり、Fは、0～100の整数であり、NとMの和は、少なくとも8である組成物が、本明細書で提供される。

【0051】

一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列の各々について、少なくとも8個の連続するアミノ酸は、 $[Xaa]_F - [Xaa]_N - [Xaa]_C$ または $[Xaa]_N - [Xaa]_C - [Xaa]_F$ の式で表され、式中、各Xaaは、アミノ酸であり、 $[Xaa]_N$ および $[Xaa]_C$ 各々は、GATA3遺伝子の異なる部分によりコードされるアミノ酸配列を含み、 $[Xaa]_F$ は、任意のアミノ酸配列であり、 $[Xaa]_N$ は、GATA3遺伝子の非野生型リーディングフレームにコードされ、 $[Xaa]_C$ は、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、GATA3遺伝子の非野生型リーディングフレームにコードされ、Nは、0～100の整数であり、Cは、1～100の整数であり、Fは、0～100の整数であり、NとMの和は、少なくとも8である。一部の実施形態では、 $[Xaa]_F$ の各Xaaは、リシン残基であり、Fは、1～100、1～10、9、8、7、6、5、4、3、2または1の整数である。一部の実施形態では、Fは、3、4または5である。

【0052】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸は、少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続する突然変異型アミノ酸を含む。一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列の各々は、少なくとも $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $250\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または少なくとも $400\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在する。一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列の各々は、最大でも $5000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $2500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $750\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または最大でも $300\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でのみ存在する。一部の実施形態では、突然変異型GATA3ペプチド配列の各々は、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 5000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 4000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 3000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 2000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $25\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{mL}\sim 400\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または $3000\mu\text{g}/\text{mL}\sim 400\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在する。

【0053】

一部の実施形態では、組成物は、免疫調節剤またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、ポリICLCである。態様では、本明細書に記載の組成物と薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、 1mM 未満の濃度または 1mM より高い濃度で存在するpH調整剤を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、ワクチン組成物である。一部の実施形態では、医薬組成物は、水性である。

【0054】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドのうちの1つまたは複数は、 $pI > 5$ かつ $\text{HYDRO} > -6$ 、 $pI > 8$ かつ $\text{HYDRO} > -8$ 、 $pI < 5$ かつ $\text{HYDRO} > -5$ 、 $pI > 9$ かつ $\text{HYDRO} < -8$ 、 $pI > 7$ かつ $\text{HYDRO} \text{値} > -5.5$ 、 $pI < 4.3$ かつ $-4 \geq \text{HYDRO} \geq -8$ 、 $pI > 0$ かつ $\text{HYDRO} < -8$ 、 $pI > 0$ かつ $\text{HYDRO} > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $-4 \geq \text{HYDRO} \geq -8$ 、 $pI > 0$ かつ $\text{HYDRO} > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $\text{HYDRO} \leq -4$ 、 $pI > 0$ かつ $\text{HYDRO} > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $-4 \geq \text{HYDRO} \geq -9$ 、 $5 \geq pI \geq 12$ かつ $-4 \geq \text{HYDRO} \geq -9$ により限定される。

【0055】

一部の実施形態では、pH調整剤は、塩基である。一部の実施形態では、pH調整剤は、弱酸のコンジュゲート塩基である。一部の実施形態では、pH調整剤は、薬学的に許容される塩である。一部の実施形態では、pH調整剤は、ジカルボン酸塩またはトリカルボン酸塩である。一部の実施形態では、pH調整剤は、クエン酸および／またはクエン酸塩である。一部の実施形態では、クエン酸塩は、クエン酸二ナトリウムおよび／またはクエン酸三ナトリウムである。一部の実施形態では、pH調整剤は、コハク酸および／またはコハク酸塩である。一部の実施形態では、コハク酸塩は、コハク酸二ナトリウムおよび／またはコハク酸一ナトリウムである。一部の実施形態では、コハク酸塩は、コハク酸二ナトリウム・六水和物である。一部の実施形態では、pH調整剤は、 $0.1\text{mM}\sim 10\text{mM}$ の濃度で存在する。一部の実施形態では、pH調整剤は、 $0.1\text{mM}\sim 5\text{mM}$ の濃度で存在する。一部の実施形態では、pH調整剤は、 $0.1\text{mM}\sim 1\text{mM}$ の濃度で存在する。一部の実施形態では、pH調整剤は、 $1\text{mM}\sim 10\text{mM}$ の濃度で存在する。一部の実施形態では、pH調整剤は、 $1\text{mM}\sim 5\text{mM}$ の濃度で存在する。

【0056】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、液体を含む。一部の実施形態では、

10

20

30

40

50

薬学的に許容される担体は、水を含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、糖を含む。一部の実施形態では、糖は、デキストロースまたはマンニトールを含む。一部の実施形態では、デキストロースまたはマンニトールは、1～10% w/vの濃度で存在する。一部の実施形態では、糖は、トレハロースを含む。一部の実施形態では、糖は、スクロースを含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含む。

【0057】

一部の実施形態では、DMSOは、0.1%～10%、0.5%～5%、1%～5%、2%～5%、2%～4%、または2%～4%の濃度で存在する。一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含まない。一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥され得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、免疫調節物質またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、免疫調節物質またはアジュバントは、ポリICLC、1018ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、ARNAX、STINGアゴニスト、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune（Juvlmmune）、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタナイドIMS1312、モンタナイドISA206、モンタナイドISA50V、モンタナイドISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、Peptide（登録商標）、ベクター系、PLGA微小粒子、レシキモド、SRL172、ピロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、ベーターグルカン、Pam3Cys、およびAquilaのQS21 Stimulonからなる群から選択される。

【0058】

一部の実施形態では、免疫調節物質またはアジュバントは、ポリICLCを含む。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、2:1～1:10 v:vである。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、約1:1、1:1.5、1:2、1:3、1:4または1:5 v:vである。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、約1:3 v:vである。

【0059】

態様では、GATA3ペプチドを合成する方法であって、ペプチドが、Xaa-Cys、Xaa-Ser、およびXaa-Thr（これらの式中のXaaは、任意のアミノ酸である）からなる群から選択される少なくとも2個の連続するアミノ酸の配列を含み；少なくとも1つのジペプチドまたはその誘導体を、GATA3ペプチドまたはその誘導体のアミノ酸またはその誘導体とカップリングさせて、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを得るステップであって、ジペプチドまたはその誘導体が、シュードプロリン部分を含む、ステップ；1つまたは複数の選択されたアミノ酸、小ペプチドまたはその誘導体を、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンとカップリングさせるステップ；およびGATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを樹脂から切断するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0060】

一部の実施形態では、方法は、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを脱保護するステップをさらに含む。一部の実施形態では、GATA3ペプチドは、本明細書に記載の組成物のまたは本明細書における医薬組成物の少なくとも1つのポリペプチドのペプチドである。一部の実施形態では、GATA3ペプチドまたはその誘導体のN末端アミノ酸またはその誘導体は、樹脂に結合されている。一部の実施形態では、樹脂は、Wang樹脂または2-クロロトリチル樹脂（2-Cl-Trt樹脂）である。一部の実施形態では、カップリングの出発材料は、Fmoc-His(Trt)-Wang樹脂、H-His(Trt)-2-Cl-Trt樹脂、Fmoc-Asp(OtBu)

－Wang樹脂、Fmoc－Ile－Wang樹脂、Fmoc－Ser(tBu)－Wang樹脂、またはFmoc－Leu－Wang樹脂である。一部の実施形態では、少なくとも1つのジペプチドまたはその誘導体がカップリングされるアミノ酸またはその誘導体は、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、Tyr、His、およびValからなる群から選択される。

【0061】

一部の実施形態では、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンと必要に応じてカップリングされる1つまたは複数の選択されたアミノ酸、小ペプチドまたはその誘導体は、Fmoc－Ala－OH・H₂O、Fmoc－Cys(Trt)－OH、Fmoc－Asp(OtBu)－OH、Fmoc－Asp(OMpe)－OH、Fmoc－Glu(OtBu)－OH、Fmoc－Phe－OH、Fmoc－Gly－OH、Fmoc－Ile－OH、Fmoc－Lys(Boc)－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Met－OH、Fmoc－Asn(Trt)－OH、Fmoc－Pro－OH、Fmoc－Gln(Trt)－OH、Fmoc－Arg(Pbf)－OH、Fmoc－Ser(tBu)－OH、Fmoc－Thr(tBu)－OH、Fmoc－Trp(Boc)－OH、Fmoc－Tyr(tBu)－OH、Fmoc－Val－OH、Fmoc－His(Trt)－OHおよびFmoc－His(Boc)－OHを含む。

【0062】

一部の実施形態では、GATA3ペプチドまたはその誘導体のN末端アミノ酸またはその誘導体は、Fmoc－Ala－OH・H₂O、Fmoc－Cys(Trt)－OH、Fmoc－Asp(OtBu)－OH、Fmoc－Asp(OMpe)－OH、Fmoc－Glu(OtBu)－OH、Fmoc－Phe－OH、Fmoc－Gly－OH、Fmoc－Ile－OH、Fmoc－Lys(Boc)－OH、Fmoc－Leu－OH、Fmoc－Met－OH、Fmoc－Asn(Trt)－OH、Fmoc－Pro－OH、Fmoc－Gln(Trt)－OH、Fmoc－Arg(Pbf)－OH、Fmoc－Ser(tBu)－OH、Fmoc－Thr(tBu)－OH、Fmoc－Trp(Boc)－OH、Fmoc－Tyr(tBu)－OH、Fmoc－Val－OH、Fmoc－His(Trt)－OHおよびFmoc－His(Boc)－OHからなる群から選択される。

【0063】

一部の実施形態では、シュードプロリン部分は、Fmoc－Ser(tBu)－Ser(psi(Me, Me)pro)－OHである。一部の実施形態では、シュードプロリン部分は、Fmoc－Ala－Thr(psi(Me, Me)pro)－OHである。一部の実施形態では、シュードプロリン部分は、Fmoc－Glu(OtBu)－Ser(psi(Me, Me)pro)－OHである。一部の実施形態では、シュードプロリン部分は、Fmoc－Leu－Thr(psi(Me, Me)pro)－OHである。一部の実施形態では、シュードプロリン部分は、Fmoc－Leu－Cys(psi(Dmp, H)pro)－OHである。

【0064】

一部の実施形態では、Xaa－Serは、Ser－Serである。一部の実施形態では、Xaa－Serは、Glu－Serである。一部の実施形態では、Xaa－Thrは、Ala－Thrである。一部の実施形態では、Xaa－Thrは、Leu－Thrである。一部の実施形態では、Xaa－Cysは、Leu－Cysである。

【0065】

態様では、がんを有する対象を処置する方法であって、本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0066】

態様では、がんを有する対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、HLA－A02：01アレル、HLA－A24：02アレル、HLA－A03：01アレル、HLA－B07：02アレルおよび／またはHLA－B08：01アレルによりコードされる

10

20

30

40

50

タンパク質を発現する者として対象を同定するステップを含み；治療薬が、1つもしくは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、1つもしくは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々が、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、がん細胞の G A T A 3 遺伝子の突然変異から生じる突然変異型 G A T A 3 タンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸の断片である、少なくとも1つのポリペプチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドを含む1つもしくは複数の A P C を含むか；または H L A タンパク質との複合体を形成している、少なくとも1つのポリペプチドのネオエピトープに特異的な T 細胞受容体 (T C R) を含み；1つまたは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々またはその一部分が、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルおよび／または H L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合するものである、方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、方法は、治療薬を対象に投与するステップをさらに含む。

【0067】

態様では、がんを有する対象を処置する方法であって、組成物を対象に投与するステップを含み；組成物が、1つもしくは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、1つもしくは複数の突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々が、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、がん細胞の G A T A 3 遺伝子の突然変異から生じる突然変異型 G A T A 3 タンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸の断片である、少なくとも1つのポリペプチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むか；少なくとも1つのポリペプチドを含む1つもしくは複数の A P C を含むか；または H L A タンパク質との複合体を形成している、少なくとも1つのポリペプチドのネオエピトープに特異的な T 細胞受容体 (T C R) を含み；突然変異型 G A T A 3 ペプチドまたはその一部分が、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルおよび／または H L A - B 0 8 : 0 1 アレルによりコードされるタンパク質に結合し；対象が、H L A - A 0 2 : 0 1 アレル、H L A - A 2 4 : 0 2 アレル、H L A - A 0 3 : 0 1 アレル、H L A - B 0 7 : 0 2 アレルおよび／または H L A - B 0 8 : 0 1 アレルを発現すると同定される、方法が、本明細書で提供される。

【0068】

態様では、がんを有する対象を処置する方法であって、組成物を対象に投与するステップを含み、組成物が、2つもしくはそれより多くの突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、2つもしくはそれより多くの突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列の各々が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、第1の G A T A 3 ペプチド配列の C 末端が、第2の G A T A 3 ペプチド配列の N 末端とオーバーラップしている、少なくとも1つのポリペプチド；少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド；少なくとも1つのポリペプチドを含む1つもしくは複数の A P C ；または H L A タンパク質との複合体を形成している、少なくとも1つのポリペプチドのネオエピトープに特異的な T 細胞受容体 (T C R) を含み、対象により発現される H L A アレルが投与の時点で不明である方法が、本明細書で提供される。

【0069】

一部の実施形態では、免疫応答が対象において惹起される。一部の実施形態では、免疫応答は、体液性応答である。一部の実施形態では、突然変異型 G A T A 3 ペプチド配列は、同時に、別々にまたは逐次的に投与される。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第2のペプチドが第2の T 細胞を活性化するのに十分な期間の後、逐次的に投与される。一部の実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣がん、肺がん、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、および慢性リンパ球性白血病 (C L L) からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象は、抗エストロゲン療法に対して抵抗性である、M S I 乳

がんである、転移性乳がんである、Her2陰性乳がんである、Her2陽性乳がんである、ER陰性乳がんである、ER陽性乳がんである、PR陽性乳がんである、PR陰性乳がんまたはこれらの任意の組合せである、乳がんを有する。一部の実施形態では、乳がんは、突然変異を有するエストロゲン受容体を発現する。一部の実施形態では、方法は、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法を投与するステップをさらに含む。

【0070】

一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法は、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T細胞、ベクター、およびAPC、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、抗PD-1剤および抗PD-L1剤、抗CTLA-4剤、抗CD40剤、レトロゾール、フルベストラント、および／またはCDK4／6阻害剤である。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、パルボシクリブ（PD0332991）；アベマシクリブ（LY2835219）；リボシクリブ（LEE 011）；ボルシクリブ（P1446A-05）；ファスカプリシン；アルシリアフラビン；2-ブプロモ-12，13-ジヒドロ-5H-インドロ[2，3-a]ピロロ[3，4-c]カルバゾール-5，7（6H）-ジオン；3-アミノチオアクリドン（3-ATA）、trans-4-（（6-（エチルアミノ）-2-（（1-（フェニルメチル）-1H-インドール-5-イル）アミノ）-4-ピリミジニル）アミノ）-シクロヘキサノ（CINK4）；1，4-ジメトキシアクリジン-9（10H）-チオン（NSC 625987）；2-メチル-5-（p-トリルアミノ）ベンゾ[d]チアゾール-4，7-ジオン（リュウビジン）；およびフラボピリドール（アルボシジブ）；セリシクリブ；ジナシクリブ；ミルシクリブ；ロニシクリブ；アツベシクリブ；ブリシクリブ；リビシクリブ；トリラシクリブ（G1T28）；およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0071】

一部の実施形態では、追加の治療剤は、突然変異型GATA3ペプチド配列の投与の前に、投与と同時に、または投与の後に投与される。一部の実施形態では、投与するステップは、皮下投与または静脈内投与を含む。一部の実施形態では、がんは、再発または転移性乳がんである。一部の実施形態では、対象は、CDK4／6阻害剤と組み合わせての内分泌療法後に疾患進行を経験したことがある対象である。

【0072】

CLLおよびある特定のリンパ腫によく見られる突然変異は、BTK（ブルトン型チロシンキナーゼ）遺伝子の481位におけるシステインからセリンへの変化（C481S）である。突然変異は、アミノ酸配列：

【化1】

IFIITEYMANGSLLNYLREMRHR

を有する領域内にあり、突然変異したセリンには下線が付けられている。この変化は、様々なHLA分子に結合する多数の結合ペプチドを生じさせる。

【0073】

一態様では、C481S突然変異型BTKタンパク質からの1つまたは複数の突然変異型BTKペプチド配列を含む、ポリペプチドを含む組成物であって、1つまたは複数の突然変異型BTKペプチド配列が、突然変異型BTKタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、ペプチドのアミノ酸配列が、表34に記載されている、ANGSLLNY；ANGSLLNYL；ANGSLLNYLR；EYMANGSL；EYMANGSLLN；EYMANGSLLNY；GSLLNYLR；GSLLNYLREM；ITEYMANGS；ITEYMANGSL；ITEYMANGSLL；MANGSLLNYL；MANGSLLNYLR；NGSLLNYL；NGSLLNYL；SLLNYLREMR；TEYMANGSLL；TEYMANGSLLNY；YMANGSLL；またはYMANGSLLNである、組成物が、本明細書で提供される。

【0074】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型BTKペプチド配列は、(a) ANGSL LNYを含み、HLA-A36:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(b) ANGSL LNY Lを含み、HLA-C15:02、HLA-C08:01、HLA-C06:02、HLA-A02:04、HLA-C12:02、HLA-B44:02、HLA-C17:01およびHLA-B38:01からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(c) ANGSL LNY LRを含み、HLA-A74:01アレルもしくはHLA-A31:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(d) EYMANGSLを含み、HLA-C14:02、HLA-C14:03およびHLA-A24:02からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(e) EYMANGSL LNを含み、HLA-A24:02アレルもしくはHLA-A23:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(f) EYMANGSL LNYを含み、HLA-A29:02アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(g) GSL LNY LRを含み、HLA-A31:01アレルもしくはHLA-A74:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(h) GSL LNY LREMを含み、HLA-B58:02アレルもしくはHLA-B57:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(i) ITEYMANGSを含み、HLA-A01:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(j) ITEYMANGSLを含み、HLA-A01:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(k) ITEYMANGSL Lを含み、HLA-A01:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(l) MANGSL LNY Lを含み、HLA-C17:01、HLA-C02:02、HLA-B35:01、HLA-C03:03、HLA-C08:01、HLA-B35:03、HLA-C12:02、HLA-C01:02、HLA-C03:04およびHLA-C08:02からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(m) MANGSL LNY LRを含み、HLA-A33:03アレルもしくはHLA-A74:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(n) NGSL LNY Lを含み、HLA-B14:02アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(o) NGSL LNY Lを含み、HLA-A68:01、HLA-A33:03、HLA-A31:01およびHLA-A74:01からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(p) SLLNY LREMRを含み、HLA-A74:01アレルもしくはHLA-A31:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(q) TEYMANGSL Lを含み、HLA-B40:01、HLA-B44:03、HLA-B49:01、HLA-B44:02およびHLA-B40:02からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(r) TEYMANGSL LNYを含み、HLA-B44:03アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、(s) YMANGSL Lを含み、HLA-B15:09、HLA-C03:04、HLA-C03:03、HLA-C17:01、HLA-C03:02、HLA-C14:03、HLA-C14:02、HLA-C04:01、HLA-C02:02、HLA-A01:01からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測されるか、または(t) YMANGSL LNを含み、HLA-A29:02アレルもしくはHLA-A01:01アレルによりコードされるタンパク質に結合する、もしくは結合すると予測される。

10

20

30

40

50

【0075】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型BTKペプチド配列は、HLAタンパク質との複合体を形成しているコグネイトT細胞受容体に特異的である。一部の実施形態では、組成物は、2つまたはそれより多くの突然変異型BTKペプチド配列を含む。

【0076】

一態様では、C481S突然変異型BTKタンパク質からの少なくとも8個の連続するアミノ酸を各々が有する1つまたは複数の突然変異型BTKペプチド配列であって、表34から選択される、1つまたは複数の突然変異型BTKペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを含む、組成物であって、突然変異型BTKペプチド配列のN末端またはC末端に連結されている、突然変異型BTKタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基をさらに含み、3個またはそれより多くのアミノ酸残基が、細胞内の突然変異型BTKペプチド配列のプロセッシングを増強する、および／または突然変異型BTKペプチド配列のエピトープの提示を増強する、組成物が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、突然変異型BTKタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基は、CMV-pp65、HIV、MART-1または非ウイルス性、非BTK内在性ペプチドからのアミノ酸配列を含む。

10

【0077】

一部の実施形態では、突然変異型BTKタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個のアミノ酸を含む。

20

【0078】

一部の実施形態では、突然変異型BTKタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基は、最大でも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90または100個のアミノ酸のみを含む。

【0079】

一態様では、式(N末端Xaa)_N-(Xaa_{BTK})_P-(Xaa-C末端)_C(式中、Pは、7より大きい整数であり；(Xaa_{BTK})_Pは、C481S突然変異型アミノ酸を含む突然変異型BTKタンパク質の配列IFIITEYMANGSLLNYLREMRHRから選択される少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む突然変異型BTKペプチド配列であり；Nは、(i)0であるか、または(ii)2より大きい整数であり；(N末端Xaa)_Nは、突然変異型BTKタンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり；Cは、(i)0であるか、または(ii)2より大きい整数であり；(Xaa-C末端)_Cは、突然変異型BTKタンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり；およびNとCの両方が0である)の少なくとも1つのポリペプチドを含む組成物が、本明細書で提供される。

30

【0080】

一部の実施形態では、(N末端Xaa)_Nおよび／または(Xaa-C末端)_Cは、CMV-pp65、HIV、MART-1または非ウイルス性、非BTK内在性タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列を含む。

40

【0081】

一部の実施形態では、Nおよび／またはCは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40より大きい整数である。

【0082】

一部の実施形態では、Nおよび／またはCは、5、6、7、8、9、10、11、12

50

、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90または100未満の整数である。一部の実施形態では、Nが0である、請求項8～10のいずれか一項に記載の組成物。一部の実施形態では、Cが0である、8～10。

【0083】

一態様では、請求項1に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物が、本明細書で提供される。一態様では、組成物は、上記のならびに表34および36に記載の突然変異型BTKペプチドのいずれかについての1つまたは複数のペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9または10の突然変異型BTKペプチド配列を含む。一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列のうちの少なくとも1つは、突然変異型BTKタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列のうちの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10は、突然変異BTKタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列の各々、または2つもしくはそれより多くのBTKペプチド配列の各々は、突然変異型BTKタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、表35に記載されているHLAアレルによりコードされるタンパク質に150nMもしくはそれ未満の親和性および／または2時間もしくはそれより長い半減期で結合するまたは結合すると予測される、少なくとも1つの突然変異型BTKペプチド配列を含む。一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列は、(a)表34から選択される第1の突然変異型BTKペプチド配列であって、HLAアレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される第1の突然変異型BTKペプチド配列と、(b)C481S突然変異を有する第2のBTKペプチドとを含み、第1の突然変異型BTKペプチド配列と第2の突然変異型BTKペプチド配列は、非同一である。

【0084】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLAアレルによりコードされるタンパク質に10μM未満、1μM未満、500nM未満、400nM未満、300nM未満、250nM未満、200nM未満、150nM未満、100nM未満、または50nM未満の親和性で結合する、少なくとも1つの突然変異型BTKペプチド配列を含む。

【0085】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLAアレルによりコードされるタンパク質に24時間より長く、12時間より長く、9時間より長く、6時間より長く、5時間より長く、4時間より長く、3時間より長く、2時間より長く、1時間より長く、45分より長く、30分より長く、15分より長く、または10分より長く安定して結合する、少なくとも1つの突然変異型BTKペプチド配列を含む。

【0086】

一部の実施形態では、(N末端Xaa)_Nは、IDIIIMKIRNA、FFFFFFF
FFFFFFF FFFIFFFWMC、FFFFFFF FFFIFFFW、
FFFFFFFAAFWW、IFFIFFIFFFFFFFFF FFFIFFIIII

10

20

30

40

50

IIWEC、FIIFFFFIIFFFFFIIFFFFFIIFIIIIIIFWEC、TEY、WQAGILAR、HSYTAE、PLTEEKIK、GALHFKPGSR、RRANKDATAE、KAFISHEEKR、TDLSSRFSSKS、FDLGGGTFDV、CLLLHYSVSK、またはMTEYKLVVVのアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、(C末端Xaa)_cは、KKNKKDDIKD、AGNDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDKKDKDDDDDD、AGNKKKKKKKKNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN、AGRDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD、GKSALTIQL、GKSALTI、QGQNLKYQ、ILGVLLLI、EKEGKISK、AASDFIFLVT、KELKQVASPF、KKKLINEKKE、KKCDISLQFF、KSTAGDTHLG、ATFYVAVTVP、LTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDG、またはTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGEのアミノ酸配列を含む。

10

【0087】

一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列のうちの少なくとも1つは、対象のがん細胞のゲノムによりコードされない突然変異型アミノ酸を含む。

【0088】

一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列の各々は、少なくとも1 μg/mL、少なくとも10 μg/mL、少なくとも25 μg/mL、少なくとも50 μg/mL、または少なくとも100 μg/mLの濃度で存在する。一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列の各々は、最大でも5000 μg/mL、最大でも2500 μg/mL、最大でも1000 μg/mL、最大でも750 μg/mL、最大でも500 μg/mL、最大でも400 μg/mL、または最大でも300 μg/mLの濃度でのみ存在する。一部の実施形態では、突然変異型BTKペプチド配列の各々は、10 μg/mL～5000 μg/mL、10 μg/mL～4000 μg/mL、10 μg/mL～3000 μg/mL、10 μg/mL～2000 μg/mL、10 μg/mL～1000 μg/mL、25 μg/mL～500 μg/mL、または50 μg/mL～300 μg/mLの濃度で存在する。一部の実施形態では、組成物は、免疫調節剤またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、ポリICLCである。

20

【0089】

一態様では、(a) 上記の組成物と(b) 薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、医薬組成物は、pH調整剤をさらに含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、ワクチン組成物である。一部の実施形態では、医薬組成物は、水性である。一部の実施形態では、医薬組成物は、(a) $pI > 5$ かつ $HYDRO > -6$ 、(b) $pI > 8$ かつ $HYDRO > -8$ 、(c) $pI < 5$ かつ $HYDRO > -5$ 、(d) $pI > 9$ かつ $HYDRO < -8$ 、(e) $pI > 7$ かつ $HYDRO$ 値 > -5.5 、(f) $pI < 4.3$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -8$ 、(g) $pI > 0$ かつ $HYDRO < -8$ 、 $pI > 0$ かつ $HYDRO > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -8$ 、(h) $pI > 0$ かつ $HYDRO > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $HYDRO \leq -4$ 、(i) $pI > 0$ かつ $HYDRO > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -9$ 、(j) $5 \geq pI \geq 12$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -9$ により限定される少なくとも1つのポリペプチドのうちの1つまたは複数を含む。

30

40

【0090】

一部の実施形態では、pH調整剤は、塩基である。一部の実施形態では、pH調整剤は、弱酸のコンジュゲート塩基である。一部の実施形態では、pH調整剤は、薬学的に許容される塩である。一部の実施形態では、pH調整剤は、ジカルボン酸塩またはトリカルボン酸塩である。一部の実施形態では、pH調整剤は、クエン酸および/またはクエン酸塩である。一部の実施形態では、クエン酸塩は、クエン酸二ナトリウムおよび/またはクエン酸三ナトリウムである。一部の実施形態では、pH調整剤は、コハク酸および/またはコハク酸塩である。一部の実施形態では、コハク酸塩は、コハク酸二ナトリウムおよび/またはコハク酸一ナトリウムである。一部の実施形態では、コハク酸塩は、コハク酸二ナ

50

トリウム・六水和物である。一部の実施形態では、pH調整剤は、0.1mM～1mMの濃度で存在する。一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、液体を含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、水を含む。

【0091】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、糖を含む。一部の実施形態では、糖は、デキストロースを含む。一部の実施形態では、デキストロースは、1～10% w/vの濃度で存在する。一部の実施形態では、糖は、トレハロースを含む。一部の実施形態では、糖は、スクロースを含む。

【0092】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチルスルホキシド (DMSO) 10を含む。一部の実施形態では、DMSOは、0.1%～10%、0.5%～5%、または1%～3%の濃度で存在する。一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチルスルホキシド (DMSO) を含まない。一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥され得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、免疫調節物質またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、免疫調節物質またはアジュバントは、ポリICLC、1018ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870、893、CpG7909、CyaA、ARNAX、STINGアゴニスト、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタナイドIMS1312、モンタナイドISA20 206、モンタナイドISA50V、モンタナイドISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel（登録商標）、ベクター系、PLGA微小粒子、レシキモド、SRL172、ビロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、ベターグルカン、Pam3Cys、およびAquilaのQS21 Stimulonからなる群から選択される。

【0093】

一部の実施形態では、免疫調節物質またはアジュバントは、ポリICLCを含む。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、2:1～1:10 v:vである。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、約1:1、1:2、1:3、1:4または1:5 v:vである。一部の実施形態 30では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、約1:3 v:vである。

【0094】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、上記の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0095】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、それを必要とする対象に表34、36または37の左側の列から選択される配列を有するペプチドを含む組成物を投与するステップを含み、対象が、表中のペプチドに対応する右側の列に収載されているHLAアレルのいずれか1つによりコードされるタンパク質を発現する、方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、本発明は、対象のがんを処置する方法であって、それを必要 40とする対象に、1つもしくは複数の突然変異型BTKペプチドを含む組成物、または1つもしくは複数の突然変異型BTKペプチドをコードする1つもしくは複数の核酸を含む組成物を投与するステップを含み、各突然変異型BTKペプチドが、突然変異C481Sを含む突然変異型BTKタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、1つまたは複数のペプチドのうちの少なくとも1つが、対象により発現される、表34、36または37に収載されているHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合するものである、方法を提供する。一部の実施形態では、ペプチドは、HLAタンパク質に150nMもしくはそれ未満の親和性および／または2時間もしくはそれより長い半減期で結合する。

【0096】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、それを必要とする対象に、第1およ

10

20

30

40

50

び第2のペプチド、または第1および第2のペプチドをコードする核酸を投与するステップを含み、第1のペプチドが、表34、36または37から選択されるアミノ酸配列を有し、第2のペプチドが、表34、36または37のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を有する、方法が、本明細書で提供される。

【0097】

一部の実施形態では、免疫応答が対象において惹起される。一部の実施形態では、免疫応答は、体液性応答である。

【0098】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型BTKペプチドは、同時に、別々にまたは逐次的に投与される。

【0099】

一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチドが第2のT細胞を活性化するのに十分な期間の後、逐次的に投与される。

【0100】

一部の実施形態では、がんは、ある特定の種類のリンパ腫およびある特定の種類の白血病からなる群から選択される。一部の実施形態では、がんは、急性リンパ性白血病（ALL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、慢性リンパ球性リンパ腫またはB細胞非ホジキンリンパ腫である。

【0101】

一部の実施形態では、方法は、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法を投与するステップをさらに含む。

【0102】

一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法は、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T細胞、ベクター、およびAPC、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである。

【0103】

一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、抗PD-1剤および抗PD-L1剤、抗CTLA-4剤、または抗CD40剤である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、突然変異型BTKペプチド配列の投与の前に、投与と同時に、または投与の後に投与される。

【0104】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、（a）対象により発現される第1のタンパク質を同定するステップであって、第1のタンパク質が、対象の第1のHLAアレルによりコードされ、第1のHLAアレルが、表34、37または38のもののいずれか1つで提供されるHLAアレルである、ステップ；（b）（i）表34、36もしくは37のもののいずれか1つに従って提供される第1のHLAアレルに対するペプチドである第1の突然変異型BTKペプチドまたは（ii）第1の突然変異型BTKペプチドをコードするポリ核酸を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0105】

一態様では、がんを有する対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、表34、36または37のうちの1つのHLAによりコードされるタンパク質を発現する対象として対象を同定するステップを含み、治療剤が、突然変異型BTKペプチド、または突然変異型BTKペプチドをコードする核酸であり、突然変異型BTKペプチドが、C481に突然変異を含む突然変異型BTKタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、ペプチドが、（i）C481Sの突然変異を含み、（ii）表34、36または37のいずれか1つのペプチドの配列を含み、（iii）表34、36または37のいずれか1つのHLAによりコードされる対応するタンパク質に結合するものである、方法が、本明細書で提供される。

【0106】

10

20

30

40

50

一部の態様では、T790M突然変異型EGFRタンパク質からの1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列を含むポリペプチドを含む組成物であって、1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列が、LIMQLMPF、TVQLIMQL、TSTVQLIMQL、TVQLIMQLM、VQLIMQLM、STVQLIMQL、およびLSTTVQLIMからなる群から選択される少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む、組成物が、本明細書で提供される。

【0107】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列は、HLAタンパク質との複合体を形成しているコグネイトT細胞受容体に特異的である。

【0108】

一部の実施形態では、組成物は、2つまたは3つまたはそれより多くの突然変異型EGFRペプチド配列の混合物を含む。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10の突然変異型EGFRペプチド配列を含む。一部の実施形態では、突然変異型EGFRタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸。

【0109】

一部の態様では、T790M突然変異型EGFRタンパク質からの1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列であって、LIMQLMPF、TVQLIMQL、TSTVQLIMQL、TVQLIMQLM、VQLIMQLM、STVQLIMQLおよびLSTTVQLIMからなる群から選択される少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む、1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを含む、組成物であって、突然変異型EGFRペプチド配列のN末端またはC末端に連結されている、突然変異型EGFRタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基をさらに含み、3個またはそれより多くのアミノ酸残基が、細胞内の突然変異型EGFRペプチド配列のプロセッシングを増強する、および／または突然変異型EGFRペプチド配列のエピトープの提示を増強する、組成物が、本明細書で提供される。

【0110】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基は、CMV-pp65、HIV、MART-1または非ウイルス性、非EGFR内在性ペプチドからのアミノ酸配列を含む。

【0111】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個のアミノ酸を含む。

【0112】

一部の実施形態では、2つまたはそれより多くの突然変異型EGFRペプチド配列のN末端またはC末端に連結されている、突然変異型EGFRタンパク質とは異種である3個またはそれより多くのアミノ酸残基は、最大でも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90または100個のアミノ酸のみを含む。

【0113】

一部の実施形態では、(Xaa-C末端)_cは、突然変異型EGFRタンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり、NとCの両方が0でない。

【0114】

一部の実施形態では、(N末端Xaa)_Nおよび／または(Xaa-C末端)_cは、C

10

20

30

40

50

MV-pp65、HIV、MART-1または非ウイルス性、非EGFR内在性タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列を含む。

【0115】

一部実施形態では、Nおよび／またはCは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40より大きい整数である。

【0116】

一部の実施形態では、Nおよび／またはCは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90または100未満の整数である。一部の実施形態では、nは、0である。一部の実施形態では、Cは、0である。

10

【0117】

一態様では、上記のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物が、本明細書で提供される。一実施形態では、組成物は、本明細書で開示される1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0118】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列を含む組成物は、表40A～40Dから選択される1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチドをさらに含む。

20

【0119】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9または10の突然変異型EGFRペプチド配列を含む。

【0120】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列のうちの少なくとも1つは、突然変異型EGFRタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列のうちの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10は、突然変異EGFRタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列の各々、または2つもしくはそれより多くのEGFRペプチド配列の各々は、突然変異型EGFRタンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続するアミノ酸を含む。

30

【0121】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、表41に収載されているHLAアレルによりコードされるタンパク質に150nMもしくはそれ未満の親和性および／または2時間もしくはそれより長い半減期で結合するまたは結合すると予測される、少なくとも1つの突然変異型EGFRペプチド配列を含む。

40

【0122】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列は、STVQLIMQL、LI MQ LMPF、LTSTVQLIM、TVQLIMQL、TSTVQLIMQL、TVQLIMQLM、およびVQLIMQLMからなる群から選択される第1の突然変異型EGFRペプチド配列と、T790M突然変異を有する第2の突然変異型EGFRペプチド配列とを含む。

50

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列は、(a)STVQLIMQL、LIMQLMPF、LTSTVQLIM、TVQLIMQL、TSTVQLIMQL、TVQLIMQLM、およびVQLIMQLMからなる群から選択される第1の突然変異型EGFRペプチド配列であって、HLA-A68:02、HLA-C15:02、HLA-A25:01、HLA-B57:03、HLA-C12:02、HLA-C03:02、HLA-A26:01、HLA-C12:03、HLA-C06:02、HLA-C03:03、HLA-B52:01、HLA-A30:01、HLA-C02:02、HLA-C12:03、HLA-A11:01、HLA-A32:01、HLA-A02:04、HLA-A68:01、HLA-B15:09、HLA-C17:01、HLA-C03:04、HLA-B08:01、HLA-A01:01、HLA-B42:01、HLA-B57:01、HLA-B15:01、HLA-B14:02、HLA-B37:01、HLA-A36:01、HLA-C15:02、HLA-B15:09、HLA-C12:02、HLA-B38:01、HLA-C03:03、HLA-A02:03、HLA-B58:02、HLA-C08:01、HLA-B35:01、HLA-B40:01、および／またはHLA-B35:03アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される第1の突然変異型EGFRペプチド配列と、(b)T790M突然変異を有する第2の突然変異型EGFRペプチド配列とを含み、第1および第2のペプチドは、同一でない。

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLAアレルによりコードされるタンパク質に10 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、400 nM未満、300 nM未満、250 nM未満、200 nM未満、150 nM未満、100 nM未満、または50 nM未満の親和性で結合する、少なくとも1つの突然変異型EGFRペプチド配列を含む。

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドは、HLAアレルによりコードされるタンパク質に24時間より長く、12時間より長く、9時間より長く、6時間より長く、5時間より長く、4時間より長く、3時間より長く、2時間より長く、1時間より長く、45分より長く、30分より長く、15分より長く、または10分より長く安定して結合する、少なくとも1つの突然変異型EGFRペプチド配列を含む。

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態では、(N末端Xaa)_Nは、IDIMKIRNA、FFFFFFF
FFFFFFF FFFIFFFWMC、FFFFFFF FFF
FFFFFFFAAFWW、IFFIFFIFFFFFFFFFIIII
IIWEC、FIFFFIFFFFFFFFFIFIIIIIIFWEC、TEY
、WQAGILAR、HSYTTAE、PLTEEKIK、GALHFKPGSR、RR
ANKDATAE、KAFISHEEKR、TDLSSRFSKS、FDLGGGTFD
V、CLLLHYSVSK、またはMTEYKLVVVのアミノ酸配列を含む。

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、(C末端Xaa)_Cは、KKNKKDDIKD、AGNDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDKKDKDDDDDDDD、AGNKKKKKKKKNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN、AGRDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD、GKSALTIQL、GKSALTI、QGQNLKYQ、ILGVLLLI、EKEGKISK、AASDFIFLVT、KELKQVASPF、KKKLINEKKE、KKCDISLQFF、KSTAGDTHLG、ATFYVAVTVP、LTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDG、またはTIIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKOVVIDGEのアミノ酸配列を含む。

【 0 1 2 8 】

一部の実施形態では、突然変異型 E G F R ペプチド配列のうちの少なくとも 1 つは、対

象のがん細胞のゲノムによりコードされない突然変異型アミノ酸を含む。

【0129】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列は、少なくとも $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、少なくとも $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または少なくとも $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在する。

【0130】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列の各々は、最大でも $5000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $2500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $750\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最大でも $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または最大でも $300\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でのみ存在する。

【0131】

一部の実施形態では、突然変異型EGFRペプチド配列の各々は、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 5000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 4000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 3000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 2000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $25\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または $50\mu\text{g}/\text{mL}\sim 300\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在する。

【0132】

一部の実施形態では、組成物は、免疫調節剤またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、ポリICLCである。

【0133】

一態様では、(a) 上記の少なくとも1つの突然変異型EGFRペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを含む組成物と(b) 薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が、本明細書で提供される。

【0134】

一部の実施形態では、医薬組成物は、pH調整剤をさらに含む。

【0135】

一部の実施形態では、医薬組成物は、ワクチン組成物である。

【0136】

一部の実施形態では、医薬組成物は、水性である。

【0137】

一部の実施形態では、少なくとも1つのポリペプチドのうちの1つまたは複数は、 $pI > 5$ かつ $HYDRO > -6$ 、 $pI > 8$ かつ $HYDRO > -8$ 、 $pI < 5$ かつ $HYDRO > -5$ 、 $pI > 9$ かつ $HYDRO < -8$ 、 $pI > 7$ かつ $HYDRO \text{値} > -5.5$ 、 $pI < 4.3$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -8$ 、 $pI > 0$ かつ $HYDRO < -8$ 、 $pI > 0$ かつ $HYDRO > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -8$ 、 $pI > 0$ かつ $HYDRO > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $HYDRO \leq -4$ 、 $pI > 0$ かつ $HYDRO > -4$ 、または $pI > 4.3$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -9$ 、 $5 \geq pI \geq 12$ かつ $-4 \geq HYDRO \geq -9$ により限定される。

【0138】

一部の実施形態では、医薬組成物は、塩基である、pH調整剤を含む。

【0139】

一部の実施形態では、pH調整剤は、弱酸のコンジュゲート塩基である。

【0140】

一部の実施形態では、pH調整剤は、薬学的に許容される塩である。

【0141】

一部の実施形態では、pH調整剤は、ジカルボン酸塩またはトリカルボン酸塩である。

【0142】

一部の実施形態では、pH調整剤は、クエン酸および／またはクエン酸塩である。

【0143】

一部の実施形態では、クエン酸塩は、クエン酸二ナトリウムおよび／またはクエン酸三

10

20

30

40

50

ナトリウムである。

【0144】

一部の実施形態では、pH調整剤は、コハク酸および／またはコハク酸塩である。

【0145】

一部の実施形態では、コハク酸塩は、コハク酸二ナトリウムおよび／またはコハク酸一ナトリウムである。

【0146】

一部の実施形態では、コハク酸塩は、コハク酸二ナトリウム・六水和物である。

【0147】

一部の実施形態では、pH調整剤は、0.1mM～1mMの濃度で存在する。

10

【0148】

一部の実施形態では、医薬組成物は、液体を含む、薬学的に許容される担体を含む。

【0149】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、水を含む。

【0150】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、糖を含む。

【0151】

一部の実施形態では、糖は、デキストロースを含む。

【0152】

一部の実施形態では、デキストロースは、1～10% w/vの濃度で存在する。

20

【0153】

一部の実施形態では、糖は、トレハロースを含む。

【0154】

一部の実施形態では、糖は、スクロースを含む。

【0155】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む。

【0156】

一部の実施形態では、DMSOは、0.1%～10%、0.5%～5%、または1%～3%の濃度で存在する。

30

【0157】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、ジメチルスルホキシド (DMSO) を含まない。

【0158】

一部の実施形態では、医薬組成物は、凍結乾燥され得る。

【0159】

一部の実施形態では、医薬組成物は、免疫調節物質またはアジュバントをさらに含む。

【0160】

一部の実施形態では、免疫調節物質またはアジュバントは、ポリICLC、1018ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、ARNAX、STINGアゴニスト、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuviImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタナイドIMS1312、モンタナイドISA206、モンタナイドISA50V、モンタナイドISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、Peptel（登録商標）、ベクター系、PLGA微小粒子、レシキモド、SRL172、ピロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、ベターグルカン、Pam3Cys、およびAquilaのQS21 Stimulonからなる群から選択される。

40

【0161】

50

一部の実施形態では、免疫調節物質またはアジュバントは、ポリICLCを含む。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、2:1~1:10 v:vである。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、約1:1、1:2、1:3、1:4または1:5 v:vである。一部の実施形態では、医薬組成物中のポリICLCのペプチドに対する比は、約1:3 v:vである。

【0162】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、上記の医薬組成物を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0163】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、それを必要とする対象に、1つもしくは複数の突然変異型EGFRペプチド、または1つもしくは複数の突然変異型EGFRペプチドをコードする1つもしくは複数の核酸を投与するステップを含み；各突然変異型EGFRペプチドが、突然変異T790Mを含む突然変異型EGFRタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み；1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチドが、表40A~40Dで示されるアミノ酸配列を有し；1つまたは複数のペプチドのうちの少なくとも1つが、HLA-A68:02、HLA-C15:02、HLA-A25:01、HLA-B57:03、HLA-C12:02、HLA-C03:02、HLA-A26:01、HLA-C12:03、HLA-C06:02、HLA-C03:03、HLA-B52:01、HLA-A30:01、HLA-C02:02、HLA-C12:03、HLA-A11:01、HLA-A32:01、HLA-A02:04、HLA-A68:01、HLA-B15:09、HLA-C17:01、HLA-C03:04、HLA-B08:01、HLA-A01:01、HLA-B42:01、HLA-B57:01、HLA-B15:01、HLA-B14:02、HLA-B37:01、HLA-A36:01、HLA-C15:02、HLA-B15:09、HLA-C12:02、HLA-B38:01、HLA-C03:03、HLA-A02:03、HLA-B58:02、HLA-C08:01、HLA-B35:01、HLA-B40:01、および／またはHLA-B35:03アレルによりコードされるタンパク質に150nMもしくはそれ未満の親和性および／または2時間もしくはそれより長い半減期で結合し、前記アレルによりコードされるタンパク質に結合し、または結合すると予測され；前記アレルが対象により発現される、方法が、本明細書で提供される。

【0164】

一態様では、がんを有する対象を処置する方法であって、それを必要とする対象に、突然変異型EGFRペプチド配列を含むポリペプチド、または突然変異型EGFRペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与するステップを含み、(a)突然変異型EGFRペプチドが、配列LIMQLMPFを有し、対象が、HLA-C03:02アレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(b)突然変異型EGFRペプチドが、配列LTS TVQLIMを有し、対象が、HLA-C12:03、HLA-C15:02、HLA-B57:01、HLA-B57:01、HLA-A36:01、HLA-C12:02、HLA-C03:03およびHLA-B58:02からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(c)突然変異型EGFRペプチドが、配列QLIMQLMPFを有し、対象が、HLA-A26:01アレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(d)突然変異型EGFRペプチドが、配列STVQLIMQLを有し、対象が、HLA-A68:02、HLA-C15:02、HLA-A25:01、HLA-B57:03、HLA-C12:02、HLA-A26:01、HLA-C12:03、HLA-C06:02、HLA-C03:03、HLA-A30:01、HLA-C02:02、HLA-A11:01、HLA-A32:01、HLA-A02:04、HLA-A68:01、HLA-B15:09、HLA-C03:04、HLA-B38:01、HLA-B57:01、HLA-A02:03、HLA-C08:01、HLA-B35:01およびHLA-B40:01からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(e)突然変異型EGFRペプチドが

、配列STVQLIMQLMを有し、対象が、HLA-B57:01アレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(f)突然変異型EGFRペプチドが、配列STVQLIMQLを有し、対象が、HLA-C15:02アレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(g)突然変異型EGFRペプチドが、配列TVQLIMQLを有し、対象が、HLA-C17:01、HLA-B08:01、HLA-B42:01、HLA-B14:02、HLA-B37:01、HLA-B15:09からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質を発現するか、(h)突然変異型EGFRペプチドが、配列TVQLIMQLMを有し、対象が、HLA-B35:03アレルによりコードされるタンパク質を発現するか、または(i)突然変異型EGFRペプチドが、配列VQLIMQLMを有し、対象が、HLA-B52:01、HLA-B14:02およびHLA-B37:01からなる群から選択されるHLAアレルによりコードされるタンパク質を発現する、方法が、本明細書で提供される。

10

【0165】

一部の実施形態では、方法は、少なくとも1つの突然変異型EGFRペプチドを含む第2のポリペプチド組成物を投与するステップをさらに含み、第2の突然変異型EGFRペプチドは、表40A~40Dから選択される。

【0166】

一態様では、対象におけるがんを処置する方法であって、(a)対象により発現される第1のタンパク質を同定するステップであって、第1のタンパク質が、対象の第1のHLAアレルによりコードされ、第1のHLAアレルが、表41~43のもののいずれか1つで提供されるHLAアレルである、ステップ；および(b)(i)表42Aiおよびii、42Bもしくは43のいずれか1つに従って提供される第1のHLAアレルに対するペプチドである第1の突然変異型EGFRペプチド、または(ii)第1の突然変異型EGFRペプチドをコードするポリ核酸を、対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一部の実施形態では、対象において発現される1つまたは複数の特異的HLAサブタイプを同定するステップ；本明細書に記載の1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチドを含む組成物を、1つまたは複数のペプチドが、対象により発現される少なくとも1つのHLAサブタイプに150nMもしくはそれ未満の親和性および／または2時間もしくはそれより長い半減期で結合するように、対象に投与するステップを含む、対象のがんを処置する方法。

20

30

【0167】

一態様では、対象のがんを処置する方法であって、(a)対象のゲノムのHLA-B57:01アレルによりコードされるタンパク質を発現する対象を同定するステップ；(b)配列STVQLIMQLMを有するペプチドを含む組成物を対象に投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。一実施形態では、方法は、(a)対象が、対象のゲノムのHLA-A26:01アレルによりコードされるタンパク質を発現するかどうかを確認するステップ；(b)配列QLIMQLMPFを有するペプチドを含む組成物を対象に投与するステップを含む。

【0168】

一部の実施形態では、免疫応答が対象において惹起される。一実施形態では、免疫応答は、体液性応答である。

40

【0169】

一部の実施形態では、1つまたは複数の突然変異型EGFRペプチド配列は、同時に、別々にまたは逐次的に投与される。一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチドが第2のT細胞を活性化するのに十分な期間の後、逐次的に投与される。

【0170】

一部の実施形態では、がんは、神経膠芽腫、肺腺癌、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌、腎臓癌、頭頸部がん、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、胃がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんおよび食道がんからなる群から選択される。

【0171】

50

一部の実施形態では、方法は、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法を投与するステップをさらに含む。

【0172】

一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法は、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T細胞、ベクター、およびAPC、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、抗PD-1剤および抗PD-L1剤、抗CTLA-4剤、または抗CD40剤である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、突然変異型EGFRペプチド配列の投与の前に、投与と同時に、または投与の後に投与される。

10

【0173】

一態様では、がんを有する対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、表41、42Ai、42Aii、42Bまたは43のうちの1つのHLAによりコードされるタンパク質を発現する対象として対象を同定するステップを含み；治療剤が、突然変異型EGFRペプチド、または突然変異型EGFRペプチドをコードする核酸であり；突然変異型EGFRペプチドが、T790に突然変異を含む突然変異型EGFRタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み；ペプチドが、(i) T790Mの突然変異を含み、(ii) 表42Ai、42Aii、42B、43または44のいずれか1つのペプチドの配列を含み、(iii) 表42Ai、42Aii、42B、43または44のいずれか1つのHLAによりコードされる対応するタンパク質に結合するものである、方法が、本明細書で提供される。

20

【0174】

一態様では、がんを有する対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、対象がHLA-B57:01アレルによりコードされるタンパク質を発現することを判定するステップを含み、治療薬が、アミノ酸配列STVQLIMQLMを有する突然変異型EGFRペプチドを含む、方法が、本明細書で提供される。

【0175】

一態様では、対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、対象がHLA-A26:01アレルによりコードされるタンパク質を発現することを判定するステップを含み、治療薬が、アミノ酸配列QLIMQLMPFを有する突然変異型EGFRペプチドを含む、方法が、本明細書で提供される。

30

【0176】

本開示の特色は、添付の特許請求の範囲に具体的に示されている。本開示の特色および利点のより良い理解は、本開示の原理が利用されている例証的な実施形態を示す以下の詳細な説明、および添付の図面を参照することにより得られるであろう。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

以下を含む医薬組成物：

(a) 第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドもしくはその薬学的に許容される塩であって、

40

(i) 前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、かつ

(ii) 前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列のC末端配列が、前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列のN末端配列とオーバーラップしており、前記配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列PGRPLQTHVLPEPHLALQLPLQPHADHAHADAPAIQPVLWTTTPPLQHGHRRHGLEPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRRSSLWC L C S N H (配列番号2)の少なくとも1個のアミノ酸を含む、前

50

記少なくとも1つのポリペプチドもしくはその薬学的に許容される塩、または

(b) 前記少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチド。

(項目2)

前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列または前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列が、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む、項目1に記載の医薬組成物。

(項目3)

前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および前記第2の突然変異型ペプチド配列が、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む、項目1～2のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

(項目4)

前記配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列PGRPLQTHVLP EPHLALQPLQPHADHAHADAPA IQPVLWTTPLQHGHRRHGL (配列番号3) の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む、項目2～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目5)

前記配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列EPCSMLTGPPA RVPAPVPFDLHFCSRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS SLWCLCSNH (配列番号4) の少なくとも1個のアミノ酸を含む、項目2～4のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

(項目6)

前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列の少なくとも一方が、少なくとも14個の突然変異型アミノ酸を含む、項目1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目7)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、少なくとも3つの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む、項目1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目8)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、少なくとも2つのポリペプチドを含む、項目1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

(項目9)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、第3の突然変異型GATA3ペプチド配列をさらに含み、前記第3の突然変異型GATA3ペプチド配列が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、前記配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列番号2の配列の少なくとも1個のアミノ酸を含む、項目1～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目10)

前記第3のGATA3突然変異型ペプチドが、配列番号2の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む、項目9に記載の医薬組成物。

40

(項目11)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、HLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B07:02アレルおよび/またはHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される少なくとも1つの突然変異型GATA3ペプチド配列を含む、項目1～10のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目12)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、

(a) HLA-A02:01アレルおよびHLA-A24:02アレル、

(b) HLA-A02:01アレルおよびHLA-B08:01アレル、

50

(c) HLA-A24:02 アレルおよび HLA-B08:01 アレル、または

(d) HLA-A02:01 アレル、HLA-A24:02 アレルおよび HLA-B08:01 アレル

によりコードされるタンパク質に結合するまたは結合すると予測される少なくとも1つの突然変異型 GATA3 ペプチド配列を含む、項目1～11のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目13)

(a) 前記第1の突然変異型 GATA3 ペプチド配列が、HLA-A02:01 アレル、HLA-A24:02 アレル、HLA-A03:01 アレル、HLA-B07:02 アレルまたは HLA-B08:01 アレルによりコードされるタンパク質に結合し、または結合すると予測され；

(b) 前記第2の GATA3 ペプチド配列が、HLA-A02:01 アレル、HLA-A24:02 アレル、HLA-A03:01 アレル、HLA-B07:02 アレルまたは HLA-B08:01 アレルによりコードされるタンパク質に結合し、または結合すると予測され；前記第1の突然変異型 GATA3 ペプチド配列が、前記第2の突然変異型 GATA3 ペプチド配列とは異なる HLA アレルによりコードされるタンパク質に結合する、または結合すると予測される、項目1～12のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目14)

前記第1の突然変異型 GATA3 ペプチド配列および前記第2の突然変異型 GATA3 ペプチド配列の少なくとも一方が、HLA アレルによりコードされるタンパク質に500 nM未滿の親和性で結合する、項目1～13のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目15)

前記第1の突然変異型 GATA3 ペプチド配列および前記第2の突然変異型ペプチド配列の少なくとも一方が、HLA アレルによりコードされるタンパク質に1時間より長く安定して結合する、項目1～14のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目16)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、以下の配列：

(a) TLQRSSLWCL、VLPEPHLAL、HVLPEPHLAL、ALQPLQPHA、AIQPVLTWT、APAIQPVLTWT、SMLTGPPARV、MLTGPPARV、および／または YMFLKAESKI；

(b) MFLKAESKI および／または YMFLKAESKI

(c) VLWTTTPPLQH、YMFLKAESK および／または KIMFATLQR；

(d) FATLQRSSL、EPHLALQPL、QPVLWTTTPPL、GPPARVPAV、MFATLQRSSL、KPKRDGYMF および／または KPKRDGYMFL、ならびに／あるいは

(e) IMKPKRDGYM、MFATLQRSSL、FLKAESKIMF、LHFCRSSIM、EPHLALQPL、FATLQRSSL、ESKIMFATL、FLKAESKIM および／または YMFLKAESKI

のうちの少なくとも1つを含む、項目1～15のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目17)

前記少なくとも1つのポリペプチドが、以下の配列：

(a) TLQRSSLWCL、VLPEPHLAL、HVLPEPHLAL、ALQPLQPHA、AIQPVLTWT、APAIQPVLTWT、SMLTGPPARV、MLTGPPARV、および／または YMFLKAESKI；

(b) MFLKAESKI および／または YMFLKAESKI；

(c) VLWTTTPPLQH、YMFLKAESK および／または KIMFATLQR；

(d) FATLQRSSL、EPHLALQPL、QPVLWTTTPPL、GPPARVPAV、MFATLQRSSL、KPKRDGYMF および／または KPKRDGYMFL、ならびに／あるいは

(e) IMKPKRDGYM、MFATLQRSSL、FLKAESKIMF、LHF

10

20

30

40

50

CRSSIM、EPHLALQPL、FATLQRSSL、ESKIMFATL、FLK
AESKIMおよび／またはYMFLKAESKI

のうちの少なくとも2つを含む、項目1～16のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目18)

前記突然変異型GATA3ペプチド配列が、

(a) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(b)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(b) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(c)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(c) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(d)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(d) (a)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(e) (b)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(c)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(f) (b)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(d)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(g) (b)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(h) (c)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(d)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、

(i) (c)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列、または

(j) (d)からの第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および(e)からの第2
の突然変異型GATA3ペプチド配列

を含む、項目16または17に記載の医薬組成物。

(項目19)

前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および前記第2の突然変異型GATA3
ペプチド配列が、表5および／または表6のペプチドを含む、項目1～18のいずれか一
項に記載の医薬組成物。

(項目20)

前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列が、GATA3タンパク質の第1のネオ
エピトープを含み、第2のペプチド突然変異型GATA3ペプチド配列が、突然変異型G
ATA3タンパク質の第2のネオエピトープを含み、前記第1の突然変異型GATA3ペプ
チド配列が、前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列とは異なり、前記第1のネオ
エピトープが、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、前記第2のネオエピトープ
が、同じ突然変異型アミノ酸を含む、項目1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目21)

少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配
列および前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、

$[Xaa]_F - [Xaa]_N - [Xaa]_C$ または $[Xaa]_N - [Xaa]_C - [Xaa]_F$ の式で表され、式中、

各Xaaは、アミノ酸であり、

$[Xaa]_N$ および $[Xaa]_C$ の各々は、GATA3遺伝子の異なる部分によりコード
されるアミノ酸配列を含み、

$[Xaa]_F$ は、任意のアミノ酸配列であり、

$[Xaa]_N$ は、前記GATA3遺伝子の非野生型リーディングフレームにコードされ、

$[Xaa]_C$ は、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、前記GATA3遺伝子
の非野生型リーディングフレームにコードされ、

Nは、0～100の整数であり、

10

20

30

40

50

Cは、1～100の整数であり、

Fは、0～100の整数であり、

NとMの和は、少なくとも8である、項目1～20のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目22)

[Xaa]_Fの各Xaaが、リシン残基であり、Fが、1～100、1～10、9、8、7、6、5、4、3、2または1の整数である、項目21に記載の医薬組成物。

(項目23)

Fが、3、4または5である、項目22に記載の医薬組成物。

(項目24)

前記突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、少なくとも50μg/mL～400μg/mLの濃度で存在する、項目1～23のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目25)

前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列が、表1または表2の配列を含む、項目1～24のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目26)

免疫調節剤またはアジュバントをさらに含む、項目1～25のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目27)

前記アジュバントが、ポリICLCである、項目26に記載の医薬組成物。

(項目28)

1つまたは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む医薬組成物であって、

前記1つまたは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列が、ESKIMFATLQRSSL、KPKRDGYMFLKAESKI、SMLTGPPARVPAVPFDLH、EPCSMLTGPPARVPAVPFDLH、LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI、GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD、およびKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCCLCSNHからなる群から選択される配列を含む、医薬組成物。

(項目29)

0.1mM～1mMの濃度で存在するpH調整剤を含む、項目1～28のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目30)

1mM～10mMの濃度で存在するpH調整剤を含む、項目1～28のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目31)

GATA3ペプチドを合成する方法であって、

前記ペプチドが、Xaa-Cys、Xaa-Ser、およびXaa-Thr（式中、Xaaは、任意のアミノ酸である）からなる群から選択される少なくとも2個の連続するアミノ酸の配列を含み、

(a) 少なくとも1つのジペプチドまたはその誘導体を、GATA3ペプチドまたはその誘導体のアミノ酸またはその誘導体とカップリングさせて、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有するシュードプロリンを得るステップであって、前記ジペプチドまたはその誘導体が、シュードプロリン部分を含む、ステップ；

(b) 1つまたは複数の選択されたアミノ酸、小ペプチドまたはその誘導体を、GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有する前記シュードプロリンとカップリングさせるステップ；および

(c) GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有する前記シュードプロリンを樹脂から切断するステップ、を含む方法。

(項目32)

GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有する前記シュードプロリンを脱保護するス

10

20

30

40

50

テップを含む、項目31に記載の方法。

(項目33)

少なくとも1つのジペプチドまたはその誘導体がカップリングされる前記アミノ酸またはその誘導体が、Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、Tyr、His、およびValからなる群から選択される、項目31～32のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

GATA3ペプチドまたはその誘導体を含有する前記シュードプロリンと必要に応じてカップリングされる前記1つまたは複数の選択されたアミノ酸、小ペプチドまたはその誘導体が、Fmoc-Ala-OH·H₂O、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OMpe)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-His(Trt)-OHおよびFmoc-His(Boc)-OHを含む、項目31～33のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記GATA3ペプチドまたはその誘導体のN末端アミノ酸またはその誘導体が、Fmoc-Ala-OH·H₂O、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OMpe)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-His(Trt)-OHおよびFmoc-His(Boc)-OHからなる群から選択される、項目31～34のいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記シュードプロリン部分が、

- (a) Fmoc-Ser(tBu)-Ser(ψ(Me, Me)pro)-OH、
- (b) Fmoc-Ala-Thr(ψ(Me, Me)pro)-OH、
- (c) Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(ψ(Me, Me)pro)-OH、
- (d) Fmoc-Leu-Thr(ψ(Me, Me)pro)-OH、
- (e) Fmoc-Leu-Cys(ψ(Dmp, H)pro)-OH

である、項目31～35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

- (a) Xaa-Serが、Ser-Serである、
- (b) Xaa-Serが、Glu-Serである、
- (c) Xaa-Thrが、Ala-Thrである、
- (d) Xaa-Thrが、Leu-Thrである、または
- (e) Xaa-Cysが、Leu-Cysである、

項目31～36のいずれか一項に記載の方法。

(項目38)

がんを有する対象を処置する方法であって、項目1～30のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む方法。

(項目 3 9)

がんを有する対象を治療薬の候補者として同定する方法であって、
 前記対象を、HLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B07:02アレルおよび／またはHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質を発現する者として同定するステップを含み、
 前記治療薬が、
 (a) 1つもしくは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、前記1つもしくは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含み、がん細胞のGATA3遺伝子の突然変異から生じる突然変異型GATA3タンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸の断片である、前記少なくとも1つのポリペプチド、または
 (b) 前記少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含み、
 前記1つもしくは複数の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々またはその一部分が、HLA-A02:01アレル、HLA-A24:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B07:02アレルおよび／もしくはHLA-B08:01アレルによりコードされるタンパク質に結合するものである、方法。

10

(項目 4 0)

前記治療薬を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 3 9に記載の方法。

(項目 4 1)

がんを有する対象を処置する方法であって、前記対象に、
 (a) 第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および第2の突然変異型GATA3ペプチド配列を含む少なくとも1つのポリペプチドであって、
 (i) 前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列および前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列の各々が、配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、かつ
 (ii) 前記第1の突然変異型GATA3ペプチド配列のC末端配列が、前記第2の突然変異型GATA3ペプチド配列のN末端配列とオーバーラップしており、前記配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列PGRPLQTHVLPEPHLALQPLQPHADHAHADAPAIQPVLWTTTPPLQHGHRHGLEPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH(配列番号2)の少なくとも1個のアミノ酸を含む、前記少なくとも1つのポリペプチド、または
 (b) 前記少なくとも1つのポリペプチドをコードする配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む医薬組成物を投与するステップを含み、
 対象により発現されるHLAアレルが投与の時点で不明である、方法。

20

30

(項目 4 2)

前記配列番号1の少なくとも8個の連続するアミノ酸が、配列：
 PGRPLQTHVLPEPHLALQPLQPHADHAHADAPAIQPVLWTTTPPLQHGHRHGLEPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH(配列番号2)の少なくとも1個のアミノ酸を含む、項目 4 1に記載の方法。

40

(項目 4 3)

前記がんが、黒色腫、卵巣がん、肺がん、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、および慢性リンパ球性白血病(CLL)からなる群から選択される、項目 4 1～4 2のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記対象が、抗エストロゲン療法に対して抵抗性である、MSI乳がんである、転移性乳がんである、Her2陰性乳がんである、Her2陽性乳がんである、ER陰性乳がんである、ER陽性乳がん、PR陽性乳がん、PR陰性乳がんまたはこれらの任意の組合せ

50

である、乳がんを有する、項目 4 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記乳がんが、突然変異を有するエストロゲン受容体を発現する、項目 4 4 の方法。

(項目 4 6)

少なくとも 1 つの追加の治療剤または治療法を投与するステップをさらに含む、項目 4 1 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤または治療法が、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T 細胞、ベクター、および APC、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、抗 PD-1 剤および抗 PD-L1 剤、抗 CTLA-4 剤、抗 CD40 剤、レトロゾール、フルベストラント、PI3 キナーゼ阻害剤、および／または CDK4/6 阻害剤である、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、パルボシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、セリシクリブ、ジナシクリブ、ミルシクリブ、ロニシクリブ、アツベシクリブ、ブリシクリブ、リビシクリブ、セリシクリブ、トリラシクリブ、ボルシクリブまたはこれらの任意の組合せである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、パルボシクリブ (PD0332991)；アベマシクリブ (LY2835219)；リボシクリブ (LEE011)；ボルシクリブ (P1446A-05)；ファスカプリシン；アルシリアフラビン；2-ブロモ-12,13-ジヒドロ-5H-インドロ[2,3-a]ピロロ[3,4-c]カルバゾール-5,7(6H)-ジオン；3-アミノチオアクリドン (3-ATA)、trans-4-(6-(エチルアミノ)-2-(1-(フェニルメチル)-1H-インドール-5-イル)アミノ)-4-ピリミジニル)アミノ)-シクロヘキサノ (CINK4)；1,4-ジメトキシアクリジン-9(10H)-チオン (NSC 625987)；2-メチル-5-(p-トリルアミノ)ベンゾ[d]チアゾール-4,7-ジオン (リュウビジン)；フラボピリドール (アルボシジブ)；セリシクリブ；ジナシクリブ；ミルシクリブ；ロニシクリブ；アツベシクリブ；ブリシクリブ；リビシクリブ；トリラシクリブ (G1T28)；またはこれらの任意の組合せである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記少なくとも 1 つの追加の治療剤が、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコン C、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ (BYL719)、ウムブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ (BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ (SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ (GDC-0941)、XL147 (SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477 または AEZS-136 である、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記がんが、再発または転移性乳がんである、項目 4 1 ～ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記対象が、CDK4/6 阻害剤と組み合わせての内分泌療法後に疾患進行を経験したことがある、または前記対象が、以前に全身療法を受けたことがない、項目 4 1 ～ 5 2 の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記対象の細胞のエストロゲン受容体遺伝子の突然変異状態を判定するステップを含む、項目 4 1 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

前記細胞が、単離された細胞であるか、またはエストロゲン受容体の発現が増された細胞である、項目 5 4 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0177】

【図1】図1は、CD8+および／またはCD4+T細胞を誘導することができるGATA3エピトープの決定のための例示的なワークフローを示す。

10

【0178】

【図2】図2は、エピトープがプロセッシングおよび提示されるか否か（上）ならびにエピトープがT細胞により認識されるか否か（下）を決定するための実験の例示的なワークフローを示す。このワークフローにより、GATA3ネオ抗原がプロセッシングおよび提示されたこと（質量分析により検出）、ならびにHLAマルチマーに結合しているGATA3ネオ抗原が、Jurkat細胞系で発現された組換えT細胞受容体（TCR）により認識され得ることが確認された。

【0179】

【図3】図3は、質量分析によるGATA3ネオORFエピトープの検出のためのワークフローの例示的な概略図を示す。ペプチドの単離のために、バッチ溶解を実施した。免疫沈降には、HLAクラスI汎抗体（W6／32）が使用されている。

20

【0180】

【図4】図4は、CD8+T細胞のGATA3抗原特異的拡大増殖のワークフローの例示的な概略図を示す。

【0181】

【図5】図5は、HLA-A02（左）、HLA-B07（中央）、およびHLA-B08（右）に対する予測GATA3エピトープを質量分析により検出することができることを示す実験の要約を示す。

【0182】

【図6】図6は、GATA3ネオORFの説明図である。網掛け領域は、すべての患者により共有されている（共通領域）および一部の患者により共有されている（可変領域）GATA3ネオORF配列部分の部分を表す。

30

【0183】

【図7-1】図7Aは、可変領域配列（配列番号3）および共通領域配列（配列番号4）を有するGATA3ネオORF配列（配列番号2）の説明図である。

【0184】

【図7-2】図7Bは、ネオORF配列（配列番号2）を有するGATA3配列（配列番号1）を示す概略図であり、3つの予測HLA-A02：01エピトープ、2つの予測HLA-B07：02エピトープ、および1つの予測HLA-B08：01が質量分析により観察されたことを示す。このデータは、エピトープが標的化可能であることを示す。

40

【0185】

【図7-3】図7Cは、GATA3ネオORF領域全体にわたるオーバーラップしているペプチド（OLP）のペプチド設計スキームの例の説明図である。

【0186】

【図7-4】図7Dは、GATA3ネオORF（配列番号3）の可変領域の例示的なアミノ酸配列である。

【0187】

【図7-5】図7Eは、GATA3ネオORF（配列番号4）の共通領域の例示的なアミノ酸配列である。

50

【0188】

【図8】図8は、治療用クラスI GATA3ネオORFエピトープの数対これらのエピトープを含有する患者のパーセントを示すグラフである。ほとんどの患者は4～5つのエピトープを有する。

【0189】

【図9-1】図9Aは、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、表記のペプチドに対する抗原特異的CD8⁺T細胞応答を示す結果の例を示す。

【0190】

【図9-2】図9Bは、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、表記のペプチドに対する抗原特異的CD8⁺T細胞応答を示す結果の例を示す。

10

【0191】

【図9-3】図9Cは、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、表記のペプチドに対する抗原特異的CD8⁺T細胞応答を示す結果の例を示す。

【0192】

【図10-1】図10Aは、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、表記のペプチドに対する抗原特異的CD8⁺T細胞応答を示す結果の例を示す。

【0193】

【図10-2】図10Bは、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、表記のペプチドに対する抗原特異的CD8⁺T細胞応答を示す結果の例を示す。

【0194】

20

【図11】図11は、GATA3ネオORFペプチドを負荷してまたは負荷せずにAPCで刺激した健康なHLA-A02:01ドナーに由来するCD4⁺細胞のIFN γ およびTNF α レベルの抗原特異的誘導のFACS解析を示す図である。

【0195】

【図12-1】図12Aは、表記のペプチドが、表記のペプチド濃度では、5mMまたは0.25mMコハク酸塩、DMSOなし、水中5%デキストロース(5DW)、およびポリICLCなしの医薬組成物中で可溶性であったことを示す。

【0196】

【図12-2】図12Bは、表記のペプチドが、表記のペプチド濃度では、5mMまたは0.25mMコハク酸塩、DMSOなし、水中5%デキストロース(5DW)、およびポリICLCの医薬組成物中で可溶性であったことを示す。

30

【0197】

【図12-3】図12Cは、表記のペプチドが、表記のペプチド濃度では、5mMまたは0.25mMコハク酸塩、DMSOなし、水中5%デキストロース(5DW)、および表記のペプチド：ポリICLC比のポリICLCの医薬組成物中で可溶性であったことを示す。

【0198】

【図13】図13は、GATA3フレームシフト突然変異の共通領域のアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【0199】

40

【図14】図14は、MSK-IMPACT乳がんデータセットにおける患者のカプランマイヤー生存曲線を示す。

【0200】

【図15】図15は、患者当たりの提示エピトープのシミュレートされた数を示す。

【0201】

【図16】図16は、GATA3野生型および突然変異ヌクレオチド配列のアラインメントを示す。

【0202】

【図17】図17は、GATA3野生型および突然変異アミノ酸配列のアラインメントを示す。

50

【0203】

【図18】図18は、GATA3突然変異がコードされたプラスミドマップを示す。

【0204】

【図19】図19は、GATA3突然変異遺伝子のマルチアラインメントおよびGATA3突然変異プラスミド構築物のDNA配列決定データを示す。

【0205】

【図20】図20は、AflIIによるGATA3突然変異プラスミドの制限酵素消化を示す。

【0206】

【図21】図21は、GATA3を形質導入したHEK293T細胞のMHCクラスIおよびMHCクラスIIの発現を示す。

10

【0207】

図22A～22Dは、HLA-A02.01、HLA-B07.02、およびHLA-B08.01をトランスフェクトしたGATA3 HEK293T細胞のHLA-A02およびMHC-ABCの発現プロファイルを示す。

【0208】

【図22-1】図22Aは、トランスフェクトされていないGATA3 HEK293T細胞を示す。

【0209】

【図22-2】図22Bは、HLA-A02.01をトランスフェクトしたGATA3 HEK293T細胞を示す。

20

【0210】

【図22-3】図22Cは、HLA-B07.02をトランスフェクトしたGATA3 HEK293T細胞を示す。

【0211】

【図22-4】図22Dは、HLA-B08.01をトランスフェクトしたGATA3 HEK293T細胞を示す。

【0212】

【図23】図23は、HEK293T細胞において安定的に発現されるGATA3ネオORFの共通領域に由来する予測ペプチドエピトープの検出を示す。明灰色および黒色の配列は、それぞれ、GATA3ネオORFの可変領域および共通領域を示す。

30

【0213】

【図24-1】図24Aは、内因的にプロセシングされたペプチドエピトープSMLTGPPARV（下）およびその対応する合成ペプチド（上）のMS/MSスペクトルを示す。

【0214】

【図24-2】図24Bは、MS/MSスペクトル一致の網羅的なプロットを示す。

【0215】

【図25-1】図25Aは、内因的にプロセシングされたペプチドエピトープMLTGPPARV（下）およびその対応する合成ペプチド（上）のMS/MSスペクトルを示す。

【0216】

【図25-2】図25Bは、スペクトル一致の網羅的なプロットを示す。

40

【0217】

【図26-1】図26Aは、内因的にプロセシングされたペプチドエピトープKPKRDGYMF（下）およびその対応する合成ペプチド（上）のMS/MSスペクトルを示す。

【0218】

【図26-2】図26Bは、スペクトル一致の網羅的なプロットを示す。

【0219】

【図27-1】図27Aは、内因的にプロセシングされたペプチドエピトープKPKRDGYMFL（下）およびその対応する合成ペプチド（上）のMS/MSスペクトルを示す。

【0220】

50

【図 27-2】図 27B は、スペクトル一致の網羅的なプロットを示す。

【0221】

【図 28-1】図 28A は、内因的にプロセシングされたペプチドエピトープ ESKImFATL（下）およびその対応する合成ペプチド（上）の MS/MS スペクトルを示す。

【0222】

【図 28-2】図 28B は、スペクトル一致の網羅的なプロットを示す。

【0223】

【図 29-1】図 29A は、GATA3 ネオORF 特異的ペプチド（FLT-mDC GATA3 Stim2 マルチマー）による CD8+ 応答の代表的な誘導を示す。

【0224】

【図 29-2】図 29B は、PBMC および樹状細胞において CD8+ 応答の誘導のない陰性対照を示す。

【0225】

【図 30-1】図 30A は、ペプチドを用いない抗原特異的 CD4 T 細胞の誘導を示す。

【0226】

【図 30-2】図 30B は、GATA3 ネオORF 特異的ペプチドを用いた抗原特異的 CD4 T 細胞の誘導を示す。

【0227】

図 31A～31D は、マルチマー染色による GATA3 特異的 CD8+ T 細胞を示す。

【0228】

【図 31-1】図 31A は、健康なドナー HD47 の長期刺激後に、平均 1.16% 陽性で GATA3 特異的 CD8+ T 細胞が観察されたことを示す。

【0229】

【図 31-2】図 31B は、健康なドナー HD50 の長期刺激後に、平均 1.29% 陽性で GATA3 特異的 CD8+ T 細胞が観察されたことを示す。

【0230】

【図 31-3】図 31C は、健康なドナー HD51 の長期刺激後に、平均 1.9% 陽性で GATA3 特異的 CD8+ T 細胞が観察されたことを示す。

【0231】

【図 31-4】図 31D は、図 31C とは異なる濃度のペプチドでの健康なドナー HD51 の長期刺激後に、平均 4.5% 陽性で GATA3 特異的 CD8+ T 細胞が観察されたことを示す。

【0232】

【図 32】図 32 は、生標的細胞のカスパーゼ-3 陽性割合の比較を示す。4つの異なる、GATA3 により誘導した健康なドナー PBMC 1～4 を、GATA3 突然変異を形質導入した HEK293T 細胞（GATA3 Trd）または陰性対照群としての形質導入されていない HEK293T 細胞（NoTrd293T）と共に共培養した。

【0233】

【図 33】図 33 は、GATA3 を形質導入した HEK293T 細胞と形質導入されていない HEK293T 細胞との間の有意差を示す。

【0234】

【図 34】図 34 は、GATA3 を形質導入した HEK293T 細胞または形質導入されていない HEK293T 細胞と共に共培養した CD8+ T 細胞の CD107a 発現の差を示す。

【0235】

【図 35】図 35 は、GATA3 を形質導入した HEK293T 細胞と、形質導入されていない HEK293T 細胞との間の、GATA3 により誘導した T 細胞との共培養条件下における IFN- γ 濃度の差を示す。

【0236】

【図 36】図 36 は、GATA3 特異的 TCR クローニングの概要を示す。詳細は実施例

10

20

30

40

50

26に記載されている。

【0237】

【図37】図37は、GATA3特異的TCRを形質導入したJurkatおよびPBMCを生成するための例示的な方法を示す。詳細は実施例26に記載されている。

【0238】

【図38】図38は、TCRを形質導入したJurkatを用いた機能アッセイの概要を示す。

【0239】

【図39】図39は、選別のためにマルチマー染色することによるGATA3特異的CD8+T細胞を示す。

10

【0240】

【図40】図40は、レンチウイルス用のGATA3特異的TCR構築物を示す。

【0241】

【図41-1】図41Aは、GATA3 TCRアルファ配列および野生型DNA配列のマルチアラインメントを示す。

【0242】

【図41-2】図41Bは、GATA3 TCRベータ配列および野生型DNA配列のマルチアラインメントを示す。

【0243】

【図42】図42は、AflIIによるGATA3 TCRプラスミドの制限酵素消化を示す。

20

【0244】

【図43】図43は、GATA3マルチマーPEおよびGATA3マルチマーBV650で染色した、GATA3特異的TCRを形質導入したJurkatを示す。

【0245】

【図44】図44は、GATA3特異的TCRペプチド滴定アッセイを示す。

【0246】

【図45】図45は、GATA3特異的TCRを形質導入したJurkat細胞およびGATA3突然変異を形質導入した標的細胞のIL-2放出アッセイを示す。

【0247】

30

【図46】図46は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、14個のアミノ酸およびESKIMFATLQRSSLの配列からなる。ペプチドは、 $C_{70}H_{119}N_{19}O_{22}S$ の分子式、および 1610.89 g/mol の分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

【0248】

【図47】図47は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、16個のアミノ酸およびKPKRDGYMFLKAESKIの配列からなる。ペプチドは、 $C_{87}H_{143}N_{23}O_{23}S$ の分子式、および 1911.30 g/mol の分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

【0249】

40

【図48】図48は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、18個のアミノ酸およびSMLTGPPARVPAPFDLHの配列からなる。ペプチドは、 $C_{87}H_{137}N_{23}O_{23}S$ の分子式、および 1905.25 g/mol の分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

【0250】

【図49】図49は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、21個のアミノ酸およびEPCSMMLTGPPARVPAPFDLHの配列からなる。ペプチドは、 $C_{100}H_{156}N_{26}O_{28}S_2$ の分子式、および 2234.62 g/mol の分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

【0251】

50

【図50】図50は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、25個のアミノ酸およびLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIの配列からなる。ペプチドは、 $C_{134}H_{217}N_{37}O_{34}S_3$ の分子式、および2986.62 g/molの分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

【0252】

【図51】図51は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、26個のアミノ酸およびGPPARVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDの配列からなる。ペプチドは、 $C_{131}H_{209}N_{39}O_{33}S_2$ の分子式、および2922.47 g/molの分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

10

【0253】

【図52】図52は、例示的なGATA3ネオORFペプチドの立体化学を示す。ペプチドは、33個のアミノ酸およびKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSLLWCLCSNHの配列からなる。ペプチドは、 $C_{173}H_{274}N_{48}O_{46}S_4$ の分子式、および3890.63 g/molの分子量を有する。ペプチドは、トリフルオロ酢酸(TFA)塩の形態である。

【0254】

【図53】図53は、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用した、BTK抗原ペプチド特異的CD8⁺T細胞応答を示す。

20

【0255】

【図54】図54は、ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用した、EGFR抗原ペプチド特異的CD8⁺T細胞応答を示す。

【発明を実施するための形態】

【0256】

GATA3は、乳がん高度に発現される遺伝子であり、これらのがんにおいて最も高頻度に突然変異される遺伝子の1つである。この遺伝子の突然変異の最もよく見られるクラスは、アミノ酸393をコードするヌクレオチドとアミノ酸445(天然停止コドン)をコードするヌクレオチドの間の挿入および欠失である。これらが、オープンリーディングフレームを+1フレームにシフトさせると、それらは、健康な細胞には通常発現されない少なくとも61個から113個までのアミノ酸を導く伸長した新規リーディングフレーム(「ネオORF」)に至る。61個のアミノ酸は、全ての患者間で共有される(保存領域)が、各患者は、0~52個の追加のアミノ酸(可変領域)を有することになる。したがって、このネオORFからプロセシングされ、提示されるエピトープは、この同じクラスの突然変異を保有する一部または全ての患者間で共有されるネオ抗原である。GATA3ネオORFは、乳がんにおける有害予後因子であるように見える。GATA3野生型は、高度に発現される遺伝子であり、GATA3ネオORFは、高度な発現を保持する。GATA3ネオORFは、翻訳され、乳がんのリスク増大と関連付けられる。

30

【0257】

一部の実施形態では、ネオORF全体に広がるオーバーラップしている長いペプチド(OLP)をがんの処置に使用することができる。一部の態様では、本明細書に記載のOLPは、ペプチドの末端にエピトープを含むように設計されており、これは、プロセシングおよび提示のプロセスを単純化する(1つの切断事象のみが必要であるため)。一部の態様では、MHCクラスIタンパク質に結合する短いペプチド(例えば、9~11アミノ酸)を対象に投与して、がんを処置することができる。本明細書に記載の手法を使用して、患者を彼らのHLA組成に基づいて選択する必要なく、多くのネオ抗原を標的とすることができる。

40

【0258】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、免疫原性を増大させることができる修飾(例えば、脂質付加)を含むことができる。一部の実施形態では、全GATA3ネ

50

オORFによりコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ポリボディ）が提供される。一部の実施形態では、特定のエピトープを標的とするTCRを発現する操作されたT細胞などの、細胞ベースの治療を使用して、がんを有する対象を処置することができる。

【0259】

GATA3タンパク質の共通領域に広がる合成の長いペプチド（SLP）が本明細書で開示される。これらのペプチドは、本明細書に記載の製剤に可溶性であり、s.c.注射用のポリICLCと適合性である。これらのペプチドの1つまたは複数についての高い純度および合成収率は、固相ペプチド合成（SPPS）中のシュードプロリンブロックの採用により達成することができる。これらのペプチドの各々についての精製条件も開発された。

10

【0260】

個体の腫瘍に固有の突然変異事象から生じるネオ抗原の発見に基づく新規免疫治療剤およびそれらの使用が、本明細書に記載される。したがって、本明細書に記載の本開示は、例えば、腫瘍関連抗原またはネオエピトープに対する免疫応答を刺激するために、疾患の処置に使用するための免疫原性組成物またはがんワクチンを作成するために、使用することができる、ペプチド、ペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびペプチド結合剤を提供する。

【0261】

以下の説明および例によって本開示の実施形態が詳細に例証される。本開示が、本明細書に記載の特定の実施形態に限定されず、したがって変わり得ることを理解されたい。本発明の範囲に包含される、本開示の非常に多くの変形形態および修飾形態があることは、当業者には理解されるであろう。

20

【0262】

全ての用語は、それらが当業者によって理解されるように理解されることを意図したものである。別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての専門および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。

【0263】

本明細書で使用される節の見出しは、単に構成のためのものであり、記載の主題を限定すると見なすべきでない。

30

【0264】

本開示の様々な特徴が単一の実施形態に関連して記載されることがあるが、特徴が別々にまたは任意の好適な組合せで提供されることもある。逆に、本開示は、明確にするために別々の実施形態に関連して本明細書に記載されることがあるが、本開示が単一の実施形態で実行されることもある。

【0265】

以下の定義は、当技術分野における定義を補足するものであり、本願を対象とするものであり、いずれの関連または非関連ケースにも、例えば、所有者が共通するいずれの特許または出願にも、帰属しないものとする。本明細書に記載のものと同様または同等の任意の方法および材料を本開示の試験の実施の際に使用することができるが、好ましい材料および方法が本明細書に記載される。したがって、本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態を説明することを目的にしたものに過ぎず、限定することを意図したものではない。

40

定義

【0266】

本明細書で使用される用語法は、特定のケースを説明することを目的にしたものに過ぎず、限定することを意図したものではない。本願では、単数形の使用は、別段の具体的な記述がない限り複数形を含む。本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈による別段の明確な指示がない限り、複数形も含むように意図される。

【0267】

本願では、「または」の使用は、別段の記述がない限り、「および／または」を意味す

50

る。本明細書で使用される場合の用語「および／または」および「これらの任意の組合せ」およびそれらの文法的等価表現は、同義的に使用され得る。これらの用語は、任意の組合せが特に企図されることを伝えることができる。単に例証を目的として、次の句「A、Bおよび／またはC」または「A、B、C、またはこれらの任意の組合せ」は、「個別にA；個別にB；個別にC；AおよびB；BおよびC；AおよびC；ならびにA、BおよびC」を意味することがある。用語「または」は、文脈が選言的使用に具体的に言及している場合を除き、連言的に使用されることもあり、または選言的に使用されることもある。

【0268】

用語「約」または「おおよそ」は、当業者によって決定されるような特定の値についての許容される誤差範囲内を意味し、この許容される誤差範囲は、値が測定または決定される方法、すなわち、測定システムの制約に一部依存することになる。例えば、「約」は、当技術分野での実務に従って、1以内の標準偏差を意味することもあり、または1より大きい標準偏差を意味することもある。あるいは、「約」は、所与の値の20%以下、10%以下、5%以下または1%以下の範囲を意味することもある。あるいは、特に生物システムまたは生物学的プロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味することもある。特定の値が本願または特許請求の範囲に記載される場合、別段の記述がない限り、その特定の値の許容される誤差範囲内を意味する用語「約」を想定すべきである。

【0269】

本願および特許請求の範囲で使用される場合、「含むこと (comprising)」 (ならびに含むこと (comprising) の任意の形、例えば、「含む (comprise)」および「含む (comprises)」)、「有すること (having)」 (ならびに有すること (having) の任意の形、例えば、「有する (have)」および「有する (has)」)、「含むこと (including)」 (ならびに含むこと (including) の任意の形、例えば、「含む (includes)」および「含む (include)」) 、または含有すること (containing) (ならびに含有すること (containing) の任意の形、例えば、「含有する (contains)」および「含有する (contain)」) という語は、包括的または非限定的であり、追加の、挙げられていない要素または方法ステップを除外しない。本明細書で論じられる任意の実施形態を本開示の任意の方法または組成物に関して実行することができること、および逆に、本開示の任意の方法または組成物を本明細書で論じられる任意の実施形態に関して実行することができることが企図される。さらに、本開示の組成物を使用して、本開示の方法を達成することができる。

【0270】

「一部の実施形態」、「ある実施形態」、「1つの実施形態」または「他の実施形態」への本明細書での言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造または特性が、本開示の少なくとも一部の実施形態に含まれるが、必ずしも全ての実施形態に含まれるとは限らないことを意味する。本開示の理解を助長するために、いくつかの用語および句が下記で定義される。

【0271】

「主要組織適合遺伝子複合体」または「MHC」は、生理的免疫応答の原因となる細胞相互作用の制御に関与する遺伝子のクラスターである。ヒトの場合、MHC複合体は、ヒト白血球抗原 (HLA) 複合体としても公知である。MHCおよびHLA複合体の詳細な説明については、Paul, Fundamental Immunology, 3rd Ed., Raven Press, New York (1993) を参照されたい。

「主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のタンパク質または分子」、「MHC分子」、「MHCタンパク質」または「HLAタンパク質」は、タンパク質抗原のタンパク質分解切断の結果として得られるペプチドに結合することができ、可能性のあるリンパ球エпитープ (例えば、T細胞エпитープおよびB細胞エпитープ) を提示することができ、それらを細胞表面に輸送することができ、それらをそこで特定の細胞、特に、細胞傷害性Tリン

10

20

30

40

50

パ球、ヘルパーT細胞、またはB細胞に提示することができる、タンパク質を意味すると理解されたい。ゲノム内の主要組織適合遺伝子複合体は、細胞表面に発現された遺伝子産物が内在性および／または外来抗原に結合し、それらを提示するために、したがって免疫学的プロセスを調節するために重要である、遺伝子領域を含む。主要組織適合遺伝子複合体は、異なるタンパク質をコードする2つの遺伝子群、すなわち、MHCクラスIの分子とMHCクラスIIの分子に分類される。2つのMHCクラスの細胞生物学および発現パターンは、これらの異なる役割に適応する。

【0272】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」は、ヒトクラスIまたはクラスII主要組織適合遺伝子複合体(MHC)タンパク質である(例えば、Stites, et al., Immunology, 8th Ed., Lange Publishing, Los Altos, Calif. (1994)を参照されたい)。

【0273】

本明細書で使用される場合の「ポリペプチド」、「ペプチド」およびそれらの文法的等価表現は、通常は、隣接するアミノ酸の α -アミノ基とカルボキシル基の間のペプチド結合により、一方が他方に接続されている、アミノ酸残基、通常はL-アミノ酸、のポリマーを指す。ポリペプチドおよびペプチドは、「突然変異型ペプチド」、「ネオ抗原ペプチド」および「ネオ抗原性ペプチド」を含むが、これらに限定されない。ポリペプチドまたはペプチドは、様々な長さで、それらの中性(非荷電)形態または塩である形態のどちらかであり得、グリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化などの修飾がないこともあり、またはこれらの修飾を、修飾が本明細書に記載されるようなポリペプチドの生物活性を破壊しないことを条件として、含有することもある。「成熟タンパク質」は、全長であり、必要に応じて、グリコシル化または所与の細胞環境におけるタンパク質に典型的な他の修飾を含む、タンパク質である。本明細書で開示されるポリペプチドおよびタンパク質(それらの機能的部分および機能的バリエーションを含む)は、1つまたは複数の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含み得る。そのような合成アミノ酸は、当技術分野において公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、trans-3-およびtrans-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリセリン、 α -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リシン、N', N'-ジベンジル-リシン、6-ヒドロキシリシン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 α -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 α , γ -ジアミノ酪酸、 α , β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、ならびに α -tert-ブチルグリシンを含む。本開示は、操作された細胞における本明細書に記載のポリペプチドの発現が、ポリペプチド構築物の1つまたは複数のアミノ酸の翻訳後修飾に付随し得ることを、さらに企図している。翻訳後修飾の非限定的な例としては、リン酸化、アシル化(アセチル化およびホルミル化を含む)、グリコシル化(N連結型およびO連結型を含む)、アミド化、ヒドロキシル化、アルキル化(メチル化およびエチル化を含む)、ユビキチン化、ピロリドンカルボン酸の付加、ジスルフィド架橋の形成、硫酸化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、ファルネシル化、ゲラニル化、グリピエーション、リポイル化およびヨウ素化が挙げられる。

【0274】

ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも1つの隣接配列を含み得る。本明細書で使用される場合の用語「隣接配列」は、エピトープの一部でないペプチドの断片または領域を指す。

【0275】

「免疫原性」ペプチドまたは「免疫原性」エピトープまたは「ペプチドエピトープ」は、ペプチドが、HLA分子に結合し、細胞媒介応答または体液性応答、例えば、細胞傷害性Tリンパ球（CTL（例えば、CD8⁺））、ヘルパーTリンパ球（Th（例えば、CD4⁺））および／またはBリンパ球応答を誘導することになるように、アレル特異的モチーフを含むペプチドである。したがって、本明細書に記載の免疫原性ペプチドは、適切なHLA分子に結合することができ、その後、ペプチドに対するCTL（細胞傷害性）応答、またはHTL（および体液性）応答を誘導することができる。

【0276】

「ネオ抗原」は、タンパク質の腫瘍特異的变化から生じる腫瘍抗原のクラスを意味する。ネオ抗原は、例えば、タンパク質配列の置換、フレームシフト突然変異、融合ポリペプチド、インフレーム欠失、挿入、内在性レトロウイルスポリペプチドの発現、およびポリペプチドの腫瘍特異的過剰発現から生じる、腫瘍抗原を包含するが、これらに限定されない。

【0277】

用語「残基」は、アミド結合もしくはアミド結合模倣物によってペプチドもしくはタンパク質に組み込まれている、またはアミノ酸もしくはアミノ酸模倣物をコードする核酸（DNAもしくはRNA）に組み込まれている、アミノ酸残基もしくはアミノ酸模倣残基を指す。

【0278】

「ネオエピトープ」、「腫瘍特異ネオエピトープ」または「腫瘍抗原」は、非罹患細胞、例えば、非がん性細胞または生殖系列細胞などの、参照には存在しないが、罹患細胞、例えばがん細胞には見られる、エピトープまたは抗原決定領域を指す。これは、対応するエピトープが正常な非罹患細胞または生殖系列細胞に見られるが、罹患細胞、例えばがん細胞、における1つまたは複数の突然変異に起因して、そのエピトープの配列が変化してネオエピトープを生じさせる結果となる状況を含む。本明細書で使用される場合の用語「ネオエピトープ」は、ペプチドまたはネオ抗原性ペプチド内の抗原決定領域を指す。ネオエピトープは、少なくとも1個の「アンカー残基」および少なくとも1つの「アンカー残基隣接領域」を含み得る。ネオエピトープは、「分離領域」をさらに含み得る。用語「アンカー残基」は、HLAとの相互作用の特異性をもたらす、HLA上の特定のポケットに結合するアミノ酸残基を指す。一部の場合には、アンカー残基は、標準アンカー位置に存在することがある。他の場合には、アンカー残基は、非標準アンカー位置に存在することもある。ネオエピトープは、ペプチド結合溝のポケットの中に突き出している一次および二次アンカー残基によってHLA分子に結合することができる。ペプチド結合溝内で、特定のアミノ酸が、提示されたネオエピトープのアンカー残基の対応する側鎖に対応するポケットを構成している。ペプチド結合選好性が、HLA I分子とHLA II分子の両方の異なるアレル間に存在する。HLAクラスI分子は、短いネオエピトープに結合し、そのN末端およびC末端がネオエピトープ結合溝の末端に位置するポケットに繫留される。HLAクラスI結合ネオエピトープの大多数は、約9アミノ酸のものであるが、より長いネオエピトープは、それらの中央部分の突出部によって調整することができ、その結果、約8～12アミノ酸の結合ネオエピトープとなる。HLAクラスIIタンパク質に結合するネオエピトープは、サイズの制約がなく、約16から約25アミノ酸まで様々であり得る。HLAクラスII分子中のネオエピトープ結合溝は、両方の末端が開放されており、このことによって相対的により長い長さを有するペプチドの結合が可能になる。コアの9アミノ酸残基の長いセグメントは、ネオエピトープの認識に一番貢献するが、アンカー残基隣接領域も、HLAクラスIIアレルに対するペプチドの特異性にとって重要である。一部の場合には、アンカー残基隣接領域は、N末端残基である。別の場合には、アンカー残基隣接領域は、C末端残基である。さらに別の場合には、アンカー残基隣接領域は、N末端残基とC末端残基の両方である。一部の場合には、アンカー残基隣接領域には少なくとも2個のアンカー残基が隣接している。アンカー残基が隣接しているアンカー残基隣接

10

20

30

40

50

領域は、「分離領域」である。

【0279】

「参照」は、腫瘍検体から本開示の方法で得られた結果を相関させるためにおよび比較するために使用され得る。典型的には、「参照」は、患者または1もしくは複数の個体、例えば健康な個体、特に同じ種の個体のいずれから採取された、1つまたは複数の正常な検体、特に、がん疾患に罹患していない検体に基づいて、得ることができる。「参照」は、十分に多い数の正常な検体を試験することにより、実験によって決定することができる。

【0280】

「エピトープ」は、認識される部位、例えば、免疫グロブリン、T細胞受容体、HLA分子、またはキメラ抗原受容体により認識される部位と一緒に形成する、分子の集団的特徴、例えば一次、二次および三次ペプチド構造ならびに電荷である。あるいは、エピトープは、特定の免疫グロブリンによる認識にまたはT細胞の状況に関与する一連のアミノ酸残基であって、T細胞受容体タンパク質、キメラ抗原受容体および／または主要組織適合遺伝子複合体(MHC)受容体による認識に必要な残基と定義することができる。「T細胞エピトープ」は、ペプチド提示MHC分子またはMHC複合体の形態のクラスIまたはIIのMHC分子により結合され、その後、この形態で、Tリンパ球またはヘルパーT細胞などのT細胞により認識され、結合され得る、ペプチド配列を意味すると理解されたい。エピトープは、天然源からの単離によって調製することができ、または当技術分野における標準的プロトコールに従って合成することができる。合成エピトープは、人工アミノ酸残基、「アミノ酸模倣物」、例えば、天然に存在するL-アミノ酸残基のD異性体、または天然に存在しないアミノ酸残基、例えばシクロヘキシルアラニンを含むことができる。本開示を通して、エピトープは、一部の 경우에는 ペプチドまたはペプチドエピトープと呼ばれることもある。本明細書に記載のエピトープまたはアナログはもちろん追加のアミノ酸も含むタンパク質またはペプチドがやはり本開示の範囲内であることを理解されたい。ある特定の実施形態では、ペプチドは、抗原の断片を含む。ある特定の実施形態では、本開示のペプチドの長さ制限がある。長さが制限される実施形態は、本明細書に記載のエピトープを含むタンパク質またはペプチドが、ネイティブ配列と100%の同一性を有する領域(すなわち、連続した一連のアミノ酸残基)を含む場合に生じる。例えば天然分子全体に関して、読み取りからのエピトープの定義を避けるために、ネイティブペプチド配列と100%の同一性を有する任意の領域について長さ制限がある。したがって、本明細書に記載のエピトープと、ネイティブペプチド配列と100%の同一性を有する領域とを含むペプチドについて、ネイティブ配列と100%の同一性を有する領域は、一般に、600未満またはそれに等しいアミノ酸残基、500未満またはそれに等しいアミノ酸残基、400未満またはそれに等しいアミノ酸残基、250未満またはそれに等しいアミノ酸残基、100未満またはそれに等しいアミノ酸残基、85未満またはそれに等しいアミノ酸残基、75未満またはそれに等しいアミノ酸残基、65未満またはそれに等しいアミノ酸残基、および50未満またはそれに等しいアミノ酸残基の長さを有する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の「エピトープ」は、下は5アミノ酸残基に至るまで任意の増分で、ネイティブペプチド配列と100%の同一性を有する51未満のアミノ酸残基、例えば、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1アミノ酸残基を有する領域を有するペプチドにより構成される。

【0281】

ペプチドまたはタンパク質を記載するために使用される命名法は、アミノ基が各アミノ酸残基の左側(アミノ末端またはN末端)、およびカルボキシル基が右側(カルボキシ末端またはC末端)に提示される、従来 of 慣例に従う。ペプチドエピトープ内のアミノ酸残基位置に言及される場合、それらは、アミノからカルボキシル方向に番号付けされ、エピ

10

20

30

40

50

トープの、またはそれが一部であり得るペプチドもしくはタンパク質の、アミノ末端に位置する残基が1位となる。本開示の選択された特定の実施形態を表す式では、アミノおよびカルボキシル末端基は、具体的に示されていないが、別段の指定がない限りそれらが生理pH値でとるであろう形態である。アミノ酸構造式では、各残基は、標準的な3文字または1文字表示によって一般に表される。アミノ酸残基のL形は、大文字1文字によって、または3文字記号の大文字の先頭文字によって表され、D形を有するアミノ酸残基についてのD形は、小文字1文字によって、または小文字3文字記号によって表される。しかし、3文字記号またはフルネームが大文字なしで使用される場合、それらは、Lアミノ酸残基を指すこともある。グリシンは、不斉炭素原子を有さないため単に「Gly」または「G」と呼ばれる。本明細書で示されるペプチドのアミノ酸配列は、標準的な1文字記号を使用して一般に表される。(A、アラニン；C、システイン；D、アスパラギン酸；E、グルタミン酸；F、フェニルアラニン；G、グリシン；H、ヒスチジン；I、イソロイシン；K、リシン；L、ロイシン；M、メチオニン；N、アスパラギン；P、プロリン；Q、グルタミン；R、アルギニン；S、セリン；T、トレオニン；V、バリン；W、トリプトファン；およびY、チロシン)。

【0282】

用語「突然変異」は、参照と比較した核酸配列の変化または相違(ヌクレオチド置換、付加または欠失)を指す。「体細胞突然変異」は、胚細胞(精子および卵子)の除く身体の細胞のいずれかで起こることがあり、したがって、子供に伝えられない。これらの変更は(常にではないが)がんまたは他の疾患の原因となり得る。一部の実施形態では、突然変異は、非同義突然変異である。用語「非同義突然変異」は、翻訳産物におけるアミノ酸置換などのアミノ酸変化をもたらす突然変異、例えば、ヌクレオチド置換を指す。「フレームシフト」は、突然変異が遺伝子のコドン周期性(「リーディングフレーム」としても公知)の正常な位相を破壊した場合に起こり、その結果、ノンネイティブタンパク質配列の翻訳が生じることになる。遺伝子の異なる突然変異が、同じ変更リーディングフレームを獲得することがあり得る。

【0283】

「保存的」アミノ酸置換は、あるアミノ酸残基が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えられる、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されており、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。例えば、フェニルアラニンでのチロシンの置換は、保存的置換である。ペプチド機能を消失させないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当技術分野において周知である。

【0284】

本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、結合対の2つのメンバー、例えば、HLA結合ペプチドとクラスIまたはII HLAとの間の結合の強度の尺度を指す。 K_D は、解離定数であり、モル濃度の単位を有する。親和性定数は、解離定数の逆数である。親和性定数は、この化学物質を記載するための一般用語として使用されることもある。それは、結合エネルギーの直接的尺度である。親和性は、例えば、市販のBiacore SPRユニットを使用して表面プラズモン共鳴(SPR)により、実験に基づいて決定することができる。親和性は、ペプチドの50%が置換される濃度である阻害濃度50(IC_{50})として表されることもある。同様に、 $\ln(IC_{50})$ は、 IC_{50} の自然対数を指す。 K_{off} は、例えば、HLA結合ペプチドとクラスIまたはII HLAの解離についての、解離速度定数を指す。本開示を通して、「結合データ」の結果は、「 IC_{50} 」の観点で表され得る。 IC_{50} は、標識参照ペプチドの結合の50%阻害が観察される結

10

20

30

40

50

合アッセイにおける被験ペプチドの濃度である。アッセイが実行される条件（すなわち、HLAタンパク質および標識参照ペプチド濃度の制限）を考えると、これらの値は、 K_D 値に近い。結合を判定するためのアッセイは、当技術分野において周知であり、例えば、PCT公開公報WO94/20127およびWO94/03205、ならびに他の公表文献、例えば、Sidney et al., *Current Protocols in Immunology* 18.3.1 (1998); Sidney, et al., *J. Immunol.* 154:247 (1995); および Sette, et al., *Mol. Immunol.* 31:813 (1994) に、詳細に記載されている。あるいは、結合は、参照標準ペプチドによる結合と比較して表現されることもある。例えば、参照標準ペプチドのIC₅₀に対する、そのIC₅₀に基づくことがある。結合は、他のアッセイ系を使用して決定されることもあり、そのような他のアッセイ系には、生細胞を使用するもの（例えば、Ceppellini et al., *Nature* 339:392 (1989); Christnick et al., *Nature* 352:67 (1991); Busch et al., *Int. Immunol.* 2:443 (1990); Hill et al., *J. Immunol.* 147:189 (1991); del Guercio et al., *J. Immunol.* 154:685 (1995)）、界面活性剤溶解物を使用する無細胞系を使用するもの（例えば、Cerundolo et al., *J. Immunol.* 21:2069 (1991)）、固定化精製MHCを使用するもの（例えば、Hill et al., *J. Immunol.* 152, 2890 (1994); Marshall et al., *J. Immunol.* 152:4946 (1994)）、ELISA系を使用するもの（例えば、Reay et al., *EMBO J.* 11:2829 (1992)）、表面プラズモン共鳴を使用するもの（例えば、Khilko et al., *J. Biol. Chem.* 268:15425 (1993)）；高フラックス可溶性相アッセイを使用するもの（Hammer et al., *J. Exp. Med.* 180:2353 (1994)）、およびクラスI MHC安定化または会合の測定を使用するもの（例えば、Ljunggren et al., *Nature* 346:476 (1990); Schumacher et al., *Cell* 62:563 (1990); Townsend et al., *Cell* 62:285 (1990); Parker et al., *J. Immunol.* 149:1896 (1992)）が含まれる。「交差反応性結合」は、ペプチドが1つより多くのHLA分子により結合されることを示し、同義語は、縮重結合である。

【0285】

エピトープを論じるために使用されるとき用語「誘導された／由来の (derived)」およびその文法的等価表現は、「調製された」およびその文法的等価表現と同義語である。誘導エピトープを天然源からの単離することができ、またはそれを当技術分野において標準的なプロトコールに従って合成することができる。合成エピトープは、人工アミノ酸残基、「アミノ酸模倣物」、例えば、天然に存在するLアミノ酸残基のD異性体、または非天然アミノ酸残基、例えばシクロヘキシルアラニンを含むことができる。誘導または調製エピトープは、ネイティブエピトープのアナログであることもある。

【0286】

「ネイティブ」または「野生型」配列は、自然界に見られる配列を指す。そのような配列は、本来、より長い配列を含み得る。

【0287】

「受容体」は、リガンドに結合することができる生体分子または分子配置を意味すると理解されたい。受容体は、細胞、細胞形成または生物に関する情報を伝達するように機能し得る。受容体は、例えば、各受容体単位がタンパク質分子からなり得る、少なくとも1つの受容体単位を含む。受容体は、リガンドの構造を補完する構造を有し、結合パートナーとしてのリガンドを複合体化することができる。情報は、特に、細胞表面でのリガンドの複合体化後の受容体の立体構造変化により伝達される。一部の実施形態では、受容体は

、特に、リガンド、特に好適な長さのペプチドまたはペプチド断片、と受容体／リガンド複合体を形成することができるMHCクラスIおよびIIのタンパク質を意味すると理解されたい。

【0288】

「リガンド」は、受容体の構造と相補的な構造を有する分子であって、この受容体と複合体を形成することができる分子を意味すると理解されたい。一部の実施形態では、リガンドは、ペプチドまたはペプチド断片がMHCクラスIまたはMHCクラスIIのタンパク質と複合体を形成することができるようにそのアミノ酸配列において好適な長さおよび好適な結合モチーフを有する、ペプチドまたはペプチド断片を意味すると理解されたい。

【0289】

一部の実施形態では、「受容体／リガンド複合体」はまた、クラスIのまたはクラスIIのペプチド提示またはペプチド断片提示MHC分子を含む、「受容体／ペプチド複合体」または「受容体／ペプチド断片複合体」を意味すると理解されたい。

【0290】

「合成ペプチド」は、非天然源から得られるペプチド、例えば、人間が作り出したペプチドを指す。そのようなペプチドは、化学合成または組換えDNA技術のような方法を使用して生成することができる。「合成ペプチド」は、「融合タンパク質」を含む。

【0291】

用語「モチーフ」は、被定義長のアミノ酸配列、例えば、長さが約15アミノ酸残基未満、または長さが約13アミノ酸残基未満のペプチド、例えば、特定のHLA分子により認識される、クラスI HLAモチーフについては約8～約13アミノ酸残基（例えば、8、9、10、11、12または13）およびクラスII HLAモチーフについては約6～約25アミノ酸残基（例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25）のペプチドにおける、残基のパターンを指す。モチーフは、通常は、所与のヒトHLAアレルによりコードされるHLAタンパク質ごとに異なる。これらのモチーフは、一次および二次アンカー残基についてのそれらのパターンが異なる。一部の実施形態では、MHCクラスIモチーフは、長さが9、10または11アミノ酸残基のペプチドを識別する。

【0292】

本明細書において使用される場合の用語「天然に存在する」およびその文法的等価表現は、物体を自然界で見出すことができることを指す。例えば、生物（ウイルスを含む）に存在し、自然界の供給源から単離することができる、ペプチドまたは核酸であって、研究室で人間によって意図的に修飾されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在するものである。

【0293】

本開示によれば、用語「ワクチン」は、病原体または罹患細胞、例えばがん細胞を認識して攻撃する免疫応答、例えば細胞性または体液性免疫応答を、投与時に誘導する、医薬調製物（医薬組成物）または医薬製品に関する。ワクチンは、疾患の予防に使用されることもあり、または処置に使用されることもある。用語「個々に応じたがんワクチン」または「個別化がんワクチン」は、特定のがん患者に関するものであり、がんワクチンが個々のがん患者の必要または特別な状況に適応することを意味する。

【0294】

「抗原プロセッシング」または「プロセッシング」およびその文法的等価表現は、ポリペプチドまたは抗原の、前記ポリペプチドまたは抗原の断片であるプロセッシング産物への分解（例えば、ポリペプチドのペプチドへの分解）、および細胞、例えば抗原提示細胞による特定のT細胞への提示のためのこれらの断片の1つまたは複数とMHC分子の（例えば結合を介した）会合を指す。

【0295】

「抗原提示細胞」（APC）は、それらの細胞表面にMHC分子に関連しているタンパク質抗原のペプチド断片を提示する細胞である。一部のAPCは、抗原特異的T細胞を活

10

20

30

40

50

性化することができる。プロフェッショナル抗原提示細胞は、ファゴサイトーシスまたは受容体媒介エンドサイトーシスのどちらかによる抗原の内在化、およびその後のクラスⅡ MHC分子に結合した抗原断片のそれらの膜への提示における効率が非常に高い。T細胞は、抗原提示細胞の膜上の抗原-クラスⅡ MHC分子複合体を認識し、それと相互作用する。その結果、追加の共刺激シグナルが、抗原提示細胞により産生され、T細胞の活性化に至る。共刺激分子の発現は、プロフェッショナル抗原提示細胞を決定付ける特徴である。プロフェッショナル抗原提示細胞の主な種類は、樹状細胞（これらは、最も広い抗原提示範囲を有し、恐らく、最も重要な抗原提示細胞である）、マクロファージ、B細胞、およびある特定の活性化上皮細胞である。樹状細胞（DC）は、末梢組織に捕捉された抗原をT細胞へMHCクラスⅡ抗原提示経路とMHCクラスⅠ抗原提示経路の両方によって提示する白血球集団である。樹状細胞が免疫応答の強力な誘導因子であること、およびこれらの細胞の活性化が抗腫瘍免疫の誘導に必要な不可欠なステップであることは、周知である。樹状細胞は、「未熟」細胞および「成熟」細胞として便宜的に大別され、これは、2つの十分に特徴付けられた表現型を区別する単純な方法として使用され得る。しかし、この命名法を、分化についての全ての可能性のある中間段階を除外するように解釈すべきでない。未熟樹状細胞は、Fc受容体（FcR）およびマンノース受容体の高度な発現と相関する高い抗原の取込みおよびプロセッシング能力を有する抗原提示細胞として特徴付けられる。成熟表現型は、これらのマーカーのより低度の発現、しかしT細胞活性化に関与する細胞表面分子、例えばクラスⅠおよびクラスⅡ MHC、接着分子（例えば、CD54およびCD11）ならびに共刺激分子（例えば、CD40、CD80、CD86および4-1BB）の高度な発現を、通常は特徴とする。

【0296】

本明細書で使用される場合の用語「同一の」およびその文法的等価表現、またはポリペプチドの2つの核酸配列またはアミノ酸配列の文脈での「配列同一性」は、指定比較ウィンドウにわたって最大に一致するようにアラインメントされたときに同じである2つの配列中の残基を指す。本明細書で使用される場合の「比較ウィンドウ」は、ある配列を同数の連続する位置の参照配列とそれら2配列の最適なアラインメント後に比較することができる、少なくとも約20の連続する位置、通常は約50～約200、より通常は約100～約150の連続する位置のセグメントを指す。比較のための配列アラインメントの方法は、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、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 (1970)のアラインメントアルゴリズムにより; Pearson and Lipman, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 85:2444 (1988)の類似性検索方法により; これらのアルゴリズムのコンピュータインプリメンテーション (Intelligents, Mountain View, Calif. によるPC/GeneプログラムのCLUSTAL; Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., U. S. A. のGAP, BESTFIT, BLAST, FASTAおよびTFASTAを含むが、これらに限定されない) により行うことができ、CLUSTALプログラムは、Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244 (1988) およびHiggins and Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Corpet et al., Nucleic Acids Res., 16:10881-10890 (1988); Huang et al., Computer Applications in the Biosciences, 8:155-165 (1992); ならびにPearson et al., Methods in Molecular Biology, 24:307-331 (1994) によって十分に説明されている。アラインメントは、点検および手動アラインメントにより行われることも多い。実施形態の1つのクラスでは

10

20

30

40

50

、本明細書におけるポリペプチドは、例えば、デフォルトパラメーターを使用してBLASTP（またはCLUSTAL、または任意の他の利用可能なアラインメントソフトウェア）によって測定して、参照ポリペプチドまたはその断片に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。同様に、核酸もまた出発核酸に対して記載されることがあり、例えば、それらは、例えば、デフォルトパラメーターを使用してBLASTN（またはCLUSTAL、または任意の他の利用可能なアラインメントソフトウェア）によって測定して、参照核酸またはその断片に対して50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、98%、99%または100%の配列同一性を有することがある。1つの分子が、より大きい分子とのある特定の配列同一性パーセンテージを有すると言われるとき、それは、これら2分子が最適にアラインメントされたとき、小さいほうの分子中の前記パーセンテージの残基が、大きいほうの分子中でこれら2分子が最適にアラインメントされた順序に従ってマッチ残基と出会うことを意味する。

【0297】

核酸配列またはアミノ酸配列に適用される場合の用語「実質的に同一の」およびその文法的等価表現は、核酸またはアミノ酸配列が、標準的パラメーターを使用して上記のプログラム、例えばBLASTを使用して、参照配列と比較して少なくとも90%のもしくはそれより高い配列同一性、または少なくとも95%、少なくとも98%および少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。例えば、BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列について）は、デフォルトとして、ワード長（W）11、期待値（E）10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列についてのBLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長（W）3、期待値（E）10、およびBLOSUM62スコア行列を使用する（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)を参照されたい）。配列同一性パーセンテージは、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の部分が、2つ配列の最適なアラインメントのために参照配列（これは、付加も欠失も含まない）と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことがある、比較ウィンドウにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較することにより決定される。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に出現する位置の数を決定してマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性パーセンテージを得ることによって計算される。実施形態では、実質的同一性は、長さが少なくとも約50残基である配列の領域にわたって、少なくとも約100残基の領域にわたって存在し、一部の実施形態では、配列は、少なくとも約150残基にわたって実質的に同一である。実施形態では、配列は、コード領域の全長にわたって実質的に同一である。

【0298】

本明細書で使用される場合の用語「ベクター」は、宿主細胞において目的の1つまたは複数の遺伝子または配列を送達することおよび通常は発現させることができる構築物を意味する。ベクターの例としては、ウイルスベクター、ネイキッドDNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド、またはファージベクター、カチオン性縮合剤を伴うDNAまたはRNA発現ベクター、およびリポソームに封入されたDNAまたはRNA発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0299】

「単離されている」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、自然界では見られない形態であるポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、それらが自然界で見られる形態ではもはやない程に精製さ

れているものを含む。一部の実施形態では、単離されているポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、実質的に純粋である。一部の実施形態では、「単離されたポリヌクレオチド」は、PCRまたは定量的PCR反応で増幅されたポリヌクレオチドを含む、PCRまたは定量的PCR反応を包含する。

【0300】

用語「単離された」、「生物学的に純粋な」またはそれらの文法的等価表現は、物質がそのネイティブな状態で見出されたときに物質に通常は伴う成分が実質的にまたは本質的にない物質を指す。したがって、本明細書に記載の単離されたペプチドは、それらの本来の位置の環境にあるペプチドに通常は付随する物質の一部も全ても含有しない。「単離された」エピトープは、エピトープが由来した抗原の全配列を含まないエピトープを指す。通常は、「単離された」エピトープには、ネイティブ配列の全長にわたって100%の同一性を有する配列をもたらず追加のアミノ酸残基が結合していない。ネイティブ配列は、エピトープが由来する腫瘍関連抗原などの配列であることもある。したがって、用語「単離された」は、物質がその元の環境（例えば、その物質が天然に存在する場合には天然環境）から除去されていることを意味する。「単離された」核酸は、その天然環境から除去された核酸である。例えば、生きている動物に天然に存在するポリヌクレオチドまたはペプチドは、単離されていないが、天然の系に共存する物質の一部または全てから分離された同じポリヌクレオチドまたはペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドがベクターの一部であることもあり、および／またはそのようなポリヌクレオチドもしくはペプチドが組成物の一部であることもあるが、それでもやはり、そのようなベクターもしくは組成物がその天然環境の一部でないことから「単離されている」こともある。単離されたRNA分子は、本明細書に記載のDNA分子の*in vivo*または*in vitro* RNA転写物を含み、合成的に生成されたそのような分子をさらに含む。

【0301】

本明細書で使用される場合の用語「実質的に精製された」およびその文法的等価表現は、核酸、ポリペプチド、タンパク質または他の化合物が天然に伴う、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチドおよび他の分子が本質的にない、すなわち、その約50%より多くがない、その約70%より多くがない、その約90%より多くがない、核酸配列、ポリペプチド、タンパク質または他の化合物を指す。

【0302】

本明細書で使用される場合の用語「実質的に純粋な」は、少なくとも50%純粋（すなわち、夾雑物がない）、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%純粋である物質を指す。

【0303】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「核酸」、「ポリ核酸」または「オリゴヌクレオチド」およびそれらの文法的等価表現は、本明細書では同義的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNA、例えばmRNAを含む。したがって、これらの用語は、二本鎖および一本鎖DNA、三重鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAを含む。それは、例えばメチル化によりおよび／またはキャッピングにより、修飾された形態、ならびに未修飾の形態のポリヌクレオチドも含む。この用語はまた、天然に存在しないまたは合成のヌクレオチドはもちろんヌクレオチドアナログも含む分子を含むように意図される。本明細書で開示または企図される核酸配列およびベクターは、例えばトランスフェクション、形質転換または形質導入により、細胞に導入することができる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらのアナログであってもよく、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であってもよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドおよび核酸は、*in vitro*で転写されたmRNAであり得る。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して投与されるポリヌクレオチドは、mRNAである。

【0304】

本明細書で使用される場合の「トランスフェクション」、「形質転換」または「形質導入」は、物理的または化学的方法を使用することによる宿主細胞への1つまたは複数の外因性ポリヌクレオチドの導入を指す。多くのトランスフェクション技術が、当技術分野において公知であり、例えば、リン酸カルシウムDNA共沈法（例えば、Murray E. J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991)を参照されたい)；DEAE-デキストラン；電気穿孔；カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション；タングステン粒子促進微粒子銃（Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)）；およびリン酸ストロンチウムDNA共沈法（Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)）を含む。その多くが市販されている、好適なパッケージング細胞の中で感染粒子を成長させた後に、ファージまたはウイルスベクターを宿主細胞に導入することができる。

【0305】

核酸および／または核酸配列は、それらが、共通の祖先核酸または核酸配列から天然にまたは人工的に誘導された場合、「相同」である。タンパク質および／またはタンパク質配列は、それらのコードDNAが共通の祖先核酸または核酸配列から天然にまたは人工的に誘導された場合、「相同」である。相同分子は、ホモログと呼ばれる。例えば、本明細書に記載の、任意の天然に存在するタンパク質を、任意の利用可能な突然変異誘発法によって修飾することができる。発現されたとき、この突然変異誘発された核酸は、元の核酸によりコードされるタンパク質と相同であるポリペプチドをコードする。相同性は、2つまたはそれより多くの核酸またはタンパク質（またはそれらの配列）間の配列同一性から一般に推測される。相同性を確立するのに有用である配列間の正確な同一性パーセンテージは、問題の核酸およびタンパク質によって変わるが、相同性を確立するためにわずか25%ほどの配列同一性のみが通常は使用される。高い配列同一性レベル、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%もしくはそれより高い%を使用して相同性を確立することもできる。配列同一性パーセンテージを決定する方法（例えば、デフォルトパラメーターを使用するBLASTPおよびBLASTN）は、本明細書に記載され、一般に利用可能である。

【0306】

用語「対象」は、特定の処置のレシピエントになる、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、げっ歯類などを含むがこれらに限定されない、任意の動物（例えば、哺乳動物）を指す。概して、用語「対象」および「患者」は、ヒト対象に関して本明細書では同義的に使用される。

【0307】

用語「有効量」または「治療有効量」または「治療効果」は、対象または哺乳動物の疾患または障害を「処置する」のに有効な治療薬の量を指す。薬物の治療有効量は、治療効果を有し、したがって、疾患もしくは障害の発症を予防することができ、疾患もしくは障害の発症を遅らせることができ、疾患もしくは障害の進行を遅らせることができ、疾患もしくは障害に関連する症状の1つもしくは複数がある程度軽減することができ、罹患率もしくは死亡率を低下させることができ、生活の質、またはそのような効果の組合せを改善することができる。

【0308】

用語「処置すること (treating)」もしくは「処置」もしくは「処置すること (to treat)」または「緩和すること」もしくは「緩和する」は、(1) 診断された病的状態もしくは障害を治癒させる、遅らせる、その症状を減少させる、および／またはその進行を停止させる、治療的手段と、(2) 標的とする病的状態または障害の発症を予防または緩徐化する発病予防手段または予防手段の、両方を指す。したがって、処置を必要とする者は、障害を既に有している者；障害に罹患しやすい者；および疾患を予防すべき者を含む。

【0309】

「薬学的に許容される」は、一般に非毒性の、不活性の、および／または生理学的に適合性の組成物または組成物の成分を指す。

【0310】

「医薬品賦形剤」または「賦形剤」は、アジュバント、担体、pH調製および緩衝剤、等張化剤、湿潤剤、保存薬などのような物質を含む。「医薬品賦形剤」は、薬学的に許容される賦形剤である。

ネオ抗原およびそれらの使用

【0311】

根治的かつ腫瘍特異的な免疫療法の開発に対する深刻な障害の1つは、自己免疫を回避するための高特異的な限定された腫瘍抗原の同定および選択である。悪性細胞内の遺伝子変化（例えば、逆位、転座、欠失、ミスセンス突然変異、スプライス部位突然変異など）の結果として生じる腫瘍ネオ抗原は、腫瘍特異性が最も高い抗原クラスの代表である。ネオ抗原は、それらの同定、最適化された抗原の選択、およびワクチンまたは免疫原性組成物に使用するためのネオ抗原の産生が技術的に困難であるため、がんワクチンまたは免疫原性組成物にはほとんど使用されていない。これらの問題には、がんを有する対象の高い割合からのマッチする生殖系列試料中ではなく腫瘍中にDNAレベルで存在する新生物／腫瘍の突然変異を同定すること；同定された突然変異を1つまたは複数のペプチド-MHC結合予測アルゴリズムで解析して、新生物／腫瘍内に発現され、患者HLAアレルの高い割合に結合する、複数のネオ抗原T細胞エピトープを生成すること；およびがんを有する対象の高い割合を処置するのに好適ながんワクチンまたは免疫原性組成物において使用するために、全てのネオ抗原ペプチドおよび予測された結合ペプチドのセットから選択された複数のネオ抗原ペプチドを合成することによって、対処することができる。

【0312】

例えば、治療ワクチンへのペプチド配列決定情報の翻訳は、個体の高い割合についてのHLA分子に結合することができる突然変異ペプチドの予測を含み得る。免疫源として利用する特定の突然変異を効率的に選択するには、どの突然変異ペプチドが患者のHLAアレルの高い割合に効率的に結合するのかを予測できなければならない。最近、検証された結合および非結合ペプチドを用いる神経回路網に基づく学習手法が、主要HLA-Aおよび-Bアレルについての予測アルゴリズムの正確度を向上させた。しかし、HLA-Aペプチド結合規則をコードするために、向上した神経回路網に基づくアルゴリズムを使用しても、いくつかの要因が、HLAアレル上に提示されるペプチドの予測力を制限する。

【0313】

治療ワクチンへのペプチド配列決定情報の翻訳の別の例としては、長いペプチドのマルチエピトープワクチンとしての薬物の製剤化を挙げることができる。実現可能な限り多くの突然変異エピトープを標的化することによって、免疫系の非常に大きな能力が活用され、免疫標的化遺伝子産物の抑制的調節による免疫回避の機会が防止され、エピトープ予測手法の公知正確度が補償される。合成ペプチドは、複数の免疫原を効率的に調製するための、および突然変異型エピトープの同定を有効なワクチンに迅速に翻訳するための、有用な手段を提供する。夾雑細菌物質も夾雑動物物質もない試薬を利用してペプチドを容易に化学合成することおよび簡単に精製することができる。小さいサイズによって、タンパク質の突然変異領域に明確に焦点を合わせることが可能になり、他の成分（非突然変異タンパク質またはウイルスベクター抗原）からの不適切な抗原の競合も低減される。

【0314】

治療ワクチンへのペプチド配列決定情報の翻訳についてのさらに別の例としては、強いワクチンアジュバントとの組合せを挙げることができる。有効なワクチンは、免疫応答を開始させるために強いアジュバントを必要とし得る。例えば、TLR3ならびにMDA5およびRIG3のRNAヘリカーゼドメインについてのアゴニストであるポリICLCは、ワクチンアジュバントに望ましいいくつかの特性を示した。これらの特性は、in vivoでの免疫細胞の局所および全身性活性化の誘導、刺激性ケモカインおよびサイトカ

10

20

30

40

50

インの産生、ならびにDCによる抗原提示の刺激を含む。さらに、ポリICLCは、ヒトにおいて持続的CD4⁺およびCD8⁺応答を誘導することができる。重要なこととして、転写経路およびシグナル伝達経路の上方調節の著しい類似性が、ポリICLCを用いるワクチン接種を受けた対象、および非常に有効な複製可能な黄熱病ワクチンを受けたボランティアに見られた。さらに、NYESO-1ペプチドワクチン（モンタナイドに加えて）と組み合わせてポリICLCで免疫された卵巢癌患者の>90%は、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の誘導、ならびに最近の第1相研究でペプチドに対する抗体応答を示した。それに加えて、ポリICLCは、今日までに25を超える臨床試験で広く試験され、比較的無害な毒性プロファイルを示した。

【0315】

一部の態様では、タンパク質の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含む組成物、第1のペプチドと第2のペプチドとをコードするポリヌクレオチドを含む組成物、第1のペプチドと第2のペプチドとを含む1つもしくは複数のAPCを含む組成物、またはHLAタンパク質との複合体中の第1のネオエピトープに特異的な第1のT細胞受容体(TCR)と、HLAタンパク質との複合体中の第2のネオエピトープに特異的な第2のTCRとを含む組成物であって、第1のペプチドが、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープが、突然変異を含み、第2のネオエピトープが、同じ突然変異を含む、組成物が、本明細書で提供される。

【0316】

一部の態様では、タンパク質の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1のネオエピトープおよび第2のネオエピトープが、同じである領域の少なくとも1個のアミノ酸を含む、組成物、第1のペプチドと第2のペプチドとをコードするポリヌクレオチドを含む組成物、第1のペプチドと第2のペプチドとを含む1つもしくは複数のAPCを含む組成物、またはHLAタンパク質との複合体中の第1のネオエピトープに特異的な第1のT細胞受容体(TCR)と、HLAタンパク質との複合体中の第2のネオエピトープに特異的な第2のTCRとを含む組成物であって、第1のペプチドが、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープが、第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープが、第2の突然変異を含む、組成物が、本明細書で提供される。

【0317】

一部の実施形態では、第1の突然変異と第2の突然変異は同じである。一部の実施形態では、第1のペプチドと第2のペプチドは、異なる分子である。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、同じタンパク質の領域の第1のネオエピトープを含み、第2のネオエピトープは、同じタンパク質の領域の第2のネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第1のネオエピトープおよび第2のネオエピトープは、同じである領域の少なくとも1個のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、タンパク質の領域は、タンパク質の少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900または1,000個の連続するアミノ酸を含む。一部の実施形態では、タンパク質の領域は、タンパク質の最大でも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900または1,000個の連続するアミノ酸のみを有する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、クラスI HLAタンパク質に結合して、クラスI HLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、クラスII HLAタンパク質に結合して、クラスII HLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、クラスI HLAタンパク質に結合して、クラスI HLA

10

20

30

40

50

Aーペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、クラスIIHLAタンパク質に結合して、クラスIIHLAーペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、第1のペプチドからプロセシングされた第1のネオエピトープペプチドであり、および／または第2のネオエピトープは、第2のペプチドからプロセシングされた第2のネオエピトープペプチドである。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、長さが第1のペプチドより短く、および／または第2のネオエピトープは、長さが第2のペプチドより短い。一部の実施形態では、第1のネオエピトープペプチドは、第1のペプチドを含む抗原提示細胞（APC）によりプロセシングされ、および／または第2のネオエピトープペプチドは、第2のペプチドを含むAPCによりプロセシングされる。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、CD8⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、CD4⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、CD8⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、CD4⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞のTCRは、第1または第2のペプチドを含むクラスIIHLAーペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞のTCRは、第1または第2のペプチドを含むクラスIIHLAーペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞のTCRは、第1または第2のペプチドを含むクラスIIHLAーペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞のTCRは、第1または第2のペプチドを含むクラスIIHLAーペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、1つまたは複数のAPCは、第1のペプチドを含む第1のAPC、および第2のペプチドを含む第2のAPCを含む。一部の実施形態では、突然変異は、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、第1のネオエピトープおよび第2のネオエピトープは、表1または2の遺伝子によりコードされる配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質は、表1または2の遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、突然変異は、表1または2の第2列の突然変異である。一部の実施形態では、タンパク質は、GATA3である。一部の実施形態では、第1のネオエピトープおよび第2のネオエピトープは、表34または表36の遺伝子によりコードされる配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質は、表34または表36の遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、突然変異は、表34または表36の第2列の突然変異である。一部の実施形態では、タンパク質は、BTKである。一部の実施形態では、第1のネオエピトープはおよび第2のネオエピトープは、表40A～40Dの遺伝子によりコードされる配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質は、表3または35の遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、突然変異は、表3または35の第2列の突然変異である。一部の実施形態では、タンパク質は、EGFRである。一部の実施形態では、単一のポリペプチドが、第1のペプチドおよび第2のペプチドを含み、または単一のポリヌクレオチドが、第1のペプチドおよび第2のペプチドをコードする。一部の実施形態では、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、同じ転写開始部位から転写された配列によりコードされる。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第1の転写開始部位から転写された配列によりコードされ、第2のペプチドは、第2の転写開始部位から転写された配列によりコードされる。一部の実施形態では、単一のポリペプチドは、少なくとも18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500または10,000アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、第1の対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

10

20

30

40

50

95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する第1の配列と、対応する第2の野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する第2の配列とを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、対応する第1の野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する少なくとも8または9個の連続するアミノ酸の第1の配列と、対応する第2の野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する少なくとも16または17個の連続するアミノ酸の第2の配列とを含む。一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチドより長い。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第2のペプチドより長い。一部の実施形態では、第1のペプチドは、少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500または10,000アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第2のペプチドは、少なくとも17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500、または10,000アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第1のペプチドは、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する少なくとも9個の連続するアミノ酸の配列を含む。一部の実施形態では、第2のペプチドは、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する少なくとも17個の連続するアミノ酸の配列を含む。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、第1のネオエピトープより長い。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、少なくとも8アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、8~12アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、少なくとも8個の連続するアミノ酸を含み、8個の連続するアミノ酸のうちの少なくとも2個は、野生型配列の対応する位置のものと異なる。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、少なくとも16アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、16~25アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、少なくとも16個の連続するアミノ酸を含み、16個の連続するアミノ酸のうちの少なくと

10

20

30

40

50

も2個は、野生型配列の対応する位置におけるものと異なる。

【0318】

一部の実施形態では、第1のペプチドは、少なくとも1つの付加的突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数は、第1のネオエピトープの突然変異でない。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数は、第1のネオエピトープの突然変異である。一部の実施形態では、第2のペプチドは、少なくとも1つの付加的突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数は、第2のネオエピトープの突然変異でない。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数は、第2のネオエピトープの突然変異である。一部の実施形態では、第1のペプチド、第2のペプチドまたは両方は、少なくとも1つの隣接配列を含み、少なくとも1つの隣接配列は、ネオエピトープの上流または下流にある。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、非野生型配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、N末端隣接配列である。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、C末端隣接配列である。一部の実施形態では、第1のペプチドの少なくとも1つの隣接配列は、第2のペプチドの少なくとも1つの隣接配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、第1のペプチドの少なくとも1つの隣接領域は、第2のペプチドの少なくとも1つの隣接領域とは異なる。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接残基は、突然変異を含む。一部の実施形態では、第1のネオエピトープ、第2のネオエピトープまたは両方は、少なくとも1個のアンカー残基を含む。一部の実施形態では、第1のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、標準アンカー位置にある。一部の実施形態では、第1のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、非標準アンカー位置にある。一部の実施形態では、第2のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、標準アンカー位置にある。一部の実施形態では、第2のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、非標準アンカー位置にある。一部の実施形態では、第1のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、第2のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基とは異なる。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、野生型残基である。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、置換物である。一部の実施形態では、第1ネオエピトープおよび／または第2のネオエピトープは、置換のない対応するネオエピトープより大きい親和性でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1ネオエピトープおよび／または第2のネオエピトープは、置換のない対応する野生型配列より大きい親和性でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、突然変異を含まない。一部の実施形態では、第1のネオエピトープ、第2のネオエピトープまたは両方は、少なくとも1つのアンカー残基隣接領域を含む。一部の実施形態では、ネオエピトープは、少なくとも1個のアンカー残基を含む。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、少なくとも2個のアンカー残基を含む。一部の実施形態では、少なくとも2個のアンカー残基は、少なくとも1個のアミノ酸を含む分離領域により分離されている。一部の実施形態では、少なくとも1つのアンカー残基隣接領域は、分離領域内にない。一部の実施形態では、少なくとも1つのアンカー残基隣接領域は、(a)および(b)両方ともに少なくとも2個のアンカー残基のうちのC末端アンカー

10

20

30

40

50

残基の下流の少なくとも2個のアンカー残基のうちのN末端アンカー残基の上流にある。

【0319】

一部の実施形態では、組成物は、アジュバントを含む。一部の実施形態では、組成物は、1つまたは複数の追加のペプチドを含み、1つまたは複数の追加のペプチドは、第3のネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、対応する野生型配列より大きい親和性でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nMまたは10nM未満のK_DまたはIC₅₀でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nMまたは10nM未満のK_DまたはIC₅₀でHLAクラスIタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nMまたは10nM未満のK_DまたはIC₅₀でHLAクラスIIタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、対象により発現されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する。一部の実施形態では、突然変異は、対象の非がん細胞には存在しない。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、対象のがん細胞の遺伝子または発現遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、組成物は、第1のTCRを含む第1のT細胞を含む。一部の実施形態では、組成物は、第2のTCRを含む第2のT細胞を含む。一部の実施形態では、第1のTCRは、ノンネイティブ細胞内ドメインを含み、および／または第2のTCRは、ノンネイティブ細胞内ドメインを含む。一部の実施形態では、第1のTCRは、可溶性TCRであり、および／または第2のTCRは、可溶性TCRである。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、細胞傷害性T細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、ガンマデルタT細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、ヘルパーT細胞である。一部の実施形態では、第1のT細胞は、第1のネオエピトープで刺激、拡大もしくは誘導されたT細胞であり、および／または第2のT細胞は、第2のネオエピトープで刺激、拡大もしくは誘導されたT細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、自己T細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、同種異系T細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、操作されたT細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のT細胞は、細胞系のT細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のTCRは、1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nMまたは10nM未満のK_DまたはIC₅₀でHLA-ペプチド複合体に結合する。一部の態様では、本明細書に記載の第1および第2のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターが、本明細書で提供される。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されている。一部の実施形態では、ベクターは、自己増幅RNAレプリコン、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルスまたはビリオンを含む。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、ワクシニアウイルス、B型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルスまたはこれらの偽型に由来する。一部の実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、ナノ粒子、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、金属ナノポリマー、ナノロッド、リポソーム、ミセル、マイクロバブル、細胞透過性ペプチド、またはリボスフィアである。

【0320】

一部の態様では、本明細書に記載の組成物または本明細書に記載のベクターと薬学的に

10

20

30

40

50

許容される賦形剤とを含む医薬組成物が、本明細書で提供される。

【0321】

一部の実施形態では、複数の細胞は、自己細胞である。一部の実施形態では、複数のAPC細胞は、自己細胞である。一部の実施形態では、複数のT細胞は、自己細胞である。一部の実施形態では、医薬組成物は、免疫調節剤またはアジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。一部の実施形態では、アジュバントは、ポリICLCである。一部の実施形態では、アジュバントは、ヒルトノールである。

【0322】

一部の態様では、がんを処置する方法であって、それを必要とする対象に本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0323】

一部の態様では、がん治療に対する抵抗性を予防する方法であって、それを必要とする対象に本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0324】

一部の態様では、免疫応答を誘導する方法であって、それを必要とする対象に本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が、本明細書で提供される。

【0325】

一部の実施形態では、免疫応答は、体液性応答である。一部の実施形態では、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、同時に、別々にまたは逐次的に投与される。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第2のペプチドの後に逐次的に投与される。一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチド後に逐次的に投与される。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第2のペプチドがT細胞を活性化するのに十分な期間の後、逐次的に投与される。一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチドがT細胞を活性化するのに十分な期間の後、逐次的に投与される。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第2のペプチドの後にT細胞を再刺激するために逐次的に投与される。一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチドの後にT細胞を再刺激するために逐次的に投与される。一部の実施形態では、第1のペプチドは、T細胞を刺激するために投与され、第2のペプチドは、第1のペプチドの後にT細胞を再刺激するために投与される。一部の実施形態では、第2のペプチドは、T細胞を刺激するために投与され、第1のペプチドは、第2のペプチドの後にT細胞を再刺激するために投与される。

【0326】

一部の実施形態では、対象は、がんを有し、がんは、黒色腫、卵巣がん、肺がん、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、および慢性リンパ球性白血病（CLL）からなる群から選択される。一部の実施形態では、がんは、抗エストロゲン療法に対して抵抗性である、MSI乳がんである、転移性乳がんである、Her2陰性乳がんである、Her2陽性乳がんである、ER陰性乳がんである、ER陽性乳がんである、PR陽性乳がんである、PR陰性乳がんまたはこれらの任意の組合せである、乳がんである。一部の実施形態では、乳がんは、突然変異を有するエストロゲン受容体を発現する。一部の実施形態では、対象は、抗エストロゲン療法に対して抵抗性である乳がんを有する。一部の実施形態では、乳がんは、突然変異を有するエストロゲン受容体を発現する。一部の実施形態では、対象は、イブルチニブ療法に対して抵抗性であるCLLを有する。一部の実施形態では、CLLは、C481S突然変異などの突然変異を有するブルトン型チロシンキナーゼを発現する。一部の実施形態では、対象は、チロシンキナーゼ阻害剤に対して抵抗性である肺がんを有する。一部の実施形態では、肺がんは、T790M突然変異などの突然変異を有する上皮増殖因子受容体（EGFR）を発現する。一部の実施形態では、第1のペプチドを含む複数のAPC細胞、および第2のペプチドを含む複数のAPC細胞は、同時に、別々にまたは逐次的に投与される。一部の実施形態では、第1のTCRを含む複数のT細胞、および第2のTCRを含む複数のT細胞は、同時に、別々にまたは逐次的に投与される。一部の実施形態では、方法は、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法を

10

20

30

40

50

投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤または治療法は、外科手術、チェックポイント阻害剤、抗体もしくはその断片、化学療法剤、放射線、ワクチン、小分子、T細胞、ベクター、およびAPC、ポリヌクレオチド、腫瘍溶解性ウイルス、またはこれらの任意の組合せである。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、抗PD-1剤および抗PD-L1剤、抗CTLA-4剤、または抗CD40剤である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、本明細書における記載に従って医薬組成物の投与の前に、投与と同時に、または投与の後に投与される。

ペプチド

【0327】

態様では、本開示は、表1または2からの腫瘍特異的突然変異を含む単離されたペプチドを提供する。態様では、本開示は、表34からの腫瘍特異的突然変異を含む単離されたペプチドを提供する。態様では、本開示は、表40A~40Dからの腫瘍特異的突然変異を含む単離されたペプチドを提供する。これらのペプチドおよびポリペプチドは、本明細書では「ネオ抗原性ペプチド」または「ネオ抗原性ポリペプチド」と呼ばれる。本明細書で使用される場合の「ポリペプチド」、「ペプチド」およびそれらの文法的等価表現は、通常は隣接するアミノ酸の α -アミノ基とカルボキシル基の間のペプチド結合により、一方が他方に接続されている、アミノ酸残基、通常は、L-アミノ酸、のポリマーを指す。ポリペプチドおよびペプチドは、「突然変異型ペプチド」、「ネオ抗原ペプチド」および「ネオ抗原性ペプチド」を含むが、これらに限定されない。ポリペプチドおよびペプチドは、様々な長さで、それらの中性（非荷電）形態または塩の形態のどちらかであり得、グリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化などの修飾がないこともあり、またはこれらの修飾を、修飾が本明細書に記載されるようなポリペプチドの生物活性を破壊しないことを条件として、含有することもある。ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも1つの隣接配列を含み得る。本明細書で使用される場合の用語「隣接配列」は、エピトープの一部でないペプチドの断片または領域を指す。

表1はGATA3ネオORFペプチドを収載するものである

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

タイプ	配列
8量体	EPCSMLTG, PCSMLTGP, CSMLTGPP, SMLTGPPA, MLTGPPAR, LTGPPARV, TGPPARVP, GPPARVPA, PPARVPAV, PARVPAVP, ARVPAVPF, RVPVAVPFD, VPAVPFDL, PAVPFDLH, AVPFDLHF, VPFDLHFC, PFDLHFCR, FDLHFCRS, DLHFCRSS, LHFCRSSI, HFCRSSIM, FCRSSIMK, CRSSIMKP, RSSIMKPK, SSIMKPKR, SIMKPKRD, IMKPKRDG, MKPKRDGY, KPKRDGYM, PKRDGYMF, KRDGYMFL, RDGYMFLK, DGYMFLKA, GYMFLKAE, YMFLKAES, MFLKAESK, FLKAESKI, LKAESKIM, KAESKIMF, AESKIMFA, ESKIMFAT, SKIMFATL, KIMFATLQ, IMFATLQR, MFATLQRS, FATLQRSS, ATLQRSSL, TLQRSSLW, LQRSSLWC, QRSSLWCL, RSSLWCLC, SSLWCLCS, SLWCLCSN
9量体	EPCSMLTGPP, PCSMLTGPPA, CSMLTGPPA, SMLTGPPAR, MLTGPPARV, LTGPPARVP, TGPPARVPA, GPPARVPAV, PPARVPAVP, PARVPAVPF, ARVPAVPFD, RVPVAVPFDL, VPAVPFDLH, PAVPFDLHF, AVPFDLHFC, VPFDLHFCR, PFDLHFCRS, FDLHFCRSS, DLHFCRSSI, LHFCRSSIM, HFCRSSIMK, FCRSSIMKP, CRSSIMKPK, RSSIMKPKR, SSIMKPKRD, SIMKPKRDG, IMKPKRDGY, MKPKRDGYM, KPKRDGYMF, PKRDGYMFL, KRDGYMFLK, RDGYMFLKA, DGYMFLKAE, GYMFLKAE, YMFLKAESK, MFLKAESKI, FLKAESKIM, LKAESKIMF, KAESKIMFA, AESKIMFAT, ESKIMFATL, SKIMFATLQ, KIMFATLQR, IMFATLQRS, MFATLQRSS, FATLQRSSL, ATLQRSSLW, TLQRSSLWC, LQRSSLWCL, QRSSLWCLC, RSSLWCLCS, SSLWCLCSN, SLWCLCSNH
10量体	EPCSMLTGPPA, PCSMLTGPPA, CSMLTGPPAR, SMLTGPPARV, MLTGPPARVP, LTGPPARVPA, TGPPARVPAV, GPPARVPAVP, PPARVPAVPF, PARVPAVPFD, ARVPAVPFDL, RVPVAVPFDLH, VPAVPFDLHF, PAVPFDLHFC, AVPFDLHFCR, VPFDLHFCRS, PFDLHFCRSS, FDLHFCRSSI, DLHFCRSSIM, LHFCRSSIMK, HFCRSSIMKP, FCRSSIMKPK, CRSSIMKPKR, RSSIMKPKRD, SSIMKPKRDG, SIMKPKRDGY, IMKPKRDGYM, MKPKRDGYMF, KPKRDGYMFL, PKRDGYMFLK, KRDGYMFLKA, RDGYMFLKAE, DGYMFLKAE, GYMFLKAE, YMFLKAESK, MFLKAESKI, FLKAESKIM, FLKAESKIMF, LKAESKIMFA, KAESKIMFAT, AESKIMFATL, ESKIMFATLQ, SKIMFATLQR, KIMFATLQRS, IMFATLQRSS, MFATLQRSSL, FATLQRSSLW, ATLQRSSLWC, TLQRSSLWCL, LQRSSLWCLC, QRSSLWCLCS, RSSLWCLCSN, SSLWCLCSNH, SLWCLCSNH
11量体	EPCSMLTGPPA, PCSMLTGPPAR, CSMLTGPPARV, SMLTGPPARVP, MLTGPPARVPA, LTGPPARVPAV, TGPPARVPAVP, GPPARVPAVPF, PPARVPAVPFD, PARVPAVPFDL, ARVPAVPFDLH, RVPVAVPFDLHF, VPAVPFDLHFC, PAVPFDLHFCR, AVPFDLHFCRS, VPFDLHFCRSS, PFDLHFCRSSI, FDLHFCRSSIM, DLHFCRSSIMK, LHFCRSSIMKP, HFCRSSIMKPK, FCRSSIMKPKR, CRSSIMKPKRD, RSSIMKPKRDG, SSIMKPKRDGY, SIMKPKRDGYM, IMKPKRDGYMF, MKPKRDGYMFL, KPKRDGYMFLK, PKRDGYMFLKA, KRDGYMFLKAE, RDGYMFLKAE, DGYMFLKAE, GYMFLKAE, YMFLKAESK, MFLKAESKI, FLKAESKIM, FLKAESKIMF, FLKAESKIMFA, LKAESKIMFAT, KAESKIMFATL, AESKIMFATLQ, ESKIMFATLQR, SKIMFATLQRS, KIMFATLQRSS, IMFATLQRSSL, MFATLQRSSLW, FATLQRSSLWC, ATLQRSSLWCL, TLQRSSLWCLC, LQRSSLWCLCS, QRSSLWCLCSN, RSSLWCLCSNH
12量体	EPCSMLTGPPAR, PCSMLTGPPARV, CSMLTGPPARVP, SMLTGPPARVPA, MLTGPPARVPAV, LTGPPARVPAVP, TGPPARVPAVPF, GPPARVPAVPFD, PPARVPAVPFDL, PARVPAVPFDLH, ARVPAVPFDLHF, RVPVAVPFDLHFC, VPAVPFDLHFCR, PAVPFDLHFCRS, AVPFDLHFCRSS, VPFDLHFCRSSI, PFDLHFCRSSIM, FDLHFCRSSIMK, DLHFCRSSIMKP, LHFCRSSIMKPK, HFCRSSIMKPKR, FCRSSIMKPKRD, CRSSIMKPKRDG, RSSIMKPKRDGY, SSIMKPKRDGYM, SIMKPKRDGYMF, IMKPKRDGYMFL, MKPKRDGYMFLK, KPKRDGYMFLKA, PKRDGYMFLKAE, KRDGYMFLKAE, RDGYMFLKAE, DGYMFLKAE, GYMFLKAE, YMFLKAESKIM, MFLKAESKIMF, FLKAESKIMFA, LKAESKIMFAT, KAESKIMFATL, AESKIMFATLQ, ESKIMFATLQR, SKIMFATLQRS, KIMFATLQRSS, IMFATLQRSSL, KAESKIMFATLQ, AESKIMFATLQR, ESKIMFATLQRS, SKIMFATLQRSS, KIMFATLQRSSL,

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	IMFATLQRSSLW, MFATLQRSSLWC, FATLQRSSLWCL, ATLQRSSLWCLC, TLQRSSLWCLCS, LQRSSLWCLCSN, QRSSLWCLCSNH
13量体	EPCSMLTGPPARV, PCSMLTGPPARVP, CSMLTGPPARVPA, SMLTGPPARVPAV, MLTGPPARVPAVP, LTGPPARVPAVPF, TGPPARVPAVPFD, GPPARVPAVPFDL, PPARVPAVPFDLH, PARVPAVPFDLHF, ARVPAVPFDLHFC, RVPVPFDLHFCR, VPAVPFDLHFCRS, PAVPFDLHFCRSS, AVPFDLHFCRSSI, VPFDLHFCRSSIM, PFDLHFCRSSIMK, FDLHFCRSSIMKP, DLHFCRSSIMKPK, LHFCRSSIMKPKR, HFCRSSIMKPKRD, FCRSSIMKPKRDG, CRSSIMKPKRDGY, RSSIMKPKRDGYM, SSIMKPKRDGYMF, SIMKPKRDGYMFL, IMKPKRDGYMFLK, MKPKRDGYMFLKA, KPKRDGYMFLKAE, PKRDGYMFLKAES, KRDGYMFLKAESK, RDGYMFLKAESKI, DGYMFLKAESKIM, GYMFLKAESKIMF, YMFLKAESKIMFA, MFLKAESKIMFAT, FLKAESKIMFATL, LKAESKIMFATLQ, KAESKIMFATLQR, AESKIMFATLQRS, ESKIMFATLQRSSL, SKIMFATLQRSSL, KIMFATLQRSSLW, IMFATLQRSSLWC, MFATLQRSSLWCL, FATLQRSSLWCLC, ATLQRSSLWCLCS, TLQRSSLWCLCSN, LQRSSLWCLCSNH
14量体	EPCSMLTGPPARVP, PCSMLTGPPARVPA, CSMLTGPPARVPAV, SMLTGPPARVPAVP, MLTGPPARVPAVPF, LTGPPARVPAVPFD, TGPPARVPAVPFDL, GPPARVPAVPFDLH, PPARVPAVPFDLHF, PARVPAVPFDLHFC, ARVPAVPFDLHFCR, RVPVPFDLHFCRS, VPAVPFDLHFCRSS, PAVPFDLHFCRSSI, AVPFDLHFCRSSIM, VPFDLHFCRSSIMK, PFDLHFCRSSIMKP, FDLHFCRSSIMKPK, DLHFCRSSIMKPKR, LHFCRSSIMKPKRD, HFCRSSIMKPKRDG, FCRSSIMKPKRDGY, CRSSIMKPKRDGYM, RSSIMKPKRDGYMF, SSIMKPKRDGYMFL, SIMKPKRDGYMFLK, IMKPKRDGYMFLKA, MKPKRDGYMFLKAE, KPKRDGYMFLKAES, PKRDGYMFLKAESK, KRDGYMFLKAESKI, RDGYMFLKAESKIM, DGYMFLKAESKIMF, GYMFLKAESKIMFA, YMFLKAESKIMFAT, MFLKAESKIMFATL, FLKAESKIMFATLQ, LKAESKIMFATLQR, KAESKIMFATLQRS, AESKIMFATLQRSS, ESKIMFATLQRSSL, SKIMFATLQRSSLW, KIMFATLQRSSLWC, IMFATLQRSSLWCL, MFATLQRSSLWCLC, FATLQRSSLWCLCS, ATLQRSSLWCLCSN, TLQRSSLWCLCSNH
15量体	EPCSMLTGPPARVPA, PCSMLTGPPARVPAV, CSMLTGPPARVPAVP, SMLTGPPARVPAVPF, MLTGPPARVPAVPFD, LTGPPARVPAVPFDL, TGPPARVPAVPFDLH, GPPARVPAVPFDLHF, PPARVPAVPFDLHFC, PARVPAVPFDLHFCR, ARVPAVPFDLHFCRS, RVPVPFDLHFCRSS, VPAVPFDLHFCRSSI, PAVPFDLHFCRSSIM, AVPFDLHFCRSSIMK, VPFDLHFCRSSIMKP, PFDLHFCRSSIMKPK, FDLHFCRSSIMKPKR, DLHFCRSSIMKPKRD, LHFCRSSIMKPKRDG, HFCRSSIMKPKRDGY, FCRSSIMKPKRDGYM, CRSSIMKPKRDGYMF, RSSIMKPKRDGYMFL, SSIMKPKRDGYMFLK, SIMKPKRDGYMFLKA, IMKPKRDGYMFLKAE, MKPKRDGYMFLKAES, KPKRDGYMFLKAESK, PKRDGYMFLKAESKI, KRDGYMFLKAESKIM, RDGYMFLKAESKIMF, DGYMFLKAESKIMFA, GYMFLKAESKIMFAT, YMFLKAESKIMFATL, MFLKAESKIMFATLQ, FLKAESKIMFATLQR, LKAESKIMFATLQRS, KAESKIMFATLQRSS, AESKIMFATLQRSSL, ESKIMFATLQRSSLW, SKIMFATLQRSSLWC, KIMFATLQRSSLWCL, IMFATLQRSSLWCLC, MFATLQRSSLWCLCS, FATLQRSSLWCLCSN, ATLQRSSLWCLCSNH
16量体	EPCSMLTGPPARVPAV, PCSMLTGPPARVPAVP, CSMLTGPPARVPAVPF, SMLTGPPARVPAVPFD, MLTGPPARVPAVPFDL, LTGPPARVPAVPFDLH, TGPPARVPAVPFDLHF, GPPARVPAVPFDLHFC, PPARVPAVPFDLHFCR, PARVPAVPFDLHFCRS, ARVPAVPFDLHFCRSS, RVPVPFDLHFCRSSI, PAVPFDLHFCRSSIM, VPAVPFDLHFCRSSIMK, PAVPFDLHFCRSSIMKP, AVPFDLHFCRSSIMKP, VPFDLHFCRSSIMKPK, PFDLHFCRSSIMKPKR, FDLHFCRSSIMKPKRD, DLHFCRSSIMKPKRDG, LHFCRSSIMKPKRDGY, HFCRSSIMKPKRDGYM, FCRSSIMKPKRDGYMF, CRSSIMKPKRDGYMFL, RSSIMKPKRDGYMFLK, SSIMKPKRDGYMFLKA, SIMKPKRDGYMFLKAE, IMKPKRDGYMFLKAES, MKPKRDGYMFLKAESK, KPKRDGYMFLKAESKI, PKRDGYMFLKAESKIM, KRDGYMFLKAESKIMF, RDGYMFLKAESKIMFA, DGYMFLKAESKIMFAT, GYMFLKAESKIMFATL, YMFLKAESKIMFATLQ, MFLKAESKIMFATLQR

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

	FLKAESKIMFATLQRS, LKAESKIMFATLQRSS, KAESKIMFATLQRSSL, AESKIMFATLQRSSLW, ESKIMFATLQRSSLWC, SKIMFATLQRSSLWCL, KIMFATLQRSSLWCLC, IMFATLQRSSLWCLCS, MFATLQRSSLWCLCSN, FATLQRSSLWCLCSNH
17量体	EPCSMLTGPPARVPAVP, PCSMLTGPPARVPAVPF, CSMLTGPPARVPAVPFD, SMLTGPPARVPAVPFDL, MLTGPPARVPAVPFDLH, LTGPPARVPAVPFDLHF, TGPPARVPAVPFDLHFC, GPPARVPAVPFDLHFCR, PPARVPAVPFDLHFCRS, PARVPAVPFDLHFCRSS, ARVPAVPFDLHFCRSSI, RVPAPFDLHFCRSSIM, VPAVPFDLHFCRSSIMK, PAVPFDLHFCRSSIMKP, AVPFDLHFCRSSIMKPK, VPFDLHFCRSSIMKPKR, PFDLHFCRSSIMKPKRD, FDLHFCRSSIMKPKRDG, DLHFCRSSIMKPKRDGY, LHFCRSSIMKPKRDGYM, HFCRSSIMKPKRDGYMF, FCRSSIMKPKRDGYMFL, CRSSIMKPKRDGYMFLK, RSSIMKPKRDGYMFLKA, SSIMKPKRDGYMFLKAE, SIMKPKRDGYMFLKAES, IMKPKRDGYMFLKAESK, MKPKRDGYMFLKAESKI, KPKRDGYMFLKAESKIM, PKRDGYMFLKAESKIMF, KRDDGYMFLKAESKIMFA, RDGYMFLKAESKIMFAT, DGYMFLKAESKIMFATL, GYMFLKAESKIMFATLQ, YMFLKAESKIMFATLQR, MFLKAESKIMFATLQRS, FLKAESKIMFATLQRSS, LKAESKIMFATLQRSSL, KAESKIMFATLQRSSLW, AESKIMFATLQRSSLWC, ESKIMFATLQRSSLWCL, SKIMFATLQRSSLWCLC, KIMFATLQRSSLWCLCS, IMFATLQRSSLWCLCSN, MFATLQRSSLWCLCSNH
18量体	EPCSMLTGPPARVPAVPF, PCSMLTGPPARVPAVPFD, CSMLTGPPARVPAVPFDL, SMLTGPPARVPAVPFDLH, MLTGPPARVPAVPFDLHF, LTGPPARVPAVPFDLHFC, TGPPARVPAVPFDLHFCR, GPPARVPAVPFDLHFCRS, PPARVPAVPFDLHFCRSS, PARVPAVPFDLHFCRSSI, ARVPAVPFDLHFCRSSIM, RVPAPFDLHFCRSSIMK, VPAVPFDLHFCRSSIMKP, PAVPFDLHFCRSSIMKPK, AVPFDLHFCRSSIMKPKR, VPFDLHFCRSSIMKPKRD, PFDLHFCRSSIMKPKRDG, FDLHFCRSSIMKPKRDGY, DLHFCRSSIMKPKRDGYM, LHFCRSSIMKPKRDGYMF, HFCRSSIMKPKRDGYMFL, FCRSSIMKPKRDGYMFLK, CRSSIMKPKRDGYMFLKA, RSSIMKPKRDGYMFLKAE, SSIMKPKRDGYMFLKAE, SIMKPKRDGYMFLKAESK, IMKPKRDGYMFLKAESKI, MKPKRDGYMFLKAESKIM, KPKRDGYMFLKAESKIMF, PKRDGYMFLKAESKIMFA, KRDDGYMFLKAESKIMFAT, RDGYMFLKAESKIMFATL, DGYMFLKAESKIMFATLQ, GYMFLKAESKIMFATLQR, YMFLKAESKIMFATLQRS, MFLKAESKIMFATLQRSS, FLKAESKIMFATLQRSSL, LKAESKIMFATLQRSSLW, KAESKIMFATLQRSSLWC, AESKIMFATLQRSSLWCL, ESKIMFATLQRSSLWCLC, SKIMFATLQRSSLWCLCS, KIMFATLQRSSLWCLCSN, IMFATLQRSSLWCLCSNH
19量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFD, PCSMLTGPPARVPAVPFDL, CSMLTGPPARVPAVPFDLH, SMLTGPPARVPAVPFDLHF, MLTGPPARVPAVPFDLHFC, LTGPPARVPAVPFDLHFCR, TGPPARVPAVPFDLHFCRS, GPPARVPAVPFDLHFCRSS, PPARVPAVPFDLHFCRSSI, PARVPAVPFDLHFCRSSIM, ARVPAVPFDLHFCRSSIMK, RVPAPFDLHFCRSSIMKP, VPAVPFDLHFCRSSIMKPK, PAVPFDLHFCRSSIMKPKR, AVPFDLHFCRSSIMKPKRD, VPFDLHFCRSSIMKPKRDG, PFDLHFCRSSIMKPKRDGY, FDLHFCRSSIMKPKRDGYM, DLHFCRSSIMKPKRDGYMF, LHFCRSSIMKPKRDGYMFL, HFCRSSIMKPKRDGYMFLK, FCRSSIMKPKRDGYMFLKA, CRSSIMKPKRDGYMFLKAE, RSSIMKPKRDGYMFLKAES, SSIMKPKRDGYMFLKAESK, SIMKPKRDGYMFLKAESKI, IMKPKRDGYMFLKAESKIM, MKPKRDGYMFLKAESKIMF, KPKRDGYMFLKAESKIMFA, PKRDGYMFLKAESKIMFAT, KRDDGYMFLKAESKIMFATL, RDGYMFLKAESKIMFATLQ, DGYMFLKAESKIMFATLQR, GYMFLKAESKIMFATLQRS, YMFLKAESKIMFATLQRSS, MFLKAESKIMFATLQRSSL, FLKAESKIMFATLQRSSLW, LKAESKIMFATLQRSSLWC, KAESKIMFATLQRSSLWCL, AESKIMFATLQRSSLWCLC, ESKIMFATLQRSSLWCLCS, SKIMFATLQRSSLWCLCSN, KIMFATLQRSSLWCLCSNH
20量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDL, PCSMLTGPPARVPAVPFDLH, CSMLTGPPARVPAVPFDLHF, SMLTGPPARVPAVPFDLHFC, MLTGPPARVPAVPFDLHFCR, LTGPPARVPAVPFDLHFCRS, TGPPARVPAVPFDLHFCRSS, GPPARVPAVPFDLHFCRSSI, PPARVPAVPFDLHFCRSSIM, PARVPAVPFDLHFCRSSIMK, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, RVPAPFDLHFCRSSIMKPK, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, LHFCRSSIMKPKRDGYMFL, HFCRSSIMKPKRDGYMFLK, FCRSSIMKPKRDGYMFLKA, CRSSIMKPKRDGYMFLKAE, RSSIMKPKRDGYMFLKAES, SSIMKPKRDGYMFLKAESK, SIMKPKRDGYMFLKAESKI, IMKPKRDGYMFLKAESKIM, MKPKRDGYMFLKAESKIMF, KPKRDGYMFLKAESKIMFA, PKRDGYMFLKAESKIMFAT, KRDDGYMFLKAESKIMFATL, RDGYMFLKAESKIMFATLQ, DGYMFLKAESKIMFATLQR, GYMFLKAESKIMFATLQRS, YMFLKAESKIMFATLQRSS, MFLKAESKIMFATLQRSSL, FLKAESKIMFATLQRSSLW, LKAESKIMFATLQRSSLWC, KAESKIMFATLQRSSLWCL, AESKIMFATLQRSSLWCLC, ESKIMFATLQRSSLWCLCS, SKIMFATLQRSSLWCLCSN, KIMFATLQRSSLWCLCSNH

10

20

30

40

50

【表 1-4】

	VPDFDLHFCRSSIMKPKRDGY, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, LHFRCRSSIMKPKRDGYMFLK, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, CRSSIMKPKRDGYMFLKAES, RSSIMKPKRDGYMFLKAESK, SSIMKPKRDGYMFLKAESKI, SIMKPKRDGYMFLKAESKIM, IMKPKRDGYMFLKAESKIMF, MKPKRDGYMFLKAESKIMFA, KPKRDGYMFLKAESKIMFAT, PKRDGYMFLKAESKIMFATL, KRDGYMFLKAESKIMFATLQ, RDGYMFLKAESKIMFATLQR, DGYMFLKAESKIMFATLQRS, GYMFLKAESKIMFATLQRSS, YMFLKAESKIMFATLQRSSL, MFLKAESKIMFATLQRSSLW, FLKAESKIMFATLQRSSLWC, LKAESKIMFATLQRSSLWCL, KAESKIMFATLQRSSLWCLC, AESKIMFATLQRSSLWCLCS, ESKIMFATLQRSSLWCLCSN, SKIMFATLQRSSLWCLCSNH	
21 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLH, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHF, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCR, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCR, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSS, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, RVPAPVPFDLHFCRSSIMKPKR, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, LHFRCRSSIMKPKRDGYMFLKA, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, MKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, KPKRDGYMFLKAESKIMFATL, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, KRDGYMFLKAESKIMFATLQR, RDGYMFLKAESKIMFATLQRS, DGYMFLKAESKIMFATLQRSS, GYMFLKAESKIMFATLQRSSL, YMFLKAESKIMFATLQRSSLW, MFLKAESKIMFATLQRSSLWC, FLKAESKIMFATLQRSSLWCL, LKAESKIMFATLQRSSLWCLC, KAESKIMFATLQRSSLWCLCS, AESKIMFATLQRSSLWCLCSN, ESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	10
22 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHF, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFC, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCR, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRS, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSS, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, RVPAPVPFDLHFCRSSIMKPKRD, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, LHFRCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, FLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, LKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, KAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, AESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	20
23 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHF, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFC, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCR, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRS, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSS, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, RVPAPVPFDLHFCRSSIMKPKRD, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, LHFRCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, FLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, LKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, KAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, AESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	30
23 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHF, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCR, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRS, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSS, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, RVPAPVPFDLHFCRSSIMKPKRD, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, LHFRCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, FLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, LKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, KAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, AESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	40

【表 1 - 5】

	MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, RVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, FLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, LKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, KAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	10
24量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRS, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRS, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, RVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, FLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, LKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	20
25量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRS, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSS, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, RVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, LKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	30
		40

【表 1 - 6】

	FLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	
26量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPK, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKR, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRD, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDG, PARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGY, ARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYM, RVPVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMF, VPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFL, PAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLK, AVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKA, VPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAE, PFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAES, FDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESK, DLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKI, LHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIM, HFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMF, FCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFA, CRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFAT, RSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATL, SSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, SIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, IMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, MFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	10
27量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSI, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPK, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKR, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRD, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDG, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGY, PARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYM, ARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMF, RVPVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFL, VPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLK, PAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKA, AVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAE, VPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAES, PFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESK, FDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKI, DLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIM, LHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMF, HFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFA, FCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFAT, CRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATL, RSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, SSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, SIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, IMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, YMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	20
28量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIM, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPK, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKR, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRD, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDG, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGY, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYM, PARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMF, ARVPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFL, RVPVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLK, VPAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKA, PAVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAE, AVPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAES, VPFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESK, PFDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKI, FDLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIM, DLHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMF, LHFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFA, HFCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFAT, FCRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATL, CRSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, RSSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, SSIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, SIMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, IMPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, GYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	30
		40

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

29 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMK, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKP, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, RVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, DGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH
30 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPK, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKK, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, RVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, PKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, KRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, RDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH
31 量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKR, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDG, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, RVPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS,

10

20

30

40

50

【表 1-8】

[illegible]

【表 1 - 9】

	PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	10
34量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, RVPAPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, MKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	20
35量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGY, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, RVPAPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, 	30
		40

【表 1 - 1 0】

	AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, IMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	10
36量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYM, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, RVPAPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, RSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, SSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, SIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	20
37量体	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMF, PCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFL, CSMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLK, SMLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, MLTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, LTGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, RVPAPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS,	30 40

【表 1-11】

[illegible]

【表 1 - 1 2】

	CRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH
40量体	EPCSMILTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKA, PCSMLTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAE, CSMLTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAES, SMLTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK, MLTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI, LTGP PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIM, TGPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMF, GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFA, PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFAT, PARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATL, ARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQ, RVPAPVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR, VPAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS, PAVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSS, AVPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSL, VPFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLW, PFDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWC, FDLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL, DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLC, LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCS, HFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSN, FCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH

10

20

下記の表 2 は例示的な選択されたペプチドを収載するものである

【表 2 - 1】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド (HLA アレル例)	例示的疾患
表 2		フレームシフト ¹		
GATA3	L328fs N334fs	<u>AQAKAVCSQESRDVL</u> <u>CELSDHHNHTLEEE</u> <u>QWGPCLQCLWALLQ</u> <u>ASQY*</u>	CLQCLWALL (A02.01) CQWGPCLQCL (A02.01) QWGPCLQCL (A24.02) QWGPCLQCLW (A24.02)	乳がん
GATA3	H400fs S408fs S408fs S430fs H434fs H435fs	<u>PGRPLQTHVLPEPHLA</u> <u>LOPLOPHADHAHADA</u> <u>PAIQPVLTWTPPLQHG</u> <u>HRHGLEPCSMILTGP</u> <u>ARVPAVPFDLHFCRSS</u> <u>IMKPKRDGYMFLKAE</u> <u>SKIMFATLQRSSLWCL</u> <u>CSNH*</u>	AIQPVLTWT (A02.01) ALQPLQPHA (A02.01) DLHFCRSSIM (B08.01) EPHLALQPL (B07.02, B08.01) ESKIMFATL (B08.01) FATLQRSSL (B07.02, B08.01) FLKAESKIM (B08.01) FLKAESKIMF (B08.01) GPPARVPAV (B07.02) IMKPKRDGYM (B08.01) KIMFATLQR (A03.01) KPKRDGYMF (B07.02) KPKRDGYMFL (B07.02) LHFCRSSIM (B08.01) LQHGHHRHGL (B08.01) MFATLQRSSL (B07.02, B08.01) MFLKAESKI (A24.02) MLTGPPARV (A02.01) QPVLWTTPL (B07.02)	乳がん

30

40

【表 2 - 2】

			SMLTGPPARV (A02.01) TLQRSSLWCL (A02.01) VLPEPHLAL (A02.01) VPAVPFDLHF (B07.02) YMFLKAESK (A03.01) YMFLKAESKI (A02.01, A03.01, A24.02, B08.01)	
--	--	--	---	--

¹ 下線付き A A は、ノンネイティブ A A を表す

表 3

【表 3 - 1】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド (HLA アレル例)	例示的疾患
表 3A		点突然変異 ¹		
AKT1	E17K	MSDVAIVKEGWLHKR G <u>K</u> YIKTWRPRYFLLK NDGTFIGYKERPDV DQREAPLNNFSVAQC QLMKTER	KYIKTWRPRY (A24.02) WLHKGKGYI (A02.01, B07.02, B08.01) WLHKGKGYIK (A03.01)	BRCA, CESC, HNSC, LUSC, PRAD, SKCM, THCA
ANAPC1	T537A	TMLVLEGSGNLVLYT GVVRVGKVFIPGLPAP SLTMSNTMPRPSTPLD GVS <u>A</u> PKPLSKLLGSLD EVLVLLSPVPELRDSSK LHDSLYNEDCTFQQL GTYIHSI	APKPLSKLL (B07.02) GVSAPKPLSK (A03.01) VSAPKPLSK (A03.01)	GBM, LUSC, PAAD, PRAD, SKCM
FGFR3	S249C	HRIGGIKLRHQQWSL VMESVVPDRGNITC VVENKFGSIRQTYTLD VLER <u>C</u> PHRPILQAGLP ANQTAVLGSDVEFHC KVYSDAQPHIQWLKH VEVNGSKVG	CPHRPILQA (B07.02)	BLCA, HNSC, KIRP, LUSC
FRG1B	I10T	MREPIYMHSTMVFLP WELHTKKGSPPEQF MAVKLSDSRTALKSG YGKYLGINSDVLGH SDAIGPREQWEPVFQ NGKMALLASNSCFIR	KLSDSRTAL (A02.01, B07.02, B08.01) KLSDSRTALK (A03.01) LSDSRTALK (A01.01, A03.01) RTALKSGYGK (A03.01) TALKSGYGK (A03.01)	KIRP, PRAD, SKCM
FRG1B	L52S	AVKLSDSRIALKSGYG KYLGINSDVLGHSD AIGPREQWEPVFQNG KMAL <u>S</u> ASNSCFIRCNE AGDIEAKSKTAGEEE MIKIRSCAETKTKKD DIPEEDKG	ALSASNSCF (A02.01, A24.02, B07.02) ALSASNSCFI (A02.01) FQNGKMALSA (A02.01, B08.01)	GBM, KIRP, PRAD, SKCM
HER2	L755S (抵抗性)	AMPNQAQMRILKETE LRKVKVLGSGAFGT YKGIWIPDGENVKIPV AIKV <u>S</u> RENTSPKANKE ILDEAYVMAGVGSPY VSRLLGICLTSTVQLV TQLMPYGC	KVSRENTSPK (A03.01)	BRCA

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

IDH1	R132G	RVEEFKLKQMWKSPN GTIRNILGGTVFREAI CKNIPRLVSGWVKPII GGHAYGDQYRATDF VVPGPVKVEITYTPSD GTQKVTYLVHNFEEG GGVAMGM	KPIIIGGHAY (B07.02)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUAD, PAAD, PRAD, UCEC
KRAS	G12C	MTEYKLVVVGACGV GKSALTIQLIQNHFVD EYDPTIEDSYRKQVVI DGETCLLDILD ~~T~~ AGQE	KLVVVGACGV (A02.01) LVVVGACGV (A02.01) VVGACGVGK (A03.01, A11.01) VVVGACGVGK (A03.01)	BRCA, CESC, CRC, HNSC, LUAD, PAAD, UCEC
KRAS	G12D	MTEYKLVVVGADGV GKSALTIQLIQNHFVD EYDPTIEDSYRKQVVI DGETCLLDILD ~~T~~ AGQE	VVGADGVGK (A11.01) VVVGADGVGK (A11.01) KLVVVGADGV (A02.01) LVVVGADGV (A02.01)	BLCA, BRCA, CESC, CRC, GBM, HNSC, KIRP, LIHC, LUAD, PAAD, SKCM, UCEC
KRAS	G12V	MTEYKLVVVGAVGV GKSALTIQLIQNHFVD EYDPTIEDSYRKQVVI DGETCLLDILD ~~T~~ AGQE	KLVVVGAVGV (A02.01) LVVVGAVGV (A02.01) VVGAVGVGK (A03.01, A11.01) VVVGAVGVGK (A03.01, A11.01)	BRCA, CESC, CRC, LUAD, PAAD, THCA, UCEC
KRAS	Q61H	AGGVGKSALTIQLIQN HFVDEYDPTIEDSYRK QVVIDGETCLLDILD ~~T~~ AGHEEYSAMRDQYM RTGEGFLCVFAINNTK SFEDIHHYREQIKRVK DSEDVPM	ILD ~~T~~ AGHEEY (A01.01)	CRC, LUSC, PAAD, SKCM, UCEC
KRAS	Q61L	AGGVGKSALTIQLIQN HFVDEYDPTIEDSYRK QVVIDGETCLLDILD ~~T~~ AGLEEYSAMRDQYM RTGEGFLCVFAINNTK SFEDIHHYREQIKRVK DSEDVPM	ILD ~~T~~ AGLEEY (A01.01) LLDILD ~~T~~ AGL (A02.01)	CRC, GBM, HNSC, LUAD, SKCM, UCEC
NRAS	Q61K	AGGVGKSALTIQLIQN HFVDEYDPTIEDSYRK QVVIDGETCLLDILD ~~T~~ AGKEEYSAMRDQYM RTGEGFLCVFAINNSK SFADINLYREQIKRVK DSDDVPM	ILD ~~T~~ AGKEEY (A01.01)	BLCA, CRC, LIHC, LUAD, LUSC, SKCM, THCA, UCEC
NRAS	Q61R	AGGVGKSALTIQLIQN HFVDEYDPTIEDSYRK QVVIDGETCLLDILD ~~T~~ AGREEYSAMRDQYM RTGEGFLCVFAINNSK SFADINLYREQIKRVK DSDDVPM	ILD ~~T~~ AGREEY (A01.01)	BLCA, CRC, LUSC, PAAD, PRAD, SKCM, THCA, UCEC
PIK3CA	E542K	IEEHANWSVSREAGFS YSHAGLSNRLARDNE LRENDKEQLKAISTRD PLSKITEQE ~~K~~ DFLWSH RHYCVTIPEILPKLLS VKWNSRDEVAQMYC LVKDWPP	AISTRDPLSK (A03.01)	BLCA, BRCA, CESC, CRC, GBM, HNSC, KIRC, KIRP, LIHC, LUAD, LUSC, PRAD, UCEC

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

PTEN	R130Q	KFNCRVAQYPFEDHN PPQLELIKPFCELDQ WLSEDDNHVAAIHCK AGKGQTGVMICAYLL HRGKFLKAQEALDFY GEVTRDKKGVITPSQ RRYVYYYSY	QTGVMICAY (A01.01)	BRCA, CESC, CRC, GBM, KIRC, LUSC, UCEC
RAC1	P29S	MQAIKCVVVGDAV GKTCLLSYTTNAFSG EYIPTVFDNYSANVM VDGKPVNLGLWDTA GQEDYDRLRPLSYPQ TVGET	FSGEYIPTV (A02.01) TTNAFSGEY (A01.01) YTTNAFSGEY (A01.01)	黒色腫
SF3B1	K700E	AVCKSKKSWQARHT GKIVQQIAILMGCAIL PHLRSLVEIIEHGLVD EQQEVRTISALAIAAL AEAATPYGIESFDSVL KPLWKGIRQHRGKGL AAFLKAI	GLVDEQQEV (A02.01)	MDSに関連するAML; 慢性リンパ球性白血病 -小リンパ球性リンパ腫; 骨髄異形成症候群; AML; Luminal NS乳癌; 慢性骨髄性白血病; 膵管癌; 慢性骨髄単球性 白血病; 慢性リンパ球性白血病 -小リンパ球性リンパ腫; 骨髄線維症; 骨髄異形成症候群; PRAD; 本態性血小板血症; 髄筋芽腫
SPOP	F133L	YLSLYLLLVSCKPSEV RAKFKFSILNAKGEET KAMESQRAYRFVQG KDWGLKKFIRRDFFL DEANGLLPDDKLTFL CEVSVVQDSVNISGQ NTMNMVKVPE	FVQGKDWGL (A02.01, B08.01)	PRAD
SPOP	F133V	YLSLYLLLVSCKPSEV RAKFKFSILNAKGEET KAMESQRAYRFVQG KDWGVKKFIRRDFFL DEANGLLPDDKLTFL CEVSVVQDSVNISGQ NTMNMVKVPE	FVQGKDWGV (A02.01)	PRAD
TP53	G245S	IRVEGNLRVEYLDDR NTFRHSVVVPYEPPEV GSDCTTIHNYMCNS SCMGSMNRRPILTIITL	CMGSMNRRPI (A02.01, B08.01) GSMNRRPIL (B08.01) MGSMNRRPI (B08.01) MGSMNRRPIL (B08.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUSC, PAAD, PRAD

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

		EDSSGNLLGRNSFEVR VCACPGRDRRTEEN LRKKGEP	SMNRRPILTI (A02.01, A24.02, B08.01)	
TP53	R248Q	EGNLRVEYLDDRNTF RHSVVVPYEPPEVGS DCTTIHYNMCMSSC MGGMNQRPILTIITLE DSSGNLLGRNSFEVR VCACPGRDRRTEEN LRKKGEPHHE	CMGGMNQRP (A02.01, B08.01) GMNQRPILTI (A02.01, B08.01) NQRPILTI (A02.01, B08.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, KIRC, LIHC, LUSC, PAAD, PRAD, UCEC
TP53	R248W	EGNLRVEYLDDRNTF RHSVVVPYEPPEVGS DCTTIHYNMCMSSC MGGMNWRPILTIITLE DSSGNLLGRNSFEVR VCACPGRDRRTEEN LRKKGEPHHE	CMGGMNWRP (A02.01, A24.02, B08.01) GMNWRPILTI (A02.01, B08.01) MNWRPILTI (A02.01, A24.02, B08.01) MNWRPILTI (A02.01, A24.02)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LIHC, LUSC, PAAD, SKCM, UCEC
TP53	R273C	PEVGS DCTTIHYNM CMSSCMGGMNRRPIL TIITLE DSSGNLLGRNS FEVCVCACPGRDRRT EEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSSSP QPKKKPL	NSFEVCVCA (A02.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUSC, PAAD, UCEC
TP53	R273H	PEVGS DCTTIHYNM CMSSCMGGMNRRPIL TIITLE DSSGNLLGRNS FEVHVCACPGRDRRT EEENLRKKGEPHHELP PGSTKRALPNNTSSSP QPKKKPL	NSFEVHVCA (A02.01)	BRCA, CRC, GBM, HNSC, LIHC, LUSC, PAAD, UCEC
TP53	Y220C	TEVVRRCPHHERCSD SDGLAPPQHLIRVEGN LRVEYLDDRNTFRHS VVVPCEPPEVGS DCTT IHYNMCMSSCMGG MNRPPILTIITLE DSSG NLLGRNSF	VVPCEPPEV (A02.01) VVVPCEPPEV (A02.01)	BLCA, BRCA, GBM, HNSC, LIHC, LUAD, LUSC, PAAD, SKCM, UCEC
表 3B		MSI 関連フレームシフト ¹		
MSH6	F1088fs; +1	YNFDKNYKDWQSAV ECIAVL DVLLCLANYS RGGDGP MCRPVILLPE DTPPLLRA	ILLPEDTPPL (A02.01) LLPEDTPPL (A02.01)	MSI+ CRC, MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+ 胃がん、 リンチ症候群
表 3C		フレームシフト ¹		
APC	F1354fs	AKFQQCHSTLEPNPA DCRVLVYLQNPQGTK LLNFLQERNLPPKVVL RHPKVHLNTMFRPH SCLADVLLSVHLIVLR VVRLPAPFRVNHAVE W*	APFRVNHAV (B07.02) CLADVLLSV (A02.01) FLQERNLPPK (A03.01) HLIVLRVVR (A02.01, B08.01) HPKVHLNTM (B07.02, B08.01) HPKVHLNTMF (B07.02, B08.01) KVHLNTMFR (A03.01) KVHLNTMFRR (A03.01)	CRC, LUAD, UCEC, STAD

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

			LPAPFRVNHA (B07.02) MFRRPHSCL (B07.02, B08.01) MFRRPHSCLA (B08.01) NTMFRRPHSC (B08.01) RPHSCLADV (B07.02) RPHSCLADV (B07.02) RVVRLPAPFR (A03.01) SVHLIVLRV (A02.01) TMFRRPHSC (B08.01) TMFRRPHSCL (A02.01, B08.01) VLLSVHLIV (A02.01) VLLSVHLIVL (A02.01) VLRVVRLPA (B08.01) VVRLPAPFR (A03.01)	
ARID1A	Y1324fs	<u>ALGPHSRISCLPTQTR</u> <u>GCILLAATPRSSSSSS</u> <u>NDMIPMAISSPPKAPL</u> <u>LAAPSPASRLQCINSN</u> <u>SRITSGQWMAHMALL</u> <u>PSGTKGRCTACHTAL</u> <u>GRGSLSSSSCPQPSPSL</u> <u>PASNKLPSLPLSKMYT</u> <u>TSMAMPILPLPQLLS</u> <u>ADQQAAPRTNFHSSL</u> <u>AETVSLHPLAPMPSKT</u> <u>CHHK*</u>	AMPILPLPQL (A02.01) APLLAAPSPA (B07.02) APRTNFHSS (B07.02) APRTNFHSSL (B07.02, B08.01) CPQPSPSLPA (B07.02) GQWMAHMAL (A02.01) GQWMAHMALL (A02.01) HMALLPSGTK (A03.01) HTALGRGSL (B07.02) IPMAISSPP (B07.02) IPMAISSPPK (B07.02) KLPSLPLSK (A03.01) KLPSLPLSKM (A02.01) KMYTTSMAM (A02.01, A03.01) LLAAPSPASR (A03.01) LLLSADQQA (A02.01) LLSADQQA (A02.01) LPASNKLPS (B07.02) LPASNKLPSL (B07.02, B08.01) LPLPQLLSA (B07.02) LPSLPLSKM (B07.02) LSKMYTTSM (B08.01) MALLPSGTK (A03.01) MPILPLPQL (B07.02) MPILPLPQLL (B07.02) MYTTSMAMPI (A24.02) PMAISSPPK (A03.01) QWMAHMALL (A24.02) SKMYTTSMAM (B07.02) SMAMPILPL (A02.01, B07.02, B08.01) SNKLPSLPL (B08.01) SPASRLQCI (B07.02, B08.01) SPPKAPLLAA (B07.02) SPSLPASNKL (B07.02) YTTSMAMPI (A02.01) YTTSMAMPIL (A02.01)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS
ARID1A	G1848fs	<u>RSYRRMIHLWWTAQI</u> <u>SLGVCRSLTVACCTG</u> <u>GLVGGTPLSISRPTSR</u> <u>ARQSCCLPGLTHPAH</u>	CLPGLTHPA (A02.01) GLTHPAHQPL (A02.01) HPAHQPLGSM (B07.02) LTHPAHQPL (B07.02)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

		<u>QPLGSM*</u>	RPTSRARQSC (B07.02) RQSCCLPGL (A02.01) TSRARQSCCL (B08.01)	
β2M	L13fs	<u>QHSGRDVSLRGLSCA</u> <u>RATLSFWPGGYPAYC</u> <u>KDSGLLTSSSREWKV</u> <u>KFPELLCVWVSSIRH*</u>	ELLCVWVSSI (A02.01) EWKVKFPEL (B08.01) KFPELLCVW (A24.02) LLCVWVSSI (A02.01) LTSSSREWK (A03.01) LTSSSREWK (A03.01) YPAYSKDSGL (B07.02)	CRC, STAD, SKCM, HNSC
GATA3	L328fs N334fs	<u>AQAKAVCSQESRDVL</u> <u>CELSDHNNHTLEEEC</u> <u>QWGPCLQCLWALLO</u> <u>ASQY*</u>	CLQCLWALL (A02.01) CQWGPCLQCL (A02.01) QWGPCLQCL (A24.02) QWGPCLQCLW (A24.02)	乳がん
GATA3	H400fs S408fs S408fs S430fs H434fs H435fs	<u>PGRPLQTHVLPEPHLA</u> <u>LQPLQPHADHAHADA</u> <u>PAIQPVLWTTTPLOHG</u> <u>HRHGLEPCSMGTGPP</u> <u>ARVPAVPFDLHFCRSS</u> <u>IMKPKRDGYMFLKAE</u> <u>SKIMFATLQRSSLWCL</u> <u>CSNH*</u>	AIQPVLWTT (A02.01) ALQPLQPHA (A02.01) DLHFCRSSIM (B08.01) EPHLALQPL (B07.02, B08.01) ESKIMFATL (B08.01) FATLQRSSL (B07.02, B08.01) FLKAESKIM (B08.01) FLKAESKIMF (B08.01) GPPARVPAV (B07.02) IMKPKRDGYM (B08.01) KIMFATLQR (A03.01) KPKRDGYMF (B07.02) KPKRDGYMFL (B07.02) LHFCRSSIM (B08.01) LQHGHRHGL (B08.01) MFATLQRSSL (B07.02, B08.01) MFLKAESKI (A24.02) MLTGPPARV (A02.01) QPVLWTTPL (B07.02) SMLTGPPARV (A02.01) TLQRSSLWCL (A02.01) VLPEPHLAL (A02.01) VPAVPFDLHF (B07.02) YMFLKAESK (A03.01) YMFLKAESKI (A02.01, A03.01, A24.02, B08.01)	乳がん
MLL2	P647fs L656fs	<u>TRRCHCCPHLRSHPCP</u> <u>HHLRNHPRPHHLRHH</u> <u>ACHHHLRNCPPHFL</u> <u>RHCTCPGRWRNRPSL</u> <u>RRLRSLCLPHLNHHL</u> <u>FLHWRSRPCLHRKSH</u> <u>PHLLHLRRLYPHHLK</u> <u>HRPCPHHLKNLLCPR</u> <u>HLRNCPLPRHLKHLA</u> <u>CLHHLRSHPCPLHLKS</u> <u>HPCLHHRRLVCSHH</u> <u>LKSLLCPLHLRSLFPF</u> <u>HHLRHHACPHHLRTR</u> <u>LCPHHLKNHLCPPHL</u>	APGPRGRTC (B07.02) CLRSHTCPPR (A03.01) CLWCHACLHR (A03.01) CPHLGSHPC (B07.02) CPLGLKSPL (B07.02) CPRSCRCPH (B07.02) CPRSCRCPHL (B07.02, B08.01) CSLPLGNHPY (A01.01) GLRNRICPL (A02.01, B07.02, B08.01) GLRSHTYLR (A03.01) GLRSHTYLRR (A03.01) GPRGRTCHPG (B07.02) HLGSHPCRL (B08.01)	STAD, BLCA, CRC, HNSC, BRCA

10

20

30

40

<u>RYRAYPPCLWCHACL</u>	HLRLHASP (A03.01)
<u>HRLRNLPCPHRLRSLP</u>	HLRSCPCSL (B07.02, B08.01)
<u>RPLHLRLHASPHHLRT</u>	HLRTHLLPH (A03.01)
<u>PPPHHLRTHLLPHHR</u>	HLRTHLLPHH (A03.01)
<u>RTRSCPCRWRSHPPCC</u>	HLRYRAYPP (B08.01)
<u>HYLRSRNSAPGPRGR</u>	HLRYRAYPPC (B08.01)
<u>TCHPGLRSRTCPPGLR</u>	HPHHLRTHL (B07.02)
<u>SHTYLRLRLRSHTCPPS</u>	HPHHLRTHLL (B07.02, B08.01)
<u>LRSHAYALCLRSHTCP</u>	HTYLRLRLSH (A03.01)
<u>PRLRDHICPLSLRNCT</u>	LPCPHRLRSL (B07.02, B08.01)
<u>CPPRLRSRTCLLCLRS</u>	LPHHRRTRSC (B07.02, B08.01)
<u>HACPPNLRNHTCPPSL</u>	LPLGNHPYL (B07.02)
<u>RSHACPPGLRNRICPL</u>	LPRPLHLRL (B07.02, B08.01)
<u>SLRSHPCPLGLKSPLR</u>	NLRNHTCPP (B08.01)
<u>SQANALHLRSCPCSLP</u>	PPRLRSRTCL (B07.02, B08.01)
<u>LGNHYPYLPCELSQPCL</u>	RLHASPHHL (A02.01)
<u>SLGNHLCPLCPRSCRC</u>	RLHASPHHLR (A03.01)
<u>PHLGSHPCRLS*</u>	RLRDHICPL (A02.01, B07.02, B08.01)
	RLRNLPCPH (A03.01)
	RLRNLPCPHR (A03.01)
	RLRSHTCPP (B08.01)
	RLRSLPRPL (B07.02, B08.01)
	RLRSLPRPLH (A03.01)
	RLRSRTCLL (B07.02, B08.01)
	RNRICPLSL (B07.02, B08.01)
	RPLHLRLHA (B07.02)
	RPLHLRLHAS (B07.02)
	RSHACPPGLR (A03.01)
	RSHACPPNLR (A03.01)
	RSHAYALCLR (A03.01)
	RSHPCCHYLR (A03.01)
	RSHPCPLGLK (A03.01)
	RSHTCPPSLR (A03.01)
	RSLPRPLHLR (A03.01)
	RSRTCLLCL (B07.02)
	RSRTCLLCLR (A03.01)
	RSRTCPLGL (B07.02)
	RSRTCPLGLR (A03.01)
	RTHLLPHHRR (A03.01)
	RTRSCPCRWR (A03.01)
	RYRAYPPCL (A24.02)
	RYRAYPPCLW (A24.02)
	SLGNHLCPL (A02.01, B07.02, B08.01)
	SLPLGNHPYL (A02.01)
	SLPRPLHLRL (A02.01)
	SLRNCTCPPR (A03.01)
	SLRSHAYAL (A02.01, B07.02, B08.01)
	SLRSHPCPL (A02.01, B07.02, B08.01)
	SPHHLRTPP (B07.02)
	SPHHLRTPPH (B07.02)
	SPLRSQANAL (B07.02, B08.01)

40

【表 3 - 8】

			YLRLRLSHTC (B08.01) YLRSRNSAP (B08.01) YLRSRNSAPG (B08.01)	
MLL2	P2354fs	<u>GPRSHPLPRLWHLLL</u> <u>QVTQTSFALAPTLTH</u> <u>MLSPH*</u>	ALAPTLTHM (A02.01) ALAPTLTHML (A02.01) LLQVTQTSFA (A02.01) LQVTQTSFAL (A02.01) RLWHLLLQV (A02.01) RLWHLLLQVT (A02.01)	STAD, BLCA, CRC, HNSC, BRCA
RNF43	G659fs	<u>PLGLVPWTRWCPQGK</u> <u>PRFPAMSTTTATGTTT</u> <u>TKSGSSGMAGSLAQK</u> <u>PESPSGLLFLGHSPSQ</u> <u>SHLLLISKSPDPTQOPL</u> <u>RGGSLTHSAPGPSLSQ</u> <u>PLAQLTPPASAPVPAV</u> <u>CSTCKNPASLPDTHRG</u> <u>KGGGVPPSPPLALGPR</u> <u>MQCTQLARFFPITPP</u> <u>VWHILGPQRHTP*</u>	CTQLARFFPI (A24.02) FFPITPPVW (A24.02) FPITPPVWHI (B07.02) GPRMQLCTQL (B07.02, B08.01) ITPPVWHIL (A24.02) LALGPRMQL (B07.02) MQLCTQLARF (A24.02) RFFPITPPV (A02.01, A24.02) RFFPITPPVW (A24.02) RMQLCTQLA (A02.01) RMQLCTQLAR (A03.01) SPPLALGPRM (B07.02) TQLARFFPI (A02.01, A24.02, B08.01)	STAD
SMAP1	E169fs	<u>KYEKKKYDKNIAI</u> <u>TNISSDAPLQPLVSSP</u> <u>SLQAAVDKNKLEKEK</u> <u>EKKRKRKREKRSQKS</u> <u>RQNHLOLKSCRRKISN</u> <u>WSLKKVPALKKLRS</u> <u>LWIF</u>	KSRQNLHLQL (B07.02) ALKKLRSL (B08.01, B07.02) HLQLKSCRRK (A03.01) KISNWSLKK (A03.01, A11.01) KISNWSLKKV (A03.01) KLRSPLWIF (A24.02) KSRQNLHLQLK (A03.01) NWSLKKVPAL (B08.01) SLKKVPALK (A03.01, A11.01) SLKKVPALKK (A03.01) SQKSRQNLHL (B08.01) WSLKKVPAL (B08.01) WSLKKVPALK (A03.01)	MSI+ CRC, MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん
TP53	P58fs P72fs G108fs R110fs	<u>CCPRTILNNGSLKTQV</u> <u>QMKLPECQRLLPWP</u> <u>LHQQLHRRPLHQPPP</u> <u>GPCHLLSLPRKPTRAA</u> <u>TVSVWASCILGQPSL*</u>	KLPECQRL (A02.01) KPTRAATVSV (B07.02) LPPWPLHQQL (B07.02) LPRKPTRAA (B07.02, B08.01) LPRKPTRAA (B07.02) QQLHRRPL (B08.01) RLLPPWPLH (A03.01)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC
TP53	P152fs	<u>LARTPLPSTRCFANWP</u> <u>RPALCSCGLIPHRPA</u> <u>PASAPWPSTSSHST*</u>	APASAPWPST (B07.02) APWPSTSSH (B07.02) RPAPASAPW (B07.02) WPSTSSHST (B07.02)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC
UBR5	K2120fs	<u>SQGLYSSSASSGKCL</u> <u>MEVTVDRCLEVLPT</u> <u>KMSYAANLKNVMNM</u> <u>QNRQKKKGKNSPCCQ</u>	RVQNQGHLL (B07.02)	

10

20

30

40

【表 3 - 9】

		<u>KKLRVQNQGHLLMIL</u> <u>LHN*</u>		
VHL	L116fs G123fs	<u>TRASPPRSSSAIAVRA</u> <u>SCCPYGSTSTASRSPT</u> <u>QRCRLARAAASTATE</u> <u>VTFGSSEMQGHTMGF</u> <u>WLTCLNYLCHLSMLT</u> <u>DSLFLPISHCQCIL*</u>	FLPISHCQCI (A02.01) FWLTKLNYL (A24.02, B08.01) HLSMLTDSL (A02.01) HTMGFWLTK (A03.01) HTMGFWLTKL (A02.01) KLNYLCHLSM (A02.01) LPISHCQCI (B07.02, B08.01) LPISHCQCIL (B07.02, B08.01) LTDSLFLPI (A01.01, A02.01) LTKLNYLCHL (B08.01) MLTDSLFLPI (A01.01, A02.01, B08.01) MQGHTMGFWL (A02.01) NYLCHLSML (A24.02) SMLTDSLFL (A02.01) TMGFWLTKL (A02.01) YLCHLSMLT (A02.01)	KIRC, KIRP
表 3D		インサート ¹		
HER2	G776insYVM A	<u>LGSGAFGTVYKGIWIP</u> <u>DGENVKIPVAIKVLRE</u> <u>NTSPKANKEILDEAYV</u> <u>MAYVMAGVGSPYVS</u> <u>RLLGICLTSTVQLVTQ</u> <u>LMPYGCLLDHVREN</u> <u>GRLGSQDLLNW</u>	ILDEAYVMAY (A01.01) VMAYVMAGV (A02.01) YVMAYVMAG (A02.01, B07.02, B08.01) YVMAYVMAGV (A02.01, B07.02, B08.01)	肺がん

¹ 下線付き A A は、ノンネイティブ A A を表す

² 太字 A A は、2つの融合した遺伝子の 2 番目のものによりコードされるアミノ酸配列のネイティブ A A を表す

³ 太字かつ下線付き A A は、フレームシフトに起因する、2つの融合した遺伝子の 2 番目のものによりコードされるアミノ酸配列のノンネイティブ A A を表す

【0328】

ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) を標的とし、CLL およびある特定のリンパ腫に使用される分子である、イブルチニブに非常によく見られる突然変異は、481 位におけるシステインからセリンへの変化 (C481S) である。この変化は、様々な HLA 分子に結合する多数の結合ペプチドを生じさせる。突然変異は、アミノ酸配列：

【化 2】

IFIITEYMANGSLLNYLREMRHR

を有する領域内にあり、突然変異したセリンには下線が付けられている。

【0329】

C481S 突然変異に対応する例示的ネオ抗原性ペプチドは、表 34 で提示される。この表は、HLA アレルのリストも提供し、これらの HLA アレルのコードされたタンパク質産物は、ペプチドに結合することができる。一部の実施形態では、本開示は、がん治療薬の C481S ネオエピトープ、例えば、ANGSLLNY; ANGSLLNYL; ANGSLNLYLR; EYMANGSL; EYMANGSLLN; EYMANGSLNLY; GSLNLYLR; GSLNLYLREM; ITEYMANGS; ITEYMANGSL; ITEYMANGSLL; MANGSLNLYL; MANGSLNLYLR; NGSLLNLYL; NGSLLNLYL; SLLNLYLREMR; TEYMANGSL; TEYMANGSLNLY; YMANGSL; および YMANGSLLN を提供する。表 35 および 3 は、他のがん関連遺伝子突然変異に対応する例示的ネオ抗原候補を提供する。図 36 は、本願のための選択された HLA 拘束性 BTK ペプチド、および突然変異型 BTK

ペプチドが結合するまたは結合すると予測されるHLAアレルによりコードされる対応するタンパク質についてのリストを提供する。表37は、本願の文脈に当てはまるような、選択されたBTKペプチド、およびペプチドが結合するまたは結合すると予測されるHLAアレルによりコードされる対応する好ましいタンパク質についてのリストを提供する。下記の表34はC481S突然変異に対応する例示的ネオ抗原性ペプチドを収載するものである

【表34】

BTK ペプチド	HLA アレル
ANGSLLNY	HLA-A36:01
ANGSLLNYL	HLA-C15:02; HLA-C08:01; HLA-C06:02; HLA-A02:04; HLA-C12:02; HLA-B44:02; HLA-C17:01; HLA-B38:01
ANGSLLNYLR	HLA-A74:01, HLA-A31:01
EYMANGSL	HLA-C14:02; HLA-C14:03; HLA-A24:02
EYMANGSLL	HLA-A24:02; HLA-A23:01; HLA-A68:04; HLA-C14:02, HLA-C14:03, HLA-A33:03, HLA-C04:01, HLA-B15:09, HLA-B38:01,
EYMANGSLLN	HLA-A23:01, HLA-A24:02
EYMANGSLLNY	HLA-A29:02
GSLNLYLR	HLA-A74:01, HLA-A31:01
GSLNLYLREM	HLA-B57:01, HLA-B58:02
ITEYMANGS	HLA-A01:01
ITEYMANGSL	HLA-A01:01
ITEYMANGSLL	HLA-A01:01
MANGSLLNY	HLA-C02:02, HLA-C03:02, HLA-B53:01, HLA-C12:02, HLA-C12:03, HLA-A36:01, HLA-A26:01, HLA-A25:01, HLA-A03:01, HLA-B46:01, HLA-B15:03, HLA-A33:03, HLA-B35:03, HLA-A11:01, HLA-B15:01, HLA-B35:03, HLA-A29:02, HLA-B58:01, HLA-A30:02, HLA-B35:01
MANGSLLNYL	HLA-C17:01, HLA-C02:02, HLA-B35:01, HLA-C03:03, HLA-C08:01, HLA-B35:03, HLA-C12:02, HLA-C01:02, HLA-C03:04, HLA-C08:02
MANGSLLNYLR	HLA-A33:03, HLA-A74:01
NGSLLNYL	HLA-B14:02
NGSLLNYLR	HLA-A68:01, HLA-A33:03, HLA-A31:01, HLA-A74:01
SLLNYLREM	HLA-A02:04, HLA-A02:03, HLA-C03:02, HLA-A03:01, HLA-A32:01, HLA-A02:07, HLA-C14:03, HLA-C14:02, HLA-A31:01, HLA-A30:02, HLA-A74:01, HLA-C06:02, HLA-B15:03, HLA-B46:01, HLA-B13:02, HLA-A25:01, HLA-A29:02, HLA-C01:02, HLA-A02:01
SLLNYLREMR	HLA-A74:01, HLA-A31:01
TEYMANGSL	HLA-B14:02, HLA-B49:01, HLA-B44:03, HLA-B44:02, HLA-B37:01, HLA-B15:09, HLA-B41:01, HLA-B50:01, HLA-B18:01, HLA-B40:01, HLA-B40:02
TEYMANGSLL	HLA-B40:02, HLA-B44:03, HLA-B49:01, HLA-B44:02, HLA-B49:01
TEYMANGSLLNY	HLA-B44:03
YMANGSLL	HLA-A01:01, HLA-C02:02, HLA-C04:01, HLA-C14:02, HLA-C14:03, HLA-C03:02, HLA-C17:01, HLA-C03:03, HLA-C03:04, HLA-B15:09
YMANGSLLN	HLA-A01:01, HLA-A29:02
YMANGSLLNY	HLA-A29:02, HLA-A36:01, HLA-B46:01, HLA-A25:01, HLA-B15:01, HLA-A26:01, HLA-A30:02, HLA-A32:01

表35は他のがん関連遺伝子突然変異に対応する例示的ネオ抗原候補を提供するものである

【表35-1】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
-----	--------------------	------------------	---------------	-------

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
表35A		点突然変異 ¹		
ABL1	E255K	VADGLITTLHYPAPKR NKPTVYGVSPNYDKW EMERTDITMKHKLGG GQYGKVVYEGVWKKY SLTVAVKTLKEDTME VEEFLKEAAVMKEIK HPNLVQLLGVC	GQYGKVVYEG (A02.01) GQYGKVVYEGV (A02.01) KLGGGQYGK (A03.01) KLGGGQYGKV (A02.01) KVYEGVWKK (A02.01, A03.01) KVYEGVWKKY (A03.01) QYGKVVYEGV (A24.02) QYGKVVYEGVW (A24.02)	慢性骨髄性 白血病(CML)、 急性リンパ球性 白血病(ALL)、 消化管間質 腫瘍(GIST)
ABL1	E255V	VADGLITTLHYPAPKR NKPTVYGVSPNYDKW EMERTDITMKHKLGG GQYGVVYEGVWKKY SLTVAVKTLKEDTME VEEFLKEAAVMKEIK HPNLVQLLGVC	GQYGVVYEG (A02.01) GQYGVVYEGV (A02.01) KLGGGQYGV (A02.01) KLGGGQYGVV (A02.01) QYGVVYEGV (A24.02) QYGVVYEGVW (A24.02) VVYEGVWKK (A02.01, A03.01) VVYEGVWKKY (A03.01)	慢性骨髄性 白血病(CML)、 急性リンパ球性 白血病(ALL)、 消化管間質 腫瘍(GIST)
ABL1	M351T	LLGVCTREPPFYIITEF MTYGNLLDYLRECNR QEVNAVLLYMATQI SSATEYLEKKNFIHRD LAARNCLVGENHLVK VADFGLSRLMTGDTY TAHAGAKF	ATQISSATEY (A01.01) ISSATEYLEK (A03.01) SSATEYLEK (A03.01) TQISSATEYL (A02.01) YMATQISSAT (A02.01)	慢性骨髄性 白血病(CML)、 急性リンパ球性 白血病(ALL)、 消化管間質 腫瘍(GIST)
ABL1	T315I	SLTVAVKTLKEDTME VEEFLKEAAVMKEIK HPNLVQLLGVC FYIIIEFMTYGNLLDYL RECNRQEVNAVLLY MATQISSAMEYLEKK NFIHRDLA	FYIIIEFMTY (A24.02) IIEFMTYGNL (A02.01) IIIEFMTYG (A02.01) IIIEFMTYGN (A02.01) YIIIEFMTYG (A02.01)	慢性骨髄性 白血病(CML)、 急性リンパ球性 白血病(ALL)、 消化管間質 腫瘍(GIST)
ABL1	Y253H	STVADGLITTLHYPAP KRNKPTVYGVSPNYD KWEMERTDITMKHKL GGGQHGEVYEGVWK KYSLTVAVKTLKEDT MEVEEFLKEAAVMKE IKHPNLVQLLG	GQHGEVYEGV (A02.01) KLGGGQHGEV (A02.01)	慢性骨髄性 白血病(CML)、 急性リンパ球性 白血病(ALL)、 消化管間質 腫瘍(GIST)
ALK	G1269A	SSLAMLDLLHVARDI ACGCQYLEENHFIHR DIAARNCLLTCPGPR	KIADFGMAR (A03.01) RVAKIADFGM (A02.01, B07.02)	NSCLC

10

20

30

40

【表 3 5 - 3】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		VAKIADFGMARDIYR ASYRKGKGCAMLPVK WMPPEAFMEGIFTSKT DTWSFGVLL		
ALK	L1196M	QVAVKTLPEVCSEQD ELDFLMEALIISKFNH QNIVRCIGVSLQSLPRF ILMELMAGGDLKSFL RETRPRPSQPSSLAML DLLHVARDIACGCQY LEENHFI	FILMELMAGG (A02.01) ILMELMAGG (A02.01) ILMELMAGGD (A02.01) LMELMAGGDL (A02.01) LPRFILMEL (B07.02, B08.01) LPRFILMELM (B07.02) LQSLPRFILM (A02.01, B08.01) SLPRFILMEL (A02.01, A24.02, B07.02, B08.01)	NSCLC
BRAF	V600E	MIKLIDIARQTAQGMD YLHAKSIHRDLKSNH IFLHEDLTVKIGDFGL ATEKSRWSGSHQFEQ LSGSILWMAPEVIRMQ DKNPYSFQSDVYAFGI VLYELM	LATEKSRWS (A02.01, B08.01) LATEKSRWSG (A02.01, B08.01)	CRC, GBM, KIRP, LUAD, SKCM, THCA
BTK	C481S	MIKEGSMSEDEFIEEA KVMMNLSHEKLVQL YGVCTKQRPIFIITEY MANGSLLNYLREMRH RFQTQQLLEMCKDVC EAMEYLESKQFLHRD LAARNCLVND	EYMANGSLL (A24.02)	BTK
EEF1B2	S43G	MGFGDLKSPAGLQVL NDYLADKSYIEGYVPS QADVAVFEAVSGPPP ADLCHALRWYNHIKS YEKEKASLPGVKKAL GKYGPADVEDTTGSG AT	GPPPADLCHAL (B07.02)	BLCA, KIRP, PRAD, SKCM
ERBB3	V104M	ERCEVVMGNLEIVLT GHNADLSFLQWIREV TGYVLVAMNEFSTLP LPNLRMVRGTQVYDG KFAIFVMLNYNTNSSH ALRQLRLTLTEILSG GVYIEKNDK		CRC, 胃がん
ESR1	D538G	HLMAKAGLTQQQH QRLAQLLLILSHIRHM SNKGMEHLYSMKCK NVVPLYGLLLEMLDA HRLHAPTSRGGASVE	GLLLEMLDA (A02.01) LYGLLLEML (A24.02) NVVPLYGLL (A02.01) PLYGLLLEML (A02.01) PLYGLLLEML (A02.01,	乳がん

10

20

30

40

【表 3 5 - 4】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		ETDQSHLATAGSTSSH SLQKYYITGEA	A24.02) VPLYGLLLEM (B07.02) VVPLYGLLL (A02.01, A24.02)	
ESR1	S463P	NQGKCVEGMVEIFDM LLATSSRFRMMNLQG EEFVCLKSIILLNSGVY TFLPSTLKSLEEKDHH RVLDKITDTLIHLMK AGLTLQQQHQLAQL LLILSH	FLPSTLKSL (A02.01, A24.02, B08.01) GVYTFLPST (A02.01) GVYTFLPSTL (A02.01, A24.02) TFLPSTLKSL (A24.02) VYTFLPSTL (A24.02) YTFLPSTLK (A03.01)	乳がん
ESR1	Y537C	IHLMAKAGLTLQQQH QRLAQLLLILSHIRHM SNKGMEHLYSMKCK NVVPLCDLLEMLDA HRLHAPTSRGGASVE ETDQSHLATAGSTSSH SLQKYYITGE	NVVPLCDLL (A02.01) NVVPLCDLLL (A02.01) PLCDLLEML (A02.01) PLCDLLEML (A02.01) VPLCDLLEML (B07.02) VVPLCDLLL (A02.01, A24.02)	乳がん
ESR1	Y537N	IHLMAKAGLTLQQQH QRLAQLLLILSHIRHM SNKGMEHLYSMKCK NVVPLNDLLEMLDA HRLHAPTSRGGASVE ETDQSHLATAGSTSSH SLQKYYITGE	NVVPLNDLL (A02.01) NVVPLNDLLL (A02.01) PLNDLLEML (A02.01) PLNDLLEML (A02.01) VPLNDLLEML (B07.02)	乳がん
ESR1	Y537S	IHLMAKAGLTLQQQH QRLAQLLLILSHIRHM SNKGMEHLYSMKCK NVVPLSDLLEMLDA HRLHAPTSRGGASVE ETDQSHLATAGSTSSH SLQKYYITGE	NVVPLSDLL (A02.01) NVVPLSDLLL (A02.01) PLSDLLEML (A02.01) PLSDLLEML (A02.01) VPLSDLLEML (B07.02) VVPLSDLLL (A02.01, A24.02)	乳がん
FGFR3	S249C	HRIGGIKLRHQQWSL VMESVVPDRGNITC VVENKFGSIRQTYTLD VLERC ~~C~~ PHRPILQAGLP ANQTAVLGSDVEFHC KVYSDAQPHIQWLKH VEVNGSKVG	VLERC ~~C~~ PHRPI (A02.01, B08.01) YTLDVLERC (A02.01)	BLCA, HNSC, KIRP, LUSC
FRG1B	L52S	AVKLSDSRIALKSGYG KYLGINDELVGHS AIGPREQWEPVFQNG KMAL ~~S~~ ASNSCFIRCNE AGDIEAKSKTAGEEE MIKIRSCAEKETKKKD DIPEEDKG	FQNGKMALS (A02.01)	GBM, KIRP, PRAD, SKCM
HER2	V777L (抵抗性)	GSGAFGT ~~V~~ YKGIWIPD GENVKIPVAIKVLREN TSPKANKEILDEAYV MAGL ~~G~~ SPYVSRLLGIC	VMAGLGSPYV (A02.01, A03.01)	BRCA

10

20

30

40

【表 3 5 - 5】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		LTSTVQLVTQLMPYG CLLDHVRENRGRLGS QDLLNWCM		
IDH1	R132H	RVEEFKLKQMWKSPN GTIRNILGGTVFREAI CKNIPRLVSGWVKPIII GHHAYGDQYRATDF VVPGPVKVEITYTPSD GTQKVITYLVHNFEEG GGVAMGM	KPIIIIGHHA (B07.02)	BLCA, GBM, PRAD
IDH1	R132C	RVEEFKLKQMWKSPN GTIRNILGGTVFREAI CKNIPRLVSGWVKPIII GCHAYGDQYRATDFV VPGPGKVEITYTPSDG TQKVITYLVHNFEEGG GVAMGM	KPIIIIGCHA (B07.02)	BLCA, GBM, PRAD
IDH1	R132G	RVEEFKLKQMWKSPN GTIRNILGGTVFREAI CKNIPRLVSGWVKPIII GHHAYGDQYRATDF VVPGPVKVEITYTPSD GTQKVITYLVHNFEEG GGVAMGM	KPIIIIGGHA (B07.02)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUAD, PAAD, PRAD, UCEC
IDH1	R132S	RVEEFKLKQMWKSPN GTIRNILGGTVFREAI CKNIPRLVSGWVKPIII GSHAYGDQYRATDF VPGPGKVEITYTPSDG TQKVITYLVHNFEEGG GVAMGM	KPIIIIGSHA (B07.02)	BLCA, BRCA, GBM, HNSC, LIHC, LUAD, LUSC, PAAD, SKCM, UCEC
KIT	T670I	VAVKMLKPSAHLTER EALMSELKVL SYLGN HMNIVNLLGACTIGGP TLVIIIEYCCYGDLLNF LRRKRDSFICSKQEDH AEAAALYKNLLHSKES SCSDSTNE	IIIEYCCYGDL (A02.01) TIGGPTLVII (A02.01) VIIIEYCCYG (A02.01)	消化管 間質腫瘍(GIST)
KIT	V654A	VEATAYGLIKSDAAM TVAVKMLKPSAHLTE REALMSELKVL SYLG NHMNIANLLGACTIG GPTLVITEYCCYGDLL NFLRRKRDSFICSKQE DHAEAAALYK	HMNIANLLGA (A02.01) IANLLGACTI (A02.01) MNIANLLGA (A02.01) YLGNHMNIA (A02.01, B08.01) YLGNHMNIAN (A02.01)	消化管 間質腫瘍(GIST)
MEK	C121S	ISELGAGNGGVVFKVS HKPSGLVMARKLIHL EIKPAIRNQIIRELQVL HESNSPYIVGFYGAFF SDGEISICMEHMDGGS	VLHESNSPY (A03.01) VLHESNSPYI (A02.01)	黒色腫

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 6】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		LDQVLKKAGRIPEQIL GKVS		
MEK	P124L	LGAGNGGVVFKVSHK PSGLVMARKLIHLEIK PAIRNQIIRELQVLHEC NSLYIVGFYGAIFYSDG EISICMEHMDGGSLDQ VLKKAGRIPEQILGKV SIAVI	LQVLHECNSL (A02.01, B08.01) LYIVGFYGA (A24.02) NSLYIVGFY (A01.01) QVLHECNSL (A02.01, B08.01) SLYIVGFY (A02.01) SLYIVGFYGA (A02.01) VLHECNSLY (A03.01) VLHECNSLYI (A02.01, A03.01)	黒色腫
MYC	E39D	MPLNVSTNRNYDL YDSVQPYFYCDEEN FYQQQQSDLPAPPS EDIWKKFELLPTPLSP SRRSGLCSPSYVAVTP FSLRGDNDGG	FYQQQQSDL (A24.02) QQQSDLPAPPA (A02.01) QQSDLPAPPA (A02.01) YQQQQSDL (A02.01, B08.01)	リンパ系のがん; バーキットリンパ腫
MYC	P57S	FTNRNYDLDYDSVQ PYFYCDEENFYQQQ QSELQPPAPSEDIWKK FELLSTPPLSPRRSGL CSPSYVAVTPFSLRGD NDGGGGSFSTADQLE MTELLG	FELLSTPPL (A02.01, B08.01) LLSTPPLSPS (A02.01)	リンパ系のがん
MYC	T58I	TNRNYDLDYDSVQ PYFYCDEENFYQQQ SELQPPAPSEDIWKK FELLPIPPLSPRRSGL CSPSYVAVTPFSLRGD DGGGGSFSTADQLEM VTELLG	FELLPIPPL (A02.01) IWKKFELLPI (A24.02) LLPIPPLSPS (A02.01, B07.02) LPIPPLSPS (B07.02)	神経芽腫
PDGFRa	T674I	VAVKMLKPTARSSEK QALMSELKIMTHLGP HLNIVNLLGACTKSGP IYIIIEYCFYGDVNYL HKNRDSFLSHHPEKPK KELDIFGLNPADESTR SYVILS	IIIEYCFYGD (A02.01) IIIEYCFY (A02.01) IYIIIEYCF (A24.02) IYIIIEYCFY (A24.02) YIIIEYCFY (A02.01)	慢性好酸球性 白血病
PIK3CA	E 542K	IEEHANWSVSREAGFS YSHAGLSNRLARDNE LRENDKEQLKAISTRD PLSKITEQEKDFLWSH RHYCVTIPEILPKLLLS VKWNSRDEVAQMYC LVKDWPP	KITEQEKD (A02.01)	BLCA, BRCA, CESC, CRC, GBM, HNSC, KIRC, KIRP, LIHC, LUAD, LUSC, PRAD, UCEC
PIK3CA	E545K	HANWSVSREAGFSYS HAGLSNRLARDNELR ENDKEQLKAISTRDPL	STRDPLSEITK (A03.01) DPLSEITK (A03.01)	BLCA, BRCA, CESC, CRC, GBM, HNSC, KIRC, KIRP, LIHC,

10

20

30

40

【表 3 5 - 7】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		SEITKQEKDFLWSHRH YCVTIPEILPKLLLSVK WNSRDEVAQMYCLV KDWPPIKP		LUAD, LUSC, PRAD, SKCM, UCEC
PIK3CA	H1047R	LFINLFSMMLGSGMPE LQSFDDIAYIRKTLAL DKTEQEALEYFMKQM NDARHGGWTTKMDW IFHTIKQHALN		BRCA, CESC, CRC, GBM, HNSC, LIHC, LUAD, LUSC, PRAD, UCEC
POLE	P286R	QRGGVITDEEETSKKI ADQLDNIVDMREYDV PYHIIRLSIDIETTKLPL KFRDAETDQIMMISY MIDGQGYLITNREIVS EDIEDFEFTPKPEYEGP FCVFN	LPLKFRDAET (B07.02)	結腸直腸腺癌; 子宮/子宮内膜腺癌; 結腸直腸腺癌、MSI+; 子宮/子宮内膜腺癌、 MSI+; 類内膜癌; 子宮内膜漿液性癌; 子宮内膜癌肉腫 -悪性中胚葉性 混合腫瘍; 神経膠腫; 星状細胞種; GBM
PTEN	R130Q	KFNCRVAQYPFEDHN PPQLELIKPFCELDLQ WLSEDDNHVAAIHCK AGKGQTGVMICAYLL HRGKFLKAQEALDFY GEVTRDKKGVITPSQ RRYVYYYSY	QTGVMICAYL (A02.01)	BRCA, CESC, CRC, GBM, KIRC, LUSC, UCEC
RAC1	P29S	MQAIKCVVVG DGAV GKTCLLSYTTNAFSG EYIPTVFDNYSANVM VDGKPVNLGLWDTA GQEDYDRLRPLSYPQ TVGET	AFSGEYIPTV (A02.01, A24.02)	黒色腫
TP53	G245S	IRVEGNLRVEYLDDR NTFRHSVVVPYEPPEV GSDCTTIHYNMCNS SCMG\$MNRRPILTIITL EDSSGNLLGRNSFEVR VCACPGRDRRTEEN LRKKGEP	SMNRRPILT (A02.01, B08.01) YMCNSSCMGS (A02.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUSC, PAAD, PRAD
TP53	R175H	TYSPALNKMFCQLAK TCPVQLWVDSTPPPGT RVRAMAIYKQSQHMT EVVRHCPHHERCSDS		BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUAD, PAAD, PRAD, UCEC

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 8】

遺伝子	例示的タンパク質変化	突然変異配列コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		DGLAPPQHILIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEV		
TP53	R248Q	EGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNMCMSSCMGGMNQRPILTITILEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEENLRKKGEPHHE	GMNQRPILT (A02.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, KIRC, LIHC, LUSC, PAAD, PRAD, UCEC
TP53	R248W	EGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNMCMSSCMGGMNWRPILTITILEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEENLRKKGEPHHE	GMNWRPILT (A02.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LIHC, LUSC, PAAD, SKCM, UCEC
TP53	R273C	PEVGSDCTTIHYNMCMSSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVCVCACPGRDRRTEENLRKKGEPHHEPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPL	LLGRNSFEVC (A02.01)	BLCA, BRCA, CRC, GBM, HNSC, LUSC, PAAD, UCEC
表 35B		MSI-ASSOCIATED FRAMESHIFTS ¹		
ACVR2A	D96fs; +1	GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKRQP*		MSI+CRC、MSI+子宮/子宮内膜がん、MSI+胃がん、リンチ症候群
ACVR2A	D96fs; -1	GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKTALKYIFVAVRAICVMKSFLIFRRWKS HSPLQQLHLSHPITTS CSIPWCHLC*	ALKYIFVAV (A02.01, B08.01) ALKYIFVAVR (A03.01) AVRAICVMK (A03.01) AVRAICVMKS (A03.01) CVEKKTALK (A03.01) CVEKKTALKY (A01.01) CVMKSFLIF (A24.02, B08.01) CVMKSFLIFR (A03.01) FLIFRRWKS (A02.01, B08.01) FRRWKSHP (B08.01) FVAVRAICV (A02.01, B08.01) FVAVRAICVM (B08.01) IQLHLSHPI (A02.01)	MSI+CRC、MSI+子宮/子宮内膜がん、MSI+胃がん、リンチ症候群

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 9】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
			KSFLIFRRWK (A03.01) KTALKYIFV (A02.01) KYIFVAVRAI (A24.02) RWKSHSPLQI (A24.02) TALKYIFVAV (A02.01, B08.01) VAVRAICVMK (A03.01) VMKSFLIFR (A03.01) VMKSFLIFRR (A03.01) YIFVAVRAI (A02.01)	
C15ORF4 0	L132fs; +1	TAEAVNVAIAAPPSEG EANAELCRYLSKVLE LRKSDVVLDKVGLAL FFFFFETKSCSVAQAG VQWRSLSLQPPPGF KLFSCSLFLSSWDYRR MPPCLANFCIFNRDGV SPCWSGWS*	ALFFFFFET (A02.01) ALFFFFFETK (A03.01) AQAGVQWRS (A02.01) CLANFCIFNR (A03.01) CLSFLSSWDY (A01.01, A03.01) FFETKSCSV (B08.01) FFFETKSCSV (A02.01) FKLFSCLSFL (A02.01) FLSSWDYRRM (A02.01) GFKLFSCLSF (A24.02) KLFSCSLFL (A02.01, A03.01) KLFSCSLFLS (A02.01, A03.01) LALFFFFFET (A02.01) LFFFFFETK (A03.01) LSFLSSWDY (A01.01) LSFLSSWDYR (A03.01) RMPPCLANF (A24.02) RRMPPCLANF (A24.02) SLQPPPPGFK (A03.01) VQWRSLSL (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
CNOT1	L1544fs; +1	LSVIIFFFVYIWHWAL PLILNNHHICLMSSIL DCNSVRQSIMSVCF FSVIFSTRCLTDSRYPN ICWFK*	FFFSVIFST (A02.01) MSVCFFFFSV (A02.01) SVCFFFFSV (A02.01, B08.01) SVCFFFFSVI (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
CNOT1	L1544fs; -1	LSVIIFFFVYIWHWAL PLILNNHHICLMSSIL DCNSVRQSIMSVCF FCYILNTMFDR*	FFCYILNTMF (A24.02) MSVCFFFFCY (A01.01) SVCFFFFCYI (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
EIF2B3	A151fs; -1	VLVLSCDLITDVALHE VVDLFRAYDASLAML MRKGQDSIEPVPQK GKKKQWSSVTSLEWT	KQWSSVTSL (A02.01) VLWMPSTV (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、

10

20

30

40

【表 3 5 - 1 0】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示の疾患
		<u>AQERGCSSWLMKQT</u> <u>WMKSWSLRDPSYRSI</u> <u>LEYVSTRVLWMPST</u> <u>V*</u>		リンチ症候群
EPHB2	K1020fs; -1	<u>SIQVMRAQMNQIQSV</u> <u>EGQPLARRPRATGRT</u> <u>KRCQPRDVTKKTCNS</u> <u>NDGKKREWEKRRKQIL</u> <u>GGGGKYKEYFLKRILI</u> <u>RKAMTVLAGDKKGL</u> <u>GRFMRCVQSETKAVS</u> <u>LQLPLGR*</u>	ILIRKAMTV (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
ESRP1	N512fs; +1	<u>LDFLGEFATDIRTHGV</u> <u>HMVLNHQGRPSGDAF</u> <u>IQMKSADRAFMAAQK</u> <u>CHKKKHEGOIC*</u>		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
ESRP1	N512fs; -1	<u>LDFLGEFATDIRTHGV</u> <u>HMVLNHQGRPSGDAF</u> <u>IQMKSADRAFMAAQK</u> <u>CHKKT*</u>		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
FAM111 B	A273fs; -1	<u>GALCKDGRFRSDIGEF</u> <u>EWKLKEGHKKIYGKQ</u> <u>SMVDEVSGKVLEMDI</u> <u>SKKKHYNRKISIKKLN</u> <u>RMKVPLMKLITRV*</u>	RMKVPLMK (A03.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
GBP3	T585fs; -1	<u>RERAQLLEEQEKTLS</u> <u>KLQEQARVLKERCQG</u> <u>ESTQLQNEIQKLQKTL</u> <u>KKKPRDICRIS*</u>	TLKKKPRDI (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
JAK1	P861fs; +1	<u>VNTLKEGKRLPCPPNC</u> <u>PDEVYQLMRKCWEFQ</u> <u>PSNRTSFQNLIEGFEAL</u> <u>LKTSN*</u>	LIEGFEALLK (A03.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
JAK1	K860fs; -1	<u>CRPVTSPCKELADLM</u> <u>TRCMNYDPNQRPFFR</u> <u>AIMRDINKLEEQNPD</u> <u>VSEKNQQLKWTPHIL</u> <u>KSAS*</u>	QQLKWTPHI (A02.01) QLKWTPHILK (A03.01) IVSEKNQQLK (A03.01) QLKWTPHILK (A03.01) QQLKWTPHI (A24.02) NQQLKWTPHIL (B08.01) NQQLKWTPHI (B08.01) QLKWTPHIL (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
LMAN1	E305fs; +1	<u>DDHDVLSFLTFLTEP</u> <u>GKEPPTPDKEISEKEK</u> <u>EKYQEEFEHFQQELD</u> <u>KKKRGIEGPPRPRA</u>	GPPRPPRAAC (B07.02) PPRPPRAAC (B07.02)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、

10

20

30

40

【表 3 5 - 1 1】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		ACGGNI*		リンチ症候群
LMAN1	E305fs; -1	DDHDVLSFLTFLTEP GKEPPTPDKEISEKEK EKYQEEFEHFQQELD KKKRNSRRATPTSKG <u>SLRRKYLRV*</u>	SLRRKYLRV (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
MSH3	N385fs; +1	TKSTLIGEDVNPLIKL DDAVNVDEIMTDTST SYLLCISENKENVRDK KKGQHIFYWHCGSAA <u>CHRRGCV*</u>	SAACHRRGCV (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
MSH3	K383fs; -1	LYTKSTLIGEDVNPLI KLDDAVNVDEIMTDT STSYLLCISENKENVR DKKRATFLLALWECS <u>LPQARLCLIVSRTLLL</u> <u>VQS*</u>	ALWECSLPQA (A02.01) CLIVSRTLL (B08.01) CLIVSRTLLL (A02.01, B08.01) FLLALWECS (A02.01) FLLALWECSL (A02.01, B08.01) IVSRTLLLV (A02.01) LIVSRTLLL (A02.01, B08.01) LIVSRTLLLV (A02.01) LLALWECSL (A02.01, B08.01) LPQARLCLI (B08.01, B07.02) LPQARLCLIV (B08.01) NVRDKKRATF (B08.01) SLPQARLCLI (A02.01, B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
NDUFC2	A70fs; +1	LPPPKLTDPRLLYIGFL GYCSGLIDNLIRRRPIA TAGLHRQLLYITAFF <u>CWILSCKT*</u>	FFCWILSCK (A03.01) FFFCWILSCK (A03.01) ITAFFFCWI (A02.01) LYITAFFFCW (A24.02) YITAFFFCWI (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
NDUFC2	F69fs; -1	SLPPPKLTDPRLLYIGF LGYCSGLIDNLIRRRPI ATAGLHRQLLYITAFF <u>LLDIIL*</u>	ITAFFLLDI (A02.01) LLYITAFFL (A02.01, B08.01) LLYITAFFLL (A02.01, A24.02) LYITAFFLL (A24.02) LYITAFFLLD (A24.02) YITAFFLLDI (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
RBM27	Q817; +1	NQSGGAGEDCQIFSTP GHPKMIYSSSNLKTPTS KLCSGSKSHDVQEV KKKTGSNEVTTRYEE <u>KKTGSVRKANRMPKD</u>	GSNEVTTRY (A01.01) MPKDVNIQV (B07.02) TGSNEVTTRY (A01.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群

10

20

30

40

【表 3 5 - 1 2】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		<u>VNIQVRKKQKHETR</u> <u>KSKYNEDFERAWRED</u> <u>LTIKR*</u>		
RPL22	K16fs; +1	<u>MAPVKKL VVKGGKK</u> <u>KEASSEVHS*</u>		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
RPL22	K15fs; -1	<u>MAPVKKL VVKGGKK</u> <u>RSKF*</u>		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
SEC31A	I462fs; +1	<u>MPSHQGAEEQQQQQH</u> <u>HVFISQVVTEKEFLSR</u> <u>SDQLQQAVQSQGFIN</u> <u>YCQKKN*</u>		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
SEC31A	I462fs; -1	<u>MPSHQGAEEQQQQQH</u> <u>HVFISQVVTEKEFLSR</u> <u>SDQLQQAVQSQGFIN</u> <u>YCQKKMLLRNLNRK</u> <u>MCGPF*</u>	KKMLLRNL (A02.01) KLMLLRNL (A02.01, A03.01, B07.02, B08.01) KLMLLRNLNR (A03.01) LLRLNLRKM (B08.01) LMLLRNL (B08.01) LMLLRNLNRK (A03.01) LNLRKMCGPF (B08.01) MLLRNLNRK (A03.01) MLLRNLNRKM (A02.01, A03.01, B08.01) NLRKMCGPF (B08.01) NYCQKKMLL (A24.02) YCQKKMLL (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
SEC63	K530fs; +1	<u>AEVFEKEQSICAAEEQ</u> <u>PAEDGQGETNKNRTK</u> <u>GGWQQKSKGPKKTA</u> <u>KSKKKETFKKKTYTC</u> <u>AITTVKATETKAGKW</u> <u>SRWE*</u>	FKKKTYTCAI (B08.01) ITTVKATETK (A03.01) KSKKKETFK (A03.01) KSKKKETFKK (A03.01) KTYTCAITTV (A02.01, A24.02) TFKKKTYTC (B08.01) TYTCAITTV (A24.02) TYTCAITTVK (A03.01) YTCAITTVK (A03.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
SEC63	K529fs; -1	<u>MAEVFEKEQSICAAEE</u> <u>QPAEDGQGETNKNRT</u>	TAKSKKRNL (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 1 3】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
		KGGWQQKSKGPKKT AKSKKRNL*		MSI+胃がん、 リンチ症候群
SLC35F5	C248fs; -1	NIMEIRQLPSSHALEA KLSRMSYPVKEQESIL KTVGKLTATQVAKISF FFALCGFWQICHIIKH FQTHKLL*	FALCGFWQI (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
SMAP1	K172fs; +1	YEKKKYDKNIAIT NISSSDAPLQPLVSSPS LQAAVDKNKLEKEKE KKKGREKERKGARKA GKTTY*		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
SMAP1	K171fs; -1	KYEKKKYDKNIAI TNISSSDAPLQPLVSSP SLQAAVDKNKLEKEK EKRRKRKREKRSQKS RQNHQLKSCRRKISN WSLKKVPALKLRSP LWIF*	LKKLRSPL (B08.01) SLKKVPAL (B08.01) RKISNWSLKK (A03.01) VPALKLRSPL (B07.02)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
TFAM	E148fs; +1	IYQDAYRAEWQVYKE EISRFKEQLTPSQIMSL EKEIMDKHLKRKAMT KKKRVNTAWTKTKT SFSL*	KRVNTAWTK (A03.01) MTKKKRVNTA (B08.01) RVNTAWTK (A03.01) RVNTAWTKK (A03.01) TKKKRVNTA (B08.01) WTKKTSFSL (B08.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
TFAM	E148fs; -1	IYQDAYRAEWQVYKE EISRFKEQLTPSQIMSL EKEIMDKHLKRKAMT KKKS*		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
TGFBR2	P129fs; +1	KPQEVCAVWRKND ENITLETVCHDPKLPY HDFILEDAAAPKCMK EKKKAW*		MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
TGFBR2	K128fs; -1	EKPQEVCAVWRKN DENITLETVCHDPKLP YHDFILEDAAAPKCM KEKKS ~~LVRLSSCPVA~~ LMSAMTTSSSQKNITP AILTCC*	ALMSAMTTS (A02.01) AMTTSSSQK (A03.01, A11.01) AMTTSSSQKN (A03.01) CIMKEKKS (B08.01) CIMKEKSLV (B08.01) IMKEKKS (B08.01) IMKEKSLV (B08.01) KSLVRLSSCV (A02.01) LVRLSSCPV (A02.01) RLSSCPVA (A02.01,	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群

10

20

30

40

50

【表 35 - 14】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
			A03.01) RLSSCVPVAL (A02.01) SAMTTSSSQK (A03.01, A11.01) SLVRLSSCV (A02.01) VPVALMSAM (B07.02) VRLSSCVPVA (A02.01)	
THAP5	K99fs; -1	VPSKYQFLCSDHFTPD SLDIRWGIRYLKQTAV PTIFSLPEDNQGKDP KKNPRRKTWKMRKK YAOKPSQKNHLY*	KMRKKYAQK (A03.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
TTK	R854fs; -1	GTTEEMKYVLGQLVG LNSPNSILKAAKTLYE HYSGGESHNSSSSKTF EKKGEKNDLQLFVMS DTTYKIYWTVILLNPC GNLHLKTTSL*	FVMSDTTYK (A03.01) FVMSDTTYKI (A02.01) KTFEKKGEK (A03.01) LFVMSDTTYK (A03.01) MSDTTYKIY (A01.01) VMSDTTYKI (A02.01) VMSDTTYKIY (A01.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
XPOT	F126fs; -1	QQLIRETLISWLQAQM LNPQPEKTFIRNKAQ VFALLFVTEYLTWKP KFFLTFSQ*	YLTkWPKFFL (A02.01)	MSI+CRC、MSI+ 子宮/子宮内膜がん、 MSI+胃がん、 リンチ症候群
表 35C		フレームシフト ¹		
APC	V1352fs F1354fs Q1378fs S1398fs	AKFQOCHSTLEPNPA DCRVLYYLQNPQGTK LLNFLOERNLPPKVVL RHPKVHLNTMFRRPH SCLADVLLSVHLIVLR VYRLPAPFRVNHAVE W*	FLQERNLPP (A02.01) FRPHSCLA (B08.01) LIVLRVRL (B08.01) LLSVHLIVL (A02.01, B08.01)	CRC, LUAD, UCEC, STAD
APC	S1421fs R1435fs T1438fs P1442fs P1443fs V1452fs P1453fs K1462fs E1464fs	APVIFQIALDKPCHQA EVKHLHLLKQLKPS EKYLKIKHLLKRRERV DLSKLQ*	EVKHLHLL (B08.01) HLHLLKQLK (A03.01) HLLKRERV (B08.01) KIKHLLK (A03.01) KPSEKYLK (B07.02) KYLKIKHLL (A24.02) KYLKIKHLL (A24.02) LLKQLKPSEK (A03.01) LLKRERVDL (B08.01) LLKRERVDL (B08.01) QLKPSEKYLK (A03.01) YLIKHLHLL (A02.01, B08.01) YLIKHLHLLK (A03.01)	CRC, LUAD, UCEC, STAD
APC	T1487fs H1490fs	MLQFRGSRFFQMLILY YILPRKVLQMDFLVHP	ILPRKVLQM (B08.01) KVLQMDFLV (A02.01,	CRC, LUAD, UCEC, STAD

10

20

30

40

【表 3 5 - 1 5】

遺伝子	例示的タンパク質変化	突然変異配列コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	L1488fs	A*	A24.02) LPRKVLQMDF (B07.02, B08.01) LQMDFLVHPA (A02.01) QMDFLVHPA (A02.01) YILPRKVLQM (A02.01, B08.01)	
ARID1A	Q1306fs S1316fs Y1324fs T1348fs G1351fs G1378fs P1467fs	<u>ALGPHSRISCLPTQTR</u> <u>GCILLAATPRSSSSSS</u> <u>NDMIPMAISSPPKAPL</u> <u>LAAPSPASRLQCINSN</u> <u>SRITSGQWMAHMALL</u> <u>PSGTKGRCTACTHAL</u> <u>GRGSLSSSSCPQSPSL</u> <u>PASNKLPSLPLSKMYT</u> <u>TSMAMPILPLPQLLS</u> <u>ADQQAAPRTNHFSSL</u> <u>AETVSLHPLAPMPSKT</u> <u>CHHK*</u>	APSPASRLQC (B07.02) HPLAPMPSKT (B07.02) ILPLPQLL (A02.01) LLLSADQQA (A02.01) LPTQTRGCI (B07.02) LPTQTRGCIL (B07.02) RISCLPTQTR (A03.01) SLAETVSLH (A03.01) TPRSSSSSS (B07.02) TPRSSSSSS (B07.02)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS
ARID1A	S674fs P725fs R727fs I736fs	<u>AHQGFPAAKESRVIQL</u> <u>SLLSLLIPPLTCLASEA</u> <u>LPRLLALPPVLLSLA</u> <u>QDHSRLQCQATRCH</u> <u>LGHPVASRTASCILP*</u>	ALPPVLLSL (A02.01) ALPPVLLSLA (A02.01) ALPRPLLAL (A02.01) ASRTASCIL (B07.02) EALPRPLLAL (B08.01) HLGHPVASR (A03.01) HPVASRTAS (B07.02) HPVASRTASC (B07.02) IIQLSLLSLL (A02.01) IQLSLLSLL (A02.01) IQLSLLSLLI (A02.01, A24.02) LLALPPVLL (A02.01) LLIPPLTCL (A02.01) LLIPPLTCLA (A02.01) LLSLLIPPL (A02.01) LLSLLIPPLT (A02.01) LPRPLLALPP (B07.02) QLSLLSLLI (A02.01) RLLQCQATR (A03.01) RPLLALPPV (B07.02) RPLLALPPVL (B07.02) SLAQDHSRL (A02.01) SLAQDHSRLL (A02.01) SLLIPPLTCL (A02.01) SLLSLLIPP (A02.01) SLLSLLIPPL (A02.01, B08.01)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS
ARID1A	G414fs Q473fs H477fs	<u>PILAATGTSVRTAART</u> <u>WVPRAAIRVPDPAAV</u> <u>PDDHAGPGAECGRP</u>	AAATSAASTL (B07.02) AAIPASTSAV (B07.02) AIPASTSAV (A02.01)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 1 6】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	S499fs P504fs Q548fs P549fs	<u>LLYTADSSSLWTTTRPQ</u> <u>RVWSTGPDSSIQPAKS</u> <u>SPSAAAAATLLPATTVP</u> <u>DPSCPTFVSAAAATVST</u> <u>TTAPVLSASILPAAIPA</u> <u>STSAVPGSIPLPAVDD</u> <u>TAAPPEPAPLLTATGS</u> <u>VSLPAAATSAASTLDA</u> <u>LPAGCVSSAPVSAVPA</u> <u>NCLFPAALPSTAGAIS</u> <u>RFIWVSGILSPLNDLQ*</u>	ALPAGCVSSA (A02.01) APLLTATGSV (B07.02) APVLSASIL (B07.02) ATLLPATTVP (A02.01) ATVSTTTAPV (A02.01) AVPANCLFPA (A02.01) CLFPAALPST (A02.01) CPTFVSAAA (B07.02) FPAALPSTA (B07.02) FPAALPSTAG (B07.02) GAECHGRPL (B07.02) GAISRFIWV (A02.01) ILPAAIPAST (A02.01) IWVSGILSPL (A24.02) LLTATGSVSL (A02.01) LLYTADSSL (A02.01) LPAAATSAA (B07.02) LPAAATSAAS (B07.02) LPAAIPAST (B07.02) LPAGCVSSA (B07.02) LPAGCVSSAP (B07.02) LYTADSSSLW (A24.02) QPAKSSPSA (B07.02) QPAKSSPSAA (B07.02) RFIWVSGIL (A24.02) RPQRVWSTG (B07.02) RVWSTGPDSSI (A02.01) SAVPGSIPL (B07.02) SILPAAIPA (A02.01) SLPAAATSA (A02.01) SLPAAATSAA (A02.01) SLWTTTRPQR (A03.01) SLWTTTRPQRV (A02.01) SPSAAAAATL (B07.02) SPSAAAAATLL (B07.02) TLDALPAGCV (A02.01) TVSTTTAPV (A02.01) VLSASILPA (A02.01) VLSASILPAA (A02.01) VPANCLFPA (B07.02) VPANCLFPAA (B07.02) VPDPSCPTF (B07.02) VPGSIPLPA (B07.02) VPGSIPLPAV (B07.02) WVSGILSPL (A02.01) YTADSSSLWTT (A02.01)	
ARID1A	T433fs A441fs Y447fs	<u>PCRAGRRVPWAASLI</u> <u>HSRFLMDNKPAGM</u> <u>VNRRARLHITTSKVLTL</u>	APAGMVNRA (B07.02) ASLHRRSYL (B08.01) ASLHRRSYLK (A03.01)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS

40

【表 3 5 - 1 7】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	P483fs P484fs P504fs S519fs H544fs P549fs P554fs Q563fs	<u>SSSSHPTPSNHRPRPL</u> <u>MPNLRISSSHSLNHHS</u> <u>SSPLSLHTPPSSHPSLHI</u> <u>SSPRLHTPPSSRRHSST</u> <u>PRASPPTHSHRLSLLTS</u> <u>SSNLSSQHPRRSPSRL</u> <u>RILSPSLSSPSKLPSS</u> <u>ASLHRRSYLKIHLGLR</u> <u>HPQPPQ*</u>	FLLMDNKAPA (A02.01) HPRRSPSRL (B07.02, B08.01) HPSLHISSP (B07.02) HRRSYLKIHL (B08.01) HSRFLMDNK (A03.01) KLPISSASL (A02.01) KVLTLSSSSH (A03.01) LIHSRFLM (B08.01) LLMDNKAPA (A02.01) LMDNKAPAGM (A02.01) LPISSASL (B07.02) MPNLRISSS (B07.02, B08.01) MPNLRISSSH (B07.02) NLRISSSHSL (B07.02, B08.01) PPTHSHRLSL (B07.02) RAGRVPWAA (B08.01) RARLHITTSK (A03.01) RISSSHSLNH (A03.01) RLHTPPSSR (A03.01) RLHTPPSSRR (A03.01) RLRILSPSL (A02.01, B07.02, B08.01) RPLMPNLRI (B07.02) RPRPLMPNL (B07.02) SASLHRRSYL (B07.02, B08.01) SLHISSPRL (A02.01) SLHRRSYLK (A03.01) SLHRRSYLKI (B08.01) SLIHSRFLM (A02.01) SLIHSRFLM (A02.01, B08.01) SLLTSSSNL (A02.01) SLNHHSSSPL (A02.01, B07.02, B08.01) SLSSPSKLP (A02.01) SPLSLHTPS (B07.02) SPLSLHTPPS (B07.02) SPPTHSHRL (B07.02) SPRLHTPPS (B07.02) SPRLHTPPSS (B07.02) SPSLSSPSKL (B07.02) SYLKIHLGL (A24.02) TPSNHRPRPL (B07.02, B08.01)	

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 1 8】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
			TPSSHPSLHI (B07.02)	
ARID1A	A2137fs P2139fs L1970fs V1994fs	<u>RTNPTVRMRPHCVPF</u> <u>WTGRILLPSAASVCPI</u> <u>FEACHLCQAMTLRCP</u> <u>NTQGCCSSWAS*</u>	CVPFWTGRIL (B07.02) HCVPFWTGRIL (B07.02) ILLPSAASV (A02.01) ILLPSAASVC (A02.01) LLPSAASVCPI (A02.01) LPSAASVCPI (B07.02) MRPHCVPF (B08.01) RILLPSAASV (A02.01) RMRPHCVPF (A24.02, B07.02, B08.01) RMRPHCVPFW (A24.02) RTNPTVRMR (A03.01) SVCPIPFEA (A02.01) TVRMRPHCV (B08.01) TVRMRPHCVPF (B08.01) VPFWTGRIL (B07.02) VPFWTGRILL (B07.02) VRMRPHCVPF (B08.01)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS
ARID1A	N756fs S764fs T783fs Q799fs A817fs	<u>TNQALPKIEVICRGTP</u> <u>RCPSTVPPSPAQPYL</u> <u>R</u> <u>VSLPEDRYTQAWAPT</u> <u>S</u> <u>SRTPWGAMVPRGVS</u> <u>MAHKVATPGSQTIMP</u> <u>CPMPTTPVQAWLEA*</u>	AMVPRGVSM (B07.02, B08.01) AMVPRGVSM (A02.01) AWAPTSRTPW (A24.02) CPMPTTPVQA (B07.02) CPSTVPPSPA (B07.02) GAMVPRGVSM (B07.02, B08.01) MPCPMPTTPV (B07.02) MPTTPVQAW (B07.02) MPTTPVQAWL (B07.02) SLPEDRYTQA (A02.01) SPAQPYL RV (B07.02) SPAQPYL RV (B07.02) TIMPCPMPT (A02.01) TPVQAWLEA (B07.02) TSRTPWGAM (B07.02) VPPSPAQPYL (B07.02) VPRGVSM (B07.02)	STAD, UCEC, BLCA, BRCA, LUSC, CESC, KIRC, UCS
β2M	N62fs E67fs L74fs F82fs	<u>RMERELKKWSIQTCL</u> <u>SARTGLSISCTTLNSPP</u> <u>LKKMSMPAV*</u>	CLSARTGLSI (B08.01) CTTLNSPPLK (A03.01) GLSISCTTL (A02.01) SPPLKKMSM (B07.02,	CRC, STAD, SKCM, HNSC

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 1 9】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	T91fs E94fs		B08.01) TLNSPPLKK (A03.01) TTLNSPPLK (A03.01) TTLNSPPLKK (A03.01)	
β2M	L13fs S14fs	<u>LCSRYSLFLAWRLSSV</u> <u>LQRFRFTHVIOQRMES</u> <u>QIS*</u>	LQRFRFTHV (B08.01) LQRFRFTHVI (B08.01) RLSSVLQRF (A24.02) RLSSVLQRF (A03.01) VLQRFRFTHV (A02.01, B08.01)	CRC, STAD, SKCM, HNSC
CDH1	A691fs P708fs L711fs	<u>RSACVTVKGPLASVG</u> <u>RHLSKQDCKFLPFW</u> <u>GFLEEFLLC*</u>	ASVGRHSLSK (A03.01) KFLPFWGFL (A24.02) LASVGRHSL (B07.02) LPFWGFLEEF (B07.02) PFWGFLEEF (A24.02) SVGRHSLSK (A03.01)	ILC LumA 乳がん
CDH1	H121fs P126fs H128fs N144fs V157fs P159fs N166fs N181fs F189fs P201fs F205fs	<u>IQWGTTTAPRPIRPPFL</u> <u>ESKQNCSEHPTPLLAS</u> <u>EDRRETGLFLPSAAQK</u> <u>MKKAHFLKTWFRSNP</u> <u>TKTKKARFSTASLAKE</u> <u>LTHPLLVSLLLKEKQD</u> <u>G*</u>	APRPIRPPF (B07.02) APRPIRPPFL (B07.02) AQKMKAHFL (B08.01) FLPSAAQKM (A02.01) GLFLPSAAQK (A03.01) HPLLVSLLL (B07.02) KAHFLKTWFR (A03.01) KARFSTASL (B07.02) KMKAHFLK (A03.01) KTWFRSNPTK (A03.01) LAKELTHPL (B07.02, B08.01) LAKELTHPLL (B08.01) NPTKTKKARF (B07.02) QKMKAHFL (B08.01) RFSTASLAK (A03.01) RPIRPPFLES (B07.02) RSNPTKTKK (A03.01) SLAKELTHPL (A02.01, B08.01) TKKARFSTA (B08.01)	ILC LumA 乳がん
CDH1	V114fs P127fs V132fs P160fs	<u>PTDPFLGLRLGLHLQK</u> <u>VFHQSHAEYSGAPPPP</u> <u>PAPSGLRFWNPSRIAH</u> <u>ISQLLWPQKTEERLG</u> <u>YSSHQLPRK*</u>	GLRFWNPSR (A03.01) ISQLLWPQK (A03.01) RIAHISQLL (A02.01) RLGYSSHQL (A02.01) SQLLWPQK (A03.01) SRIAHISQL (B08.01) WPQKTEERL (B07.02) YSSHQLPRK (A03.01)	ILC LumA 乳がん
CDH1	L731fs R749fs E757fs	<u>FCCSCCFGGGERWSKS</u> <u>PYCPQRMTPGTTFITM</u> <u>MKKEAEKRTRTLT*</u>	CPQRMTPGTT (B07.02) EAEKRTRTL (B08.01) GTTFITMMK (A03.01)	ILC LumA 乳がん

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2 0】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	G759fs		GTTFITMMKK (A03.01) ITMMKKEAEK (A03.01) RMTPGTTFI (A02.01) SPYCPQRMT (B07.02) TMMKKEAEK (A03.01) TPGTTFITM (B07.02) TPGTTFITMM (B07.02) TTFITMMKK (A03.01)	
CDH1	S19fs E24fs S36fs	<u>WRRNCKAPVSLRKSV</u> <u>QTPARSSPARPDRTRR</u> <u>LPSLGVPQGPWALGA</u> <u>AASRRCCCCRSPLGS</u> <u>ARSRSPATLALTPRAT</u> <u>RSRCPGATWREASW</u> <u>AE*</u>	CPGATWREA (B07.02) CPGATWREAA (B07.02) RSRCPGATWR (A03.01) TPRATRSRC (B07.02)	ILC LumA 乳がん
GATA3	P394fs P387fs S398fs H400fs M401fs S408fs P409fs S408fs P409fs T419fs H424fs P425fs S427fs F431fs S430fs H434fs H435fs S438fs M443fs G444fs *445fs	<u>PGRPLQTHVLPEPHLA</u> <u>LQPLQPHADHAHADA</u> <u>PAIQPVLTTPPLQHG</u> <u>HRHGLEPCSMILTGP</u> <u>ARVPAVPFDLHFCRSS</u> <u>IMKPKRDGYMFLKAE</u> <u>SKIMFATLQRSSLWCL</u> <u>CSNH*</u>	HVLPEPHLAL (B07.02) RPLQTHVLPE (B07.02) VLWTTPLQH (A03.01)	乳がん
GATA3	P426fs H434fs P433fs T441fs	<u>PRPRRCTRHPACPLDH</u> <u>TTPPAWSPPWVRALL</u> <u>DAHRAPSESPSPFRL</u> <u>AFLQEYHEA*</u>	APSESPSPF (B07.02) CPLDHTTPPA (B07.02) FLQEYHEA (A02.01, B08.01) RLAFLQEYH (A03.01) SPCSPFRLAF (B07.02) SPPWVRALL (B07.02) YPACPLDHTT (B07.02)	乳がん
MLL2	P519fs E524fs P647fs S654fs	<u>TRRCHCCPHLRSHPCP</u> <u>HHLRNHPRPHILRHH</u> <u>ACHHHLRNCPPHFL</u> <u>RHCTCPGRWRNRPSL</u>	ALHLRSCPC (B08.01) CLHHRRLV (B08.01) CLHHRRLVC (B08.01)	STAD, BLCA, CRC, HNSC, BRCA

10

20

30

40

50

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示の疾患
	L656fs R755fs L761fs Q773fs	<u>RRLRSLCLPHLNHHL</u> <u>FLHWRSRPCLHRKSH</u> <u>PHLLHLRRLYPHHLK</u> <u>HRPCPHHLKNLLCPR</u> <u>HLRNCPLPRHLKHLA</u> <u>CLHHLRSHPCPLHLKS</u> <u>HPCLHHRRHLVCSHH</u> <u>LKSLLCPLHLRSLPPF</u> <u>HHLRHHACPHHLRTR</u> <u>LCPHHLKNHLCPPHLR</u> <u>YRAYPPCLWCHACLH</u> <u>RLRNLPCPHRLRSLPR</u> <u>PLHLRLHASPHHLRTP</u> <u>PHPHHLRTHLLPHHRR</u> <u>TRSCPCRWRSHPCCH</u> <u>YLRSRNSAPGPRGRTC</u> <u>HPGLRSRTCPPGLRSH</u> <u>TYLRRLRSHTCPPSLR</u> <u>SHAYALCLRSHTCPPR</u> <u>LRDHICPLSLRNCTCP</u> <u>PRLRSRTCLLCLRSHA</u> <u>CPPNLRNHTCPPSLRS</u> <u>HACPPGLRNRICPLSL</u> <u>RSHPCPLGLKSPLRSQ</u> <u>ANALHLRSCPCSLPLG</u> <u>NHPYLPCLSQPCSLSL</u> <u>GNHLCPLCPRSCRCPH</u> <u>LGSHPCRLS*</u>	CLHRKSHPHL (B08.01) CLRSACPP (B08.01) CLRSHTCPP (B08.01) CLWCHACLH (A03.01) CPHHLKNHL (B07.02) CPHHLKNLL (B07.02) CPHHLRTRL (B07.02, B08.01) CPLHLRSLPF (B07.02, B08.01) CPLPRHLKHL (B07.02, B08.01) CPLSLRSHPC (B07.02) CPRHLRNCPL (B07.02, B08.01) FPHHLRHH (B07.02, B08.01) FPHHLRHHAC (B07.02, B08.01) GLRSRTCP (B08.01) HACLHRLNL (B08.01) HLACLHHLR (A03.01) HLCPPHLRY (A03.01) HLCPPHLRYR (A03.01) HLKHLACLH (A03.01) HLKHRPCPH (B08.01) HLKNHLCPP (B08.01) HLKSHPCPLH (A03.01) HLKSLLCPL (A02.01, B08.01) HLLHLRRLY (A03.01) HLRNCPLPR (A03.01) HLRNCPLPRH (A03.01) HLRRLYPHHL (B08.01) HLRSHPCPL (B07.02, B08.01) HLRSHPCPLH (A03.01) HLRSLPFPH (A03.01) HLRTRLCPLH (A03.01, B08.01) HLVCSHHLK (A03.01) HPCLHHRRHL (B07.02, B08.01) HPGLRSRTC (B07.02) HPHLLHLRRL (B07.02, B08.01) HRKSHPHLL (B08.01) HRRTRSCPC (B08.01) KSHPHLLHLR (A03.01) KSLLCPLHLR (A03.01) LLCPLHLRSL (A02.01,	

40

【表 3 5 - 2 2】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
			B08.01) LLHLRRLYPH (B08.01) LPRHLKHLA (B07.02) LPRHLKHLAC (B07.02, B08.01) LRRLSHTC (B08.01) LRRLYPHHL (B08.01) LVCSHHLKSL (B08.01) NLRNHTCPPS (B08.01) PLHLRSLPF (B08.01) RLCPHHLKNH (A03.01) RLYPHHLKH (A03.01) RLYPHHLKHR (A03.01) RPCPHHLKNL (B07.02) RSHPCPLHLK (A03.01) RSLPFPHHLR (A03.01) RTRLCPHHL (B07.02) RTRLCPHHLK (A03.01) SLLCPLHLR (A03.01) SLRSHACPP (B08.01) SPLRSQANA (B07.02) YLRRLSHT (B08.01) YPHHLKHRPC (B07.02, B08.01)	
PTEN	I122fs I135fs A148fs L152fs D162fs I168fs	<u>SWKGTNWCNDMCIFI</u> <u>TSGQIFKGTRGPRFLW</u> <u>GSKDQROKGSNYSQS</u> <u>EALCVLL*</u>	FITSGQIFK (A03.01) IFITSGQIF (A24.02) SQSEALCVL (A02.01) SQSEALCVLL (A02.01)	UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM
PTEN	L265fs K266fs	<u>KRTKCFTFG*</u>		UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM
PTEN	A39fs E40fs V45fs R47fs N48fs	<u>PIFIQTLLLWDFLOKD</u> <u>LKAYTGILMM*</u>	AYTGTILMM (A24.02) DLKAYTGIL (B08.01)	UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM
PTEN	T319fs T321fs K327fs A328fs A333fs	<u>QKMILTKQIKTKPTDT</u> <u>FLQILR*</u>	ILTKQIKTK (A03.01) KMILTKQIK (A03.01) KPTDTFLQI (B07.02) KPTDTFLQIL (B07.02) MILTKQIKTK (A03.01)	UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM
PTEN	N63fs E73fs A86fs N94fs	<u>GFWIOSIKTITRYTIFV</u> <u>LKDIMTPPNLIAELHNI</u> <u>LLKTITHHS*</u>	ITRYTIFVLK (A03.01) LIAELHNIL (A02.01) LIAELHNILL (A02.01) MTPPNLIAEL (A02.01) NLIAELHNI (A02.01)	UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2 3】

遺伝子	例示的タンパク質変化	突然変異配列コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
			NLIAELHNIL (A02.01) RYTIFVLKDI (A24.02) TITRYTIFVL (A02.01) TPPNLIAEL (B07.02)	
PTEN	T202fs G209fs C211fs I224fs G230fs P231fs R233fs D236fs	<u>NYSNVQWRNLOSSVC</u> <u>GLPAKGEDIFLQFRTH</u> <u>TTGRQVHVL*</u>	FLQFRTHHT (A02.01, B08.01) LPAKGEDIFL (B07.02) LQFRTHHTGR (A03.01) NLQSSVCGL (A02.01) SSVCGLPAK (A03.01) VQWRNLQSSV (A02.01)	UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM
PTEN	G251fs E256fs K260fs Q261fs L265fs M270fs H272fs T286fs E288fs	<u>YQSRVLPQTEQDAKK</u> <u>GQNVSLGKYILHTRT</u> <u>RGNLRKSRKWKSM*</u>	GQNVSLGK (A03.01) HTRTRGNLRK (A03.01) ILHTRTRGNL (B08.01) KGQNVSLGK (A03.01) LLGKYILHT (A02.01) LRKSRKWKSM (B08.01) SLLGKYILH (A03.01) SLLGKYILHT (A02.01)	UCEC, PRAD, SKCM, STAD, BRCA, LUSC, KIRC, LIHC, KIRP, GBM
TP53	A70fs P72fs A76fs A79fs P89fs W91fs S96fs V97fs V97fs G108fs G117fs S121fs V122fs C124fs K139fs V143fs	<u>SSQNARGCSPRGPCTS</u> <u>SSYTGGPCTSPLLAPVI</u> <u>FCFPENLPGQLRFP</u> <u>GLLAFWDSQVCDLHV</u> <u>LPCPQQDVLPTGQDLP</u> <u>CAAVG*</u>	CTSPLLAPV (A02.01) FPENLPGQL (B07.02) GLLAFWDSQV (A02.01) IFCFPENL (A24.02) LLAFWDSQV (A02.01) LLAPVIFCP (A02.01) LLAPVIFCPF (A02.01, A24.02) LPCPQQDVL (B07.02) RFPSGLLAF (A24.02) RFPSGLLAFW (A24.02) SPLLAPVIF (B07.02) SPRGPCSTSS (B07.02) SPRGPCSTSS (B07.02) SQVCDLHVL (A02.01) VIFCFPENL (A02.01)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC
TP53	V173fs H178fs D186fs H193fs L194fs E198fs V203fs E204fs L206fs D207fs N210fs	<u>GAAPTMSAAQIAMV</u> <u>WPLLSILSEWKEICVW</u> <u>SIWMTETLFDIVWWC</u> <u>PMSRLRLALTVPSTT</u> <u>TTCVTPAWAA*</u>	AMVWPLLSI (A02.01) AMVWPLLSIL (A02.01) AQIAMVWPL (A02.01, A24.02) AQIAMVWPLL (A02.01) CPMSRLRLA (B07.02, B08.01) CPMSRLRLAL (B07.02, B08.01) IAMVWPLLSI (A02.01,	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC

10

20

30

40

【表 3 5 - 2 4】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	T211fs F212fs V225fs S241fs		A24.02, B08.01) ILSEWKEICV (A02.01) IVWWCPMSR (A03.01) IVWWCPMSRL (A02.01) IWMTETLFDI (A24.02) LLSILSEWK (A03.01) MSAAQIAMV (A02.01) MSRLRLALT (B08.01) MSRLRLALTV (B08.01) MVWPLLSIL (A02.01) RLALTVPPST (A02.01) TLFDIVWWC (A02.01) TLFDIVWWCP (A02.01) TMSAAQIAMV (A02.01) VWSIWMTETL (A24.02) WMTETLFDI (A02.01, A24.02) WMTETLFDIV (A01.01, A02.01)	
TP53	R248fs P250fs S260fs N263fs G266fs N268fs V272fs V274fs P278fs D281fs R282fs T284fs E285fs L289fs K292fs P301fs S303fs T312fs S314fs K319fs K320fs P322fs Y327fs F328fs L330fs R333fs R335fs R337fs E339fs	<u>TGGPSSPSSHWKTPVV</u> <u>IYWDGTALRCVFVPV</u> <u>LGETGAQRKRISARK</u> <u>GSLTTSCPOGALSEHC</u> <u>PTTPAPLPSQRRNHW</u> <u>MENISPFERSVGVSASR</u> <u>CSES*</u>	ALRCVFVPV (A02.01, B08.01) ALRCVFVPVL (A02.01, B08.01) ALSEHCPTT (A02.01) AQRKRISARK (A03.01) GAQRKRISA (B08.01) HWMENISPF (A24.02) LPSQRRNHW (B07.02) LPSQRRNHW (B07.02, B08.01) NISPFERSVG (A02.01) RISARKGSL (B07.02, B08.01) SPFRSVGVSA (B07.02) SPSSHWKTPV (B07.02, B08.01) TALRCVFVPV (A02.01) VIYWDGTAL (A02.01) VIYWDGTALR (A03.01) VLGETGAQRK (A03.01)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC

10

20

30

40

【表 3 5 - 2 5】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
TP53	S149fs P151fs P152fs V157fs Q165fs S166fs H168fs V173fs	<u>FHTPARHPRPRHGH</u> <u>QAVTAHDGGCEALPP</u> <u>P*</u>	HPRPRHGH (B07.02, B08.01) HPRPRHGH (B07.02) RPRHGHQA (B07.02) RPRHGHQA (B07.02, B08.01)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC
TP53	P47fs D48fs D49fs Q52fs F54fs E56fs P58fs P60fs E62fs M66fs P72fs V73fs P75fs A78fs P82fs P85fs S96fs P98fs T102fs Y103fs G108fs F109fs R110fs G117fs	<u>CCPRTILNNGSLKTQV</u> <u>QMKLPECQRLPPWP</u> <u>LHQQLLHRRPLHOPPP</u> <u>GPCHLLSLPRKPTRAA</u> <u>TVSVWASCILGQPSL*</u>	GSLKTQVQMK (A03.01) PPGPCHLLSL (B07.02) RTILNNGSLK (A03.01) SLKTQVQMK (A03.01) SLKTQVQMKL (B08.01) TILNNGSLK (A03.01)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC
TP53	L26fs P27fs P34fs P36fs A39fs Q38fs	<u>VRKHFQTYGNYFLKT</u> <u>TFCPPCRPKQWMI*</u>	CPPCRPKQWM (B07.02) TTFCPPCRPK (A03.01)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC
TP53	C124fs L130fs N131fs C135fs K139fs A138fs T140fs V143fs Q144fs V147fs T150fs P151fs P152fs	<u>LARTPLPSTRCFANWP</u> <u>RPALCSCGLIPHPAP</u> <u>ASAPWPSTSSHST*</u>	CFANWPRPAL (A24.02) FANWPRPAL (B07.02, B08.01) GLIPHPRPA (A02.01) HPRPAPASA (B07.02, B08.01) HPRPAPASAP (B07.02) IPHPRPAPA (B07.02, B08.01) IPHPRPAPAS (B07.02) RPALCSCGL (B07.02) RPALCSCGLI (B07.02)	BRCA, CRC, LUAD, PRAD, HNSC, LUSC, PAAD, STAD, BLCA, OV, LIHC, SKCM, UCEC, LAML, UCS, KICH, GBM, ACC

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2 6】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	G154fs R156fs R158fs A161fs		TPLPSTRCF (B07.02) WPRPALCSC (B07.02) WPRPALCSCG (B07.02)	
VHL	L178fs D179fs L184fs T202fs R205fs D213fs G212fs	<u>ELQETGHRQVALRRS</u> <u>GRPPKCAERPGAADT</u> <u>GAHCTSTDGRLKISVE</u> <u>TYTVSSQLLMVLMSL</u> <u>DLDTGLVPSLVSKCLI</u> <u>LRVK*</u>	ALRRSGRPPK (A03.01) GLVPSLVSK (A03.01) KISVETYTV (A02.01) LLMVLMSDL (A02.01, B08.01) LMSLDLDTGL (A02.01) LMVLMSDL (A02.01) LVSKCLILRV (A02.01) QLLMVLMSL (A02.01, B08.01) RPGAADTGA (B07.02) RPGAADTGAH (B07.02) SLDLDTGLV (A02.01) SLVSKCLIL (A02.01, B08.01) SQLLMVLMSL (A02.01) TVSSQLLMV (A02.01) TYTVSSQLL (A24.02) TYTVSSQLLM (A24.02) VLMSDLDT (A02.01) VPSLVSKCL (B07.02) VSKCLILRVK (A03.01) YTVSSQLLM (A01.01) YTVSSQLLMV (A02.01)	KIRC, KIRP
VHL	L158fs K159fs R161fs Q164fs	<u>KSDASRLSGA*</u>		KIRC, KIRP
VHL	P146fs I147fs F148fs L158fs	<u>RTAYFCQYHTASVYS</u> <u>ERAMPPGCPEPSQA*</u>	FCQYHTASV (B08.01)	KIRC, KIRP
VHL	S68fs S72fs I75fs S80fs P86fs P97fs I109fs H115fs L116fs G123fs	<u>TRASPPRSSSAIAVRAS</u> <u>CCPYGSTSTASRSPTQ</u> <u>RCRLARAAASTATEV</u> <u>TFGSSEMQGHTMGFW</u> <u>LTKLNYLCHLSMLTD</u> <u>SLFLPISHCQCIL*</u>	CPYGSTSTA (B07.02) CPYGSTSTAS (B07.02) LARAAASTAT (B07.02) MLTDSLFLP (A02.01) PPRSSSAIAV (B07.02) RAAASTATEV (B07.02) SPPRSSSAI (B07.02) SPPRSSSAIA (B07.02) SPTQRCRLA (B07.02) TQRCRLARA (B08.01)	KIRC, KIRP

10

20

30

40

50

【表 35 - 27】

遺伝子	例示的タンパク質変化	突然変異配列コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	T124fs N131fs L135fs V137fs G144fs D143fs I147fs		TQRCRLARAA (B08.01)	
VHL	K171fs P172fs N174fs L178fs D179fs L188fs	<u>SSLRITGDWTSSGRST</u> <u>KIWKTTQMCRKTWSG</u> *	KIWKTTQMCR (A03.01) WTSSGRSTK (A03.01)	KIRC, KIRP
VHL	V62fs V66fs Q73fs V84fs F91fs T100fs P103fs S111fs L116fs H115fs D126fs	<u>RRRRGGVGRRGVRRPG</u> <u>RVRPGGTGRRGGDGG</u> <u>RAAAARAALGELARA</u> <u>LPGHLLQSQSARRAA</u> <u>RMAQLRRRAAALPNA</u> <u>AAWHGPPHPQLPRSP</u> <u>LALQRCRDTRWASG*</u>	ALGELARAL (A02.01) AQLRRRAAA (B08.01) AQLRRRAAAL (B08.01) ARRAARMAQL (B08.01) HPQLPRSPL (B07.02, B08.01) HPQLPRSPLA (B07.02) LARALPGHL (B07.02) LARALPGHLL (B07.02) MAQLRRRAA (B07.02, B08.01) MAQLRRRAAA (B07.02, B08.01) QLRRRAAAL (B07.02, B08.01) RAAALPNAAA (B07.02) RMAQLRRRAA (B07.02, B08.01) SQSARRAARM (B08.01)	KIRC, KIRP
表 35D		隠れたエクソン ¹		
AR-v7	隠れた 最終エクソン	<u>SCKVFFKRAAEGKQK</u> <u>YLCASRNDCTIDKFRR</u> <u>KNCPCRLRKCYEAG</u> <u>MTLGEKFRVGNCKHL</u> <u>KMTRP*</u>	GMTLGEKFRV (A02.01) RVGNCKHLK (A03.01)	前立腺がん、 去勢抵抗性 前立腺がん
表 35E		アウトオブフレーム融合 ^{1,3}		
AC01199 7.1:LRRC 69	AC011997.1:L RRC69 *アウトオブフレーム	MAGAPPPASLPCCSLIS DCCASNQRDSVGVGP SEP: <u>G:NNIKICNESAS</u> <u>RK*</u>	GPSEPGNNI (B07.02) KICNESASRK (A03.01)	LUSC、乳がん、 頭頸部がん、 LUAD
EEF1DP3	EEF1DP3:FR Y	HGWRPFLPVRARSRW NRRLDVTVANR: <u>S:W</u>	GIQVLNVSLK (A03.01) IQVLNVSLK (A03.01)	乳がん

10

20

30

40

50

【表 35 - 28】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
	アウトオブフレーム	<u>KYGWSLLRVPQVNG</u> <u>IQVLNVSLKSSSNVIS</u> <u>YE</u>	KSSSNVISY (A01.01, A03.01) KYGWSLLRV (A24.02) RSWKYGWSL (A02.01) SLKSSSNVI (B08.01) SWKYGWSLL (A24.02) TVANGRSWK (A03.01) VPQVNGIQV (B07.02) VPQVNGIQVL (B07.02) VTVANGRSWK (A03.01) WSLLRVPQV (B08.01)	
MAD1L1; MAFK	MAD1L1:MA FK	RLKEVFQTKIQEFRKA CYTLTGQIDITTENQ YRLTSLYAEHPGDCLI FK::L <u>RVPGSSVLTV</u> <u>PGL*</u>	HPGDCLIFKL (B07.02) KLRVPGSSV (B07.02) KLRVPGSSVL (B07.02) RVPGSSVLV (A02.01) SVLVTVPGL (A02.01) VPGSSVLTV (B07.02)	CLL
PPP1R1B :STARD3	PPP1R1B:ST ARD3	AEVLKVIRQSAGQKT TCGQGLEGPWERPPPL DESERDGGSEDQVED PALS:A::LLLRPRPPRP <u>EVGAHQDEQAAOGA</u> <u>DPRLGAQPACRGLP</u> <u>GLLTVPQPEPLLAPP</u> <u>SAA*</u>	ALLLRPRPPR (A03.01) ALSALLLRPR (A03.01)	乳がん
表 35F		インフレーム欠失 および融合 ¹²		
BCR:ABL L	BCR:ABL	ERAEWRENIREQQKK CFRSFSLTSVELQMLT NSCVKLQTVHSIPLTI NKE::EALQRPVASF EPQGLSEAARWNSK ENLLAGPSENDPNLF VALYDFVASG	LTINKEEAL (A02.01, B08.01)	CML, AML
BCR:ABL L	BCR:ABL	ELQMLTNSCVKLQTV HSIPLTINKEDDESPGL YGFLNVIVHSATGFKQ SS:K:ALQRPVASF PQGLSEAARWNSKE NLLAGPSENDPNLFV ALYDFVASGD	IVHSATGFK (A03.01) ATGFKQSSK (A03.01)	CML, AML
C11orf95: RELA	C11orf95:REL A	ISNSWDAHLGLGACG EAEGLVQGAEIEEEE EEEEEEGAGVPACP PKGP:E:LFPLIFPAEP AQASGPYVEIEQPK QRGMRFRYKCEGRS AGSIPGERSTD	ELFPLIFPA (A02.01, B08.01) KGPELFPLI (A02.01, A24.02) KGPELFPLIF (A24.02)	テント上上衣腫
CBFB:M	(バリエーション)	LQRLDGMGCLEFDEE		AML

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2 9】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
YH11	"a型")	RAQQEDALAQQAFEE ARRRTREFEDRDRSH REEME::VHELEKSKR ALETQMEEMKTQLE ELEDELQATEDAKL RLEVNMQALKGQF		
CD74:RO S1	(エクソン6: エクソン32)	KGSFPENLRHLKNTM ETIDWKVFESWMHH WLLFEMSRHSLEQKP TDAPPK::AGVPNKPG IPKLLEGSKNSIQWE KAEDNGCRITYYLEI RKSTSNLQNNQ	KPTDAPPKAGV (B07.02)	NSCLC, クリゾチニブ抵抗性
EML4:AL K	EML4:ALK	SWENSDDSRNKLSKIP STPKLIPKVTKTADKH KDVIINQAKMSTREK NSQ::V:YRRKHQELQ AMQMELQSPEYKLS KLRTSTIMTDYNPNY CFAGKTSSISDL	QVYRRKHQEL (B08.01) STREKNSQV (B08.01) VYRRKHQEL (A24.02, B08.01)	NSCLC
FGFR3:T ACC3	FGFR3:TACC 3	EGHRMDKPANCTHDL YMIMRECWHAAPSQR PTFKQLVEDLDRVLT VTSTD::VKATQEENR ELRSRCEELHGKNLE LGKIMDRFEEVVYQ AMEEVQKQKELS	VLTVTSTDV (A02.01) VLTVTSTDVK (A03.01)	膀胱がん、 LUSC
NAB:ST AT6	NAB:STAT6 c473	RDNTLLRRVELFSL RQVARESTYLSSLKGS RLHPEELGGPPLKLLK QE::ATSKSQIMSLWG LVSKMPPEKVQRLY VDFPQHLRHLLGDW LESQPWEFLVGSDAF CC	IMSLWGLVS (A02.01) IMSLWGLVSK (A03.01) KLKQEATSK (A03.01) QIMSLWGLV (A02.01) SQIMSLWGL (A02.01, A24.02, B08.01) SQIMSLWGLV (A02.01) TSKSQIMSL (B08.01)	孤立性線維性腫瘍
NDRG1:E RG	NDRG1:ERG	MSREMQDVDLAEVKP LVEKGETITGLLQEF VQ::EALSVVSEDQSL FECAYGTPHLAKTE MTASSSSDYGQTSK MSPRVPQQDW	LLQEFDVQEA (A02.01) LQEFDVQEAL (A02.01)	前立腺がん
PML:RA RA	PML:RARA (エクソン3: エクソン3)	VLDMHGFLRQALCRL RQEEPQSLQAAVRTD GFDEFKVRLLQDLSCI TQGK::A:IETQSSSSEE IVPSPSPPLPRIYKP CFVCQDKSSGYHYG VSACEGCKG		急性前骨髄球性 白血病
PML:RA	PML:RARA	RSSPEQPRPSTSKAVSP		急性前骨髄球性

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 3 0】

遺伝子	例示的 タンパク質 変化	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド(HLAアレル例)	例示的疾患
RA	(エクソン 6: エクソン 3)	PHLDGPPSPRSPVIGSE VFLPNSNHVASGAGE A:A:JETQSSSSEEIVPS PPSPPLPRIYKPCFV CQDKSSGYHYGVSA CEGCKG		白血病
RUNX1	RUNX1(ex5)- RUNX1T1(ex 2)	VARFNDLRFVGRSGR GKSFTLTITVFTNPPQ VATYHRAIKITVDGPR EPR: <u>N</u> :RTEKHSTMPD SPVDVKTQSRLTPPT MPPPTTQGAPRTSS FTPTTLTNGT	GPREPRTNRT (B07.02) RNRTEKHSTM (B08.01)	AML
TMPRSS 2:ERG	TMPRSS2:ER G	MALNS::EALSVVSED QSLFECAYGTPHLAKT EMTASSSSDYGQTSK MSPRVPQQDW	ALNSEALSV (A02.01) ALNSEALSVV (A02.01) MALNSEALSV (A02.01, B08.01)	前立腺がん

¹ 下線付き A A は、ノンネイティブ A A を表す

² 太字 A A は、2つの融合した遺伝子の 2 番目のものによりコードされるアミノ酸配列のネイティブ A A を表す

³ 太字かつ下線付き A A は、フレームシフトに起因する、2つの融合した遺伝子の 2 番目のものによりコードされるアミノ酸配列のノンネイティブ A A を表す

下記の表 3 6 は、本願のための選択された H L A 拘束性 B T K ペプチド、および突然変異型 B T K ペプチドが結合するまたは結合すると予測される H L A アレルによりコードされる対応するタンパク質についてのリストを提供する。

表 3 6

【表 3 6 - 1】

BTK ペプチド	HLA アレル
SLLNYLREM	HLA-A02:04
	HLA-A02:03
	HLA-C03:02
	HLA-A03:01
	HLA-A32:01
	HLA-A02:07
	HLA-C14:03
	HLA-C14:02
	HLA-A31:01
	HLA-A30:02
	HLA-A74:01
	HLA-C06:02
	HLA-B15:03
	HLA-B46:01
	HLA-B13:02
	HLA-A25:01
	HLA-A29:02
	HLA-C01:02
EYMANGSLL	HLA-C14:02

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 2】

	HLA-C14:03	10
	HLA-A33:03	
	HLA-C04:01	
	HLA-B15:09	
	HLA-B38:01	
TEYMANGSL	HLA-B14:02	
	HLA-B49:01	
	HLA-B44:03	
	HLA-B44:02	
	HLA-B37:01	
	HLA-B15:09	
	HLA-B41:01	
MANGSLLNY	HLA-B50:01	20
	HLA-C02:02	
	HLA-C03:02	
	HLA-B53:01	
	HLA-C12:02	
	HLA-C12:03	
	HLA-A36:01	
	HLA-A26:01	
	HLA-A25:01	
	HLA-B57:01	
	HLA-A03:01	30
	HLA-B46:01	
	HLA-B15:03	
	HLA-A33:03	
	HLA-B35:03	
YMANGSLLNY	HLA-A11:01	
	HLA-A29:02	
	HLA-A36:01	
	HLA-B46:01	
	HLA-A25:01	
	HLA-B15:01	
	HLA-A26:01	
	HLA-A30:02	
	HLA-A32:01	

表 3 7 は、本願の文脈に当てはまるような、選択された B T K ペプチド、およびペプチドが結合するまたは結合すると予測される H L A アレルによりコードされる対応する好ましいタンパク質についてのリストを提供する。

表 3 7

【表 3 7 - 1】

ペプチド	アレル	
ANGSLLNY	HLA-A36:01	40
ANGSLLNYL	HLA-C15:02	
	HLA-C08:01	
	HLA-C06:02	
	HLA-A02:04	
	HLA-C12:02	
	HLA-B44:02	
	HLA-C17:01	
ANGSLLNYLR	HLA-B38:01	
	HLA-A74:01	

【表 3 7 - 2】

	HLA-A31:01	
EYMANGSL	HLA-C14:02	
	HLA-C14:03	
	HLA-A24:02	
EYMANGSLL	HLA-C14:02	
	HLA-C14:03	
	HLA-A33:03	
	HLA-C04:01	
	HLA-B15:09	
	HLA-B38:01	
EYMANGSLLN	HLA-A24:02	
	HLA-A23:01	
EYMANGSLLNY	HLA-A29:02	
GSLNLYLR	HLA-A31:01	
	HLA-A74:01	
GSLNLYLREM	HLA-B58:02	
	HLA-B57:01	
ITEYMANGS	HLA-A01:01	
ITEYMANGSL	HLA-A01:01	
ITEYMANGSLL	HLA-A01:01	
MANGSLLNY	HLA-C02:02	
	HLA-C03:02	
	HLA-B53:01	
	HLA-C12:02	
	HLA-C12:03	
	HLA-A36:01	
	HLA-A26:01	
	HLA-A25:01	
	HLA-B57:01	
	HLA-A03:01	
	HLA-B46:01	
	HLA-B15:03	
	HLA-A33:03	
	HLA-B35:03	
	HLA-A11:01	
MANGSLLNYL	HLA-C17:01	
	HLA-C02:02	
	HLA-B35:01	
	HLA-C03:03	
	HLA-C08:01	
	HLA-B35:03	
	HLA-C12:02	
	HLA-C01:02	
	HLA-C03:04	
	HLA-C08:02	
MANGSLLNYLR	HLA-A33:03	
	HLA-A74:01	
NGSLLNYL	HLA-B14:02	
NGSLLNYLR	HLA-A68:01	
	HLA-A33:03	
	HLA-A31:01	
	HLA-A74:01	
SLLNYLREM	HLA-A02:04	

10

20

30

40

50

【表 3 7 - 3】

	HLA-A02:03
	HLA-C03:02
	HLA-A03:01
	HLA-A32:01
	HLA-A02:07
	HLA-C14:03
	HLA-C14:02
	HLA-A31:01
	HLA-A30:02
	HLA-A74:01
	HLA-C06:02
	HLA-B15:03
	HLA-B46:01
	HLA-B13:02
	HLA-A25:01
	HLA-A29:02
	HLA-C01:02
SLLNYLREMR	HLA-A74:01
TEYMANGSL	HLA-A31:01
	HLA-B14:02
	HLA-B49:01
	HLA-B44:03
	HLA-B44:02
	HLA-B37:01
	HLA-B15:09
TEYMANGSLL	HLA-B41:01
	HLA-B50:01
	HLA-B40:01
	HLA-B44:03
	HLA-B49:01
TEYMANGSLLNY	HLA-B44:02
	HLA-B40:02
YMANGSLL	HLA-B44:03
	HLA-B15:09
	HLA-C03:04
	HLA-C03:03
	HLA-C17:01
	HLA-C03:02
	HLA-C14:03
	HLA-C14:02
	HLA-C04:01
	HLA-C02:02
YMANGSLLN	HLA-A01:01
	HLA-A29:02
YMANGSLLNY	HLA-A01:01
	HLA-A29:02
	HLA-A36:01
	HLA-B46:01
	HLA-A25:01
	HLA-B15:01
	HLA-A26:01
	HLA-A30:02
	HLA-A32:01

10

20

30

40

【0 3 3 0】

様々な種類のがんを高頻度に見られる E G F R 遺伝子の例示的突然変異が表 4 0 A ~ 4 0 D で提示される。この表は、例示的 E G F R ネオ抗原性ペプチドも提供する。がんを高頻度に見られる単一アミノ酸置換を伴う突然変異は、表 4 0 A ~ 4 0 C に収載される。欠失を伴うまたは欠失および挿入を伴う例示的突然変異は、表 4 0 D で提示される。

表 4 0 A . がんにおける例示的 E G F R 点突然変異および突然変異型ペプチド

【表 40-1】

遺伝子	ヌクレオチド	突然変異 (アミノ酸)	突然変異配列 コンテキスト	ネオペプチド	がん
EGFR	c.1786C>T	p.P596S	CTGRGPDNCIQCAHYID GPRCVRTC[p.P596S]SAG VMGENNTLVWKYADA GHVCHLCH	CVKTCSAGV,VKTCSAGV M,CVKTCSAGVM	GBM
EGFR	c.1787C>T	p.P596L	CTGRCPDNCIQCAHYID GPHCVKTC[p.S596L] LAGVMGENNTLVWKY ADAGHVCHLCH	CVKTCLAGV,GPHCVKTC L,VKTCLAGVM	GBM
EGFR	c.1793G>C	p.G598A	GRGPDNCIQCAHYIDGP HCVKTCPA[p.G598A]AV MGENTLVWKYADAG HVCHLCHPN	CVKTCPAAV,VKTCPAAV M,AVMGENTLV,AVMGE NNTLV,CVKTCPAAVM,A AVMGENTLV	GBM
EGFR	c.1793G>T	p.G598V	GRGPDNCIQCAHYIDGP HCVKTCPA[p.G598V]VV MGENTLVWKYADAG HVCHLCHPN	CVKCPAVV,VKTCPAVVM ,VVMGENTLV,CVKTCP AVVM	GBM
EGFR	c.185T>G	p.L62R	KLTQLGTFEDHFLSLQR MFNNCLVV[p.L62R]RG NLEITYVQRNYDLSFLK TQEVAG	MFNNCEVVR,EVVRGNLE I,VRGNLETTY,RMFNNCE VVR,VVRGNLEITY,CEVV RGNIE	GBM
EGFR	c.2125G>A	p.E709K	QERELVEPLTPSGEAPN QALLRILK[p.E709K]KTE FKKIKVLGSGAFGTVYK GLWIP	RILKKTEFK,ILKKTEFKK, QALLRILKK,LRILKTEF,RI LKKTEFKK,NQALLRILKK ,LLRLKKTEF	GBM

10

20

30

40

50

【表 40-2】

遺伝子	ヌクレオチド	突然変異 (アミノ酸)	突然変異配列 コンテキスト	ネオペプチド	がん
EGFR	c.2156G>C	p.G719A	PSGEAPNQALLRILKETE FKKIKVL[p.G719A]ASG AFGTVYKGLWIPEGEKV KIPVAI	A5GAFGTVY,VLASGAFG T,LASAFGTY,KIKVLASG A,KVLASGAFG,IKVLASG AF,KKIKVLASG,VLASG,V LASGAFGTV,ASGAFGTV YK,KIKVLASGAF,LASGA FGTVY,KKIKVLASGA,TE FKKIKVIA	LUAD
EGFR	c.2235, 2249> GGAATTA AGAGAAG C	p.ELREA 746del	GAFGTVYKGLWIPEGEK VKIPVAIK[p.ELREA745d el]TSPKANKEILDEAYV MASVDNPHVCRLLGICL TSTVQLIT	AIKTSPKANK,KVKIPVAI KT,KT5PKANKEI	LUAD
EGFR	c.2303G>T	p.5768I	AIKELREQATSPKANKEI LDEAYVMA[p.5768I]VD NPHVCRLLGICLTSTVQ LITQLM	MAIVDNPHV,VMAIVDNP H,DEAYVMAIV,LDEAYY MAI,RDEAYVMAI,VMAIV DNPHV,AIVDNPHVCR,YV MAIVDNPH,DEAYVMAIV D	LUAD
EGFR	c.2512C>A	p.L838M	YLLNVVCVQLAKGMNY LEDRLVHRD[p.L838M] MAARNVLVKTPQHVKI TDFGLAKLLG	RLVHRDMAA,DMAARNV LV,MAARNVLVK,LVHRD MARR,RDMAARNVL,RLV HRDMAAR,DMAARNVLV K,HRDMAARNVL,RDMA ARNVLV	KIRC
EGFR	c.2573T>G	p.L858R	LVHRDLAARNVLVKTP QHIVKITDEG[p.L858R]R AKLGAEKEYHAFGGR VPIKWMAL	KITDGRAK,HVKITDFGR,F GRAKLLGA,HVKITDFGR A,RAKLIGAEK	LUAD
EGFR	c.2582T>A	p.L861Q	RDLAARNVLVKTPQHV RITDFGLAK[p.L861Q]QL GAEEKEYHAEGGKVPIK WMALES	LAKQLGAEEK,KQLGAEE KEY	LUSC

10

20

30

40

50

【表 4 0 - 3】

遺伝子	ヌクレオチド	突然変異 (アミノ酸)	突然変異配列 コンテキスト	ネオペプチド	がん
EGFR	c.323G>A	p.R108K	QEVAGYVLIALNTVERI PLENLQAIE[p.R108K]KG NMYYENSIALVLSNYD ANKTGLK	QHKGNMYY,LQHKGNMY ,LQHKGNMYY,KGNMYY ENSY	GBM
EGFR	c.754C>T	p.R252C	SPSDECLMNQCAAGEIG PNESDLVC[p.R252C]CKF RDEATCKDTCPLMLY NPTTYQM	RESDECLVCC	GBM
EGFR	c.865G>A	p.A289T	CPPLMLYNPTTYQMDV NPEGKYSFG[p.A289T]TT CVKKCPRNYVVDHGS CVRACGAD	YSFGTTCVK,TTCVKKCPR ,GKYSFGTTC,YSFGTTCV KK,KYSFGTTCVK,GTTCV KKCPR,GKYSFGTTCV	GBM
EGFR	c.866C>A	p.A289D	CPPLMLYNPTTYQMDV NPEGKYSFG[p.A289D]D TCVKKCPRNYVVDHG SCVRACGAD	YSFGDTCVK,DTCVKKCP R,GKYSFGDTC,YSFGDTC VKK,KYSFGTCVK,GKYSF GDTCV	GBM
EGFR	c.866C>T	p.A289V	CPPLMLYNPTTYQMDV NPEGKYSFG[p.A289V]V TCVKKCPRNYVVDHG SCVRACGAD	YSFGVTCVK,KYSFGVTC V,VTCVKKCPR,GKYSFGV TC,YSFGVTCVKK,KYSFG VTCVK,GVTCVKKCPR,G KYSFGVTCV	GBM
EGFR	c.910C>T	p.H304Y	VNPEGKYSFGATCVKKI CPRNYVVTD[p.H304Y]Y GSCVRACGADSYEMEE DGVKCKKC	VVTDYGSCV,YVVDYGS CV,VVTDYGSCVR,CPRNY VVTDY	GBM

表 4 0 B . がんにおける例示的 E G F R 点突然変異および突然変異型ペプチド

【表 4 0 - 4】

突然変異アミノ酸 (ヌクレオチド)	ネオペプチド	がん	アレル
EGFRp.L858R (uc003tqk.2)	FGRKLLGA	肺腺癌	HLA.B08.01
EGFRp.L858R (uc003tqk.2)	KITDFGRAK	肺腺癌	HLA.A03.01

10

20

30

40

50

【表 4 0 - 5】

			HLA.A11.01
			HLA.A30.01

表 4 0 C . がんにおける例示的 E G F R 点突然変異および突然変異型ペプチド

【表 4 0 - 6】

EGFR 突然変異	突然変異配列 コンテキスト	ネオペプチド	疾患
EGFR, T790M	GICLTSTVQLIMQLM PFGCLLDY	VQLIMQLMPF, STVQLIMQLM, QLIMQLMPF, MQLMPFGCLL, LIMQLMPF, LTSTVQLIM, STVQLIMQL, TSTVQLIMQL, TVQLIMQL, TVQLIMQLM, VQLIMQLM, CLTSTVQLIM, IMQLMPFGC, IMQLMPFGCL, LIMQLMPFG, LIMQLMPFGC, QLIMQLMPFG	CRC
EGFR, S492R	SLNITSLGLRSLKEIS DGDVIISGNKNLCY ANTINWKKLFGTSG QKTKIIRNRGENSCK ATGQVCHALCSPEG CWGPEPRDCVSCRN VSRGRECVDKCNLL	IIRNRGENSCK	NSCLC, PRAD

表 4 0 D . がんにおける例示的 E G F R 欠失突然変異、融合突然変異

【表 4 0 - 7】

EGFR 突然変異	突然変異配列コンテキスト	ネオペプチド	疾患
EGFR _{vIII} (内部欠失)	MRPSGTAGAALLALLAALC PASRALEEKK:G:NYVVTDH GSCVRACGADSYEMEEDG VRKCKKCEGPCRKVCNGIG IGEFKD	ALEEKKGNYV	GBM
EGFR:SEPT 14	LPQPPICTIDVYMIMVKCW MIDADSRPKFRELIIEFSKM ARDPQRYLVIQ::LQDKFEH LKMIQQEEIRKLEEEKKQ LEGEIIDFYKMKAASEAL QTQLSTD	IQLQDKFEHL QLQDKFEHL QLQDKFEHLK YLVIQLQDKF	GBM、神経膠腫、 頭頸部がん

上記の表において、例示的融合の1つまたは複数について、最初の「:」の前にある配列は、第1の遺伝子によりコードされるポリペプチドのエクソン配列に属し、2番目の「:」の後にある配列は、第2の遺伝子によりコードされるポリペプチドのエクソン配列に属し、「:」記号の間に出現するアミノ酸は、第1の遺伝子によりコードされるポリペプチドのエクソン配列と第2の遺伝子によりコードされるポリペプチドのエクソン配列の間で分割されるコドンによりコードされる。

【0331】

しかし、一部の実施形態、例えば、NAB:STAT6では、NABエクソンは、STAT6の5'UTRに連結されており、接合部の後に出現する第1のアミノ酸は、STAT6の通常の開始コドンである（この部位にフレームは存在しない（それは、通常は翻訳されないため））。

【0332】

上記の表中のAR-V7を、一部の実施形態では、全長ARに見られるリガンド結合ドメインを欠いているタンパク質をコードするAR遺伝子のスプライスバリエーションと見なすこともできる。

【0333】

一部の実施形態では、腫瘍特異的突然変異を同定するために配列決定法が使用される。任意の好適な配列決定法、例えば次世代配列決定(NGS)技術を、本開示に従って使用することができる。第三世代配列決定法は、方法の配列決定ステップを加速するために、将来、NGS技術と置き換わる可能性がある。明確にするために、本開示の文脈での用語「次世代配列決定」または「NGS」は、サンガー化学として公知の「従来の」配列決定方法論とは対照的に、全ゲノムを小片に分解することにより核酸鋳型を全ゲノムに沿って並行してランダムに読み取る、全ての新規ハイスループット配列決定技術を意味する。そのようなNGS技術(大規模並列配列決定技術としても公知)は、非常に短期間で、例えば、1~2週間以内、例えば、1~7日以内または24時間未満以内に、全ゲノム、エクソーム、トランスクリプトーム(ゲノムの全ての転写配列)またはメチローム(ゲノムの全てのメチル化配列)の核酸配列情報を供給することができ、原理上は単一細胞配列決定手法を可能にする。市販されているまたは文献で述べられている複数のNGSプラットフォーム、例えば、WO2012/159643に詳細に記載されているものを、本開示に関連して使用することができる。

【0334】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、これらに限定されないが、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約150、約200、約300、約350、約400、約450、約500、約600、約700、約800、約900、約1,000、約1,500、約2,000、約2,500、約3,000、約4,000、約5,000、約7,500、約10,000個のアミノ酸またはそれより多くのアミノ酸残基、およびこれらの中から導出可能な任意の範囲を含み得る。特定の実施形態では、ネオ抗原性ペプチド分子は、100アミノ酸に等しいかまたはそれ未満である。

【0335】

一部の実施形態では、ペプチドは、長さが約8から約50アミノ酸残基まで、または長さが約8から約30アミノ酸残基まで、約8から約20アミノ酸残基まで、約8から約18アミノ酸残基まで、約8から約15アミノ酸残基まで、または約8から約12アミノ酸残基までであり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、長さが約8から約500アミノ酸残基まで、または長さが約8から約450アミノ酸残基まで、約8から約400アミノ酸残基まで、約8から約350アミノ酸残基まで、約8から約300アミノ酸残基まで、約8から約250アミノ酸残基まで、約8から約200アミノ酸残基まで、約8から約150アミノ酸残基まで、約8から約100アミノ酸残基まで、約8から約50アミノ酸残基まで、または約8から約30アミノ酸残基までであり得る。

【0336】

一部の実施形態では、ペプチドは、長さが少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50またはそれを超えるアミノ酸残基であり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、長さが少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36

、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500またはそれを超えるアミノ酸残基であり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、長さが最大でも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50またはそれ未満のアミノ酸残基であり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、長さが最大でも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500またはそれ未満のアミノ酸残基であり得る。

【0337】

一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450、または少なくとも500アミノ酸の全長を有する。

【0338】

一部の実施形態では、ペプチドは、最大でも8、最大でも9、最大でも10、最大でも11、最大でも12、最大でも13、最大でも14、最大でも15、最大でも16、最大でも17、最大でも18、最大でも19、最大でも20、最大でも21、最大でも22、最大でも23、最大でも24、最大でも25、最大でも26、最大でも27、最大でも28、最大でも29、最大でも30、最大でも40、最大でも50、最大でも60、最大でも70、最大でも80、最大でも90、最大でも100、最大でも150、最大でも200、最大でも250、最大でも300、最大でも350、最大でも400、最大でも450、または最大でも500アミノ酸の全長のみを有する。

【0339】

より長いペプチドをいくつかの方法で設計することができる。一部の実施形態では、HLA結合ペプチドが予測されるまたは分かっている場合、より長いペプチドは、(1) 各々の対応する遺伝子産物のNおよびC末端の方に2～5アミノ酸の伸長がある個々の結合ペプチド、または(2) 各々に伸長配列がある結合ペプチドの一部または全ての連鎖を含む。他の実施形態では、配列決定が、腫瘍に存在する長い(>10残基)ネオエピトープ配列を(例えば、新規ペプチド配列をもたらすフレームシフト、リードスルーまたはイントロン包含に起因して)示す場合、より長いペプチドは、単一のより長いペプチド、またはいくつかのオーバーラップしているより長いペプチドのどちらかのような、新規腫瘍特異的アミノ酸の全ストレッチからなり得る。一部の実施形態では、より長いペプチドの使用は、患者細胞による内因性プロセッシングを可能にすると推定され、より有効な抗原提示およびT細胞応答の導入をもたらすことができる。一部の実施形態では、ペプチドがオーバーラップし、長いネオ抗原性ペプチドにわたってタイリングされている、2つまたはそれより多くのペプチドが使用され得る。

【0340】

一部の実施形態では、ペプチドは、約0.5～約12、約2～約10、または約4～約8のpI値を有することがある。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5のまたはそれより大きいpI値を有することもある

。一部の実施形態では、ペプチドは、最大でも4、5、5、5、6、6、5、7、7、5、またはそれ未満のpI値のみを有することもある。

【0341】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、溶解していることがあり、凍結乾燥されていることがあり、または結晶形態であることもある。一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドを、組換えDNA技術もしくは化学合成によって合成的に調製することができ、または自然腫瘍もしくは病原生物などの天然源から単離することができる。ネオエピトープを個々に合成することができ、またはペプチド内で直接もしくは間接的に接合させることができる。本明細書に記載のペプチドには他の天然に存在する宿主細胞タンパク質およびそれらの断片が実質的にないことがあるが、一部の実施形態では、ペプチドを、ネイティブ断片または粒子に接合するように合成的にコンジュゲートさせることができる。

10

【0342】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドを多種多様な方法で調製することができる。一部の実施形態では、従来の技術に従って溶液中または固体支持体上でペプチドを合成することができる。様々な自動合成装置が市販されており、公知のプロトコールに従ってそれらを使用することができる。例えば、Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. Ed., Pierce Chemical Co., 1984を参照されたい。さらに、化学的ライゲーションを使用して個々のペプチドを接合させて、やはり本開示の範囲内にあるより長いペプチドを生成することができる。

20

【0343】

あるいは、ペプチドをコードするヌクレオチド配列が、発現ベクターに挿入され、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトされ、発現に好適な条件下で培養される、組換えDNA技術を利用することができる。これらの手順は、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)に一般に記載されているように、当技術分野において一般に公知である。したがって、本明細書に記載の1つまたは複数のネオ抗原性ペプチドを含む組換えペプチドを使用して、適切なT細胞エピトープを提示することができる。

30

【0344】

一部の実施形態では、ペプチドは、ネイティブペプチドのアミノ酸置換を生じさせる結果となる点突然変異を有する遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、ペプチドは、フレームシフト突然変異を生じさせる結果となる点突然変異を有する遺伝子によりコードされる。フレームシフトは、突然変異が遺伝子のコドン周期性（「リーディングフレーム」としても公知）の正常な位相を破壊した場合に起こり、その結果、ノンネイティブタンパク質配列の翻訳が生じることになる。遺伝子の異なる突然変異が、変更された同じリーディングフレームを獲得することがあり得る。一部の実施形態では、ペプチドは、融合ポリペプチド、インフレーム欠失、挿入、内在性レトロウイルスポリペプチドの発現、およびポリペプチドの腫瘍特異的過剰発現を生じさせる結果となる突然変異を有する遺伝子によりコードされる。一部の実施形態では、ペプチドは、第1の遺伝子と第2の遺伝子の融合体によりコードされる。一部の実施形態では、ペプチドは、第1の遺伝子と第2の遺伝子のインフレーム融合体によりコードされる。一部の実施形態では、ペプチドは、第1の遺伝子と第1の遺伝子のスプライスバリエーションとの融合体によりコードされる。一部の実施形態では、ペプチドは、第1の遺伝子と第1の遺伝子の隠れたエクソンとの融合体によりコードされる。一部の実施形態では、ペプチドは、第1の遺伝子と第2の遺伝子の融合体によりコードされ、このペプチドは、融合の結果として生じるアウトオブフレーム配列によりコードされるアミノ酸配列を含む。

40

【0345】

一部の態様では、本開示は、少なくとも2つのまたは2つより多くのペプチドを含む組

50

成物を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、少なくとも2つの明確に異なるペプチドを含有する。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含有する。一部の実施形態では、第1および第2のペプチドは、同じタンパク質に由来する。少なくとも2つの明確に異なるペプチドは、長さ、アミノ酸配列または両方が異なり得る。ペプチドは、腫瘍特異的突然変異を含有することが分かっているまたは判明した任意のタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、タンパク質の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1のペプチドは、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは、突然変異を含み、第2のネオエピトープは、同じ突然変異を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、タンパク質の第1の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1の領域は、第2の領域の少なくとも1個のアミノ酸を含み、第1のペプチドは、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは、第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープは、第2の突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の突然変異と第2の突然変異は同じである。一部の実施形態では、突然変異は、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0346】

一部の実施形態では、ペプチドは、置換突然変異、例えば、KRAS G12C、G12D、G12V、Q61HもしくはQ61L突然変異、またはNRAS Q61KもしくはQ61R突然変異、またはBTK C481S突然変異、またはEGFR S492RもしくはEGFR T490M突然変異を有するタンパク質に由来し得る。置換は、ペプチドの長さに沿ってどこに位置してもよい。例えば、置換は、ペプチドのN末端3分の1に位置することもあり、ペプチドの中央3分の1に位置することもあり、またはペプチドのC末端3分の1に位置することもある。別の実施形態では、置換残基は、N末端から2～5残基離れて位置することもあり、またはC末端から2～5残基離れて位置することもある。ペプチドは、同様に、腫瘍特異的挿入突然変異に由来することもあり、この場合、ペプチドは、1つもしくは複数のまたは全ての挿入残基を含む。

【0347】

一部の実施形態では、第1のペプチドは、少なくとも1つの付加的突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数の、第1のネオエピトープの突然変異でない。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数の、第1のネオエピトープの突然変異である。一部の実施形態では、第2のペプチドは、少なくとも1つの付加的突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数の、第2のネオエピトープの突然変異でない。一部の実施形態では、少なくとも1つの付加的突然変異のうちの1つまたは複数の、第2のネオエピトープの突然変異である。

【0348】

一部の態様では、本開示は、第1のペプチドと第2のペプチドとを含む単一のポリペプチドを含む組成物、または第1のペプチドと第2のペプチドとをコードする単一のポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、1つまたは複数の追加のペプチドを含み、1つまたは複数の追加のペプチドは、第3のネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、同じ転写開始部位から転写された配列によりコードされる。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第1の転写開始部位から転写された配列によりコードされ、第2のペプチドは、第2の転写開始部位から転写された配列によりコードされる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,5

10

20

30

40

50

00、3,000、4,000、5,000、7,500、または10,000アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する第1の配列と、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する第2の配列とを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する少なくとも8または9個の連続するアミノ酸の第1の配列と、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する少なくとも16または17個の連続するアミノ酸の第2の配列とを含む。

【0349】

一部の実施形態では、第2のペプチドは、第1のペプチドより長い。一部の実施形態では、第1のペプチドは、第2のペプチドより長い。一部の実施形態では、第1のペプチドは、少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500または10,000アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第2のペプチドは、少なくとも17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500、または10,000アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第1のペプチドは、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する少なくとも9個の連続するアミノ酸の配列を含む。一部の実施形態では、第2のペプチドは、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する少なくとも17個の連続するアミノ酸の配列を含む。

【0350】

一部の実施形態では、第1のペプチド、第2のペプチドまたは両方は、少なくとも1つ

の隣接配列を含み、少なくとも1つの隣接配列は、ネオエピトープの上流または下流にある。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、非野生型配列を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、N末端隣接配列である。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接配列は、C末端隣接配列である。一部の実施形態では、第1のペプチドの少なくとも1つの隣接配列は、第2のペプチドの少なくとも1つの隣接配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、第1のペプチドの少なくとも1つの隣接領域は、第2のペプチドの少なくとも1つの隣接領域とは異なる。一部の実施形態では、少なくとも1つの隣接残基は、突然変異を含む。

【0351】

一部の実施形態では、隣接配列を有するネオ抗原性ペプチドは、式(N末端Xaa)_N-(Xaa_{BT}K)_P-(Xaa-C末端)_C(式中、(Xaa_{BT}K)_Pは、突然変異型BTKタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む突然変異型BTKペプチド配列であり；Pは、7より大きい整数であり；Nは、(i)0であるか、または(ii)2より大きい整数であり；(N末端Xaa)_Nは、突然変異型タンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり；Cは、(i)0であるか、または(ii)2より大きい整数であり；(Xaa-C末端)_Cは、突然変異型BTKタンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり；およびNとCの両方が0ではない)により表され得るポリペプチドを含む。

【0352】

一部の実施形態では、隣接配列を有するネオ抗原性ペプチドは、式(N末端Xaa)_N-(Xaa_{EGFR})_P-(Xaa-C末端)_C(式中、(Xaa_{EGFR})_Pは、突然変異型EGFRタンパク質の少なくとも8個の連続するアミノ酸を含む突然変異型EGFRペプチド配列であり；Pは、7より大きい整数であり；Nは、(i)0であるか、または(ii)2より大きい整数であり；(N末端Xaa)_Nは、突然変異型EGFRタンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり；Cは、(i)0であるか、または(ii)2より大きい整数であり；(Xaa-C末端)_Cは、突然変異型EGFRタンパク質とは異種の任意のアミノ酸配列であり；およびNとCの両方が0ではない)により表され得るポリペプチドを含む。

【0353】

一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの突然変異型アミノ酸を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24

10

20

30

40

50

、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0354】

一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているネオ抗原性ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているネオ抗原性ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているネオエピトープBTK配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの突然変異型アミノ酸を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と少なくとも1個の太字のアミノ酸とを含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペ

10

20

30

40

50

プチドは、表 1 または 2 に示されているような、少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の上流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0355】

一部の実施形態では、ペプチドは、表 34 または 36 に示されているような、少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 34 または 36 に示されているような、少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の上流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0356】

一部の実施形態では、ペプチドは、表 40A～40D、32 または 3A～3D に示されているネオ抗原性ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 40A～40D に示されているネオエピトープ E G F R 配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 40A～40D に示されているような少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの突然変異型アミノ酸（例えば、表 40A～40D のいずれか 1 つにおける下線付きアミノ酸）を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、E G F R ペプチドは、表 40D に示されているような太字で示されている少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸を含むネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 40A～40D に示されているような、少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 40A～40D に示されているような、少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸（例えば、表 40C 中の下線付きアミノ酸）と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の上流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 40A～40D に示されているような、少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、

10

20

30

40

50

24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表40A～40Dに示されているような、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの非突然変異型アミノ酸とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

10

【0357】

一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

20

30

【0358】

一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では

40

50

、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0359】

一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%

10

20

30

40

50

%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0360】

一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表1または2に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0361】

一部の実施形態では、BTKペプチドは、表34または36に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0362】

一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表34または36に示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列と

10

20

30

40

50

を含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表 3 4 または 3 6 に示されているような少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも 60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列と、この少なくとも 1 個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも 60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0363】

C 4 8 1 S 突然変異に対応する例示的ネオ抗原性ペプチドは、表 3 4 で提示される。この表は、H L A アレルのリストも提供し、これらの H L A アレルのコードされたタンパク質産物は、ペプチドに結合することができる。一部の実施形態では、C 4 8 1 S 突然変異を含むペプチドは、

【化 3】

MIKEGSMSEDEFIEEAKVMMNLSHEKLVQLYGVCTKQRPIFIITEYMANGSLLNYLREMRHRFQTQQ
LLEMCKDVCEAMEYLESKQFLHRDLAARNCLVND

である。一部の実施形態では、B T K 突然変異を含むペプチドは、A N G S L L N Y のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、A N G S L L N Y L のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、A N G S L L N Y L R のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、E Y M A N G S L のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、E Y M A N G S L L N のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、E Y M A N G S L L N Y のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、G S L L N Y L R のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、G S L L N Y L R E M のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、I T E Y M A N G S のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、I T E Y M A N G S L のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、I T E Y M A N G S L L のネオエピトープ配列を含む。M A N G S L L N Y L。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、M A N G S L L N Y L R のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、N G S L L N Y L のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、N G S L L N Y L のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K 突然変異を含むペプチドは、S L L N Y L R E M R のネオエピトープ配列を含む。

一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K突然変異を含むペプチドは、T E Y M A N G S L L ; T E Y M A N G S L L N Yのネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、C 4 8 1 S B T K突然変異を含むペプチドは、Y M A N G S L Lのネオエピトープ配列を含む。

【0364】

一部の実施形態では、E G F Rペプチドは、表40A～40Dに示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表40A～40Dに示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表40A～40Dに示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0365】

一部の実施形態では、ペプチドは、表40A～40Dに示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表40A～40Dに示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、

79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、表40A~40Dに示されているような少なくとも1個の突然変異型アミノ酸（下線付きアミノ酸）と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の上流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列と、この少なくとも1個の突然変異型アミノ酸の下流に、対応する野生型配列に対して少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個またはそれより多くの連続するアミノ酸を含む配列とを含むタンパク質に由来する、ネオエピトープ配列を含む。

【0366】

一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化4】

GICLTSTVQLIMQLMPFGCLLDY

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化5】

VQLIMQLMPF

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化6】

STVQLIMQLM

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む突然変異型EGFRペプチドは、

【化7】

QLIMQLMPF

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化8】

MLMPFGCLL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含

むペプチドは、

【化 9】

LIMQLMPF

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 10】

LTSTVQLIM

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 11】

STVQLIMQL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 12】

TSTVQLIMQL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 13】

TVQLIMQL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 14】

TVQLIMQLM

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 15】

VQLIMQLM

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 16】

CLTSTVQLIM

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 17】

IMQLMPFGC

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含むペプチドは、

【化 18】

IMQLMPFGC

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M 突然変異を含む

10

20

30

40

50

むペプチドは、

【化 19】

IMQLMPFGCL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化 20】

LIMQLMPFG

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化 21】

LIMQLMPFGC

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含むペプチドは、

【化 22】

QLIMQLMPFG

のネオエピトープ配列を含む。

【0367】

一部の実施形態では、EGFR S492R突然変異を含むペプチドは、

【化 23】

SLNITSGLRSLKEISDGDVVISGKNKLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIRNRGENSCKATGQVCHALC
SPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR S492R突然変異を含むペプチドは、

【化 24】

IIRNRGENSCK

のネオエピトープ配列を含む。

【0368】

一部の実施形態では、EGFRネオペプチドは、表40A～40Dから選択される。

【0369】

一部の実施形態では、EGFRvIIIにおけるGの欠失（内部欠失）などの、EGFRの欠失突然変異を含むペプチド、

【化 25】

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEKK;G:NYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEG
PCRKVCNGIGIGEFKD

は、

【化 26】

ALEEKKGNYV

のネオエピトープ配列を含む。

【0370】

一部の実施形態では、配列：

10

20

30

40

50

【化 2 7】

LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQ::LQDKFEHLKMIQQEEIR
KLEEEKKQLEGEIIDFYKMKAASEALQTQLSTD

で示される突然変異を含むペプチドは、

【化 2 8】

IQLQDKFEHL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、配列：

【化 2 9】

LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQ::LQDKFEHLKMIQQEEIR
KLEEEKKQLEGEIIDFYKMKAASEALQTQLSTD

10

で示される突然変異を含むペプチドは、

【化 3 0】

QLQDKFEHL

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、配列：

【化 3 1】

LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQ::LQDKFEHLKMIQQEEIR
KLEEEKKQLEGEIIDFYKMKAASEALQTQLSTD

20

で示される突然変異を含むペプチドは、

【化 3 2】

QLQDKFEHLK

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、配列：

【化 3 3】

LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQ::LQDKFEHLKMIQQEEIR
KLEEEKKQLEGEIIDFYKMKAASEALQTQLSTD

30

で示される突然変異を含むペプチドは、のネオエピトープ配列を含む。

ペプチド修飾

【0 3 7 1】

一部の実施形態では、本開示は、修飾ペプチドを含む。修飾は、抗原性ペプチド自体の一次アミノ酸配列を変更しない共有結合性化学的修飾を含み得る。修飾は、所望の特性、例えば、*in vivo* 半減期の延長、安定性の増大、クリアランスの低減、免疫原性もしくはアレルギー誘発性の変更、特定の抗体の産生の可能化、細胞標的化、抗原取込み、抗原プロセッシング、HLA 親和性、HLA 安定性または抗原提示、を有するペプチドを生じさせることができる。一部の実施形態では、ペプチドは、例えば免疫応答を生じさせるために、APC によるエピトープのプロセッシングおよび提示を増強する 1 つまたは複数の配列を含み得る。

40

【0 3 7 2】

一部の実施形態では、ペプチドを、所望の特質が得られるように修飾することができる。例えば、CTL 活性を誘導するペプチドの能力を、ヘルパー T 細胞応答を誘導することができる少なくとも 1 つのエピトープを含有する配列への連結によって増強することができる。一部の実施形態では、免疫原性ペプチド／ヘルパー T コンジュゲートをスパーサー分子により連結させることができる。一部の実施形態では、スパーサーは、生理条件下で実質的に非荷電である比較的小さい中性分子、例えば、アミノ酸またはアミノ酸模倣物を含む。スパーサーは、例えば、Ala スパーサー、Gly スパーサー、または非極性もし

50

くは中性極性アミノ酸の他の中性スペーサーから選択することができる。必要に応じて存在するスペーサーが、同じ残基から構成される必要がなく、したがって、ヘテロオリゴマーであってもまたはホモオリゴマーであってもよいことは、理解されるであろう。ネオ抗原性ペプチドをペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のどちらかで直接またはスペーサーを介してヘルパーTペプチドに連結させることができる。ネオ抗原性ペプチドまたはヘルパーTペプチドどちらかのアミノ末端をアシル化することができる。ヘルパーTペプチドの例としては、破傷風トキソイド残基830～843、インフルエンザ残基307～319、ならびにマラリアスポロゾイト周囲残基382～398および残基378～389が挙げられる。

【0373】

本開示のペプチド配列を、DNAレベルでの変化によって、詳細には、ペプチドをコードするDNAの予め選択された塩基を、所望のアミノ酸に翻訳されることになるコドンが生成されるように突然変異させることにより、必要に応じて変更することができる。

【0374】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、結果として得られるペプチドの物理的特性（例えば、安定性または溶解度）を修飾するような置換を含有することができる。例えば、ペプチドを α -アミノ酪酸（「B」）でのシステイン（C）の置換により修飾することができる。その化学的性質のため、システインには、ジスルフィド結合を形成し、ペプチドを、構造的に結合能を低下させるのに十分に變更する傾向がある。 α -アミノ酪酸でのCの置換は、この問題を緩和するばかりでなく、ある特定の事例では結合および架橋結合能を実際に向上させもする。 α -アミノ酪酸でのシステインの置換は、ネオ抗原性ペプチドの任意の残基で、例えば、ペプチド内のエピトープもしくはアナログのアンカーもしくは非アンカー位置のどちらかで、またはペプチドの他の位置で行うことができる。

【0375】

化合物のアミノ酸配列を、例えばアミノ酸の付加または欠失により、伸長または減少させることによって、ペプチドを修飾することもできる。ある特定の残基の順序または組成を變更することにより、ペプチドまたはアナログを修飾することもできる。生物活性に不可欠なある特定のアミノ酸残基、例えば、必要不可欠な接触部位におけるものまたは保存残基は、一般に、變更すると生物活性に対して有害効果を伴う可能性があることが当業者に理解されるであろう。必要不可欠でないアミノ鎖は、L- α -アミノ酸などのタンパク質中に天然に存在するものに必ずしも限定されず、D-異性体、 β - γ - δ -アミノ酸などの非天然アミノ酸も、L- α -アミノ酸の多くの誘導体も含み得る。

【0376】

一部の実施形態では、単一アミノ酸置換を有する一連のペプチドを使用してペプチドを修飾して、HLA結合に対する帯電、疎水性などの効果を判定することができる。例えば、一連の正荷電（例えば、LysもしくはArg）または負荷電（例えば、Glu）アミノ酸置換を、様々なHLA分子およびT細胞受容体に対して異なる感受性パターンを示すペプチドの長さに沿って行うことができる。加えて、Ala、Gly、Proまたは類似の残基などの、小さい、相対的に中性の分子を使用する複数の置換を利用することができる。置換物は、ホモオリゴマーであってもまたはヘテロオリゴマーであってもよい。置換または付加される残基の数およびタイプは、不可欠な接触点間に必要な間隔、および求められるある特定の機能的特質（例えば、疎水性対親水性）に依存する。親ペプチドの親和性と比較して、HLA分子またはT細胞受容体に対する結合親和性の増大も、そのような置換によって達成することができる。いずれにせよ、そのような置換は、例えば、結合を妨げる可能性がある立体および電荷障害を回避するように選択された、アミノ酸残基または他の分子断片を利用するべきである。アミノ酸置換は、通常は、単一残基の置換である。置換、欠失、挿入またはこれらの任意の組合せを組み合わせることで最終ペプチドに到達することができる。

【0377】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、アミノ酸模倣物または非天然アミ

10

20

30

40

50

ノ酸残基、例えば、D-またはL-ナフチルアラニン (naphylalanine) ; D-またはL-フェニルグリシン; D-またはL-2-チエンイルアラニン; D-またはL-1、-2、3-、または4-ピレンイルアラニン; D-またはL-3チエンイルアラニン; D-またはL-(2-ピリジニル)-アラニン; D-またはL-(3-ピリジニル)-アラニン; D-またはL-(2-ピラジニル)-アラニン; D-またはL-(4-イソプロピル)-フェニルグリシン; D-(トリフルオロメチル)-フェニルグリシン; D-(トリフルオロ-メチル)-フェニルアラニン; D-p-フルオロフェニルアラニン; D-またはL-p-ビフェニル-フェニルアラニン; D-またはL-p-メトキシビフェニルフェニルアラニン; D-またはL-2-インドール(アリル)アラニン; およびD-またはL-アルキルアラニン(この場合のアルキル基は、置換もしくは非置換メチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、イソブチル、sec-イソチル(sec-isotyl)、イソペンチル、または非酸性アミノ酸残基であり得る)を含み得る。非天然アミノ酸の芳香族環は、例えば、チアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンゾイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリルおよびピリジル芳香族環を含む。様々なアミノ酸模倣物または非天然アミノ酸残基を有する修飾ペプチドは、in vivoでの安定性増大を有し得る。そのようなペプチドは、改善された有効期間または製造特性も有し得る。

【0378】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドを、末端NH₂アシル化により、例えば、アルカノイル(C₁~C₂₀)またはチオグリコリルアセチル化、末端カルボキシルアミド化、例えば、アンモニア、メチルアラニンなどにより、修飾することができる。一部の実施形態では、これらの修飾は、支持体または他の分子への連結のための部位を提供することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、修飾、例えば、これらに限定されないが、グリコシル化、側鎖酸化、ビオチン化、リン酸化、表面活性物質、例えば脂質、の付加を含むことができ、または本明細書に記載のペプチドを化学的に修飾すること、例えばアセチル化など、ができる。さらに、ペプチド中の結合は、ペプチド結合以外、例えば、共有結合、エステルまたはエーテル結合、ジスルフィド結合、水素結合、イオン結合などであってもよい。

【0379】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、当技術分野において周知のものなどの担体、例えば、サイログロブリン、アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド、ポリアミノ酸残基、例えばポリ-L-リシンおよびポリ-L-グルタミン酸、インフルエンザウイルスタンパク質、B型肝炎ウイルスコアタンパク質などを含むことができる。

【0380】

通常はタンパク質の一部でない追加の化学的部分を含有するようにペプチドをさらに修飾することができる。これらの誘導体化部分は、溶解度、生物学的半減期、タンパク質の吸収、または結合親和性を改善することができる。これらの部分は、ペプチドの任意の望ましい副作用などを低減または消失させることもできる。これらの部分についての概要は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)において見つけることができる。例えば、所望の活性を有するネオ抗原性ペプチドを、所望のHLA分子に結合するおよび適切なT細胞を活性化する未修飾ペプチドの生物活性の実質的に全てを増大させるまたは少なくとも保持する上に、ある特定の所望の特質、例えば、改善された薬理学的特性を提供するように、必要に応じて修飾することができる。例えば、ペプチドは、保存的置換または非保存的置換どちらかの置換などの様々な変化の対象になり得、そのような変化は、それらを使用する上でのある特定の利点、例えば、改善されたHLA結合をもたらす可能性がある。そのような保存的置換は、アミノ酸残基を、生物学的におよび／または化学的に類似している別のアミノ酸残基で置き換えること、例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基に、またはある極性残基を別の極性残基に置き

10

20

30

40

50

換えることを包含し得る。単一アミノ酸置換の効果を、D-アミノ酸を使用して探索することもできる。そのような修飾は、例えば、Merrifield, Science 232:341-347 (1986), Barany & Merrifield, The Peptides, Gross & Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979); および Stewart & Young, Solid Phase Peptide Synthesis, (Rockford, III., Pierce), 2d Ed. (1984) に記載されているような、周知のペプチド合成手順を使用して行うことができる。

【0381】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドを、大きい、緩徐に代謝される巨大分子、例えばタンパク質；多糖類、例えば、セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズ；高分子アミノ酸、例えば、ポリグルタミン酸、ポリリシン；アミノ酸コポリマー；不活化ウイルス粒子；不活化細菌毒素、例えば、ジフテリア、破傷風、コレラ、ロイコトキシン分子からの毒素；不活化細菌；および樹状細胞に、コンジュゲートさせることができる。

10

【0382】

担体タンパク質へのコンジュゲーション、リガンドへのコンジュゲーション、抗体へのコンジュゲーション、PEG化、ポリシアル化、HES化、組換えPEG模倣物、Fc融合、アルブミン融合、ナノ粒子結合、ナノ粒子封入、コレステロール融合、鉄融合、アシル化、アミド化、グリコシル化、側鎖酸化、リン酸化、ビオチン化、表面活性物質の付加、アミノ酸模倣物の付加、または非天然アミノ酸の付加を、これらに限定されないが含み得る、ペプチドに対する変化。

20

【0383】

グリコシル化は、タンパク質の物理的特性に影響を与えることができ、タンパク質安定性、分泌、および細胞内局在の点でも重要であり得る。適切なグリコシル化は、生物活性にとって重要であり得る。実際、真核生物からの一部の遺伝子は、タンパク質をグリコシル化するための細胞内プロセスを欠いている細菌（例えば、E. coli）に発現されたとき、それらのグリコシル化欠如のため活性がほとんどまたは全くないタンパク質を生じさせ、これらのタンパク質が回収される。グリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することにより果たすことができる。ペプチドまたはタンパク質に対する変更は、例えば、1もしくは複数のセリンもしくはトレオニン残基（O連結型グリコシル化部位について）もしくはアスパラギン残基（N連結型グリコシル化部位について）の付加によって、またはこれらの残基による置換によって、行うことができる。N連結型もしくはO連結型オリゴ糖の構造および各タイプに見られる糖残基の構造は、異なり得る。両方に見られることが多い糖の1つのタイプは、N-アセチルノイラミン酸（本明細書では以降、シアル酸と呼ぶ）である。シアル酸は、通常、N連結型およびO連結型オリゴ糖両方の末端残基であり、その負電荷のため、糖タンパク質に酸性の特性を付与することができる。本開示の実施形態は、N-グリコシル化バリエーションの生成および使用を含む。炭水化物の除去は、化学的にもしくは酵素的に果たすこともでき、またはグリコシル化されているアミノ酸残基をコードするコドンの置換により果たすこともできる。化学的脱グリコシル化技術は、公知であり、ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断を様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用により達成することができる。

30

40

【0384】

コンジュゲーションのための追加の好適な成分および分子としては、例えば、リンパ系に標的化するための分子、サイログロブリン；アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HAS）；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリアミノ酸、例えば、ポリ（D-リシン：D-グルタミン酸）；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルス赤血球凝集素、インフルエンザウイルス核タンパク質；キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）；ならびにB型肝炎ウイルスコアタンパク質および表面抗原；または前述のものの任意の組合せが挙げられる。

50

【0385】

別のタイプの修飾は、ポリペプチド配列のN末端および／またはC末端での、1つまたは複数の追加の成分または分子、例えば、別のタンパク質（例えば、対象タンパク質とは異種のアミノ酸配列を有するタンパク質）、または担体分子の、コンジュゲート（例えば、連結）である。したがって、例示的なポリペプチド配列は、別の成分または分子とのコンジュゲートとして提供され得る。一部の実施形態では、本開示のペプチドまたはタンパク質へのアルブミンの融合は、例えば、HSAをコードするDNAまたはその断片が、1つまたは複数のポリペプチド配列をコードするDNAに接合されるように遺伝子操作することによって、達成することができる。その後、融合ポリペプチドを発現するように、例えば好適なプラスミドの形態の、融合ヌクレオチド配列で、好適な宿主を形質転換すること、またはそのような融合ヌクレオチド配列を宿主にトランスフェクトすることができる。発現を、例えば原核もしくは真核細胞から、*in vitro*で果たすことができ、または例えばトランスジェニック生物から、*in vivo*で果たすことができる。本開示の一部の実施形態では、融合タンパク質の発現は、哺乳動物細胞系、例えばCHO細胞系で行われる。さらに、アルブミン自体を、その循環半減期を延長するように修飾することができる。1つまたは複数のポリペプチドへの修飾アルブミンの融合は、上記の遺伝子操作技術により、または化学的コンジュゲーションにより成し遂げることができ、結果として得られる融合分子は、非修飾アルブミンとの融合体の半減期を超える半減期を有する（例えば、WO2011/051489を参照されたい）。コンジュゲートした脂肪酸鎖（アシル化）によるアルブミン結合を含む、いくつかのアルブミン結合戦略が、直接融合の代替法として開発されている。血清アルブミンは脂肪酸の輸送タンパク質であるので、アルブミン結合活性を有するこれらの天然リガンドを低分子タンパク質治療薬の半減期延長に使用されている。

10

20

【0386】

コンジュゲーションのための追加の候補成分および分子は、単離または精製に好適なものを含む。非限定的な例としては、結合分子、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対）、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または固体支持体を構成する分子が挙げられ、固体支持体は、例えば、プラスチックまたはポリスチレンビーズ、プレートまたはビーズ、磁気ビーズ、試験紙、および膜を含む。コンジュゲートをそれらの様々な分子量に有効に分離するカチオン交換クロマトグラフィーなどの精製方法を使用して、電荷の差によりコンジュゲートを分離することができる。カチオン交換クロマトグラフィーにより得られた画分の内容を、従来の方法、例えば、質量分析、SDS-PAGE、または分子量により分子実体を分離するための他の公知の方法を使用して、分子量により同定することができる。

30

【0387】

一部の実施形態では、本開示のペプチドまたはタンパク質配列のアミノまたはカルボキシル末端を免疫グロブリンFc領域（例えば、ヒトFc）と融合させて、融合コンジュゲート（または融合分子）を形成することができる。Fc融合コンジュゲートは、バイオ医薬品の全身半減期を増加させることが示されており、したがって、バイオ医薬製品は、あまり頻繁な投与を必要としない可能性がある。Fcは、血管の内側を覆っている内皮細胞中の新生児型Fc受容体（FcRn）に結合し、結合すると、Fc融合分子は、分解から保護され循環へ再放出され、その結果、分子はより長く循環中に保持される。このFc結合は、内在性IgGがその長い血漿半減期を保持する機序であると考えられる。ごく最近のFc融合技術は、抗体のFc領域にバイオ医薬品の単一のコピーを連結させて、旧来のFc融合コンジュゲートと比較してバイオ医薬品の薬物動態特性および薬力学的特性を最適化する。

40

【0388】

本開示は、1つまたは複数の特性を改善するための、ペプチドの現在公知のまたは将来開発される他の修飾の使用を企図している。本開示のペプチドの循環半減期を延長する、安定性を増大させる、クリアランスを低減させる、または免疫原性もしくはアレルギー誘

50

発性を変更するための1つのそのような方法は、分子の特性を修飾するために他の分子に連結されたヒドロキシエチルデンプン誘導体を利用する、HES化によるペプチド配列の修飾を含む。HES化の様々な態様は、例えば、米国特許出願公開第2007/0134197号および同第2006/0258607号に記載されている。

【0389】

ペプチド安定性を多数の方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼならびに様々な生体媒質、例えばヒト血漿および血清が、安定性を試験するために使用されている。例えば、Verhoeff, et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics 11:291 (1986)を参照されたい。本明細書に記載のペプチドの半減期は、25%ヒト血清(v/v)アッセイを使用して便利には決定される。このプロトコールは、次の通りである：プールされたヒト血清(AB型、非加熱不活性化)を使用前に遠心分離により粉碎する。次いで、血清をRPMI-1640または別の好適な組織培養培地で25%に希釈する。所定の時間間隔で、少量の反応溶液を除去し、6%トリクロロ酢酸(TCA)水溶液またはエタノールのどちらかに添加する。この濁った反応試料を15分間冷却(4℃)し、次いで、回転させて、沈殿した血清タンパク質をペレット化する。次いで、安定性に特化したクロマトグラフィー条件を使用して逆相HPLCによりペプチドの存在を判定する。

【0390】

短い血漿半減期またはプロテアーゼ分解に対する脆弱性に関連する問題は、ペプチドまたはタンパク質配列を様々な非タンパク質性ポリマーのいずれか、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンにコンジュゲートまたは連結させること(例えば、タンパク質と非タンパク質性ポリマー、例えばPEG、の両方に共有結合している連結部分を通常は介して)を含む、様々な修飾により、克服することができる。そのようなPEGコンジュゲート型生体分子は、より良好な物理的および熱安定性、酵素分解に対する脆弱性からの保護、溶解度向上、より長いin vivo循環半減期およびクリアランス減少、免疫原性および抗原性低下、ならびに毒性低下を含む、臨床的に有用な特性を有することが示されている。

【0391】

ポリペプチドまたはタンパク質配列へのコンジュゲーションに好適なPEGは、一般に、室温で水溶性であり、一般式 $R-(O-CH_2-CH_2)_n-O-R$ (式中、Rは、水素であるか、またはアルキルもしくはアルカノール基などの保護基であり、nは、1~1000の整数である)を有する。Rが保護器である場合、それは、一般に、1~8個の炭素を有する。ポリペプチド配列にコンジュゲートされるPEGは、直鎖状であってもまたは分岐していてもよい。分岐型PEG誘導体、「星型PEG」およびマルチアームPEGが本開示により企図される。本開示は、PEGが異なるn値を有し、したがって、様々な異なるPEGが特定の比率で存在する、コンジュゲートの組成物も企図している。例えば、一部の組成物は、n=1、2、3および4であるコンジュゲートの混合物を含む。一部の組成物は、n=1であるコンジュゲートのパーセンテージが、18~25%であり、n=2であるコンジュゲートのパーセンテージが、50~66%であり、n=3であるコンジュゲートのパーセンテージが、12~16%であり、n=4であるコンジュゲートのパーセンテージが、5%以下である。そのような組成物を、当技術分野において公知の反応条件および精製方法により生成することができる。例えば、カチオン交換クロマトグラフィーを使用してコンジュゲートを分離することができ、次いで、例えば、所望の数のPEGが結合しているコンジュゲートを含有する画分であって、精製され、未修飾タンパク質配列がなく、かつ他の数のPEGが結合しているコンジュゲートがない、画分が、同定される。

【0392】

PEGを本開示のペプチドまたはタンパク質に末端反応基(「スペーサー」)を介して結合させることができる。スペーサーは、例えば、ポリペプチド配列の1つまたは複数についての遊離アミノまたはカルボキシル基とPEGとの結合を媒介する末端反応基である

10

20

30

40

50

。遊離アミノ基に結合され得る、スペーサーを有するPEGは、N-ヒドロキシスクシニルイミドでPEGのコハク酸エステルを活性化することにより調製され得る、N-ヒドロキシスクシニルイミドPEGを含む。遊離アミノ基に結合され得る別の活性化PEGは、PEGモノメチルエーテルをシアヌル酸クロリドと反応させることにより調製され得る、2, 4-ビス(オ-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンである。遊離カルボキシル基に結合される活性化PEGは、ポリオキシエチレンジアミンを含む。

【0393】

スペーサーを有するPEGへの本開示のペプチドまたはタンパク質配列のうちの1つまたは複数のコンジュゲーションは、様々な従来の方法により行うことができる。例えば、コンジュゲーション反応は、4:1~30:1の試薬のペプチド/タンパク質に対するモル比を利用して、溶液中で、5~10のpHで、4℃~室温の温度で、30分~20時間、行うことができる。反応条件は、所望の置換度を主として生じさせるように反応を方向付けるように選択することができる。一般に、低温、低pH(例えば、pH=5)、および短い反応時間は、結合されるPEGの数を減少させる傾向があり、これに対して、高温、中~高pH(例えば、pH>7)、およびより長い反応時間は、結合されるPEGの数を増加させる傾向がある。当技術分野において公知の様々な手段を使用して反応を終結させることができる。一部の実施形態では、反応混合物を酸性化し、例えば-20℃で、凍結させることにより、反応が終結される。

【0394】

本開示は、PEG模倣物の使用も企図している。PEGの特質(例えば、血清半減期の向上)を保持し、その上、いくつかの追加の有利な特性を付与する、組換えPEG模倣物が、開発されている。例として、PEGに類似した伸長立体構造を形成することができる単純なポリペプチド鎖(例えば、Ala、Glu、Gly、Pro、SerおよびThrを含む)であって、目的のペプチドまたはタンパク質薬に組換えにより既に融合されているポリペプチド鎖を生成することができる(例えば、AmunixのXTEN技術; Mountain View, CA)。これは、製造プロセス中の追加のコンジュゲーションステップの必要性をなくす。さらに、確立された分子生物学技術によってポリペプチド鎖の側鎖組成を制御することができ、その結果、免疫原性および製造特性の最適化が可能になる。

ネオエピトープ

【0395】

ネオエピトープは、免疫系により認識される、ネオ抗原性ペプチドまたはネオ抗原性ポリペプチドのネオ抗原決定部分を含む。ネオエピトープは、非罹患細胞、例えば、非がん性細胞または生殖系細胞などの、参照には存在しないが、罹患細胞、例えばがん細胞には見られる、エピトープを指す。これは、対応するエピトープが正常な非罹患細胞または生殖系細胞に見られるが、罹患細胞、例えばがん細胞、における1つまたは複数の突然変異に起因して、そのエピトープの配列が変化してネオエピトープを生じさせる結果となる状況を含む。用語「ネオエピトープ」は、通常は隣接するアミノ酸のαアミノ基とカルボキシル基とのペプチド結合により、互いに接続されている一連の残基、通常はL-アミノ酸、を示すために、本明細書では「腫瘍特異的ネオエピトープ」と同義的に使用される。ネオエピトープは、様々な長さで、それらの中性(非荷電)形態または塩である形態のどちらかであり得、グリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化などの修飾がないこともあり、またはこれらの修飾を、修飾が本明細書に記載されるようなポリペプチドの生物活性を破壊しないことを条件として、含有することもある。本開示は、表1または2からの腫瘍特異的突然変異を含む単離されたネオエピトープを提供する。本開示は、表34からの腫瘍特異的突然変異を含む例示的な単離されたネオエピトープも提供した。本開示は、表40A~40Dおよび表3A~3Dからの腫瘍特異的突然変異を含む例示的な単離されたネオエピトープも提供する。

【0396】

一部の実施形態では、HLAクラスⅠについて本明細書に記載されるネオエピトープは、長さが13残基またはそれ未満であり、通常は、約8～約12の間の残基、特に、9または10残基からなる。一部の実施形態では、HLAクラスⅡについて本明細書に記載されるネオエピトープは、長さが25残基またはそれ未満であり、通常は、約16～約25の間の残基からなる。

【0397】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、タンパク質の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1のペプチドは、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは、突然変異を含み、第2のネオエピトープは、同じ突然変異を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、タンパク質の第1の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1の領域は、第2の領域の少なくとも1個のアミノ酸を含み、第1のペプチドは、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは、第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープは、第2の突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の突然変異と第2の突然変異は同じである。一部の実施形態では、突然変異は、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードアウト突然変異、遺伝子融合突然変異およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0398】

一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、クラスⅠ HLAタンパク質に結合して、クラスⅠ HLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、クラスⅡ HLAタンパク質に結合して、クラスⅡ HLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、クラスⅠ HLAタンパク質に結合して、クラスⅠ HLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、クラスⅡ HLAタンパク質に結合して、クラスⅡ HLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、CD8⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、CD4⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、CD4⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、CD8⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞のTCRは、クラスⅡ HLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞のTCRは、クラスⅡ HLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞のTCRは、クラスⅠ HLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞のTCRは、クラスⅠ HLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、ネオ抗原性C481S BTKペプチドを含む組成物は、第1のBTKネオエピトープおよび第2のBTKネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第1のBTKネオエピトープは、表34から選択されるネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第2のBTKネオエピトープは、表34から選択されるネオエピトープを含む。

【0399】

一部の実施形態では、表34から選択される第1の突然変異型BTKペプチド配列は、それぞれのペプチドに対応する（右側に対する左側の列）、表34に収載されているHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する、または結合すると予測される。

【0400】

一部の実施形態では、ネオ抗原性EGFRペプチドを含む組成物は、第1のEGFRネオエピトープおよび第2のEGFRネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第1のEGFRネオエピトープは、表40A～40Dから選択されるネオエピトープを含む。一部の実施形態では、第2のEGFRネオエピトープは、表40A～40Dから選択されるネオエピトープを含む。

【0401】

一部の実施形態では、第1の突然変異型EGFRネオエピトープは、STVQLIMQ

L、LIMQLMPF、LTSTVQLIM、TVQLIMQL、TSTVQLIMQL、TVQLIMQLMおよびVQLIMQLMからなる群から選択される。

【0402】

一部の実施形態では、STVQLIMQL、LIMQLMPF、LTSTVQLIM、TVQLIMQL、TSTVQLIMQL、TVQLIMQLMおよびVQLIMQLMからなる群から選択される第1の突然変異型EGFRペプチド配列は、HLA-A68:01アレル、HLA-B15:02アレル、HLA-A25:01アレル、HLA-B57:03アレル、HLA-C12:02アレル、HLA-C03:02アレル、およびHLA-A26:01アレル、HLA-C12:03アレル、HLA-C06:02アレル、HLA-C03:03、HLA-B52:01アレル、HLA-A30:01アレル、HLA-C02:02アレル、HLA-C12:03アレル、HLA-A11:01アレル、HLA-A32:01アレル、HLA-A02:04アレル、HLA-B15:09アレル、HLA-C17:01アレル、HLA-C03:04アレル、HLA-B08:01アレル、HLA-A01:01アレル、HLA-B42:01アレル、HLA-B57:01アレル、HLA-B14:02アレル、HLA-B37:01アレル、HLA-B36:01アレル、HLA-B38:01アレル、HLA-C03:03アレル、HLA-B14:02アレル、HLA-B37:01アレル、HLA-A02:03アレル、HLA-B58:02アレル、HLA-C08:01アレル、HLA-B35:01アレル、HLA-B40:01アレル、および／またはHLA-B35:03アレルによりコードされるタンパク質に結合する、または結合すると予測される。

表41は、EGFRネオ抗原性ペプチドに結合することができるまたは結合すると予測されるHLAタンパク質をコードする例示的なHLAアレルについてのリストを提供する。

10

20

30

40

50

【表 4 1 - 1】

HLA-A23:01	
HLA-A25:01	
HLA-A26:01	
HLA-A32:01	
HLA-B15:01	
HLA-B15:02	
HLA-B38:01	
HLA-B39:01	
HLA-B39:06	
HLA-B40:02	
HLA-C03:02	10
HLA-C12:03	
HLA-A01:01	
HLA-C15:02	
HLA-B57:01	
HLA-B57:03	
HLA-A36:01	
HLA-C12:02	
HLA-C03:03	
HLA-B58:02	
HLA-B15:01	
HLA-A26:01	
HLA-A68:02	
HLA-C15:02	20
HLA-A25:01	
HLA-B57:03	
HLA-C12:02	
HLA-A26:01	
HLA-C12:03	
HLA-C06:02	
HLA-C03:03	
HLA-A30:01	
HLA-C02:02	
HLA-A11:01	
HLA-A32:01	
HLA-A02:04	
HLA-A68:01	30
HLA-B15:09	
HLA-C03:04	
HLA-B38:01	
HLA-B57:01	
HLA-A02:03	
HLA-C08:01	
HLA-B35:01	
HLA-B40:01	
HLA-A26:01	
HLA-B57:01	
HLA-C15:02	
HLA-C17:01	
HLA-B08:01	40

【表 4 1 - 2】

HLA-B42:01
HLA-B14:02
HLA-B37:01
HLA-B15:09
HLA-B35:03
HLA-B52:01
HLA-B14:02
HLA-B37:01

10

20

30

40

50

表 4 2 A i、4 2 A i i および 4 2 B は、E G F R ネオエピトープを予測される H L A サブタイプ特異性ととも示す。

表 5 A i、5 A i i および 5 B は、E G F R ネオエピトープを予測される H L A サブタイプ特異性ととも示す。

表 4 2 A i

【表 4 2 - 1】

EGFR 突然変異	突然変異配列コンテキスト	ペプチド	HLA アレル
S492R	SLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNK NLCYANTINWKKLFGTSGQKTKII RNRGENSCKATGQVCHALCSPEG CWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVD KCNLL	IIRNRGENSCK	A03.01

10

表 4 2 A i i

【表 4 2 - 2】

EGFR 突然変異	突然変異配列 コンテキスト	ペプチド	HLA アレル
T790M	IPVAIKELREATSP KANKEILDEAYVM ASVDNPHVCRLLG ICLTSTVQLIMQLM PFGCLLDYVREHK DNIGSQYLLNWCV QIAKGMNYLEDRR LVHRDLAA	CLTSTVQLIM	A01.01, A02.01
		IMQLMPFGC	A02.01
		IMQLMPFGCL	A02.01, A24.02, B08.01
		LIMQLMPFG	A02.01
		LIMQLMPFGC	A02.01
		LTSTVQLIM	A01.01
		MQLMPFGCL	A02.01, B07.02, B08.01
		MQLMPFGCLL	A02.01, A24.02, B08.01
		VQLIMQLMPF	A02.01, A24.02, B08.01
		LIMQLMPF	HLA-C03:02
		LTSTVQLIM	HLA-C12:03, HLA-A01:01, HLA-C15:02, HLA-B57:01 HLA-B57:03, HLA-A36:01, HLA-C12:02, HLA-C03:03, HLA-B58:02,
		QLIMQLMPF	HLA-A26:01
		STVQLIMQL	HLA-A68:02, HLA-C15:02, HLA-A25:01, HLA-B57:03, HLA-C12:02, HLA-A26:01, HLA-C12:03, HLA-C06:02, HLA-C03:03, HLA-A30:01, HLA-C02:02, HLA-A11:01, HLA-A32:01, HLA-A02:04, HLA-A68:01, HLA-B15:09, HLA-C03:04, HLA-B38:01, HLA-B57:01, HLA-A02:03, HLA-C08:01, HLA-B35:01, HLA-B40:01
		STVQLIMQLM	HLA-B57:01
		TSTVQLIMQL	HLA-C15:02
		TVQLIMQL	HLA-C17:01, HLA-B08:01, HLA-

20

30

40

【表 4 2 - 3】

			B42:01, HLA-B14:02, HLA-B37:01, HLA-B15:09
		TVQLIMQLM	HLA-B35:03
		VQLIMQLM	HLA-B52:01, HLA-B14:02, HLA-B37:01

50

表 4 2 B

【表 4 2 - 4】

EGFR 突然変異	突然変異配列コンテキスト	ペプチド	HLA アレル
EGFRvIII (内部欠失)	MRPSGTAGAALLALLAALCPA SRALEEKK:G:NYVVTDHGSCV RACGADSYEMEEDGVRKCKK CEGPCRKVCNGIGIGEFKD	ALEEKKGNYV	A02.01
EGFR:SEPT14	LPQPPICTIDVYMIMVKCWMI DADSRPKFRELIIEFSKMARDP QRYLVIQ::LQDKFEHLKMIQ QEEIRKLEEEKKQLEGEIHF YKMKAAASEALQTQLSTD	IQLQDKFEHL	A02.01, B08.01
		QLQDKFEHL	A02.01, B08.01
		QLQDKFEHLK	A03.01
		YLVIQLQDKF	A02.01, A24.02

【0403】

一部の実施形態では、第1のネオエピトープと第2のネオエピトープは、異なるエピトープである。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、第1のネオエピトープより長い。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、少なくとも8アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、8～12アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、少なくとも8個の連続するアミノ酸の配列を含み、8個の連続するアミノ酸のうちの少なくとも1個は、野生型配列の対応する位置におけるものと異なる。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、少なくとも8個の連続するアミノ酸の配列を含み、8個の連続するアミノ酸のうちの少なくとも2個は、野生型配列の対応する位置におけるものと異なる。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、少なくとも16アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、16～25アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、少なくとも16個の連続するアミノ酸の配列を含み、16個の連続するアミノ酸のうちの少なくとも1個は、野生型配列の対応する位置におけるものと異なる。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、少なくとも16個の連続するアミノ酸の配列を含み、16個の連続するアミノ酸のうちの少なくとも2個は、野生型配列の対応する位置におけるものと異なる。

【0404】

一部の実施形態では、ネオエピトープは、少なくとも1個のアンカー残基を含む。一部の実施形態では、第1のネオエピトープ、第2のネオエピトープまたは両方は、少なくとも1個のアンカー残基を含む。一実施形態では、第1のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、標準アンカー位置または非標準アンカー位置にある。別の実施形態では、第2のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、標準アンカー位置または非標準アンカー位置にある。さらに別の実施形態では、第1のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基は、第2のネオエピトープの少なくとも1個のアンカー残基とは異なる。

【0405】

一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、野生型残基である。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、置換物である。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、突然変異を含まない。

【0406】

一部の実施形態では、第1もしくは第2のネオエピトープまたは両方は、少なくとも1つのアンカー残基隣接領域を含む。一部の実施形態では、ネオエピトープは、少なくとも1個のアンカー残基を含む。一部の実施形態では、少なくとも1個のアンカー残基は、少なくとも2個のアンカー残基を含む。一部の実施形態では、少なくとも2個のアンカー残基は、少なくとも1個のアミノ酸を含む分離領域により分離されている。一部の実施形態では、少なくとも1つのアンカー残基隣接領域は、分離領域内にない。一部の実施形態で

は、少なくとも1つのアンカー残基隣接領域は、(a) 少なくとも2個のアンカー残基のうちのN末端アンカー残基の上流、(b) 少なくとも2個のアンカー残基のうちのC末端アンカー残基の下流、または(a)と(b)の両方にある。一部の実施形態では、第2のネオペプチドは、表34から選択される。

【0407】

一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、突然変異T790Mを含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化34】

VQLIMQLMPF

10

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化35】

STVQLIMQLM

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化36】

QLIMQLMPF

20

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化37】

MLMPFGCLL

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化38】

LIMQLMPF

30

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化39】

LTSTVQLIM

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオペプチドは、

【化40】

STVQLIMQL

40

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化41】

TSTVQLIMQL

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化42】

TVQLIMQL

50

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化43】

TVQLIMQLM

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化44】

VQLIMQLM

10

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化45】

CLTSTVQLIM

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化46】

IMQLMPFGC

20

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化47】

IMQLMPFGC

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化48】

IMQLMPFGCL

30

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化49】

LIMQLMPFG

のネオエピトープ配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化50】

LIMQLMPFGC

40

の配列を含む。一部の実施形態では、EGFR T790M突然変異を含む第2のネオエピトープは、

【化51】

QLIMQLMPFG

の配列を含む。

【0408】

一部の実施形態では、EGFR S492R突然変異を含む第2のネオエピトープ。一部の実施形態では、EGFR S492R突然変異を含むペプチドは、

50

【化 5 2】

IIRNRGENSCK

のネオエピトープ配列を含む。

【0 4 0 9】

一部の実施形態では、ネオエピトープ配列が、

【化 5 3】

ALEEKKGNVYV

である、EGFRvIIIにおけるGの欠失（内部欠失）などの、EGFRの欠失突然変異を含む、第2のEGFRネオエピトープ。

【0 4 1 0】

一部の実施形態では、ネオエピトープ配列が、

【化 5 4】

QLQDKFEHL

である、配列：

【化 5 5】

LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIEFSKMARDPQRYLVIQ::LQDKFEHLKMIQQEEIR
KLEEEKKQLEGEIIDFYKMKAASEALQTQLSTD

で示される突然変異を含む第2のネオエピトープ。一部の実施形態では、第2のネオエピトープ配列は、

【化 5 6】

QLQDKFEHL

である。一部の実施形態では、第2のネオエピトープ配列は、

【化 5 7】

QLQDKFEHLK

である。一部の実施形態では、第2のネオエピトープ配列は、

【化 5 8】

YLVILQDKF

である。

【0 4 1 1】

一部の実施形態では、第2のネオペプチドは、表35または表3A～表3Dから選択される。

【0 4 1 2】

一部の実施形態では、ネオエピトープは、HLAタンパク質（例えば、HLAクラスIまたはHLAクラスII）に結合する。一部の実施形態では、ネオエピトープは、対応する野生型ペプチドより大きい親和性でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、ネオエピトープは、5,000nM未満、1,000nM未満、500nM未満、100nM未満、50nM未満、またはそれ未満のIC₅₀を有する。

【0 4 1 3】

一部の実施形態では、ネオエピトープは、約1pM～約1mM、約100pM～約500μM、約500pM～約10μM、約1nM～約1μM、または約10nM～約1μMの間のHLA結合親和性を有することがある。一部の実施形態では、ネオエピトープは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、1

10

20

30

40

50

50、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900もしくは1,000 nMまたはそれより大きいHLA結合親和性を有することもある。一部の実施形態では、ネオエピトープは、最大でも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900または1,000 nMのHLA結合親和性のみを有することもある。

【0414】

一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、対応する野生型ネオエピトープより大きい親和性でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、1,000 nM、900 nM、800 nM、700 nM、600 nM、500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nMまたは10 nM未満の K_D または IC_{50} でHLAタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、1,000 nM、900 nM、800 nM、700 nM、600 nM、500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nMまたは10 nM未満の K_D または IC_{50} でHLAクラスIIタンパク質に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、2,000 nM、1,500 nM、1,000 nM、900 nM、800 nM、700 nM、600 nM、500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nMまたは10 nM未満の K_D または IC_{50} でHLAクラスIIIタンパク質に結合する。

【0415】

ある態様では、第1および／または第2のネオエピトープは、対象により発現されるHLAアレルによりコードされるタンパク質に結合する。別の態様では、突然変異は、対象の非がん細胞には存在しない。さらに別の実施形態では、第1および／または第2のネオエピトープは、対象のがん細胞の遺伝子または発現される遺伝子によりコードされる。

【0416】

一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、表1または2の第2列に示されているような突然変異を含む。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、表1または2の第2列に示されているような突然変異を含む。一部の実施形態では、ある特定の抗原性ペプチドは、特定のアレルと対になっている。

【0417】

置換は、ネオエピトープの長さに沿ってどこに位置してもよい。例えば、置換は、ペプチドのN末端3分の1に位置することもあり、ペプチドの中央3分の1に位置することもあり、またはペプチドのC末端3分の1に位置することもある。別の実施形態では、置換残基は、N末端から2～5残基離れて位置することもあり、またはC末端から2～5残基離れて位置することもある。ペプチドは、同様に、腫瘍特異的挿入突然変異に由来することもあり、この場合、ペプチドは、挿入残基の1つもしくは複数または全てを含む。

【0418】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、細菌性または動物性夾雑物質がない試薬を利用して容易に化学合成することができる(Merrifield RB: Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-54, 1963)。一部の実施形態では、ペプチドは、(1)均一な合成および切断条件を使用するマルチチャネル機器での並列固相合成；(2)RP-HPLCカラムでのカラムストリッピングによる精製；およびペプチド間で再洗浄、但し交換なし；続いて(3)最も情報価値の高いアッセイの限られたセットによる分析により、調製される。適正製造基準(GMP)のフットプリントを、個々の患者のペプチドのセットについて定義することができ、したがって、スイート切り替え手順が必要となるのは、異なる患者のペプチド合成間のみである。

ポリヌクレオチド

【0419】

あるいは、本開示のペプチドをコードする核酸（例えば、ポリヌクレオチド）を使用して、ネオ抗原性ペプチドをインビトロで産生することができる。ポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA、一本鎖および／もしくは二本鎖、またはネイティブもしくは安定化形態のいずれかのポリヌクレオチド、例えば、ホスホロチオエート（phosphorothiate）骨格を有するポリヌクレオチドなど、あるいはこれらの組み合わせであり得、ポリヌクレオチドは、それがペプチドをコードする限り、イントロンを含んでもまたは含まなくてもよい。一部の実施形態では、ペプチドを産生するために *in vitro* 翻訳が使用される。

10

【0420】

本開示に記載のネオ抗原性ペプチドの各々をコードするネオ抗原性ポリヌクレオチドが、本明細書で提供される。用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、または「核酸」は、本開示では、「突然変異型ポリヌクレオチド」、「突然変異型ヌクレオチド」、「突然変異型核酸」、「ネオ抗原性ポリヌクレオチド」、「ネオ抗原性ヌクレオチド」または「ネオ抗原性突然変異型核酸」と同義的に使用される。様々な核酸配列は、遺伝コードの冗長性のため同じペプチドをコードすることがある。これらの核酸の各々が、本開示の範囲に含まれる。ペプチドをコードする核酸は、DNAもしくはRNA、例えばmRNAであっても、またはDNAとRNAの組合せであってもよい。一部の実施形態では、ペプチドをコードする核酸配列は、自己複製mRNAである（Brito et al., Adv. Genet. 2015; 89:179-233）。本明細書に記載のペプチドをコードする任意の好適なポリヌクレオチドが、本開示の範囲に含まれる。

20

【0421】

用語「RNA」は、「mRNA」を含み、一部の実施形態では、「mRNA」に関する。用語「mRNA」は、「メッセンジャーRNA」を意味し、DNA鋳型を使用することにより生成され、ペプチドまたはポリペプチドをコードする、「転写物」に関する。通常は、mRNAは、5'-UTR、タンパク質コード領域、および3'-UTRを含む。mRNAは、細胞内および *in vitro* で限られた半減期のみを有する。一部の実施形態では、mRNAは、自己増幅mRNAである。本開示に関して、mRNAは、DNA鋳型からの *in vitro* 転写により生成され得る。 *in vitro* 転写方法論は、当業者に公知である。例えば、市販されている様々なインビトロ転写キットがある。

30

【0422】

RNAの安定性および転写効率を必要に応じて修飾することができる。例えば、RNAの安定化効果を有するおよび／または翻訳効率を上昇させる1つまたは複数の修飾により、RNAを安定化することおよびその翻訳を増加させることができる。そのような修飾は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるPCT/EP2006/009448に記載されている。本開示に従って使用されるRNAの発現を増加させるために、そのRNAをコード領域内で、すなわち、発現されるペプチドまたはタンパク質をコードする配列を、発現されるペプチドまたはタンパク質の配列を変更することなく、修飾して、GC含量を増加させてmRNA安定性を増大させること、およびコドン最適化を行い、かくて細胞内での翻訳を増強させることができる。

40

【0423】

本開示で使用されるRNAの文脈での用語「修飾」は、RNAの、当該RNAに天然に存在しない、あらゆる修飾を含む。一部の実施形態では、RNAは、キャッピングされていない5'-三リン酸を有さない。そのようなキャッピングされていない5'-三リン酸の除去は、RNAをホスファターゼで処理することにより達成することができる。他の実施形態では、RNAは、その安定性を増大させるためにおよび／または細胞傷害性を低下させるために修飾リボヌクレオチドを有し得る。一部の実施形態では、RNA中の、例えばシチジンを、5-メチルシチジンで部分的にまたは完全に置換することができる。あるいは、例えばウリジンが、シュードウリジンで部分的にまたは完全に置換される。

50

【0424】

一部の実施形態では、用語「修飾」は、RNAに5'キャップまたは5'キャップアナログを設けることに関する。用語「5'キャップ」は、mRNA分子の5'末端に見られるキャップ構造を指し、一般に、異常な5'-5'三リン酸連結によってmRNAに接続されているグアノシンヌクレオチドからなる。一部の実施形態では、このグアノシンは、7位がメチル化されている。用語「従来の5'キャップ」は、7-メチルグアノシンキャップ(m⁷G)に対して、天然に存在するRNA 5'キャップを指す。本開示に関して、用語「5'キャップ」は、RNAキャップ構造に似ている5'キャップアナログであって、*in vivo*および／または細胞内で、RNAに結合した場合にRNAを安定化する能力および／またはRNAの翻訳を増強させる能力を有するように修飾されている、5'キャップアナログを含む。

10

【0425】

ある特定の実施形態では、本開示のネオ抗原性ペプチドをコードするmRNAは、それを必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、本開示は、修飾ヌクレオシドを含むRNA、オリゴリボヌクレオチドおよびポリリボヌクレオチド分子、それらを含む遺伝子治療ベクター、それらを含む遺伝子治療方法および遺伝子転写サイレンシング方法を提供する。一部の実施形態では、投与されることになるmRNAは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む。

【0426】

本明細書に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、化学技術、例えば、Matteucci, et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981)のホスホトリエステル法により、合成することができる。アナログを含むまたはアナログからなるペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ネイティブエピトープをコードするものを適切な所望される核酸塩基で単に置換することにより、作製することができる。

20

【0427】

本明細書に記載のポリヌクレオチドは、1つまたは複数の合成イントロンまたは天然に存在するイントロンを転写領域に含み得る。mRNA安定化配列、および哺乳動物細胞における複製のための配列を含めることも、ポリヌクレオチド発現を増加させるために検討され得る。加えて、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、免疫刺激配列(ISSまたはCpG)を含み得る。これらの配列をベクター内のポリヌクレオチドコード配列の外側に含めて、免疫原性を増強することができる。

30

【0428】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、同じリーディングフレーム内の、例えば、宿主細胞からのペプチドまたはタンパク質の発現および／または分泌を助けるポリヌクレオチドに融合した、ペプチドまたはタンパク質のコード配列(例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列)を含み得る。リーダー配列を有するポリペプチドは、プレタンパク質であり、成熟形態のポリペプチドを形成するために宿主細胞によって切断されるリーダー配列を有することができる。

【0429】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、同じリーディングフレーム内の、例えば、コードされたペプチドの精製を可能にするマーカー配列に融合した、ペプチドまたはタンパク質のコード配列を含むことができ、次いでそれを個別化疾患ワクチンまたは免疫原性組成物に組み込むことができる。例えば、マーカー配列は、細菌宿主の場合はマーカーに融合した成熟ポリペプチドの精製を行うためにpQE-9ベクターにより供給されるヘキサヒスチジンタグであることもあり、またはマーカー配列は、哺乳動物宿主(例えば、COS-7細胞)が使用される場合にはインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来する赤血球凝集素(HA)タグであることもある。さらなるタグとしては、カルモジュリンタグ、FLAGタグ、Mycタグ、Sタグ、SBPタグ、Softag 1、Softag 3、V5タグ、Xpressタグ、Isopeptag、Spyタグ、ビオチンカルボキ

40

50

シルキキャリアープロテイン（BCCP）タグ、GSTタグ、蛍光タンパク質タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質タグ）、マルトース結合タンパク質タグ、Nusタグ、Streptタグ、チオレドキシンタグ、TCタグ、Tyタグなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0430】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、複数のネオ抗原性ペプチドを産生することができる単一のコンカテマー化ネオ抗原性ペプチド構築物を作成するために、同じリーディングフレーム内に融合した1つまたは複数の本明細書に記載のペプチドまたはタンパク質のコード配列を含むこともある。

【0431】

一部の実施形態では、DNA配列は、組換え技術を使用して、目的の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することにより構築される。必要に応じて、部位特異的突然変異誘発により配列の突然変異を誘発して、その機能的アナログを得ることができる。例えば、Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) および米国特許第4,588,585号を参照されたい。別の実施形態では、目的のペプチドまたはタンパク質をコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成装置を使用して化学合成により構築されることになる。所望のペプチドのアミノ酸配列に基づいて、および目的の組換えポリペプチドが産生される宿主細胞において有利であるコドンを選択して、そのようなオリゴヌクレオチドを設計することができる。標準的な方法を応用して、目的の単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全アミノ酸配列を使用して、逆翻訳遺伝子を構築することができる。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードするいくつかの小さいオリゴヌクレオチドを合成し、そしてその後、ライゲーションすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、相補的会合のために5'または3'オーバーハングを通常は含有する。

【0432】

会合すると（例えば、合成、部位指定突然変異誘発、または別の方法によって）、目的の特定の単離されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、発現ベクターに挿入され、所望の宿主におけるタンパク質の発現に適した発現制御配列に必要な応じて作動的に連結される。適切な会合は、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、および好適な宿主における生物活性ポリペプチドの発現により、確認することができる。当技術分野において周知であるように、宿主におけるトランスフェクト遺伝子の高い発現レベルを得るために、遺伝子を、選択された発現宿主において機能する転写および翻訳発現制御配列に作動的に連結させることができる。

【0433】

したがって、本開示はまた、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドおよびネオエピトープの産生および投与に有用なベクターおよび発現ベクターに、ならびにそのようなベクターを含む宿主細胞に関する。

ベクター

【0434】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドまたはタンパク質を発現することができる発現ベクターも調製することができる。種々の細胞型のための発現ベクターが当技術分野において周知であり、過度の実験なしにそれらを選択することができる。一般に、DNAは、プラスミドなどの発現ベクターに、発現のための適切な配向でおよび正しいリーディングフレーム内に挿入される。必要に応じて、所望の宿主（例えば、細菌）により認識される適切な転写および翻訳調節対照ヌクレオチド配列にDNAを連結させることができるが、そのような対照は、一般に、発現ベクターで入手可能である。次いで、ベクターは、標準的技術を使用してクローニングのために宿主細菌に導入される（例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A L

10

20

30

40

50

aboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照されたい)。

【0435】

本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドの産生および投与に好適な多数のベクターおよび宿主系が当業者に公知であり、市販されている。以下のベクターが例として提供される。細菌性：pQE70、pQE60、pQE-9 (Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pBluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene)；ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)；pCR (Invitrogen)。真核生物性：pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)；pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)；p75.6 (Valentis)；pCEP (Invitrogen)；pCEI (Epimmune)。しかし、任意の他のプラスミドまたはベクターを、それが宿主において複製可能かつ実行可能であるのであれば、使用することができる。

【0436】

本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドの発現のために、コード配列は、所望の細胞宿主における発現のための発現ベクターを提供するために開始および停止コドンと、プロモーターおよび終結領域と、一部の実施形態では、加えて複製系とを作用可能に連結した状態で、提供されることになる。例えば、細菌宿主と適合性のプロモーター配列は、所望のコード配列の挿入に便利な制限部位を含有するプラスミド内に備えられる。結果として得られる発現ベクターが好適な細菌宿主に形質転換で導入される。

【0437】

哺乳動物発現ベクターは、複製起点、好適なプロモーターおよびエンハンサー、ならびにまた任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、転写終結配列、および5' 隣接非転写配列を含むことになる。そのようなプロモーターは、例えばヒトサイトメガロウイルス (CMV-IEプロモーター) または単純ヘルペスウイルス1型 (HSV TKプロモーター) などの、ウイルス源に由来することもある。SV40スプライス部位およびポリアデニル化部位に由来する核酸配列を使用して、必要非転写遺伝子エレメントを得ることができる。

【0438】

組換え発現ベクターを使用して、本明細書に記載のペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを増幅することおよび発現させることができる。組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子に由来する好適な転写または翻訳調節エレメントに作動的に連結されたペプチドまたは生物学的同等アナログをコードする合成またはcDNA由来のDNA断片を有する、複製可能なDNA構築物である。転写単位は、本明細書で詳細に記載されるような、(1) 遺伝子発現において調節的役割を果たす遺伝子エレメント (単数または複数)、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサーと、(2) mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造配列またはコード配列と、(3) 適切な転写および翻訳開始および終結配列との会合体を一般に含む。そのような調節エレメントは、転写を制御するためのオペレーター配列を含み得る。複製起点と形質転換体の認識を助長するための選択遺伝子とによって通常は付与される、宿主における複製能力を、さらに組み込むことができる。DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合、作動的に連結されている。例えば、シグナルペプチド (分泌リーダー) のDNAは、ポリペプチドの分泌に関与する前駆体としてそれが発現される場合、ポリペプチドのDNAに作動的に連結されており、プロモーターは、それが配列の転写を制御する場合、コード配列に作動的に連結されており、またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするように配置されている場合、コード配列に作動的に連結されている。一般に、作動的に連結した／された／されているは、連続していることを意味し、分泌リーダーの場合は、連続しており、リーディングフレーム内にあることを意味する。酵母発現系における使用が意

図される構造エレメントは、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。あるいは、組換えタンパク質がリーダーまたは輸送配列なしで発現される場合、それは、N末端メチオニン残基を含み得る。その後、この残基を発現された組換えタンパク質から必要に応じて切断して最終産物を得ることができる。

【0439】

一般に、組換え発現ベクターは、複製起点と、宿主細胞の形質転換を可能にする選択可能なマーカー、例えば、*E. coli* のアンピシリン耐性遺伝子および *S. cerevisiae* TRP1 遺伝子と、下流の構造配列の転写を指令するための高度に発現される遺伝子に由来するプロモーターとを含むことになる。そのようなプロモーターは、数ある中でも特に 3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、酸性ホスファターゼまたは熱ショックタンパク質などの、糖分解酵素をコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳開始および終結配列、ならびに一部の実施形態では、細胞膜周辺腔または細胞外培地への翻訳タンパク質の分泌を指令することができるリーダー配列と、適切な期に会合される。必要に応じて、異種配列は、所望の特性、例えば、発現された組換え産物の安定化または精製の単純化をもたらす、N末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。

【0440】

本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ユビキチン化シグナル配列、および／または標的化配列、例えば、結果して生じるペプチドの小胞体への移動を助長するための小胞体 (ER) シグナル配列も、含むことができる。

【0441】

一部の実施形態では、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドを、ウイルスまたは細菌ベクターによって投与することおよび／または発現させることができる。発現ベクターの例としては、ワクシニアまたは鶏痘などの、弱毒化ウイルス宿主が挙げられる。この手法の例として、ワクシニアウイルスは、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターとして使用される。免疫化プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば、米国特許第 4,722,848 号に記載されている。別のベクターは、BCG (カルメット・ゲラン桿菌) である。BCG ベクターは、Stover et al., Nature 351:456-460 (1991) によって記載されている。

【0442】

本明細書に記載のネオ抗原性ポリペプチドの治療的投与または免疫化に有用な多種多様な他のベクター、例えば、アデノおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、*Salmonella Typhimurium* ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター、センダイウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、カナリア痘ベクター、ならびに鶏痘ベクターなどが、本明細書における記載から当業者に明らかになる。一部の実施形態では、ベクターは、改変ワクシニア・アンカラ (VA) (例えば、*Bavarian Noridic* (MVA-BN)) である。

【0443】

本開示の実施の際に使用することができるベクターの中で、レトロウイルス遺伝子移入法を用いて細胞の宿主ゲノムへの組込みが可能であり、これは、挿入された導入遺伝子の長期発現を生じさせる結果となることが多い。一部の実施形態では、レトロウイルスは、レンチウイルスである。加えて、多くの異なる細胞型および標的組織において高い形質導入効率が観察されている。レトロウイルスの向性は、外来性エンベロープタンパク質を組み込み、標的タンパク質の潜在的標的集団を拡大することによって、変更することができる。ある特定の細胞型のみがレンチウイルスに感染するような、挿入された導入遺伝子の条件的発現を可能にするように、レトロウイルスを操作することもできる。細胞型特異的プロモーターを使用して、特異的細胞型における発現を標的化することができる。レンチウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである (およびしたがって、レンチウイルスベクターとレトロウイルスベクターの両方を本開示の実施の際に使用することができる

）。さらに、レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入することまたは非分裂細胞を感染させることができ、通常は、高いウイルス力価を生じさせることができる。したがって、レトロウイルス遺伝子移入系の選択は、標的組織に依存し得る。レトロウイルスベクターは、最大6～10 kbの外來配列のパッケージング能があるシス作用性の長い末端反復配列から構成される。最小シス作用性LTRは、所望の核酸を標的細胞に組み込んで永続的発現をもたらすために後に使用されるベクターの複製およびパッケージングに十分なものである。本開示の実施の際に使用することができる、広く使用されているレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、およびこれらの組合せに基づくものが挙げられる (例えば、Buchsch et al., (1992) J. Virol. 66:2731-2739; Johann et al., (1992) J. Virol. 66:1635-1640; Somnerfelt et al., (1990) Virol. 176:58-59; Wilson et al., (1998) J. Virol. 63:2374-2378; Miller et al., (1991) J. Virol. 65:2220-2224; PCT/US94/05700を参照されたい)。

【0444】

最小非霊長類レンチウイルスベクター、例えば、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV) に基づくレンチウイルスベクターも、本開示の実施の際に有用である。これらのベクターは、標的遺伝子の発現を駆動するサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを有し得る。したがって、本開示は、本開示の実施の際に有用なベクターの中でも、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを含むウイルスベクターを企図している。

【0445】

アデノウイルスベクターも、本開示の実施の際に有用である。1つの利点は、移入された核酸の高度な発現をもたらす様々な哺乳動物細胞および組織に組換え遺伝子を *in vitro* および *in vivo* で効率的に移入し、そこで発現させる組換えアデノウイルスの能力である。さらに、静止細胞を生産的に感染させる能力は、組換えアデノウイルスベクターの有用性を拡大する。加えて、高い発現レベルは、免疫応答を生じさせるのに十分なレベルに核酸の産物が発現されることになることを保証する (例えば、これにより参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,029,848号を参照されたい)。

【0446】

本開示の実施の際に有用なアデノウイルスベクターについては、米国特許第6,955,808号に言及される。使用されるアデノウイルスベクターは、Ad5、Ad35、Ad11、C6およびC7ベクターからなる群から選択することができる。アデノウイルス5 (「Ad5」) ゲノムの配列は、公開されている。(Chroboczek, J., Bieber, F., and Jacrot, B. (1992) The Sequence of the Genome of Adenovirus Type 5 and Its Comparison with the Genome of Adenovirus Type 2, Virology 186, 280-285; この内容は、これにより参照により本明細書に組み込まれる)。Ad35ベクターは、米国特許第6,974,695号、同第6,913,922号および同第6,869,794号に記載されている。Ad11ベクターは、米国特許第6,913,922号に記載されている。C6アデノウイルスベクターは、米国特許第6,780,407号、同第6,537,594号、同第6,309,647号、同第6,265,189号、同第6,156,567号、同第6,090,393号、同第5,942,235号および同第5,833,975号に記載されている。C7ベクターは、米国特許第6,277,558号に記載されている。E1欠損もしくは欠失型、E3欠損もしくは欠失型、および／またはE4欠損もしくは欠失型であるアデノウイルスベクターも、使用することができる。E1領域に突然変異を有する、ある特定のアデノウイルスは、E1欠損アデノウイルス突然変異体が非許容細胞では複製することができないかまたは少なくとも高度に弱毒化されているので、改善

された安全マージンを有する。E 3 領域の突然変異を有するアデノウイルスは、アデノウイルスがMHCクラスI分子を下方調節する機序を破壊することにより増強された免疫原性を有し得る。E 4 突然変異を有するアデノウイルスは、後期遺伝子発現の抑制のため、低下したアデノウイルスベクター免疫原性を有し得る。そのようなベクターは、同ベクターを利用する反復再ワクチン接種が所望される場合に特に有用であり得る。E 1、E 3、E 4；E 1とE 3；およびE 1とE 4が欠失または突然変異しているアデノウイルスベクターを本開示に従って使用することができる。

【0447】

さらに、全てのウイルス遺伝子が欠失している「ガットレス」アデノウイルスベクターも、本開示に従って使用することができる。そのようなベクターは、それらの複製のためにヘルパーウイルスを必要とし、自然環境には存在しない条件である、E 1aとCreの両方を発現する特殊なヒト293細胞系を必要とする。そのような「ガットレス」ベクターは、非免疫原性であり、したがって、これらのベクターを再ワクチン接種のために複数回接種することができる。「ガットレス」アデノウイルスベクターを、異種インサート／遺伝子、例えば、本開示の導入遺伝子の挿入に使用することができ、多数の異種インサート／遺伝子の同時送達にも使用することができる。

【0448】

一部の実施形態では、送達は、単回追加免疫用量であることもある、アデノウイルスによる送達である。一部の実施形態では、アデノウイルスは、複数用量によって送達される。in vivo送達に関して、AAVは、毒性が低いこと、およびそれが宿主ゲノムに組み込まれないので挿入突然変異を引き起こす確率が低いことから、他のウイルスベクターより有利である。AAVは、4.5または4.75 Kbのパッケージング限界を有する。4.5または4.75 Kbより大きい構築物は、ウイルス産生を有意に低減させる結果となる。核酸分子発現を駆動するために使用することができる多くのプロモーターがある。AAV ITRは、プロモーターとしての機能を果たすことができ、追加のプロモーターエレメントの必要をなくするのに有利である。

【0449】

普遍的発現には、以下のプロモーターを使用することができる：CMV、CAG、CBh、PGK、SV40、フェリチン重鎖または軽鎖など。脳での発現には、以下のプロモーターを使用することができる：全てのニューロンのためにシナプシンI、興奮性ニューロンのためにCaMK IIアルファ、GABA作動性ニューロンのためにGAD67またはGAD65またはVGATなど。RNA合成を駆動するために使用されるプロモーターとしては、U6またはH1などの、Pol IIプロモーターを挙げることができる。Pol IIプロモーターおよびイントロンカセットの使用は、ガイドRNA (gRNA)を発現するために使用され得る。本開示の実施の際に有用なAAVベクターに関しては、米国特許第5658785号、同第7115391号、同第7172893号、同第6953690号、同第6936466号、同第6924128号、同第6893865号、同第6793926号、同第6537540号、同第6475769号および同第6258595号、ならびにこれらに引用されている文献に言及される。AAVについては、AAVは、AAV1、AAV2、AAV5、またはこれらの任意の組合せであり得る。標的とされ得る細胞に関してAAVを選択することができ、例えば、脳または神経細胞を標的化するためにAAV血清型1、2、5もしくはハイブリッドカプシドAAV1、AAV2、AAV5またはこれらの任意の組合せを選択することができ、心組織を標的化するためにAAV4を選択することができる。AAV8は、肝臓への送達に有用である。一部の実施形態では、送達は、AAVによる送達である。投薬量を、あらゆる副作用に対する治療利益のバランスを取るように調整することができる。

【0450】

一部の実施形態では、ボックスウイルスは、本明細書に記載の組成物に使用される。これらには、オルソボックスウイルス、トリボックス、ワクシニア、MVA、NYVAC、カナリア痘、ALVAC、鶏痘、TROVACなどが含まれる（例えば、Verardi

10

20

30

40

50

et al., Hum. Vaccin. Immunother. 2012 Jul; 8 (7) : 961-70; および Moss, Vaccine. 2013; 31 (39) : 4220-4222 を参照されたい)。ポックスウイルス発現ベクターは、1982年に記載され、あっという間に、ワクチン開発はもちろん多くの分野での研究にも広く使用されるようになった。このベクターの利点としては、単純な構築、大量の外来DNAに適応する能力、および高い発現レベルが挙げられる。本開示の実施の際に使用することができるポックスウイルス、例えば、なかなずく、Chordopoxvirinae サブファミリーのポックスウイルス（脊椎動物のポックスウイルス）、例えば、オルソポックスウイルスおよびトリポックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス（例えば、Wyeth 株、WR 株（例えば、ATCC（登録商標）VR-1354）、コペンハーゲン株、NYVAC、NYVAC. 1、NYVAC. 2、MVA、MVA-BN）、カナリア痘ウイルス（例えば、Wheatley C93 株、ALVAC）、鶏痘ウイルス（例えば、FP9 株、Webster 株、TROVAC）、ハト痘（dovepox）、ハト痘（pigeonpox）、ウズラ痘、およびアライグマボックス、とりわけ、これらの合成組換え体または天然に存在しない組換え体、それらの使用、ならびにそのような組換え体を作製および使用するための方法に関する情報は、科学文献および特許文献において見つけることができる。

【0451】

一部の実施形態では、ワクシニアウイルスは、抗原を発現させるために疾患ワクチンまたは免疫原性組成物において使用される。（Rolph et al., Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. Curr. Opin. Immunol. 9:517-524, 1997）。組換えワクシニアウイルスは、感染した宿主細胞の細胞質内で複製することができる、したがって、目的のポリペプチドが、免疫応答を誘導することができる。さらに、ポックスウイルスは、免疫細胞、特に、抗原提示細胞を直接感染させることによって、コードされている抗原を、主要組織適合遺伝子複合体クラスⅠ経路によるプロセッシングの標的にするそれらの能力のため、しかしまた自己アジュバントに対するそれらの能力に起因して、ワクチンまたは免疫原性組成物ベクターとして広く使用されている。

【0452】

一部の実施形態では、ALVAC は、疾患ワクチンまたは免疫原性組成物においてベクターとして使用されている。ALVAC は、外来導入遺伝子を発現するように改変することができるカナリア痘ウイルスであり、原核生物抗原と真核生物抗原の両方に対するワクチン接種のための方法として使用されている（Horig H, Lee DS, Conkright W, et al. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. Cancer Immunol. Immunother. 2000; 49:504-14; von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, et al. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. Clin. Cancer. Res. 2000; 6:2219-28; Musey L, Ding Y, Elizaga M, et al. HIV-1 vaccination administered intramuscularly can induce both systemic and mucosal T cell immunity in HIV-1-uninfected individuals. J. Immunol. 2003; 171:1094-101; Paoletti E. Applications of pox virus vectors

10

20

30

40

50

to vaccination: an update. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1996; 93: 11349-53; 米国特許第7, 255, 862号)。第I相臨床試験で、腫瘍抗原CEAを発現するALVACウイルスは、選択された患者において卓越した安全性プロファイルを示し、CEA特異的T細胞応答の増加をもたらしたが、客観的臨床応答は観察されなかった(Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, et al. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 332-7)。

10

【0453】

一部の実施形態では、改変ワクシニア・アンカラ(MVA)ウイルスを抗原ワクチンまたは免疫原性組成物のためのウイルスベクターとして使用することができる。MVAは、オルソポックスウイルス科のメンバーであり、ワクシニアウイルスのアンカラ株のニトリ胚線維芽細胞(CVA)での約570回の連続継代によって生成された(例えば、Mayr, A., et al., Infection 3, 6-14, 1975を参照されたい)。これらの継代の結果として、得られるMVAウイルスは、CVAと比較して31キロ塩基少ないゲノム情報を含み、高度に宿主細胞拘束性である(Meyer, H. et al., J. Gen. Virol. 72, 1031-1038, 1991)。MVAは、その極度の弱毒化、すなわち、毒性または感染能力の低下を特徴とするが、卓越した免疫原性をなお保持する。様々な動物モデルで試験されたとき、MVAは、免疫抑制個体においても無毒であることが証明された。さらに、MVA-BN(登録商標)-HER2は、HER-2陽性乳がんの処置のために設計された候補免疫療法であり、現在、臨床試験中である。(Mandl et al., Cancer Immunol. Immunother. Jan 2012; 61(1): 19-29)。組換えMVAを作製および使用する方法は、記載されている(例えば、これによりその全体が組み込まれる米国特許第8, 309, 098号および同第5, 185, 146号を参照されたい)。

20

【0454】

ポリペプチドの発現のための好適な宿主細胞は、適切なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母、昆虫または高等真核細胞を含む。原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、E. coliまたは桿菌を含む。高等真核細胞は、哺乳動物由来の樹立細胞系を含む。無細胞翻訳系を利用することもできるだろう。細菌、真菌、酵母および哺乳動物細胞宿主とともに使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、当技術分野において周知である(Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985を参照されたい)。

30

【0455】

様々な哺乳動物または昆虫細胞培養系も、組換えタンパク質を発現させるために有利に利用される。哺乳動物細胞において組換えタンパク質の発現を行うことができる。なぜなら、そのようなタンパク質が、一般に、正しくフォールディングされ、適切に修飾され、完全に機能性であるからである。好適な哺乳動物宿主細胞系の例としては、Gluzman(Cell 23: 175, 1981)により記載されたサル腎臓細胞のCOS-7系、ならびに例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、293、HeLaおよびBHK細胞系を含む、適切なベクターを発現することができる他の細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、発現されることになる遺伝子に連結されている好適なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに5'または3'非翻訳配列、例えば、必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、および転写終結配列を含むことができる。昆虫細胞における異種タン

40

50

パク質の産生のためのバキュロウイルス系は、Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988) により概説されている。

【0456】

宿主細胞は、例えばクローニングベクターまたは発現ベクターであり得る、ベクターで遺伝子操作される（形質導入または形質転換またはトランスフェクトされる）。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。操作された宿主細胞を、プロモーターの活性化、形質転換体の選択またはポリヌクレオチドの増幅のために必要に応じて改変された従来の栄養培地で培養することができる。温度、pHなどのような培養条件は、発現のために選択される宿主細胞に関して以前に使用されたものであり、当業者には明らかであるだろう。

10

【0457】

適切な宿主の代表例として、細菌細胞、例えば、E. coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimuriumならびにPseudomonas、StreptomycesおよびStaphylococcus属の中の様々な種；真菌細胞、例えば酵母；昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエおよびSf9；；動物細胞、例えば、Gluzman, Cell 23:175 (1981) により記載された、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7細胞系、ならびに適合性ベクターを発現することができる他の細胞系、例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞系またはBows黒色腫、植物細胞などを挙げることができる。適切な宿主の選択は、本明細書における教示から当業者の範囲内であると思われる。

20

【0458】

好適なベクターおよび制御配列を利用して、酵母、昆虫または哺乳動物細胞宿主を使用することもできる。哺乳動物発現系の例としては、Gluzman, Cell 23:175 (1981) により記載された、サル腎臓線維芽細胞のCOS-7系、ならびに適合性ベクターを発現することができる他の細胞系、例えば、C127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞系が挙げられる。

【0459】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを、ヒト細胞（例えば、樹状細胞を含む、免疫細胞）に投与することおよび発現させることができる。ヒトコドン使用頻度表を使用して、各アミノ酸についてのコドン選択を導くことができる。そのようなポリヌクレオチドは、上記のものなどの、エピトープおよび／もしくはアナログ間にスパーサーアミノ酸残基を含み、またはエピトープおよび／もしくはアナログ（ならびに／またはCTL（例えば、CD8⁺）、Th（例えば、CD4⁺）およびB細胞エピトープ）に隣接する天然に存在する隣接配列を含むことができる。

30

【0460】

当業者に周知の標準的調節配列を、ヒト標的細胞における発現を確実にするためにベクターに含めることができる。いくつかのベクターエレメントが望ましい：ポリヌクレオチド、例えばミニ遺伝子挿入、のための下流クローニング部位を伴うプロモーター；効率的転写終結のためのポリアデニル化シグナル；E. coli複製起点；E. coli選択可能マーカー（例えば、アンピシリンまたはカナマイシン耐性）。非常に多くのプロモーター、例えば、ヒトサイトメガロウイルス（hCMV）プロモーターを、このために使用することができる。例えば、他の好適なプロモーター配列については米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号を参照されたい。一部の実施形態では、プロモーターは、CMV-IEプロモーターである。

40

【0461】

真核生物宿主、特に、哺乳動物またはヒトに有用な発現ベクターとしては、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルスからの発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、公知の細菌プラスミド、例えば、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体を含む、Escherichia coliからのプラスミド、より広い宿主範囲プラスミ

50

ド、例えば、M13 および糸状一本鎖DNAファージが挙げられる。

【0462】

ベクターをいくつかの異なる方法により動物組織に導入することができる。2つの最も評判のよい手法は、標準的な皮下針を使用する、食塩水中のDNAの注射、および遺伝子銃送達である。DNAワクチンプラスミドの構築およびこれら2つの方法による宿主へのその後のその送達についての概要の要旨は、Scientific American (Weiner et al., (1999) Scientific American 281 (1): 34-41) で説明されている。食塩水での注射は、通常は、骨格筋内への筋肉内注射で(IM)、または皮内注射で(ID)行われ、DNAが細胞外空間に送達される。これを、電気穿孔により、ブピバカインなどの筋毒素で筋肉繊維を一時的に損傷させることにより、または食塩水もしくはスクロースの高張性溶液を使用することにより、支援することができる(Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410)。この送達方法に対する免疫応答は、針の種類、針の配列、注射速度、注射体積、筋肉の種類、注射される動物の年齢、性別および生理的状态を含む多くの要因による影響を受け得る(Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410)。

10

【0463】

他の一般に使用されている送達方法である遺伝子銃送達は、促進剤として圧縮ヘリウムを使用して、標的細胞への金またはタングステン微粒子に吸着されたプラスミドDNA (pDNA) を弾道的に加速させる(Alarcon et al., (1999). Adv. Parasitol. Advances in Parasitology 42: 343-410; Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88)。

20

【0464】

代替送達方法としては、鼻または肺粘膜などの粘膜表面に対するネイキッドDNAのエアロゾル滴下(Lewis et al., (1999). Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88) および眼および腔粘膜へのpDNAの局所投与(Lewis et al., (1999) Advances in Virus Research (Academic Press) 54: 129-88) を挙げることができる。粘膜表面送達はまた、カチオン性リポソーム-DNA調製物、生体内分解性マイクロスフェア、腸管粘膜への経口投与のための弱毒化ShigellaまたはListeriaベクター、および組換えアデノウイルスベクターを使用して達成されている。細胞膜を軽度機械的に破壊して細胞を一時的に透過性にした後、DNAまたはRNAを細胞に送達することもできる。膜のそのような軽度の機械的破壊は、小さい開口部を通して細胞を穏やかに押し出すことによって果たすことができる(Sharei et al., Ex Vivo Cytosolic Delivery of Functional Macromolecules to Immune Cells, PLOS ONE (2015))。

30

40

【0465】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段としては、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、および脂質に基づく系が挙げられ、脂質に基づく系は、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む。in vitroおよびin vivoで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。非ウイルス送達系が利用される場合、例示的な送達媒体は、リポソームである。「リポソーム」は、密閉脂質二重層または凝集体の生成により形成される様々な単一および多層脂質ビヒクルを包含する一般的な用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜と内部の水性媒体とを

50

伴う小胞構造を有することを特徴とし得る。多層リポソームは、水性媒体によって隔てられた複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰な水溶液に懸濁されると自発的に形成される。脂質成分は、自己再構成を経た後、閉じた構造を形成し、脂質二重層間に水および溶解した溶質を封入する（G h o s h e t a l . , G l y c o b i o l o g y 5 : 5 0 5 - 1 0 (1 9 9 1) ）。しかし、正常な小胞構造とは異なる構造を溶液中で有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造をとることもあり、または単に脂質分子の不均一な凝集体として存在することもある。リポフェクタミン-核酸複合体も考えられる。

【0466】

宿主細胞への核酸の（*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*での）導入のために脂質製剤の使用が企図される。別の態様では、核酸は、脂質を伴うこともある。脂質を伴う核酸は、リポソームの水性の内部に封入されていることもあり、リポソームの脂質二重層内に散在していることもあり、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方に付随する連結分子を介してリポソームに結合していることもあり、リポソームに封入されていることもあり、リポソームと複合体化していることもあり、脂質を含有する溶液に分散していることもあり、脂質と混合されていることもあり、脂質と化合していることもあり、脂質中に懸濁液として含有されることもあり、ミセルとともに含有されるもしくはミセルと複合体化していることもあり、または脂質を別様に伴うこともある。脂質、脂質／DNAまたは脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液中でいずれの特定の構造にも限定されない。例えば、それらは、二重層構造内に、ミセルとして、または「つぶれた」構造で存在することがある。それらは、溶液中に単に散在していることもあり、したがって、サイズまたは形状が均一でない凝集体を形成する可能性がある。脂質は、天然に存在する脂質であることもまたは合成脂質であることもある、脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質中に天然に存在する脂肪液滴、ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドなどの、長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含有する化合物のクラスを含む。

【0467】

使用に好適な脂質は、商業的供給源から入手することができる。例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma、St. Louis、Mo. から入手することができ、リン酸ジセチル（「DCP」）は、K & K Laboratories（Plainview、N. Y.）から入手することができ、コレステロール（「Choi」）は、Calbiochem-Behringから入手することができ、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.（Birmingham、Ala.）から入手することができるだろう。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中の脂質の保存液を、約-20℃で保管することができる。クロロホルムは、メタノールより容易に蒸発するので、単なる溶媒として使用される。

【0468】

一部の実施形態では、ベクターは、第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとをコードする、ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1および第2のペプチドは、同じタンパク質に由来する。少なくとも2つの明確に異なるペプチドは、長さ、アミノ酸配列または両方が異なり得る。ペプチドは、腫瘍特異的突然変異を含有することが分かっているまたは判明した任意のタンパク質に由来する。一部の実施形態では、ベクターは、タンパク質の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1のペプチドは、第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは、突然変異を含み、第2のネオエピトープは、同じ突然変異を含む。一部の実施形態では、ベクターは、タンパク質の第1の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドと、同じタンパク質の第2の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドとを含み、第1の領域は、第2の領域の少なくとも1個のアミノ酸を含み、第1のペプチドは、第2のペプ

10

20

30

40

50

チドとは異なり、第1のネオエピトープは、第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープは、第2の突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の突然変異と第2の突然変異は同じである。一部の実施形態では、突然変異は、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0469】

一部の実施形態では、ベクターは、プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ベクターは、自己増幅RNAレプリコン、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、ウイルスまたはビリオンである。一部の実施形態では、ベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、ワクシニアウイルス、B型肝炎ウイルス、ヒトパピローマウイルスまたはこれらの偽型に由来する。一部の実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、ナノ粒子、カチオン性脂質、カチオン性ポリマー、金属ナノポリマー、ナノロッド、リボソーム、ミセル、マイクロバブル、細胞透過性ペプチド、またはリボスフィアである。

T細胞受容体

【0470】

一態様では、本開示は、免疫応答性細胞（例えば、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR））を活性化するネオ抗原認識受容体を発現する細胞、および免疫応答の増強を必要とする疾患の処置のためにそのような細胞を使用する方法を提供する。そのような細胞としては、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドの1つを結合する抗原認識受容体（例えば、TCRまたはCAR）を発現する遺伝子改変された免疫応答性細胞（例えば、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL（例えば、CD8⁺））細胞、ヘルパーTリンパ球（Th（例えば、CD4⁺））細胞）が挙げられる。したがって、抗原特異的免疫応答の増加が望まれる新生物および他の病理の処置のための使用方法。T細胞活性化は、抗原を標的とするTCRまたはCARにより媒介される。

【0471】

本開示は、免疫応答性細胞（例えば、TCR、CAR）を活性化する抗原認識受容体とキメラ共刺激受容体（CCR）との組合せを発現する細胞、および免疫応答の増強を必要とする疾患の処置のためにそのような細胞を使用する方法を提供する。一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的T細胞、NK細胞、CTL細胞、または他の免疫応答性細胞は、新生物の処置または予防のための1つまたは複数の共刺激リガンドの選択的富化のための運搬体として使用される。そのような細胞は、特定のがんの処置または予防のために、それを必要とするヒト対象に投与される。

【0472】

一部の実施形態では、本開示の方法において使用することができる腫瘍抗原特異的ヒトリンパ球としては、限定ではないが、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球（Sadelain, M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45）、aおよびpヘテロダイマーを含む全長腫瘍抗原認識T細胞受容体複合体を発現するように遺伝子改変された末梢ドナーリンパ球（Morgan, R. A., et al. 2006 Science 314:126-129）、腫瘍生検の腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）に由来するリンパ球培養物（Panelli, M. C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M. C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392）、および人工抗原提示細胞（AAPC）またはパルス樹状細胞を用いて選択的にin vitro拡大増殖された抗原特異的末梢血白血球（Dupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G. A., et al. 2003 B

lood 102:2498-2505) が挙げられる。T細胞は、自己由来、同種異系、または操作された前駆もしくは幹細胞から *in vitro* で導出してもよい。

【0473】

一部の実施形態では、免疫療法薬は、操作された受容体である。一部の実施形態では、操作された受容体は、キメラ抗原受容体 (CAR)、T細胞受容体 (TCR)、またはB細胞受容体 (BCR)、養子T細胞療法 (ACT)、またはそれらの誘導体である。他の態様では、操作された受容体は、キメラ抗原受容体 (CAR) である。一部の態様では、CARは、第1世代CARである。他の態様では、CARは、第2世代CARである。さらに他の態様では、CARは、第3世代CARである。一部の態様では、CARは、細胞外部分、膜貫通部分、および細胞内部分を含む。一部の態様では、細胞内部分は、少なくとも1つのT細胞共刺激ドメインを含む。一部の態様では、T細胞共刺激ドメインは、CD27、CD28、TNFRS9 (4-1BB)、TNFRSF4 (OX40)、TNFRSF8 (CD30)、CD40LG (CD40L)、ICOS、ITGB2 (LFA-1)、CD2、CD7、KLRC2 (NKG2C)、TNFRS18 (GITR)、TNFRSF14 (HVEM)、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

10

【0474】

一部の態様では、操作された受容体は、標的を結合する。一部の態様では、結合は、疾患または状態に罹患している1つまたは複数の対象に特異的なペプチドに対して特異的である。

【0475】

一部の態様では、免疫療法薬は、本明細書に詳細に記載されているような細胞である。一部の態様では、免疫療法薬は、本明細書に記載のペプチドまたはネオエピトープを特異的に結合する受容体を含む細胞である。一部の態様では、免疫療法薬は、本開示のペプチド／核酸と組み合わせて使用される細胞である。一部の実施形態では、細胞は、患者細胞である。一部の実施形態では、細胞は、T細胞である。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍浸潤性リンパ球である。

20

【0476】

一部の態様では、状態または疾患を有する対象は、対象のT細胞受容体レパートリーに基づいて処置される。一部の実施形態では、ペプチドまたはネオエピトープは、対象のT細胞受容体レパートリーに基づいて選択される。一部の実施形態では、対象は、本明細書に記載のようなペプチドまたはネオエピトープに特異的なTCRを発現するT細胞で処置される。一部の実施形態では、対象は、TCR、例えば対象特異的TCRに特異的なペプチドまたはネオエピトープで処置される。一部の実施形態では、対象は、TCR、例えば対象特異的TCRを発現するT細胞に特異的なペプチドまたはネオエピトープで処置される。一部の実施形態では、対象は、対象特異的TCRに特異的なペプチドまたはネオエピトープで処置される。

30

【0477】

一部の実施形態では、本明細書に記載のような組成物は、1つまたは複数の対象で同定されたTCRに基づいて選択される。一部の実施形態では、T細胞レパートリーの同定および機能アッセイでの試験を使用して、状態または疾患を有する1つまたは複数の対象に投与されることになる組成物を決定する。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載のような1つまたは複数のペプチドまたはタンパク質を含む抗原ワクチンである。一部の実施形態では、ワクチンは、対象特異的なネオ抗原性ペプチドを含む。一部の実施形態では、ワクチンに含まれることになるペプチドは、ネオエピトープに結合する対象特異的TCRの定量化に基づいて選択される。一部の実施形態では、ペプチドは、TCRに対するペプチドの結合親和性に基づいて選択される。一部の実施形態では、選択は、量および結合親和性の両方の組合せに基づく。例えば、機能アッセイではネオエピトープに強力に結合するが、TCRレパートリーではあまり目立たないTCRが、抗原ワクチンの良好な候補であり得、それは、TCRを発現するT細胞が有利に増幅され得るからである。

40

【0478】

50

一部の実施形態では、1つまたは複数の対象に投与するためのペプチドまたはタンパク質は、TCRに対する結合に基づいて選択される。一部の実施形態では、疾患または状態を有する対象に由来するT細胞などのT細胞を拡大増殖することができる。ネオ抗原性ペプチドまたはネオエピトープに特異的なTCRを発現する拡大増殖されたT細胞を、対象に投与して戻すことができる。一部の実施形態では、好適な細胞、例えばPBMCに、ネオ抗原性ペプチドまたはネオエピトープに特異的なTCRの発現のためのポリヌクレオチドを形質導入またはトランスフェクトし、対象に投与する。ネオ抗原性ペプチドまたはネオエピトープに特異的なTCRを発現するT細胞を拡大増殖し、対象に投与して戻すことができる。一部の実施形態では、自己疾患組織と共にインキュベートすると細胞溶解活性をもたらす、ネオ抗原性ペプチドまたはネオエピトープに特異的なTCRを発現するT細胞を拡大増殖し、対象に投与することができる。一部の実施形態では、機能アッセイで使い、ネオ抗原性ペプチドまたはネオエピトープへの結合をもたらしたT細胞を拡大増殖し、対象に投与することができる。一部の実施形態では、対象特異的ネオ抗原性ペプチドまたはネオエピトープに結合することが決定されているTCRをT細胞で発現させ、対象に投与することができる。

【0479】

実施形態では、本開示は、第1のネオエピトープを含む第1のペプチドおよび第2のネオエピトープを含む第2のペプチドを含む組成物であって、第1のペプチドが第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープが突然変異を含み、第2のネオエピトープが同じ突然変異を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、第1のネオエピトープに特異的な第1のT細胞受容体(TCR)を含む第1のT細胞、および第2のネオエピトープに特異的な第2のTCRを含む第2のT細胞を含む。一部の実施形態では、第1および第2のペプチドは、同じタンパク質に由来する。

【0480】

別の実施形態では、本開示は、タンパク質の第1の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドおよび同じタンパク質の第2の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドを含む組成物であって、第1の領域が第2の領域の少なくとも1つのアミノ酸を含み、第1のペプチドが第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープが第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープが第2の突然変異を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、第1のネオエピトープに特異的な第1のT細胞受容体(TCR)を含む第1のT細胞、および第2のネオエピトープに特異的な第2のTCRを含む第2のT細胞を含む。一部の実施形態では、第1の突然変異および第2の突然変異は同じである。

【0481】

一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、クラスIHLAタンパク質に結合して、クラスIHLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、クラスIIHLAタンパク質に結合して、クラスIIHLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、クラスIIHLAタンパク質に結合して、クラスIIHLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、クラスIHLAタンパク質に結合して、クラスIHLA-ペプチド複合体を形成する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、CD8⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第1のネオエピトープは、CD4⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、CD4⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、第2のネオエピトープは、CD8⁺T細胞を活性化する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞のTCRは、クラスIIHLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞のTCRは、クラスIIHLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD8⁺T細胞のTCRは、クラスIHLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、CD4⁺T細胞のTCRは、クラスIHLA-ペプチド複合体に結合する。

【0482】

一部の実施形態では、第1のTCRは、第1のネオエピトープに特異的な第1のキメラ抗原受容体であり、第2のTCRは、第2のネオエピトープに特異的な第2のキメラ抗原受容体である。一部の実施形態では、第1のT細胞は、細胞傷害性T細胞である。一部の実施形態では、第1のT細胞は、ガンマデルタT細胞である。一部の実施形態では、第2のT細胞は、ヘルパーT細胞である。一部の実施形態では、第1および／または第2のTCRは、1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM、または10nM未満の K_D または IC_{50} で、HLA-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のTCRは、1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM、または10nM未満の K_D または IC_{50} で、HLAクラスI-ペプチド複合体に結合する。一部の実施形態では、第1および／または第2のTCRは、2,000、1,500、1,000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM、または10nM未満の K_D または IC_{50} で、HLAクラスII-ペプチド複合体に結合する。

抗原提示細胞

【0483】

ネオ抗原性ペプチドまたはタンパク質は、本明細書に記載のようなペプチド、タンパク質、またはポリヌクレオチドを含有する抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）として提供することができる。他の実施形態では、そのような抗原提示細胞は、患者に使用するためのT細胞を刺激するために使用される。したがって、本開示の一実施形態は、本明細書に記載の1つまたは複数のネオ抗原性ペプチドまたはポリヌクレオチドでパルスまたは負荷された少なくとも1つの抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を含有する組成物である。一部の実施形態では、そのようなAPCは、自己由来である（例えば、自己樹状細胞）。あるいは、患者から単離された末梢血単核細胞（PBMC）に、ネオ抗原性ペプチドまたはポリヌクレオチドをex vivoで負荷してもよい。関連する実施形態では、そのようなAPCまたはPBMCは、注射して患者に戻される。一部の実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞である。関連する実施形態では、樹状細胞は、ネオ抗原性ペプチドまたは核酸でパルスされた自己樹状細胞である。ネオ抗原性ペプチドは、適切なT細胞応答を生じさせる任意の好適なペプチドであってもよい。腫瘍関連抗原に由来するペプチドでパルスされた自己樹状細胞を使用するT細胞療法は、Murphy et al. (1996) The Prostate 29, 371-380およびTjua et al. (1997) The Prostate 32, 272-278に開示されている。一部の実施形態では、T細胞は、CTL（例えば、 $CD8^+$ ）である。一部の実施形態では、T細胞は、ヘルパーTリンパ球（Th（例えば、 $CD4^+$ ））である。

【0484】

一部の実施形態では、本開示は、対象に投与することもできる細胞に基づく免疫原性医薬組成物を含む組成物を提供する。例えば、抗原提示細胞（APC）に基づく免疫原性医薬組成物は、当技術分野において適切であり理解されている周知の技法、担体、および賦形剤のいずれかを使用して製剤化することができる。APCとしては、単球、単球由来細胞、マクロファージ、および樹状細胞が挙げられる。ある場合には、APCに基づく免疫原性医薬組成物は、樹状細胞に基づく免疫原性医薬組成物であってもよい。

【0485】

樹状細胞に基づく免疫原性医薬組成物は、当技術分野で周知の任意の方法により調製することができる。一部の場では、樹状細胞に基づく免疫原性医薬組成物は、ex vivoまたはin vivo法により調製することができる。ex vivo法は、患者への投与の前に本明細書に記載のポリペプチドを用いてex vivoでパルスしてDCを活性化または負荷した自己DCの使用を含んでもよい。in vivo法は、本明細書に記載のポリペプチドとカップリングされている抗体を使用して、特異的DC受容体を標的とすることを含んでもよい。DCに基づく免疫原性医薬組成物は、TLR3、TL

R-7~8、およびCD40アゴニストなどのDC活性化因子をさらに含んでもよい。DCに基づく免疫原性医薬組成物は、アジュバントおよび薬学的に許容される担体をさらに含んでもよい。

【0486】

抗原提示細胞（APC）は、ヒトおよび非ヒト霊長類、他の哺乳動物、ならびに脊椎動物を含む、様々な供給源から調製することができる。ある特定の実施形態では、APCは、ヒトまたは非ヒト脊椎動物の血液から調製することができる。APCは、白血球の富化集団から分離することもできる。白血球の集団は、当業者に公知の方法により調製することができる。そのような方法としては、典型的には、ヘパリン添加血液の収集、アフレーションまたは白血球フェレーション、バフィーコートの調製、ロゼット形成、遠心分離、密度勾配遠心分離（例えば、フィコール、コロイド状シリカ粒子、およびスクロースを使用して）、非白血球細胞の差次的溶解、および濾過が挙げられる。白血球集団は、対象から血液を収集し、除細動（defibrillating）して血小板を除去し、赤血球細胞を溶解することによっても調製することができる。白血球集団は、必要に応じて、単球性樹状細胞前駆体を富化してもよい。

10

【0487】

血液細胞集団は、白血球の富化集団の所望の使用に応じて、様々な対象から得ることができる。対象は、健康な対象であってもよい。あるいは、血液細胞は、例えば、がん患者または免疫刺激が有益となる他の患者など、免疫刺激を必要とする対象から得ることができる。同様に、血液細胞は、例えば、自己免疫障害（例えば、関節リウマチ、糖尿病、狼瘡、および多発性硬化症など）を有する患者など、免疫抑制を必要とする対象から得ることができる。白血球の集団は、HLA一致の健康な個体から得ることもできる。

20

【0488】

APCの供給源として血液を使用する場合、血液白血球は、それらの生存能力を維持する従来法を使用して得ることができる。本開示の一態様によると、血液は、ヘパリンまたは他の適切な抗凝固剤を含有してもしなくてもよい媒体に希釈してもよい。血液の媒体に対する体積は約1対1であり得る。細胞は、媒体中の血液の4℃での約1,000rpm（150g）での遠心分離により濃縮することができる。血小板および赤血球細胞は、赤血球を溶解する当技術分野で公知の任意の数の溶液、例えば塩化アンモニウムに細胞を再懸濁することにより枯渇させることができる。例えば、混合物は、体積で約1：1の媒体および塩化アンモニウムであってもよい。血小板および赤血球細胞を実質的に含まない白血球の集団が得られるまで、細胞を遠心分離により濃縮し、所望の溶液で洗浄することができる。組織培養において一般的に使用される任意の等張溶液を、血小板および赤血球細胞から血液白血球を分離するための媒体として使用することができる。そのような等張溶液の例は、リン酸緩衝食塩水、ハンクス平衡塩類溶液、および完全増殖培地であってもよい。APCおよび／またはAPC前駆細胞は、水簸により精製することもできる。

30

【0489】

一実施形態では、APCは、炎症または別様の活性化状態下では非ノミナルAPC（non-nominal APC）であってもよい。例えば、非ノミナルAPCとしては、インターフェロングammaで刺激された上皮細胞、APC活性を誘導する因子または条件により活性化されたT細胞、B細胞、および／または単球を挙げることができる。そのような非ノミナルAPCは、当技術分野で公知の方法により調製することができる。

40

【0490】

APCは、APCのタイプに応じて、所望の場合、培養、拡大増殖、分化、および／または成熟させてもよい。APCは、例えば、培養プレート、フラスコ、培養バッグ、およびバイオリアクターなどの任意の適切な培養容器で培養することができる。

【0491】

ある特定の実施形態では、調製物中のAPCの数を維持および／または拡大増殖させるために、APCを、好適な培養または増殖培地中で培養することができる。培養培地は、単離されたAPCのタイプに応じて選択することができる。例えば、成熟樹状細胞などの

50

成熟APCを、それらの維持および拡大増殖に好適な増殖培地中で培養することができる。培養培地には、アミノ酸、ビタミン、抗生物質、および二価カチオンなどを補充することができる。加えて、サイトカイン、増殖因子、および／またはホルモンが、増殖培地に含まれていてもよい。例えば、成熟樹状細胞の維持および／または拡大増殖のために、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）および／またはインターロイキン4（IL-4）などのサイトカインを添加することができる。他の実施形態では、未成熟APCを、培養および／または拡大増殖してもよい。未成熟樹状細胞は、標的mRNAを取り込み、新しい抗原をプロセッシングする能力を保持することができる。一部の実施形態では、未成熟樹状細胞は、それらの維持および培養に好適な培地で培養することができる。培養培地には、アミノ酸、ビタミン、抗生物質、および二価カチオンなどを補充することができる。加えて、サイトカイン、増殖因子、および／またはホルモンが、増殖培地に含まれていてもよい。

10

【0492】

他の未成熟APCも同様に培養または拡大増殖させることができる。未成熟APCの調製物を成熟させて成熟APCを形成することができる。APCの成熟は、ネオ抗原性ペプチドへの曝露中または曝露後に生じてよい。ある特定の実施形態では、未成熟樹状細胞の調製物を成熟させてもよい。好適な成熟因子としては、例えば、サイトカインTNF- α および細菌産物（例えば、BCG）などが挙げられる。別の態様では、単離されたAPC前駆体を使用して、未成熟APCの調製物を調製することができる。APC前駆体を、培養、分化、および／または成熟させることができる。ある特定の実施形態では、単球性樹状細胞前駆体を、アミノ酸、ビタミン、サイトカイン、および／または二価カチオンを補充した好適な培養培地の存在下で培養して、単球性樹状細胞前駆体の未成熟樹状細胞への分化を促進させることができる。一部の実施形態では、APC前駆体は、PBMCから単離される。PBMCは、ドナー、例えばヒトドナーから得ることができ、新鮮なまま使用しても、または将来の使用のために凍結してもよい。一部の実施形態では、APCは、1つまたは複数のAPC調製物から調製される。一部の実施形態では、APCは、第1および第2のネオエピトープを含む第1および第2のネオ抗原性ペプチド、または第1および第2のネオエピトープを含む第1および第2のネオ抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドで負荷したAPCを含む。一部の実施形態では、APCは、自己APC、同種異系APC、または人工APCである。

20

30

【0493】

実施形態では、本開示は、第1のネオエピトープを含む第1のペプチドおよび第2のネオエピトープを含む第2のペプチドを含むAPCを含む組成物であって、第1のペプチドが第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープが突然変異を含み、第2のネオエピトープが同じ突然変異を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、第1および第2のペプチドは、同じタンパク質に由来する。別の実施形態では、本開示は、タンパク質の第1の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドおよび同じタンパク質の第2の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドを含むAPCを含む組成物であって、第1の領域が第2の領域の少なくとも1つのアミノ酸を含み、第1のペプチドが第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープが第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープが第2の突然変異を含む、組成物を提供する。一部の実施形態では、第1の突然変異および第2の突然変異は同じである。

40

アジュバント

【0494】

アジュバントを使用して、本明細書で提供されるような組成物を受けている患者において誘発される免疫応答（体液性および／または細胞性）を増強することができる。ある場合には、アジュバントは、Th1型応答を誘発することができる。他の場合では、アジュバントは、Th2型応答を誘発することができる。Th1型応答は、IL-4、IL-5、およびIL-10などのサイトカインの産生により特徴付けることができるTh2型応答とは対照的に、IFN- γ などのサイトカインの産生により特徴付けることができる。

50

【0495】

一部の態様では、MPLAおよびMDPなどの脂質に基づくアジュバントを、本明細書で開示される免疫原性医薬組成物と共に使用することができる。例えば、モノホスホリルリピドA (MPLA) は、特定のTリンパ球に対するリポソーム抗原提示の増加を引き起こすアジュバントである。加えて、ムラミルジペプチド (MDP) も、本明細書に記載の免疫原性医薬製剤と併せて好適なアジュバントとして使用することができる。

【0496】

好適なアジュバントは当技術分野で公知であり (WO2015/095811を参照)、これらに限定されないが、ポリ (I:C)、ポリ-ICLC、Hiltonol、STINGアゴニスト、1018ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド、ImuFact IMP321、ISパッチ、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、モノホスホリルリピドA、Montanide IMS1312、Montanide ISA206、Montanide ISA50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel (登録商標)、ベクター系、PLG微粒子、レシキモド、SRL172、ピロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、ベクターグルカン、Pam3Cys、Pam3CSK4、サポニン、マイコバクテリア抽出物、および合成細菌細胞壁模倣物に由来するAquilaのQS21 Stimulon (Aquila Biotech、Worcester、マサチューセッツ州、米国)、ならびにRibidiのDetox、QuilまたはSuperfosなど他の有標アジュバントが挙げられる。アジュバントとしては、不完全フロイントまたはGM-CSFも挙げられる。樹状細胞に特異的ないくつかの免疫学的アジュバント (例えば、MF59) およびそれらの調製は、以前に記載されている (Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186 (1): 18-27; Allison AC; Dev. Biol. Stand. 1998; 92: 3-11) (Mosca et al. Frontiers in Bioscience, 2007; 12: 4050-4060) (Gamvrellis et al. Immunol & Cell Biol. 2004; 82: 506-516)。サイトカインも使用することができる。いくつかのサイトカインは、リンパ組織への樹状細胞遊走に影響を及ぼすこと (例えば、TNF- α)、Tリンパ球に対する効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速させること (例えば、GM-CSF、PGE1、PGE2、IL-1、IL-1b、IL-4、IL-6、およびCD40L) (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,849,589号)、および免疫アジュバントとして作用すること (例えば、IL-12) に直接的に関連付けられている (Gabrilovich DI, et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6): 414-418)。

【0497】

また、アジュバントは、サイトカインなどの刺激性分子を含むことができる。サイトカインの非限定的な例としては：CCL20、 α -インターフェロン (IFN- α)、 β -インターフェロン (IFN- β)、 γ -インターフェロン、血小板由来増殖因子 (PDGF)、TNF α 、TNF β (リンホトキシン α (LT α))、GM-CSF、表皮増殖因子 (EGF)、皮膚T細胞誘引ケモカイン (CTACK)、上皮胸腺発現ケモカイン (TECK)、粘膜関連上皮ケモカイン (MEC)、IL-12、IL-15、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-1a、MIP-1 γ 、IL-8、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF

、IL-18の突然変異型形態、CD40、CD40L、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、神経成長因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Fas、Fasリガンド、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IKB、不活性型NIK、SAP K、SAP-I、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKリガンド、Ox40、Ox40リガンド、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、およびTAP2が挙げられる。

10

【0498】

追加のアジュバントとしては：MCP-1、MIP-1a、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18の突然変異型形態、CD40、CD40L、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、IL-22、神経成長因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNF受容体、Fas、Fasリガンド、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IKB、不活性型NIK、SAP K、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKリガンド、Ox40、Ox40リガンド、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2、およびそれらの機能性断片が挙げられる。

20

【0499】

一部の態様では、アジュバントは、トール様受容体のモジュレーターであってもよい。トール様受容体のモジュレーターの例としては、TLR-9アゴニストが挙げられ、イミキモドなどのトール様受容体の小分子モジュレーターに限定されない。本明細書に記載の免疫原性医薬組成物と組み合わせて使用されるアジュバントの他の例としては、これらに限定されないが、サポニンおよびCpG ODNなどを挙げることができる。ある場合には、アジュバントは、細菌トキソイド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックポリマー、アルミニウム塩、リポソーム、CpGポリマー、水中油型エマルジョン、またはそれらの組合せから選択される。ある場合には、アジュバントは、水中油型エマルジョンである。水中油型エマルジョンは、少なくとも1つの油および少なくとも1つの界面活性剤を含んでもよく、油および界面活性剤は、生分解性（代謝性）および生体適合性である。エマルジョン中の油滴は、直径が5 μm未満であってもよく、サブミクロンの直径を有する場合さえあり、これらの小さなサイズは、安定エマルジョンを提供するためにマイクロフルイダイザーを用いて達成される。サイズが220 nm未満の液滴は、フィルター滅菌に供することができる。

30

40

処置方法および医薬組成物

【0500】

本明細書に記載のネオ抗原治療薬（例えば、ペプチド、ポリヌクレオチド、TCR、CAR、TCRまたはCARを含有する細胞、ポリペプチドを含有するAPCまたは樹状細胞、ポリヌクレオチドを含有する樹状細胞、抗体など）は、これらに限定されないが、がんの処置など、治療的処置方法を含む様々な応用に有用である。一部の実施形態では、治療的処置方法は、免疫療法を含む。ある特定の実施形態では、ネオ抗原性ペプチドは、免疫応答を活性化、促進、増加、および／もしくは増強する、既存の免疫応答を新しい標的

50

に方向付け直す、腫瘍の免疫原性を増加させる、腫瘍成長を阻害する、腫瘍体積を低減させる、腫瘍細胞アポトーシスを増加させる、ならびに／または腫瘍の腫瘍形成性を低減させるために有用である。使用方法は、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*法であってもよい。

【0501】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドまたはタンパク質を使用して対象の免疫応答を活性化するための方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドを使用して対象の免疫応答を促進するための方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドを使用して対象の免疫応答を増加させるための方法を提供する。一部の実施形態では、本開示は、ネオ抗原性ペプチドを使用して免疫応答を増強するための方法を提供する。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、細胞媒介性免疫を増加させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、T細胞活性または体液性免疫を増加させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、CTLまたはTh活性を増加させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、NK細胞活性を増加させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、T細胞活性を増加させることおよびNK細胞活性を増加させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、CTL活性を増加させることおよびNK細胞活性を増加させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答の活性化、促進、増加、および／または増強は、T制御性(Treg)細胞の抑制活性を阻害または減少させることを含む。一部の実施形態では、免疫応答は、抗原刺激の結果である。一部の実施形態では、抗原刺激は、腫瘍細胞である。一部の実施形態では、抗原刺激は、がんである。

【0502】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドを使用して、免疫応答を活性化、促進、増加、および／または増強する方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、ネオ抗原性ペプチドまたはポリヌクレオチドを腫瘍細胞へと送達する治療有効量のネオ抗原性ペプチドを投与するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、腫瘍細胞により内部移行される治療有効量のネオ抗原性ペプチドを投与するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、腫瘍細胞により内部移行される治療有効量のネオ抗原性ペプチドを投与するステップを含み、ネオ抗原性ペプチドは細胞によりプロセッシングされる。一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、腫瘍細胞により内部移行される治療有効量のネオ抗原性ポリペプチドを投与するステップを含み、ネオエпитープが腫瘍細胞の表面に提示される。一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、腫瘍細胞により内部移行され、細胞によりプロセッシングされる治療有効量のネオ抗原性ポリペプチドを投与するステップを含み、抗原性ペプチドが腫瘍細胞の表面に提示される。

【0503】

一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、少なくとも1つのネオ抗原性ペプチドを含む外因性ポリペプチドを腫瘍細胞へと送達する本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原性ペプチドまたはポリヌクレオチドを投与するステップを含み、ネオ抗原性ペプチドに由来する少なくとも1つのネオエピトープが、腫瘍細胞の表面に提示される。一部の実施形態では、抗原性ペプチドは、MHCクラスI分子と複合体を形成して腫瘍細胞の表面に提示される。一部の実施形態では、ネオエピトープは、MHCクラスII分子と複合体を形成して腫瘍細胞の表面に提示される。

【0504】

一部の実施形態では、方法は、腫瘍細胞を、少なくとも1つのネオ抗原性ペプチドを含む外因性ポリペプチドを腫瘍細胞へと送達する本明細書に記載のネオ抗原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと接触させるステップを含み、少なくとも1つのネオ抗原性ペプ

チドに由来する少なくとも1つのネオエピトープが、腫瘍細胞の表面に提示される。一部の実施形態では、ネオエピトープは、MHCクラスI分子と複合体を形成して腫瘍細胞の表面に提示される。一部の実施形態では、ネオエピトープは、MHCクラスII分子と複合体を形成して腫瘍細胞の表面に提示される。

【0505】

一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、少なくとも1つの抗原性ペプチドを含む外因性ポリペプチドを腫瘍細胞へと送達する本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与するステップを含み、ネオエピトープが腫瘍細胞の表面に提示され、腫瘍細胞に対する免疫応答が誘導される。一部の実施形態では、腫瘍細胞に対する免疫応答が増加される。一部の実施形態では、ネオ抗原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、少なくとも1つのネオ抗原性ペプチドを含む外因性ポリペプチドを腫瘍細胞へと送達し、ネオエピトープが腫瘍細胞の表面に提示され、腫瘍成長が阻害される。

10

【0506】

一部の実施形態では、方法は、それを必要とする対象に、少なくとも1つのネオ抗原性ペプチドを含む外因性ポリペプチドを腫瘍細胞へと送達する本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与するステップを含み、少なくとも1つのネオ抗原性ペプチドに由来するネオエピトープが、腫瘍細胞の表面に提示され、腫瘍細胞に対して方向付けられるT細胞死滅が誘導される。一部の実施形態では、腫瘍細胞に対して方向付けられるT細胞死滅が増強される。一部の実施形態では、腫瘍細胞に対して方向付けられるT細胞死滅が増加される。

20

【0507】

一部の実施形態では、対象の免疫応答を増加させる方法は、本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原性治療薬を対象に投与するステップを含み、作用剤は、本明細書に記載のネオ抗原を特異的に結合する抗体である。一部の実施形態では、対象の免疫応答を増加させる方法は、治療有効量の抗体を対象に投与するステップを含む。

【0508】

本開示は、既存の免疫応答を腫瘍に方向付け直す方法を提供する。一部の実施形態では、既存の免疫応答を腫瘍に方向付け直す方法は、本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与するステップを含む。一部の実施形態では、既存の免疫応答は、ウイルスに対してである。一部の実施形態では、ウイルスは、麻疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV；チキンポックスウイルス）、インフルエンザウイルス、おたふく風邪ウイルス、ポリオウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、A型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、およびサイトメガロウイルス（CMV）からなる群から選択される。一部の実施形態では、ウイルスは、水痘帯状疱疹ウイルスである。一部の実施形態では、ウイルスは、サイトメガロウイルスである。一部の実施形態では、ウイルスは、麻疹ウイルスである。一部の実施形態では、既存の免疫応答は、自然ウイルス感染後に獲得されている。一部の実施形態では、既存の免疫応答は、ウイルスに対するワクチン接種後に獲得されている。一部の実施形態では、既存の免疫応答は、細胞媒介性応答である。一部の実施形態では、既存の免疫応答は、細胞傷害性T細胞（CTL）またはTh細胞を含む。

30

40

【0509】

一部の実施形態では、既存の免疫応答を対象の腫瘍に方向付け直す方法は、（i）ネオ抗原を特異的に結合する抗体および（ii）本明細書に記載の少なくとも1つのネオ抗原性ペプチドを含む融合タンパク質を投与するステップを含み、（a）融合タンパク質は、腫瘍関連抗原またはネオエピトープに結合した後、腫瘍細胞により内部移行され、（b）ネオ抗原性ペプチドは、プロセッシングされ、MHCクラスI分子に付随して腫瘍細胞の表面に提示され、（c）ネオ抗原性ペプチド/MHCクラスI複合体は、細胞傷害性T細胞により認識される。一部の実施形態では、細胞傷害性T細胞は、メモリーT細胞である。一部の実施形態では、メモリーT細胞は、ネオ抗原性ペプチドによるワクチン接種の結果

50

である。

【0510】

本開示は、腫瘍の免疫原性を増加させる方法を提供する。一部の実施形態では、腫瘍の免疫原性を増加させる方法は、腫瘍または腫瘍細胞を、本明細書に記載の有効量のネオ抗原治療薬と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、腫瘍の免疫原性を増加させる方法は、本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与するステップを含む。

【0511】

また、本開示は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬を使用して腫瘍の成長を阻害するための方法を提供する。ある特定の実施形態では、腫瘍の成長を阻害する方法は、細胞混合物をネオ抗原治療薬と *in vitro* で接触させるステップを含む。例えば、免疫細胞（例えば、T細胞）と混合された不死化細胞系またはがん細胞系を、ネオ抗原性ペプチドが添加されている培地中で培養する。一部の実施形態では、腫瘍細胞を、患者試料、例えば、組織生検、胸水、または血液試料から単離し、免疫細胞（例えば、T細胞）と混合し、ネオ抗原治療薬が添加されている培地中で培養する。一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、免疫細胞の活性を増加、促進、および／または増強する。一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、腫瘍細胞成長を阻害する。一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、腫瘍細胞の死滅を活性化する。

【0512】

ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は腫瘍を有するか、または対象は少なくとも部分的に除去された腫瘍を有していた。

【0513】

一部の実施形態では、腫瘍の成長を阻害する方法は、治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与することを含む、既存の免疫応答を新しい標的に方向付け直すステップを含み、既存の免疫応答は、ネオ抗原性ペプチドにより腫瘍細胞に送達された抗原性ペプチドに対してである。一部の実施形態では、処置方法は、ペプチドを投与する前に、ペプチドが、対象により特異的に発現される少なくとも1つまたは複数のHLAサブタイプに結合するように、対象において発現される1つまたは複数のHLAサブタイプを同定するステップを含む。一部の実施形態では、表34から選択される1つまたは複数の突然変異型BTKペプチドを対象に投与する場合、投与されたペプチドが、対象により特異的に発現される少なくとも1つまたは複数のHLAサブタイプに結合するように、表34のペプチドに対応するHLAサブタイプの発現の事前決定が、対象において実施される。一部の実施形態では、方法は、HLA-C14:02アレル、HLA-C14:03アレル、HLA-A33:03アレル、HLA-C04:01アレル、HLA-B15:09アレル、またはHLA-B38:02アレルによりコードされるタンパク質を対象が発現することを決定するステップを含み、治療薬は、アミノ酸配列EYMANGLSLを有する突然変異型BTKペプチドを含む。一部の実施形態では、方法が、HLA-C02:02アレル、HLA-C03:02アレル、HLA-B53:01アレル、HLA-C12:02アレル、HLA-C12:03アレル、HLA-A36:01アレル、HLA-A26:01アレル、HLA-A25:01アレル、HLA-B57:01アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-B46:01アレル、HLA-B15:03アレル、HLA-A33:03アレル、HLA-B35:03アレル、またはHLA-A11:01アレルのいずれか1つによりコードされるタンパク質を対象が発現することを決定するステップを含む場合、治療薬は、アミノ酸配列MANGSLNLYを有する突然変異型BTKペプチドを含む。一部の実施形態では、方法は、HLA-A02:04アレル、HLA-A02:03アレル、HLA-C03:02アレル、HLA-A03:01アレル、HLA-A32:01アレル、HLA-A02:07アレル、HLA-C14:03アレル、HLA-C14:02アレル、HLA-A31:01アレル、HLA-A30:02アレル、HLA-A74:01アレル、HLA-C06:02アレル、HLA-B15:03アレル、HLA-B46:01アレル、HLA-B13:02アレル、HLA-A25:01アレル、

10

20

30

40

50

H L A - A 2 9 : 0 2 アレル、または H L A - C 0 1 : 0 2 アレルのいずれか 1 つによりコードされるタンパク質を対象が発現することを決定するステップを含み、治療薬は、アミノ酸配列 S L L N Y L R E M を有する突然変異型 B T K ペプチドを含む。

【 0 5 1 4 】

一部の実施形態では、方法は、H L A - B 1 4 : 0 2 アレル、H L A - B 4 9 : 0 1 アレル、H L A - B 4 4 : 0 3 アレル、H L A - B 4 4 : 0 2 アレル、H L A - B 3 7 : 0 1 アレル、H L A - B 1 5 : 0 9 アレル、H L A - B 4 1 : 0 1、または H L A - B 5 0 : 0 1 アレルのいずれか 1 つによりコードされるタンパク質を対象が発現することを決定するステップを含み、治療薬は、アミノ酸配列 T E Y M A N G S L を有する突然変異型 B T K ペプチドを含む。

10

【 0 5 1 5 】

ある特定の実施形態では、腫瘍は、がん幹細胞を含む。ある特定の実施形態では、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度は、ネオ抗原治療薬の投与により低減される。一部の実施形態では、対象の腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減する方法であって、治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与するステップを含む方法が提供される。

【 0 5 1 6 】

加えて、一部の態様では、本開示は、対象の腫瘍の腫瘍形成性を低減させる方法であって、本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、がん幹細胞を含む。一部の実施形態では、腫瘍の腫瘍形成性は、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度を低減させることにより低減される。一部の実施形態では、方法は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬を使用するステップを含む。ある特定の実施形態では、腫瘍におけるがん幹細胞の頻度は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬の投与により低減される。

20

【 0 5 1 7 】

一部の実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。ある特定の実施形態では、腫瘍は、結腸直腸腫瘍、膵臓腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、肝臓腫瘍、乳房腫瘍、腎臓腫瘍、前立腺腫瘍、神経内分泌腫瘍、胃腸管腫瘍、黒色腫、子宮頸部腫瘍、膀胱腫瘍、神経膠芽腫、および頭頸部腫瘍からなる群から選択される腫瘍である。ある特定の実施形態では、腫瘍は、結腸直腸腫瘍である。ある特定の実施形態では、腫瘍は、卵巣腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は、乳房腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は、肺腫瘍である。ある特定の実施形態では、腫瘍は、膵臓腫瘍である。ある特定の実施形態では、腫瘍は、黒色腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。

30

【 0 5 1 8 】

本開示は、対象のがんを処置するための方法であって、本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与するステップを含む方法をさらに提供する。

【 0 5 1 9 】

一部の実施形態では、がんを処置する方法は、既存の免疫応答を新しい標的に方向付け直すステップを含み、治療有効量のネオ抗原治療薬を対象に投与するステップを含み、既存の免疫応答は、ネオ抗原性ペプチドによりがん細胞に送達された抗原性ペプチドに対してである。

40

【 0 5 2 0 】

本開示は、がんを処置する方法であって、本明細書に記載の治療有効量のネオ抗原治療薬を対象（例えば、処置を必要とする対象）に投与するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は、がん性腫瘍を有する。ある特定の実施形態では、対象は、腫瘍を少なくとも部分的に除去したことがある。

【 0 5 2 1 】

対象は、例えば、哺乳動物、ヒト、妊婦、高齢者、成人、青年、前青年、子供、幼児、乳児、新生児、または新生児であってもよい。対象は、患者であってもよい。一部の場合では、対象はヒトであってもよい。一部の場合では、対象は、子供（すなわち、思春期

50

年齢未満の若年ヒト）であってもよい。一部の場合では、対象は乳児であってもよい。一部の場合では、対象は、人工栄養乳児であってもよい。一部の場合では、対象は、臨床研究に登録されている個人であってもよい。一部の場合では、対象は、実験動物、例えば、哺乳動物またはげっ歯動物であってもよい。一部の場合では、対象は、マウスであってもよい。一部の場合では、対象は、肥満または太りすぎの対象であってもよい。

【0522】

一部の実施形態では、対象は、1つまたは複数の異なるがん治療法で以前に処置されたことがある。一部の実施形態では、対象は、放射線療法、化学療法、または免疫療法の1つまたは複数で以前に処置されたことがある。一部の実施形態では、対象は、1、2、3、4、または5つの以前の療法で処置されたことがある。一部の実施形態では、以前の療法は、細胞傷害性療法である。

10

【0523】

ある特定の実施形態では、がんは、結腸直腸がん、膵臓がん、肺がん、卵巣がん、肝臓がん、乳がん、腎臓がん、前立腺がん、胃腸管がん、黒色腫、子宮頸部がん、神経内分泌がん、膀胱がん、神経膠芽腫、および頭頸部がんからなる群から選択されるがんである。ある特定の実施形態では、がんは、膵臓がんである。ある特定の実施形態では、がんは、卵巣がんである。ある特定の実施形態では、がんは、結腸直腸がんである。ある特定の実施形態では、がんは、乳がんである。ある特定の実施形態では、がんは、前立腺がんである。ある特定の実施形態では、がんは、肺がんである。ある特定の実施形態では、がんは、黒色腫である。一部の実施形態では、がんは、固形がんである。一部の実施形態では、がんは、固形腫瘍を含む。

20

【0524】

一部の実施形態では、がんは、血液学的がんである。一部の実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病（AML）、ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞急性リンパ性白血病（T-ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄性白血病（CML）、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、および皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）からなる群から選択される。

【0525】

一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、併用療法として投与される。2つまたはそれよりも多くの治療剤との併用療法は、必須ではないが、異なる作用機序により作用する作用剤を使用する。異なる作用機序を有する作用剤を使用する併用療法は、相加または相乗効果をもたらすことができる。併用療法は、各作用剤の用量を単剤療法で使用されるよりも低くすることを可能にし、それにより、作用剤の毒性副作用を低減することおよび／または治療指数を増加させることができる。併用療法は、抵抗性がん細胞が発生する可能性を減少させることができる。一部の実施形態では、併用療法は、免疫応答に影響を及ぼす（例えば、応答を増強または活性化する）治療剤、および腫瘍／がん細胞に影響を及ぼす（例えば、阻害または死滅させる）治療剤を含む。

30

【0526】

一部の場合では、免疫原性医薬組成物は、追加の作用剤と共に投与することができる。一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、免疫療法と共に投与することができる。免疫療法は、例えば、免疫チェックポイントを標的とする抗体であってもよい。一部の実施形態では、抗体は、二特異性抗体である。追加の作用剤の選択は、少なくとも部分的に、処置される状態に依存し得る。追加の作用剤としては、例えば、抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40、または抗TIM3作用剤（例えば、抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40、または抗TIM3抗体）などのチェックポイント阻害性作用剤；または例えば、NSAID、例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、アセトアミノフェン、ケトプロフェン、またはアスピリンなどの、炎症状態を処置するために使用される薬物を含む、病原体感染（例えば、ウイルス感染）に対して治療効果を有する任意の作用剤を挙げることができる。例えば、チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ（ONO-

40

50

4538/BMS-936558、MDX1 106、OPDIVO)、ペンブロリズマブ(MK-3475、KEYTRUDA)、ピジリズマブ(CT-011)、およびMPDL3280A(ROCHE)からなる群から選択されるPD-1/PD-L1アンタゴニストであってもよい。別の例として、製剤は、ビタミンC、Eまたは他の抗酸化剤などの1つまたは複数のサプリメントをさらに含有することができる。

【0527】

本開示の方法は、当技術分野で公知の任意のタイプのがんを処置するために使用することができる。本開示の方法により処置されるがんの非限定的な例としては、黒色腫(例えば、転移性悪性黒色腫)、腎がん(例えば、明細胞癌)、前立腺がん(例えば、ホルモン不応性前立腺腺癌)、膵臓腺癌、乳がん、結腸がん、肺がん(例えば、非小細胞肺癌)、食道がん、頭頸部扁平上皮癌、肝臓がん、卵巣がん、子宮頸部がん、甲状腺がん、神経膠芽腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫、および他の新生物悪性腫瘍を挙げることができる。

【0528】

加えて、本明細書で提供される疾患または状態は、本開示の処置方法を使用してその成長を阻害することができる難治性または再発性の悪性腫瘍を含む。一部の実施形態では、本開示の処置方法により処置されるがんは、癌腫、扁平上皮癌、腺癌、肉腫、子宮内膜がん、乳がん、卵巣がん、子宮頸部がん、卵管がん、原発性腹膜がん、結腸がん、結腸直腸がん、肛門性器領域扁平上皮癌、黒色腫、腎細胞癌、肺がん、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌、胃がん、膀胱がん、胆嚢がん、肝臓がん、甲状腺がん、喉頭がん、唾液腺がん、食道がん、頭頸部がん、神経膠芽腫、神経膠腫、頭頸部扁平上皮癌、前立腺がん、膵臓がん、中皮腫、肉腫、血液学のがん、白血病、リンパ腫、神経腫、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、本開示の方法により処置されるがんとしては、例えば、癌腫、扁平上皮癌(例えば、子宮頸管、眼瞼、結膜、膣、肺、口腔、皮膚、膀胱、舌、喉頭、および食道)、および腺癌(例えば、前立腺、小腸、子宮内膜、子宮頸管、大腸、肺、膵臓、食道、直腸、子宮、胃、乳腺、および卵巣)が挙げられる。一部の実施形態では、本開示の方法により処置されるがんとしては、肉腫(例えば、筋原性肉腫)、白血病、神経腫、黒色腫、およびリンパ腫がさらに挙げられる。一部の実施形態では、本開示の方法により処置されるがんは、乳がんである。一部の実施形態では、本開示の処置方法により処置されるがんは、三種陰性乳がん(TNBC)である。一部の実施形態では、本開示の処置方法により処置されるがんは、卵巣がんである。一部の実施形態では、本開示の処置方法により処置されるがんは、結腸直腸がんである。

【0529】

一部の実施形態では、本開示の医薬組成物で処置される患者または患者の集団は、固形腫瘍を有する。一部の実施形態では、固形腫瘍は、黒色腫、腎細胞癌、肺がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、胆嚢がん、喉頭がん、肝臓がん、甲状腺がん、胃がん、唾液腺がん、前立腺がん、膵臓がん、またはメルケル細胞癌である。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物で処置される患者または患者の集団は、血液学のがんを有する。一部の実施形態では、患者は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(「DLBCL」)、ホジキンリンパ腫(「HL」)、非ホジキンリンパ腫(「NHL」)、濾胞性リンパ腫(「FL」)、急性骨髄性白血病(「AML」)、または多発性骨髄腫(「MM」)などの血液学のがんを有する。一部の実施形態では、処置される患者または患者の集団は、卵巣がん、肺がん、および黒色腫からなる群から選択されるがんを有する。

【0530】

本開示に準じて予防および/または処置することができるがんの具体的な例としては、これらに限定されないが、以下が挙げられる：腎がん、腎臓がん、多形神経膠芽腫、転移性乳がん；乳癌；乳房肉腫；神経線維腫；神経線維腫症；小児腫瘍；神経芽細胞腫；悪性黒色腫；表皮癌；白血病、例えば、これらに限定されないが、急性白血病、急性リンパ球性白血病、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病性白血病、および骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome)などの急性骨髄性白血病、これらに限定されないが、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ球性白

10

20

30

40

50

血病、ヘアリー細胞白血病などの慢性白血病；真性赤血球増加症；これらに限定されないが、ホジキン病、非ホジキン病などのリンパ腫；これらに限定されないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌型骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫、および髄外形質細胞腫などの多発性骨髄腫；ワルデンストレームマクログロブリン血症；意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症；良性単クローン性高ガンマグロブリン血症；重鎖病；これらに限定されないが、骨の肉腫、骨髄腫骨疾患、多発性骨髄腫、コレステリン腫誘発性骨肉腫、骨パジェット病、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟組織肉腫、管肉腫（血管肉腫）、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、および滑膜肉腫などの骨がんおよび結合組織肉腫；これらに限定されないが、神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠腫、聴神経神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽細胞腫、および原発性脳リンパ腫などの脳腫瘍；これらに限定されないが、腺癌、小葉（小細胞）癌、腺管内癌、髄質乳がん、粘液性乳がん、管状乳がん、乳頭状乳がん、パジェット病（若年性パジェット病を含む）、および炎症性乳がんを含む乳がん；これらに限定されないが、褐色細胞腫および副腎皮質癌などの副腎がん；これらに限定されないが、乳頭状または濾泡性甲状腺がん、甲状腺髄様がん、および未分化甲状腺がんなどの甲状腺がん；これらに限定されないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドまたは膵島細胞腫瘍などの膵臓がん；これらに限定されないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症、および尿崩症（*diabetes insipidus*）などの下垂体がん；これらに限定されないが、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、および毛様体黒色腫などの眼黒色腫、ならびに網膜芽細胞腫などの眼のがん；扁平上皮癌、腺癌、および黒色腫などの膣がん；扁平上皮癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫、およびパジェット病などの外陰がん；これらに限定されないが、扁平上皮癌および腺癌などの子宮頸部がん；これらに限定されないが、子宮内膜癌および子宮肉腫などの子宮がん；これらに限定されないが、卵巣上皮癌、境界型腫瘍、胚細胞腫瘍、および間質腫瘍などの卵巣がん；子宮頸部癌；これらに限定されないが、扁平上皮がん、腺癌、腺様嚢胞癌（*adenoid cystic carcinoma*）、粘表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、疣贅癌、および燕麦細胞（小細胞）癌などの食道がん；これらに限定されないが、腺癌、菌状（ポリープ状）、潰瘍性、表在性拡大型、びまん性拡大型の悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および癌肉腫などの胃がん；結腸がん；結腸直腸がん、*KRAS*変異型結腸直腸がん；結腸癌；直腸がん；これらに限定されないが、肝細胞癌および肝芽腫などの肝臓がん、腺癌などの胆嚢がん；これらに限定されないが、乳頭状、結節性、およびびまん性などの胆管癌；*KRAS*変異型非小細胞肺癌、非小細胞肺癌、扁平上皮癌（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌、および小細胞肺癌などの肺癌；肺癌；これらに限定されないが、胚性腫瘍、セミノーマ、未分化、古典的（典型的）、精母細胞性、非セミノーマ性、胚性癌、奇形腫癌、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）などの精巣がん、これらに限定されないが、アンドロゲン非依存性前立腺がん、アンドロゲン依存性前立腺がん、腺癌、平滑筋肉腫、および横紋筋肉腫などの前立腺がん；ペナルがん（*penal cancer*）；これに限定されないが、扁平上皮癌などの口腔がん；基底がん（*basal cancer*）；これらに限定されないが、腺癌、粘表皮癌、および腺様嚢胞癌などの唾液腺がん；これらに限定されないが、扁平上皮がんおよびいぼ状などの咽頭がん；これらに限定されないが、基底細胞癌、扁平上皮癌、および黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、黒子悪性黒色腫、末端黒子型黒色腫などの皮膚がん；これらに限定されないが、腎細胞がん、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮がん（腎盂および／またはウテレル（*uterer*））などの腎臓がん；腎癌；ウィルムス腫瘍；これらに限定されないが、移行上皮癌、扁平上皮がん、腺癌、癌肉腫などの膀胱がん。加えて、がんとしては、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、および乳頭状腺癌が挙げられる。

【0531】

10

20

30

40

50

がんとしては、これらに限定されないが、B細胞がん、例えば、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、例えば、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、およびミュー鎖病などの重鎖病、良性単クローン性高ガンマグロブリン血症、および免疫細胞性アミロイドーシス、黒色腫、乳がん、肺がん、気管支がん、結腸直腸がん、前立腺がん（例えば、転移性、ホルモン不応性前立腺がん）、膵臓がん、胃がん、卵巣がん、膀胱がん、脳または中枢神経系がん、末梢神経系がん、食道がん、子宮頸部がん、子宮または子宮内膜がん、口腔または咽頭がん、肝臓がん、腎臓がん、精巣がん、胆道がん、小腸または虫垂がん、唾液腺がん、甲状腺がん、副腎がん、骨肉腫、軟骨肉腫、および血液学的組織のがんなどが挙げられる。本開示により包含される方法に適用可能ながんのタイプの他の非限定的な例としては、ヒト肉腫および癌種、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、結腸直腸がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞腫、胆管癌、肝臓がん、絨毛癌、セミノーマ、胚性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸部がん、骨がん、脳腫瘍、精巣がん、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫；白血病、例えば、急性リンパ球性白血病および急性骨髄球性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病性）；慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）；ならびに真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および重鎖病が挙げられる。一部の実施形態では、その表現型が本開示の方法により決定されるがんは、これらに限定されないが、膀胱がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、婦人科がん、腎がん、喉頭がん、肺がん、口腔がん、頭頸部がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、または皮膚がんなどの上皮がんである。他の実施形態では、がんは、乳がん、前立腺がん、肺がん、または結腸がんである。さらに他の実施形態では、上皮がんは、非小細胞肺がん、非乳頭状腎細胞癌、子宮頸部癌、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌）、または乳癌である。上皮がんは、これらに限定されないが、漿液性、類内膜性、粘液性、明細胞性、プレッナー性、または未分化を含む他の様々な様式で特徴付けることができる。一部の実施形態では、本開示は、これに限定されないがマントル細胞リンパ腫を含むリンパ腫またはそのサブタイプの処置、診断、および／または予後に使用される。リンパ増殖性障害も、増殖性疾患とみなされる。

【0532】

一部の実施形態では、本明細書に記載の作用剤と少なくとも1つの追加の治療剤との組合せは、相加的または相乗的な結果をもたらす。一部の実施形態では、併用療法は、作用剤の治療指数の増加をもたらす。一部の実施形態では、併用療法は、追加の治療剤の治療指数の増加をもたらす。一部の実施形態では、併用療法は、作用剤の毒性および／または副作用の減少をもたらす。一部の実施形態では、併用療法は、追加の治療剤の毒性および／または副作用の減少をもたらす。

【0533】

ある特定の実施形態では、方法または処置は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬を投与するステップに加えて、少なくとも1つの追加の治療剤を投与するステップをさらに含む。追加の治療剤は、作用剤の投与の前、同時、および／または後に投与することができる。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の治療剤は、1つ、2つ、3つ、またはそれよりも多くの追加の治療剤を含む。

【0534】

本明細書に記載のネオ抗原治療薬と組み合わせて投与することができる治療剤としては、化学療法剤が挙げられる。したがって、一部の実施形態では、方法または処置は、化学療法剤と組み合わせた、または化学療法剤のカクテルと組み合わせた本明細書に記載の作用剤の投与を含む。作用剤による処置は、化学治療薬の投与の前、同時、または後に行っ

10

20

30

40

50

てもよい。併用投与は、単一の医薬製剤でもしくは別々の製剤を使用してのいずれかでの同時投与、またはいずれの順序でもよいが、一般にすべての活性作用剤がそれらの生物学的活性を同時に発揮することができるような期間内での連続投与を含むことができる。そのような化学療法剤の調製および投薬スケジュールは、製造業者の使用説明書に従って、または熟練の開業医により経験的に決定されるように使用することができる。そのような化学療法薬の調製および投薬スケジュールは、The Chemotherapy Source Book, 4th Edition, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PAにも記載されている。

【0535】

化学療法剤の有用な種類としては、例えば、抗チューブリン剤、オーリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA複製阻害剤、アルキル化剤（例えば、シスプラチン、モノ（白金）、ビス（白金）、および三核白金錯体、およびカルボプラチンなどの白金錯体）、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸代謝拮抗剤、代謝拮抗薬、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ素化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソウレア、プラチノール、プリン代謝拮抗薬、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、またはビンカアルカロイドなどが挙げられる。ある特定の実施形態では、第2の治療剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、有糸分裂阻害薬、トポイソメラーゼ阻害剤、または血管新生阻害剤である。

【0536】

本開示に有用な化学療法剤としては、これらに限定されないが、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN）などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびビボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、ウレドーパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスファオルアミド（triethylenethiophosphoramidate）、およびトリメチルロロメラミン（trimethylololamelamine）を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン（methyamelamine）；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミン酸化物塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-2-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシンなどの抗生物質；メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）などの代謝拮抗薬；デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセートなどの葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シトシンアラビノシド、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤（anti-adrenal）；フォリン酸などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリ

10

20

30

40

50

ン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート（edatraxate）；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジコン；エルフォルミチン（elformithine）；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK；ラゾキサン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（Ara-C）；タキソイド、例えば、パクリタキセル（TAXOL）およびドセタキセル（TAXOTERE）；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金アナログ；ピンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；CPT11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタビン（XELODA）；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。また、化学療法剤としては、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン（FARESTON）を含む、抗エストロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤；ならびにフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。ある特定の実施形態では、追加の治療剤は、シスプラチンである。ある特定の実施形態では、追加の治療剤は、カルボプラチンである。

【0537】

ある特定の実施形態では、化学療法剤は、トポイソメラーゼ阻害剤である。トポイソメラーゼ阻害剤は、トポイソメラーゼ酵素（例えば、トポイソメラーゼIまたはII）の作用を妨げる化学療法剤である。トポイソメラーゼ阻害剤としては、これらに限定されないが、ドキソルビシンHCl、クエン酸ダウノルビシン、ミトキサントロンHCl、アクチノマイシンD、エトポシド、トポテカンHCl、テニポシド（VM-26）、およびイリノテカン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。一部の実施形態では、追加の治療剤は、イリノテカンである。

【0538】

ある特定の実施形態では、化学療法剤は、代謝拮抗薬である。代謝拮抗薬は、正常な生化学反応に必要な代謝物に類似する構造を有するが、細胞分裂などの細胞の1つまたは複数の正常機能を妨げるのに十分な程度に異なる化学物質である。代謝拮抗薬としては、これらに限定されないが、ゲムシタビン、フルオロウラシル、カペシタビン、メトトレキサートナトリウム、ラルイトレキセド（ralitrexed）、ペメトレキセド、テガフル、シトシンアラビノシド、チオグアニン、5-アザシチジン、6メルカプトプリン、アザチオプリン、6-チオグアニン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、およびクラドリビン、ならびにこれらのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。ある特定の実施形態では、追加の治療剤は、ゲムシタビンである。

【0539】

ある特定の実施形態では、化学療法剤は、これらに限定されないが、チューブリンを結合する作用剤を含む、抗有糸分裂剤である。一部の実施形態では、作用剤は、タキサンである。ある特定の実施形態では、作用剤は、パクリタキセルもしくはドセタキセル、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルの薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体である。ある特定の実施形態では、作用剤は、パクリタキセル（TAXOL）、ドセタキセ

ル (TAXOTERE)、アルブミン結合パクリタキセル (ABRAXANE)、DHA-パクリタキセル、またはPG-パクリタキセルである。ある特定の代替的实施形態では、抗有糸分裂剤は、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、もしくはビンデシンなどのピンカアルカロイド、またはその薬学的に許容される塩、酸、もしくは誘導体を含む。一部の实施形態では、抗有糸分裂剤は、キネシンEg5の阻害剤、またはオーロラAまたはPlk1などの有糸分裂キナーゼの阻害剤である。ある特定の实施形態では、追加の治療剤は、パクリタキセルである。一部の实施形態では、追加の治療剤は、アルブミン結合パクリタキセルである。

【0540】

一部の实施形態では、追加の治療剤は、小分子などの作用剤を含む。例えば、処置は、これらに限定されないが、EGFR、HER2 (ErbB2)、および／またはVEGFを含む腫瘍関連抗原に対する阻害剤として作用する小分子との、本開示の作用剤の併用投与を含んでいてもよい。一部の实施形態では、本開示の作用剤は、ゲフィチニブ (IRESSA)、エルロチニブ (TARCEVA)、スニチニブ (SUTENT)、ラパタニブ、バンデタニブ (ZACTIMA)、AEE788、C1-1033、セジラニブ (RECENTIN)、ソラフェニブ (NEXAVAR)、およびパゾパニブ (GW786034B) からなる群から選択されるプロテインキナーゼ阻害剤と組み合わせて投与される。一部の实施形態では、追加の治療剤は、mTOR阻害剤を含む。別の实施形態では、追加の治療剤は、Treg細胞の数を低減させる化学療法薬または他の阻害剤である。ある特定の实施形態では、治療剤は、シクロホスファミドまたは抗CTLA4抗体である。別の实施形態では、追加の治療薬は、骨髄由来サプレッサー細胞の存在を低減させる。さらなる实施形態では、追加の治療薬は、カルボタキソール (carboplatin) である。別の实施形態では、追加の治療剤は、細胞をTヘルパー1応答へとシフトさせる。さらなる实施形態では、追加の治療剤は、イブルチニブである。

【0541】

一部の实施形態では、追加の治療剤は、抗体などの生物学的分子を含む。例えば、処置は、これらに限定されないが、EGFR、HER2 / ErbB2、および／またはVEGFを結合する抗体を含む腫瘍関連抗原に対する抗体との、本開示の作用剤の併用投与を含んでいてもよい。ある特定の实施形態では、追加の治療剤は、がん幹細胞マーカーに特異的な抗体である。ある特定の实施形態では、追加の治療剤は、血管新生阻害剤である抗体 (例えば、抗VEGFまたはVEGF受容体抗体) である。ある特定の实施形態では、追加の治療剤は、ベバシズマブ (AVASTIN)、ラムシルマブ、トラスツズマブ (HERCEPTIN)、ペルツズマブ (OMNITARG)、パニツムマブ (VECTIBIX)、ニモツズマブ、ザルツムマブ、またはセツキシマブ (ERBITUX) である。

【0542】

本明細書で提供される作用剤および組成物は、単独で、または外科手術、放射線照射、化学療法、および／もしくは骨髄移植 (自己、同系、同種異系、または無関係) など、従来の治療レジメンと組み合わせて使用することができる。一組の腫瘍抗原が、例えば、がん患者の大部分で有用であり得る。

【0543】

一部の实施形態では、免疫原性ワクチンを含む組成物に加えて、少なくとも1つまたは複数の化学療法剤を投与してもよい。一部の实施形態では、1つまたは複数の化学療法剤は、異なる種類の化学療法剤に属していてもよい。

【0544】

化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、ナイトロジェンマスタードなどのアルキル化剤 (例えば、メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード)、クロラムブシル、シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標))、イホスファミド、およびメルファラン) ; ニトロソウレア (例えば、N-ニトロソー-N-メチル尿素、ストレプトゾシン、カルムスチン (BCNU)、ロムスチン、およびセムスチン) ; スルホン酸アルキル (例えば、ブスルファン) ; テトラジン (例えば、ダカルバジン (DTIC)、ミトゾロミ

10

20

30

40

50

ドおよびテモゾロミド (Temodar (登録商標)) ; アジリジン (例えば、チオテパ、ミトマイシン (mytomicin)、およびジアジコン) ; ならびに白金薬 (例えば、シスプラチン、カルボプラチン、およびオキサリプラチン) ; プロカルバジンおよびアルトレタミン (ヘキサメチルメラミン) などの非古典的アルキル化剤 ; 5-フルオウラシル (5-FU)、6-メルカプトプリン (6-MP)、カペシタビン (Xeloda (登録商標))、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン (Ara-C (登録商標))、デシタビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ネララビン、ゲムシタビン (Gemzar (登録商標))、ヒドロキシ尿素、メトトレキセート、ペメトレキセド (Alimta (登録商標))、ペントスタチン、チオグアニン、ビダーザなどの代謝拮抗剤 ; ビンカアルカロイド (例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンレルビン、ビンデシン、およびビンフルニン) などの抗微小管剤 ; タキサン (例えば、パクリタキセル (Taxol (登録商標))、ドセタキセル (Taxotere (登録商標)) ; ポドフィロトキシン (例えば、エトポシドおよびテニポシド) ; エポチロン (例えば、イクサベピロン (Ixempra (登録商標)) ; エストラムスチン (Emcyt (登録商標)) ; アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン、ドキシソルビシン (Adriamycin (登録商標))、エピルビシン、イダルビシン) などの抗腫瘍抗生物質 ; アクチノマイシナー D ; ならびにブレオマイシン ; トポテカンおよびイリノテカン (CPT-11) などのトポイソメラーゼ II 阻害剤 ; エトポシド (VP-16)、テニポシド、ミトキサントロン、ノボビオシン、メルパロン、およびアクリルビシンなどのトポイソメラーゼ II 阻害剤 ; プレドニゾン、メチルプレドニゾン (Solumedrol (登録商標)) およびデキサメタゾン (Decadron (登録商標)) などのコルチコステロイド ; L-アスパラギナーゼ ; ボルテゾミブ (Velcade (登録商標)) ; リツキシマブ (Rituxan (登録商標))、アレムツズマブ (Campath (登録商標))、サリドマイド、レナリドマイド (Revlimid (登録商標))、BCG、インターロイキン 2、インターフェロン-アルファ、および Provenge (登録商標) などのがんワクチンなどの免疫療法剤 ; フルベストラント (Faslodex (登録商標))、タモキシフェン、トレミフェン (Fareston (登録商標))、アナストロゾール (Arimidex (登録商標))、エキセメスタン (Aromasin (登録商標))、レトロゾール (Femara (登録商標))、酢酸メゲストロール (Megace (登録商標))、エストロゲン、ピカルタミド (Casodex (登録商標))、フルタミド (Eulexin (登録商標))、ニルタミド (Nilandron (登録商標))、ロイプロリド (Lupron (登録商標))、およびゴセレリン (Zoladex (登録商標)) などのホルモン治療剤 ; レチノイド、トレチノイン (ATRA または Atralin (登録商標))、ベキサロテン (Targretin (登録商標))、および三酸化ヒ素 (Arsenox (登録商標)) などの分化誘導剤 ; ならびにイマチニブ (Gleevec (登録商標))、ゲフィチニブ (Iressa (登録商標))、およびスニチニブ (Sutent (登録商標)) などの標的化治療剤が挙げられる。一部の実施形態では、化学療法薬は、カクテル療法薬である。カクテル療法薬の例としては、これらに限定されないが、CHOP/R-CHOP (リツキサン、シクロホスファミド、ヒドロキシドキシソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン)、EPOCH (エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ヒドロキシドキシソルビシン)、Hyper-CVAD (シクロホスファミド、ビンクリスチン、ヒドロキシドキシソルビシン、デキサメタゾン)、FOLFOX (フルオウラシル (5-FU)、ロイコボリン、オキサリプラチン)、ICE (イホスファミド、カルボプラチン、エトポシド)、DHAP (高用量のシタラビン [Ara-C]、デキサメタゾン、シスプラチン)、ESHAP (エトポシド、メチルプレドニゾン、シタラビン [Ara-C]、シスプラチン)、および CMF (シクロホスファミド、メトトレキセート、フルオウラシル (fluouracil)) が挙げられる。

【0545】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、ホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3キナーゼ、PI3K) の阻害剤と組み合わせて使用してもよい。例えば、免疫原性ワクチン

10

20

30

40

50

は、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、AEZS-136、またはそれらの任意の組合せと組み合わせて使用してもよい。

10

【0546】

一部の実施形態では、PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136の、ヒト処置のために用いられる用量は、1日当たり約0.01mg/kg～約100mg/kgの範囲（例えば、1日当たり約0.1mg/kg～約100mg/kg、1日当たり約0.1mg/kg～約50mg/kg、1日当たり約10mg/kg、または1日当たり約30mg/kg）であってもよい。所望の用量は、便利には、単回用量で、または例えば1日当たり2、3、4つ、もしくはそれよりも多くの分割用量として適切な間隔で投与される複数回用量として投与してもよい。

20

【0547】

一部の実施形態では、PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136の投薬量は、約1ng/kg～約100mg/kgであってもよい。PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136の投薬量は、これらに限定されないが、約1μg/kg、25μg/kg、50μg/kg、75μg/kg、100μg/kg、125μg/kg、150μg/kg、175μg/kg、200μg/kg、2

30

40

50

25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、275 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、325 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、425 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、475 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、525 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、550 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、575 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、625 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、650 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、675 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、725 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、775 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、825 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、850 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、875 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、925 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、950 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、975 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1mg $/\text{kg}$ 、2.5mg $/\text{kg}$ 、5mg $/\text{kg}$ 、10mg $/\text{kg}$ 、15mg $/\text{kg}$ 、20mg $/\text{kg}$ 、25mg $/\text{kg}$ 、30mg $/\text{kg}$ 、35mg $/\text{kg}$ 、40mg $/\text{kg}$ 、45mg $/\text{kg}$ 、50mg $/\text{kg}$ 、60mg $/\text{kg}$ 、70mg $/\text{kg}$ 、80mg $/\text{kg}$ 、90mg $/\text{kg}$ 、または100mg $/\text{kg}$ を含む任意の投薬量であってもよい。

10

【0548】

免疫原性ワクチンおよびPI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ (BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ (BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ (SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ (GDC-0941)、XL147 (SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136の投与様式は、同時であっても逐次的であってもよく、免疫原性ワクチンおよび少なくとも1つの追加の薬学的に活性な作用剤は、逐次的に（または別々に）投与される。例えば、免疫原性ワクチンおよびPI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ (BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ (BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ (SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ (GDC-0941)、XL147 (SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136は、一緒に摂取するための単一の単位剤形で、または同時にもしくはある特定の時間差で投与するための別々の実体（例えば、別々の容器中の）として提供されてもよい。この時間差は、1時間～1か月の間、例えば1日～1週間、例えば48時間～3日間の間であってもよい。加えて、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ (BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ (BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ (SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ (GDC-0941)、XL147 (SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136とは異なる別の投与方式で投与することが可能である。例えば、免疫原性ワクチンまたはPI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ (BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR

20

30

40

50

1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136のいずれかを静脈内に、他方を全身性または経口で投与することが有利であり得る。例えば、免疫原性ワクチンは静脈内にまたは皮下に、PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136は経口で投与される。

【0549】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136の時間的に前に投与される。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤が投与される1~24時間、2~24時間、3~24時間、4~24時間、5~24時間、6~24時間、7~24時間、8~24時間、9~24時間、10~24時間、11~24時間、12~24時間、1~30日、2~30日、3~30日、4~30日、5~30日、6~30日、7~30日、8~30日、9~30日、10~30日、11~30日、12~30日、13~30日、14~30日、15~30日、16~30日、17~30日、18~30日、19~30日、20~30日、21~30日、22~30日、23~30日、24~30日、25~30日、26~30日、27~30日、28~30日、29~30日、1~4週、2~4週、3~4週、1~12か月、2~12か月、3~12か月、4~12か月、5~12か月、6~12か月、7~12か月、8~12か月、9~12か月、10~12か月、11~12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤が投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、免疫原性ワクチンは、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブ

10

20

30

40

50

ラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136が投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

10

【0550】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤が投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、免疫原性ワクチンは、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136が投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

20

30

【0551】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤が投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、免疫原性ワクチンは、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)

40

50

、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136が投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

10

【0552】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、少なくとも1つの追加の薬学的に活性な作用剤として時間的に同時に投与される。

【0553】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、PI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136の時間的に後で投与される。一部の実施形態では、PI3キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される1～24時間、2～24時間、3～24時間、4～24時間、5～24時間、6～24時間、7～24時間、8～24時間、9～24時間、10～24時間、11～24時間、12～24時間、1～30日、2～30日、3～30日、4～30日、5～30日、6～30日、7～30日、8～30日、9～30日、10～30日、11～30日、12～30日、13～30日、14～30日、15～30日、16～30日、17～30日、18～30日、19～30日、20～30日、21～30日、22～30日、23～30日、24～30日、25～30日、26～30日、27～30日、28～30日、29～30日、1～4週、2～4週、3～4週、1～12か月、2～12か月、3～12か月、4～12か月、5～12か月、6～12か月、7～12か月、8～12か月、9～12か月、10～12か月、11～12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。一部の実施形態では、PI3キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド

20

30

40

50

529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136は、免疫原性ワクチンが投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

10

【0554】

一部の実施形態では、PI3キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136は、免疫原性ワクチンが投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

20

30

【0555】

一部の実施形態では、PI3キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド5

40

50

29、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136は、免疫原性ワクチンが投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

【0556】

一部の実施形態では、状態または疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の免疫原性ワクチンを、治療有効量のPI3キナーゼ阻害剤と組み合わせて投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。例えば、状態または疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の免疫原性ワクチンを、治療有効量のウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136と組み合わせて投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。

【0557】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日サイクルで、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間連続して、1日1回、2回、または3回投与し、続いて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間休薬し(例えば、免疫原性ワクチンの投与無し/処置の中断)、PI3キナーゼ阻害剤(例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ(BYL719)、ウンブラリシブ、(TGR1202)、コパンリシブ(BAY80-6946)、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ(SAR245409、XL765)、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ(GDC-0941)、XL147(SAR245408)、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136)を、1日またはそれよりも多くの日において(例えば、サイクル1の1日目に)免疫原性ワクチンの投与の前、同時、または後に投与する。一部の実施形態では、併用療法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日間の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、または13サイクルで投与される。一部の実施形態では、併用療法は、28日間の1~12または13サイクル(例えば、約12か月間)で投与される。

【0558】

一部の実施形態では、状態または疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の免疫原性ワクチンを、治療有効量のPI3キナーゼ阻害剤、例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136、およびチェックポイント阻害剤などの二次的活性作用剤と組み合わせて投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日サイクルで、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間連続して、1日1回、2回、または3回投与し、続いて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間休薬し（例えば、免疫原性ワクチンの投与無し／処置の中断）、PI3キナーゼ阻害剤（例えば、ウォルトマンニン、デメトキシビリジン、LY294002、ヒビスコンC、イデラリシブ、コパンリシブ、デュベリシブ、タセリシブ、ペリホシン、ブパルリシブ、デュベリシブ、アルペリシブ（BYL719）、ウンブラリシブ、（TGR1202）、コパンリシブ（BAY80-6946）、PX-866、ダクトリシブ、CUDC-907、ボクスタリシブ（SAR245409、XL765）、CUDC-907、ME-401、IPI-549、SF1126、RP6530、INK1117、ピクチリシブ（GDC-0941）、XL147（SAR245408）、パロミド529、GSK1059615、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、またはAEZS-136）を、1日またはそれよりも多くの日において（例えば、サイクル1の1日目に）免疫原性ワクチンの投与の前、同時、または後に投与し、二次的活性作用剤を毎日、毎週、または毎月投与する。一部の実施形態では、併用療法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日間の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、または13サイクルで投与される。一部の実施形態では、併用療法は、28日間の1～12または13サイクル（例えば、約12か月間）で投与される。

【0559】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼの阻害剤、例えば、CDK4および／またはCDK6の阻害剤と組み合わせて使用することができる。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、パルボシクリブ（IBRANCE）である（例えば、Clin. Cancer Res. ; 2015, 21(13); 2905-10を参照）。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、リボシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、アベマシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、セリシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、ジナシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、ミルシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、ロニシクリブである。本免疫原性ワク

10

20

30

40

50

チンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、アツベシクリブ（*atuvaciclib*）である。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、ブリシクリブ（*briciclib*）である。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、リビシクリブ（*riviciclib*）である。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、セリシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、トリラシクリブである。本免疫原性ワクチンと組み合わせて使用することができるそのような阻害剤の例は、ボルシクリブ（*voruciclib*）である。一部の例では、本開示の免疫原性ワクチンは、CDK4および／もしくはCDK6の阻害剤と、CDK4／6阻害剤の細胞分裂抑制活性を強化する作用剤と、ならびに／または可逆的な細胞分裂抑制を不可逆的な成長停止もしくは細胞死に変換する作用剤と組み合わせて使用することができる。例示的ながんサブタイプとしては、NSCLC、黒色腫、神経芽細胞腫、神経膠芽腫、脂肪肉腫、およびマントル細胞リンパ腫が挙げられる。

【0560】

一部の実施形態では、ヒト処置に用いられる、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブの用量は、1日当たり約0.01mg/kg～約100mg/kgの範囲であってもよい（例えば、1日当たり約0.1mg/kg～約100mg/kg、1日当たり約0.1mg/kg～約50mg/kg、1日当たり約10mg/kg、または1日当たり約30mg/kg）。所望の用量は、便利には、単回用量で、または例えば1日当たり2、3、4、もしくはそれよりも多くの分割用量として適切な間隔で投与される複数回用量として投与してもよい。

【0561】

一部の実施形態では、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブの投薬量は、約1ng/kg～約100mg/kgであってもよい。サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブの投薬量は、これらに限定されないが、約1μg/kg、25μg/kg、50μg/kg、75μg/kg、100μg/kg、125μg/kg、150μg/kg、175μg/kg、200μg/kg、225μg/kg、250μg/kg、275μg/kg、300μg/kg、325μg/kg、350μg/kg、375μg/kg、400μg/kg、425μg/kg、450μg/kg、475μg/kg、500μg/kg、525μg/kg、550μg/kg、575μg/kg、600μg/kg、625μg/kg、650μg/kg、675μg/kg、700μg/kg、725μg/kg、750μg/kg、775μg/kg、800μg/kg、825μg/kg、850μg/kg、875μg/kg、900μg/kg、925μg/kg、950μg/kg、975μg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、または100mg/kgを含む任意の投薬量であってもよい。

【0562】

免疫原性ワクチンおよびサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブの投与様式は、同時であっても逐次的であってもよく、免疫原性ワクチンおよび少なくとも1つの追加の薬学的に活性な作用剤は、逐次的に（または別々に）投与される。例えば、免疫原性ワクチンおよびサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブは、一緒に摂取するための単一の単位剤形で、または同時にもしくはある特定の時間差で投与するための別々の実体（例えば、別々の容器中の）として提供されてもよい。この時間差は、1時間～1か月の間、例えば1日～1週間、例えば48時間～3日間の間であってもよい。加えて、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻

害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブとは異なる別の投与方式で投与することが可能である。例えば、免疫原性ワクチンまたはサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、もしくはパルボシクリブのいずれかを静脈内に、他を全身性にまたは経口で投与することが有利であり得る。例えば、免疫原性ワクチンは静脈内または皮下に、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブは経口で投与される。

【0563】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブの時間的に前に投与される。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤が投与される1～24時間、2～24時間、3～24時間、4～24時間、5～24時間、6～24時間、7～24時間、8～24時間、9～24時間、10～24時間、11～24時間、12～24時間、1～30日、2～30日、3～30日、4～30日、5～30日、6～30日、7～30日、8～30日、9～30日、10～30日、11～30日、12～30日、13～30日、14～30日、15～30日、16～30日、17～30日、18～30日、19～30日、20～30日、21～30日、22～30日、23～30日、24～30日、25～30日、26～30日、27～30日、28～30日、29～30日、1～4週、2～4週、3～4週、1～12か月、2～12か月、3～12か月、4～12か月、5～12か月、6～12か月、7～12か月、8～12か月、9～12か月、10～12か月、11～12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤が投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、免疫原性ワクチンは、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブが投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

【0564】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤が投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、免疫原性ワクチンは、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブが投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、2

3日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

【0565】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤が投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、免疫原性ワクチンは、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブが投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

【0566】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、少なくとも1つの追加の薬学的に活性な作用剤と時間的に同時に投与される。

【0567】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブの時間的に後で投与される。一部の実施形態では、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される1～24時間、2～24時間、3～24時間、4～24時間、5～24時間、6～24時間、7～24時間、8～24時間、9～24時間、10～24時間、11～24時間、12～24時間、1～30日、2～30日、3～30日、4～30日、5～30日、6～30日、7～30日、8～30日、9～30日、10～30日、11～30日、12～30日、13～30日、14～30日、15～30日、16～30日、17～30日、18～30日、19～30日、20～30日、21～30日、22～30日、23～30日、24～30日、25～30日、26～30日、27～30日、28～30日、29～30日、1～4週、2～4週、3～4週、1～12か月、2～12か月、3～12か月、4～12か月、5～12か月、6～12か月、7～12か月、8～12か月、9～12か月、10～12か月、11～12か月、またはそれらに任意の組合せの前に投与される。一部の実施形態では、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブは、免疫原性ワクチンが投与される少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、

7 か月、8 か月、9 か月、10 か月、11 か月、12 か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

【0568】

一部の実施形態では、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブは、免疫原性ワクチンが投与される最大でも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

10

【0569】

一部の実施形態では、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤は、免疫原性ワクチンが投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与される。例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブは、免疫原性ワクチンが投与される約1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、1週間、2週間、3週間、4週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、またはそれらの任意の組合せの前に投与してもよい。

20

30

【0570】

一部の実施形態では、状態または疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の免疫原性ワクチンを、治療有効量のサイクリン依存性キナーゼ阻害剤と組み合わせて投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。例えば、状態または疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の免疫原性ワクチンを、治療有効量のセリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブと組み合わせて投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。

40

【0571】

一部の実施形態では、免疫原性ワクチンを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日サイクルで、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間連続して、1日1回、2回、または3回投与し、続いて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、2

50

6、27、28、29、または30日間休薬し（例えば、免疫原性ワクチンの投与無し／処置の中断）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤（例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブ）を、1日またはそれよりも多くの日において（例えば、サイクル1の1日目に）免疫原性ワクチンの投与の前、同時、または後に投与する。一部の実施形態では、併用療法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日間の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、または13サイクルで投与される。一部の実施形態では、併用療法は、28日間の1～12または13サイクル（例えば、約12か月間）で投与される。

【0572】

一部の実施形態では、状態または疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の免疫原性ワクチンを、治療有効量のサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、例えばセリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブ、およびチェックポイント阻害剤などの二次的活性作用剤と組み合わせて投与するステップを含む方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日サイクルで、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間連続して、1日1回、2回、または3回投与し、続いて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30日間休薬し（例えば、免疫原性ワクチンの投与無し／処置の中断）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤（例えば、セリシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ、またはパルボシクリブ）を、1日またはそれよりも多くの日において（例えば、サイクル1の1日目に）免疫原性ワクチンの投与の前、同時、または後に投与し、二次的作用剤を毎日、毎週、または毎月投与する。一部の実施形態では、併用療法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、または28日間の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、または13サイクルで投与される。一部の実施形態では、併用療法は、28日間の1～12または13サイクル（例えば、約12か月間）で投与される。

【0573】

ある特定の実施形態では、追加の治療剤は、第2の免疫療法剤を含む。一部の実施形態では、追加の免疫療法剤としては、これらに限定されないが、コロニー刺激因子、インターロイキン、免疫抑制機能を阻止する抗体（例えば、抗CTLA-4抗体、抗CD28抗体、抗CD3抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体）、免疫細胞機能を増強する抗体（例えば、抗GITR抗体、抗OX-40抗体、抗CD40抗体、または抗4-1BB抗体）、トール様受容体（例えば、TLR4、TLR7、TLR9）、可溶性リガンド（例えば、GITRL、GITRL-Fc、OX-40L、OX-40L-Fc、CD40L、CD40L-Fc、4-1BBリガンド、または4-1BBリガンド-Fc）、またはB7ファミリーのメンバー（例えば、CD80、CD86）が挙げられる。一部の実施形態では、追加の免疫療法剤は、CTLA-4、CD28、CD3、PD-1、PD-L1、TIGIT、GITR、OX-40、CD-40、または4-1BBを標的とする。

【0574】

一部の実施形態では、追加の治療剤は、免疫チェックポイント阻害剤である。一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗CD28抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG3抗体、抗TIM3抗体、抗GITR抗体、抗4-1BB抗体、または抗OX-40抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、抗TIGIT抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は

10

20

30

40

50

、ニボルマブ（OPDIVO）、ペンブロリズマブ（KEYTRUDA）、ピジルズマブ、MED10680、REGN2810、BGB-A317、およびPDR001からなる群から選択される抗PD-1抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、BMS935559（MDX-1105）、アテキソリズマブ（MPDL3280A）、デュルバルマブ（MED14736）、およびアベルマブ（MSB0010718C）からなる群から選択される抗PD-L1抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、イピリムマブ（YERVOY）およびトレメリムマブからなる群から選択される抗CTLA-4抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、BMS-986016およびLAG525からなる群から選択される抗LAG-3抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、MED16469、MED10562、およびMOXR0916からなる群から選択される抗OX-40抗体である。一部の実施形態では、追加の治療剤は、PF-05082566からなる群から選択される抗4-1BB抗体である。

【0575】

一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、アドレノメデュリン（AM）、アンジオポエチン（Ang）、BMP、BDNF、EGF、エリスロポエチン（EPO）、FGF、GDNF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、幹細胞因子（SCF）、GDF9、HGF、HDGF、IGF、遊走刺激因子、ミオスタチン（GDF-8）、NGF、ニューロトロフィン、PDGF、トロンプオエチン、TGF- α 、TGF- β 、TNF- α 、VEGF、PLGF、ガンマーIFN、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、およびIL-18からなる群から選択される生物分子と組み合わせて投与することができる。

【0576】

一部の実施形態では、本明細書に記載のネオ抗原治療薬による処置には、腫瘍の外科的除去、がん細胞の除去、または処置する医師が必要であるとみなす任意の他の外科的療法が伴ってもよい。

【0577】

ある特定の実施形態では、処置は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬を、放射線療法と組み合わせて投与することを含む。作用剤による処置は、放射線療法の投与の前、同時、または後に行ってもよい。そのような放射線療法の投与スケジュールは、熟練の開業医により決定することができる。

【0578】

併用投与は、単一の医薬製剤でもしくは別々の製剤を使用してのいずれかでの同時投与、またはいずれの順序でもよいが、一般にすべての活性作用剤がそれらの生物学的活性を同時に発揮することができるような期間内での連続投与を含むことができる。

【0579】

本明細書に記載のネオ抗原治療薬と少なくとも1つの追加の治療剤との組合せは、任意の順序でまたは同時発生的に投与することができることが理解されるだろう。一部の実施形態では、作用剤は、第2の治療剤による処置を以前に受けたことがある患者に投与される。ある特定の他の実施形態では、ネオ抗原治療薬および第2の治療剤は、実質的に同時にまたは同時発生的に投与される。例えば、対象は、第2の治療剤（例えば、化学療法）による一連の処置を受けている間に作用剤を与えてもよい。ある特定の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、第2の治療剤による処置の1年以内に投与される。2つ（またはそれよりも多く）の作用剤または処置は、わずか数時間または数分以内に（すなわち、実質的に同時に）対象に投与することができることがさらに理解される。

【0580】

疾患の処置の場合、本明細書に記載のネオ抗原治療薬の適切な投薬量は、すべて処置する医師の裁量で、処置しようとする疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、疾患の応答性、作用剤が治療的または予防目的で投与されるのか、以前の療法、および患者の病歴などに依存する。ネオ抗原治療薬は、1度に、もしくは数日～数か月間続く一連の処置に

わたって、または治療がもたらされるかもしくは疾患状態の縮小（例えば、腫瘍サイズの低減）が達成されるまで投与してもよい。最適な投薬スケジュールは、患者の体内における薬物蓄積の測定値から計算することができ、個々の作用剤の相対的効力に応じて様々である。投与する医師は、最適な投薬量、投薬方法論、および反復率を決定することができる。

【0581】

一部の実施形態では、ネオ抗原治療薬は、初期にはより高い「負荷」用量で、続いて1つまたは複数のより低い用量で投与してもよい。一部の実施形態では、投与の頻度を変化させることもできる。一部の実施形態では、投薬レジメンは、初期用量を投与し、続いて追加の用量（または「維持」用量）を週1回、2週毎に1回、3週毎に1回、または毎月1回投与することを含んでいてもよい。例えば、投薬レジメンは、初期負荷用量を投与し、続いて、例えば初期用量の半分の毎週の維持用量を投与することを含んでいてもよい。または、投薬レジメンは、初期負荷用量を投与し、続いて、例えば初期用量の半分の維持用量を隔週で投与することを含んでいてもよい。または、投薬レジメンは、3つの初期用量を3週間投与し、続いて、例えば同じ量の維持用量を隔週で投与することを含んでいてもよい。

10

【0582】

当業者に公知であるように、いかなる治療剤の投与も、副作用および／または毒性をもたらし得る。一部の場合では、治療有効用量での特定の作用剤の投与が妨げられるほど副作用および／または毒性が深刻である。一部の場合では、療法を中断しなければならず、他の作用剤を試みてもよい。しかしながら、同じ治療用クラスの多くの作用剤は、同様の副作用および／または毒性を示し、これは、患者が、療法を中止するか、または可能であれば、治療剤に関連する不快な副作用に苦しまなければならないかのいずれかであることを意味する。

20

【0583】

一部の実施形態では、投薬スケジュールは、具体的な数の投与または「サイクル」に限定される場合がある。一部の実施形態では、作用剤は、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多くのサイクルで投与される。例えば、作用剤は2週間毎に6サイクルで投与される、作用剤は3週間毎に6サイクルで投与される、作用剤は2週間毎に4サイクルで投与される、作用剤は3週間毎に4サイクルで投与されるなどである。投薬スケジュールは、当業者により決定され、その後修正されてもよい。

30

【0584】

本開示は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬を対象に投与する方法であって、作用剤、化学療法剤などの投与に関連する副作用および／または毒性を低減することができる、1つまたは複数の作用剤を投与するための間欠投薬戦略を使用するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、ヒト対象のがんを処置するための方法は、対象に、治療有効用量のネオ抗原治療薬を、治療有効用量の化学療法剤と組み合わせて投与するステップを含み、作用剤の一方または両方は、間欠投薬戦略に従って投与される。一部の実施形態では、ヒト対象のがんを処置するための方法は、対象に、治療有効用量のネオ抗原治療薬を、治療有効用量の第2の治療剤と組み合わせて投与するステップを含み、作用剤の一方または両方は、間欠投薬戦略に従って投与される。一部の実施形態では、間欠投薬戦略は、初期用量のネオ抗原治療薬を対象に投与すること、および後続用量の作用剤を2週間毎に約1回投与することを含む。一部の実施形態では、間欠投薬戦略は、初期用量のネオ抗原治療薬を対象に投与すること、および後続用量の作用剤を3週間毎に約1回投与することを含む。一部の実施形態では、間欠投薬戦略は、初期用量のネオ抗原治療薬を対象に投与すること、および後続用量の作用剤を4週間毎に約1回投与することを含む。一部の実施形態では、作用剤は、間欠投薬戦略を使用して投与され、追加の治療剤は、毎週投与される。

40

【0585】

本開示は、本明細書に記載のネオ抗原治療薬を含む組成物を提供する。また、本開示は

50

、本明細書に記載のネオ抗原治療薬および薬学的に許容されるビヒクルを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、免疫療法において使用が見出される。一部の実施形態では、組成物は、腫瘍成長を阻害することにおいて使用が見出される。一部の実施形態では、医薬組成物は、対象（例えば、ヒト患者）の腫瘍成長を阻害することにおいて使用が見出される。一部の実施形態では、組成物は、がんを処置することにおいて使用が見出される。一部の実施形態では、医薬組成物は、対象（例えば、ヒト患者）のがんを処置することにおいて使用が見出される。

【0586】

製剤は、本開示のネオ抗原治療薬を薬学的に許容されるビヒクル（例えば、担体または賦形剤）と組み合わせることにより、保管および使用のために調製される。当業者は、一般に、薬学的に許容される担体、賦形剤、および／または安定剤を、製剤または医薬組成物の不活性成分であるとみなす。例示的な製剤は、WO 2015 / 095811 に列挙されている。

【0587】

好適な薬学的に許容されるビヒクルとしては、これらに限定されないが、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの非毒性緩衝剤；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール、メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールなどの保存剤；低分子量ポリペプチド（例えば、約10アミノ酸残基未満）；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシンなどのアミノ酸；単糖、二糖、グルコース、マンノース、またはデキストリンなどの炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；Zn-タンパク質錯体などの金属錯体；ならびにTWEEN（登録商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。（Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.）。一部の実施形態では、ビヒクルは、水中5%デキストロースである。

【0588】

本明細書に記載の医薬組成物は、局所または全身処置のいずれかのために、任意の数の方式で投与することができる。投与は、表皮もしくは経皮パッチ剤、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、スプレー剤、液剤、および散剤による局部的；ネブライザーによることを含む散剤もしくはエアロゾル剤の吸入もしくは吹送による肺内、気管内、および鼻腔内；経口；または、静脈内、動脈内、腫瘍内、皮下、腹腔内、筋肉内（例えば、注射または点滴）、もしくは頭蓋内（例えば、髄腔内または脳室内）を含む非経口であってもよい。

【0589】

治療用製剤は、単位剤形であってもよい。そのような製剤としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、水もしくは非水性媒体中の溶液剤もしくは懸濁剤、または坐剤が挙げられる。

【0590】

また、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドは、マイクロカプセルに封入されていてもよい。そのようなマイクロカプセルは、例えば、コアセルベーション技法により、または界面重合、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, Londonに記載のように、コロイド状薬物送達系

10

20

30

40

50

(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)、もしくはマクロエマルジョンでは、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ(メチルメタシレート(methylmethacrylate))マイクロカプセルにより調製される。

【0591】

ある特定の実施形態では、医薬製剤は、リポソームと複合体化された本明細書に記載のネオ抗原治療薬を含む。リポソームを産生するための方法は、当業者に公知である。例えば、一部のリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物との逆相蒸発により生成することができる。リポソームを規定の孔径のフィルターを通して押し出して、所望の直径を有するリポソームを得ることができる。

10

【0592】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のネオ抗原性ペプチドを含む徐放性調製物を産生することができる。徐放性調製物の好適な例としては、成形品(例えば、フィルムまたはマイクロカプセル)の形態である、作用剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられる。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)などのヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸および7エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注射用マイクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、スクロースアセテートイソブチレート、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

20

【0593】

本開示は、免疫原性ワクチンを含む処置方法を提供する。疾患(がんまたはウイルス感染など)を処置する方法が提供される。方法は、対象に、免疫原性抗原を含む有効量の組成物を投与するステップを含んでいてもよい。一部の実施形態では、抗原は、ウイルス抗原を含む。一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原を含む。

【0594】

調製することができるワクチンの非限定的な例としては、ペプチドに基づくワクチン、核酸に基づくワクチン、抗体に基づくワクチン、T細胞に基づくワクチン、および抗原提示細胞に基づくワクチンが挙げられる。

30

【0595】

ワクチン組成物は、薬学的に使用することができる調製物への活性作用剤のプロセッシングを容易にする賦形剤および助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容される担体を使用して製剤化することができる。適切な製剤は、選択される投与経路に依存する場合がある。周知の技法、担体、および賦形剤はいずれも、好適におよび当技術分野で理解されているように使用することができる。

【0596】

一部の場合では、ワクチン組成物は、ペプチドに基づくワクチン、核酸に基づくワクチン、抗体に基づくワクチン、または細胞に基づくワクチンとして製剤化される。例えば、ワクチン組成物としては、カチオン性脂質製剤中のネイキッドcDNA;リポペプチド(例えば、Vitiello, A. et al., J. Clin. Invest. 95:341, 1995)、例えば、ポリ(DL-ラクチド-co-グリコリド)(「PLG」)マイクロスフェアに封入されているネイキッドcDNAまたはペプチド(例えば、Eldridge, et al., Molec. Immunol. 28:287-294, 1991; Alonso et al, Vaccine 12:299-306, 1994; Jones et al, Vaccine 13:675-681, 1995を参照);免疫刺激複合体(ISCMS)に含有されているペプチド組成物(例えば、Takahashi et al, Nature 344:873-875, 1990; Hu et al, Clin. Exp. Immunol. 113:235

40

50

－243, 1998); または複数の抗原ペプチド系 (MAP) (例えば, Tam, J. P., Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 85:5409-5413, 1988; Tarn, J. P., J. Immunol. Methods 196:17-32, 1996を参照) を挙げることができる。ある場合には、ワクチンは、ペプチドに基づくワクチン、または核酸がポリペプチドをコードする核酸に基づくワクチンとして製剤化される。ある場合には、ワクチンは、抗体に基づくワクチンとして製剤化される。ある場合には、ワクチンは、細胞に基づくワクチンとして製剤化される。

【0597】

同定された疾患特異的免疫原性ネオ抗原ペプチドのアミノ酸配列を使用して、薬学的に許容される組成物を開発することができる。抗原の供給源は、これらに限定されないが、糖タンパク質、ペプチド、およびスーパー抗原を含む天然または合成タンパク質；抗体／抗原複合体；リポタンパク質；RNAまたはその翻訳産物；ならびにDNAまたはDNAによりコードされるポリペプチドであってもよい。また、抗原の供給源は、形質転換されていない、形質転換された、トランスフェクトされた、または形質導入された細胞または細胞系を含んでいてもよい。細胞は、組換え抗原を発現するために用いることができる当業者に公知の様々な発現ベクターまたはレトロウイルスベクターのいずれかを使用して、形質転換、トランスフェクト、または形質導入することができる。また、発現は、組換え抗原をコードするDNA分子を含有する発現またはレトロウイルスベクターを形質転換、トランスフェクト、または形質導入した任意の適切な宿主細胞にて達成することができる。当業者に公知の任意の数のトランスフェクション、形質転換、および形質導入プロトコールを使用することができる。組換えワクシニアベクターおよびワクシニアベクターに感染させた細胞を、抗原の供給源として使用することができる。

【0598】

組成物は、合成疾患特異的免疫原性ネオ抗原ペプチドを含んでいてもよい。組成物は、2つまたはそれよりも多くの疾患特異的免疫原性ネオ抗原ペプチドを含んでいてもよい。組成物は、疾患特異的免疫原性ペプチド（タンパク質、ペプチド、DNA、およびRNAなど）の前駆体を含んでいてもよい。疾患特異的免疫原性ペプチドに対する前駆体は、同定された疾患特異的免疫原性ネオ抗原ペプチドに対して生じても生じさせもよい。一部の実施形態では、治療用組成物は、免疫原性ペプチドの前駆体を含む。疾患特異的免疫原性ペプチドに対する前駆体は、プロドラッグであってもよい。一部の実施形態では、疾患特異的免疫原性ネオ抗原ペプチドを含む組成物は、アジュバントをさらに含んでいてもよい。例えば、ネオ抗原ペプチドを、ワクチンとして利用することができる。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、薬学的に許容される免疫原性ネオ抗原ペプチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、免疫原性ワクチンは、免疫原性ネオ抗原ペプチドに対する薬学的に許容される前駆体（タンパク質、ペプチド、DNA、およびRNAなど）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、処置方法は、対象に、免疫原性ネオ抗原ペプチドを特異的に認識する有効量の抗体を投与するステップを含む。一部の実施形態では、処置方法は、対象に、免疫原性ネオ抗原ペプチドを特異的に認識する有効量の可溶性TCRまたはTCRアナログを投与するステップを含む。

【0599】

本明細書に記載の方法は、免疫原性ネオ抗原ペプチドを使用して同じ個体のための治療薬（ワクチンまたは治療用抗体など）が開発される個別化医療の状況において特に有用である。したがって、対象の疾患を処置する方法は、本明細書に記載の方法に従って対象の免疫原性ネオ抗原ペプチドを同定するステップ；およびペプチド（またはその前駆体）を合成するステップ；およびペプチドまたはペプチドを特異的に認識する抗体を対象に投与するステップを含んでいてもよい。一部の実施形態では、免疫原性ネオ抗原の発現パターンは、患者特異的ワクチンの生成のための本質的基盤としての役目を果たすことができる。一部の実施形態では、免疫原性ネオ抗原の発現パターンは、特定の疾患を有する患者群のためのワクチンの生成のための本質的基盤としての役目を果たすことができる。したが

って、患者群の特定の疾患、例えば特定のタイプの腫瘍を選択的に処置することができる。

【0600】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、大規模患者群において自己抗疾患T細胞により認識され得る構造的に通常の抗原である。一部の実施形態では、疾患が構造的に通常のネオ抗原を発現する罹患対象群の抗原発現パターンが決定される。

【0601】

一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、タンパク質の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドおよび同じタンパク質の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドを含み、第1のペプチドは第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは突然変異を含み、第2のネオエピトープは同じ突然変異を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドは、タンパク質の第1の領域の第1のネオエピトープを含む第1のペプチドおよび同じタンパク質の第2の領域の第2のネオエピトープを含む第2のペプチドを含み、第1の領域は第2の領域の少なくとも1つのアミノ酸を含み、第1のペプチドは第2のペプチドとは異なり、第1のネオエピトープは第1の突然変異を含み、第2のネオエピトープは第2の突然変異を含む。一部の実施形態では、第1の突然変異および第2の突然変異は同じである。一部の実施形態では、突然変異は、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0602】

免疫原性ネオ抗原を産生するための様々な方式が存在する。タンパク質またはペプチドは、標準的な分子生物学的技法によるタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチドの発現、天然供給源からのタンパク質もしくはペプチドの単離、*in vitro*翻訳、またはタンパク質もしくはペプチドの化学合成を含む、当業者に公知の任意の技法により作製することができる。一般に、そのような疾患特異的ネオ抗原は、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで産生することができる。免疫原性ネオ抗原は、ペプチドまたはポリペプチドとして*in vitro*で産生することができ、次いで、それらを、個別化ワクチンまたは免疫原性組成物へと製剤化し、対象に投与することができる。免疫原性ネオ抗原の*in vitro*産生は、ペプチド合成、または様々な細菌、真核生物、もしくはウイルス組換え発現系のいずれかにおけるDNAもしくはRNA分子からのペプチド／ポリペプチドの発現、続く発現されたペプチド／ポリペプチドの精製を含んでもよい。あるいは、免疫原性ネオ抗原は、免疫原性ネオ抗原をコードする分子（例えば、DNA、RNA、およびウイルス発現系）を対象に導入し、その際にコードされた免疫原性ネオ抗原が発現されることにより*in vivo*で産生することができる。一部の実施形態では、免疫原性ネオ抗原ペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して、ネオ抗原ペプチドを*in vitro*で産生することができる。

【0603】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、免疫原性ネオ抗原をコードするポリヌクレオチドと少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0604】

ポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、PNA、CNA、RNA、一本鎖および／もしくは二本鎖、ネイティブもしくは安定化形態のポリヌクレオチド、またはそれらの組合せであってもよい。免疫原性ネオ抗原ペプチドをコードする核酸配列は、核酸配列がペプチドをコードする限り、イントロンを含有していてもいなくてもよい。一部の実施形態では、*in vitro*翻訳を使用してペプチドを産生する。

【0605】

ネオ抗原をコードする配列を含む発現ベクターならびに発現ベクターを含有する宿主細

10

20

30

40

50

胞も企図される。本開示での使用に好適な発現ベクターは、核酸配列に操作的に連結されている少なくとも1つの発現制御エレメントを含んでいてもよい。発現制御エレメントの例は、当技術分野で周知であり、例えば、*lac*系、ラムダファージのオペレーターおよびプロモーター領域、酵母プロモーター、およびポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルス、またはSV40に由来するプロモーターが挙げられる。追加のオペレータ的なエレメントとしては、これらに限定されないが、リーダー配列、終止コドン、ポリアダニル化シグナル、ならびに宿主系における核酸配列の適切な転写およびその後の翻訳に必要なまたは好ましい任意の他の配列が挙げられる。当業者であれば、発現制御エレメントの正しい組合せは、選択した宿主系に依存することを理解するだろう。発現ベクターは、核酸配列を含有する発現ベクターの宿主系への移入およびその後の複製に必要な追加のエレメントを含有するべきであることがさらに理解されるだろう。そのようなエレメントの例としては、これらに限定されないが、複製起点および選択可能なマーカーが挙げられる。

【0606】

ネオ抗原ペプチドは、所望のネオ抗原ペプチドをコードするRNAまたはcDNA分子の形態で提供することができる。本開示の1つまたは複数のネオ抗原ペプチドは、単一の発現ベクターによりコードされていてもよい。一般に、DNAを、発現のために適切な方向性および正しいリーディングフレームでプラスミドなどの発現ベクターに挿入し、必要に応じて、DNAを、所望の宿主（例えば、細菌）により認識される適切な転写および翻訳調節性制御ヌクレオチド配列に連結させてもよいが、そのような制御は、発現ベクターにおいて一般に利用可能である。次いで、ベクターを、標準的な技法を使用してクローニング用の宿主細菌に導入する。真核生物宿主、特に哺乳動物またはヒトのために有用な発現ベクターとしては、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、およびサイトメガロウイルスに由来する発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、pCR1、pBR322、pMB9、およびそれらの誘導体を含む*E. coli*由来のプラスミドなどの公知の細菌プラスミド、M13などの広宿主域プラスミド、ならびに繊維状一本鎖DNAファージが挙げられる。

【0607】

実施形態では、目的のポリペプチドをコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成機を使用して化学合成により構築することができる。そのようなオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、目的の組換えポリペプチドが産生される宿主細胞において有利であるコドンを選択して設計することができる。標準的な方法を適用して、単離された目的のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成することができる。

【0608】

ポリペプチドの発現に好適な宿主細胞としては、適切なプロモーターの制御下にある原核、酵母、昆虫、または高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性菌、例えば*E. coli*または*bacilli*が挙げられる。高等真核細胞としては、哺乳動物由来の確立された細胞系が挙げられる。無細胞翻訳系も用いることができる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主との使用のための適切なクローニングおよび発現ベクターは、当技術分野で周知である。種々の哺乳動物または昆虫細胞培養系を用いて、組換えタンパク質を発現させることができる。例示的な哺乳動物宿主細胞系としては、これらに限定されないが、COS-7、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、293、HeLa、およびBHK細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、発現させようとする遺伝子に連結されている適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列などの非転写エレメント、ならびに必要なリボソーム結合部位、ポリアダニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、ならびに転写終結配列などの5'または3'非翻訳配列を含んでいてもよい。

【0609】

形質転換された宿主により産生されたタンパク質は、任意の好適な方法に従って精製することができる。そのような標準的な方法としては、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、およびサイジングカラムクロマトグラフィーなど）、遠心分離、溶解度の差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技法によるものが挙げられる。ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの親和性タグをタンパク質に付着させて、適切な親和性カラムを通過させることによる容易な精製を可能にすることができる。また、単離されたタンパク質を、タンパク質分解、核磁気共鳴、およびX線結晶解析法などの技法を使用して物理的に特徴付けることができる。

10

【0610】

ワクチンは、本明細書に記載のポリペプチド配列を結合する実体を含んでもよい。実体は、抗体であってもよい。抗体に基づくワクチンは、周知の技法、担体、および賦形剤のいずれかを、好適におよび当技術分野で理解されているように使用して、製剤化することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載のペプチドを、抗体治療薬などのネオ抗原特異的治療薬を作製するために使用することができる。例えば、ネオ抗原は、ネオ抗原を特異的に認識する抗体を生じさせるおよび／または同定するために使用することができる。これらの抗体は、治療薬として使用することができる。抗体は、天然抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体であってもよく、または抗体断片であってもよい。抗体は、本明細書に記載のポリペプチドの1つまたは複数を認識することができる。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のポリペプチドと最大で40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列を有するポリペプチドを認識することができる。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のポリペプチドと少なくとも40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する配列を有するポリペプチドを認識することができる。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のポリペプチドの長さの少なくとも30%、40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるポリペプチド配列を認識することができる。一部の実施形態では、抗体は、本明細書に記載のポリペプチドの長さの最大で30%、40%、50%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であるポリペプチド配列を認識することができる。

20

30

40

【0611】

また、本開示は、ネオ抗原ペプチド／ポリペプチドを、*in vivo*で、例えばDNA／RNAワクチンの形態で、それを必要とする対象に送達するためのビヒクルとしての核酸分子の使用を企図する。

【0612】

一部の実施形態では、ワクチンは、核酸ワクチンである。一部の実施形態では、ネオ抗

50

原は、プラスミドの使用により対象に投与することができる。プラスミドは、いくつかの異なる方法、例えば、鼻および肺粘膜などの粘膜表面へのネイキッドDNAの注射またはエアロゾル滴注により動物組織へと導入することができる。一部の実施形態では、「遺伝子銃」などを用いた物理的送達を使用することができる。発現ベクターの正確な選択は、発現させようとするペプチド／ポリペプチドに依存する場合があります、十分当業者の技術の範囲内にある。

【0613】

一部の実施形態では、核酸は、免疫原性ペプチドまたはペプチド前駆体をコードする。一部の実施形態では、核酸ワクチンは、免疫原性ペプチドまたはペプチド前駆体をコードする配列に隣接する配列を含む。一部の実施形態では、核酸ワクチンは、1つよりも多くの免疫原性エピトープを含む。一部の実施形態では、核酸ワクチンは、DNAに基づくワクチンである。一部の実施形態では、核酸ワクチンは、RNAに基づくワクチンである。一部の実施形態では、RNAに基づくワクチンは、mRNAを含む。一部の実施形態では、RNAに基づくワクチンは、ネイキッドmRNAを含む。一部の実施形態では、RNAに基づくワクチンは、修飾mRNAを含む（例えば、プロタミンを使用して分解から保護されているmRNA、修飾5'CAP構造を含有するmRNA、または修飾ヌクレオチドを含有するmRNA）。一部の実施形態では、RNAに基づくワクチンは、一本鎖mRNAを含む。

【0614】

ポリヌクレオチドは、実質的に純粋であっても、好適なベクターまたは送達系に含有されていてもよい。好適なベクターおよび送達系としては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、または1つよりも多くのウイルスのエレメントを含有するハイブリッドに基づく系などのウイルスが挙げられる。非ウイルス送達系としては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマー（例えば、カチオン性リポソーム）が挙げられる。

【0615】

1つまたは複数のネオ抗原ペプチドを、ウイルスに基づく系を使用して *in vivo* でコードおよび発現させることができる。ウイルスの感染力を破壊することなく新しい遺伝子が導入されるようにウイルスゲノムの部分が欠失されているウイルスベクターを、本開示における組換えベクターとして使用してもよい。本開示のウイルスベクターは、非病原性ウイルスである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、哺乳動物の特定の細胞タイプに対して向性を有する。別の実施形態では、本開示のウイルスベクターは、樹状細胞およびマクロファージなどのプロフェッショナル抗原提示細胞に感染することができる。本開示のさらに別の実施形態では、ウイルスベクターは、哺乳動物の任意の細胞に感染することができる。ウイルスベクターは、腫瘍細胞にも感染することができる。本開示で使用されるウイルスベクターとしては、これらに限定されないが、ワクシニアウイルス、アピポックスウイルス、鶏痘ウイルス、および高度に弱毒化されたワクシニアウイルス（AnkaraまたはMVA）などのポックスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびバキュロウイルスなどが挙げられる。

【0616】

ワクチンは、様々な経路を介して送達することができる。送達経路としては、経口（頬側および舌下を含む）、直腸、鼻、局部、経皮パッチ、肺、膈、坐剤、もしくは非経口（筋肉内、動脈内、髄腔内、皮内、腹腔内、皮下、および静脈内を含む）投与、またはエアロゾル化、吸入、もしくは吹送による投与に好適な形態のものを挙げることができる。薬物送達系に関する基本情報は、Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lippencott Williams & Wilkins, Baltimore Md. (1999))に見出すことができる。本明細書に記載のワクチンは、筋肉に投与してもよく、または皮内注射もしくは皮下注射により、またはイオントフォレーシスなどにより経皮的に投与してもよい。ワクチンの表皮投与を用いてもよい。

【0617】

一部の場合では、ワクチンは、鼻道を介する投与のために製剤化することもできる。担体が固体である場合、経鼻投与に好適な製剤としては、嗅ぎタバコを吸うように、すなわち鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻道を介する急速な吸入により投与される、例えば、約10～約500ミクロンの範囲の粒子サイズを有する粗散剤を挙げることができる。製剤は、鼻腔スプレー、点鼻薬であっても、ネブライザーによるエアロゾル投与によるものであってもよい。製剤は、ワクチンの水性または油性溶液を含んでいてもよい。

【0618】

ワクチンは、懸濁液剤、シロップ剤、またはエリキシル剤などの液体調製物であってもよい。また、ワクチンは、無菌懸濁液剤またはエマルジョン剤など、非経口、皮下、皮内、筋肉内、または静脈内投与（例えば、注射剤投与）のための調製物であってもよい。

10

【0619】

ワクチンは、単回免疫化のための材料を含んでいてもよく、または複数回免疫化のための材料を含んでいてもよい（すなわち、「複数用量」キット）。複数用量の配合には、保存剤を含めることが好ましい。複数用量組成物に保存剤を含めることの代わりとして（またはそれに加えて）、組成物は、材料の取り出しのための無菌アダプターを有する容器に含有されていてもよい。

【0620】

ワクチンは、約0.5mLの投薬体積で投与することができるが、子供には半分の用量（すなわち、約0.25mL）を投与することができる。ある場合には、ワクチンは、より高い用量、例えば、約1mLで投与することができる。

20

【0621】

ワクチンは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多くの用量コースレジメン（*dose-course regimen*）として投与することができる。ある場合には、ワクチンは、1、2、3、または4用量コースレジメンとして投与される。ある場合には、ワクチンは、1用量コースレジメンとして投与される。ある場合には、ワクチンは、2用量コースレジメンとして投与される。

【0622】

最初の用量および2回目の用量の投与は、約0日、1日、2日、5日、7日、14日、21日、30日、2か月、4か月、6か月、9か月、1年、1.5年、2年、3年、4年、またはそれよりも長く、隔てられていてもよい。

30

【0623】

本明細書に記載のワクチンは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも長い年毎に投与してもよい。ある場合には、本明細書に記載のワクチンは、2、3、4、5、6、7またはそれよりも長い年毎に投与される。ある場合には、本明細書に記載のワクチンは、4、5、6、7またはそれよりも長い年毎に投与される。ある場合には、本明細書に記載のワクチンは、一度投与される。

【0624】

投薬量の例は、限定ではなく、本明細書に記載のワクチンを投与するための特定の投薬レジメンを例示するために使用されているに過ぎない。ヒトに使用するための有効量は、動物モデルから決定することができる。例えば、ヒトのための用量は、動物において有効であることが見出されている循環、肝臓、局所、および／または胃腸管中濃度を達成するように製剤化することができる。当業者であれば、動物データおよび他のタイプの類似データに基づき、ヒトに適切なワクチン組成物の有効量を決定することができる。

40

【0625】

作用剤または作用剤の組合せを参照する場合の有効量は、一般に、医学もしくは医薬品分野の種々の規制もしくは諮問機関（FDA、AMAなど）のいずれかにより、または製造業者もしくは供給業者により、推奨または承認されている用量範囲、投与様式、製剤などを意味する。

【0626】

50

一部の態様では、本明細書に記載のワクチンおよびキットは、 2°C ～ 8°C の間で保管することができる。一部の場合では、ワクチンは、凍結保管されない。一部の場合では、ワクチンは、 -20°C または -80°C などの温度で保管される。一部の場合では、ワクチンは、日光を避けて保管される。

キット

【0627】

本明細書に記載のネオ抗原治療薬は、投与の説明書と共にキット形態で提供することができる。典型的には、キットは、容器内の単位剤形の所望のネオ抗原治療薬および投与の説明書を含み得る。また、追加の治療薬、例えば、サイトカイン、リンホカイン、チェックポイント阻害剤、抗体がキットに含まれていてもよい。望ましい場合もあり得る他のキット構成物としては、例えば、無菌注射器、ブースター投薬物、および他の所望の賦形剤が挙げられる。

10

【0628】

また、キットおよび製造品は、本明細書に記載の1つまたは複数の方法で使用するために本明細書で提供される。キットは、1つまたは複数のネオエピトープを含む1つまたは複数のネオ抗原性ポリペプチドを含有してもよい。また、キットは、本明細書に記載のペプチドもしくはタンパク質の1つもしくは複数のコードする核酸、本明細書に記載のペプチドの1つもしくは複数の認識する抗体、または本明細書に記載のペプチドの1つもしくは複数の活性化されるAPCに基づく細胞を含有してもよい。キットは、ワクチンの構成および送達に必要なアジュバント、試薬、および緩衝剤をさらに含有してもよい。

20

【0629】

また、キットは、バイアルおよびチューブなどの1つまたは複数の容器を受け入れるように区画化されているキャリア、包装、または容器を含んでもよく、容器の各々は、本明細書に記載の方法で使用されるペプチドおよびアジュバントなどの別々の要素の1つを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、および試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなど、様々な材料で形成されていてもよい。

【0630】

本明細書で提供される製造品は、包装材料を含有する。医薬品包装材料の例としては、これらに限定されないが、プリスターパック、ボトル、チューブ、バッグ、容器、ボトル、ならびに選択された製剤および意図されている投与様式および処置に好適な任意の包装材料が挙げられる。キットは、典型的には、内容物および／または使用説明が列挙されている標識、ならびに使用説明が記載された添付文書を含む。典型的には、一組の説明書も含まれる。

30

【0631】

本開示は、具体的な例によって、より詳細に記載される。以下の実施例は、説明の目的で提供されており、いかなる点においても本開示を限定することを意図するものではない。当業者であれば、変更または改変して、本開示による代替的实施形態を得ることができる様々な非クリティカルパラメーターを容易に認識するだろう。本明細書に列挙されている特許、特許出願、および印刷刊行物はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【実施例】

【0632】

これらの実施例は、例示の目的のみで提供されており、本明細書で提供される特許請求の範囲を限定するものではない。

(実施例1)

CD4⁺およびCD8⁺T細胞応答の誘導

【0633】

in vitro T細胞誘導を使用して、ネオ抗原特異的T細胞を拡大増殖させる。これらのアッセイのために、成熟プロフェッショナルAPCを以下の方式で調製する。ビーズに基づくキット(Miltenyi)を使用して、単球を健康なヒトドナーPBMCか

50

ら富化する。富化した細胞を、GM-CSFおよびIL-4に播種して、未成熟DCを誘導する。5日後、未成熟DCを、ペプチドのプールと共に37℃で1時間インキュベートしてから、サイトカイン成熟カクテル（GM-CSF、IL-1 β 、IL-4、IL-6、TNF α 、PGE1 β ）を添加する。ペプチドのプールは、複数の突然変異を含んでいてもよく、それぞれCD8⁺およびCD4⁺T細胞を拡大増殖させるためのショートマー（shortmer）およびロングマー（longmer）を両方とも有する。細胞を37℃でインキュベートしてDCを成熟させる。

【0634】

DCの成熟後、PBMC（バルクまたはT細胞が富化されているかのいずれか）を、増殖サイトカインと共に成熟樹状細胞に添加する。機能アッセイおよび／またはテトラマー染色の組合せを使用して、培養物を、ペプチド特異的T細胞についてモニターする。修飾ペプチドおよび親ペプチドを用いて並行した免疫原性アッセイにより、ペプチドがペプチド特異的T細胞を拡大増殖させる相対効率の比較が可能になった。

（実施例2）

テトラマー染色アッセイ

【0635】

MHCテトラマーを購入するかオンサイトで製造し、免疫原性アッセイにてペプチド特異的T細胞の拡大増殖を測定するために使用する。評価のために、テトラマーを、製造業者の説明書に従って、1%FCSおよび0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBS（FACS緩衝液）中の 1×10^5 細胞に添加する。細胞を室温で20分間暗所にてインキュベートする。次いで、CD8などのT細胞マーカーに特異的な抗体を、製造業者が示唆する最終濃度になるように添加し、細胞を4℃で20分間暗所にてインキュベートする。細胞を冷却FACS緩衝液で洗浄し、1%ホルムアルデヒドを含有する緩衝液に再懸濁する。細胞をFACS Calibur（Becton Dickinson）機器で取得し、Cellquestソフトウェア（Becton Dickinson）の使用により分析する。テトラマー陽性細胞の分析には、前方および側方散乱プロットからリンパ球ゲートを採取する。データは、CD8⁺／テトラマー⁺であった細胞のパーセンテージとして報告する。

（実施例3）

細胞内サイトカイン染色アッセイ

【0636】

抗原特異的T細胞集団を同定するための十分に確立されたテトラマー染色の非存在下で、抗原特異性は、十分に確立されたフローサイトメトリーアッセイを使用するサイトカイン産生の評価を使用して推定することができる。手短に言えば、T細胞を、目的のペプチドで刺激し、対照と比較する。刺激後、CD4⁺T細胞によるサイトカインの産生（例えば、IFN γ およびTNF α ）を、細胞内染色により評価する。これらのサイトカイン、特にIFN γ を使用して、刺激された細胞を同定することができる。図11は、GATA3ネオORFペプチドで負荷してまたは負荷せずにAPCで刺激した健康なHLA-A02：01ドナーに由来するCD4⁺細胞のIFN γ およびTNF α レベルの抗原特異的誘導のFACS解析を示す。

（実施例4）

ELISPOTアッセイ

【0637】

T細胞からのIFN γ 放出を単一細胞に基づいて測定するELISPOTアッセイ（BD Biosciences）を使用して、ペプチド特異的T細胞を機能的に数え上げる。標的細胞（T2またはHLA-A0201をトランスフェクトしたC1R）に、10 μ Mペプチドを37℃で1時間パルスし、3回洗浄した。1 $\times 10^5$ 個のペプチドでパルスした標的を、免疫原性培養物から採取した様々な濃度のT細胞（5 $\times 10^2 \sim 2 \times 10^3$ 個）と共に、ELISPOTプレートウェルで共培養する。プレートを、製造業者のプロトコールに従って発色させ、付属のソフトウェアを用いてELISPOTリーダー（Ce

10

20

30

40

50

llular Technology Ltd.) で分析する。IFN γ 産生 T 細胞の数に対応するスポットを、播種した T 細胞の数当たりの絶対スポット数として報告する。修飾ペプチドで拡大増殖した T 細胞を、修飾ペプチドでパルスした標的を認識する能力だけでなく、親ペプチドでパルスした標的を認識する能力についても試験する。図 35 は、IFN γ の抗原特異的誘導を示すグラフである。GATA3 ネオ ORF ペプチドをコードするレンチウイルス発現ベクターを疑似形質導入または形質導入した 2 つの試料の IFN γ レベルが示されている。

(実施例 5)

CD107 染色アッセイ

【0638】

CD107a および b は、同族ペプチドによる活性化後、CD8⁺ T 細胞の細胞表面上に発現される。T 細胞の溶解顆粒は、分子 CD107a および b を含むリソソーム関連膜糖タンパク質 (「LAMP」) を含有する脂質二重層を有する。細胞傷害性 T 細胞が T 細胞受容体を介して活性化されると、これらの溶解顆粒の膜が動員され、T 細胞の原形質膜と融合する。顆粒内容物が放出され、これが標的細胞の死に結び付く。CD107a および b は、顆粒膜が原形質膜と融合すると細胞表面に露出するため、それらは脱顆粒のマーカーである。CD107a および b 染色により測定される脱顆粒は、単一細胞に基づいて報告されるため、アッセイは、ペプチド特異的 T 細胞を機能的に数え上げるために使用する。アッセイを実施するため、ペプチドを、最終濃度が 20 μ M になるように HLA-A02:01 をトランスフェクトした細胞 C1R に添加し、細胞を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、3 回洗浄した。1 $\times$ 10⁵ 個のペプチドでパルスした C1R 細胞をチューブにアリコートし、CD107a および b に特異的な抗体を、製造業者 (Becton Dickinson) が示唆する最終濃度になるように添加する。アッセイの経過中一過性に表面に出現する際に CD107 分子を「捕捉」するために、T 細胞の添加の前に抗体を添加する。次に、免疫原性培養物に由来する 1 $\times$ 10⁵ 個の T 細胞を添加し、試料を 37 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。T 細胞を、CD8 などの追加の細胞表面分子についてさらに染色し、FACS Calibur 機器 (Becton Dickinson) で取得する。付属の Cellquest ソフトウェアを使用してデータを分析し、結果を、CD8⁺/CD107a および b⁺ 細胞のパーセンテージとして報告する。図 34 は、細胞傷害性マーカー CD107a の抗原特異的誘導を示すグラフである。GATA3 ネオ ORF ペプチドをコードするレンチウイルス発現ベクターを疑似形質導入または形質導入した 2 つの試料の総 CD8⁺ 細胞中の CD107a⁺ 細胞パーセントが示されている。

(実施例 6)

細胞傷害性アッセイ

【0639】

細胞傷害活性を、方法 1 または方法 2 を使用して測定する。方法 1 は、クロム放出アッセイを伴う。標的 T2 細胞を 37 $^{\circ}$ C にて 1 時間 Na⁵¹Cr で標識し、洗浄する。次いで、5 $\times$ 10³ 個の標的 T2 細胞を、免疫原性培養物に由来する様々な数の T 細胞に添加する。37 $^{\circ}$ C で 4 時間のインキュベーションの後で回収した上清中のクロム放出を測定する。特異的溶解のパーセンテージを、以下のように算出する。

方程式 10. 実験放出 - 自然放出 / 放出合計 - 自然放出 $\times$ 100

【0640】

方法 2 では、フローサイトメトリーによる標的細胞内の切断されたカスパーゼ 3 の検出により、細胞傷害活性を測定する。標的がん細胞を、操作して、適切な MHC-I アレルと共に、突然変異型ペプチドを発現させる。疑似形質導入した標的細胞 (すなわち、突然変異型ペプチドを発現していない) を、陰性対照として使用する。細胞を CFSE で標識して、エフェクター細胞として使用される刺激 PBMC と区別する。標的およびエフェクター細胞を 6 時間共培養してから、回収する。細胞内染色を実施して、CFSE 陽性標的がん細胞内のカスパーゼ 3 の切断型を検出する。特異的溶解のパーセンテージを、以下のように算出する。

方程式 11. カスパーゼ 3 の実験切断／カスパーゼ 3 の自然切断（突然変異型ペプチド発現の非存在下で測定される）× 100

【0641】

方法 2 の細胞傷害性アッセイは、本明細書の実施例 25 の材料および方法セクションに提供されている。

（実施例 7）

ロングマーおよびショートマーを逐次的に使用した *in vivo* での $CD8^+$ T 細胞応答の増強

【0642】

ロングマーペプチドでのワクチン接種は、ペプチドのプロセッシングおよび提示に応じて、 $CD4^+$ および $CD8^+$ T 細胞応答の両方を誘導することができる。最小ショートマーエピトープによるワクチン接種は、 $CD8^+$ T 細胞応答を生成することに集中するが、抗原提示前のペプチドプロセッシングを必要としない。そのため、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）だけでなく、任意の細胞がエピトープを容易に提示することができる。これは、末梢性寛容の一部として、抗原を提示する健康な細胞に接触する T 細胞の寛容に結び付く場合がある。これを回避するために、ロングマーによる初期免疫化は、ペプチドをプロセッシングおよび提示することができる APC によってのみ、 $CD8^+$ T 細胞のプライミングを可能にする。その後の免疫化は、初期 $CD8^+$ T 細胞応答をブーストする。

in vivo 免疫原性アッセイ

【0643】

19 匹の 8～12 週齢の雌 C57BL/6 マウス（Taconic Biosciences）を、到着時にランダムに、かつ前向きに処置群に割り当てた。動物を、研究開始前に 3 日間順化させた。動物は、Lab Diet（商標）5053 滅菌げっ歯動物餌で維持し、滅菌水を自由に提供した。群 1 の動物は、ワクチン接種アジュバントのみの対照として役目を果たし、0、7、および 14 日目に皮下注射（s.c.）により 0.1 mL の体積で 100 μ g のポリイノシン：ポリシチジル酸（ポリ I：C）単独を投与した。群 2 の動物には、6 つのロングマーペプチド（下に記載）の各々 50 μ g を、100 μ g のポリ I：C と共に、0、7、および 14 日目に 0.1 mL の体積で s.c. 投与した。群 3 の動物には、6 つのロングマーペプチド（下に記載）の各々 50 μ g を、100 μ g のポリ I：C と共に、0 日目に 0.1 mL の体積で s.c. 投与し、モル一致当量の対応するショートマーペプチド（下に記載）を、100 μ g のポリ I：C と共に、7 および 14 日目に 0.1 mL の体積で s.c. 投与した。動物を、毎日計量し、全体的な健康をモニターした。研究終了 21 日目に、動物が 0 日目の体重と比較してその体重の > 30% を喪失した場合、または動物が瀕死であると見出された場合、動物を CO₂ 過剰投与により安楽死させた。殺時に、脾臓を回収し、標準的プロトコールを使用して単一細胞懸濁液へと加工した。手短に言えば、脾臓を 70 μ M フィルターに通して機械的に分解し、ペレット化し、ACK 溶解緩衝液（Sigma）で溶解してから、細胞培養培地に再懸濁した。

ペプチド

【0644】

6 つの以前に同定されたマウスネオ抗原を、 $CD8^+$ T 細胞応答を誘導するそれらの実証されている能力に基づいて使用した。各ネオ抗原について、最小エピトープに対応するショートマー（8～11 個のアミノ酸）が画定されている。突然変異周囲の 20～27 個のアミノ酸に対応するロングマーを使用した。

ELISPOT

【0645】

ELISPOT 分析（マウス IFN γ ELISPOT Ready-SET-Go；E Bioscience）を、キットプロトコールに従って実施した。手短に言えば、分析日の前日に、96 ウェルフィルタープレート（0.45 μ m の孔径の疎水性 PVD F 膜；EMD Millipore）を活性化し（35% EtOH）、洗浄し（PBS）、捕捉抗体でコーティングした（1：250；4°C O/N）。分析日に、ウェルを洗浄し、ブ

10

20

30

40

50

ロッキングした（培地；37℃で2時間）。100μL中およそ 2×10^5 個の細胞を、100μLの10mM試験ペプチドプール（ショートマー）、またはPMA／イオノマイシン陽性対照抗原、またはビヒクルと共にウェルに添加した。細胞を、抗原と共に37℃で一晩（16～18時間）インキュベートした。翌日、細胞懸濁液を廃棄し、ウェルをPBSで1回および脱イオン水で2回洗浄した。アッセイの残りのすべての洗浄ステップでは、ウェルが各洗浄ステップで3分間浸漬されることを可能にした。次いで、ウェルを洗浄緩衝液（PBS+0.05%Tween（登録商標）-20）で3回洗浄し、検出抗体（1:250）をすべてのウェルに添加した。プレートを室温で2時間インキュベートした。検出抗体溶液を廃棄し、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄した。アビジン-HRP（1:250）をすべてのウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートした。コンジュゲート溶液を廃棄し、ウェルを洗浄緩衝液で3回、次いでPBSで1回洗浄した。基質（3-アミノ-9-エチルカルバゾール、0.1M酢酸緩衝液、H₂O₂）をすべてのウェルに添加し、スポット発色をモニターした（およそ10分間）。ウェルを水で洗浄することにより基質反応を停止させ、プレートを一晩空気乾燥させた。プレートを、付属のソフトウェアを用いてELISPOTリーダー（Cellular Technology Ltd.）で分析した。IFNγ産生T細胞の数に対応するスポットを、播種したT細胞の1個当たりの絶対スポット数として報告する。

（実施例8）

質量分析によるGATA3ネオORFペプチドの検出
【0646】

293T細胞に、GATA3ネオORFによりコードされるペプチドの種々の領域をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。GATA3ネオORF配列によりコードされるペプチドを発現する5000万～7億個の形質導入した細胞を培養し、酸洗浄を使用してペプチドをHLA-ペプチド複合体から溶出させた。次いで、溶出したペプチドをMS/MSで分析した。HLA-A02:01タンパク質を発現する293T細胞の場合、ペプチドVLPEPHLAL、SMLTGPPARV、およびMLTGPPARVが質量分析により検出された（図5）。HLA-B07:02タンパク質を発現する293T細胞の場合、ペプチドKPKRDGYMFおよびKPKRDGYMFLが質量分析により検出された（図5）。HLA-B08:01タンパク質を発現する293T細胞の場合、ペプチドESKIMFATLが質量分析により検出された（図5）。

（実施例9）

GATA3ネオORFは、複数のアレルに強力なエピトープを産生する。
【0647】

下記の表4のネオエピトープを含有する複数のペプチドを、抗原提示細胞（APC）上に発現させるかまたは負荷した。次いで、質量分析を実施し、表記のHLAアレルに対するネオエピトープの親和性、およびHLAアレルとのネオエピトープの安定性を決定した。表4は、複数のアレルでの例示的なGATA3ネオORF産生エピトープを列挙している

10

20

30

40

50

【表 4】

アレル	ネオエピトープ	共通(C)または 可変(V)領域	観察された MHC親和性 (nM)	観察された MHC 安定性 (時間)
A02:01	AIQPVLTWT	V	8	1.5
	MLTGPPARV	C	11	5.8
	SMLTGPPARV	C	14	21.7
	VLPEPHLAL	V	16	1.1
	TLQRSSLWCL	C	118	0.5
	YMFLKAESKI	C	141	0.6
	ALQPLQPHA	V	604	1.5
A03:01	KIMFATLQR	C	3	5.6
	VLWTTPLQH	V	16	0.3
	YMFLKAESK	C	80	0.3
A11:01	KIMFATLQR	C	23	8.9
	VLWTTPLQH	V	4539	0
	YMFLKAESK	C	1729	0
A24:02	MFLKAESKI	C	332	0.2
	YMFLKAESKI	C	6,995	1.2
B07:02	FATLQRSSL	C	14	0.7
	EPHLALQPL	V	17	7.2
	KPKRDGYMF	C	28	8.6
	KPKRDGYMFL	C	98	3.3
	QPVLTWTPL	V	109	1.4
	GPPARVPAV	C	221	1.6
	MFATLQRSSL	V	267	0
B08:01	EPHLALQPL	V	12	0
	ESKIMFATL	C	18	1.3
	FLKAESKIM	C	22	1.2
	FATLQRSSL	C	27	0
	YMFLKAESKI	C	32	0.4
	IMKPKRDGYM	C	33	0.4
	MFATLQRSSL	C	53	0
	FLKAESKIMF	C	82	0
	LHFCRSSIM	C	119	0

(実施例 10)

複数のネオエピトープがCD8+T細胞応答を誘発する

【0648】

ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、抗原特異的T細胞の誘導を実施した。T細胞製造後にCD8+T細胞誘導を分析した。分析のために様々な時点で細胞試料を採取することができる。pMHCマルチマーを使用して、誘導培養における抗原特異的CD8+T細胞の割合をモニターした。図9A～9Cおよび10A～10Bは、それぞれ、SMLTGPPARVおよびMLTGPPARVで誘導した抗原特異的CD8+メモリーT細胞の割合を示す例示的な結果を示す。図9Aは、刺激または誘導後にフローサイトメトリーにより分析したMLTGPPARVペプチドに反応した抗原特異的CD8+T細胞の割合を示す、6人の異なる健康なドナーに由来するPBMCを使用したT細胞応答アッセイの例示的な結果を示す。抗原特異的T細胞の割合の増加が観察された。図9Bは、刺激または誘導後にフローサイトメトリーにより分析したSMLTGPPARVペプチドに反応した抗原特異的CD8+T細胞の割合を示す、健康なドナーに由来するPBMCを使用したT細胞応答アッセイの例示的な結果を示す。抗原特異的T細胞の割合の増加が観察された。試験した5人の健康なドナーのうち、4人は、MLTGPPARVペプチドに反応した抗原特異的CD8+T細胞の割合の増加を示した。3人の異なる健康なドナーに由来するPBMCを使用したT細胞応答アッセイは、3人のドナーのうち1人において、刺激または誘導後にフローサイトメトリーにより分析したVLPEPHLALペプチドに反応した抗原特異的CD8+T細胞の割合の増加を示した。図9Cは、刺激または誘導後にフローサイトメトリーにより分析したSMLTGPPARV、MLTGPPARV、KIM

FATLQR、KPKRDGYMFL、KPKRDGYMF、またはESKIMFATLペプチドに应答した抗原特異的CD8⁺T細胞の割合を示す、HLA-A02:01、HLA-A03:01、HLA-A11:01、HLA-B07:02、およびHLA-B08:01の健康なドナーに由来するPBMCを使用したT細胞応答アッセイの例示的な結果を示す。図10Aは、刺激ペプチドKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH（最小エピトープKPKRDGYMFおよびKPKRDGYMFLを分析）に应答した抗原特異的CD8⁺T細胞の割合を示す、HLA-B07:02の健康なドナーに由来するPBMCを使用したT細胞応答アッセイの例示的な結果を示す。図10Bは、刺激ペプチドSMLTGPPARVPAVPFDLH（最小エピトープSMLTGPPARVおよびMLTGPPARVを分析）に应答した抗原特異的CD8⁺T細胞の割合を示す、HLA-A02:01の健康なドナーに由来するPBMCを使用したT細胞応答アッセイの例示的な結果を示す。

10

（実施例11）

誘導されたT細胞の細胞傷害性アッセイ

【0649】

細胞傷害性アッセイを使用して、誘導されたT細胞培養物が抗原発現腫瘍系を死滅させることができるか否かを評価した。この実施例では、生および死腫瘍細胞での活性カスパーゼ3での発現を測定して、早期細胞死および死腫瘍細胞を定量化した。図33では、誘導されたCD8⁺応答は、抗原発現腫瘍標的を死滅させることが可能であった。GATA3ネオORFペプチドをコードするレンチウイルス発現ベクターを疑似形質導入または形質導入した2つの試料の生カスパーゼ-A陽性標的細胞のパーセントが示されている。

20

（実施例12）

ペプチド合成

【0650】

下記の表5のペプチドが合成され、精製された。予測されたおよび決定された分子量が示されている。表記のペプチドの粗純度および最終純度も示されている。

表5

【表5-1】

ID	配列	MW 理論値	MW 決定値	粗純度	最終純度
L7	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLH	2234.6	2235.2	47%	97.4%
L8	GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD	2922.5	2923.5	51%	99.5%
L9	LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI	2986.6	2987.7	37%	98.1%
L10	KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR	2759.3	2760.3	53%	92.6%
L10b	KPKRDGYMFLKAESKIMFAT	2361.9	2362.4	41%	97.6%
L10b-4K	KKKKKPKRDGYMFLKAESKIMFAT	2874.5	2874.9	57%	85.7%

30

40

【表 5 - 2】

L10c	KPKRDGYMFLKAESKI	1911.3	1911.4	69%	98.4%
L11	FLKAESKIMFATLQRSSLWCL	2473.0	2473.0	66%	86%
L11b	YMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL	2767.4	2767.2	37%	80.0%
L11c	YMFLKAESKIMFATLQRSS	2251.7	2252.4	38%	95.9%
L11c-4K	KKKKYMFLKAESKIMFATLQRSS	2764.3	2764.8	45%	82.0%
L11d	KAESKIMFATLQRSSLWCL	2212.7	2213.0	32%	96.6%
L11d-4K	KKKKKAESKIMFATLQRSSLWCL	2725.3	2725.8	28%	82.3%
L11e	DGYMFLKAESKIMFAT	1852.2	1852.3	39%	91.6%
L11f	FLKAESKIMFATLQRS	1870.2	1870.2	62%	95.0%
L11g	ESKIMFATLQRSSLWC	1900.2	1900.2	41%	91.0%
L11h	FLKAESKIMFATLQR	1783.1	1783.8	35%	84%
L11i	ESKIMFATLQRSSL	1610.87	1610.80	75%	97%
L12	KIMFATLQRSSLWCLCSNH	2238.7	2238.6	31%	68.0%
L12-4K	KKKKKIMFATLQRSSLWCLCSNH	2751.3	2751.8	49%	75.7%
L12b	MFATLQRSSLWCLCSNH	1997.3	1997.8	47%	98.7%
L12b-4K	KKKKMFATLQRSSLWCLCSNH	2510	2510.4	39%	92.7%
L12c	MFATLQRSSLWCLC	1659.0	1659	57%	90%
L12d	TLQRSSLWCLCSNH	1647.9	1648	60%	99%
L14	SMLTGPPARVPAVPFDLH	1905.2	1905.3	64.5%	99.5%
L15	KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	3890.58	3891	37%	96%
L15b	KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL	3449.1	3449.5	42%	87%
L15c	DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCL	4639.5	4640.4	40%	90%

(実施例 13)

合成 G A T A 3 ネオ O R F ペプチドの溶解度試験

【0651】

下記の表 6 の各ペプチドの溶解度を、種々の表記の溶液で試験した。SS = コハク酸ナトリウム。試験した製剤 A は、D5W 中に 4% DMSO、5mM コハク酸ナトリウム (SS) を含んでいた。試験した製剤 B は、DMSO を含まず、D5W 中に 5mM SS を含んでいた。試験した製剤 C は、DMSO を含まず、D5W 中に 0.25mM SS を含んでいた。2つのシステインを含有する 33 量体 L15 の合成は、配列中の ES、AT、SS の側鎖のコンジュゲーションにより、シュードプロリン構造単位を作出することにより

使用して実施した。これにより、L 1 5を95%の純度に精製し、固相ペプチド合成中の凝集を防止することが可能になった。

下記の表6はペプチド溶解度を列挙している

【表6-1】

ID	配列	AA	4% DMSO 有りの D5W中 5mM SS	4% DMSO 有りの D5W中 0.5mM SS	4% DMSO 有りの D5W中 0.75 mM SS	4% DMSO 有りの D5W中 0.25 mM SS	ポリ ICLC + 4% DMSO 有りの D5W中 0.5mM SS	ポリ ICLC + 4% DMSO 有りの D5W中 0.75 mM SS	ポリ ICLC + 4% DMSO 有りの D5W中 0.25 mM SS	ポリ ICLC + 4% DMSO 有りの D5W中 0.25 mM SS	DMSO 無しの D5W中 0.25 mM SS	ポリ ICLC + DMSO 無しの D5W中 0.25 mM SS	DMSO 無しの D5W中 5mM SS	ポリ ICLC + DMSO 無しの D5W中 5mM SS
7	EPCSMLTGPP ARVPAVPFD LH	21	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り		有り	有り	有り	有り
14	SMLTGPPAR VPAVPFDLH	18	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り			有り	有り
8	GPPARVPAV PFDLHFCRSS IMKPKRD	26	有り	有り	有り	有り	有り	有り	有り		有り	有り	有り	有り
9	LHFCRSSIMK PKRDGYMFL KAESKI	25	有り	有り	有り	有り		有り	有り		有り		有り	有り
10	KPKRDGYMF LKAESKIMF ATLQR	23	有り			有り		無し		無し				
11	FLKAESKIMF ATLQRSSLW CL	21							無し					
12	KIMFATLQR SSLWCLCSN H	19												
10b	KPKRDGYMF LKAESKIMF	20		有り	有り	有り		無し	無し					

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

	AT													
11b	YMFLKAESK IMFATLQRSS LWCL	23												
11c	YMFLKAESK IMFATLQRSS	19		有り	有り	有り		無し	無し					
11d	KAESKIMFA TLQRSSLWC L	19		有り	有り	有り					有り	有り		
12b	MFATLQRSS LWCLCSNH	17		有り	有り	有り		無し	無し					
10b -4K	KKKKKPKRD GYMFLKAES KIMFAT	25	有り											
11c- 4K	KKKKYMFL KAESKIMFA TLQRSS	23												
11d -4K	KKKKKAESK IMFATLQRSS LWCL	23	有り											
12b -4K	KKKKMFATL QRSSLWCLC SNH	20	有り											
12- 4K	KKKKKIMFA TLQRSSLWC LCSNH	23	有り											
L10 c	KPKRDGYMF LKAESKI	16	有り			有り				有り	有り	有り	有り	有り
L11 e	DGYMFLKAE SKIMFAT	16	無し			無し								
L11 f	FLKAESKIMF ATLQRS	16			有り	有り					有り	有り		
L11 g	ESKIMFATLQ RSSLWC	16	無し			有り			無し					
L11 h	FLKAESKIMF ATLQR	15												
L11 i	ESKIMFATLQ RSSL	14									有り	有り		
L12	MFATLQRSS	14	無し			無し								

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

c	LWCLC												
L12 d	TLQRSSLWC LCSNH	14	有り			有り			有り	有り	有り		
L15	KPKRDGYMF LKAESKIMF ATLQRSSLW CLCSNH	33	無し								有り	有り	
L15 b	KPKRDGYMF LKAESKIMF ATLQRSSLW CL	29											
L15 c	DLHFCRSSIM KPKRDGYMF LKAESKIMF ATLQRSSLW CL	39											
10b -4K	KKKKKPKRD GYMFLKAES KIMFAT	24	有り										
11c- 4K	KKKKYMFL KAESKIMFA TLQRSS	23											
11d -4K	KKKKKAESK IMFATLQRSS LWCL	23	有り										
12b -4K	KKKKMFATL QRSSLWCCL SNH	21	有り										
12- 4K	KKKKKIMFA TLQRSSLWC LCSNH	23	有り										

(実施例 14)

対象への投与のための合成 G A T A 3 ネオ O R F ペプチドのプールの設計

【 0 6 5 2】

表記の G A T A 3 ペプチドの種々のプールの、下記の表 7 に従って設計した。例えば、「設計 1」は、3つのペプチドプールを含有し、プール 1 は 3つのペプチド（すなわち、L 7、L 8、L 14）を含有し、プール 2 は 2つのペプチド（すなわち、L 9 および L 10 c）を含有し、プール 3 は 2つのペプチド（すなわち、L 15 および L 11 f）を含有する。例えば、「設計 6」は、2つのペプチドプールを含有し、プール 1 は 4つのペプチド（すなわち、L 7、L 8、L 9、および L 14）を含有し、プール 2 は 2つのペプチド（すなわち、L 15 および L 11 f）を含有する。例えば、「設計 10」は、4つのペプチドプールを含有し、プール 1 は 5つのペプチド（すなわち、L 7、L 8、L 9、L 10 c、および L 14）を含有し、プール 2 は 1つのペプチド（すなわち、L 15）を含有し、プール 3 は 1つのペプチド（すなわち、L 11 f）を含有し、プール 4 は 1つのペプチド（すなわち、L 11 i）を含有する。プール内の各ペプチドの濃度は、ペプチド製剤を調製する当業者に従って変更することができる。下記の表 7 には、G A T A 3 プールの設計の説明が列挙されている。

表 7

【表 7】

#		設計 1	設計 2	設計 3	設計 4	設計 5	設計 6	設計 7	設計 8	設計 9	設計 10	設計 11
		3 プール	3 プール	3 プール	2 プール	4 プール	2 プール	3 プール	4 プール	3 プール	4 プール	3 プール
1	L7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	L14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	L8	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1
4	L9	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1
5	L15	3	3	3	2	4	2	3	2	2	2	2
6	L11f	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	N/A
7	L10c	2	2	1	1	2	N/A	N/A	4	1	1	1
8	L11i	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4	3

(実施例 15)

G A T A 3 ネオ O R F ペプチド合成

【0653】

700mgの粗材料を標的として従来の合成を実施する。適切な側鎖保護を有する以下のFmoc-アミノ酸を、L7ペプチド(EPCSMLTGPPARVPVPFDLH)の構築に使用した：Fmoc-Ala-OH・H₂O、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、およびFmoc-Val-OH。C末端ヒスチジンを、H-His(Trt)-2Cl-Trt樹脂またはFmoc-His(Trt)-Wang樹脂のいずれかを使用することによって樹脂に事前負荷することにより配列に組み込んだ。アスパルタミド(aspartamide)形成を最小限に抑えるために「DG」の配列組合せを用いるなど、Fmoc-Asp(OtBu)-OHの代わりにFmoc-Asp(OMpe)-OHを使用して、合成の向上を支援することができる。

【0654】

ペプチド配列をジメチルホルムアミド(DMF)で膨潤させ、2回排液した。合成は、DMF中20%ピペリジンを使用して、混合のために窒素を分注しながらN-α-FMOC保護基の脱保護から開始した。廃液後、樹脂をDMFで洗浄した。次に、0.4Mアミノ酸溶液を、0.4M HCTUおよび0.8M DIEAと共に添加した。混合のために窒素を分注しながらカップリング反応を実行し、続いて反応容器(RV)を排液した。アミノ酸、HCTU、およびDIEAの添加を、最初のカップリングステップと同じ混合および排液パラメーターを用いてダブルカップリングサイクルで繰り返した。次いで、樹脂をDMFで再び洗浄した。このサイクルを、すべてのアミノ酸残基に対して繰り返した。最終脱保護法により、N末端FmocをDMF中20%のピペリジンにより除去し、樹脂をDMFで洗浄し、続いてMeOHで洗浄した。樹脂は、取り出すまで窒素下で機器に入れたままにした。

【0655】

マイクロ波合成の場合、同じFmoc-アミノ酸出発材料を使用し、(H-His(Trt)-2Cl Trt樹脂ではなく) Fmoc-His(Trt)-Wang樹脂のみを利用してC末端ヒスチジンを組み込んだ。

【0656】

マイクロ波合成機にて、樹脂をDMFで膨潤させてから、HTラインを介してマイクロ波反応容器(RV)に移した。RVにある間、Fmoc-His(Trt)-OH負荷樹脂をDMF中25%ピロリジンで処理して、85℃/90W、続いて100℃/20W下でN-α-Fmocを除去した。次に、RVを排液し、DMFで洗浄し、再び排液した。プログラムされたFmoc-アミノ酸を、4M DICおよび0.25M Oxymapureと共にRVに添加した(DMF中0.5M)。このカップリング反応後に、105℃/288W加熱、続いて105℃/73W加熱を行った。この最初の脱保護では、まずDMFで希釈したが、RVにはカップリング反応に由来するDMFがすでに含有されていたため、このステップは、いかなるその後の脱保護でも必要ではなかった。ペプチドが合成されるまで、脱保護、洗浄、およびカップリングのサイクルを各残基に対して繰り返した。アルギニン残基の場合、ダブルカップリングステップを実施し、その場合、シングルカップリングを実施した後に、溶液を排液し、カップリングステップを繰り返してから脱保護に進んだ。N末端Fmoc基の最終脱保護は、排液し、DMFで2回洗浄してから、DMFにより元のHT樹脂位置に移し戻すことを除いて、上記と同様に実施した。

【0657】

合成後、DMFを使用して樹脂をフリット注射器に移し、MeOHですすぎ、真空マニホールドを使用して乾燥させた。次いで、Reagent K(82.5%トリフルオロ酢酸(TFA)、5%水、5%チオアニソール、5%フェノール、および2.5%エタンジチオール)を使用し、往復振とう機上の直立ホルダーを使用して、樹脂を室温で3時間切断した。

【0658】

次いで、切断カクテルを、濾過注射器フリットを介して冷却ジエチルエーテルまたは冷却メチルtert-ブチルエーテル(MTBE)に分注した。次いで、各注射器を、攪拌により95:5トリフルオロ酢酸:水の溶液ですすいだ。次いで、すすぎ液を、カクテル/エーテル混合物の残りに添加した。次いで、混合物を遠心分離した。エーテルをデカントした後、別の冷却エーテル洗浄液を添加した。容器をボルテックスし、再び遠心分離した。これを繰り返してペレットをよくすすいだ。最終洗浄液をデカントし、ペレットを真空デシケーターにより乾燥させた。ペレットの試料を溶媒(例えば、DMSO、DMF、水、またはアセトニトリル)に溶解し、UPLC-MSにより同一性、粗純度、および滞留時間を分析した。他のペプチド、例えば、L14(SMLTGPPARVPAVPFDLH)、L8(GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD)、L10c(KPKRDGYMFLKAESKI)、L11h(FLKAESKIMFATLQR)、およびL11i(ESKIMFATLQRSSL)を、それらの配列に特異的なアミノ酸および事前負荷樹脂を使用して同様の形式で作製した。

(実施例16)

GATA3ネオORFペプチド合成

【0659】

以下のFmoc-アミノ酸を、ペプチドL15(KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH)を合成するのに使用した: Fmoc-Ala-OH·H₂O、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Trp

(Boc)-OH、および Fmoc-Tyr(tBu)-OH。C末端ヒスチジンを、H-His(Trt)-2Cl-Trt樹脂または Fmoc-His(Trt)-Wang樹脂のいずれかを使用することによって樹脂に事前負荷することにより配列に組み込んだ。アスパルタミド形成を最小限に抑えるために「DG」の配列組合せを用いるなど、Fmoc-Asp(OtBu)-OHの代わりに Fmoc-Asp(OMpe)-OHを使用して、合成の向上を支援することができる。セリン(Ser、S)およびスレオニン(Thr、T)残基が存在する場合、「SS」の代わりに Fmoc-Ser(tBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH、「AT」の代わりに Fmoc-Ala-Thr(psi(Me, Me)pro)-OH、および「ES」の代わりに Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OHなどのアミノ酸ジペプチド(シュードプロリン)を組み込んで合成収率を向上させた。L15の一部の合成では、3つのシュードプロリンすべて(すなわち、「SS」の代わりに Fmoc-Ser(tBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH、「AT」の代わりに Fmoc-Ala-Thr(psi(Me, Me)pro)-OH、および「ES」の代わりに Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH)の組合せを使用した。L15の他の合成では、それぞれ、以下のペストプロリン(pseudoproline)およびシュードプロリンの組合せを使用した:「AT」の代わりに Fmoc-Ala-Thr(psi(Me, Me)pro)-OHおよび「ES」の代わりに Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH;「SS」の代わりに Fmoc-Ser(tBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OHおよび「ES」の代わりに Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH;「SS」の代わりに Fmoc-Ser(tBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OHおよび「AT」の代わりに Fmoc-Ala-Thr(psi(Me, Me)pro)-OH;「AT」の代わりに Fmoc-Ala-Thr(psi(Me, Me)pro)-OH;「ES」の代わりに Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH;ならびに「SS」の代わりに Fmoc-Ser(tBu)-Ser(psi(Me, Me)pro)-OH。

【0660】

ペプチド配列をDMFで膨潤させ、2回排液した。合成は、DMF中20%ピペリジンを使用して、混合のために窒素を分注しながらN-α-Fmoc基の脱保護から開始した。廃液後、樹脂をDMFで洗浄した。次に、0.4Mアミノ酸溶液を、0.4M HCTUおよび0.8M DIEAと共に添加した。混合のために窒素を分注しながらカップリング反応を実施し、続いて反応容器(RV)を排液した。アミノ酸、HCTU、およびDIEAの添加を、最初のカップリングステップと同じ混合および排液パラメーターを用いてダブルカップリングサイクルで繰り返した。次いで、樹脂をDMFで再び洗浄した。このサイクルを、すべてのアミノ酸残基に対して繰り返した。最終脱保護法により、N末端FmocをDMF中20%ピペリジンにより除去し、樹脂をDMFで洗浄し、続いてMeOHで洗浄した。樹脂は、取り出すまで窒素のカバー下で機器に入れたままにした。

【0661】

マイクロ波合成の場合、同じアミノ酸出発材料を使用し、(H-His(Trt)-2Cl-Trt樹脂ではなく) Fmoc-His(Trt)-Wang樹脂のみを利用してC末端ヒスチジンを組み込んだ。

【0662】

マイクロ波合成機にて、樹脂をDMFで膨潤させてから、HTラインを介してマイクロ波反応容器(RV)に移した。RVにある間、Fmoc-His(Trt)負荷樹脂をDMF中25%ピロリジンで処理して、85℃/90W、続いて100℃/20W下でN-α-Fmocを除去した。この最初の脱保護では、まずDMFで希釈したが、RVにはカップリング反応に由来するDMFがすでに含有されていたため、このステップは、いかなるその後の脱保護でも必要ではなかった。次に、RVを排液し、DMFで洗浄し、再び排液した。次いで、プログラムされたFmoc-アミノ酸を、4M DICおよび0.25M

O x y m a p u r eと共にRVに添加した（DMF中0.5M）。このカップリング反応後に、105℃/288W加熱、続いて105℃/73W加熱を行った。ペプチドが合成されるまで、脱保護、洗浄、およびカップリングのサイクルを各残基に対して繰り返した。アルギニン残基の場合、ダブルカップリングステップが存在し、その場合、シングルカップリングを実施した後に、溶液を排液し、カップリングステップを繰り返してから脱保護に進んだ。N末端Fmoc基の最終脱保護は、排液し、DMFで2回洗浄してから、DMFにより元のHT樹脂位置に移し戻すことを除いて、すべての他の脱保護ステップと同じく実施した。

【0663】

合成後、DMFを使用して樹脂をフリット注射器に移し、MeOHですすぎ、真空マニホールドを使用して乾燥させた。次いで、Reagent K（82.5%トリフルオロ酢酸（TFA）、5%水、5%チオアニソール、5%フェノール、および2.5%エタンジチオール）を使用し、往復振とう機上の直立ホルダーを使用して、樹脂を室温で切断した。

【0664】

次いで、切断カクテルを、濾過注射器フリットを介して冷却ジエチルエーテルまたは（または冷却MTBE）に分注した。次いで、各注射器を、攪拌により95:5トリフルオロ酢酸：水の溶液ですすいだ。次いで、すすぎ液を、カクテル／エーテル混合物の残りに添加した。次いで、混合物を遠心分離した。エーテルをデカントした後、別の冷却エーテル洗浄液を添加した。容器をボルテックスし、再び遠心分離した。これを繰り返してペレットをよくすすいだ。最終洗浄液をデカントし、ペレットを真空デシケーターにより乾燥させた。ペレットの試料を溶媒（例えば、DMSO、DMF、水、またはアセトニトリル）に溶解し、UPLC-MSにより同一性、粗純度、および滞留時間を分析した。

【0665】

他のペプチド、例えば、L9（LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI）を、それらの配列に特異的なアミノ酸および事前負荷樹脂、ならびにセリン（Ser、S）またはスレオニン（Thr、T）残基が存在するシュードプロリン誘導体および上記のようなFmoc-Asp（OMpe）-OHを使用して、類似の形式で作製した。

（実施例17）

溶解度研究

【0666】

ネオエピトープを有するいくつかのGATA3ペプチドを、まず、4%DMSO有りのD5W中5mMコハク酸ナトリウム（SS）を使用して溶解度について試験した。初期の結果に基づきコハク酸ナトリウム（SS）濃度およびDMSO量を調整することにより製剤戦略を向上させた。それにより7つのペプチドの選択に至った。これらのペプチドのプール化戦略を、溶解度およびポリICLCとの適合性について決定した。これらの結果に基づき、3つのプールを選択した。D5W中0.25mM SSにペプチドが各々1つかない2つのプール、およびD5W中5mM SSに5つのペプチドを有する第3のプール。ポリICLCと組み合わせた後のプールのpHはすべてpH5.0～6.0であり、濾過中の喪失は最小限であった。

【0667】

以下の研究のためにスクリーニングしたペプチドはすべて表8に列挙されている。

表8

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

名称	配列	分子量	理論的 TFA 含有量	理論的 ペプチド 含有量%	純度%
L7	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLH	2234.6	13.3	80.3	97
L8	GPPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD	2922.4	21.5	72.1	100
L9	LHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESKI	2986.6	23.4	70.2	98
L10B	KPKRDGYMFLKAESKIMFAT	2361.8	22.5	71.1	98
L11C	YMFLKAESKIMFATLQRSS	2251.7	16.8	76.8	93
L11D	KAESKIMFATLQRSSLWCL	2212.6	17.1	76.5	92

10

【表 8 - 2】

L12B	MFATLQRSSLWCLCSNH	1997.3	14.6	79.0	93
L10	KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQR	2759.3	22.4	71.2	93
L10c	KPKRDGYMFLKAESKI	1911.3	26.4	67.2	98
L11	FLKAESKIMFATLQRSSLWCL	2473.0	15.6	78.0	86
L11e	DGYMFLKAESKIMFAT	1852.2	15.6	78.0	92
L11f	FLKAESKIMFATLQRS	1870.2	19.6	74.0	95
L11g	ESKIMFATLQRSSLWC	1900.2	15.3	78.3	91
L12c	MFATLQRSSLWCLC	1659.0	12.1	81.5	90
L12d	TLQRSSLWCLCSNH	1647.9	17.2	76.4	99
L15	KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	3890.6	19.0	74.6	98
L14	SMLTGPPARVPAVPFDLH	1905.2	15.2	78.4	99
L11i	ESKIMFATLQRSSL	1610.9	17.5	76.1	96

20

30

【0668】

緩衝液はすべての毎日調製した。D5Wは、デキストロースを秤量し、デキストロースにmilliQ水を添加して、適切な体積に到達させることにより調製した。例えば、12.5gのデキストロースに水を添加して総体積を250mLに到達させた。秤量することによって50mLのD5W中5mM SSを調製するために、67.54mgのSSを秤量し、D5Wに添加して総体積を50mLに到達させた。D5W中0.25mM SSを調製するために、2.5mLのD5W中5mM SSを、47.5mLのD5Wで希釈した。

【0669】

各ペプチドのペプチド含有量%を以下のように決定した：総TFA理論値は、正電荷（N末端、Arg、Lys、およびHis）の数の合計に等しい。その数を以下の方程式に代入した。式中、MWはペプチドの分子量である。

方程式1. $TFA\% = 100 * ((TFA\% * 114.02) / ((TFA\% * 114.02) + MW))$

【0670】

次いで、含水量理論値として6.45%を使用してペプチド含有量パーセントを算出するためにこの値を使用した。

方程式2. $ペプチド\% = 100 - TFA\% - 6.45\%$

【0671】

40

50

これらの実験の標的総重量は、以下の方程式を使用して算出した。

方程式 3. 標的総重量 = $(13.2 \times 10000) / (\text{ペプチド含有量} \% \times \text{純度} \%)$
【0672】

ペプチドを、Mettler Toledo XP105 Delta Mass 分析天びんを使用して 15 mL または 50 mL コニカルチューブに秤量し、実際の総重量を記録し、50 mg/mL を得るための DMSO の量を決定するために使用した。計算を下記に示す。

方程式 4. $\text{DMSO} (\mu\text{L}) = (\text{実際の総重量} (\text{mg}) \times 264 \mu\text{L}) / (\text{標的総重量} (\text{mg}))$
【0673】

次いで、ストックを、適切な製剤緩衝液中で 2 mg/mL に希釈した（1 部の DMSO ストック、24 部の緩衝液）。

【0674】

ペプチド重量および含有量パーセントを上記のように算出し、適切な緩衝液をペプチドに直接添加した。方程式 3 を使用して標的総重量を算出し、2 mg/mL ペプチドを得るために使用される緩衝液の体積を方程式 5 を使用して算出した。

方程式 5. 緩衝液 (mL) = $(\text{実際の総重量} (\text{mg}) \times 6.6 \text{ mL}) / (\text{標的総重量} (\text{mg}))$
【0675】

ペプチドを緩衝液で 1 : 4 にさらに希釈して 0.4 mg/mL を得るか、または表記されている場合のみ、緩衝液を乾燥ペプチドに直接添加して 0.4 mg/mL を得た。後者の場合、方程式 6 を使用して添加する適切な体積を決定した。

方程式 6. 緩衝液 (mL) = $(\text{実際の総重量} (\text{mg}) \times 3.3 \text{ mL}) / (\text{標的総重量} (\text{mg}))$
【0676】

ペプチドは、それらを超音波処理またはボルテックスすることによってではなく、コニカルチューブを逆さまにすることにより溶解させた。

【0677】

5 つのペプチドをプールするために、各 2 mg/mL ストックの等体積を組み合わせ、0.4 mg/mL の各ペプチドを得た。5 つ未満のペプチドを有するプールの場合、等体積のペプチドを組み合わせ、次いで溶液を適切な緩衝液で希釈して、0.4 mg/mL の各ペプチドを得た。プールを 3 ~ 5 回逆さまにして混合した。製剤化されたペプチドをガラスバイアルに移して、溶解度を視覚化した。2 時間毎に写真を撮影して、あらゆる外観の変化を記録した。

【0678】

ポリ IC LC は商業的に入手した。プールは、3 : 1 のペプチドのポリ IC LC に対する比で、150 μL のポリ IC LC を使用して 450 μL のペプチドプールと 2 mL ガラスバイアルにて組み合わせた。溶液を 3 ~ 5 回逆さまにして混合し、6 時間、2 時間毎に写真を撮影して、あらゆる外観の変化を記録した。pH 測定はすべて、使用前に毎日較正した Mettler Toledo inLab Micro pH メーターを使用して行った。分析している試料の 100 μL を取り出し、マイクロ遠心分離チューブに添加して pH を測定した。次いで、試料を廃棄した。UPLC-MS (Acquity QDa 質量分析計を備えた Waters Acquity H-Class) により試料を分析した。各サンプルの 2 μL 注射を、10 : 90 溶媒 A : B から 50 : 50 溶媒 A : B (A : 0.1% TFA / 水、B : 0.1% TFA : アセトニトリル) までの 8 分間勾配を使用して二連で分析した。標準製剤中のペプチドの初期溶解度を、0.4 mg/mL および 2 mg/mL の各ペプチドについて決定した。写真を撮影したが、ゲルは透明であることが多かった、またはペプチドは溶解すると小さなガラス状粒子であったため、写真は、必ずしも明確に溶解度を示すとは限らなかった。4% DMSO 有りの 5 mM SS / D5W におけるペプチド溶解度を表 9 に示す。

10

20

30

40

50

下記の表 9 は、4 % D M S O 有りの 5 m M S S / D 5 W でのペプチド溶解度および観察を列挙している

【表 9 - 1】

ペプチド名	ペプチド溶解度 (2 mg/mLでの) (Y/N)	製剤観察 (2 mg/mLでの)	ペプチド溶解度 (0.4 mg/mLでの) (Y/N)	製剤観察 (0.4 mg/mLでの)
L7	Y	透明	Y	透明
L8	Y	透明	Y	透明
L9	Y	透明	Y	透明
L15	N	白濁	N	4 時間にわたって白濁
L14	Y	透明	Y	透明
L10	Y	透明	Y	透明
L10c	Y	透明	Y	透明

10

【表 9 - 2】

L11	N	白濁、沈殿	N	ガラス状粒子
L11e	N	白濁、大型沈殿物	N	ガラス状粒子
L11f	N	白濁	N	ガラス状粒子
L11g	N	白濁	N	ガラス状粒子
L12c	N	白濁、大型沈殿物	N	ガラス状粒子
L12d	Y	透明	Y	透明

20

【 0 6 7 9 】

5 m M S S に不溶性であったペプチドを、4 % D M S O 有りの D 5 W 中 0 . 2 5 m M S S を使用して試験した。結果は、表 1 0 に要約されている。5 m M S S に不溶性であったペプチドの多くは、6 時間後に、0 . 4 m g / m L の濃度で 4 % D M S O 有りの 0 . 2 5 m M S S / D 5 W に可溶性であり、さらなる研究ではこのより低い S S 濃度を使用して試験した。

30

表 1 0 は、4 % D M S O 有りの 0 . 2 5 m M S S / D 5 W でのペプチド溶解度および観察を列挙している

【表 1 0】

ペプチド名	ペプチド溶解度 (2 mg/mLでの) (Y/N)	製剤観察 (2 mg/mLでの)	(0.4 mg/mLでの) (Y/N)	製剤観察 (0.4 mg/mLでの)
L15	Y	透明	Y	透明
L11	N(ガラス状粒子)	ガラス粒子	Y	透明
L11e	N	ゲル	N	ガラス状粒子
L11f	Y	透明	Y	透明
L11g	N(経時的にゲル)	経時的にゲル	Y	透明
L12c	N	大型粒子	N	白濁
L12d	Y	透明	Y	透明

40

【 0 6 8 0 】

50

これらの結果に基づき、ペプチド L7、L8、L9、L14、L10c、L11d、L11f、および L15 を、製剤研究のために選択した。DMSO 無しの製剤を、製剤化されたペプチドの安定性を向上させ、システイン含有ペプチドの二量体化を遅延させるための方式として試験した。濃度が 0.25 mM SS 中 0.4 mg/mL の試験したペプチド (L7、L8、L9、L14、L10c、L11d、L11f、および L15) はすべて、DMSO 無しで 6 時間後に可溶性であった。ペプチド L7、L8、L9、L10c、L12d、および L14 を、5 mM SS 中で試験し、同様に 6 時間後に DMSO 無しで可溶性であった。0.25 mM SS/D5W および 5 mM SS/D5W 中のペプチド製剤の pH 値は、表 11 に列挙されている。

下記の表 11 は、0.25 mM SS/D5W および 5 mM SS/D5W 中の 0.4 mg/mL ペプチド製剤の pH を示す

【表 11-1】

ペプチド名	5mM SS/D5W 中での pH	0.25mM SS/D5W 中での pH
L7	6.4	4.5
L8	6.4	5.0

【表 11-2】

L9	6.4	4.6
L10c	6.4	4.3
L11f	N/A	5.0
L14	6.4	4.2
L15	N/A	4.8

【0681】

表 11 に報告されているペプチドはすべて、0.25 mM SS に可溶性であったため、より低い SS 濃度を使用して初期プール設計を研究した。プールは、個々の溶解度も念頭に置いて設計した。L15 および L11f は、低 SS に可溶性であったため、それら 2 つのペプチドを一緒にプールした。最初の 3 つのプール設計を表 12 に示す。

下記の表 12 は、0.25 mM SS/D5W 中の初期ペプチドプールを示す

【表 12】

	設計 1	設計 2	設計 3
ペプチド名	3 プール	3 プール	3 プール
L7	1	1	1
L14	1	1	1
L8	1	2	2
L9	2	2	2
L15	3	3	3
L11f	3	3	3
L10c	2	2	1

【0682】

ペプチドはすべて、プールした後も可溶性のままであった。ポリ ICLC を添加したまたは添加しないペプチドプールの pH 値を表 13 に示す。

下記の表 13 は、ポリ ICLC を添加したまたは添加しない表 12 のペプチドプールの pH を列挙している

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1】

プール	プールのpH	ポリICLC有りのプールのpH
設計 1		
プール 1	3.4	4.7
プール 2	3.8	5.1
プール 3	4.0	5.5
設計 2		
プール 1	3.7	5.0
プール 2	3.6	4.8
プール 3	4.0	5.5
設計 3		
プール 1	3.5	4.7
プール 2	3.9	5.5

10

【表 1 3 - 2】

プール 3	4.0	5.5
-------	-----	-----

20

【0 6 8 3】

次いで、各設計のプールをポリICLCと混合して、アジュバントとの適合性を試験した。プール3およびペプチドL10cを含有するすべてのプールは、ポリICLCと組み合わせると沈殿した。加えて、3つのペプチドを有するプールは、ポリICLCと組み合わせると5.0未満のpHを有し、これは、プールが2つよりも多くのペプチドを含有する場合、緩衝能力をより高くするべきであることを示唆する。

【0 6 8 4】

L7、L8、L9、L10c、およびL14はすべて、5mM SSに可溶性であるため、それらを高SS濃度を有するプールで試験した。これらの5つのペプチドを用いて3つのプールを試験した。1つのプールはL10cを有しておらず、1つはL10c単独を有し、3つ目は5つのペプチドすべてを有していた。L11fおよびL15は、このより高い濃度では可溶性でなかったため、0.25mM SSで製剤化した。しかしながら、沈殿が観察されたため、単一プールではなく、別々に0.4mg/mLに製剤化した。ペプチドの各々は、それぞれの製剤に可溶性であった。これらのプールは、視覚化に基づきポリICLCとも適合性であり、プールをポリICLCと組み合わせた後のpH値はすべて5.0～6.3の間であり（表14）、これは、皮下注射に適切である。表14は、ポリICLC無しのペプチドプールのpH対ポリICLC有りのペプチドプールのpHを列挙している

30

【表 1 4】

プール	ポリICLC無しのプールのpH	ポリICLC有りのプールのpH
プール 1	5.6	5.6
プール 2	5.4	5.5
L10c	6.4	6.3
L11f	5.0	5.9
L15	4.8	6.0

40

【0 6 8 5】

50

ペプチド L11i を、DMSO 無しの種々のコハク酸塩濃度を有する D5W 中で試験した。ペプチドは、0.4 mg/mL ではすべての SS 濃度で可溶性であると考えられた。より高い SS 濃度では、2 mg/mL でいくらかの沈殿が観察された。試料はすべて、ポリ ICLC と組み合わせても同じであるように見えた。ポリ ICLC 無しの 0.25 mM SS、0.5 mM SS、または 5 mM SS 中の 2 mg/mL または 0.4 mg/mL ペプチド L11i、およびポリ ICLC 有りの 0.25 mM SS、0.5 mM SS、または 5 mM SS 中の 0.4 mg/mL ペプチド L11i の製剤の pH 値を表 15 に示す。表 15 は、ポリ ICLC 無しの 0.25 mM SS、0.5 mM SS、および 5 mM SS 中の 2 mg/mL または 0.4 mg/mL L11i ペプチド、ならびにポリ ICLC 有りの 0.25 mM SS、0.5 mM SS、および 5 mM SS 中の 0.4 mg/mL

10

【表 15】

	pH		
	2 mg/mL ペプチド L11i	0.4 mg/mL ペプチド L11i	ポリ ICLC 有りの 0.4 mg/mL ペプチド L11i
5mM SS	5.8	6.7	6.6
0.5mM SS	4.1	5.8	6.1
0.25mM SS	3.7	5.3	6.1

【0686】

結果に基づいて最終的に決定されたプールには、プール 1 (5 mM SS / D5W 中の L7、L8、L9、L10c、および L14)、プール 2 (0.25 mM SS / D5W 中の L11i または L11f のいずれか)、およびプール 3 (0.25 mM SS / D5W 中の L15) が含まれていた。これらのプールの各々を、Pall 製 0.2 μm フィルター (HP1002) での保持について試験した。事前に濾過した試料ならびに 2 回濾過の各々の後の試料を、UPLC-MS により分析した。L11f および L11i の 3% 未満が最初の濾過ステップ後に失われ、2 回目の濾過ステップ後には追加のペプチドは失われなかった。わずか 4.9% の L15 が最初の濾過後に失われ、次いで、1.3% が 2 回目の濾過後に失われた。プール 1 の各ペプチドの合計 3% 未満が、2 回の濾過ステップ後に失われた。

20

結論

【0687】

一連の有望な GATA3 ペプチドを、4% DMSO 有りの 5 mM SS / D5W を含有する製剤緩衝液中での溶解度について試験した。5 mM SS に不溶性のペプチドも、より低い SS 濃度で試験した。これらの結果に基づき 7 つのペプチドを選択し、そのうちの 5 つは、5 mM SS に可溶性であり (L7、L8、L9、L10c、および L14)、他のものは、より低い濃度で可溶性であった (L11f、L11i、および L15)。DMSO の除去も試験した。DMSO の除去は、溶解度を向上させ、UPLC 分析をより困難にする場合があるジスルフィド形成を遅延させることができる。選択したペプチドの各々は、DMSO 無しで可溶性であった。

30

【0688】

溶解度の結果に基づき、0.25 mM SS / D5W を使用して 3 つのプール設計を生成した。プールは可溶性であったが、一部は、ポリ ICLC と適合性ではなかった。一部の場合では、L10c を含有するプールをポリ ICLC と混合すると沈殿が観察された。L11f および L15 の両方を含有するプールをポリ ICLC と組み合わせただけの場合でも、同じ観察がなされた。これらの結果に基づき、第 4 のセットのプールを設計した。第 1 のプールは、5 mM SS / D5W 中に L7、L8、L9、L10c、および L14 を含有し、ポリ ICLC と適合性であった。ペプチド L15 および L11f または L11i を、0.25 mM SS / D5W を用いて直接溶解して 0.4 mg/mL にすることにより調製される個々のペプチドとして維持した。これらのプールはすべて、ポリ ICLC と混合した場合 pH 5.0 よりも高く、これは、皮下注射に許容される。

40

(実施例 18)

50

GATA3ネオORF突然変異の出現率 【0689】

この実施例では、GATA3ネオORF突然変異の出現率および翻訳の証拠を特徴付ける。ワクチンは、この遺伝子のある特定のフレームシフト突然変異を内包する細胞にのみ存在するGATA3（GATA結合タンパク質3）の新規オープンリーディングフレームにわたる長鎖ペプチドのプールで構成されている。フレームシフト突然変異の開始位置に応じて、得られるオープンリーディングフレームは長さが様々であり得るが、それらはすべて、共通翻訳領域「GATA3ネオORF」を共有する。図13は、共通翻訳領域の例示的なアミノ酸配列を提供する。GATA3ネオORF翻訳配列をもたらすあらゆる遺伝子フレームシフト突然変異が、「GATA3ネオORF突然変異」である。公的に入手可能なゲノムおよびプロテオミクスデータセットを、GATA3ネオORF突然変異の出現率およびGATA3ネオORFについての翻訳の証拠について調査した。

10

材料および方法

データセット

【0690】

MSK-IMPACT乳がんデータセット：MSK-IMPACT乳がんデータセット（Razavi et al., 2018）は、cBioPortal for Cancer Genomics（http://www.cbioportal.org/study?id=breast_msk_2018）で利用可能な公開データセットである。このデータセットは、ハイブリダイゼーション捕捉に基づく次世代配列決定アッセイであるMSK-IMPACTを使用した配列決定データを含むし、合計で1918個の乳房腫瘍検体および1756人の患者に由来する患者一致正常検体（patient-matched normal）に由来する、341~468個の間のがん関連遺伝子のすべてのタンパク質コードエクソンを分析する。この研究のため、公的に入手可能な突然変異データ、ならびにERステータス、HER2ステータス、および全生存期間を含む臨床データをダウンロードした。

20

【0691】

TCGA乳がんプロテオームデータセット：TCGA乳がんプロテオームデータセット（NCI CPTAC et al., 2016）は、CPTACデータポータル（<https://cptac-data-portal.georgetown.edu/cptac/s/S015>）で利用可能な公的データセットである。このデータセットは、iTRAQタンパク質定量法を使用した105人のTCGA乳がん患者に由来するグローバルプロテオームのタンデム質量分析データを含む。この研究のために、公的に入手可能な生データをダウンロードした。

30

突然変異出現率分析

【0692】

GATA3ネオORF同定：MSK-IMPACT乳がんデータセットのGATA3遺伝子の各突然変異事象を、ヒトゲノム由来のGATA3転写物ENST00000346208.3（hg19、GRCh37ゲノムリファレンスコンソーシアムヒューマンリファレンス（Genome Reference Consortium Human Reference）37）にマッピングし、次いでin silicoで全長タンパク質に翻訳した。全長タンパク質がGATA3ネオORF配列を含む場合、この突然変異事象を含む試料を、GATA3ネオORF陽性と標識する。

40

【0693】

GATA3ネオORF出現率：コホート内のすべての対象について、対象が、GATA3ネオORF陽性であると同定された少なくとも1つの配列決定された腫瘍試料を有する場合、対象をGATA3ネオORF陽性とみなす。GATA3ネオORF出現率を、コホートにおけるGATA3ネオORF陽性対象のパーセンテージであると規定する。

プロテオミクスデータからのペプチド同定

【0694】

50

タンパク質配列データベース：タンパク質配列データベースは、UCSCタンパク質配列データベース（2009年2月のヒト参照配列、GRCh37/hg19）からの63,691個のタンパク質配列、およびGATA3ネオORF配列を含有する1つの全長タンパク質を含有する。

【0695】

ペプチド同定：TCGA乳がんプロテオームデータセットの生データを、タンデム質量スペクトルの解釈のためのオープンソースソフトウェアパッケージであるComet検索エンジン（<http://comet-ms.sourceforge.net>）で分析した。Comet（バージョン2017.01レビジョン2）を使用して、UCSCタンパク質配列データベースに対してTCGA乳がんプロテオームデータセットからのすべてのMS/MSスペクトルを検索した。+6までの前駆体イオンを有するMS/MSスペクトルの検索を可能にした。前駆体イオンの質量誤差許容範囲は±10百万分率（ppm）であり、0.02のm/zピン幅を断片イオンに使用した。検索はすべて、トリプシンにより制限され、その結果、実験スペクトルに一致する各ペプチドは、酵素の切断特異性、つまりリシンまたはアルギニンのC末端側と一致しなければならなかった。最大で2つの切断ミス許容した。iTRAQ標識化から予想される+144.1021Daの固定修飾を、ペプチドのN末端およびすべてのリシン残基に適用した。可変修飾は、1ペプチド当たり最大で2つの酸化メチオニン残基を含んでいた。カルバミドメチル化システインの場合、+57.021464Daの固定修飾を、すべてのシステインに適用した。標的ーデコイ偽発見率を評価するため、検索中に、Comet検索エンジンの一部としてデコイペプチドが自動的に生成された。検索結果をPercolator（バージョン3.02.0）により処理して、タンデム質量分析データを使用して、ペプチド同定の偽発見率を評価するための従来基準であるペプチドレベルq値を算出した。標準閾値（q値<0.01）を使用して、偽発見の可能性が高いものが許容ペプチドの1%未満になるように、データセットから同定されたペプチドを許容した。

【0696】

GATA3ネオORFの翻訳の証拠：UCSCタンパク質配列データベース中の任意の他のタンパク質からではなく、GATA3ネオORFを含有するタンパク質配列から特異的に導出されるペプチドを、GATA3ネオORF特異的ペプチドと呼んだ。GATA3ネオORF特異的ペプチドの同定を、GATA3ネオORFの翻訳の証拠とみなした。

結果

乳がんにおけるGATA3ネオORF突然変異出現率

【0697】

1,756人の患者のMSK-IMPACT乳がんデータセットから、突然変異出現率分析を実施し（上記の材料および方法のセクション1）、GATA3ネオORF陽性であった91人の患者を同定した。これらの91人の患者のうち、77人の患者が、HR+Her2（-）であると報告され、62人の患者が診断時に転移性であると報告された。各サブグループにおけるGATA3ネオORF陽性患者の出現率は、下記の表16に報告されている。HR+Her2（-）患者の中で、GATA3ネオORF陽性患者は、全HR+Her2（-）患者と比較して全生存期間に統計的差異を有さない（それらのGATA3ネオORFステータスに関わらず）（p値=0.246）（図14）。

下記の表16は、GATA3ネオORFの出現率を列挙している

【表16】

	患者数	GATA3 ネオ ORF 陽性患者数	出現率
全患者	1,756	91	5.2%
HR+Her2(-)	1,272	77	6.1%
HR+Her2(-) 転移性	856	62	7.2%

下記の表17は、TCGA乳がんプロテオームデータセットから同定された基準GATA3に対してマッピングされたGATA3ネオORF特異的ペプチドおよび他のペプチドを

列挙している

【表 17】

#	ペプチド配列	マッピングされたタンパク質
1	HGLEPCSMITGPPAR	GATA3ネオ ORF
2	RDGYMFLK	GATA3ネオ ORF
3	SSIMKPK	GATA3ネオ ORF
4	AGTSCANCQTTTTTLWR	GATA3
5	ALGSHHTASPWNLSPFSK	GATA3
6	DGTGHYLCNACGLYHK	GATA2, GATA3, GATA4, GATA5
7	DVSPDPSLSTPGSAGSAR	GATA3
8	ECVNCGATSTPLWR	GATA3
9	EGIQTR	GATA2, GATA3, GATA4, GATA6
10	EGIQTRNR	GATA2, GATA3
11	KEGIQTR	GATA2, GATA3, GATA4, GATA6
12	KVHDSLEDFPK	GATA3
13	LHNINRPLTMK	GATA3
14	LHNINRPLTMKK	GATA3
15	MNGQNRPLIKPK	GATA2, GATA3
16	NANGDPVCNACGLYYK	GATA2, GATA3
17	NSSFNPAALSR	GATA3
18	RAGTSCANCQTTTTTLWR	GATA3
19	RDGTGHYLCNACGLYHK	GATA2, GATA3, GATA4, GATA5
20	SSTEGRECVNCGATSTPLWR	GATA3
21	VHDSLEDFPK	GATA3
22	YQVPLPDSMK	GATA3

【0698】

乳がんゲノムデータセットの調査により、GATA3ネオORFが、それらの転移ステータスに応じて、HR+Her2（-）乳がん患者の6～7%に広く存在していることが示された。基準GATA3にマッピングされた複数のGATA3ネオORF特異的ペプチドが、他のペプチドと共に同定され、GATA3ネオORFの翻訳が示された。まとめると、これらの結果は、GATA3ネオORF突然変異が、HR+Her2（-）乳がんに広く存在しており、存在する場合、GATA3ネオORFは翻訳されて、タンパク質産物をもたらす得ることを示した。

（実施例19）

HLA型にわたるGATA3ネオORFエピトープ数

【0699】

この実施例は、多様なHLA型を有する患者集団にわたるGATA3ネオORFから予想され得る典型的なエピトープの数の推定を提供する。

材料および方法

【0700】

GATA3ネオORFの共通領域（実施例18で規定されているような）内のペプチド（長さ8～11）はすべて、遺伝子発現、HLA結合能、およびプロテアソームプロセッシング能が併せて考慮されるin silico予測アルゴリズムを使用して、提示確率を評価した。アルゴリズムでは、3つの変数を、単一アレル質量分析HLA-Iプロファイリングデータに対するロジスティック回帰フィッティングによる全体的提示予測に組み合わせる。3つの入力変数を規定するために、以下の仮定およびツールを使用した。

発現

【0701】

The Cancer Genome Atlas (TCGA) RNA-Seqデータに基づくと、乳がん試料は、100万個当たり約700個の転写物 (TPM) のGATA3発現中央値を有する。変異型アレルおよび野生型アレルがGATA3発現全体に等しく寄与すると仮定すると、ネオORF転写物は、350個のTPMで発現されると推定される。

HLA結合能

【0702】

米国でのアレル頻度を、民族特異的頻度に基づき、米国集団が62.3%欧州人、13.3%アフリカ系アメリカ人、6.8%アジア太平洋島民、および17.6%ヒスパニックであると仮定して帰属させた (表18)。21個の最も一般的なHLA-Aアレルおよび49個の最も一般的なHLA-Bアレルの場合、ペプチド結合予測は、ツールNetMHCPan-3.0を使用して実行した (21個および49個のアレルは、それぞれ、HLA-AおよびHLA-Bに95%の集団網羅範囲を提供する)。

プロセシング能

【0703】

プロセシング能の予測因子を、例えば、Abelin, J. et al. Immunity, 2017、Bassani-Sternberg, M. et al Molecular & Cellular Proteomics 2015に記載のような、各ペプチドの上流および下流配列内容に基づいてプロセシング能を決定するニューラルネットワーク構成である、公的に入手可能な質量分析に基づくHLA-Iプロファイリングデータを使用してトレーニングした。

【0704】

1患者当たりのエピトープ数をシミュレートするため、それらの全体的米国頻度に従って、2つのHLA-Aアレルおよび2つのHLA-Bアレルをランダムに抜き出す (ホモ接合性を可能にするため、置き換え有り) ことにより、模擬HLA遺伝子型を作出した (表18)。ほとんどの模擬患者は、4つの個別のアレルを有していたが、ホモ接合性が可能にされていたため、一部の模擬患者は、2つまたは3つの個別のアレルしか有していなかった。模擬患者の各ペプチド-アレル対に対して、帰属された提示確率 (上記のモデルから導出された) によりパラメーター化されたベルヌーイコイントスを実施した。陽性結果を、所与のペプチドが所与のアレルに提示され得ることを示すと解釈した。各模擬患者に対して、固有の陽性ペプチドの総数を合計して、反応性エピトープの総数を決定した (シミュレーションにおいて複数のアレルに提示されたペプチドは、1回だけ計数したことを意味する)。入れ子構造のエピトープ (例えば、陽性10量体内に完全に含有される陽性9量体) を単一エピトープとして計数することにより、結果をさらに選抜した。統計プログラミング言語Rを使用し、この様式で1万人の患者をシミュレートした。

下記の表18は、シミュレーションで使用されたアレル頻度を列挙している

10

20

30

40

50

【表 18 - 1】

アレル	欧州人	アフリカ系 アメリカ人	アジア 太平洋島民	ヒスパニック	合衆国平均
A*02:01	29.6%	12.5%	9.5%	19.4%	24.2%
A*01:01	17.2%	4.7%	5.1%	6.7%	12.9%
A*03:01	14.3%	8.1%	2.6%	7.9%	11.6%
A*24:02	8.7%	2.2%	18.2%	12.3%	9.1%
A*11:01	5.6%	1.6%	17.9%	4.6%	5.8%
A*29:02	3.3%	3.6%	0.1%	4.2%	3.3%
A*23:01	1.7%	10.8%	0.2%	3.7%	3.1%
A*68:01	2.5%	3.7%	1.9%	4.7%	3.0%
A*26:01	2.9%	1.4%	3.9%	2.9%	2.8%
A*32:01	3.1%	1.4%	1.3%	2.7%	2.7%
A*31:01	2.4%	1.0%	3.2%	4.8%	2.7%
A*30:01	1.3%	6.9%	2.1%	2.1%	2.3%
A*30:02	0.9%	6.2%	0.1%	2.8%	1.9%
A*68:02	0.8%	6.5%	0.0%	2.5%	1.8%
A*33:03	0.1%	4.5%	9.4%	1.3%	1.5%
A*25:01	1.9%	0.5%	0.1%	0.9%	1.4%
A*33:01	1.0%	2.1%	0.1%	2.0%	1.3%
A*02:06	0.2%	0.0%	4.8%	3.9%	1.1%
A*02:05	0.8%	1.9%	0.3%	1.5%	1.0%
A*74:01	0.0%	5.2%	0.1%	0.8%	0.8%
A*02:02	0.1%	4.2%	0.0%	0.7%	0.7%
B*07:02	14.0%	7.3%	2.6%	5.5%	10.8%
B*08:01	12.5%	3.8%	1.6%	4.5%	9.2%
B*44:02	9.0%	2.1%	0.8%	3.3%	6.5%
B*35:01	5.7%	6.5%	4.3%	6.4%	5.8%
B*44:03	5.0%	5.4%	4.2%	6.1%	5.2%
B*15:01	6.7%	1.0%	3.5%	2.9%	5.0%
B*51:01	4.5%	2.2%	6.3%	5.8%	4.6%
B*40:01	5.6%	1.3%	8.0%	1.4%	4.5%
B*18:01	4.6%	3.6%	1.2%	4.0%	4.1%
B*14:02	3.1%	2.2%	0.1%	4.1%	3.0%
B*57:01	3.8%	0.5%	2.1%	1.2%	2.8%
B*27:05	3.3%	0.7%	0.8%	1.7%	2.5%
B*13:02	2.6%	1.0%	2.3%	1.2%	2.1%
B*53:01	0.3%	11.2%	0.1%	1.6%	2.0%
B*38:01	2.2%	0.2%	0.5%	1.9%	1.7%
B*40:02	1.0%	0.4%	3.1%	4.9%	1.7%
B*49:01	1.3%	2.8%	0.1%	2.4%	1.6%
B*52:01	1.0%	1.4%	3.7%	2.7%	1.5%

10

20

30

40

50

【表 18-2】

B*35:03	1.6%	0.4%	2.4%	1.4%	1.4%
B*58:01	0.5%	3.5%	5.8%	1.5%	1.4%
B*55:01	1.7%	0.4%	0.5%	1.1%	1.4%
B*15:03	0.1%	6.2%	0.0%	1.6%	1.2%
B*45:01	0.4%	4.5%	0.2%	1.5%	1.1%
B*37:01	1.3%	0.5%	1.5%	0.6%	1.1%
B*50:01	0.8%	0.9%	0.7%	1.5%	0.9%
B*39:01	1.0%	0.4%	1.3%	1.0%	0.9%
B*35:02	1.1%	0.1%	0.2%	1.1%	0.9%
B*42:01	0.0%	5.5%	0.0%	0.6%	0.8%
B*14:01	0.8%	0.9%	0.3%	0.9%	0.8%
B*39:06	0.5%	0.2%	0.0%	2.0%	0.7%
B*58:02	0.0%	4.1%	0.0%	0.5%	0.6%
B*57:03	0.0%	3.4%	0.0%	0.7%	0.6%
B*48:01	0.1%	0.0%	2.0%	2.2%	0.6%
B*41:01	0.4%	0.5%	0.1%	1.3%	0.5%
B*15:10	0.0%	3.0%	0.1%	0.5%	0.5%
B*07:05	0.2%	0.7%	2.0%	0.5%	0.5%
B*56:01	0.5%	0.2%	0.8%	0.4%	0.5%
B*39:05	0.0%	0.0%	0.1%	2.3%	0.4%
B*41:02	0.4%	0.7%	0.0%	0.6%	0.4%
B*46:01	0.0%	0.0%	6.1%	0.0%	0.4%
B*35:08	0.4%	0.0%	0.2%	0.9%	0.4%
B*15:17	0.3%	0.6%	0.5%	0.7%	0.4%
B*35:12	0.0%	0.0%	0.0%	1.9%	0.3%
B*15:16	0.0%	1.7%	0.0%	0.5%	0.3%
B*81:01	0.0%	2.0%	0.1%	0.3%	0.3%
B*40:06	0.0%	0.0%	3.7%	0.3%	0.3%
B*35:17	0.0%	0.0%	0.0%	1.6%	0.3%
B*15:02	0.0%	0.1%	3.6%	0.0%	0.3%
B*38:02	0.0%	0.0%	3.7%	0.0%	0.2%

結果

【0705】

方法セクションに記載されている分析は、患者の95%が、GATA3ネオORFに由来する ≥ 2 つのHLA-Iエピトープを提示し得ることを示した（図15）。GATA3ネオORFは、上に提示されている詳細に基づくと、患者のHLA遺伝子型に関わらず、複数の提示可能なHLA-Iエピトープを内包することができる。これは、これらの予測ネオ抗原に対するT細胞応答を誘導する療法の有効性を示す。予測エピトープのサブセットを、以下の実施例20、21、22、23に詳述されているフォローアップ研究での検証のために選択した。

（実施例20）

エピトープの生化学的測定

【0706】

以下の実施例は、GATA3ネオORFに由来するエピトープの親和性の生化学的検証を提供する。多数のエピトープが、多くのHLAアレルに結合することができる（実施例19に記載のように）。この実施例では、エピトープを、いくつかの一般的なHLAアレル、つまりHLA-A*02:01、HLA-B*07:02、およびHLA-B*08:01に結合する能力について評価した。エピトープとそれらの予測HLAとの間の結合の親和性および安定性の両方を評価した。

【0707】

親和性は、HLAに対するエピトープの結合の強さの尺度である。強力な結合（一般に $< 500 \text{ nM}$ と規定される）は、T細胞により標的とされ得るネオ抗原の重要な特徴である。これは、ネオ抗原が腫瘍細胞の表面に提示されなければならない、したがって、一度に1つのペプチドしか個々のHLA分子に結合することができないため、HLA分子の1つ

の結合ポケットのために、腫瘍細胞により産生される他の抗原に打ち勝たなければならないからである。さらに、免疫原性エピトープは、それらの特異的HLAに対して強力な親和性を有する傾向があることが示されている。

【0708】

安定性は、所与のエピトープが、どれだけの間、同族HLAに結合したままでいるかの尺度である。安定的な結合（一般に>1時間と規定される）も、T細胞により標的とされ得るネオ抗原の重要な特徴である。エピトープは、T細胞により認識されるために、細胞表面上にて腫瘍細胞に結合したままでなければならない。さらに、親和性と同様に、免疫原性エピトープは、それらの特異的HLAに安定的に結合する傾向があることが以前に示されている。

【0709】

同族HLA分子に対するエピトープの安定性および親和性を評価するため、ペプチドを、>70%の純度（UV分析の面積%による）で合成し、20mMまたはそれより低く希釈し、それらの親和性および安定性を測定した。

【0710】

この実施例では、14個のエピトープと同族HLA分子との間の結合の親和性および安定性が報告される。4つのエピトープをHLA-A02:01で研究し、5つのエピトープをHLA-B07:02で研究し、8つのエピトープをHLA-B08:01で研究した（3つのエピトープを、HLA-B07:02およびHLA-B08:01の両方で研究した）。ペプチドはすべて、9.5nM~242.8nMの範囲の親和性により強力な結合を示した。安定性は、0時間~21.7時間の範囲であり、各アレルに対する少なくとも1つのエピトープは、1時間を超えていた。これらの結果は、1アレル当たり少なくとも1つのGATA3ネオORFに由来する強力なエピトープが存在することを示す。

材料および方法

生化学的測定のためのエピトープの選択

【0711】

GATA3ネオORFに由来する複数のエピトープを、具体的な一般的HLAアレル、つまりHLA-A02:01、HLA-B07:02、またはHLA-B08:01への結合に対する能力の確認のために選択した。これらのエピトープは、弱い~強い結合物質の範囲にあると予測された。

固相ペプチド合成

【0712】

Intavisペプチド合成機での固相ペプチド合成を使用して、ペプチドを5μmol規模で作製した。DMF中20%ピペリジンを使用してFmoc脱保護を実施し、ニートDMFですすいだ。アミノ酸はすべて、60μLの0.5Mアミノ酸（6当量）、55μLの0.5M HCTU（5.5当量）、5μLのNMP（0.5当量）、および14μLの4M NMM（11.2当量）を使用して、15分間の持続期間で室温にてダブルカップリングした。各ダブルカップリングサイクル後、100μLのDIEA溶液（まずNMP中2Mの溶液として作製し、次いでDMFを使用して12.5%に希釈した）およびDMF中6.25%無水酢酸を15分間添加することによりアセチルカップリングを実施してから、真空排液し、DMFですすいだ。脱保護、洗浄、ダブルカップリング、アセチルカップリング、洗浄サイクルを、配列の各アミノ酸に対して繰り返した。DMF中20%ピペリジンで最終脱保護を、DMF、EtOH、およびDCMで最終洗浄を実施した。機器での5分間の最終廃液乾燥が完了した後、プレート底部をDCMですすいだ。

ペプチドの切断

【0713】

92.5%TFA、2.5%TIPS、2.5%H₂O、2.5%EDTの溶液を使用してペプチドを切断した。1時間後、プレートを、1.2mL Micronicラックへと真空排液した。次いで、合計で3時間後、ペプチドを、冷却ジエチルエーテルを用いて遠心分離により沈殿させた。

10

20

30

40

50

ペプチドのUPLC-UV-MS分析

【0714】

粗ペプチドを乾燥させ、0.1% TFAを含有する1:1 ACN:H₂Oに再懸濁し、完全に凍結するまで-80℃で維持した。次いで、ペプチドを凍結乾燥して、ペプチドを粉末形態で単離した。ペプチド粉末を、まずニートDMSOに溶解し、次いでUPLC-UV-MS分析のためにDMSO:H₂Oで3:1に希釈した。UVモニタリングを、214 nmの波長で、200~1250 Daにわたる質量検出器範囲にて実施した。長さが9アミノ酸未満のペプチドに使用されるUPLC-UV-MS法は、2.1×50 mm 1.7 μM BEH Acquity UPLCカラムでの、5分間にわたる0~100%移動相B（アセトニトリル中0.085% TFA、対応する移動相Aは、水中0.1% TFA）の勾配を含み、9アミノ酸よりも大きなペプチドのための方法は、2.1×100 mm 1.7 μM BEH Acquity UPLCカラムでの、8分間にわたる10~80%移動相Bの勾配を含んでいた。

10

A214法によるペプチド濃度の決定

【0715】

A214法による評価のために、粗ペプチドを2~5 mg/mLの濃度でニートDMSOに溶解した。UPLC-UVクロマトグラムのペプチドピーク面積は、分析のために注入したペプチドの量、および検出波長でのペプチドの吸光係数に比例する。したがって、ペプチド試料の濃度は、そのUVピーク面積を公知の濃度の参照ペプチドのUVピーク面積と比較し、それぞれの吸光係数を考慮することにより決定することができる。以下の方程式を使用して、ペプチド濃度を算出する。

20

方程式7. $C = C_{ref} * (A_{sam} * E_{ref} * V_{ref}) / (A_{ref} * E_{sam} * V_{sam})$

【0716】

式中、Cは、mMでのペプチド試料濃度であり、C_{ref}は、mMでの参照ペプチド濃度であり、A_{sam}は、ペプチド試料のUVピーク面積であり、A_{ref}は、参照ペプチドのUVピーク面積であり、E_{ref}は、M⁻¹cm⁻¹での参照ペプチドの吸光係数であり、E_{sam}は、M⁻¹cm⁻¹でのペプチド試料の吸光係数であり、V_{sam}は、試料の注入体積であり、V_{ref}は、参照ペプチドの注入体積である。

【0717】

214 nmにおけるペプチドの吸光係数は、個々のアミノ酸およびペプチド結合の吸光係数を組み合わせることにより予測される。RAKF KQLL（ペプチドID LS-18）の配列を有する0.2 mg/mLの参照ペプチドを、粗ペプチド試料と順にUPLC-UV-MSに流す。次いで、UVピーク面積および吸光係数計算値を使用して、mMでのペプチド濃度を算出する。

30

親和性測定

【0718】

HLA分子の結合ポケットのために規定の放射性標識ペプチドに打ち勝つ能力を評価することにより、ペプチドのHLA分子に対する結合親和性を測定した。これは、HLA分子を精製し、それらを複数濃度の目的のペプチドおよび放射性標識されている高親和性結合ペプチドとインキュベートすることにより行った。2日間のインキュベーション後、未結合放射性標識ペプチドを、サイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、放射性標識ペプチドを有するHLA分子の割合を測定した。アッセイの終了時に結合していた放射性標識ペプチドのパーセンテージが低いペプチドは、HLAに対して強い親和性を有する。放射性標識ペプチドの結合を50%阻害するために必要な目的のペプチドの濃度は、複数濃度にわたる阻害の回帰分析により定量的に決定することができる。このIC₅₀測定を、真の結合親和性の近似として使用した。

40

【0719】

分析したペプチドの第1のウェーブ（wave）では、ペプチドの実際の濃度は、A214測定に基づき公知であり、濃度に基づいてあらゆる必要な補正を行った。分析したペ

50

プチドの第2のウェーブでは、ペプチドの濃度はすべて20mMであると推定し、その推定に基づいて初期IC50を算出し、後に実際の濃度を考慮して調整を実施した。実際の濃度が20mM未満のペプチドの場合、測定したIC50に、A214法で決定した実際の濃度をかけ、20mMで割ることにより補正した。

安定性測定

【0720】

クラスI MHCに対するペプチドの結合安定性を測定するため、ビオチン化MHC-I重鎖および軽鎖をコードする合成遺伝子をE. coliで発現させ、標準的な方法を使用して封入体から精製する。軽鎖(β2m)を、ヨウ素(125I)で放射性標識し、18℃にて精製MHC-I重鎖および目的のペプチドと組み合わせて、pMHC-I複合体形成を開始させた。これらの反応を、ストレプトアビジンをコーティングしたマイクロプレートで実施して、ビオチン化MHC-I重鎖を表面に結合させ、放射性標識軽鎖の測定を可能にして、複合体形成をモニターした。より高い濃度の未標識軽鎖の添加、および37℃でのインキュベーションにより、解離を開始させた。安定性は、シンチレーション計数により測定して、複合体の半分が解離するのにかかる時間単位の時間の長さとして規定した。二連測定を実施した。2回の測定値の平均を安定性として採用した。

結果

親和性測定

下記の表19は、エピトープ親和性測定値を列挙している

【表19】

ウェーブ	ペプチド配列	HLA アレル	実際のペプチド濃度(mM)	IC50測定値(nM)	IC50補正值(nM)
2	MLTGPPARV	A02:01	13.7	15.4	10.6
1	SMLTGPPARV	A02:01	20.0	15.4	15.4
2	TLQRSSLWCL	A02:01	8.4	281.2	117.7
1	YMFLKAESKI	A02:01	20.0	165.9	165.9
2	FATLQRSSL	B07:02	20.0	14.0	14.0
2	KPKRDGYMF	B07:02	20.0	28.2	28.2
2	KPKRDGYMFL	B07:02	17.0	115.2	98.1
2	GPPARVPAV	B07:02	15.7	281.9	221.2
2	MFATLQRSSL	B07:02	15.2	350.3	266.9
2	ESKIMFATL	B08:01	15.2	23.3	17.7
2	FLKAESKIM	B08:01	20.0	21.9	21.9
2	FATLQRSSL	B08:01	19.4	27.5	26.6
1	YMFLKAESKI	B08:01	20.0	32.0	32.0
2	IMKPKRDGYM	B08:01	16.5	40.2	33.2
2	MFATLQRSSL	B08:01	20.0	53.4	53.4
2	FLKAESKIMF	B08:01	18.3	90.0	82.3
2	LHFCRSSIM	B08:01	14.2	167.3	118.7

【0721】

*ここに報告されている実際のペプチド濃度およびIC50測定値は、生データから丸められているが、IC50補正值は、丸められていない生データを使用して算出したことに留意されたい。

安定性測定

下記の表20は、安定性測定値を列挙している

10

20

30

40

50

【表 20】

ウェーブ	配列	HLA アレル	実験 1 半減期(時間)	実験 2 半減期(時間)	平均半減期 (時間)
2	TLQRSSLWCL	A02:01	0.5	0.5	0.5
2	MLTGPPARV	A02:01	5.8	5.8	5.8
1	YMFLKAESKI	A02:01	0.6	0.6	0.6
1	SMLTGPPARV	A02:01	21.7	21.8	21.7
2	KPKRDGYMFL	B07:02	3.3	3.3	3.3
2	KPKRDGYMF	B07:02	8.3	9.0	8.6
2	FATLQRSSL	B07:02	0.7	0.6	0.7
2	MFATLQRSSL	B07:02	0.0	0.0	0.0
2	GPPARVPAV	B07:02	1.5	1.8	1.6
2	FLKAESKIMF	B08:01	0.0	0.0	0.0
2	FATLQRSSL	B08:01	0.0	0.0	0.0
2	MFATLQRSSL	B08:01	0.0	0.0	0.0
2	ESKIMFATL	B08:01	1.0	1.6	1.3
2	FLKAESKIM	B08:01	0.8	1.5	1.2
2	LHFCRSSIM	B08:01	0.0	0.0	0.0
2	IMKPKRDGYM	B08:01	0.4	0.4	0.4
1	YMFLKAESKI	B08:01	0.4	0.5	0.4

【0722】

実施例 20 では、複数の一般的な HLA 分子（HLA-A02:01、HLA-B07:02、HLA-B08:01）に対する GATA3 ネオ ORF 由来の予測エピトープを評価した。すべてのエピトープは、強力な親和性（＜500 nM）を有すると決定された。これらのエピトープのサブセットも安定的結合物質（＞1 時間）であり、評価した HLA アレルの各々に対して少なくとも 1 つの強力な結合物質があった。これらのデータは、GATA3 ネオ ORF エピトープが、複数の HLA アレルにわたって存在することを示す。

（実施例 21）

GATA3 突然変異および HLA アレルを有する細胞系の生成

【0723】

この実施例には、GATA 結合タンパク質 3（GATA3）新規オープンリーディングフレーム（ネオ ORF）突然変異ならびに高出現率 HLA アレル HLA-A02:01 および HLA-B07:02 を有する細胞系の調製を記載した。この細胞系は、GATA3 ネオ ORF 突然変異を含有する腫瘍細胞の *in vitro* 代用物として使用することができる。注目した特異的 GATA3 ネオ ORF を天然に内包する細胞系は、容易に入手することができず、それを、一般的に使用される細胞系 HEK293T の安定的レンチウイルス形質導入により調製した。この細胞系を選択したのは、一般的な HLA アレルの 2 つ、HLA-A02:01 および HLA-B07:02 を天然で発現するからである。この改変細胞系を、T 細胞による機能アッセイに使用した（実施例 25 および実施例 26）。加えて、この細胞系を、複数の HLA アレルに対する GATA3 ネオ ORF に由来するネオ抗原プロセッシング／提示の検証に使用した（実施例 22）。これらの研究では、HLA アレルを改変細胞系に一過性にトランスフェクトした。

材料および方法

GATA3 突然変異細胞系の生成の概要

【0724】

GATA3 突然変異を形質導入した HEK293T 細胞の生成は、（a）GATA3 突然変異がコードされたプラスミド設計、レンチウイルスの産生、GATA3 突然変異の HEK293T 細胞株への形質導入、および形質導入された細胞の選択を伴った。GATA3 突然変異細胞系の生成のためのこれらのステップが下に記載されている。

細胞系および培養

【0725】

HEK293T 細胞系は、American Type Culture Collec

tion (Rockford、メリーランド州、米国) から購入し、DMEM 10% FBS、およびPen/Strep培地で維持した。

GATA3突然変異がコードされたプラスミドの設計

GATA3突然変異遺伝子

【0726】

GATA3突然変異遺伝子プラスミド構築物の効率的な発現のために、1473~2074の600bp GATA結合タンパク質3 (GATA3) 野生型配列 (558~1892のコードDNA配列 (CDS) 配列を含有する) を、NCBI参照配列: NM_001002295.01から得た。さらに、GATA3突然変異配列を、参照配列から1734および1735における2つのヌクレオチドを欠失させることにより生成した (図16)。そのため、GATA3突然変異配列は、野生型配列からのアミノ酸配列の87位におけるフレームシフトを翻訳する (図17)。このDNA構築物は、野生型GATA3アミノ酸配列の87個の残基、および欠失により引き起こされるフレームシフトしたGATA3ネオORFアミノ酸配列の114を網羅することができる。

10

GATA3突然変異プラスミドの設計

【0727】

GATA3突然変異配列をコドン最適化し、合成し、pCDH-CMV-Puroベクター (Genescript) にクローニングした (図18)。

レンチウイルス産生

【0728】

Lenti-X293T細胞 (Clontech) を完全培養培地 (10% FBS、Pen/Strepを含有するDMEM) で培養し、GATA3突然変異がコードされたレンチウイルスプラスミドをトランスフェクトして、GATA3突然変異遺伝子のレンチウイルスを産生した。トランスフェクションの前日に、1ウェル当たり 8×10^5 個の細胞を6ウェルプレートに播種した。トランスフェクション当日に培養培地を置き換えた。4 μ gのレンチウイルス構築物プラスミドおよび4.6 μ Lのレンチウイルスパッケージングプラスミドミックス (Sigma-Aldrich) を、Opti-MEM (Thermo Fisher) 中で混合した。混合物を10 μ LのFuGENE HD (Promega) と混合し、細胞に直接添加した。24時間後に、培地を新鮮な完全培養培地に置き換えた。レンチウイルスを含有していた上清を、トランスフェクションの72時間後に回収した。

20

GATA3突然変異の形質導入

【0729】

5×10^5 個のHEK293T細胞 (ATCC) を、6 μ g/mLポリブレンおよび10% FBSを含有していた12ウェルプレートの2mL DMEM培地に播種した。GATA3レンチウイルスを含有する130 μ Lの上清を、細胞に直接添加した。細胞を5% CO₂インキュベーターでインキュベートした。24時間時に、培地を、10% FBSおよびPen/Strepを有するDMEM培地に置き換えた。

30

ピューロマイシン選択

【0730】

1 μ g/mL濃度のピューロマイシン処理を、GATA3突然変異レンチウイルスの形質導入の2日後に開始した。細胞を、回収するまで、10% FBS、Pen/Strep、および1 μ g/mLピューロマイシンを有するDMEM培地で培養および拡大増殖した。

40

HLAをコードする構築物によるトランスフェクション

【0731】

1.5×10^7 個のGATA3突然変異を形質導入したHEK293T細胞を、T175フラスコに接種した。15 μ gのHLA-A02:01、HLA-B07:02、またはHLA-B08:01がコードされたプラスミド (Genewiz) を、70 μ LのFuGENE HD (Promega) と混合し、室温で15分間インキュベートした。各HLA型プラスミドとFuGENE HDとの混合物を、トランスフェクションのために

50

、T175フラスコ内のGATA3突然変異を形質導入したHEK293T細胞に添加した。3つの異なるHLAをトランスフェクトした、およびGATA3突然変異を形質導入したHEK293T細胞を、48時間培養してから回収した。

GATA3突然変異を形質導入した、およびHLAをトランスフェクトした細胞の回収【0732】

細胞を1×PBSで洗浄し、0.25%トリプシン-EDTA (Thermo-Fisher Scientific) を添加した。37℃での3分間のインキュベーション後、細胞を、10%FBSおよびPen/Strepを有するDMEM培地に再懸濁し回収した。1,500rpmでの5分間の遠心分離、続くPBS緩衝液での懸濁を含む洗浄ステップを3回実施した。細胞ペレットを、70%エタノール中のドライアイスで急速凍結した。凍結した細胞ペレットを、プロテオミクス分析のために-80℃の冷凍庫で保管した。

10

結果

【0733】

GATA3突然変異を形質導入したHEK293Tを、GATA3特異的TCR機能アッセイを評価するための標的細胞として、および質量分析によりHLA-A02.01に対するGATA突然変異提示を評価するための材料として使用した（実施例22）。下には、GATA3突然変異を発現させたHEK293T細胞の生成を実証する結果が概説されている。

GATA3突然変異プラスミド構築物

20

【0734】

GATA3突然変異がコードされたプラスミド構築物を生成し、GENEWIZでのDNA配列決定により評価した。最終的なGATA3突然変異がコードされたプラスミドのDNA配列決定データは、設計したGATA3突然変異遺伝子配列と100%一致する（図19）。制限酵素AflII消化後、ゲル電気泳動アッセイのレーン2に、5000bp〜3000bpの間に2つのDNAバンドが観察された。これらのバンドは、それぞれ4243bpおよび3424bpの予想サイズと相関する（図20）。

GATA3突然変異形質導入および回収

【0735】

HEK293T細胞を、GATA3突然変異形質導入に使用した。形質導入された細胞を、総細胞数が200×10⁶個の細胞に達するまで培養した。回収当日に、1×10⁶個の細胞を、HLA-クラスIおよびHLA-クラスIIの発現についてフローサイトメーターにより使用した（図21）。99.5%の細胞がHLA-クラスI陽性であった。プロテオミクス分析のために193×10⁶個の細胞を凍結した。

30

HLAトランスフェクション

【0736】

GATA3突然変異を形質導入したHEK293T細胞に、BAPタグ付きHLA-A02.01、BAPタグ付きHLA-B07.02、およびBAPタグ付きHLA-B08.01がコードされた発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を48時間培養し、回収した。回収当日に、1×10⁶個の細胞を、HLA-A02.01およびHLA-クラスI発現についてフローサイトメトリーにより使用した（図22）。トランスフェクトされていない（図22A）、HLA-A02.01をトランスフェクトした（図22B）、HLA-B07.02をトランスフェクトした（図22C）、およびHLA-B08.01をトランスフェクトした（図22C）GATA3 HEK293T細胞。トランスフェクトされた細胞はすべて、HLA-A02.01およびHLA-クラスIを高度に発現した。

40

【0737】

突然変異GATA3遺伝子を含むレンチウイルスのHEK293T細胞への安定的な形質導入により、GATA3ネオORFを発現する改変細胞系を生成した。GATA3突然変異を形質導入したHEK293T細胞は、HLAクラスIを発現した。その後、こ

50

の細胞系を、G A T A 3 ネオ抗原に特異的なT細胞を用いた機能アッセイの標的として使用した（実施例 2 5 および実施例 2 6）。さらに、いくつかの一般的H L A アレルのトランスフェクション後、これらの細胞系は、より広い分布のH L A クラスIおよびH L A - A : 0 2 発現レベルを示し、これらのアレルに対する複数のネオ抗原のプロセッシングおよび提示の評価のために使用した（実施例 2 2）。

（実施例 2 2）

質量分析によるG A T A 3 ネオO R F ペプチドエピトープの検証

【0 7 3 8】

この実施例は、H L A - A * 0 2 : 0 1、H L A - B * 0 7 : 0 2、およびH L A - B * 0 8 : 0 1 ヘテロダイマーに結合するためのG A T A 結合タンパク質3（G A T A 3）新規オープンリーディングフレーム（ネオO R F）の共通領域に由来する予測ペプチドエピトープの内因性プロセッシングおよび提示の、質量分析による検証を提供する。H E K 2 9 3 T細胞を、G A T A 3 ネオO R Fを安定的に発現するように操作し、目的のビオチンアクセプターペプチド（B A P）タグ付きH L A アレルを発現するように一過性にトランスフェクトした。アレル特異的ペプチドエピトープの予測およびH E K 2 9 3 T細胞の生成は、それぞれ実施例 1 9 および実施例 2 1 に記載されている。H L A - ペプチド複合体を、各H L A クラスIヘテロダイマーのアルファ鎖に発現されたビオチン化B A P タグの親和性プルダウンにより細胞溶解物から単離した。酸での処理によりペプチドリガンドをH L A - ペプチド複合体から放出させ、逆相液体クロマトグラフィーにより脱塩した。H L A - ペプチドリガンドを、高分解能タンデム質量分析計にカップリングされたナノ液体クロマトグラフィー（n L C - M S / M S）によりさらに分離した。G A T A 3 ネオO R F に由来する予測ペプチドエピトープを、標的化n L C - M S / M Sに供し、各ペプチドエピトープの前駆体質量の先験的知識を使用して、高エネルギー衝突解離（H C D）による断片化およびその後のペプチド配列決定のために、各ペプチドエピトープの理論的モノアイソトピック質量を選択した。G A T A 3 ネオO R F ペプチドエピトープは、G A T A 3 ネオO R Fを含有するデータベースに対するデータベースマッチングアルゴリズムにより、およびそれらの合成ペプチド対応物に対応する前駆体質量（M S）とM S / M S スペクトルとのスペクトル比較により、得られたタンデム質量スペクトル（M S / M S）と一致した。

【0 7 3 9】

3つの異なるH L A ヘテロダイマーに結合した、G A T A 3 ネオO R Fの共通領域に由来する合計で5つのペプチドエピトープが、操作したH E K 2 9 3 T細胞においてn L C - M S / M Sにより検出された。H L A - A * 0 2 : 0 1の場合、4つの標的化ペプチドエピトープのうち以下の2つが検出された：S M L T G P P A R VおよびM L T G P P A R V。H L A - B * 0 7 : 0 2の場合、5つの標的化ペプチドエピトープのうち以下の2つが検出された：K P K R D G Y M FおよびK P K R D G Y M F L。H L A - B * 0 8 : 0 1の場合、8つの標的化ペプチドエピトープのうちの以下の1つが検出された：E S K I M F A T L。G A T A 3 ネオO R Fを発現する細胞からのこれらのペプチドエピトープの、n L C - M S / M Sによる検出および同定により、それらが内因的にプロセッシングされ、その後H L A ヘテロダイマーにより結合したことが実証された。

材料および方法

【0 7 4 0】

ペプチド：G A T A 3 ネオO R F ペプチドエピトープに対応する^{1 2}C^{1 4}N合成ペプチドを合成した。

下記の表 2 1 は、G A T A 3 ネオO R F 予測ペプチドエピトープに対応する合成ペプチドのリストを提供する

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 1】

アレル	配列	長さ	分子量理論値
HLA-A*02:01	SMLTGPPARV	10	1027.5484
HLA-A*02:01	MLTGPPARV	9	940.5164
HLA-B*07:02	KPKRDGYMF	9	1140.5750

【表 2 1 - 2】

HLA-B*07:02	KPKRDGYMFL	10	1253.6590
HLA-B*08:01	ESKIMFATL	9	1054.5368

細胞培養

【0741】

GATA3 ネオORFを安定的に発現する操作されたHEK293T細胞の生成、および各親和性タグ付き（BAPタグ付き）アレルの一過性トランスフェクションは、実施例21に記載されている。表22は、標的化nLC-MS/MSに使用した試料および細胞数を列挙している。

下記の表22は、標的化nLC-MS/MSのための試料の要約を提供する

【表 2 2】

アレル	細胞タイプ	細胞数 ($\times 10^6$)	プルダウンタイプ
HLA-A*02:01	HEK293T	55	親和性タグ
HLA-B*07:02	HEK293T	61	親和性タグ
HLA-B*08:01	HEK293T	60	親和性タグ

親和性タグ付き（BAPタグ付き）HLA-ペプチド複合体のプルダウン

【0742】

BAPタグ付きHLA分子を含有する凍結細胞ペレットを氷上で20分間解凍し、次いで、 50×10^6 個の細胞当たり1.2mL溶解緩衝液の比の冷却溶解緩衝液〔20mM Tris-Cl pH8、100mM NaCl、6mM MgCl₂、1.5% (v/v) Triton（登録商標）X-100、60mMオクチルB-D-グルコピラノシド、0.2mM 2-ヨードアセトアミド、1mM EDTA pH8、1mM PMSF、1×complete無EDTAプロテアーゼ阻害剤カクテル〕中で手作業にてピペットすることにより穏やかに溶解した。溶解物を、 50×10^6 個の細胞当たり ≥ 250 単位のベンゾナーゼの比のベンゾナーゼヌクレアーゼと共に、回転させて4℃で15分間インキュベートして、DNA/RNAを分解し、次いで15,000×gにて20分間4℃で遠心分離して細胞残渣および不溶性材料を除去した。清澄化した上清を新しいチューブに移し、BAPタグ付きHLA分子を、0.56μMビオチン、1mM ATP/1mM酢酸マグネシウム、および3μM BirAを有する1.5mLチューブにて10分間回転させて室温でインキュベートすることによりビオチン化した。上清を、 50×10^6 個の細胞当たり200μLのPierce high-capacity NeutrAvidinビーズ状アガロース樹脂スラリーに対応する体積で、回転させて4℃で30分間インキュベートして、ビオチン化HLA-ペプチド複合体を親和性富化した。最後に、HLA結合樹脂を1mL冷却洗浄緩衝液（20mM Tris-Cl pH8、100mM NaCl、60mMオクチルB-D-グルコピラノシド、0.2mM 2-ヨードアセトアミド、1mM EDTA pH8）で4回洗浄し、次いで1mLの冷却10mM Tris-Cl pH8で4回洗浄した。洗浄の間では、HLA結合樹脂を手作業で穏やかに混合し、次いで1,500×gで1分間4℃での遠心分離によりペレット化した。NeutrAvidinビーズ状アガロース樹脂は、使用前に1mL冷却PBSで3回洗浄した。HLAペプチドの溶出前の1週間未満の間、洗浄したHLA結合樹脂を-80℃で保管した。

HLA-ペプチドの脱塩、還元、およびアルキル化

【0743】

10

20

30

40

50

H L A - ペプチドを、親和性タグ付き (B A P タグ付き) H L A 複合体から溶出させ、同時に S e p - P a k 固相抽出システムを使用して脱塩した。手短に言えば、S e p - P a k カートリッジを、24 ポジション固相抽出マニホールドに取り付け、200 μ L のメタノール、続いて100 μ L の50% (v/v) アセトニトリル/0.1% (v/v) ギ酸で2回活性化し、次いで500 μ L の1% (v/v) ギ酸で4回洗浄した。親和性タグ付き (B A P タグ付き) H L A 分子からH L A - ペプチドを解離させ、t C 18 固相へのペプチド結合を促進するために、400 μ L の3% (v/v) アセトニトリル/5% (v/v) ギ酸を、H L A 結合ビーズ状アガロース樹脂を含有するチューブに添加した。スラリーをピペットすることにより混合し、次いでS e p - P a k カートリッジに移した。チューブおよびピペットチップを1% (v/v) のギ酸 (2 $\times$ 200 μ L) ですすぎ、すすぎ液をカートリッジに移した。100 フェムトモルのP i e r c e ペプチド滞留時間較正混合物を、負荷対照としてカートリッジに添加した。ビーズ状アガロース樹脂を、200 μ L の10% (v/v) 酢酸と共に5分間、2回インキュベートして、H L A - ペプチドを親和性タグ付き (B A P タグ付き) H L A 分子からさらに解離させ、次いで500 μ L の1% (v/v) ギ酸で4回洗浄した。250 μ L の15% (v/v) アセトニトリル/1% (v/v) ギ酸、続いて250 μ L の30% (v/v) アセトニトリル/1% (v/v) ギ酸による段階的分画により、H L A - ペプチドを、t C 18 から新しい1.5 mL マイクロチューブへと溶出させた。活性化、試料負荷、洗浄、および溶出に使用した溶液は重力で流したが、カートリッジから残りの溶出液を取り出すためには真空 (≥ -2.5 P S I) を使用した。H L A - ペプチドを含有する溶出液を凍結し、真空遠心分離により乾燥させ、 -80°C で保管した後、還元、アルキル化、および第2の脱塩ワークフローに供した。

【0744】

システイン含有H L A - ペプチドの還元およびアルキル化を、1.5 mL マイクロチューブにて以下のように実施した。乾燥したペプチドを、200 μ L の10 mM T r i s - C l p H 8 に可溶化し、次いでT h e r m o M i x e r にて1,000 rpm で振とうしながら、5 mM のジチオスレイトールと共に 60°C で30分間インキュベートすることにより還元した。還元されたチオールを、15 mM 2-ヨードアセトアミドと共に室温にて30分間、暗所でインキュベートすることによりアルキル化した。あらゆる未反応2-ヨードアセトアミドを、5 mM のジチオスレイトールと共に室温にて15分間、暗所でインキュベートすることによりクエンチした。還元およびアルキル化の直後、試料を脱塩した。

【0745】

H L A - ペプチド試料の二次脱塩は、E m p o r e C 18 固相抽出ディスクの2つの16 ゲージパンチを使用して充填した自家製S t a g e T i p を用いて実施した。S t a g e T i p を100 μ L のメタノール、続いて50 μ L の99.9% (v/v) アセトニトリル/0.1% (v/v) ギ酸で2回活性化し、次いで100 μ L の1% (v/v) ギ酸で3回洗浄した。ペプチド溶液を、200 μ L の3% (v/v) アセトニトリル/5% (v/v) を添加することにより酸性化し、次いでS t a g e T i p に負荷した。チューブおよびピペットチップを、200 μ L の3% (v/v) アセトニトリル/5% (v/v) 、続いて1% (v/v) ギ酸 (2 $\times$ 100 μ L) ですすぎ、リンス体積をS t a g e T i p に移した。S t a g e T i p を、100 μ L の1% (v/v) ギ酸で5回洗浄した。20 μ L の15% (v/v) アセトニトリル/1% (v/v) ギ酸、続いて2つの20 μ L 分の30% (v/v) アセトニトリル/1% (v/v) ギ酸による段階的勾配を使用して、ペプチドを1.5 mL マイクロチューブへと溶出させた。試料負荷、洗浄、および溶出は、卓上遠心分離機で最高速度を1,800 ~ 3,500 $\times g$ にして室温にて実施した。溶出液を凍結し、真空遠心分離で乾燥させ、 -80°C で保管した。

n L C - M S / M S によるH L A - ペプチド配列決定

【0746】

すべてのn L C - M S / M S 分析で、下に記載のものと同じ液体クロマトグラフィー分

10

20

30

40

50

離条件を用いた。ReproSil-Pur 120 Å C18-AQ 1.9 μm 充填材料を約 1,000 psi のヘリウム圧力で約 35 cm まで充填し、分離中は 60 °C に加熱した内径 75 μm の PicoFrit および 10 μm エミッターナノスプレーカラムを装着した EASY-nLC 1200 システムを使用してペプチドをクロマトグラフィーで分離した。カラムを、10 × ベッド体積の溶媒 A [3 % (v/v) アセトニトリル / 0.1 % (v/v) ギ酸] で平衡化し、試料を 4 μL の 3 % (v/v) アセトニトリル / 5 % (v/v) ギ酸で負荷し、ペプチドを、84 分間にわたる 6 ~ 40 % の溶媒 B [80 % (v/v) アセトニトリル / 0.1 % (v/v) ギ酸]、9 分間にわたる 40 ~ 60 % の溶媒 B の線形勾配で溶出させ、次いで 90 % 溶媒 B で 5 分間、および 50 % 溶媒 B で 9 分間保持して、カラムを洗浄した。線形勾配は、200 nL / 分の速度で実行した。

10

【0747】

ペプチドを、2.5 kV にて、Nanospray Flex イオン源を備えた Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 質量分析計へと溶出させた。4 × 10⁵ の自動ゲイン制御 (AGC) 標的および 50 ミリ秒の最大注入時間を用いて 300 から 1,800 m/z まで 15,000 の分解能で、フルスキャン MS を取得した。各 MS スキャンは、標的化 GATA3 ネオORF ペプチドエピトープのイオン質量計算値 (m/z) およびそれらの予測電荷ステータス (z) を含むインクルージョン質量リスト (inclusion mass list) (表 23) に従って MS / MS スキャン後に行った。以下の基準を満たしたペプチドの追加のイオン質量計算値が含まれていた: i) 配列中の 1 つもしくは複数の塩基性残基の存在により複数の電荷ステータスが予想されること、ならびに / または ii) システイン、メチオニン、および N 末端グルタミンなど、試料プロセッシング中に改変されることが予想されるアミノ酸を含有するペプチド。最大注入時間を 100 ミリ秒 ~ 120 ミリ秒の間で変化させて、クロマトグラフィーピークの幅を 2 ~ 2.8 秒のサイクル時間に維持した。MS / MS スキャンは、1 m/z の単離幅、34 の正規化 HCD 衝突エネルギー、および 1 × 10⁵ の AGC 標的を使用して、110 から 1,300 ~ 1,500 m/z まで、15,000 の分解能で取得した。

20

表 23 は、各 HLA アレルの GATA3 ネオORF ペプチドエピトープのインクルージョン質量リストを列挙している

30

40

50

【表 2 3 - 1】

#	アレル	ペプチド配列*	m/z	z
1	HLA-A*02:01	MLTGPPARV	471.2655	2
2	HLA-A*02:01	mLTGPPARV	479.2629	2
3	HLA-A*02:01	SMLTGPPARV	514.7815	2
4	HLA-A*02:01	SmLTGPPARV	522.7790	2
5	HLA-A*02:01	TLQRSSLWCamcL	421.8887	3
6	HLA-A*02:01	TLQRSSLWCamcL	632.3294	2
7	HLA-A*02:01	TLQRSSLWCcysL	442.5495	3
8	HLA-A*02:01	TLQRSSLWCcysL	663.3207	2
9	HLA-A*02:01	TLQRSSLWCL	402.8815	3
10	HLA-A*02:01	TLQRSSLWCL	603.8186	2
11	HLA-A*02:01	YMFLKAESKI	410.5581	3
12	HLA-A*02:01	YmFLKAESKI	415.8898	3
13	HLA-A*02:01	YMFLKAESKI	615.3336	2
14	HLA-A*02:01	YmFLKAESKI	623.3310	2
1	HLA-B*07:02	FATLQRSSL	511.7851	2
2	HLA-B*07:02	GPPARVPAV	432.2585	2
3	HLA-B*07:02	KPKRDGYMF	381.1989	3
4	HLA-B*07:02	KPKRDGYmF	386.5306	3
5	HLA-B*07:02	KPKRDGYMF	571.2948	2
6	HLA-B*07:02	KPKRDGYmF	579.2922	2
7	HLA-B*07:02	KPKRDGYMFL	418.8936	3
8	HLA-B*07:02	KPKRDGYmFL	424.2253	3
9	HLA-B*07:02	KPKRDGYMFL	627.8368	2
10	HLA-B*07:02	KPKRDGYmFL	635.8343	2
11	HLA-B*07:02	MFATLQRSSL	577.3053	2
12	HLA-B*07:02	mFATLQRSSL	585.3028	2
1	HLA-B*08:01	ESKIMFATL	520.2783	2
2	HLA-B*08:01	ESKImFATL	528.2757	2
3	HLA-B*08:01	FATLQRSSL	511.7851	2

【表 2 3 - 2】

4	HLA-B*08:01	FLKAESKIM	356.2037	3
5	HLA-B*08:01	FLKAESKIm	361.5353	3
6	HLA-B*08:01	FLKAESKIM	533.8019	2
7	HLA-B*08:01	FLKAESKIm	541.7994	2
8	HLA-B*08:01	FLKAESKIMF	405.2265	3
9	HLA-B*08:01	FLKAESKImF	410.5581	3
10	HLA-B*08:01	IMKPKRDGYM	413.5510	3
11	HLA-B*08:01	ImKPKRDGYM	418.8826	3
12	HLA-B*08:01	ImKPKRDGYm	424.2143	3
13	HLA-B*08:01	IMKPKRDGYM	619.8228	2
14	HLA-B*08:01	ImKPKRDGYM	627.8203	2
15	HLA-B*08:01	ImKPKRDGYm	635.8178	2
16	HLA-B*08:01	LHFCamcRSSIM	384.1881	3
17	HLA-B*08:01	LHFCamcRSSIm	389.5197	3
18	HLA-B*08:01	LHFCamcRSSIM	575.7784	2
19	HLA-B*08:01	LHFCamcRSSIm	583.7759	2
20	HLA-B*08:01	LHFCcysRSSIM	606.7698	2
21	HLA-B*08:01	LHFCcysRSSIm	614.7672	2
22	HLA-B*08:01	MFATLQRSSL	577.3053	2
23	HLA-B*08:01	mFATLQRSSL	585.3028	2
24	HLA-B*08:01	YMFLKAESKI	410.5581	3
25	HLA-B*08:01	YmFLKAESKI	415.8898	3
26	HLA-B*08:01	YMFLKAESKI	615.3336	2
27	HLA-B*08:01	YmFLKAESKI	623.3310	2

*小文字のm=酸化メチオニン、Camc=カルバミドメチル化システイン、Ccys=システニル化システイン

10

20

30

40

50

データベース検索

【0748】

質量スペクトルを、Spectrum Millソフトウェアパッケージを使用して解釈した。MS/MSスペクトルは、600~2,000 Daの範囲の前駆体MH+を有してなかった、>5の前駆体電荷を有していた、または4つ未満の検出ピークを有していた場合、検索から除外した。同じクロマトグラフィーピークで取得された同じ前駆体m/zとの類似スペクトルのマージを無効にした。MS/MSスペクトルを、全長GATA3ネオORF配列および150個の一般的夾雑物と組み合わせて、ゲノムのhg19注釈を有するすべてのUCSC Genome Browser遺伝子およびそのタンパク質をコードする転写物を含有していたデータベース(63,691個のエントリー)に対して検索した。データベース検索の前に、すべてのMS/MSは、配列タグ長が>2である(つまり、最低で3質量がアミノ酸の鎖内質量により分離される)スペクトル品質フィルターに合格しなければならなかった。最小骨格切断スコアを5に設定し、「ESI QExactive HLA v2」スコアリングスキームを使用した。スペクトルはすべて、酵素特異性がないこと、システインカルバミドメチル化(Camc)の固定修飾、ならびに以下の可変修飾:酸化メチオニン(m)、ピログルタミン酸、およびシステニル化(Ccy s)を使用して検索した。前駆体および産物の質量許容値を、それぞれ0.1 Daおよび10 ppmに設定し、最小一致ピーク強度を30%に設定した。個々のスペクトルのペプチドスペクトル一致(PSM)は、Spectrum Mill自動検証モジュールを使用してPSMランクでの標的-デコイに基づくFDR推定を適用し、スコアリング閾値基準を設定することにより確実に割り当てられるように自動的に指定した。最小配列長7、自動可変範囲前駆体質量フィルタリング、ならびにスコアおよびデルタランク1-ランク2スコア閾値を使用する自動閾値戦略を、HLAアレルのすべてのnLC-MS/MS実行にわたって最適化し、各前駆体電荷ステータスについて<1%のPSM FDR推定値を得た。

方程式

【0749】

各ペプチドエピトープの実験的モノアイソトピック分子量(MW)を、以下の方程式に従って算出した。式中、m/zは、質量分析計により検出されたペプチドエピトープの質量電荷比であり、zは、ペプチドエピトープの電荷であり、1.007276は、プロトンのモノアイソトピック分子量である。

方程式8. 実験的MW = ((m/z) × (z)) - ((z) × (1.007276))
結果

【0750】

標的化nLC-MS/MSを使用して、HLA-A*02:01、HLA-B*07:02、およびHLA-B*08:01に結合することが予測されたGATA3ネオORFに由来するペプチドエピトープの内因性プロセッシングを検証した。GATA3ネオORFの共通領域に由来する5つのペプチドエピトープが、HEK293T細胞にて3つのアレルにわたって検出された(図23)。

【0751】

HLA-A*02:01ヘテロダイマーの場合、GATA3ネオORFの共通領域に由来する4つのペプチドを、nLC-MS/MSにより標的とした。共通領域に由来する2つのペプチドSMLTGPPARVおよびMLTGPPARVを、データベース検索により、およびそれらの合成ペプチド対応物とのスペクトル一致により同定することに成功した。各ペプチドエピトープの理論的および実験的モノアイソトピック分子量が、関連する質量誤差と共に表24に示されている。Spectrum Millデータベース検索ワークフローにより報告された骨格切断スコアおよびスコア化ピーク強度が表25に列挙されている。骨格切断スコアは、HCDにより生成された断片特異的イオンの数を示し、スコア化ピーク強度は、検索解釈により説明されるMS/MSスペクトルにおけるイオン電流のパーセンテージを示す。

下記の表 2 4 は、分子量理論値および分子量実験値を質量誤差と共に列挙している
【表 2 4】

アレル	配列*	MW 理論値 (Da)	MW 実験値 (Da)	質量誤差 (Da)
HLA-A*02:01	SMLTGPPARV	1027.5484	1027.5570	0.0086
HLA-A*02:01	MLTGPPARV	940.5164	940.5126	-0.0038
HLA-B*07:02	KPKRDGYMF	1140.5750	1140.5748	-0.0002
HLA-B*07:02	KPKRDGYMFL	1253.6590	1253.6514	-0.0076
HLA-B*08:01	ESKImFATL	1054.5368	1054.5370	0.0002

10

*小文字のmは、メチオニンの酸化を示す。

表 2 5 は、データベース検索の解釈基準を示す

【表 2 5】

アレル	配列網羅範囲マップ * 解読法: / y-イオン, \ b-イオン, b- & y-イオン	骨格切断スコア	スコア化 ピーク強度 (%)
HLA-A*02:01	S M L/T/G/P/P A R V	5/9	78.5
HLA-A*02:01	M/L/T/G/P/P A R V	5/8	83.6
HLA-B*07:02	K/P K/R D G Y M F	5/8	81.1
HLA-B*07:02	K/P/K R D G Y\M F\L	5/9	72.2
HLA-B*08:01	E S K\I m\F\A/T/L	5/8	73.9

20

*小文字のmは、メチオニンの酸化を示す。

【0 7 5 2】

内因的にプロセシングされたペプチドエピトープに対して取得された各MS/MSスペクトルは、対応する合成ペプチドを使用して生成されたMS/MSスペクトルと一致した。図 2 4 は、内因的にプロセシングされたペプチドエピトープ SMLTGPPARV の MS/MS スペクトル (図 2 4 A 下) と、その対応する合成ペプチドの MS/MS スペクトル (図 2 4 A 上) とのスペクトル比較を示す。図 2 4 B は、同一のスペクトル一致の代替的表現を示す。これらの網羅的なプロットは、それぞれ 9 量体および 10 量体ペプチドエピトープの上位 4 5 または 50 位の最も豊富なイオンを使用して生成した (<http://orgmassspec.github.io/>)。

30

【0 7 5 3】

図 2 5 は、HLA-A*02:01 の内因的にプロセシングされたペプチドMLTGPPARV の MS/MS スペクトル比較を示す。

【0 7 5 4】

HLA-B*07:02 の場合、GATA3 ネオORF の共通領域に由来する 5 つのペプチドエピトープを、nLC-MS/MS により標的とした。共通領域に由来する 2 つのペプチドエピトープKPKRDGYMF およびKPKRDGYMFL を、データベース検索により、およびそれらの対応する合成ペプチドとのスペクトル一致により同定することに成功した。各ペプチドエピトープの理論的および実験的分子量が、関連する質量誤差と共に表 2 4 に示されている。検索エンジンにより報告された骨格切断スコアおよびスコア化ピーク強度が表 2 5 に列挙されている。

40

【0 7 5 5】

図 2 6 および図 2 7 は、HLA-B*07:02 のペプチドエピトープKPKRDGYMF およびKPKRDGYMFL のスペクトル比較をそれぞれ示す。

【0 7 5 6】

HLA-B*08:01 の場合、GATA3 ネオORF の共通領域に由来する 8 つのペプチドエピトープを、nLC-MS/MS により標的とした。共通領域に由来する 1 つのペプチドエピトープESKImFATL を、データベース検索により、および対応する合成ペプチドとのスペクトル一致により同定することに成功した。このペプチドは、側鎖へ

50

の酸素の付加を示す15.999 Daの質量シフトをもたらした、メチオニンのスルホキシド形態で検出された。メチオニンのスルホキシド形態への酸化（小文字のmで示されている）は、試料プロセッシングの一般的な結果である。ESKImFATLの理論的および実験的分子量が、関連する質量誤差と共に表24に示されている。検索エンジンにより報告された骨格切断スコアおよびスコア化ピーク強度が表25に列挙されている。

【0757】

図28は、HLA-B*08:01ペプチドエピトープESKImFATLのスペクトル比較を示す。

【0758】

標的化nLC-MS/MSを使用して、HLA-A*02:01、HLA-B*07:02、およびHLA-B*08:01ヘテロダイマーに結合すると予測された、GATA3ネオORFの共通領域に由来する5つのペプチドエピトープのプロセッシングおよび提示を検証した。各クラスI HLAヘテロダイマーのアルファ鎖に遺伝子発現された親和性タグを使用してGATA3ネオORFを安定的に発現するHEK293T細胞から、クラスI HLAヘテロダイマーを精製した。各親和性タグ付きヘテロダイマー（BAPタグ付きHLAアレル）を、RP19-005に記載のように、GATA3ネオORF発現HEK293T細胞に一過性にトランスフェクトした。各標的化ペプチドエピトープの正しい線形配列を、nLC-MS/MSペプチド配列決定により確認した。すべてのMS/MSスペクトルは、実験的MS/MSスペクトルを、全長GATA3ネオORFを含む>63,000個のエントリーで構成されるデータベースからのペプチドに対して照合したSpectrum Millデータベース検索ワークフローで解釈した。観察された各ペプチドエピトープの分子量は、その分子量理論値の+/-0.01 Da以内で算出された。実験的MS/MSスペクトルの解釈は、MS/MSスペクトルのイオン電流の≥72%が、配列特異的断片イオンにより説明できることを示した。内因的にプロセッシングされたペプチドエピトープ配列の追加の確認は、同一の断片イオン質量および骨格切断パターンを示した対応する合成ペプチドのMS/MSスペクトルとスペクトルを照合することにより実施した。併せて、標的化nLC-MS/MSにより、HLA-A*02:01ペプチドエピトープSMLTGPPARVおよびMLTGPPARV、HLA-B*07:02ペプチドエピトープKPKRDGYMFおよびKPKRDGYMFL、ならびにHLA-B*08:01ペプチドエピトープESKImFATLが、HEK293T細胞中で内因的にプロセッシングされ、その後HLAヘテロダイマーにより結合したことが確認された。

（実施例23）

MHC Iに対する免疫原性

【0759】

この実施例では、種々の高出現率HLAアレルに対するGATA3ネオORFの免疫原性を評価する。GATA3ネオORFは、少なくとも61個の新規アミノ酸によるタンパク質の伸長をもたらす、天然終止コドンの前に生じるフレームシフト突然変異である。免疫原性を、HLA-A02:01、A03:01、A24:02、B07:02、またはB08:01に特異的な予測最小エピトープに対する健康なドナー（HD）PBMCのin vitro誘導により評価した。

材料および方法

表26は、アレル制限に基づいて調製されたペプチドプールを列挙している

10

20

30

40

50

【表 2 6】

ペプチドプール	配列	ペプチドの長さ	最終純度	MW 実験値	HLA アレル
A02.01	SMLTGPPARV	10	100%	1028.1	A02.01
	YMFLKAESKI	10	100%	1229.4	B08.01/A02.01/A24.02
	VLPEPHLAL	9	100%	988.4	A02.01
	TLQRSSLWCL	10	98%	1206.5	A02.01
	MLTGPPARV	9	100%	941.3	A02.01
A03.01	YMFLKAESK	9	80%	1116.2	A03.01
	KIMFATLQR	9	71%	1107.3	A03.01
	VLWTTPLQH	10	85%	1191.3	A03.01
A24.02	YMFLKAESKI	10	85%	1229.4	B08.01/A02.01/A24.02
	MFLKAESKI	9	86%	1066.3	A24.02
	YMFLKAESK	9	80%	1116.2	A03.01 / A24.02
	KIMFATLQR	9	71%	1107.3	A03.01 / A24.02
	VLWTTPLQH	10	85%	1191.3	A03.01 / A24.02
B07.02	KPKRDGYMFL	10	71%	1254.3	B07.02
	FATLQRSSL	9	83%	1022.2	B08.01/B07.02
	EPHLALQPL	9	81%	1017.2	B08.01/B07.02
	KPKRDGYMF	9	73%	1141.2	B07.02
	GPPARVPAV	9	81%	863.0	B07.02
B08.01-1	FATLQRSSL	9	83%	1022.2	B08.01/A24.02
	ESKIMFATL	9	76%	1039.2	B08.01/B07.02
	FLKAESKIM	9	78%	1066.2	B08.01/B07.02
	EPHLALQPL	9	81%	1017.2	B08.01
B08.01-2	YMFLKAESKI	10	85%	1229.4	B08.01/A02.01/A24.02
	MFATLQRSSL	10	80%	1153.2	B08.01/B07.02
	IMKPKRDGYM	10	74%	1238.4	B08.01
	FLKAESKIMF	10	71%	1213.3	B08.01

表 2 7 は、健康なドナーの情報を列挙している

【表 2 7 - 1】

健康なドナーの ID	クラス I タイプ					
	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
HD44	11:01:01	24:02:01	13:01:01	40:01:02	03:04:01	N/A
HD45	03:01	68:01:02	39:01:01	51:08:01	07:02:01	16:02:01
HD48	02:06:01	29:02:01	07:02:01	48:01:01	07:02:01	08:03:01
HD50	02:01:01	68:03:01	35:01:01	51:01:01	07:02:01	16:02:01

【表 2 7 - 2】

HD56	01:01:01	68:01:02	08:01:01	40:08	03:04:01	07:01:01
------	----------	----------	-----------------	-------	----------	----------

N / A = ドナーは特定のアレルがホモ接合性である。エピトープ標的化アレルは、太字である。

FMS 様チロシンキナーゼ 3 リガンド (FLT3L) を使用して DC を刺激する誘導【0760】

FLT3L 刺激を、以下の方法で実施した。PBMC を解凍し、 5×10^7 細胞/mL で AIM-V 培地に再懸濁した。ベンゾナーゼ (Sigma-Aldrich 70746) を $25 \sim 29 \text{ U} / \mu\text{L}$ で添加し、 37°C で 30 分間～1 時間インキュベートした。製造業者のプロトコール (Miltenyi Biotec, Inc 130-050-201、130-092-983) に従って CD14 / CD25 枯渇を実施して、単球 (CD14) および T 制御性細胞 (CD25) を除去した。 2×10^6 細胞/mL の細胞を、 $50 \text{ ng} / \text{mL}$ の FLT3L (CellGenix 1415-050) を有する AIM-V 培地に再懸濁し、24 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2 mL で一晚播種した。AIM-V で希釈したペプチドを、 2 uM の最終濃度で添加し、ウェルを穏やかに混合した。細胞を、ペプチドと共に 37°C で 1 時間インキュベートした。

【0761】

腫瘍壊死因子 α (TNF- α) (1000U/mL) (CellGenix 1406-050)、IL-1 β (10ng/mL) (CellGenix 1411-050)、プロスタグランジン-E1 (PGE-1) (0.5 μ g/mL)、およびIL-7 (0.5ng/mL)を有する成熟カクテルを添加し、37°Cで一晩インキュベートした。成熟カクテルで一晩のインキュベーション後、FBSを、10体積%の最終濃度で各ウェルに添加し、混合した。5日目から開始して2~3日毎に、ウェル中の最終濃度が5ng/mLになるような十分なIL-7およびIL-15を有する新鮮なRoswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) +10%FBSで、培地の75%を注意深く置き換えることにより、共培養に栄養供給した。最初の栄養供給後の栄養供給の場合、ウェル中の最終濃度が5ng/mLになるような十分なIL-7およびIL-15を有する新鮮な20/80+10%FBSで培地を置き換えた。mDC生成を、4日目に開始した。

10

成熟樹状細胞 (mDC) の生成

【0762】

PBMCを解凍し、 5×10^7 細胞/mLで樹状細胞 (DC) 培地 (CellGenix 20801-0500) に再懸濁した。ベンゾナーゼ (sigma-aldrich 70746) を25~29U/ μ Lで添加し、37°Cで30分間~1時間インキュベートした。

【0763】

汎単球単離を、製造業者のプロトコール (Miltenyi biotec, Inc 130-096-537) に従って実施した。細胞を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (800U/mL) (CellGenix 1412-050) およびIL-4 (400U/mL) (CellGenix 1403-050) を有する6ウェルプレートの2mL DC培地に 3×10^6 細胞/ウェルで播種し、37°Cで5日間インキュベートした。

20

【0764】

ペプチド負荷および成熟を、以下の様式で実施した。immDCを、ピペットすることによりウェルから収集し、1200RPMで5分間遠心分離することによりペレット化した。細胞を、1mLでDC培地に再懸濁した。細胞を、各プールについて1ウェル当たり 0.2×10^6 (または 0.5×10^6) 細胞を有するプールに分割し、1.6 μ Mのペプチド (0.4 μ M最終濃度) と共に37°Cで1時間インキュベートした。1ウェル当たり800 μ L (または2mL) のDC培地を、ペプチド負荷immDCに添加し、以下のサイトカインを有する6ウェルプレートの播種し、37°Cで2日間インキュベートした: IL-4 (400U/mL) (CellGenix 1403-050)、GM-CSF (800U/mL) (CellGenix 1412-050)、TNF- α (10ng/mL) (CellGenix 1406-050)、IL-1 β (10ng/mL) (CellGenix 1411-050)、PGE-1 (0.5 μ g/mL) (チェコ共和国のCayman)、IL-6 (10ng/mL) (CellGenix 1004-50)。

30

成熟樹状細胞媒介性長期刺激 (mDC LTS)

【0765】

12日目に、FLT3Lで刺激したT細胞を添加した。DCを、1mLの20/80に再懸濁した。共培養ウェルを回収および計数し、細胞を、 5×10^6 /mLで20/80に再懸濁した。1mLのナイーブT細胞を、サイトカインIL-7 (5ng/mL) IL-15 (5ng/mL) と共に10:1 (T細胞:mDC) の比でmDCに添加した。最終体積が1ウェル当たり5mLになるように培地を添加した。共培養物を37°Cでインキュベートした。共培養物には、15日目から開始して2~3日毎に栄養供給した。必要に応じて、細胞をより大きい体積のフラスコに拡大増殖させた。

40

方程式9. 添加する培地 (mL) = (現在の体積 (mL) $\times$ (180-グルコース)

50

) / 60

【0766】

23日目に、培養物を新しいmDCで再刺激した。DCを、1mLの20/80に再懸濁した。共培養ウェルを回収し、細胞を、 2×10^6 / mL (または 5×10^6 / mL) で20/80に再懸濁した。1mLのナイーブT細胞を、サイトカインIL-7 (5 ng / mL) IL-15 (5 ng / mL) と共に10:1 (T細胞:mDC) の比でmDCに添加した。最終体積が1ウェル当たり5mLになるように培地を添加した。共培養物を37℃でインキュベートした。共培養物には、2~3日毎に栄養供給した。必要に応じて、細胞をより大きい体積のフラスコに拡大増殖させた。

方程式9. 添加する培地 (mL) = (現在の体積 (mL) × (180 - グルコース)

10

) / 60

【0767】

31日目に、細胞を、1mL凍結培地 (90% FBS、10% DMSO) で凍結した。細胞を、-80℃にて一晩、Cool Cell Freeze Container (VWR 75779-816) で維持してから、長期保管のために液体窒素に移した。

マルチマー生成および分析

ペプチド交換モノマー

【0768】

UV切断可能なペプチドを負荷したHLA MHCクラスIモノマーを内部的に生成した。モノマーを、 $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ で濾過PBSに再懸濁し、アッセイペプチドを、 $10 \text{ mg} / \text{mL}$ でDMSOに再懸濁し、UV切断可能なペプチドを、UV光下で1時間4℃にて個々のアッセイペプチドと1 μL ペプチド: 50 μL モノマーの比で交換した。交換したモノマーを、3600 RPMで遠心沈降させ、上清を収集した。

20

蛍光色素コンジュゲーション

【0769】

50 μL のpMHCを、以下の蛍光色素のコンジュゲーション比 (CR) の各々に従って、暗所の氷上で30分間ストレプトアビジン標識蛍光色素と組み合わせた: PE (BioLegend 405203) (CR: 2); APC (BioLegend 405207) (CR: 3); BV421 (BioLegend 405226) (CR: 2); QD605 (Life Technologies Q10101 MP) (CR: 2); QD705 (Life Technologies Q10161 MP) (CR: 2); BUUV395 (BD 564176) (CR: 2); BV650 (BD 563855) (CR: 2)。各pMHCを分割し、2つの個々の蛍光色素にコンジュゲートさせた。ビオチン (Avidity BIO200) + 0.5% アジドを1:20の比で添加し、マルチマーを4℃で1~3日間、暗所にて保管した。11日目、22日目、および凍結後に、フローサイトメトリー読出しを得た。約 2×10^6 細胞を、ポリプロピレンV底96ウェルプレートの25~29 μL のベンゾナーゼ (sigma-aldrich 70746) を有する培地に収集し、37℃で30分間~1時間インキュベートした。

30

【0770】

細胞を、50 μL の濾過リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で、誘導されたペプチドが負荷された以下のすべての蛍光色素コンジュゲートマルチマーを用いて、15分間37℃で暗所にて染色した。PE (BioLegend 405203) 1 μL ; APC (BioLegend 405207) 3 μL ; BV421 (BioLegend 405226) 1 μL ; QD605 (Life Technologies Q10101 MP) 4.5 μL ; QD705 (Life Technologies Q10161 MP) 4.5 μL ; BUUV395 (BD 564176) 3.5 μL ; BV650 (BD 563855) 2.5 μL 。試料を、暗所の氷上にて30分間、以下の表面抗体で染色した。分化クラスター (CD) 8 (+) / CD4 (-) / CD14 (-) / CD16 (-) / CD19 (-) / Dead (-) / マルチマー__1 (+) / マルチマー__2 (+) / 無関連マルチマー (-): CD8-FITC (BioLegend 344704) 2 μL 、CD4-AF7

40

50

00 (BD 557922) 1uL、CD14-AF700 (BD 557923) 1uL、CD19-AF700 (BD 557921) 1uL、CD16-AF700 (BD 557920) 1uL、Live dead染色剤 (Molecular probes L-23101) 0.1uLをLSR-Fortessaで分析した。

結果

【0771】

各試料を、ドナーがそれに対して誘導されたすべてのペプチド毎に、蛍光色素組合せが固有である2つのマルチマーで染色した。陽性誘導は、少なくとも10個の事象が、少なくとも1つの特定の蛍光色素組合せに対して陽性であり、無関連蛍光色素組合せに対して陰性であることにより決定した。データを各刺激後に収集し、2つの刺激にわたって結果が陽性であったものを陽性誘導とみなした。図29Aおよび図29Bは、GATA3ネオ抗原CD8+応答の代表的な誘導を示す。

表28は、陽性GATA3ネオ抗原CD8+応答のパーセンテージを示す

【表28】

誘導ペプチド	アレル	反応性 TCR を有するウェルの数	試験したウェルの数	陽性誘導のパーセント
MLTGPPARV	A02:01	5	5	100%
SMLTGPPARV	A02:01	1	5	20%
GPPARVPAV	B07:02	1	5	20%
KPKRDGYMF	B07:02	1	5	20%
ESKIMFATL	B08:01	1	5	20%

表28は、2つの独立した刺激にわたって確認されたナীব C D 8 + T 細胞誘導をもたらした複製物のパーセンテージを報告している。

【0772】

これらの結果は、5つのアッセイしたHLAのうちの4つに対してCD8+特異的誘導を*in vitro*で生成することができる少なくとも1つの最小エピトープがGATA3ネオORF内に存在することを示す。結果により、GATA3ネオORFのすべてのHLAにわたる広範な免疫原性が示され、高出現率のHLAに特異的な免疫原性最小ネオ抗原エピトープが同定される。

(実施例24)

MHC IIに対する免疫原性

【0773】

この実施例では、GATA3ネオORFに特異的なロングマーペプチド(>15個のアミノ酸)のCD4免疫原性を評価する。*in vivo* CD4免疫原性を予測するため、最小HLA-クラスIIオーバーラップを有する5人の異なる健康なドナーに対して*in vitro*誘導アッセイを使用した。

材料および方法

下記の表29は、誘導ペプチドを列挙している

【表29】

ペプチド プール	配列	ペプチドの 長さ	最終純度	分子量
L1	PGRPLQTHVLPEPHLALQPLQPHADHA	27	95%	2971.2
	APAIQPVLTTPPLQHGHRHGLEPCS	26	90%	2843.4
	PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD	25	93%	2865.8
L2	EPHLALQPLQPHADHAHADAPAIQPV	26	92%	2774.2
	TPPLQHGHRHGLEPCSMLTGPPARVPA	27	96%	2857.8
	DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK	25	88%	2989.0
	KAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	24	100%	1810.0
L3	HADHAHADAPAIQPVLTTPPLQH	24	94%	2624.1
	EPCSMLTGPPARVPAVPFDLHFCR	24	98%	2641.4
	KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS	24	98%	2846.8

下記の表 30 は、健康なドナーの情報を提供した

【表 30】

		健康なドナーのID				
		HD41	HD44	HD63	HD47	HD56
クラスIIアレル	HLA-DPA1	01:03:01	02:02:02	01:03:01	01:03:01	01:03:01
		01:04:01	02:02:02	01:03:01	01:03:01	02:01:02
	HLA-DPB1	05:01:01	05:01:01	04:01:01	04:01:01	01:01:01
		107:01	05:01:01	04:01:01	15:01:01	04:02:01
	HLA-DQA1	03:03:01	01:02:02	02:01:01	05:01:01	03:01:01
		01:03:01	05:08	04:01:01	05:05:01	05:01:01
	HLA-DQB1	01:03:01	03:01:01	02:02:01	02:01:01	02:01:01
		01:03:01	05:02:01	04:02:01	03:01:01	03:02:01
	HLA-DRB1	04:05:01	12:01:01	07:01:01	03:01:01	03:01:01
		11:01:01	16:02:01	08:02:01	11:02:01	04:04:01
	HLA-DRB345	02:02:01	01:01:02	01:01:01	02:02:01	01:01:02
		01:03:01	01:01:01	存在しない	02:02:01	01:03:01

10

成熟樹状細胞（mDC）の生成

単球単離

【0774】

PBMCを解凍し、 5×10^7 細胞/mLで樹状細胞（DC）培地（Cell Genix 20801-0500）に再懸濁した。ベンゾナーゼ（sigma-aldrich 70746）を25～29 U/uLで添加し、37℃で30分間～1時間インキュベートした。汎単球単離を、製造業者のプロトコール（Miltenyi biotec, Inc 130-096-537）に従って実施した。細胞を、GM-CSF（800 U/mL）およびIL-4（400 U/mL）を有する6ウェルプレートの2 mL DC培地に 3×10^6 細胞/ウェルで播種し、37℃で5日間インキュベートした。

20

ペプチド負荷および成熟

【0775】

i mmDCを、ピペットすることによりウェルから収集し、1200 RPMで5分間遠心分離することによりペレット化した。細胞を、1 mLでDC培地に再懸濁した。細胞を、各プールについて1ウェル当たり 0.2×10^6 （または 0.5×10^6 ）細胞のプールに分割し、1.6 uMのペプチド（0.4 uM最終濃度）と共に37℃で1時間インキュベートした。1ウェル当たり800 uL（または2 mL）のDC培地を、ペプチド負荷i mmDCに添加し、以下のサイトカインを有する24（または6）ウェルプレートに播種し、37℃で2日間インキュベートした：IL-4（400 U/mL）（Cell Genix 1403-050）、GM-CSF（800 U/mL）（Cell Genix 1412-050）、TNF- α （10 ng/mL）（Cell Genix 1406-050）、IL-1b（10 ng/mL）（Cell Genix 1411-050）、PGE-1（0.5 μ g/mL）（チェコ共和国のCayman）、IL-6（10 ng/mL）（Cell Genix 1004-50）。

30

長期刺激（LTS）

【0776】

ナイーブT細胞を添加した。PBMCを解凍し、 5×10^7 細胞/mLでDC培地（Cell Genix 20801-0500）に再懸濁した。ベンゾナーゼ（sigma-aldrich 70746）を25～29 U/uLで添加し、37℃で30分間～1時間インキュベートした。

40

【0777】

CD14/CD25 枯渇を、製造業者のプロトコール（Miltenyi Biotech, Inc 130-050-201、130-092-983）に従って実施して、単球（CD14）およびT制御性細胞（CD25）を除去した。1 mLのナイーブT細胞を、サイトカインIL-7（5 ng/mL；Cell Genix） IL-15（5 ng/

50

mL ; Cell Genix) と共に 10 : 1 (T細胞:mDC) の比でmDCに添加した。共培養物を 37℃でインキュベートした。mDCは、20/80に再懸濁したか、またはサイトカインと共にDC培地で維持したかのいずれかであった。

【0778】

共培養物には、5日目から開始して2~3日毎に、下記の方法1または方法2(2.3.2.1.1または2.3.2.1.2)のいずれかに従って栄養供給した。必要に応じて、細胞をより大きい体積のフラスコに拡大増殖させた。

【0779】

方法1の場合、添加する培地を、(mL) = (現在の体積(mL) × (180 - グルコース)) / 60のように算出した。方法2の場合、グルコース計を使用して培地が黄色か否かを調べた。グルコースが高いままである場合(>90mg/dL)、100μLの20 × IL-7およびIL-15をウェルに添加した。グルコースが低い場合(<90mg/dL)、細胞を6ウェルプレートに拡大増殖し(4mL/ウェル)、1 × IL-15およびIL-7で補完した。グルコースが非常に低い場合(<60mg/dL)、6ウェルプレートで6mL/ウェルに拡大増殖した。6および13または14日目に、新しいmDCが生成された。

【0780】

13および21または22日目に、新しいmDCの培養物を再刺激した。共培養ウェルを回収し、計数し、細胞を 2×10^6 /mL(または 5×10^6 /mL)で20/80に再懸濁した。1mLのナイーブT細胞を、サイトカインIL-7(5ng/mL) IL-15(5ng/mL)と共に10:1(T細胞:mDC)の比でmDCに添加した。共培養物を37℃でインキュベートした。mDCは、20/80に再懸濁したか、またはサイトカインと共にDC培地で維持したかのいずれかであった。28または29日目に、細胞を、1mL凍結培地(90%FBS、10%DMSO)で凍結した。細胞を、-80℃にて一晚、CoolCell Freeze Container(VWR 75779-816)で維持してから、長期保管のために液体窒素に移した。

CD4リコールアッセイ

【0781】

新しいmDCを生成したか、または同じ誘導ドナーに由来する新鮮なPBMCを解凍したかのいずれかであった。細胞を、0.26/ウェルのPBMCおよび 0.02×10^6 個/ウェルのmDCで、0.8μMの最終濃度ペプチドまたはDMSO有りの96ウェル底プレートに播種する。誘導試料を、1:1の誘導:PBMCまたは10:1の誘導:mDCの比でウェルに添加し、32℃で20~24時間インキュベートした。

フローサイトメトリー読出し

【0782】

Golgi stop(BD 554724)およびgolgi plug(BD 555029)を、製造業者のプロトコールに従って培養物に添加し、4時間インキュベートした。細胞をCD4-BV786(BD 563877)、CD8-AF700(BD 561453)、CD14-FITC(BD 340682)、CD16-FITC(BD 340704)、CD19-FITC(BD 340864)、Live dead染色剤(Molecular probes L-23101)で20分間染色した。試料を、製造業者のプロトコールに従って固定/透過化キット(BD 554714)を使用して固定した。細胞を、IFN-γ-PE(Biolegend 502508)で20分間染色した。分析は、LSR-Fortessaで、CD4(+)/CD8(-)/CD14(-)/CD16(-)/CD19(-)、Dead(-)/IFNγ(+)について行った。

結果

【0783】

フローサイトメトリーを使用して、抗原特異的なCD4 T細胞を同定した(図30Aおよび図30B)。試験したすべての健康なドナーにおいて、GATA3ネオORF特異

10

20

30

40

50

的ペプチドに対する少なくとも1つの誘導が同定された。

【0784】

誘導された細胞を個々のペプチドに対してリコールし、ペプチド無しでのリコールと比較することにより、特異的な反応性ペプチドを同定した。各誘導試料を、まず誘導プールに対して分析し、その後陽性試料を、個々のペプチドに対してリコールした。すべての試料を二連プレートで分析し、ペプチドを有する誘導試料の平均CD4+/IFN γ パーセンテージが、ペプチドを有しない同じ試料と比較して2%よりも大きかった場合、試料をヒットとみなした。

表31は、GATA3ネオ抗原CD4応答のパーセンテージを示す

【表31】

誘導ペプチド	HD41	HD44	HD56	HD47	HD63
EPHLALQPLQPHADHAHADAPAIQPV	0%	20%	0%	0%	0%
APAIQPVLTTPPLQHGHRHGLEPCS	0%	0%	0%	20%	0%
PPARVPAVPFDLHFCRSSIMKPKRD	0%	20%	20%	0%	0%
DLHFCRSSIMKPKRDGYMFLKAESK	40%	0%	20%	40%	20%
KPKRDGYMFLKAESKIMFATLQRS	0%	40%	0%	0%	0%
LKAESKIMFATLQRSSLWCLCSNH	20%	0%	0%	0%	0%

太字の配列は、すべての患者に共通するGATA3ネオORFの領域にある

【0785】

試験したすべての健康なドナーにおいて、GATA3ネオORFの共通領域に対して少なくとも1つのCD4特異的応答が観察された。これらのドナーは、幅広い範囲のMHCクラスIIHLAアレルを有しており、これは、CD4GATA3応答を生成する能力が、アレルに依存しないことを示す。

(実施例25)

誘導されたCD8+T細胞による機能アッセイ

【0786】

この実施例は、GATA結合タンパク質3(GATA3)新規オープンリーディングフレーム(ネオORF)に由来するネオ抗原に特異的なCD8+T細胞の、適切なGATA3ネオORF突然変異を内包する細胞を死滅させる能力を示す。ネオ抗原特異的CD8+T細胞の誘導は、実施例23において以前に記載されており、GATA3ネオORF突然変異を内包する細胞系の生成は、実施例21に記載されている。

【0787】

この実施例では、HLA-A02:01に提示されたGATA3ネオORFに由来する単一エピトープ(ペプチド配列MLTGPPARVにより網羅される)に特異的なCD8+T細胞を、この詳細な分析のために選択した。手短かに言えば、誘導されたCD8+T細胞を、GATA3ネオORFを形質導入したかまたは陰性対照として未操作であったかのいずれかの標的細胞と共に共培養した。共培養の後、誘導されたCD8+T細胞による細胞傷害性の尺度として、細胞死のマーカであるカスパーゼ3の発現について標的細胞を評価した。未操作細胞と比較して、GATA3ネオORFを発現する標的細胞でのカスパーゼ3の増加は、同族エピトープが標的細胞の表面上に提示されていることに起因する特異的な死滅であることを表す。加えて、CD8+T細胞を、抗原特異的T細胞活性化を測定するために、T細胞活性化マーカーであるCD107aの発現について評価した。GATA3により誘導したPBM Cの抗原特異的認識をさらに評価するため、抗原認識時にCD8+細胞傷害性T細胞により産生されるサイトカインであるIFN- γ も上清で測定した。

【0788】

合計で、HLA-A02:01に対するGATA3ネオORFエピトープに特異的な

4つの異なるCD8+T細胞集団を、突然変異を内包する標的細胞を死滅させる能力について試験した。4つの場合すべてにおいて、突然変異を有しない標的細胞と比較して、GATA3ネオORFを内包する標的細胞にてカスパーゼ3の増加が観察された。カスパーゼ3の増加は、GATA3ネオORFに由来するエピトープに特異的なCD8+T細胞の、GATA3ネオORF突然変異を内包する細胞を死滅させる能力を示す。

材料および方法

細胞傷害性アッセイ

【0789】

HEK293T細胞系は、American Type Culture Collection (Rockford、メリーランド州、米国) から購入し、DMEM、10% FBS、およびPen/Strep培地で維持した。GATA3遺伝子がコードされたレンチウイルスを生成し、HEK293T細胞に形質導入した。GATA3を形質導入したHEK293T細胞を、完全培地中の1μg/mLピブローマイシン下で2週間よりも長く維持した。さらなる詳細は、実施例21に記載されている。

【0790】

1mL中 1×10^7 個の標的細胞を、1μLのTag-it Violet (Biolegend) に添加し、続いて5% CO₂ インキュベーターで20分間インキュベートし、10% FBSで5mLの培養培地を2回洗浄し、細胞を 1×10^6 細胞で培養培地に再懸濁した。

【0791】

誘導されたPBMCのバイアルを、37℃の水浴に入れることにより解凍した。次いで、1mLのFBSを各バイアルに添加した。細胞を、AIM-V、10% FBS、およびPen/Strep培地の15mL培養培地を含有する50mLコニカルチューブに移した。細胞を、1500rpmで5分間遠心分離し、5mLの培養培地に再懸濁した。細胞を、5% CO₂ インキュベーターに37℃にて1時間30分静置してから、5μLのベンゾナーゼ (Millipore Sigma) を添加し、5% CO₂ インキュベーターで30分間37℃にてさらにインキュベートした。インキュベートした細胞を再び遠心分離し、上清を除去した後、5mLのAIM-V培地に再懸濁した。Vi-CELL計数器 (Beckman coulter) を使用して細胞数を計数した。

【0792】

細胞を遠心分離し、 1×10^7 個の標的細胞当たり40μLのMACS緩衝液に再懸濁した。CD8+陽性細胞を、ヒトCD8+T細胞単離キット (Miltenyi Biotec) に従って陰性富化した。CD8+細胞を、 2.5×10^6 個の細胞で1mLのAIM-V培地に再懸濁した。1ウェル当たり 5×10^4 個の標的細胞を、96ウェル平底プレートの50μLの培養培地に接種し、5% CO₂ インキュベーターで一晩37℃にて培養した。GATA3により誘導したおよびCD8+富化した細胞を、100μL AIM-V培地中の1ウェル当たり 2.5×10^5 細胞で標的細胞に接種した。共培養細胞を、5% CO₂ インキュベーターで6時間37℃にてインキュベートした。

【0793】

共培養物の培養上清を回収し、製造業者のプロトコール (Meso Scale Discovery) に従ってV-PLEXヒトIFN-γアッセイによりIFN-γ濃度を評価した。

【0794】

懸濁細胞を、新しい染色プレートに移し、1ウェル当たり50μLのトリプシンを添加し、37℃でインキュベートし、AIM-V培地に再懸濁した後で付着細胞を移した。細胞を合わせ、遠心分離し、FACS緩衝液で洗浄した。50μLの抗体混合物 (抗CD3-BUV8052、抗CD4-BV711、抗CD107a-BV786、抗CD8+PE-cy5、およびIR色素Live/Dead; BD) を各試料に添加し、続いて氷上で30分間インキュベーションした。細胞を100μLのFACS緩衝液で洗浄した。カスパーゼ-3細胞内染色を、Cytotfix/Cytopermキット (BD) の製造

10

20

30

40

50

マニュアルに従って2 μ Lのカスパーゼ-3抗体を用いて実施した。染色された細胞を、Fortessa II (BD) で分析した。

結果

GATA3により誘導したPBMCによる細胞傷害性アッセイ

【0795】

3つの異なる健康なドナーのPBMC (HD47、HD50、およびHD51) を、長期刺激法により、GATA3 HLA-A:02ネオ抗原ペプチドMLTGPPARVで誘導した。このエピトープ：アレルの組合せは、アレル頻度および細胞計数を考慮すると、GATA3ネオORFに関係する他のエピトープ：アレルと比較して細胞傷害性アッセイで試験するために最適であると決定した。図31A~31Dは、マルチマー染色によるGATA3特異的CD8+T細胞を示す。これらのT細胞を、細胞傷害性アッセイのためのエフェクター細胞として選択した。

【0796】

GATA3を形質導入したHEK293T細胞を標的細胞として使用した（実施例21）。また、形質導入されていないHEK293T細胞を陰性対照に使用した。エフェクター細胞および標的細胞の6時間の共培養後、形質導入されていない標的細胞での4回の実験では、平均で3.3%、3.7%、2.5%、および2.8%のカスパーゼ-3陽性細胞が見出され、GATA3を形質導入した細胞では、それぞれ平均で4.4%、5.2%、6.3%、および6.9%のカスパーゼ-3陽性細胞が見られた（図32）。HD51に由来するGATA3により誘導したPBMCとの共培養では、顕著により高いカスパーゼ-3陽性標的細胞が観察された（図33）。CD107a発現CD8+T細胞のより高い頻度が、GATA3により誘導した健康なドナーのPBMCの2つ（試料1および試料2）とのGATA3を形質導入したHEK293T細胞共培養条件で観察された（図34）。より高いレベルのIFN- γ が、GATA3により誘導した健康なドナーのPBMCの2つ（試料1および試料2）との同じ条件の共培養で検出された（図35）。

【0797】

*in vitro*細胞傷害性アッセイを利用して、GATA3フレームシフト突然変異を内包する細胞を認識および死滅させる、GATA3ネオORFに特異的なCD8+T細胞の能力を評価した。GATA3フレームシフトペプチドMLTGPPARVで刺激した健康なドナーに由来するHLA-A02:01に対するGATA3フレームシフトネオ抗原に特異的なT細胞を含むPBMCを、GATA3フレームシフトワクチンから誘導され得るT細胞のタイプの代表として試験した。これらのT細胞は、標的細胞死マーカーであるカスパーゼ-3の存在をアッセイすることにより確認したところ、腫瘍細胞死に結び付いた。CD8+T細胞活性化マーカーCD107aおよびサイトカインIFN- γ アッセイからの結果は、これらのペプチド誘導性T細胞が、GATA3フレームシフトネオ抗原を天然でプロセッシングおよび提示する細胞を認識および死滅させることができることをさらに示唆する。

（実施例26）

TCRクローニングおよび機能アッセイ

【0798】

実施例は、HLA-A02:01に対するGATA3ネオORFに由来するネオ抗原に特異的なCD8+T細胞に由来するT細胞受容体（TCR）のクローニングおよび機能アッセイを示す。ネオ抗原特異的CD8+T細胞の誘導は、実施例23に記載されている。特異的なCD8+T細胞を、蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用して単離し、TCR配列を、10 $\times$ GenomicsおよびMiSeqプラットフォームを使用して同定した。次いで、TCRの機能的特徴付けならびにGATA3ネオORF突然変異を内包する細胞の表面でのネオ抗原のプロセッシングおよび提示の評価の両方のために、選択したTCRをT細胞系で組換え的に発現させた。その生成は実施例21に記載されている。

【0799】

TCRは、40nM未満の結合力を有すると特徴付けられた。これにより、GATA3

ネオ抗原に対するTCRを有するCD8+T細胞を生成することが可能であることが実証される。さらに、TCRは、GATA3ネオORF突然変異を内包するHEK293T細胞の表面にプロセッシングおよび提示されたネオ抗原を認識することができ、これは、実施例22の結果を支持しており、突然変異を内包する細胞の表面でのGATA3ネオ抗原のプロセッシングおよび提示を実証する。

材料および方法

【0800】

図36~38は、TCRクローニングおよび機能アッセイの概要を示す。マルチマーによるGATA3 CD8+T細胞選別

【0801】

GATA3ネオORF特異的T細胞を誘導し、拡大増殖した（実施例23）。誘導された細胞を、GATA3 9量体ペプチドマルチマーおよび表面抗体（CD8、CD4、CD14、CD16、CD19、および近IR蛍光反応性色素）で染色した。GATA3マルチマーであり、CD8陽性であったGATA3特異的T細胞を、FACSARIA融合（BD）により選別し、PBS中2%FBSを含有する1.5mLチューブに収集した。

10×GenomicsおよびMiSeqによる単一T細胞TCR配列決定

【0802】

選別後、収集した細胞を単一細胞バーコード化のために直ちにプロセッシングし、Chromium Single Cell V(D)J試薬キット（10×Genomics）を用いてcDNAを生成した。TCR配列富化およびライブラリー構築を、製造業者のプロトコルに従って実施した。配列決定を、MiSeq300サイクル試薬キットおよびMiSeq（Illumina）を用いて10pM規模で実施した。TCR配列およびクローン性の分析を、Cell RangerソフトウェアおよびLoupe VDJブラウザー（10×Genomics）を用いて行った。

TCR遺伝子合成およびクローニング

【0803】

選択したTCR配列を、哺乳動物系のためにコドン最適化した。TCR DNA配列は、GENEWIZ（ニュージャージー州、米国）により合成し、レンチウイルスベクター（pCDH-EF1α-Puro、System Biosciences）にクローニングした。レンチウイルスベクターは、EF1αプロモーター、続いてTCRベータ、フューリン切断部位、F2A、TCRアルファ、T2A、およびピューロマイシン耐性部位を含有していた（図40）。

レンチウイルス産生

【0804】

GATA3ネオORF TCR遺伝子がコードされたレンチウイルスを生成するために、レンチウイルスベクター、パッケージングプラスミド、および新鮮なHEK293T細胞（ATCC）を、トランスフェクション法により使用した。トランスフェクションおよび回収の詳細は、実施例21に記載されている。

Jurkat細胞またはPBMCへの形質導入

【0805】

TCRベータを欠如する改変Jurkat（J.RT3-T3.5、ATCC）細胞を、CD8+アルファ遺伝子をコードするレンチウイルスによりCD8+アルファ鎖を発現するように改変した。改変Jurkat細胞を、GATA3 TCRレンチウイルスの形質導入に使用した。1.8×10⁶個のJurkat細胞を、24ウェルプレートの10%FBSおよび6μg/mLのポリブレンを有する1.2mL RPMI-1640培地に接種した。0.6mLのGATA3特異的TCRレンチウイルスを細胞に添加した後、プレートを、2,400rpmで45分間32℃にて遠心分離した。細胞を、5%CO₂インキュベーターで24時間インキュベートした。形質導入したJurkat細胞を、1μg/mLのピューロマイシンと共に10%FBSを有するRPMI-1640培地で10日間維持した。

10

20

30

40

50

ペプチド滴定による I L - 2 放出アッセイ

【0806】

Jurkat細胞にクローニングしたTCRの感度を評価するために、ペプチド滴定アッセイを実施した。Jurkat細胞は、TCRシグナル伝達に应答して特異的にIL-2を分泌する。このアッセイで用いられるJurkat細胞は内因性TCRベータを欠如するため、これらの細胞の表面上のTCRは、明らかに、クローニングしたTCRである。広範囲の濃度にわたって、ペプチドを、関連HLA（HLA-A02:01）を有するがGATA3突然変異を有していないHEK293T標的細胞に添加して、最大IL-2分泌を評価し、この最大分泌の50%を放出するのに必要なペプチドの濃度（EC50）を推定した。このEC50を、TCRの結合力とした。HLA:A02.01を内因的に発現する20,000個の未改変HEK293T細胞を、10%FBSを有するDMEM中の100μL GATA3ペプチドまたは20μM~2pM濃度範囲の無関連ペプチドを添加した96ウェルプレートに接種した。37℃で一晩のインキュベーション後、200,000個のGATA3ネオORF特異的TCRを形質導入したJurkat細胞を、10:1のTCRを形質導入したJurkat細胞のペプチド負荷HEK293T細胞に対する比で各ウェルに添加した。共培養物を、5%CO2インキュベーターで24時間37℃でインキュベートした。各ウェルから50μLの上清を回収し、ヒトIL-2の濃度を、製造業者のプロトコールに従ってMeso scale discoveryキットにより測定した。

10

GATA3突然変異を形質導入した標的細胞による I L - 2 放出アッセイ

20

【0807】

真にプロセッシングおよび提示されたネオ抗原を認識するTCRの能力を評価するため、TCRを形質導入したJurkat細胞およびHEK293T標的細胞の共培養。しかしながら、この系では、ペプチドを外因的に添加しなかった。代わりに、GATA3ネオORFまたは無関連遺伝子のいずれかを形質導入した細胞系を標的として利用した。このように、TCRを形質導入したJurkat細胞がその標的を認識するためには、GATA3ネオ抗原がプロセッシングされ、標的細胞の表面に提示されなければならない。

【0808】

GATA3突然変異または無関連遺伝子を形質導入した20,000個のHEK293T細胞を、96ウェルプレートに接種した。一晩のインキュベーション後、200,000個のGATA3特異的TCRを形質導入したJurkat細胞を各ウェルに添加した。共培養物を、5%CO2インキュベーターで24時間37℃でインキュベートした。各ウェルから50μLの上清を回収し、ヒトIL-2の濃度を、製造業者のプロトコール（Meso scale Discovery）に従ってMeso scale discoveryキットにより測定した。

30

結果

GATA3特異的TCR Jurkat細胞

GATA3特異的CD8+T細胞選別

【0809】

GATA3ネオORFペプチドMLTGPPARVによる長期刺激後、健康なドナー42のウェル番号5では、GATA3 HLA-A02マルチマーにより2.1%のGATA3特異的CD8+T細胞が検出された。マルチマー二重陽性の5,402個の細胞を、FACSARIAにより選別した（図39）。選別された細胞は、10×Genomic s V（D）Jキットでバーコード化された単一細胞であった。TCRアルファおよびベータ対配列を、Loupe V（D）Jブラウザで分析した。優性クローノタイプ（クローノタイプ1）は、それぞれ、CDR3 TCRのアルファおよびベータアミノ酸配列の配列CALDIYGNRLAFおよびCASSLDLVLAGSYSYEQFFを有する。クローノタイプ2は、TCRアルファの配列を有していないクローノタイプ1と同じTCRベータ配列を有する。クローノタイプ4は、TCRベータの配列を有していないクローノタイプ1と同じTCRアルファ配列を有する。クローノタイプ1、2、および4の合計割合は、

40

50

全 T C R クロノタイプの 82.5% であり、他のクロノタイプは 1% 未満であった（表 3 2）。

下記の表 3 2 は、例示的な G A T A 3 特異的 T C R クロノタイプ分析を示す

【表 3 2 - 1】

クロノタイプ_id	頻度	割合	CDR3アミノ酸配列
クロノタイプ1	1178	48%	TRA:CALDIYGNNRLAF;TRB:CASSLDFVLAGSYSYNEQFF
クロノタイプ2	848	34%	TRB:CASSLDFVLAGSYSYNEQFF
クロノタイプ4	12	0.5%	TRA:CALDIYGNNRLAF
クロノタイプ3	12	0.5%	TRA:CAEKVPNTGNQFYF;TRB:CASSSLGTVRTEAFF
クロノタイプ5	10	0.4%	TRA:CAVEAYNFNKFYF;TRB:CASRSENTIYF
クロノタイプ6	10	0.4%	TRA:CILSDSGNTPLVF;TRB:CASSDWAVSGNTIYF
クロノタイプ7	9	0%	TRA:CAGAANAGGTSYGKLTFF;TRB:CASSQAQGANYGYTF
クロノタイプ9	7	0%	TRA:CAEIPTFSGGYNKLIF;TRB:CASSLAGQETQYF
クロノタイプ8	7	0%	TRA:CLRGGSTLGRLYF;TRB:CASSLYPTGGSGMDEQYF

10

【表 3 2 - 2】

クロノタイプ10	6	0%	TRA:CAVRDGNTGGFKTIF;TRB:CASSELKTGGAFF
----------	---	----	---------------------------------------

20

G A T A 3 特異的 T C R DNA 合成およびクローニング

【0810】

クロノタイプ1 T C R アルファおよびベータ配列を、ヒト細胞系および P B M C での最大発現のために、ヒトコドン使用頻度に従ってコドン最適化した（表 3 2）。T C R 遺伝子がコードされたレンチウイルスプラスミド（図 4 0）を、DNA 配列決定および制限酵素消化により評価した。最終的な G A T A 3 ネオ O R F 特異的 T C R がコードされたプラスミドの DNA 配列データは、T C R アルファおよびベータコドン最適化配列と 100% 一致する（図 4 1 の太字）。制限酵素 A f l I I I での消化後、2つの DNA バンドが観察された。一方のバンドは 6000bp ~ 5000bp の間、他方のバンドは 4000bp ~ 3000bp の間。これらのバンドは、それぞれ 5590bp および 3424bp の予想サイズと相関する（図 4 2）。

30

下記の表 3 3 は、G A T A 3 特異的 T C R アルファおよびベータ DNA 配列およびコドン最適化配列を示す

40

50

【表 3 3】

クロナタイプ1 TCRアルファ	コドン最適化されたクロナタイプ1 TCRアルファ
ATGGCTTTTGGCTGAGAAGGCTGGGTCTAC ATTTAGGCCACATTTGGGGAGACGAATGGA GTCATTCTGGGAGGTGTTTTGCTGATTTTGT GGCTTCAAGTGGACTGGGTGAAGAGCCAAAA GATAGAACAGAATTTCCGAGGCCCTGAACATT CAGGAGGGTAAAACGGCCACCCTGACCTGCA ACTATACAACTATTCTCCAGCATACTTACAG TGGTACCGACAAGATCCAGGAAGAGGCCCTG TTTTCTTGCTACTCATACGTGAAAATGAGAAA GAAAAAAGGAAAGAAAGACTGAAGGTCACC TTTGATACCACCCTTAAACAGAGTTTGTTCAT TATCACAGCCTCCAGCCTGCAGACTCAGCT ACCTACCTCTGTGCTCTAGACATTTATGGGAA CAACAGACTCGCTTTTGGGAAGGGGAACCAA GTGGTGGTCATACCA	ATGGCCTTCTGGCTGAGGAGACTGGGTTTAC ACTTCAGACCCCCATTTAGGCAGAAGAATGGA GAGCTTTTTAGGCGGCGTGCTGCTGATTTTAT GGCTGCAAGTTGACTGGGTGAAGAGCCAGAA GATCGAGCAGAACAGCGAGGCTTTAAACATT CAAGAAGGCAAGACAGCCACTTTAACTTGTA ACTATACCAACTACTCCCCGCTTATTTACAG TGGTACAGACAAGATCCCGGCAGAGGCCCCCG TGTTTTTACTGCTGATTTCGTGAGAACGAGAA GGAGAAGAGGAAGGAGAGACTGAAGGTGAC CTTCGACACCACTTTAAAGCAGTCTTTATTCC ACATCACCGCCAGCCAGCCCGCTGATAGCGC CACCTATTTATGCGCTTTAGACATCTACGGCA ACAATCGTCTGGCCTTCGGCAAGGGCAACCA AGTTGTGGTGATCCCC
クロナタイプ1 TCRベータ	コドン最適化されたクロナタイプ1 TCRベータ
ATGGGAATCAGGCTCCTCTGTCTGTGGCCTT TTGTTTCCTGGCTGTAGGCCTCGTAGATGTGA AAGTAACCCAGAGCTCGAGATATCTAGTCAA AAGGACGGGAGAGAAAAGTTTTCTGGAATGT GTCCAGGATATGGACCATGAAAATATGTTCT GGTATCGACAAGACCCAGGTCTGGGGCTACG GCTGATCTATTTCTCATATGATGTTAAAATGA AAGAAAAAGGAGATATTCTGAGGGGTACA GTGTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGCTTCTC CCTGATTCTGGAGTCCGCCAGCACCAACCAG ACATCTATGTACCTCTGTGCCAGCAGTTTAGA TTTTGTGCTAGCGGGGTCTACTCCTACAATG AGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCAC CGTGCTAG	ATGGGCATTCTGTCTGTGTCTGTGGCCTT CTGCTTTTTAGCCGTGGGTTTGTAGTGACGTGA AGGTGACCCAGTCTCTCGTTATTTAGTGAAG AGGACCGGCGAGAAGGTGTTTTTAGAATGCG TGCAAGATATGGACCACGAGAACATGTTCTG GTACAGACAAGATCCCGGACTGGGTTTAAAG CTGATCTACTTCAGCTACGACGTGAAGATGA AGGAGAAGGGCGACATCCCCGAGGGCTACTC CGTGTCTCGTGAGAAGAAGGAGAGGTTCTCT TTAATTTTAGAGTCCGCCAGCACCAACCAGA CCAGCATGTATTTATGCGCCAGCTCTTTAGAC TTTGTGCTGGCCCGGCAGCTACAGCTACAACG AGCAGTTCTTCGGCCCCGGCACCAGACTGAC CGTGCTG

10

20

GATA3 特異的 TCR 発現

【0811】

GATA3 特異的 TCR を発現させた Jurkat 細胞の場合、GATA3 特異的 TCR 構築物での HEK293T 細胞系のトランスフェクション後、レンチウイルス系を使用し、レンチウイルスを Jurkat 細胞に形質導入した。形質導入し、ピューロマイシンで選択した Jurkat 細胞を、GATA3 マルチマー-PE および GATA3 マルチマー-BV650 で染色し、形質導入されていない Jurkat 細胞と比較して、GATA3 特異的 TCR 発現を検証した。73.1% の細胞が、GATA3 マルチマー-PE および GATA3 マルチマー-BV650 の両方に陽性であり、これは、GATA3 ネオORF 特異的 TCR の発現を示す（図 43）。

30

ペプチド滴定試験

【0812】

組換え TCR が機能性であることを検証するため、20 μ M ~ 0.2 pM のペプチド濃度を、GATA3 特異的 TCR を形質導入した Jurkat 細胞で試験した。Jurkat 細胞からの IL-2 分泌レベルは、GATA3 ペプチド濃度と非線形相関性を示し、 $EC_{50} = 37.85$ nM が観察された（図 44）。

40

GATA3 特異的 TCR を形質導入した Jurkat の IL-2 放出アッセイ

【0813】

GATA3 突然変異特異的 TCR Jurkat による内因性 GATA3 突然変異抗原の認識を検証するため、突然変異を形質導入した HEK293T 細胞を標的細胞として使用し、GATA3 TCR を形質導入した Jurkat 細胞と共に共培養した。IL-2 レベルは、図 45 では、GATA3 突然変異ペプチド負荷 HEK293T 細胞群（円形）の方が、無関連ペプチド負荷細胞群（三角形）よりも高かった。また、IL-2 レベルは

50

、図45では、GATA3突然変異を形質導入した標的細胞群（四角形）の方が、無関連遺伝子を形質導入した標的細胞群（逆三角形）よりも高かった。

【0814】

この研究では、HLA-A02:01に提示されたGATA3ネオ抗原に特異的なCD8⁺T細胞からTCRをクローニングした。TCRの結合力は、ペプチド滴定により40 nM未満（EC50）であると画定され、TCRは、GATA3ネオORF発現細胞系を認識することができた。これらのデータにより、GATA3ネオORF突然変異を有する細胞を認識することができる強力なTCRを有するCD8⁺T細胞の生成が確認される。

下に記載の実施例27～実施例41は、突然変異型BTKおよび突然変異型EGFRペプチドに関する

（実施例27）

細胞内サイトカイン染色アッセイ

【0815】

BTKネオ抗原特異的CD4⁺およびCD8⁺T細胞応答の誘導ならびにテトラマー染色アッセイを、実施例1および実施例2に記載のように実施する。EGFRネオ抗原特異的CD4⁺およびCD8⁺T細胞応答の誘導ならびにテトラマー染色アッセイを、実施例1および実施例2に記載のように実施する。抗原特異的T細胞集団を同定するための十分に確立されたテトラマー染色の非存在下では、抗原特異性は、十分に確立されたフローサイトメトリーアッセイを使用したサイトカイン産生の評価を使用して推定することができる。手短に言えば、T細胞を、目的のペプチドで刺激し、対照と比較する。刺激後、CD4⁺T細胞によるサイトカインの産生（例えば、IFN γ およびTNF α ）を、細胞内染色により評価する。これらのサイトカイン、特にIFN γ を、刺激された細胞を同定するために使用することができる。突然変異型BTKを負荷したまたは負荷しないAPCで刺激された健康なドナーに由来するCD4⁺細胞のIFN γ およびTNF α レベルの抗原特異的誘導のFACS解析を実施する。突然変異型EGFRペプチドで負荷したまたは負荷しないAPCで刺激された健康なドナーに由来するCD4⁺細胞のIFN γ およびTNF α レベルの抗原特異的誘導のFACS解析を実施する。

（実施例28）

ELISPOTアッセイ

【0816】

ELISPOTアッセイ（BD Biosciences）を使用して、ペプチド特異的T細胞を機能的に数える。このアッセイでは、T細胞からのIFN γ 放出を単一細胞に基づいて測定する。標的細胞（T2またはHLA-A0201をトランスフェクトしたC1R）に、10 μ Mペプチドで37℃で1時間パルスし、3回洗浄した。1 $\times$ 10⁵個のペプチドパルス標的を、免疫原性培養物から採取した様々な濃度のT細胞（5 $\times$ 10²～2 $\times$ 10³個）と共に、ELISPOTプレートウェルで共培養する。プレートを、製造業者のプロトコールに従って発色させ、付属のソフトウェアを用いてELISPOTリーダー（Cellular Technology Ltd.）で分析する。IFN γ 産生T細胞の数に対応するスポットを、播種したT細胞の1個当たりの絶対スポット数として報告する。改変ペプチドで拡大増殖したT細胞を、改変ペプチドでパルスした標的を認識する能力だけでなく、親ペプチドでパルスした標的を認識する能力についても試験する。突然変異型BTKペプチドまたは突然変異型EGFRペプチドをコードするレンチウイルス発現ベクターを疑似形質導入または形質導入した試料のIFN γ レベルを決定する。

（実施例29）

CD107染色アッセイ

【0817】

CD107aおよびbは、同族ペプチドによる活性化後、CD8⁺T細胞の細胞表面に発現される。T細胞の溶解性顆粒は、分子CD107aおよびbを含むリソソーム関連膜糖タンパク質（「LAMP」）を含有する脂質二重層を有する。細胞傷害性T細胞がT細胞受容体を介して活性化されると、これらの溶解性顆粒の膜が動員され、T細胞の原形質

10

20

30

40

50

膜と融合する。顆粒内容物が放出され、これが標的細胞の死に結び付く。顆粒膜が原形質膜と融合すると、CD107aおよびbは、細胞表面に露出するため、脱顆粒のマーカーである。CD107aおよびb染色により測定される脱顆粒は、単一細胞に基づいて報告されるため、アッセイは、ペプチド特異的T細胞を機能的に数えるために使用される。アッセイを実施するために、ペプチドを、最終濃度が20 μMになるようにHLA-A02:01をトランスフェクトした細胞C1Rに添加し、細胞を37℃で1時間インキュベートし、3回洗浄する。1×10⁵個のペプチドパルスC1R細胞をチューブにアリコートし、CD107aおよびbに特異的な抗体を、製造業者(Becton Dickinson)が示唆する最終濃度になるように添加する。CD107分子がアッセイの経過中に一過性で表面に出現する際にCD107分子を「捕捉」するために、T細胞の添加の前に抗体を添加する。次に、免疫原性培養物に由来する1×10⁵個のT細胞を添加し、試料を37℃で4時間インキュベートする。T細胞を、CD8などの追加の細胞表面分子についてさらに染色し、FACS Calibur機器(Becton Dickinson)で取得する。付属のCellquestソフトウェアを使用してデータを分析し、結果を、CD8⁺/CD107aおよびb⁺細胞のパーセンテージとして報告する。

(実施例30)

細胞傷害性アッセイ

【0818】

細胞傷害活性を、方法1または方法2を使用して測定する。方法1は、クロム放出アッセイを伴う。標的T2細胞を37℃で1時間Na⁵¹Crで標識し、洗浄する。次いで、5×10³個の標的T2細胞を、免疫原性培養物に由来する様々な数のT細胞に添加する。37℃での4時間のインキュベーション後に回収した上清中のクロム放出を測定する。特異的溶解パーセンテージを、以下のように算出する。

方程式10. 実験放出－自然放出／放出合計－自然放出×100

方法2では、フローサイトメトリーによる標的細胞中の切断されたカスパーゼ3の検出により、細胞傷害活性を測定する。標的がん細胞を、操作して、適切なMHC-Iアレルと共に突然変異型ペプチドを発現させる。疑似形質導入した標的細胞(すなわち、突然変異型ペプチドを発現しない)を、陰性対照として使用する。細胞をCFSEで標識して、エフェクター細胞として使用される刺激PBMCと区別する。標的およびエフェクター細胞を、6時間共培養してから、回収する。細胞内染色を実施して、CFSE陽性標的がん細胞中のカスパーゼ3の切断型を検出する。特異的溶解パーセンテージを、以下のように算出する。

方程式11. カスパーゼ3の実験切断／カスパーゼ3の自然切断(突然変異型ペプチド発現の非存在下で測定)×100

方法2の細胞傷害性アッセイは、本明細書の実施例25の材料および方法セクションに提供されている。

(実施例31)

ロングマーおよびショートマーを逐次的に使用したin vivoでのCD8⁺T細胞応答の増強

【0819】

ロングマーペプチドでのワクチン接種は、ペプチドのプロセッシングおよび提示に応じて、CD4⁺およびCD8⁺T細胞応答の両方を誘導することができる。最小ショートマーエピトープによるワクチン接種は、CD8⁺T細胞応答を生成することに集中するが、抗原提示前のペプチドプロセッシングを必要としない。そのため、プロフェッショナル抗原提示細胞(APC)だけでなく、任意の細胞がエピトープを容易に提示することができる。これは、末梢性寛容の一部として、抗原を提示する健康な細胞に接触するT細胞の寛容に結び付く場合がある。これを回避するために、ロングマーによる初期免疫化は、ペプチドをプロセッシングおよび提示することができるAPCによってのみ、CD8⁺T細胞のプライミングを可能にする。その後の免疫化は、初期CD8⁺T細胞応答をブーストする。

in vivo免疫原性アッセイ

【0820】

19匹の8～12週齢の雌C57BL/6マウス（Taconic Biosciences）を、到着時にランダムに、かつ前向きに処置群に割り当てた。動物を、研究開始前に3日間順化させた。動物は、Lab Diet（商標）5053滅菌げっ歯動物餌で維持し、滅菌水を自由に提供する。群1の動物は、ワクチン接種アジュバントのみの対照として役目を果たし、0、7、および14日目に皮下注射（s.c.）により0.1mLの体積で100μgのポリイノシン：ポリシチジル酸（ポリI：C）単独を、投与する。群2の動物には、6つのロングマーペプチド（下に記載）の各々50μgを、100μgのポリI：Cと共に、0、7、および14日目に0.1mLの体積でs.c.投与する。群3の動物には、6つのロングマーペプチド（下に記載）の各々50μgを、100μgのポリI：Cと共に、0日目に0.1mLの体積でs.c.投与し、モル一致当量の対応するショートマーペプチド（下に記載）を、100μgのポリI：Cと共に、7および14日目に0.1mLの体積でs.c.投与する。動物を、毎日計量し、全体的な健康をモニターした。研究終了21日目に、動物が0日目の体重と比較してその体重の>30%を喪失した場合、または動物が瀕死であると見出された場合、動物をCO₂過剰投与により安楽死させる。殺時に、脾臓を回収し、標準的プロトコルを使用して単一細胞懸濁液へと加工する。手短に言えば、脾臓を70μMフィルターに通して機械的に分解し、ペレット化し、ACK溶解緩衝液（Sigma）で溶解してから、細胞培養培地に再懸濁する。

ペプチド

【0821】

6つの以前に同定されたマウスネオ抗原を、CD8⁺T細胞応答を誘導するそれらの実証されている能力に基づいて使用する。各ネオ抗原について、最小エピトープに対応するショートマー（8～11個のアミノ酸）が画定されている。突然変異周囲の20～27個のアミノ酸に対応するロングマーを使用する。

ELISPOT

【0822】

ELISPOT分析（マウスIFN γ ELISPOT Reasy-SET-Go；E Bioscience）を、キットプロトコルに従って実施する。手短に言えば、分析日の前日に、96ウェルフィルタープレート（0.45μmの孔径の疎水性PVD F膜；EMD Millipore）を活性化し（35% EtOH）、洗浄し（PBS）、捕捉抗体でコーティングする（1：250；4℃ O/N）。分析日に、ウェルを洗浄し、ブロッキングする（培地；37℃で2時間）。100μL中およそ2×10⁵個の細胞を、100μLの10mM試験ペプチドプール（ショートマー）、またはPMA／イオノマイシン陽性対照抗原、またはビヒクルと共にウェルに添加する。細胞を、抗原と共に37℃で一晩（16～18時間）インキュベートする。翌日、細胞懸濁液を廃棄し、ウェルをPBSで1回および脱イオン水で2回洗浄する。アッセイの残りのすべての洗浄ステップでは、各洗浄ステップにてウェルが3分間浸漬されることを可能にする。次いで、ウェルを洗浄緩衝液（PBS＋0.05% Tween（登録商標）-20）で3回洗浄し、検出抗体（1：250）をすべてのウェルに添加する。プレートを室温で2時間インキュベートする。検出抗体溶液を廃棄し、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄する。アビジン-HRP（1：250）をすべてのウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。コンジュゲート溶液を廃棄し、ウェルを洗浄緩衝液で3回、次いでPBSで1回洗浄する。基質（3-アミノ-9-エチルカルバゾール、0.1M酢酸緩衝液、H₂O₂）をすべてのウェルに添加し、スポット発色をモニターする（およそ10分間）。ウェルを水で洗浄することにより基質反応を停止させ、プレートを一晩空気乾燥させる。プレートを、付属のソフトウェアを用いてELISPOTリーダー（Cellular Technology Ltd.）で分析する。IFN γ 産生T細胞の数に対応するスポットを、播種したT細胞の1個当たりの絶対スポット数として報告する。

（実施例32）

質量分析による突然変異型BTKペプチドの検出

【0823】

293T細胞に、突然変異型BTKペプチドの種々の領域をコードするレンチウイルスベクターを形質導入する。突然変異型BTKペプチドによりコードされるペプチドを発現する5000万～1億個の形質導入した細胞を培養し、酸洗浄を使用してペプチドをHLA-ペプチド複合体から溶出させる。次いで、溶出したペプチドをMS/MSで分析した。

(実施例33)

突然変異型BTKペプチドは、複数のアレルに対して強力なエピトープを産生する。

【0824】

ネオエピトープを含有する複数のペプチドを、抗原提示細胞(APC)上に発現または負荷する。次いで、質量分析を実施し、表記のHLAアレルに対するネオエピトープの親和性、およびネオエピトープとHLAアレルとの安定性を決定する。

(実施例34)

複数のBTKネオエピトープがCD8+T細胞応答を誘発する

【0825】

ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、抗原特異的T細胞誘導を実施することができる。T細胞製造後にCD8+T細胞誘導を分析する。分析のために様々な時点で細胞試料を採取することができる。pMHCマルチマーを使用して、誘導培養における抗原特異的CD8+T細胞の割合をモニターする。

(実施例35)

突然変異型BTKネオペプチドの予測HLA特異性

【0826】

特異的BTKネオペプチドを、有標RECONアルゴリズムにかけて、HLA特異性を予測した。ネオペプチドを、予測結合親和性に基づいてランク付けした。表38は、高い～低い親和性に基づいてさらにランク付けされたアレル特異性を示す。ランク値が低いほど、親和性が強いことを示す。表38は、本明細書で同定および特徴付けられた突然変異型BTKネオペプチドが、複数のアレルとの強力なエピトープを有することをさらに実証する。

表38は、高い～低い親和性に基づいてさらにランク付けされたアレル特異性を示す

【表38-1】

BTK, C481S	IFIITEYMANGSLLNYLREMRHR	
ペプチド	アレル	ランク

10

20

30

40

50

【表 3 8 - 2】

ANGSLLNY	HLA-A36:01	24
ANGSLLNYL	HLA-C15:02	14
ANGSLLNYL	HLA-C08:01	19
ANGSLLNYL	HLA-C06:02	19
ANGSLLNYL	HLA-A02:04	21
ANGSLLNYL	HLA-C12:02	25
ANGSLLNYL	HLA-B44:02	26
ANGSLLNYL	HLA-C17:01	27
ANGSLLNYL	HLA-B38:01	27
ANGSLLNYLR	HLA-A74:01	19
ANGSLLNYLR	HLA-A31:01	26
EYMANGSL	HLA-C14:02	13
EYMANGSL	HLA-C14:03	13
EYMANGSL	HLA-A24:02	25
EYMANGSLL	HLA-A24:02	3
EYMANGSLL	HLA-A23:01	9
EYMANGSLL	HLA-C14:02	11
EYMANGSLL	HLA-C14:03	12
EYMANGSLL	HLA-A33:03	19
EYMANGSLL	HLA-C04:01	20
EYMANGSLL	HLA-B15:09	22
EYMANGSLL	HLA-B38:01	23
EYMANGSLLN	HLA-A24:02	24
EYMANGSLLN	HLA-A23:01	27
EYMANGSLLNY	HLA-A29:02	27
GSLNLYR	HLA-A31:01	16
GSLNLYR	HLA-A74:01	23
GSLNLYREM	HLA-B58:02	15
GSLNLYREM	HLA-B57:01	27
ITEYMANGS	HLA-A01:01	23
ITEYMANGSL	HLA-A01:01	20
ITEYMANGSLL	HLA-A01:01	21
MANGSLLNY	HLA-C02:02	1
MANGSLLNY	HLA-C03:02	2
MANGSLLNY	HLA-B53:01	2
MANGSLLNY	HLA-B35:01	4
MANGSLLNY	HLA-A29:02	11
MANGSLLNY	HLA-C12:02	11
MANGSLLNY	HLA-C12:03	11
MANGSLLNY	HLA-A30:02	12
MANGSLLNY	HLA-A36:01	12
MANGSLLNY	HLA-A26:01	16
MANGSLLNY	HLA-A01:01	17
MANGSLLNY	HLA-B15:01	17
MANGSLLNY	HLA-A25:01	18
MANGSLLNY	HLA-B57:01	19
MANGSLLNY	HLA-B58:01	22
MANGSLLNY	HLA-A03:01	23
MANGSLLNY	HLA-B46:01	23
MANGSLLNY	HLA-B15:03	24
MANGSLLNY	HLA-A33:03	25
MANGSLLNY	HLA-B35:03	28
MANGSLLNY	HLA-A11:01	28

10

20

30

40

50

【表 3 8 - 3】

MANGSLLNYL	HLA-C17:01	17
MANGSLLNYL	HLA-C02:02	18
MANGSLLNYL	HLA-B35:01	18
MANGSLLNYL	HLA-C03:03	21
MANGSLLNYL	HLA-C08:01	24
MANGSLLNYL	HLA-B35:03	24
MANGSLLNYL	HLA-C12:02	25
MANGSLLNYL	HLA-C01:02	26
MANGSLLNYL	HLA-C03:04	28
MANGSLLNYL	HLA-C08:02	28
MANGSLLNYLR	HLA-A33:03	24
MANGSLLNYLR	HLA-A74:01	28
NGSLLNYL	HLA-B14:02	19
NGSLLNYLR	HLA-A68:01	14
NGSLLNYLR	HLA-A33:03	16
NGSLLNYLR	HLA-A31:01	25
NGSLLNYLR	HLA-A74:01	26
SLLNYLREM	HLA-A02:04	5
SLLNYLREM	HLA-A02:01	13
SLLNYLREM	HLA-A02:03	16
SLLNYLREM	HLA-C03:02	16
SLLNYLREM	HLA-A03:01	19
SLLNYLREM	HLA-A32:01	20
SLLNYLREM	HLA-A02:07	20
SLLNYLREM	HLA-C14:03	20
SLLNYLREM	HLA-C14:02	20
SLLNYLREM	HLA-A31:01	21
SLLNYLREM	HLA-A30:02	22
SLLNYLREM	HLA-A74:01	22
SLLNYLREM	HLA-C06:02	24
SLLNYLREM	HLA-B15:03	25
SLLNYLREM	HLA-B46:01	25
SLLNYLREM	HLA-B13:02	25
SLLNYLREM	HLA-A25:01	26
SLLNYLREM	HLA-A29:02	28
SLLNYLREM	HLA-C01:02	28
SLLNYLREMR	HLA-A74:01	14
SLLNYLREMR	HLA-A31:01	20
TEYMANGSL	HLA-B40:01	8
TEYMANGSL	HLA-B40:02	8
TEYMANGSL	HLA-B14:02	11
TEYMANGSL	HLA-B49:01	14
TEYMANGSL	HLA-B44:03	16
TEYMANGSL	HLA-B44:02	17
TEYMANGSL	HLA-B37:01	19
TEYMANGSL	HLA-B18:01	20
TEYMANGSL	HLA-B15:09	23
TEYMANGSL	HLA-B41:01	25
TEYMANGSL	HLA-B50:01	25
TEYMANGSLL	HLA-B40:01	7
TEYMANGSLL	HLA-B44:03	15
TEYMANGSLL	HLA-B49:01	17
TEYMANGSLL	HLA-B44:02	21

10

20

30

40

50

【表 3 8 - 4】

TEYMANGSLL	HLA-B40:02	24
TEYMANGSLLNY	HLA-B44:03	21
YMANGSLL	HLA-B15:09	14
YMANGSLL	HLA-C03:04	15
YMANGSLL	HLA-C03:03	16
YMANGSLL	HLA-C17:01	16
YMANGSLL	HLA-C03:02	21
YMANGSLL	HLA-C14:03	22
YMANGSLL	HLA-C14:02	23
YMANGSLL	HLA-C04:01	24
YMANGSLL	HLA-C02:02	26
YMANGSLL	HLA-A01:01	26
YMANGSLLN	HLA-A29:02	25
YMANGSLLN	HLA-A01:01	25
YMANGSLLNY	HLA-A01:01	6
YMANGSLLNY	HLA-A29:02	10
YMANGSLLNY	HLA-A36:01	16
YMANGSLLNY	HLA-A03:01	16
YMANGSLLNY	HLA-B46:01	18
YMANGSLLNY	HLA-A25:01	19
YMANGSLLNY	HLA-B15:01	20
YMANGSLLNY	HLA-A26:01	20
YMANGSLLNY	HLA-A30:02	21
YMANGSLLNY	HLA-A32:01	24

10

20

(実施例 3 6)

突然変異型 B T K ネオペプチドの親和性および安定性

【0 8 2 7】

下記の表のネオエピトープを含有する複数のペプチドを、抗原提示細胞に発現させたかまたは負荷したかのいずれかを行った。次いで、質量分析を実施し、表記の H L A アレルに対するネオエピトープの親和性を決定し、ネオエピトープと H L A アレルとの安定性を決定した。

表 3 9 は、突然変異型 B T K ペプチドの親和性および安定性をそれぞれ示す

30

【表 3 9】

遺伝子	HLA アレル	ペプチド配列	親和性 (nM)	安定性(1/2 時間)
BTK, C481S	A01.01	YMANGSLLNY	13.24495	0.866167
BTK, C481S	A01.01	MANGSLLNY	439.029	0.216408
BTK, C481S	A03.01	MANGSLLNY	35.62463	0.237963
BTK, C481S	A03.01	YMANGSLLNY	95.93212	0.279088
BTK, C481S	A11.01	MANGSLLNY	535.6333	NB
BTK, C481S	A11.01	YMANGSLLNY	974.2881	NB
BTK, C481S	A24.02	EYMANGSLL	4.961145	5.716141
BTK, C481S	A02.01	SLLNYLREM	67.69132	3.043604
BTK, C481S	A02.01	MANGSLLNYL	1006.566	0
BTK, C481S	A02.01	YMANGSLLN	3999.442	0
BTK, C481S	B07.02	SLLNYLREM	865.8805	0
BTK, C481S	B07.02	MANGSLLNYL	16474.59	0
BTK, C481S	B08.01	SLLNYLREM	959.6542	0
BTK, C481S	B08.01	MANGSLLNYL	18463.09	0

40

(実施例 3 7)

質量分析による突然変異型 E G F R ペプチドの検出

【0 8 2 8】

2 9 3 T 細胞に、突然変異型 E G F R ペプチドの種々の領域をコードするレンチウイルスベクターを形質導入する。突然変異型 E G F R ペプチドによりコードされるペプチドを

50

発現する5000万～1億個の形質導入した細胞を培養し、酸洗浄を使用してペプチドをHLA-ペプチド複合体から溶出させる。次いで、溶出したペプチドをMS/MSで分析した。

(実施例38)

突然変異型EGFRペプチドは、複数のアレルに対して強力なエピトープを産生する【0829】

ネオエピトープを含有する複数のペプチドを、抗原提示細胞(APC)に発現または負荷する。次いで、質量分析を実施し、表記のHLAアレルに対するネオエピトープの親和性、およびネオエピトープとHLAアレルとの安定性を決定した。

(実施例39)

複数のEGFRネオエピトープがCD8+T細胞応答を誘発する【0830】

ヒトドナーに由来するPBMC試料を使用して、抗原特異的T細胞誘導を実施することができる。T細胞製造後にCD8+T細胞の誘導を分析する。分析のために様々な時点で細胞試料を採取することができる。pMHCマルチマーを使用して、誘導培養における抗原特異的CD8+T細胞の割合をモニターする。

(実施例40)

EGFRネオペプチドの予測HLA特異性【0831】

特異的ネオペプチドを、有標RECONアルゴリズムにかけて、HLA特異性を予測した。ネオペプチドを、予測結合親和性に基づいてランク付けした。表43は、高い～低い親和性に基づいてさらにランク付けされたアレル特異性を示す。ランク値が低いほど、親和性が高いことを示す。表43は、本明細書で同定および特徴付けられた突然変異型EGFRネオペプチドが、複数のアレルとの強力なエピトープを有することも実証する。

表43

【表43-1】

ペプチド	アレル	ランク
LIMQLMPF	HLA-C03:02	5
	HLA-C12:03	10
	HLA-A01:01	13
	HLA-C15:02	13
	HLA-B57:01	14
	HLA-B57:03	15
	HLA-A36:01	16
	HLA-C12:02	18
	HLA-C03:03	19
LTSTVQLIM	HLA-B58:02	21
QLIMQLMPF	HLA-B15:01	15
	HLA-A26:01	21
STVQLIMQL	HLA-A68:02	1
	HLA-C15:02	2
	HLA-A25:01	3
	HLA-B57:03	4
	HLA-C12:02	4
	HLA-A26:01	5
	HLA-C12:03	6
	HLA-C06:02	7
	HLA-C03:03	8
	HLA-A30:01	9
	HLA-C02:02	9
	HLA-A11:01	10
	HLA-A32:01	10
	HLA-A02:04	10

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2】

	HLA-A68:01	11
	HLA-B15:09	11
	HLA-C03:04	12
	HLA-B38:01	18
	HLA-B57:01	19
	HLA-A02:03	20
	HLA-C08:01	21
	HLA-B35:01	21
	HLA-B40:01	21
STVQLIMQLM	HLA-A26:01	15
	HLA-B57:01	17
TSTVQLIMQL	HLA-C15:02	17
TVQLIMQL	HLA-C17:01	11
	HLA-B08:01	12
	HLA-B42:01	13
	HLA-B14:02	15
	HLA-B37:01	15
	HLA-B15:09	17
TVQLIMQLM	HLA-B35:03	21
VQLIMQLM	HLA-B52:01	8
	HLA-B14:02	19
	HLA-B37:01	19

(実施例 4 1)

突然変異型 E G F R ネオペプチドの親和性および安定性

【0 8 3 2】

下記の表のネオエピトープを含有する複数のペプチドを、抗原提示細胞に発現させたかまたは負荷したかのいずれかを行った。次いで、質量分析を実施し、表記の H L A アレルに対するネオエピトープの親和性を決定し、ネオエピトープと H L A アレルとの安定性を決定した。表 4 4 は、突然変異型 E G F R ペプチドのそれぞれの親和性および安定性を示す。

表 4 4

10

20

30

40

50

【表 4 4 - 1】

遺伝子	HLA アレル	ペプチド配列	親和性 (nM)	安定性 (1/2 時間)
EGFR_T790M	A01.01	LTSTVQLIM	2891.111	0.103721
EGFR_T790M	A01.01	CLTSTVQLIM	8276.876	0
EGFR_T790M	A02.01	MLMPFGCLL	16.26147	0.381118
EGFR_T790M	A02.01	MLMPFGCL	116.3352	0.368273
EGFR_T790M	A02.01	LIMQLMPFGC	132.4766	0.381284
EGFR_T790M	A02.01	QLIMQLMPF	192.8406	0.34067
EGFR_T790M	A02.01	CLTSTVQLIM	537.1391	0
EGFR_T790M	A02.01	IMQLMPFGCL	653.1065	0.515559
EGFR_T790M	A02.01	IMQLMPFGC	1205.368	0.370112
EGFR_T790M	A02.01	LIMQLMPFG	3337.708	0
EGFR_T790M	A02.01	VQLIMQLMPF	4942.892	0
EGFR_T790M	A02.01	QLIMQLMPFG	5214.668	0
EGFR_T790M	A02.01	STVQLIMQL	7256.773	0

【表 4 4 - 2】

EGFR_T790M	A24.02	QLIMQLMPF	2030.807	0.368673
EGFR_T790M	A24.02	VQLIMQLMPF	4103.131	0
EGFR_T790M	A24.02	IMQLMPFGCL	14119.38	0
EGFR_T790M	A24.02	MLMPFGCLL	18857.47	0
EGFR_T790M	B07.02	MLMPFGCL	1589.188	0
EGFR_T790M	B08.01	QLIMQLMPF	330.1933	0
EGFR_T790M	B08.01	IMQLMPFGCL	427.3913	0
EGFR_T790M	B08.01	MLMPFGCL	4931.727	0
EGFR_T790M	B08.01	MLMPFGCLL	11244.9	0
EGFR_T790M	B08.01	VQLIMQLMPF	16108.18	0
EGFR_T790M	B08.02	QLIMQLMPF	5590.3	ND

10

20

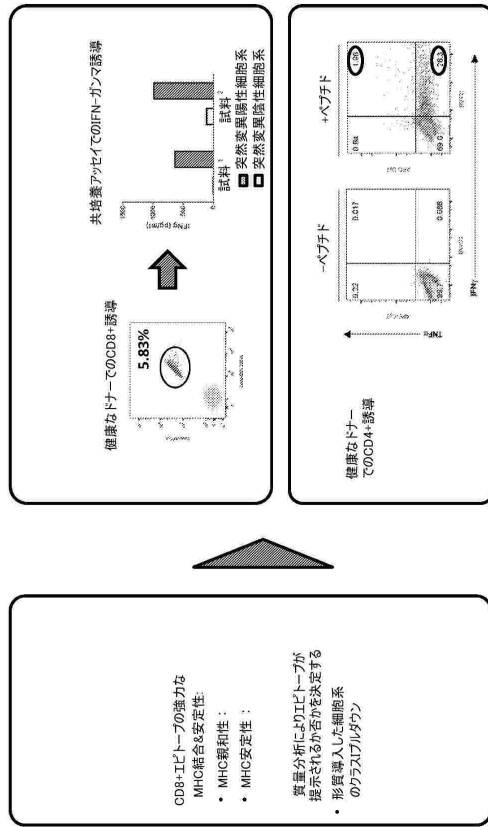
30

40

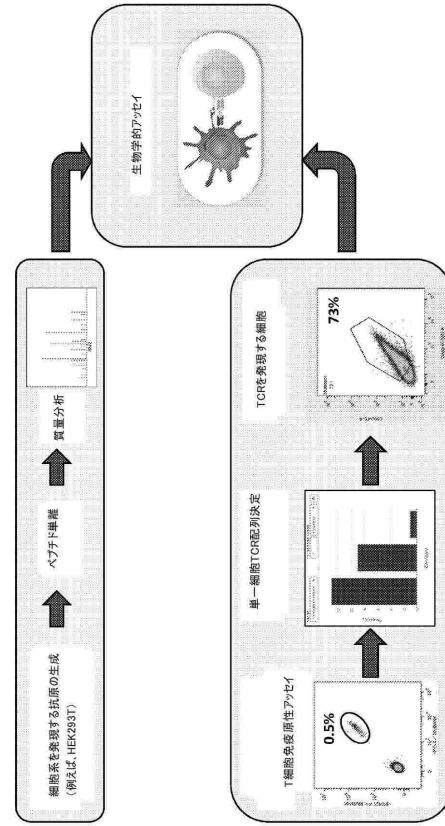
50

【図面】

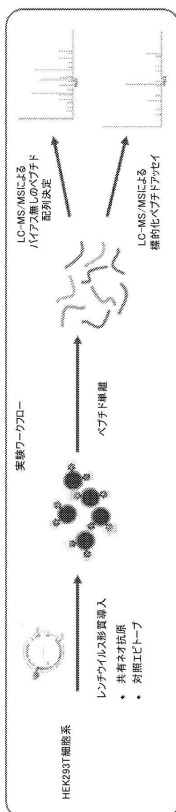
【図 1】



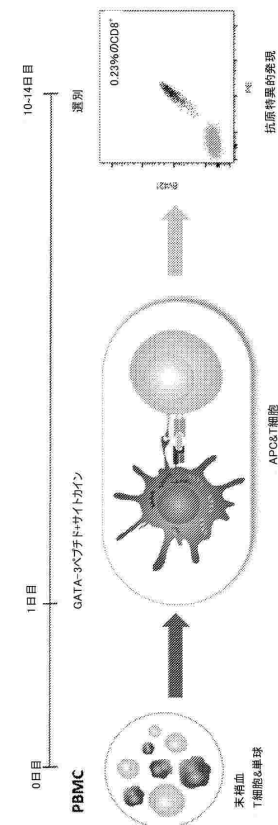
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

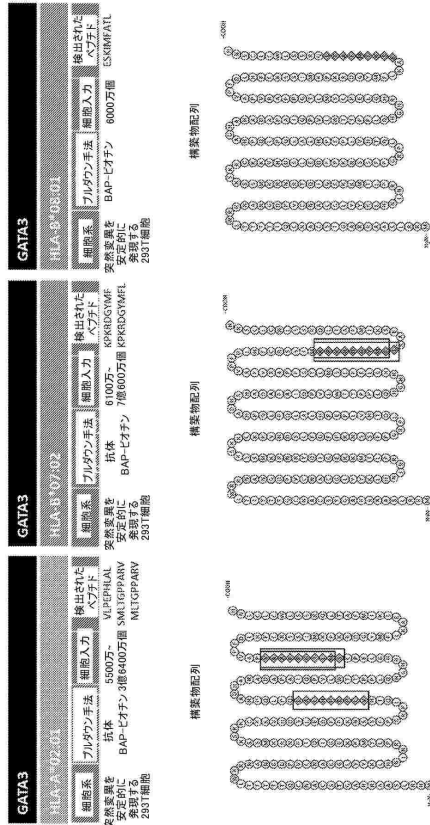


FIG. 5

【図 6】

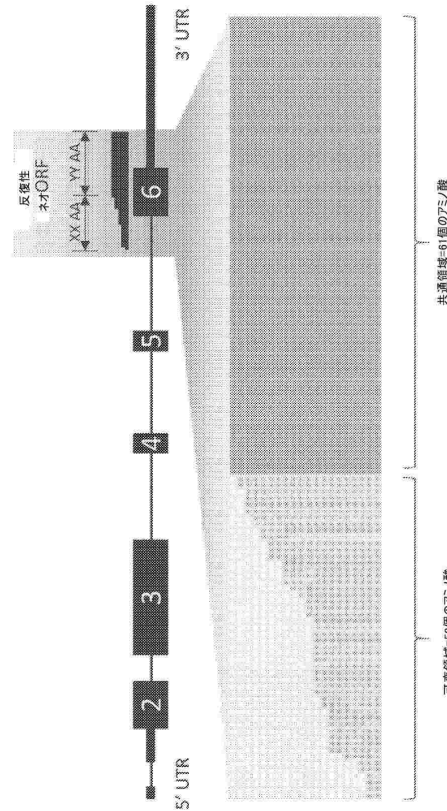


FIG. 6

【図 7 - 1】

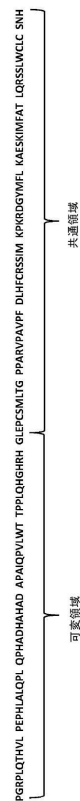


FIG. 7A

【図 7 - 2】



FIG. 7B

10

20

30

40

50

【図 7 - 3】



【図 7 - 4】



【図 7 - 5】



【図 8】

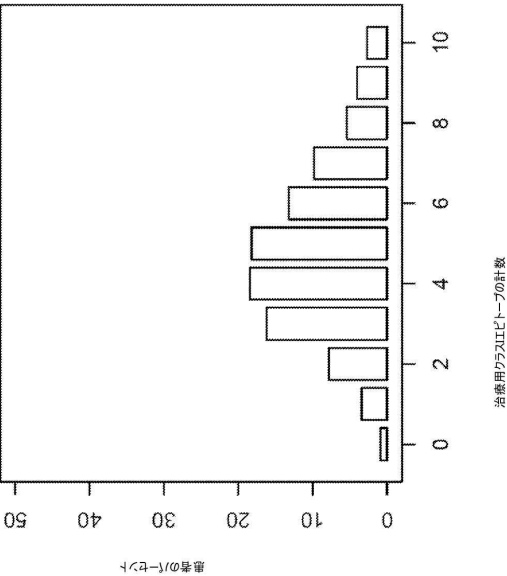


FIG. 8

10

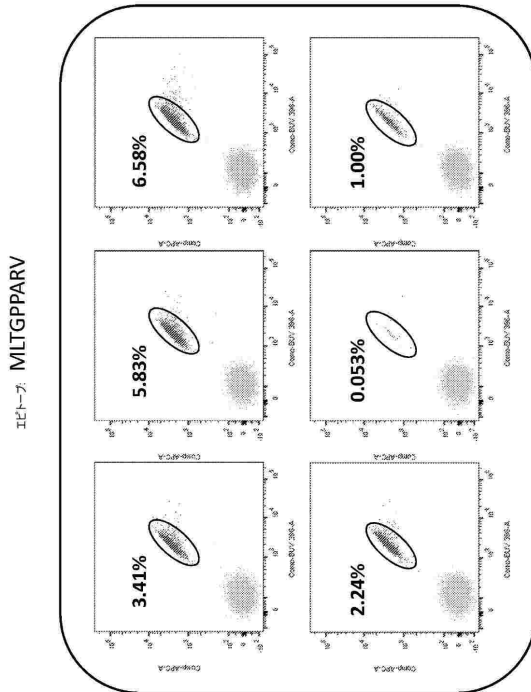
20

30

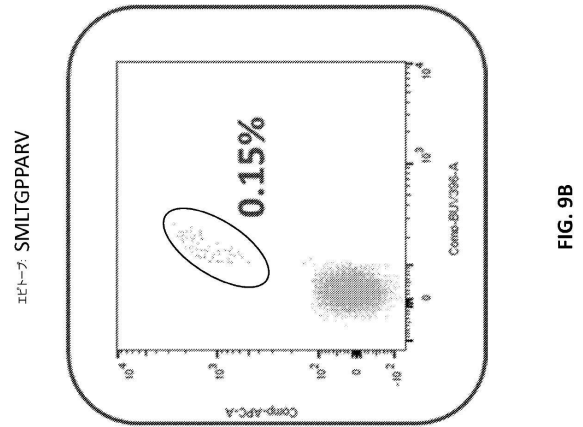
40

50

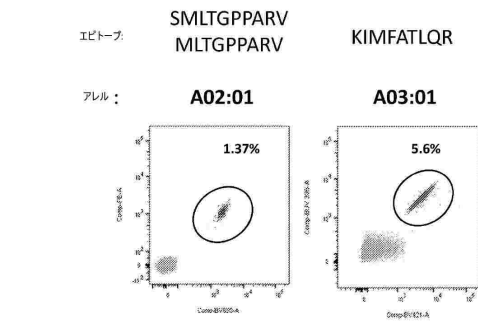
【図 9 - 1】



【図 9 - 2】



【図 9 - 3】



【図 10 - 1】

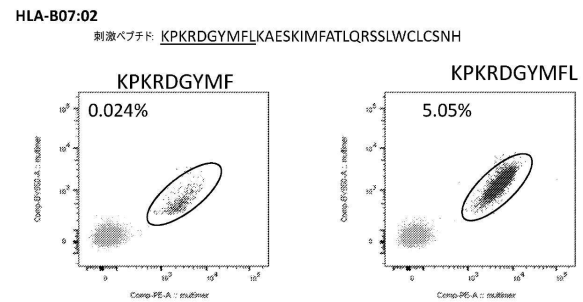


FIG. 10A

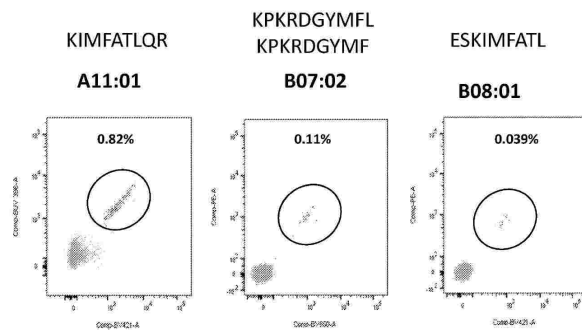


FIG. 9C

10

20

30

40

50

【図 1 0 - 2】

HLA-A02:01
刺激ペプチド: SMLTGPPARVPAVPFDLH

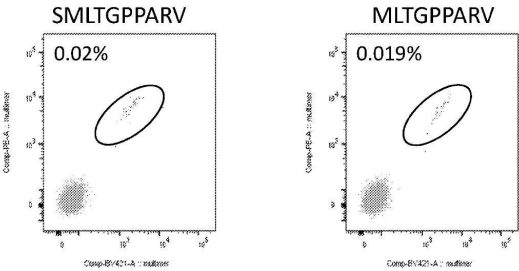


FIG. 10B

【図 1 1】

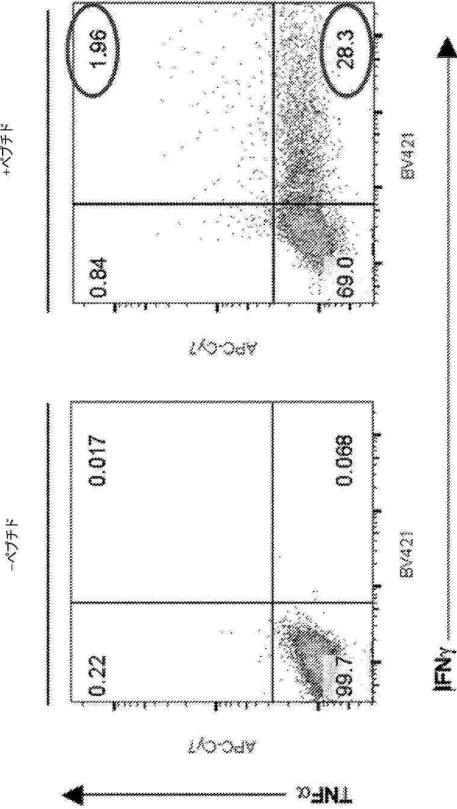


FIG. 11

【図 1 2 - 1】

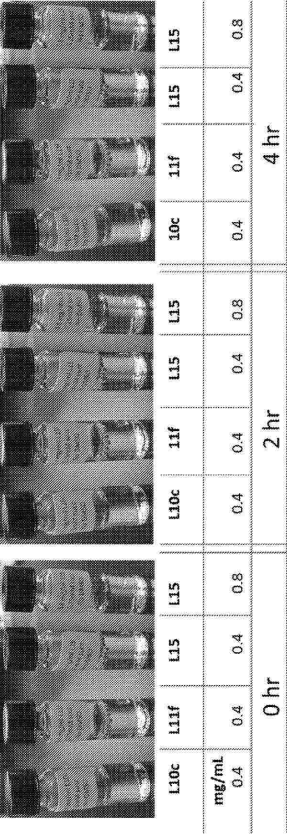


FIG. 12A

【図 1 2 - 2】

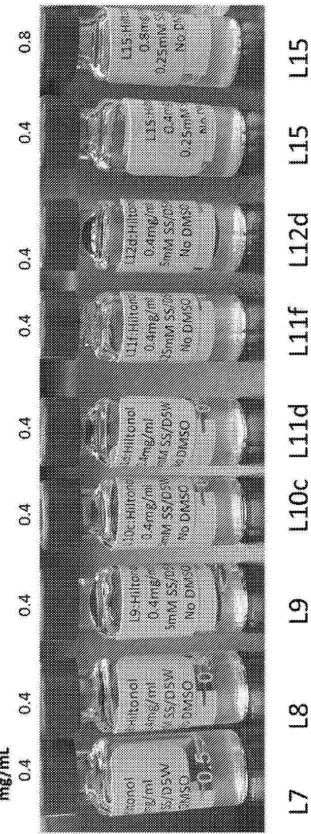


FIG. 12B

10

20

30

40

50

【図 1 2 - 3】

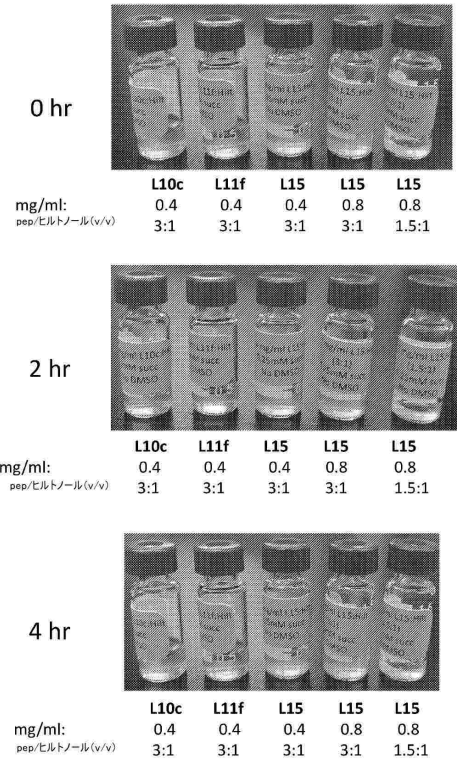


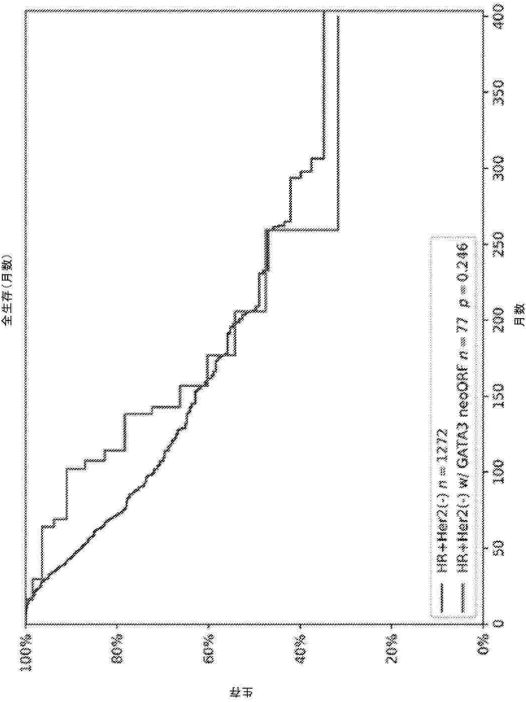
FIG. 12C

【図 1 3】

EPCSMLTGPP ARVPVPFDL HFCSRSSIMKP KRKGVMFLKA ESKIMFATLQ
RSSLWCLCSN H

FIG. 13

【図 1 4】



【図 1 5】

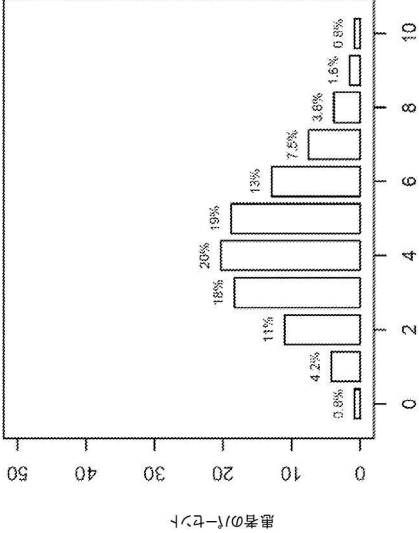
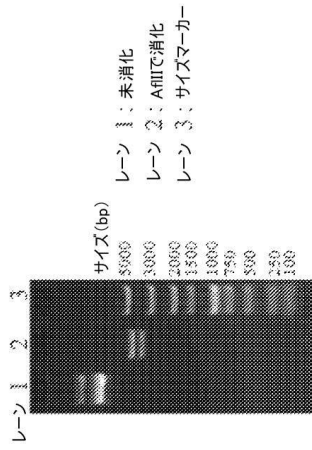


FIG. 15

【図 20】



【図 21】

FIG. 20

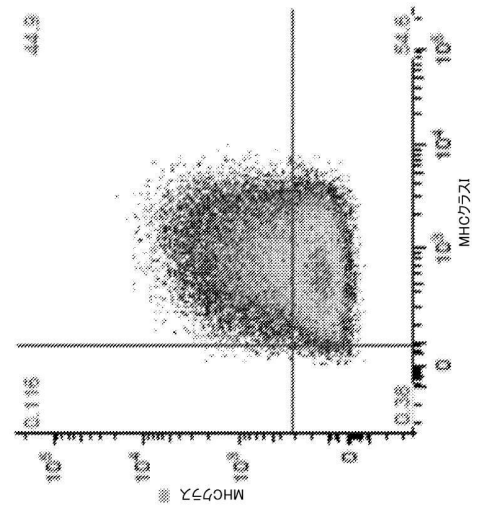
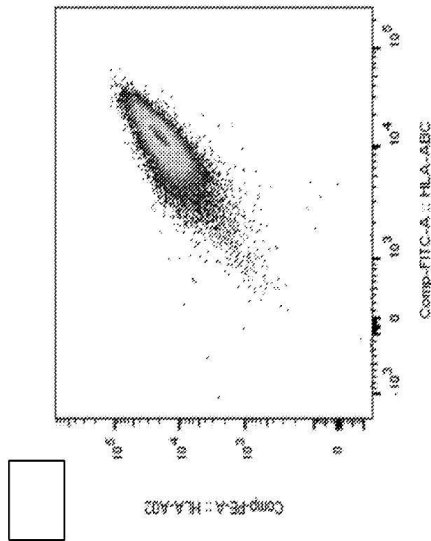


FIG. 21

【図 22-1】



【図 22-2】

FIG. 22A

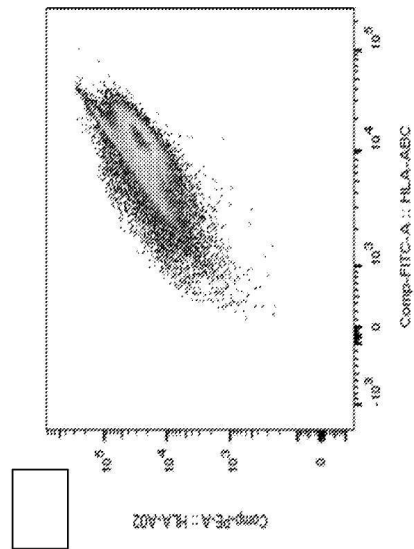


FIG. 22B

10

20

30

40

50

【図 2 2 - 3】

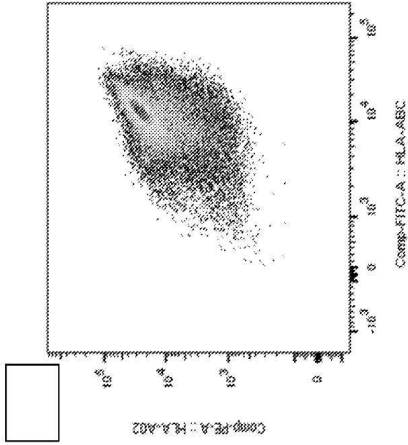


FIG. 22C

【図 2 2 - 4】

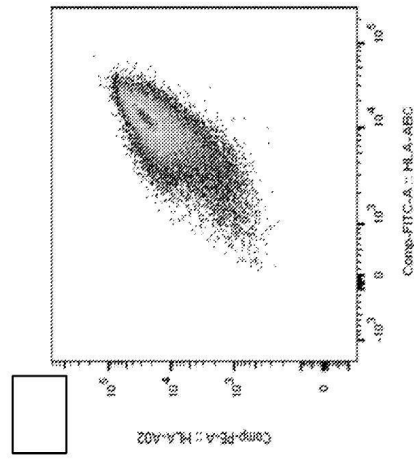


FIG. 22D

【図 2 3】

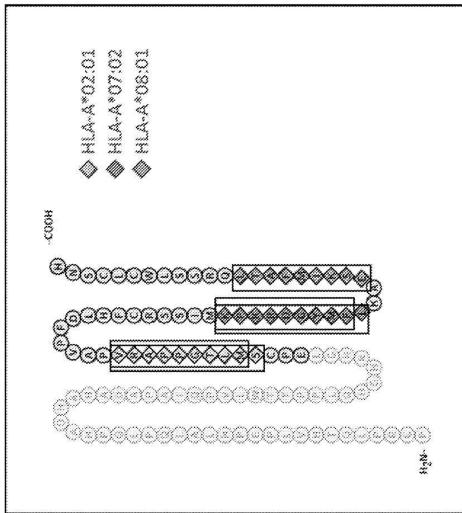


FIG. 23

【図 2 4 - 1】

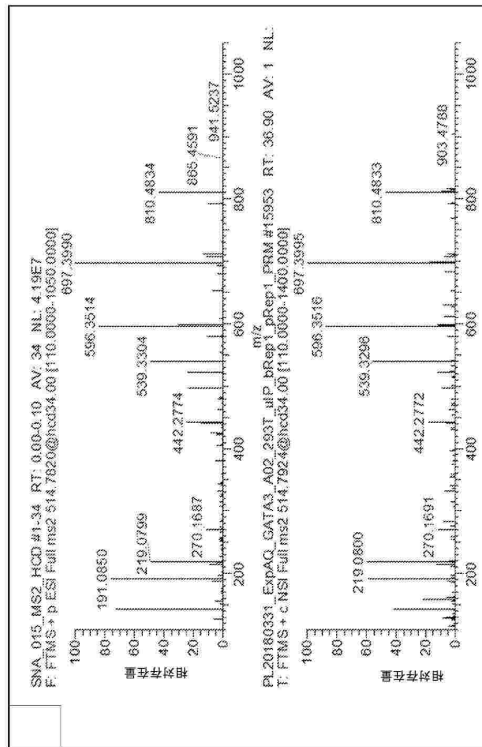


FIG. 24A

10

20

30

40

50

【図 24 - 2】

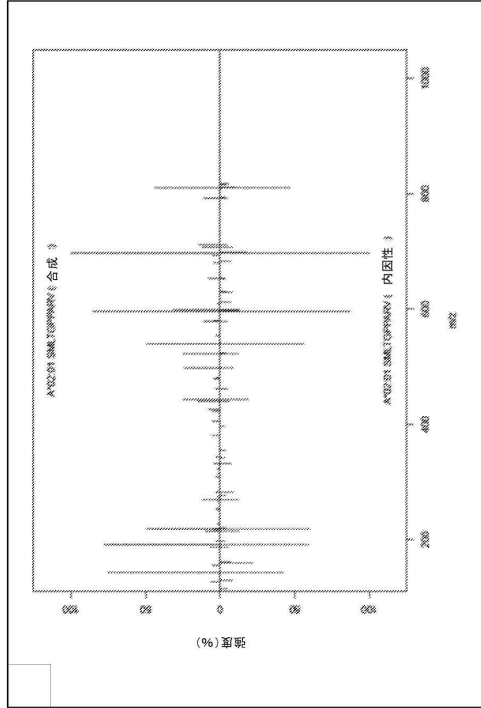


FIG. 24B

【図 25 - 1】

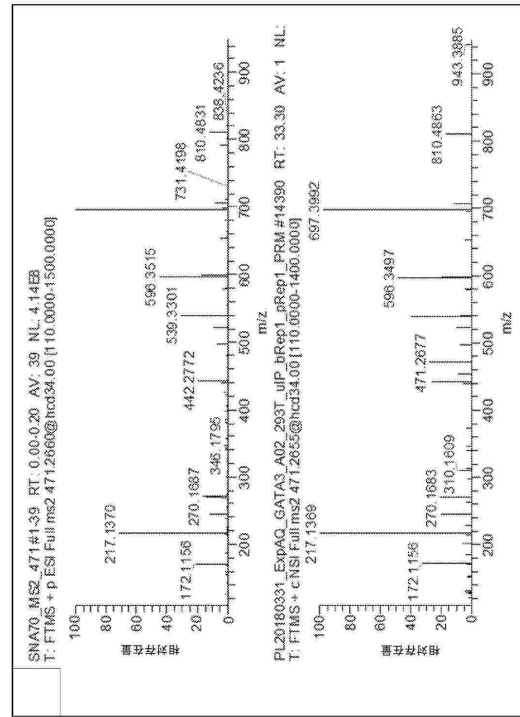


FIG. 25A

【図 25 - 2】

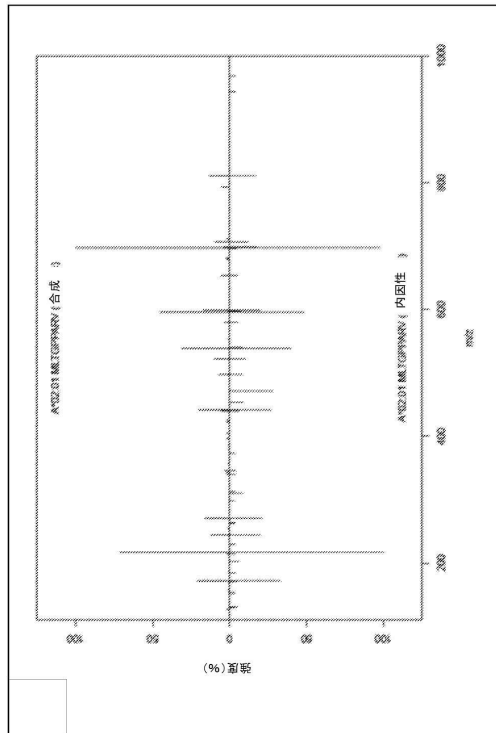


FIG. 25B

【図 26 - 1】

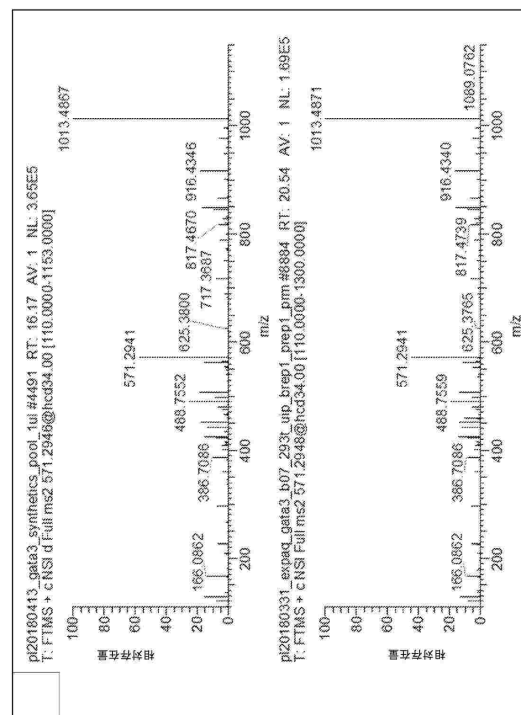


FIG. 26A

10

20

30

40

50

【図 26-2】

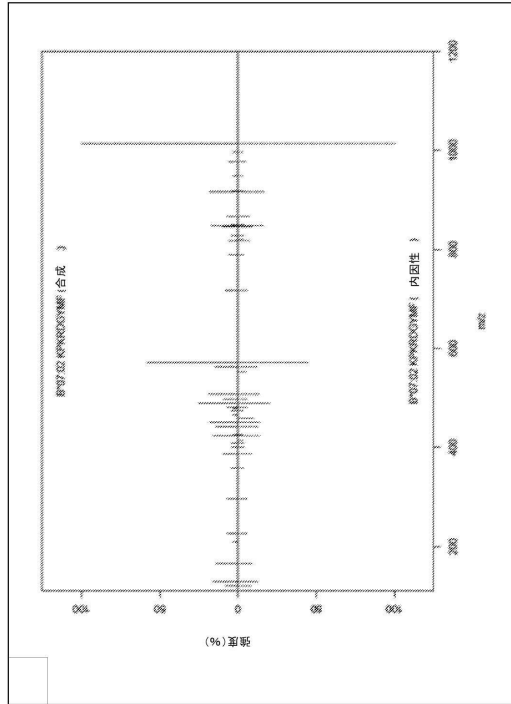


FIG. 26B

【図 27-1】

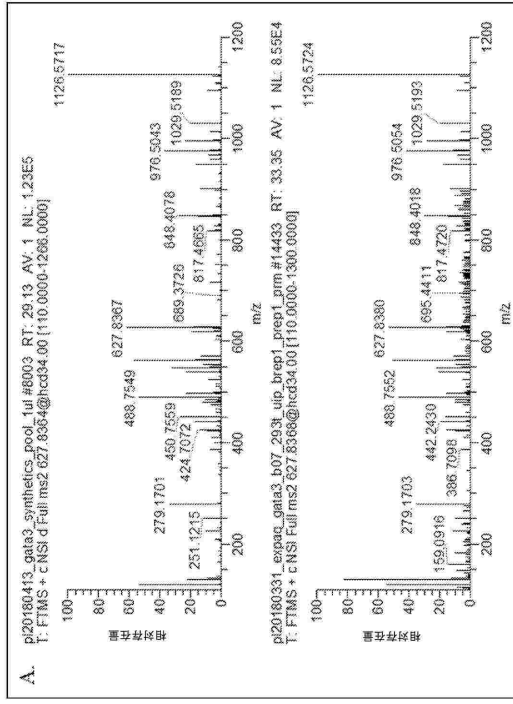


FIG. 27A

10

20

【図 27-2】

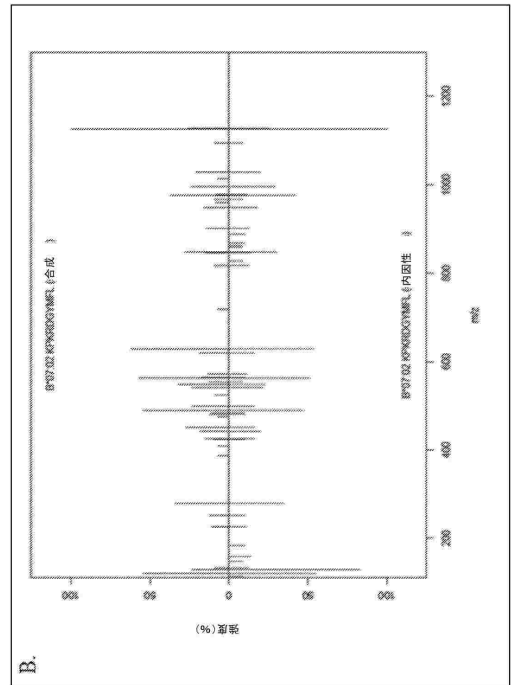


FIG. 27B

【図 28-1】

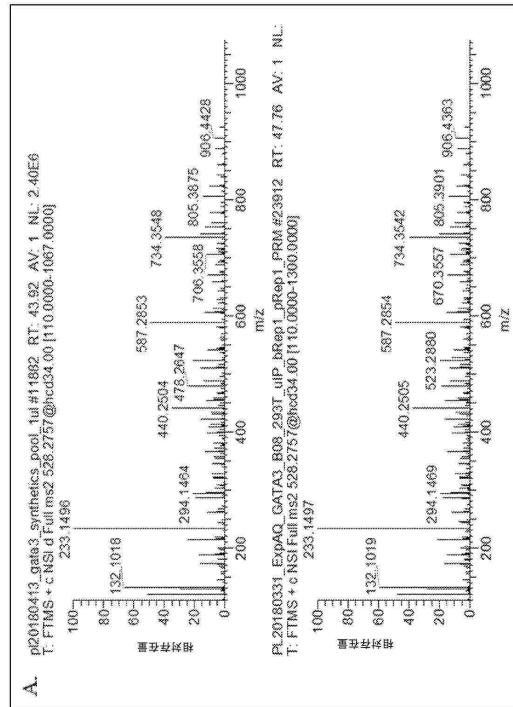


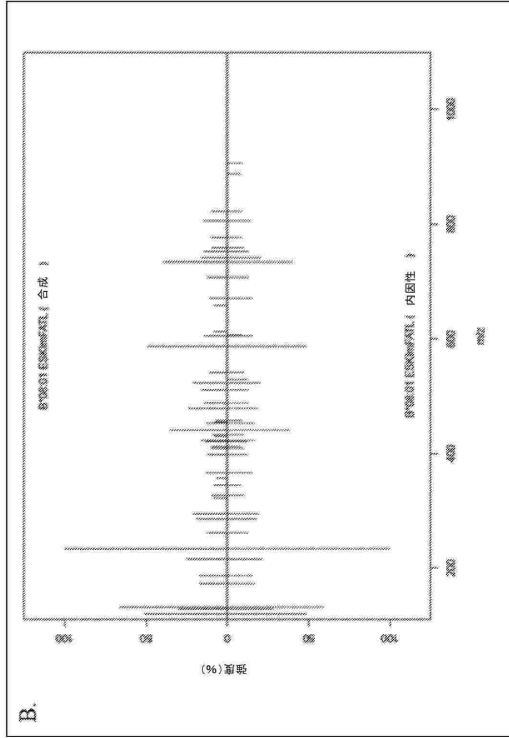
FIG. 28A

30

40

50

【図 28-2】



【図 29-1】

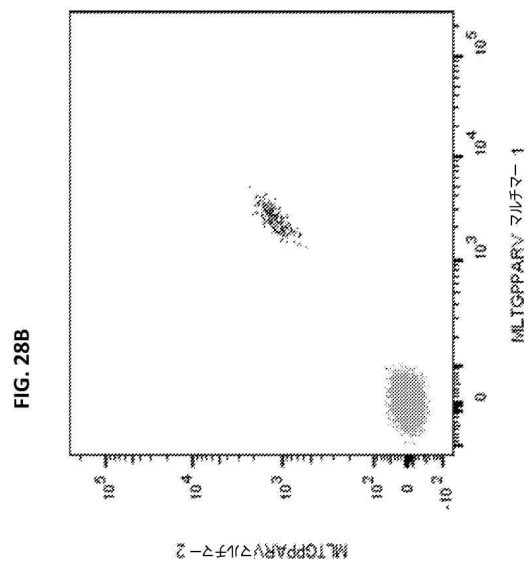
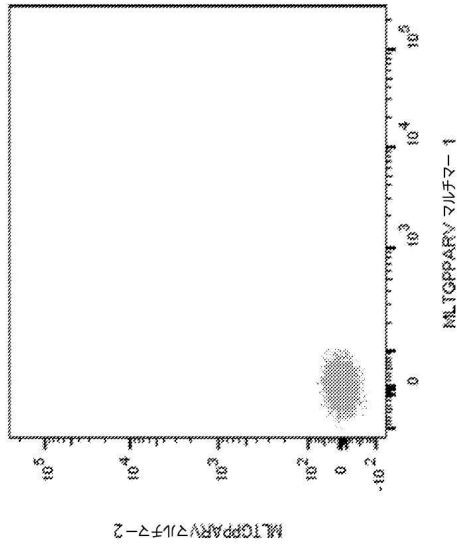


FIG. 29A

10

【図 29-2】



【図 30-1】

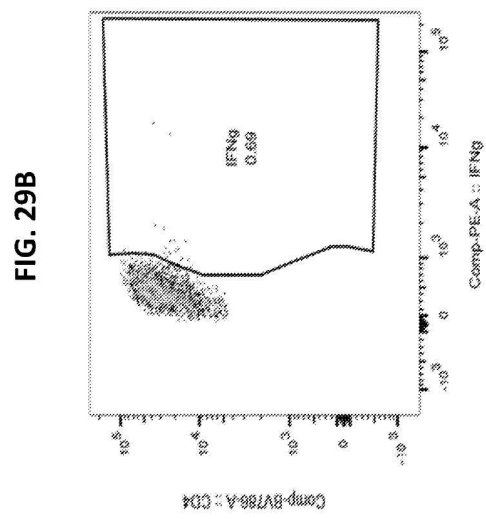


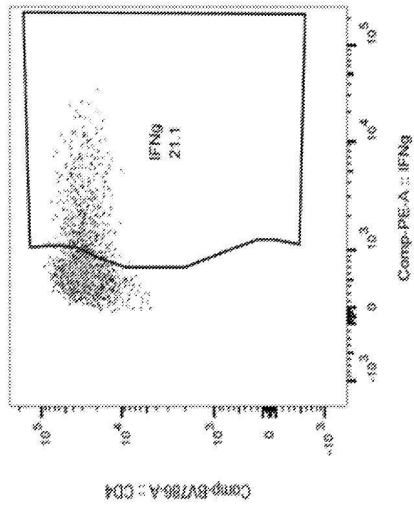
FIG. 30A

30

40

50

【図 3 0 - 2】



【図 3 1 - 1】

FIG. 30B

HD47

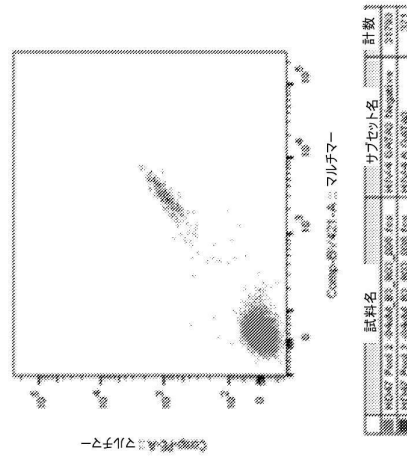
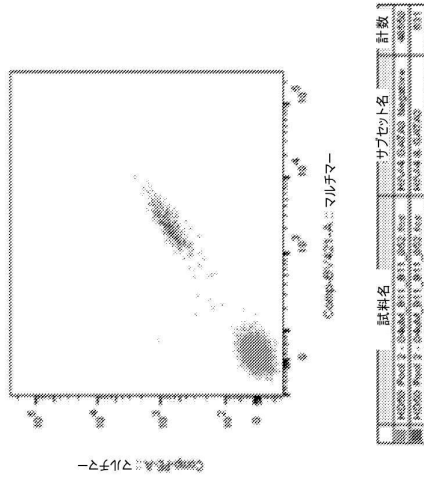


FIG. 31A

【図 3 1 - 2】

HD50



【図 3 1 - 3】

FIG. 31B

HD51

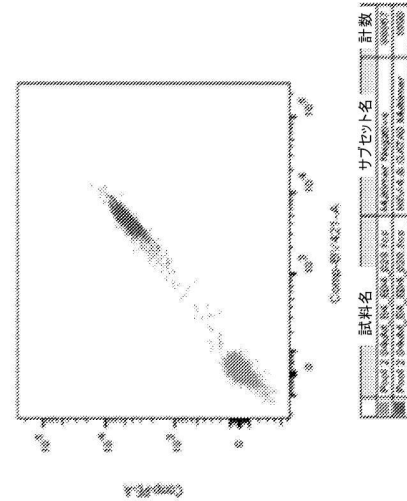


FIG. 31C

10

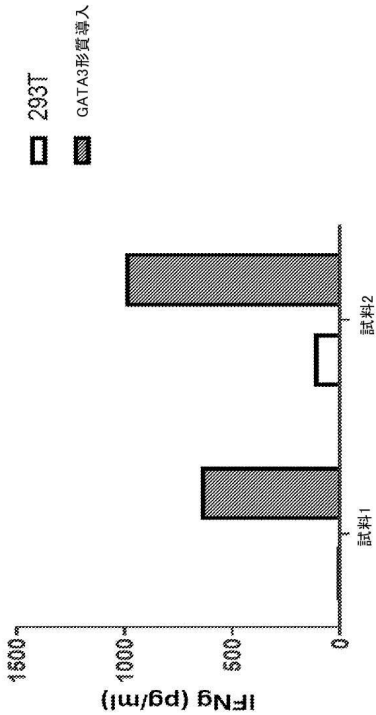
20

30

40

50

【図 3 5】



【図 3 7】

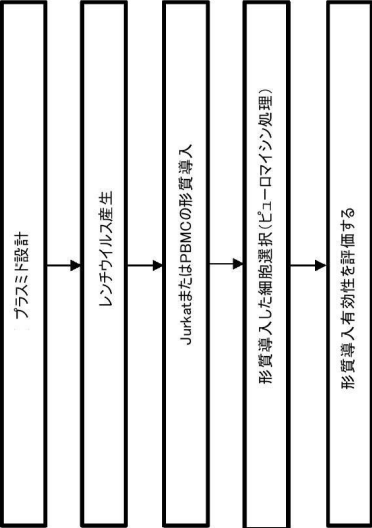


FIG. 37

【図 3 8】

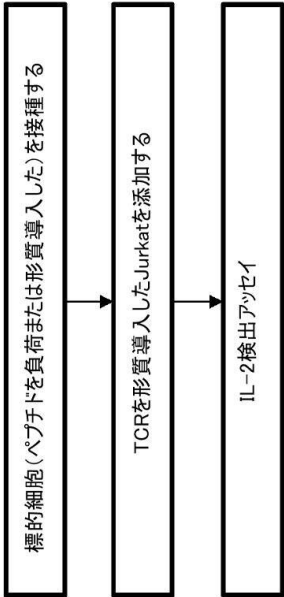


FIG. 38

【図 3 6】

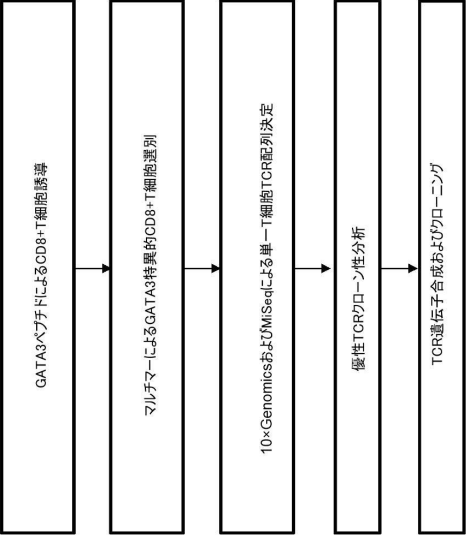


FIG. 36

10

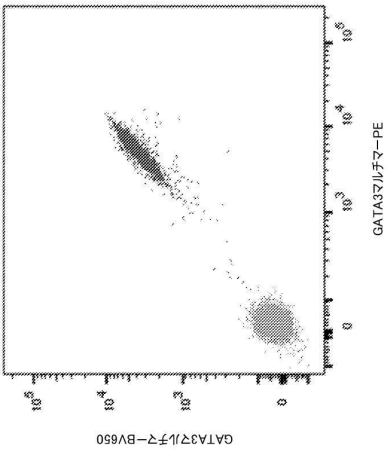
20

30

40

50

【図 3 9】



【図 4 0】

FIG. 39

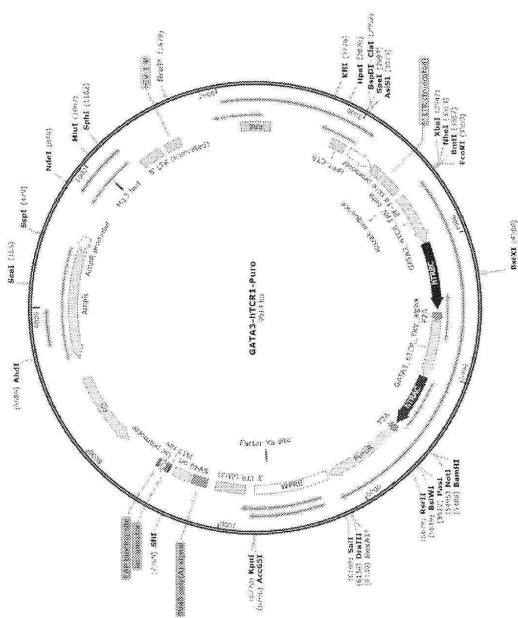


FIG. 40

【図 4 1 - 1】

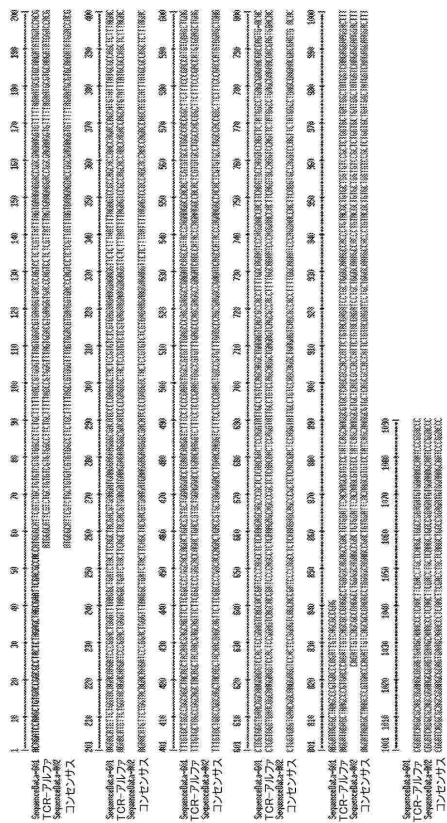


FIG. 41A

【図 4 1 - 2】

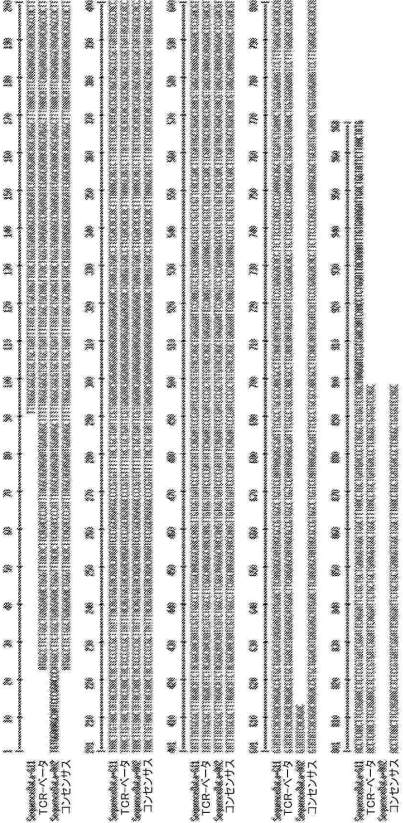


FIG. 41B

10

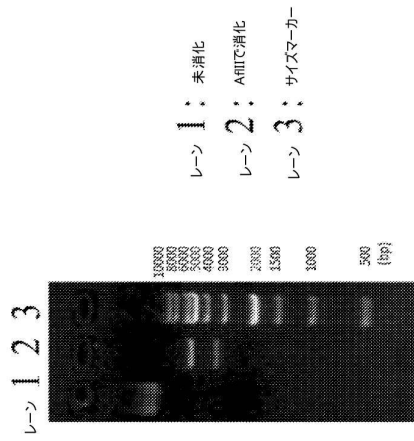
20

30

40

50

【図 4 2】



【図 4 4】

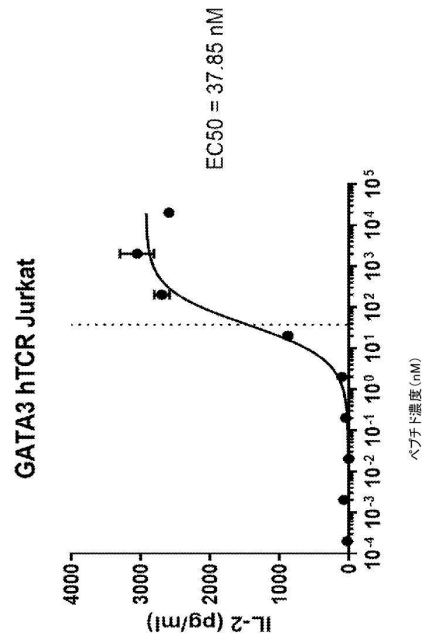


FIG. 44

【図 4 5】

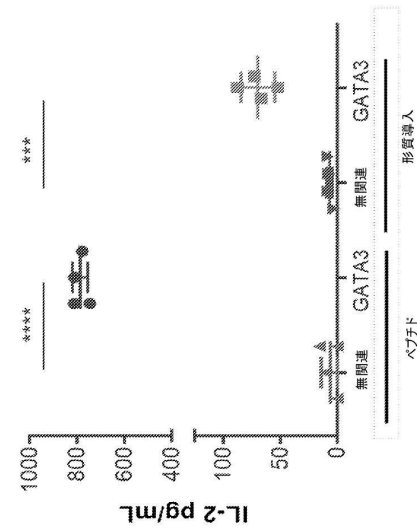


FIG. 43

【図 4 3】

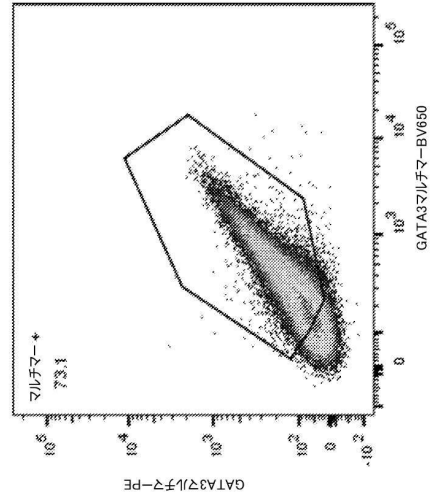


FIG. 42

FIG. 45

10

20

30

40

50

【図 46】

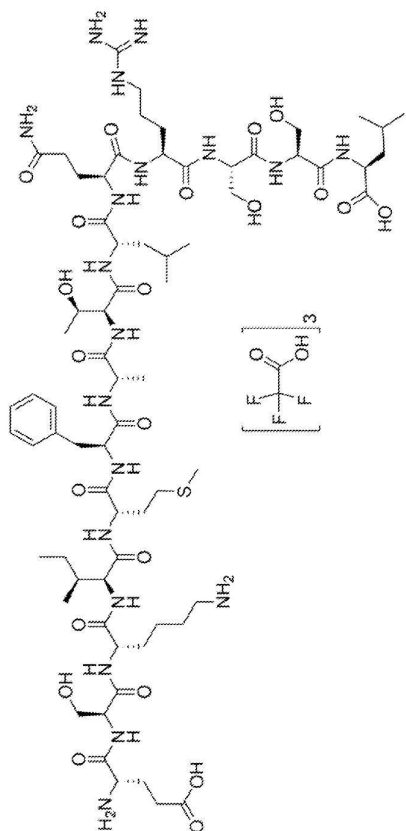


FIG. 46

【図 47】

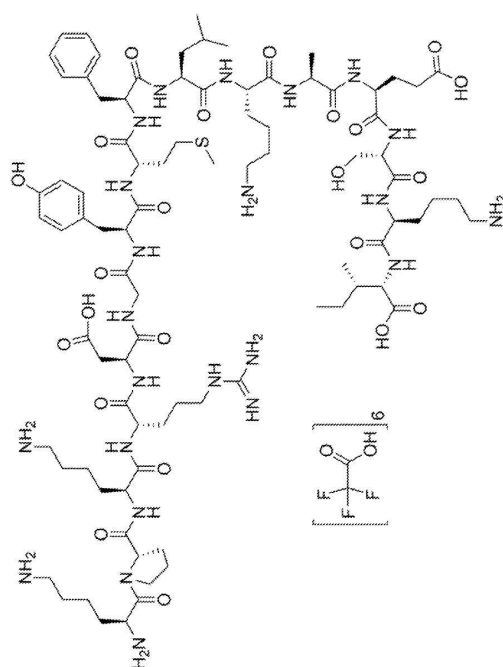


FIG. 47

【図 48】

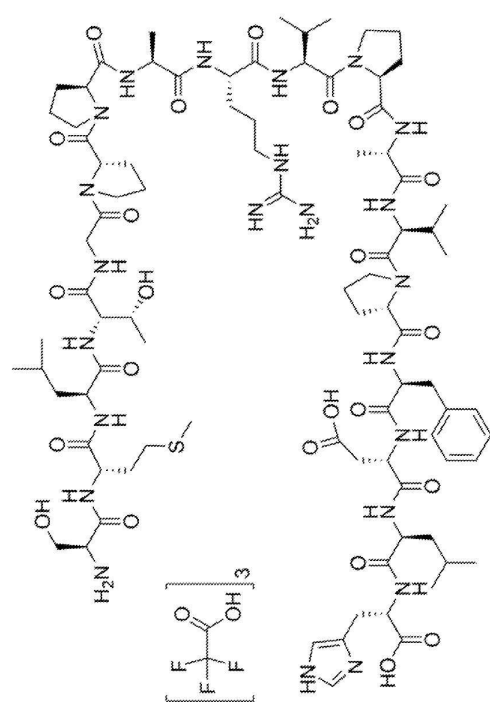


FIG. 48

【図 49】

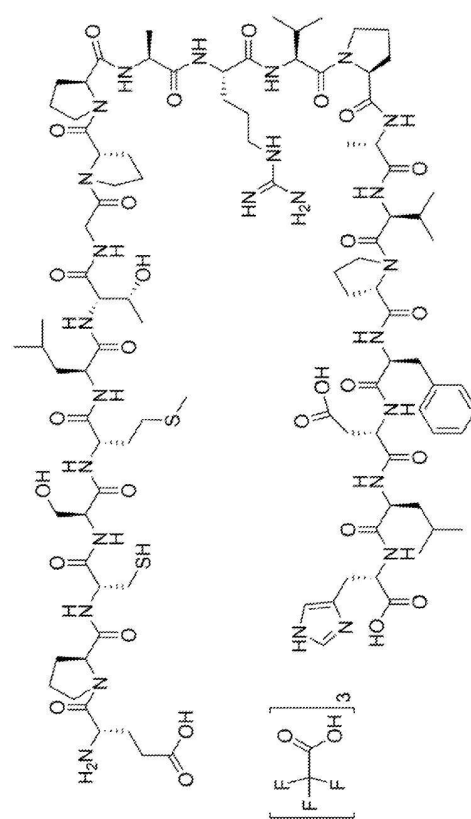


FIG. 49

10

20

30

40

50

【図 50】

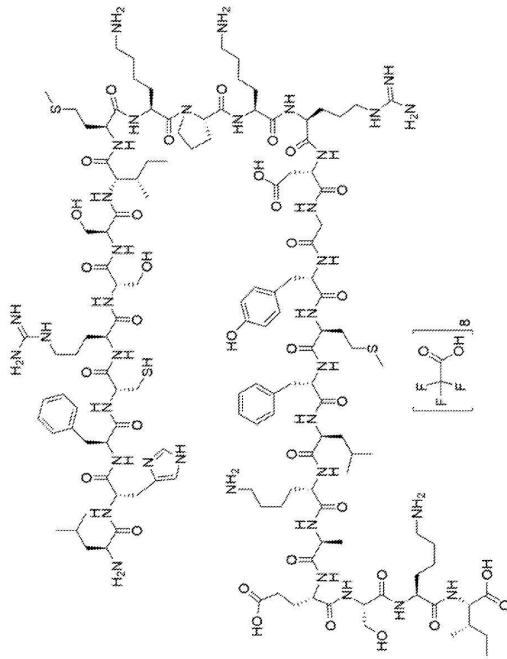


FIG. 50

【図 51】

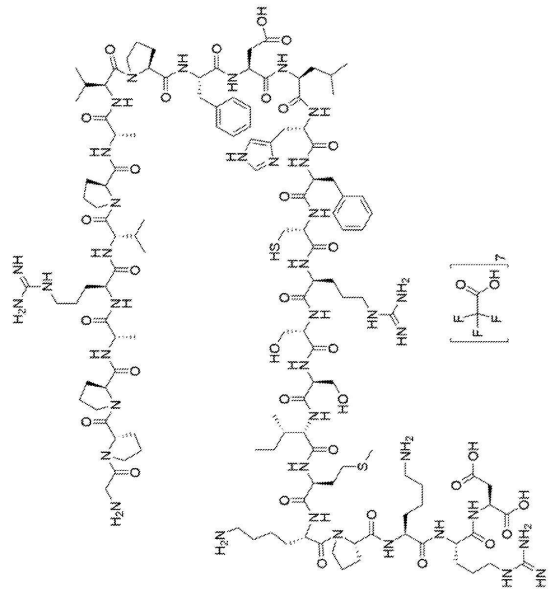


FIG. 51

【図 52】

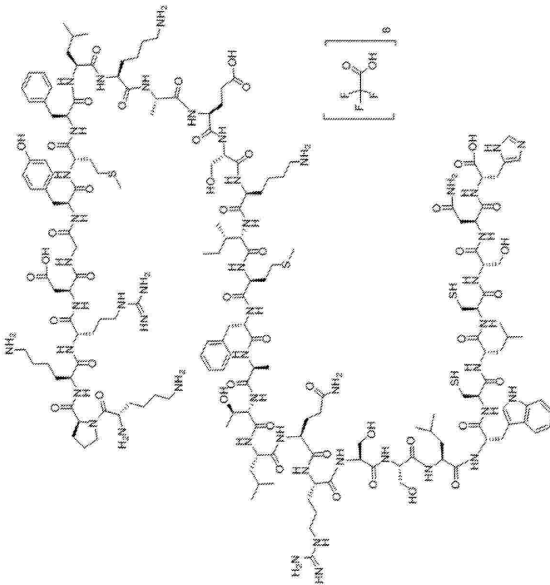


FIG. 52

【図 53】

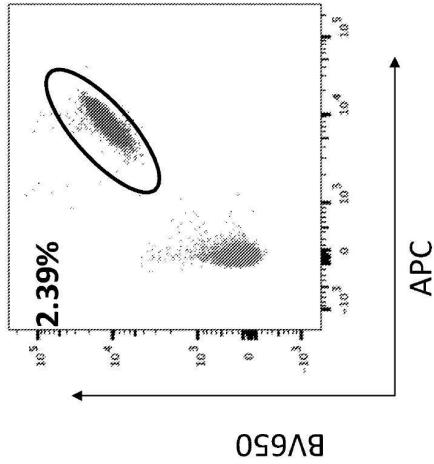


FIG. 53

10

20

30

40

50

【図 5 4】

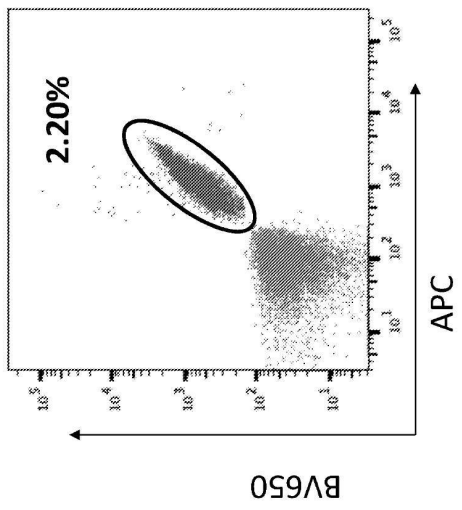


FIG. 54

【配列表】

0007514189000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395		T
A 6 1 K	31/4196(2006.01)	A 6 1 K	31/4196		
A 6 1 K	31/565 (2006.01)	A 6 1 K	31/565		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/519		
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 Q	1/6869		Z
		C 1 2 N	15/12		Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/726,804

(32)優先日 平成30年9月4日(2018.9.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/789,162

(32)優先日 平成31年1月7日(2019.1.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/800,700

(32)優先日 平成31年2月4日(2019.2.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/800,792

(32)優先日 平成31年2月4日(2019.2.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/801,981

(32)優先日 平成31年2月6日(2019.2.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ジュネジャ, ヴィクラム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02453, ウォルサム, レイム ストリート 10, ナンバー1

(72)発明者 ドン, ジェンシン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01746, ホリストン, フェアビュー ストリート 66

(72)発明者 アイザート, ロビン ジェシカ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02143, サマービル, ローウェル ストリート 18

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第2017/173321 (WO, A1)

国際公開第2017/015490 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38/17

A 6 1 K 35/00

A 6 1 P 35/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)