

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6518921号  
(P6518921)

(45) 発行日 令和1年5月29日(2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/47 (2006.01)

C O 7 K 14/47

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 N 5/078

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

請求項の数 16 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-557262 (P2015-557262)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月22日 (2014.5.22)  
 (65) 公表番号 特表2016-525498 (P2016-525498A)  
 (43) 公表日 平成28年8月25日 (2016.8.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/002678  
 (87) 国際公開番号 W02014/188721  
 (87) 国際公開日 平成26年11月27日 (2014.11.27)  
 審査請求日 平成29年5月10日 (2017.5.10)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-109567 (P2013-109567)  
 (32) 優先日 平成25年5月24日 (2013.5.24)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

前置審査

(73) 特許権者 502240113  
 オンコセラピー・サイエンス株式会社  
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一  
 (74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T h 1 細胞の I M P - 3 エピトープペプチドおよびこれを含有するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2 1 ~ 3 0 アミノ酸長からなり、配列番号：6 のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

( a ) 配列番号：2 および 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

( b ) ( a ) のアミノ酸配列において 1 または 2 個のアミノ酸が置換および / または付加されているアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、T ヘルパー 1 型 ( T h 1 ) 細胞を誘導する能力を有する、ペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドまたはその断片が少なくとも 2 種類の M H C クラス I I 分子に結合する能力を有する、請求項 1 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 3】

前記 M H C クラス I I 分子が、H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 からなる群より選択される、請求項 2 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

I M P - 3 特異的細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離されたペプチド。

【請求項 5】

10

20

配列番号：2および1からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる請求項1に記載のペプチド。

【請求項6】

請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】

- (i) T h 1 細胞、
- (i i) C T L、
- (i i i) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 ( A P C )、および
- (i v) C T L を誘導する能力を有する A P C

からなる群より選択される細胞の少なくとも1つを誘導するための組成物であって、請求項1から5のいずれか一項に記載の1つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項8】

- (a) 請求項1から5のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；
  - (b) 請求項6に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；
  - (c) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数の A P C ；
  - (d) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する1つまたは複数の T h 1 細胞；および
  - (e) 前記 ( a ) から ( d ) の任意の2つまたはそれ以上の組合せ
- からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有し、ならびに

- (i) がんの治療、
  - (i i) がんの予防、
  - (i i i) がんにおける術後再発の予防、および
  - (i v) 前記 ( i ) から ( i i i ) の任意の2つまたはそれ以上の組合せ
- からなる群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

【請求項9】

M H C クラス I I 分子として H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 からなる群より選択される少なくとも1つを有する対象への投与用に製剤化されている、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

C T L 誘導能を有する1つまたは複数のペプチドをさらに含有する、請求項8または9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

- M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、
- (a) 請求項1から5のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；
  - (b) 請求項6に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；
  - (c) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数の A P C ；
  - (d) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する1つまたは複数の T h 1 細胞；および
  - (e) 前記 ( a ) から ( d ) の任意の2つまたはそれ以上の組合せ
- からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有する、組成物。

【請求項12】

T h 1 細胞を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、A P C を請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロで接触させる段階を含む、方法。

【請求項13】

T h 1 細胞をインビトロで誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞を、M H C クラス I I 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する A P C と共培養する段階；および

(b) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで T C R が、細胞表面に提示される M H C クラス I I 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階

からなる群より選択される段階を含む、方法。

【請求項 1 4】

C T L をインビトロで誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞および C D 8 陽性 T 細胞の両方を、請求項 4 に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階；ならびに

(b) C D 8 陽性 T 細胞を、請求項 4 に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階

からなる群より選択される段階を含む、方法。

【請求項 1 5】

M H C クラス I I 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離された A P C 。

【請求項 1 6】

A P C の表面に提示された請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離された T h 1 細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物科学の分野、より詳細にはがん療法の分野に関する。特に、本発明は、がんワクチンとして極めて有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬剤に関する。

【0002】

優先権

本出願は、2013年5月24日出願の日本特許出願第2013 109567号の恩典を主張し、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

C D 8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) クラス I 分子上で見いだされる腫瘍関連抗原 ( T A A ) に由来するエピトープペプチドを認識し、その後腫瘍細胞を死滅させることが示されている。T A A の最初の例として黒色腫抗原 ( M A G E ) ファミリーが発見されて以来、多くの他の T A A が、主として免疫学的アプローチを通して、発見されてきた ( 非特許文献 1、2 )。これらの T A A のいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発が進められている。

【0004】

がん細胞の増殖および生存に不可欠な T A A は、免疫療法のための標的として有用である。なぜなら、そのような T A A の使用は、治療に行われる免疫選択の結果としての T A A の欠失、突然変異または下方制御に起因するがん細胞の免疫回避の広く記述されている危険性を最小限に抑え得るからである。したがって、強力で特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができる新規 T A A の同定はさらなる発展を保証する。そこで、様々なタイプのがんに対するペプチドワクチン戦略の臨床適用が進行中である ( 非特許文献 3 ~ 10 )。現在までに、これらの腫瘍関連抗原由来ペプチドを使用した臨床試験のいくつかの報告がある。残念ながら、これまでのところ、これらのがんワクチンの治験は、今までにこれらのがんワクチン治験で認められてきた低い客観的奏効率しかもたらしていない ( 非特

10

20

30

40

50

許文献 11 ~ 13)。したがって、免疫療法標的としての使用に適する新規 TAA が当分野において依然として必要である。

【0005】

近年、本発明者らは、ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析を用いることにより、肺がん、頭頸部がん (HNC)、食道がんおよび様々な他の悪性腫瘍で高頻度で過剰発現するがん胎児抗原、インスリン様成長因子 I I mRNA 結合タンパク質 3 (IMP-3) を同定した (非特許文献 14、特許文献 1 ~ 3)。1 本発明者らはまた、肺がん患者の末梢血単核細胞 (PBMC) から HLA-A2 (A\*02:01) 拘束性 CTL および HLA-A24 (A\*24:02) 拘束性 CTL を誘導することができる、高い免疫原性を示す IMP-3 由来短鎖ペプチド (SP) を同定した (非特許文献: 14、15、特許文献 2、3)。それゆえ、IMP-3 は、がん免疫療法にとって依然として魅力的な標的分子である。IMP-3 由来 CTL エピトープを用いた、肺がん、頭頸部がん (HNC)、食道がんおよび大腸がん患者のためのがん免疫療法フェーズ I / II 臨床試験が進行中である (非特許文献: 14 ~ 18)。

【0006】

腫瘍特異的 CD4<sup>+</sup> ヘルパー T (Th) 細胞、特に T ヘルパー 1 型 (Th1) 細胞は、CTL 媒介性抗腫瘍免疫の効率的な誘導に重要な役割を果たす (非特許文献 19)。Th1 細胞によって主として産生される IFN- $\gamma$  は、長く持続する CTL 応答の誘導と維持のために必須であり、免疫記憶の維持において重要な多数の相互作用を通して支援を提供する (非特許文献 20、21)。Th1 細胞によって分泌される IFN- $\gamma$  は、直接の抗腫瘍作用または抗血管新生作用も媒介する (非特許文献 22)。さらに、Th 細胞は、腫瘍部位における CTL の侵入のための道筋をつけているであろうことが示されている (非特許文献 23)。それゆえ、特異的 Th1 細胞を活性化することができる腫瘍関連抗原 (TAA) 由来 Th 細胞エピトープの同定は、腫瘍担持宿主における有効な腫瘍免疫の誘導のために重要である; 理想的には、有効なワクチンの設計は、CTL と Th1 細胞の両方を刺激する複数のエピトープを含むべきである (非特許文献 24)。しかしながら、IMP-3 に由来するそのようなエピトープは未だ同定されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】WO2004/031413

【特許文献 2】WO2007/013665

【特許文献 3】WO2007/013671

【特許文献 4】WO2006/090810

【特許文献 5】WO2011/067920

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80

【非特許文献 2】Boon T and van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9

【非特許文献 3】Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55

【非特許文献 4】Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42

【非特許文献 5】Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

【非特許文献 6】van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14

【非特許文献 7】Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8

【非特許文献 8】Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72

【非特許文献 9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66

【非特許文献 10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94

【非特許文献 11】Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80

【非特許文献 12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42

- 【非特許文献 13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15  
 【非特許文献 14】Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011;102:71-8  
 【非特許文献 15】Suda T, et al., Cancer Sci 2007;98:1803-8  
 【非特許文献 16】Mizukami Y, et al., Cancer Sci 2008;99:1448-54  
 【非特許文献 17】Kono K, et al., Cancer Sci 2009;100:1502-9  
 【非特許文献 18】Kono K, et al., J Transl Med 2012;10:141  
 【非特許文献 19】Chamoto K et al. Cancer Res 2004;64: 386-90  
 【非特許文献 20】Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004;4: 595-602  
 【非特許文献 21】Shedlock DJ and Shen H. Science 2003;300: 337-9  
 【非特許文献 22】Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7  
 【非特許文献 23】Bos R, and Sherman LA. Cancer Res;70: 8368-77  
 【非特許文献 24】Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60

10

# 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

### 【0009】

本発明に関連して、本発明者らは、がん免疫療法のための理想的なペプチドワクチンは、両者が互いに天然で近位である、CTLとTh1細胞の両方のエピトープを含む単一ポリペプチドを含むものであると考えた(Kenter GG et al. N Engl J Med 2009; 361: 1838-47)。

### 【0010】

そのために、本発明者らは、プロミスキラスな(promiscuous)HLAクラスII分子との関連で認識され、CTLエピトープを含む、新規IMP-3由来Th1細胞エピトープを同定する戦略を設計し、そのようにして特徴づけられたエピトープがより効率的なT細胞媒介性腫瘍免疫を誘導するという仮定の下で研究を進めた。HLAクラスII結合ペプチドを予測するコンピュータアルゴリズムおよびHLA-A24(A\*24:02)またはHLA-A2(A\*0201)拘束性CTLによって認識される公知のCTLエピトープ配列を使用して、候補となる、CTLエピトープを含有するプロミスキラスなHLAクラスII拘束性Th1細胞エピトープを選択した。

20

### 【0011】

本発明は、少なくとも部分的には、Th1細胞応答を誘導するための免疫療法の標的として役立つ適切なエピトープペプチドの発見に基づく。IMP-3遺伝子は、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCを含む多くのがん型で上方制御されることが認められているので、本発明は、IMP-3遺伝子の遺伝子産物、より詳細にはGenBankアクセッション番号NM\_006547.2(遺伝子番号:5)の遺伝子によってコードされる配列番号:6に代表的に示すポリペプチドをさらなる解析のための標的とする。対応する分子に特異的なTh1細胞を誘発するエピトープペプチドを含むIMP-3遺伝子産物をさらなる試験のために特に選択した。例えば、健常ドナーから得られた末梢血単核細胞(PBMC)を、ヒトIMP-3に由来するプロミスキラスなHLA-DRおよび/またはDP結合ペプチドを用いて刺激した。それぞれの候補ペプチドでパルスしたHLA-DRまたはDP陽性標的細胞を認識するTh1細胞を樹立し、IMP-3に対する強力な特異的な免疫応答を誘導することができるHLA-DRおよび/またはDP拘束性エピトープペプチドを同定した。これらの結果は、IMP-3が強力な免疫原性をもち、そのエピトープはTh1細胞応答を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを明らかにする。付加的な試験は、少なくとも1つのCTLエピトープを含むプロミスキラスなHLA-DRおよび/またはDP結合ペプチドが、同じドナーにおいてIMP-3特異的にCTL応答を刺激できることも明らかにした。これらの結果は、IMP-3が強く免疫原性であること、ならびにTh1細胞エピトープおよびCTLエピトープの両方を含むそのエピトープが、Th1細胞応答およびCTL応答の両方

30

40

50

を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを確認する。

【 0 0 1 2 】

それゆえ、T h 1 細胞誘導能ならびに配列番号： 1 および 2 の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供することが本発明の 1 つの目的である。本発明は、改変されたペプチド、すなわち最大 3 0 アミノ酸までの長さであり、配列番号： 6 ( I M P - 3 ) のアミノ酸配列から選択される連続するアミノ酸配列を有する、T h 1 細胞誘導能を備えたペプチド、ならびにその機能的等価物を企図する。あるいは、本発明はまた、T h 1 細胞誘導能および C T L 誘導能の両方を有するペプチドも提供する。いくつかの態様において、本発明のペプチドは、配列番号： 1 もしくは 2 のアミノ酸配列または、T h 1 細胞を誘導する能力を維持しつつ、1、2 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / もしくは付加されている、その改変型に対応する。

10

【 0 0 1 3 】

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、好ましくは 1 つまたは複数の抗原提示細胞の表面に提示され、次にこれが T h 1 細胞を誘導する。本発明のペプチドが少なくとも 1 つの C T L エピトープをさらに含む場合、そのような A P C はまた、本発明のペプチドから生成される C T L エピトープを提示し、したがってそれぞれのペプチドを標的とする C T L を誘導するようにペプチドをプロセッシングする。それゆえ、本発明のペプチドのいずれかまたはその断片を提示する抗原提示細胞、ならびに抗原提示細胞を誘導するための方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

【 0 0 1 4 】

20

本発明の 1 つもしくは複数のペプチドまたはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはそのようなペプチドまたはその断片を提示する抗原提示細胞の投与は、強力な抗腫瘍免疫応答の誘導をもたらす。したがって、以下の 1 つまたは複数の有効成分として含有する薬剤または医薬組成物を提供することが本発明のさらにもう 1 つの目的である： ( a ) 本発明の 1 つまたは複数のペプチド、( b ) そのようなペプチドをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチド、および ( c ) 本発明の 1 つまたは複数の抗原提示細胞。そのような本発明の薬剤または医薬組成物は、ワクチンとして特に有用である。

【 0 0 1 5 】

がん ( すなわち腫瘍 ) の治療および / もしくは予防 ( p r o p h y l a x i s ) ( すなわち予防 ( p r e v e n t i o n ) )、ならびに / またはその術後再発の予防のための方法を提供することが本発明のなおさらなる目的である。本発明の 1 つもしくは複数のペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示細胞または薬剤もしくは医薬組成物を投与する段階を含む、T h 1 細胞を誘導するまたは抗腫瘍免疫を誘導するための方法もまた企図される。さらに、本発明の T h 1 細胞はがんに対するワクチンとしても使用され、がんの例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺がん ( N S C L C )、小細胞肺がん ( S C L C )、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍および H N C が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 1 6 】

本発明の特に企図される目的の例には以下が含まれる：

40

[ 1 ] 1 0 ~ 3 0 アミノ酸長を有し、配列番号： 6 のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって：

( a ) 配列番号： 1 または 2 のアミノ酸配列から選択される 9 を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；ならびに

( b ) ( a ) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / または付加されているアミノ酸配列  
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、T ヘルパー 1 型 ( T h 1 ) 細胞を誘導する能力を有する、ペプチド。

[ 2 ] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも 2 種類の M H C クラス I I 分子に結合する能力を有する、[ 1 ] に記載の単離されたペプチド。

50

[ 3 ] 前記 M H C クラス I I 分子が H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 からなる群より選択される、[ 2 ] に記載の単離されたペプチド。

[ 4 ] I M P - 3 特異的細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[ 1 ] から [ 3 ] のいずれか 1 つに記載の単離されたペプチド。

[ 5 ]

( a ) 配列番号 : 1 および 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列 ; ならびに

( b ) ( a ) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / または付加されているアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[ 4 ] に記載の単離されたペプチド。

10

[ 6 ] [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

[ 7 ]

( i ) T h 1 細胞、

( i i ) C T L、

( i i i ) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 ( A P C )、および

( i v ) C T L を誘導する能力を有する A P C

からなる群より選択される細胞の少なくとも 1 つを誘導するための組成物であって、[ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載の 1 つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物、または

20

( i ) T h 1 細胞、

( i i ) C T L、

( i i i ) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 ( A P C )、および

( i v ) C T L を誘導する能力を有する A P C

からなる群より選択される少なくとも 1 種類の細胞を誘導するための組成物であって、[ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載の 1 つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

[ 8 ]

( a ) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド ;

( b ) [ 6 ] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド ;

30

( c ) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ;

( d ) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞 ; および

( e ) 上記 ( a ) から ( d ) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

からなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有し、ならびに

( i ) がんの治療、

( i i ) がんの予防、

( i i i ) がんににおける術後再発の予防、および

( i v ) 上記 ( i ) から ( i i i ) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

40

からなる群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

[ 9 ] M H C クラス I I 分子として H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 からなる群より選択される少なくとも 1 つを有する対象への投与のために製剤化されている [ 8 ] に記載の医薬組成物、または H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 からなる群より選択される少なくとも 1 つの M H C クラス I I 分子を有する対象への投与のために製剤化されている [ 8 ] に記載の医薬組成物。

[ 1 0 ] 前記組成物が、C T L 誘導能を有する 1 つまたは複数のペプチドをさらに含有する、[ 8 ] または [ 9 ] に記載の医薬組成物。

[ 1 1 ] M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物で

50

あって、

(a) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) [ 6 ] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ；

(d) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 上記 ( a ) から ( d ) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する、組成物。

[ 1 2 ] T h 1 細胞を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、 A P C を [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階を含む方法。

10

[ 1 3 ] C T L を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、

(a) A P C を [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階；および

(b) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階

からなる群より選択される段階を含む方法。

[ 1 4 ] T h 1 細胞を誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞を、 M H C クラス I I 分子と [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する A P C と共培養する段階；および

20

(b) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで T C R が、細胞表面に提示される M H C クラス I I 分子と [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階

からなる群より選択される段階を含む方法、または T h 1 細胞を誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞を、 M H C クラス I I 分子と [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する A P C と共培養する段階；および

30

(b) 両方の T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットをコードする単一ポリヌクレオチド、または各々別々の T C R サブユニットをコードする複数のポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで T C R が、 A P C の細胞表面に提示される M H C クラス I I 分子と [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階

からなる群より選択される段階を含む方法。

[ 1 5 ] C T L を誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞および C D 8 陽性 T 細胞の両方を、 [ 4 ] または [ 5 ] に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階；ならびに

40

(b) C D 8 陽性 T 細胞を、 [ 4 ] または [ 5 ] に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階

からなる群より選択される段階を含む方法。

[ 1 6 ] M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、

(a) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) [ 6 ] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [ 1 ] から [ 5 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ；

50



(d) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法。

[17] M H C クラス I I 分子と [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離された A P C。

[18] [12] または [13] に記載の方法によって誘導される A P C。

[19] A P C の表面に提示された [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離された T h 1 細胞。

[20] [14] に記載の方法によって誘導される T h 1 細胞。

[21] がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、

(a) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) [6] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C；

(d) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する組成物を対象に投与する段階を含む方法。

[22] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

[23] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

[24] [23] に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

[25] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチド、[6] に記載のポリヌクレオチドまたは [22] に記載の抗体を含む、診断キット。

【0017】

上記に加えて、本発明の他の目的および特徴は、以下の詳細な説明を付属の図面および実施例と併せて読めばより十分に明らかになる。しかしながら、本発明の前記概要および以下の詳細な説明はどちらも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、ここでいくつかの特定の態様を参照して本発明を説明するが、説明は本発明を例証するものであり、本発明の限定とは解釈されないことが認識される。様々な変更および適用が、付属の特許請求の範囲に記載されている本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者に想起され得る。同様に、本発明の他の目的、特徴、利益および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかであり、また当業者には容易に明白である。そのような目的、特徴、利益および利点は、単独でまたは本明細書に組み込まれる参考文献を考慮して、付属の実施例、データ、図面およびそれらから引き出されるすべての妥当な推論と併せて上記から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

本発明の様々な局面および適用は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明とその好ましい態様を考慮した上で当業者に明らかになるであろう。

【0019】

【図1】図1は、近年開発されたコンピュータアルゴリズムによって予測された、C T L エピトープを含む I M P - 3 由来のプロミスキャスな H L A クラス I I 結合ペプチドを示す。パート A では、ヒト I M P - 3 タンパク質のアミノ酸配列を、アルゴリズム ( I E D

10

20

30

40

50

B解析リソース、コンセンサス法、: tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\_II\_binding.html)を用いて解析した。横軸の数字は、IMP-3由来の15merペプチドのN末端のアミノ酸位置を示す。より高いコンセンサスパークセンタイル順位は、HLAクラスII分子へのより強い結合親和性を示す。パートBでは、複数のHLAクラスIIアリル産物(DRB1\*09:01、DRB1\*04:05およびDRB1\*15:02)について高いコンセンサスパークセンタイル順位を有し、かつHLA-A24(IMP-3-A24<sub>508-516</sub>)または-A2(IMP-3-A2<sub>515-523</sub>)拘束性CTLによって認識される9merペプチドを有する、オーバーラップする22merおよび21mer LPであるIMP-3<sub>402-423</sub>-LPおよびIMP-3<sub>507-527</sub>-LPを合成した(A、黒い棒)。

10

【図2A-B】図2は、健常ドナーからのIMP-3特異的Th細胞の誘導を示す。パートAでは、IMP-3特異的Th細胞をIMP-3<sub>402-423</sub>-LPで刺激することによって、DR53<sup>+</sup>健常ドナー(HD1)から生成した。生成されたTh細胞を、自己PBMCまたはIMP-3<sub>402-423</sub>-LPでパルスしたL細胞で再度刺激した。IFN- $\gamma$ 産生Th細胞の数はELISPOTアッセイによって解析された。HD1から得られた同様の結果を示した少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーHD1のHLAクラスII遺伝子型をパネル上部に示す。下線のHLA-クラスIIアリルは、ペプチドをTh細胞に提示したHLA-クラスII分子をコードする。パートBでは、IMP-3特異的Th細胞を、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPで刺激することによって、DR53陰性、DR8陽性健常ドナー(HD2)から生成した。

20

【図2C-E】パートCでは、HLA-DR拘束性IMP-3<sub>402-423</sub>-LP特異的Th細胞を、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPで刺激することによって、健常ドナー(HD3)から生成した。パートDでは、HLA-DR拘束性IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的Th細胞を、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPで刺激することによって、健常ドナー(HD3)から生成した。パートEでは、HLA-DR9拘束性IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的Th細胞を、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPで刺激することによって、健常ドナー(HD4)から生成した。

【図3】図3は、DCによるIMP-3-LPの天然プロセッシングおよび提示を示す。パートAでは、ドナーHD4から樹立したHLA-DR9拘束性IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的Thクローンが、組換えIMP-3タンパク質をロードした自己DCを認識した。同様の結果を示した少なくとも2つの独立した実験からの代表的なデータを示す。パートBでは、ドナーHD1から樹立したHLA-DR53拘束性およびIMP-3<sub>402-423</sub>-LP特異的Thクローンが、組換えIMP-3タンパク質をロードした自己DCを認識した。

30

【図4A】図4は、IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的バルクTh細胞によって産生されたサイトカインプロファイルを示す。パートAでは、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPの存在下において、自己PBMCと共培養したT細胞の24時間のインキュベーション後、培養上清を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、GM-CSF、IL-4およびIL-17)の濃度を測定した。データは3回のアッセイの平均 $\pm$ SDとして提示している。

40

【図4B】パートBは、抗原刺激後にバルクIMP-3特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出である。細胞をIMP-3<sub>507-527</sub>-LP、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPまたは無関係なペプチドで再刺激した。示されている事象はCD4<sup>+</sup>T細胞にゲートをかけている。プロットの内部の数字は、象限の特徴を有する細胞集団(CD4<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>T細胞)のパーセンテージを示す。

【図5】図5は、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPがインビトロおよびインビボでCTLの効率的なクロスプライミングを誘導することを示す。パートAでは、健常ドナーのPBMCから単離したCD8<sup>+</sup>T細胞を、週1回の間隔で、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPパルスした自己DCで刺激した。少なくとも3回の刺激後、IFN- $\gamma$ 産生CD8<sup>+</sup>T細胞

50

胞の数を、インビトロでのIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイによって解析した。パートBでは、HLA-A2 Tgmを、IFA中に乳化したIMP-3507-527-LPを用いて免疫した。IMP-3507-527-LPでの2回目のワクチン接種後、鼠径リンパ節中のマウスCD8<sup>+</sup>T細胞を、IMP-3-A2515-523SPまたはHIV-A2SPでパルスしたBM-DCで刺激した。IFN- $\gamma$  産生マウスCD8<sup>+</sup>T細胞の数をエクスピボELISPOTによって解析した。同様の結果を示した少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

態様の説明

10

本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似または等価の任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をここに記述する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本発明が本明細書で述べる特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコル等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。また、本記載で用いる用語は、特定のバージョンまたは態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図されず、本発明の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

【0021】

本明細書で言及する各々の公報、特許または特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。しかしながら、本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によるそのような開示に先行する権利がないことの承認と解釈されるべきではない。

20

【0022】

#### I. 定義

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。しかしながら、矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。

【0023】

本明細書で使用する「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という語は、特に明確に示されない限り「少なくとも1つの」を意味する。

30

【0024】

ある物質（例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等）に関して使用する「単離された」および「精製された」という用語は、その物質が、さもなければ天然源中に含まれる少なくとも1つの物質を実質的に含まないことを指示する。したがって、単離されたまたは精製されたペプチドは、そのペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの糖質、脂質もしくは他の混入タンパク質などの細胞材料を実質的に含まない、または化学合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。

【0025】

「細胞物質を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、そのペプチドが単離されたまたは組換え生産された細胞の細胞成分から切り離されている、ペプチドの調製物を包含する。したがって、細胞物質を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%または5%（乾燥重量）未満の異種タンパク質（本明細書では「混入タンパク質」とも称する）を有するポリペプチドの調製物を包含する。ペプチドが組換え生産される場合は、ペプチドは、好ましくは培地も実質的に含まず、ペプチド調製物の容積の約20%、10%または5%未満の培地を含むペプチドの調製物を包含する。ペプチドが化学合成によって生産される場合は、ペプチドは、好ましくは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、そのペプチドの合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容積の約30%、20%、10%または5%（乾燥重量）未満含むペプチドの調製物を包含する。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドを含むことは、

40

50

例えばタンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の単一バンドの出現およびゲルのクマシーブリアントブルー染色等によって示され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは単離または精製されている。

#### 【 0 0 2 6 】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書ではアミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。本用語は、天然のアミノ酸ポリマーに加えて、1つもしくは複数のアミノ酸残基が改変された残基であるアミノ酸ポリマー、または対応する天然のアミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基にも適用される。

10

#### 【 0 0 2 7 】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびに細胞内で翻訳後に修飾されたもの（例えばヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基およびR基に結合した炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチルメチオニンスルホニウム）を有する化合物を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様に機能する化合物を指す。

20

#### 【 0 0 2 8 】

アミノ酸は、本明細書ではIUPAC - IUB生化学命名法委員会によって推奨される、一般に公知の3文字表記、または1文字表記によって言及され得る。

#### 【 0 0 2 9 】

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、一般に受け入れられている1文字コードによって言及される。

「剤」および「組成物」という用語は、本明細書では、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組合せから直接または間接的に生じる任意の生成物を指すために互換的に使用される。医薬組成物に関するそのような用語は、有効成分、および担体を構成する不活性成分を含む生成物、ならびに成分の任意の2つもしくはそれ以上の組合せ、錯体形成もしくは凝集から、または成分の1つもしくは複数の解離から、または成分の1つもしくは複数の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図されている。したがって、本発明の医薬組成物は、本発明の化合物と医薬的または生理学的に許容される担体とを混合することによって作製される任意の組成物を包含する。

30

#### 【 0 0 3 0 】

「有効成分」という用語は、本明細書では生物学的または生理学的に活性な組成物中の物質を指す。特に、医薬組成物に関連して、「有効成分」という用語は、目的の薬理学効果を示す成分物質を指す。例えば、がんの治療または予防における使用のための医薬組成物の場合、組成物中の有効成分は、直接または間接的にがん細胞および/または組織に対する少なくとも1つの生物学的または生理学的作用をもたらす得る。好ましくは、そのような作用は、がん細胞増殖を低減するまたは阻害すること、がん細胞および/または組織を損傷するまたは死滅させること等を含み得る。典型的には、有効成分の間接的な作用は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答の誘導である。製剤化される前は、「有効成分」は「バルク」、「原薬」または「原体」とも称され得る。本明細書で使用する「医薬的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料を含むがこれらに限定されない、医薬的または生理学的に許容される材料、組成物、物質またはビヒクルを意味する。

40

#### 【 0 0 3 1 】

50

特に定義されない限り、「がん」という用語は、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、小細胞肺がん（SCLC）、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCを含む、IMP-3遺伝子を過剰発現するがんを指す。IMP-3遺伝子を発現するがんはまた、IMP-3を発現するがんまたは、IMP-3をコードする遺伝子を発現するがんとも称される。

#### 【0032】

特に定義されない限り、「Tリンパ球」および「T細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

#### 【0033】

特に定義されない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」および「CTL」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に指示されない限り、非自己細胞（例えば腫瘍細胞、ウイルス感染細胞）を認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球のサブグループを指す。CTLは、CD8<sup>+</sup>Tリンパ球と区別され、MHCクラスI分子によって提示されるペプチドを認識することができる。

#### 【0034】

特に定義されない限り、「HLA-A24」という用語は、サブタイプを含むHLA-A24型を指し、その例には、HLA-A\*2401、HLA-A\*2402、HLA-A\*2403、HLA-A\*2404、HLA-A\*2407、HLA-A\*2408、HLA-A\*2420、HLA-A\*2425およびHLA-A\*2488が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0035】

特に定義されない限り、本明細書で使用する「HLA-A2」という用語は、典型的にはサブタイプを指し、その例には、HLA-A\*0201、HLA-A\*0202、HLA-A\*0203、HLA-A\*0204、HLA-A\*0205、HLA-A\*0206、HLA-A\*0207、HLA-A\*0210、HLA-A\*0211、HLA-A\*0213、HLA-A\*0216、HLA-A\*0218、HLA-A\*0219、HLA-A\*0228およびHLA-A\*0250が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0036】

特に定義されない限り、「Tヘルパー1型細胞」および「Th1細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドを認識することができ、細胞性免疫に関連するCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のサブグループを指す。特に定義されない限り、「Th細胞」、「CD4<sup>+</sup>T細胞」および「CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞」という用語も本明細書では互換的に使用される。Th1細胞は、細胞性免疫に関する他の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ）の活性化および/または刺激を助けるために様々なサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF、TNF- $\beta$ 等）を分泌する。

#### 【0037】

特に定義されない限り、「HLA-DR9」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA-DRB1\*09:01、HLA-DRB1\*09:02、HLA-DRB1\*09:03、HLA-DRB1\*09:04、HLA-DRB1\*09:05、HLA-DRB1\*09:06、HLA-DRB1\*09:07、HLA-DRB1\*09:08およびHLA-DRB1\*09:09が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「HLA-DR14」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA-DRB1\*14:01、HLA-DRB1\*14:02、HLA-DRB1\*14:03、HLA-DRB1\*14:04、HLA-DRB1\*14:05、HLA-DRB1\*14:06、HLA-DRB1\*14:07、HLA-DRB1\*14:08およびHLA-DRB1\*14:10が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0038】

特に定義されない限り、「HLA-DR53」という用語はサブタイプを指し、その例

10

20

30

40

50

には、HLA - DRB 4 \* 0 1 : 0 1 および HLA - DRB 4 \* 0 1 : 0 3 が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「HLA - DR 8」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 1、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 2、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 3、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 4、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 5、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 6、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 0 7、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 1 0、HLA - DRB 1 \* 0 8 : 1 1 および HLA - DRB 1 \* 0 8 : 1 2 が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 3 9 】

特に定義されない限り、「MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答」という語句は、MHCクラスII分子によるペプチドの提示によって誘導される免疫応答を指す。本明細書では、「MHCクラスII抗原によって媒介される免疫応答」は、CD 4 \* T細胞、特にTh 1細胞によって誘導される免疫応答を含む。そのような免疫応答の例には、サイトカイン（例えばIFN - 、IL - 2、TNF - 、GM - CSF、TNF - 等）の産生ならびに他の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ等）の活性化および/または刺激が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 4 0 】

特に定義されない限り、「IMP - 3に特異的なTh 1細胞」という語句は、IMP - 3に由来するペプチドを提示する抗原提示細胞によって特異的に活性化されるが、他の抗原提示細胞では活性化されないTh 1細胞を指す。

#### 【 0 0 4 1 】

特に定義されない限り、「IMP - 3特異的CTL」という語句は、IMP - 3を発現する標的細胞に対して特異的に細胞傷害性を示すCTLを指す。

特に定義されない限り、ペプチドに関連して使用される場合、「CTL誘導能」という語句は、抗原提示細胞上に提示された場合にCTLを誘導するペプチドの能力を指す。

特に定義されない限り、本明細書で使用する「キット」という用語は、試薬と他の材料の組合せに関して用いられる。キットは、マイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが本明細書で企図される。「キット」という用語は、試薬および/または材料の特定の組合せに限定されることを意図しない。

#### 【 0 0 4 2 】

本発明に関連して、「抗体」という用語は、指定されるタンパク質またはそのペプチドに特異的に反応性のある免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体は、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射性標識に融合した抗体、および抗体断片を含み得る。さらに、本明細書における抗体はその最も広い意味で使用され、特にインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えばIg A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg M）を指す。

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

#### 【 0 0 4 3 】

##### II . ペプチド

以下で詳細に説明する本発明のペプチドは、「IMP - 3ペプチド」または「IMP - 3ポリペプチド」と称され得る。

IMP - 3に由来するペプチドがTヘルパー1型（Th 1）細胞によって認識される抗原として機能することを明らかにするため、IMP - 3に由来するペプチド（配列番号：6）を、これらがMHCクラスII分子によってプロミスキヤスに拘束される抗原エピートプであるかどうかを判定するために分析した。IMP - 3に由来するプロミスキヤスなMHCクラスII結合ペプチドの候補を、HLA - DR 8、HLA - DR 5 3、HLA - DR 1 4 および HLA - DR 9 への結合親和性に基づいて同定した。これらのペプチドを

10

20

30

40

50

ロードした樹状細胞 (DC) による CD4<sup>+</sup> T 細胞のインビトロ刺激後、以下のペプチドの各々を用いて Th1 細胞を成功裏に樹立した：

IMP - 3<sub>402-423</sub> - LP / QSE TETVHLFIPALSVGAIIIGK (配列番号：1)、および

IMP - 3<sub>507-527</sub> - LP / GKTVNELQNLSSAEVVVPRDQ (配列番号：2)。

#### 【0044】

上述したこれらの樹立された Th1 細胞は、それぞれのペプチドでパルスした抗原提示細胞の刺激に応答して強力な特異的 Th1 細胞活性を示した。さらに、前記ペプチドは、日本人において高頻度に認められるいくつかの HLA - DR および HLA - DP 分子 (例えば HLA - DR8、HLA - DR53、HLA - DR14 および HLA - DR9) によって拘束される Th1 細胞を刺激することができた。本明細書におけるこれらの結果は、IMP - 3 が Th1 細胞によって認識される抗原であること、およびペプチドが、いくつかの HLA クラス II 分子 (例えば HLA - DR8、HLA - DR53、HLA - DR14 および HLA - DR9) によってプロミスキュスに拘束される IMP - 3 のエピトープペプチドであることを明らかにする。

#### 【0045】

上記で同定したペプチドは、IMP - 3 に特異的な CTL を誘導する能力を有する CTL エピトープのアミノ酸配列を付加的に含み、本明細書で明らかにするように、そのようなペプチドは、Th1 細胞に加えて IMP - 3 に特異的な CTL も誘導することができる。したがって、これらのペプチドは、IMP - 3 を発現するがんに対する免疫応答の誘導のための適切なペプチドであり得る。IMP - 3 遺伝子は、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺癌 (NSCLC)、小細胞肺癌 (SCLC)、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍および HNC を含む大部分のがん組織で過剰発現されるので、免疫療法のための良好な標的である。

#### 【0046】

したがって、本発明は、IMP - 3 に特異的な Th1 細胞を誘導する能力を有するペプチドを提供する。本発明のペプチドは、少なくとも 1 つの MHC クラス II 分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。あるいは、本発明のペプチドの断片は、少なくとも 1 つの MHC クラス II 分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。ペプチドのこれらの断片は、抗原提示細胞内でのプロセッシングによって生成され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドまたはその断片は、2 またはそれ以上の種類の MHC クラス II 分子 (例えば HLA - DR53、HLA - DR8、HLA - DR14 および HLA - DR9) に結合する能力を有する。言い換えると、本発明のペプチドは、2 またはそれ以上の種類の MHC クラス II 分子によって拘束される Th1 細胞を誘導する能力を有し得る。別の態様では、本発明のペプチドは、IMP - 3 特異的 CTL 誘導能力を有するペプチドのアミノ酸配列を含む。IMP - 3 特異的 CTL 誘導能力を有するそのようなペプチドの典型的な例には、配列番号：3 または 4 のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

#### 【0047】

MHC クラス II 分子における結合溝は両端で開いているので、MHC クラス II 結合ペプチドはその長さに柔軟性を有し得る。MHC クラス II 分子についてのコア結合モチーフは 9 個のアミノ酸残基から成り、MHC クラス II 結合ペプチドは一般に、コア結合モチーフと隣接する他のアミノ酸残基を有する。隣接アミノ酸残基の数は限定されない。したがって、配列番号：1 または 2 のすべてのアミノ酸残基が MHC クラス II 分子に結合するために必ずしも必要ではない。したがって、本発明のペプチドは、Th1 細胞を誘導する能力を有するペプチドであり得、そのようなペプチドは以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：

(a) 配列番号：1 または 2 のアミノ酸配列からの 9 個より多い連続するアミノ酸を

10

20

30

40

50

有するアミノ酸配列；および

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列。

MHCクラスII結合ペプチドの長さは一般に10～30アミノ酸である。配列番号：1および2のアミノ酸配列はIMP-3のアミノ酸配列(配列番号：6)の一部からなるので、本発明のペプチドは以下の[1]～[5]に記載のペプチドであり得る：

[1] 10～30アミノ酸長を有し、配列番号：6のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列から選択される9を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチド；

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド；

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14およびHLA-DR9からなる群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド；

[4] 前記ペプチドが、IMP-3特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1]から[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド；ならびに

[5]

(a) 配列番号：1および2からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の単離されたペプチド。

【0048】

本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞はIMP-3に特異的である。それゆえ、いくつかの態様において、本発明は、配列番号：6のアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなる30アミノ酸残基未満のペプチドであって、配列番号：1または2のアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

【0049】

一般に、インターネット上で現在利用可能なソフトウェアプログラム、例えばWang P et al. 2008. PLoS Comput Biol. 4(4): e1000048. 11: 568; およびWang P et al. 2010. BMC Bioinformatics. に記載されているソフトウェアプログラムを使用して、様々なペプチドとHLA抗原との間の結合親和性をインシリコで算出することができる。HLA抗原との結合親和性は、例えばNielsen M and Lund O. 2009. BMC Bioinformatics. 10: 296.; Nielsen M et al. 2007. BMC Bioinformatics. 8: 238. Bui HH, et al. 2005. Immunogenetics. 57: 304-314. Sturmiolo T et al. 1999. Nat Biotechnol. 17(6): 555-561 およびNielsen M et al. 2008. PLoS Comput Biol. 4(7) e1000107に記載されているように測定することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムを用いて同定されたHLA抗原と結合すると決定されたIMP-3のペプチドを包含する。

【0050】

上述したように、MHCクラスII結合ペプチドはその長さに柔軟性があるので、配列番号：1または2のアミノ酸配列は、生じるペプチドが必要なTh1細胞誘導能を保持す

10

20

30

40

50



る限り、場合により付加的なアミノ酸残基と隣接していてもよい。Th1細胞誘導能を有するそのようなペプチドは、典型的には約30アミノ酸未満、しばしば約29アミノ酸未満、通常は約28または27アミノ酸未満である。配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列に隣接する特定のアミノ酸配列は、そのような隣接アミノ酸配列がもとのペプチドのTh1細胞誘導能を損なわない限り、限定されず、任意の種類のアミノ酸で構成され得る。典型的な態様では、そのような隣接アミノ酸配列は、配列番号：1または2のアミノ酸配列に隣接する配列番号：6のアミノ酸配列の中から選択され得る；しかし、本発明はそれに限定されない。そこで、本発明はまた、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

#### 【0051】

他方で、MHCクラスII分子についてのコア結合モチーフは9個のアミノ酸残基からなるので、配列番号：1または2のアミノ酸配列の全長がMHCクラスII分子に結合するためおよびTh1細胞の誘導のために必ずしも必要ではない。したがって、本発明のペプチドは、必要なTh1細胞誘導能を保持することを条件として、配列番号：1または2のアミノ酸配列から9個より多い連続するアミノ酸を有するペプチドの形態をとることができる。Th1細胞誘導能を有するペプチドは、典型的には約10より多いアミノ酸、しばしば11または12より多いアミノ酸、通常は13または14より多いアミノ酸である。したがって、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能を有し、かつ配列番号：1または2のアミノ酸配列からの9、10、11、12、13または14個より多い連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、ペプチドであり得る。

#### 【0052】

タンパク質中の1、2またはそれ以上のアミノ酸の改変はタンパク質の機能に影響を及ぼさず、一部の場合にはもとのタンパク質の所望の機能を増強することさえあることは一般に公知である。実際に、改変されたペプチド（すなわちもとの参照配列と比較して1、2または数個のアミノ酸残基が改変されている（すなわち置換、付加、欠失または挿入されている）アミノ酸配列からなるペプチド）が、もとのペプチドの生物学的活性を保持することは知られている（Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadié-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13）。したがって、1つの態様では、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列の両方を有し得、1、2またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、挿入、欠失および/または置換されている。あるいは、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1または2のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が付加、挿入、欠失および/または置換されているアミノ酸配列の両方を有し得る。

#### 【0053】

当業者は、単一アミノ酸または小さな割合のアミノ酸を改変するアミノ酸配列への個々の付加または置換は、もとのアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識する。そこで、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、タンパク質の改変は、もとのタンパク質と類似の機能を有する改変されたタンパク質を生じさせる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野において周知である。アミノ酸側鎖の特性の例は、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、および以下の共通する官能基または特徴を有する側鎖：脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；ヒドロキシル基含有側鎖（S、T、Y）；硫黄原子含有側鎖（C、M）；カルボン酸およびアミド含有側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；ならびに芳香族含有側鎖（H、F、Y、W）である。加えて、以下の8群は各々相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：

- 1) アラニン（A）、グリシン（G）；

2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ;  
3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ;  
4) アルギニン (R)、リシン (K) ;  
5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ;  
6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) ;  
7) セリン (S)、トレオニン (T) ; および  
8) シス테인 (C)、メチオニン (M) (例えば Creighton, Proteins 1984 参照)。

【0054】

そのような保存的に改変されたペプチドも本発明のペプチドとみなされる。しかし、本発明のペプチドはそれらに限定されず、改変されたペプチドがもとのペプチドの Th1 細胞誘導能を保持する限り、非保存的改変も含み得る。さらに、改変されたペプチドは、IMP-3 の多型変異体、種間相同体およびアレルの Th1 細胞誘導性ペプチドを除外すべきではない。

【0055】

必要な Th1 細胞誘導能を保持するために、少数の (例えば 1、2 もしくは数個) または低い割合のアミノ酸を改変する (挿入、付加、欠失および/または置換する) ことができる。本明細書では、「数個」という用語は、5 またはそれ以下のアミノ酸、例えば 4 または 3 またはそれ以下のアミノ酸を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは 20 % もしくはそれ以下、より好ましくは 15 % もしくはそれ以下、さらに一層好ましくは 10 % もしくは 8 % もしくはそれ以下、または 1 ~ 5 % である。

【0056】

本発明の好ましいペプチド、すなわち配列番号: 1 および 2 (IMP-3<sub>402-423</sub>-LP、IMP-3<sub>507-527</sub>-LP) のホモロジー解析は、これらのペプチドが他の公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドと有意の相同性を有さないことを確認する。したがって、免疫療法に使用した場合、これらのペプチドが未知のまたは望ましくない免疫応答を生じる可能性は有意に低い。したがって、これらのペプチドは、がん患者において IMP-3 に対する免疫を誘発するために極めて有用であると期待される。

【0057】

免疫療法に関連して使用する場合、本発明のペプチドまたはその断片は、抗原提示細胞の表面に、好ましくは HLA クラス II 抗原との複合体として、提示されなければならない。それゆえ、Th1 細胞を誘導するだけでなく、HLA クラス II 抗原に高い結合親和性も有するペプチドを選択することが好ましい。そのために、ペプチドをアミノ酸残基の置換、挿入、欠失および/または付加によって改変し、改善された結合親和性を有する改変されたペプチドを生成することができる。

【0058】

本発明はまた、上述したペプチドの N 末端および/または C 末端への 1 ~ 2 個のアミノ酸の付加を企図する。高い HLA 抗原結合親和性を有し、Th1 細胞誘導能を保持するそのような改変ペプチドも本発明に含まれる。

例えば、本発明は、HLA クラス II 抗原に結合し、Th1 細胞誘導能を有し、配列番号: 1 および 2 からなる群より選択されるアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列を含む、31、30、29、28、27 または 26 未満のアミノ酸長の単離されたペプチドを提供する。

これらのペプチドはまた、APC と接触するかまたは APC に導入された場合、APC 中でプロセッシングされて、プロセッシングされた断片をその上に提示し得る。例えば、本発明のペプチドは、APC の表面に提示される通常 11 ~ 26 (典型的には 15 ~ 25) アミノ酸残基からなる断片にプロセッシングされ得る。

【0059】

しかしながら、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫疾患および/または特定の物質に対する

10

20

30

40

50

アレルギー症状などの負の副作用を誘導し得る。それゆえ、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列とマッチする状況を回避するために、利用可能なデータベースを用いて最初にホモロジー検索を実施することが望ましいと考えられる。目的のペプチドと比較して同一のペプチドまたは1もしくは2個のアミノ酸相違を有するペプチドが自然界に存在しないことがホモロジー検索から明らかになった場合は、そのような副作用の危険性を伴わずにHLA抗原とのその結合親和性を高めるためならびに/またはそのTh1細胞および/もしくはCTL誘導能を高めるために目的のペプチドを改変することができる。

#### 【0060】

上述したHLAクラスII抗原に高い結合親和性を有するペプチドは極めて有効であると期待されるが、指標として高い結合親和性の存在に従って選択した候補ペプチドを、Th1細胞誘導能の存在に関してさらに検討する。本明細書では、「Th1細胞誘導能」という語句は、APCと接触した場合、Th1細胞を誘導する能力をAPCに付与するペプチドの能力を示す。さらに、「Th1細胞誘導能」は、Th1細胞の活性化および/またはTh1細胞の増殖を誘導する、IFN- $\gamma$ 産生を含むTh1細胞媒介性サイトカイン産生を促進して他の細胞（例えばCTL、マクロファージ）を助けるおよび/または刺激する、ペプチドの能力を含む。

#### 【0061】

Th1細胞誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を担持する抗原提示細胞（例えばBリンパ球、マクロファージおよび樹状細胞（DC））、またはより詳細にはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、ペプチドで刺激した後、CD4陽性T細胞（CD4<sup>+</sup>T細胞）と混合して、次にCD4<sup>+</sup>T細胞によって産生され、放出されたIFN- $\gamma$ を測定することによって達成できる。あるいは、ペプチドのTh1細胞誘導能は、Th1細胞によるCTL活性化に基づいて評価することができる。例えば、CD4<sup>+</sup>T細胞を試験ペプチドで刺激したDCと共培養し、次にCTLおよびCTLの標的細胞と混合する。標的細胞は、<sup>51</sup>Crなどで放射性標識することができ、Th1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化されたCTLの細胞傷害活性を、標的細胞から放出された放射能から算出することができる。あるいは、Th1細胞誘導能は、試験ペプチドで刺激した抗原提示細胞（APC）の存在下でTh1細胞によって産生され、放出されたIFN- $\gamma$ を測定し、抗IFN- $\gamma$ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻害領域を可視化することによって評価できる。

#### 【0062】

上述した改変に加えて、本発明のペプチドはまた、生じる結合ペプチドがもとのペプチドのTh1細胞誘導能を保持する限り、他の物質に結合することもできる。適切な物質の例には、例えばペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成ポリマー等が含まれる。本発明のペプチドは、修飾がもとのペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化等のような修飾を含み得る。これらの種類の修飾は、付加的な機能（例えば標的化機能および送達機能）を付与するまたはペプチドを安定化するために実施できる。

#### 【0063】

例えば、ペプチドのインビボでの安定性を高めるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体または非天然アミノ酸を導入することは当技術分野において公知である；この概念は本発明のペプチドにも適合させ得る。ペプチドの安定性は多くの方法で評価することができる。例えば、ペプチダーゼならびにヒト血漿および血清などの様々な生物学的媒質を用いて安定性を試験することができる（例えばVerhoeft et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302参照）。

#### 【0064】

本発明のペプチドは、HLAクラスII抗原と組み合わせた複合体としてAPCの表面に提示され、その後Th1細胞を誘導し得る。それゆえ、APCの表面でHLAクラスII抗原と複合体を形成するペプチドも本発明に含まれる。本発明のペプチドを提示するA

10

20

30

40

50

P Cをワクチンとして接種することができる。

【0065】

上記複合体に含まれるHLA抗原の型は、治療および/または予防を必要とする対象の型とマッチしなければならない。例えば、日本人においては、HLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14およびHLA-DR9が一般的であり、それゆえ日本人患者の治療に適する。典型的には、臨床において、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を前もって検査し、これにより特定のHLAクラスII抗原への結合能力を有するペプチドの適切な選択が可能になる。好ましい態様では、本発明のペプチドはTh1細胞をプロミスキヤスに誘導することができる。本明細書では、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって拘束されるTh1細胞を誘導することができる場合、このペプチドのTh1細胞誘導能は「プロミスキヤス」である。言い換えると、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される場合、そのような抗原認識は「プロミスキヤス」とみなされる。ペプチドに関連して使用する場合、「少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される」という語句は、ペプチドまたはその断片が少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子に結合できることを示す。例えば、IMP-3<sub>402-423</sub>-LP（配列番号：1）は、HLA-DR8、HLA-DR14およびHLA-DR53によって認識され、かつIMP-3<sub>507-527</sub>-LP（配列番号：2）は、HLA-DR9およびHLA-DR14によって認識される。それゆえ、これらのペプチドは「プロミスキヤス」なエピトープの典型的な例である。

10

20

【0066】

HLA-DR8、HLA-DR14またはHLA-DR53陽性APCを使用する場合は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましく使用される。HLA-DR9またはHLA-DR14陽性APCを使用する場合は、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましく使用される。

したがって、好ましい態様では、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にHLA-DR8、HLA-DR14またはHLA-DR53を有すると同定された対象においてTh1細胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にHLA-DR9またはHLA-DR14を有すると同定された対象においてTh1細胞の誘導のために使用し得る。

30

【0067】

III. IMP-3ペプチドの調製

本発明のペプチドは周知の技術を用いて調製することができる。例えば、本発明のペプチドは、組換えDNA技術または化学合成を用いて、合成によって調製することができる。本発明のペプチドは、個別にまたは2もしくはそれ以上のペプチドからなるより長いポリペプチドとして合成することができる。本発明のペプチドを、次に、他の天然の宿主細胞タンパク質およびその断片、または他の何らかの化学物質を実質的に含まないようにするために、単離する、すなわち精製することができる。

【0068】

本発明のペプチドは、修飾がもとの参照ペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために使用できる、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の組み込みが含まれる。

40

【0069】

本発明のペプチドは、選択したアミノ酸配列に基づく化学合成を通して得ることができる。この合成に適合させ得る従来のペプチド合成法の例には以下が含まれる：

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

50

(iii)「ペプチド合成」(日本語)、丸善、1975；  
(iv)「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語)、丸善、1985；  
(v)「医薬品の開発」(日本語)、続第14巻(ペプチド合成)、広川書店、；  
(vi)国際公開第99/67288号；および  
(vii)Barany G. & Merrifield R. B., Peptide  
s Vol. 2, 'Solid Phase Peptide Synthesis',  
Academic Press, New York, 1980, 100-118。

#### 【0070】

あるいは、本発明のペプチドは、ペプチドを作製するための任意の公知の遺伝子工学的  
方法を適合させて得ることができる(例えばMorrison J, J Bacteri  
ology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Cu  
rtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al  
) 1983, 101:347-62)。例えば、最初に、発現可能な形態で(例えばプロ  
モーター配列に対応する調節配列の下流に)目的のペプチドをコードするポリヌクレオチ  
ドを保有する適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に形質転換する。次に宿主細胞を  
培養して関心対象のペプチドを生産させる。本発明のペプチドはまた、インビトロ翻訳系  
を採用してインビトロで作製することもできる。

#### 【0071】

##### IV. ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明の前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供  
する。これらには、天然のIMP-3遺伝子(GenBankアクセッション番号NM\_\_  
006547.2(配列番号:5))に由来するポリヌクレオチド、ならびにその保存的  
に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書では、「  
保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一または本質的に同一のアミノ  
酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重に起因して、数多くの機能的に同一の核  
酸が所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCU  
はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって特  
定されるあらゆる位置で、コドンを、コードされるポリペプチドを変化させることなく前  
述した対応するコドンのいずれかに変化させることができる。そのような核酸変異は、保  
存的に改変された変異の一種である、「サイレント変異」である。ペプチドをコードする  
本明細書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレント変異も表す。当業者は  
、核酸中の各々のコドン(通常メチオニンの唯一のコドンであるAUG、および通常トリ  
プトファンの唯一のコドンであるTGGを除く)を、機能的に同一の分子を生じるように  
改変できることを認識する。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異  
は、各々の開示される配列において暗黙のうちに表現される。

#### 【0072】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNAおよびそれらの誘導体で構成され得る。  
当技術分野において周知のように、DNAはA、T、CおよびGなどの塩基で適切に構成  
され、Tは、RNAではUに置き換えられる。当業者は、非天然の塩基もポリヌクレオチ  
ドに含まれ得ることを認識する。

#### 【0073】

本発明のポリヌクレオチドは、その間に介在アミノ酸配列を含んでまたは含まずに、本  
発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在アミノ酸配列は、ポリヌクレオチド  
または翻訳されたペプチドの切断部位(例えば酵素認識配列)を提供することができる。  
さらに、ポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードするコード配列に加えて任意の  
付加的な配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配  
列を含む組換えポリヌクレオチドであり得るか、またはマーカー遺伝子などを含む発現ベ  
クター(プラスミド)であり得る。一般に、そのような組換えポリヌクレオチドは、例え  
ばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを使用する従来の組換え技術を通したポリヌク  
レオチドの操作によって調製することができる。

## 【0074】

組換えおよび化学合成の両方の技術が、本発明のポリヌクレオチドを作製するために使用できる。例えば、ポリヌクレオチドは適切なベクターへの挿入によって作製でき、これをコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現させ得る。あるいは、PCR技術または適切な宿主における発現を用いてポリヌクレオチドを増幅することができる（例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989 参照）。あるいは、ポリヌクレオチドは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5 に記載されているように、固相技術を用いて合成することができる。

10

## 【0075】

V. 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞 (APC) も提供する。本発明のペプチドと接触させることによって得られる APC は、治療および/または予防の対象である患者に由来することができ、それだけでまたは本発明のペプチド、Th1細胞またはCTLを含む他の薬剤と組み合わせてワクチンとして投与することができる。

## 【0076】

APC は特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるためにタンパク質性抗原をその細胞表面に提示することが知られている、樹状細胞 (DC)、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞および活性化T細胞を含む。DCはAPCの中で最も強力なTh1細胞誘導活性を有する代表的なAPCであるので、DCは本発明のAPCとして有用である。

20

## 【0077】

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、Th1 (クラスII) と同様に、MHCクラスI抗原によって媒介されるCTL応答を誘導することもできる。一般に、MHCクラスI抗原によって認識されるエピトープの長さは、MHCクラスII抗原のもの (15またはそれ以上のアミノ酸残基) より短い (例えば8~10アミノ酸残基) ことが周知である。それゆえ、本発明のペプチドのプロセッシングされた産物はCTLの誘導をもたらす。実際に、IMP-3507-527-LP (配列番号: 2) から誘導されるCTLは、CTL認識エピトープとして既に同定されている断片 (KTVNELQNL: 配列番号: 3) および断片 (NLSSEVVV: 配列番号: 4) を認識する。したがって、本発明のペプチドは、Th1を誘導するだけでなく、APC内でのプロセッシング後にCTLも誘導する。言い換えると、本発明のペプチドと接触したAPCは、本発明のペプチドをプロセッシングして、MHCクラスI抗原と共にそれらの断片を提示し、ならびにMHCクラスII抗原と共にそれらの全体を提示する。その結果として、MHCクラスII抗原と共にAPCに提示される本発明のペプチドを認識するTh1、およびペプチドのプロセッシングされた断片を介して誘導されるCTLの両方が、本発明のペプチドを使用して誘導され得る。

30

40

## 【0078】

例えば、APCは、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エキスピボまたはインビボで本発明のペプチドと接触させる (刺激する) ことによって得られる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドまたはその断片を提示するAPCが対象の体内で誘導される。本明細書では、「APCを誘導する」という語句は、APCを本発明のペプチドと接触させて (で刺激して)、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体をAPCの表面に提示させることを含む。あるいは、本発明のペプチドをAPCに導入して、本発明のペプチドまたはその断片をAPCに提示させた後、APCをワクチンとして対象に投与することができる。例えば、エキスピボ投与は、

50

- a : 第 1 の対象から A P C を回収する段階、
- b : 段階 a の A P C を本発明のペプチドと接触させる段階、および
- c : ペプチドをロードした A P C を第 2 の対象に投与する段階

を含みうる。

#### 【 0 0 7 9 】

第 1 の対象と第 2 の対象は同じ個体であってもよく、または異なる個体でもよい。あるいは、本発明によれば、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、前記方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。段階 ( b ) によって得た A P C をワクチンとして対象に投与することができる。

10

#### 【 0 0 8 0 】

本発明の 1 つの側面として、本発明の A P C は高レベルの T h 1 細胞誘導能を有する。本明細書では、「高レベルの T h 1 細胞誘導能」という語句において、高レベルとは、ペプチドと接触していない A P C、または T h 1 細胞を誘導することができないペプチドと接触した A P C による T h 1 細胞誘導能のレベルと比較したものである。本明細書では、A P C に関連して使用する場合、「T h 1 細胞誘導能」という語句は、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞と接触した場合に T h 1 細胞を誘導する A P C の能力を示す。高レベルの T h 1 細胞誘導能を有するような A P C は、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をインビトロで A P C に移入する段階を含む方法によって調製することができる。導入する遺伝子は D N A または R N A の形態であり得る。導入のための方法の例には、特に限定されることなく、この分野で従来実施されている様々な方法が含まれ、例えばリポフェクション、エレクトロポレーションおよびリン酸カルシウム法などが使用できる。より詳細には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第 2000-509281 号に記載されているように実施することができる。遺伝子を A P C に移入することにより、遺伝子は細胞内で転写、翻訳を受け、その後得られたタンパク質は M H C クラス I またはクラス II によってプロセッシングされて、提示経路を通してペプチドの提示へと進む。あるいは、本発明の A P C は、A P C を本発明のペプチドと接触させる段階を誘導する方法によって調製することができる。

20

30

#### 【 0 0 8 1 】

好ましい態様では、本発明の A P C は、H L A - D R 8、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 5 3 の群から選択される M H C クラス II 分子と本発明のペプチド ( 配列番号: 1 のアミノ酸配列を含む ) の複合体を自らの表面に提示する A P C であり得る。別の態様では、本発明の A P C は、H L A - D R 9 および H L A - D R 1 4 の M H C クラス II 分子と本発明のペプチド ( 配列番号: 2 のアミノ酸配列を含む ) の複合体を自らの表面に提示する A P C であり得る。好ましくは、H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 は、それぞれ H L A - D R B 1 \* 0 8 0 3、H L A - D R B 4 \* 0 1 0 3、H L A - D R B \* 1 4 : 0 5 および H L A - D R B 1 \* 0 9 0 1 であり得る。

40

#### 【 0 0 8 2 】

##### V I . T ヘルパー 1 型細胞 ( T h 1 細胞 )

本発明のペプチドのいずれかに対して誘導される T h 1 細胞は、インビボでがん細胞を標的とする C T L を含むエフェクター細胞のいずれかの免疫応答を強化し、したがってペプチド自体と同様の方法で、ワクチンとして役立つ。そこで、本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかによって特異的に誘導されるまたは活性化される単離された T h 1 細胞も提供する。

#### 【 0 0 8 3 】

そのような T h 1 細胞は、( 1 ) 1 つまたは複数の本発明のペプチドを対象に投与し、

50

対象から T h 1 細胞を回収すること、( 2 ) A P C および C D 4 + T 細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ(で刺激し)、その後 T h 1 細胞を単離すること、( 3 ) C D 4 + T 細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明の A P C と接触させること、または( 4 ) T 細胞受容体( T C R )サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドもしくは T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 + T 細胞に導入すること( T C R は M H C クラス I I 分子と本発明のペプチドの複合体に結合することができる)、によって得ることができる。( 3 ) の方法のためのそのような A P C は上述した方法によって調製することができる。( 4 ) の方法の詳細は、以下の「 V I I . T 細胞受容体( T C R )」の章で述べる。

#### 【 0 0 8 4 】

本発明の A P C での刺激によって誘導された T h 1 細胞は、治療および/または予防の対象である患者に由来してもよく、作用を調節するために単独でまたは本発明のペプチドを含む他の薬剤と組み合わせて投与することができる。得られた T h 1 細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞(例えば C T L、マクロファージ)を活性化するおよび/または刺激することができる。本発明の T h 1 細胞によって活性化され得るそのような免疫細胞には、がん細胞などの標的細胞に対して細胞傷害性を示す C T L が含まれる。例えば、そのような C T L の標的細胞は、内因性に I M P - 3 を発現する細胞(例えばがん細胞)、または I M P - 3 遺伝子をトランスフェクトされた細胞であり得る。好ましい態様では、本発明のペプチドは、C T L エピトープペプチドの少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むことができ、T h 1 細胞に加えて、がん細胞などの I M P - 3 発現細胞に対する C T L も誘導することができる。この場合、本発明のペプチドは、T h 1 細胞および C T L をインビボで同時にまたは連続的に誘導することができ、誘導された T h 1 細胞は、誘導された C T L を有効に活性化することができる。したがって、C T L エピトープペプチドの少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むそのようなペプチドは、がん免疫療法のための適切なペプチドである。

#### 【 0 0 8 5 】

さらに、本発明の T h 1 細胞は、他の標的細胞に対するいずれの C T L も抗原非依存的に活性化するおよび/または刺激する様々なサイトカイン(例えば I F N - )を分泌する。したがって、本発明の T h 1 細胞は、I M P - 3 以外の腫瘍関連抗原( T A A )を発現する細胞を標的とする C T L 活性を増強することにも寄与し得る。したがって、本発明の T h 1 細胞は、本発明のペプチドおよび A P C と同様に、I M P - 3 を発現する腫瘍だけでなく、他の T A A を発現する腫瘍のための免疫療法にも有用である。

#### 【 0 0 8 6 】

いくつかの態様において、本発明の T h 1 細胞は、H L A - D R または H L A - D P 抗原と本発明のペプチドの複合体を提示する細胞を認識する T h 1 細胞である。T h 1 細胞に関連して、「細胞を認識する」という語句は、その T C R を介して細胞表面の M H C クラス I I 分子と本発明のペプチドの複合体の結合し、抗原特異的に活性化されることを指す。本明細書では、「抗原特異的に活性化される」という語句は、特定の M H C クラス I I 分子とペプチドに応答して活性化されることを指し、活性化された T h 1 細胞からのサイトカイン産生が誘導される。好ましい態様では、H L A - D R は、H L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4 および H L A - D R 9 からなる群より選択され得る。好ましくは、H L A - D R 8、H L A - D R 5 3 および H L A - D R 9 は、それぞれ H L A - D R B 1 \* 0 8 : 0 3、H L A - D R B 4 \* 0 1 : 0 3、H L A - D R B \* 1 4 : 0 5 および H L A - D R B 1 \* 0 9 : 0 1 であり得る。

#### 【 0 0 8 7 】

##### V I I . T 細胞受容体( T C R )

本発明はまた、T 細胞受容体( T C R )のサブユニットを形成することができる 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する組成物、およびこれを使用する方法を提供する。そのような T C R サブユニットは、I M P - 3 ペプチドを提示する A P C に対する特異性を C D 4 + T 細胞に付与する T C R を形成す



る能力を有する。当技術分野において公知の方法を用いることにより、本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞のTCRサブユニットとして鎖および鎖の核酸を同定することができる(国際公開第2007/032255号およびMorgan et al., J Immunol, 171, 3288(2003))。誘導体TCRは、IMP-3ペプチドを提示するAPCに高い結合力で結合することができ、場合により効率的なサイトカイン産生を媒介することができる。

#### 【0088】

TCRサブユニットをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド(すなわちTCRサブユニットの両方をコードする単一ポリヌクレオチドまたは各々別々のTCRサブユニットをコードする複数のポリヌクレオチド)を適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは当技術分野において周知である。ポリヌクレオチドまたはそれらを含むベクターは、CD4<sup>+</sup>T細胞、例えば患者由来のCD4<sup>+</sup>T細胞に有用に移入することができる。好都合には、本発明は、患者自身のT細胞(または別の哺乳動物のT細胞)の速やかな改変を可能にし、優れたがん細胞死滅特性を有する改変されたT細胞を迅速かつ容易に生産する、すぐに入手可能な組成物を提供する。

#### 【0089】

本発明はさらに、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドでの形質導入によって調製されるTh1細胞を提供し、ここで、TCRサブユニットはIMP-3ペプチド(例えばHLA-DR8、HLA-DR14もしくはHLA-DR53に関しては配列番号:1、およびHLA-DR9もしくはHLA-DR14に関しては配列番号:2)に結合することができる。形質導入されたTh1細胞は、インビボでがん細胞にホーミングすることができ、インビトロで周知の培養方法によって増殖させることができる(例えばKawakami et al., J Immunol, 142, 3452-3461(1989))。上述したように調製したTh1細胞は、治療または保護を必要とする患者においてがんを治療するまたは予防する上で有用な免疫原性組成物を形成するために使用できる。

#### 【0090】

##### VIII. 薬剤または医薬組成物

本発明の方法および組成物ががんの「治療」に関連して有用性を有する限り、治療が臨床上の利益、例えばIMP-3遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、有病率または転移能の低減を導く場合、治療は「有効」とみなされる。治療が予防的に適用される場合、「有効」は、がんの形成を遅延させるもしくは予防するまたはがんの臨床症状を予防するもしくは軽減することを意味する。有効性は、特定の腫瘍型を診断するまたは治療するための任意の公知の方法に関連して決定される。

本発明の方法および組成物ががんの「予防」(preventionおよびprophylaxis)に関連して有用性を有する限り、そのような用語は、本明細書では、疾患による死亡率または罹患率の負荷を低減させる任意の行為を指すために互換的に使用される。予防(preventionおよびprophylaxis)は、「一次、二次および三次予防レベルで」行われ得る。一次予防(preventionおよびprophylaxis)は疾患の発生を回避し、一方二次および三次レベルの予防(preventionおよびprophylaxis)は、疾患の進行および症状の出現の予防(preventionおよびprophylaxis)、ならびに機能を回復させ、疾患に関連する合併症を減少させることによって既存の疾患の負の影響を低減することを目指す活動を包含する。あるいは、予防(preventionおよびprophylaxis)は、特定の障害の重症度を軽減すること、例えば腫瘍の増殖および転移を低減すること、血管新生を減少させることを目指す広範囲の予防的治療を含む。

#### 【0091】

本発明に関連して、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/またはその術後再発の防止は、以下の段階、例えばがん細胞の外科的除去、がん性細胞の成長の阻害、腫瘍の退縮または後退、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退行、ならびに転移の低減ま

10

20

30

40

50

たは阻害などの段階のいずれかを含む。がんの有効な治療および/または予防は、がんを有する個体の死亡率を低下させ、予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、がんに伴う検出可能な症状を軽減する。例えば、有効な治療および/または予防を構成する症状の低減または改善は、10%、20%、30%もしくはそれ以上の低減または安定な疾患を含む。

#### 【0092】

上述したように、本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞を助けることができる。Th1細胞によって分泌されるサイトカインは抗原非依存的にCTLに影響を及ぼし得るので、そのような免疫細胞には、IMP-3を発現するがん細胞に対するCTLだけでなく、他のTAAを発現するがん細胞に対するCTLも含まれる。したがって、本発明は、少なくとも1つの本発明のペプチドを含有する薬剤または医薬組成物を提供する。薬剤または医薬組成物において、そのようなペプチドは治療的または医薬的に有効な量で存在する。

10

#### 【0093】

本発明の薬剤または組成物によって誘導されるTh1細胞は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞に影響を及ぼすサイトカインを分泌することができるので、本発明の薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ）を助ける、刺激するおよび/または増強するために有用である。それゆえ、本発明の薬剤または組成物は、CTLを含むそのような免疫細胞によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するあらゆる目的に有用である。例えば、本発明の薬剤または組成物は、そのような免疫細胞によって媒介されるがんまたは腫瘍に対する免疫応答を増強するまたは促進することができるので、本発明は、がんの治療および/または予防における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物を提供する。そのような薬剤または組成物中のペプチドの量は、IMP-3を発現するがんを担持する対象において免疫応答を有意に増強するまたは刺激するのに有効な量であり得る。

20

#### 【0094】

本発明はまた、HLA-A2およびHLA-A24などのMHCクラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物も提供する。別の態様では、本発明はさらに、MHCクラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物を製造するための本発明のペプチドの使用を提供する。

30

#### 【0095】

好ましい態様において、本発明の過程で同定されたIMP-3由来ペプチドは、Th1細胞ならびにIMP-3発現細胞に対するCTLを誘導することができる。したがって、本発明はまた、IMP-3を発現するがんまたは腫瘍に対するCTLの誘導における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物も提供する。

#### 【0096】

さらに、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するのに使用することができる。

40

#### 【0097】

IMP-3の発現は、正常組織と比較して、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCを含むいくつかのがん型において特異的に上昇するので（国際公開第2004/031413号、国際公開第2007/013665号、国際公開第2007/013671号、Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8および本発明者らのマイクロアレイデータ（データは示さず））、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の

50

防止のために使用することができる。したがって、本発明は、本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの1つまたは複数を有効成分として含有する、がんもしくは腫瘍の治療および／もしくは予防のため、ならびに／またはその術後再発の防止のための薬剤または医薬組成物を提供する。あるいは、本発明のペプチドを、薬剤または医薬組成物としての使用のために、APCなどの前記細胞のいずれかの表面で発現させることができる。加えて、前記Th1細胞も、本発明の薬剤または医薬組成物の有効成分として使用することができる。

【0098】

別の態様では、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤の製造における：

- (a) 本発明のペプチド、
  - (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
  - (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および
  - (d) 本発明のTh1細胞
- の中から選択される有効成分の使用を提供する。

【0099】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するのに使用するための、

- (a) 本発明のペプチド、
  - (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
  - (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および
  - (d) 本発明のTh1細胞
- の中から選択される有効成分を提供する。

【0100】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、有効成分として、

- (a) 本発明のペプチド、
  - (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
  - (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および
  - (d) 本発明のTh1細胞
- の中から選択される有効成分と医薬的または生理学的に許容される担体を製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

【0101】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、

- (a) 本発明のペプチド、
  - (b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、
  - (c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および
  - (d) 本発明のTh1細胞
- の中から選択される有効成分を医薬的または生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程も提供する。

【0102】

あるいは、本発明の医薬組成物または薬剤は、がんまたは腫瘍の予防およびその術後再発の防止のいずれかまたは両方のために使用し得る。

【0103】

本発明の薬剤または医薬組成物はワクチンとして使用される。本発明に関連して、「ワクチン」（免疫原性組成物とも称される）という語句は、動物に接種した場合抗腫瘍免疫

10

20

30

40

50

を誘導する機能を有する組成物を指す。

【0104】

本発明の薬剤または医薬組成物は、対象または患者においてがんもしくは腫瘍を治療するおよび／もしくは予防する、ならびに／またはその術後再発もしくは転移性再発を防止するために使用できる。そのような対象の例には、ヒトならびに、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒヒおよびチンパンジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含むがこれらに限定されない他の哺乳動物が含まれる。

【0105】

本発明の過程で、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、いくつかのHLA-DRおよび／またはHLA-DP分子（例えばHLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR9、HLA-DR14）によって拘束されるプロミスカスなTh1細胞エпитープであることが見出され、これらは、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答に起因する、がんに対する強力で特異的な免疫応答を誘導することができる候補であり得る。それゆえ、配列番号：1または2のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含む本発明の薬剤または医薬組成物は、MHCクラスII分子としてHLA-DR8、HLA-DR53、HLA-DR14およびHLA-DR9の中から選択される少なくとも1つを有する対象への投与に特に適する。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む薬剤または医薬組成物にも当てはまる。

【0106】

あるいは、好ましい態様では、本発明の過程で同定されたペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24を有する対象に適用された場合、IMP-3に特異的なCTLを誘導することもできる。したがって、本発明のペプチドの投与を通して、Th1細胞の誘導に加えてIMP-3を発現するがんに対するCTL応答が誘導され得ることがさらに期待される。さらに、本発明のペプチドは、IMP-3発現細胞に対するCTL応答を、そのプロセッシングを介して誘導することができるだけでなく、それによって媒介されるTh1細胞誘導により、CTL応答を増強することもできる。したがって、同じ対象においてTh1細胞およびIMP-3特異的CTLの両方の誘導を達成するために、例えば、治療される対象は、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを投与する場合は、好ましくはMHCクラスII分子としてHLA-DR9またはHLA-DR14を有し、およびMHCクラスI分子としてHLA-A24またはHLA-A2を有する。

【0107】

別の態様では、本発明は、Th1細胞誘導に依存するがん免疫療法を提供する。本発明によって提供される治療戦略は、Th1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化される免疫細胞が目的のがん細胞を標的とする限り、IMP-3発現とは無関係に任意のがんに適用でき、有効である。

【0108】

本発明の薬剤または医薬組成物によって治療されるべきがんまたは腫瘍には、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、小細胞肺がん（SCLC）、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCが含まれるがこれらに限定されないIMP-3を発現する任意の種類のがんまたは腫瘍が含まれる。

【0109】

本発明の薬剤または医薬組成物は、前記有効成分に加えて、Th1細胞またはCTLを誘導する能力を有する他のペプチド、前記他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、前記他のペプチドまたはその断片を提示する他の細胞等を含有し得る。Th1細胞またはCTLを誘導する能力を有するそのような「他の」ペプチドの例には、がん特異抗原（例えば同定されたTAA）に由来するペプチドが含まれるが、これに限定されない。

【0110】

必要に応じて、本発明の薬剤または医薬組成物は、有効成分、例えば本発明のペプチドのいずれかの抗腫瘍作用を他の治療物質が阻害しない限り、場合により他の治療物質を付加的な有効成分として含んでもよい。例えば、製剤は、抗炎症薬、鎮痛剤、化学療法剤等を含み得る。医薬自体に他の治療物質を含めることに加えて、本発明の医薬を1つまたは複数の他の薬理的剤と連続的にまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理的剤の量は、例えば、使用される薬理的剤の種類、治療される疾患、および投与のスケジュールおよび投与経路に依存する。

#### 【0111】

当業者は、本明細書で特に言及する成分に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物が、対象となる製剤の種類を考慮して当技術分野において慣例的な他の剤（例えば増量剤、結合剤、希釈剤、賦形剤等）も含み得ることを認識する。

10

#### 【0112】

本発明の1つの態様では、本発明の薬剤または医薬組成物を、治療する疾患、例えばがんの病的状態を治療するために有用な材料を含む製品およびキットに含めることができる。前記製品は、ラベルを付した本発明の薬剤または医薬組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器上のラベルは、剤が疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防に使用されることが示されるべきである。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

20

#### 【0113】

上述した容器に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物を含むキットは、場合により医薬的に許容される希釈剤を収容する第二の容器をさらに含んでもよい。第二の容器は、使用のための指示書と共に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

#### 【0114】

薬剤または医薬組成物は、所望する場合は、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置中に包装することができる。パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与のための指示書が添付され得る。

30

#### 【0115】

(1) ペプチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明のペプチドは、薬剤もしくは医薬組成物として直接投与することができるか、または必要な場合は、従来の製剤方法によって製剤化される。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬剤に通常使用される担体、賦形剤などが、特に制限されることなく適宜含まれ得る。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれるが、これらに限定されない。さらに、薬剤または医薬組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、防腐剤、界面活性剤などを含有し得る。本発明の薬剤または医薬組成物は抗がん目的に用いることができる。

#### 【0116】

本発明のペプチドは、インビボでTh1細胞を誘導する本発明のペプチドの2つまたはそれ以上で構成される、組合せとして調製することができる。ペプチドの組合せはカクテルの形態をとってもよく、または標準的な技術を用いて互いに複合化し得る。例えば、ペプチドを化学的に連結するかまたは単一融合ポリペプチド配列として発現させることができる。組合せ中のペプチドは、同じであってもよくまたは異なってもよい。

40

#### 【0117】

本発明のペプチドを投与することにより、ペプチドまたはその断片がAPC上のHLAクラスII抗原によって高密度で提示され、次に提示されたペプチドとHLAクラスII抗原との間で形成された複合体に対して特異的に反応するTh1細胞が誘導される。あるいは、対象からAPC（例えばDC）を取り出し、次に本発明のペプチドによって刺激して、本発明のペプチドまたはその断片のいずれかを自らの表面に提示するAPCを得る。

50

これらのAPCを対象に再投与して、対象においてTh1細胞を誘導することができ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

【0118】

本発明のペプチドを有効成分として含む、がんまたは腫瘍の治療および/または予防のための薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫を有効に樹立することが公知のアジュバントも含み得る。あるいは、薬剤または医薬組成物は、他の有効成分と共に投与することができ、または顆粒に製剤化することによって投与できる。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続的に）投与した場合、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。本明細書で企図されるアジュバントには、文献（*Clin Microbiol Rev* 1994, 7: 277-89）に記載されているものが含まれる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、不完全フロイントアジュバント（IFA）、完全フロイントアジュバント（CFA）、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、水中油型エマルション等が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0119】

さらに、リポソーム製剤、ペプチドが直径数マイクロメートルのビーズに結合している顆粒製剤、および脂質がペプチドに結合している製剤を好都合に使用し得る。

本発明の別の態様では、本発明のペプチドはまた、医薬的に許容される塩の形態で投与し得る。好ましい塩の例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸（例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸等）との塩、および無機酸（例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等）との塩が含まれる。本明細書で使用する場合、「医薬的に許容される塩」という語句は、化合物の生物学的有効性および特性を保持し、無機酸または無機塩基、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等との反応によって得られる塩を指す。

20

【0120】

いくつかの態様において、本発明の薬剤または医薬組成物は、Th1細胞および場合によりCTLをプライミングする成分をさらに含む得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでTh1細胞および場合によりCTLをプライミングすることができる剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリシン残基の - アミノ基および - アミノ基に結合し、次に本発明のペプチドに連結することができる。その後、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子中で直接投与する、リポソーム中に組み込む、またはアジュバント中に乳化することができる。Th1細胞および場合によりCTL応答の脂質プライミングの別の例として、トリバルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン（P3CSS）などの大腸菌（*E. coli*）リボタンパク質が、適切なペプチドに共有結合した場合、Th1細胞および場合によりCTLをプライミングするために使用できる（例えばDerese et al., *Nature* 1989, 342: 561-4 参照）。

30

【0121】

適切な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹腔内および静脈内注射など、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与（すなわち直接注入）が含まれるが、これらに限定されない。投与は、単回投与によって実施でき、または反復投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量のペプチドを、IMP-3を発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはIMP-3を発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のペプチドを、IMP-3を発現するがんを担持する対象に投与することができる。本発明のペプチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0

40

50

．1mg～10mg、例えば0.5mg～5mgであり、数日から数ヶ月に1回投与することができる。当業者は、適切で最適な用量を容易に決定することができる。

#### 【0122】

(2) ポリヌクレオチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明の薬剤または医薬組成物はまた、本明細書で開示するペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチドを含有し得る。本明細書では、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞内に導入された場合、抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてインビボで発現されることを意味する。例示的な態様では、関心対象のポリヌクレオチドの核酸配列は、ポリヌクレオチドの発現に必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムへの安定な組み込みを達成するのに必要なものを備え得る（相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12 参照）。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8；米国特許第5,580,859号；同第5,589,466号；同第5,804,566号；同第5,739,118号；同第5,736,524号；同第5,679,647号；および国際公開第98/04720号参照。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA」、促進（ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性）送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性（「遺伝子銃」）または圧力媒介性送達が含まれる（例えば米国特許第5,922,687号参照）。

#### 【0123】

本発明のペプチドは、ウイルスベクターまたは細菌ベクターによっても発現され得る。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。このアプローチは、例えば本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するベクターとしての、ワクシニアウイルスの使用を含む。宿主への導入後、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を惹起する。免疫プロトコ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 1991, 351: 456-60に記載されている。治療的投与または免疫のために有用である多種多様な他のベクター、例えばアデノウイルスベクター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、チフス菌（*Salmonella typhi*）ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えばShata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71；Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806；Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85 参照。

#### 【0124】

対象へのポリヌクレオチドの送達は、直接的であってもよく、この場合対象はポリヌクレオチドを担持するベクターに直接暴露され、または間接的であってもよく、この場合は最初にインビトロで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次に細胞を対象に移植する。これら2つのアプローチは、それぞれインビボおよびエクスビボ遺伝子治療として公知である。

#### 【0125】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505；Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95；Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96；Mulligan, Science 1993, 260: 926-32；Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217；Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215 参照）。本発明にも使用できる、組換えDNA技術の分野で一般に公知の方法は

、eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; および Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990 に記載されている。

#### 【0126】

ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与は、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内および/または腹腔内注射などによって実施してよく、全身投与もしくは標的部位の近傍への局所投与も使用される。投与は、単回投与によって実施でき、または複数回投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量の本発明のポリヌクレオチドを、IMP-3を発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはIMP-3を発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のポリヌクレオチドを、IMP-3を発現するがんを担持する対象に投与することができる。適切な担体または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日ごとに1回から数ヶ月ごとに1回投与することができる。当業者は、適切で最適な投与量を容易に決定することができる。

#### 【0127】

##### IX. ペプチド、APCまたはTh1細胞を使用する方法

本発明のペプチドおよびそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のAPCおよびTh1細胞を誘導するために使用できる。本発明のAPCはまた、本発明のTh1細胞を誘導するためにも使用できる。ペプチド、ポリヌクレオチドおよびAPCは、任意の他の化合物がこれらのTh1細胞誘導能を阻害しない限り、任意の他の化合物と組み合わせて使用することができる。したがって、本発明の前記薬剤または医薬組成物のいずれかを、Th1細胞を誘導するために使用でき、それに加えて、ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものも、以下で論じるようにAPCを誘導するために使用できる。

#### 【0128】

##### (1) 抗原提示細胞(APC)を誘導する方法:

本発明は、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用してAPCを誘導する方法を提供する。APCの誘導は、「V. 抗原提示細胞」の章で上述したように実施することができる。本発明はまた、Th1細胞誘導能を有するAPCを誘導するための方法も提供し、前記APCの誘導は、「V. 抗原提示細胞」、前出の項目でも言及されている。

#### 【0129】

あるいは、本発明は、Th1細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞(APC)を調製するための方法であって、以下の段階:

(a) APCを本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階の1つを含み得る方法を提供する。

あるいは、本発明は、Th1細胞誘導能を有するAPCを誘導するための方法であって、

(a) APCを本発明のペプチドと接触させる段階; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階からなる群より選択される段階を含む方法を提供する。

#### 【0130】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好

10

20

30

40

50



ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエキスビボで実施できる。好ましい態様では、T h 1 細胞誘導能を有するA P Cの誘導のために使用するA P Cは、好ましくはM H CクラスI I分子としてH L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4およびH L A - D R 9中から選択される少なくとも1つを発現するA P Cであり得る。そのようなA P Cは、M H CクラスI I分子としてH L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4およびH L A - D R 9の1つの中から選択される少なくとも1つを有する対象から得た末梢血単核細胞（P B M C）から、当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導されるA P Cは、本発明のペプチドまたはその断片とH L AクラスI I抗原（例えばH L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 9、H L A - D R 1 4）の複合体を自らの表面に提示するA P Cであり得る。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために、本発明の方法によって誘導されたA P Cを対象に投与する場合、対象は、好ましくはA P Cが由来するのと同じ対象である。しかし、対象がA P Cドナーと同じH L A型を有する限り、対象はA P Cドナーとは異なる対象であってもよい。

10

#### 【0131】

別の態様では、本発明は、T h 1 細胞誘導能を有するA P Cを誘導するのに使用するための剤または組成物を提供し、そのような剤または組成物は、本発明の1つまたは複数のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

#### 【0132】

別の態様では、本発明は、A P Cを誘導するために製剤化される剤または組成物の製造における、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。

20

#### 【0133】

あるいは、本発明はさらに、T h 1 細胞誘導能を有するA P Cを誘導するのに使用するための本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリペプチドを提供する。

#### 【0134】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、T h 1 応答を誘導するだけでなく、それらをプロセッシングした後にC T L 応答も誘導する。したがって、好ましい態様では、本発明の方法によって調製されるA P Cは、がん細胞を含む、I M P - 3 発現細胞に対するC T Lを誘導するためにも有用であり得る。例えば、配列番号：4のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、H L A - A 2を発現するA P CがI M P - 3 特異的C T Lを誘導するのに適する。あるいは、配列番号：3のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、H L A - A 2 4を発現するA P CがI M P - 3 特異的C T Lを誘導するのに適する。

30

#### 【0135】

（2）T h 1 細胞を誘導する方法：

さらに、本発明は、本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは本発明のペプチドもしくはその断片を提示するA P Cを用いてT h 1 細胞を誘導するための方法を提供する。本発明はまた、本発明のペプチドとH L AクラスI I抗原の複合体を認識するT細胞受容体（T C R）サブユニットを形成することができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用してT h 1 細胞を誘導するための方法も提供する。好ましくは、T h 1 細胞を誘導するための方法は：

40

a：C D 4 陽性T細胞を、H L AクラスI I抗原と本発明のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞と接触させる段階、および

b：T C Rが本発明のペプチドまたはその断片とH L AクラスI I抗原の複合体を認識するまたは複合体に結合することができる、T C Rサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはT C Rサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをC D 4 陽性T細胞に導入する段階

からなる群より選択される少なくとも1つの段階を含む。

#### 【0136】

50

本発明のペプチドを対象に投与した場合、対象の体内でT h 1細胞が誘導され、M H CクラスII分子によって媒介される免疫応答（例えばがん細胞を標的とする免疫応答）が増強される。あるいは、本発明のペプチドおよび本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをエクスピボ治療法に使用することができ、この治療法では、対象由来のA P CおよびC D 4陽性細胞、または末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ（本発明のペプチドで刺激し）、T h 1細胞を誘導した後、活性化したT h 1細胞を対象に戻す。例えば、前記方法は：

- a：対象からA P Cを回収する段階；
  - b：段階aのA P Cを本発明のペプチドと接触させる段階；
  - c：段階bのA P CをC D 4<sup>+</sup>T細胞と混合し、T h 1細胞を誘導するために共培養する段階；および
  - d：段階cの共培養物からC D 4<sup>+</sup>T細胞を回収する段階。
- を含み得る。

さらに、T h 1細胞は、T C Rが本発明のペプチドまたはその断片とH L AクラスII抗原の複合体に結合することができる、T C Rサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはT C Rサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをC D 4陽性T細胞に導入することによって誘導できる。そのような形質導入は、「V I I . T細胞受容体（T C R）」の章で上述したように実施することができる。

#### 【0137】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。T h 1細胞の誘導のために使用するC D 4陽性T細胞は、対象から得たP B M Cから当技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様では、C D 4陽性T細胞のドナーは、M H CクラスII分子としてH L A - D R 8、H L A - D R 5 3、H L A - D R 1 4およびH L A - D R 9の中から選択される少なくとも1つを有する対象であり得る。本発明の方法によって誘導されるT h 1細胞は、本発明のペプチドまたはその断片とH L AクラスII抗原の複合体を自らの表面に提示するA P Cを認識することができるT h 1細胞であり得る。対象においてがんに対する免疫応答（またはM H CクラスII分子によって媒介される免疫応答）を誘導するために、本発明の方法によって誘導されたT h 1細胞を対象に投与する場合、対象は、好ましくはC D 4陽性T細胞が由来するのと同じ対象である。しかし、対象がC D 4陽性T細胞ドナーと同じH L A型を有する限り、対象はC D 4陽性T細胞ドナーとは異なる対象であってもよい。

#### 【0138】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、I M P - 3発現細胞に対するC T LならびにT h 1細胞を誘導することができる。それゆえ、本発明はさらに、C T Lを誘導するための方法であって：

- a：C D 4陽性T細胞およびC D 8陽性T細胞の両方を、本発明のペプチドと接触させたA P Cと共培養する段階；ならびに
  - b：C D 8陽性T細胞を本発明のペプチドと接触させたA P Cと共培養する段階。
- からなる群より選択される少なくとも1つの段階を含む方法を提供する。

#### 【0139】

C T Lを誘導するそのような方法では、本発明のペプチドはA P C内でプロセッシングされてC T Lエピトープペプチドを生成し、生成されたC T LエピトープペプチドはA P Cの表面に提示される。

#### 【0140】

あるいは、本発明によれば、T h 1細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、T h 1細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、T h 1細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。

## 【 0 1 4 1 】

本発明の方法によって誘導される C D 4 + T 細胞は、ワクチンとして対象に投与することができる。

## 【 0 1 4 2 】

本発明に関連して、I M P - 3 を過剰発現するがんをこれらの有効成分で治療することができる。そのようながんの例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、小細胞肺癌 ( S C L C )、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍および H N C が含まれるが、これらに限定されない。したがって、有効成分を含有するワクチンまたは医薬組成物の投与の前に、治療されるがん細胞または組織における I M P - 3 の発現レベルが同じ器官の正常細胞と比較して増大しているかどうかを確認することが好ましい。したがって、1つの態様では、本発明は、I M P - 3 を ( 過剰 ) 発現するがんを治療するための方法であって：

i ) 治療されるべきがんを有する対象から得たがん細胞または組織における I M P - 3 の発現レベルを測定する段階；

i i ) I M P - 3 の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

i i i ) 上記 ( a ) ~ ( d ) からなる群より選択される少なくとも1つの成分を、正常対照と比較して I M P - 3 を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。  
を含み得る方法を提供する。

## 【 0 1 4 3 】

あるいは、本発明は、I M P - 3 を過剰発現するがんを有する対象に投与するのに使用するための、上記 ( a ) ~ ( d ) からなる群より選択される少なくとも1つの成分を含有するワクチンまたは医薬組成物を提供し得る。言い換えると、本発明はさらに、本発明の I M P - 3 ポリペプチドで治療されるべき対象を同定するための方法であって、対象由来のがん細胞または組織における I M P - 3 の発現レベルを測定する段階を含み、遺伝子の正常対照レベルと比較したレベル上昇が、対象が本発明の I M P - 3 ポリペプチドで治療し得るがんを有することを示す方法を提供する。本発明のがんを治療する方法を以下でより詳細に説明する。

## 【 0 1 4 4 】

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドを投与する前に対象の H L A 型を同定し得る。例えば、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 8、H L A - D R 1 4 または H L A - D R 5 3 を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 9 または H L A - D R 1 4 を有すると同定された対象に投与する。

## 【 0 1 4 5 】

目的の I M P - 3 の転写または翻訳産物を含む限り、任意の対象由来の細胞または組織を I M P - 3 発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、血液、唾液および尿などの体組織および体液が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、対象由来の細胞または組織試料は、上皮細胞、より好ましくはがん性上皮細胞またはがん性であることが疑われる組織由来の上皮細胞を含む細胞集団を含有する。さらに、必要な場合は、得られた体組織および体液から細胞を精製し、その後対象由来試料として使用してもよい。

## 【 0 1 4 6 】

本発明の方法によって治療される対象は、好ましくは哺乳動物である。例示的な哺乳動物には、例えばヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマおよびウシが含まれるが、これらに限定されない。

## 【 0 1 4 7 】

本発明によれば、対象から得たがん細胞または組織における I M P - 3 の発現レベルを測定する。発現レベルは、当技術分野において公知の方法を用いて、転写 ( 核酸 ) 産物レベルで測定することができる。例えば、I M P - 3 の m R N A は、ハイブリダイゼーショ

ン法（例えばノーザンハイブリダイゼーション）によりプローブを用いて定量化し得る。検出はチップまたはアレイ上で実施し得る。IMP-3の発現レベルを検出するにはアレイの使用が好ましい。当業者は、IMP-3の配列情報を利用してそのようなプローブを調製することができる。例えば、IMP-3のcDNAをプローブとして使用し得る。必要な場合は、プローブを色素、蛍光物質および同位体などの適切な標識で標識化してもよく、遺伝子の発現レベルをハイブリダイズした標識の強度として検出し得る。

#### 【0148】

さらに、IMP-3の転写産物（例えば配列番号：5）は、増幅に基づく検出方法（例えばRT-PCR）によってプライマーを使用して定量化し得る。そのようなプライマーは、利用可能な遺伝子の配列情報に基づいて調製し得る。

10

#### 【0149】

詳細には、本発明の方法に使用するプローブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件下、中等度にストリンジェントな条件下または低ストリンジェントな条件下でIMP-3のmRNAにハイブリダイズする。本明細書で使用する場合、「ストリンジェントな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高温で認められる。一般に、ストリンジェントな条件の温度は、規定のイオン強度およびpHで特定の配列の熱融解温度（ $T_m$ ）よりも約5℃低くなるように選択される。 $T_m$ とは、（規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度下で）標的配列に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である。標的配列は一般に過剰に存在するので、 $T_m$ では、プローブの50%が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、塩濃度がpH7.0~8.3で約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01~1.0Mのナトリウムイオン（または他の塩）であり、および温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば10~50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃であり、より長いプローブまたはプライマーの場合は少なくとも約60℃である条件である。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によっても達成し得る。

20

#### 【0150】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出してもよい。例えば、IMP-3タンパク質（配列番号：6）の量を測定し得る。翻訳産物としてのタンパク質の量を測定するための方法には、タンパク質を特異的に認識する抗体を使用する免疫測定法が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変抗体がIMP-3タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型（例えばキメラ抗体、scFv、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv等）を検出に使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。

30

翻訳産物に基づきIMP-3遺伝子の発現レベルを検出する別の方法として、IMP-3タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学分析を介して染色の強度を測定し得る。すなわち、この測定では、強い染色は、タンパク質の存在/レベルの増大、および同時に、IMP-3遺伝子の高い発現レベルを指す。

40

#### 【0151】

がん細胞における標的遺伝子、例えばIMP-3遺伝子の発現レベルは、標的遺伝子の対照レベル（例えば正常細胞におけるレベル）から、例えば10%、25%もしくは50%増大している場合、または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超もしくはそれ以上に増大している場合、増大していると決定され得る。

#### 【0152】

対照レベルは、疾患状態（がん性または非がん性）が既知である対象から以前に採取され、保存されていた試料を使用することによって、がん細胞と同時に測定し得る。加えて

50

、治療されるべきがんを有する器官の非がん性領域から得た正常細胞を正常対照として使用してもよい。あるいは、疾患状態が既知である対象由来の試料において以前に測定されたIMP-3遺伝子の発現レベルを分析することによって得られた結果に基づき、統計学的方法によって対照レベルを決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験した細胞からの発現パターンのデータベースから導き出すことができる。さらに、本発明の1つの態様によれば、生物学的試料におけるIMP-3遺伝子の発現レベルを、複数の参照試料から決定した複数の対照レベルと比較し得る。対象由来の生物学的試料のものと類似の組織型に由来する参照試料から決定した対照レベルを使用することが好ましい。さらに、疾患状態が既知である集団におけるIMP-3遺伝子の発現レベルの標準値を使用することが好ましい。標準値は当技術分野において公知の任意の方法によって入手し得る。例えば、平均 $\pm$ 2 S.D.または平均 $\pm$ 3 S.D.の範囲を標準値として使用し得る。

10

【0153】

本発明に関連して、非がん性であることが既知の生物学的試料から決定した対照レベルを「正常対照レベル」と称する。他方で、対照レベルをがん性生物学的試料から決定した場合は、それを「がん性対照レベル」と称する。試料の発現レベルと対照レベルの差は、発現レベルが細胞のがん性または非がん性状態に依存して異ならないことが公知の対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して基準化することができる。例示的な対照遺伝子には、 $\alpha$ -アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼおよびリボソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

【0154】

20

IMP-3遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比べて増大しているか、またはがん性対照レベルと類似/同等である場合、対象は、治療されるべきがんを有すると診断され得る。

【0155】

より詳細には、本発明は、(i)対象が治療されるべきがんを有するか否かを診断する、および/または(ii)がん治療のための対象を選択する方法であって：

a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるIMP-3の発現レベルを測定する段階；

b) IMP-3の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；

c) IMP-3の発現レベルが正常対照レベルと比較して増大している場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

30

d) 段階c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階。

を含む方法を提供する。

【0156】

あるいは、そのような方法は：

a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるIMP-3の発現レベルを測定する段階；

b) IMP-3の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；

c) IMP-3の発現レベルががん性対照レベルと類似または同等である場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

40

d) 段階c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階。

を含む。

【0157】

いくつかの態様において、そのような方法は、上記で定義した段階a)～d)の後または前に、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14およびHLA-DR53からなる群より選択されるHLAを有する対象を同定する段階をさらに含み得る。本発明によるがん療法は、IMP-3を過剰発現するがんに罹患しており、ならびにHLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR14およびHLA-DR53のいずれか1つを有する

50

対象にとって好ましい。H L A タイピングの方法は当技術分野において周知である。例えば、H L A アリルをタイピングするための P C R に基づく方法は周知である。各々の H L A 分子に特異的な抗体も、対象の H L A 型を同定するための適切なツールである。

【 0 1 5 8 】

本発明はまた、本発明の I M P - 3 ポリペプチドで治療することができるがんに罹患している対象を決定するためのキットも提供し、そのようなキットは、特定のがん療法、より詳細には、がん免疫療法の効果を評価するおよび / またはモニタリングするのにも有用であり得る。適切ながんの説明例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、小細胞肺癌 ( S C L C )、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟組織腫瘍、精巣腫瘍および H N C が含まれるが、これらに限定されない。より詳細には、キットは、好ましくは対象由来のがん細胞における I M P - 3 遺伝子の発現を検出するための少なくとも 1 つの試薬を含み、そのような試薬は：

( a ) I M P - 3 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；

( b ) I M P - 3 タンパク質を検出するための試薬；および

( c ) I M P - 3 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬

の群より選択される。

【 0 1 5 9 】

I M P - 3 遺伝子の m R N A を検出するのに適した試薬の例には、I M P - 3 m R N A に特異的に結合するまたは I M P - 3 m R N A を同定する核酸、例えば I M P - 3 m R N A の一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、I M P - 3 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製し得る。必要な場合は、I M P - 3 m R N A を検出するための試薬を固体マトリックス上に固定化し得る。さらに、I M P - 3 m R N A を検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

【 0 1 6 0 】

他方で、I M P - 3 タンパク質を検出するのに適した試薬の例には、I M P - 3 タンパク質に対する抗体が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変された抗体が I M P - 3 タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型 (例えばキメラ抗体、s c F v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v 等) を試薬として使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。さらに、直接結合または間接標識技術により、抗体をシグナル生成分子で標識してもよい。標識、ならびに抗体を標識し、その標的への抗体の結合を検出するための方法は当分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明のために利用し得る。さらに、I M P - 3 タンパク質を検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

【 0 1 6 1 】

キットは、前記試薬の複数を含んでもよい。例えば、がんを有さないまたはがんに罹患している対象から得た組織試料は、有用な対照試薬として役立ち得る。本発明のキットは、使用のための指示書と共に、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書 (例えば書面、テープ、C D - R O M 等) を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。これらの試薬などは、ラベルを付した容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

【 0 1 6 2 】

本発明の 1 つの態様として、試薬が I M P - 3 m R N A に対するプローブである場合、少なくとも 1 つの検出部位を形成するために試薬を多孔性ストリップなどの固体マトリックス上に固定化し得る。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、各々が核酸 (

10

20

30

40

50

プローブ)を含む複数の部位を含み得る。試験ストリップはまた、陰性対照および/または陽性対照のための部位を含んでもよい。あるいは、対照部位は、試験ストリップから隔てられたストリップ上に配置し得る。場合により、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含んでもよく、すなわち、第一検出部位ではより高い量を含み、それに続く部位ではより少ない量を含んでもよい。試験試料の添加後、検出可能なシグナルを提示する部位の数により、試料中に存在するIMP-3 mRNAの量の定量的指標が提供される。検出部位は、任意の適切な検出可能形状に構成することができ、典型的には、試験ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

#### 【0163】

本発明のキットは、陽性対照試料またはIMP-3標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、IMP-3陽性試料を採取し、次にそのIMP-3レベルを検定することによって調製し得る。あるいは、精製されたIMP-3タンパク質またはポリヌクレオチドを、IMP-3を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはIMP-3標準試料を形成してもよい。本発明では、精製IMP-3は組換えタンパク質であり得る。陽性対照試料のIMP-3レベルは、例えばカットオフ値を上回る。

#### 【0164】

##### X. 抗体:

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、本発明のペプチドに特異的に結合し、他のペプチドには結合しない(または弱く結合する)。あるいは、抗体は、本発明のペプチドならびにそのホモログに結合する。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断アッセイおよび予後判定アッセイならびに画像化法において使用され得る。同様に、そのような抗体は、IMP-3ががん患者において発現されるまたは過剰発現される限り、他のがんの治療、診断および/または予後判定において使用され得る。さらに、細胞内で発現される抗体(例えば一本鎖抗体)は、IMP-3の発現が関与するがんを処置する際に治療的に使用され得、その例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺がん(NSCLC)、小細胞肺がん(SCLC)、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0165】

本発明はまた、配列番号: 1および2の中から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むIMP-3タンパク質(配列番号: 6)またはその断片の検出および/または定量化のための様々な免疫学的アッセイも提供する。そのようなアッセイは、適宜に、IMP-3タンパク質またはその断片を認識し、結合することができる1つまたは複数の抗IMP-3抗体を含み得る。本発明において、IMP-3ポリペプチドに結合する抗IMP-3抗体は、好ましくは他のペプチドを排除して、好ましくは配列番号: 1および2の中から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は阻害試験で確認することができる。すなわち、分析する抗体と全長IMP-3ポリペプチドの間の結合が配列番号: 1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有する任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、抗体は断片に「特異的に結合する」とみなされる。本発明に関連して、そのような免疫学的アッセイは、様々なタイプの放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィ技術、固相酵素免疫検定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光検定法(ELIFA)等を含むがこれらに限定されない、当技術分野において周知の様々な免疫学的アッセイ形式内で実施される。

#### 【0166】

本発明の関連する免疫学的であるが抗体を使用しないアッセイには、T細胞免疫原性アッセイ(阻害性または刺激性)ならびにMHC結合アッセイも含まれ得る。加えて、本発明の標識抗体を用いたラジオシンチグラフィ画像化法を含むがこれに限定されない、IMP-3を発現するがんを検出することができる免疫学的画像化法も本発明によって提供される。そのようなアッセイは、IMP-3を発現するがんの検出、モニタリングおよび予

後判定において臨床的に使用することができ、そのようながんの例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、小細胞肺がん（SCLC）、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0167】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体も提供する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で使用することができ、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ヒト抗体ならびに遺伝的組換えによって作製されるヒト化抗体を包含する。

10

#### 【0168】

抗体を得るための抗原として使用する本発明のペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくはヒト、マウスまたはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のペプチドは、本明細書で開示するヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手し得る。

本発明によれば、本発明のポリペプチドの完全なペプチドおよび部分ペプチドは免疫化抗原として役立ち得る。適切な部分ペプチドの例には、例えば本発明のペプチドのアミノ（N）末端断片またはカルボキシ（C）末端断片が含まれる。

#### 【0169】

20

本明細書では、抗体は、全長IMP-3ペプチドまたはIMP-3ペプチドの断片のいずれかと反応するタンパク質と定義される。好ましい態様では、本発明の抗体は、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するIMP-3の断片ペプチドを認識することができる。オリゴペプチドを合成する方法は当技術分野において周知である。合成後、ペプチドを、場合により免疫原として使用する前に精製してもよい。本発明では、オリゴペプチド（例えば24merまたは26mer）を、免疫原性を増強するために担体と複合化または連結してもよい。キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）は担体として周知である。KLHとペプチドを複合化する方法も当技術分野において周知である。

#### 【0170】

30

あるいは、本発明のペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに挿入してもよく、次にそれを使用して本明細書で述べるような宿主細胞を形質転換する。所望のペプチドまたはその断片を任意の標準的な方法によって宿主細胞の外部または内部から回収することができ、その後抗原として使用し得る。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体またはその溶解物または化学合成したペプチドを抗原として使用してもよい。

#### 【0171】

任意の哺乳動物を抗原で免疫し得るが、好ましくは細胞融合のために使用する親細胞との適合性を考慮に入れる。一般に、げっ歯目（Rodentia）、ウサギ目（Lagomorpha）または霊長目（Primate）科の動物を使用し得る。げっ歯目科の動物には、例えばマウス、ラットおよびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目科の動物には、例えばカニクイザル（Macaca fascicularis）、アカゲザル、マントヒヒおよびチンパンジーなどの狭鼻下目（Catarrhini）のサル（旧世界ザル）が含まれる。

40

#### 【0172】

抗原で動物を免疫する方法は当技術分野において公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射が哺乳動物の免疫のための標準的な方法である。より詳細には、抗原を適切な量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、生理食塩水等に希釈し、懸濁し得る。所望する場合は、抗原懸濁液を適切な量の標準的なアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化して、その後哺乳動物に投与してもよい。好ましくは、それに続いて、適切な量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を4～21日ごとに数回投与する

50



。適切な担体も免疫のために使用し得る。上記のように免疫した後、血清を、所望抗体の量の増加に関して標準的な方法によって検査し得る。

【0173】

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望抗体の増加に関して検査した免疫哺乳動物から血液を採取し、任意の従来の方法で血液から血清を分離することによって調製し得る。ポリクローナル抗体には、ポリクローナル抗体を含有する血清、ならびに血清から単離し得るポリクローナル抗体を含有する画分が含まれる。免疫グロブリンGまたはMは、例えば本発明のペプチドと結合したアフィニティカラムを用いて本発明のペプチドだけを認識する画分から調製することができ、プロテインAまたはプロテインGカラムを用いてこの画分をさらに精製し得る。

10

【0174】

本発明に関する使用のためのモノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を採取し、上述したように血清中の所望抗体のレベル上昇を検査して、細胞融合に供する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記免疫細胞と融合させる他の好ましい親細胞には、例えば哺乳動物の骨髄腫細胞、より好ましくは薬剤による融合細胞の選択のための獲得特性を有する骨髄腫細胞が含まれる。上記免疫細胞と骨髄腫細胞を公知の方法に従って、例えばMilstein et al.の方法(Galfrè and Milstein, Methods Enzymol 73: 3 - 46 (1981))に従って融合させることができる。

【0175】

20

生じる細胞融合によって得られたハイブリドーマは、それらを標準的な選択培地、例えばHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン含有培地)で培養することによって選択し得る。細胞培養を、典型的には数日間から数週間、すなわち所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞(非融合細胞)を死滅させるのに十分な時間、HAT培地中で継続する。その後、標準的な限界希釈を実施して、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、クローン化し得る。

【0176】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記方法に加えて、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したものをインビトロでペプチド、ペプチド発現細胞またはそれらの溶解物で免疫し得る。次に、免疫したリンパ球を、U266などの無限に分裂することができるヒト由来骨髄腫細胞と融合させて、ペプチドに結合することができる所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを生成し得る(特開昭63-17688号)。

30

【0177】

得られたハイブリドーマを、その後マウスの腹腔に移植し、腹水を抽出し得る。得られたモノクローナル抗体を、例えば硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィまたは本発明のペプチドを結合させたアフィニティカラムによって精製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドの精製および検出に使用できるだけでなく、本発明のペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても用いることができる。

40

あるいは、抗体を産生する、免疫リンパ球などの免疫細胞をがん遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体を調製するために使用してもよい。

【0178】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子工学技術を用いて組換えによって調製することもできる(例えばBorrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)参照)。例えば、抗体をコードするDNAを免疫細胞、例えば抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫リンパ球などからクローン化し、適切なベクターに挿入して、宿主細胞に導入し、組換え抗体を調製し得る。本発明はまた、

50

上述したように調製される組換え抗体も提供する。

【0179】

本発明の抗体は、抗体の断片または改変された抗体が本発明のペプチドの1つまたは複数に結合する限り、抗体の断片または改変された抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはH鎖とL鎖からのFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であり得る(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-83(1988))。より詳細には、抗体断片は、抗体をパパインまたはペプシンなどの酵素で処理することによって生成し得る。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入して、適切な宿主細胞において発現させてもよい(例えばCo et al., J Immunol 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178:497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121:652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9:132-7(1991)参照)。

10

【0180】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)などの様々な分子との結合によって修飾し得る。本発明はそのような修飾された抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得られ得る。これらの修飾方法は当技術分野において慣例的である。

20

【0181】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常領域を含むヒト化抗体として入手し得る。そのような抗体は公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、げっ歯動物のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置き換えることによって実施できる(例えばVerhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988))。したがって、そのようなヒト化抗体は、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ない部分が非ヒト種からの対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。

30

【0182】

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えてヒト可変領域を含む完全ヒト抗体も使用できる。そのような抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を用いて作製することができる。例えば、インビトロ法は、バクテリオファージ上に提示されるヒト抗体断片の組換えライブラリの使用を含む(例えばHoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991)参照)。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスに導入することによって作製できる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号;同第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号に記載されている。

40

【0183】

上述したようにして得られた抗体を均一に精製し得る。例えば、抗体の分離および精製は、一般的なタンパク質に用いられる分離および精製方法に従って実施できる。例えば、抗体を、アフィニティークロマトグラフィ、フィルター、限外ろ過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動などの、しかしこれらに限定されないカラムクロマトグラフィの適切に選択し、組み合わせた使用によって分離および単離し得る(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor La

50

boratory (1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティカラムとして使用することができる。使用される例示的なプロテインAカラムには、例えばHyper D、POROSおよびSephacrose F.F. (Pharmacia)が含まれる。

【0184】

適切なクロマトグラフィ技術の例には、アフィニティクロマトグラフィを除いて、例えばイオン交換クロマトグラフィ、疎水性クロマトグラフィ、ゲルろ過、逆相クロマトグラフィ、吸着クロマトグラフィ等が含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィ手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィによって実施することができる。

10

【0185】

例えば、吸光度の測定、固相酵素免疫検定法 (ELISA)、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA) および/または免疫蛍光法 (IF) を用いて本発明の抗体の抗原結合活性を測定し得る。ELISAでは、本発明の抗体をプレートに固定化し、本発明のペプチドをプレートに塗布して、次に所望の抗体を含有する試料、例えば抗体産生細胞の培養上清または精製抗体を適用する。その後、一次抗体を認識する、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体を適用し、プレートをインキュベートする。次に、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。C末端またはN末端断片などのペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として使用し得る。BIACore (Pharmacia) を、本発明による抗体の活性を評価するために使用してもよい。

20

【0186】

上記方法は、本発明の抗体を、本発明のペプチドを含むと推測される試料に曝露し、抗体とペプチドによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のペプチドの検出または測定を可能にする。

本発明によるペプチドの検出または測定の方法は、ペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法はペプチドを用いる様々な実験で実施することができる。

30

【0187】

XII. ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドを導入するベクターおよび宿主細胞も提供する。本発明のベクターは、本発明のペプチドを発現するためまたは遺伝子治療のために本発明のヌクレオチドを投与するための、宿主細胞における本発明のヌクレオチド、特にDNAの担体として有用である。

【0188】

大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌 (例えばJM109、DH5、HB101またはXL1 Blue) において大量に増幅し、生産する場合、ベクターは、大腸菌における増幅に適した「複製起点 (ori)」および形質転換した大腸菌を選択するのに適したマーカー遺伝子 (例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等のような薬剤によって選択される薬剤耐性遺伝子) を有するべきである。例えば、M13シリーズのベクター、pUCシリーズのベクター、pBR322、pBlue-script、pCR-script等が使用できる。加えて、pGEM-T、pDIRECTおよびpT7も、上述したベクターと同様に、cDNAをサブクローニングし、抽出するために使用できる。本発明のタンパク質を生産するためにベクターを使用する場合は、発現ベクターが使用できる。例えば、大腸菌で発現される発現ベクターは、大腸菌において増幅される上記特徴を有するべきである。JM109、DH5、HB101またはXL1 Blueなどの大腸菌を宿主細胞として使用する場合、ベクターは

40

50

、大腸菌において所望の遺伝子を効率的に発現することができるプロモーター、例えばlacZプロモーター(Ward et al., Nature 341:544-6(1989); FASEB J 6:2422-7(1992))、araBプロモーター(Better et al., Science 240:1041-3(1988))、T7プロモーター等を有するべきである。その点に関して、pGEX-5X-1(Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFPおよびpET(この場合、宿主は、好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である)が、例えば、上記ベクターの代わりに使用できる。加えて、ベクターはまた、ペプチド分泌のためのシグナル配列も含み得る。ペプチドが大腸菌のペリプラズムに分泌されるように指令する例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列である(Le 10  
i et al., J Bacteriol 169:4379(1987))。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

#### 【0189】

大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター(例えばpcDNA3(Invitrogen)およびpEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17):5322(1990))、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えばpHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えばpZIpneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば「P 20  
ichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)ならびに枯草菌(Bacillus subtilis)由来の発現ベクター(例えばpPL608、pKTH50)が、本発明のポリペプチドを産生するために使用できる。

#### 【0190】

CHO、COSまたはNIH3T3細胞などの動物細胞においてベクターを発現するために、ベクターは、そのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MMLV-LTRプロモーター、EF1プロモーター(Mizushima 30  
et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMVプロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子(例えば、薬剤(例えばネオマイシン、G418)によって選択される薬剤耐性遺伝子)を担持すべきである。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSVおよびpOP13が含まれる。

#### 【0191】

以下では、特定の実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。しかし、以下の実験材料、方法および実施例は、当業者が本発明の特定の態様を作製し、使用することを助けるのに役立ち得るが、本発明の態様を例示することだけを意図し、したがっていかなる意 40  
味でも本発明の範囲を限定するものではない。当業者は容易に認識するように、本明細書で述べるものと類似または等価の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

#### 【実施例】

#### 【0192】

材料および方法

細胞株

抗原提示細胞(APC)として、DR4(DRB1\*04:05)、L-DR4;DR 8(DRB1\*08:03)、L-DR8;DR9(DRB1\*09:01)、L-DR 9;DR15(DRB1\*15:02)、L-DR15;DR53(DRB4\*01:0 50

3)、L-DR53;またはDP5(DPB1\*05:01)、L-DP5を発現するように遺伝的に操作されたマウス線維芽細胞株(L細胞)を使用した。抗原ペプチド輸送体(TAP)欠失およびHLA-A2陽性細胞株T2は、理研細胞材料開発室(Cell Bank)(筑波、日本)より購入した。

#### 【0193】

##### HLAクラスII結合ペプチドの予測

潜在的なプロミスキヤスHLAクラスIIに結合するヒトIMP-3由来ペプチドを予測するため、近年開発されたコンピュータアルゴリズム(IEDB解析リソース、コンセンサス法、tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\_\_II\_\_binding.html)でヒトIMP-3タンパク質のアミノ酸配列を解析した(Wang P et al. BMC Bioinformatics 2010;11:568. Wang P et al. PLoS Comput Biol 2008;4:e1000048)。プログラムは、IMP-3タンパク質全体を包含する15アミノ酸長配列のオフセットを解析した。DRB1\*09:01、DRB1\*04:05またはDRB1\*15:02アレルによってコードされる複数のHLAクラスII分子についてオーバーラップする高いコンセンサスパークンタイル順位を有し、かつIMP-3由来の9merCTLエピトープ(IMP-3-A24<sub>508-516</sub>およびIMP-3-A2<sub>515-523</sub>)を含む22アミノ酸長および21アミノ酸長ペプチドである、IMP-3<sub>402-423</sub>長鎖ペプチド(LP)(QSETETVHLFIPALSVGAIIIGK:配列番号:1)およびIMP-3<sub>507-527</sub>-LP(GKTVNELQNLSSAEVVVPRDQ:配列番号:2)を選択して合成した(図1および表1)。

#### 【0194】

10

20

【表 1】

## HLAクラスII分子に対するIMP-3由来ペプチドの結合アルゴリズムスコア

アミノ酸 残基の位置	パーセンタイル順位			
	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	
IMP-3 <sub>402-423</sub> -LP				
402-416	26.4	2.0	3.0	10
403-417	22.7	2.0	3.0	
404-418	22.2	2.0	3.0	
405-419	3.8	2.0	3.0	
406-420	2.8	2.0	3.0	
407-421	2.1	2.9	3.0	
408-422	2.2	3.0	3.0	
409-423	3.2	5.3	4.3	
IMP-3 <sub>507-527</sub> -LP				20
507-521	2.6	4.3	5.4	
508-522	1.1	4.2	5.4	
509-523	0.5	6.0	5.4	
510-524	0.3	6.2	5.4	
511-525	0.6	7.9	5.4	
512-526	1.2	15.4	5.4	
513-527	2.9	16.0	5.4	30

示されたHLAクラスII分子のペプチド結合アルゴリズムスコアは、15merのIMP-3由来オーバーラッピングペプチド毎に示される。

## 【0195】

合成ペプチドおよび組換えタンパク質

HLA-A2 (IMP-3-A2<sub>515-523</sub>) (Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8) または HLA-A24 (IMP-3-A24<sub>508-516</sub>) (Suda T, et al., Cancer Sci 2007; 98: 1803-8) によって提示される2つのヒトIMP-3由来短鎖ペプチド (SP) および2つのLP (IMP-3<sub>402-423</sub>-LP および IMP-3<sub>507-527</sub>-LP) を合成した (MBL、名古屋、日本; 純度 > 95%; 図1B)。HLA-A2 (HIV-A2) に結合するヒト免疫不全ウイルス (HIV) - SP を陰性対照SPとして使用した (Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8; Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 697-705)。ペプチドを10 µg / µL の濃度でジメチルスルホキシドに溶解し、-80 °C に保管した。組換え全長IMP-3タンパク質はProSci社から購入した (カルフォルニア、アメリカ; 純度 > 90%)。組換えヒト全長IMP-3タンパク質をpET28aベクター (Novagen) を用いて大腸菌 (Escherichia coli) BL21によって発現させ、かつ精製した組換えヒトIMP-3

タンパク質は、対照として使用した。

#### 【0196】

健常ドナーからの抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の生成

健常ドナーからPBMCを採取し、使用するための研究プロトコルは、熊本大学の治験審査委員会によって承認された。本発明者らは、書面によるインフォームドコンセントを得た4名の健常ドナーから、PBMCを得た。HLA-A、DRB1およびDPB1アレルの遺伝子型判定はHLA研究所（京都、日本）で行われた（表2）。抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の誘導を、いくつかの変更を加えて、以前に述べられているように行った（Zarour HM, et al., Cancer Res 2000; 60: 4946-52）。CD4<sup>+</sup>T細胞を、磁気マイクロビーズを用いて陽性選択によってPBMCから精製した（Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA）（Inoue M, et al., Int J Cancer 2010; 127: 1393-403）。単球由来の樹状細胞（DC）を、以前に述べられているように（Harao M, et al., Int J Cancer 2008; 123: 2616-25）インビトロ培養によってCD14<sup>+</sup>細胞から生成し、抗原提示細胞（APC）として使用して、抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を誘導した。DC（ $1 \times 10^4$  個細胞/ウェル）を10  $\mu$ g/mLのLPで3時間パルスし、放射線照射して（45 Gy）、その後96ウェル平底培養プレートの各ウェルにおいて5%ヒト補体除去血漿を添加したAIM-V 200  $\mu$ L中のCD4<sup>+</sup>T細胞（ $3 \times 10^4$  個細胞/ウェル）と混合した。7日後、培地の半分を各培養物から除去し、ペプチド（10  $\mu$ g/mL）パルスした、放射線照射（50 Gy）自己PBMC（ $1 \times 10^5$  個細胞/ウェル）および5 ng/mLの組換えヒトインターロイキン7（rhIL-7）を含む新鮮培地（100  $\mu$ L/ウェル）を添加した。ペプチドでの2回目の刺激の2日後に、rhIL-2を各ウェルに添加した（10 IU/mL）。1週間後、各ウェル中の刺激したCD4<sup>+</sup>T細胞を、IFN-ELISPOTアッセイにおいて特異性について分析した。コグネイトペプチドに特異的応答を示すT細胞を24ウェルプレートに移し、rhIL-2（20 IU/mL）およびrhIL-7（5 ng/mL）を添加した培地中、ペプチドでパルスした放射線照射自己PBMC（ $1 \times 10^6$  個細胞/ウェル）を用いて週1回の間隔で再刺激した。場合によっては、T細胞は、以前に述べられているように、さらなる研究のために限界希釈によってクローン化した（Tabata H, et al., Hum Immunol 1998; 59: 549-60）。

#### 【0197】

#### 【表2】

#### 健常ドナーのHLA-A、-DR、および-DP 遺伝子型

ドナーID	HLA-A 遺伝子型	HLA-DRB1 遺伝子型	HL-DPB1 遺伝子型
HD1	A*02:01/24:02	DRB1*04:05/-	DPB1*05:01/-
HD2	A*11:01/31:01	DRB1*08:03/15:02	DPB1*02:01/09:01
HD3	A*24:02/31:01	DRB1*08:03/14:05	DPB1*02:02/05:01
HD4	A*02:01/02:06	DRB1*09:01/04:05	DPB1*02:01/04:02

HLA, ヒト組織適合性白血球抗原; n.t., 試験せず

#### 【0198】

ペプチドおよびタンパク質に対するT細胞応答の評価

ペプチドまたはタンパク質でパルスした抗原提示細胞（APC）に対するTh細胞の免疫応答を、以前に述べられているように（Tomita Y et al., Cancer Sci 2011; 102: 697-705）IFN- $\gamma$  酵素結合免疫スポット（ELISPOT）アッセイ（BD Biosciences）によって評価した。簡単に述べると、ペプチドでパルスしたPBMC（ $3 \times 10^4$  個細胞/ウェル）での刺激後の $3 \times 10^4$  のバルクCD4<sup>+</sup>T細胞、またはペプチドでパルスしたHLA-DRを発現するL細胞（ $5 \times 10^4$  個細胞/ウェル）での刺激後の $1 \times 10^4$  のバルクCD4<sup>+</sup>T細胞当たり

の、IFN- $\gamma$ を産生するペプチド特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の頻度を分析した。抗原提示に  
関与するHLA分子による拘束性を決定するため、抗原誘導性IFN- $\gamma$ 産生のブロッキ  
ングを、抗HLA-DRモノクローナル抗体(mAb)(L243、Biolegend)、  
抗HLA-DP mAb(B7/21、Abcam)、抗ヒトHLA-DQ mAb(  
SPV-L3、Abcam)または抗HLAクラスII mAb(W6/32、Abcam)  
)を添加することによって検査した。すべてのmAbを5  $\mu$ g/mLの最終濃度で使用し  
た。IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイのすべての評価は2連または3連に実施し、結  
果は平均+/-SDとして表示した。

#### 【0199】

##### サイトカインアッセイ

HLA-DR拘束性IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的バルクTh細胞およびTh  
細胞クローン(Th-クローン、 $1 \times 10^4$ 個細胞/ウェル)を、96ウェル培養プレ  
ートにおいてコグネイトペプチドの存在下で自己PBMC( $3 \times 10^4$ 個細胞/ウェル)と  
培養した。24時間後、培養上清を採取し、サイトカイン(IL-2、IFN- $\gamma$ 、GM  
-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-4およびIL-17)レベルを、Bio-Plexシステ  
ム(Bio-Rad)を製造者の使用説明書に従って使用して測定した。

#### 【0200】

##### CD107a動員アッセイ

ペプチドによって刺激された脱顆粒CD4<sup>+</sup>Tリンパ球を同定するため、細胞表面上の  
CD107aをフローサイトメトリによって分析した(Rubio V et al. N  
at Med 2003; 9:1377-82. Betts MR, et al. J I  
mmunol Methods 2003; 281:65-78)。簡単に述べると、C  
D107a動員アッセイを以前に述べられているように実施した(Tomita Y e  
t al. Cancer Sci 2011; 102:71-8)。コグネイトLPまたは  
対照LP(1  $\mu$ g/mL)を刺激剤として添加し、FITC標識抗ヒトCD107a  
mAbまたはFITC標識アイソタイプ対照マウスIgG1およびモネンシンを各ウェル  
に添加した。細胞を37℃で5時間培養した。培養後、ペプチドで刺激したTh細胞をP  
E結合抗ヒトCD4抗体(eBioscience, San Diego, CA)で染色  
し、FACScan(BD Biosciences, Bedford, MA)フローサ  
イトメーターで分析した。

#### 【0201】

##### インビトロクロスプライミングアッセイ

末梢単球由来樹状細胞(DC)は、以前に述べられているように生成した。DCは20  
 $\mu$ g/mLのIMP-3<sub>507-527</sub>-LPで3時間パルスした。その後0日目に細胞  
を放射線照射し(45 Gy)、単離されたCD8<sup>+</sup>T細胞と共にインキュベートした。7  
日目および14日目において、ペプチドをロードした自己DCで2回追加刺激を行った。  
最後の刺激の6日後に、IMP-3-A2<sub>515-523</sub>SPパルスしたT2細胞( $2 \times$   
 $10^4$ 個細胞/ウェル)での刺激後にIFN- $\gamma$ 産生CD8<sup>+</sup>T細胞( $1 \times 10^5$ 個細胞  
/ウェル)の数をELISPOTアッセイによって計数した。

#### 【0202】

##### インビボクロスプライミングアッセイ

HLA-A2(HHD)トランスジェニックマウス(Tgm)は、F. A. Lemon  
nier博士の厚意により提供された(Firat H, et al., Eur J  
Immunol 1999; 29:3112-21. Jung KO, et al. J  
Virol 2012; 86:7616-24)。マウスに、7日の間隔で、不完全フロ  
インドアジュバント(IFA)中に乳化したIMP-3<sub>507-527</sub>-LP溶液(HL  
A-A2 Tgm、100  $\mu$ g/マウス)を尾の基部で皮内注射した。IMP-3<sub>507</sub>  
-527-LPでの2回目のワクチン接種の7日後に、鼠径リンパ節からCD8<sup>+</sup>T細胞  
を磁気マイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA  
)による陽性選択により単離した。IMP-3-A2<sub>515-523</sub>SPパルスした骨髓

10

20

30

40

50



由来のDC (BM-DC、 $2 \times 10^4$  個細胞/ウェル)での刺激後にIFN- $\gamma$  産生CD8<sup>+</sup>T細胞 ( $1 \times 10^5$  個細胞/ウェル)の数をエクスピボELISPOTアッセイによって計数した(Harao M, et al., Int J Cancer 2008; 123:2616-25.; Inoue M, et al., Immunol Lett 2009; 126:67-72)。

#### 【0203】

##### 統計解析

本発明者らは、データを、両側スチューデントt検定(棒グラフ)、またはノンパラメトリックのマン-ホイットニーU検定(散布図)によって比較した。すべての検定に関してP値<0.05の差を統計的に有意とみなした。

#### 【0204】

##### 結果

CTLエピトープを含む潜在的なプロミスキラスHLAクラスII結合IMP-3長鎖ペプチドの予測および選択

IMP-3の潜在的かつプロミスキラスなHLAクラスII結合Th細胞エピトープを同定するため、本発明者らは、最初に、近年開発されたコンピュータアルゴリズムを用いて(図1Aおよび表1)(Wang P, et al. BMC Bioinformatics 2010; 11:568. Wang P, et al. PLoS Comput Biol 2008; 4:e1000048)、IMP-3のアミノ酸配列を調べた。ある領域であるIMP-3<sub>402-423</sub>-LPペプチドが、既知のCTLエピトープ配列を含まないが、コンピュータアルゴリズムによって強力なプロミスキラスHLAクラスII結合ペプチドと予測された。コンピュータアルゴリズムによって強力なプロミスキラスHLAクラスII結合ペプチドと予測された、別の領域であるIMP-3<sub>507-527</sub>-LPは、HLA-A2またはA24拘束性CTLによって認識されるCTLエピトープに近位であった(図1B)。それゆえ、本発明者らは、日本人において頻度の高いHLAクラスII分子であるHLA-DR9、HLA-DR4およびHLA-DR15に対して強い結合親和力を有すると予測され、かつそれらのうちの1つはHLA-A2またはHLA-A24拘束性CTLによって認識される9merペプチドを含む、2つの候補LP、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPおよびIMP-3<sub>507-527</sub>-LPを、その後の分析のために合成した。

#### 【0205】

##### プロミスキラスなIMP-3由来Th細胞の同定

健常ドナーのPBMCから単離したCD4<sup>+</sup>T細胞を、週1回の間隔で、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPでパルスした自己DCおよびPBMCで刺激した。少なくとも3回の刺激後、培養したCD4<sup>+</sup>T細胞のIMP-3<sub>402-423</sub>-LP特異的応答をIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイによって調べた。HLA-DR53陽性の健常ドナー(HD1)において、生成されたTh細胞は、HLA-DR依存的にIMP-3<sub>402-423</sub>-LPでパルスしたPBMCに反応して有意な量のIFN- $\gamma$  を産生した。バルクTh細胞は、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPでパルスしたL-DR53細胞をHLA-DR依存的に特異的に認識したが、パルスしなかったL-DR53細胞またはIMP-3<sub>402-423</sub>-LPでパルスしたL-DR4細胞は認識しなかった(図2A)。これらの結果は、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPが、HLA-DR53によって提示されたことを示す。他のHLAクラスII分子によって拘束されるTh細胞において、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPが応答を誘導するかどうかを調べるために、他の健常ドナーからのCD4<sup>+</sup>T細胞を試験した。本発明者らは、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPが、HLA-DR8(DRB1\*08:03)拘束性Th細胞およびHLA-DR(DRB1\*08:03または14:05)拘束性バルクTh細胞を生成することを確認した(図2BおよびC)。したがって、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPがHLA-DR53、HLA-DR8および他のHLA-DR分子と結合することは、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPが、高頻度HLAクラスII分子(Saito S, et al., Tissue Antig

10

20

30

40

50

ens 2000; 56: 522-9.; Mack SJ, et al., Tissue Antigens 2000; 55: 383-400) によって提示されるプロミスキヤスなTh細胞エピトープであることを示唆する。

#### 【0206】

次に、本発明者らは、既知のCTLエピトープを有するIMP-3<sub>507-527</sub>-LPが、Th細胞を生成することができるかどうかについて評価した。HLA-DR8およびDR14陽性健常ドナー(HD3)において、生成されたTh細胞は、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPでパルスしたPBMCに応答してHLA-DR依存的に有意な量のIFN- $\gamma$ を産生した(図2D)。他のHLAクラスII分子によって拘束されるTh細胞において、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPが応答を誘導することができるかどうかを調べるために、HLA-DR8およびHLA-DR14陰性健常ドナー(HD4)からのCD4<sup>+</sup>T細胞を試験した。本発明者らは、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPが、このドナーにおいて、HLA-DR9拘束性バルクTh細胞を生成することができることを確認した(図2E)。これらの結果は、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPもまた、プロミスキヤスなTh細胞エピトープであることを示している。

#### 【0207】

IMP-3<sub>507-527</sub>-LPは、DCによって天然にプロセッシングされ、提示される

本発明者らは続けて、DCがIMP-3タンパク質を取り込み、プロセッシングして、IMP-3特異的Thクローンを刺激するかどうかを評価した。組換えIMP-3タンパク質をロードしたDCを調製し、IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイにおけるAPCとして使用した(Tomita Y, et al., Cancer Sci 2011; 102: 71-8.); Harao M, et al., Int J Cancer 2008; 123: 2616-25.)。HLA-DR9拘束性IMP-3<sub>507-527</sub>-LP反応性Thクローンは、IMP-3タンパク質をロードしたDCを効率よく認識したが、対照タンパク質をロードしたDCは認識しなかった。このことは、このエピトープが天然にプロセッシングされかつHLA-DR9分子によって提示されることを示している(図3A)。HLA-DR53拘束性IMP-3<sub>402-423</sub>-LP反応性Thクローンは、IMP-3タンパク質をロードしたDCをHLA-DR依存的に効率よく認識したが、対照タンパク質をロードしたDCは認識しなかった。このことは、このエピトープもまた天然にプロセッシングされかつHLA-DR53分子によって提示されることを示している(図3B)。要約すると、これらの結果は、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPおよびIMP-3<sub>507-527</sub>-LPが、IMP-3タンパク質から天然にプロセッシングされかつDCによって提示されることを示している。

#### 【0208】

IMP-3<sub>507-527</sub>-LPは、Th1型CD4<sup>+</sup>細胞を刺激する。

IMP-3-LP反応性Th細胞をさらに特徴づけるため、本発明者らは、Bio-Plexシステムを用いて、コグネイトペプチドによる刺激に応答して放出されたいくつかのサイトカインのレベルを測定した。HD3由来IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的バルクTh細胞は、コグネイトペプチドでの再刺激後に、大量のIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2およびGM-CSFを産生したが、IL-4およびIL-17の産生はより少なく、このことは、Th1分極特性を示した(図4A)。以前に抗ウイルス性CD4<sup>+</sup>エフェクターT細胞および腫瘍浸潤性CD4<sup>+</sup>リンパ球について示されたのと同様に(Casazza JP, et al., J Exp Med 2006; 203: 2865-77.; Attig S, et al., Cancer Res 2009; 69: 8412-9.; Widenmeyer M, et al., Int J Cancer 2012; 131: 140-9.; Martorelli D, et al., Int Rev Immunol 2010; 29: 371-402)、細胞傷害性マーカーCD107aも、コグネイトペプチドで刺激したIMP-3<sub>402-423</sub>-LP特異的およびIMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的バルクTh細胞上で検出された(図4B)。こ

これらのデータは、IMP-3特異的Th細胞が、ヘルパー機能だけでなく、直接の細胞傷害活性を提供することを示唆し、これらはどちらもがん免疫療法のために有益である。

#### 【0209】

IMP-3-LPの交差提示は、インビトロおよびインビボでIMP-3特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を効率的にプライミングする

インビトロでIMP-3-A2<sub>515-523</sub>特異的CTLを誘導するIMP-3<sub>507-527</sub>-LPの能力を評価するために、週1回の間隔で健常ドナーのPBMCから単離したCD8<sup>+</sup>T細胞をIMP-3<sub>507-527</sub>-LPでパルスした自己DCで刺激した。少なくとも3回の刺激後、CD8<sup>+</sup>T細胞は、HLA-A2陽性健常ドナー(HD1およびHD4)において、IMP-3<sub>515-523</sub>-SPでパルスしたT2細胞に対する応答で大量のIFN- $\gamma$ を産生した(図5A)。

10

IMP-3-A2<sub>515-523</sub>特異的CTLをプライミングするIMP-3<sub>507-527</sub>-LPの能力を、エキスピボIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイで調べた。HLA-A2 Tgmを、IFA中に乳化したIMP-3<sub>507-527</sub>-LPで2回免疫した。IMP-3<sub>507-527</sub>-LPでワクチン接種したHLA-A2 TgmのCD8<sup>+</sup>T細胞は、IMP-3-A2<sub>515-523</sub> SPでパルスしたBM-DCでの刺激に応答してIFN- $\gamma$ を特異的に産生した(図5B)。これらの結果は、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPの取込み後、APCがHLA-A2 TgmにおいてインビボでIMP-3-A2<sub>515-523</sub> SP特異的CTLをクロスプライミングすることができることを示唆する。

20

#### 【0210】

##### 考察

腫瘍の異なった型に対するIMP-3-A2<sub>515-523</sub> SPおよびIMP-3-A2<sub>4508-516</sub> SPを用いたいくつかの第I/II相臨床試験が行われている。(Mizukami Y, et al., Cancer Sci 2008; 99:1448-54.; Kono K, et al., Cancer Sci 2009; 100:1502-9.; Kono K, et al., J Transl Med 2012; 10:141)。これらの試験の結果は、いくらかの進行がん患者には、有望である。それゆえ、本発明者らは、ペプチドワクチン免疫療法のさらなる発展のために、抗原特異的Th1細胞およびCTLの両方を誘導するLPを同定することを試みた。

30

本発明者らは、2つのプロミスキラスなIMP-3由来Th細胞エピトープペプチドを同定した。それらのうちの1つは、HLA-A2拘束性CTLエピトープおよびHLA-A24拘束性CTLエピトープの両方を含む。本発明者らは、HLAクラスII分子との関連において、IMP-3<sub>402-423</sub>-LPおよびIMP-3<sub>507-527</sub>-LPが天然にプロセッシングされ、細胞表面上に提示されることを確認した。本発明者らはまた、IMP-3<sub>507-527</sub>-LP特異的CD4<sup>+</sup>T細胞がTh1分極特性を有することを実証し、IMP-3-LPによって誘導されたCD4<sup>+</sup>T細胞が、がん免疫療法のために有益な特性を有することを示唆した。

#### 【0211】

IMP-3-LPはHLA-DR9、DR8およびDR53拘束性Th細胞を誘導した。さらにIMP-3-LPは、HLA-DR14拘束性Th細胞を誘導する可能性を有することが示された。HLA-DR9、DR8、DR14およびDR53アリルは、日本人および太平洋/アジア人において、高頻度なHLAクラスII分子であり、かつHLA-A2およびA24アリルもまた、これらの人々において高頻度に認められる。加えて、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPはインビトロおよびインビボにおいて、IMP-3-A2<sub>515-523</sub>特異的CTLのプライミングおよび増殖を誘導し、IMP-3-SPエピトープを担持するIMP-3-LPがIMP-3特異的Th細胞およびCTLの両方を誘導可能であることを示唆した。それゆえ、本発明者らは、これら免疫原性IMP-3-LPが、より強力な抗腫瘍応答を誘導する能力を有し得ると信じる。

40

LPの最近の研究では、LPの持続性交差提示のため、抗腫瘍CTL免疫の誘導におい

50

て、天然CTLエピトープを含むワクチンが、最小限のCTLエピトープからなるワクチンに勝ることを示している(Melief CJ, et al., Nat Rev Cancer 2008; 8:351-60.; Bijker MS, et al., Eur J Immunol 2008; 38:1033-42.; Chauvin JM, et al., J Immunol 2012; 188:2102-10)。本発明者らは、IMP-3<sub>507-527</sub>-LPおよびIMP-3-A2<sub>515-523</sub>-SPとの間のIMP-3-A2<sub>515-523</sub>特異的CTL誘導能については未だ比較していない。これは、将来の研究で評価されるであろう。

#### 【0212】

結論として、本発明者らは、Th細胞を誘導可能な2つの免疫原性IMP-3-LPを同定した。それらのうちの1つはIMP-3-A2およびIMP-3-A24エピトープの両方を包含する。本発明者らの結果は、IMP-3-LPがIMP-3特異的Th1細胞およびCTLの両方の増殖のための有用なツールを提供することを示唆する。これらの所見は、様々な種類のがんのためのIMP-3ペプチドに基づく免疫療法の予定される臨床試験を促進するであろう。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0213】

本発明は、強力な抗腫瘍免疫応答を誘導することができ、したがって多種多様ながん型に適用可能性を有する、IMP-3由来のTh1細胞エピトープペプチドを記述する。そのようなペプチドは、がん、特にIMP-3を発現するがんに対するペプチドワクチンとしてのさらなる開発に値する。本発明のペプチドは、Th1細胞応答を誘導することができ、したがって、Th1細胞によって分泌されるサイトカインが、抗原非依存的に細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞を助けるかまたは活性化することができる。それゆえ、本発明によって提供される免疫治療戦略は、疾患がMHCクラスII分子によって媒介される免疫応答によって改善され得る限り、がんを含む任意の疾患に適用することができる。特に、本発明のTh1細胞は、CTLによって惹起される免疫応答を改善することができる。それゆえ、本発明のペプチドは、対象においてがんを含む疾患に対するCTL応答を増強するのに有益である。

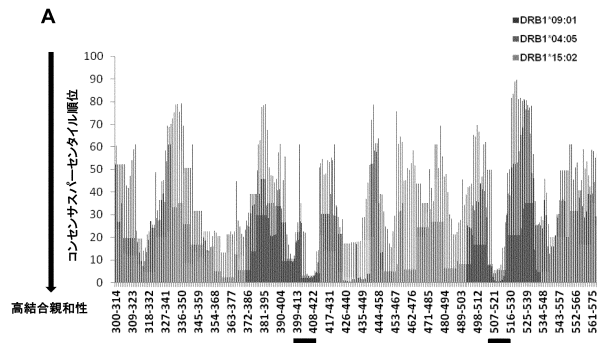
#### 【0214】

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、Th1細胞だけでなく、IMP-3発現細胞に対するCTLも誘導することができる。本発明のそのようなペプチドは、IMP-3に関連する疾患、例えばがん、より詳細には膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、慢性骨髄性白血病、大腸がん、直腸がん、食道がん、びまん性胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、リンパ腫、骨肉腫、卵巣がん、腎臓がん、軟部組織腫瘍、精巣腫瘍およびHNCの治療のためにも有用であり得る。

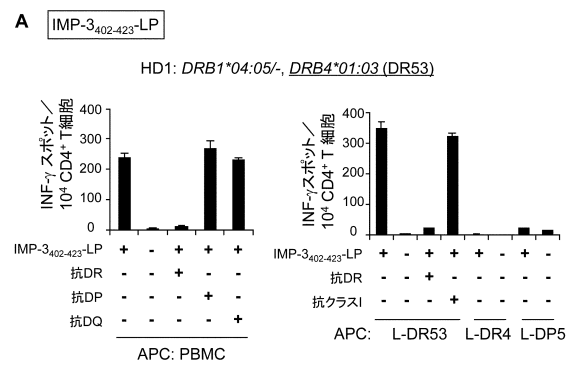
#### 【0215】

本発明を、詳細におよびその特定の態様を参照して本明細書で説明したが、前記説明は本質的に例示的および説明的であり、本発明とその好ましい態様を例証することを意図する。日常的な実験を通して、当業者は、その境域および境界が添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされ得ることを容易に認識するであろう。

【図 1】

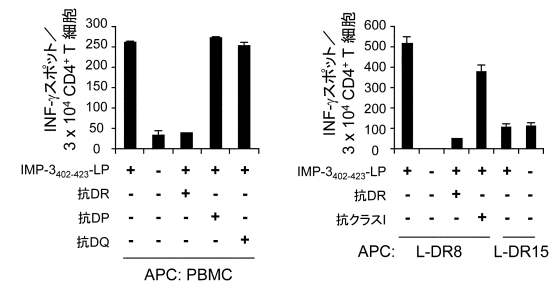


【図 2 A - B】

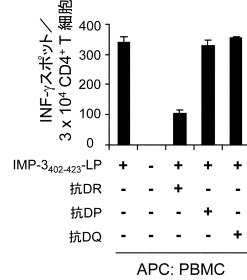
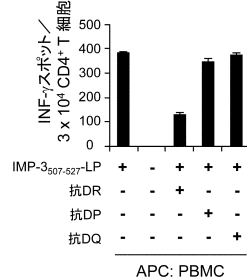


B

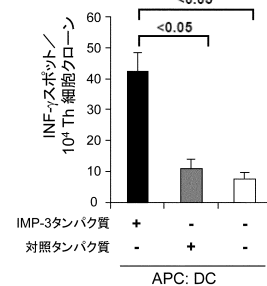
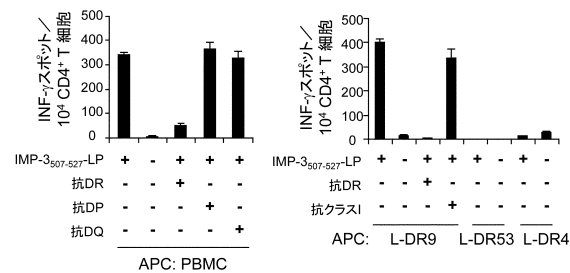
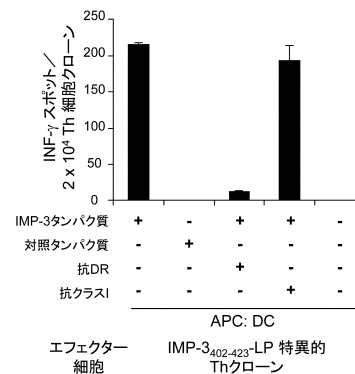
1. IMP-3<sub>402-423</sub>-LP: (QSETETVHLFIPALSVGAIGK) 22mer (配列番号: 1)
  2. IMP-3<sub>507-527</sub>-LP: (GKTVNELQNLSSAEVVPDQ) 21mer (配列番号: 2)
- IMP-3-A24<sub>608-516</sub> IMP-3-A215<sub>523</sub>

B IMP-3<sub>402-423</sub>-LPHD2: *DRB1\*0803/15:02*

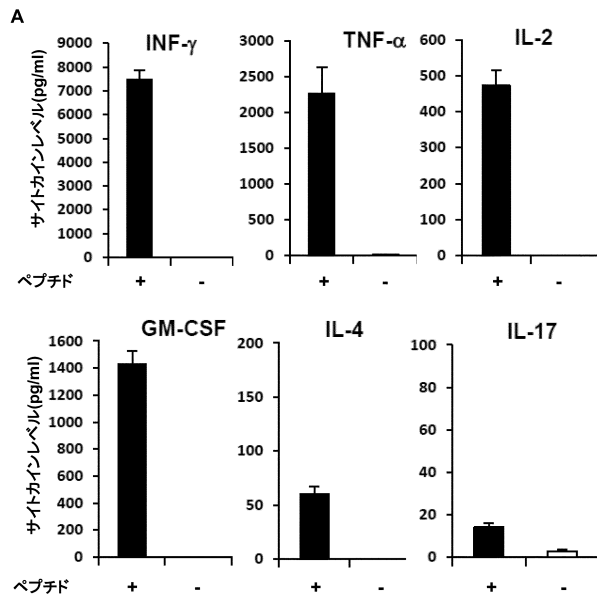
【図 2 C - E】

C IMP-3<sub>402-423</sub>-LPHD3: *DRB1\*0803/14:05*D IMP-3<sub>507-527</sub>-LPHD3: *DRB1\*0803/14:05*

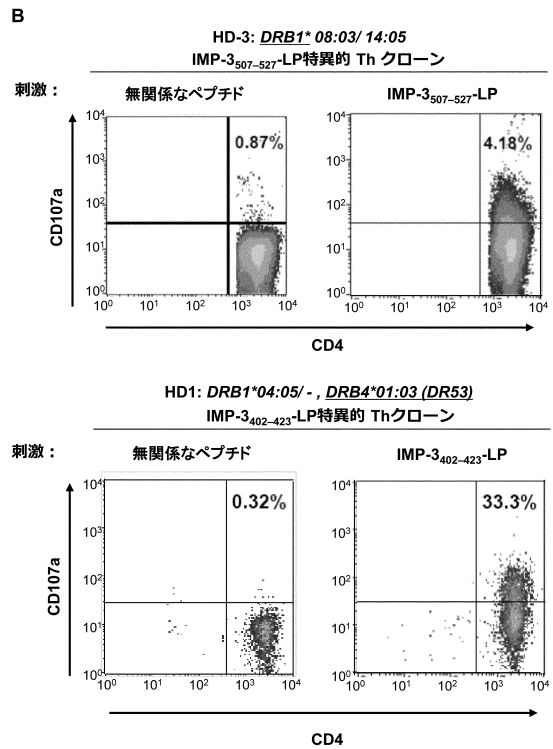
【図 3】

A IMP-3<sub>507-527</sub>-LPHD4: *DRB1\*0901/04:05*E IMP-3<sub>507-527</sub>-LPHD4: *DRB1\*0901/04:05*B IMP-3<sub>402-423</sub>-LPHD1: *DRB1\*04:05*-, *DRB4\*01:03* (DR53)

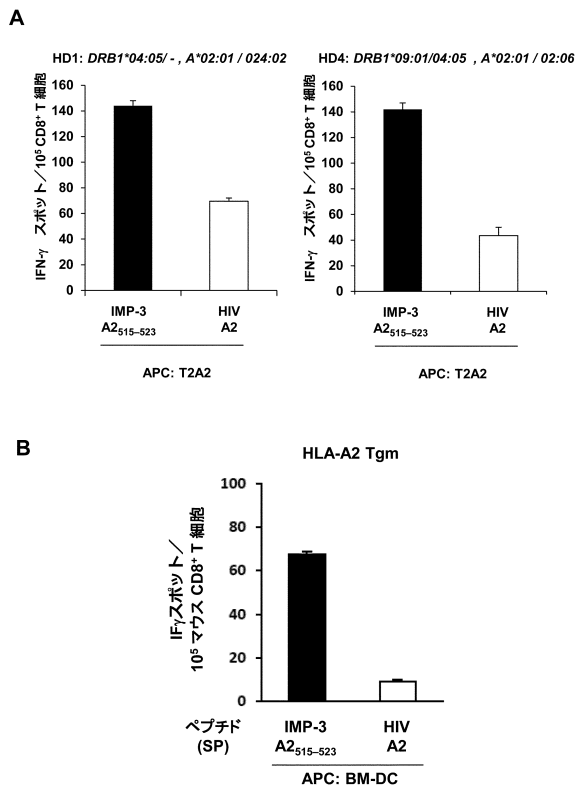
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 5】



【配列表】

0006518921000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 38/17	(2006.01)	A 6 1 K 38/17	
A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K 35/17	A

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 西村 泰治  
熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 富田 雄介  
熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 平山 真敏  
熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 大沢 龍司  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 特表2013-511958(JP,A)  
Major Histocompatibility Complex, 2013年 3月26日, 20(1), p.45-56  
Cancer Sci., 2011年, 102(1), p.71-78  
Cancer Sci., 2007年, 98(11), p.1803-1808

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
C07K 7/00 - 14/825  
C12N 5/078 - 5/10  
A61K 31/7088  
A61K 35/17  
A61K 38/17  
A61P 35/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/REGISTRY(STN)  
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)