

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-533861

(P2022-533861A)

(43)公表日 令和4年7月26日(2022.7.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全96頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-512708(P2022-512708)	(71)出願人	521483261
(86)(22)出願日	令和2年5月4日(2020.5.4)		リチャード ギレム
(85)翻訳文提出日	令和3年12月27日(2021.12.27)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/031357		1 4 ニューヨーク ヴァリック ストリ
(87)国際公開番号	WO2020/227233		ート 1 8 0 スイート 6 6 5 エピヴァ
(87)国際公開日	令和2年11月12日(2020.11.12)		ックス オンコロジー インコーポレイテ
(31)優先権主張番号	62/842,800		ッド内
(32)優先日	令和1年5月3日(2019.5.3)	(71)出願人	521483272
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		スウェイス ランディー エフ
(31)優先権主張番号	62/880,965		アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 3 7
(32)優先日	令和1年7月31日(2019.7.31)		シカゴ サウス エリス アベニュー 5 8
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		0 1 ザ ユニヴァーシティ オブ シカ
(31)優先権主張番号	62/932,651	(71)出願人	521483283
	最終頁に続く		アルディート マシュー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんにおける新抗原

(57)【要約】

本発明は、改善された手法、予後指標、組成物および個別化新生物ワクチンの製造および使用方法を提供する。より詳細には、本開示の実施形態は、生存の推定および被験体特異的ネオエピトープの特定と設計のために新生物特異的新抗原を特定し、さらに前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、判定される、または推定されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、判定される、または推定される当該ネオエピトープを、個別化新生物ワクチンに使用される被験体特異的ネオエピトープから排除することに関する。本開示はさらに、個人化新生物ワクチンに使用する最適な被験体特異的ネオエピトープを決定するための新規の格付けシステムに関する。

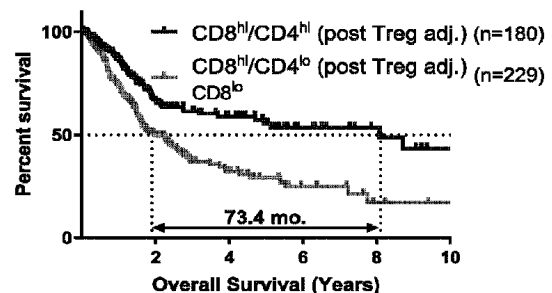


FIG. 6E

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

新生物を有するヒト被験体の死亡リスクを判定するための予後方法であって、被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異の集団を特定すること、特定された新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされたクラスⅠおよび／またはクラスⅡの新抗原を特定すること、前記突然変異によりコードされた新抗原を分析して、エフェクターＴ細胞を関与させる新抗原と調節性Ｔ細胞を関与させるネオエピトープを特定および分類すること、ならびに前記集団の免疫原性から予後スコアを計算することを含む予後方法。

【請求項 2】

エフェクター新抗原または寛容原性新抗原としてのクラスⅠネオエピトープの分類を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

エフェクター新抗原、寛容新抗原または寛容原性新抗原としてのクラスⅠネオエピトープの分類を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

強エフェクター新抗原から強寛容原性新抗原の範囲で等級分けされた尺度に基づくクラスⅠ新抗原の分類を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

エフェクター新抗原または寛容原性新抗原としてのクラスⅡ新抗原の分類を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

エフェクター新抗原、寛容新抗原または寛容原性新抗原としてのクラスⅡ新抗原の分類を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

強エフェクター新抗原から強調節性新抗原の範囲で等級分けされた尺度に基づくクラスⅡ新抗原の分類を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

クラスⅠ新抗原の分類およびクラスⅡ新抗原の分類を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

クラスⅠとクラスⅡの間で交差反応性である新抗原の特定を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

新抗原がエフェクタークラスⅠ新抗原かつ寛容原性クラスⅡ新抗原である、またはエフェクタークラスⅡ新抗原かつ寛容原性クラスⅠ新抗原である、または寛容クラスⅠ新抗原かつ寛容クラスⅡ新抗原である、またはエフェクタークラスⅡ新抗原かつ寛容クラスⅠ新抗原である場合、新抗原を計算から除外することを含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

予後スコアがエフェクター新抗原の上位 50% および寛容原性新抗原の上位 50% に基づいて計算される、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

予後スコアがエフェクター新抗原の上位 20% および寛容原性新抗原の上位 20% に基づいて計算される、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

予後スコアがエフェクター新抗原の上位 5% および寛容原性新抗原の上位 5% に基づいて計算される、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

予後スコアが少なくとも上位 100 種のエフェクター新抗原および少なくとも上位 100

10

20

30

40

50

種の寛容原性新抗原に基づいて計算される、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

T e f f および／または T r e g 細胞に対する結合強度を判定することを含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

T e f f および／または T r e g 細胞に対する結合強度が既知であるか、測定、推定または計算される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

T r e g 細胞に対する結合強度が、I F N γ の生成を阻害する能力により判定される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

T e f f 細胞または T r e g 細胞に対する結合強度が、所定の T e f f および／または T r e g 活性を有する一群の新抗原との比較によって判定される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

新生物特異的突然変異を評価することが、

a) 1 種または複数の M H C 分子に対する突然変異ペプチドの結合スコアを判定すること、ここで前記突然変異ペプチドは前記新生物特異的突然変異の少なくとも 1 種によりコードされる、と、

b) 1 種または複数の M H C 分子に対する非突然変異ペプチドの結合スコアを判定すること、ここで該非突然変異ペプチドは前記新生物特異的突然変異のうちコードされた少なくとも 1 種を除いて突然変異ペプチドと同一である、と、

c) 工程 (a) の突然変異ペプチドと工程 (b) の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて無作為に生成された少なくとも 10,000 のペプチドについて予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位を判定することと、

d) 前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの、T C R 対向アミノ酸残基を決定することと、

e) それを使用して、

1) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 5 パーセンタイル内に該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 10 パーセンタイル未満である場合、または

2) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 5 パーセンタイル内に該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 10 パーセンタイル内に該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも 1 個のミスマッチな T C R 対向アミノ酸が存在する場合に、

予後スコアを計算することと

を含む、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

個別化新生物ワクチン向けに被験体特異的ネオエピトープを特定する方法であって、

i) 被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異を特定することと、

i i) 工程 (i) で特定された新生物特異的突然変異を評価して、個別化新生物ワクチンに使用するための、前記突然変異によりコードされたクラス I とクラス II のネオエピトープを特定すること、ここで前記ネオエピトープは、被験体の M H C タンパク質に結合することが既知である、判定される、または推定される、と

i i i) 調節性 T 細胞を関与させるネオエピトープを寛容または寛容原性として分類し、寛容または寛容原性である当該クラス II ネオエピトープを排除し、かつ寛容原性である当該クラス I ネオエピトープを排除することと

を含む方法。

【請求項 2 1】

工程 (i) において新生物特異的突然変異を特定することが、新生物を有すると診断された被験体からの新生物標本と非新生物標本の間における、完全または部分的ゲノム、エキソムおよび／またはトランスクリプトームの配列差異を特定することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

新生物特異的突然変異を特定することまたは配列差異を特定することが次世代シーケンシング (N G S) を含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

工程 (i) において新生物特異的突然変異を特定することが、非新生物試料中に存在しない変異を各々が含む複数の核酸配列を新生物から選択することを含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

新生物特異的突然変異を特定することまたは配列差異を特定することが、新生物標本のゲノム D N A および／または R N A のシーケンシングを含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記非新生物標本が、新生物を有すると診断された被験体由来である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記新生物特異的突然変異が新生物特異的体細胞突然変異である、請求項 2 0 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

前記新生物特異的体細胞突然変異が、単一ヌクレオチド変異 (S N V) 、インフレーム挿入、インフレーム欠失、アウトオブフレーム挿入およびアウトオブフレーム欠失である、請求項 2 0 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記新生物特異的体細胞突然変異が、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中でコードされたタンパク質の突然変異である、請求項 2 6 または 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

工程 (i i) において新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定されたネオエピトープを特定することが、

30

a) 1 種または複数の M H C 分子に対する突然変異ペプチドの結合スコアを判定すること、ここで前記突然変異ペプチドは前記新生物特異的突然変異の少なくとも 1 種によりコードされる、と、

b) 1 種または複数の M H C 分子に対する非突然変異ペプチドの結合スコアを判定すること、ここで該非突然変異ペプチドは、前記新生物特異的突然変異のうちコードされた少なくとも 1 種を除いて突然変異ペプチドと同一である、と、

c) 工程 (a) の突然変異ペプチドと工程 (b) の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて無作為に生成された少なくとも 1 0 , 0 0 0 のペプチドについて予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位を判定することと、

40

d) 前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの、 T C R 対向アミノ酸残基を決定することと、

e) 1) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 5 パーセンタイル内に該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 1 0 パーセンタイル未満である場合、または

2) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 5 パーセンタイル内に該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 1 0 パーセンタイル内に該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも 1 個のミスマッチな T

50

C R 対向アミノ酸が存在する場合に、
突然変異ペプチドをネオエピトープとして特定することと
を含む、請求項 20～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドがいずれも 9 アミノ酸長である、または突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドがいずれも 10 アミノ酸長である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

MHC クラス II 分子に結合する 9 mer の突然変異ペプチドと 9 mer の非突然変異ペプチドの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 2 位、3 位、5 位、7 位および 8 位におけるものであり、MHC クラス II 分子に結合する 9 mer の突然変異ペプチドと 9 mer の非突然変異ペプチドの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものであり、MHC クラス II 分子に結合する 10 mer の突然変異ペプチドと 10 mer の非突然変異ペプチドの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位におけるものである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

工程 (ii) において新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定されるネオエピトープを特定することがインシリコ試験を含む、請求項 1～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

工程 (ii) で前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定されるネオエピトープを特定するための前記インシリコ試験が、想定上の T 細胞エピトープのタンパク質配列を選別するアルゴリズムの使用を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程 (iii) で調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープを特定することが、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープがヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質と TCR コンタクトを共有するか否かを判定することを含み、ここでヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質と TCR コンタクトを共有すると判定される前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープは、調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープとして特定される、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

MHC クラス II 分子に結合する 9 mer の特定ネオエピトープの TCR コンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 2 位、3 位、5 位、7 位および 8 位におけるものであり、MHC クラス II 分子に結合する 9 mer の特定ネオエピトープの TCR コンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものであり、MHC クラス II 分子に結合する 10 mer の特定ネオエピトープの TCR コンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位におけるものである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程 (iii) で調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープを特定することがインシリコ試験を含む、請求項 1～35 のいずれか

1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記インシリコ試験が、特定ネオエピトープが調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させると推定されるか否かについて調節性細胞との交差反応性を推定するアルゴリズムを使用して分析することを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

特定されたネオエピトープのスコアが所定のカットオフより高ければ、該ネオエピトープは調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（潜在的な宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させると推定される、請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 39】

工程 (iii) において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープを特定することが、特定ネオエピトープが調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することを含む、請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

ネオエピトープが、結果として調節性 T 細胞の活性化、増殖、および／または IL-10 もしくは TGF- β の生成をもたらす場合に前記ネオエピトープは調節性 T 細胞を関与させると判定される、請求項 39 に記載の方法。

20

【請求項 41】

特定ネオエピトープが調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することをさらに含む、請求項 36～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

ネオエピトープが、結果として調節性 T 細胞の活性化、増殖、および／または IL-10 もしくは TGF- β の生成をもたらす場合に調節性 T 細胞を関与させると判定される、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

iv) 前記突然変異によりコードされた少なくとも 1 種の特定ネオエピトープが工程 (iii) で調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、少なくとも 1 種の前記エピトープを含む少なくとも 1 種の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを設計することをさらに含む、請求項 1～42 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 44】

v) 工程 (iv) で設計された少なくとも 1 種のペプチドまたはポリペプチドを提供することあるいは前記ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸をさらに含む、請求項 43 に記載の方法。

40

【請求項 45】

vi) 工程 (v) で提供された少なくとも 1 種のペプチドまたはポリペプチドまたは核酸を含むワクチンを提供すること
をさらに含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

1 種の医薬組成物であって、
被験体において新生物特異的エフェクター T 細胞応答を誘導する 1 種もしくは複数の特定

50

ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチド、または前記複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチドをコードする１種もしくは複数の核酸と、薬学的に許容される補助剤および／もしくは担体とを含み、

１種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチド、または前記複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチドをコードする１種もしくは複数の核酸が、

i) 新生物を有すると診断された被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異を特定することと、

ii) 工程(i)で特定された新生物特異的突然変異を評価して、医薬組成物に使用するための前記突然変異によりコードされたネオエピトープを特定すること、ここで前記ネオエピトープは被験体のMHCタンパク質に結合することが既知である、または判定(例えば推定)される、と、

iii) 工程(ii)で特定された新生物特異的突然変異を分類して、前記突然変異によりコードされ、寛容または寛容原性であるクラスIとクラスIIのネオエピトープを特定し、寛容または寛容原性であるクラスのIIネオエピトープを排除し、寛容原性であるクラスのIネオエピトープを排除することと、

iv) 工程(ii)と工程(iii)での評価に基づき、１種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数のペプチドもしくはポリペプチドを選択する、または前記少なくとも１種のペプチドもしくはポリペプチドをコードする１種もしくは複数の核酸を選択すること

を含むプロセスによって選択される、医薬組成物。

【請求項４７】

工程(i)において新生物特異的突然変異を特定することが、新生物を有すると診断された被験体からの新生物標本と非新生物標本の間における、完全または部分的ゲノム、エキソームおよび／またはトランスクリプトームの配列差異を特定することを含む、請求項４６に記載の医薬組成物。

【請求項４８】

新生物特異的突然変異を特定することまたは配列差異を特定することが次世代シーケンシング(NGS)を含む、請求項４６または４７に記載の医薬組成物。

【請求項４９】

工程(i)において新生物特異的突然変異を特定することが、非新生物試料中に存在しない変異を各々が含む複数の核酸配列を新生物から選択することを含む、請求項４６または４７に記載の医薬組成物。

【請求項５０】

新生物特異的突然変異を特定することまたは配列差異を特定することが、新生物標本のゲノムDNAおよび／またはRNAのシーケンシングを含む、請求項４６または４７に記載の医薬組成物。

【請求項５１】

前記非新生物標本が、新生物を有すると診断された被験体から採取される、請求項４７に記載の医薬組成物。

【請求項５２】

前記新生物特異的突然変異が新生物特異的体細胞突然変異である、請求項４６～５１のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項５３】

前記新生物特異的突然変異が、単一ヌクレオチド変異(SNV)、インフレーム挿入、インフレーム欠失、アウトオブフレーム挿入およびアウトオブフレーム欠失である、請求項４６～５１のいずれか１項に記載の医薬組成物。

【請求項５４】

前記新生物特異的体細胞突然変異が、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中

10

20

30

40

50

で発現したタンパク質の突然変異である、請求項 5 2 または 5 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 5】

工程 (i i) において新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定されるネオエピトープを特定することが、

a) 1 種または複数の M H C 分子に対する突然変異ペプチドの結合スコアを判定すること、ここで前記突然変異ペプチドは前記新生物特異的突然変異の少なくとも 1 種によりコードされる、と、

b) 1 種または複数の M H C 分子に対する非突然変異ペプチドの結合スコアを判定すること、ここで該非突然変異ペプチドは前記新生物特異的突然変異のうちコードされた少なくとも 1 種を除いて突然変異ペプチドと同一である、と、

c) 工程 (a) の突然変異ペプチドと工程 (b) の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて無作為に生成された少なくとも 1 0 , 0 0 0 のペプチドについて予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位を判定することと、

d) 前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの、T C R 対向アミノ酸残基を決定することと、

e) 1) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 5 パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 1 0 パーセンタイル未満である場合、または

2) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 5 パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位 1 0 パーセンタイルに該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも 1 個のミスマッチな T C R 対向アミノ酸が存在する場合に、

突然変異ペプチドをネオエピトープとして特定することと

を含む、請求項 4 6 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドがいずれも 9 アミノ酸長である、または突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドがいずれも 1 0 アミノ酸長である、請求項 5 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

M H C クラス I I 分子に結合する 9 m e r の突然変異ペプチドと 9 m e r の非突然変異ペプチドの T C R 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 2 位、3 位、5 位、7 位および 8 位におけるものであり、M H C クラス I 分子に結合する 9 m e r の突然変異ペプチドと 9 m e r の非突然変異ペプチドの T C R 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものであり、M H C クラス I 分子に結合する 1 0 m e r の突然変異ペプチドと 1 0 m e r の非突然変異ペプチドの T C R 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位におけるものである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

工程 (i i) において新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定されるネオエピトープを特定することがインシリコ試験を含む、請求項 4 7 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5 9】

工程 (i i) で前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定されるネオエピトープを特定するための前記インシリコ試験が、想定上の T 細胞エピトープのタンパク質配列を選別するアルゴリズムの使用を含む、請求項 5 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 0】

前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程 (i i i) で調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞を関与させることが既知である、または判定され

10

20

30

40

50

るネオエピトープを特定することが、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープがプロテオームまたはマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質と T C R コンタクトを共有するか否かを判定することを含み、ここでヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質と T C R コンタクトを共有すると判定される前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープは、調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープとして特定される、請求項 47～59 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 61】

M H C クラス I I 分子に結合する 9 m e r の特定ネオエピトープの T C R コンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 2 位、3 位、5 位、7 位および 8 位におけるものであり、M H C クラス I 分子に結合する 9 m e r の特定ネオエピトープの T C R コンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものであり、M H C クラス I 分子に結合する 10 m e r の特定ネオエピトープの T C R コンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位におけるものである、請求項 60 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 62】

前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程（i i i）で調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープを特定することがインシリコ試験を含む、請求項 47～61 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 63】

前記インシリコ試験が、特定ネオエピトープが調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させると推定されるか否かについて調節性細胞との交差反応性を推定するアルゴリズムを使用して分析することを含む、請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 64】

特定されたネオエピトープのスコアが所定のカットオフより高ければ、該ネオエピトープは調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞を関与させると推定される、請求項 45 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 65】

工程（i i i）において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定されるネオエピトープを特定することが、特定ネオエピトープが調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することを含む、請求項 47～61 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 66】

ネオエピトープが、結果として調節性 T 細胞の活性化、増殖、および／または I L - 10 もしくは T G F - β の生成をもたらす場合に調節性 T 細胞を関与させると判定される、請求項 65 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 67】

特定ネオエピトープが調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することをさらに含む、請求項 62～64 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 68】

ネオエピトープが、結果として調節性 T 細胞の活性化、増殖、および／または I L - 10 もしくは T G F - β の生成をもたらす場合に調節性 T 細胞を関与させると判定される、請

50

求項 67 に記載の医薬組成物。

【請求項 69】

1 種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドが、1 種または複数の特定ネオエピトープを含む少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、少なくとも 5 種、少なくとも 6 種、少なくとも 7 種、少なくとも 8 種、少なくとも 9 種、少なくとも 10 種、少なくとも 11 種、少なくとも 12 種、少なくとも 13 種、少なくとも 14 種、少なくとも 15 種、少なくとも 16 種、少なくとも 17 種、少なくとも 18 種、少なくとも 19 種、または少なくとも 20 種のペプチドまたはポリペプチドを含む、請求項 47～68 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 70】

1 種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドが、1 種または複数の特定ネオエピトープを含む 3～20 種の選択されたペプチドまたはポリペプチドを含む、請求項 47～69 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 71】

1 種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドがそれぞれ 9～100 アミノ酸長を有する、請求項 47～70 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 72】

前記複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードする 1 種または複数の核酸が DNA、RNA、または mRNA である、請求項 47～71 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 73】

医薬組成物が抗免疫抑制剤をさらに含む、請求項 47～72 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 74】

抗免疫抑制剤がチェックポイント遮断調整剤を含む、請求項 73 に記載の医薬組成物。

【請求項 75】

補助剤がポリ ICLC を含む、請求項 47～74 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 76】

新生物が固形腫瘍である、請求項 47～75 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 77】

新生物が膀胱がん、乳がん、脳腫瘍、結腸がん、胃がん、頭頸がん、腎臓がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんまたは精巣がんである、請求項 47～76 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 78】

新生物が膀胱がんである、請求項 47～77 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 79】

MHC クラス II 分子に結合する 9mer の特定ネオエピトープの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて 2 位、3 位、5 位、7 位および 8 位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHC クラス I 分子に結合する 9mer の特定ネオエピトープの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、特定されたネオエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位、1 位、4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位、または 1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものであり、MHC クラス I 分子に結合する 9mer の特定ネオエピトープの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて 1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHC クラス I 分子に結合する 10mer の特定ネオエピトープの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、特定されたネオエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位、1 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位、または 1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位におけるものであり、MHC クラス I 分子に結合する 10mer の特定ネオエピトープの TCR 対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数

10

20

30

40

50

えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである、請求項29に記載の方法。

【請求項80】

MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである、請求項34に記載の方法。

10

【請求項81】

MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCR対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCR対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、特定されたネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCR対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCR対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて、特定されたネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCR対向アミノ酸残基が、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである、請求項57に記載の方法。

20

30

【請求項82】

MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトが、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである、請求項60に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

関連出願および援用

本出願は、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれている、2019年5月3日に提出された米国仮出願連続番号第62/842,800号、2019年7月31日に提出された米国仮出願連続番号第62/880,965号、2019年11月8日に提出された米国仮出願連続番号第62/932,651号、2019年11月8日に提出された米国仮出願連続番号第62/932,654号、および2019年11月18日に提出された米国仮出願連続番号第62/936,654号の優先権を主張するものである。それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれている、2020年2月27日に提出された国際出願連続番号第PCT/US2020/020089号および2019年2月27日に提出された米国仮出願連続番号第62/811,207号が参照される。

10

前述の出願、およびそれらに、またはそれらの実行時に引用されたすべての文献（「出願引用文献」）、および出願引用文献に引用または参照されたすべての文献、および本明細書に引用または参照されたすべての文献（「本明細書引用文献」）、および本明細書引用文献に引用または参照されたすべての文献が、本明細書または参照により本明細書に組み込まれている任意の文献に記載のあらゆる製品についてのあらゆるメーカー取扱説明書、説明書、製品仕様書および製品シートと共に、参照により本明細書に組み込まれており、本発明の実施に採用される。より具体的には、すべての参照文献は、各々の文献が、具体的かつ個々に参照により組み込まれていると示されるのと同程度に参照により組み込まれている。

20

【0002】

本発明の実施形態は、改善された手法、予後指標、組成物および個別化新生物ワクチンの製造および使用方法に関する。より詳細には、本発明の実施形態は、被験体特異的ネオエピトープを特定および設計するために新生物特異的新抗原を特定し、さらに前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）される当該特定ネオエピトープを、個別化新生物ワクチンに使用される被験体特異的ネオエピトープから排除することに関する。

30

【背景技術】

【0003】

アブレーション技法（例えば外科手術、低温治療および熱治療、超音波、高周波ならびに放射線）および化学的技法（例えば医薬品、細胞毒性薬および化学療法薬、モノクローナル抗体ならびにそれらの様々な組合せ）を含む多くのがん治療法が既に存在する。しかし、これらの治療法は、深刻なリスク、有害な副作用および極めて高いコスト、ならびに不確実な効果を伴うことが多い。最近になって、患者自身の免疫系を利用することによって患者のがんを効果的に抑制する精密がん免疫療法の可能性が臨床試験により浮かび上がった。当該精密がん免疫療法は、患者特異的な新生物特異的新抗原プールの特定および使用を含む。しかし、個別化新生物ワクチンを調製するためのいくつかの異なる方法論が採用されてきた一方、近年の複数の研究において、標的新生物を効果的に治療するために強固なCD8⁺およびCD4⁺のエフェクターT細胞応答を確立することの難しさが示されている。この困難は、調節性T細胞によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある、抑制性T細胞ネオエピトープの新抗原系ワクチンへの不用意な包含により、腫瘍細胞に対する効果的な免疫応答が消失することに起因すると考えられる。さらに、TCRコンタクトを自己由来エピトープと共有する抗体由来エピトープを認識するT細胞は、周辺部に放出され得る前に胸腺選択中に除去されるまたはアネルギー性になると考えられる。したがって、これらのT細胞を標的とするワクチン成分は非効果的であると思われる。一方、交差反応性エピトープを標的とするワクチン誘導性免疫応答は、相同性検索によっ

40

50

て特定される交差反応性エピトープの相同体を標的とする不要な自己免疫応答を誘導すると考えられる。結果として、ワクチンの安全性が低下する恐れがある。したがって、他の有害T細胞（自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞、ならびにアネルギー性T細胞を含む）によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある他の有害T細胞ネオエピトープを新抗原系ワクチンに不用意に包含することも、腫瘍細胞に対して無効な免疫応答に繋がる可能性がある。

【0004】

免疫寛容は、抗原提示細胞（APC）、T細胞、B細胞、サイトカイン、ケモカインおよび表面受容体の間での複雑な相互作用によって調節される。髄質上皮細胞が特定の自己タンパク質エピトープを未熟T細胞に発現する最初の自己／非自己識別が、新生児発育時の胸腺に生じる。高親和性の自己抗原を認識するT細胞は除去されるが、適度な親和性の自己反応性T細胞は時々除去を回避し、所謂「天然」調節性T細胞に転換され得る。これらの天然調節性T細胞は周辺部に送出され、潜在的自己免疫応答の制御を補助する。第二の寛容形態は周辺部で発達する。この場合、活性化T細胞がIL-10、TGF-βおよびCCL19など特定の免疫抑制性のサイトカインやケモカインの作用を通じて「順応性」調節性T細胞表現型に転換される。これらの「順応性」調節性T細胞が果たすと考えられる役割の例としては、侵入病原体を一掃した後の免疫応答の抑制、アレルギー反応に起因する過剰な炎症の制御、低レベルまたは慢性の感染に起因する過剰な炎症の制御、または場合により有益共生細菌を標的とする炎症応答の制御が挙げられる。

【0005】

自然発生の調節性T細胞（天然調節性T細胞および順応性調節性T細胞を含む）は、周辺部における免疫調節の重要要素である。例えば、天然調節性T細胞はそれらのTCRを通じて活性化された後、免疫調節性サイトカインやケモカインを発現する。活性化された天然調節性T細胞は、コンタクト依存性および非依存性のメカニズムを通じて近傍のエフェクターT細胞を抑制する可能性がある。加えて、IL-10やTGF-βなどを含むがそれらに限定されない、これらの細胞により放出されるサイトカインは、抗原特異的な順応性調節性T細胞を誘導する能力を有する。しかし、調節性T細胞活性は自己免疫の防止に不可欠であるが、過剰な調節性T細胞機能は腫瘍細胞に対する効果的な免疫応答を消失させる可能性がある（Nishikawa et al., "Regulatory T Cells in Tumor Immunity," *Int. J. Cancer* 127:759-767 (2010)）。実際、調節性T細胞活性の下方調節は、抗がん治療法を改善する有効手段として用いられてきた（Grauer et al., "Elimination of Regulatory T Cells is Essential for an Effective Vaccination with Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells in a Murine Glioma Model," *Int. J. Cancer* 122:1794-1802 (2008); Zhou et al., "Depletion of Endogenous Tumor-Associated Regulatory T Cells Improves the Efficacy of Adoptive Cytotoxic T-Cell Immunotherapy in Murine Acute Myeloid Leukemia," *Blood* 114:3793-3802 (2009)）。したがって、調節性T細胞によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある、抑制性T細胞ネオエピトープの新抗原系ワクチンへの不用意な包含を回避して、腫瘍細胞に対する効果的な免疫応答の消失を防止しなければならない。

【0006】

したがって、改善された手法、組成物および個別化新生物ワクチン製造方法が引き続き必要とされている。より詳細には、手法、組成物、ならびに調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させ、かつ／または誘導することが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）される当該特定ネオエピトープを、個別化新生物ワクチンに使用される被験体特異的なネオエピトープから排除することを含む個別化新生物ワクチン製造方法が引き続き必要とされている。個別化新生物ワクチ

ンに使用される最適な被験体特異的ネオエピトープを決定するための改善された格付けシステムも引き続き必要とされている。

本出願におけるいかなる文献の引用または特定も、当該文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることの容認には当たらない。

【発明の概要】

【0007】

したがって、本発明の実施形態は、新規の手法、予後指標、組成物および個別化新生物ワクチンの製造および使用方法を提供する。

一態様において、本発明は、新生物を有するヒト被験体の死亡リスクを判定する予後方法であって、新生物特異的突然変異を特定すること、ならびに新生物特異的新抗原を評価して、エフェクターT細胞（Teff）機能または調節性T細胞（Treg）機能を促進する新抗原を特定および分類することを含む予後方法を提供する。特定の実施形態において、新抗原は大まかに、i）クラスIおよび／またはクラスIIのMHC結合性新抗原と、ii）免疫原性または寛容原性として分類される。特定の実施形態において、クラスIおよび／またはクラスIIの結合は、新抗原とクラスIおよび／またはクラスIIのMHCとの、計算もしくは測定可能な相互作用強度によって、またはデータベースとの比較によって分類される。特定の実施形態において、新抗原は、免疫原性、寛容可能または寛容原性など一定範囲の機能にわたり、あるいは高免疫原性から高寛容原性までの数値的尺度などの尺度に基づいて分類される。

【0008】

一態様において、該予後方法は、新抗原ワクチンに対する応答に最適な新生物を有する被験体の区別に用いられる。別の一態様において、該予後方法は、新抗原ワクチンと、Treg機能を選択的に阻害する薬剤の同時投与による改善された転帰の恩恵に与ると予想される被験体の特定に用いられる。

したがって、本発明は、新生物を有するヒト被験体の死亡リスクを判定する予後方法と、診断方法、および被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異の集団を特定すること、特定された新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされたクラスIおよび／またはクラスIIの新抗原を分類すること、前記突然変異によりコードされた新抗原を分析して、エフェクターT細胞を関与させる新抗原および調節性T細胞を関与させるネオエピトープを特定および分類すること、ならびに新抗原個体の集団の免疫原性から予後スコアを判定することを含む新抗原ワクチン成分を選択する方法の両方を提供する。特定の実施形態において、該方法はコンピューター上で実施される。

本発明の方法は、任意の所定の患者について、クラスIとクラスIIの新抗原をエフェクター新抗原または寛容原性抗原として分類、順序付けまたは別段に認識する、あるいは任意の新抗原を中間に分類するよう考案されている。本発明はさらに、交差反応性である新抗原、例えばクラスIIのエフェクターとクラスIの寛容原性活性、またはクラスIのエフェクターとクラスIIの寛容原性活性、またはその他、予後もしくは治療の転帰に有害な組合せを有する新抗原を認識するよう考案されている。

【0009】

したがって、本発明の一実施形態において、該方法は、被験体のクラスI新抗原をエフェクター新抗原または寛容原性新抗原として分類することを含む。別の一実施形態において、該方法は、被験体のクラスI新抗原をエフェクター新抗原、寛容新抗原または寛容原性新抗原として分類することを含む。別の一実施形態において、該方法は、被験体のクラスI新抗原を強エフェクター新抗原から強寛容原性新抗原の範囲で等級分けされた尺度に基づいて分類することを含む。

一実施形態において、該方法は、被験体のクラスII新抗原をエフェクター新抗原または寛容原性新抗原として分類することを含む。別の一実施形態において、該方法は、被験体のクラスII新抗原をエフェクター新抗原、寛容新抗原または寛容原性新抗原として分類することを含む。別の一実施形態において、該方法は、被験体のクラスII新抗原を強エフェクター新抗原から強調節性新抗原の範囲で等級分けされた尺度に基づいて分類するこ

とを含む。

特定の実施形態において、該方法は、被験体のクラスⅠ新抗原を分類することおよびクラスⅡ新抗原を分類することを含み、またクラスⅠとクラスⅡの間で交差反応性である被験体新抗原を特定することを含み得る。

【0010】

本発明の当該実施形態では、新抗原がクラスⅠエフェクター新抗原およびクラスⅡ寛容原性新抗原である、またはクラスⅡエフェクター新抗原およびクラスⅠ寛容原性新抗原である、または寛容クラスⅠ新抗原および寛容クラスⅡ抗原である、またはエフェクタークラスⅡ新抗原および寛容クラスⅠ新抗原である場合に、新抗原を予後方法または診断方法から除外してもよい。

特定の実施形態において、予後スコアが、エフェクター新抗原の上位50%および寛容原性新抗原の上位50%、またはエフェクター新抗原の上位40%および寛容原性新抗原の上位40%、またはエフェクター新抗原の上位30%および寛容原性新抗原の上位30%、またはエフェクター新抗原の上位20%および寛容原性新抗原の上位20%、またはエフェクター新抗原の上位10%および寛容原性新抗原の上位10%、またはエフェクター新抗原の上位5%および寛容原性新抗原の上位5%、またはエフェクター新抗原の上位2%および寛容原性新抗原の上位2%、またはエフェクター新抗原の上位1%および寛容原性新抗原の上位1%に基づいて計算される。特定の実施形態において、予後スコアが、少なくとも上位10種のエフェクター新抗原および少なくとも上位10種の寛容原性新抗原、または少なくとも上位25種のエフェクター新抗原および少なくとも上位25種の寛容原性新抗原、または少なくとも上位50種のエフェクター新抗原および少なくとも上位50種の寛容原性新抗原、または少なくとも上位100種のエフェクター新抗原および少なくとも上位100種の寛容原性新抗原に基づいて計算される。

【0011】

特定の実施形態において、該方法は、Teffおよび／またはTreg細胞に対する新抗原の結合強度を判定することを含む。Teffおよび／またはTreg細胞に対する結合強度は既知であるか、測定、推定または計算することができる。特定の実施形態において、該方法は、新抗原の免疫原性を物理化学的方法との比較により、および／または免疫原性が既知である一群の抗原との比較により判定することを含む。特定の実施形態において、被験体における新抗原の活性は、免疫細胞を活性化または阻害するその能力、例えば、独力でまたは他の抗原もしくは新抗原と混合されることによりIFN γ の生成を阻害する能力により判定される。いくつかの実施形態において、Teff細胞またはTreg細胞に対する結合強度は、所定のTeffおよび／またはTreg活性を有する一群の新抗原との比較により判定される。

したがって、本発明は予後および診断のバイオマーカーを提供する。該方法は、被験体における複数の新生物特異的突然変異（ネオエピトープ）を特定し、ネオエピトープを含む新抗原の集団が免疫原性である度合いを判定することが関係する。全体的な免疫原性が高いほど、すなわちエフェクター細胞を刺激する能力が高く調節性細胞を刺激する能力が低いほど、予後が良いことを意味する。

【0012】

別の一態様において、本発明は、個別化新生物ワクチン向けに被験体特異的ネオエピトープを特定する方法であって、i) 新生物を有すると診断された被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異を特定すること、ii) 個別化新生物ワクチンに使用するための、前記突然変異によりコードされたクラスⅠとクラスⅡのネオエピトープであって、被験体のMHCタンパク質に結合することが既知である、判定される、または推定されるネオエピトープを特定すること、およびiii) 前記突然変異によりコードされた工程(i)からの特定ネオエピトープを分類して、寛容または寛容原性であるクラスⅠとクラスⅡのネオエピトープを特定し、寛容または寛容原性である当該クラスⅡネオエピトープと寛容原性である当該クラスⅠネオエピトープを、個別化新生物ワクチンに使用するための被験体特異的ネオエピトープから排除することを含む方法を対象とする。

【0013】

本発明の一態様は、新生物を有すると診断された被験体からの新生物標本と非新生物標本の間における、完全または部分的ゲノム、エキソムおよび／またはトランスクリプトームの配列差異を特定することを含む。複数の態様において、非新生物標本は、新生物を有すると診断された被験体に由来する。さらなる複数の態様において、新生物特異的突然変異の特定または配列差異の特定は、次世代シーケンシング（NGS）を含む。複数の態様において、工程（i）における新生物特異的突然変異の特定は、非新生物試料中に存在しない突然変異を各々が含む複数の核酸配列を新生物から選択することを含む。複数の態様において、新生物特異的突然変異の特定または配列差異の特定は、新生物標本のゲノムDNAおよび／またはRNAのシーケンシングを含む。

10

【0014】

本発明の複数の態様において、新生物特異的突然変異は新生物特異的体細胞突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、単一ヌクレオチド変異（SNV）、挿入と欠失（インフレーム突然変異とフレームシフト突然変異の両方を生じ得る）、およびその他、染色体の逆位、複製、挿入、欠失または転座などを含むがそれらに限定されない大規模転位である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNV、挿入および欠失を含め、非同義突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、挿入と欠失（非同義突然変異の場合もある）および他の大規模転位は、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中でコードされたタンパク質の突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNVを含め、非同義突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNV（非同義突然変異の場合もある）、インデルおよびフレームシフトを含め、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中で発現するタンパク質の突然変異である。

20

【0015】

本発明の複数の態様において、新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されたネオエピトープを特定することは、a) 1種または複数のMHC分子に対する突然変異ペプチドの結合スコアを判定することであって、前記突然変異ペプチドが前記新生物特異的突然変異の少なくとも1種によりコードされること、b) 1種または複数のMHC分子に対する非突然変異ペプチド結合スコアを判定することであって、該非突然変異ペプチドが、前記新生物特異的突然変異のうちコードされた少なくとも1種を除いて該突然変異ペプチドと同一であること、c) 工程（a）の突然変異ペプチドおよび工程（b）の非突然変異ペプチドの両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて、無作為に生成されたペプチドからなる十分に大きな群（例えば少なくとも10,000）について予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位を判定すること、d) 前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの、TCR対向アミノ酸残基を決定すること、およびe) 1) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセンタイル未満である場合、または2) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセンタイルに該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも1個のミスマッチなTCR対向アミノ酸が存在する場合に、突然変異ペプチドをネオエピトープとして特定することを含む。さらなる複数の態様において、1種または複数のMHC分子は、MHCクラスII分子および／またはMHCクラスII分子である。複数の態様において、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドはいずれも9のアミノ酸長である、または突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドはいずれも10のアミノ酸長である。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドのTCR対向ア

30

40

50

ミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する10merの突然変異ペプチドと10merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない）の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定されたネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定されたネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである。

10

20

30

40

50

【0016】

本発明の複数の態様において、新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、インシリコ試験を含む。特定の複数の態様において、工程（ii）における前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定するための前記インシリコ試験は、想定上のT細胞エピトープのタンパク質配列を選別するアルゴリズムの使用を含む。一実施形態において、アルゴリズムはEpiMatrix（登録商標）アルゴリズムを含む。

【0017】

本発明の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープがヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質とTCRコンタクトを共有するかどうかを判定することであって、ヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質とTCRコンタクトを共有すると判定される、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープが、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープとして特定されることを含む。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープの

T C Rコンタクトは、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない）の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、M H CクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのT C Rコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものである。さらなる複数の態様において、M H CクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのT C Rコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、M H CクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのT C Rコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、M H CクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのT C Rコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである。

10

【0018】

本発明の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、インシリコ試験を含む。複数の態様において、インシリコ試験は、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させると推定されるか否かについてJ A N U S M A T R I X（商標）アルゴリズムを使用して分析することを含む。さらなる複数の態様において、特定ネオエピトープは、J A N U S M A T R I X（商標）スコアが2以上（さらなる複数の態様では3以上）であれば、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させると推定される。複数の態様において、該方法は、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することをさらに含む。複数の態様において、ネオエピトープは、結果として調節性T細胞の活性化、増殖、および／またはI L - 1 0もしくはT G F - β の生成をもたらす場合、調節性T細胞を関与させると判定される。

20

30

【0019】

本発明の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することを含む。複数の態様において、ネオエピトープは、結果として調節性T細胞の活性化、増殖、および／またはI L - 1 0もしくはT G F - β の生成をもたらす場合、調節性T細胞を関与させると判定される。

40

【0020】

個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、該方法は、前記ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、前記突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピト

50

ープを含む少なくとも1種の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを設計することをさらに含む。複数の態様において、該方法は、工程(i v)で設計された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチド、あるいは前記ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸を準備することをさらに含む。さらなる複数の態様において、該方法は、v i) 工程(v)で提供された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドまたは核酸を含むワクチンを提供することをさらに含む。

【0021】

別の態様において、本発明は、被験体において新生物特異的エフェクターT細胞応答を誘導する1種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチド、または前記複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチドをコードする1種もしくは複数の核酸と、薬学的に許容される補助剤および／もしくは担体とを含む医薬組成物を提供する。1種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチド、または前記複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチドをコードする1種もしくは複数の核酸は、i) 新生物を有すると診断された被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異を特定すること、i i) 工程(i)で特定された新生物特異的突然変異を評価して、医薬組成物に使用するための前記突然変異によりコードされたネオエピトープであって、被験体のMHCタンパク質に結合することが既知である、または判定(例えば推定)されるネオエピトープを特定すること、i i i) 工程(i i)で前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞(可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む)を関与させることが既知である、または判定(例えば推定)されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞(可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む)を関与させることが既知である、または判定(例えば推定)される当該特定ネオエピトープを、医薬組成物に使用するための被験体特異的ネオエピトープから排除すること、およびi v) 前記ネオエピトープが、工程(i i i)で調節性T細胞および／または他の有害T細胞(可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む)を関与させることが既知である、または判定(例えば推定)されるものとして特定されていないことを前提に、工程(i i)と工程(i i i)での評価に基づき、1種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数のペプチドもしくはポリペプチドを選択する、または前記少なくとも1種のペプチドもしくはポリペプチドをコードする1種もしくは複数の核酸を選択することを含むプロセスによって選択される。

【0022】

本発明の複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定することは、新生物を有すると診断された被験体からの新生物標本と非新生物標本の間における、完全または部分的ゲノム、エキソームおよび／またはトランスクリプトームの配列差異を特定することを含む。複数の態様において、前記非新生物標本は、新生物を有すると診断された被験体から採取される。さらなる複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定することまたは配列差異を特定することは、次世代シーケンシング(NGS)を含む。複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定することは、非新生物試料中に存在しない突然変異を各々が含む複数の核酸配列を新生物から選択することを含む。追加的な複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定することまたは配列差異を特定することは、新生物標本のゲノムDNAおよび／またはRNAのシーケンシングを含む。

【0023】

医薬組成物の複数の態様において、新生物特異的突然変異は新生物特異的体細胞突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、単一ヌクレオチド変異(SNV)、インデル(インフレーム挿入またはインフレーム欠失としても知られる)、またはフレームシフト(アウトオブフレーム挿入またはアウトオブフレーム欠失としても知られる)である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNVを含め、非同義突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNV(非同義突然変異の場

合もある)、インデルおよびフレームシフトを含め、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中でコードされたタンパク質の突然変異である。

【0024】

医薬組成物の複数の態様において、新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定(例えば推定)されるネオエピトープを特定することは、a) 1種または複数のMHC分子に対する突然変異ペプチドの結合スコアを判定することであって、前記突然変異ペプチドが前記新生物特異的突然変異の少なくとも1種によりコードされること、b) 1種または複数のMHC分子に対する非突然変異ペプチドの結合スコアを判定することであって、該非突然変異ペプチドが、前記新生物特異的突然変異のうちコードされた少なくとも1種を除いて突然変異ペプチドと同一であること、c) 工程(a)の突然変異ペプチドと工程(b)の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて無作為に生成された少なくとも10,000のペプチドについて予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位を判定すること、d) 前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの、TCR対向アミノ酸残基を決定すること、およびe) 1) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセンタイル未満である場合、または2) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセンタイルに該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも1個のミスマッチなTCR対向アミノ酸が存在する場合に、突然変異ペプチドをネオエピトープとして特定することを含む。さらなる複数の態様において、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドはいずれも長さ9のアミノ酸である、または突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドはいずれも長さ10のアミノ酸である。複数の態様において、1種または複数のMHC分子は、MHCクラスI分子および/またはMHCクラスII分子である。さらなる複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する10merの突然変異ペプチドと10merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位(例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない)の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるもので

10

20

30

40

50

ある。

【0025】

医薬組成物の複数の態様において、工程（i i）における新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、インシリコ試験を含む。複数の態様において、工程（i i）で前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定するためのインシリコ試験は、想定上のT細胞エピトープのタンパク質配列を選別するアルゴリズムの使用を含む。一実施形態において、アルゴリズムはE p i M a t r i x（登録商標）アルゴリズムを含む。

【0026】

医薬組成物の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程（i i i）で調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープがヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質とTCRコンタクトを共有するかどうかを判定することであって、ヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質とTCRコンタクトを共有すると判定される前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープが、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープとして特定されることを含む。医薬組成物の複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない）の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、MHCクラスIに結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位の残基の任意の組合せにおけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位、1位、4位、5位、6位、7位、8位および9位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。さらなる複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである。

【0027】

医薬組成物の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程（i i i）で調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは

、インシリコ試験を含む。複数の態様において、インシリコ試験は、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させると推定されるか否かについてJANUSMATRIX（商標）アルゴリズムを使用して分析することを含む。さらなる複数の態様において、特定ネオエピトープは、JANUSMATRIX（商標）スコアが2以上（さらなる複数の態様では3以上）であれば、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させると推定される。複数の態様において、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させるか否かがインビトロ判定される。複数の態様において、ネオエピトープは、結果として調節性T細胞の活性化、増殖、および／またはIL-10もしくはTGF- β の生成をもたらす場合、調節性T細胞を関与させると判定される。

10

【0028】

医薬組成物の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、工程(iii)において調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することを含む。複数の態様において、ネオエピトープは、結果として調節性T細胞の活性化、増殖、および／またはIL-10もしくはTGF- β の生成をもたらす場合、調節性T細胞を関与させると判定される。

20

【0029】

医薬組成物の複数の態様において、1種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドは、1種または複数の特定ネオエピトープを含む少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、少なくとも11種、少なくとも12種、少なくとも13種、少なくとも14種、少なくとも15種、少なくとも16種、少なくとも17種、少なくとも18種、少なくとも19種、または少なくとも20種のペプチドまたはポリペプチドを含む。複数の態様において、1種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドは、1種または複数の特定ネオエピトープを含む3～20種の選択されたペプチドまたはポリペプチドを含む。

30

【0030】

本発明の一態様において、共有のネオエピトープを含むワクチンが提供される。TCGA膀胱がんメタノームにおける非同義突然変異(NSM、例えばミスセンス、インデルおよびフレームシフト突然変異)の約99%が個人特有である。しかし、39種の共有NSMがBLCAゲノムの少なくとも1%に認められており、これは既製ワクチンの開発機会をもたらすものである。10種の共有新抗原からなる一群がTCGA BLCA集団の約25%をカバーし、この新抗原の集団を20種の共有新抗原に拡大すると、カバー率はBLCA患者の約3分の1にまで増える。

40

医薬組成物の複数の態様において、1種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドはそれぞれ、9～100アミノ酸長を有する。複数の態様において、1種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドはそれぞれ、9～40アミノ酸長、9～30アミノ酸長、9～25アミノ酸長、9～23アミノ酸長、9～20アミノ酸長、または9～15アミノ酸長を有する。

医薬組成物の複数の態様において、前記複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードする1種または複数の核酸はDNA、RNA、またはmRNAである。

50

【0031】

医薬組成物の複数の態様において、医薬組成物は抗免疫抑制剤をさらに含む。複数の態様において、抗免疫抑制剤は、チェックポイント遮断阻害剤や免疫チェックポイント刺激剤などチェックポイント遮断調整剤を含む。

医薬組成物の複数の態様において、補助剤はポリICLCを含む。

医薬組成物の複数の態様において、新生物は固形腫瘍である。複数の態様において、新生物は膀胱がん、乳がん、脳腫瘍、結腸がん、胃がん、頭頸がん、腎臓がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんまたは精巣がんである。複数の態様において、新生物は膀胱がんである。

【0032】

別の態様において、本発明は、新生物を有するヒト被験体の死亡リスクを判定するための予後方法であって、被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異の集団を特定すること、工程(i)で特定された新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされたクラスIとクラスIIのネオエピトープを特定すること、前記突然変異によりコードされたネオエピトープを分析して、エフェクターT細胞を関与させるネオエピトープと調節性T細胞を関与させるネオエピトープを特定および定量化すること、ならびに前記集団の免疫原性から予後スコアを計算することを含む予後方法を提供する。

上記および追加的な実施形態ならびに本明細書に開示される対象事項の特徴は、本明細書に記載の図および詳細な説明の参照によって明らかとなる。

したがって、本発明の目的は、いかなる既知の製品、プロセスまたは方法についても出願人が権利を留保し、ここに免責事項を開示できるように、いかなる既知の製品、該製品の製造方法または該製品の使用方法を本発明の範囲内に包含しないことである。さらに、本発明は、以前に記述されたいかなる製品、該製品の製造方法または該製品の使用方法についても出願人が権利を留保し、ここに免責事項を開示できるように、USPTO(35 USC § 112、第1項)またはEPO(EPC第83条)の記述および実現可能要件を満たさないいかなる製品、該製品の製造プロセスまたは該製品の使用方法も本発明の範囲内に包含することを意図しないことにも留意されたい。本発明の実践においてはEPC第53(c)条およびEPC規則28の(b)と(c)を遵守することが有利と考えられる。本出願の系統または他の任意の系統または任意の第三者による任意の先行出願において出願人に付与された任意の特許の対象である任意の実施形態を明示的に放棄するあらゆる権利が明示的に留保される。本明細書の内容は一切、約束と解釈してはならない。

【0033】

本開示、特に請求項および／または段落において、「含む(comprises)」、「含まれる(comprised)」、「含んでいる(comprising)」などの用語は、米国特許法においてそれらに帰属する意味を有し得ること、例えば、それらは「含む(includes)」、「含まれる(included)」、「含んでいる(including)」などを意味し得ること、および「本質的に～からなる(consisting essentially of)」や「本質的に～からなる(consists essentially of)」などの用語は、米国特許法においてそれらに帰属する意味を有すること、例えばそれらは明示的に列挙されているわけではない要素を許容するが、先行技術において認められる要素または発明の基本的もしくは新規の特徴に影響を及ぼす要素を排除することに留意されたい。

上述の要約および下記の詳細な説明はいずれも例示であり、主張されたとおりの本開示の付加的説明の提供を意図するものであることを理解されたい。要約および下記の説明はいずれも、要約または説明に記載の特定の特徴に対して本開示の適用範囲を定義または限定することを意図するものではない。

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1枚の図面を含む。本特許または特許出願のカラー図面付き刊行物の写しは、要請があれば、必要な手数料が支払われ次第、当社から提供される。

【0034】

下記の詳細な説明は、例示によって示されるが、本発明を記載の特定の実施形態だけに限

10

20

30

40

50

定することを意図するものではなく、添付図面と併せて理解されるのが最善と考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1A】ネオエピトープの推定。(A) 3種類の分析方法、すなわち腫瘍遺伝子変異量(TMB): クラスIとクラスIIのネオエピトープの分析(NetMHCpan/NetMHCIIPan)、ANCER(商標)ネオエピトープ分析、およびThe Cancer Genome Atlas(TCGA)からの突然変異データを使用する比較による、膀胱がん5年生存推定。(B) 正確性分析。(C) クラスIとクラスIIのネオエピトープの推定値および自己類似ネオエピトープの除外。

10

【図1B】ネオエピトープの推定。(A) 3種類の分析方法、すなわち腫瘍遺伝子変異量(TMB): クラスIとクラスIIのネオエピトープの分析(NetMHCpan/NetMHCIIPan)、ANCER(商標)ネオエピトープ分析、およびThe Cancer Genome Atlas(TCGA)からの突然変異データを使用する比較による、膀胱がん5年生存推定。(B) 正確性分析。(C) クラスIとクラスIIのネオエピトープの推定値および自己類似ネオエピトープの除外。

【図1C】ネオエピトープの推定。(A) 3種類の分析方法、すなわち腫瘍遺伝子変異量(TMB): クラスIとクラスIIのネオエピトープの分析(NetMHCpan/NetMHCIIPan)、ANCER(商標)ネオエピトープ分析、およびThe Cancer Genome Atlas(TCGA)からの突然変異データを使用する比較による、膀胱がん5年生存推定。(B) 正確性分析。(C) クラスIとクラスIIのネオエピトープの推定値および自己類似ネオエピトープの除外。

20

【図2-1】EPIMATRIX(登録商標)を使用してのCD4とCD8のエピトープの正確な特定。CD4 T細胞エピトープークラスIIの推定は、インビトロHLA結合アッセイで前向き試験した場合に74%正確である。IEDB推定は、同一セットのペプチドと対比して試験した場合に54~66%正確である。

【図2-2】EPIMATRIX(登録商標)を使用してのCD4とCD8のエピトープの正確な特定。CD4 T細胞エピトープークラスIIの推定は、インビトロHLA結合アッセイで前向き試験した場合に74%正確である。IEDB推定は、同一セットのペプチドと対比して試験した場合に54~66%正確である。

30

【図3】エピトープはエフェクターまたは調節性のいずれかであり得る。JANUSMATRIX(商標)は、T細胞エピトープを比較し、ネオエピトープペプチド配列を自己類似(免疫抑制性、Treg)および非自己として評価するために開発された免疫情報学ツールである(Moise L. et al., Hum Vaccin Immunother. 2015;11(9):2312-21)。右図に記載のとおり、インシリコ由来のインフルエンザ(H7N9) Tregエピトープは、JANUSMATRIX(商標)由来のTregエピトープ同様、エフェクターペプチドに対するIFN γ 応答を低減させる(Liu R. et al., Hum Vaccin Immunother. 2015 11:9, 2241-2252)。

【図4】CT26自己類似ネオエピトープによるIFN γ 応答の免疫抑制。ANCER(商標)由来のTeffネオエピトープはIFN γ 応答を誘導する一方、JANUSMATRIX(商標)によって特定される自己類似ネオエピトープは応答を5分の1に抑制する。

40

【図5A】13GVAX治療を受けた膵臓病患者におけるクラスIとクラスIIのネオエピトープの分析。(A) ネオエピトープの組成。膵臓がん患者における交差反応性(XR)潜在性が低い、平均および高い、クラスIとクラスIIのネオエピトープの数と頻度。(B) 腫瘍中に認められるMHCクラスIIのエフェクター(Teff)ネオエピトープ対調節性(Treg)ネオエピトープの比は、腫瘍の転帰と関連する。(Teff/Treg)比が高い患者は(Teff/Treg)比が低い患者より無病生存(DFS)期間が長く、この比は腫瘍遺伝子変異量より高感度な推定因子である。

【図5B】13GVAX治療を受けた膵臓病患者におけるクラスIとクラスIIのネオエ

50

ピトープの分析。(A) ネオエピトープの組成。膵臓がん患者における交差反応性 (X R) 潜在性が低い、平均および高い、クラス I とクラス II のネオエピトープの数と頻度。

(B) 腫瘍中に認められる MHC クラス II のエフェクター (T e f f) ネオエピトープ対調節性 (T r e g) ネオエピトープの比は、腫瘍の転帰と関連する。(T e f f / T r e g) 比が高い患者は (T e f f / T r e g) 比が低い患者より無病生存 (D F S) 期間が長く、この比は腫瘍遺伝子変異量より高感度な推定因子である。

【図 6 A】TCGA マーカー分析。(A) 総遺伝子変異量に基づく患者の区別。(B) 原初の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(C) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(D) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と原初の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(E) 「寛容」CD 8 ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と「寛容」CD 4 ネオエピトープを除外した後の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づき、CD 4 寛容エピトープを除外するための高い方のカットオフを使用しての患者の区別。

10

【図 6 B】TCGA マーカー分析。(A) 総遺伝子変異量に基づく患者の区別。(B) 原初の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(C) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(D) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と原初の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(E) 「寛容」CD 8 ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と「寛容」CD 4 ネオエピトープを除外した後の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づき、CD 4 寛容エピトープを除外するための高い方のカットオフを使用しての患者の区別。

20

【図 6 C】TCGA マーカー分析。(A) 総遺伝子変異量に基づく患者の区別。(B) 原初の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(C) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(D) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と原初の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(E) 「寛容」CD 8 ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と「寛容」CD 4 ネオエピトープを除外した後の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づき、CD 4 寛容エピトープを除外するための高い方のカットオフを使用しての患者の区別。

30

【図 6 D】TCGA マーカー分析。(A) 総遺伝子変異量に基づく患者の区別。(B) 原初の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(C) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(D) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と原初の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(E) 「寛容」CD 8 ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と「寛容」CD 4 ネオエピトープを除外した後の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づき、CD 4 寛容エピトープを除外するための高い方のカットオフを使用しての患者の区別。

【図 6 E】TCGA マーカー分析。(A) 総遺伝子変異量に基づく患者の区別。(B) 原初の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(C) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(D) 「寛容」ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と原初の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づく患者の区別。(E) 「寛容」CD 8 ネオエピトープを除外した後の CD 8 ネオエピトープ含有率と「寛容」CD 4 ネオエピトープを除外した後の CD 4 ネオエピトープ含有率に基づき、CD 4 寛容エピトープを除外するための高い方のカットオフを使用しての患者の区別。

40

【図 7 A】患者の層化。(A) 患者の TMB は短期と長期の生存者を顕著に層化する。(B) A N C E R (商標) による CD 8 ネオエピトープ負荷の評価は、膀胱がん患者の層化に役立つ。(C) CD 4 ネオエピトープ負荷の包含は、A N C E R (商標) によるがん患者のさらなる層化に役立つ。(E) CD 4 ネオエピトープの表現型を評価すると、患者の

50

層化がさらに拡充される。

【図 7 B】患者の層化。(A) 患者の TMB は短期と長期の生存者を顕著に層化する。(B) A N C E R (商標) による C D 8 ネオエピトープ負荷の評価は、膀胱がん患者の層化に役立つ。(C) C D 4 ネオエピトープ負荷の包含は、A N C E R (商標) によるがん患者のさらなる層化に役立つ。(E) C D 4 ネオエピトープの表現型を評価すると、患者の層化がさらに拡充される。

【図 7 C】患者の層化。(A) 患者の TMB は短期と長期の生存者を顕著に層化する。(B) A N C E R (商標) による C D 8 ネオエピトープ負荷の評価は、膀胱がん患者の層化に役立つ。(C) C D 4 ネオエピトープ負荷の包含は、A N C E R (商標) によるがん患者のさらなる層化に役立つ。(E) C D 4 ネオエピトープの表現型を評価すると、患者の層化がさらに拡充される。

10

【図 7 D】患者の層化。(A) 患者の TMB は短期と長期の生存者を顕著に層化する。(B) A N C E R (商標) による C D 8 ネオエピトープ負荷の評価は、膀胱がん患者の層化に役立つ。(C) C D 4 ネオエピトープ負荷の包含は、A N C E R (商標) によるがん患者のさらなる層化に役立つ。(E) C D 4 ネオエピトープの表現型を評価すると、患者の層化がさらに拡充される。

【発明を実施するための形態】

【0036】

下記の詳細な説明は、例示によって示されるが、本発明を記載された特定の実施形態だけに限定することを意図するものではなく、添付図面と併せて理解されるのが最善と考えられる。

20

本発明の様々な実施形態の特有の詳細は、特定の態様を例示するために記載されており、本発明の範囲の限定を意図するものではない。当該技術分野の当業者にとっては、添付の請求項において定義される実施形態の範囲から逸脱することなく修正や変更が可能であることが明らかとなる。より具体的には、本発明の実施形態におけるいくつかの態様が本明細書において好適または特に有利として特定される可能性があるが、本発明の実施形態はこれらの好適な態様に限定されないことが予期される。

他に特に規定がなければ、本明細書に用いられているすべての技術用語および科学用語は、本明細書に開示される対象事項が属する技術分野の当業者が一般に理解するものと同様の意味を有する。

30

【0037】

複数の臨床研究において、様々ながん兆候にわたり患者のがんを効果的に制御する個別化がん免疫療法の潜在性を強調してきた一方、近年の複数の研究において、患者のがんに対する強力な C D 8 + および C D 4 + の T 細胞応答を確立することの難しさを示している。本発明者らは、低いがんワクチン性能は総じて、調節性 T 細胞 (T r e g) によって認識されることで T r e g を活性化する可能性のある抑制性 T 細胞ネオエピトープの新抗原系ワクチンへの不用意な包含、および／または他の有害 T 細胞 (自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞、ならびにアネルギー性 T 細胞を含む) によって認識されることで該 T 細胞を活性化する可能性のある他の有害 T 細胞ネオエピトープの新抗原系ワクチンへの不用意な包含に起因すると考えられるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、個別化新生物ワクチンの製造に関して本明細書に開示される手法、組成および方法を用いて、C T 2 6 同種マウスモデルからネオエピトープを特定および選択した。他の個別化ワクチンパイプラインに勝る個別化新生物ワクチンの製造に関して本明細書に開示される手法、組成物および方法の際立った特徴は、C D 4 + および C D 8 + の T 細胞ネオエピトープを推定し、調節性 T 細胞によって認識されることで該 T 細胞を活性化する可能性のあるネオエピトープ、および／または他の有害 T 細胞 (自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞、ならびにアネルギー性 T 細胞を含む) の不用意な包含を特定した後、これを排除する能力である。

40

【0038】

50

最初の一連の実験において、CD4+およびCD8+のネオエピトープをコードする最適に選択されたCT26ネオエピトープワクチン候補を設計し、本明細書に開示される手法と方法に従って格付けした。自己類似の推定調節性T細胞のエピトープと、他の有害T細胞（自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞、ならびにアネルギー性T細胞を含む）によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のあるエピトープを、このプロセスから除外した。

Treg細胞およびネオエピトープワクチン候補の成分の役割に関してさらなる見識を得るため、がん患者治療の転帰とがん患者におけるネオエピトープのレパートリーの間の相関関係を特定する遡及的分析を実施した。初期の分析ではクラスIIネオエピトープに焦点を当て、次いでクラスIネオエピトープを含める形で拡大した。

したがって、クラスIとクラスIIのネオエピトープは現在、免疫原性活性に関して、より精密に分類される。クラスIとクラスIIのネオエピトープは、有利には免疫原性、寛容または寛容原性として格付けされる。さらに、膀胱がん患者におけるクラスIとクラスIIのネオエピトープについて、免疫原性、寛容または寛容原性のネオエピトープの割合を全体的な生存率と比較する遡及的分析を実施すると、より効果的な新抗原ワクチンをもたらすクラスIとクラスIIの区別が明らかとなる。

【0039】

ネオエピトープは、自己との類似性が高いことから、調節性T細胞によって認識される可能性がある。以前、CT26自己類似ネオエピトープ（例えば調節性T細胞によって認識され、調節性T細胞を活性化すると推定されたもの）を、我が最適に設計したネオエピトープワクチンと一緒に、未投薬のBalb/cマウスに同時投与した結果、自己類似ネオエピトープを使用しないワクチン接種と比べ、IFN γ ELISpot応答が5分の1に現象することが判明した。したがって、低いがんワクチン性能は総じて、調節性T細胞によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある、抑制性T細胞ネオエピトープの不用意な包含、および／または他の有害T細胞（自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞、ならびにアネルギー性T細胞を含む）によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある、他の有害T細胞ネオエピトープの新抗原系ワクチンへの不用意な包含に起因すると考えられることが示唆された。

【0040】

調節性T細胞が腫瘍中に存在することは既に十分に知られている一方、これらの結果は、腫瘍由来のネオエピトープが調節性T細胞を腫瘍に導入している可能性があることを示唆するものである。より重要なことには、調節性T細胞駆動性ネオエピトープ、および／または他の有害T細胞（自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞、ならびにアネルギー性T細胞を含む）によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある有害T細胞ネオエピトープを不用意にワクチン製剤に含めると、強力なT細胞介在性腫瘍制御を誘導する努力を阻害する一方で自己免疫応答に繋がる可能性もある。ネオエピトープ、および／または他の有害T細胞（自己免疫応答をもたらすことができる、可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞、ならびにアネルギー性T細胞を含む）によって認識されることで該T細胞を活性化する可能性のある、他の有害T細胞ネオエピトープを誘導する潜在的な調節性T細胞を特定し排除するための新抗原配列の選別（例えば、インシリコ選別ツールを含む特殊ツールの使用）は、費用と所要時間を最小限化しながら、より高品質の新ワクチンを改良および設計する可能性をもたらす。本発明者らは今回、新抗原の分類および膀胱がん患者の遡及的分析により、クラスIとクラスIIの新抗原の組合せの優位性および改善された効果を示す。さらに、クラスIとクラスII両方のMHCに結合する交差反応性新抗原は、ある者に関して免疫原性を有する一方で他者に関して寛容または寛容原性であると考えられる。本発明者らの結果は、交差反応するクラスIとクラスIIの新抗原の識別の改善を可能にするものである。したがって、本発明は、新抗原ワクチンの有効性を改善するほか、予後指標にもなる。

【0041】

したがって、本発明は、改善された手法、組成物および個別化新生物ワクチンの製造および投与方法を対象とする。本発明は、例えば死亡リスクの評価または治療の調節のための予後方法も提供する。より詳細には、本開示の実施形態は、被験体特異的ネオエピトープを特定および設計するために新生物特異的新抗原を特定し、さらに前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）される当該特定ネオエピトープを、個別化新生物ワクチンに使用される被験体特異的ネオエピトープから排除することに関する。さらに、本開示は、個別化新生物ワクチンに使用される被験体特異的ネオエピトープを含む最適なペプチドまたはポリペプチドを判定するための新規の格付けシステムに関する。

10

一実施形態は、個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法であって、i) 新生物を有すると診断された被験体の新生物標本における新生物特異的突然変異を特定すること、ii) 工程(i)で特定された新生物特異的突然変異を評価して、個人化新生物ワクチンに使用する前記突然変異によりコードされたネオエピトープを特定することであって、前記ネオエピトープが被験体のMHCタンパク質に結合することが既知である、または判定（例えば推定）されること、およびiii) 工程(ii)からの前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）される当該特定ネオエピトープを、個別化新生物ワクチンに使用するための被験体特異的ネオエピトープから排除することを含む方法を対象とする。個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、該方法は、iv) 前記突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピトープが工程(iii)で調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、少なくとも1種の前記エピトープを含む少なくとも1種の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを設計することをさらに含む。複数の態様において、該方法は、v) 工程(iv)で設計された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドを提供すること、あるいは前記ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸をさらに含む。さらなる複数の態様において、該方法は、vi) 工程(v)で提供された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドまたは核酸を含むワクチンを提供することをさらに含む。

20

30

【0042】

複数の態様において、個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法は、i) 特定された新生物を有すると診断された被験体の新生物標本からの特定新生物特異的突然変異を評価して、個別化新生物ワクチンに使用するための前記突然変異によりコードされたネオエピトープを特定することであって、前記ネオエピトープが被験体のMHCタンパク質に結合することが既知である、または判定（例えば推定）されること、およびii) 工程(i)からの前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定し、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）される当

40

50

該特定ネオエピトープを、個人化新生物ワクチンに使用するための被験体特異的ネオエピトープから排除することを含む。個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、該方法は、(iii) 前記突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピトープが工程(iii)で調節性T細胞および／または他の有害T細胞(可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアレルギー性T細胞を含む)を関与させることが既知である、または判定(例えば推定)されるものとして特定されていないことを前提に、少なくとも1種の前記エピトープを含む少なくとも1種の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを設計することをさらに含む。複数の態様において、該方法は、(iv) 工程(iii)で設計された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドを提供すること、あるいは前記ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸をさらに含む。さらなる複数の態様において、該方法は、(v) 工程(iv)で提供された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドまたは核酸を含むワクチンを提供することをさらに含む。

10

【0043】

定義

本明細書に用いられている単数形の表記は、文脈が明らかに別の意味を示唆する場合を除き、「少なくとも1種」を含め、複数形を含むと意図される。「または」は「および／または」を意味する。本明細書に用いられている「および／または」および「1種または複数の」という用語は、関連する列挙項目のありとあらゆる組合せを含む。

本明細書に用いられている「約」という用語は、当該技術分野における通常の許容差の範囲内、例えば平均値の2標準偏差の範囲内と理解される。「約」は記載の値の50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%または0.01%以内として理解され得る。文脈から別段に明らかである場合を除き、本明細書に記載の数値はすべて「約」という用語で修飾される。

20

【0044】

本明細書に用いられている「抗原」という用語は、免疫応答を引き起こす任意の物質を指す。複数の態様において、抗原は、抗体またはTリンパ球(T細胞)と特異的に反応する任意の物質に関連する、好ましくはペプチドまたはポリペプチドに関連する。本発明によれば、「抗原」という用語は、少なくとも1種のエピトープを含む任意の分子を含む。好ましくは、抗原は、処理後に任意に、免疫反応を誘導する、好ましくは抗原(抗原を発現する細胞を含む)特有の免疫反応を誘導する分子である。抗原は好ましくは細胞によって生じる、好ましくは、MHC分子の文脈で言えば抗原に対する免疫反応を引き起こす罹患細胞、特にがん細胞を含む細胞を示す抗原によって生じる。抗原は好ましくは、自然発生の抗原と一致する、または自然発生の抗原に由来する生成物である。当該自然発生の抗原は、細胞質、細胞表面または細胞核に由来する可能性のある腫瘍細胞中で発現する、特に主として腫瘍細胞の細胞内でまたは表面抗原として発生するタンパク質またはペプチドなど腫瘍細胞の一部を含む。

30

本明細書に用いられている「生体試料」という用語は、有機体からの組織、細胞または分泌物の任意の試料を指す。

40

【0045】

本明細書に用いられている「含む(comprises)」、「含んでいる(comprising)」、「含んでいる(containing)」および「有している(having)」などの用語は、米国特許法においてそれらに帰属する意味を有し得、「含む(includes)」、「含んでいる(including)」などを意味し得る。同様に、「本質的に～からなる(consisting essentially of)」または「本質的に～からなる(consists essentially of)」なども米国特許法においてそれらに帰属する意味を有し、この用語は制約がなく、列挙されている要素の基本的または新規の特徴が列挙されている要素を超える要素の存在によって変化しない限り、列挙されている要素を超える要素の存在を許容するが、先行技術の実施形態は除く。

50

本明細書に用いられている「対照」という用語は、標準または参照条件を意味する。

本明細書に用いられている「疾患」という用語は、細胞、組織または臓器の通常の機能に損傷を与えるまたは干渉する何らかの状態または障害を意味する。

【0046】

本明細書に用いられている「有効量」という用語は、疾患の症状（例えば新生物／腫瘍）を未治療の患者と比較して改善するために必要な量を意味する。疾患治療のために本発明を実践する場合に使用する活性化合物の有効量は、投与形態、被験体の年齢、体重および全般的健康状態に応じて変動する。究極的には、担当する医師または獣医が適切な量および投薬計画を決定する。当該量は「有効」量と称する。

本明細書に用いられている「断片」という用語は、ポリペプチドまたは核酸分子の一部を指す。この部分は、好ましくは、基準となる核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を含む。断片は5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000以上の分子またはアミノ酸を含んでいてもよい。

【0047】

本明細書に用いられている「免疫応答」という用語は、リンパ球、抗原提示細胞。食細胞、顆粒球、および上記の細胞または肝臓によって生成される可溶性巨大分子（抗体、サイトカインおよび補体を含む）による、結果的に人体に対する選択的損傷、人体の破壊、あるいは人体からのがん性細胞、転移性腫瘍細胞、悪性黒色腫、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織の排除、または自己免疫性もしくは病的炎症の場合は人体からの正常なヒト細胞またはヒト組織の排除に至る協奏作用を指す。

本明細書に用いられている「免疫シナプス」という用語は、細胞表面MHC複合体とTCRの両方に付与されたT細胞エピトープの同時作用によって形成されるタンパク質複合体を意味する。

本明細書に用いられている「単離」という用語は、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはそれらの断片、変種もしくは誘導体が、それに自然に付随する他の生体物質から本質的に取り出された状態、あるいは例えば本発明のポリペプチドを発現させるために遺伝子組換えされた組換え宿主細胞に由来する他の生体物質から本質的に遊離した状態を意味する。

【0048】

本明細書に用いられている「主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）」、「MHC分子」、「MHCタンパク質」または「HLAタンパク質」という用語は、特に、タンパク質抗原のタンパク質分解的切断の結果としてペプチドを結合し、潜在的T細胞エピトープを示し、それらを細胞表面に輸送し、そこから特定の細胞、特に細胞毒性Tリンパ球またはTヘルパー細胞に提示する能力を有するタンパク質を意味するものとして理解されることになる。ゲノム中の主要組織適合性遺伝子複合体は、細胞表面で発現する、内在性および／または外因性の抗原の結合と提示に重要な、したがって免疫学的プロセスの調節に重要な遺伝子生成物を有する遺伝領域を含む。主要組織適合性遺伝子複合体は、異なるタンパク質、すなわちMHCクラスIの分子およびMHCクラスIIの分子をコードする2種の遺伝子の集団に分類される。2種のMHCクラスの分子は別々の抗原源向けに特殊化される。MHCクラスIの分子は、ウイルスタンパク質や腫瘍抗原など内因性合成抗原を提示する。MHCクラスIIの分子は、細菌生成物など外因性の源泉に由来するタンパク質抗原を提示する。2種のMHCクラスの細胞生物学と発現パターンは、これらの異なる役割に適応する。クラスIのMHC分子は重鎖と軽鎖からなり、約8～11個のアミノ酸のペプチド、ただし適切な結合モチーフを有するペプチドの場合は9個または10個のアミノ酸のペプチドを結合し、それを細胞毒性Tリンパ球に提示する能力を有する。クラスIのMHC分子が結合するペプチドは、内因性タンパク質抗原に由来する。クラスIのMHC分子の重鎖は好ましくはHLA-A、HLA-BまたはHLA-Cのモノマーであり、軽鎖はβ-2ミクログロブリンである。クラスIIのMHC分子はα鎖とβ鎖からなり、約1

5～24のアミノ酸のペプチドが適切な結合モチーフを有する場合にこのペプチドを結合し、Tヘルパー細胞に提示する能力を有する。クラスIIのMHC分子が結合するペプチドは通常、外因性タンパク質抗原の細胞外に由来する。 α 鎖と β 鎖は、特にHLA-DR、HLA-DQおよびHLA-DPのモノマーである。

【0049】

本明細書に用いられている「MHC結合モチーフ」という用語は、特定のMHCアレルへの結合を推定する、タンパク質配列におけるアミノ酸のパターンを指す。

本明細書に用いられている「MHCリガンド」という用語は、1種または複数の特定のMHCアレルに結合する能力を有するポリペプチドを意味する。「HLAリガンド」という用語は「MHCリガンド」という用語と区別なく使用可能である。表面にMHC／リガンド複合体を発現する細胞は「抗原提示細胞（APC）」と称する。同様に、本明細書に用いられている「MHC結合ペプチド」は、MHCクラスIおよび／またはMHCクラスIIの分子に結合するペプチドに関連する。MHCクラスI／ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは典型的に8～10アミノ酸長であるが、より長いペプチドまたはより短いペプチドが有効である可能性もある。MHCクラスII／ペプチド複合体の場合、結合ペプチドは典型的に10～25アミノ酸長、特に13～18アミノ酸長であるが、より長いペプチドおよびより短いペプチドが有効である可能性もある。

【0050】

本明細書に用いられている「エピトープ」という用語は、抗原など分子中の抗原決定基、すなわち免疫系によって認識される、例えば特にMHC分子の文脈で提示される場合にT細胞によって認識される、分子の一部または断片を指す。腫瘍抗原などタンパク質のエピトープは、好ましくは前記タンパク質の連続部分または不連続部分を含み、好ましくは5～100アミノ酸長、好ましくは5～50アミノ酸長、より好ましくは8～30アミノ酸長、最も好ましくは10～25アミノ酸長であり、例えばエピトープは好ましくは9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸長または25アミノ酸長であってもよい。特に好ましくは、本発明の文脈におけるエピトープはT細胞エピトープである。

本明細書に用いられている「ポリペプチド」という用語はアミノ酸のポリマーを指し、特定の長さを指すのではない。したがって、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質はポリペプチドの定義の範囲に含まれる。本明細書に用いられているポリペプチドは、組換え細胞および非組換え細胞から単離されると細胞物質を実質的に含まない場合、あるいは化学合成されると化学的前駆体または他の化学物質を含まない場合、「単離」または「精製」された状態にあると言われる。ただし、本開示のポリペプチドは、細胞中で通常は付随せず引き続き「単離」または「精製」された状態にある別のポリペプチド（例えば異種ポリペプチド）に接合、連結または挿入され得る。ポリペプチドを組換え製造する場合、培地を実質的に含まない、例えば培地がポリペプチド調製物の体積に占める割合が約20%未満、約10%未満または約5%未満とすることもできる。

【0051】

本明細書に用いられている「ネオエピトープ」という用語は、正常な非がん性細胞または生殖系細胞などの基準物質には存在しないががん細胞中に認められるT細胞エピトープを指す。これは特に、正常な非がん性細胞または生殖系細胞中に相当するエピトープが認められるが、がん細胞中の1種または複数の突然変異が原因で、ネオエピトープを生じる結果となるほどエピトープの配列が変化するという状況を含む。これは、正常な非がん性細胞または生殖系細胞中にT細胞エピトープは認められないが、がん細胞中の1種または複数の突然変異が原因で、新たなネオエピトープを創出するほど配列が変化するという状況も含む。複数の態様において、本開示の「ネオエピトープ」は、新生物患者／被験体に特有の新生物特異的突然変異によってコードされる可能性があり（例えばがん細胞およびがん細胞が認められる被験体の両方に特異的なエピトープ）、これを本明細書では「被験体

特異的ネオエピトープ」と称する場合もある。複数の態様において、本開示の「ネオエピトープ」は、新生物（例えば膀胱がん）を罹患している被験体集団において被験体の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%または5%超の新生物（例えばがん）細胞中に存在する新生物特異的突然変異によってコードされる可能性があり、これを本明細書では「共有ネオエピトープ」と称する場合もある。複数の態様において、「共有ネオエピトープ」は、新生物（例えば膀胱がん）を罹患している被験体集団において例えば2種以上、3種以上、4種以上、5種以上の被験体に存在する可能性がある。

【0052】

本明細書に用いられている「新抗原」または「新抗原性」という用語は、ゲノムにコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させる新生物特異的突然変異から生じる腫瘍抗原の一区分を意味する。「新抗原」は、被験体特異的ネオエピトープまたは共有ネオエピトープを含む1種または複数のネオエピトープを含み得る。「被験体特異的ネオエピトープ」は、新生物患者／被験体に特有の新生物特異的突然変異（例えばがん細胞およびがん細胞が認められる被験体の両方に特有の突然変異）を意味する。「共有新生物特異的突然変異」は、例えば膀胱がんなど特定種類の新生物を罹患している被験体集団において被験体の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%または5%超における新生物（例えばがん）細胞中に存在する新生物特異的突然変異を意味する。複数の態様において、「共有新生物特異的突然変異」は、例えば膀胱がんなど特定種類の新生物を罹患している被験体集団において例えば2名以上、3名以上、4名以上、5名以上の被験体における新生物（例えばがん）細胞中に存在する新生物特異的突然変異を意味する。

【0053】

本明細書に用いられている「新生物」という用語は、異常な細胞増殖、不適切に低いレベルのアポトーシスまたはこれら両方に起因または帰結する何らかの疾患を指す。新生物は良性、前がん性または悪性となり得る。がんは新生物の一例である。がんの非限定的な例としては、白血病（例えば急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病）、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えばホジキン病、非ホジキン病）、ワルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、および肉腫やがん腫など固形腫瘍（例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、皮脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支がん、腎細胞がん、肝臓がん、胆管がん、絨毛腫、精上皮腫、胎生期がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、子宮がん、精巣がん、肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、上皮がん、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、神経鞘腫、髄膜腫、悪性黒色腫、神経芽腫および網膜芽腫が挙げられる。リンパ増殖性疾患も増殖性疾患と捉えられている。

【0054】

本明細書に用いられている「薬学的に許容される」という用語は、連邦政府または州政府の規制機関により承認されているまたは承認可能である、あるいは米国薬局方または人間を含む動物での使用向けに一般的に認識されている他の薬局方に記載されていることを指す。

本明細書に用いられている「薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤」などの用語は、薬剤と一緒に被験体に投与可能であり、その薬理活性を破壊せず、薬剤の治療量を提供する十分な用量で投与した場合に非毒性である賦形剤、担体または希釈剤を指す。

本明細書に記載の範囲は、その範囲内の値すべての簡略表現であると理解される。例えば、1～25の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25からなる群からの任意の数、複数の数の組合せまたは部分範囲、ならびに前述の整数の間に介在

10

20

30

40

50

するすべての10進値、例えば1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8および1.9を含むと理解される。部分範囲に関しては、範囲の片方の終点から拡大する「入れ子部分範囲」が具体的に予期される。例えば、1～25の例示的な入れ子部分範囲は1～5、1～10、1～15、および1～20を片方向に含む、または25～20、25～15、および25～5を反対方向に含んでいてもよい。

【0055】

本明細書に用いられている「調整性T細胞」または「Treg」などの用語は、細胞間コンタクトや抑制性サイトカイン生成を含む様々な異なるメカニズムを通じ、CD4+および／またはCD8+のエフェクターT細胞（Teff）の誘導、増殖および／またはサイトカイン生成の抑制または下方調節を含む免疫エフェクター機能を抑制するT細胞の下位個体の集団（サブ集団）を意味する。複数の態様において、CD4+Tregは、CD4、CD25およびFoxP3を含むがそれらに限定されない特定の細胞表面マーカーの存在が特徴である。複数の態様において、活性化された後、CD4+調節性T細胞は、IL-10および／またはTGFβを含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。CD4+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBやパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。複数の態様において、CD8+Tregは、CD8、CD25、および活性化された後のFoxP3を含むがそれらに限定されない特定の細胞表面マーカーの存在が特徴である。複数の態様において、活性化された後、調節性CD8+T細胞は、IFNγ、IL-10および／またはTGFβを含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。複数の態様においてCD8+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBおよび／またはパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。

【0056】

本明細書に用いられている「調節性T細胞エピトープ」（Tregitope）は、寛容原性応答を引き起こし（Weber CA et al., (2009), Adv Drug Deliv, 61(11):965-76）、MHC分子に結合する能力を有し、循環している自然発生のTreg（複数の態様において天然Tregおよび／または順応性Tregを含む）を関与させる（すなわち相互作用し活性化させる）「T細胞エピトープ」を指す。複数の態様において、活性化された後、CD4+調節性T細胞は、IL-10および／またはTGFβを含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。CD4+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBやパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。複数の態様において、CD8+Tregは、CD8、CD25、および活性化後のFoxP3を含むがそれらに限定されない特定の細胞表面マーカーの存在が特徴である。複数の態様において、活性化された後、調節性CD8+T細胞は、IFNγ、IL-10および／またはTGFβを含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。複数の態様において、CD8+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBおよび／またはパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。

【0057】

本明細書に用いられている「T細胞エピトープ」という用語は、7～30のアミノ酸長を有し、MHC分子（例えばヒト白血球抗原（HLA）分子）に特異的に結合し特定のT細胞受容体（TCR）と相互作用する能力を有する、MHCリガンドまたはタンパク質決定基を意味する。本明細書に用いられている、T細胞（例えば調節性T細胞および／または、可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞など他の有害T細胞）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるT細胞エピトープ（例えばネオエピトープ、Tregitopeなど）の文脈における「関与させる」または「関与」などの用語は、MHC分子（例えばヒト白血球抗原（HLA）分子

）に結合すると、T細胞エピトープはT細胞のTCRと相互作用しT細胞を活性化させる（アネルギー性T細胞の場合には機能的活性化を含む）能力を有することを意味する。一般的に、T細胞エピトープは線形であり、特異的な三次元的特徴を発現しない。T細胞エピトープは、変性溶媒の存在による影響を受けない。T細胞と相互作用する能力は、インシリコ法によって推定可能である（De Groot AS et al., (1997), AIDS Res Hum Retroviruses, 13(7):539-41; Schafer JR et al., (1998), Vaccine, 16(19):1880-4; De Groot AS et al., (2001), Vaccine, 19(31):4385-95; De Groot A R et al., (2003), Vaccine, 21(27-30):4486-504、これらはすべてそれぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれている）。

【0058】

本明細書に用いられている「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、APCの表面で提示されるMHC／リガンド複合体の特定のレパートリーを関与させる能力のあるT細胞によって発現されるタンパク質複合体を指す。

本明細書に用いられている「ワクチン」という用語は、投与後に免疫応答、特に細胞免疫応答を誘導し、新生物（例えば癌細胞）などの病原体または罹患細胞を認識し攻撃する医薬調製物（医薬組成物）または製品を指す。ワクチンは疾患の予防または治療に使用することができる。したがって、ワクチンは、抗原を含み、ワクチン接種による特異的な防衛物質および保護物質を生成するためにヒトまたは動物に使用される薬剤である。「個人化新生物ワクチン」などの用語は、特定の新生物患者に関係し、また新生物（例えば癌）ワクチンが個々の新生物患者の要求または特別な状況に適応することを意味する。

【0059】

HLA／MHC結合

本発明の複数の態様において、新抗原および自己抗原は免疫提示について評価される。主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）は、順応性免疫系に不可欠な細胞表面タンパク質をコードする一連の密接に連鎖した多型遺伝子を含む、脊椎動物のDNA上の大型遺伝子座である。ヒトMHCはHLA（ヒト白血球抗原）とも称する。新抗原は個別に、インビトロでの結合または一群の単一アレル細胞に対する結合について評価することができる。MHC結合は、ペプチド提示経路全体を既を経た多数の配列の特定を可能にする液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC MS／MS）により、MHCに付帯するペプチドを特定することで判定可能である（Creech et al., 2018, The Role of Mass Spectrometry and Proteogenomics in the Advancement of HLA Epitope Prediction. Proteomics 18(12):e1700259）。Abelinらによって公表されたLC MS／MSデータセットは、16のHLA-AまたはHLA-Bの単一アレル細胞株にわたって溶出された26,000種余りのクラスIペプチドを表す（Abelin et al., 2017, Mass Spectrometry Profiling of HLA-Associated Peptidomes in Mono-allelic Cells Enables More Accurate Epitope Prediction. Immunity 46(2):315-326）。当該溶出ペプチドデータベースは、MHCに結合するペプチドの特定、インシリコ推定の評価、インシリコ推定により特定されたペプチドの選別または格付け、およびインシリコ推定法の改善に有用である。HLA／MHCに対する結合を評価することができる。

【0060】

いくつかの公開インシリコツールが、MHC結合の推定向けに開発されている。NetMHCpan-2.0は、任意のペプチドとMHCクラスIの相互作用の親和性の定量的推定を生成するインシリコツールである。NetMHCpan-2.0は、ヒトのHLA-AとHLA-Bをカバーする大規模な一連の定量的MHC結合データを基に開発された（Hoof I, Peters B, Sidney J, et al. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. Immunogenetics. 2009;61:1-13）。NetMHCpan-3.0は異なるMHC分子に対するバインダーの長さプロファイルの差異を捕捉し、より均一なMHCの試料採取を背景にリガンド特定の改善された正確性に繋がる（Nielsen M, Andreatta M. NetMHCpan-3.0; improved prediction of

10

20

30

40

50

binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med.* 2016;8:33)。NetMHCpan-4.0はインシリコツールのさらなる改良版であり、結合親和性と溶出リガンドのデータを基に開発された (Jurtz V, Paul S, Andreatta M, et al. NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J. Immunol.* 2017;199:3360 LP-3368)。

【0061】

T細胞

T細胞は、様々な免疫応答に介在する最も重要な種類のエフェクター細胞であり、したがって免疫調節の好適な標的とされてきた。T細胞は、それぞれの機能の逆説的性質に基づいて、大まかにTエフェクター (Teff) 細胞とT調節性 (Treg) 細胞に分類できる (Kumar, P. et al., 2018, A Comprehensive Review on the Role of Co-signaling Receptors and Treg Homeostasis in Autoimmunity and Tumor Immunity. *J. Autoimmun.* 95:77)。Foxp3は、Treg細胞に限り発現してTeff細胞では発現しない、系統特異的転写因子である (Josefowicz, S.Z. et al., 2012, Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30:531)。Treg細胞とTeff細胞の間での主な識別要因は、自己抗原に対するそれぞれの親和性である (Jordan, M.S. et al., 2001, Thymic selection of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2:468)。胸腺選択中、自己抗原に対して高親和性のT細胞受容体 (TCR) を発現するT細胞クローンは、陰性選択により除去されるか、またはアネルギー性となる。しかし、胸腺陰性選択は、自己反応性T細胞クローンが陰性選択を避け、周辺部に移動し、自己免疫に寄与するという点で、不完全である。一方、自己抗原に対して中程度の親和性を有するTCRを発現し、Foxp3発現を達成してTregとなるT細胞は陽性選択され、周辺部に移動して周辺部の自己寛容の維持を補助する (Jordan, 2001)。

【0062】

T細胞受容体 (TCR) のレパートリー

T細胞受容体は多様であり、T細胞機能に応じて異なる。Bentzenは、バーコード化されたペプチド-MHC変異体のライブラリーに対するTCRの総体的親和性の測定によって、ペプチド-主要組織適合性遺伝子複合体 (pMHC) のTCR認識を支配し、TCRフィンガープリントを発達させる相互作用を判定する方法を記述している (Bentzen et al., 2018, T cell receptor fingerprinting enables in-depth characterization of the interactions governing recognition of peptide-MHC complexes. *Nature Biotechnology* 36:1191)。Jurtzらは、ペプチド-MHC複合体の認識を支配する相互作用の詳細な特性評価を可能にするT細胞受容体フィンガープリント化の推定方法を開発した (Jurtz et al., 2018, NetTCR: sequence-based prediction of TCR binding to peptide-MHC complexes using convolutional neural networks. doi:10.1101/433706)。別の例では、NetTCRと称する機械学習アプローチが考案され、IEDBと免疫アッセイデータから得られた8,920のTCRβ CDR3配列と91の同源ペプチド標的を基に開発された (Klinger et al., 2015, Multiplex identification of antigen-specific T cell receptors using a combination of immune assays and immune receptor sequencing. *PLoS One* 10, e0141561)。OgishiおよびYotsuyanagiは、特にT細胞によって認識されやすくなる要因となるいくつかの顕著な特徴を示すと予想される免疫優勢エピトープを活用して、レパートリー全体にわたるTCR-エピトープコンタクトの潜在性をモデル化した (Ogishi and Yotsuyanagi, 2019, Quantitative prediction of the landscape of T cell epitope immunogenicity in sequence space. *Front. Immunol.* 10, 827)。

【0063】

新生物特異的突然変異の特定

複数の態様において、新生物特異的突然変異（例えばがん特異的突然変異）を特定する工程は、新生物標本（例えば患者の新生物標本）のゲノムDNAおよび／またはRNAのシーケンシングを含む。複数の態様において、新生物標本は、新生物細胞（例えば腫瘍または癌細胞）を含むまたは含むと予想される、患者から採取した身体試料など、どの試料にも関連する。複数の態様において、身体試料は、血液、新生物試料（例えば原発腫瘍または腫瘍転移／循環腫瘍細胞からの試料）または新生物細胞（例えば腫瘍またはがん細胞）を含む他の試料など、どの組織試料であってもよい。

【0064】

複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定する工程は、新生物標本から得られた配列情報を、体細胞または生殖系組織／細胞など正常な非新生物細胞（例えば非がん細胞）の核酸（例えばDNAまたはRNA）のシーケンシングから得られた配列情報などの参照試料と比較することを含む。複数の態様において、参照試料を新生物患者または別の個人から採取してもよい。複数の態様において、参照試料は、血液または非新生物組織からの試料など、どの組織試料であってもよい。複数の態様において、正常なゲノム生殖系DNAを末梢血単核細胞（PBMC）から採取してもよい。

【0065】

複数の態様において、新生物特異的突然変異は、患者の1種または複数の新生物細胞（例えばがん細胞または腫瘍細胞）に存在するすべての新生物特異的（例えばがん特異的）突然変異を含んでいてもよい、あるいは患者の1種または複数の新生物細胞に存在する新生物特異的突然変異の一部分のみを指すものであってもよい。したがって、本開示は、患者の1種または複数の新生物細胞に存在するすべての新生物特異的突然変異の特定が関係すると考えられる、あるいは患者の1種または複数の新生物細胞に存在する新生物特異的突然変異の一部分のみの特定が関係すると考えられる。複数の態様において、本開示の個人化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法は、本明細書に開示される手法、方法および組成物に含まれる十分な数のネオエピトープを提供する多数の新生物特異的突然変異の特定を可能にする。

【0066】

複数の態様において、突然変異は、新生物標本のゲノム、エキソムおよび／またはトランスクリプトームと非新生物標本のゲノム、エキソムおよび／またはトランスクリプトームの間の配列差異を特定することにより判定可能な、新生物患者（例えばがん患者）の新生物標本における新生物特異的突然変異（例えば体細胞突然変異）である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、体細胞突然変異を含め、新生物標本のゲノムにおいて、好ましくは全ゲノムにおいて判定される。したがって、本開示は、1種または複数の新生物細胞のゲノムの突然変異のすべてまたは一部分、好ましくは全ゲノムを特定することを含むと考えられる。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、体細胞突然変異を含め、新生物標本のエキソムにおいて、好ましくは全エキソムにおいて判定される。したがって、本開示は、1種または複数の新生物細胞のエキソムの突然変異のすべてまたは一部分、好ましくは全エキソムを特定することを含むと考えられる。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、体細胞突然変異を含め、新生物標本のトランスクリプトームにおいて、好ましくは全トランスクリプトームにおいて判定される。したがって、本開示は、1種または複数の新生物細胞のトランスクリプトームの突然変異のすべてまたは一部分、好ましくは全トランスクリプトームを特定することを含むと考えられる。

【0067】

複数の態様において、当該技術分野で既知の任意の適切なシーケンシング法を、「従来型」シーケンシング手法や次世代シーケンシング（NGS）を含むがそれらに限定せず、工程（i）で新生物特異的突然変異を特定するために、本開示に従って用いることができる。「次世代シーケンシング」または「NGS」は、サンガー化学法として知られ

10

20

30

40

50

る「従来型」手法とは対照的に、ゲノム全体を小片に分割することにより全ゲノムに沿って平行に核酸テンプレートを読み取る、すべての高スループットシーケンシング技術を指す。当該技術分野で知られているように、当該NGS技術（大規模並列シーケンシングとしても知られる）は、全ゲノム、全エキソム、全トランスクリプトーム（ゲノムのすべての転写配列）または全メチローム（ゲノムのすべてのメチル化配列）の核酸配列情報を非常に短い期間、例えば1～2週間以内、好ましくは1～7日以内、最も好ましくは24時間以内に提供可能であり、原則として単一細胞シーケンシングアプローチを可能にする。市販のまたは当該技術分野で既知の多重NGSプラットフォームを用いることができる。当該NGS技術／プラットフォームの非限定な例としては、ライゲーションによるシーケンシングアプローチ、イオン半導体シーケンシング、パイロシーケンシング、単一分子シーケンシング技術、単一分子シーケンシング向けのナノ技術、および単一分子シーケンシング向けの電子顕微鏡技術が挙げられるがそれらに限定されない。さらに、複数の態様において、当該技術分野で知られているように、「第三世代シーケンシング」法を、新生物特異的突然変異の判定に用いることができる。複数の態様において、新生物特異的突然変異を、当該技術分野で知られているように、直接タンパク質シーケンシング技法により判定可能である。さらに、複数の態様において、新生物特異的突然変異を、当該技術分野で知られているように、MHCマルチマーを使用して判定可能である。

10

【0068】

したがって、個人化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定する工程は、新生物を有すると診断された被験体からの新生物標本と非新生物標本の間での、完全または部分的ゲノム、エキソムおよび／またはトランスクリプトームの配列差異の特定を含む。複数の態様において、非新生物標本は、新生物を有すると診断された被験体から採取される。さらなる複数の態様において、新生物特異的突然変異の特定または配列差異の特定は、次世代シーケンシング（NGS）を含む。複数の態様において、新生物特異的突然変異を特定する工程は、非新生物試料中に存在しない突然変異を各々が含む複数の核酸配列を新生物から選択することを含む。複数の態様において、新生物特異的突然変異の特定は、新生物標本のゲノムDNAおよび／またはRNAのシーケンシングを含む。

20

【0069】

個人化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、新生物特異的突然変異は新生物特異的体細胞突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、単一ヌクレオチド変異（SNV）、挿入と欠失（インフレーム突然変異とフレームシフト突然変異の両方を生じ得る）、およびその他、染色体の逆位、複製、挿入、欠失または転座などを含むがそれらに限定されない大規模転位である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNV、挿入および欠失を含め、非同義突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、挿入と欠失（非同義突然変異の場合もある）および他の大規模転位は、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中でコードされたタンパク質の突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNVを含め、非同義突然変異である。複数の態様において、新生物特異的突然変異は、SNV（非同義突然変異の場合もある）、インデルおよびフレームシフトを含め、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本中でコードされたタンパク質の突然変異である。

30

40

【0070】

被験体特異的ネオエピトープの特定

個人化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、新生物特異的突然変異を評価して前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定する工程は、インシリコ試験を含む。複数の態様において、インシリコ試験は、妥当性確認済みアルゴリズム（例えばEpiMatrix（登録商標）、netMHCpan、NetMHC、netMHCco

50

ns、SYFPEITHI、HLA__BINDなど、ただしそれらに限定されない)を使用して、どの新生物特異的突然変異が、エピトープ、特に患者のMHCアロタイプに結合し得るネオエピトープを生じるかを推定することを含む。例えば、妥当性確認済みアルゴリズムを使用し、特定された新生物特異的突然変異およびそれぞれの同源天然抗原の生物情報分析を実施して、特定された新生物特異的突然変異のうちどれが、患者のMHCアロタイプに結合し得るネオエピトープを生じるかを推定可能であり、また複数の実施形態において、特定された新生物特異的突然変異のうちどれが、源天然抗原よりも効果的に患者のMHCアロタイプに結合し得るネオエピトープを生じるかを推定可能である。したがって、複数の態様において、新生物を有すると診断された被験体の新生物標本からの特定新生物特異的突然変異を評価して、個人化新生物ワクチンに使用するために前記突然変異によりコードされたネオエピトープを特定することであって、前記ネオエピトープが被験体のMHCタンパク質に結合することが既知である、または判定(例えば推定)されることは、適切に妥当性確認済みのアルゴリズムを使用することを含む。

10

【0071】

複数の態様において、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定(例えば予測)されるネオエピトープを特定するための前記インシリコ試験は、EpiMatrix(登録商標)アルゴリズムを使用することを含む。EpiMatrix(登録商標)は、EpiVaxによって開発された、想定上のT細胞エピトープの存在に関するタンパク質配列の選別に使用される独自のコンピュータプログラムである。このアルゴリズムは、MHC分子に結合する9merおよび10merのペプチドを推定するためのマトリックスを使用する。各マトリックスは、ポケットプロファイル法と同一ではないが同様の方法により解明される、アミノ酸結合親和性に関連する位置特異的係数に基づく(Sturniolo, T. et al., Nat. Biotechnol., 17:555-561, 1999)。入力配列は、各フレームの末端でそれぞれ8個または9個のアミノ酸が重なる9merまたは10merのフレームへとパースされる。したがって、複数の態様において、工程(a)からの突然変異ペプチドと工程(b)からの非突然変異ペプチドの入力配列が、各フレームの末端でそれぞれ8個または9個のアミノ酸が重なる9merまたは10merのフレームへとパースされる。次いで工程(a)からの突然変異ペプチドと工程(b)からの非突然変異ペプチドから生成されるフレームそれぞれに、MHCクラスIIアレル(例えばHLA-AやHLA-Bのアレル、ただしそれらに限定されない)およびMHCクラスIIアレル(例えばHLA-DRB1アレル、ただしそれらに限定されない)に関して推定される結合親和性を表すスコアが付与される。EpiMatrix(登録商標)の原スコアは、無作為に生成されたペプチド(例えば10,000の無作為に生成されたペプチド、ただしそれらに限定されない)からなる大型サンプルのスコアと対比して正規化される。結果的な「Z」スコアは正規分布であり、アレル全体で直接比較可能である。結果的な「Z」スコアが報告される。複数の態様において、任意の9merまたは10merのペプチドのアレル特異的なEpiMatrix(登録商標)Zスコアが理論上、任意の所定のサンプルの上位5%(例えばEpiMatrix(登録商標)Zスコアが1.64を超える)である場合、想定上のT細胞エピトープと見なされる。複数の態様において、EpiMatrix(登録商標)は、1)突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセントに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセント未満である場合、または2)突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセントに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセントに該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも1個のミスマッチな、TCR対向アミノ酸が存在する場合、突然変異ペプチドをネオエピトープとして特定する。以前の複数の研究でも、EpiMatrix(登録商標)は公表されているMHCリガンドおよびT細胞エピトープを正確に推定することを実証している。

20

30

40

【0072】

予後方法および個人化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法

50

の複数の態様において、新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、
a) 前記突然変異ペプチドの結合スコアを判定する工程であって、1種または複数のMHC分子に結合する突然変異ペプチドが前記新生物特異的突然変異の少なくとも1種によってコードされる、工程

b) 1種または複数のMHC分子に対する非突然変異ペプチドの結合スコアを判定する工程であって、非突然変異ペプチドが、前記新生物特異的突然変異のうちコードされた少なくとも1種を除き突然変異ペプチドと同一である、工程

c) 工程(a)の突然変異ペプチドと工程(b)の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて、無作為に生成されたペプチドからなる十分に大きなセット（例えば少なくとも10,000）について予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位を判定する工程、

d) 前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの、TCR対向アミノ酸残基を決定する工程、および

e) 1) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセンタイル未満である場合、または2) 突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位5パーセンタイルに該当し、非突然変異ペプチドの結合スコア判定結果が予想分布の上位10パーセンタイルに該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも1個のミスマッチな、TCR対向アミノ酸が存在する場合に、突然変異ペプチドをネオエピトープとして特定する工程、

の1つまたは複数を含む。

さらなる複数の態様において、1種または複数のMHC分子は、MHCクラスI分子および／またはMHCクラスII分子である。

【0073】

本発明の複数の態様において、新生物特異的突然変異を評価して、前記突然変異によりコードされた、既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定する工程は、インビトロ試験を含む。より詳細には、工程(a)の突然変異ペプチドと工程(b)の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを判定することは、1種または複数のMHC分子に対する突然変異ペプチドの結合スコアを判定し、1種または複数のMHC分子に対する非突然変異ペプチドの結合スコアを判定する、（当該技術分野で知られているような）インビトロMHC結合アッセイを含んでいてもよい。複数の態様において、インシリコ分析と同様に、入力された配列は、各フレームの終端でそれぞれ8個または9個のアミノ酸が重なる9merまたは10merのフレームへとパースされる。したがって、複数の態様において、工程(a)からの突然変異ペプチドと工程(b)からの非突然変異ペプチドの入力配列が、各フレームの終端でそれぞれ8個または9個のアミノ酸が重なる9merまたは10merのフレームへとパースされる。次いで工程(a)からの突然変異ペプチドと工程(b)からの非突然変異ペプチドから生成されるフレームそれぞれに、MHCクラスIIアレル（例えばHLA-AやHLA-Bのアレル、ただしそれらに限定されない）に関する結合親和性を表す、当該技術分野で知られているようなインビトロ結合アッセイでのスコアが付与される。MHCクラスIIアレル（例えばHLA-DRB1アレル、ただしそれらに限定されない）に結合するエピトープのインビトロ結合アッセイでの試験の場合、入力配列は、各フレームの終端でそれぞれ5個または10個のアミノ酸が重なる15merまたは20merのフレームへとパースされる。したがって、複数の態様において、工程(a)からの突然変異ペプチドと工程(b)からの非突然変異ペプチドの入力配列が、各フレームの終端でそれぞれ5個または10個のアミノ酸が重なる15merまたは20merのフレームへとパースされる。次いで工程(a)からの突然変異ペプチドと工程(b)からの非突然変異ペプチドから生成されるフレームそれぞれに、MHCクラスIIアレル（例えばHLA-DRB1アレル、ただしそれらに限定されない）に関する結合親和性を表す、当該技術分野で知られているようなインビトロ結合アッセイでのスコア

10

20

30

40

50

が付与される。

【0074】

本発明の複数の態様において、工程（a）の突然変異ペプチドと工程（b）の非突然変異ペプチド両方の結合スコアを、自然に観察されるアミノ酸頻度を用いて、無作為に生成されたペプチドからなる十分に大きな群（例えば少なくとも10,000）について予想される結合スコア分布と比較した場合のパーセンタイル順位、すなわち原結合スコアを判定する工程は、インシリコ法またはインビトロ法のどちらによる判定かを問わず、正規分布またはZ分布に適合するよう調整される。原結合スコアは、下記のとおり、UniProtKB/Swiss-Protからの自然に観察されるアミノ酸頻度に従って、多数の（例えば10,000）無作為の9merまたは10merのアミノ酸配列のセットにおける平均（ μ ）結合スコアと標準偏差（ σ ）に基づいて正規化される。

10

【数1】

$$\text{正規化結合スコア} = \frac{\text{原結合スコア} - \mu}{\sigma}$$

【0075】

正規化結合スコアは、結合スコアまたは結合確率と称する場合もあり、この正規分布の上位5%が「ヒット」と定義され、ヒットは潜在的に免疫原性であり、さらなる検討に値する。これらのペプチドは、親和性が中程度～高いMHC分子に結合する有意な可能性を有することから、樹状細胞またはマクロファージなど専門的抗原提示細胞（APC）、なら

20

【0076】

複数の態様において、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドはいずれも9アミノ酸長である、または突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドはいずれも10アミノ酸長である。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない）の残基の任意の組合せにおけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。複数の態様において、

30

40

50

MHCクラスI分子に結合する10merの突然変異ペプチドと10merの非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。

【0077】

個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法、特に既知である、または判定（例えば推定）される被験体特異的突然変異を評価する方法の複数の態様において、特定されたネオエピトープをさらに、ペプチド-MHC結合の実験的妥当性確認、CD8+および／またはCD4+のT細胞の活性化、および／またはRNAレベルでの遺伝子発現の確認によって確認することができる。当該実験的妥当性確認は、当該技術分野で知られているようなインビトロおよび／またはインビボの技法を含んでいてもよい。

10

【0078】

調節性T細胞および／または他の有害T細胞を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープの特定および排除
前述のとおり、本明細書に開示されるデータは、腫瘍由来のネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を腫瘍に導入していると考えられることを示唆するものである。したがって、調節性T細胞駆動性ネオエピトープおよび／または他の有害T細胞駆動性ネオエピトープ（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を不用意にワクチン製剤に含めると、強力なT細胞介在性腫瘍制御を誘導する努力を阻害する可能性がある。潜在的な調節性T細胞誘導性ネオエピトープおよび／または他の有害T細胞誘導性ネオエピトープを特定および排除するための新抗原配列を選別すること（インシリコ選別ツールを含む特殊ツールを使用）は、より高品質の新ワクチンを設計する上で極めて重要であると考えられる。

20

【0079】

したがって、個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定することは、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープがヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質とTCRコンタクトを共有するかどうかを判定することであって、ヒトプロテオームまたはヒトマイクロバイオームのいずれかに由来するタンパク質とTCRコンタクトを共有すると判定される、前記突然変異によりコードされた前記特定ネオエピトープが、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープとして特定することを含む。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープのTCRコンタクトは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、

30

40

50

5 位、7 位および 8 位、2 位、3 位、5 位および 7 位などを含むがそれらに限定されない) の残基の任意の組合せにおけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。複数の態様において、MHC クラス I 分子に結合する 9 mer の突然変異ペプチドと 9 mer の非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの TCR 対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位、1 位、4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位、または 1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。複数の態様において、MHC クラス I 分子に結合する 10 mer の突然変異ペプチドと 10 mer の非突然変異ペプチドにおける前記突然変異ペプチドと前記非突然変異ペプチドの TCR 対向アミノ酸残基を決定する工程は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの 1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位の残基の任意の組合せにおけるものであるアミノ酸残基を特定することを含む。

10

【0080】

複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定する工程は、MHC に結合する高い確率を示す個別の特定されたネオエピトープまたはエピトープの配列に関する相同性選別を実施して、コードされた MHC クラス I および MHC クラス II 拘束性の特定ネオエピトープとそれらに対応する非突然変異エピトープそれぞれの自己との類似性の度合いを特性評価することを含む。MHC クラス I または MHC クラス II のネオエピトープおよび MHC クラス I または MHC クラス II の対応する非突然変異エピトープは、参照プロテオームにおいて 2 種以上（およびさらなる複数の態様において 3 種以上）の交差反応性マッチを有する場合、高い自己との類似性を示すものとして分類され、寛容される確率あるいは調節性 T 細胞および／または他の有害 T 細胞（可能性のある宿主交差反応性を有する T 細胞および／またはアネルギー性 T 細胞を含む）を関与させる確率がより高いと見なされる。

20

【0081】

複数の態様において、相同性選別は、参照プロテオームにおいて一般的に認められる TCR 対向残基の組合せを含むエピトープを排除するために用いられる。複数の態様において相同性選別は、所定のタンパク質中に含まれるすべての推定されるエピトープを分析し、推定される個別のエピトープを MHC 結合アグレトープと TCR 結合エピトープ両方の成分アミノ酸含有率に分割することを含む。複数の態様において、MHC クラス II 分子に結合する 9 mer の特定ネオエピトープまたはエピトープの TCR 結合エピトープ（TCR 結合残基、TCR 対向エピトープ、TCR 対向残基または TCR コンタクトと称することができる）は、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの 2 位、3 位、5 位、7 位および 8 位におけるものである一方、MHC クラス II 分子に結合する 9 mer の特定ネオエピトープまたはエピトープの MHC 結合アグレトープ（MHC コンタクト、MHC 対向残基、MHC 結合残基または MHC 結合面と称することができる）は、アミノ末端から数えて、1 位、4 位、6 位および 9 位におけるものである。複数の態様において、MHC クラス I 分子に結合する 9 mer の特定ネオエピトープまたはエピトープの TCR 結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位および 8 位におけるものである一方、MHC クラス I 分子に結合する 9 mer の特定ネオエピトープまたはエピトープの MHC 結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、1 位、2 位、3 位および 9 位におけるものである。複数の態様において、MHC クラス I 分子に結合する 10 mer の特定ネオエピトープまたはエピトープの TCR 結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの 4 位、5 位、6 位、7 位、8 位および 9 位におけるものである一方、MHC クラス I 分子に結合する 10 mer の特定ネオエピトープまたはエピトープの MHC 結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、1 位、2 位、3 位、9 位および 10 位におけるものである。複数の態

30

40

50

様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない）の残基の任意の組合せにおけるものである一方、9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレートープは、アミノ末端から数えて、TCR対向残基に対する補完面である。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものである一方、9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレートープは、アミノ末端から数えて、TCR対向残基に対する補完面である。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである一方、10merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレートープは、アミノ末端から数えて、TCR対向残基に対する補完面である。

10

【0082】

次いで、各配列はタンパク質データベース（例えばUniProtデータベース（UniProt Proteome ID UP000005640、Reviewed/Swiss-Protセット）に由来するヒトタンパク質データベース）と対比して選別される。交差保存性エピトープ、または互換性のあるMHC結合アグレートープ（すなわち入力（突然変異）ペプチドとその参照非突然変異カウンターパート両方のアグレートープが同じMHCアレルに結合すると推定される）を有する参照プロテオームに由来するエピトープ、および全く同一のTCR対向エピトープが返される。エピトープの相同性スコアは、参照プロテオームの範囲内でマッチする交差保存性MHC結合ペプチドの数に相当する。言い換えれば、エピトープeの相同性スコア H_e は下記のとおり計算される。

20

$$H_e = |X_e|$$

式中、

X_e はエピトープeと同じMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性であり、エピトープeと同一のTCR対向エピトープを提示する、参照プロテオームに由来する一連のMHC結合エピトープを表す。

30

【0083】

延長線上で考えると、所定のペプチドまたはタンパク質の相同性スコアは、該ペプチドまたはタンパク質と共に含有される個別のエピトープの平均相同性スコアに相当する。言い換えれば、ペプチドpの相同性スコア H_p は下記のとおり計算される。

【数2】

$$H_p = \frac{\sum_{e \in E} H_e}{|E|}$$

40

式中、

Eはペプチドpの範囲内の一連のMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性エピトープを表し、

H_e は上記の定義のとおり、エピトープeの相同性スコアを表す。

【0084】

複数の態様において、分析手順は次に各突然変異配列について実行され、アミノ酸配列内にサブストリングが認められ、結果として

該サブストリングにおいて少なくとも1種のMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性エピトープがコードされ、かつ

該サブストリングにおいてコードされたMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性ネ

50

オエピトープがすべて、参照プロテオームにおける２種以下の交差反応性マッチを有し、かつ

該サブストリングにおいてコードされたMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性エピトープがすべて、参照プロテオームにおける２種以下の交差反応性マッチを有するとなるかどうかを判定する。

【0085】

この分析手順は、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させる想定上のエピトープおよび他の高交差保存性エピトープを含むアミノ酸サブストリングを、特定されたネオエピトープ配列から排除する効果を有する。結果的な配列は、自己配列との低い類似性を示すエピトープまたはネオエピトープのみ含むことになる。上記の基準にマッチするサブストリングが認められない場合、ネオエピトープ配列は個人化新生物特異的ワクチンにおける使用の検討から除外される。逆に、同じ相同性分析を、免疫原性であることが知られている、例えばIEDBデータベースから抽出される一連の既知の感染性疾患由来のエピトープと対比して、あるいは一連の他の免疫原性配列または共通の病原体由来の配列と対比して実行することができる。この分析は、他の既知である、または想定上のエフェクターT細胞エピトープとの高度な相同性を共有するネオエピトープ候補を特定するという目的を有する。当該ネオエピトープを含む新抗原は、ワクチン製剤において優先され得る。

10

【0086】

個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定する工程は、インシリコ試験を含む。複数の態様において、インシリコ試験は、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させると推定されるか否かについてJANUSMATRIX（商標）アルゴリズムを使用して分析することを含む。JANUSMATRIX（商標）は、線形ペプチド断片ではなくゲノム配列全体にわたり想定上のT細胞エピトープとそれらのTCR対向残基を比較することで、原初の配列アラインメントでは捕捉されない抗原認識の様々な側面を考察する、相同性分析ツールである。複数の態様において、JANUSMATRIX（商標）は、エピトープを9merフレームおよび／または10merフレームへとパースし、各9merと10merをMHC結合アグレトープとTCR結合エピトープに分割する。複数の態様において、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープ（TCR結合残基、TCR対向エピトープ、TCR対向残基またはTCRコンタクトと称することができる）は、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープの2位、3位、5位、7位および8位におけるものである一方、MHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレトープ（MHCコンタクト、MHC対向残基、MHC結合残基またはMHC結合面と称することができる）は、アミノ末端から数えて、1位、4位、6位および9位におけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの4位、5位、6位、7位および8位におけるものである一方、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、1位、2位、3位および9位におけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである一方、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープま

20

30

40

50

たはエピトープのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、1位、2位、3位、9位および10位におけるものである。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの2位、3位、5位、7位および8位（例えば3位、5位、7位および8位、2位、5位、7位および8位、2位、3位、5位および7位などを含むがそれらに限定されない）の残基の任意の組合せにおけるものである一方、9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、TCR対向残基に対する補完面である。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの4位、5位、6位、7位および8位、1位、4位、5位、6位、7位および8位、または1位、3位、4位、5位、6位、7位および8位におけるものである一方、9merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、TCR対向残基に対する補完面である。複数の態様において、MHCクラスI分子に結合する10merの特定ネオエピトープまたはエピトープのTCR結合エピトープは、アミノ末端から数えて、特定ネオエピトープまたはエピトープの1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位および9位の残基の任意の組合せにおけるものである一方、10merの特定ネオエピトープまたはエピトープのMHC結合アグレトープは、アミノ末端から数えて、TCR対向残基に対する補完面である。JANUSMATRIX（商標）は次に、腸マイクロバイーム（例えばヒト腸マイクロバイーム）を構成する細菌性およびウイルス性の生物、ゲノム（例えばヒトゲノム）からの自己タンパク質、ならびにウイルス性および細菌性の病原体（例えばヒトウイルス性およびヒト細菌性の病原体）からのタンパク質配列を含む、ツールにプリロード済みの、任意の数の大規模配列データベースにわたって、潜在的に交差反応性のTCR対向エピトープを検索する。JANUSMATRIX（商標）は9merおよび／または10merの検索に焦点を当てるが、これは異なる長さのペプチドがMHCと相互作用するものの、ほとんどのT細胞エピトープを、ペプチドがより長くても、どの所定のペプチドにおける少なくとも9または10のアミノ酸に対してマッピング可能であるからである。さらなる複数の態様において、特定されたネオエピトープは、出力されるJANUSMATRIX（商標）スコアが2以上（さらなる複数の態様では3以上）であれば、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（潜在的な宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させると推定される。

10

20

30

40

50

【0087】

複数の態様において、該方法は、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させるか否かをインピットで判定することをさらに含む。複数の態様において、ネオエピトープは、結果として調節性T細胞の活性化、増殖、および／またはIL-10もしくはTGF- β の生成をもたらす場合、調節性T細胞を関与させると判定される。前述のとおり、複数の態様において、活性化された後、CD4+調節性T細胞は、IL-10および／またはTGF- β を含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。CD4+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBやパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。複数の態様において、CD8+Tregは、CD8、CD25、および活性化後のFoxP3を含むがそれらに限定されない特定の細胞表面マーカーの存在が特徴である。複数の態様において、活性化された後、調節性CD8+T細胞は、IFN γ 、IL-10および／またはTGF- β を含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。複数の態様において、活性化された後、CD8+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBおよび／またはパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。

【0088】

個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、前記突然変異によりコードされた特定ネオエピトープを評価して、調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるネオエピトープを特定する工程は、特定ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させるか否かをインビトロで判定することを含む。複数の態様において、ネオエピトープは、結果として調節性T細胞の活性化、増殖、および／またはIL-10もしくはTGF- β の生成をもたらす場合、調節性T細胞を関与させると判定される。前述のとおり、複数の態様において、活性化された後、CD4+調節性T細胞は、IL-10および／またはTGF β を含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。CD4+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBやパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。複数の態様において、CD8+Tregは、CD8、CD25、および活性化後のFoxP3を含むがそれらに限定されない特定の細胞表面マーカーの存在が特徴である。複数の態様において、活性化された後、調節性CD8+T細胞は、IFN γ 、IL-10および／またはTGF β を含むがそれらに限定されない免疫抑制性のサイトカインやケモカインを分泌する。複数の態様において、活性化された後、CD8+Tregは、標的細胞の直接死滅を通じて免疫抑制効果を発揮することもでき、グランザイムBおよび／またはパーフォリンを含むがそれらに限定されないエフェクター分子の活性化後の発現が特徴である。複数の態様において、交差反応性または自己反応性のT細胞応答は、非同義アミノ酸置換を含み自己pAPCによって提示されるネオエピトープペプチドを使用する、T細胞のインビトロプライミングによって試験される。このインビトロ免疫原性プロトコルは、Wullnerらによって確立された手法に従うことができる（Wullner D, Zhou L, Bramhall E, Kuck A, Golletz TJ, Swanson S, Chirmule N, Jawa V. Considerations for Optimization and Validation of an In vitro PBMC Derived T cell Assay for Immunogenicity Prediction of Biotherapeutics. Clin Immunol 2010 Oct; 137(1): 5-14（参照によりその全体が本明細書に組み込まれている））。インビトロプライミング後に膨張してネオエピトープペプチドとなる細胞は次に、対応する天然または野生型（非突然変異）のペプチドエピトープに対する反応性を試験される。天然ペプチド配列に対する反応性は、IFN γ 、TNF α 、IL-2を含むがそれらに限定されないサイトカイン生成、および／またはCD107aやグランザイムBを含むがそれらに限定されないT細胞エフェクター機能のマーカーを測定することにより判定される。

10

20

30

【0089】

前記特定新生物特異的突然変異によりコードされた被験体特異的ネオエピトープを含むポリペプチドの格付け

個人化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、該方法は、前記ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を動員すると知られているまたは判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、特定された被験体特異的ネオエピトープを含む前記ペプチドまたはポリペプチドを、個人化新生物ワクチンなど免疫原性組成物におけるそれらの有用性について格付けすることをさらに含む。したがって、複数の態様において、前記特定新生物特異的突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む、特定された被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、前記ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を動員すると知られているまたは判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、個人化新生物ワクチンなど免疫原性組成物における

40

50

エピトープとしてのそれらの有用性について格付けされる。複数の態様において、該方法は、特定された被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドが分析され、提供されることになる各ワクチンにおけるそれらの有用性に基づいて選択される、手動またはコンピューターベースの分析プロセスを含む。複数の態様において、前記分析プロセスは計算アルゴリズムに基づくプロセスである。好ましくは、前記分析プロセスは、被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを、免疫原性であるそれらの能力の判定（例えば推定）に従って判定および／または格付けすることを含む。

【0090】

複数の態様において、前記特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを個人化新生物ワクチンなど免疫原性組成物におけるエピトープとしてのそれらの有用性について格付けすることは、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドの、免疫原性関連の特徴、シーケンシング関連の特徴および／または物理化学関連の特徴を含む1種または複数の特徴を判定（例えば推定）することを含む。

10

【0091】

複数の態様において、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドについて判定される免疫原性関連の特徴は、MHCクラスIネオエピトープのカウント、MHCクラスIネオエピトープのパーセンタイル順位、MHCクラスI拘束性の調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が誘導する潜在性、MHCクラスIIネオエピトープのカウント、MHCクラスIIネオエピトープのパーセンタイル順位、MHCクラスII拘束性の調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が誘導する潜在性、および／または最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がMHCクラスIとII両方のネオエピトープを含むか否かの1種または複数を含むと考えられる。

20

複数の態様において、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドについて判定されるシーケンシング関連の特徴は、付随する転写の発現レベル、腫瘍DNAにおける突然変異の標的領域、すなわち突然変異のゲノム位置と重複する固有のシーケンシング読み取り結果、腫瘍DNAにおける突然変異の変異アレル割合（VAF）、すなわちシーケンシング読み取り結果全体にわたり観察される突然変異の0～1の相対的頻度、および／または他のシーケンシングメタデータ（必要に応じて）の1種または複数を含むと考えられる。

30

【0092】

複数の態様において、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドについて判定される物理化学関連の特徴は、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の正味荷電、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種の荷電残基を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の範囲内のシステイン（C）の数、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種のシステイン（C）を含み、負に帯電した状態であるか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がポリプロリンモチーフ（PP）を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種のメチオニン（M）を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がN末端グルタミン（Q）を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がグリシン（G）および／またはプロリン

40

50

(P)を最後までしくは最後まで2番目の位置に含むか否か、最適化された新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)が「DG」、「DS」、「DA」または「DN」のモチーフを含むか否か、および／または最適化された新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)の疎水性指標の1種または複数を含むと考えられる。

【0093】

複数の態様において、該方法は、判定された特徴に基づいて、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドをそれぞれ格付けすることをさらに含む。複数の態様において、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドの格付けの上位5～30位が、すべての値および範囲を含め、個人化新生物ワクチンに含まれる。複数の態様において、特定被験体特異的ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドは、実施例1に開示される格付け体系に従ってスコア付けおよび格付けされる。

10

【0094】

阻害性CD8+細胞の効果

抑制性(Treg)CD8+T細胞は、周辺部で発達すると見られるが、まだ十分に特性評価されていない。抑制性表現型を有するCD8+T細胞は、ヒト腫瘍において記述されているが、腫瘍成長細胞表現型の制御を直接関連付けるデータは限られており、抑制性表現型を有するCD8+T細胞の生成は多様なメカニズムに起因し得る。発明者らはCD8+の抑制的效果を特性評価し、CT26新抗原ワクチンの変位型アレルの総体的免疫原性活性のスコアを考案した。

20

スコア=免疫原性×VAF

式中、

免疫原性=(クラスIネオエピトープ含有率-クラスI交差反応潜在性)+(クラスIIネオエピトープ含有率-クラスII交差反応潜在性)

および

VAFは腫瘍資料中に観察される変異アレル頻度である。

クラスIとクラスIIの免疫原性も、下記のとおり、例えばサイトカイン放出または推定アルゴリズムにより測定される、エフェクターおよび調節活性と一致することが観察されている。

【0095】

【数3】

$$\text{クラスI免疫原性} = \beta \max \left(\sum Z - \left(\sum Z + \frac{JMX}{2} \right) \right)$$

30

および

【数4】

$$\text{クラスII免疫原性} = \alpha \left(0, \sum Z - \left(\sum Z + \frac{JMX}{2} \right) \right)$$

式中、Z=非エピトープZスコア(クラスIまたはII)

40

および

JMX=JANUSMATRIX(商標)スコア(クラスIまたはII)である。

JANUSMATRIX(商標)は、HLA結合側とTCR対向側の両方からの交差反応性T細胞エピトープを検証して、共通のヒト病原体を含む複数の大型ゲノム配列データベースにわたる比較を可能にする。JANUSMATRIX(商標)スコアは、調節性T細胞および／または他の有害T細胞の関与の推定を表す。

概して、より多くのクラスIIネオエピトープを含むペプチドほど、クラスII免疫原性スコアが高くなり、免疫原性潜在性は交差反応潜在性によって打ち消され得る。クラスIIのJMXスコアが3未満のペプチドは、正のクラスII免疫原性スコアを保持し、JMXスコアが3のペプチドは免疫原性スコアがゼロになる一方、クラスIIのJMXスコア

50

が3以上のペプチドはクラスII免疫原性スコアが負になる。

【0096】

概して、より多くのクラスIネオエピトープを含むペプチドほど、クラスI免疫原性スコアが高くなり、免疫原性潜在性は交差反応潜在性によって打ち消され得る。クラスIのJMXスコアが3未満のペプチドは、正のクラスI免疫原性スコアを保持する一方、クラスIのJMXスコアが3以上のペプチドはクラスI免疫原性スコアがゼロになる。言い換えれば、クラスIの場合、高いJMXスコアの免疫原性に対する効果は中立的であった。

腫瘍中のクラスIIとクラスIのネオエピトープの分析

腫瘍中のクラスIIとクラスIのネオエピトープを分析し、患者の転帰と関連付けた。ネオエピトープ発現は、遺伝子変異量より大幅に良好な、無病生存（DFS）予測因子である。Tregエピトープと比べ相対的に高いレベルのTeffネオエピトープを示す被験体は、より長いDFSを明示し、この関連性は、クラスIIとクラスI両方のネオエピトープを考慮すると向上する。

ワクチンの設計および予後用途向けに、ネオエピトープの分析は以下の1種または複数の考察を含む。

【0097】

免疫原性関連の特徴（複数の態様において、以下の1種または複数を含むと考えられる）：
MHCクラスIネオエピトープのカウント、MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位、MHCクラスI拘束性Tregを新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が誘導する潜在性、MHCクラスIIネオエピトープのカウント、MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位、MHCクラスII拘束性Tregを新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が誘導する潜在性、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がMHCクラスIとII両方のネオエピトープを含むか否か。

シーケンシング関連の特徴（複数の態様において、以下の1種または複数を含むと考えられる）：付随する転写の発現レベル、腫瘍DNAにおける突然変異の標的領域、すなわち突然変異のゲノム位置と重複する固有のシーケンシング読み取り結果、腫瘍DNAにおける突然変異の変異アレル割合（VAF）、すなわちシーケンシング読み取り結果全体にわたり観察される突然変異の0～1の相対的頻度、必要に応じて他のシーケンシングメタデータ。

【0098】

物理化学関連の特徴（複数の態様において、以下の1種または複数を含むと考えられる）：
最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の正味荷電、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種の荷電残基を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の範囲内のシステイン（C）の数、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種のシステイン（C）を含み、負に帯電した状態であるか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がポリリンモチーフ（PP）を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種のメチオニン（M）を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がN末端グルタミン（Q）を含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がグリシン（G）および／またはプロリン（P）を最後までしくは最後から2番目の位置に含むか否か、最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が「DG」、「DS」、「DA」または「DN」のモチーフを含むか否か、および／または最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオ

10

20

30

40

50

エピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)の疎水性指標。

【0099】

スコアを新抗原の特徴に割り当てることができる。変更または最適化してもよい、ポイント、パーセンテージ、およびペナルティを課す工程を含む、付点体系の一例を以下に記す。

MHCクラスIネオエピトープのカウント(最大20ポイント):1種以下のMHCクラスIネオエピトープを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの0%(すなわち0ポイント)を割り当てられ、2種のMHCクラスIネオエピトープを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの80%(すなわち16ポイント)を割り当てられ、3種以上のMHCクラスIネオエピトープを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの100%(すなわち20ポイント)を割り当てられる。

10

【0100】

MHCクラスIネオエピトープのパーセンタイル順位(最大20ポイント):MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が2.5%超5%以下に該当する新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの0%(すなわち0ポイント)を割り当てられ、MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%超2.5%以下に該当する新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの50%(すなわち10ポイント)を割り当てられ、MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%以下に該当する新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの100%(すなわち20ポイント)を割り当てられる。

20

MHCクラスIIネオエピトープのカウント(最大10ポイント):1種以下のMHCクラスIIネオエピトープを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの0%(すなわち0ポイント)を割り当てられ、2種のMHCクラスIIネオエピトープを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの80%(すなわち8ポイント)を割り当てられ、3種以上のMHCクラスIIネオエピトープを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの100%(すなわち10ポイント)を割り当てられる。

30

【0101】

MHCクラスIIネオエピトープのパーセンタイル順位(最大5ポイント):MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が2.5%超5%以下に該当する新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの0%(すなわち0ポイント)を割り当てられ、MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%超2.5%以下に該当する新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの50%(すなわち2.5ポイント)を割り当てられ、MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%以下に該当する新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの100%(すなわち5ポイント)を割り当てられる。

40

MHCクラスIとII両方のネオエピトープの存在(最大20ポイント):MHCクラスIネオエピトープのみまたはMHCクラスIIネオエピトープのみ含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの0%(すなわち0ポイント)を割り当てられ、少なくとも1種のMHCクラスIネオエピトープと少なくとも1種のMHCクラスIIネオエピトープとを含む新抗原(例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)はポイントの100%(すなわち20ポイント)を割り当てられる。

50

【0102】

MHCクラスI拘束性Treg誘導潜在性（最大5ポイント）：参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスI拘束性平均深度、またはMHCクラスI相同性スコア（上記のとおり計算）が0以上0.25未満である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち5ポイント）を割り当てられ、参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスI拘束性平均深度、またはMHCクラスI相同性スコアが0.25以上0.5未満である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち2.5ポイント）を割り当てられ、参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスI拘束性平均深度、またはMHCクラスI相同性スコアが0.5以上1未満である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの10%（すなわち0.5ポイント）を割り当てられ、参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスI拘束性平均深度、またはMHCクラスI相同性スコアが1以上である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる。

10

【0103】

MHCクラスII拘束性Treg誘導潜在性（最大20ポイント）：参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスII拘束性平均深度、またはMHCクラスII相同性スコアが0以上0.25未満である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち20ポイント）を割り当てられ、参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスII拘束性平均深度、またはMHCクラスII相同性スコアが0.25以上0.5未満である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち10ポイント）を割り当てられ、参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスII拘束性平均深度、またはMHCクラスII相同性スコアが0.5以上1未満である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの10%（すなわち2ポイント）を割り当てられ、参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスII拘束性平均深度、またはMHCクラスII相同性スコアが1以上である新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる。

20

30

【0104】

転写発現（単位は例えば当該技術分野で知られているように計算される100万当たり転写（TPM））（最大30ポイント）：発現がTPMの上位10%に該当する転写に由来する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち30ポイント）を割り当てられ、発現がTPMの上位25%未満に該当する転写に由来する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられ、発現がTPMの上位25%～10%に該当する転写に由来する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）は比例分配されるパーセントのポイントのポイントを割り当てられる。

40

被覆領域（当該技術分野で知られているように計算）（最大1ポイント）：腫瘍DNA内被覆領域の深度が20未満である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられ、腫瘍DNA内被覆領域の深度が20～50（厳格に未満）である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち0.5ポイント）を割り当てられ、腫瘍DNA内被覆領域の深度が50以上である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち1ポイント）を割り当てられる。

【0105】

50

変異アレル割合 (VAF) (当該技術分野で知られているように計算) (最大20ポイント) :

同系モデルのムタノームに由来する新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) の場合: VAFが0.5未満である突然変異を含む新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) はポイントの0% (すなわち0ポイント) を割り当てられ、VAFが0.5~0.75 (厳格に未満) である突然変異を含む新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) はポイントの50% (すなわち10ポイント) を割り当てられ、VAFが0.75以上である突然変異を含む新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) はポイントの100% (すなわち20ポイント) を割り当てられる。

10

【0106】

患者のムタノームに由来する新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) の場合: VAFが0.1未満である突然変異を含む新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) はポイントの0% (すなわち0ポイント) を割り当てられ、VAFが0.1~0.25 (厳格に未満) である突然変異を含む新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) はポイントの50% (すなわち10ポイント) を割り当てられ、VAFが0.25以上である突然変異を含む新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) はポイントの100% (すなわち20ポイント) を割り当てられる。

20

【0107】

ペナルティーが候補新抗原に割り当てられ得る。

厳格なペナルティー (例えば100ポイント正規化の前または後に割り当てることができる100ポイントの減算とする規定): 新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が帯電状態の残基を有していない場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) の正味荷電がゼロである場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が少なくとも2種のシステインを有する場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が少なくとも1種のシステインを有し、負の帯電状態である場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) がN末端グルタミンを含む場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) がポリ-プロリンモチーフを有する場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が2以上の疎水性指標を有する場合。

30

中程度のペナルティー (例えば10ポイント減算とする規定) を新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) に割り当てることができる: 新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が1種のシステインを含む場合。

40

軽微なペナルティー (例えば1ポイント減算とする規定) を新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) に割り当てることができる: 新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が負の帯電状態である場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が少なくとも1種のメチオニンを含む場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) がグリシンおよび/またはプロリンを最後までしくは最後から2番目の位置に含む場合、または新抗原 (例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド) が「DG」、「DS」、「DA」または「DN」のモチーフを含む場合。

【0108】

50

前記特定新生物特異的突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドの設計

個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、該方法は、前記ネオエピトープが調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、前記突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む少なくとも1種の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを設計することをさらに含む。

【0109】

個別化新生物ワクチン向けの被験体特異的ネオエピトープを特定する方法の複数の態様において、該方法は、i v) 前記突然変異によりコードされた少なくとも1種の特定ネオエピトープが工程（i i i）で調節性T細胞および／または他の有害T細胞（可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む）を関与させることが既知である、または判定（例えば推定）されるものとして特定されていないことを前提に、少なくとも1種の前記エピトープを含む少なくとも1種の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを設計することをさらに含む。複数の態様において、該方法は、工程（i v）で設計された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチド、あるいは前記ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸を準備することをさらに含む。さらなる複数の態様において、該方法は、v i) 工程（v）で提供された少なくとも1種のペプチドまたはポリペプチドまたは核酸を含むワクチンを提供することをさらに含む。

【0110】

複数の態様において、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、長さが多様であり得る。複数の態様において、当該被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは少なくとも、患者のMHC分子に結合すると判定（例えば推定）される特定ネオエピトープを含むことになる。複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、Nおよび／またはC末端方向に拡大する追加的な隣接するアミノ酸を含む。複数の態様において、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、少なくとも1種の特定ネオエピトープ（例えばMHCクラスII分子に結合する9merの特定ネオエピトープ、および／またはMHCクラスI分子に結合する9merもしくは10merの特定ネオエピトープ、および／またはそれらの断片もしくは変異体）と、任意に少なくとも1種の特定ネオエピトープのN末端および／またはC末端に任意の比で分布する1～12個の追加アミノ酸とを含む、それらからなる、または本質的にそれらからなる。複数の態様において、本開示は、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む、それらからなる、または本質的にそれらからなるコアアミノ酸配列を有し、任意に該コアアミノ酸配列のC末端および／またはN末端に1～12個のアミノ酸の拡張を有し、これらの隣接アミノ酸の総数が1～12個、1～3個、2～4個、3～6個、1～10個、1～8個、1～6個、2～12個、2～10個、2～8個、2～6個、3～12個、3～10個、3～8個、3～6個、4～12個、4～10個、4～8個、4～6個、5～12個、5～10個、5～8個、5～6個、6～12個、6～10個、6～8個、7～12個、7～10個、7～8個、8～12個、8～10個、9～12個、9～10個または10～12個であり、隣接アミノ酸がC末端とN末端に任意の比で追加され得る（例えばすべての隣接アミノ酸が片方の末端に追加され得る、またはアミノ酸が両方の末端に均等にもしくは任意の他の比で追加され得る）ペプチドまたはポリペプチドを対象とする。複数の態様において、本開示は、少なくとも1種の特定ネオエピトープ（ならびに／またはそれらの断片および変異体）を含む、それらからなる、または本質的にそれらからなるコアアミノ酸配列を有し、任意にC末端および／またはN末端に1～12個のアミノ酸の拡張を有し、これらの隣接アミノ酸の総数が1～12個、1～3個、2～4個、3～6個、1～10個、1～8個、1～6個、2～12個、2～10個、2～8個、2～6個、3～12個、3～10個、3～8個、3～6個、4～12

10

20

30

40

50

個、4～10個、4～8個、4～6個、5～12個、5～10個、5～8個、5～6個、6～12個、6～10個、6～8個、7～12個、7～10個、7～8個、8～12個、8～10個、9～12個、9～10個または10～12個であり、隣接アミノ酸がC末端とN末端に任意の比で追加され得る（例えばすべての隣接アミノ酸が片方の末端に追加され得る、またはアミノ酸が両方の末端に均等にもしくは任意の他の比で追加され得る）、ただし隣接アミノ酸を有するポリペプチドが、前記隣接アミノ酸を有していなくても前記ポリペプチドのコア配列と同じHLA分子に結合する（すなわちMHC結合傾向を保持する）能力を引き続き有することを前提とする、ペプチドまたはポリペプチドを対象とする。複数の態様において、隣接アミノ酸を有する前記ポリペプチドは、前記隣接アミノ酸を有していなくても前記ポリペプチドのコア配列と同じHLA分子に結合（すなわちMHC結合傾向を保持）し、同じTCR特異性を保持する能力を引き続き有する。複数の態様において、前記隣接アミノ酸配列は、自然発生のタンパク質における少なくとも1種の特定ネオエピトープにも隣接する配列である。

10

【0111】

複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドはN末端アセチルおよびC末端アミノ基で被覆され得る。複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは中性（非荷電）または塩の形態とすることができ、またグリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化などの修飾を含まないまたは含むものであってもよい。

複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、「単離」または「精製」された状態とすることができ、これは組換え細胞および非組換え細胞から単離されると細胞物質を実質的に含まない、あるいは化学合成されると化学的前駆体または他の化学物質を含まないことを意味する。ただし、本開示の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、細胞中で通常は付随せず引き続き「単離」または「精製」された状態にある別のポリペプチド（例えば異種ポリペプチド）に接合、連結または挿入され得る。

20

【0112】

複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、約9～約100個の、該当する任意の値または範囲を含め、ただしそれらに限定されない、アミノ酸を含んでもよい。複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、100個を超えるアミノ酸残基を含んでもよい。複数の態様において、1種または複数の特定されたネオエピトープを含む個々の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、9～40アミノ酸長、9～30アミノ酸長、9～25アミノ酸長、9～23アミノ酸長、9～20アミノ酸長、または9～15アミノ酸長を有する。複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、患者のMHC分子に結合すると判定（例えば推定）される、それぞれがアミノ酸の拡張（例えば前述のような1～12アミノ酸長の拡張）、場合によっては被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドの生化学的特性（例えば溶解性または安定性、ただしそれらに限定されない）の改善またはペプチドの効率的なプロテアソーム処理の確率の改善に貢献する拡張を含む、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含んでもよい。

30

【0113】

複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは1種または複数の特定ネオエピトープを含んでもよく、個々の1種または複数の特定ネオエピトープは、リンカーによって、特に中性リンカーによって間隔を空けてもよい。「リンカー」という用語は、2種のペプチド領域の間に追加される、前記ペプチド領域を接続するエピトープまたはワクチン配列などのペプチドを指す。複数の態様において、リンカー配列は、1種または複数の特定ネオエピトープそれぞれの間の立体障害を低減するために使用され、適切に転換され、1種または複数の特定ネオエピトープそれぞれの処理を補助または可能にする。リンカーは免疫原性配列要素をほとんどまたは全く有するべきではない。例えば、複数の態様において、本開示は、追加的なペプチドまたはポリペプチドに対して一体的に連結、融合または接合される（例えばインフレーション融合、化学結合または別の形で結合される）、本明細書に開示される被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを1種または複数

40

50

含む鎖状のポリペプチドまたはペプチドを対象とする。当該追加的ペプチドまたはポリペプチドは、本明細書に開示される1種または複数の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドであってもよい、または従来型の腫瘍関連抗原（TAA）など関心の的となる追加的ペプチドまたはポリペプチドであってもよい。複数の態様において、鎖状ペプチドは2種以上、3種以上、4種以上、5種以上、6種以上、7種以上、8種以上、9種以上の、本明細書に開示される被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドからなる。他の複数の態様において、鎖状ペプチドまたはポリペプチドは、1000種以上、1000種以下、900種以下、500種以下、100種以下、75種以下、50種以下、30種以下、20種以下または10種以下の被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを含む。さらに他の複数の実施形態において、鎖状ペプチドは、3～100種、5～100種、10～100種、15～100種、20～100種、25～100種、30～100種、35～100種、40～100種、45～100種、50～100種、55～100種、60～100種、65～100種、70～100種、75～100種、80～100種、90～100種、5～50種、10～50種、15～50種、20～50種、25～50種、30～50種、35～50種、40～50種、45～50種、100～150種、100～200種、100～300種、100～400種、100～500種、50～500種、50～800種、50～1,000種または100～1,000種の、一体的に連結、融合または接合された、本明細書に開示される被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを有する。鎖状ポリペプチドの各ペプチドまたはポリペプチドは、それぞれのNおよび／またはC末端の隣に、切断感受性部位であってもよい1種または複数のリンカーを有していてもよい。当該鎖状ペプチドにおいて、2種以上のペプチド（本明細書に開示される被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを含む）が中間に切断感受性部位を有していてもよい。代わりに、2種以上のペプチド（本明細書に開示される被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを含む）が相互に直接または切断感受性部位でないリンカーを介して接続されてもよい。

10

20

【0114】

本明細書に用いられているとおり、2種のペプチドまたはポリペプチド（またはポリペプチドの一領域）は、アミノ酸配列が少なくとも約45～55%、典型的には少なくとも約70～75%、より典型的には少なくとも約80～85%、より典型的には約90%超、より典型的には95%以上相同または同一である場合、実質的に相同または同一である。2種のアミノ酸配列、または2種の核酸配列の相同率または同一率を決定するため、配列は最適な比較目的に対してアラインされる（例えば1種のポリペプチドまたは核酸分子において、他のポリペプチドまたは核酸分子との最適なアラインメントのためのギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。ある配列における位置を、他の配列において対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが占有する場合、分子はその位置において相同である。本明細書に用いられているとおり、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」に相当する。2種の配列間における相同率は、該配列が共有する同一位置の数の関数である（例えば、相同率＝同一位置の数÷位置の総数×100である）。

30

40

【0115】

複数の態様において、本開示は、同一性の度合いはより低い1種または複数の同じ機能を果たすのに十分な類似性を有する少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドも含む。類似性は保存されたアミノ酸置換により判定される。当該置換は、あるポリペプチドにおける所定のアミノ酸を、特徴が類似する別のアミノ酸に置き換える置換である。同類置換は、表現型に変化が生じないと考えられる。典型的に同類置換と見なされるのは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、MetおよびIleの間での相互の代替、ヒドロキシル残基SerとThrの交換、酸性残基AspとGluの交換、アミド残基AsnとGlnの間での置換、塩基性残基His、LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基Trp、PheおよびTyrの間での代替である。表現型

50

に変化が生じないと考えられるアミノ酸変化の種類に関する指針が文献に記載されている (Bowie JU et al., (1990), Science, 247(4948):130610、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている)。

【0116】

複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドの少なくとも1種の特定ネオエピトープの変異型は、1個または複数の置換、欠失、挿入、逆位、融合および切断またはこれらの任意の組合せにより、アミノ酸配列が異なり得る。複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドの少なくとも1種の特定ネオエピトープの変異型は、完全に機能を果たすことができる (例えばMHC結合傾向およびTCR特異性を保持する)、または1種または複数の活性において機能が欠如し得る。完全に機能的な変異型は典型的に、保存的変異のみ、あるいは非必須残基または非必須領域での変異のみ含み、この場合は典型的に、MHC結合によってもたらされるHMCコンタクト残基が保存される。複数の態様において、機能的変異型は、結果的に変化を生じないまたは機能の変化が顕著でない類似のアミノ酸の置換も含み得る (例えばMHC結合傾向およびTCR特異性を保持する)。あるいは、当該置換は機能にある程度、好影響または悪影響を及ぼし得る。非機能的変異型は典型的に、1個または複数の非保存的アミノ酸置換、欠失、挿入、逆位、あるいは必須残基または必須領域における置換、挿入、逆位または欠失を含み、この場合、典型的にTCRコンタクト残基。

10

【0117】

複数の態様において、本開示は、本明細書に開示される被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドの少なくとも1種の特定ネオエピトープの断片も含む。複数の態様において、本開示は、本明細書に記載の特定ネオエピトープの変異型の断片も含む。複数の態様において、本明細書に用いられているとおり、断片は少なくとも約9個の隣接アミノ酸を含む。有用な断片 (および本明細書に記載の特定ネオエピトープの変異型の断片) の例としては、特定ネオエピトープにおける1種または複数の生物活性、特にMHC結合傾向およびTCR特異性を保持する断片が挙げられる。生物学的に活性の断片は、例えば約9アミノ酸長、12アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、20アミノ酸長または30アミノ酸長以上であり、それらの中間の値または範囲を含む。複数の態様において、断片は離散的であり得る (他のアミノ酸またはポリペプチドに融合していない) またはより大型のポリペプチド内に存在し得る。複数の態様において、複数の断片が、単一のより大型のポリペプチド内に含まれ得る。複数の態様において、宿主における発現向けに設計された断片は、ポリペプチド断片のアミノ末端に融合された前ポリペプチド領域と後ポリペプチド領域、および断片のカルボキシル末端に融合された追加領域を有し得る。

20

30

【0118】

複数の態様において、被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドの少なくとも1種の特定ネオエピトープは、アレル変異型または配列変異型 (「突然変異体」) あるいはそれらの類似体を含み得る。複数の態様において、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、化学的修飾 (例えばポリエチレングリコール化、グリコシル化) を含み得る。複数の態様において、突然変異体は、本開示の核酸分子によりコードされたポリペプチドが果たす機能と同じ機能、特にMHC結合傾向およびTCR特異性を保持する。複数の態様において、突然変異体は、MHC分子に対する拡充された結合をもたらし得る。複数の態様において、突然変異体は、TCRに対する拡充された結合に繋がり得る。別の一例において、突然変異体は、MHC分子および/またはTCRに対する結合の低減に繋がり得る。結合するもののTCR経路の信号伝達を許容しない突然変異体も予期される。

40

【0119】

複数の態様において、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、それらの薬学的に許容される塩を含み得る。ペプチドまたはポリペプチドの「薬学的に許容される塩」は、薬学的に許容可能であり、親ペプチドまたはポリペプチドの所望される薬理活性を有する塩を意味する。本明細書に用いられている「薬

50

学的に許容される」塩は、本明細書に開示されるペプチドまたはポリペプチドの誘導体を指し、当該化合物はそれらの酸または塩基塩の製造により修飾される。薬学的に許容される塩の例としては、アミンなど塩基性残基の鉱酸塩または有機酸塩、カルボン酸など酸性残基のアルカリ塩または有機塩などが挙げられるがそれらに限定されない。薬学的に許容される塩の例としては、従来の非毒性塩、あるいは例えば非毒性の無機酸または有機酸から形成される親化合物の第4級アンモニウム塩が挙げられる。例えば、当該従来の非毒性塩の例としては2-アセトキシ安息香酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、酢酸、アスコルビン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、重炭酸、炭酸、クエン酸、エデト酸、エタジスルホン酸、1,2-エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、グリコールアルサルニル酸、ヘキシールレゾルチン酸、ヒドラバミン酸、臭化水素酸、塩酸、ヨウ化水素酸、ヒドロキシマレイン酸、ヒドロキシナフトエ酸、イセチオン酸、乳酸、ラクトビオン酸、ラウリルスルホン酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ナプシル酸、硝酸、シュウ酸、パモ酸、パントテン酸、フェニル酢酸、リン酸、ポリガラクトロン酸、プロピオン酸、サリチル酸、ステアリン酸、スバセチン酸、コハク酸、スルファン酸、硫酸、タンニン酸、酒石酸、トルエンスルホン酸、および一般的に存在するアミン酸、例えばグリシン、アラニン、フェニルアラニン、アルギニンなどが挙げられるがそれらに限定されない。

10

【0120】

少なくとも1種の特異的ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドは、インビトロ法やインビボ法において既知のものを含む、任意の既知のペプチドまたはポリペプチド製造方法により製造できる。インビトロ製造は、ペプチドまたはポリペプチドの化学合成技法、標準的な分子生物技法を介したタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現、天然原料からのタンパク質またはペプチドの単離、インビトロ転換、それらに続く発現後のペプチド／ポリペプチドの必要な精製を含む、当該技術分野で知られている様々な方法により行うことができる。あるいは、少なくとも1種の特異的ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドを、腫瘍特異的新抗原を被験体内にコードする分子（例えばDNA、RNA、ウイルス発現系など）を導入することにより製造でき、その後、コードされた腫瘍特異的新抗原が発現する。

20

【0121】

複数の態様において、本開示は、1種または複数のペプチドまたはポリペプチドもしくは本開示の鎖状ペプチドの全体または一部をコードする核酸（例えばDNA、RNA、ベクター、ウイルスまたはハイブリッド）も提供する。複数の態様において、少なくとも1種の特異的ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドもしくは鎖状ペプチドをコードする核酸（例えばポリヌクレオチド）を使用して、ネオエピトープをインビトロまたはインビボで製造できる。ポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、pNA、CNA、RNAなどの、一本鎖および／または二本鎖、あるいは天然のまたは当該技術分野で知られているような安定化された形態のポリヌクレオチドであってもよい。ポリヌクレオチドを発現可能な発現ベクターを準備することもできる。様々な種類の細胞向けの発現ベクターが当該技術分野でよく知られており、それらを必要以上の実験を経ずに選択できる。一般的に、DNAが、プラスミドなどの発現ベクターに、発現のための適切な配向および適正な読み取りフレーム内で挿入される。必要であれば、所望の宿主（例えば細菌）により認識される適切な転写／転換調節性制御ヌクレオチド配列に連結してもよいが、当該制御は一般的に発現ベクターにおいて利用可能である。次いでベクターは、標準的な技法を用いてクローン作成向けに宿主細菌に導入される（例えば以下を参照のこと：Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.）。

30

40

【0122】

複数の態様において、本開示は、少なくとも1種の特異的ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドまたは鎖状ペプチドを含む発現ベクターを対象とするほか、発現ベクターを含む宿主細胞も予期される。少なくとも1種の特異的ネオエピトープを含

50

む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドまたは鎖状ペプチドは、所望のネオエピトープをコードするRNAまたはcDNA分子の形態で提供されてもよい。本開示の1種または複数のペプチドまたはポリペプチドまたは鎖状ペプチドを、単一の発現ベクターによってコードすることができる。当該核酸分子は、それらを必要とする被験体に新抗原性のペプチド／ポリペプチド／鎖状ペプチドをインビボで、例えばDNA／RNAワクチンの形態で送達する手段の役割を果たすことができる。

複数の態様において、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチド（鎖状ペプチドを含む）を、精製して均質化または部分精製することができる。ただし、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドが均質な状態にまで精製されない調製が有用であることを理解されたい。極めて重要な特徴は、この調製により、他の成分が相当量存在する場合でも、少なくとも1種のネオエピトープの所望の機能が可能になることである。したがって、本開示は様々な純度を含む。一実施形態において、「細胞物質を実質的に含まない」という表現は、他のタンパク質（例えば汚染性タンパク質）の含有率が約30%未満（乾燥重量比）、約20%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満あるいはそれらの中間の任意の値または範囲である少なくとも1種のネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドの調製物を含む。複数の態様において、本開示の少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドが遺伝子組換えにより製造される場合、前記ペプチドまたはポリペプチドを、培地を実質的に含まない状態、例えばペプチドまたはポリペプチドまたは核酸の調製物の体積に培地が占める割合が約20%未満、約10%未満または約5%未満の状態にすることもできる。「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という表現は、ペプチドまたはポリペプチドまたは核酸の調製物が、その合成に係る化学的前駆体または他の化学物質から分離されていることを含む。「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という表現は、例えば、化学的前駆体または他の化学物質の含有率（乾燥重量比）が約20%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満であるペプチドまたはポリペプチドの調製を含み得る。

【0123】

医薬組成物

複数の態様において、本明細書に記載の1種または複数の特定ネオエピトープを含む、製造された被験体特異的ペプチドまたはポリペプチド（鎖状ペプチドを含む）をその後、個人化新生物ワクチンなどの医薬組成物に製剤し、被験体の新生物を治療するために被験体に投与することができる。

したがって、さらなる一実施形態は、被験体における新生物特異的エフェクターT細胞応答を誘導する1種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチド、または前記複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチドをコードする1種もしくは複数の核酸を含む医薬組成物を対象とする。複数の態様において、1種もしくは複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチド、または前記複数の選択されたペプチドもしくはポリペプチドをコードする1種もしくは複数の核酸は、本明細書に開示される方法により選択され製造される。

【0124】

複数の態様において、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでいてもよい。「薬学的に許容される賦形剤」は、概して安全、非毒性で、生物学的にも別の形で望ましくないものでない医薬組成物の調製に有用な賦形剤を意味し、ヒトの薬学的用途同様に獣医用としても許容される賦形剤を含む。「医薬賦形剤」という用語は、本明細書において、本発明の化合物以外の任意の成分を記述するために使用される。医薬賦形剤の例としては、希釈剤、香味剤、可溶化剤、潤滑剤、懸濁剤、結合剤、保存剤、湿潤剤、錠剤崩壊剤またはカプセル化材料の役割を果たすことができる1種または複数の物質を含む。賦形剤の選択は、総じて、特定の投与形態、賦形剤が可溶性や安定性に与える効果、および投与形態の性質などの要因に左右される。「医薬賦形剤」は1種の賦形剤および複数の

賦形剤の両方を含む。

【0125】

複数の態様において、医薬組成物は、ヒトまたは動物への投与向けの薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。したがって、医薬組成物は経口投与または固形もしくは液体として投与することができる、あるいは溶液、懸濁液または乳剤として筋肉注射もしくは静脈注射により投与することができる。あるいは、医薬組成物は、リポソーム懸濁液として、吸入、静脈注射または筋肉注射により投与することができる。いくつかの実施形態において、医薬組成物は経口投与向けに製剤される。他の複数の実施形態において、医薬組成物は静脈内投与向けに製剤される。複数の態様において、医薬組成物は、薬学的に許容される補助剤を含んでいてもよい。当該補助剤の例としては、ポリICLC、1018 ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS 15、BCG、CP-870、893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、ImiquimodImuFact IMP321IS Patch、ISS、ISCOMAT RTX、Juvlmmune、LipoVac、MF59、Monophosphoryl Lipid A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PEPTEL、vector system、PLGA微小粒子、レシキモド、SRL172、Virusomesおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGFトラップ、R848、ベータグルカン、Pam3Cys、およびAquila社製QS21 Stimulonが挙げられるがそれらに限定されない。医薬組成物の複数の態様において、補助剤はポリICLCを含む。TLR9作動薬CpGおよび合成二本鎖RNA(dsRNA)TLR3リガンドポリICLCは、現在臨床開発中の最も有望な新生物ワクチン補助剤の2種である。複数の前臨床研究において、ポリICLCはLPSやCpGと比較して最も強力なTLR補助剤と見られている。これはポリICLCが炎症性サイトカインを誘導することやIL-10の刺激がないことのほか、DCにおける高レベルの共刺激性分子の維持によるものと見られる。ポリICLCは、平均約5000ヌクレオチド長のポリI鎖およびポリC鎖からなる合成二重鎖RNAであり、ポリリシンとカルボキシメチルセルロースの添加により、熱変性および血清ヌクレアーゼによる加水分解に対して安定化されている。この化合物は、いずれもPAMPファミリーに属するTLR3およびMDA5のRNAヘリカーゼ領域を活性化し、DCおよびナチュラルキラー(NK)細胞の活性化と、I型インターフェロン、サイトカインおよびケモカインの混合生成に繋がる。

10

20

30

40

【0126】

医薬組成物の複数の態様において、1種または複数の特定されたネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドは、それぞれが1種または複数の特定ネオエピトープを含む少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、少なくとも11種、少なくとも12種、少なくとも13種、少なくとも14種、少なくとも15種、少なくとも16種、少なくとも17種、少なくとも18種、少なくとも19種または少なくとも20種のペプチドまたはポリペプチドを含む。複数の態様において、1種または複数の特定ネオエピトープを含む複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドは、それぞれが1種または複数の特定ネオエピトープを含む3~20の選択されたペプチドまたはポリペプチドを含む。

【0127】

医薬組成物の複数の態様において、前記複数の選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードする1種または複数の核酸はDNA、RNA、またはmRNAである。医薬組成物の複数の態様において、医薬組成物は免疫抑制剤をさらに含む。複数の態様において、免疫抑制剤は、下記のとおり、チェックポイント遮断阻害剤や免疫チェックポイント刺激剤などのチェックポイント遮断調整剤または他の追加的な治療用補助剤を含む。

【0128】

50

治療方法

一実施形態は、新生物（例えばがんまたは腫瘍）の治療を必要としている被験体の新生物治療方法を対象とし、該方法は、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチド（鎖状ペプチドを含む）あるいは本明細書に開示される医薬組成物を有効量投与することを含む。本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチド（鎖状ペプチドを含む）あるいは医薬組成物を被験体に有効量投与することにより、肺、胸部、結腸、卵巣、脳、肝臓、脾臓、前立腺などの固形腫瘍、悪性黒色腫、非黒色腫皮膚がんならびに血液系腫瘍を含むがそれらに限定されない広範囲に及ぶがん、および／または小児白血病や小児リンパ腫などの悪性腫瘍、多発性骨髄腫、ホジキン病、リンパ球および皮膚に由来するリンパ腫、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病または慢性骨髄性白血病などの急性および慢性の白血病、形質細胞種、リンパ腫およびＡＩＤＳ関連がんの治療が可能になることを理解されたい。がん治療を必要としている被験体におけるがん治療方法の特定の実施形態において、該方法は、がんが膀胱がんである場合に、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは本明細書に開示される医薬組成物を被験体に有効量投与することを含む。

10

【０１２９】

本明細書に用いられている「治療（すること）」という用語は、予防的治療や治療処置を含むがそれらに限定されない、新生物（例えばがんまたは固形腫瘍）の何らかの治療に関する。「治療（すること）」は、例えば、新生物の改善に帰結する予防、低下、低減、調整または排除などの何らかの効果を含む。例えば、がん状態の「治療（すること）」または「治療」は、がんの阻害、すなわちがんまたはその臨床症状の発達を阻止すること、あるいはがんの緩和、すなわちがんまたはその臨床症状を一時的または恒久的に退行させることを含む。「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防的治療」などは、ある疾患または状態を有するわけではないが発達する危険性があるまたは発達に対して脆弱である被験体において疾患または状態が発達する確率を低減させることを指す。

20

「被験体」は哺乳動物、例えばヒト、ペット（例えばイヌ、ネコ、鳥など）、家畜（例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、家禽など）および実験動物（例えばラット、マウス、モルモット、鳥など）を含む。新生物治療を必要としている被験体における、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物を被験体に投与することを含む、新生物治療方法の特定の実施形態において、有効量を投与される被験体は、哺乳動物、より具体的にはヒトである。

30

【０１３０】

「有効量」は、本明細書において、新生物（例えばがんまたは固形腫瘍）の治療との関連で言えば、新生物（例えばがん細胞または腫瘍）の増殖の減少、低減、阻害または別の形で解消に繋がる量と定義される。「有効量」は、新生物とその重度、および治療を受ける哺乳動物の年齢、体重などに応じて変動する。被験体に投与される本開示の組成物の量、ならびに時期および投与計画は、疾患の種類や重度、ならびに全般的な健康状態、年齢、性別、体重および薬物に対する寛容などの個体の特徴に左右される。量は新生物疾患の程度、重度および種類にも左右される。熟練職人であれば、上記および他の要因に応じて適切な用量および投薬計画を判断できると予想される。

40

【０１３１】

いくつかの態様において、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、被験体の身体において特に影響を受ける単一または複数の領域に局所的に送達され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、全身投与され得る。例えば、がん治療を必要としている被験体におけるがん治療方法のいくつかの実施形態において、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、経口投与される。本明細書に開示される方法に

50

従って、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、固体または液体として経口投与され得る。治療を必要としている被験体におけるがん治療の他の複数の実施形態において、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、静脈注射により投与される。本明細書に開示される方法に従って、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、溶液、懸濁液または乳剤として静脈注射により投与され得る。あるいは、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、リポソーム懸濁液として、吸入、静脈注射または筋肉注射により投与することもできる。

10

【０１３２】

本発明の組成物は、１種または複数の追加的な治療用化合物と組み合わせて投与することもできる。したがって、新生物（例えばがんまたは固形腫瘍）治療を必要としている被験体における、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物を被験体に投与することを含む、新生物治療方法のいくつかの態様において、該方法は、１種または複数の追加的な治療用化合物を被験体に投与することをさらに含む。がん治療に対する治療上の便益は、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物による治療を１種または複数の追加的な治療用化合物と組み合わせることによって実現され得ることを理解されたい。「追加的な治療用化合物」という用語は、他の抗がん剤または治療を含む。当該組合せの選択は、疾患の種類、被験体の年齢や全般的健康状態、疾患進行の悪性度、および当該組合せを含む薬剤を寛容する被験体の能力を含むがそれらに限定されない様々な要因に左右される。例えば、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物は、腫瘍サイズの低減に有効な他の薬剤や治療計画（例えば放射線、手術、化学療法、ホルモン治療および／または遺伝子療法）と組み合わせることができる。さらに、いくつかの実施形態において、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物を、疾患の副作用または追加的治療剤の１種の副作用を処置する１種または複数の薬剤と組み合わせること、例えば被験体に鎮痛剤を投与することが望ましいと考えられる。

20

30

【０１３３】

したがって、「追加的な治療用化合物」という用語は、抗新生物薬または化学治療薬としても知られる化合物など、様々な抗がん剤または治療を含む。該薬剤を、本明細書に開示される１種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物と併用することができる。当該化合物の例としては、アルキル化剤、DNA挿入剤、タンパク質合成阻害剤、DNAまたはRNA合成阻害剤、DNA塩基類似体、トポイソメラーゼ阻害剤、血管新生阻害剤およびテロメラーゼ阻害剤またはテロメアDNA結合化合物が挙げられるがそれらに限定されない。例えば、適切なアルキル化剤の例としては、ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル、ベンゾデゼパ、カルボコン、メツレデパおよびウレデパなどのアジリジン、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびトリメチロールメラミンなどのエチレンイミンおよびメチルメラミン、クロラムブシル、クリマファジン、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミン酸化物塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン、フェネテスリン、プレドニムスチン、トリホスファミドおよびウラシルマスタードなどの窒素マスタード、カルムスチン、クロロゾトチン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチンなどのニトロソ尿素が挙げられる。

40

【０１３４】

化学療法用タンパク質合成阻害剤を、がん治療向けに、本明細書に開示される１種または

50

複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物と組み合わせることもできる。当該阻害剤の例としては、アブリン、アウリントリカルボン酸、クロラムフェニコール、コリシンE3、シクロヘキシミド、ジフテリア毒素、エディンA、エメチン、エリスロマイシ、フッ化物、5-フルオロトリプトファン、フシジン酸、グアニリルメチレンジホスホン酸およびグアニリルイミドジホスホン酸、カナマイシン、カスガマイシン、キロマイシンおよびO-メチルトレオニンが挙げられる。

加えて、タンパク質合成阻害剤を、がん治療向けに、本明細書に開示される1種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物と組み合わせることもできる。当該阻害剤の例としては、モデシン、ネオマイシン、ノルバリン、パクタマイシン、パロモマイシン、ピューロマイシン、リシン、志賀毒素、ショードマイシン、スパルソマイシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、チオストレプトンおよびトリメトプリムが挙げられる。さらに、DNA合成阻害剤を、がん治療向けに、本明細書に開示される1種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物と組み合わせることができる。当該阻害剤の例としては、硫酸ジメチル、ミトマイシンC、窒素マスタードおよび硫黄マスタードなどのアルキル化剤、アクリジン色素、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アントラセン、ベンゾピレン、臭化エチジウム、2ヨウ化プロピジウムなどの挿入剤、ならびにジスタマイシンおよびネトロプシンなどの薬剤が挙げられる。クーママイシン、ナリジクス酸、ノボビオシンおよびオキシソリニン酸などのトポイソメラーゼ阻害剤、コルセミド、コルヒチン、ビンブラスチンおよびビンクリスチンを含む細胞分裂阻害剤、ならびにアクチノマイシンD、 α -アマニチンおよび他の真菌のアマトキシ、コルジセピン(3'-デオキシアデノシン)、ジクロロリボフラノシルベンジミダゾール、リファンピシン、ストレプトバリシンおよびストレプトリディジンを含むRNA合成阻害剤を、本明細書に開示される1種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物と組み合わせて、適切ながん治療をもたらすこともできる。

【0135】

したがって、本明細書に開示される1種または複数の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチドあるいは医薬組成物との組合せ治療に使用可能な現在の化学治療剤の例としては、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル(5FU)、エトポシド、カンプトテシン、アクチノマイシンD、ミトマイシン、シスプラチン、過酸化水素、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、タモキシフェン、タクソール、トランスプラチン、ビンブラスチンおよびメトトレキサートなどが挙げられるがそれらに限定されない。

追加的治療剤は、同じ経路または異なる経路で投与できる。例えば、選択された組合せの第1の治療剤を静脈注射により投与してもよい一方、組合せの他の治療剤を経口投与してもよい。あるいは、例えば、すべての治療剤を経口投与してもよく、またはすべての治療剤を静脈注射により投与してもよい。治療剤の投与順序は、厳密に重要ではない。

【0136】

本発明およびその優位性が詳細に記述されているが、本明細書において様々な変更、代替および修正を、添付の請求項において定義されたとおりの本発明の精神と範囲から逸脱しない限り、行うことができる。

本発明は、下記の実施例においてさらに詳しく例示され、これらは単に例示が目的であり、いかなる形でも本発明を制限することを意図するものではない。

【実施例】

【0137】

(実施例1)

Tregitope 枯渇個人化がんワクチン接種後の腫瘍増殖阻害。

10

20

30

40

50

複数の臨床研究が、様々ながん兆候にわたって患者の腫瘍を効果的に制御する精密がん免疫療法の潜在性を強調してきた。しかし、近年の複数の研究において、強固なCD8+およびCD4+のエフェクターT細胞応答を確立することの難しさを示している。低いがんワクチン性能は部分的に、調節性T細胞(Treg)によって認識される可能性のある、抑制性T細胞ネオエピトープの新抗原系ワクチンへの不用意な包含が原因である。

この仮説を検証するため、ネオエピトープを特定および選択し、調節性T細胞を関与させると推定される当該ネオエピトープを、個人化新生物ワクチンに使用するための被験体特異的ネオエピトープから排除する。最新の推定アルゴリズムが、感染性疾患に関する遡及的ワクチン研究において拡大的に妥当性確認されている(Moise et al., Hum. Vaccines Immunother 2015; Wada et al., Sci. Rep. 2017)。他のインシリコパイプラインに勝る、この手順の際立った特徴は、CD4+およびCD8+のT細胞エピトープを正確に推定し、寛容エピトープまたはTregエピトープを特定する能力である。

10

【0138】

Tregitope 枯渴ワクチンの生物情報科学設計

各ペプチドをまず、重なり合う9merおよび10merのフレームへとパースし、各ペプチドがBalb/cのMHCクラスI(H2-DdとH2-Kd)およびMHCクラスII(E-A、E-E)のアレルに結合する確率についてフレームを評価する。ヒト分析の場合、各フレームを、患者のMHCクラスI(HLA-A、HLA-B)およびMHCクラスII(HLA-DRB1)のアレルに結合する確率について評価する。推定が容易に入手可能でないMHCアレルを患者が発現する場合、患者のアレルと本発明者らの参照アレルとの間で相同性分析を実施できる。この分析向けに、患者のアレルのMHC結合ポケットからアミノ酸配列を抽出し、それらを、本発明者らが確実にモデル化するアレルからの結合ポケットと比較する。参照アレルのMHC結合ポケットと比較して少なくとも90%相同であるMHC結合ポケットを有する無支持の患者アレルはすべて、本発明者らの分析に含めることができ、その場合、相同参照アレルのモデルを使用して、フレームが患者のアレルに結合する確率を評価する。

20

【0139】

アレル別フレーム「評価」はそれぞれ、推定されるMHC結合親和性に関する言明(すなわち判定)である。原結合スコアを正規分布またはZ分布に適合するよう調整する。原結合スコアを下記のとおり、UniProtKB/Swiss-Prot(web.expasy.org/docs/relnotes/relnstat.html)からの自然に観察されるアミノ酸頻度に従って、10,000の無作為の9merまたは10merのアミノ酸配列のセットにおける平均(μ)結合スコアと標準偏差(σ)に基づいて正規化する。

30

【数5】

$$\text{正規化結合スコア} = \frac{\text{原結合スコア} - \mu}{\sigma}$$

正規化結合スコアは、本明細書では結合スコアまたは結合確率と称し、この正規分布の上位5%以内が「ヒット」、つまり潜在的に免疫原性であり、さらなる検討に値するものとして定義される。これらのペプチドは、親和性が中程度～高いMHC分子に結合する有意な可能性を有することから、樹状細胞またはマクロファージなど専門的抗原提示細胞(APC)、ならびに非専門的APCの両方の表面に提示され、そこで通過するT細胞によって探索される可能性がかなり高い。

40

【0140】

突然変異配列内で推定されるT細胞エピトープを、正規適合配列と比較して、ネオエピトープを特定する。以下のいずれかに該当する場合、突然変異配列からのT細胞エピトープをネオエピトープと称する。

それらがMHCに結合する確率が本発明者らの予想分布の上位5パーセンタイル以内に該当し、正規適合配列がMHCに結合する確率が予想分布の上位10パーセンタイル未満に

50

該当する場合、または

それらがMHCに結合する確率が本発明者らの予想分布の上位5パーセンタイル以内に該当し、正規適合配列がMHCに結合する確率が予想分布の上位10パーセンタイル以内に該当し、突然変異ペプチドと非突然変異ペプチドの間に少なくとも1個のミスマッチな、TCR対向アミノ酸が存在する場合。

MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの2位、3位、5位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する9merの突然変異ペプチドと9merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位および8位におけるものであり、MHCクラスII分子に結合する10merの突然変異ペプチドと10merの非突然変異ペプチドのTCR対向アミノ酸残基は、アミノ末端から数えて、突然変異ペプチドおよび非突然変異ペプチドの4位、5位、6位、7位、8位および9位におけるものである。

【0141】

加えて、MHCに結合する高い確率を示す配列を、カスタマイズされた相同性検索を用いて選別して、参照プロテオームに一般的に認められるTCR対向残基の組合せを含むエピトープを排除する。この相同性選別ではまず、所定のタンパク質配列内に含まれるすべての推定エピトープを検討し、個々の推定エピトープをそれぞれの成分であるアグレトープとエピトープに区分する。次いで各配列を、UniProtデータベース(UniProt Proteome ID UP000000589、Reviewed/Swiss-Protセット)に由来するマウスタンパク質データベースと対比して選別する。ヒト分析の場合、次いで各配列をUniProtデータベース(UniProt Proteome ID UP0000005640、Reviewed/Swiss-Protセット)に由来するヒタンパク質データベースと対比して選別することになる。

交差保存性エピトープ、または互換性のあるMHC結合アグレトープ(すなわち入力(突然変異)ペプチドとその参照非突然変異カウンターパート両方のアグレトープが同じMHCアレルに結合すると推定される)を有する参照プロテオームに由来するエピトープ、および全く同一のTCR対向エピトープが返される。エピトープの相同性スコアは、参照プロテオームの範囲内でマッチする交差保存性MHC結合ペプチドの数に相当する。言い換えれば、エピトープeの相同性スコア H_e は下記のとおり計算される。

$$H_e = |X_e|$$

式中、

X_e はエピトープeと同じMHCクラスIIまたはMHCクラスII拘束性であり、エピトープeと同一のTCR対向エピトープを提示する、参照プロテオームに由来する一連のMHC結合エピトープを表す。

【0142】

延長線上で考えると、所定のペプチドまたはタンパク質の相同性スコアは、該ペプチドまたはタンパク質と共に含有される個別のエピトープの平均相同性スコアに相当する。言い換えれば、ペプチドpの相同性スコア H_p は下記のとおり計算される。

【数6】

$$H_p = \frac{\sum_{e \in E} H_e}{|E|}$$

式中、

Eはペプチドpの範囲内の一連のMHCクラスIIまたはMHCクラスII拘束性エピトープを表し、

H_e は上記の定義のとおり、エピトープeの相同性スコアを表す。

【0143】

TCRコンタクトを自己由来エピトープと共有する抗体由来エピトープを認識するT細胞

は、周辺部に放出され得る前に胸腺選択中に除去されるまたはアネルギー性となる可能性がある。したがって、これらのT細胞を標的とするワクチン成分は非効果的であると思われる。他方、交差反応性エピトープを標的とするワクチン誘導性免疫応答は、相同性検索によって特定される交差反応性エピトープの相同体を標的とする望ましくない自己免疫応答を誘導する可能性がある。結果として、ワクチンの安全性が低下する恐れがある。IEDBデータベース(iedb.org)に収録されたMHCクラスII拘束性T細胞エピトープを再検討すると、高い相同性スコアと観察されたIL-10生成との間での統計的に有意な関係、および高い相同性スコアと観察されたIL-4生成との間での統計的に有意な逆の関係が存在することが分かる(例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれているMoise et al. iVax: An integrated toolkit for the selection and optimization of antigens and the design of epitope-driven vaccines. Human Vaccin Immunother. 2015; 11(9):2312-21を参照のこと)。逆に、同じ相同性分析を、免疫原性であることが知られている、例えばIEDBデータベースから抽出される一連の既知の感染性疾患由来のエピトープと対比して、あるいは一連の他の免疫原性配列または共通の病原体由来の配列と対比して実行することができる。この分析は、他の既知である、または想定上のエフェクターT細胞エピトープとの高度な相同性を共有するネオエピトープ候補を特定するという目的を有する。当該ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド(あるいは前記ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸)は、ワクチン製剤において優先され得る。

10

20

【0144】

各突然変異配列について、前述の相同性選別を実施して、コードされたMHCクラスIおよびMHCクラスII拘束性ネオエピトープそれぞれの自己との類似性の度合いを特性評価する。MHCクラスIまたはMHCクラスIIのネオエピトープおよびMHCクラスIまたはMHCクラスIIの対応する非突然変異エピトープは、2種以上の交差反応性マッチを有する場合、高い自己との類似性を示すものとして分類され、寛容される確率あるいは調節性T細胞および／または他の有害T細胞(可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を含む)を関与させる確率がより高いと見なされる。次いで各突然変異配列について最適化手順を実行し、アミノ酸配列内にサブストリングが認められ、結果として

30

該サブストリングにおいて少なくとも1種のMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性エピトープがコードされ、かつ

該サブストリングにおいてコードされたMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性ネオエピトープがすべて、参照プロテオームにおける2種以下の交差反応性マッチを有し、かつ

該サブストリングにおいてコードされたMHCクラスIまたはMHCクラスII拘束性エピトープがすべて、参照プロテオームにおける2種以下の交差反応性マッチを有する
となるかどうかを判定する。

【0145】

この手順は、Tregitopeおよび／または他の想定上の有害T細胞を関与させる想定上のエピトープ(可能性のある宿主交差反応性を有するT細胞および／またはアネルギー性T細胞を関与させるエピトープを含む)および他の高交差保存性エピトープを含むアミノ酸サブストリングを、突然変異配列から排除する効果を有する。結果的な最適化された配列は、自己配列との低い類似性を示すエピトープまたはネオエピトープのみ含むことになる。上記の基準にマッチするサブストリングが認められない場合、突然変異配列は検討から除外される。

40

【0146】

分析した378種の突然変異配列のうち135種を最適化した結果、低い自己との類似性を示す、MHCクラスIおよび／またはMHCクラスII拘束性ネオエピトープを含むアミノ酸配列を得ることができた。次いでこれら135種の配列(1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド)を、以下に挙げる特徴の1種または複

50

数に従って格付けした。

免疫原性関連の特徴（複数の態様において、以下の1種または複数を含むと考えられる）

MHCクラスIネオエピトープのカウント

MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位

MHCクラスI拘束性Tregを新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が誘導する潜在性

MHCクラスIIネオエピトープのカウント（態様において、1又は複数を含み得る）

MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位

MHCクラスII拘束性Tregを新抗原（1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が誘導する潜在性

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がMHCクラスIとII両方のネオエピトープを含むか否か

【0147】

シーケンシング関連の特徴（複数の態様において、以下の1種または複数を含むと考えられる）

付随する転写の発現レベル

腫瘍DNAにおける突然変異の標的領域、すなわち突然変異のゲノム位置と重複する固有のシーケンシング読み取り結果

腫瘍DNAにおける突然変異の変異アレル割合（VAF）、すなわちシーケンシング読み取り結果全体にわたり観察される突然変異の0～1の相対的頻度

必要に応じて他のシーケンシングメタデータ

【0148】

物理化学関連の特徴（複数の態様において、以下の1種または複数を含むと考えられる）

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の正味荷電

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種の荷電残基を含むか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の範囲内のシステイン（C）の数

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種のシステイン（C）を含み、負に帯電した状態であるか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がポリプロリンモチーフ（PP）を含むか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも1種のメチオニン（M）を含むか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がN末端グルタミン（Q）を含むか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がグリシン（G）および／またはプロリン（P）を最後までしくは最後から2番目の位置に含むか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が「DG」、「DS」、「DA」または「DN」のモチーフを含むか否か

最適化された新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の疎水性指標

【0149】

下記の付点体系に従って、新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）にスコアを割り当てることができる（複数の態様において、スコア（例えばポイントおよび／またはパーセンテージ）が斜体字および太字で記載されている場合、調整の対象となる場合がある。複数の態様において、付点体系は下記の付点

10

20

30

40

50

工程／ペナルティーを課す工程の1つまたは複数を含む場合がある）。

MHCクラスIネオエピトープのカウント（最大20ポイント）

1種以下のMHCクラスIネオエピトープを含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

2種のMHCクラスIネオエピトープを含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの80%（すなわち16ポイント）を割り当てられる

3種以上のMHCクラスIネオエピトープを含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち20ポイント）を割り当てられる

10

【0150】

MHCクラスIネオエピトープのパーセンタイル順位（最大20ポイント）

MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が2.5%超5%以下に該当する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%超2.5%以下に該当する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち10ポイント）を割り当てられる

MHCクラスIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%以下に該当する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち20ポイント）を割り当てられる

20

【0151】

MHCクラスIIネオエピトープのカウント（最大10ポイント）

1種以下のMHCクラスIIネオエピトープを含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

2種のMHCクラスIIネオエピトープを含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの80%（すなわち8ポイント）を割り当てられる

3種以上のMHCクラスIIネオエピトープを含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち10ポイント）を割り当てられる

30

【0152】

MHCクラスIIネオエピトープのパーセンタイル順位（最大5ポイント）

MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が2.5%超5%以下に該当する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%超2.5%以下に該当する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち2.5ポイント）を割り当てられる

MHCクラスIIネオエピトープの最低パーセンタイル順位が1%以下に該当する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち5ポイント）を割り当てられる

40

【0153】

MHCクラスIとII両方のネオエピトープの存在（最大20ポイント）

MHCクラスIネオエピトープのみまたはMHCクラスIIネオエピトープのみ含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

少なくとも1種のMHCクラスIネオエピトープと少なくとも1種のMHCクラスIIネ

50

オエピトープとを含む新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの１００％（すなわち２０ポイント）を割り当てられる

【０１５４】

MHCクラスⅠ拘束性Treg誘導潜在性（最大５ポイント）

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅠ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅠ相同性スコア（上記のとおり計算）が０以上０．２５未満である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの１００％（すなわち５ポイント）を割り当てられる

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅠ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅠ相同性スコアが０．２５以上０．５未満である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの５０％（すなわち２．５ポイント）を割り当てられる

10

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅠ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅠ相同性スコアが０．５以上１未満である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの１０％（すなわち０．５ポイント）を割り当てられる

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅠ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅠ相同性スコアが１以上である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの０％（すなわち０ポイント）を割り当てられる

20

【０１５５】

MHCクラスⅡ拘束性Treg誘導潜在性（最大２０ポイント）

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅡ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅡ相同性スコアが０以上０．２５未満である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの１００％（すなわち２０ポイント）を割り当てられる

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅡ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅡ相同性スコアが０．２５以上０．５未満である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの５０％（すなわち１０ポイント）を割り当てられる

30

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅡ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅡ相同性スコアが０．５以上１未満である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの１０％（すなわち２ポイント）を割り当てられる

参照プロテオーム内標的領域のMHCクラスⅡ拘束性平均深度、またはMHCクラスⅡ相同性スコアが１以上である新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの０％（すなわち０ポイント）を割り当てられる

【０１５６】

転写発現（単位は例えば当該技術分野で知られているように計算される１００万当たり転写（TPM））（最大３０ポイント）

40

発現がTPMの上位１０％に該当する転写に由来する新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの１００％（すなわち３０ポイント）を割り当てられる

発現がTPMの上位２５％未満に該当する転写に由来する新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの０％（すなわち０ポイント）を割り当てられる

発現がTPMの上位２５％～１０％に該当する転写に由来する新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）は比例分配されるパーセントのポイントを割り当てられる

50

【0157】

被覆領域（当該技術分野で知られているように計算）（最大1ポイント）

腫瘍DNA内被覆領域の深度が20未満である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

腫瘍DNA内被覆領域の深度が20～50（厳格に未満）である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち0.5ポイント）を割り当てられる

腫瘍DNA内被覆領域の深度が50以上である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち1ポイント）を割り当てられる

10

【0158】

変異アレル割合（VAF）（当該技術分野で知られているように計算）（最大20ポイント）

同系モデルのムタノームに由来する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の場合

VAFが0.5未満である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

VAFが0.5～0.75（厳格に未満）である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち10ポイント）を割り当てられる

20

VAFが0.75以上である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち20ポイント）を割り当てられる

【0159】

患者のムタノームに由来する新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の場合

VAFが0.1未満である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの0%（すなわち0ポイント）を割り当てられる

30

VAFが0.1～0.25（厳格に未満）である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの50%（すなわち10ポイント）を割り当てられる

VAFが0.25以上である突然変異を含む新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）はポイントの100%（すなわち20ポイント）を割り当てられる

【0160】

次いでポイントを合算し、100ポイントの尺度を基準に正規化し、完璧な新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）、言い換えれば最大ポイント数を割り当てられる新抗原はスコアが100となる。

40

厳格なペナルティー（現在は、100ポイント正規化の前または後に割り当てることができる100ポイントの減算とする規定）を、以下の場合に候補新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）に割り当てることができる。

新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が帯電状態の残基を有していない場合、または

新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）の正味荷電がゼロである、または

新抗原（例えば1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）

50

）が少なくとも２種のシステインを有する場合、または
 新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも１種のシステインを有し、負の帯電状態である場合、または
 新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がN末端グルタミンを含む場合、または
 新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がポリ－プロリンモチーフを有する場合、または
 新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が２以上の疎水性指標を有する場合

【０１６１】

中程度のペナルティー（現在は、１０ポイント減算とする規定）を、以下の場合に新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）に割り当てることができる。

新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が１種のシステインを含む場合

軽微なペナルティー（現在は、１ポイント減算とする規定）を、以下の場合に新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）に割り当てることができる。

新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が負の帯電状態である場合、または

新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が少なくとも１種のメチオニンを含む場合、または

新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）がグリシンおよび／またはプロリンを最後もしくは最後から２番目の位置に含む場合、または

新抗原（例えば１種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が「DG」、「DS」、「DA」または「DN」のモチーフを含む場合

【０１６２】

あるいは、下記の付点体系に従ってスコアを割り当てることができる。

$$S_p = (C_{1p} + C_{2p}) \times F_p \times E_p$$

または

$$S_p = (C_{1p} + C_{2p}) \times F_p$$

式中、

S_p はペプチド p のスコアを指し、

C_{1p} はペプチド p のMHCクラスⅠ拘束性免疫原性潜在性を指し、

C_{2p} はペプチド p のMHCクラスⅡ拘束性免疫原性潜在性を指し、

F_p は腫瘍生検において観察されたペプチド p によりコードされた突然変異の頻度を指し、

、

E_p は腫瘍生検において観察されたペプチド p によりコードされた突然変異の発現（複数の態様においては突然変異を含む遺伝子の発現）を観察された発現分布のパーセンタイル順位で表したものを指す。

【０１６３】

ペプチド p のMHCクラスⅠ拘束性免疫原性潜在性 C_{1p} は下記のとおり計算される。

【数７】

$$C_{1p} = \alpha_1 \left(Z_{1p} - \left(Z_{1p} \times \frac{H_{1p}}{\beta_1} \right) \right)$$

または

【数８】

$$C1_p = \alpha_1 \sum_{e \in E1_p} \left(Z1_e - \left(Z1_e \times \frac{H1_e}{\beta_1} \right) \right)$$

式中、

α_1 （例えば通常は 1 に設定される）および β_1 （例えば通常は 2 に設定され、上記で定義される方法において「参照プロテオームにおいて 2 種以上の交差反応性マッチを有するエピトープは高い自己との類似性を示すものとして分類される」状況を指す）は既定の定数を指し、

$E1_p$ はペプチド p 内の一連の MHC クラス I 拘束性ネオエピトープを指し、

$Z1_p$ はペプチド p 内の MHC クラス I 拘束性ネオエピトープそれぞれのパーセンタイル順位の合計を標準 Z スコアを使用して表したものを指し、

$Z1_e$ は MHC クラス I 拘束性ネオエピトープ e のパーセンタイル順位を標準 Z スコアを使用して表したものを指し、

$H1_p$ は上記で定義されるペプチド p の MHC クラス I 拘束性相同性スコアを指し、

$H1_e$ は上記で定義されるネオエピトープ e の MHC クラス I 拘束性相同性スコアを指す。

【0164】

ペプチド p の MHC クラス II 拘束性免疫原性潜在性 $C2_p$ は下記のとおり計算される。

【数 9】

$$C2_p = \alpha_2 \left(Z2_p - \left(Z2_p \times \frac{H2_p}{\beta_2} \right) \right)$$

または

【数 10】

$$C2_p = \alpha_2 \sum_{e \in E2_p} \left(Z2_e - \left(Z2_e \times \frac{H2_e}{\beta_2} \right) \right)$$

式中、

α_2 （例えば通常は 1 に設定される）および β_2 （例えば通常は 2 に設定され、上記で定義される方法において「参照プロテオームにおいて 2 種以上の交差反応性マッチを有するエピトープは高い自己との類似性を示すものとして分類される」状況を指す）は既定の定数を指し、

$E2_p$ はペプチド p 内の一連の MHC クラス II 拘束性ネオエピトープを指し、

$Z2_p$ はペプチド p 内の MHC クラス II 拘束性ネオエピトープそれぞれのパーセンタイル順位の合計を標準 Z スコアを使用して表したものを指し、

$Z2_e$ は MHC クラス II 拘束性ネオエピトープ e のパーセンタイル順位を標準 Z スコアを使用して表したものを指し、

$H2_p$ は上記で定義されるペプチド p の MHC クラス II 拘束性相同性スコアを指し、

$H2_e$ は上記で定義されるネオエピトープ e の MHC クラス II 拘束性相同性スコアを指す。

【0165】

次いで候補抗原（例えば 1 種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）を、それぞれの高～低のスコアに応じて格付けする。最高順位の抗原（例えば 1 種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）が選択される。

【0166】

下表は CL-26 がんモデルからのペプチドの例である。

【表 1】

表1: 1種または複数の特定ネオエピトープを含む新抗原							
ペプチドID	遺伝子座	配列 MHCクラスIネオエピトープ(拘束性)および <u>MHC</u> <u>C</u> クラスIIネオエピトープ(拘束性)	遺伝子	参照 AA	AA 位置	代替 AA	配列 番号
EO_CT 26_01	CHR4:86583 172	Ac-LQARLTSYETLK-NH2	Haus6	Ala	821	Thr	1
		ARLTSYETL (Dd)					2
		ARLTSYETL (Kd)					3
		ARLTSYETL (Ad)					4
EO_CT 26_02	CHR11:6964 9178	Ac-ETPEACRQARNYLE FSE-NH2	Fxr2	Ser	287	Asn	5
		EACRQARNY (Ad)					6
		ACRQARNYL (Kd)					7
		RQARNYLEF (Ad)					8
EO_CT 26_03	CHR2:12867 6212	Ac-SSRVQYVVNPVAVKI VF-NH2	Anapc1	Asp	241	Asn	9
		RVQYVVNPA (Ad)					10
		QYVVNPVAVKI (Kd)					11
EO_CT 26_04	CHR2:15885 1764	Ac-TSKYYMRDVIAIESA -NH2	Dhx35	Thr	646	Ile	12
		SKYYMRDVI (Kd)					13
		KYYMRDVIAI (Kd)					14
		YYMRDVIAI (Dd)					15
		YYMRDVIAI (Kd)					16
		YYMRDVIAI (Ad)					17
EO_CT 26_05	CHR6:33770 51	Ac-PALLIKHMYNKLIS- NH2	Samd9l	Arg	70	His	18
		PALLIKHMY (Ad)					19
		LLIKHMYNK (Ed)					20
		LIKHMYNKL (Kd)					21
		KHMYNKLIS (Ad)					22
EO_CT 26_06	CHR5:10003 7938	Ac-LSWDTSKKNLTEYL SRF-NH2	Hnmpdl	Asp	163	Asn	23
		SWDTSKKNL (Kd)					24
		TSKKNLTEYL (Kd)					25
		SKKNLTEYL (Kd)					26

10

20

30

40

50

EO_CT 26_07	CHR12:9881 5985	NNVHYLNDGDALIIYHT AS-NH2	Em15	Asp	1396	Ala	27
		HYLNDGDAI (Kd)					28
		HYLNDGDALII (Kd)					29
		GDALIIYHTA (Ad)					30
EO_CT 26_08	CHRX:60293 650	Ac-PQPDLYRFVRRISI-N H2	Atp11c	Gly	223	Arg	31
		DLYRFVRRRI (Ed)					32
		LYRFVRRISI (Kd)					33
EO_CT 26_09	CHR12:9878 5005	Ac-DTKCTKADCLFTHM SR-NH2	Zc3h14	Pro	653	Leu	34
		TKCTKADCL (Ad)					35
		KADCLFTHM (Kd)					36
EO_CT 26_10	CHR15:3275 728	EEDGIAVWTLNNGN-NH 2	Sepp1	Asp	122	Ala	37
		DGIAVWTL (Dd)					38
		DGIAVWTL (Kd)					39
EO_CT 26_11	CHR7:55873 449	Ac-ATVHSSMNKMLEE- NH2	Cyfip1	Glu	71	Lys	40
		TVHSSMNKM (Kd)					41
		VHSSMNKML (Ed)					42
EO_CT 26_12	CHR12:9182 5363	ILGYRYWTGIGVLQSC- NH2	Sel11	Ala	299	Thr	43
		GYRYWTGIGV (Kd)					44
		RYWTGIGVL (Dd)					45
		RYWTGIGVL (Kd)					46
		RYWTGIGVLQ (Kd)					47
EO_CT 26_13	CHR6:52729 334	Ac-FCYVITYKGEIRGAS- NH2	Tax1bp1	His	107	Tyr	48
		CYVITYKGEI (Kd)					49
EO_CT 26_14	CHR2:10929 8148	Ac-VKICNMQKAAIL-NH 2	Kif18a	Glu	383	Ala	50
		KICNMQKAA (Ad)					51
		KICNMQKAAI (Kd)					52
EO_CT 26_15	CHR10:1220 89020	Ac-RQFPVVEANWTML HDE-NH2	Tmem5	Ser	259	Asn	53
		VVEANWTML (Dd)					54
EO_CT 26_16	CHR2:18071 3221	Ac-MSYAEKSDEITKD-N H2	Gid8	Pro	7	Ser	55
		SYAEKSDEI (Kd)					56

10

20

30

40

50

EO_CT 26_17	CHR7:45442 527	Ac-RIQEFVRSHFY-NH2 RIQEFVRSH (Kd)	Gys1	Gly	310	Ser	57 58
EO_CT 26_18	CHR5:12969 7821	Ac-KVGLTVKTYEFLER NIP-NH2 LTVKTYEFL (Kd) KTYEFLERN (Ed) KTYEFLERNI (Kd) TYEFLERNI (Dd) TYEFLERNI (Kd)	Sept14	Lcu	97	Phe	59 60 61 62 63 64
EO_CT 26_19	CHR7:65663 891	Ac-NSSTYWKGNPOMET LQ-NH2 TYWKGNPOM (Kd) TYWKGNPOME (Kd) KGNPEMETL (Kd)	Tarsl2	Glu	353	Lys	65 66 67 68
EO_CT 26_20	CHR11:5818 8928	Ac-RKSYMQKYFLDTV KSYMQKYFL (Kd) SYMQKYFL (Kd) SYMQKYFLD (Kd) YYMQKYFLDT (Kd)	Gm1225 0	Asn	390	Lys	69 70 71 72 73

10

20

【 0 1 6 7 】

30

40

50

【表 2】

表2: 高交差保存性MHCクラスII拘束性ネオエピトープ							
ペプチドID	遺伝子座	配列 MHCクラスII寛容/寛容 原性ネオエピトープ(拘束 性)	遺伝子	参照 AA	AA 位置	代替 AA	配列 番号
EO_CT2 6_Treg_ 01	CHR2:109894 549	Ac-PQKLQALQRALQSE- NH2	Lin7	Val	41	Ala	74
		<u>KLQALQRAL</u> (Ad)					75
EO_CT2 6_Treg_ 02	CHR2:156167 568	Ac-PHSIKLSRRRSRSKNP FRKDKSPVR-NH2	Rbm39	Ser	129	Asn	76
		<u>IKLSRRRSR</u> (Ed)					77
		<u>KLSRRRSRS</u> (Ed)					78
		<u>LSRRRSRSK</u> (Ed)					79
		<u>SRRRSRSKN</u> (Ed)					80
		<u>SKNPFRKDK</u> (Ed)					81
EO_CT2 6_Treg_ 03	CHR2:767127 42	Ac-HPWLKQRIDKVSTK- NH2	Ttn	Arg	31554	Lys	82
		<u>WLKQRIDKV</u> (Ed)					83
EO_CT2 6_Treg_ 04	CHR3:408058 84	Ac-HSVEMLLKPRRSLDE N-NH2	Plk4	Ser	405	Leu	84
		<u>MLLKPRRSL</u> (Ad, Ed)					85
EO_CT2 6_Treg_ 05	CHR3:900251 94	Ac-KTPSSLENDSSNLD- NH2	Ubp2l	Met	295	Leu	87
		<u>SSENDSSN</u> (Ed)					87
EO_CT2 6_Treg_ 06	CHR5:106983 158	Ac-SRVQAAQAQHSKDS LYKRDND-NH2	Cdc7	Glu	500	Lys	88
		<u>QAAQAQHSK</u> (Ad)					89
		<u>HSKDSLYKR</u> (Ed)					90
EO_CT2 6_Treg_ 07	CHR9:857199 17	Ac-LEGVRLNEKSNVIA KKTGNK-NH2	Ibtk	Ile	747	Ser	91
		<u>VRLNEKSN</u> (Ed)					92
		<u>EKSNVIAKK</u> (Ed)					93
		<u>KSNVIAKKT</u> (Ed)					94
EO_CT2 6_Treg_ 08	CHR11:40728 456	Ac-DTLLASTKKAKKS VSKK-NH2	Hmnr	Ala	66	Thr	95
		<u>LLASTKKAK</u> (Ed)					96
		<u>STKKAKKSV</u> (Ed)					97

10

20

30

40

50

EO_CT2 6_Treg_ 09	CHR12:98794 154	Ac-LLVSSLKIWRKKRDR RCAIH-NH2	Em15	Gly	44	Arg	98
		SSLKIWRKK (Ed)					99
		SLKIWRKKR (Ed)					100
		LKIWRKKRD (Ed)					101
		WRKKRDRRC (Ed)					102
EO_CT2 6_Treg_ 10	CHR16:57513 281	Ac-PMNELDKVVKKHKE S-NH2	Filip11	Glu	146	Lys	103
		ELDKVVKKII (Ed)					104

10

【 0 1 6 8 】

20

30

40

50

【表 3】

表3: 高交差保存性MHCクラスI拘束性ネオエピトープ							
ペプチドID	遺伝子座	配列 MHCクラスI寛容/寛容原性ネオエピトープ(拘束性)	遺伝子	参照AA	AA位置	代替AA	配列番号
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 1	CHR1:163996 661	Ac-VLDFGCGSGLLGITA-NH2	Mettl18	Leu	184	Phe	105
		FGCGSGLLG (Dd)					106
		CGSGLLGIT (Dd)					107
		GSGLLGITA (Dd)					108
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 2	CHR2:109894 549	Ac-PQKLQALQRALQSE-NH2	Lin7c	Val	41	Ala	74
		KLQALQRAL (Dd)					75
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 3	CHR3:299796 53	Ac-NMDTRPSSDSSLQH A-NH2	Mecom	Gly	301	Ser	109
		TRPSSDSSL (Dd)					110
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 4	CHR3:138148 475	Ac-RRDVARSSLRLI IDC-NH2	Trmt10a	Val	105	Ile	111
		VARSSLRLI (Dd)					112
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 5	CHR5:441921 34	Ac-MSN NFVEIKESVFKK-NH2	Tapt1	Gly	285	Glu	113
		NFVEIKESV (Kd)					114
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 6	CHR5:137327 443	Ac-PSRAIPLGIIIAVAY-NH2	Slc12a9	Thr	302	Ile	115
		RAIPLGII (Dd)					116
		AIPLGIIA (Dd)					117
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 7	CHR7_55873 449	Ac-VHSSMNKMLEEGQEY-NH2	Cyfip1	Glu	71	Lys	118
		SMNKMLEEG (Kd)					119
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 8	CHR13_1240 9236	Ac-QHFGVEKTVSSLLN-NH2	Heatr1	Glu	552	Lys	120
		GVEKTVSSL (Kd)					121
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_0 9	CHR17_8442 9178	Ac-IKCLMENLKDEISQA-NH2	Thada	Glu	892	Lys	122
		LMENLKDEI (Kd)					123
EO_CT2 6_Treg_ MHCI_1 0	CHR19_5363 5752	Ac-QQRKFKASRASILSE M-NH2	Smc3	Asp	733	Ala	124
		KFKASRASI (Kd)					125
		FKASRASIL (Dd)					126

10

20

30

40

【0169】

インビボ研究設計

ワクチンの有効性を B a l b / c マウスで試験した。マウスを以下のとおり 1) P B S 対照、2) ポリ I C L C (賦形剤)、3) 選択された新抗原ペプチド + ポリ I C L C の 3 グループに分けた。

グループ 1 : P B S を 5 日目、8 日目、12 日目、15 日目、19 日目、22 日目および 26 日目に皮下注射

グループ 2 : 50 μ g のポリ I C L C を 5 日目、8 日目、12 日目、15 日目、19 日目

50

、 22日目および26日目に皮下注射

グループ3：5 μ gの選択された新抗原ペプチド（合計100 μ gの選択された新抗原ペプチド）+50 μ gのポリICLCを5日目、8日目、12日目、15日目、19日目、22日目および26日目に皮下注射

すべてのマウス（各グループ10匹ずつ）に、0%のMatrigelに入れた 3×10^5 の腫瘍細胞を0日目に注射した。腫瘍体積が2,000 mm^3 に到達した時点または45日目のいずれか早い時点でマウスを殺処分した。

【0170】

ポリICLCは腫瘍負荷を制御できない

グループ2（ポリICLCで免疫を付与されたマウス）は、グループ1（PBSで免疫を付与されたマウス）と比較した腫瘍負荷の低減を示さなかった。これらの結果は、以前報告されたCharles Riverによる実験と一致する。グループ1のマウスは28日目を過ぎて生存率が50%未満で、10匹中7匹（70%）はその日までに腫瘍体積が少なくとも2,000 mm^3 に達した。

選択された新抗原ペプチドワクチンは腫瘍負荷を低減する

グループ3（選択された新抗原ペプチドワクチン+ポリICLCで免疫を付与されたマウス）は、グループ1と比較して、生存延長を示した。グループ1とは対照的に、グループ3ではその日までにエンドポイントに達したマウスがより少なかった。

【0171】

（実施例2）

ペプチドワクチンと自己類似ネオエピトープを同時投与した場合のIFN γ 応答の抑制
A n c e r（商標）プラットフォームを使用して、CT26変異型を特定し、潜在的ワクチン候補ペプチドとして格付けした。このリストから、CT26大腸がん同種マウスモデル向けに開発されたペプチド系ワクチンの開発に活用するための20種の新抗原を選択した（上記参照）。

ワクチン候補に対する免疫原性応答を抑制する潜在性を有することを背景に、想定上の「自己類似」ネオエピトープを特定し排除することの重要性を実証するため、JANUSMATRIX（商標）を基に高い自己との類似性を示すCT26ネオエピトープを特定し、それらをワクチン製剤に含めると製剤の免疫原性がどう変化するかを検証した。

【0172】

CT26自己類似配列の選択

固有および公開のCT26ムタノームから抽出し378種の変異型をJANUSMATRIX（商標）アルゴリズムによって選別して、マウス配列との高い類似性を示す新抗原配列を特定した。これら378種の、SNVを生成した想定上の「自己類似」調節性T細胞ネオエピトープのうち35種と24種が、それぞれMHCクラスIIおよびMHCクラスI拘束性であった。これらのMHCクラスII拘束性配列のうち10種を、潜在的な製造可能性の問題を理由に、またはMHCに結合する潜在性が限られる想定上のTregネオエピトープの存在を理由に除外した。

残り25種のMHCクラスII拘束性配列を手作業で再検討して、交差保存性が最も高いネオエピトープを含む新抗原に優先順位を付けた。言い換えれば、MHCクラスII拘束性ネオエピトープをコードする新抗原のうち、参照マウスプロテオーム内の互換性のあるTCR面との相同マッチ数が最も多いものを、他の新抗原より優先した。このリストから10種のMHCクラスII「自己類似」新抗原を、インビボ免疫原性研究に使用するために選択した。

加えて、10種のMHCクラスI「自己類似」新抗原を、後続のインビボ研究に使用するために選択した。

【0173】

研究設計

B a l b / cマウスを、A) 賦形剤対照、B) A n c e r（商標）選択CT26新抗原ペプチド+補助剤、C) A n c e r（商標）選択CT26新抗原ペプチド+JANUSMA

10

20

30

40

50

TRI X (商標) MHCクラスII選択ペプチド+補助剤の3グループに分けた。すべてのワクチンを、補助剤ポリICLCを添加して製剤した。ポリICLCはHiltono lとしても知られ、パターン認識受容体(PRR)向けの合成二本鎖RNA(dsRNA)作動薬であり、TLR3作動薬でもある。グループA、BおよびCは初回ワクチン接種を受け、その後、初回ワクチン接種の2週間後と4週間後にワクチン強化接種を受けた。すべてのマウスを最終強化接種の7~10日後に殺処分し、脾細胞単離とIFN γ ELISpotアッセイ向けに脾臓を採取した。

グループA: 50 μ gのポリICLC (容積200 μ L)

グループB: 20種のAncer (商標) 選択CT26新抗原ペプチド (1種につき5 μ g)、100 μ gの全ペプチド、50 μ gのポリICLC (容積200 μ L)

グループC: 20種のAncer (商標) 選択CT26新抗原ペプチド+10種のJANUSMATRIX (商標) MHCクラスII自己類似ペプチド (1種につき5 μ g)、150 μ gの全ペプチド、50 μ gのポリICLC (容積200 μ L)

【0174】

単離した脾細胞をプレートに固定し、Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチド (CT26__pool)、JANUSMATRIX (商標) 選択ペプチド (CT26-Treg__pool)、クラスIペプチドプール、ならびに個別のAncer (商標) 選択CT26新抗原ペプチドCT26-1 (CT26__peptide 1) およびCT26-20 (CT26__peptide 1) で刺激した。プレートを終夜培養し、その後、読み取った。陽性の結果は、背景上で脾細胞100万個当たり50個超のスポット形成細胞(SFC)が存在し、刺激指数が背景上で2倍超の場合と定義された。スチューデントT検定により統計的有意性を判定し、マウスの抗原対無抗原刺激の対比、およびグループ比較を行った ($p < 0.05$)。

【0175】

Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチドは免疫原性である

CT26新抗原ペプチドプール、クラスI拘束性プール、および個別ペプチドCT26-1は、CT26ペプチドのワクチン接種を受けたマウスにおいて、有意なエピトープ特異的IFN γ 応答を誘発した。JANUSMATRIX (商標) 選択ペプチドは認識されず、この刺激条件では陽性の結果が全く測定されなかった。Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチドは、Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチド+ポリICLCでワクチン接種を受けたマウスにおいて免疫原性であると判定された。CT26__poolに対するリコール応答は、媒体のみで刺激された細胞と比べ、エピトープ特異的IFN γ 応答の有意な増加を刺激した。CT26-Tregペプチドプールで刺激された細胞ではIFN γ 応答が測定されなかったことから、CT26ペプチドのみでワクチン接種を受けたマウスでは無関係なペプチドが認識されないことが実証された。加えて、CT26新抗原は、クラスIプールに対する陽性応答により実証されたとおり、CD8+特異的T細胞応答を刺激することができた。個別エピトープに対する応答は多様であった。CT26-1 (クラスIとII) エピトープは免疫原性と考えられる一方、CT26-20 (クラスI) はそうでなかった。

【0176】

Ancer (商標) 選択CT26 MHCクラスII「自己類似」Treg新抗原ペプチドは新抗原免疫応答を抑制する

Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチドプールは、グループBのワクチン接種マウスにおいて、グループAには見られなかった強いIFN γ 応答を誘発し、エピトープ特異的応答を実証した。CT26ペプチドプールとクラスIプールは、グループBにおいてグループAと比較して強いエピトープ特異的IFN γ 応答を刺激することもできたが、グループCに投与したワクチンにJANUSMATRIX (商標) 選択MHCクラスIIエピトープを添加すると、IFN γ 応答が有意に低減する。

Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチドの応答は、Ancer (商標) 選択CT26新抗原ペプチドとJANUSMATRIX (商標) 選択新抗原の両方で免疫を付与さ

10

20

30

40

50

れたグループCのマウスにおいて、A n c e r（商標）選択CT26新抗原ペプチドのみ接種されたグループBと比べ抑制される。

【0177】

（実施例3）

インビトロHLAペプチド結合アッセイ

患者の全エキソームシーケンシングデータから特定される、個別の腫瘍特異的突然変異ペプチド（例えば、本明細書に開示されるような1種または複数の特定ネオエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド）のHLA結合を、インビトロ競争的結合アッセイでの試験により評価する。このアッセイでは、試験ペプチドの結合親和性を、結合親和性が既知である対照ペプチドによるHLA結合の阻害を測定することによって立証する。試験ペプチドを様々な濃度で培養し、対照ペプチドの濃度を対応するHLA分子と併せて設定する。HLA分子に対する対照ペプチド結合の阻害レベルを、各試験ペプチド濃度で測定し、これらのデータを使用して、アッセイで評価する特定のHLA分子について、試験ペプチドの結合親和性を立証する。

10

【0178】

例示的なクラスII HLA結合アッセイは、Steere AC et al., 2006, Antibiotic-Refractory Lyme Arthritis is Associated with HLA-DR Molecules that Bind a Borrelia burgdorferi Peptide. J Exp Med 203(4): 961-71を基に適応されたものである。このアッセイにより、ペプチド-MHC親和性の間接的尺度が得られる。結合アッセイでは、ビオチン化されたHLA特異的な高結合制御ペプチドと、可溶性HLA分子を、非標識化実験用ペプチドと併せて培養する。実験用ペプチドを、pH 5.3の緩衝水溶液中で結合試薬と混合し、その結果、8通りの濃度の最終範囲が102, 500 nM~0 nMとなる。混合物を37℃で24時間培養して、平衡状態に到達させる。結合反応に用いる温度とpHの条件は、ペプチド処理およびHLA分子へのローディングの過程でエンドソーム中に認められる生理学的条件に相当するように選択した。翌日、結合反応を中和し、4℃で24時間にわたり総抗ヒトHLA-DR抗体（クローンL243）で被覆した酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）プレート上で、HLA-ペプチド複合体を捕捉する。洗浄し、周囲温度で1時間にわたりユーロピウム標識化ストレプトアビジンで培養した後、結合した標識化制御ペプチドを測定する時間分解光を、SpectraMax M5プレートリーダーで評価する。アッセイはすべて3回実施する。

20

30

【0179】

（実施例4）

インビトロ免疫原性プロトコル

患者特異的HLA分子に対するペプチド結合の検証後、患者のT細胞が腫瘍特異的突然変異ペプチド（例えば、少なくとも1種の特定ネオエピトープを含むアミノ酸配列を含む、それからなるまたは本質的にそれからなる少なくとも1種の特定ネオエピトープを含む被験体特異的ペプチドまたはポリペプチド（および／またはそれらの断片もしくは変異体））を認識および応答する能力を判定し、任意に、少なくとも1種の特定ネオエピトープのN末端および／またはC末端に任意の比で分布する1~12個の追加的なアミノ酸を判定する。患者特異的HLA分子に結合することが確認された突然変異ペプチドを合成し、それらを使用して、自己樹状細胞またはCD50L拡張自己B細胞などの患者由来の専門的抗原提示細胞（pAPC）にパルスを与える。週1回、IL-2およびIL-7の存在下でペプチドパルス自己pAPCによるインビトロでの再刺激を用いて、患者由来T細胞を拡張する。数週間の培養後、拡張T細胞のペプチド-HLA特異的反応性をELISpotアッセイにより試験して、IFN γ 放出を測定する。ペプチド特異的T細胞応答のさらなる特性評価を、クロム遊離アッセイまたはそれに匹敵する患者T細胞クローンを使用する方法などのインビトロ死滅アッセイを用いて実施してもよい。ペプチドパルス自己pAPCを使用するインビトロ刺激と、標準プロトコルに従う希釈制限による追加的なクローン作成工程の包含により、T細胞クローンを生成する。

40

【0180】

50

(実施例 5)

阻害性 T r e g ペプチド配列の評価

エフェクター T 細胞機能を抑制可能な阻害性調節性 T 細胞 (T r e g) 応答を活性化するペプチド配列の能力を、破傷風トキソイドバイスタンダー抑制アッセイ (T T B S A) と称するインビトロアッセイを用いて評価することができる。このアッセイは、破傷風トキソイド特有の記憶 T 細胞の機能を抑制する T r e g の能力に基づく。破傷風トキソイドによる免疫付与歴のある患者からの末梢血単核細胞 (P B M C) を培養すると、破傷風トキソイド特異的 C D 4 + エフェクター T 細胞が拡張する。T r e g によって認識されたペプチドを、破傷風トキソイドと併せてインビトロ添加すると、破傷風トキソイド特異的 C D 4 + エフェクター T 細胞の活性化と増殖が、用量依存の形で T r e g によって阻害される。このエフェクター T 細胞の活性化と増殖の阻害を、ペプチド特異的 T r e g 活性の尺度として用いる。

10

【0181】

(実施例 6)

阻害性 T r e g ペプチド配列の評価

交差反応性または自己反応性の T 細胞応答を、非同義アミノ酸置換を含み自己 p A P C によって提示されるネオエピトープペプチドを使用する、T 細胞のインビトロプライミングによって試験する。このインビトロ免疫原性プロトコルは、W u l l n e r らによって確立された手法に従うことができる (W u l l n e r D, Z h o u L, B r a m h a l l E, K u c k A, G o l e t z T J, S w a n s o n S, C h i r m u l e N, J a w a V. Considerations for Optimization and Validation of an In vitro PBMC Derived T cell Assay for Immunogenicity Prediction of Biotherapeutics. Clin Immunol 2010 Oct; 137(1): 5-14 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれている))。次に、インビトロプライミング後に膨張してネオエピトープペプチドとなる細胞の、対応する天然または野生型 (非突然変異) のペプチドエピトープに対する反応性を試験する。天然ペプチド配列に対する反応性を、I F N γ 、T N F α 、I L - 2 を含むがそれらに限定されないサイトカイン生成、および / または C D 1 0 7 a や グランザイム B を含むがそれらに限定されない T 細胞エフェクター機能のマーカーを測定することによって判定する。

20

【0182】

(実施例 7)

T C G A 膀胱がん患者の遡及的生存分析

T h e C a n c e r G e n o m e A t l a s (T C G A) の筋肉侵襲性膀胱がん (B L C A) コホートに由来するゲノムデータを、3 種のパイプラインにより独立的に分析して (図 1 A)、高度インシリコ T 細胞エピトープ選別システム (A N C E R (商標)) が、腫瘍遺伝子変位量 (T M B) と比較する予後層化、または公開されているツール (N e t M H C p a n / N e t M H C I I p a n) で実施する T 細胞エピトープ分析の改善に繋がるかどうかを判定した。

30

方法

B L C A 患者ムタノーム (412 種) を T C G A から検索し、N e t M H C p a n / N e t M H C I I p a n、または A N C E R (商標) という、機械学習ベースの H L A I および H L A I I のネオエピトープ特定ツールを組合せて阻害性調節性 T 細胞エピトープを排除する選別プラットフォームを使用して評価した。B L C A 患者を T M B 中央値 (サイレント突然変異および非サイレント突然変異を含む) あるいは N e t M H C p a n / N e t M H C I I p a n または A N C E R (商標) に基づくネオエピトープ負荷中央値に基づいて層化した。

40

【0183】

A) 各パイプラインについて遺伝子変位量またはネオエピトープ負荷が「高い」患者と「低い」患者の間での全生存 (O S) を、 Kaplan-Meier 法を用いて分析し、差をログランク検定によって分析した。ほとんどのムタノームパイプラインが C F 8 ネオエピトープに限り焦点を当てることから、C D 8 と C F 4 両方のネオエピトープ負荷の統合による

50

効果を調査した。

B) 加えて、遺伝子変異量またはネオエピトープ負荷中央値に基づく5年生存推定の正の推定値 (PPV) と負の推定値 (NPV) を検証した。各パイプラインについて、遺伝子変異量またはネオエピトープ負荷が「高い」患者または「低い」患者を、5年を超えて生存すると推定した。推定した生存状態を、観察されたOSと比較した。5年のカットオフの前に追跡できなくなった患者は分析から除外した。モデル間の差異を、マクネマー検定を用いて評価した。

【0184】

結果

A) 低TMCと比べ、高TMBは生存改善との関連が有意であった (OS中央値が39mo. 増加、 $p=0.001$ 、図6A、図7A)。OS中央値の分化の改善は、ANCER (商標) による推定のとおり、患者の層CD8ネオエピトープ含有率に基づいて患者を区分した結果、達成された (OS中央値が60mo. 増加、 $p<0.0001$ 、図6B)。「寛容」と見なされたCD8ネオエピトープを排除しても、OS中央値間の差は有意に変化しなかった (図6C)。しかし、患者のCD8ネオエピトープに加えて患者の総CD4ネオエピトープ含有率も検討したところ、患者層化の改善が観察された (OS中央値が70mo. 増加、 $p=0.0001$ 、図6D)。さらに、「寛容」CD4配列の選別によって本発明者らの分析が改善し得るかどうかを評価した。Teff因子 (Teff) 応答を誘導すると予想されるCD4ネオエピトープを特定した後、CD8およびCD4それぞれのTeff含有率が高い患者の生存中央値が、他のコホートと比較して73.4か月に延びることが判明した ($p<0.0001$ 、図6E、7C)。NetMHCpanとNetMHCIIPanによるCD8とCD4のネオエピトープ分析を実施したが、ANCER (商標) により特定されたTMBまたはネオエピトープを使用した分析と比べ、患者層化は拡充しなかった (OS中央値が34mo. 増加、 $p=0.0020$ 、図6D)。

【0185】

B) ANCER (商標) を使用した場合の5年生存状態推定の正確性 (CD8とCD4のネオエピトープ負荷中央値を「寛容」ネオエピトープについて選別) は、TMB中央値 (59%の正確性、ANCER (商標) 対TMBの $p=0.0125$) またはNetMHCpan/NetMHCIIPanにより特定されたネオエピトープ中央値 (61%の正確性、ANCER (商標) 対NetMHCpan/NetMHCIIPanの $p=0.0192$) と比べ、有意に正確であった (65%の正確性、図1B)。各モデルの正の推定値と負の推定値 (PPVとNPV) を決定した場合も推定の改善が観察され (図1C、左図)、PPVとNPVの増加が、ANCER (商標) ($PPV=34.1\%$ 、 $NPV=87.6\%$) について、TMB ($PPV=29.5\%$ 、 $NPV=86.1\%$) またはNetMHCpan/NetMHCIIPanに基づく推定 ($PPV=29.5\%$ 、 $NPV=84.8\%$) と比べ、達成された。結果は、5年生存を推定する際のクラスIとクラスII両方のネオエピトープの推定 (図1C、中央の図) と自己類似 (潜在的な阻害性または交差反応性を含む) ネオエピトープの選別 (図1C、右図) の重要性も示した。

【0186】

結論

本発明者らの分析は、CF8、CD4およびTregエピトープの最適な宿主免疫認識が、がん生存に重要な役割を果たすことを示唆するものである。CD8ネオエピトープ負荷を定義することでOSとの関連が拡充された一方、CD4 Teffネオエピトープ負荷の包含は、長期生存者の特定に大幅に役立った。これらの結果は、ANCER (商標) を使用して真のネオエピトープ数を定義することが、新規かつ有用な予後的または推定的バイオマーカーに相当することを示唆するものである。

【0187】

TMB分析と比較した患者層化の改善は、ANCER (商標) による推定のとおり、患者のクラスIネオエピトープ含有率に基づいて患者を区分した場合に達成された (図7A、7B)。TMB分析と比較した改善は、クラスIネオエピトープ含有率を公開ツールで推

定した場合には達成されなかった（図 7 B）。腫瘍の「原初」クラス II ネオエピトープ含有率（JANUSMATRIX（商標）により選別前）を、クラス I の含有率に加えて考察した場合に、ANCER（商標）による推定のとおり、漸進的改善が達成された（図 7 C）。クラス II の公開推定ツールによる分析は、患者層化の改善に至らなかった（図 7 C）。クラス II ネオエピトープ含有率を JANUSMATRIX（商標）で精緻化（すなわち想定上の Treg ネオエピトープを分析から除外）した結果、患者層化がさらに改善された（図 7 D）。ANCER（商標）は、他の推定ツールよりも高い正確性、PPV および NPV で 5 年生存状態を推定する。

【0188】

（実施例 8）

MHC クラス II エフェクター（Teff）と調節性（Treg）ネオエピトープの対比と、膵臓がん患者の転帰との関連性

膵臓がんは、免疫療法の飛躍的進歩にもかかわらず依然として最も致死的ながんの 1 種である。転帰が思わしくない患者は、調節性 T 細胞（Treg）を活性化するネオエピトープ中で腫瘍が増殖していると考えられる。

HLA II と II の分類が可能で、かつ GVAX という、刺激性 GM-CSF サイトカインを分泌するよう開発された自己がんワクチンによる治療を受けた 13 名の膵臓がん患者から得られた全エキソームシーケンシングデータを、インシリコネオエピトープ特定プラットフォームである ANCER（商標）により分析した。ANCER（商標）の際立った特徴は、HLA II リガンドの推定、および寛容エピトープまたは Treg エピトープの特定を正確に行う能力である。ANCER（商標）を使用して、各患者のエフェクターネオエピトープ対調節性ネオエピトープの含有率比を推定した。図 5 A では、交差反応性（XR）潜在性が低、平均または高として分類されるクラス I とクラス II のネオエピトープの数と頻度を示している。

【0189】

次いでクラス II エフェクター（Teff）ネオエピトープ対調節性（Treg）ネオエピトープの比を分析して、無病生存との相関関係の有無を判定した。エフェクター含有率の高い患者の無病生存（DFS）期間中央値（25 か月）は、調節性の含有率比が高い方に移動する患者（6 か月）より 4 倍余り長かった。同じ患者を本人の腫瘍遺伝子変異量（TMB）を使用して分析したが、確定的結果を得られなかった。対照的に、高 TMB の患者の DFS 期間中央値（17 か月）は低 TMB の患者（14 か月）と同等であった。図 5 B では、Teff/Treg ネオエピトープ比が高い患者、 $(Teff/Treg)^{hi}$ は Teff/Treg ネオエピトープ比が高い患者、 $(Teff/Treg)^{lo}$ より転帰が良好であったことを示している。Teff/Treg ネオエピトープ比は、腫瘍遺伝子変異量より優れた、無病生存推定因子でもあった。

これらの結果は、腫瘍中の Treg を活性化する可能性のあるネオエピトープ数が多いほど、より短い DFS に関連する傾向にあることを示唆するものである。

以上、本発明の好適な実施形態を詳細に記述してきたが、上記の段落により定義される本発明は、上記の特定の詳細に限定されることを意図するものではなく、本発明の精神または範囲から逸脱しない限り、本発明の明白な変形が多数、可能であることを理解されたい。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

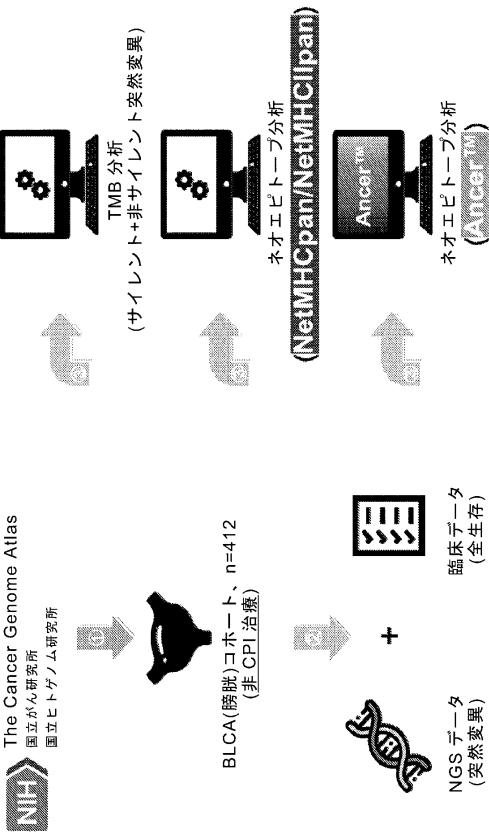


FIG. 1A

【図 1 B】

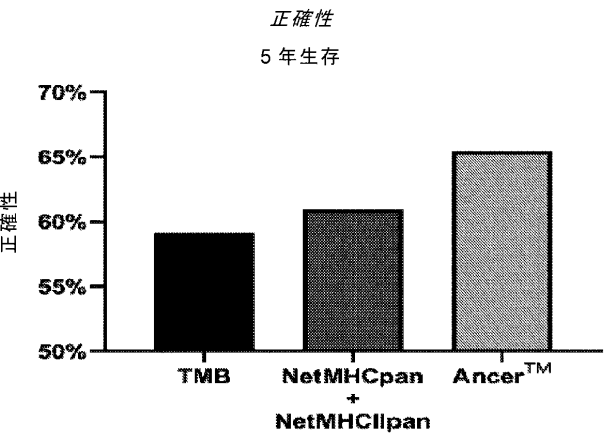


FIG. 1B

【図 1 C】

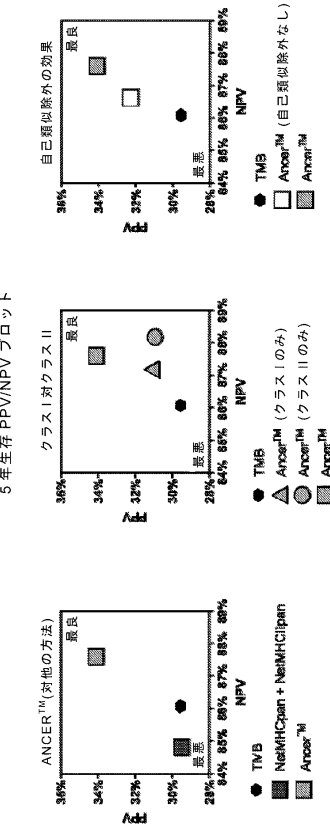


FIG. 1C

【図 2 - 1】

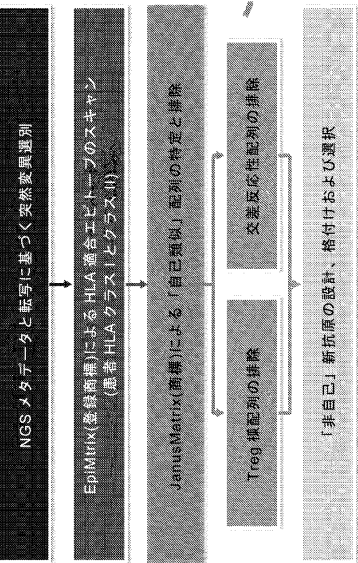
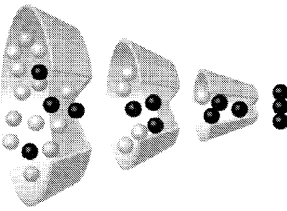


FIG. 2



10

20

30

40

50

【図 2 - 2】

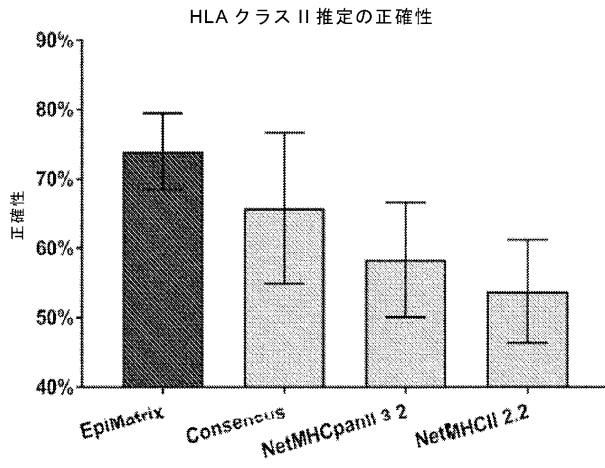


Fig. 2 (続き)

【図 3】

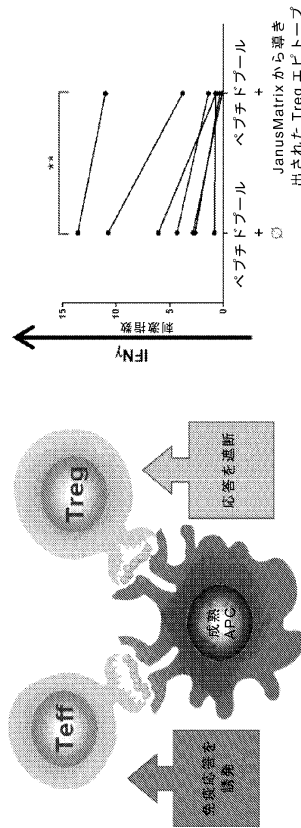


Fig. 3

【図 4】

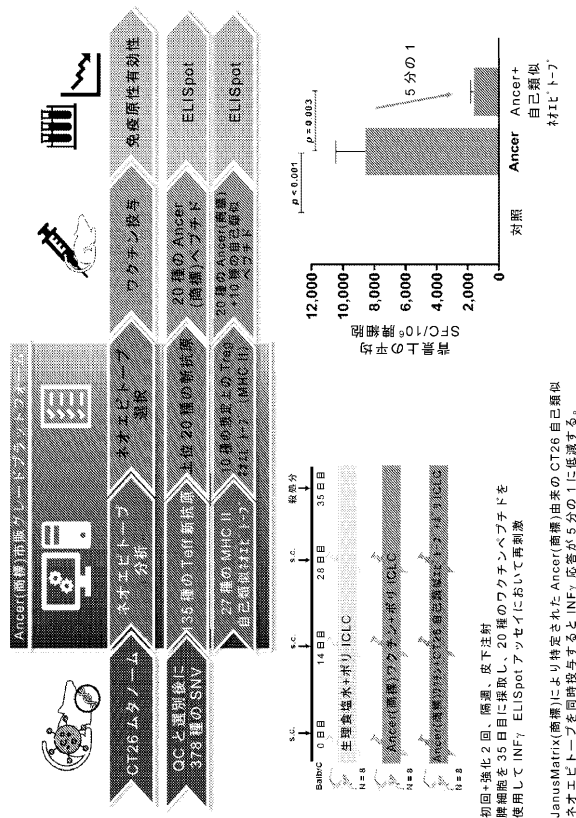


FIG. 4

【図 5 A】

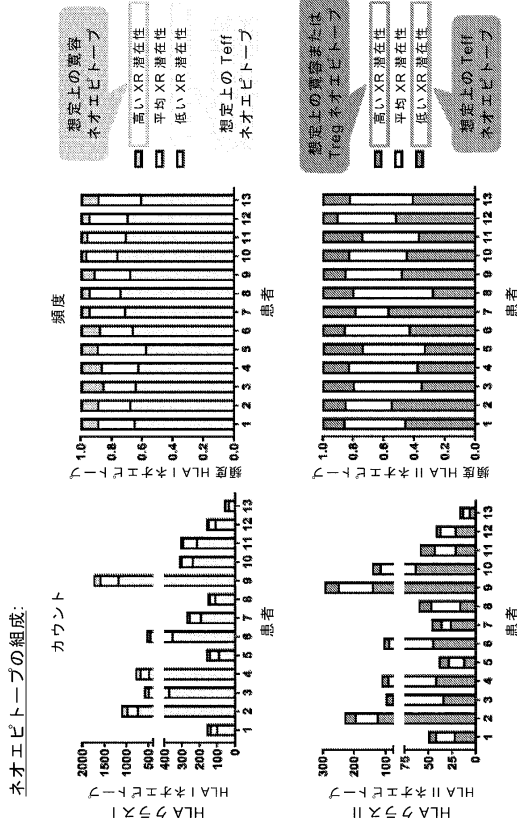


FIG 5A

10

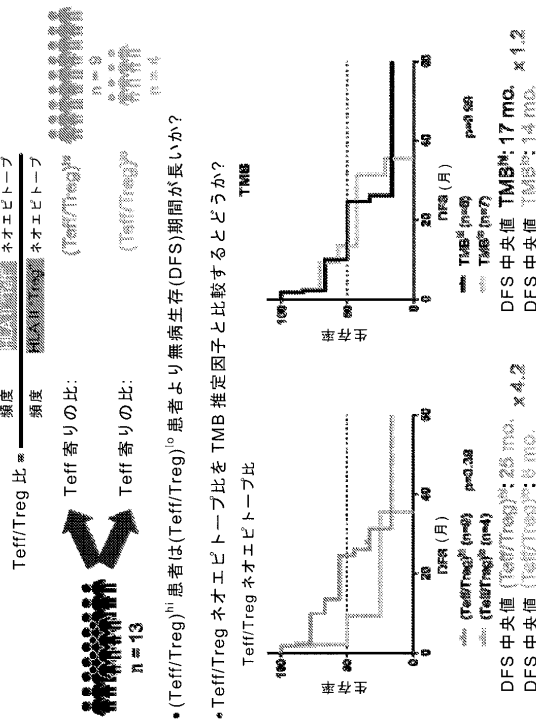
20

30

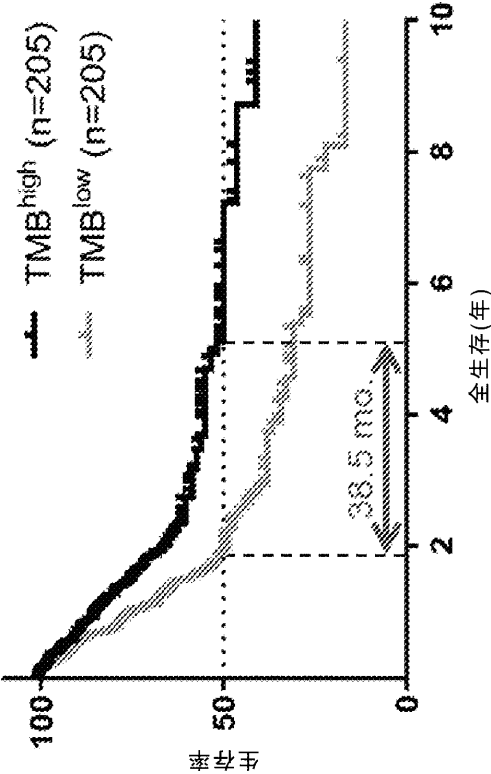
40

50

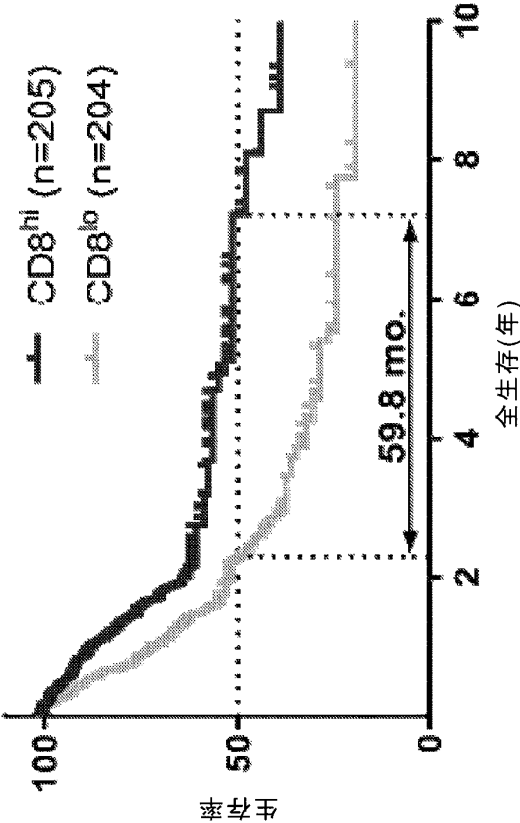
【図 5 B】



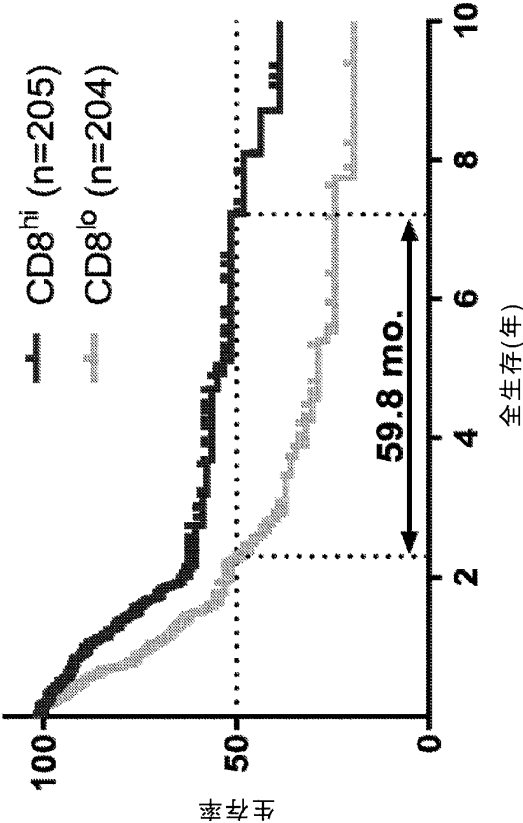
【図 6 A】



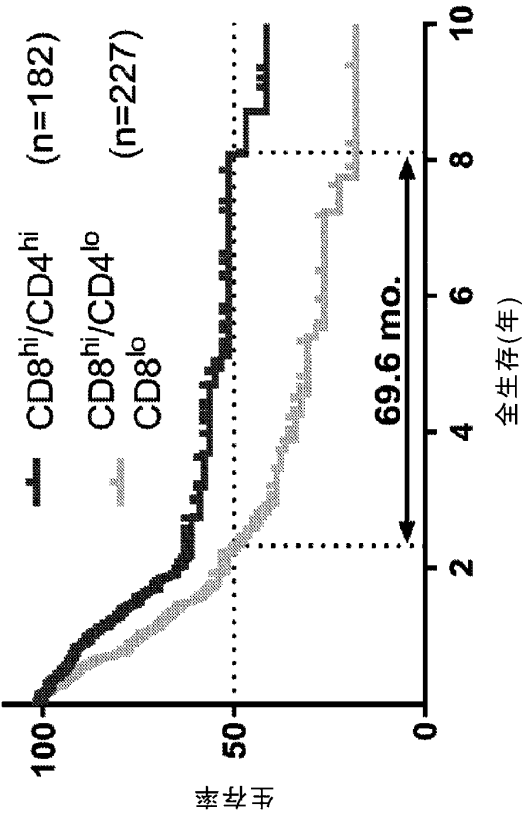
【図 6 B】



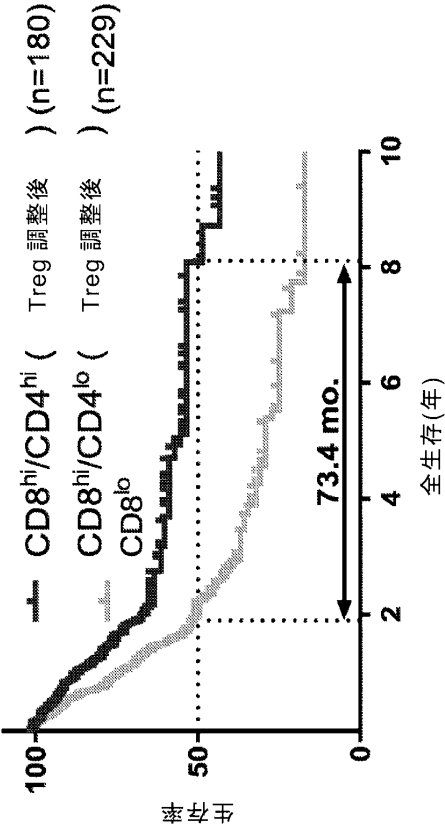
【図 6 C】



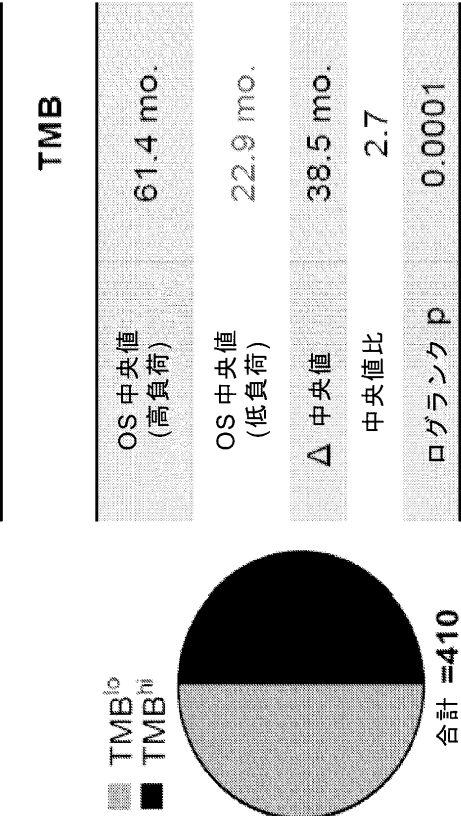
【図 6 D】



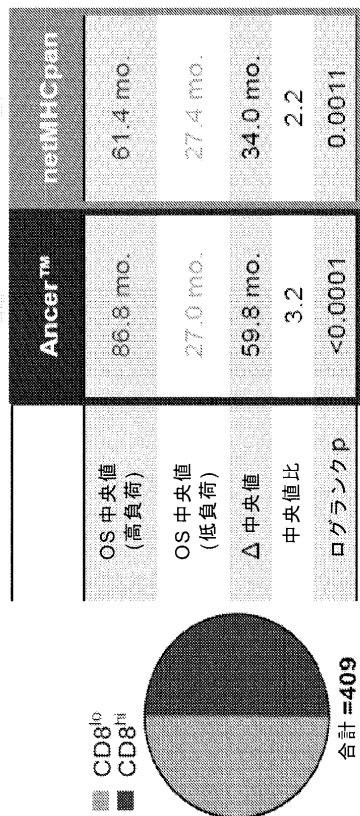
【図 6 E】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

20

30

40

50

【図 7 C】



FIG. 7C

【図 7 D】

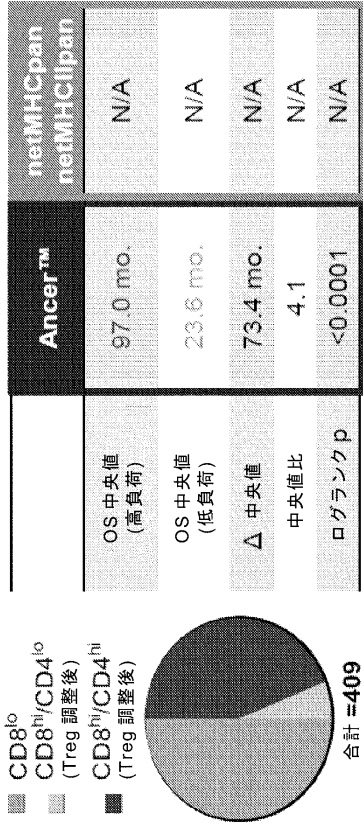


FIG. 7D

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/031357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 A61P35/00 A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. D. BROWN ET AL: "Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival", GENOME RESEARCH, vol. 24, no. 5, 29 April 2014 (2014-04-29), pages 743-750, XP055262143, US	1-18
Y	ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/gr.165985.113	1-18
A	page 744, column 1, paragraph 2 - page 745, column 2, paragraph 2 ----- -/--	19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
3 September 2020		02/11/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, Björn

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/031357

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARTA LUKSZA ET AL: "A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy", NATURE, 8 November 2017 (2017-11-08), XP055506171, London ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature24473 abstract	1
A	----- BALACHANDRAN VINOD P ET AL: "Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP UK, LONDON, vol. 551, no. 7681, 1 November 2017 (2017-11-01), pages 512-516, XP037202983, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE24462 [retrieved on 2017-11-01] abstract	1
Y	----- GIUSEPPEV MASUCCI ET AL: "Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume I - pre-analytical and analytical validation", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 4, no. 1, 15 November 2016 (2016-11-15), pages 1-25, XP021241446, DOI: 10.1186/S40425-016-0178-1 page 6, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1	1-18
Y	----- JIANDA YUAN ET AL: "Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 4, no. 1, 19 January 2016 (2016-01-19), pages 1-25, XP021233391, DOI: 10.1186/S40425-016-0107-3 page 7, column 2, paragraph 1 ----- -/--	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/031357

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Guilhem Richard ET AL: "Selection of Class I and Class II T cell neo-epitopes and removal of Treg epitopes", 1 July 2018 (2018-07-01), XP055727117, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-5311 Retrieved from the Internet: URL:https://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13_Supplement/5311 [retrieved on 2020-09-02] the whole document	1-19
A	----- A. CORTHAY: "How do Regulatory T Cells Work?", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 70, no. 4, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 326-336, XP055197142, ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x page 328, column 1, paragraph 2 -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/031357

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

1-19

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2020/ 031357

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-19

A prognostic method for determining risk of death.

2. claims: 20-82

A method of identifying subject-specific neoantigens for a neoplasia vaccine and corresponding pharmaceutical compositions

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/53	K
(32)優先日 令和1年11月8日(2019.11.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 62/932,654		
(32)優先日 令和1年11月8日(2019.11.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内		
(71)出願人 521483294 ガルシア ツィンツニ アメリカ合衆国 イリノイ州 60637 シカゴ サウス エリス アベニュー 5801 ザ ユニヴ ァーシティー オブ シカゴ内		
(71)出願人 521483308 モイーズ レオナルド アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内		
(71)出願人 521483319 プリンシオッタ マイケル エフ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 ス イート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内		
(71)出願人 521483320 ブリドン ドミニク アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 ス イート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内		
(71)出願人 521483331 マーティン ウィリアム ディー アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内		
(71)出願人 521483342 ベルドゥーゴ ガッド アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 ス イート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内		
(71)出願人 521483353 バラール アルジュン アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10016 ニューヨーク ファースト アベニュー 660 エヌ		

- ワイユー ランゴーン ヘルス内
(71)出願人 521483364
スタインバーグ ゲイリー ディー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10016 ニューヨーク ファースト アベニュー 660 エヌ
ワイユー ランゴーン ヘルス内
- (71)出願人 521483375
デ フロート アンネ エス
アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス
イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内
- (74)代理人 100094569
弁理士 田中 伸一郎
- (74)代理人 100103610
弁理士 ▲吉▼田 和彦
- (74)代理人 100109070
弁理士 須田 洋之
- (74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100168631
弁理士 佐々木 康匡
- (72)発明者 リチャード ギレム
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 スイ
ート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内
- (72)発明者 スウェイス ランディー エフ
アメリカ合衆国 イリノイ州 60637 シカゴ サウス エリス アベニュー 5801 ザ ユニヴ
ァーシティー オブ シカゴ内
- (72)発明者 アルディート マシュー
アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス
イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ガルシア ツィンツニ
アメリカ合衆国 イリノイ州 60637 シカゴ サウス エリス アベニュー 5801 ザ ユニヴ
ァーシティー オブ シカゴ内
- (72)発明者 モイーズ レオナルド
アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス
イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 プリンシオッタ マイケル エフ
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 スイ
ート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ブリドン ドミニク
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 スイ
ート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内
- (72)発明者 マーティン ウィリアム ディー
アメリカ合衆国 ロードアイランド州 02909 プロヴィデンス バレー ストリート 188 ス
イート 44 エピヴァックス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ベルドゥーゴ ガッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10014 ニューヨーク ヴァリック ストリート 180 スイ
ート 665 エピヴァックス オンコロジー インコーポレイテッド内

-
- (72)発明者 バラール アルジュン
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6 ニューヨーク ファースト アベニュー 6 6 0 エヌ
 ワイユー ランゴーン ヘルズ内
- (72)発明者 スタインバーグ ゲイリー ディー
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 6 ニューヨーク ファースト アベニュー 6 6 0 エヌ
 ワイユー ランゴーン ヘルズ内
- (72)発明者 デ フロート アンネ エス
 アメリカ合衆国 ロードアイランド州 0 2 9 0 9 プロヴィデンス バレー ストリート 1 8 8 ス
 イート 4 4 エピヴァックス インコーポレイテッド内
- F ターム (参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QR32 QR72 QR77
 4C084 AA02 AA19 BA03 NA05 NA14 ZA811 ZA812 ZB07 ZB261 ZB262
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA81 ZB07
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA15 CA41 DA86 EA28 EA31