

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-522239

(P2021-522239A)

(43) 公表日 令和3年8月30日 (2021. 8. 30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 7/06 (2006. 01)	C 0 7 K 7/06 Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/025 (2006. 01)	C 0 7 K 14/025	4 C 0 8 5
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/11 (2006. 01)	C 1 2 N 15/11 Z	
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)	A 6 1 P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-559376 (P2020-559376)	(71) 出願人	515124598 アジェナス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 4 2 1, レキシントン, フォーブス ロード 3
(86) (22) 出願日	平成31年4月25日 (2019. 4. 25)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85) 翻訳文提出日	令和2年12月21日 (2020. 12. 21)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/029112	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 国際公開番号	W02019/210055	(72) 発明者	マーク・アーサー・フィンダイス アメリカ合衆国・マサチューセッツ・O 2 4 7 8・ベルモント・スクール・ストリー ト・4 3 1
(87) 国際公開日	令和1年10月31日 (2019. 10. 31)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	62/663, 083		
(32) 優先日	平成30年4月26日 (2018. 4. 26)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/692, 009		
(32) 優先日	平成30年6月29日 (2018. 6. 29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 熱ショックタンパク質結合ペプチド組成物およびその使用方法

(57) 【要約】

新規のH S P結合ペプチドを含むポリペプチドおよび組成物が提供される。そのようなポリペプチドおよび組成物は、免疫療法薬（例えば、がんワクチン）として特に有用である。そのようなポリペプチドおよび組成物を使用して細胞性免疫応答を誘導する方法、そのようなポリペプチドおよび組成物を使用して疾患を治療する方法、そのようなポリペプチドおよび組成物を含むキット、およびそのような組成物を作製する方法も提供される。

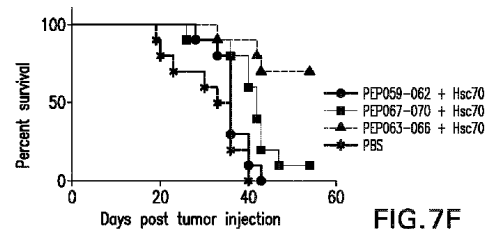


FIG. 7F

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

X₁ L X₂ L T X₃（配列番号 1）のアミノ酸配列を含む熱ショックタンパク質（H S P）結合ペプチドを含む単離されたポリペプチドであって、式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

前記 H S P 結合ペプチドが、

（a）N X₁ L X₂ L T X₃（配列番号 2）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）、

10

（b）W L X₁ L T X₂（配列番号 3）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）、あるいは

（c）N W L X₁ L T X₂（配列番号 4）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）、のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

前記 H S P 結合ペプチドが、配列番号 5～12、98～113、207、および 212 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

20

前記 H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 5～12、98～113、207、および 212 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 3 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

前記 H S P 結合ペプチドが配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

前記 H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 6 のアミノ酸配列からなる、請求項 5 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

30

N W X₁ X₂ X₃ X₄ X₅（配列番号 232）のアミノ酸配列を含む H S P 結合ペプチドを含む単離されたポリペプチドであって、式中、X₁は、LまたはIであり、X₂は、L、R、またはKであり、X₃は、LまたはIであり、X₄は、T、L、F、K、R、またはWであり、X₅は、WまたはKである、単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

前記 H S P 結合ペプチドが、配列番号 204、208～211、および 213～215 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 9】

40

前記 H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 204、208～211、および 213～215 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 8 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 205 のアミノ酸配列を含む H S P 結合ペプチドを含む単離されたポリペプチド。

【請求項 11】

前記 H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列が配列番号 205 のアミノ酸配列からなる、請求項 10 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

前記 H S P 結合ペプチドが 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、1

50

6、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50以下のアミノ酸の長さである、請求項1～11のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項13】

1つ以上の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)結合エピトープを含む抗原性ペプチドをさらに含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項14】

前記MHC結合エピトープが、500nM以下の IC_{50} でMHC I分子に結合する、請求項13に記載の単離されたポリペプチド。

10

【請求項15】

前記MHC結合エピトープが、1000nM以下の IC_{50} でMHC II分子に結合する、請求項13に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項16】

前記MHC結合エピトープががん細胞に由来する、請求項13～15のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項17】

前記MHC結合エピトープが、前記がん細胞のアミノ酸変異または遺伝子融合変異を含む、請求項16に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項18】

前記アミノ酸変異が、置換、欠失、または挿入の変異である、請求項17に記載の単離されたポリペプチド。

20

【請求項19】

前記アミノ酸変異または遺伝子融合変異が、前記抗原性ペプチドのアミノ酸配列の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50にある、請求項17または18に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項20】

前記MHC結合エピトープが病原性微生物に由来する、請求項13～15のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

30

【請求項21】

前記病原性微生物がウイルスである、請求項20に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項22】

前記ウイルスがヒトパピローマウイルス(HPV)である、請求項21に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項23】

前記抗原性ペプチドが、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項22に記載の単離されたポリペプチド。

40

【請求項24】

前記抗原性ペプチドが8～50アミノ酸の長さであり、任意選択で8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸の長さである、請求項13～21のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項25】

前記抗原性ペプチドが20～30アミノ酸の長さである、請求項24に記載の単離されたポリペプチド。

50

【請求項 26】

前記抗原性ペプチドが27アミノ酸の長さである、請求項24に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 27】

HSP結合ペプチドと、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗原性ペプチドとを含む単離されたポリペプチド。

【請求項 28】

前記抗原性ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項27に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 29】

前記HSP結合ペプチドが、配列番号1～12、98～113、204、205、207～215、および232からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項27または28に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 30】

前記HSP結合ペプチドのアミノ酸配列が、配列番号1～12、98～113、204、205、207～215、および232からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項29に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 31】

前記MHC結合エピトープが修飾アミノ酸残基を含む、請求項13～30のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 32】

前記修飾アミノ酸残基が、側鎖ヒドロキシルまたはアミンでリン酸化されたTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、またはHisである、請求項31に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 33】

前記修飾アミノ酸残基が、側鎖ヒドロキシルまたはアミンでリン酸化されたTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、またはHisアミノ酸の模倣物である、請求項31に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 34】

前記模倣物がリン酸化残基の非加水分解性類似体である、請求項33に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 35】

前記修飾アミノ酸残基が、側鎖アミドでグリコシル化されたAsn、側鎖ヒドロキシルでグリコシル化されたSerまたはThr、側鎖アミノでメチル化されたLysまたはArg、側鎖アミノでアセチル化されたLys、 α -アミノでアセチル化されたN末端残基、または α -カルボキシルでアミド化されたC末端残基である、請求項31に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 36】

前記修飾アミノ酸残基が、前記抗原性ペプチドのアミノ酸配列の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50にある、請求項31～35のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 37】

前記HSP結合ペプチドが化学リンカーを介して抗原性ペプチドに連結されている、請求項13～36のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 38】

前記HSP結合ペプチドがペプチドリinkerを介して抗原性ペプチドに連結されている、請求項13～36のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 39】

前記ペプチドリinkerが、FFRK（配列番号13）またはFRのアミノ酸配列を含む、請求項38に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 40】

前記HSP結合ペプチドが前記ポリペプチドのC末端にある、請求項38または39に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 41】

(a) FFRKX₁LX₂LTX₃（配列番号14）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）、

(b) FFRKNX₁LX₂LTX₃（配列番号15）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）、

(c) FFRKWLX₁LTX₂（配列番号16）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）、

(d) FFRKNWLX₁LTX₂（配列番号17）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）、あるいは

(e) FFRKNWX₁X₂X₃X₄X₅（配列番号233）（式中、X₁は、LまたはIであり、X₂は、L、R、またはKであり、X₃は、LまたはIであり、X₄は、T、L、F、K、R、またはWであり、X₅は、WまたはKである）、のアミノ酸配列を、前記ポリペプチドのC末端を含む、請求項40に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 42】

配列番号18～25、71、72、74、75、166、167、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項40に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 43】

前記HSP結合ペプチドが前記ポリペプチドのN末端にある、請求項38または39に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 44】

(a) X₁LX₂LTX₃FFRK（配列番号26）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）、

(b) NX₁LX₂LTX₃FFRK（配列番号27）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）、

(c) WLX₁LTX₂FFRK（配列番号28）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）、

(d) NWLX₁LTX₂FFRK（配列番号29）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）、あるいは

(e) NWX₁X₂X₃X₄X₅FFRK（配列番号234）（式中、X₁は、LまたはIであり、X₂は、L、R、またはKであり、X₃は、LまたはIであり、X₄は、T、L、F、K、R、またはWであり、X₅は、WまたはKである）、のアミノ酸配列を、前記ポリペプチドのN末端を含む、請求項43に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 45】

配列番号30～37、および216～229からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項43に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 46】

前記ペプチドが12～50アミノ酸の長さであり、任意選択で12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸の長さである、請求項1～45のいずれか1項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 47】

前記ポリペプチドが20～40アミノ酸の長さである、請求項1～46のいずれか1項

10

20

30

40

50

に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 48】

配列番号 54～69 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～47 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 49】

前記ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号 54～69 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 48 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 50】

前記ポリペプチドが化学的に合成される、請求項 1～49 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 51】

請求項 13～50 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドと、精製されたストレスタンパク質との複合体を含む、組成物。

【請求項 52】

前記ストレスタンパク質が、H s c 70、H s p 70、H s p 90、H s p 110、G r p 170、G p 96、カルレティキュリン、およびそれらの変異体または融合タンパク質からなる群から選択される、請求項 51 に記載の組成物。

【請求項 53】

前記ストレスタンパク質が H s c 70 である、請求項 52 に記載の組成物。

【請求項 54】

前記ストレスタンパク質がヒト H s c 70 である、請求項 53 に記載の組成物。

【請求項 55】

前記ストレスタンパク質が組換えタンパク質である、請求項 51～54 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 56】

複数の、請求項 13～50 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む組成物。

【請求項 57】

請求項 13～50 のいずれか 1 項に記載の 2～20 個の異なるポリペプチドを含む、請求項 51～56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 58】

前記異なるポリペプチドのそれぞれが、同じ H S P 結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む、請求項 57 に記載の組成物。

【請求項 59】

前記ポリペプチドのそれぞれの抗原性ペプチドが、配列番号 38～53 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 56～58 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 60】

前記組成物が、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 の異なる抗原性ペプチドを含む、請求項 59 に記載の組成物。

【請求項 61】

前記ポリペプチドのそれぞれが、配列番号 54～69 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 58～60 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 62】

前記ポリペプチドのそれぞれのアミノ酸配列が、配列番号 54～69 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 58～61 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 63】

前記組成物が、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 の異なるポリペプチドを含む、請求項 58～62 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 64】

前記組成物中のポリペプチドの総量が約 0.1～20 nmol である、請求項 47～5

10

20

30

40

50

9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項65】

前記組成物中のポリペプチドの総量が約3、4、5、または6nmolである、請求項64に記載の組成物。

【請求項66】

前記組成物中のストレスタンパク質の量が約10μg～600μgである、請求項51～55および57～65のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項67】

前記組成物中のストレスタンパク質の量が約250μg～290μgである、請求項66に記載の組成物。

【請求項68】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約0.5：1～5：1である、請求項51～55および57～67のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項69】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約1：1～2：1である、請求項68に記載の組成物。

【請求項70】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約1：1、1.25：1、または1.5：1である、請求項69に記載の組成物。

【請求項71】

前記組成物中の前記ポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量が、約10μg～600μgである、請求項51～55および57～70のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項72】

前記組成物中の前記ポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量が約300μgである、請求項71に記載の組成物。

【請求項73】

前記組成物がアジュバントをさらに含む、請求項51～72のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項74】

前記アジュバントがサポニンまたは免疫刺激性核酸を含む、請求項73に記載の組成物。

【請求項75】

前記アジュバントがQS-21を含む、請求項73に記載の組成物。

【請求項76】

前記組成物中のQS-21の量が約10μg、25μg、または50μgである、請求項75に記載の組成物。

【請求項77】

前記アジュバントが、TLRアゴニスト、任意選択でTLR4アゴニスト、TLR5アゴニスト、TLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、および／またはTLR9アゴニストを含む、請求項73～76のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項78】

薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物である、請求項51～77のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項79】

前記組成物が単位剤形である、請求項51～78のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項80】

対象において抗原性ペプチドに対する細胞性免疫応答を誘導する方法であって、(a)有効量の、請求項51～78のいずれか1項に記載の組成物、または(b)請求項79に記載の単位剤形を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項81】

10

20

30

40

50

前記対象ががんを有する、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記対象が病原性微生物に感染している、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 83】

対象の疾患を治療する方法であって、(a)有効量の、請求項 51～78 のいずれか 1 項に記載の組成物、または (b)請求項 79 に記載の単位剤形を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 84】

前記疾患ががんである、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記疾患が病原性微生物の感染である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 86】

前記 MHC 結合エピトープが前記対象のがん細胞に存在する、請求項 81 または 84 に記載の方法。

【請求項 87】

前記 MHC 結合エピトープが前記病原性微生物に存在する、請求項 82 または 85 に記載の方法。

【請求項 88】

前記組成物または単位剤形が 4 週の間週 1 回前記対象に投与される、請求項 80～87 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 89】

前記組成物または単位剤形の少なくとも 2 回のさらなる用量が、4 回の週 1 回の用量の後に隔週に 1 回前記対象に投与される、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記組成物または単位剤形の少なくとも 1 回の追加免疫用量が、最後の前記週 1 回または隔週に 1 回の用量の 3 ヶ月後に投与される、請求項 88 または 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記組成物または単位剤形が、少なくとも 1 年間、3 ヶ月ごとにさらに投与される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

レナリドマイド、デキサメタゾン、インターロイキン-2、組換えインターフェロナルファ-2b、または PEG-インターフェロナルファ-2b を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 80～91 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

インドールアミンジオキシゲナーゼ-1 (IDO-1) 阻害剤を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 80～92 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 94】

前記 IDO-1 阻害剤が 4-アミノ-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-N'-ヒドロキシ-1, 2, 5-オキサジアゾール-3-カルボキシミダミドである、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

免疫チェックポイント抗体を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 80～94 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 96】

前記免疫チェックポイント抗体が、アゴニスト抗 GITR 抗体、アゴニスト抗 OX40 抗体、アンタゴニスト抗 PD-1 抗体、アンタゴニスト抗 CTLA-4 抗体、アンタゴニスト抗 TIM-3 抗体、アンタゴニスト抗 LAG-3 抗体、アンタゴニスト抗 TIGIT 抗体、アゴニスト抗 CD96 抗体、アンタゴニスト抗 VISTA 抗体、アンタゴニスト抗 CD73 抗体、アゴニスト抗 CD137 抗体、アンタゴニスト抗 CEACAM1 抗体、アゴニスト抗 ICOS 抗体、および／またはそれらの抗原結合フラグメントからなる群から

10

20

30

40

50

選択される、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

請求項 13～51 のいずれか 1 項に記載の前記ポリペプチドを含む第 1 の容器と、前記ポリペプチドに結合することができる精製されたストレスタンパク質を含む第 2 の容器とを含むキット。

【請求項 98】

前記第 1 の容器が、請求項 13～51 のいずれか 1 項に記載の 2～20 の異なるポリペプチドを含む、請求項 97 に記載のキット。

【請求項 99】

前記異なるポリペプチドのそれぞれが、同じ H S P 結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む、請求項 98 に記載のキット。

10

【請求項 100】

前記第 1 の容器中の前記ポリペプチドの総量が約 0.1～20 nmol である、請求項 97～99 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 101】

前記第 1 の容器中の前記ポリペプチドの総量が約 3、4、5、または 6 nmol である、請求項 100 に記載のキット。

【請求項 102】

前記ストレスタンパク質が、H s c 70、H s p 70、H s p 90、H s p 110、G r p 170、G p 96、カルレティキュリン、およびそれらの変異体からなる群から選択される、請求項 97～101 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

【請求項 103】

前記ストレスタンパク質が H s c 70 である、請求項 102 に記載のキット。

【請求項 104】

前記ストレスタンパク質がヒト H s c 70 である、請求項 103 に記載のキット。

【請求項 105】

前記ストレスタンパク質が組換えタンパク質である、請求項 97～104 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 106】

前記第 2 の容器中の前記ストレスタンパク質の量が約 10 μg～600 μg である、請求項 97～105 のいずれか 1 項に記載のキット。

30

【請求項 107】

前記第 2 の容器中の前記ストレスタンパク質の量が約 250 μg～290 μg である、請求項 106 に記載のキット。

【請求項 108】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約 0.5：1～5：1 である、請求項 97～107 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 109】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約 1：1～2：1 である、請求項 108 に記載のキット。

40

【請求項 110】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約 1：1、1.25：1、または 1.5：1 である、請求項 109 に記載のキット。

【請求項 111】

前記第 1 の容器中の前記ポリペプチドおよび前記第 2 の容器中の前記ストレスタンパク質の総量が約 10 μg～600 μg である、請求項 97～110 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 112】

前記第 1 の容器中の前記ポリペプチドおよび前記第 2 の容器中の前記ストレスタンパク質の総量が 300 μg である、請求項 111 に記載のキット。

50

【請求項 1 1 3】

アジュバントを含む第 3 の容器をさらに含む、請求項 9 7 ～ 1 1 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 1 1 4】

前記アジュバントがサポニンまたは免疫刺激性核酸を含む、請求項 1 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 1 5】

前記アジュバントが Q S - 2 1 を含む、請求項 1 1 4 に記載のキット。

【請求項 1 1 6】

前記第 3 の容器中の Q S - 2 1 の量が約 1 0 μ g、2 5 μ g、または 5 0 μ g である、請求項 1 1 5 に記載のキット。

10

【請求項 1 1 7】

前記アジュバントが、T L R アゴニスト、任意選択で T L R 4 アゴニスト、T L R 5 アゴニスト、T L R 7 アゴニスト、T L R 8 アゴニスト、および／または T L R 9 アゴニストを含む、請求項 1 1 3 ～ 1 1 6 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 1 1 8】

ワクチンを作製する方法であって、1 つ以上の、請求項 1 3 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを、精製されたストレスタンパク質と、前記精製されたストレスタンパク質が前記ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つに結合するような適切な条件下で混合することを含む方法。

20

【請求項 1 1 9】

前記ストレスタンパク質が、H s c 7 0、H s p 7 0、H s p 9 0、H s p 1 1 0、G r p 1 7 0、G p 9 6、カルレティキュリン、およびそれらの変異体からなる群から選択される、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記ストレスタンパク質が H s c 7 0 である、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記ストレスタンパク質がヒト H s c 7 0 である、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記ストレスタンパク質が組換えタンパク質である、請求項 1 1 8 ～ 1 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 2 3】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約 0 . 5 : 1 ～ 5 : 1 である、請求項 1 1 8 ～ 1 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約 1 : 1 ～ 2 : 1 である、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記適切な条件が約 3 7 $^{\circ}$ C の温度を含む、請求項 1 1 8 ～ 1 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 2 6】

前記ポリペプチド対前記ストレスタンパク質のモル比が約 1 : 1、1 . 2 5 : 1、または 1 . 5 : 1 である、請求項 1 1 8 ～ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

この出願は、2 0 1 8 年 4 月 2 6 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 6 6 3 , 0 8 3 号および 2 0 1 8 年 6 月 2 9 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 6 9 2 , 0 0 9 号の優先権を主張し、それぞれの開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0002】

本発明は、熱ショックタンパク質（HSP）結合ペプチド組成物、および免疫療法薬（例えば、がんワクチン）としてのそのような組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

免疫療法は、がんの治療において重要なツールになりつつある。免疫療法アプローチの1つは、がん細胞を標的にして破壊するように患者の免疫系を積極的に教育するがん特異的抗原性ペプチドを含む治療用がんワクチンの使用を含む。しかし、そのような治療用がんワクチンの生成は、がん特異的抗原性ペプチドの免疫原性によって制限される。

【0004】

したがって、当技術分野では、免疫原性の高いがん特異的抗原性ペプチドを生成する改善された方法、およびこれらのペプチドを含む効果的な抗がんワクチンを作成する必要がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国仮特許出願第62／663，083号

【特許文献2】米国仮特許出願第62／692，009号

【発明の概要】

【0006】

本開示は、新規のHSP結合ペプチドを含むポリペプチドおよび組成物を提供する。そのようなポリペプチドおよび組成物は、免疫療法薬（例えば、がんワクチン）として特に有用である。そのようなポリペプチドおよび組成物を使用して細胞性免疫応答を誘導する方法、そのようなポリペプチドおよび組成物を使用して疾患を治療する方法、そのようなポリペプチドおよび組成物を含むキット、およびそのような組成物を作製する方法も提供される。

【0007】

したがって、一態様では、本開示は、 $X_1LX_2LTX_3$ （配列番号1）のアミノ酸配列を含む熱ショックタンパク質（HSP）結合ペプチドを含む単離されたポリペプチドを提供し、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 はRまたはKであり、 X_3 は、W、F、またはGである。別の態様では、本開示は、 $NWX_1X_2X_3X_4X_5$ （配列番号232）のアミノ酸配列を含むHSP結合ペプチドを含む単離されたポリペプチドを提供し、式中、 X_1 は、LまたはIであり、 X_2 は、L、R、またはKであり、 X_3 は、LまたはIであり、 X_4 は、T、L、F、K、R、またはWであり、 X_5 は、WまたはKである。

【0008】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、 $NX_1LX_2LTX_3$ （配列番号2）のアミノ酸配列を含み、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 はW、F、またはGであるか、 WLX_1LTX_2 （配列番号3）のアミノ酸配列を含み、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGであり、あるいは $NWLX_1LTX_2$ （配列番号4）のアミノ酸配列を含み、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。

【0009】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号5～12、98～113、204、205、および207～215からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5～12、98～113、204、205、および207～215からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号6のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、2

10

20

30

40

50

5、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50以下のアミノ酸残基の長さである。

【0010】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、1つ以上の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)結合エピトープを含む抗原性ペプチドをさらに含む。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、500nM以下のIC₅₀でMHC I分子に結合する。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、1000nM以下のIC₅₀でMHC II分子に結合する。

【0011】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、がん細胞に由来する。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、がん細胞のアミノ酸変異または遺伝子融合変異を含む。特定の実施形態では、アミノ酸変異は、置換、欠失、または挿入の変異である。特定の実施形態では、アミノ酸変異または遺伝子融合変異は、抗原性ペプチドの中またはその近くにある。特定の実施形態では、アミノ酸変異または遺伝子融合変異は、抗原性ペプチドのアミノ酸配列の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50にある。

【0012】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、病原性微生物に由来する。特定の実施形態では、病原性微生物はウイルスである。特定の実施形態では、ウイルスは、ヒトパピローマウイルス(HPV)である。特定の実施形態では、抗原性ペプチドは、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0013】

別の態様では、本開示は、HSP結合ペプチドと、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗原性ペプチドとを含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0014】

特定の実施形態では、抗原性ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号1～12、98～113、204、205、207～215、および232からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号1～12、98～113、204、205、207～215、および232からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【0015】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、修飾アミノ酸残基を含む。特定の実施形態では、修飾アミノ酸は、側鎖ヒドロキシルまたはアミンでリン酸化されたTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、またはHisである。特定の実施形態では、修飾アミノ酸は、側鎖ヒドロキシルまたはアミンでリン酸化されたTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、またはHisアミノ酸の模倣物である。いくつかの実施形態では、模倣物は、リン酸化残基の非加水分解性類似体である。特定の実施形態では、修飾アミノ酸残基は、側鎖アミドでグリコシル化されたAsn、側鎖ヒドロキシルでグリコシル化されたSerまたはThr、側鎖アミノでメチル化されたLysまたはArgであり、側鎖アミノでアセチル化されたLys、α-アミノでアセチル化されたN末端残基、またはα-カルボキシルでアミド化されたC末端残基である。特定の実施形態では、修飾アミノ酸残基は、抗原性ペプチドの中またはその近くにある。特定の実施形態では、修飾アミノ酸残基は、抗原性ペプチドのアミノ酸配列の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38

10

20

30

40

50

、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50にある。

【0016】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、化学リンカーを介して抗原性ペプチドに連結されている。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、ペプチドリリンカーを介して抗原性ペプチドに連結されている。特定の実施形態では、ペプチドリリンカーは、FFRK（配列番号13）またはFRのアミノ酸配列を含む。

【0017】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、ポリペプチドのC末端にある。特定の実施形態では、ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含む：

（a）FFRKX₁LX₂LTX₃（配列番号14）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）；

（b）FFRKNX₁LX₂LTX₃（配列番号15）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）；

（c）FFRKWLX₁LTX₂（配列番号16）、（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）；（d）FFRKNWLX₁LTX₂（配列番号17）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）あるいは

（e）FFRKNWX₁X₂X₃X₄X₅（配列番号233）（式中、X₁は、LまたはIであり、X₂は、L、R、またはKであり、X₃は、LまたはIであり、X₄は、T、L、F、K、R、またはWであり、X₅は、ポリペプチドのC末端にあるWまたはKである）。特定の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドのC末端に、配列番号18～25、71～75、166、167、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0018】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、ポリペプチドのN末端にある。特定の実施形態では、ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含む：

（a）X₁LX₂LTX₃FFRK（配列番号26）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）；

（b）NX₁LX₂LTX₃FFRK（配列番号27）（式中、X₁は、WまたはFであり、X₂は、RまたはKであり、X₃はW、F、またはGである）；

（c）WLX₁LTX₂FFRK（配列番号28）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）；

（d）NWLX₁LTX₂FFRK（配列番号29）（式中、X₁は、RまたはKであり、X₂は、WまたはGである）；あるいは

【0019】

（e）FFRKNWX₁X₂X₃X₄X₅（配列番号35）（式中、X₁は、LまたはIであり、X₂は、L、R、またはKであり、X₃は、LまたはIであり、X₄は、T、L、F、K、R、またはWであり、X₅は、ポリペプチドのN末端にあるWまたはKである）。特定の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドのN末端に、配列番号30～37および216～229からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0020】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、12～50アミノ酸の長さ（例えば、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸の長さ）である。特定の実施形態では、ポリペプチドは、20～40アミノ酸の長さである。

【0021】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号54～69からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5

10

20

30

40

50

4～69からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【0022】

特定の実施形態では、ポリペプチドは化学的に合成される。

【0023】

別の態様では、本開示は、本明細書に開示されるポリペプチドと精製されたストレスタンパク質との複合体を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、H s c 7 0、H s p 7 0、H s p 9 0、H s p 1 1 0、G r p 1 7 0、G p 9 6、カルレティキュリン、およびそれらの変異体または融合タンパク質からなる群から選択される。特定の実施形態では、ストレスタンパク質はH s c 7 0である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ヒトH s c 7 0である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、組換えタンパク質である。

10

【0024】

別の態様において、本開示は、本明細書に開示される複数のポリペプチドを含む組成物を提供し、任意選択で、本明細書に開示される精製されたストレスタンパク質をさらに含む。特定の実施形態では、組成物は、本明細書に開示される2～20の異なるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、異なるポリペプチドのそれぞれは、同じH S P結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む。

【0025】

特定の実施形態では、ポリペプチドのそれぞれの抗原性ペプチドは、配列番号38～53からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、組成物は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16の異なる抗原性ペプチドを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのそれぞれは、配列番号54～69からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのそれぞれのアミノ酸配列は、配列番号54～69からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、組成物は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16の異なるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、組成物中のポリペプチドの総量は、約0.1～20 nmolである。特定の実施形態では、組成物中のポリペプチドの総量は、約3、4、5、または6 nmolである。特定の実施形態では、組成物中のストレスタンパク質の量は、約10 μg～600 μgである。特定の実施形態では、組成物中のストレスタンパク質の量は、約250 μg～290 μgである。

20

30

【0026】

特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約0.5：1～5：1である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約1：1～2：1である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約1：1、1.25：1、または1.5：1である。

【0027】

特定の実施形態では、組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量は、約10 μg～600 μgである。特定の実施形態では、組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量は、約300 μgである。

40

【0028】

特定の実施形態では、組成物は、アジュバントをさらに含む。特定の実施形態では、アジュバントは、サポニンまたは免疫刺激性核酸を含む。特定の実施形態では、アジュバントは、Q S - 2 1を含む。特定の実施形態では、組成物中のQ S - 2 1の量は、約10 μg、25 μg、または50 μgである。特定の実施形態では、アジュバントは、T o l l様受容体（T L R）アゴニストを含む。特定の実施形態では、T R Lアゴニストは、T L R 4のアゴニストである。特定の実施形態では、T R Lアゴニストは、T L R 7および／またはT L R 8のアゴニストである。特定の実施形態では、T R Lアゴニストは、T L R 9のアゴニストである。特定の実施形態では、T R Lアゴニストは、T L R 5のアゴニストである。

50

【0029】

特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物である。特定の実施形態では、組成物は単位剤形である。

【0030】

別の態様では、本開示は、対象において抗原性ペプチドに対する細胞性免疫応答を誘導する方法であって、有効量の、本明細書に開示される組成物または単位剤形を対象に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、対象はがんを有する。特定の実施形態では、対象は、病原性微生物の感染症を有する。

【0031】

別の態様では、本開示は、対象の疾患を治療する方法であって、有効量の、本明細書に開示される組成物または単位剤形を対象に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、疾患はがんである。特定の実施形態では、疾患は、病原性微生物の感染症である。

【0032】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、対象のがん細胞に存在する。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、病原性微生物に存在する。

【0033】

特定の実施形態では、組成物または単位剤形は、4週の間週1回対象に投与される。特定の実施形態では、組成物または単位剤形の少なくとも2回のさらなる用量は、4回の週1回の用量の後に隔週に1回対象に投与される。特定の実施形態では、組成物または単位剤形の少なくとも1つの追加免疫用量は、最後の週1回または隔週に1回の用量の3ヶ月後に投与される。特定の実施形態では、組成物または単位剤形は、少なくとも1年間、3ヶ月ごとにさらに投与される。

【0034】

特定の実施形態では、方法は、レナリドマイド、デキサメタゾン、インターロイキン-2、組換えインターフェロンアルファ-2b、またはPEG-インターフェロンアルファ-2bを対象に投与することをさらに含む。特定の実施形態では、方法は、インドールアミンジオキシゲナーゼ-1 (IDO-1) 阻害剤を対象に投与することをさらに含む。特定の実施形態では、IDO-1阻害剤は、4-アミノ-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-N'-ヒドロキシ-1, 2, 5-オキサジアゾール-3-カルボキシミダミドである。特定の実施形態では、この方法は、免疫チェックポイント抗体を対象に投与することをさらに含む。特定の実施形態では、免疫チェックポイント抗体は、アゴニスト抗GITR抗体、アゴニスト抗OX40抗体、アンタゴニスト抗PD-1抗体、アンタゴニスト抗CTLA-4抗体、アンタゴニスト抗TIM-3抗体、アンタゴニスト抗LAG-3抗体、アンタゴニスト抗TIGIT抗体、アゴニスト抗CD96抗体、アンタゴニスト抗VISTA抗体、アンタゴニスト抗CD73抗体、アゴニスト抗CD137抗体、アンタゴニスト抗CEACAM1抗体、アゴニスト抗ICOS抗体、および／またはそれらの抗原結合フラグメントからなる群から選択される。

【0035】

別の態様では、本開示は、本明細書に開示されるようなポリペプチドを含む第1の容器と、ポリペプチドに結合することができる精製されたストレスタンパク質を含む第2の容器とを含むキットを提供する。

【0036】

特定の実施形態では、第1の容器は、本明細書に開示される2~20の異なるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、異なるポリペプチドのそれぞれは、同じHSP結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドの総量は、約0.1~20nmolである。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドの総量は、約3、4、5、または6nmolである。

【0037】

特定の実施形態では、第1の容器は、本明細書で開示される単一のポリペプチドを含む

。特定の実施形態では、第1の容器は、本明細書で開示される少なくとも20の異なるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、異なるポリペプチドのそれぞれは、同じHSP結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドの総量は、約0.1~20nmolである。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドの総量は、約3、4、5、または6nmolである。

【0038】

特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、Gp96、カルレティキュリン、およびそれらの変異体からなる群から選択される。特定の実施形態では、ストレスタンパク質はHsc70である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ヒトHsc70である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、組換えタンパク質である。特定の実施形態では、第2の容器中のストレスタンパク質の量は、約10μg~600μgである。特定の実施形態では、第2の容器中のストレスタンパク質の量は、約250μg~290μgである。

【0039】

特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約0.5:1~5:1である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約1:1~2:1である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約1:1、1.25:1、または1.5:1である。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドおよび第2の容器中のストレスタンパク質の総量は、約10μg~600μgである。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドおよび第2の容器中のストレスタンパク質の総量は、300μgである。

【0040】

特定の実施形態では、キットは、アジュバントを含む第3の容器をさらに含む。特定の実施形態では、アジュバントは、サポニンまたは免疫刺激性核酸を含む。特定の実施形態では、アジュバントは、QS-21を含む。特定の実施形態では、第3の容器中のQS-21の量は、約10μg、25μg、または50μgである。特定の実施形態では、アジュバントは、TLRアゴニストを含む。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR4のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR7および/またはTLR8のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR9のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR5のアゴニストである。

【0041】

別の態様では、本開示は、ワクチンを作製する方法であって、本明細書に開示される1つ以上のポリペプチドを、精製されたストレスタンパク質と、精製されたストレスタンパク質がポリペプチドのうちの少なくとも1つに結合するような適切な条件下で混合することを含む方法を提供する。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、Gp96、カルレティキュリン、およびそれらの変異体からなる群から選択される。特定の実施形態では、ストレスタンパク質はHsc70である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ヒトHsc70である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、組換えタンパク質である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約0.5:1~5:1である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約1:1~2:1である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、約1:1、1.25:1、または1.5:1である。特定の実施形態では、適切な条件は、約37℃の温度を含む。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】非複合体形成Hsc70（上）およびペプチド複合体形成Hsc70（下）のUV吸光度を示す例示的なサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）クロマトグラムである。「C」、「D」、「T」、および「HMW」は、それぞれペプチド-Hsc70複合体

10

20

30

40

50

、H s c 7 0 ダイマー、H s c 7 0 トリマー、および高分子量オリゴマーH s c 7 0 種に対応するクロマトグラムのセグメントを示す。「M_{s h}」はモノマーショルダーを指す。

【図 2】H s c 7 0 と 0. 2 5 : 1 ~ 3 : 1 の範囲のモル比で混合した P E P 0 0 6 の U V 吸光度を示すクロマトグラムであり、混合物中の組成物をサイズ排除クロマトグラフィーで分離した。

【図 3 A】H s c 7 0 と 0. 1 2 5 : 1 ~ 4 : 1 のモル比で混合した P E P 0 0 6 を含むポリペプチドの U V 吸光度を示すクロマトグラムであり、混合物中の組成物をサイズ排除クロマトグラフィーにより分離した。

【図 3 B】図 3 A と同様のサイズ排除クロマトグラフィートレースから計算した、0. 1 2 5 : 1 ~ 4 : 1 までのポリペプチド : H s c 7 0 モル比の範囲にわたる、P E P 0 0 6 含有ポリペプチドの H s c 7 0 との複合体形成パーセントを示すグラフである。3 つの独立した実験が示されている。

【図 4 A】5 つの異なるペプチドの H s c 7 0 との複合体形成パーセントを示すグラフであり、5 つの異なるペプチドのそれぞれが 3 つの形態で合成された。1 つは C 末端 P E P 0 0 1 配列を有し、1 つは C 末端 P E P 0 0 6 配列を有し、1 つは C 末端 H S P 結合ペプチドを有さない（「ネイキッドペプチド」）。

【図 4 B】6 つの異なるペプチドの H s c 7 0 との複合体形成パーセントを示すグラフであり、6 つの異なるペプチドのそれぞれが 2 つの形態で合成された。1 つは C 末端 P E P 0 0 1 配列を有し、もう 1 つは C 末端 P E P 0 0 6 配列を有する。

【図 5 A】遊離ペプチドとして、または 2 : 1 または 1 : 1 の比率で H s c 7 0 タンパク質と混合して、P E P 0 0 1 含有 H P V プールペプチドまたは P E P 0 0 6 含有 H P V プールペプチド、または H S P 結合ペプチドに連結されていない H P V プールペプチド（ネイキッド H P V ペプチド）を含むワクチンで免疫したマウス由来の I F N γ 産生脾細胞の相対数を示すグラフである（n = 3 マウス / 処理群）。

【図 5 B】遊離ペプチドとして、または 2 : 1 または 1 : 1 の比率で H s c 7 0 タンパク質と混合して、P E P 0 0 1 含有 H P V プールペプチドまたは P E P 0 0 6 含有 H P V プールペプチド、または H S P 結合ペプチドに連結されていない H P V プールペプチド（ネイキッド H P V ペプチド）を含むワクチンで免疫したマウス由来の I F N γ 産生脾細胞の相対数を示すグラフである（n = 3 マウス / 処理群）。

【図 6】遊離ペプチドとして、または 2 : 1 または 1 : 1 の比率で H s c 7 0 タンパク質と混合して、M C 3 8 ペプチドの示されたプールで免疫したマウス由来の I F N γ 産生脾細胞の相対数を示すグラフである（n = 3 マウス / 処理群）。

【図 7 A】同系マウス腫瘍モデルにおける腫瘍の平均体積を示すグラフであり、P E P 0 0 1 含有 H P V ペプチド（「P E P 0 6 7 - 0 7 0」）、P E P 0 0 6 含有 H P V ペプチド（「P E P 0 6 3 - 0 6 6」）、またはネイキッド H P V ペプチド（「P E P 0 5 9 - 0 6 2」）を含むワクチンでマウスを免疫し、それぞれの場合において、本明細書のセクション 6. 2. 2 に記載される H s c 7 0 タンパク質、または陰性対照としての P B S と混合した（n = 1 0 マウス / 処理群）。

【図 7 B】これら 4 つの処理群における各マウスの腫瘍体積を示す。

【図 7 C】これら 4 つの処理群における各マウスの腫瘍体積を示す。

【図 7 D】これら 4 つの処理群における各マウスの腫瘍体積を示す。

【図 7 E】これら 4 つの処理群における各マウスの腫瘍体積を示す。

【図 7 F】マウスの生存曲線のセットを示す。

【図 8 A】同系マウス腫瘍モデルにおける腫瘍の平均体積を示すグラフであり、P E P 0 0 6 含有 H P V ペプチドの新しいプール（「P E P 0 7 1 - 0 8 6」）または以前に試験された P E P 0 0 6 含有 H P V ペプチドのプール（「P E P 0 6 3 - 0 6 6」）を含むワクチンでマウスを免疫し、いずれの場合においても、本明細書のセクション 6. 2. 3 に記載される H s c 7 0 タンパク質、または陰性対照としての P B S と混合した（n = 1 3 マウス / 処理群、エラーバー：標準偏差）。

【図 8 B】マウスの生存曲線のセットを示す。

10

20

30

40

50

【図 9 A】 P B S と比較した P E P 0 0 6 を含む 1 6 の異なる H P V ペプチドをロードした H S C 7 0 ベースのワクチンの 2 つの異なる製剤で処理した個々のマウスの腫瘍増殖動態を示す一連のグラフである。

【図 9 B】 同じマウスにおけるマウスの群平均腫瘍増殖動態を示すグラフである。

【図 9 C】 同じ実験での全生存期間を示すグラフである。

【図 1 0 A】 は、ネイキッド配列番号 9 7) または P E P 0 0 1 (配列番号 2 3 0) もしくは P E P 0 0 6 (配列番号 2 3 1) と連結した O v a ペプチドの化学合成生成物の逆相クロマトグラフィーシグナルを示す一連のクロマトグラムである。矢印は、純粋なペプチドの保持時間を示す。

【図 1 0 B】 図 1 0 A のシグナルの定量化を示すグラフである。

【図 1 1】 ネイキッドペプチド (A-Y) と C 末端 P E P 0 0 6 配列を有する同じペプチド (A-Y) の粗純度を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 3】

本開示は、新規の H S P 結合ペプチドを含むポリペプチドおよび組成物を提供する。そのようなポリペプチドおよび組成物は、免疫療法薬（例えば、がんワクチン）として特に有用である。そのようなポリペプチドおよび組成物を使用して細胞性免疫応答を誘導する方法、そのようなポリペプチドおよび組成物を使用して疾患を治療する方法、そのようなポリペプチドおよび組成物を含むキット、およびそのような組成物を作製する方法も提供される。

【0 0 4 4】

5. 1 定義

本明細書で特に定義されない限り、本明細書で使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有する。潜在的なあいまいさが生じた場合、本明細書で提供される定義は、辞書または外部の定義よりも優先される。文脈で特に必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。「または (or)」の使用は、別途記述されない限り、「および／または (and/or)」を意味する。用語「including (～を含む)」、ならびに、「include s (～を含む)」および「included (含まれる)」等の他の形態の使用は、限定的なものではない。

【0 0 4 5】

本明細書で使用されるとき、「約」および「およそ」という用語は、数値または数値範囲を修飾するために使用されるとき、記載された値または範囲の、5 % から 1 0 % 上（例えば、5 % から 1 0 % 上まで）および 5 % から 1 0 % 下（例えば、5 % から 1 0 % 下まで）の偏差が、記載された値または範囲の意図された意味内に留まることを示す。

【0 0 4 6】

本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」という用語は、6 つ以上のアミノ酸残基のペプチドを含む天然に存在しないポリマーを指す。ポリペプチドは、1 つ以上の非アミノ酸残基構造をさらに含むことができる。特定の実施形態では、ポリペプチドは、化学的リンカーを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドの 2 つの部分連結する化学リンカーを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質（例えば、天然に存在するタンパク質）のアミノ酸配列全体を含まない。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質（例えば、天然に存在するタンパク質）のうちの、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、または 1 0 0 を超える連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を含まない。

【0 0 4 7】

本明細書で使用されるとき、「単離されたポリペプチド」という用語は、ポリペプチドの発現（例えば、組換え発現）または合成（例えば、化学合成）の後に存在する 1 つ以上

10

20

30

40

50

の分子から分離されるポリペプチドを指す。

【0048】

本明細書で使用されるとき、「主要組織適合性複合体」および「MHC」という用語は互換可能に使用され、MHCクラスI分子および／またはMHCクラスII分子を指す。

【0049】

本明細書で使用されるとき、「ヒト白血球抗原」および「HLA」という用語は互換可能に使用され、ヒトにおける主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を指す。HLA分子は、クラスI MHC分子(例えば、HLA-A、HLA-B、HLA-C)またはクラスII MHC分子(例えば、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR)であり得る。

【0050】

本明細書で使用されるとき、「主要組織適合遺伝子複合体(MHC)結合エペトープ」という用語は、MHC分子に結合するか、または結合すると予測されるペプチドを指す。

【0051】

本明細書で使用されるとき、「熱ショックタンパク質結合ペプチド」および「HSP結合ペプチド」という用語は互換可能に使用され、HSPに非共有結合するペプチドを指す。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質(例えば、天然に存在するタンパク質)のうちの、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、または50を超える連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を含まない。

【0052】

本明細書で使用されるとき、「ペプチドリinker」という用語は、第1のペプチドのC末端アミノ酸残基を第2のペプチドのN末端アミノ酸残基に連結するペプチド結合またはペプチド配列を指す。

【0053】

本明細書で使用されるとき、「化学リンカー」という用語は、2つの分子を連結することができる任意の化学結合または部分を指し、結合または部分はペプチドリinkerではない。

【0054】

本明細書で使用されるとき、「治療する」、「治療すること」、および「治療」という用語は、本明細書に記載の治療的または予防的手段を指す。「治療」の方法は、疾患または障害を有する、またはそのような疾患または障害を有する素因を有する対象に対し、疾患もしくは障害または再発性の疾患もしくは障害を、予防、治療、遅延、その重症度の軽減、またはその1つ以上の症状の改善のため、あるいは、そのような治療の非存在下で予想されるものを超えて対象の生存を延長するために、抗体の投与を採用する。

【0055】

本明細書で使用されるとき、対象への療法の投与の文脈における「有効量」という用語は、所望の予防または治療効果を達成する療法の量を指す。

【0056】

本明細書で使用されるとき、「対象」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。

【0057】

5. 2 熱ショックタンパク質(HSP)ー結合ペプチド

一態様では、本開示は、表1に提供されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むHSP結合ペプチドを含むポリペプチドを提供する。

【0058】

10

20

30

40

【表 1 - 1】

表 1. HSP 結合ペプチドのアミノ酸配列

説明	アミノ酸配列	配列番号
コンセンサス配列 1	$X_1 L X_2 L T X_3$ 、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 は、W、F、またはGである。	1
コンセンサス配列 2	$N X_1 L X_2 L T X_3$ 、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 は、W、F、またはGである。	2
コンセンサス配列 3	$W L X_1 L T X_2$ 、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。	3
コンセンサス配列 4	$N W L X_1 L T X_2$ 、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。	4
コンセンサス配列 5	$N W X_1 X_2 X_3 X_4 X_5$ 、式中、 X_1 は、LまたはIであり、 X_2 は、L、R、またはKであり、 X_3 は、LまたはIであり、 X_4 は、T、L、F、K、R、またはWであり、 X_5 は、WまたはKである。	2 3 2
PEP016	WLRLLTW	5
PEP017	NWLRLLTW	6
PEP018	WLKLTTW	7
PEP019	NWLKLTTW	8
PEP020	WLRLLTG	9
PEP021	NWLRLLTG	10
PEP022	FLRLTTF	11
PEP023	NFLRLTTF	12
PEP024	WLRLLTTF	98
PEP025	NWLRLLTTF	99
PEP040	WLKLTF	100
PEP041	NWLKLTF	101
PEP042	WLKLTTG	102
PEP043	NWLKLTTG	103
PEP044	FLRLTW	104
PEP045	NFLRLTW	105
PEP046	FLRLTTG	106
PEP047	NFLRLTTG	107
PEP048	FLKLTTW	108
PEP049	NFLKLTTW	109
PEP050	FLKLTF	110
PEP051	NFLKLTF	111

【表 1 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号
PEP103	FLKLTG	112
PEP104	NFLKLTG	113
PEP185	NWLLLTW	204
PEP186	NLLRWTG	205
PEP188	FWLRLTW	207
PEP189	NWLRLTW	208
PEP190	NWLRLFW	209
PEP191	NWLRLKW	210
PEP192	NWIRITW	211
PEP193	QWLRLTW	212
PEP194	NWLKLKW	213
PEP195	NWLKLRW	214
PEP196	NWLKLWK	215

10

【0059】

一態様では、本開示は、 $X_1 L X_2 L T X_3$ （配列番号1）のアミノ酸配列を含むHSP結合ペプチドを含むポリペプチドを提供し、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 は、W、F、またはGである。別の態様では、本開示は、 $NW X_1 X_2 X_3 X_4 X_5$ （配列番号232）のアミノ酸配列を含むHSP結合ペプチドを含むポリペプチドを提供し、式中、 X_1 は、LまたはIであり、 X_2 はL、R、またはKであり、 X_3 は、LまたはIであり、 X_4 は、T、L、F、K、R、またはWであり、 X_5 は、WまたはKである。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、 $10^{-3} M$ 、 $10^{-4} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、または $10^{-9} M$ より低い K_d でHSP（例えば、Hsc70、Hsp70、Hsp90の、Hsp110、Grp170、GP96、またはカルレティキュリン）に結合する。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、 $10^{-3} M$ 、 $10^{-4} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、またはそれ以下の K_d で、Hsc70（例えば、ヒトHsc70）に結合する。

20

30

【0060】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、 $NX_1 L X_2 L T X_3$ （配列番号2）のアミノ酸配列を含み、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 はW、F、またはGである。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、 $WLX_1 L T X_2$ （配列番号3）のアミノ酸配列を含み、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、 $NWLX_1 L T X_2$ （配列番号4）のアミノ酸配列を含み、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。

【0061】

特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号5～12、98～113、204～205、および207～215からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号12のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号98のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号

40

50

20

30

40

50

特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5～12、98～113、204、205、および207～215からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号6のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号7のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号8のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号9のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号10のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号11のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号12のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号98のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号99のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号100のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号101のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号102のアミノ酸配列からなる。

る。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 5 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 1 1 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 1 2 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 1 3 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 0 4 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 0 5 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 0 7 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 0 8 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 0 9 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 1 0 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 1 1 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 1 2 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 1 3 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 1 4 のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 2 1 5 のアミノ酸配列からなる。

【0064】

特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドは、1 0 0 以下（例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95）のアミノ酸残基の長さである。特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドは、6～50（例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50）のアミノ酸残基の長さである。

【0065】

特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、H S P 結合ペプチドのアミノ酸配列からなる。

【0066】

特定の実施形態では、H S P 結合ペプチドは、リンカーをさらに含む。リンカーは、当技術分野で知られている任意の化学リンカーまたはペプチドリinkerであり得る。

【0067】

特定の実施形態では、リンカーは、化学的架橋または紫外線（UV）架橋のための部分を含む。当技術分野で知られている任意の化学的架橋またはUV架橋部分（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、Wong, 1991, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press, incorporated herein by reference in its entiretyを参照されたい）を使用することができる。特定の

実施形態では、リンカーは、クリックケミストリーハンドルを含む。本明細書で使用されるとき、「クリックケミストリーハンドル」という用語は、クリックケミストリー反応に関与することができる反応物または反応基を指す。例示的なクリックケミストリーハンドルは、米国特許出願公開第2013/0266512号に示され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0068】

特定の実施形態では、リンカーはペプチドリリンカーを含む。特定の実施形態では、ペプチドリリンカーは、プロテアーゼによって認識および／または切断され得るアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、プロテアーゼは、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）において発現する。特定の実施形態では、プロテアーゼは、抗原提示細胞（例えば、B細胞、マクロファージ、樹状細胞）において発現する。特定の実施形態では、プロテアーゼはセリンプロテアーゼである。特定の実施形態では、プロテアーゼは、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、またはエラスターゼである。特定の実施形態では、ペプチドリリンカーは、FFRK（配列番号13）のアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。特定の実施形態では、ペプチドリリンカーは、FRのアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

【0069】

【表 2 - 1】

表 2. リンカーのアミノ酸配列およびリンカーを有するHSP結合ペプチド

説明	アミノ酸配列	配列番号
リンカー	FFRK	13
リンカー	FR	N/A
N末端リンカーを有する コンセンサス配列 1	FFRKX ₁ LX ₂ LTX ₃ 、式中、 X ₁ は、WまたはFであり、 X ₂ は、RまたはKであり、 X ₃ は、W、F、またはGである。	14
N末端リンカーを有する コンセンサス配列 2	FFRKNX ₁ LX ₂ LTX ₃ 、式中、 X ₁ は、WまたはFであり、 X ₂ は、RまたはKであり、 X ₃ は、W、F、またはGである。	15
N末端リンカーを有する コンセンサス配列 3	FFRKWLX ₁ LTX ₂ 、式中、 X ₁ は、RまたはKであり、 X ₂ は、WまたはGである。	16
N末端リンカーを有する コンセンサス配列 4	FFRKNWLX ₁ LTX ₂ 、式中、 X ₁ は、RまたはKであり、 X ₂ は、WまたはGである。	17
N末端リンカーを有する コンセンサス配列 5	FFRKNWX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ 、式中、 X ₁ は、LまたはIであり、 X ₂ は、L、R、またはKであり、 X ₃ は、LまたはIであり、 X ₄ は、T、L、F、K、R、またはWであり、 X ₅ は、WまたはKである。	233
PEP001	FFRKNLLRLTG	71
PEP003	FFRKNWLLLTW	166
PEP004	FFRKNLLRWTG	167
PEP006	FFRKNWLRLTW	18
PEP012	FFRKNWLKLTW	19
PEP013	FFRKNWIRITW	173
PEP014	FFRKQWLRLTW	174
PEP026	FFRKNWLRLTG	20
PEP027	FFRKNFLRLTF	21
PEP028	FRNWLRLTW	22
PEP029	FRNWLKLTW	23
PEP030	FRNWLRLTG	24
PEP031	FRNFLRLTF	25
PEP055	FFRKNWLKCLKW	72
PEP057	FFRKNWLKLRW	74
PEP058	FFRKNWLKLWK	75
C末端リンカーを有する コンセンサス配列 1	X ₁ LX ₂ LTX ₃ FFRK、式中、 X ₁ は、WまたはFであり、 X ₂ は、RまたはKであり、 X ₃ は、W、F、またはGである。	26

10

20

30

40

【表 2 - 2】

説明	アミノ酸配列	配列番号
C末端リンカーを有するコンセンサス配列 2	$NX_1LX_2LTX_3FFRK$ 、式中、 X_1 は、WまたはFであり、 X_2 は、RまたはKであり、 X_3 は、W、F、またはGである。	27
C末端リンカーを有するコンセンサス配列 3	WLX_1LTX_2FFRK 、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。	28
C末端リンカーを有するコンセンサス配列 4	$NWLX_1LTX_2FFRK$ 、式中、 X_1 は、RまたはKであり、 X_2 は、WまたはGである。	29
C末端リンカーを有するコンセンサス配列 5	$NWX_1X_2X_3X_4X_5FFRK$ 、式中、 X_1 は、LまたはIであり、 X_2 は、L、R、またはKであり、 X_3 は、LまたはIであり、 X_4 は、T、L、F、K、R、またはWであり、 X_5 は、WまたはKである。	234
PEP032	NWLRLTWFFRK	30
PEP033	NWLKLTWFFRK	31
PEP034	NWLRLTGFFRK	32
PEP035	NFLRLTFFFRK	33
PEP036	NWLRLTWFR	34
PEP037	NWLKLTWFR	35
PEP038	NWLRLTGFR	36
PEP039	NFLRLTFFR	37
PEP197	NLLRLTWFFRK	216
PEP198	NRLLLTGFFRK	217
PEP199	NWLLLTWFFRK	218
PEP200	NLLRWTGFFRK	219
PEP201	NRLWLTGFFRK	220
PEP202	FWLRLTWFFRK	221
PEP203	NWLRLLTWFFRK	222
PEP204	NWLRLFWFFRK	223
PEP205	NWLRLKWFFRK	224
PEP206	NWIRITWFFRK	225
PEP207	QWLRLTWFFRK	226
PEP208	NWLKLKWFFRK	227
PEP209	NWLKLRFWFFRK	228
PEP210	NWLKLWKFFRK	229

【0070】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、表 2 に提供されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つを含む。

【0071】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、リンカーは、H S P 結合ペプチドのN末端である。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号14、15、16、17、または233のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、71、72、74、75、166、167、173、または174のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号14、15、16、17、または233のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、71、72、74、75、166、167、173、または174のアミノ酸配列からなる。

【0072】

特定の実施形態では、リンカーは、H S P 結合ペプチドのC末端である。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26、27、28、29、または234のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30、31、32、33、34、35、36、37、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、または229のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号26、27、28、29、または234のアミノ酸配列からなる。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号30、31、32、33、34、35、36、37、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、または229のアミノ酸配列からなる。

【0073】

5. 3 H S P 結合ペプチドを含むポリペプチド

一態様では、本開示は、本明細書に開示されるようなH S P 結合ペプチドと、1つ以上のMHC結合エピトープを含む抗原性ペプチドとを含むポリペプチドを提供する。

【0074】

MHC結合エピトープは、当技術分野で知られている方法によって、例えば、ペプチドのMHC分子（例えば、HLA分子）への結合を測定するアッセイによって同定することができる。そのようなアッセイの非限定的な例には、抗原提示の阻害（Sette, et al., J. Immunol. 141:3893, 1991）、in vitroアセンブリアッセイ（Townsend, et al., Cell 62:285, 1990）、およびRMA-S等の変異細胞を使用するFACSベースのアッセイ（Melief, et al., Eur. J. Immunol. 21:2963, 1991）が含まれる。場合によっては、MHC結合エピトープは、ソフトウェアプログラム（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、SYFPEITHI, Rammensee, et al., Immunogenetics 50, 213-219, 1999）によって、MHC分子（例えば、HLA分子）に結合すると予測され得る。MHC結合エピトープを同定するために使用できる他の方法には、非限定的に、Guan, P. et al., (2003) Applied Bioinformatics, 2:63-66; Blythe, M. J. et al., (2002) Bioinformatics, 18:434-439; Flower, D. R. and Doytchinova, I. A. (2002). Applied Bioinformatics, 1:167-176; Yu, K. et al., (2002) Molecular Medicine, 8:137-48; Brusica, V. et al., (2002) Immunology and Cell Biology, 80:280-285; Jung, G. et al., (2001) Biologicals, 29:179-181（T細胞エピトープ予測プログラムEPIPREICTを記載する）; Kwok, W. W. et al., (2001) Trends in Immunology, 22:583-588; Mallios, R. R. (2001) Bioinformatics, 17:942-948; Romisch, K. (2001). Trends in Biochemical Sciences, 26:531; Schirle, M. et al., (2001) Jou

10

20

30

40

50

rnal of Immunological Methods, 257:1-16; Singh, H. and Raghava, G. P. S. (2001) Bioinformatics, 17:1236-1237; Andersen, M. H. et al., (2000) Tissue Antigens, 55:519-531; Buus, S. (1999). Current Opinion in Immunology, 11:209-213; Mallios, R. R. (1999) Bioinformatics, 15:432-439; Maffei, A. and Harris, P. E. (1998). Peptides, 19:179-198; および Vita R. et al., (2015) Nucleic Acids Res., 43:D405-D412 (www.iedb.orgで入手可能な免疫エピトープデータベース (IEDB) 3.0を記載する)に開示されているもの(その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる)を含む。

【0075】

MHC分子は、クラスI分子またはクラスII分子のいずれかに分類される。クラスI MHC分子は、主に樹状細胞、Bリンパ球、マクロファージ等の免疫応答の開始と維持に参与する細胞で発現する。クラスII MHC分子は、ヘルパーTリンパ球によって認識され、ヘルパーTリンパ球の増殖と、提示される特定の免疫原性ペプチドに対する免疫応答の増幅とを誘導する。クラスI MHC分子は、ほとんど全ての有核細胞で発現し、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によって認識され、細胞傷害性Tリンパ球が抗原保有細胞を破壊する。細胞傷害性Tリンパ球は、腫瘍の拒絶反応やウイルス感染との闘いにおいて特に重要である。CTLは、無傷の外來抗原自体ではなく、MHCクラスI分子に結合したペプチドフラグメントの形で抗原を認識する。ペプチドがMHC分子に結合する能力は、抗原提示の阻害(Sette, et al., J. Immunol. 141:3893, 1991、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)、in vitroアセンブリアッセイ(Townsend, et al., Cell 62:285, 1990)、およびRMA-S等の変異細胞を使用するFACSベースのアッセイ(Melief, et al., Eur. J. Immunol. 21:2963, 1991、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)等、様々な方法で測定できる。MHCクラスI分子に結合すると予測されるMHC結合エピトープは通常8~11残基であり、MHCクラスII分子に結合すると予測されるMHC結合エピトープは通常10~20残基の範囲である。

【0076】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、HLA結合エピトープである。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、500nM以下(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、または450nM以下)のIC50でMHC I分子に結合する。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、1000nM以下(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、または900nM以下)のIC50でMHC II分子に結合する。

【0077】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープの配列は、対象のがん細胞(例えば、子宮頸癌、腺癌、神経膠芽腫、または多発性骨髄腫の細胞)のうちの1つ以上から同定される。特定の実施形態では、MHC結合エピトープのアミノ酸配列は、がん細胞から同定された配列と100%同一である。特定の実施形態では、MHC結合エピトープのアミノ酸配列は、がん細胞から同定された配列と少なくとも70%、80%、90%、または95%同一であり、任意選択で、その差異は、アミノ酸の保存的置換を大部分またはそのみ含む。がん細胞から同定されたアミノ酸配列は、種の集団の最も頻繁な配列と比較して、野生型または変異体のいずれかである可能性がある。がん細胞から同定されたアミノ酸配列

が変異体である場合、それは、アミノ酸変異（例えば、置換、欠失、または挿入変異）または遺伝子融合変異（例えば、ゲノム転座または転位の結果として）を含み得る。

【0078】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープの配列は、病原性微生物から同定される。病原性微生物は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、または寄生虫であり得る。例示的なウイルスには、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ（例えば、インフルエンザAまたはインフルエンザB）、バリセラ、アデノウイルス、単純ヘルペスI型（HSV-I）、単純ヘルペスII型（HSV-II）、リンダーペスト、サイウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス（例、ヒトパピローマウイルス（HPV））、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、はしかウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、エプスタインバーウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-I）、ヒト免疫不全ウイルスII型（HIV-II）、デング熱ウイルス、スモールポックスウイルス、およびジカウイルスが含まれる。例示的な細菌には、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Staphylococcus aureus*、*Enterococcus faecalis*、*Proteus vulgaris*、*Staphylococcus viridans*、および*Pseudomonas aeruginosa*が含まれる。例示的な真菌には、カンジダ（例えば、*Candida glabrata*）、*Pneumocystis carinii*、*Fusarium keratitis*、コクシジウム、*Aspergillus niger*、*Cryptococcus neoformans*、および*Curvularia geniculata*が含まれる。例示的な原生動物には、リーシュマニア、コクシジウム症、トリパノソーマ住血吸虫、およびマラリアが含まれる。例示的な寄生虫には、クラミジアおよびリケッチアが含まれる。

【0079】

特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、修飾アミノ酸残基を含む。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、リン酸化残基（例えば、側鎖ヒドロキシルまたはアミンでリン酸化されたTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、またはHis）を含む。特定の実施形態では、MHC結合エピトープは、ホスホミメティック基（例えば、側鎖ヒドロキシルまたはアミンでリン酸化されたTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、またはHisアミノ酸の模倣物）を含む。ホスホミメティック基の非限定的な例には、オーボラノホスホ、ボロノ、オージチオホスホ、ホスホルアミド、H-ホスホネート、アルキルホスホネート、ホスホロチオレート、ホスホジチオレート、およびホスホロフルオリデートが含まれ、これらのうちのいずれも、Tyr、Thr、Ser、Arg、Lys、またはHis残基で誘導体化され得る。特定の実施形態では、AspまたはGlu残基は、ペプチド中のホスホ-Tyr、ホスホ-Thr、ホスホ-Ser、ホスホ-Arg、ホスホ-Lys、および／またはホスホ-His残基の代わりにホスホミメティックとして使用される。特定の実施形態では、ホスホミメティック残基は、リン酸化残基の非加水分解性類似体である。

【0080】

抗原性ペプチドは、1つ以上のMHC結合エピトープを含み得る。特定の実施形態では、抗原性ペプチドは、1つのMHC結合エピトープを含む。特定の実施形態では、抗原性ペプチドは、2つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）のMHC結合エピトープを含む。2つ以上のMHC結合エピトープは、化学リンカーまたはペプチドリinkerを介して連結することができ、ペプチドリinkerは、プロテアーゼによって認識および／または切断することができるアミノ酸配列を任意選択で含む。

【0081】

特定の実施形態では、抗原性ペプチドは、8～50アミノ酸（例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37

10

20

30

40

50

、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸)の長さである。特定の実施形態では、抗原性ペプチドは、12~50、20~40、20~35、25~40、20~30、25~35、または30~40アミノ酸の長さである。

【0082】

HSP結合ペプチドは、化学リンカーまたはペプチドリinkerを介して抗原性ペプチドに連結され得る。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、化学リンカーを介して抗原性ペプチドに連結され得る。HSP結合ペプチドと抗原性ペプチドを連結するために、任意の化学的リンカーを使用することができる。例示的な化学リンカーには、化学架橋(例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれるWong, 1991, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press)、UV架橋、およびクリック化学反応(例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2013/266512号)によって生成される部分が含まれる。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、ペプチドリinker(例えば、セクション5.2に開示されるようなペプチドリinker)を介して抗原性ペプチドに連結され得る。

【0083】

HSP結合配列は、任意のアミノ酸位置で抗原性ペプチドに結合することができる。特定の実施形態では、HSP結合配列のC末端は、化学リンカーを介して抗原性ペプチドのN末端に連結されている。特定の実施形態では、HSP結合配列のN末端は、化学リンカーを介して抗原性ペプチドのC末端に連結されている。特定の実施形態では、HSP結合配列のC末端は、ペプチドリinkerを介して抗原性ペプチドのN末端に連結されている。特定の実施形態では、HSP結合配列のN末端は、ペプチドリinkerを介して抗原性ペプチドのC末端に連結されている。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、ポリペプチドのC末端にある。C末端にHSP結合ペプチドを有するポリペプチドは、一般に、固相合成によって生成される場合に改善された純度を有するという点で有利である。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、ポリペプチドのN末端にある。特定の実施形態では、熱ショックタンパク質結合ペプチドは、ポリペプチドのN末端またはC末端にない。特定の実施形態では、熱ショックタンパク質結合ペプチドは、ポリペプチドの中心にある。

【0084】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、N末端からC末端に向けて、1つ以上のMHC結合エピトープを含む抗原性ペプチドと、ペプチドリinkerと、本明細書に開示されるHSP結合ペプチドとを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号14、15、16、17、または233のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、71、72、74、75、166、167、173、または174のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、N末端からC末端に向けて、本明細書に開示される抗原性ペプチドのアミノ酸配列と、配列番号14、15、16、17、または233のアミノ酸配列とからなる。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、N末端からC末端に向けて、本明細書に開示される抗原性ペプチドのアミノ酸配列と、配列番号18、19、20、21、22、23、24、25、71、72、74、75、166、167、173、または174のアミノ酸配列とからなる。

【0085】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、N末端からC末端に向けて、本明細書に開示されるHSP結合ペプチドと、ペプチドリinkerと、1つ以上のMHC結合エピトープを含む抗原性ペプチドとを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号26、27、28、29、または234のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号30、31、32、33、34、35、36、37、または216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227

、228、または229のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、N末端からC末端に向けて、配列番号26、27、28、29、または234のアミノ酸配列と、本明細書に開示される抗原性ペプチドのアミノ酸配列とからなる。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、N末端からC末端に向けて、配列番号30、31、32、33、34、35、36、37、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、または229のアミノ酸配列と、本明細書に開示される抗原性ペプチドのアミノ酸配列とからなる。

【0086】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、500アミノ酸以下（例えば、400、300、200、100、90、80、70、60、50、または40アミノ酸以下）の長さである。特定の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は天然に存在しない。

【0087】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、または 10^{-9} Mより低い K_d で、HSP（例えば、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、GP96、またはカルレチキュリン）に結合する。特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、またはそれ以下の K_d で、Hsc70（例えば、ヒトHsc70）に結合する。

【0088】

5. 3. 1 化学合成によるポリペプチドの生産

本明細書に開示されるポリペプチドは、ペプチドシンセサイザーの使用を含む標準的な化学的方法によって合成することができる。従来のペプチド合成または当技術分野で周知の他の合成プロトコルを使用することができる。

【0089】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基からなる。そのようなポリペプチドは、例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれるMerrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149によって記載されたものと同様の手順を使用する固相ペプチド合成によって合成することができる。合成中、保護された側鎖を有するN- α -保護アミノ酸は、そのC末端によって不溶性のポリマー支持体、すなわちポリスチレンビーズに連結された成長中のポリペプチド鎖に段階的に付加される。ポリペプチドは、N- α -脱保護アミノ酸のアミノ基を、ジシクロヘキシルカルボジイミドまたは2-(6-クロロ-1-H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-тетラメチルアミニウムヘキサフルオロホスフェート等の試薬と反応させることによって活性化された、N- α -保護アミノ酸の α -カルボキシル基に連結することによって合成される。活性化されたカルボキシルへの遊離アミノ基の結合は、ペプチド結合の形成をもたらす。最も一般的に使用されるN- α -保護基には、酸に不安定なBocと塩基に不安定なFmocが含まれる。適切な化学物質、樹脂、保護基、保護されたアミノ酸および試薬の詳細は、当技術分野で周知である（それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Atherton, et al., 1989, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press、およびBodanszky, 1993, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2nd Ed., Springer-Verlagを参照されたい）。

【0090】

さらに、ポリペプチドの類似体および誘導体は、上述のように化学的に合成することができる。必要に応じて、非古典的アミノ酸または化学アミノ酸類似体を、ペプチド配列へと置換または付加として導入することができる。非古典的アミノ酸には、一般的なアミノ酸のD-異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、ヒドロキシプロリン、サルコシ

10

20

30

40

50

ン、シトルリン、シスチン酸、 γ -ブチルグリシン、 γ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、 β -メチルアミノ酸、 $C-\alpha$ -メチルアミノ酸、 $N-\alpha$ -メチルアミノ酸等のデザイナーアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。

【0091】

Tyr、Ser、Thr、Arg、Lys、およびHisの側鎖でリン酸化されたポリペプチドは、適切な側鎖で保護されたFmoc-ホスホアミノ酸を使用するFmoc固相合成で合成できる。このようにして、リン酸化および非リン酸化のTyr、Ser、Thr、Arg、Lys、およびHis残基の組み合わせを有するポリペプチドを合成することができる。例えば、Staerka et alの方法を適用することができる (1991, Tetrahedron Letters 32:5389-5392)。他の手順 (特定のアミノ酸に関するものもある) は、De Bont et al. (1987, Trav. Chim Pays Bas 106:641, 642)、Bannwarth and Trezeciak (1987, Helv. Chim. Acta 70:175-186)、Perich and Johns (1988, Tetrahedron Letters 29:2369-2372)、Kitas et al. (1990, J. Org. Chem. 55:4181-4187)、Valerio et al. (1989, Int. J. Peptide Protein Res. 33:428-438)、Perich et al. (1991, Tetrahedron Letters 32:4033-4034)、Pennington (1994, Meth. Molec. Biol. 35:195-2)、およびPerich (1997, Methods Enzymol. 289:245-266、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に詳述される。

【0092】

リン酸化ポリペプチドは、ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸で形質転換された細胞を最初に培養することによっても産生され得る。細胞培養によりこのようなポリペプチドを生成した後、適切なアミノ酸のヒドロキシル基は、有機合成またはリン酸化酵素を用いた酵素的方法を使用してリン酸基で置換される。例えば、セリン特異的リン酸化の場合、セリンキナーゼを使用することができる。

【0093】

ポリペプチドのリン酸化アミノ酸残基がホスホメチリック基で置き換えられているホスホペプチド模倣物も合成することができる。ホスホメチリック基の非限定的な例には、 O -ボラノホスホ、ボロノ、 O -ジチオホスホ、ホスホルアミド、 H -ホスホネート、アルキルホスホネート、ホスホロチオレート、ホスホジチオレート、およびホスホロフルオリデートが含まれ、これらのうちのいずれも、Tyr、Thr、Ser、Arg、Lys、またはHis残基で誘導体化され得る。特定の実施形態では、AspまたはGlu残基は、ホスホメチリックとして使用される。AspまたはGlu残基は、ホスホメチリック基としても機能し、ペプチドのホスホ-Tyr、ホスホ-Thr、ホスホ-Ser、ホスホ-Arg、ホスホ-Lysおよび/またはホスホ-His残基の代わりに使用することができる。

【0094】

得られたペプチドの精製は、逆相、ゲル浸透、分配および/またはイオン交換クロマトグラフィーを使用する分取HPLC等の標準的な手順を使用して達成される。適切なマトリックスおよび緩衝液の選択は当技術分野で周知であり、したがって本明細書では詳細に説明されていない。

【0095】

5. 3. 2 組換えDNA技術を使用するポリペプチドの産生

本明細書に開示されるペプチドはまた、当該分野で公知の組換えDNA方法によって調製され得る。ポリペプチドをコードする核酸配列は、アミノ酸配列の逆翻訳によって得られ、オリゴヌクレオチドシンセサイザーの使用等の標準的な化学的方法によって合成され

得る。代替的に、ポリペプチドのコーディング情報は、特別に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーとPCR方法論を使用してDNAテンプレートから取得できる。ポリペプチドの変異体およびフラグメントは、機能的に同等の分子を提供する置換、挿入、または欠失によって作製することができる。ヌクレオチドコード配列の縮重のために、ポリペプチドの同じものまたは変異体をコードするDNA配列を、本発明の実施において使用することができる。これらには、配列内の機能的に同等のアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって変更され、したがってサイレントまたは保存的な変化をもたらすヌクレオチド配列が含まれるが、これらに限定されない。ポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞での増殖および発現のために発現ベクターに挿入することができる。

【0096】

本明細書で企図される長さのペプチドのコード配列は、化学的技術、例えば、M a t t e u c c i e t a l . , J . A m . C h e m . S o c . 1 0 3 : 3 1 8 5 (1 9 8 1 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる) のホスホトリエステル法によって合成することができ、改変は、天然ペプチド配列をコードするものを適切な塩基で置き換えることによって簡単に行うことができる。次いで、コード配列に適切なリンカーを提供し、当技術分野で一般に利用可能な発現ベクターに連結し、ベクターを使用して、適切な宿主を形質転換して、所望のペプチドまたは融合タンパク質を産生することができる。多くのそのようなベクターと適切な宿主システムが現在利用可能である。ペプチドまたは融合タンパク質の発現のために、コード配列は、作動可能に連結された開始および停止コドン、プロモーターおよびターミネーター領域、ならびに通常、所望の細胞宿主における発現のための発現ベクターを提供するための複製システムを備えている。

【0097】

発現コンストラクトは、適切な宿主細胞におけるペプチドの発現を可能にする、1つ以上の調節領域と作動可能に連結されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を指す。「作動可能に連結された」は、調節領域と発現されるペプチド配列が、転写、そして最終的には翻訳を可能にするような方法で結合および配置される結合を指す。

【0098】

ペプチドの転写に必要な調節領域は、発現ベクターによって提供することができる。同族の開始コドンを欠くペプチド遺伝子配列を発現させる場合は、翻訳開始コドン (A T G) も提供され得る。互換性のある宿主-コンストラクトシステムでは、RNAポリメラーゼ等の細胞転写因子が発現コンストラクトの調節領域に結合して、宿主生物のペプチド配列の転写をもたらす。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、宿主細胞ごとに異なる可能性がある。一般に、RNAポリメラーゼに結合し、作動可能に結合する核酸配列の転写を促進することができるプロモーターが必要である。そのような調節領域は、T A T Aボックス、キャッピング配列、C A A T配列等の、転写および翻訳の開始に関与するそれらの5'非コード配列を含み得る。コード配列の3'側の非コード領域は、ターミネーターおよびポリアダニル化部位等の転写終結調節配列を含み得る。

【0099】

プロモーター等の調節機能を有するDNA配列をペプチド遺伝子配列に結合するため、またはペプチド遺伝子配列をベクターのクローニング部位に挿入するために、当技術分野で周知の技術によって適切な適合性制限部位を提供するリンカーまたはアダプターをcDNAの末端に連結することができる (参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWu e t a l . , 1 9 8 7 , M e t h o d s i n E n z y m o l 1 5 2 : 3 4 3 - 3 4 9)。制限酵素による切断の後に、ライゲーションの前に消化するか、一本鎖DNA末端を埋めることにより、平滑末端を作成するように修飾することができる。代替的に、所望の制限酵素部位を含むプライマーと共にPCRを使用することによるDNAの増幅によって、所望の制限酵素部位をDNAのフラグメントに導入することができる。

【0100】

調節領域と作動可能に連結されたポリペプチドコード配列を含む発現コンストラクトは、さらなるクローニングなしに、ペプチドの発現および産生のために適切な宿主細胞に直

10

20

30

40

50

接導入することができる。発現コンストラクトはまた、例えば、相同組換えを介して、宿主細胞のゲノムへのDNA配列の組み込みを促進するDNA配列を含むことができる。この場合、宿主細胞においてペプチドを増殖および発現させるために、適切な宿主細胞に適した複製起点を含む発現ベクターを使用する必要はない。

【0101】

プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、または改変ウイルスを含む様々な発現ベクターを使用することができる。典型的には、そのような発現ベクターは、適切な宿主細胞におけるベクターの増殖のための機能的な複製起点、ペプチド遺伝子配列の挿入のための1つ以上の制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つ以上の選択マーカーを含む。発現ベクターは、本明細書に開示される1つ以上のポリペプチドのヌクレオチド配列を運ぶように構築され得る。発現ベクターは、細菌、酵母、昆虫、哺乳動物、およびヒトを含むがこれらに限定されない原核生物または真核生物に由来し得る適合性のある宿主細胞と共に使用されなければならない。そのような宿主細胞は、本明細書に開示されるポリペプチドのいずれかをコードする複数のヌクレオチド配列を含む単一の発現ベクターによる宿主細胞の形質転換によって、または本明細書に開示される異なるポリペプチドをコードする複数の発現ベクターによる宿主細胞の形質転換によって等で、本明細書に開示される1つ以上のポリペプチドを発現するように形質転換され得る。

【0102】

細菌系では、ポリペプチドを産生するために、いくつかの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、医薬組成物の生成のために、そのようなタンパク質を大量に産生する場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を誘導するベクターが望ましい場合がある。そのようなベクターには、ペプチドコード配列が、融合タンパク質が生成されるようにlacZコード領域とインフレームでベクターに個別に連結され得るE. coli発現ベクターpUR278（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるRutherford et al., 1983, EMBO J. 2, 1791）、pINベクター（そのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれるInouye and Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13, 3101-3109; Van Heeke and Schuster, 1989, J. Biol. Chem 264, 5503-5509）等が含まれる。pGEXベクターを使用して、これらのペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させることもできる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオンアガロースビーズへの吸着に続く遊離グルタチオンの存在下での溶離により溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターはトロニンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されているため、ポリペプチドはGST部分から放出され得る。

【0103】

代替的に、適切に処理されたペプチド複合体の長期の高収率産生のために、哺乳動物細胞における安定した発現が好ましい。ペプチド複合体を安定して発現する細胞株は、選択可能なマーカーを含むベクターを使用して改変することができる。例として、発現コンストラクトの導入後、改変細胞を濃縮培地で1～2日間増殖させ、次いで選択培地に切り替えることができる。発現コンストラクトの選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞が発現コンストラクトをそれらの染色体に安定して組み込み、培養で増殖し、細胞株に増殖することを最適に可能にする。このような細胞は、ペプチドが継続的に発現している間、長期間培養することができる。

【0104】

組換え細胞は、温度、インキュベーション時間、光学密度、および培地組成の標準的な条件下で培養することができる。しかしながら、組換え細胞の増殖の条件は、ポリペプチドの発現の条件とは異なる場合がある。改変された培養条件および培地もまた、ペプチドの産生を増強するために使用され得る。例えば、それらの同族のプロモーターを有するペプチドを含む組換え細胞は、熱または他の環境ストレス、または化学的ストレスにさらさ

れ得る。当技術分野で知られている任意の技法を適用して、ペプチド複合体を生成するための最適な条件を確立することができる。

【0105】

本発明の一実施形態では、メチオニンをコードするコドンが、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の5'末端に付加されて、ペプチドの翻訳の開始のためのシグナルを提供する。このメチオニンは、ポリペプチドに結合したままであり得るか、あるいはメチオニンは、ペプチドからのメチオニンの切断を触媒することができる酵素または複数の酵素の添加によって除去され得る。例えば、原核生物と真核生物の両方において、N末端メチオニンはメチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)によって除去される(参照によりその全体が本明細書に組み込まれるTsunasawa et al., 1985, J. Biol. Chem. 260, 5382-5391)。メチオニンアミノペプチダーゼは、E. coli、酵母、およびラット等のいくつかの生物から分離およびクローン化されている。

10

【0106】

ペプチドは、既知の方法によって、細菌、哺乳動物、または他の宿主細胞タイプから、または培養培地から回収することができる(例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるCurrent Protocols in Immunology, vol. 2, chapter 8, Coligan et al. (ed.), John Wiley & Sons, Inc.; Pathogenic and Clinical Microbiology: A Laboratory Manual by Rowland et al., Little Brown & Co., June 1994を参照されたい)。

20

【0107】

前述の方法の両方は、本明細書に開示されるポリペプチドを合成するために使用することができる。例えば、HSP結合ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドは、化学的に合成され得、そして任意選択で組換えDNA技術によって産生された抗原性ペプチドに、ペプチド結合を介して結合され得る。

【0108】

本発明の範囲内に含まれるのは、翻訳中または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化(例えば、C末端カルボキシル基の)、または既知の保護/ブロッキング基による誘導体化、またはタンパク質分解切断によって修飾される、本明細書に開示されるポリペプチドの誘導体または類似体である。多数の化学修飾のいずれも、遊離NH₂、遊離COOH-基、OH-基、Trp-、Tyr-、Phe-、His-、Arg-、またはLys-の側鎖基の保護または修飾のために有用な試薬、臭化シアン、ヒドロキシルアミン、BNP S-スカトール、酸、またはアルカリ加水分解による特定の化学的切断、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼによる酵素的切断、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元; ツニカマイシンの存在下での代謝合成等を含むがこれらに限定されない公知の技法によって実施することができる。

30

【0109】

5. 4 医薬組成物

40

別の態様では、本開示は、本明細書に開示されるような1つ以上のポリペプチドを含む組成物(例えば、医薬組成物)を提供する。特定の実施形態では、本開示は、1つ以上(例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、10以上、または20以上)の異なる本明細書に開示されるポリペプチドを含む組成物(例えば、医薬組成物)を提供する。特定の実施形態では、本開示は、本明細書に開示されるような30以下の異なるポリペプチドを含む組成物(例えば、医薬組成物)を提供する。特定の実施形態では、本開示は、1~30(例えば、2~20、3~20、4~20、5~20、5~15、または5~10)の異なる本明細書に開示されるポリペプチドを含む組成物(例えば、医薬組成物)を提供する。特定の実施形態では、異なるポリペプチドはそれぞれ、同じHSP結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む。

50

【0110】

特定の実施形態では、組成物は、精製されたストレスタンパク質をさらに含む。このような組成物は、ワクチン製剤として有用である。ワクチンを作製するための方法であって、精製されたストレスタンパク質がHSP結合抗原コンジュゲートまたはペプチドの少なくとも1つに結合するように、本明細書に開示される1つ以上の組成物を精製されたストレスタンパク質と混合することを含む、方法も提供される。

【0111】

5. 4. 1 ストレスタンパク質と複合体を形成したポリペプチド

特定の態様では、本開示は、本明細書に開示されるような1つ以上のポリペプチドと精製されたストレスタンパク質とを含む組成物（例えば、医薬組成物）を提供する。特定の
10 実施形態では、精製されたストレスタンパク質の少なくとも一部は、組成物中のポリペプチドに結合する。そのような組成物は、がんまたは病原性微生物の感染症の治療のためのワクチン製剤として有用である。

【0112】

特定の実施形態では、精製されたストレスタンパク質との複合体形成の前に、ポリペプチドは、100% DMSO中で粉末から再構成されることができる。次いで、等モル量のペプチドを、滅菌水で希釈した75% DMSOの溶液中にプールすることができる。

【0113】

特定の実施形態では、精製されたストレスタンパク質との複合体形成の前に、ポリペプチドを中性水中で再構成することができる。
20

【0114】

特定の実施形態では、精製されたストレスタンパク質との複合体形成の前に、ポリペプチドは、HClを含む酸性水中で再構成することができる。

【0115】

特定の実施形態では、精製されたストレスタンパク質との複合体形成の前に、ポリペプチドは、NaOHを含む塩基性水中で再構成することができる。

【0116】

特定の実施形態では、精製されたストレスタンパク質との複合体形成の前に、水における各ポリペプチドの溶解度を試験することができる。ポリペプチドが中性水に可溶である場合、中性水をポリペプチドの溶媒として使用することができる。ポリペプチドが中性水
30 に溶解しない場合、HCl、または別の酸、例えば、酢酸、リン酸、または硫酸を含む酸性水への溶解度を試験することができる。ポリペプチドがHCl（または別の酸）を含む酸性水に可溶である場合、HCl（または別の酸）を含む酸性水をポリペプチドの溶媒として使用することができる。ポリペプチドがHCl（または別の酸）を含む酸性水に溶解しない場合は、NaOHを含む塩基性水への溶解度を試験することができる。ポリペプチドがNaOHを含む塩基性水に可溶である場合、NaOHを含む塩基性水をポリペプチドの溶媒として使用することができる。ポリペプチドがNaOHを含む塩基性水に溶解しない場合、ポリペプチドはDMSOに溶解する可能性がある。ポリペプチドがDMSOに溶解しない場合、ポリペプチドはワクチンから除外される場合がある。次いで、溶解したポリペ
40 プチドを混合して、ポリペプチドのプールを作製することができる。溶解したポリペプチドは等量で混合することができる。溶解したポリペプチドは、等モル量で混合することができる。

【0117】

本発明の実施において有用な、本明細書において互換可能に熱ショックタンパク質（HSP）とも呼ばれるストレスタンパク質は、他のタンパク質またはペプチドに結合することができ、アデノシン三リン酸（ATP）の存在下または酸性条件下で、結合したタンパク質またはペプチドを放出することができる任意の細胞タンパク質の中から選択することができる。このようなタンパク質の細胞内濃度は、細胞がストレスの多い刺激にさらされると増加する可能性がある。ストレスによって誘発される熱ショックタンパク質に加えて、HSP60、HSP70、HSP90、HSP100、sHSP、およびPDIファミ
50

リーには、例えば35%を超えるアミノ酸の同一性を有する配列類似性でストレス誘発性HSPに関連するタンパク質も含まれるが、その発現レベルはストレスによって変化しない。したがって、ストレスタンパク質または熱ショックタンパク質は、ストレスの多い刺激に応答して細胞内での発現レベルが増強される、これらのファミリーのメンバーとの少なくとも35%（例えば、少なくとも40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または99%）のアミノ酸同一性を有する他のタンパク質、それらの変異体、類似体、およびバリエーションを包含する。したがって、特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ストレスタンパク質のhsp60、hsp70、またはhsp90ファミリーのメンバー（例えば、Hsc70、ヒトHsc70）、またはそれらの変異体、類似体、またはバリエーションである。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、カルレチキュリン、それらの変異体、およびそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択される。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70（例えば、ヒトHsc70）である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsp70（例えば、ヒトHsp70）である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質（例えば、ヒトhsc70）は、組換えタンパク質である。

10

【0118】

天然に存在するHSPのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、GenBank等の配列データベースで一般的に入手可能である。例えば、Homo sapiens熱ショックタンパク質HSP70（熱ショック70kDaタンパク質1A）には、次の識別子HGNC:5232;Entrez Gene:3303;Ensembl:ENSG00000204389;OMIM:140550;UniProtKB:P08107およびNCBI参照配列:NM_005345.5を有する。Entrez等のコンピュータプログラムを使用して、データベースを参照し、アクセッション番号で目的のアミノ酸配列および遺伝子配列データを取得できる。これらのデータベースを検索して、アラインメントスコアと統計によって類似配列をランク付けするFASTAやBLAST等のプログラムを使用して、クエリ配列と様々な程度の類似性を持つ配列を特定することもできる。本発明のHSPペプチド結合フラグメントの調製に使用することができるHSPの非限定的な例のヌクレオチド配列は以下の通りである：ヒトHsp70、Genbankアクセッション番号NM_005345、Sargent et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86:1968-1972;ヒトHsc70:Genbankアクセッション番号P11142、Y00371;ヒトHsp90、Genbankアクセッション番号X15183、Yamazaki et al., Nucl. Acids Res. 17:7108;ヒトgp96:Genbankアクセッション番号X15187、Maki et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:5658-5662;ヒトBiP:Genbankアクセッション番号M19645;Ting et al., 1988, DNA 7:275-286;ヒトHsp27、Genbankアクセッション番号M24743;Hickey et al., 1986, Nucleic Acids Res. 14:4127-45;マウスHsp70:Genbankアクセッション番号M35021、Hunt et al., 1990, Gene, 87:199-204;マウスgp96:Genbankアクセッション番号M16370、Srivastava et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:3807-3811;およびマウスBiP:Genbank Accession No. U16277、Haas et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:2250-2254（これらの参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。

20

30

40

【0119】

上述の主要なストレスタンパク質ファミリーに加えて、小胞体に存在するタンパク質であるカルレチキュリンも、抗原性分子と複合体形成したときに免疫応答を誘発するのに

50

有用なさらに別の熱ショックタンパク質として同定されている（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるBasu and Srivastava, 1999, J. Exp. Med. 189:797-202）。本発明で利用できる他のストレスタンパク質には、grp78（またはBiP）、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）、hsp110、およびgrp170が含まれる（そのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Lin et al., 1993, Mol. Biol. Cell, 4:1109-1119; Wang et al., 2001, J. Immunol., 165:490-497）。これらのファミリーの多くのメンバーは、その後、栄養素の欠乏、代謝破壊、酸素ラジカル、低酸素症、および細胞内病原体の感染等、他のストレスの多い刺激に応答して誘発されることが判明した（そのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Welch, May 1993, Scientific American 56-64; Young, 1990, Annu. Rev. Immunol. 8:401-420; Craig, 1993, Science 260:1902-1903; Gething, et al., 1992, Nature 355:33-45; およびLindquist, et al., 1988, Annu. Rev. Genetics 22:631-677を参照されたい）。これらのファミリーの全てに属するHSP/ストレスタンパク質を本発明の実施に使用できることが企図されている。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ペプチド-MHC提示を促進する任意のシャペロンタンパク質を包含する。適切なシャペロンタンパク質には、ERシャペロンおよびタパシン（例えば、ヒトタパシン）が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0120】

主要なストレスタンパク質は、ストレスを受けた細胞では非常に高いレベルで蓄積する可能性があるが、ストレスを受けていない細胞では低レベルから中程度のレベルで発生する。例えば、高誘導性の哺乳動物hsp70は、常温ではほとんど検出できないが、熱ショック時に細胞内で最も活発に合成されるタンパク質の1つとなる（その全体が参照により本明細書に組み込まれるWelch, et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:1198-1211）。対照的に、hsp90およびhsp60タンパク質は、全てではないがほとんどの哺乳動物細胞に常温で豊富に存在し、熱によってさらに誘導される（そのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Lai, et al., 1984, Mol. Cell. Biol. 4:2802-10; van Bergen Henegouwen, et al., 1987, Genes Dev. 1:525-31）。

30

【0121】

様々な実施形態では、ファミリー内の熱ショックタンパク質または熱ショックタンパク質の変異体をコードするヌクレオチド配列は、低から中程度のストリンジェンシーの条件下で、HSPをコードするヌクレオチド配列を含むプローブとのハイブリダイゼーションによって同定および取得することができる。例として、このような低ストリンジェンシーの条件を使用する手順は次の通りである（Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792も参照されたい）。DNAを含むフィルターは、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA、および500 μg/mlの変性サケ精子DNAを含む溶液中で、40℃で6時間予め処理される。ハイブリダイゼーションは、次の変更を加えた同じ溶液で実行される：0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 μg/mlサケ精子DNA、10% (wt/vol) デキストラン硫酸。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で40℃で18~20時間インキュベートし、次いで2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA、および0.1% SDSを含む溶液中で55℃で1.5時間洗浄する。洗浄液を新しい溶液と交換し、60℃でさらに1.5時間インキュベートする。フィルターはプロット乾燥し、シグナル検出のために露光する。必要に応じて、シグナルを検出する前に、フィルターを65~68℃

40

50

で3回洗浄する。使用され得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当技術分野で周知である（例えば、種間ハイブリダイゼーションに使用されるような）。

【0122】

ストレスタンパク質が使用される場合、ストレスタンパク質のペプチド結合フラグメントおよび機能的に活性な誘導体、類似体、およびそれらのバリエーションも使用することができる。したがって、特定の実施形態では、ストレスタンパク質は全長HSPである。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、HSP（例えば、Hsp60、Hsp70、またはHsp90ファミリーのメンバー、例えば、Hsc70、特にヒトHsc70）のドメインを含むポリペプチドであり、ドメインは、ペプチド（例えば、本明細書に記載のHSP結合ペプチド）と非共有結合的に会合して複合体を形成し、任意選択で免疫応答を誘発することができ、ストレスタンパク質は全長HSPではない。

10

【0123】

特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ペプチド（例えば、本明細書に記載のHSP結合ペプチド）と非共有結合的に会合して複合体を形成し、任意選択で免疫応答を誘発することができるポリペプチドであり、ストレスタンパク質は、野生型HSP（例えば、Hsp60、Hsp70、またはHsp90ファミリーのメンバー、例えばHsc70、特にヒトHsc70）との高い程度の配列類似性を共有する。2つのアミノ酸配列または核酸配列間の同一領域を決定するために、配列は、最適な比較目的のために整列される（例えば、ギャップは、第2のアミノ酸または核酸配列との最適な整列のために、第1のアミノ酸または核酸配列の配列に導入され得る）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列の位置が、第2の配列の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 同一の重複する位置の数 / 位置の総数 × 100%）。一実施形態では、2つの配列は同じ長さである。

20

【0124】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用しても実行できる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, のアルゴリズムであり、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877にあるように改変されている（これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。このようなアルゴリズムは、Altschul, et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれる。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、例えば、スコア=100、ワード長=12で実行することができる。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、例えば、スコア=50、ワード長=3で実行することができる。比較の目的でギャップ付きの整列を得るには、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載のギャップ付きBLASTを利用できる。代替的に、PSI-BLASTを使用して、分子間の遠い関係を検出する反復検索を実行できる（Altschul et al., 1997、前出）。BLAST、ギャップ付きBLAST、およびPSI-BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトのパラメーターを使用できる。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を

30

40

50

比較するためにALIGNプログラムを利用するとき、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティ、および4のギャップペナルティを使用できる。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許可するかどうかにかかわらず、上記と同様の手法を使用して決定できる。同一性パーセントの計算では、通常、完全一致のみが計数される。

【0125】

特定の実施形態では、ストレスタンパク質（例えば、Hsp70およびHsc70）の単離されたペプチド結合ドメインが使用される。これらのペプチド結合ドメインは、ストレスタンパク質（例えば、Hsp70およびHsc70）のペプチド結合部位の三次元構造のコンピューターモデリングによって同定することができる。例えば、米国特許公開第US2001/0034042号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているHSPのペプチド結合フラグメントを参照されたい。

10

【0126】

特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、天然のストレスタンパク質よりも大きい標的ポリペプチドに対する親和性を有する変異ストレスタンパク質である。このような変異ストレスタンパク質は、標的ポリペプチドがリン酸化されているか、リン酸化ペプチド模倣物（非加水分解性類似体等）であるか、または他の翻訳後修飾を有する場合に有用であり得る。

【0127】

ストレスタンパク質は、組織からの精製、または組換えDNA技術によって調製できる。HSPは、ATPの存在下または酸性条件下（pH1～pH6.9）で組織から精製し、その後1つ以上のポリペプチドと*in vitro*で複合体を形成することができる。Peng, et al., 1997, J. Immunol. Methods, 204:13-21; Li and Srivastava, 1993, EMBO J. 12:3143-3151を参照されたい（これらの参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。「精製された」ストレスタンパク質は、細胞内、細胞抽出物中、細胞培養培地中、または個体内のタンパク質に関連する物質を実質的に含まない。特定の実施形態では、組織から精製されるストレスタンパク質は、異なるHSP、例えば、hsp70およびhsc70の混合物である。

20

【0128】

所与のHSPまたはそのペプチド結合ドメインの定義されたアミノ酸またはcDNA配列を使用して、宿主細胞にトランスフェクトされて発現する遺伝子コンストラクトを作製することができる。組換え宿主細胞は、HSPまたはペプチド結合フラグメントをコードする配列を含む核酸配列の1つ以上のコピーを含み得、宿主細胞におけるHSP核酸配列の発現を駆動する調節領域と作動可能に連結される。組換えDNA技術は、組換えHSP遺伝子またはHSP遺伝子のフラグメントを生成するために容易に利用することができ、標準的な技術を使用して、そのようなHSP遺伝子フラグメントを発現させることができる。cDNAおよびゲノムDNAを含む、HSPペプチド結合ドメインをコードする任意の核酸配列を使用して、本発明のHSPまたはペプチド結合フラグメントを調製することができる。核酸配列は、野生型または同じアミノ酸配列をコードするコドン最適化バリエーションであり得る。ペプチド結合ドメインを含むHSP遺伝子フラグメントを適切なクローニングベクターに挿入し、宿主細胞に導入して、遺伝子配列の多くのコピーを生成することができる。ラムダ誘導体等のバクテリオファージ、またはpBR322、pUCプラスミド誘導体、Bluescriptベクター（Stratagene）、もしくは以下のpETシリーズのベクター（Novagen）等のプラスミド等、当技術分野で知られている多数のベクター-宿主系を使用することができる。当技術分野で知られている変異導入のための任意の技術を使用して、発現ペプチド配列にアミノ酸置換を行う目的で、またはさらなる操作を容易にするために制限部位を作成／削除するために、DNA配列の個々のヌクレオチドを改変することができる。

30

40

【0129】

ストレスタンパク質は、それらが発現される細胞からの回収および精製を容易にするた

50

めに融合タンパク質として発現され得る。例えば、ストレスタンパク質は、培養培地への分泌のために小胞体膜を横切るその移動を指示するためのシグナル配列リーダーペプチドを含み得る。さらに、ストレスタンパク質は、標的ポリペプチド、例えば、カルボキシル末端への結合に関与しないタンパク質の任意の部分に融合された親和性ラベルを含み得る。アフィニティーラベルは、アフィニティーパートナー分子に結合することにより、タンパク質の精製を容易にするために使用できる。当技術分野で知られている様々なアフィニティーラベルを使用することができ、その非限定的な例には、免疫グロブリン定常領域、ポリヒスチジン配列が含まれる（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる P e t t y, 1996, Metal-chelate affinity chromatography, in Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience）、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST；参照によりその全体が本明細書に組み込まれる S m i t h, 1993, Methods Mol. Cell Bio. 4:220-229）、E. coli マルトース結合タンパク質（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる G u a n et al., 1987, Gene 67:21-30）、および様々なセルロース結合ドメイン（そのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 5, 496, 934 号；同第 5, 202, 247 号；同第 5, 137, 819 号；T o m m e et al., 1994, Protein Eng. 7:117-123）が含まれる。

10

20

【0130】

そのような組換えストレスタンパク質は、免疫応答を誘発するそれらの能力に関して、ペプチド結合活性についてアッセイすることができる（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる K l a p p a et al., 1998, EMBO J., 17:927-935 を参照されたい）。特定の実施形態では、宿主細胞において産生される組換えストレスタンパク質は、免疫原性組成物の意図されたレシピエント（例えば、ヒト）と同じ種のものである。

【0131】

ストレスタンパク質は、非共有結合または共有結合でポリペプチドに結合し得る。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ポリペプチドに非共有結合している。そのような複合体を調製する方法は、以下に記載されている。

30

【0132】

総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 0.01:1、0.02:1、0.05:1、0.1:1、0.2:1、0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、49:1、100:1 までを含むがこれらに限定されない、約 0.01:1～約 100:1 までの任意の比であり得る。特定の実施形態では、組成物は、それぞれが本明細書に開示されるポリペプチドおよびストレスタンパク質を含む複数の複合体を含み、各複合体におけるポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、少なくとも約 1:1（例えば、約 1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、49:1、100:1 まで）である。

40

【0133】

特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 0.5:1～5:1 である。特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 1:1～2:1 である。特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 1:1、1.25:1、または 1.5:1 である。そのような比率、特に 1:1 に近い比率は、組成物がストレスタンパク質に結合されていない大過剰の遊

50

離ペプチドを含まないという点で有利である。MHC結合エピトープを含む多くの抗原性ペプチドは疎水性領域を含む傾向があるため、過剰量の遊離ペプチドは、組成物の調製および保存中に凝集する傾向がある可能性がある。総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比が1:1に近い（例えば、1:1、1.25:1、1.5:1、または2:1）ストレスタンパク質との実質的な複合体形成は、ストレスタンパク質に対するポリペプチドの高い結合親和性によって可能となる。したがって、特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、または 10^{-9} Mより低い K_d で、HSP（例えば、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、GP96、またはカルレチキュリン）に結合する。特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、またはそれ以下の K_d で、Hsc70（例えば、ヒトHsc70）に結合する。

【0134】

特定の実施形態では、ストレスタンパク質の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%が組成物中でポリペプチドに結合する。特定の実施形態では、実質的に全てのストレスタンパク質は、組成物中のポリペプチドに結合する。

【0135】

任意の数の異なるポリペプチドを本明細書に開示される単一の組成物に含めることができる。特定の実施形態では、組成物は、100以下の異なるポリペプチド、例えば、2~50、2~30、2~20、5~20、5~15、5~10、または10~15の異なるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、ポリペプチドのそれぞれは、同じHSP結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む。特定の実施形態では、組成物は、単一のストレスタンパク質を含み、ストレスタンパク質は、HSP結合ペプチドに結合することができる。本発明の医薬組成物は、増量剤、安定剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、カルシウム塩、界面活性剤、抗酸化剤、キレート剤、他の賦形剤、およびそれらの組み合わせを含む、1つ以上の薬学的に許容される担体または賦形剤を含むように製剤化することができる。

【0136】

ワクチン組成物の凍結乾燥製剤の調製には、増量剤が好ましい。このような増量剤は、凍結乾燥生成物の結晶部分を形成し、マンニトール、グリシン、アラニン、およびヒドロキシエチルスターチ（HES）からなる群から選択することができる。

【0137】

安定剤は、ショ糖、トレハロース、ラフィノース、およびアルギニンからなる群から選択することができる。これらの薬剤は、好ましくは1~4%の量で存在する。塩化ナトリウムは、好ましくは100~300 mMの量で本製剤に含まれ得るか、または前述の増量剤なしで使用される場合、300~500 mMのNaClの量で製剤に含まれ得る。カルシウム塩には、塩化カルシウム、グルコン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、またはグルセプト酸カルシウムが含まれる。

【0138】

緩衝剤は、ヒスチジン、リン酸カリウム、TRIS [tris- (ヒドロキシメチル) -アミノメタン]、BIS-Trisプロパン (1)、3-ビス- [トリス- (ヒドロキシメチル) メチルアミノ] -プロパン)、PIPES [ピペラジーン-N, N'-ビス- (2-エタンスルホン酸)]、MOPS [3- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸]、HEPES (N-2-ヒドロキシエチル-ピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸)、MES [2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸]、およびACES (N-2-アセトアミド-2-アミノエタンスルホン酸) を含むがこれらに限定されない、緩衝剤として作用する能力を有する任意の生理学的に許容される化学物質または化学物質の組み合わせであり得る。通常、緩衝剤は10~50 mMの濃度で含まれている。塩基緩衝液の具体例には、(i) PBS、(ii) 10 mMの KPO_4 、150 mMのNaCl、(iii) 10 mMのHEPES、150 mMのNaCl、(iv) 10 mMのイミダゾール、150 m

MのNaCl、(v) 20 mMのクエン酸ナトリウムが含まれる。使用できる賦形剤には、(i) グリセロール (10%、20%)、(ii) Tween 50 (0.05%、0.005%)、(iii) 9%スクロース、(iv) 20%ソルビトール、(v) 10 mM リジン、または(vi) 0.01 mMデキストラン硫酸が含まれる。

【0139】

界面活性剤は、存在する場合、好ましくは0.1%以下の濃度であり、ポリソルベート20、ポリソルベート80、プルロニック（登録商標）ポリオール、およびBR I J 35（ポリオキシエチレン23ローレルエーテル）を含むがこれらに限定されない群から選択され得る。酸化防止剤は、使用する場合、医薬製剤との使用に適合性がなければならず、好ましくは水溶性である。適切な抗酸化剤には、ホモシステイン、グルタチオン、リポ酸、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (Trolox)、メチオニン、チオ硫酸ナトリウム、白金、グリシン-グリシン-ヒスチジン（トリペプチド）、およびブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) が含まれる。キレート剤は、カルシウム塩が組成物に使用されている場合、カルシウムよりも高い親和性で銅や鉄等の金属に結合することが好ましい。例示的なキレート剤はデフェロキサミンである。

【0140】

当技術分野で知られている多くの製剤を使用することができる。例えば、米国特許第5, 763, 401号は、15~60 mMのスクロース、最大50 mMのNaCl、最大5 mMの塩化カルシウム、65~400 mMのグリシン、および最大50 mMのヒスチジンを含む治療製剤を記載している。いくつかの実施形態では、治療用製剤は、リン酸カリウム緩衝液中の9%スクロースの溶液である。

【0141】

米国特許第5, 733, 873号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、0.01~1 mg/mlの界面活性剤を含む製剤を開示している。この特許は、以下の範囲の賦形剤を有する製剤を開示している：少なくとも0.01 mg/ml、好ましくは0.02~1.0 mg/mlの量のポリソルベート20または80。少なくとも0.1 MのNaCl；少なくとも0.5 mMのカルシウム塩；および少なくとも1 mMのヒスチジン。より具体的には、以下の具体的な製剤も開示される：(1) 14.7~50~65 mMヒスチジン、0.31~0.6 MのNaCl、4 mM塩化カルシウム、0.001~0.02~0.025%ポリソルベート80、0.1%PEG 4000または19.9 mMスクロースを含むかまたは含まない、(2) 20 mg/ml マンニトール、2.67 mg/ml ヒスチジン、18 mg/ml のNaCl、3.7 mM塩化カルシウム、および0.23 mg/ml ポリソルベート80。

【0142】

低濃度または高濃度の塩化ナトリウムの使用が記載されており、例えば、米国特許第4, 877, 608号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）は、0.5 mM~1.5 mMのNaCl、5 mM塩化カルシウム、0.2 mM~5 mMヒスチジン、0.01~10 mM塩酸リジン、および最大10%マルトース、10%スクロース、または5%マンニトールを含む製剤等、比較的低濃度の塩化ナトリウムを含む製剤を教示している。

【0143】

米国特許第5, 605, 884号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、比較的高濃度の塩化ナトリウムを含む製剤の使用を教示している。これらの製剤には、0.35 M~1.2 MのNaCl、1.5~40 mMの塩化カルシウム、1 mM~50 mMのヒスチジン、およびマンニトール、スクロース、マルトース等の最大10%の糖が含まれる。0.45 MのNaCl、2.3 mM塩化カルシウム、および1.4 mMヒスチジンを含む製剤が例示されている。

【0144】

国際特許出願WO 96/22107（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）は、糖トレハロースを含む製剤、例えば、(1) 0.1 MのNaCl、15 mM塩化カルシウム、15 mMヒスチジン、および1.27 M (48%) トレハロース、または(2)

0.011%塩化カルシウム、0.12%ヒスチジン、0.002%TRIS、0.002%Tween80、0.004%PEG3350、7.5%トレハロース、および0.13%または1.03%のNaClを含む製剤を記載している。

【0145】

米国特許第5,328,694号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)は、100~650mMの二糖および100mM~1.0Mのアミノ酸、例えば(1)0.9Mのスクロース、0.25Mのグリシン、0.25Mのリジン、および3mM塩化カルシウム、ならびに(2)0.7Mスクロース、0.5Mグリシン、および5mM塩化カルシウムを含む製剤を記載している。医薬組成物は、任意選択で凍結乾燥製品として調製することができ、その後、経口投与用に製剤化するか、または非経口投与用に液体形態に再構成することができる。

10

【0146】

特定の実施形態では、組成物は、組成物が投与される対象において1つ以上のMHC結合エピトープを含むポリペプチドを発現または提示する細胞に対するT細胞応答を刺激する。ポリペプチドを発現する細胞は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞であり得る。ポリヌクレオチドは、細胞のゲノム、エピソームベクター、または細胞に感染したウイルスのゲノムにある。ポリペプチドを提示する細胞は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含まなくてもよく、細胞をポリペプチドまたはその誘導体と接触させることによって生成され得る。

20

【0147】

特定の実施形態では、組成物は、対象から単離された末梢血単核球(PBMC)においてT細胞の*in vitro*活性化を誘導する。T細胞の*in vitro*活性化には、T細胞の*in vitro*増殖、T細胞からのサイトカイン(例えば、IFN γ)の産生、およびT細胞上の活性化マーカー(例えば、CD25、CD45RO)の表面発現の増加が含まれるが、これらに限定されない。

【0148】

5.4.2 ポリペプチドとストレスタンパク質の複合体の調製

別の態様では、本開示は、ワクチンを作製する方法であって、本明細書に開示される1つ以上のポリペプチドを、精製されたストレスタンパク質と、精製されたストレスタンパク質がポリペプチドのうちの少なくとも1つに結合するような適切な条件下で、*in vitro*で混合することを含む方法を提供する。この方法は、本明細書では複合体形成反応とも呼ばれる。特定の実施形態では、2つ以上の精製されたストレスタンパク質が使用され、各精製されたストレスタンパク質は、ポリペプチドの少なくとも1つに結合する。

30

【0149】

ストレスタンパク質は、非共有結合または共有結合でポリペプチドに結合し得る。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、ポリペプチドに非共有結合している。様々な実施形態では、*in vitro*で形成された複合体は、任意選択で精製される。ストレスタンパク質とポリペプチドの精製された複合体は、細胞内または細胞抽出物中のそのような複合体に関連する物質を実質的に含まない。精製ストレスタンパク質と精製ポリペプチドが*in vitro*複合体形成反応で使用される場合、「精製された複合体」という用語は、遊離ストレスタンパク質および複合体中にはないコンジュゲートまたはペプチドも含む組成物を除外しない。

40

【0150】

前出の任意のストレスタンパク質を本発明の方法で 사용할 ことができる。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、Gp96、カルレチキュリン、それらの変異体、およびそれらの2つ以上の組み合わせからなる群から選択される。一実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70、例えば、ヒトHsc70である。別の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsp70、例えば、ヒトHsp70である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質(例えば、ヒトHsc70またはヒトHsp70)は、組換えタンパク質である。

50

【0151】

複合体を形成する前に、HSPをATPで前処理するか、酸性条件にさらして、目的のHSPと非共有結合的に会合している可能性のあるペプチドを除去することができる。酸性条件は、pH1～pH2、pH2～pH3、pH3～pH4、pH4～pH5、pH5～pH6、およびpH6～pH6.9の範囲を含むpH7未満の任意のpHレベルである。ATP処理が使用される場合、過剰のATPは、Levy, et al., 1991, Cell 67:265-274（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）によって記載されるように、アピラナーゼの添加によって調製物から除去される。酸性条件を使用する場合、pH調整試薬を添加して緩衝液を中性pHに再調整する。

【0152】

総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、0.01:1、0.02:1、0.05:1、0.1:1、0.2:1、0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、49:1、100:1までを含むがこれらに限定されない、0.01:1～100:1の任意の比であり得る。特定の実施形態では、調製される組成物は、それぞれが本明細書に開示されるポリペプチドとストレスタンパク質を含む複数の複合体を含み、複合体形成反応は、ポリペプチドをストレスタンパク質と混合することを含み、各複合体中のポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、少なくとも1:1（例えば、約2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、49:1、100:1まで）である。

【0153】

特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約0.5:1～5:1である。特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約1:1～2:1である。特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約1:1、1.25:1、または1.5:1である。そのような比率、特に1:1に近い比率は、組成物がストレスタンパク質に結合されていない大過剰の遊離ペプチドを含まないという点で有利である。MHC結合エピトープを含む多くの抗原性ペプチドは疎水性領域を含む傾向があるため、過剰量の遊離ペプチドは、組成物の調製および保存中に凝集する傾向がある可能性がある。総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比が1:1に近い（例えば、1:1、1.25:1、1.5:1、または2:1）ストレスタンパク質との実質的な複合体形成は、ストレスタンパク質に対するポリペプチドの高い結合親和性によって可能となる。したがって、特定の実施形態では、複合体形成反応で使用されるポリペプチドは、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、または 10^{-9} Mより低い K_d で、HSP（例えば、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、GP96、またはカルレチキュリン）に結合する。特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、またはそれ以下の K_d で、Hsc70（例えば、ヒトHsc70）に結合する。

【0154】

本明細書に開示される方法を使用して、組成物（例えば、医薬組成物またはワクチン）を大量（例えば、30mg、50mg、100mg、200mg、300mg、500mg、または1g以上の総ペプチドとタンパク質）に調製することができる。次いで、調製された組成物は、単回使用または多回使用の容器に移すか、または単位剤形に配分することができる。代替的に、本明細書に開示される方法を使用して、組成物（例えば、医薬組成物またはワクチン）を少量（例えば、300μg、1mg、3mg、10mg、30mg、または100mg以下の総ペプチドとタンパク質）で調製することができる。特定の実施形態では、組成物は、任意選択で単位剤形で、単回使用のために調製される。

【0155】

特定の実施形態では、医薬組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量は、約10 μ g～600 μ g（例えば、約50 μ g、100 μ g、200 μ g、300 μ g、400 μ g、または500 μ g）である。特定の実施形態では、医薬組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量は、約300 μ gである。単位剤形中のストレスタンパク質とポリペプチドの量は、以下に開示されている。

【0156】

ポリペプチドの集団のストレスタンパク質への *in vitro* での非共有結合的な複合体形成のための例示的なプロトコールが本明細書に提供される。ポリペプチドの集団は、本発明の異なるポリペプチド種の混合物を含むことができる。次いで、混合物を、精製および／または前処理されたストレスタンパク質と共に、適切な結合緩衝液中、例えば、任意選択で0.01%ポリソルベート20を添加したリン酸緩衝生理食塩水pH7.4；リン酸カリウム緩衝液中の9%スクロースを含む緩衝液；2.7mMリン酸二水素ナトリウム、1.5mMリン酸二水素カリウム、150mMのNaClを含む緩衝液、pH7.2；20mMリン酸ナトリウム、pH7.2～7.5、350～500mMのNaCl、3mMのMgCl₂、および1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）を含む緩衝液；および任意選択で1mMのADPを含む緩衝液中で、4℃～50℃（例えば、37℃）で15分～3時間（例えば、1時間）インキュベートする。ストレスタンパク質と互換性のある任意の緩衝液を使用できる。次に、Centricon 10アセンブリ（Millipore；Billerica, MA）で遠心分離して未結合のペプチドを全て除去することにより、調製物を任意選択で精製する。タンパク質／ペプチドとHSPの非共有結合的な会合は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析（MS）、混合リン球標的細胞アッセイ（MLTC）、または酵素結合免疫スポット（ELISPOT）アッセイ（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるTaguchi T, et al., J Immunol Methods 1990; 128: 65-73）によってアッセイできる。複合体が単離および希釈されると、それらは、本明細書に記載の投与プロトコールおよび賦形剤を使用して、任意選択で動物モデルにおいてさらに特性評価することができる（例えば、以下の実施例2を参照されたい）。

【0157】

別々の共有結合的および／または非共有結合的な複合体形成反応からのストレスタンパク質とポリペプチドの複合体は、対象に投与する前に組成物を形成するように調製することができる。特定の実施形態では、組成物は、対象への投与前の1、2、3、4、5、6、または7日以内に調製される。特定の実施形態では、組成物は、対象に投与する前の1、2、3、4、5、6、7、または8週間以内に調製される。特定の実施形態では、組成物は、対象に投与する前の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月以内に調製される。組成物は、調製後および使用前に、任意選択で約4℃、-20℃、または-80℃で保存することができる。

【0158】

特定の実施形態では、本明細書に開示される方法によって調製された複合体は、患者への投与の直前に、ベッドサイドでアジュバントと混合される。特定の実施形態では、アジュバントは、サポニンまたは免疫刺激性核酸を含む。特定の実施形態では、アジュバントは、QS-21を含む。特定の実施形態では、QS-21の用量は、10 μ g、25 μ g、または50 μ gである。特定の実施形態では、QS-21の用量は50 μ gである。特定の実施形態では、アジュバントは、TLRアゴニストを含む。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR4のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR7および／またはTLR8のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR9のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR5のアゴニストである。

【0159】

ストレスタンパク質とポリペプチドの非共有結合的な複合体を作製する代わりに、ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドは、例えば、化学的架橋またはUV架橋によって、ストレスタンパク質に共有結合することができる。当技術分野で知られている任意の化学的架橋またはUV架橋の方法（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Wong, 1991, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press, incorporated herein by reference in its entiretyを参照されたい）を使用することができる。例えば、グルタルアルデヒド架橋（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるBarrios et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:1365-1372を参照されたい）を使用することができる。例示的なプロトコールでは、1~2mgのHSP-ペプチド複合体が0.002%グルタルアルデヒドの存在下で2時間架橋される。グルタルアルデヒドは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対する一晩の透析によって除去される（その全体が参照により本明細書に組み込まれるLussow et al., 1991, Eur. J. Immunol. 21:2297-2302）。

【0160】

5.4.3 ワクチン

本明細書に開示される組成物は、ワクチンとして有用である。したがって、別の態様では、本開示はワクチン製剤を提供する。ワクチン製剤は、安定した、無菌の、好ましくは注射可能な製剤をもたらす任意の方法によって調製することができる。

【0161】

特定の実施形態では、ワクチンは、本明細書に開示される1つ以上の組成物と1つ以上のアジュバントとを含む。例えば、全身アジュバントおよび粘膜アジュバントを含む、様々なアジュバントを使用することができる。全身アジュバントは、非経口的に送達できるアジュバントである。全身アジュバントには、デポー効果を生み出すアジュバント、免疫系を刺激するアジュバント、および両方を行うアジュバントが含まれる。

【0162】

デポー効果を生み出すアジュバントは、抗原を体内でゆっくりと放出させ、免疫細胞の抗原への曝露を延長させるアジュバントである。このクラスのアジュバントには、ミョウバン（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム）、または、鉱油、非鉱油、油中水または水中油型の油型エマルジョン、水中油型エマルジョン、例えば、Montanide adjuvantsのSeppic ISAシリーズ（例えば、Montanide ISA 720, Air Liquide, Paris, France）、MF-59（Span 85およびTween 80で安定化された水中スクアレンエマルジョン；Chiron Corporation, Emeryville, Calif.）、およびPROVAX（安定化洗剤とミセル形成剤を含む水中油型エマルジョン；IDEC, Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Calif.）が含まれる。

【0163】

他のアジュバントは免疫系を刺激し、例えば、免疫細胞にサイトカインまたはIgGを産生および分泌させる。このクラスのアジュバントには、CpGオリゴヌクレオチド等の免疫刺激性核酸、QS-21等のQ. saponariaの木の樹皮から精製されたサポニン、ポリ[ジ（カルボキシラトフェノキシ）ホスファゼン（PCPPポリマー；Virus Research Institute, USA）；ポリリジンで安定化されたポリイノシン酸：ポリシチジル酸（ポリI：C）またはポリI：C等のRNA模倣物（ポリICLC [ヒルトノール（登録商標）；Oncovir, Inc.]、モノホスホリルリピドA等のリポ多糖（LPS）の誘導體（MPL；Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.）、ムラミルジペプチド（MDP；Ribi）、およびスレオニルムラミルジペプチド（t-MDP；Ribi）；OM-174（リピドAに関連するグルコサミン二糖；OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland）、およびリーシュマニア伸長因子（精製されたリーシ

ュマニアタンパク質；Corixa Corporation, Seattle, Wash.）が含まれる。

【0164】

他の全身アジュバントは、デポー効果を生み出し、免疫系を刺激するアジュバントである。これらの化合物は、全身性アジュバントの上述の両方の機能を有する。このクラスのアジュバントには、ISCOM（混合サポニン、脂質を含み、抗原を保持できる細孔を有するウイルスサイズの粒子を形成する免疫刺激複合体；CSL, Melbourne, Australia）、MPLおよびQS-21を含むリポソームベースの製剤であるAS01（GlaxoSmithKline, Belgium）、AS02（GlaxoSmithKline, Belgium）、MPLおよびQS-21を含む水中油型エマルジョンである、GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium）；AS04（GlaxoSmithKline, Belgium、ミョウバンとMPLを含む；GSK, Belgium）；CpGオリゴヌクレオチド、MPL、およびQS-21を含むリポソームベースの製剤であるAS15（GlaxoSmithKline, Belgium）、CRL 1005等のミセルを形成する非イオン性ブロックコポリマー（これらは、ポリオキシエチレンの鎖に隣接する疎水性ポリオキシプロピレンの直鎖を含む；Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.）、およびSyntexアジュバント製剤（SAF、Tween80および非イオン性ブロックコポリマーを含む水中油型エマルジョン；Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colo.）が含まれるが、これらに限定されない。

【0165】

本発明に従って有用な粘膜アジュバントは、本発明の複合体とコンジュゲートして粘膜表面に投与された場合に、対象において粘膜免疫応答を誘導することができるアジュバントである。粘膜アジュバントには、CpG核酸（例えば、PCT公開特許出願WO99/61056、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、細菌毒素：例えば、コレラ毒素（CT）、CT Bサブユニット（CTB）、CTD53（ValからAsp）、CTK97（ValからLys）、CTK104（TyrからLys）、CTD53/K63（ValからAsp、SerからLys）；CTH54（ArgからHis）；CTN107（HisからAsn）；CTE114（SerからGlu）；CTE112K（GluからLys）；CTS61F（SerからPhe）；CTS106（ProからLys）；CTK63（SerからLys）を含むがこれらに限定されないCT誘導体、Zonula occludens毒素（zot）、Escherichia coliの熱に不安定なエンテロトキシン、不安定な毒素（LT）、LT Bサブユニット（LTB）、LT7K（ArgからLys）、LT61F（SerからPhe）、LT112K（GluからLys）、LT118E（GlyからGlu）、LT146E（ArgからGlu）、LT192G（ArgからGly）、LTK63（SerからLys）、およびLTR72（AlaからArg）を含むがこれらに限定されないLT誘導体、百日咳毒素、PT、PT-9K/129Gを含む、毒素誘導体（下記参照）；リピドA誘導体（例えば、モノホスホリルリピドA、MPL）；ムラミルジペプチド（MDP）誘導体；細菌の外膜タンパク質（例えば、Borrelia burgdorferiの外膜タンパク質A（OspA）リポタンパク質、Neisseria meningitidisの外膜タンパク質）、水中油型エマルジョン（例えば、MF59；アルミニウム塩（Isakae et al., 1998, 1999）、およびサポニン（例えば、QS-21、例えば、QS-21 STIMULON（登録商標）、Antigenics LLC, Lexington, Mass.）、ISCOM、MF-59（Span85およびTween80で安定化された水中スクアレンエマルジョン；Chiron Corporation, Emeryville, Calif.）、Montanide adjuvantのSeppic ISAシリーズ（例えば、Montanide ISA 720；Air Liquide, Paris, France）、PROVAX（安定化界面活性剤とミセル形成剤を含む水中油型エマルジョン；IDEC Pharmaceuticals C

orporation, San Diego, Calif.)、Syntext Adjuvant Formulation (SAF; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colo.) ; ポリ [ジ (カルボキシラトフェノキシ)] ホスファゼン (PCPPポリマー; Virus Research Institute, USA)、ならびにおよびリーシュマニア伸長因子 (Corixa Corporation, Seattle, Wash.) が含まれる。

【0166】

特定の実施形態では、本明細書に開示される組成物に添加されるアジュバントは、サポニンおよび／または免疫刺激性核酸を含む。特定の実施形態では、組成物に添加されるアジュバントは、QS-21を含むか、またはさらに含む。

10

【0167】

特定の実施形態では、本明細書に開示される組成物に添加されるアジュバントは、Toll様受容体 (TLR) アゴニストを含む。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR4のアゴニストである。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR7および／またはTLR8のアゴニストである。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR9のアゴニストである。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR5のアゴニストである。

【0168】

本明細書に記載の本発明の組成物は、いくつかの方法でアジュバントと組み合わせることができる。例えば、異なるポリペプチドを最初に一緒に混合して混合物を形成し、次いでストレスタンパク質および／またはアジュバントと複合体を形成して組成物を形成することができる。別の例として、異なるポリペプチドは、ストレスタンパク質および／またはアジュバントと個別に複合体化され得、次いで、得られた複合体のバッチは、組成物を形成するために混合され得る。

20

【0169】

アジュバントは、ストレスタンパク質とポリペプチドの複合体を含む組成物の投与前、投与中、または投与後に投与することができる。アジュバントおよび組成物の投与は、同じまたは異なる投与部位で行うことができる。

【0170】

5. 4. 4 単位剤形

30

別の態様では、本開示は、本明細書に開示される医薬組成物またはワクチンの単位剤形を提供する。

【0171】

ポリペプチド、ストレスタンパク質、および／またはアジュバントの量および濃度は、本発明のワクチン製剤の有効性がポリペプチド、ストレスタンパク質、および／またはアジュバントの化学的性質および効力に応じて変化し得る。典型的には、ワクチン製剤中の開始量および濃度は、標準的な投与経路、例えば筋肉内注射を使用して、所望の免疫応答を誘発するために従来から使用されているものである。次いで、ペプチド、コンジュゲート、ストレスタンパク質、および／またはアジュバントの量および濃度を、例えば、希釈剤を使用する希釈によって調整することができ、その結果、当技術分野で知られている標準的な方法を使用して評価されるときに、効果的な防御免疫応答が達成される（例えば、対照製剤と比較したワクチン製剤に対する抗体またはT細胞応答によって決定される）。

40

【0172】

特定の実施形態では、医薬組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量は、約10 μ g ~ 600 μ g（例えば、約50 μ g、100 μ g、200 μ g、300 μ g、400 μ g、または500 μ g）である。特定の実施形態では、医薬組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量は、約300 μ gである。特定の実施形態では、組成物中のストレスタンパク質の量は、約250 μ g ~ 290 μ gである。

【0173】

特定の実施形態では、医薬組成物中のストレスタンパク質の量は、約10 μ g ~ 600

50

μg （例えば、約 $50\mu\text{g}$ 、 $100\mu\text{g}$ 、 $200\mu\text{g}$ 、 $300\mu\text{g}$ 、 $400\mu\text{g}$ 、または $500\mu\text{g}$ ）である。特定の実施形態では、医薬組成物中のストレスタンパク質の量は、約 $300\mu\text{g}$ である。ポリペプチドの量は、指定されたモル比およびポリペプチドの分子量に基づいて計算される。

【0174】

特定の実施形態では、医薬組成物の単位剤形におけるポリペプチドの総モル量は、約 $0.1\sim 10\text{nmol}$ （例えば、約 0.1nmol 、 0.5nmol 、 1nmol 、 2nmol 、 3nmol 、 4nmol 、 5nmol 、 6nmol 、 7nmol 、 8nmol 、 9nmol 、または 10nmol ）である。特定の実施形態では、医薬組成物の単位剤形中のポリペプチドの総モル量は、約 4nmol である。特定の実施形態では、医薬組成物の単位剤形中のポリペプチドの総モル量は、約 5nmol である。

10

【0175】

総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 $0.01:1$ 、 $0.02:1$ 、 $0.05:1$ 、 $0.1:1$ 、 $0.2:1$ 、 $0.5:1$ 、 $1:1$ 、 $1.5:1$ 、 $2:1$ 、 $2.5:1$ 、 $3:1$ 、 $4:1$ 、 $5:1$ 、 $6:1$ 、 $7:1$ 、 $8:1$ 、 $9:1$ 、 $10:1$ 、 $11:1$ 、 $12:1$ 、 $13:1$ 、 $14:1$ 、 $15:1$ 、 $16:1$ 、 $17:1$ 、 $18:1$ 、 $19:1$ 、 $20:1$ 、 $30:1$ 、 $40:1$ 、 $49:1$ 、 $100:1$ までを含むがこれらに限定されない、約 $0.01:1\sim 100:1$ までの任意の比であり得る。特定の実施形態では、組成物は、それぞれがポリペプチドおよびストレスタンパク質を含む複数の複合体を含み、各複合体におけるポリペプチド対ストレスタンパク質のモル比は、少なくとも約 $1:1$ （例えば、約 $1.5:1$ 、 $2:1$ 、 $2.5:1$ 、 $3:1$ 、 $4:1$ 、 $5:1$ 、 $6:1$ 、 $7:1$ 、 $8:1$ 、 $9:1$ 、 $10:1$ 、 $11:1$ 、 $12:1$ 、 $13:1$ 、 $14:1$ 、 $15:1$ 、 $16:1$ 、 $17:1$ 、 $18:1$ 、 $19:1$ 、 $20:1$ 、 $30:1$ 、 $40:1$ 、 $49:1$ 、 $100:1$ まで）である。特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 $0.5:1\sim 5:1$ である。

20

【0176】

特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 $1:1\sim 2:1$ である。特定の実施形態では、総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比は、約 $1:1$ 、 $1.25:1$ 、または $1.5:1$ である。そのような比率、特に $1:1$ に近い比率は、組成物がストレスタンパク質に結合されていない大過剰の遊離ペプチドを含まないという点で有利である。MHC 結合エピトープを含む多くの抗原性ペプチドは疎水性領域を含む傾向があるため、過剰量の遊離ペプチドは、組成物の調製および保存中に凝集する傾向がある可能性がある。総ポリペプチド対総ストレスタンパク質のモル比が $1:1$ に近い（例えば、 $1:1$ 、 $1.25:1$ 、 $1.5:1$ 、または $2:1$ ）ストレスタンパク質との実質的な複合体形成は、ストレスタンパク質に対するポリペプチドの高い結合親和性によって可能となる。したがって、特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3}M 、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、または 10^{-9}M より低い K_d で、HSP（例えば、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、GP96、またはカルレチキュリン）に結合する。特定の実施形態では、ポリペプチドは、 10^{-3}M 、 10^{-4}M 、 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、またはそれ以下の K_d で、Hsc70（例えば、ヒト Hsc70）に結合する。

30

40

【0177】

単位剤形中の成分の量を計算する方法が提供される。例えば、特定の実施形態では、ポリペプチドは、約 3kD の平均分子量を有し、Hsc70 の分子量は、約 71kD である。一実施形態では、医薬組成物中のポリペプチドおよびストレスタンパク質の総量が $300\mu\text{g}$ であり、ポリペプチド対 hsc70 のモル比が $1.5:1$ であると仮定する。Hsc70 のモル量は $300\mu\text{g}$ を $71\text{kD}+1.5\times 3\text{kD}$ で割ると約 4.0nmol になり、Hsc70 の質量はモル量に 71kD をかけると約 280kD になるように計算できる。ポリペプチドの総モル量は $1.5\times 4.0\text{nmol}$ と計算でき、 6.0nmol にな

50

る。10の異なるポリペプチドを使用する場合、各ポリペプチドのモル量は0.60nmolである。別の実施形態では、300μgの用量のHsc70が単位剤形に含まれることが意図されており、ポリペプチド対Hsc70のモル比が1.5:1であると仮定する。ポリペプチドの総モル量は、300μgを71kDで割った後、1.5をかけることによって計算でき、6.3nmolになる。10の異なるポリペプチドを使用する場合、各ポリペプチドのモル量は0.63nmolである。1つ以上の変数がこの例と異なる場合、ストレスタンパク質およびポリペプチドの量はそれに応じてスケールアップされる。

【0178】

単位剤形は、上に開示されるように、1つ以上のアジュバントを任意選択で含むことができる。特定の実施形態では、アジュバントは、サポニンおよび/または免疫刺激性核酸を含む。特定の実施形態では、アジュバントは、QS-21を含むか、またはさらに含む。特定の実施形態では、医薬組成物の単位剤形中のQS-21の量は、10μg、25μg、または50μgである。特定の実施形態では、医薬組成物の単位剤形中のQS-21の量は、50μgである。特定の実施形態では、アジュバントは、Toll様受容体(TLR)アゴニストを含む。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR4のアゴニストである。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR7および/またはTLR8のアゴニストである。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR9のアゴニストである。特定の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR5のアゴニストである。

【0179】

5.5 使用方法

本明細書に開示される組成物(例えば、医薬組成物)、ワクチン製剤、および単位剤形は、細胞免疫応答を誘導するために有用である。ストレスタンパク質は、抗原提示細胞(APC)の交差提示経路を介して(例えば、膜受容体(主にCD91)を介したマクロファージおよび樹状細胞(DC))、またはToll様受容体に結合することにより、免疫原性ペプチドを送達することができ、それによってCD8⁺およびCD4⁺T細胞の活性化をもたらす。ストレスタンパク質-ペプチド複合体の内在化により、ケモカインおよびサイトカイン産生を伴うAPCの機能的成熟がもたらされ、ナチュラルキラー細胞(NK)、単球、Th1およびTh2を介した免疫応答が活性化される。

【0180】

したがって、一態様では、本開示は、対象において抗原性ペプチドに対する細胞性免疫応答を誘導する方法であって、有効量の、本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を対象に投与することを含む、方法を提供する。別の態様では、本開示は、対象の疾患(例えば、がんまたは感染症)を治療する方法であって、有効量の、本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を対象に投与することを含む、方法を提供する。本明細書に開示される組成物(例えば、医薬組成物)、ワクチン製剤、および単位剤形はまた、対象の治療のための薬剤またはワクチンを調製する際に使用することができる。

【0181】

様々な実施形態では、そのような対象は、動物、例えば、哺乳動物、非ヒト霊長類、およびヒトであり得る。「動物」という用語には、ネコやイヌ等のコンパニオンアニマル、動物園の動物、シカ、キツネ、アライグマ等の野生動物、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、シチメンチョウ、アヒル、ニワトリ等の家畜、家禽、およびげっ歯類、ウサギ、モルモット等の実験動物が含まれる。特定の実施形態では、対象はがんを有する。特定の実施形態では、対象は、病原性微生物の感染症を有する。

【0182】

5.5.1 がんの治療

本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形は、単独で、またはがんの治療のための他の治療法と組み合わせて使用することができる。HSP結合抗原コンジュゲートまたはペプチド中の1つ以上のMHC結合エピトープは、対象のがん細胞に存在することがで

きる。特定の実施形態では、1つ以上のMHC結合エピトープは、がんのタイプおよび／または病期に共通であるか、または頻繁に見出される。本明細書で使用されるとき、「がんで頻繁に見られる」という用語は、5%を超えるがんで見られる1つ以上の変異型MHC結合エピトープを指す。特定の実施形態では、1つ以上のMHC結合エピトープは、対象のがんに特異的である。

【0183】

本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を使用して治療することができるがんには、固形腫瘍、血液癌（例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫、例えば、多発性骨髄腫）、および転移性病変が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、がんは固形腫瘍である。固形腫瘍の例には、悪性腫瘍、例えば、肉腫および癌腫、例えば、例えば、様々な臓器系の腺癌、例えば、肺、乳房、卵巣、リンパ系、胃腸（例えば、結腸）、肛門、生殖器、および生殖管（例えば、腎、尿路上皮、膀胱細胞、前立腺）、咽頭、CNS（例えば、脳、神経またはグリア細胞）、頭頸部、皮膚（例、黒色腫）、および脾臓に影響を与えるもの等、ならびに悪性腫瘍を含む腺癌、例えば、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌または小細胞肺癌）、小腸癌および食道癌が含まれる。がんは、初期、中期、後期、または転移性のがんであり得る。特定の実施形態では、がんは、PD-1活性の上昇（例えば、PD-1発現の上昇）に関連している。

【0184】

一実施形態では、がんは、肺癌（例えば、肺腺癌または非小細胞肺癌（NSCLC）（例えば、扁平上皮および／または非扁平上皮組織を有するNSCLC、またはNSCLC腺癌））、黒色腫（例えば、進行性黒色腫）、腎癌（例えば、腎細胞癌）、肝臓癌（例えば、肝細胞癌または肝内胆管細胞癌）、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、前立腺癌、乳癌（例えば、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、またはHer2/neuの1つ、2つ、または全てを発現しない乳癌、例、トリプルネガティブ乳癌）、卵巣癌、結腸直腸癌、脾臓癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、肛門癌、胃食道癌（例えば、食道扁平上皮癌）、中皮腫、鼻咽頭癌、甲状腺癌、頸部癌、上皮癌、腹膜癌、またはリンパ増殖性疾患（例えば、移植後のリンパ増殖性疾患）から選択される。一実施形態では、がんはNSCLCである。一実施形態では、がんは腎細胞癌である。一実施形態では、がんは卵巣癌であり、任意選択で、卵巣癌はヒトパピローマウイルス（HPV）感染に関連している。特定の実施形態では、卵巣癌は、白金不応性卵巣癌である。

【0185】

一実施形態では、癌は、血液癌、例えば、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である。一実施形態では、がんは白血病、例えば、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性骨髄芽球性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、または有毛細胞白血病である。一実施形態では、がん癌はリンパ腫、例えば、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、活性化B細胞様（ABC）びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、胚中心B細胞（GCB）びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、再発非ホジキンリンパ腫、難治性非ホジキンリンパ腫、再発性濾胞性非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、またはリンパ腫辺縁帯リンパ腫である。一実施形態では、がんは骨髄腫、例えば多発性骨髄腫である。

【0186】

別の実施形態では、がんは、癌腫（例えば、進行性または転移性癌腫）、黒色腫、または肺癌腫、例えば、非小細胞肺癌腫から選択される。

【0187】

一実施形態では、がんは、肺癌、例えば、肺腺癌、非小細胞肺癌、または小細胞肺癌である。

【0188】

10

20

30

40

50

一実施形態では、がんは黒色腫、例えば進行性黒色腫である。一実施形態では、がんは、他の治療法にตอบสนองしない進行性または切除不能な黒色腫である。他の実施形態では、がんは、BRAF変異（例えば、BRAF V600変異）を伴う黒色腫である。さらに他の実施形態では、本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形は、BRAF阻害剤（例えば、ベムラフェニブまたはダブラフェニブ）を伴うかまたは伴わない抗CTLA-4抗体（例えば、イピリムマブ）による治療後に投与される。

【0189】

別の実施形態では、がんは、ウイルス感染、例えば、慢性ウイルス性肝炎を伴うかまたは伴わない、肝細胞癌、例えば、進行性肝癌である。

【0190】

別の実施形態では、がんは、前立腺癌、例えば、進行性前立腺癌である。

【0191】

さらに別の実施形態では、がんは骨髄腫、例えば多発性骨髄腫である。

【0192】

さらに別の実施形態では、がんは、腎癌、例えば、腎細胞癌（RCC）（例えば、転移性RCC、明細胞腎細胞癌（CCRCC）、または腎臓乳頭状細胞癌）である。

【0193】

さらに別の実施形態では、がんは、肺癌、黒色腫、腎臓癌、乳癌、結腸直腸癌、白血病、またはがんの転移性病変から選択される。

【0194】

本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形は、がんが検出されたとき、または再発のエピソードの前または最中に投与され得る。

【0195】

投与は、がんまたは再発の最初の兆候から開始し、その後、少なくとも症状が実質的に軽減するまで、およびその後の期間、用量を追加することができる。

【0196】

いくつかの実施形態では、組成物は、切除された腫瘍組織から収集された代表的な抗原のセットを含む治療有効量の自己がんワクチンの産生のための不十分な量の切除された腫瘍組織（例えば、7 g未満、6 g未満、5 g未満、4 g未満、3 g未満、2 g未満、または1 g未満の切除された腫瘍組織）をもたらし腫瘍切除手術を受けたがんを有する対象に投与することができる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる Expert Opin. Biol. Ther. 2009 Feb; 9 (2) : 179-86に記載されているがワクチンを参照されたい。

【0197】

本発明の組成物、ワクチン製剤、および単位剤形はまた、がんの再発に対する免疫化に使用することができる。個体への組成物の予防的投与は、がんの将来の再発に対する保護を与えることができる。

【0198】

5. 5. 2 感染症の治療

本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形は、単独で、または微生物感染症（例えば、病原性微生物感染症）の治療のための他の治療法と組み合わせて使用することができる。HSP結合抗原コンジュゲートまたはペプチドの1つ以上のMHC結合エピトープを微生物から同定することができる。特定の実施形態では、1つ以上のMHC結合エピトープは、微生物または微生物に感染した細胞の表面に存在する。

【0199】

本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を使用して治療することができる感染症には、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、原虫感染症、または寄生虫感染症が含まれるが、これらに限定されない。

【0200】

本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位投与形態によって治療するこ

10

20

30

40

50

とができるウイルス感染症には、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ（例えば、インフルエンザAまたはインフルエンザB）、バリセラ、アデノウイルス、単純ヘルペスI型（HSV-I）、単純ヘルペスII型（HSV-II）、リンダーペスト、サイウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パピローマウイルス（例、ヒトパピローマウイルス（HPV））、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、ムンプスウイルス、はしかウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、エプスタインバーウイルス（EBV）、ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-I）、ヒト免疫不全ウイルスII型（HIV-II）、デング熱ウイルス、スモールポックスウイルス、およびジカウイルスによって引き起こされるものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法に従って治療することができるこれらのウイルスのいずれかによって引き起こされるウイルス性疾患には、発熱、免疫不全、ウイルス性髄膜炎、および脳炎が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0201】

本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形によって治療することができる細菌感染症には、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Staphylococcus aureus*、*Enterococcus faecalis*、*Proteus vulgaris*、*Staphylococcus viridans*、および*Pseudomonas aeruginosa*によって引き起こされる感染症が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法に従って治療することができるこれらの細菌のいずれかによって引き起こされる細菌性疾患には、マイコバクテリア感染症、マイコプラズマ、ナイセリア、*S. pneumonia*、*Borrelia burgdorferi*（ライム病）、*Bacillus anthracis*（炭疽病）、破傷風、連鎖状球菌、ブドウ球菌、マイコバクテリウム、百日咳、コレラ、ペスト、ジフテリア、クラミジア、*S. aureus*、およびレジオネラが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0202】

本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形によって治療することができる真菌感染症には、カンジダ（例えば、*Candida glabrata*）、*Pneumocystis carinii*、*Fusarium keratitis*、コクシジウム菌、*Aspergillus niger*、*Cryptococcus neoformans*、および*Curvularia geniculata*によって引き起こされる感染症が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法に従って治療できるこれらの細菌のいずれかによって引き起こされる真菌性疾患には、接合真菌症、カンジダ乳房炎、潜在性トリコスポロネミアを伴う進行性播種性トリコスポロノーシス、播種性カンジダ症、肺パラコクシジウム菌症、肺アスペルギルス症、肺糸状菌症、肺炎、クリプトコッカス性髄膜炎、コクシジウム性髄膜脳炎および脳脊髄血管炎、鼻副鼻腔真菌症、*Aspergillus fumigatus*心内膜炎、脛骨異形成症、*Candida glabrata*膈炎、口腔咽頭カンジダ症、X連鎖慢性肉芽腫症、足白癬、皮膚カンジダ症、真菌性胎盤炎、播種性トリコスポロン症、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、真菌性角膜炎、真菌性腹膜炎、ブドウ球菌性眼内炎、スポロトリコーシス、および皮膚糸状菌症が含まれるがこれらに限定されない。

30

40

【0203】

本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形によって治療することができる原虫感染症には、リーシュマニア、コクシジウム症、トリパノソーマ住血吸虫、およびマラリアによって引き起こされる感染症が含まれるが、これらに限定されない。

【0204】

本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形によって治療することができる寄生虫感染症には、クラミジアおよびリケッチアによって引き起こされる感染症が含まれるが、これらに限定されない。

50

【0205】

本発明の組成物、ワクチン製剤、および単位剤形は、当技術分野で知られている任意の医学的方法によって感染症を有すると診断された対象に対する免疫化に使用することができる。それらは、予防のために、病原性微生物に曝露された、病原性微生物に曝露されようとしている、またはそうでなければ感染症にかかるリスクが高い対象に対する免疫化に使用することができる。

【0206】

5. 5. 3 組み合わせ療法

組み合わせ療法は、がんまたは感染症を治療するための第2のモダリティを伴う、第1のモダリティとしての本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形の使用を指す。したがって、特定の実施形態では、本開示は、本明細書に開示される対象において抗原性ペプチドに対する細胞性免疫応答を誘導する方法、または本明細書に開示される対象において疾患を治療する方法であって、有効量の、(a) 本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形と、(b) 第2のモダリティと、を対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0207】

一実施形態では、第2のモダリティは、非HSPモダリティ、例えば、構成要素としてHSPを含まないモダリティである。このアプローチは、一般に、組み合わせ療法、補助療法、または結合療法と呼ばれる（これらの用語は互換可能に使用される）。組み合わせ療法では、相加的効力または相加的治療効果を観察することができる。治療効果が相加的よりも大きい場合、相乗的な結果が求められる。組み合わせ療法の使用はまた、第1または第2のモダリティのいずれかを単独で投与するよりも優れた治療プロファイルを提供することができる。

【0208】

相加効果または相乗効果により、いずれかまたは両方のモダリティの投与量および／または投与頻度を減らして、副作用を軽減することができる。特定の実施形態では、単独で投与される第2のモダリティは、対象を治療するのに臨床的に適切ではなく（例えば、対象は単一のモダリティに対して無反応または不応性である）、その結果、対象は追加のモダリティを必要とする。特定の実施形態では、対象は、第2のモダリティに応答したが、副作用、再発、抵抗性の発生等に苦しんでいるため、対象は追加のモダリティを必要とする。本発明の方法は、第2のモダリティの治療効果を改善するために、そのような対象に本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を投与することを含む。治療法の有効性は、当技術分野で知られている方法を使用して、*in vivo*または*in vitro*でアッセイすることができる。

【0209】

一実施形態では、より少ない量の第2のモダリティが対象において治療上の利益を生み出すために必要とされる。特定の実施形態では、第2のモダリティの量の約10%、20%、30%、40%、および50%の削減を達成することができる。観察可能な治療上の利益をもたらさない範囲の量を含む第2のモダリティの量は、当技術分野で周知の方法によって動物モデルで実施された用量反応実験によって決定することができる。

【0210】

特定の実施形態では、第2のモダリティは、TCR、例えば、可溶性TCRまたはTCRを発現する細胞を含む。特定の実施形態では、第2のモダリティは、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞を含む。特定の実施形態では、TCRまたはCARを発現する細胞は、T細胞である。特定の実施形態では、TCRまたはCARは、本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形中の少なくとも1つのMHC結合エピトープに結合する（例えば、特異的に結合する）。

【0211】

特定の実施形態では、第2のモダリティは、TCR模倣抗体を含む。特定の実施形態では、TCR模倣抗体は、ペプチド-MHC複合体に特異的に結合する抗体である。TCR

模倣抗体の非限定的な例は、米国特許第 9, 074, 000 号、米国特許出願公開第 2009/0304679 A1 号および US 2014/0134191 A1 に開示されており、これらは全て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、TCR 模倣抗体は、本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形中の少なくとも 1 つの MHC 結合エピトープに結合する（例えば、特異的に結合する）。

【0212】

特定の実施形態では、第 2 のモダリティは、チェックポイント標的薬を含む。特定の実施形態では、チェックポイント標的薬は、アンタゴニスト抗 CTLA-4 抗体、アンタゴニスト抗 PD-L1 抗体、アンタゴニスト抗 PD-L2 抗体、アンタゴニスト抗 PD-1 抗体、アンタゴニスト抗 TIM-3 抗体、アンタゴニスト抗 LAG-3 抗体、アンタゴニスト CEACAM1 抗体、アゴニスト抗 CD137 抗体、アンタゴニスト抗 TIGIT 抗体、アンタゴニスト VISTA 抗体、アゴニスト抗 GITR 抗体、およびアゴニスト抗 OX40 抗体からなる群から選択される。

【0213】

特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、本明細書に開示される方法で第 2 のモダリティとして使用される。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、Bristol-Myers Squibb によって開発された、BMS-936558 または MDX1106 としても知られている、ニボルマブである。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、Merck & Co によって開発された、ランブロリズマブまたは MK-3475 としても知られるペンブロリズマブである。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、CureTech によって開発された、CT-011 としても知られるビディリズマブである。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、Medimmune によって開発された、AMP-514 としても知られる MEDI0680 である。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、Novartis Pharmaceuticals によって開発された PDR001 である。特定の態様では、抗 PD-1 抗体は、Regeneron Pharmaceuticals によって開発された REGN2810 である。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、Pfizer によって開発された PF-06801591 である。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、BeiGene によって開発された BGB-A317 である。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、AnaptysBio および Tesaro によって開発された TSR-042 である。特定の実施形態では、抗 PD-1 抗体は、Hengrui によって開発された SHR-1210 である。

【0214】

本明細書に開示される治療方法において使用され得る抗 PD-1 抗体のさらなる非限定的な例は、以下の特許および特許出願に開示されており、それらの全ては全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる：米国特許第 6, 808, 710 号；米国特許第 7, 332, 582 号；米国特許第 7, 488, 802 号；米国特許第 8, 008, 449 号；米国特許第 8, 114, 845 号；米国特許第 8, 168, 757 号；米国特許第 8, 354, 509 号；米国特許第 8, 686, 119 号；米国特許第 8, 735, 553 号；米国特許第 8, 747, 847 号；米国特許第 8, 779, 105 号；米国特許第 8, 927, 697 号；米国特許第 8, 993, 731 号；米国特許第 9, 102, 727 号；米国特許第 9, 205, 148 号；米国公開番号 US 2013/0202623 A1；米国公開番号 US 2013/0291136 A1；米国公開番号 US 2014/0044738 A1；米国公開番号 US 2014/0356363 A1；米国公開番号 US 2016/0075783 A1；ならびに PCT 公開番号 WO 2013/033091 A1；PCT 公開番号 WO 2015/036394 A1；PCT 公開番号 WO 2014/179664 A2；PCT 公開番号 WO 2014/209804 A1；PCT 公開番号 WO 2014/206107 A1；PCT 公開番号 WO 2015/058573 A1；PCT 公開番号 WO 2015/085847 A1；PCT 公開番号 WO 2015/200119 A1；PCT 公開番号 WO 2016/015685 A1；および PCT 公開番号 WO 2016/020856 A1。

【0215】

特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、本明細書に開示される方法で第2のモダリティとして使用される。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、Genentechによって開発されたアテゾリズマブである。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、AstraZeneca、Celgene、およびMedimmuneによって開発されたデュルバルマブである。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、Merck SeronoおよびPfizerにより開発された、MSB0010718Cとしても知られるアベルマブである。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、Bristol-Myers Squibbによって開発されたMDX-1105である。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、AmplimmuneおよびGSKによって開発されたAMP-224である。

【0216】

本明細書に開示される治療方法に使用され得る抗PD-L1抗体の非限定的な例は、以下の特許および特許出願に開示されており、それらの全ては全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる：米国特許第7,943,743号；米国特許第8,168,179号；米国特許第8,217,149号；米国特許第8,552,154号；米国特許第8,779,108号；米国特許第8,981,063号；米国特許第9,175,082号；米国公開番号US2010/0203056A1；米国公開番号US2003/0232323A1；米国公開番号US2013/0323249A1；米国公開番号US2014/0341917A1；米国公開番号US2014/0044738A1；米国公開番号US2015/0203580A1；米国公開番号US2015/0225483A1；米国公開番号US2015/0346208A1；米国公開番号US2015/0355184A1；ならびにPCT公開番号WO2014/100079A1；PCT公開番号WO2014/022758A1；PCT公開番号WO2014/055897A2；PCT公開番号WO2015/061668A1；PCT公開番号WO2015/109124A1；PCT公開番号WO2015/195163A1；PCT公開番号WO2016/000619A1；およびPCT公開番号WO2016/030350A1。

【0217】

特定の実施形態では、IDO（インドールアミン（2,3）-ジオキシゲナーゼ）および/またはTDO（トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ）等の免疫調節酵素を標的とする化合物は、本明細書に開示される方法における第2のモダリティとして使用される。したがって、一実施形態では、化合物は、インドールアミン（2,3）-ジオキシゲナーゼ（IDO）の阻害剤等の免疫調節酵素を標的とする。特定の実施形態では、そのような化合物は、エパカドスタット（Incyte Corp；例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2010/005958を参照されたい）、F001287（Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb）、インドキシモド（NewLink Genetics）、およびNLG919（NewLink Genetics）からなる群から選択される。一実施形態では、化合物はエパカドスタットである。別の実施形態では、化合物はF001287である。別の実施形態では、化合物はインドキシモドである。別の実施形態では、化合物はNLG919である。特定の実施形態では、本明細書に開示される抗TIM-3（例えば、ヒトTIM-3）抗体は、がんを治療するためのIDO阻害剤と組み合わせて対象に投与される。がんの治療に使用する本明細書に記載のIDO阻害剤は、錠剤、丸剤またはカプセルなどの医薬組成物の固体剤形で存在し、医薬組成物はIDO阻害剤および薬学的に許容される賦形剤を含む。したがって、本明細書に記載の抗体と本明細書に記載のIDO阻害剤は、別々の剤形として別々に、逐次的に、または同時に投与することができる。一実施形態では、抗体は非経口投与され、IDO阻害剤は経口投与される。特定の実施形態では、阻害剤は、エパカドスタット（Incyte Corporation）、F001287（Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb

）、インドキシモド（New Link Genetics）、およびNLG919（New Link Genetics）からなる群から選択される。エパカドスタットは、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2010/005958号に記載されている。一実施形態では、阻害剤はエパカドスタットである。別の実施形態では、阻害剤はF001287である。別の実施形態では、阻害剤はインドキシモドである。別の実施形態では、阻害剤はNLG919である。

【0218】

特定の実施形態では、第2のモダリティは、がんまたは感染症を治療するための異なるワクチン（例えば、ペプチドワクチン、DNAワクチン、またはRNAワクチン）を含む。特定の実施形態では、ワクチンは、熱ショックタンパク質ベースの腫瘍ワクチンまたは熱ショックタンパク質ベースの病原体ワクチン（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2016/183486に記載されるようなワクチン）である。特定の実施形態では、第2のモダリティは、ストレスタンパク質ベースのワクチンを含む。例えば、特定の実施形態では、第2のモダリティは、第1のモダリティとは異なる、本明細書に開示される組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を含む。特定の実施形態では、第2のモダリティは、HSP結合ペプチドの異なる配列を有することを除いて、本明細書に開示されるものと類似の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形を含む。特定の実施形態では、ストレスタンパク質ベースのワクチンは、ワクチンによって誘発される免疫が、各対象のがんによって発現される独特の抗原性ペプチドレパートリーに対して特異的に向けられるように、腫瘍調製物に由来する。

【0219】

特定の実施形態では、第2のモダリティは、本明細書に開示されるワクチン製剤に含まれる上述に開示されるもの等の1つ以上のアジュバントを含む。特定の実施形態では、第2のモダリティは、サポニン、免疫刺激性核酸、および／またはQS-21を含む。特定の実施形態では、第2のモダリティは、Toll様受容体（TLR）アゴニストを含む。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR4のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR7および／またはTLR8のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR9のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR5のアゴニストである。

【0220】

特定の実施形態では、第2のモダリティは、レナリドマイド、デキサメタゾン、インターロイキン-2、組換えインターフェロンアルファ-2b、およびペグインターフェロンアルファ-2bからなる群から選択される1つ以上の薬剤を含む。

【0221】

特定の実施形態では、医薬組成物、ワクチン製剤、または単位剤形が、がんを有する対象を治療するために使用される場合、第2のモダリティは、化学療法剤または放射線療法剤を含む。特定の実施形態では、化学療法剤は低メチル化剤（例えば、アザシチジン）である。

【0222】

特定の実施形態では、病原性微生物の感染を有する対象を治療するために医薬組成物、ワクチン製剤、または単位剤形が使用される場合、第2のモダリティは、感染症の治療のための1つ以上の抗感染性介入（例えば、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、または抗蠕虫薬）を含む。

【0223】

本発明の組成物、ワクチン製剤、または単位剤形は、同じまたは異なる送達経路によって、第2のモダリティ（例えば、化学療法、放射線療法、チェックポイント標的薬、IDO阻害剤、ワクチン、アジュバント、可溶性TCR、TCRを発現する細胞、CARを発現する細胞、および／またはTCR模倣抗体）と別に、逐次的に、または同時に投与することができる。

【0224】

5. 5. 4 投与レジメン

本明細書に開示される組成物またはワクチン製剤の投与量、および組み合わせ療法が投与される場合の追加の治療モダリティの投与量は、治療される対象の体重および総合的な健康状態、ならびに治療の頻度および投与経路に大きく依存する。この使用に有効な量は、疾患の病期および重症度、ならびに処方する医師の判断にも依存するが、一般に、初期免疫（すなわち、治療的投与）の範囲は、70 kgの患者について本明細書に開示される組成物のいずれか1つの約1.0 μ g～約1000 μ g（1 mg）（例えば、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、240、250、300、350、400、450、500、550、600を含む、650、700、750、800、850、900、950、または1000 μ g）であり、続いて、患者の血液中の特定のCTL活性を測定することによる患者の応答と状態に応じて、数週間から数か月にわたる追加免疫レジメンに準拠する、組成物の約1.0 μ g～約1000 μ g（例えば、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700を含む、750、800、850、900、950、または1000 μ g）の追加免疫投与量である。部位、用量、頻度を含む継続治療のレジメンは、初期応答と臨床的判断によって導かれる可能性がある。アジュバントの投与量範囲およびレジメンは当業者に知られている。例えば、Vogel and Powell, 1995, A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients; M. F. Powell, M. J. Newman (eds.), Plenum Press, New York, pages 141-228を参照されたい。

10

20

【0225】

好ましいアジュバントには、QS-21、例えば、QS-21 Stimulon（登録商標¹）、およびCpGオリゴヌクレオチドが含まれる。QS-21の例示的な投与量範囲は、投与あたり1 μ g～200 μ gである。他の実施形態では、QS-21の投与量は、投与あたり10、25、および50 μ gであり得る。特定の実施形態では、アジュバントは、Toll様受容体（TLR）アゴニストを含む。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR4のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR7および／またはTLR8のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR9のアゴニストである。特定の実施形態では、TRLアゴニストは、TLR5のアゴニストである。

30

【0226】

特定の実施形態では、組成物の投与量は、投与経路および組成物中のHSPのタイプに依存する。例えば、組成物中のHSPの量は、例えば、投与あたり5～1000 μ g（1 mg）の範囲であり得る。特定の実施形態では、Hsc70-、Hsp70-および／またはGp96-ポリペプチド複合体を含む組成物の投与量は、例えば、5、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、750、800、900、または1000 μ gである。特定の実施形態では、組成物の投与量は、投与あたり約10～600 μ gの範囲であり、組成物が皮内投与される場合は約5～100 μ gの範囲である。特定の実施形態では、組成物の投与量は、約5 μ g～600 μ g、約5 μ g～300 μ g、約5 μ g～150 μ g、または約5 μ g～60 μ gである。特定の実施形態では、組成物の投与量は、100 μ g未満である。特定の実施形態では、組成物の投与量は、約5 μ g、25 μ g、50 μ g、または240 μ gである。特定の実施形態では、ストレスタンパク質とポリペプチドとの複合体を含む組成物は、精製される。

40

【0227】

治療レジメンの一実施形態では、そのような哺乳動物とヒトとの相対的なリンパ節のサイズに基づいて、より小さな非ヒト動物（例えば、マウスまたはモルモット）で有効であると観察されたものと実質的に同等の投与量が、任意選択で50倍の増加を超えない補正

50

係数を条件として、ヒト投与に有効である。具体的には、ヒト用量の抗原分子に非共有結合または混合されたストレストタンパク質（またはHSP）の種間用量反応同等性は、マウスで観察された治療用量と単一のスケーリング比の積として推定され、50倍の増加を超えない。特定の実施形態では、組成物の投与量は、外挿によって推定された投与量よりもはるかに少なくすることができる。

【0228】

上述の用量は、毎日または1日おき、毎週、隔週、または毎月等、1年または1年以上までの期間、1回または繰り返し投与することができる。投与は、好ましくは、約52週間以上の期間、28日に1回与えられる。

【0229】

一実施形態では、組成物は、追加の治療モダリティまたは複数のモダリティと同時に合理的に対象に投与される。この方法は、2つの投与が、例えば、同じ医師への来院において、1分未満から約5分、または互いに最大約60分の時間枠内で実行されることを提供する。

【0230】

別の実施形態では、組成物および追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、まったく同時に投与される。

【0231】

さらに別の実施形態では、組成物および追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、本発明の複合体と追加の治療モダリティまたはモダリティとが一緒に作用して、それらが単独で投与された場合よりも増加した利益を提供できるように、逐次的にかつ時間間隔内に投与される。

【0232】

別の実施形態では、組成物と追加の治療モダリティまたは複数のモダリティとは、所望の治療的または予防的結果を提供するように、時間的に十分に接近して投与される。それぞれを同時にまたは別々に、適切な形態で、適切な経路で投与することができる。一実施形態では、本発明の複合体および追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、異なる投与経路によって投与される。代替的な実施形態では、それぞれが同じ投与経路によって投与される。組成物は、同じまたは異なる部位、例えば、腕と脚に投与することができる。同時に投与される場合、組成物と追加の治療モダリティまたは複数のモダリティとは、混合して、または同じ投与経路によって同じ投与部位に投与されてもされなくてもよい。

【0233】

様々な実施形態では、組成物および追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、1時間未満の間隔で、約1時間間隔で、1時間から2時間間隔で、2時間から3時間間隔で、3時間から4時間間隔で、4時間から5時間間隔で、5時間から6時間間隔で、6時間から7時間間隔で、7時間から8時間間隔で、8時間から9時間間隔で、9時間から10時間間隔で、10時間から11時間間隔で、11時間から12時間間隔で、24時間以下の間隔で、または48時間以下の間隔で投与される。他の実施形態では、組成物およびワクチン組成物は、2から4日間隔で、4から6日間隔で、1週間間隔で、1から2週間間隔で、2から4週間間隔で、1ヶ月間隔で、1から2ヶ月間隔で、または2か月以上の間隔で投与される。好ましい実施形態では、組成物と追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、両方がまだ活性である時間枠で投与される。当業者は、投与された各成分の半減期を決定することにより、そのような時間枠を決定することができるであろう。

【0234】

特定の実施形態では、組成物は、少なくとも4週間、毎週対象に投与される。特定の実施形態では、4週間の投与後、組成物の少なくとも2回（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20）のさらなる用量が、対象に隔週で投与される。特定の実施形態では、組成物は、最後の毎週または隔週の投与の3ヶ月後に追加免疫として投与される。3ヶ月の追加免疫は、

対象の生涯にわたって投与することができる（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、またはそれ以上の年）。特定の実施形態では、対象に投与される組成物の総投与回数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。

【0235】

一実施形態では、組成物および追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、同じ患者の来院内で投与される。特定の実施形態では、組成物は、追加の治療モダリティまたは複数のモダリティの投与の前に投与される。代替的な特定の実施形態では、組成物は、追加の治療モダリティまたは複数のモダリティの投与に続いて投与される。

10

【0236】

特定の実施形態では、組成物および追加の治療モダリティまたは複数のモダリティは、対象に周期的に投与される。周期的な療法は、一定期間の組成物の投与、続いて一定期間のモダリティの投与、およびこの逐次的投与を繰り返すことを含む。周期的な療法は、1つ以上の療法に対する耐性の発生を低減し、1つの療法の副作用を回避または低減し、および／または治療の有効性を改善することができる。そのような実施形態では、本開示は、組成物の交互投与と、それに続く4～6日後、好ましくは2～4日後、より好ましくは1～2日後のモダリティの投与を企図し、このような周期は、必要に応じて何度も繰り返すことができる。特定の実施形態では、組成物およびモダリティは、3週間未満の周期で、2週間に1回、10日に1回、または毎週1回交互に投与される。特定の実施形態では、組成物は、モダリティの投与後1時間から24時間の時間枠内で対象に投与される。徐放型または連続放出型のモダリティ送達システムを使用する場合、時間枠をさらに数日以上に延長することができる。

20

【0237】

5. 5. 5 投与経路

本明細書に開示される組成物は、任意の所望の投与経路を使用して投与することができる。経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、粘膜、鼻腔内、腫瘍内、およびリンパ節内の経路を含むがこれらに限定されない、上述の組成物を導入するために多くの方法を使用することができる。非粘膜投与経路には、皮内投与および局所投与が含まれるが、これらに限定されない。粘膜投与経路には、経口、直腸、および鼻への投与が含まれるが、これらに限定されない。皮内投与の利点には、それぞれ低用量の使用と迅速な吸収が含まれる。皮下または筋肉内投与の利点には、それぞれいくつかの不溶性懸濁液および油性懸濁液への適合性が含まれる。粘膜投与用の調製物は、以下に記載されるような様々な製剤に適している。

30

【0238】

溶解性および投与部位は、組成物の投与経路を選択する際に考慮されるべき因子である。投与方法は、上述の投与経路を含む複数の投与経路間で変えることができる。

【0239】

組成物が水溶性である場合、それは、適切な緩衝液、例えば、リン酸緩衝生理食塩水または他の生理学的に適合性のある溶液、好ましくは無菌で処方され得る。代替的に、組成物が水性溶媒への溶解度が低い場合、それは、Tweenまたはポリエチレングリコール等の非イオン性界面活性剤で製剤化され得る。したがって、組成物は、吸入または吹送（口または鼻のいずれかを介して）または経口、口腔、非経口、または直腸投与による投与用に製剤化することができる。

40

【0240】

経口投与の場合、組成物は、液体形態、例えば、溶剤、シロップ剤または懸濁剤であり得るか、または使用前に水または他の適切なビヒクルで再構成するための製剤として提供され得る。そのような液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または水素化食用脂肪）、乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシアゴム）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステル、または画分化植物油）、およ

50

び保存剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）等の薬学的に許容される添加剤を用いた従来の手段によって調製することができる。組成物は、例えば、結合剤（例えばアルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、もしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えばラクトース、結晶セルロース、もしくはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、もしくはシリカ）；崩壊剤（例えばジャガイモデンプンもしくはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）等の薬学的に許容可能な賦形剤と共に従来の手段によって調製された錠剤またはカプセル剤の形態をとることができる。錠剤は、当該技術分野において公知の方法によってコーティングされ得る。

10

【0241】

経口投与用の組成物は、制御されたおよび／または時限的に放出されるように適切に製剤化され得る。

【0242】

口腔投与の場合、組成物は、従来の方法で製剤化された錠剤またはロゼンジの形態をとることができる。

【0243】

製剤は、注射、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化することができる。注射用製剤は、例えば、保存剤を加えたアンプルまたは複数用量容器内に、単位剤形として提供されてもよい。製剤は、油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤、または乳剤のような形態を取り得、懸濁剤、安定剤、および／または分散剤のような配合剤を含むことができる。代替的に、有効成分は、使用前に、適切なビヒクル、例えば、無菌のピロジェンフリー水で構成するための粉末形態であり得る。

20

【0244】

製剤はまた、例えば、カカオバターまたは他のグリセリド等の従来の坐剤基剤を含む、坐剤または保持浣腸等の直腸製剤に製剤化することができる。

【0245】

上述の製剤に加えて、製剤はまた、デポー製剤として製剤化され得る。そのような長時間作用型製剤は、移植（例えば、皮下または筋肉内）または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、製剤は、適切なポリマーまたは疎水性材料（例えば、許容可能な油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂として、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として製剤化され得る。リポソームおよびエマルジョンは、親水性薬物の送達ビヒクルまたは担体のよく知られた例である。

30

【0246】

吸入による投与の場合、組成物は、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスを使用して、加圧パックまたはネブライザーからのエアゾールスプレー提供の形態で都合よく送達される。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、計量された量を送達するための弁を提供することによって決定することができる。吸入器または吹送器において使用するための例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物とラクトースまたはデンプン等の適切な粉末基剤との粉末混合物を含むように製剤化することができる。

40

【0247】

5. 5. 6 患者（対象）の評価

本明細書に開示される組成物で治療された患者は、抗腫瘍免疫応答について試験され得る。これに関して、患者からの末梢血を採取し、抗腫瘍免疫のマーカーについてアッセイすることができる。標準的な実験手順を使用して、末梢血から白血球を採取し、様々な免疫細胞の表現型の頻度、HLAサブタイプ、および抗腫瘍免疫細胞の機能についてアッセイすることができる。

【0248】

抗腫瘍反応におけるエフェクター免疫細胞の大部分はCD8⁺T細胞であり、したがっ

50

てHLAクラスIに拘束されている。他の腫瘍タイプで免疫療法戦略を使用すると、HLAクラスI拘束抗原を認識するCD8+細胞の増殖が大多数の患者に見られる。しかしながら、CD4+T細胞、マクロファージ、樹状細胞等、抗原提示細胞として機能する可能性のある他の細胞タイプが抗腫瘍免疫応答に関与している。T細胞（CD4+、CD8+、およびTreg細胞）、マクロファージ、および抗原提示細胞の集団は、フローサイトメトリーを使用して決定できる。HLAタイピングは、Boegel et al. Genome Medicine 2012, 4:102 (seq2HLA)に記載されている方法等、当技術分野の日常的な方法を使用して、またはTruSight（登録商標）HLAシーケンシングパネル（Illumina, Inc.）を使用して実行できる。CD8+T細胞のHLAサブタイプは、補体依存性微小細胞傷害性試験によって決定できる。

10

【0249】

抗腫瘍T細胞応答が増加しているかどうかを判断するために、酵素結合免疫スポットアッセイを実行して、IFN γ 産生末梢血単核細胞（PBMC）を定量化することができる。この技法は、抗原認識と免疫細胞機能のアッセイを提供する。いくつかの実施形態では、ワクチンに臨床的に応答する対象は、腫瘍特異的T細胞および／またはIFN γ 産生PBMCの増加を有し得る。いくつかの実施形態では、免疫細胞頻度は、フローサイトメトリーを使用して評価される。いくつかの実施形態では、抗原認識および免疫細胞機能は、酵素結合免疫スポットアッセイを使用して評価される。

【0250】

20

いくつかの実施形態では、アッセイのパネルは、組成物に対して単独で、または標準治療（例えば、最大の外科的切除、放射線療法、および多形性膠芽腫に対するテモゾロミドとの併用および補助化学療法）と組み合わせてもたらされる免疫応答を特徴評価するために実施され得る。いくつかの実施形態では、アッセイのパネルは、以下の試験のうちの1つ以上を含む：全血細胞数、絶対リンパ球数、単球数、CD4+CD3+T細胞のパーセンテージ、CD8+CD3+T細胞のパーセンテージ、CD4+CD25+FoxP3+制御性T細胞のパーセンテージ、およびその他のPBL表面マーカーの表現型、タンパク質レベルで炎症誘発性サイトカインを検出する細胞内サイトカイン染色、mRNAレベルでサイトカインを検出するqPCR、T細胞増殖をアッセイするCFSE希釈。

【0251】

30

対象を評価する際に、対象の総合的な健康状態を決定するために、他の多くの試験を実施することができる。例えば、血液試料は、対象から採取され、血液学、凝固時間、および血清生化学について分析され得る。CBCの血液学には、赤血球数、血小板、ヘマトクリット値、ヘモグロビン、白血球（WBC）数に加えて、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、および単球の絶対数を提供するWBC百分率検査を含み得る。血清生化学には、アルブミン、アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、総ビリルビン、BUN、グルコース、クレアチニン、カリウム、およびナトリウムが含まれ得る。プロトロンビン時間（PT）および部分 tromboplastin 時間（PTT）も試験できる。次の検査の1つ以上も実施できる：抗甲状腺（抗ミクロソームまたはサイログロブリン）抗体検査、抗核抗体の評価、およびリウマチ因子。尿検査は、尿中のタンパク質、RBC、およびWBCレベルを評価するために実行される場合がある。また、組織適合性白血球抗原（HLA）の状態を判断するための採血を行うこともできる。

40

【0252】

いくつかの実施形態では、放射線学的腫瘍評価は、腫瘍のサイズおよび状態を評価するために、治療全体を通して1回または複数回実行される。例えば、腫瘍評価スキャンは、手術前30日以内、手術後48時間以内（例えば、切除率を評価するため）、最初のワクチン接種の1週間（最大14日）前（例えば、ベースライン評価として）、およびその後の特定の期間に約8週間ごとに実施され得る。MRIまたはCTイメージングを使用できる。通常、ベースライン評価に使用されるのと同じ画像診断法が、各腫瘍評価訪問に使用

50

される。

【0253】

5. 6 キット

本明細書に開示される予防的および治療的方法を実施するためのキットも提供される。キットは、任意選択で、キットの様々な構成要素を使用する方法に関する使用説明書をさらに含む得る。

【0254】

特定の実施形態では、キットは、本明細書に開示される組成物を含む第1の容器と、1つ以上のアジュバントを含む第2の容器とを含む。アジュバントは、本明細書に開示される任意のアジュバント、例えば、サポニン、免疫刺激性核酸、またはQS-21（例えば、QS-21 Stimulon（登録商標））であり得る。特定の実施形態では、キットは、追加の治療モダリティを含む第3の容器をさらに含む。キットは、例えば、本明細書のセクション5. 5に開示されるような、組成物、アジュバント、および追加の治療モダリティの適応症、投与レジメン、および投与経路に関する使用説明書をさらに含むことができる。

【0255】

代替的に、キットは、本明細書に開示される組成物のストレスタンパク質およびポリペプチドを別々の容器に含むことができる。特定の実施形態では、キットは、本明細書に開示される1つ以上のポリペプチドを含む第1の容器と、ポリペプチドに結合することができる精製されたストレスタンパク質を含む第2の容器とを含む。

【0256】

第1の容器は、任意の数の異なるポリペプチドを含むことができる。例えば、特定の実施形態では、第1の容器は、100以下の異なるポリペプチド、例えば、2~50、2~30、2~20、5~20、5~15、5~10、または10~15の異なるポリペプチドを含む。特定の実施形態では、異なるポリペプチドのそれぞれは、同じHSP結合ペプチドと異なる抗原性ペプチドとを含む。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドの総量は、単位投与量に適切な量である。特定の実施形態では、第1の容器中のポリペプチドの総量は、約0.1~20nmol（例えば、3、4、5、または6nmol）である。

【0257】

第2の容器は、本明細書に開示される任意のストレスタンパク質を含むことができる。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、Grp96、またはカルレチキュリン、およびそれらの変異体または融合タンパク質からなる群から選択される。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70（例えば、ヒトHsc70）である。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、組換えタンパク質である。特定の実施形態では、第2の容器内のストレスタンパク質の総量は、約10μg~600μg（例えば、250μg~290μg）である。特定の実施形態では、第2の容器内のストレスタンパク質の総量は、約50μg、100μg、200μg、300μg、400μg、または500μgである。特定の実施形態では、医薬組成物中のストレスタンパク質の量は、約300μgである。特定の実施形態では、第2の容器中のストレスタンパク質の総モル量は、第1の容器中のポリペプチドの総モル量に基づいて計算され、その結果、ポリペプチド：ストレスタンパク質のモル比は、約0.5：1~5：1（例えば、約1：1~2：1、例えば、約1：1、1.25：1、または1.5：1）となる。特定の実施形態では、第2の容器内のストレスタンパク質の総量は、複数回の投与のための量である（例えば、1mg、3mg、10mg、30mg、または100mg以下）。

【0258】

特定の実施形態では、キットは、第1の容器内のポリペプチドと第2の容器内のストレスタンパク質とから組成物を調製するための使用説明書（例えば、本明細書のセクション5. 4. 2に開示される複合体形成反応のための使用説明書）をさらに含む。

【0259】

特定の実施形態では、キットは、1つ以上のアジュバントを含む第3の容器をさらに含む。アジュバントは、本明細書に開示される任意のアジュバント、例えば、サポニン、免疫刺激性核酸、またはQS-21（例えば、QS-21 Stimulon（登録商標））であり得る。特定の実施形態では、キットは、追加の治療モダリティを含む第4の容器をさらに含む。キットは、例えば、本明細書のセクション5.5に開示されているような、ポリペプチドおよびストレスタンパク質、アジュバント、および追加の治療モダリティから調製された組成物の適応症、投与レジメン、および投与経路に関する使用説明書をさらに含むことができる。

【0260】

10

特定の実施形態では、容器内の組成物、ポリペプチド、ストレスタンパク質、アジュバント、および追加の治療モダリティは、がんまたは感染症を治療するのに有効な所定の量で存在する。必要に応じて、組成物は、組成物の1つ以上の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサーデバイスで提供することができる。パックは、例えば、プリスターパック等の金属またはプラスチック箔を含み得る。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための使用説明書が添付されてもよい。

【0261】

5.7 HPVペプチド

別の態様では、本開示は、HSP結合ペプチドとヒトパピローマウイルス（HPV）（例えば、HPV16またはHPV18）由来のアミノ酸配列とを含むポリペプチドを提供する。このようなアミノ酸配列は、本明細書ではHPVペプチドとも呼ばれる。

20

【0262】

HPVペプチドは、表3に開示されている任意のアミノ酸配列を含むことができる。特定の実施形態では、HPVに由来するアミノ酸配列は、配列番号38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または53のアミノ酸配列からなる。

【0263】

【表 3】

表3. 抗原性HPVペプチドのアミノ酸配列

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号:
PEP087	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTI	38
PEP088	PRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLL	39
PEP089	HDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIV	40
PEP090	RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKF	41
PEP091	RDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLY	42
PEP092	YSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDL	43
PEP093	GTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCP	44
PEP094	DLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFH	45
PEP095	PEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTG	46
PEP096	DKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL	47
PEP097	MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLN	48
PEP098	LQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGP	49
PEP099	QLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIV	50
PEP100	PAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCV	51
PEP101	VTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLL	52
PEP102	VQSTHVDIRTLEDLLMGLTGIVCPICSKP	53

【0264】

HSP結合ペプチドは、セクション5.2に開示されている任意のHSP結合ペプチド、または当技術分野で知られている任意のHSP結合ペプチドであり得る（例えば、そのそれぞれが、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、US2016/0331821A1およびUS7309491B2を参照されたい）。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号1、2、3、4、または232のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、204、205、207、208、209、210、211、212、213、214、または215のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、HSP結合ペプチドは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0265】

HPVペプチドは、本明細書（例えば、セクション5.3に）に開示されている任意のリンカーを介してHSP結合ペプチドに連結することができる。特定の実施形態では、HPVペプチドは、ペプチドリンカーを介してHSP結合ペプチドに連結されている。特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、FRまたはFFRKのアミノ酸配列（配列番号13）を含む。

【0266】

特定の実施形態では、HPVペプチドは、配列番号54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、または69のアミノ酸配列を含む。

【0267】

【表 4】

表 4. HSP 結合抗原 HPV ペプチドのアミノ酸配列

ペプチドの名 称	説明	アミノ酸配列	配列番号：
PEP071	HPV16 E61-30 は PEP006 に連結されている	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIFFRKNWLRWT	54
PEP072	HPV16 E616-45 は PEP006 に連結されている	PRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLFFRKNWLRWT	55
PEP073	HPV16 E631-60 は PEP006 に連結されている	HDIILECVYCKQQLRREVYDFAFRDLCIVFFRKNWLRWT	56
PEP074	HPV16 E646-76 は PEP006 に連結されている	RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFFRKNWLRWT	57
PEP075	HPV16 E662-91 は PEP006 に連結されている	RDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYFFRKNWLRWT	58
PEP076	HPV16 E677-106 は PEP006 に連結されている	YSKISEYRHYCYSLYGTLEQQYNKPLCDLFFRKNWLRWT	59
PEP077	HPV16 E692-119 は PEP006 に連結されている	GTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPFFRKNWLRWT	60
PEP078	HPV16 E6105-133 は PEP006 に連結されている	DLLIRCINCQKPLCPPEKQRHLDKKQRFHFFRKNWLRWT	61
PEP079	HPV16 E6119-141 は PEP006 に連結されている	PEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGFFRKNWLRWT	62
PEP080	HPV16 E6127-158 は PEP006 に連結されている	DKKQRFHNIRGRWTGRCMCCRSSRTRETQLFFRKNWLRWT	63
PEP081	HPV16 E71-29 は PEP006 に連結されている	MHGDTPTLHEYMLDLQPETDLYCYEQLNFFRKNWLRWT	64
PEP082	HPV16 E715-41 は PEP006 に連結されている	LQPETDLYCYEQLNDSSEEEIDGPFPRKNWLRWT	65
PEP083	HPV16 E727-55 は PEP006 に連結されている	QLNDSSEEEIDGPAGQAEPRAHYNIVFFRKNWLRWT	66
PEP084	HPV16 E741-69 は PEP006 に連結されている	PAGQAEPRAHYNIVTFCKCDSTLRCLVFFRKNWLRWT	67
PEP085	HPV16 E755-83 は PEP006 に連結されている	VTFCKCDSTLRCLVQSTHVDIRTLEDLLFFRKNWLRWT	68
PEP086	HPV16 E769-98 は PEP006 に連結されている	VQSTHVDIRTLEDLLMGTGIVCPICSQKPFPRKNWLRWT	69

【0268】

別の態様では、本開示は、複数の異なるポリペプチドを含む組成物（例えば、医薬組成物）を提供し、各ポリペプチドは、HSP 結合ペプチドと HPV ペプチドとを含む。特定の実施形態では、少なくとも 1 つの HPV ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 38～53 からなる群から選択される。特定の実施形態では、各 HPV ペプチドのアミノ酸配列は

、配列番号 38～53 からなる群から選択される。特定の実施形態では、組成物は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 の異なる HPV ペプチドを含む。

【0269】

特定の実施形態では、少なくとも 1 つのポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 54～69 からなる群から選択される。特定の実施形態では、各ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 54～69 からなる群から選択される。特定の実施形態では、組成物は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 の異なるポリペプチドを含む。

【0270】

特定の実施形態では、組成物は、精製されたストレスタンパク質をさらに含む。本明細書（例えば、セクション 5.4）に開示されている任意のストレスタンパク質を使用することができる。例えば、特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70、Hsp70、Hsp90、Hsp110、Grp170、Gp96、カルレティキュリン、およびそれらの変異体または融合タンパク質からなる群から選択される。特定の実施形態では、ストレスタンパク質は、Hsc70（例えば、ヒト Hsc70）である。

【0271】

ポリペプチド対ストレスタンパク質の比率は、本明細書に開示される任意の比率、例えば、約 0.5 : 1～5 : 1 であり得る。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質の比率は、約 1 : 1～2 : 1 である。特定の実施形態では、ポリペプチド対ストレスタンパク質の比は、約 1 : 1、1.25 : 1、または 1.5 : 1 である。また、ポリペプチドおよびストレスタンパク質の量は、本明細書のセクション 5.4 に開示されている任意の量であり得る。特定の実施形態では、組成物は単位剤形である。

【0272】

別の態様では、本開示は、本明細書に開示される組成物を単一の容器または別個の容器のいずれかに含み、任意選択で、本明細書のセクション 5.6 に開示される、1 つ以上のアジュバントおよび追加の治療法を含む容器をさらに含むキットを提供する。

【0273】

別の態様では、本開示は、対象において HPV ペプチドに対する細胞性免疫応答を誘導する方法であって、有効量の、このセクションに開示されるような組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。別の態様では、本開示は、対象の HPV 関連疾患を治療する方法であって、有効量の、このセクションに開示されるような組成物を対象に投与することを含む、方法を提供する。特定の実施形態では、HPV 関連疾患は、がん（例えば、子宮頸癌）である。特定の実施形態では、HPV は HPV16 または HPV18 である。本明細書のセクション 5.5.4 に開示されている任意の投与レジメンおよび本明細書のセクション 5.5.5 に開示されている任意の投与経路を使用することができる。方法は、本明細書のセクション 5.5.3 に開示されるような追加の治療モダリティをさらに含むことができ、本明細書のセクション 5.5.6 に開示されるような患者評価ステップをさらに含むことができる。

【実施例】

【0274】

このセクション（すなわち、セクション 6）の例は、例示のために提供されるものであり、限定のためのものではない。

【0275】

6.1 実施例 1 : Hsc70 に高い親和性で結合するペプチドの同定

この実施例は、NLRLRTG（配列番号 70）のアミノ酸配列を有する熱ショックタンパク質結合ペプチドと比較して、HSP への結合が改善された熱ショックタンパク質（HSP）結合ペプチドの設計を記載する（全体が参照により本明細書に組み込まれる、US2016/033182A1 として公開された米国特許出願を参照されたい）。

【0276】

6. 1. 1 ペプチドのHsc70への結合

ヒトHsc70に高い親和性で結合するペプチドを同定するために、NLLRLTG（配列番号70）配列のバリエーションを設計し、FFRK（配列番号13）のアミノ酸配列を有するリンカーをN末端に付加した。合成および試験されたペプチドのアミノ酸配列を表5に示す。

【0277】

【表5】

表5. HSP結合ペプチドのアミノ酸配列

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号：
PEP001	FFRKNLLRLTG	71
PEP006	FFRKNWLRLTW	18
PEP012	FFRKNWLKLTW	19
PEP055	FFRKNWLKLKW	72
PEP056	FFRKNWLKLKWアミド*	73
PEP057	FFRKNWLKLRW	74
PEP058	FFRKNWLKLWK	75

*C末端のカルボキシル基のアミド化

【0278】

ペプチドは、Symphony-X自動シンセサイザー（Gyros Protein Technologies Inc）で、ポリスチレンwang（PS-Wang）樹脂をプリロードした標準的なFmoc固相化学合成を使用して合成した。Fmocで保護されたL-アミノ酸は、標準的なHCTU/NMM活性化化学で適用された。レジン置換に関しては、5倍過剰のアミノ酸、5倍過剰の活性化試薬（HCTU）、および10倍過剰のN-メチルモルホリンを使用して、アミノ酸をカップリングしてペプチド結合を作成した。反応は、合成全体を通して不完全なカップリングに対して二重カップリングサイクルで6分間行った。これらのステップは、所望の配列が得られるまで繰り返された。合成の最後に、樹脂をジクロロメタン（DCM）で洗浄し、乾燥させた。ペプチドの組み立てが完了したら、樹脂を別の切断容器に移して、ペプチドを樹脂から切断した。切断カクテル試薬トリフルオロ酢酸：ジチオスレイトール水：トリイソプロピルシラン（88：5：5：2 v/w/v/v）を樹脂と混合し、25℃で4時間攪拌した。粗ペプチドを濾過により樹脂から単離し、N₂ガスで蒸発させた後、冷却したジエチルエーテルで沈殿させ、-20℃で12時間保存した。沈殿したペプチドを遠心分離し、エーテルで2回洗浄し、乾燥させ、選択した溶媒に溶解し、凍結乾燥して、粗乾燥粉末を生成した。粗ペプチドは、水（0.1% TFA）-アセトニトリル（0.1% TFA）勾配を使用したC18カラム（Ultimate 3000、Thermo Scientific）を使用した分取HPLCで精製した。ペプチドの純度は、分析用C18カラムを使用して試験した。さらなる特性評価は、6550 Q-TOF（Agilent Technologies）質量分析によって確認された。

【0279】

個々のペプチドを100% DMSO中に10 mg/mlで可溶化し、続いて75% DMSO中に320 μMまで2回目の希釈ステップを行った。ペプチド-Hsc70複合体を形成するために、Hsc70を7 μM（0.5 mg/ml）の濃度で、最終容量25 μlの1×PBS中の適切な濃度のペプチドと混合した。次いで、混合した試料を37℃で1時間インキュベートし、氷上で10分間冷却した。溶液中の複合体の量を評価するために

、20 μ l (10 μ g) の試料をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラム TSK gel Super SW3000 (Tosoh Bioscience) に0.2 ml / 分の流速でランニング緩衝液としての1 $\times$ PBSと共にロードした。データは、280 nmと214 nmの両方で吸光度を測定することによって収集した。

【0280】

別の実験では、ペプチドNLLRLTG (配列番号70) のさらなるバリエーションが生成され、ペプチド-Hsc70複合体を形成するこれらのペプチドの能力が分析された。ペプチドは、上述のように、標準的なFmoc固相化学合成を使用して再度合成された。個々のペプチドを250 μ Mの濃度でpH調整水に可溶化し、ポリソルベート20を最終濃度0.1%までスパイクした。ペプチド-Hsc70複合体を形成するために、Hsc70 (1 mg/ml、0.1%ポリソルベート) をペプチド:Hsc70のモル比0.25:1、0.5:1、1:1、2:1、および4:1でペプチドと、30℃で60分間混合した。インキュベーション後、試料を室温で5分間冷却し、分析のためにHPLCバイアルに移した。溶液中の複合体の量を評価するために、20 μ l (10 μ g) の試料をサイズ排除クロマトグラフィーカラムTSK gel Super SW3000 (Tosoh Bioscience) に0.2 ml / 分の流速でランニング緩衝液としての1 $\times$ PBSと共にロードした。データは、214 nmで吸光度を測定することによって収集した。

【0281】

ペプチドに結合したHsc70のパーセントはSECによって計算された。図1に示すSECクロマトグラムに示されているように、組換えヒト熱ショック同族の71 kDaタンパク質 (Hsc70) は、SECクロマトグラフィーにかけたとき、モノマー (M)、ダイマー (D)、トリマー (T)、および高次高分子量 (HMW) オリゴマー種として現れた。ペプチド-Hsc70複合体が特定のペプチドまたはペプチド混合物で形成された程度 of 分離と評価は、Hsc70モノマーとペプチド (Msh) の複合体の密接な溶出によって複雑になった。モノマーと複合体に対応するピークは重なり合っており、標準的なSEC媒体では完全には分離されなかった。複合体形成の程度をより正確に計算するために、以下のデータ分析法を使用した。この方法の中心的な特徴は、Hsc70のトリマーおよびダイマーの形態がモノマーペプチド複合体の形成に動員されることが観察されたという観察に基づいていた。これらのタンパク質種のピーク面積の積分は、複合体とモノマーから十分に分離された。さらに、複合体が形成された程度は、トリマーおよびダイマーが複合体形成に動員された程度に反比例するように見えた。この観察のために、トリマーおよびダイマーの変化は、モノマーが複合体の形成に動員された程度を反映していた。したがって、トリマーおよびダイマーのレベルの変化の進行を使用して、重複する複合体およびモノマー種のピーク面積の予想される変化を計算し、これらの計算されたピーク面積を使用して、複合体の正味の形成を計算した。このデータ分析方法を以下に記載する。

【0282】

様々なクロマトグラフィー画分に使用される用語には、高分子量 (HMW)、トリマーおよびその他の中次オリゴマー (T)、ダイマー (D)、複合体 (C)、モノマーショルダー (Msh)、およびモノマー (M) が含まれる (図1を参照されたい)。様々な画分のピーク面積をSECデータから抽出し、ペプチド-Hsc70複合体形成のパーセンテージを次の一連の方程式を使用して計算した。

【0283】

$$\text{複合体 \%} = (\text{面積}_{\text{複合体}} / \text{面積}_{\text{合計}}) \times 100$$

$$\text{面積}_{\text{複合体}} = \text{面積}_{\text{合計}} - (\text{面積}_{\text{T} + \text{D}} + \text{面積}_{\text{Msh}} + \text{面積}_{\text{M}})$$

$$\text{面積}_{\text{合計}} = \text{面積}_{\text{T} + \text{D}} + \text{面積}_{\text{C}} + \text{面積}_{\text{Msh}} + \text{面積}_{\text{M}} + (\text{面積}_{\text{HMW}} - \text{面積}_{\text{HMW} - 0})$$

$$\text{面積}_{\text{Msh}} = \text{面積}_{\text{Msh}0} \times (\text{面積}_{\text{(T+D)}} / \text{面積}_{\text{(T+D)}0})$$

$$\text{面積}_{\text{M}} = \text{面積}_{\text{M}0} \times (\text{面積}_{\text{(T+D)}} / \text{面積}_{\text{(T+D)}0})$$

【0284】

面積_{合計}は、トリマー/オリゴマー領域からモノマーピークまでの合計積分ピーク面積の合計であり、最初のHMWピーク面積は含まれないが、ペプチドを添加したときに観察

されたH M Wピーク面積の過剰な増加が含まれる。H M Wピークは、複合体形成に機能しない凝集タンパク質であることに基づいて、複合体形成の計算から除外された。この修正では、H M W面積のわずかな増加の面積_{合計}係数が考慮され、複合体の面積の計算に使用されるベース合計面積に追加された。この調整を含めると、複合体を形成するために使用されるペプチド濃度の範囲全体で、より安定した面積_{合計}が得られた。

【0285】

前述の方法を各錯化反応のS E Cクロマトグラムに適用し、クロマトグラムに垂直線を適用してH M W、T、C、D、およびMセグメントを生成し（図1を参照されたい）、示されたH M W、T、C、D、およびMセグメントのそれぞれの曲線下面積を計算し、上述の式に値を入力する。この分析の結果を表6に示す。

【表6】

表6. H s c 7 0 とのペプチドの複合体形成パーセント

ペプチドの 名称	配列番号:	配列	0. 25 : 1	0. 5 : 1	1 : 1	2 : 1	4 : 1
PEP001	71	FFRKNLLRLTG	23. 4	44. 7	68. 1	82. 5	90. 1
PEP002	165	FFRKNRLLLTG	19. 2	32. 0	48. 7	64. 8	78. 8
PEP003	166	FFRKNWLLLTW	26. 8	45. 6	67. 2	81. 3	87. 6
PEP004	167	FFRKNLLRWTG	15. 4	29. 0	46. 8	62. 5	75. 3
PEP005	168	FFRKNRLWLTG	16. 0	32. 7	54. 8	67. 6	77. 6
PEP006	18	FFRKNWLRLTW	25. 4	53. 4	81. 5	88. 3	91. 8
PEP027	21	FFRKNFLRLTF	19. 1	49. 0	77. 0	85. 6	90. 0
PEP008	169	FFRKFWLRLTW	24. 4	38. 3	61. 8	79. 1	81. 6
PEP009	170	FFRKNWLRLW	32. 8	63. 5	81. 0	85. 3	89. 0
PEP010	171	FFRKNWLRLFW	19. 1	42. 2	64. 9	79. 3	86. 5
PEP011	172	FFRKNWLRLKW	31. 2	58. 2	81. 6	87. 8	90. 4
PEP012	19	FFRKNWLKLTW	29. 9	58. 2	79. 2	86. 2	89. 5
PEP013	173	FFRKNWIRITW	25. 6	48. 3	69. 6	81. 9	87. 7
PEP014	174	FFRKQWLRLTW	29. 3	54. 4	80. 9	88. 1	90. 3
PEP028	22	FRNWLRLTW	24. 0	46. 4	75. 6	84. 1	87. 5
PEP055	72	FFRKNWLKWK	24. 1	52. 2	75. 9	83. 7	86. 3
PEP057	74	FFRKNWLKLRW	24. 9	50. 0	72. 2	82. 8	88. 3
PEP058	75	FFRKNWLKLWK	22. 7	43. 5	66. 5	78. 8	83. 9
PEP155	164	FFRKNLLRLTW	22. 5	48. 1	75. 6	82. 9	86. 6

【0286】

P E P 0 0 6 は、さらなる特性評価のために選択された。

【0287】

6. 1. 2 H s c 7 0 と P E P 0 0 6 の複合体形成

この例は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定されるとき、0. 25 : 1 ~ 3 : 1 までのモル比の範囲でH s c 7 0 に結合するP E P 0 0 6 の能力を示す。

【0288】

簡潔に述べると、P E P 0 0 6 ペプチドを注射用水（W F I）で645 μ Mの濃度に再構成した。組換えヒトH s c 7 0（r h H s c 7 0）を1. 66 mg / mLの濃度に希釈

した。両方の溶液を37℃のインキュベーターで10分間予熱し、合わせて37℃で60分間インキュベートした。rhHsc70の最終濃度は1mg/mL（約14.1μM）であり、PEP006対rhHsc70のモル比は0.25:1、0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、および3:1であった。1mg/mLのrhHsc70のみを含む陰性対照も調製した。

【0289】

クロマトグラフィーカラムTSK gel SuperSW3000 (Tosoh Bioscience、カタログ#18675)を使用するサイズ排除HPLC (Alliance HPLC, Waters Model #2695 Separations Module; Dual Wavelength UV Detector, Waters Model 2487)による分離のために、各試料10μgを3回ずつニートで注入した。カラム温度は25℃±5℃に制御され、オートサンプラー温度は5℃±3℃に制御された。移動相は、10mMリン酸ナトリウムと300mM塩化ナトリウム、pH7.2で構成され、0.2mL/分の流速で30分間供給された。PEP006ペプチドとrhHsc70タンパク質のUV吸光度を、214nmと280nmの波長で測定した。吸光度データはWaters Empower (V2)ソフトウェアで処理された。

10

【0290】

図2は、PEP006-Hsc70複合体形成生成物のクロマトグラムを示し、rhHsc70がPEP006に結合すると、カラムの保持時間が短くなった。

【0291】

6.1.3 Hsc70とPEP006を含むポリペプチドとの複合体形成

この実施例は、PEP006およびと察されたペプチド (LGVRPRALHRELDLVDDSPTPGSPGS (配列番号76)) とを含むポリペプチドLGVRPRALHRELDLVDDSPTPGSPGSFFRKNWLRRLTW (配列番号77) へのHsc70の結合の特性評価を記載する。この実施例で試験したポリペプチド対Hsc70のモル比は、0.125:1、0.25:1、0.5:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、および4:1であった。

20

【0292】

図3Aは、ポリペプチド-Hsc70複合体形成生成物のクロマトグラムを示し、rhHsc70がポリペプチドに結合すると、カラムの保持時間が短くなった。図3Bは、実施例6.1.1に記載の方法を使用して、図3Aのものと同様のサイズ排除クロマトグラフィートレースから計算された、0.125:1から4:1までのポリペプチド:Hsc70のモル比の範囲にわたるPEP006を含むポリペプチドとHSC70との複合体形成パーセントを示すグラフである。3つの独立した実験が示されている。

30

【0293】

C末端PEP006またはPEP001を含むポリペプチドへのHsc70の結合をさらに特性評価するために、C末端PEP001、PEP006、および場合によってはC末端HSC70結合ペプチドを有しない同じポリペプチドを使用して一連のポリペプチドを生成した。使用したペプチドを以下の表7に示す。ポリペプチドを合成し、複合体形成を実施し、SECデータを上述の実施例6.1.1に記載の方法に従って分析した。

40

【0294】

【表 7】

表 7. ポリペプチド

ペプチド の名称	配列	配列番号：
PEP165	AKFVAAWTLKAAA	184
PEP166	AKFVAAWTLKAAAFFRKNLLRLTG	185
PEP167	AKFVAAWTLKAAAFFRKNWLRLTW	186
PEP168	PLLPFYPPDEALEIGLELNSSALPTE	187
PEP169	PLLPFYPPDEALEIGLELNSSALPTEFFRKNLLRLTG	188
PEP170	PLLPFYPPDEALEIGLELNSSALPTEFFRKNWLRLTW	189
PEP171	EHIHRAGGLFVADAIQVGFRIGKHF	190
PEP172	EHIHRAGGLFVADAIQVGFRIGKHF FFRKNLLRLTG	191
PEP173	EHIHRAGGLFVADAIQVGFRIGKHF FFRKNWLRLTW	192
PEP174	DKPLRRNNSYTSYIMAICGMPLDSFRA	193
PEP175	DKPLRRNNSYTSYIMAICGMPLDSFRAFFRKNLLRLTG	194
PEP176	DKPLRRNNSYTSYIMAICGMPLDSFRAFFRKNWLRLTW	195
PEP177	EVIQTSKYMRDVIAIESAWLLELAPH	196
PEP178	EVIQTSKYMRDVIAIESAWLLELAPH FFRKNLLRLTG	197
PEP179	EVIQTSKYMRDVIAIESAWLLELAPH FFRKNWLRLTW	198
PEP180	VILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTPP	199
PEP181	VILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTPPFFRKNLLRLTG	200
PEP182	VILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTPPFFRKNWLRLTW	201

【0295】

図 4 A は、5つの異なるペプチドの複合体形成パーセントを示すグラフであり、5つの異なるペプチドのそれぞれが、C末端 PEP001、C末端 PEP006を含んだか、またはC末端 HSC70 結合ペプチドを含まなかった。図 4 B は、6つの異なるペプチドの複合体形成パーセントを示すグラフであり、6つの異なるペプチドのそれぞれが、C末端 PEP001、またはC末端 PEP006のいずれかを含んだ。

【0296】

6. 2 実施例 2：HSP 結合ペプチドによる細胞性免疫の増強

この実施例は、2つの動物モデルでHPV E6-E7 ペプチドと PEP001 または PEP006 とを含むポリペプチドの免疫原性と腫瘍抑制活性を示す。

【0297】

6. 2. 1 HSP 結合ペプチドによる抗原性ペプチド免疫原性の増加

この実施例では、PEP001 もしくは PEP006 に連結しているか、または HSP

結合ペプチドに結合していない免疫原性HPV E6またはE7ペプチドをそれぞれ含む4つのポリペプチドのプールの免疫原性を、免疫原性動物モデルで分析した。

【0298】

簡潔に述べると、表8に示すアミノ酸配列を有する4つのHPV E6またはE7ペプチドを単独で、またはPEP001またはPEP006に連結して化学合成し、25～100mg/mlの範囲の濃度で100%DMSOに溶解した。これらのHPV E6およびE7のペプチドは、C57BL/6マウスで免疫原性があることが知られていた（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Bartkowiak et al. (2015) Proc Natl Acad Sci U S A. 112 (38); およびManuri et al. (2007) Vaccine 25 (17): 3302-10を参照されたい）。PEP059およびPEP060の既知のエピトープ配列はRAHYNIVTF（配列番号78）であり、PEP061およびPEP062の既知のエピトープ配列はVYDFAFRDL（配列番号79）であった。

【0299】

【表8】

表8. HPVペプチドのアミノ酸配列*

ペプチド プール	ペプチドの 名称	説明	アミノ酸配列	配列番 号：
ネイキッ ドペプチ ド	PEP059	HPV16 E7 44-62 Q19D	QAEPDRAHYNIVTFCKCD	80
	PEP060	HPV16 E7 49-57 R9F	RAHYNIVTF	81
	PEP061	HPV16 E6 43-57 Q15L	QLLRREYDFAFRDL	82
	PEP062	HPV16 E6 49-58 V10C	VYDFAFRDLC	83
PEP001 連結ペプ チド	PEP067	C末端 PEP001 に連結さ れた PEP059	<u>QAEPDRAHYNIVTFCKCDE</u> <u>FRKNLLRLTG</u>	84
	PEP068	C末端 PEP001 に連結さ れた PEP060	RAHYNIVTFFRKNLLRLTG	85
	PEP069	C末端 PEP001 に連結さ れた PEP061	<u>QLLRREYDFAFRDL</u> <u>FFRKN</u> <u>LLRLTG</u>	86
	PEP070	C末端 PEP001 に連結さ れた PEP062	<u>VYDFAFRDLC</u> <u>FFRKNLLRLT</u> <u>G</u>	87
PEP006 連結ペプ チド	PEP063	C末端 PEP006 に連結さ れた PEP059	<u>QAEPDRAHYNIVTFCKCDE</u> <u>FRKNWLRLTW</u>	88
	PEP064	C末端 PEP006 に連結さ れた PEP060	RAHYNIVT <u>FFRKNWLRLT</u> <u>W</u>	89
	PEP065	C末端 PEP006 に連結さ れた PEP061	<u>QLLRREYDFAFRDL</u> <u>FFRKN</u> <u>WLRLTW</u>	90
	PEP066	C末端 PEP006 に連結さ れた PEP062	<u>VYDFAFRDLC</u> <u>FFRKNWLRLT</u> <u>W</u>	91

*ポリペプチドのPEP001およびPEP006配列には下線が付されている

【0300】

組換えヒトHsc70 (rhHsc70) タンパク質は、rhHsc70を発現するE. coli から、弱陰イオン性Qセファロースカラム、ATPアガロースアフィニティークラム、およびDEAE-FF弱陰イオン交換カラムを逐次的に使用するクロマトグラフィーによって精製した。精製したrhHsc70タンパク質を、0.01%ポリソルベート20を添加した濾過PBSで希釈した。

【0301】

ワクチン調製のために、4つのポリペプチドの等モルプールを75%DMSO中で総濃度320 μ Mで調製した。精製したrhHsc70タンパク質を37°Cで30分間プレインキュベートし、ポリペプチドプールをrhHsc70タンパク質溶液に2:1または1:1のモル比で添加して、rhHsc70タンパク質濃度が0.5 mg/mlになるようにした。混合物を37°Cで1時間インキュベートし、0.8 μ mと0.2 μ mのフィルターを通して逐次的に濾過した。次いで、混合物を氷上に30分間置き、-80°Cで保存した。

【0302】

ワクチン接種のために、ジャクソン研究所から購入した6週齢のメスC57BL/6Jマウスを、特定病原体除去環境で維持した。マウスはワクチンの皮下注射によって免疫化された。各注射は、ペプチドプール(1:1比の場合には0.42 nmol、または2:1比の場合には0.84 nmol)と複合体形成したHsc70(約0.42 nmol)を合計で30 μ g含み、BioXcell InVivoPure pH7.0希釈緩衝液中で最終容量200 μ lまで希釈した10 μ gのQS-21 Stimulon(登録商標)を補充していた。(Hsc70との複合体を含まない)遊離ペプチドグループ内の各注射については、4つのペプチドの等モルプールは、アジュバントQS-21 STIMULON(登録商標)10 μ gを補充した10 nmolの総濃度で、0.1%ポリソルベート20を含む濾過PBSで最終容量200 μ lまで希釈した。最初の免疫の1週間後、同量のワクチンを含む追加免疫用量を各マウスに皮下注射した。

【0303】

2回目の免疫の1週間後、IFN γ ELISpotアッセイを実施した。簡潔に述べると、免疫したマウスを安楽死させ、脾細胞を穏やかに単離し、そして各マウス由来の $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 生細胞は、予めマウスIFN γ 捕捉抗体でコーティングしたプレート上に播種した。ネイキッドペプチド(PEP059-062)を使用して、細胞を一晩再刺激した。細胞を溶解により除去し、捕捉抗体に結合したIFN γ を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合した検出抗体を使用して検出した。各ウェルのIFN γ 産生細胞の数を表す各ウェルのスポットの数は、CTL S6 ImmunoSpot(登録商標)アナライザーとソフトウェアを使用してカウントされた。

【0304】

図5Aに示すように、Hsc70と複合体形成したPEP001またはPEP006の連結ペプチドを含むHPVワクチンは、ネイキッドHPVペプチドと比較して免疫原性の増加を示した。これらの特定のHPVペプチドでは、Hsc70と複合体を形成したPEP006連結ペプチドを含むワクチンは、使用した条件下で、Hsc70と複合体を形成したPEP001連結ペプチドを含むワクチンよりも高い免疫原性を示した。

【0305】

PEP001およびPEP006を含むワクチンの免疫原性を、同じペプチド用量でネイキッドペプチドを使用するワクチンと比較するために、Hsc70が存在せず、遊離ペプチドの量が2:1の比率の群と1:1の比率の群でそれぞれ0.84 nmolと0.42 nmolであったことを除いて上述と同じ手順を用いて追加の実験を実施した。

【0306】

図5Bに示すように、Hsc70と複合体形成したPEP001またはPEP006の連結ペプチドを含むHPVワクチンは、1:1および2:1のモル比でHsc70と複合体形成した同等用量のネイキッドペプチドよりも多くの数のIFN γ 産生脾細胞を誘発し

た。H s c 7 0 と複合体形成した P E P 0 0 1 および P E P 0 0 6 の連結ペプチドを含むワクチンも、1 : 1 および 2 : 1 のモル比で H s c 7 0 と複合体を形成していない同等量の遊離ペプチドよりも大きな応答を誘発した。これらの特定の H P V ペプチドでは、H s c 7 0 と複合体を形成した P E P 0 0 6 連結ペプチドを含むワクチンは、使用した条件下で、H s c 7 0 と複合体を形成した P E P 0 0 1 連結ペプチドを含むワクチンよりも高い免疫原性を示した。

【0307】

関連する実験では、3つの異なる M C 3 8 ペプチドの3つのプールの免疫原性を、H P V E 6 または E 7 のペプチドについて上述の免疫原性動物モデルおよびプロトコルを使用して評価した。M C 3 8 ペプチドプールの詳細を表9に示す。図6に示すように、全てのペプチドプールはある程度の免疫応答を誘発した。

【0308】

【表9】

表9. M C 3 8 ペプチドワクチンプール*

ワクチン プール	ペプチドの 名称	説明	アミノ酸配列	配列番 号：
ネイキッ ドペプチ ド	PEP156	MC38 ペプチド	GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR	165
	PEP157	MC38 ペプチド	GIPVHLELASMTNMELMSSI VHQQVFPT	166
	PEP158	MC38 ペプチド	EAGQSLVISASIIVFNLELEGDYR	167
PEP001 連結ペプ チド	PEP159	C 末端 PEP001 に連結さ れた PEP156	GRVLELFRAAQLANDVVLQI MELCGATRF <u>FFRKNLLRLTG</u>	168
	PEP160	C 末端 PEP001 に連結さ れた PEP157	GIPVHLELASMTNMELMSSI VHQQVFPT <u>FFRKNLLRLTG</u>	169
	PEP161	C 末端 PEP001 に連結さ れた PEP158	EAGQSLVISASIIVFNLELEG DYR <u>FFRKNLLRLTG</u>	170
PEP006 連結ペプ チド	PEP162	C 末端 PEP006 に連結さ れた PEP156	GRVLELFRAAQLANDVVLQI MELCGATRF <u>FFRKNWLRLTW</u>	171
	PEP163	C 末端 PEP006 に連結さ れた PEP157	GIPVHLELASMTNMELMSSI VHQQVFPT <u>FFRKNWLRLTW</u>	172
	PEP164	C 末端 PEP006 に連結さ れた PEP158	EAGQSLVISASIIVFNLELEG DYR <u>FFRKNWLRLTW</u>	173

*ポリペプチドの P E P 0 0 1 および P E P 0 0 6 配列には下線が付されている。

【0309】

6. 2. 2 H S P 結合ペプチドによる腫瘍ワクチンの有効性の増加

この実施例は、T C 1 H P V 1 6 E 6 / E 7 同系マウス腫瘍モデルを使用して、セクション6. 2. 1に記載の H P V ワクチンの治療効果を示す。

【0310】

T C 1 細胞は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、L i n e t a l . (1 9 9 6) C a n c e r R e s . 5 6 (1) : 2 1 - 2 6 に開示されているように、腫瘍遺伝子 H R A S 、H P V 1 6 E 6 および E 7 を発現する。低継代 T C 1 細胞を無血清 P B S で洗浄し、 2×10^6 細胞 / m l の濃度で P B S に再懸濁した。使用の3日前に脇腹を剃った C 5 7 B L / 6 マウスに、剃った領域に $100 \mu l$ の容量の 2×10^5 の細胞を皮下注射した。ワクチンは、セクション6. 2. 1に記載の方法に従って調製した。ネイキッドペプチド、P E P 0 0 1 連結ペプチド、および P E P 0 0 6 連結ペプチドは、

それぞれ 1 : 1、4 : 1、および 2 : 1 の比率で r h H s c 7 0 タンパク質と複合体形成した。ワクチンは、T C 1 細胞移植後 5、1 0、および 1 5 日目にマウスに皮下投与された。

【0311】

腫瘍はノギスで 3 ~ 4 日ごとに測定された。腫瘍体積は、 $1/2 \times D \times d^2$ (式中、D は長軸、d は短軸である) の式を使用して計算された。腫瘍の非存在を 0 mm^3 として記録したのに対し、任意の触知できるが非測定可能な腫瘍を 0.5 mm^3 として推定した。腫瘍が 2000 mm^3 に達したとき、または潰瘍形成の際に、マウスを屠殺し、生存曲線をプロットした。

【0312】

図 7 A ~ 7 E に示すように、P E P 0 0 1 または P E P 0 0 6 に連結した H P V ペプチドを含むワクチンを注射したマウスの腫瘍増殖は、ネイキッド H P V ペプチドを含むワクチンまたは P B S を注射したマウスよりも遅かった。P E P 0 0 1 および P E P 0 0 6 に結連結した H P V ペプチドを含むワクチンの同様の治療効果が生存曲線で観察された (図 7 F)。

【0313】

r h H s c 7 0 と複合体形成した P E P 0 0 6 連結 H P V ペプチドを含むワクチンは、r h H s c 7 0 と複合体形成した P E P 0 0 1 連結 H P V ペプチドを含むワクチンよりも腫瘍増殖の抑制に強力であった (図 7 A、7 D、および 7 E)。特に、この違いは、これらの実験における死亡に対する実質的な保護に変換された (図 7 F)。

【0314】

6. 2. 3 P E P 0 0 6 と H P V ペプチドの新規セットを含む腫瘍ワクチンの有効性
この実施例は、H P V ペプチドの新規セットを含む H P V ワクチンの治療効果を示す。ワクチンに使用されるポリペプチドの配列を表 4 に示す。具体的には、P E P 0 7 3 および P E P 0 7 4 は、E V Y D F A F R D L (配列番号 9 2) のアミノ酸配列、マウス H - 2 D b および ヒト H L A - A * 2 4 : 0 2 エピトープを含んでいた。P E P 0 8 1 は、Y M L D L Q P E T (配列番号 9 3) および M L D L Q P E T T (配列番号 9 4) のアミノ酸配列、ヒト H L A - A * 0 2 : 0 1 エピトープを含んでいた。P E P 0 8 4 は、マウス H - 2 D b エピトープである R A H Y N I V T F (配列番号 7 8) のアミノ酸配列を含んでいた。P E P 0 8 6 は、ヒト H L A - A * 0 2 : 0 1 エピトープである L L M G T L G I V C (配列番号 9 5) のアミノ酸配列を含んでいた。各ペプチドは、P E P 0 0 6 のアミノ酸配列も含んでいた。

【0315】

ワクチンはセクション 6. 2. 2 に記載されている方法で調製され、H P V ペプチドプールのペプチド対 r h H s c 7 0 タンパク質の比率は 2 : 1 であった。ワクチンの有効性は、セクション 6. 2. 2 に記載したのと同じマウスモデルを使用して評価し、P E P 0 6 3 - 0 6 6 のプールを含むワクチンを比較基準として使用した。

【0316】

図 8 A および 8 B に示すように、H s c 7 0 および P E P 0 7 1 - 0 8 6 を含むワクチンは、T C 1 H P V 1 6 E 6 / E 7 同系腫瘍モデルの P B S 対照と比較して、腫瘍増殖を抑制し、生存率を改善した。

【0317】

6. 2. 4 P E P 0 0 6 を含む腫瘍ワクチンの 2 つの製剤の有効性
この実施例は、1 つは全てのペプチドが最初に D M S O で再構成され、もう 1 つは中性、酸性、または塩基性の水に溶解しないペプチドのみが最初に D M S O で再構成された、2 つの異なる製剤を使用するワクチンの治療効果を示す。H P V E 6 および E 7 腫瘍性タンパク質からの腫瘍関連抗原を含むワクチンで使用するポリペプチドの配列を表 4 に示す。具体的には、この実施例で使用されるワクチンは、1 6 個のペプチド P E P 0 7 1 ~ P E P 0 8 6 を含んだ。各ペプチドは、C 末端にアミノ酸配列 P E P 0 0 6 を含む。

【0318】

評価のためにワクチンの2つの製剤が生成された。製剤Aでは、16個のHPVペプチドのそれぞれが最初に100% DMSO中に粉末から再構成された。具体的には、ペプチドを25 mg/mlで100% DMSOに再懸濁し、次いで等モル量の各ペプチドを、最終プール濃度320 μMの滅菌水で希釈した75% DMSOの溶液にプールした（各ペプチドは

【数1】

≡

10

20 μM)。製剤Bでは、各ペプチドの溶解度を中性水で試験した後、必要に応じてpH調整済み（酸性、HClを含む、または塩基性、NaOHを含む）水で試験した。DMSOは、ペプチドが水溶性でない場合にのみ使用された。具体的には、16個のペプチドを中性水溶液、pH調整水、または100% DMSO（ペプチドを水溶液に再懸濁できなかった場合）に500 μMで可溶化した。次に、ペプチドを等量で混合して、500 μMのワーキングプールを作成した（各ペプチドは

【数2】

≡

20

31 μM)。続いて、両方のワクチン製剤について、ペプチドを水性緩衝液で、Hsc70との複合体形成に望ましい濃度に希釈した。

【0319】

HSC70の複合体形成のために、滅菌手順に続いて、rh-Hsc70を37℃で0.5時間インキュベートし、次いで、16のペプチドのプールと共に、総ペプチド：タンパク質の2：1モル比で37℃で1時間さらにインキュベートした。次いで、複合体を氷上で15分間インキュベートした。複合体を濾過し、等分した。

【0320】

C57BL/6マウス（n=13/群）の脇腹に 2×10^5 の生きたTC-1腫瘍細胞を皮下注射した後、E6およびE7のHPV腫瘍性タンパク質の全長をカバーする同じ16の重複する長い合成ペプチドを含むか、またはPBS対照である、ワクチンの2つの製剤で処理した。腫瘍接種後5、10、および15日目に、マウスに、腫瘍部位から対角線上にある上腕リンパ節領域の皮下で、（a）30 μgのHsc70ベースのワクチン（製剤Aもしくは製剤B）+10 μgのQS-21または（b）PBSを投与した。ワクチンの各用量には、QS-21アジュバントと共に30 μgのHsc70と約4 μgの総ペプチド（各ペプチド約250 ng）が含まれていた。注射は、Sub-Q 26 G×5 / 8インチの針を備えた1 mL BDシリンジを使用して実施された。

【0321】

腫瘍増殖動態および生存率をモニターした。腫瘍体積は、腫瘍接種後5日目から開始して、研究の3～4日ごとにノギスによって測定された。腫瘍の長さは、最長の直線距離に基づいていた。幅は、長さに垂直な最長の直線距離に基づいていた。腫瘍体積が2000 mm³に達したとき、マウスを安楽死させた。腫瘍体積（mm³）は、長さ×幅²×0.5として計算された。2つの腫瘍を持つマウスの場合、それぞれを個別に測定し、体積を合計した。腫瘍接種後5日目にマウスを各治療群にランダムに分配した。初期の測定可能な腫瘍のないマウスは研究から除外された。カプランマイヤー法とログランク検定（いずれかのワクチン製剤で処理したマウスの生存率対PBSで処理したマウスの生存率でp≤0.0001）を使用して、群あたり10匹のマウスの生存率を追跡した。腫瘍サイズを2～3日ごとに評価し、各群の平均腫瘍体積を時間の関数としてプロットした。

【0322】

30

40

50

PBSで処理した対照マウスでは腫瘍が急速に増殖した（図9Aおよび9B）。対照的に、いずれかのワクチン製剤で処理したマウスでは腫瘍増殖速度の有意な遅延が観察された（図9Aおよび9B）（PBSで処理したマウスの腫瘍増殖と比較した製剤Aで処理したマウスの腫瘍増殖** $p \leq 0.01$ 、PBSで処理したマウスの腫瘍増殖と比較した製剤Bで処理した腫瘍増殖マウス*** $p \leq 0.0001$ ：ウィルコクソン順位和検定）。個々のマウスの腫瘍増殖動態を時間の関数としてプロットした。PBSで処理したマウスと比較して、製剤Aまたは製剤Bのいずれかで処理したマウスでは、生存期間の延長が観察された（図9C）。

【0323】

TC-1腫瘍は、免疫編集および腫瘍によって発現されるエピトープの喪失によって引き起こされる可能性のある抗原標的療法に対する耐性表現型を発現することが知られており（Smahele et al., 2007）、これはおそらく、両方のワクチン製剤について約28日から開始する腫瘍の最終的な進行を説明する。まとめると、これらのデータは、HPV E6およびE7腫瘍性タンパク質等の腫瘍関連抗原に対する効率的なワクチン誘発免疫応答が有意な腫瘍制御および生存期間の延長につながる可能性があることを示す。

10

【0324】

6.3 実施例3：Hsc70結合ペプチドによるペプチド合成の改善

この例は、PEP001およびPEP006が合成中にペプチドの粗純度を改善する能力を示す。

20

【0325】

6.3.1 PEP001またはPEP006の付加によるOva抗原性ペプチドの粗純度の改善

ネイキッドまたはPEP001（PEP052、配列番号230、EVSGLEQLESIINFEEKLTEWTSSNVMEFFRKNLLRLTG）もしくはPEP006（PEP054、配列番号231、EVSGLEQLESIINFEEKLTEWTSSNVMEFFRKNWLRLTW）に連結されたEVSGLEQLESIINFEEKLTEWTSSNVME（PEP053、配列番号97）のアミノ酸配列を含むOva抗原性ペプチドは、セクション6.1.1に記載の方法で合成された。このOva抗原性ペプチドは、SIINFEEKL（配列番号96）のアミノ酸配列を有するMHC結合エピトープを含んでいた。ペプチド純度は、Chromelon7.0ソフトウェアパッケージに含まれているVanquish/Ultimate3000ユーザーガイドおよびData Explorerユーザーガイドに記載されている手順に従って、Vanquish BioanalyticalおよびUltimate3000 Dionexワークステーションを使用する逆相クロマトグラフィーによって決定された。

30

【0326】

アミノ酸残基の添加を繰り返した後、合成したペプチドを樹脂から切断し、1:1のアセトニトリル：水（v/v）に1mg/mLの濃度で溶解した。溶解した試料を、Phenomenex Luna C1810 μ m 4.6 $\times$ 250mmカラムを使用する分析HPLCで分析した。20 μ Lの体積の試料を注入し、表10の勾配に従って、移動相として溶液A（水中0.1%TFA）と溶液B（アセトニトリル中0.1%TFA）の混合物を使用して勾配溶出を行った。カラム温度は37 $\pm$ 5 $^{\circ}$ Cに維持された。ペプチドは、214nmおよび280nmの波長でのUV吸光度によって検出された。

40

【0327】

【表 10】

表 10. HPLC移動相の勾配表

時間 (分)	流量 (mL/分)	溶液A%	溶液B%	曲線
0	1	95	5	5
0.01	1	95	5	5
25	1	35	65	5
25.01	1	5	95	5
31	1	5	95	5
31	1	95	5	5
40	1	95	5	5

10

【0328】

溶出曲線では、各ピークは特定の保持時間を有するペプチドを表しており、ピーク下面積はこのペプチドの量を反映している。正しいペプチドのピークは、質量分析によって確認された。ペプチドの粗純度は、正しいペプチドのピーク下面積を曲線全体の下での総面積で割ったものとして計算された。

20

【0329】

図10Aに示すように、ネイキッドOvaペプチド（中央のパネル）には不均一なシグナルがあった。対照的に、Ova-PEP001（上のパネル）とOva-PEP006（下のパネル）の製剤は、予想される保持時間でほぼ単一のピークを示した。クロマトグラムの定量化により、Ova-PEP001およびOva-PEP006の粗純度が大幅に向上したことも示された（図10B）。この結果は、ペプチドが長いほど合成および精製が困難であるという一般的な規則に反しており、PEP001およびPEP006がペプチドの化学合成における粗純度を改善することを示唆していた。

30

【0330】

6. 3. 2 PEP006の付加による一連のペプチドの粗純度の改善

以下の表11に示す50のペプチドは、セクション6. 1. 1で記載した方法で合成した。この50ペプチドの群には、C末端PEP006ペプチド配列の付加を伴って、または伴わず（「ネイキッドペプチド」）に合成された25の固有のペプチド配列（A-Yとラベルする）が含まれている。ペプチドの純度は、上述のセクション6. 3. 1に記載した逆相クロマトグラフィーによって決定された。図11に示すように、PEP006ペプチド配列を付加すると、対応するネイキッドペプチドと比較して、大部分のペプチドの粗純度が向上した。試料が複雑なため、多くのペプチド分離は多次元であった。最大95%の標準的な逆相勾配では、C18カラムで3つのペプチドは検出されなかった。これらの3つのペプチドでは、勾配全体に積分する検出可能なピークはなく、粗純度はゼロとしてリストされた。3つのペプチドが検出されない原因として考えられるのは、C18カラムまたは保存バイアルへの試料の付着、および／または試料の溶液からの脱落等である。

40

【0331】

【表 1 1 - 1】

表 1 1. ペプチド

	ネイキッドペプチド配列			PEP006を含むペプチド配列		
	配列	ペプチド の名称	配列 番号:	配列	ペプチ ドの名 称	配列 番号:
A	KFPLILYLGMIAIVTVLYI SLGSLGYLQ	PEP105	114	KFPLILYLGMIAIVTVLYISLGSLGY LQFFRKNWLRLTW	PEP130	139
B	TMRGCGPCLRIAPSFSSM SNKYPQAVF	PEP106	115	TMRGCGPCLRIAPSFSSMSNKYPQA VFFFRKNWLRLTW	PEP131	140
C	RMKKENLMPREELARLFP NLPELIEIH	PEP107	116	RMKKENLMPREELARLFPNLPELIE IHFFRKNWLRLTW	PEP132	141
D	FSRTWIGIWSVLCFASTL FTVLTYLVD	PEP108	117	FSRTWIGIWSVLCFASTLFTVLTYL VDFFRKNWLRLTW	PEP133	142
E	TSLAIGTKSGYKLFSLSS VEQLDQVHG	PEP109	118	TSLAIGTKSGYKLFSLSSVEQLDQV HGFFRKNWLRLTW	PEP134	143
F	LFPTDCHSVPPHYTELLT FHSKEGTDH	PEP110	119	LFPTDCHSVPPHYTELLTFHSKEGT DHFFRKNWLRLTW	PEP135	144
G	PSRGSSSSSGYPVGVPVQ PVGSGGVQP	PEP111	120	PSRGSSSSSGYPVGVPVQVPGSGGV QPFFRKNWLRLTW	PEP136	145
H	LSPGAAAPSGWALAPLGD TMKIYMELQ	PEP112	121	LSPGAAAPSGWALAPLGD TMKIYME LQFFRKNWLRLTW	PEP137	146
I	ELYRKLRLRSQSVRFQCG LLENSAHLI	PEP113	122	ELYRKLRLRSQSVRFQCGLLENSAH LIFFRKNWLRLTW	PEP138	147
J	AQVIILNHPGQISTGYAP VLDCHTAHI	PEP114	123	AQVIILNHPGQISTGYAPVLDCHTA HIFFRKNWLRLTW	PEP139	148
K	PVQLWVSATPPAGSPVRA MAIYKKSQH	PEP115	124	PVQLWVSATPPAGSPVRAMAIYKKS QHFFRKNWLRLTW	PEP140	149
L	NAFNPLNASASLPPAAMP ITTADGRSD	PEP116	125	NAFNPLNASASLPPAAMPITTADGR SDFFRKNWLRLTW	PEP141	150
M	VGSVAGNKLLRAAWRRAS LAATSLALG	PEP117	126	VGSVAGNKLLRAAWRRASLAATSLA LGFFRKNWLRLTW	PEP142	151
N	AETSLLEAGASAASTAAA LENLQVEAS	PEP118	127	AETSLLEAGASAASTAAALENLQVE ASFFRKNWLRLTW	PEP143	152
O	NSVLQTLQMRAAKSSVA PSREELLGT	PEP119	128	NSVLQTLQMRAAKSSVAPSREELL GTFFRKNWLRLTW	PEP144	153
P	DFTHPEAREWFQGLLRRL RLRYNVTSTF	PEP120	129	DFTHPEAREWFQGLLRRLRLRYNVT SFFFRKNWLRLTW	PEP145	154
Q	KKHDVRSIIGSPGLPFP LHPLDIMAD	PEP121	130	KKHDVRSIIGSPGLPFPALHPLDIM ADFFRKNWLRLTW	PEP146	155
R	AGRPRPVLRSVNSLEPSQ VIFCNRSRPR	PEP122	131	AGRPRPVLRSVNSLEPSQVIFCNRS PRFFRKNWLRLTW	PEP147	156
S	TFFASDNAVDITTLTNSC LSNSDHSRD	PEP123	132	TFFASDNAVDITTLTNSCLNSDHS RDFFRKNWLRLTW	PEP148	157

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

T	TLLRSSYVAQVPLLTLCT RGPPEEDAP	PEP124	133	TLLRSSYVAQVPLLTLCTRGPPPEED APFFRKNWLRLTW	PEP149	158
U	MFSFNMFDPHPIPLVFQNR FSTQYR	PEP125	134	MFSFNMFDPHPIPLVFQNRFTQYRF FRKNWLRLTW	PEP150	159
V	ATAAGSSTISQDTIHLTS GPVSALASG	PEP126	135	ATAAGSSTISQDTIHLTSGPVSALA SGFFRKNWLRLTW	PEP151	160
W	ACSSSYNSAVMESSSVNV SMVHSSSKE	PEP127	136	ACSSSYNSAVMESSSVNVSMVHSSS KEFFRKNWLRLTW	PEP152	161
X	VLQEWKACDKLYDVATMR TTQLTYSME	PEP128	137	VLQEWKACDKLYDVATMRITQLTYS MEFFRKNWLRLTW	PEP153	162
Y	RDPFRVRASAALLNKLYA MGLVPTRGS	PEP129	138	RDPFRVRASAALLNKLYAMGLVPTR GSFFRKNWLRLTW	PEP154	163

10

【0332】

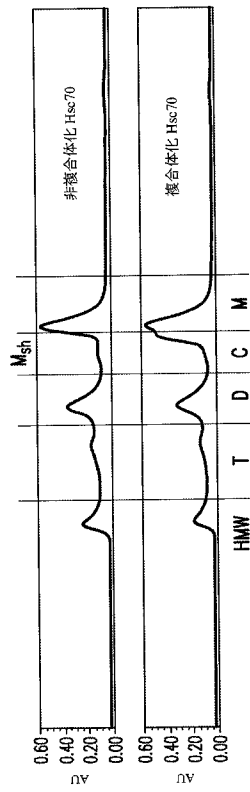
本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲が限定されるものではない。実際、説明されたものに加えて、本発明の様々な修正が、上述の説明および添付の図面から当業者に明らかになるであろう。そのような修正は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

20

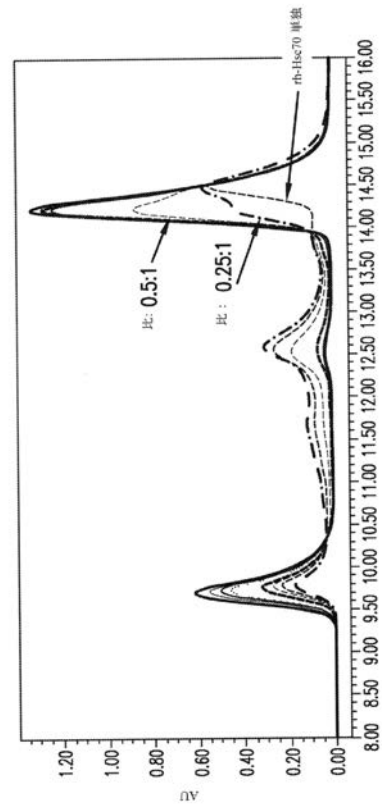
【0333】

本明細書に引用される全ての参考文献（例えば、出版物または特許または特許出願）は、各個々の参考文献（例えば、出版物または特許または特許出願）が具体的かつ個々に全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれると示されているのと同程度に、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内にある。

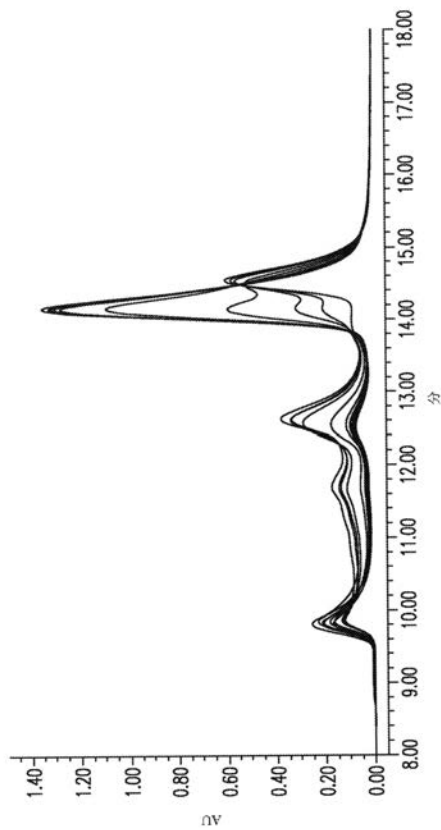
【図 1】



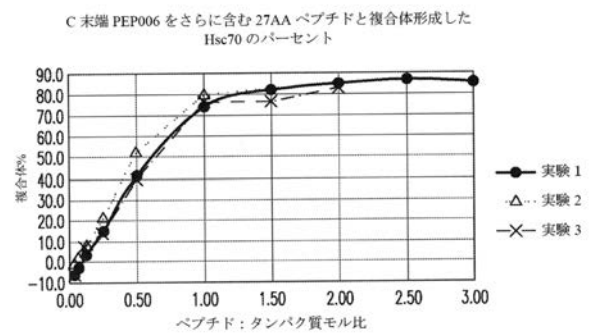
【図 2】



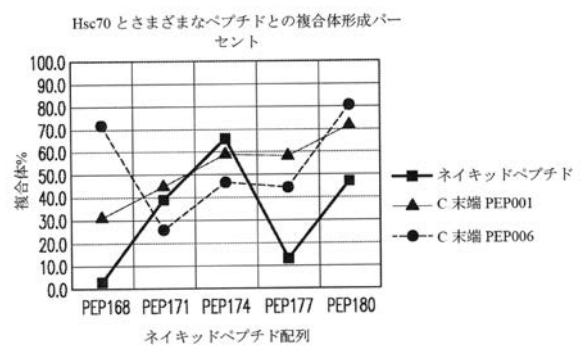
【図 3 A】



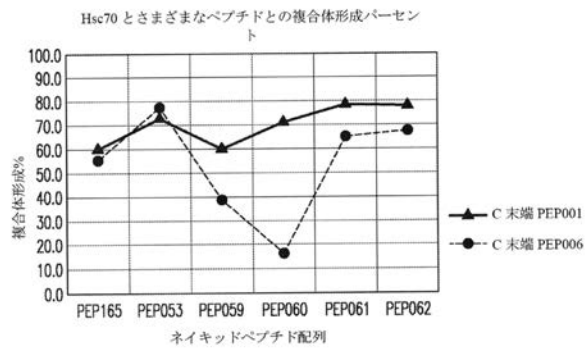
【図 3 B】



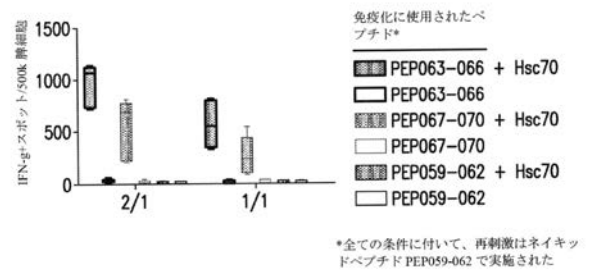
【図 4 A】



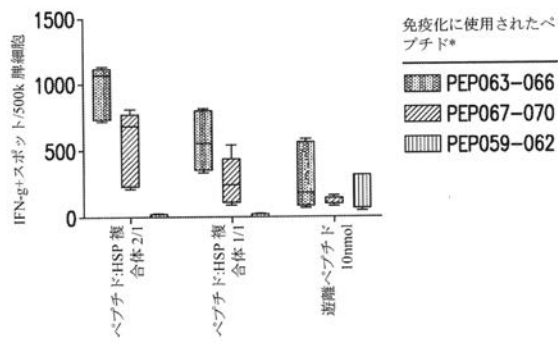
【図 4 B】



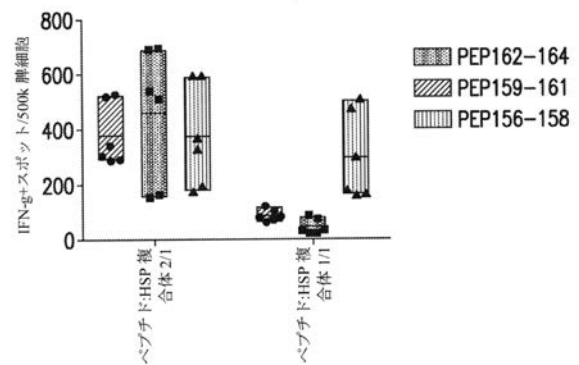
【図 5 B】



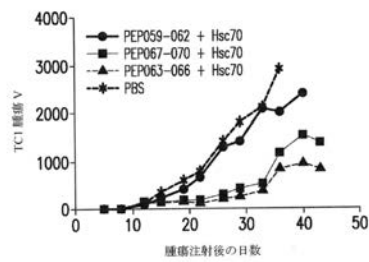
【図 5 A】



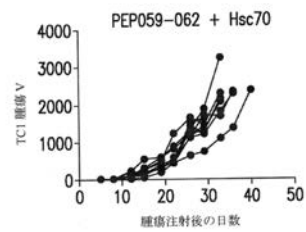
【図 6】



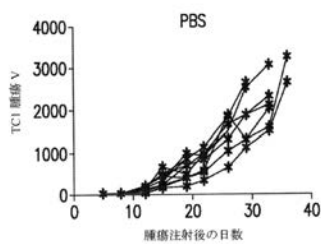
【図 7 A】



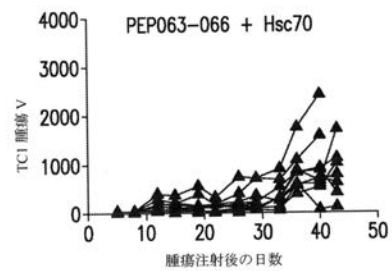
【図 7 C】



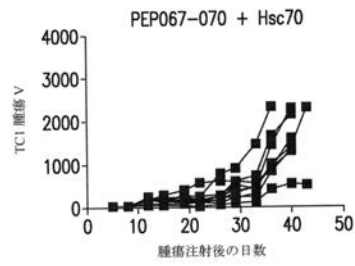
【図 7 B】



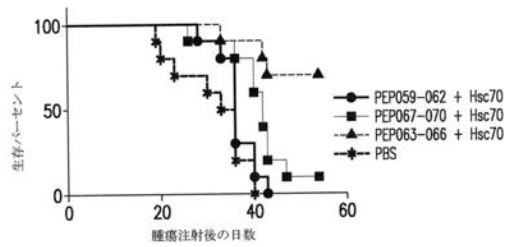
【図 7 D】



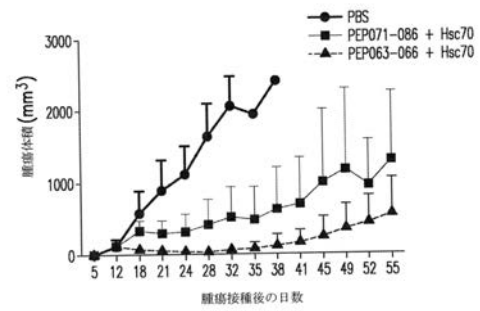
【図 7 E】



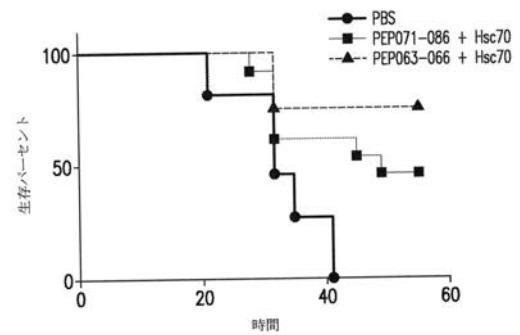
【図 7 F】



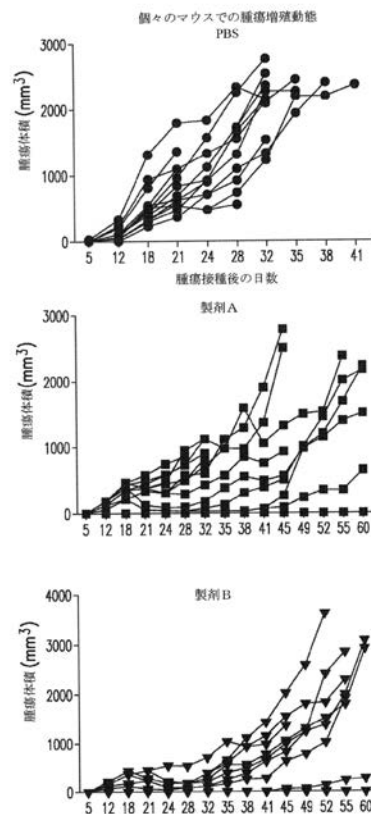
【図 8 A】



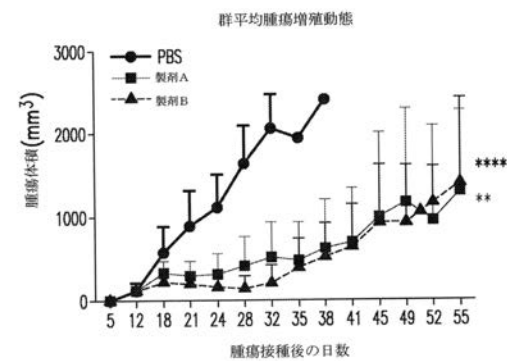
【図 8 B】



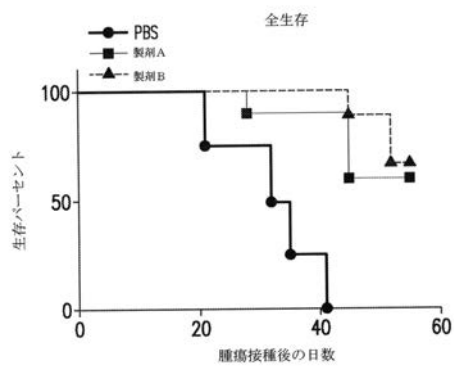
【図 9 A】



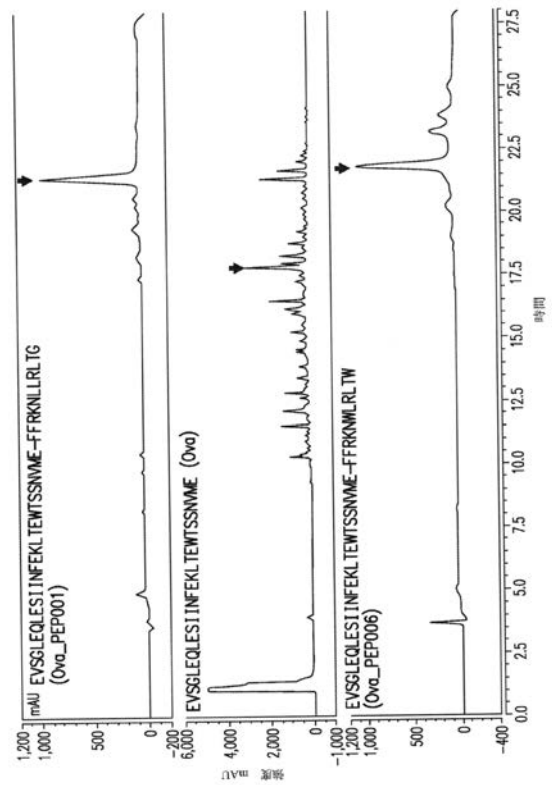
【図 9 B】



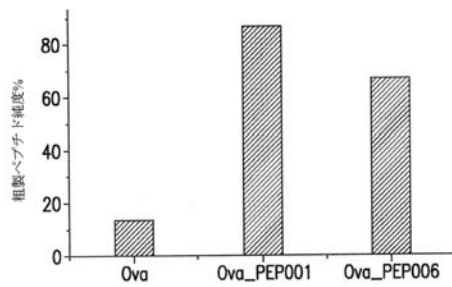
【図 9 C】



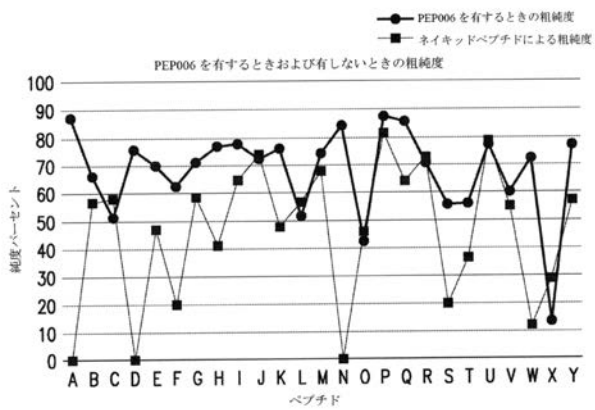
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11】



【配列表】

2021522239000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和2年2月26日 (2020.2.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0019

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0019】

(e) $FFRKNWX_1X_2X_3X_4X_5$ (配列番号 233) (式中、 X_1 は、L または I であり、 X_2 は、L、R、または K であり、 X_3 は、L または I であり、 X_4 は、T、L、F、K、R、または W であり、 X_5 は、ポリペプチドの N 末端にある W または K である)。特定の実施形態では、ポリペプチドは、ポリペプチドの N 末端に、配列番号 30～37 および 216～229 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0308

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0308】

【表 9】

表9. MC38 ペプチドワクチンプール*

ワクチンプール	ペプチドの名称	説明	アミノ酸配列	配列番号:
ネイキッドペプチド	PEP156	MC38 ペプチド	GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR	<u>175</u>
	PEP157	MC38 ペプチド	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT	<u>176</u>
	PEP158	MC38 ペプチド	EAGQSLVISASIIVFNLLELEGDYR	<u>177</u>
PEP001 連結ペプチド	PEP159	C 末端 PEP001 に連結された PEP156	GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR <u>FFRKNLLRLTG</u>	<u>178</u>
	PEP160	C 末端 PEP001 に連結された PEP157	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT <u>FFRKNLLRLTG</u>	<u>179</u>
	PEP161	C 末端 PEP001 に連結された PEP158	EAGQSLVISASIIVFNLLELEGDYR <u>FFRKNLLRLTG</u>	<u>180</u>
PEP006 連結ペプチド	PEP162	C 末端 PEP006 に連結された PEP156	GRVLELFRAAQLANDVVLQIMELCGATR <u>FFRKNWLRLTW</u>	<u>181</u>
	PEP163	C 末端 PEP006 に連結された PEP157	GIPVHLELASMTNMELMSSIVHQQVFPT <u>FFRKNWLRLTW</u>	<u>182</u>
	PEP164	C 末端 PEP006 に連結された PEP158	EAGQSLVISASIIVFNLLELEGDYR <u>FFRKNWLRLTW</u>	<u>183</u>

*ポリペプチドの PEP001 および PEP006 配列には下線が付されている。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/029112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/47 C07K14/005 C07K14/19 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)

C07K 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, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/071457 A2 (MOJAVE THERAPEUTICS INC [US]; FLETCHNER JESSICA ET AL.) 26 August 2004 (2004-08-26) abstract paragraph [0101] - paragraph [0104]; claims 1-20; figures 1-7; example 5 ----- -/--	1-9, 12-26, 31-38, 46,47, 50-56, 64-97, 100-126

☒ 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

19 September 2019

Date of mailing of the international search report

20/11/2019

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

Gurdjian, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/029112

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/22761 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; ROTHMAN JAMES E [US] ET AL.) 14 May 1999 (1999-05-14) abstract page 13, paragraph 2 page 30, paragraph 2; claims 1,14,18; examples 7,8; sequence 314 -----	1-9, 12-26, 31-38, 46,47, 50-56, 64-97, 100-126
Y	WO 2012/126118 A1 (ATLANTIC CANCER RES INST [CA]; NEW ENGLAND PEPTIDES LLC [US] ET AL.) 27 September 2012 (2012-09-27) abstract; claims 1,11,27,28 -----	1-9, 12-26, 31-38, 46,47, 50-56, 64-97, 100-126
A	WO 01/52791 A2 (UNIV CONNECTICUT HEALTH CT [US]) 26 July 2001 (2001-07-26) abstract; claim 1 -----	1-9, 12-26, 31-38, 46,47, 50-56, 64-97, 100-126
A	PETER O BAUER ET AL: "Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 28, no. 3, 28 February 2010 (2010-02-28), pages 256-263, XP055243039, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.1608 abstract; figure 1 -----	1-9, 12-26, 31-38, 46,47, 50-56, 64-97, 100-126

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/029112**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).

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.:
1-9(completely); 12-26, 31-126(partially)

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/ US2019/ 029112

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-9(completely); 12-26, 31-126(partially)

A polypeptide comprising a heat shock protein (HSP) binding peptide comprising the amino acid sequences [WF]L[RK]LT[WFG] (seq.id.1), N[WF]L[RK]LT[WFG] (seq.id.2), WL[RK]LT[WG] (seq.id.3), NWL[RK]LT[WG] (seq.id.4), or NW[LI][LRK][LI][TLFKRW][WK] (seq.id.232), corresponding composition with a stress protein, their use in reducing a cellular immune response, kit and method of making a vaccine.

2. claims: 10, 11(completely); 12-26, 31-126(partially)

A polypeptide comprising a heat shock protein (HSP) binding peptide comprising the amino acid sequence NLLRWTG (seq.id.205), corresponding composition with a stress protein, their use in reducing a cellular immune response, kit and method of making a vaccine.

3. claims: 27-30(completely); 31-126(partially)

A polypeptide comprising a heat shock protein (HSP) binding peptide and human papillomavirus (HPV) antigenic peptide comprising the amino acid sequences seq.id.38-53, corresponding composition with a stress protein, their use in reducing a cellular immune response, kit and method of making a vaccine.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/029112

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004071457 A2	26-08-2004	AU 2004212003 A1 CA 2520591 A1 EP 1622563 A2 JP 2006523185 A US 2005202033 A1 WO 2004071457 A2	26-08-2004 26-08-2004 08-02-2006 12-10-2006 15-09-2005 26-08-2004
WO 9922761 A1	14-05-1999	AU 761432 B2 CA 2308299 A1 EP 1027070 A1 JP 2002501722 A US 2003134787 A1 US 2003166530 A1 WO 9922761 A1	05-06-2003 14-05-1999 16-08-2000 22-01-2002 17-07-2003 04-09-2003 14-05-1999
WO 2012126118 A1	27-09-2012	BR 112013023978 A2 CA 2830772 A1 EP 2688904 A1 US 2013243802 A1 WO 2012126118 A1	06-09-2016 27-09-2012 29-01-2014 19-09-2013 27-09-2012
WO 0152791 A2	26-07-2001	AU 2962901 A US 2001034042 A1 WO 0152791 A2	31-07-2001 25-10-2001 26-07-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K	38/08
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
			A 6 1 K	39/395
			A 6 1 K	39/395
			A 6 1 K	39/39

(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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 ベンジャミン・マキシム・モーリン
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 1 4 4・サマーヴィル・ゴーハム・ストリート・1 8・
アパートメント・2

(72)発明者 ビシュヌ・ジョシー
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・0 2 4 2 1・レキシントン・キャプテン・パーカー・アーム
ス・9・アパートメント・# 0 2

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA07 AA19 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA23 BA44
CA53 MA02 MA52 MA66 NA05 NA14 ZB092 ZB261 ZB321 ZC751
4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE03 EE06 FF12 FF14 GG01
GG08
4H045 AA10 AA20 AA30 BA14 BA41 CA01 CA40 DA86 EA28 EA31
FA34 GA25