

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5728717号
(P5728717)

(45) 発行日 平成27年6月3日(2015.6.3)

(24) 登録日 平成27年4月17日(2015.4.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C O 7 K 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0784 (2010.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 7/06

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C 1 2 N 5/00 2 O 2 L

C 1 2 N 5/00 2 O 2 M

請求項の数 17 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-535341 (P2011-535341)
 (86) (22) 出願日 平成22年2月17日(2010.2.17)
 (65) 公表番号 特表2012-517799 (P2012-517799A)
 (43) 公表日 平成24年8月9日(2012.8.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/001005
 (87) 国際公開番号 W02010/095428
 (87) 国際公開日 平成22年8月26日(2010.8.26)
 審査請求日 平成25年2月6日(2013.2.6)
 (31) 優先権主張番号 61/153,408
 (32) 優先日 平成21年2月18日(2009.2.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 FOXM1ペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

H L A - A 2 4 拘束性の細胞傷害性Tリンパ球(C T L)誘導能を有する15アミノ酸未満の単離されたペプチドであって、

S E Q I D N O : 2、7、8、16、25、30、および31

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたペプチド。

【請求項2】

S E Q I D N O : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、単離されたペプチド。

【請求項3】

H L A - A 2 4 拘束性の細胞傷害性Tリンパ球(C T L)誘導能を有する15アミノ酸未満の単離されたペプチドであって、1個または2個のアミノ酸が置換された、S E Q I D N O : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記置換が以下の(a)および(b)のいずれかまたは両方である、ペプチド:

(a) S E Q I D N O : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列におけるN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている(ただしS E Q I D N O : 2、16および31のアミノ酸配列についてはチロシンへの置換を除き、S E Q I D N O : 8のアミノ酸配列についてはフェニルア

ラニンへの置換を除く) ; ならびに

(b) SEQ ID NO : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列におけるC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている (ただしSEQ ID NO : 2および31のアミノ酸配列についてはフェニルアラニンへの置換を除き、SEQ ID NO : 7、25、および30のアミノ酸配列についてはロイシンへの置換を除き、SEQ ID NO : 8および16のアミノ酸配列についてはイソロイシンへの置換を除く)。

【請求項4】

H L A - A 2 4 拘束性の細胞傷害性Tリンパ球 (C T L) 誘導能を有する単離されたペプチドであって、1個または2個のアミノ酸が置換された、SEQ ID NO : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列からなり、前記置換が以下の (a) および (b) のいずれかまたは両方である、ペプチド :

(a) SEQ ID NO : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列におけるN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている (ただしSEQ ID NO : 2、16および31のアミノ酸配列についてはチロシンへの置換を除き、SEQ ID NO : 8のアミノ酸配列についてはフェニルアラニンへの置換を除く) ; ならびに

(b) SEQ ID NO : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列におけるC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸で置換されている (ただしSEQ ID NO : 2および31のアミノ酸配列についてはフェニルアラニンへの置換を除き、SEQ ID NO : 7、25、および30のアミノ酸配列についてはロイシンへの置換を除き、SEQ ID NO : 8および16のアミノ酸配列についてはイソロイシンへの置換を除く)。

【請求項5】

ノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項1 ~ 4 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

【請求項6】

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

【請求項7】

細胞表面上のH L A - A 2 4 と請求項1 ~ 5 いずれか一項記載のペプチドとの間で形成された複合体を認識し得るC T Lを誘導するための組成物であって、請求項1 ~ 5 のいずれか一項記載の1種もしくは複数種のペプチド、または請求項6記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む組成物。

【請求項8】

H L A - A 2 4 を有する対象においてがんの治療および/もしくは予防のための、ならびに/または術後のその再発の予防のための薬学的組成物であって、請求項1 ~ 5 のいずれか一項記載の1種もしくは複数種のペプチド、または請求項6記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む薬学的組成物。

【請求項9】

がんを治療するために製剤化される、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

C T L 誘導能を有する抗原提示細胞 (A P C) をインビトロで誘導するための方法であって、以下の段階の1つを含む方法 :

(a) H L A - A 2 4 を有するA P C を、請求項1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとインビトロで接触させる段階 ; および

(b) 請求項1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを、

10

20

30

40

50

H L A - A 2 4 を有する A P C に導入する段階。

【請求項 1 1】

以下の段階の少なくとも 1 つを含む方法のいずれかによって、C T L をインビトロで誘導するための方法：

(a) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A - A 2 4 と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体をその表面上に提示する A P C と共培養する段階；

(b) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A - A 2 4 と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体をその表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

(c) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドと H L A - A 2 4 の H L A 分子との複合体に結合する T 細胞受容体 (T C R) サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、T 細胞に導入する段階。

10

【請求項 1 2】

H L A - A 2 4 と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体をその表面上に提示する、単離された A P C。

【請求項 1 3】

請求項 1 0 記載の方法によって誘導される、請求項 1 2 記載の A P C。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドを標的とする、単離された C T L であって、細胞表面上の H L A - A 2 4 と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を認識し得る C T L。

20

【請求項 1 5】

請求項 1 1 記載の方法によって誘導される、請求項 1 4 記載の C T L。

【請求項 1 6】

H L A - A 2 4 を有する対象においてがんに対する免疫応答を誘導するための組成物であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチド、または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の 1 種もしくは複数種のペプチド、または請求項 6 記載の 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、H L A - A 2 4 を有する抗原提示細胞を誘導するための剤。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は、2009年2月18日に提出された米国仮特許出願第61/153,408号の恩典を主張し、その内容の全体は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、生物学の分野、より具体的にはがん治療の分野に関連する。特に本発明は、がんワクチンとして極めて有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍を治療および予防するための薬物に関連する。

40

【背景技術】

【0003】

C D 8 陽性 C T L は、主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) クラス I 分子上の腫瘍関連抗原 (T A A) 由来のエピトープペプチドを認識し、その後、腫瘍細胞を殺傷することが実証されている。T A A の最初の例としてメラノーマ抗原 (M A G E) ファミリーが発見されて以来、他の多くの T A A が、免疫学的アプローチによって発見されており (非特許文献 1 : Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80; 非特許文献 2 : Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9)、この T A A のいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発の過程にある。

【0004】

50

強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導する新規 T A A の同定により、様々な種類のがんにおけるペプチドワクチン接種戦略のさらなる発展および臨床的適用が保証される（非特許文献 3 : Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55; 非特許文献 4 : Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42; 非特許文献 5 : Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9; 非特許文献 6 : van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14; 非特許文献 7 : Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8; 非特許文献 8 : Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72; 非特許文献 9 : Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66; 非特許文献 10 : Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94）。これまでに、これらの腫瘍関連抗原由来ペプチドを用いた臨床試験がいくつか報告されている。残念ながらこれまでのところ、これらのがんワクチン試験では低い客観的奏効率しか観察できていない（非特許文献 11 : Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80; 非特許文献 12 : Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42; 非特許文献 13 : Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15）。

【 0 0 0 5 】

免疫療法の標的としての、好適な T A A は、がん細胞の増殖および生存に不可欠であり、そのわけは、そのような T A A を用いることで、治療によって誘発される免疫選択の結果としての T A A の欠失、変異、または下方制御に起因し得るがん細胞の免疫回避の詳説されているリスクが、最小限に抑えられ得るためである。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【 非特許文献 13 】 Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、免疫療法の適切な標的の発見に一部基づいている。T A A は概して免疫系にとって「自己」として認識され、したがって免疫原性がない場合が多いため、適切な標的を発見することは極めて重要である。上記したように、F O X M 1 (G e n B a n k アクセッション番号 N M _ 2 0 2 0 0 2 . 1 (S E Q I D N O : 3 3) の遺伝子によってコードされる S E Q I D N O : 3 4) が、急性骨髄性白血病 (A M L)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、慢性骨髄性白血病 (C M L)、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、小細胞肺癌 (S C L C)、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍などのがん組織において上方制御されると同定された。したがって、F O X M 1 は免疫療法の候補標的である。

【 0 0 0 8 】

本発明は、F O X M 1 に特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) を誘導する能力を有する、F O X M 1 の特異的エピトープペプチドの同定に少なくとも一部基づいている。以

下に詳述するように、健常ドナーから得られた末梢血単核細胞（P B M C）を、F O X M 1由来のH L A - A * 2 4 0 2 結合候補ペプチドを用いて刺激した。次に、各候補ペプチドをパルスしたH L A - A 2 4 陽性標的細胞に対する特異的細胞傷害性を有するC T L株を樹立した。これらの結果から、これらのペプチドが、F O X M 1を発現する細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るH L A - A 2 4 拘束性エピトープペプチドであることが実証される。これらの結果から、F O X M 1は免疫原性が強く、そのエピトープは腫瘍免疫療法の有効な標的であることが実証される。

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の目的は、F O X M 1（S E Q I D N O : 3 4）またはその断片である、H L A 抗原に結合する単離されたペプチドを提供することである。本発明のペプチドは、C T L 誘導能を有すると予測される。それらは、C T L をエキスピボで誘導するために用いることができ、またはA M L、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍などのがんに対する免疫応答を誘導するために対象に投与することができる。好ましくは、ペプチドはノナペプチドまたはデカペプチドであり、より好ましくは、S E Q I D N O : 2、7、8、1 6、2 5、3 0、および3 1の群より選択されるアミノ酸配列からなり、強力なC T L 誘導能を示す。

【 0 0 1 0 】

本発明は、改変されたペプチドが元のC T L 誘導能を保持する限り、1 個、2 個、またはそれ以上のアミノ酸が置換または付加されている、S E Q I D N O : 2、7、8、1 6、2 5、3 0、および3 1のアミノ酸配列を有する改変ペプチドを意図する。

【 0 0 1 1 】

さらに本発明は、本発明のペプチドのいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。これらのポリヌクレオチドは、本発明のペプチドと同様に、C T L 誘導能を有する抗原発現細胞（A P C）を誘導または調製するために用いることができ、またはがんに対する免疫応答を誘導するために対象に投与することができる。

【 0 0 1 2 】

対象に投与した場合、本発明のペプチドはA P Cの表面上に提示され、その後、各ペプチドを標的とするC T Lを誘導する。したがって、本発明の1つの局面は、C T Lを誘導するための、本発明の任意のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む組成物または物質を提供することである。さらに、該ペプチドまたはポリヌクレオチドのいずれかをを含む組成物または物質は、A M L、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍などのがんを治療および/もしくは予防するために、ならびに/または術後のその再発を予防するために用いることができる。したがって、本発明のさらに別の目的は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドのいずれかをを含む、がんの治療および/もしくは予防のための、ならびに/または術後のその再発の予防のための薬学的な組成物または物質を提供することである。本発明の薬学的な組成物または物質は、有効成分として、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの代わりに、またはそれに加えて、本発明のペプチドのいずれかを提示するA P Cまたはエキソソームを含んでもよい。

【 0 0 1 3 】

本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを用いて、例えば、対象由来のA P Cを本発明のペプチドと接触させるか、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをA P Cに導入することによって、H L A 抗原と本発明のペプチドとの複合体をその表面上に提示するA P Cを誘導することができる。そのようなA P Cは標的ペプチドに対する高いC T L 誘導能を有し、がん免疫療法に有用である。したがって、本発明の別の目的は、C T L 誘導能を有するA P Cを誘導する方法、および该方法によって得られるA P Cを提供することである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

本発明のさらなる目的は、C D 8 陽性細胞を、本発明のペプチドをその表面上に提示するA P Cもしくはエキソソームと共培養する段階、または本発明のペプチドに結合するT細胞受容体(T C R)サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を導入する段階を含む、C T Lを誘導するための方法を提供することである。本発明の方法によって得られ得るC T Lは、A M L、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍などのがんの治療および/または予防においても使用される。したがって、本発明の別の目的は、本発明の方法によって得られ得るC T Lを提供することである。

10

【 0 0 1 5 】

さらに、本発明のさらなる目的は、F O X M 1もしくはその断片、F O X M 1もしくはその断片をコードするポリヌクレオチド、またはF O X M 1もしくはその断片を提示するエキソソームもしくはA P Cを含む物質または組成物を投与する段階を含む、がんに対する免疫応答を誘導するための方法を提供することである。

【 0 0 1 6 】

本発明は、A M L、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍などの癌を含む、F O X M 1過剰発現に関連する任意の疾患に適用することができる。

20

【 0 0 1 7 】

[本発明1001]

H L A 抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球(C T L)誘導能を有する単離されたペプチドであって、S E Q I D N O : 34のアミノ酸配列からなるか、またはその免疫学的活性断片である単離されたペプチド。

[本発明1002]

H L A 抗原がH L A - A 24である、本発明1001の単離されたペプチド。

[本発明1003]

S E Q I D N O : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001または1002の単離されたペプチド。

30

[本発明1004]

ノナペプチドまたはデカペプチドである、本発明1002または1003の単離されたペプチド。

[本発明1005]

1個、2個、または数個のアミノ酸が挿入、置換、欠失、または付加されている、S E Q I D N O : 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、本発明1004の単離されたペプチド。

[本発明1006]

以下の特徴の一方または両方を有する、本発明1004または1005のペプチド：

(a) N 末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンの群より選択される；ならびに

40

(b) C 末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンの群より選択される。

[本発明1007]

本発明1001～1006のいずれかのペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[本発明1008]

C T L を誘導するための組成物であって、本発明1001～1006のいずれかの1種もしくは複数種のペプチド、または本発明1007の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む組成物。

[本発明1009]

50

がんの治療および／もしくは予防のための、ならびに／または術後のその再発の予防のための薬学的組成物であって、本発明1001～1006のいずれかの1種もしくは複数種のペプチド、または本発明1007の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む薬学的組成物。

[本発明1010]

H L A 抗原が H L A - A 24である対象への投与のために製剤化される、本発明1009の薬学的組成物。

[本発明1011]

がんを治療するために製剤化される、本発明1009または1010の薬学的組成物。

[本発明1012]

C T L 誘導能を有する抗原提示細胞 (A P C) を誘導するための方法であって、以下の段階の1つを含む方法：

(a) A P C を、本発明1001～1006のいずれかのペプチドとインビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させる段階；および

(b) 本発明1001～1006のいずれかのペプチドをコードするポリヌクレオチドを、A P C に導入する段階。

[本発明1013]

以下の段階の少なくとも1つを含む方法のいずれかによって、C T L を誘導するための方法：

(a) C D 8陽性T細胞を、H L A 抗原と本発明1001～1006のいずれかのペプチドとの複合体をその表面上に提示するA P C と共培養する段階；

(b) C D 8陽性T細胞を、H L A 抗原と本発明1001～1006のいずれかのペプチドとの複合体をその表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

(c) 本発明1001～1006のいずれかのペプチドに結合するT細胞受容体 (T C R) サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、T細胞に導入する段階。

[本発明1014]

H L A 抗原と本発明1001～1006のいずれかのペプチドとの複合体をその表面上に提示する、単離されたA P C 。

[本発明1015]

本発明1012の方法によって誘導される、本発明1014のA P C 。

[本発明1016]

本発明1001～1006のいずれかのペプチドを標的とする、単離されたC T L 。

[本発明1017]

本発明1013の方法によって誘導される、本発明1016のC T L 。

[本発明1018]

対象においてがんに対する免疫応答を誘導する方法であって、本発明1001～1006のいずれかのペプチド、その免疫学的活性断片、または該ペプチドもしくは該断片をコードするポリヌクレオチドを含む組成物を対象に投与する段階を含む方法。

前述の本発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

本発明の様々な局面および適用は、以下の図面の簡単な説明ならびに本発明の詳細な説明およびその好ましい態様を考慮することで、当業者に明白となるであろう。

【図 1 - 1】 図 1 は、F O X M 1 由来のペプチドを用いて誘導したC T L におけるI F N - E L I S P O T アッセイの結果を示す写真を示す。F O X M 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (S E Q I D N O : 2) のペプチドで刺激したウェル番号# 1、4、および# 7 中のC T L (a)、F O X M 1 - A 2 4 - 9 - 3 5 1 (S E Q I D N O : 7) で刺激した# 7 中のC T L (b)、F O X M 1 - A 2 4 - 9 - 5 7 (S E Q I D N O : 8) で

10

20

30

40

50

刺激した#5中のCTL(c)、FOX M1-A24-10-240(SEQ ID NO:16)で刺激した#3中のCTL(d)、FOX M1-A24-10-318(SEQ ID NO:25)で刺激した#6中のCTL(e)、およびFOX M1-A24-10-390(SEQ ID NO:30)で刺激した#4中のCTL(f)は、それぞれ対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。

【図1-2】FOX M1-A24-10-238(SEQ ID NO:31)で刺激したウェル番号#4中のCTL(g)は、それぞれ対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。対照的に、陰性データの典型的な例として、ペプチドをパルスした標的細胞に対する、FOX M1-A24-9-316(SEQ ID NO:1)のペプチドで刺激したCTLからの特異的なIFN- γ 産生は示されなかった(h)。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしなかった標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。これらの写真のウェル上の四角は、対応するウェルから細胞を増殖させてCTL株を樹立したことを示す。

【図2】図2は、IFN- γ ELISAアッセイによって検出された、FOX M1-A24-9-262(SEQ ID NO:2)(a)、FOX M1-A24-10-240(SEQ ID NO:16)(b)、FOX M1-A24-10-318(SEQ ID NO:25)(c)、およびFOX M1-A24-10-238(SEQ ID NO:31)(d)のペプチドで刺激したCTL株のIFN- γ 産生を示す折れ線グラフを示す。これにより、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことが実証された。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしなかった標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

【図3】図3は、FOX M1-A24-9-262(SEQ ID NO:2)(a)、FOX M1-A24-10-240(SEQ ID NO:16)(b)、およびFOX M1-A24-10-238(SEQ ID NO:31)(c)のペプチドで刺激したCTL株から限界希釈により樹立されたCTLクローンのIFN- γ 産生を示す。これにより、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローンが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことが実証された。図中、「+」は、各ペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしなかった標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

【図4】図4は、FOX M1およびHLA-A*2402を外因的に発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す折れ線グラフを示す。HLA-A*2402または全長FOX M1遺伝子をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。FOX M1-A24-9-262(SEQ ID NO:2)のペプチドを用いて樹立されたCTLクローンは、FOX M1およびHLA-A*2402を両方ともトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した(黒菱形)。対照的に、HLA-A*2402(白三角)またはFOX M1(白丸)のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

【0019】

態様の説明

本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等な任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法、装置、および材料をここに記載する。しかしながら、本材料および方法について記載する前に、本明細書に記載の特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコール等は慣行的な実験法および最適化に従って変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図されないことも、同様に理解されるべきである。

【0020】

本明細書において言及される各出版物、特許、または特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に明確に組み入れられる。しかしながら、本明細書中のいかなるものも、本発明が先の発明によるそのような開示に先行する権利を与えられないことを承認するものとしては解釈されるべきではない。

【0021】

矛盾する場合には、定義を含め、本明細書が優先される。加えて、材料、方法、および実施例は単に例示であり、限定することを意図しない。

【0022】

I. 定義

本明細書で用いる「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単語は、特に他に具体的に指示がない限り「少なくとも1つ」を意味する。

10

【0023】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。本用語は、1個または複数個のアミノ酸残基が修飾された残基であるか、または対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基であるアミノ酸ポリマーと、天然アミノ酸ポリマーとに適用される。

【0024】

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

20

【0025】

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)の推奨する、一般に公知の3文字表記または1文字表記により参照されてもよい。

30

【0026】

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、他に特記しない限り、これらは、一般に受け入れられている1文字コードにより参照されるアミノ酸と同様である。

【0027】

特記しない限り、「がん」という用語はFOX M1遺伝子を過剰発現しているがんを指し、その例には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膀胱癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0028】

特記しない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」、および「CTL」という用語は本明細書において互換的に用いられ、特に別段の定めのない限り、非自己細胞（例えば、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞）を認識すること、およびそのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球のサブグループを指す。

【0029】

特記しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。

【0030】

50

II. ペプチド

FOX M1由来のペプチドが、CTLによって認識される抗原として機能することを実証するために、FOX M1 (SEQ ID NO: 34)由来のペプチドを解析して、それらが、一般的に見られるHLAアリルであるHLA-A24によって拘束される抗原エピトープであるかどうかを決定した (Date Y et al., Tissue Antigens 47: 93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155: 4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152: 3913-24, 1994)。

【0031】

FOX M1由来のHLA-A24結合ペプチドの候補を、HLA-A24に対するそれらの結合親和性に基づいて同定した。以下のペプチドが候補ペプチドである：

FOX M1 - A24 - 9 - 316 (SEQ ID NO: 1)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 262 (SEQ ID NO: 2)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 451 (SEQ ID NO: 3)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 455 (SEQ ID NO: 4)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 483 (SEQ ID NO: 5)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 443 (SEQ ID NO: 6)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 351 (SEQ ID NO: 7)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 57 (SEQ ID NO: 8)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 133 (SEQ ID NO: 9)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 754 (SEQ ID NO: 10)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 429 (SEQ ID NO: 11)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 436 (SEQ ID NO: 12)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 524 (SEQ ID NO: 13)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 241 (SEQ ID NO: 14)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 627 (SEQ ID NO: 15)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 240 (SEQ ID NO: 16)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 777 (SEQ ID NO: 17)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 453 (SEQ ID NO: 18)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 382 (SEQ ID NO: 19)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 483 (SEQ ID NO: 20)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 435 (SEQ ID NO: 21)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 396 (SEQ ID NO: 22)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 325 (SEQ ID NO: 23)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 443 (SEQ ID NO: 24)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 318 (SEQ ID NO: 25)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 713 (SEQ ID NO: 26)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 513 (SEQ ID NO: 27)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 7 (SEQ ID NO: 28)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 376 (SEQ ID NO: 29)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 390 (SEQ ID NO: 30)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 238 (SEQ ID NO: 31)、および
 FOX M1 - A24 - 10 - 264 (SEQ ID NO: 32)。

【0032】

これらのペプチドを負荷した樹状細胞(DC)によるT細胞のインビトロでの刺激後、以下の各ペプチドを用いてCTLを樹立することに成功した：

FOX M1 - A24 - 9 - 262 (SEQ ID NO: 2)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 351 (SEQ ID NO: 7)、
 FOX M1 - A24 - 9 - 57 (SEQ ID NO: 8)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 240 (SEQ ID NO: 16)、
 FOX M1 - A24 - 10 - 318 (SEQ ID NO: 25)、

FOX M1 - A24 - 10 - 390 (SEQ ID NO: 30)、および
FOX M1 - A24 - 10 - 238 (SEQ ID NO: 31)。

【0033】

樹立されたこれらのCTLは、それぞれのペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な特異的CTL活性を示す。これらの結果から、FOX M1がCTLによって認識される抗原であること、および試験された該ペプチドがHLA-A24拘束性のFOX M1のエピトープペプチドであることが実証される。

【0034】

FOX M1遺伝子は、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍などのがん細胞では過剰発現するが、大部分の正常臓器では発現しないため、これは免疫療法のための優れた標的である。したがって本発明は、CTLによって認識されるFOX M1のエピトープに相当するノナペプチド(アミノ酸残基9個からなるペプチド)およびデカペプチド(アミノ酸残基10個からなるペプチド)を提供する。あるいは、本発明は、HLA抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導する単離されたペプチドであって、該ペプチドが、SEQ ID NO: 34のアミノ酸配列からなるか、またはその免疫学的活性断片である、ペプチドを提供する。本発明のノナペプチドおよびデカペプチドの好ましい例には、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドが含まれる。

【0035】

一般的に、Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75、Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003)、およびNielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)に記載されているソフトウェアプログラムなどの、例えばインターネット上で現在利用可能なソフトウェアプログラムを用いて、種々のペプチドとHLA抗原との間の結合親和性をインシリコで算出することができる。例えばParker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75; およびKuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81に対する参照において記載されているように、HLA抗原との結合親和性を測定することができる。結合親和性を決定するための方法は、例えばJournal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; Protein Science, 2000, 9: 1838-1846に記載されている。したがって、そのようなソフトウェアプログラムを使用して、HLA抗原との高い結合親和性を有するFOX M1由来の断片を選択することができる。したがって本発明は、そのような公知のプログラムを用いて同定された、HLA抗原と結合するFOX M1由来の任意の断片からなるペプチドを包含する。本発明のペプチドは、全長FOX M1からなるペプチドであってもよい。

【0036】

本発明のペプチドには、結果として生じるペプチドがそのCTL誘導能を保持する限り、付加的なアミノ酸残基を隣接させることができる。本発明のペプチドに隣接するアミノ酸残基は、それらが元のペプチドのCTL誘導能を損なわない限り、任意の種類のアミノ酸から構成され得る。したがって本発明は、FOX M1に由来するペプチドを含み、かつHLA抗原に対する結合親和性を有するペプチドを包含する。そのようなペプチドは、典型的には約40アミノ酸未満であり、約20アミノ酸未満である場合が多く、通常は約15アミノ酸未満である。

【0037】

一般的に、あるペプチド中の1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸の改変は、該ペプチドの機能に影響を及ぼさず、場合によっては元のタンパク質の所望の機能を増強することさえある。実際に、改変ペプチド(すなわち、元の参照配列と比較して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が改変された(すなわち、置換、欠失、付加、または挿入された)アミノ酸配列から構成されるペプチド)は、元のペプチドの生物学的活性を保持することが知られている(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller

10

20

30

40

50

and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。したがって、1つの態様において、本発明のペプチドは、CTL誘導能、ならびに1個、2個、またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、挿入、および/または置換されている、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31の中より選択されるアミノ酸配列の双方を有してよい。

【0038】

当業者は、単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を変更する、アミノ酸配列に対する個々の付加または置換が、元のアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識する。したがって、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、この場合、タンパク質の変化により元のタンパク質と類似の機能を有する改変タンパク質が生じる。機能的に類似しているアミノ酸を提示する保存的置換の表は、当技術分野において周知である。保存するのが望ましいアミノ酸側鎖の特性の例には、例えば、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、ならびに以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖が含まれる：脂肪族側鎖(G、A、V、L、I、P)；ヒドロキシル基含有側鎖(S、T、Y)；硫黄原子含有側鎖(C、M)；カルボン酸およびアミド含有側鎖(D、N、E、Q)；塩基含有側鎖(R、K、H)；ならびに芳香族含有側鎖(H、F、Y、W)。加えて、以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるとして当技術分野で認められるアミノ酸を含む：

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

【0039】

このような保存的改変ペプチドもまた、本発明のペプチドと見なされる。しかしながら、本発明のペプチドはこれらに限定されず、改変ペプチドが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、非保存的な改変を含み得る。さらに、改変ペプチドは、FOX M1の多型バリエーション、種間相同体、および対立遺伝子のCTL誘導可能なペプチドを排除しない。

【0040】

必要なCTL誘導能を保持するために、少数の（例えば、1個、2個、または数個の）またはわずかな割合のアミノ酸を改変する（挿入、欠失、付加、および/または置換すること）ができる。本明細書において、「数個」という用語は、5個またはそれ未満のアミノ酸、例えば4個、3個、またはそれ未満を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは20%もしくはそれ未満、より好ましくは15%もしくはそれ未満、さらにより好ましくは10%もしくはそれ未満、または1～5%である。

【0041】

さらに、高い結合親和性を達成するために、本発明のペプチドにおいてアミノ酸残基を挿入、置換、または付加することができ、またはアミノ酸残基を欠失させてもよい。免疫療法との関連で用いられた場合、本発明のペプチドは、好ましくはHLA抗原との複合体として、細胞またはエキソソームの表面上に提示されるはずである。天然に提示されるペプチドに加えて、HLA抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であるため(J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307)、そのような規則性に基づいた改変を本発明の免疫原性ペプチドに導入することができる。例えば、HLA-A24結合を増大させるためには、N末端から2番目

のアミノ酸をフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンで置換すること、および/またはC末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、もしくはメチオニンで置換することが望ましい場合がある。したがって、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31のアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンで置換されている、および/またはSEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31のアミノ酸配列のC末端がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、もしくはメチオニンで置換されている、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、本発明によって包含される。

10

【0042】

本発明はまた、記載したペプチドのN末端および/またはC末端への1個、2個、または数個のアミノ酸の付加を意図する。高いHLA抗原結合親和性を有し、かつCTL誘導能を保持するような改変ペプチドもまた、本発明に包含される。

【0043】

しかしながら、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫障害および/または特定の物質に対するアレルギー症状などの副作用が誘発される可能性がある。したがって、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列と一致する状況を回避するために、第一に、利用可能なデータベースを用いて相同性検索を行うことが好ましい。相同性検索から、対象ペプチドと比較して1個または2個のアミノ酸が異なるペプチドさえも存在しないことが明らかになった場合には、前記副作用のいかなる危険も伴わずに、HLA抗原とのその結合親和性を増大させるために、および/またはそのCTL誘導能を増大させるために、該対象ペプチドを改変することができる。

20

【0044】

上記のようにHLA抗原に対する高い結合親和性を有するペプチドは、非常に効果的であると予測されるが、指標としての高い結合親和性の存在に従って選択された候補ペプチドを、CTL誘導能の存在についてさらに調べる。本明細書において「CTL誘導能」という語句は、抗原提示細胞(APC)上に提示された場合にCTLを誘導するペプチドの能力を示す。さらに、「CTL誘導能」は、CTL活性化を誘導する、CTL増殖を誘導する、CTLによる標的細胞の溶解を促進する、およびCTLのIFN- γ 産生を増加させる、ペプチドの能力を含む。

30

【0045】

CTL誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を保有するAPC(例えば、Bリンパ球、マクロファージ、および樹状細胞(DC))、またはより具体的にはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、かつペプチドによる刺激後、CD8陽性細胞と混合し、その後、標的細胞に対してCTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定することにより達成される。反応システムとして、ヒトHLA抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物(例えば、BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auyeung C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) responseに記載されているもの)を用いることができる。例えば、標的細胞を ^{51}Cr 等で放射線標識することが可能であり、標的細胞から放出された放射能から細胞傷害活性を算出することができる。あるいは、固定化したペプチドを保有するAPCの存在下で、CTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻止帯を可視化することによって、CTL誘導能を評価することができる。

40

【0046】

上記のようにペプチドのCTL誘導能を試験した結果、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31によって示されるアミノ酸配列からなるペプチドより

50

選択されるノナペプチドまたはデカペプチドが、HLA抗原に対する高い結合親和性に加えて、特に高いCTL誘導能を示すことが判明した。したがって、これらのペプチドは本発明の好ましい態様として例示される。

【0047】

さらに、相同性解析の結果から、これらのペプチドが、任意の他の公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドと有意な相同性を有していないことが示された。このため、免疫療法に用いた場合の未知または望ましくない免疫応答の可能性は低くなる。したがって、この局面からもまた、これらのペプチドはがん患者においてFOX M1に対する免疫を誘発するのに使用される。よって、本発明のペプチドは、好ましくはSEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドである。

10

【0048】

上記した本発明のペプチドの改変に加えて、記載したペプチドは、それらが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、他の物質にさらに連結させることができる。例示的な物質には、ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマー等が含まれる。本発明のペプチドは、修飾によって元のペプチドの生物学的活性が損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、および/またはリン酸化などの修飾を含み得る。これらの種類の修飾は、付加的な機能（例えば、標的化機能および送達機能）を付与し、かつ/またはペプチドを安定化し得る。

【0049】

20

例えば、ポリペプチドのインビボ安定性を高めるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体、または非天然アミノ酸を導入することが当技術分野で公知であり、この概念を本発明のポリペプチドに用いることもできる。ポリペプチドの安定性は、多数の方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼ、ならびにヒトの血漿および血清などの様々な生物学的媒質を用いて、安定性を試験することができる（例えば、Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302を参照されたい）。

【0050】

さらに、上記したように、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、または付加した改変ペプチドの中から、元のペプチドと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元と比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有する改変ペプチドをスクリーニングまたは選択する方法を提供する。例えば、本方法は以下の段階を含み得る：

30

a：本発明のペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基を置換、欠失、または付加する段階、

b：該ペプチドの活性を決定する段階、

c：元と比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するペプチドを選択する段階。

【0051】

本明細書において、本発明のペプチドはまた、「FOX M1ペプチド」または「FOX M1ポリペプチド」とも記載され得る。

【0052】

40

III. FOX M1ペプチドの調製

周知の技法を用いて、本発明のペプチドを調製することができる。例えば、組換えDNA技術または化学合成を用いて、ペプチドを合成的に調製することができる。本発明のペプチドは、個々に、または2つもしくはそれ以上のペプチドから構成されるより長いポリペプチドとして、合成することができる。その後ペプチドを単離すること、すなわち他の天然の宿主細胞タンパク質およびそれらの断片、または任意の他の化学物質を実質的に含まないように、精製または単離することができる。

【0053】

本発明のペプチドは、本明細書に記載したペプチドの生物学的活性が修飾によって損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の修飾に

50

は、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために用いることができる、D - アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の取り込みが含まれる。

【 0 0 5 4 】

選択されたアミノ酸配列に基づいた化学合成によって、本発明のペプチドを得ることができる。該合成に適合させることのできる従来のペプチド合成法の例には、以下のものが含まれるが、これらに限定されない：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;
- (i i) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
- (i i i) Peptide Synthesis (日本語), Maruzen Co., 1975 ;
- (i v) Basics and Experiment of Peptide Synthesis (日本語), Maruzen Co., 19 10
85 ;
- (v) Development of Pharmaceuticals (second volume) (日本語), Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa, 1991 ;
- (v i) WO 9 9 / 6 7 2 8 8 ; および
- (v i i) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【 0 0 5 5 】

あるいは、ペプチドを作製するための任意の公知の遺伝子工学的な方法（例えば、Morris on J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101: 347-62) を適合させて、本発明のペプチドを得ること 20
ができる。例えば、最初に、発現可能な形態で（例えば、プロモーター配列に相当する調節配列の下流に）目的のペプチドをコードするポリヌクレオチドを有する適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に入れて形質転換する。次いで、該宿主細胞を培養して、関心対象のペプチドを産生させる。インビトロ翻訳システムを適合させて、ペプチドをインビトロで作製することもできる。

【 0 0 5 6 】

I V . ポリヌクレオチド

本発明はまた、前述の本発明のペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。これらは、天然 F O X M 1 遺伝子 (Gen Bank アクセッション番号 NM_2 0 2 0 0 2 . 1 (S E Q I D N O : 3 3)) 由来のポリヌクレオチド、およびその保 30
存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む。本明細書において「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一な核酸が任意の特定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G、および G C U はすべて、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、あるコドンによってアラニンが指定されるあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、該コドンを記載された対応するコドンのいずれかに変更することができる。このような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に改変された変異の一種である。ペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、該核酸の可能性のあるあらゆるサイレント変異をも表す。核酸中の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンである A U G、および通常トリプトファンに対する唯一のコドンである T G G を除く）を改変して、機能的に同一な分子を得ることができることを、当業者は認識するであろう。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、公開した各配列において非 40
明示的に記載されている。

【 0 0 5 7 】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、およびそれらの誘導体から構成され得る。当技術分野において周知の通り、DNA 分子は塩基、例えば天然の塩基 A、T、C、および G などから構成され、RNA では T は U に置き換えられる。非天然の塩基もまたポリヌクレオチドに含まれることを、当業者は認識するであろう。

【 0 0 5 8 】

本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を伴って、または伴わずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在するアミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位（例えば、酵素認識配列）を提供し得る。さらに、ポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードするコード配列に対する任意の付加的配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであってよく、またはマーカー遺伝子等を有する発現ベクター（プラスミド）であってよい。一般に、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いる従来の組換え技法によりポリヌクレオチドを操作することによって、そのような組換えポリヌクレオチドを調製することができる。

【0059】

10

組換え技法および化学合成技法の両方を用いて、本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、適切なベクター内に挿入することによってポリヌクレオチドを作製することができ、これはコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現され得る。あるいは、PCR技法または適切な宿主内での発現を用いて、ポリヌクレオチドを増幅することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989を参照されたい）。あるいは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5に記載されているような固相技法を用いて、ポリヌクレオチドを合成することができる。

【0060】

20

V. エキソソーム

本発明は、本発明のペプチドとHLA抗原との間で形成される複合体を自身の表面上に提示する、エキソソームと称される細胞内小胞をさらに提供する。エキソソームは、例えば公表特許公報特表平11-510507号およびWO99/03499に詳述されている方法を用いることによって調製することができ、治療および/または予防の対象となる患者から得られたAPCを用いて調製することができる。本発明のエキソソームは、本発明のペプチドと同様の様式で、ワクチンとして接種することができる。

【0061】

前記複合体中に含まれるHLA抗原の型は、治療および/または予防を必要とする対象のものと一致しなければならない。例えば日本人集団では、HLA-A24（特にA*2402）がよく見られ、したがって日本人患者の治療に適していると考えられる。日本人および白人の間で高発現しているA24型の使用は、有効な結果を得るのに好ましい。典型的には、臨床では、治療を必要とする患者のHLA抗原の型があらかじめ調べられ、これにより、特定の抗原に対して高レベルの結合親和性を有する、または抗原提示によるCTL誘導能を有するペプチドの適切な選択が可能となる。さらに、高い結合親和性およびCTL誘導能の両方を有するペプチドを取得するために、天然のFOX M1の部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて、1個、2個、または数個のアミノ酸の置換、挿入、および/または付加を行うことができる。

30

【0062】

本発明のエキソソームに対してA24型HLA抗原を用いる場合、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31のいずれか1つの配列を有するペプチドが使用される。

40

【0063】

VI. 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLA抗原と本発明のペプチドとの間に形成される複合体を自身の表面上に提示する単離されたAPCを提供する。APCは、治療および/または予防の対象となる患者に由来していてもよく、かつ、単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくはCTLを含む他の薬物と組み合わせて、ワクチンとして投与することができる。

【0064】

50

前記 A P C は、特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている D C、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B 細胞、および活性化 T 細胞を含む。D C は、A P C の中で最も強力な C T L 誘導作用を有する代表的な A P C であるため、D C は本発明の A P C として使用される。

【 0 0 6 5 】

例えば、本発明の A P C は、末梢血単球から D C を誘導し、次にそれらをインビトロ、エキスビボ、またはインビボで本発明のペプチドと接触させる（で刺激する）ことによって得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドを提示する A P C が該対象の体内で誘導される。したがって、本発明の A P C は、本発明のペプチドを対象に投与した後、該対象から A P C を回収することによって得ることができる。あるいは、本発明の A P C は、対象から回収された A P C を本発明のペプチドと接触させることによって得ることもできる。

10

【 0 0 6 6 】

対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために、本発明の A P C を単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくは C T L を含む他の薬物と組み合わせて対象に投与することができる。例えば、エキスビボ投与は、以下の段階を含み得る：

- a：第 1 の対象から A P C を回収する段階、
- b：段階 a の A P C をペプチドと接触させる段階、および
- c：段階 b の A P C を第 2 の対象に投与する段階。

20

【 0 0 6 7 】

第 1 の対象と第 2 の対象は同一の個体であってもよく、または異なる個体であってもよい。段階 b によって得られた A P C を、A M L、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍を含むがんを治療および/または予防するためのワクチンとして投与することができる。

【 0 0 6 8 】

本発明はまた、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体と共に混合または製剤化する段階を含む方法である、A P C を誘導する薬学的組成物を製造するための方法または工程を提供する。

30

【 0 0 6 9 】

本発明の 1 つの局面によると、A P C は高レベルの C T L 誘導能を有する。「高レベルの C T L 誘導能」という用語において、高レベルとは、ペプチドと接触させていない A P C、または C T L を誘導することができないペプチドと接触させた A P C による C T L 誘導能のレベルと比較したものである。高レベルの C T L 誘導能を有するそのような A P C は、上記の方法に加え、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをインビトロで A P C に導入する段階を含む方法によって、調製することができる。導入する遺伝子は、D N A または R N A の形態であってよい。導入のための方法の例には、特に制限されることなく、リポフェクション、エレクトロポレーション、およびリン酸カルシウム法などの、当技術分野において従来より実施される様々な方法が含まれる。より具体的には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第 2 0 0 0 - 5 0 9 2 8 1 号に記載されているように、それを実施することができる。遺伝子を A P C に導入することによって、該遺伝子は細胞内で転写、翻訳を受け、次いで、得られたタンパク質は M H C クラス I またはクラス I I によってプロセシングされて、提示経路を経てペプチドが提示される。

40

【 0 0 7 0 】

V I I . 細胞傷害性 T リンパ球 (C T L)

本発明のペプチドのいずれかに対して誘導された C T L は、インビボでがん細胞を標的とする免疫応答を増強させるため、ペプチド自体と同様の様式でワクチンとして用いることができる。したがって本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかによって特異的に誘

50

導または活性化された、単離されたC T Lを提供する。

【0071】

そのようなC T Lは、(1)本発明のペプチドを対象に投与し、該対象からC T Lを回収すること；または(2)対象由来のA P CおよびC D 8陽性細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ(で刺激し)、次いでC T Lを単離すること；または(3)C D 8陽性細胞もしくは末梢血単核白血球を、H L A抗原と本発明のペプチドとの複合体をその表面上に提示するA P Cもしくはエキソソームとインビトロで接触させ、次いでC T Lを単離すること；または(4)本発明のペプチドに結合するT細胞受容体(T C R)サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をC T Lに導入することによって、得ることができる。前述のA P Cおよびエキソソームは上記の方法によって調製することができ、(4)の方法は下記「V I I I . T細胞受容体(T C R)」の章において詳述する。

10

【0072】

本発明のC T Lは、治療および/または予防の対象となる患者に由来してよく、かつ、単独で投与すること、または効果を調節する目的で本発明のペプチドもしくはエキソソームを含む他の薬物と組み合わせて投与することができる。得られたC T Lは、本発明のペプチド、例えば誘導に用いた同一のペプチドを提示する標的細胞に対して特異的に作用する。標的細胞は、がん細胞などの、F O X M 1を内因的に発現する細胞、またはF O X M 1遺伝子をトランスフェクトされた細胞であってよく、かつ、本発明のペプチドによる刺激によって該ペプチドを細胞表面上に提示する細胞もまた、活性化されたC T Lの攻撃の標的となり得る。

20

【0073】

V I I I . T細胞受容体(T C R)

本発明はまた、T細胞受容体(T C R)のサブユニットを形成し得るポリペプチドをコードする核酸を含む組成物、およびそれを用いる方法を提供する。T C Rサブユニットは、F O X M 1を発現する腫瘍細胞に対する特異性をT細胞に付与するT C Rを形成する能力を有する。当技術分野における公知の方法を用いることにより、本発明の1つまたは複数のペプチドを用いて誘導されたC T LのT C Rサブユニットとしての鎖および鎖の核酸を同定することができる(W O 2 0 0 7 / 0 3 2 2 5 5、およびMorgan et al., J I mmunol, 171, 3288 (2003))。例えば、T C Rを解析するためにはP C R法が好ましい。解析のためのP C Rプライマーは、例えば、5'側プライマーとしての5'-Rプライマー(5'-g t c t t a c c a g g c a t t c g c t t c a t - 3') (S E Q I D N O : 3 5)、および3'側プライマーとしての、T C R鎖C領域に特異的な3-T R a - Cプライマー(5'-t c a g c t g g a c c a c a g c c g c a g c g t - 3') (S E Q I D N O : 3 6)、T C R鎖C1領域に特異的な3-T R b - C 1プライマー(5'-t c a g a a a t c c t t t c t c t t g a c - 3') (S E Q I D N O : 3 7)、またはT C R鎖C2領域に特異的な3-T R - C 2プライマー(5'-c t a g c c t c t g g a a t c c t t t c t c t t - 3') (S E Q I D N O : 3 8)であり得るが、限定されない。T C R誘導体は、F O X M 1ペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ任意で、F O X M 1ペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビボおよびインビトロで媒介することができる。

30

40

【0074】

T C Rサブユニットをコードする核酸を、適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは、当技術分野において周知である。該核酸またはそれらを有用に含むベクターを、T細胞、例えば患者由来のT細胞に導入することができる。有利には、本発明は、患者自身のT細胞(または別の哺乳動物のT細胞)の迅速な改変により、優れたがん細胞殺傷特性を有する改変T細胞を迅速かつ容易に作製することを可能にする、既製の組成物を提供する。

【0075】

特異的T C Rとは、本発明のペプチドとH L A分子との複合体を特異的に認識すること

50

ができ、T細胞の表面上に該TCRが存在する場合に、標的細胞に対するT細胞特異的活性をもたらすことができる受容体である。上記複合体の特異的認識は任意の公知の方法によって確認することができ、好ましい方法には、例えば、HLA分子および本発明のペプチドを用いた四量体解析、ならびにELISPOTアッセイが含まれる。ELISPOTアッセイを行うことにより、細胞表面上にTCRを発現しているT細胞が細胞をTCRによって認識すること、およびシグナルが細胞内で伝達されることを確認することができる。T細胞表面上に上記の複合体が存在する場合に該複合体がT細胞の細胞傷害活性をもたらし得るという確認もまた、公知の方法によって行うことができる。好ましい方法には、例えば、クロム放出アッセイなどの、HLA陽性標的細胞に対する細胞傷害活性の決定が含まれる。

10

【0076】

また本発明は、HLA-A24との関連で、例えばSEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31のFOX M1ペプチドに結合するTCRサブユニットポリペプチドをコードする核酸を形質導入することによって調製されるCTLを提供する。形質導入されたCTLは、インビボでがん細胞にホーミングすることができ、かつ周知のインビトロ培養法によって増殖させることができる（例えば、Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)）。本発明のCTLは、治療または防御を必要としている患者におけるがんの治療または予防に有用な免疫原性組成物を形成するために使用することができる（WO 2006/031221）。

【0077】

20

IX. 薬学的な物質または組成物

予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患による死亡率または罹患率の負荷を軽減させる任意の行為を含む。予防（preventionおよびprophylaxis）は、「第一次、第二次、および第三次の予防レベルで」行われ得る。第一次の予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患の発生を回避するのに対し、第二次および第三次レベルの予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患の進行および症状の出現を予防（preventionおよびprophylaxis）することに加え、機能を回復させ、かつ疾患関連の合併症を減少させることによって、既存の疾患の悪影響を低下させることを目的とした行為を包含する。あるいは、予防（preventionおよびprophylaxis）は、特定の障害の重症度を軽減すること、例えば腫瘍の増殖および転移を減少させること、血管形成を減少させることを目的とした広範囲の予防的治療を含む。

30

【0078】

がんの治療および／もしくは予防、ならびに／または術後のその再発の予防は、以下の段階、例えばがん細胞の外科的除去、がん性細胞の成長の阻害、腫瘍の退行または退縮、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍の退縮、ならびに転移の低減または阻害などの段階のいずれかを含む。がんの効果的な治療および／または予防は、死亡率を減少させ、がんを有する個体の予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、かつがんに伴う検出可能な症状を軽減する。例えば、症状の軽減または改善は効果的な治療を構成し、および／または予防は10%、20%、30%、もしくはそれ以上の軽減または安定した疾患を含む。

40

【0079】

FOX M1の発現は、正常組織と比較して、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍を含むがんにおいて特異的に上昇するため、本発明のペプチドまたはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドを、がんもしくは腫瘍の治療および／もしくは予防のために、ならびに／または術後のその再発の予防のために用いることができる。したがって本発明は、本発明のペプチドの1種または複数種、または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含む、がんもしくは腫瘍を治療および／もしくは予防するための

50

、ならびに／または術後のその再発を予防するための薬学的な物質または組成物を提供する。あるいは、薬学的な物質または組成物として用いるために、本発明のペプチドを、前述のエキソソームまたはAPCなどの細胞のいずれかの表面上に発現させることができる。加えて、本発明のペプチドのいずれかを標的とする前述のCTLもまた、本発明の薬学的な物質または組成物の有効成分として用いることができる。

【0080】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための薬学的な組成物または物質の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドをその表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

10

【0081】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍の治療において用いるための、以下の中より選択される有効成分を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドをその表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0082】

20

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するための薬学的な組成物または物質を製造するための方法または工程であって、有効成分として以下の中より選択される有効成分と共に、薬学的にまたは生理学的に許容される担体を製剤化する段階を含む、方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドをその表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0083】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための薬学的な組成物または物質を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む、方法または工程を提供する：

30

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドをその表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0084】

あるいは、本発明の薬学的な組成物または物質は、がんまたは腫瘍の予防、および術後のその再発の予防のいずれかまたは双方に用いることができる。

40

【0085】

本発明の薬学的な物質または組成物は、ワクチンとして使用される。本発明の文脈において、「ワクチン」（「免疫原性組成物」とも称される）という語句は、動物に接種した際に、抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する物質を指す。

【0086】

本発明の薬学的な物質または組成物は、ヒト、ならびに非限定的にマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒヒ、およびチンパンジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含む任意の他の哺乳動物を含む対象または患者において、がんもしくは腫瘍を治療および／もしくは予防するために、ならびに／または術後のその再発を予防するために用いることができる。

50

【 0 0 8 7 】

本発明により、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31のいずれか1つのアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24拘束性エピトープペプチドまたはその候補であることが判明した。したがって、SEQ ID NO: 2、7、8、16、25、30、および31のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含む本発明の薬学的な物質または組成物は、HLA抗原がHLA-A24である対象への投与に特に適している。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド(すなわち、本発明のポリヌクレオチド)を含む薬学的な物質および組成物にも当てはまる。

【 0 0 8 8 】

本発明の薬学的な物質または組成物によって治療されるがんまたは腫瘍は限定されず、これには、例えばAML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍を含む、FOX M1が関与する(例えば、過剰発現する)任意のがんまたは腫瘍が含まれる。

【 0 0 8 9 】

本発明の薬学的な物質または組成物は、前述の有効成分に加えて、がん性細胞に対するCTLを誘導する能力を有するその他のペプチド、該その他のペプチドをコードするその他のポリヌクレオチド、該その他のペプチドを提示するその他の細胞等を含み得る。本明細書において、がん性細胞に対するCTLを誘導する能力を有するその他のペプチドは、がん特異的抗原(例えば、同定されたTAA)によって例示されるが、これに限定されない。

【 0 0 9 0 】

必要であれば、本発明の薬学的な物質または組成物は、例えば本発明のペプチドのいずれかといった有効成分の抗腫瘍効果をその他の治療物質が阻害しない限り、有効成分として該治療物質を任意に含み得る。例えば、製剤は、抗炎症物質、鎮痛剤、化学療法剤等を含み得る。薬剤自体に他の治療物質を含めることに加えて、本発明の薬剤を、1つまたは複数の他の薬理学的な物質と連続してまたは同時に投与することもできる。薬剤および薬理学的な物質の量は、例えば、使用される薬理学的な物質の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび投与経路に依存する。

【 0 0 9 1 】

本明細書において特に言及される成分に加えて、本発明の薬学的な物質または組成物は、問題の製剤の種類を考慮して、当技術分野において慣例的な他の組成物も含み得ることが理解されるべきである。

【 0 0 9 2 】

本発明の1つの態様において、本発明の薬学的な物質または組成物を、例えばがんのような治療されるべき疾患の病態を治療するのに有用な材料を含む製品およびキットに含めることができる。該製品は、ラベルを有する本発明の薬学的な物質または組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。該容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器上のラベルには、組成物が、疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防のために用いられることが示されるべきである。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

【 0 0 9 3 】

上記の容器に加えて、本発明の薬学的な物質または組成物を含むキットは、任意で、薬学的に許容される希釈剤を収容した第2の容器をさらに含み得る。それは、使用のための指示書と共に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および添付文書を含む、商業上および使用者の立場から見て望ましい他の材料をさらに含み得る。

【 0 0 9 4 】

必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置にて、薬学的な物質または組成物を提供することができる。該パックは、

10

20

30

40

50

例えば、プリスターパックのように金属またはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与に関する指示書が添付され得る。

【 0 0 9 5 】

(1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的な物質または組成物

本発明のペプチドは、薬学的な物質もしくは組成物として直接投与することができ、または必要であれば、従来の製剤方法によって製剤化される。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬物に通常用いられる担体、賦形剤等が特に制限なく適宜含まれ得る。そのような担体の例は、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等である。さらに、薬学的な物質または組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤等を含み得る。本発明の薬学的な物質または組成物は、抗がん目的に用いることができる。

10

【 0 0 9 6 】

インビボでCTLを誘導するために、本発明のペプチドを、本発明のペプチドの2種またはそれ以上から構成される組み合わせとして調製することができる。ペプチドの組み合わせはカクテルの形態をとってよく、または標準的な技法を用いて互いにコンジュゲートしてもよい。例えば、該ペプチドを化学的に結合させても、または単一の融合ポリペプチド配列として発現させてもよい。組み合わせにおけるペプチドは、同一であっても異なってもよい。本発明のペプチドを投与することによって、該ペプチドはHLA抗原によってAPC上に高密度で提示され、次いで、提示されたペプチドと該HLA抗原との間に形成された複合体に対して特異的に反応するCTLが誘導される。あるいは、APC(例えば、DC)を対象から取り出し、次にこれを本発明のペプチドにより刺激して、本発明のペプチドのいずれかをそれらの細胞表面上に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再び投与して、対象においてCTLを誘導し、その結果、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

20

【 0 0 9 7 】

有効成分として本発明のペプチドを含む、がんまたは腫瘍の治療および/または予防のための薬学的な物質または組成物は、細胞性免疫を効率的に誘導することが知られているアジュバントもまた含み得る。あるいは、薬学的な物質または組成物は、他の有効成分と共に投与することができ、または顆粒内への製剤化によって投与することもできる。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に(または連続して)投与した場合に、該タンパク質に対する免疫応答を増強させる化合物を指す。本明細書において意図されるアジュバントには、文献(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)に記載されているものが含まれる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 9 8 】

さらに、リポソーム製剤、直径数マイクロメートルのビーズにペプチドが結合している顆粒製剤、およびペプチドに脂質が結合している製剤が好都合に用いられ得る。

【 0 0 9 9 】

本発明の別の態様において、本発明のペプチドは、薬学的に許容される塩の形態で投与してもよい。塩の好ましい例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸との塩、および無機酸との塩が含まれる。

40

【 0 1 0 0 】

いくつかの態様において、本発明の薬学的な物質または組成物は、CTLを刺激する(prime)成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでCTLを刺激し得る物質として同定された。例えば、パルミチン酸残基をリジン残基のアミノ基およびアミノ基に付着させ、次に本発明のペプチドに連結させることができる。次いで、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子の状態直接投与すること、リポソーム中に取り込ませること、またはアジュバント中に乳化させることができる。CTL応答の脂質による刺激の別の例として、トリパルミトイル-S-グリセリルシステニル-セリル-セリン(P3CSS)などの大腸菌(E.coli)リポタンパク質を、適切なペプチドに共有結合させて、CTLを刺激するために用いることができる(例えば、Deres et

50

al., Nature 1989, 342: 561-4を参照されたい)。

【0101】

投与方法は、経口、皮内、皮下、静脈内注射等、および全身投与または標的部位の近傍への局所投与であってよい。投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によって強化することもできる。本発明のペプチドの用量を、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に従って適切に調節することができ、これは通常0.001mg~1000mg、例えば0.001mg~1000mg、例えば0.1mg~10mgであり、数日から数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適切に選択することができる。

【0102】

(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的な物質または組成物

本発明の薬学的な物質または組成物はまた、本明細書に開示するペプチドをコードする核酸を発現可能な形態で含み得る。本明細書において、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞内に導入された場合に抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてインビボで発現され得ることを意味する。例示的な態様において、関心対象のポリヌクレオチドの核酸配列は、該ポリヌクレオチドの発現に必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドには、標的細胞のゲノム中への安定的な組み込みが達成されるように、必要なものを備えさせることができる(相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12を参照されたい)。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 米国特許第5,580,859号; 第5,589,466号; 第5,804,566号; 第5,739,118号; 第5,736,524号; 第5,679,647号; およびWO 98/04720を参照されたい。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA」、促進された(プピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性)送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性(「遺伝子銃」)または圧力媒介性の送達が含まれる(例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい)。

【0103】

ウイルスベクターまたは細菌ベクターによって、本発明のペプチドを発現させることもできる。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。このアプローチは、例えば、ペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターとして、ワクシニアウイルスの使用を伴う。宿主内に導入すると、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を誘発する。免疫化プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターはBCG(カルメット・ゲラン桿菌)である。BCGベクターは、Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60に記載されている。治療的投与または免疫化に有用である多種多様な他のベクター、例えばアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌(Salmonella typhi)ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えば、Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85を参照されたい。

【0104】

ポリヌクレオチドの対象内への送達は、直接的であってもよいし(この場合、ポリヌクレオチドを保有するベクターに対象を直接曝露する)、または間接的であってもよい(この場合、まずインビトロで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次いで該細胞を対象内に移植する)。これら2つのアプローチはそれぞれ、インビボおよびエキスピボの遺伝子治療として公知である。

【0105】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Ander

10

20

30

40

50

son, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215を参照されたい。本発明にも用いることのできる、組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; および Krieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990に記載されている。

【0106】

投与方法は、経口、皮内、皮下、静脈内注射等であってよく、全身投与または標的部位の近傍への局所投与が用いられる。投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によって強化することもできる。適切な担体中のポリヌクレオチドの用量、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換した細胞の用量を、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に従って適切に調節することができ、これは通常0.001mg～1000mg、例えば0.001mg～1000mg、例えば0.1mg～10mgであり、数日に1度～数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適切に選択することができる。

【0107】

X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法

APCおよびCTLを誘導するために、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを用いることができる。CTLを誘導するために、本発明のエキソソームおよびAPCを用いることもできる。ペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、任意の他の化合物がそれらのCTL誘導能を阻害しない限り、該化合物と組み合わせて用いることができる。したがって、前述の本発明の薬学的な物質または組成物のいずれかをCTLを誘導するために用いることができ、それに加えて、前記ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものを、以下に説明されるように、APCを誘導するために用いることもできる。

【0108】

(1) 抗原提示細胞(APC)を誘導する方法

本発明は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを用いた、高いCTL誘導能を有するAPCを誘導または調製する方法を提供する。

【0109】

本発明の方法は、APCを本発明のペプチドとインビトロ、エキスピボ、またはインビボで接触させる段階を含む。例えば、APCを該ペプチドとエキスピボで接触させる方法は、以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階、および

b：段階aのAPCをペプチドと接触させる段階。

【0110】

前記APCは特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られているDC、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞を含む。DCは、APCの中でもそのCTL誘導能が最も強力であるために、好ましく用いられ得る。本発明の任意のペプチドを、段階bのペプチドとして単独で、または本発明の他のペプチドと組み合わせて用いることができる。

【0111】

あるいは、本発明のペプチドをAPCとインビボで接触させるように該ペプチドを対象に投与してもよい。結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが対象の体内で誘導され得る。したがって本発明はまた、APCをインビボで誘導するために、本発明のペプチドを対象に投与する方法を意図する。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能な形態で対象に投与して、本発明のペプチドを発現させてAPCとインビボで接触させるようにし、結果的に高いCTL誘導能を有するAPCを対象の体内で誘導することも可能である。したがって本発明はまた、APCをインビボで誘導するために、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与する方法を意図する。「発現可能な形態」という語句は、

上記「IX．薬学的な物質または組成物」の章において定義されている。

【0112】

(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的な物質または組成物

さらに本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導または調製するために、本発明のポリヌクレオチドをAPCに導入することを含む。例えば、本方法は以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階、および

b：本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。

【0113】

段階bは、上記「VI．抗原提示細胞」の章に記述した通りに行うことができる。

10

【0114】

あるいは、本発明は、FOX M1に対するCTL活性を特異的に誘導する抗原提示細胞(APC)を調製するための方法であって、以下の段階の1つを含む方法を提供する：

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

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

【0115】

(2) CTLを誘導する方法

さらに本発明は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、またはエキソソームもしくはAPCを用いてCTLを誘導するための方法を提供する。

20

【0116】

本発明はまた、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識するT細胞受容体(TCR)サブユニットを形成し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、CTLを誘導するための方法を提供する。好ましくは、CTLを誘導するための方法は、以下からなる群より選択される少なくとも1つの段階を含む：

a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体をその表面上に提示する抗原提示細胞および/またはエキソソームと接触させる段階；ならびに

b) 本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識するTCRサブユニットを形成し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、CD8陽性細胞に導入する段階。

【0117】

30

本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、またはエキソソームを対象に投与した場合、該対象の体内でCTLが誘導され、がん細胞を標的とする免疫応答の強度が増強される。したがって本発明はまた、CTLを誘導するために、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、またはエキソソームを対象に投与する段階を含む方法を意図する。

【0118】

あるいは、エキスピボでの使用によってCTLを誘導することもできる。そのような場合には、CTLを誘導した後、活性化したCTLを対象に戻す。例えば、CTLを誘導するための本発明の方法は、以下の段階を含み得る：

a) 対象からAPCを回収する段階；

b) 段階a)のAPCをペプチドと接触させる段階；および

c) 段階b)のAPCをCD8陽性細胞と共培養する段階。

40

【0119】

上記の段階c)においてCD8陽性細胞と共培養するAPCは、上記「VI．抗原提示細胞」の章に記述した通りに、本発明のポリヌクレオチドを含む遺伝子をAPCに導入することによって調製することもできるが、これに限定されず、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体をその表面上に効率的に提示する任意のAPCを本方法に用いることができる。

【0120】

そのようなAPCの代わりに、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体をその表面上に提示するエキソソームを用いることもできる。すなわち、本発明はまた、HLA抗原と

50

本発明のペプチドとの複合体をその表面上に提示するエキソソームを、C D 8 陽性細胞と共培養する方法を意図する。そのようなエキソソームは、上記「V . エキソソーム」の章に記述した方法によって調製することができる。

【0121】

さらに、本発明のペプチドに結合するTCRサブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をC D 8 陽性細胞に導入することによって、CTLを誘導することができる。そのような形質導入は、上記「VII . T細胞受容体(TCR)」の章に記述した通りに行うことができる。

【0122】

加えて、本発明は、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体と共に混合または製剤化する段階を含む方法である、CTLを誘導する薬学的な物質または組成物を製造するための方法または工程を提供する。

【0123】

(3) 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、FOX M1に関連する疾患に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。適切な疾患にはがんが含まれ、その例には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍が含まれる。

【0124】

本方法は、本発明のペプチドまたはそれらをコードするポリヌクレオチドのいずれかを含む物質または組成物を投与する段階を含む。本発明の方法はまた、本発明のペプチドのいずれかを提示するエキソソームまたはAPCの投与を意図する。詳細については、「IX . 薬学的な物質または組成物」の項目、特にワクチンとしての本発明の薬学的な物質または組成物の使用について記載している部分を参照されたい。加えて、免疫応答を誘導するための本発明の方法に用いることができるエキソソームおよびAPCは、上記「V . エキソソーム」、「VI . 抗原提示細胞(APC)」、ならびに「X . ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法」の(1)および(2)の項目において詳述されている。

【0125】

本発明はまた、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体と共に混合または製剤化する段階を含む方法である、免疫応答を誘導する薬学的な物質または組成物を製造するための方法または工程を提供する。

【0126】

あるいは、本発明の方法は、以下を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する段階を含み得る：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドをその表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0127】

本発明において、FOX M1を過剰発現するがんをこれらの有効成分を用いて治療することができる。がんには、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。したがって、有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する前に、治療すべきがん細胞またはがん組織におけるFOX M1の発現レベルが、同じ臓器の正常細胞と比較して増強されているかどうかを確認することが好ましい。したがって1つの態様において、本発明は、以下の段階を含み得る、FOX M1を(過剰)発現するがんを治療するための方法を提供する：

i) 治療すべきがんを有する対象から得られたがん細胞またはがん組織において、FOX M 1 の発現レベルを決定する段階；

ii) FOX M 1 の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

iii) 上記の (a) ~ (d) からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分を、正常対照と比較して FOX M 1 を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

あるいは、本発明はまた、FOX M 1 を過剰発現するがんを有する対象への投与において用いるための、上記の (a) ~ (d) からなる群より選択される少なくとも 1 つの成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を提供する。換言すれば、本発明はさらに、本発明の FOX M 1 ポリペプチドで治療すべき対象を、同定するための方法を提供し、該方法は、対象由来のがん細胞またはがん組織における FOX M 1 の発現レベルを決定する段階を含ん
10
でよく、ここで、該レベルが、該遺伝子の正常対照レベルと比較して上昇していることにより、対象が、本発明の FOX M 1 ポリペプチドで治療され得るがんを有することが示される。本発明のがんを治療する方法を、以下により詳細に説明する。

【0128】

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

【0129】

本発明に従って、対象から得られたがん細胞またはがん組織における FOX M 1 の発現レベルを決定する。発現レベルは、当技術分野で公知の方法を用いて、転写（核酸）産物
20
レベルで決定することができる。例えば、FOX M 1 の mRNA は、ハイブリダイゼーション法（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション）により、プローブを用いて定量してもよい。検出は、チップまたはアレイ上で実施してもよい。アレイの使用は、FOX M 1 の発現レベルを検出するのに好ましい。当業者は、FOX M 1 の配列情報を使用して、このようなプローブを調製することができる。例えば、FOX M 1 の cDNA をプローブとして用いてもよい。必要であれば、色素、蛍光物質、および同位体などの適切な標識でプローブを標識することができ、ハイブリダイズした標識の強度として、遺伝子の発現レベルを検出することができる。

【0130】

さらに、FOX M 1（例えば、SEQ ID NO: 34）の転写産物は、増幅に基づく検出法（例えば、RT-PCR）により、プライマーを用いて定量することができる。
30
このようなプライマーもまた、該遺伝子の入手可能な配列情報に基づいて調製することができる。

【0131】

具体的には、本発明の方法のために用いられるプローブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件、中程度にストリンジェントな条件、または低ストリンジェントな条件の下で、FOX M 1 の mRNA にハイブリダイズする。本明細書において使用する場合、「ストリンジェントな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、より短い配列よりも高い温度で観察される。一般に、ストリンジェントな条件の温度は、規定のイオン強度および pH における特定の配列の融解温度（ T_m ）よりも約 5 °C 低くなるように選択される。 T_m とは、平衡時に、標的配列に相補的なプローブの 50 % が標的配列とハイブリダイズする（規定のイオン強度、pH、および核酸濃度における）温度である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 T_m では、平衡時に、プローブの 50 % が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、pH 7.0 ~ 8.3 において、塩濃度が約 1.0 M 未満のナトリウムイオン、典型的には約 0.01 ~ 1.0 M のナトリウムイオン（または他の塩）であり、かつ温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば、10 ~ 50 ヌクレオチド）の場合
40
は少なくとも約 30 °C であり、より長いプローブまたはプライマーの場合は少なくとも
50

約 60 である条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの脱安定化物質を添加することによって達成してもよい。

【0132】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出することもできる。例えば、FOX M1 タンパク質 (SEQ ID NO: 34) の量を決定することができる。翻訳産物としてタンパク質の量を決定するための方法には、該タンパク質を特異的に認識する抗体を使用するイムノアッセイ法が含まれる。抗体は、モノクローナルであってもよく、またはポリクローナルであってもよい。さらに、抗体の任意の断片または改変体 (例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等) も、その断片または改変抗体が FOX M1 タンパク質への結合能を保持している限り、検出のために用いることができる。タンパク質を検出するためのこれらの種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明においては、任意の方法を使用して、そのような抗体およびそれらの等価物を調製することができる。

10

【0133】

FOX M1 遺伝子の発現レベルをその翻訳産物に基づいて検出する別の方法として、FOX M1 タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、染色強度を観察してもよい。すなわちこの測定では、強い染色により、タンパク質の存在 / レベルの上昇が示され、それと同時に FOX M1 遺伝子の高い発現レベルが示される。

【0134】

がん細胞における、例えば FOX M1 遺伝子を含む標的遺伝子の発現レベルは、そのレベルが、対応する標的遺伝子の対照レベル (例えば、正常細胞におけるレベル) よりも例えば 10%、25%、もしくは 50% 上昇しているか、または 1.1 倍超、1.5 倍超、2.0 倍超、5.0 倍超、10.0 倍超、もしくはそれ以上に上昇している場合に、上昇していると決定することができる。

20

【0135】

対照レベルは、疾患状態 (がん性または非がん性) が既知である対象から予め回収し保存しておいた試料を用いることにより、がん細胞と同時に決定することができる。加えて、治療すべきがんを有する臓器の非がん性領域から得られた正常細胞を、正常対照として用いてもよい。あるいは、対照レベルは、疾患状態が既知である対象由来の試料中の FOX M1 遺伝子の予め決定された発現レベルを解析することによって得られた結果に基づいて、統計的方法により決定してもよい。さらに、対照レベルは、予め試験された細胞由来の発現パターンのデータベースに由来し得る。さらに、本発明の 1 つの局面に従って、生物学的試料中の FOX M1 遺伝子の発現レベルは、複数の参照試料から決定された複数の対照レベルと比較してもよい。対象由来の生物学的試料の組織型と類似の組織型に由来する参照試料から決定された対照レベルを用いることが好ましい。さらに、疾患状態が既知である集団における FOX M1 遺伝子の発現レベルの標準値を用いることが好ましい。標準値は、当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。例えば、平均値 $\pm 2 S.D.$ 、または平均値 $\pm 3 S.D.$ の範囲を、標準値として用いることができる。

30

【0136】

本発明との関連において、がん性ではないことが既知である生物学的試料から決定された対照レベルは、「正常対照レベル」と称される。一方、がん性の生物学的試料から対照レベルが決定された場合、これは「がん性対照レベル」と称される。

40

【0137】

FOX M1 遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇しているか、またはがん性対照レベルと類似している / 同等である場合、対象は、治療すべきがんを有すると診断され得る。より具体的には、本発明は、(i) 対象が、治療すべきがんを有するかどうかを診断する、および / または (ii) がん治療のための対象を選択する方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られたがん細胞またはがん組織における FOX M1 の発現レベルを決定する段階；

50

- b) F O X M 1 の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；
- c) F O X M 1 の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇している場合に、該対象を、治療すべきがんを有すると診断する段階；および
- d) 段階 c) において、対象が、治療すべきがんを有すると診断された場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

【 0 1 3 8 】

あるいは、そのような方法は以下の段階を含む：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られたがん細胞またはがん組織における F O X M 1 の発現レベルを決定する段階；
- b) F O X M 1 の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；
- c) F O X M 1 の発現レベルががん性対照レベルと比較して類似しているか、または同等である場合に、該対象を、治療すべきがんを有すると診断する段階；および
- d) 段階 c) において、対象が、治療すべきがんを有すると診断された場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

【 0 1 3 9 】

本発明はまた、本発明の F O X M 1 ポリペプチドで治療され得るがんに罹患している対象を決定するためのキットを提供し、該キットはまた、がん免疫療法の有効性を評価および/またはモニターするのにも有用であり得る。好ましくは、がんには、A M L、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。より具体的には、キットは、対象由来のがん細胞における F O X M 1 遺伝子の発現を検出するための少なくとも 1 つの試薬を含むことが好ましく、試薬は以下の群より選択され得る：

- (a) F O X M 1 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；
- (b) F O X M 1 タンパク質を検出するための試薬；および
- (c) F O X M 1 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【 0 1 4 0 】

F O X M 1 遺伝子の m R N A を検出するのに適した試薬には、F O X M 1 m R N A の一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドなどの、F O X M 1 m R N A に特異的に結合するかまたは F O X M 1 m R N A を同定する核酸が含まれる。これらの種類のオリゴヌクレオチドの例は、F O X M 1 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブである。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製することができる。必要であれば、F O X M 1 m R N A を検出するための試薬を固体マトリックス上に固定化してもよい。さらに、F O X M 1 m R N A を検出するための 2 つ以上の試薬をキットに含めることができる。

【 0 1 4 1 】

一方、F O X M 1 タンパク質を検出するのに適した試薬には、F O X M 1 タンパク質に対する抗体が含まれる。抗体は、モノクローナルであってもよく、またはポリクローナルであってもよい。さらに、抗体の任意の断片または改変体（例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ') 2、F v 等）も、その断片または改変抗体が F O X M 1 タンパク質への結合能を保持している限り、試薬として用いることもできる。タンパク質を検出するためのこれらの種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明においては、任意の方法を使用して、そのような抗体およびそれらの等価物を調製することができる。さらに、直接連結または間接標識技術により、抗体をシグナル生成分子で標識することができる。標識、および抗体を標識してそれらの標的に対する抗体の結合を検出するための方法は、当技術分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明のために使用することができる。さらに、F O X M 1 タンパク質を検出するための 2 つ以上の試薬をキットに含めることができる。

【 0 1 4 2 】

キットは、前述の試薬のうち 2 つ以上を含有していてもよい。例えば、がん罹患して

10

20

30

40

50

いないまたはがん罹患している対象から得られた組織試料は、有用な対照試薬として役立つ。本発明のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用のための説明を含む添付文書（例えば、文書、テープ、CD-ROM等）を含む、商業上の観点および使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含んでもよい。これらの試薬等は、ラベルを有する容器中に保持され得る。適切な容器には、瓶、バイアル、および試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。

【0143】

本発明の1つの態様において、試薬がFOX M1のmRNAに対するプローブである場合、少なくとも1つの検出部位が形成されるよう、該試薬を多孔質ストリップなどの固体マトリックスの上に固定化することができる。多孔質ストリップの測定領域または検出領域は、各々が1つの核酸（プローブ）を含有している複数の部位を含んでいてもよい。テストストリップはまた、陰性対照および/または陽性対照のための部位を含んでいてもよい。あるいは、対照部位は、テストストリップとは別のストリップ上に配置されてもよい。任意で、異なる検出部位は、固定化された核酸を、異なる量含有していてもよく、すなわち、第1の検出部位ではより多い量含有し、以降の部位ではより少ない量含有していてもよい。試験試料を添加すると、検出可能なシグナルを示す部位の数により、試料中に存在するFOX M1 mRNAの量の定量的な指標が提供される。検出部位は、適切に検出可能な任意の形状で構成することができ、典型的には、テストストリップの幅にわたるバーまたはドットの形状である。

【0144】

本発明のキットは、陽性対照試料またはFOX M1標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、FOX M1陽性試料を回収し、次にそれらのFOX M1レベルをアッセイすることによって調製することができる。あるいは、精製FOX M1タンパク質またはポリヌクレオチドを、FOX M1を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはFOX M1試料を形成してもよい。本発明において、精製FOX M1は組換えタンパク質であってもよい。陽性対照試料のFOX M1レベルは、例えばカットオフ値よりも高い。

【0145】

以下の実施例は、本発明を説明するために、ならびに本発明の作製および使用において当業者を支援するために提示される。本実施例は、本発明の範囲を他の形で限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0146】

材料および方法

細胞株

TISI、HLA-A*2402陽性Bリンパ芽球様細胞株は、IHWG Cell and Gene Bank (Seattle, WA) から購入した。COS7、アフリカミドリザル腎細胞株は、ATCCから購入した。

【0147】

FOX M1由来のペプチドの候補選択

HLA-A*2402分子に結合するFOX M1由来の9merおよび10merのペプチドを、結合予測ソフトウェア「BIMAS」(www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75)、Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81))、および「NetMHC 3.0」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Bus et al. (Tissue Antigens, 62:378-84, 2003)、Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003、Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004))を用いて予測した。これらのペプチドは、標準的な固相合成法に従ってBiosynthesis (Lewisville, Texas) によって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製した。ペプチドの純度 (>90%) および同一性を、それぞれ分析用HPLCお

よび質量分析によって決定した。ペプチドをジメチルスルホキシドに 20 mg/ml で溶解し、-80 で保存した。

【0148】

インビトロでのCTL誘導

単球由来の樹状細胞(DC)を抗原提示細胞として用いて、ヒト白血球抗原(HLA)上に提示されたペプチドに対する細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答を誘導した。他所に記載されているように、DCをインビトロで作製した(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。具体的には、Ficoll-Plaque(Pharmacia)溶液によって健常なボランティア(HLA-A*2402陽性)から単離した末梢血単核細胞(PBMC)を、プラスチック製の組織培養ディッシュ(Becton Dickinson)へ付着させることによって分離し、それらを単球画分として濃縮した。2%の加熱非働化した自己血清(AS)を含むAIM-V培地(Invitrogen)中で、1000U/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(R&D System)および1000U/mlのインターロイキン(IL)-4(R&D System)の存在下で、単球が濃縮した集団を培養した。培養7日後、サイトカインで誘導したDCに、AIM-V培地中で3時間、37 にて、3 µg/mlの 2-ミクログロブリンの存在下で20 µg/mlの各合成ペプチドをパルスした。作製した細胞は、その細胞表面上に、CD80、CD83、CD86、およびHLAクラスIIなどのDC関連分子を発現しているようであった(データは示さず)。次いで、ペプチドをパルスしたこれらのDCを、X線照射(20 Gy)によって不活化し、CD8 Positive Isolation Kit(Dynal)を用いた陽性選択によって得られた自己CD8 + T細胞と1:20の比率で混合した。これらの培養物を48ウェルプレート(Corning)中に準備し;各ウェルは、0.5 mlのAIM-V/2%AS培地中に、 1.5×10^4 個のペプチドパルスしたDC、 3×10^5 個のCD8 + T細胞、および10 ng/mlのIL-7(R&D System)を含んだ。3日後、これらの培養物に、IL-2(CHIRON)を最終濃度20 IU/mlまで補充した。7日目および14日目に、ペプチドパルスした自己DCでT細胞をさらに刺激した。該DCは上記と同じ方法によって毎回調製した。21日目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたTISI細胞に対してCTLを試験した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9)。

【0149】

CTL増殖手順

Riddellら(Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23)によって記載されている方法と類似の方法を用いて、CTLを培養下で増殖させた。40 ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体(Pharminogen)の存在下で、マイトマイシンCによって不活化した2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株と共に、合計 5×10^4 個のCTLを25 mlのAIM-V/5%AS培地中に懸濁した。培養開始1日後に、120 IU/mlのIL-2を該培養物に添加した。5、8、および11日目に、30 IU/mlのIL-2を含む新たなAIM-V/5%AS培地を、該培養物に供給した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9)。

【0150】

CTLクローンの樹立

96丸底マイクロタイタープレート(Nalge Nunc International)において0.3個、1個、および3個のCTL/ウェルとなるように、希釈を行っ

た。CTLを、 1×10^4 個の細胞/ウェルの2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株、 30 ng/ml の抗CD3抗体、および 125 U/ml のIL-2と共に、合計 $150 \mu\text{l}$ /ウェルの5%AS含有AIM-V培地中で培養した。10日後、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルのIL-2を、 125 U/ml のIL-2の最終濃度に到達するように培地に添加した。14日目にCTL活性を試験し、上記と同じ方法を用いてCTLクローンを増殖させた(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

【0151】

特異的CTL活性

特異的CTL活性を調べるために、インターフェロン(IFN) - 酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイおよびIFN - 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を行った。具体的には、ペプチドパルスしたTISI(1×10^4 個の細胞/ウェル)を刺激細胞として調製した。48ウェル中の培養細胞を応答細胞として使用した。IFN - ELISPOTアッセイおよびIFN - ELISAアッセイは、製造業者の手順に従って行った。

【0152】

プラスミドのトランスフェクション

標的遺伝子またはHLA-A*2402のオープンリーディングフレームをコードするcDNAをPCRによって増幅した。PCR増幅産物をpCAGGSベクターにクローニングした。製造業者の推奨手順に従ってリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、標的遺伝子陰性およびHLA-A24陰性細胞株であるCOS7にプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから2日後、トランスフェクトした細胞をversene(Invitrogen)を用いて回収し、CTL活性アッセイのための標的細胞(5×10^4 個の細胞/ウェル)として使用した。

【0153】

結果

FOX M1由来のHLA-A24結合ペプチドの予測

表1aおよび1bは、FOX M1の9merおよび10merのHLA-A24結合ペプチドを、結合親和性の高い順に示す。BIMASにより29種のペプチド(SEQ ID NO: 1~12およびSEQ ID NO: 15~31)が予測され、NetMHC 3.0により3種のペプチド(SEQ ID NO: 13~14およびSEQ ID NO: 32)が予測された。潜在的なHLA-A24結合能を有する合計32種のペプチドを選択して、エピトープペプチドを決定するために試験した。

【0154】

(表1a) FOX M1に由来する9merのHLA-A24結合ペプチド

10

20

30

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
316	RYLTLDQVF	432	1
262	IYTWIEDHF	140	2
451	LFNFIFLCL	50.4	3
455	IFLCLSVLL	36	4
483	LFGEFGSPL	28.8	5
443	DFGTPITSL	20	6
351	RNMTIKTEL	18.48	7
57	KFPAGIKII	15	8
133	RTEVTLETL	12	9
754	RSLTEGLVL	12	10
429	VFGYMSKFF	10	11
436	FFSGDLRDF	10	12
開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
524	EWSPAPSF	99	13
241	YMAMIQFAI	421	14

【 0 1 5 5 】

(表 1 b) FOXM1 に由来する 10mer の HLA - A 2 4 結合ペプチド

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
627	SYSQeVGGPF	140	15
240	SYMAmIQFAI	105	16
777	SFPGIDEDPL	30	17
453	NFIFICLSVL	30	18
382	QFPVnQSLVL	30	19
483	LFGEgFSPLL	24	20
435	KFFSgDLRDF	20	21
396	KVPLpLAASL	14.4	22
325	KPLDpGSPQL	14.4	23
443	DFGTpITSLF	14	24
318	LTLDqVFKPL	12.096	25
713	RLLSsEPLDL	12	26
513	RPIKvESPPL	12	27
7	RPLIKRRRL	12	28
376	SYLVpIQFPV	10.5	29
390	VLQPsVKVPL	10.08	30
238	PYSYmAMIQF	10	31
開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
264	TWIEDHFPYF	20	32

開始位置は、FOX M1のN末端からのアミノ酸残基の数を示す。

結合スコアおよび解離定数 [K d (n M)] は、「B I M A S」および「N e t M H C 3 . 0」から導き出している。

【 0 1 5 6 】

H L A - A * 2 4 0 2 拘束性のFOX M1由来予測ペプチドを用いたCTLの誘導、およびFOX M1由来ペプチドで刺激したCTL株の樹立

FOX M1由来のペプチドに対するCTLを、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。IFN - E L I S P O Tアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を決定した(図1 a ~ g)。それにより、FOX M1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (SEQ ID NO: 2)で刺激したウェル番号# 1、# 4、および# 7 (a)、FOX M1 - A 2 4 - 9 - 3 5 1 (SEQ ID NO: 7)で刺激した# 7 (b)、FOX M1 - A 2 4 - 9 - 5 7 (SEQ ID NO: 8)で刺激した# 5 (c)、FOX M1 - A 2 4 - 1 0 - 2 4 0 (SEQ ID NO: 16)で刺激した# 3 (d)、FOX M1 - A 2 4 - 1 0 - 3 1 8 (SEQ ID NO: 25)で刺激した# 6 (e)、FOX M1 - A 2 4 - 1 0 - 3 9 0 (SEQ ID NO: 30)で刺激した# 4 (f)、およびFOX M1 - A 2 4 - 1 0 - 2 3 8 (SEQ ID NO: 31)で刺激した# 5 (g)が、対照ウェルと比較して強力なIFN - 産生を示すことが示された。一方、表1 a および1 bに示した他のペプチドはH L A - A * 2 4 0 2との結合活性を有する可能性があったにもかかわらず、それらのペプチドを用いた刺激では強力なIFN - 産生は検出できなかった。例えば、ペプチドをパルスした標的細胞に対する、FOX M1 - A 2 4 - 9 - 3 1 6 (SEQ ID NO: 1)で刺激したCTL応答の典型的な陰性データ(h)。その結果、FOX M1由来の7種のペプチドが、強力なCTLを誘導し得るペプチドとしてスクリーニングされたことが示された。

【 0 1 5 7 】

FOX M1由来ペプチドに対するCTL株およびCTLクローンの樹立

FOX M1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (SEQ ID NO: 2)で刺激したウェル番号#

10

20

30

40

50

4 (a)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 4 0 (S E Q I D N O : 1 6) で刺激した # 3 (b)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 3 1 8 (S E Q I D N O : 2 5) で刺激した # 6 (c)、および FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 3 8 (S E Q I D N O : 3 1) で刺激した # 5 (d) 中の、IFN - E L I S P O T アッセイによって検出されるペプチド特異的な C T L 活性を示した細胞を増殖させて、C T L 株を樹立した。これらの C T L 株の C T L 活性を、IFN - E L I S A アッセイによって決定した (図 2 a ~ d)。それにより、すべての C T L 株が、ペプチドをパルスしなかった標的細胞と比較して、対応するペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な IFN - 産生を示すことが示された。さらに、C T L 株から限界希釈することにより C T L クローンを樹立し、ペプチドをパルスした標的細胞に対する C T L クローンからの IFN - 産生を、IFN - E L I S A アッセイによって決定した。図 3 において、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (S E Q I D N O : 2) (a)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 4 0 (S E Q I D N O : 1 6) (b)、および FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 3 8 (S E Q I D N O : 3 1) (c) で刺激した C T L クローンから強力な IFN - 産生が測定された。

【 0 1 5 8 】

FOX M 1 および H L A - A * 2 4 0 2 を外因的に発現する標的細胞に対する特異的 C T L 活性

これらのペプチドに対して産生された樹立 C T L 株および C T L クローンを、FOX M 1 および H L A - A * 2 4 0 2 遺伝子を内因的に発現する標的細胞を認識する能力について試験した。全長 FOX M 1 および H L A - A * 2 4 0 2 遺伝子の両方をトランスフェクトした C O S 7 細胞 (FOX M 1 および H L A - A * 2 4 0 2 遺伝子を外因的に発現する標的細胞の特定のモデル) に対する特異的 C T L 活性を、対応するペプチドによって産生された C T L 株および C T L クローンをエフェクター細胞として用いて試験した。全長 FOX M 1 遺伝子または H L A - A * 2 4 0 2 のいずれかをトランスフェクトした C O S 7 細胞を、対照として調製した。図 4 において、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (S E Q I D N O : 2) で刺激した C T L は、FOX M 1 および H L A - A * 2 4 0 2 の両方を発現する C O S 7 細胞に対する強力な C T L 活性を示した。一方、対照に対する有意な特異的 C T L 活性は検出されなかった。したがってこれらのデータにより、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (S E Q I D N O : 2) は、内因的にプロセシングされて、H L A - A * 2 4 0 2 分子と共に標的細胞上に発現し、C T L によって認識されることが明確に実証された。これらの結果から、FOX M 1 に由来するこのペプチドが、FOX M 1 を発現する腫瘍を有する患者に対してがんワクチンを適用するために利用可能であり得ることが示された。

【 0 1 5 9 】

抗原ペプチドの相同性解析

FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (S E Q I D N O : 2)、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 3 5 1 (S E Q I D N O : 7)、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 5 7 (S E Q I D N O : 8)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 4 0 (S E Q I D N O : 1 6)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 3 1 8 (S E Q I D N O : 2 5)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 3 9 0 (S E Q I D N O : 3 0)、および FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 3 8 (S E Q I D N O : 3 1) で刺激した C T L は、有意でかつ特異的な C T L 活性を示した。この結果は、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 2 (S E Q I D N O : 2)、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 3 5 1 (S E Q I D N O : 7)、FOX M 1 - A 2 4 - 9 - 5 7 (S E Q I D N O : 8)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 4 0 (S E Q I D N O : 1 6)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 3 1 8 (S E Q I D N O : 2 5)、FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 3 9 0 (S E Q I D N O : 3 0)、および FOX M 1 - A 2 4 - 1 0 - 2 3 8 (S E Q I D N O : 3 1) の配列が、ヒト免疫系を感作することが知られている他の分子に由来するペプチドと相同的であるという事実に起因する可能性がある。この可能性を排除するため、B L A S T アルゴリズム (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) を用いて、クエリーとしてのこれらの

ペプチド配列に対して相同性解析を行ったが、有意な相同性を有する配列は認められなかった。相同性解析の結果から、FOX M1 - A24 - 9 - 262 (SEQ ID NO: 2)、FOX M1 - A24 - 9 - 351 (SEQ ID NO: 7)、FOX M1 - A24 - 9 - 57 (SEQ ID NO: 8)、FOX M1 - A24 - 10 - 240 (SEQ ID NO: 16)、FOX M1 - A24 - 10 - 318 (SEQ ID NO: 25)、FOX M1 - A24 - 10 - 390 (SEQ ID NO: 30)、およびFOX M1 - A24 - 10 - 238 (SEQ ID NO: 31)の配列は固有のものであり、したがって、本発明者らの知る限りでは、これらの分子が、ある非関連分子に対して意図しない免疫応答を引き起こす可能性はほとんどないことが示される。

【0160】

10

結論として、FOX M1由来の新規HLA - A24エピトープペプチドが同定された。さらに、FOX M1のエピトープペプチドが、がん免疫療法に適用可能であり得ることが実証された。

【0161】

産業上の利用可能性

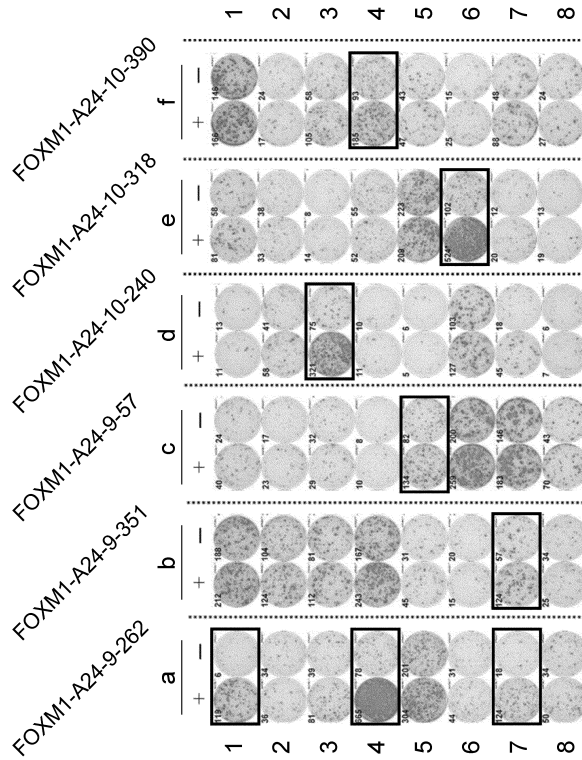
本発明は、新規TAA、特に強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し、幅広いがんのタイプに対する適用性を有する、FOX M1由来の新規TAAを提供する。このようなTAAは、FOX M1に関連した疾患、例えばがん、より具体的にはAML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、肝癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、軟部組織腫瘍、および精巣腫瘍に対するペプチドワクチンとして有用である。

20

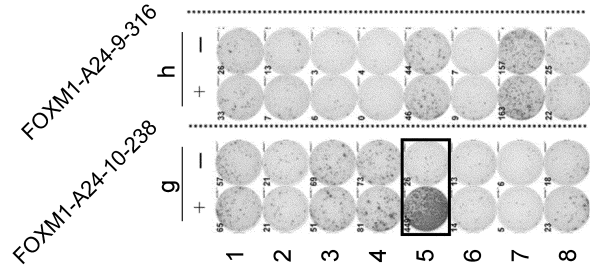
【0162】

本発明はその特定の態様に関して本明細書において詳細に記載されるが、前述の説明は本質的に例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。当業者は、日常的な実験を通して、その境域および境界が添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされ得ることを容易に理解するであろう。

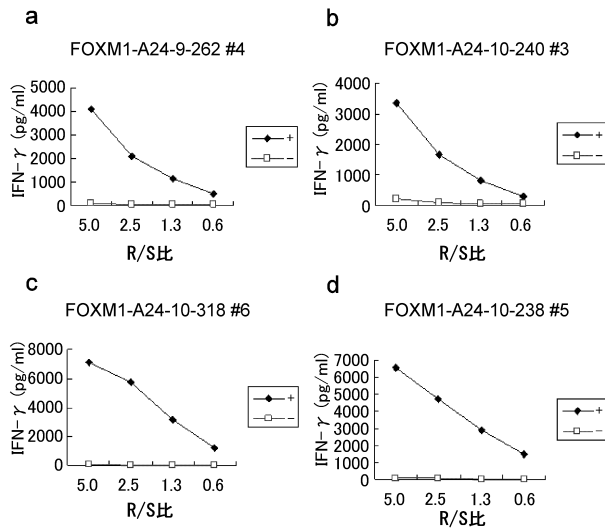
【図 1 - 1】



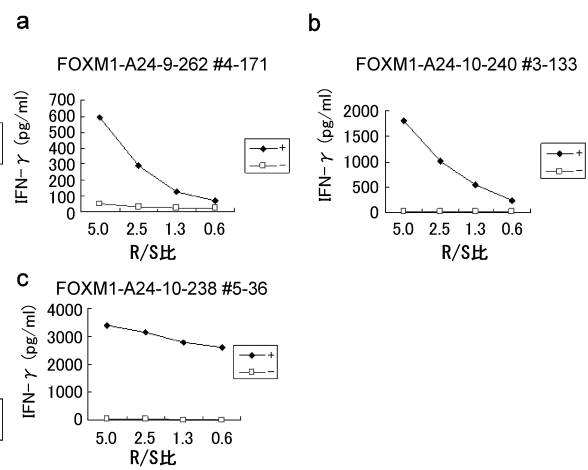
【図 1 - 2】



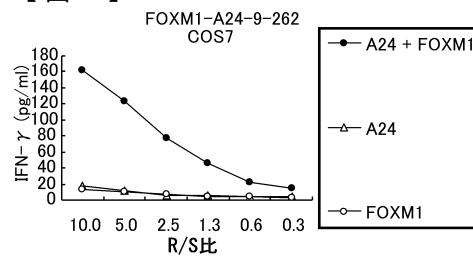
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0005728717000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

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

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

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

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

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第2009/025196(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/BIOSIS(STN)

Thomson Innovation