

(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2013-540419

(P2013-540419A)

(43) 公表日 平成25年11月7日(2013.11.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 5 0
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00 1 O 1	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-510816 (P2013-510816)	(71) 出願人	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
(86) (22) 出願日	平成23年9月6日 (2011.9.6)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月2日 (2013.5.2)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/JP2011/004987	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02012/032764	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成24年3月15日 (2012.3.15)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/380,611	(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(32) 優先日	平成22年9月7日 (2010.9.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T T L L 4 ベプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【要約】

がんに対するペプチドワクチンを本明細書に記載する。特に、C T L を誘発する T T L L 4 遺伝子に由来するエピトープペプチドを提供する。そのようなペプチドを標的とする抗原提示細胞および単離された C T L 、ならびに抗原提示細胞または C T L を誘導するための方法も提供する。本発明はさらに、T T L L 4 に由来するペプチドまたはポリ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薬学的組成物を提供する。さらに、本発明は、T T L L 4 に由来するペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくは該ペプチドを提示する抗原提示細胞、または本発明の薬学的組成物を使用して、がん(腫瘍)を治療および/もしくは予防(p r o p h y l a x i s) (すなわち、予防(p r e v e n t i n g))、ならびに/または術後のその再発を予防するための方法、ならびに C T L を誘導するための方法、抗腫瘍免疫性を誘導するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C T L 誘導能を有する単離されたペプチドであって、T T L L 4 のアミノ酸配列またはその免疫学的活性断片からなる、単離されたペプチド。

【請求項 2】

S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 および 59 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 3】

S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 および 59 からなる群より選択されるアミノ酸配列において 1 個、2 個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および / または付加されているアミノ酸配列を含み、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。 10

【請求項 4】

H L A 抗原と結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

【請求項 5】

前記 H L A 抗原が H L A - A 2 4 または H L A - A 2 である、請求項 4 記載の単離されたペプチド。 20

【請求項 6】

以下の特徴の一方または両方を有する、請求項 5 記載のペプチド：
(a) S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、および 37 からなる群より選択されるアミノ酸配列の 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、またはトリプトファンからなる群より選択される；ならびに

(b) S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、および 37 からなる群より選択されるアミノ酸配列の C 末端アミノ酸が、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、またはメチオニンからなる群より選択される。 30

【請求項 7】

以下の特徴の一方または両方を有する、請求項 5 記載のペプチド：
(a) S E Q I D N O : 38、39、44 および 59 からなる群より選択されるアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される；ならびに

(b) S E Q I D N O : 38、39、44 および 59 からなる群より選択されるアミノ酸配列の C 末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。 40

【請求項 8】

ノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の単離された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 10】

C T L を誘導するための組成物であって、請求項 1 ~ 8 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 9 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 11】

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のための薬学的組成物であって、請求項 1 ~ 8 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 9 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。 50

【請求項 1 2】

H L A 抗原が H L A - A 2 4 または A 2 である対象への投与のために製剤化される、請求項 1 1 記載の薬学的組成物。

【請求項 1 3】

以下からなる群より選択される段階を含む、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：

(a) A P C を、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載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) 請求項 1 ~ 8 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 A P C に導入する段階。

10

【請求項 1 4】

以下からなる群より選択される段階を含む、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 抗原と請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を表面上に提示する A P C と共に培養する段階；

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

(c) 請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチドと結合する 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。

20

【請求項 1 5】

H L A 抗原と請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された A P C。

【請求項 1 6】

請求項 1 3 記載の方法によって誘導される、請求項 1 5 記載の A P C。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 8 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。

【請求項 1 8】

請求項 1 4 記載の方法によって誘導される、請求項 1 7 記載の C T L。

【請求項 1 9】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチド、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該対象に投与する段階を含む、方法。

30

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的活性断片。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞。

40

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のペプチド、請求項 9 記載のヌクレオチド、または請求項 2 0 記載の抗体を含む、診断キット。

【請求項 2 4】

S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 および 59 からなる群より選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

50

【0001】

本発明は、生物科学の分野、より具体的にはがん療法の分野に関する。特に本発明は、がんワクチンとして有効な新規ペプチド、腫瘍を治療および予防するための薬物、ならびに腫瘍を診断するための方法に関する。

【0002】**優先権**

本出願は、2010年9月7日に出願された米国仮特許出願第61/380,611号の恩典を主張し、その全体の内容が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】**【0003】**

C D 8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) は、主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 分子上に見出される腫瘍関連抗原 (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、主として免疫学的アプローチによって発見されている (非特許文献 1 ; 非特許文献 2) 。これらの T A A のうちのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発の過程にある。

10

【0004】

好ましい T A A は、がん細胞の増殖および生存に不可欠な T A A である。そのような T A A を免疫療法の標的として用いることにより、療法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、突然変異、または下方制御に起因し得るがん細胞の免疫回避の詳述されているリスクが最小限に抑えられ得る。したがって、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し得る新規 T A A の同定により、進行中の様々な種類のがんに対するペプチドワクチン接種戦略のさらなる開発およびひいては臨床応用が保証される (非特許文献 3 ; 非特許文献 4 ; 非特許文献 5 ; 非特許文献 6 ; 非特許文献 7 ; 非特許文献 8 ; 非特許文献 9 ; 非特許文献 10) 。現在までに、これらの T A A 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、これらのがんワクチンの治験においては低い客観的奏功率しか観察されていない (非特許文献 11 ; 非特許文献 12 ; 非特許文献 13) 。したがって、免疫療法の標的としての新規 T A A が依然として必要とされている。

20

【0005】

T T L L 4 (G e n B a n k アクセッション番号 : N P _ 0 5 5 4 5 5) 、チューブリンチロシンリガーゼ様ファミリーメンバー 4 (t u b u l i n t y r o s i n e l i g a s e - l i k e f a m i l y m e m b e r 4) は、ポリグルタミラーゼ酵素である。この酵素は、いくつかの微小管機能において重要な役割を担う。ポリグルタミル化は、標的タンパク質の内部グルタミン酸残基に対するグルタミン酸の連続的共有結合により生じる可逆的修飾である (非特許文献 14) 。その生物学的意義はよく知られていない。ポリグルタミル化の数少ない既知の標的は、微小管の構造単位である - チューブリンおよび - チューブリン (非特許文献 15) 、ならびにヌクレオソームアセンブリータンパク質、 N A P 1 および N A P 2 (非特許文献 16) である。

30

【0006】

肺管腺癌 (P D A C) 細胞のゲノムワイド遺伝子発現プロファイル解析により、 T T L L 4 は P D A C 中で過剰発現されることが示された。さらに、 P D A C 細胞における s i R N A による T T L L 4 のノックダウンにより P D A C 細胞の増殖が減衰し、 T T L L 4 の外因的導入により細胞増殖が促進した (非特許文献 17) 。ノーザンプロットティング解析により、 T T L L 4 は精巣を除く正常器官中で発現されないことが実証された。

40

【0007】

総合すると、これらのデータにより、 T T L L 4 ががん免疫療法プロトコール、特に T T L L 4 を発現する腫瘍を有する患者に適切な標的であり得ることが示唆される。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0008】**

50

- 【非特許文献 1】Boon T, Int J Cancer 1993, 54(2): 177-80
 【非特許文献 2】Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996, 183(3): 725-9
 【非特許文献 3】Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996, 88(20): 1442-55
 【非特許文献 4】Butterfield LH et al., Cancer Res 1999, 59(13): 3134-42
 【非特許文献 5】Vissers JL et al., Cancer Res 1999, 59(21): 5554-9
 【非特許文献 6】van der Burg SH et al., J Immunol 1996, 156(9): 3308-14
 【非特許文献 7】Tanaka F et al., Cancer Res 1997, 57(20): 4465-8
 【非特許文献 8】Fujie T et al., Int J Cancer 1999, 80(2): 169-72
 【非特許文献 9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 459-66
 【非特許文献 10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999, 81(3): 387-94
 【非特許文献 11】Belli F et al., J Clin Oncol 2002, 20(20): 4169-80
 【非特許文献 12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002, 188: 33-42
 【非特許文献 13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004, 10(9): 909-15
 【非特許文献 14】Eddle B. et al., Science. 1990; 247(4938): 83-5
 【非特許文献 15】Rudiger M. et al., FEBS Lett. 1992; 308(1): 101-5
 【非特許文献 16】Regnard C., J Biol Chem. 2000; 275(21): 15969-76
 【非特許文献 17】Kotoe K., Cancer Res. 2010; 70(10): 4024-33

【発明の概要】

【0009】

本発明は、免疫療法の適切な標的として役立つ可能性のある新規ペプチドの発見に少なくとも一部基づいている。TAAは一般に免疫系によって「自己」として認識され、そのため多くの場合は自然免疫原性を有しないため、適切な標的の発見は極めて重要である。本発明を通して、TTL4 (GenBank アクセション番号 NM_014640 (SEQ ID NO: 79) の遺伝子によってコードされる SEQ ID NO: 80) は、がん細胞中で、特に、限定されないが、膀胱癌、胆管細胞癌、慢性骨髄性白血病 (CML)、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、小細胞肺癌 (SCLC)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、軟部組織腫瘍および骨肉腫において特異的に過剰発現されることが実証される。したがって、本発明は、適切ながんマーカーおよび免疫療法の標的についての候補として TTL4 に着目する。

【0010】

本発明はさらに、TTL4 に特異的な CTL を誘導する能力を有する TTL4 の遺伝子産物中の特異的なエピトープペプチドの同定に関する。以下に詳述するように、健常ドナーから得た末梢血単核細胞 (PBMC) を、TTL4 由来の HLA-A^{*}2402 または HLA-A^{*}0201 結合候補ペプチドを用いて刺激した。その後、各候補ペプチドをパルスした HLA-A24 または HLA-A2 陽性標的細胞に対する特異的細胞傷害性を有する CTL 株を樹立した。本明細書における結果は、これらのペプチドが、TTL4 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 HLA-A24 拘束性または HLA-A2 拘束性エピトープペプチドであることを実証している。これらの結果は、TTL4 は免疫原性が強く、かつ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をさらに示している。

【0011】

したがって、HLA 抗原と結合し、TTL4 配列 (SEQ ID NO: 80) またはその免疫原性断片を含む単離されたペプチドを提供することは、本発明の 1 つの目的である。これらのペプチドは、CTL 誘導能を有することが予測され、したがって、インビトロ、エクスピボもしくはインビボで CTL を誘導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ために用いることができ、がんの例には、限定されるものではないが、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。好ましいペプチドは、ノナペプチドおよびデカペプチドであり、より好ましくは、SEQ ID NO: 1、3~37 および 38~

10

20

30

40

50

73の中より選択されるアミノ酸配列を有するノナペプチドおよびデカペプチドである。これらのうち、SEQ ID NO: 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44および59の中より選択されるアミノ配列を有するペプチドが最も好ましい。

【0012】

本発明はまた、得られる改変ペプチドが元の未改変ペプチドの必要なCTL誘導能およびHLA結合能を保持する限り、1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されているSEQ ID NO: 1、3～37および38～73の中より選択されるアミノ酸配列を有する改変ペプチドも企図する。

【0013】

本発明はさらに、本発明のペプチドのいずれか1種をコードする単離されたポリヌクレオチドを包含する。これらのポリヌクレオチドは、CTL誘導能を有するAPCを誘導または調製するために用いることができる。本発明の上記ペプチドと同様に、そのようなAPC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。

【0014】

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、各ペプチドを標的とするCTLを誘導するように、好ましくはAPCの表面上に提示される。したがって、CTLを誘導する剤および/または組成物であって、本発明の1種もしくは複数種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含むそのような組成物または剤を提供することは、本発明の1つの目的である。そのような剤、物質、および/または組成物は、原発性がん、その転移または術後の再発の治療および/または予防に用いることができる。本発明によって企図されるがんの例には、限定されるものではないが、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれる。

【0015】

本発明はさらに、上記の原発性がん、転移または術後再発の治療および/または予防のために製剤化される本発明の1種または複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを含むかまたは取り込む薬学的な組成物または剤を企図する。本発明の薬剤および/または組成物は、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APCまたはエキソソームを含み得る。

【0016】

本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを、例えば、対象由来のAPCを該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APCに導入することにより、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示するAPCを誘導するために用いることができる。そのようなAPCは、標的ペプチドに対する高いCTL誘導能を有し、がん免疫療法に有用である。したがって、本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための方法、ならびに該方法によって得られるAPCを包含する。

【0017】

CTLを誘導するための方法を提供することは本発明のさらなる目的であり、そのような方法は、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明の1種もしくは複数種のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共に培養する段階、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明の1種もしくは複数種のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共に培養する段階、または本発明のペプチドと結合するT細胞受容体(TCR)サブユニットポリペプチドをコードする1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む遺伝子を導入する段階を含む。そのような方法によって得られるCTLは、がん、より詳細には、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫の治療および/または予防において用いられる。したがって、CTLを提供することは、本発明のさらに別の目

10

20

30

40

50

的である。

【0018】

H LA 抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示する単離された A P C を提供することは、本発明のさらに別の目的である。本発明はさらに、本発明のペプチドを標的とする単離された C T L を提供する。これらの A P C および C T L は、がん免疫療法に用いることができる。

【0019】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、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含む組成物を対象に投与する段階を含むそのような方法を提供することは、本発明のさらに別の目的である。

10

【0020】

本発明の適用性は、T T L L 4 の過剰発現に関連するかまたはT T L L 4 の過剰発現から生じる多数の疾患のいずれにも及び、その疾患の例には、限定されるものではないが、膀胱癌、胆管細胞癌、C M L 、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、S C L C 、N S C L C 、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれる。上記に加え、本発明のその他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことによって、より十分に明らかになるであろう。しかしながら、前述の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。特に、本発明をいくつかの特定の態様を参照して本明細書において説明するが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが理解されよう。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明のその他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかになり、当業者には容易に明白になるであろう。そのような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図面、およびそれらから引き出されるあらゆる妥当な推論と併せて上記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0021】

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。

【0022】

【図1-1】 図1-1は、T T L L 4 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一連の写真 (a) ~ (j) から構成される。T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 5 0 (S E Q I D N O : 1) を用いたウェル番号 # 7 (a) 、T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 9 (S E Q I D N O : 6) を用いた # 8 (b) 、T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 9 3 (S E Q I D N O : 1 1) を用いた # 8 (c) 、T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 6 9 1 (S E Q I D N O : 1 2) を用いた # 5 (d) 、T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 1 0 3 (S E Q I D N O : 1 6) を用いた # 1 (e) 、T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 3 (S E Q I D N O : 2 0) を用いた # 3 (f) 、T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 7 7 3 (S E Q I D N O : 2 1) を用いた # 3 (g) 、T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 8 8 3 (S E Q I D N O : 2 2) を用いた # 8 (h) 、T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 1 8 6 (S E Q I D N O : 2 8) を用いた # 2 (i) 、T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 2 2 (S E Q I D N O : 2 9) を用いた # 3 (j) における C T L はそれぞれ、対照と比較して強力な I F N - 産生を示した。これらの写真的ウェル上の四角は、対応するウェルからの細胞を、C T L 株を樹立するために増殖させたことを示す。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する I F N - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する I F

40

50

N - 產生を示す。

【0023】

【図1-2】図1-2は、TTL4由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるIFN-ELISPOTアッセイの結果を示す一連の写真(k)~(m)から構成される。TTL4-A24-10-994(SEQ ID NO:32)を用いたウェル番号#1(k)およびTTL4-A24-10-891(SEQ ID NO:37)を用いた#6(l)におけるCTLはそれぞれ、対照と比較して強力なIFN-產生を示した。これらの写真的ウェル上の四角は、対応するウェルからの細胞を、CTL株を樹立するために増殖させたことを示す。対照的に、典型的な陰性データの例として、TTL4-A24-9-579(SEQ ID NO:2)で刺激したCTLからは、特異的IFN-產生が検出されなかった(m)。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-產生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN-產生を示す。

10

【0024】

【図2】図2は、TTL4-A24-9-750(SEQ ID NO:1)(a)、TTL4-A24-9-79(SEQ ID NO:6)(b)、TTL4-A24-9-691(SEQ ID NO:12)(c)、TTL4-A24-9-103(SEQ ID NO:16)(d)、TTL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20)(e)およびTTL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21)(f)で刺激したCTL株のIFN-產生を順に実証するIFN-ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ(a)~(f)から構成される。これらの結果は、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-產生を示すことを実証している。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-產生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN-產生を示す。

20

【0025】

【図3】図3は、TTL4-A24-9-750(SEQ ID NO:1)(a)、TTL4-A24-9-79(SEQ ID NO:6)(b)、TTL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20)(c)およびTTL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21)(d)で刺激したCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローニングのIFN-產生を示す一連の折れ線グラフ(a)~(d)から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローニングが、対照と比較して強力なIFN-產生を示すことを実証している。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-產生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN-產生を示す。

30

【0026】

【図4】図4は、TTL4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活性を示す一連の折れ線グラフ(a)~(c)から構成される。HLA-A^{*}2402または全長TTL4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。TTL4-A24-9-103(SEQ ID NO:16)(a)を用いて樹立されたCTL株ならびにTTL4-A24-10-103(SEQ ID NO:20)(b)およびTTL4-A24-10-773(SEQ ID NO:21)(c)を用いて樹立されたCTLクローニングは、TTL4およびHLA-A^{*}2402の両方を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)。一方、HLA-A^{*}2402(三角)またはTTL4(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。

40

【0027】

【図5】図5は、TTL4由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるIFN-ELISPOTアッセイの結果を示す一連の写真(a)~(d)から構成される。TTL4-A02-9-222(SEQ ID NO:38)を用いたウェル番号#3(a)

50

)、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 8 0 5 (SEQ ID NO: 39)を用いた#7(b)、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 6 6 (SEQ ID NO: 44)を用いた#8(c)およびT T L L 4 - A 0 2 - 1 0 - 5 7 4 (SEQ ID NO: 59)を用いた#7(d)におけるCTLはそれぞれ、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。これらの写真のウェル上の四角は、対応するウェルからの細胞を、CTL株を樹立するために増殖させたことを示す。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ていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

【0028】

【図6】図6は、IFN- γ ELISAアッセイによって検出した、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 2 2 2 (SEQ ID NO: 38) (a)、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 8 0 5 (SEQ ID NO: 39) (b)、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 6 6 (SEQ ID NO: 44) (c)およびT T L L 4 - A 0 2 - 1 0 - 5 7 4 (SEQ ID NO: 59) (d)で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ(a)~(d)から構成される。これらの結果は、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 産生を示すことを実証している。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ていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

10

【0029】

【図7】図7は、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 2 2 2 (SEQ ID NO: 38) (a)、T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 8 0 5 (SEQ ID NO: 39) (b)およびT T L L 4 - A 0 2 - 1 0 - 5 7 4 (SEQ ID NO: 59) (c)で刺激したCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローニングのIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ(a)~(c)から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローニングが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。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ていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

20

【0030】

【図8】図8は、T T L L 4 およびHLA-A*0201を外因的に発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す一連の折れ線グラフから構成される。HLA-A*0201または全長T T L L 4 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。T T L L 4 - A 0 2 - 9 - 8 0 5 (SEQ ID NO: 39) (a)を用いて樹立されたCTLクローニングおよびT T L L 4 - A 0 2 - 9 - 6 6 (SEQ ID NO: 44) (b)を用いて樹立されたCTL株は、T T L L 4 およびHLA-A*0201の両方を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)。一方、HLA-A*0201(三角)またはT T L L 4(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。

30

【発明を実施するための形態】

40

【0031】

態様の説明

上記概要に加え、以下のものを提供することは、本発明の目的である:

[1] CTL誘導能を有する単離されたペプチドであって、T T L L 4 のアミノ酸配列またはその免疫学的活性断片からなる、単離されたペプチド。

[2] SEQ ID NO: 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 および 59 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[1]に記載の単離されたペプチド。

[3] SEQ ID NO: 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 および 59 からなる群より選択されるアミノ酸配列にお

50

いて1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されているアミノ酸配列を含み、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導能を有する、単離されたペプチド。

[4] HLA抗原と結合する、[1]～[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド。

[5] 前記HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である、[4]に記載の単離されたペプチド。

[6] 以下の特徴の一方または両方を有する、[5]に記載のペプチド：

(a) SEQ ID NO: 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、および37からなる群より選択されるアミノ酸配列の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、またはトリプトファンからなる群より選択される、ならびに

(b) SEQ ID NO: 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、および37からなる群より選択されるアミノ酸配列のC末端アミノ酸が、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、またはメチオニンからなる群より選択される。

[7] 以下の特徴の一方または両方を有する、[5]に記載のペプチド：

(a) SEQ ID NO: 38、39、44および59からなる群より選択されるアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される；ならびに

(b) SEQ ID NO: 38、39、44および59からなる群より選択されるアミノ酸配列のC末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。

[8] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1]～[7]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド。

[9] [1]～[8]のいずれか1つに記載の単離されたペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

[10] CTLを誘導するための組成物であって、[1]～[8]のいずれか1つに記載の1種もしくは複数種のペプチド、または[9]に記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物。

[11] 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のための薬学的組成物であって、[1]～[8]のいずれか1つに記載の1種もしくは複数種のペプチド、または[9]に記載の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。

[12] HLA抗原がHLA-A24またはA2である対象への投与のために製剤化される、[11]に記載の薬学的組成物。

[13] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTL誘導能を有する抗原提示細胞（APC）を誘導するための方法：

(a) APCを、[1]～[8]のいずれか1つに記載のペプチドとインビトロ、エクスビオまたはインビボで接触させる段階；および

(b) [1]～[8]のいずれか1つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[14] 以下からなる群から選択される段階を含む、CTLを誘導するための方法：

(a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[8]のいずれか1つに記載のペプチドとの複合体を表面上に提示するAPCと共に培養する段階、

(b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[8]のいずれか1つに記載のペプチドとの複合体を表面上に提示するエキソソームと共に培養する段階、および

(c) [1]～[8]のいずれか1つに記載のペプチドと結合するT細胞受容体（TCR）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。

[15] HLA抗原と[1]～[8]のいずれか1つに記載のペプチドとの複合体を自身

10

20

30

40

50

の表面上に提示する、単離されたA P C。

[1 6] [1 3] に記載の方法によって誘導される、[1 5] に記載のA P C。

[1 7] [1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載のペプチドを標的とする、単離されたC T L。

[1 8] [1 4] に記載の方法によって誘導される、[1 7] に記載のC T L。

[1 9] がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、[1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載のペプチド、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該対象に投与する段階を含む、方法。

[2 0] [1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的活性断片。 10

[2 1] [1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

[2 2] [2 1] に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞。

[2 3] [1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載のペプチド、[9] に記載のヌクレオチド、または [2 0] に記載の抗体を含む、診断キット。

[2 4] S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44 および 59 からなる群より選択される、[1] ~ [8] のいずれか 1 つに記載の単離されたペプチド。 20

【 0 0 3 2 】

あるいは、別の態様において、本発明はまた、以下のペプチドおよびその使用を提供する：

[1] C T L 誘導能を有する、単離されたペプチドであって、T T L L 4 のアミノ酸配列もしくはその免疫学的活性断片からなるペプチド、または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 : 8 0 のアミノ酸配列からなるペプチドの免疫学的活性断片のアミノ酸配列を含むもしくはその配列からなるペプチド。

[2] S E Q I D N O : 1、3 ~ 3 7 および 3 8 ~ 7 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[1] に記載の単離されたペプチド。 30

[3] 元のペプチドのC T L 誘導能を保持する改変ペプチドを生じさせるために 1 個、2 個、または数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失、または付加されている、[1] または [2] に記載の単離されたペプチド。

[4] H L A 抗原と結合する、[1] ~ [3] に記載の単離されたペプチド。

[5] 前記H L A 抗原がH L A - A 2 4 またはH L A - A 2 である、[4] に記載の単離されたペプチド。

[6] H L A - A 2 4 との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、[3] ~ [5] に記載の単離されたペプチド：

(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、またはトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている；および

(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、またはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている。 40

[7] H L A - A 2 との関連において、以下からなる群より選択される少なくとも 1 個の置換を有する、[3] ~ [5] に記載の単離されたペプチド：

(a) N末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される；ならびに

(b) C末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。

[8] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1] ~ [7] のいずれか 1 つに記載の単離されたペプチド。 50

【0033】

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のいかなる方法および材料も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、本発明の材料および方法を記載する前に、これらの記載が説明のものにすぎず、限定されるものではないことが理解されるべきである。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例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことも理解されるべきである。さらに、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しない。

10

【0034】

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、その全体が参考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、本発明が先行発明によりそのような開示に先行する権利を与えられないと承認するものとしては解釈されるべきではない。

別段の定めのない限り、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によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。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、および例は、単に例証するためのものであり、限定することは意図しない。

20

【0035】

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、特に別段の指定のない限り「少なくとも1つ」を意味する。

【0036】

物質（例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等）に関して使用する「単離された」という用語は、該物質が、そうでなければ天然源中に含まれ得る少なくとも1種の物質を実質的に含まないことを示す。したがって、単離または精製されたペプチドは、細胞材料、例えば糖質、脂質、またはペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの他の混入タンパク質を実質的に含まないかまたは化学合成される場合には化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、それが単離された細胞または組換え産生された細胞の細胞成分から分離されたペプチドの調製物を含む。したがって、細胞材料を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%、または5%（乾燥重量ベースで）未満の異種タンパク質（本明細書において「混入タンパク質」とも称する）を有するポリペプチドの調製物を含む。ペプチドを組換え産生する場合、ペプチドは、好ましくは、培養培地も実質的に含まず、培養培地をペプチド調製物の容量の約20%、10%、または5%未満で有するペプチドの調製物を含む。ペプチドを化学合成によって生成する場合、ペプチドは、好ましくは、化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、ペプチドの合成に関する化学物質前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容量の約30%、20%、10%、5%（乾燥重量ベースで）未満で有するペプチドの調製物を含む。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドを含むことは、例えば、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクーマシーブリリアントブルー染色等の後の単一バンドの出現によって示すことができる。好ましい態様において、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは、単離または精製される。

30

【0037】

「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個もしく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、ならびに天然アミノ酸ポリマーに適用され

40

50

る。

【0038】

本明細書で時として用いる「オリゴペプチド」という用語は、長さが20残基またはそれ未満、典型的には15残基またはそれ未満の本発明のペプチド、および典型的には約8～約11残基、しばしば約9または10残基から構成される本発明のペプチドを指すのに用いられる。後者はそれぞれ、本明細書において「ノナペプチド」および「デカペプチド」と称される。

【0039】

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、D-カルボキシグルタミン酸、およびD-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。

【0040】

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

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「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、特に別段の指定のない限り、一般に受け入れられている1文字コードで記載される。

【0041】

「剤」、および「組成物」という用語は本明細書で互換的に用いられ、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組み合わせから直接または間接的に生じる任意の生成物を指す。薬学的組成物に関するそのような用語は、有効成分と担体を構成する不活性成分とを含む生成物、ならびに任意の2つもしくはそれ以上の成分の組み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、1つもしくは複数の成分の解離から、または1つもしくは複数の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。したがって、本発明の薬学的組成物は、本発明の化合物と薬学的または生理学的に許容される担体とを混合することにより作製される任意の組成物を包含する。

【0042】

本明細書における「有効成分」という用語は、生物学的活性または生理的活性のある、剤または組成物中の物質を指す。特に、薬学的な剤または組成物との関連において、「有効成分」という用語は、目的の薬理学的効果を示す物質を指す。例えば、がんの治療または予防に用いるための薬学的な剤または組成物の場合、剤または組成物中の有効成分は、がん細胞および/または組織に対して直接的または間接的に、少なくとも1つの生物学的作用または生理的作用をもたらし得る。好ましくは、そのような作用には、がん細胞増殖の低下または阻害、がん細胞および/または組織の損傷または殺傷などが含まれ得る。典型的には、有効成分の間接的効果は、がん細胞を認識または殺傷するCTLの誘導である。製剤化される前には、「有効成分」は「バルク」、「原薬」、または「原体」とも称することができる。

【0043】

本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体增量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入材料を含むがこれらに限定されない、薬学的または生理学的に許容される材料、組成物、物質、また

10

20

30

40

50

は媒体を意味する。

【0044】

いくつかの本発明の薬学的な剤または組成物は、特にワクチンとして使用される。本発明との関連において、「ワクチン」という語句（「免疫原性組成物」とも称される）は、動物に接種した際に抗腫瘍免疫を改善、増強および／または誘導する機能を有する剤または組成物を指す。

【0045】

別段の定めのない限り、「がん」という用語は、T T L L 4 遺伝子を過剰発現するがんまたは腫瘍を指し、その例には、膀胱癌、胆管細胞癌、慢性骨髄性白血病（C M L）、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、小細胞肺癌（S C L C）、非小細胞肺癌（N S C L C）、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。
10

【0046】

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

【0047】

別段の定めのない限り、「H L A - A 2 4」という用語は、その例には、H L A - A * 2 4 0 1、H L A - A * 2 4 0 2、H L A - A * 2 4 0 3、H L A - A * 2 4 0 4、H L A - A * 2 4 0 7、H L A - A * 2 4 0 8、H L A - A * 2 4 2 0、H L A - A * 2 4 2 5 およびH L A - A * 2 4 8 8が含まれるが、これらに限定されないサブタイプを含むH L A - A 2 4型を指す。
20

【0048】

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「H L A - A 2」という用語は、典型的には、その例には、H L A - A * 0 2 0 1、H L A - A * 0 2 0 2、H L A - A * 0 2 0 3、H L A - A * 0 2 0 4、H L A - A * 0 2 0 5、H L A - A * 0 2 0 6、H L A - A * 0 2 0 7、H L A - A * 0 2 1 0、H L A - A * 0 2 1 1、H L A - A * 0 2 1 3、H L A - A * 0 2 1 6、H L A - A * 0 2 1 8、H L A - A * 0 2 1 9、H L A - A * 0 2 2 8 およびH L A - A * 0 2 5 0が含まれるが、これらに限定されないサブタイプを指す。
30

【0049】

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「キット」という用語は、試薬と他の材料との組み合わせに関して用いられる。本明細書では、キットはマイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが企図される。「キット」という用語は、試薬および／または材料の特定の組み合わせに限定されないことが意図される。

【0050】

対象または患者との関連において、本明細書で用いる「対象の（または患者の）H L A 抗原はH L A - A 2 4 またはH L A - A 2である」という語句は、対象または患者がM H C（主要組織適合複合体）クラスI分子としてのH L A - A 2 4 またはH L A - A 2 抗原遺伝子をホモ接合的またはヘテロ接合的に保有し、H L A - A 2 4 またはH L A - A 2 抗原が対象または患者の細胞においてH L A 抗原として発現していることを指す。
40

【0051】

本発明の方法および組成物ががんの「治療」との関連において有用である限り、治療が、T T L L 4 遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、広がり、もしくは転移能の減少などの臨床的利点をもたらす場合に、治療は「有効である」と見なされる。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、がんの形成が遅延されるもしくは妨げられるか、またはがんの臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、特定の腫瘍の種類を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。

【0052】

本発明の方法および組成物ががんの「予防 (p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s) 」との関連において有用である限り、そのような用語は本明細書において互換的に用いられ、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働きを指す。予防 (p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s) 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 (p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s) 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 (p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s) は、疾患の進行および症状の出現を予防することに加え、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働きを包含する。あるいは、予防 (p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s) は、特定の障害の重症度を緩和すること、例えば腫瘍の増殖および転移を減少させることを目的とした広範囲の予防的療法を含み得る。

10

【 0 0 5 3 】

本発明との関連において、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、がん細胞の外科的切除、がん性細胞の増殖の阻害、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緩和する。例えば、症状の軽減または改善は効果的な治療および／または予防を構成し、10%、20%、30%、もしくはそれ以上の軽減もしくは安定した疾患を含む。

20

【 0 0 5 4 】

本発明との関連において、「抗体」という用語は、指定のタンパク質またはそのペプチドと特異的に反応する免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体には、ヒト抗体、靈長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射標識と融合させた抗体、および抗体断片が含まれ得る。さらに、本明細書において抗体は広義で使用され、具体的には完全なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの完全な抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を包含し、また所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM）を示す。

30

【 0 0 5 5 】

別段の定めのない限り、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によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。

【 0 0 5 6 】

I I . ペプチド

以下に詳細に記載する本発明のペプチドは、「T T L L 4 ペプチド」または「T T L L 4 ポリペプチド」と称することができる。

【 0 0 5 7 】

T T L L 4 由来のペプチドが C T L 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、T T L L 4 (S E Q I D N O : 8 0) 由来のペプチドを解析して、それらが、一般的に見られる H L A アリルである H L A - A 2 4 または A 2 によって拘束される抗原エピトープであるかどうかを判定した (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)。

40

【 0 0 5 8 】

T T L L 4 由来の H L A - A 2 4 結合ペプチドの候補を、H L A - A 2 4 に対するそれらの結合親和性に基づいて同定した。以下の候補ペプチドを同定した：

T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 5 0 (S E Q I D N O : 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 9 9 4 (S E Q I D N O : 3) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 6 9 (S E Q I D N O : 4) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 5 5 (S E Q I D N O : 5) 、 T T L L

50

4 - A 2 4 - 9 - 7 9 (S E Q I D N O : 6) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 6 8 4 (S E Q I D N O : 7) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 6 8 9 (S E Q I D N O : 8) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 7 9 (S E Q I D N O : 9) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 3 0 4 (S E Q I D N O : 1 0) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 9 3 (S E Q I D N O : 1 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 6 9 1 (S E Q I D N O : 1 2) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 4 1 (S E Q I D N O : 1 3) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 1 0 8 6 (S E Q I D N O : 1 4) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 1 1 8 6 (S E Q I D N O : 1 5) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 1 0 3 (S E Q I D N O : 1 6) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 3 6 2 (S E Q I D N O : 1 7) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 1 0 3 7 (S E Q I D N O : 1 8) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 7 3 (S E Q I D N O : 1 9) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 3 (S E Q I D N O : 2 0) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 7 7 3 (S E Q I D N O : 2 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 8 8 3 (S E Q I D N O : 2 2) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 2 7 (S E Q I D N O : 2 3) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 6 8 4 (S E Q I D N O : 2 4) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 4 3 (S E Q I D N O : 2 5) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 2 2 3 (S E Q I D N O : 2 6) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 2 2 (S E Q I D N O : 2 7) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 1 8 6 (S E Q I D N O : 2 8) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 2 2 (S E Q I D N O : 2 9) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 6 8 9 (S E Q I D N O : 3 0) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 8 0 4 (S E Q I D N O : 3 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 9 9 4 (S E Q I D N O : 3 2) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 9 9 3 (S E Q I D N O : 3 3) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 1 0 5 (S E Q I D N O : 3 4) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 6 9 6 (S E Q I D N O : 3 5) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 6 6 5 (S E Q I D N O : 3 6) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 8 9 1 (S E Q I D N O : 3 7) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 2 5 4 (S E Q I D N O : 3 8) および T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 9 4 (S E Q I D N O : 3 9) 。
【0059】

さらに、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の樹立に成功した：

T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 5 0 (S E Q I D N O : 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 9 (S E Q I D N O : 6) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 7 9 3 (S E Q I D N O : 1 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 6 9 1 (S E Q I D N O : 1 2) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 9 - 1 0 3 (S E Q I D N O : 1 6) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 3 (S E Q I D N O : 2 0) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 7 7 3 (S E Q I D N O : 2 1) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 8 8 3 (S E Q I D N O : 2 2) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 1 8 6 (S E Q I D N O : 2 8) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 2 2 (S E Q I D N O : 2 9) 、 T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 9 9 4 (S E Q I D N O : 3 2) および T T L L 4 - A 2 4 - 1 0 - 8 9 1 (S E Q I D N O : 3 7) 。

【0060】

T T L L 4 由来の H L A - A 2 結合ペプチドの候補を、 H L A - A 2 に対するそれらの結合親和性に基づいて同定した。以下のペプチドを免疫療法のための候補ペプチドと見なす：

T T L L 4 - A 2 - 9 - 2 2 2 (S E Q I D N O : 3 8) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 8 0 5 (S E Q I D N O : 3 9) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 6 1 0 (S E Q I D N O : 4 0) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 1 1 6 3 (S E Q I D N O : 4 1) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 5 7 5 (S E Q I D N O : 4 2) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 1 1 8 9 (S E Q I D N O : 4 3) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 6 6 (S E Q I D N O : 4 4) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 8 6 4 (S E Q I D N O : 4 5) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 8 9 9 (S E Q I D N O : 4 6) 、 T T L L 4 - A 2 - 9 - 1 4 7 (S E Q I D N O : 4 7) 。

ID NO : 47)、TTL4-A2-9-578 (SEQ ID NO : 48)、
 TTL4-A2-9-697 (SEQ ID NO : 49)、TTL4-A2-9-
 1088 (SEQ ID NO : 50)、TTL4-A2-9-988 (SEQ ID
 NO : 51)、TTL4-A2-9-423 (SEQ ID NO : 52)、TTL
 L4-A2-9-852 (SEQ ID NO : 53)、TTL4-A2-9-128
 (SEQ ID NO : 54)、TTL4-A2-9-107 (SEQ ID NO :
 55)、TTL4-A2-9-605 (SEQ ID NO : 56)、TTL4-A
 2-9-356 (SEQ ID NO : 57)、TTL4-A2-10-363 (SE
 Q ID NO : 58)、TTL4-A2-10-574 (SEQ ID NO : 59
)、TTL4-A2-10-895 (SEQ ID NO : 60)、TTL4-A2
 -10-605 (SEQ ID NO : 61)、TTL4-A2-10-578 (SE
 Q ID NO : 62)、TTL4-A2-10-756 (SEQ ID NO : 63
)、TTL4-A2-10-550 (SEQ ID NO : 64)、TTL4-A2
 -10-610 (SEQ ID NO : 65)、TTL4-A2-10-107 (SE
 Q ID NO : 66)、TTL4-A2-10-933 (SEQ ID NO : 67
)、TTL4-A2-10-1163 (SEQ ID NO : 68)、TTL4-A
 2-10-871 (SEQ ID NO : 69)、TTL4-A2-10-863 (S
 EQ ID NO : 70)、TTL4-A2-10-852 (SEQ ID NO : 7
 1)、TTL4-A2-10-62 (SEQ ID NO : 72)、TTL4-A2
 -10-804 (SEQ ID NO : 73)、TTL4-A2-10-70 (SEQ
 ID NO : 74)、TTL4-A2-10-1092 (SEQ ID NO : 75
)、TTL4-A2-10-1113 (SEQ ID NO : 76)、TTL4-A
 2-10-778 (SEQ ID NO : 77)およびTTL4-A2-10-86 (S
 EQ ID NO : 78)。

【0061】

さらに、これらのペプチドをパルスした(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の樹立に成功した：

TTL4-A02-9-222 (SEQ ID NO : 38)、TTL4-A02-
 9-805 (SEQ ID NO : 39)、TTL4-A02-9-66 (SEQ I
 D NO : 44)およびTTL4-A02-10-574 (SEQ ID NO : 59
)。

【0062】

樹立されたこれらのCTLは、各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。明細書におけるこれらの結果は、TTL4がCTLによって認識される抗原であること、およびそれらのペプチドがHLA-A24またはHLA-A2拘束性TTL4のエピトープペプチドであることを実証している。

【0063】

TTL4遺伝子は、例えば膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫を含むがんの細胞および組織では過剰発現され、ほとんどの正常器官では発現されないため、これは免疫療法の優れた標的を表す。したがって、本発明は、CTLによって認識されるTTL4からのエピトープに相当するノナペプチド(9個のアミノ酸残基から構成されるペプチド)およびデカペプチド(10個のアミノ酸残基から構成されるペプチド)を提供する。本発明の特に好ましいノナペプチドおよびデカペプチドの例には、SEQ ID NO : 1、3~37および38~73の中より選択されるアミノ酸配列を有するこれらのペプチドが含まれる。

【0064】

一般に、Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75およびNielsen M et a
 l., Protein Sci 2003; 12: 1007-17に記載されているソフトウェアプログラムなど、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、様々なペプチ

10

20

30

40

50

ドと H L A 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。H L A 抗原との結合親和性は、例えばParker KC et al., J Immunol 1994, 152 (1) : 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98 (6) : 1872-81, Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424, Buus S et al. Tissue Antigens., 62: 378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17、およびNielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796 (これらは、例えばLafuente EM et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3 209-3220に要約されている)に記載されているように測定することができる。結合親和性を測定するための方法は、例えば、Journal of Immunological Methods (1995, 185: 181-190) および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 H L A 抗原との高い結合親和性を有する T T L L 4 由来の断片を選択するために、そのようなソフトウェアプログラムを容易に利用することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムによって H L A 抗原と結合することが決定された、T T L L 4 由来の任意の断片から構成されるペプチドを包含する。さらに、そのようなペプチドは、全長の T T L L 4 配列からなるペプチドを含み得る。

10

【 0 0 6 5 】

本発明のペプチド、特に本発明のノナペプチドおよびデカペプチドは、結果として生じるペプチドがその C T L 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。具体的な付加的なアミノ酸残基は、それらが元のペプチドの C T L 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、H L A 抗原に対する結合親和性を有するペプチド、特に T T L L 4 由来のペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば、約 40 アミノ酸未満であり、多くの場合は約 20 アミノ酸未満であり、通常は約 15 アミノ酸未満である。

20

【 0 0 6 6 】

一般に、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、付加、欠失、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 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、一態様において、本発明のペプチドは、C T L 誘導能を有し、かつ 1 個、2 個、またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加および／または置換されている、S E Q I D N O : 1、3 ~ 3 7 および 3 8 ~ 7 3 の中より選択されるアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 6 7 】

当業者は、単一のアミノ酸またはアミノ酸配列全体のわずかな割合を変更する、アミノ酸配列に対する個々の改変（すなわち、欠失、挿入、付加および／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。保存すること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ているアミノ酸を含む：

40

1) アラニン (A) 、グリシン (G) ；

50

- 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)。

【 0 0 6 8 】

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、得られた改変ペプチドが元の未改変ペプチドの 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、 TTL L 4 の多型変異体、種間相同体、およびアリル由来の CTL 誘導可能なペプチドを排除しない。10

【 0 0 6 9 】

より高い結合親和性を達成するために、本発明のペプチドに対してアミノ酸残基を挿入、置換、または付加してもよく、あるいは本発明のペプチドからアミノ酸残基を欠失させてもよい。必要な CTL 誘導能を保持するために、好ましくは少数の(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のみを改変(すなわち、欠失、挿入、付加および / または置換) する。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。改変され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、例えば 1 ~ 5 % である。20

【 0 0 7 0 】

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べきである。したがって、CTL を誘導するだけでなく、HLA 抗原に対する高い結合親和性を保有するペプチドを選択することが好ましい。その目的のために、ペプチドをアミノ酸残基の置換、挿入、欠失および / または付加によって改変して、改善された結合親和性を有する改変ペプチドを生じさせることができる。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ことから(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。30

【 0 0 7 1 】

例えば、高い HLA - A 2 4 結合親和性を保有するペプチドは、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンで置換された N 末端から 2 番目のアミノ酸を有する傾向がある。C 末端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、またはメチオニンで置換されたペプチドも同様である。したがって、HLA - A 2 4 結合親和性を高めるためには、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、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可能性がある。したがって、SEQ ID NO : 1 および 3 ~ 37 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、前記 SEQ ID NO のアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および / または前記 SEQ ID NO のアミノ酸配列の C 末端がバリンもしくはロイシンで置換されているペプチドが、本発明に包含される。40

【 0 0 7 2 】

同様に、高い HLA - A 2 結合親和性を示すペプチドは、ロイシンもしくはメチオニンで置換された N 末端から 2 番目のアミノ酸および / またはバリンもしくはロイシンで置換された C 末端のアミノ酸を有する傾向がある。あるいは、HLA - A 2 結合親和性を高め

10

20

30

40

50

るためには、N末端から2番目のアミノ酸をロイシンもしくはメチオニンで置換すること、および／またはC末端のアミノ酸をバリンもしくはロイシンで置換することが望ましい可能性がある。したがって、SEQ ID NO:38～73の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、前記SEQ ID NO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／または前記SEQ ID NO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ペプチドが、本発明に包含される。

【0073】

末端のアミノ酸においてだけでなく、ペプチドの潜在的なT細胞受容体(TCR)認識部位においても、置換を導入することができる。いくつかの研究は、例えばCAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)またはgp100(209-217)など、アミノ酸置換を有するペプチドが元のものと同等であるかまたはより優れたものであり得ることを実証している(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997、T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002); 168(3):1338-47., S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206、およびS. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

【0074】

本発明はまた、1個、2個、または数個のアミノ酸を本発明のペプチドのN末端および／またはC末端に付加することもできる付加も企図する。高いHLA抗原結合親和性を有し、かつCTL誘導能を保持するそのような改変ペプチドもまた、本発明に含まれる。

【0075】

例えば、本発明は、CTL誘導能を有し、かつ以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む14、13、12、11、または10未満のアミノ酸長の単離されたペプチドを提供する：

(i) SEQ ID NO:1～19および38～57からなる群より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列であって、ペプチドがHLA抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球を誘導するアミノ酸配列、

(ii) HLA-A24との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(i)のアミノ酸配列：

(a) 前記SEQ ID NO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、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あるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(b) 前記SEQ ID NOの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あるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(iii) HLA-A2との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(i)のアミノ酸配列：

(a) 前記SEQ ID NOのN末端から2番目のアミノ酸が、ロイシ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あるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている；ならびに

(b) 前記SEQ ID NOのC末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている。

【0076】

さらに、本発明はまた、CTL誘導能を有し、かつ以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む15、14、13、12、または11未満のアミノ酸長の単離されたペプチドも提供する：

(i') SEQ ID NO:20～37および58～78からなる群より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列で

10

20

30

40

50

あって、ペプチドが HLA 抗原に結合し、かつ細胞傷害性 T リンパ球を誘導するアミノ酸配列、

(i i ') HLA - A 2 4 との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(i ') のアミノ酸配列：

(a) 前記 SEQ ID NO 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、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あるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(b) 前記 SEQ ID NO の 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あるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている。

(i i i ') HLA - A 2 との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(i ') のアミノ酸配列：

(a) 前記 SEQ ID NO の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシ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あるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている；ならびに

(b) 前記 SEQ ID NO の C 末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている。

これらのペプチドは、これらのペプチドを APC と接触させた場合、または APC に導入した場合、APC においてプロセシングされてその上に (i) 、 (i i) 、 (i i i) 、 (i ') 、 (i i ') 、および (i i i ') のペプチドが提示される。

【 0 0 7 7 】

しかしながら、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫障害および / 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、利用可能なデータベースを用いて最初に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でさえも存在しないことが明らかになった場合には、そのような副作用の危険を全く伴うことなしに、HLA 抗原とのその結合親和性を増大させるため、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。

【 0 0 7 8 】

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、高い結合親和性の存在を指標として選択された候補ペプチドを、CTL 誘導能の有無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、細胞傷害性 T リンパ球 (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。

【 0 0 7 9 】

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、APC を試験ペプチドで刺激した後、APC を CD8 陽性細胞と混合して CTL を誘導し、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。反応系として、ヒト HLA 抗原を発現するよう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, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 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。あるいは、標的細胞を ^{51}Cr 等で放射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 CTL の細胞傷

10

20

30

40

50

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A P Cの存在下で、C T Lによって産生および放出されたI F N -_αを測定し、抗I F N -_α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、C T L誘導能を評価することができる。

【0080】

上記のようにペプチドのC T L誘導能を調べた結果、S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44および59によって示されるアミノ酸配列中より選択されるノナペプチドまたはデカペプチドが、H L A抗原に対する高い結合親和性に加えて、特に高いC T L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。

10

【0081】

さらに、相同性解析結果から、そのようなペプチドが、他のいかなる公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドとも有意な相同性を有していないことが実証された。そのため、免疫療法に用いた場合に未知のまたは望ましくない免疫応答が生じる可能性は低くなっている。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T T L L 4に対する免疫を誘発するのに有用である。よって、本発明の好ましいペプチド、好ましくは、S E Q I D N O : 1、6、11、12、16、20、21、22、28、29、32、37、38、39、44および59の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが本発明に包含される。

【0082】

上記の改変に加えて、本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチドが、元のペプチドの必要なC T L誘導能を保持する限り、より好ましくは、必要なH L A結合も保持する限り、他のペプチドに連結させることもできる。「他の」適切なペプチドの例には、本発明のペプチドまたは他のT A Aに由来するC T L誘導性ペプチドが含まれる。本発明のペプチドは、リンカーを介して直接的または間接的に「他の」ペプチドに連結させることができる。適切なペプチド間リンカーは当技術分野で周知であり、例えばA A Y (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、A A A、N K R K (R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-7315)、またはK (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476、K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-5715)を含む。

20

【0083】

例えば、H L AクラスIおよび/またはクラスIIを介する免疫応答を増大させるために、T T L L 4ではない腫瘍関連抗原ペプチドを実質的に同時に使用することもできる。がん細胞が2種類以上の腫瘍関連遺伝子を発現し得ることは、十分に確立されている。したがって、特定の対象がさらなる腫瘍関連遺伝子を発現するかどうかを判定すること、ならびに続いて本発明によるT T L L 4組成物またはワクチン中に、そのような遺伝子の発現産物に由来するH L AクラスIおよび/またはH L AクラスII結合ペプチドを含めることは、当業者の慣例的な実験法の範囲内である。

30

【0084】

H L AクラスIおよびH L AクラスII結合ペプチドの例は当業者に公知であり（例えば、Coulie, Stem Cells 13: 393 - 403, 1995を参照されたい）、本明細書に開示したものと同様の様式で本発明において用いることができる。したがって、当業者は、1種もしくは複数種のT T L L 4ペプチドおよび1種もしくは複数種のT T L L 4ではないペプチドを含むポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードする核酸を、分子生物学の標準的な手順を用いて容易に調製することができる。

40

【0085】

上記の連結ペプチドを本明細書では「ポリトープ」と称し、これはすなわち、様々な配置（例えば、連鎖状、重複）で一緒に連結され得る、2つまたはそれ以上の潜在的な免疫原性または免疫応答刺激性ペプチドの群である。ポリトープ（またはポリトープをコードする核酸）を標準的な免疫化プロトコールで例えば動物に投与して、免疫応答の促進、増強、および/または誘発における該ポリトープの有効性を試験することができる。

50

【0086】

ペプチドを直接的にまたは隣接配列の使用により連結して、ポリトープを形成することができ、ポリトープのワクチンとしての使用は当技術分野において周知である（例えば、Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990を参照されたい）。様々な数および組み合わせのエピトープを含むポリトープを調製することができ、CTLによる認識について、および免疫応答の増大における有効性について試験することができる。

【0087】

本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチドが、元のペプチドの必要なCTL誘導能を保持する限り、他の物質に連結させることもできる。好適な物質の例には、例えば、ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマー等が含まれる。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、またはリン酸化などの修飾を含み得る。このような種類の修飾は、付加的な機能（例えば、標的化機能および送達機能）を付与するために、またはペプチドを安定化するために実施することができる。

【0088】

例えば、ペプチドのインビオ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において公知であり、この概念を本発明のペプチドに対して適合することもできる。ペプチドの安定性は、いくつか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）。

【0089】

さらに、上述したように、1個、2個、または数個のアミノ酸残基により置換、欠失、挿入または付加されている変形ペプチドの中から、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、元のものと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有する変形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。例示的方法は以下の段階を含む：

- a : 本発明のペプチドの少なくとも1個のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入または付加する段階、
- b : ペプチドの活性を測定する段階、および
- c : 元のもの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。

本明細書において、アッセイすることができる活性には、MHC結合活性、APCまたはCTL誘導能、および細胞傷害活性が含まれ得る。

【0090】

I I I . T T L L 4 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を含む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、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、または他のいかなる化学物質も実質的に含まないよう精製または単離することができる。

【0091】

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、またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために用いることができる、D-アミノ酸または

10

20

30

40

50

他のアミノ酸模倣体の組み込みが含まれる。

【0092】

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：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;
- (i i) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;
- (i i i) 「ペプチド合成」(日本語), 丸善, 1975;
- (i v) 「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語), 丸善, 1985;
- (v) 医薬品の開発 続第14巻(ペプチド合成)(日本語), 広川書店, 1991; 10
- (v i) WO 99 / 67288; 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.

【0093】

あるいは、ペプチドを產生するための任意の公知の遺伝子工学的方法を適合させて、本発明のペプチドを得ることもできる(例えば、Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 10 1: 347-62)。例えば、最初に、目的のペプチドを発現可能な形態で(例えば、プロモーター配列に相当する調節配列の下流に)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產生させる。インピトロ翻訳系を採用して、ペプチドをインピトロで作製することもできる。 20

【0094】

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。これらには、天然T T L L 4 遺伝子(GenBank アクセッション番号NM_014640 (SEQ ID NO: 79))由来のポリヌクレオチド、およびその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において「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の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。そ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、該核酸のあらゆる可能な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、機能的に同一の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、開示した各配列において非明示的に表されている。 30 40

【0095】

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はA、T、C、およびGなどの塩基から適切に構成され、RNAではTはUに置き換えられる。当業者は、非天然塩基もまたポリヌクレオチドに含まれ得ることを認識する。

【0096】

本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を間に伴って、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 50

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もよく、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）であってもよい。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。

【0097】

組換え技法および化学合成技法のいずれを用いても、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もできる（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に記載されている固相技法を用いて、ポリヌクレオチドを合成することもできる。

10

【0098】

V. エキソソーム

本発明はさらに、本発明のペプチドとHLA抗原との間に形成された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。

20

【0099】

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およびHLA-A2、特にHLA-A^{*}2402およびHLA-A^{*}0201およびHLA-A^{*}0206が広く一般的であり、したがってこれは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するA24型の使用は、有効な結果を得るのに好ましく、A2402、A^{*}0201およびA^{*}0206などのサブタイプもまた使用される。典型的には、クリニックにおいて、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を予め調べることにより、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得るために、天然のTTL4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、欠失および／または付加を行うことができる。

30

【0100】

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:1および3～37の中より選択される配列を有するペプチドが特に有用である。

40

【0101】

あるいは、本発明のエキソソームに対してA2型HLA抗原を用いる場合、SEQ ID NO:38～73の中より選択される配列を有するペプチドが特に有用である。

【0102】

いくつかの態様において、本発明のエキソソームは、本発明のペプチドとHLA-A24またはHLA-A2抗原との複合体を自身の表面上に提示するエキソソームである。

【0103】

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た複合体を自身の表面上に提示する単離された抗原提示細胞(APC)を提供する。APCは、治療および／ま

50

たは予防の対象となる患者に由来してもよく、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。

【0104】

APCは特定の種類の細胞に限定されず、これには、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樹状細胞(DC)、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞が含まれる。DCは、APCの中で最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCであるため、DCは本発明のAPCとして使用される。

【0105】

例えば、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボ、またはインビボで本発明のペプチドと接触させる(で刺激する)ことによって、本発明のAPCを得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与する場合、本発明のペプチドを提示するAPCが該対象の体内で誘導される。「APCを誘導する」という語句は、細胞を本発明のペプチド、または本発明のペプチドをコードするヌクレオチドと接触(で刺激)させて、HLA抗原と本発明のペプチドとの間で形成された複合体を細胞表面上に提示させることを含む。したがって、本発明のAPCは、本発明のペプチドを対象に投与した後、該対象からAPC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APCは、対象から回収されたAPC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

【0106】

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APC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CTL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、エクスピボ投与は以下の段階を含み得る：

- a：第1の対象から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を第2の対象に投与する段階。

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。

【0107】

本発明との関連において、抗原提示細胞を誘導し得る薬学的組成物を製造するために本発明のペプチドを利用することができる。抗原提示細胞を誘導するための薬学的組成物を製造するための方法または工程が本明細書において提供され、該方法または工程は、好ましくは、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含む。

20

【0108】

本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドの使用を提供する。段階bによって得られるAPCは、限定されないが、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫などのがんを治療および/または予防するためのワクチンとして製剤化および投与することができる。

40

【0109】

本発明の一局面によると、本発明のAPCは高レベルのCTL誘導能を有する。「高レベルのCTL誘導能」という用語における高レベルとは、ペプチドと接触させていないAPC、またはCTLを誘導することができないペプチドと接触させたAPCによるCTL誘導能のレベルと比較したものである。高レベルのCTL誘導能を有するそのようなAPC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APC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、DNAまたはRNAの形態であってよい。導入の方法の例には、特に限定されることなく、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、当分

50

野において従来より実施されている様々な方法が含まれ、それらを使用することができる。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2000-509281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APCに導入することによって、該遺伝子は細胞内で転写、翻訳等を受け、次いで、得られたタンパク質はMHCクラスIまたはクラスIIによってプロセシングされて、提示経路を経て部分ペプチドが提示される。

【0110】

いくつかの態様において、本発明のAPCは、HLA-A24またはHLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCである。

【0111】

VIII. 細胞傷害性Tリンパ球(CTL)

本発明のペプチドのいずれか1種に対して誘導されたCTLは、インビポでがん細胞を標的とする免疫応答を増強するため、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、本発明のペプチドのいずれか1種によって特異的に誘導または活性化された、単離されたCTLを提供する。

【0112】

そのようなCTLは、(1)本発明のペプチドを対象に投与する、または(2)対象由来のAPCおよびCD8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る(で刺激する)、または(3)CD8陽性T細胞もしくは末梢血単核白血球を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCもしくはエキソソームとインビトロで接触させる、または(4)本発明のペプチドに結合するT細胞受容体(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導入することによって得ることができる。そのようなAPCまたは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)の方法の詳細は「VIII.T細胞受容体(TCR)」の章において以下に記載する。

【0113】

本発明のCTL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CTL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、がん細胞のようにTTL4を内因的に発現する細胞、またはTTL4遺伝子をトランスフェクトし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CTLの攻撃の標的として機能し得る。

【0114】

いくつかの態様において、本発明のCTLは、HLA-A24またはHLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞を認識するCTLである。CTLとの関連において、「細胞を認識する」という語句は、細胞表面上のHLA-A24またはHLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体にそのTCRを介して結合し、その細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すことを指す。本明細書では、「特異的な細胞傷害活性」は、HLA-A24またはHLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞に対して細胞傷害活性を示すが、他の細胞には示さないことを指す。

【0115】

VIII.T細胞受容体(TCR)

本発明はまた、T細胞受容体(TCR)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、およびそれを使用する方法を提供する。TCRサブユニットは、TTL4を提示する腫瘍細胞に対する特異性をT細胞に付与するTCR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種または複数種のペプチドで誘導されたCTLのTCRサブユニットとして鎖および鎖の核酸を同定することができる(WO2007/032255、およびMorgan et al., J Immun

10

20

30

40

50

ol, 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 a c c a g g c a t t c g c t t c a t - 3'）(SEQ ID NO: 81) 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'）(SEQ ID NO: 82)、T C R 鎖 C 1 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 c t c t t g a c - 3'）(SEQ ID NO: 83) または T C R 鎖 C 2 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 c t c t t - 3'）(SEQ ID NO: 84) であってよいが、これらに限定されない。T C R 誘導体は、T T L L 4 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、T T L L 4 ペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビオおよびインビトロで媒介する。

10

【0116】

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、通常、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容易入手可能な組成物を提供する。

20

【0117】

特異的 T C R とは、T C R が T 細胞の表面上に提示される場合に、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して、標的細胞に対する特異的活性を T 細胞に付与し得る受容体である。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、好ましい方法の例には、例えば、H L A 分子および本発明のペプチドを用いる H L A 多量体染色解析、ならびに E L I S P O T アッセイが含まれる。E L I S P O T アッセイを行うことにより、細胞表面上に T C R を発現する T 細胞がその T C R によって細胞を認識すること、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。上述した複合体が、その複合体が T 細胞表面上に存在する場合に T 細胞に細胞傷害活性を付与することができることの確認を、公知の方法によって行うこともできる。好ましい方法には、例えば、H L A 陽性標的細胞に対する細胞傷害活性の測定、例えばクロム放出アッセイなどが含まれる。

30

【0118】

また、本発明は、例えば、H L A - A 2 4 との関連において SEQ ID NO: 1 および 3 ~ 3 7 の T T L L 4 ペプチド、さらには H L A - A 2 との関連において SEQ ID NO: 3 8 ~ 7 3 のペプチドと結合する T C R サブユニットポリペプチドをコードする核酸の形質導入によって調製される C T L も提供する。

40

【0119】

形質導入された C T L は、インビオでがん細胞にホーミングすることができ、かつ周知の培養法によってインビトロで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 C T L は、療法または予防を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用いることができる（WO 2006 / 031221 参照、その内容は参照により本明細書に組み入れられる）。

【0120】

I X . 薬学的組成物

T T L L 4 の発現は、その例には膀胱癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、N S C L C、軟部組織腫瘍および骨肉腫を含むがこれらに限定されない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ポリヌクレオチドを、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に用いることができる。したがって、本発明は、がんの治療および／も

50

しくは予防のため、ならびに／または術後のその再発の予防のために製剤化される薬学的な組成物または剤であって、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1種または複数種を有効成分として含むそのような組成物または剤を提供する。あるいは、薬学的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A P C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1種を標的とする前述のC T Lもまた、本発明の薬学的組成物の有効成分として用いることができる。

【0121】

したがって、本発明は、以下の中より選択される少なくとも1種の有効成分を含む剤または組成物を提供する：

- (a) 本発明の1種または複数種のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする1種または複数種のポリヌクレオチド；
- (c) 本発明の1種または複数種のA P Cまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の1種または複数種のC T L。

【0122】

本発明の薬学的組成物は、ワクチンとしても使用される。本発明との関連において、「ワクチン」という語句（「免疫原性組成物」とも称される）は、動物に接種した際に抗腫瘍免疫を改善、増強および／または誘導する機能を有する剤または組成物を指す。換言すると、本発明は、対象においてがんに対する免疫応答を誘導するための本発明の薬学的な剤または組成物を提供する。

【0123】

本発明の薬学的組成物は、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、がんを治療および／もしくは予防するため、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。いくつかの態様において、本発明の薬学的な剤または組成物は、H L A抗原がH L A - A 2 4またはH L A - A 2である対象への投与のために製剤化することができる。

【0124】

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剤の製造における、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ペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するA P C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。

【0125】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍の治療および／または予防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ペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するA P C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。

【0126】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療または予防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ともに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ペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

(c) 本発明のペプチドを自身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】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療または予防するための薬学的な組成物または剤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と薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを混合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ペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身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。

【0128】

本発明により、SEQ ID NO: 1 および 3 ~ 37 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが、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見出され、また SEQ ID NO: 38 ~ 73 が対象において HLA-A24 または HLA-A2 および TTL4 を発現するがんに対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得る HLA-A2 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見出された。したがって、SEQ ID NO: 1、3 ~ 37 および 38 ~ 73 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組成物または剤は、それぞれ、HLA抗原が HLA-A24 および HLA-A2 である対象への投与のために特に適している。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）を含む薬学的な組成物または剤にも当てはまる。

【0129】

本発明の薬学的な組成物または剤により治療することができるがんは限定されず、TTL4 が関与する全ての種類のがんを含み、これには、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるがこれらに限定されない。

【0130】

本発明の薬学的な組成物または剤は、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。

【0131】

必要に応じて、本発明の薬学的な組成物または剤は、その他の治療物質が、例えば本発明のペプチドのいずれかなどの有効成分の抗腫瘍効果を阻害しない限り、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、抗炎症組成物、鎮痛剤、化学療法薬等を含み得る。医薬自体にその他の治療物質を含めることに加えて、本発明の医薬を、1つまたは複数のその他の薬理学的組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理学的組成物の量は、例えば、使用する薬理学的組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に依存する。

【0132】

本明細書において具体的に言及される成分に加えて、本発明の薬学的な組成物または剤は、対象となる製剤の種類を考慮して、当技術分野において慣例的なその他の組成物も含み得ることが理解されるべきである。

【0133】

本発明の一態様において、本発明の薬学的な組成物または剤を、例えばがんなどの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組成物または剤のいずれかの容器を

10

20

20

30

40

50

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、組成物または剤が、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。

【0134】

本発明の薬学的な組成物または剤を含むキットは、上記の容器に加えて、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、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明を記載した添付文書を含む、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み得る。

【0135】

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、薬学的な組成物または剤を提供することができる。該パックは、例えば、プリスター・パックのように金属ホイル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、投与に関する説明書が添付され得る。

10

【0136】

(1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的組成物

本発明のペプチドは、薬学的な組成物または剤として直接投与してもよく、または必要であれば、従来の製剤化法によって製剤化してもよい。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必要に応じて含まれ得る。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、薬学的な組成物または剤は、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。本発明の薬学的な組成物または剤は、抗がん目的に用いることができる。

20

【0137】

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つまたはそれ以上で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もよく、または標準的な技法を用いて互いに結合させてもよい。例えば、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、同一であってもよく、または異なっていてもよい。本発明のペプチドを投与することにより、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、その後、本発明のペプチドによって刺激して、本発明のペプチドのいずれかを自身の細胞表面上に提示するAPCを得る。これらのAPCは、対象に再び投与し、その対象においてCTLを誘導し、結果として腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

30

【0138】

有効成分として本発明のいずれかのペプチドを含む、がんの治療および／または予防のための薬学的な組成物または剤は、細胞性免疫を効率的に樹立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、薬学的な組成物または剤は、他の有効成分と共に投与してもよく、または顆粒内へ製剤化することによって投与してもよい。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する化合物を指す。本明細書において企図されるアジュバントには、文献（Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89）に記載されているものが含まれる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミヨウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、IFA（不完全フロイントアジュバント）、CFA（完全フロイントアジュバント）等が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0139】

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を好都合に用いてもよい。

【0140】

50

本発明の別の態様において、本発明のペプチドはまた、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。本明細書で使用する「薬学的に許容される塩」とは、その化合物の生物学的有効性および特性を保持する塩を指し、それらは、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などの無機酸または無機塩基との反応によって得られる。

【0141】

いくつかの態様において、本発明の薬学的な組成物または剤は、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を刺激し得る組成物として同定されている。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で直接投与するか、リポソーム中に取り込ませて投与するか、またはアジュバント中に乳化させて投与することができる。CTL応答の脂質による刺激の別の例として、適切なペプチドに共有結合している場合、トリパルミトイール-S-グリセリルシステイニル-セリル-セリン(P3CSS)などの大腸菌(E.coli)リポタンパク質を用いてCTLを刺激することができる(例えば、Deres et al., Nature 1989, 342: 561-4を参照されたい)。

10

【0142】

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ブーストすることもできる。本発明のペプチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mgであり、数日~数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

20

【0143】

(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物

本発明の薬学的な組成物または剤はまた、本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸を含み得る。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することを意味する。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、標的細胞のゲノムへの安定した挿入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(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WO98/04720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(ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性)送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性(「遺伝子銃」)または圧力媒介性の送達が含まれる(例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい)。

30

【0144】

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

40

50

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。治療的な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隨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; Shadlock 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。

【0145】

ポリヌクレオチドの患者内への送達は、直接的であってもよく、この場合にはポリヌクレオチドを保有するベクターに患者を直接曝露し、または間接的であってもよく、この場合には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、次いで該細胞を患者内に移植する。これら2つのアプローチはそれぞれ、インビボおよびエクスピボの遺伝子治療として公知である。

10

【0146】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215を参照されたい。本発明に適用可能な、組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、Ausubel et al. のCurrent Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, 1993); およびKriegerのGene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, NY, 1990)に記載されている。

20

【0147】

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使用される。投与は、単回投与によって行うことができるし、または複数回投与によってブーストすることもできる。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された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、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、適切な用量を適宜選択することができる。

30

【0148】

X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、APCおよびCTLを誘導することができる。本発明のエキソソームおよびAPCを用いて、CTLを誘導することもできる。ペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、CTL誘導能を他の化合物が阻害しない限り、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組成物または剤のいずれかを用いてCTLを誘導することができる。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用いて、以下に説明するように、APCを誘導することもできる。

40

【0149】

(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て、高いCTL誘導能を有するAPCを誘導する方法を提供する。

【0150】

本発明の方法は、APCを本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させる段階を含む。例えば、APCを該ペプチドとエク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を該ペプチドと接触させる段階。

50

【0151】

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。A P C の中で最も強力な C T L 誘導能を有することから、好ましくは D C を用いることができる。本発明のペプチドのいずれか 1 種を、単独で、または本発明の他のペプチドもしくは T T L L 4 以外の T A A 由來の C T L 誘導性ペプチドと組み合わせて用いることができる。

【0152】

一方、本発明のペプチドを対象に投与すると、A P C は、該ペプチドとインビボで接触し、その結果、高い C T L 誘導能を有する A P C が対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は、本発明のペプチドを対象に投与して、対象の体内で C T L 誘導能を有する A P C を誘導することを含む。同様に、本発明のポリヌクレオチドを発現可能な形態で対象に投与すると、本発明のペプチドがインビボで発現して A P C と接触し、その結果、高い C T L 誘導能を有する A P C が対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法はまた、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与して、対象の体内で C T L 誘導能を有する A P C を誘導することを含む。「発現可能な形態」という語句は、「IX. 薬学的組成物(2)有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物」の章に上述されている。

10

【0153】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを A P C に導入して、C T L 誘導能を有する A P C を誘導することを含む。例えば、方法は以下の段階を含み得る：

20

a : 対象から A P C 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。

段階 b は、「V I . 抗原提示細胞」の章に上述したように行うことができる。

【0154】

あるいは本発明は、以下の段階のうちの 1 つを含み得る、T T L L 4 に対する C T L 活性を特異的に誘導する抗原提示細胞(A P C)を調製するための方法を提供する：

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

30

(b) 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 に導入する段階。

【0155】

あるいは本発明は、以下の中より選択される段階を含む、C T L 誘導能を有する A P C を誘導するための方法を提供する：

30

(a) A P C を本発明のペプチドと接触させる段階；および

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

【0156】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法は、インビトロまたはエクスピボで実施することができる。C T L 誘導能を有する A P C の誘導に使用する A P C は、好ましくは、H L A - A 2 4 または H L A - A 2 抗原を発現する A P C であってよい。そのような A P C は、H L A 抗原が H L A - A 2 4 または H L A - A 2 である対象から得られた末梢血单核細胞(P B M C)から当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導した A P C は、本発明のペプチドと H L A 抗原(H L A - A 2 4 または H L A - A 2 抗原)との複合体を自身の表面に提示する A P C であってよい。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために本発明の方法によって誘導した A P C を対象に投与する場合、対象は、好ましくは、A P C が由来する同一の対象である。しかしながら、対象は、対象が A P C ドナーと同一の H L A 型を有する限り、A P C ドナーと異なる対象でもよい。

40

【0157】

別の態様において、本発明は、C T L 誘導能を有する A P C の誘導に用いるための剤または組成物を提供し、そのような剤または組成物は、本発明の 1 種または複数種のペプチ

50

ドまたはポリヌクレオチドを含む。

【0158】

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

【0159】

あるいは本発明は、C T L誘導能を有するA P Cの誘導に用いるための本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリペプチドをさらに提供する。

【0160】

(2) C T Lを誘導する方法

本発明はまた、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A P Cを用いてC T Lを誘導する方法を提供する。

【0161】

本発明はまた、本発明のペプチドとH L A抗原との複合体を認識するT細胞受容体(T C R)サブユニットを形成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、C T Lを誘導する方法を提供する。好ましくは、C T Lを誘導するための方法は、以下の中より選択される少なくとも1つの段階を含む：

a : C D 8陽性T細胞を、H L A抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身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H L A抗原との複合体を認識するT C R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C D 8陽性T細胞に導入する段階。

【0162】

本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、A P C、またはエキソソームを対象に投与すると、該対象の体内でC T Lが誘導され、T T L L 4を発現するがん細胞を標的とする免疫応答の強度が増強される。したがって本発明の方法は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、A P C、またはエキソソームを対象に投与する段階を含む。

【0163】

あるいはC T Lは、それらをエクスピボまたはインビボで用いることによって誘導することもでき、C T Lを誘導した後、活性化C T Lを対象に戻す。例えば、方法は以下の段階を含み得る：

a : 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C D 8陽性T細胞と共に培養する段階。

【0164】

上記の段階cにおいてC D 8陽性T細胞と共に培養するA P Cは、「V I . 抗原提示細胞」の章に上述したように、本発明のポリヌクレオチドを含む遺伝子をA P Cに導入することによって調製することもできるが、本発明はこれに限定されず、したがってH L A抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に効果的に提示する任意のA P Cを包含する。

【0165】

そのようなA P Cの代わりに、H L A抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身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、H L A抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを共培養する段階を含み得る。そのようなエキソソームは、「V . エキソソーム」の章に上述した方法によって調製することができる。

【0166】

さらに、本発明のペプチドに結合する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 D 8陽性T細胞に導入することによって、C T Lを誘導することができる。そのような形質導入は、「V I I I . T細胞受容体(T C R)」の章に上述したように行うことができる。

10

20

30

40

50

【0167】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法は、インビトロまたはエクスピボで実施することができる。C T Lの誘導に用いるC D 8陽性T細胞は、対象から得たP B M Cから当技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様において、C D 8陽性T細胞のためのドナーは、H L A抗原がH L A - A 2 4またはH L A - A 2である対象であってよい。本発明の方法によって誘導したC T Lは、本発明のペプチドとH L A抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識し得るC T Lであってよい。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために本発明の方法によって誘導したC T Lを対象に投与する場合、対象は、好ましくは、C D 8陽性T細胞が由来する同一の対象である。しかしながら、対象は、対象がC D 8陽性T細胞ドナーと同一のH L A型を有する限り、C D 8陽性T細胞ドナーと異なる対象でもよい。

10

【0168】

加えて、本発明は、C T Lを誘導する薬学的な組成物または剤を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含む方法を提供する。

【0169】

別の態様において、本発明は、C T Lを誘導するための剤または組成物であって、本発明の1種もしくは複数種のペプチド、1種もしくは複数種のポリヌクレオチド、または1種もしくは複数種のA P Cもしくはエキソソームを含む剤または組成物を提供する。

20

【0170】

別の態様において、本発明は、C T Lの誘導のために製剤化される剤または組成物の製造における、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、またはA P Cもしくはエキソソームの使用を提供する。

20

あるいは本発明は、C T Lの誘導に用いるための本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、またはA P Cもしくはエキソソームをさらに提供する。

【0171】

X I . 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、T T L L 4に関連する疾患に対して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、膀胱癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、S C L C、N S C L C、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0172】

本発明の方法は、本発明のペプチドのいずれか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み得る。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A P Cの投与も企図する。詳細については、「I X . 薬学的組成物」の項、特に本発明の薬学的組成物のワクチンとして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に本発明の方法に使用することができるエキソソームおよびA P Cは、上記「V . エキソソーム」、「V I . 抗原提示細胞(A P C)」、ならびに「X . ペプチド、エキソソーム、A P C、およびC T Lを用いる方法」の(1)および(2)の項において詳述している。

40

【0173】

本発明はまた、免疫応答を誘導する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、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含み得る方法を提供する。

【0174】

あるいは、本発明の方法は、以下を含む本発明のワクチンまたは薬学的な組成物もしくは物質を投与する段階を含み得る：

(a) 本発明のペプチド；

50

- (b) 本明細書に開示する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自身の表面上に提示する A P C もしくはエキソソーム；または
 (d) 本発明の細胞傷害性 T 細胞。

【 0 1 7 5 】

本発明との関連において、T T L L 4 を過剰発現するがんをこれらの有効成分で治療することができる。そのようながんの例には、膀胱癌、胆管細胞癌、C M L 、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、S C L C 、N S C L C 、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、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な組成物もしくは物質を投与する前に、治療すべき対象におけるT T L L 4 の発現レベルが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、T T L L 4 を（過剰）発現するがんの治療が必要とされる患者においてT T L L 4 を（過剰）発現するがんを治療するための方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

i) 治療すべきがんを有する対象から得られた生物学的試料中のT T L L 4 の発現レベルを決定する段階；

i i) T T L L 4 の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

i i i) 上記の(a) ~ (d)の中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T T L L 4 を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

【 0 1 7 6 】

あるいは本発明は、T T L L 4 を過剰発現するがんを有する対象へ投与することができる、上記の(a) ~ (d)の中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T T L L 4 ポリペプチドで治療すべき対象を同定するための方法であって、対象由来の生物学的試料中のT T L L 4 の発現レベルを決定する段階を含み、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、該対象が本発明のT T L L 4 ポリペプチドで治療され得るがんを有し得ることが示される方法を提供する。本発明のがんを治療する方法を、以下、より詳細に説明する。

【 0 1 7 7 】

目的とするT T L L 4 の転写産物または翻訳産物を含む限り、対象由来の任意の細胞または組織をT T L L 4 発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、身体組織、ならびに血液、痰、および尿などの体液が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、対象由来の細胞または組織試料は、上皮細胞、より好ましくはがん性上皮細胞、またはがんの疑いがある組織に由来する上皮細胞を含む細胞集団を含む。さらに、必要に応じて、得られた身体組織および体液から細胞を精製し、その後これを対象由来試料として用いてもよい。

【 0 1 7 8 】

本発明の方法によって治療すべき対象は、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、およびウシが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 7 9 】

本発明によれば、対象から得られた生物学的試料中のT T L L 4 の発現レベルを決定することができる。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）産物レベルで決定することができる。例えば、T T L L 4 のm R N A を、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）によってプローブを用いて定量することができる。検出は、チップまたはアレイにおいて行うことができる。アレイの使用は、T T L L 4 の発現レベルを検出するのに好ましい。当業者は、T T L L 4 の配列情報をを利用して、そのようなプローブを調製することができる。例えば、T T L L 4 のc D N A をプローブとして用いることができる。必要に応じて、プローブを、色素、蛍光物質、および同位体などの適切な標識で標識してもよく、該遺伝子の発現レベルを、ハイブリダイズした標識の強度として検出してよい。

10

20

30

40

50

【0180】

さらに、増幅に基づく検出法（例えば、R T - P C R）によりプライマーを用いて、T T L L 4 の転写産物を定量してもよい。そのようなプライマーは、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。

【0181】

具体的には、本発明の方法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下、中程度にストリンジェントな条件下、または低ストリンジェントな条件下で、T T L L 4 のm R N Aとハイブリダイズする。本明細書で使用する「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とはハイブリダイズするが、その他の配列と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に依存し、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高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、所定のイオン強度およびp Hにおける特定の配列の熱融解温度（T m）よりも約5℃低くなるように選択する。T mとは、平衡状態で、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（所定のイオン強度、p H、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、平衡状態でプローブの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、p H 7.0~8.3において塩濃度がナトリウムイオン約1.0M未満、典型的にはナトリウムイオン（または他の塩）約0.01~1.0M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）に関しては少なくとも約30℃、およびより長いプローブまたはプライマーに関しては少なくとも約60℃である条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化物質の添加によって達成してもよい。

10

20

30

40

【0182】

本発明のプローブまたはプライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、少なくとも約2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50、または25の連続する、T T T L 4 配列を含む核酸のセンス鎖ヌクレオチド配列、またはT T T L 4 配列を含む核酸のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列、またはそれらの配列の天然の変異体とハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。特に、例えば、好ましい態様において、5~50の長さを有するオリゴヌクレオチドを、検出すべき遺伝子を増幅するためのプライマーとして用いることができる。より好ましくは、T T T L 4 遺伝子のm R N Aまたはc D N Aは、特定のサイズ、一般には15~30 b長のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーによって検出することができる。サイズは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチドの範囲であってよく、プローブおよびプライマーのサイズは5~10ヌクレオチド、10~15ヌクレオチド、15~20ヌクレオチド、20~25ヌクレオチド、および25~30ヌクレオチドの範囲にわたってよい。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーの長さは、15~25から選択することができる。そのようなオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いることによって遺伝子を検出するためのアッセイ手順、装置、または試薬は、周知である（例えばオリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはP C R）。これらのアッセイにおいて、プローブまたはプライマーはタグまたはリンカー配列も含み得る。さらに、プローブまたはプライマーは、検出可能な標識または捕捉することができる親和性リガンドで修飾することができる。あるいは、ハイブリダイゼーションに基づく検出手順において、数百（例えば、約100~200）塩基から数千（例えば、約1000~2000）塩基長を有するポリヌクレオチドも、プローブに用いることができる（例えば、ノーザンプロッティングアッセイまたはc D N Aマイクロアレイ解析）。

【0183】

50

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ができる。例えば、TTL4タンパク質(SEQ ID NO: 80)またはその免疫学的断片の量を測定することができる。翻訳産物としてタンパク質の量を測定する方法には、タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる免疫測定法が含まれる。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。さらに、断片または改变抗体がTTL4タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改变物(例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等)を検出に用いることができる。本発明のペプチドに対するそのような抗体およびその断片も本発明によって提供される。タンパク質を検出するためのこのような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

【0184】

TTL4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、TTL4タンパク質に対する抗体を用いる免疫組織化学的解析により、染色の強度を測定してもよい。すなわちこの測定では、強度の染色により、該タンパク質の存在/レベルの増加が示され、それと同時にTTL4遺伝子の高発現レベルが示される。

【0185】

標的遺伝子、例えばTTL4遺伝子のがん細胞における発現レベルは、そのレベルが、標的遺伝子の対照レベル(例えば、正常細胞中のレベル)から例えば10%、25%、もしくは50%上昇するか;または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超、もしくはそれ以上まで上昇する場合に、上昇していると判定され得る。

20

【0186】

対照レベルは、疾患状態(がん性または非がん性)が判明している対象から予め採取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器官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、疾患状態が判明している対象に由来する試料中のTTL4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、以前に試験された細胞に由来する発現パターンのデータベースに由来し得る。さらに、本発明の一局面によれば、生物学的試料中のTTL4遺伝子の発現レベルを、複数の参考試料から決定された複数の対照レベルと比較することもできる。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考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、疾患状態が判明している集団におけるTTL4遺伝子の発現レベルの基準値を用いることが好ましい。基準値は、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+/-2S.D.または平均値+/-3S.D.の範囲を、基準値として用いることができる。

30

【0187】

本発明との関連において、がん性でないと判明してい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、対照レベルががん性生物学的試料から決定される場合には、これは「がん性対照レベル」と称される。試料の発現レベルと対照レベルとの差を、その発現レベルが細胞のがん性状態または非がん性状態に応じて異なることが判明している对照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して正規化することができる。例示的な対照遺伝子には、-アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素、およびリボソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0188】

TTL4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、該対象は治療すべきがんを有すると診断され得る。

【0189】

本発明はまた、(i)治療すべきがんを有する疑いのある対象を診断する方法、および

50

/ または (i i) 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生物学的試料中の T T L L 4 の発現レベルを決定する段階；
- b) T T L L 4 の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；
- c) T T L L 4 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る場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

【 0 1 9 0 】

10

あるいは、そのような方法は以下の段階を含み得る：

- 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生物学的試料中の T T L L 4 の発現レベルを決定する段階；
- b) T T L L 4 の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；
- c) T T L L 4 の発現レベルががん性対照レベルと類似しているか、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る場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

【 0 1 9 1 】

20

本発明はまた、本発明の T T L L 4 ポリペプチドで治療され得るがんに罹患している、またはその疑いのある対象を診断または判定するための診断キットを提供し、該キットはまた、がん免疫療法の有効性または適用性を評価および / 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、膀胱癌、胆管細胞癌、C M L 、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、S C L C 、N S C L C 、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。より詳細には、キットは、対象由来細胞中の T T L L 4 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、そのような試薬は以下からなる群より選択することができる：

- (a) T T L L 4 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；
- (b) T T L L 4 タンパク質またはその免疫学的断片を検出するための試薬；および
- (c) T T L L 4 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【 0 1 9 2 】

30

T T L L 4 遺伝子の m R N A を検出するのに適した試薬の例には、T T L L 4 m R N A の一部に対する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドなどの、T T L L 4 m R N A に特異的に結合するか、または T T L L 4 m R N A を同定する核酸が含まれる。このような種類のオリゴヌクレオチドは、T T L L 4 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。このような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。必要に応じて、T T L L 4 m R N A を検出するための試薬を固体基質上に固定化することができる。さらに、T T L L 4 m R N A を検出するための 2 つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

【 0 1 9 3 】

40

一方、T T L L 4 タンパク質またはその免疫学的断片を検出するのに適した試薬の例には、T T L L 4 タンパク質またはその免疫学的断片に対する抗体が含まれ得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。さらに、断片または改变抗体が T T L L 4 タンパク質またはその免疫学的断片への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改变物（例えば、キメラ抗体、s c F v 、F a b 、F (a b')₂ 、F v 等）を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のよう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、直接連結技法または間接標識技法により、抗体をシグナル発生分子で標識することができる。標識、および抗体を標識し、標的に対する抗体の結合を検出する方法は当技術分野において周知であり

50

、任意の標識および方法を本発明に使用することができる。さらに、TTL4タンパク質を検出するための2つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

【0194】

キットは、前述の試薬のうちの2つ以上を含み得る。キットはさらに、TTL4遺伝子に対するプローブまたはTTL4ペプチドに対する抗体を結合させるための固体基質および試薬、細胞を培養するための培地および容器、陽性および陰性対照試薬、ならびにTTL4ペプチドに対する抗体を検出するための二次抗体を含み得る。例えば、がんを有さない対象、またはがんに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ち得る。本発明のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明を記載した添付文書（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み得る。これらの試薬等は、ラベルを貼った容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。該容器は、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。

10

【0195】

本発明の一態様において、試薬がTTL4 mRNAに対するプローブである場合には、該試薬を多孔性ストリップなどの固体基質上に固定化して、少なくとも1つの検出部位を形成させることができる。多孔性ストリップの測定または検出領域は、それぞれが核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。検査ストリップはまた、陰性および/または陽性対照用の部位を含み得る。あるいは、対照部位は、検査ストリップとは別のストリップ上に位置し得る。任意で、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含み得る、すなわち、第1検出部位ではより多い量の固定化核酸を、および以降の部位ではより少ない量の固定化核酸を含み得る。試験試料を添加すると、検出可能なシグナルを呈する部位の数により、試料中に存在するTTL4 mRNAの量の定量的指標が提供される。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、検査ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

20

【0196】

本発明のキットは、陽性対照試料またはTTL4標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、TTL4陽性試料を回収し、次にそれらのTTL4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TTL4タンパク質またはポリヌクレオチドを、TTL4を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはTTL4標準試料を形成してもよい。本発明において、精製TTL4は組換えタンパク質であってよい。陽性対照試料のTTL4レベルは、例えばカットオフ値よりも高い。

30

【0197】

一態様において、本発明はさらに、本発明の抗体またはその断片によって特異的に認識されるタンパク質またはその部分タンパク質を含む診断キットを提供する。

【0198】

本発明のタンパク質の部分ペプチドの例には、本発明のタンパク質のアミノ酸配列中の少なくとも8個、好ましくは15個、およびより好ましくは20個の連続したアミノ酸からなるポリペプチドが含まれる。本発明のタンパク質またはペプチド（ポリペプチド）を用いて試料（例えば、血液、組織）中の抗体を検出することにより、がんを診断することができる。本発明のタンパク質およびペプチドを調製するための方法は、上記の通りである。

40

【0199】

抗TTL4抗体の量と、上記のような対応する対照試料中の抗TTL4抗体の量との差を測定することにより、本発明のがんを診断する方法を実施することができる。対象の細胞または組織が該遺伝子の発現産物（TTL4）に対する抗体を含み、この抗TTL4抗体の量が正常対照中の抗TTL4抗体の量と比較してカットオフ値のレベルよりも高いと判定される場合に、該対象ががんに罹患していることが疑われる。

【0200】

50

別の態様において、本発明の診断キットは、本発明のペプチドおよびそれに結合しているH L A分子を含み得る。抗原性ペプチドおよびH L A分子を使用して抗原特異的C T Lを検出するための方法は、既に確立されている（例えば、Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6）。したがって、腫瘍抗原特異的C T Lを検出するための検出法に、本発明のペプチドとH L A分子との複合体を適用することができ、それによってがんの再発および／または転移のより早期の発見が可能になる。さらに、本発明のペプチドを有効成分として含む医薬を適用できる対象を選択するために、または医薬の治療効果を評価するために、これを使用することができる。

【0201】

詳細には、公知の方法に従って（例えば、Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6を参照されたい）、放射標識H L A分子と本発明のペプチドとの四量体などのオリゴマー複合体を調製することができる。この複合体を用いて、例えば、がんに罹患している疑いのある対象に由来する末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的C T Lを定量することにより、診断を行うことができる。

【0202】

本発明はさらに、本明細書に記載されるペプチドエピトープを用いて、対象の免疫学的応答を評価するための方法または診断用の剤を提供する。本発明の一態様において、本明細書に記載するようなH L A - A 2 4またはH L A - A 2 4拘束性ペプチドを、対象の免疫応答を評価または予測するための試薬として用いることができる。評価される免疫応答は、免疫原を免疫担当細胞とインビトロまたはインビボで接触させることにより誘導される。好ましい態様において、免疫学的応答を評価するための免疫担当細胞は、末梢血、末梢血リンパ球（P B L）、および末梢血単核細胞（P B M C）から選択し得る。そのような免疫担当細胞を回収または単離するための方法は当技術分野において周知である。いくつかの態様においては、ペプチドエピトープを認識して結合する抗原特異的C T Lの産生をもたらし得る任意の剤を、試薬として用いてもよい。ペプチド試薬を免疫原として使用しなくてもよい。そのような解析に用いられるアッセイ系には、四量体、細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン放出アッセイ、またはE L I S P O Tアッセイなどの比較的最近の技術開発が含まれる。好ましい態様において、ペプチド試薬と接触させる免疫担当細胞は、樹状細胞を含む抗原提示細胞であってよい。

【0203】

例えば、本発明のペプチドを四量体染色アッセイにおいて使用して、腫瘍細胞抗原または免疫原への曝露後の抗原特異的C T Lの存在について末梢血単核細胞を評価することができる。H L A四量体複合体を使用して、抗原特異的C T Lを直接可視化し（例えば、Og g et al., Science 279: 2103-2106, 1998；およびAltman et al., Science 174: 94-96, 1996を参照されたい）、末梢血単核細胞の試料中の抗原特異的C T L集団の頻度を測定することができる。本発明のペプチドを使用する四量体試薬は、以下に記載するように作製することができる。

【0204】

H L A分子に結合するペプチドは、対応するH L A重鎖および2-ミクログロブリンの存在下で再び折り畳まれて、3分子複合体を生成する。この複合体において、該重鎖のカルボキシ末端の前もってタンパク質中に作製した部位をビオチン化する。次にストレプトアビジンを該複合体に添加して、3分子複合体およびストレプトアビジンから構成される四量体を形成する。蛍光標識ストレプトアビジンの手法によって、この四量体を使用して、抗原特異的細胞を染色することができる。次いで、この細胞を例えばフローサイトメトリーによって同定することができる。そのような解析を、診断または予後予測目的に使用することができる。この手順によって同定された細胞を治療目的に使用することもできる。

【0205】

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、免疫リコール応答を評価するための試薬を提供する（例えば、Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100: 503-513, 1997、およびPenna

10

20

30

40

50

et al., J Exp. Med. 174: 1565-1570, 1991を参照されたい)。例えば、治療すべきがんを有する個体からの患者PBM C試料を、特異的ペプチドを用いて抗原特異的CTLの存在について解析する。PBM Cを培養し、該細胞を本発明のペプチドで刺激することによって、単核細胞を含む血液試料を評価することができる。適切な培養期間後、増殖した細胞集団を例えばCTL活性について解析することができる。

【0206】

ペプチドは、ワクチンの有効性を評価するための試薬として用いることもできる。免疫原をワクチン接種した患者から得られたPBM Cを、例えば上記の方法のいずれかを用いて解析することができる。患者のHLA型を決定し、その患者に存在するアリル特異的分子を認識するペプチドエピトープ試薬を解析のために選択する。ワクチンの免疫原性は、PBM C試料中のエピトープ特異的CTLの存在によって示され得る。

10

【0207】

本発明のペプチドは、当技術分野で周知の技法を用いて抗体を作製するために使用することもでき(例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley / Greene, NY; およびAntibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい)、この抗体は、がんを診断またはモニターするための試薬として有用であり得る。そのような抗体は、HLA分子との関連でペプチドを認識する抗体、すなわちペプチド-MHC複合体に結合する抗体を含み得る。

20

【0208】

本発明のペプチドおよび組成物はさらなる用途をいくつか有し、そのうちの一部を本明細書に記載する。例えば、本発明は、TTLL4免疫原性ポリペプチドの発現を特徴とする障害を診断または検出する方法を提供する。これらの方法は、生物学的試料中のTTLL4 HLA結合ペプチド、またはTTLL4 HLA結合ペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現を測定することを含む。ペプチドまたはペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現は、該ペプチドまたは該複合体の結合パートナーを用いてアッセイすることによって、測定または検出することができる。好ましい態様において、ペプチドまたは複合体の結合パートナーは、該ペプチドを認識してこれに特異的に結合する抗体である。腫瘍生検などの生物学的試料中のTTLL4の発現は、TTLL4プライマーを用いる標準的なPCR増幅プロトコールによって試験することができる。腫瘍発現の例は本明細書に提示しており、TTLL4増幅のための例示的な条件およびプライマーのさらなる開示は、WO2003/27322に見出すことができる。

30

【0209】

好ましくは診断法は、対象から単離された生物学的試料をTTLL4 HLA結合ペプチドに特異的な剤と接触させて、該生物学的試料中のTTLL4 HLA結合ペプチドの存在を検出することを含む。本明細書で使用する「接触させる」とは、剤と生物学的試料中に存在するTTLL4 HLA結合ペプチドとの間の特異的相互作用が可能となるように、生物学的試料を、例えば濃度、温度、時間、イオン強度の適切な条件下で、剤に十分に近接させて配置することを意味する。一般に、剤と生物学的試料を接触させるための条件は、分子と生物学的試料中のその同族物(例えば、タンパク質とその受容体同族物、抗体とそのタンパク質抗原同族物、核酸とその相補的配列同族物)との間の特異的相互作用を促進するための、当業者に公知の条件である。分子とその同族物との間の特異的相互作用を促進するための例示的な条件は、Lowらに対して発行された米国特許第5,108,921号に記載されている。

40

【0210】

本発明の診断法は、インビオおよびインビトロの一方または両方で行うことができる。したがって、生物学的試料は、本発明においてインビオまたはインビトロに位置し得る。例えば、生物学的試料はインビオの組織であってよく、かつTTLL4免疫原性ポリペプチドに特異的な剤を用いて、組織中のそのような分子の存在を検出することができる。あるいは、生物学的試料をインビトロで採取または単離することができる(例えば、血液試料、腫瘍生検、組織抽出物)。特に好ましい態様において、生物学的試料は細胞を含む試

50

料であってよく、より好ましくは、診断または治療する対象から採取された腫瘍細胞を含む試料であってよい。

【0211】

あるいは、フルオレセイン標識 H L A 多量体複合体で染色することによって、抗原特異的 T 細胞の直接的な定量を可能にする方法により、診断を行うこともできる（例えば、Altman, J. D. et al., 1996, Science 274: 94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330）。細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン-

放出アッセイ、または E L I S P O T アッセイもまた提供されている。四量体染色、細胞内リンホカイン染色、および E L I S P O T アッセイはすべて、より慣例的なアッセイよりも少なくとも 10 倍感度が高いようである（Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413）。五量体（例えば、U S 2 0 0 4 - 2 0 9 2 9 5 A）、デキストラマー（d e x t r a m e r）（例えば、W O 0 2 / 0 7 2 6 3 1）、およびストレプタマー（s t r e p t a m e r）（例えば、Nature medicine 6. 631-637 (2002)）を使用することもできる。10

【0212】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の T T L L 4 ペプチドの少なくとも 1 つを投与された対象の免疫学的応答を診断または評価するための方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

(a) 免疫原を、該免疫原に対して特異的な C T L の誘導に適した条件下で免疫担当細胞と接触させる段階；20

(b) 段階 (a) で誘導された C T L の誘導レベルを検出または決定する段階；および
(c) 対象の免疫学的応答を C T L 誘導レベルと相關させる段階。

【0213】

本発明において、免疫原は、(a) S E Q I D N O : 1、3 ~ 3 7 および 3 8 ~ 7 3 のアミノ酸配列の中より選択される T T L L 4 ペプチド、そのようなアミノ酸配列を有するペプチド、ならびにそのようなアミノ酸配列が 1 個、2 個、またはそれ以上のアミノ酸置換によって改変されたペプチド、のうち少なくとも 1 つである。一方、免疫原特異的 C T L の誘導に適した条件は当技術分野において周知である。例えば、免疫担当細胞を、免疫原特異的 C T L を誘導するために免疫原の存在下でインビトロで培養してもよい。免疫原特異的 C T L を誘導する目的で、任意の刺激因子を細胞培養物に添加してもよい。例えば、I L - 2 は、C T L 誘導のための好ましい刺激因子である。30

【0214】

いくつかの態様において、ペプチドがん療法によって治療される対象の免疫学的応答をモニターまたは評価する段階は、治療前、治療中、および / または治療後に行うことができる。一般に、がん療法プロトコール中、免疫原性ペプチドは、治療される対象に繰り返し投与される。例えば、免疫原性ペプチドを 3 ~ 1 0 週間にわたって毎週投与してもよい。したがって、対象の免疫学的応答は、がん療法プロトコール中に評価またはモニターされ得る。あるいは、がん療法に対する免疫学的応答を評価またはモニターする段階が、療法プロトコールの完了時であってもよい。40

【0215】

本発明によれば、免疫原特異的 C T L の誘導が対照と比較して強化されていることにより、評価または診断される対象が、投与された免疫原に対して免疫学的に応答したことが示される。免疫学的応答を評価するのに適した対照には、例えば、免疫担当細胞をペプチドと接触させていない場合の、またはいかなる T T L L 4 ペプチドとも異なるアミノ酸配列（例えば、ランダムなアミノ酸配列）を有する対照ペプチドと接触させている場合の、C T L 誘導レベルが含まれ得る。好ましい態様において、対象に投与された各免疫原間で免疫学的応答を比較することにより、対象の免疫学的応答を配列特異的な様式で評価する。特に、いくつかの種類の T T L L 4 ペプチドについての混合物を対象に投与する場合であっても、免疫学的応答はペプチドに依存して異なる可能性がある。その場合には、各ペ50

ペプチド間で免疫学的応答を比較することにより、対象がより強い応答を示すペプチドを同定することができる。

【0216】

XII. 抗体

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は本発明のペプチドに特異的に結合し、本発明のペプチドではないものには結合しない（または弱く結合する）。あるいは、抗体は本発明のペプチドおよびその相同体に結合する。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断および予後予測のアッセイ、ならびに画像化方法論において使用され得る。同様に、そのような抗体は、TTL4ががん患者において同じく発現または過剰発現する限り、他のがんの治療、診断、および／または予後予測において使用され得る。さらに、細胞内で発現する抗体（例えば、一本鎖抗体）は、TTL4の発現が関与するがんの治療において治療的に使用することができ、そのようながんの例には、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0217】

本発明はまた、TTL4タンパク質（SEQ ID NO: 80）、またはSEQ ID NO: 1、3～37および38～73からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むその断片を検出および／または定量するための様々な免疫学的アッセイを提供する。そのようなアッセイは、必要に応じて、TTL4タンパク質またはその断片を認識してそれと結合し得る1種または複数種の抗TTL4抗体を含み得る。本発明との関連において、TTL4ポリペプチドに結合する抗TTL4抗体は、好ましくは、SEQ ID NO: 1、3～37および38～73からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は、阻害試験で確認することができる。すなわち、解析される抗体と全長TTL4ポリペプチドとの間の結合が、SEQ ID NO: 1、3～37および38～73の中より選択されるアミノ酸配列からなる任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、この抗体が該断片に特異的に結合することが示される。本発明との関連において、そのような免疫学的アッセイは、様々な種類の放射免疫測定法、免疫クロマトグラフ技法、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光測定法（ELIFA）等を含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の様々な免疫学的アッセイ形式の範囲内で行われる。

20

【0218】

本発明の免疫学的であるが非抗体性の関連アッセイには、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）およびMHC結合アッセイもまた含まれ得る。加えて、本発明は、TTL4を発現するがんを検出し得る免疫学的画像化法を企図し、その例には、本発明の標識抗体を使用する放射性シンチグラフィー画像化法が含まれるが、これに限定されない。そのようなアッセイは、TTL4を発現するがんの検出、モニタリング、および予後予測において臨床的に使用され、そのがんの例には、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0219】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体として任意の形態で用いることができ、これには、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することにより得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えにより作製されたヒト化抗体がさらに含まれ得る。

40

【0220】

抗体を得るために抗原として用いられる本発明のペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくはヒト、マウス、またはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のペプチドは、本明細書に開示するヌクレオチド配列またはアミノ酸配

50

列から得ることができる。

【0221】

本発明によれば、免疫抗原として用いられるペプチドは、完全なタンパク質または該タンパク質の部分ペプチドであってよい。部分ペプチドは、例えば、本発明のペプチドのアミノ(N)末端断片またはカルボキシ(C)末端断片を含み得る。

【0222】

本明細書では、抗体を、 T T L L 4 ペプチドの全長または断片のいずれかと反応するタンパク質と定義する。好ましい態様において、本発明の抗体は、 S E Q I D N O : 1 、 3 ~ 3 7 および 3 8 ~ 7 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する T T L L 4 の断片ペプチドを認識し得る。オリゴペプチドを合成する方法は、当技術分野において周知である。合成後、免疫原として使用する前にペプチドを任意に精製してもよい。本発明との関連において、免疫原性を高めるために、オリゴペプチド(例えば、 9 m e r または 1 0 m e r)を担体と結合または連結させてもよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン(K L H)が周知である。 K L H とペプチドを結合する方法もまた、当技術分野において周知である。

10

【0223】

あるいは、本発明のペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに挿入することができ、次にこれを用いて本明細書に記載のように宿主細胞を形質転換する。所望のペプチドまたはその断片を、任意の標準的な方法により宿主細胞の外部または内部から回収することができ、後にこれを抗原として用いることができる。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体もしくはそれらの溶解物、または化学合成したペプチドを抗原として用いてもよい。

20

【0224】

任意の哺乳動物を抗原で免疫することができるが、細胞融合に用いられる親細胞との適合性を考慮に入れることができ。一般に、齧歯目(R o d e n t i a)、ウサギ目(L a g o m o r p h a)、または靈長目(P r i m a t e)の動物を使用することができる。齧歯目科の動物には、例えばマウス、ラット、およびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。靈長目科の動物には、例えばカニクイザル(M a c a c a f a s c i c u l a r i s)、アカゲザル、マントヒビ、およびチンパンジーなどの狭鼻下目(C a t a r r h i n i) (旧世界ザル) のサルが含まれる。

30

【0225】

動物を抗原で免疫する方法は、当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物を免疫するための標準的な方法である。より具体的には、抗原を適量のリン酸緩衝食塩水(P B S)、生理食塩水等で希釈し、懸濁させる。必要に応じて、抗原懸濁液を、フロイント完全アジュバントなどの適量の標準的アジュバントと混合し、乳化した後、哺乳動物に投与することができる。その後、適量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を、 4 ~ 2 1 日ごとに数回投与することができる。免疫化には、適切な担体を用いてもよい。上記のように免疫した後、血清を、所望の抗体の量の増加について標準的方法で調べることができます。

40

【0226】

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望の抗体の増加について調べた免疫後の哺乳動物から血液を回収し、任意の従来法により血液から血清を分離することによって、調製することができる。ポリクローナル抗体はポリクローナル抗体を含む血清を含んでよく、またポリクローナル抗体を含む画分を該血清から単離してもよい。免疫グロブリン G または M は、本発明のペプチドのみを認識する画分から、例えば、本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた上で、この画分をプロテイン A またはプロテイン G カラムを用いてさらに精製して、調製することができる。

【0227】

モノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を回収し、上記のように血清中の所望の抗体のレベル上昇について確かめた上で、細胞融合に供する

50

。細胞融合に用いる免疫細胞は、好ましくは脾臓から得ることができる。上記の免疫細胞と融合させる別の好ましい親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髄腫細胞、およびより好ましくは薬物による融合細胞の選択のための特性を獲得した骨髄腫細胞が含まれる。

【0228】

公知の方法、例えば、Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)) の方法に従って、上記の免疫細胞と骨髄腫細胞とを融合させることができる。

【0229】

細胞融合によって結果として得られたハイブリドーマは、それらを HAT 培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地中で培養することによって選択することができる。細胞培養は典型的に、HAT 培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な期間である数日間から数週間にわたって継続する。その後、標準的な限界希釈を行い、所望の抗体を產生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングおよびクローニングすることができる。10

【0230】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したリンパ球などのヒトリンパ球を、ペプチド、ペプチドを発現している細胞、またはそれらの溶解物でインビトロにおいて免疫することもできる。次いで、免疫後のリンパ球を、U266などの無限に分裂可能なヒト由来骨髄腫細胞と融合させて、該ペプチドに結合し得る所望のヒト抗体を產生するハイブリドーマを得ることができる（特開昭63-17688号）。20

【0231】

続いて、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムにより精製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドの精製および検出のためだけでなく、本発明のペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても使用することができる。

【0232】

あるいは、免疫したリンパ球などの、抗体を產生する免疫細胞を癌遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体の調製に用いることもできる。30

【0233】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を用いて組換えにより調製することもできる（例えば、MacMillan Publishers LTD (1990)により英国で刊行された、Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodiesを参照されたい）。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を產生するハイブリドーマまたは免疫化リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製された組換え抗体を提供する。

【0234】

さらに、本発明の抗体は、本発明のペプチドの1種または複数種に結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scfv)であってよい(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。より具体的には、抗体断片は、抗体をパパインまたはペプシンなどの酵素で処理することにより作製することができる。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞内で発現させることができる（例えば、Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:40

10

20

30

40

50

663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい)。
。

【0235】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)などの様々な分子との結合によって修飾することができる。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で慣例的である。

【0236】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体に由来する相補性決定領域(CDR)と、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域(FR)および定常領域とを含むヒト化抗体として得ることもできる。そのような抗体は、公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、齧歯類のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することによって行うことができる(例えば、Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)を参照されたい)。したがって、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全には満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されたキメラ抗体である。

10

【0237】

ヒトのフレームワーク領域および定常領域に加えて、ヒト可変領域をも含む完全なヒト抗体を用いることもできる。そのような抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を用いて作製することができる。例えば、インビトロの方法には、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用が含まれる(例えば、Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991))。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することもできる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号、第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号に記載されている。

20

【0238】

上記のようにして得られた抗体は、均質になるまで精製してもよい。例えば、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って、抗体の分離および精製を行うことができる。例えば、これらに限定されないが、アフィニティーコロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、および等電点電気泳動の使用を適切に選択しあわせることにより、抗体を分離および単離することができる(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティーカラムとして使用することができる。用いられるべき例示的なプロテインAカラムには、例えば、Hyper D、POROS、およびSephadex F.F.(Pharmacia)が含まれる。

30

【0239】

例示的なクロマトグラフィーには、アフィニティーコロマトグラフィー以外に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が含まれる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィー手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うことができる。

40

【0240】

例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、および/または免疫蛍光法を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAの場合、本発明の抗体をプレート上に固定化し、本発明のペプチドを該プレートに添加し、次に抗体産生細胞の培養上清また

50

は精製抗体といった所望の抗体を含む試料を添加する。次いで、一次抗体を認識し、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を該プレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。抗体の結合活性を評価するために、C末端またはN末端断片などのペプチド断片を抗原として用いてもよい。本発明の抗体の活性を評価するために、BIAcore (Pharmacia) を用いてもよい。

【0241】

本発明の抗体を本発明のペプチドを含むと考えられる試料に対して曝露し、該抗体と該ペプチドとによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、上記の方法によって本発明のペプチドの検出または測定が可能になる。

10

【0242】

本発明のペプチドを検出または測定する方法はペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法は、該ペプチドを使用する種々の実験において使用され得る。

【0243】

XIII. ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドが導入されたベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明のベクターは、宿主細胞中に本発明のヌクレオチド、特にDNAを保持するため、本発明のペプチドを発現させるため、または遺伝子治療用に本発明のヌクレオチドを投与するために使用することができる。

20

【0244】

大腸菌が宿主細胞であり、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5、HB101、またはXL1Blue）内で増幅して大量に生成する場合、ベクターは、大腸菌内で増幅するための「複製起点」と、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の薬物によって選択される薬物耐性遺伝子）とを有する必要がある。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBlue script、pCR-Script等を用いることができる。加えて、pGEM-T、pDIRECT、およびpT7もまた上記のベクターと同様に、cDNAのサブクローニングおよび抽出に用いることができる。ベクターを本発明のタンパク質の産生に用いる場合には、発現ベクターが使用され得る。例えば、大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5、HB101、またはXL1Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現し得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1989)）、araBプロモーター（Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)）、T7プロモーター等を有する必要がある。この点に関して、例えば、pGEX-5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpressシステム」（Qiagen）、pEGFP、およびpET（この場合、宿主は好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である）を上記のベクターの代わりに用いることができる。さらにベクターは、ペプチド分泌のためのシグナル配列を含んでもよい。ペプチドを大腸菌のペリプラズムに分泌させる例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列（Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)）である。ベクターを標的宿主細胞に導入する手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

30

【0245】

大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen）、およびpEGF-BOS（Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」（GIBCO BRL）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（

40

50

例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIpneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「ピキア(Pichia)発現キット」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)、および枯草菌(Bacillus subtilis)由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)を、本発明のポリペプチドの产生に使用することができる。

【0246】

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

【0247】

本発明の実施または試験にあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等の方法および材料を用いることができるが、適切な方法および材料を記載する。本明細書に挙げたすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により組み入れられる。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、および例は、単に例証するためのものであり、限定することは意図しない。

【実施例】

【0248】

実験1

材料および方法

細胞株

HLA-A^{*}2402陽性Bリンパ芽球様細胞株であるT1SIは、IHWG Cell Line and Gene Bank (Seattle, WA)から購入した。アフリカミドリザル腎細胞株であるCOS7は、ATCCから購入した。

【0249】

TTL4由来ペプチドの候補選択

HLA-A^{*}2402分子と結合するTTL4由来の9merおよび10merペプチドを、「NetMHC3.0」結合予測サーバー(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus 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、Biogenesis (Lewisville, Texas)により、標準的な固相合成法によって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製した。該ペプチドの純度(>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20mg/mlで溶解し、-80°で保存した。

【0250】

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, 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%の加熱非動

10

20

30

40

50

化した自己血清（A S）を含むA I M - V 培地（In vitro g e n）中、1 0 0 0 U / m l 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1 0 0 0 U / m l のインターロイキン（I L）- 4（R & D System）の存在下で、単球が濃縮された集団を培養した。7日間の培養後、サイトカインで誘導したD Cに、A I M - V 培地中で3 7 度3時間、3 μ g / m l の2 - ミクログロブリンの存在下で2 0 μ g / m l の各合成ペプチドをパルスした。作製された細胞は、自身の細胞表面上に、C D 8 0 、C D 8 3 、C D 8 6 、およびH L A クラスIIなどのD C 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、ペプチドパルスしたこれらのD CをX線照射（2 0 G y）により不活化し、C D 8 Positive Isolation Kit（D y n a l）を用いた陽性選択によって得られた自己C D 8 + T 細胞と1 : 2 0 の比率で混合した。これらの培養物を4 8 ウェルプレート（Corning）中に準備し、各ウェルは、0 . 5 m l のA I M - V / 2 % A S 培地中に、 $1 . 5 \times 1 0 ^ 4$ 個のペプチドパルスしたD C、 $3 \times 1 0 ^ 5$ 個のC D 8 + T 細胞、および1 0 n g / m l のI L - 7（R & D System）を含んだ。3日後、これらの培養物に、I L - 2（C H I R O N）を最終濃度2 0 I U / m lまで添加した。7日目および1 4 日目に、ペプチドパルスした自己D CでT 細胞をさらに刺激した。D Cは上記と同じ方法によって毎回調製した。2 1 日目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたT I S I 細胞に対してC T Lを試験した（Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84 (1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84 (8) : 1052 - 7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 , 10 (24) : 8577 - 86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 , 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 , 96 (8) : 498-506）。

【0 2 5 1】

C T L 増殖手順

R i d d e l l ら（Walter EA et al., N Engl J Med 1995 333(16): 1038-44; Riddell I SR et al., Nat Med 1996, 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、C T Lを培養下で増殖させた。4 0 n g / m l の抗C D 3 モノクローナル抗体（P h a r m i n g e n）の存在下で、マイトイシン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 $5 \times 1 0 ^ 4$ 個のC T Lを2 5 m l のA I M - V / 5 % A S 培地中に懸濁した。培養開始1日後に、1 2 0 I U / m l のI L - 2を該培養物に添加した。5、8、および1 1 日目に、3 0 I U / m l のI L - 2を含む新たなA I M - V / 5 % A S 培地を、該培養物に供給した（Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84 (1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84 (8) : 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 , 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 , 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 , 96 (8) : 498-506）。

【0 2 5 2】

C T L クローンの樹立

9 6 丸底マイクロタイタープレート（N a l g e N u n c Internation a l）においてC T L 0 . 3個、1個、および3個 / ウェルとなるように、希釀を行った。C T Lを、 $1 \times 1 0 ^ 4$ 個細胞 / ウェルの2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株、3 0 n g / m l の抗C D 3 抗体、および1 2 5 U / m l のI L - 2と共に、合計1 5 0 μ l / ウェルの5 % A S 含有A I M - V 培地中で培養した。1 0 日後、5 0 μ l / ウェルのI L - 2を、I L - 2の最終濃度が1 2 5 U / m lに到達するように該培地に添加した。1 4 日目にC T L活性を試験し、上記と同じ方法を用いてC T Lクローンを増殖させた（Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 , 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 , 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 , 96 (8) : 498-506）。

【0 2 5 3】

特異的C T L活性

特異的C T L活性を調べるために、インターフェロン（I F N）- 酵素結合免疫スポット（E L I S P O T）アッセイおよびI F N - 酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）を行った。具体的には、ペプチドパルスしたT I S I ($1 \times 1 0 ^ 4$ 個 / ウェル)を刺

10

20

30

40

50

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-E L I S P O T アッセイおよびIFN-E L I S A アッセイは、製造業者の手順に従って行った。

【0254】

標的遺伝子およびHLA-A24のいずれか一方または両方を強制的に発現する細胞の樹立

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増幅産物をベクターにクローニングした。製造業者の推奨する手順に従ってリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、標的遺伝子およびHLA-A^{*}2402ヌル細胞株であるCOS7に該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ベルセン(Invitrogen)を用いて回収し、CTL活性アッセイのための標的細胞(5×10⁴個細胞/ウェル)として使用した。

10

【0255】

結果

T T L L 4由来のHLA-A24結合ペプチドの予測

表1aおよび1bは、T T L L 4のHLA-A24結合9merおよび10merペプチドを、結合親和性の高い順に示す。エピトープペプチドを決定するために、HLA-A24結合能を有する可能性がある合計37種のペプチドを選択して調べた。

20

【0256】

【表1a】

TTLL4に由来するHLA-A24結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
750	RYLHKPYLI	5	1
579	LFPNVPPTI	21	2
994	FYASVLDVL	24	3
769	VYVTSYDPL	37	4
755	PYLISGSKF	43	5
79	AYFFCPSTL	54	6
684	RFGKKEFSF	68	7
689	EFSFPQSF	77	8
779	IYLFSDGLV	119	9
304	WYNRNNLAM	229	10
793	KYSPSMKSL	284	11
691	SFFPQSFIL	325	12
41	VWPQAHQQV	387	13
1086	VWSLPTSLL	399	14
1186	TFQSISDSL	473	15
103	CYLHSLPDL	492	16
362	SFLNPSFQW	754	17
1037	RFFEQPRYF	800	18
773	SYDPLRIYL	1501	19

【0 2 5 7】

【表1b】

TTLL4に由来するHLA-A24結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
103	CYLHSLPDLF	11	20
773	SYDPLRIYLF	21	21
883	PYSCHELFGF	47	22
127	PYQQLESFCL	67	23
684	RFGKKEFSFF	70	24
1043	RYFNILTTQW	148	25
223	MWPNSTPVPL	181	26
122	SYRQKPYQQL	210	27
1186	TFQSISDSLL	323	28
1022	QFERIFPSHI	561	29
689	EFSFFPQSF1	584	30
804	KFMHLTNYSV	836	31
994	FYASVLDVLT	860	32
993	DFYASVLDVL	3998	33
1105	AFSKSETSKL	5879	34
696	SFILPQDAKL	7815	35
665	SFQIGRKDR1	18177	36
891	GFDIMLDENL	24816	37

開始位置は、TTLL4のN末端からのアミノ酸残基数を示す。

解離定数 [Kd (nM)] は「NetMHC3.0」から導き出している。

【0258】

HLA-A*2402拘束性のTTLL4由来予測ペプチドによるCTLの誘導

TTLL4由来のそれら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- γ ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を測定した(図1a~l)。TTLL4-A24-9-750(SEQ ID NO: 1)を用いたウェル番号#7(a)、TTLL4-A24-9-79(SEQ ID NO: 6)を用いた#8(b)、TTLL4-A24-9-793(SEQ ID NO: 11)を用いた#8(c)、TTLL4-A24-9-691(SEQ ID NO: 12)を用いた#5(d)、TTLL4-A24-9-103(SEQ ID NO: 16)を用いた#1(e)、TTLL4-A24-10-103(SEQ ID NO: 20)を用いた#3(f)、TTLL4-A24-10-773(SEQ ID NO: 21)を用いた#3(g)、TTLL4-A24-10-883(SEQ ID NO: 22)を用いた#3(h)である。

10

20

30

40

50

ID NO : 22) を用いた #8 (h)、TTL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO : 28) を用いた #2 (i)、TTL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO : 29) を用いた #3 (j)、TTL4-A24-10-994 (SEQ ID NO : 32) を用いた #1 (k) および TTL4-A24-10-891 (SEQ ID NO : 37) を用いた #6 (l) は、対照ウェルと比較して強力な IFN- γ 産生を実証することが示された。一方、表 1a および 1b に示されるその他のペプチドは、HLA-A^{*}2402 との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドでの刺激では、特異的な CTL 活性が測定されなかった。典型的な陰性データの例として、TTL4-A24-9-579 (SEQ ID NO : 2) で刺激した CTL からは特異的 IFN- γ 産生が示されなかった (m)。結果として、TTL4 に由来する 12 種のペプチドが、強力な CTL を誘導することができ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。

10

【0259】

TTL4 由来ペプチドに対する CTL 株およびクローニングの樹立

上記「材料および方法」の章に記載した通りに、TTL4-A24-9-750 (SEQ ID NO : 1) を用いたウェル番号 #7 (a)、TTL4-A24-9-79 (SEQ ID NO : 6) を用いた #8 (b)、TTL4-A24-9-691 (SEQ ID NO : 12) を用いた #5 (c)、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO : 16) を用いた #1 (d)、TTL4-A24-10-103 (SEQ ID NO : 20) を用いた #3 (e) および TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO : 21) を用いた #3 (f) における IFN- γ ELISPOT アッセイによって検出されるペプチド特異的 CTL 活性を示した細胞を増殖させ、CTL 株を樹立した。これらの CTL 株の CTL 活性を IFN- γ ELISA アッセイによって測定した (図 2a ~ f)。CTL 株は、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- γ 産生を示した。さらに、「材料および方法」に記載した通りに、CTL 株から限界希釈によって CTL 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 CTL クローンからの IFN- γ 産生を IFN- γ ELISA アッセイによって測定した。TTL4-A24-9-750 (SEQ ID NO : 1) (a)、TTL4-A24-9-79 (SEQ ID NO : 6) (b)、TTL4-A24-10-103 (SEQ ID NO : 20) (c) および TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO : 21) (d) で刺激した CTL クローンから強力な IFN- γ 産生が測定された。(図 3a ~ d)。

20

【0260】

TTL4 および HLA-A^{*}2402 を発現する標的細胞に対する特異的 CTL 活性

各ペプチドに対して産生された樹立 CTL 株およびクローニングを、TTL4 および HLA-A^{*}2402 分子を発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長 TTL4 および HLA-A^{*}2402 遺伝子の両方をトランスフェクトした COS7 細胞 (TTL4 および HLA-A^{*}2402 遺伝子を発現する応答細胞の特異的モデル) に対する特異的 CTL 活性を、対応するペプチドによって産生された CTL 株およびクローニングを刺激細胞として用いることによって試験した。全長 TTL4 または HLA-A^{*}2402 のいずれかをトランスフェクトした COS7 細胞を対照として調製した。図 4において、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO : 16) で刺激した CTL 株 (a) ならびに TTL4-A24-10-103 (SEQ ID NO : 20) (b) および TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO : 21) (c) で刺激した CTL クローンが、TTL4 および HLA-A^{*}2402 の両方を発現する COS7 細胞に対して強力な CTL 活性を示した。一方、対照に対して有意な特異的 CTL 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、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO : 16) (a)、TTL4-A24-10-103 (SEQ ID NO : 20) (b) および TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO : 21) (c) のペプチドが、内因的にプロセシングされ、HLA-A^{*}2402 分子と

30

40

50

もに標的細胞上に提示され、CTLによって認識されることが明確に実証された。これらの結果は、TTL4に由来するこれらのペプチドが、TTL4を発現する腫瘍を有する患者の治療のためのがんワクチンとして適している可能性があることを示した。

【0261】

抗原ペプチドの相同意解

TTL4-A24-9-750 (SEQ ID NO: 1)、TTL4-A24-9-79 (SEQ ID NO: 6)、TTL4-A24-9-793 (SEQ ID NO: 11)、TTL4-A24-9-691 (SEQ ID NO: 12)、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO: 16)、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO: 20)、TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO: 21)、TTL4-A24-10-883 (SEQ ID NO: 22)、TTL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO: 28)、TTL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO: 29)、TTL4-A24-10-994 (SEQ ID NO: 32)およびTTL4-A24-10-891 (SEQ ID NO: 37)で刺激したCTLが、有意かつ特異的なCTL活性を示した。この結果は、TTL4-A24-9-750 (SEQ ID NO: 1)、TTL4-A24-9-79 (SEQ ID NO: 6)、TTL4-A24-9-793 (SEQ ID NO: 11)、TTL4-A24-9-691 (SEQ ID NO: 12)、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO: 16)、TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO: 21)、TTL4-A24-10-883 (SEQ ID NO: 22)、TTL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO: 28)、TTL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO: 29)、TTL4-A24-10-994 (SEQ ID NO: 32)およびTTL4-A24-10-891 (SEQ ID NO: 37)の配列がヒト免疫系を感作することが公知の他の分子に由来するペプチドと相同であるという事実に起因し得る。この可能性を排除するために、BLASTアルゴリズム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)を用いて、クエリーとしてのこのペプチド配列に対して相同意解を行ったが、有意な相同意解を有する配列は認められなかった。相同意解の結果は、TTL4-A24-9-750 (SEQ ID NO: 1)、TTL4-A24-9-79 (SEQ ID NO: 6)、TTL4-A24-9-793 (SEQ ID NO: 11)、TTL4-A24-9-691 (SEQ ID NO: 12)、TTL4-A24-9-103 (SEQ ID NO: 16)、TTL4-A24-10-773 (SEQ ID NO: 21)、TTL4-A24-10-883 (SEQ ID NO: 22)、TTL4-A24-10-1186 (SEQ ID NO: 28)、TTL4-A24-10-1022 (SEQ ID NO: 29)、TTL4-A24-10-994 (SEQ ID NO: 32)およびTTL4-A24-10-891 (SEQ ID NO: 37)の配列が固有のものであることを示し、したがって本発明者らの知る限りでは、この分子が、ある非関連分子に対して意図しない免疫学的応答を引き起こす可能性はほとんどない。

【0262】

結論として、TTL4に由来する新規HLA-A^{*}2402エピトープペプチドが同定され、それらががん免疫療法に適していることが実証された。

【0263】

実験2

材料および方法

細胞株

HLA-A^{*}0201陽性Bリンパ芽球様細胞株であるT2、およびアフリカミドリザル腎細胞株であるCOS7は、ATCCから購入した。

10

20

30

40

50

【0264】

T T L L 4 由来ペプチドの候補選択

HLA-A^{*}0201分子と結合するT T L L 4 由来の9merおよび10merペプチドを、「NetMHC3.0」結合予測サーバー(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus 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、Biosynthesis (Lewisville, Texas)により、標準的な固相合成法によって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製した。該ペプチドの純度(>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20mg/mlで溶解し、-80°で保存した。

10

【0265】

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, 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^{*}0201陽性)から単離した末梢血单核細胞を、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%の加熱非動化した自己血清(AS)を含むAIM-V培地(Invitrogen)中、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、単球が濃縮された集団を培養した。7日間の培養後、サイトカインで誘導したDCに、AIM-V培地中で37°Cで3時間、3μg/mlの2-ミクログロブリンの存在下で20μg/mlの各合成ペプチドをパルスした。作製された細胞は、自身の細胞表面上に、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、ペプチドパルスしたこれらのDCをX線照射(20Gy)により不活化し、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、0.5mlのAIM-V/2%AS培地中に、1.5×10⁴個のペプチドパルスしたDC、3×10⁵個のCD8+T細胞、および10ng/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20IU/mlまで添加した。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。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T2細胞に対してCTLを試験した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

20

30

40

次いで、ペプチドパルスしたこれらDCをX線照射(20Gy)により不活化し、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、0.5mlのAIM-V/2%AS培地中に、1.5×10⁴個のペプチドパルスしたDC、3×10⁵個のCD8+T細胞、および10ng/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20IU/mlまで添加した。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。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T2細胞に対してCTLを試験した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

50

【0266】

CTL増殖手順

Riddellら(Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 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。40ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体(Pharmingen)の存在下で、マイトイシンCによって不活化した2種類のヒトBリンパ球様細胞株と共に、合計5×10⁴個のCTLを25mlのAIM-V/5%AS培地中に懸濁した。培養開始1日後に、120IU/mlのIL-2を該培養物に添加した。5、8、および11日目に、30IU/mlのIL-2を含む新たなAIM-

50

V / 5 % A S 培地を、該培養物に供給した (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84 (1) : 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84 (8) : 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96 (8) : 498-506)。

【0267】

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 CTL 0.3 個、1 個、および 3 個 / ウェルとなるように、希釀を行った。CTL を、 1×10^4 個細胞 / 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 μl / ウェルの 5 % A S 含有 AIM-V 培地中で培養した。10 日後、50 μl / ウェルの IL-2 を、IL-2 の最終濃度が 125 U / ml に到達するように該培地に添加した。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, 10 (24) : 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97 (5) : 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96 (8) : 498-506)。

10

【0268】

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 T2 (1×10^4 個 / 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つて行った。

20

【0269】

標的遺伝子および HLA - A 02 のいずれか一方または両方を強制的に発現する細胞の樹立

標的遺伝子または HLA - A * 0201 のオープンリーディングフレームをコードする cDNA を PCR によって增幅した。PCR 増幅産物をベクターにクローニングした。製造業者の推奨する手順に従ってリポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を用いて、標的遺伝子および HLA - A * 0201 ヌル細胞株である COS7 に該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ベルセン (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 個細胞 / ウェル) として使用した。

30

【0270】

結果

TTL4 由来の HLA - A 02 結合ペプチドの予測

表 2a および 2b は、TTL4 の HLA - A 02 結合 9mer および 10mer ペプチドを、結合親和性の高い順に示す。エピトープペプチドを決定するために、HLA - A 02 結合能を有する可能性がある合計 41 種のペプチドを選択して調べた。

40

【0271】

【表2a】
TTLL4に由来するHLA-A02結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
222	FMWPNSTPV	2	38
805	FMHLTNYSV	6	39
610	KMSTVTPNI	7	40
1163	SLSTQTLPV	10	41
575	LIYSLFPNV	15	42
1189	SISDSLLAV	16	43
66	GLGPGLLGV	32	44
864	TIISSEPYV	37	45
899	NLKWPWVLEV	48	46
147	SLPQKSLPV	49	47
578	SLFPNVPPT	51	48
697	FILPQDAKL	52	49
1088	SLPTSLLTI	70	50
988	KIPDQDFYA	79	51
423	LLASHASGL	163	52
852	SIWEKIKDV	200	53
128	YQQLESFCL	265	54
107	SLPDLFNST	278	55
605	KLLRWKMST	325	56
356	CQLEQSSFL	1503	57

10

20

30

【表2b】
TTLL4に由来するHLA-A02結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
363	FLNPSFQWNV	3	58
574	ALIYSLFPNV	4	59
895	MLDENLKPWV	10	60
605	KLLRWKMSTV	16	61
578	SLFPNVPPTI	19	62
756	YLISGSKFDL	37	63
550	AMISRSCMEI	39	64
610	KMSTVTPNIV	42	65
107	SLPDLFNSTL	46	66
933	NLAGFVLVPN	56	67
1163	SLSTQTLVPI	59	68
871	YVTSLLKMYV	94	69
863	KTIISSEPYV	118	70
852	SIWEKIKDVV	150	71
62	TLSAGLGPGL	188	72
804	KFMHLTNYSV	192	73
70	GLLGVPPQPA	230	74
1092	SLLTISKDDV	292	75
1113	KLGKQSSCEV	324	76
778	RIYLFSDGLV	358	77
86	TLCSSGTTAV	421	78

開始位置は、TTLL4のN末端からのアミノ酸残基数を示す。

解離定数 [Kd (nM)] は「NetMHC3.0」から導き出している。

【0273】

HLA-A*0201拘束性のTTLL4由来予測ペプチドによるCTLの誘導
 TTLL4由来のそれら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- γ ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を測定した(図5a~d)。TTLL4-A02-9-222(SEQ ID NO: 38)を用いたウェル番号#3(a)、TTLL4-A02-9-805(SEQ ID NO: 39)を用いた#7(b)、TTLL4-A02-9-66

10

20

30

40

50

(SEQ ID NO: 44)を用いた#8(c)およびTTL4-A02-10-574(SEQ ID NO: 59)を用いた#7(d)は、対照ウェルと比較して強力なIFN-産生を実証した。一方、表2aおよび2bに示されるその他のペプチドは、HLA-A*0201との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドでの刺激では、特異的なCTL活性が測定されなかった。これらの結果は、TTL4に由来する4種のペプチドが、強力なCTLを誘導することができるペプチドとしてスクリーニングされたことを示している。

【0274】

TTL4由来ペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

上記の材料および方法の章に記載した通りに、TTL4-A02-9-222(SEQ ID NO: 38)を用いたウェル番号#3(a)、TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO: 39)を用いた#7(b)、TTL4-A02-9-66(SEQ ID NO: 44)を用いた#8(c)およびTTL4-A02-10-574(SEQ ID NO: 59)を用いた#7(d)におけるIFN-ELISAアッセイによって検出されるペプチド特異的CTL活性を示した細胞を増殖させ、CTL株を樹立した。これらのCTL株のCTL活性をIFN-ELISAアッセイによって測定した(図6a~d)。CTL株は、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-産生を示した。さらに、「材料および方法」に記載した通りに、CTL株から限界希釈によってCTL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CTLクローンからのIFN-産生をIFN-ELISAアッセイによって測定した。TTL4-A02-9-222(SEQ ID NO: 38)(a)、TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO: 39)(b)およびTTL4-A02-10-574(SEQ ID NO: 59)(c)で刺激したCTLクローンから強力なIFN-産生が測定された(図7a~c)。

【0275】

TTL4およびHLA-A*0201を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

各ペプチドに対して産生された樹立CTL株およびクローンを、TTL4およびHLA-A*0201分子を発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長TTL4およびHLA-A*0201遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞(TTL4およびHLA-A*0201遺伝子を発現する応答細胞の特異的モデル)に対する特異的CTL活性を、対応するペプチドによって産生されたCTL株およびクローンを刺激細胞として用いることによって試験した。全長TTL4またはHLA-A*0201のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。図8において、TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO: 39)で刺激したCTLクローン(a)およびTTL4-A02-9-66(SEQ ID NO: 44)で刺激したCTL株(b)が、TTL4およびHLA-A*0201の両方を発現するCOS7細胞に対して強力なCTL活性を示した。一方、対照に対して有意な特異的CTL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、TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO: 39)(a)およびTTL4-A02-9-66(SEQ ID NO: 44)(b)のペプチドが内因的にプロセシングされ、HLA-A*0201分子とともに標的細胞上に提示され、CTLによって認識されることが明確に実証された。これらの結果は、TTL4に由来するこれらのペプチドが、TTL4を発現する腫瘍を有する患者の治療のためのがんワクチンとして適している可能性があることを示した。

【0276】

抗原ペプチドの相同性解析

TTL4-A02-9-222(SEQ ID NO: 38)、TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO: 39)、TTL4-A02-9-66(SEQ ID NO: 44)およびTTL4-A02-10-574(SEQ ID NO: 50)

10

20

30

40

50

9)で刺激したCTLが、有意かつ特異的なCTL活性を示した。この結果は、TTL4-A02-9-222(SEQ ID NO:38)、TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO:39)、TTL4-A02-9-66(SEQ ID NO:44)およびTTL4-A02-10-574(SEQ ID NO:59)の配列がヒト免疫系を感作することが公知の他の分子に由来するペプチドと相同であるという事実に起因し得る。この可能性を排除するために、BLASTアルゴリズム(httpt://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi)を用いて、クエリーとしてのこ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。相同性解析の結果は、TTL4-A02-9-222(SEQ ID NO:38)、TTL4-A02-9-66(SEQ ID NO:44)およびTTL4-A02-10-574(SEQ ID NO:59)の配列が固有のものであることを示し、したがって本発明者らの知る限りでは、この分子が、ある非関連分子に対して意図しない免疫学的応答を引き起こす可能性はほとんどない。TTL4-A02-9-805(SEQ ID NO:39)の配列はTTL5と相同であるが、本発明者らのマイクロアレイデータにおけるTTL5の発現プロファイルは、TTL5発現が正常組織中で低く、該ペプチドががん療法に適用できることを示している。

結論として、TTL4に由来する新規HLA-A^{*}0201エピトープペプチドが同定され、それらががん免疫療法に適していることが実証された。

【産業上の利用可能性】

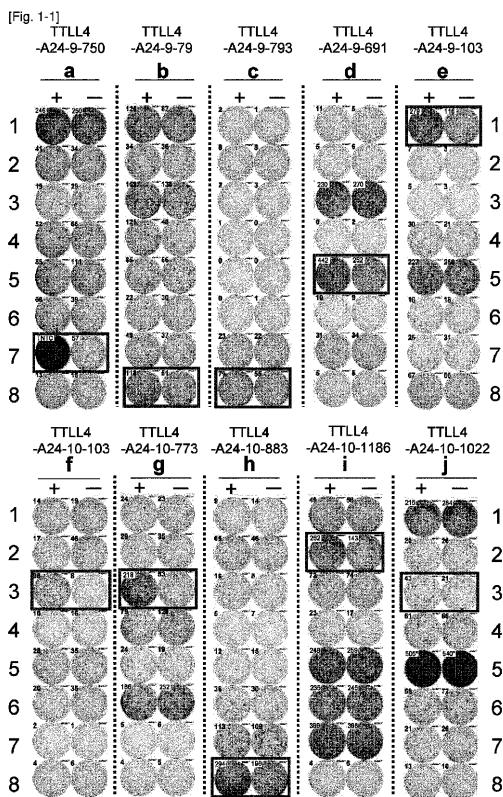
【0277】

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、かつ幅広いがんの種類に対する適用性を有し得る、TTL4由来の新規TAAを提供する。そのようなTAAは、TTL4に関連する疾患、例えばがんに対するペプチドワクチンとして利用することができ、そのがんの例には、膀胱癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、肝癌、リンパ腫、肺癌、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLC、軟部組織腫瘍および骨肉腫が含まれるが、これらに限定されない。

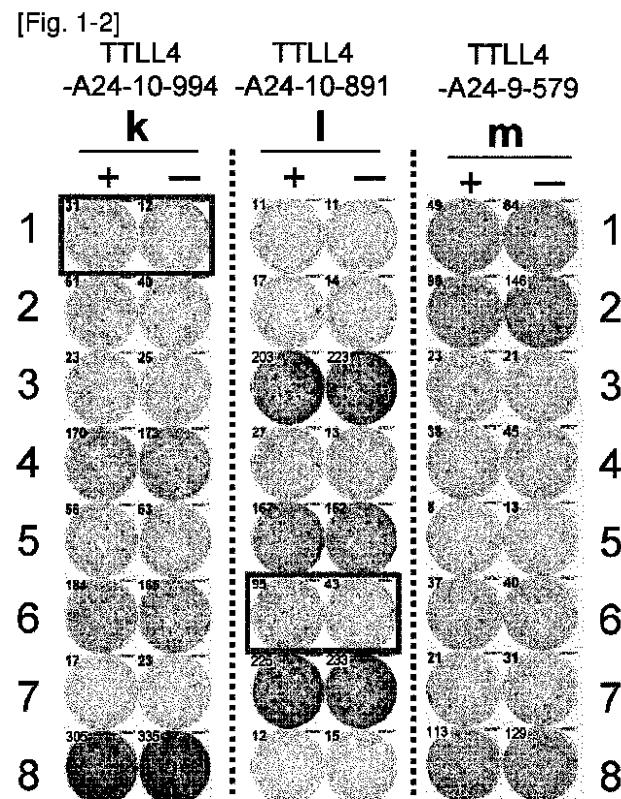
【0278】

本明細書において、本発明をその特定の態様に関して詳細に説明しているが、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。慣例的な実験を通して、当業者は、その境界および限界が添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変がその中でなされ得ることを容易に認識するであろう。

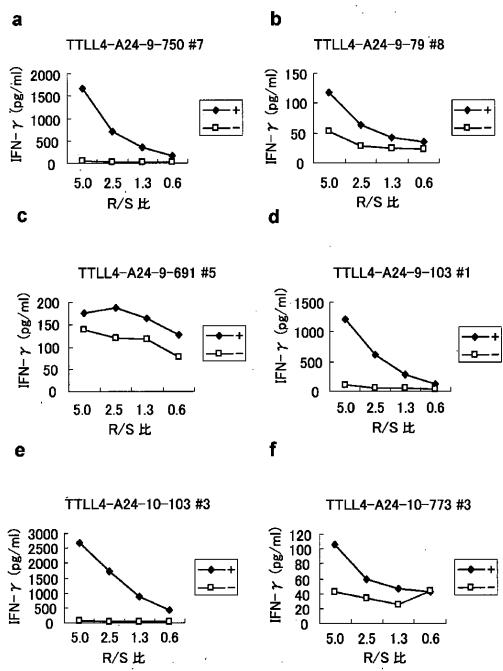
【図 1 - 1】



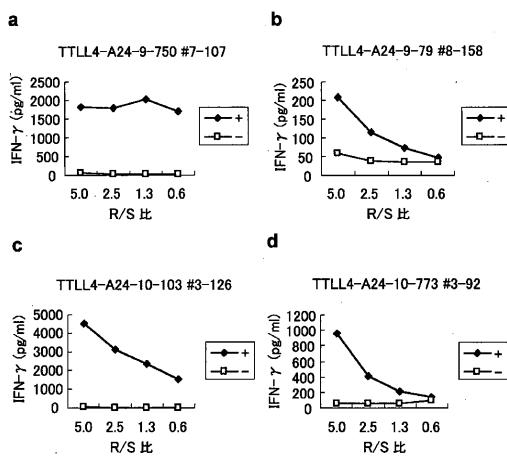
【図 1 - 2】



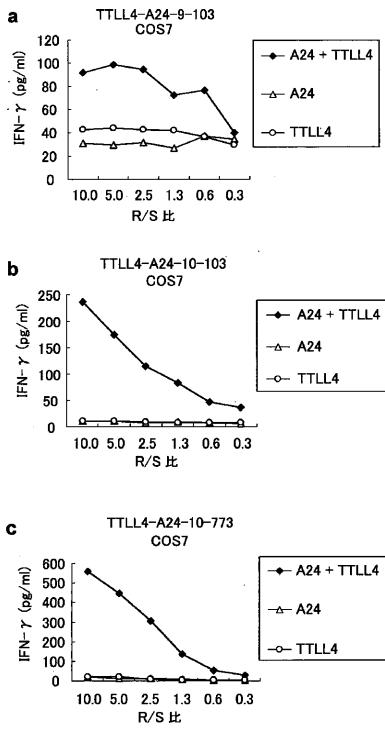
【図 2】



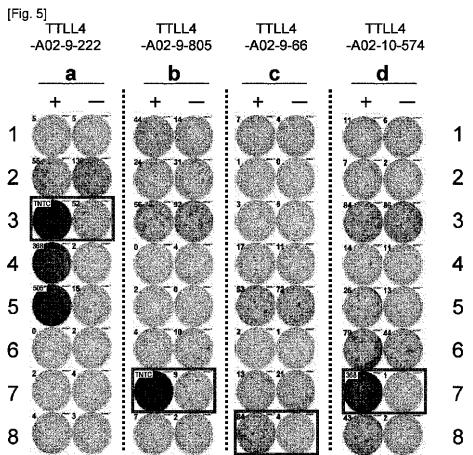
【図 3】



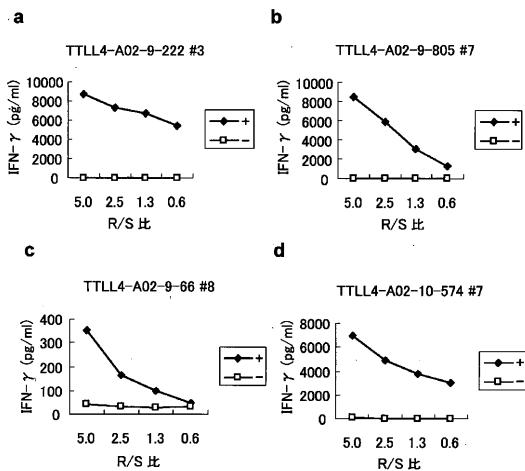
【図4】



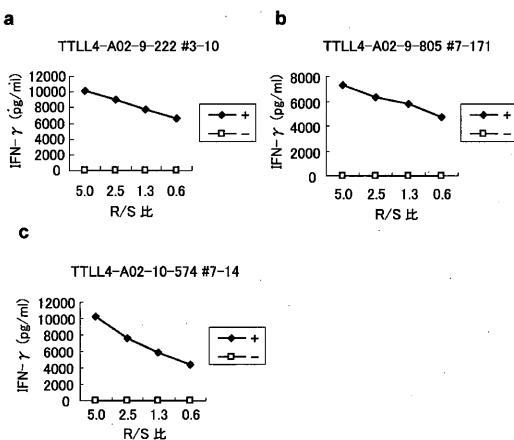
【図5】



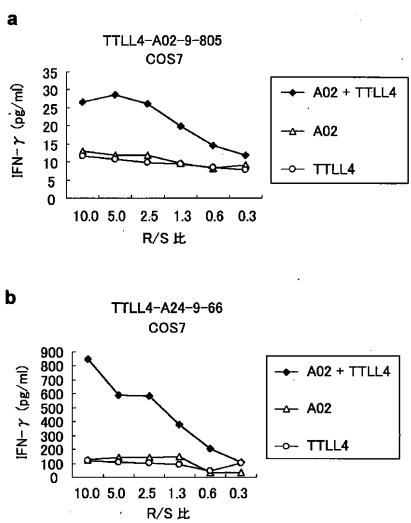
【図6】



【図7】



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/004987
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C12N15/09 (2006.01)i, A61K38/00 (2006.01)i, A61K39/00 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, C07K7/06 (2006.01)i, C12N9/10 (2006.01)n 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) Int.Cl. C12N15/09, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K7/06, C12N9/10		
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) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/ A	WO 2010/023856 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2010.03.04, the whole document & EP 2334790 A	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
Y/ A	KASHIWAYA K. et al., Involvement of the tubulin tyrosine ligase-like family member 4 polyglutamylase in PELP1 polyglutamylation and chromatin remodeling in pancreatic cancer cells., Cancer Res. (May 2010) vol. 70, pages 4024-4033, the whole document	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
Y/ A	MIYAZAWA M. et al., Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer., Cancer Sci. (Feb. 2010) vol. 101, pages 433-439	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
Y/ A	YOKOMINE K. et al., The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy., Int. J. Cancer (May 2010) vol. 126,	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 01.12.2011	Date of mailing of the international search report 13.12.2011	
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Satoshi Ishimaru Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448	
	4B 3777	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/004987

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	pages 2153-2163	
Y/ A	HARANO M. et al., HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL., Int. J. Cancer (2008) vol. 123, pages 2616-2625	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
Y/ A	IMAI K. et al., Identification of a novel tumor-associated antigen, cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers., Clin. Cancer Res. (2008) vol. 14, pages 6487-6495	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
Y/ A	SUDA T. et al., Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy., Cancer Sci. (2007) vol. 98, pages 1803-1808	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24
Y/ A	WO 2004/018667 A1 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) 2004.03.04, & JP 4406607 B & AU 2003254950 A & TWB 001333958	1, 4, 5, 8-18, 20-23/ 2, 3, 6, 7, 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/004987

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.: 19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 19 relates to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, which does not require an intentional search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and [Rule 39.1(iv)].
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:

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 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.:

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.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

(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 中村 祐輔
東京都港区白金台四丁目6番1号 国立大学法人東京大学 医科学研究所内
(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

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA10 CA04 DA02 EA04 GA11
4B050 CC03 DD11 LL01
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C085 AA03 BB01 CC32 DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 BA15 DA76 EA20 FA74