

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-527620
(P2024-527620A)

(43)公表日 令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/83 (2006.01)	C 1 2 N	15/83	Z	4 C 0 8 7
C 0 7 K	14/74 (2006.01)	C 0 7 K	14/74		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全142頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-502131(P2024-502131)		(71)出願人	303055165	
(86)(22)出願日	令和4年7月7日(2022.7.7)			ユニヴェルシテ ド モントリオール	
(85)翻訳文提出日	令和6年2月19日(2024.2.19)			カナダ エイチ3ティ 1ジェイ4 ケベ	
(86)国際出願番号	PCT/CA2022/051068			ック モントリオール エデュアル モ	
(87)国際公開番号	WO2023/023840			ンプティ ブールヴァール 2 9 0 0	
(87)国際公開日	令和5年3月2日(2023.3.2)		(74)代理人	100147485	
(31)優先権主張番号	63/203,320			弁理士 杉村 憲司	
(32)優先日	令和3年7月16日(2021.7.16)		(74)代理人	230118913	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁護士 杉村 光嗣	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	100230891	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			弁理士 里見 紗弥子	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		(72)発明者	クラウド ペロー	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			カナダ国 エイチ2ブイ 2エックス1	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			ケベック モントリオール クロードーシ	
	最終頁に続く			ャンバーニュ アベニュー 7 0	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 がん幹細胞に対する新規の腫瘍特異的抗原及びそれらの使用

(57)【要約】

がん幹細胞(CSC)は、腫瘍開始を駆動し得、再発を引き起こし得る腫瘍細胞の亜集団である。これらの細胞は、しばしば侵襲性、不均一性及び治療耐性の腫瘍と相関する、腫瘍の確立及び増殖の促進剤とみなされる。CSCによって特異的に発現される新規の腫瘍特異的抗原(TSA)及び腫瘍関連抗原(TAA)が本明細書に記載される。本明細書に記載されるTSAのほとんどは、正常な組織では発現されないイントロン配列及び遺伝子間配列などの異常に発現される非変異ゲノム配列に由来する。これらのTSAに由来する核酸、組成物、細胞、抗体、及びワクチンが記載される。がん、より詳細には、低分化がんなどのCSCの存在に関連するがんの治療のためのTSA、核酸、組成物、抗体、細胞及びワクチンの使用もまた記載される。

【選択図】 図6B

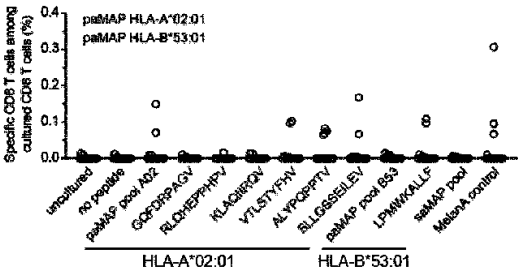


FIG. 6B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のアミノ酸配列のうちの 1 つを含む、がん幹細胞（CSC）腫瘍抗原ペプチド（TAP）：

【表 1】

ペプチド配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号
NTENYILWGY	1	ISMCDLVY	21
MKFGNQVSGLF	2	YKRMKLD SY	22
RLQHEPPHPV	3	QPLPEPLQLW	23
LPMWKALLF	4	IPMKIYLW)	24
RPARPPAGL	5	SQSSLMLYL	25
FAYPNQKVTF	6	ALYPQPPTV	26
GQAHPQGSF	7	YTPFPSYGHY	27
YSDQKPYSY	8	FTEEDLHFVLY	28
KLAQIIRQV	9	GQITHNTSF	29
GEIKTFSDL	10	VTLSTYFHV	30
GKLDNTNEY	11	GQFDRPAGV	31
AKKKENITY	12	VSDQQNGTY	32
SAQGKPTYF	13	KHFDSRPGVAF	33
EEEIHSPTL	14	GEHLVSVTL	34
SKLRSTGQSF	15	YSIYPMRNL	35
NTLSESYIY	16	SQNSPIRY	36
QPLPQPLELW	17	FHSQNSPIRY	37
RTDTGKRVLY	18	VAKPPGTAF	38
LPSGETIAKW	19	SLLGSSEILEV	39
KLDSYIIPY	20		
GKFQGLIEKF	47	ALLEGVNTVVV	55
KQMENDIQLY	48	SETHPPEVAL	56
ASTPASSEL	49	SPQEASGVRW	57
RLWNETVELF	50	YLLNCHLLI	58
FGDGKFSEV	51	GQFLVKSGY	59
SEVSADKLVAL	52	QTELNN SKQEY	60
AMYHALEKA	53	MAWNGILHL	61
FAYPNQKDF	54	HPLPGLILEW	62

又は前記 CSC TAP をコードする核酸。

【請求項 2】

前記 CSC TAP が、配列番号 1 ～ 39 に定義される配列のうちの 1 つを含む、請求項 1 に記載の CSC TAP 又は核酸。

【請求項 3】

前記 C S C T A P が、H L A - A * 0 1 : 0 1 分子に結合し、配列番号 1、8、16、20、21、27、28、32、37、又は 60 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 4】

前記 C S C T A P が、H L A - A * 0 2 : 0 1 分子に結合し、配列番号 3、6、26、30、31、39、53、55、又は 58 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 5】

前記 C S C T A P が、H L A - B * 0 7 : 0 2 分子に結合し、配列番号 5 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

10

【請求項 6】

前記 C S C T A P が、H L A - B * 1 5 : 0 3 分子に結合し、配列番号 2、7、11、12、15、22、29、36、38、47、48、又は 59、好ましくは配列番号 2、7、11、12、15、22、29、36、又は 38 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 7】

前記 C S C T A P が、H L A - B * 4 0 : 0 1 分子に結合し、配列番号 10、25、34、52、又は 56 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 8】

前記 C S C T A P が、H L A - B * 5 3 : 0 1 分子に結合し、配列番号 4、17、19、23、24、又は 57 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

20

【請求項 9】

前記 C S C T A P が、H L A - C * 0 2 : 1 0 分子に結合し、配列番号 6、54、又は 61 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 10】

前記 C S C T A P が、H L A - C * 0 3 : 0 4 分子に結合し、配列番号 6、35、49、又は 51 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 11】

前記 C S C T A P が、H L A - C * 0 4 : 0 1 分子に結合し、配列番号 13、33、又は 50 の配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

30

【請求項 12】

前記 C S C T A P が、ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 13】

前記ゲノムの非タンパク質コード領域が、非翻訳転写領域 (U T R) である、請求項 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 14】

前記ゲノムの非タンパク質コード領域が、イントロンである、請求項 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

40

【請求項 15】

前記ゲノムの非タンパク質コード領域が、遺伝子間領域である、請求項 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 16】

前記ゲノムの非タンパク質コード領域が、長い非コード R N A である、請求項 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 17】

核酸である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の C S C T A P 又は核酸。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に定義される C S C T A P 又は核酸のうちの少なくとも

50

も 2 つを含む、組み合わせ。

【請求項 19】

前記核酸が、mRNA である、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の C S C T A P 若しくは核酸、又は請求項 18 に記載の組み合わせ。

【請求項 20】

前記核酸が、DNA である、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の C S C T A P 若しくは核酸、又は請求項 18 に記載の組み合わせ。

【請求項 21】

前記核酸が、ウイルスベクターの成分である、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸、又は組み合わせ。

【請求項 22】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸、又は組み合わせを含む、脂質小胞又は粒子。

【請求項 23】

前記脂質小胞が、脂質ナノ粒子 (LNP) である、請求項 22 に記載の脂質小胞又は粒子。

【請求項 24】

カチオン性脂質を含む、請求項 22 又は 23 に記載の脂質小胞又は粒子。

【請求項 25】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸若しくは組み合わせ、又は請求項 22～24 のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子と、薬学的に許容され得る担体と、を含む、組成物。

【請求項 26】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸若しくは組み合わせ、又は請求項 22～24 のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、又は請求項 25 に記載の組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン。

【請求項 27】

単離された主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子であって、そのペプチド結合溝内に、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の C S C T A P を含む、単離された MHC クラス I 分子。

【請求項 28】

多量体の形態にある、請求項 27 に記載の単離された MHC クラス I 分子。

【請求項 29】

前記多量体が、四量体である、請求項 28 に記載の単離された MHC クラス I 分子。

【請求項 30】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸、又は組み合わせを含む、単離された細胞。

【請求項 31】

単離された細胞であって、その表面において、主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子を発現し、前記 MHC クラス I 分子が、それらのペプチド結合溝内に、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の C S C T A P 又は請求項 18 に記載の組み合わせを含む、単離された細胞。

【請求項 32】

抗原提示細胞 (APC) である、請求項 30 又は 31 に記載の細胞。

【請求項 33】

前記 APC が、樹状細胞である、請求項 32 に記載の細胞。

【請求項 34】

請求項 27～29 のいずれか一項に記載の単離された MHC クラス I 分子、及び／又は請求項 31～33 のいずれか一項に記載の細胞の表面において発現された MHC クラス I 分子を特異的に認識する、T 細胞受容体 (TCR)。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

請求項 27～29 のいずれか一項に記載の単離された MHC クラス I 分子、及び／又は請求項 31～33 のいずれか一項に記載の細胞の表面において発現された MHC クラス I 分子に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 36】

二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項 35 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 37】

前記二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが、一本鎖ダイアボディ (scDb) である、請求項 36 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 38】

前記二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが、T 細胞シグナル伝達分子にも特異的に結合する、請求項 36 又は 37 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 39】

前記 T 細胞シグナル伝達分子が、CD3 鎖である、請求項 38 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 40】

単離された細胞であって、その細胞表面において、請求項 34 に記載の TCR を発現する、単離された細胞。

【請求項 41】

CD8⁺T リンパ球である、請求項 40 に記載の単離された細胞。

20

【請求項 42】

請求項 40 又は 41 に定義される単離された細胞を少なくとも 0.5% 含む、細胞集団。

【請求項 43】

対象においてがんを治療する方法であって、前記対象に有効量の (i) 請求項 1～21 のいずれか一項に記載の CSC TAP、核酸若しくは組み合わせ、(ii) 請求項 22～24 のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、(iii) 請求項 25 に記載の組成物、(iv) 請求項 26 に記載のワクチン、(v) 請求項 30～33 及び 40～42 のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞集団、又は (vii) 請求項 35～39 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法。

30

【請求項 44】

前記がんが、白血病 (例えば、AML)、脳がん (例えば、膠芽腫)、乳がん、肺がん、胃腸がん (例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がん)、肝臓がん (例えば、肝細胞がん)、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん (例えば、黒色腫)、頭頸部がん、又は骨髄腫 (例えば、多発性骨髄腫) である、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法を前記対象に投与することを更に含む、請求項 43 又は 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、請求項 45 に記載の方法。

40

【請求項 47】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、CDK4/6、TGF- β 、及び／又は WNT- β -カテニンの阻害剤を含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

対象においてがんを治療するための、又は対象においてがんを治療するための医薬品の製造のための、(i) 請求項 1～21 のいずれか一項に記載の CSC TAP、核酸若しくは組み合わせ、(ii) 請求項 22～24 のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、(iii) 請求項 25 に記載の組成物、(iv) 請求項 26 に記載のワクチン、(v)

50

）請求項 30～33 及び 40～42 のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞集団、又は（v i）請求項 35～39 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントの使用。

【請求項 49】

前記がんが、白血病（例えば、AML）、脳がん（例えば、膠芽腫）、乳がん、肺がん、胃腸がん（例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がん）、肝臓がん（例えば、肝細胞がん）、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、頭頸部がん、又は骨髓腫（例えば、多発性骨髓腫）である、請求項 48 に記載の使用。

【請求項 50】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法を前記対象に使用することを更に含む、請求項 48 又は 49 に記載の使用。

【請求項 51】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、請求項 50 に記載の使用。

【請求項 52】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、CDK4／6、TGF-β、及び／又は WNT-β-カテニンの阻害剤を含む、請求項 51 に記載の使用。

【請求項 53】

対象においてがんを治療するために使用するための薬剤であって、（i）請求項 1～21 のいずれか一項に記載の CSC TAP、核酸若しくは組み合わせ、（ii）請求項 22～24 のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、（iii）請求項 25 に記載の組成物、（iv）請求項 26 に記載のワクチン、（v）請求項 30～33 及び 40～42 のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞集団、又は（vi）請求項 35～39 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントである、薬剤。

【請求項 54】

前記がんが、白血病（例えば、AML）、脳がん（例えば、膠芽腫）、乳がん、肺がん、胃腸がん（例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がん）、肝臓がん（例えば、肝細胞がん）、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、頭頸部がん、又は骨髓腫（例えば、多発性骨髓腫）である、請求項 53 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 55】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法を対象に使用することを更に含む、請求項 53 又は 54 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 56】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、請求項 55 に記載の使用のための薬剤。

【請求項 57】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、CDK4／6、TGF-β、及び／又は WNT-β-カテニンの阻害剤を含む、請求項 56 に記載の使用のための薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる、2021年7月16日に出願された米国仮特許出願第 63／203,320 号の利益を主張する。

【0002】

本発明は、一般に、腫瘍学の分野に関し、より詳細には、がん幹細胞に関連したがんの治療に関する。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

世界保健機関（WHO）の報告によると、2012年に820万人の患者ががんで死亡した。したがって、がんは、発展途上国と先進国の両方で継続的に増加している健康問題である。また、今後20年以内に年間のがん症例数が増加すると推定されている。がんの共通の一般的な治療法は、手術、内分泌療法、化学療法、免疫療法及び放射線療法である。

【0004】

これら全ての治療法により、近年（2006～2015年）は、がんの発生率は女性で安定し、男性でわずかに低下しており、がん死亡率（2007～2016年）も低下している。しかしながら、従来のがん治療方法は、いくつかの悪性腫瘍に対してのみ有効である。がん治療の失敗の主な理由は、転移、再発、不均一性、化学療法及び放射線療法に対する耐性、並びに免疫学的監視の回避である。

10

【0005】

がん幹細胞（CSC）又は腫瘍開始細胞（TIC）は、腫瘍開始を駆動し得、再発を引き起こし得る腫瘍細胞の亜集団である。これらの細胞は、しばしば侵襲性、不均一性及び治療耐性の腫瘍と相関する、腫瘍の確立及び増殖の促進剤とみなされる。

【0006】

したがって、がんの治療のための新規治療アプローチ、特にCSCを標的とするアプローチが必要とされている。

【0007】

本明細書は、いくつかの文献を参照し、それらの内容は、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

【発明の概要】

【0008】

本開示は、以下の項目1～57を提供する。

1. 以下のアミノ酸配列のうちの1つを含む、がん幹細胞（CSC）腫瘍抗原ペプチド（TAP）：

30

40

50

【表 1】

ペプチド配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号
NTENYILWGY	1	ISMCDLVY	21
MKFGNQVSGLF	2	YKRMKLDSY	22
RLQHEPPHPV	3	QPLPEPLQLW	23
LPMWKALLF	4	IPMKIYLW)	24
RPARPPAGL	5	SQSSLMLYL	25
FAYPNQKVTF	6	ALYPQPPTV	26
GQAHPQGSF	7	YTPFPSYGHY	27
YSDQKPPYSY	8	FTEEDLHFVLY	28
KLAQIIRQV	9	GQITHNTSF	29
GEIKTFSDL	10	VTLSTYFHV	30
GKLDNTNEY	11	GQFDRPAGV	31
AKKKENITY	12	VSDQQNGTY	32
SAQGKPTYF	13	KHFDSPRGVAF	33
EEEIHSPTL	14	GEHLVSVTL	34
SKLRSTGQSF	15	YSIYPMRNL	35
NTLSESYIY	16	SQNSPIRY	36
QPLPQPLELW	17	FHSQNSPIRY	37
RTDTGKRVLY	18	VAKPPGTAF	38
LPSGETIAKW	19	SLLGSSEILEV	39
KLDSYIIPY	20		

【表 2】

ペプチド配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号
GKFQGLIEKF	47	ALLEGVNTVVV	55
KQMENDIQLY	48	SETHPPEVAL	56
ASTPASSEL	49	SPQEASGVRW	57
RLWNETVELF	50	YLLNCHLLI	58
FGDGKFSEV	51	GQFLVKSGY	59
SEVSADKLVAL	52	QTELNNKQEY	60
AMYHALEKA	53	MAWNGILHL	61
FAYPNQKDF	54	HPLPGLILEW	62

10

20

30

40

50

又は当該 C S C T A P をコードする核酸。

2. 当該 C S C T A P が、配列番号 1 ~ 3 9 に定義される配列のうちの 1 つを含む、項目 1 に記載の C S C T A P 又は核酸。

3. H L A - A * 0 1 : 0 1 分子に結合し、配列番号 1、8、16、20、21、27、28、32、37、又は 60 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

4. H L A - A * 0 2 : 0 1 分子に結合し、配列番号 3、6、26、30、31、39、53、55、又は 58 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

5. H L A - B * 0 7 : 0 2 分子に結合し、配列番号 5 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

6. H L A - B * 1 5 : 0 3 分子に結合し、配列番号 2、7、11、12、15、22、29、36、38、47、48、又は 59、好ましくは配列番号 2、7、11、12、15、22、29、36、又は 38 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

7. H L A - B * 4 0 : 0 1 分子に結合し、配列番号 10、25、34、52、又は 56 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

8. H L A - B * 5 3 : 0 1 分子に結合し、配列番号 4、17、19、23、24、又は 57 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

9. H L A - C * 0 2 : 1 0 分子に結合し、配列番号 6、54、又は 61 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

10. H L A - C * 0 3 : 0 4 分子に結合し、配列番号 6、35、49、又は 51 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

11. H L A - C * 0 4 : 0 1 分子に結合し、配列番号 13、33、又は 50 の配列を含む、項目 1 又は 2 に記載の C S C T A P 又は核酸。

12. ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる、項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の C S C T A P 又は核酸。

13. 当該ゲノムの非タンパク質コード領域が、非翻訳転写領域 (U T R) である、項目 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

14. 当該ゲノムの非タンパク質コード領域が、イントロンである、項目 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

15. 当該ゲノムの非タンパク質コード領域が、遺伝子間領域である、項目 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

16. 当該ゲノムの非タンパク質コード領域が、長い非コード R N A である、項目 12 に記載の C S C T A P 又は核酸。

17. 核酸である、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の C S C T A P 又は核酸。

18. 項目 1 ~ 16 のいずれか一項に定義される C S C T A P 又は核酸のうちの少なくとも 2 つを含む、組み合わせ。

19. 核酸が、m R N A である、項目 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の C S C T A P 若しくは核酸、又は請求項 18 に記載の組み合わせ。

20. 核酸が、D N A である、項目 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の C S C T A P 若しくは核酸、又は請求項 18 に記載の組み合わせ。

21. 核酸が、ウイルスベクターの成分である、項目 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸又は組み合わせ。

22. 項目 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸、又は組み合わせを含む、脂質小胞又は粒子。

23. 脂質小胞が、脂質ナノ粒子 (L N P) である、項目 22 に記載の脂質小胞又は粒子。

24. カチオン性脂質を含む、項目 22 又は 23 に記載の脂質小胞又は粒子。

25. 項目 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の C S C T A P、核酸、若しくは組み合わせ、又は項目 22 ~ 24 のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子と、薬学的に許容さ

10

20

30

40

50

れ得る担体と、を含む、組成物。

26. 項目1～21のいずれか一項に記載のCSC TAP、核酸、若しくは組み合わせ、又は項目22～24のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、又は項目25に記載の組成物と、アジュバントと、を含む、ワクチン。

27. 単離された主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子であって、そのペプチド結合溝内に、項目1～16のいずれか一項に記載のCSC TAPを含む、単離されたMHCクラスI分子。

28. 多量体の形態にある、項目27に記載の単離されたMHCクラスI分子。

29. 当該多量体が、四量体である、項目28に記載の単離されたMHCクラスI分子。

30. 項目1～21のいずれか一項に記載のCSC TAP、核酸、又は組み合わせを含む、単離された細胞。

31. 単離された細胞であって、その表面において、主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子を発現し、MHCクラスI分子が、それらのペプチド結合溝内に、項目1～16のいずれか一項に記載のCSC TAP又は項目18に記載の組み合わせを含む、単離された細胞。

32. 抗原提示細胞(APC)である、項目30又は31に記載の細胞。

33. 当該APCが、樹状細胞である、項目32に記載の細胞。

34. 項目27～29のいずれか一項に記載の単離されたMHCクラスI分子及び／又は項目31～33のいずれか一項に記載の細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子を特異的に認識する、T細胞受容体(TCR)。

35. 項目27～29のいずれか一項に記載の単離されたMHCクラスI分子、及び／又は項目31～33のいずれか一項に記載の細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子に特異的に結合する、抗体又はその抗原結合フラグメント。

36. 二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントである、項目35に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

37. 二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが、一本鎖ダイアボディ(scDb)である、項目36に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

38. 二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが、T細胞シグナル伝達分子にも特異的に結合する、項目36又は37に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

39. T細胞シグナル伝達分子が、CD3鎖である、項目38に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

40. 単離された細胞であって、その細胞表面において、項目34に記載のTCRを発現する、単離された細胞。

41. CD8⁺Tリンパ球である、項目40に記載の単離された細胞。

42. 項目40又は41に定義される単離された細胞を少なくとも0.5%含む、細胞集団。

43. 対象においてがんを治療する方法であって、対象に有効量の(i)項目1～21のいずれか一項に記載のCSC TAP、核酸、若しくは組み合わせ、(ii)項目22～24のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、(iii)項目25に記載の組成物、(iv)項目26に記載のワクチン、(v)項目30～33及び40～42のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞集団、又は(vii)項目35～39のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントを投与することを含む、方法。

44. がんが、白血病(例えば、AML)、脳がん(例えば、膠芽腫)、乳がん、肺がん、胃腸がん(例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がん)、肝臓がん(例えば、肝細胞がん)、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん(例えば、黒色腫)、頭頸部がん、又は骨髓腫(例えば、多発性骨髓腫)である、項目43に記載の方法。

45. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法を対象に投与することを更に含む、項目43又は44に記載の方法。

46. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、項目45に記載の方法。

10

20

30

40

50

47. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、CDK4/6、TGF- β 、及び/又はWNT- β -カテニンの阻害剤を含む、項目46に記載の方法。

48. 対象においてがんを治療するための、又は対象においてがんを治療するための医薬品の製造のための、(i)項目1~21のいずれか一項に記載のCSC TAP、核酸、若しくは組み合わせ、(ii)項目22~24のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、(iii)項目25に記載の組成物、(iv)項目26に記載のワクチン、(v)項目30~33及び40~42のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞集団、又は(vii)項目35~39のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントの使用。

49. がんが、白血病(例えば、AML)、脳がん(例えば、膠芽腫)、乳がん、肺がん、胃腸がん(例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がん)、肝臓がん(例えば、肝細胞がん)、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん(例えば、黒色腫)、頭頸部がん、又は骨髓腫(例えば、多発性骨髓腫)である、項目48に記載の使用。

50. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法を対象に使用することを更に含む、項目48又は49に記載の使用。

51. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、項目50に記載の使用。

52. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、CDK4/6、TGF- β 、及び/又はWNT- β -カテニンの阻害剤を含む、項目51に記載の使用。

53. 対象においてがんを治療する際に使用するための薬剤であって、(i)項目1~21のいずれか一項に記載のCSC TAP、核酸、若しくは組み合わせ、(ii)項目22~24のいずれか一項に記載の脂質小胞若しくは粒子、(iii)項目25に記載の組成物、(iv)項目26に記載のワクチン、(v)項目30~33及び40~42のいずれか一項に記載の細胞若しくは細胞集団、又は(vii)項目35~39のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントである、薬剤。

54. がんが、白血病(例えば、AML)、脳がん(例えば、膠芽腫)、乳がん、肺がん、胃腸がん(例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がん)、肝臓がん(例えば、肝細胞がん)、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん(例えば、黒色腫)、頭頸部がん、又は骨髓腫(例えば、多発性骨髓腫)である、項目53に記載の使用のための薬剤。

55. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法を、対象に使用することを更に含む、項目53又は54に記載の使用のための薬剤。

56. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、化学療法剤、免疫療法、免疫チェックポイント阻害剤、放射線療法、又は手術である、項目55に記載の使用のための薬剤。

57. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤又は療法が、CDK4/6、TGF- β 、及び/又はWNT- β -カテニンの阻害剤を含む、項目56に記載の使用のための薬剤。

【0009】

本開示の他の目的、利点、及び特徴は、添付の図面を参照して例としてのみ与えられる、それらの特定の実施形態の以下の非限定的な説明を読むと、より明らかになるだろう。

【0010】

添付図面において、

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】ヒトiPSCを使用したpaMAPのMSベースの同定に使用されるアプローチを示す。(Laumont et al., 2018)からのプロテオゲノムアプローチに基づく、iPSCを使用したpaMAP同定のためのワークフロー。pMHC-I P、ペプチド-MHC I免疫沈降; MAP、MHC I関連ペプチド; TEC、胸腺上皮細胞; LC-MS/MS、タンデム質量分析による液体クロマトグラフィー; FDR、偽発見率; RPHM、1億回当たりのリード。

【図1B】ヒトiPSCを使用したpaMAPのMSベースの同定に使用されるアプロー

10

20

30

40

50

チを示す。MAPアノテーション前のiPSC試料ごとに同定されたMAPの総数。

【図2A】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。GTExコンソーシアムからの健康な組織（ $n = 5 \sim 150$ 、試料の利用可能性に応じて）及びmTEC（ $n = 11$ ）におけるpaMAP及びsaMAPの平均RNA発現 [$\log_{10}(\text{RPHM} + 1)$] を示すヒートマップ。枠で囲まれた：試料の $> 25\%$ において > 8.55 RPHMの発現を有する組織。

【図2B】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。PSC（本研究及び（Churko et al., 2017）からの）及びASC（健康な選別された初代成体幹細胞、正常造血前駆体（prec.）、又は臍帯血試料）におけるpaMAP及びsaMAPの平均RNA発現 [$\log_{10}(\text{RPHM} + 1)$] を示すヒートマップ。枠で囲まれた： > 8.55 RPHMの試料にわたる平均発現。各試料群の試料数を括弧内に示す。MSC、間葉系幹細胞。

【図2C】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。該当する場合、各バイオタイプに対応するpaMAPソース遺伝子のパーセンテージ、及びそれぞれのpaMAPコード領域で重複するEREのクラスを示す円グラフ。

【図2D】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。上図：各ソース遺伝子に由来するsaMAPの数。下図：saMAPソース遺伝子で著しく濃縮されたReactome経路。

【図2E】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。上図：各ソース遺伝子に由来するpaMAPの数。下図：paMAPソース遺伝子で著しく濃縮されたReactome経路。

【図2F】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。本研究からのiPSC及び（Churko et al., 2017）からのPSCにおけるpaMAPコード配列の発現 [$\log_{10}(\text{RPHM} + 1)$] を示し、iPSCが、リプログラミングに使用する方法に従ってグループ化されている箱ひげ図。データは、中央値及び四分位範囲として表される。一対のウィルコクソン順位和検定からのp値は、Benjamini-Hochberg法を使用して多重比較のために調整された。

【図2G】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。観察された保持時間と、予測された保持時間との間のピアソン相関。

【図2H】iPSCの免疫ペプチドームが、それらの多能性状態を反映することを示す。観察された保持時間と、疎水性指数との間のピアソン相関。

【図3】paMAPが、がんタイプにわたって共有されることを示す。左パネル：当社のラボ又はTCGAからのがん試料中のpaMAPの平均RNA発現 [$\log_{10}(\text{RPHM} + 1)$]、及び括弧内のがんタイプごとのそれぞれの試料数を示すヒートマップ。枠で囲まれた：試料の $> 10\%$ において > 2 RPHMの発現を有する組織。右パネル：試料間の異なる共有レベルでpaMAPコード配列を発現するTCGAがんタイプの累積数を示すバープロット。TCGA頭字語を、TCGA（portal.gdc.cancer.gov/）によって定義されるように使用した。太字のpaMAPは、以前に報告された。

【図4A】高幹細胞性がんが、paMAP発現を獲得することを示す。がんタイプ内のTCGA試料ごとに発現されたpaMAPの数を中央値の漸増順に示した箱ひげ図。

【図4B】高幹細胞性がんが、paMAP発現を獲得することを示す。（Aran et al., 2015）からの推定される腫瘍純度に従って、TCGAがん（ $n = 21$ がんタイプ）にわたって発現されたpaMAPの数を示す散布図。

【図4C】高幹細胞性がんが、paMAP発現を獲得することを示す。TCGAがん（ $n = 32$ がんタイプ、TGCTを除く）にわたって発現されたsaMAPの数と比較したpaMAPの数を示す散布図。

【図4D】高幹細胞性がんが、paMAP発現を獲得することを示す。paMAP/saMAP発現なし（分化型）、saMAP発現はあるがpaMAP発現なし（幹細胞様）、又はpaMAP発現を有する（多能性様）TCGA試料における変異荷重 [$\log_{10}(\text{RPHM} + 1)$] を示す箱ひげ図。

メガ塩基対当たりの非同義変異+1)」。推定純度 >0.75 を有する試料のみ (Arnett et al., 2015) が含まれた (図10D)。

【図4E】高幹細胞性がんが、p a M A P 発現を獲得することを示す。高い p a M A P 発現 (>4 p a M A P、 $n=775$) 及び高い s a M A P 発現 (>4 s a M A P 及び 0 p a M A P、 $n=1270$) を有する試料間の差次的に発現した遺伝子 (赤い点) を示すボルケーノプロット。

【図4F】高幹細胞性がんが、p a M A P 発現を獲得することを示す。それぞれ乳がん (B R C A)、神経膠腫 (L G G、G B M)、子宮内膜 (U C E C) がんの異なる分子サブタイプ、悪性度、又は病期における p a M A P の数、並びに原発性及び転移性黒色腫 (S K C M) 試料内における p a M A P の数を示す箱ひげ図。各灰色の点は、1つの試料を表す。

10

【図5A】共有されたエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。がんにわたるそれぞれのソース遺伝子のプロモーター領域における p a M A P 発現 (R P H M) とメチル化 β 値との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。450Kメチル化データセットの全ての利用可能なデータを含めた。枠で囲まれた: $p\text{-adj} < 10^{-4}$ (Benjamini-Hochberg)。

【図5B】共有されたエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。p a M A P 発現 (R P H M) と局所 D N A コピー数との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。参照のためにソース遺伝子符号を追加する; N A、アノテーション付きソース遺伝子なし; 利用可能な全てのデータを含めた。枠で囲まれた: $p\text{-adj} < 10^{-4}$ (Benjamini-Hochberg)。

20

【図5C】共有されたエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。試料ごとに発現された p a M A P 及び s a M A P の数と、M S i g D B からの特徴的な遺伝子セットについての s s G S E A スコアとの間のがん内スピアマン相関; 有意な相関のみが提示され ($p\text{-adj} < 0.05$ 、Benjamini-Hochberg)、それ以外の場合、細胞は白色である。

【図5D】共有されたエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。発現のないものと比較した、p a M A P 及び s a M A P を発現するがん試料 (>2 R P H M) における示されたゲノム特徴の有病率。上位3つのブロックを、p a M A P 及び s a M A P 陽性試料における最も高い有病率又は最も低い p 値に基づいて選択した。対照的に、最後のブロックの特徴は、P I 3 K / A K T シグナル伝達アンタゴニストである。p 値は、カイ二乗検定を使用して、2つの試料群における有病率の差に基づいて計算された。Features MUT、体細胞変異; Gain、単一コピー増加; Amp、増幅; HL、ヘテロ接合性喪失; HD、ホモ接合性欠失。

30

【図5E】共有されたエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。発現された p a M A P 及び s a M A P の数と、がんタイプ内の P R C 2 成分の発現との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。枠で囲まれた: $p\text{-adj} < 0.05$ (Benjamini-Hochberg) との相関。

40

【図6A】p a M A P 及び s a M A P の免疫原性を示す。インビトロ刺激後の特異的 C D 8 + T 細胞のペプチド-H L A 四量体染色のフローサイトメトリープロットであり、数字は全 C D 8 + T 細胞の頻度を示す。

【図6B】p a M A P 及び s a M A P の免疫原性を示す。ペプチドを含まない対照と比較して、示されたペプチド単独で又はプール内でのインビトロ刺激後の特異的 T 細胞クロノタイプの拡大を示す F E S T アッセイ (表3A~B)。

【図6C】p a M A P 及び s a M A P の免疫原性を示す。四量体染色を使用して定量化した、各ドナー (D 1 1 ~ 1 4) の前免疫レパートリーにおける C D 8 + T 細胞 1 0 0 万個

50

当たりの特異的細胞の数。N.D.、検出せず。

【図7A】p a M A P及びs a M A Pの発現が免疫回避と相関することを示す。発現されたp a M A Pの数 (>0 R P H M) を共変量とする、死亡のリスクと、予測された提示を有するp a M A Pの数 (# H L A - p a M A P) との間の関連性のハザード比 (死亡のリスク) ($\pm 95\%$ C I)。赤い点及びひげ、 p 値 < 0.05 (C o x 比例ハザードモデル)。2つ以上の試料を有する患者は、分析から除外された。

【図7B】p a M A P及びs a M A Pの発現が免疫回避と相関することを示す。発現されたp a M A P及びs a M A Pの数と、がんタイプ内のM H C - I 関連遺伝子の発現との間のスピアマン相関。

【図7C】p a M A P及びs a M A Pの発現が免疫回避と相関することを示す。発現されたp a M A P及びs a M A Pの数と、がんタイプ内の免疫動員ケモカインをコードする遺伝子の発現との間のスピアマン相関。

【図7D】p a M A P及びs a M A Pの発現が免疫回避と相関することを示す。発現されたp a M A P及びs a M A Pの数と、がんタイプ内のC D K 4 / 6 遺伝子の発現との間のスピアマン相関。枠で囲まれた: $p - a d j < 0.05$ (B e n j a m i n i - H o c h b e r g) との相関。

【図8A】I F N - γ 処理後の多能性マーカー及びM H C 発現の分析を示す。上パネル: 未処理及びI F N - γ 処理 F i b r o - i P S C. 2 上の表面H L A - A、H L A - B 及びH L A - C (H L A - A、B、C) 分子の代表的なフローサイトメトリープロファイル。下パネル: 3つのI F N - γ 処理及び未処理のi P S C 試料についての、Q I F I K I T (実施例1を参照されたい) を使用して定量されたH L A - A、B、C 分子の数の平均及び標準偏差を示すバープロット。

【図8B】I F N - γ 処理後の多能性マーカー及びM H C 発現の分析を示す。未処理及びI F N - γ 処理 F i b r o - i P S C. 2 についての、多能性マーカーO c t 4、S S E A - 3、S S E A - 4、及び分化マーカーS S E A - 1 の代表的なフローサイトメトリープロファイル。

【図8C】I F N - γ 処理後の多能性マーカー及びM H C 発現の分析を示す。(B e n - P o r a t h e t a l. , 2008) からの遺伝子のE S 1 セットを使用した、(C h u r k o e t a l. , 2017) からのP S C、及び異なる供給源からの分化細胞を用いた、本研究におけるi P S C のクラスタリングを示すヒートマップ。B M、骨髄; D C、樹状細胞; F i b、線維芽細胞; e p、上皮細胞; n c p m、100万個当たりの正規化カウント; i s o、アイソタイプ。

【図9A】p a M A P及びそれらのソース遺伝子が、P S C において高発現であるが、分化細胞において高発現ではないことを示す。(C h u r k o e t a l. , 2017) からのP S C 及び本研究からのi P S C のパネルにわたるp a M A P のRNA発現 [$\log_{10}$ (R P H M + 1)] を示すヒートマップ。各i P S C リプログラミング方法のカラーコードが示される。

【図9B】p a M A P及びそれらのソース遺伝子が、P S C において高発現であるが、分化細胞において高発現ではないことを示す。バープロットは、処理ごと、細胞株ごとに同定された固有のp a M A P の数、及び細胞株ごとに2つの条件間で共有されたp a M A P の数を示す。

【図9C】p a M A P及びそれらのソース遺伝子が、P S C において高発現であるが、分化細胞において高発現ではないことを示す。p a M A P ソース遺伝子セットのs s G S E A スコアと、本研究からの他の公開された多能性関連遺伝子セット又はs a M A P ソース遺伝子セットとの間のピアソン相関。

【図9D】p a M A P及びそれらのソース遺伝子が、P S C において高発現であるが、分化細胞において高発現ではないことを示す。s a M A P ソース遺伝子セットのs s G S E A スコアと、本研究からの他の公開された多能性関連遺伝子セット又はp a M A P ソース遺伝子セットとの間のピアソン相関。

【図9E】p a M A P及びそれらのソース遺伝子が、P S C において高発現であるが、分

10

20

30

40

50

化細胞において高発現ではないことを示す。様々な供給源からの P S C 及び分化細胞における p a M A P 及び s a M A P 由来の遺伝子セット並びに他の公開された多能性関連遺伝子セットの s s G S E A スコア（遺伝子セットにわたって正規化された m i n - m a x）。

【図 9 F】 p a M A P 及びそれらのソース遺伝子が、P S C において高発現であるが、分化細胞において高発現ではないことを示す。それぞれの遺伝子セットに含まれる遺伝子間の重複。

【図 10 A】 高幹細胞性試料において p a M A P が発現していることを示す。（A r a n e t a l . , 2015）からの推定される腫瘍純度に従って、T C G A がん（n = 21 がんタイプ）にわたって発現された s a M A P の数を示す散布図。

【図 10 B】 高幹細胞性試料において p a M A P が発現していることを示す。左パネル：T C G A からのがん試料中の s a M A P の平均 R N A 発現 [$\log_{10} (R P H M + 1)$]、及び括弧内のがんタイプごとのそれぞれの試料数を示すヒートマップ。枠で囲まれた：試料の > 10 % において > 2 R P H M の発現を有する組織。右パネル：がんタイプ間の異なる共有レベルで s a M A P コード配列を発現するがんタイプの累積数を示すバープロット。

【図 11 A】 共通のエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。がん内のそれぞれのソース遺伝子のプロモーター領域における p a M A P 発現（R P H M）とメチル化 β 値との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。全てのメチル化データは、27 K メチル化データセットに由来するデータを含有する O V を除いて、450 K メチル化データセットから得た。枠で囲まれた：p - a d j < 0.05（B e n j a m i n i - H o c h b e r g）。

【図 11 B】 共通のエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。がん内の p a M A P 発現（R P H M）と局所 D N A コピー数との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。参照のためにソース遺伝子名を追加する；N A、アノテーション付きソース遺伝子なし；利用可能な全てのデータを含めた。

【図 11 C】 共通のエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。がんにわたるそれぞれのソース遺伝子のプロモーター領域における s a M A P 発現（R P H M）とメチル化 β 値との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。450 K メチル化データセットの全ての利用可能なデータを含めた。枠で囲まれた：p - a d j < 10^{-4} （B e n j a m i n i - H o c h b e r g）。

【図 11 D】 共通のエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。s a M A P 発現（R P H M）と局所 D N A コピー数との間のスピアマン相関を示すヒートマップ。参照のためにソース遺伝子名を追加する；N A、アノテーション付きソース遺伝子なし；利用可能な全てのデータを含めた。枠で囲まれた：p - a d j < 10^{-4} （B e n j a m i n i - H o c h b e r g）。

【図 11 E】 共通のエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。純度推定を共変量として用いた、試料ごとに発現された p a M A P 及び s a M A P の数と、M S i g D B からの特徴的な遺伝子セットについての s s G S E A スコアとの間のがん内スピアマン相関；有意な相関のみが提示される（p - a d j < 0.05）、それ以外の場合、細胞は白色である；（A r a n e t a l . , 2015）からの推定純度を有する試料のみが含まれた。

【図 11 F】 共通のエピジェネティック及びシグナル伝達事象が、がんにわたる p a M A P 及び s a M A P 発現に関連することを示す。ヒートマップは、p a M A P 及び s a M A P を発現するがん試料においてがんタイプ当たりの中央値を上回る上位 3 つの最も一般的な変異を有する遺伝子を示す。p 値 > 0.05、フィッシャーの正確確率検定。2 つ以上の試料を有する患者は、分析から除外された。

【図 12 A】 がん及び正常試料中の免疫原性 p a M A P 及び s a M A P コード配列の発現

10

20

30

40

50

を示す。免疫原性 p a M A P 及び s a M A P の概要の詳細を示す円グラフ。中央から開始：M A P タイプ、バイオタイプ、ゲノム領域で重複する E R E のクラス（該当する場合）、ソース遺伝子、M A P 配列。

【図 1 2 B】がん及び正常試料中の免疫原性 p a M A P 及び s a M A P コード配列の発現を示す。少なくとも 1 0 % の試料がそれぞれの M A P（図 3）を発現した対応するがんタイプにおける、及び G T E x からの対応する正常組織における、本研究又は他の研究で決定される免疫原性 p a M A P の M C S 発現 $[\log_{10} (R P H M + 1)]$ 。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ （ウィルコクソン検定）。

【図 1 2 C】がん及び正常試料中の免疫原性 p a M A P 及び s a M A P コード配列の発現を示す。少なくとも 1 0 % の試料がそれぞれの M A P（図 3）を発現した対応するがんタイプにおける、及び G T E x からの対応する正常組織における、本研究又は他の研究で決定される免疫原性 s a M A P の M C S 発現 $[\log_{10} (R P H M + 1)]$ 。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ （ウィルコクソン検定）。

【図 1 3 A】p a M A P 及び s a M A P の発現が免疫回避の増加と相関することを示す。死亡のリスクと、発現された p a M A P の数 (> 0 R P H M) との間の関連性についてのハザード比 ($\pm 95\%$ C I)。点及びひげ、 p 値 < 0.05 (C o x 比例ハザードモデル)。2 つ以上の試料を有する患者は、分析から除外された。

【図 1 3 B】p a M A P 及び s a M A P の発現が免疫回避の増加と相関することを示す。死亡のリスクと、発現された s a M A P の数 (> 0 R P H M) (図 1 3 B、左)、及び発現された s a M A P の数 (> 0 R P H M) を共変量とする予測された提示を有する s a M A P の数 (# H L A - s a M A P) (図 1 3 B、右) との間の関連性についてのハザード比 ($\pm 95\%$ C I)。

【図 1 3 C】p a M A P 及び s a M A P の発現が免疫回避の増加と相関することを示す。がんタイプ内の、x C e l l からの免疫細胞浸潤スコアと、p a M A P 及び s a M A P ソース遺伝子についての s s G S E A スコア (左) 又は 2 R P H M を超えて発現された p a M A P 及び s a M A P の数 (右) との間のスピアマン相関。枠で囲まれた： $p - a d j < 0.05$ (B e n j a m i n i - H o c h b e r g) との相関。

【図 1 3 D】p a M A P 及び s a M A P の発現が免疫回避の増加と相関することを示す。がんタイプ内の、[(M i r a n d a e t a l . , 2 0 1 9 , T h o r s s o n e t a l . , 2 0 1 8) からの] 免疫阻害遺伝子の発現と、p a M A P 及び s a M A P ソース遺伝子の s s G S E A スコア (左)、又は 2 R P H M を超えて発現された p a M A P 及び s a M A P の数 (右) との間のスピアマン相関。枠で囲まれた： $p - a d j < 0.05$ (B e n j a m i n i - H o c h b e r g) との相関。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 2】

技術を説明する文脈において（特に、以下の特許請求の範囲の文脈において）、「a」及び「an」及び「the」という用語、並びに同様の指示対象の使用は、本明細書において別段示されないか、又は文脈に明らか矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方を網羅するように解釈されるものである。

【0 0 1 3】

「含む (c o m p r i s i n g)」、「有する」、「含む (i n c l u d i n g)」、及び「含有する」という用語は、別段注釈が付かない限り、オープンエンド用語（すなわち、「含むが、それに限定されない」を意味する）として解釈されるものである。

【0 0 1 4】

本明細書に記載される全ての方法は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施され得る。

【0 0 1 5】

本明細書に提供される任意の及び全ての実施例、又は例示的な言語（「例えば」、「な

10

20

30

40

50

ど」)の使用は、単に特許請求される技術の実施形態をより良好に例示することを意図しており、別段特許請求されない限り、範囲の限定を提起するものではない。

【0016】

本明細書におけるいかなる言語も、任意の特許請求されていない要素を特許請求される技術の実施形態の実施に不可欠であることを示すものとして解釈されるべきではない。

【0017】

本明細書では、「約」という用語は、その通常の意味を有する。「約」という用語は、ある値が、その値を決定するために用いられるデバイス若しくは方法の誤差についての固有の変動を含むか、又は列挙された値に近似する値、例えば、列挙された値（若しくは値の範囲）の10%以内の値を包含することを示すために使用される。

【0018】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において別段示されない限り、単に、範囲内に含まれる各個別の値を個々に参照する簡略方法として機能することを意図しており、各個別の値は、本明細書に個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。範囲内の値の全てのサブセットもまた、本明細書に個々に列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。

【0019】

本開示の特徴又は態様が、マーカッシュ群又は代替物の一覧の観点から説明される場合、当業者は、本開示がまた、それによってマーカッシュ群又は代替物の一覧の任意の個々の構成要素又は構成要素の部分群の観点からも説明されることを認識するであろう。

【0020】

別段具体的に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味（例えば、幹細胞生物学、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学、及び生化学における）と同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【0021】

別段示されない限り、本開示において利用される組換えタンパク質、細胞培養、及び免疫学的技法は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技術は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、及びF. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在に至るまでの全ての改訂版を含む)、Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、及びJ. E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在に至るまでの全ての改訂版を含む)などの情報源における文献全体を通じて記載及び説明されている。

【0022】

本明細書に記載される研究において、本発明者らは、プロテオゲノミクスに基づくアプローチを使用して、ヒトiPSCから腫瘍特異的抗原(TSA)及び腫瘍関連抗原(TA

10

20

30

40

50

A) 候補を同定した。正常組織及び成体幹細胞のトランスクリプトームには存在しないが、多能性幹細胞（PSC）及び複数のがんタイプで発現されるいくつかの多能性関連MHC-I関連ペプチド（pMAP）を同定した。コード転写産物及び非コードとされる（48%）転写産物に由来するこれらのpMAPは、多能性維持に関与し、試料中のそれらの発現は、がんタイプにわたって共通するソース遺伝子の低メチル化及びゲノム異常と相関していた。本明細書で同定された新規のTSA及びTAA候補は、例えば、T細胞ベースの免疫療法及びがん幹細胞（CSC）に対するワクチン、例えば、低分化がんの治療に有用であり得る。

【0023】

したがって、一態様では、本開示は、以下のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、又はそれからなる、がん幹細胞（CSC）腫瘍抗原ペプチド（TAP）（若しくはCSC腫瘍特異的ペプチド）に関する。

【表3】

ペプチド配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号
NTENYILWGY	1	ISMCDLVY	21
MKFGNQVSGLF	2	YKRMKLDSY	22
RLQHEPPHPV	3	QPLPEPLQLW	23
LPMWKALLF	4	IPMKIYLW)	24
RPARPPAGL	5	SQSSLMLYL	25
FAYPNQKVTF	6	ALYPQPPTV	26
GQAHPQGSF	7	YTPFPSYGHY	27
YSDQKPPYSY	8	FTEEDLHFVLY	28
KLAQIIRQV	9	GQITHNTSF	29
GEIKTFSDL	10	VTLSYFHV	30
GKLDNTNEY	11	GQFDRPAGV	31
AKKKENITY	12	VSDQQNGTY	32
SAQGKPTYF	13	KHFDSRPGVAF	33
EEEIHSPTL	14	GEHLVSVTL	34
SKLRSTGQSF	15	YSIYPMRNL	35
NTLSESYIY	16	SQNSPIRY	36
QPLPQPLELW	17	FHSQNSPIRY	37
RTDTGKRVLY	18	VAKPPGTAF	38
LPSGETIAKW	19	SLGGSSEILEV	39
KLDSYIIPY	20		

10

20

30

40

50

【表 4】

ペプチド配列	配列番号	ペプチド配列	配列番号
GKFQGLIEKF	47	ALLEGVNTVVV	55
KQMENDIQLY	48	SETHPPEVAL	56
ASTPASSEL	49	SPQEASGVRW	57
RLWNETVELF	50	YLLNCHLLI	58
FGDGKFSEV	51	GQFLVKSGY	59
SEVSADKLVAL	52	QTELNNSKQEY	60
AMYHALEKA	53	MAWNGILHL	61
FAYPNQKDF	54	HPLPGLILEW	62

10

【0024】

一般に、HLAクラスⅠに関連して提示される腫瘍抗原ペプチド（TAP）などのペプチドは、長さが約7若しくは8～約15個、又は好ましくは8～14個のアミノ酸残基である。本開示の方法の一部の実施形態では、本明細書に定義されるTAP配列を含む、より長いペプチドは、細胞によってプロセッシングされる抗原提示細胞（APC）などの細胞に人工的に負荷され、TAPは、APCの表面においてMHCクラスⅠ分子によって提示される。この方法では、15個のアミノ酸残基よりも長いペプチド／ポリペプチドをAPCに負荷することができ、提示のために本明細書に定義される対応するTAPを提供するAPC細胞質中のプロテアーゼによってプロセッシングされる。一部の実施形態では、本明細書に定義されるTAPを生成するために使用される前駆体ペプチド／ポリペプチドは、例えば、1000、500、400、300、200、150、100、75、50、45、40、35、30、25、20、又は15個以下のアミノ酸である。したがって、本明細書に記載のTAPを使用する全ての方法及びプロセスは、細胞（APC）による処理後の「最終的な」8～14個のTAPの提示を誘導するための、より長いペプチド又はポリペプチド（天然タンパク質を含む）、すなわち、腫瘍抗原前駆体ペプチド／ポリペプチドの使用を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の白血病TAPは、約8～14、8～13、又は8～12アミノ酸長（例えば、8、9、10、11、12、又は13アミノ酸長）であり、HLAクラスⅠ分子に直接適合するのに十分小さい。一実施形態では、TAPは、20個以下のアミノ酸、好ましくは15個以下のアミノ酸、より好ましくは14個以下のアミノ酸を含む。一実施形態では、TAPは、少なくとも7個のアミノ酸、好ましくは少なくとも8個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも9個のアミノ酸を含む。

20

30

【0025】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、TAPの合成類似体を調製するためのペプチド化学において使用される天然に存在するアミノ酸並びに他のアミノ酸（例えば、天然に存在するアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、核酸配列によってコードされていないアミノ酸など）のL体及びD体の両方を含む。天然に存在するアミノ酸の例は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンなどである。他のアミノ酸としては、例えば、非遺伝子コード形態のアミノ酸、アミノ酸類似体、並びにL-アミノ酸の保存的置換が挙げられる。天然に存在する非遺伝子コードアミノ酸及びアミノ酸類似体としては、例えば、ベーターアラニン、3-アミノプロピオン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、アルファ-アミノイソ酪酸（Aib）、4-アミノ酪酸、N-メチルグリシン（サルコシン）、ヒドロキシプロリン、オルニチン（例えば、L-オルニチン）、シトルリン、セーブチルアラニン、セーブチルグリシン、N-メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン（Nle）、ノ

40

50

ルバリン、2-ナフチルアラニン、ピリジルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、ベター-2-チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、L-ホモアルギニン (H o a r g)、N-アセチルリシン、2-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、2, 4-ジアミノ酪酸 (D-若しくはL-)、p-アミノフェニルアラニン、N-メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン (H o S e r)、システイン酸、イプシロン-アミノヘキサン酸、デルター-アミノ吉草酸、ベンジルオキシチロシン、β-フェニルアラニン、又は2, 3-ジアミノ酪酸 (D-若しくはL-) などが挙げられる。これらのアミノ酸は、生化学／ペプチド化学の分野で周知である。したがって、本明細書に記載されるC S C T A P (配列番号1～62) におけるアミノ酸のうちの1つ以上は、非遺伝子コードアミノ酸及び／又はアミノ酸類似体によって置き換えられ得る。T A Pはまた、例えば、メチルアミノ酸、β-アミノ酸、又はペプチドの組み込みによって、ペプチドのタンパク質分解安定性を改善するように修飾され得る。一実施形態では、T A Pは、天然に存在するアミノ酸のみ含む。

10

【0026】

実施形態では、本明細書に記載されるT A Pは、本明細書に記載の配列と比較して、機能的に同等のアミノ酸残基の置換を含有する変化した配列を有するペプチドを含む。例えば、配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、機能的等価物として作用する類似の極性（類似の物理化学的特性を有する）の別のアミノ酸（又はアミノ酸類似体）と置換することができ、沈黙変更をもたらす。配列内のアミノ酸の置換は、アミノ酸が所属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、正電荷を持つ（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、及びヒスチジン（並びにホモアルギニン及びオルニチン）が含まれる。無極性（疎水性）アミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、プロリン、トリプトファン、及びメチオニンが含まれる。非電荷極性アミノ酸には、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれる。負電荷（酸性）アミノ酸には、グルタミン酸及びアスパラギン酸が含まれる。アミノ酸グリシンは、無極性アミノ酸ファミリー又は非電荷（中性）極性アミノ酸ファミリーのいずれかに含まれ得る。アミノ酸のファミリー内で行われた置換は、保存的な置換であると一般に理解されている。本明細書に記載のT A Pは、あらゆるL-アミノ酸、あらゆるD-アミノ酸、又はL-アミノ酸とD-アミノ酸との混合物を含み得る。一実施形態では、本明細書に記載のT A Pは、全てのL-アミノ酸を含む。

20

30

【0027】

一実施形態では、配列番号1～39及び47～62の配列のうちの1つを含むか、又はそれからなるT A Pの配列において、T細胞受容体との相互作用に実質的に寄与しないアミノ酸残基は、T細胞の反応性に実質的に影響を与えず、かつ関連するM H Cへの結合を排除しない他のアミノ酸で置換することによって修飾することができる。

【0028】

T A Pはまた、化学的安定性及び／又は増強された生物学的／薬理学的特性（例えば、半減期、吸収、効力、効率など）を改善し得るペプチドのアミド結合のうちの1つ以上を置き換えることによって修飾され得る。典型的なペプチド結合の置換としては、エステル、ポリアミン及びそれらの誘導体、並びにアミノメチル及びケトメチレンなどの置換アルカン及びアルケンが挙げられる。例えば、上述のT A Pは、 $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ （シス又はトランス）、 $-CH_2SO-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、又は $-COCH_2-$ などの連結によって置き換えられた1つ以上のアミド結合を有し得る。

40

【0029】

T A Pはまた、分解を防いで、安定性、親和性、及び／又は取り込みを改善するために、N末端及び／若しくはC末端キャッピング、又は修飾され得る。したがって、別の態様では、本開示は、式 Z^1-X-Z^2 の修飾されたT A Pを提供し、式中、Xは、配列番号

50

1～39及び47～62のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、又はそれからなるTAPである。

【0030】

一実施形態では、TAPのアミノ末端残基（すなわち、N末端の遊離アミノ基）は、例えば、部分／化学基（ Z^1 ）の共有結合によって、修飾される（例えば、分解に対する保護のために）。 Z^1 は、1～8個の炭素の直鎖又は分枝鎖アルキル基、又はアシル基（ $R-CO-$ ）であってもよく、式中、Rは、疎水性部分（例えば、アセチル、プロピオニル、ブタニル、イソプロピオニル、若しくはイソブタニル）、又はアロイル基（ $Ar-CO-$ ）であり、式中、Arは、アリール基である。一実施形態では、アシル基は、 C_1-C_{16} 又は C_3-C_{16} アシル基（直鎖又は分岐、飽和又は不飽和）であり、更なる一実施形態では、飽和 C_1-C_6 アシル基（直鎖又は分岐）又は不飽和 C_3-C_6 アシル基（直鎖又は分岐）、例えば、アセチル基（ CH_3-CO- 、Ac）である。一実施形態では、 Z^1 は存在しない。TAPのカルボキシ末端残基（すなわち、TAPのC末端の遊離カルボキシ基）は、例えば、アミド化（ NH_2 基によるOH基の置換）によって修飾され得（例えば、分解に対する保護のために）、したがって、そのような場合、 Z^2 は NH_2 基である。一実施形態では、 Z^2 は、ヒドロキサメート基、ニトリル基、アミド（1級、2級、又は3級）基、メチルアミン、イソブチルアミン、イソバレルイルアミン、若しくはシクロヘキシルアミンなどの1～10個の炭素の脂肪族アミン、アニリン、ナフチルアミン、ベンジルアミン、シンナミルアミン、若しくはフェニルエチルアミンなどの芳香族若しくはアリールアルキルアミン、アルコール、又は CH_2OH であり得る。一実施形態では、 Z^2 は存在しない。一実施形態では、TAPは、配列番号1～39及び47～62のアミノ酸配列のうちの1つを含む。一実施形態では、TAPは、配列番号1～39及び47～62のアミノ酸配列のうちの1つからなり、すなわち、 Z^1 及び Z^2 は存在しない。

10

20

【0031】

一実施形態では、本開示のTAPは、配列番号1～39のアミノ酸配列のうちの1つを含むか、又はそれからなる。

【0032】

別の態様では、本開示は、配列番号1、8、16、20、21、27、28、32、37、又は60、好ましくは配列番号1、8、16、20、21、27、28、32、又は37の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-A*01:01分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。

30

【0033】

別の態様では、本開示は、配列番号3、6、26、30、31、39、53、55、又は58、好ましくは配列番号3、6、26、30、31、又は39の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-A*02:01分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-A*02:05、HLA-A*02:06及び／又はHLA-A*02:07分子に更に結合し得る。

【0034】

別の態様では、本開示は、配列番号5の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-B*07:02分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-B*35:02、HLA-B*35:03、HLA-B*55:01及び／又はHLA-B*56:01分子に更に結合し得る。

40

【0035】

別の態様では、本開示は、配列番号2、7、11、12、15、22、29、36、38、47、48、又は59、好ましくは配列番号2、7、11、12、15、22、29、36、又は38の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-B*15:03分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性

50

を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-B*15:01、HLA-B*15:02、及び／又はHLA-B*46:01分子に更に結合し得る。

【0036】

別の態様では、本開示は、配列番号10、25、34、52、又は56、好ましくは配列番号10、25、又は34の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-B*40:01分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-B*18:01、HLA-B*40:02、HLA-B*41:02、HLA-B*44:02、HLA-B*44:03、及び／又はHLA-B*45:01分子に更に結合し得る。

10

【0037】

別の態様では、本開示は、配列番号4、17、19、23、24、又は57、好ましくは配列番号4、17、19、23、又は24の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-B*53:01分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-B*35:02、HLA-B*35:03、HLA-B*52:01、HLA-B*51:01、HLA-B*55:01、及び／又はHLA-B*56:01分子に更に結合し得る。

【0038】

別の態様では、本開示は、配列番号6、54、又は61、好ましくは配列番号6の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-C*02:10分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。

20

【0039】

別の態様では、本開示は、配列番号6、35、49、又は51、好ましくは配列番号6又は35の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-C*03:04分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-B*46:01、HLA-C*03:02、HLA-C*08:01、HLA-C*08:02、HLA-C*12:02、HLA-C*12:03、HLA-C*15:02、及び／又はHLA-C*16:01分子に更に結合し得る。

30

【0040】

別の態様では、本開示は、配列番号13、33、50、好ましくは配列番号13又は33の配列を含むか、又はそれからなる、HLA-C*04:01分子に結合する、CSC TAP（又は腫瘍特異的ペプチド）を提供する。HLAアレルが乱雑性を示すため（特定のHLAアレルが類似のエピトープを提示する）、上記の特定されたTAPは、HLA-C*07:02及び／又はHLA-C*14:02分子に更に結合し得る。

【0041】

本開示のTAPは、TAP（組換え発現）をコードする核酸を含む宿主細胞における発現によって、又は化学合成（例えば、固相ペプチド合成）によって生成され得る。ペプチドは、当該技術分野で周知の手動及び／又は自動化固相手順によって容易に合成することができる。好適な合成は、例えば、「T-boc」又は「Fmoc」手順を利用することによって行うことができる。固相合成のための技術及び手順は、例えば、Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, E. Atherton and R. C. Sheppard, IRL, Oxford University Press, 1989に記載されている。代替的に、MiHAペプチドは、例えば、Liu et al., Tetrahedron Lett. 37:933-936, 1996、Baca et al., J. Am. Chem. Soc. 117:1881-1887, 1995、Tam et al., Int. J. Peptide Protein Res. 45:209-216, 1995、Schnol

40

50

zer and Kent, Science 256:221-225, 1992、Liu and Tam, J. Am. Chem. Soc. 116:4149-4153, 1994、Liu and Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6584-6588, 1994、及び Yamashiro and Li, Int. J. Peptide Protein Res. 31:322-334, 1988)に記載されるように、セグメント凝縮によって調製されてもよい。TAPの合成に有用な他の方法は、Nakagawa et al., J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092, 1985に記載されている。一実施形態では、TAPは、化学的に合成される(合成ペプチド)。本開示の別の実施形態は、天然に存在しないペプチドに関するものであり、当該ペプチドは、本明細書に定義されるアミノ酸配列からなるか、又は本質的になり、薬学的に許容され得る塩として合成的に産生されている(例えば、合成されている)。本開示によるTAPの塩は、インビボで生成されるペプチドが塩を有しないので、インビボでのそれらの状態(複数可)においてペプチドとは実質的に異なる。ペプチドの非天然塩形態は、特にペプチドを含む医薬組成物、例えば、本明細書に開示されるペプチドワクチンに関連して、ペプチドの溶解性を調節し得る。好ましくは、塩は、ペプチドの薬学的に許容され得る塩である。

10

20

30

【0042】

一実施形態では、本明細書に記載のTAPは、実質的に純粋である。化合物は、それが天然に付随する成分から分離されたときに「実質的に純粋」である。典型的には、化合物は、重量%で、試料中の総材料の少なくとも60%、より一般には、75%、80%、又は85%、好ましくは90%超、及びより好ましくは95%超であるときに実質的に純粋である。したがって、例えば、組換え技術によって化学的に合成されるか又は産生されるポリペプチドは、一般に、その天然に関連する成分、例えば、その供給源の高分子の成分を実質的に含まないであろう。核酸分子は、核酸が由来する有機体の天然に存在するゲノムにおいて正常に連続しているコード配列と直後に連続しない(すなわち、共有結合されていない)ときに実質的に純粋である。実質的に純粋な化合物は、例えば、天然源からの抽出によるか、ペプチド化合物をコードする組換え核酸分子の発現によるか、又は化学合成によって得られ得る。純度は、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、HPLCなどの任意の適切な方法を用いて測定することができる。一実施形態では、TAPは、溶液中にある。別の実施形態では、TAPは、固形形態であり、例えば、凍結乾燥されている。

【0043】

一実施形態では、TAPは、ゲノムの非タンパク質コード領域に位置する配列によってコードされる。一実施形態では、TAPは、非翻訳転写領域(UTR)、すなわち、3'-UTR又は5'-UTR領域に位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、イントロンに位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、遺伝子間領域に位置する配列によってコードされる。別の実施形態では、TAPは、エキソンに位置する配列によってコードされ、フレームシフトから生じる。

【0044】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載のTAP又は腫瘍抗原前駆体ペプチドをコードする(単離された)核酸を更に提供する。一実施形態では、核酸は、約21ヌクレオチド~約45ヌクレオチド、約24~約45ヌクレオチド、例えば、24、27、30、33、36、39、42又は45ヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「単離された」とは、分子の天然環境に存在する他の成分又は天然に存在する供給源の高分子(例えば、他の核酸、タンパク質、脂質、糖などを含む)から分離されたペプチド又は核酸分子を指す。本明細書で使用される場合、「合成」とは、例えば、組換え技術を通して、又は化学合成を使用して産生される、その天然源から単離されていないペプチド又は核酸分子を指す。一実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸(DNA、RNA)は、以下の表に示される配列又は対応するRNA配列のうちのいずれか1つを含む。一実施形態では、TAPをコードする核酸は、mRNA分子である。

40

50

【表 5 - 1】

ペプチド配列	コードするヌクレオチド配列	ペプチド配列	コードするヌクレオチド配列
NTENYLWG Y	AACACAGAAAATTATATA CTCTGGGGTTAC(配列番号 88)	ISMCDLVY	ATTTCTATGTGTGATT TGGTTTAT(配列番号 108)
MKFGNQVS GLF	ATGAAATTTGGTAATCA GGTAAGCGGACTCTTC(配列番号 89)	YKRMKLDYSY	TACAAAAGAATGAAGT TGGACTCTTAC(配列番号 109)
RLQHEPPHP V	AGATTACAGCATGAGCC ACCACACCCTGTC(配列番号 90)	QPLPEPLQL W	CAGCCACTCCCAGAGC CCCTGCAACTCTGG(配列番号 110)
LPMWKALLF	CTGCCCATGTGGAAGGC TCTGCTGTTT(配列番号 91)	IPMKIYLW)	ATCCCCATGAAAATAT ATCTCTGG(配列番号 111)
RPARPPAGL	CGCCCTGCACGGCCGCC AGCCGGCCTC(配列番号 92)	SQSSLMLYL	TCCCAGAGCTCACTAA TGCTATATTTA(配列番号 112)
FAYPNQKVT F	TTTGCCTACCCAAATCA AAAGGTAACTTTT(配列番号 93)	ALYPQPPTV	GCGCTGTATCCTCAGC CGCCCACTGTG(配列番号 113)
GQAHPQGSF	GGTCAAGCTCACCCCA AGGCAGCTTC(配列番号 94)	YTPFPSYGHY	TACACGCCTTTCCCGT CCTATGGACACTAC(配列番号 114)
YSDQKPPYS Y	TACAGCGACCAGAAGCC GCCCTACTCGTAC(配列番号 95)	FTEEDLHFVL Y	TTCACGGAGGAGGACC TGCACTTCGTTCTGTAC(配列番号 115)
KLAQIIRQV	AAGCTGGCCCAGATCAT CCGTCAGGTC(配列番号 96)	GQITHNTSF	GGGCAAATCACACATA ACACTTCATTC(配列番号 116)
GEIKTFSDL	GGTGAAATAAAGACATT TTCAGATCTG(配列番号 97)	VTLSTYFHV	GTCACCTTGAGTACTT ATTTCCATGTG(配列番号 117)

10

20

30

40

50

GKLDNTNEY	GGTAAATTAGACAACAC GAACGAATAC(配列番号 98)	GQFDRPAGV	GGGCAGTTCGACCGAC CAGCCGGCGTG(配列番 号 118)
AKKKENITY	GCAAAGAAAAAGGAAAA TATCACCTAT(配列番号 99)	VSDQQNGTY	GTGAGTGATCAGCAGA ATGGGACATAC(配列番 号 119)
SAQGKPTYF	AGTGCACAGGGAAAGCC AACCTACTTT(配列番号 100)	KHFDSPRGV AF	AAGCACTTTGACTCCC CACGGGGTGTGGCCT TC(配列番号 120)
EEEIHSPTL	GAAGAAGAAATCCACAG CCCTACCCTG(配列番号 101)	GEHLVSVTL	GGTGAGCACCTGGTAT CTGTGACACTG(配列番 号 121)

【表 5 - 2】

SKLRSTGQSF	TCCAAACTGAGAAGCAC TGGACAGTCATTT(配列 番号 102)	YSIYPMRNL	TACTCCATCTACCCCA TGCGCAACCTC(配列番 号 122)
NTLSESYIY	AACACCCTGAGTGAATC TTACATTTAT(配列番号 103)	SQNSPIRY	TCTCAAACTCTCCTA TAAGGTAT(配列番号 123)
QPLPQPLEL W	CAGCCACTTCCACAGCC CCTGGA ACTCTGG(配列 番号 104)	FHSQNSPIRY	TTTCATTCTCAAACT CTCCTATAAGGTAT(配 列番号 124)
RTDTGKRVL Y	AGGACTGACACAGGTAA GAGAGTCTTGTAT(配列 番号 105)	VAKPPGTAF	GTAGCCAAACCCCCAG GAACTGCTTTC(配列番 号 125)
LPSGETIAK W	TTGCCAAGCGGTGAGAC TATCGCCAAGTGG(配列 番号 106)	SLLGSSEILEV	TCCCTGCTTGGCAGCA GTGAAATTTTGGAGGT C(配列番号 126)
KLDSYIIPY	AAGTTGGACTCTTACAT TATACCATAT(配列番号 107)		

10

20

30

40

50

【表 6】

ペプチド配列	コードするヌクレオチド配列	ペプチド配列	コードするヌクレオチド配列
GKFQGLIEK F	GGGAAGTTCCAGGGTCT GATTGAGAAGTTT(配列番号 127)	ALLEGVNTV VV	GCGCTCCTTGAGGGA GTTAATACAGTTGTGG TG(配列番号 135)
KQMENDIQ LY	AAGCAAATGGAAAATGAT ATTCAGTTATAT(配列番号 128)	SETHPPEVAL	TCTGAGACACATCCTC CTGAAGTGGCTCTT(配列番号 136)
ASTPASSEL	GCCTCCACTCCAGCCTCA TCAGAGTTA(配列番号 129)	SPQEASGVR W	TCTCCACAAGAGGCCT CTGGTGTGAGGTGG(配列番号 137)
RLWNETVE LF	AGGCTGTGGAATGAGAC CGTGGAGCTTTTT(配列番号 130)	YLLNCHLLI	TACCTTCTAAACTGCC ACCTGTTAATC(配列番号 138)
FGDGKFSEV	TTTGGCGATGGCAAGTTC TCCGAGGTC(配列番号 131)	GQFLVKSGY	GGCCAGTTCTTGGTCA AATCCGGCTAC(配列番号 139)
SEVSADKLV AL	TCCGAGGTCTCTGCAGAC AACTGGTGGCACTG(配列番号 132)	QTELNNKQ EY	CAGACAGAGCTGAATA ATTCAAAGCAAGAATA T(配列番号 140)
AMYHALEK A	GCCATGTACCATGCTCTG GAGAAAGCC(配列番号 133)	MAWNGILHL	ATGGCATGGAATGGAA TCCTACACCTC(配列番号 141)
FAYPNQKD F	TTTGCCTACCCAAATCAA AAGGATTTT(配列番号 134)	HPLPGLILEW	CATCCTTTACCAGGCT TGATATTAGAATGG(配列番号 142)

【0045】

本開示の核酸は、本開示のTAPの組換え発現のために使用することができ、宿主細胞にトランスフェクトされ得るベクター又はプラスミド、例えば、クローニングベクター又は発現ベクター内に含まれ得る。一実施形態では、本開示は、本開示のTAPをコードする核酸配列を含むクローニングベクター、発現ベクター、若しくはウイルスベクター、又はプラスミドを提供する。代替的に、本開示のTAPをコードする核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。いずれにしても、宿主細胞は、核酸によってコードされるTAP又はタンパク質を発現する。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、特定の対象細胞のみならず、そのような細胞の子孫又は潜在的子孫を指す。宿主細胞は、本明細書に記載されるTAPを発現することができる任意の原核細胞（例えば、大腸菌）又

は真核細胞（例えば、昆虫細胞，酵母菌、又は哺乳動物細胞）であり得る。ベクター又はプラスミドは、挿入されたコード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含有し、耐性遺伝子、クローニング部位などの他の構成要素を含有し得る。当業者に周知の方法を使用して、ペプチド又はポリペプチドをコードする配列、及びそれに作動可能に連結された適切な転写及び翻訳制御／調節要素を含有する発現ベクターを構築してもよい。これらの方法には、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術、及びインビボでの遺伝子組換えが含まれる。そのような技術は、Sambrook, et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.、及びAusubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y. に記載されている。「作動可能に連結されている」とは、成分、特にヌクレオチド配列の正常な機能を行うことができるようにする成分の並列配置を指す。したがって、調節配列に作動可能に連結されたコード配列は、コード配列が調節配列の調節制御、すなわち、転写及び／又は翻訳制御下で発現され得る、ヌクレオチド配列の構成を指す。本明細書で使用される場合、「調節／制御領域」又は「調節／制御配列」とは、コード核酸の発現の調整に関わる非コードヌクレオチド配列を指す。したがって、調節領域という用語は、プロモーター配列、調節タンパク質結合部位、上流活性化因子配列などを含む。ベクター（例えば、発現ベクター）は、それぞれの宿主細胞における効率的な遺伝子転写及び翻訳のための、プロモーター配列（例えば、CMV、PGK、及びEF1αプロモーター）、リボソーム認識及び結合TATAボックス、並びに3' UTR AAUAAA転写終結配列などの必要な5' 上流及び3' 下流調節エレメントを有し得る。他の好適なプロモーターとしては、シミアンビムス40 (SV40) 初期プロモーター、マウス乳がんウイルス (MMTV) プロモーター、HIV LTRプロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、EBV最初期プロモーター、及びRous肉腫ビムスプロモーターの構成的プロモーターが挙げられる。ヒト遺伝子プロモーターも使用され得、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、誘導性プロモーターは、TAPを発現するベクターの一部としても企図される。これは、目的のポリヌクレオチド配列の発現をオンにする、又は発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオニンプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、又はテトラサイクリンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの例としては、プラスミド、自律複製配列、及び転位エレメントである。追加の例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体（例えば、酵母人工染色体 (YAC)）、細菌人工染色体 (BAC)、又はPL由来人工染色体 (PAC)、バクテリオファージ（例えば、ラムダファージ又はM13ファージ）、及び動物ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターとして有用な動物ウイルスのカテゴリーの例としては、限定されないが、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、及びパポバウイルス（例えば、SV40）が挙げられる。発現ベクターの例は、哺乳動物細胞における発現のためのLentiviral（商標）バイシストロニック発現系 (Neo) ベクター (Clontech)、pClnNeoベクター (Promega)；哺乳動物細胞におけるレンチウイルス媒介性遺伝子導入及び発現のためのpLentiv4/V5-DEST（商標）、pLentiv6/V5-DEST（商標）、及びpLentiv6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) である。本明細書に開示されるTAPのコード配列は、哺乳動物細胞におけるTAPの発現のためのそのような発現ベクターにライゲーションすることができる。

【0046】

特定の実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸は、ウイルスベクターにおいて

提供される。ウイルスベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、又は泡沫状ウイルスに由来するものであり得る。本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパッケージングされる能力を有する核酸ベクター構築物を指す。ウイルスベクターは、非必須ウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載の様々なタンパク質のコード配列を含有することができる。ベクター及び／又は粒子は、インビトロ又はインビボのいずれかで、DNA、RNA、又は他の核酸を細胞内に導入する目的で利用することができる。多数の形態のウイルスベクターが当該技術分野で既知である。

【0047】

実施形態では、本開示のTAPをコードする核酸(DNA、RNA)は、脂質小胞(例えば、リボソーム)又は脂質ナノ粒子(LNP)などの小胞若しくはナノ粒子、又は任意の他の好適なビヒクル内に含まれる。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載されるCSC TAPのうちの1つ以上をコードする、mRNAなどの核酸を含む、脂質小胞又はナノ粒子を提供する。

【0048】

本明細書で使用されるリボソームという用語は、その通常の意味に従って、内部水性媒体を封入するリン脂質の二重層又は任意の同様の両親媒性脂質(例えば、スフィンゴ脂質)からなる顕微鏡的な脂質小胞を指す。

【0049】

「脂質ナノ粒子」という用語は、リボソームと同様の内部水性媒体を取り囲む1つ以上の脂質二重層環、又は非水性コア内の分子(例えば、核酸)を封入するミセル様構造を含み得るリボソーム様構造を指す。脂質ナノ粒子は、典型的には、イオン化可能なカチオン性脂質などのカチオン性脂質を含有する。LNPに使用され得るカチオン性脂質の例としては、DOTMA、DOSPA、DOTAP、ePC、DLin-MC3-DMA、C12-200、ALC-0315、cKK-E12、脂質H(SM-102)、OF-Deg-Lin、A2-Iso5-2DC18、306Oj10、BAME-O16B、TT3、9A1P9、FTT5、COATSOME(登録商標)SS-E、COATSOME(登録商標)SS-EC、COATSOME(登録商標)SS-OC、及びCOATSOME(登録商標)SS-OPが挙げられる(例えば、Hou et al., Nature Reviews Materials, volume 6, pages 1078-1094 (2021)、Tenchov et al., ACS Nano, 15, 16982-17015 (2021)を参照されたい。

【0050】

リボソーム及び脂質ナノ粒子は、典型的には、脂質、脂質様材料、並びに安定性、送達有効性、耐容性、及び生体内分布などのリボソーム又はナノ粒子の特性を改善することができるポリマーなどの他の脂質成分を含む。これらには、1,2-ジステアロイル-s n-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)などのリン脂質(例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルグリセロール)並びにDOPE、ステロール(コレステロール及びコレステロール誘導体など)、1,2-ジミリストイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2000-DMG)及び1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メトキシポリエチレングリコール-2000(PEG2000-DSG)などのPEG化脂質(PEG脂質)が含まれる。

【0051】

一実施形態では、本開示による脂質ナノ粒子は、イオン化可能なカチオン性脂質などの1つ以上のカチオン性脂質を含む。

【0052】

CSC TAPのうちの1つ以上をコードする核酸(例えば、mRNA)は、例えば、安定性を増加させ、かつ／又は免疫原性を低減するように修飾され得る。例えば、5'末端は、(例えば、US10519189及びUS10494399に記載されるように)

分子を安定化させ、免疫原性を低下させるためにキャップされ得る。mRNAの1つ以上のヌクレオシドは、分子の安定性を増加させるか、又は先天性免疫系による分子の認識を低減するかのいずれかのために、1-メチル偽ウリジンで修飾又は置換されてもよい。修飾ヌクレオシドの形態は、US9371511に記載されている。mRNAに対して行われ得る他のタイプの修飾としては、抗リバースキャップ類似体（ARCA）、5'-メチルシチジン三リン酸塩（m5CTP）、N6-メチル-アデノシン-5'-三リン酸塩（m6ATP）、2-チオ-ウリジン三リン酸塩（s2UTP）、プソイドウリジン三リン酸塩、N¹-メチルプソイドウリジン三リン酸塩、又は5-メトキシウリジン三リン酸塩（5moUTP）の組み込みが挙げられる。mRNAはまた、5'及び／又は3'非翻訳領域（UTR）並びにポリアデニル化（ポリA）尾部への追加の修飾を含み得る（例えば、Kim et al., Molecular & cellular toxicology vol. 18, 1 (2022): 1-8を参照されたい）。CSC TAPをコードする核酸（例えば、mRNA）に対するこれらの修飾及び他の修飾は全て本開示に含まれる。

10

【0053】

別の態様では、本開示は、配列番号1～39及び47～62のTAPのうちの1つ以上を含む（すなわち、提示するか、又は結合される）MHCクラスI分子を提供する。

【0054】

一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A*01:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A*02:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B*07:02分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B*15:03分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B*40:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-B*53:01分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-C*02:10分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-C*03:04分子である。一実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-C*04:01分子である。

20

【0055】

一実施形態では、TAP（例えば、配列番号1～39及び47～62）は、MHCクラスI分子に非共有結合される（すなわち、TAPは、MHCクラスI分子のペプチド結合溝／ポケットに負荷されるか、又は非共有結合される）。別の実施形態では、TAPは、MHCクラスI分子（アルファ鎖）に共有結合／結合される。そのような構築物において、TAP及びMHCクラスI分子（アルファ鎖）は、典型的には短い（例えば、5～20個の残基、好ましくは約8～12個、例えば、10個）可撓性リンカー又はスペーサー（例えば、ポリグリシンリンカー）を有する、合成融合タンパク質として産生される。別の態様では、本開示は、MHCクラスI分子（アルファ鎖）に融合された本明細書に定義されるTAPを含む融合タンパク質をコードする核酸を提供する。一実施形態では、MHCクラスI分子（α鎖）-ペプチド複合体は、多量体化される。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載のTAPで負荷された（共有的に又は非共有的に）MHCクラスI分子の多量体を提供する。そのような多量体は、多量体の検出を可能にするタグ、例えば蛍光タグに付着され得る。MHC二量体、四量体、五量体、八量体などを含む、MHC多量体の産生のための多数の戦略が開発されている（Bakker and Schumacher, Current Opinion in Immunology 2005, 17: 428-433に概説されている）。MHC多量体は、例えば、抗原特異的T細胞の検出及び精製に有用である。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAPに特異的なCD8⁺Tリンパ球を検出又は精製（単離、濃縮）するための方法を提供し、TAPで負荷された（共有的に又は非共有的に）MHCクラスI分子の多量体と細胞集団を接触させることと、MHCクラスI多量体によって結合されたCD8⁺Tリンパ球を検出又は単離することと、を含む。MHCクラスI多量体によって結合されたCD8⁺Tリンパ球は、既知の方法、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）又は

30

40

50

磁気活性化細胞選別 (MACS) を使用して単離され得る。

【0056】

また別の態様では、本開示は、細胞 (例えば、宿主細胞) を提供し、実施形態では、本明細書に記載の核酸、ベクター、又は本開示のプラスミド (すなわち、1つ以上のTAPをコードする核酸又はベクター) を含む単離された細胞を提供する。別の態様では、本開示は、本開示によるTAPに結合した又はそれを提示するMHCクラスI分子 (例えば、上に開示されたアレルのうちの1つのMHCクラスI分子) を発現する細胞を提供する。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞、細胞株又は不死化細胞である。別の実施形態では、細胞は、抗原提示細胞 (APC) である。一実施形態では、宿主細胞は、初代細胞、細胞株又は不死化細胞である。別の実施形態では、細胞は、抗原提示細胞 (APC) である。核酸及びベクターは、従来の形質転換又はトランスフェクション技術を介して細胞に導入することができる。「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、マイクロ注入、及びウイルス媒介性トランスフェクションを含む、外来核酸を宿主細胞に導入するための技術を指す。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションするための好適な方法は、例えば、Sambrook et al. (上記)、及び他の実験室マニュアルに見出すことができる。インビボで哺乳動物細胞に核酸を導入する方法も既知であり、遺伝子治療のために本開示のベクター又はプラスミドを対象に送達するために使用され得る。

10

20

【0057】

APCなどの細胞は、当該技術分野で既知の様々な方法を使用して、1つ以上のTAPで負荷され得る。本明細書で使用される場合、TAPで「細胞を負荷する」とは、TAPをコードするRNA若しくはDNA又はTAPが細胞にトランスフェクトされること、あるいは代替的に、APCがTAPをコードする核酸で形質転換されること、を意味する。また、細胞を、細胞表面 (例えば、ペプチドでパルスされた細胞) に存在するMHCクラスI分子に直接結合することができる外因性TAPと接触させることによって、細胞が負荷され得る。TAPはまた、MHCクラスI分子によるその提示を容易にするドメイン又はモチーフ、例えば、小胞体 (ER) 回収シグナル、C末端Lys-Asp-Glu-Leu配列に融合され得る (Wang et al., Eur J Immunol. 2004 Dec; 34 (12): 3582-94を参照されたい)。

30

【0058】

別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP (又は当該ペプチド (複数可) をコードする核酸) のうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせを含む、組成物又はペプチドの組み合わせ／プールを提供する。一実施形態では、組成物は、本明細書に定義されるTAPの任意の組み合わせ (2、3、4、5、6、7、8、9、10個、若しくはそれ以上のTAPの任意の組み合わせ)、又は当該TAPをコードする核酸の任意の組み合わせを含む。本明細書に定義されるTAPの任意の組み合わせ／部分的組み合わせを含む組成物が本開示に包含される。別の実施形態では、組み合わせ又はプールは、1つ以上の既知の腫瘍抗原を含んでもよい。

40

【0059】

したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP (例えば、配列番号1~39及び47~62) のうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせと、MHCクラスI分子 (例えば、上に開示されたアレルのうちの1つのMHCクラスI分子) を発現する細胞と、を含む、組成物を提供する。本開示において使用するためのAPCは、特定のタイプの細胞に限定されるものではなく、CD8⁺Tリンパ球によって認識されるように、それら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、及びB細胞などのプロフェッショナルAPCを含む。例えば、APCは、末梢血単球からDCを誘導し、次いで、インビトロ、エクスピボ、又はインビボのいずれかで、TAPに接触させる (刺激する) ことによって得る

50

ことができる。APCはまた、インビボでTAPを提示するように活性化され得（本開示のTAPのうちの1つ以上が対象に投与される）、TAPを提示するAPCは、対象の体内で誘導される。「APCを誘導する」又は「APCを刺激する」という語句は、細胞を、1つ以上のTAP又はTAPをコードする核酸と接触させるか又はそれらを負荷し、その結果、MHCクラスI分子によって細胞の表面においてTAPが提示されることを含む。本明細書に記載されるように、本開示によると、TAPは、例えば、TAPの配列を含むより長いペプチド／ポリペプチド（天然タンパク質を含む）を使用して間接的に負荷され得、次いで、APCの内部でプロセッシングされて（例えば、プロテアーゼによって）、細胞の表面にTAP／MHCクラスI複合体を生成する。APCをTAPで負荷し、APCにTAPを提示させた後、APCをワクチンとして対象に投与することができる。例えば、エキスピボ投与は、（a）第1の対象からAPCを採取するステップと、（b）ステップ（a）のAPCをTAPと接触させて／を負荷して、APCの表面においてMHCクラスI／TAP複合体を形成するステップと、（c）治療を必要とする第2の対象に、ペプチド負荷APCを投与するステップと、を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0060】

第1の対象及び第2の対象は、同じ対象（例えば、自己ワクチン）であってもよく、又は異なる対象（例えば、同種ワクチン）であってもよい。代替的に、本開示によると、抗原提示細胞を誘導するための組成物（例えば、医薬組成物）を製造するための本明細書に記載のTAP（又はその組み合わせ）の使用が提供される。加えて、本開示は、抗原提示細胞を誘導するための医薬組成物を製造するための方法又はプロセスを提供し、本方法又はプロセスが、TAP、又はその組み合わせを薬学的に許容可能な担体と混合又は配合するステップを含む。本明細書に定義されるTAPのうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせで負荷されたMHCクラスI分子（例えば、上記のHLA分子のうちのいずれか）を発現するAPCなどの細胞は、CD8⁺Tリンパ球、例えば、自己CD8⁺Tリンパ球を刺激／増殖するために使用され得る。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP（又はそれをコードする核酸若しくはベクター）、MHCクラスI分子を発現する細胞、及びTリンパ球、より具体的にはCD8⁺Tリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球を含む細胞集団）、のうちのいずれか1つ、又はそれらの任意の組み合わせを含む組成物を提供する。

【0061】

一実施形態では、組成物は、緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地（例えば、培養培地）を更に含む。更なる実施形態では、緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地は、薬学的に許容され得る緩衝液（複数可）、賦形剤（複数可）、担体（複数可）、希釈剤（複数可）及び／又は培地である。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容され得る緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地」は、生理学的に適合性があり、有効成分（複数可）の生物活性の有効性を妨げず、かつ対象に毒性でない、任意及び全ての溶媒、緩衝液、結合剤、潤滑剤、充填剤、増粘剤、崩壊剤、可塑剤、コーティング、バリア層製剤、潤滑剤、安定化剤、放出遅延剤、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤などが含まれる。医薬活性物質のためのそのような培地及び薬剤の使用は、当該技術分野で周知である（Rowe et al., Handbook of pharmaceutical excipients, 2003, 4th edition, Pharmaceutical Press, London UK）。任意の従来の培地又は薬剤が活性化化合物（ペプチド、細胞）と不適合である限りを除いて、本開示の組成物におけるそれらの使用が企図される。一実施形態では、緩衝液、賦形剤、担体、及び／又は培地は、天然に存在しない緩衝液、賦形剤、担体、及び／又は培地である。一実施形態では、本明細書に定義されるTAPのうちの1つ以上、又は当該1つ以上のTAPをコードする核酸（例えば、mRNA）は、脂質小胞又はリポソーム、例えば、カチオン性リポソーム（例えば、Vitor MT et al., Recent Pat Drug Deliv Formul. 2013 Aug; 7(2): 99-110を参照されたい）又は好適な他の担体内に含まれるか、又はそれと複合体化される。

【0062】

別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるTAP（例えば、配列番号1～39及び47～62）（又は当該ペプチド（複数可）をコードする核酸）のうちのいずれか1つ又は任意の組み合わせ、並びに緩衝液、賦形剤、担体、希釈剤、及び／又は培地のうちの1つ以上を含む組成物を提供する。細胞（例えば、APC、Tリンパ球）を含む組成物について、組成物は、生細胞の維持を可能にする好適な培地を含む。そのような培地の代表的な例としては、生理食塩水、Earlの緩衝塩類溶液（Life Technologies（登録商標））、又はPlasmaLyte（登録商標）（Baxter International（登録商標））が挙げられる。一実施形態では、組成物（例えば、医薬組成物）は、「免疫原性組成物」、「ワクチン組成物」又は「ワクチン」である。本明細書で使用される場合、「免疫原性組成物」、「ワクチン組成物」、又は「ワクチン」という用語は、1つ以上のTAP又はワクチンベクターを含み、対象に投与された場合、その中に存在する1つ以上のTAPに対して免疫応答を誘発することができる組成物又は配合物を指す。哺乳動物における免疫応答を誘導するためのワクチン又はワクチンベクターの使用は、ワクチン分野で既知の任意の従来の経路によって、例えば、粘膜（例えば、眼、鼻腔内、肺、経口、胃、腸、直腸、膺、又は尿路）表面を介して、非経口（例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、又は腹腔内）経路を介して、又は局所投与（例えば、パッチなどの経皮送達システムを介して）によって投与されるワクチン又はワクチンベクターを含む。一実施形態では、TAP（又はその組み合わせ）は、TAP（複数可）の免疫原性を増加させるために担体タンパク質にコンジュゲートされる（コンジュゲートワクチン）。したがって、本開示は、TAP（若しくはその組み合わせ）又はTAPをコードする核酸（若しくはその組み合わせ）と、担体タンパク質と、を含む組成物（コンジュゲート）を提供する。例えば、TAP（複数可）又は核酸（複数可）は、Toll様受容体（TLR）リガンド（例えば、Zomet al., Adv Immunol. 2012, 114:177-201を参照されたい）、又はポリマー／デンドリマー（例えば、Liu et al., Biomacromolecules. 2013 Aug 12; 14(8):2798-806を参照されたい）にコンジュゲートされ得るか、又はそれと複合体化され得る。一実施形態では、免疫原性組成物又はワクチンは、アジュバントを更に含む。「アジュバント」とは、抗原（本開示によるTAP、核酸、及び／又は細胞）などの免疫原性剤に添加された場合、混合物への曝露時に、宿主において薬剤に対する免疫応答を非特異的に増強又は強化する物質を指す。現在ワクチンの分野で使用されているアジュバントの例としては、（1）鉱物塩（リン酸アルミニウム及び水酸化アルミニウムなどのアルミニウム塩、リン酸カルシウムゲル）、スクアレン、（2）油ベースのアジュバント（油エマルション及び界面活性剤ベースの配合物など）、例えば、MF59（マイクロ流動化洗剤安定化水中油型エマルション）、QS21（精製サポニン）、AS02 [SBAS2]（水中油型エマルション+MPL+QS-21）、（3）粒子状アジュバント、例えば、ピロソーム（インフルエンザヘマグルチニンを組み込んだ単層リポソームビヒクル）、AS04（MPLを含む [SBAS4] アルミニウム塩）、ISCOMS（サポニン及び脂質の構造複合体）、ポリラクチドコグリコリド（PLG）、（4）微生物誘導体（天然及び合成）、例えば、モノホスホリルリピドA（MPL）、Detox（MPL + M. Phle i細胞壁骨格）、AGP [RC-529]（合成アシル化単糖類）、DC-Chol（リポソームへと自己構築することができるリポイド免疫促進物質）、OM-174（リピドA誘導体）、CpGモチーフ（免疫促進性CpGモチーフを含有する合成オリゴヌクレオチド）、改変LT及びCT（非毒性アジュバント効果を提供するために遺伝子修飾した細菌毒素免疫組織化体）、（5）内因性ヒト免疫調節剤、例えば、hGM-CSF又はhIL-12（タンパク質又はコードされるプラスミドのいずれかとして投与され得るサイトカイン）、Immudaptin（C3dタンデムアレイ）、及び／又は（6）金粒子などの不活性ビヒクルなどが挙げられる。

【0063】

一実施形態では、TAP（複数可）（例えば、配列番号1～39及び47～62）又は

それを含む組成物は、凍結乾燥形態である。別の実施形態では、TAP（複数可）又はそれを含む組成物は、液体組成物である。更なる実施形態では、TAP（複数可）は、組成物中に約0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度である。更なる実施形態では、TAP（複数可）は、組成物中において約0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約10、20、30、40、又は50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、又は約2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度である。

【0064】

本明細書に記載されるように、本明細書に定義されるTAPのうちのいずれか1つ、又はそれらの任意の組み合わせで負荷された又はそれらに結合されたMHCクラスI分子を発現するAPCなどの細胞は、インビボ又はエキスピボでCD8⁺Tリンパ球を刺激／増殖するために使用され得る。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載のMHCクラスI分子／TAP複合体と相互作用又は結合することができるT細胞受容体（TCR）分子、及びそのようなTCR分子をコードする核酸分子、及びそのような核酸分子を含むベクターを提供する。本開示によるTCRは、MHCクラスI分子に負荷される又はそれによって提示されるTAPと、好ましくはインビトロ又はインビボで生細胞の表面において、特異的に相互作用又は結合することができる。

【0065】

本明細書で使用されるTCRという用語は、可変結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通領域、及び短い細胞質尾部を有する免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーを指し（例えば、Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照されたい）、MHC受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合することができる。TCRは、細胞の表面に見出され得、一般に、 α 鎖及び β 鎖（それぞれTCR α 及びTCR β としても知られる）を有するヘテロ二量体からなる。免疫グロブリンと同様に、TCR鎖（例えば、 α 鎖、 β 鎖）の細胞外部分は、2つの免疫グロブリン領域、可変領域（例えば、TCR可変 α 領域又はV α 、及びTCR可変 β 領域又はV β ；典型的には、N末端におけるRabat番号付けに基づくアミノ酸1～116）と、細胞膜に隣接する1つの定常領域（例えば、TCR定常ドメイン α 又はC α 、及び典型的には、Rabatに基づくアミノ酸117～259、TCR定常ドメイン β 又はC β 、典型的には、Rabatに基づくアミノ酸117～295）と、を含有する。また、免疫グロブリンと同様に、可変ドメインは、フレームワーク領域（FR）によって分離された相補性決定領域（CDR、各鎖に3つ）を含有する。特定の実施形態では、TCRは、T細胞（又はTリンパ球）の表面に見出され、CD3複合体と会合する。

【0066】

TCR及び具体的には本開示のTCRをコードする核酸を適用して、例えば、Tリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球）又はMHCクラスI／TAP複合体を特異的に認識する新規のTリンパ球クローンを生成する他のタイプのリンパ球を、遺伝子的に形質転換／修飾することができる。特定の実施形態では、患者から得られたTリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球）は、TAPを認識する1つ以上のTCRを発現するように形質転換され、形質転換された細胞が、患者に投与される（自己細胞輸血）。特定の実施形態では、ドナーから得られたTリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球）は、TAPを認識する1つ以上のTCRを発現するように形質転換され、形質転換された細胞が、レシピエントに投与される（同種細胞輸血）。別の実施形態では、本開示は、TAP特異的TCRをコードするベクター又はプラスミドによって形質転換／トランスフェクトされたTリンパ球（例えば、CD8⁺Tリンパ球）を提供する。更なる実施形態では、本開示は、TAP特異的TCRで形質転換された自己細胞又は同種細胞で患者を治療する方法を提供する。特定の実施形態では、TCRは、例えば、CRI SPR、TALEN、ジnkフィンガー、又は他の標的化破壊システムを使用して、内因性遺伝子座（例えば、内因性TRAC及び／又はTRBC遺伝子座）を置き換えることによって、初代T細胞（例えば、細胞傷害性T

10

20

30

40

50

細胞)において発現される。

【0067】

一実施形態では、本開示による抗CSC TCRは、表3B(配列番号73~84)に示されるアミノ酸配列のうちの1つを含む相補性決定領域3(CDR3)を含むTCRペー

【0068】

タ(β)鎖を含む。
別の実施形態では、本開示は、上述のTCRをコードする核酸を提供する。更なる実施形態では、核酸は、上記のベクターなどのベクターに存在する。

【0069】

なお更なる実施形態では、がん(白血病、例えば、低分化がんなどのCSCの存在に

10

【0070】

関連するがん)の治療のための自己細胞又は同種細胞の製造におけるCSC腫瘍抗原特異的TCRの使用が提供される。
いくつかの実施形態では、本開示の組成物(例えば、医薬組成物)で治療される患者は、抗腫瘍剤及び/又は免疫療法(例えば、CAR療法)での治療の前又は後に治療される。本開示の組成物には、TAPに対してエキスピボで活性化された同種Tリンパ球(例えば、CD8⁺Tリンパ球)、TAPで負荷された同種若しくは自己APCワクチン、TAPワクチン、及び同種若しくは自己Tリンパ球(例えば、CD8⁺Tリンパ球)、又は腫瘍抗原特異的TCRで形質転換されたリンパ球が含まれる。本開示によるTAPを認識することができるTリンパ球クローンを提供するための方法は、対象(例えば、移植片レシ

20

【0071】

ピエント)、例えば、ASCT及び/又はドナーリンパ球輸注(DLI)レシピエントにおいて、TAPを発現する腫瘍細胞のために生成され得、それを特異的に標的化し得る。したがって、本開示は、TAP/MHCクラスI分子複合体を特異的に認識するか、又はそれに結合することができるT細胞受容体をコード及び発現するCD8⁺Tリンパ球を提供する。当該Tリンパ球(例えば、CD8⁺Tリンパ球)は、組換え(操作された)又は自然選択されたTリンパ球であり得る。したがって、本明細書は、本開示のCD8⁺Tリンパ球を産生するための少なくとも2つの方法を提供し、T細胞活性化及びT細胞増殖の誘発に資する条件下で、未分化リンパ球を(典型的には、APCなどの細胞の表面において発現される)TAP/MHCクラスI分子複合体と接触させるステップを含み、これは、インビトロ又はインビボで(すなわち、APCがTAPで負荷されるAPCワクチンを投与された患者において、又はTAPワクチンで治療された患者において)行うことができる。MHCクラスI分子に結合したTAPの組み合わせ又はプールを使用して、複数のTAPを認識することができるCD8⁺Tリンパ球の集団を生成することが可能である。代替的に、腫瘍抗原特異的Tリンパ球又は標的Tリンパ球は、MHCクラスI分子/TAP複合体(すなわち、操作又は組換えCD8⁺Tリンパ球)に特異的に結合するTCR(より具体的には、アルファ鎖及びベータ鎖)をコードする1つ以上の核酸(遺伝子)をクローニングすることによって、インビトロで、又はエキスピボで産生/生成することができる。本開示のTAP特異的TCRをコードする核酸は、当該技術分野で既知の方法を使用して、エキスピボでTAPに対して活性化されたTリンパ球から(例えば、TAPで負荷されたAPCにより)、又はペプチド/MHC分子複合体に対して免疫応答を示す個体

30

40

50

めの方法を提供する。一実施形態では、本方法は、免疫エフェクター細胞が本明細書に記載される1つ以上のTCRを発現するように、免疫エフェクター細胞、例えば、結腸直腸がん（例えば、結腸がん、直腸がん）を有する対象などの対象から単離された免疫エフェクター細胞をトランスフェクト又は形質導入することを含む。特定の実施形態では、免疫エフェクター細胞は、個体から単離され、更にインビトロで操作することなく遺伝子修飾される。そのような細胞は、次いで、個体に直接再投与することができる。更なる実施形態では、免疫エフェクター細胞は、最初に活性化され、インビトロで増殖するように刺激した後、TCRを発現するように遺伝子修飾される。これに関して、免疫エフェクター細胞は、遺伝子修飾される前又は遺伝子修飾された後に培養され得る（すなわち、本明細書に記載されるTCRを発現するように形質導入又はトランスフェクトされる）。

10

【0072】

本明細書に記載の免疫エフェクター細胞のインビトロ操作又は遺伝子修飾の前に、細胞源を、対象から得ることができる。特に、本明細書に記載されるTCRとともに使用するための免疫エフェクター細胞は、T細胞を含む。T細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺問題、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、いくつかの供給源から得ることができる。特定の実施形態では、T細胞は、FICOLL（商標）分離などの当業者に既知の任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液の単位から得ることができる。一実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエーシスによって得ることができる。アフエーシス生成物は、典型的には、リンパ球を含有し、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、及び血小板が含まれる。一実施形態では、アフエーシスによって採取された細胞は、洗浄して血漿画分を除去し、その後の処理のために細胞を適切な緩衝液又は培地中に入れることができる。本発明の一実施形態では、細胞は、PBSで洗浄される。代替の実施形態では、洗浄液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠いてもよく、又は全てではないが多くの二価カチオンを欠いてもよい。当業者によって理解されるであろうが、洗浄ステップは、例えば、半自動フロースルー遠心分離を使用することによって、当業者に既知の方法によって達成され得る。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性の緩衝液又は緩衝液を含む若しくは含まない他の生理食塩水に再懸濁され得る。特定の実施形態では、アフエーシス試料の望ましくない成分は、培地に直接再懸濁された細胞において除去され得る。特定の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって（例えば、PERCOLL（商標）勾配を介した遠心分離によって）、末梢血単核細胞（PBMC）から単離される。CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+、及びCD45RO+ T細胞などのT細胞の特定の亜集団は、ポジティブ又はネガティブ選択技術によって更に単離され得る。例えば、ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択された細胞に固有の表面マーカーを対象とする抗体の組み合わせによって達成することができる。本明細書で使用するための1つの方法は、負の磁気免疫付着又はフローサイトメトリーによる細胞選別及び／又は選択であり、これは、ネガティブ選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーを対象とするモノクローナル抗体のカクテルを使用する。例えば、ネガティブ選択によってCD8+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD4に対する抗体を含む。フローサイトメトリー及び細胞選別を使用して、本開示で使用するための目的の細胞集団を単離することもできる。PBMCは、本明細書に記載される方法を使用して、TCRによる遺伝子修飾のために直接使用することができる。特定の実施形態では、PBMCの単離後、Tリンパ球は更に単離され、特定の実施形態では、遺伝子修飾及び／又は増殖の前又は後のいずれかで、細胞傷害性Tリンパ球及びヘルパーTリンパ球の両方を、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜集団に選別することができる。

20

30

40

【0073】

本開示は、TAP（すなわち、細胞の表面において発現されたMHCクラスI分子に結合したTAP）、又はTAPの組み合わせによって、特異的に誘導、活性化、及び／又は

50

増幅（増殖）される単離された免疫細胞（例えば、 $CD8^+$ Tリンパ球）を提供する。本開示はまた、本開示によるTAP又はその組み合わせ（すなわち、MHCクラスI分子に結合した1つ以上のTAP）及び当該TAP（複数可）を認識することができる $CD8^+$ Tリンパ球を含む組成物を提供する。別の態様では、本開示は、本明細書に記載される1つ以上のMHCクラスI分子／TAP複合体を特異的に認識する $CD8^+$ Tリンパ球において濃縮された細胞集団又は細胞培養（例えば、 $CD8^+$ Tリンパ球集団）を提供する。そのような濃縮された集団は、本明細書に開示されるTAPのうちの1つ以上で負荷された（例えば、これらを提示する）MHCクラスI分子を発現するAPCなどの細胞を使用して、特異的Tリンパ球のエキスピボ増殖を行うことによって得ることができる。本明細書で使用される「濃縮」とは、集団中の腫瘍抗原特異的 $CD8^+$ Tリンパ球の比率が、天然細胞集団、すなわち、特定のTリンパ球のエキスピボ増殖のステップに供されていない集団と比較して有意に高いことを意味する。更なる実施形態では、細胞集団におけるTAP特異的 $CD8^+$ Tリンパ球の比率は、少なくとも約0.5%、例えば、少なくとも約1%、1.5%、2%、又は3%である。一部の実施形態では、細胞集団におけるTAP特異的 $CD8^+$ Tリンパ球の比率は、約0.5～約10%、約0.5～約8%、約0.5～約5%、約0.5～約4%、約0.5～約3%、約1%～約5%、約1%～約4%、約1%～約3%、約2%～約5%、約2%～約4%、約2%～約3%、約3%～約5%、又は約3%～約4%である。目的の1つ以上のMHCクラスI分子／ペプチド（TAP）複合体を特異的に認識する $CD8^+$ Tリンパ球で濃縮されたそのような細胞集団又は培養物（例えば、 $CD8^+$ Tリンパ球集団）は、以下に詳細に記載されるように、腫瘍抗原ベースのがん免疫療法において使用され得る。一部の実施形態では、TAP特異的 $CD8^+$ Tリンパ球の集団は、例えば、本明細書に定義されるTAP（複数可）で負荷された（共有的に又は非共有的に）MHCクラスI分子の多量体などの親和性に基づくシステムを使用して、更に濃縮される。したがって、本開示は、TAP特異的 $CD8^+$ Tリンパ球の精製又は単離された集団を提供し、例えば、TAP特異的 $CD8^+$ Tリンパ球の比率は、少なくとも約50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%である。

10

20

30

40

50

【0074】

別の態様では、本開示は、本明細書に定義されるHLA分子などのHLA分子に結合した本明細書に記載のTAPを含む複合体に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。そのような抗体は、一般的に、TCR様抗体と称される。本明細書で使用する用語「抗体又はその抗原結合フラグメント」は、所望の抗原特異性／結合活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト化抗体、CDR-グラフト抗体、キメラ抗体、及び抗体フラグメントを含むあらゆるタイプの抗体／抗体フラグメントを指す。抗体フラグメントは、全長抗体の一部、一般には抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvフラグメント、ダイアボディ、線形抗体、一本鎖抗体分子（例えば、一本鎖Fv、scFv）、単ドメイン抗体（例えば、ラクダ科由来）、サメNAR単ドメイン抗体、並びに抗体フラグメント、一本鎖ダイアボディ（scDb）、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）、二重親和性リターゲティング分子（DART）、二価scFv-Fc、及び三価scFv-Fcから形成された多重特異性抗体が挙げられる。抗体フラグメントは、V_H領域（V_H、V_H-V_H）、アンチカリン、ペプボディ、抗体-T細胞エピトープ融合体（トロイボディ）、又はペプボディなど、CDRや抗原結合ドメインを含む結合部位を指す場合もあるが、これらに限定されない。一実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、一本鎖抗体、好ましくは一本鎖Fv（scFv）である。一実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの定常ドメイン、例えば、軽鎖及び／若しくは重鎖の定常ドメイン、又はそのフラグメントを含む。更なる実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、抗体の定常重鎖のフラグメント結晶化可能な（Fc）フラグメントを含む。一実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、Fcフラグメント（scFv-Fc）を

含む s c F v である。一実施形態では、s c F v 成分は、リンカー、例えば、ヒンジによって F c フラグメントに接続される。F c 領域の存在は、腫瘍細胞に対する補体依存性細胞傷害性 (C D C) 又は抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) 応答を誘導するのに有用である。

【0075】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、二重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントなどの多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントであり、多重特異性抗体又は抗体フラグメントの抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つが、H L A 分子に結合した本明細書に記載の T A P を含む複合体を認識する。一実施形態では、多重特異性抗体又は抗体フラグメントの抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫細胞エフェクター分子を認識する。「免疫細胞エフェクター分子」という用語は、免疫細胞によって発現され、その多重特異性抗体又は抗体フラグメントによる係合が免疫細胞の活性化をもたらす分子 (例えば、タンパク質) を指す。免疫細胞エフェクター分子の例としては、C D 8⁺ T 細胞などの T 細胞における C D 3 シグナル伝達複合体、及び N K 細胞上の様々な活性化受容体 (N K G 2 D、K I R 2 D S、N K p 4 4 など) が挙げられる。更なる実施形態では、多重特異性抗体又は抗体フラグメントの抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つは、T 細胞 (例えば、抗 C D 3) 中の C D 3 シグナル伝達複合体を認識し、係合する。更なる実施形態では、多重特異性抗体又は抗体フラグメントは、一本鎖ダイアボディ (s c D b) である。更なる実施形態では、s c D b は、H L A 分子に結合した本明細書に記載される T A P を含む複合体に結合する第1の抗体フラグメント (例えば、s c F v) と、T 細胞内の C D 3 シグナル伝達複合体 (例えば、抗 C D 3 s c F v) などの免疫細胞エフェクター分子に結合し、係合する第2の抗体フラグメント (例えば、s c F v) と、を含む。そのような構築物は、例えば、多重特異性抗体又は抗体フラグメントによって認識される腫瘍抗原 / M H C 複合体を発現する腫瘍細胞の細胞傷害性 T 細胞媒介性殺傷を誘導するために使用され得る。抗体又はその抗原結合フラグメントは、C A R⁺ T 細胞、C A R⁺ N K 細胞などを産生するためのキメラ抗原受容体 (C A R) としても使用され得る。C A R は、所望の抗原 (例えば、M H C / T A P 複合体) に対して特異性を提供するリガンド結合ドメイン (例えば、抗体又は抗体フラグメント) を、T 細胞又は N K 細胞活性化ドメインなどの活性化細胞内ドメイン (又はシグナル伝達ドメイン) 部分と組み合わせ、一次活性化シグナルを提供する。腫瘍細胞によって発現される分子に結合することができる抗体、より具体的には s c F v の抗原結合フラグメントは、C A R におけるリガンド結合ドメインとして一般的に使用される。したがって、別の態様では、本開示は、本明細書に記載される抗体又は抗体フラグメント (例えば、s c F v) を発現する、宿主細胞、好ましくは T 細胞又は N K 細胞などの免疫細胞を提供する。

【0076】

本開示は、上記の免疫細胞 (C D 8⁺ T リンパ球、C A R⁺ T 細胞) 又は T A P 特異的 C D 8⁺ T リンパ球の集団を含む医薬組成物又はワクチンに更に関する。そのような医薬組成物又はワクチンは、上記のように、1つ以上の薬学的に許容され得る賦形剤及び／又はアジュバントを含み得る。

【0077】

本開示は、本開示による任意の T A P (例えば、配列番号 1 ~ 3 9 及び 4 7 ~ 6 2、好ましくは配列番号 1 ~ 3 9)、核酸、発現ベクター、T 細胞受容体、抗体 / 抗体フラグメント、細胞 (例えば、T リンパ球、A P C、C A R⁺ T 細胞)、及び／若しくは組成物、又はそれらの任意の組み合わせの、医薬品としての使用又は医薬品の製造における使用に更に関する。一実施形態では、医薬品は、がんの治療のためのものであり、例えば、がんワクチンである。本開示は、がんの治療における、例えば、がんワクチンとして使用するための、本開示による任意の T A P、核酸、発現ベクター、T 細胞受容体、抗体 / 抗体フラグメント、細胞 (例えば、T リンパ球、A P C)、及び／若しくは組成物 (例えば、ワクチン組成物)、又はそれらの任意の組み合わせに関する。本明細書で同定される T A P 配列は、i) 腫瘍患者に注射される腫瘍抗原特異的 T 細胞のインビトロ刺激及び増殖のた

めに使用される、及び／又は i i) がん幹細胞の存在に関連するがん、例えば、低分化がんに罹患している患者などの、がん患者における抗腫瘍 T 細胞応答を誘導若しくは増強するためのワクチンとして使用される、合成ペプチドの産生のために使用され得る。

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用される「がん幹細胞」(CSC)という用語は、固形腫瘍又は血液がん内に見出されるがん細胞の亜集団を指し、腫瘍の開始を駆動し、正常な幹細胞と関連する特徴、具体的には、自己再生及び複数の腫瘍細胞型への分化の能力を有する。CSCは、化学療法(多剤耐性)及び放射線療法に対して耐性を示すことが示されており、がんの再発及び転移と関連している。がん幹細胞は、特定のマーカーを発現する細胞を包含する。様々なタイプのがんにおけるCSCのマーカーの例を以下の表に示す(例えば、Walcher et al., "Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies", Front Immunol. 2020; 11:1280、Suster et al., "Presence and role of stem cells in ovarian cancer", World J Stem Cells. 2019 Jul 26; 11(7):383-397を参照されたい。)

10

20

30

40

50

【表 7】

異なるタイプのがんにおけるCSCマーカーの例

がんタイプ	CSC マーカー
肺がん	細胞表面:CD44(及びバリエント)、CD87、CD90、CD133、CD166、EpCAM 細胞内:ALDH、Nanog、Oct-3/4
CML	細胞表面:CD25、CD26、CD33、CD36、CD117、CD123、IL1RAP 細胞内:JAK/STAT、Wnt/ β -カテニン、FOXO、ヘッジホッグ/Smo/Gli2
乳がん	細胞表面:CD24、CD29、CD44(及びバリエント)、CD49f、CD61、CD70、CD90、CD133、CXCR4、EpCAM、LGR5、ProC-R 細胞内:ALDH、BMI-1、Nanog、Notch、Oct-3/4、Sox2、Wnt/ β -カテニン
胃がん	細胞表面:CD24、CD44(及びバリエント)、CD90、CD133、CXCR4、EpCAM、LGR5、LINGO2 細胞内:ALDH、Letm1、Musashi2、Nanog、Oct-3/4、Sox2
肝臓がん	細胞表面:CD24、CD44、CD90、CD133、EpCAM 細胞内:AFP、Nanog、Notch、Oct-3/4、Sox2、Wnt/ β -カテニン
結腸直腸がん	細胞表面:CD24、CD44、CD133、CD166、EpCAM、LGR5 細胞内:ALDH、Letm1、Nanog、Oct-3/4、Sall4、Sox2
AML	細胞表面:CD33、CD123、CLL-1、TIM3 細胞内:ALDH、Nanog、Oct-3/4、Sox2
卵巣がん	細胞表面:CD24、CD44、CD117、CD133、EpCAM、ROR1 細胞内:ALDH、Nanog、Ssea-4、Oct-4、Sox2、MYC
黒色腫	細胞表面:ネスチン、CD133
神経膠腫	細胞表面:ネスチン、CD133

10

20

30

【0079】

CSCは、多剤耐性(MDR)タンパク質(MRP)を発現又は過剰発現することも知られている。MRPは、ATP駆動エネルギーを使用して濃度勾配に対して広範囲の抗がん剤を排出する、ATP結合カセット(ABC)トランスポーターと呼ばれるタンパク質の群のCファミリーのメンバーである。最も一般的なMRPは、ABCサブファミリーCメンバー1(ABCC1/MRP1)、ABCサブファミリーCメンバー2(ABCC2/MRP2)、ABCサブファミリーCメンバー3(ABCC3/MRP3)、ABCサブファミリーCメンバー4(ABCC4/MRP4)、ABCサブファミリーCメンバー5(ABCC5/MRP5)、ABCサブファミリーCメンバー6(ABCC6/MRP6)、ABCサブファミリーCメンバー10(ABCC10/MRP7)、ABCサブファミリーCメンバー11(ABCC11/MRP8)、ABCサブファミリーCメンバー12(ABCC12/MRP9)、ABCサブファミリーBメンバー1(ABCB1、P-糖タンパク質(P-gp))としても知られている)、ABCサブファミリーBメンバー5(ABCB5)、及びABCサブファミリーGメンバー2(ABCG2)である。

40

50

【0080】

したがって、一実施形態では、本明細書に定義される方法及び使用は、上述のマーカのうちの1つ以上を発現するCSCを殺傷することを目的とする。

【0081】

がんは、CSC、例えば心臓肉腫、肺がん、小細胞肺がん（SCLC）、非小細胞肺がん（NSCLC）、気管支原性がん腫（扁平上皮細胞、未分化小細胞、未分化巨細胞、線がん）、肺胞（細気管支）がん腫、気管支腺腫、肉腫（例えば、ユーイング肉腫、カポジ肉腫）、リンパ腫、軟骨性過誤腫、中皮腫；胃腸系のがん、例えば、食道（扁平上皮細胞がん腫、線がん、平滑筋肉腫、リンパ腫）、胃（stomach）（がん腫、リンパ腫、平滑筋肉腫）、胃（gastric）、膵臓（管状線がん、インスリノーマ、グルカゴノーマ、ガストリノーマ、カルチノイド腫瘍、ピポーマ）、小腸（線がん、リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カポジ肉腫、平滑筋腫、血管腫、脂肪腫、神経線維腫、線維腫）、大腸（線がん、管状腺腫、絨毛腺腫、過誤腫、平滑筋腫）、尿生殖器管のがん、例えば、腎臓がん（線がん、ウィルムス腫瘍〔腎芽腫〕、リンパ腫、白血病）、膀胱及び／又は尿道がん（扁平上皮細胞がん腫、移行細胞がん腫、線がん）、前立腺がん（線がん、肉腫）、精巣がん（セミノーマ、奇形腫、胎児性がん腫、奇形がん腫、絨毛がん腫、肉腫、間質細胞がん腫、線維腫、線維腺腫、腺腫様腫瘍、脂肪腫）；肝臓がん、例えば、ヘパトーマ（肝細胞がん腫、HCC）、肝内胆管がん腫、肝芽腫、脈管肉腫、肝細胞腺腫、血管腫、膵内分泌腫瘍（褐色細胞腫、インスリノーマ、血管作用性小腸ペプチド腫瘍、膵島細胞腫瘍及びグルカゴノーマなど）；骨がん、例えば、骨形成性肉腫（骨肉腫）、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、軟骨肉腫、悪性リンパ腫（細網細胞肉腫）、多発性骨髄腫、悪性巨細胞腫瘍脊索腫、骨軟骨腫（osteochondroma）（骨軟骨性外骨症）、良性脊索腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、類骨骨腫及び巨細胞腫瘍；神経系のがん、例えば、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、頭蓋骨がん（骨腫、血管腫、肉芽腫、黄色腫、変形性骨炎）、髄膜（髄膜腫、髄膜肉腫、グリオマトーシス）、脳がん（星細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、上衣腫、胚腫〔松果体腫〕、多形性膠芽細胞腫、乏突起膠腫、シュワン細胞腫、網膜芽細胞腫、先天性腫瘍）、脊髓神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、肉腫）；生殖系のがん、例えば、婦人科系のがん、子宮がん（子宮内膜がん腫）、子宮頸部（子宮頸部がん腫、前腫瘍子宮頸部異形成）、卵巣がん（卵巣がん腫〔漿液性嚢胞腺腫、粘液嚢胞腺がん、未分化がん腫〕、顆粒膜卵胞膜細胞腫瘍、セルトリ・ライディッヒ細胞腫瘍、未分化胚細胞腫、悪性奇形腫）、外陰がん（扁平上皮細胞がん腫、上皮内がん腫、線がん、線維肉腫、黒色腫）、陰がん（明細胞がん腫、扁平上皮細胞がん腫、ブドウ状肉腫（胎児性横紋筋肉腫）、卵管がん（がん腫））；胎盤がん、陰茎がん、前立腺がん、精巣がん；血液系のがん、例えば、血液がん（急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、骨髄増殖性疾患、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群）、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫〔悪性リンパ腫〕）；口腔のがん、例えば、口唇がん、舌がん、歯肉がん、口蓋がん、中咽頭がん、鼻咽頭がん、顎洞がん；皮膚がん、例えば、悪性黒色腫、皮膚黒色腫、基底細胞がん腫、扁平上皮細胞がん腫、カポジ肉腫、黒子性異形成母斑（moles dysplastic nevi）、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、及びケロイド；副腎がん：神経芽腫；及び結合組織及び軟組織、後腹膜腔及び腹膜を含む他の組織のがん、眼がん、眼球黒色腫、及び付属器、乳がん（例えば、乳管がん）、頭部及び／又は頸部のがん（頭頸部扁平上皮細胞がん腫）、肛門がん、甲状腺がん、副甲状腺がん；リンパ節の二次及び特定不能の悪性新生物、呼吸器系及び消化器系の二次悪性新生物、並びに他の部位の二次悪性新生物を含む、任意の組織又は器官に影響を及ぼす腫瘍であり得る。一実施形態では、がんは、白血病（例えば、AML）、脳がん（例えば、膠芽腫）、乳がん、結腸がん、肝臓がん（例えば、肝細胞がん腫）、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、又は骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）である。

【0082】

一実施形態では、本明細書に定義される方法及び使用は、予後不良のがんの治療を目的

10

20

30

40

50

とする。本明細書で使用される「予後不良のがん」という用語は、同じがんの他のサブタイプ（複数可）と比較して、より低い生存率（例えば、5年生存率又は10年生存率）に関連する所与のがんのサブタイプを指す。予後不良のがんは、一般に、がんのサブタイプの特定の特性、例えば、特定の変異、染色体の異常などの存在に関連しており、これにより、治療に対する耐性が高くなる。予後不良は、後期ステージで診断されたがん（例えば、遠隔転移を伴う）にも関連している。また、上記のように、高いCSC頻度は、いくつかのがんにおいて、治療に対する応答が悪く、生存率が低いことと相関することが示されてきた。例えば、乳がんの場合、トリプルネガティブ乳がん（TNBC）は、他の乳がんサブタイプと比較して低い5年相対生存率と関連するため、予後不良の乳がんとみなされる。また、高レベルの循環がん幹細胞（cCSC）は、化学療法に対する低い腫瘍応答率、及び乳がん患者における全体生存率及び無増悪生存率の低下と関連している（Lee, Chet al., BMC Cancer 19, 1167 (2019)）。卵巣がんの場合、浸潤性上皮性卵巣がん及び卵管がんは、一般に、卵巣間質腫瘍及び生殖細胞腫瘍と比較して低い5年相対生存率と関連している。膵臓がんの5年間の全体生存率は非常に低く（約3%）、これは一部に、患者の半数超が進行期で診断されているためである。ステージIII/IVでの膵臓がん（遠隔転移を伴う）の診断は、非常に不良な予後と関連している。同様に、前立腺がんの場合、ステージIV（遠隔転移を伴う）での診断は、予後不良と関連する（ステージI~IIIでの診断の少なくとも80~85%と比較して、5年相対生存率が30%未満）。肺がんの場合、小細胞肺がんは、特に後期ステージで診断された場合（例えば、局所転移又は遠隔転移を伴う）、特に予後不良と関連している。後期ステージで診断された非小細胞肺がん（例えば、遠隔転移を伴う）もまた、予後不良と関連している。結腸直腸がんにおいて、粘液性腺がん（細胞外ムチンの豊富な存在を特徴とする）は、化学療法に対する応答の低下及び予後不良と関連している。腹膜障害及びBRAF変異もまた、結腸直腸がんの不良な予後マーカーを構成する。腎臓がんの場合、透明細胞RCCは、乳頭状RCCよりも悪い転帰（例えば、低い5年相対生存率）と関連している。皮膚がんでは、より厚い腫瘍、リンパ節の関与、及び後期ステージでの診断（例えば、局所転移又は遠隔転移を伴う）は、黒色腫における生存率の低下と関連している。Nestin及びCD133の発現は、黒色腫及び神経膠腫における不良な転帰と関連している。

10

20

30

40

50

【0083】

一実施形態では、予後不良がんは、ステージIII/IVがんである。別の実施形態では、予後不良のがんは、CSCの数又は頻度が高い、すなわち、同じタイプのがん（例えば、卵巣がん、乳がん）におけるCSCの平均数又は頻度よりも高いCSCの数又は頻度を有するがんである。一実施形態では、CSCの数又は頻度は、同じタイプのがんにおけるCSCの平均数又は頻度よりも、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%（2倍）、200%（3倍）、300%（4倍）、又は400%（5倍）である。

【0084】

一実施形態では、予後不良がんは、60%未満の5年相対生存率を有するがんである。一実施形態では、予後不良がんは、50%未満の5年相対生存率を有するがんである。一実施形態では、予後不良がんは、40%未満の5年相対生存率を有するがんである。一実施形態では、予後不良がんは、30%未満の5年相対生存率を有するがんである。一実施形態では、予後不良がんは、20%未満の5年相対生存率を有するがんである。一実施形態では、予後不良がんは、10%未満の5年相対生存率を有するがんである。一実施形態では、予後不良がんは、5%未満の5年相対生存率を有するがんである。

【0085】

別の態様では、本開示は、対象において、CSCの存在と関連するがんなどのがんを治療するためのワクチンとしての、本明細書に記載のTAP（例えば、配列番号1~39及び47~62、好ましくは配列番号1~39）、又はその組み合わせ（例えば、ペプチドプール）の使用を提供する。本開示はまた、対象において、リンパ芽球性白血病などのが

んを治療するためのワクチンとして使用するための、本明細書に記載のTAP、又はその組み合わせ（例えば、ペプチドプール）を提供する。一実施形態では、対象は、TAP特異的CD8⁺Tリンパ球のレシピエントである。したがって、別の態様では、本開示は、がんを治療する（例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷する）方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象に、有効量の、（APCなどの細胞の表面に発現される）1つ以上のMHCクラスI分子／TAP複合体を認識する（すなわち、それらに結合するTCRを発現する）CD8⁺Tリンパ球を投与（注入）することを含む。一実施形態では、本方法は、当該CD8⁺Tリンパ球の投与／注入後、当該対象に、有効量のTAP若しくはその組み合わせ、及び／又はTAP（複数可）で負荷されたMHCクラスI分子（複数可）を発現する細胞（例えば、樹状細胞などのAPC）を投与することを更に含む。また更なる実施形態では、本方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の1つ以上のTAPで負荷された樹状細胞を投与することを含む。なお更なる実施形態では、本方法は、それを必要とする患者に、治療有効量の、MHCクラスI分子によって提示されるTAPに結合する組換えTCRを発現する同種又は自己細胞を投与することを含む。

10

【0086】

別の態様では、本開示は、対象においてがんを治療する（例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷する）ための、TAP又はその組み合わせで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を認識するCD8⁺Tリンパ球の使用を提供する。別の態様では、本開示は、対象において、リンパ芽球性白血病などのがんを治療するための（例えば、腫瘍細胞の数を低減し、腫瘍細胞を殺傷するための）医薬品の調製／製造のための、TAP又はその組み合わせで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を認識するCD8⁺Tリンパ球の使用を提供する。別の態様では、本開示は、対象において、リンパ芽球性白血病などのがんの治療に使用するための（例えば、腫瘍細胞の数を低減する、腫瘍細胞を殺傷するための）、TAP又はその組み合わせで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を認識するCD8⁺Tリンパ球（細胞傷害性Tリンパ球）を提供する。更なる実施形態では、本使用は、当該TAP特異的CD8⁺Tリンパ球の使用後、有効量のTAP（若しくはその組み合わせ）、及び／又はTAPで負荷された（これを提示する）1つ以上のMHCクラスI分子を発現する細胞（例えば、APC）の使用を更に含む。

20

【0087】

本開示はまた、対象において本明細書に開示されるTAP（例えば、配列番号1～39及び47～62、好ましくは配列番号1～39）のうちのいずれか、又はその組み合わせで負荷されたヒトクラスI MHC分子を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を作成する方法を提供し、この方法は、TAP又はTAPの組み合わせで負荷されたクラスI MHC分子を特異的に認識する細胞傷害性Tリンパ球を投与することを含む。本開示はまた、TAP又はその組み合わせで負荷されたヒトクラスI MHC分子を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するための、本明細書に開示されるTAPのうちのいずれか又はTAPの組み合わせで負荷されたクラスI MHC分子を特異的に認識する細胞傷害性Tリンパ球の使用を提供する。

30

【0088】

一実施形態では、本明細書に記載の方法又は使用は、治療／使用の前に、患者によって発現されるHLAクラスIIアレルを判定することと、患者によって発現されるHLAクラスIIアレルのうちの1つ以上に結合するTAPを投与又は使用することと、を更に含む。例えば、患者がHLA-A2*01及びHLA-B15*03を発現すると判定された場合、（i）配列番号3、6、26、30、31、39、53、55、及び／又は58のTAP（HLA-A2*01に結合するもの）と、（ii）配列番号2、7、11、12、15、22、29、36、38、47、48、及び／又は59のTAP（HLA-B15*03に結合するもの）との任意の組み合わせが、患者に投与又は使用され得る。

40

【0089】

一実施形態では、本開示によるTAP、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、抗体／抗

50

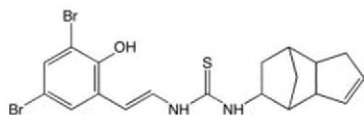
体フラグメント、細胞（例えば、Tリンパ球、CAR T若しくはNK細胞、APC）、及び／又は組成物、あるいはそれらの任意の組み合わせは、がんを治療するために、1つ以上の追加の活性剤又は療法、例えば、化学療法（例えば、ビンカアルカロイド、微小管形成を妨げる薬剤（例えば、コルヒチン及びその誘導体）、抗血管新生剤、治療用抗体、EGFR標的化剤、チロシンキナーゼ標的化剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、遷移金属錯体、プロテアソーム阻害剤、代謝拮抗剤（例えば、ヌクレオシド類似体）、アルキル化剤、白金系薬剤、アントラサイクリン抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、マクロライド、レチノイド（例えば、全てのトランスレチノイン酸又はその誘導体）、ゲルダナマイシン又はその誘導体（17-AAG）、CDK4／6、TGF-β、WNT-β-カテニン、MYC、若しくはPI3Kの阻害剤、手術、免疫チェックポイント阻害剤又は免疫療法剤（例えば、抗PD-1／PD-L1抗体などのPD-1／PD-L1阻害剤、抗CTLA-4抗体などのCTLA-4阻害剤、抗B7-1／B7-2抗体などのB7-1／B7-2阻害剤、抗TIM3抗体などのTIM3阻害剤、抗BTLA抗体などのBTLA阻害剤、抗CD47抗体などのCD47阻害剤、抗GITR抗体などのGITR阻害剤）、腫瘍抗原に対する抗体（例えば、抗CD19、抗CD22抗体）、細胞ベースの療法（例えば、CAR T細胞、CAR NK細胞）、並びにIL-2、IL-7、IL-21、及びIL-15などのサイトカインと組み合わせて使用することができる。一実施形態では、本開示によるTAP、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、細胞（例えば、Tリンパ球、APC）、及び／又は組成物は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与／使用される。一実施形態では、本開示によるTAP、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、細胞（例えば、Tリンパ球、APC）、及び／又は組成物は、CDK4／6、TGF-β、及び／又はWNT-β-カテニンの阻害剤と組み合わせて投与／使用される。いくつかのCDK4／6阻害剤は、Palbociclib（PD-0332991、Ibrance）、Ribociclib（LEE-011、Kisqali）、Abemaciclib（LY2835219、Verzenio）、SHR6390、及びTrilaciclib（G1T28）を含む臨床試験中である。TGF-βの阻害剤としては、AP12009（Trabectedin）及びISTH0036などのアンチセンス阻害剤、GC1008（Fresolimumab）、LY2382770、及びP144などの抗体及びリガンドトラップ、Belagenpumatucel-L（Lucanix（商標））などのTGF-β経路を標的とするワクチン、並びにLY2157299（Galunisertib）及びTEW-7197などの低分子阻害剤が挙げられる。WNT-β-カテニン経路の阻害剤としては、アミノ酸飢餓因子（アスパラギナーゼ）、GSK3阻害剤、C2（

10

20

30

【化1】



）、WNT974、ETC-1922159、RXC004、CGX1321、OTS A101-DTPA-90Y、Vantictumab（OMP-18R5）、Ipafricept（OMP-54F28）、PRI-724、SM08502、分泌型frizzled関連タンパク質／ペプチド、及びタンキラーゼ阻害剤（XAV939、JW-55、RK-287107、及びG007-LK）が挙げられる。

40

【0090】

追加の療法は、本開示による、TAP、核酸、発現ベクター、T細胞受容体、抗体／抗体フラグメント、細胞（例えば、Tリンパ球、CAR T若しくはNK細胞、APC）、及び／又は組成物の投与前、投与と同時、又は投与後に投与され得る。

【実施例】

【0091】

50

本開示は、以下の非限定的な実施例によって更に詳細に例示される。

【0092】

実施例1：材料及び方法

ヒトiPSC培養

OCT4、SOX2、KLF4、及びc-MYCを発現する欠陥のあるポリシストロンレトロウイルスを使用して、成人男性ヒト皮膚線維芽細胞に由来するhiPSC22細胞を、Takara Bio (CellartisヒトiPS細胞株22) から得た。hiPSC22細胞を、製造業者の指示に従って、コーティングされた (Cellartis DEF-CS 500 COAT-1、Takara Bio) 細胞培養容器上の添加剤を含むCellartis (登録商標) DEF-CS (商標) 500基底培地 (Takara Bio) 中で培養した。Fibro-iPSC. 1及びFibro-iPSC. 2細胞は、(Hong et al., 2011) に従って、OCT4、SOX2、NANOG、及びLIN28を発現するレンチウイルスを使用して、成人女性ヒト皮膚線維芽細胞から再プログラムされた同じiPS細胞株の生物学的複製物であり、Mick Bathia博士 (McMaster University, Ontario, Canada) によって提供された。製造業者の指示に従って、mTeSR1培地 (STEMCELL) 中のMatrigel (登録商標) (Corning、GibcoのDMEM/F-12で希釈) でコーティングした細胞培養容器上で、Fibro-iPSC. 1及びFibro-iPSC. 2を培養した。全てのiPSCを、Gentle Cell Dissociation Reagent (STEMCELL) を使用して継代したか、又はTrypLE Express (Gibco) を使用して単一の細胞に解離し、下流分析のためにDPBS (Gibco) で洗浄した。RNA-seqについては $3 \sim 5 \times 10^6$ 個のiPSC、フローサイトメトリーについては 5×10^6 個の細胞を除去した後、iPSCをペレット化し、MS分析まで -80°C で保存した。IFN- γ 処理試料について、iPSCを、収集前に72時間、 40 ng/mL の最終濃度の組換えヒトIFN- γ (Gibco) で処理した。MS分析は、各画分について、以下のように、iPS細胞株当たり2つの画分に対して行った：未処理のFibro-iPSC. 1及びFibro-iPSC. 2については 250×10^6 細胞、未処理のhiPSC22については 375×10^6 細胞、及び全てのIFN- γ 処理iPSC試料については $100 \sim 125 \times 10^6$ 細胞。

10

20

30

【0093】

フローサイトメトリー分析

製造業者の指示に従って、単一細胞懸濁液を、PeCP-Cy5. 5マウス抗Oct3/4、PEマウス抗SSEA-1、Alexa Fluor 647マウス抗SSEA-4抗体又はそれぞれのアイソタイプ (ヒト及びマウス多能性幹細胞分析キット、BD Biosciences)、APC/シアニン7抗ヒト/マウスSSEA-3 (BioLegend) 又はAPC-Cy (商標) 7ラットIgM、 κ アイソタイプ対照 (BD Biosciences) で染色した。製造業者の指示に従って、QIFIKIT (FITCコンジュゲート、Agilent Dako) を使用して、表面HLA-A、B、C分子を定量した。フローサイトメトリー実験をZE5 (Bio-Rad) 上で実施し、FlowJoソフトウェアを使用してデータを分析した。

40

【0094】

RNA抽出及び配列決定

総RNA抽出は、TRIzol (商標) (Invitrogen) を使用して行い、 3×10^6 Fibro-iPSC. 2及びFibro-iPSC. 2 __ IFN細胞から、並びに他の全ての試料については 5×10^6 細胞からRNeasy Microキット (QIAGEN) を用いて更に精製した。RNA定量化は、QuBIT (Life Technologies) を使用して実施し、RNA品質は、Bioanalyzer Nano (Agilent) を使用して評価し、全ての試料は、10のRNA整合性番号を有した。cDNAライブラリー調製は、hiPSC22 __ IFNについては 1000 ng のR

50

NAを使用し、他の全ての試料については4000ngのRNAを使用して、ポリA捕捉を有するKAPA Hyperprep RNAseq鎖キット(KAPA)を使用して行った。hiPSC22_IFN及び他の全てのiPSC試料について、それぞれ9回及び7回のPCRサイクルをライブラリー増幅に使用した。QuBitによってライブラリーを定量化し、BioAnalyzer DNA1000で平均ライブラリー長を評価した。全てのライブラリーを10nMに希釈し、KAPAライブラリー定量キット(KAPA)を使用してqPCRによって正規化した。ライブラリーをプールして、等モル濃度にした。Illumina Nextseq500を用い、2pMのプールされたライブラリーを使用して、Nextseq High Output 150サイクル(hiPSC22及びhiPSC22_IFNについては2×80bp、他の全てのiPSCについては2×75bp)を使用して配列決定を実施した。(MSデータベース生成のためにプールされた3つの技術的反復において)hiPSC22試料当たり約180×10⁶個のペアエンドリードを生成し、hiPSC22_IFNについては360×10⁶個のペアエンドリードを生成し、他の全てのiPSC試料については230×10⁶個のペアエンドリードを生成した。ライブラリー調製及び配列決定は、Institute for Research in Immunology and Cancer(IRIC) Genomics Platformで行った。

10

【0095】

ショットガン質量分析のためのデータベース生成

個別化された正準プロテオームの生成。これは、以前に記載されたように実施した(Laumont et al., 2018)。簡潔に、RNA-seqリードは、Trimomatic v0.35を使用してトリミングされ、STAR v2.5.1b(Dobin et al., 2013)を使用してGRCh38.88に整列され、--alignSJoverhangMin、--alignMatesGapMax、--alignIntronMax、及び--alignSJstitchMismatchNmaxパラメータを除いてデフォルトパラメータで実行され、bamファイルを生成するために、デフォルト値がそれぞれ10、200,000、200,000、及び「5-15 5」に置き換えられた。最小代替カウント設定が5である単一塩基変異を、freeBayes v1.0.2-16-gd466dde(Garrison and Marth, 2012)を使用して特定した。転写産物の発現は、デフォルトパラメータを用いて、kallisto v0.43.0を用いて、100万個当たりの転写産物数(tpm)で定量化した。最後に、pyGeno(Daouda et al., 2016)を使用して、高品質の試料特異的一塩基変異(freeBayes品質>20)を参照エキソームに挿入し、発現した転写産物(tpm>0)によって生成された既知のタンパク質の試料特異的配列をエクスポートして、個別化された正準プロテオームのfastaファイルを生成した。

20

30

【0096】

iPSC及びmTEC k-merデータベースの生成。これは、以下の例外を除いて、以前に記載されているように実施した(Laumont et al., 2018)。6つのmTECの代わりに、8つのmTEC試料(GEOアクセッションGSE127825、GSE127826)を使用し、mTECで許容され得るk-merの出現は、0ではなく1であった(概略図については、以下、図1Aを参照されたい)。簡潔に、各試料のR1及びR2 fastqファイルを、上で報告したようにトリミングし、逆マッピングリード(IFN-γの有無に関わらず、hiPSC22のR1、及びFibro-iPSC.1及びFibro-iPSC.2のR2)を、FASTX-Toolkit v0.0.14のfastx_reverse_complement関数を使用して逆相補化した。k-merデータベース(24又は33長)を、Jellyfish v2.2.3(Marcais and Kingsford, 2011)を使用して生成した。各iPSC試料について、単一のk-merデータベースを生成し、一方、8つのmTEC試料を、それらのfastqファイルを連結することによって、固有のデータベース

40

50

で組み合わせた。k-merアセンブリの持続時間は3000万k-merを超えて指数関数的に増加するため、各iPSCの33ヌクレオチド長k-merデータベースを、アセンブリステップの最大3000万k-merに到達するために、出現時の試料特異的閾値（所与のk-merがデータベースに存在する回数）に基づいてフィルタリングした。このフィルタリングの後、mTEC k-merデータベースに2回以上存在するk-merを各試料データベースから除去し、残りのk-merを、当施設で開発されたソフトウェアであるNEKTARを用いてコンティグにアセンブリした。簡潔に、提示された33ヌクレオチド長のk-merのうちの1つを、同じ鎖上に32ヌクレオチドが重複する連続するk-merを有する両端から伸長するシードとして、ランダムに選択する（-rオプションを無効化し、k-merの鎖状セットを使用した）。アセンブリプロセスは、k-merをアセンブリすることができない場合又は複数のk-merが適合する場合のいずれかで停止する（線形アセンブリ用の-a 1オプション）。次いで、新しいシードが選択され、提示されたリストから全てのk-merが一度使用されるまで、アセンブリプロセスが再開される。最後に、コンティグを、当施設のpythonスクリプトを使用して3フレーム翻訳し、アミノ酸配列を内部停止コドンで分割し、得られたサブ配列を、各試料のそれぞれの個別化された正準プロテオームと連結した。

10

【0097】

MHC 関連ペプチドの単離

W6/32抗体（BioXcell）を、スラリーのmL当たり1mgの抗体の比で、PureProteomeタンパク質A磁気ビーズ（Millipore）を用いて、PBS中で、室温で60分間培養した。（Lamoliatte et al., 2017）に記載されるジメチルビメリデートを使用して、抗体を磁気ビーズに共有結合的に架橋した。ビーズを、PBS（pH 7.2）中に4℃で保存した。凍結したhiPSC22ペレットを解凍し、最大1mLのPBS（pH 7.2）に再懸濁し、PBS（pH 7.2）を含有する1mLの洗浄剤緩衝液、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma）を補充された1%（w/v）のCHAPS（Sigma）を添加することによって可溶化した。凍結したFibro-iPSC.1及びFibro-iPSC.2ペレットを解凍し、最大1mLのPBS（pH 7.2）に再懸濁し、0.5%（w/v）のデオキシコール酸ナトリウム（Thermo Fisher）/0.4mMのヨードアセトアミド（Sigma）/2%（w/v）のオクチルβ-D-グルコピラノシド（Sigma）/プロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma）を補充した2mMのEDTA（Promega）を含有する1mLの洗浄剤緩衝液を添加することによって可溶化した。可溶化細胞ペレットを、4℃で転回させながら60分間インキュベートし、次いで、16600xgで20分間、4℃で遠沈した。上清を、1試料当たり1mgのW6/32抗体共有結合架橋タンパク質A磁気ビーズを含有する新しいチューブに移し、4℃で転回させながら180分間インキュベートした。試料を磁石の上に置いて、磁気ビーズに結合したMHC I複合体を回収した。磁気ビーズを、最初に8×1mLのPBSで、次いで1×1mLの0.1X PBSで、最後に1×1mLの水で洗浄した。0.2%のギ酸（FA）を使用した酸処理によって、MHC I複合体を磁気ビーズから溶出させた。任意の残存する磁気ビーズを除去するために、溶出液を、2.0mLのCostar mL Spin-X遠心分離管フィルター（0.45μm、Corning）に移し、855xgで2分間遠沈した。2つの直径1mmのオクタデシル（C-18）固相抽出ディスク（EMPORE）で充填された自家製のステージチップを使用して、ペプチドを含有する濾液をMHC Iサブユニット（HLA分子及びβ-2マクログロブリン）から分離した。ステージチップを、最初にメタノールで、次いで、0.2%のトリフルオロ酢酸（TFA）中の80%のアセトニトリル（ACN）で、最後に、0.2%のFAで予め洗浄した。試料を、ステージチップに負荷し、0.2%のFAで洗浄した。0.1%のTFA中の30%のACNでペプチドを溶出させ、真空遠心分離を使用して乾燥させ、次いで、MS分析まで-20℃で保存した。

20

30

40

【0098】

質量分析

50

乾燥ペプチド抽出物を、4%のギ酸に再懸濁し、自家製C18分析カラム（C18 Jupiter Phenomenexを充填した15 cm×150 μm内径）に負荷し、Easy LC IIシステム上で、0%から30%へのアセトニトリル（0.2%のギ酸）の56分間の勾配（hiPSC22、hiPSC22__IFN）又は106分間の勾配（他の全ての試料）及び600 nL／分の流量を用いた。試料を、1.6 kVのNanospray 2源を有する陽イオンモードで、Q-ExactiVe HF質量分析計（Thermo Fisher Scientific）で分析した。60,000分解能で取得された各完全MSスペクトルの後に、20個のMS／MSスペクトルが続き、30,000の分解能、 2×10^4 の自動ゲイン制御ターゲット、100 msの注入時間（hiPSC22__IFN）又は800 ms（他の全ての試料）、及び25%の衝突エネルギーを有するMS／MS配列決定のために最も豊富な多価イオンを選択した。

10

【0099】

バイオインフォマティクス分析

全ての分析は、トリミングされたデータ上で実施され、全ての整列は、特に別途言及しない限り、前のセクションで説明したように、GRCh38.88ゲノムバージョン上のSTARを用いて行われた。

【0100】

MAPの同定。全ての液体クロマトグラフィー（LC）-MS／MS（LC-MS／MS）データは、PEAKS 10.5（Bioinformatics Solutions Inc.）を使用して関連データベースに対して検索した。ペプチドの同定については、前駆イオン及びフラグメントイオンの許容度をそれぞれ10 ppm及び0.01 Daに設定した。酸化（M）及び脱アミド化（NQ）の発生を、可変修飾として設定した。ペプチドの同定後、我々は、デコイヒットの数とスコア閾値を上回る標的ヒットの数との間の比として計算される1%の偽発見率（FDR）を確実にするために、PEAKSに組み込まれた修正標的-デコイアプローチを使用して、PEAKSスコアに試料特異的閾値を適用した。各試料の1% FDRに対応するPEAKSスコアは、以下の通りであった：14（hiPSC22）、15（hiPSC22__IFN）、15（Fibro-iPSC.1）、14（Fibro-iPSC.1__IFN）、16（Fibro-iPSC.2）、14（Fibro-iPSC.2__IFN）。閾値を超えたペプチドを、以下の基準に一致するように更にフィルタリングした：8～11アミノ酸のペプチド長、NetMHCpan-4.0に基づいた試料のHLAアレルへの結合親和性ランク<2%（Jurtz et al., 2017）（図1A）。これらのフィルタリングステップは、MAPDPを使用して行った（Courcelles et al., 2020）。

20

30

【0101】

paMAPの同定。paMAP候補を同定するために、各MAP及びそのコード配列を、以前に記載されているように、それぞれ、関連するiPSC及びmTEC正準プロテオーム又はiPSC及びmTEC 24ヌクレオチド長k-merデータベースで照会した（Laumont et al., 2018）。mTEC正準プロテオーム内にMAPが見出されなかった場合、又は所与のMAPの全ての可能なMAPコード配列（MCS）が、i)mTEC内で2 KPHM（1億リード当たりのMCSの24ヌクレオチド長k-merセットの最小出現）未満で発現された場合、及びii)mTECと比較してiPSCにおいて10以上のKPHM倍率変化を有した場合、MAPをpaMAP候補として保持した。

40

【0102】

ロイシン及びイソロイシンのバリエーションは、標準的なMSアプローチによって区別できないため、既存のバリエーションが非paMAP候補としてフラグ付けされたpaMAP候補は、バリエーションよりも高いRNA発現を有しない限り、破棄した。paMAP候補のゲノム位置は、IGV（Robinson et al., 2011）及びBLAT（UCSCゲノムブラウザからのツール）を使用して、参照ゲノム上のそれらのコード配列を含むマッピングリードによって割り当てた。（UCSCゲノムブラウザ内の）Repea

50

tMaskerを使用して、EREとの重複を検証した。

【0103】

p a M A P 候補のRNA発現は、以前に記載されているように (E h x e t a l . , 2021)、G T E x、m T E C、及び成体幹細胞 (A S C) 試料 (図1A、下記M A PのRNA発現のセクションにおける詳細を参照されたい) のRNA-seqにおいて評価された。既知の生殖細胞系多型 (d b S N P 149) に対応しないM C S中のヌクレオチドバリエーションを含有するp a M A P 候補は、変異M A Pとして分類され、分析から破棄された。少なくとも1つのM C Sが参照ゲノムに首尾よく整列された全てのM A Pを保持した。G T E x 試料及びA S CにおけるRNA発現フィルターを通過したp a M A P 候補 (図1AのM A Pアノテーションを参照されたい) は、p a M A Pとみなされた。G T E x 及びm T E C 試料におけるRNA発現フィルターを通過したが、A S Cでは通過しなかったp a M A P 候補は、s a M A Pとみなされた。

10

【0104】

M A PのRNA発現。p a M A P 候補のRNA発現を、以前に記載されているように (E h x e t a l . , 2021)、RNA-seq試料 (G T E x、P S C、A S C、T C G A ; 図1A、図2A~B、図3) で評価した。簡潔に述べると、全てのM A Pアミノ酸配列を、当施設のpythonスクリプトを用いて全ての可能なヌクレオチド配列に逆翻訳した (Z e n o d o にD O I : 3739257で寄託)。次に、G S N A P (W u a n d N a c u , 2010) を有するゲノムに、-n 1000000 オプションを用いて、これら全ての可能な配列をマッピングして、所与のM A Pをコードすることができる全てのゲノム領域を定位した。重複するスプライス部位の配列によってコードされたM A Pを確信的に捕捉するために、考えられるM C Sをトランスクリプトーム (c D N A 及び非コードRNA) にマッピングして、参照トランスクリプトーム配列の大部分 (80ヌクレオチド) を抽出し (s a m t o o l s f a i d x の--length 80 オプションを用いて)、次いで、参照ゲノムにマッピングした (G S N A P、--use-splicing 及び--novelsplicing=1 オプションを用いて)。全てのp a M A P 候補について、それらのコード配列を含有する全てのリードのゲノム整列も実施した。G S N A Pの出力をフィルタリングして、配列と参照との間の完全な一致のみを保持して、所与のM A Pのコードに影響を受けやすい全ての可能なゲノム領域を含有するb e d ファイルを生成した。s a m t o o l s v i e w (-F 256 オプション)、g r e p、及びw c (-l オプション) を使用することによって、各所望のRNA-seq試料におけるそれぞれのゲノム位置でM A Pコード配列を含有するリードの数をカウントし、S T A R (b a m ファイル) を用いて参照ゲノムに整列させた。G D C データポータル (https://docs.gdc.cancer.gov/API/Users_Guide/BAM_Slicing/) からのB A M スライス機能を使用して、T C G A 試料のG R C h 38 アライメントファイルの各ゲノム位置でのリード数をカウントした。最後に、所与のM A Pの (異なる領域及びコード配列からの) 全てのリードカウントを合計し、各評価した試料において配列決定されたリードの総数で正規化して、1億当たりのリード (R P H M) カウントを得た。

20

30

【0105】

M A P 保持時間及び疎水性指数の予測。D e e p L C 0.1.16 (B o u w m e e s t e r e t a l . , 2020) を使用して、M A P D P 内のM A P 保持時間を予測した (C o u r c e l l e s e t a l . , 2020)。S S R c a l c (K r o k h i n , 2006) (<http://hs2.proteome.ca/SSRCalc/SSRCalcQ.html>) を使用して、ペプチド配列に基づいて疎水性指数を計算した。

40

【0106】

経路濃縮分析。p a M A P 又はs a M A P ソース遺伝子 (アノテーション付きの場合) を、P A N T H E R v 20200728 (M i e t a l . , 2021) に設定されたアノテーションとしてR e a c t o m e 経路 (バージョン65) を使用して「統計的過

50

剥提示試験」に提出した。ホモサピエンス遺伝子の全リストを参照として使用した。各経路の濃縮の統計的有意性は、多重検定のためのボンフェローニ補正を用いて、フィッシャーの正確確率検定を使用して評価した。正の濃縮及び調整された p 値 < 0.05 を有する経路のみを維持した。

【0107】

単一試料遺伝子セット濃縮分析 (ssGSEA)。paMAP及びsaMAPソース遺伝子、又は (Miranda et al., 2019) によってコンパイルされた幹細胞性遺伝子セットについてのssGSEAを、正規化せずに、RのGSVAパッケージを使用して、前のセクションに記載されているように、kallisto (Bray et al., 2016) を使用して定量化されたTPM値を使用して実施した。その後、得られた値を、遺伝子セット及び試料にわたる最小値と最大値との間の絶対差 (最小-最大正規化) によって正規化した。

10

【0108】

試料クラスタリング。デフォルトパラメータでkallistoにより実施した転写産物発現定量化 (Bray et al., 2016) を、Rパッケージのtximportを使用して遺伝子レベルのカウントに変換した。次いで、edgeRパッケージを使用して、低発現遺伝子をフィルタリングし、目的の試料にわたってTMM正規化を実施した。(Ben-Porath et al., 2008) のセット1からのESC関連遺伝子の発現に基づいて、正規化された100万当たりのカウント (cpm) 値を使用して、試料クラスタリングを実施した。heatmap.2関数を使用して、デフォルトのhclust関数を使用して発現ヒートマップ及び試料クラスタリングを生成した。

20

【0109】

TCGA分析

別途明記しない限り、TCGA由来の全ての腫瘍試料を含めた。睾丸生殖細胞腫瘍 (TGCT) 試料は、GTEXからの正常睾丸中の正準paMAPの存在に起因して、がんタイプにわたって実施された分析から除外された。変異率データは、1塩基当たりの非同義変異の数 (rate_nonカラム) としてFirebrowse (<http://firebrowse.org>) から取得した。固形腫瘍の純度推定値は、(Arane et al., 2015) から得た。分子サブタイプ及び腫瘍悪性度情報は、RのTCGAbiolinks (Colaprico et al., 2016) パッケージを使用して取得し、キュレート臨床病期データは、(Liu et al., 2018) から得た。

30

【0110】

予測されたpaMAP及びsaMAP提示。Polysolver (Castro et al., 2019) を使用して得られた各TCGA患者のHLAアレルは、Hannah Carter博士 (UC San Diego) の厚意により提供された。所与のMAPに対する混合結合剤 (MAPを提示することができる全てのHLAアレル) は、NetMHCpan-4.0 (Jurtz et al., 2017) を使用して得られ、所与のMAPが結合親和性ランク $< 2\%$ を有するHLAアレルであった。所与のMAP (paMAP又はsaMAP) は、それが発現 > 0 RPHMを有し、患者のHLAアロタイプのうちの少なくとも1つが潜在的な結合剤であった場合、試料中に提示されたものとみなされた。患者が、MAPを提示することができる2つ以上のHLAアレルを発現した場合、MAPは、1回提示されたものとしてカウントされた。

40

【0111】

生存率分析。TCGA患者についての汎がんキュレート臨床データを (Liu et al., 2018) から得た。(Liu et al., 2018) によって全生存データの使用が推奨されなかったがんタイプは、分析から除外した。原発性固形腫瘍からの試料のみを保持したが、黒色腫 (SKCM) 及びAMLについては、利用可能なデータを有する全ての試料を使用した。全生存期間と、発現されたpaMAP (若しくはsaMAP) との関連、又は予測された提示 (上記を参照されたい) との関連についてのハザード比は、Rパッケージ生存期間からのcoxph関数を有するCox比例ハザードモデルを使

50

用して実施した。予測された提示 (HLA-MAP) を有する p a M A P 又は s a M A P の数を使用する分析について、C o x モデルは、これらの2つのメトリックが相関し、より多くの p a M A P 及び s a M A P を発現する患者は、より不良な予後を有することが予想されるため、試料ごとに発現される p a M A P 又は s a M A P の数のいずれかを制御した。

【0112】

相関関係及び遺伝子発現分析。全ての分析を R において実施した。h g 3 8 の R N A - s e q 遺伝子発現データを、各がんタイプの T C G A b i o l i n k s パッケージを使用して、100万マップリード当たりの転写産物のキロベース当たりの上方四分位正規化フラグメント (F P K M - U Q) として取得した。次いで、発現データをがんによってマージした。重複エントリを有する遺伝子について、我々は、がんによって最高の平均発現を有するものを選択した。次いで、マージされた F P K M - U Q 値を使用して、上記の s s G S E A セクションに記載されているように、M S i g D B (L i b e r z o n e t a l . , 2 0 1 5) (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) からの特徴的な遺伝子セットの s s G S E A スコアを計算した。次いで、非正規化 s s G S E A スコアを使用して、r c o r r 関数を使用して、がんタイプ内の試料ごとに発現された p a M A P 及び s a M A P の数とのスピアマン相関を実施した。(A r a n e t a l . , 2 0 1 5) からの推定純度を共変量として使用したスピアマン相関は、p p c o r パッケージからの p c o r . t e s t 関数を使用して実施した。P 値は、B e n j a m i n i - H o c h b e r g 法を使用して調整した。

【0113】

試料ごとの p a M A P 及び s a M A P の数と遺伝子発現との間の相関について、R N A - s e q 発現データを、各がんタイプについて T C G A b i o l i n k s パッケージを使用して H T S e q - C o u n t として取得した。重複エントリを有する遺伝子について、我々は、がんによって最高の平均発現を有するものを選択した。次いで、e d g e R パッケージを使用して、f i l t e r B y E x p r 関数 (10の最小カウント) を使用して低発現遺伝子を除去した後、T M M 正規化を使用してカウントを正規化した。得られた100万当たりの正規化したカウント (c p m) 値と、試料ごとに発現された p a M A P 及び s a M A P の数との間のスピアマン相関を、r c o r r 関数を使用して実施した。最後に、得られた p 値を、p . a d j u s t 関数を用いた B e n j a m i n i - H o c h b e r g 法を使用して、多重検定のために補正した。原発性固形腫瘍からの試料のみを保持したが、黒色腫 (S K C M) 及び A M L については、利用可能なデータを有する全ての試料を使用した。

【0114】

上記のように得られた H T S e q カウントを、がんによって差次的遺伝子発現分析のために、がんタイプによってマージした。重複エントリを有する遺伝子について、がんによって最高の平均発現を有するものを選択した。e d g e R パッケージを使用して、低発現遺伝子を除去し (50超の試料中で > 1 c p m の遺伝子を保持した)、T M M 正規化を実施した。次いで、v o o m 法を用いた l i m m a パッケージを使用して、腫瘍純度及びがんタイプを制御して、p a M A P 数が高い試料と s a M A P 数が高い試料との間の差次的遺伝子発現を評価した。(A r a n e t a l . , 2 0 1 5) からの純度推定値を有する試料のみが含まれた。T G C T も除外した。絶対倍率変化 > 2 及び調整された p 値 < 0 . 0 5 を有する遺伝子を、差次的に発現したとみなした。

【0115】

メチル化及び局所 C N V 分析。T C G A 試料について処理されたレベル3メチル化データ (T C G A - O V については H M 2 7、及び他の全てのがんタイプについては H M 4 5 0) を、T C G A b i o l i n k s パッケージを使用して取得した。所与の p a M A P 又は s a M A P ソース遺伝子の転写開始部位の 2 k b 以内のプロープのみを保持した。次いで、関心対象の各 M A P の R P H M 発現と、がん内のそれぞれの遺伝子のベータ値との間でスピアマン相関を実施した。平均ベータ値は、複数のプロープに関連する遺伝子に使用

した。HM27を使用したTCGA-OVの相関結果を、プロットिंगのために他の全てのがんについてのHM450の結果とマージした。p値は、Benjamini-Hochberg法を使用して、多重検定のために調整した。HM450ベータ値のみを、TGCTを伴わないがんタイプにわたる相関に使用した。

【0116】

局所CNV相関について、処理されたhg38遺伝子レベルのコピー数スコアを、TCGAbiolinksパッケージを使用して取得した。paMAP又はsaMAPコード領域内のDNAコピー数変化を使用して、がん内の関心対象の各MAPの発現(RPHM)とのスピアマン相関を実施した。平均コピー数値は、MAPコード領域と関連付けられた複数のセグメントについて使用した。TGCT試料は、がん全体にわたる相関分析から除外した。p値は、Benjamini-Hochberg法を使用して、多重検定のために調整した。

10

【0117】

paMAP及びsaMAPカウントとのゲノム相関。TCGA統一アンサンブル「MC3」体細胞変異(SNP及びINDEL)呼び出し(Elrott et al., 2018)は、UCSC Xena機能ゲノミクスエクスプローラ(Goldman et al., 2020) (<https://xenabrowser.net/>)からダウンロードされ、フィルター=PASSを有する遺伝子レベルの非サイレント変異呼び出しのみが保持され、バイナリ値(1、非サイレント変異; 0、WT)に変換された。GISTIC2閾値法を使用して推定されるTCGA汎がん遺伝子レベルコピー数多型(CNV)をUCSC Xenaからダウンロードし、推定値を、それぞれ、ホモ接合性欠失、単一コピー欠失、二倍体正常コピー、低レベルコピー数増幅、又は高レベルコピー数増幅を表す、-2、-1、0、1、2に変換した。2つ以上の試料を有する患者、TGCTを有する患者、並びに体細胞変異及びCNVデータの両方を有しなかった患者は、分析から除外した。カイ二乗検定を使用して、各遺伝子のWT又は変異バリエーションを有する患者の間で、>0のpaMAP及びsaMAP(>2 RPHM)を発現する患者の数を、他の患者と比較した。遺伝子レベルの増幅(1及び2)並びに欠失(-2及び-1)について同じ分析を繰り返した。paMAP及びsaMAP発現試料におけるそれらの有病率、高い統計的有意性、又は関心対象のシグナル伝達経路との関連に基づいて、プロットするために特徴を更に選択した。

20

30

【0118】

図12Dについて、UCSC Xenaからダウンロードした「MC3」体細胞変異(SNP及びINDEL)呼び出しを使用した。2つ以上の試料を有する患者は、分析から除外された。次いで、我々は、フィッシャーの正確確率検定を使用して、各遺伝子のWT又は変異バリエーションを有する患者の間で、paMAP及びsaMAPの数の中央値以上(>2 RPHM)を発現する患者の数を、他の患者と比較した。p値が0.05未満の比較を維持し、がんタイプ当たりの中央値数を超えてpaMAP及びsaMAPを発現するがん試料中で最も一般的な変異を有する上位3つの遺伝子をプロットした。p値が0.05未満の場合、少なくとも1つのがんタイプにおいてこれらの基準を満たす遺伝子を、全てのがんタイプにおいてプロットして、がんタイプにわたるpaMAP及びsaMAP発現と相関する共通のゲノム事象を強調した。

40

【0119】

免疫浸潤分析。xCeLL濃縮スコアは、rawEnrichmentAnalysis関数を使用してRにおいて計算され、生のスコアを調整することは省略された(Aran et al., 2017b)。生細胞型濃縮スコアと、試料当たりのpaMAP及びsaMAPカウント、又はpaMAP及びsaMAPソース遺伝子についてのssGSEA濃縮スコア(上記のFPKM-UQ値を使用して)との間でスピアマン相関を実施し、続いてRにおいてp.adjust機能を用いてp値調整(Benjamini-Hochberg法)を実施した。SKCM及びLAM Lを除いて、原発性固形腫瘍試料のみを相関に使用した。

50

【0120】

免疫原性アッセイ

免疫原性予測。p a M A P 及び s a M A P の免疫原性予測は、R e p i t o p e (O g i s h i a n d Y o t s u y a n a g i , 2 0 1 9) を使用して実施した。予め定義された M H C I _ H u m a n _ M i n i m u m F e a t u r e S e t 変数、並びにパッケージの M e n d e l e y リポジトリに提供されている F e a t u r e D F _ M H C I 及び F r a g m e n t L i b r a r y ファイルを用いて特徴計算を実施した (2 0 1 9 年 7 月 1 3 日バージョン、D O I : 1 0 . 1 7 6 3 2 / s y d w 5 x n x p t . 1) 。

【0121】

インビトロペプチド特異的 T 細胞増殖。4 人の健康なドナーからのペプチド特異的 C D 8 + T 細胞を、インビトロで増殖させた (D 1 1 、 D 1 2 、 D 1 3 、及び D 1 4) 。 D 1 2 由来の増殖した細胞を、F E S T 及び四量体染色アッセイに使用したが、D 1 1 、 D 1 3 、及び D 1 4 由来の増殖した細胞は、四量体染色アッセイにのみ使用した。

【0122】

わずかな変更を加えて、前述のように T 細胞を培養した (D a n i l o v a e t a l . , 2 0 1 8) 。簡潔に、0 日目に、各健常ドナー (B i o I V T) からの解凍した P B M C を、ヒト汎 T 細胞単離キット (M i l t e n y i B i o t e c) を使用して T 細胞を濃縮した。T 細胞を、5 0 μ g / m L のゲンタマイシン (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) 及び 1 % の H E P E S を補充した A I M V 培地に、 2×10^6 / m L で再懸濁した。T 細胞陰性画分を、3 0 G y で照射し、洗浄し、5 0 μ g / m L のゲンタマイシン及び 1 % の H E P E S を補充した A I M V 培地に、 2×10^6 / m L で再懸濁した。1 ウェル当たり 2 . 5 m L の T 細胞と照射された T 細胞枯渇細胞との両方を、ペプチド単独、ペプチドプール (1 プール当たり最大 6 M A P 、各 M A P について 1 μ g / m L の最終濃度) のいずれかとともに、又はペプチドなしで、6 ウェルプレートに添加した。細胞を、3 7 $^{\circ}$ C 、5 % の C O ₂ で 1 0 日間培養した。3 日目及び 7 日目に、培養培地の半分を、1 0 0 I U / m L の I L - 2 、5 0 n g / m L の I L - 7 、及び 5 0 n g / m L の I L - 1 5 (3 日目) 、並びに 2 0 0 I U / m L の I L - 2 、5 0 n g / m L の I L - 7 、及び 5 0 n g / m L の I L - 1 5 (7 日目) を含有する新鮮な培養培地で置き換えた。1 0 日目に、同じドナーからの解凍した P B M C を使用して、T 細胞枯渇細胞の新しいバッチを生成した。これらの細胞を 3 0 G y で照射し、1 μ g / m L の関連するペプチド (複数可) とともに、又はペプチドなしで、1 : 1 の T 細胞 : 非 T 細胞比で培養物に添加した。1 3 日目及び 1 7 日目に、培養培地の少なくとも半分を新鮮な培養培地で置き換えた (最終濃度 : 1 0 0 I U / m L の I L - 2 、2 5 n g / m L の I L - 7 、及び 2 5 n g / m L の I L - 1 5) 。2 0 日目に、細胞を採取して、四量体染色及び / 又は F E S T アッセイを実施した。

【0123】

F E S T アッセイ。F E S T アッセイについて、ヒト C D 8 + T 細胞単離キット (M i l t e n y i B i o t e c) を使用して、C D 8 + 細胞を更に単離した。陰性対照として、C D 8 + T 細胞もまた、同じ健常ドナーの解凍したばかりの未培養 P B M C から単離した。Q I A G E N D N A 血液ミニキット (Q I A G E N) を使用して、C D 8 + T 細胞から D N A を抽出した。i m m u n o S E Q プラットフォーム (A d a p t i v e B i o t e c h n o l o g i e s) の調査分解能を使用して、T C R V β C D R 3 配列決定を行った。i m m u n o S E Q ポータルからエクスポートされた生データを、F E S T ウェブツール (w w w . s t a t - a p p s . o n c . j h m i . e d u / F E S T) で処理した。

【0124】

四量体染色。ペプチドを負荷した T 細胞枯渇細胞及びサイトカインを使用した 2 0 日間の共培養の後、 1×10^6 個の細胞を、カスタムメイドのペプチド-H L A 四量体 (N I H) によって 4 $^{\circ}$ C で 3 0 分間染色し、次いで、C D 8 モノクローナル抗体 (B D B i o s c i e n c e s) によって 4 $^{\circ}$ C で 3 0 分間染色した。細胞を、P B S (2 % F B S 含有

10

20

30

40

50

）で洗浄した後、C e l e s t a サイトメーター（B D B i o s c i e n c e s）を用いて取得した。データを、F l o w J o v 1 0 ソフトウェア（B D B i o s c i e n c e s）を使用して分析した。

【0125】

エクスピボペプチド特異的T細胞定量化。インビトロ増殖のないペプチド-MHC特異的CD8⁺T細胞の頻度もまた、4人の健康なドナー（D11、D12、D13、及びD14）について判定した。50×10⁶～180×10⁶個の解凍したPBMCを、1μg/mLのPE-及び5μg/mLのAPC-標識ペプチド-MHC四量体（N I H T e t r a m e r C o r e F a c i l i t y）によって4℃で30分間染色した。氷冷選別緩衝液（P B S、2mM E D T A、0.5% B S A）で洗浄した後、細胞を450μLの氷冷選別緩衝液、並びに50μLの抗PE及び抗APC抗体コンジュゲート化磁性マイクロビーズ（M i l t e n y i B i o t e c）に再懸濁し、次いで4℃で20分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、四量体⁺細胞を、製造業者の指示に従って、L S カラム（M i l t e n y i B i o t e c）によって磁氣的に濃縮した。得られた四量体⁺濃縮画分を、APC-H7コンジュゲート抗CD3、BB515コンジュゲート化抗CD8、BV510コンジュゲート化抗CD4、P e r C P - C y 5.5コンジュゲート化抗CD14、CD16、CD19抗体（B D B i o s c i e n c e s）により4℃で30分間染色し、洗浄した。次いで、染色した試料全体をF A C S C e l e s t a サイトメーター（B D B i o s c i e n c e s）で7-AADを用いて分析し、蛍光計数ビーズ（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c）を使用して結果を正規化した。対照として、3つのHLA-A*02:01制限免疫優性エピトープ：M e l a n A₂₇（黒色腫由来のA g、E L A G I G I L T V、配列番号143）、N S 3₁₀₇₋₃（C型肝炎ウイルス由来、C I N G V C W T V、配列番号144）、及びG a g₇₇（ヒト免疫不全ウイルス由来、S L Y N T V A T L、配列番号145）を標的とする抗原特異的CD8⁺T細胞レパートリーも濃縮した。

【0126】

定量化及び統計分析

図の凡例に記載されていない限り、2つの条件を比較する全ての統計的検定を、Rにおける対応のない両側ウィルコクソン検定で実施した。多重対比較のために、p値を、Rにおけるc o m p a r e _ m e a n s関数を使用して、B e n j a m i n i - H o c h b e r g法を使用して調整した。全ての箱ひげ図は、中央値及び四分位範囲（I Q R）を示し、ひげは、箱のヒンジから1.5×I Q R以下の最大値まで延びる。言及しない限り、全ての相関は、スピアマンの相関係数を使用して実施した。プロット及び統計分析は、R v 3.6.5又はP y t h o n v 3.6.7において実施した。

【0127】

実施例2：ヒトiPSCを使用したp a M A PのMSベースの同定

全ての可能なゲノム領域に由来するp a M A Pを同定するために、T S A同定のために以前に開発されたプロテオゲノム戦略（L a u m o n t e t a l., 2018）を使用した。本質的に、i P S細胞株特異的MSデータベースは、1）アノテーション付きプロテオーム由来配列（正準プロテオーム）と、2）ヒト胸腺髄質上皮細胞（m T E C）で発現された部分配列を枯渇させた非正準i P S C特異的コンティグの3フレーム翻訳とを組み合わせることによって構築した（図1A）。この方法は、最適なデータベースサイズを維持し、中枢性トランスを媒介するm T E Cの役割のために、免疫原性であり得るM A Pの同定を可能にする。

【0128】

M A Pの豊富さは、MSベースの同定において限定的であり、i P S Cは、低レベルの表面MHC I分子を発現する（S u a r e z - A l v a r e z e t a l., 2010、V o g e l a n d M a r c o t t e, 2009）ため、MS分析のために収集する前に、インターフェロンγ（I F N - γ）による72時間処理を実施した（図1A）。I F N - γ処理は、正準多能性マーカーの発現に影響を与えることなく、研究された3つの

線維芽細胞由来 i P S C 試料（実施例 1 を参照されたい）の表面 H L A - A / B / C レベルの平均 3 4 倍の増加を誘導した（S t e w a r t e t a l . , 2 0 0 6）（図 8 A ~ C）。結果として、この処理は、未処理の i P S C（図 1 B）よりも 1 . 8 ~ 4 . 5 倍多くの固有の M A P の検出を可能にし、したがって、p a M A P のための我々の探索空間を拡大した。

【 0 1 2 9 】

実施例 3 : i P S C の免疫ペプチドームは、それらの多能性状態を反映している。

M A P が細胞表面に提示される確率は、主に 2 つの要因に依存する。第一に、M H C - I 遺伝子の発現に依存し、造血細胞及び m T E C では高い（M H C - 1 高）が、非炎症性の胸腺外非造血細胞では低い（M H C - 1 低）（B e n h a m m a d i e t a l . , 2 0 2 0）。第二に、M A P コード配列（M C S）の発現に依存する（B a s s a n i - S t e r n b e r g e t a l . , 2 0 1 5、E h x e t a l . , 2 0 2 1、P e a r s o n e t a l . , 2 0 1 6、R u i z C u e v a s e t a l . , 2 0 2 1）。実際、8 . 5 5 R P H M（1 億当たりのリード）よりも劣る M C S 発現は、骨髓細胞において 5 % 未満の M A P 生成の確率に対応する（E h x e t a l . , 2 0 2 1）。M H C - 1 低であるため、胸腺外非造血細胞では確率が更に低くなると想定され得る。したがって、p a M A P の探索において、G T E x データセットからの 2 9 の異なる健康な組織において、M C S が 8 . 5 5 R P H M 未満（1 億当たりのリード）で発現された M A P を選択した（G e n o t y p e - T i s s u e E x p r e s s i o n , (L o n s d a l e e t a l . , 2 0 1 3)）。精巣における M C S 発現は、精子細胞系統の細胞が M H C - I 遺伝子を発現せず（Z h a o e t a l . , 2 0 1 4）、いくつかの多能性マーカーの発現を保持し得るため、除外基準ではなかった（I z a d y a r e t a l . , 2 0 1 1、W a n g e t a l . , 2 0 0 7、Z h e n g e t a l . , 2 0 0 9）。未処理及び I F N - γ 処理 i P S C から同定された 5 4 2 4 個の固有の M A P のうち、7 2 個（1 . 3 3 %）がストリンジェントな発現プロファイルと一致した（図 1 A 及び 2 A、表 1 A ~ D）。多能性プログラムとは対照的に、幹細胞プログラムに関連する M A P を区別するために、異なる起源からの初代成人幹細胞及び前駆細胞（A S C）の R N A - s e q における 7 2 個の M A P コード配列を定量化した：間葉系幹細胞、骨髓前駆細胞、臍帯血試料からの造血幹細胞、グリア前駆細胞。2 6 個の M A P が少なくとも 1 つの A S C データセットで発現され、幹細胞性関連 M A P（s a M A P、表 1 C ~ D）と称されたが、残りの 4 6 個の M A P は、多能性関連（p a M A P）とみなされた（図 2 B、表 1 A ~ B）。i P S C 生成に使用される体細胞の単一ヌクレオチド変異（S N V）情報が不足しており、生殖細胞系とリプログラミング関連変異とを区別することができなかったため（M e r k l e e t a l . , 2 0 1 7）、変異 D N A 配列に由来する M A P をこれらの分析から除外した。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 1 A：本明細書で同定された p a M A P の特徴

ペプチド配列(配列番号)	供給源	遺伝子記号	アンサンブル遺伝子 ID	予測される HLA アレル	免疫原性スコア
NTENYILWGY(1)	lncRNA	AC005062	ENSG00000243004	HLA-A*01:01	0,26304
MKFGNQVSGLF(2)	lncRNA	AC009055	ENSG00000260834	HLA-B*15:03	0,29712
RLQHEPPHPV(3)	偽遺伝子	AC073585	ENSG00000255624	HLA-A*02:01	0,38736
LPMWKALLF(4)	アノテーション付きエキソン	CLDN6	ENSG00000184697	HLA-B*53:01	0,37296
RPARPPAGL(5)	5'UTR	DNMT3B	ENSG00000088305	HLA-B*07:02	0,47264
FAYPNQKVTF(6)	エキソン-イントロン	DPPA4	ENSG00000121570	HLA-C*03:04、HLA-C*02:10	0,17104
GQAHPQGSF(7)	lncRNA	ERVH48-1	ENSG00000233056	HLA-B*15:03	0,30584
YSDQKPPYSY(8)	アノテーション付きエキソン	FOXB1	ENSG00000171956	HLA-A*01:01	0,13264

【表 8 - 2】

KLAQIRQV(9)	アノテーション付きエキソン	FOXH1	ENSG00000160973	HLA-A*02:01	0,31952
GEIKTFSDL(10)	アノテーション付きエキソン	L1TD1	ENSG00000240563	HLA-B*40:01	0,1748
GKLDNTNEY(11)	アノテーション付きエキソン	L1TD1	ENSG00000240563	HLA-B*15:03	0,19088
AKKKENITY(12)	アノテーション付きエキソン	L1TD1	ENSG00000240563	HLA-B*15:03	0,24296
SAQGKPTYF(13)	アノテーション付きエキソン	LIN28A	ENSG00000131914	HLA-C*04:01	0,19016
EEEIHSPTL(14)	アノテーション付きエキソン	LIN28A	ENSG00000131914	HLA-B*40:01	0,27
SKLRSTGQSF(15)	lncRNA	LINC01108	ENSG00000226673	HLA-B*15:03	0,20112
NTLSESYIY(16)	lncRNA	LINC01801	ENSG00000267767	HLA-A*01:01	0,23104
QPLPQPLELW(17)	lncRNA	LINC-ROR	ENSG00000258609	HLA-B*53:01	0,55088
RTDTGKRVLY(18)	lncRNA	LNCPRESS2	ENSG00000249152	HLA-A*01:01	0,19088
LPSGETIAKW(19)	遺伝子間	NA	NA	HLA-B*53:01	0,28952
KLDSYIIPY(20)	遺伝子間	NA	NA	HLA-A*01:01	0,21496

10

20

30

40

50

ISMCDLVY(21)	遺伝子間	NA	NA	HLA-A*01:01	0,362
YKRMKLDSY(22)	遺伝子間	NA	NA	HLA-B*15:03	0,18624
QPLPEPLQLW(23)	遺伝子間	NA	NA	HLA-B*53:01	0,54832
IPMKIYLW(24)	遺伝子間	NA	NA	HLA-B*53:01	0,39112
SQSSLMLYL(25)	イントロン(アンチセンス)	NTN4	ENSG00000074527	HLA-B*40:01	0,29256
ALYPQPPTV(26)	lncRNA	PCAT14	ENSG00000280623	HLA-A*02:01	0,56536

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

YTPFPSYGHY(27)	アノテーション付きエキソン	PRDM14	ENSG00000147596	HLA-A*01:01	0,37456
FTEEDLHFVLY(28)	アノテーション付きエキソン	PRDM14	ENSG00000147596	HLA-A*01:01	0,1776
GQITHNTSF(29)	アノテーション付きエキソン	SLC6A15	ENSG00000072041	HLA-B*15:03	0,2984
VTLSTYFHV(30)	イントロン	TAF4	ENSG00000130699	HLA-A*02:01	0,26056
GQFDRPAGV(31)	アノテーション付きエキソン	TRIM71	ENSG00000206557	HLA-A*02:01	0,392
VSDQQNGTY(32)	アノテーション付きエキソン	TRIM71	ENSG00000206557	HLA-A*01:01	0,21936
KHFDSPRGVAF(33)	アノテーション付きエキソン	TRIM71	ENSG00000206557	HLA-C*04:01	0,2888
GEHLVSVTL(34)	アノテーション付きエキソン	TRIM71	ENSG00000206557	HLA-B*40:01	0,30552
YSIYPMRNL(35)	アノテーション付きエキソン	VRTN	ENSG00000133980	HLA-C*03:04	0,26776
SQNSPIRY(36)	イントロン	ZNF462	ENSG00000148143	HLA-B*15:03	0,2544
FHSQNSPIRY(37)	イントロン	ZNF462	ENSG00000148143	HLA-A*01:01	0,24584

10

20

30

40

50

VAKPPGTAF(38)	アノテーション付きエキソン	ZNF730	ENSG00000183850	HLA-B*15:03	0,3736
SLLGSSEILEV(39)	アノテーション付きエキソン	ZSCAN10	ENSG00000130182	HLA-A*02:01	0,29272
TASDLNLKV(40)	3'UTR	CLYBL	ENSG00000125246	HLA-C*03:04	0,266
VLMDEGAVLTL(41)	アノテーション付きエキソン	L1TD1	ENSG00000240563	HLA-A*02:01	0,42496

10

20

【表 8 - 4】

TEFQQIINL(42)	アノテーション付きエキソン	L1TD1	ENSG00000240563	HLA-B*40:01	0,20448
KVLEHVVRV(43)	アノテーション付きエキソン	MAGEA4	ENSG00000147381	HLA-A*02:01	0,2992
GVYDGREHTV(44)	アノテーション付きエキソン	MAGEA4	ENSG00000147381	HLA-C*04:01	0,86328
GLYDGREHSV(45)	アノテーション付きエキソン	MAGEA8	ENSG00000156009	HLA-A*02:01	0,40472
NPIGDTGVKF(46)	アノテーション付きエキソン	NLRP7	ENSG00000167634	HLA-B*53:01	0,30048

30

40

50

【表 9 - 1】

表 1 B : 本明細書で同定された p a M A P の特徴 (続き)

ペプチド配列(配列番号)	ERE	ERE ファミリー	ERE クラス	2 RPHM を超える 10%以上の試料を有するがんタイプの数	以前に報告されたか?
NTENYILWGY(1)	NA	NA	NA	2	いいえ
MKFGNQVSGLF(2)	HERVH-int、部分的な重複	ERV1	LTR	1	いいえ
RLQHEPPHPV(3)	NA	NA	NA	10	いいえ
LPMWKALLF(4)	NA	NA	NA	5	いいえ
RPARPPAGL(5)	NA	NA	NA	5	いいえ
FAYPNQKVTF(6)	NA	NA	NA	2	いいえ
GQAHPQGSF(7)	HERVH48-int	ERV1	LTR	4	いいえ
YSDQKPPYSY(8)	NA	NA	NA	5	いいえ
KLAQIIRQV(9)	NA	NA	NA	5	いいえ
GEIKTFSDL(10)	L1MEd	L1	LINE	4	いいえ
GKLDNTNEY(11)	L1TD1	L1	LINE	3	いいえ
AKKKENITY(12)	L1MEd	L1	LINE	4	いいえ
SAQGKPTYF(13)	NA	NA	NA	2	いいえ
EEEIHSPTL(14)	NA	NA	NA	2	いいえ
SKLRSTGQSF(15)	NA	NA	NA	1	いいえ
NTLSESYIY(16)	L1ME3B	L1	LINE	3	いいえ
QPLPQPLELW(17)	HERVH-int	ERV1	LTR	6	いいえ

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

RTDTGKRVLY(18)	NA	NA	NA	0	いいえ
LPSGETIAKW(19)	HERV9NC-int	ERV1	LTR	7	いいえ
KLDSYIIPY(20)	L1M3	L1	LINE	1	いいえ
ISMCDLVY(21)	L1ME1 アンチセンス	L1	LINE	0	いいえ
YKRMKLDY(22)	L1M3	L1	LINE	7	いいえ
QPLPEPLQLW(23)	HERVH-int	ERV1	LTR	1	いいえ
IPMKIYLW(24)	L1M3	L1	LINE	4	いいえ
SQSSLMLYL(25)	L1MEc	L1	LINE	0	いいえ
ALYPQPPTV(26)	HERVK-int	ERVK	LTR	2	いいえ
YTPFPSYGHY(27)	NA	NA	NA	1	いいえ
FTEEDLHFVLY(28)	NA	NA	NA	1	いいえ
GQITHNTSF(29)	NA	NA	NA	9	いいえ
VTLSTYFHV(30)	L1MA4A	L1	LINE	1	いいえ
GQFDRPAGV(31)	NA	NA	NA	3	いいえ
VSDQQNGTY(32)	NA	NA	NA	3	いいえ
KHFDSRPGVAF(33)	NA	NA	NA	3	いいえ
GEHLVSVTL(34)	NA	NA	NA	3	いいえ
YSIYPMRNL(35)	NA	NA	NA	2	いいえ
SQNSPIRY(36)	MIR、アンチセンス	MIR	SINE	0	いいえ
FHSQNSPIRY(37)	MIR、アンチセンス	MIR	SINE	0	いいえ
VAKPPGTAF(38)	NA	NA	NA	0	いいえ
SLLGSSEILEV(39)	NA	NA	NA	1	いいえ
TASDLNLKV(40)	NA	NA	NA	3	PMID:32047025
VLMDEGAVLTL(41)	L1MEd	L1	LINE	4	US2016/0279214
TEFQQIINL(42)	NA	NA	NA	4	WO2020/058285
KVLEHVVRV(43)	NA	NA	NA	14	PMID:21350607

10

20

30

40

GVYDGREHTV(44)	NA	NA	NA	13	PMID:11502003、 PMID:10540345
GLYDGREHSV(45)	NA	NA	NA	1	PMID:10352307
NPIGDTGVKF(46)	NA	NA	NA	10	WO2018/138257

50

【表 1 0 - 1】

表 1 C : 本明細書で同定された s a M A P の特徴

ペプチド配列(配列番号)	供給源	遺伝子記号	アンサンブル遺伝子 ID	予測される HLA アレル	免疫原性スコア
GKFQGLIEKF(47)	アノテーション付きエキソン	CDC25C	ENSG00000158402	HLA-B*15:03	0,8116
KQMENDIQLY(48)	アノテーション付きエキソン	CENPE	ENSG00000138778	HLA-B*15:03	0,0847
ASTPASSEL(49)	アノテーション付きエキソン	CLSPN	ENSG00000092853	HLA-C*03:04	0,2182
RLWNETVELF(50)	アノテーション付きエキソン	DEPDC1B	ENSG00000035499	HLA-C*04:01	0,911
FGDGKFSEV(51)	アノテーション付きエキソン	DNMT3B	ENSG00000088305	HLA-C*03:04	1,2864

10

20

30

40

50

ペプチド配列(配列番号)	供給源	遺伝子記号	アンサンブル遺伝子ID	予測されるHLAアレル	免疫原性スコア
SEVSADKLVAL(52)	アノテーション付きエキソン	DNMT3B	ENSG00000088305	HLA-B*40:01	0,1455
AMYHALEKA(53)	アノテーション付きエキソン	DNMT3B	ENSG00000088305	HLA-A*02:01	0,5
FAYPNQKDF(54)	アノテーション付きエキソン	DPPA4	ENSG00000121570	HLA-C*03:04、HLA-C*02:10	0.0308、0.0919
ALLEGVNTVVV(55)	アノテーション付きエキソン	DPPA4	ENSG00000121570	HLA-A*02:01	0,3886
SETHPPEVAL(56)	アノテーション付きエキソン	DPPA4	ENSG00000121570	HLA-B*40:01	0,1729

10

20

30

40

50

ペプチド配列(配列番号)	供給源	遺伝子記号	アンサンブル遺伝子 ID	予測される HLA アレル	免疫原性スコア
SPQEASGVRW(57)	アノテーション付きエキソン	DPPA4	ENSG00000121570	HLA-B*53:01	0,2415
YLLNCHLLI(58)	アノテーション付きエキソン	DPPA4	ENSG00000121570	HLA-A*02:01	0,0553
GQFLVKSGY(59)	アノテーション付きエキソン	IGF2BP1	ENSG00000159217	HLA-B*15:03	0,1989

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 2】

QTELNNSKQEY(60)	アノ テー ション付 きエ キソ ン	KIF15	ENSG00000163808	HLA- A*01:01	0,1568
MAWNGILHL(61)	遺伝 子間	NA	NA	HLA- C*02:10	0,0935
HPLPGLILEW(62)	アノ テー ション付 きエ キソ ン	POLQ	ENSG00000051341	HLA- B*53:01	0,014
TPSPIQQL(63)	アノ テー ション付 きエ キソ ン	SKA3	ENSG00000165480	HLA- B*53:01	0,3482
FLLPGVLLSEA(64)	アノ テー ション付 きエ キソ ン	UGT3A2	ENSG00000168671	HLA- A*02:01	0,1943
SANVSKVSF(65)	アノ テー ション付 きエ	ASPM	ENSG00000066279	HLA- B*15:03	0,9036

10

20

30

40

50

	キソ ン				
LALGNTKEL(66)	アノ テー ショ ン付 きエ キソ ン	BRCA2	ENSG00000139618	HLA- C*03:04	0,0397
KQFEGTVEI(67)	アノ テー ショ ン付 きエ キソ ン	BRCA2	ENSG00000139618	HLA- A*02:01	0,1429
KLQEKIQEL(68)	アノ テー ショ ン付 きエ キソ ン	CENPE	ENSG00000138778	HLA- A*02:01	0,1966
KMSELQTYV(69)	アノ テー ショ ン付 きエ キソ ン	CENPF	ENSG00000117724	HLA- A*02:01	0,0155
RLWNETVEL(70)	アノ テー ショ ン付 きエ キソ ン	DEPDC1B	ENSG00000035499	HLA- A*02:01	0,1007
ALLEGVNTV(71)	アノ テー ショ	DPPA4	ENSG00000121570	HLA- A*02:01	0,0093

10

20

30

40

50

	ン付 きエ キソ ン				
GQKENVVVY(72)	アノ テー ショ ン付 きエ キソ ン	ERCC6L	ENSG00000186871	HLA- B*15:03	0,09

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 D : 本明細書で同定された s a M A P の特徴 (続き)

ペプチド配列(配列番号)	ERE	ERE ファミリー	ERE クラス	2 RPHM を超える 10%以上の試料を有するがんタイプの数	以前に報告されたか?
GKFQGLIEKF(47)	NA	NA	NA	29	いいえ
KQMENDIQLY(48)	NA	NA	NA	22	いいえ
ASTPASSEL(49)	NA	NA	NA	25	いいえ
RLWNETVELF(50)	NA	NA	NA	31	いいえ
FGDGKFSEV(51)	NA	NA	NA	28	いいえ
SEVSADKLVAL(52)	NA	NA	NA	22	いいえ
AMYHALEKA(53)	NA	NA	NA	24	いいえ
FAYPNQKDF(54)	NA	NA	NA	3	いいえ
ALLEGVNTVVV(55)	NA	NA	NA	3	いいえ
SETHPPEVAL(56)	NA	NA	NA	3	いいえ
SPQEASGVRW(57)	NA	NA	NA	3	いいえ
YLLNCHLLI(58)	NA	NA	NA	3	いいえ
GQFLVKSGY(59)	NA	NA	NA	12	いいえ
QTELNNKQY(60)	NA	NA	NA	23	いいえ
MAWNGILHL(61)	NA	NA	NA	1	いいえ
HPLPGLILEW(62)	NA	NA	NA	25	いいえ
TPSPIIQL(63)	NA	NA	NA	30	WO2003/050255
FLLPGVLLSEA(64)	NA	NA	NA	5	US10596241
SANVSKVSF(65)	NA	NA	NA	18	WO2017/089781
LALGNTKEL(66)	NA	NA	NA	8	Creative Biolabs PEP -123419CQ
KQFEGTVEI(67)	NA	NA	NA	17	PMID:27841757
KLQEKIQEL(68)	NA	NA	NA	28	PMID:27841757
KMSELQTYV(69)	NA	NA	NA	32	US2016/0280759
RLWNETVEL(70)	NA	NA	NA	32	US2017/0037092
ALLEGVNTV(71)	NA	NA	NA	3	WO2017/001491
GQKENVVVY(72)	NA	NA	NA	23	US7250498

【0130】

1つを除く全ての s a M A P が、アノテーション付きタンパク質コードエキソンに由来する一方で、p a M A P の 48% が、非コードとされるゲノム領域、特にアノテーション付きの長い非コード RNA (l n c R N A) (17%)、遺伝子間 (13%)、及びイントロン (9%) 配列に由来することは注目に値する (図 2 B ~ C、表 1 A ~ D)。注目すべきことに、これらの 3 つの表面的非コード領域からのほぼ全ての p a M A P コード配列は、主に長い散在核要素 (L I N E) 及び長い末端反復 (L T R) 配列を含む重複 E R E を有していた (図 2 C 及び表 1 B)。これらの要素、特に L I N E - 1 (L 1) 及びヒト内因性レトロウイルスサブファミリー H (H E R V - H) は、リプログラミング中に抑制

され、lncRNA及び隣接する遺伝子の特異的発現を増強するため、多能性の維持に不可欠である (Fort et al., 2014、Friedli et al., 2014、Kelley and Rinn, 2012、Klawitter et al., 2016、Lu et al., 2014)。EREとの主な重複は、これらの非コードとされる領域のPSC特異的転写及び翻訳についての機構原理を提供する。対照的に、正準pamAPコード配列とのERE重複は、L1レトロエレメントに由来し、PSCの自己再生に必要な馴養されたRNA結合タンパク質である、1 (L1TD1) を含有するLINE1型トランスポザーゼドメインに由来するpamAPにおいてのみ見出された (McLaughlin et al., 2014、Naervae et al., 2012) (表1B)。

10

【0131】

pamAPのいくつかの特徴は、多能性へのそれらの関連を強化する。第一に、pamAP及びsaMAPソース遺伝子は、DNMT3B及びDPPA4の2つの遺伝子を除いて非冗長であった。これらの2つの遺伝子は、非正準MAPのiPSC特異的発現を生成したが、それらのエキソンMAPは、ASCにおいても高発現であった (図2B、D、E、及び表1A～D)。したがって、pamAPソース遺伝子で著しく濃縮された唯一の生物学的経路は、多能性調節遺伝子LIN28A、ZSCAN10、PRDM14、及びDPPA4によって表される、PSCの転写調節であった (Chia et al., 2010、Hernandez et al., 2018、Wang et al., 2007、Zhang et al., 2016) (図2D)。対照的に、saMAPソース遺伝子は、主に細胞周期調節に関与していた (図2E)。第二に、pamAPは、6つの異なるリプログラミング方法から生成されたESCとiPSCとの間で同様に発現された (Churko et al., 2017) (図2F、9A)。更に、pamAPは、研究した未処理試料及びIFN- γ 処理試料において同様に発現された (図9B及びC)。最後に、前述のように、アノテーション付きsaMAP及びpamAPソース遺伝子 (表1A～D) が、単一試料遺伝子セット濃縮分析 (ssGSEA) を使用して、幹細胞性及び多能性を推定できるかどうかを評価した (Barbie et al., 2009、Henzelmann et al., 2013)。この目的のために、異なるがんデータセットからMiranda及び同僚によって抽出された幹細胞性シグネチャを使用した (Miranda et al., 2019)。saMAP及びpamAPソース遺伝子シグネチャ (それぞれ、saMAP ssGSEA、及びpamAP ssGSEA) は、様々な供給源からのPSC、選別された前駆細胞及び分化細胞からのRNA-seqデータのアレイにおける幹細胞性シグネチャとの良好な相関を示した (ほとんどの遺伝子セットについては、ピアソンの $R > 0.5$ 、図9D及びE)。他のデータセットでこの所見を検証するために追加の分析が必要であろうが、pamAPソース遺伝子濃縮は、我々の分析でPSCに対する最高の特異性を達成した (図9F及びG)。したがって、iPSCの免疫ペプチドームは、健康な組織及びASCには存在しない多能性関連転写事象に由来するpamAPを含有すると結論付けることができる。

20

30

【0132】

pamAP及びsaMAP同定の堅牢性を評価するために、ハイスループットMSで同定されたMAPの検証のための2つのクラス最高のメトリックを使用した。観察されたマップ保持時間 (RT) の分布を、DeepLCアルゴリズムを使用して計算されたRTの分布 (Bouwmeester et al., 2020)、及びSSRcalcで評価された疎水性指数の分布 (Krokhin, 2006) と比較した。これらのメトリックの両方は、pamAP及びsaMAPについて観察されたRTと強い相関を有し (図2G及びH)、RT分布は、正しい同定を支持する正準プロテオーム由来ペプチド (F検定) の分布と有意差がなかった。

40

【0133】

実施例4：pamAPはがんタイプにわたって共有される

次に、がん細胞がpamAPの異常発現を呈するかどうかを評価した。この目的のため

50

に、The Cancer Genome Atlas (TCGA) に含まれる33のがんタイプ、並びに急性骨髄性白血病 (AML) (Ehx et al., 2021) 及び卵巣高悪性度漿液性がん (HGSC) (Zhao et al., 2020) の以前のプロテオゲノム研究からのがん試料のRNA-seqにおけるpaMAPのMCSを照会した。46個のpaMAPのうち40個が、TCGA由来の最大14個のがんタイプの試料の少なくとも10%で発現され、これらのpaMAPのうち9個が、1個又は2個のがんタイプの試料の50%超で共有されたことが見出された (図3)。以前の研究で研究したAML及びHGSC試料も、それぞれ13個及び19個のpaMAPの発現を共有した (図3)。ほとんどのpaMAPは新規であったが、それらのうちの6つは、がん免疫療法の文脈で以前に報告されており、多くのTCGAがんタイプによって共有されていた (図3、太字)。報告されたpaMAPのうち、5つは、フレーム内エキソン翻訳に由来する (Duffour et al., 1999、Huang et al., 1991、Jia et al., 2010、Schuster et al., 2017) が、1つは、3' UTRに由来し、HGSC試料中のaetSAとして独立して同定されている (Zhao et al., 2020) (表1B)。したがって、新規の共通に発現されるpaMAPコード配列は、複数のがんタイプにわたって患者間で共有TSAを生成する可能性が高い。

10

【0134】

実施例5：高幹細胞性がんはpaMAP発現を獲得する

幹細胞性がTCGA試料間で変化することを示す以前の報告 (Malta et al., 2018、Miranda et al., 2019、Smith et al., 2018) と一致して、RNAレベルで、発現されたpaMAPの数が試料当たり0~19の範囲であることが見出された (精巣がんを除く、図4A)。しかしながら、Aran及び同量 (Aran et al., 2015) からの21個の固形がんについての純度推定の包含は、発現されたpaMAPの数が試料の純度とともに増加することを明らかにした。この相関から、paMAPががん細胞で特異的に発現され、低純度では、いくつかのがん試料でその数が過小評価され得ることが推測された (図4B)。しかしながら、この状況は、高純度試料と低純度試料で同様のカウントを有していたsaMAPとは異なるものであった。後者は、健康又は前がん性成体幹細胞又は健康な増殖細胞におけるsaMAPの発現を反映した可能性が高い (図10A)。

20

30

【0135】

paMAPとsaMAPの発現を比較することによって、2つの追加の観察を行うことができる：i) saMAPは、がん試料においてより広く発現し、TCGA試料の86%が少なくとも1つのsaMAPを発現し、試料の60%のみが1つ以上のpaMAPを発現した (図4A、10B、及び10C)、またii) paMAP発現は、saMAPと共発生したが、試料純度を考慮しても、全ての高幹細胞性試料がpaMAP陽性というわけではなかった (図4C、10D、及び10E)。これは、paMAP発現が、がんの進行、及び幹細胞性から多能性関連プログラムへの更なる脱分化とともに現れることを示唆する。実際、paMAP/saMAP発現を有しない試料から、saMAP発現のみを有する試料への、続いてpaMAP (及びsaMAP) 発現試料 (図4D及び10D) への、がん試料における非同義変異負荷の漸増が見出された。次いで、(純度及び腫瘍タイプを制御する) 差次的遺伝子発現分析を、paMAPを有する試料と、多くのsaMAPを有するがpaMAPを有しない試料との間で実施した。この分析は、paMAPを有する腫瘍が、がん細胞の移動及び浸潤に関与する遺伝子、すなわち、CDH12 (カドヘリン-12) 及びHIF3A (低酸素誘導因子3アルファサブユニット) を過剰発現したことを明らかにした (Ma et al., 2016、Wang et al., 2011、Zhou et al., 2018) (図4E及び表2)。高paMAP発現試料はまた、TPTE (テンシン相同性を有する膜貫通ホスファターゼ) 及びMAGEA3 (黒色腫関連抗原A3) を含むpaMAPソース遺伝子に加えて、胚抗原及びCGAの過剰発現を示した。特に、TPTE及びMAGEA3は、切除不能な黒色腫を有する患者において持続

40

50

的な免疫応答を誘導することが報告された（Sahin et al. , 2020）。
【表 12－1】

表 2：図 4 Eに関連。高 p aMAP 発現（> 4 p aMAP、n = 7 7 5）及び高 s aMAP 発現（> 4 s aMAP 及び 0 p aMAP、n = 1 2 7 0）を有する TCGA 試料間の差次的に発現された遺伝子（p 調整 < 0. 0 5 及び絶対倍率変化 > 2）。この分析から T G C T を除外した。

遺伝子	logFC	AveExpr	t	P 値	調整 P 値
MAGEA4	6,63225770 8	-3,462000504	21,1944557 2	1,61E-90	3,79E-86
MAGEA3	4,40559481	-3,428705246	12,8499245 3	1,09E-36	4,27E-33
MAGEA6	4,36647362 2	-3,580584508	12,8724832	8,29E-37	4,06E-33
MAGEA10	4,13730776 5	-4,335730041	15,1723006 2	1,24E-49	9,76E-46
MAGEA4-AS1	4,07171919 7	-4,9605578	19,1020133 2	3,12E-75	3,68E-71
MAGEA12	3,76922498 8	-3,78369304	12,5344186 4	4,54E-35	1,53E-31
MAGEA11	3,37666364 5	-3,462693839	9,98228775 4	3,05E-23	4,24E-20
CLDN6	3,27254370 6	-1,726222796	11,1596317 1	2,08E-28	4,91E-25
CSAG1	3,21091419 4	-2,986166987	10,8610522 6	4,74E-27	1,02E-23
L1TD1	3,13138388 4	-1,448928921	12,8693850 8	8,60E-37	4,06E-33
CLCA1	3,06866954 7	-4,071871582	7,66834705 2	1,34E-14	8,13E-12
FAR2P4	3,06347320 9	-3,97969639	12,0683108 7	9,75E-33	2,88E-29
MAGEA1	3,05109305 8	-4,023098803	8,89507767 8	6,31E-19	6,21E-16
LINC02864	3,01371652 9	-4,167809677	10,5648212 5	9,80E-26	1,93E-22

10

20

30

40

50

CTCFL	3,00057319	-3,120008804	9,33345300 1	1,30E-20	1,46E-17
IGF2BP1	3,00022320 9	-0,576086822	10,2742216 2	1,78E-24	3,24E-21
LIN28B	2,89941765 6	-4,041691181	9,38569239 9	8,09E-21	1,01E-17
FAR2P1	2,85973619 1	-1,523452552	8,20213843 7	2,07E-16	1,69E-13
MAGEA9B	2,82036011 5	-5,172591831	11,2091298 9	1,23E-28	3,22E-25
LINC00648	2,77908636	-3,550632196	10,2556898 6	2,14E-24	3,61E-21
DSCR8	2,68478678 9	-4,312165986	8,60423067 6	7,56E-18	6,62E-15
CTAG2	2,62080671 5	-4,924562108	8,05386919 8	6,77E-16	5,00E-13
CSAG3	2,60989155 6	-4,052699875	9,10391241 2	1,01E-19	1,09E-16
LINC01194	2,57003006 4	-5,183448976	10,0275713 5	1,97E-23	2,91E-20
MAGEC2	2,54096860 7	-4,426898723	7,31185655 2	1,89E-13	9,09E-11
LINC00470	2,48786459 3	-3,906617783	8,83108607 4	1,10E-18	1,04E-15
CSAG2	2,45491117 5	-4,583016437	9,35735336 7	1,05E-20	1,24E-17
MAGEB2	2,45106353 2	-4,800494947	7,91926777 1	1,95E-15	1,25E-12
GABRA3	2,40120267 4	-1,5386807	6,80413398 6	6,67E-12	2,72E-09
LINC00355	2,37725077 5	-4,544278065	8,02308732 3	8,64E-16	6,00E-13

10

20

30

40

50

AP005262.2	2,36195474 6	-4,841835769	9,09471485 6	1,10E-19	1,13E-16
CT45A10	2,33829671 9	-5,166077827	8,54634243 2	1,23E-17	1,04E-14
SLCO1A2	2,33225708	-1,820708837	7,09391404 5	8,97E-13	4,15E-10

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

CLEC2L	2,31822897 4	-2,559416528	7,46591794 8	6,11E-14	3,14E-11
SAGE1	2,27898789 3	-4,599785502	7,74237752 9	7,64E-15	4,75E-12
TRIM71	2,27478303 8	-2,315646179	7,38213963 7	1,13E-13	5,68E-11
MAGEC1	2,27217942	-4,26256943	6,60432946 1	2,54E-11	9,44E-09
G2E3-AS1	2,25330246 1	-4,544466185	8,03377087 7	7,94E-16	5,68E-13
MKRN3	2,24396738 6	-1,621335464	6,55934381 5	3,42E-11	1,22E-08
POU6F2	2,20666052 4	-2,269357531	5,51356964 1	1,98E-08	5,04E-06
AC008443.3	2,20477585 9	-4,687607745	10,1593100 4	5,50E-24	8,66E-21
LINC01446	2,17774905 5	-4,950349114	7,61799065 2	1,96E-14	1,13E-11
SLC6A10P	2,15236426 1	-4,15168278	6,52954737 1	4,16E-11	1,44E-08
AF279873.3	2,15118888 8	-4,9621382	7,65473809 4	1,49E-14	8,79E-12
FAM133A	2,14952436 2	-2,821149844	7,93907454	1,67E-15	1,13E-12
CLDN19	2,14087598 1	-3,395891462	6,60340863 9	2,56E-11	9,44E-09
NAA11	2,13761787 9	-5,145381142	7,58731485 4	2,47E-14	1,36E-11
GTSF1	2,13075894 6	-1,263445408	6,92777909 3	2,86E-12	1,21E-09
LIN28A	2,12157196 9	-4,499735739	7,92762946 7	1,83E-15	1,20E-12

10

20

30

40

50

MAGEA8	2,11790700 4	-3,977326437	8,17917990 9	2,49E-16	1,96E-13
LINC01980	2,11776125 3	-3,829927052	5,32617505 5	5,57E-08	1,34E-05
KLF2P4	2,10058941 5	-4,750235714	8,68630909 8	3,78E-18	3,43E-15
DSCR4	2,09275523 2	-5,403808431	8,08629979 1	5,23E-16	3,99E-13
ITLN1	2,08867667 2,08867667	-2,29318729	5,03472184 6	2,60E-07	5,54E-05
CT45A1	2,07938087 4	-5,405359006	7,31402329 6	1,86E-13	9,09E-11
NF1P8	2,07537051 1	-5,692894919	9,47393679 2	3,61E-21	4,74E-18
KLF2P1	2,07300844 4	-3,6200697	6,27208956 6	2,17E-10	7,02E-08
MIR548XHG	2,07044428 3	-5,331794313	7,51728279 5	4,17E-14	2,24E-11
LINC02575	2,06253054 6	-3,044269717	6,40642414 8	9,23E-11	3,12E-08
AC011632.1	2,05117293 6	-3,638753537	5,72305268 6	6,01E-09	1,63E-06
PAGE2	2,04957635 4	-4,909073568	5,88058940 9	2,38E-09	6,71E-07
LGSN	2,03105435 2	-3,044695186	6,36687095 1	1,19E-10	3,90E-08
AACSP1	2,0309077 2,0309077	-3,709092597	6,62325996 2,24E-11	2,24E-11	8,69E-09
PHF2P2	2,02608367 7	-5,004988879	7,08599550 4	9,49E-13	4,31E-10
CCNYL2	2,02266969 8	-3,765568365	6,79677610 3	7,01E-12	2,81E-09
LINC00668	2,01449390 6	-1,56612255	4,38810929 4	6,01E-06	0,0010069

10

20

30

40

50

LINC01518	2,00650582 4	-5,085290655	7,02328617 4	1,47E-12	6,44E-10
ADAMTS20	2,00569731 8	-3,637561693	6,50259877 8	4,96E-11	1,70E-08
SOHLH1	2,00179654 6	-4,330101622	6,620743	2,28E-11	8,69E-09
PNMA5	1,99993345 3	-3,517960398	6,14969324 8	4,66E-10	1,41E-07
DEFA5	1,99380561 3	-4,907030767	5,12217872 5	1,65E-07	3,68E-05
LINC02820	1,99176331 6	-4,143824928	6,07312697 6	7,47E-10	2,21E-07
BAGE2	1,98815273 9	-5,263687596	6,72385393 7	1,15E-11	4,51E-09
LINC02241	1,97334177 7	-5,300067715	7,02890487 9	1,42E-12	6,31E-10
AL117329.1	1,95404017 2	-3,347929769	5,42806490 7	3,19E-08	8,01E-06
LINC02315	1,95100476 3	-4,212787021	5,58120750 9	1,35E-08	3,56E-06
EZHIP	1,94663563 9	-4,861354709	7,12728653 6	7,08E-13	3,35E-10
ASNSP1	1,92187134 7	-4,78892165	6,56273560 5	3,34E-11	1,22E-08

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

GPR1-AS	1,90854342 1	-5,109281461	6,89959410 8	3,47E-12	1,44E-09
TMEM132D- AS1	1,90322959 7	-5,300638941	6,16664479 9	4,20E-10	1,29E-07
AC132807.2	1,89850573	-5,072021979	6,40387057 9	9,39E-11	3,12E-08
AC006206.2	1,89466753 4	-2,638052905	4,83056563 2	7,32E-07	0,00014647 4
COX7B2	1,89117777 5	-5,455245962	5,77528269 9	4,43E-09	1,22E-06
AC106771.1	1,88506669	-5,675456684	7,59193580 5	2,39E-14	1,34E-11
HIF3A	1,87070366 1	0,701127594	6,55459978	3,53E-11	1,24E-08
GALNT8	1,87008543 3	-0,437607776	6,11239296 4	5,87E-10	1,75E-07
ZIC1	1,86070947	-1,516130927	3,95640373 8	3,94E-05	0,00571413 3
AL139023.1	1,85495192 8	-5,012681672	6,24278669 9	2,61E-10	8,11E-08
HTR2C	1,85422103 4	-4,119297399	5,17313745	1,26E-07	2,87E-05
NLRP7	1,84914606 9	-2,338087652	5,56952060 5	1,45E-08	3,76E-06
PRSS21	1,84073042 4	-0,204247118	3,49245274 5	0,00024442 8	0,03137845 2
BRDT	1,83529903 7	-3,904248712	5,04809181 8	2,43E-07	5,22E-05
CSAG4	1,83431103 2	-5,614686507	7,49284210 4	5,00E-14	2,63E-11
LINC01234	1,82637594 2	-1,805925328	5,26151511 8	7,90E-08	1,83E-05

10

20

30

40

50

HBE1	1,81760241 9	-4,603140502	6,06334466 6	7,93E-10	2,31E-07
PURPL	1,81448641 2	-3,679257662	5,55378686 4	1,58E-08	4,06E-06
LINC00221	1,80965224 5	-5,175454703	5,10868506 8	1,77E-07	3,92E-05
LINC02616	1,80548068 5	-5,362176958	6,26329133	2,29E-10	7,32E-08
LCN15	1,79941768 1	-3,762435269	3,99097847 6	3,41E-05	0,00512597 6
AC021504.1	1,79837377 4	-3,676444658	4,39704612 8	5,77E-06	0,00097361 8
AC010789.1	1,79436371 6	-4,853215323	5,68320359 7	7,57E-09	2,03E-06
PASD1	1,79144572 1	-5,484613287	6,24971135 6	2,50E-10	7,87E-08
REG3A	1,79129850 1	-4,368125337	3,80950238 8	7,17E-05	0,01002078 3
AC073365.1	1,78358149 7	-4,131354349	4,65837099 9	1,70E-06	0,00031316 4
MAGEB1	1,77967523 2	-5,606739837	5,78022560 8	4,31E-09	1,20E-06
SLC5A12	1,76660195 8	-1,94255727	4,53581586 5	3,04E-06	0,00054340 6
RSPO4	1,75738542 1	-1,302683289	4,50691291 5	3,48E-06	0,00061278 4
AC209154.1	1,74843245 8	-5,516016104	5,93583986 6	1,71E-09	4,94E-07
LINC01667	1,74601455 4	-5,061254566	4,96068391 9	3,80E-07	7,95E-05
AL121949.1	1,74499487 2	-4,316419882	5,30742274 2	6,17E-08	1,44E-05

10

20

30

40

50

AC010894.3	1,74025515	-2,833927786	4,85899940 7	6,35E-07	0,00012822 6
AP005119.2	1,72925950 2	-4,88170109	5,88196138 5	2,37E-09	6,71E-07
MKRN9P	1,72263432 1	-4,182416635	5,35370364	4,80E-08	1,19E-05
AC010595.1	1,71535429 3	-4,644368767	4,77173095 3	9,78E-07	0,000191
AL133467.2	1,70114837 4	-4,976525616	5,19537125 5	1,12E-07	2,58E-05
LINC02476	1,70039512	-5,644032437	6,98624286 3	1,91E-12	8,19E-10
RETNLB	1,69905438 8	-3,885915433	4,77330013	9,71E-07	0,000191
KCNMB2-AS1	1,69506068 5	-0,988145978	3,66807520 9	0,00012534 1	0,01682202 4
XAGE2	1,68668288 6	-4,710971025	4,19830722 3	1,40E-05	0,00225396 8
AC090015.1	1,68563075 1	-4,398114868	4,38325494 1	6,14E-06	0,00102214 4
KIF1A	1,68277571 1	1,285541005	3,71448129	0,00010456 3	0,01427671 5
AC007848.1	1,67835554 6	-4,038653977	4,58746057 1	2,38E-06	0,00043251 5

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 4】

KIF25-AS1	1,67403570 9	-3,690845996	3,76157779 4	8,68E-05	0,01199234 2
FBN3	1,67333283 1	-0,814673664	4,05940170 1	2,55E-05	0,00391633 9
SELENOOLP	1,67332344	-5,427826167	5,31485009 1	5,92E-08	1,41E-05
AL133467.4	1,66593951 8	-5,219430378	5,33993471 9	5,17E-08	1,26E-05
LINC00858	1,65860011 1	-2,959261909	3,7390908	9,49E-05	0,01303317 1
PSLNR	1,65509093 7	-4,913943477	4,65027640 8	1,76E-06	0,00032305 1
SLC9A3P2	1,64973031	-5,075829423	4,89159277 7	5,39E-07	0,00011081 2
AC090809.1	1,64927951 6	-5,541899357	5,05059780 3	2,40E-07	5,20E-05
FAM230C	1,64425093 8	-5,449349021	4,82680666 3	7,46E-07	0,00014797 9
POU6F2-AS2	1,64356882 7	-4,777156529	4,41872622 3	5,23E-06	0,00088808 6
GABRG2	1,63690516 2	-4,549333623	3,81301022 9	7,07E-05	0,00993938 1
AC092969.1	1,63092205 1	-3,497782673	3,98185434	3,54E-05	0,00522538 9
AP005205.3	1,63088659 4	-4,902468701	5,61968681 2	1,09E-08	2,89E-06
LINC01807	1,63063548 1	-4,415451565	5,31060612 4	6,06E-08	1,43E-05
SMPD4P1	1,62580106 4	-4,11531327	5,17084564 8	1,28E-07	2,88E-05
AP003900.1	1,62265677 7	-5,509143568	5,34453978 2	5,04E-08	1,24E-05

10

20

30

40

50

LINC01297	1,61612901 7	-5,187259869	5,06695497 7	2,20E-07	4,82E-05
STRA8	1,61344221 6	-4,32985331	4,58407168 7	2,42E-06	0,00043616
LINC00898	1,61238719 2	-4,234760239	4,10546801 3	2,10E-05	0,00328108 1
AC104041.1	1,61166537 8	-4,278463036	4,26112177 2	1,06E-05	0,00174464 2
GPR158	1,60678108	0,014262028	3,98373108 6	3,51E-05	0,00521720 1
DPPA2	1,60291860 2	-5,428860929	4,48204868 6	3,90E-06	0,00068283 9
FSTL5	1,60148065 1	-3,657873756	3,65669399 3	0,00013099 8	0,01748198 5
LINC01419	1,59902066 9	-5,434029513	4,27654700 5	9,93E-06	0,00164048 6
ZNF280A	1,59702360 9	-3,745846628	4,69327010 3	1,43E-06	0,00026886 6
LINC01257	1,59623947 1	-4,822384088	4,89290313 4	5,36E-07	0,00011081 2
DDX53	1,59338022 6	-5,585676236	4,97314678 5	3,57E-07	7,53E-05
LINC02109	1,58770809 1	-5,096060193	4,68128819 2	1,52E-06	0,00028264 9
ATOH1	1,58401175 9	-4,323628236	3,95591676 2	3,94E-05	0,00571413 3
GAGE2A	1,57882551 9	-5,784159759	4,51505300 7	3,35E-06	0,00059437 3
AC061975.6	1,57695345 7	-4,390879942	4,13440396 2	1,85E-05	0,00293577
MIR663AHG	1,57196349 1	-4,295677555	3,89253236 9	5,12E-05	0,00733028 4

10

20

30

40

50

ZNF716	1,57190378 1	-5,225870114	4,22235544 2	1,26E-05	0,00204213 3
LINC02432	1,57142300 7	-2,466053998	3,51815082 7	0,00022206 6	0,02866351 5
CACNA1B	1,57032150 9	-1,022319545	3,70094206 5	0,00011026 3	0,01496858 3
CDH12	1,57016108 5	-3,529294838	3,69285734 5	0,00011380 6	0,01536115 7
AC074389.2	1,56346689 2	-5,315547276	4,04591797 5	2,70E-05	0,00412008 4
OR51B5	1,56334915 8	-4,863088039	4,72212301 2	1,25E-06	0,00023945
LINC01456	1,56169628 6	-4,890259711	4,19419350 5	1,43E-05	0,00227939 4
TEX15	1,55989131 5	-3,253834105	3,94296641 5	4,16E-05	0,00599251
RPL18P13	1,55603627 4	-3,569081847	4,70484374	1,36E-06	0,00025831 1
VCX	1,55499766 7	-4,658496433	4,07168171 7	2,42E-05	0,00374133 1
LINC01854	1,54990413 5	-5,575379569	4,76449112 9	1,01E-06	0,00019628 6
MED15P9	1,54957751 9	-5,311556643	4,45479101 2	4,43E-06	0,00076334 4
LINC02327	1,54751503 2	-5,650900283	4,70019428 3	1,39E-06	0,00026208 3

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 5】

PAGE1	1,53812186 8	-5,476489549	3,98716515 6	3,46E-05	0,00517541 6
CNTNAP4	1,53725007	-3,991211492	3,57910638 9	0,00017643 4	0,02289866 8
AC005537.2	1,52953115 7	-2,609421265	3,76262642 8	8,65E-05	0,01199234 2
AL157778.1	1,52500822	-5,636437717	4,43913110 2	4,76E-06	0,00081452 1
PRR20G	1,51385350 6	-5,165353937	4,12489475 9	1,93E-05	0,00303828 5
LINC02335	1,50454990 9	-5,765093178	4,25254193 2	1,10E-05	0,00179975 1
CT55	1,49866312 2	-5,137051168	4,87851091 5	5,76E-07	0,00011730 8
ERVV-2	1,49655181 6	-4,750807631	3,39448810 2	0,00035040 2	0,04426125 5
MDGA2	1,49433561 1	-3,870539531	3,85389091 4	5,99E-05	0,00847747 8
AL031736.1	1,46045502 9	-4,549830006	3,97949795 4	3,57E-05	0,00524426 6
LINC02267	1,46023831 9	-5,874832643	4,46598361 9	4,20E-06	0,00073019 8
MAGEA9	1,44919015 9	-5,915870849	4,09677066 6	2,18E-05	0,00338330 3
ERVH48-1	1,44841793 1	-2,632076296	3,61327990 8	0,00015485 4	0,02043473
LINC02377	1,44386879 6	-5,646432241	3,60248400 2	0,00016138 9	0,02106171 4
POTEF	1,44012798 5	-2,58034864	4,04216739 3	2,75E-05	0,00415918 8
CASC20	1,43449738 6	-5,072988283	3,38379046 1	0,00036426 2	0,04576725 1

10

20

30

40

50

TPTE	1,41689770 8	-5,806978532	3,87115525	5,59E-05	0,00795058 7
GOLGA6L7	1,41643619 2	-4,741969567	3,60762080 4	0,00015824 8	0,02076656 5
IZUMO2	1,40696584 8	-4,762766617	3,46512831 2	0,00027049 9	0,03453763 8
LINC01901	1,40612794 8	-4,999833531	3,43011135 6	0,00030770 5	0,03907686 7
LINC02484	1,36981357	-5,93251048	3,61677119 6	0,00015279 5	0,02027621 7

10

【0136】

p a M A P は、多能性がんの進行及び浸潤に関連するという概念を支持し（Ben-Porath et al., 2008）、予後不良又は進行期を有するがんサブタイプにおいて優先的に発現された（図4F）。乳がん（BRCA）において、基底サブタイプは、最多数のp a M A Pを有し、HER2サブタイプ及び管腔A及び管腔Bサブタイプが続いた。膠芽腫（GBM、G4）試料はまた、低悪性度の膠腫（LGG、G2、及びG3）と比較して著しく高い数のp a M A Pを示したが、ステージIII及びIVの子宮内膜がん（UCEC）は、早期ステージの腫瘍よりも多くのp a M A Pを発現した。同様に、転移性黒色腫試料は、原発性病変と比較してより多くのp a M A Pを発現した（図4F）。それにも関わらず、全てのサブタイプ及びステージからのがんがp a M A Pを再発現し得ることが観察され（図4F及び10F）、p a M A Pの免疫標的化が任意の腫瘍ステージで想定され得ることが示された。

20

【0137】

実施例6：共有されたエピジェネティック及びシグナル伝達事象は、がんにわたるp a M A P及びs a M A P発現と関連する。

30

p a M A P発現を調節する機構を解明するために、エピジェネティック及び局所DNAコピー数異常との潜在的な相関を最初に評価した。この分析は、がんタイプ内及びがんタイプにわたって、ソース遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化状態が、ほとんどのp a M A PについてのMCS発現と負の相関を示すことを示した（図5A及び11A）。対照的に、p a M A Pのごく一部のみが、DNAコピー数の増加と関連していた（図5B及び11B）。s a M A Pについて同様の傾向が観察され（図11C及びD）、起源の組織に関係なく、エピジェネティクスが、がんにおける幹細胞性及び多能性特徴を獲得する上で重要な機構であることを示す。

40

【0138】

次に、分子シグネチャデータベース（MSigDB）（Liberzon et al., 2015）からの特徴的な遺伝子セットコレクションを使用して、p a M A P及びs a M A P発現を駆動し得る他の事象を探索し（それらの共発生を考慮して一緒に調査した）、グローバルパターンに対するそれらの効果を理解した。第一に、このデータは、有糸分裂紡錘体アセンブリ、G2/Mチェックポイント、E2F、及びMYCシグナル伝達などの増殖関連遺伝子セットが、全てのp a M A P及びs a M A P発現試料にわたって最も濃縮され、共有されていたことを明らかにした（図5C及び11E）。増殖及び機能性の高い要求に応じて、DNA修復、タンパク質合成、及びアンフォールドタンパク質応答プログラムもまた、堅牢に上方制御された。がん内のp a M A P及びs a M A P発現と相関

50

する第2のPSCパターン：糖解への代謝再配線、及び分化組織（すなわち、酸化リン酸化、胆汁酸、及び脂肪酸代謝）において活性な経路の下方調節（Aran et al., 2017a, Kroemer and Pouyssegur, 2008, Zhang et al., 2012）。

【0139】

特に、2つのシグナル伝達経路は、paMAP及びsaMAP発現試料において非常に濃縮されていた：MYCシグナル伝達及びホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）／タンパク質キナーゼB（AKT）／ラパマイシンの哺乳動物標的（mTOR）経路。これらの2つの経路は、細胞増殖、タンパク質合成、及び代謝を調節して、がん細胞の生存及び播種を促進する（Heiden et al., 2009, Janku et al., 2018）（図5C）。これらの経路における活性化変化は、TCGA試料中で最も頻繁であるが（Sanchez-Vega et al., 2018）、paMAP及びsaMAP発現試料中のそれらの有病率は、非発現試料中よりも著しく高かった。これは、PIK3CAの変異、PI3K／AKTシグナル伝達アンタゴニストPTEN、PIK3R1、及びSTK11（LKB1とも呼ばれる）の欠失、並びにMYC増幅に特に該当した（図5D）。活性化PIK3CA^{H1047R}変異は、ヒトPSCにおける多能性遺伝子の発現及び自己再生を増加させるPI3K／AKT活性化の能力と一致する、乳がん、肺がん、及び結腸直腸がんのマウスモデルにおける脱分化によって多能性を誘導する（Madsen, 2020）。更に、MYC及びPI3K／AKT／mTOR経路の調節下での代謝とエピジェネティクスとの間のリンクは、PSC及びがんの両方において記載されている（Dai et al., 2020, Fagnocchi and Zippo, 2017, Madsen, 2020, Zhang et al., 2012）。細胞の成長及び増殖を促進することに加えて、MYC過剰発現は、系統を特定する転写因子の転写抑制を誘導する。これは、幹様状態、腫瘍発生、及び自己再生に向けたエピジェネティックリプログラミングを促進するポリコム抑制複合体2（PRC2）などのクロマチン修飾因子の上方制御及び動員によって達成される（Dardenne et al., 2016, Das et al., 2019, Fagnocchi and Zippo, 2017, Poli et al., 2018, Stine et al., 2015, Zhang et al., 2019）。したがって、paMAP及びsaMAPの数は、がん内のPRC2成分（SUZ12、EZH2、EED）の発現と強く相関することが分かった（図5E）。

【0140】

発がん性脱分化を促進するためにクロストークする他のコアシグナル伝達経路、すなわち、ヘッジホッグ、形質転換成長因子（TGF）-β、WNT／β-カテニン、及びNOTCHシグナル伝達（Madsen, 2020, Malta et al., 2018, Pelullo et al., 2019）もまた、高paMAP及びsaMAP発現試料で濃縮された（図5C）が、一方、腫瘍抑制剤は、高い欠失の発生率を有していた（図5D）。その中で、多能性阻害剤TP53（Lin and Lin, 2017, Merkle et al., 2017）は、paMAP及びsaMAP発現を有するがん内及びがんにわたって強い負の濃縮シグネチャを有し、変異の発生率が最も高いことが見出された（図5C、5D、及び11F）。総じて、これらのデータは、共通のゲノム及びシグナル伝達異常が、がんにわたって統一的なPSC様プログラムを誘導するために協働することを示す。

【0141】

実施例7：paMAP及びsaMAPの免疫原性

paMAPが免疫療法のための魅力的な標的であることを考慮して、それらの免疫原性を、健康なドナーからの末梢血単核細胞（PBMC）を用いたインビトロT細胞アッセイを使用して試験した。paMAPは、i) Repitopeによって予測された免疫原性スコア、T細胞応答の確率を予測するために公開T細胞受容体（TCR）データベースを使用する機械学習アルゴリズム（Ogishi and Yotsuyanagi, 20

19)、ii) paMAPを提示するHLAアロタイプ(iPSC及びPBMCドナーによって共有されるHLA-A*02:01又はHLA-B*53:01)、iii)少なくとも1つのTCGAがんタイプにおける試料の少なくとも10%における発現(図3)、及びiv)新規MAP状態の4つの基準に基づいて優先した。11個のpaMAPに対するCD8 T細胞の応答を、ペプチド-HLA四量体染色及び／又は特異的T細胞のより高感度の機能的増殖(FEST)アッセイを使用して試験した(Danilova et al., 2018)。FESTアッセイでは、TCR配列決定は、合成paMAPで刺激されたT細胞又は刺激されていないT細胞に対して実施される。T細胞を、個々の又はプールされた(n=5又は6)paMAPでパルスした自己T細胞枯渇PBMCでインビトロで刺激した(表3A~B)。

【表13】

表3A：免疫原性研究で使用するペプチド

全ての paMAP の プール HLA- A*02:01(6 ペプチ ド)	5 つの paMAP の プール HLA- B*53:01	saMAP のプール(3 つの HLA-A*02:01 2 つの HLA- B*53:01)	HLA-B*53:01 ペ プチド単独	MelanA ctl ペプチ ド
GQFDRPAGV(pa_03) RLQHEPPHPV(pa_05) KLAQIIRQV(pa_07) VTLSTYFHV(pa_10) ALYPQPPTV(pa_11) SLLGSSEILEV(pa_12)	QPLPQPLELW(pa_01) QPLPEPLQLW(pa_02) IPMKIYLW(pa_04) LPMWKALLF(pa_06) LPSGETIAKW(pa_08)	HPLPGLILEW(sa_01) ALLEGVNTV(sa_02) FLLPGVLLSEA(sa_04) TPSPHQQQL(sa_05) RLWNETVEL(sa_06)	LPMWKALLF(pa_06)	ELAGIGILT

【表 1 4】

表 3 B : ペプチド又はペプチドプールによって増幅された TCR β クロノタイプ

増幅された TCR β クロノタイプ (TCR β CDR3 配列)	ペプチド又はペプチドプール
CASSQPPAAGAKNIQYF (配列番号 73)	プール paMAP HLA-A*02:01
CASSITGGEKLFF (配列番号 74)	プール paMAP HLA-A*02:01
CASSKWGSYGYTF (配列番号 75)	pa_10 ペプチド HLA-A*02:01
CASSLPDTTYEQYF (配列番号 76)	pa_10 ペプチド HLA-A*02:01
CASSYRTGSAEAF (配列番号 77)	pa_11 ペプチド HLA-A*02:01
CASSLGAYEQYF (配列番号 78)	pa_11 ペプチド HLA-A*02:01
CASSYPQGGEQFF (配列番号 79)	pa_11 ペプチド HLA-A*02:01
CATSRGTGVNTEAF (配列番号 80)	pa_11 ペプチド HLA-A*02:01
CASSRDTYSPLHF (配列番号 81)	pa_12 ペプチド HLA-A*02:01
CASSLGRWNSPLHF (配列番号 82)	pa_12 ペプチド HLA-A*02:01
CASSGPGDQPQHF (配列番号 83)	pa_06 HLA-B*53:01
CASSEWGSRAGGDTQYF (配列番号 84)	pa_06 HLA-B*53:01
CASSMGRGHEQYF (配列番号 85)	MelanA ctl ペプチド
CASSHFGRRGTEAF (配列番号 86)	MelanA ctl ペプチド
CASSSHLPYPYEQYF (配列番号 87)	MelanA ctl ペプチド

10

20

【0 1 4 2】

正準 p a M A P S L L G S S E I L E V 及び K L A Q I I R Q V に対する著しい T 細胞応答を、4 人のドナーのうちの 1 人（それぞれ、D 1 3 及び D 1 4）において四量体染色によって検出した（図 6 A）。F E S T アッセイはまた、四量体染色によって特異的 T 細胞増殖が検出されなかった D 1 2 における 4 つの p a M A P の免疫原性を明らかにした（図 6 B）。単一のペプチドによる刺激に続いて、正準 p a M A P S L L G S S E I L E V 及び L P M W K A L L F、並びに非正準 p a M A P V T L S T Y F H V 及び A L Y P Q P P T V に対する 2 ~ 4 つの TCR β クロノタイプの特異的増殖（図 6 B、表 3 A ~ B）が特定された。2 つの追加の TCR β クロノタイプは、H L A - A * 0 2 : 0 1 結合 p a M A P のプールによる刺激後に増殖した（図 6 B、表 3 A ~ B）。加えて、5 つの s a M A P の免疫原性を評価した。リンパ系前駆細胞におけるその発現にも関わらず（図 2 B）、U D P グリコシルトランスフェラーゼファミリー 3 メンバー A 2（U G T 3 A 2）遺伝子に由来する正準 s a M A P F L L P G V L L S E A は、四量体染色によって 1 つのドナーにおいて免疫原性であったことが見出された（図 6 A 及び B）。

30

40

【0 1 4 3】

p a M A P 及び s a M A P 検出の偶然性は、インビトロ刺激前のドナー P B M C における低頻度抗原特異的（すなわち、四量体⁺）C D 8 ⁺ T 細胞によって説明することができ、1 0 ⁶ 個の C D 8 ⁺ T 細胞当たりの p a M A P 特異的細胞の中央値は ≤ 0.75 である（図 6 C）。実際、高い特異的 T 細胞頻度を有する陽性対照ペプチドは、刺激後の四量体染色によって一貫して免疫原性であった。対照的に、p a M A P 及び s a M A P と同様の特異的 T 細胞頻度を有していた陽性対照エピトープ G a g ₇₇（ヒト免疫不全ウイルス、H I V に由来する）は、試験した 3 つの P B M C ドナーのうちのいずれにおいても免疫原

50

性ではなかった（図 6 C）。インビトロプライミングの前に検出された A g 特異的 T 細胞の低頻度は、それらが（メモリーではなく）天然の T 細胞区画内にあったことを示唆する。

【 0 1 4 4 】

要約すると、5つの新規 p a M A P（3／4 正準及び 2／7 非正準）並びに 1／5 正準 s a M A P は、一方又は両方の T 細胞アッセイにおいて免疫原性であった（図 1 2 A）。それらの M C S は、対応する正常組織よりもがん試料において著しく多く発現した（図 2 A、図 3、図 1 2 B、及び図 1 2 C）。これらの p a M A P は、異なる起源を有していた： i）多能性維持及び胚発達に關与する転写因子（T F）であり、がんにおける自己再生を促進することが知られている、Z S C A N 1 0、F O X H 1、及び T A F 4（K a z a n t s e v a e t a l. , 2 0 1 6、L o i z o u e t a l. , 2 0 1 9、W a n g e t a l. , 2 0 1 9、2 0 0 7、Y u e t a l. , 2 0 0 9）、i i）がん胎児性抗原 C L D N 6（R e i n h a r d e t a l. , 2 0 2 0）、並びに i i i）前立腺がんに関連する「エキソン化」転置因子、P C A T 1 4（B a b a r i n d e e t a l. , 2 0 2 0、P r e n s n e r e t a l. , 2 0 1 1）（図 1 2 A）。加えて、M A G E A 4（G V Y D G R E H T V 及び K V L E H V V R V）に由来し、がん試料中で過剰発現した p a M A P のうちの 2 つ（図 1 2 B）は、以前の研究（D u f f o u r e t a l. , 1 9 9 9、J i a e t a l. , 2 0 1 0）において免疫原性であり、全体として、p a M A P の治療可能性を強化した。

【 0 1 4 5 】

実施例 8：p a M A P 及び s a M A P の発現は免疫回避と相關する

p a M A P 及び s a M A P が免疫原性であり得ることを判定した後、T C G A 患者コホートの患者の生存に対するそれらの H L A 提示の効果を、C o x 回帰分析を使用して評価した。p a M A P 又は s a M A P が、N e t M H C p a n - 4 . 0 ソフトウェア（J u r t z e t a l. , 2 0 1 7）に従って、M C S の発現、及びマップに結合し、提示することができる H L A アロタイプの存在の 2 つの条件が満たされた場合、所与の試料において提示されたと推定した（表 4）。したがって、各マップは、その M C S が発現された試料の一部（関連する H L A アロタイプを有する）においてのみ提示されると想定された。p a M A P の提示は、腎臓明細胞がん（K I R C）における生存に H L A 依存性の正の影響を有したが、他のがんタイプにおいては、負の影響を有しなかったか、又は最小限の負の影響を有した（図 7 A 及び 1 3 A）。s a M A P を使用して実施された同じ分析は、同様の結果を示した。s a M A P の単なる発現は、多くのがんタイプにおいて、生存期間の短縮と相關した（図 1 3 B）。しかしながら、関連する H L A アロタイプの存在は、K I R C 及び甲状腺がん（T H C A）において正の効果を有し、A M L（L A M L）において負の効果を有し、他の全てのがんタイプにおいて効果を有しなかった（図 1 3 B）。したがって、群間の差異が最小であることを考慮すると、p a M A P 及び s a M A P の提示は、T C G A コホートからの患者に明確な生存優位性を与えなかったと結論付けることができ、これにより、それらの発現と関連する可能性のある免疫回避機構を調査することになった。

10

20

30

40

50

【表 15 - 1】

表 4 : NetMHCpan-4.0 (結合親和性ランク<2%) を使用して計算した、p aM A P 及び s a M A P (混合結合剤) に結合可能な T C G A 患者由来の H L A アレル。全ての T C G A 患者アレルを試験した。研究した i P S C 試料からの H L A アレルをこのリストに追加した。

MAP	HLA アレル
AKKKENITY	HLA-B15:03 HLA-B15:18 HLA-B15:46
ALLEGVNTV	HLA-A02:01 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A69:01 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B48:01 HLA-B13:01 HLA-B48:03 HLA-B15:30 HLA-B39:02 HLA-B15:58 HLA-C12:03 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C08:03
ALLEGVNTVVV	HLA-A02:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10

10

20

30

40

50

【表 15 - 2】

ALYPQPPTV	HLA-A02:01 HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B46:01 HLA-B13:01 HLA-B48:03 HLA-B51:07 HLA-B15:30 HLA-B15:58 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
AMYHALEKA	HLA-A02:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10	
ASTPASSEL	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B46:01 HLA-B57:03 HLA-B15:17 HLA-B15:16 HLA-B57:02 HLA-B15:30 HLA-B15:58 HLA-B57:04 HLA-C12:03 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C15:05 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C15:04 HLA-C08:03	20
EEEIHSPTL	HLA-B40:01 HLA-B18:01 HLA-B44:02 HLA-B40:02 HLA-B44:03 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B45:01 HLA-B41:02 HLA-B44:05 HLA-B48:03 HLA-B14:03 HLA-B38:02 HLA-B44:15 HLA-B15:37 HLA-B18:03 HLA-B15:09 HLA-B44:10 HLA-B41:03 HLA-B39:09	
FAYPNQKDF	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-B53:01 HLA-C04:01 HLA-A25:01 HLA-B52:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B51:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B58:01 HLA-B35:05 HLA-B46:01 HLA-B57:03 HLA-B56:04 HLA-B15:02 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B51:02 HLA-B51:08 HLA-B15:10 HLA-B15:05 HLA-B51:07 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:37 HLA-B59:01 HLA-B15:08 HLA-B15:16 HLA-B15:11 HLA-B78:01 HLA-B15:09 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B15:20 HLA-B15:06 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B57:04 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	30 40

【表 15 - 3】

FAYPNQKVTF	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-B53:01 HLA-C04:01 HLA-A25:01 HLA-A24:03 HLA-A24:02 HLA-A23:01 HLA-A24:07 HLA-A24:10 HLA-A24:20 HLA-B52:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B15:01 HLA-B51:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B58:01 HLA-B35:05 HLA-B46:01 HLA-B39:10 HLA-B67:01 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B56:04 HLA-B15:02 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B51:02 HLA-B81:01 HLA-B51:08 HLA-B15:10 HLA-B15:05 HLA-B51:07 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:37 HLA-B59:01 HLA-B15:08 HLA-B15:16 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B78:01 HLA-B15:09 HLA-B55:04 HLA-B56:01 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58 HLA-B57:04 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
FGDGKFSEV	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-A02:06 HLA-A02:05 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:10 HLA-B39:09 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	30
FHSQNSPIRY	HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-A01:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-B15:18 HLA-B38:01 HLA-B15:10 HLA-B38:02 HLA-B15:37 HLA-B15:09 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C07:01 HLA-C02:02 HLA-C07:18 HLA-C15:04 HLA-C07:17	40

FLLPGVLLSEA	HLA-A02:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-B55:02 HLA-B54:01 HLA-B56:01
FTEEDLHFVLY	HLA-A01:01 HLA-A26:01 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A26:08 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-A26:02 HLA-A43:01 HLA-B18:01 HLA-B18:03 HLA-C05:01
GEHLVSVTL	HLA-B40:01 HLA-B13:02 HLA-B48:01 HLA-B18:01 HLA-B44:02 HLA-B40:02 HLA-B38:01 HLA-B44:03 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B13:01 HLA-B49:01 HLA-B45:01 HLA-B41:02 HLA-B50:01 HLA-B44:05 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B38:02 HLA-B44:15 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B41:03
GEIKTFSDL	HLA-B40:01 HLA-B48:01 HLA-B18:01 HLA-B44:02 HLA-B40:02 HLA-B44:03 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B13:01 HLA-B49:01 HLA-B45:01 HLA-B41:02 HLA-B50:01 HLA-B44:05 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B44:15 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B15:46 HLA-B41:03
GKFQGLIEKF	HLA-B15:03 HLA-A24:03 HLA-A24:02 HLA-A23:01 HLA-A24:07 HLA-A24:10 HLA-A24:20 HLA-B27:02 HLA-B47:01 HLA-B15:46
GKLDNTNEY	HLA-B15:03 HLA-B15:18 HLA-B15:46
GLYDGREHSV	HLA-A02:01 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-C04:07
GQAHPQGSF	HLA-B15:03 HLA-B48:01 HLA-B15:01 HLA-B15:18 HLA-B13:01 HLA-B15:02 HLA-B48:03 HLA-B15:05 HLA-B15:25 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58
GQFDRPAGV	HLA-A02:01 HLA-C02:10 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B37:01 HLA-B13:01 HLA-B49:01 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B47:01 HLA-B15:30 HLA-B39:02 HLA-B15:58 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:01 HLA-C02:02 HLA-C07:04 HLA-C07:18 HLA-C17:01 HLA-C04:04 HLA-C07:05

10

20

30

40

50

【表 15 - 4】

GQFLVKSGY	HLA-B15:03 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A80:01 HLA-B18:01 HLA-B15:01 HLA-B15:18 HLA-B27:02 HLA-B15:02 HLA-B15:05 HLA-B15:25 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:12 HLA-B15:20 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:31 HLA-B15:46
GQITHNTSF	HLA-B40:01 HLA-B15:03 HLA-B48:01 HLA-B18:01 HLA-B15:01 HLA-B40:02 HLA-B15:18 HLA-B38:01 HLA-B37:01 HLA-B27:02 HLA-B46:01 HLA-B13:01 HLA-B50:01 HLA-B15:02 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B15:10 HLA-B15:05 HLA-B38:02 HLA-B15:25 HLA-B15:37 HLA-B15:08 HLA-B27:04 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B15:09 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B39:02 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58 HLA-B41:03 HLA-C03:02 HLA-C12:02
GQKENVVVY	HLA-B15:03 HLA-A30:02 HLA-A30:04 HLA-B18:01 HLA-B15:01 HLA-B15:18 HLA-B46:01 HLA-B15:02 HLA-B15:05 HLA-B15:25 HLA-B15:08 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B15:12 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:31 HLA-B15:46
GVYDGREHTV	HLA-C04:01 HLA-A02:06 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-C04:07
HPLPGLILEW	HLA-B53:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B51:01 HLA-B35:02 HLA-B58:01 HLA-B35:05 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B56:04 HLA-B58:02 HLA-B51:02 HLA-B51:08 HLA-B35:08 HLA-B59:01 HLA-B82:01 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B82:02 HLA-B57:04
IPMKIYLW	HLA-B53:01 HLA-B51:01 HLA-B51:02 HLA-B51:08 HLA-B42:02 HLA-B51:07 HLA-B59:01
ISMCDLVY	HLA-A01:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-B35:01 HLA-B35:05 HLA-B15:02 HLA-B15:17 HLA-B15:05 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:16 HLA-B15:20 HLA-B15:06 HLA-B57:04
KHFDSPRGVAF	HLA-B15:03 HLA-C04:01 HLA-B15:18 HLA-B38:01 HLA-B15:10 HLA-B38:02 HLA-B15:37 HLA-B15:09 HLA-C07:02 HLA-C14:02 HLA-C04:07 HLA-C14:03 HLA-C07:17
KLAQIIRQV	HLA-A02:01 HLA-C02:10 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-C02:02 HLA-C15:02 HLA-C17:01 HLA-C16:02

10

20

30

40

50

KLDSYIIPY	HLA-B15:03 HLA-A01:01 HLA-C04:01 HLA-A03:01 HLA-A11:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A03:02 HLA-A30:04 HLA-A32:01 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A74:01 HLA-A11:02 HLA-A01:02 HLA-A74:03 HLA-A11:12 HLA-A80:01 HLA-A11:03 HLA-B35:01 HLA-B15:01 HLA-B15:18 HLA-B15:02 HLA-B15:05 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:12 HLA-B15:20 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:31 HLA-C05:01 HLA-C08:02 HLA-C04:07 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C04:03 HLA-C15:04	10
KLQEKIQEL	HLA-A02:01 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-B48:01 HLA-B08:01 HLA-B42:01 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B42:02 HLA-B14:03 HLA-B15:30 HLA-B39:02 HLA-B15:58 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C07:18 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C07:17 HLA-C07:05	20

30

40

50

【表 15 - 5】

KMSELQTYV	HLA-A02:01 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A30:01 HLA-A30:04 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A74:01 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A74:03 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B48:01 HLA-B46:01 HLA-B13:01 HLA-B48:03 HLA-B15:30 HLA-B39:02 HLA-B15:58 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:05	10
KQFEGTVEI	HLA-A02:01 HLA-B40:01 HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A30:04 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A24:10 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B15:01 HLA-B40:02 HLA-B15:18 HLA-B38:01 HLA-B39:01 HLA-B37:01 HLA-B27:02 HLA-B41:01 HLA-B46:01 HLA-B13:01 HLA-B14:02 HLA-B49:01 HLA-B39:06 HLA-B41:02 HLA-B50:01 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B15:10 HLA-B15:05 HLA-B27:03 HLA-B38:02 HLA-B51:07 HLA-B15:25 HLA-B15:37 HLA-B27:04 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:09 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B73:01 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B15:46 HLA-B15:58 HLA-B41:03 HLA-B39:09 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	20 30
KQMENDIQLY	HLA-B15:03 HLA-A01:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A32:01 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-B48:01 HLA-B15:01 HLA-B44:02 HLA-B15:18 HLA-B44:03 HLA-B27:02 HLA-B13:01 HLA-B15:02 HLA-B48:03 HLA-B15:05 HLA-B15:25	40

	HLA-B27:04 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B39:02 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58	
KVLEHVVRV	HLA-A02:01 HLA-C02:10 HLA-A02:02 HLA-A30:01 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A69:01 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
LALGNTKEL	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B53:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B51:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B35:05 HLA-B46:01 HLA-B39:10 HLA-B67:01 HLA-B56:04 HLA-B51:02 HLA-B81:01 HLA-B51:08 HLA-B15:10 HLA-B35:08 HLA-B15:37 HLA-B15:08 HLA-B78:01 HLA-B15:09 HLA-B55:04 HLA-C12:03 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C15:05 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C01:03 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17	20 30

【表 15 - 6】

LPMWKALLF	HLA-B07:02 HLA-C03:04 HLA-B53:01 HLA-C04:01 HLA-A25:01 HLA-A29:02 HLA-A29:01 HLA-A24:07 HLA-B52:01 HLA-B35:03 HLA-B08:01 HLA-B35:01 HLA-B18:01 HLA-B55:01 HLA-B51:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B38:01 HLA-B39:01 HLA-B07:05 HLA-B55:02 HLA-B35:05 HLA-B54:01 HLA-B42:01 HLA-B39:10 HLA-B14:02 HLA-B67:01 HLA-B56:04 HLA-B15:02 HLA-B51:02 HLA-B81:01 HLA-B51:08 HLA-B15:10 HLA-B42:02 HLA-B14:03 HLA-B38:02 HLA-B51:07 HLA-B35:08 HLA-B15:37 HLA-B59:01 HLA-B15:08 HLA-B18:03 HLA-B15:11 HLA-B78:01 HLA-B15:09 HLA-B82:01 HLA-B55:04 HLA-B56:01 HLA-B15:13 HLA-B07:04 HLA-B82:02 HLA-B15:31 HLA-B39:09 HLA-C12:03 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C03:03 HLA-C16:01 HLA-C08:02 HLA-C04:07 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17	10
LPSGETIAKW	HLA-B53:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B58:01 HLA-B35:05 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B51:08 HLA-B35:08 HLA-B59:01 HLA-B15:16 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B57:04	20
MAWNGILHL	HLA-A02:01 HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-B53:01 HLA-C04:01 HLA-A68:02 HLA-A29:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A29:01 HLA-A02:05 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A69:01 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B35:03 HLA-B48:01 HLA-B35:01 HLA-B15:01 HLA-B55:01 HLA-B51:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B38:01 HLA-B39:01 HLA-B58:01 HLA-B55:02 HLA-B37:01 HLA-B35:05 HLA-B54:01 HLA-B42:01 HLA-B46:01 HLA-B39:10 HLA-B13:01 HLA-B14:02 HLA-B67:01 HLA-B49:01 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B39:06 HLA-B56:04 HLA-B15:02 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B51:02 HLA-B81:01 HLA-B51:08 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B15:10 HLA-B15:05 HLA-B42:02 HLA-B14:03 HLA-B38:02 HLA-B51:07 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:37 HLA-B59:01 HLA-B15:08 HLA-	30
		40

	B15:16 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B78:01 HLA-B15:09 HLA-B82:01 HLA-B55:04 HLA-B56:01 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B73:01 HLA-B57:02 HLA-B07:04 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B82:02 HLA-B39:02 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58 HLA-B39:09 HLA-B57:04 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
MKFGNQVSGLF	HLA-B15:03 HLA-B15:18 HLA-B38:01 HLA-B27:02 HLA-B15:10 HLA-B38:02 HLA-B47:01 HLA-B15:46	20
NPIGDTGVKF	HLA-B07:02 HLA-B53:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B35:02 HLA-B07:05 HLA-B35:05 HLA-B42:01 HLA-B39:10 HLA-B67:01 HLA-B56:04 HLA-B81:01 HLA-B35:08 HLA-B15:08 HLA-B15:11 HLA-B82:01 HLA-B55:04 HLA-B82:02	
NTENYILWGY	HLA-A01:01 HLA-A68:01 HLA-A25:01 HLA-A26:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A11:10 HLA-A36:01 HLA-A66:02 HLA-A66:01 HLA-A34:01 HLA-A26:08 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-A66:03 HLA-A26:03 HLA-A26:02 HLA-A43:01 HLA-B18:01 HLA-B44:02 HLA-B44:03 HLA-B44:05 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA-B44:10	30

【表 15 - 7】

NTLSESYIY	HLA-A01:01 HLA-B53:01 HLA-A25:01 HLA-A26:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A11:10 HLA-A36:01 HLA-A26:08 HLA-A01:02 HLA-A34:02 HLA-A80:01 HLA-A26:03 HLA-A26:02 HLA-A43:01 HLA-B35:01 HLA-B35:05 HLA-B15:02 HLA-B15:05 HLA-B35:08 HLA-B15:08 HLA-B15:11 HLA-B15:13 HLA-B15:20 HLA-B15:31 HLA-B57:04	
QPLPEPLQLW	HLA-B53:01 HLA-B58:02 HLA-B51:08 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B57:04	10
QPLPQPLELW	HLA-B53:01 HLA-B58:02 HLA-B51:08 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B57:04	
QTELNNSKQEY	HLA-A01:01 HLA-A01:03 HLA-A36:01 HLA-A01:02	
RLQHEPPHPV	HLA-A02:01 HLA-A02:02 HLA-A02:03 HLA-B13:02 HLA-B48:01 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B15:30 HLA-B39:02 HLA-B15:58	
RLWNETVEL	HLA-A02:01 HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A74:01 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A74:03 HLA-A80:01 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B48:01 HLA-B39:01 HLA-B13:01 HLA-B81:01 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B15:05 HLA-B15:25 HLA-B27:04 HLA-B47:01 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B39:02 HLA-B15:58 HLA-B39:09 HLA-C07:02 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	20 30
RLWNETVELF	HLA-A02:01 HLA-B15:03 HLA-C04:01 HLA-A24:03 HLA-A30:02 HLA-A24:02 HLA-A23:01 HLA-A30:04 HLA-A32:01 HLA-A24:07 HLA-A24:10 HLA-A02:07 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A24:20 HLA-A80:01 HLA-B13:02 HLA-B48:01 HLA-B15:01 HLA-B27:02 HLA-B13:01 HLA-B58:02 HLA-B15:05 HLA-B15:25 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:46 HLA-C04:07 HLA-C04:04	40

RPARPPAGL	HLA-B07:02 HLA-C03:04 HLA-B35:03 HLA-B55:01 HLA-B35:02 HLA-B07:05 HLA-B42:01 HLA-B39:10 HLA-B67:01 HLA-B56:04 HLA-B81:01 HLA-B15:10 HLA-B42:02 HLA-B14:03 HLA-B15:09 HLA-B82:01 HLA-B55:04 HLA-B07:04 HLA-B82:02 HLA-C01:02 HLA-C03:03 HLA-C08:02 HLA-C08:04 HLA-C01:03	
RTDTGKRVLY	HLA-A01:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-A11:03 HLA-B57:01 HLA-B15:17 HLA-B57:04 HLA-C05:01 HLA-C16:02 HLA-C04:03 HLA-C15:04	10
SANVSKVSF	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-B53:01 HLA-B35:03 HLA-B35:01 HLA-B15:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B58:01 HLA-B35:05 HLA-B42:01 HLA-B46:01 HLA-B67:01 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B56:04 HLA-B15:02 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B81:01 HLA-B15:05 HLA-B42:02 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:08 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B82:01 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B15:20 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B82:02 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B57:04 HLA-C12:03 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C08:02 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C01:03 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17	20 30

【表 15 - 8】

SAQ GKPTYF	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-B46:01 HLA-B15:02 HLA-B15:08 HLA-B15:11 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C07:18 HLA-C04:07 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
SETHPPEVAL	HLA-B40:01 HLA-B48:01 HLA-B44:02 HLA-B40:02 HLA-B44:03 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B41:02 HLA-B44:05 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B44:15 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B41:03 HLA-C15:05	
SEVSADKLVAL	HLA-B40:01 HLA-B48:01 HLA-B44:02 HLA-B40:02 HLA-B44:03 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B13:01 HLA-B41:02 HLA-B50:01 HLA-B44:05 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B44:15 HLA-B47:01 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B41:03	
SKLRSTGQSF	HLA-B15:03 HLA-B15:01 HLA-B15:18 HLA-B46:01 HLA-B15:02 HLA-B15:05 HLA-B42:02 HLA-B15:25 HLA-B15:08 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B07:04 HLA-B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:46 HLA-B15:58	20
SLLGSSEILEV	HLA-A02:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10	
SPQEASGVRW	HLA-B53:01 HLA-B44:02 HLA-B44:03 HLA-B35:08 HLA-B82:01 HLA-B15:13 HLA-B82:02	
SQNSPIRY	HLA-B15:03 HLA-A30:02 HLA-B15:01 HLA-B15:46	
SQSSLMLYL	HLA-A02:01 HLA-B40:01 HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-C04:01 HLA-A02:02 HLA-A30:04 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B15:01 HLA-B40:02 HLA-B15:18 HLA-B38:01 HLA-B39:01 HLA-B37:01 HLA-B27:02 HLA-B46:01 HLA-B13:01 HLA-B14:02 HLA-B49:01 HLA-B39:06 HLA-B41:02 HLA-B50:01 HLA-B44:05 HLA-B48:03 HLA-B27:06 HLA-B15:10 HLA-B15:05 HLA-B14:03 HLA-B38:02 HLA-B44:15 HLA-B15:25 HLA-B15:37 HLA-B47:01 HLA-B15:07 HLA-B15:09 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-	30 40

	B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58 HLA-B41:03 HLA-B39:09 HLA- C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA- C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA- C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
TASDLNLKV	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B53:01 HLA-A68:02 HLA-A69:01 HLA- B51:01 HLA-B51:02 HLA-B51:08 HLA-B51:07 HLA-B59:01 HLA-C12:03 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA- C15:05 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C04:03 HLA-C15:04 HLA-C08:03	20
TEFQQIINL	HLA-B40:01 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B18:01 HLA- B44:02 HLA-B40:02 HLA-B38:01 HLA-B44:03 HLA-B39:01 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B13:01 HLA-B49:01 HLA-B45:01 HLA-B41:02 HLA- B50:01 HLA-B44:05 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B15:10 HLA-B38:02 HLA-B51:07 HLA-B44:15 HLA-B15:37 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA- B15:09 HLA-B73:01 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B41:03 HLA-B39:09	30

30

40

50

【表 15 - 9】

	B15:20 HLA-B15:30 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-B15:58 HLA-B41:03 HLA-B39:09 HLA- C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA- C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA- C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05	10
TASDLNLKV	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-B53:01 HLA-A68:02 HLA-A69:01 HLA- B51:01 HLA-B51:02 HLA-B51:08 HLA-B51:07 HLA-B59:01 HLA-C12:03 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA- C15:05 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C04:03 HLA-C15:04 HLA-C08:03	20
TEFQQIINL	HLA-B40:01 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B18:01 HLA- B44:02 HLA-B40:02 HLA-B38:01 HLA-B44:03 HLA-B39:01 HLA-B37:01 HLA-B41:01 HLA-B13:01 HLA-B49:01 HLA-B45:01 HLA-B41:02 HLA- B50:01 HLA-B44:05 HLA-B40:06 HLA-B48:03 HLA-B15:10 HLA-B38:02 HLA-B51:07 HLA-B44:15 HLA-B15:37 HLA-B18:03 HLA-B47:01 HLA- B15:09 HLA-B73:01 HLA-B44:10 HLA-B39:02 HLA-B41:03 HLA-B39:09	30

30

40

50

VTLSTYFHV	HLA-A02:01 HLA-A68:02 HLA-A24:02 HLA-A23:01 HLA-A30:01 HLA-A30:04 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A02:05 HLA-A24:07 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A24:20 HLA-A69:01 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B51:01 HLA-B58:01 HLA-B13:01 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B51:02 HLA-B51:08 HLA-B51:07 HLA-B59:01 HLA-B15:16 HLA-B57:02 HLA-C15:02 HLA-C15:05 HLA-C17:01 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C15:04 HLA-C08:03
YKRMKLD SY	HLA-B15:03 HLA-B15:18 HLA-B15:46 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C07:01 HLA-C07:18 HLA-C07:17 HLA-C07:05
YLLNCHLLI	HLA-A02:01 HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-C04:01 HLA-A29:02 HLA-A24:02 HLA-A23:01 HLA-A02:02 HLA-A02:06 HLA-A32:01 HLA-A29:01 HLA-A02:05 HLA-A24:07 HLA-A02:03 HLA-A02:07 HLA-A02:14 HLA-A02:17 HLA-A02:04 HLA-A24:20 HLA-A80:01 HLA-A69:01 HLA-A02:10 HLA-B13:02 HLA-B52:01 HLA-B48:01 HLA-B13:01 HLA-B51:08 HLA-B48:03 HLA-B51:07 HLA-B59:01 HLA-B39:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C04:07 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05

10

20

30

40

50

【表 15 - 10】

YSDQKPPYSY	HLA-C02:10 HLA-A01:01 HLA-C04:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A36:01 HLA-A26:08 HLA-A01:02 HLA-A80:01 HLA-B35:01 HLA-B46:01 HLA-B15:17 HLA-B15:05 HLA-B35:08 HLA-B15:31 HLA-B57:04 HLA-C05:01 HLA-C02:02 HLA-C08:02 HLA-C04:07 HLA-C16:02 HLA-C04:03 HLA-C15:04
YSIYPMRNL	HLA-C03:04 HLA-C02:10 HLA-A68:02 HLA-A25:01 HLA-A26:01 HLA-A32:01 HLA-A66:02 HLA-A66:01 HLA-A34:01 HLA-A26:08 HLA-A66:03 HLA-A69:01 HLA-A26:03 HLA-A26:02 HLA-A43:01 HLA-B58:01 HLA-B46:01 HLA-B14:02 HLA-B57:01 HLA-B57:03 HLA-B58:02 HLA-B15:17 HLA-B15:16 HLA-B15:13 HLA-B57:02 HLA-B15:30 HLA-B15:58 HLA-B57:04 HLA-C06:02 HLA-C07:06 HLA-C07:02 HLA-C12:03 HLA-C07:01 HLA-C14:02 HLA-C01:02 HLA-C05:01 HLA-C03:03 HLA-C02:02 HLA-C16:01 HLA-C07:04 HLA-C08:02 HLA-C15:02 HLA-C07:18 HLA-C15:05 HLA-C17:01 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C04:06 HLA-C08:01 HLA-C12:02 HLA-C08:04 HLA-C16:04 HLA-C14:03 HLA-C04:03 HLA-C01:03 HLA-C04:04 HLA-C15:04 HLA-C08:03 HLA-C07:17 HLA-C07:05
YTPFPSYGHY	HLA-C02:10 HLA-B15:03 HLA-A01:01 HLA-B53:01 HLA-A68:01 HLA-A25:01 HLA-A26:01 HLA-A30:02 HLA-A29:02 HLA-A01:03 HLA-A30:04 HLA-A29:01 HLA-A11:10 HLA-A36:01 HLA-A66:02 HLA-A66:01 HLA-A34:01 HLA-A26:08 HLA-A01:02 HLA-A34:02 HLA-A80:01 HLA-A66:03 HLA-A26:03 HLA-A11:03 HLA-A26:02 HLA-A43:01 HLA-B35:01 HLA-B15:01 HLA-B55:01 HLA-B51:01 HLA-B15:18 HLA-B35:02 HLA-B35:05 HLA-B46:01 HLA-B56:04 HLA-B15:02 HLA-B15:17 HLA-B51:02 HLA-B15:05 HLA-B35:08 HLA-B15:25 HLA-B15:08 HLA-B15:16 HLA-B15:07 HLA-B15:11 HLA-B78:01 HLA-B56:01 HLA-B15:12 HLA-B15:13 HLA-B15:20 HLA-B15:06 HLA-B15:27 HLA-B15:31 HLA-B15:46 HLA-C06:02 HLA-C12:03 HLA-C02:02 HLA-C03:02 HLA-C16:02 HLA-C12:02 HLA-C16:04 HLA-C15:04 HLA-C07:17

10

20

30

40

【0146】

ほとんどのがんタイプ内で、xCell (Aran et al., 2017b) を使用して本明細書に由来する免疫浸潤シグネチャは、高い p a M A P 及び s a M A P カウント又はそれらのソース遺伝子濃縮を有する試料において減少したことが見出された (図 13C)。T 細胞認識からの脱出を媒介することができる細胞自律機構を考慮すると、その下方制御が免疫検出からの回避につながる M H C - I 分子の発現が最初に評価された (Agudo et al., 2018、Castro et al., 2019)。試料ごとに発現される p a M A P 及び s a M A P の数と、表面 H L A 発現に関与する遺伝子の発現との間に有意な負の相関が見出された (図 7B)。加えて、腫瘍抗原を交差提示するた

50

めに重要である、BATF3⁺DCを含む免疫細胞を動員するケモカインをコードする遺伝子の発現との負の関連が見出された (Spranger et al., 2017) (図7C)。更に、paMAP及びsaMAP発現と強く関連する経路 (図5C及びD)、すなわち、MYC及びWNT-β-カテニンシグナル伝達の活性化、P53の機能の喪失、並びにPI3K経路阻害剤の喪失は、T細胞の活性化及び浸潤を阻害することが知られている (Spranger and Gajewski, 2018)。したがって、paMAP及びsaMAPの数は、ほぼ全てのTCGAがんタイプにおいて、CDK4及びCDK6の発現と強い正の相関を示した (図7D)。重要なことに、WNT-β-カテニン及びTGF-βシグナル伝達、並びにCDK4/6は、乳がん及び黒色腫におけるT細胞除外及び免疫回避を促進するがん細胞プログラムを調節する (Bagati et al., 2021、Goel et al., 2017、Jerby-Arnon et al., 2018、Spranger et al., 2015)。最後に、幹細胞性シグネチャは、免疫抑制遺伝子PVR (CD155) 及びCD276 (B7-H3) との正の汎がん相関を示した (図13D)。まとめると、これらのデータは、多数のpaMAP及びsaMAPを有するがんが、免疫検出及び破壊からのシールドとして多剤耐性機構を採用することを示唆する。結論として、データは、増加した免疫回避及び抑制プログラムが、低分化進行がんにおいて見出されるpaMAP及びsaMAPの免疫認識を妨げる可能性があることを示す。更に、それらは、いくつかのタイプのがんを治療するために現在使用されているWNT-β-カテニン、TGF-β、及びCDK4/6阻害剤 (Alvarez-Fernandez and Malumbres, 2020、Hinze et al., 2020、Huang et al., 2021) が、paMAP及びsaMAPを発現する腫瘍細胞の免疫認識を潜在的に増強し得ることを示唆する。

10

20

【0147】

本発明は、上記にその特定の実施形態によって説明されているが、添付の特許請求の範囲で定義される主題発明の趣旨及び性質から逸脱することなく変更することができる。特許請求の範囲では、「含む」という単語は、「含むが、それに限定されない」という語句と実質的に等価である、オープンエンド用語として使用される。「a」、「an」、及び「the」という単数形は、別段文脈が明らかに指示しない限り、対応する複数の対象物を含む。

30

【0148】

参考文献

Agudo, J., Park, E. S., Rose, S. A., Alibo, E., Sweeney, R., Dhainaut, M., Kobayashi, K. S., Sachidanandam, R., Baccarini, A., Merad, M., et al. (2018). Quiescent Tissue Stem Cells Evade Immune Surveillance. *Immunity* 48, 271-285.

Åkesson, E., Wolmer-Solberg, N., Cederarv, M., Falci, S., and Odeberg, J. (2009). Human neural stem cells and astrocytes, but not neurons, suppress an allogeneic lymphocyte response. *Stem Cell Res.* 2, 56-67.

40

Alvarez-Fernandez, M., and Malumbres, M. (2020). Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition. *Cancer Cell* 37, 514-529.

Anderson, K. G., Stromnes, I. M., and Greenberg, P. D. (2017). Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies. *Cancer Ce*

50

ll 31, 311–325.

Apavaloaei, A., Hardy, M., Thibault, P., and Perreault, C. (2020). The Origin and Immune Recognition of Tumor-Specific Antigens. *Cancers (Basel)*. 12, 2607.

Aran, D., Sirota, M., and Butte, A. J. (2015). Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nat. Commun.* 6, 1–12.

Aran, D., Camarda, R., Odegaard, J., Paik, H., Oskotsky, B., Krings, G., Goga, A., Sirota, M., and Butte, A. J. (2017a). Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcripts. *Nat. Commun.* 8, 1–13.

Aran, D., Hu, Z., and Butte, A. J. (2017b). xCell: Digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol.* 18, 1–14.

Babarinde, I., Ma, G., Li, Y., Deng, B., Luo, Z., Liu, H., Abdul, M. M., Ward, C., Chen, M., Fu, X., et al. (2020). Transposable Element-Gene Splicing Modulates the Transcriptional Landscape of Human Pluripotent Stem Cells. *BioRxiv*.

Bagati, A., Kumar, S., Jiang, P., Pyrdol, J., Zou, A. E., Godicelj, A., Mathewson, N. D., Cartwright, A. N. R., Cejas, P., Brown, M., et al. (2021). Integrin $\alpha v \beta 6$ –TGF β –SOX4 Pathway Drives Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell* 39, 54–67. e9.

Barbie, D. A., Tamayo, P., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Moody, S. E., Dunn, I. F., Schinzel, A. C., Sandy, P., Meylan, E., Scholl, C., et al. (2009). Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 462, 108–112.

Bassani-Sternberg, M., Pletscher-Frankild, S., Jensen, L. J., and Mann, M. (2015). Mass Spectrometry of Human Leukocyte Antigen Class I Peptidomes Reveals Strong Effects of Protein Abundance and Turnover on Antigen Presentation. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 658–673.

Batlle, E., and Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 23, 1124–1134.

Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., and Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* 40, 499–507.

10

20

30

40

50

Benhammad i, M. , Mathe, J. , Dumont-Lagace, M. , Kobayashi, K. S. , Gaboury, L. , Brochu, S. , and Perreault, C. (2020) . IFN- λ Enhances Constitutive Expression of MHC Class I Molecules on Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* 205, 1268-1280.

Bouwmeester, R. , Gabriels, R. , Hulstaert, N. , Martens, L. , and Degroeve, S. (2020) . DeepLC can predict retention times for peptides that carry as-yet unseen modifications. *Biorxiv.* 10

Bray, N. L. , Pimentel, H. , Melsted, P. , and Pachter, L. (2016) . Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34, 525-527.

Brewer, B. G. , Mitchell, R. A. , Harandi, A. , and Eaton, J. W. (2009) . Embryonic vaccines against cancer: An early history. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 192-197.

Caron, E. , Vincent, K. , Fortier, M. -H. , Laverdure, J. -P. , Bramoulle, A. , Hardy, M. -P. , Voisin, G. , Roux, P. P. , Lemieux, S. , Thibault, P. , et al. (2011) . The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol. Syst. Biol.* 7, 1-15. 20

Castro, A. , Ozturk, K. , Pyke, R. M. , Xian, S. , Zannetti, M. , and Carter, H. (2019) . Elevated neoantigen levels in tumors with somatic mutations in the HLA-A, HLA-B, HLA-C and B2M genes. *BMC Med. Genomics* 12, 1-13. 30

Chia, N. Y. , Chan, Y. S. , Feng, B. , Lu, X. , Orlov, Y. L. , Moreau, D. , Kumar, P. , Yang, L. , Jiang, J. , Lau, M. S. , et al. (2010) . A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468, 316-320.

Chong, C. , Mueller, M. , Pak, H. S. , Harnett, D. , Huber, F. , Grun, D. , Leleu, M. , Auger, A. , Arnaud, M. , Stevenson, B. J. , et al. (2020) . Integrated proteogenomic deep sequencing and analytics accurately identify non-canonical peptides in tumor immunopeptidomes. *Nat. Commun.* 11, 1293. 40

Churko, J. M. , Lee, J. , Ameen, M. , Gu, M. , Venkatasubramanian, M. , Diecke, S. , Sallam, K. , Im, H. , Wang, G. , Gold, J. D. , et al. (2017) . Transcriptomic and epigenomic differences in human induced pluripotent stem cells generated from six reprogramming methods. *Nat* 50

. Biomed. Eng. 1, 826–837.

Colaprico, A., Silva, T. C., Olsen, C., Garofano, L., Cava, C., Garolini, D., Sabedot, T. S., Malta, T. M., Pagnotta, S. M., Castiglioni, I., et al. (2016). TCGA biolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res.* 44, e71.

Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J., Van Der Bruggen, P., and Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 14, 135–146.

Courcelles, M., Durette, C., Daouda, T., Lavedure, J. -P., Vincent, K., Lemieux, S., Perreault, C., and Thibault, P. (2020). MAPDP: A Cloud-Based Computational Platform for Immunopeptidomics Analyses. *J. Proteome Res.* 19, 1873–1881.

Dai, Z., Ramesh, V., and Locasale, J. W. (2020). The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* 21, 737–753.

Danilova, L., Anagnostou, V., Caushi, J. X., Sidhom, J. W., Guo, H., Chan, H. Y., Suri, P., Tam, A., Zhang, J., Asmar, M. El, et al. (2018). The mutation-associated neoantigen functional expansion of specific T cells (MANIFEST) assay: A sensitive platform for monitoring antitumor immunity. *Cancer Immunol. Res.* 6, 888–899.

Daouda, T., Perreault, C., and Lemieux, S. (2016). pyGeno: A Python package for precision medicine and proteogenomics. *F1000Res.* 5, 381.

Dardenne, E., Beltran, H., Benelli, M., Gayvert, K., Berger, A., Puca, L., Cyrta, J., Sboner, A., Noorzad, Z., MacDonald, T., et al. (2016). N-Myc Induces an EZH2-Mediated Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cancer Cell* 30, 563–577.

Das, B., Pal, B., Bhuyan, R., Li, H., Sarma, A., Gayan, S., Talukdar, J., Sandhya, S., Bhuyan, S., Gogoi, G., et al. (2019). MYC Regulates the HIF2 α Stemness Pathway via Nanog and Sox2 to Maintain Self-Renewal in Cancer Stem Cells versus Non-Stem Cancer Cells. *Cancer Res.* 79, 4015–4025.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultra

10

20

30

40

50

fast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

Duffour, M. T. , Chaux, P. , Lurquin, C. , Cornelis, G. , Boon, T. , and Van Der Bruggen, P. (1999) . A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes . *Eur. J. Immunol.* 29, 3329–3337.

Ehx, G. , and Perreault, C. (2019) . Discovery and characterization of actionable tumor antigens. *Genome Med.* 11, 10–12.

Ehx, G. , Larouche, J. -D. , Durette, C. , Laverdure, J. -P. , Hesnard, L. , Vincent, K. , Hardy, M. -P. , Theriault, C. , Rulleau, C. , Lanoix, J. , et al. (2021) . Atypical acute myeloid leukemia-specific transcripts generate shared and immunogenic MHC class-I-associated epitopes Article Atypical acute myeloid leukemia-specific transcripts generate shared and immunogenic MHC class-I-associated epitopes. *Immunity* 54, 737–752.

Ellrott, K. , Bailey, M. H. , Saksena, G. , Covington, K. R. , Kandoth, C. , Stewart, C. , Hess, J. , Ma, S. , Chiotti, K. E. , McLellan, M. D. , et al. (2018) . Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines. *Cell Syst.* 6, 271–281. e7.

Erhard, F. , Doelken, L. , Schilling, B. , and Schlosser, A. (2020) . Identification of the Cryptic HLA-I Immunopeptidome. *Cancer Immunol. Res.* 8, 1018–1026.

Fagnocchi, L. , and Zippo, A. (2017) . Multiple roles of MYC in integrating regulatory networks of pluripotent stem cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 1–19.

Fort, A. , Hashimoto, K. , Yamada, D. , Salimullah, M. , Keya, C. A. , Saxena, A. , Bonetti, A. , Voineagu, I. , Bertin, N. , Kratz, A. , et al. (2014) . Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance. *Nat. Genet.* 46, 558–566.

Friedli, M. , Turelli, P. , Kapopoulou, A. , Rawel, B. , Castro-Diaz, N. , Rowe, H. M. , Ecco, G. , Unzu, C. , Planet, E. , Lombardo, A. , et al. (2014) . Loss of transcriptional control over endogenous retroelements during reprogramming to pluripotency. *Genome Res.* 24, 1251–1259.

Garrison, E. , and Marth, G. (2012) . Haplotyp

e-based variant detection from short-read sequencing. ArXiv:Genomics.

Goel, S., Decristo, M. J., Watt, A. C., Brinjon es, H., Sceneay, J., Li, B. B., Khan, N., Ubella cker, J. M., Xie, S., Metzger-Filho, O., et al. (2017). CDK4/6 inhibition triggers anti-tu mour immunity. *Nature* 548, 471–475.

Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repecka , K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., et al. (2020). Vi 10
sualizing and interpreting cancer genomi cs data via the Xena platform. *Nat. Biotec hnol.* 38, 675–678.

Haen, S. P., Loeffler, M. W., Rammensee, H. G., and Brossart, P. (2020). Towards new horizo ns: characterization, classification and i mplications of the tumour antigenic repe rtoire. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 595–610.

Haenzelmann, S., Castelo, R., and Guinney, J . (2013). GSEA: Gene set variation analysis 20
for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioi nformatics* 14, 7.

Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., and Thompson , C. B. (2009). Understanding the Warburg Ef fect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Hernandez, C., Wang, Z., Ramazanov, B., Tang, Y., Mehta, S., Dambrot, C., Lee, Y. W., Tessema, K., Kumar, I., Astudillo, M., et al. (2018). Dp pa2/4 Facilitate Epigenetic Remodeling d uring Reprogramming to Pluripotency. *Cell* 30
Stem Cell 23, 396–411. e8.

Hinze, L., Labrosse, R., Degar, J., Han, T., Sc hatoff, E. M., Schreek, S., Karim, S., McGuckin , C., Sacher, J. R., Wagner, F., et al. (2020). E xploiting the Therapeutic Interaction of WNT Pathway Activation and Asparaginase for Colorectal Cancer Therapy. *Cancer Dis cov.* 10, 1690–1705.

Hong, S.-H., Lee, J.-H., Lee, J. B., Ji, J., and Bhatia, M. (2011). ID1 and ID3 represent co nserved negative regulators of human emb ryonic and induced pluripotent stem cell hematopoiesis. *J. Cell Sci.* 124, 1445–1452. 40

Huang, C.-Y., Chung, C.-L., Hu, T.-H., Chen, J .-J., Liu, P.-F., and Chen, C.-L. (2021). Rece nt progress in TGF- β inhibitors for canc er therapy. *Biomed. Pharmacother.* 134.

Huang, L.-Q., Brasseur, F., Serrano, A., De P laen, E., Bruggen, P. van der, Boon, T., and Pe 50

l, A. Van (1991). Cytolytic T Lymphocytes Recognize an Antigen Encoded by MAGE-A10 on a Human Melanoma. *J. Immunol.* 162, 6849–6854.

Humeau, J., Sauvat, A., Cerrato, G., Xie, W., Loos, F., Iannantuoni, F., Bezu, L., Levesque, S., Paillet, J., Pol, J., et al. (2020). Inhibition of transcription by dactinomycin reveals a new characteristic of immunogenic cell stress. *EMBO Mol. Med.* 12, e11622.

Ishak, C. A., and De Carvalho, D. D. (2020). Reactivation of Endogenous Retroelements in Cancer Development and Therapy. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 4, 159–176.

Izadyar, F., Wong, J., Maki, C., Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., Yuen, C., Greilach, S., Zhao, H. H., Chow, M., et al. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Hum. Reprod.* 26, 1296–1306.

Janku, F., Yap, T. A., and Meric-Bernstam, F. (2018). Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 273–291.

Jerby-Arnon, L., Shah, P., Cuoco, M. S., Rodman, C., Su, M. J., Melms, J. C., Leeson, R., Kanodia, A., Mei, S., Lin, J. R., et al. (2018). A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell* 175, 984–997. e24.

Jia, Z. C., Ni, B., Huang, Z.-M., Tian, Y., Tang, J., Wang, J.-X., Fu, X.-L., and Wu, Y.-Z. (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin. Dev. Immunol.* 2010, 567594.

Jurtz, V., Paul, S., Andreatta, M., Marcatili, P., Peters, B., and Nielsen, M. (2017). NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. *J. Immunol.* 199, 3360–3368.

Kazantseva, J., Sadam, H., Neuman, T., and Palm, K. (2016). Targeted alternative splicing of TAF4: A new strategy for cell reprogramming. *Sci. Rep.* 6, 1–11.

Kelley, D., and Rinn, J. (2012). Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biol.* 13, R107.

Klawitter, S., Fuchs, N. V., Upton, K. R., Munro

z-Lopez, M., Shukla, R., Wang, J., Garcia-Canadas, M., Lopez-Ruiz, C., Gerhardt, D. J., Sebe, A., et al. (2016). Reprogramming triggers endogenous L1 and Alu retrotransposition in human induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 7, 10286.

Kooreman, N. G., Kim, Y., de Almeida, P. E., Termglinchan, V., Diecke, S., Shao, N. Y., Wei, T. T., Yi, H., Dey, D., Nelakanti, R., et al. (2018). Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo. *Cell Stem Cell* 22, 501-513. 10

Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.

Krokhin, O. V (2006). Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-A pore size C18 sorbents. *Anal. Chem.* 78, 7785-7795. 20

Lamoliatte, F., McManus, F. P., Maarifi, G., Chelbi-Alix, M. K., and Thibault, P. (2017). Uncovering the SUMOylation and ubiquitylation crosstalk in human cells using sequential peptide immunopurification. *Nat. Commun.* 8, 14109.

Laumont, C. M., Vincent, K., Hesnard, L., Audemard, E., Bonneil, E., Laverdure, J.-P., Gendron, P., Courcelles, M., Hardy, M.-P., Cote, C., et al. (2018). Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci. Transl. Med.* 10, 1-11. 30

Li, L., Baroja, M. L., Majumdar, A., Chadwick, K., Rouleau, A., Gallacher, L., Ferber, I., Lebkowski, J., Martin, T., Madrenas, J., et al. (2004). Human Embryonic Stem Cells Possess Immune-Privileged Properties. *Stem Cells* 22, 448-456.

Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdottir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., and Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* 1, 417-425. 40

Lin, T., and Lin, Y. (2017). P53 Switches Off Pluripotency on Differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 44.

Liu, J., Lichtenberg, T., Hoadley, K. A., Poisson, L. M., Lazar, A. J., Cherniack, A. D., Kovatich, A. J., Benz, C. C., Levine, D. A., Lee, A. V., et al. (2018). An Integrated TCGA Pan-Canc 50

er Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* 173, 400–416. e11.

Loeffler, M. W. , Mohr, C. , Bichmann, L. , Freud enmann, L. K. , Walzer, M. , Schroeder, C. M. , Tra utwein, N. , Hilke, F. J. , Zinser, R. S. , Muehlen bruch, L. , et al. (2019) . Multi-omics discov ery of exome-derived neoantigens in hepa tocellular carcinoma. *Genome Med.* 11, 1–16.

Loizou, E. , Banito, A. , Livshits, G. , Ho, Y. J. , Koche, R. P. , Sanchez-Rivera, F. J. , Mayle, A. , Chen, C. C. , Kinalis, S. , Bagger, F. O. , et al. (2019) . A gain-of-function p53-mutant onc ogene promotes cell fate plasticity and myeloid leukemia through the pluripotenc y factor foxh1. *Cancer Discov.* 9, 962–979.

Lonsdale, J. , Thomas, J. , Salvatore, M. , Phil lips, R. , Lo, E. , Shad, S. , Hasz, R. , Walters, G. , Garcia, F. , Young, N. , et al. (2013) . The Gen otype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat . Genet.* 45, 580–585.

Lu, X. , Sachs, F. , Ramsay, L. A. , Jacques, P. E. , Goeke, J. , Bourque, G. , and Ng, H. H. (2014) . T he retrovirus HERVH is a long noncoding R NA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 423–425.

Ma, J. , Zhao, J. , Lu, J. , Wang, P. , Feng, H. , Zon g, Y. , Ou, B. , Zheng, M. , and Lu, A. (2016) . Cadh erin-12 enhances proliferation in colore ctal cancer cells and increases progress ion by promoting EMT. *Tumor Biol.* 37, 9077–9088.

Madsen, R. R. (2020) . PI3K in stemness regu lation: From development to cancer. *Bioche m. Soc. Trans.* 48, 301–315.

Malta, T. M. , Sokolov, A. , Gentles, A. J. , Burz ykowski, T. , Poisson, L. , Weinstein, J. N. , Kam inska, B. , Huelksen, J. , Omberg, L. , Gevaert, O . , et al. (2018) . Machine Learning Identifi es Stemness Features Associated with Onc ogenic Dedifferentiation. *Cell* 173, 338–35 4. e15.

Marcais, G. , and Kingsford, C. (2011) . A fas t, lock-free approach for efficient paral lel counting of occurrences of k-mers. *Bi oinformatics* 27, 764–770.

McLaughlin, R. N. , Young, J. M. , Yang, L. , Neme , R. , Wichman, H. A. , and Malik, H. S. (2014) . Po sitive Selection and Multiple Losses of the LINE-1-Derived L1TD1 Gene in Mammals

10

20

30

40

50

Suggest a Dual Role in Genome Defense and Pluripotency. *PLoS Genet.* 10.

Merkle, F. T. , Ghosh, S. , Kamitaki, N. , Mitchell, J. , Avior, Y. , Mello, C. , Kashin, S. , Mekhoubad, S. , Ilic, D. , Charlton, M. , et al. (2017). Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* 545, 229–233.

Mi, H. , Ebert, D. , Muruganujan, A. , Mills, C. , Albou, L. –P. , Tremayne, M. , and Thomas, P. D. (2021). PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Res.* 49, D394–D403. 10

Miranda, A. , Hamilton, P. T. , Zhang, A. W. , Pattnaik, S. , Becht, E. , Mezheyeuski, A. , Bruun, J. , Micke, P. , de Reynies, A. , and Nelson, B. H. (2019). Cancer stemness, intratumoral heterogeneity, and immune response across cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 9020–9029. 20

Naervae, E. , Rahkonen, N. , Emani, M. R. , Lund, R. , Pursiheimo, J. P. , Naesti, J. , Autio, R. , Rasool, O. , Denessiouk, K. , Laehdesmaeki, H. , et al. (2012). RNA-binding protein L1TD1 interacts with LIN28 via RNA and is required for human embryonic stem cell self-renewal and cancer cell proliferation. *Stem Cells* 30, 452–460.

Nicola, M. Di, Carlo–Stella, C. , Magni, M. , Milanesi, M. , Longoni, P. D. , Matteucci, P. , Grisanti, S. , and Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838–3843. 30

Ochsenbein, A. F. (2005). Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin. Immunopathol.* 27, 19–35.

Ogishi, M. , and Yotsuyanagi, H. (2019). Quantitative prediction of the landscape of T cell epitope immunogenicity in sequence space. *Front. Immunol.* 10, 827. 40

Pearson, H. , Thibault, P. , Perreault, C. , Pearson, H. , Daouda, T. , Granados, D. P. , Durette, C. , Bonneil, E. , Courcelles, M. , Rodenbrock, A. , et al. (2016). MHC class I – associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J. Clin. Invest.* 126, 4690–4701. 50

Pelullo, M., Zema, S., Nardozza, F., Checquolo, S., Screpanti, I., and Bellavia, D. (2019). Wnt, Notch, and TGF- β pathways impinge on hedgehog signaling complexity: An open window on cancer. *Front. Genet.* 10, 1–16.

Petroni, G., Buque, A., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2021). Immunomodulation by targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 39, 310–345.

Poli, V., Fagnocchi, L., Fasciani, A., Cherubini, A., Mazzoleni, S., Ferrillo, S., Miluzio, A., Gaudio, G., Vaira, V., Turdo, A., et al. (2018). MYC-driven epigenetic reprogramming favors the onset of tumorigenesis by inducing a stem cell-like state. *Nat. Commun.* 9, 1024.

Prensner, J. R., Iyer, M. K., Balbin, O. A., Dhasekaran, S. M., Cao, Q., Brenner, J. C., Laxman, B., Asangani, I. A., Grasso, C. S., Kominsky, H. D., et al. (2011). Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat. Biotechnol.* 29, 742–749.

Reinhard, K., Rengstl, B., Oehm, P., Michel, K., Billmeier, A., Hayduk, N., Klein, O., Kuna, K., Ouchan, Y., Woell, S., et al. (2020). An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. *Science* 367, 446–453.

Van Rhenen, A., Feller, N., Kelder, A., Westra, A. H., Rombouts, E., Zweegman, S., Van Der Pol, M. A., Waisfisz, Q., Ossenkoppele, G. J., and Schuurhuis, G. J. (2005). High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin. Cancer Res.* 11, 6520–6527.

Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., and Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26.

Ruiz Cuevas, M. V., Hardy, M. P., Holly, J., Bonnell, E., Durette, C., Courcelles, M., Lanoix, J., Cote, C., Staudt, L. M., Lemieux, S., et al. (2021). Most non-canonical proteins uniquely populate the proteome or immunopeptidome. *Cell Rep.* 34, 108815.

Sahin, U., Oehm, P., Derhovannessian, E., Jabulowsky, R. A., Vormehr, M., Gold, M., Maurus, D.

10

20

30

40

50

, Schwarck-Kokarakis, D., Kuhn, A. N., Omokoko, T., et al. (2020). An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* 585, 107–112.

Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., et al. (2016). Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* 44, 924–938.

10

Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadou, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., Saghafeinia, S., et al. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173, 321–337.

Schumacher, T. N., Scheper, W., and Kvistborg, P. (2019). Cancer Neoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 37, 173–200.

20

Schuster, H., Peper, J. K., Boesmueller, H. C., Roehle, K., Backert, L., Bilich, T., Ney, B., Loeffler, M. W., Kowalewski, D. J., Trautwein, N., et al. (2017). The immunopeptidomic landscape of ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E9942–E9951.

Smith, B. A., Balanis, N. G., Nanjundiah, A., Sheu, K. M., Tsai, B. L., Zhang, Q., Park, J. W., Thompson, M., Huang, J., Witte, O. N., et al. (2018). A Human Adult Stem Cell Signature Marks Aggressive Variants across Epithelial Cancers. *Cell Rep.* 24, 3353–3366. e5.

30

Spranger, S., and Gajewski, T. F. (2018). Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nat. Rev. Cancer* 18, 139–147.

Spranger, S., Bao, R., and Gajewski, T. F. (2015). Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231–235.

40

Spranger, S., Dai, D., Horton, B., and Gajewski, T. F. (2017). Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 31, 711–723. e4.

Stewart, M. H., Bosse, M., Chadwick, K., Menendez, P., Bendall, S. C., and Bhatia, M. (2006). Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment. *Nat. Methods* 3, 807–815.

50

Stine, Z. E. , Walton, Z. E. , Altman, B. J. , Hsieh, A. L. , and Dang, C. V. (2015) . MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov.* 5, 1024–1039.

Suarez-Alvarez, B. , Rodriguez, R. M. , Calvanese, V. , Blanco-Gelaz, M. A. , Suhr, S. T. , Ortega, F. , Otero, J. , Cibelli, J. B. , Moore, H. , Fraga, M. F. , et al. (2010) . Epigenetic mechanisms regulate MHC and antigen processing molecules in human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 5, e10192. 10

Thorsson, V. , Gibbs, D. L. , Brown, S. D. , Wolf, D. , Bortone, D. S. , Ou Yang, T. H. , Porta-Pardo, E. , Gao, G. F. , Plaisier, C. L. , Eddy, J. A. , et al. (2018) . The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 48, 812–830. e14.

Vasileiou, S. , Lulla, P. D. , Tzannou, I. , Watanabe, A. , Kuvalekar, M. , Callejas, W. L. , Bilgi, M. , Wang, T. , Wu, M. J. , Kamble, R. , et al. (2021) . T-Cell Therapy for Lymphoma Using Nonengineered Multiantigen-Targeted T Cells Is Safe and Produces Durable Clinical Effects. *J. Clin. Oncol.* 39, 1415–1425. 20

Vogel, C. , and Marcotte, E. M. (2009) . Absolute abundance for the masses. *Nat. Biotechnol.* 27, 825–826.

Wang, J. F. , She, L. , Su, B. H. , Ding, L. C. , Zheng, F. F. , Zheng, D. L. , and Lu, Y. G. (2011) . CDH12 promotes the invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *Oncol. Rep.* 26, 101–108. 30

Wang, L. , Su, Y. , Huang, C. , Yin, Y. , Zhu, J. , Knupp, A. , Chu, A. , and Tang, Y. (2019) . FOXH1 Is Regulated by NANOG and LIN28 for Early-stage Reprogramming. *Sci. Rep.* 9, 1–8.

Wang, Z. -X. , Kueh, J. L. L. , Teh, C. H. -L. , Rossbach, M. , Lim, L. , Li, P. , Wong, K. -Y. , Lufkin, T. , Robson, P. , and Stanton, L. W. (2007) . Zfp206 Is a Transcription Factor That Controls Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 25, 2173–2182. 40

Wei, L. H. , and Guo, J. U. (2020) . Coding functions of “noncoding” RNAs. *Science* 367, 1074–1075.

Wu, T. D. , and Nacu, S. (2010) . Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 26, 873–881.

Yaddanapudi, K. , Mitchell, R. A. , Putty, K. , Willer, S. , Sharma, R. K. , Yan, J. , Bodduluri, H. , and Eaton, J. W. (2012) . Vaccination with E 50

embryonic Stem Cells Protects against Lung Cancer: Is a Broad-Spectrum Prophylactic Vaccine against Cancer Possible? PLoS One 7, e42289.

Yewdell, J. W. (2010). Designing CD8+ T cell vaccines: It's not rocket science (yet). Curr. Opin. Immunol. 22, 402–410.

Yu, H. B., Kunarso, G., Hong, F. H., and Stanton, L. W. (2009). Zfp206, Oct4, and Sox2 are integrated components of a transcriptional regulatory network in embryonic stem cells. J. Biol. Chem. 284, 31327–31335.

Zhang, H. Le, Wang, P., Lu, M. Z., Zhang, S. D., and Zheng, L. (2019). c-Myc maintains the self-renewal and chemoresistance properties of colon cancer stem cells. Oncol. Lett. 17, 4487–4493.

Zhang, J., Nuebel, E., Daley, G. Q., Koehler, C. M., and Teitell, M. A. (2012). Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. Cell Stem Cell 11, 589–595.

Zhang, J., Ratanasirintrao, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S. B., Yu, C., Ross, C. A., Cacchiarelli, D., Xia, Q., Seligson, M., et al. (2016). LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. Cell Stem Cell 19, 66–80.

Zhao, Q., Laverdure, J.-P., Lanoix, J., Durette, C., Cote, C., Bonneil, E., Laumont, C. M., Gendron, P., Vincent, K., Courcelles, M., et al. (2020). Proteogenomics Uncovers a Vast Repertoire of Shared Tumor-Specific Antigens in Ovarian Cancer. Cancer Immunol. Res. 8, 544–555.

Zhao, S., Zhu, W., Xue, S., and Han, D. (2014). Testicular defense systems: Immune privilege and innate immunity. Cell. Mol. Immunol. 11, 428–437.

Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K. H., and Wang, P. J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. BMC Dev. Biol. 9, 1–11.

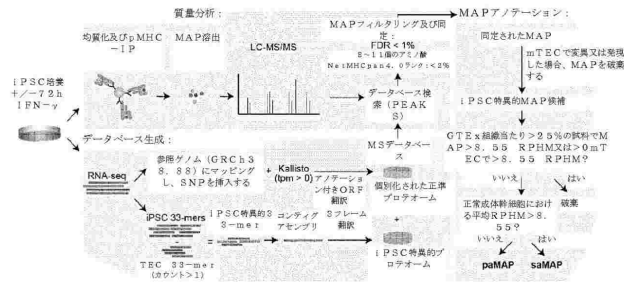
Zhou, X., Guo, X., Chen, M., Xie, C., and Jiang, J. (2018). HIF-3 α promotes metastatic phenotypes in pancreatic cancer by transcriptional regulation of the RhoC-ROCK1 signaling pathway. Mol. Cancer Res. 16, 124–134.

Zitvogel, L., Perreault, C., Finn, O. J., and Kroemer, G. (2021). Beneficial autoimmunity

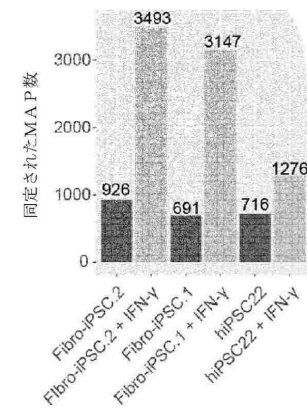
improves cancer prognosis. Nat. Rev. Clin. Oncol.

【図面】

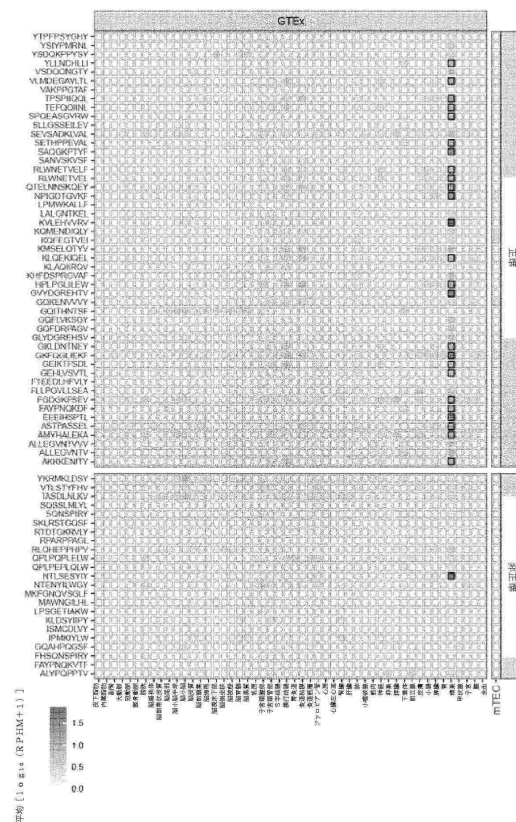
【図 1 A】



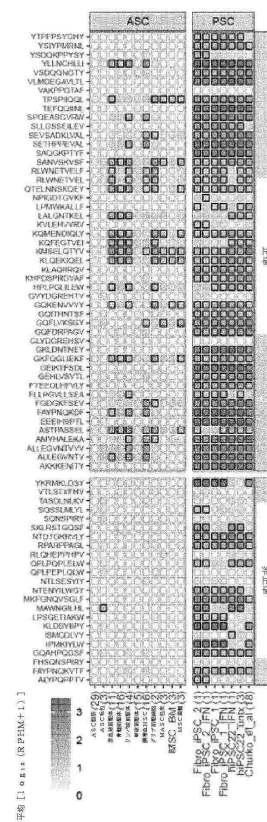
【図 1 B】



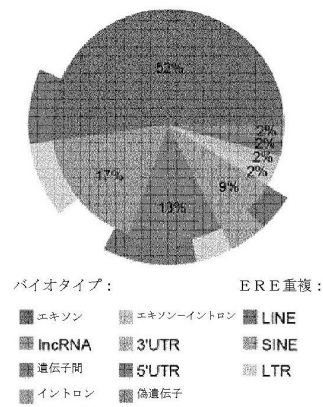
【図 2 A】



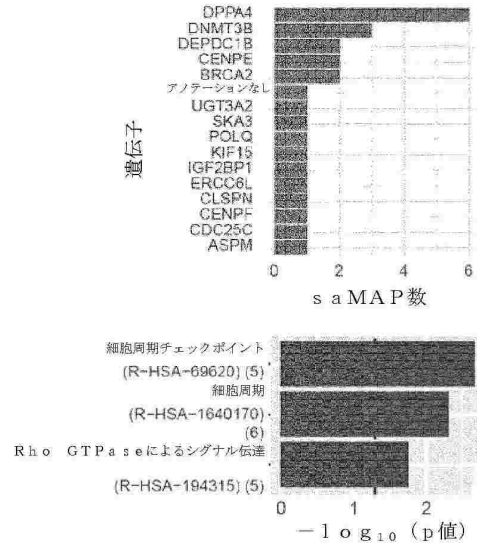
【図 2 B】



【図 2 C】

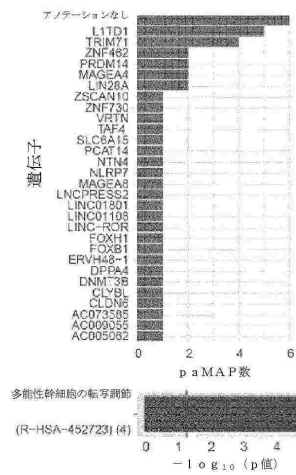


【図 2 D】

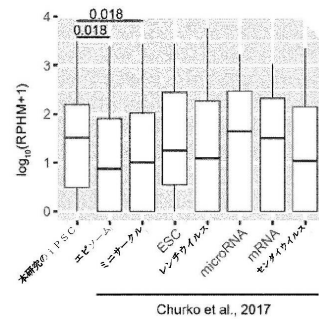


10

【図 2 E】



【図 2 F】



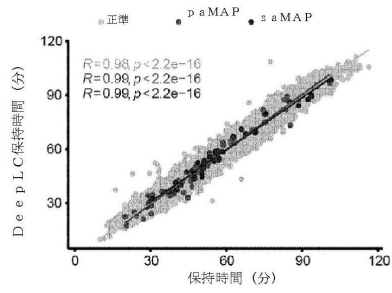
20

30

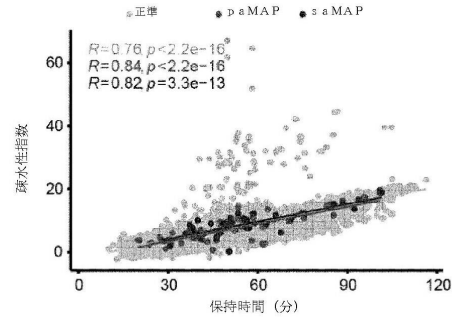
40

50

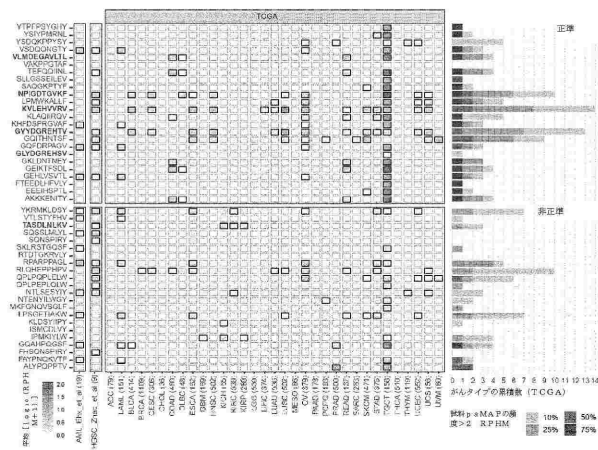
【図 2 G】



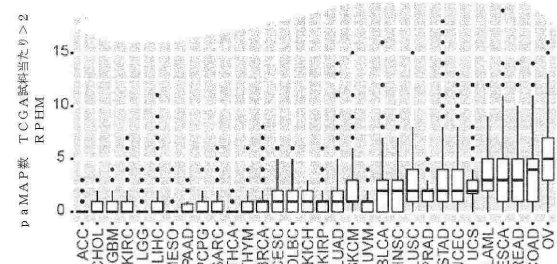
【図 2 H】



【図 3】



【図 4 A】



10

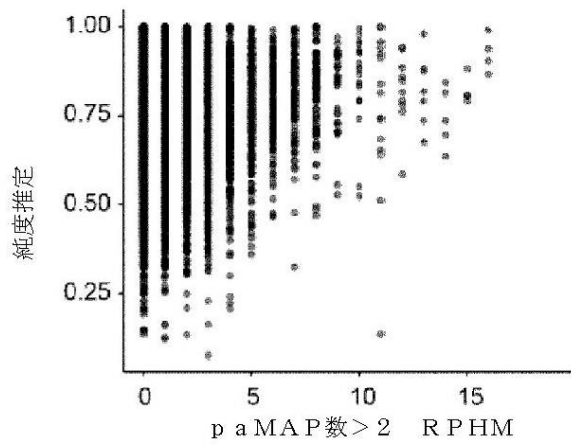
20

30

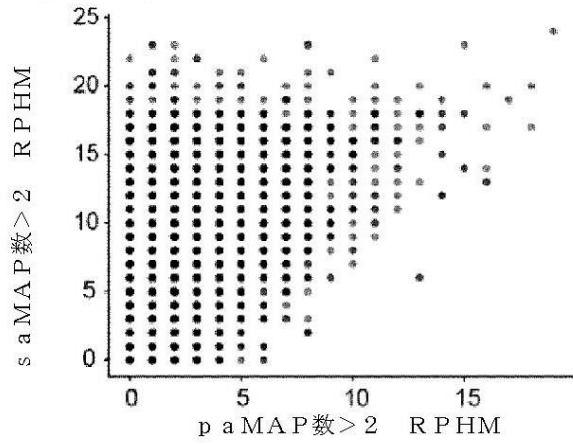
40

50

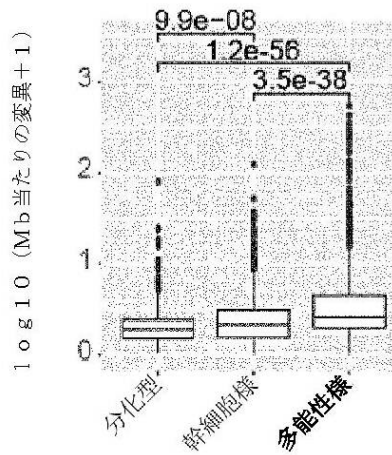
【図 4 B】



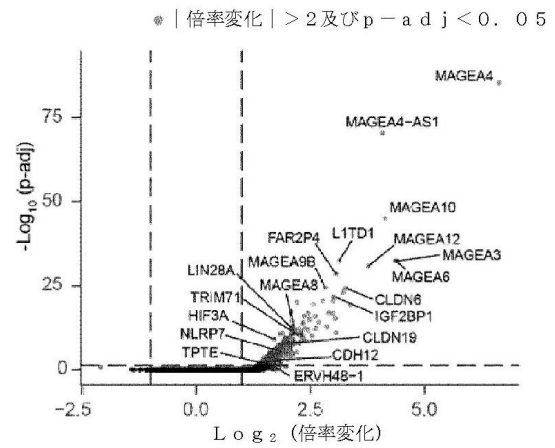
【図 4 C】



【図 4 D】



【図 4 E】



10

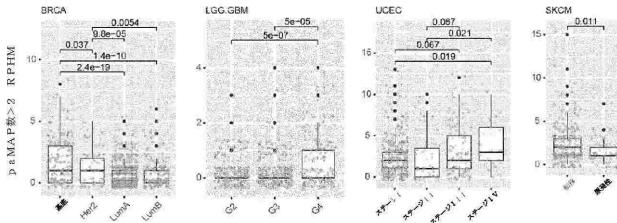
20

30

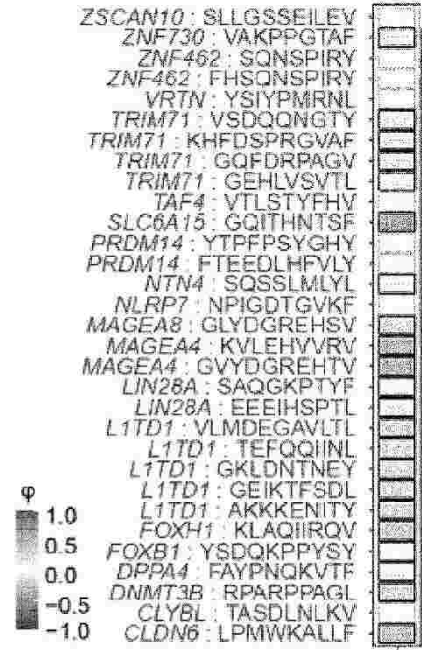
40

50

【図 4 F】

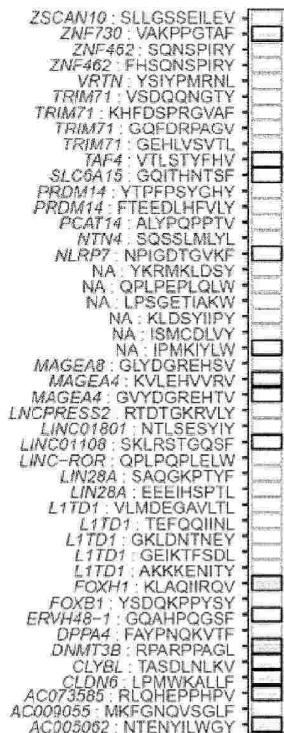


【図 5 A】



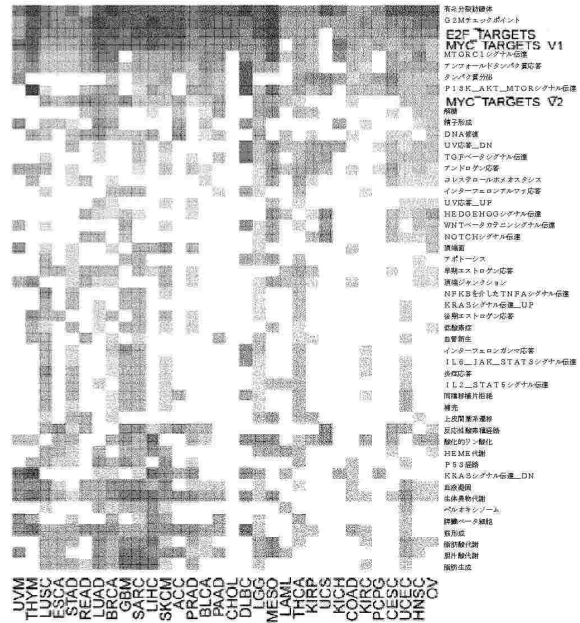
汎がん

【図 5 B】



汎がん

【図 5 C】



10

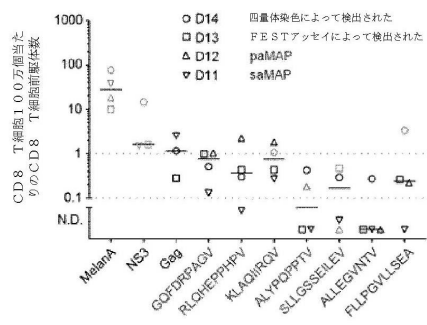
20

30

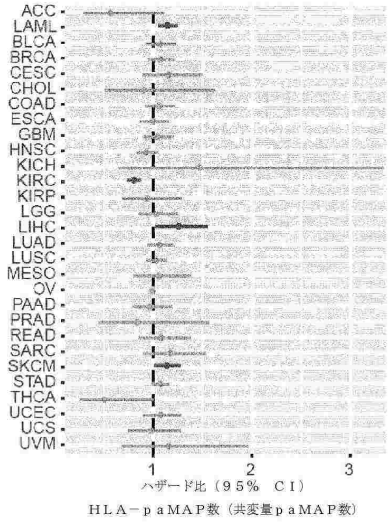
40

50

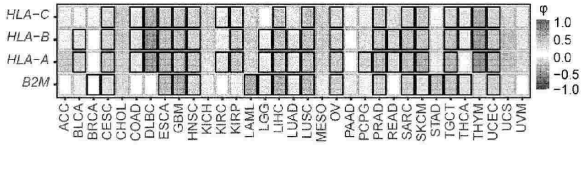
【図 6 C】



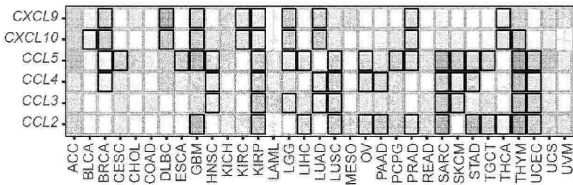
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】



10

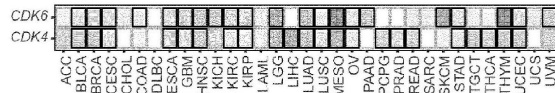
20

30

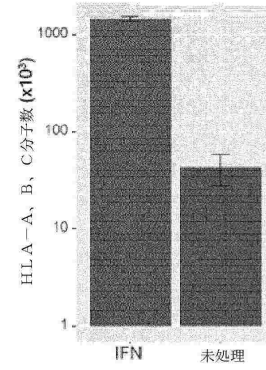
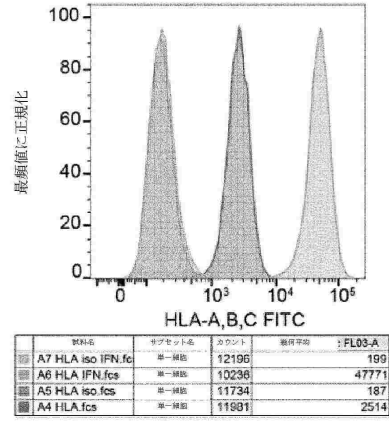
40

50

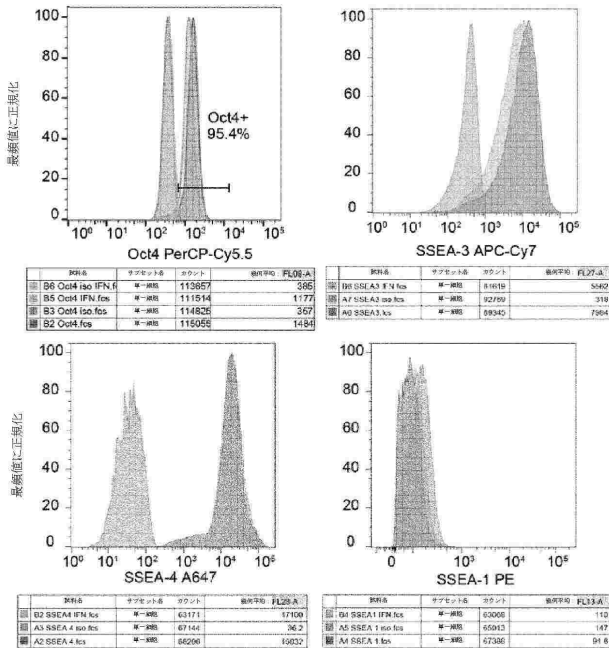
【図 7 D】



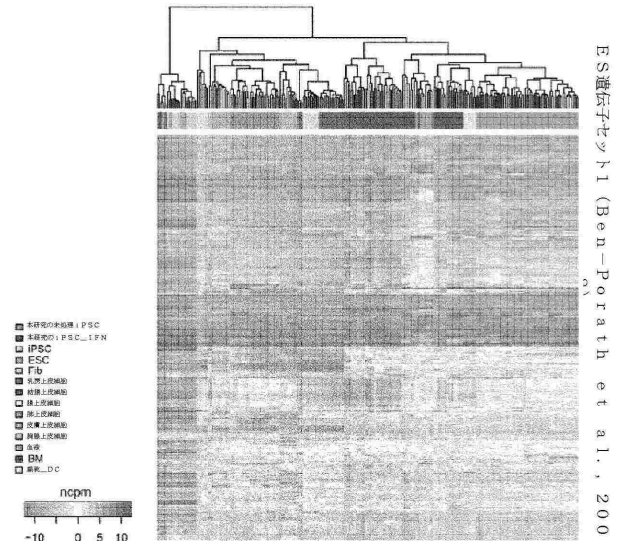
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



10

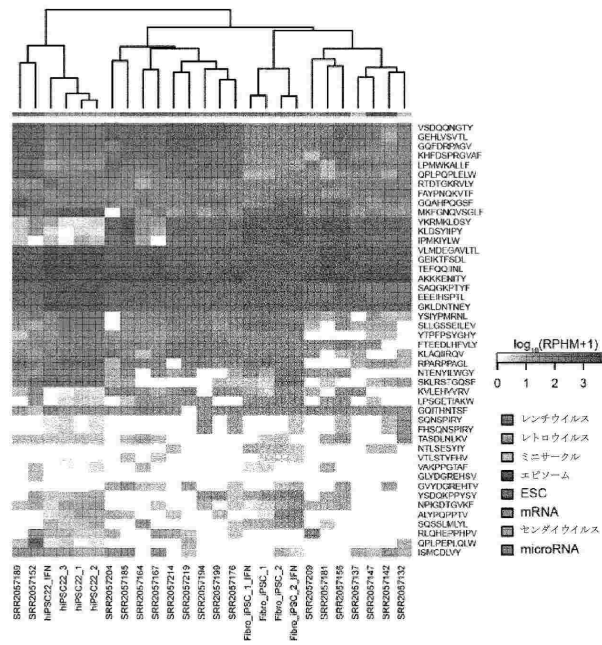
20

30

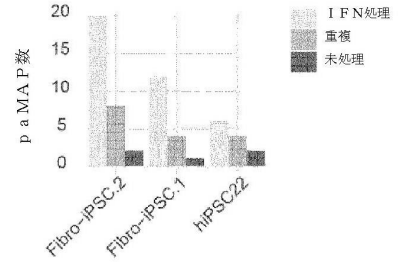
40

50

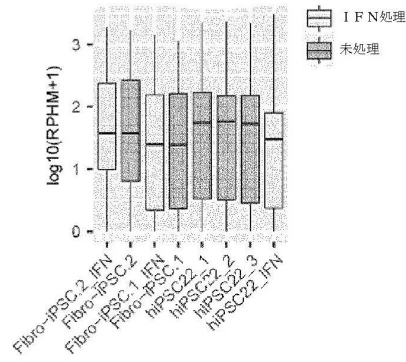
【図 9 A】



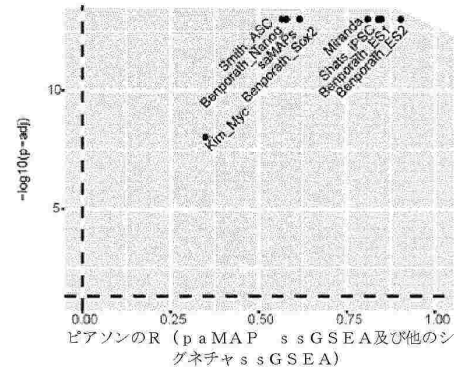
【図 9 B】



【図 9 C】



【図 9 D】



10

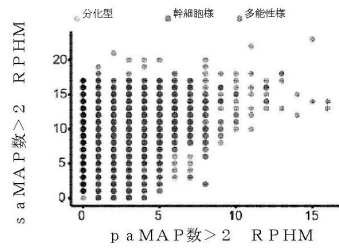
20

30

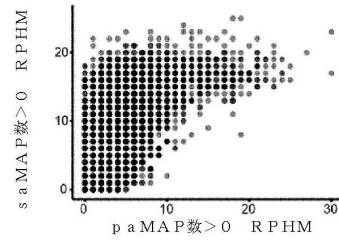
40

50

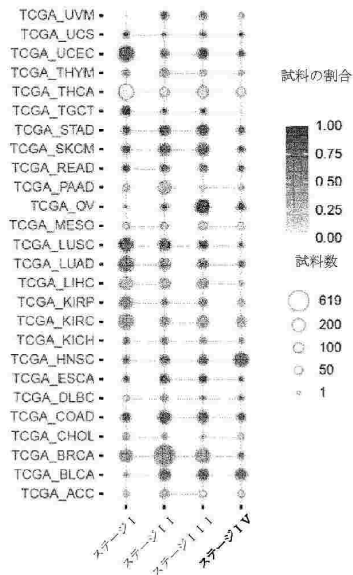
【図 10 D】



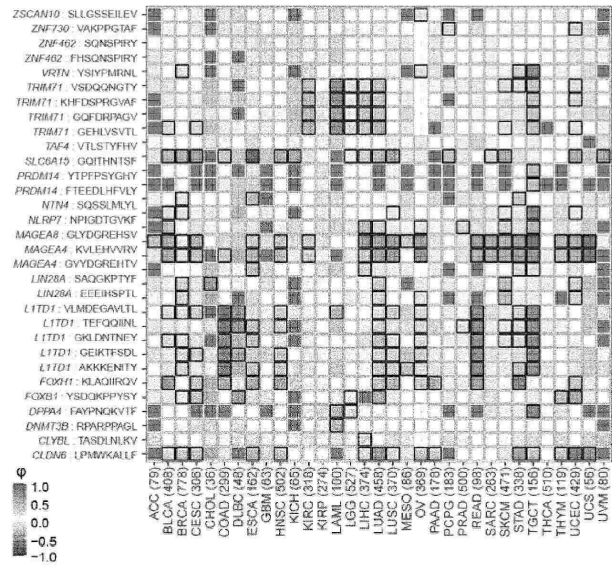
【図 10 E】



【図 10 F】



【図 11 A】



10

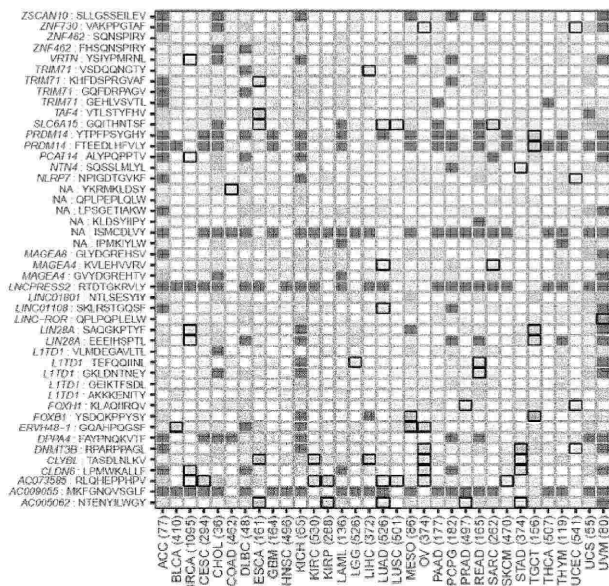
20

30

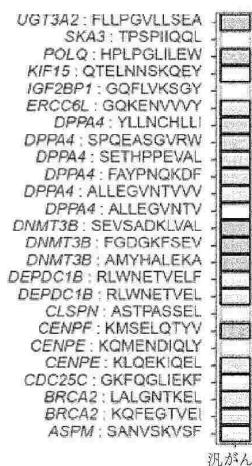
40

50

【図 11 B】

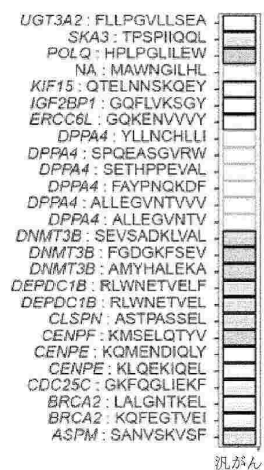


【図 1 1 C】



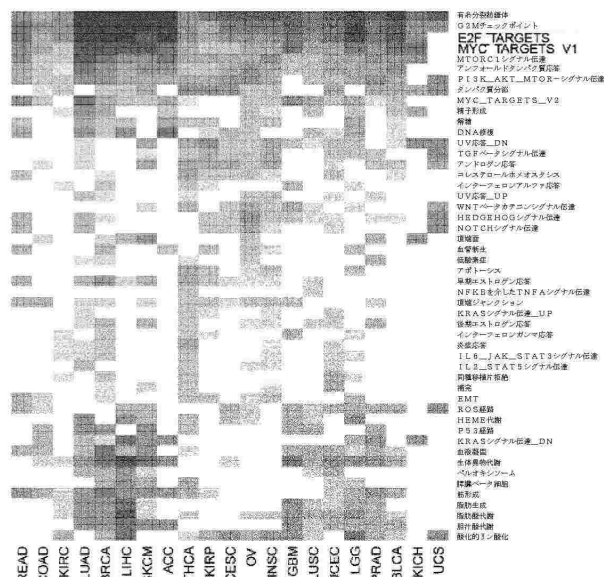
10

【図 11 D】



汎がん

【図 11 E】



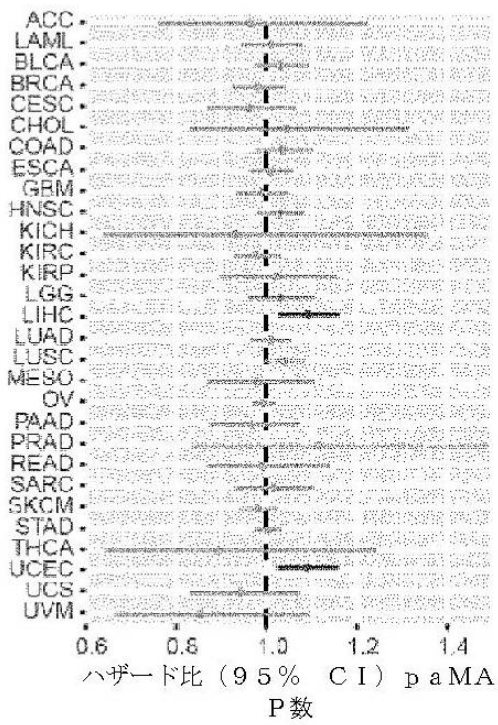
20

30

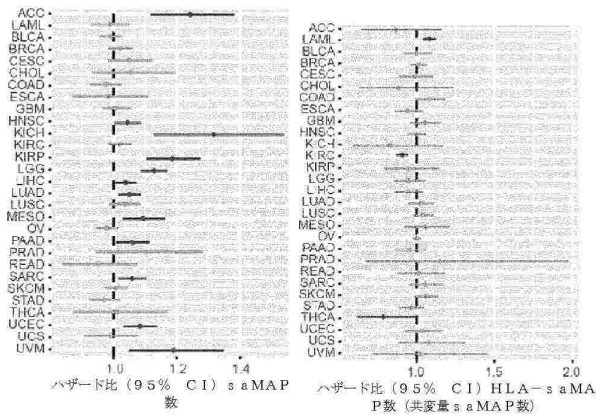
40

50

【図 13 A】



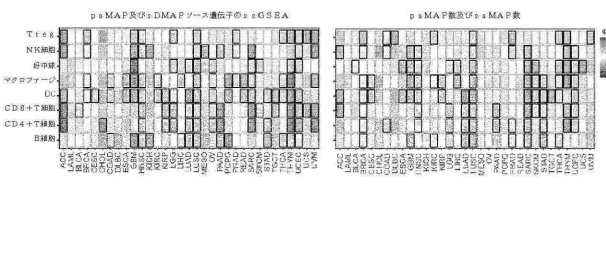
【図 13 B】



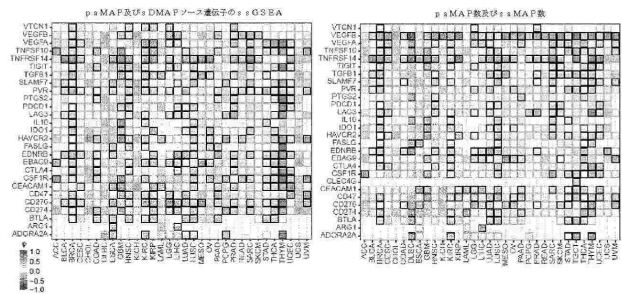
10

20

【図 13 C】



【図 13 D】



30

40

50

【配列表】

2024527620000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/051068									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 15/12</i> (2006.01), <i>A61K 35/15</i> (2015.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) CPC: <i>C12N 15/10</i> (2022.05), <i>A61K 35/15</i> (2020.01), <i>A61K 39/001111</i> (2020.01), <i>A61K 39/39558</i> (2020.01), <i>A61P 35/00</i> (2020.01), <i>A61P 37/04</i> (2020.01) (more CPCs on the last page) 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) IPC: <i>C12N 15/12</i> , <i>A61K 35/15</i> , <i>A61K 39/00</i> , <i>A61K 39/395</i> , <i>A61P 35/00</i> , <i>A61P 37/04</i> , <i>C07K 7/06</i> , <i>C07K 7/08</i> , <i>C07K 14/47</i> , <i>C07K 14/705</i> , <i>C07K 14/725</i> , <i>C07K 16/28</i> , <i>C12N 5/10</i> , <i>C12N 5/078</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Scopus, STNext, Canadian Patent Database, GenomeQuest, GenBank, Protein Data Bank, Genpept. Keywords: Cancer stem cell, tumor antigen, peptide, HLA, vaccine, therapy, Universite de Montreal, Perreault Claude, Thibault Pierre, Hardy Marie-Pierre, Apavaloaei Anca											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>LI et al., "Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles for Cancer Stem Cell Targeting". <i>Frontiers in Pharmacology</i>, 14 February 2017 (14-02-2017), Vol. 8(51), pp. 1-12, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3389/fphar.2017.00051></td> <td style="text-align: center;">1-57</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A, D</td> <td>APAVALOAEI et al., "The Origin and Immune Recognition of Tumor-Specific Antigens". <i>Cancers</i>, 12 September 2020 (12-09-2020), Vol. 12(2607), pp. 1-13, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3390/cancers12092607></td> <td style="text-align: center;">1-34 and 40-57</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	LI et al., "Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles for Cancer Stem Cell Targeting". <i>Frontiers in Pharmacology</i> , 14 February 2017 (14-02-2017), Vol. 8(51), pp. 1-12, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3389/fphar.2017.00051>	1-57	A, D	APAVALOAEI et al., "The Origin and Immune Recognition of Tumor-Specific Antigens". <i>Cancers</i> , 12 September 2020 (12-09-2020), Vol. 12(2607), pp. 1-13, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3390/cancers12092607>	1-34 and 40-57
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	LI et al., "Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles for Cancer Stem Cell Targeting". <i>Frontiers in Pharmacology</i> , 14 February 2017 (14-02-2017), Vol. 8(51), pp. 1-12, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3389/fphar.2017.00051>	1-57									
A, D	APAVALOAEI et al., "The Origin and Immune Recognition of Tumor-Specific Antigens". <i>Cancers</i> , 12 September 2020 (12-09-2020), Vol. 12(2607), pp. 1-13, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3390/cancers12092607>	1-34 and 40-57									
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 16 September 2022 (16-09-2022)		Date of mailing of the international search report 20 September 2022 (20-09-2022)									
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Serisha Moodley (819) 353-9056									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/CA2022/051068

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SALJO et al., " <i>HLA and Histo-Blood Group Antigen Expression in Human Pluripotent Stem Cells and their Derivatives</i> ". Scientific Reports, 12 October 2017 (12-10-2017), Vol. 7(13072), pp. 1-14, [online] [retrieved on 16 September 2022 (16-09-2022)]. Retrieved from the Internet: <DOI:10.1038/s41598-017-12231-8>	30
A, D	SMITH et al., " <i>A Human Adult Stem Cell Signature Marks Aggressive Variants across Epithelial Cancers</i> ". Cell Reports, 18 September 2018 (18-09-2018), Vol. 24, pp. 3353-3366, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.062>	1-20
A	WO 2020/041876 A1 (LAUMONT et al.) 5 March 2020 (05-03-2020)	1-34 and 40-57
A	WO 2020/257922 A1 (ZHAO et al.) 30 December 2020 (30-12-2020)	1-34 and 40-57

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2022/051068
Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2022/051068

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☐ Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claim 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. ☐ Claim 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: Groups A1-A39 - Claims 1-57 (partially) are directed to a cancer stem cell (CSC) tumour antigen peptide (TAP) comprising one of the sequences of SEQ ID NOs: 1-39, as well as related subject matter; and Groups B1-B16 - Claims 1 and 3-57 (partially) are directed to a cancer stem cell (CSC) tumour antigen peptide (TAP) comprising one of the sequences of SEQ ID NOs: 47-62, as well as related subject matter. Continued on extra sheet. 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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 claim 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 claim 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.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

International application No.
PCT/CA2022/051068

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2020041876A1	05 March 2020 (05-03-2020)	AU2019330487A1	04 February 2021 (04-02-2021)
		BR112021002394A2	11 May 2021 (11-05-2021)
		CA3109716A1	05 March 2020 (05-03-2020)
		CN112639136A	09 April 2021 (09-04-2021)
		EP3844172A1	07 July 2021 (07-07-2021)
		EP3844172A4	10 August 2022 (10-08-2022)
		IL280651A	25 March 2021 (25-03-2021)
		JP2021534830A	16 December 2021 (16-12-2021)
		KR20210049150A	04 May 2021 (04-05-2021)
		SG11202100528YA	25 February 2021 (25-02-2021)
WO2020257922A1	30 December 2020 (30-12-2020)	US2021253638A1	19 August 2021 (19-08-2021)
		AU2020301838A1	10 February 2022 (10-02-2022)
		BR112021025943A2	08 February 2022 (08-02-2022)
		CA3141898A1	30 December 2020 (30-12-2020)
		CN114026117A	08 February 2022 (08-02-2022)
		EP3990483A1	04 May 2022 (04-05-2022)
		IL288826A	01 February 2022 (01-02-2022)
		KR20220025808A	03 March 2022 (03-03-2022)
		SG11202113192QA	30 December 2021 (30-12-2021)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/051068

Continued of: Box No. III

Reference is made to the following documents:

D1 LI et al., *Frontiers in Pharmacology*, 14 February 2017 (14-02-2017), Vol. 8(51), pp. 1-12, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi: 10.3389/fphar.2017.00051>

D2 APAVALOAEI et al., *Cancers*, 12 September 2020 (12-09-2020), Vol. 12(2607), pp. 1-13, [online] [retrieved on 22 July 2022 (22-07-2022)]. Retrieved from the Internet: <doi:10.3390/cancers12092607>

D1 is a review article that discloses the common general knowledge regarding CSCs, their function and potential as targets for cancer therapy (abstract and page 1). D1 discloses a number of therapeutic strategies to target CSCs, including the use of chemotherapeutics that interfere with cell growth, target the tumor microenvironment, inhibit CSC-dependent signalling pathways, targeting CSC-dependent markers, interfering with CSC differentiation, using TAPs for cancer vaccination and exploiting CSC-specific metabolic differences (Figure 1 and pages 2-5). D1 further discloses the design and use of polymeric drug-loaded nanoparticle delivery systems to improve drug pharmacokinetics and enhance the specific targeting and accumulation of drugs to a tumor (pages 5-8). D1 also discloses the use of combination therapy (page 9).

D2 is a review article that discloses the common general knowledge regarding tumor-specific antigens (TSAs) also known as MHC-associated peptides (MAPs), including their characteristics, identification and use in cancer immunotherapeutics (pages 1-7).

The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Groups A1-A39 - Claims 1-57 (partially) are directed to a cancer stem cell (CSC) tumour antigen peptide (TAP) comprising one of the sequences of SEQ ID NOs: 1-39, as well as related subject matter; and

Groups B1-B16 - Claims 1 and 3-57 (partially) are directed to a cancer stem cell (CSC) tumour antigen peptide (TAP) comprising one of the sequences of SEQ ID NOs: 47-62, as well as related subject matter.

Groups A1-A39 and B1-B16 relate to structurally and functionally distinct peptides, nucleic acids, lipid vesicles/ particles, vaccines, MHC class I molecules and antibodies that bind said peptides for use in treating cancer. Further CSC TAPs, associated nucleic acids, vaccines and antibodies that bind said peptides appear to be known (see D1 and D2), and the subject-matter of the claims is not linked as to form a single general inventive concept that defines a contribution over the prior art. Therefore the claims lack unity *a priori* and *a posteriori*.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in PCT Rule 13.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2022/051068

IPC:

C07K 7/06 (2006.01), *C07K 7/08* (2006.01), *C07K 14/47* (2006.01), *C07K 14/705* (2006.01),
C07K 14/725 (2006.01), *C07K 16/28* (2006.01), *C12N 5/10* (2006.01), *C12N 5/078* (2010.01)

CPC:

C07K 7/06 (2020.01), *C07K 7/08* (2020.01), *C07K 14/47* (2020.01), *C07K 14/705* (2020.01),
C07K 14/7051 (2020.01), *C07K 16/3076* (2020.01), *C12N 5/10* (2020.05), *C12N 5/0634* (2020.01)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0784(2010.01)	C 1 2 N	5/0784	
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
		A 6 1 K	35/12	
		A 6 1 K	35/15	
		A 6 1 K	45/00	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PYTHON

(72)発明者 ピエール ティボー

カナダ国 エイチ２エム ２エム８ ケベック モントリオール リュ ジョセフ カンタル ８５６０

(72)発明者 マリーーピエール ハーディ

カナダ国 ジェイ６ワイ ０エイ５ ケベック テルボンヌ リュ デ ベチュジー ６１８

(72)発明者 アンカ アパファロエイ

カナダ国 エイチ２アール １ジェイ６ ケベック モントリオール リュ ヴィルレー １１６０ ア
パートメント ２４

F ターム (参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44 CA45 CA46

4C084 AA01 AA02 AA03 AA19 MA02 MA16 MA17 MA55 MA56 MA58

MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC202
ZC751

4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB11 CC23 DD86 EE01 EE03 EE06

GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06

4C087 AA01 AA02 BB44 BB64 BB65 MA16 MA17 MA55 MA56 MA58

MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75

4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA16 CA40 DA86 EA28 EA31 FA33

FA74