

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和4年8月31日(2022.8.31)

【国際公開番号】WO2020/041876

【公表番号】特表2021-534830(P2021-534830A)

【公表日】令和3年12月16日(2021.12.16)

【出願番号】特願2021-536116(P2021-536116)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/12(2006.01)

10

C 0 7 K 7/06(2006.01)

C 1 2 Q 1/02(2006.01)

C 1 2 Q 1/6809(2018.01)

C 1 2 Q 1/6872(2018.01)

C 1 2 N 15/88(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 0 7 K 14/725(2006.01)

A 6 1 K 39/00(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

20

A 6 1 K 48/00(2006.01)

A 6 1 K 9/127(2006.01)

A 6 1 K 39/39(2006.01)

A 6 1 P 37/04(2006.01)

A 6 1 K 35/76(2015.01)

A 6 1 K 45/00(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 P 35/02(2006.01)

A 6 1 K 35/17(2015.01)

A 6 1 K 35/15(2015.01)

30

C 4 0 B 40/08(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 7/06 Z N A

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/6809 Z

C 1 2 Q 1/6872 Z

C 1 2 N 15/88 Z

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 14/725

40

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 39/39

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 35/76

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

50

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 35/17 Z

A 6 1 K 35/15 Z

C 4 0 B 40/08

【手続補正書】

【提出日】令和4年8月23日(2022.8.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

10

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍細胞試料における腫瘍抗原候補を特定するための方法であって、

(a) 腫瘍特異的プロテオームデータベースを、

(i) 腫瘍RNA配列から、少なくとも33塩基対を含むサブ配列(k-mer)のセットを抽出することと、

(ii) (i)の前記腫瘍サブ配列のセットを、正常細胞からのRNA配列から抽出された少なくとも33塩基対を含む対応するコントロールサブ配列のセットと比較することと、

20

(iii) 前記対応するコントロールサブ配列に存在しない前記腫瘍サブ配列を抽出し、それによって腫瘍特異的サブ配列を得ることと、

(iv) 前記腫瘍特異的サブ配列をコンピュータによって翻訳し、それによって前記腫瘍特異的プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(b) 個別化腫瘍プロテオームデータベースを、

(i) 前記腫瘍RNA配列を参照ゲノム配列と比較して、前記腫瘍RNA配列における一塩基変異を特定することと、

(ii) (i)で特定された前記一塩基変異を前記参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化腫瘍ゲノム配列を作成することと、

30

(iii) 前記個別化腫瘍ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって前記個別化腫瘍プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(c) 前記腫瘍からの主要組織適合性複合体(MHC)関連ペプチド(MAP)の配列を、(a)の前記腫瘍特異的プロテオームデータベースおよび(b)の前記個別化腫瘍プロテオームデータベースの配列と比較して、前記MAPを特定することと、

(d) (c)で特定された前記MAPの中で腫瘍抗原候補を特定することと、を含み、腫瘍抗原候補は、配列および/またはコード配列が、正常細胞と比較して腫瘍細胞中で過剰発現または過剰提示されるペプチドである、方法。

【請求項2】

40

前記方法は、(1)前記腫瘍細胞試料から主要組織適合性複合体(MHC)関連ペプチド(MAP)を単離および配列決定すること、ならびに/または(2)前記腫瘍細胞試料で全トランスクリプトーム配列決定を実施して、前記腫瘍RNA配列を得ることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記MAPの単離は、(i)前記MAPを前記細胞試料から弱酸処理によって放出することと、(ii)前記放出されたMAPをクロマトグラフィーに供することと、を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記方法は、前記放出されたペプチドを前記クロマトグラフィーの前にサイズ排除カラ

50

ムで濾過することをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サブ配列は、33～54塩基対を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

重複する腫瘍特異的サブ配列を、より長い腫瘍サブ配列（コンティグ）に組み立てることをさらに含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 M A P の配列決定は、前記単離された M A P を質量分析（M S）配列決定分析に供することを、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記方法は、対応する正常細胞を使用して個別化正常プロテオームデータベースを生成することをさらに含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記（d）における特定は、前記 M A P を、その配列が前記正常個別化プロテオームデータベース中で検出される場合に、除外することを、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法は、前記腫瘍 R N A 配列および正常細胞からの R N A 配列から 24 または 39ヌクレオチド k - m e r データベースを生成して腫瘍 k - m e r データベースおよび正常 k - m e r データベースを得ることと、前記腫瘍 k - m e r データベースおよび正常 k - m e r データベースを、前記 M A P コード配列に由来する 24 または 39ヌクレオチド k - m e r と比較することと、をさらに含み、前記正常 k - m e r データベースと比較して前記腫瘍 k - m e r データベースにおける前記 M A P コード配列に由来する前記 k - m e r の過剰発現または過剰提示が、対応する M A P が腫瘍抗原候補であることを示す、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記 M A P コード配列に由来する前記 k - m e r は、前記正常 k - m e r データベースと比較して、前記腫瘍 k - m e r データベースにおいて少なくとも 10 倍過剰発現または過剰提示される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 M A P コード配列に由来する前記 k - m e r は、前記正常 k - m e r データベースには存在しない、請求項 10 または 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記方法は、

（a）腫瘍細胞試料における M A P を単離および配列決定することと、

（b）全トランスクリプトーム配列決定を前記腫瘍細胞試料で実施し、それによって腫瘍 R N A 配列を得ることと、

（c）腫瘍特異的プロテオームデータベースを、

（i）前記腫瘍 R N A 配列から少なくとも 33ヌクレオチドを含むサブ配列のセットを抽出することと、

40

（i i）（i）の前記腫瘍サブ配列のセットを、正常細胞からの R N A 配列から抽出された少なくとも 33ヌクレオチドを含む対応するコントロールサブ配列のセットと比較することと、

（i i i）前記対応するコントロールサブ配列において、存在しないか、または少なくとも 4 倍下方発現されている前記腫瘍サブ配列を抽出し、それによって腫瘍特異的サブ配列を得ることと、

（i v）前記腫瘍特異的サブ配列をコンピュータによって翻訳し、それによって前記腫瘍特異的プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

（d）個別化腫瘍プロテオームデータベースを、

（i）前記腫瘍 R N A 配列を参照ゲノム配列と比較して、前記腫瘍 R N A 配列におけ

50

る一塩基変異を特定することと、

(i i) (i) で特定された前記一塩基変異を前記参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化腫瘍ゲノム配列を作成することと、

(i i i) 前記個別化腫瘍ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって前記個別化腫瘍プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(e) 個別化正常プロテオームデータベースを、

(i) 正常細胞からの R N A 配列を参照ゲノム配列と比較して、前記正常 R N A 配列における一塩基変異を特定することと、

(i i) (i) で特定された前記一塩基変異を前記参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化正常ゲノム配列を作成することと、

(i i i) 前記個別化正常ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって前記個別化正常プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(f) 正常および腫瘍 k - m e r データベースを、(i) 正常細胞からの前記 R N A 配列および前記腫瘍 R N A 配列から少なくとも 2 4 ヌクレオチドを含むサブ配列のセットを抽出することによって生成することと、

(g) (a) で得られた前記 M A P の配列を、(c) の前記腫瘍特異的プロテオームデータベースおよび(d) の前記個別化腫瘍プロテオームデータベースの配列と比較して、前記 M A P を特定することと、

(h) (g) で特定された前記 M A P の中で腫瘍抗原候補を特定することと、を含み、腫瘍抗原候補は、(1) 配列が前記個別化正常プロテオームデータベースに存在せず、かつ(2) (i) 配列が前記個別化腫瘍プロテオームデータベースに存在し、かつ/または(i i) コード配列が、前記正常 k - m e r データベースと比較して前記腫瘍 k - m e r データベースにおいて過剰発現もしくは過剰提示される、M A P に対応する、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記方法は、8 ~ 1 1 個のアミノ酸の長さを有する M A P を選択することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記正常細胞は、胸腺細胞である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記腫瘍抗原候補の前記コード配列を、正常組織からの配列と比較することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 M A P は、8 ~ 1 1 個のアミノ酸の長さを有する、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

(i) 前記腫瘍抗原候補の M H C 分子との結合、

(i i) 細胞集団における前記腫瘍抗原候補を認識する T 細胞の頻度、

(i i i) T 細胞活性化を誘導する前記腫瘍抗原候補の能力、および/または

(i v) T 細胞媒介性腫瘍細胞死滅を誘導し、かつ/または腫瘍成長を阻害する前記腫瘍抗原候補の前記能力

を評価することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

配列番号 1 ~ 3 9 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含むか、またはそれからなる、ゲノムの非タンパク質コード領域に由来する腫瘍抗原ペプチドであって、1 4 個以下のアミノ酸を含み、

(a) 配列番号 3 3、2 9、3 0、3 1、3 5、3 6、3 7 および 3 8 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含む、肺腫瘍抗原ペプチドである、あるいは

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 17 ~ 27 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含む、B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (B - A L L) 腫瘍抗原ペプチドである、前記腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 20】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - A * 0 2 : 0 1 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 17 ~ 19 および 27 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含む、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 21】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - B * 4 0 : 0 1 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

10

【請求項 22】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - A * 1 1 : 0 1 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 21 ~ 23、29 ~ 31、33 および 35 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含む、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 23】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - B * 0 8 : 0 1 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 24 または 25 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 24】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - B * 0 7 : 0 2 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 26 または 36 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

20

【請求項 25】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - A * 2 4 : 0 2 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 38 または 39 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 26】

前記腫瘍抗原ペプチドは、H L A - C * 0 7 : 0 1 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、請求項 19 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

30

【請求項 27】

前記腫瘍は、非小細胞肺癌 (N S C L C) である、請求項 19 ~ 26 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 28】

前記ゲノムの前記非タンパク質コード領域は、遺伝子間領域、イントロン領域、5' 非翻訳領域 (5' U T R)、3' 非翻訳領域 (3' U T R)、または内在性レトロエレメント (E R E) である、請求項 19 ~ 27 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド。

【請求項 29】

請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチドをコードする、核酸。

40

【請求項 30】

m R N A である、請求項 29 に記載の核酸。

【請求項 31】

請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、または請求項 29 もしくは 30 に記載の核酸を含む、小胞。

【請求項 32】

請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、請求項 29 もしくは 30 に記載の核酸、または請求項 31 に記載の小胞と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 33】

50

請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、請求項 29 もしくは 30 に記載の核酸、請求項 31 に記載の小胞、または請求項 32 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 34】

請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチドをそれらのペプチド結合溝を含む主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子を、その表面で発現する、単離された細胞。

【請求項 35】

請求項 34 に記載の細胞の表面で発現される MHC クラス I 分子を特異的に認識する、T 細胞受容体 (TCR)。

10

【請求項 36】

請求項 35 に定義される TCR を、その表面で発現する、CD8 + T リンパ球の少なくとも 0.5 % を含む、細胞集団。

【請求項 37】

対象において癌を治療するための、(i) 請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、(ii) 請求項 29 もしくは 30 に記載の核酸、(iii) 請求項 31 に記載の小胞、(iv) 請求項 32 に記載の組成物、(v) 請求項 33 に記載のワクチン、(vi) 請求項 34 に記載の細胞、または (vii) 請求項 36 に記載の細胞集団を含む、医薬組成物。

【請求項 38】

対象において癌を治療するための医薬品の製造のための、(i) 請求項 19 ~ 28 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、(ii) 請求項 29 または 30 に記載の核酸、(iii) 請求項 31 に記載の小胞、(iv) 請求項 32 に記載の組成物、(v) 請求項 33 に記載のワクチン、(vi) 請求項 34 に記載の細胞、または (vii) 請求項 36 に記載の細胞集団の、使用。

20

【請求項 39】

前記癌は、B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (B-ALL) である、請求項 37 に記載の医薬組成物 または 請求項 38 に記載の使用。

【請求項 40】

前記癌は、非小細胞肺癌 (NSCLC) である、請求項 37 に記載の医薬組成物 または 請求項 38 に記載の使用。

30

【請求項 41】

少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤または療法と組み合わせて使用するためのものである、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の医薬組成物 または 使用。

【請求項 42】

前記少なくとも 1 つの追加の抗腫瘍剤または療法は、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、または手術である、請求項 41 に記載の医薬組成物 または 使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

40

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本開示は、以下の項目 1 ~ 75 を提供する。

1. 腫瘍細胞試料における腫瘍抗原候補を特定するための方法であって、
(a) 腫瘍特異的プロテオームデータベースを、(i) 腫瘍 RNA 配列から少なくとも 3 塩基対を含むサブ配列 (k-mer) のセットを抽出することと、(ii) (i) の腫瘍サブ配列のセットを、正常細胞からの RNA 配列から抽出された少なくとも 3 塩基対を含む対応するコントロールサブ配列のセットと比較することと、(iii) 対応するコ

50

ントロールサブ配列に存在しない腫瘍サブ配列を抽出し、それによって腫瘍特異的サブ配列を得ることと、(i v) 腫瘍特異的サブ配列をコンピュータによって翻訳し、それによって腫瘍特異的プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(b) 個別化腫瘍プロテオームデータベースを、(i) 腫瘍 R N A 配列を参照ゲノム配列と比較して、腫瘍 R N A 配列における一塩基変異を特定することと、(i i) (i) で特定された一塩基変異を参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化腫瘍ゲノム配列を作成することと、(i i i) 個別化腫瘍ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって個別化腫瘍プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(c) 腫瘍からの主要組織適合性複合体 (M H C) 関連ペプチド (M A P) の配列を、(a) の腫瘍特異的プロテオームデータベースおよび (b) の個別化腫瘍プロテオームデータベースの配列と比較して、M A P を特定することと、

(d) (c) で特定された M A P の中で腫瘍抗原候補を特定することと、を含み、腫瘍抗原候補は、その配列および / またはコード配列が、正常細胞と比較して腫瘍細胞中で過剰発現または過剰提示されるペプチドである、方法。

2 . 上記の方法は、(1) 腫瘍細胞試料から主要組織適合性複合体 (M H C) 関連ペプチド (M A P) を単離および配列決定すること、ならびに / または (2) 腫瘍細胞試料で全トランスクリプトーム配列決定を実施して、腫瘍 R N A 配列を得ること、をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

3 . 当該 M A P の単離は、(i) 当該 M A P を当該細胞試料から弱酸処理によって放出することと、(i i) 放出された M A P をクロマトグラフィーに供することと、を含む、項目 2 に記載の方法。

4 . 当該方法は、放出されたペプチドを当該クロマトグラフィーの前にサイズ排除カラムで濾過することをさらに含む、項目 3 に記載の方法。

5 . 当該サブ配列は 3 3 ~ 5 4 塩基対を含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

6 . 重複する腫瘍特異的サブ配列を、より長い腫瘍サブ配列 (コンティグ) に組み立てることをさらに含む、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

7 . 当該サイズ排除カラムは、約 3 0 0 0 D a のカットオフを有する、項目 6 に記載の方法。

8 . 当該 M A P の配列決定は、単離された M A P を質量分析 (M S) 配列決定分析に供することを含む、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

9 . 当該方法は、対応する正常細胞を使用して個別化正常プロテオームデータベースを生成することをさらに含む、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

1 0 . 当該 (d) における特定は、当該 M A P を、その配列が正常個別化プロテオームデータベース中で検出される場合に、除外することを含む、項目 9 に記載の方法。

1 1 . 方法は、当該腫瘍 R N A 配列および正常細胞からの R N A 配列から 2 4 または 3 9 ヌクレオチド k - m e r データベースを生成して腫瘍 k - m e r データベースおよび正常 k - m e r データベースを得ることと、腫瘍 k - m e r データベースおよび正常 k - m e r データベースを、M A P コード配列に由来する 2 4 または 3 9 ヌクレオチド k - m e r と比較することと、をさらに含む、当該正常 k - m e r データベースと比較して当該腫瘍 k - m e r データベースにおける M A P コード配列に由来する k - m e r の過剰発現または過剰提示が、対応する M A P が腫瘍抗原候補であることを示す、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

1 2 . M A P コード配列に由来する k - m e r は、当該正常 k - m e r データベースと比較して、当該腫瘍 k - m e r データベースにおいて少なくとも 1 0 倍過剰発現または過剰提示される、項目 1 1 に記載の方法。

1 3 . M A P コード配列に由来する k - m e r は、当該正常 k - m e r データベースには存在しない、項目 1 1 または 1 2 に記載の方法。

1 4 . 当該方法は、

10

20

30

40

50

- (a) 腫瘍細胞試料における M A P を単離および配列決定することと、
- (b) 全トランスクリプトーム配列決定を当該腫瘍細胞試料で実施し、それによって腫瘍 R N A 配列を得ることと、
- (c) 腫瘍特異的プロテオームデータベースを、(i) 当該腫瘍 R N A 配列から少なくとも 3 3 ヌクレオチドを含むサブ配列のセットを抽出することと、(i i) (i) の腫瘍サブ配列のセットを、正常細胞からの R N A 配列から抽出された少なくとも 3 3 ヌクレオチドを含む対応するコントロールサブ配列のセットと比較することと、(i i i) 対応するコントロールサブ配列において、存在しないか、または少なくとも 4 倍下方発現される腫瘍サブ配列を抽出し、それによって腫瘍特異的サブ配列を得ることと、(i v) 腫瘍特異的サブ配列をコンピュータによって翻訳し、それによって腫瘍特異的プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、
- (d) 個別化腫瘍プロテオームデータベースを、(i) 腫瘍 R N A 配列を参照ゲノム配列と比較して、当該腫瘍 R N A 配列における一塩基変異を特定することと、(i i) (i) で特定された一塩基変異を参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化腫瘍ゲノム配列を作成することと、(i i i) 個別化腫瘍ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって個別化腫瘍プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、
- (e) 個別化正常プロテオームデータベースを、(i) 正常細胞からの R N A 配列を参照ゲノム配列と比較して、当該正常 R N A 配列における一塩基変異を特定することと、(i i) (i) で特定された一塩基変異を参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化正常ゲノム配列を作成することと、(i i i) 個別化正常ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって個別化正常プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、
- (f) 正常および腫瘍 k - m e r データベースを、(i) 正常細胞からの当該 R N A 配列および当該腫瘍 R N A 配列から少なくとも 2 4 ヌクレオチドを含むサブ配列のセットを抽出することによって、生成することと、
- (g) (a) で得られた M A P の配列を、(c) の腫瘍特異的プロテオームデータベースおよび(d) の個別化腫瘍プロテオームデータベースの配列と比較して、M A P を特定することと、
- (h) (g) で特定された M A P の中で腫瘍抗原候補を特定することと、を含み、腫瘍抗原候補は、(1) 配列が個別化正常プロテオームデータベースに存在せず、かつ(2) (i) 配列が個別化腫瘍プロテオームデータベースに存在し、かつ/または(i i) コード配列が、当該正常 k - m e r データベースと比較して当該腫瘍 k - m e r データベースにおいて過剰発現もしくは過剰提示される、M A P に対応する、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。
- 1 5 . 当該方法は、8 ~ 1 1 個のアミノ酸の長さを有する M A P を選択することをさらに含む、項目 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。
- 1 6 . 当該正常細胞は、胸腺細胞である、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。
- 1 7 . 当該胸腺細胞は、髄質胸腺上皮細胞 (m T E C) である、項目 1 6 に記載の方法。
- 1 8 . 当該腫瘍抗原候補のコード配列を、正常組織からの配列と比較することをさらに含む、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。
- 1 9 . 当該 M A P は、8 ~ 1 1 個のアミノ酸の長さを有する、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。
- 2 0 . 腫瘍抗原候補の M H C 分子との結合を評価することをさらに含む、項目 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。
- 2 1 . 当該結合は、M H C 結合予測アルゴリズムを使用して評価される、項目 2 0 に記載の方法。
- 2 2 . 細胞集団における腫瘍抗原候補を認識する T 細胞の頻度を評価することをさらに含む、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

23. 腫瘍抗原候補を認識するT細胞の頻度は、当該腫瘍抗原候補をそれらのペプチド結合溝に含む多量体MHCクラスI分子を使用して評価される、項目22に記載の方法。

24. T細胞活性化を誘導する腫瘍抗原候補の能力を評価することをさらに含む、項目1~23のいずれか一項に記載の方法。

25. T細胞活性化を誘導する腫瘍抗原候補の能力は、MHCクラスI分子にそれらの細胞表面で結合した当該腫瘍抗原候補を有する細胞と接触されたT細胞によるサイトカイン産生を測定することによって評価される、項目24に記載の方法。

26. 当該サイトカイン産生は、インターフェロン-ガンマ(IFN-)産生を含む、項目25に記載の方法。

27. T細胞媒介性腫瘍細胞死滅を誘導し、かつ/または腫瘍成長を阻害する腫瘍抗原候補の能力を評価することをさらに含む、項目1~26のいずれか一項に記載の方法。 10

28. 項目1~27のいずれか一項で定義される方法によって特定される、腫瘍抗原ペプチド。

29. 配列番号1~39のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、腫瘍抗原ペプチド。

30. 配列番号17~39のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、項目29に記載の腫瘍抗原ペプチド。

31. 当該腫瘍抗原ペプチドは、白血病腫瘍抗原ペプチドであり、配列番号17~28のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、項目30に記載の腫瘍抗原ペプチド。 20

32. 当該白血病は、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)である、項目31に記載の腫瘍抗原ペプチド。

33. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-A*02:01対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号17~19、27、および28のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、項目31または32に記載の腫瘍抗原ペプチド。

34. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-B*40:01対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、項目31または32に記載の腫瘍抗原ペプチド。

35. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-A*11:01対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号21~23のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、項目31または32に記載の腫瘍抗原ペプチド。 30

36. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-B*08:01対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号24または25に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、項目31または32に記載の腫瘍抗原ペプチド。

37. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-B*07:02対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、項目31または32に記載の腫瘍抗原ペプチド。

38. 当該腫瘍抗原ペプチドは、肺腫瘍抗原ペプチドであり、配列番号29~39のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、項目30に記載の腫瘍抗原ペプチド。 40

39. 当該肺腫瘍は、非小細胞肺癌(NSCLC)である、項目38に記載の腫瘍抗原ペプチド。

40. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-A*11:01対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号29~35のいずれか1つに示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むか、またはそれからなる、項目38または39に記載の腫瘍抗原ペプチド。

41. 当該腫瘍抗原ペプチドは、HLA-B*07:02対立遺伝子のヒト白血球抗原(HLA)に結合し、配列番号36に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、項目38または39に記載の腫瘍抗原ペプチド。

42. 当該腫瘍抗原ペプチドが、HLA-A*24:02対立遺伝子のヒト白血球抗原 50

(H L A) に結合し、配列番号 38 または 39 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、項目 38 または 39 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

43 . 当該腫瘍抗原ペプチドは、H L A - C * 07 : 01 対立遺伝子のヒト白血球抗原 (H L A) に結合し、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる、項目 38 または 39 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

44 . ゲノムの非タンパク質コード領域に由来する、項目 29 ~ 43 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド。

45 . ゲノムの当該非タンパク質コード領域は、遺伝子間領域、イントロン領域、5' 非翻訳領域 (5' U T R)、3' 非翻訳領域 (3' U T R)、または内在性レトロエレメント (E R E) である、項目 44 に記載の腫瘍抗原ペプチド。

10

46 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチドをコードする、核酸。

47 . m R N A またはウイルスベクターである、項目 46 に記載の核酸。

48 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、または項目 46 もしくは 47 に記載の核酸を含む、リポソーム。

49 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、項目 46 もしくは 47 に記載の核酸、または項目 48 に記載のリポソームと、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

50 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、項目 46 もしくは 47 に記載の核酸、項目 48 に記載のリポソーム、または項目 49 に記載の組成物と、アダプタントと、を含む、ワクチン。

20

51 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチドをそのペプチド結合溝を含む、単離された主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I 分子。

52 . 多量体の形態にある、項目 51 に記載の単離された M H C クラス I 分子。

53 . 当該多量体は、四量体である、項目 52 に記載の単離された M H C クラス I 分子。

54 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチドを含む、単離された細胞。

55 . 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチドをそれらのペプチド結合溝を含む主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I 分子を、その表面で発現する、単離された細胞。

30

56 . 抗原提示細胞 (A P C) である、項目 55 に記載の細胞。

57 . 当該 A P C は、樹状細胞である、項目 56 に記載の細胞。

58 . 項目 51 ~ 53 のいずれか一項に記載の単離された M H C クラス I 分子および / または項目 54 ~ 57 のいずれか一項に記載の細胞の表面で発現される M H C クラス I 分子を特異的に認識する、T 細胞受容体 (T C R) 。

59 . 項目 58 に記載の T C R をその細胞表面で発現する、単離された C D 8 + T リンパ球。

60 . 項目 59 に定義される C D 8 + T リンパ球の少なくとも 0 . 5 % を含む、細胞集団。

61 . 対象において癌を治療する方法であって、対象に有効量の (i) 項目 28 ~ 45 のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、(i i) 項目 46 もしくは 47 に記載の核酸、(i i i) 項目 48 に記載のリポソーム、(i v) 項目 49 に記載の組成物、(v) 項目 50 に記載のワクチン、(v i) 項目 54 ~ 57 のいずれか一項に記載の細胞、(v i i) 項目 59 に記載の C D 8 + T リンパ球、または (v i i i) 項目 60 に記載の細胞集団、を投与することを含む、方法。

40

62 . 当該癌は、白血病である、項目 61 に記載の方法。

63 . 当該白血病は、B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (B - A L L) である、項目 62 に記載の方法。

64 . 当該癌は、肺癌である、項目 61 に記載の方法。

65 . 当該肺腫瘍は、非小細胞肺癌 (N S C L C) である、項目 64 に記載の方法。

50

66. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤または療法を対象に投与することをさらに含む、項目61～65のいずれか一項に記載の方法。

67. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤または療法は、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、または手術である、項目66に記載の方法。

68. 対象において癌を治療するための、(i)項目28～45のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、(ii)項目46もしくは47に記載の核酸、(iii)項目48に記載のリポソーム、(iv)項目49に記載の組成物、(v)項目50に記載のワクチン、(vi)項目54～57のいずれか一項に記載の細胞、(vii)項目59に記載のCD8+Tリンパ球、または(viii)項目60に記載の細胞集団、の使用。

69. 対象において癌を治療するための医薬品の製造のための、(i)項目28～45のいずれか一項に記載の腫瘍抗原ペプチド、(ii)項目46もしくは47に記載の核酸、(iii)項目48に記載のリポソーム、(iv)項目49に記載の組成物、(v)項目50に記載のワクチン、(vi)項目54～57のいずれか一項に記載の細胞、(vii)項目59に記載のCD8+Tリンパ球、または(viii)項目60に記載の細胞集団、の使用。

70. 当該癌は、白血病である、項目68または69に記載の使用。

71. 当該白血病は、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)である、項目70に記載の使用。

72. 当該癌は、肺癌である、項目68または69に記載の使用。

73. 当該肺腫瘍は、非小細胞肺癌(NSCLC)である、項目72に記載の使用。

74. 少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤または療法の使用をさらに含む、項目68～73のいずれか一項に記載の使用。

75. 当該少なくとも1つの追加の抗腫瘍剤または療法は、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、または手術である、項目74に記載の使用。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

【図1A-C】腫瘍特異的抗原(TSA)の特定のための標的化プロテオゲノミクスワークフローを示す。図1A、B：標準的癌プロテオーム(図1A)および癌特異的プロテオーム(図1B)が各々の分析された試料についてどのように構築されたかを詳細に示す概略図。図1C：次いで、包括的癌データベース(global cancer data base)と称されるこれらの2つのプロテオームの組み合わせを使用して、2つの十分に特徴付けられたマウス細胞株、すなわち、CT26およびEL4、ならびに7つのヒト原発性試料、すなわち、4つのB-ALLおよび3つの肺腫瘍生検(試料あたりn=2～4)から、液体クロマトグラフィー-MS/MS(LC-MS/MS)によって配列決定されたMAP、より具体的にはTSAを特定した。包括的癌データベースの各部分に関する統計は、表4a～bで認めることができ、k-merプロファイリングによって癌特異的プロテオームを構築するための実施詳細(implementation details)は、図7に示される。aa：アミノ酸、nt：ヌクレオチド、th：k-mer発生時の試料特異的閾値(以下の実施例1のk-merフィルタリングおよび癌特異的プロテオームの生成を参照する)。

【図2A-D】ほとんどのTSAは非コード領域の翻訳に由来することを示す実験の結果を示す。図2A：TSA発見に関わる主要な検証ステップを示すフローチャート。各ステップに関する詳細は、図8に認めることができる。図2B：ほとんどのTSA候補は、異常に発現した配列に由来する。CT26およびEL4腫瘍モデルにおけるmTSA(m)およびaeTSA候補(ae)の数を示すバープロット。図2C：RNA-Seqデータが公開されて利用可能である22個の組織/臓器におけるaeTSA候補に関するMCS

10

20

30

40

50

の発現を示すヒートマップ（表 5 を参照）。以前に報告された過剰発現した E L 4 T A A 4 0、4 1 における M C S の発現をコントロールとして示す。発現値を r p h m（配列決定した 1 億リードあたりのリード、詳細については実施例 1 の M C S の末梢発現のセクションを参照）に基準化し、各組織について利用可能な全ての R N A - S e q 実験にわたって平均した。太字の正方形は、関連する M C S が > 0 r p h m で検出された組織を示す。脂肪組織 (A d i p . t i s s u e) : 脂肪組織、乳腺 (m a m . g l a n d) : 乳腺、および皮下脂肪組織 (s . c . a d i p . t i s s u e) : 皮下脂肪組織。図 2 D : ほとんどの a e / m T S A は、非コード領域に由来する。コード化エキソンのインフレーム (i n - f r a m e) 翻訳 (コード化 - 内)、コード化エキソンのアウトオブフレーム (o u t - o f - f r a m e) 翻訳 (コード化 - 外)、および非コード化とされる領域の翻訳 (非コード化) に由来する T S A の数を示すバープロット。バー内の数値は、a e T S A / m T S A の数を表す。バー上のパーセントは、非定型的な翻訳事象に由来する T S A、すなわち、コード化 - 外および非コード化分類に属する T S A の割合を示す。C T 2 6 および E L 4 T S A の特徴は、それぞれ、表 1 a および b に認めることができる。

10

【図 3 A - C】個々の T S A に対する免疫は、E L 4 細胞に対して異なる程度の保護を付与することを示すグラフである。C 5 7 B L / 6 雌

【数 A】

̂

マウスを、以下のように、個々の T S A によってパルス化した D C で 2 回免疫化した。(図 3 A) 2 つの a e T S A、(図 3 B) 2 つの E R E T S A (1 つの a e T S A または 1 つの m T S A)、および (図 3 C) 1 つの m T S A。マウスに、 5×10^5 個の生 E L 4 細胞 (黒色の三角形) を 0 日目に静脈内に注入し、生存した全てのマウスを 1 5 0 日目に再負荷した。コントロール群を非パルス化 D C で免疫化した (黒色線は生存期間中央値を表す)。免疫化した群対コントロール群の統計的有意性は、対数順位検定を使用して計算し、n s は有意でないことを表す ($p > 0.05$)。ペプチド特異的免疫についての群あたり 10 匹のマウス、コントロール群について 19 匹のマウス。

20

【図 4 A - D】ナイーブおよび免疫化マウスにおける T S A 特異的 T 細胞の頻度および T S A 特異的 T 細胞による I F N - 分泌を示すグラフである。図 4 A : ナイーブマウスにおける 10^6 個の C D 8 + T 細胞あたりの四量体 + C D 8 + T 細胞の数。各円は、1 匹のマウス ($n = 5 \sim 9$ 匹のマウス) を表す。点線は、 10^6 個の C D 8 + T 細胞あたり 1 個の四量体 + T 細胞の頻度を表す。p 値は、両側マンホイットニー検定を使用して計算された (**、 $p < 0.01$ および ***, $p < 0.001$)。図 4 B : 免疫後の抗原特異的 C D 8 + T 細胞の増殖。四量体 + C D 8 + T 細胞の豊富化倍率は、関連 (白色バー) または無関連 (灰色バー) ペプチドで免疫化されたマウスにおける平均頻度を、ナイーブマウスにおける平均頻度で除することによって計算した。図 4 C、4 D : 免疫化したマウスから選別した C D 8 + T 細胞を、放射線照射したペプチドパルス化脾臓細胞の存在下で 48 時間インキュベートした。図 4 C : I F N - 分泌性抗原特異的細胞の頻度は、免疫化マウスにおけるスポット形成細胞の平均頻度 (播種された 10^6 個の C D 8 T 細胞あたりで報告された S F C) からナイーブマウスにおけるものを減じたものとして表される。技術的反復を表す円を有する 3 つの独立した実験。p 値は独立両側スチューデント検定 t を使用して計算し、全て $p < 0.05$ (範囲: $0.0025 \sim 0.0143$) である。図 4 D : S F C の頻度を最大値に対して基準化することによって、そして用量応答曲線を使用して各ペプチドについて E C 5 0 を計算することによって、抗原特異的 T 細胞の機能的結合活性を計算した。H 7 a および H 1 3 a における機能的結合活性値は、既に公表され、比較目的のために使用した。3 つの独立した実験。全ての関連パネルで、各条件の上の全ての水平線および数値は平均値を表す。コントロールとして使用されるウイルスペプチドは、灰色で強調される。

30

40

【図 5 A - D】E L 4 由来 T S A の高発現は抗白血病応答を誘導するのに重要であるが十分ではないことを示すグラフである。図 5 A、B : R N A およびペプチドレベルでの T S

50

A 発現の分析を、0日目または150日目にそれぞれ注入されたEL4細胞で実施した。図5A: EL4 RNA-Seqリードの数を表すバープロットは、5つのEL4 TSAの各々をコードするMCSと完全に重複している。図5B: 5つのEL4 TSAの13C合成ペプチド類似体を使用してPRMMSによって評価される、細胞あたりのTSAコピー数。TSAあたりEL4細胞の3回複製。細胞あたりのTSAコピー数の平均をグラフの右側に示す。N.D.: 検出されない。図5C: ペプチドパルス化DCによる前免疫を伴わない生EL4細胞による注入後のTSA特異的CD8⁺T細胞の増殖。四量体+CD8⁺T細胞の豊富化倍率は、EL4注入マウスにおける平均頻度をナイーブマウスの平均頻度で除することによって計算した。EL4細胞によって提示されないウイルスペプチドを認識するT細胞の豊富化倍率は陰性コントロールとして示され、灰色で強調される。図5D: C57BL/6雌マウスを、592d(10,000cGy)放射線照射EL4細胞(青色線)またはコントロールとして非パルス化DC(黒色線)で2回免疫化し、次いで 5×10^5 個の生EL4細胞を静脈内注入した。

10

【数B】

x̄

は生存期間の中央値を表す。放射線照射されたEL4細胞免疫について10匹のマウス、コントロール群について19匹のマウス。

【図6A-C】ヒト原発性腫瘍で検出されるほとんどのTSAは、非コード化領域の翻訳に由来することを示す。図6A: ほとんどのヒトTSAはaeTSAである。分析した各原発性試料におけるaeTSA候補(ae)およびmTSA(m)の数を示すバープロット。図6B: ヒトaeTSA候補およびTAAの末梢発現。RNA-Seqデータが公開されて利用可能である28個のヒト組織のパネルにわたって、Cancer Immunity Peptideデータベース48から得られた、27個のaeTSAおよび24個の過剰発現したTAAについてMCSの発現を示すヒートマップ(表6を参照)。発現値をrphmに基準化し(詳細については、以下の実施例1のMCSの末梢発現のセクションを参照)、各組織について利用可能な全てのRNA-Seq実験にわたって平均化した。各抗原について、そのMCSが > 15 rphmで発現される組織の数がヒートマップの左側に示される。皮下脂肪(adip.s.c): 皮下脂肪図6C: ほとんどのヒトTSAは、非コード領域に由来する。コード化エキソンのインフレイム翻訳(コード化-内)、コード化エキソンのアウトオブフレーム翻訳(コード化-外)、および非コード化とされる領域の翻訳(非コード化)に由来するヒトTSAの数を示すバープロット。各試料において特定されたヒトTSAの特徴は、表2a~dおよび3a~cに認めることができる。

20

30

【図7A-D】k-merプロファイリングワークフローに使用される規則の構成の概略図である。RNA-seqリードからk-merを生成し(図7A)、k-merをフィルターにかけ(図7B)、k-merをコンティグに組み立て(図7C)、コンティグを翻訳する(図7D)ために使用される規則に関する詳細。

【図8A-C】TSA検証プロセスを示す。図8A: MAP/タンパク質の対の免疫原性状態の計算を詳細に示す概略図。FC: 腫瘍/同系mTECh i(マウス試料)またはTEC/mTEC(ヒト試料)。図8B: TSA候補としてフラグ付けされたMAPのMS関連検証を実施するために使用される戦略。図8C: MS検証済みマウスTSA候補(C26およびEL4)、ならびにB-ALL標本および肺癌におけるMS検証済みヒトTSA候補にゲノム位置を割り当てるために使用される戦略を要約する概略図。

40

【図9A-D】ナイーブおよび前免疫されたマウスにおける抗原特異的CD8⁺T細胞の検出を示すグラフである。図9A: pMHC四量体+CD8⁺T細胞のエキスビボ検出のためのゲーティング戦略。四量体豊富化を、各マウスの脾臓およびリンパ節から単離した単一細胞懸濁液で実施した。ダブレット排除後、Dump-CD3⁺細胞をCD8およびCD4発現について分析し、pMHC I四量体+細胞をCD8⁺区画内で分析した。ナイーブマウスにおけるVTPV/H-2K^b-PEおよびM45/H-2D^b-APC四

50

量体豊富化後に得られた代表的な染色を示す。各特異性について検出された四量体 + C D 8 + T細胞の絶対数を示す。D u m pチャンネルは、死細胞、C D 4 5 RおよびC D 1 9、F 4 / 8 0、C D 1 1 b、C D 1 1 cについて陽性であるプールされた事象に対応する。図 9 B、C : ナイープ (上段) および前免疫化 (下段) マウスにおける抗原特異的 C D 8 T細胞でのC D 4 4発現の代表的な分析。磁気豊富化前 (図 9 B、左パネル) ならびに四量体 + ウイルス特異性 (図 9 B) およびT S A特異性 (図 9 C) におけるエクスピボ豊富化後のC D 8 + 細胞のC D 4 4状態を表す。C D 4 4陽性または陰性細胞の割合および数を示す。図 9 D : 免疫化およびナイープマウスにおけるI F N - 分泌性C D 8 + T細胞の頻度の1つの代表的な実験。各条件において播種したC D 8 + T細胞の数に対するスポット形成単位 (S F U) の数を各枠の下に示す。

10

【図 1 0 A - D】抗原特異的T細胞の頻度を示すグラフである。図 1 0 A : ナイープまたは関連もしくは無関連のペプチドで免疫化されたマウスにおける抗原特異的T細胞の頻度。図 1 0 B、C : 1 5 0日目にE L 4細胞で再負荷されたV T P V Y Q H LもしくはT V P L N H N T Lに対して (図 1 0 B)、またはV N Y L H R N VもしくはV N Y I H R N Vに対して (図 1 0 C) 免疫化されたマウスにおける抗原特異的C D 8 + T細胞の頻度。比較目的のために、図 1 0 Aに報告されるナイープおよび免疫化マウスにおける抗原特異的T細胞の頻度を再現する。図 1 0 D : E L 4細胞を注入した非免疫化マウスにおける抗原特異的T細胞の頻度。四量体 + C D 8 + T細胞の全ての計算された頻度は、1 0⁶個のC D 8 + T細胞あたりの抗原特異的C D 8 + T細胞の数として表される。各記号は、1匹のマウス (n = 1 ~ 9匹のマウス) を表す。点線は、1 0⁶個のC D 8 + T細胞あたり1個の四量体 + T細胞の最小検出レベルを表す。コントロールとして使用されるウイルスペプチドを灰色で強調する。p値は、両側マンホイットニー検定 (* p 0 . 0 5) を使用して計算した。

20

【図 1 1 A - C】ナイープおよび前免疫化マウスにおける抗原特異的T細胞頻度間の相関を示すグラフである。四量体染色 (図 1 1 A) およびI F N - E L I S p o tアッセイ (図 1 1 B) によって計算したナイープレパートリーおよび免疫化マウスにおける抗原特異的C D 8 + T細胞の頻度の相関。図 1 1 C : 四量体染色およびI F N - E L I S p o tアッセイによって計算された免疫化マウスにおける抗原特異的C D 8 + T細胞の頻度における相関。平均頻度はデータのプロットに使用した。曲線のフィッティングは、決定係数 (r²) によって決定された。

30

【図 1 2 A - B】ヒトT E Cおよびm T E Cトランスクリプトームランドスケープの概要を図示する。図 1 2 A : 無関係ドナーから単離されたヒトT E C (0 6 2 0 1 5および1 0 2 0 1 5) およびm T E C (S 5 ~ S 1 1) は、類似のトランスクリプトームプロファイルを示す。R N A - S e qに続いて、k a l l i s t oによって推定されるように、t p m > 1を有する少なくとも1つのドナーで発現された転写物を選択して、全ての1対1の散乱プロットを描いた。スピアマン順位相関係数 () は、各グラフの左上隅に示され、黒色線は転写物の同一の発現を表す。図 1 2 B : 追加のヒトT E C / m T E C試料のR N A - S e qは、情報の最小ゲインをもたらすべきである。発現した転写物のセット (少なくとも1つの試料中でt p m > 1) を使用して、追加の試料 (n S、以下の実施例 1 のT E Cおよびm T E C試料中で検出された転写物の累積数のセクションを参照) をコホートに追加することによって検出されるべき転写物の累積数 (c T) を、以下の関数を使用して外挿し、

40

【数 C】

$$cT = \frac{a \times (nS - 1)}{[b + (nS - 1)]} + c$$

式中、a = 2 3 , 8 9 2 . 7 3、b = 0 . 8 2 4 3 3 8 9、およびc = 7 5 , 9 7 6 . 1 1 (灰色線) である。グラフ上には、n S = 6 (本発明のコホート、黒点) またはn S = 2 0 試料を分析することによって検出される転写物の累積数、ならびに

【数 D】

50

$$\lim_{nS \rightarrow \infty} \left(\frac{a \times (nS-1)}{[b+(nS-1)]} + c \right) = a + c = 99,868$$

(漸近線値)に対応する検出されるべき転写物の総数が示される。

【図13A-C】FACS選別によって単離された細胞におけるゲーティング戦略を示すグラフである。図13A：マウスmTECh iの単離のためのゲーティング戦略。mTECh i単離を、C57BL/6またはBalb/cマウスの胸腺から単離された単一細胞懸濁液で実施した。ダブレット排除後、mTECh i細胞を、7-AAD⁻、EpCAM⁺、CD45⁻(C57BL/6マウスではAlexa Fluor 700、またはBalb/cマウスではFITC)、UEA-1⁺およびI-Ab⁺(C57BL/6マウス)として定義した。図13B：ヒトTECおよびmTECの単離のためのゲーティング戦略。細胞選別を、心臓血管矯正手術を受ける3ヶ月~7歳の個体から得られた胸腺から単離された単一細胞懸濁液で実施した。ダブレット排除後、TECを、CD45⁻、7-AAD⁻、EpCAM⁺、およびHLA-DR⁺として定義した。mTECの選別のために、細胞をCDR2⁻としてさらに定義した。図13C：IFN-ELISPOTアッセイ用のCD8⁺T細胞の単離のためのゲーティング戦略。CD8⁺T細胞単離を、ナイーブまたは免疫化C57BL/6マウスの脾臓から単離された単一細胞懸濁液で実施した。ダブレット排除後、CD8aマーカーを使用して、CD8⁺T細胞を豊富化した。

10

20

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

一実施形態では、本方法は、

(a) 腫瘍細胞試料中の主要組織適合性複合体(MHC)関連ペプチド(MAP)を単離および配列決定することと、

(b) 全トランスクリプトーム配列決定を当該腫瘍細胞試料で実施し、それによって腫瘍RNA配列を得ることと、

30

(c) 腫瘍特異的プロテオームデータベースを、

(i) 当該腫瘍RNA配列から少なくとも33ヌクレオチドを含むサブ配列(k-mer)のセットを抽出することと、

(ii) (i)の腫瘍サブ配列のセットを、正常細胞からのRNA配列から抽出された少なくとも33ヌクレオチドを含む対応するコントロールサブ配列のセットと比較することと、

(iii) 対応するコントロールサブ配列において、存在しないか、または少なくとも4倍下方発現されている腫瘍サブ配列を抽出し、それによって腫瘍特異的サブ配列を得ることと、

(iv) 腫瘍特異的サブ配列をコンピュータによって翻訳し、それによって腫瘍特異的プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

40

(d) 個別化腫瘍プロテオームデータベースを、

(i) 腫瘍RNA配列を参照ゲノム配列と比較して、当該腫瘍RNA配列における一塩基変異を特定することと、

(ii) (i)で特定された一塩基変異を参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化腫瘍ゲノム配列を作成することと、

(iii) 当該個別化腫瘍ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって個別化腫瘍プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(e) 個別化正常プロテオームデータベースを、

50

(i) 正常細胞からの R N A 配列を参照ゲノム配列と比較して、当該正常 R N A 配列における一塩基変異を特定することと、

(i i) (i) で特定された一塩基変異を参照ゲノム配列に挿入し、それによって個別化正常ゲノム配列を作成することと、

(i i i) 当該個別化正常ゲノム配列から、発現されるタンパク質コード転写物をコンピュータによって翻訳し、それによって個別化正常プロテオームデータベースを得ることと、によって生成することと、

(f) (i) 正常細胞からの当該 R N A 配列および当該腫瘍 R N A 配列から少なくとも 2 4 ヌクレオチドを含むサブ配列のセットを抽出することによって、正常および腫瘍 k - m e r データベースを生成することと、

(g) (a) で得られた M A P の配列を、(c) の腫瘍特異的プロテオームデータベースの配列および (d) の個別化腫瘍プロテオームデータベースと比較して、M A P を特定することと、

(h) (g) で特定された M A P の中で腫瘍抗原候補を特定することと、を含み、腫瘍抗原候補は、(1) 配列が個別化正常プロテオームデータベースに存在せず、かつ (2) (i) 配列が個別化腫瘍プロテオームデータベースに存在し、かつ / または (i) コード配列は、当該正常 k - m e r データベースと比較して当該腫瘍 k - m e r データベースにおいて過剰発現もしくは過剰提示される、M A P に対応する。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 7】

一実施形態では、本方法は、特定された腫瘍抗原候補 (T S A 候補) の M H C クラス I 分子との結合を決定または予測することをさらに含む。結合は、対立遺伝子産物に対するペプチドの予測される結合親和性 (I C 5 0) であり得、N e t M H C などのツールを使用して得られ得る。様々な利用可能な M H C クラス I ペプチド結合ツールの概要は、P e t e r s B e t a l . , P L o S C o m p u t B i o l 2 0 0 6 , 2 (6) : e 6 5、T r o s t e t a l . I m m u n o m e R e s 2 0 0 7 , 3 (1) : 5、L i n e t a l . , B M C I m m u n o l o g y 2 0 0 8 , 9 : 8 で示される。特定された T S A 候補の M H C クラス I 分子との結合は、他の既知の方法、例えば、T 2 ペプチド結合アッセイを使用して決定され得る。T 2 細胞株は、T A P を欠損しているが、依然として細胞表面上に低い量の M H C クラス I を発現する。T 2 結合アッセイは、T 2 細胞株の表面で M H C クラス I 複合体を安定化するペプチドの能力に基づいている。T 2 細胞を特異的ペプチド (例えば、T S A 候補) と共にインキュベートし、汎 H L A クラス I 抗体を使用して安定化 M H C クラス I 複合体を検出し、分析を (例えば、フローサイトメトリーによって) 実行し、結合を非結合陰性コントロールと関連して評価する。安定化ペプチド / M H C クラス I 複合体の表面での存在は、ペプチド (例えば、候補 T S A) が M H C クラス I 分子に結合することを示す。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 7】

本明細書で使用される「アミノ酸」という用語は、天然起源のアミノ酸の L - 異性体および D - 異性体の両方、ならびに腫瘍抗原ペプチドの合成類似体を調製するペプチド化学で使用される他のアミノ酸 (例えば、天然起源アミノ酸、非天然起源アミノ酸、核酸配列によってコードされないアミノ酸など) が含まれる。天然起源のアミノ酸の例は、グリシ

10

20

30

40

50

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。他のアミノ酸には、例えば、アミノ酸の非遺伝子コード形態、ならびにL-アミノ酸の保存的置換が含まれる。天然起源の非遺伝子コード化アミノ酸には、例えば、ベータ-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-アミノイソブチル酸 (Aib)、4-アミノ-ブチル酸、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、t-ブチルアラニン、t-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)、ノルバリン、2-ナフチルアラニン (2-naphthylalanine)、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、2-チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、L-ホモギニン (Hoarg)、N-アセチルリジン、2-アミノ酪酸、2,4-ジアミノ酪酸 (D-または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 (HoSer)、システイン酸、イプシロン-アミノヘキサ酸、デルタ-アミノ吉草酸、または2,3-ジアミノ酪酸 (D-またはL-) などが含まれる。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。実施形態では、腫瘍抗原ペプチドは、天然起源のアミノ酸のみを含む。

10

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

20

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

本開示の腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸を含む宿主細胞における発現 (組換え発現) によって、または化学合成 (例えば、固相ペプチド合成) によって産生され得る。ペプチドは、当該技術分野で周知であるマニュアルおよび/また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」または「Fmoc」手順を利用することによって実施され得る。固相合成のための技法および手順は、例えば、IRL, Oxford University Press, 1989によって発行されたSolid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, by E. Atherton and R. C. Sheppardに記載されている。あるいは、腫瘍抗原ペプチドはセグメント縮合の方法によって調製され得、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、Schmolzer 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、およびYamashiro and Li, Int. J. Peptide Protein Res. 31322-334, 1988に記載されている。腫瘍抗原ペプチドを合成するのに有用である他の方法は、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、腫瘍抗原ペプチドは、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、非天然起源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、または本質的になり、薬学的に許容され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)。本開示による腫瘍抗原ペプチドの塩は、インビボで生成されるペプチドは塩ではないため、インビボでのそれらの状態 (複数可) のペプチドとは実質的に異なる。ペプチドの非天然塩形

30

40

50

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の関連において、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る塩である。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書で言及される本開示の腫瘍抗原ペプチド、核酸、ベクター、またはプラスミド、すなわち、1つ以上の腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸またはベクターを含む、細胞（例えば、宿主細胞）、一実施形態では、単離された細胞を提供する。別の態様では、本開示は、本開示による腫瘍抗原ペプチドと結合されるか、またはそれを提示する、MHCクラスI分子（例えば、上記で開示される対立遺伝子の1つのMHCクラスI分子）を表面で発現する細胞を提供する。一実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞、細胞株、または不死化細胞などの真核生物細胞である。別の実施形態では、細胞は、樹状細胞（DC）または単球/マクロファージなどの抗原提示細胞（APC）である。一実施形態では、宿主細胞は、一次細胞、細胞株、または不死化細胞である。核酸およびベクターは、従来の形質転換またはトランスフェクション技法を介して細胞に導入することができる。「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、外来核酸を宿主細胞に導入するための技法を指し、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、およびウイルス媒介トランスフェクションを含む。宿主細胞を形質転換また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ら（上記）、および他の実験室マニュアルに認めることができる。核酸をインビボで哺乳動物細胞に導入するための方法も既知であり、遺伝子治療のために本開示のベクターまたはプラスミドを対象に送達するために使用され得る。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0105

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0105】

標準的癌および正常プロテオームの生成。全ての試料について、RNA-Seqリードを、Trimomaticバージョン0.35を使用して配列決定アダプタおよび低品質3'塩基のためにトリミングし、次いで、マウス試料ではGRCm38.87およびヒト試料ではGRCh38.88である参照ゲノムに対して、STARバージョン2.5.1b4aを使用し、--alignSJoverhangMin、--alignMatesGapMax、--alignIntronMax、および--alignSJstitchMismatchNmaxでは、パラメータはデフォルト値をそれぞれ10、200、000、200、000、および5-155に置き換えた以外は、デフォルトパラメータで実行してアラインメントした。最小代替カウント設定が5である一塩基変異を、freeBayesバージョン1.0.2-16-gd466dde[arXiv:1207.3907]を使用して特定し、VCFでエクスポートし、これをpyGeno5aと互換性のある非依存SNPファイル形式に変換した(GitHub、https://github.com/tariqdaouda/pyGeno)で入手可能。最後に、転写発現を、Kallistoバージョン0.43.1[Nicolas L Bray, Harold Pimentel, Pall Melsted and Lior Pachter, Near-Optimal probabilistic RNA-se

10

20

30

40

50

quantification, Nature Biotechnology 34, 525-527 (2016)]を用いてデフォルトパラメータで実行し、百万あたりの転写物 (tpm) で定量化した。注意すべきこととして、Kallistoインデックスは、インデックス機能を使用し、Ensemblからダウンロードされた適切な*.cdna.all.fa.gzファイルを使用して構築した。各試料の標準的プロテオームを構築するために、pyGenoを使用して、(i) 高品質の試料特異的一塩基変異 (freeBayes品質 > 20) を参照ゲノムに挿入し、それによって個別化エクソームを作成し、(ii) 発現した転写物 (tpm > 0) によって生成された既知タンパク質の試料特異的配列 (複数可) をエクスポートした。これらのタンパク質配列をfastqファイルに書き込み、その後、質量分析 (MS) データベース検索 (癌標準的プロテオーム) および/またはMHC I関連ペプチド (MAP) 分類 (癌および正常標準的プロテオーム) に使用した。概略について図1Bを、統計について表4a~bを参照する。

10

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0108

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0108】

MAP単離。EL4およびCT26細胞について、 250×10^6 個の指数的に増殖する細胞の3つの生物学的複製物を、指数的に増殖する細胞から調製した。全ての原発性白血球試料について、約 $450 \sim 700 \times 10^6$ 個の細胞の3つの生物学的複製物を、新たに採取した白血球細胞から調製した (ヒト原発性試料のセクションを参照)。MAPを、既に報告されている7a方法に軽微な変更を加えて得、弱酸溶出 (MAE) 後、ペプチドを、Oasis HLBカートリッジ (30mg, Waters) で脱塩し、3kDaの分子量カットオフ (Amicon Ultra-4, Millipore) で濾過して、2-ミクログロブリン (2 M) タンパク質を除去した。原発性白血球試料のうちの1つ (標本10H080) について、 100×10^6 個の細胞の4つの追加の複製物を調製し、MAPを、既に報告されている1aのように免疫沈降 (IP) によって単離した。最後に、肺腫瘍生検 (771~1, 825mgの範囲の湿潤重量、ヒト原発性試料のセクションを参照) を小切片に切断し (約3mmのサイズの立方体)、タンパク質阻害剤カクテル (Sigma) を含有する氷冷PBS 5mlを各組織試料に添加した。組織を、Ultra Turrax T25ホモジナイザー (20,000rpmで20秒、IKA-Labor Technik) を使用して最初に2回均質化し、次にUltra Turrax T8ホモジナイザー (25,000rpmで20秒、IKA-Labor Technik) を使用して1回均質化した。次いで、 $550 \mu\text{l}$ の氷冷10倍溶解緩衝液 (10% w/v CHAPS) を各試料に加え、MAPを既に報告されている1のように、試料あたりプロテインA磁気ビーズと共有結合によって交差結合したW6/32抗体の1mg (1ml) を使用して免疫沈降させた。MAP分離技法にかかわらず、MAP抽出物はMS分析前に、全てSpeed-Vacを使用して乾燥させ、凍結して維持した。

20

30

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0109

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0109】

質量分析解析。乾燥したMAP抽出物を全て0.2%ギ酸中に再懸濁した。EL4およびCT26について、MAP抽出物を、自家製C18プレカラム (C18 Jupiter Phenomenexで充填した5mm x 内径360 μm) に加え、自家製C18分析カラム (C18 Jupiter Phenomenexで充填した15cm x 内径150 μm) で、nEasy-LC IIシステムによって、0~40%アセトニトリル (0.2

40

50

%ギ酸)の56分間の勾配、および600 ml・分⁻¹の流量によって分離した。全てのヒト試料について、MAP抽出物を、自家製C18分析カラム(C18 Jupiter Phenomenexで充填した15 cm×内径150 μm)で、nEasy-LC Iシステムによって、0~40%アセトニトリル(0.2%ギ酸、07H103、10H080-MAE、10H118、および12H018)の56分間の勾配、または5~28%アセトニトリル(0.2%ギ酸、肺腫瘍生検および10H080-IP)の100分間の勾配、および600 ml・分⁻¹の流量で加えた。試料をQ-Exactiv Plus(EL4、Thermo Fisher Scientific)またはHF(全ての他の試料、Thermo Fisher Scientific)で分析した。Q-Exactiv Plusでは、70,000分解能で取得された各フルMSスペクトルに12 MS/MSスペクトルが続き、最も豊富な多荷電イオンは、17,500の分解能、1e6の自動ゲイン制御標的、50 msの注入時間、および25%の衝突エネルギーで、MS/MS配列決定のために選択された。Q-Exactiv HFでは、60,000分解能で取得した各フルMSスペクトルに続いて、20 MS/MSスペクトルを得、最も豊富な多荷電イオンは、15,000(CT26、07H103、10H080-MAE、10H118、12H018)または30,000(肺腫瘍生検、10H080-IP)の分解能、5×10⁴の自動ゲイン制御標的、100 msの注入時間、および25%の衝突エネルギーで、MS/MS配列決定のために選択された。ペプチドはピーク8.5(Bioinformatics Solution Inc.)を使用して特定し、ペプチド配列は関連する包括的癌データベースに対して検索し、標準的癌プロテオームと癌特異的プロテオームを連結することによって得た(標準的癌プロテオームおよび正常プロテオームの生成、ならびに、ならびに癌特異的プロテオームのk-merフィルタリングおよび生成のセクションを参照)。ペプチド特定のために、プレカーサーイオンおよびフラグメントイオンについて許容誤差をそれぞれ10 ppmおよび0.01 Daに設定した。酸化(M)および脱アミド化(NQ)の発生を翻訳後修飾として考慮した。

10

20

30

40

50