

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 6 月 11 日(11.06.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/083763 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01) C12N 5/078 (2010.01)
A61P 27/02 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
A61P 29/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/082059
- (22) 国際出願日: 2014 年 12 月 4 日(04.12.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-253000 2013 年 12 月 6 日(06.12.2013) JP
- (71) 出願人: オンコセラピー・サイエンス株式会社
(ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒
2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 -
1 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 角田 卓也(TSUNODA, Takuya); 〒
2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 -
1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内
Kanagawa (JP). 大沢 龍司(OSAWA, Ryuji); 〒
2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2 -
1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内
Kanagawa (JP). 山下 祥子(YAMASHITA, Sachiko);
〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2
- 1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内
Kanagawa (JP). 渡辺 朝久(WATANABE, Tomohisa);
〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 丁目 2
- 1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内
Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao et al.);
〒3000847 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄
つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関
する申立て (規則 4.17(ii))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: VEGFR2-DERIVED PEPTIDE, AND VACCINE CONTAINING SAME

(54) 発明の名称: VEGFR2 由来ペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) Abstract: Provided is an epitope peptide which is derived from VEGFR2 and which can induce cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The present invention further provides a polynucleotide coding said peptide, an antigen-presenting cell that presents said peptide, a CTL that targets said peptide, and a method for inducing said antigen-presenting cell or said CTL. The present invention also provides a composition and a drug composition that include the same as active ingredients. Moreover, the present invention provides a method for treating and/or preventing angiogenesis-mediated diseases and/or the reoccurrence thereof after surgery by using the peptide, polynucleotide, antigen-presenting cell, CTL or drug composition of the present invention. Also provided is a method for inhibiting angiogenesis at disease sites of angiogenesis-mediated diseases.

(57) 要約: 本発明は、細胞障害性 T 細胞誘導能を有する VEGFR2 由来のエピトープペプチドを提供する。本発明はまた、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ペプチドを提示する抗原提示細胞および該ペプチドを標的とする細胞障害性 T 細胞、ならびに該抗原提示細胞または該 CTL を誘導する方法を提供する。本発明はさらに、これらを有効成分として含む組成物および薬学的組成物を提供する。さらに本発明は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示細胞、細胞障害性 T 細胞、または本発明の薬学的組成物を用いて、血管新生により媒介される疾患を治療および／もしくは予防する、ならびに／または術後のその再発を予防する方法を提供する。また血管新生により媒介される疾患の疾患部位における血管新生を阻害する方法を提供する。

WO 2015/083763 A1

明 細 書

発明の名称：

VEGFR2由来ペプチドおよびそれを含むワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、血管新生の阻害ならびに血管新生により媒介される疾患の治療および予防に有効なペプチドに関する。本発明はまた、これらのペプチドを含む血管新生阻害剤ならびに血管新生により媒介される疾患の治療および／または予防のための薬学的組成物およびワクチンに関する。

[0002] 本出願は、2013年12月6日に提出された日本特許出願（特願2013-253000）の恩典を主張し、その全内容が参照によって本明細書に組み入れられる。

背景技術

[0003] 腫瘍増殖は一般に、血管が新生される血液供給がない場合は1~2mm³に制限されており、血管形成は、腫瘍の浸潤、増殖、および転移において重大な役割を有している（非特許文献1-4）。腫瘍血管形成の阻害が、腫瘍進行の抑制に関連していることも示されている。血管形成の抑制を達成するため、多数の研究者が、血管形成の過程の調節において重大な役割を果たしている血管内皮増殖因子（VEGF）およびVEGF受容体（VEGFR）を標的とした治療戦略を調査してきた。これらの研究は、モノクローナル抗体、組換え受容体、またはシグナル伝達の阻害剤を使用して、インビトロまたはインビボで、腫瘍増殖が成功裡に抑制され得ることを示した（非特許文献5-10）。しかしながら、これらの戦略は、比較的高い用量レベルで高頻度にまたは連続的に試薬を投与することを必要とし、これは、かなりの不便さおよび副作用に関連し得る。

[0004] VEGFは、腫瘍組織内の内皮細胞に強発現するが、正常組織においてはそうではない2つの関連するチロシンキナーゼ受容体である、VEGFR1（Flt-1）およびVEGFR2（KDR）に結合する（非特許文献11-14）。VEGFR1は、最初に同定

されたVEGF受容体であり（非特許文献15）、VEGF（VEGF-A）、ならびにVEGFファミリーの他の2つのメンバーである、VEGF-B（非特許文献16）および胎盤増殖因子（PlGF）（非特許文献17）と相互作用する。PlGFは、VEGFR1からVEGFを移動させることにより、より多くのVEGFがVEGFR2に結合してVEGFR2を活性化できるようにし、それによりVEGFにより駆動される血管形成を増強すると予想されている（非特許文献18）。その他の研究は、PlGF^{-/-}マウスにおける腫瘍形成障害および血管漏出により証明されるように、特に病理学的状況においては、インビボのVEGFとPlGFとの間に相乗作用が存在することを示している（非特許文献19）。

[0005] また、VEGFのこの2種類の受容体は、ヒト脈絡膜血管新生（CNV）膜においても発現する。しかしながら、CNVにおけるVEGFR1シグナル伝達経路の役割については、依然として議論の余地がある。例えばある研究では、抗体の経口投与、遺伝子ノックダウン、またはsiRNAによるVEGFR1シグナル伝達の阻害により、CNVが阻害されると報告している。別の研究では、眼内において、VEGF、またはVEGFR2のリガンドである胎盤増殖因子1（PlGF1）によるVEGFR1の活性化により、SPARCによるVEGFR2の活性化を介してCNVが活性化されると報告している。一方でVEGFR2については、VEGFR2シグナル伝達の活性化によりCNV増殖が促進されるという知見が一般に受け入れられている。

[0006] 最近では、細胞傷害性T細胞（CTL）誘導能を有するVEGFR1またはVEGFR2由来のHLA-A2またはHLA-A24拘束性のペプチド断片が同定されており、これらのペプチドが血管新生阻害効果を有することが報告されている（特許文献1-2、非特許文献20）。また、これらのペプチドが、腫瘍（非特許文献21）や黄斑変性症（特許文献3-4）などの血管新生によって媒介される疾患の治療に有効であることも報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：W02004/024766

特許文献2：W02006/093030

特許文献3 : W02008/099908

特許文献4 : W02010/143435

非特許文献

- [0008] 非特許文献1 : Folkman, J. (2002) Semin. Oncol. 29:15-8,
非特許文献2 : Kerbel and Folkma, (2002). Nature Rev. Cancer. 2:727-39
非特許文献3 : Brown et al., (1995) Hum. Pathol. 26:86-915
非特許文献4 : Eberhard et al., (2000) Cancer Res. 60:1388-93)
非特許文献5 : El-Mousawi et al., (2003) J. Biol. Chem. 278:46681-91
非特許文献6 : Stefanik et al., (2001) J. Neurooncol. 55:91-100
非特許文献7 : Wood et al., (2000) Cancer Res. 60:2178-89
非特許文献8 : Luttun et al., (2002) Nat. Med. 8:831-40
非特許文献9 : Lyden et al., (2001) Nat. Med. 7:1194-201
非特許文献10 : Lu et al., (2001) Cancer Res. 61:7002-8
非特許文献11 : Risau, W. (1997) Nature. 386:671-4
非特許文献12 : Ferrara and Davis-Smyth, (1997) Endor. Rev. 18:4-25
非特許文献13 : Shibuya et al., (1999) Curr. Topics. Microbiol. Immunol. 237: 59-83
非特許文献14 : Plate et al., (1994) Int. J. Cancer. 59:520-9
非特許文献15 : Shibuya et al., (1990) Oncogene 5:519-24
非特許文献16 : Olofsson et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2576-81
非特許文献17 : Maglione et al., 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9267-71
非特許文献18 : Park et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:25646-54
非特許文献19 : Carmeliet et al., (2001) Nat. Med. 7:575-83
非特許文献20 : Wada et al., (2005) Cancer Res. 65(11):4939-46
非特許文献21 : Ogawa et al., (2010) Biotherapy 24(2):129-37

発明の概要

- [0009] 本発明は、VEGFR2を発現する細胞に対して特異的な細胞傷害性T細胞 (CTL) を誘導し得るペプチドに関する。これらのペプチドが、ヒト白血球抗原 (H

LA) によって抗原提示細胞 (APC) 上に提示されると、VEGFR2発現細胞に特異的な細胞傷害活性を示すCTLが誘導される。これまでに同定されているVEGFR2由来のCTL誘導能を有するペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24拘束性のペプチドであり、これらのHLAを発現していない細胞に対しては、CTLを誘導することができない。そのため、これらのHLAを有さない対象において免疫療法を行う場合には、従来のペプチドは適さない。HLA-A11およびHLA-A33は、アジア人の中でよく見られるアリルであるが (Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12)、HLA-A11またはHLA-A33陽性の対象に対しては、HLA-A11またはHLA-A33拘束性のペプチドを投与することが望まれる。よって、本発明は、HLA-A11またはHLA-A33拘束性のVEGFR2由来ペプチドであって、CTL誘導能を有するペプチドに関する。本明細書に開示された結果から、本発明のペプチドが、VEGFR2を発現する細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A11またはHLA-A33拘束性エピトープペプチドであることが実証される。

[0010] したがって、HLA-A11またはHLA-A33拘束性の様式で、CTLを誘導し得るVEGFR2由来のペプチドを提供することは、本発明の1つの目的である。これらのペプチドは、CTLをインビトロ、エキスビボまたはインビボで誘導するために用いることができ、または、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導する目的で対象に投与するために用いることができる。好ましいペプチドは配列番号：1、43、70および89の中より選択されるアミノ酸配列を含むものであり、より好ましくはノナペプチドまたはデカペプチドであり、さらに好ましくは、配列番号：1、43、70および89の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0011] 本発明のペプチドは、結果として生じた改変ペプチドが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているペプチドも包含する。

本発明はまた、本発明のペプチドのいずれか1つをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。これらのポリヌクレオチドは、本発明のペプチ

ドと同様に、CTL誘導能を有するAPCを誘導するために用いることができ、またはVEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導するために対象に投与することができる。

[0012] 本発明はまた、本発明の1種類もしくは複数種のペプチドまたは本発明の1種類もしくは複数種のペプチドをコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む剤または組成物を提供する。本発明の剤または組成物は好ましくは薬学的な剤または組成物である。対象に投与した場合、本発明のペプチドは、APCの表面上に提示され、それにより該ペプチドを標的とするCTLが誘導される。したがって、CTLを誘導する組成物であって、本発明の1種類もしくは複数種のペプチドまたは本発明の1種類もしくは複数種のペプチドをコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む組成物を提供することは、本発明のさらなる目的である。本発明はさらに、血管新生により媒介される疾患の治療および／または予防、ならびに術後のその再発の予防のために製剤化された、本発明の1種類もしくは複数種のペプチドまたは本発明の1種類もしくは複数種のペプチドをコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を提供する。

[0013] CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法であって、APCを本発明の1種類もしくは複数種のペプチドと接触させる段階、または本発明のペプチドのいずれか1つをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階を含む方法を提供することは、本発明のさらなる目的である。

[0014] 本発明はまた、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、または細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るT細胞受容体（TCR）の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターをCD8陽性T細胞に導入する段階を含む、CTLを誘導する方法を提供する。

[0015] HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する単離され

たAPCを提供することは、本発明のさらに別の目的である。本発明はさらに、本発明のペプチドを標的とする単離されたCTLを提供する。これらのAPCおよびCTLは、血管新生により媒介される疾患に対する免疫療法に用いることができる。

[0016] 対象においてVEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導する方法であって、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ペプチドを提示するエキソソームまたはAPCおよび該ペプチドを自身の表面上に提示する細胞を認識することができるCTLの中より選択される少なくとも1つの成分を含む組成物を該対象に投与する段階を含む方法を提供することは、本発明の別の目的である。

[0017] 上記に加え、本発明の他の目的および特徴は、添付の図表および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことによって、より十分に明らかになる。しかしながら、前述の発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、本発明をいくつかの特定の態様を参照して本明細書において説明するが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが理解されよう。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明のその他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかになり、当業者には容易に明白になるであろう。そのような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図表、およびそれらから引き出されるあらゆる妥当な推論と併せて上記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、VEGFR2由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるIFN- γ ELISPOTアッセイの結果を示す写真 (a) および (b) から構成される。対照と比

較して強力なIFN- γ 産生を示した陽性データの典型例を（a）に示す。特異的なIFN- γ 産生を示さなかった陰性データの典型例を（b）に示す。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[0019] [図2]図2は、VEGFR2由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるIFN- γ ELISPOTアッセイの結果を示す写真（a）および（b）から構成される。対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した陽性データの典型例を（a）に示す。特異的なIFN- γ 産生を示さなかった陰性データの典型例を（b）に示す。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[0020] [図3-1]図3は、VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-9-521（配列番号：3）（c）、VEGFR2-A11-9-973（配列番号：4）（d）、VEGFR2-A11-9-309（配列番号：5）（e）、VEGFR2-A11-9-860（配列番号：9）（f）、VEGFR2-A11-9-134（配列番号：15）（g）、VEGFR2-A11-9-195（配列番号：26）（h）、VEGFR2-A11-9-502（配列番号：27）（i）、VEGFR2-A11-9-1281（配列番号：39）（j）、VEGFR2-A11-10-576（配列番号：40）（k）、VEGFR2-A11-10-397（配列番号：41）（l）、VEGFR2-A11-10-308（配列番号：42）（m）、VEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（n）、VEGFR2-A11-10-278（配列番号：44）（o）およびVEGFR2-A11-10-972（配列番号：45）（p）で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ（a）～（p）から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[図3-2]図3は、VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-9-521（配列番号：3）（c）、VEGFR2-A11-9-973（配列番号：4）（d）、VEGFR2-A11-9-309（配列番号：5）（e）、VEGFR2-A11-9-860（配列番号：9）（f）、VEGFR2-A11-9-134（配列番号：15）（g）、VEGFR2-A11-9-195（配列番号：26）（h）、VEGFR2-A11-9-502（配列番号：27）（i）、VEGFR2-A11-9-1281（配列番号：39）（j）、VEGFR2-A11-10-576（配列番号：40）（k）、VEGFR2-A11-10-397（配列番号：41）（l）、VEGFR2-A11-10-308（配列番号：42）（m）、VEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（n）、VEGFR2-A11-10-278（配列番号：44）（o）およびVEGFR2-A11-10-972（配列番号：45）（p）で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ（a）～（p）から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[図3-3]図3は、VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-9-521（配列番号：3）（c）、VEGFR2-A11-9-973（配列番号：4）（d）、VEGFR2-A11-9-309（配列番号：5）（e）、VEGFR2-A11-9-860（配列番号：9）（f）、VEGFR2-A11-9-134（配列番号：15）（g）、VEGFR2-A11-9-195（配列番号：26）（h）、VEGFR2-A11-9-502（配列番号：27）（i）、VEGFR2-A11-9-1281（配列番号：39）（j）、VEGFR2-A11-10-576（配列番号：40）（k）、VEGFR2-A11-10-397（配列番号：41）（l）、VEGFR2-A11-10-308（配列番号：42）（m）、VEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（n）、VEGFR2-A11-10-278（配列番号：44）（o）およびVEGFR2-A11-10-972（配列番号：45）（p）で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ（a）～（p）から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、

対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[0021] [図4-1]図4は、VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-9-521（配列番号：3）（c）、VEGFR2-A11-9-973（配列番号：4）（d）、VEGFR2-A11-9-309（配列番号：5）（e）、VEGFR2-A11-9-860（配列番号：9）（f）、VEGFR2-A11-9-134（配列番号：15）（g）、VEGFR2-A11-9-195（配列番号：26）（h）、VEGFR2-A11-9-502（配列番号：27）（i）、VEGFR2-A11-9-1281（配列番号：39）（j）、VEGFR2-A11-10-576（配列番号：40）（k）、VEGFR2-A11-10-397（配列番号：41）（l）、VEGFR2-A11-10-308（配列番号：42）（m）、VEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（n）およびVEGFR2-A11-10-972（配列番号：45）（o）で刺激したCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローンのIFN- γ 産生を示す一連の折れ線グラフ（a）～（o）から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローンが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[図4-2]図4は、VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-9-521（配列番号：3）（c）、VEGFR2-A11-9-973（配列番号：4）（d）、VEGFR2-A11-9-309（配列番号：5）（e）、VEGFR2-A11-9-860（配列番号：9）（f）、VEGFR2-A11-9-134（配列番号：15）（g）、VEGFR2-A11-9-195（配列番号：26）（h）、VEGFR2-A11-9-502（配列番号：27）（i）、VEGFR2-A11-9-1281（配列番号：39）（j）、VEGFR2-A11-10-576（配列番号：40）（k）、VEGFR2-A11-10-397（配列番号：41）（l）、VEGFR2-A11-10-308（配列番号：42）（m）、VEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（n）およびVEGFR2-A11-10-972（配列番号：45）（o）で刺激したCTL株か

ら限界希釈によって樹立されたCTLクローンのIFN- γ 産生を示す一連の折れ線グラフ (a) ~ (o) から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローンが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[図4-3]図4は、VEGFR2-A11-9-319 (配列番号 : 1) (a)、VEGFR2-A11-9-863 (配列番号 : 2) (b)、VEGFR2-A11-9-521 (配列番号 : 3) (c)、VEGFR2-A11-9-973 (配列番号 : 4) (d)、VEGFR2-A11-9-309 (配列番号 : 5) (e)、VEGFR2-A11-9-860 (配列番号 : 9) (f)、VEGFR2-A11-9-134 (配列番号 : 15) (g)、VEGFR2-A11-9-195 (配列番号 : 26) (h)、VEGFR2-A11-9-502 (配列番号 : 27) (i)、VEGFR2-A11-9-1281 (配列番号 : 39) (j)、VEGFR2-A11-10-576 (配列番号 : 40) (k)、VEGFR2-A11-10-397 (配列番号 : 41) (l)、VEGFR2-A11-10-308 (配列番号 : 42) (m)、VEGFR2-A11-10-159 (配列番号 : 43) (n) およびVEGFR2-A11-10-972 (配列番号 : 45) (o) で刺激したCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローンのIFN- γ 産生を示す一連の折れ線グラフ (a) ~ (o) から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローンが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[0022] [図5-1]図5は、VEGFR2-A33-9-823 (配列番号 : 87) (a)、VEGFR2-A33-9-114 (配列番号 : 89) (b)、VEGFR2-A33-9-214 (配列番号 : 90) (c)、VEGFR2-A33-9-577 (配列番号 : 21) (d)、VEGFR2-A33-10-213 (配列番号 : 104) (e)、VEGFR2-A33-10-97 (配列番号 : 83) (f)、VEGFR2-A33-10-576 (配列番号 : 40) (g)、VEGFR2-A33-10-113 (配列番号 : 70) (h) およびVEGFR2-A33-10-1046 (配列番号 : 114) (i) で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ (a) ~ (i) から

構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[図5-2]図5は、VEGFR2-A33-9-823（配列番号：87）（a）、VEGFR2-A33-9-114（配列番号：89）（b）、VEGFR2-A33-9-214（配列番号：90）（c）、VEGFR2-A33-9-577（配列番号：21）（d）、VEGFR2-A33-10-213（配列番号：104）（e）、VEGFR2-A33-10-97（配列番号：83）（f）、VEGFR2-A33-10-576（配列番号：40）（g）、VEGFR2-A33-10-113（配列番号：70）（h）およびVEGFR2-A33-10-1046（配列番号：114）（i）で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を順に実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ（a）～（i）から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[0023] [図6]図6は、VEGFR2-A33-9-114（配列番号：89）（a）、VEGFR2-A33-9-214（配列番号：90）（b）、VEGFR2-A33-9-577（配列番号：21）（c）、VEGFR2-A33-10-213（配列番号：104）（d）、VEGFR2-A33-10-97（配列番号：83）（e）、VEGFR2-A33-10-113（配列番号：70）（f）およびVEGFR2-A33-10-1046（配列番号：114）（g）で刺激したCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローンのIFN- γ 産生を示す一連の折れ線グラフ（a）～（g）から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローンが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- γ 産生を示す。

[0024] [図7-1]図7は、VEGFR2およびHLA-A*1101を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す一連の折れ線グラフ (a) ~ (c) から構成される。HLA-A*1101または全長VEGFR2遺伝子をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。VEGFR2-A11-9-319 (配列番号: 1) (a) およびVEGFR2-A11-10-159 (配列番号: 43) (b) を用いて樹立されたCTL株またはCTLクローンは、VEGFR2およびHLA-A*1101の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した (黒菱形)。一方、HLA-A*1101 (三角) またはVEGFR2 (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった。陰性データの典型的な例であるが、VEGFR2-A11-9-863 (配列番号: 2) を用いて樹立されたCTLクローンは、特異的CTL活性を示さなかった (c)。

[図7-2]図7は、VEGFR2およびHLA-A*1101を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す一連の折れ線グラフ (a) ~ (c) から構成される。HLA-A*1101または全長VEGFR2遺伝子をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。VEGFR2-A11-9-319 (配列番号: 1) (a) およびVEGFR2-A11-10-159 (配列番号: 43) (b) を用いて樹立されたCTL株またはCTLクローンは、VEGFR2およびHLA-A*1101の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した (黒菱形)。一方、HLA-A*1101 (三角) またはVEGFR2 (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった。陰性データの典型的な例であるが、VEGFR2-A11-9-863 (配列番号: 2) を用いて樹立されたCTLクローンは、特異的CTL活性を示さなかった (c)。

[0025] [図8-1]図8は、VEGFR2およびHLA-A*3303を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す一連の折れ線グラフ (a) ~ (c) から構成される。HLA-A*3303または全長VEGFR2遺伝子をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。VEGFR2-A33-9-114 (配列番号: 89) (a) およびVEGFR2-A33-10-113 (配列番号: 70) (b) を用いて樹立されたCTL株またはCTLクローンは、VEGFR2およびHLA-A*3303の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した (黒菱形)。一方、HLA-A*3303 (三角) またはVEGFR2 (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった

。対照的に、陰性データの典型的な例であるが、VEGFR2-A33-9-577（配列番号：21）を用いて樹立されたCTLクローンは、特異的CTL活性を示さなかった（c）。

[図8-2]図8は、VEGFR2およびHLA-A*3303を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す一連の折れ線グラフ（a）～（c）から構成される。HLA-A*3303または全長VEGFR2遺伝子をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。VEGFR2-A33-9-114（配列番号：89）（a）およびVEGFR2-A33-10-113（配列番号：70）（b）を用いて樹立されたCTL株またはCTLクローンは、VEGFR2およびHLA-A*3303の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した（黒菱形）。一方、HLA-A*3303（三角）またはVEGFR2（丸）のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった。対照的に、陰性データの典型的な例であるが、VEGFR2-A33-9-577（配列番号：21）を用いて樹立されたCTLクローンは、特異的CTL活性を示さなかった（c）。

発明を実施するための形態

[0026] 本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法、装置、および材料をここに記載する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本明細書に記載の特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコール等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図されないことも、また理解されるべきである。

[0027] 1. 定義

本明細書で用いる「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」という単語は、他に特記されない限り「少なくとも1つ」を意味する。

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

[0028] 「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。本用語は、1個もしくは複数個のアミノ酸残基が修飾された残基であるか、または対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基であるアミノ酸ポリマー、および天然アミノ酸ポリマーに適用される。

[0029] 本明細書で用いる「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、および細胞内で翻訳後に修飾されたアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、およびD-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基に結合した α 炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様の機能を有する化合物を指す。

[0030] アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会（Biochemical Nomenclature Commission）の推奨する、一般に公知の3文字表記または1文字表記により参照されてもよい。

[0031] 「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、他に特記しない限り、一般に受け入れられている1文字コードにより参照される。

「剤」および「組成物」という用語は本明細書では互換的に用いられ、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに、特定量の特定成分の組合せから直接的または間接的に生じる任意の生成物を指す。そのような用語は、（「薬学的な剤」および「薬学的組成物」の場合のように）「薬学的（な）」という修飾語に関連して使用されるとき、有効成分と、担体を構成する不活性成分とを含む生成物、ならびに、任意の2つもしくはそれ以上の成分の組合せ、複合体化または凝集から、あるいは、1つもしくは複数の成分の解離から、あるいは、1つもしくは複数の成分の他の種類の反応または相互作用から直接的または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。したがって、本発明との関連において、「薬学的な剤」および「薬学的組成物」という用語は、本発明の分子または化合物と、薬学的または生理学的に許

容される担体とを混合することによって作製される任意の生成物を指す。

[0032] 本明細書で使用する「組成物」という用語は、特定量の特定成分を含む生成物、および特定量の特定成分の組み合わせから直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。薬学的組成物に関するそのような用語は、有効成分と担体を構成する不活性成分とを含む生成物、ならびに任意の2つもしくはそれ以上の成分の組み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、1つもしくは複数の成分の解離から、または1つもしくは複数の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。したがって、本発明の薬学的組成物は、本発明の化合物または細胞と薬学的または生理学的に許容される担体とを混合することにより作製される任意の組成物を包含する。本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒および封入材料を含むがこれらに限定されない、薬学的または生理学的に許容される材料、組成物、物質、または媒体を意味する。

[0033] 特記しない限り、「血管新生により媒介される疾患」という用語は、疾患の発生および／または進行に血管新生が関与する疾患を指し、その例としては、各種がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症：加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデレミア、脈絡膜骨腫など）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化などが含まれるが、これらに限定されない。より具体的には、VEGFR2遺伝子の発現が関与する血管新生により媒介される疾患を指す。これらの疾患の疾患部位では、血管内皮細胞において、VEGFR2遺伝子が発現されている。

[0034] 特記しない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」、および「CTL」という用語は本明細書において互換的に用いられ、特に別段の定めのない限り、非自己細胞（例えば、腫瘍／がん細胞、ウイルス感染細胞）を

認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球の亜群を指す。

[0035] 特記しない限り、「HLA-A11」という用語は、HLA-A*1101、HLA-A*1102、HLA-A*1103、HLA-A*1104などのサブタイプを含むHLA-A11型を指す。

[0036] 特記しない限り、「HLA-A33」という用語は、HLA-A*3303、HLA-A*3301、HLA-A*3304などのサブタイプを含むHLA-A33型を指す。

[0037] 本発明の方法および組成物ががんなどの血管新生により媒介される疾患の「治療」との関連において有用である限り、治療が、対象において、VEGFR2遺伝子の発現の低下、血管新生の阻害または血管新生により媒介される疾患の症状の軽減などの臨床的利点をもたらす場合に、治療は「有効である」と見なされる。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、疾患への罹患が遅延するもしくは妨げられるか、または疾患の臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、特定の疾患の種類を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。本発明の方法および組成物が血管新生により媒介される疾患の「予防」との関連において有用である限り、「予防」という用語は本明細書において、疾患による死亡率または罹患率の負荷を軽減させる任意の働きを含む。予防は、「第一次、第二次、および第三次の予防レベル」で行われ得る。第一次の予防は疾患の発生を回避するのに対し、第二次および第三次レベルの予防は、疾患の進行および症状の出現を予防することに加え、機能を回復させ、かつ疾患関連の合併症を減少させることによって、既存の疾患の悪影響を低下させることを目的とした働きを包含する。あるいは、予防は、特定の障害の重症度を緩和すること、例えば腫瘍の増殖および転移を減少させることを目的とした広範囲の予防的治療を含み得る。

[0038] 本発明との関連において、がんの治療および／もしくは予防、ならびに／または術後のその再発の予防は、以下の段階、がん細胞の外科的切除、がん細胞の増殖阻害、腫瘍の退行または退縮、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退縮、ならびに転移の低減または阻害などの段階のいずれかを含む

。がんの効果的な治療および／または予防は、死亡率を減少させ、がんを有する個体の予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、かつがんに伴う検出可能な症状を緩和する。例えば、症状の軽減または改善は効果的な治療および／または予防を構成し、10%、20%、30%、もしくはそれ以上の軽減もしくは症状が安定した状態を含む。

[0039] 別段の定めのない限り、本明細書で用いる「キット」という用語は、試薬と他の物質との組合せに関して用いられる。本明細書では、キットはマイクロアレイ、チップ、マーカーなどを組み得ることが企図される。「キット」という用語は、試薬および／または物質の特定の組合せに限定することを意図しない。

[0040] 本発明との関連において、「抗体」という用語は、指定のタンパク質またはそのペプチドと特異的に反応する免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体には、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射標識と融合させた抗体、および抗体断片が含まれ得る。さらに、本明細書において「抗体」は広義で使用され、具体的にはインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、2以上のインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を包含し、また所望の生物活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM）を示す。

[0041] 特記しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されている用語と同じ意味を有する。

[0042] 1.1. ペプチド

HLA-A11およびHLA-A33は、アジア人の中でよく見られるアリルである（Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12）。そのため、HLA-A11またはHLA-A33によって拘束されるVEGFR2由来のCTL誘導性ペプチドを提供することにより、多くのアジア人に、血管新生により媒介される疾患の有効な治療方法を提供することができる。よって、本発明は、HLA-A11またはHLA-A3

3拘束性の様式でCTLを誘導し得るVEGFR2由来のペプチドを提供する。

[0043] 本発明のペプチドは、HLA-A11またはHLA-A33拘束性の様式でCTLを誘導し得るVEGFR2由来のペプチドである。HLA-A11拘束性の様式でCTLを誘導し得るペプチドとしては、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。また、HLA-A33拘束性の様式でCTLを誘導し得るペプチドとしては、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。

[0044] これらのペプチドでパルスした樹状細胞（dendritic cell; DC）によるT細胞のインビトロでの刺激により、これらのペプチドに特異的な細胞傷害活性を有するCTLが樹立され得る。樹立されたCTLは、各ペプチドをパルスした標的細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示す。

[0045] VEGFR2遺伝子は、血管新生により媒介される疾患において、疾患部位の血管内皮細胞で強発現しているが、ほとんどの正常器官では発現しないため、免疫療法のための優れた標的である。したがって本発明のペプチドは、血管新生により媒介される疾患の免疫療法のために好適に用いることができる。好ましいペプチドは、ノナペプチド（アミノ酸残基9個からなるペプチド）またはデカペプチド（アミノ酸残基10個からなるペプチド）であり、配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましい。例えば、配列番号：1または43に記載のアミノ酸配列を有するペプチドは、HLA-A11とVEGFR2とを発現する細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すCTLの誘導に適しており、HLA-A11陽性患者における血管新生により媒介される疾患の免疫療法のために好適に使用することができる。また、配列番号70または89に記載のアミノ酸配列を有するペプチドは、HLA-A33とVEGFR2とを発現する細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すCTLの誘導に適しており、HLA-A33陽性患者における血管新生により媒介される疾患の免疫療法のために好適に用いることができる。より好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号：1、43

、70および89の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0046] 本発明のペプチドは、結果として生じるペプチドが元のペプチドCTL誘導能を保持する限り、本発明のペプチドのアミノ酸配列に付加的なアミノ酸残基を隣接させることができる。付加的なアミノ酸残基は、それらが元のペプチドのCTL誘導能を損なわない限り、任意の種類のアミノ酸から構成され得る。したがって本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中より選択されるアミノ酸配列を含む、CTL誘導能を有するペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば約40アミノ酸未満であり、多くの場合には約20アミノ酸未満であり、通常は約15アミノ酸未満である。したがって、本発明のペプチドは、元のペプチドがノナペプチドであれば、当該ペプチドに付加的なアミノ酸を隣接させることによって生じる10アミノ酸長、または11～40アミノ酸長のペプチドを包含する。また、元のペプチドが、デカペプチドであれば、11～40アミノ酸長のペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば、11～20アミノ酸長のペプチドであることができ、11～15アミノ酸長のペプチドであることができる。付加的なアミノ酸残基の好ましい例は、VEGFR2の全長アミノ酸配列において本発明のペプチドのアミノ酸配列に隣接するアミノ酸残基である。したがって、本発明のペプチドは、VEGFR2由来のペプチドであって、配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中より選択されるアミノ酸配列を含む、CTL誘導能を有するペプチドを包含する。

[0047] 一般的に、あるペプチド中の1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸の改変は該ペプチドの機能に影響を及ぼさず、場合によっては元のペプチドの所望の機能を増強することさえある。実際に、改変ペプチド（すなわち、元の参照配列と比較して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が改変された（すなわち、置換、欠失、挿入および／または付加された）アミノ酸配列から構成されるペプチド）は、元のペプチドの生物活性を保持することが知られている（Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6 ; Zoller an

d Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500 ; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13) 。したがって、一態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、かつCTL誘導能を有するペプチドであり得る。

[0048] 当業者は、元のアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向がある、単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を変更する、アミノ酸配列に対する個々の置換を認識することができる。したがって、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、この場合、タンパク質の変化により元のタンパク質の類似の機能を有する改変タンパク質が生じる。機能的に類似しているアミノ酸を提示する保存的置換の表は、当技術分野において周知である。保存するのが望ましいアミノ酸側鎖の特性の例には、例えば、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、ならびに以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖が含まれる：脂肪族側鎖 (G、A、V、L、I、P)；ヒドロキシル基含有側鎖 (S、T、Y)；硫黄原子含有側鎖 (C、M)；カルボン酸およびアミド含有側鎖 (D、N、E、Q)；塩基含有側鎖 (R、K、H)；ならびに芳香族含有側鎖 (H、F、Y、W)。加えて、以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるとして当技術分野で認められているアミノ酸を含む：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)；および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins 198

4を参照されたい)。

- [0049] このような保存的改変ペプチドもまた、本発明のペプチドに包含される。しかしながら、本発明のペプチドはこれらに限定されず、改変ペプチドが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、非保存的な改変を含み得る。さらに、改変ペプチドは、VEGFR2の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子由来のCTL誘導可能なペプチドを排除しない。
- [0050] 元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、少数の（例えば、1個、2個、または数個の）またはわずかな割合のアミノ酸を改変する（すなわち、置換、欠失、挿入および／または付加する）ことができる。本明細書において、「数個」という用語は、5個またはそれ未満のアミノ酸、例えば4個もしくは3個またはそれ未満を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは20%もしくはそれ未満、より好ましくは15%もしくはそれ未満、さらにより好ましくは10%もしくはそれ未満、または1～5%である。
- [0051] 免疫療法との関連で用いられた場合、本発明のペプチドは、好ましくはHLA抗原との複合体として、細胞またはエキソソームの表面上に提示されるべきである。したがって、本発明のペプチドは、HLA抗原に対する高い結合親和性を有することが好ましい。そのため、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入および／または付加によってペプチドを改変して、結合親和性が改善された改変ペプチドを得てもよい。HLA抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であることから (Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 23 2-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.)、そのような規則性に基づいた改変を本発明のペプチドに導入することができる。
- [0052] 例えば、HLA Class Iに対する結合性を有するペプチドでは、一般に、N末端から2番目のアミノ酸およびC末端のアミノ酸がHLA Class Iへの結合に関与するアンカー残基であることが多い (Rammensee HG, et al., Immunogenetics. 1995;41(4):178-228.)。例えば、HLA-A11では、N末端から2番目のアミノ酸としてスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン

およびチロシンが、C末端のアミノ酸としてリジンおよびアルギニンが、HLA-A11に対する結合親和性が高いアンカー残基として知られている (Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9)。さらに、HLA-A11では、N末端から3番目および7番目の位置に補助的なアンカー残基を有し、N末端から3番目のアミノ酸としてはロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、およびアラニンが好ましく、N末端から7番目のアミノ酸としてはロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンおよびフェニルアラニンが好ましいことが知られている (Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9)。

[0053] そのため、HLA-A11結合親和性を維持あるいは増大させるためには、N末端から2番目のアミノ酸をスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンもしくはチロシンで置換すること、および／またはC末端のアミノ酸をリジンもしくはアルギニンで置換することが望ましい可能性がある。さらに、N末端から3番目のアミノ酸をロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、もしくはアラニンで置換すること、および／またはN末端から7番目のアミノ酸をロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンもしくはフェニルアラニンで置換することも望ましい可能性がある。したがって、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸がスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンもしくはチロシンで置換されている、N末端から3番目のアミノ酸がロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン、アラニンで置換されている、N末端から7番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンもしくはフェニルアラニンで置換されている、および／またはC末端のアミノ酸がリジンもしくはアルギニンで置換されている、アミノ酸配列を含むCTL誘導能を有するペプチドは、本発明のペプチドに包含される。

[0054] 好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27

および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸がスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンもしくはチロシンで置換されている、N末端から3番目のアミノ酸がロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンもしくはアラニンで置換されている、N末端から7番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンもしくはフェニルアラニンで置換されている、および／またはC末端のアミノ酸がリジンもしくはアルギニンで置換されている、アミノ酸配列からなるCTL誘導能を有するペプチドであり得る。すなわち、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、以下の（a）～（d）の中より選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、CTL誘導能を有するペプチドを包含する：

（a）N末端から2番目のアミノ酸がスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンまたはチロシンで置換されている；

（b）N末端から3番目のアミノ酸がロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンまたはアラニンで置換されている；

（c）N末端から7番目のアミノ酸がロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンまたはフェニルアラニンで置換されている；および

（d）C末端のアミノ酸がリジンまたはアルギニンで置換されている。

[0055] 好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、上記（a）～（d）の中より選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列からなる、CTL誘導能を有するペプチドであり得る。本発明において、好ましい置換の数は、前記（a）～（d）から選択される1個、2個、3個あるいは4個の置換である。

[0056] また、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸がスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンもしくはチロシンで置換されている、および／またはC末端のアミノ酸がリジンもしくはアルギニンで置換されている、アミノ酸配列を含むCTL誘導能を有するペプチド

ドであり得る。好ましくは、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸がスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンもしくはチロシンで置換されている、および／またはC末端のアミノ酸がリジンもしくはアルギニンで置換されている、アミノ酸配列からなるCTL誘導能を有するペプチドであり得る。すなわち、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、以下の（a）および（b）の中より選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、CTL誘導能を有するペプチドであり得る：

（a）N末端から2番目のアミノ酸がスレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンまたはチロシンで置換されている；および

（b）C末端のアミノ酸がリジンまたはアルギニンで置換されている。

[0057] 好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列において、上記（a）～（b）の中より選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列からなる、CTL誘導能を有するペプチドであり得る。より好ましい態様では、N末端から2番目のアミノ酸はスレオニン、バリン、イソロイシンまたはロイシンで置換されている。

[0058] また、例えば、HLA-A33では、N末端から2番目のアミノ酸としてフェニルアラニン、チロシン、アラニン、イソロイシン、ロイシン、およびバリンが、C末端のアミノ酸としてアルギニンおよびリジンが、HLA-A33に対する結合親和性が高いアンカー残基として知られている（Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.）。さらに、HLA-A33では、N末端から1番目のアミノ酸残基もアンカー残基として機能することが知られており、N末端から1番目のアミノ酸としてアスパラギン酸およびグルタミン酸が好ましいことが知られている（Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 232-41; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.）。

[0059] そのため、HLA-A33結合親和性を維持あるいは増大させるためには、N末端から1番目のアミノ酸をアスパラギン酸もしくはグルタミン酸で置換すること、N末端から2番目のアミノ酸をフェニルアラニン、チロシン、アラニン、イソロイシン、ロイシンもしくはバリンで置換すること、および／またはC末端のアミノ酸をアルギニンもしくはリジンで置換することが望ましい可能性がある。したがって、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列において、N末端から1番目のアミノ酸がアスパラギン酸もしくはグルタミン酸で置換されている、N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、アラニン、イソロイシン、ロイシンもしくはバリンで置換されている、および／またはC末端のアミノ酸がアルギニンもしくはリジンで置換されている、アミノ酸配列を含むCTL誘導能を有するペプチドは、本発明のペプチドに包含される。

[0060] 好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列において、N末端から1番目のアミノ酸がアスパラギン酸もしくはグルタミン酸で置換されている、N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、アラニン、イソロイシン、ロイシンもしくはバリンで置換されている、および／またはC末端のアミノ酸がアルギニンもしくはリジンで置換されている、アミノ酸配列からなるCTL誘導能を有するペプチドであり得る。すなわち、本発明のペプチドは、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列において、以下の（a）～（c）の中より選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列を含む、CTL誘導能を有するペプチドを包含する：

（a）N末端から1番目のアミノ酸がアスパラギン酸またはグルタミン酸で置換されている；

（b）N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、アラニン、イソロイシン、ロイシンまたはバリンで置換されている；および

（c）C末端のアミノ酸がアルギニンまたはリジンで置換されている。

[0061] 好ましい態様では、本発明のペプチドは、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列において、上記（a）～（c）の中より選択される1以上の置換を有するアミノ酸配列からなる、CTL誘導能を有するペプチドであり得る。本発明において、好ましい置換の数は、前記（a）～（c）から選択される1個、2個あるいは3個の置換である。より好ましい態様では、N末端から2番目のアミノ酸はフェニルアラニンまたはチロシンで置換されている。

[0062] 末端のアミノ酸においてだけでなく、ペプチドの潜在的なT細胞受容体（TCR）認識部位においても、置換を導入することができる。いくつかの研究は、例えばCAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎、またはgp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎など、アミノ酸置換を有するペプチドが元のペプチドと同等の活性を有するかまたはより優れた活性を有し得ることを実証している（Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-7, 1997、T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1;168 (3):1338-47.、S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206、およびS. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-14）。

[0063] 本発明はまた、本発明のペプチド（例えば、配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド）のN末端および／またはC末端に、1個、2個、または数個のアミノ酸を付加することができることを企図する。CTL誘導能を保持するそのような改変ペプチドもまた、本発明に含まれる。例えば、配列番号1、43、70または89に記載のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端および／またはC末端に1個、2個、または数個のアミノ酸が付加されたペプチドは、APCに接触させると、APC内に取り込まれてプロセッシングを受け、配列番号1、43、70または89に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとなる。その後、抗原提示経路を経て、APCの細胞表面に提示することにより、CTLを誘導し得る。

[0064] しかしながら、ペプチドのアミノ酸配列が、異なる機能を有する内因性マ

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

[0065] 本発明のペプチドの1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されたペプチドは、元のペプチドのCTL誘導能を保持し得ると予測されるが、改変ペプチドに関してCTL誘導能を確認することが好ましい。本明細書において「CTL誘導能を有するペプチド」とは、そのペプチドで刺激されたAPCによって、CTLが誘導されるペプチドを指す。「CTLの誘導」には、CTL活性化の誘導、CTL増殖の誘導、CTLによる標的細胞の溶解の誘導、およびCTLのIFN- γ 産生増加の誘導が含まれる。

[0066] CTL誘導能の確認は、HLA抗原を保有するAPC（例えば、Bリンパ球、マクロファージ、および樹状細胞（DC））を誘導し、ペプチドで刺激した後、CD8陽性T細胞と混合し、その後、標的細胞に対してCTLによって放出されたIFN- γ を測定することにより行うことができる。APCは、好ましくは、ヒト末梢血単核白血球由来のDCを使用することができる。反応系として、HLA抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物（例えば、BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) responseに記載されているもの）を用いることもできる。また、例えば、標的細胞を⁵¹Cr等で放射標識し、標的細胞から放出された放射活性からペプチドで誘導されたCTLの細

胞傷害活性を算出することができる。あるいは、ペプチドで刺激したAPCの存在下で、CTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻止帯を可視化することによって、CTL誘導能を評価することができる。

[0067] 上記の改変に加えて、本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチドがCTL誘導能を保持する限り、他のペプチドに連結させることもできる。本発明のペプチドと連結させる適切なペプチドの例としては、腫瘍関連抗原 (TAA) に由来するCTL誘導性ペプチドが挙げられる。また、本発明のペプチド同士を連結させることもできる。ペプチド間の連結に使用できる適切なリンカーは当技術分野で公知であり、例えばAAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (R. P. M. Suttmuller et al., J Immunol, 2000, 165: 7308-15)、またはK (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-6、K. S. Kawamura et al., J Immunol, 2002, 168: 5709-15) のようなリンカーを使用することができる。ペプチドは、様々な配置 (例えば、連鎖状、重複など) で連結することができ、3つ以上のペプチドを連結することもできる。

[0068] 本発明のペプチドはまた、結果として生じる連結ペプチドがCTL誘導能を保持する限り、他の物質に連結させることもできる。本発明のペプチドと連結させる適切な物質の例としては、例えば、ペプチド、脂質、糖もしくは糖鎖、アセチル基、および天然もしくは合成のポリマー等が挙げられる。本発明のペプチドは、CTL誘導能が損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を行うこともできる。このような種類の修飾を行って、付加的な機能 (例えば、標的化機能および送達機能) を付与すること、またはペプチドを安定化することができる。

[0069] 例えば、ペプチドのインビボ安定性を高めるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体、または非天然アミノ酸を導入することが当技術分野において公知であり、この概念を本発明のペプチドに適合させることもできる。ペプチドの安定性は、いくつかの方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼ、ならびにヒトの血漿および血清などの様々な生体媒質を用いて、安

定性を試験することができる（例えば、Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302を参照されたい）。

[0070] さらに、上述したように、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加された改変ペプチドの中から、元のペプチドと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元のものと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有する改変ペプチドをスクリーニングまたは選択する方法を提供する。具体的には、本発明は、CTL誘導能を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

(a) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列からなる元のアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる候補配列を作成する段階；

(b) (a) で作成した候補配列の中からVEGFR2以外のいかなる公知のヒト遺伝子産物とも有意な相同性（配列同一性）を有さない候補配列を選択する段階；

(c) (b) で選択した候補配列からなるペプチドと、APCとを接触させる段階；

(d) (c) のAPCとCD8陽性T細胞とを接触させる段階；および

(e) 元のアミノ酸配列からなるペプチドよりも同等かまたはより高いCTL誘導能を有するペプチドを選択する段階。

[0071] 本明細書において、本発明のペプチドはまた、「VEGFR2ペプチド」または「VEGFR2ポリペプチド」とも記載される。

[0072] 1.1.1. VEGFR2ペプチドの調製

周知の技法を用いて、本発明のペプチドを調製することができる。例えば、組換えDNA技術または化学合成を用いて、本発明のペプチドを調製することができる。本発明のペプチドは、個々に、または2つもしくはそれ以上のペプ

チドを含むより長いポリペプチドとして、合成することができる。組換えDNA技術を用いて宿主細胞内で産生させた後、または化学合成した後、宿主細胞または合成反応物から、本発明のペプチドを単離することができる。すなわち、他の宿主細胞タンパク質およびそれらの断片、または他のいかなる化学物質も実質的に含まないように、本発明のペプチドを精製または単離することができる。

[0073] 本発明のペプチドは、修飾によって元のペプチドの生物活性が損なわれないう限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えば当該ペプチドの血清半減期を延長させるために用いることができる、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の取り込みが含まれる。

[0074] 選択されたアミノ酸配列に基づいた化学合成によって、本発明のペプチドを得ることができる。該合成に適合させることのできる従来のペプチド合成法の例には、以下のような文献に記載の方法が含まれる：

- (i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;
- (i i) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
- (i i i) 「ペプチド合成」 (日本語) , 丸善, 1975 ;
- (i v) 「ペプチド合成の基礎と実験」 (日本語) , 丸善, 1985 ;
- (v) 「医薬品の開発」 (日本語) , 続第14巻 (ペプチド合成) , 広川書店, 1991 ;
- (v i) W099/67288 ; および
- (v i i) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, Solid Phase Peptide Synthesis, Academic Press, New York, 1980, 100-18。

[0075] あるいは、ペプチドを産生するための任意の公知の遺伝子工学的方法を適合させて、本発明のペプチドを得ることもできる (例えば、Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51 ; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (Wu et al.) 1983, 101: 347-62) 。例えば、最初に、本発明のペプチドを発現可能な形態で (例えば、プロモーター配列に相当する調節配列

の下流に) コードするポリヌクレオチドを含む適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に形質転換する。次いで、該宿主細胞を培養して、本発明のペプチドを産生させる。あるいは、インビトロ翻訳系を用いて、本発明のペプチドをインビトロで作製することもできる。

[0076] ⅠⅤ. ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。これらには、天然VEGFR2遺伝子（例えば、GenBankアクセッション番号NM_002253.2（配列番号：122））由来のポリヌクレオチド、およびその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一の核酸が任意の特定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、あるコドンによってアラニンが指定される任意の位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、該コドンの前記の対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に改変された変異の一種である。ペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、該核酸のあらゆる可能なサイレント変異をも表す。核酸中の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く）を改変して、機能的に同一の分子を得ることができることを、当業者は認識するであろう。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、開示した各配列において非明示的に記載されている。

[0077] 本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNAおよびそれらの誘導体から構成され得る。DNAはA、T、CおよびGなどの塩基から適切に構成され、RNAではTはUに置き換えられる。

[0078] 本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を間に伴って、また

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

[0079] 組換え技法および化学合成技法のいずれを用いても、本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、適切なベクターに挿入することによってポリヌクレオチドを作製することができ、これはコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現され得る。あるいは、PCR技法または適切な宿主内での発現を用いて、ポリヌクレオチドを増幅することもできる（例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989を参照されたい）。あるいは、Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., *EMBO J* 1984, 3: 801-5に記載されている固相技法を用いて、ポリヌクレオチドを合成することもできる。

[0080] V. エキソソーム

本発明はさらに、本発明のペプチドとHLA抗原との間に形成された複合体を自身の表面上に提示する、エキソソームと称される細胞内小胞を提供する。エキソソームは、例えば特表平11-510507号およびW099/03499に詳述されている方法を用いて調製することができ、治療および／または予防の対象となる患者から得られたAPCを用いて調製することができる。本発明のエキソソームは、本発明のペプチドと同様の様式で、ワクチンとして接種することができる。

[0081] 前記複合体中に含まれるHLA抗原の型は、治療および／または予防を必要とする対象のものと一致しなければならない。例えばアジア人集団では、HLA-A11（例えば、HLA-A*1101）およびHLA-A33（例えば、HLA-A*3303）は広く一般的に見られるアリルであり、これらのHLA抗原の型はアジア人患者の治療に適していると考えられる。典型的には、クリニックにおいて、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を予め調べることにより、特定のHLA抗原に対して高レベルの結合親和性を有する、または特定のHLA抗原を介した抗原提示によるCTL誘導能を有するペプチドの適切な選択が可能となる。

[0082] 本発明のエキソソームは、本発明のペプチドとHLA-A11またはHLA-A33との複合体をその表面上に提示する。本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A11である場合、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27、および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその改変ペプチドであることがより好ましい。あるいは、本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A33である場合、本発明のペプチドは、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ配列からなるペプチドまたはその改変ペプチドであることがより好ましい。

[0083] V I . 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLA抗原と本発明のペプチドとの間に形成される複合体を自身の表面上に提示する抗原提示細胞（APC）を提供する。あるいは、本発明は、HLA抗原と本発明のペプチドとの間に形成された複合体をその細胞表面上に有するAPCを提供する。本発明のAPCは、単離されたAPCであり得る。細胞（APC、CTL等）に関して用いられる場合、「単離された」という用語は、該細胞が他の種類の細胞から分離されていることを指す。本発明のAPCは、治療および／または予防の対象となる患者に由来するAPCから誘導されたものであって

もよく、かつ単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくはCTLを含む他の薬物と併用して、ワクチンとして投与することができる。

[0084] 本発明のAPCは特定の種類の細胞に限定されず、これには、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている樹状細胞（DC）、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞が含まれる。DCは、APCの中で最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCであるため、DCは本発明のAPCとして好ましく使用され得る。本発明において、好ましいDCは、ヒト由来の単離されたDC、あるいはそれらの混合物である。すなわち、異なるペプチドを抗原提示したDCを混合して用いることもできる。

[0085] 例えば、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エキスビボ、またはインビボで本発明のペプチドで刺激することによって、本発明のAPCを得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドを提示するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって、本発明のAPCは、本発明のペプチドを対象に投与した後、該対象からAPCを回収することによって得ることができる。あるいは、本発明のAPCは、対象から回収されたAPCを本発明のペプチドと接触させることによって得ることもできる。

[0086] 対象において、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導するために、本発明のAPCを単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくはCTLを含む他の薬剤と併用して、対象に投与することができる。例えば、エキスビボ投与は以下の段階を含み得る：

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

[0087] 第1の対象と第2の対象は同一の個体であってもよく、または異なる個体であってもよい。第1の対象と第2の対象が異なる個体である場合、第1の対象と第2の対象のHLAは同一の型であることが好ましい。上記の段階bによって得られたAPCは、血管新生により媒介される疾患を治療および／または予防するた

めのワクチンとなり得る。

[0088] 上記のような方法によって得られた、本発明のAPCはCTL誘導能を有する。APCに関して用いられる「CTL誘導能」という用語は、CD8陽性T細胞と接触させたときに、CTLを誘導することができるAPCの能力を指す。さらに、「CTL誘導能」には、CTL活性化を誘導するAPCの能力、CTL増殖を誘導するAPCの能力、CTLによる標的細胞の溶解を促進するAPCの能力、および、CTLによるIFN- γ 産生を増加させるAPCの能力が含まれる。本発明のAPCによって誘導されたCTLは、VEGFR2に特異的なCTLであり、VEGFR2発現細胞に対して特異的な細胞障害活性を示す。

[0089] 本発明のAPCは、上記の方法に加え、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをインビトロでAPCに導入することによって調製することもできる。導入するポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAの形態であってよい。導入の方法の例には、特に限定されることなく、リポフェクション、エレクトロポレーション、およびリン酸カルシウム法などの、当分野において従来より実施されている様々な方法が含まれる。より具体的には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第2000-509281号に記載されているような方法を用いることができる。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入することによって、該ポリヌクレオチドは細胞内で転写、翻訳等を受け、次いで、生じたペプチドはMHCクラスIによってプロセッシングされて、提示経路を経て本発明のペプチドがAPCの細胞表面に提示される。

[0090] 好ましい態様において、本発明のAPCは、HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）と本発明のペプチドとの間に形成される複合体を、自身の細胞表面上に提示しているAPCである。本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A11である場合、本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列

からなるペプチドであることがより好ましい。また、本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A33である場合、本発明のペプチドは、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ配列からなるペプチドであることがより好ましい。

[0091] また、本発明のAPCは、好ましくは、以下のaまたはbに記載される段階を含む方法によって誘導されるAPCである：

a：HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）を発現しているAPCを本発明のペプチドと接触させる段階；

b：HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）を発現しているAPCに、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。HLA-A11を発現しているAPCと接触させる本発明のペプチドは、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがより好ましい。また、HLA-A33を発現しているAPCと接触させる本発明のペプチドは、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ配列からなるペプチドであることがより好ましい。

[0092] また、本発明によれば、CTL誘導能を有するAPCを誘導する薬学的組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導する薬学的組成物を製造するための方法または工程を提供する。さらに、本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための本発明のペプチドを提供する。

[0093] V I I . 細胞傷害性Tリンパ球 (CTL)

本発明のペプチドによって誘導されたCTLは、インビボでVEGFR2を発現する血管内皮細胞を標的とする免疫応答を増強するため、本発明のペプチドと同様にワクチンとして用いることができる。したがって本発明は、本発明のペプチドによって誘導または活性化された、CTLを提供する。本発明のCTLは、本発明のペプチドを標的とするCTLであり、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体に結合することができるCTLである。該複合体へのCTLの結合は、CTLの細胞表面上に存在するT細胞受容体（TCR）を介して行われる。本発明のCTLは、単離されたCTLであり得る。好ましいCTLは、ヒト由来の単離されたCTL、あるいはその混合物である。すなわち、異なるペプチドが抗原提示されたHLA複合体を認識するCTLを混合して用いることもできる。

[0094] 本発明のCTLは、（１）本発明のペプチドを対象に投与すること、または（２）対象由来のAPC、およびCD8陽性T細胞、もしくは末梢血単核球をインビトロで本発明のペプチドで刺激すること、または（３）CD8陽性T細胞もしくは末梢血単核球を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCもしくはエキソソームとインビトロで接触させること、または（４）細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るT細胞受容体（TCR）の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを導入することによって得ることができる。上記（２）または（３）の方法で使用されるエキソソームおよびAPCは、それぞれ「V. エキソソーム」および「V I. 抗原提示細胞（APC）」の章に記載の方法によって調製することができ、上記（４）の方法の詳細は「V I I I. T細胞受容体（TCR）」の章において記載する。

[0095] 本発明のCTLは、治療および／または予防の対象となる患者に対して、単独で投与することができ、または効果を調節する目的で本発明のペプチド、APCもしくはエキソソームを含む他の薬物と併用して投与することができる。また、本発明のCTLは、該CTLの投与対象となる患者に由来するCD8陽性T細胞から誘導されたCTLであり得る。本発明のCTLは、本発明のペプチド、例えば本発明のCTLの誘導に用いたものと同じのペプチドを提示する標的細胞に対して

特異的に作用する。標的細胞は、腫瘍組織の内皮細胞のようにVEGFR2を内因的に発現する細胞、またはVEGFR2遺伝子をトランスフェクトした細胞であってよい。本発明のペプチドによる刺激によって該ペプチドを細胞表面上に提示する細胞もまた、本発明のCTLの攻撃の標的となり得る。また、本発明のCTLの標的細胞は、好ましくは、HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）陽性またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）陽性の細胞である。

[0096] 好ましい態様において、本発明のCTLは、HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）とVEGFR2の両方を発現している細胞を特異的に標的とする。本明細書において、CTLが細胞を「標的とする」とは、HLAと本発明のペプチドとの複合体を細胞表面に提示している細胞をCTLが認識して、該細胞に対して細胞傷害活性を示すことをいう。また、「特異的に標的とする」とは、CTLが該細胞に対して細胞傷害活性を示すが、それ以外の細胞に対しては傷害活性を示さないことをいう。また、CTLとの関連では、「細胞を認識する」という用語は、細胞表面に提示されるHLAと本発明のペプチドとの複合体にそのTCRを介して結合し、該細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すことを指す。したがって、本発明のCTLは、好ましくは、細胞表面上に提示されたHLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）と本発明のペプチドとの間に形成される複合体に、TCRを介して結合することができるCTLである。

また、本発明のCTLは、好ましくは、以下のaまたはbに記載される段階を含む方法によって誘導されたCTLである：

a：CD8陽性T細胞を、HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームとインビトロで接触させる段階；

b：CD8陽性T細胞に、細胞表面上にHLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）またはHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。

[0097] V I I I . T細胞受容体 (TCR)

本発明はまた、細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るT細胞受容体 (TCR) の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む組成物、およびそれを使用する方法を提供する。該ポリヌクレオチドは、細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRを形成させることにより、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する特異性をCD8陽性T細胞に付与する。当技術分野における公知の方法を用いることにより、本発明のペプチドで誘導されたCTLのTCRサブユニットとしての α 鎖および β 鎖をコードするポリヌクレオチドを同定することができる (W02007/032255、およびMorgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。例えば、TCRを分析するためにはPCR法が好ましい。分析のためのPCRプライマーは、例えば、次の5'側プライマーに、以下の3'側プライマーを組み合わせる増幅用プライマーセットとすることができるが、これらに限定されない。

5'側プライマー：

5'-Rプライマー (5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3') (配列番号：124)

3'側プライマー：

TCR α 鎖C領域に特異的：

3-TRa-Cプライマー (5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (配列番号：125) ;

TCR β 鎖C1領域に特異的

3-TRb-C1プライマー (5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (配列番号：126)

; または

TCR β 鎖C2領域に特異的：

3-TR β -C2プライマー (5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3') (配列番号：127)

同定されたポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入することによって形成されるTCRは、本発明のペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ、本発明のペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷を

インビボおよびインビトロで媒介する。

[0098] TCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドは、適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは、当技術分野において周知である。該ポリヌクレオチドまたはそれらを発現可能な形態で含むベクターを、CD8陽性T細胞、例えば患者由来のCD8陽性T細胞に導入することができる。本発明は、患者自身のT細胞（または別の哺乳動物のT細胞）の迅速な改変により、優れた血管内皮細胞殺傷特性を有する改変T細胞を迅速かつ容易に作製することを可能にする既成の組成物を提供する。

[0099] 本明細書において、特異的TCRとは、該TCRがCD8陽性T細胞の表面上に存在する場合に、標的細胞表面上に提示された本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を特異的に認識して、標的細胞に対する特異的な細胞傷害活性を付与し得るTCRである。上記複合体の特異的認識は任意の公知の方法によって確認することができ、その好ましい例には、HLA分子および本発明のペプチドを用いるHLA多量体染色分析、ならびにELISPOTアッセイ法が含まれる。ELISPOTアッセイを行うことにより、上記ポリヌクレオチドを導入したT細胞がTCRによって標的細胞を特異的に認識すること、およびシグナルが細胞内で伝達されることを確認することができる。上記TCRがCD8陽性T細胞表面上に存在する場合に、該TCRが、CD8陽性T細胞に対して、標的細胞特異的な細胞傷害活性を付与し得るという確認もまた、公知の方法によって行うことができる。好ましい方法には、例えば、クロム放出アッセイ法などにより標的細胞に対する細胞傷害活性を測定することが含まれる。

[0100] また本発明は、HLA-A11との関連では、例えば配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに結合するTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを形質導入することによって調製されるCTLを提供する。あるいは本発明は、HLA-A33との関連では、例えば配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに結合するTCRの各サブユニットをコードす

るポリヌクレオチドを形質導入することによって調製されるCTLを提供する。

[0101] 形質導入されたCTLは、インビボでホーミングすることができ、かつ周知のインビトロ培養法によって増殖させることができる（例えば、Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-61 (1989)）。本発明のCTLは、治療または予防を必要としている患者における疾患の治療または予防に有用な免疫原性組成物を形成するために使用することができる（その内容が参照により本明細書に組み入れられるW02006/031221を参照されたい）。

[0102] IX. 薬学的な剤または組成物

本発明はまた、以下の中から選択される少なくとも1つの有効成分を含む、組成物または薬学的組成物を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のAPC；
- (d) 本発明のエキソソーム；
- (e) 本発明のCTL。

[0103] 本発明の薬学的組成物は、上記の有効成分に加えて、医薬品に通常用いられる担体、賦形剤等を特に制限なく必要に応じて含み得る。本発明の薬学的組成物に使用可能な担体の例としては、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等が挙げられる。したがって、本発明はまた、以下の（a）～（e）から選択される少なくとも1つの有効成分と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のAPC；
- (d) 本発明のエキソソーム；
- (e) 本発明のCTL。

[0104] さらに、本発明の薬学的組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤等を含み得る。

VEGFR2の発現は、正常組織と比較して、血管新生により媒介される疾患において、疾患部位の血管内皮細胞で上昇する。そのため、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを、血管新生により媒介される疾患の治療および／もしくは予防、ならびに／または術後のその再発の予防に用いることができる。したがって本発明は、血管新生により媒介される疾患の治療および／もしくは予防、ならびに／または術後のその再発の予防のための薬学的組成物であって、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの1種類または複数種を有効成分として含む組成物を提供する。あるいは、薬学的組成物として用いるために、本発明のペプチドを、エキソソームまたはAPCの表面上に提示させることができる。加えて、本発明のペプチドのいずれか1つを標的とする本発明のCTLもまた、本発明の薬学的組成物の有効成分として用いることができる。本発明の薬学的組成物は、治療的有效量または薬学的有効量の上記有効成分を含み得る。

[0105] 本発明の薬学的組成物はまた、ワクチンとして使用され得る。本発明との関連において、「ワクチン」（「免疫原性組成物」とも称される）という語句は、動物に接種した際に、抗血管新生作用をもたらす免疫応答を誘導する機能を有する組成物を指す。したがって、本発明の薬学的組成物は、抗血管新生作用をもたらす免疫応答を誘導するために用いることができる。

本発明の薬学的組成物は、ヒトである対象または患者において、血管新生により媒介される疾患を治療および／もしくは予防するため、ならびに／または術後のその再発を予防するために用いることができる。本発明の薬学的組成物は、HLA-A11陽性またはHLA-A33陽性の対象に対して、好ましく使用することができる。

[0106] 別の態様において、本発明はまた、血管新生により媒介される疾患を治療または予防するための薬学的組成物の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；

- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0107] あるいは、本発明はさらに、血管新生により媒介される疾患の治療または予防において用いるための、以下の中より選択される有効成分を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0108] あるいは、本発明はさらに、血管新生により媒介される疾患を治療または予防するための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分と、薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0109] 別の態様において、本発明はまた、血管新生により媒介される疾患を治療または予防するための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0110] 別の態様において、本発明はまた、血管新生により媒介される疾患を治療または予防するための方法であって、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0111] 本発明において、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A11拘束性エピトープペプチドとして見出された。また、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A33拘束性エピトープペプチドとして見出された。したがって、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドの少なくとも1つを含む本発明の薬学的組成物は、HLA抗原としてHLA-A11（例えば、HLA-A*1101）を有する対象への投与に特に適している。また、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドの少なくとも1つを含む本発明の薬学的組成物は、HLA抗原としてHLA-A33（例えば、HLA-A*3303）を有する対象への投与に特に適している。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド（すなわち、本発明のポリヌクレオチド）、これらのペプチドを提示するAPCまたはエキソソーム（すなわち、本発明のAPCまたはエキソソーム）、およびこれらのペプチドを標的とするCTL（すなわち、本発明のCTL）を含む薬学的組成物にも当てはまる。すなわち、配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分を含む薬学的組成物は、HLA-A11を有する対象（すなわち、HLA-A11陽性の対象）への投与に適している。また、配列番号：21、40、70、83、87

、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効有効成分を含む薬学的組成物は、HLA-A33を有する対象（すなわち、HLA-A33陽性の対象）への投与に適している。より好ましい態様では、本発明の薬学的組成物は、配列番号：1、43、70および89の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドの少なくとも1つを含む薬学的組成物である。

[0112] 本発明の薬学的組成物によって治療および／または予防される疾患は、特に限定されず、各種がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症：加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデレミア、脈絡膜骨腫など）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、またはアテローム性動脈硬化などを含む、VEGFR2が関与するあらゆる種類の血管新生により媒介される疾患を含む。

[0113] また、腫瘍部位における血管新生は、固形腫瘍の増殖および転移とも密接に関連している（Folkman, J. (1995) *Nature Med.* 1: 27-31; Bicknell et al., (1996) *Curr. Opin. Oncol.* 8: 60-5）。そのため、本発明の薬学的組成物は、がん（固形腫瘍）の増殖および／または転移を抑制するためにも使用され得る。

[0114] 本発明の薬学的組成物は、前述の有効成分に加えて、疾患部位の血管内皮細胞に対するCTLを誘導する能力を有するその他のペプチド（例えばVEGFR1由来のペプチドCTL誘導性ペプチド）、該その他のペプチドをコードするその他のポリヌクレオチド、該その他のペプチドを提示するその他の細胞等を含み得る。また、本発明の薬学的組成物が、特にがんを治療および／または予防するためのものである場合には、本発明の薬学的組成物は、がん細胞に対するCTLを誘導する能力を有するペプチド（例えば、がん抗原由来のCTL誘導性ペプチド）、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ペプチドを提示する細胞等を含んでもよい。

[0115] 本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドなどの上記有効成分の抗血管新生効果が阻害されない限り、その他の治療物質もまた有効成分として任意

に含み得る。例えば、本発明の薬学的組成物は、抗炎症組成物、鎮痛剤、化学療法薬等を任意に含み得る。本発明の薬学的組成物自体にその他の治療物質を含めることに加えて、本発明の薬学的組成物を、1つまたは複数のその他の薬学的組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。本発明の薬学的組成物およびその他の薬学的組成物の投与量は、例えば、使用する薬学的組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に依存する。

[0116] 本明細書において具体的に言及される成分に加えて、本発明の薬学的組成物は、製剤の種類を考慮して、当技術分野において慣例的なその他の成分も含み得ることが理解されるべきである。

[0117] 本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含む製品またはキットを提供する。本発明の製品またはキットは、本発明の薬学的組成物を収容した容器を含み得る。適切な容器の例としては、ボトル、バイアル、および試験管が挙げられるが、これらに限定されない。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器には、ラベルが貼付されていてもよく、ラベルには、本発明の薬学的組成物が使用されるべき疾患または疾患の状態を記載することができる。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

[0118] 本発明の製品またはキットは、本発明の薬学的組成物を収容した容器に加えて、任意で、薬学的に許容される希釈剤を収容した第2の容器をさらに含み得る。本発明の製品またはキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明を記載した添付文書などの、商業上の観点および使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含み得る。

[0119] 必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置にて、本発明の薬学的組成物を提供することができる。該パックは、例えば、ブリストアパックのように金属ホイルまたはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与に関する説明書が添付され得る。

[0120] (1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的組成物

本発明のペプチドを含む薬学的組成物は、必要であれば、従来の製剤化法によって製剤化することができる。本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドに加えて、医薬品に通常用いられる担体、賦形剤等を特に制限なく必要に応じて含み得る。本発明の薬学的組成物に使用可能な担体の例としては、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等が挙げられる。さらに、本発明の薬学的組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤等を含み得る。本発明の薬学的組成物は、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対して特異的な免疫を誘導することができるため、抗血管新生目的に用いることができる。

[0121] 本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドの2種類またはそれ以上の種類の組み合わせを含むこともできる。ペプチドの組み合わせは、ペプチドが混合されたカクテルの形態をとってよく、または標準的な技法を用いてペプチドを互いに結合させてもよい。例えば、ペプチドを化学的に結合させても、または単一の融合ポリペプチド配列として発現させてもよい。本発明のペプチドを投与することによって、該ペプチドはHLA抗原によってAPC上に高密度で提示され、次いで、提示されたペプチドと該HLA抗原との間に形成された複合体に対して特異的に反応するCTLが誘導される。あるいは、対象からAPC（例えば、DC）を取り出し、次に本発明のペプチドにより刺激して、本発明のペプチドのいずれかを自身の細胞表面上に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再度投与して、該対象においてCTLを誘導し、結果として、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する攻撃性を増大させることができる。

[0122] 本発明の薬学的組成物は、細胞性免疫を効率的に確立することが知られているアジュバントもまた含み得る。アジュバントとは、免疫学的活性を有する抗原と共に（または連続して）投与した場合に、該抗原に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントとしては、例えばClin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89等の文献に記載されている公知のものを使用することができる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニ

ウム、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、不完全フロイントアジュバント（IFA）、完全フロイントアジュバント（CFA）、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、水中油型エマルション等が含まれるが、これらに限定されない。アジュバントは、本発明の薬学的組成物を含むキットにおいて、本発明のペプチドを含む薬学的組成物とは別の容器に収容されていてもよい。この場合、該アジュバントと該薬学的組成物は、連続して対象に投与されてもよく、対象への投与直前に混合されてもよい。このような本発明のペプチドを含む薬学的組成物とアジュバントとを含むキットもまた、本発明によって提供される。

[0123] さらに、本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドを封入したリポソーム製剤、直径数マイクロメートルのビーズにペプチドが結合している顆粒製剤、またはペプチドに脂質が結合している製剤であってもよい。

[0124] 本発明の別の態様において、本発明のペプチドはまた、薬学的に許容される塩の形態で投与してもよい。塩の好ましい例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、アミンとの塩、有機酸（酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸など）との塩、および無機酸（塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸など）との塩が含まれる。本明細書で使用される「薬学的に許容される塩」という語句は、その化合物の生物学的な有効性および特性を保持し、かつ、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などの無機酸または無機塩基との反応によって得られるそのような塩を指す。したがって、本発明のペプチドの薬学的に許容される塩を含む薬学的組成物もまた、本発明に包含される。

[0125] いくつかの態様において、本発明の薬学的組成物は、CTLを刺激する成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでCTLを刺激し得る物質として同定された。例えば、パルミチン酸残基をリジン残基の ϵ アミノ基および α アミノ基に付着させ、次に本発明のペプチドに連結させることが

できる。次いで、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子の状態で直接投与するか、リポソーム中に取り込ませて投与するか、またはアジュバント中に乳化させて投与することができる。CTL応答の脂質による刺激の別の例として、適切なペプチドに共有結合している場合、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニル-セリル-セリン (P3CSS) などの大腸菌 (*E. coli*) リポタンパク質を用いてCTLを刺激することができる (例えば、Deres et al., *Nature* 1989, 342: 561-4を参照されたい)。

[0126] 本発明のペプチドまたは薬学的組成物の適切な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹膜、静脈内注射等、および全身投与または標的部位の近傍への局所投与 (すなわち、直接注射) であってよい。中でも一般的な投与方法は、例えば皮下注射である。投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によってブーストすることもできる。本発明のペプチドは、血管新生により媒介される疾患を治療するための薬学的有効量またはVEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫 (より具体的にはCTL) を誘導するための薬学的有効量で、対象に投与することができる。本発明のペプチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調製することができ、これは各本発明のペプチドに関して、通常0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~30mg、例えば0.1mg~10mgであり、例えば0.5mg~5mgであることができる。また、投与間隔は数日~数ヶ月に1度であることができ、例えば週に1回の間隔で投与することができる。当業者は、適切な投与量 (用量) を適宜選択することができる。

[0127] (2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物

本発明の薬学的組成物はまた、本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチドを含み得る。本明細書において、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞に導入された場合に、本発明のペプチドが発現されることを意味する。例示的な態様において、本発明のポリヌクレオチドの配列は、本発明のペプチドの発現に必要な調節エレメントを含む。本発明のポリヌクレオチドには、標的細胞のゲノムへの安定した

挿入が達成されるために必要な配列を備えさせることができる（相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12を参照されたい）。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 米国特許第5,580,859号;第5,589,466号;第5,804,566号;第5,739,118号;第5,736,524号;第5,679,647号;およびW098/04720を参照されたい。DNAに基づく送達技術の例には、「naked DNA」、促進された（ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性）送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性（「遺伝子銃」）または圧力媒介性の送達が含まれる（例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい）。

[0128] ウイルスベクターまたは細菌ベクターによって、本発明のペプチドを発現させることもできる。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。例えば、本発明のペプチドを発現させるためのベクターとして、ワクシニアウイルスを使用することができる。宿主に導入すると、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を誘発する。免疫化プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターはBCG（カルメット・ゲラン桿菌）である。BCGベクターは、Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60に記載されている。治療的な投与または免疫化に有用である多種多様な他のベクター、例えばアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌（*Salmonella typhi*）ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えば、Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Sheddlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85を参照されたい。

[0129] 本発明のポリヌクレオチドの患者内への送達は、直接的であってもよく、この場合には本発明のポリヌクレオチドを保有するベクターに患者を直接曝露することができる。または間接的であってもよく、この場合にはまずインビトロで細胞を本発明のポリヌクレオチドを保有するベクターで形質転換し

、次いで該細胞を患者内に移植する。これら2つのアプローチはそれぞれ、インビボおよびエキスビボの遺伝子治療として公知である。

[0130] 遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505 ; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95 ; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96 ; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32 ; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217 ; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215を参照されたい。

本発明にも用いることのできる、組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993 ; およびKrieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990に記載されている。

[0131] ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与が、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内および／または腹膜注射などによって行われる場合があり、また、全身投与または標的部位近傍への局所投与は使用が見出される。投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によってブーストすることもできる。本発明のポリヌクレオチドは、血管新生により媒介される疾患を治療するための薬学的有効量またはVEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫（より具体的にはCTL）を誘導するための薬学的有効量で、対象に投与することができる。適切な担体中のポリヌクレオチドの用量、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調製することができ、これは通常0.001mg～1000mg、例えば0.01mg～100mg、例えば、0.1mg～30mg、例えば0.1mg～10mg、例えば0.5mg～5mgであることができる。投与間隔は数日に1度～数ヶ月に1度であることができ、例えば週に1回の間隔で投与することができる。当業者は、適切な投与量（用量）を適宜選択することができる。

[0132] X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、APCおよびCTLを誘導

することができる。本発明のエキソソームおよびAPCを用いて、CTLを誘導することもできる。本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、それらのCTL誘導能が阻害されない限り、任意の他の化合物と組み合わせて用いることができる。したがって、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APCおよびエキソソームのいずれかを含有する薬学的組成物を用いて本発明のCTLを誘導することができる。また、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を用いて本発明のAPCを誘導することができる。

[0133] (1) APCを誘導する方法

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

[0134] 本発明の方法は、APCを本発明のペプチドとインビトロ、エキスビボ、またはインビボで接触させる段階を含む。例えば、APCを該ペプチドとエキスビボで接触させる方法は、以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階；および

b：段階aのAPCを本発明のペプチドと接触させる段階。

前記APCは特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られているDC、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞を用いることができる。DCはAPCの中で最も強力なCTL誘導能を有するため、好ましくはDCを用いることができる。本発明の任意のペプチドを単独で、または本発明の他のペプチドと共に用いることができる。また、本発明のペプチドと、他のCTL誘導性ペプチド（例えば、VEGFR1由来のCTL誘導性ペプチドやがん抗原由来のCTL誘導性ペプチド）とを組み合わせることもできる。

[0135] 一方、本発明のペプチドを対象に投与した場合、APCは該ペプチドとインビボで接触し、結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって本発明の方法は、本発明のペプチドを対象に投与する段階を含み得る。同様に、本発明のポリヌクレオチドを発現可能な形態で対象に投与した場合、本発明のペプチドがインビボで発現し、これがAPCとインビボ

で接触し、結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与する段階を含み得る。

[0136] 本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するために、本発明のポリヌクレオチドをAPCに導入する段階を含み得る。例えば、本方法は以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階；および

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

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

[0137] したがって、一態様において、本発明は、以下のaまたはbの段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法を提供する：

a：APCを本発明のペプチドで接触させる段階；

b：本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[0138] また、本発明は、以下のaまたはbの段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを調製する方法を提供する：

a：APCを本発明のペプチドで接触させる段階；

b：本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[0139] 上記の方法は、インビトロ、エキスピボ、またはインビボのいずれでも行うことができるが、インビトロまたはエキスピボで行うことが好ましい。上記方法で使用されるAPCは、誘導されたAPCの投与が予定されている対象に由来するものであってもよいが、異なる対象に由来するものであってもよい。投与が予定されている対象とは異なる対象（ドナー）に由来するAPCを使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、同一である必要がある。本発明の方法において、本発明のペプチドとして配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、いずれもHLA-A11（

より好ましくはHLA-A*1101)であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCは、HLA-A11 (より好ましくはHLA-A*1101)を発現しているAPCであることが好ましい。また、本発明のペプチドとして配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを使用する場合、投与対象者とドナーのHLAは、いずれもHLA-A33 (より好ましくはHLA-A*3303)であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCは、HLA-A33 (より好ましくはHLA-A*3303)を発現しているAPCであることが好ましい。APCは、ドナーから採取された血液から比重遠心分離法等によりPBMCを分離した後、該PBMCから公知の方法を用いて調製することができる。

[0140] 別の態様において、本発明はまた本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための薬学的組成物を提供する。

[0141] あるいは、本発明はさらに、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための薬学的組成物の製造における、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。

[0142] あるいは、本発明はさらに、CTL誘導能を有するAPCの誘導において用いるための、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

[0143] あるいは、本発明はさらに、APCを誘導するための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

[0144] 別の態様において、本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する。

本発明の方法によって誘導されたAPCは、VEGFR2に特異的なCTL (すなわち

本発明のCTL)を誘導することができる。

[0145] (2) CTLを誘導する方法

本発明はまた、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、またはAPCを用いてCTLを誘導する方法を提供する。本発明はまた、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識し得るT細胞受容体(TCR)を形成し得るポリペプチド(すなわち、TCRサブユニット)をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを使用してCTLを誘導する方法を提供する。好ましくは、CTLを誘導する方法は、以下の中より選択される少なくとも1つの段階を含む:

- a. CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する抗原提示細胞と接触させる段階;
- b. CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと接触させる段階;および
- c. 本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識することができるTCRを形成し得るポリペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。

[0146] 本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、またはAPCを対象に投与すると、該対象の体内でCTLが誘導され、VEGFR2を発現する血管内皮細胞を標的とする免疫応答の強度が増強される。したがって本発明の方法は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、またはエキソソームを対象に投与する段階を含み得る。

[0147] あるいは、それらをインビトロまたはエキスビボで用いることによってCTLを誘導することもできる。例えば、本発明の方法は以下の段階を含み得る:

- a. 対象からAPCを回収する段階、
- b. 段階aのAPCを本発明のペプチドと接触させる段階、および
- c. 段階bのAPCをCD8陽性T細胞と共培養する段階。

誘導されたCTLは、その後対象に戻してもよい。

[0148] 上記の段階cにおいてCD8陽性T細胞と共培養するAPCは、「V I. 抗原提示細胞(APC)」の章に上述したように、本発明のペプチドをコードするポリヌ

クレオチドをAPCに導入することによって調製することもできる。しかしながら、本発明の方法で用いられるAPCはこれに限定されず、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する任意のAPCを用いることができる。

[0149] 本発明の方法では、そのようなAPCの代わりに、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを用いることもできる。すなわち、本発明の方法は、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームとを共培養する段階を含み得る。そのようなエキソソームは、「V. エキソソーム」の章に上述した方法によって調製することができる。

[0150] さらに、細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターをCD8陽性T細胞に導入することによって、CTLを誘導することもできる。そのような形質導入は、「V. T細胞受容体 (TCR)」の章に上述したように行うことができる。

[0151] したがって、一態様において、本発明は、以下の中より選択される段階を含む、CTLを誘導する方法を提供する：

a : CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階；

b : CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

c : 細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを、CD8陽性T細胞に導入する段階。

[0152] 上記の方法は、インビトロ、エキスピボ、またはインビボのいずれでも行うことができるが、インビトロまたはエキスピボで行うことが好ましい。上記方法で使用されるAPCもしくはエキソソーム、およびCD8陽性T細胞は、誘導されたCTLの投与が予定されている対象に由来するものであってもよいが、異

なる対象に由来するものであってもよい。投与が予定されている対象とは異なる対象（ドナー）に由来するAPCもしくはエキソソーム、およびCD8陽性T細胞を使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、同一である必要がある。例えば、本発明のペプチドとして配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを用いる場合、投与対象者とドナーのHLA型は、いずれもHLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCまたはエキソソームは、HLA-A11（より好ましくはHLA-A*1101）と本発明のペプチド（配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチド）との複合体を自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームであることが好ましい。この場合、誘導されたCTLは、HLA-A11と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞（例えば、VEGFR2を発現するHLA-A11陽性細胞）に対して、特異的な細胞傷害活性を示す。また、本発明のペプチドとして配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを用いる場合、投与対象者とドナーのHLAは、いずれもHLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCまたはエキソソームは、HLA-A33（より好ましくはHLA-A*3303）と本発明のペプチド（配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチド）との複合体を自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームであることが好ましい。この場合、誘導されたCTLは、HLA-A33と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞（例えば、VEGFR2を発現するHLA-A33陽性細胞）に対して、特異的な細胞傷害活性を示す。

[0153] 別の態様において、本発明はまた、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分を含む、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物を提供する：

(a) 本発明のペプチド；

- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム。

[0154] 別の態様において、本発明はまた、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム。

[0155] あるいは、本発明はさらに、CTLの誘導において用いるための、以下の中より選択される有効成分を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム。

[0156] あるいは、本発明はさらに、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分と、薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム。

[0157] 別の態様において、本発明はまた、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム。

[0158] X I. 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、VEGFR2に関連する疾患に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。適切な疾患は、血管新生により媒介される疾患であり、これには各種がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症：加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデレミア、脈絡膜骨腫など）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化などが含まれるが、これらに限定されない。

[0159] 本発明はまた、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。VEGFR2は、上記のような血管新生により媒介される疾患において、疾患部位の血管内皮細胞で強発現していることが認められる。そのため、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答が誘導されると、その結果として、疾患部位における血管新生が阻害される。したがって、本発明はまた、血管新生により媒介される疾患の疾患部位において、血管新生を阻害する方法も提供する。

[0160] 本発明の方法は、本発明のペプチドのいずれかまたはそれらをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を投与する段階を含み得る。本発明の方法はまた、本発明のペプチドのいずれかを提示するエキソソームまたはAPCの投与を企図する。詳細については、「IX. 薬学的な剤または組成物」の項、特に本発明の薬学的組成物のワクチンとしての使用について記載している部分を参照されたい。加えて、免疫応答を誘導するために本発明の方法に使用することができるエキソソームおよびAPCは、前記の「V. エキソソーム」、「VI. 抗原提示細胞（APC）」、ならびに「X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法」の（1）および（2）の項において詳述されてい

る。

[0161] 別の態様において、本発明はまた、血管新生により媒介される疾患の疾患部位に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンであって、以下の中より選択される有効成分を含む、薬学的組成物またはワクチンを提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0162] あるいは、本発明はさらに、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンであって、以下の中より選択される有効成分を含む、薬学的組成物またはワクチンを提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0163] あるいは、本発明はさらに、血管新生により媒介される疾患の疾患部位において、血管新生を阻害するための薬学的組成物またはワクチンであって、以下の中より選択される有効成分を含む、薬学的組成物またはワクチンを提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0164] 別の態様において、本発明はまた、血管新生により媒介される疾患の疾患

部位に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンの製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表目状に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0165] あるいは、本発明はさらに、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンの製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0166] あるいは、本発明はさらに、血管新生により媒介される疾患の疾患部位において、血管新生を阻害するための薬学的組成物またはワクチンの製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0167] 本発明はまた、免疫応答を誘導する薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを薬学的に許容される担体と共に混合または製剤化する段階を含み得る方法を提供する。

[0168] あるいは、本発明は、以下の中より選択される有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を対象に投与する段階を含む、血管新生により媒介される

疾患の疾患部位において血管新生を阻害するための方法、または血管新生により媒介される疾患の疾患部位に対する免疫応答を誘導する方法を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0169] 本発明との関連において、本発明のペプチド、ポリペプチド、APC、エクソソームおよび／またはCTLを投与することにより、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患を治療することができる。あるいは、本発明のペプチド、ポリペプチド、APC、エクソソームおよび／またはCTLを投与することにより、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患の疾患部位に対する免疫応答を誘導することができる。そのような疾患の例には、各種がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症：加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデミア、脈絡膜骨腫など）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化などが含まれるが、これらに限定されない。また、本発明の本発明のペプチド、ポリペプチド、APC、エクソソームおよび／またはCTLを投与することにより、VEGFR2を発現する血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導することができる。したがって、上記の有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する前に、治療する対象の疾患部位におけるVEGFR2の発現レベルが増強されているかどうかを確認することが好ましい。

[0170] したがって一態様において、本発明は、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患の治療を必要とする患者において該疾患を治療する方法を提供し、そのような方法は以下の段階を含む：

- i) 治療すべき疾患を有する対象の疾患部位から得られた生体試料中のVEGFR

2の発現レベルを測定する段階；

i i) VEGFR2の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

i i i) 上記の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの成分を、正常対照と比較してVEGFR2を過剰発現する疾患を有する対象に投与する段階。

[0171] あるいは、本発明はまた、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患を有する対象に投与するための、上記の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を提供する。本発明はさらに、上記の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分で治療する対象を同定する方法であって、対象由来の生体試料中のVEGFR2の発現レベルを測定する段階を含み、該レベルが正常対照レベルと比較して上昇していることにより、該対象が上記の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分で治療され得る対象であると同定される方法を提供する。生体試料中のVEGFR2発現は公知の方法で測定することができ、例えば、VEGFR2遺伝子の転写産物をプローブやPCR法により検出する方法（例えば、cDNAマイクロアレイ法、ノーザンブロット法、RT-PCR法など）、VEGFR2遺伝子の翻訳産物を抗体により検出する方法（例えば、ウェスタンブロット法、免疫染色法など）等を用いることができる。

[0172] VEGFR2を過剰発現する細胞におけるVEGFR2遺伝子の発現レベルは、そのレベルが、対照レベル（例えば、正常な細胞におけるレベル）から、例えば、10%、25%もしくは50%上昇するか、または、1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超もしくはそれ以上に上昇する場合には上昇していると判定され得る。

[0173] 対照レベルは、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患の状態（当該疾患を有するまたは有しない）が判明している対象から予め採取し保存しておいた試料を用いることにより決定することができる。加えて、治療すべき疾患を有する器官の治療を要しない領域から得られた正常細胞を、正常対照として用いてもよい。あるいは、対照レベルは、疾患の状態が判明

している対象に由来する試料におけるVEGFR2遺伝子の予め決定された発現レベルを解析することによって得られた結果に基づいて統計学的方法によって決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験された細胞に由来する発現パターンのデータベースに由来し得る。さらに、本発明の1つの局面によれば、生体試料におけるVEGFR2遺伝子の発現レベルを、複数の参照試料から決定された複数の対照レベルと比較してもよい。対象由来の生体試料の組織型と類似の組織型に由来する参照試料から決定された対照レベルを用いることが好ましい。さらに、疾患状態が判明している集団におけるVEGFR2遺伝子の発現レベルの基準値を用いることが好ましい。基準値は、当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。例えば、平均値 $\pm 2S.D.$ または平均値 $\pm 3S.D.$ の範囲を、基準値として用いることができる。

[0174] 対象由来の生体試料の発現レベルと対照レベルとの差を、その発現レベルが、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患の状態に応じて異なることが判明している対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して正規化することができる。例示的な対照遺伝子には、 β -アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素、およびリボソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

[0175] 好ましい態様では、上記の (a) ~ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を投与する前に、対象のHLA型を確認することが好ましい。例えば、配列番号：1~5、9、15、26、27および39~45の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分の投与対象としては、HLA-A11陽性対象を選択することが好ましい。また、配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分の投与対象としては、HLA-A33陽性対象を選択することが好ましい。

[0176] 本発明はまた、本発明のペプチドとHLAとの複合体を提供する。前記本発明の複合体は、単量体であっても多量体であってもよい。本発明の複合体が多量体である場合、重合数は特に限定されず、任意の重合数の多量体であるこ

とができる。例としては、四量体、五量体、六量体等が挙げられるが、これらに限定されない。また、デキストラマー（W02002/072631）、ストレプトマー（Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.）もまた本発明の多量体に包含される。本発明のペプチドとHLAとの複合体は、公知の方法に従って調製することができる（例えば、Altman JD et al., Science.1996,274(5284):94-6、W02002/072631、W02009/003492、Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7等）。本発明の複合体は、例えば、本発明のペプチドに特異的なCTLの定量に用いることができる。例えば、本発明の薬学的組成物を投与した対象から血液試料を採取し、PBMCを分離した後CD4陰性細胞を調製し、蛍光色素を結合させた本発明の複合体と該CD4陰性細胞とを接触させる。その後、フローサイトメトリーで解析することにより、本発明のペプチドに特異的なCTLの割合を測定することができる。例えば、本発明の薬学的組成物の投与前、投与中、および／または投与後に、本発明のペプチドに特異的なCTLを測定することにより、本発明の薬学的組成物による免疫応答誘導効果をモニタリングすることができる。

[0177] X I I. 抗体

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は本発明のペプチドに特異的に結合し、本発明のペプチドではないものには結合しない（または弱く結合する）。別の態様において、そのような抗体は、HLA分子との関連でペプチドを認識する抗体、すなわちペプチド-MHC複合体に結合する抗体を含み得る。抗体の結合特異性は、阻害試験で確認することができる。すなわち、分析する抗体と全長VEGFR2ポリペプチドとの間の結合が、本発明のペプチドの存在下で阻害される場合、この抗体が本発明のペプチドに特異的に結合することが示される。本発明のペプチドに対する抗体は、疾患の診断および予後診断のアッセイ、ならびに本発明の薬学的組成物の投与対象の選択および本発明の薬学的組成物のモニタリングにおいて使用され得る。

[0178] 本発明はまた、本発明のペプチドもしくはその断片を検出および／または

定量するための様々な免疫学的アッセイ法を提供する。そのような免疫学的アッセイ法は、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフ法、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光測定法（ELIFA）等を含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の様々な免疫学的アッセイ形式の範囲内で行われる。

[0179] 本発明の抗体は、VEGFR2を発現する疾患を検出し得る免疫学的画像化法に用いることができ、その例には、本発明の標識抗体を使用する放射性シンチグラフィ画像化法が含まれるが、これに限定されない。そのようなアッセイ法は、VEGFR2を発現する疾患の検出、モニタリング、および予後診断において臨床的に使用され、そのような疾患の例には、各種がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症：加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデミア、脈絡膜骨腫など）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化などが含まれるが、これらに限定されない。

[0180] 本発明の抗体は、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で用いることができ、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することにより得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えにより作製されたヒト化抗体をさらに含み得る。

[0181] 抗体を得るための抗原として用いられる本発明のペプチドもしくはその断片は、本明細書に開示するアミノ酸配列に基づいて、化学合成により、または遺伝子工学的手法により得ることができる。

[0182] 免疫抗原として用いられるペプチドは、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドの断片であってよい。また、免疫原性を高めるために、ペプチドを担体と結合または連結させてもよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）が周知である。KLHとペプチドを結合する方法もまた、当技術分野において周知である。

[0183] 任意の哺乳動物を前記抗原で免疫することができるが、細胞融合に用いられる親細胞との適合性を考慮に入れることが好ましい。一般に、齧歯目 (Rodentia)、ウサギ目 (Lagomorpha)、または霊長目 (Primate) の動物を使用することができる。齧歯目科の動物には、例えばマウス、ラット、およびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目科の動物には、例えばカニクイザル (*Macaca fascicularis*)、アカゲザル、マントヒヒ、およびチンパンジーなどの狭鼻下目 (Catarrhini) (旧世界ザル) のサルが含まれる。

[0184] 動物を抗原で免疫する方法は、当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物を免疫するための標準的な方法である。より具体的には、抗原を適量のリン酸緩衝食塩水 (PBS)、生理食塩水等で希釈し、懸濁させる。必要に応じて、抗原懸濁液を、フロイント完全アジュバントなどの適量の標準的アジュバントと混合し、乳化した後、哺乳動物に投与することができる。その後、適量のアジュバントと混合した抗原を、4〜21日ごとに数回投与することが好ましい。免疫化には、適切な担体を用いてもよい。上記のように免疫した後、血清を、所望の抗体の量の増加に関して標準的方法で調べることができる。

[0185] 本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望の抗体の増加に関して調べた免疫後の哺乳動物から血液を回収し、任意の従来法により血液から血清を分離することによって、調製することができる。ポリクローナル抗体はポリクローナル抗体を含む血清を含んでよく、またポリクローナル抗体を含む画分を該血清から単離してもよい。免疫グロブリンGまたはMは、本発明のペプチドのみを認識する画分から、例えば、本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた上で、この画分をプロテインAまたはプロテインGカラムを用いてさらに精製して、調製することができる。

[0186] モノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を回収し、上記のように血清中の所望の抗体のレベル上昇について確かめた上で、細胞融合に供する。細胞融合に用いる免疫細胞は、好ましくは脾臓

から得ることができる。上記の免疫細胞と融合させるもう一方の好ましい親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髓腫細胞、およびより好ましくは薬物による融合細胞の選択のための特性を獲得した骨髓腫細胞が含まれる。

[0187] 公知の方法、例えば、Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)) の方法に従って、上記の免疫細胞と骨髓腫細胞を融合させることができる。

[0188] 細胞融合によって結果として得られたハイブリドーマは、それらをHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地中で培養することによって選択することができる。細胞培養は典型的に、HAT培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な期間である数日間から数週間にわたって継続する。その後、標準的な限界希釈を行い、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングおよびクローニングすることができる。

[0189] ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したリンパ球などのヒトリンパ球を、ペプチド、ペプチドを発現している細胞、またはそれらの溶解物でインビトロにおいて免疫することもできる。次いで、免疫後のリンパ球を、U266などの無限に分裂可能なヒト由来骨髓腫細胞と融合させて、該ペプチドに結合し得る所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる（特開昭63-17688号）。

[0190] 続いて、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のペプチドを結合させたアフィニティークラムにより精製することができる。

[0191] あるいは、免疫したリンパ球などの、抗体を産生する免疫細胞を癌遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体の調製に用いることもできる。

[0192] このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を用いて組換えにより調製することもできる（例えば、MacMillan Publishers LTD (1990)により英国で刊行された、Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodiesを参照されたい）。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫化リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製された組換え抗体を提供する。

[0193] さらに、本発明の抗体は、本発明のペプチドに結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、抗体の抗原結合部位を含むことが望ましい。具体的には、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv (scFv) であってよい (Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。より具体的には、抗体断片は、抗体をパパインまたはペプシンなどの酵素で処理することにより作製することができる。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞内で発現させることができる（例えば、Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい）。

[0194] 抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) などの様々な分子との結合によって修飾することができる。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で慣例的である。

[0195] あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体に由来する

相補性決定領域（CDR）と、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域（FR）および定常領域とを含むヒト化抗体として得ることもできる。そのような抗体は、公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、齧歯類のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することによって行うことができる（例えば、Verhoeyen et al., Science 239:1534-6 (1988)を参照されたい）。したがって、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全には満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されたキメラ抗体である。

[0196] ヒトのフレームワーク領域および定常領域に加えて、ヒト可変領域をも含む完全なヒト抗体を用いることもできる。そのような抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を用いて作製することができる。例えば、インビトロの方法には、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用が含まれる（例えば、Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991)）。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することもできる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号、第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号に記載されている。

[0197] 上記のようにして得られた抗体は、均一になるまで精製してもよい。例えば、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って、抗体の分離および精製を行うことができる。例えば、これらに限定されないが、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、および等電点電気泳動の使用を適切に選択しかつ組み合わせることにより、抗体を分離および単離することができる（Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)）。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティークラムとして

使用することができる。用いられるべき例示的なプロテインAカラムには、例えば、Hyper D、POROS、およびSepharose F. F. (Pharmacia) が含まれる。

[0198] 例示的なクロマトグラフィーには、アフィニティークロマトグラフィー以外に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィー手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うことができる。

[0199] 例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、および／または免疫蛍光法を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAの場合、本発明の抗体をプレート上に固定化し、本発明のペプチドを該プレートに添加し、次に抗体産生細胞の培養上清または精製抗体といった所望の抗体を含む試料を添加する。次いで、一次抗体を認識し、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を該プレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。抗体の結合活性を評価するために、C末端またはN末端断片などのペプチドの断片を抗原として用いてもよい。本発明の抗体の活性を評価するために、BIAcore (Pharmacia) を用いてもよい。

[0200] 本発明の抗体を本発明のペプチドを含むと考えられる試料に対して曝露し、該抗体と該ペプチドとによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、上記の方法によって本発明のペプチドの検出または測定が可能になる。本発明によるペプチドを検出または測定する方法はペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法は、該ペプチドを使用する種々の実験において使用され得る。

例えば、本発明の抗体は、対象の血液試料（例えば血清試料）中に存在す

る本発明のペプチドを検出するために用いることもできる。あるいは、逆に、対象の血液試料（例えば血清試料）中に存在する本発明の抗体を、本発明のペプチドを用いて検出することもできる。対象の血液試料中において本発明のペプチドまたは本発明の抗体を測定した結果は、本発明の薬学的組成物の投与対象の選択、または本発明の薬学的組成物の効果のモニタリングに役立てることができる。

[0201] XIII. ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターおよび該ベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターは、宿主細胞中に本発明のポリヌクレオチドを保持するため、宿主細胞に本発明のペプチドを発現させるため、または遺伝子治療用に本発明のポリヌクレオチドを投与するために使用され得る。

[0202] 大腸菌が宿主細胞であり、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1Blue）内で増幅して大量に生成する場合、ベクターは、大腸菌内で増幅するための「複製起点」と、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の薬物によって選択される薬物耐性遺伝子）とを有する必要がある。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script等を用いることができる。加えて、pGEM-T、pDIRECT、およびpT7もまた上記のベクターと同様にクローニングのために用いることができる。ベクターを本発明のペプチドの産生に用いる場合には、発現ベクターが使用され得る。例えば、大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1 Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現し得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989) ; FASEB J 6: 2422-7 (1989)）、araBプロモーター（Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)）、T7プロモーター等を有する必要がある。この点に関して、例えば、pGEX-

5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpressシステム」(Qiagen)、pEGFP、およびpET (この場合、宿主は好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である)を上記のベクターの代わりに用いることができる。さらにベクターは、ペプチド分泌のためのシグナル配列を含んでもよい。ペプチドを大腸菌のペリプラズムに分泌させる例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列 (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987)) である。ベクターを標的宿主細胞に導入する手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

[0203] 大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (Invitrogen)、およびpEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990))、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えば、pMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIpneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「ピキア (Pichia) 発現キット」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)、および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) を、本発明のポリペプチドの産生に使用することができる。

[0204] ベクターをCHO、COS、またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターはこのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979))、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (1990))、CMVプロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子 (例えば、薬物 (例えば、ネオマイシン、G418) によって選択される薬物耐性遺伝子) を有する必要がある。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。

[0205] 上記説明本発明の態様を以下に例示するが、本発明はこれらに限定されな

い。

[1] 以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞障害性T細胞 (CTL) 誘導能を有する15アミノ酸未満のペプチド：

(a) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列；および

(b) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列。

[2] 配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45からなる群より選択されるアミノ酸配列において、以下の (a) ～ (d) から選択される1以上の置換を有する、[1]記載のペプチド：

(a) N末端から2番目のアミノ酸が、スレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；

(b) N末端から3番目のアミノ酸が、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンおよびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；

(c) N末端から7番目のアミノ酸が、ロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および

(d) C末端のアミノ酸が、アルギニンに置換されている。

[3] 配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列において、以下の (a) ～ (c) から選択される1以上の置換を有する、[1]記載のペプチド：

(a) N末端から1番目のアミノ酸が、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；

(b) N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、アラニン

、イソロイシン、ロイシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および

(c) C末端のアミノ酸が、アルギニンおよびリジンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。

[4] 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、[1]記載のペプチド。

[5] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

[6] 薬学的に許容される担体と、以下の(a)～(e)からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[7] CTLを誘導するための組成物であって、以下の(a)～(d)からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む、[6]記載の組成物：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；および

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム。

[8] 薬学的組成物である、[6]記載の組成物。

[9] (i) 血管新生により媒介される疾患の治療、(ii) 血管新生により媒介される疾患の予防、および(iii) 血管新生により媒介される疾患の術後の再発の予防からなる群より選択される1以上の用途のための薬学的組成物である、[8]記載の組成物。

[10] 血管新生により媒介される疾患の疾患部位において、血管新生を阻害するための薬学的組成物である、[8]記載の組成物。

[11] 血管新生により媒介される疾患が、がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化である、[9]または[10]記載の組成物。

[12] 脈絡膜における血管新生に関連する疾患が、加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデミア、脈絡膜骨腫である、[11]記載の組成物。

[13] がんの増殖または転移を抑制するために使用される、[11]記載の組成物。

[14] HLA-A11陽性またはHLA-A33陽性である対象への投与のために製剤化される、[6]～[13]のいずれか一項記載の組成物。

[15] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法：

(a) APCを、[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エキスビボ、またはインビボで接触させる段階、および

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[16] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTLを誘導する方法：

(a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、

(b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドと

の複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、および
(c) 細胞表面上にHLA抗原により提示された[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドに結合し得るT細胞受容体(TCR)の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。

[17] HLA抗原と[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPC。

[18] [15]記載の方法によって誘導される、17記載のAPC。

[19] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[20] [16]記載の方法によって誘導される、19記載のCTL。

[21] 以下の(a)～(e)からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、血管新生により媒介される疾患の疾患部位における血管新生を阻害する方法：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞(APC)；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[22] 以下の(a)～(e)からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、血管新生により媒介される疾患を治療および／もしくは予防する、ならびに／または術後のその再発を予防する方法：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の

細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[23] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドに結合する抗体。

[24] CTL誘導能を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列からなる元のアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる候補配列を作成する段階；

(b) (a) で作成した候補配列の中からVEGFR2以外のいかなる公知のヒト遺伝子産物とも有意な相同性（配列同一性）を有さない候補配列を選択する段階；

(c) (b) で選択した候補配列からなるペプチドと、APCとを接触させる段階；

(d) (c) のAPCとCD8陽性T細胞とを接触させる段階；および

(e) 元のアミノ酸配列からなるペプチドよりも同等かまたはより高いCTL誘導能を有するペプチドを選択する段階。

[25] 血管新生により媒介される疾患の疾患部位における血管新生を阻害するための組成物の製造における、以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の

細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[26] 血管新生により媒介される疾患の治療および／もしくは予防、ならびに／または術後のその再発の予防のための薬学的組成物の製造における、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[27] 血管新生により媒介される疾患の疾患部位における血管新生を阻害するための、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[28] 血管新生により媒介される疾患を治療および／もしくは予防する、ならびに／または術後のその再発を予防するための、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[29] 以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、VEGFR2を発現する細胞に対する細胞傷害活性を誘導する方法：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[0206] 本発明をその特定の態様に関して本明細書において詳細に説明してきたが、前述の説明は事実上、例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。当業者は、慣例的な実験を通して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な変更および修正がその中でなされ得ることを容易に理解するであろう。したがって本発明は、上記の説明によって規定されるのではなく、添付の特許請求の範囲およびそれらの等価物によって規定されることが意図される。

[0207] 以下、実施例を参照して本発明をより詳細に記載する。しかしながら、以

下の材料、方法および実施例は、本発明のある形態の作製および使用において当業者を支援するために役立ち得る一方、本発明の局面を説明するためのものにすぎず、したがって本発明の範囲を決して限定することを意図しない。当業者は、本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0208] 材料および方法

細胞株

HLA-AおよびHLA-B陰性ヒトBリンパ芽球様細胞株であるC1R、ならびにアフリカミドリザル腎細胞株であるCOS7は、ATCCから購入した。

[0209] HLA-A*1101またはHLA-A*3303を安定的に発現する刺激細胞の作成

HLA-A*1101またはHLA-A*3303を安定的に発現するC1R（C1R-A11およびC1R-A33）は、刺激細胞として使用された。HLA-A*1101またはHLA-A*3303のオープンリーディングフレームをコードするcDNAはPCRで増幅され、発現ベクターへクローニングされた。C1R細胞はNeonトランスフェクションシステム（Invitrogen）を用いて上記発現ベクターで形質転換され、その後、G418（Invitrogen）を用いて2週間選択された。G418選択細胞はG418が添加された培養培地を含む96ウェルプレートのウェルへ蒔かれた。外来性HLA-A*1101またはHLA-A*3303のC1R細胞における発現はフローサイトメトリー解析で確認された。

[0210] VEGFR2由来のペプチドの候補選択

HLA-A*1101分子またはHLA-A*3303分子に結合するVEGFR2由来の9merおよび10merのペプチドを、結合予測ソフトウェア「NetMHC」（www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/）（Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5):378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12(5):1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12;20(9):1388-97）を用いて予測した。

[0211] 表1および表2は、VEGFR2のHLA-A11結合性9merペプチドおよび10merペプチ

ドを、結合親和性の高い順に示す。潜在的なHLA-A11結合能を有する合計86種類のペプチドを選択した。

[0212]

[表1]

VEGFR2に由来するHLA-A11結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
319	STFVRVHEK	7	1
863	RTVAVKMLK	9	2
521	AANVSALYK	11	3
973	ASSGFVEEK	13	4
309	ASSGLMTKK	15	5
160	SLCARYPEK	18	6
398	VILTNPISK	19	7
1262	MVLASEELK	23	8
860	ATCRTVAVK	25	9
1320	SSEEAECLK	36	10
279	TQSGSEMCK	36	11
308	AASSGLMTK	38	12
541	RVISFHVTR	45	13
278	KTQSGSEMK	46	14
134	GVVYITENK	47	15
1043	KICDFGLAR	53	16
912	LMVIVEFCK	61	17
400	LTNPISKEK	69	18
576	STFENLTWY	75	19
1220	ISQYLQNSK	83	20
577	TFENLTWYK	98	21
782	LVILRTVK	116	22
1015	GMEFLASRK	132	23
446	TVYAIPPPH	153	24
1102	GASPYPGVK	154	25
195	AGMVFCEAK	163	26
502	NQFALIEGK	186	27
94	IGNDTGAYK	348	28
233	GIELSVGEK	426	29
640	YVCLAQDRK	432	30
186	TIPSYMISY	472	31
1062	KGDARLPLK	538	32
1000	LTLEHLICY	610	33
1221	SQYLQNSKR	656	34
383	LTIMEVSER	719	35
783	VIILRTVKR	739	36
567	VSLWCTADR	786	37
418	YVPPQIGEK	847	38
1281	SFGGMVPSK	855	39

開始位置はVEGFR2のN末端からのアミノ酸残基数を示す。
 解離定数[Kd (nM)]は「NetMHC3.2」に由来する。

[0213] [表2]

VEGFR2に由来するHLA-A11結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID
576	STFENLTWYK	5	40
397	TVILTNPISK	10	41
308	AASSGLMTKK	15	42
159	VSLCARYPEK	16	43
278	KTQSGSEMCK	17	44
972	SASSGFVEEK	19	45
520	QAANVSALYK	20	46
307	CAASSGLMTK	34	47
1005	LICYSFQVAK	35	48
1319	YSSEEAECLK	37	49
526	ALYKCEAVNK	47	50
290	STLTIDGVTR	51	51
1219	GISQYLQNSK	64	52
35	SIQKDILTIK	64	53
898	VVNLLGACTK	66	54
93	VIGNDTGAYK	71	55
185	FTIPSYMISY	82	56
1261	GMVLASEELK	83	57
135	VVYTENKNK	84	58
318	NSTFVRVHEK	87	59
1030	AARNILLSEK	99	60
487	SVEDFQGGNK	131	61
1221	SQYLQNSKRK	145	62
1034	ILLSEKNVVK	164	63
112	SVIYVYVQDY	169	64
738	QACSVLGCAK	170	65
399	ILTNPISKEK	175	66
707	LVEDSGIVLK	193	67
566	SVSLWCTADR	196	68
859	TATCRTVAVK	201	69
113	VIYVYVQDYR	261	70
911	PLMVIVEFCK	270	71
575	RSTFENLTWY	285	72
83	LFCKTLTIK	296	73
1280	PSFGGMVPSK	301	74
128	SVSDQHGVVY	310	75
314	MTKKNSTFVR	368	76
782	LVILRTVKR	368	77
428	LISPVDSYQY	394	78
951	YVGAIPVDLK	409	79
194	YAGMVFCEAK	463	80
781	LLVILRTVK	466	81
439	TTQTLTCTVY	480	82
97	DTGAYKCFYR	502	83
160	SLCARYPEKR	606	84
354	YLGYPPEIK	731	85
212	IMYIVVVVGY	818	86

開始位置はVEGFR2のN末端からのアミノ酸残基数を示す。
 解離定数[Kd (nM)]は「NetMHC3.2」に由来する。

[0214] 表3および表4は、VEGFR2のHLA-A33結合性9merペプチドおよび10merペプチドを、結合親和性の高い順に示す。潜在的なHLA-A33結合能を有する合計51種類のペプチドを選択した。

[0215]

[表3]

VEGFR2に由来するHLA-A33結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID
823	DASKWEFPR	27.41	87
541	RVISFHVTR	28.31	13
98	TGAYKCFYR	53.61	88
114	IYVYVQDYR	71.79	89
214	YIVVVVGYR	84.45	90
924	LSTYLRSKR	95.12	91
156	NLNVSLCAR	146.63	92
267	HQHKKLVNR	148.23	93
1024	CIHRDLAAR	154.78	94
383	LTIMEVSER	180.1	35
319	STFVRVHEK	194.27	1
46	NTTLQITCR	211.83	95
1072	MAPETIFDR	211.83	96
783	VILRTVKR	218.82	36
577	TFENLTWYK	265.87	21
1019	LASRKC IHR	302.73	97
1053	IYKDPDYVR	316.12	98
921	FGNLSTYLR	384.09	99
779	WLLLVILR	423.37	100
1014	KGMEFLASR	625.01	101
1142	CWHGEPSQR	638.68	102
1043	KICDFGLAR	883.6	16
567	VSLWCTADR	912.75	37
1118	RLKEGTRMR	995.27	103

開始位置はVEGFR2のN末端からのアミノ酸残基数を示す。

解離定数[Kd (nM)]は「NetMHC3.2」に由来する。

[0216] [表4]

VEGFR2に由来するHLA-A33結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID
213	MYIVVVVGYR	14.79	104
314	MTKKNSTFVR	16.13	76
97	DTGAYKCFYR	23.05	83
576	STFENLTWYK	87.23	40
782	LVILRTVKR	105.99	77
923	NLSTYLRSKR	130.18	105
113	VIYVYVQDYR	134.47	70
648	KTKKRHCVVR	146.63	106
1052	DIYKDPDYVR	176.24	107
290	STLTIDGVTR	186.04	51
566	SVSLWCTADR	207.3	68
1018	FLASRKCIHR	226.04	108
160	SLCARYPEKR	418.82	84
920	KFGNLSTYLR	442.1	109
655	VVRQLTVLER	482.07	110
257	DFNWEYPSSK	487.32	111
1220	ISQYLQNSKR	520	112
778	FWLLLVILR	520	113
1046	DFGLARDIYK	531.38	114
155	SNLNVSLCAR	573.19	115
1071	WMAPETIFDR	579.42	116
48	TLQITCRGQR	704.01	117
318	NSTFVRVHEK	727.23	59
9	VALWLCVETR	727.23	118
935	FVPYKTKGAR	776.01	119
532	AVNKVGRGER	837.07	120
643	LAQDRKTKKR	912.75	121

開始位置はVEGFR2のN末端からのアミノ酸残基数を示す。
 解離定数[Kd (nM)]は「NetMHC3.2」に由来する。

[0217] ペプチドの合成

これらのペプチドは、標準的な固相合成法に従って合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって精製した。該ペプチドの純度（>90%）および同一性は、それぞれ分析用HPLCおよび質量分析によって測定した。ペプチドはジメチルスルホキシド（DMSO）に20mg/mlで溶解し、-80℃で保存した。

[0218] インビトロでのCTL誘導

単球由来の樹状細胞（DC）を抗原提示細胞として使用し、ヒト白血球抗原（HLA）上に提示されたペプチドに対する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答を誘導した。他所に記載されているように、DCはインビトロで作製した（Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14):4112-8）。具体的には、Ficoll-Paque plus（Pharmacia）溶液によって健常なボランティア（HLA-A*1101またはHLA-A*3303陽性）から単離した末梢血単核細胞を、プラスチック製の組織培養ディッシュ（Becton Dickinson）へ付着させることによって分離し、それらを単球画分として濃縮した。2%の加熱不活化した自己血清（AS）を含むAIM-V培地（Invitrogen）中、1000 IU/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（R&D System）および1000 IU/mlのインターロイキン（IL）-4（R&D System）の存在下で、単球が濃縮された集団を培養した。7日間の培養後、サイトカインで誘導したDCに、AIM-V培地中に37℃で3時間、3 μg/mlのβ2-ミクログロブリンの存在下で20 μg/mlの各合成ペプチドをパルスした。作製された細胞は、自身の細胞表面上にCD80、CD83、CD86、およびHLA class IIなどのDC関連分子を発現しているようであった（データは示さず）。次いで、ペプチドパルスしたこれらのDCをX線照射（20Gy）によって不活化し、CD8 Positive Isolation Kit（Dyna1）を用いた陽性選択によって得られた自己CD8⁺T細胞と1：20の比率で混合した。これらの培養物を48ウェルプレート（Corning）中に播種した。各ウェルは、0.5mlのAIM-V/2%AS培地中に、1.5 × 10⁴個のペプチドパルスしたDC、3 × 10⁵個のCD8⁺T細胞および10ng/mlのIL-7（R&D System）を含むようにした。3日後、これらの培養物に、IL-2（CHIRON）を最終濃度20IU

/mlまで添加した。7日目および14日目に、ペプチドパルスした自己DCでT細胞をさらに刺激した。DCは上記と同一の方法によって毎回調製した。21日目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたC1R-A11またはA33細胞に対してCTLを試験した (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1): 94-9; Um ano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

[0219] CTLの増殖

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

[0220] CTLクローンの樹立

96丸底マイクロタイタープレート (Nalge Nunc International) においてCTL 0.3個、1個、および3個/ウェルとなるように、希釈を行った。CTLを、 1×10^4 個細胞/ウェルの2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株、30ng/mlの抗CD3抗体、および125IU/mlのIL-2とともに、合計150 μ l/ウェルの5%AS含有AIM-V培地中で培養した。10日後、50 μ l/ウェルのIL-2を、IL-2の最終濃度が125IU/mlに達するように該培地に添加した。14日目にCTL活性を試験し、上記と同一の方法を使用してCTLクローンを増殖させた (Uchida N et al., Clin Cancer

Res 2004, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8): 498-506)。

[0221] 特異的CTL活性

特異的CTL活性を調べるために、インターフェロン (IFN) - γ 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイおよびIFN- γ 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を実施した。具体的には、ペプチドパルスしたC1R - A11またはC1R - A33 (1×10^4 個/ウェル) を刺激細胞として調製した。48ウェルプレート中の培養細胞を応答細胞として使用した。IFN- γ ELISPOTアッセイおよびIFN- γ ELISAアッセイは、製造業者の手順に従って実施した。

[0222] 標的遺伝子およびHLAを強制発現させた標的細胞の樹立

標的遺伝子またはHLA-A*1101もしくはHLA-A*3303のオープンリーディングフレームをコードするcDNAをPCRによって増幅した。PCR増幅産物を発現ベクターにクローニングした。製造業者の推奨する手順に従ってリポフェクタミン2000 (Invitrogen) を使用して、標的遺伝子およびHLAの陰性細胞株であるCOS7に標的遺伝子の発現ベクターおよびHLA-A*1101もしくはHLA-A*3303の発現ベクターのいずれかまたは両方をトランスフェクトした。トランスフェクションから2日後、トランスフェクトした細胞をベルセン (Invitrogen) を用いて回収し、CTL活性アッセイのための標的細胞 (5×10^4 個細胞/ウェル) として使用した。

[0223] 結果

HLA-A*1101拘束性のVEGFR2由来予測ペプチドによるCTLの誘導

VEGFR2由来のペプチドに対するCTLを、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。IFN- γ ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を測定した。表1および表2に示されるペプチドのうち、対照ウェルと比較して強力なIFN- γ 産生を示すペプチドがいくつか見出された。一方、他のペプチドは、HLA-A*1101との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドでの刺激によっては、特異的なCTL活性が測定されなかった。IFN- γ ELISPOTアッセイにおける陽性データと陰性データの典型

例を図1に示す。

[0224] HLA-A*3303拘束性のVEGFR2由来予測ペプチドによるCTLの誘導

VEGFR2由来のペプチドに対するCTLを、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。IFN- γ ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を測定した。表3および表4に示されるペプチドのうち、対照ウェルと比較して強力なIFN- γ 産生を示すペプチドがいくつか見出された。一方、表3および表4に示される他のペプチドは、HLA-A*3303との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドでの刺激によっては、特異的なCTL活性が測定されなかった。IFN- γ ELISPOTアッセイにおける陽性データと陰性データの典型例を図2に示す。

[0225] HLA-A*1101拘束性のVEGFR2由来ペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

IFN- γ ELISPOTアッセイにおいてペプチド特異的なCTL活性を示した細胞を増殖させ、CTL株を樹立した。これらのCTL株のCTL活性をIFN- γ ELISAアッセイによって測定した。VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-9-521（配列番号：3）（c）、VEGFR2-A11-9-973（配列番号：4）（d）、VEGFR2-A11-9-309（配列番号：5）（e）、VEGFR2-A11-9-860（配列番号：9）（f）、VEGFR2-A11-9-134（配列番号：15）（g）、VEGFR2-A11-9-195（配列番号：26）（h）、VEGFR2-A11-9-502（配列番号：27）（i）、VEGFR2-A11-9-1281（配列番号：39）（j）、VEGFR2-A11-10-576（配列番号：40）（k）、VEGFR2-A11-10-397（配列番号：41）（l）、VEGFR2-A11-10-308（配列番号：42）（m）、VEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（n）、VEGFR2-A11-10-278（配列番号：44）（o）およびVEGFR2-A11-10-972（配列番号：45）（p）で誘導したCTL株は、ペプチドをパルスしなかった標的細胞と比較して、対応するペプチドをパルスした標的細胞に対して強力なIFN- γ 産生を示した（図3）。さらに、CTL株から限界希釈によってCTLクローンを樹立し、ペプチドをパルスした標的細胞に対するCTLクローンからのIFN- γ 産生をIFN- γ ELISAアッセイによって測定した。VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）、VEGFR2-A11-9-863（配列番号：2）（b）、VEGFR2-A11-

9-521 (配列番号: 3) (c)、VEGFR2-A11-9-973 (配列番号: 4) (d)、VEGFR2-A11-9-309 (配列番号: 5) (e)、VEGFR2-A11-9-860 (配列番号: 9) (f)、VEGFR2-A11-9-134 (配列番号: 15) (g)、VEGFR2-A11-9-195 (配列番号: 26) (h)、VEGFR2-A11-9-502 (配列番号: 27) (i)、VEGFR2-A11-9-1281 (配列番号: 39) (j)、VEGFR2-A11-10-576 (配列番号: 40) (k)、VEGFR2-A11-10-397 (配列番号: 41) (l)、VEGFR2-A11-10-308 (配列番号: 42) (m)、VEGFR2-A11-10-159 (配列番号: 43) (n) および VEGFR2-A11-10-972 (配列番号: 45) (o) で刺激した CTL クローンから強力な IFN- γ 産生が測定された (図4)。

[0226] HLA-A*3303拘束性のVEGFR2由来ペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

IFN- γ ELISPOT アッセイにおいてペプチド特異的 CTL 活性を示した細胞を増殖させ、CTL 株を樹立した。これらの CTL 株の CTL 活性を IFN- γ ELISA アッセイによって測定した。VEGFR2-A33-9-823 (配列番号: 87) (a)、VEGFR2-A33-9-114 (配列番号: 89) (b)、VEGFR2-A33-9-214 (配列番号: 90) (c)、VEGFR2-A33-9-577 (配列番号: 21) (d)、VEGFR2-A33-10-213 (配列番号: 104) (e)、VEGFR2-A33-10-97 (配列番号: 83) (f)、VEGFR2-A33-10-576 (配列番号: 40) (g)、VEGFR2-A33-10-113 (配列番号: 70) (h) および VEGFR2-A33-10-1046 (配列番号: 114) (i) で誘導した CTL 株は、ペプチドをパルスしなかった標的細胞と比較して、対応するペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な IFN- γ 産生を示した (図5)。さらに、CTL 株から限界希釈によって CTL クローンを樹立し、ペプチドをパルスした標的細胞に対する CTL クローンからの IFN- γ 産生を IFN- γ ELISA アッセイによって測定した。VEGFR2-A33-9-114 (配列番号: 89) (a)、VEGFR2-A33-9-214 (配列番号: 90) (b)、VEGFR2-A33-9-577 (配列番号: 21) (c)、VEGFR2-A33-10-213 (配列番号: 104) (d)、VEGFR2-A33-10-97 (配列番号: 83) (e)、VEGFR2-A33-10-113 (配列番号: 70) (f) および VEGFR2-A33-10-1046 (配列番号: 114) (g) で刺激した CTL クローンから強力な IFN- γ 産生が測定された (図6)。

[0227] VEGFR2およびHLA-A*1101を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

HLA-A*1101拘束性ペプチドに対して樹立されたCTL株およびCTLクローンを、VEGFR2およびHLA-A*1101分子を発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長VEGFR2およびHLA-A*1101遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞（VEGFR2およびHLA-A*1101遺伝子を発現する応答細胞の特異的モデル）を刺激細胞として調製した。全長VEGFR2またはHLA-A*1101のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）（a）およびVEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）（b）で刺激したCTL株およびCTLクローンが、VEGFR2およびHLA-A*1101の両方を発現するCOS7細胞に対して強力なCTL活性を示した。一方、対照細胞に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった（図7）。これらのデータにより、VEGFR2-A11-9-319（配列番号：1）およびVEGFR2-A11-10-159（配列番号：43）が、VEGFR2の内因的プロセッシングにより生じるペプチドであり、かつHLA-A*1101分子とともに標的細胞上に提示されてCTLによって認識されることが明確に実証される。これらの結果は、VEGFR2に由来するこれらのペプチドが、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患の治療および／または予防のためのワクチンとして適していることを示し、特にHLA-A11陽性患者に対して有用性が高いことを示す。

[0228] VEGFR2およびHLA-A*3303を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

HLA-A*3303拘束性ペプチドに対して樹立されたCTL株およびCTLクローンを、VEGFR2およびHLA-A*3303分子を発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長VEGFR2およびHLA-A*3303遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞（VEGFR2およびHLA-A*3303遺伝子を発現する応答細胞の特異的モデル）を刺激細胞として調製した。全長VEGFR2またはHLA-A*3303のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。VEGFR2-A33-9-114（配列番号：89）（a）およびVEGFR2-A33-10-113（配列番号：70）（b）が、VEGFR2およびHLA-A*3303の両方を発現するCOS7細胞に対して強力なCTL活性を示した。一方、対照細胞に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった（図8）。これらのデータにより、VEGFR2-A33-9-114（配列番号：89）およびVEGFR

2-A33-10-113（配列番号：70）が、VEGFR2の内因的プロセッシングにより生じるペプチドであり、かつHLA-A*3303分子とともに標的細胞上に提示されてCTLによって認識されることが明確に実証される。これらの結果は、VEGFR2に由来するこれらのペプチドが、VEGFR2発現に関連する血管新生により媒介される疾患の治療および／または予防のためのワクチンとして適していることを示し、特にHLA-A33陽性患者に対して有用性が高いを示す。

[0229] 抗原ペプチドの相同性解析

上記の試験においてペプチド特異的なCTL活性を誘導したペプチドは、ヒト免疫系を感作する他の分子と相同な配列を有しているためにCTL活性を誘導できた可能性がある。この可能性を排除するために、BLASTアルゴリズム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、これらのペプチドの配列をクエリーとして相同性解析を行った。その結果、これらのペプチドの配列に対して有意な相同性を有する配列は認められなかった。したがって、これらのペプチドが、VEGFR2とは関連のない分子に対して意図しない免疫応答を引き起こす可能性はほとんどないと考えられる。結論として、これらのペプチドは、副作用なく免疫療法に使用し得ることが示された。

産業上の利用可能性

[0230] 本発明は、異常な血管新生を伴う疾患部位の血管内皮細胞に対して、強力かつ特異的な免疫応答を誘導することができ、血管新生により媒介される幅広い種類の疾患に対する適用性を有し得る、VEGFR2由来の新規ペプチドを提供する。このようなペプチドは、VEGFR2に関連した血管新生により媒介される疾患に対するペプチドワクチンとして有用であり得、そのような疾患の例には、各種がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症：加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデレミア、脈絡膜骨腫など）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化などが含まれるが、これらに限定されない。

請求の範囲

[請求項1] 以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞障害性T細胞（CTL）誘導能を有する15アミノ酸未満のペプチド：

- (a) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列；および
- (b) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列。

[請求項2] 配列番号：1～5、9、15、26、27および39～45からなる群より選択されるアミノ酸配列において、以下の(a)～(d)から選択される1以上の置換を有する、請求項1記載のペプチド：

- (a) N末端から2番目のアミノ酸が、スレオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；
- (b) N末端から3番目のアミノ酸が、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンおよびアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；
- (c) N末端から7番目のアミノ酸が、ロイシン、イソロイシン、チロシン、バリンおよびフェニルアラニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および
- (d) C末端のアミノ酸が、リジンおよびアルギニンに置換されている。

[請求項3] 配列番号：21、40、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列において、以下の(a)～(c)から選択される1以上の置換を有する、請求項1記載のペプチド：

- (a) N末端から1番目のアミノ酸が、アスパラギン酸およびグルタミン酸からなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；

(b) N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、アラニン、イソロイシン、ロイシンおよびバリンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および

(c) C末端のアミノ酸が、アルギニンおよびリジンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。

[請求項4] 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1記載のペプチド。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

[請求項6] 薬学的に許容される担体と、以下の(a)～(e)からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物：

(a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[請求項7] CTLを誘導するための組成物であって、以下の(a)～(d)からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む、請求項6記載の組成物：

(a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；および

(d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム。

[請求項8] 薬学的組成物である、請求項6記載の組成物。

[請求項9] (i) 血管新生により媒介される疾患の治療、(ii) 血管新生により媒介される疾患の予防、および(iii) 血管新生により媒介される疾患の術後の再発の予防からなる群より選択される1以上の用途のための薬学的組成物である、請求項8記載の組成物。

[請求項10] 血管新生により媒介される疾患の疾患部位において、血管新生を阻害するための薬学的組成物である、請求項8記載の組成物。

[請求項11] 血管新生により媒介される疾患が、がん、脈絡膜における血管新生に関連する疾患（新生血管黄斑症）、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチ、乾癬、およびアテローム性動脈硬化である、請求項9または10記載の組成物。

[請求項12] 脈絡膜における血管新生に関連する疾患が、加齢黄斑変性症、近視性黄斑変性症、網膜色素線条症、中心性滲出性網脈絡膜症、種々の網膜色素上皮症、脈絡膜萎縮症、コロイデレミア、脈絡膜骨腫である、請求項11記載の組成物。

[請求項13] がんの増殖または転移を抑制するために使用される、請求項11記載の組成物。

[請求項14] HLA-A11陽性またはHLA-A33陽性である対象への投与のために製剤化される、請求項6～13のいずれか一項記載の組成物。

[請求項15] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法：

(a) APCを、請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エキスビボ、またはインビボで接触させる段階、および

(b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌ

クレオチドをAPCに導入する段階。

- [請求項16] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTLを誘導する方法：
- (a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、
- (b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、および
- (c) 細胞表面上にHLA抗原により提示された請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドに結合し得るT細胞受容体（TCR）の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。
- [請求項17] HLA抗原と請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPC。
- [請求項18] 請求項15記載の方法によって誘導される、請求項17記載のAPC。
- [請求項19] 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。
- [請求項20] 請求項16記載の方法によって誘導される、請求項19記載のCTL。
- [請求項21] 以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、血管新生により媒介される疾患の疾患部位における血管新生を阻害する方法：
- (a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[請求項22] 以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、血管新生により媒介される疾患を治療および／もしくは予防する、ならびに／または術後のその再発を予防する方法：

(a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[請求項23] 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドに結合する抗体。

[請求項24] CTL誘導能を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 配列番号：1～5、9、15、21、26、27、39～45、70、83、87、89、90、104および114の中から選択されるアミノ酸配列からなる元のアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる候補配列を作成する段階；

(b) (a) で作成した候補配列の中からVEGFR2以外のいかなる公知のヒト遺伝子産物とも有意な相同性（配列同一性）を有さない候補配列を選択する段階；

(c) (b) で選択した候補配列からなるペプチドと、APCとを接触させる段階；

(d) (c) のAPCとCD8陽性T細胞とを接触させる段階；および

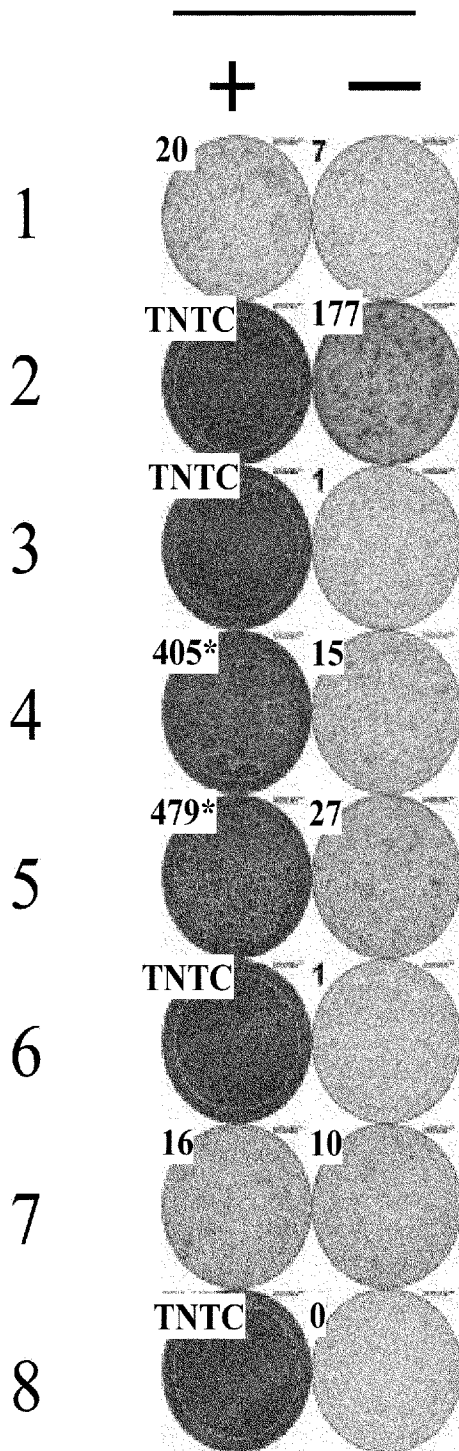
(e) 元のアミノ酸配列からなるペプチドよりも同等かまたはより高

いCTL誘導能を有するペプチドを選択する段階。

[図1]

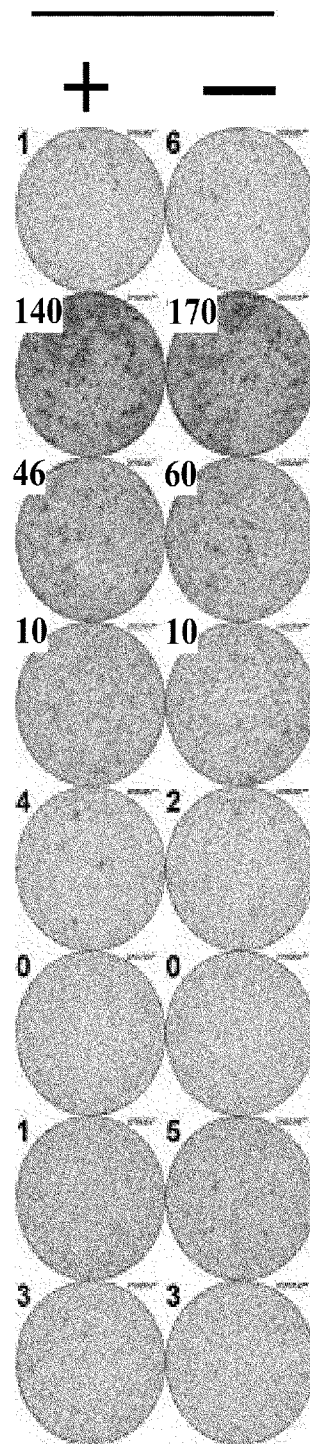
VEGFR2-
A11-10-159

a



VEGFR2-
A11-9-782

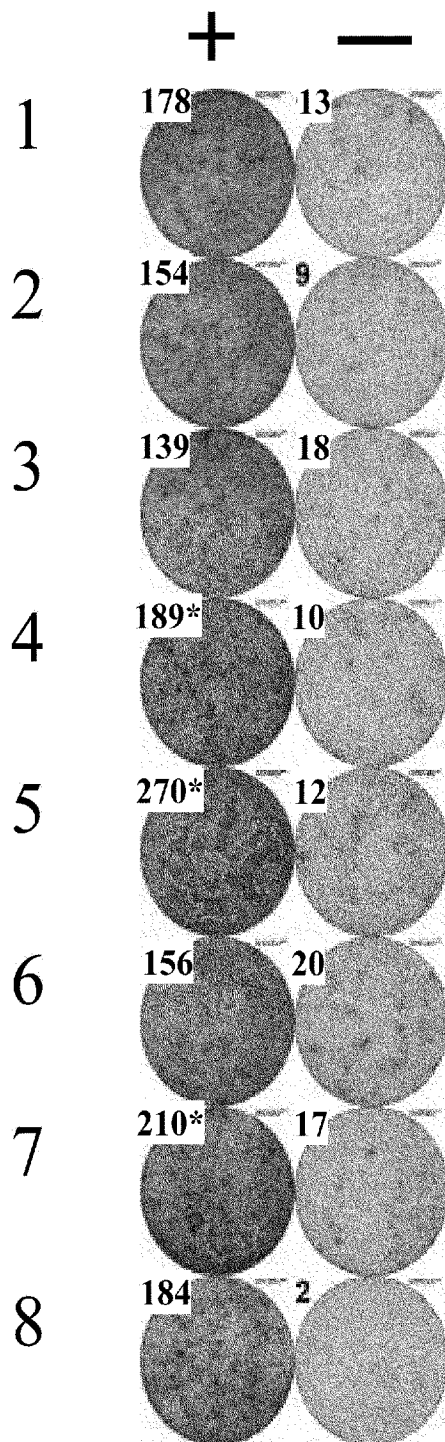
b



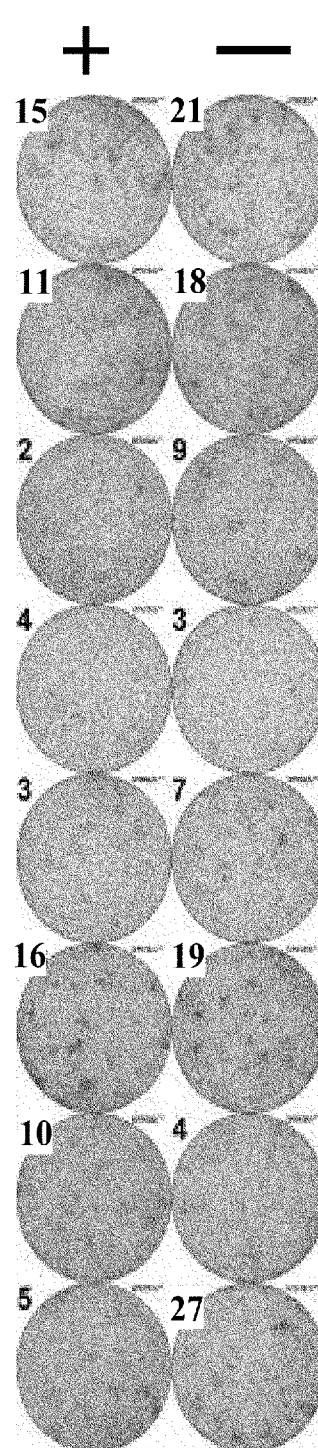
[図2]

VEGFR2-
A33-9-577

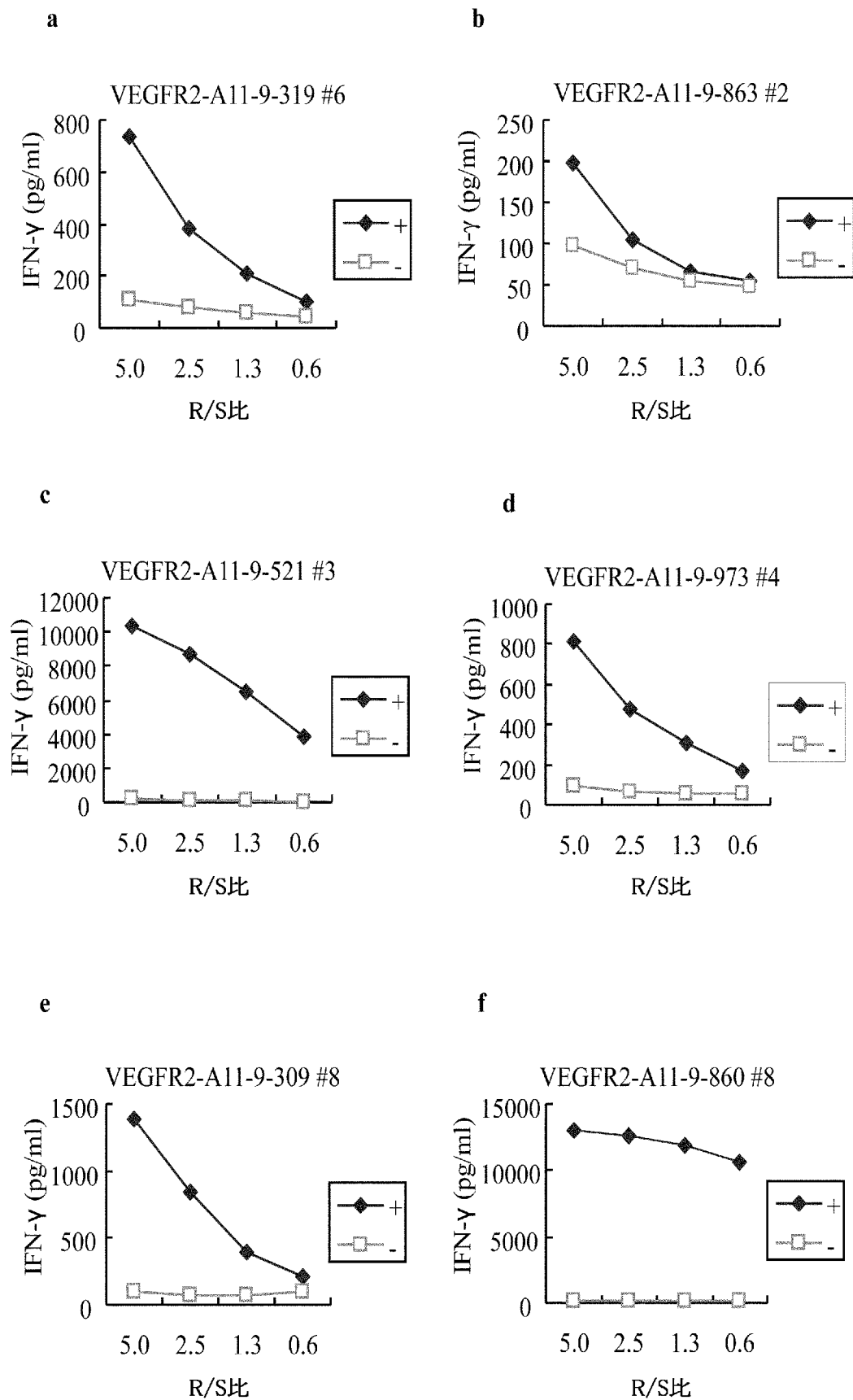
a

VEGFR2-
A33-9-541

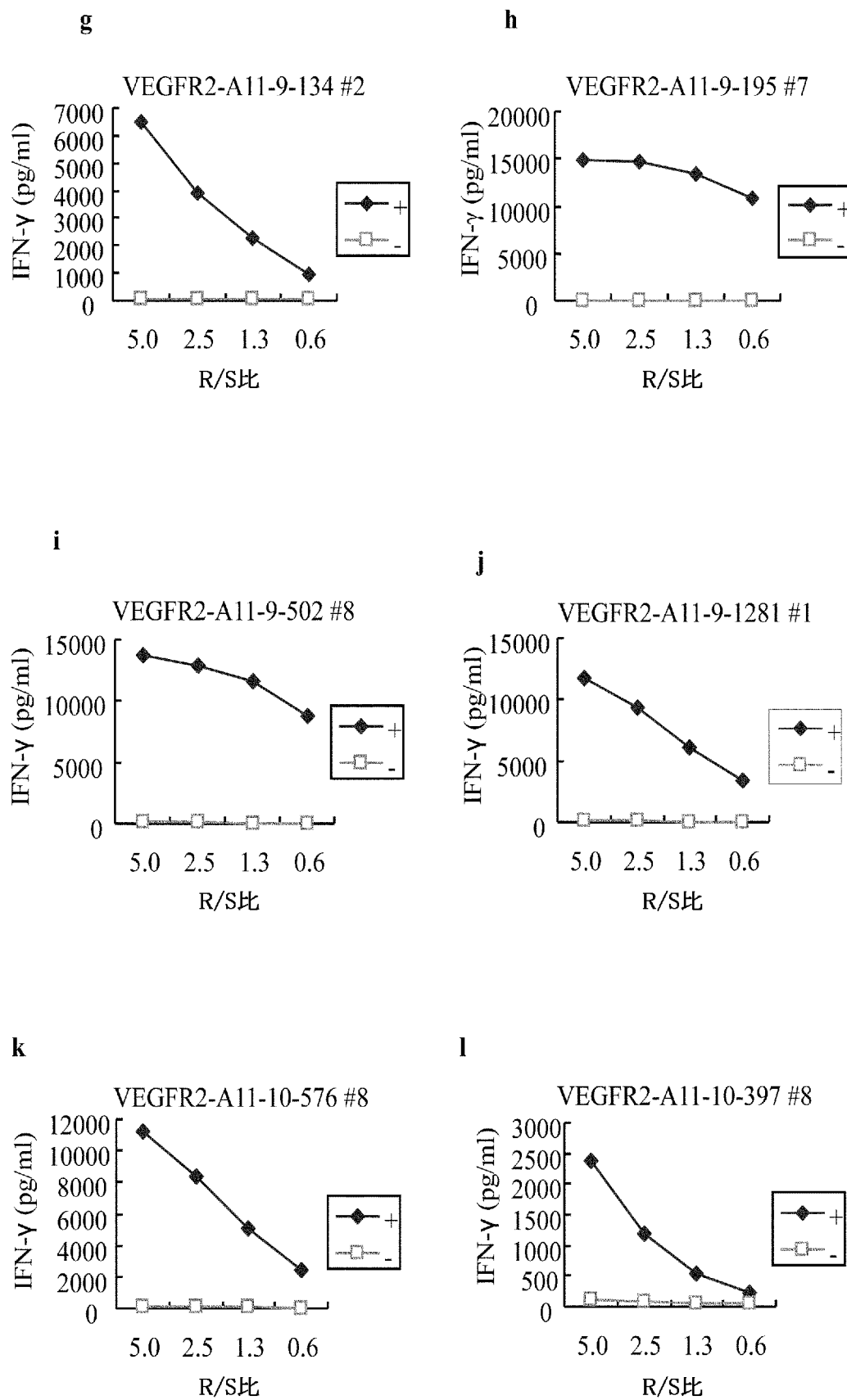
b



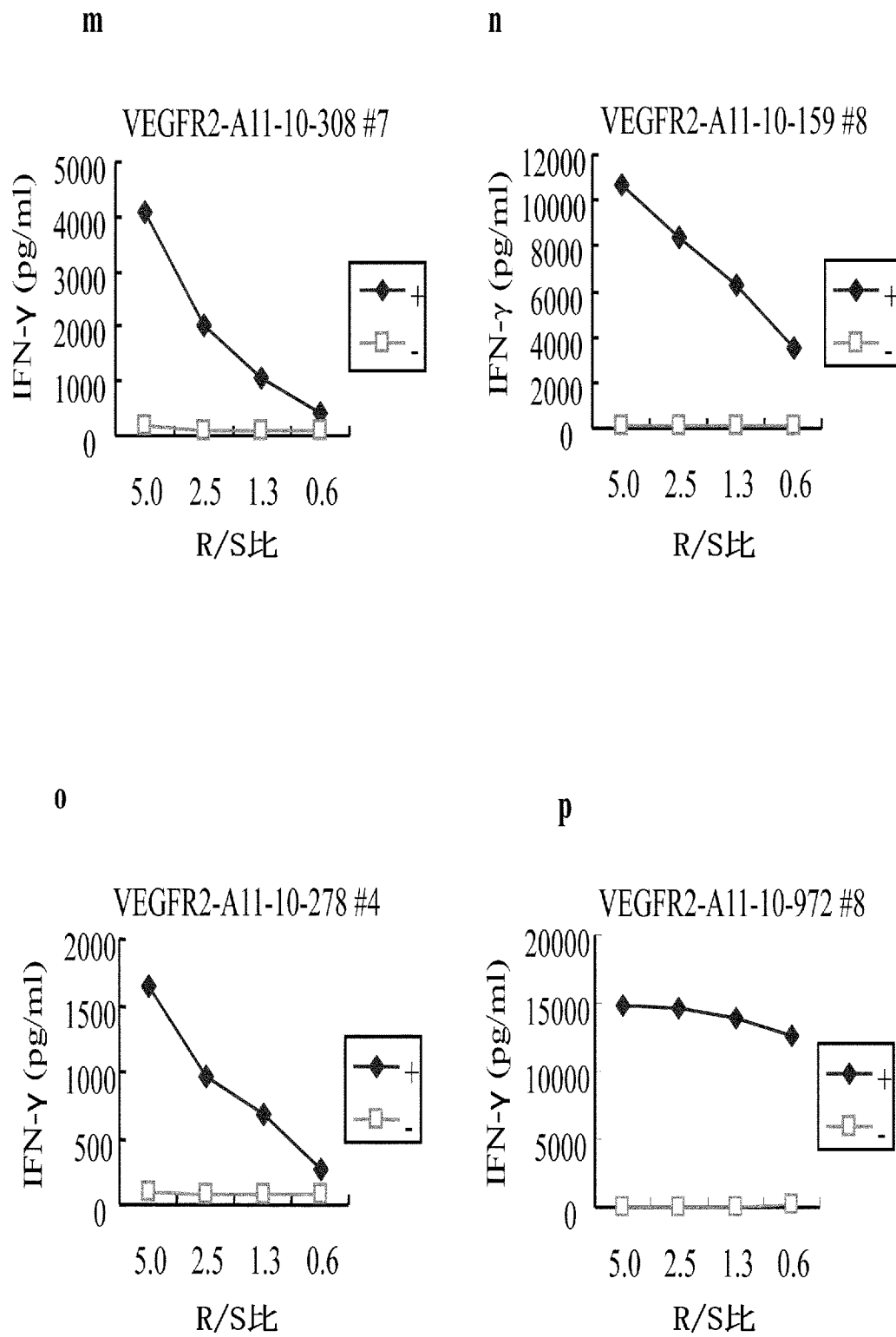
[図3-1]



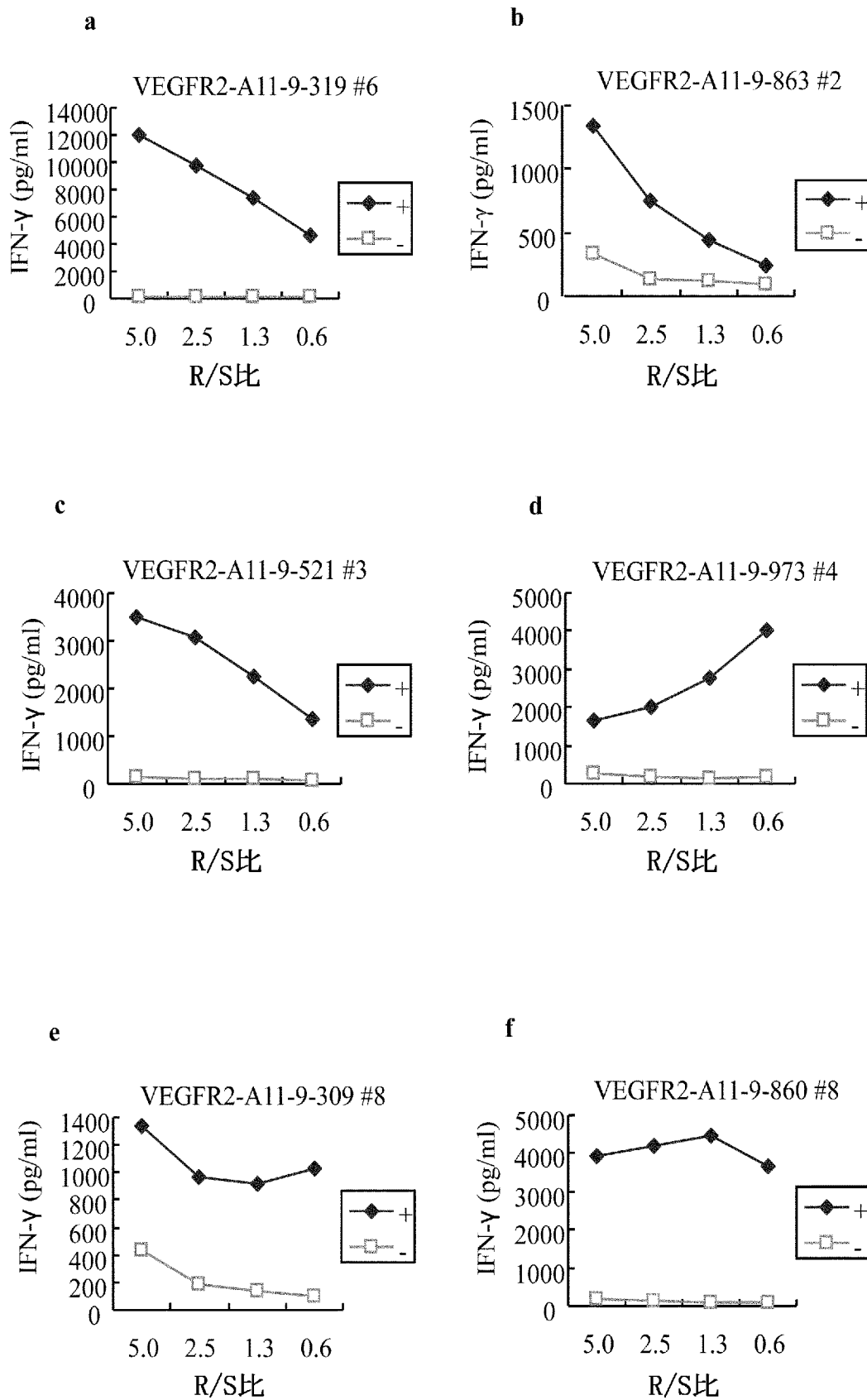
[図3-2]



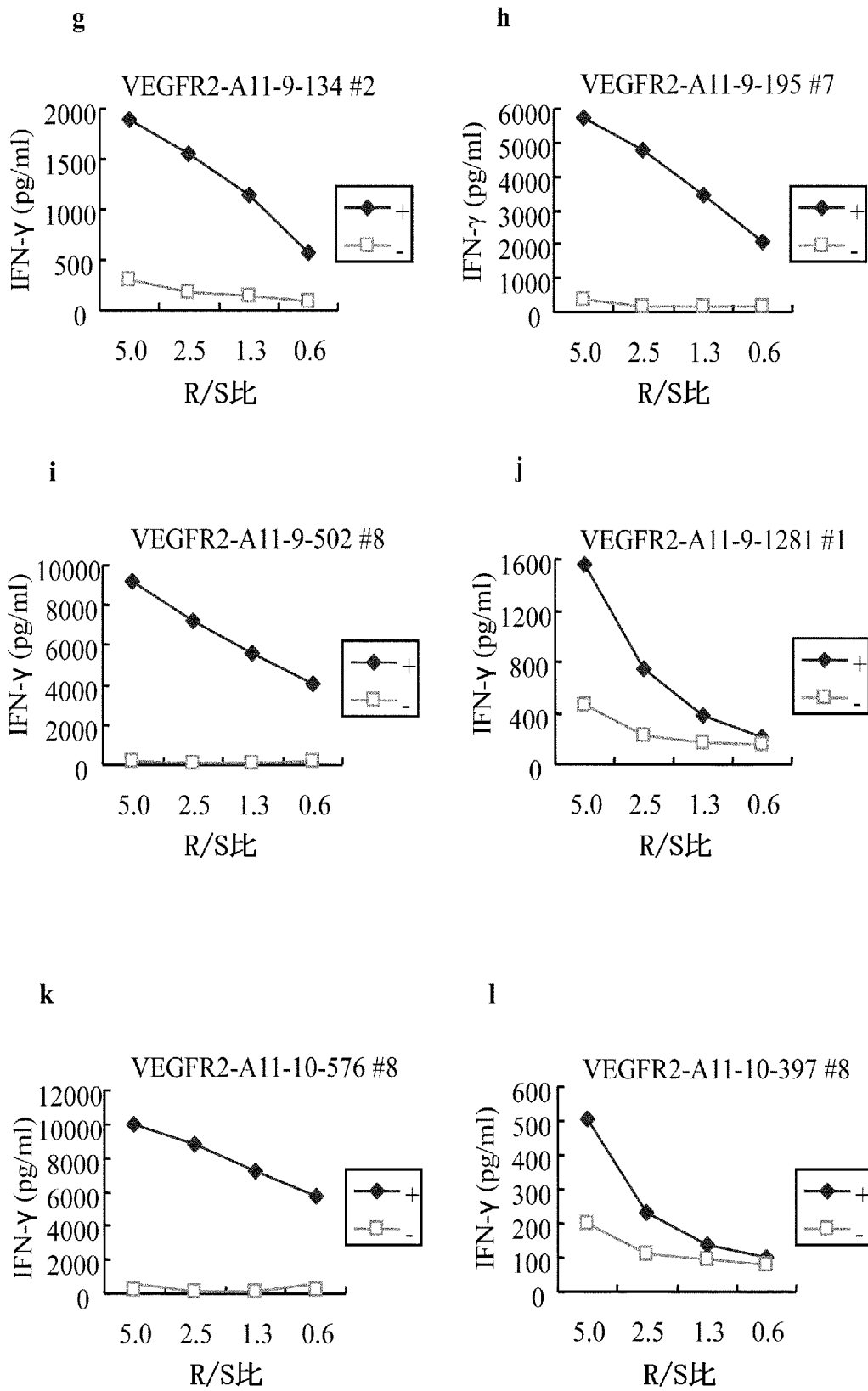
[図3-3]



[図4-1]

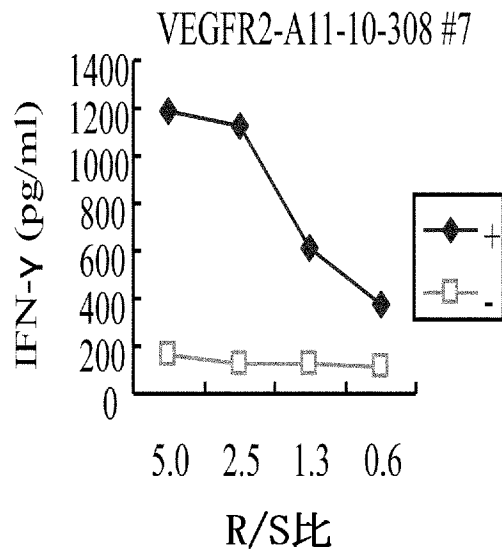


[図4-2]

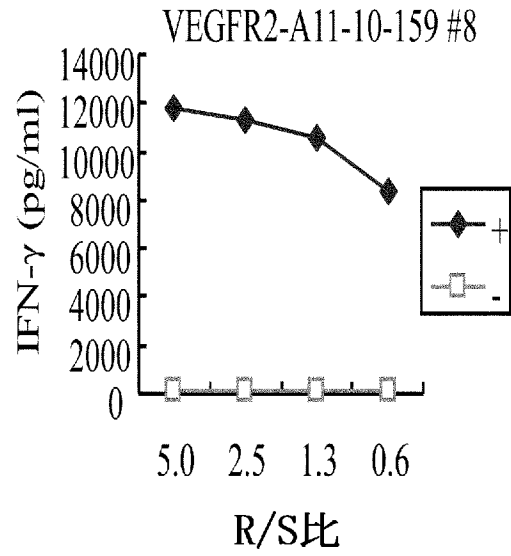


[図4-3]

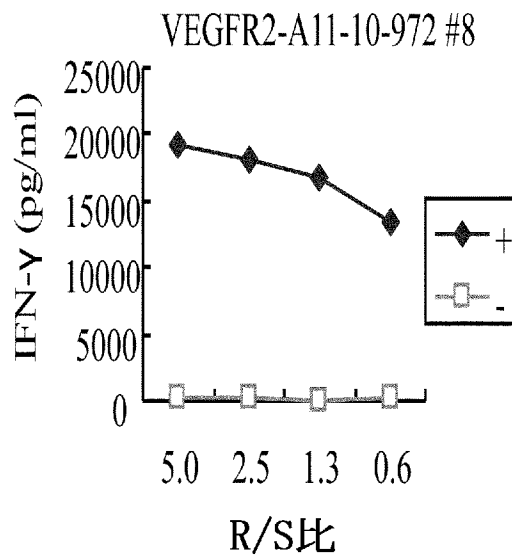
m



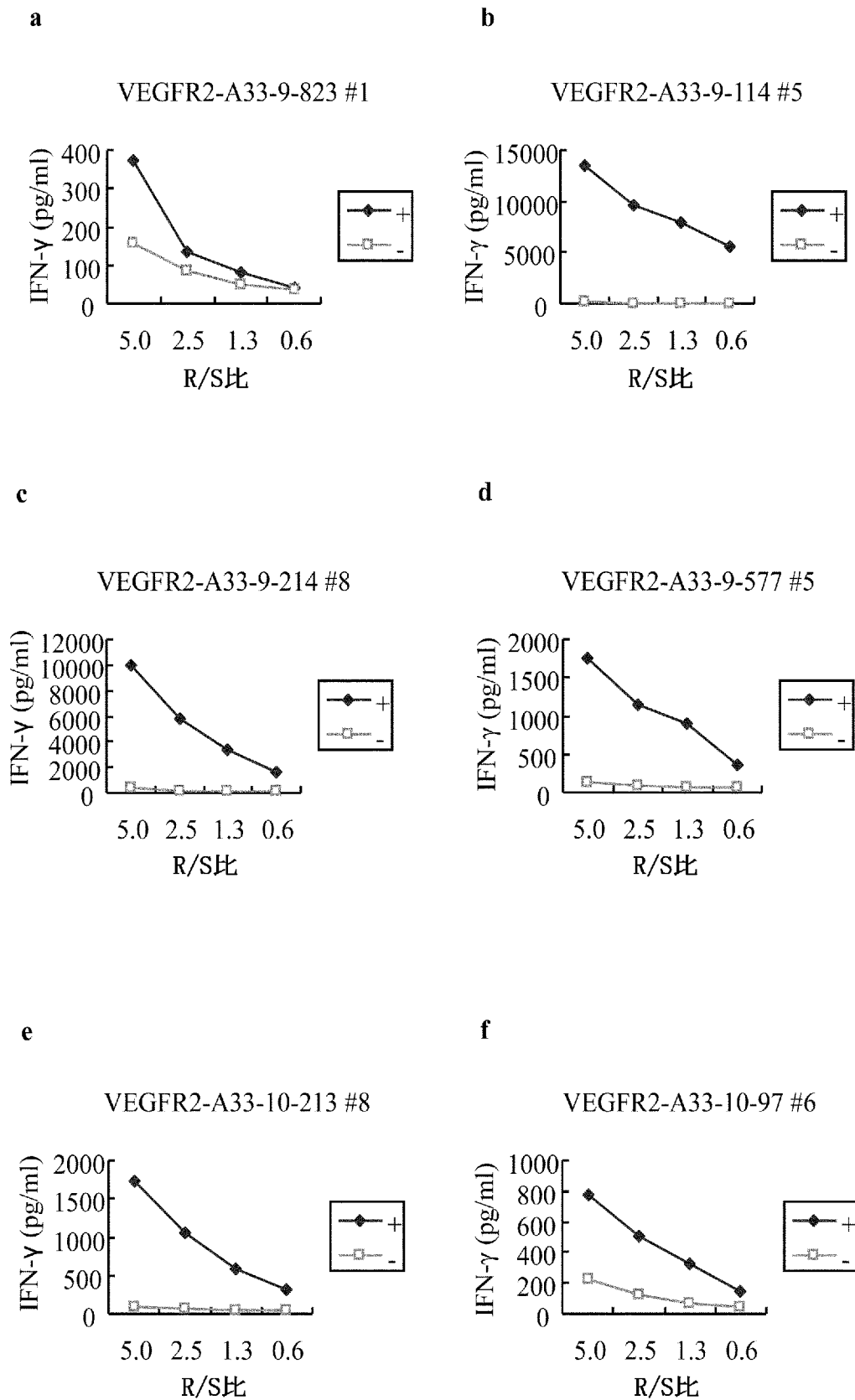
n



o



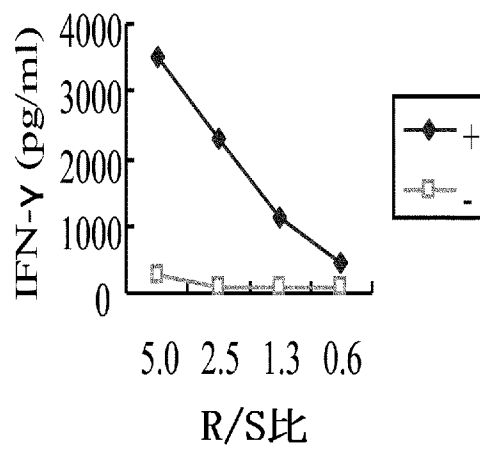
[図5-1]



[図5-2]

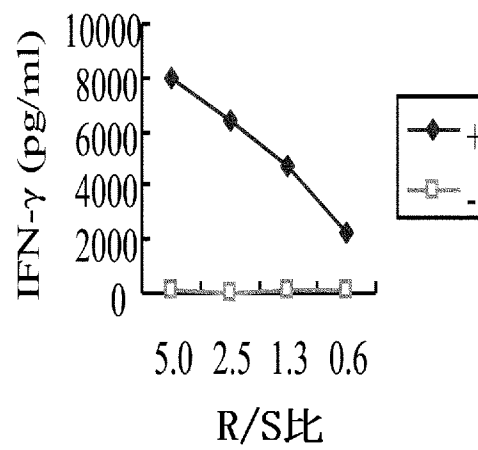
g

VEGFR2-A33-10-576 #2



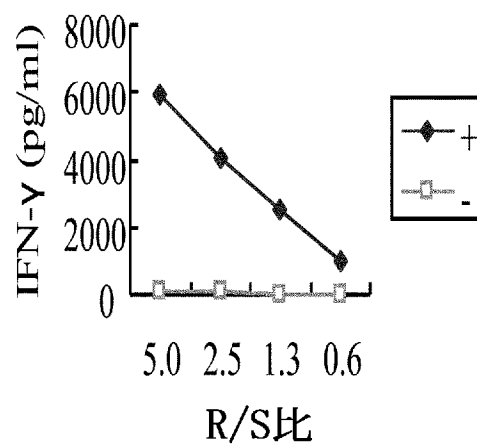
h

VEGFR2-A33-10-113 #1

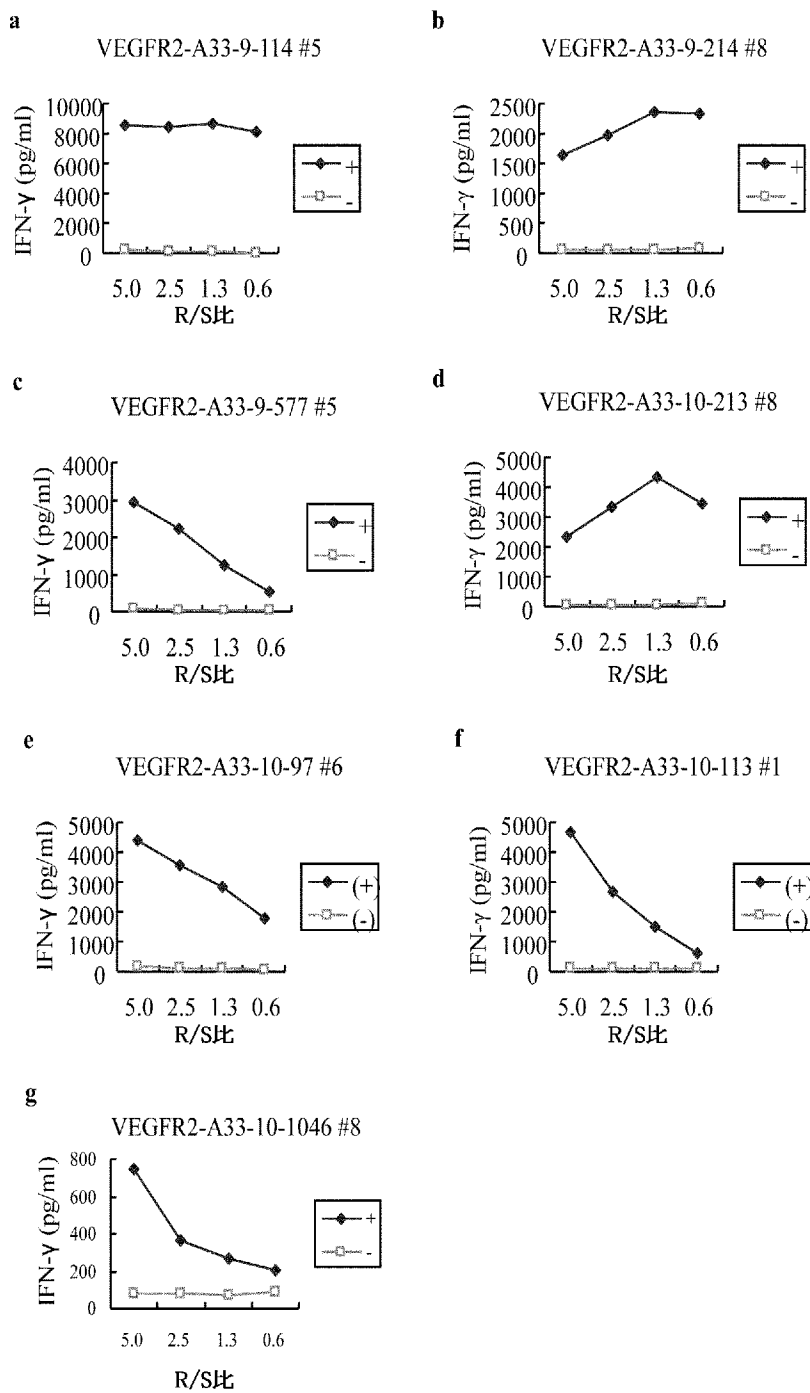


i

VEGFR2-A33-10-1046 #8

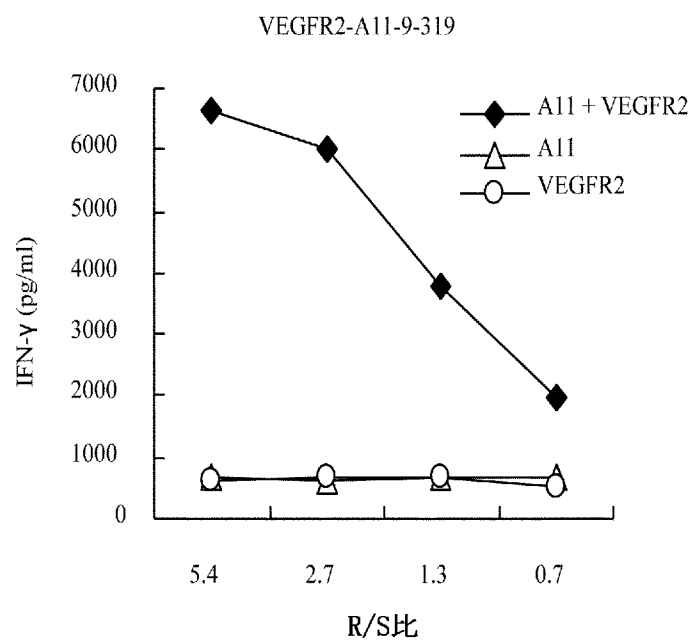


[図6]

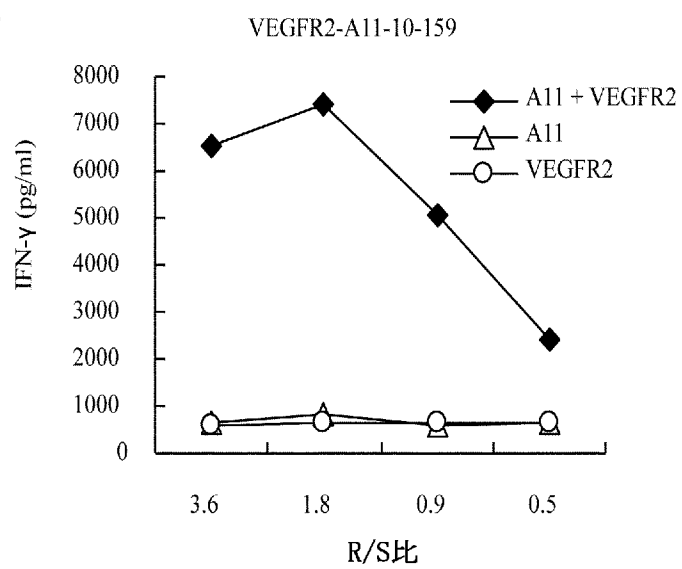


[図7-1]

a



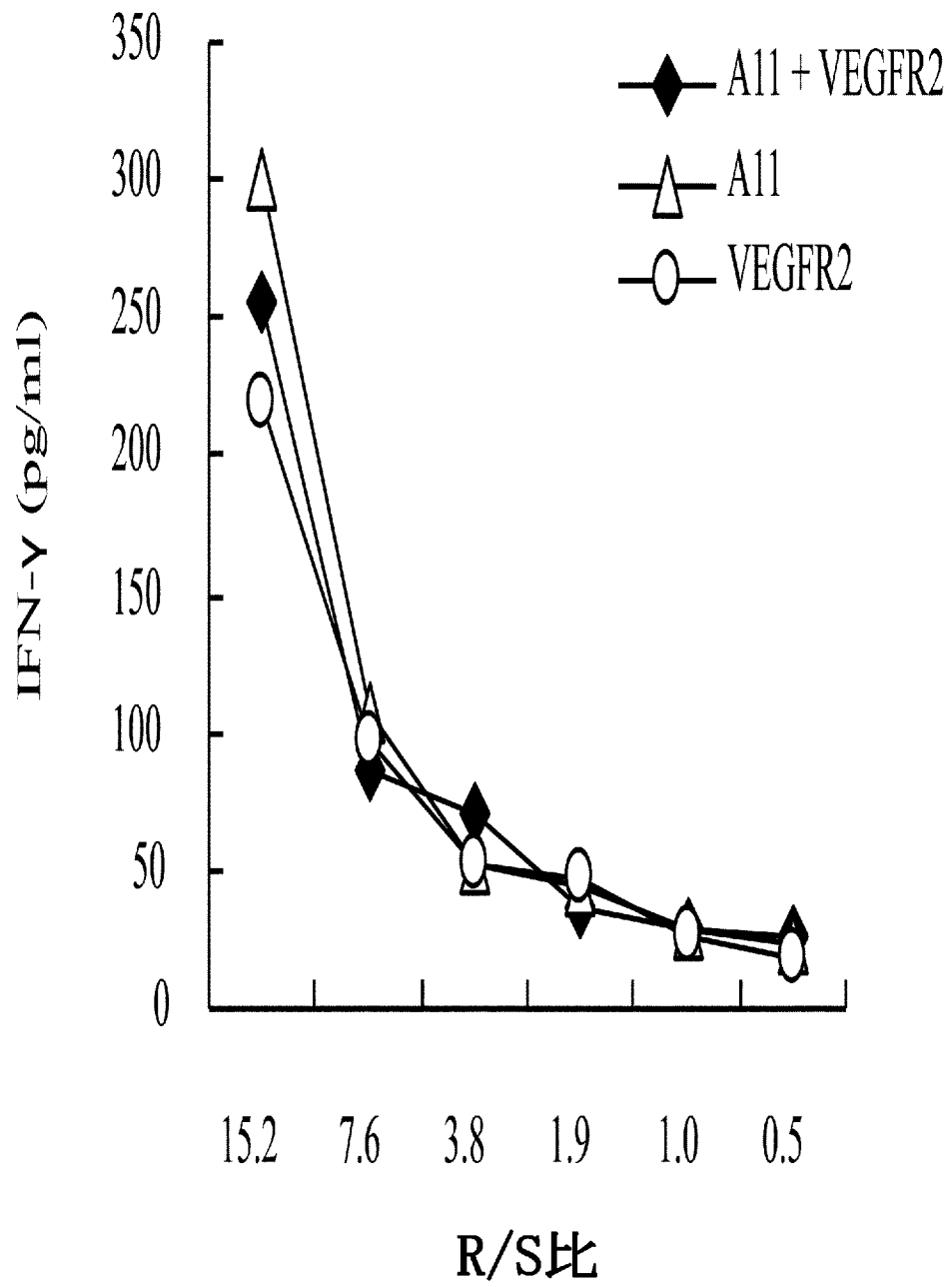
b



[図7-2]

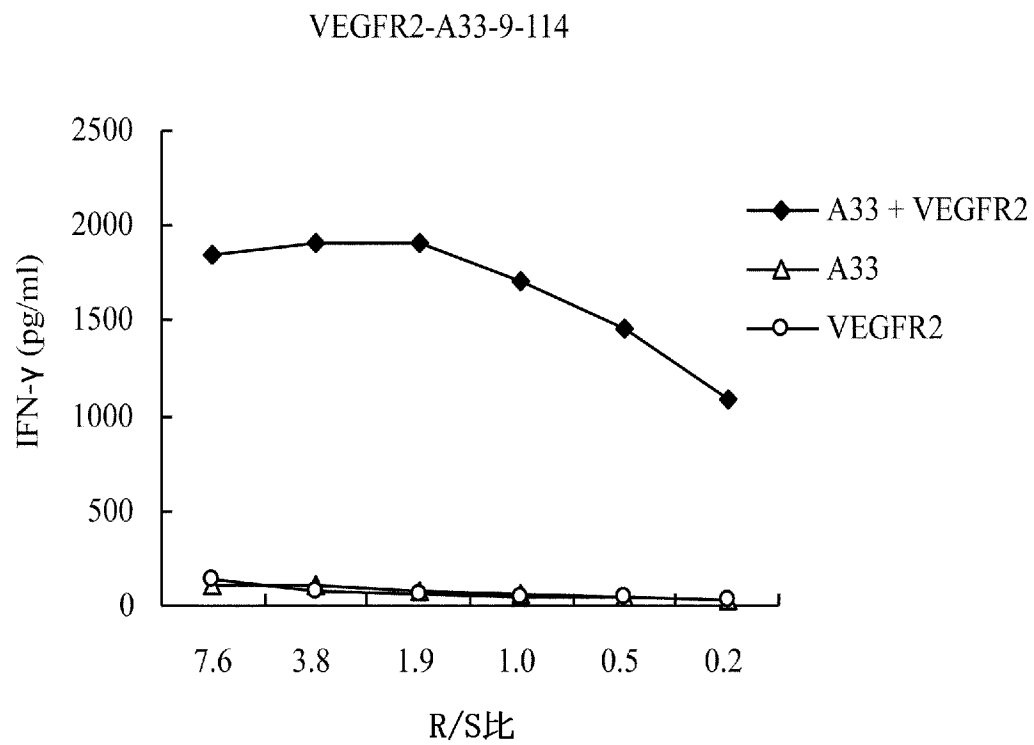
c

VEGFR2-A11-9-863

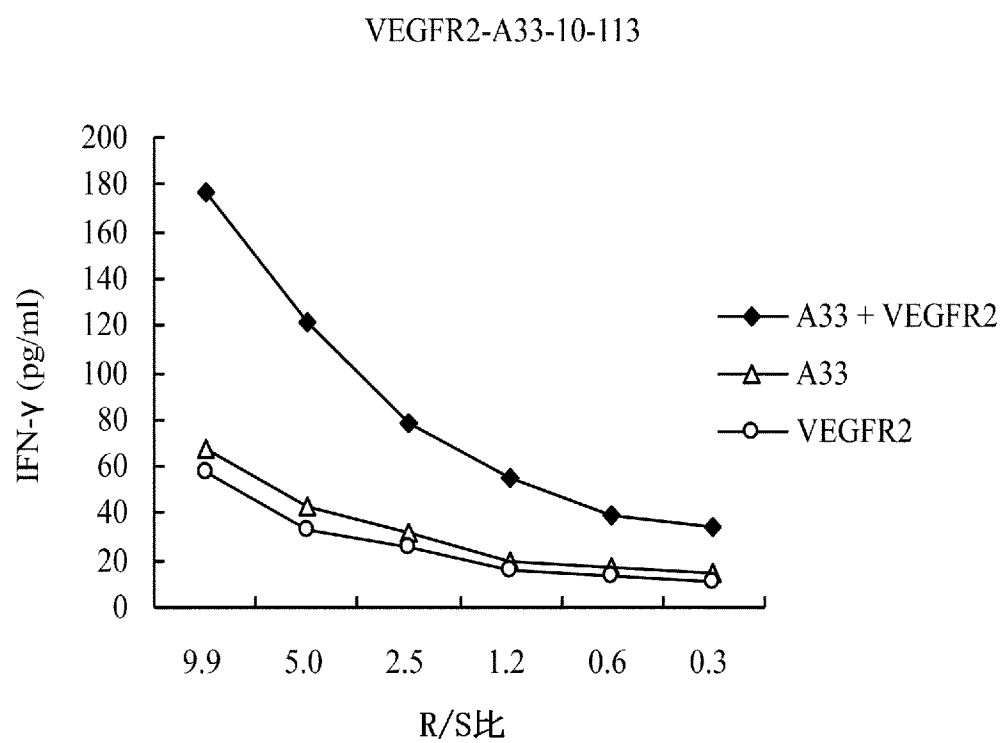


[図8-1]

a



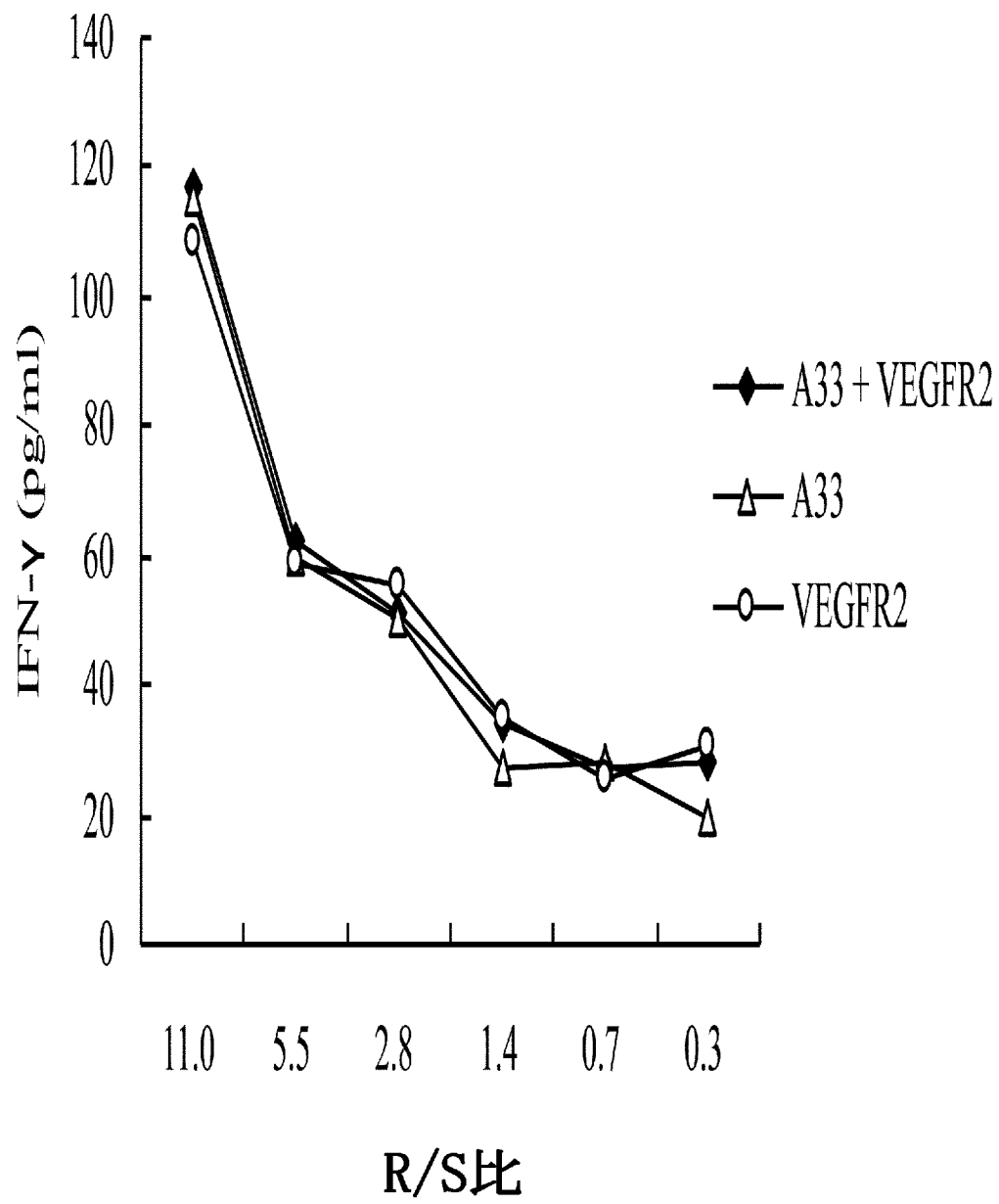
b



[図8-2]

c

VEGFR2-A33-9-577



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

C07K7/06, A61K35/12, A61K38/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/06, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/04, A61P37/04, A61P37/06, C07K14/71, C07K16/28, C12N5/078, C12N5/0783, C12N15/09, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-176368 A (Oncotherapy Science, Inc.), 09 September 2013 (09.09.2013), claims; SEQ ID NO:83, 221 (Family: none)	1-13, 17-20, 24
Y	WO 2004/024766 A1 (Oncotherapy Science, Inc.), 25 March 2004 (25.03.2004), claims; page 2, lines 16 to 20; examples & US 2006/0216301 A1 & US 2007/0277251 A1 & EP 001548032 A1 & JP 2007-191485 A & JP 2007-277251 A & CN 001694901 A	1-14, 17-20, 23-24
Y	WO 2007/049394 A1 (Kurume University), 03 May 2007 (03.05.2007), claims; paragraphs [0004] to [0007]; examples & JP 2009-018990 A	1-14, 17-20, 23-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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
27 February 2015 (27.02.15)

Date of mailing of the international search report
10 March 2015 (10.03.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082059

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/007711 A1 (Green Peptide Co., Ltd.), 17 January 2008 (17.01.2008), paragraphs [0002] to [0004]; examples & JP 5114403 B	1-14, 17-20, 23-24
Y	Hiroko TAKEDATSU et al., "Identification of Peptide Vaccine Candidates Sharing among HLA- A3 ⁺ , -A11 ⁺ , -A31 ⁺ , and -A33 ⁺ Cancer Patients", Clinical Cancer Research, 2004, Vol.10, p.1112- 1120	1-14, 17-20, 23-24
X	JP 2012-197258 A (Tohoku University), 18 October 2012 (18.10.2012), SEQ ID NO:22 (Family: none)	1, 4
X	US 2011/0104783 A1 (LUCIA IRENE GONZALEZ), 05 May 2011 (05.05.2011), SEQ ID NO:68 & US 2013/0156723 A1 & WO 2011/059779 A2 & CA 2779290 A	1, 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082059

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

*C07K7/06(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)i, A61K38/00(2006.01)i,
A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i,
A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P35/04(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i,
C07K14/71(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i,
C12N5/0783(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082059

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15-16, 21-22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082059

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

The inventions of claims 15-16, 21-22 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy or diagnostic methods therefor and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K7/06, A61K35/12, A61K38/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/06, A61P27/02, A61P29/00, A61P35/00, A61P35/04, A61P37/04, A61P37/06, C07K14/71, C07K16/28, C12N5/078, C12N5/0783, C12N15/09, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/ BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2013-176368 A（オンコセラピー・サイエンス株式会社） 2013. 09. 09,	1-13, 17-20, 2 4
Y	【特許請求の範囲】，配列番号 8 3 及び 2 2 1， （ファミリーなし）	1-14, 17-20, 2 3-24

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 7 . 0 2 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

坂崎 恵美子

4 B

9 4 5 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2004/024766 A1 (オンコセラピー・サイエンス株式会社) 2004.03.25, 請求の範囲, 2 頁 1 6 行～2 0 行, 実施例, & US 2006/0216301 A1 & US 2007/0277251 A1 & EP 001548032 A1 & JP 2007-191485 A & JP 2007-277251 A & CN 001694901 A	1-14, 17-20, 2 3-24
Y	WO 2007/049394 A1 (学校法人 久留米大学) 2007.05.03, 請求の範囲, [0004] ～ [0007], 実施例, & JP 2009-018990 A	1-14, 17-20, 2 3-24
Y	WO 2008/007711 A1 (株式会社グリーンペプタイト) 2008.01.17, [0002] ～ [0004], 実施例, & JP 5114403 B	1-14, 17-20, 2 3-24
Y	Hiroko TAKEDATSU et al., “Identification of Peptide Vaccine Candidates Sharing among HLA-A3 ⁺ , -A11 ⁺ , -A31 ⁺ , and -A33 ⁺ Cancer Patients”, Clinical Cancer Research, 2004, Vol.10, p.1112-1120	1-14, 17-20, 2 3-24
X	JP 2012-197258 A (国立大学法人 東北大学) 2012.10.18, 配列番号 22, (ファミリーなし)	1, 4
X	US 2011/0104783 A1 (LUCIA IRENE GONZALEZ) 2011.05.05, 配列番号 68, & US 2013/0156723 A1 & WO 2011/059779 A2 & CA 2779290 A	1, 4

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 15-16, 21-22 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項15-16, 21-22に係る発明は、人の身体の手術若しくは治療による処置又は診断方法に係るものであり、P C T 第17条(2)(a)(i)及びP C T 規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

発明の属する分野の分類

C07K7/06(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/06(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/04(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K14/71(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i