

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6985153号

(P6985153)

(45) 発行日 令和3年12月22日(2021. 12. 22)

(24) 登録日 令和3年11月29日(2021. 11. 29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
C O 7 K 7/04 (2006. 01)	C O 7 K 7/04
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10
C O 7 K 14/725 (2006. 01)	C O 7 K 14/725

請求項の数 15 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-557212 (P2017-557212)	(73) 特許権者	506258073
(86) (22) 出願日	平成28年5月4日(2016. 5. 4)		イマティクス バイオテクノロジーズ ゲー
(65) 公表番号	特表2018-520644 (P2018-520644A)		ーエムペーハー
(43) 公表日	平成30年8月2日(2018. 8. 2)		ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, パ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/060007		ウルーエンリヒェシュトラッセ 1 5
(87) 国際公開番号	W02016/177784	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開日	平成28年11月10日(2016. 11. 10)		弁理士 庄司 隆
審査請求日	平成31年3月6日(2019. 3. 6)	(72) 発明者	メア, アンドレア
(31) 優先権主張番号	1507719. 1		ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, キ
(32) 優先日	平成27年5月6日(2015. 5. 6)		ルシェンヴェーク 2 2
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(72) 発明者	ヴァインシェンク, トニ
	英国 (GB)		ドイツ, 7 3 7 7 3 アイヒヴァルト, イ
(31) 優先権主張番号	62/157, 684		ム モルゲンレイン 1 5
(32) 優先日	平成27年5月6日(2015. 5. 6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関			
	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸直腸がん (CRC) およびその他のがんに対する免疫療法で使用するための新規ペプチドおよびペプチドとそのスキャフォールドとの組み合わせ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドであって、前記ペプチドが主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子に結合する能力を有する、ペプチド、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 2】

前記 MHC 分子に結合すると、CD8 T 細胞によって認識されることができるようになる、請求項 1 に記載のペプチド、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 3】

請求項 1 もしくは 2 に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩が、修飾され、および／または非ペプチド結合を含む、修飾および／または非ペプチド結合ペプチド、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 4】

H L A-D R 抗原関連不変鎖 (I i) の N 末端アミノ酸及び、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のペプチドもしくはその薬学的に許容可能な塩を含んでなる融合タンパク質、またはその薬学的に許容可能な塩。

【請求項 5】

可溶性または膜結合 T 細胞受容体であって、MHC 分子に結合している H L A リガンドと反応性を有し、前記リガンドが、請求項 1 に定義されるペプチドである T 細胞受容体、または

10

20

可溶性または膜結合T細胞受容体であって、MHC分子に結合しているHLAリガンドと反応性を有し、前記リガンドが、請求項1に定義されるペプチドであるT細胞受容体であって、前記T細胞受容体が可溶性分子として提供され、免疫刺激ドメインまたは毒素から選択されるさらなるエフェクター機能を保有する、T細胞受容体。

【請求項6】

請求項1もしくは2に記載のペプチドまたは請求項5に記載のT細胞受容体をエンコードする核酸、または前記核酸を発現する能力がある発現ベクター、または請求項1もしくは2に記載のペプチドまたは請求項5に記載のT細胞受容体をエンコードする核酸、または前記核酸を発現する能力がある発現ベクターであって、前記核酸または前記発現ベクターが、異種プロモーター配列と結合している、核酸または発現ベクター。

10

【請求項7】

請求項1もしくは2に記載のペプチド、または請求項6に記載の核酸もしくは発現ベクターを含んでなる、または請求項1もしくは2に記載のペプチド、または請求項6に記載の核酸もしくは発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞であって、前記宿主細胞が抗原提示細胞である、または請求項1もしくは2に記載のペプチド、または請求項6に記載の核酸もしくは発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞であって、さらに前記T細胞受容体をコードする核酸を含んでなる、組換え宿主細胞であって、前記宿主細胞がT細胞またはNK細胞である、組換え宿主細胞。

【請求項8】

20

請求項1または2に記載のペプチドを提示する、または請求項6に記載の核酸を発現する、または請求項6に記載の発現ベクターを有する、請求項7に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記ペプチドを前記宿主細胞またはその培養液から単離するステップとを含んでなる、請求項1または2に記載のペプチドを製造する方法。

【請求項9】

T細胞を、適切な抗原提示細胞の表面に、または抗原提示細胞を模倣する人工コンストラクトの表面に発現される抗原負荷ヒトクラスI MHC分子に、前記T細胞を抗原特異の様式で活性化するのに十分な時間にわたり、生体外で接触させるステップを含んでなり、前記抗原が、請求項1または2に記載のペプチドである、活性化Tリンパ球を製造するインビトロ法。

30

【請求項10】

請求項1または2に記載のペプチドを提示する細胞を選択的に認識する、請求項9に記載の方法によって製造される活性化Tリンパ球。

【請求項11】

請求項10に記載の活性化Tリンパ球を含んでなる標的細胞死滅剤であって、前記標的細胞が、請求項1または2に記載のペプチドを提示する、標的細胞死滅剤。

【請求項12】

請求項1もしくは2に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項4に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項5に記載のT細胞受容体、請求項6に記載の核酸または発現ベクター、請求項7に記載の組換え宿主細胞、または請求項10に記載の活性化Tリンパ球からなる群から選択される少なくとも1つの活性成分と、薬学的に許容可能な担体を含んでなる医薬組成物。

40

【請求項13】

医療において使用するための、請求項1～3のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項4に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項5に記載のT細胞受容体、請求項6に記載の核酸または発現ベクター、請求項7に記載の宿主細胞、請求項10に記載の活性化Tリンパ球、または請求項12に記載の医薬組成物を含んでなる医薬。

【請求項14】

がんを治療するためのまたはがん治療用薬剤の製造における、請求項1～3のいずれか

50

一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球または請求項 12 に記載の医薬組成物の使用、または

がんを治療するためのまたはがん治療用薬剤の製造における、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球または請求項 12 に記載の医薬組成物の使用であって、前記薬剤がワクチンまたは細胞療法用である、使用、または

10

がんを治療するためのまたはがん治療用薬剤の製造における、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球または請求項 12 に記載の医薬組成物の使用であって、前記がんが、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんの群から選択される、使用、または

がんを治療するためのまたはがん治療用薬剤の製造における、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球または請求項 12 に記載の医薬組成物の使用であって、前記薬剤がワクチンまたは細胞療法用であり、前記がんが、肺がん、脳がん、肝臓がん、腎臓がん、結腸直腸がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんの群から選択される、使用。

20

【請求項 15】

(a) 請求項 1～3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球を含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる容器；及び

30

(b) 前記凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第 2 の容器；
を含んでなるキット、または

(a) 請求項 1～3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球を含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる容器；及び

(b) 前記凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第 2 の容器；
を含んでなるキットであって、さらに配列番号 1～21 および配列番号 23～191 に示されるアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つ以上のペプチドを含んでなる、キット、または

40

(a) 請求項 1～3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項 4 に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項 5 に記載の T 細胞受容体、請求項 6 に記載の核酸または発現ベクター、請求項 7 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の活性化 T リンパ球を含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる容器；及び

(b) 前記凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第 2 の容器；
を含んでなるキットであって、(i) 緩衝液、(ii) 希釈剤、(iii) フィルター、

50

(i v) 針、または(V) シリンジから選択される1つまたは複数をさらに含んでなる、キット、または

(a) 請求項1～3のいずれか一項に記載のペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩、請求項4に記載の融合タンパク質またはその薬学的に許容可能な塩、請求項5に記載のT細胞受容体、請求項6に記載の核酸または発現ベクター、請求項7に記載の宿主細胞、または請求項10に記載の活性化Tリンパ球を含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる容器；及び

(b) 前記凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第2の容器；を含んでなるキットであって、さらに配列番号1～21および配列番号23～191に示されるアミノ酸配列からなる群から選択される少なくとも1つ以上のペプチドを含んでなり、(i) 緩衝液、(i i) 希釈剤、(i i i) フィルター、(i v) 針、もしくは(V) シリンジから選択される1つまたは複数をさらに含んでなる、キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫療法において使用するためのペプチド、タンパク質、核酸、および細胞に関する。特に、本発明は、がんの免疫療法に関する。本発明は、単独のまたはその他の腫瘍関連ペプチドと組み合わせられた、腫瘍関連T細胞ペプチドエпитープにさらに関し、それは、例えば、抗腫瘍免疫応答を刺激し、または生体外でT細胞を刺激して患者に移入する、ワクチン組成物の活性医薬品成分の役割を果たし得る。主要組織適合性複合体(MHC)の分子と結合しているペプチド、またはペプチドそれ自体もまた、抗体、可溶性T細胞受容体、およびその他の結合分子の標的になり得る。

20

【0002】

本発明は、ヒト腫瘍細胞のHLAクラスI分子に由来する、いくつかの新規ペプチド配列およびそれらの変異型に関し、それらは抗腫瘍免疫応答を引き起こすためのワクチン組成物中で、または薬理的／免疫学的活性化合物および細胞の開発のための標的として、使用され得る。

【背景技術】

【0003】

結腸直腸がん(CRC)は、男性では3番目に最も頻度の高いがんであり、女性では2番目に最も頻度の高いがんである。世界的に、CRCは、全ての新規診断されたがん症例の約10%を占める。2012年には、男性で746,000例、女性で614,000例の136万人の新規CRC症例が診断され、男性：女性比は1.2：1となった(World Cancer Report, 2014)。CRCは高齢者の疾患である。診断時の平均年齢は68才である(SEER Statistics, 2014)。

30

【0004】

発生率は地理的に約10倍変動し、男性と女性で類似している。男女の双方における最大発生率は、オーストラリア／ニュージーランドに見られる(男性10万人当たり年齢調整罹患率(ASR)=45人、女性10万人当たりASR=32人)。欧州における発生率は地域差が小さく、男性10万人当たりASR=38人、女性10万人当たりASR=25人である。世界で最も低い発生率は西アフリカに見られ、男性10万人当たり4.5人、女性10万人当たり3.8人である(World Cancer Report, 2014)。

40

【0005】

CRCからの総合5年生存率は、約65%である。しかし、生存率は診断時の病期に左右される。限局CRCの5年生存率は89.8%であり、領域および遠隔CRCでは、それぞれ70.5%および12.9%である。CRCは、がん死亡の4番目に高い原因である(694,000人の死亡；8.5%)(SEER Statistics, 2014；World Cancer Report, 2014)。

【0006】

50

CRCは通常、原発腫瘍（T）のサイズ、リンパ節の関与（N）、および遠隔転移（M）の発生に関する情報を組み込んだ、TNMシステムを用いて進行度診断される。UICC（Union Internationale Contre le Cancer）進行度分類はTNMシステムに基づいており、予後予測のための統計学的データを含む（Stintzing, 2014）。

【0007】

CRCを発症するリスク因子としては、生活習慣要素、遺伝性素質、および炎症状態が挙げられる。過剰なアルコール使用、喫煙、および肥満は、CRCを発症するリスクの上昇と関連する。遺伝性のリスク因子は、CRCの家族性発症、家族性腺腫様ポリープ症（FAP）、弱毒性FAP（AFAP）／弱毒性大腸腺腫様ポリポーシス（AAPC）、遺

10

【0008】

組織学的には、全CRCの90%以上が腺がんである。まれなCRC型としては、神経内分泌、扁平細胞、腺扁平上皮、紡錘細胞、および未分化がん腫が挙げられる（Fleming et al., 2012）。結腸直腸腺がんの大部分は、腺腫または異形成前駆病変に由来する。病変／がん腫の型次第で、異なる分子機序が腫瘍形成に寄与する。染色体不安定性（CIN）経路（「サプレッサー」経路）は、APC、KRASまたはp53

20

【0009】

CRCの病期次第で、異なる標準的治療法が、結腸および直腸がんに対して利用できる。標準手順としては、外科手術、放射線療法、化学療法、およびCRC標的療法が挙げられる（Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b）。

30

【0010】

CRCの治療には、腫瘍の除去が不可欠である。直腸は骨盤内に位置し、腫瘍はアクセスが困難であり得るので、直腸がんの解剖学的条件は他のCRCと異なる。高分化型の小さな直腸腫瘍（T1期）は切除が必要であるが、化学療法によるさらなる治療は必要ない。より高いT期の直腸腫瘍を有する患者は、全結腸直腸摘出（TME）および補助化学療法に先だって、フルオロピリミジンを用いたネオアジュバント放射線化学療法を受ける。化学療法治療では、薬物カペシタビンまたは5-フルオロウラシル（5-FU）が使用される。併用化学療法では、5-FU、ロイコボリン、およびオキサリプラチンを含むカクテル（FOLFOX）が推奨される（Stintzing, 2014; Berman et al., 2015b）。

40

【0011】

結腸がんの治療は、根治的結腸半切除およびリンパ節切除を伴う。早期（UICC病期I）は、追加治療を必要としない。UICC病期IIの腫瘍を有する患者には、5-FUまたはカペシタビンが投与される。UICC病期IIIを有する患者の治療としては、FOLFOXおよびXELOX（カペシタビン＋オキサリプラチン）の合剤が挙げられる（Berman et al., 2015a; Stintzing, 2014）。

【0012】

50

転移性で切除不能なCRCは、FOLFIRI（5-FU、ロイコボリン、イリノテカン）、FOLFOX、FOLFOXIRI（5-FU、イリノテカン、オキサリプラチン）、FOLFOX／カペシタビン、FOLFOX／オキサリプラチン、FOLFIRI／カペシタビンおよびイリノテカンまたはUFT（5-FU、テガフル・ウラシル）などの化学療法カクテルで治療される（Stintzing, 2014）。

【0013】

化学療法剤に加えて、上皮成長因子受容体を標的とする（EGFR、セツキシマブ、パニツマブ）、または血管内皮成長因子Aを標的とする（VEGF-A、ベバシズマブ）、いくつかのモノクローナル抗体が、高病期疾患を有する患者に投与される。第二選択治療および後期治療のために、VEGF阻害剤アフリベルセプト、チロシンキナーゼ阻害剤レ
10
ゴラフェニブ、およびチミジル酸シンセターゼ阻害剤TAS-102、およびdUTPアーゼ阻害剤TAS-114が使用され得る（Stintzing, 2014; Wilson et al., 2014）。

【0014】

最新の臨床試験は、能動免疫療法をCRCに対する治療選択肢として分析する。これらの戦略としては、腫瘍関連抗原（TAA）由来ペプチド、全腫瘍細胞、樹状細胞（DC）ワクチン、およびウイルスベクターによるワクチン接種が挙げられる（Koido
o et al., 2013）。

【0015】

ペプチドワクチンは、これまでに、がん胎児性抗原（CEA）、ムチン1、EGFR、
20
T細胞3（SART3）によって認識される扁平上皮がん抗原、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン（β-hCG）、ウィルムス腫瘍抗原1（WT1）、サバイビン-2B、MAGE3、p53、リングフィンガータンパク質43、およびミトコンドリア外膜34（TOMM34）のトランスロカーゼ、または変異KRASに向けられている。いくつかの第IおよびII相臨床試験において、患者は、抗原特異的CTL応答または抗体産生を示した。免疫学的応答とは対照的に、多くの患者は、臨床的レベルでペプチドワクチンの恩恵を被らなかった（Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011）。

【0016】

樹状細胞ワクチンは、TAA由来ペプチド、腫瘍細胞溶解産物、アポトーシス腫瘍細胞、または腫瘍RNAまたはDC腫瘍細胞融合産物のいずれかでパルス処理されたDCを含
30
んでなる。第I／II相試験にある多くの患者が、特異的免疫学的応答を示した一方で、少数のみが臨床上の便益を有した（Koido et al., 2013）。

【0017】

全腫瘍細胞ワクチンは、GM-CSFを分泌するように改変された、照射によって改変された自己由来腫瘍細胞、またはウイルス感染された照射細胞からなる。ほとんどの患者は、いくつかの第II／III相試験において臨床利益を示さなかった（Koido et
al., 2013）。

【0018】

CEAをコードするワクシニアウイルスまたは複製欠陥鳥類ポックスウイルス、ならび
40
にB7.1、ICAM-1、およびLFA-3は、第I相臨床試験におけるウイルスベクターワクチンのビヒクルとして使用されている。別の研究では、CEAおよびB7.1をコードする非複製カナリアポックスウイルスが使用された。CEA特異的T細胞応答の誘導に加えて、患者の40%は客観的な臨床応答を示した（Horig et al., 2000; Kaufman et al., 2008）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

がんの治療に伴う重度の副作用および費用を考慮すると、がん全般、そして特にCRC
50

の治療に使用し得る要素を同定する必要がある。がんのより良い診断、予後の評価、および治療成功の予測につながる、がん全般、特にCRCのためのバイオマーカーに相当する要素を同定する必要性もまたある。

【0020】

がんの免疫療法は、がん細胞を特異的に標的化しながら副作用を最小化する選択肢に相当する。がん免疫療法は、腫瘍関連抗原の存在を利用する。

【0021】

腫瘍関連抗原（TAA）の現行の分類は、次の主要群を含んでなる：

a) がん精巣抗原：T細胞によって認識され得る、これまでに同定された最初のTAAはこのクラスに属し、元々はがん精巣（CT）抗原と称されたが、それは、そのメンバーが組織学的に異なるヒト腫瘍において発現し、正常組織では精巣の精母細胞／精原細胞のみに存在し、時として胎盤に存在するためであった。精巣の細胞はクラスIおよびII HLA分子を発現しないので、これらの抗原は正常組織のT細胞によって認識され得ず、したがって免疫学的に腫瘍特異的と見なされる。CT抗原の周知の例は、MAGEファミリーメンバーおよびNY-ESO-1である。

b) 分化抗原：これらのTAAは、腫瘍と、それから腫瘍が生じる正常組織との間で共有される。既知の分化抗原のほとんどは、メラノーマおよび正常メラノサイトに見いだされる。これらのメラノサイト系関連タンパク質の多くは、メラニン生合成に関与し、したがって腫瘍特異的でないが、それでもなおがん免疫療法のために広く利用されている。例としては、メラノーマに対するチロシナーゼとMelan-A/MART-1、または前立腺がんに対するPSAが挙げられるが、これに限定されるものではない。

c) 過剰発現TAA：広範に発現されるTAAをエンコードする遺伝子は、組織学的に異なる型の腫瘍において検出され、多数の正常組織においても概してより低い発現レベルで検出されている。正常組織によってプロセスされて潜在的に提示され得るエピトープの多くは、T細胞認識の閾値レベル未満であり得る一方で、腫瘍細胞におけるそれらの過剰発現は、以前確立された免疫寛容を破壊することにより、抗がん応答を始動し得る。このクラスのTAAの顕著な例は、Her-2/neu、サバイビン、テロメラゼまたはWT1である。

d) 腫瘍特異的抗原：これらのユニークなTAAは、正常な遺伝子（β-カテニン、CDK4など）の変異から生じる。これらの分子変化のいくつかは、腫瘍性形質転換および／または進行に関連している。腫瘍特異的抗原は、通常、正常組織に対する自己免疫反応のリスクなしに、強力な免疫応答を誘導できる。他方、これらのTAAは、ほとんどの場合、その上でそれらが同定されたまさにその腫瘍のみと関係があり、通常は、多くの個々の腫瘍間で共有されない。腫瘍特異的（関連）イソ型を有するタンパク質では、ペプチドの腫瘍特異性（または関連性）はまた、ペプチドが腫瘍（関連）エクソンに由来する場合に生じてよい。

e) 異常な翻訳後修飾から生じるTAA：このようなTAAは、特異的でなく腫瘍において過剰発現もされないタンパク質から生じてよいが、それでもなお、腫瘍において主に活性である翻訳後プロセスによって腫瘍関連になる。このクラスの例は、腫瘍にMUC1のような新規エピトープをもたらす改変グリコシル化パターン、または腫瘍特異的であってもなくてもよい分解中のタンパク質スプライシングのような事象から生じる。

f) オンコウイルスタンパク質：これらのTAAはウイルスタンパク質であり、それらは発がん過程において重要な役割を果たしてもよく、外来性である（ヒト由来でない）ため、それらはT細胞応答を誘起し得る。このようなタンパク質の例は、子宮頸がんにおいて発現される、ヒト乳頭腫16型ウイルスタンパク質E6およびE7である。

【0022】

T細胞に基づく免疫療法は、主要組織適合性複合体（MHC）の分子によって提示される、腫瘍関連または腫瘍特異的タンパク質由来ペプチドエピトープを標的とする。腫瘍特異的Tリンパ球によって認識される抗原、すなわちそれらのエピトープは、酵素、受容体、転写因子などの全てのタンパク質クラスに由来する分子であり得て、それらはそれぞれ

10

20

30

40

50

の腫瘍細胞において発現されて、同一起源の非改変細胞と比較して、通常、上方制御される。

【0023】

MHC分子には、MHCクラスIおよびMHCクラスIIの2つのクラスがある。MHCクラスI分子は α 重鎖および β 2ミクログロブリンから構成され、MHCクラスII分子は α および β 鎖から構成される。それらの三次元立体構造は、ペプチドとの非共有結合相互作用のために使用される、結合溝をもたらす。

【0024】

MHCクラスI分子は、ほとんどの有核細胞上に見いだされる。それらは、主に内因性タンパク質、欠陥リボソーム産物(DRIP)、およびより大型のペプチドのタンパク質切断から得られる、ペプチドを提示する。しかし、エンドソームコンパートメントまたは外因性起源に由来するペプチドもまた、MHCクラスI分子上に頻繁に見いだされる。この非古典的様式のクラスI提示は、文献中で交差提示と称される(Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990)。MHCクラスII分子は、大部分はプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に見いだされ、例えば、エンドサイトーシス中にAPCに取り込まれて引き続きプロセッシングされる、外因性または膜貫通タンパク質のペプチドを主に提示する。

【0025】

ペプチドとMHCクラスIの複合体が、適切なT細胞受容体(TCR)を有するCD8陽性T細胞によって認識される一方で、ペプチドとMHCクラスII分子の複合体は、適切なTCRを有するCD4陽性ヘルパーT細胞によって認識される。その結果、TCR、ペプチド、およびMHCは、化学量論的に1:1:1の量で存在することが良く知られている。

【0026】

CD4陽性ヘルパーT細胞は、CD8陽性細胞傷害性T細胞による、効果的な応答の誘導と維持において重要な役割を果たす。腫瘍関連抗原(TAA)に由来するCD4陽性T細胞エピトープの同定は、抗腫瘍免疫応答を始動させる医薬品の開発に非常に重要である(Gnjatic et al., 2003)。腫瘍部位では、Tヘルパー細胞が、細胞毒性T細胞(CTL)親和的サイトカイン環境を維持して(Mortara et al., 2006)、例えば、CTL、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、および顆粒球などのエフェクター細胞を引きつける(Hwang et al., 2007)。

【0027】

炎症不在下では、MHCクラスII分子の発現は、免疫系細胞、特に、例えば、単球、単球由来細胞、マクロファージ、樹状細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に主に限定される。がん患者においては、腫瘍細胞がMHCクラスII分子を発現することが判明している(Dengjel et al., 2006)。

【0028】

伸長された(より長い)本発明のペプチドは、MHCクラスII活性エピトープとして作用し得る。

【0029】

MHCクラスIIエピトープによって活性化されたTヘルパー細胞は、抗腫瘍免疫におけるCTLのエフェクター機能を統合するのに重要な役割を果たす。TH1型のTヘルパー細胞応答を始動するTヘルパー細胞エピトープは、それらの細胞表面に腫瘍関連ペプチド/MHC複合体を提示する腫瘍細胞に向けられた、細胞傷害機能をはじめとする、CD8陽性キラーT細胞のエフェクター機能を支持する。このようにして腫瘍関連Tヘルパー細胞ペプチドエピトープは、単独で、またはその他の腫瘍関連ペプチドとの組み合わせで、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の活性医薬品成分の役割を果たし得る。

【0030】

例えば、マウスなどの哺乳類動物モデルにおいて、CD8陽性Tリンパ球の不在下であ

10

20

30

40

50

っても、インターフェロン γ (IFN γ) の分泌による血管新生阻害を通じて腫瘍発現を阻害するには、CD4陽性T細胞で十分であることが示された (Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999)。CD4 T細胞が、直接抗腫瘍エフェクターであるという証拠がある (Braumüller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

【0031】

HLAクラスII分子の構成的発現は、通常、免疫細胞に限定されるので、原発性腫瘍からクラスIIペプチドを直接単離する可能性があり得るとは、これまで考えられなかった。しかし、Dengjel et al. は、いくつかのMHCクラスIIエピトープを腫瘍から直接、成功裏に同定した (国際公開第2007/028574号パンフレット、欧州特許第1760088B1号明細書)。

10

【0032】

CD8およびCD4依存性の双方のタイプの応答は、抗腫瘍効果に共同して相乗的に寄与するので、CD8+T細胞 (リガンド:MHCクラスI分子+ペプチドエピトープ)、またはCD4陽性Tヘルパー細胞 (リガンド:MHCクラスII分子+ペプチドエピトープ) のどちらかによって認識される、腫瘍関連抗原の同定および特性解析は、腫瘍ワクチンの開発にとって重要である。

【0033】

MHCクラスIペプチドが細胞性免疫応答を始動 (惹起) するためには、それはまた、MHC分子に結合しなくてはならない。この過程は、MHC分子の対立遺伝子と、ペプチドのアミノ酸配列の特定の多型性とに依存する。MHCクラスI結合ペプチドは、通常は8~12アミノ酸残基長であり、通常は、MHC分子の対応する結合溝と相互作用するこれらの配列中に、2つの保存残基 (「アンカー」) を含有する。このようにして、各MHC対立遺伝子は、どのペプチドが結合溝と特異的に結合し得るかを決定する、「結合モチーフ」を有する。

20

【0034】

MHCクラスI依存免疫反応においては、ペプチドは腫瘍細胞によって発現される特定のMHCクラスI分子に結合できるだけでなく、それらはまた、引き続いて特異的T細胞受容体 (TCR) を有するT細胞によって認識されなくてはならない。

【0035】

タンパク質がTリンパ球によって腫瘍特異的または腫瘍関連抗原として認識され、治療で利用されるためには、特定の必要条件が満たされなくてはならない。抗原は主に腫瘍細胞によって発現され、健常組織によって発現されず、または比較的少量発現されるべきである。好ましい実施形態では、ペプチドは、腫瘍細胞によって、健常組織と比較して過剰提示されるべきである。それぞれの抗原は、ある種の腫瘍に存在するだけでなく、高い濃度 (すなわち、それぞれのペプチド細胞当たりのコピー数) で存在することもさらに望ましい。腫瘍特異的および腫瘍関連抗原は、例えば、細胞周期調節またはアポトーシス抑制における機能のために、正常細胞から腫瘍細胞への形質転換に直接関与するタンパク質に由来することが多い。さらに、形質転換の直接原因となるタンパク質の下流標的が、上方制御されてもよく、(und)したがって間接的に腫瘍関連であってもよい。このような間接的腫瘍関連抗原もまた、ワクチン接種アプローチの標的であってもよい (Singh-Jasuja et al., 2004)。このようなペプチド (「免疫原性ペプチド」) が、腫瘍関連抗原に由来して、生体外または生体内T細胞応答をもたらすことを確実にするためには、抗原のアミノ酸配列内にエピトープが存在することが必須である。

30

40

【0036】

基本的に、MHC分子に結合できるあらゆるペプチドが、T細胞エピトープとして機能してもよい。生体外または生体内T細胞応答誘導のための必要条件是、対応するTCRを有するT細胞の存在、およびこの特定のエピトープに対する免疫寛容の不在である。

【0037】

したがって、TAAは、腫瘍ワクチンをはじめとするが、これに限定されるものではな

50

い、T細胞に基づく治療法開発の出発点である。TAAを同定して特性決定する方法は、通常は、患者または健常人から単離され得るT細胞の使用に基づき、またはそれらは、腫瘍および正常組織間の示差的転写プロファイル、または示差的ペプチド発現パターンの生成に基づく。しかし、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株において過剰発現され、またはこのような組織または細胞株において選択的に発現される遺伝子の同定は、免疫療法においてこれらの遺伝子から転写される抗原の使用に関する、正確な情報を提供しない。これは、これらの抗原のエピトープの個々の亜集団のみが、このような用途に適するためであり、その理由は、対応するTCRを有するT細胞が存在しなくてはならず、この特定のエピトープに対する免疫寛容が不在または最小でなくてはならないからである。したがって本発明の非常に好ましい実施形態では、それに対する機能性および／または増殖性T細胞が見いだされる、過剰にまたは選択的に提示されるペプチドのみを選択することが、重要である。このような機能性T細胞は、特異的抗原による刺激時にクローン増殖され得て、エフェクター機能を果たすことができるT細胞（「エフェクターT細胞」）と定義される。

10

【0038】

本発明による特異的TCR（例えば、可溶性TCR）および抗体またはその他の結合分子（スキュフォールド）によってペプチドMHCを標的化する場合、基礎となるペプチドの免疫原性は二次的である。これらの場合には、提示が決定要因である。

【課題を解決するための手段】

【0039】

本発明の第1の態様では、本発明は、配列番号1～配列番号191、または配列番号1～配列番号191と少なくとも77%、好ましくは少なくとも88%相同的な（好ましくは少なくとも77%または少なくとも88%同一の）その変異配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドに関し、その中で前記変異体は、MHCと結合し、および／またはT細胞と前記ペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩との交差反応を誘導し、その中で前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

20

【0040】

本発明は、配列番号1～配列番号191、または配列番号1～配列番号191と少なくとも77%、好ましくは少なくとも88%相同的な（好ましくは少なくとも77%または少なくとも88%同一の）その変異体からなる群から選択される配列を含んでなる、本発明のペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたはその変異型は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14アミノ酸の全長を有する。

30

【0041】

続く表は、本発明によるペプチド、それらの各配列番号、およびそれらのペプチドの予測される起源（基礎）遺伝子を示す。表1および表2の全てのペプチドは、HLA-A*02に結合する。表2のペプチドは、誤り率が高い、またはアルゴリズムを使用して計算された、ハイスループットスクリーニングの結果としての大きなリスト中で以前開示されているが、これまでがんとは全く関連付けられていなかった。表3のペプチドは、本発明のその他のペプチドとの組み合わせで有用であってもよい、追加的なペプチドである。表4AおよびBのペプチドは、それぞれの基礎ポリペプチドの過剰発現または過剰提示を伴う様々なその他の悪性腫瘍の診断および／または治療においてさらに有用である。

40

【0042】

【表 1 - 1】

表 1:本発明によるペプチド

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
1	ALIKQLFEA	168417, 441234, 89958	ZNF679, ZNF716, SAPCD2
2	ALLPRYFFL	23120	ATP10B
3	RLIPDTLYSV	1303	COL12A1
4	RLAELTVDEFL	26155, 401010	NOC2L, LOC401010
5	WLFDDGGLTL	6557, 6558, 6559	SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3
6	FLAELPGSLSL	5326	PLAGL2
7	YLTRHLAVL	4583	MUC2
8	ALMLQGVDLL	3329	HSPD1
9	ILDDHLSRV	8313	AXIN2
10	RMYNKIFAI	80201	HKDC1
11	YLFKFTFNM	90161	HS6ST2
12	ALVQGILERV	4843	NOS2
13	FLLAEDTKV	10592	SMC2
14	FLDKPEDVLL	2036	EPB41L1
15	LQLDKEFQL	24140	FTSJ1
16	VLVDQSWVL	5655	KLK10
17	ALAAARVEL	6558	SLC12A2
18	FLSSLKGGLL	83608	C18orf21
19	RLYTKLLNEA	4651	MYO10
20	YKDGDVML	11180	WDR6
21	VLIDHRWVL	43849	KLK12
22	GLIDEVMVL	54905	CYP2W1
23	FLDANGHFV	54905	CYP2W1
24	VLDGVLMEL	4190	MDH1
25	SLADRLIGV	57535	KIAA1324

10

20

【表 1 - 2】

26	GLASKENFSNVSL	6840	SVIL
27	LLADEDSSYL	51510	CHMP5
28	ALTEIQEFI	5591	PRKDC
29	QMLDVAIRV	8943	AP3D1
30	GLSSAYGGL	10787, 3856, 728638	NCKAP1, KRT8, KRT8P3
31	LLYGKYVSV	84065	TMEM222
32	KLNTETFGV	149986	LSM14B
33	ALWEKNTHL	11190	CEP250
34	ILLEKSVSV	80728	ARHGAP39
35	KLLDLTVRI	10562	OLFM4
36	GLLESPSIFNFTA	23185	LARP4B
37	GLFAGLGAGAGA	10916	MAGED2
38	SLAPTPVSA	8870	IER3
39	GLNGGSPAAA	1045	CDX2
40	ALSNVIHKV	5268	SERPINB5
41	ILDDSFKLL	9843	HEPH
42	SILDDSFKL	9843	HEPH
43	TLDAAQPRV	6649	SOD3
44	SLESKLSV	9289	GPR56
45	ALAELLHGA	26470	SEZ6L2
46	GLDDRYSLV	11187	PKP3
47	KLYERCEVV	2065	ERBB3
48	FLDASDPAL	65266	WNK4
49	SGMGGITAV	3856	KRT8
50	TLMAEMHV	2186	BPTF
51	QVWEIQHTV	26290	GALNT8
52	ALDSSNSMQTI	3875	KRT18
53	FLLGSEIKL	54885	TBC1D8B
54	ALLNGEYLLAA	57418	WDR18
55	QIITSVSV	5378	PMS1
56	VLFTDEGVPKFL	4731	NDUFV3
57	NLLEKENYL	5318	PKP2
58	AMADKMDMSL	10189	ALYREF
59	LLTDNVVKL	79810	PTCD2
60	VLDEDEPRFL	23287	AGTPBP1
61	KLLKLFQGV	26058	GIGYF2
62	YLAPENGYL	6625	SNRNP70
63	KLFSILSTV	54919	HEATR2
64	KTLGKLWRL	30812, 6662, 6663	SOX8, SOX9, SOX10
65	FGAPGIISA	5725	PTBP1
66	GLDDGPDFL	58533	SNX6
67	SLNDLEKDVMLL	6597	SMARCA4
68	SILQFVHMV	5800	PTPRO
69	GMLNEAEGKAIKL	4629	MYH11
70	MISELEVR	4629	MYH11
71	RLWTEIPTAI	3710	ITPR3

10

20

30

40

【表 1 - 3】

72	YLLDYPNNLL	26057	ANKRD17
73	YLFDAIVSM	51074	APIP
74	YLMGFLHAV	23779, 553158, 55615	ARHGAP8, PRR5-ARHGAP8, PRR5
75	EMIENIQSV	1080	CFTR
76	YLIGEKQHYL	7429	VIL1
77	SLLKRDFGA	1655	DDX5
78	ALDPELLLL	57805	KIAA1967
79	SLAADQLLKL	9295	SRSF11
80	QVDEVVDIMRV	3604, 6844, 9341	TNFRSF9, VAMP2, VAMP3
81	ALLSQQTHL	7050	TGIF1
82	QLYEEDPTKL	10270	AKAP8
83	LTIEDGIFEV	3306, 3312, 100287551	HSPA2, HSPA8, HSPA8P8
84	SMVEDITGLRL	1832	DSP
85	ILHDINSDGVL	4924	NUCB1
86	KVFPKGISV	56667	MUC13
87	LLFDAPDLRL	55561	CDC42BPG
88	KLDIKVETV	55243	KIRREL
89	SLIEYEFVR	3655	ITGA6
90	GLLKPLNVVL	10969	EBNA1BP2
91	TVDVATPSV	8924	HERC2
92	WIDDTSAFV	5073	PARN
93	SLQELRLLL	55502	HES6
94	KSMDIVLTV	4586, 727897	MUC5AC, MUC5B
95	AILDAHIEV	26290	GALNT8
96	KLYSRLVYV	387496	RASL11A
97	ALWWGVVTV	3784	KCNQ1
98	AMNGKSFSV	79572	ATP13A3
99	KLLEVDLDTV	4648	MYO7B
100	SLDDFLATA	55341	LSG1
101	GLSEGHTFQV	2318	FLNC
102	KILVSLIEV	10422	UBAC1
103	FLFGYPKRL	64110	MAGEF1
104	ILLTIKDDTIYL	4583	MUC2
105	YALDLSTFL	8870	IER3
106	SLISEKILL	26504	CNNM4
107	ALLGGGPYML	80004	ESRP2
108	SLAELVPGVGGI	9742	IFT140
109	ALDGDQMEL	3192	HNRNPU
110	LLGELPRLLLL	1604	CD55
111	HMDDGGYSM	27316, 494115	RBMX, RBMXL1
112	KLGGVLIYL	51809	GALNT7
113	ILYDLQQNL	3783	KCNN4
114	TAVGHALVL	1293	COL6A3
115	SLFDVSHML	275	AMT
116	LVYQFVHPI	25803	SPDEF
117	TLQPVNDSTISL	1266	CNN3

10

20

30

40

【表 1 - 4】

118	LLADLKTVM	5141, 5142, 5143, 5144	PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D
119	ILYQTVTGL	83732	RIOK1
120	VLYEGVDEV	93432	MGAM2
121	SLAPNIISQL	25824	PRDX5
122	SLMGMLKL	11169	WDHD1

【 0 0 4 3】

【表 2 - 1】

表 2: がん関連性が以前知られていない本発明による追加的なペプチド ; J*=ホスホセリン

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
123	KTLESYLL	6240	RRM1
124	RVLPPSALQSV	9212	AURKB
125	KLGFGLLVEL	9088	PKMYT1
126	TLAKYLMEL	891, 9133	CCNB1, CCNB2
127	RLAELTVDEFLA	26155	NOC2L
128	MLDDRAYLV	23511	NUP188
129	VLIDVLKEL	23019	CNOT1
130	GLGGSQIDTHL	23215	PRRC2C
131	KLLDVVHPA	10574	CCT7
132	ALLNAILHSA	25926	NOL11
133	RTFEKIEEV	3978	LIG1
134	GVAGGSILKGV	1968, 255308	EIF2S3, LOC255308
135	KLQEEIPVL	1062	CENPE
136	KLFDIFSQQV	55737	VPS35
137	QLTEIKPLL	57446	NDRG3
138	KQFEGTVEI	675	BRCA2
139	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
140	LLNEILEQV	64151	NCAPG
141	AVIEHLERL	283459	GATC
142	SLVQRVETI	1894	ECT2
143	KLSDVWKEL	197259	MLKL
144	LLNDRIWLA	90204	ZSWIM1
145	LLLEVVKQV	65065	NBEAL1
146	ALSDETWGL	2886	GRB7
147	TLTELRAFL	8242	KDM5C
148	RLENMTEVV	23042	PDXDC1
149	YQFDKVGILTL	8563	THOC5
150	RLADLEALKV	10535	RNASEH2A
151	SAQGSVSLTACKV	100507703, 3105	LOC100507703, HLA-A
152	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
153	ILFSEDSTKLFV	84916	CIRH1A
154	KLPSETIFVGC	50628	GEMIN4
155	RLLGEEVVRV	9894	TEL02
156	SLMMTIINL	7153	TOP2A
157	SLIERDLKL	9875	URB1
158	GLLDPSVFHV	79050	NOC4L
159	VLVDDDGKVV	79022	TMEM106C
160	KLLEFDQLQL	8871	SYNJ2

10

20

30

40

【表 2 - 2】

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
161	FLKNELDNV	10293	TRAIP
162	KLMDYIDEL	85444	LRRCC1
163	RLLHEVQEL	10540	DCTN2
164	KMLDEILLQL	5425	POLD2
165	RLLDFPEAMVL	23113	CUL9
166	GLLEARGILGL	990	CDC6
167	SVIDHIHLISV	10755	GIPC1
168	GLIRFPLMTI	55643	BTBD2
169	YLAHFIEGL	64328	XP04
170	ALAGGITMV	790	CAD
171	RLQETEGMVAV	10042	HMGXB4
172	LLDVTVMQV	22820	COPG1
173	KLGDLMVLL	57647	DHX37
174	ILLDDNMQIRL	5261	PHKG2
175	TLLGGKEAQLGV	94059	LENG9
176	RTLDKVLEV	9933	KIAA0020
177	ALLQGAIESV	25894	PLEKHG4
178	YLFREPATI	4728	NDUFS8
179	RLLJPLSSA	125950	RAVER1
180	NLEIAPHL	2820	GPD2
181	NLFDLGGQYLRV	22827	PUF60
182	SLNKWIFTV	339665	SLC35E4
183	TLQEVVTGV	55750	AGK
184	SLLDENNVSSYL	5591	PRKDC
185	VLYTGVRV	64682	ANAPC1
186	KMSEKILLL	5690	PSMB2
187	GLHNVYGI	23019	CNOT1
188	FLVDGPRVQL	90204	ZSWIM1
189	AISEVIGKITA	9183	ZW10
190	AMAEMVLQV	9918	NCAPD2
191	QLFSEIHNH	55755	CDK5RAP2

10

20

30

【 0 0 4 4】

【表 3 - 1】

表 3:例えば、個別化がん治療のために有用なペプチド; J*=ホスホセリン

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
192	KIQEMQHFL	4321	MMP12
193	KLSPITVGL	8313	AXIN2
194	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
195	LLGERVAL	23475	QPR1
196	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
197	SLFGQDVKAV	26036	ZNF451
198	VLYGPDVPTI	4680	CEACAM6
199	FLLEREQLL	165055	CCDC138
200	SAVDFIRTL	9263	STK17A
201	GJFNGALAAV	39	ACAT2
202	GLAALAVHL	2175	FANCA
203	KLIDLSQVMYL	346389	MACC1

40

【表 3 - 2】

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
204	KLLDLETERILL	2803	GOLGA4
205	RLHDENILL	23322	RPGRIPI1L
206	RIAGIRGIQGV	23167	EFR3A
207	KLCEGFNEV	51142, 646630	CHCHD2, CHCHD2P8
208	RLIDRIKTV	60560	NAA35
209	KLQDGLLHI	7076	TIMP1
210	KLAVALLAA	3576	IL8
211	SLFGKKYIL	2274	FHL2
212	FLLDGSANV	1293	COL6A3
213	LLWAPTAQA	389812	LCN15
214	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
215	KLQEKIQEL	1062	CENPE
216	YLWDLDHGFAGV	832	CAPZB
217	KLLDTMVDFTL	100527963, 11243	PMF1-BGLAP, PMF1
218	KLSWDLIYL	51148	CERCAM
219	FLDEKGRCV	4583	MUC2
220	KMDPVAYRV	5859	QARS
221	ILNVDGLIGV	47	ACLY
222	GVIAEILRGV	10528	NOP56
223	VLQMDSRLYL	983	CDK1
224	QLQEGKNVIGL	8407	TAGLN2
225	YLYGQTTTYL	7153	TOP2A
226	FLVDGSWSV	1303	COL12A1
227	LTAPPEALLMV	79050	NOC4L
228	SMSGYDQVL	3187, 3188	HNRNPH1, HNRNPH2
229	YLLEKFVAV	1663, 440081, 642846	DDX11, DDX12P, LOC642846
230	AMSSKFFLV	7474	WNT5A
231	RLFADILNDV	64755	C16orf58
232	RLLDSVSRL	3918	LAMC2
233	RLDDLKMTV	3918	LAMC2
234	KMFESFIESV	5576	PRKAR2A
235	LLHEENFSV	6942	TCF20
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	KLVEFDLGA	10460	TACC3
238	NMLEAVHTI	7272	TTK
239	QLIEKNWLL	56992	KIF15
240	VLAPRVLRA	5954	RCN1
241	ILIDWLQVQ	891	CCNB1
242	RLEEDGDVAM	10482	NXF1
243	TLMDMRLSQV	24148	PRPF6
244	SLHFLILYV	487, 488	ATP2A1, ATP2A2
245	QLIDYERQL	11072	DUSP14
246	GLTDNIHLV	25878	MXRA5
247	SLDTLMTYV	22829	NLGN4Y
248	ALYGDIDAV	5743	PTGS2

10

20

30

40

【表 3 - 3】

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
249	ALYGRLEV	23294	ANKS1A
250	ALCEENMRGV	1938	EEF2
251	SLLQATDFMSL	7070	THY1
252	YVYQNNIYL	2191	FAP
253	KLLDEVTYLEA	1573	CYP2J2
254	VLFEALWHV	2194	FASN
255	ALALWIPSL	200634	KRTCAP3
256	GLLEELTV	642475	MROH6
257	SLADFMQEV	23019	CNOT1
258	LLYEGKLT	440107	PLEKHG7
259	ALADKELLPSV	84883	AIFM2
260	ALLAEGITWV	54499	TMC01
261	YLYDSETKNA	4316	MMP7
262	VLAKPGVISV	1293	COL6A3
263	LLAGQTYHV	1293	COL6A3
264	RLLDVLAPLV	80781	COL18A1
265	LLDKKIGV	10576	CCT2

10

【0045】

本発明は、さらに、例えば、肺がん、脳がん、胃がん、腎臓がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん（MCC）、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんなどの増殖性疾患の治療において使用するための本発明によるペプチドに一般に関する。

20

【0046】

特に好ましいのは、配列番号1～配列番号191からなる群から選択される、本発明による単独のまたは組み合わされたペプチドである。より好ましいのは、配列番号1～配列番号68（表1を参照されたい）からなる群から選択される単独のまたは組み合わせのペプチド、およびCRC、肺がん、脳がん、胃がん、腎臓がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がん、および好ましくはCRCの免疫療法におけるそれらの使用である。

30

【0047】

最も好ましいのは、配列番号1、3、6、11、13、16、18、19、22、23、24、26、31、32、34、37、40、44、45、59、67、71、82、87、88、100、103、105、113、123、124、126、129、131、132、133、135、137、140、142、150、152、153、および配列番号166からなる群から選択される単独のまたは組み合わせのペプチド、およびCRC、肺がん、脳がん、胃がん、腎臓がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がん、および好ましくはCRCの免疫療法におけるそれらの使用である。配列番号22のペプチドもまた、以下で説明される各T細胞受容体（TCR）を作製する方法で特に好ましい。

40

【0048】

以下の表4AおよびBに示されるように、本発明によるペプチドの多くは、その他の腫瘍型上にもまた見られ、したがって、その他の適応症のための免疫療法においても使用され得る。図1Dおよび実施例1もまた参照されたい。

【0049】

表4A: 本発明によるペプチド、およびその他の増殖性疾患、特にその他のがん性疾患における、それらの具体的使用。表は、選択されたペプチドについて、測定された腫瘍サンプルの5%超で過剰提示されるか、または測定された腫瘍サンプルの5%超で3を超える腫瘍対正常組織の幾何学平均比で提示されるかのどちらかである、それらがその上で発見された追加的な腫瘍型を示す。過剰提示は、最大提示がある正常サンプルと比較して、より高い

50

腫瘍サンプル上の提示と定義される。

【表 4 A - 1】

配列番号	配列	その他の関連臓器／疾患
1	ALIKQLFEA	肺、脳、卵巣、食道
3	RLIPDTLYSV	肺、脾臓、乳房、卵巣、食道
4	RLAELTVDEFL	肺、卵巣
6	FLAELPGSLSL	肺、肝臓、白血球、メラノーマ、卵巣
8	ALMLQGVDLL	脾臓、白血球
10	RMYNKIFAI	肝臓
11	YLFKTFNM	肺、脳、食道
13	FLLAEDTKV	メラノーマ
15	LQLDKEFQL	肺、食道
16	VLVDQSWVL	卵巣
18	FLSSLKGGLL	卵巣
19	RLYTKLLNEA	脳、食道
25	SLADRLIGV	前立腺、卵巣
26	GLASKENFSNVS	肺、肝臓、食道
29	QMLDVAIRV	白血球
31	LLYGKYSV	肺、腎臓、脳、肝臓、白血球、卵巣、食道
33	ALWEKNTHL	肝臓、MCC
34	ILLEKSVSV	卵巣
37	GLFAGLGGAGA	食道
38	SLAPTPVSA	脾臓
40	ALSNVIHKV	肺、脾臓、食道
44	SLESKLTSV	脳、脾臓、卵巣
45	ALAELLHGA	肺、腎臓、脳、肝臓、前立腺、乳房、卵巣
46	GLDDRYSLV	食道
47	KLYERCEVV	肝臓
48	FLDASDPAL	腎臓、前立腺
53	FLLGSEIKL	腎臓、脾臓
54	ALLNGEYLLAA	肝臓、卵巣、食道
55	QIITSVSV	脾臓
56	VLFTDEGVPKFL	肺、腎臓、肝臓
57	NLLEKENYL	卵巣
58	AMADKMDMSL	脳、白血球、メラノーマ
59	LLTDNVVKL	肺、肝臓、食道
61	KLLKLFQGV	腎臓
62	YLAPENGYL	肺、肝臓、メラノーマ、食道
63	KLFSILSTV	脳、肝臓、前立腺、卵巣、食道
65	FGAPGIISA	胃、食道
67	SLNDLEKDVMLL	白血球、メラノーマ
69	GMLNEAEGKAIKL	前立腺
70	MISELEVRL	腎臓、胃、前立腺、食道
71	RLWTEIPTAI	肝臓
72	YLLDYPNNLL	肺、腎臓、脳、肝臓、白血球、乳房、卵巣、食道
74	YLMGFLHAV	卵巣
76	YLIGEKQHYL	肝臓

10

20

30

40

【表 4 A - 2】

配列番号	配列	その他の関連臓器／疾患
77	SLKRDFGA	肺、乳房
79	SLAADQLKL	肺、肝臓
80	QVDEVVDIMRV	白血球
81	ALLSQQTHL	食道
82	QLYEEDTKL	白血球、食道
83	LTIEDGIFEV	腎臓、白血球、MCC、メラノーマ、食道
84	SMVEDITGLRL	肺、肝臓、食道
87	LLFDAPDLRL	肺、卵巣
88	KLDIKVETV	肺、腎臓、肝臓、メラノーマ、卵巣、食道
89	SLIEYEFV	肝臓、食道
90	GLLKPGNNVL	肺、食道
91	TVDVATPSV	乳房、卵巣
92	WIDDTSAFV	メラノーマ
98	AMNGKSFSV	肝臓、食道
101	GLSEGHFQV	前立腺
102	KILVSLIEV	肺、腎臓、卵巣、食道
103	FLFGYPKRL	脳、肝臓、前立腺
105	YALDLSTFL	腎臓、肝臓
107	ALLGGPYML	肺
108	SLAELVPGVGGI	腎臓、脳、肝臓、卵巣
110	LLGELPRLLL	肺、脾臓、白血球
116	LVYQFVHPI	脾臓、前立腺、乳房、卵巣
117	TLQPVDNSTISL	肺、腎臓、肝臓、脾臓、食道
118	LLADLKMV	脳、白血球、メラノーマ
119	ILYQTVTGL	食道
121	SLAPNIISQL	肝臓、白血球
123	KTLSRYLL	肺、腎臓、肝臓、MCC、卵巣、食道
124	RVLPPSALQSV	肺、肝臓、MCC、メラノーマ、卵巣、食道
125	KLQDFGLLVEL	肺、脳、メラノーマ、卵巣、食道
126	TLAKYLMEL	肺、脳、肝臓、卵巣、食道
127	RLAELTVDEFLA	卵巣
128	MLDDRAYLV	肺、脳、乳房、MCC、卵巣、食道
129	VLIDVLKEL	腎臓、白血球
131	KLLDVVHPA	肺、脳、肝臓、前立腺、卵巣
132	ALLNAILHSA	肺、脳、肝臓、卵巣、食道
133	RTFEKIEEV	肺、腎臓、脳、胃、肝臓、乳房、MCC、卵巣、食道
134	GVAGGSILKGV	肺、肝臓、メラノーマ、卵巣、食道
135	KLQEEIPVL	肺
136	KLFDIFSQQV	肝臓
137	QLTEIKPLL	脳、卵巣
138	KQFEGTVEI	食道
139	VLLNEILEQV	肺、肝臓、メラノーマ、卵巣、食道
140	LLNEILEQV	肺、メラノーマ、卵巣
141	AVIEHLERL	肺、腎臓、食道
142	SLVQRVETI	肺、腎臓、肝臓、メラノーマ、卵巣、食道
143	KLSDVVKEL	肺
144	LLNDRIWLA	食道

10

20

30

40

【表 4 A - 3】

配列番号	配列	その他の関連臓器／疾患
145	LLLEVVKQV	メラノーマ、
146	ALSDETWGL	腎臓、胃、脾臓、乳房、卵巣
147	TLTELRAFL	腎臓
148	RLEENMTEVV	肝臓
149	YQFDKVGILTL	白血球、メラノーマ
151	SAQGSVDVSLTACKV	肺
152	KLLAVIHEL	肺、腎臓、脾臓、卵巣、食道
153	ILFSEDSTKLFV	肺、肝臓、白血球、メラノーマ、卵巣、食道
154	KLPSETIFVGC	肺、肝臓、白血球、卵巣、食道
155	RLLGEEVVRV	食道
156	SLMMTIINL	肺、肝臓、メラノーマ
157	SLIERDLKL	肺、腎臓、脳、肝臓、食道
158	GLLDPSVFHV	腎臓、脳、肝臓、食道
159	VLVDDDGKVV	肝臓、メラノーマ、卵巣
160	KLLEFDQLQL	肺、腎臓、白血球、卵巣
161	FLKNELDNV	肺、肝臓、白血球、乳房、メラノーマ、卵巣
162	KLMDYIDEL	脳、食道
163	RLLHEVQEL	脳
164	KMLDEILLQL	脳
165	RLLDFPEAMVL	肺、卵巣
166	GLLEARGILGL	肝臓
167	SVIDHIHLISV	肺、メラノーマ、卵巣
168	GLIRFPLMTI	肺、腎臓、肝臓
169	YLAHFIEGL	脳、肝臓、白血球、食道
170	ALAGGITMV	肺、腎臓、肝臓、脾臓、メラノーマ、食道
171	RLQETEGMVAV	肝臓、白血球、MCC
172	LLLDTVTMQV	腎臓、メラノーマ、卵巣
173	KLGDLMVLL	白血球
174	ILLDDNMQIRL	肝臓、メラノーマ、卵巣
175	TLLGGKEAQALGV	卵巣
177	ALLQGAIESV	メラノーマ、卵巣、食道
178	YLFREPATI	肺、脳、肝臓、前立腺、メラノーマ、卵巣、食道
180	NLLEIAPHL	脳、白血球、乳房
181	NLFDLGGQYLRV	脳、肝臓、卵巣
183	TLQEVVTGV	前立腺、乳房
184	SLLDENNVSSYL	肺、腎臓、肝臓、脾臓、前立腺、MCC、メラノーマ、卵巣、食道
185	VLYTGVRV	白血球、メラノーマ、卵巣
186	KMSEKILL	食道
187	GLHNVVYGI	前立腺
188	FLVDGPRVQL	乳房、メラノーマ
189	AISEVIGKITA	卵巣
190	AMAEMVLQV	肺
191	QLFSEIHNL	脳、肝臓
192	KIQEMQHFL	肺、食道
193	KLSPTVVGL	肝臓、卵巣
194	SLYKGLLSV	肺、腎臓、脳、肝臓、卵巣、食道

10

20

30

40

【表 4 A - 4】

配列番号	配列	その他の関連臓器／疾患
195	LLLGERVAL	肝臓、卵巣
197	SLFGQDVKAV	MCC、食道
198	VLYGPDVPTI	脾臓
199	FLLEREQLL	腎臓、白血球、メラノーマ
200	SAVDFIRTL	乳房、食道
201	GJFNGALAAV	脳、脾臓
202	GLAALAVHL	メラノーマ、卵巣、食道
203	KLIDLSQVMYL	肺、腎臓、脾臓、卵巣
204	KLLDLETERILL	肺、肝臓、前立腺、卵巣
205	RLHDENILL	肺、腎臓、脳、肝臓、脾臓、前立腺、卵巣、食道
206	RIAGIRGIQGV	肺、腎臓、肝臓、前立腺、卵巣
207	KLCEGFNEV	脳、肝臓
208	RLIDRIKTV	肺、脳、肝臓、卵巣
209	KLQDGLLHI	腎臓、脳、肝臓、脾臓
210	KLAVALLAA	肺、腎臓、脳、肝臓、食道
211	SLFGKKYIL	腎臓
212	FLLDGSANV	肺、脾臓、食道
214	SVLEKEIYSI	肺、肝臓、前立腺、乳房、卵巣、食道
215	KLQEKIQEL	肺、卵巣、食道
216	YLWDLHGFGV	肺、脳、肝臓、前立腺、メラノーマ、卵巣、食道
217	KLLDTMVDFTL	肺、腎臓、脳、肝臓、卵巣、食道
218	KLSWDLIYL	肺、腎臓
220	KMDPVAYRV	肝臓、前立腺
221	ILNVDGLIGV	腎臓、脳、肝臓、前立腺、白血球
222	GVIAEILRGV	肺、腎臓、脳、肝臓
223	VLMQDSRLYL	肺
224	QLQEGKNVIGL	脾臓
225	YLYGQTTYL	肺、腎臓、胃、肝臓、メラノーマ、卵巣、食道
226	FLVDGWSV	肺、胃、脾臓、乳房、卵巣、食道
227	LTAPPEALLMV	肺、腎臓、脳、肝臓、脾臓、白血球、卵巣、食道
228	SMSGYDQVL	肺、白血球
229	YLLEKFVAV	肺、肝臓、卵巣
230	AMSSKFFLV	肺、脳、胃、肝臓、脾臓、前立腺、乳房、卵巣、食道
231	RLFADILNDV	肺、脳、肝臓、前立腺、MCC、卵巣
232	RLLDSVSRL	肺、腎臓、肝臓、脾臓、乳房、卵巣、食道
233	RLLDLKMTV	肺、腎臓、脾臓、乳房、卵巣、食道
234	KMFESFIESV	肺、腎臓、脳、肝臓、前立腺、卵巣、食道
235	LLHEENFSV	肺、腎臓、肝臓、卵巣、食道
236	KMSELQTYV	肺、脾臓、メラノーマ、卵巣、食道
237	KLVEFDLGA	肺、脳、胃、肝臓、MCC、卵巣、食道
238	NMLEAVHTI	肺、肝臓、メラノーマ、卵巣、食道
239	QLIEKNWLL	肺、肝臓、白血球、卵巣、食道
240	VLAPRVLRA	肺、腎臓、脳、肝臓、脾臓、卵巣
241	ILIDWLQVQ	肺、腎臓、脳、肝臓、脾臓、卵巣、食道
242	RLEEDDGDVAM	肺、腎臓、脳、肝臓、脾臓、白血球、乳房、メラノーマ
243	TLMDMRLSQV	肺、腎臓、脳、肝臓、前立腺、卵巣
244	SLHFLILYV	肺、腎臓、脳、肝臓、メラノーマ

10

20

30

40

【表 4 A - 5】

配列番号	配列	その他の関連臓器／疾患
245	QLIDYERQL	肺、腎臓、肝臓、膵臓、乳房、食道
246	GLTDNIHLV	肺、腎臓、膵臓、乳房、卵巣、食道
247	SLDTLMTYV	肺、腎臓、脳、膵臓、前立腺、白血球、食道
248	ALYGDIDAV	肺、脳、膵臓、食道
249	ALYGRLEV	MCC、卵巣、食道
250	ALCEENMRGV	肺、腎臓、脳、肝臓、MCC、食道
251	SLLQATDFMSL	腎臓、膵臓、食道
252	YVYQNNIYL	肺、胃、肝臓、膵臓、乳房、メラノーマ、卵巣、食道
253	KLLDEVTYLEA	肝臓
254	VLFEALWHV	肝臓
255	ALALWIPSL	肺、膵臓、卵巣、食道
256	GLLEELVT	肺、胃、膵臓、卵巣
257	SLADFMQEV	肺、前立腺、MCC、卵巣
258	LLYEGKLT	乳房、卵巣
259	ALADKELPSV	肺、腎臓、肝臓、膵臓、前立腺、メラノーマ、卵巣、食道
260	ALLAEGITWV	肝臓
261	YLYDSETKNA	腎臓、肝臓、膵臓、卵巣、食道
262	VLAKPGVISV	肺、膵臓
264	RLLDVLAPLV	腎臓、肝臓
265	LLDKKIGV	腎臓、卵巣、食道

10

20

【0050】

表4B: 本発明によるペプチド、およびその他の増殖性疾患、特にその他のがん性疾患における、それらの具体的使用（表4Aの修正）。表は、表4Aのように、選択されたペプチドについて、測定された腫瘍サンプルの5%超で過剰提示を示すか、または測定された腫瘍サンプルの5%超で3を超える腫瘍対正常組織の幾何学平均比で提示を示す、それらがその上で発見された追加的な腫瘍型を示す。過剰提示は、最大提示がある正常サンプルと比較して、より高い腫瘍サンプル上の提示と定義される。それに対する過剰提示が試験された正常組織は、脂肪組織、副腎、血液細胞、血管、骨髄、脳、食道、眼、胆嚢、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、神経、膵臓、副甲状腺、腹膜、下垂体、胸膜、唾液腺、骨格筋、皮膚、小腸、脾臓、胃、甲状腺、気管、尿管、膀胱であった。

30

【表 4 B - 1】

配列番号	配列	追加的な実体
1	ALIKQLFEA	SCLC、GC、BRCA、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
2	ALLPRYFFL	子宮がん
3	RLIPDTLYSV	メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
4	RLAELTVDEFL	CLL、メラノーマ、膀胱がん、AML
6	FLAELPGSLSL	SCLC、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
8	ALMLQGVDDL	BRCA、メラノーマ、膀胱がん、AML
11	YLFKTFNM	SCLC、膀胱がん
13	FLLAEDTKV	膀胱がん、AML、NHL、OC
15	LQLDKEFQL	CLL、BRCA、膀胱がん、子宮がん、PC
16	VLVDQSWVL	食道がん、膀胱がん
18	FLSSLKGGLL	メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、AML
19	RLYTKLLNEA	メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
22	GLIDEVMVL	胆嚢がん、胆管がん
23	FLDANGHFV	GC、食道がん、胆嚢がん、胆管がん

40

【表 4 B - 2】

配列番号	配列	追加的な実体
25	SLADRLIGV	SCLC、BRCA、子宮がん
26	GLASKENFSNVSL	膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
28	ALTEIQEFI	NSCLC、脳がん、HCC、BRCA、メラノーマ、食道がん、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
29	QMLDVAIRV	BRCA
31	LLYGKYVSV	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん
32	KLNTETFGV	GC、BRCA、食道がん、AML
33	ALWEKNTHL	膀胱がん
34	ILLEKSVSV	BRCA、メラノーマ、食道がん、膀胱がん
35	KLLDLTVRI	胆嚢がん、胆管がん
36	GLLESPSIFNFTA	BRCA
37	GLFAGLGGAGA	BRCA、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
38	SLAPTPVSA	子宮がん
40	ALSNVIHKV	膀胱がん
42	SILDDSFKL	胆嚢がん、胆管がん
43	TLDAAQPRV	PrC、食道がん
44	SLESKLTSV	メラノーマ、膀胱がん、子宮がん
45	ALAELLHGA	メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
46	GLDDRYSLV	膀胱がん
47	KLYERCEVV	メラノーマ
53	FLLGSEIKL	HCC、メラノーマ、膀胱がん、AML
54	ALLNGEYLLAA	NSCLC、脳がん、GC、BRCA、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
55	QIITSVSV	CLL、膀胱がん、子宮がん、AML
56	VLFTDEGVPKFL	BRCA、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、OC
58	AMADKMDMSL	NSCLC、SCLC、BRCA、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
59	LLTDNVVKL	メラノーマ、AML、NHL
61	KLLKLFQGV	メラノーマ、AML
62	YLAPENGYL	SCLC、CLL、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
63	KLFSILSTV	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL
64	KTLGKLWRL	メラノーマ
66	GLDDGPDFL	メラノーマ
67	SLNDEKDVMLL	SCLC、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL
71	RLWTEIPTAI	NSCLC、SCLC、メラノーマ、食道がん、膀胱がん
72	YLLDYPNNLL	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL、PC
74	YLMGFLHAV	BRCA、膀胱がん
75	EMIENIQSV	胆嚢がん、胆管がん
77	SLLKRDFGA	SCLC、メラノーマ、食道がん、膀胱がん、子宮がん、NHL
78	ALDPELLLL	AML
79	SLAADQLLKL	子宮がん
80	QVDEVVDIMRV	AML
81	ALLSQQTHL	膀胱がん、AML

10

20

30

40

【表 4 B - 3】

配列番号	配列	追加的な実体
82	QLYEEDPTKL	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
83	LTIEDGIFEV	NHL
84	SMVEDITGLRL	SCLC、OC、膀胱がん、子宮がん、NHL
87	LLFDAPDLRL	SCLC、BRCA、膀胱がん、子宮がん
88	KLDIKVETV	BRCA、膀胱がん
90	GLLKPGLNVVL	膀胱がん、AML
91	TVDVATPSV	CLL
93	SLQELRLLL	SCLC
97	ALWWGVVTV	CLL
98	AMNGKSFSV	NSCLC、SCLC、BRCA、メラノーマ、OC、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん
99	KLLEVDLDTV	胆嚢がん、胆管がん、AML
100	SLDDFLATA	PC、CLL、BRCA、メラノーマ、食道がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
102	KILVSLIEV	NHL
103	FLFGYPKRL	NSCLC、SCLC、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、AML
105	YALDLSTFL	BRCA、メラノーマ、膀胱がん、PC
107	ALLGGGPYML	膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん
108	SLAELVPGVGGI	BRCA
109	ALDGDQMEI	AML
110	LLGELPRLLLL	メラノーマ、食道がん、膀胱がん
113	ILYDLQQNL	SCLC、CLL、BRCA、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
114	TAVGHALVL	BRCA、メラノーマ、胆嚢がん、胆管がん
116	LVYQVHPI	膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
117	TLQPVNSTISL	子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
118	LLADLKTMT	NHL
119	ILYQVTGTL	CLL、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL
120	VLYEGVDEV	SCLC、BRCA、胆嚢がん、胆管がん
121	SLAPNIISQL	AML
123	KTLSRYLL	SCLC、BRCA、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL、PC
124	RVLPPSALQSV	SCLC、BRCA、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL、PC
125	KLGDGFLVEL	SCLC、膀胱がん、AML、PC
126	TLAKYLMEL	SCLC、BRCA、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
127	RLAELTVDEFLA	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、AML
128	MLDDRAYLV	PC
129	VLIDVLKEL	メラノーマ、NHL
130	GLGGSQIDTHL	食道がん、子宮がん
131	KLLDVVHPA	CLL、BRCA、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL
132	ALLNAILHSA	SCLC、CLL、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、NHL、PC
133	RTFEKIEEV	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL
134	GVAGGSILKGV	CLL、BRCA、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL
135	KLQEEIPVL	BRCA、メラノーマ、NHL
136	KLFDIFSQQV	膀胱がん、子宮がん、NHL

10

20

30

40

【表 4 B - 4】

配列番号	配列	追加的な実体
137	QLTEIKPLL	CLL、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
138	KQFEGTVEI	CLL、NHL
139	VLLNEILEQV	SCLC、CLL、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL、PC
140	LLNEILEQV	SCLC、CLL、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
142	SLVQRVETI	SCLC、PC、BRCA、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL
143	KLSDVWKEL	胆嚢がん、胆管がん
144	LLNDRIWLA	BRCA、メラノーマ、子宮がん
145	LLLEVVKQV	胆嚢がん、胆管がん、NHL
146	ALSDETWGL	SCLC、CLL、食道がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
147	TLTELRAFL	CLL、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL
148	RLENMTEVV	CLL、OC、膀胱がん、子宮がん、NHL
149	YQFDKVGILTL	SCLC、RCC、脳がん
150	RLADLEALKV	膀胱がん、NHL
152	KLLAVIHLEL	BRCA、メラノーマ、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
153	ILFSEDSTKLFV	膀胱がん、NHL
154	KLPSETIFVGC	メラノーマ、子宮がん、AML
155	RLGEEVVRV	メラノーマ
156	SLMMTIINL	SCLC、GC、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL、OC
158	GLLDPSVFHV	メラノーマ、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
159	VLVDDGIKVV	SCLC、BRCA、食道がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL
160	KLLEFDQLQL	SCLC
161	FLKNELDNV	食道がん、膀胱がん、子宮がん、AML、NHL
162	KLMDYIDEL	NSCLC、BRCA、メラノーマ、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、NHL
163	RLLEHVQEL	RCC、AML、NHL
164	KMLDEILLQL	SCLC、RCC、CLL、メラノーマ、OC、膀胱がん、AML、NHL
165	RLLDPEAMVL	SCLC、CLL、膀胱がん、子宮がん
166	GLLEARGILGL	膀胱がん、AML、NHL
167	SVIDHIHLISV	SCLC、BRCA
168	GLIRFPLMTI	CLL、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、AML
169	YLAHFIEGL	膀胱がん、OC
170	ALAGGITMV	CLL、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
171	RLQETEGMVAV	メラノーマ、OC
172	LLLDVTMQV	膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML
173	KLGDLMVLL	メラノーマ、AML、NHL
174	ILLDDNMQIRL	SCLC、CLL、膀胱がん、AML
177	ALLQGAIESV	SCLC、GC、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん
178	YLFREPATI	BRCA、膀胱がん、子宮がん、PC
179	RLLJPLSSA	AML、BRCA、PC、胆嚢(Gallbladder)がん、HCC、メラノーマ、NHL、OC、食道がん、脳がん、NSCLC、SCLC、子宮がん
180	NLEIAPHL	NSCLC、メラノーマ、OC、食道がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢がん、胆管がん、AML

10

20

30

40

【表 4 B - 5】

配列番号	配列	追加的な実体
181	NLFDLGGQYLRV	CLL、メラノーマ、膀胱がん
182	SLNKWIFTV	メラノーマ
183	TLQEVTVGV	CLL、メラノーマ、膀胱がん、子宮がん、NHL
184	SLLDENNVSSYL	SCLC、CLL、BRCA、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL、OC
185	VLYTGVRV	SCLC、BRCA、食道がん、AML、NHL
186	KMSEKILL	メラノーマ
187	GLHNVVYGI	CLL、メラノーマ、膀胱がん、NHL
188	FLVDGPRVQL	CLL、子宮がん
189	AISEVIGKITA	胆嚢がん、胆管がん、PC
190	AMAEMVLQV	SCLC、CLL、BRCA、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL
191	QLFSEIHNH	SCLC、メラノーマ、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん、AML、NHL、PC

NSCLC=非小細胞肺がん、SCLC=小細胞肺がん、RCC=腎臓がん、CRC=結腸または直腸がん、GC=胃がん、HCC=肝臓がん、PC=膵臓がん、PrC=前立腺がん、BRCA=乳がん、MCC=メルケル細胞がん、OC=卵巣がん、NHL=非ホジキンリンパ腫、AML=急性骨髄性白血病、CLL=慢性リンパ球性白血病。

【0051】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、肺がんの併用療法のための、配列番号1、3、4、6、11、15、26、31、40、45、56、59、62、72、77、79、84、87、88、90、102、107、110、117、123、124、125、126、128、131、132、133、134、135、139、140、141、142、143、151、152、153、154、156、157、160、161、165、167、168、170、178、184、190、192、194、203、204、205、206、208、210、212、214、215、216、217、218、222、223、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、250、252、255、256、257、259、および262のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0052】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、脳がんの併用療法のための、配列番号1、11、19、31、44、45、58、63、72、103、108、118、125、126、128、131、132、133、137、157、158、162、163、164、169、178、180、181、191、194、201、205、207、208、209、210、216、217、221、222、227、230、231、234、237、240、241、242、243、244、247、248、および250のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0053】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、胃がんの併用療法のための、配列番号65、70、133、146、225、226、230、237、252、および256のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0054】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、腎臓がんの併用療法のための、配列番号31、45、48、53、56、61、70、72、83、88、102、105、108、117、123、129、133、141、142、146、147、152、157、158、160、168、170、172、184、194、199、203、205、206、209、210、211、217、218、221、222、225、227、232、233、234、235、240、241、242、243

10

20

30

40

50

、244、245、246、247、250、251、259、261、264、および265のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0055】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、肝臓がんの併用療法のための、配列番号6、10、26、31、33、45、47、54、56、59、62、63、71、72、76、79、84、88、89、98、103、105、108、117、121、123、124、126、131、132、133、134、136、139、142、148、153、154、156、157、158、159、161、166、168、169、170、171、174、178、181、184、191、193、194、195、204、205、206、207、208、209、210、214、216、217、220、221、222、225、227、229、230、231、232、234、235、237、238、239、240、241、242、243、244、245、250、252、253、254、259、260、261、および264のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

10

【0056】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、膵臓がんの併用療法のための、配列番号3、8、38、40、44、53、55、110、116、117、146、152、170、184、198、201、203、205、209、212、224、226、227、230、232、233、236、240、241、242、245、246、247、248、251、252、255、256、259、261、および262のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

20

【0057】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、前立腺がんの併用療法のための、配列番号25、45、48、63、69、70、101、103、116、131、178、183、184、187、204、205、206、214、216、220、221、230、231、234、243、247、257、および259のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0058】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、白血病の併用療法のための、配列番号6、8、29、31、58、67、72、80、82、83、110、118、121、129、149、153、154、160、161、169、171、173、180、185、199、221、227、228、239、242、および247のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

30

【0059】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、乳がんの併用療法のための、配列番号3、45、72、77、91、116、128、133、146、161、180、183、188、200、214、226、230、232、233、242、245、246、252、および258のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

40

【0060】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、メルケル細胞がんの併用療法のための、配列番号33、83、123、124、128、133、171、184、197、231、237、249、250、および257のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0061】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、メラノーマの併用療法のための、配列番号6、13、58、62、67、83、88、92、118、124、125、134、139、140、142、145、149、153、156、159、1

50

61、167、170、172、174、177、178、184、185、188、199、202、216、225、236、238、242、244、252、および259のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0062】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、卵巣がんの併用療法のための、配列番号1、3、4、6、16、18、25、31、34、44、45、54、57、63、72、74、87、88、91、102、108、116、123、124、125、126、127、128、131、132、133、134、137、139、140、142、146、152、153、154、159、160、161、165、167、172、174、175、177、178、181、184、185、189、193、194、195、202、203、204、205、206、208、214、215、216、217、225、226、227、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、243、246、249、252、255、256、257、258、259、261、および265のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

10

【0063】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、食道がんの併用療法のための、配列番号1、3、11、15、19、26、31、37、40、46、54、59、62、63、65、70、72、81、82、83、84、88、89、90、98、102、117、119、123、124、125、126、128、132、133、134、138、139、141、142、144、152、153、154、155、157、158、162、169、170、177、178、184、186、192、194、197、200、202、205、210、212、214、215、216、217、225、226、227、230、232、233、234、235、236、237、238、239、241、245、246、247、248、249、250、251、252、255、259、261、および265のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

20

【0064】

したがって、本発明の別の態様は、好ましくは、CRC、肺がん、脳がん、胃がん、腎臓がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんの群から選択される増殖性疾患の併用治療のための、本発明によるペプチドの使用に関する。

30

【0065】

本発明は、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子に結合する能力、または長さ変異体などの伸長形態ではMHCクラスIIに結合する能力を有する、本発明によるペプチドにさらに関する。

【0066】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは(それぞれ)配列番号1~配列番号191に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる。

【0067】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、修飾され、および/または非ペプチド結合を含む。

40

【0068】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、特にHLA-D R抗原関連不変鎖(I i)のN末端アミノ酸に融合した、または例えば樹状細胞に対して特異的な抗体などの抗体(またはその配列中)に融合した、融合タンパク質の一部である。

【0069】

本発明は、本発明によるペプチドをエンコードする核酸にさらに関する。本発明は、DNA、cDNA、PNA、RNA、またはそれらの組み合わせである、本発明による核酸にさらに関する。

50

【0070】

本発明は、本発明による核酸を発現でき、および／または発現する、発現ベクターにさらに関する。

【0071】

本発明は、疾患の治療においてそして医療において、特にがんの治療において使用するための本発明によるペプチド、本発明による核酸または本発明による発現ベクターにさらに関する。

【0072】

本発明は、本発明によるペプチドに、または前記本発明によるペプチドとMHCの複合体に、特異的に対抗する抗体と、それらを製造する方法とにさらに関する。

10

【0073】

本発明は、自己由来または同種異系T細胞に組み込まれた、T細胞受容体(TCR)、特に可溶性TCR(sTCR)、およびクローン化TCR、そしてこれらを製造する方法、ならびに前記TCRを有するまたは前記TCRと交差反応する、NK細胞またはその他の細胞を製造する方法にさらに関する。

【0074】

抗体およびTCRは、本発明によるペプチドの免疫療法用途の追加的な実施形態である。

【0075】

本発明は、前述のような本発明による核酸または発現ベクターを含んでなる、宿主細胞にさらに関する。本発明は、抗原提示細胞であり、好ましくは樹状細胞である、本発明による宿主細胞にさらに関する。

20

【0076】

本発明は、本発明による宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、本発明によるペプチドを製造する方法にさらに関する。

【0077】

本発明は、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞または人工抗原提示細胞の表面に発現されるクラスIまたはII MHC分子上に抗原が負荷される、本発明による方法にさらに関する。

30

【0078】

本発明は、抗原提示細胞が、配列番号1～配列番号191を含有する、好ましくは配列番号1～配列番号68を含有する前記ペプチド、または変異アミノ酸配列を発現できまたは発現する、発現ベクターを含んでなる、本発明による方法にさらに関する。

【0079】

本発明は、本発明による方法によって製造される活性化T細胞にさらに関し、前記T細胞は、本発明によるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを発現する細胞を選択的に認識する。

【0080】

本発明は、本発明によって製造されるT細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる、患者において、本発明による任意のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する標的細胞を死滅させる方法にさらに関する。

40

【0081】

本発明は、薬剤としてのまたは薬剤の製造における、記載される任意のペプチド、本発明による核酸、本発明による発現ベクター、本発明による細胞、本発明による活性化Tリンパ球、T細胞受容体または抗体またはその他のペプチドーおよび／またはペプチドーMHCー結合分子の使用にさらに関する。好ましくは、前記薬剤は、がんに対して有効である。

【0082】

好ましくは、前記薬剤は、可溶性TCRまたは抗体に基づく、細胞療法、ワクチンまた

50

はタンパク質である。

【0083】

本発明は、本発明による使用にさらに関し、前記がん細胞は、CRC、肺がん、脳がん、胃がん、腎臓がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん(MCC)、メラノーマ、卵巣がん、および食道がん、および好ましくはCRC細胞である。

【0084】

本発明は、がん、好ましくはCRCの診断において使用され得る、本明細書で「標的」と称される、本発明によるペプチドをベースとするバイオマーカーにさらに関する。マーカーは、ペプチドそれ自体の過剰提示、または対応遺伝子の過剰発現であり得る。マーカーはまた、好ましくは免疫療法、最も好ましくはバイオマーカーによって同定されるのと同じ標的を標的とする免疫療法である、治療の成功確率を予測するのに使用されてもよい。例えば、抗体または可溶性TCRを使用して腫瘍切片が染色され、MHCと複合体形成する目的ペプチドの存在が検出され得る。

10

【0085】

任意選択的に、抗体は、免疫刺激ドメインまたは毒素などのさらなるエフェクター機能を保有する。

【0086】

本発明はまた、がん治療の文脈におけるこれらの新規標的の使用に関する。

【0087】

追加的ながん性疾患に対する治療的および診断的使用の双方が、本発明によるペプチドの基本的発現産物(ポリペプチド)に関する、以下のより詳細な説明で開示される。

20

【0088】

AKAP8(AKAP95とも称される)は、タンパク質キナーゼA(PKA)のRI/RIIサブユニットに対する結合ドメインを含有してPKAおよびその他のシグナル伝達分子を特定の細胞内部位に動員する、スキャフォールドタンパク質を含む、Aキナーゼアンカータンパク質ファミリーのメンバーをコードする。AKAP8はPKAのRII α サブユニットに結合し、PKAおよびコンデンシン複合体をクロマチンに標的化することによって、有糸分裂中の染色体凝縮において役割を果たしてもよい(RefSeq, 2002)。AKAP8タンパク質発現は、直腸がんおよび肺がんにおいて有意に上方制御され、細胞分化および病理組織型と関連しており、腫瘍の発生および進行における重要な役割が示唆される。AKAP8の発現は、サイクリンEおよびサイクリンDの発現と相関する(Chen et al., 2012; Hu et al., 2013; Qi et al., 2015)。

30

【0089】

ARHGAP39(VilseまたはCrGAPとも称される)は、Roundabout(Robo)受容体媒介性斥力性軸索誘導およびRAC依存性細胞骨格変化の調節に関与する、Rho GTPアーゼ活性化タンパク質をコードする(Hu et al., 2005)。ARHGAP39は、膀胱がん細胞株においてしばしば上方制御される(Matsuda et al., 2011)。ARHGAP39は、内皮細胞の方向性移動に関与する(Kaur et al., 2008)。

40

【0090】

AURKB(AIM-1とも称される)は、セリン/スレオニンキナーゼのオーロラキナーゼサブファミリーのメンバーである、オーロラキナーゼBをコードする。AURKBはその他のタンパク質と共に、微小管との結合を通じて、有糸分裂および減数分裂中の染色体の分離を調節する(RefSeq, 2002)。AURKB発現は、肺がん、結腸直腸がん、および乳がんならびに白血病をはじめとする、異なるがん型において上方制御され、それによって予後不良と関連する。したがって臨床療法のためのAURKB阻害剤の開発は、興味深い分野である(Hayama et al., 2007; Pohl et al., 2011; Hegyi et al., 2012; Goldenson an

50

d Crispino, 2015)。AURKBの過剰発現は、ヒストンH3のリン酸化と、発がんの重大な要素である染色体の不安定性とをもたらす(Ota et al., 2002; Tatsuka et al., 1998)。AURKB活性は、発がん性Ras媒介細胞形質転換を増強する(Kanda et al., 2005)。

【0091】

C18orf21 (XTP13とも称される)は、HIV感染症の阻害と関連する、異常ヘモグロビンβ鎖ペプチドをコードする(Liu et al., 2011a; Aschauer et al., 1983)。

【0092】

CCNB1は、有糸分裂に参与する調節タンパク質である、サイクリンB1をコードする。これは2つの代案の転写産物を有し、G2/M期において、1つは構成的に発現され、もう1つは優勢に発現される(RefSeq, 2002)。CCNB1は、有糸分裂に参与する調節タンパク質である、サイクリンB1をコードする。(RefSeq, 2002)。CCNB1は十分に説明された腫瘍抗原であり、CCNB1の過剰発現が、乳がん、頭頸部がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肺がん、および肝臓がんについて記載されている(Egloff et al., 2006)。CCNB1は、結腸直腸がん、乳がん、肺がん、および腎臓がんをはじめとする、多様ながん実体において上方制御されることが示された。CCNB1の下方制御は、G2/M期細胞周期停止と、増殖および移動の阻害とをもたらす(Chang et al., 2013; Sakurai et al., 2014; Fang et al., 2014; Ding et al., 2014)。CCNB1遺伝子の遺伝子多型は、中国の漢民族女性の乳がん易罹患性、進行、および生存と関連している(Li et al., 2013)。

【0093】

CCNB2は、細胞周期調節において役割を果たすサイクリンファミリーのメンバーである、サイクリンB2をコードする(RefSeq, 2002)。CCNB2は、結腸直腸腺がんにおいて上方制御される(Park et al., 2007)。CCNB2は、様々なヒト腫瘍において過剰発現される。腫瘍細胞における強力なCCNB2発現は、肺腺がんおよび浸潤性乳がんを有する患者における予後不良と関連する(Takashima et al., 2014; Albulescu, 2013)。

【0094】

CCT7は、アクチンおよびチューブリンをはじめとする様々なタンパク質のATP依存性折り畳みに参与する、TCP1含有シャペロニン複合体(CCT)サブユニット7(η)をコードする。CCT7は、後期ヒト結腸直腸がんを顕著に区別する、タンパク質サブネットワークの一部であることが見出された(Nibbe et al., 2009)。

【0095】

CDC42BPG (MRCKγとも称される)は、筋緊張性ジストロフィーキナーゼ関連CDC42結合キナーゼファミリーのメンバーである、CDC42結合タンパク質キナーゼγ(DMPK様)をコードする(Ng et al., 2004)。

【0096】

CDC6は、DNA複製の開始に不可欠なタンパク質をコードする(RefSeq, 2002)。CDC6発現は、胆嚢がん、子宮頸がん、および前立腺がんをはじめとする、異なるがん型において脱調節される(Wu et al., 2009; Wang et al., 2009c; Robles et al., 2002; Shu et al., 2012)。CDC6は、c-Mycと協同して、遺伝的不安定性、腫瘍様形質転換、およびアポトーシス減弱を促進する(Chen et al., 2014a)。低酸素誘導ATRは、CDC6の分解を促進する。DNA複製の開始は、Cdc6タンパク質安定性を通じてp53によって調節される(Duursma and Agami, 2005; Martin et al., 2012)。

【0097】

CENPEは、細胞周期のG2期中に蓄積するキネシン様モータータンパク質である、セントロメアタンパク質E、312kDaをコードするCENPEは、哺乳類染色体移動および／または紡錘体伸長を担うモータの1つであることが、提案されている(RefSeq, 2002)。CENPE発現は、神経膠腫のグレードと有意に相関し、神経膠腫患者の生存時間を予測するためのその他のパラメータを補うかもしれない(Biet al., 2011)。CENPEは、化学療法感受性腫瘍と比較して、化学療法抵抗性上皮卵巢腫瘍において上方制御される(Juet al., 2009)。CENPEは、浸潤性および侵襲浸潤性プロラクチン下垂体腫瘍において上方制御される(Wierinckx et al., 2007)。

【0098】

CIRH1A(Cirhinとも称される)は、核小体に局在するWD40反復含有タンパク質である、硬変常染色体性劣性1Aをコードする。それは、北米インディアン小児肝硬変(NAIC)を引き起こす(RefSeq, 2002)。CIRH1Aは、標準的NF-κB因子を上方制御し得て、NF-κB因子を含有するその他の遺伝子の調節に関与するかもしれない。これは、CIRH1Aが、がん関連NF-κB経路に影響を与え得ることを示唆する(Yu et al., 2009)。

【0099】

CNOT1は、翻訳およびmRNA安定性の重要な調節因子である、CCR4-NOTデアデニラーゼ複合体の酵素的関連サブユニットをコードする(Ito et al., 2011; Bolland et al., 2013)。CNOT1遺伝子の一塩基多型(SNP)が、骨肉腫および急性リンパ芽球性白血病(ALL)において検出された(Gutierrez-Camino et al., 2014; Bilbao-Aldaiturriaga et al., 2015)。CNOT1枯渇は、mRNAの安定化およびERストレス媒介アポトーシスの活性化を誘導する(Ito et al., 2011)。

【0100】

COL12A1は、FACIT(中断三重らせんがある原線維関連コラーゲン)コラーゲンファミリーのメンバーであって細胞外マトリックス(ECM)の一部である、XII型コラーゲンのα鎖をコードする(RefSeq, 2002)。COL12A1は、卵巣がん細胞株の薬剤耐性変異株において過剰発現される(Januchowski et al., 2014)。結腸直腸がんにおいては、COL12A1は、線維形成性間質および周囲のがん関連線維芽細胞において、ならびに浸潤前面を覆うがん細胞において過剰発現される(Karagiannis et al., 2012)。

【0101】

CYP2W1は、薬物代謝に関与し、コレステロール、ステロイド、およびその他の脂質の合成に関与する、多数の反応を触媒するモノオキシゲナーゼである、酵素のチトクロームP450スーパーファミリーのメンバーをコードする(RefSeq, 2002)。CYP2W1は、肝細胞がん、結腸直腸がん、および胃がんをはじめとする、多様なヒトがんにおいて過剰発現される。CYP2W1過剰発現は、腫瘍進行および低生存率と関連する(Aung et al., 2006; Gomez et al., 2010; Zhang et al., 2014e)。腫瘍特異的発現のために、CYP2W1は、がん治療中の興味深い薬物標的であり、またはプロドラッグの酵素的賦活剤である(Karlgren and Ingelman-Sundberg, 2007; Nishida et al., 2010)。

【0102】

ECT2は、Rho特異的交換因子および細胞周期調節因子に関連する、グアニンヌクレオチド交換因子および形質転換タンパク質である、上皮細胞形質転換タンパク質2をコードする(RefSeq, 2002)。ECT2は、肺がん、卵巣がん、胃がん、および膵臓がんをはじめとする、多様なヒト腫瘍における腫瘍特異的遺伝子増幅の結果として過剰発現される。ECT2は、細胞増殖、移動、浸潤、および腫瘍形成能にとって重要であ

10

20

30

40

50

る (Fields and Justilien, 2010; Jin et al., 2014)。タンパク質キナーゼC α およびECT2はMEK/ERKを通じて活性化され、卵巣がんにおいて腫瘍開始細胞表現型をシグナル伝達する (Wang et al., 2013e)。核ECT2がRho GTPアーゼRac1に優先的に結合し、Rac1活性化を通じて細胞形質転換に至る一方で、細胞質ECT2はRho GTPアーゼRhoAに結合し、RhoA活性化を通じて細胞質分裂溝の形成に至る (Suet al., 2011; Huff et al., 2013)。

【0103】

GPR56は、脳皮質パターン形成を調節する、接着Gタンパク質共役型の受容体G1 (ADGRG1) をコードする。GPR56は、腫瘍進行阻害剤である、トランスグルタミナーゼ2に特異的に結合する (RefSeq, 2002)。GPR56は、メラノーマおよび前立腺がんにおいて、腫瘍増殖および転移の抑制によって腫瘍形成を阻害する。その他のがん型における役割は、おそらくc-mycおよびp53応答要素のような転写因子を活性化するGPR56の異なるスプライシング変異体の様々な能力のために、複雑であると思われる (Kim et al., 2010b; Xu et al., 2010; Yang and Xu, 2012)。GPR56は、プロテインキナーゼC α が関与するシグナル伝達経路を通じて、メラノーマ細胞からのVEGF産生を阻害し、それらの血管新生および増殖を妨げる (Yang et al., 2011a)。

【0104】

HS6ST2は、ヘパリン硫酸 (HS) スルホトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーのメンバーをコードする。HS6ST2は、HSへの硫酸塩移動を触媒する (RefSeq, 2002)。HS6ST2は、甲状腺がん、結腸直腸がん、および卵巣がんをはじめとする異なるがん型において過剰発現され、移動、浸潤、および予後不良と関連する (Backen et al., 2007; Hatabe et al., 2013; Diet al., 2014)。TGF- β は、HS6ST2およびIL-11産生の刺激によってがん転移を促進する (Pollari et al., 2012)。HS6ST2は、EGF、FGF2、およびVEGFシグナル伝達経路に応答する、血管新生の調節因子である (Ferrer et al., 2012; Cole et al., 2014)。

【0105】

I ER3 (I EX-1とも称される) は、Fasまたは腫瘍壊死因子 α 誘導性アポトーシスから細胞を保護する機能を有する、最初期応答3をコードする (RefSeq, 2002)。卵巣がん、膵臓がん、血液がん、乳がん、結腸直腸がん、リンパ腫、および骨髄腫におけるI ER3発現の調節解除は、腫瘍の型および進行段階次第で、芳しくないまたはより良好な予後に関連し、タンパク質を単独で、またはその他の遺伝子と合わせてのどちらかで、貴重なバイオマーカーにする (Wu et al., 2013)。I ER3遺伝子発現は、正または負様式を通じてアポトーシスおよび細胞増殖を調節する上で、重要な役割を果たす。I ER3の過剰発現は、いくつかの細胞をアポトーシス感受性にして細胞周期の進行を加速するが、その他の細胞の増殖は低下させるのに対し、I ER3発現の妨害は、アポトーシスおよび細胞周期の進行の双方を低下させる (Zhang et al., 2011a)。I ER3は、特定のシグナル伝達経路、特に、NF- κ B、MAPK/ERK、およびPI3K/Aktを妨害する。マウスモデルは、免疫機能におけるI ER3発現の関与もまた明らかにした (Arlt and Schaffer, 2011; Wu, 2003)。

【0106】

ITPR3は、C末端カルシウムチャネルとN末端リガンド結合部位とを含有する、イノシトール1, 4, 5-三リン酸の受容体をコードする。ITPR3は、エネルギー代謝および増殖の根底にある外分泌において役割を果たす (RefSeq, 2002)。ITPR3は、結腸直腸がん、胃がん、および乳がんをはじめとするいくつかのがん型において過剰発現され、がん進行および腫瘍の侵襲性と直接関連する (Shibao et a

10

20

30

40

50

l. , 2010 ; Mound et al. , 2013 ; Sakakura et al. , 2003) 。 Akt は、小胞体 (endoplasmatic reticulum) からの Ca^{2+} 放出を減少させることによって、ITPR3 依存的様式でアポトーシスから細胞を保護し得る (Marchi et al. , 2012) 。

【0107】

KCNN4 (KCa3.1 または hIKCa1 とも称される) は、細胞内カルシウムによって活性化される、ヘテロ四量体電圧非依存性カリウムチャネルの一部をコードする。このチャネルの活性化の後に、カルシウム流入を促進する、膜の過分極が続く (RefSeq , 2002) 。 KCNN4 は、乳がん、肺がん、および前立腺がんをはじめとするいくつかのがんにおいて上方制御され、細胞増殖および腫瘍増殖と関連する (Chou et al. , 2008 ; Lallet-Daher et al. , 2009 ; Haren et al. , 2010 ; Bulk et al. , 2015) 。 KCNN4 の阻害は、活性酸素種 (ROS) レベルを調節して p53 活性化を促進し、それは細胞の増殖および移動を抑制してアポトーシスをもたらす (Liu et al. , 2015b) 。

10

【0108】

KIRREL (NEPH1 とも称される) は、そのメンバーがポドシンの細胞質ドメインと相互作用する、ネフリン様タンパク質ファミリーのメンバーをコードする (RefSeq , 2002) 。

【0109】

KLK10 (NES1 とも称される) は、発がんにおいて役割を果たしてバイオマーカーとしての可能性を有する、セリンプロテアーゼのカリクレインサブファミリーのメンバーをコードする (RefSeq , 2002) 。 KLK10 は、結腸がん、卵巣がん、および胃がんで上方制御されるが、乳がん、肺がん、および前立腺がんでは下方制御される (Yousef et al. , 2005 ; Feng et al. , 2006 ; Zhang et al. , 2010 ; Li et al. , 2001) 。 KLK10 のエピジェネティックなサイレンシングが、TGFbeta / Smad シグナル伝達によって維持される一方で、KLK10 上方制御は、Ras / MEK / ERK および PI3K / Akt シグナル伝達の活性化によって促進される (Paliouras and Diamandis , 2008 ; Papageorgis et al. , 2010) 。

20

【0110】

LIG1 は、ヌクレオチド切除修復 (NER) および塩基切除修復 (BER) 経路に関与する、DNA 修復遺伝子である。LIG1 一塩基多型は、肺がん、子宮内膜がん、および神経膠腫リスクに関連する (Doherty et al. , 2011 ; Lee et al. , 2008b ; Liu et al. , 2009) 。

30

【0111】

LSG1 は、大型 60S サブユニット核 export GTP アーゼ 1 をコードする。タンパク質は細胞生存に必要であり、小胞体、核、および細胞質に局在してもよい (RefSeq , 2002) 。

【0112】

LSM14B (RAP55B とも称される) は、RNA 代謝、有糸分裂 G2 / M 期の調節、翻訳抑制、mRNP 粒子への取り込み、P-body 形成、およびストレス顆粒局在化に関与する、LSM (Sm 様) ドメインファミリーのメンバーをコードする (Marnett et al. , 2009 ; Albrecht and Lengauer , 2004) 。

40

【0113】

MAGED2 は、X 連鎖精神遅滞のホットスポットである Xp11.2 における新たに定義された MAGED クラスターのメンバーである、メラノーマ抗原ファミリー D、2 をコードする。MAGED2 は、特定の脳領域および精巣の間質において、高発現レベルで遍在的に発現される。MAGED2 は、野生型 p53 活性の潜在的な負の調節因子である (Langnaese et al. , 2001 ; Papageorgio et a

50

1. , 2007)。MAGED2の過剰発現は、メラノーマ、乳がん、および結腸がんに関連している(Li et al. , 2004; Strelakova et al. , 2015)。

【0114】

MAGEF1は、マイクロサテライトリピートを含んで遍在的に発現される、メラノーマ抗原(MAGE)スーパーファミリーのメンバーをコードし、正常な細胞生理学における役割が示唆される(Stone et al. , 2001)。フラボピリドールは、異なるヒト腫瘍細胞株において、ヒト腫瘍細胞増殖の阻害およびMAGEF1の下方制御を誘導する(Lu et al. , 2004)。MAGEF1は、結腸直腸がん組織において有意に過剰発現される(Chung et al. , 2010)。

10

【0115】

MDH1は、クエン酸回路中のNAD/NADH補因子系を利用してリンゴ酸のオキサロ酢酸への可逆的酸化を触媒する酵素である、リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする。MDH1は細胞質に局在し、細胞質ゾルとミトコンドリアとの間の代謝協調において機能するリンゴ酸アスパラギン酸シャトルにおいて、中心的役割を果たしてもよい(RefSeq, 2002)。神経膠芽腫において、MDH1はいくつかの脱調節マイクロRNAの標的であり、その発現は抑制される。既知の腫瘍抑制因子または発がん遺伝子と共に、MDH1は、低悪性度と高悪性度の神経膠腫を識別するのを助け得る(Lages et al. , 2011; Kounelakis et al. , 2013)。MDH1は、ヌル細胞下垂体腺腫および甲状腺オンコサイトーマにおいて、過剰発現される(Hu et al. , 2007; Baris et al. , 2004)。

20

【0116】

MYO10は、非通常性ミオシンに相当する、ミオシンスーパーファミリーのメンバーをコードする。それはアクチンベースの分子モーターとして機能し、減数分裂の間にF-アクチンと微小管細胞骨格との統合において役割を果たす(RefSeq, 2002)。MYO10は、乳がんおよび肺がんをはじめとするいくつかのがん実体において過剰発現され、転移、細胞移動、および侵襲性表現型と関連する(Cao et al. , 2014; Sun et al. , 2015b; Courson and Cheney, 2015)。変異体p53は、を促進する(Mutant p53 promotes) NCAPGは、有糸分裂および減数分裂中の染色体の凝縮および安定化を担う、非SMC凝縮I複合体サブユニットGをコードする(RefSeq, 2002)。NCAPGは、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、および血液または骨髄腫細胞由来白血病細胞を有する患者において、下方制御される(Cohen et al. , 2014)。NCAPGは、結腸直腸がんにおける多剤耐性遺伝子であってもよい(Li et al. , 2012)。NCAPGは、ヒト細胞がんの色素嫌性亜型において高度に上方制御されるが、従来のヒト腎細胞がんでは上方制御されない(Kim et al. , 2010a)。NCAPGの上方制御は、メラノーマ進行に関連している(Ryu et al. , 2007)。NCAPGは、ぶどう膜メラノーマに関連している(Van Ginkel et al. , 1998)。NCAPGは、異なる腫瘍細胞において変動する発現を示す(Jager et al. , 2000)。

30

40

【0117】

NDRG3は、精巣、前立腺、および卵巣において高度に発現されて精子形成において役割を果たしてもよい、N-myc下流調節遺伝子のメンバーをコードする(Zhao et al. , 2001)。NDRG3は、膀胱がんをはじめとする異なるがん型の腫瘍抑制遺伝子として機能してもよい(Yang et al. , 2013; Tsui et al. , 2015)。NDRG3は前立腺がんにおいて腫瘍プロモーターの役割を果たし、上方制御された発現は、血管新生ケモカインの増殖速度増加、より高い移動、および誘導をもたらす。NDRG3の上方制御は、肝細胞がん細胞における悪性表現型と関連する(Wang et al. , 2009b; Fan et al. , 2011)。

【0118】

50

NOL11は、リボソーム生合成における最適rDNA転写に必要な核小体タンパク質11をコードする(Freed et al., 2012; Griffin et al., 2015)。Nol11は、乳房および卵巣の腫瘍抑制因子BRCA1の相互作用物質である(Hill et al., 2014)。

【0119】

PLAGL2は、多形性腺腫遺伝子(PLAG)ファミリーのメンバーをコードして、DNAおよび/またはRNAを認識するジンクフィンガータンパク質である(Kaset al., 1998)。PLAGL2は、白血病、神経膠腫、結腸直腸がん、および肺腺がんをはじめとする多様ながんにおいて、プロトオンコジーンとして機能する。PLAGL2が、細胞周期停止およびアポトーシスを開始することによって、腫瘍抑制因子として作用し得るという証拠もある(Yang et al., 2011b; Hanks and Gauss, 2012; Liu et al., 2014a)。PLAGL2は、p53の安定性を調節するE3ユビキチンリガーゼPirh2のプロテアソーム(proteasomal)分解を防止する。PLAGL2発現はまた、p73レベルを増加させ、p73およびBaxのようなp73標的遺伝子を上方制御する(Zheng et al., 2007; Hanks and Gauss, 2012; Landrette et al., 2005)。

【0120】

PTCD2は、ミトコンドリアDNAに由来するチトクロームbをはじめとする、RNA転写物のプロセッシングに関与してもよい、ペントトリコペプチドリピードドメインタンパク質2をコードする。このタンパク質の機能不全は、心不全の病因において可能な役割を果たす(Xu et al., 2008)。

【0121】

RAD54は、DEAD様ヘリカーゼスーパーファミリーに属するタンパク質をコードする。それは、そのどちらもがDNAの相同組換えおよび修復に関与する、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) RAD54およびRDH54との類似性を共有する。このタンパク質は二本鎖DNAに結合し、DNA存在下ではATPアーゼ活性を示す。この遺伝子は、精巣および脾臓で高度に発現され、それは減数分裂および有糸分裂組換えにおける積極的役割を示唆する(RefSeq, 2002)。RAD54Bのホモ接合型変異体は、原発性リンパ腫および結腸がんで観察された(Hiramoto et al., 1999)。RAD54Bは、ヒト腫瘍細胞において、dsDNAに対するRAD51の直接結合のゲノム不安定化効果を抑制する(Mason et al., 2015)。

【0122】

RNASEH2Aは、ヘテロ三量体II型リボヌクレアーゼH酵素の構成要素をコードし、その活性の主要な供給源である。RNASEH2Aはエンドヌクレアーゼであり、ラギング鎖DNA合成中に岡崎フラグメントRNAプライマーを除去すると予測されている(RefSeq, 2002)。RNASEH2Aは、形質転換された間葉系幹細胞において上方制御され、侵襲性前立腺がんをはじめとする多数のがん細胞において過剰発現される。RNASEH2Aのノックダウンは足場非依存性増殖を阻害するが、がん細胞の増殖は変化させない(Flanagan et al., 2009; Williams et al., 2014)。

【0123】

RRM1は、分裂細胞のS期におけるDNA合成に先だつデオキシリボヌクレオチドの産生に必須の酵素である、リボヌクレオチド還元酵素M1をコードする。これは、重要な腫瘍抑制遺伝子領域である11p15.5のインプリンティング遺伝子ドメインに位置する、いくつかの遺伝子の1つである(RefSeq, 2002)。RRM1は、細胞増殖、細胞移動、腫瘍形成、および転移進行の調節に関与する。肺がん、膵がん、乳がん、および胃がんなどの異なるがん型を有する多数の患者を対象とした研究は、RRM1の予後または予測的価値を確立する(Carvalho et al., 2009; Jordh

10

20

30

40

50

eim et al., 2011; Wang et al., 2013d)。がん治療における一般的な化学療法薬であるヌクレオシド類似体ゲムシタピンは、RRM1を標的とする (Jordheim and Dumontet, 2013)。

【0124】

SERPINB5 (マスピンとも称される) は、アポトーシスを促進し細胞浸潤および血管新生を阻害するその能力に基づいてクラスII腫瘍抑制因子として特徴付けられる、セルピンペプチダーゼ阻害剤クレードBメンバー5をコードする (Bailey et al., 2006)。SERPINB5は、診断のための有益な分子マーカーであり、乳がん、肺がん、頭頸部がん、口腔がん、および前立腺がんをはじめとする多くのがん型の予後の予測因子でもある (Marioni et al., 2009; Lomardo et al., 2010; Sager et al., 1996; Sheng, 2004)。SERPINB5はHDAC1活性の内因性調節因子の役割を果たし、p53腫瘍抑制因子経路と相互作用する (Maass et al., 2000; Kaplan et al., 2012)。

10

【0125】

SEZ6L2は、細胞表面に局在し脾臓β細胞に豊富である発作関連タンパク質をコードする (RefSeq, 2002; Stutzer et al., 2013)。SEZ6L2の発現は肺がんにおいて上方制御され、より高い発現レベルはより短い生存期間に関連している (Ishikawa et al., 2006)。

【0126】

SMARCA4 (BRG1とも称される) は、大型ATP依存性クロマチン再構築複合体SWI/SNFの一部である、SWI/SNFファミリーのヘリカーゼおよびATPアーゼ含有タンパク質のメンバーをコードするこの複合体は、通常は、クロマチンによって抑制される遺伝子の転写活性化に必要である (RefSeq, 2002)。SMARCA4は、腫瘍抑制因子の役割を果たし、乳がん、肺がん、および結腸がんをはじめとする、異なるがん実体の変異を通じて下方制御される。低いSMARCA4レベルは、変異および浸潤のような腫瘍進行と関連する (Medina and Sanchez-Cespedes, 2008; Bai et al., 2013b; Reisman et al., 2003; Wang et al., 2016)。SMARCA4は、いくつかの腫瘍抑制因子と、p53、p16INK4a、hTERT、およびAktのような重要な腫瘍関連タンパク質に関連する (Medina and Sanchez-Cespedes, 2008; Becker et al., 2009; Naidu et al., 2009; Liu et al., 2014b; Wu et al., 2014a)。

20

30

【0127】

SMC2 (CAP-EまたはSMC2L1とも称される) は、有糸分裂染色体凝縮およびDNA修復に重要な染色体ファミリーの構造維持のメンバーをコードする (RefSeq, 2002)。SMC2遺伝子はフレームシフト変異によって改変され、マイクロサテライト不安定性を有する胃がんおよび結腸直腸がんにおける発現喪失は、SMC2が腫瘍の病因に関与しているかもしれないことを示唆する (Je et al., 2014)。SMC2遺伝子の改変は、臍胸関連リンパ腫におけるその他の改変の蓄積を促進する、ゲノム不安定性において役割を果たし得る (Ham et al., 2007)。

40

【0128】

SVILは、細胞拡散および接着斑解体中にミオシンII構築を補助するよう見える、別個のアミノ末端およびカルボキシ末端ドメインを有する二分タンパク質であるsuper villinをコードする (RefSeq, 2002)。SVILは、主にプロモーターメチル化を通じて、前立腺がん組織において有意に下方制御される (Vanaja et al., 2006)。SVILは、p53レベルの制御を通じて細胞生存を調節する。SVIL発現は、生存シグナル伝達と細胞運動経路との間のクロストークに必要である (Fang and Luna, 2013)。

【0129】

50

TMEM222は、染色体1p36.11上に位置する膜貫通タンパク質222をコードする(RefSeq, 2002)。

【0130】

ZNFB79は、転写因子として機能するKRAB(Kruppel関連ボックス)ドメインを含有する、ジンクフィンガータンパク質をコードする。ZNFB79のプロモーター領域は、共抑制因子KAP1およびH3me3K9(リジン9のヒストン3トリメチル化)によって結合される(O'Geen et al., 2007)。

【発明を実施するための形態】

【0131】

免疫応答の刺激は、宿主免疫系によって外来性と認識された抗原の存在に依存する。腫瘍関連抗原の存在の発見は、宿主の免疫系を用いて腫瘍成長に介入する可能性を高めた。免疫系の体液性および細胞性アームの双方を活用する様々な機構が、がん免疫療法のために目下探求されている。

10

【0132】

細胞性免疫応答の特定の要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からのT細胞の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、細胞質ゾル内に位置するタンパク質または欠陥リボソーム産物(DRIPS)に由来する、通常は8~10アミノ酸残基の主要組織適合性複合体(MHC)保有ペプチドのクラスI分子を認識するCD8陽性T細胞が、この応答において重要な役割を果たす。ヒトのMHC分子はまた、ヒト白血球抗原(HLA)とも称される。

20

【0133】

本明細書の用法では、別段の記載がない限り、全ての用語は下述のとおり定義される。

【0134】

「T細胞応答」という用語は、生体外または生体内でペプチドによって誘導される、エフェクター機能の特異的増殖および活性化を意味する。MHCクラスI拘束性細胞毒性T細胞では、エフェクター機能は、ペプチドパルスされた、ペプチド前駆体パルスされたまたは天然ペプチド提示標的細胞の溶解；好ましくはペプチドによって誘導されるインターフェロン- γ 、TNF- α 、またはIL-2であるサイトカインの分泌；好ましくはペプチドによって誘導されるグランザイムまたはパーフォリンであるエフェクター分子の分泌；または脱顆粒であってもよい。

30

【0135】

「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。ペプチドは、好ましくは9アミノ酸長であるが、8アミノ酸長程度に短くあり得て、10、11、12、13、または14以上に長くあり得て、MHCクラスIIペプチドの場合(本発明のペプチドの伸長された変種)、それらは15、16、17、18、19または20アミノ酸長以上に長くあり得る。

【0136】

さらに「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基の塩を含むものとする。好ましくは、塩は、例えば、塩化物塩または酢酸塩(トリフルオロ酢酸塩)などの、ペプチドの薬学的に許容可能な塩である。ペプチドは生体内で塩ではないので、本発明によるペプチドの塩は、それらの生体内の状態がペプチドと実質的に異なることに留意すべきである。

40

【0137】

「ペプチド」という用語は、「オリゴペプチド」もまた含むものとする。「オリゴペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。オリゴペプチドの長さは、その中で正しいエピトープまたはエピトープ

50

が保持されれば、本発明には重要でない。オリゴペプチドは、典型的に、約30アミノ酸残基長未満であり、約15アミノ酸長を超える。

【0138】

「ポリペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノおよびカルボニル基の間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を指す。正しいエピトープが保持されれば、ポリペプチドの長さは本発明にとって重要でない。ペプチドまたはオリゴペプチドという用語とは対照的に、ポリペプチドという用語は、約30を超えるアミノ酸残基を含有する分子を指すことが意図される。

【0139】

ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質またはこのような分子をコードするポリヌクレオチドは、免疫応答を誘導できれば「免疫原性」である（したがって本発明における「免疫原」である）。本発明では、免疫原性は、より具体的には、T細胞応答を誘導する能力と定義される。したがって「免疫原」は、免疫応答を誘導できる分子であり、本発明では、T細胞応答を誘導できる分子である。別の態様では、免疫原は、それに対する特異的抗体またはTCRを生じさせるのに使用される、ペプチド、ペプチドとMHCの複合体、オリゴペプチド、および／またはタンパク質であり得る。

【0140】

クラスI T細胞「エピトープ」は、クラスI MHC受容体に結合している短いペプチドを必要とし、三成分複合体（MHCクラスI α 鎖、 β -2-ミクロglobulin、およびペプチド）を形成し、それは、適切な親和性でMHC／ペプチド複合体に結合する適合T細胞受容体を保有するT細胞によって、認識され得る。MHCクラスI分子に結合するペプチドは、典型的に8～14アミノ酸長であり、最も典型的には9アミノ酸長である。

【0141】

ヒトにおいては、MHCクラスI分子（ヒト白血球抗原（HLA）ともまた称されるヒトのMHC分子）をコードする、3つの異なる遺伝子座、HLA-A、HLA-B、およびHLA-Cがある。HLA-A*01、HLA-A*02、およびHLA-B*07は、これらの遺伝子座から発現され得る、異なるMHCクラスI対立遺伝子の例である。

【0142】

表5:HLA-A*02およびHLA-A*24の発現頻度F、および最も高頻度のHLA-DR血清型。頻度は、ハーディ・ワインベルグ式、 $F=1-(1-G_f)^2$ を用いて、Mori et al. (Mori et al., 1997)から適応された、米国人母集団内のハプロタイプ頻度Gfから推定される。連鎖不均衡のために、A*02またはA*24と特定のHLA-DR対立遺伝子との組み合わせは、それらの単一頻度から予測されるよりも、豊富でありまたは低頻度であるかもしれない。詳細については、Chanock et al. (Chanock et al., 2004)を参照されたい。

10

20

30

【表 5 - 1】

対立遺伝子	母集団	対立遺伝子出現頻度から計算された表現型
A*02	白人(北米)	49.1%
A*02	アフリカ系米国人(北米)	34.1%
A*02	アジア系米国人(北米)	43.2%
A*02	ラテン系米国人(北米)	48.3%
DR1	白人(北米)	19.4%
DR2	白人(北米)	28.2%
DR3	白人(北米)	20.6%
DR4	白人(北米)	30.7%
DR5	白人(北米)	23.3%
DR6	白人(北米)	26.7%
DR7	白人(北米)	24.8%
DR8	白人(北米)	5.7%
DR9	白人(北米)	2.1%
DR1	アフリカ系(北)米人	13.20%
DR2	アフリカ系(北)米人	29.80%
DR3	アフリカ系(北)米人	24.80%
DR4	アフリカ系(北)米人	11.10%
DR5	アフリカ系(北)米人	31.10%
DR6	アフリカ系(北)米人	33.70%
DR7	アフリカ系(北)米人	19.20%
DR8	アフリカ系(北)米人	12.10%
DR9	アフリカ系(北)米人	5.80%
DR1	アジア系(北)米人	6.80%
DR2	アジア系(北)米人	33.80%
DR3	アジア系(北)米人	9.20%

10

20

【表 5 - 2】

対立遺伝子	母集団	対立遺伝子出現頻度から計算された表現型
DR4	アジア系(北)米人	28.60%
DR5	アジア系(北)米人	30.00%
DR6	アジア系(北)米人	25.10%
DR7	アジア系(北)米人	13.40%
DR8	アジア系(北)米人	12.70%
DR9	アジア系(北)米人	18.60%
DR1	ラテン系(北)米人	15.30%
DR2	ラテン系(北)米人	21.20%
DR3	ラテン系(北)米人	15.20%
DR4	ラテン系(北)米人	36.80%
DR5	ラテン系(北)米人	20.00%
DR6	ラテン系(北)米人	31.10%
DR7	ラテン系(北)米人	20.20%
DR8	ラテン系(北)米人	18.60%
DR9	ラテン系(北)米人	2.10%
A*24	フィリピン	65%
A*24	ロシアネネツ	61%
A*24:02	日本	59%
A*24	マレーシア	58%
A*24:02	フィリピン	54%
A*24	インド	47%
A*24	韓国	40%
A*24	スリランカ	37%
A*24	中国	32%
A*24:02	インド	29%
A*24	オーストラリア西部	22%
A*24	米国	22%
A*24	ロシアサマラ	20%
A*24	南米	20%
A*24	欧州	18%

【0143】

本発明のペプチドは、好ましくは、本明細書に記載される本発明のワクチンに包含される場合、A*02に結合する。ワクチンはまた、汎結合MHCクラスIIペプチドを含んでもよい。したがって、本発明のワクチンを使用して、A*02陽性の患者においてがんを治療し得る一方で、これらのペプチドの汎結合特性のために、MHCクラスIIアロタイプを選択する必要はない。

【0144】

本発明のA*02ペプチドが、例えばA*24などの別の対立遺伝子に結合するペプチドと組み合わせられた場合、MHCクラスI対立遺伝子のいずれか単独による対処と比較して、任意の患者集団のより高い割合を治療し得る。大多数の母集団では、いずれか単独の対立遺伝子によって50%未満の患者が対処され得る一方で、HLA-A*24およびHLA-A*02エピトープを含んでなるワクチンは、任意の妥当な母集団で少なくとも60%の患者を治療し得る。具体的には、様々な地域において、以下の百分率の患者が、これらの対立遺伝子の少なくとも1つについて陽性である：米国61%、西欧62%、中国75%、韓国77%、日本86%（www.allele-frequencies.netから計算された）。

【0145】

好ましい実施形態では、「ヌクレオチド配列」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのヘテロ重合体を指す。

【0146】

特定のペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列

は、天然起源であってもよく、またはそれらは合成的に構築されてもよい。一般に、本発明のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質をエンコードするDNA断片は、cDNAフラグメントおよび短いオリゴヌクレオチドリンカーから構築され、またはひと続きのオリゴヌクレオチドから構築されて、微生物またはウイルスオペロンに由来する調節因子を含んでなる、組換え転写単位で発現できる合成遺伝子が提供される。

【0147】

本明細書の用法では「ペプチドをコーディング（またはコード）するヌクレオチド」という用語は、配列が、例えば、TCRの産生に有用な樹状細胞または別の細胞株によって発現される生体系と適合性である人工（人造）開始および停止コドンを含む、ペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を指す。

10

【0148】

本明細書の用法では、核酸配列への言及は、一本鎖および二本鎖の核酸の双方を含む。したがって、例えば、特定の配列は、文脈上明らかに別の意味が示唆されない限り、このような配列の一本鎖DNA、このような配列とその補体との二本鎖（二本鎖DNA）、およびこのような配列の補体を指す。

【0149】

「コード領域」という用語は、その天然ゲノム環境内で、遺伝子の発現産物を天然にまたは通常コードする遺伝子の部分、すなわち、遺伝子の天然発現産物を生体内でコードする領域を指す。

【0150】

コード領域は、非変異（「正常」）、変異または改変遺伝子に由来し得て、またはDNA合成技術の当業者に周知の方法を使用して実験室で完全に合成された、DNA配列または遺伝子にさえ由来し得る。

20

【0151】

「発現産物」という用語は、遺伝子の、そして遺伝コード縮重に起因する同等物をコードし、したがって同一アミノ酸をコードする任意の核酸配列の天然翻訳産物である、ポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

【0152】

コード配列に言及する場合、「フラグメント」という用語は、その発現産物が、完全コード領域の発現産物と本質的に同一の生物学的機能または活性を保つ、完全未満のコード領域を含んでなるDNAの部分の意味する。

30

【0153】

「DNA断片」という用語は、別々のフラグメントの形態の、またはより大型のDNAコンストラクトの構成要素としての、DNAポリマーを指し、それは、実質的に純粋な、すなわち、混入内因性物質を含まない形態で、例えばクローニングベクターを使用した標準生化学的方法によって、断片およびその構成ヌクレオチド配列が同定、操作、および回収できる量または濃度で、少なくとも1回単離されたDNAに由来する。このような断片は、典型的に真核生物遺伝子内に存在する内部非翻訳配列またはイントロンによって中断されていない、読み取り枠の形態で提供される。非翻訳DNA配列は、それがコード領域の操作または発現を妨げない、読み取り枠下流に存在してもよい。

40

【0154】

「プライマー」という用語は、DNAの1本鎖と対合し得て、DNAポリメラーゼがそこでデオキシリボヌクレオチド鎖合成を開始する、遊離3'-OH末端を提供する、短い核酸配列を意味する。

【0155】

「プロモーター」という用語は、転写を開始するためのRNAポリメラーゼ結合に関与する、DNAの領域を意味する。

【0156】

「単離」という用語は、物質が、その元の環境（例えば、それが天然起源であれば天然環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然ポ

50

リヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然システムで共存する物質の一部または全部から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得て、および／またはこのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であり得るが、このようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部でないと言う意味では、なおも単離されている。

【0157】

本発明によって開示されるポリヌクレオチド、および組換えまたは免疫原性ポリペプチドは、「精製」形態であってもよい。「精製」という用語は、完全に純粋である必要はなく；むしろ、それは相対的定義であることが意図されて、これらの用語が当業者によって理解されるように、高度に精製された調製物、または部分的にのみ精製された調製物を含み得る。例えば、cDNAライブラリーから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一に、従来法で精製されている。少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁までの、出発原料または天然物質の精製が明示的に検討される。さらに、重量基準で、好ましくは99.999%、または少なくとも99.99%または99.9%；さらに望ましくは99%以上の純度を有する、特許請求されるポリペプチドが明示的に包含される。

【0158】

本発明によって開示される核酸およびポリペプチド発現産物、ならびにこのような核酸および／またはこのようなポリペプチドを含有する発現ベクターは、「富化形態」であってもよい。本明細書の用法では、「富化」という用語は、物質濃度が、（例えば）その天然濃度の少なくとも約2、5、10、100、または1000倍であることを意味し、有利には重量基準で0.01%、好ましくは重量基準で少なくとも約0.1%である。重量基準で約0.5%、1%、5%、10%、および20%の富化調製物もまた、検討される。本発明を構成する配列、コンストラクト、ベクター、クローン、およびその他の物質は、有利には富化または単離形態であり得る。「活性フラグメント」という用語は、通常は、単独で、または任意選択的に適切なアジュバントと共に、またはベクター中で、例えば、ウサギまたはマウスのようなそしてまたヒトをはじめとする哺乳類などの動物に投与すると免疫応答を生じる（すなわち、免疫原性を有する）ペプチド、ポリペプチドまたは核酸配列のフラグメントを意味し、このような免疫応答は、ヒトなどのレシピエント動物内でT細胞応答を刺激する形態を取る。代案としては、「活性フラグメント」はまた、生体外T細胞応答を誘導するのに使用されてもよい。

【0159】

本明細書の用法では、ポリペプチドとの関連で使用される場合、「部分」、「断片」、および「フラグメント」という用語は、アミノ酸残基などの連続する残基の配列を指し、その配列は、より大型の配列の部分集合を形成する。例えば、ポリペプチドが、トリプシンまたはキモトリプシンなどの一般的なエンドペプチダーゼのいずれかによって処理されれば、このような処理から得られるオリゴペプチドは、出発ポリペプチドの部分、断片またはフラグメントに相当するであろう。ポリヌクレオチドに関して使用される場合、これらの用語は、いずれかのエンドヌクレアーゼによる前記ポリヌクレオチドの処理によって生じる生成物を指す。

【0160】

本発明によると、配列に言及する場合、「同一性百分率」または「パーセント同一の」という用語は、比較される配列（「比較配列」）と、記載されまたは特許請求される配列（「参照配列」）とのアライメント後に、配列が、特許請求されまたは記載される配列と比較されることを意味する。次に同一性百分率は、次式に従って判定される：

同一性百分率 = $100 \left[1 - (C/R) \right]$

式中、Cは、参照配列と比較される配列との間のアライメント長にわたる、参照配列と比較配列の間の差異の数であり、

(i) 比較配列中に対応する整列塩基またはアミノ酸を有しない、参照配列中の各塩基ま

10

20

30

40

50

たはアミノ酸、および

(i i) 参照配列中の各ギャップ、および

(i i i) 比較配列中の整列塩基またはアミノ酸と異なる、参照配列中の各整列塩基またはアミノ酸が差異を構成して、

(i i i i) アライメントは、整合配列の1位から開始しなくてはならず；

Rは、比較配列とのアライメント長にわたる参照配列中の塩基またはアミノ酸の数であり、参照配列中に生じる任意のギャップもまた、塩基またはアミノ酸として数えられる。

【0161】

比較配列と、それに対して同一性百分率が上のように計算される参照配列との間に、特定の最小同一性百分率とほぼ同じまたはそれを上回るアライメントが存在すれば、その中に、上記のように計算された同一性百分率が特定の同一性百分率未満であるアライメントが存在したとしても、比較配列は、参照配列との特定の最小同一性百分率を有する。

10

【0162】

したがって上述したように、本発明は、配列番号1～配列番号191、または配列番号1～配列番号191と88%相同的であるその変異体、またはT細胞を前記ペプチドと交差反応させるその変異体からなる群から選択される配列を含んでなる、ペプチドを提供する。本発明のペプチドは、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子または前記ペプチドの伸長バージョンをクラスIIに結合する能力を有する。

【0163】

本発明では、「相同的」という用語は、2つのアミノ酸配列、すなわちペプチドまたはポリペプチド配列の配列間の同一性の程度を指す(上の同一性百分率を参照されたい)。前述の「相同性」は、比較される配列にわたり、最適条件下でアライメントされた2つの配列を比較することで判定される。このような配列相同性は、例えばClustalWアルゴリズムを使用してアライメントを作成することで、計算され得る。一般に利用できる配列解析ソフトウェア、より具体的には、Vector NTI、GENETYXまたはその他のツールが、公共データベースによって提供される。

20

【0164】

当業者は、特定のペプチドの変異体によって誘導されるT細胞が、ペプチドそれ自体と交差反応できるかどうかを評価できるであろう(Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997)。

30

【0165】

所与のアミノ酸配列の「変異型」によって、本発明者らは、ペプチドが、配列番号1～配列番号191からなる所与のアミノ酸配列からなるペプチドと実質的に同様に、HLA分子となおも結合できるように、(例えば、それらを別の天然アミノ酸残基の側鎖で、またはその他の側鎖で置換することにより)例えば、アミノ酸の1つまたは2つの残基の側鎖が変化することを意味する。例えば、ペプチドは、それがHLA-A*02または-D Rなどの適切なMHC分子の結合溝と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、活性化CTLのTCRに結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。

40

【0166】

これらのT細胞は、引き続いて細胞と交差反応して、本発明の態様で定義される同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を殺滅し得る。学術文献およびデータベース(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)から導出され得るように、HLA結合ペプチドの特定の位置は、典型的に、アンカー残基であり、結合溝を構成するポリペプチド鎖の極性、電気物理的、疎水性、および空間特性によって画定されるHLA受容体の結合モチーフと適合する、コア配列を形成する。したがって、当業者は、既知のアンカー残基を保つことで、配列番号1～配列番号191に記載されるアミノ酸配列を修飾でき、このような変異型がMHCクラスIまたはII分子に結合する能力を維持するかどうかを判定できるであろう。本発

50

明の変異型は、活性化T細胞のTCRに結合する能力を維持し、それは引き続いて、本発明の態様で定義されるような同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞と交差反応して、それを殺滅し得る。

【0167】

本明細書で開示される元の（未修飾）ペプチドは、特に明記されない場合は、ペプチド鎖内の異なる、おそらくは選択的な部位における、1つまたは複数の残基の置換によって修飾され得る。好ましくはこれらの置換は、アミノ酸鎖の末端に位置する。このような置換は、保存的性質であってもよく、例えば、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸によって置換されるなど、構造および特徴の類似したアミノ酸によってアミノ酸が置換される。さらにより保存的な置換は、ロイシンのイソロイシンによる置換などの、同一または類似サイズおよび化学的性質のアミノ酸の置換である。天然起源相同タンパク質ファミリーの配列多様性の研究では、特定のアミノ酸置換は、他よりも耐容されることが多く、これらは、元のアミノ酸とその置換物の間のサイズ、電荷、極性、および疎水性の類似性との相関を示すことが多く、これが「保存的置換」の定義の基礎である。

10

【0168】

保存的置換は、本明細書では、以下の5つのグループの1つの中の交換として定義される：グループ1—小型脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基（Ala、Ser、Thr、Pro、Gly）；グループ2—極性の負に帯電した残基およびそれらのアミド（Asp、Asn、Glu、Gln）；グループ3—極性の正に帯電した残基（His、Arg、Lys）；グループ4—大型脂肪族非極性残基（Met、Leu、Ile、Val、Cys）；およびグループ5—大型芳香族残基（Phe、Tyr、Trp）。

20

【0169】

より保存的でない置換は、アラニンのイソロイシン残基による置換などの、類似した特徴を有するがサイズがいくらか異なる別のアミノ酸による置換を伴うかもしれない。高度に非保存的な置換は、極性アミノ酸の、または塩基性アミノ酸の酸性アミノ酸による置換を伴うかもしれない。しかし化学効果は完全に予測可能でなく、極端な置換が単純な化学的原理からは予測できない偶然の効果を生じる可能性があるため、このような「極端な」置換を潜在的に無効であるとして却下し得ない。

【0170】

もちろんこのような置換には、通常のL-アミノ酸以外の構造体が関与してもよい。したがってD-アミノ酸が、本発明の抗原性ペプチドに通常見いだされるL-アミノ酸を置換するかもしれない、依然として本明細書の開示に包含される。さらに、非標準アミノ酸（すなわち、一般的な天然タンパク質新生アミノ酸以外）もまた置換目的で使用して、本発明による免疫原および免疫原性ポリペプチドが製造されてもよい。

30

【0171】

2つ以上の位置における置換が、以下に定義されるように実質的に同等のまたはそれを超える抗原活性のあるペプチドをもたらすことが判明した場合、これらの置換の組み合わせを試験して、置換の組み合わせが、ペプチドの抗原性に相加または相乗効果をもたらすかどうか判定される。最大でも、ペプチド内の4つ以上の位置を超えて同時に置換されることはない。

40

【0172】

本明細書で示されるようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドは、非修飾ペプチドと比較すると、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIまたはII分子に結合する能力が実質的に変化したり悪影響を受けたりすることなく交換される、1つまたは2つの非アンカーアミノ酸を有し得る（アンカーモチーフについては下記を参照されたい）。別の実施形態では、本明細書で示されるようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドにおいては、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIまたはII分子に結合する能力が非修飾ペプチドと比較して実質的に変化したり悪影響を受けることなく、1つまたは2つのアミノ酸がそれらの保存的交換パートナー（以下を参照されたい）で交換され得る。

【0173】

50

T細胞受容体との相互作用に実質的に寄与しないアミノ酸残基は、その組み込みが、T細胞反応性に実質的に影響を及ぼさず、関連MHCとの結合を排除しない、その他のアミノ酸での置換によって修飾され得る。したがって与えられた但し書きを除いて、本発明のペプチドは、与えられたようなアミノ酸配列またはそれらの部分または変異体を含む、任意のペプチド（本発明者らは、その用語にオリゴペプチドまたはポリペプチドを含める）であってもよい。

【0174】

表6: 配列番号7、9、31、192、212、および142に記載のペプチドの変異型およびモチーフ

【表6-1】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号7	Y	L	T	R	H	L	A	V	L
変異型									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号9	I	L	D	D	H	L	S	R	V
変異型									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							

10

20

30

40

【表 6 - 2】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号 31	L	L	Y	G	K	Y	V	S	V
変異型									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号 192	K	I	Q	E	M	Q	H	F	L
変異型		L							V
		L							I
		L							
		L							A
		M							V
		M							I

10

20

30

40

【表 6－3】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号 212	F	L	L	D	G	S	A	N	V
変異型									I
									L
									A
		M							
		M							I
		M							L
		M							A
		A							
		A							I
		A							L
		A							A
		V							
		V							I
		V							L
		V							A
		T							
		T							I
		T							L
		T							A
		Q							
		Q							I
		Q							L
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号 142	S	L	V	Q	R	V	E	T	I

10

20

30

40

【表 6 - 4】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
変異型									V
									L
									A
		M							V
		M							
		M							L
		M							A
		A							V
		A							
		A							L
		A							A
		V							V
		V							
		V							L
		V							A
		T							V
		T							
		T							L
		T							A
		Q							V
		Q							
		Q							L
		Q							A

10

20

【0175】

より長い（伸長された）ペプチドもまた、適切であってもよい。MHCクラスⅠエペトープは、通常は8～11アミノ酸長であるが、実際のエペトープを含むより長いペプチドまたはタンパク質から、ペプチドプロセッシングによって作製することが可能である。実際のエペトープ側面に位置する残基は、プロセッシング中に実際のエペトープを曝露させるのに必要なタンパク質分解切断に、実質的に影響を及ぼさない残基であることが好ましい。

30

【0176】

本発明のペプチドは、最大4個のアミノ酸によって伸長させ得て、すなわち4：0～0：4の間のあらゆる組み合わせで、どちらかの末端に1、2、3または4個のアミノ酸が付加され得る。本発明による伸長の組み合わせは、表7にある。

【0177】

表7: 本発明のペプチドの伸長の組み合わせ

【表 7】

C 末端	N 末端
4	0
3	0 または 1
2	0 または 1 または 2
1	0 または 1 または 2 または 3
0	0 または 1 または 2 または 3 または 4
N 末端	C 末端
4	0
3	0 または 1
C 末端	N 末端
2	0 または 1 または 2
1	0 または 1 または 2 または 3
0	0 または 1 または 2 または 3 または 4

10

【0178】

伸長／延長のためのアミノ酸は、元のタンパク質配列のペプチドまたは任意のその他のアミノ酸であり得る。伸長を利用して、ペプチドの安定性または溶解度を高め得る。

【0179】

したがって本発明のエピトープは、天然起源腫瘍関連または腫瘍特異的エピトープと同一であってもよく、またはそれらが実質的に同一の抗原活性を有しさえすれば、4つ以下の残基が参照ペプチドと異なるエピトープを含んでもよい。

20

【0180】

代案の実施形態では、ペプチドは、4つを超えるアミノ酸で、好ましくは最大30アミノ酸の全長まで、片側または両側で伸長される。これは、MHCクラスII結合ペプチドをもたらしてもよい。MHCクラスIIへの結合は、当該技術分野で公知の方法によって試験される得る。

【0181】

したがって、本発明は、MHCクラスIIエピトープのペプチドおよび変異型を提供し、ペプチドまたは変異型は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14、すなわち8、9、10、11、12、13、14アミノ酸の全長を有し、伸長されたクラスII結合ペプチドの場合、長さはまた、15、16、17、18、19、20、21または22アミノ酸であり得る。

30

【0182】

もちろん、本発明によるペプチドまたは変異型は、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIまたはIIの分子に結合する能力を有する。ペプチドまたは変異体のMHC複合体への結合は、当該技術分野で既知の方法によって試験されてもよい。

【0183】

好ましくは、本発明によるペプチドに特異的なT細胞を置換ペプチドについて試験する場合、置換ペプチドが背景に対して最大溶解増加の半分を達成するペプチド濃度は、約1mM以下、好ましくは約1μM以下、より好ましくは約1nM以下、さらにより好ましくは約100pM以下、最も好ましくは約10pM以下である。置換ペプチドが、2人以上、少なくとも2人、より好ましくは3人の個人からのT細胞によって認識されることもまた好ましい。

40

【0184】

本発明の特に好ましい実施形態では、ペプチドは、配列番号に1～配列番号191に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる。

【0185】

「から本質的になる」は、本発明によるペプチドが、配列番号1～配列番号191のいずれかに記載の配列またはその変異体に加えて、MHC分子エピトープのエピトープとして機能するペプチドの一部を必ずしも構成しない、追加的なNおよび／またはC末端に位置するアミノ酸の一連の配列を含有することを意味するものとする。

50

【0186】

それでもなお、これらの一連の配列は、本発明によるペプチドの細胞への効率的な導入を提供するのに重要であり得る。本発明の一実施形態では、ペプチドは、例えば、NCBI、GenBank受入番号X00497に由来する、HLA-DR抗原関連不変鎖（p33、以下の「Ii」）の80個のN末端アミノ酸を含んでなる、融合タンパク質の一部である。その他の融合物においては、本発明のペプチドは、本明細書に記載されるような抗体、またはその機能的部分に、特に抗体の配列に、前記抗体によって特異的に標的化されるように融合し得て、または例えば、本明細書に記載されるような樹状細胞に対して特異的な抗体に、またはその中に融合し得る。

【0187】

さらにペプチドまたは変異型は、より強力な免疫応答を引き起こすために、安定性および／またはMHC分子への結合を改善するようにさらに修飾されてもよい。ペプチド配列のこのような最適化方法は当該技術分野で周知であり、例えば、逆ペプチド結合または非ペプチド結合の導入が挙げられる。

【0188】

逆ペプチド結合においては、アミノ酸残基はペプチド（ —CO—NH— ）結合によって連結せず、ペプチド結合が逆転する。このようなレトロインベルソペプチド模倣剤は、例えば、参照により本明細書に援用される、Mezriere et al. (1997) (Mezriere et al., 1997)に記載されるものなどの当該技術分野で既知の方法を使用して製造されてもよい。このアプローチは、側鎖の方向でなく主鎖に關与する変化を含有する、擬ペプチドの生成を伴う。Mezriere et al. (Mezriere et al., 1997)は、MHC結合およびTヘルパー細胞応答のために、これらの擬ペプチドが有用であることを示す。CO—NHペプチド結合の代わりにNH—CO結合を含有するレトロインバースペプチドは、タンパク質分解に対してはるかにより高い耐性がある。

【0189】

非ペプチド結合は、例えば、 $\text{—CH}_2\text{—NH—}$ 、 $\text{—CH}_2\text{S—}$ 、 $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{—}$ 、 —CH=CH— 、 $\text{—COCH}_2\text{—}$ 、 $\text{—CH(OH)CH}_2\text{—}$ 、および $\text{—CH}_2\text{SO—}$ である。米国特許第4,897,445号明細書は、標準手順によって合成されるポリペプチド、および NaCNBH_3 の存在下でアミノアルデヒドとアミノ酸を反応させることで合成される非ペプチド結合が關与する、ポリペプチド鎖中の非ペプチド結合（ $\text{—CH}_2\text{—NH—}$ ）を固相合成する方法を提供する。

【0190】

上述の配列を含んでなるペプチドは、それらのアミノおよび／またはカルボキシ末端に存在する追加的な化学基と共に合成されて、ペプチドの安定性、生物学的利用能、および／または親和性が高められてもよい。例えば、カルボベンゾキシル、ダンシル、または t -ブチルオキシカルボニル基などの疎水性基が、ペプチドのアミノ末端に付加されてもよい。同様に、アセチル基または γ -フルオレニルメトキシカルボニル基が、ペプチドのアミノ末端に配置されてもよい。さらに、疎水性基、 t -ブチルオキシカルボニル、またはアミド基が、ペプチドのカルボキシ末端に付加されてもよい。

【0191】

さらに、本発明のペプチドは、それらの立体配置を改変するように合成されてもよい。例えば、通常のL異性体でなく、ペプチドの1つまたは複数のアミノ酸残基のD異性体を使用されてもよい。なおもさらに、本発明のペプチドのアミノ酸残基の少なくとも1つが、周知の非天然起源アミノ酸残基の1つで置換されてもよい。このような改変は、本発明のペプチドの安定性、生物学的利用能および／または結合作用の増大に役立ってもよい。

【0192】

同様に、本発明のペプチドまたは変異体は、ペプチド合成の前または後のどちらかに、特定のアミノ酸を反応させることで化学的に修飾されてもよい。このような修飾の例は当該技術分野で周知であり、例えば、参照により本明細書に援用される、R. Lundbl

10

20

30

40

50

ad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 004 (Lundblad, 2004) に要約される。アミノ酸の化学修飾としては、これに限定されるものではないが (although without limitation thereto)、アシル化、アミジン化、リジンのピリドキシル化、還元アルキル化、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) によるアミノ基のトリニトロベンジル化、システインのシステイン酸への過ギ酸酸化によるカルボキシル基のアミド修飾およびスルフヒドリル修飾、水銀誘導体形成、その他のチオール化合物との混合ジスルフィド形成、マレイミドとの反応、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化、およびアルカリ性 pH でのシアネートによるカルバモイル化による修飾が挙げられるが、これに限定されるものではない (is not limited to)。この点において、当業者は、タンパク質の化学修飾に関するより詳細な手順について、Chapter 15 of Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000) (Coligan et al., 1995) を参照されたい。

10

【0193】

簡単に述べると、例えばタンパク質中のアルギニル残基の修飾は、付加体を形成するためのフェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、および 1, 2-シクロヘキサジオンなどの隣接するジカルボニル化合物の反応に基づくことが多い。別の実施例は、メチルグリオキサールとアルギニン残基の反応である。システインは、リジンおよびヒスチジンなどのその他の求核性部位の同時の修飾なしに修飾され得る。その結果、システイン修飾のために多数の試薬が利用可能である。Sigma-Aldrich などの会社のウェブサイト (<http://www.sigma-aldrich.com>) が、特定の試薬に関する情報を提供する。

20

【0194】

タンパク質中のジスルフィド結合の選択的還元もまた、一般的である。ジスルフィド結合は、生物医薬品の加熱処理中に形成されて酸化され得る。ウッドワード試薬 K を使用して、特定のグルタミン酸残基が修飾されてもよい。N-(3-(ジメチルアミノ)プロピル)-N'-エチルカルボジイミドを利用して、リジン残基とグルタミン酸残基の間に分子内架橋が形成され得る。例えば、ジエチルピロ炭酸は、タンパク質中のヒスチジル残基修飾のための試薬である。ヒスチジンはまた、4-ヒドロキシ-2-ノネナールを使用して修飾され得る。リジン残基およびその他の α -アミノ基の反応物は、例えば、ペプチドの表面への結合またはタンパク質/ペプチド架橋において有用である。リジンはポリ(エチレン)グリコールの付着部位であり、タンパク質のグリコシル化の主要な修飾部位である。タンパク質中のメチオニン残基は、例えば、ヨードアセトアミド、プロモエチルアミン、およびクロラミン T によって修飾され得る。

30

【0195】

テトラニトロメタンおよび N-アセチルイミダゾールを使用して、チロシル残基が修飾され得る。ジチロシンの形成を通じた架橋は、過酸化水素/銅イオンによって達成され得る。

40

【0196】

トリプトファンの修飾に関する最近の研究では、N-ブロモサクシニミド、臭化 2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルまたは 3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルメルカプト)-3H-インドール (BPN S-スカトール) が使用されている。

【0197】

PEG による治療用タンパク質およびペプチドの成功裏の修飾が、循環半減期の延長に関連することが多い一方で、タンパク質と、グルタルアルデヒド、ポリエチレングリコールジアクリレート、およびホルムアルデヒドとの架橋は、ハイドロゲル調製のために使用される。免疫療法のためのアレルゲンの化学修飾は、シアン酸カリウムを用いたカルバミル化によって達成されることが多い。

50

【0198】

ペプチドが修飾されまたは非ペプチド結合を含む、ペプチドまたは変異体は、本発明の好ましい実施形態である。一般に、ペプチドおよび変異体（少なくともアミノ酸残基間にペプチド結合を含有するもの）は、Lukas et al. (Lukas et al., 1981) によって、そしてその中で引用される参考文献によって開示される、Fmoc-ポリアミド様式の固相ペプチド合成によって合成されてもよい。一時的なN-アミノ基保護は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 基によってもたらされる。この高度に塩基不安定性の保護基の反復性切断は、N, N-ジメチルホルムアミド中の20%ピペリジンを使用して実施される。側鎖官能基は、それらのブチルエーテル（セリン、スレオニン、およびチロシンの場合）、ブチルエステル（グルタミン酸およびアスパラギン酸の場合）、ブチルオキシカルボニル誘導体（リジンおよびヒスチジンの場合）、トリチル誘導体（システインの場合）、および4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホン誘導体（アルギニンの場合）として保護されてもよい。グルタミンまたはアスパラギンがC末端残基である場合、側鎖アミド官能基を保護するために、4, 4'-ジメトキシベンズヒドリル基が活用される。固相担体は、ジメチルアクリルアミド（主鎖単量体）、ビスアクリロイルエチレンジアミン（架橋剤）、およびアクリロイルサルコシンメチルエステル（機能化因子）の3つの単量体から構成される、ポリジメチルアクリルアミドポリマーをベースとする。使用されるペプチド-対-樹脂の切断可能な結合因子は、酸不安定性4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸誘導体である。逆転N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド/1-ヒドロキシベンゾトリアゾール媒介共役手順を使用して付加されるアスパラギンおよびグルタミンを除いて、全てのアミノ酸誘導体は、それらのあらかじめ形成された対称的な無水物誘導体として付加される。全ての共役および脱保護反応は、ニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸またはイサチン (isotatin) 試験手順を使用してモニターされる。合成完了時に、ペプチドは樹脂担体から切断され、同時に、50%スカベンジャー混合物を含有する95%トリフルオロ酢酸での処理によって、側鎖保護基が除去される。一般に使用されるスカベンジャーとしては、エタンジチオール、フェノール、アニソール、および水が挙げられ、正確な選択は、合成されるペプチドの構成アミノ酸に左右される。ペプチドの合成のための固相法と溶液相法の組み合わせもまた、可能である（例えば、(Bruckdorfer et al., 2004)、およびその中で引用される参考文献を参照されたい）。

【0199】

トリフルオロ酢酸は、真空蒸発によって除去され、引き続くジエチルエーテルを用いた磨砕は、粗製ペプチドをもたらす。存在する任意のスカベンジャーは、単純な抽出手順によって除去され、それは水相の凍結乾燥時に、スカベンジャーを含まない粗製ペプチドを与える。ペプチド合成のための試薬は、通常、例えば、Calbiochem-Nova biochem (Nottingham, UK) から入手できる。

【0200】

精製は、再結晶化、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、および（通常は）例えば、アセトニトリル/水勾配分離を使用した逆相高速液体クロマトグラフィーなどの技術の任意の1つまたは組み合わせによって、実施してもよい。

【0201】

ペプチドの分析は、薄層クロマトグラフィー、電気泳動法、特にキャピラリー電気泳動法、固相抽出 (CSPE)、逆相高速液体クロマトグラフィー、酸加水分解後のアミノ酸分析を使用して、高速原子衝撃 (FAB) 質量分光分析によって、ならびにMALDIおよびESI-Q-TOF質量分光分析によって、実施されてもよい。

【0202】

過剰提示ペプチドを選択するために、中央値サンプル提示ならびに反復試験変動を示す、提示プロファイルが計算される。プロファイルは、目的腫瘍実体のサンプルを正常なサンプルのベースラインに並置させる。次に、線形混合効果モデルのp値を計算し (Pin

heiro et al., 2015)、偽発見率によって複数試験について補正することで (Benjamini and Hochberg, 1995)、これらの各プロファイルが過剰提示スコアに統合され得る。

【0203】

質量分析によるHLAリガンドの同定と相対的定量化のために、衝撃凍結サンプルからのHLA分子が精製されて、HLA関連ペプチドが単離された。単離ペプチドは分離され、オンラインナノエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 実験によって配列が同定された。その結果生じたペプチド配列は、CRCサンプル (N=24 A*02 陽性サンプル) から記録された天然TUMAPの断片化パターンと、同一配列の対応する合成標準ペプチドの断片化パターンとの比較によって、確認された。ペプチドは、原発性腫瘍のHLA分子のリガンドとして直接、同定されたので、これらの結果は、24人のCRC患者から入手された原発性がん組織上における、同定されたペプチドの天然プロセッシングおよび提示の直接的証拠を提供する。

10

【0204】

発見パイプラインXPRESIDENT (登録商標) v2.1 (例えば、その内容全体が参照により明細書に援用される、米国特許第2013-0096016号明細書を参照されたい) は、いくつかの異なる非がん性組織および臓器と比較した、がん組織上のHLA拘束性ペプチドレベルの直接相対定量化に基づく、妥当な過剰提示ペプチドワクチン候補の同定と選択ができるようにする。これは、独自仕様のデータ解析パイプラインで処理された獲得LC-MSデータを使用して、配列同定のためのアルゴリズム、スペクトルクラスタリング、イオン計数、滞留時間アライメント、電荷状態のデコンボリューション、および正規化を組み合わせる、無標識示差定量化の開発によって達成された。

20

【0205】

各ペプチドおよびサンプルの誤差推定値を含む、提示レベルが確立された。腫瘍組織上で排他的に提示されるペプチド、および腫瘍において過剰提示されるペプチドが、非がん性の組織および臓器との比較で同定されている。

【0206】

CRC組織サンプルからのHLAペプチド複合体は精製されて、HLA結合ペプチドが単離され、LC-MSによって分析された (実施例を参照されたい)。本出願に含まれる全てのTUMAPは、このアプローチによって原発性CRCサンプル上で同定され、原発性CRC上におけるそれらの提示が確認された。

30

【0207】

複数のCRCおよび正常組織上で同定されたTUMAPは、無標識LC-MSデータのイオン計数を使用して定量化された。方法は、ペプチドのLC-MSシグナル面積が、サンプル中のその存在量と相関すると仮定する。様々なLC-MS実験におけるペプチドの全ての定量的シグナルは、中心傾向に基づいて正規化され、サンプル当たりで平均化されて、提示プロファイルと称される棒グラフにマージされた。提示プロファイルは、タンパク質データベース検索、スペクトルクラスタリング、電荷状態デコンボリューション (除電)、および滞留時間アライメントおよび正規化のような、異なる解析法を統合する。

【0208】

40

さらに、発見パイプラインXPRESIDENT (登録商標) v2.xは、がんまたはその他の感染組織上で、MHC拘束性、好ましくはHLA拘束性のペプチドレベルの直接絶対定量化を可能にする。簡単に述べると、分析された組織サンプルの全DNA含有量から、総細胞数が計算された。組織サンプル中のTUMAPの全ペプチド量は、天然TUMAPと、既知量のTUMAPの同位体標識バージョン、いわゆる内標準との比率として、ナノLC-MS/MSによって測定された。TUMAP単離の効率は、全ての選択されたTUMAPのペプチド:MHC複合体をTUMAP単離手順の可能な限り早い時点で組織溶解産物に添加して、ペプチド単離手順の完了後に続く、ナノLC-MS/MSによるそれらの検出によって判定された。総細胞数および全ペプチド量は、組織サンプル当たり三連の測定から計算された。ペプチド単離効率は、それぞれ三連で測定された、10回の添

50

加実験からの平均として計算された（実施例 6 および表 1 2 を参照されたい）。

【0209】

本発明は、本発明のペプチドを過剰にまたは排他的に提示する、好ましくはCRCである、がん／腫瘍を治療するのに有用なペプチドを提供する。これらのペプチドは、原発性ヒトCRCサンプル上で、HLA分子によって天然に提示されることが、質量分析法によって示された。

【0210】

それにペプチドが由来する起源遺伝子／タンパク質（「完全長タンパク質」または「基礎タンパク質」とも称される）の多くは、正常組織と比較してがんにおいて高度に過剰発現されることが示されて、起源遺伝子の高度な腫瘍関連性が実証され、「正常組織」は、本発明との関連で、大腸（結腸または直腸）からの健康な細胞またはその他の正常組織細胞のどちらかを意味するものとする（実施例 2 を参照されたい）。さらに、ペプチド自体は、腫瘍組織上で強く過剰提示されるが正常組織上では過剰提示されず、「腫瘍組織」は本発明との関連で、CRCに罹患している患者に由来するサンプルを意味するものとする（実施例 1 を参照されたい）。

10

【0211】

HLA結合ペプチドは、免疫系、特にTリンパ球によって認識され得る。T細胞は、例えば、誘導ペプチドを提示するCRC細胞などの、認識されたHLA／ペプチド複合体を提示する細胞を破壊し得る。

【0212】

本発明のペプチドは、T細胞応答を刺激でき、および／または過剰提示されることが示されており、したがって本発明に従って、抗体および／または可溶性TCRなどのTCRの製造のために使用され得る（実施例 3、実施例 4 を参照されたい）。さらに、ペプチドは、それぞれのMHCと複合体化した場合に、本発明による抗体および／またはTCR、特にTCRの製造のためにも使用され得る。それぞれの方法は当業者に良く知られており、それぞれの参考文献にもまた見られる。したがって本発明のペプチドは、腫瘍細胞を破壊し得る免疫応答を患者において生じさせるのに有用である。患者における免疫応答は、理想的には免疫原性を増強する薬剤（すなわちアジュバント）との組み合わせで、記載されるペプチド、または適切な前駆体（例えば伸長ペプチド、タンパク質、またはこれらのペプチドをコードする核酸）を患者に直接投与することで誘導され得る。本発明の標的ペプチドは、正常組織上では同等のコピー数で提示されないもので、このような治療的ワクチン接種から生じる免疫応答は、腫瘍細胞に対して高度に特異的であることが予測され得て、患者の正常細胞に対する望まれない自己免疫反応のリスクを防止する。

20

30

【0213】

本明細書は、鎖および $\alpha\beta$ 鎖（「 α/β TCR」）を含んでなる、T細胞受容体（TCR）にさらに関する。MHC分子によって提示された際に、TCRおよび抗体に結合できるペプチドもまた提供される。本明細書はまた、本明細書のTCRおよびペプチドを発現するための核酸、ベクター、および宿主細胞；そしてそれを使用する方法にも関する。

【0214】

「T細胞受容体」（TCRと略記される）という用語は、 α ポリペプチド鎖（ α 鎖）および β ポリペプチド鎖（ β 鎖）を含んでなるヘテロ二量体分子を指し、ヘテロ二量体受容体は、HLA分子によって提示されるペプチド抗原と結合できる。本用語は、いわゆる γ/δ TCRもまた含む。

40

【0215】

一実施形態では、本明細書は、本明細書に記載されるようなTCRを製造する方法を提供し、方法は、TCRの発現を促進するのに適した条件下でTCRを発現できる、宿主細胞を培養するステップを含んでなる。

【0216】

本明細書の別の態様では、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞または人工抗原提示細胞の表面に発現されるクラスIまたはII MHC分

50

子上に、抗原が負荷され、または抗原／クラス I または I I MHC 複合体モノマーを四量体化することで、クラス I または I I MHC 四量体上に抗原が負荷される、本明細書に記載の方法に関する。

【0217】

α/β TCR の α および β 鎖、そして γ/δ TCR の γ および δ 鎖は、一般にそれぞれ 2 つの「領域」、すなわち可変領域と定常領域を有すると見なされる。可変領域は、可変領域 (V) の連結と、連結領域 (J) とからなる。可変領域はまた、リーダー領域 (L) を含んでもよい。 β および δ 鎖はまた、多様性領域 (D) を含んでもよい。 α および β 定常領域はまた、 α および β 鎖を細胞膜に固着させる C 末端膜貫通 (TM) 領域を含んでもよい。

10

【0218】

γ/δ TCR に関して、「TCR γ 可変領域」という用語は、本明細書の用法ではリーダー領域 (L) のない TCR γ V (TRGV) 領域と TCR γ J (TRGJ) 領域との連結を指し、TCR γ 定常領域という用語は、細胞外 TRGC 領域を指し、または C 末端トランケート型 TRGC 配列を指す。同様に「TCR δ 可変領域」という用語は、リーダー領域 (L) のない TCR δ V (TRDV) 領域と TCR δ D/J (TRDD/TRDJ) 領域との連結を指し、「TCR δ 定常領域」という用語は、細胞外 TRDC 領域を指し、または C 末端トランケート型 TRDC 配列を指す。

【0219】

本明細書の TCR は、好ましくは、約 100 μ M 以下、約 50 μ M 以下、約 25 μ M 以下、または約 10 μ M 以下の結合親和性 (KD) で、ペプチド-HLA 分子複合体に結合する。より好ましいのは、約 1 μ M 以下、約 100 nM 以下、約 50 nM 以下、約 25 nM 以下の結合親和性を有する、高親和性 TCR である。本発明の TCR の好ましい結合親和性範囲の非限定的例としては、約 1 nM ~ 約 10 nM；約 10 nM ~ 約 20 nM；約 20 nM ~ 約 30 nM；約 30 nM ~ 約 40 nM；約 40 nM ~ 約 50 nM；約 50 nM ~ 約 60 nM；約 60 nM ~ 約 70 nM；約 70 nM ~ 約 80 nM；約 80 nM ~ 約 90 nM；および約 90 nM ~ 約 100 nM が挙げられる。

20

【0220】

本明細書の用法では、本明細書の TCR との関連で、「特異的結合」およびそれらの文法的変種は、ペプチド-HLA 分子複合体に対して、100 μ M 以下の結合親和性 (KD) を有する TCR を意味するために使用される。

30

【0221】

本明細書の α/β ヘテロ二量体 TCR は、それらの定常領域の間に導入された、ジスルフィド結合を有してもよい。このタイプの好ましい TCR としては、TRAC 定常領域配列と TRBC1 または TRBC2 定常領域配列とを有するものが挙げられるが、ただし、TRAC の Thr48 および TRBC1 または TRBC2 の Ser57 は、システイン残基によって置換されており、前記システインは、TCR の TRAC 定常領域配列と TRBC1 または TRBC2 定常領域配列との間に、ジスルフィド結合を形成する。

【0222】

上述の導入された鎖間結合の存在下または不在下で、本明細書の α/β ヘテロ二量体 TCR は、TRAC 定常領域配列と TRBC1 または TRBC2 定常領域配列とを有してもよく、TCR の TRAC 定常領域配列と、TRBC1 または TRBC2 定常領域配列とが、TRAC のエクソン 2 の Cys4 と、TRBC1 または TRBC2 のエクソン 2 の Cys2 との間の天然ジスルフィド結合によって連結されてもよい。

40

【0223】

本明細書の TCR は、放射性核種、フルオロフォア、およびビオチンからなる群から選択される、検出可能な標識を含んでなってもよい。本明細書の TCR は、放射性核種、化学療法剤、または毒素などの治療的活性薬剤にコンジュゲートされてもよい。

【0224】

一実施形態では、 α 鎖に少なくとも 1 つの変異を有し、および/または β 鎖に少なくと

50

も1つの変異を有する本明細書のTCRは、非変異TCRと比較して修飾されたグリコシル化を有する。

【0225】

一実施形態では、TCR α 鎖および／またはTCR β 鎖に少なくとも1つの変異を含んでなるTCRは、ペプチド-HLA分子複合体に対して、非変異TCR α 鎖および／または非変異TCR β 鎖を含んでなるTCRの少なくとも2倍の結合親和性および／または結合半減期を有する。腫瘍特異的TCRの親和性増大とその利用は、最適TCR親和性のウィンドウの存在に依存する。このようなウィンドウの存在は、HLA-A2拘束性病原体に対して特異的なTCRが、HLA-A2拘束性腫瘍関連自己抗原に対して特異的なTCRと比較して、一般に約10分の1のKD値を有するという観察に基づく。腫瘍抗原は免疫原性である可能性を有するが、腫瘍は個人自身の細胞から生じるので、改変された翻訳プロセッシングのある変異型タンパク質またはタンパク質のみが、免疫系によって異質と見なされることが今や知られている。上方制御されまたは過剰発現される抗原（いわゆる自己抗原）は、腫瘍に対する機能性免疫応答を必ずしも誘導しない。これらの抗原に対して高度に反応性のTCRを発現するT細胞は、中枢性免疫寛容として知られているプロセス、すなわち自己抗原に対する低親和性TCRを有するT細胞のみが残留するプロセスによって、胸腺において負選択される。したがって、発明による（*tot he*）ペプチドに対する本明細書のTCRまたは変異体の親和性は、当該技術分野で周知の方法によって増大され得る。

【0226】

本明細書は、本明細書に従ってTCRを同定して単離する方法にさらに関し、前記方法は、HLA-A*02陰性健常ドナーからのPBMCをA2／ペプチドモノマーと共にインキュベートするステップと、PBMCを四量体フィコエリトリン（PE）と共にインキュベートするステップと、高結合活性T細胞を蛍光活性化細胞選別（FACS）Calibur分析によって単離するステップとを含んでなる。

【0227】

本明細書は、本明細書に従ってTCRを同定して単離する方法にさらに関し、前記方法は、そのT細胞がマウスTCR欠損を補償する多様なヒトTCRレパートリーを発現する、全ヒトTCR $\alpha\beta$ 遺伝子遺伝子座（1.1および0.7Mb）を有する遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを目的ペプチドで免疫化するステップと、遺伝子組換えマウスから得られたPBMCを四量体フィコエリトリン（PE）と共にインキュベートするステップと、高結合活性T細胞を蛍光活性化細胞選別（FACS）Calibur分析によって単離するステップとを含んでなる。

【0228】

一態様では、本明細書のTCRを発現するT細胞を得るために、本明細書のTCR- α および／またはTCR- β 鎖をコードする核酸が、 γ レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの発現ベクターにクローン化される。組換えウイルスが作製され、次に、抗原特異性および機能性結合活性などの機能について試験される。次に、最終生成物のアリコートを使用して、標的T細胞集団（一般に患者のPBMCから精製される）が形質導入され、それは患者への輸液前に増殖される。別の態様では、本明細書のTCRを発現するT細胞を得るために、例えば、生体外転写システム（*sys-tems*）などの当該技術分野で公知の技術によって、TCR RNAが合成される。次に生体外で合成されたTCR RNAは、健常ドナーから得られた原発性CD8⁺T細胞内に電気穿孔によって導入され、腫瘍特異的TCR- α および／またはTCR- β 鎖が再発現される。

【0229】

発現を増加させるために、本明細書のTCRをコードする核酸は、レトロウイルス長末端反復（LTR）、サイトメガロウイルス（CMV）、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）U3、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）、 β -アクトリン、ユビキチン、およびシミアンウイルス40（SV40）／CD43複合プロモーター、伸長因子（EF）-1 α 、および脾臓フォーカス形成ウイルス（SFV）プロモーターなどの強力なプロモータ

ーと作動可能に連結されてもよい。好ましい実施形態では、プロモーターは、発現される核酸に対して異種である。強力なプロモーターに加えて、本明細書のTCR発現カセットは、レンチウイルスコンストラクトの核転座を促進する、中央ポリプリントラクト(cPPT)(Follenziet al., 2000)、およびRNA安定性を増大させることで導入遺伝子発現のレベルを高める、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子(wPRE)(Zufferey et al., 1999)をはじめとする、導入遺伝子発現を高め得る追加的な要素を含有してもよい。

【0230】

本発明のTCRの α および β 鎖は、別々のベクターにある核酸によってコードされてもよく、または同一ベクターにあるポリヌクレオチドによってコードされてもよい。

10

【0231】

高レベルのTCR表面発現の達成には、導入されたTCRのTCR- α およびTCR- β 鎖の双方が、高レベルで転写される必要がある。そうするために、本明細書のTCR- α およびTCR- β 鎖は、この障害を克服できることが示されている、単一ベクター内のバイシストロニックコンストラクトにクローン化されてもよい。TCR- α およびTCR- β 鎖は、翻訳中に2つのタンパク質に分かれて等モル比のTCR- α およびTCR- β 鎖の生成を確実にする単一転写物から生成されるので、TCR- α およびTCR- β 鎖の間のウイルス配列内リボソーム進入部位の使用は、双方の鎖の協調発現をもたらす(Schmitt et al., 2009)。

【0232】

20

本明細書のTCRをコードする核酸はコドン最適化されて、宿主細胞からの発現が増加されてもよい。遺伝コードの重複は、いくつかのアミノ酸が2つ以上のコドンによってコードされるようにするが、特定のコドンは、適合tRNAの相対可用性ならびにその他の要因のために、他のものよりも「最適」でない(Gustafsson et al., 2004)。各アミノ酸が、哺乳類遺伝子発現のための最適コドンによってコードされるように、TCR- α およびTCR- β 遺伝子配列を修飾すること、ならびにmRNA不安定モチーフまたは潜在的スプライス部位を除去することは、TCR- α およびTCR- β 遺伝子発現を有意に高めることが示されている(Scholtzen et al., 2006)。

【0233】

30

さらに、導入TCR鎖と内因性TCR鎖の間の誤対合は、自己免疫に重大なリスクをもたらす特異性の獲得を引き起こすこともある。例えば、混合TCR二量体の形成は、適切に対合するTCR複合体を形成するために利用できるCD3分子の数を減少させてもよく、ひいては導入TCRを発現する細胞の機能性結合活性を有意に低下させ得る(Kuball et al., 2007)。

【0234】

誤対合を減少させるために、本明細書の導入TCR鎖のC末端領域は、鎖間親和性を高める一方で、導入鎖が内因性TCRと対形成する能力を低下させるために、修飾されてもよい。これらの戦略は、ヒトTCR- α およびTCR- β のC末端領域をそれらのマウス対応物(マウス化C末端領域)で置換する;導入TCRのTCR- α およびTCR- β 鎖の双方に第2のシステイン残基を導入することで、C末端領域に第2の鎖間ジスルフィド結合を作製する(システイン修飾);TCR- α およびTCR- β 鎖C末端領域内の相互作用残基を交換する(「ノブ・イン・ホール」);そしてTCR- α およびTCR- β 鎖の変換領域をCD3ζに直接融合させる(CD3ζ融合)ことを含んでもよい(Schmitt et al., 2009)。

40

【0235】

一実施形態では、宿主細胞は、本細書のTCRを発現するように遺伝子操作される。好ましい実施形態では、宿主細胞は、ヒトT細胞またはT細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞またはT細胞前駆細胞は、がん患者から得られる。その他の実施形態では、T細胞またはT細胞前駆細胞は、健常ドナーから得られる。本明細書の宿主細胞

50

は、治療される患者に関して、同種異系または自己由来であり得る。一実施形態では、宿主は、 α/β TCRを発現するように形質転換された γ/δ T細胞である。

【0236】

「医薬組成物」は、医学的状況においてヒトへの投与に適する組成物である。好ましくは、医薬組成物は無菌であり、GMPガイドラインに準拠して製造される。

【0237】

医薬組成物は、遊離形態または薬学的に許容可能な塩の形態のどちらかのペプチドを含んでなる（上記もまた参照されたい）。本明細書の用法では、「薬学的に許容可能な塩」は、開示されたペプチドの誘導体を指し、ペプチドは、薬剤の酸性または塩基性塩を生成することで修飾される。例えば、酸性塩は、適切な酸との反応を伴って、遊離塩基（典型的に、その中で中性形態の薬剤が中性-NH₂基を有する）から調製される。酸性塩を調製するための適切な酸としては、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、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、サリチル酸などの有機酸、ならびに例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸リン酸などの無機酸の双方が挙げられる。逆に、ペプチド上に存在してもよい酸部分の塩基性塩の調製物は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリメチルアミンなどの薬学的に許容可能な塩基を使用して調製される。

【0238】

特に好ましい一実施形態では、医薬組成物は、酢酸（酢酸塩）、トリフルオロ酢酸または塩酸（塩化物）の塩としてのペプチドを含んでなる。

【0239】

好ましくは、本発明の薬剤は、ワクチンなどの免疫療法剤である。それは、患者に直接、罹患臓器に、または全身的に、i. d.、i. m.、s. c.、i. p.、およびi. v. 投与され、または生体外で患者またはヒト細胞株に由来する細胞に適用されて、それが引き続いて患者に投与され、または生体外で使用されて患者に由来する免疫細胞の亜集団が選択され、次にそれが患者に再投与されてもよい。核酸が、生体外で細胞に投与される場合、インターロイキン2などの免疫刺激サイトカインを同時発現させるように、細胞を形質移入することが有用であってもよい。ペプチドは、実質的に純粋であり、または免疫刺激アジュバント（下記参照）と組み合わせられ、または免疫賦活性サイトカインと組み合わせ使用され、または例えば、リポソームなどの適切な送達系によって投与されてもよい。ペプチドはまた、キーホールリンペットヘモシニアン（KLH）またはマンナンなどの適切な担体に共役されてもよい（国際公開第95/18145号パンフレットおよび（Longenecker et al., 1993）を参照されたい）。ペプチドはまた、標識されてもよく、融合タンパク質であってもよく、またはハイブリッド分子であってもよい。その配列が本発明に記載されるペプチドは、CD4またはCD8 T細胞を刺激することが予測される。しかし、CD8 T細胞の刺激は、CD4 Tヘルパー細胞によって提供される援助の存在下で、より効率的である。したがって、CD8 T細胞を刺激するMHCクラスIエピトープでは、ハイブリッド分子の融合パートナーまたはセクションは、適切にはCD4陽性T細胞を刺激するエピトープを提供する。CD4およびCD8刺激エピトープは当該技術分野で周知であり、本発明で同定されたものが挙げられる。

【0240】

一態様では、ワクチンは、配列番号1～配列番号191に記載されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのペプチドと、少なくとも1つの追加的なペプチド、好ましくは2～50、より好ましくは2～25、なおもより好ましくは2～20、最も好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18個のペプチドとを含んでなる。ペプチドは、1つまたは複数の特異的TAAから誘導されてもよく、MHCクラスI分子に結合してもよい。

【0241】

本発明のさらなる態様は、本発明のペプチドまたはペプチド変異体をエンコードする核

10

20

30

40

50

酸（例えばポリヌクレオチド）を提供する。ポリヌクレオチドは、それがペプチドをコードしさえすれば、例えば、単鎖および／または二本鎖のいずれかのDNA、cDNA、pDNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってもよく、または例えばホスホロチオエート主鎖を有するポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドの未変性または安定化形態であってもよく、それはイントロンを含有してもまたはしなくてもよい。もちろん、天然起源ペプチド結合によって連結する天然アミノ酸残基を含有するペプチドのみが、ポリヌクレオチドによってエンコードされ得る。本発明のなおもさらなる態様は、本発明によるポリペプチドを発現できる発現ベクターを提供する。

【0242】

例えば相補的付着端を通じて、ポリヌクレオチド、特にDNAをベクターに連結する、多様な方法が開発されている。例えば、ベクターDNAに挿入されるDNA断片に、相補的ホモポリマー配列が付加され得る。次に、相補的ホモポリマー尾部間の水素結合によって、ベクターとDNA断片が連結されて組換えDNA分子が形成する。

【0243】

1つまたは複数の制限酵素認識部位を含有する合成リンカーは、DNA断片をベクターに連結する代替え方法を提供する。多様な制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する合成リンカーは、International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, USAをはじめとするいくつかの供給元から商業的に入手できる。

【0244】

本発明のポリペプチドをコードするDNAを修飾する望ましい方法は、Saiki R K, et al. (Saiki et al., 1988)で開示されるようなポリメラーゼ連鎖反応を用いる。この方法は、例えば適切な制限酵素認識部位を改変することで、DNAを適切なベクターに導入するために使用されてもよく、またはそれは、当該技術分野で既知のその他の有用な様式でDNAを修飾するために使用されてもよい。ウイルスベクターを使用するのであれば、ボックスウイルスまたはアデノウイルスベクターが好ましい。

【0245】

次にDNA（またはレトロウイルスベクターの場合はRNA）を適切な宿主において発現させ、本発明のペプチドまたは変異体を含んでなるポリペプチドが製造されてもよい。このようにして、本明細書に含まれる教示を考慮して適切に修正された既知の技術に従って、本発明のペプチドまたは変異体をコードするDNAを使用して、発現ベクターが構築されてもよく、次にそれを使用して、本発明のポリペプチドの発現および製造のために、適切な宿主細胞が形質転換される。このような技術としては、例えば、米国特許第4,440,859号明細書、米国特許第4,530,901号明細書、米国特許第4,582,800号明細書、米国特許第4,677,063号明細書、米国特許第4,678,751号明細書、米国特許第4,704,362号明細書、米国特許第4,710,463号明細書、米国特許第4,757,006号明細書、米国特許第4,766,075号明細書、および米国特許第4,810,648号明細書で開示されるものが挙げられる。

【0246】

本発明の化合物を構成するポリペプチドをエンコードするDNA（またはレトロウイルスベクターの場合はRNA）は、適切な宿主への導入のために、多種多様なその他のDNA配列に連結されてもよい。コンパニオンDNAは、宿主の性質、DNAの宿主への導入様式、およびエピソームの維持または組み込みが所望されるかどうかによって左右される。

【0247】

一般に、DNAは、発現のための適切な方向および正しい読み枠で、プラスミドなどの発現ベクターに挿入される。必要ならば、DNAは、所望の宿主によって認識される適切な転写および翻訳調節制御ヌクレオチド配列に連結されてもよいが、このような制御は、一般に発現ベクター中で利用できる。次に、標準的な技術を通じて、ベクターが宿主に導入される。一般に、全ての宿主がベクターによって形質転換されるわけではない。したが

10

20

30

40

50

って、形質転換された宿主細胞を選択することが必要になる。一選択技術は、抗生物質耐性などの形質転換細胞内で選択可能な形質をコードする、任意の必要な制御因子を有するDNA配列を発現ベクター内に組み込むことを伴う。

【0248】

代案としては、このような選択可能な形質の遺伝子は、所望の宿主細胞を同時形質転換するのに使用される、別のベクター上にあり得る。

【0249】

次に、本明細書で開示される教示を考慮して、当業者に知られている適切な条件下で十分な時間にわたり、本発明の組換えDNAによって形質転換された宿主細胞が培養されてポリペプチドが発現され、次にそれが回収され得る。

10

【0250】

細菌（例えば大腸菌（*E. coli*）およびバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、酵母（例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、糸状菌（例えばアスペルギルス属（*Aspergillus*））、植物細胞、動物細胞、および昆虫細胞をはじめとする多数の発現系が知られている。好ましくは、発現系は、ATCC Cell Biology Collectionから入手できるCHO細胞などの哺乳類細胞であり得る。

【0251】

構成的発現のための典型的な哺乳類細胞ベクタープラスミドは、適切なポリA尾部と、ネオマイシンなどの耐性マーカーとを有する、CMVまたはSV40プロモーターを含んでなる。一例は、Pharmacia, Piscataway, NJ, USAから入手できるpSVLである。誘導性哺乳類発現ベクターの一例であるpMSGもまた、Pharmaciaから入手できる。有用な酵母プラスミドベクターは、pRS403-406およびpRS413-416であり、通常、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USAから入手できる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405、およびpRS406は、酵母組み込みプラスミド（YIps）であり、酵母の選択可能なマーカーHIS3、TRP1、LEU2、およびURA3が組み込まれている。プラスミドpRS413-416は、酵母セントロメアプラスミド（Ycps）である。CMVプロモーターベースのベクター（例えば、Sigma-Aldrich製）は、一過性または安定性発現、細胞質内発現または分泌、およびFRAG、3xFLAG、c-mycまたはMATの様々な組み合わせでのN末端またはC末端標識付けを提供する。これらの融合タンパク質は、組換えタンパク質を検出、精製、および分析できるようにする。二重標識融合物は、検出に融通性を与える。

20

30

【0252】

強力なヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター調節領域は、COS細胞において、構成タンパク質発現レベルを1mg/L程度の高さに駆動する。効力がより低い細胞株では、タンパク質レベルは、典型的に約0.1mg/Lである。SV40複製起点の存在は、SV40複製許容COS細胞における高レベルのDNA複製をもたらす。CMVベクターは、例えば、細菌細胞におけるpMB1（pBR322の誘導體）複製起点、細菌におけるアンピシリン耐性選択のためのb-ラクターゼ遺伝子、hGHポリA、およびf1起点を含有し得る。プレプロトリプシンリーダー（PPT）配列を含有するベクターは、抗FRAG抗体、樹脂、およびプレートを使用した精製のために、培養液中へのFRAG融合タンパク質分泌を誘導し得る。多様な宿主細胞において使用するためのその他のベクターおよび発現系が、当該技術分野で周知である。

40

【0253】

別の実施形態では、本発明の2つ以上のペプチドまたはペプチド変異型がコードされ、したがって順次発現される（「数珠玉構造」コンストラクトに類似する）。その際に、ペプチドまたはペプチド変異型は、例えばLLLLLLなどの一続きのリンカーアミノ酸によって、共に連結または融合されてもよく、またはそれらの間のいかなる追加的なペプチドもなしに連結されてもよい。これらのコンストラクトはまた、がん治療のために使用さ

50

れ得て、MHC I と MHC II の双方が関与する免疫応答を誘導してもよい。

【0254】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドベクターコンストラクトで形質転換された宿主細胞にも関する。宿主細胞は、原核または真核生物のどちらかであり得る。細菌細胞は、いくつかの状況では、好ましい原核宿主細胞であってもよく、典型的には、例えば、Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA から入手できる大腸菌 (E. coli) DH5 株、および米国微生物系統保存機関 (ATCC) Rockville, MD, USA から入手できる RR1 (ATCC 番号 31343) などの大腸菌 (E. coli) 株である。好ましい真核宿主細胞としては、酵母、昆虫、および哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒト線維芽および結腸細胞株に由来するものなどの脊椎動物細胞が挙げられる。酵母宿主細胞としては、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA から一般に入手できる、YPH499、YPH500、および YPH501 が挙げられる。好ましい哺乳類宿主細胞としては、ATCC から CCL61 として入手できるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ATCC から CRL1658 として入手できる NIH Swiss マウス胚細胞 NIH/3T3、ATCC から CRL1650 として入手できるサル腎臓由来 COS-1 細胞、およびヒト胎児由来腎細胞である 293 細胞が挙げられる。好ましい昆虫細胞は、バキュロウイルス発現ベクターで形質移入され得る Sf9 細胞である。発現のための適切な宿主細胞の選択に関する概説は、例えば、Paulina Balbas および Argelia Lorence の教科書 "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9 および当業者に公知のその他の文献にある。

【0255】

本発明の DNA コンストラクトによる適切な細胞宿主の形質転換は、典型的に、使用されるベクターのタイプに左右される、周知の方法によって達成される。原核宿主細胞の形質転換に関しては、例えば、Cohen et al. (Cohen et al., 1972) および (Green and Sambrook, 2012) を参照されたい。酵母細胞の形質転換は、Sherman et al. (Sherman et al., 1986) に記載される。Beggs (Beggs, 1978) の方法もまた有用である。脊椎動物細胞に関しては、このような細胞を形質移入するのに有用な、例えば、リン酸カルシウムおよび DEAE-デキストランまたはリポソーム製剤などの試薬が、Stratagene Cloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USA から入手できる。電気穿孔もまた、細胞を形質転換および／または形質移入するのに有用であり、酵母細胞、細菌細胞、昆虫細胞、および脊椎動物細胞を形質転換する技術分野で周知である。

【0256】

成功裏に形質転換された細胞、すなわち本発明の DNA コンストラクトを含有する細胞は、PCR などの周知の技術によって同定され得る。代案としては、抗体を使用して上清中のタンパク質の存在が検出され得る。

【0257】

例えば、細菌、酵母、および昆虫細胞などの本発明の特定の宿主細胞は、本発明のペプチドの調製において有用であることが理解されるであろう。しかしその他の宿主細胞が、特定の治療法において有用であってもよい。例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞は、それらが適切な MHC 分子中に負荷されてもよいように、本発明のペプチドを発現するために有用に使用されてもよい。したがって、本発明は、本発明による核酸または発現ベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。

【0258】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞または抗原提示細胞である。前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）を含有する組換え融合タンパク質が負荷されたAPCは、無症候性または微小症候性転移性HRPCを治療するために、米国食品医薬品局（FDA）によって2010年4月20日に認可された（シプロイセルT）（Rini et al., 2006; Small et al., 2006）。

【0259】

本発明のさらなる態様は、宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、ペプチドまたはの変異型を製造する方法を提供する。

【0260】

別の実施形態では、本発明のペプチド、核酸または発現ベクターは、医療において使用される。例えば、ペプチドまたはその変異体は、静脈内（i. v.）注射、皮下（s. c.）注射、皮内（i. d.）注射、腹腔内（i. p.）注射、筋肉内（i. m.）注射のために調合されてもよい。ペプチド注射の好ましい方法としては、s. c.、i. d.、i. p.、i. m.、およびi. v.が挙げられる。DNA注射の好ましい方法としては、i. d.、i. m.、s. c.、i. p.、およびi. v.が挙げられる。例えば、50 μg～1.5 mg、好ましくは125 μg～500 μgのペプチドまたはDNAの用量が投与されてもよく、それぞれのペプチドまたはDNAに左右される。この範囲の用量は、以前の試験で成功裏に使用された（Walter et al., 2012）。

【0261】

活性ワクチン接種のために使用されるポリヌクレオチドは、実質的に純粋であってもよく、または適切なベクターまたは送達系に含有されてもよい。核酸は、DNA、cDNA、PNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってもよい。このような核酸をデザインして導入する方法は、当該技術分野で周知である。概説は、例えば、Teufel et al.（Teufel et al., 2005）によって提供される。ポリヌクレオチドワクチンは調製が容易であるが、免疫応答誘導におけるこれらのベクターの作用機序は、完全には分かっていない。適切なベクターおよび送達系としては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、または2つ以上のウイルスの構成要素を含有するハイブリッドベースのシステムなどのウイルスDNAおよび／またはRNAが挙げられる。非ウイルス送達系としては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマーが挙げられ、DNA送達技術分野において周知である。「遺伝子銃」などを通じた物理的送達もまた、使用されてもよい。核酸によってコードされるペプチドまたはペプチド群は、例えば、上述のように、それぞれの逆CDRのT細胞を刺激する、エピトープとの融合タンパク質であってもよい。

【0262】

本発明の薬剤は、1つまたは複数のアジュバントもまた含んでもよい。アジュバントは、免疫応答（例えば、CD8陽性T細胞およびヘルパーT（TH）細胞によって媒介される抗原に対する免疫応答を非特異的に促進または増強する物質であり、したがって本発明の薬剤中で有用であると見なされる。適切なアジュバントとしては、1018 ISS、アルミニウム塩、AMPLIVAX（登録商標）、AS15、BCG、CP-870, 893、CpG 7909、CyaA、dSLIM、フラジェリンまたはフラジェリン由来TLR5リガンド、FLT3リガンド、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド（ALDARA（登録商標））、レシキモド、ImuFact IMP321、IL-2やIL-13やIL-21などのインターロイキン、インターフェロン-αまたは-βまたはそれらのPEG化誘導体、ISパッチ、ISS、ISCOMATRIX、ISCOM、JuvImmune（登録商標）、LipoVac、MALP2、MF59、モノホスホリルリピドA、モンタニドIMS1312、モンタニドISA206、モンタニドISA50V、モンタニドISA-51、油中水型および水中油型エマルジョン、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、Peptide1（登録商標）ベクター系、ポリ（ラクチドコグリコリド）[PLG]ベースおよびデキストラン

10

20

30

40

50

微粒子、タラクトフェリン S R L 1 7 2、ピロソームおよびその他のウイルス様粒子、Y F-1 7 D、V E G F トラップ、R 8 4 8、 β -グルカン、P a m 3 C y s、サポニンに由来する A q u i l a ' s Q S 2 1 s t i m u l o n、マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁模倣体、および R i b i ' s D e t o x または Q u i l または S u p e r f o s などのその他の独自の仕様の補助剤が挙げられるが、これに限定されるものではない。フロイントまたは G M-C S F などのアジュバントが好ましい。樹状細胞およびそれらの調製物に対して特異的な、いくつかの免疫学的アジュバント（例えば M F 5 9）が、以前記載されている（A l l i s o n a n d K r u m m e l, 1 9 9 5）。サイトカインもまた、使用されてもよい。数種のサイトカインは、樹状細胞のリンパ組織（例えば T N F- α ）への移動に影響を与えること、T リンパ球（例えば、G M-C S F、I L-1、および I L-4）のための効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速すること（その内容全体が参照により本明細書に具体的に援用される、米国特許第 5, 8 4 9, 5 8 9 号明細書）、および免疫増強剤（例えば、I L-1 2、I L-1 5、I L-2 3、I L-7、I F N- α 、I F N- β ）として作用することと、直接関連付けられている（G a b r i l o v i c h e t a l., 1 9 9 6）。

【0263】

C p G 免疫賦活性オリゴヌクレオチドもまた、ワクチン環境において、アジュバント効果を増強することが報告されている。理論により拘束されることなく、C p G オリゴヌクレオチドは、T o l l 様受容体（T L R）、主に T L R 9 を通じた、内在的（非適応性）免疫系の活性化によって作用する。C p G 誘導性 T L R 9 活性化は、ペプチドまたはタンパク質抗原、生きたまたは死滅ウイルス、樹状細胞ワクチン、自己細胞ワクチン、そして予防的および治療的ワクチンの双方における多糖コンジュゲートをはじめとする、多種多様な抗原に対する、抗原特異的体液性および細胞性応答を増強する。より重要なことには、それは樹状細胞の成熟と分化を増強し、C D 4 T 細胞援助の不在下であってさえも、T H 1 細胞の活性化の促進、および強力な細胞傷害性 T リンパ球（C T L）生成をもたらす。T L R 9 刺激によって誘導される T H 1 バイアスは、通常は T H 2 バイアスを促進する ミョウバンまたは不完全フロイントアジュバント（I F A）などのワクチンアジュバント存在下であってさえも、維持される。C p G オリゴヌクレオチドは、その他のアジュバントと調合されまたは同時投与された際に、または微粒子、ナノ粒子、脂質エマルジョンなどの配合物、または類似配合物中で、なおもより高いアジュバント活性を示し、それは、抗原が比較的弱い場合、強力な応答を誘導するのに特に必要である。それらは免疫応答もまた加速し、いくつかの実験では、C p G なしのワクチン総量と同等の抗体応答で、抗原用量のほぼ 2 桁分の低減を可能にする（K r i e g, 2 0 0 6）。米国特許第 6, 4 0 6, 7 0 5 B 1 号明細書は、抗原特異的免疫応答を誘導するための C p G オリゴヌクレオチド、非核酸アジュバント、および抗原の併用を記載する。C p G T L R 9 拮抗薬は、本発明の医薬組成物の好ましい構成要素である、M o l o g e n（B e r l i n, G e r m a n y）製の d S L I M（二重ステムループ免疫調節剤）である。RNA 結合 T L R 7、T L R 8 および／または T L R 9 などのその他の T L R 結合分子もまた、使用されてもよい。

【0264】

有用なアジュバントのその他の例としては、化学修飾 C p G（例えば、C p R、I d e r a）；ポリ（I：C）などの d s R N A アナログおよびそれらの誘導體（例えば A m p l i G e n（登録商標）、H i l t o n o l（登録商標）、ポリ（I C L C）、ポリ（I C-R）、ポリ（I：C 1 2 U）、非 C p G 細菌 DNA または RNA；ならびにシクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ（登録商標）、セレブレックス、N C X-4 0 1 6、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ、テモゾロマイド、テムシロリムス、X L-9 9 9、C P-5 4 7 6 3 2、パゾパニブ、V E G F T r a p、Z D 2 1 7 1、A Z D 2 1 7 1、抗 C T L A 4 などの免疫活性小型分子および抗体；免疫系の重要な構造体を標的にするその他の抗体（例えば、抗 C D 4 0、抗 T G F β 、抗 T N F α 受容体）；S C 5 8 1 7 5 が挙げられるが、これに限定されるものではなく、これ

らは治療的におよび／またはアジュバントとして作用してもよい。本発明の文脈で有用なアジュバントおよび添加剤の量と濃度は、過度の実験を実施することなく、当業者によって容易に判定され得る。

【0265】

好ましいアジュバントは、抗CD40、イミキモド、レシキモド、GM-CSF、シクロホスファミド、スニチニブ、ペバシズマブ、インターフェロンα、CpGオリゴヌクレオチドおよび誘導体、ポリ(I:C)および誘導体、RNA、シルデナフィル、およびPLGまたはビロソーム微粒子調合物である。

【0266】

本発明による薬剤組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、サルグラモスチム)、シクロホスファミド、イミキモド、レシキモド、およびインターフェロンαなどのコロニー刺激因子からなる群から選択される。

【0267】

本発明による医薬組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、サルグラモスチム)、シクロホスファミド、イミキモド、およびレシキモドなどのコロニー刺激因子からなる群から選択される。本発明による薬剤組成物の好ましい実施形態では、アジュバントは、シクロホスファミド、イミキモドまたはレシキモドである。なおもより好ましいアジュバントは、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 20、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、ポリICLC(Hiltonol(登録商標))、および抗CD40mAbまたはそれらの組み合わせである。

【0268】

この組成物は、皮下、皮内、筋肉内などの非経口投与、または経口投与のために使用される。このためには、ペプチドおよび任意選択的にその他の分子が、薬学的に許容可能な、好ましくは水性担体に溶解され、または懸濁される。さらに組成物は、緩衝液、結合剤、プラスチック剤、希釈剤、風味、潤滑剤などの賦形剤を含有し得る。ペプチドはまた、サイトカインなどの免疫刺激物質と共に投与され得る。このような組成物中で使用される賦形剤の詳細な一覧は、例えば、A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000)から採用され得る。組成物は、腺腫様(adenomatous)またはがん性疾患の阻止、予防法および／または治療法のために使用され得る。例示的調合物は、例えば、欧州特許第2112253号明細書にある。

【0269】

本発明によるワクチンによって引き起こされる免疫応答は、異なる細胞分裂期および異なる発生段階のがんを攻撃することを理解することが重要である。さらに、異なるがん関連シグナル伝達経路が攻撃される。これは、1つまたは少数の標的のみに対処して攻撃に対する腫瘍の容易な適応(腫瘍エスケープ)を引き起こすこともあるワクチンに、優る利点である。さらに個々の腫瘍の全てが、同一パターンの抗原を発現するとは限らない。したがって、いくつかの腫瘍関連ペプチドの組み合わせによって、ありとあらゆる腫瘍が標的の少なくとも一部を有することが確実になる。組成物は、それぞれの腫瘍が抗原のいくつかを発現することを予期して設計され、腫瘍の増殖と維持に必要ないくつかの独立した経路をカバーする。したがって、ワクチンは、より大きな患者集団のために容易に「出来合」で使用され得る。これは、ワクチンで治療される患者の予備選択が、HLAタイピングに限定され得て、抗原発現に関する任意の追加的なバイオマーカーアセスメントを必要としないことを意味するが、いくつかの標的が誘導免疫応答によって同時に攻撃されることはなおも確実であり、これは有効性にとって重要である(Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012)。

【0270】

本明細書の用法では、「スキャフォールド」という用語は、(例えば、抗原性)決定因

10

20

30

40

50

子に特異的に結合する分子を指す。一実施形態では、スキャフォールドはまた、それが付着する実体（例えば、（第2の）抗原結合部分）を例えば、抗原決定基（例えば本出願書に記載のペプチドとMHCの複合体）を有する特異的腫瘍細胞または腫瘍間質などの型標的的部位に誘導できる。別の実施形態では、スキャフォールドは、例えば、T細胞受容体複合体抗原などのその標的抗原を介して、シグナル伝達を活性化できる。スキャフォールドとしては、抗体およびそれらのフラグメント、抗体重鎖可変領域および抗体軽鎖可変領域を含んでなる抗体の抗原結合ドメイン、少なくとも1つのアンキリンリピートモチーフと単一ドメイン抗原結合（SDAB）分子とを含んでなる結合タンパク質、アプタマー、（可溶性）TCR、および同種異系または自己由来T細胞などの（改変）細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。分子が標的に結合するスキャフォールドであるかどうかを評価するために、結合アッセイが実施され得る。

10

【0271】

「特異的」結合は、特異的標的を保有する細胞を殺滅できる活性分子を装備したスキャフォールドが、特異的標的を保有せずその他のペプチド-MHC複合体を提示する別の細胞を殺滅できない程度に、スキャフォールドがその他の天然ペプチド-MHC複合体よりもさらに良好に、目的ペプチド-MHC複合体に結合することを意味する。交差反応性ペプチド-MHCのペプチドが天然に存在せず、すなわち、ヒトHLA-ペプチドームに由来しない場合、その他のペプチド-MHC複合体への結合は無関係である。標的細胞死滅を評価する試験は、当該技術分野で周知である。それらは、非改変ペプチド-MHC提示を有する標的細胞（初代細胞または細胞株）、または天然に存在するペプチド-MHCレベルに達するようにペプチドを負荷された細胞を使用して、実施されるべきである。

20

【0272】

各スキャフォールドは標識を含んでなり得て、それは、標識によって提供されるシグナルの存在または不在を判定することで、結合スキャフォールドが検出できるようにする。例えば、スキャフォールドは、蛍光染料または任意のその他の適用可能な細胞マーカー分子で標識され得る。このようなマーカー分子は、当該技術分野で周知である。例えば、蛍光染料によって提供される蛍光標識は、蛍光またはレーザー走査顕微鏡またはフローサイトメトリーによる、結合アプタマーの視覚化を提供し得る。

【0273】

各スキャフォールドは、例えば、IL-21、抗-CD3、抗-CD28などの第2の活性分子にコンジュゲートされ得る。

30

【0274】

ポリペプチドスキャフォールドに関するさらなる情報については、例えば国際公開第2014/071978A1号パンフレットの背景セクション、およびその中で引用された参考文献を参照されたい。

【0275】

本発明は、アプタマーにさらに関する。アプタマー（例えば、国際公開第2014/191359号パンフレット、およびその中で引用される文献を参照されたい）は、短い一本鎖核酸分子であり、それは、所定の三次元構造に折り畳まれて、特異的標的構造体を認識し得る。それらは、標的療法を開発するための適切な代案のようであった。アプタマーは、高い親和性および特異性で、多様な複合体標的と選択的に結合することが示されている。

40

【0276】

細胞表面に位置する分子を認識するアプタマーは、過去10年間に同定されており、診断および治療的アプローチを開発する手段を提供する。アプタマーは、毒性および免疫原性がほぼ皆無であることが示されているので、それらは生物医学的用途のための有望な候補である。確かに、例えば、前立腺特異的膜抗原認識アプタマーなどのアプタマーは、標的療法のために成功裏に用いられており、異種移植片生体内モデルにおいて機能できることが示されている。さらに、特定の腫瘍細胞株を認識するアプタマーが同定されている。

【0277】

50

DNAアプタマーは、様々ながん細胞、特に固形腫瘍に由来するものに対して広域スペクトル認識特性を示す一方で、非腫瘍形成性および初代健常細胞を認識しないように選択され得る。同定されたアプタマーが、特異的腫瘍サブタイプを認識するだけでなく、むしろ一連の腫瘍と相互作用する場合、これは、アプタマーをいわゆる広域スペクトル診断薬および治療薬として応用可能にする。

【0278】

さらに、フローサイトメトリーによる細胞結合挙動の研究は、アプタマーが、ナノモル濃度範囲内の非常に良好な見かけの親和性を見せたことを示した。

【0279】

アプタマーは、診断および治療目的で有用である。さらに、アプタマーの一部は腫瘍細胞に取り込まれ、したがって腫瘍細胞内への siRNA などの抗がん剤の標的化送達のための分子ビヒクルとして、機能し得ることが示され得た。

【0280】

アプタマーは、細胞 S E L E X（試験管内進化法）技術を使用して、細胞および組織などの複合体標的に対して、および本発明による配列番号 1～配列番号 191 のいずれかに記載の配列と MHC 分子とを含んでなり、好ましくはそれからなるペプチド複合体などに対して、選択され得る。

【0281】

本発明のペプチドを使用して、MHC／ペプチド複合体に対する特異的抗体が生成されて開発され得る。これらは、毒素または放射性物質を患部組織に標的化する治療法のために、使用され得る。これらの抗体の別の用途は、PET などのイメージング目的の放射性核種の患部組織への標的化であり得る。この用途は、小規模な転移の検出、または病的組織のサイズと正確な位置確認の判定を助け得る。

【0282】

したがって HLA 拘束性抗原と複合体化した、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II と特異的に結合する、組換え抗体を製造する方法を提供することが、本発明のさらなる態様であり、方法は、前記ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II を発現する細胞を含んでなる、遺伝子操作された非ヒト哺乳類を前記 HLA 拘束性抗原と複合体化した可溶性形態の MHC クラス I または II 分子によって免疫化するステップと； mRNA 分子を前記非ヒト哺乳類の抗体産生細胞から単離するステップと；前記 mRNA 分子によってコードされるタンパク質分子を提示する、ファージディスプレイライブラリーを作製するステップと；少なくとも 1 つのファージを前記ファージディスプレイライブラリーから単離するステップとを含んでなり、前記少なくとも 1 つのファージは、前記 HLA 拘束性抗原と複合体化した前記ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II と特異的に結合する、前記抗体を提示する。

【0283】

HLA 拘束性抗原と複合体化したヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラス I または II と特異的に結合する抗体を提供することも、本発明のさらなる態様であり、その中で抗体は、好ましくは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体および／またはキメラ抗体である。

【0284】

このような抗体および一本鎖クラス I 主要組織適合性複合体を製造するそれぞれの方法、ならびにこれらの抗体を製造するためのその他のツールは、本発明の目的で、その内容全体が参照により全て明示的に援用される、国際公開第 03／068201 号パンフレット、国際公開第 2004／084798 号パンフレット、国際公開第 01／72768 号パンフレット、国際公開第 03／070752 号パンフレット、および文献（Cohen et al., 2003a；Cohen et al., 2003b；Denkberg et al., 2003）で開示される。

【0285】

好ましくは、抗体は、20 ナノモル濃度未満、好ましくは 10 ナノモル濃度未満の結合

10

20

30

40

50

親和性で複合体に結合し、それは本発明の文脈で「特異的」とも見なされる。

【0286】

本発明は、配列番号1～配列番号191からなる群から選択される配列、または配列番号1～配列番号191と少なくとも88%相同的な（好ましくは同一の）その変異体を含んでなるペプチド、またはT細胞を前記ペプチドと交差反応させるその変異体に関し、前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

【0287】

本発明は、配列番号1～配列番号191からなる群から選択される配列、または、配列番号1～配列番号191と少なくとも88%相同的な（好ましくは同一の）その変異体を含んでなるペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたは変異体は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14アミノ酸の全長を有する。

10

【0288】

本発明は、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIまたはIIの分子に結合する能力を有する、本発明によるペプチドにさらに関する。

【0289】

本発明は、ペプチドが、配列番号1～配列番号191に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる、本発明によるペプチドにさらに関する。

【0290】

本発明は、ペプチドが（化学的に）修飾された、および／または非ペプチド結合を含む、本発明によるペプチドにさらに関する。

20

【0291】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、ペプチドは、融合タンパク質の一部であり、特にHLA-DR抗原関連不変鎖（Ii）のN末端アミノ酸を含んでなり、またはペプチドは、例えば樹状細胞特異的抗体などの抗体に（またその中に）融合する。

【0292】

本発明は、本発明によるペプチドをエンコードする核酸にさらに関するが、ただしペプチドは完全（完全長）ヒトタンパク質でない。

【0293】

本発明は、DNA、cDNA、PNA、RNAまたはそれらの組み合わせである、本発明による核酸にさらに関する。

30

【0294】

本発明は、本発明による核酸を発現できる、発現ベクターにさらに関する。

【0295】

本発明は、医療において、特にCRCの治療において使用される、本発明によるペプチド、本発明による核酸または本発明による発現ベクターにさらに関する。

【0296】

本発明は、本発明による核酸または本発明による発現ベクターを含んでなる、宿主細胞にさらに関する。

【0297】

本発明は、抗原提示細胞、好ましくは樹状細胞である、本発明による宿主細胞にさらに関する。

40

【0298】

本発明は、本発明による宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、本発明によるペプチドを製造する方法にさらに関する。

【0299】

本発明は、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞の表面に発現されるクラスIまたはII MHC分子上に、抗原が負荷される、本発明による方法にさらに関する。

【0300】

50

本発明は、抗原提示細胞が、配列番号1～配列番号191または前記異アミノ酸配列を含有する、前記ペプチドを発現できる、発現ベクターを含んでなる、本発明による方法にさらに関する。

【0301】

本発明は、本発明による方法によって製造される活性化T細胞にさらに関し、前記T細胞は、本発明によるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する細胞を選択的に認識する。

【0302】

本発明は、本発明によるT細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる、患者において、本発明による任意のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する標的細胞を死滅させる方法にさらに関する。

10

【0303】

本発明は、記載される任意のペプチド、本発明による核酸、本発明による発現ベクター、本発明による細胞、または本発明による活性化細胞傷害性Tリンパ球の、薬剤としての、または薬剤の製造における、使用にさらに関する。本発明は、薬剤ががんに対して有効である、本発明による使用にさらに関する。

【0304】

本発明は、薬剤がワクチンである、本発明による使用にさらに関する。本発明は、薬剤ががんに対して有効である、本発明による使用にさらに関する。

【0305】

20

本発明は、発明による使用にさらに関し、前記がん細胞は、CRC細胞であり、また肺がん、脳がん、胃がん、腎臓がん、肝臓がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、メラノーマ、卵巣がん、および食道がんなどのその他の固形または血液学的腫瘍細胞である。

【0306】

本発明は、CRCの診断および／または予後診断において使用され得る、本明細書で「標的」と称される、本発明によるペプチドベースの特定の標識タンパク質およびバイオマーカーにさらに関する。本発明はまた、がん治療のためのこれらの新規標的の使用に関する。

【0307】

30

「抗体（単数）」または「抗体（複数）」という用語は、本明細書では広義に使用され、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の双方を含む。無処理または「完全」免疫グロブリン分子に加えて、「抗体」という用語には、本発明による所望の特性（例えば、CRCマーカー（ポリ）ペプチドの特異的結合、がんマーカー遺伝子を増大レベルで発現するCRC細胞への毒素の送達、および／またはCRCマーカーポリペプチドの活性阻害）のいずれかを示しさえすれば、フラグメント（例えば、CDRs、Fv、Fab、およびFcフラグメント）、またはこれらの免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子ヒト化バージョンのポリマーもまた含まれる。

【0308】

可能な場合は常に、本発明の抗体は、商業的供給元から購入されてもよい。また本発明の抗体は、周知の方法を使用して作製されてもよい。当業者は、本発明の抗体を製造するために、完全長CRCマーカーポリペプチドまたはそのフラグメントのどちらを使用してもよいことを理解するであろう。本発明の抗体を製造するために使用されるポリペプチドは、天然原料から部分的にまたは完全に精製されてもよく、または組換えDNA技術を使用して製造されてもよい。

40

【0309】

例えば、配列番号1～配列番号191ポリペプチドに記載のペプチドなどの本発明によるペプチドをコードするcDNA；またはその変異体またはフラグメントが、原核細胞（例えば、細菌）または真核細胞（例えば、酵母、昆虫、または哺乳類細胞）で発現され得て、その後、組換えタンパク質が精製されて、本発明による抗体を生成するために使用さ

50

れる、CRCマーカーポリペプチドに特異的に結合する、モノクローナルまたはポリクローナル抗体製剤を生成するために使用され得る。

【0310】

当業者は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の2つ以上の異なるセットの生成が、その目的の用途（例えば、ELISA、免疫組織化学的検査、生体内イメージング、免疫毒素療法）に必要な特異性および親和性を有する抗体を得る可能性を最大化することを理解するであろう。抗体は、それに対して抗体が使用される目的に従って、既知の方法によりそれらの所望の活性について試験された（例えば、ELISA、免疫組織化学的検査、免疫療法など；抗体の生成および試験のさらなるガイダンスについては、例えば、Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)を参照されたい）。
例えば、抗体は、ELISAアッセイ、ウェスタンブロット、ホルマリン固定されたがんまたは冷凍組織切片の免疫組織化学染色において試験されてもよい。それらの最初の生体外特性解析後、治療または生体内診断用途を意図した抗体が、既知の臨床試験法によって試験される。

10

【0311】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書の用法では、実質的に均質な抗体集団から入手される抗体を指し；すなわち、母集団を構成する個々の抗体は、微量で存在してもよい可能な自然発生的変異以外は同一である。本明細書では、「モノクローナル抗体」は、それらが所望の拮抗活性を示しさえすれば、その中で重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来しまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する、抗体中の対応する配列と同一または相同的である一方、鎖の残部は、別の種に由来しまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同的である、「キメラ」抗体、ならびにこのような抗体のフラグメントを具体的に含む（その内容全体が本明細書に援用される、米国特許第4,816,567号明細書）。

20

【0312】

本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を使用して調製されてもよい。ハイブリドーマ法においては、典型的に、マウスまたはその他の適切な宿主動物が免疫剤によって免疫化され、免疫剤と特異的に結合する抗体を産生するまたは産生できるリンパ球を生じさせる。代案としては、リンパ球は生体外で免疫化されてもよい。

【0313】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号明細書に記載されるものなどの組換えDNA法によって製造されるものであってもよい。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合できる、オリゴヌクレオチドプローブの使用によって）、容易に単離および配列決定され得る。

30

【0314】

インビトロ法もまた、一価の抗体を調製するのに適する。抗体フラグメント、特にFabフラグメントを作製するための抗体の消化は、当該技術分野で既知の通例の技術を使用して達成され得る。例えば、消化は、パパインを使用して実施され得る。パパイン消化の例は、国際公開第94/29348号パンフレットおよび米国特許第4,342,566号明細書に記載される。抗体のパパイン消化は、それぞれ単一抗原結合部位を有するFabフラグメントと称される2つの同一の抗原結合フラグメントと、残りのFcフラグメントとを典型的に生じる。ペプシン処理は、F(ab')₂フラグメントおよびpFc'フラグメントをもたらす。

40

【0315】

抗体フラグメントは、その他の配列に付着するかどうかに関わりなく、フラグメントの活性が非修飾抗体または抗体フラグメントと比較して顕著に変化せずまたは損なわれないという条件で、特定領域または特定アミノ酸残基の挿入、欠失、置換、またはその他の選択された修飾もまた含み得る。これらの修飾は、ジスルフィド結合できるアミノ酸の除去／付加、そのバイオ寿命増大、その分泌特性改変などのいくつかの追加的な特性を提供し

50

得る。いずれにしても、抗体フラグメントは、結合活性、結合領域における結合調節などの生理活性特性を有しなくてはならない。抗体の機能性または活性領域は、タンパク質の特定領域の変異誘発と、それに続く発現と、発現したポリペプチドの試験によって同定されてもよい。このような方法は、当該技術分野の熟練した実務家には容易に分かり、抗体フラグメントをエンコードする核酸の部位特異的変異誘発を含み得る。

【0316】

本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含んでなってもよい。非ヒト（例えばマウス）抗体などのヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（抗体のFv、Fab、Fab'またはその他の抗原結合部分配列など）である。ヒト化抗体としては、その中でレシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト生物種（ドナー抗体）のCDRからの残基によって置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が挙げられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体または移入CDRまたはフレームワーク配列のどちらにも見いだされない、残基を含んでなってもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つおよび典型的に2つの可変領域の実質的に全てを含んでなり、その中では、CDR領域の全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン共通配列のものである。ヒト化抗体は、至適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部もまた含んでなる。

【0317】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野で周知である。通常、ヒト化抗体は、非ヒト起源から導入された、1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と称され、それは典型的に「移入」可変領域から得られる。ヒト化は、齧歯類CDR（複数）またはCDR（単数）配列を対応するヒト抗体配列によって置換することで、基本的には実施され得る。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第4,816,567号明細書）であり、その中では、実質的に非損傷ヒト可変領域未満が、非ヒト生物種からの対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的にヒト抗体であり、その中ではいくつかのCDR残基と、おそらくはいくつかのFR残基とが、齧歯類抗体中の類似部位からの残基によって置換される。

【0318】

免疫化に際して、内因性免疫グロブリン産生の不在下で、ヒト抗体の完全レパートリーを産生できる遺伝子組換え動物（例えばマウス）が用いられ得る。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける、抗体重鎖連結領域遺伝子のホモ接合型欠失が、内因性抗体生成の完全阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖細胞系変異マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの転写は、抗原チャレンジに際してヒト抗体の産生をもたらす。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー中でも産生され得る。

【0319】

本発明の抗体は、好ましくは薬学的に許容可能な担体中で、対象に投与される。典型的に、製剤中で適量の薬理的に許容可能な塩が使用されて、製剤を等張にする。薬理的に許容可能な担体の例としては、生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液が挙げられる。溶液のpHは、好ましくは約5～約8、より好ましくは約7～約7.5である。さらなる担体としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックス徐放性製剤が挙げられ、そのマトリックスは、例えば、フィルム、リポソームまたは微粒子などの造形品の形態である。当業者には、例えば、投与される抗体の投与経路と濃度次第で、特定の担体がより好ましくあってもよいことが明らかであろう。

【0320】

抗体は、注射（例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内）によって、またはその有効形態での血流への送達を確実にする輸液などのその他の方法によって、対象、患者、または細胞に投与され得る。抗体はまた、腫瘍内または腫瘍周囲経路によって投与されて、局所性ならびに全身性の治療効果を発揮してもよい。局所注射または静脈注射が好ましい。

【0321】

抗体を投与するための有効投与量およびスケジュールは、経験的に判定されてもよく、このような測定の実施は、当該技術分野の技術範囲内である。当業者は、投与しなくてはならない抗体用量が、例えば、抗体を投与される対象、投与経路、使用される特定の抗体型、および投与されるその他の薬剤次第で変動することを理解するであろう。単独使用される抗体の典型的な1日量は、上述の要素次第で、1日当たり約1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ～最大1000 mg/kg 体重またはそれ以上の範囲に及ぶかもしれない。好ましくはCRCを治療するためである、抗体投与に続いて、治療用抗体の効力は、熟練した実務家に良く知られている様々な方法で評価され得る。例えば、標準腫瘍イメージング技術を使用して、治療を受ける対象におけるがんのサイズ、数、および／または分布がモニターされてもよい。抗体投与不在下で起こるであろう疾患経過と比較して、腫瘍成長を停止させ、腫瘍収縮をもたらし、および／または新規腫瘍の発生を予防する、治療的に投与された抗体は、がん治療のための有効な抗体である。

【0322】

特異的ペプチド-MHC複合体を認識する可溶性T細胞受容体 (sTCR) を製造する方法を提供することもまた、本発明のさらなる態様である。このような可溶性T細胞受容体は、特異的T細胞クローンから生成され得て、それらの親和性は、相補性決定領域を標的とする変異誘発によって増大させ得る。T細胞受容体の選択目的で、ファージディスプレイを利用し得る（米国特許第2010/0113300号明細書、(Liddy et al., 2012)）。ファージディスプレイ中に、そして薬剤として実用する際に、T細胞受容体を安定化させる目的で、例えば、非天然ジスルフィド結合、その他の共有結合（一本鎖T細胞受容体）、または二量体化ドメインによって、 α および β 鎖を連結させ得る (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T細胞受容体は、標的細胞上で特定機能を発揮させるために、毒素、薬剤、サイトカイン（例えば、米国特許第2013/0115191号明細書を参照されたい）、抗CD3ドメインのようなエフェクター細胞増進ドメインなどに、連結させ得る。さらにそれは、養子免疫伝達のために使用されるT細胞において発現され得る。さらなる情報は、国際公開第2004/033685A1号パンフレットおよび国際公開第2004/074322A1号パンフレットにある。TCRの組み合わせは、国際公開第2012/056407A1号パンフレットに記載される。さらなる製造法は、国際公開第2013/057586A1号パンフレットで開示される。

【0323】

さらに本発明のペプチドおよび／またはTCRまたは抗体またはその他の結合分子を使用して、病理学者の生検サンプルに基づくがん診断を確認し得る。

【0324】

抗体またはTCRはまた、生体内診断アッセイのために使用されてもよい。通常、抗体は、免疫シンチグラフィ (immunoscinigraphy) を使用して腫瘍が位置確認され得るように、放射性ヌクレオチド (^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S など) で標識される。一実施形態では、抗体またはそれらのフラグメントは、上述のタンパク質からなる群から選択されるタンパク質の2つ以上の標的の細胞外ドメインに結合し、親和性 (Kd) は $1 \times 10 \mu\text{M}$ 未満である。

【0325】

診断用の抗体は、様々なイメージング法による検出に適するプローブで標識されてもよい。プローブの検出方法としては、蛍光、光学、共焦点および電子顕微鏡検査；磁気共鳴画像法および分光法；蛍光透視法、コンピュータ断層撮影、および陽電子放射型断層撮影が挙げられるが、これに限定されるものではない。適切なプローブとしては、フルオレセ

イン、ローダミン、エオジンおよびその他のフルオロフォア、放射性同位体、金、ガドリニウムおよびその他のランタニド、常磁性鉄、フッ素18およびその他の陽電子放出放射性核種が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに、プローブは二官能価または多官能価であってもよく、列挙される方法の2つ以上によって検出可能であってもよい。これらの抗体は、前記プローブで直接または間接的に標識されてもよい。特に十分に技術分野で承認されている、プローブの抗体への付着としては、プローブの共有結合、プローブの抗体への組み込み、およびプローブ結合のためのキレート化合物の共有結合が挙げられる。免疫組織化学的検査では、疾患組織サンプルは、新鮮または冷凍であってもよく、またはパラフィン包埋されてホルマリンなどの保存料で固定されてもよい。サンプルを含有する固定または包埋切片は、標識一次抗体および二次抗体と接触されて、抗体を使用して原位置タンパク質発現が検出される。

10

【0326】

本発明の別の態様は、活性化T細胞を製造するインビトロ法を含み、方法は、生体外T細胞を、適切な抗原提示細胞の表面に発現される抗原負荷ヒトMHC分子に、T細胞を抗原特異的様式で活性化するのに十分な時間にわたり接触させるステップを含んでなり、抗原は本発明によるペプチドである。好ましくは、抗原提示細胞と共に、十分な量の抗原が使用される。

【0327】

好ましくは、哺乳類細胞は、TAPペプチド輸送体のレベルまたは機能が皆無でありまたは低下している。TAPペプチド輸送体が欠如している適切な細胞としては、T2、RMA-S、およびショウジョウバエ細胞が挙げられる。TAPは、抗原処理に関連する輸送体である。

20

【0328】

ヒトペプチド負荷欠損細胞株T2は、12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USAの米国微生物系統保存機関からカタログ番号CRL1992の下に入手でき；ショウジョウバエ細胞株Schneider株2は、カタログ番号CRL19863の下にATCCから入手でき；マウスRMA-S細胞株は、Ljunggren et al. (Ljunggren and Karre, 1985)に記載される。

【0329】

好ましくは、移入前に、宿主細胞は、MHCクラスI分子を実質的に発現しない。刺激因子細胞が、B7.1、B7.2、ICAM-1、およびLFA3のいずれかなどのT細胞のための共刺激シグナルを提供する上で、重要な分子を発現することもまた好ましい。多数のMHCクラスI分子および共刺激因子分子の核酸配列は、GenBankおよびEMBLデータベースから公的に入手可能である。

30

【0330】

MHCクラスIエピトープが抗原として使用される場合、T細胞はCD8陽性T細胞である。

【0331】

抗原提示細胞が、このようなエピトープを発現するために形質移入される場合、好ましくは、細胞は、配列番号1～配列番号191またはその変異アミノ酸配列を含有するペプチドを発現できる、発現ベクターを含んでなる。

40

【0332】

生体外でT細胞を製造するために、その他のいくつかの方法が使用されてもよい。例えば、自己由来腫瘍浸潤性リンパ球が、CTLを生成するために使用され得る。Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995)は、T細胞の調製において、自己由来末梢血リンパ球(PLB)を利用した。さらに、樹状細胞をペプチドまたはポリペプチドでパルス処理する、または組換えウイルスで感染させることによる、自己由来T細胞の製造も可能である。B細胞もまた、自己由来T細胞の製造において使用され得る。さらに、ペプチドまたはポリペプチドでパルス処理された、または組換え

50

ウイルスで感染されたマクロファージが、自己CTLの調製において使用されてもよい。S. Walter et al. (Walter et al., 2003)は、人工抗原提示細胞(aAPC)を使用したT細胞の生体外プライミングを記載し、それはまた、選択されたペプチドに対するT細胞を製造するための適切な方法でもある。本発明では、ビオチン：ストレプトアビジン生化学によって、あらかじめ形成されたMHC：ペプチド複合体を表面ポリスチレン粒子(マイクロビーズ)に共役させることで、aAPCが作製された。このシステムは、aAPC上のMHC密度の正確な調節を可能にし、それは、血液サンプルから高効率で、高または低結合活性の抗原特異的T細胞応答を選択的に引き起こすことを可能にする。MHC：ペプチド複合体の他に、aAPCは、それらの表面に共役する、抗CD28抗体のような共刺激活性を有するその他のタンパク質を保有すべきである。さらにこのようなaAPCベースのシステムは、例えばサイトカイン様インターロイキン12などの適切な可溶性因子の付加を要することが多い。

10

【0333】

同種異系細胞はまた、T細胞の調製において使用されてもよく、方法は、参照により本明細書に援用される、国際公開第97/26328号パンフレットで詳述される。例えば、ショウジョウバエ細胞およびT2細胞に加えて、その他の細胞を使用して、CHO細胞、バキュロウイルス感染昆虫細胞、細菌、酵母、ワクシニア感染標的細胞などの抗原を提示してもよい。さらに植物ウイルスが使用されてもよい(例えば、外来性ペプチド提示のための高収率システムとしてのササゲモザイクウイルス開発を記載するPorta et al. (Porta et al., 1994)を参照されたい)。

20

【0334】

本発明のペプチドに向けられた活性化T細胞は、治療法において有用である。したがって、本発明のさらなる態様は、前述の本発明の方法によって入手可能な活性化T細胞を提供する。

【0335】

上記方法によって製造された活性化T細胞は、配列番号1～配列番号191のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する、細胞を選択的に認識する。

【0336】

好ましくは、T細胞は、そのTCRを通じた、HLA／ペプチド複合体(例えば結合)との相互作用によって、細胞を認識する。T細胞は、その標的細胞が、本発明のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する患者において、標的細胞を死滅させる方法で有用であり、患者には有効数の活性化T細胞が投与される。患者に投与されるT細胞は、患者に由来して、上述のように活性化されてもよい(すなわち、それらは自己T細胞である)。代案としては、T細胞は、患者でなく別の個人に由来する。もちろん、個人が健常人であれば、それが好ましい。「健常人」によって、本発明者らは、個人が概して健康良好であり、好ましくは有能な免疫系を有して、より好ましくは容易に検査され検出され得るいかなる疾患にも罹患していないことを意味する。

30

【0337】

生体内で、本発明によるCD8陽性T細胞の標的細胞は、(時にMHCクラスIIを発現する)腫瘍細胞であり得て、および／または(時にMHCクラスIIもまた発現する；(Dengjel et al., 2006))腫瘍(腫瘍細胞)周囲の間質細胞であり得る。

40

【0338】

本発明のT細胞は、治療用組成物の活性成分として使用されてもよい。したがって、本発明は、その標的細胞が、本発明のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する患者において、標的細胞を死滅させる方法もまた提供し、方法は、上で定義されるようなT細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる。

【0339】

「異常に発現される」によって、本発明者らは、正常な発現レベルと比較して、ポリペプチドが過剰発現されること、または腫瘍がそれに由来する組織においては遺伝子がサイ

50

レントであるが、腫瘍においてはそれが発現されることもまた意味する。「過剰発現」によって、本発明者らは、ポリペプチドが、正常組織に存在するレベルの少なくとも1.2倍のレベルで；好ましくは正常組織に存在するレベルの少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも5倍または10倍のレベルで存在することを意味する。

【0340】

T細胞は、例えば上で記載されるものなどの当該技術分野で公知の方法によって得られてもよい。

【0341】

T細胞のこのいわゆる養子免疫伝達のためのプロトコルは、当該技術分野で周知である。概説は、Gattioni et al. and Morgan et al. (Gattinoni et al., 2006; Morgan et al., 2006) 10
にある。

【0342】

本発明の別の態様は、その核酸がクローン化されて、好ましくはT細胞である宿主細胞に導入されるT細胞受容体を生成するための、MHCと複合体形成するペプチドの使用を含む。次に、この遺伝子操作T細胞は、がん治療のために患者に移入され得る。

【0343】

本発明の任意の分子、すなわちペプチド、核酸、抗体、発現ベクター、細胞、活性化T細胞、T細胞受容体またはそれをエンコードする核酸は、免疫応答を逃れた細胞によって特徴付けられる障害の治療に有用である。したがって本発明の任意の分子は、薬剤として 20
、または薬剤の製造において使用されてもよい。分子は、単独で、または本発明のその他の分子または既知の分子との組み合わせで、使用されてもよい。

【0344】

本発明は、

(a) 溶液中のまたは凍結乾燥形態の上述の医薬組成物を含有する容器；

(b) 任意選択的に、凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第2の容器；および

(c) 任意選択的に、(i) 溶液の使用、または(ii) 凍結乾燥製剤の再構成および／または使用のための取扱説明書

を含んでなるキットをさらに目的とする。

【0345】

キットは、(iii) 緩衝液、(iv) 希釈剤、(V) 濾過、(vi) 針、または(V) シリンジの1つまたは複数をさらに含んでなってもよい。容器は、好ましくは、ボトル、バイアル、シリンジまたは試験管であり；それは、多回使用容器であってもよい。医薬組成物は、好ましくは凍結乾燥される。

【0346】

本発明のキットは、好ましくは、適切な容器内の本発明の凍結乾燥製剤と、その再構成および／または使用のための取扱説明書とを含んでなる。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル（例えば二重チャンバーバイアル）、シリンジ（二重チャンバーシリンジなど）、および試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な 40
材料から形成されてもよい。好ましくは、キットおよび／または容器は、容器上の、または容器に付随する、取扱説明を含み、それは再構成および／または使用上の指示を示す。例えば、ラベルは、凍結乾燥製剤が、上述されるようなペプチド濃度に再構成されることを表示してもよい。ラベルは、製剤が皮下投与に有用であり、または皮下投与用であることをさらに表示してもよい。

【0347】

製剤を収容する容器は、多回使用バイアルであってもよく、それは再構成製剤の反復投与（例えば、2～6回の投与）を可能にする。キットは、適切な希釈剤（例えば、炭酸水素ナトリウム溶液）を含んでなる、第2の容器をさらに含んでなってもよい。

【0348】

10

20

30

40

50

希釈剤と凍結乾燥製剤の混合時に、再構成製剤中の最終ペプチド濃度は、好ましくは少なくとも 0.15 mg/mL / ペプチド ($= 75 \mu\text{g}$) であり、好ましくは 3 mg/mL / ペプチド ($= 1500 \mu\text{g}$) 以下である。キットは、その他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および取扱説明が掲載されるパッケージインサートをはじめとする、商業的および使用者観点から望ましい、その他の物品をさらに含んでもよい。

【0349】

本発明のキットは、その他の構成要素（例えば、その他の化合物またはこれらのその他の化合物の医薬組成物）が添加されたまたは添加されない、本発明による医薬組成物製剤を含有する単回容器を有してもよく、または各構成要素のための別個の容器を有してもよい。

10

【0350】

好ましくは、本発明のキットは、第2の化合物（アジュバント（例えばGM-CSF）、化学療法剤、天然物、ホルモンまたは拮抗薬、抗血管新生因子または阻害剤、アポトーシス誘導剤またはキレート剤など）またはその医薬組成物の同時投与と合わせて使用するためにパッケージされた、本発明の製剤を含む。キットの構成要素は、あらかじめ混合されてもよく、または各構成要素は、患者への投与前に別個の異なる容器内にあってもよい。キットの構成要素は、1つまたは複数の液体溶液、好ましくは水溶液、より好ましくは無菌水溶液中で、提供されてもよい。またキットの構成要素は、固体として提供されてもよく、それは、好ましくは別の異なる容器内に提供される、適切な溶媒の添加によって液体に変換されてもよい。

20

【0351】

治療用キットの容器は、バイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または固体または液体を封入するその他のあらゆる手段であってもよい。通常、2つ以上の構成要素がある場合、キットは、第2のバイアルまたはその他の容器を含有して、別々の投薬を可能にする。キットは、薬学的に許容可能な液体のための別の容器もまた、含有してもよい。好ましくは、治療用キットは、装置（例えば、1本または複数本の針、シリンジ、点眼器、ピペットなど）を含有して、本キットの構成要素である本発明の作用物質の投与を可能にする。

【0352】

本製剤は、経口（腸内）、経鼻、眼、皮下、皮内、筋肉内、静脈内または経皮などの任意の許容できる手段によるペプチド投与に適するものである。好ましくは、投与はs.c.であり、最も好ましくはi.d.投与であり、輸液ポンプによる投与であってもよい。

30

【0353】

本発明のペプチドは、CRCから単離されたので、本発明の薬剤は、好ましくはCRCを治療するために使用される。

【0354】

本発明は、予備スクリーニングTUMAPの貯蔵庫から選択される少なくとも1つのペプチドを含んでなる、医薬組成物を製造するステップを含んでなる、個々の患者のための個別化医薬品を製造する方法にさらに関し、医薬組成物中で使用される少なくとも1つのペプチドは、個々の患者における適切さについて選択される。一実施形態では、医薬組成物はワクチンである。方法はまた、TCR単離または可溶性抗体などの下流用途、およびその他の治療選択肢のためのT細胞クローンを製造するためにも適応され得る。

40

【0355】

「個別化医薬品」は、積極的個別化がんワクチンおよび自己由来患者組織を使用した養子細胞療法をはじめとする、このような個々の患者の治療のためにのみ使用される、一個人の患者のために特に調整された治療法を意味するものとする。

【0356】

本明細書の用法では、「貯蔵庫」という用語は、特定の腫瘍型における免疫原性および/または過剰提示について予備スクリーニングされている、一群のまたは一組のペプチドを指すものとする。「貯蔵庫」という用語は、ワクチンに含まれる特定のペプチドが、予

50

備製造されて物理的設備内で貯蔵されることを暗示することは意図されないが、その可能性も検討される。ペプチドは、製造される各個別化ワクチンのために新規に製造されてもよく、または予備製造されて貯蔵されてもよいことが、明示的に検討される。貯蔵庫（例えば、データベースの形態）は、様々なHLA-AHLA-BおよびHLA-C対立遺伝子があるCRC患者の腫瘍組織内で高度に過剰発現される、腫瘍関連ペプチドから構成される。それは、MHCクラスIおよびMHCクラスIIペプチドまたは伸長MHCクラスIペプチドを含有してもよい。いくつかのCRC組織から採取された腫瘍関連ペプチドに加えて、貯蔵庫は、HLA-A*02およびHLA-A*24標識ペプチドを含有してもよい。これらのペプチドは、TUMAPによって誘導されるT細胞免疫の規模を定量的に比較できるようにし、したがって抗腫瘍応答を引き起こすワクチンの能力について、重要な結論が導かれるようにする。第2に、それらは、患者において、「自己」抗原に由来するTUMAPに対するいかなるワクチン誘導T細胞応答も観察されない症例において、「非自己」抗原に由来する重要な陽性対照ペプチドとして機能する。第3に、それは、患者の免疫能力状態に関する結論が導かれるようにしてもよい。

10

【0357】

貯蔵庫のためのTUMAPは、遺伝子発現解析、質量分析、およびT細胞免疫学を組み合わせた、統合ゲノム機能解析アプローチ（X President（登録商標））を使用して同定される。アプローチは、高い割合の腫瘍上に真に存在するが、正常組織上では発現されず、または最小限にのみ発現されるTUMAPだけが、さらなる分析のために選択されることを保証する。最初のペプチド選択のために、患者に由来するCRCサンプルおよび健常ドナーに由来する血液を段階的アプローチで分析した：

20

1. 悪性物質からのHLAリガンドを質量分析法によって同定した
2. ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸（mRNA）発現解析を使用して、一連の正常臓器および組織と比較して悪性組織（CRC）中の遺伝子過剰発現を同定した
3. 同定されたHLAリガンドを遺伝子発現データと比較した。好ましくは、ステップ2で検出されたような選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、腫瘍組織上で過剰提示されまたは選択的に提示されるペプチドが、多重ペプチドワクチンのための適切なTUMAP候補と見なされた。

【0358】

4. 同定されたペプチドのTUMAPとしての妥当性を支持する追加的な証拠を同定するために、文献調査を実施した
5. mRNAレベルでの過剰発現の関連性をステップ3からの選択されたTUMAPの腫瘍組織上における再検出と、健常組織における検出の欠如（またはまれな）検出によって確認した。

30

【0359】

6. 選択されたペプチドによる生体内T細胞応答の誘導が可能かどうかを評価するために、健常ドナーならびにCRC患者からのヒトT細胞を使用して、生体外免疫原性アッセイを実施した。

【0360】

一態様では、貯蔵庫に含める前に、ペプチドを免疫原性について予備スクリーニングする。制限を意図しない一例として、貯蔵庫に包含されるペプチドの免疫原性は、ペプチド/MHC複合体および抗CD28抗体が負荷された人工抗原提示細胞による、健常ドナーからのCD8+T細胞の反復刺激を通じた、生体外T細胞プライミングを含んでなる方法によって判定される。

40

【0361】

この方法は、稀ながんに、そして稀な発現プロファイルを有する患者にとって、好ましい。一定組成を有する多重ペプチド混合物とは対照的に、現在開発されている貯蔵庫は、腫瘍における抗原の実際の発現とワクチンとの顕著により高いマッチングを可能にする。多標的アプローチでは、各患者のために、選択された単一のまたは組み合わせられた数種の「既製」ペプチドが利用される。理論上は、例えば50個の抗原性ペプチドのライブラリ

50

ーからの5個の異なる抗原性ペプチドの選択に基づくアプローチは、それだけでおよそ1700万個の可能な医薬品(DP)組成物をもたらす。

【0362】

一態様では、ペプチドは、本明細書に記載される、または以下のような本発明による方法に基づく、個々の患者に対するそれらの適切さに基づいて、ワクチンへの包含のために選択される。

【0363】

HLA表現型、トランスクリプトミクス、およびペプチドミクスデータが、患者の腫瘍材料および血液サンプルから収集されて、「貯蔵庫」および患者に特有の(すなわち変異)TUMAPを含有する、各患者に対して最も適切なペプチドが同定される。患者の腫瘍において選択的にまたは過剰発現されて、可能であれば、患者の個々のPBMCと共に試験すると、強力な生体外免疫原性を示すペプチドが選択される。

【0364】

好ましくは、ワクチンに含まれるペプチドは、(a)個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される腫瘍関連ペプチド(TUMAP)を同定するステップと；(b)(a)で同定されたペプチドを上述のペプチド貯蔵庫と比較するステップと；(c)少なくとも1つのペプチドを患者において同定された腫瘍関連ペプチドに関連がある貯蔵庫(データベース)から選択するステップとを含んでなる方法によって同定される。例えば、腫瘍サンプルによって提示されるTUMAPは、(a1)前記腫瘍サンプルからの発現データを前記腫瘍サンプルの組織型に対応する正常組織サンプルからの発現データと比較して、前記腫瘍サンプルにおいて過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質を同定するステップと；(a2)発現データを腫瘍サンプル中のMHCクラスIおよび/またはクラスII分子と結合しているMHCリガンドの配列と相関させて、腫瘍によって過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質に由来するMHCリガンドを同定するステップとによって同定される。好ましくは、MHCリガンドの配列は、腫瘍サンプルから単離されたMHC分子から結合ペプチドを溶出させて、溶出したリガンドを配列決定することで同定される。好ましくは、腫瘍サンプルおよび正常組織は、同一患者から入手される。

【0365】

貯蔵庫(データベース)モデルを使用してペプチドを選択するのに加えて、またはその代案として、TUMAPを患者において新規に同定し、次に、ワクチンに含めてもよい。一実施例として、(a1)前記腫瘍サンプルからの発現データを前記腫瘍サンプルの組織型に対応する正常組織サンプルからの発現データと比較して、前記腫瘍サンプルにおいて過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質を同定するステップと；(a2)発現データを腫瘍サンプル中のMHCクラスIおよび/またはクラスII分子と結合しているMHCリガンドの配列と相関させて、腫瘍によって過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質に由来するMHCリガンドを同定するステップとによって、候補TUMAPが患者において同定されてもよい。別の実施例として、個々の患者からの正常な対応組織と比較して、腫瘍サンプルに特有の変異を含有するタンパク質が同定されてもよく、特異的に変異を標的とするTUMAPが同定され得る。例えば、腫瘍のゲノム、および対応する正常組織のゲノムは、全ゲノム配列決定によって配列決定され得る。遺伝子のタンパク質コード領域における非同義の変異を発見するために、ゲノムDNAおよびRNAが腫瘍組織から抽出され、正常な非変異ゲノム生殖細胞系DNAが末梢血単核細胞(PBMC)から抽出される。適用されたNGSアプローチは、タンパク質コード領域の再配列決定(エクソーム再配列決定)に限定される。この目的で、供給業者が提供する標的富化キットを使用して、ヒトサンプルからのエクソンDNAが捕捉され、例えばHiSeq2000(Illumina)による配列決定がそれに続く。それに加えて、遺伝子発現の直接定量と、変異遺伝子が患者の腫瘍において発現されることの妥当性評価とのために、腫瘍mRNAが配列決定される。結果として得られる数百万の配列読み取りは、ソフトウェアアルゴリズムを通じて処理される。出力一覧は、変異および遺伝子発現を含む。PBMC由来生殖細胞系の多様性と比較することで腫瘍特異的体細胞変異が判定され、優先順位がつけ

られる。次に、新規に同定されたペプチドは、貯蔵庫について上述されたような免疫原性について試験され得て、適切な免疫原性を保持する候補 T U M A P が、ワクチンへの包含のために選択される。

【0366】

例示的一実施形態では、ワクチンに包含されるペプチドは、(a) 個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される腫瘍関連ペプチド (T U M A P) を上述の方法 (方法) によって同定するステップと; (b) a) で同定されたペプチドを対応する正常組織との比較で腫瘍における免疫原性および過剰提示について予備選別されたペプチドの貯蔵庫と比較するステップと; (c) 少なくとも 1 つのペプチドを患者において同定された腫瘍関連ペプチドに関連がある貯蔵庫から選択するステップと; (d) 任意選択的に、(a) で新規に同定された少なくとも 1 つのペプチドを選択して、その免疫原性を確認するステップとによって同定される。

10

【0367】

例示的一実施形態では、ワクチンに包含されるペプチドは、(a) 個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される腫瘍関連ペプチド (T U M A P) を同定するステップと; (b) (a) で新規に同定された少なくとも 1 つのペプチドを選択して、その免疫原性を確認するステップとによって同定される。

【0368】

ひとたび個別化ペプチドベースのワクチンのためのペプチドが選択されたら、ワクチンが製造される。ワクチンは、好ましくは、約 33% DMSO などの 20~40% DMSO、好ましくは約 30~35% DMSO に溶解された、個々のペプチドからなる液体製剤である。

20

【0369】

製品に包含される各ペプチドは、DMSO に溶解される。単一ペプチド溶液の濃度は、製品に包含されるペプチド数に応じて選択されなくてはならない。単一ペプチド DMSO 溶液を等量で混合し、ペプチド当たり約 2.5 mg/ml の濃度で、製品に包含される全てのペプチドを含有する溶液を得る。次に、混合溶液を注射用水で 1:3 に希釈して、33% DMSO 中でペプチド当たり 0.826 mg/ml の濃度を得る。希釈溶液を 0.22 μm の無菌フィルターを通して濾過する。最終バルク溶液を得る。

【0370】

最終バルク溶液をバイアルに充填して、使用時まで -20℃ で保存する。1 本のバイアルは、0.578 mg の各ペプチドを含有する 700 μL の溶液を含有する。この内、500 μL (ペプチド当たりおよそ 400 μg) を皮内注射のために適用する。

30

【0371】

がんを治療するために有用であるのに加えて、本発明のペプチドは、診断法としてもまた有用である。ペプチドは CRC から生成されたので、そしてこれらのペプチドは正常組織には存在せずまたはより低レベルで存在すると判定されたので、これらのペプチドを利用してがんの存在を診断し得る。

【0372】

特許請求されるペプチドの血液サンプル中の組織生検上の存在は、がん診断において病理学者を補佐し得る。抗体、質量分析法またはその他の当該技術分野で公知の方法の手段による特定のペプチドの検出は、組織サンプルが悪性または炎症性または概して病的であることを病理学者に告げ得て、または CRC のバイオマーカーとして利用され得る。ペプチド基の存在は、病的組織の分類または下位分類を可能にし得る。

40

【0373】

患部組織検体上のペプチドの検出は、特に T リンパ球が作用機序に関与することが知られておりまたは予測される場合に、免疫系が関与する治療法の利点を判定できるようにする。MHC 発現の喪失は、それによって感染悪性細胞が免疫監視を逃れる、十分に説明された機序である。したがってペプチドの存在は、この機序が、分析した細胞によって活用されていないことを示す。

50

【0374】

本発明のペプチドは、ペプチドまたはMHC分子と複合体化したペプチドに対するT細胞応答または抗体応答などの、これらのペプチドに対するリンパ球応答を分析するのに使用されるかもしれない。これらのリンパ球応答は、さらなる治療段階を決定するための予後マーカーとして使用され得る。これらの応答はまた、例えば、タンパク質、核酸、自己材料のワクチン接種や、リンパ球の養子免疫伝達などの異なる手段によるリンパ球応答の誘導を目指す、免疫療法アプローチにおける代理応答マーカーとして使用され得る。遺伝子治療の設定では、副作用の評価において、ペプチドに対するリンパ球応答が考慮され得る。リンパ球応答のモニタリングはまた、例えば移植片対宿主病および宿主対移植片病の検出など、移植治療の経過観察検査のための有益な手段かもしれない。

10

【0375】

本発明をここで、その好ましい実施形態を描写する以下の実施例において、添付図面を参照して説明するが、それでもなお、それらには限定されないものとする。本発明の目的で、本明細書で引用される全ての参考文献は、その内容全体が参照により援用される。

【図面の簡単な説明】

【0376】

【図1A】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1A：遺伝子記号：ZNF679、ZNF716、SAPCD2、ペプチド：ALIKQLFEA（配列番号1）、組織左から右：1脂肪組織、3副腎、6動脈、3骨髄、7脳、3乳房、1神経（nerve）、1卵巣、8食道、2胆嚢、5心臓、16腎臓、21肝臓、46肺、3リンパ節、4白血球サンプル、3卵巣、7脾臓、4末梢神経、1腹膜、1脳下垂体、2胎盤、3胸膜、1前立腺、2唾液腺、4骨格筋、4皮膚、2小腸、4脾臓、7胃、4精巣、2胸腺、3甲状腺腺、1気管、1尿管、3膀胱、2子宮、2静脈、13結腸、6直筋、24CRC。ペプチドは、9/99肺がん、2/28脳がん、4/20卵巣がん、1/45胃がん、1/33前立腺がん、および2/15食道がん（図示せず）上でさらに検出された。

20

【図1B】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1B：遺伝子記号：BRCA2、ペプチド：KQFEGTVEI（配列番号138）、組織左から右：1脂肪組織、3副腎、6動脈、3骨髄、7脳、3乳房、1神経（nerve）、1卵巣、8食道、2胆嚢、5心臓、16腎臓、21肝臓、46肺、3リンパ節、4白血球サンプル、3卵巣、7脾臓、4末梢神経、1腹膜、1脳下垂体、2胎盤、3胸膜、1前立腺、2唾液腺、4骨格筋、4皮膚、2小腸、4脾臓、7胃、4精巣、2胸腺、3甲状腺腺、1気管、1尿管、3膀胱、2子宮、2静脈、13結腸、6直筋、24CRC。ペプチドは、1/15食道がん、1/28脳がん、1/45胃がん、および3/91肺がん（図示せず）上でさらに検出された。

30

【図1C】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1C：遺伝子記号：IL8、ペプチド：KLAVALLAA（配列番号210）、組織左から右：1脂肪組織、3副腎、6動脈、3骨髄、7脳、3乳房、1神経（nerve）、1卵巣、8食道、2胆嚢、5心臓、16腎臓、21肝臓、46肺、3リンパ節、4白血球サンプル、3卵巣、7脾臓、4末梢神経、1腹膜、1脳下垂体、2胎盤、3胸膜、1前立腺、2唾液腺、4骨格筋、4皮膚、2小腸、4脾臓、7胃、4精巣、2胸腺、3甲状腺腺、1気管、1尿管、3膀胱、2子宮、2静脈、13結腸、6直筋、24CRC。ペプチドは、14/99肺がん、1/18腎臓がん、2/28脳がん、2/16肝臓がん、1/20卵巣がん、1/45胃がん、および3/15食道がん上でさらに検出された（図示せず）。

40

【図1D】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1D）遺伝子記号：TMM222、ペプチド：LLYGKYVSV（配列番号31）組織左から右：3脾臓細胞株、3皮膚細胞株、1白血球細胞株、0正常組織、28がん組織（2脳がん、1乳がん、1結腸がん、1食道がん、2腎臓がん、1白血病、5肝臓がん、7肺がん、5卵巣がん、1前立腺がん、2直腸がん）。試験された正常

50

な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。図1 Dと表4との間の腫瘍の種類型に関する齟齬は、表4に適用されたより厳密な選択基準に起因するかもしれない（詳細は表4を参照されたい）。過剰提示パラメータおよび技術的サンプル品質チェックにかかわりなく、ペプチドYの検出可能な提示があった全てのサンプルを示す。

【図1 E】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 E：遺伝子記号：ZNF679、ZNF716、SAPCD2、ペプチド：ALIKQLFEA（配列番号1）、組織左から右：7がん細胞株、1原発性がん細胞培養物、58がん組織（5脳がん、1乳がん、9結腸がん、1結腸直腸がん、3食道がん、1胆嚢がん、2白血病、15肺がん、2リンパ節がん、1骨髄性細胞がん、5卵巣がん、1前立腺がん、4直腸がん、1皮膚がん、2胃がん、2膀胱がん、3子宮がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

10

【図1 F】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 F：F）遺伝子記号：PLAGL2、ペプチド：FLAELPGSLSL（配列番号6）、組織左から右：8がん細胞株、1原発性がん細胞培養物、2正常組織（1リンパ節、1脾臓）、57がん組織（1骨髄がん、1乳がん、1盲腸がん、5結腸がん、2食道がん、1胆嚢がん、3白血病、2肝臓がん、13肺がん、8リンパ節がん、1骨髄性細胞がん、9卵巣がん、2直腸がん、1皮膚がん、1胃がん、4膀胱がん、2子宮がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

【図1 G】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 G：遺伝子記号：CYP2W1、ペプチド：FLDANGHFV（配列番号23）、組織左から右：1原発性がん細胞培養物、3正常組織（3胎盤）、12がん組織（5結腸がん、1食道がん、1胆嚢がん、2直腸がん、3胃がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

20

【図1 H】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 H：遺伝子記号：CYP2W1、ペプチド：GLIDEVMVL（配列番号22）、組織左から右：1正常組織（1胃）、6がん組織（3結腸がん、1胆嚢がん、2直腸がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

【図1 I】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 I：遺伝子記号：AXIN2、ペプチド：ILDHLSRV（配列番号9）、組織左から右：5がん組織（1盲腸がん、1結腸がん、1肺がん、2直腸がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

30

【図1 J】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 J：遺伝子記号：RAD54B、ペプチド：KLLAVIHLEL（配列番号152）、組織左から右：3細胞株、2正常組織（1リンパ節、1脾臓）、34がん組織（1乳がん、7結腸がん、1食道がん、1胆嚢がん、1腎臓がん、8肺がん、4リンパ節がん、1骨髄性細胞がん、4卵巣がん、1脾臓がん、1直腸がん、3皮膚がん、1膀胱がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

【図1 K】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 K：遺伝子記号：ECT2、ペプチド：SLVQRVETI（配列番号142）、組織左から右：5細胞株、1初代培養、47がん組織（2胆管がん、2乳がん、1盲腸がん、7結腸がん、3食道がん、3胆嚢がん、1腎臓がん、2肝臓がん、10肺がん、2リンパ節がん、4卵巣がん、1脾臓がん、2直腸がん、2皮膚がん、1胃がん、2膀胱がん、2子宮がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

40

【図1 L】正常組織（白色バー）およびCRC（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図1 L：遺伝子記号：MMP12、ペプチド：KIQEMQHFL（配列番号192）、組織左から右：1初代培養、44がん組織（5結腸がん、1食道がん、1胆嚢がん、1頭頸部がん、30肺がん、1リンパ節がん、1直腸がん、1胃がん、1精巣がん、1膀胱がん、1子宮がん）。試験された正常な組織パネルは、図1 A～Cと同一であった。

50

【図 1 M】正常組織（白色バー）および C R C（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。図 1 M：遺伝子記号：C O L 6 A 3、ペプチド：F L L D G S A N V（配列番号 2 1 2）、組織左から右：3 細胞株、2 正常組織（1 胎盤、1 脾臓）、1 4 6 がん組織（4 胆管がん、1 3 乳がん、1 盲腸がん、8 結腸がん、1 結腸直腸がん、6 食道がん、5 胆嚢がん、5 頭頸部がん、2 腎臓がん、1 肝臓がん、6 2 肺がん、2 リンパ節がん、9 卵巣がん、7 膵臓がん、3 直腸がん、4 皮膚がん、5 胃がん、5 膀胱がん、3 子宮がん）。試験された正常な組織パネルは、図 1 A～C と同一であった。

【図 2 A】正常組織（白色バー）および 1 0 個の C R C サンプル（黒色バー）のパネルにおいて、C R C で高度に過剰発現されるかまたは排他的に発現される、本発明の起源遺伝子の例示的な発現プロファイル（正常結腸および直腸と比較した相対的発現）を示す。組織左から右：副腎、動脈、骨髄、脳（全体）、乳房、結腸、食道、心臓、腎臓（三連）、白血球、肝臓、肺、リンパ節、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、膀胱、子宮子宮頸部、子宮、静脈、3 正常結腸サンプル、1 0 C R C サンプル。図 2 A、C C N B 1；

【図 2 B】同上 図 2 B、C D K 1；

【図 2 C】同上 図 2 C、C H M P 5。

【図 2 D】正常組織（白色バー）および 2 0 個の C R C サンプル（黒色バー）のパネルにおいて、C R C で高度に過剰発現されるかまたは排他的に発現される、本発明の起源遺伝子の例示的な発現プロファイル（正常結腸および直腸と比較した相対的発現）を示す。組織左から右：6 動脈、2 血液細胞、2 脳、1 心臓、2 肝臓、3 肺、2 静脈、1 脂肪組織、1 副腎、5 骨髄、1 軟骨、1 結腸、1 食道、2 眼、2 胆嚢、2 唾液腺、1 腎臓、6 リンパ節、4 膵臓、2 末梢神経、2 脳下垂体、1 直腸、2 骨格筋、1 皮膚、1 小腸、1 脾臓、1 胃、1 甲状腺、7 気管、1 膀胱、1 乳房、5 卵巣、5 胎盤、1 前立腺、1 精巣、1 胸腺、1 子宮、2 0 C R C サンプル。図 2 D：E C T 2。

【図 3】例示的免疫原性データを示す：ペプチド特異的多量体染色後のフローサイトメトリ結果。

【図 4-1】健常 H L A - A * 0 2 + ドナーのペプチド特異的生体外 C D 8 + T 細胞応答の例示的結果を示す。C D 8 + T 細胞は、それぞれ配列番号 2 2 ペプチド（A、左パネル）、配列番号 9 ペプチド（B、左パネル）または配列番号 1 4 2 ペプチド（C、左パネル）と複合体形成する、抗 C D 2 8 m A b および H L A - A * 0 2 で被覆された人工 A P C を用いて、初回刺激された。3 サイクルの刺激後、A * 0 2 / 配列番号 2 2（A）、A * 0 2 / 配列番号 9（B）または A * 0 2 / 配列番号 1 4 2（C）を用いた 2 D 多量体染色によって、ペプチド反応性細胞の検出を実施した。右パネル（A、B、および C）は、無関係の A * 0 2 / ペプチド複合体で刺激された細胞の対照染色を示す。生存一重細胞は、C D 8 + リンパ球についてゲートされた。ブリーアンゲートは、異なるペプチドに対して特異的な多量体によって検出された、擬陽性事象の排除を助けた。C D 8 + リンパ球の中の特異的な多量体 + 細胞の頻度が示される。

【図 4-2】同上

【実施例】

【0 3 7 7】

実施例 1

細胞表面に提示される腫瘍関連ペプチドの同定および定量化
組織サンプル

患者の腫瘍組織は、University Hospital of Tübingen から入手された。

【0 3 7 8】

正常組織は、Asterand, Detroit, USA and Royston, Herts, UK; Bio-Options Inc, CA, USA; BioServe, Beltsville, MD, USA; Capital BioScience Inc, Rockville, MD, USA; Geneticist Inc., Glend

10

20

30

40

50

ale, CA, USA; Tissue Solutions Ltd, Glasgow, Scotland, UK; University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; Kyoto Prefectural University of Medicine (KPU M); University Hospital Munich; ProteoGene x Inc., Culver City, CA, USA; University Hospital of Tübingenから入手された。全ての患者の告知に基づく同意書が、外科手術または検死解剖前に得られた。組織は切除直後に衝撃凍結され、TUMAPの単離まで -70°C 未満で保存された。

【0379】

組織サンプルからのHLAペプチドの単離

衝撃凍結組織サンプルからのHLAペプチド貯留は、わずかに修正されたプロトコル (Falk et al., 1991; Seeger et al., 1999) に従って、HLA-A*02-特異的抗体BB7.2、HLA-A、-B、-C特異的抗体W6/32、CNBr活性化セファロース、酸処理、および限外濾過を使用して、免疫沈殿によって固形組織から得られた。

【0380】

質量分析

得られたHLAペプチド貯留は、逆相クロマトグラフィー (nanoAcquity UPLC system, Waters) によってそれらの疎水性に従って分離し、ESI源を装着したLTQ-velosおよびfusion hybrid質量分光計 (ThermoElectron) 内で溶出ペプチドを分析した。ペプチド貯留は、毎分400 nLの流速を適用して、 $1.7\mu\text{m}$ C18逆相材料 (Waters) で充填された分析用融合シリカマイクロキャピラリーカラム ($75\mu\text{m}$ 内径 $\times$ 250mm) 上に直接挿入した。引き続いて、毎分300 nLの流速で10%から33%へのBの二段階180分間二成分勾配を用いて、ペプチドを分離した。勾配は、溶媒A (水中の0.1%ギ酸) および溶媒B (アセトニトリル中の0.1%ギ酸) から構成された。nanoESI源への導入には、金被覆ガラス毛管 (PicoTip, New Objective) を使用した。LTQ-Orbitrap質量分光計は、TOP5ストラテジーを使用してデータ依存モードで操作した。手短に述べると、Orbitrap ($R=30000$) 内の高質量精度の完全スキャンでスキャンサイクルを開始し、これもまたOrbitrap ($R=7500$) 内の5種の最も豊富な前駆イオンのMS/MSスキャンがそれに続き、以前選択されたイオンは動的に排除された。タンデム質量スペクトルは、SEQUESTおよび追加的な手動調節によって解釈した。同定されたペプチド配列は、生成された天然ペプチド断片化パターンと、配列が同一の合成参照ペプチドの断片化パターンとの比較によって確認した。

【0381】

イオン計数によって、すなわちLC-MS特性の抽出と解析によって、無標識相対LC-MS定量化を実施した (Mueller et al., 2007)。方法は、ペプチドのLC-MSシグナル面積が、サンプル中のその存在量と相関すると仮定する。抽出された特性は、電荷状態デコンボリューションと滞留時間アライメントによってさらに処理した (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008)。最終的に、全てのLC-MS特性を配列同定結果と相互参照して、異なるサンプルの定量的データと、組織からペプチドへの提示プロファイルとを組み合わせた。定量的データは、技術的および生物学的反復試験内の変動を考慮した中心傾向に従って、二段法で正規化された。このようにして、それぞれの同定されたペプチドが定量的データに関連付けられ得て、サンプルと組織の間の相対定量化ができるようになる。さらに、ペプチド候補について得られた全ての定量的データを手動で検査し、データ整合性を保証して自動解析の確度を確認した。各ペプチドについて提示プロファイルを計算し、平均サンプル提示ならびに反復試験変動を示した。プロファイルは、CRCサンプルを正常組織サンプルのベー

10

20

30

40

50

スラインに並置する。例示的過剰提示ペプチドの提示プロファイルは、図 1 に示される。代表的ペプチドの提示スコアは、表 8 に示される。

【0382】

表8:提示スコア。表は、正常組織パネルと比較して腫瘍上で非常に高度に過剰提示され(+++), 正常組織パネルと比較して腫瘍上で高度に過剰提示され(++), 正常組織パネルと比較して腫瘍上で過剰提示される(+), ペプチドを列挙する。

【表 8 - 1】

配列番号	配列	ペプチド提示
1	ALIKQLFEA	+++
2	ALLPRYFFL	+++
3	RLIPDTLYSV	+++
4	RLAELTVDEFL	+++
5	WLFDDGGLTL	+++
6	FLAELPGSLSL	+
7	YLTRHLAVL	+++
8	ALMLQGVDLL	+++
9	ILDDHLSRV	+++
10	RMYNKIFAI	+++
11	YLFEKTFNM	+++
12	ALVQGILERV	+++
13	FLLAEDTKV	+++
15	LQLDKEFQL	+
16	VLVDQSWVL	+++

10

20

【表 8 - 2】

17	ALAAARVEL	+++
18	FLSSLKGGLL	+++
19	RLYTKLLNEA	+++
21	VLIDHRWVL	+++
22	GLIDEVMVL	+++
23	FLDANGHFV	+
25	SLADRLIGV	+++
26	GLASKENFSNVSL	+++
27	LLADEDSSYL	+++
30	GLSSAYGGL	+++
31	LLYGKYVSV	+++
32	KLNTETFGV	+++
33	ALWEKNTHL	+++
34	ILLEKSVSV	+++
35	KLLDLTVRI	+++
36	GLLESPSIFNFTA	+++
37	GLFAGLGGAGA	+++
38	SLAPTPVSA	+++
39	GLNGGSPAAA	+++
40	ALSNVIHKV	+++
41	ILDDSFKLL	++
42	SILDDSFKL	+++
43	TLDAAQPRV	++
44	SLESKLTSV	+++
45	ALAELLHGA	+++
46	GLDDRYSLV	+
47	KLYERCEVV	++
48	FLDASDPAL	+++
51	QVWEIQHTV	++
53	FLLGSEIKL	++
54	ALLNGEYLLAA	+
56	VLFTDEGVKFL	+
57	NLLEKENYL	++
58	AMADKMDMSL	+
59	LLTDNVVKL	+
60	VLDEDEPRFL	+
61	KLLKLFQGV	+++
62	YLAPENGYL	++
63	KLFSILSTV	+
64	KTLGKLWRL	+++
65	FGAPGIISA	+++
66	GLDDGPDFL	+
67	SLNDLEKDVMLL	+
68	SILQFVHMV	++
69	GMLNEAEGKAIKL	+
70	MISELEVRL	+
71	RLWTEIPTAI	++
72	YLLDYPNNLL	++

10

20

30

40

【表 8 - 3】

73	YLFDIIVSM	++
74	YLMGFLHAV	++
75	EMIENIQSV	+
77	SLLKRDFGA	+
78	ALDPELLLL	+
80	QVDEVVDIMRV	++
81	ALLSQQTHL	++
82	QLYEEDTKL	++
83	LTIEDGIFEV	+
88	KLDIKVETV	+
89	SLIEYFRV	++
90	GLLKPLNVVL	+
92	WIDDTSAFV	+++
93	SLQELRLLL	+
95	AILDAHIEV	+
96	KLYSRLVYV	++
97	ALWWGVVTV	++
100	SLDDFLATA	+
102	KILVSLIEV	+++
103	FLFGYPKRL	+
110	LLGELPRLLLL	+
111	HMDGGYSM	+
112	KLQQLIYL	+++
113	ILYDLQNL	+
123	KTLEERSYLL	+++
124	RVLPPSALQSV	++
125	KLGDFFLLVEL	+++
126	TLAKYLMEL	+++
127	RLAELTVDEFLA	+++
128	MLDDRAYLV	++
129	VLIDVLKEL	+++
130	GLGGSQIDTHL	+++
131	KLLDVVHPA	+++
132	ALLNAILHSA	+++
133	RTFEKIEEV	+++
134	GVAGGSILKGV	+++
135	KLQEEIPVL	+++
136	KLFDIFSQQV	+++
137	QLTEIKPLL	+++
138	KQFEGTVEI	+++
139	VLLNEILEQV	+
141	AVIEHLERL	+++
142	SLVQRVETI	+++
143	KLSDVWKEL	+++
144	LLNDRIWLA	+
145	LLLEVVKQV	+++
146	ALSDETWGL	+
148	RLENMTEVV	++

10

20

30

40

【表 8 - 4】

150	RLADLEALKV	+++
152	KLLAVIHEL	+
153	ILFSEDSTKLFV	+
154	KLPSETIFVGC	+
155	RLLGEEVVRV	++
156	SLMMTIINL	++
157	SLIERDLKL	++
158	GLLDPSVFHV	+++
159	VLVDDGKVV	+++
160	KLEFDQLQL	++
161	FLKNELDNV	++
162	KLMDYIDEL	++
163	RLLHEVQEL	++
164	KMLDEILLQL	++
165	RLLDFPEAMVL	+++
166	GLLEARGILGL	+
168	GLIRFPLMTI	++
170	ALAGGITMV	++
171	RLQETEGMVAV	+
172	LLDVTVMQV	+
173	KLGDLMVLL	+
177	ALLQGAIESV	+
178	YLFREPATI	+
179	RLLJPLSSA	+
180	NLEIAPHL	++
183	TLQEVVTGV	+
185	VLYTGVRV	+
186	KMSEKILL	+
187	GLHNVVYGI	++
188	FLVDGPRVQL	+
192	KIQEMQHFL	+++
193	KLSPTVVGL	+++
194	SLYKGLLSV	+++
195	LLGERVAL	+++
198	VLYGPDVPTI	++
199	FLLEREQLL	+++
201	GJFNGALAAV	+++
202	GLAALAVHL	+++
203	KLIDLSQVMYL	+
204	KLLDLETERILL	++
205	RLHDENILL	+++
206	RIAGIRGIQGV	++
207	KLCEGFNEV	+++
208	RLIDRIKTV	+++
209	KLQDGLLHI	+++
210	KLAVALLAA	+++
211	SLFGKKYIL	+++
213	LLWAPTAQA	+++

10

20

30

40

【表 8－5】

214	SVLEKEIYSI	+++
215	KLQEKIQEL	+++
216	YLWDLDHGFAGV	+++
217	KLLDTMVDFTL	++
218	KLSWDLIYL	+
220	KMDPVAYRV	+
221	ILNVDGLIGV	+
223	VLMQDSRLYL	+++
224	QLQEGKNVIGL	+++
225	YLYGQTTTYL	+
226	FLVDGSWSV	+
227	LTAPPEALLMV	++
228	SMSGYDQVL	+
229	YLLEKFVAV	++
230	AMSSKFFLV	++
231	RLFADILNDV	+++
232	RLLDSVSRL	+
233	RLDDLKMTV	++
234	KMFESFIESV	++
235	LLHEENFSV	++
236	KMSELQTYV	+
237	KLVEFDLGA	++
238	NMLEAVHTI	++
239	QLIEKNWLL	+++
240	VLAPRVLRA	++
241	ILIDWLQV	+
242	RLEEDDGDVAM	++
243	TLMDMRLSQV	+
244	SLHFLILYV	+
245	QLIDYERQL	+
246	GLTDNIHLV	+
247	SLDTLMTYV	+
249	ALYGRLEV	+
250	ALCEENMRGV	+
252	YVYQNNIYL	+
254	VLFEALWHV	++
257	SLADFMQEV	++
259	ALADKELLPSV	+
261	YLYDSETKNA	+

10

20

30

【0383】

実施例 2

本発明のペプチドをコードする遺伝子発現プロファイリング

正常細胞と比較した腫瘍細胞上のペプチドの過剰提示または特異的提示は、免疫療法におけるその有用性にとって十分であり、いくつかのペプチドは、それらの起源タンパク質が正常組織にもまた存在するにもかかわらず、腫瘍特異的である。それでもなお、mRNA発現プロファイリングは、免疫療法のためのペプチド標的の選択において、安全性のレベルを高めることができる。特に、アフィニティ成熟TCRなどの安全性リスクが高い治療の選択肢では、理想的な標的ペプチドは、腫瘍に特有で正常組織上には見いだされないタンパク質に由来する。

40

【0384】

RNA起源および調製

外科的に除去された組織標本は、告知に基づく同意書が各患者から入手された後に、上述の通り提供された（実施例1を参照されたい）。腫瘍組織標本を手術直後にスナップ凍結し、その後、液体窒素下で乳鉢と乳棒を用いて均質化した。TRI試薬（Ambion

50

、Darmstadt, Germany) を使用して、これらのサンプルから全RNAを調製し、RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germany) による精製がそれに続き; どちらの方法も製造業者のプロトコルに従って実施した。

【0385】

健常ヒト組織からの全RNAは、商業的に入手された (Ambion, Huntingdon, UK; Clontech, Heidelberg, Germany; Stratagene, Amsterdam, Netherlands; BioChain, Hayward, CA, USA)。幾人 (2~123人) かの個人からのRNAは、各個人からのRNAが等しく重み付けされるように混合した。

【0386】

全てのRNAサンプルの品質および量は、RNA 6000 Pico LabChip キット (Agilent) を使用して、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Germany) 上で評価した。

【0387】

マイクロアレイ実験

全ての腫瘍および正常組織RNAサンプルの遺伝子発現解析は、Affymetrix Human Genome (HG) U133AまたはHG-U133 Plus 2.0オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) によって実施した。全てのステップは、Affymetrixマニュアルに従って実施した。簡単に述べると、マニュアルに記載されるようにして、Super Script RTII (Invitrogen) およびオリゴdT-T7プライマー (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) を使用して、5~8μgの全RNAから二本鎖cDNAを合成した。生体外転写は、U133AアレイのためのBioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, USA) を用いて、またはU133 Plus 2.0のためのGeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) を用いて実施し、cRNA断片化、ハイブリダイゼーション、そしてストレプトアビジン-フィコエリトリンとビオチン化抗ストレプトアビジン抗体 (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) とを用いた染色がそれに続いた。Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) またはAffymetrix GeneChip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0) で画像をスキャンして、全てのパラメータについてデフォルト設定を使用して、GCOSソフトウェア (Affymetrix) によってデータを解析した。正規化のために、Affymetrixによって提供される100個のハウスキーピング遺伝子を使用した。ソフトウェアによって与えられるシグナルlog比から、相対的発現値を計算し、正常な腎臓サンプルを自由裁量で1.0に設定した。CRC中で高度に過剰発現されまたは排他的に発現される本発明の起源遺伝子の代表的発現プロファイルは、図2に示される。さらなる例示的遺伝子の発現スコアは、表9に示される。

【0388】

表9: 発現スコア。表は、正常組織パネルと比較して腫瘍において非常に高度に過剰発現され(+++)、正常組織パネルと比較して腫瘍において高度に過剰発現され(++)、正常組織パネルと比較して腫瘍において過剰発現される(+)、遺伝子に由来するペプチドを列挙する。

【表 9 - 1】

配列番号	遺伝子名	配列	遺伝子発現
2	ATP10B	ALLPRYFFL	+++
5	SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3	WLFDDGGLTL	+++
6	PLAGL2	FLAELPGSLSL	+++
7	MUC2	YLTRHLAVL	+
8	HSPD1	ALMLQGVDLL	+
13	SMC2	FLLAEDTKV	+++
16	KLK10	VLVDQSWVL	+
17	SLC12A2	ALAAARVEL	+++
19	MYO10	RLYTKLLNEA	+++
27	CHMP5	LLADEDSSYL	++
29	AP3D1	QMLDVAIRV	+
35	OLFM4	KLLDLTVRI	+
36	LARP4B	GLLESPIFNFTA	+
39	CDX2	GLNGGSPAAA	++
40	SERPINB5	ALSNVIHKV	+
41	HEPH	ILDDSFKLL	++
42	HEPH	SILDDSFKL	++
46	PKP3	GLDDRYSLV	+
47	ERBB3	KLYERCEVV	+
53	TBC1D8B	FLLGSEIKL	+
55	PMS1	QIITSVVSV	++
57	PKP2	NLLEKENYL	++
60	AGTPBP1	VLDEDEPRFL	+
63	HEATR2	KLFSILSTV	++
64	SOX8, SOX9, SOX10	KTLGKLWRL	++
67	SMARCA4	SLNDLEKDVMLL	++
68	PTPRO	SILQFVHMV	+
73	APIP	YLFDAVSM	+
74	ARHGAP8, PRR5-ARHGAP8, PRR5	YLMGFLHAV	+
75	CFTR	EMIENIQSV	+++
77	DDX5	SLLKRDFGA	+
79	SRSF11	SLAADQLLKL	++
81	TGIF1	ALLSQQTHL	+
84	DSP	SMVEDITGLRL	+
86	MUC13	KVFPKGISV	+++
89	ITGA6	SLIEYFRV	++
90	EBNA1BP2	GLLKPGLNVVL	++
92	PARN	WIDDTSAFV	+
98	ATP13A3	AMNGKSFSV	+++
104	MUC2	ILLTIKDDTIYL	+
112	GALNT7	KLQQLIYL	++
113	KCNN4	ILYDLQQNL	+
123	RRM1	KTLESYLL	+++
124	AURKB	RVLPSPALQSV	++
126	CCNB1, CCNB2	TLAKYLMEL	+++
129	CNOT1	VLIDVLKEL	+
130	PRRC2C	GLGGSQIDTHL	++
132	NOL11	ALLNAILHSA	++
134	EIF2S3, LOC255308	GVAGGSILKGV	+

10

20

30

40

【表 9 - 2】

135	CENPE	KLQEEIPVL	+
138	BRCA2	KQFEGTVEI	++
139	NCAPG	VLLNEILEQV	+++
140	NCAPG	LLNEILEQV	+++
142	ECT2	SLVQRVETI	++
144	ZSWIM1	LLNDRIWLA	++
147	KDM5C	TLTELRAFL	+
148	PDXDC1	RLLNMTEVV	+
152	RAD54B	KLLAVIHEL	+
156	TOP2A	SLMMTIINL	+++
157	URB1	SLIERDLKL	+
160	SYNJ2	KLLEFDQLQL	+
161	TRAIP	FLKNELDNV	+
166	CDC6	GLLEARGILGL	+
171	HMGXB4	RLQETEGMAV	+
172	COPG1	LLLDVTVMQV	+
180	GPD2	NLLEIAPHL	+
183	AGK	TLQEVVTGV	++
184	PRKDC	SLLDENNVSSYL	+
187	CNOT1	GLHNVVYGI	+
188	ZSWIM1	FLVDGPRVQL	++
190	NCAPD2	AMAEMVLQV	+
191	CDK5RAP2	QLFSEIHNL	+
192	MMP12	KIQEMQHFL	++
194	RAD54B	SLYKGLLSV	+
197	ZNF451	SLFGQDVKAV	+
198	CEACAM6	VLYGPDVPTI	++
202	FANCA	GLAALAVHL	++
204	GOLGA4	KLLDLETERILL	+
205	RPGRIPI1L	RLHDENILL	+
206	EFR3A	RIAGIRGIQGV	+
208	NAA35	RLIDRIKTV	+
215	CENPE	KLQEKIQEL	+
219	MUC2	FLDEKGRCV	+
223	CDK1	VLMQDSRLYL	+++
225	TOP2A	YLYGQTTTYL	+++
228	HNRNPH1, HNRNPH2	SMSGYDQVL	+++
229	DDX11, DDX12P, LOC642846	YLLEKFVAV	+
230	WNT5A	AMSSKFFLV	+
232	LAMC2	RLLDSVSRL	++
233	LAMC2	RLDDLKMTV	++
235	TCF20	LLHEENFSV	+
236	CENPF	KMSELQTYV	++
239	KIF15	QLIEKNWLL	+++
240	RCN1	VLAPRVLRA	++
241	CCNB1	ILIDWLQVQ	+++
250	EEF2	ALCEENMRGV	+
257	CNOT1	SLADFMQEV	+

【 0 3 8 9】

実施例 3

MHC クラス I 提示ペプチドの生体外免疫原性

本発明の T U M A P の免疫原性に関する情報を得るために、本発明者らは、ペプチド／MHC 複合体および抗 C D 2 8 抗体を負荷した人工抗原提示細胞（a A P C）による C D 8 + T 細胞の反復刺激に基づく、生体外 T 細胞プライミングアッセイを用いて研究を実施した。このようにして、本発明者らは、これまでに本発明の 2 2 個の H L A - A * 0 2 0 1 拘束性 T U M A P の免疫原性を示し得て、これらのペプチドが、それに対する C D 8 +

10

20

30

40

50

前駆T細胞がヒトに存在する、T細胞エピソードであることを実証した（表10）。

【0390】

CD8+T細胞の生体外プライミング

ペプチドMHC複合体（pMHC）および抗CD28抗体を負荷した、人工抗原提示細胞による生体外刺激を実施するために、本発明者らは、最初に、告知に基づく同意後に、University clinics Mannheim, Germanyから得られた健常ドナーのCD8マイクロビーズ（Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany）を使用した正の選択を通じて、新鮮HLA-A*02白血球除去生成物からCD8+T細胞を単離した。

【0391】

PBMCおよび単離CD8+リンパ球またはPBMCは、10%熱不活性化ヒトAB血清（PAN-Biotech, Aidenbach, Germany）、100U/mlペニシリン/100μg/mlストレプトマイシン（Cambrex, Cologne, Germany）、1mMビルビン酸ナトリウム（CC Pro, Oberdorf, Germany）、20μg/mlゲンタマイシン（Cambrex）を添加した、RPMI-Glutamax（Invitrogen, Karlsruhe, Germany）からなるT細胞培地（TCM）中で、使用時まで培養した。2.5ng/mlのIL-7（PromoCell, Heidelberg, Germany）および10U/mlのIL-2（Novartis Pharma, Nurnberg, Germany）もまた、この段階でTCMに添加した。

【0392】

pMHC/抗CD28被覆ビーズの生成、T細胞刺激、および読み取りは、高度に定義された生体外システム内で、刺激条件当たり4種の異なるpMHC分子と、読み取り条件当たり8種の異なるpMHC分子を使用して実施した。

【0393】

製造会社（Perbio, Bonn, Germany）が推奨する通りにスルホーN-ヒドロキシスクシンイミドビオチンを使用して、精製共刺激マウスIgG2a抗ヒトCD28 Ab9.3（Jung et al., 1987）を化学的にビオチン化した。使用されたビーズは、直径5.6μmのストレプトアビジン被覆ポリスチレン粒子（Bangs Laboratories, Illinois, USA）であった。

【0394】

陽性および陰性対照刺激のために使用されたpMHCは、それぞれ、A*0201/M LA-001（修飾Melan-A/MART-1に由来するペプチドELAGIGILT V（配列番号266））およびA*0201/DDX5-001（DDX5に由来するYLLPAIVHI、配列番号267）であった。

【0395】

4×12.5ngの異なるビオチンpMHCの存在下で、800,000個のビーズ/200μlを96ウェルプレート内で被覆し、洗浄して、引き続いて200μlの容量中で600ngのビオチン抗CD28を添加した。5ng/mlのIL-12（PromoCell）を添加した200μlのTCM中で、1×10⁶のCD8+T細胞を2×10⁵個の洗浄被覆ビーズと、37℃で3日間にわたり同時インキュベートすることで、96ウェルプレート内で刺激を開始した。次に80U/mlのIL-2を添加した新鮮TCMで培地の半分を交換し、37℃で4日間にわたり培養を継続した。この刺激サイクルを合計3回実施した。条件当たり8種の異なるpMHC分子を使用したpMHC多量体読み取りでは、5種の異なる蛍光色素への共役を包含するわずかな修正を加えて、以前記載されたような（Andersen et al., 2012）二次元コンビナトリアルコーディングアプローチを使用した。最後に、Live/dead近赤外染料（Invitrogen, Karlsruhe, Germany）、CD8-FITC抗体クローンSK1（BD, Heidelberg, Germany）、および蛍光性pMHC多量体による細胞の染色によって多量体解析を実施した。解析では、適切なレーザーおよびフィルター

10

20

30

40

50

を装着したBD LSR II SORP血球計数器を使用した。ペプチド特異的細胞を全CD8+細胞の百分率として計算した。FlowJoソフトウェア(Tree Star, Oregon, USA)を使用して、多量体解析の評価を実施した。特異的多量体+CD8+リンパ球の生体外初回刺激は、陰性対照刺激と比較することで(b y b y)検出された。1人の健常ドナーの少なくとも1つの評価可能生体外刺激ウェルが、生体外刺激後に、特異的CD8+T細胞株を含有することが判明したら、所与の抗原の免疫原性が検出された(すなわち、このウェルは、CD8+T細胞内に少なくとも1%の特異的多量体+を含有し、特異的多量体+細胞の百分率は、陰性対照刺激の中央値の少なくとも10倍であった)。

【0396】

10

CRCペプチドの生体外免疫原性

HLAクラスIペプチドを試験するために、ペプチド特異的T細胞株の生成によって生体外免疫原性が実証され得た。本発明の1種のペプチドの、TUMAP特異的多量体染色後の例示的フローサイトメリー結果は、対応する陰性対照と共に図3に示される。本発明からの2種のペプチドの結果は、表10Aに要約される。

【0397】

表10A: 本発明のHLAクラスIペプチドの生体外免疫原性

出願人によって実施された本発明のペプチドの生体外免疫原性実験の例示的結果。<20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

【表10A】

20

配列番号	ペプチドID	ウェル	供与体
219	MUC2-001	++	+++
220	QAR-001	+++	++++

【0398】

表10B: 本発明のHLAクラスIペプチドの生体外免疫原性の追加的なデータ。

出願人によって実施された、本発明のHLA-A*02拘束性ペプチドについての生体外免疫原性実験の代表的結果である。生体外免疫原性実験の結果が示される。陽性ウェルおよびドナーの百分率(評価可能内の)は、示されるように要約される<20% = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 69 % = +++; >= 70 % = ++++

【表 10B】

配列番号	配列	ウェル陽性 [%]
1	ALIKQLFEA	"+"
2	ALLPRYFFL	"++++"
3	RLIPDTLYSV	"++++"
5	WLFDDGGLTL	"++"
7	YLTRHLAVL	"+"
9	ILDDHLSRV	"+"
10	RMYNKIFAI	"++++"
11	YLFKTFNM	"+"
19	RLYTKLLNEA	"++++"
21	VLIDHRWVL	"+"
22	GLIDEVMVL	"++"
31	LLYGKYVSV	"++"
32	KLNTETFGV	"++"
37	GLFAGLGGAGA	"+"
38	SLAPTPVSA	"+"
42	SILDDSFKL	"+"
47	KLYERCEVV	"+"
59	LLTDNVVKL	"+"
64	KTGLKLWRL	"++++"
123	KTLETSYLL	"+"
124	RVLPPSALQSV	"+"
127	RLAELTVDEFLA	"+"
132	ALLNAILHSA	"+"
133	RTFEKIEEV	"+"
136	KLFDIFSQQV	"++"
141	AVIEHLERL	"+"
142	SLVQRVETI	"+"
150	RLADLEALKV	"++"

10

20

【0399】

実施例 4

30

ペプチドの合成

Fmoc ストラテジーを使用した標準的な十分に確立された固相ペプチド合成を使用して、全てのペプチドを合成した。個々のペプチドのアイデンティティおよび純度は、質量分析および分析用 RP-HPLC によって判定された。ペプチドは、純度 > 50 % の白色から灰白色の凍結乾燥物（トリフルオロ酢酸塩）として得られた。全ての TUMAP は、好ましくはトリフルオロ酢酸塩または酢酸塩として投与され、その他の塩形態もまた可能である。

【0400】

実施例 5

MHC 結合アッセイ

40

本発明による T 細胞に基づく治療法のための候補ペプチドは、それらの MHC 結合能力（親和性）についてさらに試験された。個々のペプチド-MHC 複合体は、UV リガンド交換によって生成され、UV 感受性ペプチドは UV 照射に際して切断されて、分析される目的ペプチドで交換された。ペプチド受容性 MHC 分子と効果的に結合して安定化し得るペプチド候補のみが、MHC 複合体の分離を防止する。交換反応の収率を判定するために、安定化 MHC 複合体の軽鎖（ $\beta 2m$ ）の検出に基づく ELISA を実施した。アッセイは、Rodenko et al. (Rodenko et al., 2006) に一般的に記載されるようにして実施した。

【0401】

96 ウェル MAXISorp プレート (NUNC) を PBS 中の $2 \mu\text{g/ml}$ ストレプ

50

トアビジンにより室温で一晩被覆して4回洗浄し、ブロック緩衝液を含有する2%BSA中で37℃で1時間ブロックした。再折りたたみされたHLA-A*020102:01/MLA-001単量体が、15~500ng/mlの範囲をカバーする標準物質の役割を果たした。UV交換反応のペプチド-MHC単量体をブロック緩衝液で100倍に希釈した。サンプルを37℃で1時間インキュベートし、4回洗浄して、2μg/mlのHRP結合抗β2mと共に37℃で1時間インキュベートし、再度洗浄して、NH₂SO₄で停止させたTMB溶液で検出した。吸収は、450nmで測定された。抗体またはそれらのフラグメント、および/またはT細胞受容体またはそれらのフラグメントの生成および製造のためには、高い交換率（好ましくは50%超、最も好ましくは75%超）を示す候補ペプチドが、MHC分子に対する十分な結合活性を示してMHC複合体の分離を防止することから、一般に好ましい。

10

【0402】

表11:MHCクラスI結合スコア。HLAクラスI拘束性ペプチドとHLA-A*02:01との結合は、ペプチド交換率によって変動した: $\geq 10\%$ = +; $\geq 20\%$ = ++; $\geq 50\%$ = +++; $\geq 75\%$ = ++++; J = ホスホセリン

【表11-1】

配列番号	配列	ペプチド交換
1	ALIKQLFEA	"+++"
2	ALLPRYFFL	"++"
3	RLIPDTLYSV	"++++"
4	RLAELTVDEFL	"+++"
5	WLFDDGGLTL	"++++"
6	FLAELPGSLSL	"+++"
7	YLTRHLAVL	"++"
8	ALMLQGVDDL	"+++"
9	ILDDHLSRV	"++"
10	RMYNKIFAI	"+++"
11	YLFKTFNM	"+++"
12	ALVQGILERV	"+++"
13	FLLAEDTKV	"+++"
14	FLDKPEDVLL	"++"
15	LQLDKEFQL	"+++"
16	VLVDQSWVL	"+++"
17	ALAAARVEL	"+++"
18	FLSSLKGGLL	"+++"
19	RLYTKLLNEA	"+++"
20	YLKDGVMML	"+++"
21	VLIDHRWVL	"+++"

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

22	GLIDEVMVL	"+++"
23	FLDANGHFV	"+++"
24	VLDGVLMEI	"+++"
25	SLADRLIGV	"++++"
26	GLASKENFSNVSL	"++"
27	LLADEDSSYL	"++"
28	ALTEIQEFI	"++++"
29	QMLDVAIRV	"+++"
30	GLSSAYGGL	"+"
31	LLYGKYVSV	"+++"
32	KLNTETFGV	"++"
33	ALWEKNTHL	"+++"
34	ILLEKSVSV	"+++"
35	KLLDLTVRI	"+++"
36	GLLESPSIFNFTA	"+++"
37	GLFAGLGGAGA	"+++"
38	SLAPTPVSA	"++"
40	ALSNVIHKV	"++"
41	ILDDSFKLL	"++"
42	SILDDSFKL	"++++"
43	TLDAAPRV	"++"
44	SLESKLTSV	"+++"
45	ALAELLHGA	"+++"
46	GLDDRYSLV	"+++"
47	KLYERCEVV	"++"
48	FLDASDPAL	"++"

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

50	TLMAEMHVV	"++"
51	QVWEIQHTV	"++"
52	ALDSSNSMQTI	"++"
53	FLLGSEIKL	"++"
54	ALLNGEYLLAA	"++"
56	VLFTDEGVPKFL	"++"
57	NLLEKENYL	"++"
58	AMADKMDMSL	"++"
59	LLTDNVVKL	"++"
60	VLDEDEPRFL	"++"
61	KLLKLFQGV	"++"
62	YLAPENGYL	"++"
63	KLFSILSTV	"++"
64	KTLGKLWRL	"++"
66	GLDDGPDFL	"++"
67	SLNDLEKDVMLL	"++"
68	SILQFVHMV	"++"
69	GMLNEAEGKAIKL	"++"
70	MISELEVRL	"++"
71	RLWTEIPTAI	"++"
72	YLLDYPNNLL	"++"
73	YLFDIASVM	"++"
74	YLMGFLHAV	"++"
75	EMIENTQSV	"++"
76	YLIGEKQHYL	"++"
77	SLLKRDFGA	"++"

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

78	ALDPELLLL	"++"
79	SLAADQLLKL	"++"
80	QVDEVVDIMRV	"++"
81	ALLSQQTHL	"+++"
82	QLYEEDTKL	"++"
83	LTIEDGIFEV	"+++"
84	SMVEDITGLRL	"+++"
85	ILHDINSDGVL	"++"
86	KVFPKGISV	"++"
87	LLFDAPDLRL	"+++"
88	KLDIKVETV	"++++"
89	SLIEYEFV	"+++"
90	GLLKPGLNVVL	"+++"
91	TVDVATPSV	"+++"
92	WIDDTSAFV	"+++"
93	SLQELRLLL	"++++"
94	KSMDIVLTV	"+++"
95	AILDAHIEV	"++++"
96	KLYSRLVYV	"++"
97	ALWWGVVTV	"++"
98	AMNGKSFSV	"++"
99	KLLEVDLDTV	"+++"
100	SLDDFLATA	"+++"
101	GLSEGHTFQV	"+++"
102	KILVSLIEV	"+++"
103	FLFGYPKRL	"++"

10

20

30

40

【表 1 1 - 5】

104	ILLTIKDDTIYL	"++"
105	YALDLSTFL	"++"
106	SLISEKILL	"++"
107	ALLGGGPYML	"++"
108	SLAELVPGVGGI	"++"
109	ALDGDQMEL	"++"
110	LLGELPRLLL	"++"
112	KLQQLIYL	"++"
113	ILYDLQNL	"++"
114	TAVGHALVL	"++"
115	SLFDVSHML	"++"
116	LVYQFVHPI	"++"
117	TLQPVNSTISL	"++"
118	LLADLKMV	"++"
119	ILYQTVTGL	"++"
120	VLYEGVDEV	"++"
121	SLAPNIISQL	"++"
122	SLMGMLKL	"++"
123	KTLESYLL	"++"
124	RVLPPSALQSV	"++"
125	KLGDGFLVEL	"++++"
126	TLAKYLMEL	"++"
127	RLAELTVDEFLA	"++"
128	MLDDRAYLV	"++"
129	VLIDVLKEL	"++"
130	GLGGSQIDTHL	"++"

10

20

30

40

【表 1 1 - 6】

131	KLLDVVHPA	"++"
132	ALLNAILHSA	"+++"
133	RTFEKIEEV	"++"
134	GVAGGSILKGV	"++++"
135	KLQEEIPVL	"++"
136	KLFDIFSQQV	"+++"
137	QLTEIKPLL	"+++"
138	KQFEGTVEI	"+++"
139	VLLNEILEQV	"+++"
140	LLNEILEQV	"+++"
141	AVIEHLERL	"++++"
142	SLVQRVETI	"+++"
143	KLSDVWKEL	"+++"
144	LLNDRIWLA	"+++"
145	LLLEVVKQV	"+++"
146	ALSDETWGL	"++"
147	TLTELRAFL	"++++"
148	RLEENMTEVV	"+++"
149	YQFDKVGILTL	"+++"
150	RLADLEALKV	"+++"
151	SAQGSVSLTACKV	"+++"
152	KLLAVIHEL	"++"
153	ILFSEDSTKLFV	"+++"
154	KLPSETIFVGC	"+++"
155	RLLGEEVVRV	"+++"
156	SLMMTIINL	"++++"

10

20

30

40

【表 1 1 - 7】

157	SLIERDLKL	"+++"
158	GLLDPSVFHV	"+++"
159	VLVDDGIKVV	"++"
160	KLLEFDQLQL	"+++"
161	FLKNELDNV	"+++"
162	KLMDYIDEL	"+++"
163	RLLHEVQEL	"+++"
164	KMLDEILLQL	"++++"
165	RLLDFPEAMVL	"++++"
166	GLLEARGILGL	"+++"
167	SVIDHIHLISV	"+++"
168	GLIRFPLMTI	"+++"
169	YLAHFIEGL	"+++"
170	ALAGGITMV	"+++"
171	RLQETEGMVAV	"++"
172	LLLDVTVMQV	"+++"
173	KLGDLMVLL	"+++"
174	ILLDDNMQIRL	"++++"
175	TLLGGKEAQLGV	"+++"
176	RTLDKVLEV	"++"
177	ALLQGAIESV	"+++"
178	YLFREPATI	"++"
179	RLLJPLSSA	"+++"
181	NLFDLGGQYLRV	"+++"
182	SLNKWIFTV	"++++"
183	TLQEVVTGV	"+++"

10

20

30

40

【表 1 1 - 8】

184	SLDENNVSSYL	"+++"
185	VLYTGVRV	"+++"
186	KMSEKILL	"+++"
187	GLHNVVYGI	"+++"
188	FLVDGPRVQL	"+++"
189	AISEVIGKITA	"+++"
190	AMAEMVLQV	"+++"
191	QLFSEIHNL	"++++"

10

【0 4 0 3】

実施例 6

細胞表面に提示される腫瘍関連ペプチドの絶対定量化

抗体および／または T C R などのバインダーの生成は、骨の折れる工程であり、いくつかの選択された標的に対してのみ実施されてもよい。腫瘍関連および特異的ペプチドの場合、選択基準としては、提示の排他性および細胞表面に提示されるペプチドの密度が挙げられるが、これに限定されない。実施例 1 に記載されるペプチドの単離および相対定量に加えて、本発明者らは、特許 x (p a t e n t x) に記載されているように、細胞当たりの絶対ペプチドコピー数を分析した。固形腫瘍サンプル中の細胞当たりの T U M A P コピーの定量化は、単離された T U M A P の絶対定量化、T U M A P 単離の効率、および分析される組織サンプルの細胞計数を必要とする。本発明者らの実験的アプローチの概説は図 4 に示され、実験手順が以下に記載される。

20

【0 4 0 4】

ナノ L C - M S / M S によるペプチド定量化

質量分析によるペプチドの正確な定量化のために、内標準法を使用して各ペプチドの検量線を作成した。内標準は各ペプチドの二重同位体標識変異体であり、すなわち、2 つの同位体標識アミノ酸が T U M A P 合成に含まれた。それは、腫瘍関連ペプチドとはその質量異なるのみであるが、他の物理化学的性質に差異を示さない (A n d e r s o n e t a l . , 2 0 1 2) 。内標準を各 M S サンプルに添加して、全ての M S シグナルを内標準の M S シグナルに対して正規化し、M S 実験間の潜在的な技術的変動を平準化した。

30

【0 4 0 5】

少なくとも 3 つの異なるマトリックス中、すなわち、ルーチンの M S サンプルと同様の天然サンプルからの H L A ペプチド溶出液中で検量線を作成し、各調製物を二連の M S 試験で測定した。評価のために、M S シグナルを内標準のシグナルに対して正規化し、検量線をロジスティック回帰によって算出した。

【0 4 0 6】

組織サンプルからの腫瘍関連ペプチドの定量化のために、それぞれのサンプルにも内標準を添加し；M S シグナルを内標準に対して正規化し、ペプチド検量線を使用して定量化した。

40

【0 4 0 7】

ペプチド / M H C 単離の効率

あらゆるタンパク質精製処理と同様に、組織サンプルからのタンパク質の単離には、目的タンパク質のいくらかの損失が伴う。T U M A P 単離の効率を判定するために、絶対定量化のために選択された全ての T U M A P について、ペプチド / M H C 複合体が作製された。添加されたものを天然ペプチド / M H C 複合体から識別できるように、T U M A P の単一同位体標識バージョンが使用され、すなわち、1 つの同位体標識アミノ酸が T U M A

50

P合成に含まれた。これらの複合体は、新鮮に調製された組織溶解産物に、すなわち、TUMAP単離手順の可能な限り早い時点で添加され、次に、以下の親和性精製において、天然ペプチド／MHC複合体のように捕捉された。したがって単一標識TUMAPの回収率を測定することで、個々の天然TUMAPの単離効率に関する結論が可能になる。

【0408】

少数のサンプルで単離効率が分析され、これらの組織サンプル間で同等であった。対照的に、単離効率は個々のペプチド間で異なる。これは、単離効率が、限定数の組織サンプルにおいてのみ判定されるが、任意のその他の組織標本に外挿されてもよいことを提案する。しかしながら、単離効率がペプチドからその他のペプチドに外挿されないこともあるので、各TUMAPは個別に分析する必要がある。

10

【0409】

固体冷凍組織中の細胞数測定

絶対ペプチド定量化に供した組織サンプルの細胞数を測定するために、本発明者らは、DNA含量分析を適用した。この方法は、異なる起点の幅広いサンプルに、最も重要なことには、冷凍サンプルに適用できる (Alcose et al., 2011; Forsey and Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013)。ペプチド単離プロトコル中に、組織サンプルを均質溶解産物に処理して、それから小さな溶解産物アリコートを取り出す。アリコートを3つに分割し、それからDNAを単離する (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany)。蛍光ベースのDNA定量化アッセイ (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Germany) を使用して、少なくとも2つの反復試験において、各DNA単離からの全DNA含有量を定量化する。

20

【0410】

細胞数を計算するために、一連の定義された細胞数がある、単一健常血液細胞のアリコートから、DNA標準曲線を作成した。標準曲線を使用して、各DNA単離物からの全DNA含有量から、全細胞含有量を計算する。既知の溶解産物アリコートの容量および全溶解産物容量を考慮して、ペプチド単離のために使用された組織サンプルの平均総細胞数を外挿する。

30

【0411】

ペプチド細胞当たりコピー数

前述の実験のデータを用いて、本発明者らは、サンプルの全ペプチド量を総細胞数で除算して、それに続いて単離効率により除算することで、細胞当たりのTUMAPコピー数を算出した。選択されたペプチドの細胞コピー数は、表12に示される。

【0412】

表12: 絶対コピー数。表は、NSCLC腫瘍サンプルにおける絶対ペプチド定量化の結果を列挙する。細胞当たりコピー数の中央値が、各ペプチドについて示される: <100 = +; >=100 = ++; >=1,000 = +++; >=10,000 = ++++。評価可能な高品質MSデータが利用できるサンプル数が示される。

40

【表12】

配列番号	ペプチドコード	細胞当たりコピー数 (中央値)	サンプル数
1	ZNF-002	+	19
142	ECT2-001	+	18
22	CYP2W1-001	++	23
152	RAD54B-002	+++	6

【0413】

参考文献一覧

Allison, J. P. et al., Science 270(1995): 932-933
Andersen, R. S. et al., Nat. Protoc. 7(2012): 891-902

50

- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* 36(2006): 1805-1814
- Banchereau, J. et al., *Cell* 106(2001): 271-274
- Beatty, G. et al., *J Immunol* 166(2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* 275 (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol.57 (1995): 289-300
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16(2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Brossart, P. et al., *Blood* 90(1997): 1594-1599
- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004): 29-43 10
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 53 (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65(2004): 1211-1223
- Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* 16(2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol* 170(2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69(1972): 2110-2114
- Coligan JE et al., (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006): 2730-2738
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12(2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171(2003): 2197-2207
- Falk, K. et al., *Nature* 351(1991): 290-296 20
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001): 8809-8814
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2(1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6(2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9(1997): 905-911
- Green MR et al., 4th, (2012)
- Greenfield EA, 2nd, (2014)
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007):5829-5838
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987):4611-4615
- Kibbe AH, rd, (2000) 30
- Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484
- Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18(2012): 980-987
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162(1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
- Lundblad RL, 3rd, (2004)
- Meziere, C. et al., *J Immunol* 159(1997): 3230-3237
- Morgan, R. A. et al., *Science* 314(2006): 126-129
- Mori, M. et al., *Transplantation* 64(1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12(2006): 3435-3443 40
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7(2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999):8633-8638
- Pinheiro J et al., (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25(1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219
- Rini, B. I. et al., *Cancer* 107(2006): 67-74
- Rock, K. L. et al., *Science* 249(1990): 918-921
- Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* 1(2006): 1120-1132 50

- Saiki, R. K. et al., *Science* 239(1988): 487-491
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49(1999): 571-576
- Sherman F et al., (1986)
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 187-195
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al.,*BMC.Bioinformatics.* 9 (2008): 163
- Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62(2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., *Science* 344(2014): 641-645
- Walter, S. et al., *J Immunol* 171(2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* 18(2012): 1254-1261 10
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8(1999): 2418-2423
- Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997): 4570-4577
- Albrecht, M. et al., *FEBS Lett.* 569(2004): 18-26
- Albulescu, R., *Biomark.Med.* 7(2013): 203
- Aschauer, H. et al., *Wien.Klin.Wochenschr.* 95 (1983): 785-788
- Aung, P. P. et al.,*Oncogene* 25 (2006): 2546-2557
- Backen, A. C. et al., *Br.J Cancer* 96(2007): 1544-1548
- Bai, J. et al., *PLoS.One.* 8(2013b): e59772
- Bailey, C. M. et al., *J Cell Physiol* 209(2006): 617-624 20
- Baris, O. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* 89 (2004): 994-1005
- Becker, T. M. et al., *Mol.Cancer* 8(2009): 4
- Bie, L. et al., *PLoS.One.* 6(2011): e25631
- Bilbao-Aldaiturriaga, N. et al., *Pediatr.Blood Cancer* 62 (2015): 766-769
- Boland, A. et al.,*Nat Struct.Mol.Biol* 20 (2013):1289-1297
- Bulk, E. et al., *Int.J Cancer* 137(2015): 1306-1317
- Cao, R. et al., *Br.J Cancer* 111(2014): 539-550
- Carvalho, L. et al., *Rev Port.Pneumol.* 15 (2009): 683-696
- Chang, H. Y. et al., *PLoS.One.* 8(2013): e54117
- Chen, C. H. et al., *Oncotarget.* 5(2014a): 6300-6311 30
- Chen, Y. D. et al., *Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi.* 30 (2012): 725-729
- Chou, C. C. et al., *Expert.Rev Mol.Diagn.* 8 (2008): 179-187
- Chung, F. Y. et al., *J Surg.Oncol* 102 (2010):148-153
- Cohen, Y. et al.,*Hematology.* 19 (2014): 286-292
- Cole, C. L. et al., *J Biol Chem* 289(2014): 10488-10501
- Courson, D. S. et al., *Exp.Cell Res* 334(2015): 10-15
- Di, Maro G. et al.,*J Clin Endocrinol.Metab* 99 (2014):E1617-E1626
- Ding, K. et al.,*Med.Hypotheses* 83 (2014): 359-364
- Doherty, J. A. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 20(2011): 1873-1882 40
- Duursma, A. et al., *Mol.Cell Biol* 25(2005): 6937-6947
- Egloff, A. M. et al., *Cancer Res* 66(2006): 6-9
- Fan, C. G. et al., *Oncol Rep.* 26(2011): 1281-1286
- Fang, Y. et al.,*Cancer Biol Ther.* 15 (2014):1268-1279
- Fang, Z. et al., *J Biol Chem* 288(2013): 7918-7929
- Fang, Z. Q. et al., *Genet.Mol Res* 12(2013): 1479-1489
- Feng, B. et al., *J Gastroenterol.Hepatol.* 21 (2006): 1596-1603
- Ferreras, C. et al., *J Biol Chem* 287(2012): 36132-36146
- Fields, A. P. et al., *Adv.Enzyme Regul.* 50 (2010):190-200
- Flanagan, J. M. et al., *Mol.Cancer Ther.* 8 (2009):249-260 50

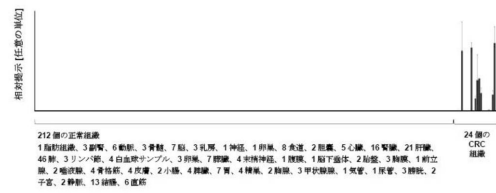
- Freed, E. F. et al., PLoS.Genet. 8(2012): e1002892
- Goldenson, B. et al., Oncogene 34(2015): 537-545
- Gomez, A. et al., Mol.Pharmacol. 78(2010): 1004-1011
- Griffin, J. N. et al., PLoS.Genet. 11(2015): e1005018
- Gutierrez-Camino, A. et al., Pediatr.Res 75 (2014): 767-773
- Ham, M. F. et al., Cancer Sci. 98(2007): 1041-1047
- Hanks, T. S. et al., Apoptosis. 17 (2012): 236-247
- Haren, N. et al., Histol.Histopathol. 25 (2010):1247-1255
- Hatabe, S. et al., Mol.Clin Oncol 1(2013): 845-850
- Hayama, S. et al., Cancer Res 67(2007): 4113-4122 10
- Hegyi, K. et al., Pathobiology 79 (2012): 314-322
- Hill, S. J. et al., Genes Dev. 28 (2014): 1957-1975
- Hiramoto, T. et al., Oncogene 18 (1999): 3422-3426
- Hu, J. et al., Pituitary. 10(2007): 47-52
- Hu, S. X. et al., Zhonghua Lao.Dong.Wei Sheng Zhi.Ye.Bing.Za Zhi. 31 (2013): 890-894
- Huff, L. P. et al., Genes Cancer 4(2013): 460-475
- Ishikawa, N. et al., Cancer Sci. 97(2006): 737-745
- Ito, K. et al., Protein Cell 2(2011): 755-763
- Jager, D. et al., Cancer Res 60(2000): 3584-3591 20
- Januchowski, R. et al., Biomed.Res Int 2014 (2014): 365867
- Jin, Y. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. 7 (2014): 8724-8731
- Jordheim, L. P. et al., Biomark.Med. 7(2013): 663-671
- Jordheim, L. P. et al., Lancet Oncol 12(2011): 693-702
- Ju, W. et al., Oncol.Res. 18(2009): 47-56
- Kanda, A. et al., Oncogene 24(2005): 7266-7272
- Kaplun, A. et al., Crit Rev Eukaryot.Gene Expr. 22(2012): 249-258
- Karlgren, M. et al., Expert.Opin.Ther.Targets. 11(2007): 61-67
- Kas, K. et al., J Biol Chem 273 (1998): 23026-23032
- Kaur, S. et al., BMC.Cell Biol 9 (2008): 61 30
- Kim, D. H., Yonsei Med.J 48 (2007): 694-700
- Kim, D. S. et al., J Proteome.Res 9(2010a): 3710-3719
- Kim, J. E. et al., J Cancer Res Clin Oncol 136 (2010b): 47-53
- Kounelakis, M. G. et al., IEEE J Biomed.Health Inform. 17 (2013): 128-135
- Lages, E. et al., PLoS.One. 6(2011): e20600
- Lallet-Daher, H. et al., Oncogene 28(2009): 1792-1806
- Landrette, S. F. et al., Blood 105(2005): 2900-2907
- Langnaese, K. et al., Cytogenet.Cell Genet. 94 (2001): 233-240
- Lee, Y. C. et al., Int.J Cancer 122(2008b): 1630-1638
- Li, B. et al., Cancer Res 61 (2001): 8014-8021 40
- Li, G. H. et al., Bioinformatics. 30(2014): 748-752
- Li, J. F. et al., Zhonghua Wei Chang Wai Ke.Za Zhi. 15 (2012): 388-391
- Li, Y. et al., PLoS.One. 8(2013): e84489
- Liu, B. et al., Int.J Clin Exp.Pathol. 7 (2014a): 3089-3100
- Liu, L. et al., Retrovirology. 8 (2011a): 94
- Liu, X. et al., Eur.J Cancer 50(2014b): 2251-2262
- Liu, Y. et al., Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 18 (2009): 204-214
- Liu, Y. et al., J Cancer 6(2015b): 643-651
- Lonardo, F. et al., Curr.Pharm.Des 16(2010): 1877-1881
- Lu, X. et al., Mol.Cancer Ther. 3 (2004): 861-872 50

- Maass, N. et al., *Acta Oncol* 39 (2000): 931-934
- Marchi, S. et al., *Cell Death.Dis.* 3(2012): e304
- Marioni, G. et al., *Acta Otolaryngol.* 129(2009): 476-480
- Marnef, A. et al., *Int.J Biochem.Cell Biol* 41 (2009): 977-981
- Martin, L. et al., *Oncogene* 31(2012): 4076-4084
- Mason, J. M. et al., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015): 3180-3196
- Matsuda, R. et al., *Br.J Cancer* 104 (2011): 376-386
- Medina, P. P. et al., *Epigenetics.* 3 (2008): 64-68
- Mound, A. et al., *Eur.J Cancer* 49(2013): 3738-3751
- Naidu, S. R. et al., *Oncogene* 28(2009): 2492-2501 10
- Ng, Y. et al., *J Biol Chem* 279(2004): 34156-34164
- Nibbe, R. K. et al., *Mol Cell Proteomics.* 8 (2009): 827-845
- Nishida, C. R. et al., *Mol.Pharmacol.* 78(2010): 497-502
- O'Geen, H. et al., *PLoS.Genet.* 3(2007): e89
- Ota, T. et al., *Cancer Res* 62(2002): 5168-5177
- Paliouras, M. et al., *Tumour.Biol* 29(2008): 63-75
- Papageorgio, C. et al., *Int.J Oncol.* 31 (2007):1205-1211
- Papageorgis, P. et al., *Cancer Res* 70(2010): 968-978
- Pohl, A. et al., *Pharmacogenomics.J* 11(2011): 93-99
- Pollari, S. et al., *Mol.Cancer Res* 10 (2012): 597-604 20
- Qi, F. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 8(2015): 1666-1673
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Reisman, D. N. et al., *Cancer Res* 63 (2003): 560-566
- Robles, L. D. et al., *J Biol Chem* 277 (2002):25431-25438
- Ryu, B. et al., *PLoS.One.* 2 (2007): e594
- Sager, R. et al., *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 213 (Pt 1) (1996): 51-64
- Sakakura, C. et al., *Anticancer Res* 23(2003): 3691-3697
- Sakurai, Y. et al., *Mol.Pharm.* 11(2014): 2713-2719
- Sakurikar, N. et al., *J Biol Chem* 287(2012): 39193-39204 30
- Sheng, S., *Front Biosci.* 9(2004): 2733-2745
- Shibao, K. et al., *Cell Calcium* 48(2010): 315-323
- Shu, G. S. et al., *Cancer Biomark.* 11(2012): 107-114
- Stone, B. et al., *Gene* 267(2001): 173-182
- Strekalova, E. et al., *Clin.Cancer Res.* (2015)
- Stutzer, I. et al., *J Biol Chem* 288(2013): 10536-10547
- Su, K. C. et al., *Dev.Cell* 21(2011): 1104-1115
- Sun, Y. et al., *Oncotarget.* 6 (2015b): 8244-8254
- Takashima, S. et al., *Tumour.Biol.* 35(2014): 4257-4265
- Tatsuka, M. et al., *Cancer Res* 58(1998): 4811-4816 40
- Tsui, K. H. et al., *Sci.Rep.* 5(2015): 12870
- Van Ginkel, P. R. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1448 (1998): 290-297
- Vanaja, D. K. et al., *Clin Cancer Res* 12(2006): 1128-1136
- Wang, G. et al., *Oncogene* 35(2016): 651-661
- Wang, G. et al., *Tumour.Biol* 36(2015a): 1055-1065
- Wang, Q. et al., *PLoS.One.* 8(2013d): e70191
- Wang, W. et al., *Int.J Cancer* 124(2009b): 521-530
- Wang, W. X. et al., *Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* 40 (2009c): 857-860
- Wierinckx, A. et al., *Endocr.Relat Cancer* 14 (2007): 887-900
- Williams, K. A. et al., *PLoS.Genet.* 10(2014): e1004809 50

- Wu, M. X., Apoptosis. 8 (2003):11-18
- Wu, M. X. et al., Expert.Opin.Ther.Targets. 17 (2013): 593-606
- Wu, S. et al., Cell Cycle 13(2014a): 2869-2878
- Wu, Z. et al., Neoplasia. 11(2009): 66-76
- Xu, F. et al., Biochem.J 416(2008): 15-26
- Yang, J. et al., Surg.Oncol 22(2013): e53-e57
- Yang, L. et al., Cancer Res 71(2011a): 5558-5568
- Yang, L. et al., Future.Oncol 8(2012): 431-440
- Yang, X. et al., Biomed.Pharmacother. 67(2013): 681-684
- Yang, Y. S. et al., Lung Cancer 74(2011b): 12-24 10
- Yousef, G. M. et al., Tumour.Biol 26(2005): 227-235
- Yu, B. et al., Exp.Cell Res 315(2009): 3086-3098
- Zhang, F. et al., J Viral Hepat. 21 (2014a):241-250
- Zhang, K. et al., Tumour.Biol 35(2014e): 7669-7673
- Zhang, M. et al., Zhong.Nan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban. 36 (2011a): 274-276
- Zhang, Y. et al., Cancer Sci. 101(2010): 934-940
- Zheng, G. et al., Biochem.Biophys.Res Commun. 364 (2007): 344-350
- Follenzi A,etal. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):217-22.
- Zufferey R, etal. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92. 20
- Scholten KB, etal. Clin Immunol. 2006 May;119(2):135-45.
- Gustafsson C, et al. TrendsBiotechnol. 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
- Kuball, J., et al. (2007). Blood109, 2331–2338.
- Schmitt, T. M., et al. (2009). Hum. Gene Ther. 20, 1240–1248

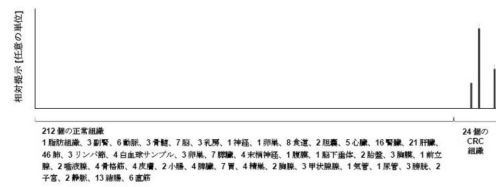
【図 1 A】

図 1A
ペプチド: ALIKQLFEA (A*02) 配列番号: 1



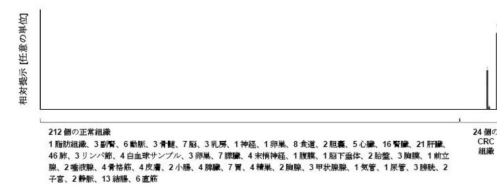
【図 1 B】

図 1B
ペプチド: KQFEGTVEI (A*02) 配列番号: 138



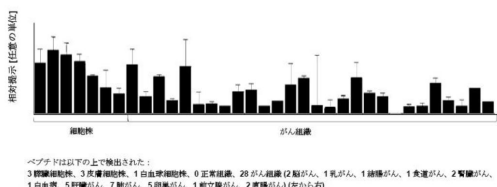
【図 1 C】

図 1C
ペプチド: KLAVALIAA (A*02) 配列番号: 210



【図 1 D】

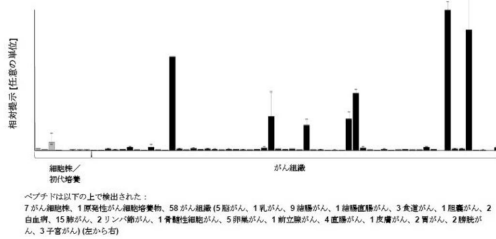
図 1D
ペプチド: LLYGKYVSV (A*02) 配列番号: 31



ペプチドは以下の上で検出された:
3 脾臓細胞, 3 赤血球細胞, 1 白血球細胞, 0 正常組織, 28 がん組織 (2 脳がん, 1 乳がん, 1 結核がん, 1 食道がん, 2 腎臓がん, 1 白血球, 5 肝臓がん, 7 肺がん, 5 脾臓がん, 1 前立腺がん, 2 直腸がん) (左から右)

【図 1 E】

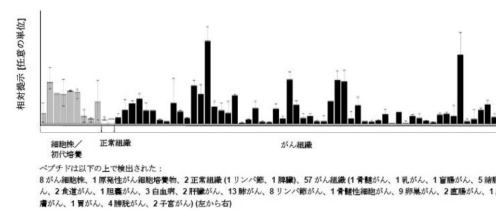
図 1E
ペプチド: ALIKQLFEA (A*02)
配列番号: 1



ペプチドは以下の上で検出された:
7 がん細胞, 1 脾臓がん細胞, 58 がん組織 (5 脳がん, 1 乳がん, 9 結核がん, 1 脾臓がん, 3 食道がん, 1 胆嚢がん, 2 白血球, 15 肺がん, 2 リンパ節がん, 1 骨髄がん, 5 脾臓がん, 1 前立腺がん, 4 直腸がん, 1 皮膚がん, 2 胃がん, 2 膀胱がん, 3 子宮がん) (左から右)

【図 1 F】

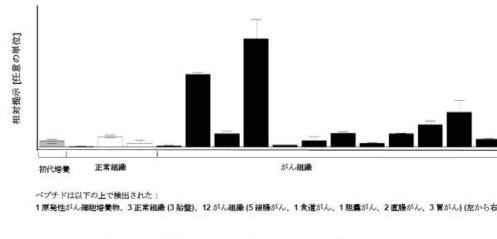
図 1F
ペプチド: FLAELPGSLSL (A*02)
配列番号: 6



ペプチドは以下の上で検出された:
8 がん細胞, 1 脾臓がん細胞, 2 正常組織 (1 リンパ節, 1 脾臓), 57 がん組織 (1 骨髄がん, 1 乳がん, 1 胃がん, 5 結核がん, 2 食道がん, 1 胆嚢がん, 13 肺がん, 8 リンパ節がん, 1 骨髄がん, 9 脾臓がん, 2 直腸がん, 1 皮膚がん, 1 胃がん, 4 膀胱がん, 2 子宮がん) (左から右)

【図 1 G】

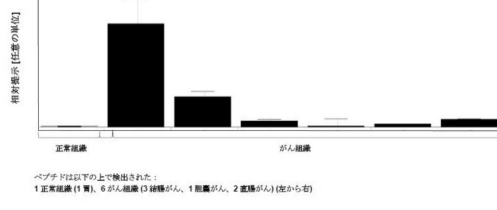
図 1G
ペプチド: FLDANGHFV (A*02)
配列番号: 23



ペプチドは以下の上で検出された:
1 脾臓がん細胞, 3 正常組織 (2 胎盤), 12 がん組織 (5 結核がん, 1 食道がん, 1 胆嚢がん, 2 直腸がん, 3 胃がん) (左から右)

【図 1 H】

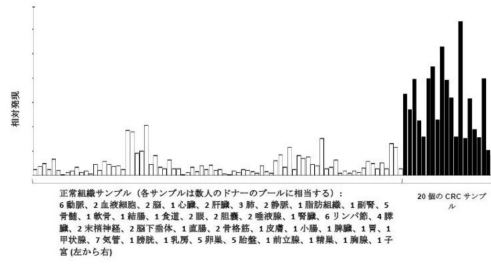
図 1H
ペプチド: GLIDEVMVL (A*02)
配列番号: 22



ペプチドは以下の上で検出された:
1 正常組織 (1 胃), 6 がん組織 (3 結核がん, 1 胆嚢がん, 2 直腸がん) (左から右)

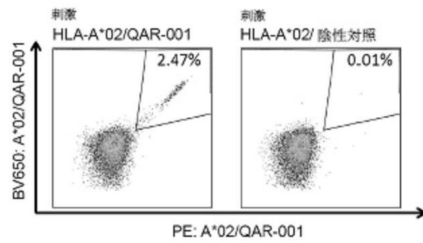
【図 2 D】

図 2D
遺伝子: ECT2
(ペプチド: SLVQRVETI, 配列番号: 142)



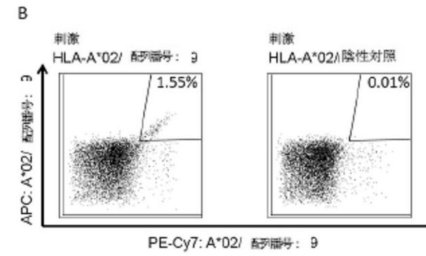
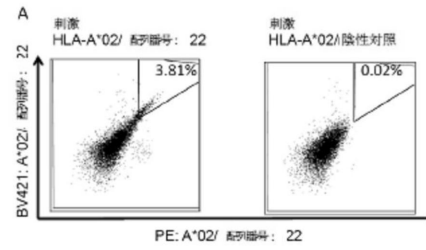
【図 3】

図 3



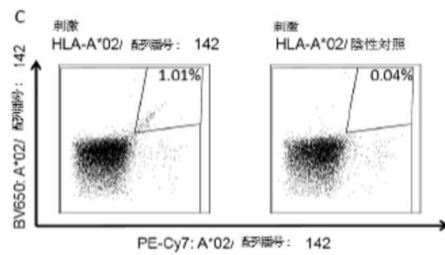
【図 4 - 1】

図 4



【図 4 - 2】

図 4 (続き)



【配列表】

0006985153000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/6851	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851 Z
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
A 6 1 K	35/15	(2015.01)	A 6 1 K	35/15 Z
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K	38/08
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 K	35/761	(2015.01)	A 6 1 K	35/761
A 6 1 K	35/763	(2015.01)	A 6 1 K	35/763
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17 Z
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 E
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
C 1 2 P	21/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
			C 1 2 P	21/00 C

前置審査

- (72)発明者 ヴィーベ, アニタ
ドイツ, 7 2 1 2 4 リュープガルテン, クヴェレンシュトラッセ 4 9
- (72)発明者 フリッチェ, イェンス
ドイツ, 7 2 1 4 4 ドゥスリンゲン, レルヒェンヴェーク 1 1
- (72)発明者 シン, ハーブリート
アメリカ, テキサス州 7 7 0 0 5, ヒューストン, 5 1 2 2 モーニングサイド ドライブ エ
ーピーティー. 5 2 5
- (72)発明者 スホール, オリバー
ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, アイヒハルデンシュトラッセ 1 9

審査官 佐久 敬

- (56)参考文献 特開2006-166789 (JP, A)
国際公開第2015/018805 (WO, A1)
特表2012-504393 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N
C 0 7 K
A 6 1 K
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq