

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-511799

(P2024-511799A)

(43)公表日 令和6年3月15日(2024.3.15)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6827(2018.01)	C 1 2 Q 1/6827	Z Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/6886(2018.01)	C 1 2 Q 1/6886	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全57頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-559016(P2023-559016)	(71)出願人	509263168
(86)(22)出願日	令和4年3月26日(2022.3.26)		ザ・トランスレーショナル・ジェノミク
(85)翻訳文提出日	令和5年11月21日(2023.11.21)		ス・リサーチ・インスティテュート
(86)国際出願番号	PCT/US2022/022074		アメリカ合衆国アリゾナ州85004,
(87)国際公開番号	WO2022/204583		フェニックス, ノース・フィフス・スト
(87)国際公開日	令和4年9月29日(2022.9.29)		リート 445, スイート 600
(31)優先権主張番号	63/166,697	(74)代理人	100118902
(32)優先日	令和3年3月26日(2021.3.26)		弁理士 山本 修
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100196508
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 松尾 淳一
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100157923
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 鶴喰 寿孝
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(72)発明者	シャルマ, スニール
	最終頁に続く		最終頁に続く

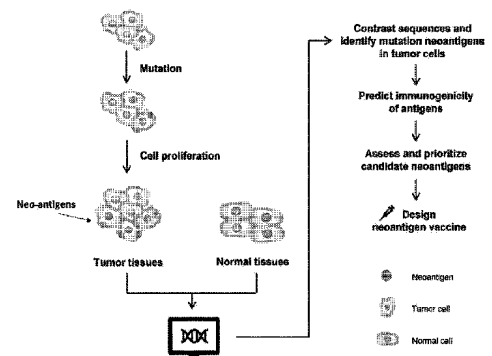
(54)【発明の名称】 ネオアンチゲンワクチンのための方法および化合物

(57)【要約】

本開示は、がんなどの疾患を有する対象を処置するための化合物および方法を含む。処置方法は、腫瘍ネオアンチゲンに対応する1つもしくは複数のペプチドの治療的有効量を患者に投与する工程または各々が腫瘍ネオアンチゲンに対応するペプチドをコードする核酸配列を有する1つもしくは複数のオリゴヌクレオチドの治療的有効量を患者に投与する工程を含む。腫瘍ネオアンチゲンは、患者の腫瘍細胞における患者特有の腫瘍突然変異から同定され得る。

【選択図】図1

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者におけるがんを処置する方法であって、

患者から切除された腫瘍から腫瘍細胞を得る工程と；

腫瘍細胞内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍 DNA および／または RNA ならびに正常 DNA および／または RNA のゲノム分析により検出する工程と；

患者の遺伝子型に対応するヒト白血球抗原（HLA）タンパク質またはその断片との特異的結合を示す、体細胞突然変異に由来するネオアンチゲンを同定する工程と；

ネオアンチゲンに基づいて 1 つまたは複数のペプチドを生成する工程と；

1 つまたは複数のペプチドの治療的有効量を患者に投与する工程と

を含む方法。

10

【請求項 2】

複数の患者特有の腫瘍突然変異を検出する工程が、標的遺伝子パネルの次世代配列決定によるゲノムプロファイリングを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ゲノムプロファイリングが、全ゲノムプロファイリング、全エクソームプロファイリング、および／またはトランスクリプトームプロファイリングを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ゲノム分析が、発現される遺伝子内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍試料および正常試料の核酸配列決定によって同定する工程を含み、突然変異が、患者のがん細胞のゲノム内に存在するが、対象由来の正常細胞内に存在しない、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

複数の患者特有の腫瘍突然変異が、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異、挿入、欠失、またはそれらの組合せを含み；

複数の患者特有の腫瘍突然変異が、野生型ポリペプチドよりも大きい親和性で HLA タンパク質またはその断片に結合する腫瘍特異的ネオエピトープを有する少なくとも 1 つの突然変異ポリペプチドをコードする、

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

患者の主要組織適合性複合体（MHC）クラス 1 および 2 遺伝子型を同定する工程をさらに含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

患者の MHC クラス 1 および 2 遺伝子型を同定する工程が、腫瘍および／または正常組織からの全エクソーム配列決定（WES）および／または RNA 配列決定の分析を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ネオアンチゲンを同定する工程が、

（i）ペプチド構築物のライブラリを提供する工程であって、

ライブラリの各ペプチド構築物が、ペプチド部分、およびペプチド部分を同定する同定核酸部分を含み、

ペプチド構築物のうちの少なくとも 1 つのペプチド部分が、HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できる、工程と；

（ii）HLA タンパク質またはその断片を、ペプチド構築物のライブラリと接触させる工程と；

（iii）HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できるペプチド部分を含む少なくとも 1 つのペプチド構築物を、HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できないペプチド部分を含むペプチド構築物から分離する工程と；

40

50

(i v) H L Aタンパク質またはその断片に特異的に結合できる少なくとも1つのペプチド構築物の同定核酸部分の全てまたは一部を配列決定する工程とを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

ペプチド構築物のライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測し、サイレント突然変異および非コード領域内の突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

バリエーションペプチドが、対応するタンパク質の構造に影響を与えると予測される突然変異を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

ネオアンチゲンを同定する工程が、

(i) ポリペプチドの遺伝的にコードされるコンビナトリアルライブラリを、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、バイシストロン性DNAディスプレイ、P2A DNAディスプレイ、CISディスプレイ、酵母ディスプレイ、または細菌ディスプレイにより生成する工程であって、コンビナトリアルライブラリが、ポリペプチドをコードする対応する核酸分子に連結されたポリペプチドを含む、工程と；

(i i) コンビナトリアルライブラリを、H L Aタンパク質またはその断片と接触させる工程と；

(i i i) コンビナトリアルライブラリとの特異的結合を示すH L Aタンパク質またはその断片を分離する工程と；

(i v) H L Aタンパク質またはその断片に結合したコンビナトリアルライブラリの核酸分子の全てまたは一部を配列決定して、ネオアンチゲンを同定する工程とを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

ポリペプチドのコンビナトリアルライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測し、サイレント突然変異および非コード領域内の突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

バリエーションペプチドが、対応するタンパク質の構造に影響を与えることが予測される突然変異を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

1つまたは複数のペプチドの治療的有効量と同時にアジュバントを患者に投与する工程をさらに含む、請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

1つまたは複数のペプチドを患者に投与する工程が、静脈内、腹膜内、皮下、筋肉内、または腫瘍内である、請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

ネオアンチゲンと、H L Aタンパク質またはその断片との間の特異的結合が、

(i)

MHCクラスII α 鎖の少なくとも一部およびMHCクラスII β 鎖の少なくとも一部を、MHCクラスII α 鎖およびMHCクラスII β 鎖がペプチド結合グループを形成するように含むMHCクラスII構成要素；ならびに

スペースホルダー分子および第1のプロセッシング可能リンカーをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子により形質転換した細胞を培養する工程であって、スペースホルダー分子が、プロセッシング可能リンカーによってMHCクラスII構成要素に連結され、スペースホルダー分子がペプチド結合グループ内で結合することによって、ペプチド結合グループ内の他のあらゆるペプチドの結合を妨害

10

20

30

40

50

し；培養する工程が、MHCクラスII構成要素を生成するように行われる、工程と；

(ii) MHCクラスII構成要素を回収する工程と；

(iii) プロセッシング可能リンカーをプロセッシングすることによって、スペースホルダー分子をペプチド結合グループから放出する工程と；

(iv) MHCクラスII構成要素をネオアンチゲンの存在下でインキュベートする工程であって、インキュベーションが、ペプチド結合グループへのネオアンチゲンの結合を促進する工程と；

(v) ネオアンチゲンに結合したMHCクラスII構成要素を回収する工程とによって判定される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

スペースホルダー分子が、コンセンサス配列AAXAAAAAXAA（配列番号30）を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

スペースホルダー分子が、PVSKMRMATPLLMQA（配列番号25）；AAMAAAAAAMA（配列番号26）；AAMAAAAA（配列番号27）；AAFAAAAAA（配列番号28）；およびASMSAASASMAA（配列番号29）からなる群から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

プロセッシング可能リンカーが、MHCクラスII構成要素のMHCクラスII α 鎖に連結されている、請求項16～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

ネオアンチゲンが結合したMHCクラスII構成要素を回収する工程が、MHCクラスII構成要素を認識する抗体によるアフィニティクロマトグラフィーを含む、請求項17～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

ネオアンチゲンと、HLAタンパク質またはその断片との間の特異的結合が、ファージディスプレイによって判定され、HLAタンパク質またはその断片が、ファージの表面上で発現され、そしてネオアンチゲンをファージとインキュベートして、特異的結合をアッセイする、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

ネオアンチゲンと、MHCクラスIタンパク質またはその断片との間の特異的結合を判定するインシリコ分析をさらに含み、インシリコ分析が、ネオアンチゲンのペプチド配列に基づいて、MHC Iタンパク質への相対結合を予測する計算アルゴリズムを使用する工程を含む、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

疾患を有する患者を処置する方法であって、

患者から切除された腫瘍から腫瘍細胞を得る工程と；

腫瘍細胞内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍DNAおよび／またはRNAならびに正常DNAおよび／またはRNAのゲノム分析により検出する工程と；

患者の遺伝子型に対応するヒト白血球抗原（HLA）タンパク質またはその断片との特異的結合を示す、体細胞突然変異に由来するネオアンチゲンを同定する工程と；

ネオアンチゲンに基づいてペプチドを設計する工程と；

ペプチドをコードする核酸配列を生成する工程と；

ペプチドをコードする核酸配列を有するオリゴヌクレオチドの治療的有効量を患者に投与する工程と

を含む方法。

【請求項24】

複数の患者特有の腫瘍突然変異を検出する工程が、標的遺伝子パネルの次世代配列決定によるゲノムプロファイリングを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

10

20

30

40

50

ゲノムプロファイリングが、全ゲノムプロファイリング、全エクソームプロファイリング、および／またはトランスクリプトームプロファイリングを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

ゲノム分析が、発現される遺伝子内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍試料および正常試料の核酸配列決定によって同定する工程を含み、突然変異が、患者のがん細胞のゲノム内に存在するが、対象由来の正常細胞内に存在しない、請求項 23～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

複数の患者特有の腫瘍突然変異が、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異、挿入、欠失、またはそれらの組合せを含み；

複数の患者特有の腫瘍突然変異が、野生型ポリペプチドよりも大きい親和性で HLA タンパク質またはその断片に結合する腫瘍特異的ネオエピトープを有する少なくとも 1 つの突然変異ポリペプチドをコードする、

請求項 23～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

患者の主要組織適合性複合体 (MHC) クラス 1 および 2 遺伝子型を同定する工程をさらに含む、請求項 23～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

患者の MHC クラス 1 および 2 遺伝子型を同定する工程が、腫瘍および／または正常組織からの全エクソーム配列決定 (WES) および／または RNA 配列決定の分析を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

ネオアンチゲンを同定する工程が、

(i) ペプチド構築物のライブラリを提供する工程であって、

ライブラリの各ペプチド構築物が、ペプチド部分、およびペプチド部分を同定する同定核酸部分を含み、

ペプチド構築物のうちの少なくとも 1 つのペプチド部分が、HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できる、工程と；

(ii) HLA タンパク質またはその断片を、ペプチド構築物のライブラリと接触させる工程と；

(iii) HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できるペプチド部分を含む少なくとも 1 つのペプチド構築物を、HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できないペプチド部分を含むペプチド構築物から分離する工程と；

(iv) HLA タンパク質またはその断片に特異的に結合できる少なくとも 1 つのペプチド構築物の同定核酸部分の全てまたは一部を配列決定する工程とを含む、請求項 23～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

ペプチド構築物のライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測し、サイレント突然変異および非コード領域内の突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

バリエーションペプチドが、対応するタンパク質の構造に影響を与えると予測される突然変異を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

患者におけるがんを処置する方法であって、

患者から切除された腫瘍から腫瘍細胞を得る工程と；

腫瘍細胞内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍 DNA および／または

10

20

30

40

50

R N Aならびに正常D N Aおよび／またはR N Aのゲノム分析により検出する工程と；

患者の遺伝子型に対応するヒト白血球抗原（H L A）タンパク質またはその断片との特異的結合を示す、体細胞突然変異に由来するネオアンチゲンを同定する工程と；

ネオアンチゲンに基づいて1つまたは複数のペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含むメッセンジャーリボ核酸（m R N A）ポリヌクレオチドを生成する工程と；

m R N Aポリヌクレオチドの治療的有効量を患者に投与する工程とを含む方法。

【請求項34】

m R N Aポリヌクレオチドが、少なくとも1つの化学修飾を含む、請求項33に記載の方法。

10

【請求項35】

化学修飾が、プソイドウリジン、N 1－メチルプソイドウリジン、N 1－エチルプソイドウリジン、2－チオウリジン、4’－チオウリジン、5－メチルシトシン、5－メチルウリジン、2－チオ－1－メチル－1－デアザ－プソイドウリジン、2－チオ－1－メチル－プソイドウリジン、2－チオ－5－アザ－ウリジン、2－チオ－ジヒドロプソイドウリジン、2－チオ－ジヒドロウリジン、2－チオ－プソイドウリジン、4－メトキシ－2－チオ－プソイドウリジン、4－メトキシ－プソイドウリジン、4－チオ－1－メチル－プソイドウリジン、4－チオ－プソイドウリジン、5－アザ－ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、5－メトキシウリジンおよび2’－O－メチルウリジンから選択される、請求項34に記載の方法。

20

【請求項36】

化学修飾が、ウラシルの炭素5位にある、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

化学修飾が、N 1－メチルプソイドウリジンまたはN 1－エチルプソイドウリジンである、請求項35に記載の方法。

【請求項38】

オープンリーディングフレーム内のウラシルの少なくとも80％が、化学修飾を有する、請求項33～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

30

m R N Aポリヌクレオチドが、5’末端キャップをさらにコードする、請求項33～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

5’末端キャップが、7 m G（5’）p p p（5’）N l m p N pである、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

複数の患者特有の腫瘍突然変異を検出する工程が、標的遺伝子パネルの次世代配列決定によるゲノムプロファイリングを含む、請求項33～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

ゲノムプロファイリングが、全ゲノムプロファイリング、全エクソームプロファイリング、および／またはトランスクリプトームプロファイリングを含む、請求項41に記載の方法。

40

【請求項43】

ゲノム分析が、発現される遺伝子内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍試料および正常試料の核酸配列決定によって同定する工程を含み、突然変異が、患者のがん細胞のゲノム内に存在するが、対象由来の正常細胞内に存在しない、請求項33～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

複数の患者特有の腫瘍突然変異が、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異、挿入、欠失、またはそれら

50

の組合せを含み；

複数の患者特有の腫瘍突然変異が、野生型ポリペプチドよりも大きい親和性でHLAタンパク質またはその断片に結合する腫瘍特異的ネオエピトープを有する少なくとも1つの突然変異ポリペプチドをコードする、
請求項33～43のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

患者の主要組織適合性複合体（MHC）クラス1および2遺伝子型を同定する工程をさらに含む、請求項33～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

患者のMHCクラス1および2遺伝子型を同定する工程が、腫瘍および／または正常組織からの全エクソーム配列決定（WES）および／またはRNA配列決定の分析を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

ネオアンチゲンを同定する工程が、

（i）ペプチド構築物のライブラリを提供する工程であって、

ライブラリの各ペプチド構築物が、ペプチド部分、およびペプチド部分を同定する同定核酸部分を含み、

ペプチド構築物のうちの少なくとも1つのペプチド部分が、HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できる、工程と；

（ii）HLAタンパク質またはその断片を、ペプチド構築物のライブラリと接触させる工程と；

（iii）HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できるペプチド部分を含む少なくとも1つのペプチド構築物を、HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できないペプチド部分を含むペプチド構築物から分離する工程と；

（iv）HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できる少なくとも1つのペプチド構築物の同定核酸部分の全てまたは一部を配列決定する工程とを含む、請求項33～46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項48】

ペプチド構築物のライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測し、サイレント突然変異および非コード領域内の突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

バリエーションペプチドが、対応するタンパク質の構造に影響を与えると予測される突然変異を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

ネオアンチゲンを同定する工程が、

（i）ポリペプチドの遺伝的にコードされるコンビナトリアルライブラリを、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、バイシストロン性DNAディスプレイ、P2A DNAディスプレイ、CISディスプレイ、酵母ディスプレイ、または細菌ディスプレイにより生成する工程であって、コンビナトリアルライブラリが、ポリペプチドをコードする対応する核酸分子に連結されたポリペプチドを含む、工程と；

（ii）コンビナトリアルライブラリを、HLAタンパク質またはその断片と接触させる工程と；

（iii）コンビナトリアルライブラリとの特異的結合を示すHLAタンパク質またはその断片を分離する工程と；

（iv）HLAタンパク質またはその断片に結合したコンビナトリアルライブラリの核酸分子の全てまたは一部を配列決定して、ネオアンチゲンを同定する工程とを含む、請求項33～46のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

ポリペプチドのコンビナトリアルライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測し、サイレント突然変異および非コード領域内の突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

バリエーションペプチドが、対応するタンパク質の構造に影響を与えることが予測される突然変異を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

mRNA ポリヌクレオチドを患者に投与する工程が、静脈内、腹膜内、皮下、筋肉内、または腫瘍内である、請求項 3 3 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5 4】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療用集団の有効量を投与する工程をさらに含む、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

TIL の治療用集団が、ペプチドまたは mRNA ポリヌクレオチドと同時に、または連続して投与される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

TIL の治療用集団が、ペプチドによって提示されたまたは mRNA ポリヌクレオチドによってコードされた少なくとも 1 つのネオアンチゲンによって活性化および／または教育されている、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。 20

【請求項 5 7】

TIL の治療用集団と共にペプチドまたは mRNA ポリヌクレオチドを投与する工程が、患者における免疫原性応答および／または抗腫瘍活性を増強する、請求項 5 4 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 3 月 26 日出願の米国仮特許出願第 63 / 166, 697 号明細書の利益を主張し、この出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。 30

【0002】

電子的に提出された配列表の参照

配列表の公式コピーが、2022 年 3 月 25 日に作成されて、7, 379 バイトのサイズを有するファイル名「91482-255WO-PCT_Sequence_Listing.txt」の ASCII フォーマット配列表として、EFS-Web を介して電子的に提出されて、本明細書と同時に出願される。この ASCII フォーマット文献に含有される配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、新規タンパク質およびそれを調製するための方法ならびに例えばがんを処置するための治療剤または予防剤としての使用に関する。 40

【背景技術】

【0004】

がんは、身体の様々な部分に広がる可能性がある異常な細胞成長を伴う疾患の群である。数百種類のがんがヒトに影響を及ぼし、数百万人が診断されており、毎年さらに数百万人が診断されている。最も一般的な種類のがんには、とりわけ、肺がん、乳がん、前立腺がん、結腸直腸がんが含まれる。がんの治療には、手術、放射線療法、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、および幹細胞置換が含まれる。処置の選択肢は侵襲的であり、様々な望ましくない副作用を伴う可能性がある。 50

【0005】

したがって、科学界はこの分野で進歩を遂げているが、当該技術分野ではがんの予防および治療のための改良された化合物および方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

がんを含む疾患の処置のための治療戦略に対する必要性が存在している。抗腫瘍免疫応答を能動的に駆動するために、治療用がんワクチンが開発されている。感染症を処置するために予防的に使用される予防ワクチンとは異なり、治療用ワクチンは、特定の腫瘍関連抗原に対する免疫応答を刺激することによって、確立されたがんを処置するように設計されている。能動免疫療法の利点は、免疫応答の先天性および適応性アームの両方に関与することによって長期にわたる抗がん活性を提供する潜在性があることである。ネオアンチゲンは、体細胞突然変異によって形成される新規の配列の主要組織適合性複合体（MHC）提示ペプチドであり、とりわけ有望な免疫療法標的を表す。なぜなら、腫瘍上で排他的に出現することで、最小オフターゲット効果を引き起こすからである。

10

【0007】

本発明は、患者におけるがんを処置するための方法を提供する。処置方法は、腫瘍ネオアンチゲンに対応する1つもしくは複数のペプチドの治療的有効量を患者に投与する工程または各々が腫瘍ネオアンチゲンに対応するペプチドをコードする核酸配列を有する1つもしくは複数のオリゴヌクレオチドの治療的有効量を患者に投与する工程を含むことができる。ネオアンチゲンは、患者の腫瘍細胞内の患者特有の腫瘍突然変異から同定され得る。

20

【0008】

様々な実施形態によれば、方法は、（a）患者から切除された腫瘍から腫瘍細胞を得る工程と；（b）腫瘍細胞内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍DNAおよび／またはRNAならびに正常DNAおよび／またはRNAのゲノム分析により検出する工程と；（c）患者の遺伝子型に対応するヒト白血球抗原（HLA）タンパク質またはその断片との特異的結合を示す、体細胞突然変異に由来するネオアンチゲンを同定する工程と；（d）腫瘍ネオアンチゲンに対応するペプチド（「ネオアンチゲンペプチド」）の治療的有効量を患者に投与する工程とを含むことができる。アジュバントが、ネオアンチゲンペプチドと同時に患者に投与されてもよい。

30

【0009】

他の実施形態によれば、方法は、（a）患者から切除された腫瘍から腫瘍細胞を得る工程と；（b）腫瘍細胞内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍DNAおよび／またはRNAならびに正常DNAおよび／またはRNAのゲノム分析により検出する工程と；（c）患者の遺伝子型に対応するヒト白血球抗原（HLA）タンパク質またはその断片との特異的結合を示す、体細胞突然変異に由来するネオアンチゲンを同定する工程と；（d）ネオアンチゲンに基づいてペプチドを設計する工程と；（e）ペプチドをコードする核酸配列を生成する工程と；（f）ペプチドをコードする核酸配列を有するオリゴヌクレオチドの治療的有効量を患者に投与する工程とを含むことができる。

【0010】

ある特定の態様では、複数の患者特有の腫瘍突然変異を検出する工程は、標的遺伝子パネルの次世代配列決定によるゲノムプロファイリングを含むことができる。一態様において、ゲノムプロファイリングが、全ゲノムプロファイリング、全エクソームプロファイリング、および／またはトランスクリプトームプロファイリングを含む。

40

【0011】

他の態様において、ゲノム分析が、発現される遺伝子内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍試料および正常試料の核酸配列決定によって同定する工程を含むことができ、突然変異が、患者のがん細胞のゲノム内に存在するが、対象由来の正常細胞内に存在しない。

【0012】

50

さらに他の態様において、複数の患者特有の腫瘍突然変異が、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異、遺伝子融合突然変異、挿入、欠失、またはそれらの組合せを含むことができ；複数の患者特有の腫瘍突然変異が、野生型ポリペプチドよりも大きい親和性で、HLAタンパク質またはその断片に結合する腫瘍特異的ネオエピトープを有する少なくとも1つの突然変異ポリペプチドをコードする。

【0013】

一部の態様では、方法は、患者のMHCクラス1および2遺伝子型を同定する工程をさらに含むことができる。一態様において、患者のMHCクラス1および2遺伝子型を同定する工程が、腫瘍および／または正常組織からの全エクソーム配列決定（WES）および／またはRNA配列決定の分析を含む。

10

【0014】

特定の態様において、ネオアンチゲンを同定する工程が、（i）ペプチド構築物のライブラリを提供する工程であって、ライブラリの各ペプチド構築物が、ペプチド部分、およびペプチド部分を同定する同定核酸部分を含み、ペプチド構築物の少なくとも1つのペプチド部分が、HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できる、工程と；（ii）HLAタンパク質またはその断片を、ペプチド構築物のライブラリと接触させる工程と；（iii）HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できるペプチド部分を含む少なくとも1つのペプチド構築物を、HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できないペプチド部分を含むペプチド構築物から分離する工程と；（iv）HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できる少なくとも1つのペプチド構築物の同定核酸部分の全てまたは一部を配列決定する工程とを含むことができる。

20

【0015】

一部の態様において、ペプチド構築物のライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測して、非コード領域内のサイレント突然変異および突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含むことができる。一態様において、バリエーションペプチドが、対応するタンパク質の構造に影響を与えると予測される突然変異を含む。

【0016】

他の態様において、ネオアンチゲンを同定する工程が、（i）ポリペプチドの遺伝的にコードされるコンビナトリアルライブラリを、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、バイシストロン性（*biscistronic*）DNAディスプレイ、P2A DNAディスプレイ、CISディスプレイ、酵母ディスプレイ、または細菌ディスプレイにより生成する工程であって、コンビナトリアルライブラリが、ポリペプチドをコードする対応する核酸分子に連結されたポリペプチドを含む、工程と；（ii）コンビナトリアルライブラリを、HLAタンパク質またはその断片と接触させる工程と；（iii）コンビナトリアルライブラリの特異的結合を示すHLAタンパク質またはその断片を分離する工程と；（iv）HLAタンパク質またはその断片に結合したコンビナトリアルライブラリの核酸分子の全てまたは一部を配列決定して、ネオアンチゲンを同定する工程とを含むことができる。

30

40

【0017】

一態様において、ポリペプチドのコンビナトリアルライブラリが、対応するタンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測して、非コード領域内のサイレント突然変異および突然変異を除外する、複数の患者特有の腫瘍突然変異の分析から設計されるバリエーションペプチドを含むことができる。

【0018】

ある特定の態様では、ネオアンチゲンとHLAタンパク質またはその断片との間の特異的結合は、（i）MHCクラスII α 鎖の少なくとも一部およびMHCクラスII β 鎖の少なくとも一部を、MHCクラスII α 鎖およびMHCクラスII β 鎖がペプチド結合グループを形成するように含むMHCクラスII構成要素；ならびにスペースホルダー分子

50

および第1のプロセス可能リンカーをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの核酸分子 (n u c l e i c m o l e c u l e) により形質転換した細胞を培養する工程であって、スペースホルダー分子が、プロセス可能リンカーによってMHCクラスII構成要素に連結され、スペースホルダー分子がペプチド結合グループ内で結合することによって、ペプチド結合グループ内の他のあらゆるペプチドの結合を妨害し；培養する工程が、MHCクラスII構成要素を生成するように行われる、工程と；(ii) MHCクラスII構成要素を回収する工程と；(iii) プロセス可能リンカーをプロセッシングすることによって、スペースホルダー分子をペプチド結合グループから放出する工程と；(iv) MHCクラスII構成要素をネオアンチゲンの存在下でインキュベートする工程であって、インキュベーションが、ペプチド結合グループへのネオアンチゲンの結合を促進する工程と；(v) ネオアンチゲンに結合したMHCクラスII構成要素を回収する工程とによって判定され得る。

10

【0019】

一態様では、スペースホルダー分子は、コンセンサス配列AAXAAAAAXAA (配列番号30)を有することができる。別の態様では、スペースホルダー分子は、PVSKMRMATPLLMQA (配列番号25)；AAMAAAAAAMA (配列番号26)；AAMAAAAA (配列番号27)；AAFAAAAAA (配列番号28)；およびASMSAASASMAA (配列番号29)からなる群から選択される。

【0020】

一部の態様において、プロセス可能リンカーが、MHCクラスII構成要素のMHCクラスII α 鎖に連結されている。他の態様において、ネオアンチゲンが結合したMHCクラスII構成要素を回収する工程が、MHCクラスII構成要素を認識する抗体によるアフニティクロマトグラフィーを含む。

20

【0021】

特定の態様において、ネオアンチゲンと、HLAタンパク質またはその断片との間の特異的結合を、ファージディスプレイによって判定し、HLAタンパク質またはその断片を、ファージの表面上で発現させ、そしてネオアンチゲンをファージとインキュベートして、特異的結合をアッセイする。

【0022】

一態様において、方法は、ネオアンチゲンと、MHCクラスIタンパク質またはその断片との間の特異的結合を判定するインシリコ分析をさらに含み、インシリコ分析が、ネオアンチゲンのペプチド配列に基づく、MHC Iタンパク質への相対結合を予測する計算アルゴリズムを使用する工程を含む。

30

【0023】

他の態様では、本発明は、患者におけるがんを処置する方法であって、患者から切除された腫瘍から腫瘍細胞を得る工程と；腫瘍細胞内の複数の患者特有の腫瘍突然変異を、患者由来の腫瘍DNAおよび／またはRNAならびに正常DNAおよび／またはRNAのゲノム分析により検出する工程と；患者の遺伝子型に対応するヒト白血球抗原 (HLA) タンパク質またはその断片との特異的結合を示す、体細胞突然変異に由来するネオアンチゲンを同定する工程と；ネオアンチゲンに基づいて1つまたは複数のペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含むメッセンジャーリボ核酸 (mRNA) ポリヌクレオチドを生成する工程と；mRNAポリヌクレオチドの治療的有効量を患者に投与する工程とを含む方法に関する。

40

【0024】

一部の態様では、mRNAポリヌクレオチドは、少なくとも1つの化学修飾を含む。一態様では、化学修飾は、プソイドウリジン、N1-メチルプソイドウリジン、N1-エチルプソイドウリジン、2-チオウリジン、4'-チオウリジン、5-メチルシトシン、5-メチルウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン、2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオ-ジヒドロプ

50

ソイドウリジン、2-チオージヒドロウリジン、2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン、4-メトキシ-プソイドウリジン、4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン、4-チオ-プソイドウリジン、5-アザ-ウリジン、ジヒドロプソイドウリジン、5-メトキシウリジンおよび2'-O-メチルウリジンから選択される。別の態様では、化学修飾は、ウラシルの炭素5位にある。別の態様では、化学修飾は、N1-メチルプソイドウリジンまたはN1-エチルプソイドウリジンである。

【0025】

ある特定の態様では、オープンリーディングフレーム内のウラシルの少なくとも80%は化学修飾を有する。他の態様では、mRNAポリヌクレオチドは、5'末端キャップをさらにコードする。一態様では、5'末端キャップは、7mG(5')ppp(5')NlmpNpである。

【0026】

他の態様では、開示された方法は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療用集団の治療的有効量を投与する工程をさらに含む。一部の態様では、TILの治療用集団は、ペプチドまたはmRNAポリヌクレオチドと同時に、または連続して投与される。TILの治療用集団は、ペプチドによって提示されたまたはmRNAポリヌクレオチドによってコードされた少なくとも1つのネオアンチゲンによって活性化および／または教育されている。

【0027】

一部の態様では、TILの治療用集団と共にペプチドまたはmRNAポリヌクレオチドを投与する工程は、患者における免疫原性応答および／または抗腫瘍活性を増強する。一態様では、患者における免疫原性応答および／または抗腫瘍活性の増加は相乗的である。

【0028】

前述の特徴および要素は、別途明示的に示されない限り、排他的ではなく、様々な組合せで組み合わされてもよい。これらの特徴および要素ならびにそれらの動作は、以下の説明を考慮するとより明らかになるであろう。しかしながら、以下の説明は本質的に例示的であり、非限定的であることを意図することを理解されたい。

【0029】

本開示の主題は、本明細書の結論部分において特に指摘され、明確に特許請求される。しかしながら、本開示のより完全な理解は、図面と併せて考慮した場合に詳細な説明および特許請求の範囲を参照することによって最適に得ることができ、図面において同様の数字は同様の要素を示し得る。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】 パーソナライズされたネオアンチゲンワクチンを生成するためにゲノムツールを使用する方法を示す。

【図2-1】 ネオアンチゲンペプチドベースのワクチンの開発のためのアプローチおよびネオアンチゲンペプチドベースのワクチンを使用して患者を処置する方法の概要を示す。

【図2-2】 ネオアンチゲンペプチドベースのワクチンの開発のためのアプローチおよびネオアンチゲンペプチドベースのワクチンを使用して患者を処置する方法の概要を示す。

【図3】 DNAバーコード化ペプチドの大きなライブラリの効率的な合成および分析のための段階的なワークフローを示す；示されたペプチド-DNAライブラリは、コードされたペプチドへのDNAの連結を容易にするピューロマイシン(「Puro」)アダプターを示す。

【図4】 候補ネオアンチゲンを同定するための腫瘍エクソームの分析、MHC-ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイによる候補ネオアンチゲンの特徴付け、およびMHC-ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイにおけるHLAタンパク質に結合したネオアンチゲンに対するT細胞応答の評価を示す。

【図5】 腫瘍エクソームの分析から同定された突然変異の分析のためのDNAコンジュゲートアッセイライブラリ設計を示す。

【図6】 MHCクラスII分子に結合するネオアンチゲンを同定するために使用したMH

10

20

30

40

50

C-ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイの実施形態を示す；対照群（「非切断」）では、CLIPペプチドはHLA構築物から除去されず、候補ネオアンチゲンが非特異的に結合するが、試験群（「切断」）では、CLIPペプチドの除去により、HLA構築物の認識部位が開き、候補ネオアンチゲンの特異的結合を可能にする。

【図7】2人のヒト患者（すなわち、TG0006およびTG00013）からの富化ペプチド（すなわち、ネオアンチゲン）の同定を示す；エクソーム分析により各患者において同定された突然変異の数は、各患者IDの下に示される；結合アッセイにおいて使用したHLA複合体のヒト白血球抗原血清型は、各グラフの左上隅に同定されている。富化ペプチドは、より大きなデータポイントとして示される。

【図8】図8Aおよび8Bは、ヒト患者TG00013から富化ペプチド（すなわち、ネオアンチゲン）を同定する追加のデータセットを示す；富化ペプチドは、切断されたHLA複合体のlog平均%読み取りが0に近い（すなわち、切断されたHLA複合体との結合が100%に近い）ペプチドに対応する各グラフの上部にデータポイントとして表示される。

【図9】富化ペプチドのアミノ酸配列、各ペプチドの対応する突然変異、およびヒト患者TG00013に対してペプチドが特異的に結合するHLA複合体のヒト白血球抗原血清型を示す。

【図10】ネオアンチゲンを同定するためのインシリコ予測に対するMHC-ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイの比較を示す；インシリコ分析で使用したIEDBコンセンサス配列は、国立アレルギー感染症研究所（National Institute of Allergy and Infectious Diseases）（NIAID）によって維持される公的リソースである免疫エピトープデータベースおよび分析リソース（Immune Epitope Database and Analysis Resource）（IEDB）から得られる。

【図11】腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を採取し、ネオアンチゲンおよび抗腫瘍活性の認識を高めるためにこれらのTILを活性化し、教育するためにペプチドを生成することによって評価した数人のヒト患者に関する情報を示す。

【図12】開示された方法によるペプチドワクチン製造の非限定的な例を示す。

【図13-1】腫瘍を有する患者に由来する末梢血単核細胞（PBMC）による腫瘍細胞オルガノイドの浸潤を示す。PBMCを、単独で、またはDMSO（陰性対照）と共に、IL-2と組み合わせて、またはIL-2およびネオアンチゲンとして同定されたペプチドと組み合わせて投与した。オルガノイドを様々な処理に供してから24時間後に画像を撮影した。棒グラフに示されているように、わずか24時間後に、IL-2とペプチドを組み合わせたPBMCはオルガノイドの顕著な浸潤を示した。

【図13-2】腫瘍を有する患者に由来する末梢血単核細胞（PBMC）による腫瘍細胞オルガノイドの浸潤を示す。PBMCを、単独で、またはDMSO（陰性対照）と共に、IL-2と組み合わせて、またはIL-2およびネオアンチゲンとして同定されたペプチドと組み合わせて投与した。オルガノイドを様々な処理に供してから24時間後に画像を撮影した。棒グラフに示されているように、わずか24時間後に、IL-2とペプチドを組み合わせたPBMCはオルガノイドの顕著な浸潤を示した。

【図13-3】腫瘍を有する患者に由来する末梢血単核細胞（PBMC）による腫瘍細胞オルガノイドの浸潤を示す。PBMCを、単独で、またはDMSO（陰性対照）と共に、IL-2と組み合わせて、またはIL-2およびネオアンチゲンとして同定されたペプチドと組み合わせて投与した。オルガノイドを様々な処理に供してから24時間後に画像を撮影した。棒グラフに示されているように、わずか24時間後に、IL-2とペプチドを組み合わせたPBMCはオルガノイドの顕著な浸潤を示した。

【図14】開示されたペプチドワクチンの安全性および有効性を試験するための研究を示す。ORR：客観的奏効率；DOR：いずれかの観察された応答の持続時間；PFS：無増悪生存；OS：全生存。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0031】

具体的に明記しない限り、「a（1つの）」、「an（1つの）」、および／または「the（その）」への言及は、1つまたは1つより多くを含む場合があること、ならびに単数の項目への言及は、複数の項目も含む場合があることを理解されたい。不定冠詞「a」、「an」、および／または「the」による要素への言及は、1つおよび1つのみの要素が存在することを文脈が明確に要求しない限り、1つより多くの要素が存在する可能性を排除するものではない。本明細書で使用される場合、用語「含む（comprise）」、およびその活用形または任意の他の変形は、その単語に続く項目が含まれるが、具体的に述べられていない項目を排除するものではないことを意味する非限定的な意味で使用される。

10

【0032】

「ネオエピトープ」は、当該技術において、特定の事象への曝露または特定の事象の出現（例えば、特定の疾患、障害、または症状、例えば、感染、がん、がんの病期等の発生または進行）の後に、対象において出現または発達するエピトープを指すと理解される。本明細書中で用いられるネオエピトープは、存在および／またはレベルが、事象への曝露または事象の出現と相関するものである。一部の実施形態において、ネオエピトープは、これを（例えば、妥当なレベルにて）発現する細胞に対して免疫応答をトリガーするものである。一部の実施形態において、ネオエピトープは、これを（例えば、妥当なレベルにて）発現する細胞を死滅させるか、そうでなければ破壊する免疫応答をトリガーするものである。一部の実施形態において、ネオエピトープをトリガーする関連事象は、細胞における体細胞突然変異であるか、またはこれを含む。一部の実施形態において、ネオエピトープは、非がん細胞において、免疫応答（例えば、ネオエピトープを発現するがん細胞を標的とするのに十分な免疫応答）をトリガーかつ／または支持するレベルにまで、かつ／または様式で、発現されなかった。一部の実施形態において、ネオエピトープはネオアンチゲンである。

20

【0033】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書中で互換的に用いられており、あらゆる長さのアミノ酸のポリマー形態、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、および修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを指す。

30

【0034】

本明細書中で用いられる用語「ペプチド構築物」は、同定オリゴヌクレオチドに取り付けられたあらゆる長さのペプチドを指す。取付けは、介在リンカーを介してよく、そして取付けは、共有結合であっても非共有結合であってもよい。同定オリゴヌクレオチドは、翻訳されて構築物のペプチド部分を形成するメッセージであってもよいし、知られており、かつ取り付けられたペプチドを配列決定によって同定するのに用いられ得る他のあらゆる配列であってもよい。「ペプチド構築物セット」は、オリゴヌクレオチドのカスタム設計セットから生成されたペプチド構築物のプールを指す。セットは、ペプチド構築物の種あたり僅か1つのコピーしか含有しなくてもよいが、典型的には、各ペプチド構築物の多くのコピーを含有する。

40

【0035】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされたアミノ酸、および後で修飾されるアミノ酸である。非天然アミノ酸は遺伝暗号によってコードされておらず、天然に存在するアミノ酸と同じ基本構造を有することができるが、必ずしも有する必要はない。「アミノ酸類似体」は、天然に存在するアミノ酸、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合した α 炭素、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムと同じ基本化学構造を有する化合物を指す。このような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有

50

することができるが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的な化学構造を保持する。「アミノ酸模倣物」は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物を指す。

【0036】

アミノ酸は、IUPACによって推奨される3文字の記号または1文字の記号のいずれかによって表すことができ、IUPACの文字コードは次の通りである：G＝グリシン；A＝アラニン；L＝ロイシン；M＝メチオニン；F＝フェニルアラニン；W＝トリプトファン；K＝リジン；Q＝グルタミン；E＝グルタミン酸；S＝セリン；P＝プロリン；V＝バリン；I＝イソロイシン；C＝システイン；Y＝チロシン；H＝ヒスチジン；R＝アルギニン；N＝アスパラギン；D＝アスパラギン酸；T＝スレオニン。

10

【0037】

用語「相同」および「類似」は、スーパーファミリー（例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー）からのタンパク質、および異なる種からの相同タンパク質を含む、「共通の進化的起源」を有するタンパク質間の関係を指す。このようなタンパク質（およびそれらをコードする遺伝子）は、類似性パーセントの観点からであろうと、保存された位置としての特定の残基またはモチーフの存在の観点からであろうと、その配列類似性によって反映されるように配列相同性を有する。特定の実施形態では、アミノ酸の少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%）がアミノ酸配列の規定された長さにならって一致する場合、2つのペプチド配列は「実質的に相同または類似」である。

20

【0038】

用語「バリエント」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。遺伝暗号の縮重のために、多数の機能的に同一の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUの全ては、アミノ酸アラニンをコードする。バリエントには、コードされた配列内の単一のアミノ酸または少しの割合のアミノ酸を変化させ、付加し、または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加が含まれ得る。

【0039】

「機能保存的バリエント」は、タンパク質または酵素中の所与のアミノ酸残基が、ポリペプチドの全体的な高次構造および機能を変化させることなく変更されているバリエントであり、アミノ酸を類似の特性（例えば、極性、水素結合電位、酸性、塩基性、疎水性、芳香性など）を有するものと置き換えることが含まれるが、これに限定されない。類似の特性を有するアミノ酸は当該技術分野で周知である。例えば、アルギニン、ヒスチジンおよびリジンは親水性塩基性アミノ酸であり、互換性があり得る。同様に、疎水性アミノ酸であるイソロイシンは、ロイシン、メチオニンまたはバリンと置き換えることができる。このような変更は、タンパク質またはポリペプチドの見かけの分子量または等電点にほとんどまたは全く影響を及ぼさないと予想される。

30

【0040】

保存されていると示されたアミノ酸以外のアミノ酸は、タンパク質内で異なる場合があるため、類似の機能の任意の2つのタンパク質間のタンパク質またはアミノ酸配列の類似性パーセントは変動する場合があります。例えば、アラインメントスキームに従って決定すると、70%～99%になる場合がある。「バリエント」はまた、BLASTまたはFASTAアルゴリズムによって決定すると、少なくとも60%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドも含み、比較される天然または親タンパク質と同じまたは実質的に類似の特性または機能を有する。特定のバリエントは、「機能獲得」バリエントであり、タンパク質または酵素における少なくとも1つの所与のアミノ酸残基の変更により、タンパク質の活性を含むが、これに限定されない、ポリペプチドの特定の機能が改善されるポリペプチドバリエントを意味する。アミノ酸残基の変更は、アミノ酸を類似の特性を有するものと置き換えること

40

50

であり得る。

【0041】

本明細書中で用いられる用語「結合」は、分子同士が互いに近い安定した会合をもたらす、2つの分子間の引力相互作用を指す。分子結合は、以下のタイプに分類され得る：非共有結合、可逆性共有結合、および不可逆性共有結合。分子結合に関与し得る分子として、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、および小有機分子、例えば医薬化合物が挙げられる。例えば、他の分子と安定した複合体を形成するタンパク質は、多くの場合、受容体と称される一方、その結合パートナーは、リガンドと呼ばれる。核酸はまた、それ自体または他の核酸と安定な複合体、例えば、DNA-タンパク質複合体、DNA-DNA複合体、DNA-RNA複合体、タンパク質-タンパク質複合体を形成することもできる。

10

【0042】

本明細書で使用される場合、用語「特異的結合」は、標的、例えばポリペプチド抗原、受容体、または抗体に優先的に結合するような、バインダー、例えばタンパク質または抗体の特異性を指す。結合パートナー、例えば、タンパク質、核酸、抗体、または他の親和性捕捉剤等を指す場合、「特異的結合」は、指定されるアッセイ条件下での選択的ハイブリダイゼーションを確実にするような親和性および／または相補性が高い2つ以上の結合パートナーの結合反応を含み得る。典型的には、特異的結合は、バックグラウンドシグナルの標準偏差の少なくとも3倍となる。ゆえに、指定された条件下で、結合パートナーは、その特定の標的分子に結合して、試料中に存在する他の分子に、かなりの量で結合しない。他の潜在的干渉物質の存在下での特定の標的のバインダーまたは抗体による認識が、そのような結合に特有のものである。好ましくは、標的に特異的であるか、または標的に特異的に結合するバインダー、抗体もしくは抗体断片、ペプチド、または融合ペプチドは、標的に、他の非標的物質に結合するよりも高い親和性で結合する。また、好ましくは、標的に特異的であるか、または標的に特異的に結合するバインダー、抗体もしくは抗体断片、ペプチドまたは融合ペプチドは、非標的物質、例えば試験試料中に存在するかなりのパーセンテージの非標的物質への結合を回避する。コグネイトエピトープを含む標的抗原、抗原性断片、ペプチド、または融合ペプチドに対する抗体の結合親和性は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で利用可能な多数の方法のいずれかを使用して容易に決定することができる。一部の実施形態では、本開示のバインダー、抗体もしくは抗体断片、ペプチド、または融合ペプチドは、約90%超の非標的物質への結合を回避するが、より高いパーセンテージが明らかに意図され、かつ好ましい。例えば、本開示のバインダー、抗体、または抗体断片、またはペプチドは、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、そして約99%以上の非標的物質への結合を回避する。他の実施形態において、本開示のバインダー、抗体、または抗体断片、またはペプチドは、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、もしくは70%超、または約75%超、または約80%超、または約85%超の非標的物質への結合を回避する。

20

30

【0043】

用語「標的」、「標的分子」、および「標的剤」は、本明細書中で互換的に用いられており、ライブラリとインキュベートして、標的への特異的結合を示すペプチドを同定するタンパク質、毒素、酵素、病原体、細胞、またはバイオマーカーを指す。標的またはマーカーは、細胞によって生成され、細胞内で発現され、細胞表面上でアクセス可能であるか、または細胞によって分泌される任意の分子構造であり得る。マーカーは、任意のタンパク質、炭水化物、脂肪、核酸、触媒部位、またはこれらの任意の標的、例えば、酵素、糖タンパク質、細胞膜、ウイルス、細胞、臓器、オルガネラ、または任意の単分子もしくは多分子構造、または単独であろうと組合せであろうと、現在知られているかもしくはまだ開示されていない任意の他のこのような構造であってもよい。標的はマーカーとも呼ばれてもよく、この用語は互換的に使用される。標的は、アミノ酸の配列、またはそれが由来し得る核酸の1つもしくは複数の鎖の配列によって表され得る。例えば、標的はタンパク質配列によって表され得る。あるいは、標的は、核酸配列、核酸配列によってコードされ

40

50

るタンパク質もしくはペプチド、またはそれらの断片によって表され得る。

【0044】

このような核酸の例には、miRNA、tRNA、siRNA、mRNA、cDNA、または相補的 (complementary) 配列を含むゲノムDNA配列を含む一本鎖および二本鎖の両方の核酸配列が含まれる。マーカーの概念は、それを表すことができる正確な核酸配列またはタンパク質配列の産生物に限定されない。むしろ、マーカーは、マーカーの発現を評価する方法によって検出され得る全ての分子を包含する。マーカーに包含される分子の例には、点突然変異、サイレント突然変異、欠失、フレームシフト突然変異、転座、選択的スプライシング誘導体、差次的にメチル化された配列、差次的に修飾されたタンパク質配列、切断、細胞膜関連マーカーの可溶型、およびマーカーとして同定され得る産生物を生じる任意の他の変異が含まれる。用語「標的」は、その発現または活性が特定の表現型もしくは細胞状態、または生理学的特徴に直接的または間接的に関連する遺伝子またはその遺伝子対立遺伝子の産生物（すなわち、タンパク質）をさらに包含する。

10

【0045】

本明細書中で用いられる用語「捕捉剤」および「捕捉基」は、標的分子上の親和性基もしくはドメインまたはペプチド構築物の親和性タグへの結合またはこれらとの連結を介して、標的分子またはペプチド構築物の捕捉を可能にするあらゆる部分を指す。捕捉剤とその親和性タグとの間の結合は、共有結合および／または非共有結合であってよい。捕捉剤として、例えば、融合ペプチド上の親和性タグに選択的に結合する結合対のメンバー、組換え技術または他の機構によって加えられる化学結合、酵素の補因子等が挙げられる。捕捉剤は、ペプチド構築物と、ハイブリダイゼーション、架橋結合（例えば、ソラレン等のフロクマリンを用いた共有結合性固定）、ライゲーション、化学的に反応性の基を介した取付け、翻訳後修飾による導入等が挙げられる従来の技術を用いて会合され得る。

20

【0046】

「配列の決定」、「配列決定」等は、核酸のヌクレオチド塩基配列に関する情報の決定を含む。そのような情報は、核酸の部分配列情報および完全配列情報の同定または決定を含んでよい。配列情報は、様々な程度の統計学的確実性または信頼性により決定されてよい。一態様において、当該用語は、同一性、および核酸における複数の連続したヌクレオチドの順序の決定を含む。「ハイスループット配列決定」または「次世代配列決定」は、本質的に並列に、多く（典型的には数千～数十億）の核酸配列を決定する、すなわち、DNA鋳型が、1つずつではなくバルクプロセスでの配列決定用に調製され、そして多くの配列が、好ましくは並列で、またはそれ以外ではそれ自体が並列化され得るウルトラハイスループットシリアルプロセスを用いて読み出される方法を用いた、配列の決定を含む。そのような方法として、以下に限定されないが、パイロシーケンシング（例えば、454 Life Sciences, Inc.、Branford、CTによって商品化されているもの）；ライゲーションによる配列決定（例えば、SOLiD（商標）技術、Life Technologies, Inc.、Carlsbad、CAにおいて商品化されているもの）；修飾ヌクレオチドを用いた合成による配列決定（例えば、Illumina、San Diego、CAによるTruSeq（商標）およびHiSeq（商標）技術；Helicos Biosciences Corporation、Cambridge、MAによるHeliscope（商標）；ならびにCalifornia, Inc.、Menlo Park、CAのPacific BiosciencesによるPacBio RSにおいて商品化されているもの）、イオン検出技術による配列決定（例えば、Ion Torrent（商標）技術、Life Technologies、Carlsbad、CA）；DNAナノボールの配列決定（Complete Genomics, Inc.、Mountain View、CA）；ナノポアベースの配列決定技術（例えば、Oxford Nanopore Technologies、LTD、Oxford、UKによって開発されたもの）、およびそのような高度に並列化された配列決定方法が挙げられる。

30

40

50

【0047】

用語「エクソーム」は、当該技術において理解される意味に従って用いられており、特定のゲノム内で見出されるエキソン配列のセットを指す。

本明細書中で用いられる用語「突然変異」は、遺伝子を構成するDNA配列内の永続的な変化を指す。一部の実施形態において、突然変異は、単一のDNA構築ブロック（DNA塩基）から、染色体の大きなセグメントのサイズに及ぶ。一部の実施形態において、突然変異は、ミスセンス突然変異、フレームシフト突然変異、重複、挿入、ナンセンス突然変異、欠失、および反復拡張を含み得る。一部の実施形態において、ミスセンス突然変異は、遺伝子によって製造されるタンパク質内での、あるアミノ酸の、別のものとの置換をもたらす一DNA塩基対の変化である。一部の実施形態において、ナンセンス突然変異もまた、一DNA塩基対における変化である。しかしながら、あるアミノ酸の、別のものとの置換の代わりに、変更されたDNA配列は、細胞にシグナルを早期に出して、タンパク質を構築するのを停止させる。一部の実施形態において、挿入は、DNA片を加えることによって、遺伝子内のDNA塩基の数を変える。一部の実施形態において、欠失は、DNA片を除去することによって、DNA塩基の数を変える。一部の実施形態において、小さな欠失が、遺伝子内の1つまたは少数の塩基対を除去し得る一方、より大きな欠失が、遺伝子全体またはいくつかの隣接遺伝子を除去し得る。一部の実施形態において、重複は、1回または複数回、異常にコピーされる、DNA片からなる。一部の実施形態において、フレームシフト突然変異は、DNA塩基の付加または消失が遺伝子のリーディングフレームを変える場合に起こる。リーディングフレームは、各々が1つのアミノ酸をコードする、3つの塩基の群からなる。一部の実施形態において、フレームシフト突然変異は、これらの塩基のグループ化をシフトして、アミノ酸のコードを変える。一部の実施形態において、挿入、欠失、および重複は全て、フレームシフト突然変異であり得る。一部の実施形態において、反復拡張は、別のタイプの突然変異である。一部の実施形態において、ヌクレオチド反復は、1列に何回も連続して反復される短いDNA配列である。例えば、トリヌクレオチド反復は3塩基対配列で構成され、テトラヌクレオチド反復は4塩基対配列で構成される。一部の実施形態において、反復拡張は、短いDNA配列が反復される回数を増やす突然変異である。

【0048】

本明細書中で用いられる「小分子」は、5キロダルトン未満、より典型的には1キロダルトン未満の分子を意味する。本明細書中で用いられる「小分子」は、ペプチドを含む。

「親和性タグ」は、当該技術におけるその普通の意味で与えられる。親和性タグは、標的生体材料または化学材料に容易に取り付けられ得るあらゆる生体材料または化学材料である。親和性タグは、適切なあらゆる方法によって、標的生体分子または化学分子に取り付けられてよい。例えば、一部の実施形態において、親和性タグは、遺伝的方法を用いて、標的分子に取り付けられてよい。例えば、親和性タグをコードする核酸配列は、生体分子をコードする配列の近くに挿入されてよい；配列は、親和性タグを生体分子と共に発現させることを可能にするように、核酸内のどこにでも、例えば、その内部に、それに隣接して、またはその近くに、配置されてよい。他の実施形態において、親和性タグはまた、分子が生成（例えば、発現または合成）された後に、標的生体分子または化学分子に取り付けられてもよい。一例として、ビオチン等の親和性タグを、例えば共有結合的に、標的タンパク質またはペプチドに化学的に結合して、ストレプトアビジンへの標的の結合を促進し得る。

【0049】

親和性タグとして、例えば、金属結合タグ、例えば、ヒスチジンタグ、GST（グルタチオン／GST結合内）、ストレプトアビジン（ビオチン／ストレプトアビジン結合内）が挙げられる。他の親和性タグとして、Myc／Max対内のMycもしくはMax、またはポリアミノ酸、例えばポリヒスチジンが挙げられる。本明細書中の種々の場所にて、特定の親和性タグが、結合相互作用と併せて説明される。知られている生体結合パートナーまたは化学結合パートナーであり得る、親和性タグが相互作用する（すなわち結合する

）分子は、「認識実体」である。本発明は、親和性タグを使用するあらゆる実施形態において、各々、本明細書中に記載される親和性タグのいずれかの選択を包含する、一連の個々の実施形態を包含することが理解されるべきである。

【0050】

「認識実体」は、親和性タグに結合することができるあらゆる化学材料または生体材料であってよい。認識実体は、例えば、小分子、例えばマルトース（MBP、またはマルトース結合タンパク質に結合する）、グルタチオン、NTA/ Ni^{2+} 、ビオチン（ストレプトアビジンに結合し得る）、または抗体であってよい。親和性タグ／認識実体相互作用は、標的分子の、例えば、別の生体材料もしくは化学材料への、または基質（例えば、ニトロセルロース膜または他の固定された基質）への取付けを促進し得る。親和性タグ／認識実体相互作用の例として、ポリヒスチジン／NTA/ Ni^{2+} 、グルタチオンS-トランスフェラーゼ／グルタチオン、マルトース結合タンパク質／マルトース、ストレプトアビジン／ビオチン、ビオチン／ストレプトアビジン、抗原（または抗原断片）／抗体（または抗体断片）等が挙げられる。

【0051】

用語「リボソームディスプレイ」は、mRNA、リボソーム、および対応する目的のタンパク質の三元複合体を産することができる反応系を指す。リボソームディスプレイは、標的抗原またはリガンド結合について、細胞表面受容体、抗体、およびそれらの断片をスクリーニングするのに用いられ得る。反応系を作製する工程は、1) DNAライブラリを生成して、ライブラリをRNAライブラリに転写する工程と、2) RNAを精製して、無細胞タンパク質合成系によりインビトロ翻訳する工程と、3) 翻訳反応のリボソーム複合体を、標的抗原またはリガンドに結合させる工程と、4) 結合したリボソーム複合体を選択する工程と；5) RNAを複合体から単離して、転写産物をcDNAに逆転写する工程とを含み得、cDNAは、増幅、配列決定、かつ／またはさらに修飾され得る。

【0052】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載される1つまたは複数のペプチドまたはオリゴヌクレオチドを、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と一緒に含む。本明細書の教示に記載されるペプチドまたはオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物の調製において、様々なビヒクル、ベクター、賦形剤、および投与経路が使用され得る。医薬組成物は、一般に、薬学的に許容される担体および薬理学的（または治療的）有効量のペプチドまたはオリゴヌクレオチドを含む。様々な実施形態では、1つまたは複数のペプチドを含む医薬組成物は、患者の免疫応答を誘導または増強するためのアジュバントまたは他の剤を含んでもよい。他の実施形態では、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物は、アジュバントなしで送達され得る。

【0053】

本明細書に記載される医薬組成物は、活性剤が対象の体内の剤の作用部位に到達できる任意の手段によって投与され得る。投与される用量は、薬理学的特徴；投与様式および経路；レシピエント対象の年齢、健康、および体重；症状の性質および程度；併用治療；ならびに治療頻度などの要因に応じて異なる。

【0054】

本明細書中で用いられる用語、対象への剤の「投与」および「投与すること」は、剤を対象に導入または送達して、その意図される機能を実行するあらゆる経路を含む。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、吸入、鼻腔内、または皮下を含む、任意の適切な経路によって実施され得る。投与として、自己投与、および他者による投与が挙げられる。

【0055】

用語「有効量」または「治療的有效量」は、疾患処置が挙げられるがこれに限定されない意図される適用に影響を与えるのに十分な、本明細書中に記載される剤または剤の組合せの量を指す。治療的有效量は、意図される適用（インビトロまたはインビボ）、処置される対象および疾患状態（例えば、対象の体重、年齢、および性別）、疾患状態の重症度、または投与の様式に応じて変わってよい。また、当該用語は、標的細胞において特定の

応答を誘導するであろう用量に当て嵌まる。具体的な用量は、選択される特定の剤、後に続く投与レジメン、剤が、他の剤と組み合わせて投与されるか、投与のタイミング、投与される組織、および化合物が運ばれる物理的送達系に応じて変わるであろう。

【0056】

用語「処置」、「処置すること」、「処置する」等は、所望の薬理学的効果および／または生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患またはその病徴を完全に、または部分的に妨げることに關して予防的であってよく、かつ／あるいは疾患に対する部分的治療もしくは完治、および／または疾患に起因する悪影響に關して治療的であってよい。本明細書中で用いられる「処置」は、哺乳動物における、特にヒトにおける疾患のあらゆる処置を包含し：（a）疾患の素因になり得るが、疾患を有するとまだ診断されていない対象において、疾患が起こることから妨げることと；（b）疾患を阻害すること、すなわちその発症または進行を抑えることと；（c）疾患を軽減すること、すなわち疾患の退縮を引き起こし、かつ／または1つもしくは複数の疾患病徴を軽減することを含む。また、「処置」は、疾患または症状の非存在下ですら、薬理効果を提供するような剤の送達を包含することを意味する。例えば、「処置」は、疾患状態の非存在下で、例えばワクチンの場合、免疫応答を誘発することができるか、または免疫を付与することができる組成物の送達を包含する。

10

【0057】

本明細書中で用いられる用語「患者」または「対象」は、例えば、実験目的、診断目的、予防目的、美容目的、および／または治療目的で、提供される組成物が投与されるか、または投与されてよいあらゆる生物を指す。例えば、対象は、ヒトまたは非ヒト動物を指すことができる。一部の態様では、対象は、限定されないが、ヒトおよび他の霊長類（例えば、チンパンジーおよび他の類人猿およびサル種）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ）、家庭内哺乳動物（例えば、イヌおよびネコ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、およびモルモットなどの齧歯動物）、ならびに鳥類（例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよび他の家禽鳥類、アヒル、ガチョウなどの飼育、野生および狩猟鳥類）を含む任意の脊椎動物を指す。一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。さらなる実施形態では、対象はヒトである。

20

【0058】

一部の実施形態では、患者は、1つまたは複数の障害または状態を患っているか、またはそれらにかかりやすい。一部の実施形態では、患者は、疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状を示す。一部の実施形態において、患者は、1つまたは複数の疾患、障害または症状を有すると診断されている。一部の実施形態において、障害または症状は、がん、または1つもしくは複数の腫瘍の存在であるか、またはこれを含む。

30

【0059】

腫瘍突然変異および／またはネオエピトープの検出

がんは、種々の知られている技術のいずれかを用いて、本明細書中に記載される突然変異および／またはネオエピトープを検出するために（例えば、ネオアンチゲン同一性および／またはネオエピトープ性質、レベルおよび／または頻度を検出するために）スクリーニングされてよい。一部の実施形態において、特定の突然変異もしくはネオエピトープ、またはその発現は、（例えば、DNAまたはRNAにおける）核酸レベルで検出される。当業者であれば、突然変異もしくはネオエピトープ、またはその発現が、がん細胞由来のDNAまたはRNAを含む試料において検出され得る。さらに、当業者であれば、がん細胞由来のDNAまたはRNAを含む試料として、循環腫瘍DNA（ctDNA）、無細胞DNA（cfDNA）、細胞、組織、または臓器が挙げられ得るがこれらに限定されないことを理解するであろう。一部の実施形態において、突然変異もしくはネオエピトープ、またはその発現は、（例えば、がん細胞由来のポリペプチドを含む試料（この試料は、細胞、組織、または臓器が挙げられるがこれらに限定されないポリペプチド複合体または他のより高次の構造であってもよいし、これを含んでもよい）において）タンパク質レベルで検出される。

40

50

【0060】

一部の特定の実施形態において、検出は、核酸配列決定を包含する。一部の実施形態において、検出は、全エクソーム配列決定を包含する。一部の実施形態において、検出は、免疫アッセイを包含する。一部の実施形態において、検出は、マイクロアレイの使用を包含する。一部の実施形態において、検出は、超並列エクソーム配列決定を包含する。一部の実施形態において、検出は、ゲノム配列決定を包含する。一部の実施形態において、検出は、RNA配列決定を包含する。一部の実施形態において、検出は、標準的なDNAまたはRNA配列決定を包含する。一部の実施形態において、検出は、質量分析を包含する。

【0061】

一部の実施形態において、検出は、次世代配列決定（DNAおよび／またはRNA）を包含する。一部の実施形態において、検出は、ゲノム配列決定、ゲノム再配列決定、標的配列決定パネル、トランスクリプトームプロファイリング（RNA-Seq）、DNA-タンパク質相互作用（ChIP-配列決定）、および／またはエピゲノム特性評価を包含する。一部の実施形態において、患者のゲノムの再配列決定は、例えばゲノム変異を検出するために、利用されてよい。

【0062】

一部の実施形態において、検出は、ELISA、ウェスタンブロットティング、免疫アッセイ、質量分析、マイクロアレイ分析等の技術を用いることを包含する。

一部の実施形態において、検出は、次世代配列決定（DNAおよび／またはRNA）を包含する。一部の実施形態において、検出は、標的とされる遺伝子パネルの次世代配列決定（例えば、ASHION（登録商標）腫瘍／正常エクソーム-RNA試験（GEMEXTRA（登録商標）、MSK-IMPACT、またはFOUNDATIONONE（登録商標））を包含する。一部の実施形態において、検出は、ゲノムプロファイリングを包含する。

【0063】

一部の実施形態において、検出は、GEMEXTRA（登録商標）試験を用いたゲノムプロファイリングを包含する。GEMEXTRA（登録商標）試験は、包括的なエクソームおよびトランスクリプトームプロファイリングアッセイであり、これらは双方とも、がん患者のケアのために情報を提供して、疾患の将来の研究を可能にする。19,000個を超える遺伝子が、体細胞点突然変異、小さな、そして大きな挿入および欠失、ならびに構造再配置の同定のために、ハイブリダイゼーション捕捉および臨床デプス配列決定を介してアッセイされる。また、マイクロサテライト不安定性（MSI）および腫瘍遺伝子変異量（TMB）を測定して、免疫腫瘍学療法の適用のために情報を提供する。同定されたバリエーションの体細胞起源を確実にするために、生殖細胞系および腫瘍エクソームが双方とも配列決定されて、比較される。また、全トランスクリプトームを配列決定して、遺伝子融合および選択的スプライシング事象の、患者のRNAからの検出を可能にする。GEMEXTRA（登録商標）は、固形がんおよび血液がんの双方に適用可能である。

【0064】

一部の実施形態において、検出は、Actionable Cancer Targets（MSK-IMPACT）のIntegrated Mutation Profilingを用いるゲノムプロファイリングを包含する（Cheng D T、Mitchell T N、Zehir Aら、Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets（MSK-IMPACT）：A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. J Mol Diagn. 2015年；17巻（3号）：251～264頁；およびRoss D S、Zehir A、Cheng D Tら、Next-Generation Assessment of Human

10

20

30

40

50

Epidermal Growth Factor Receptor 2 (ERBB2) Amplification Status: Clinical Validation in the Context of a Hybrid Capture-Based, Comprehensive Solid Tumor Genomic Profiling Assay. J Mol Diagn. 2017年;19巻(2号):244~254頁参照)。MSK-IMPACTは、点突然変異、小さな、そして大きな挿入または欠失、および再配置の検出を可能にする、複数のオンコジーンおよび腫瘍抑制遺伝子の全てのエキソンおよび選択されたイントロンのハイブリダイゼーション捕捉およびディープ配列決定を包含する包括的分子プロファイリングアッセイである。また、MSK-IMPACTは、ゲノムの全体にわたって散在して、ゲノム全体のコピー数の正確な評価に役立つ、遺伝子間の、そしてイントロンの単一ヌクレオチド多型（例えばタイリングプローブ）を捕捉する。一部の実施形態において、プローブは、メガベースを標的とし得る。

10

【0065】

一部の実施形態において、検出は、FOUNDATIONONE（登録商標）CDX（商標）（「FLCDx」）アッセイを用いるゲノムプロファイリングを包含する。FLCDxアッセイは、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍組織標本から単離されるDNAを用いた、324個の遺伝子および選ばれた遺伝子再配置内の置換、挿入、および欠失の変更（インデル）、ならびにコピー数の変更（CNA）、ならびにマイクロサテライト不安定性（MSI）および腫瘍遺伝子変異量（TMB）が挙げられるゲノムシグネチャーの検出用の次世代配列決定ベースのインビトロ診断デバイスである。FLCDxは、NSCLC、メラノーマ、乳がん、結腸直腸がん、および卵巣がんが挙げられるいくつかの腫瘍指標について、米国食品医薬品局（FDA）によって承認されている。

20

【0066】

FLCDxアッセイは、ルーチンのFFPE生検または外科的切除標本（その50~1000ngが、309個のがん関連遺伝子由来の全てのコードエキソンの全ゲノムショットガンライブラリ構築およびハイブリダイゼーションベースの捕捉を受けることとなる）からの単一DNA抽出方法、1つのプロモータ領域、1つの非コード（ncRNA）、および34個の共通して再配置される遺伝子（そのうち21個は、コードエキソンも含む）からの選択したイントロン領域を使用する。全体で、アッセイは、合計324個の遺伝子における変更を検出する。ILLUMINA（登録商標）HiSeq4000プラットフォームを用いて、ハイブリッド捕捉選択ライブラリが、ハイユニホームデプスまで配列決定される（>500×のメジアンカバー率を標的とし、>100×のカバー率でエキソンの>99%）。続いて、配列データは、塩基置換、インデル、コピー数変更（増幅およびホモ接合性遺伝子欠失）、ならびに選択したゲノム再配置（例えば遺伝子融合）が挙げられる、ゲノム変更の全てのクラスを検出するように設計された、カスタマイズされた分析パイプラインを用いてプロセッシングされる。加えて、マイクロサテライト不安定性（MSI）および腫瘍遺伝子変異量（TMB）が挙げられるゲノムシグネチャーが報告される。

30

【0067】

一部の実施形態において、検出は、少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000個、またはそれを超える遺伝子（例えば、オンコジーンおよび／または腫瘍抑制遺伝子）由来のエキソン配列および／またはイントロン配列の配列決定を含んでよい。例えば、文献報告は、MSK-IMPACTを用いて、468個のオンコジーンおよび腫瘍抑制遺伝子の全てのエキソンおよび選択したイントロンのディープ配列決定を達成してきたことを示している。

40

【0068】

代わりに、または加えて、一部の実施形態において、検出は、遺伝子間の、そして／またはイントロンの単一ヌクレオチド多型の配列決定を含んでよい。例えば、文献報告は、MSK-IMPACTを用いて、>1000個の遺伝子間の、そしてイントロンの単一ヌ

50

クレオチド多型のディープ配列決定を達成してきたことを示している。

【0069】

一部の実施形態において、検出は、スプライスバリエーションの配列決定を包含する。がん細胞は、微環境によって制御をエスケープする機構を発達させることによって適応かつ進化する。したがって、選択的スプライシングによって提供される多様性および可塑性は、腫瘍の増殖および／または拡散に適したタンパク質アイソフォームをがん細胞が生成する機会を提供する (David C J and Manley J L. *Genes Dev.* 2010年; 24巻 (21号): 2343~2364頁)。ゲノム全体のアプローチは、大規模な選択的スプライシングが、腫瘍形成中に起こることを明らかにし (Venables J Pら、*Nat Struct Mol Biol.* 2009年; 16巻 (6号): 670~676頁)、そして選択的スプライシングパターンのゲノムポートレートは、腫瘍の分類に有用であると判明した (Venables J P. *Bioessays.* 2006年; 28巻 (4号): 378~386頁; Skotheim R Iら、*Int J Biochem Cell Biol.* 2007年; 39巻 (7~8号): 1432~1449頁; Omenn G Sら、*Dis Markers.* 2010年; 28巻 (4号): 241~251頁)。

10

【0070】

異常なスプライシング事象の報告、および異なるがんにおける選択的にスプライシングされた転写産物の比率の変化が注目されてきた (Rajan Pら、*Nat Rev Urol.* 2009年; 6巻 (8号): 454~460頁)。これらの事象は、正常細胞対応物において観察されない新規の転写産物をもたらす。代謝、アポトーシス、細胞周期制御、侵入、転移、および血管形成が挙げられる、腫瘍生物学のほぼ全ての領域が、選択的スプライシングによって影響されると報告されてきた (Venables J P.、*Bioessays.* 2006年; 28巻 (4号): 378~386頁; Ghigna Cら、*Curr Genomics.* 2008年; 9巻 (8号): 556~570頁)。

20

【0071】

アポトーシス効果が相反する選択的スプライスバリエーションの最も初期の例の1つが、BCL-xである。BCL-x プレ mRNA は、2つのスプライスバリエーション、抗アポトーシス Bcl-xL (長い形態) およびアポトーシス促進性 Bcl-xS (短い形態) を生成するように選択的にスプライシングされ得る (Boise L Hら、*Cell.* 1993年; 74巻 (4号): 597~608頁)。腫瘍細胞生存を促進する高い Bcl-xL / Bcl-xS 比が、ヒトリンパ腫、乳がん、およびヒト肝細胞がんが挙げられるいくつかのがん型において見出され得る (Minn A Jら、*J Biol Chem.* 1996年; 271巻 (11号): 6306~6312頁、44-46; Olopade O Iら、*Cancer J Sci Am.* 1997年; 3巻 (4号): 230~237頁; Takehara Tら、*Hepatology.* 2001年; 34巻 (1号): 55~61頁)。がん細胞において選択的スプライシングを受けるアポトーシス関連遺伝子の別の例として、Fas 受容体遺伝子がある。

30

【0072】

多くの細胞型の細胞表面上で発現される Fas 受容体は、細胞傷害性 T 細胞によって生成される Fas リガンドによって活性化され、これは、死シグナル伝達カスケードを開始して、Fas 受容体を発現する細胞のアポトーシスに至る (Bouillet Pら、*Nat Rev Immunol.* 2009年; 9巻 (7号): 514~519頁)。コードされる膜貫通ドメインを落としている Fas の少なくとも3つの短い mRNA バリエーションが存在し、結果として生じる翻訳されたタンパク質バリエーションは、おそらく、がん細胞によって分泌されて、Fas リガンド用のデコイ受容体としての機能を果たすので、がん細胞がアポトーシスからエスケープすることができる (Cheng Jら、*Science.* 1994年; 263巻 (5154号): 1759~1762頁; Cascino Iら、*Journal of Immunology.* 1995年; 154巻 (6号): 2706~2713頁)。

40

50

【0073】

H-Ras 遺伝子内のイントロン突然変異によって引き起こされる、以前に知られていないスプライシングされたエキソン (IDX と命名) 内で、H-Ras オンコジーンを選択的スプライシングが起こる (Cohen J Bら、Cell. 1989年; 58巻 (3号): 461~472頁)。IDX スプライス部位のこの突然変異は、H-Ras mRNA バリエーションをもたらす、これは、ナンセンス媒介 mRNA 分解 (NMD) プロセスに対してより耐性であり、結果的に、がんにおいて過剰発現される (Barbier Jら、Mol Cell Biol. 2007年; 27巻 (20号): 7315~7333頁)。また、選択的スプライシングは、がんにおいて侵襲性かつ転移性の挙動を促進する役割を果たす。CD44 は、スプライスバリエーションが転移と具体的に関連する第1の遺伝子の1つであり、エキソン4-7および6-7を含有するバリエーション (それぞれ v4-7 および v6-7) が、転移臓器がん細胞株内で発現されるが、対応する親腫瘍内で発現されないことが示された (Gunthert Uら、Cell. 1991年; 65巻 (1号): 13~24頁)。

10

【0074】

突然変異コーリングソフトウェアツール

ある特定の態様では、TGenでのPegasusヒト研究パイプライン。https://github.com/tgen/pegasusPipeが使用される。配列は、HG19ヒトゲノムまたはHG38ヒトゲノムに対してアラインされる。一態様において、体細胞突然変異は、3つの別々の突然変異コーラー: Seurat、Mutect、およびStrelkaを用いてコールされる。コーラーの複数において見られる全ての突然変異が選択されて、ペプチドを生成するのに用いられる。この理論的根拠は、各コーラーがそれ自体の長所および欠点を有することである。複数のコーラーによってコールされる突然変異を索引することによって、偽陽性を同定するリスクは引き下げられる。コーラーは、Mutect: https://software.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect (Broad Institute Software); Seurat: https://github.com/tgen/seurat (TGen Caller); およびStrelka: https://github.com/Illumina/strelka (GNU一般公有使用許諾) で入手可能である。最良の実施が、DNAワークフローおよびRNAワークフローについて行われる。これ以外にも、更なる分析用の候補ネオアンチゲンとしてペプチドを生成するような変化のないCLIA認定体細胞コールが用いられる。

20

30

【0075】

一部の実施形態において、単一の、または複数の突然変異コーラーが、ゲノムバリエーションをコールするのに利用されてよい。配列決定腫瘍および正常組織からなる試料に用いられ得るコーラーとして、以下がある: Strelka、Strelka2、VarDict、VarScan2、qSNP、Shimmer、RADIA、SOAPSnv、SomaticSniper、FaSD-somatic、Samtools、JointSNVMix、Virmid、SNVSniffer、Seurat、Caveman、Mutect、Mutect2、LoFreq、EBCall、deepSNV、LoLoPicker、MuSE、MutationSeq、SomaticSeq、Snoopier、FreeBayes、HapMuC、SPLINTER、Pisces、DeepSNVMiner、smCounter、DeepVariant、Cake、Tnscope、DNAScope、NeoMutate、Maftools、scABA、Sanivar、Sarek、BATCAVE、SomaticNet、CoVaCS、RegTools、xAtlas、R2D2、Sinple、Bambino、およびexactSNP。腫瘍のみからなる試料に利用され得る配列決定コーラーとして、以下がある: Platypus、LumosVar、LumosVar2、SNVMix2、SNVer、OutLyzer、ISOWN、SomVarIUS、SinVICT、FreeBayes、SNPir、eSNV-detect、RNAIndel、Vadir、

40

50

および Clairvoyante。

【0076】

特定の実施形態において、スプライスバリエーションを認識する単一の、または複数の突然変異コーラーが、ゲノムバリエーションをコールするのに利用されてよい。配列決定腫瘍および正常組織からなる試料に用いられ得るコーラーとして、以下がある：RegTools、ASGAL、MATS (rMATS)、SUPPA (SUPPA2)、Leafcutter、MAJIQ、JunctionSeq、findAS、Cufflinks / Cuffdiff、IsoformSwitchAnalyzeR、ALEXA-seq、MISO、SplicingCompass、FluxCapacitor、JuncBASE、SpliceR、FineSplice、ARH-seq、Spladder、DEXSeq、edgeR、Limma、DiffSplice、dSpliceType、SpliceDetector、HISAT2、STAR、Subread、Subjunct、PennDiff、DSGseq、AltAnalyze、SplicingExpress、SpliceTrap、PSGInfer、FDM、IsoEM2、MADS+、Spanki、SpliceMap、CASPER、AVISPA、PASA、SpliceSeq、MATT、Aspli、IPSA、SANJUAN、VAST-Tools、SpliceV、Asprofile、DESeq2、Yanagi、ABLas、IRIS、およびAS-Quant。

10

【0077】

HLAタイピング

一部の実施形態において、腫瘍および／または正常組織からの全エクソーム配列決定 (WES) および／またはRNA配列決定が、個々の患者についてMHCクラス1および2遺伝子型を同定するのに用いられ得る。

20

【0078】

単一の、または複数のHLAコーラーが、HLA型を同定するのに利用され得る。DNA配列決定に利用され得るHLAコーラーとして、以下がある：BWAKIT、PHLAT、OptiType、HLAMiner、HISAT、HISAT2、xHLA、HLA-Vbseq、GATK HLA Caller、PolySolver、HLAReporter、Athlates、HLAseq、HLAssign、SOAP-HLA、STC-Seq、HapLogic、Gyper、HLATyphon、HLA-LA、HLA-PRG、MHC-PRG、Prohlatype、GraphTyper、ALPHLARD、Omixon、SNP2HLA、HLAScan、NeoEpitopePred、およびAssign。RNA配列決定に利用され得るHLAコーラーとして、以下がある：BWAKIT、seq2HLA、PHLAT、HLAProfiler、OptiType、HLAMiner、HLAForest、arcasHLA、HISAT、HISAT2、HLAseq、HLAssign、STC-Seq、HLATyphon、ALPHLARD、Omixon、およびHLAScan。

30

【0079】

一部の実施形態において、全エクソーム配列決定データは、PolySolver (多型遺伝子座リゾルバー) を用いて、HLAタイピングについて分析されてよい (Shuklaら、2015年)。PolySolverは、3つの主要なMHCクラスI (HLA-A、HLA-B、HLA-C) 遺伝子の対立遺伝子を推測するためのアルゴリズムである。例えば、患者のHLAクラスI対立遺伝子は、PolySolverを用いて、全エクソーム配列決定データから推測され得る。他のバリエーションにおいて、全エクソーム配列決定データの非存在下で、患者のHLAクラスI対立遺伝子は、代替のHLAタイピングアルゴリズムによって、トランスクリプトーム配列決定データから推測され得る。

40

【0080】

一実施形態において、HLAタイピングは、コンピューティングデバイス上でランされる、OptiType等の1つまたは複数の技術を用いてインシリコで行われる。Szołekら、OptiType: precision HLA typing from

50

next-generation sequencing data、Bioinformatics. 2014年12月1日; 30巻(23号)(全ての目的についてその全体が本明細書に組み込まれる)参照。また、種々の他のインシリコ技術が用いられてもよい。Majorら、HLA typing from 1000 genomes whole genome and whole exome Illumina data、PLOS One. 2013年11月6日; 8巻(11号): e78410; Wittigら、Development of a high-resolution NGS-based HLA-typing and analysis pipeline、Nucleic Acids Res. (2015年)参照。

【0081】

腫瘍突然変異からのペプチドの生成

一部の実施形態において、突然変異のデータは、セクション表題「腫瘍突然変異および／またはネオエピトープの検出」において先に記載されるように獲得される。突然変異のコールは、Varcode、customProDB、およびpyGenoが挙げられるがこれらに限定されない、単一の、または複数のツールを用いて、突然変異タンパク質配列に変換されてよい。ツールは、下流のインビトロの、そしてインシリコのHLA結合アッセイのためのペプチド配列を生成することとなる。加えて、一部の実施形態において、ペプチドは、各ペプチドがヒトプロテオームに固有であることを確認するための試験を受けることとなる。ペプチドは、非冗長タンパク質配列、基準タンパク質、モデル生物、UniProtKB/Swiss-Prot、特許を受けたタンパク質配列、タンパク質データバンクタンパク質、メタゲノムタンパク質、およびトランスクリプトームショットガンアセンブリタンパク質が挙げられる、NCBIからのいくつかの異なるタンパク質データベースにアラインされてよい。先で一覧に示されるデータベースを用いて、rBlastが、タンパク質BLASTをランして、ヒトプロテオームに対する同一性が100%であるタンパク質を同定するのに利用され得る。

【0082】

特定の態様において、Varcodeソフトウェアが、pythonにおいて、ゲノムバリエーションデータの影響を予測するのに利用される。Varcodeは、野生型タンパク質配列および突然変異タンパク質配列を、突然変異および／またはネオエピトープから、所望のペプチドサイズにて生成する。特定の態様において、所望のペプチドサイズは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれを超えるアミノ酸である。一態様において、所望のペプチドサイズは、15個のアミノ酸である。

【0083】

Varcode依存関係はPyensemblであり、これは、ペプチドを生成するためのEnsembl基準ゲノムデータへのpythonアクセスポイントである。一部の実施形態において、Varcodeは、タンパク質に及ぼす各突然変異の影響を予測する。ゲノム上の非コード領域内にあるサイレント突然変異および突然変異は、除外される。続いて、Varcodeは、ペプチド配列の全体にわたって突然変異を生成するのに用いられる。Varcodeにより生成される突然変異を含有する当該バリエーションペプチド(すなわち、候補ネオアンチゲン)を、インシリコ法および／または生化学アッセイ(例えば、ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイ)によりさらに分析して、どのペプチドが、患者特有のMHCクラスIおよびIIタンパク質と結合するかを同定し、これは最終的に患者の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)によって認識される。

【0084】

ペプチド-DNAコンジュゲートアプローチによるネオアンチゲンの分析

ペプチド-DNAコンジュゲートプラットフォームは、候補ネオアンチゲンについて多様な分子の大きな集団を迅速にスクリーニングするのに適している。一部の実施形態では、本発明は、ネオアンチゲンを同定するための以下のストラテジーを提供する。様々な実施形態によれば、ペプチド-DNAコンジュゲート法は、各々が核酸バーコードに関連付

10

20

30

40

50

けられたタンパク質のプールされた高度な並行発現のための方法を含む。一部の実施形態では、ペプチド-DNAコンジュゲート法は、各々がピュロマイシン含有連結を介してDNAバーコードに共有結合により連結したタンパク質のプールされた高度な並行 *in vitro* 発現のための方法を含む。他の実施形態では、ペプチド-DNAコンジュゲート法は、ファージディスプレイ、mRNAディスプレイ、またはその他の方法を含む。

【0085】

ペプチド-DNAコンジュゲートアプローチは、患者特有のHLAタンパク質についての候補結合剤として多数の潜在的なネオアンチゲンを迅速に生成できる独自の技術である。ペプチド-DNAコンジュゲートアプローチは、各ペプチドが、結合実験後のペプチド存在量を監視するのに用いられ得る固有のDNAタグにコンジュゲートしたペプチドライブラリ（10～50アミノ酸長）を生成する方法である。重要なことに、ペプチド配列は、少なくとも100,000個の固有のプログラム可能ペプチドによる大きな多重化結合アッセイに用いられ得る。

【0086】

あらゆる分子標的についての結合アッセイが、多様なペプチド-DNAコンジュゲート大ライブラリをスクリーニングするのに用いられ得る。生物学的構造（例えば、患者の遺伝子型に対応する患者特有のHLAタンパク質またはその断片）が、多様なペプチドと混合され、非結合ペプチドから分離されてから、「くっついた」ものについてクエリーされ得る。特定のライブラリは、（例えば、エクソーム配列決定および分析からの）標的の以前の知識に基づく、インテリジェントに設計されたライブラリであり得る。

【0087】

ペプチド-DNAコンジュゲートプラットフォームは、米国特許第9,958,454号明細書；米国特許第10,288,608号明細書；および米国特許出願公開番号第2016/0025726号明細書（これらの内容は参照により本明細書に組み込まれる）においてより詳細に記載されている。

【0088】

一部の実施形態では、ペプチド-DNAコンジュゲート法は、ネオアンチゲンを同定するために使用される。ある特定の態様では、ネオアンチゲンの同定は、（i）ペプチド構築物のライブラリを提供する工程であって、ライブラリの各ペプチド構築物が、ペプチド部分、およびペプチド部分を同定する同定核酸部分を含み、ペプチド構築物の少なくとも1つのペプチド部分が、HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できる、工程と；（ii）HLAタンパク質またはその断片を、ペプチド構築物のライブラリと接触させる工程と；（iii）HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できるペプチド部分を含む少なくとも1つのペプチド構築物を、HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できないペプチド部分を含むペプチド構築物から分離する工程と；（iv）HLAタンパク質またはその断片に特異的に結合できる少なくとも1つのペプチド構築物の同定核酸部分の全てまたは一部を配列決定する工程とを含む。一部の態様において、各ペプチド構築物の同定核酸部分は、ペプチド構築物のペプチド部分をコードするポリヌクレオチド配列またはその相補体を含む。

【0089】

ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、酵母ディスプレイ、細菌ディスプレイ、および関連技術によるネオアンチゲンの同定

一部の実施形態では、目的のポリペプチドは、ネオアンチゲンの同定を促進するように遺伝的にコードされている。遺伝的にコードされるポリペプチドライブラリの例が、mRNAディスプレイライブラリである。別の例が、複製可能遺伝的ディスプレイパッケージ（rgdp）ライブラリ、例えばファージディスプレイライブラリである。一実施形態では、目的のポリペプチドは、ファージディスプレイライブラリとして遺伝的にコードされている。これらの実施形態では、核酸は、ファージゲノムによって含まれてよい。これらの実施形態では、ポリペプチドは、ファージコートによって含まれてよい。

【0090】

一部の実施形態において、本発明は、いくつかの核酸を、対応するポリペプチドに翻訳して、前記分子スカフォールドの分子を前記ポリペプチドに連結することによって生成されるポリペプチドの遺伝的にコードされているコンビナトリアルライブラリを生成するのに用いられたい。ポリペプチドの遺伝的にコードされるコンビナトリアルライブラリを、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌ディスプレイ、またはmRNAディスプレイにより生成することができる。

【0091】

ファージディスプレイ

ファージディスプレイを実行するための技術および方法論が、WO 2009 / 098450号に見出され得る。

【0092】

様々なファージベクター（M13糸状ファージ、ラムダ、T4、およびT7ファージ）、および共有結合性の融合のための種々のファージコートタンパク質を利用する、様々なファージディスプレイシステムが何年にもわたって開発されている。M13糸状ファージが最も一般的に利用されている。糸状ファージディスプレイシステムの長所は、このファージの溶原性ライフサイクルおよびM13ファージミドベクターの利用可能性にある（Webster、1006；Huf tonら、1999年）。溶原性ファージは、そのDNAを宿主細胞のゲノムに組み込み、細菌細胞と共に複製され、ファージ粒子の形成に細菌細胞の溶解を必要としない。代わりに、ファージ粒子は細胞死を誘導することなく細菌表面から脱落する（Webster、1996年）。さらに、M13ファージミドベクターの開発により、優れた作業性が可能になっている。ファージミドは、プラスミド複製起点およびDNAインサートとカップリングしたファージコートタンパク質をコードする遺伝子と一緒に、糸状ファージの複製起点およびパッケージングシグナルを含有するプラスミドである（Webster、1996年；Armstrongら、1996年）。ファージの増殖には、ファージミドに感染した細菌細胞を、生存可能なファージビリオンの形成に不可欠な他の全てのファージ構成要素を提供する、いわゆるヘルパーファージに「重感染させる」必要がある。優れた作業性に加えて、ファージミドベクターシステムの使用により、ヘルパーファージが非組換えファージコートタンパク質に寄与するため、組換えタンパク質の一価ディスプレイ（ファージビリオン当たり最大1つの組換えタンパク質）が可能になる（Armstrongら、1996年）。種々のコートタンパク質を介したファージディスプレイのための様々なM13ベクターシステムが利用可能である（SmithおよびPetrenko、1997年；Barbas、1993年）。メジャーコートタンパク質pVIIおよびマイナーコートタンパク質pIIIは、ディスプレイ目的のために最も頻繁に使用される（Armstrongら、1996年；Rod iおよびMakowski、1999年）。両方のタンパク質のN末端がファージ表面に露出しているため、外来DNA配列がコートタンパク質をコードする遺伝子上流に挿入される。M13マイナーコートタンパク質pVIIへのC末端融合のためのファージベクター（そのC末端はファージの表面に露出している）の開発は、cDNAファージディスプレイライブラリの開発に向けた重要なステップとなっている（Huf tonら、1999年；Jesp ersら、1995年）。

【0093】

より最近では、溶解性ファージシステム、すなわちラムダファージ、T4およびT7ファージのディスプレイ法も開発された。組換えコートタンパク質を含有する組換え溶解性ファージビリオンの形成および脱落のために、細菌細胞はファージの増殖中に溶解される必要がある（Russell、1991年）。さらに、溶解性ファージに利用可能なプラスミドベクターが存在しないため、DNA単離および実験的アプローチは、プラスミドを用いる作業と比較して、より多くの労力を要する（Sambrookら、1989年）。溶解性ファージおよび溶原性ファージの両方のライフサイクルは異なるファージアセンブリ戦略を採用しているため、両方のアプローチにより異なるタンパク質のディスプレイが可能になる（Huf tonら、1999年）。M13糸状ファージのビリオンタン

10

20

30

40

50

パク質（したがって、組換えファージコートタンパク質も）は、ファージビリオンアセンブリの前に細菌細胞膜に埋め込まれるため、このプロセスにより、ファージの表面にディスプレイされ得るタンパク質に制約が課される；効率的なディスプレイのために、cDNA産生物が細菌細胞膜を横切ることができなければならず、生存可能な感染性ビリオンの形成を可能にする必要がある（Webster、1996年；Russell、1991年；Rodira、2002年）。他方で、溶解性ファージのビリオン生成では、ビリオンアセンブリの前および間に組換えタンパク質が細菌細胞のサイトゾル内に形成され、保持されるため、溶解性ファージによってディスプレイされ得る組換えタンパク質のスペクトルは、制約が少なくなる（Hufertonら、1999年；Russell、1991年；Krumpeら、2006年）。

10

【0094】

ファージディスプレイは、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号明細書；Smith（1985年）Science 228巻：1315～1317頁；WO92/18619号；WO91/17271号；WO92/20791号；WO92/15679号；WO93/01288号；WO92/01047号；WO92/09690号；WO90/02809号；de Haardら（1999年）J. Biol. Chem 274巻：18218～30頁；Hoogenboomら（1998年）Immunotechnology 4巻：1～20頁；Hoogenboomら（2000年）Immunol Today 2巻：371～8頁；Fuchsら（1991年）Bio/Technology 9巻：1370～1372頁；Hayら（1992年）Hum Antibod Hybridomas 3巻：81～85頁；Huseら（1989年）Science 246巻：1275～1281頁；Griffithsら（1993年）EMBO J 12巻：725～734頁；Hawkinsら（1992年）J Mol Biol 226巻：889～896頁；Clacksonら（1991年）Nature 352巻：624～628頁；Gramら（1992年）Proc Natl Acad Sci USA 89巻：3576～3580頁；Garrardら（1991年）Bio/Technology 9巻：1373～1377頁；Rebarら（1996年）Methods Enzymol. 267巻：129～49頁；Hoogenboomら（1991年）Nuc Acid Res 19巻：4133～4137頁；およびBarbasら（1991年）PNAS 88巻：7978～7982頁に記載されている。

20

30

【0095】

リボソームディスプレイ

特定の態様において、本明細書中に記載される方法は、ネオアンチゲンを同定するためのリボソームディスプレイの使用を含む。リボソームディスプレイは、目的のタンパク質（例えば候補ネオアンチゲン）のインビトロタンパク質合成を実行するのに用いられ得る。また、リボソームディスプレイは、インビトロタンパク質進化を実行して、所望の特性を有するタンパク質、例えば、特定の標的分子に結合するFab断片を生じさせるのに用いられ得る。リボソームディスプレイは、ライブラリを生成するのに有用な周知の技術である。この完全にインビトロな方法は、 10^{16} 個のメンバーの多様性を有するライブラリを可能にする。プロセスは、所望の特性を有する（例えば、固定された標的分子に結合する）タンパク質を選択するのに複合体として用いられ得るRNA前駆体と会合している翻訳されたタンパク質を生じさせる。続いて、所望の特性、例えば、高い結合親和性を示すRNAタンパク質複合体は、cDNAに逆転写されて、配列は、PCRを介して増幅され得る。また、このプロセスは、繰返しまたはタンパク質発現の反復サイクルを提供する。加えて、核酸突然変異は、以降のサイクルにおいて、選択された核酸ライブラリに効率的に導入されて、連続DNA多様化、およびそれによるタンパク質進化に至り得る。最終結果は、目的のタンパク質（例えば、患者特有のHLAタンパク質、最終的には患者のTILに特異的に結合するネオアンチゲン）を生成するのに用いられ得る核酸配列である。

40

【0096】

50

本明細書中で提供される方法において、目的のタンパク質は、目的のタンパク質が翻訳されることになるリボソームの表面上にディスプレイされる。手短に言うと、RNA分子のライブラリが、インビトロ翻訳系において、リボソームが脱落しないようにRNA分子の3'末端まで翻訳される。これは、RNA鑄型内に機能的終止コドンを組み込まないことによって達成される。通常、終止コドンは、リボソームからの新生ポリペプチドの剥離をトリガーする放出因子によって認識される。リボソームディスプレイにおいて、ペプチドは、リボソームから出現するが、複合体から自由に脱落しない。これにより、例えば、新生ポリペプチドは、別のポリペプチドと会合して、機能ダイマーを形成することが可能となる。一部の例において、(ジスルフィド結合を形成するのに重要な)酸化環境内での追加の折畳み工程が存在する。

10

【0097】

続いて、数日間安定している、目的の折り畳まれたタンパク質、リボソーム、およびRNAの複合体全体が、目的の翻訳されたタンパク質による結合対リガンドへの特異的結合等の所望の特性の有無に関してスクリーニングされ得る。目的の選択されたタンパク質をコードするRNAは、一本鎖cDNAに逆転写され得、これは、二本鎖DNAに変換され、かつPCRによって増幅されて、選択されたタンパク質(例えばネオアンチゲン)のコード配列が提供され得る。逆転写反応は、リボソームディスプレイ複体内で会合するmRNAに対して実行され得、またはmRNAは、リボソームディスプレイ複合体から単離されてから、逆転写工程に用いられ得る。リボソーム複合体の破壊/解離に適した方法が、当該技術において知られており、EDTA処理および/またはフェノール抽出が挙げられる。

20

【0098】

一般に、リボソームディスプレイ用の核酸(DNA)構築物は、プロモータ(T7、SP6、またはT3)、翻訳開始シグナル、例えば、Shine-Dalgarno(原核生物)またはKozak(真核生物)配列、開始コドン、および目的のタンパク質のコード配列(例えば、V_HまたはV_L鎖ドメイン)を含有する。1つまたは複数の検出タグをコードする1つまたは複数の核酸配列が、1つまたは複数の検出タグ(例えばヒスチジンタグ)をさらに含むタンパク質の生成を実現するために含まれてよい。完全な新生タンパク質がディスプレイされて、その活性のある高次構造に折り畳まれることを可能にするために、少なくとも23~30個のアミノ酸長のスペーサードメインを、C末端に加えて、タンパク質がリボソームから完全に出ることを可能にすることができる。スペーサーは、DNA配列のRT-PCR回収のためのプライマーの設計用の知られている配列を提供することができる。

30

【0099】

DNAから終止コドン除去するために、終止コドンを欠く3'プライマーが、PCR構築中に用いられ得る。細菌ベースのディスプレイ系のために設計される構築物は、DNAの5'末端および3'末端にステムループ構造を含有する配列を組み込んで、細菌無細胞系において、RNase活性による分解に対してmRNAを安定させることができる。

【0100】

本明細書中に記載される方法に用いられるmRNA翻訳系は、適切なあらゆる入手可能な系であってよい。原核生物翻訳系または真核生物翻訳系が、例えば、大腸菌(E. coli)粗溶解液(例えば、Promega Corp.、Madison、Wis. ; Agilent Technologies、Santa Clara、Calif. ; GE Healthcare Biosciences、Pittsburgh、Pa. ; Life Technologies、Carlsbad、Calif. から商業的に入手可能)、再構成リボソーム系、例えばPURE(例えば、Shimizuら、Nat. Biotechnol.、19巻: 751~755頁(2001年)参照)、または以下に記載される無細胞タンパク質合成系に用いられてよい。

40

【0101】

PURE系は、インビトロタンパク質生合成(例えば、開始、伸長、および終止)に用

50

いられる約32個の個々に精製された構成要素を含むことができる。一部の実施形態において、構成要素として、開始因子（例えば、IF1、IF2、IF3）、伸長因子（例えば、EF-G、EF-Tu、EF-Ts）、放出因子（例えば、RF1、RF3）、終止因子（例えば、RRF）、20個のアミノアシルtRNA合成酵素、メチオニル-tRNAトランスホルミラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、リボソーム、46個のtRNA、NTP、クレアチンリン酸、10-ホルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸、20個のアミノ酸、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、およびピロホスファターゼが挙げられる。

【0102】

リボソームディスプレイが、標的に対して高い親和性を有する抗体断片を首尾よく生成するのに用いられてきた。リボソームディスプレイの詳細な説明が、例えば、Hanes、J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95巻：14130～14135頁（1998年）；Schaffitzelら、J. Immunological Methods、231巻：119～135頁（1999年）；Heら、J. Immunological Methods、231巻、105～117頁（1999年）；Roberts R W、Current Opinion in Chemical Biology、3巻：268～273頁（1999年）に見出される。

【0103】

インビトロ選択のための他のディスプレイ方法

他のインビトロライブラリディスプレイ方法、例えば、以下に限定されないが、mRNAディスプレイ、バイシストロン性ディスプレイ、P2Aディスプレイ、およびCISディスプレイ（シス活性ディスプレイ）が、本明細書中に記載される方法に用いられ得る。

【0104】

mRNAディスプレイ

mRNAディスプレイにおいて、RNAライブラリの各メンバーは、これがコードする目的のタンパク質に、tRNAのアミノアシル末端を模倣し得る抗生物質であるピューロマイシンへの安定した共有結合によって直接取り付けられる（例えば、Robert R WおよびSzostak J W、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94巻：12297～12302頁（1997年）参照）。ピューロマイシンは、原核生物または真核生物のいずれにおいても活性があるアミノヌクレオシド抗生物質であり、ストレプトマイセス・アルボニガー（*Streptomyces alboniger*）に由来する。タンパク質合成は、リボソームにおいて起こる翻訳中に、早期の鎖終止によって阻害される。分子の一部が、チロシル-tRNAの3'末端の類似物としての機能を果たし、その構造の一部が、アデノシンの分子を模倣しており、別の一部が、チロシンの分子を模倣している。これは、A部位に入って、成長鎖に移って、ピューロマイシン化された新生鎖の形成および早期の鎖の放出を引き起こす。3'位は、tRNAの標準のエステル結合の代わりにアミド結合を含有して、分子を、加水分解に対してかなり耐性にし、かつリボソームに沿う進行を停止させる。

【0105】

タンパク質合成の他のピューロマイシン類似体インヒビタとして、O-デメチルピューロマイシン、O-プロパルギル-ピューロマイシン、9-{3'-デオキシ-3'-[(4-メチル-L-フェニルアラニル)アミノ]-β-D-リボフラノシル}-6-(N,N'-ジメチルアミノ)プリン[L-(4-Me)-Phe-PANS]、および6-ジメチルアミノ-9-[3-(p-アジド-L-ベーターフェニルアラニルアミノ)-3-デオキシ-ベーターリボフラノシル]プリンが挙げられる。

【0106】

RNAライブラリのメンバーは、以下に限定されないが、ポリヌクレオチドまたは化学リンカー、例えばポリエチレングリコール等のリンカーを介してピューロマイシンにライゲートされ得る（Fukudaら、Nucleic Acid Research、34巻（19号）：e127頁（2006年））。一部の実施形態において、RNAを含むポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドリinkerは、3'末端にてピューロマイシンに連結されている。他の実施形態において、PEG linkerは、ピューロマイシンに連結されている。

【0107】

RNA分子の3'末端に連結されているピューロマイシンがリボソームに入るにつれ、リボソームにおけるペプチジルトランスフェラーゼ活性の結果として、新生タンパク質（RNA分子によってコードされている）への共有結合を確立する。そして、安定したアミド結合が、タンパク質と、ピューロマイシンのO-メチルチロシン部分との間で形成される。

【0108】

RNA-ピューロマイシン融合体のRNAライブラリは、本明細書中に記載されるように、インビトロ翻訳を受けて、RNA-ピューロマイシン-タンパク質複合体（例えば、RNA-ピューロマイシン-ネオアンチゲン複合体）を生成することができる。一部の実施形態において、RNA-ピューロマイシン融合体は、患者由来の腫瘍細胞および野生型細胞のエクソーム分析によって同定される候補ネオアンチゲンをコードするRNA分子を含む。

【0109】

親和性選択を、mRNAディスプレイされたタンパク質ライブラリに対して実行して、所望の特性、例えば結合対リガンドへの特異的結合を有するタンパク質の有無に関してスクリーニングすることができる。mRNAディスプレイは、溶液中で、または固体支持体上で実行され得る。目的の選択された、mRNAディスプレイされたタンパク質は、アフィニティクロマトグラフィー等の当該技術において知られている標準的な方法によって精製され得る。mRNAは、クローニングされ、PCR増幅され、かつ／または配列決定して、目的の選択されたタンパク質のコード配列を決定することができる。一実施形態では、選択されたmRNAディスプレイライブラリは、患者特有のHLAタンパク質またはその断片、最終的には患者のTILに結合するネオアンチゲンの集団を含有する。

【0110】

一部の態様において、核酸メンバーのライブラリのメンバーは、ピューロマイシンに連結されており、各メンバーは、他の核酸メンバーによってコードされている他のタンパク質とは異なる一次アミノ酸配列を有する、目的の予期されるタンパク質をコードしている。mRNAディスプレイ系は、各複合体が、ピューロマイシン、リボソーム、および目的の予期されるタンパク質に連結された様々なmRNAを有するように、様々な複合体の集団または混合物を含有し得る。

【0111】

バイシストロン性 (Biscistronic) DNAディスプレイ

バイシストロン性DNAディスプレイは、目的のタンパク質のin vitro選択に利用することができる（例えば、Sumidaら、Nucleic Acid Research、37(22):e147(2009)を参照のこと）。この方法は、目的のin vitro翻訳タンパク質を、それらのコードDNAと複合体を形成させることに基づき、これは目的のタンパク質の配列を決定するために使用される。典型的に、それがコードするタンパク質に連結され得る複数のORFを含有するDNA鑄型が生成される。さらに、カップルした転写／翻訳反応は、油中水エマルジョン（例えば、ミセル）中で区画化される。

【0112】

一部の 경우에는、複数のORFが使用される場合、それらはリボソーム結合側で分離され得る。一部の実施形態では、目的のタンパク質のコード配列は、ストレプトアビジンのコード配列に融合される。一部の実施形態では、DNA鑄型は、リンカーを介してビオチン化される。リンカーは切断可能であり得る。

【0113】

in vitro転写／翻訳の間、タンパク質はミセル中で発現され得る。1つの非限定的な例示的实施形態では、DNA鑄型は候補ネオアンチゲンのコード配列を含有し、候

10

20

30

40

50

補ネオアンチゲンはミセル中で発現される。実施形態では、候補ネオアンチゲンが形成し、ストレプトアビジン-ビオチン連結などの連結を介して候補ネオアンチゲンをコードするDNAと会合する。候補ネオアンチゲンなどの目的のDNAディスプレイタンパク質をエマルジョンから回収し、親和性選択によってスクリーニングすることができる。目的の選択したDNAディスプレイタンパク質のDNA鋳型を、UV照射などの方法によって複合体から切断し、次いでPCR増幅、クローニング、および／または配列決定することができる。

【0114】

一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、核酸メンバーのライブラリを生成することを含み、各メンバーは、他の核酸メンバーによってコードされる他のタンパク質とは異なる一次アミノ酸を有する目的の予期されるタンパク質（すなわち、候補ネオアンチゲン）をコードする。一部の実施形態では、ライブラリはDNAメンバーを含み、この方法は、ライブラリをRNAに転写し、無細胞タンパク質合成系においてRNAを翻訳して、油中水エマルジョン中でバイシストロン性DNAディスプレイ系を生成することを含む。一部の実施形態では、バイシストロン性DNAディスプレイ系は、結合対リガンドへの特異的結合について選択される目的のタンパク質の集団を含有する。一実施形態では、バイシストロン性DNAディスプレイ系は、候補ネオアンチゲンの集団を含有し、各候補ネオアンチゲンは、候補ネオアンチゲンをコードするDNA分子と会合する。

10

【0115】

P2A DNAディスプレイ

エンドヌクレアーゼP2Aのシス活性を利用するP2A DNAディスプレイでは、P2Aおよび目的のタンパク質の融合タンパク質は、それが発現される同じDNA分子に結合する（例えば、Reiersenら、Nucleic Acids Research、33（1）：e10を参照のこと）。DNA鋳型は、P2Aのコード配列、プロモータ、および複製起点に遺伝子に融合された目的のタンパク質をコードするコード配列を含有し得る。当業者に公知の標準的な方法によって、P2Aのコード配列を得ることができ、目的のタンパク質との遺伝子融合を構築することができる。

20

【0116】

一部の実施形態では、P2A DNAディスプレイは、目的のタンパク質を選択するために使用される。目的のタンパク質は、ライブラリの各メンバーが、P2Aと目的のタンパク質との間の融合タンパク質を含む、融合タンパク質のライブラリを生成し、所望の特性、例えば、結合対リガンドへの特異的結合に基づいて目的のタンパク質を選択することによって選択することができる。ライブラリは核酸メンバーのライブラリから構築することができ、各メンバーは、P2Aのコード配列に遺伝子的に融合された異なる、目的のタンパク質をコードするDNA鋳型を含む（すなわち、目的の各タンパク質は、核酸ライブラリの他のメンバーによってコードされる他のタンパク質とは異なる一次アミノ酸配列を有する）。

30

【0117】

一部の実施形態では、P2A DNAディスプレイライブラリは、例えば、溶液中または固体支持体上で、親和性選択ストラテジーによってスクリーニングすることができる。目的の選択されたタンパク質は、例えば、親和性クロマトグラフィーによって精製することができ、複合体を形成したDNAは、PCR増幅、クローニング、および／または配列決定することができる。

40

【0118】

CISディスプレイ

P2A DNAディスプレイと同様に、CISディスプレイは、in vitroで転写／翻訳されたタンパク質を、それらをコードするDNA分子に直接連結するためのDNAベースのアプローチを含む（例えば、Odegripら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101（9）：2806～2810を参照のこと）。この方法は、DNA分子がCISエレメントを有する場合、DNA複製開始タンパク質であるRepA

50

を使用して、それが発現されるDNA分子に非共有結合により結合する。DNA分子は、RepAに加えて、目的のタンパク質（例えば、候補ネオアンチゲン）をコードするように作製することができる。

【0119】

一部の実施形態では、CISディスプレイが、目的のタンパク質を選択するために使用される。目的のタンパク質は、各メンバーがRepAと目的のタンパク質との間の融合タンパク質を含む、融合タンパク質のDNAライブラリを生成し、所望の特性、例えば、結合対リガンドへの特異的結合に基づいて目的のタンパク質を選択することによって選択することができる。ライブラリは、ライブラリの各メンバーが、RepAのコード配列に遺伝子的に融合された異なる、目的のタンパク質をコードするDNA鑄型を含む（すなわち、目的の各タンパク質は、核酸ライブラリの他のメンバーによってコードされる他のタンパク質とは異なる一次アミノ酸配列を有する）、DNAライブラリから構築することができる。

10

【0120】

一部の実施形態では、DNAライブラリのメンバーは、目的のタンパク質のコード配列、RepAのコード配列、CISElement、複製起点およびプロモータを含有し、目的のタンパク質のコード配列は、RepAのコード配列に遺伝的に融合される。CISElementは、RepAコード配列に遺伝的に連結することができる。

【0121】

一部の実施形態では、ライブラリは、RepAと目的のタンパク質との間の融合タンパク質、および融合タンパク質をコードするDNA分子を含有する。

20

RepA DNAディスプレイライブラリは、例えば、溶液中または固体支持体上で親和性選択戦略によってスクリーニングすることができる。目的の選択されたタンパク質は、例えば、親和性クロマトグラフィーによって精製することができ、複合体を形成したDNAは、PCR増幅、クローニング、および／または配列決定することができる。

【0122】

無細胞タンパク質合成（CFPS）

本明細書に記載される目的の生物学的に活性なタンパク質（すなわち、ネオアンチゲン）を発現させるために、無細胞タンパク質合成系を使用することができる。精製されたmRNA転写物から、またはin vitro合成反応の間にDNAから転写されたmRNAから、in vitroでタンパク質の合成を支援する細胞抽出物が開発された。

30

【0123】

反応ミックス中のポリペプチドのCFPSは、細菌抽出物および／または定義された試薬を含む。反応ミックスは、少なくともATPまたはエネルギー源；巨大分子、例えば、DNA、mRNAなどの産生物のための鑄型；ポリペプチド合成に必要なアミノ酸、およびそのような補因子、酵素ならびに他の試薬、例えば、リボソーム、tRNA、ポリメラーゼ、転写因子、アミノアシル合成酵素、伸長因子、開始因子などを含む。本発明の一実施形態では、エネルギー源は恒常性エネルギー源である。また、高エネルギーリン酸結合からのATPの再生を触媒する酵素、例えば、酢酸キナーゼ、クレアチンキナーゼなども含まれ得る。このような酵素は、翻訳に使用される抽出物中に存在し得るか、または反応ミックスに添加され得る。このような合成反応系は当該技術分野で周知であり、文献に記載されている。

40

【0124】

無細胞タンパク質合成のための鑄型は、mRNAまたはDNAのいずれであってもよい。鑄型は、目的の任意の特定の遺伝子についての配列を含むことができ、全長ポリペプチドまたはその任意の長さの断片をコードすることができる。タンパク質合成鑄型として機能する核酸は、必要に応じて天然源に由来するか、または合成もしくは組換えであり得る。例えば、DNAは組換えDNA、例えば、プラスミド、ウイルスなどであり得る。

【0125】

50

本明細書で使用される場合、「反応ミックス」という用語は、核酸鋳型からのポリペプチドの合成を触媒することができる反応混合物を指す。反応混合物は、細菌細胞からの抽出物、例えば、*E. coli* S30抽出物を含む。S30抽出物は当該技術分野で周知であり、例えば、Lesley, S. A.ら(1991)、*J. Biol. Chem.* 266、2632～8に記載されている。合成は、好気性または嫌気性条件のいずれかの下で実施され得る。

【0126】

一部の実施形態では、細菌抽出物は乾燥される。乾燥された細菌抽出物は、出発材料の固体パーセントを測定することによって決定して、元の固体の110%でミリQ水（例えば、逆浸透水）中で再構成され得る。一実施形態では、10mLの抽出物の元の固体の110%に相当する乾燥抽出物の正確に秤量されたアリコートが、マグネチックスターラー上の攪拌子を備えたガラスビーカー中の10mLのミリQ水に添加される。得られた混合物は、粉末が溶解するまで攪拌する。溶解すると、材料を15mLのFalconチューブに移し、すぐに使用しない限り、-80℃で保存する。

10

【0127】

反応ミックス中の抽出物の体積パーセントは変動し、抽出物は、通常、総体積の少なくとも約10%、より通常は少なくとも約20%であり、一部の場合では、総体積の少なくとも約50%、または少なくとも約60%であり、通常、約75%以下でもたらされた場合には、さらなる利益がもたらされ得る。

【0128】

一般的な系は、目的のタンパク質をコードする核酸鋳型を含む。核酸鋳型は、RNA分子（例えば、mRNA）またはmRNAをコードする核酸（例えば、RNA、DNA）であり、任意の形態（例えば、線形、環状、スーパーコイル、一本鎖、二本鎖など）である。核酸鋳型は、所望のタンパク質の生成を導く。

20

【0129】

鋳型を維持するために、抽出物を生成するために使用される細胞は、有害な酵素の活性の減少、実質的な減少もしくは排除、または活性が改変された酵素について選択され得る。ヌクレアーゼまたはホスファターゼ活性が改変された（例えば、少なくとも1つの突然変異ホスファターゼもしくはヌクレアーゼ遺伝子またはそれらの組合せを有する）細菌細胞を細胞抽出物の合成に使用して、合成効率を増加させることができる。例えば、CFPSのためのS30抽出物を作製するために使用される*E. coli*株は、RNアーゼEまたはRNアーゼAが欠損していてもよい（例えば、突然変異によって）。

30

【0130】

一般的なCFPS反応では、目的のタンパク質をコードする遺伝子が転写緩衝剤中で発現され、CFPS抽出物および翻訳緩衝剤中で目的のタンパク質に翻訳されるmRNAが生じる。転写緩衝剤、無細胞抽出物および翻訳緩衝剤は、別々に添加され得るか、またはこれらの溶液の2つ以上をそれらの添加前に組み合わせられ得るか、もしくは同時に添加され得る。

【0131】

*in vitro*で目的のタンパク質を合成するために、ある時点でCFPS抽出物は、目的のタンパク質をコードするmRNA分子を含む。一部のCFPS系では、mRNAは、天然源から精製された後、または*in vitro*において、クローニングされたDNAから、RNAポリメラーゼII、SP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼIIIおよび／またはファージ由来RNAポリメラーゼなどのRNAポリメラーゼを使用して合成的に調製された後に、外因的に添加される。他の系では、mRNAは、鋳型DNAから*in vitro*で生成され、転写および翻訳の両方が、この種類のCFPS反応において発生する。一部の実施形態では、転写および翻訳系は、カップルしているか、または同じ反応においてRNAおよびタンパク質の両方の合成を実施する相補的な転写および翻訳系を含む。このような*in vitro*転写および翻訳系では、CFPS抽出物は、単一系において転写（mRNA

40

50

Aを生成するため）および翻訳（タンパク質を合成するため）の両方に必要な全ての成分（外因性または内因性）を含有する。

【0132】

無細胞タンパク質合成反応混合物は、以下の成分を含む：少なくとも1つのプロモータ、および必要に応じて、1つもしくは複数の他の調節配列（例えば、目的の遺伝子を含むクローニングまたは発現ベクター）に作動可能に連結した目的の遺伝子を含むDNAまたはPCR断片などの鋳型核酸；目的の遺伝子が作動可能に連結しているプロモータを認識するRNAポリメラーゼ、および必要に応じて、鋳型核酸が作動可能に連結している、必要に応じた調節配列に向けられた1つまたは複数の転写因子；リボヌクレオチド三リン酸（rNTP）；必要に応じて、他の転写因子およびその補因子；リボソーム；転移RNA（tRNA）；他のまたは必要に応じた翻訳因子（例えば、翻訳開始因子、伸長因子、および終結因子）およびその補因子；1つまたは複数のエネルギー源（例えば、ATP、GTP）；必要に応じて、1つまたは複数のエネルギー再生成分（例えば、PEP／ピルビン酸キナーゼ、AP／酢酸キナーゼまたはクレアチンホスフェート／クレアチンキナーゼ）；必要に応じて、収率および／または効率を増強する因子（例えば、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ阻害剤、タンパク質安定剤、シャペロン）およびその補因子；ならびに；必要に応じて、可溶化剤。反応ミックスは、塩（例えば、酢酸、グルタミン酸、または硫酸のカリウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩、およびマンガン塩）、高分子化合物（例えば、ポリエチレングリコール、デキストラン、ジエチルアミノエチルデキストラン、四級アミノエチルおよびアミノエチルデキストランなど）、環状AMP、タンパク質または核酸分解酵素の阻害剤、タンパク質合成の阻害剤または調節因子、酸化／還元調整剤（例えば、DTT、アスコルビン酸、グルタチオン、および／またはそれらの酸化物）、非変性界面活性剤（例えば、Triton X-100）、緩衝剤成分、スペルミン、スペルミジン、プトレシンなどを含む、タンパク質合成に特に必要とされるアミノ酸および他の材料をさらに含む。CFPS反応の構成要素は、米国特許第7,338,789号および同第7,351,563号、ならびに米国特許出願公開第2010/0184135号により詳細に説明されており、これらの開示は、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。

10

20

【0133】

抽出物中に存在する特定の酵素に応じて、例えば、多くの公知のヌクレアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤、またはホスファターゼ阻害剤のうちの1つまたは複数を選択し、合成效率を改善するために有利に使用することができる。

30

【0134】

タンパク質および核酸の合成は、典型的に、エネルギー源を必要とする。エネルギーが、mRNAを生成するための転写の開始に必要とされる（例えば、DNA鋳型が使用される場合、および翻訳を開始するために、例えばGTPの形態の高エネルギーリン酸が使用される）。リボソームによる1つのコドン（3つのヌクレオチド；1つのアミノ酸）の後続の各ステップは、GDPへのさらなるGTPの加水分解を必要とする。典型的に、ATPも必要とされる。タンパク質合成の間に重合されるアミノ酸については、最初にアミノ酸が活性化されなければならない。したがって、高エネルギーリン酸結合からのかなりの量のエネルギーが、タンパク質および／または核酸合成を進行させるために必要とされる。

40

【0135】

エネルギー源は、所望の化学反応を達成するためのエネルギーを提供するために酵素的に処理され得る化学基質である。ヌクレオチド三リン酸、例えば、ATPに見出されるものなどの高エネルギーリン酸結合の切断による合成のためのエネルギーの放出を可能にするエネルギー源が一般的に使用される。高エネルギーリン酸結合に変換可能な任意の供給源が特に適している。ATP、GTP、および他の三リン酸が、通常、タンパク質合成を支援するための等価のエネルギー源として考慮され得る。

【0136】

50

合成反応にエネルギーを提供するために、系は、ATP、GTP、他のNTPなどの高エネルギー三リン酸化合物を生成または再生することができるグルコース、ピルベート、ホスホエノールピルベート（PEP）、カルバモイルホスフェート、アセチルホスフェート、クレアチンホスフェート、ホスホピルベート、グリセルアルデヒド-3-ホスフェート、3-ホスホグリセレートおよびグルコース-6-ホスフェートなどの追加のエネルギー源を含んでもよい。

【0137】

十分なエネルギーが合成系に最初に存在しない場合、追加のエネルギー源が好ましくは補充される。エネルギー源はまた、*in vitro* 合成反応の間に追加または補充されてもよい。

【0138】

一部の実施形態では、無細胞タンパク質合成反応は、NTP、*E. coli* tRNA、アミノ酸、 Mg^{2+} アセテート、 Mg^{2+} グルタメート、 K^+ アセテート、 K^+ グルタメート、フォリン酸、Tris pH 8.2、DTT、ピルビン酸キナーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、ジスルフィドイソメラーゼ、ホスホエノールピルベート（PEP）、NAD、CoA、 Na^+ オキサレート、プトレシン、スペルミジン、およびS30抽出物を含むPANOX-SP系を使用して実施される。

【0139】

一部の場では、無細胞合成反応は、一般的な二次エネルギー源の追加を必要としないが、酸化リン酸化の同時活性化およびタンパク質合成を使用する。一部の場では、CFPSは、Cytomim（細胞質模倣）系などの反応において実施される。Cytomim系は、最適化されたマグネシウム濃度でポリエチレングリコールの非存在下で実施される反応条件として定義される。この系は、タンパク質合成を阻害することが知られているホスフェートを蓄積しない。

【0140】

活性な酸化リン酸化経路の存在は、電子伝達鎖阻害剤などの、経路内のステップを特異的に阻害する阻害剤を使用して試験され得る。酸化リン酸化経路の阻害剤の例には、シアン化物、一酸化炭素、アジド、カルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン（CCCP）、および2,4-ジニトロフェノールなどの毒素、オリゴマイシンなどの抗生物質、ロテノンなどの殺虫剤、ならびにマロネートおよびオキサロアセテートなどのコハク酸デヒドロゲナーゼの競合的阻害剤が含まれる。

【0141】

一部の実施形態では、無細胞タンパク質合成反応は、NTP、*E. coli* tRNA、アミノ酸、 Mg^{2+} アセテート、 Mg^{2+} グルタメート、 K^+ アセテート、 K^+ グルタメート、フォリン酸、Tris pH 8.2、DTT、ピルビン酸キナーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、ジスルフィドイソメラーゼ、ピルビン酸ナトリウム、NAD、CoA、 Na^+ オキサレート、プトレシン、スペルミジン、およびS30抽出物を含むCytomim系を使用して実施される。一部の実施形態では、Cytomim系のエネルギー基質はピルベート、グルタミン酸、および／またはグルコースである。当該系の一部の実施形態では、ヌクレオシド三リン酸（NTP）が、ヌクレオシド-リン酸（NMP）と置き換えられる。

【0142】

ジスルフィド結合を低下させ、適切なタンパク質フォールディングを損なう可能性がある酵素を不活化するために、ヨードアセトアミドを用いて細胞抽出物を処理することができる。一部の実施形態では、細胞抽出物は、外因性タンパク質シャペロンを含む。タンパク質シャペロンは、無細胞抽出物を作製するために使用される細菌株によって発現され得るか、またはタンパク質シャペロンは細胞抽出物に添加され得る。外因性タンパク質シャペロンの非限定的な例には、ジスルフィド結合イソメラーゼ（PDI）、例えば、限定されないが、*E. coli* DsbC、およびペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼ（PPIase）、例えば、限定されないが、FkpAが含まれる。一部の実施形態

10

20

30

40

50

では、抽出物は、PDIおよびPPIaseの両方、例えば、DsbCおよびFkpAの両方を含む。グルタチオンジスルフィド（GSSG）および／またはグルタチオン（GSH）も、適切なタンパク質フォールディングが促進され、異常なタンパク質ジスルフィドの形成が阻止される比率で抽出物に添加され得る。

【0143】

一部の実施形態では、CFPS反応物は、酸化的リン酸化を実施するための反転膜小胞を含む。これらの小胞は、本明細書に記載の細胞抽出プロセスの調製物の高圧均質化ステップの間に形成され得、反応ミックスに使用される抽出物に残留する。

【0144】

細胞抽出物を調製する方法は、例えば、Zawada, J. 「Preparation and Testing of E. coli S30 In Vitro Transcription Translation Extracts」、Douthwaite, J. A. およびJackson, R. H. (eds.)、Ribosomal display and Related Technologies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 805, pp. 31~41 (Humana Press, 2012); Jewettら、Molecular Systems Biology: 4, 1~10 (2008); Shin J. およびNorieaux V., J. Biol. Eng., 4: 8 (2010)に記載されている。簡潔に述べると、細菌培養物を成長させ、収集し、適切な緩衝剤（例えば、S30緩衝剤）中に懸濁し、均質化して細胞を溶解する。

【0145】

無細胞抽出物は、CFPS反応に使用する前に室温まで解凍することができる。ジスルフィド結合を有するタンパク質を合成する場合に、抽出物を50 μ Mのヨードアセトアミドと30分間インキュベートすることができる。一部の実施形態では、CFPS反応物は、約8mMのグルタミン酸マグネシウム、約10mMのグルタミン酸アンモニウム、約130mMのグルタミン酸カリウム、約35mMのピルビン酸ナトリウム、約1.2mMのAMP、各々約0.86mMのGMP、UMP、およびCMP、約2mMのアミノ酸（チロシンについては約1mM）、約4mMのシュウ酸ナトリウム、約0.5mMのプトレシン、約1.5mMのスペルミジン、約16.7mMのリン酸カリウム、約100mMのT7 RNAポリメラーゼ、約2~10 μ g/mLのプラスミドDNA鋳型、約1~10 μ MのE. coli DsbC、および総濃度約2mMの酸化型（GSSG）グルタチオンを伴う約30%（v/v）のヨードアセトアミドで処理した抽出物を含む。必要に応じて、無細胞抽出物は1mMの還元型（GSH）を含んでもよい。

【0146】

溶解物の生成

本明細書に記載の方法および系は、目的の標的タンパク質のin vitroでの翻訳のために細胞溶解物を使用することができる。便宜上、溶解物の供給源として使用される生物は、供給源生物または宿主細胞と称することができる。宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞もしくは植物細胞、またはタンパク質を合成することができる任意の他の細胞型であってもよい。溶解物は、所望のタンパク質をコードするメッセンジャーリボ核酸（mRNA）を翻訳することができる成分を含み、必要に応じて、所望のタンパク質をコードするDNAを転写することができる成分を含む。そのような成分には、例えば、DNA指向性RNAポリメラーゼ（RNAポリメラーゼ）、所望のタンパク質をコードするDNAの転写を開始するために必要な任意の転写活性化因子、転移リボ核酸（tRNA）、アミノアシル-tRNA合成酵素、70Sリボソーム、N¹⁰-ホルミルテトラヒドロ葉酸、ホルミルメチオニン-tRNA^{fMet}合成酵素、ペプチジルトランスフェラーゼ、IF-1、IF-2、およびIF-3などの開始因子、EF-Tu、EF-Ts、およびEF-Gなどの伸長因子、RF-1、RF-2、およびRF-3などの放出因子が含まれる。

【0147】

ある実施形態では、溶解物が由来する細菌細胞を使用する。細菌の任意の株に由来する細菌溶解物を本発明の方法において使用することができる。細菌溶解物は、以下の通りに得ることができる。選択された細菌を、当該技術分野で周知であり、実践者により容易に最適化される、特定の細菌を成長させるためのいくつもの増殖培地のいずれかおよび成長条件下で対数期まで成長させる。例えば、合成のための天然の環境では、グルコースおよびホスフェートを含有する培地であって、グルコースが少なくとも約 0.25% (重量/体積)、さらに通常少なくとも約 1% ; および通常約 4% 以下、さらに通常約 2% 以下の濃度で存在する培地で成長させた細菌細胞に由来する細胞溶解物を利用する。そのような培地の例は 2 Y T P G 培地であるが、定義済みの栄養源と未定義の栄養源のどちらも使用される、E. coli などの細菌を成長させるために適した多くの培地が公開されているので、多くの培養培地がこの目的に適し得ることが当業者には理解されよう。一晩かけて採取した細胞を、細胞ペレットを適切な細胞懸濁緩衝剤中に懸濁させること、および懸濁した細胞を超音波処理によって破壊すること、懸濁した細胞をフレンチプレスで破碎すること、連続フロー高圧均質化、または効率的な細胞溶解のために有用な当該技術分野で公知の任意の他の方法によって溶解させることができる。次いで、細胞溶解物を遠心分離または濾過して大きな DNA 断片および細胞デブリを除去する。

10

【0148】

細胞溶解物を作製するために使用される細菌株は、一般に、無細胞合成効率を上昇させるために、ヌクレアーゼおよび/またはホスファターゼ活性を低下させている。例えば、無細胞抽出物を作製するために使用される細菌株は、ヌクレアーゼである RNアーゼ E および RNアーゼ A をコードする遺伝子に突然変異を有し得る。株は、無細胞合成反応においてそれぞれアミノ酸であるトリプトファン、アルギニン、セリンおよびシステインの分解を妨げる、tnaA、speA、sdaA または gshA などの遺伝子の欠失などの、細胞合成反応の成分を安定化するための突然変異も有し得る。さらに、株は、プロテアーゼである ompT または lonP のノックアウトなどの、無細胞合成のタンパク質産物を安定化するための突然変異を有し得る。

20

【0149】

停止コドンを含まない DNA 発現カセット

一部の実施形態では、リボソームディスプレイ反応系で使用される核酸鋳型は、目的のタンパク質をコードする RNA を発現することができる DNA 発現カセットを含み、RNA は作動可能な停止コドンを欠いている。発現カセットにおけるタンパク質コード領域から停止コドンを除去するために、停止コドンを欠く PCR プライマーを使用して、目的のタンパク質のコード領域を増幅させることができ、その結果、翻訳開始から C 末端アミノ酸をコードする配列までのコード領域全体が増幅する。

30

【0150】

ネオアンチゲンライブラリを用いた MHC 結合アッセイ

主要組織適合性複合体 (MHC) は、MHC タンパク質と呼ばれる糖タンパク質をコードする遺伝子の集合体である。in vivo での MHC タンパク質の主な機能は、TCR によって認識され得る形態で抗原を提示することである。MHC タンパク質は、抗原ペプチドの形態で抗原と結合して、MHC-ペプチド複合体を形成する。

40

【0151】

ヒトおよびマウスの H-2 領域におけるヒト白血球抗原 (HLA) としても知られている MHC タンパク質は、クラス I およびクラス II MHC タンパク質の 2 つのカテゴリに分類される。これらのタンパク質は、高度に多型性の遺伝子のクラスターから構成される。具体的には、ヒト HLA-A、HLA-B、および HLA-C は、クラス I MHC 分子として知られており、一方、ヒト HLA-DP、HLA-DQ、および HLA-DR は、クラス II MHC 分子として知られている。HLA 遺伝子座には、HLA-DP、HLA-DN、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-A、HLA-B および HLA-C が含まれる。これらの遺伝子座の各々は、ヒト集団において異なる対立遺伝子含有する。これらの対立遺伝子バリエーションによってコードされる

50

異なるサブタイプは、本発明の範囲内にあることが意図される。

【0152】

MHCクラスIIタンパク質は、非共有結合性会合において1つの α 鎖および1つの β 鎖を含むヘテロ二量体膜内在性タンパク質である。 α 鎖は、2つの細胞外ドメイン(α_1 および α_2)、ならびに膜貫通(TM)ドメインおよび細胞質(CYT)ドメインを有する。 β 鎖は、2つの細胞外ドメイン(β_1 および β_2)、ならびにTMドメインおよびCYTドメインを含有する。MHCクラスIIタンパク質は、3つの細胞外ドメイン(すなわち、 α_1 、 α_2 および α_3)ならびにTMドメインおよびCYTドメインを有する糖タンパク質重鎖を含む膜内在性タンパク質である。重鎖は、 β_2 -ミクログロブリン(β_{2m})と呼ばれる可溶性サブユニットと非共有結合的に会合している。

10

【0153】

一部の実施形態では、本発明の結合アッセイ(例えば、MHC-ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイ)は、プロセッシング可能リンカーによってMHCクラスII成分、例えば β 鎖に連結したスペースホルダー分子の使用を採用する。本発明のスペースホルダー分子は、ペプチド結合溝における任意の他のペプチドの結合が妨げられるように、MHCタンパク質のペプチド結合溝に結合できる任意のペプチドであり得る。好ましくは、スペースホルダー分子は、ほぼ中性のpHで、中程度の親和性、より好ましくは低い親和性でペプチド結合溝内で結合する。一実施形態では、スペースホルダー分子の長さは、約5から約40アミノ酸残基、より好ましくは約6から約30アミノ酸残基、8から約20アミノ酸残基、さらにより好ましくは約12から15アミノ酸残基に及ぶ。さらなる実施形態では、スペースホルダー分子は約13アミノ酸残基である。適切なスペースホルダー分子の例には、限定されないが、CLIPとしても知られている、(一文字アミノ酸コードで)PVSKMRMATPLLMQA(配列番号25);AAMAAAAAAMAA(配列番号26);AAMAAAAA(配列番号27);AAFAAAAAAA(配列番号28);ASMSAASASMAA(配列番号29)、およびそれらの機能的等価物が含まれる。一実施形態では、スペースホルダー分子は、コンセンサス配列AAXAAAAAAXAA(配列番号30)を有し、Xは任意のアミノ酸である。MHCクラスII分子の結合溝内にスペースホルダー分子を維持する能力は、「空の」分子が形成されるのを阻止する。「空の」MHCクラスII分子の形成は、これらの「空の」分子が凝集する傾向があるため、主要な制限要因であるので、機能的なMHCクラスII成分の単離を困難にしている。

20

30

【0154】

本発明のスペースホルダー分子は、タンパク質を切断できる酵素の標的部位を含有するアミノ酸配列を有するリンカーによって、MHC分子に共有結合され得る。このようなリンカーは、本明細書では「プロセッシング可能リンカー」と称される。本発明のプロセッシング可能リンカーの例には、コラゲナーゼ、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、カリクレイン、トロンビン、およびプラスミノゲンアクチベーターなどの酵素の標的部位を含有するリンカーが含まれる。本発明の好ましいプロセッシング可能リンカーには、トロンビン切断部位を有するリンカーが含まれる。

【0155】

本発明において有用な適切なリンカーは、様々な方法を使用して設計することもできる。リンカーが、MHCクラスII成分のペプチド結合溝へのスペースホルダー分子の結合を妨げないように、例えば、MHCタンパク質のX線結晶学的データを使用して、適切な長さおよび電荷のリンカーを設計することができる。そのような方法は、本発明に含まれる。

40

【0156】

本発明のリンカーの長さは、リンカーがスペースホルダー分子とMHCクラスII成分との間の結合を実質的に阻害しないように、十分に短い(すなわち、サイズが十分に小さい)ことが好ましい。本発明のリンカーの長さは、約1アミノ酸残基~約40アミノ酸残基、より好ましくは約5アミノ酸残基~約30アミノ酸残基、さらにより好ましくは約8

50

アミノ酸残基～約20アミノ酸残基の範囲であり得る。

【0157】

リンカーの切断は、スペースホルダー分子の放出を促進し、それによってペプチド結合溝を解放する。次いで、MHCクラスII成分を、候補ネオアンチゲンのライブラリ（例えば、腫瘍および野生型細胞のエクソーム分析から設計されたペプチドのペプチド-DNAコンジュゲートライブラリ）とインキュベートして、MHCクラスII成分への抗原ペプチド分子の結合を促進することができる。当業者によって容易に決定され得る、結合を可能にするのに十分な時間の後、抗原ペプチド分子に結合したMHCクラスII成分が回収される。

【0158】

ある特定の実施形態では、リンカーを切断し、抗原ペプチド分子とインキュベートするステップは、異なる抗原ペプチド分子を使用して繰り返される。これらのステップを繰り返すことの利点は、いくつかの抗原エピトープを認識する多数のMHCクラスII成分の形成を可能にすることである。さらに、これらのステップは、MHCクラスII遺伝子の様々な対立遺伝子型で構築されたMHCクラスII分子を使用して実施することができる。したがって、アッセイのこの機能により、多数の異なるMHC対立遺伝子の遺伝子型に特有のいくつかのMHCクラスII成分の生成が可能になる。

【0159】

あるいは、本発明の結合アッセイ（例えば、MHC-ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイ）は、ファージディスプレイ系を利用する（例えば、Hammer Jら、Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides, Cell (1993) 74 (1): 197~203を参照のこと）。MHC II成分はファージディスプレイで発現される。次いで、MHC II成分を発現するファージを、候補ネオアンチゲンのライブラリ（例えば、腫瘍および野生型細胞のエクソーム分析から設計されたペプチドのペプチド-DNAコンジュゲートライブラリ）とインキュベートして、MHCクラスII成分への抗原ペプチド分子の結合を促進する。当業者によって容易に決定され得る、結合を可能にするのに十分な時間の後、抗原ペプチド分子に結合したMHCクラスII成分が回収される。

【0160】

ある特定の態様では、インシリコ分析が、ネオアンチゲンとMHCクラスIタンパク質またはその断片との間の特異的結合を決定するために使用される。インシリコ分析は、計算アルゴリズムを適用して、ネオアンチゲンのペプチド配列に基づいてMHC Iタンパク質への相対的結合を予測することを含む。netMHCpanなどのツールは、MHCタンパク質へのペプチド/ネオアンチゲンの結合の予測に使用される（Jurtzら、NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data, J Immunol (2017) 199 (9): 3360~3368を参照のこと）。この分析への入力、目的のペプチド配列およびMHC対立遺伝子であり、出力は予測される結合親和性である。

【0161】

ある特定の態様では、MHC結合アッセイまたはインシリコにおいてMHCクラスI分子またはMHCクラスII分子との結合を実証しているネオアンチゲンをプールしてペプチド混合物を形成する。次いで、このペプチド混合物、またはペプチド混合物からのペプチドをコードするオリゴヌクレオチドは患者に直接投与され得る。

【0162】

ワクチン投与

本明細書に提供される方法によるペプチドまたはオリゴヌクレオチドの投与は、注射、輸血、皮下、皮内、腫瘍内、節内、髄内、筋肉内、髄腔内、静脈内もしくはリンパ内注射による、または腹腔内を含むがこれらに限定されない、ペプチドまたはオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドを投与するための任意の適切な方法で実施され得る。一部の実施形態では、ネオアンチゲンまたはオリゴヌクレオチドは、腫瘍組織の切除によって形成された腔に投与されるか（すなわち、腔内送達）、または切除前に腫瘍に直接投与される（すなわち、腫瘍内送達）。一実施形態では、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドは静脈内注射によって投与される。

【0163】

一実施形態では、本発明は、1つまたは複数のネオアンチゲンペプチド、または各々がネオアンチゲンペプチドをコードする核酸配列を有する1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを用いてがんを処置する方法を含み、患者は、本発明によるネオアンチゲン処置またはオリゴヌクレオチド処置の前に骨髄非破壊的化学療法で前処置されている。

10

【0164】

がんを処置する方法

開示された組成物および方法によって処置されるがんは、いずれかの固形腫瘍であり得る。がんはまた、転移性および／または再発性であり得る。がんの非限定的な例には、急性リンパ性がん、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管、または肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢、または胸膜のがん、鼻、鼻腔、または中耳のがん、外陰のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性がん、子宮頸がん、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、卵巣がん、腹膜、大網、および腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、軟部組織がん、精巣がん、甲状腺がん、尿管がん、膀胱がん、および消化管がん、例えば、食道がん、胃がん（gastric cancer）、膵臓がん、胃がん（stomach cancer）、小腸がん、消化管カルチノイド腫瘍、口腔がん、結腸直腸がん、ならびに肝胆道がんが含まれる。

20

【0165】

全ての乳がんの約15%を占めるトリプルネガティブ乳がん（TNBC）は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、およびERBB2（HER2）遺伝子増幅を欠く非常に浸潤性の種類の腫瘍である。TNBCは、タモキシフェンもしくはアロマターゼ阻害剤などのホルモン療法、またはハーセプチン（トラスツズマブ）などのHER2受容体を標的とする療法には応答しない。TNBCで利用できる標的は限られているため、現在、新しい標的を見つけ、それによってこの種類の乳がんを処置することができるパーソナライズされた医薬を見つけることに強い関心がある。したがって、一部の実施形態では、がんはトリプルネガティブ乳がん（TNBC）である。

30

【0166】

がんの併用療法

開示された組成物および方法は、他のがん免疫療法と組み合わせて使用することができる。2つの異なる種類の免疫療法が存在する：受動免疫療法は、必ずしも患者の免疫応答を開始することなく、がん細胞に対する標的とされた細胞傷害活性を指向するために免疫系の成分を使用するのに対して、能動免疫療法は、内因性免疫応答を能動的に誘発する。受動戦略には、特定の抗原に应答してB細胞によって産生されるモノクローナル抗体（mAb）の使用が含まれる。1970年代のハイブリドーマ技術の開発および腫瘍特異的抗原の同定により、免疫系による破壊のための腫瘍細胞を特異的に標的とすることができるmAbの医薬品開発が可能になった。これまでのところ、mAbは免疫療法についての最も成功したストーリーであり、2012年に最も売れた抗がん薬物の上位3つはmAbであった。それらの中には、非ホジキンリンパ腫（NHL）などのB細胞悪性腫瘍の表面上で高度に発現するCD20タンパク質に結合するリツキシマブ（リツキサン、Genentech）がある。リツキシマブは、化学療法と組み合わせたNHLおよび慢性リンパ性白血病（CLL）の処置についてFDAによって承認されている。別の重要なmAbはトラスツズマブ（ハーセプチン、Genentech）であり、HER2の発現を標的とすることによってHER2（ヒト上皮増殖因子受容体2）陽性乳がんの処置に革命を

40

50

もたらした。

【0167】

最適な「キラー」CD8 T細胞応答を生成するには、T細胞受容体の活性化と共刺激も必要であり、これは、OX40 (CD134) および4-1BB (CD137) を含む、腫瘍壊死因子受容体ファミリーメンバーのライゲーションによって提供され得る。OX40は、活性化(アゴニスト)抗OX40 mAbによる処置が、T細胞分化および細胞溶解機能を増大し、様々な腫瘍に対する抗腫瘍免疫の増強につながるため、特に興味深いものである。

【0168】

多数の抗がん薬物が、本方法および組成物と組み合わせるために利用可能である。以下は、照射と併せて、または照射を用いずに使用され得る抗がん(抗新生物)薬物の包括的ではないリストである：アシピシン；アクリルピシン；アコダゾール塩酸塩；AcrQnine；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン(Ambomycin)；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスパラギナーゼ；アスペルリン(Asperlin)；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマスタット；ベンゾデパ；ビカルタミド；ビスアントレン塩酸塩；ビスナフィドジメシラート；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナルナトリウム；プロピリミン；ブスルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチマー(Carbetimer)；カルボプラチン；カルムスチン；カルピシン塩酸塩；カルゼレシン；セデフィンゴール；クロラムブシル；シロレマイシン；シスプラチン；クラドリビン；クリスナトールメシラート；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；ダウノルピシン塩酸塩；デシタビン；デキソルマプラチン；デザグアニン；デザグアニンメシラート；ジアジクオン；ドセタキセル；ドキシソルピシン；ドキシソルピシン塩酸塩；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エダトレキサート；エフロミチン塩酸塩(Eflomithine Hydrochloride)；エルサミトルシン(ElSAMITrucin)；エンロプラチン(Enloplatin)；エンプロマート(Enpromate)；エピプロピジン；エピルピシン塩酸塩；エルプロゾール；エソルピシン塩酸塩；エストラムスチン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；ヨード化ケシ油エチルエステルI 131；エトポシド；リン酸エトポシド；エトプリリン；ファドロゾール塩酸塩；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルロシタビン；ホスキドン；ホストリエシンナトリウム；ゲムシタビン；ゲムシタビン塩酸塩；金Au198；ヒドロキシ尿素；イダルピシン塩酸塩；イホスファミド；イルモホシン；イプロプラチン；イリノテカン塩酸塩；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸ロイプロリド；リアロゾール塩酸塩；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；ロソキサントロン塩酸塩；マソプロコル；メイタンシン；メクロレタミン塩酸塩；酢酸メゲストロール；酢酸メレンゲストロール；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトプリン；メツレデパ；ミチンドミド(Mitindomide)；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトギリル；ミトマルシン；マイトマイシン；ミトスペル；ミトタン；ミトキサントロン塩酸塩；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン(Oxisuran)；パクリタキセル；ペグアスパルガーゼ；ペリオマイシン；ペンタムスチン；硫酸ペプロマイシン；ペルホスファミド；ピボプロマン；ピボスルファン；ピロキサントロン塩酸塩；プリカマイシン；プロメスタン；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；プロカルバジン塩酸塩；ピューロマイシン；ピューロマイシン塩酸塩；ピラゾフリン；リボプリン(Riboprine)；ログレチミド(Rogletimide)；サフィンゴール(Safmgol)；サフィンゴール塩酸塩；セムスチン；シムトラゼン；スパルホサートナトリウム；スパルソマイシン；スピロゲルマニウム塩酸塩；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；塩化ストロンチウムSr89；スロフェヌル；タリソマイシン(T

10

20

30

40

50

al isomycin) ; タキサン ; タキソイド ; テコガランナトリウム (Tecogalan Sodium) ; テガフル ; テロキサントロン塩酸塩 ; テモポルフィン ; テニボシド ; テロキシロン ; テストラクトン ; チアミプリン ; チオグアニン ; チオテパ ; チアゾフリン ; チラパザミン ; トポテカン塩酸塩 ; クエン酸トレミフェン ; 酢酸トレストロン ; リン酸トリシリピン ; トリメトレキサート ; グルクロン酸トリメトレキサート ; トリプトレリン ; ツブロゾール塩酸塩 (Tubulozole Hydrochloride) ; ウラシルマスタード ; ウレデパ ; バブレオチド ; ベルテポルフィン ; 硫酸ビンブラスチン ; 硫酸ビンクリスチン ; ビンデシン ; 硫酸ビンデシン ; 硫酸ビネピジン (Vinepidine Sulfate) ; 硫酸ビングリシナート (Vinglycinate Sulfate) ; 硫酸ビンレウロシン ; 酒石酸ビノレルピン ; 硫酸ビンロシジン (Vinrosidine Sulfate) ; 硫酸ビンゾリジン (Vinzolidine Sulfate) ; ポロゾール ; ゼニプラチン ; ジノスタチン ; ゾルピシン塩酸塩。

10

【0169】

開示された組成物および方法は、1つまたは複数の免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて使用することができる。免疫チェックポイント阻害剤とは、チェックポイントシグナル伝達経路におけるタンパク質を阻害する化合物を意味する。チェックポイントシグナル伝達経路におけるタンパク質には、例えば、CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、TIGIT、Lair1、CD244、HAVCR2、CD200、CD200R1、CD200R2、CD200R4、LILRB4、PILRA、ICOSL、4-1BB、またはVISTAが含まれる。免疫チェックポイント阻害剤は、当該技術分野で公知である。

20

【0170】

例えば、免疫チェックポイント阻害剤は小分子であってもよい。小分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、または他の有機分子もしくはは無機分子であってもよい。

【0171】

あるいは、免疫チェックポイント阻害剤は、抗体またはその断片である。例えば、抗体またはその断片は、CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、TIGIT、Lair1、CD244、HAVCR2、CD200、CD200R1、CD200R2、CD200R4、LILRB4、PILRA、ICOSL、4-1BBまたはVISTAなどのチェックポイントシグナル伝達経路におけるタンパク質に特異的である。

30

【0172】

抗免疫チェックポイント抗体の例としては、例えば、イピリマブ (ipilimumab) (抗CTLA-4)、ペンブロリズマブ (pembrolizumab) (抗PD-L1)、ニボルマブ (抗PD-L1)、アテゾリズマブ (抗PD-L1)、およびデュルバルマブ (durvalumab) (抗PD-L1) が含まれる。

40

【0173】

本発明は、限定と解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例示される。本出願を通じて引用された全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容、ならびに図面は、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0174】

実施例1. ネオアンチゲンワクチンの概要

本発明者らは、新規ペプチド：MHCスクリーニング技術（すなわち、「ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイ」または「PeptideSeq」）または関連する方法論（例えば、リボソームディスプレイ）を適用して、ゲノム分析から、パーソナライズされた免疫原

50

性ネオアンチゲンを予測する、差別化されたペプチドワクチンアプローチ（図 1 および 2）を開発した。患者のネオアンチゲンに対応するペプチドを設計し、次いでこれらのペプチドを患者に投与する。ネオアンチゲンに対応するペプチドをコードする核酸配列を有する 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドを製造することができる。オリゴヌクレオチドを患者に投与することができる。

【0175】

ペプチド-DNA コンジュゲートアッセイは、DNA バーコード化ペプチドの大きなライブラリの効率的な合成および分析のための方法を提供する（図 3 を参照のこと）。

実施例 2．ヒト腫瘍からのネオアンチゲンの同定のための方法

以下の方法により、ヒト腫瘍からのネオアンチゲンの同定が可能になる。

10

【0176】

様々な悪性腫瘍を有するヒト患者から新たに切除された腫瘍検体を、各々 2 つの試料に分割する。最初の試料を使用して DNA および RNA を抽出し、全エクソーム配列決定および RNA seq を可能にする。生殖細胞系列試料（例えば、血液または頬スワブ）と共に、これにより、体細胞バリエーションの同定および関連タンパク質の発現の定量が可能になる。

【0177】

配列決定データの分析に続いて、腫瘍のゲノム情報を使用して、候補突然変異およびそれらの野生型対応物を網羅する重複ペプチドのライブラリを設計する。これらのペプチドの DNA コードライブラリは、例えば、ペプチド-DNA コンジュゲートプラットフォームまたはファージディスプレイプラットフォームを使用して高度に並列化された形で合成され、一般的に発現されるヒト MHC クラス II タンパク質のパネルに対して並列でアッセイされる。並列して、MHC クラス II 結合のインシリコモデルを適用して、候補ネオアンチゲンの第 2 のサブセットを同定する。得られたデータは、下流の注意のために推定クラス II または II 制限ネオアンチゲンのサブセットの優先順位付けを可能にする。

20

【0178】

ペプチド-DNA コンジュゲートアッセイもしくはファージディスプレイプラットフォームおよび／またはインシリコ予測アプローチによって同定された候補ネオアンチゲンを使用して、ネオアンチゲンを富化するための 2 つの並行アプローチが追求される。第 1 のアプローチでは、ネオアンチゲン反応性 T 細胞の選択的増殖は、腫瘍から単離した TIL（腫瘍細胞を含まない）を、サイトカインの存在下で最終候補の（すなわち、優先的な）ネオアンチゲン配列を表すペプチドと培養することによって達成される。

30

【0179】

さらに、最終候補の配列に対応する蛍光標識化ペプチド：MHC プローブ（およびおそらく細胞疲弊マーカーと組み合わせる）を使用して、蛍光活性化細胞選別によってネオアンチゲン反応性 T 細胞を単離する。いずれの場合も、*in vitro* 由来の腫瘍オルガノイドの使用の場合により含む、*in vitro* 活性化アッセイを使用して、自己腫瘍細胞に対する細胞産生物の活性を測定する。

【0180】

実施例 3．ヒト腫瘍からのネオアンチゲンの同定のための代替方法

40

ヒト患者から新たに切除された腫瘍検体を使用して DNA および RNA を抽出し、全エクソーム配列決定および RNA seq を可能にする。生殖細胞系列試料（血液または頬スワブ）と共に、これにより、体細胞バリエーションの同定および関連タンパク質の発現の定量が可能になる。

【0181】

配列決定データの分析に続いて、腫瘍のゲノム情報を使用して、候補突然変異およびそれらの野生型対応物を網羅する重複ペプチドのライブラリを設計する。これらのペプチドの DNA コードライブラリは、ペプチド-DNA コンジュゲートプラットフォームを使用して高度に並列して合成され、患者に特有の MHC クラス II（DR、DP、および DQ）に対して並列してアッセイされる。このプロセスにより、選択性および親和性による候

50

補ネオアンチゲンペプチド：MHCの迅速で信頼性の高い同定が可能になる。並列して、インシリコ分析を、ネオアンチゲンのペプチド配列に基づいて、MHCクラスⅡタンパク質への相対結合を予測する計算アルゴリズムを適用してペプチドライブラリに対して実施することができる。結果として、ペプチド変異体細胞腫瘍バリエーションの典型的に大きなカタログの中から、標的化されたネオアンチゲンの小さなセットが選択される。

【0182】

実施例4．ヒト患者およびマウスからの試料の採取

ネオTIL療法の有効性を試験するために、数人のヒト患者を臨床試験に登録した。患者は、肺がん、結腸直腸がん、黒色腫、乳がん、および結腸がんと診断されていた。さらに、結腸がんのBALB/cマウスモデルを腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の採取のために使用した。

10

【0183】

各ヒト患者およびマウスから腫瘍生検を採取した。単離された腫瘍細胞、末梢血単核細胞、およびTILの数を、各ヒト患者について決定した。さらに、各ヒト患者および結腸がんのBALB/cマウスモデルについて、MHC対立遺伝子および突然変異の数を同定した（表1を参照のこと）。

【0184】

【表1】

表1.結腸がんの各ヒト患者およびBALB/cマウスモデルについてのMHC対立遺伝子および突

20

然変異の同定

種	患者ID	がん型	生検部位	MHC対立遺伝子		突然変異の数
ヒト	TG00006	原発性肺	肺	DRB1*07:01	DRB1*11:03	83
ヒト	TG00013	転移性黒色腫	背部	DRB1*03:01	DRB1*01:02	374
マウス	BALB/cマウス	結腸がんモデル	N/A	1(A)d		1506

30

【0185】

実施例5．ヒト試料を用いたエクソーム配列決定、ペプチドライブラリ設計、および結合アッセイ

腫瘍エクソームおよび正常細胞からのエクソームの全エクソーム配列決定を使用して、図4および図5に概説されているように、ペプチド-DNAコンジュゲートライブラリを設計した。ペプチド-DNAコンジュゲートライブラリにおけるペプチドは、配列が重複し、野生型残基（「W」）および突然変異残基（「M」）を含有した（図5を参照のこと）。

【0186】

ヒト患者TG00006およびTG00013について、Dayら、J Clin Invest. 2003; 112(6): 831~842に概説されている方法を使用して、結合アッセイを図6に示すように実施した。結合アッセイにより、各患者に存在する特定のヒト白血球抗原血清型に対して高い親和性を有するペプチドを同定した（図7に示される各グラフの左上隅の大きなデータポイントを参照のこと）。ヒト患者TG00013についてのペプチドライブラリを使用した結合アッセイによる追加の分析を図8Aおよび図8Bに示す。

40

【0187】

HLA複合体に対して高い親和性を有するペプチドをコードする核酸を、ペプチド-DNAコンジュゲートアッセイを使用して同定したペプチド構築物を用いて単離した。これ

50

らの核酸を配列決定し、対応するアミノ酸配列をヒト患者TG00013について図9に示す。MHC-ペプチド-DNAコンジュゲート結果とインシリコ予測との比較を使用して、図10に示すように、ネオアンチゲンおよび／またはネオエピトープを同定および確認することができる。

【0188】

肺がん、黒色腫、膵臓がん、結腸直腸がん、胃腺癌、ブドウ膜黒色腫、基底細胞癌、メルケル細胞癌、および胆管細胞癌を含む様々な形態のがんを有するさらに数人のヒト患者を、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を採取し、ネオアンチゲンおよび抗腫瘍活性の認識を高めるためにこれらのTILを活性化し、教育するためにペプチドを生成することによって評価した（図11を参照のこと）。ペプチドワクチンを製造するためのプロセスの非限定的な例を図12に概説する。

10

【0189】

実施例6．ペプチドによる末梢血単核細胞の活性化

末梢血単核細胞（PBMC）は丸い核を有するいずれかの末梢血細胞である。これらの細胞はリンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）および単球から構成されるが、赤血球および血小板は核を有さず、顆粒球（好中球、好塩基球、および好酸球）は分葉核を有する。ヒトでは、リンパ球がPBMC集団の大部分を占め、次に単球が続く、樹状細胞はわずかな割合のみである。

【0190】

PBMCは、血液の層を分離する親水性多糖類であるFICOLL（登録商標）、および勾配遠心分離を使用して全血から抽出され得、これにより、血液が血漿の上層に分離され、続いてPBMCの層、ならびに多形核細胞（好中球および好酸球など）および赤血球の底部画分に分離される。

20

【0191】

本明細書に開示されるように生成されたペプチドワクチンの効率を試験するために、患者由来の腫瘍オルガノイドに対して免疫浸潤アッセイを実施した。簡潔に述べると、元の検体から単離された腫瘍細胞を超低親和性（ULA）プレートで培養して3D構造（オルガノイド）を形成した。オルガノイドは、抗原性の可能性を含む、元の組織の表現型の特徴を再現することが知られている。同じ患者由来の腫瘍オルガノイドとのPBMCの共培養後、オルガノイドへのPBMC浸潤のレベルがスタッキングイメージングによって定

30

【0192】

PBMCを、数世代の細胞の移動または位置をモニタリングするのに適した赤色蛍光色素である、InvitrogenのCELLTRACKER（商標）CM-DiIで染色して、オルガノイドへのPBMC浸潤の定量を容易にした。以下の処理をオルガノイドに施した：1）PBMC；2）PBMC+IL-2；3）PBMC+IL-2+ペプチドワクチン（「PEP」）；および4）PBMC+DMSO（ビヒクル）。オルガノイドへのPBMC浸潤を、投与から24時間および48時間後に定量した。図13の棒グラフに示すように、わずか24時間後に、IL-2およびペプチドと組み合わせたPBMCは、オルガノイドの顕著な浸潤を示した。

40

【0193】

実施例7．ペプチドワクチン研究

本明細書に開示されるように生成されたペプチドワクチンの安全性および有効性を評価するための研究を図14に概説する。この研究は、図14に列挙されている主要組み入れ基準および主要除外基準を用いて進行がんまたは転移がんを有する患者で行われる。この研究は以下の目的を有する：

- ・ペプチドワクチンを投与する安全性を評価すること；
- ・客観的奏効率（ORR）および臨床的有用率（CBR）によって評価される抗腫瘍活性を観察すること；
- ・いずれかの観察された応答（DOR）の持続時間を評価すること；

50

- ・登録された全ての患者の無増悪生存（PFS）および全生存（OS）を評価すること；
- ・ワクチン処置の前、間、および後の末梢血における抗原特異的CD5+およびCD4+T細胞応答を含む、いくつかの基準を評価することにより、ワクチン誘発性免疫応答を特徴付けること；
- ・プログラム死リガンド1（PD-L1）発現、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）および骨髓細胞の存在量および表現型、体細胞突然変異負荷、ならびにネオアンチゲン負荷などの、末梢血および腫瘍生検における探索的バイオマーカーを評価すること。

【0194】

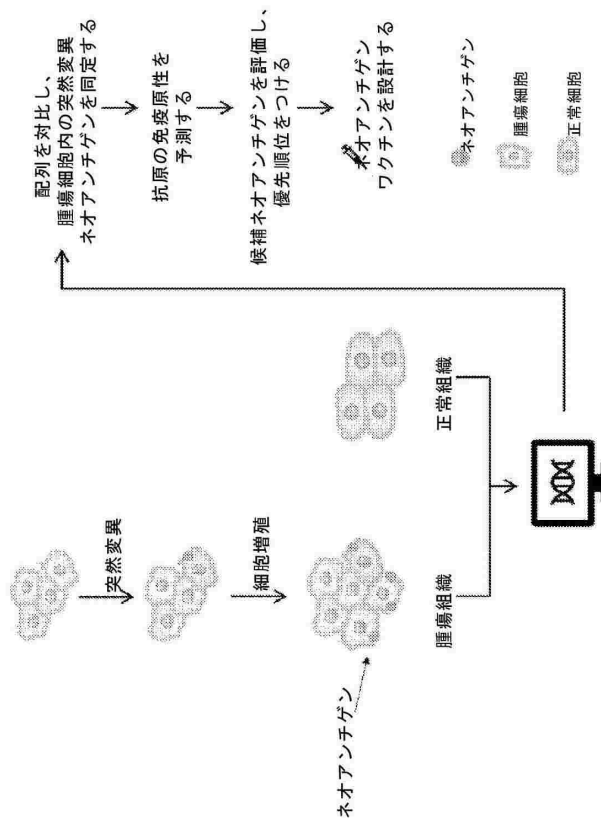
ペプチドワクチンによる処置期間は約12週間である。ワクチン接種処置期間の間、安全性、機能性、および免疫学的評価を行う。安全性および機能性評価は、最後の投与から30日（±7日）後に行う。

【0195】

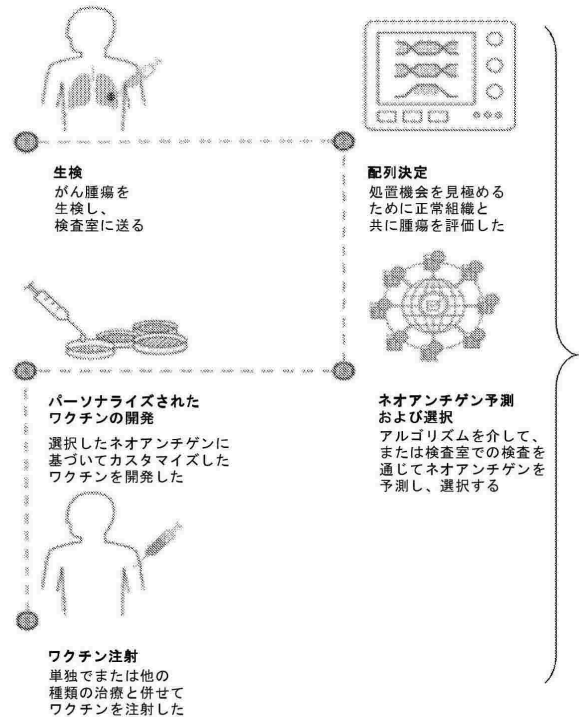
本発明をその特定の実施形態に関連して説明してきたが、さらなる修正が可能であり、本出願は、一般に本発明の原理に従った本発明のあらゆる変形、使用、または適合を網羅し、本発明が属する技術分野における知られているかまたは通常の慣行の範囲内にあり、前述の本質的な特徴に適用できるような、本開示からの逸脱を含むことを意図していることが理解されるであろう。

【図面】

【図1】



【図2-1】



10

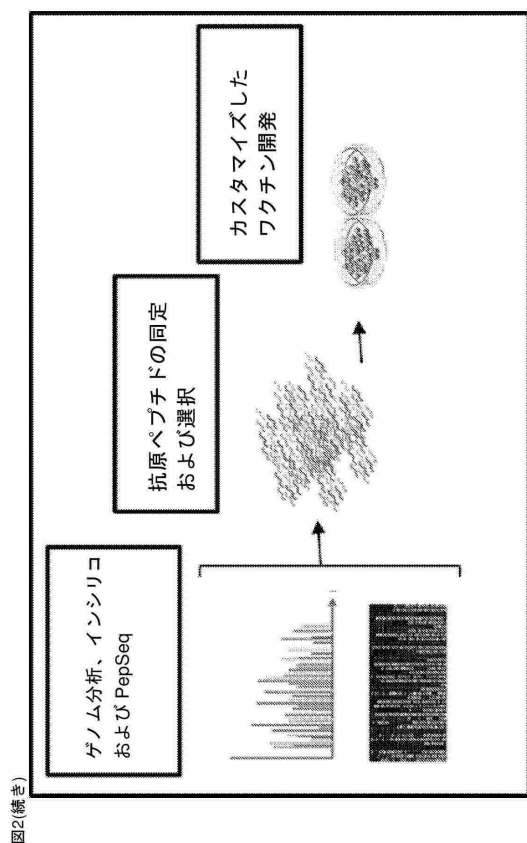
20

30

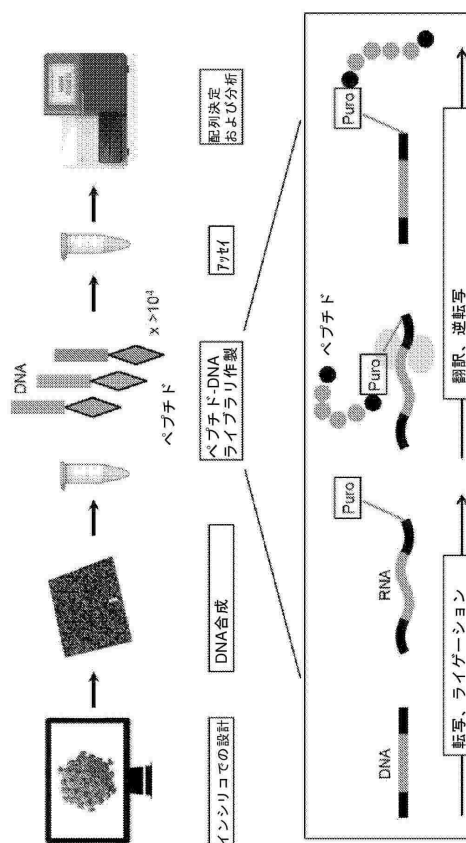
40

50

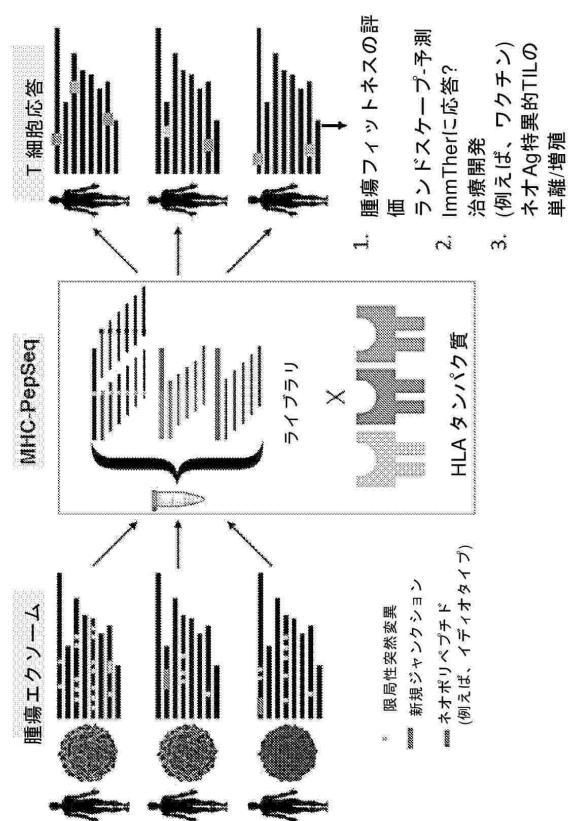
【図 2-2】



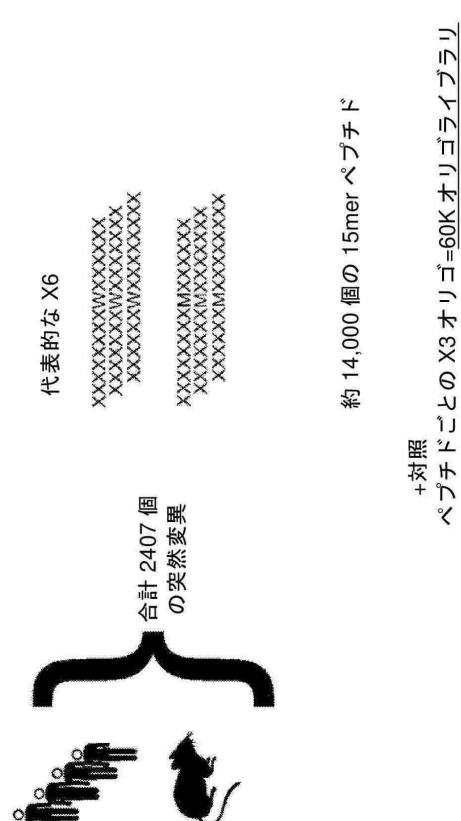
【図 3】



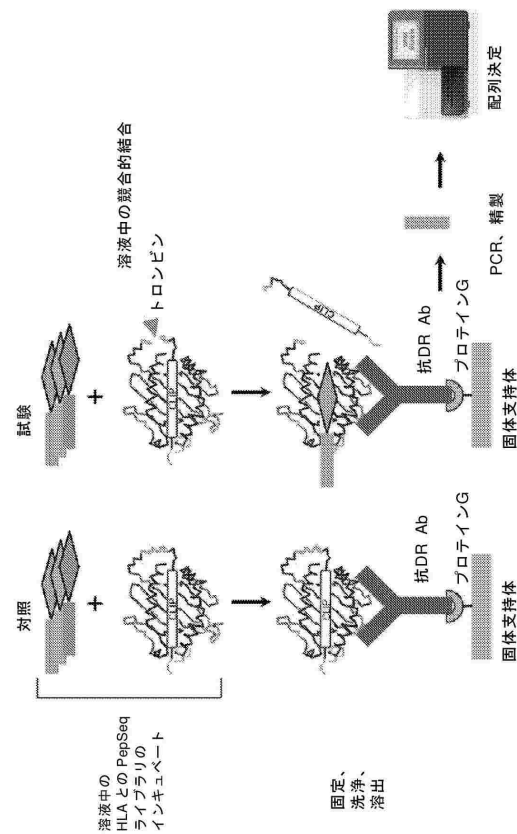
【図 4】



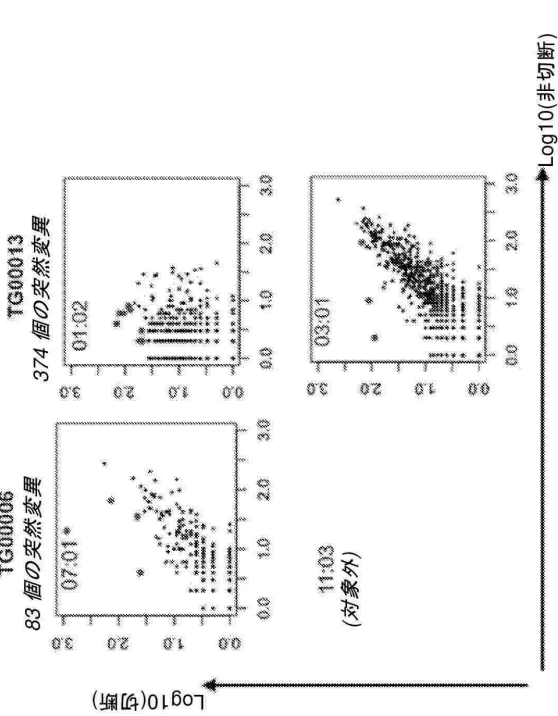
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

図 8 A

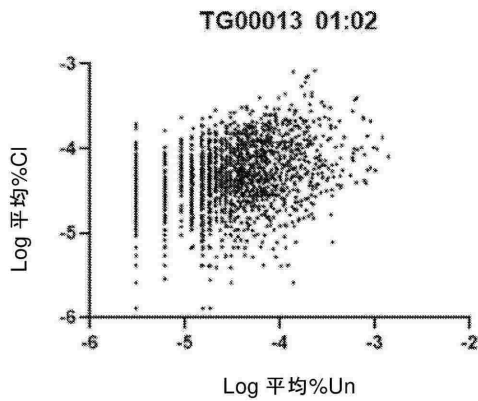
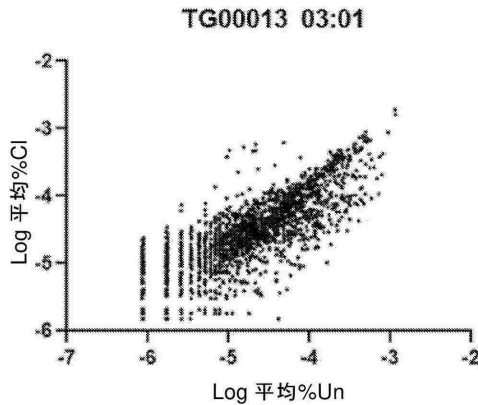


図 8 B



【図 9】

配列番号	ペプチド	バリエーションId	対立遺伝子
1	KAELSSLGALYYNT	chr12 g.29670467G>A	HLA-A*01:01
2	PHGYERKIFGIPLD	chr7 g.100490061C>T	HLA-B*49:01
3	IRENPLDVFVEAL	chr2 g.220401801G>T	HLA-B*49:01
4	QHDKEQKMGVSQS	chr10 g.107022141G>A	HLA-B*49:01
5	QENTCNITIEGLDAE	chrX g.1317557C>T	HLA-B*49:01
6	VEDPVYQVSETSRD	chr1 g.57536673C>T	HLA-B*49:01
7	LGFFKQNEHQNLUFV	chr11 g.57982316G>A	HLA-B*49:01
8	TKFIVEFPGLSMR	chr7 g.143701136G>A	HLA-B*49:01
9	ILLENTDLSAIWYLY	chr8 g.56436242C>A	HLA-A*01:01
10	SEKLSHLKITGDSFL	chr10 g.127503689_127503690G>A	HLA-B*49:01
11	KQEFVKPKIVREGG	chr14 g.23902797C>G	HLA-B*49:01
12	DCFSTNKLTYEALG	chr1 g.53446176G>A	HLA-A*01:01
13	KAIEKEMKVIALPPK	chr16 g.84432145A>T	HLA-B*49:01
14	DKEFVKFNRMHAVNG	chr11 g.93815720C>T	DRB1*01:02
15	ARALILPTRELALQ	chr12 g.113616994G>A	DRB1*01:02
16	WQPQSHSRQGHGTSP	chr20 g.62038446G>A	DRB1*01:02
17	SIHLITSRATNSQLF	chr8 g.134042224G>T	DRB1*01:02
18	QVIALHCSQAQSSVS	chrX g.91873700C>T	DRB1*01:02
19	LRCMGNNIGCRASCK	chr20 g.29965209C>T	DRB1*01:02
20	WITPLDHLVAFPTRV	chr21 g.40765177G>A	DRB1*01:02
21	AIKTLKSGHMDRQRR	chr3 g.97251282G>A	DRB1*01:02
22	ALFDGDSHLSTENPA	chr9 g.79320379G>A	DRB1*01:02
23	PSPTVLRAHAEMALD	chr9 g.95738854G>A	DRB1*01:02
24	DMLSQTNCFVSLWLP	chr15 g.42300052C>T	DRB1*03:01

10

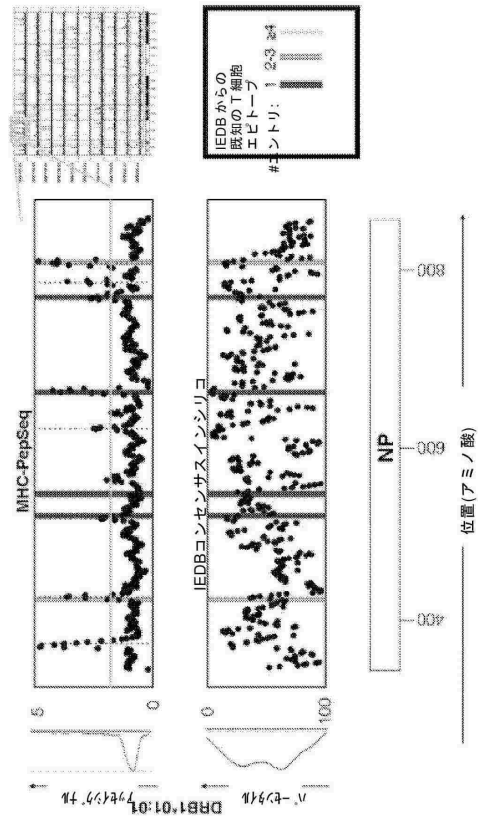
20

30

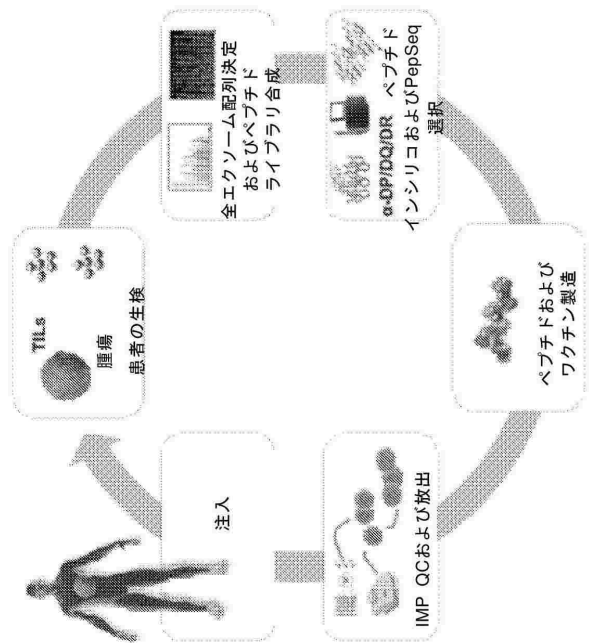
40

50

【図 1 0】



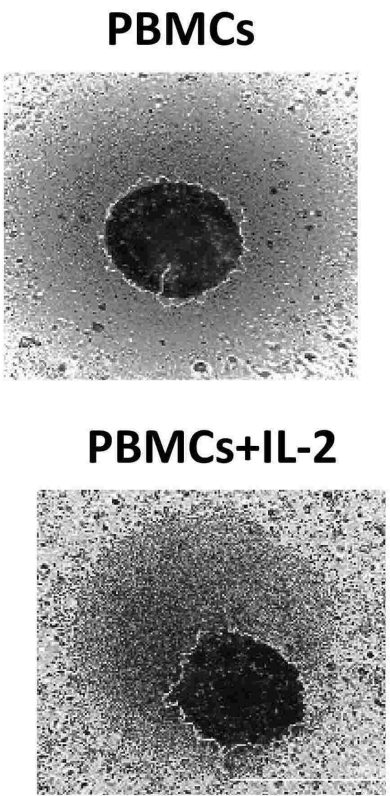
【図 1 2】



【図 1 1】

TIL患者カウント	腫瘍型	TILs	オルガノイド
1	肺	3.04 x 10 ⁶	あり
2	黒色腫	7.5 x 10 ⁵	あり
3	黒色腫	6.70 x 10 ⁶	あり
4	肺癌	4 x 10 ⁶	あり
5	肺癌	1.5 x 10 ⁶	あり
6	結腸直腸	9.65 x 10 ⁵	あり
7	肺癌	1 x 10 ⁶	あり
8	肺癌	9.53 x 10 ⁵	あり
9	胃腸癌	1.10 x 10 ⁶	あり
10	結腸直腸	5.89 x 10 ⁶	あり
11	結腸直腸	2.115 x 10 ⁶	あり
12	結腸直腸	8.54 x 10 ⁵	あり
13	ブドウ膜黒色腫	1.1 x 10 ⁶	あり
14	肺癌	3 x 10 ⁵	あり
15	黒色腫	3.5 x 10 ⁶	あり
16	基底細胞癌	6.33 x 10 ⁶	あり
17	メラノーマ細胞癌	6.33 x 10 ⁷	あり
18	胆管細胞癌	6.33 x 10 ⁸	あり

【図 1 3 - 1】



10

20

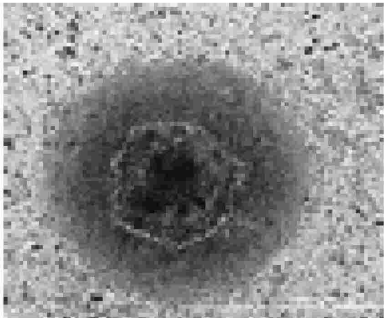
30

40

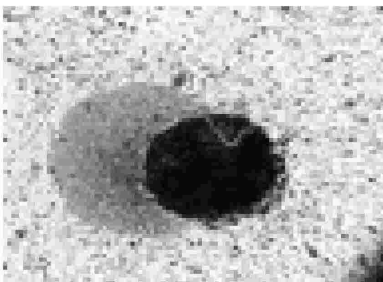
50

【図 1 3 - 2】

PBMCs+Pep+IL2



PBMCs+DMSO



【図 1 3 - 3】

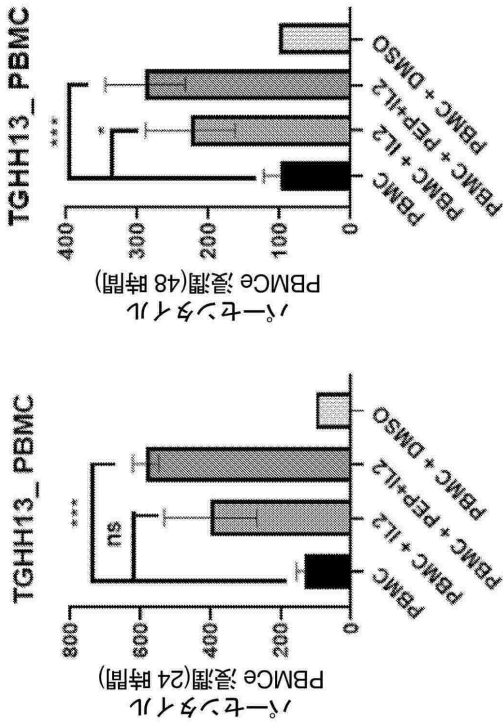
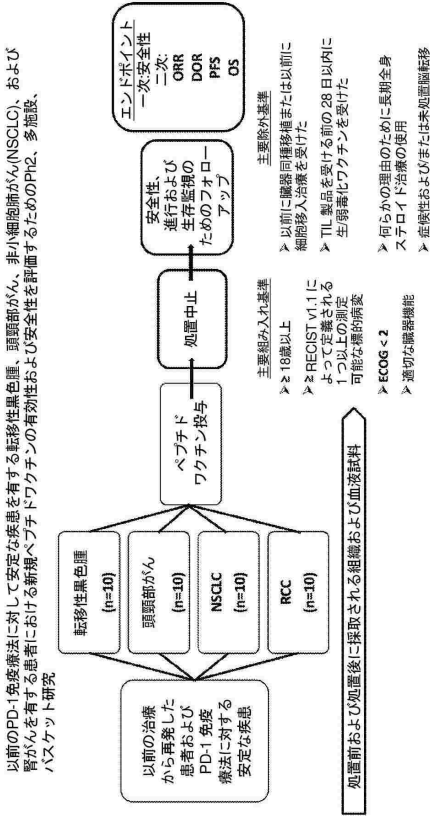


図13(続き)

【図 1 4】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024511799000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/22074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/00; C07K 16/30; A61K 35/17; C07K 14/47; A61P 35/00; A61K 38/00; C12N 15/62 (2022.01)
CPC - C12N 5/0638; A61K 39/0011; A61K 39/00; C12N 5/0693; A61K 39/001102; C07K 16/30; A61K 35/17; C07K 14/4748; C07K 14/7051; A61P 35/00; C12N 15/62; A61K 38/00; C12N 5/0638; C07K 16/2833; A61K 2039/876; A61K 2039/572; A61K 2039/82; A61K 2039/86; C07K 2319/00; C07K 2317/565; C12N 2510/00; A61K 2039/505

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	RICHTERS. "Best practices for bioinformatic characterization of neoantigens for clinical utility". Genome Medicine. Web. 28 August 2019; page 1, abstract; page 2, Figure 1 & first column, first paragraph; page 3, second column, last paragraph; page 14, first column, second paragraph; DOI: 10.1186/s13073-019-0666-2	1-4 ---
Y	WO 2020/157760 A1 (BAR ILAN UNIVERSITY) 06 August 2020; page 1, abstract; page 37, middle paragraph; page 59, last paragraph; page 61, last paragraph and page 116, last paragraph	23-26
Y	WO 2018/144775 A1 (MODERNATX INC) 09 August 2018; page 2, lines 22-23; page 3, lines 1-2; page 7, lines 16-17; page 42, lines 22-23; page 100, lines 30-32; page 101, lines 11-12	33-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 July 2022 (05.07.2022)

Date of mailing of the international search report

JUL 25 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US22/22074
Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments: An "Invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing and to Pay, Where Applicable, Late Furnishing Fee" (Form PCT/ISA/225), was mailed on 20 April 2022 (20.4.2022). No sequence listing was filed with the ISA/US in response to the Form PCT/ISA/225. Therefore, the international search will be carried out only to the extent possible.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/22074

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-22, 27-32, 39-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. P Y T H O N

2. T R I T O N

	アメリカ合衆国アリゾナ州8 5 0 0 4, フェニックス, ノース・フィフス・ストリート	4 4 5
(72)発明者	ソルディ, ラファエラ	
	アメリカ合衆国アリゾナ州8 5 0 0 4, フェニックス, ノース・フィフス・ストリート	4 4 5
(72)発明者	アルティン, ジョン	
	アメリカ合衆国アリゾナ州8 6 0 0 1, フラッグスタッフ, ノース・ロックリッジ	1 2 5 5
(72)発明者	トレント, ジェフリー	
	アメリカ合衆国アリゾナ州8 5 0 0 4, フェニックス, ノース・フィフス・ストリート	4 4 5

F ターム (参考)	4B063	QA01 QA07 QA17 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR55
		QR62 QS34 QX02
	4C084	AA13 MA66 NA14 ZB091 ZB211 ZB261
	4C085	AA02 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06