

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-536157  
(P2013-536157A)

(43) 公表日 平成25年9月19日(2013.9.19)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K 37/02	Z N A	2 G 045
<b>C07K 14/82</b> (2006.01)	C 07 K 14/82		4 C 084
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00		4 C 085
<b>A61K 39/00</b> (2006.01)	A 61 K 39/00	H	4 C 086
<b>A61K 39/39</b> (2006.01)	A 61 K 39/39		4 H 045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-512926 (P2013-512926)	(71) 出願人	506258073 イマティクス バイオテクノロジーズ ゲ ーエムベーハー
(86) (22) 出願日	平成23年6月1日 (2011.6.1)		ドイツ, 72076 テュービンゲン, パ
(85) 翻訳文提出日	平成24年10月2日 (2012.10.2)		ウルエンリヒーシュトラー 15
(86) 國際出願番号	PCT/EP2011/059121	(74) 代理人	100088904
(87) 國際公開番号	W02011/151403		弁理士 厄司 隆
(87) 國際公開日	平成23年12月8日 (2011.12.8)	(74) 代理人	100124453
(31) 優先権主張番号	61/350,731		弁理士 賀延 由利子
(32) 優先日	平成22年6月2日 (2010.6.2)	(74) 代理人	100135208
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 大杉 輔也
(31) 優先権主張番号	1009222.9	(74) 代理人	100152319
(32) 優先日	平成22年6月2日 (2010.6.2)		弁理士 曾我 亜紀
(33) 優先権主張国	英國(GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サイクリンD 1 由来腫瘍関連抗原に基づくがん治療法の改良

## (57) 【要約】

本発明は、がん患者の治療改善におけるサイクリンD 1 由来ペプチドの使用法、特にワクチンによる併用療法の形態に関する。他の態様は、ペプチドの使用または診断ツールとしてのその併用に関する。

Figure 1

```

1 MEHQQLCCEV ETIRRAYPD A NLLNDRVLRA M LKAEEETCAP SVSYFKCVQK EVLPSMRKIV
CCN-E CCN-I

61 ATWMILEVCEE QKCCEERVFPL AMNYILDRFLS LEPVKKSRLQ LLGATCMFVA SKMKETIPLT
CCN-A CCN-004 AND F1 TO F3 CCN-001 CCN-006

121 AEKLCLYTUN SIRPEELLQM ELLVNPKLW NLJAMTPHDF IEFPLSKNPF AEENQIIRK
CCN-H CCN-J

181 HAQZFEVALCA TDVKFISNPP SMVAGGSVVA AVQGLMLRSP NNFLSYTRIT PFLSLVTKCD
CCN-003 CCN-B TO D AND G CCN-002

241 PDCLRACQEQ IEALLESSLR QAGQNMDFKA ABBBBBBBBB VDLACTPTDV RDVDI
CCN-007

```

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 No. 1 から 配列番号 No. 18 のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列からなる若しくはから本質的になるペプチドを含むがん患者の治療剤、又は配列番号 No. 1 から 配列番号 No. 18 から選択されたアミノ酸配列からなる若しくはから本質的になる少なくとも 1 つのペプチドを含む組み合わせ、を含むがん患者の治療剤。

**【請求項 2】**

前記ペプチドは配列番号 No.1、配列番号 No. 4、および / または 配列番号 No. 18 から選択される、請求項 1 の治療剤。

**【請求項 3】**

前記がんは、肺癌、頭頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、子宮頸癌、消化器癌、膠芽細胞腫、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肺の前がん病変、大腸癌、メラノーマ、膀胱癌、およびその他のがん疾患から選択される、請求項 1 又は 2 の治療剤。

**【請求項 4】**

前記ペプチドまたは組み合わせは、抗がんワクチンの形態、及び / 又は GM-CSF のようなアジュバントを 1 つ以上含む形態で投与される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一に記載の治療剤。

**【請求項 5】**

配列番号 No. 19 から 配列番号 No. 26 のいずれかから選択される、サイクリン D1 に由来しない、別の腫瘍関連ペプチドを 1 つ以上投与することを含むペプチドまたは組み合わせである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一に記載の治療剤。

**【請求項 6】**

前記 1 つ以上の別の腫瘍関連ペプチドは、前記組み合わせに存在する他のペプチドに比較した、異なる HLA- 分子への結合能力に基づいて選択される、請求項 5 の治療剤。

**【請求項 7】**

前記ペプチドまたは組み合わせは、毎月、毎週、あるいは 1 週間に 2 回、繰り返し投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一に記載の治療剤。

**【請求項 8】**

CD4+ CD25+ 調節 T 細胞によって代表される免疫調節細胞集団を不活性化および / または排除する薬剤、又はシクロホスファミドによって代表される化学療法剤を 1 つ以上併用する請求項 1 ~ 7 のいずれか一に記載の治療剤。

**【請求項 9】**

1 つ以上の前記化学療法剤と併用する前記治療薬は、前記ペプチドまたは組み合わせの投与前に投与し、単回投与、又は、投与量 300 mg/m<sup>2</sup> のシクロホスファドを単回注入する、請求項 8 の治療剤。

**【請求項 10】**

前記治療剤は、スニチニブまたはソラフェニブで代表される事前の TKI 療法、および / または、インターフェロンまたはインターロイキンで代表される事前のサイトカイン療法後の補助療法として投与される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一に記載の治療剤。

**【請求項 11】**

サイトカイン療法を含み、その後シクロホスファミドを単回投与し、さらにその後、1 週間ほぼ毎日初回刺激のためワクチンを投与し、その後 6 ヶ月間以上 2 週間毎にワクチンを投与する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一に記載の治療剤。

**【請求項 12】**

抗原特異的方法で前記 CTL を活性化するのに十分な期間、適切な抗原提示細胞表面で発現したヒトクラス I または II MHC 分子が負荷されたペプチドまたは組み合わせと共に接触 CTL を含む、活性化細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を *in vitro* で生成するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一に記載のペプチドまたは組み合わせの使用。

**【請求項 13】**

10

20

30

40

50

患者の免疫系の活性化または調節を検出および／またはモニターするための診断手段としての、請求項 1 から 6 のいずれか一に記載のペプチドまたは組み合わせの使用。

【請求項 1 4】

がんの診断における診断手段としての、請求項 1 から 6 のいずれか一に記載のペプチドまたは組み合わせの使用。

【請求項 1 5】

配列番号 No. 5 または 配列番号 No. 6 から選択されたアミノ酸配列からなる、またはから本質的になる、腫瘍関連ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、癌患者の治療改善における、特にワクチンによる併用療法の形態でのサイクリン由来ペプチドの使用に関する。他の態様は、ペプチドの使用または診断ツールとしてのその組み合わせに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫応答の刺激は、宿主の免疫システムにより異物であると認識された抗原が存在するかに依存する。腫瘍関連抗原が存在することが発見され、現在、腫瘍の成長に介入するため、宿主の免疫系を利用する可能性が浮上している。体液性免疫応答と細胞性免疫応答の両方を利用する様々なメカニズムが、現在、がんの免疫療法において研究されつつある。

10

20

30

40

50

【0 0 0 3】

細胞性免疫応答のある種の要素は、腫瘍細胞を特異的に認識し破壊することができる。腫瘍浸潤細胞群または末梢血から単離した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、これらの細胞ががんに対する自然の免疫防御で重要な役割を果たしていることを示唆している (Cheever et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 1993; 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; J Immunol. 1999; 162(2):989-94; High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy)。特に、CD 8 陽性 T 細胞 (TCD8<sup>+</sup>) は、タンパク質または不完全なリボゾーム産物 (DRIPS) に由来する、通常 8~10 アミノ酸残基の主要組織適合複合体 (MHC) を有するペプチドである、クラス I 分子を認識し (Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; Nature 2000; 404(6779):770-774)、これは細胞質に存在するが、この応答に重要な役割を果たしている。ヒトの MHC 分子はヒト白血球型抗原 (HLA) とも呼ばれる。

【0 0 0 4】

MHC 分子には 2 つのクラスがあり、MHC クラス I 分子は、核を有する殆どの細胞にみられ、内因性タンパク質、DRIPS、より大きなペプチドのタンパク質分解的切断によって生じたペプチドを提示する。MHC クラス II 分子は、主にプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) に認められ、エンドサイトーシスの過程で APC により取り込まれた後処理される、外因性タンパク質のペプチドを与える (Cresswell P. Annu. Rev. Immunol. 1994; 12:259-93)。ペプチドと MHC クラス I 分子の複合体は、適切な TCR を持つ CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球により認識され、ペプチドと MHC クラス II 分子の複合体は、適切な TCR を持つ CD4 陽性ヘルパー T 細胞により認識される。TCR とペプチドと MHC 分子は 1:1:1 の化学量論量比で多量に存在することは良く知られている。

【0 0 0 5】

CD4 陽性ヘルパー T 細胞は、抗腫瘍 T 細胞応答のエフェクター機能を調整するのに重要な役割を果たしており、このことから、腫瘍関連抗原 (TAA) 由来 CD4 陽性 T 細胞エピトープの同定は抗腫瘍免疫応答を誘発する薬剤物質の開発に非常に重要である可能性がある (Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. H

erraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borras-Cuesta, and E. Celis. 2002. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. Clin. Cancer Res. 8:3219-3225., Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N.K. Altorki, R.G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y.T. Chen, A. Knuth, and L.J. Old. 2003. Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100(15):8862-7)。CD4+ T 細胞は IFN? レベルを局所的に増大に導くことができる (Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T; A critical requirement of interferon gamma-mediated angiogenesis for tumor rejection by CD8+ T cells; Cancer Res. 2003; 63(14):4095-4100)。

10

## 【0006】

MHC クラス II 分子の発現は炎症がない場合、主に免疫応答の細胞、特にプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC)、例えば、単核球、単核球由来細胞、マクロファージ、樹状細胞に限られる。腫瘍患者では、驚くべきことに、腫瘍細胞が MHC クラス II 分子を発現していることが分かった (Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsiouidis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170)。

20

## 【0007】

HLA クラス II 分子の構成的発現は、通常免疫系の細胞に限られているため (Mach, B., V. Steinle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. Annu. Rev. Immunol. 14:301-331)、原発性腫瘍から直接クラス II ペプチドを単離することはできないと考えられていた。しかし、Dengjel らは最近、腫瘍から直接多数の MHC クラス II エピトープを同定することに成功した (EP 04 023 546.7, EP 05 019 254.1;; Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsiouidis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170)。

30

## 【0008】

ペプチドが細胞性免疫応答を始動する（引き起こす）には、MHC 分子へ結合が必要である。この過程は MHC 分子の対立遺伝子およびペプチドのアミノ酸配列の対立遺伝子によって決定される。MHC クラス I 結合ペプチドは通常 8 個から 10 個のアミノ酸残基長であり、MHC 分子の対応する結合溝と相互作用するペプチドの配列内に通常 2 つの保存された残基（「アンカー」）を持つ。このようにして、個々の MHC 対立遺伝子は、どのペプチドが結合溝に特異的に結合できるかを決定する「結合モチーフ」を有する (Rammensee H. G., Bachmann J. and Stevanovic, S; MHC Ligands and Peptide Motifs, Chapman & Hall 1998)。

40

## 【0009】

MHC クラス I 依存性免疫反応において、ペプチドは、腫瘍細胞によって発現されるある種の MHC クラス I 分子と結合可能であることが必要であるだけでなく、特異的 T 細胞受容体 (TCR) を持つ T 細胞によって認識されることも必要である。

## 【0010】

腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球、つまりそのエピトープによって認識された抗原は、酵素、受容体、転写因子など、各腫瘍細胞中でアップレギュレートされる、あらゆるタンパク質クラスに由来する分子がなりうる。さらに、腫瘍関連抗原は、例えば、変異遺伝子の生成物、または代替オープンリーンディングフレーム (ORF) から、またはタンパク質スプライシングからの生成物として、腫瘍細胞に固有となることもできる (Vigneron N

50

, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome, *Science* 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90. )。もう 1 つ重要なクラスの腫瘍関連抗原は、様々な種類の腫瘍および健常な精巣組織に発現される CT (「cancer testis (癌・精巣)」) 抗原など、組織特異的抗原である。基本的に、MHC 分子に結合できるどのようなペプチドも、T 細胞エピトープとして機能しうる。*in vitro* または *in vivo*において T 細胞応答を誘発するには、対応する TCR を有する T 細胞の存在と、さらにこの固有エピトープに対する免疫学的耐性の欠損が必須条件である。

## 【0011】

そのため、TAA は腫瘍ワクチンの開発における出発点である。TAA の同定 / 特徴決定方法は、患者または健常被験者から単離される CTL の使用に基づくか、または腫瘍と正常組織との転写プロフィールおよびペプチド発現の差の発生に基づいている (Lemmel C., Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D., Rammensee H. G., Stevanovic S. *Nat. Biotechnol.* 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62 (20):5818-5827, 2002. )。

## 【0012】

しかしながら、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株に過剰発現しているか、選択的にどのような組織や細胞株に発現している遺伝子の同定では、免疫療法でこれらの遺伝子から転写される抗原を利用することに関して正確な情報は得られない。これは、対応する TCR を持つ T 細胞の存在が必要であり、また、この特定エピトープに対する免疫耐性の欠損、または最小化が必要であることから、これらの抗原エピトープの個々の亜集団のみがそのような用途に適しているからである。それゆえ、機能的 T 細胞が認められる MHC 分子と結合した状態で存在する、過剰発現または選択的に発現しているタンパクからこれらのペプチドのみを選択することが重要となる。そのような機能的 T 細胞は、特異抗原の刺激によってクローンを増やし、エフェクター機能行使できる T 細胞として定義される (「エフェクター T 細胞」)。

## 【0013】

ヘルパー T 細胞は、抗腫瘍免疫性において、CTL のエフェクター機能を統合する際に重要な役割を果たす。TH1 タイプのヘルパー T 細胞応答を始動させるヘルパー T 細胞のエピトープは、腫瘍関連ペプチド / MHC 複合体を細胞表面に提示している腫瘍細胞に対する傷害機能など、CD8 陽性キラー T 細胞のエフェクター機能をサポートしている。このようにして、腫瘍関連ヘルパー T 細胞のエピトープは、単独で、または他の腫瘍関連ペプチドと共に、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の薬剤有効成分とすることができる。

## 【0014】

CD8 および CD4 依存型の 2 つの免疫応答タイプは共に、連携し相乗して抗腫瘍効果に寄与しているため、CD8 陽性 CTL (リガンド : MDC クラス I 分子 + ペプチドエピトープ) または CD4 陽性 CTL (リガンド : MHC クラス II 分子 + ペプチドエピトープ) のいずれかを利用した腫瘍関連抗原の同定、および特徴づけは腫瘍ワクチンの開発に重要である。

## 【0015】

サイクリン D1 は高度に保存されたサイクリンファミリー、さらに具体的にはサイクリン D サブファミリーに属している (Lew DJ, Dulic V, Reed SI (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-1206; Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699) )。サイクリンはサイクリン依存キナーゼ (CDK) の調節因子として働く。異なるサイクリンは、細胞サイクルにおける各イベントの一時的な調整に寄与する、独

10

20

30

40

50

特な発現および分解パターンを呈する (Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005).Cyclins and cdks in development and cancer:a perspective.Oncogene 24, 2909-2915.) 。サイクリン D1 は CDK4 または CDK6 の調節サブユニットと複合体を形成し、調節サブユニットとして働き、その活動は細胞周期で G1/S 相の移行に必要である。CCND1 は、その複合体へ基質特異性を与える CDK4 および CDK6 と、セリン／スレオニンキナーゼのホロ酵素複合体を形成する (Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G (1994).CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1.Oncogene 9, 71-79) 。細胞周期の進行を変化させる、この遺伝子の突然変異、増殖、および過剰発現は、様々な腫瘍で頻繁に観察され、腫瘍発生に寄与している可能性がある (Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, Landberg G (1999).Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. Int. J. Cancer 84, 268-272; Vasef MA, Brynes RK, Sturm M, Bromley C, Robinson RA (1999).Expression of cyclin D1 in parathyroid carcinomas, adenomas, and hyperplasias:a paraffin immunohistochemical study. Mod. Pathol. 12, 412-416; Troussard X, vet-Loiseau H, Macro M, Mellerin MP, Malet M, Roussel M, Sola B (2000).Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. Hematol. J. 1, 181-185) 。サイクリン D1 は、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、肺癌、および乳癌、さらに白血病とリンパ腫で過剰発現し、正常組織には殆ど発現しない。サイクリン D1 は、染色体 11q13 のがん原遺伝子 CCND1 を染色体 14q32 の Ig 重鎖遺伝子と並列にする、t(11;14)(q13;q32) 転座によって特徴づけられる、マントル細胞リンパ腫においても通常過剰発現する (Wang et al., 2009; Kondo et al., 2008) 。

#### 【 0 0 1 6 】

共通の A/G 単一ヌクレオチド多型 (A870G) の結果、サイクリン D1 中に 2 つの異なる mRNA アイソフォーム a と c が形成される。交互にスプライスされたアイソフォーム b は、突発性 RCC、肺癌、大腸癌、および他のがん種など腫瘍発生率の高さと関連性がある短縮型タンパク質をコード化する。(Fu M, Wang C, LI Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004). Minireview:Cyclin D1:normal and abnormal functions.Endocrinology 145, 5439-5447; Yu J, Habuchi T, Tsuchiya N, Nakamura E, Kakinuma H, Horikawa Y, Inoue T, Ogawa O, Kato T (2004). Association of the cyclin D1 gene G870A polymorphism with susceptibility to sporadic renal cell carcinoma. J Urol. 172, 2410-2413) 。CCND1 発現の亢進は、腫瘍悪性度の上昇、転移、生存率の低下と関連していた (Maeda K, Chung Y, Kang S, Ogawa M, Onoda N, Nishiguchi Y, Ikebara T, Nakata B, Okuno M, Sowa M (1998). Cyclin D1 overexpression and prognosis in colorectal adenocarcinoma. Oncology 55, 145-151; McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Murray GI, Cassidy J, McLeod HL (2000). Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. Aberdeen Colorectal Initiative. Int. J Cancer 88, 77-81; Bahnaassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M (2004). Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. BMC. Gastroenterol. 4, 22; Balcerzak E, Pasz-Walczak G, Kumor P, Panczyk M, Kordek R, Wierzbicki R, Mirowski M (2005). Cyclin D1 protein and CCND1 gene expression in colorectal cancer. Eur. J Surg. Oncol. 31, 721-726) 。

#### 【 0 0 1 7 】

大腸癌では、mRNA とタンパク質レベルで CCND1 の過剰発現が頻繁に報告してきた。このことは、CCND1 が大腸癌でアップレギュレートされることが多い s-カテキン-TCF/LEF 経路のターゲット遺伝子であるという定着した事実によって説明できる (Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999).The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 5522-5527; Tetsu O, McCormick F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 398, 422-426) 。サイク

10

20

30

40

50

リン D1 遺伝子は、s-カテキン/LEF-1 経路のターゲットである (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 5522-5527; Tetsu O, McCormick F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 398, 422-426)。

#### 【0018】

サイクリンペプチド CCN-001 (LLGATCMFV) は Sadovnikova らによって同定された (Sadovnikova E, Jopling LA, Soo KS, Stauss HJ (1998). Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. Eur. J. Immunol. 28, 193-200)。数種のサイクリン D1 由来 HLA-A\*02 結合ペプチドに対するアロ制限 T 細胞（すなわち、HLA-A2 陰性ドナー）の誘導後、CCN-001 を認識する T 細胞クローニングはサイクリン D1 を内因的に発現する HLA-A\*02 陽性腫瘍細胞を溶解するが、サイクリン D1 に陰性な HLA-A\*02 陽性細胞は溶解しない可能性があることが示された。そのため、CCN-001 は間接的な証拠によってのみ自然に処理され存在することが示された。

10

#### 【0019】

しばらくの間、サイクリン D1 由来エピトープを認識する T 細胞は、サイクリン D1 が胸腺で発現するため、T 細胞のレパートリーには存在しないと示唆されていた。これを仮定すると、サイクリン D1 への自己 CTL の発生は不可能ということになる。

#### 【0020】

しかし、Kondo ら (Kondo E, Maecker B, Weihrauch MR, Wickenhauser C, Zeng W, Nader LM, Schultze JL, von Bergwelt-Baillon MS (2008). Cyclin D1-specific cytotoxic T lymphocytes are present in the repertoire of cancer patients: implications for cancer immunotherapy. Clin Cancer Res 14, 6574-6579) は、エピトープ CCN-001 (LLGATCMFV) に特異的な CTL は HLA-A2+ ドナーからも同様に発生する可能性があることを示した。大腸癌患者およびマントル細胞リンパ腫患者と同様に、健常ドナーについてもこのことを証明した。APC として、自己 CD40 活性化 B 細胞が使用された。

20

#### 【0021】

Wang ら (Wang M, Sun L, Qian J, Han X, Zhang L, Lin P, Cai Z, Yi Q (2009). Cyclin D1 as a universally expressed mantle cell lymphoma-associated tumor antigen for immunotherapy. Leukemia 23, 1320-1328) は、APC としてマントル細胞リンパ腫の患者の T 細胞と自己成熟単球由来 DC を使って CCN-001 に対するサイクリン D1 特異的 CTL を生成した。彼らは、元のペプチドは使用せず、最初のアミノ酸 (L) が MHC 結合を強める Y で置換された、ヘテロ環ペプチドを使用した。得られた CTL は HLA-A2+ マントル細胞リンパ腫の患者の原発性リンパ腫細胞など、サイクリン D1+ 発現細胞を殺傷する可能性がある。このペプチドはまた他の研究でも使われ (Kondo E, Grysok L, Klein-Gonzalez N, Rademacher S, Weihrauch MR, Liebig T, Shimabukuro-Vornhagen A, Kochanek M, Draube A, von Bergwelt-Baillon MS (2009a). CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential. Clin Exp Immunol. 155, 249-256; Kondo E, Grysok L, Schultze JL, von Bergwelt-Baillon MS (2009b). Using CD40-activated B cells to efficiently identify epitopes of tumor antigens. J Immunother. 32, 157-160)、CD40 活性化 B 細胞の APC としての有用性を証明した。Buchner らは (Buchner et al. Phase 1 Trial of Allogeneic Gene-Modified Tumor Cell Vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. Human Gene Therapy. March 2010, 21(3):285-297)、臨床試験における CCN-001 ペプチドについて言及している。

30

#### 【0022】

WO 2005/035714 では、腫瘍関連 HLA 制限抗原と、特に HLA-A2 制限抗原を含む、がんの治療または予防ワクチンについて述べている。特定な態様において、サイクリン D ペプチドが提供される。このようなペプチドは、選択的に腫瘍細胞を攻撃する特異的 CTL を誘導するのに使うことができる。サイクリン D ペプチドは、LLGATCMFV の配列またはそのフラグメントを含むことがある。さらに、ペプチドを含むワクチンの治療に有効な量

40

50

を患者に投与することから成る、患者のがん治療または予防方法について述べられている。その方法はさらに、二次療法用抗がん剤投与を受けている患者の治療を含み、ここで、二次療法用抗がん剤は、例えばシクロホスファミドなどの化学療法剤など、多数の薬剤から選択される。二次療法用抗がん剤はワクチンと同時に投与されるか、またはワクチンと異なる時間に投与してもよい。にもかかわらず、WO 2005/035714 ではサイクリン D1 ペプチドによる併用治療の利点について述べていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

上述の観点において、がんに対する効果的な免疫療法におけるサイクリン D1 由来ペプチドの有効な使用について殆ど知られていない。それ故、本発明の目的は、サイクリン D1 由来ペプチドに基づき、がんのより効果的な免疫治療法を目的とした新規アプローチを提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0024】

その第 1 の態様において、本発明の目的は、がん患者の治療における使用で、SEQ ID No. 1 ~ SEQ ID No. 18 から選択されたアミノ酸配列から構成されるか、または基本的に構成されるペプチドによって、あるいはがん患者の治療における使用で、SEQ ID No. 1 ~ SEQ ID No. 18 から選択されたアミノ酸配列から構成されるか、または基本的に構成されるペプチドを 1 つ以上含む組み合わせによって、解決される。

20

【0025】

本発明に従うと、がんは、肺癌、頭頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、子宮頸癌、消化器癌、膠芽細胞腫、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肺の前がん病変、大腸癌、メラノーマ、膀胱癌、およびその他のがん疾患から選択できる。好ましくは、腎臓癌、大腸癌、および膠芽細胞腫である。

【0026】

本発明との関連で、ペプチドは、好ましくは SEQ ID No. 1 から SEQ ID No. 18 のいずれかに従うアミノ酸配列から構成される。

【0027】

「基本的に構成される」とは、ペプチドが、SEQ ID No. 1 から SEQ ID No. 3 のいずれの配列に加え、さらに結合モチーフを含むペプチドの中心配列として、および免疫原性ヘルパー T 細胞エピトープとして機能するペプチドの形成に不要な、別の N 末端および / または C 末端に位置するアミノ酸伸長部を含むことを意味する。にもかかわらず、これらの伸長は、ペプチドの細胞内への効率の良い導入を提供するために重要である。

30

【0028】

下表に、本発明との関連で使用されるサイクリン D1 由来ペプチドを挙げる。

## 【表1】

表1：本発明との関連で使用されるペプチド

ペプチド名	ペプチド配列	サイクリン D1 中の位置 (aa)	結合先	SEQ ID NO
CCN-001	LLGATCMFV	101-109	HLA-I HLA-A*02	1
CCN-002	RLTRFLSRV	228-236	HLA-I HLA-A*02	2
CCN-003	NPPSMVAAGSVVAAV	198-212	HLA-II DRB1*0401	3
CCN-004	EVFPLAMNY	76-84	HLA-I HLA-A*26	4
CCN-006	ETIPLTAEKL	115-124	HLA-I HLA-A*02 HLA-A*68	5
CCN-007	ALLESSLRQA	253-262	HLA-I HLA-A*02	6
CCN-A	IVATWMLEV	59-67	HLA-A*02	7
CCN-B	SVVAAVQGL	207-215	HLA-A*02	8
CCN-C	SVVAAVQGLNL	207-217	HLA-A*02	9
CCN-D	NYLDRFLSL	83-91	HLA-A*24	10
CCN-E	DRVLRAML	25-32	B*14	11
CCN-F1	EEEVFPLAM	74-82	B*1801	12
CCN-F2	EEVFPLAMNY	75-84	HLA-I	13
CCN-F3	EVFPLAMNYL	76-85	HLA-I	14
CCN-G	NLRSPNNFLSY	216-226	HLA-I	15
CCN-H	VNKLKWNL	145-152	HLA-I	16
CCN-I	VQKEVLPSM	48-56	HLA-I	17
CCN-J	MPEAEENKQII	168-178	不明	18

10

20

30

40

## 【0029】

本発明の1つの実施形態において、本発明で使用するペプチドは融合タンパク質であり、NCBIのGenBank受入番号X00497に由来するようなHLA-DR抗原関連インバリアント鎖80残基のN末端アミノ酸(p33、以下「1i」)を含む(Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity EMBO J. 3 (4), 869-872 (1984))。

## 【0030】

本発明に使用するペプチドが、約12個のアミノ酸残基より長いペプチドで、MHC分子との結合に直接使用われる場合、コアHLA結合部位に隣接するアミノ酸残基は、MHC分子の結合溝に特異的に結合する、あるいは、CTLにペプチドを提示する、ペプチドの能力に実質上影響しない残基であることが好ましい。しかし、すでに上述した通り、より大きなペプチドは適当な抗体提示細胞によって断片化されるため、特に、ポリペプチドによってコード化される場合は、このようなより大きなペプチドが利用可能であることは理解される。

## 【0031】

50

MHC リガンド、モチーフ、変異体のペプチド例、および N および / または C 末端伸長の特定例は、<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/> にあるデータベース SYFPEITHI (Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI:database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999 Nov; 50(3-4):213-9) およびその引用文献から得られる。

#### 【0032】

本発明で使用される好ましい MHC クラス I 特異的ペプチドは、全長は 9~16 個のアミノ酸であり、好ましくは 9~12 個のアミノ酸である。これらのペプチドは、(例えば、ワクチン中で) MHC クラス II ペプチドに似た、より長いペプチドとして使用されることも稀にあることを知っておくとよい。HLA クラス I 分子に対する、ある種の HLA 特異的アミノ酸モチーフを有する、MHC クラス I に特異な「コア配列」を同定する方法は、当業者には既知であり、これらの配列は、例えば、コンピュータープログラム PAPRoC (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) および SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) によって予測できる。10

#### 【0033】

発明者は「ペプチド」には、アミノ酸残基がペプチド (-CO-NH-) 結合によって繋がる分子だけでなく、ペプチド結合が反転する分子も含めている。該レトロインバーソ型ペプチド模倣薬は当該分野で既知の方法、例えば、本明細書で引用した参考文献 (Meziere et al (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237) で記載されている方法で作成してもよい。この方法では、骨格の変化はあるが側鎖方向は変化させずに擬ペプチドを作成する。Meziere ら (1997) は、これらの擬ペプチドが、少なくとも MHC クラス II とヘルパー T 細胞応答に有用であることを示している。NH-CO 結合の代わりに CO-NH 結合を含むレトロインバーソ型ペプチドは、タンパク質分解にかなり耐性がある。20

#### 【0034】

特に好ましい実施形態において、本発明で使用されるペプチドは、明示されたアミノ酸配列と少なくともさらに 1 つの T 細胞エピトープを含むものであり、さらなる該 T 細胞エピトープは、腫瘍関連抗原を異常に発現する腫瘍タイプに向いた T 細胞応答の提示を促進できる。そのため、本発明のペプチドは、ワクチンとしても使用可能ないわゆる「一続きのビーズ」ポリペプチドを含む。30

#### 【0035】

一部の適用では、本発明で使用するペプチドは直接使用してもよく(すなわち、それらのペプチドチドは、患者細胞または患者に与えられた細胞内のポリヌクレオチドの発現によって生成されない)、そのような適用では 100 または 50 残基未満のペプチドが好ましいということが、以下の説明から理解される。本発明の好ましいペプチドは、全長 9~30 個のアミノ酸を呈する。30

#### 【0036】

本発明との関連で、「組み合わせ」とは、本発明で使用される平均 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 または 18 個の異なるペプチドまたはそれを超えるペプチドを意味する。適切なワクチンは好ましくは 4、5、6 または 7 個の異なるペプチド、および好ましくは 6 個の異なるペプチドを含むことになる。組み合わせは、治療を受ける患者が罹患している具体的ながんのタイプ、およびそのがんの状態、早期治療法、患者の免疫状態、また当然ながら、患者の HLA 遺伝子型にも左右される可能性がある。好ましい組み合わせは、SEQ ID No. 1 から SEQ ID No. 18 から選択される 1 つ以上のペプチドから選択され、非サイクリン由来の第 2 の腫瘍関連ペプチド、例えば SEQ ID No. 19 から SEQ ID No. 26 のようなペプチドも共に選択される。40

#### 【0037】

組み合わせは、ペプチドが本明細書で記載した治療との関連で、併用効果、特に治療効果を呈する限り、ペプチドを別々または一緒の容器 / 剤型の両形態におき、同時または別々に投与できる。

#### 【0038】

10

20

30

40

50

本発明で使用されるペプチドまたは組み合わせは、サイクリン D1 を発現または異常発現するがん細胞を、効率よくターゲットとし殺傷する免疫療法において特に有用である。

【0039】

次に、本発明の別の重要な態様は、本発明に使用されるペプチドまたはその組み合わせに関するものであり、前記ペプチドまたは組み合わせは、抗がんワクチンの形態で投与される。好ましくはワクチンは、(合成)ペプチドまたは上記のペプチドまたはその組み合わせを含む。その組成ワクチンは、治療を受ける患者が罹患している具体的ながんのタイプ、およびがんの状態、早期治療法、患者の免疫状態、また当然ながら、患者の HLA 遺伝子型にも左右される可能性がある。

【0040】

好ましくは本発明に従って使用される組み合わせであり、その組み合わせはさらにサイクリン D1 に由来しない 1 つ以上の別の腫瘍関連ペプチド、例えば、次の表 2 に従う SEQ ID No. 19 から SEQ ID No. 26 のいずれかから選択されるペプチドの投与を含む。

【0041】

【表 2】

表 2: 本発明の組み合わせで使用されるペプチド

ペプチド名	ペプチド配列	結合先	SEQ ID NO
Met-001	YVDPVITSI	HLA-A*02	19
Muc-001	STAPPVHNV	HLA-A*02	20
Muc-002	LLLLTVLTV	HLA-A*02	21
CEA-004	YLSGANLNL	HLA-A*02	22
CEA-005	YLSGADLNL	HLA-A*02	23
CEA-006	SPQYSWRNGIPQQHT	HLA-DR	24
TGFBI-001	ALFVRLLALA	HLA-A*02	25
BIR-002	TLGEFLKLDRERAKN	HLA-DR	26

【0042】

好ましくは、本発明に従って使用される組み合わせであって、前記 1 つ以上の別の腫瘍関連ペプチドは、前記組み合わせで提示されるような他のペプチドと比較し、異なる HLA 分子への結合能力に基づいて選択される。

【0043】

上記の観点において、本発明で使用される好ましい組み合わせは、以下の 1 つから選択される。

SEQ ID No. 1 と SEQ ID No. 19、または SEQ ID No. 1 と SEQ ID No. 20、または SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 19、および SEQ ID No. 20 を含む組み合わせ。

SEQ ID No. 1 と、SEQ ID No. 22、SEQ ID No. 23 および SEQ ID No. 24 から選択した 1 つのペプチドを含む組み合わせ。

SEQ ID No. 1 と、SEQ ID No. 22、SEQ ID No. 23、および SEQ ID No. 24 から選択した 1 つのペプチド、さらに SEQ ID No. 25 を含む組み合わせ。

SEQ ID No. 1 と、SEQ ID No. 22、SEQ ID No. 23、および SEQ ID No. 24 から選択した 1 つのペプチド、さらに SEQ ID No. 19 を含む組み合わせ。

SEQ ID No. 1、および SEQ ID No. 2 から SEQ ID No. 14 から選択した 1 つ以上のペプチドを含む組み合わせ。

SEQ ID No. 1 および SEQ ID No. 26 を含む組み合わせ

【0044】

本発明は、SEQ ID No. 6 と SEQ ID No. 1 から 5 および 7 から 14 から選択した 1 つ以上のペプチドを含む組み合わせ、さらに SEQ ID No. 5 と SEQ ID No. 1 から 4 および SEQ ID No. 6 から 14 から選択した 1 つ以上のペプチドを含む組み合わせも提供する。

【0045】

本発明は、明記したペプチドから構成される上述の組み合わせも提供する。

【0046】

本発明に従って使用されるペプチドまたは組み合わせは、好ましくは腫瘍またはがんワ

10

20

30

40

50

クチンの構成要素となる。本ワクチンは患者、患部の器官、または全身に直接投与するか、または、その後患者に投与される患者またはヒト細胞株に由来の細胞に ex vivo で適用するか、あるいは in vivo で使用して、その後患者に再投与される患者由来の免疫細胞の亜集団を選択する。ペプチドは実質的に純粋であるか、デトックス (Detox) のような免疫刺激アジュバントと併用されるか、または免疫刺激的サイトカインと併用される、あるいはリポゾームなど適当な送達システムを用いて投与される。前記ペプチドは、また、キーホールリンペットヘモシアニン (HLH) またはマンナンなど、適切な担体に接合させることもできる (WO 95/18145 および Longenecker et al (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690, 276-291 参照)。前記ペプチドは、標識するか、融合タンパク質とするか、ハイブリッド分子であってもよい。

10

#### 【0047】

配列が本発明で与えられた一部のペプチドは、CD8 CTL を刺激することが期待される。ただし、CD4 に陽性の T 細胞による助けがあると、刺激はより効率的となる。ハイブリッド分子の融合パートナーまたはセクションは、CD4<sup>+</sup> T 細胞を刺激するエピトープを適切に提供する。CD4<sup>+</sup> T 細胞刺激エピトープは、該分野でよく知られており、破傷風トキソイドで確認されたものを含む。

#### 【0048】

がんワクチンに使用するペプチドは、いかなる適切なペプチドであってもよい。特に、適切な 9mer のペプチド、または適切な 7mer または 8mer または 10mer または 11mer のペプチド、または 12mer であってよい。より長いペプチドも、適切である可能性があるが、本明細書の表 1 に記載されている 9-mer または 10-mer ペプチドが HLA クラス I ペプチドに好ましい。

20

#### 【0049】

これらのペプチドは、筋注、皮内、腹腔内、静注、または皮下で投与してよい。前記ワクチンが筋肉に投与されることは好ましい。前記ワクチンが皮膚、すなわち皮内に投与されることも好ましい。本発明のさらなる態様では、静脈内注射 (i.v.)、皮下注射 (s.c.)、皮内注射 (i.d.)、腹腔内注射 (i.p.) または筋肉内注射 (i.m.) として本発明で使用されるペプチドを提供する。ペプチド注射の好ましい方法は、s.c.、i.d.、i.p.、i.m.、および i.v. である。

30

#### 【0050】

ペプチドまたは DNA は 100 μg ~ 100 mg 間の投与量を与えてよく、好ましくは、200 μg ~ 800 μg であり、さらにより好ましくは、200 μg ~ 600 μg の範囲であり、さらにより好ましくは、400 μg ~ 500 μg の範囲であり、最も好ましくは、約 413 μg である。

#### 【0051】

ペプチドワクチンは、アジュバントなしで投与してもよい。好ましくは、有効薬剤成分としてのペプチドを、例えば、IL-2、IL-12、GM-CSF のようなアジュバント、または完全フロイントアジュバントと併用して投与する。最も好ましいアジュバントは、例えば、論文 Brinkman JA, Fausch SC, Weber JS, Kast WM. Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. Expert Opin Biol Ther. 2004 Feb;4(2):181-98 に見出される。ペプチドワクチンは、BCG またはミョウバンのようなアジュバントと共に投与してもよい。他の適切なアジュバントには、サポニン、マイコバクテリア抽出物、および合成バクテリア細胞壁模倣物由来の Aquila 社の QS21 stimulon (Aquila Biotech、米国マサチューセッツ州ウースター、)、および Ribi 社の Detox のような専売特許アジュバントがある。別のサポニン由来アジュバント、Quil A も使用可能である (Superfos、デンマーク)。CpG オリゴヌクレオチド、安定化 RNA、イミキモド (商品名 AldaraR として米国 3M Pharma から市販)、不完全フロイントアジュバント (Montanide ISA-51 としてフランス、パリ、S eppic S.A. から市販)、またはリポゾーム製剤のような他のアジュバントも有用である。キーホールリンペットホモシアニンに共役したペプチドを、好ましくはアジュバントと共に与えることも有用な可能性がある。

40

50

**【 0 0 5 2 】**

ワクチンは 2 回以上投与してもよい。治療に有効な量は、ペプチドまたはその組み合わせで、0.20 mg ~ 5.0 mg、または 0.025 mg ~ 1.0 mg、または 2.0 mg ~ 5.0 mg の範囲の可能性がある。好ましくは、前記ペプチドまたは組み合わせは、例えば、毎月、毎週、あるいは 2 週間毎に繰り返して投与される。

**【 0 0 5 3 】**

ワクチン接種により、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の応答がプロフェッショナル抗原提示細胞により刺激される。つまり、一旦 CTL が初回刺激されると、腫瘍細胞中で MHC 発現が高まるという利点の可能性がある。注射部位で、標的化ベクターおよび送達系を利用することにより、または患者のそのような細胞群の選択的精製およびペプチドの ex vivo 投与により、前記ワクチンの標的を特定の細胞群、例えば、抗原提示細胞とすることも有用である（例えば、樹状細胞は、Zhou et al (1995) Blood 86, 3295-3301; Roth et al (1996) Scand. J. Immunology 43, 646-651 に報告される通り分類することができる）。

10

**【 0 0 5 4 】**

本発明の別の重要な態様において、本発明に使用されるペプチドまたはその組み合わせ（例えば、ワクチン）は、単独または他のがん治療法と併用して、好ましくは腫瘍形成を阻害または抑制するために宿主に投与される。

**【 0 0 5 5 】**

本発明で使用されるペプチドと組み合わせは、肺癌、頭頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、子宮頸癌、消化器癌、膠芽細胞腫、白血病、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肺の前がん病変、大腸癌、メラノーマ、膀胱癌、およびその他のがん疾病を含む、がんとの関連で使用される可能性がある。好ましくは、腎臓癌、大腸癌、または膠芽細胞腫である。

20

**【 0 0 5 6 】**

本発明で使用されるペプチドと組み合わせによる治療の有効性を高めるために、これらの組成を上記疾患および病状の治療に効果的な他の薬剤と併用することが好ましいこともある。例えば、がんの治療は、本発明に使用されるペプチドと組み合わせ、および抗がん剤など他の抗がん治療法によって実施されることもある。

30

**【 0 0 5 7 】**

それ故、本発明の使用は、二次療法用抗がん剤による患者の治療を含むものであり、該二次療法用抗がん剤は、治療用ポリペプチド、治療用ポリペプチドをコード化する核酸、化学療法剤、免疫療法剤、または放射線治療薬である。二次療法用抗がん剤にはワクチンと同時に投与するか、またはワクチンと異なる時間、好ましくはワクチン投与前に投与してもよい。

**【 0 0 5 8 】**

特に好ましくは、本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用するものであり、それらにはさらに、例えば前記患者で好ましくは CD4+ CD25hi FOXP3+ CD127lo T 細胞のような CD4+CD25+ T 細胞を不活性化および / または除去する薬剤、例えばシクロホスファミドのような 1 つ以上の化学療法剤の投与が含まれる。

40

**【 0 0 5 9 】**

さらに好ましくは、本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用するものであり、1 つ以上の前記薬剤と併用する前記治療薬は、前記ペプチドまたは組み合わせの投与前に投与し、好ましくは単回投与とする。

**【 0 0 6 0 】**

特に好ましくは、本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用するものであり、1 つ以上の前記化学療法剤と併用する前記治療薬は、前記ペプチドまたは組み合わせの投与前に投与し、好ましくは単回投与、例えば、投与量 300 mg/m<sup>2</sup> を好ましくは単回注入とする。

50

**【 0 0 6 1 】**

また、好ましくは本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用するものであり、前記治療法は、例えば、スニチニブまたはソラフェニブのような事前のTKI療法、および/または、例えばインターフェロンまたはインターロイキンのような事前のサイトカイン療法後の補助療法である。

#### 【0062】

最も好ましくは、本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用するものであり、前記治療はサイトカイン療法であり、その後シクロホスファミドを単回投与し、さらにその後、第1週目の初回刺激として第1、2、3、7日目にワクチンを投与し、その後6ヶ月以上2週間に毎にワクチンを投与する。

#### 【0063】

「抗がん」剤は、例えば、がん細胞の殺傷、がん細胞へのアポトーシスの導入、がん細胞増殖速度の低減、転移頻度または転移数の減少、腫瘍サイズの減少、腫瘍増殖の阻害、腫瘍またはがん細胞への血液供給の低減、がん細胞または腫瘍に対する免疫応答の促進、がん進行の予防または阻害、またはがん患者への延命作用など、被験者のがんに負の影響を与えることができる。好ましい抗がん剤には化学療法剤が含まれる。本発明との関連で、使用するペプチドまたは組み合わせに基づく腫瘍関連HLA制限ペプチド療法は、化学療法剤の介入と併せて同様に使用される可能性もある。

#### 【0064】

免疫療法剤は、GM-CSF、CD40リガンド、抗-CD28 mAb、抗 CTL-4 mAb、抗4-1BB (CD137) mAb、およびオリゴヌクレオチドであってよい。化学療法剤は、ドキソフビジン、ダウノルビジン、ダクチノマイシン、ミトキサントロン、シスプラチン、プロカルバジン、マイトマイシン、カルボプラチニン、ブレオマイシン、エトポジド、テニポシド、メクロエタミン、シクロホスファミド、イフォソファミド、メルファラン、クロラムブシル、イフオスファミド、メルファラン、ヘキサメチルメラミン、チオペタ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル(5FU)、カムブトテシン、アクチノマイシン-D、過酸化水素、二トロソ尿素、ブリコマイシン、タモキシフェン、タキソール、トランス白金、ビンクリスチン、ビンプラスチン、TRAIL RI および R2受容体抗体またはアゴニスト、ドラスタチン10、ブリヨスタチン、アナマイシン、MylotargR、フェニル酢酸ナトリウム、酪酸ナトリウム、メトトレキサート、ダチタビン、メシル酸イマチニブ(GleevecR)、インターフェロン、ベバシズマブ、セツキシマブ、サリドマイド、ボルテゾミブ、ゲフィチニブ、エロチニブ、アザシチジン、5-AZA-2'デオキシシチジン、レブリミド、2C4、抗血管新生因子、シグナルransデューサー標的剤、インターフェロン、IL-2 および IL-12である。

#### 【0065】

様々な組み合わせを採用してもよく、例えば、ペプチドまたは組み合わせ、すなわち各ワクチンは「A」であり、二次療法は「B」、つまりA/B/A、B/A/B、B/B/A、A/A/B、A/B/B、B/A/A、A/B/B/B、B/A/B/B、B/B/B/A、B/B/A/B、A/A/B/B、A/B/A/B、A/B/B/A、B/B/A/A、B/A/B/A、B/A/A/B、A/A/A/B、B/A/A/A、A/B/A/A、A/A/B/Aである。

#### 【0066】

本発明で使用するペプチドまたは組み合わせの患者への投与は、もしあれば腫瘍関連HLA制限ペプチド療法の毒性を考慮しながら、該特定二次療法剤の投与について一般的プロトコールに従うことになる。治療サイクルは必要に応じて繰り返されることが予想される。様々な標準的療法と手術の介入が、上述のがん細胞と併用して適用される可能性も意図される。しかしながら、好ましくは次にさらに述べるような単回投与による治療である。

#### 【0067】

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体が、患者への副作用が殆どまたは全くないことから、受動的免疫療法としてさらに使用される。

#### 【0068】

10

20

30

40

50

ペプチド（少なくともアミノ酸残基間にペプチド結合を持つ）は、Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 およびその参考文献で公表されているように、固相ペプチド合成の Fmoc ポリアミド法によって合成される。一時的な N-アミノ基の保護には 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 基が使われる。塩基に非常に不安定なこの保護基の反復開裂は、20 % ピペリジンの N, N-ジメチルホルムアミド溶液を使うと達成される。側鎖の官能基は、ブチルエーテル（セリンスレオニンとチロシンの場合）、ブチルエステル（グルタミン酸とアスパラギン酸の場合）、ブチルオキシカルボニル誘導体（リジンとヒスチジンの場合）、トリチル誘導体（システインの場合）、そして 4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル誘導体（アルギニンの場合）として保護される。グルタミンまたはアスパラギンが C 末端残基の場合、側鎖アミド官能性の保護に 4,4'-ジメトキシベンズヒドリル基を用いる。固相の支持体は、ジメチルアクリルアミド（骨格モノマー）、ビスアクリロイルエチレンジアミン（架橋剤）およびアクリロイルサルコシンメチルエステル（官能基化剤）の 3 つのモノマーから成るポリジメチルアクリルアミドポリマーに基づいている。ペプチド - 樹脂を開裂可能な連結剤には、酸に不安定な 4-ヒドロキシメチル - フェノキシ酢酸誘導体を使う。全てのアミノ酸誘導体は予め作られた対称の無水物誘導体として付加されるが、アスパラギンおよびグルタミンは例外であり、これらは N, N-ジシクロヘキシリ - カルボジイミド/ヒドロキシベンゾトリアゾールで媒介される逆カップリング反応により付加される。全てのカップリングと脱保護反応は、ニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸もしくはイソチン (isotin) テストでモニターされる。合成が終了すると、ペプチドは、50% 捕捉剤を含む 95% トリフルオロ酢酸の処理による側鎖保護基の除去と同時に樹脂支持体から開裂する。捕捉剤には一般的にエタンジチオール、フェノール、アニソールおよび水が使われるが、適格な選択は合成されるペプチドの構成アミノ酸に依存する。また、ペプチド合成では固相法および液相法を組み合わせることも可能である（例えば、Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future. Curr Pharm Biotechnol. 2004 Feb;5(1):29-43 およびその参考文献などを参照）。

#### 【0069】

真空で蒸発しトリフルオロ酢酸を除去し、続いてジエチルエーテルで粉末とし、粗ペプチドを得る。捕捉剤はすべて単純な抽出作業で除去され、液相の凍結乾燥で捕捉剤不含の粗ペプチドが得られる。ペプチド合成の試薬は Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd (Nott ingham NG7 2QJ、英国) から入手できる。

#### 【0070】

精製は、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフティー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびアセトニトリル / 水の勾配分離による（通常）逆相高速液体クロマトグラフィーの 1 つあるいはその組み合わせにより達成される。

#### 【0071】

ペプチド解析は、薄層クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、酸加水分解と高速原子衝撃 (FAB) 質量分析法によるアミノ酸分析、また、MALDI および ESI 質量分析法によって実施してもよい。

#### 【0072】

特定な宿主細胞は、例えば細菌、酵母、昆虫細胞などが、本発明のペプチドの調製に有用であることは理解される。しかしながら、特定な治療方法においては他の宿主細胞も有用なこともある。例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞は、ペプチドが適切な MHC 分子に負荷されるように、本発明で使用されるペプチドを発現するのに有用に使用されることもある。

#### 【0073】

発明のさらなる態様は、続いて、抗原特異的方法で前記 CTL を活性化するのに十分な期間、適切な抗原提示細胞表面で発現し、ペプチドまたは組み合わせが負荷されたヒトクラス I または II MHC 分子と共に接触 CTL を含む、活性化細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を

10

20

30

40

50

in vitro で生成するため、本発明に従うペプチドまたは組み合わせの使用について提供している。

【0074】

続いて本発明のさらなる態様は、ターゲット細胞が本発明のアミノ酸配列を含むポリペプチドを異常に発現する、患者のターゲット細胞を死滅させる方法、つまり、本発明に従うペプチドの有効量、または前記ペプチドをコード化するポリヌクレオチドあるいは発現ベクターの有効量を患者に投与することを含む方法を提供するものであり、前記ペプチドの量、または前記ポリヌクレオチドまたは発現ベクターの量は、前記患者の抗ターゲット細胞免疫応答を引き起こすのに有効である。ターゲット細胞は、通常腫瘍またはがん細胞である。

10

【0075】

患者のターゲット細胞の殺傷方法に関して、該ターゲット細胞は、上述のようながん細胞であり、さらに好ましくは腎臓または大腸癌細胞であることが特に好ましいことが、理解されよう。

【0076】

本発明のさらなる態様は、特に以下を目的とした積極的な in vivo ワクチン接種のために、本発明のペプチドを使用することを含む。その目的とは、in vitro で自己樹状細胞の操作後、CTL 応答の活性化のため in vivo でそのように操作された樹状細胞を導入するため、in vitro で自己 CTL を活性化した後、養子療法（すなわち、そのように操作した CTL が患者に導入される）を実施するため、そして、in vitro で健康ドナー（MHC マッチまたはミスマッチ）の CTL を活性化し、養子療法を実施するためである。

20

【0077】

続いて本発明のさらなる態様は、患者の免疫系の活性化または調節を検出および／またはモニターするための診断ツールとして、本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用することに関する。この態様で該ペプチドは、抗がん治療、特に非ペプチド系治療、または結果として免疫系を活性化または調節する他の適切な治療への奏効を検出するために使用できる。診断ではペプチドは標識化できる。さらに、ペプチド（または組み合わせ）に対する抗体も使用できる。診断は in vivo または in vitro で実施できる。

【0078】

続いて本発明のさらなる態様は、がんの診断における診断ツールとして、本発明に従うペプチドまたは組み合わせを使用することに関する。基本的に、患者にペプチドまたはその組み合わせがあることはがんを意味する。例えば、CCN-001 および CEA-004 に対するワクチン接種前の奏効が特定がん患者で見出された。この場合も、診断ではペプチドは標識化できる。さらに、ペプチド（または組み合わせ）に対する抗体も使用できる。診断は in vivo または in vitro で実施できる。

30

【0079】

「単離された」という表現は、自然状態で見出される時、通常その物質に共存する成分を実質的または本質的に含んでいない物質を意味する。そのため、本発明に従う単離ペプチドは好ましくは、本来の環境でペプチドと通常結合する物質を含まない。

【0080】

続いて本発明のさらなる態様は、SEQ ID No. 5 または SEQ ID No. 6 のグループか、SEQ ID No. 5 または SEQ ID No. 6 と少なくとも 80% 相同であるその変異体か、T 細胞の前記変異体ペプチドとの交差反応を誘発するその変異体から選択された配列を含むペプチドであって、各々の（基本的な）完全な長さのポリペプチドではない前記ペプチドに関する。好ましくは、前記ペプチドは、HLA-A\*02 のような特異的 HLA サブタイプを有するペプチドから選択される。

40

【0081】

続いて本発明のさらなる態様は、SEQ ID No. 5 または SEQ ID No. 6 に従うペプチド、あるいは本発明に従うその変異体をコード化する核酸、または前記核酸を発現する能力のある発現ベクターに関する。別の態様において、本発明は、本発明に従う核酸または発

50

現ベクターを含む宿主細胞に関連し、ここで前記宿主細胞は好ましくは抗原提示細胞であり、特に樹状細胞すなわち抗原提示細胞である。

#### 【0082】

別の態様において、本発明は、活性化細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を生成するin vitro方法であって、in vitroでCTLを、適当な抗原提示細胞表面上で発現された抗原負荷ヒトクラスIまたはII MHC分子と接触させるか、または抗原特異的方法で前記CTLを活性化するのに十分な期間、抗原提示細胞を模倣する人工構築物と接触させることを含む方法に関連し、ここで前記抗原は本発明のSEQ ID No.5またはSEQ ID No.6に従うペプチドである。

#### 【0083】

さらに別の態様において、本発明は、(a)本発明のSEQ ID No.5またはSEQ ID No.6に従うペプチド、本発明に従う核酸または発現ベクター、本発明に従う細胞、または本発明に従って生成された活性化細胞傷害性Tリンパ球を含む薬剤組成物を溶液または凍結乾燥物として含んでいる容器、(b)選択的に、希釈剤もしくは、該凍結乾燥製剤用の再溶解溶液を含む第二の容器、(c)選択的に、SEQ ID NO 1~4および7~26に従うペプチドから成る基から選択された少なくとも1つのペプチド、(d)選択的に、溶液および/または再溶解溶液の使用、および/または凍結乾燥製剤についての指示を含むキットに関する。

#### 【0084】

別の態様において、本発明は、本発明に従うSEQ ID No.5またはSEQ ID No.6のHLA制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体(MHC)クラスIに特異的に結合する抗体に関するものであって、その抗体は好ましくはポリクロナール抗体、モノクロナール抗体および/またはキメラ抗体である。

#### 【0085】

続いて本発明のさらなる態様は、上述のようなペプチドまたは組み合わせまたはワクチンの使用に基づく、がん疾患の治療方法に関する。

#### 【0086】

本発明の他の目的、特徴および有益性は、以下の例で明らかになろう。特定例は、本発明の好ましい実施形態を示す一方、図でのみ描かれている。その理由は、本発明の精神と範囲内の様々な変更や改変は、当業者にとって本明細書の詳細な記述から明確となるからである。本発明の目的のため、本明細書で引用されている全ての参考文献が、その全体の参照として組み込まれている。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0087】

【図1】図1は、本発明で使用される腫瘍関連ペプチドの位置を太字で表した、SEQ ID No.27に従うサイクリンD1のアミノ酸配列を示す。

【図2-1】図2は、正常組織(図2A)の平均的発現に対する腎臓癌細胞(ccRCC)におけるCCND1の平均的過剰発現が3倍であることを示し(データセット1の発現データ)、原発性腫瘍では5.7倍、転移では5.4倍と個別に解析した(図2B:独立したデータセット2の発現データ)。原発性腫瘍の60%が、正常腎臓に対し過剰発現を示した(図2A:バーの上に「増大」を示す「I」と記された黒いバー)。

#### 【図2-2】同上

【図3】図3は、事前にTKI療法を受けた患者と比較した、事前にサイトカイン療法を受け、IMA901ワクチンを接種した患者の無増悪生存期間(Progress Free Survival:PFS)および全生存期間(Overall Survival:OS)(B)の改善を示す。

【図4】図4はサイトカイン治療後の二次療法として、ワクチンIMA901を含む(例えば、本明細書に引用文献として掲載されているEP1760089に記載されている)CCN-001の全生存期間(OS)を、SutentR(A)およびNexavarR(B)と比較した結果を示す。

【図5】図5は、シクロホスファミド(+CY)で前治療した患者群における調節T細胞の減少を示す。絶対測定数を(A)に、ベースラインからの変化の割合を(B)に示す。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、CCN-001に奏効する患者は奏効しない患者に比べ、有意に長く生存することを示している(A)。CCN-001に対するT細胞応答のこの好ましい作用は、シクロホスファミドで前治療した患者内でさらに明らかであった(B)。

【図7】図7は、ワクチンで誘発されたCCN-001に対する応答を示す。患者は、GM-CSF(コホート1)またはGM-CSF+イミキモド(コホート2)の投与下、様々な時点でIM-A910ペプチドカクテル(例えば、文献として本明細書で引用しているWO2009/015841に記載されている)で免疫化された。HLA-A<sup>\*</sup>0201結合ペプチドへの免疫応答は、マルチマーアッセイによる免疫モニタリング解析内で検討された。その後、患者のPBMCがin vitroで感作され、フロサイトメトリー分析とマルチマー染色により分析された。A)全患者(黒)、イミキモド非投与(明灰色)、イミキモド投与(暗灰色)患者のCCN-001への免疫応答率。バーは、ワクチンの誘発によりCCN-001ペプチドに奏効した患者の頻度を示す。B)ワクチン接種前(左)および後(右)の典型的な患者1名のCCN-001へ免疫応答。

10

#### 【0088】

SEQ ID No. 1~26は本発明との関連で使用されるペプチドを示す。SEQ ID No. 5およびSEQ ID No. 6は本発明に従うサイクリンペプチドを示す。

#### 【0089】

SEQ ID No. 27は、サイクリンD1のアミノ酸配列を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

20

#### 【0090】

実施例

#### 【0091】

本発明に従って使用されるペプチドの同定と特徴決定

一般的に、本発明に従って使用されるペプチドは、腎臓癌細胞に基づいて報告されるような(例えば、Weinschenk et al. Integrated Functional Genomics Approach for the Design of Patient-individual Antitumor Vaccines, CANCER RESEARCH 62, 5818?5827, October 15, 2002を参照)XPRESIDENTR法によって同定された。正常組織中の平均的発現に対するccRCC中のサイクリンD1(CCND1)の平均的過剰発現は3.0倍、原発性腫瘍では5.7倍、転移状態では5.4倍であった。原発性腫瘍の55%が正常腎臓に対して過剰発現を示した。

30

#### 【0092】

同定時のペプチドのHLA制限

CCN-001およびCCN-002のHLA A<sup>\*</sup>02との良好な結合が、所定のSYFPEITHI法から予測された(Rammensee et al., 1997; Rammensee et al., 1999)。HLA A<sup>\*</sup>0201へのCCN-001の良好な結合は、ELISAに基づく方法で確認された(Sylvester-Hvid et al., 2002)。CCN-004ではHLA-A<sup>\*</sup>26との高い結合性は認められたが、HLA-A<sup>\*</sup>02との結合は事实上見出されなかった。

40

#### 【0093】

ペプチドCCN-006のHLA-A<sup>\*</sup>02との結合性はわずかしか予測されなかった。実際、CCN-006はHLA-A<sup>\*</sup>68との結合因子であるようにみえる。新規ペプチドCCN-007は、HLA A<sup>\*</sup>02とは中等度に結合し、CCN-003はHLAクラスIIと結合し、そのためDRB1<sup>\*</sup>0401が制限されるように見える。

#### 【0094】

以下の臨床試験では、ペプチドCCN-001が選ばれた。しかしながら、当業者は、本明細書に記述されている他のすべてのペプチドまたは組み合わせも使用できること、さらには、本明細書に記述されているようなこれらのペプチドまたは組み合わせに従って、必要に応じて簡単に調整できることに、気がつくであろう。

#### 【0095】

本発明のペプチドおよび組み合わせを使用した臨床試験

50

一部の患者は、スニチニブまたはソラフェニブによる事前のTKI療法を受け、その他

の患者はインターフェロンまたはインターロイキンによる事前のサイトカイン療法を受けた。そこで、患者を2群に分け、1群は、サイクリンD1ペプチドの1つを含むワクチンによるワクチン接種前に、シクロホスファミド(300 mg/m<sup>2</sup>)を単回注入し(この症例では、CCN-001含有 immatics BiotechnologiesのワクチンIMA901を9ヶ月のコースで17回投与)、他群には、サイクリンD1ペプチドの1つを含むワクチンによるワクチン接種前に、シクロホスファミドを単回注入しなかった(同じくIMA901を9ヶ月のコースで17回投与)

【0096】

両患者群とも、無増悪生存期間(PFS)と全生存期間(OS)が追跡された。

【0097】

試験の結果

ワクチンは全体として安全であり、患者への忍容性が非常に高いことが分かった。唯一共通の有害作用は、局所的な注射部位の反応であった。

【0098】

6ヶ月目の病勢コントロール率(DCR)は期待に応えた(すなわち、プロトコールではサイトカイン治療後の患者における臨床的に関連する効果を、6ヶ月のDCRが>30%と定めた)。

【0099】

サイクリンペプチド含有ワクチンは、サイトカイン治療後の他の二次療法(SutentRまたはNexavarR)よりも、良好なOSを示した。

【0100】

事前にサイトカイン療法を受けた患者では、事前にTKI療法を受けた患者よりも良好なPFAとOSが認められた。無増悪生存(PFS)解析は、別の治験におけるプラセボ群と比べると、遅延型のポジティブ効果を示している。全生存期間(OS)は、TKIのデータと比較してより長く現れた(すなわち、二次療法mRCCに置けるソラフィニブとスニチニブ)。

【0101】

複数ペプチドによる免疫応答と全集団のOSには有意な相関があった。

【0102】

さらに驚いたことに、低用量による事前のシクロホスファミド療法は、ワクチン療法による転帰をさらに有意に改善した。期待通りに、低用量のシクロホスファミドは調節T細胞の数を減少させた。

【0103】

CCN-001に奏効する患者とCCN-001に奏効しない患者の生存を比較すると、ワクチン接種によってCCN-001への奏効が誘発された患者の生存期間は有意に長くなることが示された。CCN-001に対するT細胞応答のこの好ましい作用は、シクロホスファミドで前治療した患者ではさらに明らかであった。

10

20

30

【図1】

1 MEHQLLCCEV ETIRRAYPDA NLLN**D**RVLRA **M**LKAETCAP SVSYFKC**V**OK **E**VLPSMRKIV  
 CCN-E CCN-I

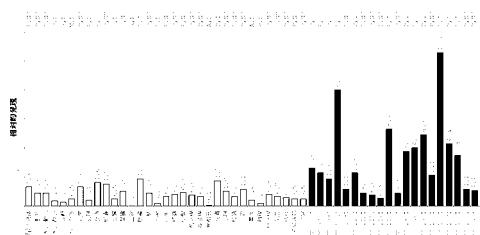
61 **A**TWMLLEVCEE QKC**S**EEVFPL AMNYLDRFLS LEPVKKSRLQ **L**LGATCMFVA SKMK**E**TIPLT  
 CCN-A CCN-004 AND F1 TO F3 CCN-001 CCN-006

121 **A**EKL**C**IYTDN SIRPEELLQM ELLL**V**NK**L**KW NLAAMTPHDF IEHFLSK**M**P**E** AEENK**Q**IIRK  
 CCN-H CCN-J

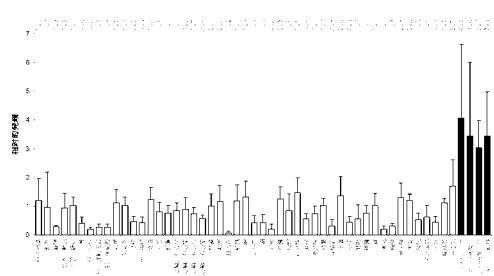
181 HAQTEVALCA TDVKFISNPP SMVAAGSVVA AVQGLNLRSP NNFLSYRLT RFLSRVIKCD  
 CCN-003 CCN-B TO D AND G CCN-002

241 PDCLRACQEQ IE**A**LESSLR QAQQNMDFKA AEEEEEEEEE VDLACTPTDV RDVDI  
 CCN-007

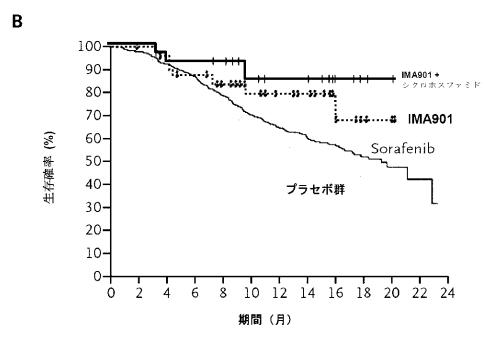
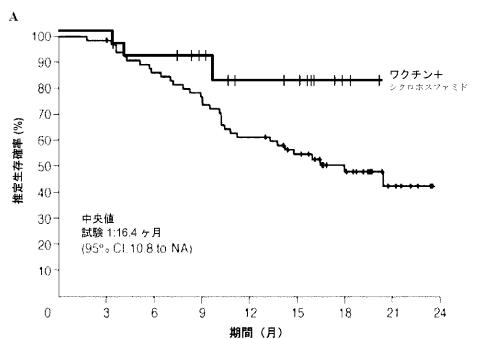
【図2-1】



【図2-2】

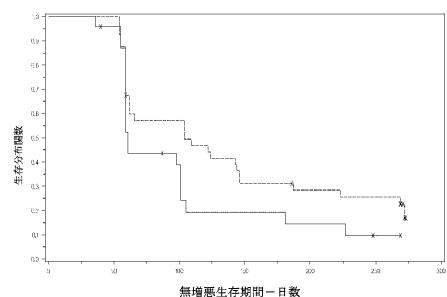


【図4】

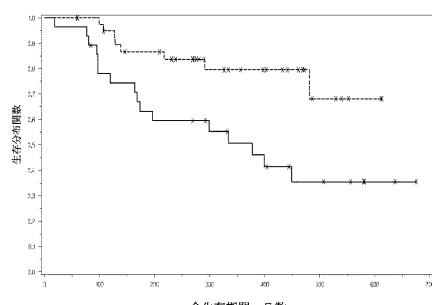


【図3】

A



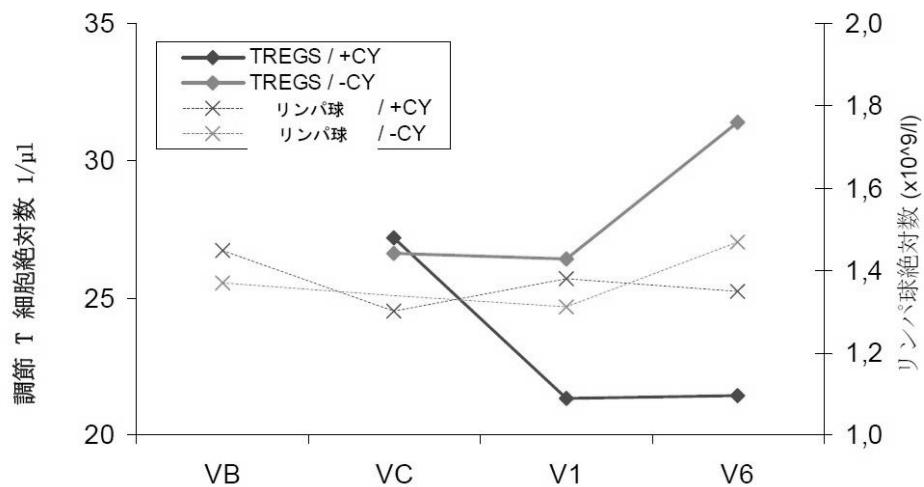
B



【図5】

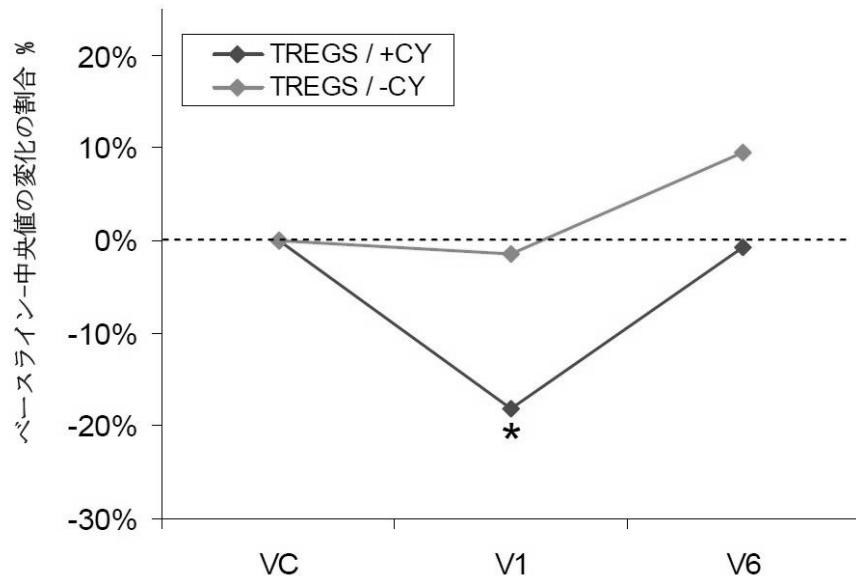
A

調節T細胞とリンパ球の絶対数（中央値）



B

調節T細胞絶対数（ベースライン-中央値の変化の割合 %）

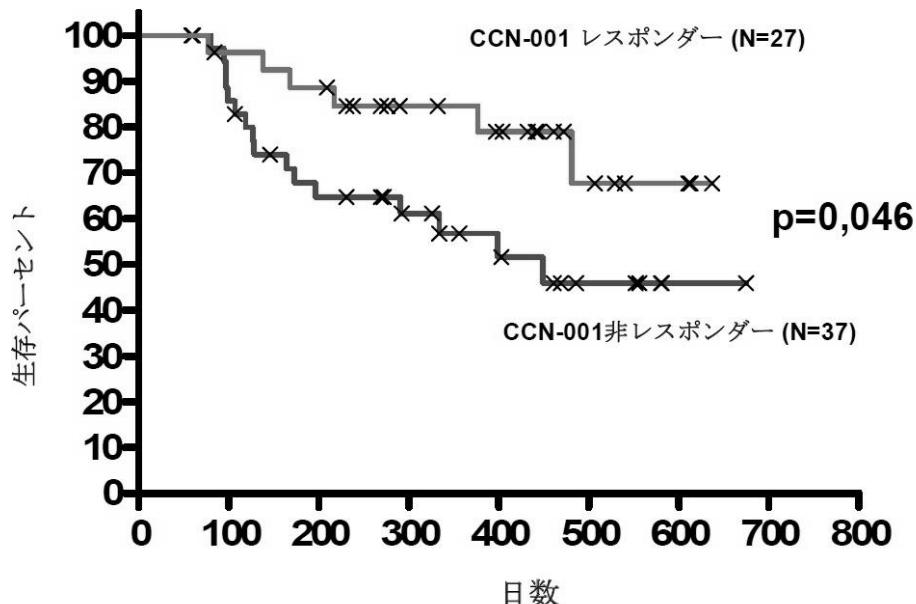


CY = シクロホスファミド

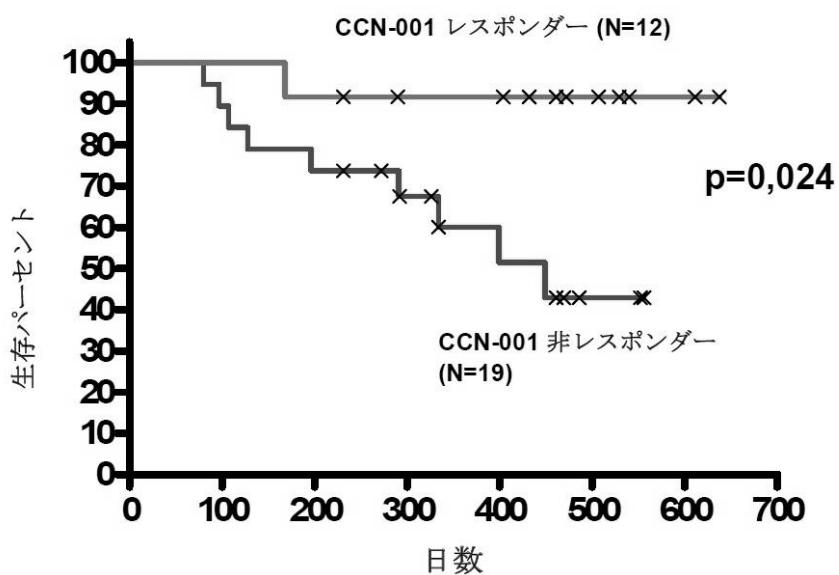
TREGS = 調節T細胞

【図6】

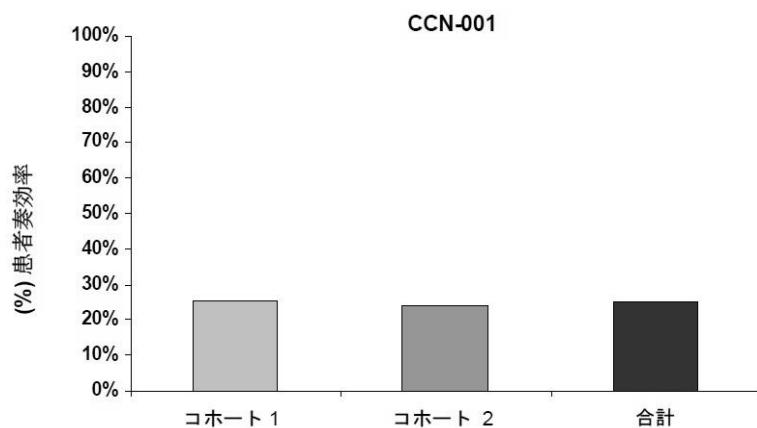
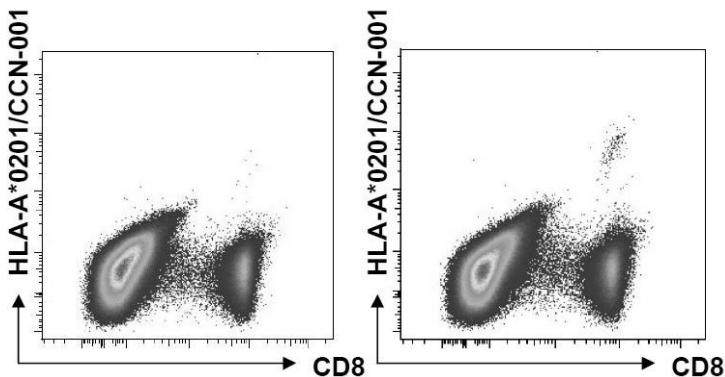
A (全患者)



B (シクロホスファミド事前投与患者)



【図7】

**A****B**

【配列表】

2013536157000001.app

## 【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/EP2011/059121

**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.: 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:

**see additional sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an 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.:

**1-14 (partially)**

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/059121
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/04 A61K39/00 A61K45/06 C07K14/47 A61P35/00 ADD.
---

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)  
A61K C07K A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/004213 A1 (SINGH HARPREET [DE] ET AL) 1 January 2009 (2009-01-01) the whole document in particular abstract paragraphs [0016] - [0028], [0052] - [0067], [0088] - [0104] claims 1-14; figures 1-18; examples 1-5 ----- -/-	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

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

Date of mailing of the international search report

8 September 2011

23/11/2011

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ferreira, Roger

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/059121
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/035714 A2 (UNIV TEXAS [US]; MOLLDREM JEFFREY [US]) 21 April 2005 (2005-04-21) cited in the application the whole document in particular abstract page 4, line 30 - page 7, line 18 page 20, line 14 - page 21, line 23 page 37, line 30 - page 38, line 3 page 55, line 15 - page 62, line 7 claims 1-116; figures 1-46; examples 1-21 -----	1-14
X	EP 1 760 089 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 7 March 2007 (2007-03-07) cited in the application the whole document in particular abstract paragraphs [0037] - [0158] claims 1-36; figures 1-9; examples I-II -----	1-14
X	WO 2009/015841 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]; SINGH HARPREET [DE]; SCHOOR OLIVER) 5 February 2009 (2009-02-05) cited in the application the whole document in particular abstract page 9, line 1 - page 11, line 11 page 18, lines 1-18 page 27, line 30 - page 29, line 22 page 43, line 22 - page 44, line 3 claims 1-16; figures 1-6; examples 1-7; table 2 -----	1-14
X	SADOVNIKOVA E ET AL: "Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 28, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 193-200, XP000864767, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<193::AID-IMMU193>3.3.CO;2-B cited in the application the whole document ----- ----- -/-	1-14
2		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/059121
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALEXANDER BUCHNER ET AL: "Phase 1 Trial of Allogeneic Gene-Modified Tumor Cell Vaccine RCC-26/CD80/IL-2 in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma", HUMAN GENE THERAPY, vol. 21, no. 3, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 285-297, XP055006260, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2008.192 cited in the application the whole document -----	1-14
X	E. KONDO ET AL: "Cyclin D1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Are Present in the Repertoire of Cancer Patients: Implications for Cancer Immunotherapy", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 14, no. 20, 15 October 2008 (2008-10-15), pages 6574-6579, XP055006240, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0825 cited in the application the whole document -----	1-14
X	M WANG ET AL: "Cyclin D1 as a universally expressed mantle cell lymphoma-associated tumor antigen for immunotherapy", LEUKEMIA, vol. 23, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 1320-1328, XP055006256, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2009.19 cited in the application the whole document -----	1-14
X	E. KONDO ET AL: "CD40-activated B cells can be generated in high number and purity in cancer patients: analysis of immunogenicity and homing potential", CLINICAL & EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 155, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 249-256, XP055006258, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03820.x cited in the application the whole document -----	1-14
2		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/059121
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KONDO EISeI ET AL: "Using CD40-activated B cells to efficiently identify epitopes of tumor antigens", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 157-160, XP009151811, ISSN: 1053-8550 cited in the application the whole document -----	1-14
A	WEINSCHENK T ET AL: "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 62, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 5818-5827, XP002266492, ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document -----	1-14
A	RAMMENSEE HANS-GEORG ET AL: "SYFPEITHI: Database for MHC ligands and peptide motifs", IMMUNOGENETICS, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 50, no. 3-4, 1 November 1999 (1999-11-01), pages 213-219, XP002183663, ISSN: 0093-7711, DOI: 10.1007/S002510050595 cited in the application the whole document -----	1-14
A	C. SYLVESTER-HVID ET AL: "Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction", TISSUE ANTIGENS, vol. 59, no. 4, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 251-258, XP055006262, ISSN: 0001-2815, DOI: 10.1034/j.1399-0039.2002.590402.x cited in the application the whole document -----	1-14
2		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/059121

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2009004213	A1	01-01-2009	NONE			
WO 2005035714	A2	21-04-2005	AU CA EP EP JP WO	2004267506 A1 2536654 A1 1660636 A2 1670899 A2 2007504149 A 2005019435 A2	03-03-2005 03-03-2005 31-05-2006 21-06-2006 01-03-2007 03-03-2005	
EP 1760089	A1	07-03-2007	AT AT AU BR CA CN DK DK EA EP WO ES ES HR JP KR NZ PT PT SI SI US	440107 T 494303 T 2006289289 A1 P10615466 A2 2621414 A1 101287755 A 1760089 T3 1922334 T3 200800676 A1 1922334 A1 2007028573 A1 2330013 T3 2358802 T3 20110240 T1 2009506762 A 20080052647 A 565956 A 1760089 E 1922334 E 1760089 T1 1922334 T1 2009274714 A1	15-09-2009 15-01-2011 15-03-2007 17-05-2011 15-03-2007 15-10-2008 16-11-2009 18-04-2011 29-08-2008 21-05-2008 15-03-2007 03-12-2009 13-05-2011 31-05-2011 19-02-2009 11-06-2008 30-06-2011 19-10-2009 01-04-2011 31-12-2009 29-04-2011 05-11-2009	
WO 2009015841	A1	05-02-2009	AU CA CN EA EP JP KR US	2008281013 A1 2694771 A1 101765434 A 201000208 A1 2178557 A1 2010534627 A 20100040875 A 2009148400 A1	05-02-2009 05-02-2009 30-06-2010 28-02-2011 28-04-2010 11-11-2010 21-04-2010 11-06-2009	

International Application No. PCT/ EP2011/059121

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

**1. claims: 1-14(partially)**

Subject-matter of claims 1-14 insofar as it relates to a peptide consisting of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 1 or to a combination comprising said peptide.

---

**2. claims: 1, 3-14(all partially)**

Subject-matter of claims 1 and 3-14 insofar as it relates to a peptide consisting of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 2 or to a combination comprising said peptide.

---

**3. claims: 1, 3-14(all partially)**

As Invention 2, wherein the peptide consists of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 3.

---

**4. claims: 1-14(partially)**

As Invention 1, wherein the peptide consists of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 4.

---

**5. claims: 1, 3-15(all partially)**

Subject-matter of claims 1 and 3-15 insofar as it relates to a peptide consisting of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 5 or to a combination comprising said peptide.

---

**6. claims: 1, 3-15(all partially)**

As Invention 5, wherein the peptide consists of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 6.

---

**7-17. claims: 1, 3-14(all partially)**

As Invention 2, wherein the peptides consist of amino acid sequences as set forth in SEQ ID Nos. 7-17, respectively (each SEQ ID No. corresponding to one single invention).

---

**18. claims: 1-14(partially)**

As Invention 1, wherein the peptide consists of an amino acid sequence as set forth in SEQ ID No. 18.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 K 31/44	
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 K 31/404	
A 6 1 K 38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,I,D,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シン , ハーブリート

ドイツ , 7 2 0 7 2 テュービンゲン , バイ デン ブファーアデストーレン 9

(72)発明者 ヴァインシェンク , トニ

ドイツ , 7 3 7 7 3 アイヒヴァルト , イム モルゲンレイン 1 5

(72)発明者 ヴァルター , シュテフェン

ドイツ , 7 2 7 6 4 ロイトリンゲン , シュタイネンベルグストラッセ 2

F ターム(参考) 2G045 AA02 AA26 AA40 CA18 CB01 CB02 DA36 FA37 FB01 FB03

FB15

4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA17 BA18 BA44 DA12 DA21 MA02

NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751

4C085 AA03 AA38 BB01 DD86 EE06 FF13

4C086 AA01 AA02 BC13 BC17 DA35 GA07 MA02 MA04 MA07 NA14

ZB26 ZB27 ZC75

4H045 AA11 AA30 BA15 BA16 BA17 CA40 DA86 EA28 EA50 FA33

FA74