

(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2016-530290
(P2016-530290A)

(43) 公表日 平成28年9月29日(2016.9.29)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00	H	4 C076
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		4 C084
A61P 35/02 (2006.01)	A 61 P 35/02		4 C085
A61K 39/39 (2006.01)	A 61 K 39/39		4 C086
A61K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	U	4 HO45

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-539635 (P2016-539635)	(71) 出願人	515170539 アルティミューン ユーケー リミテッド イギリス国 エヌダブリュ1 ○エヌエイ チ ロンドン, ロイヤル カレッジ スト リート 2, ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター
(86) (22) 出願日	平成26年9月4日 (2014.9.4)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成28年4月15日 (2016.4.15)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 國際出願番号	PCT/GB2014/052675	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 國際公開番号	W02015/033140	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開日	平成27年3月12日 (2015.3.12)		
(31) 優先権主張番号	1315946.2		
(32) 優先日	平成25年9月6日 (2013.9.6)		
(33) 優先権主張国	英國 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍学ワクチン

(57) 【要約】

配列番号1～40および48に示されている配列の1つの、又は配列番号1～40および48に示されている配列の1つに対して少なくとも80%の同一性を有する配列の、連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含むペプチドから選択される、20～60アミノ酸長の少なくとも2つのペプチドを含む医薬組成物であって、ここで、各ペプチドが少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープおよび/または少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープを含む、医薬組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4~7、9、10、13~16、19~21、25~27、30~38および48のいずれか1つに示されている配列の、または配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4~7、9、10、13~16、19~21、25~27、30~38および48のいずれか1つに示されている配列に対して少なくとも80%の同一性を有する配列の、連續的な少なくとも20アミノ酸の配列を含むペプチドから選択される、20~60アミノ酸長の少なくとも2つのペプチドを含む医薬組成物、ここで、各ペプチドは少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープおよび/または少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープを含む、該医薬組成物。

10

【請求項 2】

配列番号1~40および48のいずれか1つに示されている配列の少なくとも30アミノ酸を含む少なくとも1つのペプチドを含む、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープおよび少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープを含む少なくとも1つのペプチドを含む、請求項1または2記載の組成物。

【請求項 4】

少なくとも7つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも6つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも5つの地理的領域における少なくとも80%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも90%および/または少なくとも1つの地理的領域における少なくとも95%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲を有するペプチドを含む、請求項1~3のいずれか1項記載の組成物。

20

【請求項 5】

少なくとも5つの地理的領域における少なくとも25%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも30および/または少なくとも1つの地理的領域における少なくとも60%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有するペプチドを含む、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 6】

該組成物が、健康な対象および/または癌患者において特異的T細胞応答を誘導する少なくとも1つのペプチドを含み、該ペプチドが癌患者において特異的T細胞応答を誘導可能であり、該応答が、年齢が釣り合わされた健康な対象における同じペプチドに対する特異的T細胞応答と比較して低減した大きさである、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

30

【請求項 7】

該ペプチドの少なくとも1つが、配列番号1~40および48のいずれか1つに示されている配列、または配列番号1~40および48に示されている配列の1つの全長に対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 8】

少なくとも1つのペプチドが、該ペプチドの正味の正電荷を増加させるために、および/または該ペプチドの疎水性を減少させるために、N末端および/またはC末端に1以上の追加的アミノ酸を更に含む、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

40

【請求項 9】

該組成物が、MAGE3、MUC1、hTERT、MAGE1、P53、NY-ESO1、HER2/NEU、HAGE、サバイビン(Survivin)、WT1およびLAGE1から選択される少なくとも2つの腫瘍抗原に由来するペプチドを含む、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 10】

該組成物が、HAGE、MAGE-3、LAGE1、NY-ESO-1およびMAGE-1の少なくとも2つに由来する、またはMAGE3、MUC1、hTERTおよびMAGE1の少なくとも2つに由来するペプチドを含む、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 11】

以下の群：

50

- (xi) 配列番号40に示されている配列を含むペプチド、
- (x) 配列番号39に示されている配列を含むペプチド、
- (i) 配列番号1～3および48のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド、
- (vi) 配列番号26～29のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド、ならびに
- (iv) 配列番号22～23のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド

の少なくとも2つから選択される少なくとも1つのペプチドを含む、請求項1～10のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 1 2】

群(xi)、(x)、(i)、(vi)および(iv)の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または5つ全てから選択される少なくとも1つのペプチドを含む、請求項11記載の組成物。 10

【請求項 1 3】

以下の群：

- (i) 配列番号1～3および48のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド、
- (ii) 配列番号4～7のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド、
- (iii) 配列番号8～20のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド、ならびに
- (iv) 配列番号21～22のいずれか1つに示されている配列を含むペプチド

の少なくとも2つから選択される少なくとも1つのペプチドを含む、請求項1～10のいずれか1項記載の組成物。

【請求項 1 4】

群(i)～(iv)の少なくとも3つ、または4つ全てから選択される少なくとも1つのペプチドを含む、請求項13記載の組成物。 20

【請求項 1 5】

(a) 配列番号40の配列からなるペプチド、または配列番号40の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

(b) 配列番号39の配列からなるペプチド、または配列番号39の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

(c) 配列番号29の配列からなるペプチド、または配列番号29の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

(d) 配列番号23の配列からなるペプチド、または配列番号23の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；および 30

(e) 配列番号2の配列からなるペプチド、または配列番号2の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド
を含む、請求項12記載の組成物。

【請求項 1 6】

(f) 配列番号28の配列からなるペプチド、または配列番号28の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

(g) 配列番号22の配列からなるペプチド、または配列番号22の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

(h) 配列番号24の配列からなるペプチド、または配列番号24の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

(i) 配列番号18の配列からなるペプチド、または配列番号18の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；および 40

(j) 配列番号12の配列からなるペプチド、または配列番号12の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド

から、独立して選択されるいずれか1つ、2つ、3つ、4つ、または5つのペプチドを更に含む、請求項15記載の組成物。

【請求項 1 7】

選択肢(a)～(g)のそれぞれから、独立して選択される少なくとも1つのペプチドを含む、請求項16記載の組成物。

【請求項 1 8】

10

20

30

40

50

選択肢(a)～(j)のそれぞれから、独立して選択される少なくとも1つのペプチドを含む、請求項16記載の組成物。

【請求項19】

選択肢(a)～(j)の選択された複数ペプチドが該組成物における唯一の複数有効成分または唯一の複数ペプチド有効成分である、請求項16～18のいずれか1項記載の組成物。

【請求項20】

表A1に示されている配列を含む又は該配列からなる少なくとも1つのペプチドを含む、請求項1～10のいずれか1項記載の組成物。

【請求項21】

2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個の前記ペプチドを含み、場合により、表A2に示されている配列を含む又は該配列からなる少なくとも1つのペプチドを含んでいてもよい、請求項20記載の組成物。 10

【請求項22】

該ペプチドがフルオロカーボンベクターに連結されている、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項23】

アジュバントを更に含む、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項24】

癌の治療または予防における使用のための、前記請求項のいずれか1項記載の組成物。

【請求項25】

非小細胞肺癌、乳癌、肝癌、脳癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌、骨髄腫、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎臓癌、食道癌、黒色腫皮膚癌および前立腺癌の治療における使用のための、請求項24記載の組成物。 20

【請求項26】

非小細胞肺癌の治療における使用のための、請求項24または25記載の組成物。

【請求項27】

配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4～7、9、10、13～16、19～21、25～27、30～38および48のいずれか1つに示されている配列の、または配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4～7、9、10、13～16、19～21、25～27、30～38および48のいずれか1つに示されている配列に対して少なくとも80%の同一性を有する配列の、連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含む20～60アミノ酸長のペプチドであって、少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープおよび少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープを含むペプチド。 30

【請求項28】

少なくとも7つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも6つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも5つの地理的領域における少なくとも80%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも90%および/または少なくとも1つの地理的領域における少なくとも95%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲を有するペプチドを含む、請求項27記載のペプチド。

【請求項29】

少なくとも5つの地理的領域における少なくとも25%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも30および/または少なくとも1つの地理的領域における少なくとも60%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有するペプチドを含む、請求項27または28記載のペプチド。 40

【請求項30】

健康な対象および/または癌患者において特異的T細胞応答を誘導可能である、請求項27～29のいずれか1項記載のペプチド。

【請求項31】

該ペプチドが癌患者において特異的T細胞応答を誘導可能であり、該応答が、年齢が釣り合わされた健康な対象における同じペプチドに対する特異的T細胞応答と比較して低減

10

20

30

40

50

した大きさである、請求項27～30のいずれか1項記載のペプチド。

【請求項32】

配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4～7、9、10、13～16、19～21、25～27、30～38および48のいずれか1つに示されている配列を含む又は該配列からなる、請求項27～31のいずれか1項記載のペプチド。

【請求項33】

フルオロカーボンベクターに共有結合している、請求項27～32のいずれか1項記載のペプチド。

【請求項34】

請求項1～23のいずれか1項記載の組成物の治療的有効量または請求項27～32のいずれか1項記載のペプチドの治療的有効量を、癌の治療または予防を要する対象に投与することを含む、癌の治療または予防方法。 10

【請求項35】

T調節性細胞をダウンレギュレーションする免疫調節剤または免疫チェックポイントを遮断しうる物質と組合せて該組成物を投与する、請求項34記載の方法。

【請求項36】

該免疫調節剤がシクロホスファミドであり、あるいは該物質がサイトカインまたはモノクローナル抗体である、請求項35記載の方法。

【請求項37】

該モノクローナル抗体が抗PD1または抗CTLA-4抗体である、請求項36記載の方法。 20

【請求項38】

癌の治療または予防のための医薬の製造における、請求項1～23のいずれか1項記載の組成物の、または請求項27～32のいずれか1項記載のペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫原性腫瘍抗原ペプチド由来組成物および該組成物を使用する癌の治療に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は2008年の全世界の全死亡の13%（760万）の原因であり、増加し続けると予想されており、2030年には1300万人の死亡が予想されている。新規治療法の開発に向けた最近の相当な進歩にもかかわらず、癌は尚もほとんど解決されていない医学的課題であり、先進国における第1位の死亡原因である。 30

【0003】

癌治療プログラムの主目的は、患者を治癒させ、または患者の寿命を延長させることである。腫瘍の診断および広がりの度合が確定されたら、可能な範囲で、与えられた社会経済的状況における最も有効な癌治療に関して決断をする必要がある。腫瘍が限局しており、小さなサイズである場合には、腫瘍の除去は手術により達成されうるが、癌は隣接組織に浸潤し又は微小転移により遠隔部位に広がる傾向にあり、そのような傾向は、しばしば、その有効性を制限する。癌のタイプおよび段階に応じて、化学療法および放射線療法は寿命を延長させ、患者の生活の質を改善することが示されているが、残念ながら正常細胞に負の効果を及ぼしうる。最近承認された、小分子、例えばチロシンキナーゼインヒビターまたはモノクローナル抗体に基づく、より標的化された療法は、発癌および腫瘍成長または疾患進行に必要な特定の標的化分子を阻害することにより癌細胞の成長を阻止することを目的とした一種の薬物治療を代表するものである。標的化癌治療は現在の治療より効果的であり、正常細胞に対する害がより低いと予想されるが、抵抗性の発生および一般集団における腫瘍応答の欠如のような重要な問題にも直面している。 40

【0004】

T細胞応答を促進させることを目的とした癌に対する治療用ワクチン接種は現在、腫瘍

50

学における主要標的化アプローチの1つである。癌ワクチンの主な根拠は、該疾患の原因となる悪性腫瘍細胞を攻撃するために患者の免疫系を刺激することである。患者に特異的（患者自身の細胞または腫瘍から作製される）および患者に非特異的（この場合、ワクチンは特異的腫瘍抗原に対する免疫応答をインビボで誘導する）な2つの主要タイプの治療用ワクチンが存在する。全ての他の標準的方法（手術、化学療法、放射線療法および受動標的化療法）と比較して、ワクチンに基づく有効な抗腫瘍免疫応答は、腫瘍を治癒させ又はそれを一定の抑制状態に維持して（すなわち、免疫監視）、疾患の進行、腫瘍再発を遅らせ、生存を延長させる可能性を有する唯一の癌治療法でありうる。T細胞免疫を刺激する有効な癌ワクチンを得るために多数の方法が開発中であるが、現在のところ、前立腺癌に対処するためのただ1つの治療用ワクチン（Provenge）がFDA（2010年）およびEU（2013年）により承認されているに過ぎない。

10

【0005】

癌に対する治療用ワクチンの開発は多数の難題を伴う。癌治療の基本的要件は、腫瘍を抑制および／または根絶させるために、腫瘍抗原を標的とする強固な免疫応答、特に細胞性免疫応答を生成させることである。多数の腫瘍抗原が現在までに特定されており、それらの幾つかは免疫学的に活性であると記載されているが、それらのほとんどは発現の点で限定されすぎていて広範な臨床適用性を許容しないことが現在十分に確認されている。実際、腫瘍抗原の発現は患者、腫瘍型、病期および治療によって変動しうる。したがって、与えられた適応症における全ての腫瘍に单一の抗原で十分だとは限らない。また、ワクチン接種による免疫応答の誘導は個体の遺伝的背景、特にヒト白血球抗原（HLA）系により制御されることが公知である。

20

【0006】

ペプチドに基づく癌ワクチンは、悪性T細胞に対する免疫系を偏向させるための最も特異的なアプローチを代表するものである。なぜなら、それは、抗原の最小免疫原性領域から構成される調製物であるからである。強い理論的根拠、有望な前臨床結果および抗原特異的免疫応答の頻繁な誘導にもかかわらず、ペプチドに基づく癌ワクチンは臨床場面では比較的不良な結果を示している。

20

【0007】

これらの戦略のほとんどは、最小T細胞エピトープに対応する短いペプチドを運搬することに焦点を合わせている。短いペプチドは、専門的な抗原提示細胞（APC）ではない細胞上のMHC分子に直接的に結合し、それにより寛容またはアネルギーを潜在的に誘導する。更に、短いペプチドはHLA分子により高度に拘束され、これは、広範な集団適用範囲（population coverage）を達成することに関して大きな制約となる。

30

【発明の概要】

【0008】

本発明は、短い最小エピトープを含む長い（約35マー（35量体））ペプチドに基づく新規癌ワクチンを提供する。これらのペプチドは、最小エピトープからなるペプチドより有効な免疫原である。本発明のペプチドは、エキソペプチダーゼ媒介性分解からそれを保護する三次構造を有し、それは、HLA上に直接的に提示されるには長すぎる。したがって、それは専門的APCによりインターナリゼーションされ、提示のためにプロセシングされる必要がある。本発明のペプチドはそれぞれ、少なくとも1つのCD8+ T細胞（HLAクラスI）エピトープおよび少なくとも1つのCD4+ T細胞（HLAクラスII）エピトープを含む。

40

【0009】

短いペプチドとは異なり、そのような長いペプチドは、マウスにおいて反復ワクチン接種に際して劇的に増強される記憶CD8+ T細胞応答を誘導し、短いペプチドでのワクチン接種と比較して実質的に改善された腫瘍抑制を誘導する。長いペプチド内のエピトープに反応性のCD4+ ヘルパーT細胞の誘導も長期T細胞記憶に必要である。該ワクチンおよび好ましくは該ワクチン中の各ペプチドは、種々のHLAバックグラウンドを有する個体においてCD8+およびCD4+ T細胞応答を活性化するエピトープを含有する。したがって、本発明のワクチンは広範な集団適用範囲を有し、腫瘍抗原に対する持続的免疫応答を誘導する。

50

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明は、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4～7、9、10、13～16、19～21、25～27、30～38および48のいずれか1つに示されている配列または該配列番号のいずれか1つに示されている配列に対して少なくとも80%の同一性を有する配列の連續的な少なくとも20アミノ酸の配列を含むペプチドから選択される、20～60アミノ酸長の少なくとも2つのペプチドを含む医薬組成物を提供し、ここで、各ペプチドは少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープおよび／または少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープを含む。

【 0 0 1 1 】

該組成物は、配列番号1～40および48のいずれか1つに示されている配列の少なくとも30アミノ酸を含む少なくとも1つのペプチドを含みうる。 10

【 0 0 1 2 】

該組成物は、好ましくは、少なくとも7つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも6つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも5つの地理的領域における少なくとも80%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも90%および／もしくは少なくとも1つの地理的領域における少なくとも95%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲、ならびに／または少なくとも5つの地理的領域における少なくとも25%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも30および／または少なくとも1つの地理的領域における少なくとも60%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有する少なくとも1つのペプチドを含む。 20

【 0 0 1 3 】

該組成物は、好ましくは、健康な対象および／または癌患者において特異的T細胞応答を誘導する少なくとも1つのペプチドを含む。

【 0 0 1 4 】

該ペプチドの少なくとも1つは、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4～7、9、10、13～16、19～21、25～27、30～38および48のいずれか1つに示されている配列または該配列番号のいずれか1つに示されている配列に対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有する配列を含みうる。該ペプチドの1以上は、該ペプチドの正味の正電荷を増加させるために、および／または該ペプチドの疎水性を減少させるために、N末端および／またはC末端に1以上のアミノ酸を含みうる。該組成物は、MAGE3、MUC1、hTERT、MAGE1、P53、NY-ESO1、HER2/NEU、HAGE、サバイビン(Survivin)、WT1およびLAGE1からの少なくとも2つ、例えば3つ、4つ又はそれ以上、好ましくは、MAGE3、LAGE1、HAGE、NY-ESO-1およびMAGE1の少なくとも2つ、例えば3つ、4つ又は全てに由来するペプチドを含みうる。あるいは、該組成物は、MAGE3、MUC1、hTERTおよびMAGE1の少なくとも2つ、例えば3つ又は全てに由来するペプチドを含みうる。 30

【 0 0 1 5 】

該組成物は、好ましくは、表A1に示されている配列を含む又は該配列からなる少なくとも1つのペプチドを含みうる。該組成物は2～14個の該ペプチドを含むことが可能であり、所望により、表A2に示されている配列を含む又は該配列からなる少なくとも1つの追加的ペプチドを含みうる。 40

【 0 0 1 6 】

本発明の組成物中のペプチドはフルオロカーボンベクターに連結されうる。該組成物は更にアジュバントを含みうる。

【 0 0 1 7 】

本発明は、癌の治療または予防における使用のための、特に、非小細胞肺癌、乳癌、肝癌、脳癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌、骨髄腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎臓癌、食道癌、黒色腫皮膚癌および前立腺癌の治療のための、本発明の組成物を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明の組成物の治療的有効量を、癌の治療または予防を要する対象に投与することを

50

含む、癌の治療または予防方法、および癌の治療または予防のための医薬の製造における本発明の組成物の使用も提供する。

【0019】

また、本発明は、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4~7、9、10、13~16、19~21、25~27、30~38および48のいずれか1つに示されている配列または該配列番号のいずれか1つに示されている配列に対して少なくとも80%の同一性を有する配列の連続的な少なくとも20アミノ酸を含む20~60アミノ酸長のペプチドを提供し、ここで、該ペプチドは少なくとも1つのCD8+ T細胞エピトープおよび/または少なくとも1つのCD4+ T細胞エピトープを含む。該ペプチドは、好ましくは、少なくとも7つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも6つの地理的領域における少なくとも60%、少なくとも5つの地理的領域における少なくとも80%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも90%および/もしくは少なくとも1つの地理的領域における少なくとも95%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲、ならびに/または少なくとも5つの地理的領域における少なくとも25%、少なくとも2つの地理的領域における少なくとも30および/または少なくとも1つの地理的領域における少なくとも60%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有する。10

【0020】

該ペプチドは、好ましくは、癌患者および/または健康な対象のT細胞により認識される。

【0021】

該ペプチドは、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4~7、9、10、13~16、19~21、25~27、30~38および48のいずれか1つに示されている配列を含む、または該配列から実質的になる、または該配列からなる。20

【0022】

該ペプチドはフルオロカーボンベクターに連結されていてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、健康な対象においてIFN-ELISpotにより測定された個々のペプチドに対する特異的T細胞応答を示す。

【図2】図2は、非小細胞肺癌を有する個体(NSCLC, n=68)からのPBMCにおけるIFNスポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。図は、ペプチド抗原に応答(培養のみにおける応答を超えるもの)する100万個のPBMC当たりの平均SFCを示す。^{*}陰性対照ペプチド。TNTC - 多すぎて計数できないスポット(6000 SFC/100万の最大応答に割り当てられている)。

【図3】図3は、健康な個体(n=40)からのPBMCにおけるIFNスポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。図は、ペプチド抗原に応答(培養のみにおける応答を超えるもの)する100万個のPBMC当たりの平均SFCを示す。^{*}陰性対照ペプチド。TNTC - 多すぎて計数できないスポット(6000 SFC/100万の最大応答に割り当てられている)。

【図4】図4は、ペプチド抗原に応答するIFN-ELISpotアッセイにおけるNSCLC患者からの応答体の頻度を示す。500 SFC/100万を超えるペプチド応答を示す患者の百分率として応答体頻度を計算した。

【図5】図5は、ペプチド抗原に応答するIFN-ELISpotアッセイにおける健康な対象からの応答体の頻度を示す。500 SFC/100万を超えるペプチド応答を示す患者の百分率として応答体頻度を計算した。

【図6】図6は健康な個体(n=40)または非小細胞肺癌(NSCLC)患者(n=68)からのPBMCにおけるIFNスポット形成細胞(SFC)の頻度を示す。図はペプチド抗原での刺激の後のSFCの中央値を示す。エラーバーは四分位範囲を表す。マン-ホイットニー独立検定を用いて、SFCの数を健康な者とNSCLC患者とにおいて比較した。^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01。

【図7】図7は健康な個体(n=40)または非小細胞肺癌(NSCLC)患者(n=68)からのPBMCにおけるIFNスポット形成細胞(SFC)のスポット強度を示す。図はペプチド抗原での刺

10

20

30

40

50

激の後のIFN- γ スポット強度の中央値を示す。スポット強度はウェル当たりの全てのフォアグラウンドオブジェクト（前面オブジェクト）の百分率として測定される。エラーバーは四分位範囲を表し、点線は、完全な培地のみで刺激されたウェルにおけるスポット強度（アッセイ陰性対照）を表す。マン-ホイットニー独立検定を用いて、スポット強度を健康な者とNSCLC患者とにおいて比較した。^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001。

【図8】図8は、ペプチド抗原（培養1）での刺激の後のNSCLC患者（n=7）からのPBMCにおけるCD4+およびCD8+ T細胞サイトカイン産生を示す。結果は、親CD3/CD4またはCD3/CD8 T細胞集団の百分率として、サイトカイン産生細胞として表されている。柱状グラフにおける区分けは培養における各個のペプチド抗原による寄与を示す。

【図9】図9は、ペプチド抗原（培養2）での刺激の後のNSCLC患者（n=10）からのPBMCにおけるCD4+およびCD8+ T細胞サイトカイン産生を示す。結果は、親CD3/CD4またはCD3/CD8 T細胞集団の百分率として、サイトカイン産生細胞として表されている。

【図10】図10は、ペプチド抗原（培養3）での刺激の後のNSCLC患者（n=8）からのPBMCにおけるCD4+およびCD8+ T細胞サイトカイン産生を示す。結果は、親CD3/CD4またはCD3/CD8 T細胞集団の百分率として、サイトカイン産生細胞として表されている。柱状グラフにおける区分けは培養における各個のペプチド抗原による寄与を示す。

【図11】図11は、ペプチド抗原の混合物（該図の両方の部分における培養3）での刺激と比較された単一のペプチド抗原（(A)における培養4、(B)における培養5）での刺激の後のNSCLC患者からのPBMCにおけるCD4+およびCD8+ T細胞サイトカイン産生を示す。結果は、親CD3/CD4またはCD3/CD8 T細胞集団の百分率として、サイトカイン産生細胞として表されている。

【発明を実施するための形態】

【0024】

配列表の簡単な説明

配列番号1~3は、それぞれ、MAGE3ペプチドP513、P550およびP679のアミノ酸配列である。

【0025】

配列番号4~7は、それぞれ、MUC1ペプチドP2753、P3825、P3776およびP3698のアミノ酸配列である。

【0026】

配列番号8~21は、それぞれ、hTERTペプチドP4020、P4121、P4345、P4616、P4650、P4862、P5075、P4373、P4453、P4540、P4575、P4695、P4759およびP4939のアミノ酸配列である。

【0027】

配列番号22~23は、それぞれ、MAGE1ペプチドP5400およびP5232のアミノ酸配列である。

【0028】

配列番号25~27は、それぞれ、P53ペプチドP103、P154、P205およびP262のアミノ酸配列である。

【0029】

配列番号28および29は、それぞれ、NY-ESO-1ペプチドP805およびP830のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号30はサバイビン（Survivin）ペプチドP991のアミノ酸配列である。

【0031】

配列番号31はWT1ペプチドP1331のアミノ酸配列である。

【0032】

配列番号32~38は、それぞれ、HER2ペプチドP1575、P1632、P1930、P2200、P2238、P2262およびP2316のアミノ酸配列である。

【0033】

10

20

30

40

50

配列番号39はLAG1ペプチドP5525のアミノ酸配列である。

【0034】

配列番号40はHAGEペプチドP-HAGEのアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号41および42は、それぞれ、LAG1ペプチドP5449およびP5566のアミノ酸配列である。

【0036】

配列番号43はMUC1ペプチドP3150のアミノ酸配列である。

【0037】

配列番号44および45は、それぞれ、HER1ペプチドP1692およびP2380のアミノ酸配列である。

10

【0038】

配列番号46はNY-ES01ペプチドP750のアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号47はP53ペプチドP75のアミノ酸配列である。

【0040】

配列番号48はMAGE3ペプチドP590のアミノ酸配列である。

【0041】

配列番号49～158は、付録Bに示されているペプチドのアミノ酸配列である。実施例3に記載されているとおり、付録Bに示されている3～5個の重複ペプチドの各プールは、本明細書に開示されている、より長いペプチド配列に対応する。

20

【0042】

発明の詳細な説明

開示されている方法の種々の適用は当技術分野における具体的な要求に適合されうると理解されるべきである。また、本明細書中で用いる用語は、本発明の個々の実施形態を説明することを目的としたものであるに過ぎず、限定的なものではないと理解されるべきである。

【0043】

また、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる単数形表現は、文脈に明らかに矛盾しない限り、複数形対象物を含む。したがって、例えば、「抗体」に対する言及は複数の抗体を含み、「抗原」に対する言及は2以上のそのような抗原を含み、「対象」に対する言及は2以上のそのような対象を含む、などである。

30

【0044】

「ペプチド」は本明細書においてはその最も広い意味で用いられ、2以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体または他のペプチド模倣体の化合物を意味する。したがって、「ペプチド」なる語は短いペプチド配列を含み、より長いポリペプチドおよびタンパク質をも含む。本明細書中で用いる「アミノ酸」なる語は天然および／もしくは非天然または合成アミノ酸を意味し、グリシン、およびDまたはL光学異性体の両方、およびアミノ酸類似体ならびにペプチド模倣体を含む。

40

【0045】

ある物質の「治療的有効量」は、ある与えられた物質が、ある状態に罹患している患者に、該状態またはその症状の1以上の治癒、改善または部分的阻止に十分な量で投与されることを意味する。そのような治療は疾患症状の重症度の軽減または無症状期間の頻度もしくは持続期間の減少をもたらしうる。与えられた目的および与えられた物質に関する有効量は疾患または損傷の重症度ならびに患者の体重および全身状態に左右されるであろう。本明細書中で用いる「患者」なる語は典型的には任意の哺乳動物、好ましくはヒトを含む。

【0046】

本明細書中で引用されている全ての刊行物、特許および特許出願を、前記のものも後記のものも、それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

50

【 0 0 4 7 】**ペプチド組成物**

本発明は、集団適用範囲に関して広い適用可能性を有する、多エピトープ性CD4+およびCD8+ T細胞免疫応答を惹起しうる広く免疫原性であるペプチド配列を含む組成物を提供する。該(複数の)ペプチドは該組成物中の唯一の(複数の)有効成分でありうる。該組成物は個々のタイプに適合可能であり、あるいは広い腫瘍適用範囲を有しうる。

【 0 0 4 8 】

本発明は、20~60アミノ酸長の少なくとも1つのペプチドを含む医薬組成物を提供し、ここで、該ペプチドは、腫瘍抗原の、連続的な少なくとも20アミノ酸の断片を含む。該ペプチドは、典型的には、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3、11、1、4~7、9、10、13~16、19~21、25~27、30~38および48(すなわち、配列番号1~40および48)のいずれか1つに示されている配列の1つの連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含むペプチドから選択される。該ペプチドは少なくとも1つのCD8+ T細胞(HLAクラスI)エピトープおよび/または少なくとも1つのCD4+ T細胞(HLAクラスII)エピトープを含む。該ペプチドは、インビトロアッセイにおいて、少なくとも1名の癌患者および/または少なくとも1名の健康な対象からの末梢血単核細胞(PBMC)において、応答、典型的にはT細胞応答を惹起する。特に好ましいペプチドは20~60アミノ酸長であり、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3および11(すなわち、表A1の配列)のいずれか1つに示されている配列の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含む。

10

【 0 0 4 9 】

20

該組成物は、前記の特性を有する複数のペプチドを含みうる。該組成物は、異なる民族の少なくとも2名の個体および/または異なる腫瘍型を示す2名の個体からの末梢血単核細胞(PBMC)において免疫応答を惹起しうる。

【 0 0 5 0 】**ペプチド配列**

本発明の組成物は、配列番号1~40および48のいずれか1つの配列からの連続的な少なくとも20アミノ酸、例えば、連続的な少なくとも25、29、30、31、32、33、34または35アミノ酸を含む1以上のペプチドを含みうる。本発明の好ましいペプチドは、配列番号1~40および48のいずれか1つの配列を含む、または該配列から実質的になる、または該配列からなる。特に好ましいペプチドは配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3および11(すなわち、表A1の配列)のいずれか1つの配列を含む、または該配列から実質的になる、または該配列からなる。

30

【 0 0 5 1 】

本発明の組成物中に含まれうる更に詳細なペプチドは、配列番号1~40および48の1つに示されている配列の1つにおいて1以上、例えば2、3または4個のアミノ酸置換、付加または欠失、好ましくは置換を含む配列を含むペプチドである。該連続的配列内の1、2、3または4個のアミノ酸は置換されうる。特定されている配列内の置換は、システイン残基を除去するための突然変異を含む。例えば、システイン残基はセリン残基により置換されうる。

40

【 0 0 5 2 】

典型的には、そのようなペプチドは、配列番号1~40および48の1つにおける少なくとも15または20個、例えば25、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の連続的アミノ酸に対して、あるいは配列番号1~40および48に示されている配列の1つの全長に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%、95%または98%の配列同一性を有する(例えば、National Center for Biotechnology Information (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)において入手可能なBLASTプログラムを使用して決定される)。

【 0 0 5 3 】

該ペプチドは追加的配列を含みうる。ただし、それらの全長が60アミノ酸を超えないことが必要である。例えば、該ペプチドは、配列番号1~40および48の1つに示されている配列の1つにおける少なくとも20、例えば25、29、30、31、32、33、34または35個の連続的

50

アミノ酸を含むことが可能であり、20または25アミノ酸から30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55または60アミノ酸までの長さを有しうる。

【0054】

したがって、該ペプチド、典型的には、20～60アミノ酸、例えば25～50アミノ酸、好ましくは30～40アミノ酸、例えば31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44または45アミノ酸の長さを有する。

【0055】

該ペプチドは追加的な短いアミノ酸配列を含みうる。該追加的配列は該ペプチドの製造または製剤化を促進し、あるいは該ペプチドの安定性を増強しうる。例えば、該ペプチドは、該ペプチドの正味の正電荷を増加させるために、および／または該ペプチドの疎水性を減少させるために、1以上の追加的なアミノ酸を、典型的にはN末端および／またはC末端に含みうる。該ペプチドが7以上の等電点を有するように、正味の正電荷は増加されうる。

10

【0056】

本発明の1つの態様においては、1以上、例えば2または3個の正荷電アミノ酸（アルギニンおよび／またはリジン）が該組成物中のペプチドの1以上の、Nおよび／またはC末端に付加される。例えば、3個のリジン残基が該ペプチドの1以上の、Nおよび／またはC末端に付加されうる。典型的には、65%を超える全疎水性、0未満の正味電荷を有する、および／または疎水性アミノ酸のクラスターを含むペプチドの末端に正のアミノ酸が付加される。

20

【0057】

該ペプチドは、腫瘍抗原内に存在しない1以上のエピトープを含みうる。1つのそのような例としては、プロミスカス（手当たり次第の）Tヘルパーエピトープが（所望によりポリペプチドリンカーまたはスペーサーを介して）コンセンサス配列に共有結合している融合ペプチドの使用が挙げられる。一例としては、乱交性TヘルパーエピトープはPADREペプチド、破傷風トキソイドペプチド（830-843）またはインフルエンザ赤血球凝集素、HA（307-319）でありうる。

20

【0058】

該ペプチドがフルオロカーボンに連結されている場合、該ペプチドの末端、例えば、該フルオロカーボンまたは他の結合体に連結されていない末端は、例えば、ミセルの形成によりフルオロカーボン-ペプチド構築物の可溶性を促進させるために改変されうる。該構築物の大規模合成を促進させるために、該ペプチドのNまたはC末端アミノ酸残基が修飾されうる。所望のペプチドがペプチダーゼによる切断に特に感受性である場合、通常のペプチド結合は非切断可能ペプチド模倣体により置換されうる。そのような結合および合成方法は当技術分野でよく知られている。

30

【0059】

該ペプチドは天然ペプチドでありうる。該天然ペプチドは遊離または修飾末端を有しうる。インビボにおける該ペプチドの寿命、例えば半減期、または投与部位における存続性を延長させるために、あるいは該ペプチドを抗原提示細胞へと導くために、該ペプチドは修飾されうる。例えば、該免疫原性ペプチドは1以上の天然に存在しないアミノ酸、および／または隣接アミノ酸に共有結合するための天然に存在しない共有結合を含有しうる。ある実施形態においては、標準的でない天然に存在しないアミノ酸も該免疫原性ペプチド内に組込まれうる。ただし、それらは、HLA分子と相互作用する該ペプチドの能力を妨げるものであってはならず、天然配列を認識するT細胞と尚も交差反応性でなければならない。非天然アミノ酸は、プロテアーゼに対するペプチド抵抗性または化学的安定性を改善するために使用されうる。非天然アミノ酸の例には、D-アミノ酸およびシステイン修飾が含まれる。

40

【0060】

該ペプチドは、担体、例えばタンパク質担体または運搬ベクターに連結されうる。適当な運搬ベクターには、リポペプチド、例えば脂肪アシル鎖、例えばモノパルミトイル鎖、ビロゾーム、リポソームおよび細胞浸透性ペプチド、例えばペネトラチンおよび転写のト

50

ランスアクチベーター(TAT)が含まれる。

【0061】

本発明の組成物中のペプチドの1以上、そして好ましくは全ては、好ましくは、フルオロカーボンベクターに連結される。

【0062】

ペプチドの組合せ

本発明の組成物は複数のペプチドを含みうる。したがって、該組成物は少なくとも2、例えば少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個またはそれより多数のペプチドを含むことが可能であり、それらのそれぞれは、配列番号1～40および48のいずれかに示されているアミノ酸配列からなる、または該アミノ酸配列から実質的になる、または該アミノ酸配列を含む。それぞれの該ペプチドは20～60アミノ酸長であることが可能であり、配列番号1～40および48のいずれかの連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含みうる。他の配列を有する追加的ペプチドが該組成物中に存在しうる。該ペプチドの1以上は、置換ペプチドの連続的な少なくとも20アミノ酸を有するペプチドで、または該置換ペプチドのアミノ酸配列に対してその全長にわたって少なくとも80%の同一性を有するペプチドで置換されうる。

10

【0063】

該組成物は、配列番号1～40および48に示されている配列を含む又は該配列からなるペプチドから選択される少なくとも2、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個のペプチドを含みうる。配列番号1～40および48のいずれかの配列を含むペプチドの1以上は、配列番号1～40および48の該配列に加えて、2、3または4個のNおよび/またはC末端リジン残基を含みうる。

20

【0064】

該組成物は、好ましくは、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3および11(すなわち、表A1に示されている配列)に示されている配列のいずれかを含むペプチドの少なくとも2、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個、あるいは配列番号1、3、5、6、17、18、22、23、24、28、32、36および40に示されている配列のいずれかを含むペプチドの少なくとも2、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個を含みうる。

30

【0065】

本発明の組成物においては、複数のペプチドは同じ腫瘍関連抗原に由来しうる。もう1つの態様においては、そのような複数のペプチドは2以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、10または11個の異なる腫瘍抗原に由来しうる。複数の腫瘍抗原に由来するペプチドを含む組成物は、腫瘍抗原の単一のものに由来する1以上のペプチドを含有しうる。

【0066】

例えば、該組成物は、以下の群の1以上、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個または全てから選択されるペプチドの連続的な少なくとも20アミノ酸を含む20～60アミノ酸の1以上のペプチドを含みうる：

- (i) 配列番号1～3および48に示されているMAGE3ペプチド；
- (ii) 配列番号4～7に示されているMUC1ペプチド；
- (iii) 配列番号8～21に示されているhTERTペプチド；
- (iv) 配列番号22～23に示されているMAGE1ペプチド；
- (v) 配列番号24～23に示されているP53ペプチド；
- (vi) 配列番号26～29に示されているNY-ESO-1ペプチド；
- (vii) 配列番号30に示されているサバイビン(Survivin)ペプチド；
- (viii) 配列番号31に示されているWT1ペプチド；
- (ix) 配列番号32～38に示されているHER2ペプチド；
- (x) 配列番号39に示されているLAG1ペプチド；ならびに
- (xi) 配列番号40に示されているHAGEペプチド。

40

【0067】

50

該組成物は、前記の群(i)～(iv)の2つ、3つ又は全てのペプチドの1つの連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含む20～60アミノ酸の少なくとも1つのペプチドを含みうる。例えば、該組成物は、前記の群(i)のペプチドの連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含むペプチド、および前記の群(ii)のペプチド、群(iii)のペプチドまたは群(iv)のペプチドの連続的な少なくとも20アミノ酸を含むペプチドを含みうる。もう1つの態様においては、本発明は、ペプチド群の以下の組合せのいずれか1つからのペプチドを含むペプチドを含みうる：(i)および(ii)；(i)および(iii)；(i)および(iv)；(ii)および(iii)；(ii)および(iv)；(iii)および(iv)；(i)、(ii)および(iii)；(i)、(ii)および(iv)；(i)、(iii)および(iv)；(ii)、(iii)および(iv)；または(i)、(ii)、(iii)および(iv)。

10

【0068】

あるいは、該組成物は、前記の群(i)、(x)、(xi)、(vi)および(iv)の2つ、3つ、4つ又は全てのペプチドの1つの連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含む20～60アミノ酸の少なくとも1つのペプチドを含みうる。例えば、該組成物は、前記の群(i)のペプチドの連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含むペプチド、および前記の群(x)のペプチド、群(xi)のペプチド、群(vi)のペプチドまたは群(iv)のペプチドの連続的な少なくとも20アミノ酸を含むペプチドを含みうる。該組成物は、ペプチド群の以下の組合せのいずれか1つからのペプチドを含みうる：(i)および(x)；(i)および(xi)；(i)および(vi)；(i)および(iv)；(x)および(xi)、(x)および(vi)、(x)および(iv)；(xi)および(vi)；(xi)および(iv)；(vi)および(iv)；(i)、(x)および(xi)；(i)、(x)および(vi)；(i)、(x)および(iv)；(i)、(xi)および(vi)；(i)、(xi)および(iv)；(i)、(vi)および(iv)；(x)、(xi)および(vi)；(x)、(xi)および(iv)；(x)、(vi)および(iv)；(xi)、(vi)および(iv)；(i)、(x)、(xi)および(vi)；(i)、(x)、(xi)および(iv)；(x)、(xi)、(vi)および(iv)；(x)、(xi)、(vi)および(iv)；または(i)、(x)、(xi)、(vi)および(iv)。

20

【0069】

腫瘍抗原が何であるかの考慮に加えて又はその代わりに、組成物中のペプチドは、それらの機能特性の評価に基づいて選択されうる。例えば、該組成物中のペプチドのそれぞれは、好ましくは、癌患者、例えば非小細胞肺癌(NSCLC)患者のT細胞においてペプチド特異的応答を誘導可能であり、および/または健康な対象のT細胞においてペプチド特異的応答を誘導可能である。癌患者のT細胞における該応答は、好ましくは、年齢が釣り合わされた健康な対象のT細胞における同じペプチドに対する該応答と比較して規模(大きさ)が低減している。

30

【0070】

好ましくは、本発明の組成物中のペプチドのそれぞれは、癌患者の集団、例えばNSCLC患者の集団、または健康な対象の集団のメンバーの少なくとも20%において、T細胞応答を個別に誘導する。そのようなペプチドは本明細書においては「高応答」として記載される。該組成物は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個のペプチドを有効成分として含むことが可能であり、それらのペプチドのそれぞれは、癌患者の集団および/または健康な対象の集団のメンバーの少なくとも20%において、ペプチド特異的T細胞応答を誘導する。好ましくは、該ペプチドはそれぞれ、年齢が釣り合わされた健康な対象のT細胞における同じペプチドに対する応答と比較して規模が低減した、癌患者のT細胞における応答を誘導する。そのようなペプチドの一例は、配列番号40、39、29、23、2、28、22、24、18、12、8、17、3および11のいずれか1つの配列を含む又は該配列からなるペプチドを含む。それは、表A1に示されている配列である。

40

【0071】

表A1に示されている異なる配列をそれぞれが独立して含む又は該配列からなる少なくとも2つのペプチドを含む組成物は、好ましくは、単一の該ペプチドを含む組成物と比較し

50

てT細胞応答における相乗的上昇を示しうる。該組成物は、好ましくは、配列番号2の配列を含む又は該配列からなるペプチド、および配列番号28の配列を含む又は該配列からなるペプチド、および所望により、表A1に示されているもう1つの配列を含む又は該配列からなる少なくとも1つの追加的ペプチドを含みうる。該追加的ペプチドは、好ましくは、配列番号22の配列を含む又は該配列からなる。そのような相乗効果を示す組成物の一例は、配列番号2、28、22、3、12、18、17および8のそれぞれの配列を含む又は該配列からなるペプチドを含む。いずれの仮説によっても束縛されることを望むものではないが、該相乗効果は、種々の腫瘍抗原からの配列を含む複数の「高応答」ペプチドの組合せから生じうる、と本発明者らは考えている。その代わりに又はそれに加えて、そのような組合せにおけるペプチドは、例えばMHC結合に関して又はT細胞に対する提示に関して互いに競合せず、おそらくサイトカイン、ケモカインおよび共刺激因子の産生により、該組合せに対する全体的応答を有効に増幅する「ヘルパー」作用を誘導しうる。

10

【0072】

該組成物は、所望により更に、癌患者の集団、例えばNSCLC患者、および／または健康な対象の集団のメンバーの10～20%においてペプチド特異的T細胞応答を個別に誘導する1、2、3、4、5または6個のペプチドを含みうる。そのような単数または複数の追加的ペプチドは、好ましくは、それらが、年齢が釣り合わされた健康な対象のT細胞における同じペプチドに対する応答と比較して規模が低減した、癌患者のT細胞における応答を個別に誘導する場合に、含まれうる。そのようなペプチドの一例は、表A2に示されている配列を含む又は該配列からなるペプチドを含む。好ましい例は、配列番号1、48、30および36のいずれか1つの配列を含む又は該配列からなるペプチドを含む。

20

【0073】

前記の癌患者の集団は、好ましくは少なくとも10名、より好ましくは10～50名またはそれ以上の患者を含む。同様に、健康な対象の集団は、好ましくは少なくとも10名の対象、より好ましくは10～50名またはそれ以上の対象を含む。該集団における患者または対象は一般集団からランダムに選択可能であり、任意の民族のものでありまするが、典型的には白人である。

【0074】

ペプチドが癌患者または健康な対象のT細胞においてペプチド特異的応答を誘導しうるか否かは、いずれかの適当な手段により、典型的には、該患者または対象から採取された末梢血単核細胞（PBMC）のサンプルを適当なアッセイにおいて試験することにより決定されうる。したがって、T細胞応答は該サンプルにおいてインビトロで検出される。適当なアッセイは試験ペプチドの存在下のインキュベーションの後のT細胞の活性化を測定または検出しうる。T細胞の活性化は、典型的には、サイトカイン、例えばIFN-ガンマの分泌により示されることが可能であり、それはいずれかの適当なアッセイ、典型的にはイムノアッセイ、例えばELISAまたはELISPOTにおいて検出されうる。患者または対象のT細胞応答の大きさ（規模）は、例えば、試験ペプチドの存在下のインキュベーションの後、サンプル中の特定の細胞により又は全体としてサンプル中に放出されたサイトカインの量を定量することにより、同じアッセイにおいて決定されうる。適当なアッセイは後記および実施例に更に詳細に記載されている。

30

【0075】

前記基準に基づいて、本発明の好ましい組成物は、配列番号40、39、29、23、2、28、2、24、18、12、8、17、3および11のいずれか1つのものを含む又はそれから実質的になる又はそれからなるペプチドから、独立して選択される少なくとも2つのペプチドを含む。該組成物は3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個のそのようなペプチドを含みうる。

40

【0076】

本発明の特に好ましい組成物は、

(a) 配列番号40の配列からなるペプチド、または配列番号40の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20～60アミノ酸長であるペプチド；

50

(b) 配列番号39の配列からなるペプチド、または配列番号39の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；

(c) 配列番号29の配列からなるペプチド、または配列番号29の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；

(d) 配列番号23の配列からなるペプチド、または配列番号23の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；および

(e) 配列番号2の配列からなるペプチド、または配列番号2の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチドを含む。

【0077】

10

該組成物においては、選択肢(a)~(e)の(複数の)ペプチドは、場合により、唯一の(複数の)有効成分であることが可能であり、あるいは場合により、唯一の(複数の)ペプチド有効成分であることが可能である。あるいは、該組成物は、場合により更に、

(f) 配列番号28の配列からなるペプチド、または配列番号28の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；

(g) 配列番号22の配列からなるペプチド、または配列番号22の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；

(h) 配列番号24の配列からなるペプチド、または配列番号24の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；

(i) 配列番号18の配列からなるペプチド、または配列番号18の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド；および

(j) 配列番号12の配列からなるペプチド、または配列番号12の連続的な少なくとも20アミノ酸の配列を含み20~60アミノ酸長であるペプチド

から、独立して選択されるいずれか1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのペプチドを含みうる。

【0078】

20

本発明のもう1つの好ましい組成物は、選択肢(a)~(g)のそれぞれから、独立して選択されるペプチドを含む。本発明のもう1つの好ましい組成物は、選択肢(a)~(j)のそれぞれから、独立して選択されるペプチドを含む。該組成物のそれぞれにおいては、それぞれ選択肢(a)~(g)または(a)~(j)の(複数の)ペプチドは、所望により、唯一の(複数の)有効成分であることが可能であり、あるいは場合により、唯一の(複数の)ペプチド有効成分であることが可能である。

30

【0079】

腫瘍型

該組成物におけるペプチド配列の組合せは、1以上の腫瘍型からの腫瘍抗原内に存在するエピトープ、好ましくはCD8+およびCD4+エピトープの両方を提供する。典型的には、該組成物中に存在するペプチドに対応する腫瘍抗原を発現する任意の腫瘍が、該組成物を使用して治療されうる。

【0080】

40

したがって、本発明は、1つ、2つ、3つ又はそれ以上の腫瘍型に対するPBMCにおける免疫応答を惹起しうる組成物を提供する。各腫瘍は、該組成物中に存在する腫瘍抗原の少なくとも1つ、好ましくは2つ、3つまたはそれ以上、例えば全てを発現する。該腫瘍抗原は該腫瘍において同時に発現可能であり、あるいは腫瘍の発生における異なる時点で発現可能である。該腫瘍抗原は該腫瘍の細胞の全部または一部において発現されうる。該腫瘍が、異種腫瘍抗原を発現する細胞を含有する場合、該組成物は、好ましくは、各細胞型において発現される腫瘍抗原に由来する少なくとも1つのペプチドを含む。

【0081】

免疫応答を惹起する該組成物の能力は、いずれかの適当な方法により、例えば本明細書中の実施例に記載されている方法により決定されうる。好ましくは、該応答は異なる個体からのPBMCにおいて検出されうる。典型的には、該個体は異なるHLAバックグラウンドを有し、好ましくは、少なくとも2つ、好ましくは3つ又は4つの異なるHLAバックグラウンド

50

を有する。異なるHLAバックグラウンドの個体は異なる民族の個体でありうる。

【0082】

本発明の組成物は、好ましくは、健康な対象および／または癌患者の少なくとも20%において特異的T細胞応答を誘導するペプチドを含む。

【0083】

健康な対象または癌患者からのヒト末梢血単核細胞（PBMC）においてペプチド特異的T細胞応答を測定するための免疫学的アッセイはサイトカインELISpot、例えばIFN- γ ELISpotアッセイまたはフローサイトメトリーを使用する細胞内サイトカイン染色の手段により行われうる。

【0084】

T細胞応答をモニターするためにELISpotアッセイを使用する場合、本発明のペプチドまたは本発明の組成物は、健康な対象および／または癌患者の少なくとも20%、例えば30%もしくは40%または好ましくは50%において、100万個のPBMC当たり20個以上の細胞、例えば、100万個のPBMC当たり少なくとも30、40、50、60、70または80個の細胞において特異的T細胞応答を誘導しうる。

【0085】

該アッセイは新鮮または凍結PBMCから行われうる。該アッセイは、單一ペプチドまたは幾つかの抗原ペプチドを含む組成物と共にインキュベートされるPBMCの短期間のインビトロ培養の後で、あるいはエクスピボで行われうる。

【0086】

短期間のインビトロ培養における該ペプチドの量は0.001 μ g/ペプチドから100 μ g/ペプチドまで変動しうる。

【0087】

短期間のインビトロ培養のためのインキュベーション時間は5～15日間、例えば7～13日間または9～11日間でありうる。短期間のインビトロ培養はサイトカイン、例えばIL-2、IL-15およびIL-7、好ましくはIL-2およびIL-15の1以上の存在下で行われうる。

【0088】

短期間のインビトロ培養はT調節性細胞および／またはNK細胞の枯渇の後で行われうる。そのような細胞の枯渇は、PBMCが癌患者からのモノである場合に特に望ましいかもしれない。短期間のインビトロ培養はIL-10中和抗体、抗PD1抗体、抗CTLA-4抗体、抗OX-40抗体、抗GITR抗体、デニロイキン（denileukin）、ディフチトックス（diflotox）、キナゼインヒビターおよび／またはtoll受容体アゴニストの存在下で行われうる。

【0089】

集団適用範囲

該組成物は広い集団適用範囲（集団カバー範囲）を有する。本発明の組成物中のペプチドは、異なるHLA対立遺伝子に結合しうる複数のCD8+およびCD4+ T細胞エピトープを含んでおり、それにより該ペプチドにより表される腫瘍抗原からのエピトープは集団内の高い比率（割合）の個体においてHLA分子上に提示される。

【0090】

HLAクラスIおよびクラスII分子は多型であり、それらの頻度（度数）は民族群によって様々である。該多型のほとんどはペプチド結合領域に位置し、結果として、各HLA変異体はペプチドリガンドのユニークレパトワに結合すると考えられる。HLA多型はワクチン設計者にとっての大きな課題の1つである。なぜなら、HLA多型は差示的ペプチド結合の基礎をなすからである。更に、特異的HLA対立遺伝子は、異なる民族においては劇的に異なる頻度で発現される。

【0091】

種々のHLA対立遺伝子に対するペプチド結合アフィニティは、推定アルゴリズムツールおよび／またはインビトロHLA結合アッセイを用いて測定されうる。本発明のペプチドは複数のHLAクラスIおよび／またはHLAクラスII結合モチーフを含む。与えられた集団におけるHLA分子の対立遺伝子頻度の知見およびHLA対立遺伝子特異的結合モチーフの存在に応

10

20

30

40

50

じて、集団適用範囲が計算されうる。好ましいペプチドは、種々のHLAバックグラウンドを有する個体において免疫応答を達成しうる、そして相当数の異なる集団または民族群において高レベルの適用範囲を達成しうるHLAクラスIおよびHLAクラスII結合モチーフを含有する。

【0092】

本発明の医薬組成物は、典型的には、広範な集団適用範囲を与えるように種々のHLA対立遺伝子に結合する1以上のT細胞エピトープを含む1以上のペプチドを含む。該組成物は、特定の民族群もしくは集団領域における又は複数の民族群もしくは集団領域にわたる高頻度HLA対立遺伝子に関連した1以上のHLA結合モチーフを含有することが知られている又は予想されるペプチドを含みうる。該組成物は、2以上の対立遺伝子変異体に結合する1以上の乱交性CD4+およびCD8+ T細胞エピトープを含みうる。該組成物中のペプチド配列の組合せは、種々のHLAサブタイプに結合するT細胞エピトープを提供する。

10

【0093】

該組成物は、好ましくは、該組成物において表される腫瘍抗原のそれぞれからの単数または複数のペプチドを含み、該ペプチドは、1以上の地理的領域、例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個の地理的領域からの個体のような種々のHLAバックグラウンドを有する個体においてHLAクラスIおよび/またはHLAクラスII対立遺伝子に結合するエピトープを含む。

【0094】

該組成物は、(i)少なくとも7もしくは8個、好ましくは9もしくは10個の集団領域における少なくとも60%、(ii)少なくとも6もしくは7個、好ましくは少なくとも8、9もしくは10個の集団領域における少なくとも70%、(iii)少なくとも5もしくは6個の集団領域、好ましくは少なくとも7、8もしくは9個の集団領域における少なくとも80%、(iv)少なくとも2、3もしくは4個の集団領域、好ましくは少なくとも5、6、7、8もしくは9個の集団領域における少なくとも90%、および/または(v)少なくとも1つの集団領域、好ましくは少なくとも2、3、4もしくは5個の集団領域における少なくとも95%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲を有するペプチドを含みうる。

20

【0095】

該組成物は、(i)少なくとも5個、好ましくは少なくとも6、7、8、9もしくは10個の集団領域における少なくとも25%、(ii)少なくとも2個、好ましくは3、4、5、6、7、8、9もしくは10個の集団領域における少なくとも30%、40%もしくは50%、(iii)少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個の集団領域における少なくとも60%、(iv)少なくとも1つの集団領域、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8もしくは9個の集団領域における少なくとも70%、(v)少なくとも1つの集団領域、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6もしくは7個の集団領域における少なくとも80%、および/または(vi)少なくとも1つの集団領域、好ましくは少なくとも2、3もしくは4個の集団領域における少なくとも90%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有するペプチドを含みうる。

30

【0096】

該ペプチドは前記のクラスII対立遺伝子集団適用範囲およびクラスI対立遺伝子集団適用範囲基準の一方または好ましくは両方を満たしうる。

40

【0097】

好ましいペプチドは、(i)少なくとも7または8個、好ましくは9または10個の集団領域における少なくとも60%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲、および(i)少なくとも5個、好ましくは少なくとも6、7、8、9または10個の集団領域における少なくとも25%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有する。

【0098】

他の好ましいペプチドは、(i)少なくとも9個の集団領域における少なくとも50%のHLAクラスII対立遺伝子集団適用範囲、および(i)少なくとも7個の集団領域における少なくとも25%のHLAクラスI対立遺伝子集団適用範囲を有する。

50

【0099】

該集団領域は、オーストラリア、欧州、北アフリカ、北米、北東アジア、オセアニア、南米、東南アジア、南西アジア、サハラ以南のアフリカおよびその他から選択されうる地理的領域である。これらの集団領域は実施例において更に詳細に定められている。集団適用範囲は、実施例に記載されているとおりに決定されうる。該組成物は、好ましくは、これらの集団適用範囲基準を満たす2以上のペプチドを含み、ここで、該ペプチドは2以上の腫瘍抗原に由来する。

【0100】

1つの態様においては、本発明の組成物は、異なるHLAサブタイプを有する少なくとも2つの個体からの末梢血単核細胞（PBMC）においてインビトロで応答を惹起する。該組成物は、前記の集団領域の2、3、4もしくはそれ以上からの1つの個体において、および／または前記の領域の1つにおける異なる民族群からの2、3、4もしくはそれ以上の個体において免疫応答を惹起しうる。

10

【0101】

本発明は、少なくとも2つ、例えば3以上の異なる民族性の個体において免疫応答を惹起しうる組成物を提供する。これは、実施例に記載されているインビトロPBMCアッセイを用いて評価されうる。本発明の組成物は、東洋またはインドの癌患者、白人の癌患者およびアフリカまたはアラブの癌患者の2つ、3つ又は全てからのPBMCにおいて免疫応答を惹起する能力を有しうる。

20

【0102】

フルオロカーボン

フルオロカーボンは、ペルフルオロカーボンまたは混合フルオロカーボン／炭化水素基から誘導される1以上の鎖を含むことが可能であり、飽和または不飽和であることが可能であり、各鎖は3～30個の炭素原子を有する。したがって、フルオロカーボンの結合における鎖は典型的には飽和または不飽和であり、好ましくは飽和である。フルオロカーボンの結合における鎖は直鎖状（線状）または分枝状でありうるが、好ましくは直鎖状である。各鎖は典型的には3～30個の炭素原子、5～25個の炭素原子または8～20個の炭素原子を有する。フルオロカーボンベクターを該ペプチドに共有結合させるために、反応性基またはリガンド、例えば-CO-、-NH-、S、Oまたはいずれかの他の適当な基が該ベクター内に含まれる。共有結合を得るためのそのようなリガンドの使用は当技術分野でよく知られている。該反応性基はフルオロカーボンベクター上のいずれかの位置に位置しうる。

30

【0103】

該ペプチドへのフルオロカーボンベクターのカップリング（結合）は、天然で存在する又は該ペプチドのいずれかの部位に導入された官能基、例えば-OH、-SH、-COOHおよび-NH₂を介して達成されうる。そのような結合の例には、アミド、ヒドラゾン、ジスルフィド、チオエーテルおよびオキシム結合が含まれる。

30

【0104】

所望により、抗原提示細胞内のプロセシングのためにフルオロカーボン要素からの該ペプチドの切断を可能にするために、そして該ペプチドの立体的提示を最適化するために、スペーサー要素（ペプチド性または非ペプチド性）が組込まれうる。該スペーサーは、該分子の合成を補助するため、そしてその安定性および／または可溶性を改善するためにも組込まれうる。スペーサーの例には、タンパク質切断酵素により切断されうるアルギニンもしくはリジンのようなアミノ酸またはポリエチレングリコール（PEG）が含まれる。

40

【0105】

1つの実施形態においては、フルオロカーボン結合ペプチドは化学構造C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-Rまたはその誘導体（ここで、m = 3～30, n ≤ 2m + 1, y = 0～15, x ≤ 2y, (m + y) = 3～30であり、Spは随意的な化学的スペーサー部分であり、Rは免疫原性ペプチドである）を有しうる。典型的には、mおよびnは2m-1 ≤ n ≤ 2m + 1、好ましくはn = 2m + 1なる関係を満たす。典型的には、xおよびyは2y-2 ≤ x ≤ 2y、好ましくはx = 2yなる関係を満たす。好ましくは、C_mF_n-C_yH_x部分は直鎖状である。

50

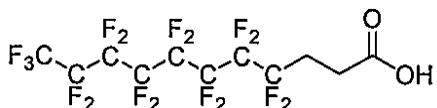
【0106】

mは5~15、より好ましくは8~12であることが好ましい。yは0~8、より好ましくは0~6または0~4であることも好ましい。 $C_mF_n-C_yH_x$ 部分は飽和しており（すなわち、n = 2m + 1かつx = 2y）、直鎖状であること、およびm = 8~12かつy = 0~6または0~4が好ましい。

【0107】

特定の例においては、フルオロカーボンベクターは以下の式：

【化1】



10

の2H、2H、3H、3H-ペルフルオロウンデカン酸から誘導される。

【0108】

したがって、好ましいフルオロカーボン結合は直鎖状飽和部分 $C_8F_{17}(CH_2)_2$ であり、これは $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ から誘導される。

【0109】

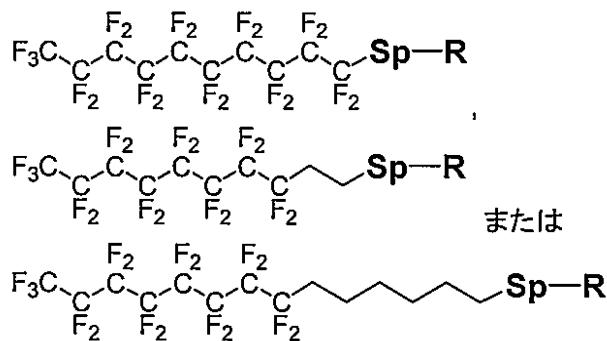
フルオロカーボン結合の更なる例は以下の式： $C_6F_{13}(CH_2)_2$ -, $C_7F_{15}(CH_2)_2$ -, $C_9F_{19}(CH_2)_2$ -, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2$ -, $C_5F_{11}(CH_2)_3$ -, $C_6F_{13}(CH_2)_3$ -, $C_7F_{15}(CH_2)_3$ -, $C_8F_{17}(CH_2)_3$ -および $C_9F_{19}(CH_2)_3$ -を有し、これらは、それぞれ、 $C_6F_{13}(CH_2)_2COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_2COOH$, $C_9F_{19}(CH_2)_2COOH$, $C_{10}F_{21}(CH_2)_2COOH$, $C_5F_{11}(CH_2)_3COOH$, $C_6F_{13}(CH_2)_3COOH$, $C_7F_{15}(CH_2)_3COOH$, $C_8F_{17}(CH_2)_3COOH$ および $C_9F_{19}(CH_2)_3COOH$ から誘導される。

20

【0110】

フルオロカーボンベクター-抗原構築物に関する適当な構造の好ましい例は、式：

【化2】



30

を有し、ここで、SpおよびRは前記のとおりである。ある実施形態においては、Spはリジン残基から誘導され、式-CONH-(CH₂)₄-CH(NH₂)-CO-を有する。好ましくは、Rは配列番号1~14のいずれか1つであり、好ましくは、Rは配列番号1~6のいずれか1つである。各ペプチド、例えば配列番号1、2、3、4、5または6のN末端アミノ酸のアミノ基は式-CONH-(CH₂)₄-CH(NH₂)-CO-のスペーサーのC末端カルボキシ基とアミド結合を形成する。

40

【0111】

本発明の場合には、フルオロカーボンの結合は、生じる化合物が該ペプチドを抗原提示細胞へと尚も運搬しうるように修飾されうる。したがって、例えば、幾つかのフッ素原子が他のハロゲン原子、例えば塩素、臭素または要素で置換されうる。また、幾つかのフッ素原子をメチル基で置換し、本明細書に記載されている該分子の特性を尚も保有させることが可能である。

【0112】

該ペプチドはスペーサー部分を介してフルオロカーボンベクターに連結されうる。スペーサー部分は好ましくはリジン残基である。このスペーサー残基は、該ペプチドが例えば合計4個のN末端リジン残基を有しうるよう、前記のいずれかの末端リジン残基に加えて

50

存在しうる。したがって、本発明の好ましい製剤は、該ペプチドがC末端またはN末端リジン残基、好ましくはN末端リジン残基を有する、フルオロカーボン連結ペプチドを含みうる。該ペプチドにおける末端リジンは、好ましくは、式 $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ を有するフルオロカーボンに連結される。フルオロカーボンは、好ましくは、N末端リジン残基のイブシロン鎖に連結される。

【0113】

本明細書に記載されている医薬組成物は、所望によりそれぞれがそれ自身のフルオロカーボンベクターに共有結合していてもよい、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個またはそれ以上の免疫原性ペプチドを含むと想定される。

【0114】

ペプチド

本発明はまた、本発明の組成物において有用なペプチドを提供する。該ペプチドは前記のペプチドのいずれか1つでありうる。特に、本発明は、配列番号1～40に示されている配列の1つ、または配列番号1～40に示されている配列の1つに対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、90%、95%もしくは98%同一である配列を含む、20アミノ酸長から30、35、40、50または60アミノ酸長までのペプチドを提供する。該ペプチドは前記の追加的アミノ酸を含みうる。1つの特定の実施形態においては、本発明は、配列番号1～40の1つに示されている配列を有するペプチドを提供する。

【0115】

該ペプチドは前記のとおりに担体にカップリング（連結）されうる。1つの好ましい態様においては、本発明のペプチドはフルオロカーボンベクターに共有結合される。フルオロカーボンベクターは前記のとおりでありうる。

【0116】

他の成分

本発明の組成物は追加的な免疫原を含みうる。該免疫原はB細胞抗原でありうる。B細胞抗原は、腫瘍に対する抗体応答を刺激するように働きうる。本発明の医薬組成物は、例えば、T細胞応答を刺激しうる1以上のフルオロカーボン連結ペプチドと、B細胞抗原とを含みうる。

【0117】

1つの態様においては、本発明は、2以上のペプチド、例えばフルオロカーボン連結ペプチド含む、そして更にアジュバントおよび／または所望により医薬上許容される担体または賦形剤を含む組成物を提供する。該賦形剤は、効率的な凍結乾燥に必要な安定剤または增量剤でありうる。具体例には、ソルビトール、トレハロース、マンニトール、ポリビニルピロリドンおよびそれらの混合物、好ましくはマンニトールが含まれる。存在しうる他の賦形剤には、当技術分野でよく知られている保存剤、例えば抗酸化剤、滑沢剤、凍結保存剤および結合剤が含まれる。

【0118】

アジュバントは、単独で投与された場合には直接的な効果は有するとしてもほとんど有さないが共投与抗原に対する免疫応答をモジュレーションしうる物質である。そのようなアジュバントは規模および／またはサイトカインプロファイルに関して免疫応答を増強する能力を有しうる。アジュバントの例には以下のものが含まれる：細菌の天然成分の天然または合成誘導改良体、例えばフロイントアジュバントおよびその誘導体、ムラミルジペプチド(MDP)誘導体、CpG、モノホスホリル脂質A；他のアジュバントまたは増強剤、例えばサポニン、アルミニウム塩、サイトカイン、水中油型アジュバント中に、油中水型アジュバント、免疫刺激複合体(ISCOM)、リポソーム、製剤化ナノおよびマイクロ粒子；細菌毒素およびトキソイド；イヌリン、特にガンマイヌリン；ならびにTLRアゴニスト。

【0119】

好ましくは、アジュバントは、ペプチドグリカン（例えば、TDM、MDP、ムラミルジペプチド、ムラブチド(Murabutide)）；ミョウバン溶液（例えば、水酸化アルミニウム、ADJUMER（商標）（ポリホスファゼン）またはリン酸アルミニウムゲル）；グルカン；アル

10

20

30

40

50

ガムリン (algammulin) ; 界面活性剤 (例えば、スクワラン、Tween 80、プルロニック (Pluronic) またはスクアレン) ; リン酸カルシウムゲル；細菌毒素またはトキソイド (例えば、コレラホロトキシン、コレラ毒素 A1-タンパク質-A-D断片融合タンパク質、コレラ毒素のサブユニットBまたはブロック共重合体) ; サイトカイン含有リポソーム；油中水型アジュバント (例えば、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバントまたはモンタニド (Montanide) 、例えばISA 51またはISA 720) ; 水中油型アジュバント (例えば、MF-59) ; イヌリンに基づくアジュバント；サイトカイン (例えば、インターフェロン-ガンマ、インターロイキン-1ベータ、インターロイキン-2、インターロイキン-7またはインターロイキン-12) ; ISCOM (例えば、イスコマトリックス (iscomatrix)) ; 任意の組成物のミクロスフェアおよび微粒子；およびToll様受容体アゴニスト (例えば、CpG、ヒトTLR 1-10のリガンド、マウスTLR 1-13のリガンド、ISS-1018、IC31、イミダゾキノリン、ポリ(I:C)、ヒルトノール (Hiltonol) 、アンプリゲン (Ampligen) 、モノホスホリルリピドA、Ribi529、コレラ毒素、易熱性毒素、Pam3Cys、CAF01またはフラジエリン (Flagellin)) からなる群から選択されうる。

10

【0120】

医薬組成物の製造

本発明の医薬組成物は、医薬産物の製剤化の第1工程として、少なくとも1つのペプチド、例えばフルオロカーボン連結ペプチドを酢酸または他の溶媒中に可溶化することにより製造されうる。混合物中にフルオロカーボン連結ペプチドの1以上を分散させるために使用されうる他の溶媒の例には、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 、プロパン-2-オール、tert-ブタノール、アセトンおよび他の有機溶媒が含まれる。フルオロカーボンベクター-ペプチドコンジュゲートを可溶化するための方法はWO2012/090002に記載されている。

20

【0121】

出発物質として使用されるフルオロカーボン連結ペプチドのペプチドは典型的には乾燥される。20アミノ酸より短いペプチドを含む及び／又は50%未満の疎水性残基を有するペプチドおよびフルオロカーボン連結ペプチドは酢酸以外の溶媒中に可溶化されうる。酢酸は、典型的には、該ペプチドが20個を超えるアミノ酸を有する及び／又は50%を超える疎水性残基を有する場合に使用される。

【0122】

溶液中のフルオロカーボン連結ペプチドの濃度は、典型的には、約0.1 mM～約10 mM、例えば約0.5 mM、1 mM、2 mM、2.5 mMまたは5 mMである。適当な濃度の一例は約10 mg/mLである。

30

【0123】

投入成分を、凝集物が存在する場合にはそれが分散するように、所望の比まで一緒に均一に混合し、滅菌し、投与のための適当な形態で提供することが可能である。そのような例は、可溶化を促進するために混合後または希釈後段階で、ボルテックスおよび／または超音波処理を導入することを含みうるであろう。製造プロセスの流れの他の順列は、該プロセスの初期段階で行われる滅菌濾過、または液体の最終形態を可能にする、凍結乾燥の省略を含みうるであろう。

40

【0124】

種々のペプチドまたはフルオロカーボン連結ペプチドを、例えば種々の溶媒中または種々の濃度の酢酸中で別々に可溶化する場合には、可溶化ペプチドまたはフルオロカーボン連結ペプチドを混合して、ペプチドまたはフルオロカーボン連結ペプチドの混合物を得る。

【0125】

随意的な (場合により使用されうる) アジュバントおよび／または1以上の医薬上許容される賦形剤も可溶化ペプチド／フルオロカーボン連結ペプチドまたはペプチド／フルオロカーボン連結ペプチドの混合物に加えられうる。典型的には、可溶化フルオロカーボン連結ペプチドを賦形剤および／またはアジュバントと混合する。

【0126】

50

可溶化および混合の後、フルオロカーボン連結ペプチドの溶液を希釈することが可能である。例えば、該混合物は水中で希釈されうる。

【0127】

該ペプチドまたはフルオロカーボン連結ペプチドを含有する溶液を、好ましくは、滅菌する。滅菌は、製剤が全身的使用を意図したものである場合に特に好ましい。任意の適当な滅菌手段、例えばUV滅菌または濾過滅菌が用いられうる。好ましくは、濾過滅菌を用いる。滅菌濾過は $0.45\text{ }\mu\text{m}$ フィルターおよびそれに続く $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滅菌等級フィルター列を含みうる。

【0128】

滅菌はいずれかの賦形剤および/またはアジュバントの添加の前または後に行われうる。

10

【0129】

本発明の組成物は乾燥形態、例えば凍結乾燥形態でありうる。本発明の組成物は、水溶液、例えば、凍結乾燥物または他の乾燥製剤を水性媒体中に溶解することにより形成される水溶液でありうる。該水溶液は典型的には中性pHに近い。

【0130】

該製剤の乾燥は長期貯蔵を促進する。いずれかの適当な乾燥方法が用いられうる。凍結乾燥が好ましいが、他の適当な乾燥方法、例えば真空乾燥、噴霧乾燥、噴霧凍結乾燥または流動床乾燥も用いられうる。乾燥方法は、該ペプチドまたはフルオロカーボン連結ペプチドを含有する無定形ケークの形成をもたらしうる。

20

【0131】

長期貯蔵のために、該滅菌組成物は凍結乾燥されうる。凍結乾燥はフリーズドライにより達成されうる。フリーズドライは典型的には凍結およびそれに続く乾燥を含む。例えば、フルオロカーボン連結ペプチド混合物は-80°で2時間凍結され、凍結乾燥装置内で24時間凍結乾燥(フリーズドライ)されうる。

【0132】

本発明の医薬上許容される組成物は固体組成物でありうる。フルオロカーボン連結ペプチド組成物は乾燥粉末形態で得られうる。凍結乾燥から得られたケークは粉末形態へと粉碎されうる。したがって、本発明の固体組成物は自由流動粒子の形態をとりうる。該固体組成物は、典型的には、密封バイアル、アンプルまたはシリンジ内の粉末として提供される。吸入用に、粉末は乾燥粉末吸入器内で提供されうる。その代わりに、固体マトリックスがパッチとして提供されうる。粉末は錠剤形態へと圧縮されうる。

30

【0133】

乾燥、例えば凍結乾燥ペプチドまたはフルオロカーボン連結ペプチド組成物は投与前に再構成(還元)されうる。本明細書中で用いる「再構成」なる語は使用前の乾燥ワクチン製品の溶解を意味すると理解される。乾燥、例えば凍結乾燥の後、該免疫原性ペプチド、例えばフルオロカーボン連結ペプチド製品は、好ましくは、等張性で中性pHの均一懸濁液を形成するように再構成される。該製剤は、典型的には、例えば、注射用水、ヒスチジンバッファー溶液(例えば、28mM L-ヒスチジンバッファー)、炭酸水素ナトリウム、Tris-HClまたはリン酸緩衝食塩水(PBS)を加えることにより水相中で再構成される。該再構成製剤は、典型的には、無菌容器、例えばバイアル、シリンジまたは貯蔵もしくは投与のためのいずれかの他の適当な形態内に分散される。

40

【0134】

該組成物は使用前に容器、例えば無菌バイアルまたはシリンジ内で貯蔵されうる。

【0135】

医学用途

本発明は、療法によるヒトまたは動物の身体の治療における使用のための、本発明の組成物を提供する。特に、本発明の組成物は癌の治療または予防方法における使用のために提供される。本発明の組成物は、癌においても有用でありうる免疫応答を惹起する。本発明の組成物は、好ましくは、癌を有する個体を治療するための治療用ワクチンとしての使

50

用のためのものである。

【0136】

本発明のペプチドおよび組成物は非小細胞肺癌、乳癌、肝癌、脳癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌、骨髄腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎臓癌、食道癌、黒色腫皮膚癌および前立腺癌患者の治療において特に有用である。

【0137】

本発明はまた、癌、特に非小細胞肺癌、乳癌、肝癌、脳癌、胃癌、膵臓癌、腎臓癌、卵巣癌、骨髄腫、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎臓癌、食道癌、黒色腫皮膚癌および前立腺癌を治療または予防するための医薬の製造における本発明の医薬組成物の使用を提供する。

10

【0138】

同様に、本発明は、本発明の組成物の予防的または治療的有効量を対象に投与することを含む、癌の治療または予防を要する対象における癌の治療または予防方法を提供する。

【0139】

本発明の組成物は、第2の治療用または予防用物質と組合せて投与されうる。例えば、第2の物質は、癌に対する免疫応答を更に刺激するための、例えば、フルオロカーボン連結ペプチドが細胞性免疫応答を刺激する場合には体液性免疫応答を刺激するためのもう1つの免疫原（例えば、球状抗原または組換え若しくは天然に存在する抗原）を含みうる。第2の物質はB細胞抗原でありうると理解される。

20

【0140】

好ましい実施形態においては、第2の物質は、既存の癌の治療における使用に関して公知の物質である。そのような既存の癌治療用物質は、シクロホスファミド、アルキル化剤、例えばシスプラチン、植物アルカロイドおよびテルペノイド、例えばビンクリスチンまたはパクリタキセル、代謝拮抗剤、例えば5-フルオロウラシル、トボイソメラーゼインヒビターIまたはII型、例えばカンプトテシンまたはドキソルビシン、細胞毒性抗生物質、例えばアクチノマイシンまたはアントラサイクリン、例えばエピルビシンから選択されうる。

【0141】

第2の物質は、免疫療法剤または免疫調節剤、例えばTLRアゴニスト；T調節性細胞をダウンレギュレーションする物質、例えばシクロホスファミド；あるいはサイトカインまたはモノクローナル抗体の形態の免疫チャックポイントを遮断するように設計された物質、例えば抗PD1および抗CTLA-4の1つ又は組合せでありうる。

30

【0142】

第2の治療用物質または予防用物質を本発明の組成物と共に使用する場合、投与は同時に又は時間を隔てて行われうる。本発明の組成物は第2の治療用物質の前に、それと一緒に又はその後で投与されうる。

【0143】

本発明の組成物は、種々の公知経路および技術を用いて、ヒトまたは動物対象にインピボで投与されうる。例えば、該組成物は、注射可能な溶液、懸濁液またはエマルションとして提供可能であり、通常の針およびシリンジを使用して、または液体ジェット注射系を用いて、非経口、皮下、経口、表皮、皮内、筋肉内、動脈内、腹腔内、静脈内注射により投与可能である。該組成物は皮膚または粘膜組織内に、例えば鼻腔内、気管内、腸内、舌下、直腸または膣に局所投与可能であり、あるいは呼吸器または肺投与に適した微細化スプレーとして提供されうる。好ましい実施形態においては、該組成物は筋肉内投与される。その代わりに、該組成物は腫瘍内に、例えば腫瘍内注射により直接投与されうる。

40

【0144】

該組成物は、投与用組成物に適した予防的および/または治療的に有効な量で対象に投与されうる。本発明の組成物の投与は「予防」または「治療」を目的としたものでありうる。本明細書中で用いる「治療的」または「治療」なる語は以下のいずれか1以上を含む：腫瘍発生/発癌の予防；症状の軽減または排除；および腫瘍または癌の退縮または完全

50

な排除。

【0145】

治療は、(癌の確定診断の前に)予防的に、または(癌の診断の後で)治療的に行われる。治療的治療はステージI、II、IIIまたはIVの癌、術前または術後介入に対して行われる。該治療は、無進行生存もしくは全生存および/または疾患の消失を改善するための術後維持治療または長期治療でありうる。

【0146】

必要な場合の担体の選択は、しばしば、該組成物の運搬経路に左右される。本発明においては、組成物はいずれかの適当な経路および投与手段のために製剤化されうる。医薬上許容される担体または希釈剤には、経口、眼、直腸、鼻腔内、局所(頬側および舌下を含む)、腔または非経口(皮下、筋肉内、静脈内、皮内、経皮を含む)投与に適した組成物において使用されるものが含まれる。

10

【0147】

該組成物は、例えば液体、固体またはエアゾールとして、いずれかの適当な経路で投与されうる。例えば、経口製剤はエマルション、シロップまたは溶液または錠剤またはカプセル剤の形態をとることが可能であり、これらは、有効成分の胃内分解を防ぐために腸溶コーティングされうる。鼻腔内製剤はスプレーまたは溶液でありうる。経皮製剤はその個々の運搬系に適合化可能であり、パッチを含みうる。注射用製剤は蒸留水または別の医薬上許容される溶媒もしくは懸濁化剤中の溶液または懸濁液でありうる。

20

【0148】

患者に投与される予防用または治療用ワクチンの適当な投与量は診療所において決定されるであろう。しかし、指針としては、適当なヒト用量は好ましい投与経路に左右されうるが、1~1000 μg、例えば約100 μg、200 μg、500 μgまたは1000 μgでありうる。免疫学的または臨床的效果を達成するためには複数の用量が必要とされることがあり、それは、必要な場合には、典型的には、1~12週間隔で投与される。より長期にわたる免疫応答の増強が必要な場合には、1ヶ月~5年間隔の反復投与が行われうる。

30

【0149】

(実施例)

以下の実施例は本発明を例示するものである。

実施例1：腫瘍抗原の集団適用範囲

HLAクラスIおよびIIエピトープの推定および集団適用範囲の計算を、MAGE-3、MUC1、hTERT、MAGE-1、P53、NY-ESO1、HER2/NEU、HAGE、サバイビン(Survivin)、WT1およびLAG-1に由来する47個のペプチド配列(配列番号1~47)に関して行った。該ペプチド配列を後記の付録Aに示す。これは配列番号48の配列をも含む。

【0150】

HLAクラスIペプチドリガンドの推定を、www.IEDB.orgにおいて入手可能であり2013年8月14日に使用した以下の2つのエピトープ推定方法を用いて行った：(1)人工ニューラルネットワークベース法(ANN; Nielsen M, Lundsgaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lambeth K, Buus S, Brunak S, Lund O. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.* 2003 May;12(5):1007-17)および(2)安定化マトリックスベース法(SMM, Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC Bioinformatics.* 2005 May 31; 6:132)。該分析のために考慮したHLAクラスI対立遺伝子は以下のものであった：HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*29:02, HLA-A*29:02, HLA-A*30:01, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:03, HLA-A*68:02, HLA-B*57:01, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*15:02, HLA-B*15:03, HLA-B*18:01, HLA-B*27:05, HLA-B*35:01, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*40:02, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*45:01, HLA-B*46:01, HLA-B*48:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01およびHLA-B*58:01。推定分

40

50

析は、各対立遺伝子に関して9アミノ酸および10アミノ酸の長さを有する長いペプチド配列に由来する潜在的エピトープに限定された。

【0151】

推測出力はIC₅₀nMの単位で示される。50 nM未満のIC₅₀値を有するペプチドは高アフィニティだとみなされ、50～500 nMは中アフィニティとみなされ、500～5000 nMは低アフィニティとみなされることが十分に確立されている。この分析においては、AN法またはSMM法のいずれかを用いた場合に50 nM未満の推測アフィニティを有するペプチドを結合体とみなした。

【0152】

HLAクラスIIペプチドリガンドの推定を、www.IEDB.orgにおいて入手可能であり2013年8月14日に使用したSturnioloら (Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA Class II matrices. Nat Biotechnol. 1999 Jun;17(6):555-61)により開発された方法を用いて行った。該分析に考慮したHLAクラスII対立遺伝子は以下のとおりであった：HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR8, HLA-DR11, HLA-DR13およびHLA-DR15の代表的メンバーとみなされた、それぞれ、HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*01:01, DRA*01:01/HLA-DRB1*03:01, DRA*01:01/HLA-DRB1*04:01, DRA*01:01/HLA-DRB1*07:01, DRA*01:01/HLA-DRB1*08:02, DRA*01:01/HLA-DRB1*11:01, DRA*01:01/HLA-DRB1*13:01およびDRA*01:01/HLA-DRB1*15:01。1を超えるスコアを有するペプチドは高アフィニティとみなされる。例えば、高アフィニティ普遍的TヘルパーエピトープHA (307-319)は、それぞれHLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*13:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*01:01およびHLA-DRB1*08:02に対して6.12、4.5、3、2.86、2.66、2.06、1.8および1.6の結合スコアを有する。その他の高アフィニティ普遍的TヘルパーエピトープTT (830-844)は、それぞれHLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*13:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*11:01に対して5.6、3.5、2.5、2.1、1.6、1、0.8、0.6の結合スコアを有する。不可変鎖ペプチドからの高アフィニティ乱交性ペプチドCLIP (81-104)は、それぞれHLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*13:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*01:01およびHLA-DRB1*08:02に対して6.3、5.6、5.4、5.38、4.2、2.9、2.78、2.4の結合スコアを有する。

【0153】

与えられたペプチドにおける特異的HLA分子に対する推定エピトープまたはエピトープ群の存在に基づいて、エピトープを含有する特定のペプチドに関する集団適用範囲を、www.IEDB.orgにおいて入手可能であり2013年8月14日に使用したリソース (resource) 分析を用いて計算した。選択された主要集団領域 (www.IEDB.orgにおいて定められているとおり)には以下のものが含まれる：オーストラリア (ヨーク岬 (Cape York)、グルート・エイラント (Groote Eylandt)、キンバリー (Kimberley) およびユエンドゥム (Yuendumu) 集団に対応)、ヨーロッパ (欧洲) (ブルガリア、クロアチア、キューバ白人、チエコ、フィン90、グルジア、アイルランド、北米白人およびスロベニア集団に対応)、北アフリカ (アルジェリア99、チャオウヤ (Chaouya)、メタルサ (Metalsa)、モロッコ98およびモロッコ99集団に対応)、北米 (アメリカインディアン、ラカンドン、セリおよびユピック集団に対応)、北東アジア (ブリヤート人、韓国200およびトウヴァ集団に対応)、オセアニア (アメリカ領サモア、フィリピン、イバantan (Ivatan) 集団に対応)、その他 (ブラジル混血、アフリカおよびヨーロッパ、キューバ・ムラート、メキシコおよび北米-ヒスパニック集団に対応)、南米 (バーリ、グアラニ-カイオワ (Guarani-Kaiowa) およびグアラニ-ナンデワ (Guarani-Nandewa) 集団に対応)、東南アジア (アミ (Ami) 97、アタヤル (Atayal)、ブヌン (Bunun)、中国人、客家 (Hakka)、漢-中国 (Han-Chinese) 149、漢-中国572、キン (Kinh)、マレー (Malay)、ミンナン (Minnan)、ムオング (Muong)、北米-アジア太平洋島民、沖縄、パイワン (Paiwan) 51、パゼー (Pazeh)、ブ

ユマ (Puyuma) 49、ルカイ (Rukai)、リュクアン (Ryukuan)、サイシアット (Saisiat)、シンガポール-中国、シラヤ (Siraya)、タイ、タオ (Thao)、トロコ (Toroko)、ツオウ (Tsou) およびヤミ (Yami) 集団に対応)、西南アジア (アラブドルーズ (Arab Druze)、イスラエルユダヤ、クルド、オマーンとトルコ集団に対応) およびサハラ以南のアフリカ (ドッゴン (Doggon)、ケニア142、ケニア高地人 (Kenyan Highlander)、ケニア低地人 (Kenyan Lowlander)、マンデンカ (Mandenka)、北米-アフリカ、ルワンダ、ショナ (Shona)、ウガンダ、ザンビアおよびズールー集団に対応)。

【0154】

集団適用範囲を計算する目的においては、エピトープ推定において使用されるHLAクラスII対立遺伝子の数が限られているため、HLAクラスII対立遺伝子の群を定義した。HLAクラスII対立遺伝子の群の定義は、同一HLA群に属するHLAクラスII対立遺伝子にわたる高度な乱交性ペプチド結合に左右される (Wilson CC, Palmer B, Southwood S, Sidney J, Higashimoto Y, Appella E, Chesnut R, Sette A, Livingston BD. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol.* 2001 May;75(9):4195-207; Lund O, Nielsen M, Kesmir C, Petersen AG, Lundsgaard C, Worsning P, Sylvester-Hvid C, Lamberth K, Roder G, Justesen S, Buus S, Brunak S. Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices. *Immunogenetics.* 2004 Mar;55(12):797-810)。HLAクラスII対立遺伝子の群 (該エピトープ推定において使用された分子を代表するもの) を以下のとおりに定義した : HLA-DR1 (HLA DRB1*01, HLA DRB1*0101, HLA DRB1*0102, HLA DRB1*010201, HLA DRB1*0103), HLA-DR3 (HLA DRB1*03, HLA DRB1*0301, HLA DRB1*030101, HLA DRB1*0302, HLA DRB1*030201, HLA DRB1*0303, HLA DRB1*0305, HLA DRB1*0308, HLA DRB1*0317), HLA-DR4 (HLA DRB1*04, HLA DRB1*0401, HLA DRB1*040101, HLA DRB1*0402, HLA DRB1*0403, HLA DRB1*040301, HLA DRB1*0404, HLA DRB1*0405, HLA DRB1*040501, HLA DRB1*0406, HLA DRB1*0407, HLA DRB1*0408, HLA DRB1*0410, HLA DRB1*0411, HLA DRB1*0412, HLA DRB1*0413, HLA DRB1*0415, HLA DRB1*0416, HLA DRB1*0436), HLA-DR7 (HLA DRB1*07, HLA DRB1*0701, HLA DRB1*070101), HLA-DR8 (HLA DRB1*08, HLA DRB1*0801, HLA DRB1*0802, HLA DRB1*080201, HLA DRB1*080302, HLA DRB1*0804, HLA DRB1*080401, HLA DRB1*080402, HLA DRB1*0805, HLA DRB1*0806, HLA DRB1*0807, HLA DRB1*0808, HLA DRB1*0809, HLA DRB1*0811, HLA DRB1*0818), HLA-DR11 (HLA DRB1*11, HLA DRB1*1101, HLA DRB1*110101, HLA DRB1*110102, HLA DRB1*1102, HLA DRB1*1103, HLA DRB1*1104, HLA DRB1*110401, HLA DRB1*1108, HLA DRB1*1109, HLA DRB1*1111, HLA DRB1*1113, HLA DRB1*111401, HLA DRB1*111901, HLA DRB1*1130), HLA-DR13 (HLA DRB1*13, HLA DRB1*1301, HLA DRB1*1302, HLA DRB1*130201, HLA DRB1*1303, HLA DRB1*130301, HLA DRB1*130302, HLA DRB1*1304, HLA DRB1*1305, HLA DRB1*1306, HLA DRB1*1307, HLA DRB1*1309, HLA DRB1*1310, HLA DRB1*1312, HLA DRB1*1317, HLA DRB1*1320, HLA DRB1*1323, HLA DRB1*1325, HLA DRB1*1327, HLA DRB1*1331) およびHLA-DR15 (HLA DRB1*15, HLA DRB1*1501, HLA DRB1*150101, HLA DRB1*1502, HLA DRB1*150201, HLA DRB1*1503, HLA DRB1*1504, HLA DRB1*1505, HLA DRB1*1506)。

【0155】

集団適用範囲の計算の結果をHLAクラスI対立遺伝子に関しては表1に、そしてHLAクラスII対立遺伝子に関しては表2に示す。

【0156】

このアプローチにおいて選択された対立遺伝子に基づけば、集団領域のそれぞれに関する最大集団適用範囲は以下のとおりであった : HLAクラスI対立遺伝子に関してはオーストラリア (86.68%)、欧州 (99.69%)、北アフリカ (83.11%)、北米 (98.21%)、北東アジア (83.80%)、オセアニア (95.18%)、その他 (96.71%)、南米 (50.67%)、東南アジア (96.03%)、西南アジア (93.06%)、サハラ以南のアフリカ (90.37%)、ならびにオーストラリア (89.67%)、欧州 (99.64%)、北アフリカ (99.28%)、北米 (90.47%)、北東アジア (90.83%)、オセアニア (91.29%)、その他 (97.18%)、南米 (57.45%)、東南アジア (50)

(75.50%) 、西南アジア (97.06%) およびサハラ以南のアフリカ (98.74%) 。

【 0 1 5 7 】

広範な集団適用範囲を達成する能力に関して好ましいペプチドを以下のとおりに定義した : HLAクラスII対立遺伝子に関しては (前記の11個の集団領域のうち) 少なくとも7個もしくは少なくとも8個の異なる集団領域または優先的には少なくとも9個の集団領域においてPC% > 60% 、およびHLAクラスI対立遺伝子に関しては (前記の11個の集団領域のうち) 少なくとも2、3、4、5もしくは6個の集団領域または優先的には少なくとも7個の集団領域においてPC% > 25% を有するペプチド。

【 0 1 5 8 】

例えば、P2380_HER、P5566_LAGE1、P75-P53、P750-NY-ESO、P1692-HER、P3150-MUC、P5 10 449-LAGEはそのような好ましいペプチドの定義に含まれない。

【 0 1 5 9 】

例えば、P513_MAGE3、P550_MAGE3、P679_MAGE3、P2753_MUC1、P3776_MUC1、P4020_hTER T、P4345_hTERT、P4373_hTERT、P4540_hTERT、P4616_hTERT、P4650_hTERT、P4695_hTERT 、P4759_hTERT、P4862_TERT、P4939_hTERT、P5075_hTERT、P5400_MAGE1およびP5232_MAGE 1 (それぞれMAGE-3、MUC-1、テロメラーゼおよびMAGE-1に由来するもの) は、好ましいペプチドの定義に含まれ、各ペプチドは、HLAクラスII対立遺伝子に関しては少なくとも9個の異なる集団領域においてPPC% > 50% 、およびHLAクラスI対立遺伝子に関しては少なくとも7個の集団領域においてPPC% > 25% を有する。

表1: HLAクラスIペプチド結合推定に基づいて各ペプチドに関して計算された集団適用圏(20 EPC%)

【 0 1 6 0 】

【表1】

	オーストラリア	欧洲	北アメリカ	北米	北東アジア	オセアニア	その他	南米	東南アジア	西南アジア	サハラ以南のアフリカ
P103-P53	50%	87%	34%	64%	54%	60%	75%	42%	63%	69%	65%
P154-P53	27%	39%	16%	11%	20%	35%	28%	0%	45%	30%	36%
P205-P53	1%	14%	12%	31%	7%	2%	15%	1%	13%	7%	28%
P262_P53	39%	66%	1%	48%	34%	58%	51%	40%	54%	32%	25%
P513_MAGE3	56%	69%	17%	45%	46%	69%	61%	40%	70%	51%	48%
P550_MAGE3	84%	94%	67%	93%	78%	94%	89%	48%	94%	85%	79%
P679_MAGE3	27%	67%	18%	44%	25%	40%	57%	41%	34%	42%	49%
P805_NY_ESO1	27%	66%	36%	57%	42%	38%	63%	41%	37%	58%	59%
P830_NY_ESO1	37%	53%	13%	31%	29%	58%	48%	40%	53%	34%	42%
P991_SURVIVIN	38%	22%	8%	8%	21%	52%	16%	1%	56%	22%	17%
P1331_WT1	27%	39%	36%	27%	27%	34%	29%	0%	45%	34%	45%
P1575_HER	42%	63%	10%	55%	37%	60%	52%	44%	61%	40%	24%
P1632_HER	41%	48%	8%	26%	27%	62%	31%	1%	68%	30%	26%
P1930_HER	40%	53%	6%	33%	31%	60%	46%	44%	59%	33%	31%
P2200_HER	27%	40%	6%	23%	15%	46%	25%	2%	53%	22%	24%
P2238-HER	58%	86%	49%	65%	57%	79%	79%	42%	78%	74%	72%
P2262-HER	25%	65%	39%	57%	38%	48%	67%	41%	43%	59%	62%
P2316_HER	7%	33%	4%	23%	10%	23%	23%	8%	32%	12%	24%
P2380_HER	1%	10%	16%	15%	12%	8%	15%	1%	13%	12%	36%
P2753_MUC1	25%	52%	12%	38%	23%	40%	48%	40%	32%	33%	42%
P3698_MUC1	26%	60%	10%	33%	23%	39%	50%	40%	31%	31%	37%
P3825_MUC1	10%	58%	25%	48%	16%	24%	39%	11%	36%	23%	37%
P3776_MUC1	47%	71%	20%	45%	42%	66%	61%	41%	65%	52%	55%
P4020_hTERT	43%	51%	31%	43%	30%	64%	35%	8%	72%	31%	38%
P4121_hTERT	3%	35%	16%	32%	13%	19%	26%	4%	25%	13%	28%
P4345_hTERT	28%	69%	7%	55%	29%	40%	54%	40%	34%	40%	28%
P4373_hTERT	49%	46%	16%	78%	27%	58%	39%	11%	54%	13%	29%
P4453_hTERT	3%	35%	2%	37%	7%	2%	21%	2%	4%	6%	22%
P4540_hTERT	61%	96%	72%	73%	72%	81%	88%	42%	83%	87%	85%
P4575_hTERT	25%	17%	20%	5%	18%	45%	18%	0%	51%	27%	33%
P4616_hTERT	32%	58%	8%	32%	22%	39%	38%	9%	53%	30%	32%
P4650_hTERT	31%	71%	23%	39%	34%	47%	57%	44%	47%	43%	50%
P4695_hTERT	25%	52%	15%	38%	23%	40%	49%	40%	33%	35%	42%
P4759_hTERT	29%	64%	27%	43%	25%	43%	54%	44%	40%	39%	48%
P4862_TERT	50%	74%	6%	38%	41%	65%	58%	44%	64%	51%	29%
P4939_hTERT	49%	82%	35%	50%	54%	65%	73%	40%	66%	71%	62%
P5075_hTERT	50%	77%	8%	57%	45%	66%	63%	44%	65%	53%	41%
P5400_MAGE1	63%	96%	57%	65%	66%	79%	83%	45%	82%	79%	78%
P5232_MAGE1	28%	43%	17%	24%	20%	36%	30%	1%	47%	30%	34%
P5525_LAGE1	23%	59%	29%	50%	40%	50%	48%	5%	60%	37%	54%
P5566_LAGE1	0%	6%	2%	19%	7%	17%	7%	0%	12%	5%	15%
P-HAGE	29%	79%	9%	61%	36%	42%	65%	42%	37%	46%	48%
P75-P53	26%	66%	16%	31%	26%	39%	42%	29%	56%	42%	50%
P750-NYESO	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
P1692-HER	3%	5%	4%	14%	4%	3%	2%	1%	8%	59%	10%
P3150-MUC	2%	25%	10%	0%	1%	3%	21%	1%	14%	1%	8%
P5449-LAGE	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

【0161】

表2: HLAクラスIIペプチド結合推定に基づいて各ペプチドに関して計算された集団適用範囲(EPC%)

【0162】

10

20

30

40

【表2】

	オーストラリア	歐州	北アメリカ	米	北東アジア	オセアニア	その他	南米	東南アジア	西南アジア	サハラ以南のアフリカ
P103-P53	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P154-P53	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P205-P53	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P262_P53	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P513_MAGE3	76%	87%	90%	35%	73%	85%	76%	40%	61%	87%	96%
P550_MAGE3	58%	99%	99%	83%	85%	88%	92%	27%	64%	96%	96%
P679_MAGE3	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P805_NY_ESO1	35%	93%	92%	17%	71%	81%	73%	6%	46%	88%	95%
P830_NY_ESO1	89%	95%	94%	85%	84%	87%	89%	55%	64%	82%	87%
P991_SURVIVIN	57%	96%	97%	83%	81%	87%	87%	26%	63%	93%	92%
P1331_WT1	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P1575_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P1632_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P1930_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P2200_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P2238_HER	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P2262_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P2316_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P2380_HER	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P2753_MUC1	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P3698_MUC1	57%	93%	93%	76%	77%	83%	80%	23%	50%	79%	80%
P3825_MUC1	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P3776_MUC1	57%	96%	97%	83%	81%	87%	87%	26%	63%	93%	92%
P4020_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4121_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4345_hTERT	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P4373_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4453_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4540_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4575_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4616_hTERT	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P4650_hTERT	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P4695_hTERT	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P4759_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4862_TERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P4939_hTERT	57%	96%	97%	83%	81%	87%	87%	26%	63%	93%	92%
P5075_hTERT	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P5400_MAGE1	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P5232_MAGE1	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P5525_LAGE1	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P5566_LAGE1	89%	97%	98%	90%	87%	91%	94%	56%	75%	95%	97%
P-HAGE	90%	100%	99%	90%	91%	91%	97%	57%	76%	97%	99%
P75-P53	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
P750-NYESO	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
P1692-HER	6%	27%	31%	1%	8%	6%	16%	1%	6%	17%	27%
P3150-MUC	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
P5449-LAGE	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

【0163】

実施例2：健康な対象におけるペプチド特異的T細胞応答

健康な対象から得られた末梢単核細胞においてペプチド特異的T細胞応答を評価した。

解凍後、培地(5%v/v)ヒトAB血清(PAA Laboratories Ltd)を含有するRPMI 1640培地、Glutamax(商標)(Life Technologies)および20 μg/mLの合計最終濃度のペプチドのブール(P103-P53, P513_MAGE3, P679_MAGE3, P805_NY_ESO1, P1575_HER, P2238_HER, P382

10

20

30

40

50

5_MUC1, P3776_MUC1, P4540_hTERT, P4575_hTERT, P5400_MAGE1, P-HAGEから構成される)の存在下、PBMCを100万細胞/mlの密度で24ウェル平底プレート(または48ウェル底プレート)内で培養した。

【0164】

該プレートを5% CO₂ インキュベーター内で37 °Cでインキュベートし、第4日に組換えヒトIL-2およびIL-15 (R&D Systems) をそれぞれ10 IU/mlおよび10 ng/mLの最終濃度で各ウェルに加えた。第7日に、PBMC培養を取り出し、培地内で洗浄し、10 IU/mLのIL-2を含有する培地内のウェル内に戻した。5% CO₂ インキュベーター内で37 °Cの一晩の静止の後、細胞を取り出し、計数し、生存能に関して評価した。PVDFプレート (MSIPS4510, Millipore) を抗ヒトIFN- γ 抗体 (R&D systems) でコートし、4 °Cで一晩インキュベートした。ついでプレートを洗浄し、ブロッキングバッファー (1% BSA (PAA), 5% スクロース (Fisher), ダルベッコ-PBS (Invitrogen))と共に少なくとも1時間インキュベートし、使用前に最終的に培地で洗浄した。培地 (5%(v/v)ヒトAB血清 (PAA Laboratories Ltd) を含有するRPMI 1640培地, Glutamax (商標) (Life Technologies))のみ (二重重複体)、または5 μg/ペプチド/mLの濃度のペプチド (P103-P53, P513_MAGE3, P679_MAGE3, P805_NY_ES01, P1575_HER, P2238-HER, P3825_MUC1, P3776_MUC1, P4540_hTERT, P4575_hTERT, P5400_MAGE1, P-HAGE) を表す重複18マー (18量体) ペプチドのプールを含有する該培地、または媒体のみの存在下、予めコートされたELISpotプレート内に培養PBMCを50,000細胞/ウェルの密度で移し、二重重複(または三重重複)で試験した。18時間の培養の後、プレートを洗浄し、ビオチン化二次抗ヒトIFN- γ 抗体 (R&D systems)と共に、ついでストレプトアビジン-APと共にインキュベートした。ELISpot青色モジュール (R&D Systems) を製造業者の説明に従い使用して、IFN- γ の産生を検出した。スポット計数ソフトウェアを備えた自動化ELISpotプレート読取系 (Cellular Technology Limited)を使用して、プレートをスキャンし、ウェルを計数した。結果はスポット形成細胞 (SFC) /10⁶ PBMCとして表されており、培地のみにおけるPBMCのIFN- γ SFCにより表されるバックグラウンド応答が各対象に関して差し引かれている。陽性応答は、20を超えるスポット形成細胞 (SFC) /10⁶ PBMCと定義された。

【0165】

図1に示されているとおり、特定のペプチドに対する応答対象の頻度はP103-P53に関しては100%、P513_MAGE3に関しては50%、P679_MAGE3に関しては80%、P805_NY_ES01に関しては50%、P1575_HERに関しては100%、P2238-HERに関しては83%、P3825_MUC1に関しては17%、P3776_MUC1に関しては100%、P4540_hTERTに関しては67%、P4575_hTERTに関しては100%、P5400_MAGE1に関しては100%、P-HAGEに関しては50%である。

【0166】

実施例3：非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者および健康な対象におけるペプチド特異的T細胞応答

材料および方法

集団

非小細胞肺癌 (NSCLC) を有すると臨床的に診断された68名の対象および年齢が釣り合わされた40名の健康な個体をUniversity Hospital SouthamptonおよびThe Royal Marsden Londonにおける研究倫理委員会 (REC) の研究に登録した。対象の人口統計を以下の表に要約する。

【0167】

【表3】

範疇	対象の数	年齢の中央値 (範囲)	腺癌 / 扁平上皮癌 / その他
健康	40	60 (34-84)	-
NSCLC ステージ I	2	64.5 (56-73)	2/0/0
NSCLC ステージ II	5	66 (45-70)	4/1/0
NSCLC ステージ IIIa	16	65 (37-73)	10/5/1
NSCLC ステージ IIIb	11	63 (54-79)	3/6/2
NSCLC ステージ IV	34	68 (33-78)	28/6/0

10

【0168】

全血からのPBMCの単離および低温保存

全個体からの書面による承認同意の後、ヘパリン処理された新鮮な静脈血を集め、末梢血単核細胞（PBMC）を単離し、血液採取の18時間以内に低温保存した。ダルベッコのリン酸緩衝食塩水（dPBS, Invitrogen）中での等体積の血液の希釈、Lymphoprep（Axis-Shield）上への注意深い層化および $800 \times g$ で20分間の遠心分離により、PBMCを単離した。該PBMC層をRPMI-1640培地（Invitrogen）中で洗浄し、PBMCを熱不活性化米国産ウシ胎児血清（FCS, A15-204, PAA）中の10% DMSO（Sigma Aldrich）中の $0.5 \sim 1.5 \times 10^7$ 細胞のアリコート中で低温保存した。分析まで細胞を液体窒素中で貯蔵した。

20

【0169】

PBMCの短期培養

各対象からのPBMCの2つのバイアルを解凍し、TruCount（BD Biosciences）を使用してリンパ球数を決定した。PBMCを2つの培養条件（培養1および培養2）に分割し、それぞれを13個のペプチドプールの混合物で刺激した。各ペプチドプールは、18アミノ酸の平均ペプチド長を有する3~5個のペプチドを含有する。各ペプチドプールは、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、11、12、13、17、18、22、23、24、28、29、30、31、32、36、39、40および46の、より長いペプチドの1つに対応する。例えば、「P-P4020-TERT」と称されるペプチドプールは、配列番号8のペプチドであるペプチド「P4020-TERT」に対応するプールである。P-P550-MAGE3、P-P5232-MAGE1、P-P991-SURVIVINおよびP-P-HAGEに関しては、該プールにおけるN末端ペプチドは1つのN末端アミノ酸により伸長されていて、合成を促進させ、その可溶性を改善する。单一アミノ酸伸長は、これらのプールの機能特性をそれのそれぞれのペプチドと比べて変化させると予想されない。

30

【0170】

培養1は、P4020-TERT, P4540-TERT, P4575-TERT, P4616-TERT, P4682-TERT, P513-MAGE3, P550-MAGE3, P679-MAGE3, P991-SURVIVIN, P1331-WT1, P5525-LAGE1に対応するプールからなるものであった。

【0171】

培養2は、P2753-MUC1, P3698-MUC1, P3776-MUC1, P3825-MUC1, P750-NYESO, P805-NYESO, P830-NYESO, P5232-MAGE1, P5400-MAGE1, P1575-HER, P2238-HER, P103-P53, P-HAGEに対応するプールからなるものであった。

40

【0172】

種々のペプチドプールを以下の表に要約し、各プールにおける短いペプチドの個々の配列を付録Bに示す。

【0173】

【表4】

培養	ペプチドプール	対応 ペプチド 配列番号	プールにおける短いペプチド
1	P-P4020-TERT	8	P4020_hTERT-1, P4020_hTERT-2, P4020_hTERT-3, P4020_hTERT-4, P4020_hTERT-5
1	P-P4540-TERT	17	P4540-TERT_1, P4540-TERT_2, P4540-TERT_3, P4540-TERT_4, P4540-TERT_5
1	P-P4575-TERT	18	P4575-TERT_1, P4575-TERT_2, P4575-TERT_3, P4575-TERT_4, P4575-TERT_5
1	P-P4616-TERT	11	P4616_hTERT-1, P4616_hTERT-2, P4616_hTERT-3, P4616_hTERT-4
1	P-P4650-TERT	12	P4650_hTERT-1, P4650_hTERT-2, P4650_hTERT-3, P4650_hTERT-4, P4650_hTERT-5
1	P-P4682-TERT	13	P4862_hTERT-1, P4862_hTERT-2, P4862_hTERT-3, P4862_hTERT-4
1	P-P513-MAGE3	1	P513-MAGE-3_1, P513-MAGE-3_2, P513-MAGE-3_3, P513-MAGE-3_4
1	P-P550-MAGE3	2	P550_MAGE3-1, P550_MAGE3-2, P550_MAGE3-3, P550_MAGE3-4
1	P-P590-MAGE3	48	P590_MAGE3-1, P590_MAGE3-2, P590_MAGE3-3
1	P-P679-MAGE3	3	P679-MAGE-3_1, P679-MAGE-3_2, P679-MAGE-3_3, P679-MAGE-3_4
1	P-P991-SURVIVIN	30	P991_SURVIVIN-1, P991_SURVIVIN-2, P991_SURVIVIN-3, P991_SURVIVIN-4
1	P-P1331-WT1	31	P1331_WT1-1, P1331_WT1-2, P1331_WT1-3, P1331_WT1-4
1	P-P5525-LAGE1	39	P5525_LAGE1-1, P5525_LAGE1-2, P5525_LAGE1-3, P5525_LAGE1-4
2	P-P2753-MUC1	4	P2753_MUC1-1, P2753_MUC1-2, P2753_MUC1-3
2	P-P3698-MUC1	7	P3698_MUC1-1, P3698_MUC1-2, P3698_MUC1-3, P3698_MUC1-4, P3698_MUC1-5
2	P-P3776-MUC1	6	P3776-MUC-1_1, P3776-MUC-1_2, P3776-MUC-1_3, P3776-MUC-1_4
2	P-P3825-MUC1	5	P3825-MUC-1_1, P3825-MUC-1_2, P3825-MUC-1_3, P3825-MUC-1_4, P3825-MUC-1_5
2	P-P750-NYESO	46	P750-NYESO-1, P750-NYESO-2, P750-NYESO-3, P750-NYESO-4
2	P-P805-NYESO	28	P805-NY-ESO-1_1, P805-NY-ESO-1_2, P805-NY-ESO-1_3, P805-NY-ESO-1_4
2	P-P830-NYESO	29	P830_NY_ESO1-1, P830_NY_ESO1-2, P830_NY_ESO1-3, P830_NY_ESO1-4
2	P-P5232-MAGE1	23	P5232_MAGE1-1, P5232_MAGE1-2, P5232_MAGE1-3, P5232_MAGE1-4
2	P-P5400-MAGE1	22	P5400-MAGE1_1, P5400-MAGE1_2, P5400-MAGE1_3, P5400-MAGE1_4, P5400-MAGE1_5
2	P-P1575-HER	32	P1575-HER_1, P1575-HER_2, P1575-HER_3, P1575-HER_4
2	P-P2238-HER	36	P2238-HER_1, P2238-HER_2, P2238-HER_3, P2238-HER_4, P2238-HER_5
2	P-P103-P53	24	P103-P53_1, P103-P53_2, P103-P53_3, P103-P53_4
2	P-P-HAGE	40	P313-HAGE_1, P313-HAGE_2, P313-HAGE_3, P313-HAGE_4

【0174】

PBMCを 1×10^6 細胞/mLの濃度で2mLの24ウェル細胞培養プレート内の培地(50%未処理ヒトAB血清(PAA)およびゲンタマイシンで補足されたCM, RPMI1640 Glutamax)内で合計7日間培養した。各プールを20 μg/mLの合計ペプチド最終濃度で加えた。第1日に、IL-7 (Peprotech) およびIL-2 (R&D Systems) をそれぞれ5 ng/mLおよび10 IU/mLの最終濃度で該培養に加えた。第3日に、IL-2を10 IU/mLの濃度で加えた。第7日に、細胞を細胞培養プレ-

10

20

30

40

50

トから回収し、培地で洗浄し、TruCount (BD Biosciences) を使用して計数した後、後記のとおりにIFN (インターフェロンガンマ) ELISpotアッセイまたは細胞内サイトカイン染色 (ICS) を用いて分析を行った。

【 0 1 7 5 】

P-P750-NYESOは陰性対照ペプチドとして使用されたことに注目されたい。

【 0 1 7 6 】

ヒトIFN ELISpotアッセイ

96ウェルマルチスクリーンPVDFフィルタープレート (Millipore) を $100\text{ }\mu\text{L}$ (1:80) の抗ヒトIFN 捕捉mAb (SEL285, R&D Systems) で28 ℃で一晩コートした。ついでプレートを洗浄し、1% BSA (ウシ血清アルブミン, PAA) および5% スクロースで補足されたPBSで2 ~ 8 ℃で2時間 ~ 7日間ブロッキングした。該短期培養からの細胞を二重重複 (アッセイ対照は三重重複で試験された) ウェル内に $0.5\text{~}1\times 10^5$ 細胞 / ウェルでプレーティングした。26個のペプチドプール、すなわち、P-P-HAGE, P-P4650_hTERT, P-P4020_hTERT, P-P5525_LAGE1, P-P4540_hTERT, P-P830_NY_ES01, P-P805_NY_ES01, P-P679_MAGE3, P-P5400_MAGE1, P-P550_MAGE3, P-P103_P53, P5232_MAGE1, P-P4575_hTERT, P-P4616_hTERT, P513_MAGE3, P-P1575_HER, P-P590-MAGE3, P-P991_SURVIVIN, P-P3698_MUC1, P-P2238-HER, P-P3825_MUC1, P-P4862_hTERT, P-P1331_WT1, P-P2753_MUC1, P-P3776_MUC1 および陰性対照ペプチドとしてのP-P750-NYESOを個別に試験した。用いた最終抗原濃度は、これらの26個のペプチドプールの個々のペプチドの濃度に関しては $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ペプチド}/\text{mL}$ 、PHA陽性対照に関しては $2.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。該アッセイ陰性対照は、培地のみを含有する細胞プレート (無抗原) であった。ELISpotプレートを $37^\circ\text{C}/5\text{ \% CO}_2$ で18 ~ 18.5時間インキュベートした。ついでプレートを洗浄し、 $100\text{ }\mu\text{L}$ (1:80) の検出mAb (SEL285, R&D Systems) と共に室温 (RT) で2時間インキュベートした。洗浄後、プレートをストレプトアビジン共役アルカリホスファターゼ (1:80) と共に1時間、ついでBCIP/NBT基質と共に30分間、製造業者の説明 (SEL002, R&D Systems) に従いインキュベートした。自動化プレート計数系 (CTL ImmunoSpot) を使用して、ELISpotプレートをスキャンし、計数した。

【 0 1 7 7 】

細胞内サイトカイン染色 (ICS)

PBMCの短期間培養物を前記のとおりに調製した。ただし、この場合には培養条件1および2の代わりに後記の代替的培養条件1 ~ 5を用い、それらのそれぞれは、以下のペプチドプールの、異なる組合せでの刺激を含む :

培養1: P-P5525-LAGE-1, P-P103-P53, P-P830-NYESO-01, P-P-HAGE, P-P5232-MAGE-A1, P-P550-MAGE-A3 および P-P4616-hTERT;

培養2: P-P5525-LAGE-1, P-P103-P53, P-P830-NYESO-01, P-P-HAGE, P-P5232-MAGE-A1, P-P550-MAGE-A3, P-P4616-hTERT, P-P805_NY_ES01, P-P679_MAGE3, P-P4650_hTERT, P-P4575_hTERT および P-P4020_hTERT;

培養3: P-P805_NY_ES01, P-P5400_MAGE1, P-P679_MAGE3, P-P4650_hTERT, P-P4575_hTERT, P-P4540_hTERT, P-P550_MAGE3 および P-P4020_hTERT;

培養4: P-P550_MAGE3;

培養5: P-P805_NY_ES01。

【 0 1 7 8 】

該短期間培養からの細胞を96ウェル丸底プレート内で 5×10^5 PBMC / ウェルでプレーティングし、 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ペプチド}/\text{mL}$ の濃度で使用される個々のペプチドプールで刺激した。プレートを 5 \% CO_2 インキュベーター内で 37°C で20時間インキュベートした。PMA/イオノマイシンをそれぞれのウェルに加え、該アッセイの最初の3時間の後でゴルジプラグ (Golgi plug) (BD Biosciences) を全てのウェルに加えた。該細胞を回収し、PBS + 0.1% BSA (洗浄バッファー) で洗浄し、抗CD3、抗CD4および抗CD8 (BD Biosciences) で4 ℃で30分間染色した。もう1回の洗浄の後、 $100\text{ }\mu\text{L}$ のCytofix/Cytoperm溶液 (BD Biosciences) で4 ℃で20分間にわたって該細胞を固定し、透過性亢進させ、ついで $1\times$ Perm/Wash溶液 (BD Biosciences) での2回の洗浄を行った。最後に、細胞を抗IL-2-FITC、抗IFN -PE および抗TNF

10

20

30

40

50

PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) で4℃で30分間染色した。FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences) 上でサンプルを得た。ゲーティングはアイソタイプ対照抗体染色および培地刺激サンプル (各対象に関するもの) に基づくものであった。

【0179】

結果および考察

実施例1に記載されている集団適用範囲の分析に基づいて好ましいペプチドの定義に含まれる25個のペプチド配列 (P-HAGE, P4650_hTERT, P4020_hTERT, P5525_LAGE1, P4540_hTERT, P830_NY_ES01, P805_NY_ES01, P679_MAGE3, P5400_MAGE1, P550_MAGE3, P103_P53, P5232_MAGE1, P4575_hTERT, P4616_hTERT, P513_MAGE3, P1575_HER, P590-MAGE3, P991_SURVIVIN, P3698_MUC1, P2238-HER, P3825_MUC1, P4862_hTERT, P1331_WT1, P2753_MUC1, P3776_MUC1) を、健康なボランティアおよびNSCLC患者からのT細胞を刺激するそれらの能力について試験するために選択した。実施例1の好ましいペプチドの定義に含まれない1つのペプチド配列 (P750-NYESO) を陰性対照ペプチドとして使用した。10

【0180】

該T細胞アッセイ法は、全てのサンプルに関して同じ単離および保存により得られるPBMCの使用に基づく。また、NSCLC患者および健康な対象からの、年齢が釣り合わされたサンプルを使用して、それらの2つの群間の適切な比較を可能にした。健康な対象およびNSCLC患者の大部分は白人民族 (~85%) であり、より小さい対象比率は、アジア人、黒人および東洋人を含む民族であった。NSCLC患者および健康な対象の任意抽出募集の結果として、PBMCサンプルにわたって観察されるT細胞応答はいずれの特異的HLAクラスIおよびHLAクラスII分子にも偏向しておらず、一般集団におけるHLA多型を代表していると予想される。20

【0181】

健康な患者および癌患者の末梢血における腫瘍抗原に特異的なT細胞の非常に低い頻度ゆえに (データ非表示)、短期の7日間のインビトロ培養に基づく方法を、「材料および方法」に記載されているとおりに用了。該短期培養は抗原特異的T細胞前駆体の増殖をもたらす。「材料および方法」に記載されているIFN-g ELISpotアッセイにより抗原特異的T細胞の頻度を測定した。より長い関心ペプチドにそれが対応する重複する短いペプチドのプール (平均ペプチド長は18アミノ酸；プール当たり3~5個のペプチド) を使用して、抗原特異的T細胞の頻度を測定した。ペプチドのプールで測定された免疫応答は、対応する長い関心ペプチドを代表するものであるとみなされる。陽性ペプチド応答を特定するために、100万個のPBMC当たり500スポットの厳密な閾値を確立した。30

【0182】

前記の25個のペプチドはそれらのそれぞれの応答の大きさ (図2および図3) および応答体頻度 (図4および図5) に関して2つの試験群間で様々である。興味深いことに、NSCLC患者および健康な対象における観察された応答体頻度と、実施例1に記載されている種々の民族群のいずれかにわたる推定集団適用範囲との間には明らかな相関性は存在しない。それでも、全ての民族群にわたって低い推定集団適用範囲を示す陰性対照ペプチドP750-NYESO (実施例1に示されているとおり) は、応答の大きさおよび応答体頻度の点で最も低い応答性ペプチドの1つであることが示された (図2、3、4および5)。40

【0183】

図3に示されるとおり、3つのペプチド群を、NSCLC患者において観察されるそれらの応答体頻度に基づいて定めた。群1：高応答ペプチド：応答体頻度 > 20% : P-HAGE, P4650_hTERT, P4020_hTERT, P5525_LAGE1, P4540_hTERT, P830_NY_ES01, P805_NY_ES01, P679_MAGE3, P5400_MAGE1, P550_MAGE3, P103_P53, P5232_MAGE1, P4575_hTERT, P4616_hTERT ; 群2：中応答ペプチド：応答体頻度 10 ~ 20% : P513_MAGE3, P1575_HER, P590-MAGE3, P991_SURVIVIN, P3698_MUC1, P2238-HER ; 群3：低応答ペプチド - 応答体頻度 <10% : P3825_MUC1, P3776_MUC1, P2753_MUC1, P4862_hTERT, P1331_WT1, P750-NYESO。以下の表A1、A2およびA3はそれらの3つの群を要約しており、対応する配列番号を示す。

【0184】

10

20

30

40

50

【表5】

表A1: 群1: 高応答ペプチド: 応答体頻度 > 20%:

名称	配列番号	頻度
P-HAGE	40	52.38%
P4020_hTERT	8	32.81%
P5525_LAGE1	39	31.03%
P4540_hTERT	17	23.43%
P830_NY_ESO1	29	39.68%
P4650_hTERT	12	38.70%
P805_NY_ESO1	28	34.92%
P679_MAGE3	3	28.57%
P5400_MAGE1	22	27.41%
P550_MAGE3	2	72.30%
P103_P53	24	50.81%
P5232_MAGE1	23	32.25%
P4575_hTERT	18	48.38%
P4616_hTERT	11	37.50%

10

表A2: 群2: 中応答ペプチド: 応答体頻度 10~20%:

名称	配列番号	頻度
P513_MAGE3	1	18.46%
P590-MAGE3	48	15.87%
P991_SURVIVIN	30	14.51%
P2238-HER	36	10.00%
P1575_HER	32	16.12%
P3698_MUC1	7	14.06%

20

表A3: 群3: 低応答ペプチド - 応答体頻度 <10%:

30

名称	配列番号	頻度
P3825_MUC1	5	8.06%
P1331_WT1	31	5.08%
P2753_MUC1	4	4.76%
P4862_hTERT	13	7.93%
P3776_MUC1	6	4.76%
P750-NYESO	46	3.12%

【0185】

40

群1におけるペプチドは、単独で又は組合されて癌の治療または予防のための組成物に含有させるのに好ましい。群2におけるペプチドは中等度に好ましい。群3におけるペプチドはそれほど好ましくないペプチドである。なぜなら、それらは陰性対照ペプチドP750-NYESOに近い応答レベルを有するからである。

【0186】

50

示されているとおり、幾つかの標的腫瘍抗原は他のものより頻繁に認識される。例えば、テロメラーゼは群1における6個のペプチドのなかの5個を含有し、一方、MUC-1は群2における1個のペプチドおよび群3における3個のペプチドを含有する。この現象に影響を及ぼす要因は、正常および腫瘍細胞における抗原の発現のレベル、該タンパク質が発現される細胞区画、免疫寛容、T細胞枯渇、または該抗原に対して生じるT細胞調節メカニズムに関連づけられる。

【0187】

これらの要因は個体によって、そして疾患の経過中に変動しうる。興味深いことに、同じ腫瘍抗原に由来する異なるペプチドは、異なる度合の応答を示しうる。例えば、テロメラーゼからのP4650_hTERT, P4020_hTERT, P4540_hTERT, P4575_hTERT, P4616_hTERは群1に属し、一方、P4862_hTERTは群3に属する。同様に、MAGE 3からのP679_MAGE3, P550_MAGE3は群1に属し、一方、P590-MAGE3, P513_MAGE3は群2に属する。予想どおり、NY-ESO-1に由来する陰性対照ペプチドP750-NYESOは群3に含まれ、一方、P830_NY_ESO1およびP805_NY_ESO1は群1に含まれる。

【0188】

NSCLC患者および年齢が釣り合わされた健康な個体における免疫応答間の相違が認められた。全体的には、大多数のペプチドに関する抗原特異的T細胞の頻度はNSCLC患者においては、健康な対象の場合より低かった(図5)。健康な対象において観察される、このより高い免疫応答レベルは、NSCLC患者においては恐らく変化する防御メカニズムである癌に対する免疫監視における腫瘍抗原特異的T細胞の役割を反映している可能性がある。したがって、選択された腫瘍抗原(MAGE-3、MAGE-1、テロメラーゼ、HAGE、LAGE、HER-2/neu、MUC-1、P53、NY-ESO-1、LAGE-1、サバイビン(Survivin))が同様に発現される他の癌適応症において同じ様な現象が予想される。そのような癌適応症には、乳癌、肝癌、脳癌、胃癌、肺腺癌、腎臓癌、卵巣癌、骨髄腫、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎臓癌、食道癌、黒色腫皮膚癌および前立腺癌が含まれる。

10

【0189】

驚くべきことに、IFN-

20

【0190】

また、ペプチドP-HAGE, P4650_hTERT, P4020_hTERT, P5525_LAGE1, P4540_hTERT, P830_NY_ESO1, P805_NY_ESO1, P679_MAGE3, P5400_MAGE1, P550_MAGE3, P103_P53, P5232_MAGE1, P4575_hTERTおよびP4616_hTERTは、細胞内サイトカイン染色により測定された場合のTh1サイトカイン産生CD4および/またはCD8 T細胞応答を促進させる能力を示す(図8, 9および10を参照されたい)。

30

【0191】

驚くべきことに、図11は、ペプチド特異的CD4およびCD8 T細胞応答の大きさが、単一ペプチドプールでの短期培養(P-P550_MAGE3のみでの培養4およびP-P805_NY_ESO1のみでの培養5)の後では、幾つかのペプチドプールの組合せでの短期培養の場合と比べて劇的に低いことを示している。これは、ペプチド(特に階層1からのペプチド)を組合せることにより、観察される応答の相乗的改善を達成することが可能であることを示唆している。この結果は、少なくとも短期培養相中では、該混合物中のペプチドの間で競合が存在しないという証拠となり、そしてまた、該混合物中のペプチドの少なくとも幾つか(特に、最高レベルの応答を促進させるもの:P805_NY_ESO1, P5400_MAGE1およびP550_MAGE3)の「ヘルパー」効果の存在を裏付けるものである。この効果は、おそらく、サイトカイン、ケモカインおよび共刺激因子の産生を介して作用するのであろう。

40

SEQ ID N°1	P513_MAGE3	EFOAALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLG
SEQ ID N°2	P550_MAGE3	SVVGNWQYFFPVIFSKASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIF
SEQ ID N°3	P679_MAGE3	YEFLWGPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPHISYPPLH
SEQ ID N°4	P2753_MUC1	MTPGTQSPPFLLLLLTVLTVTGSASHASSTPGG
SEQ ID N°5	P3825_MUC1	EMFLQIYKQGGFLGLSNIKFPGSVVVQTLAFREGTIN VH
SEQ ID N°6	P3776_MUC1	TSSNHSTSPQLSTGVSSFFLSFHISNLQFNSSL EDPST
SEQ ID N°7	P3698_MUC1	PALGSTAPPVNNTSASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASK
SEQ ID N°8	P4020_hTERT	RAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRA
SEQ ID N°9	P4121_hTERT	AFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVL
SEQ ID N°10	P4345_hTERT	KEQLRPSFLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGT PRRLPR
SEQ ID N°11	P4616_hTERT	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREK
SEQ ID N°12	P4650_hTERT	RTFRRREKRAERLTSRVKALFSVLYERARRPGLLGASV LGLDDI
SEQ ID N°13	P4862_hTERT	AGIRRDGLLLRLVDDFLLVPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYG
SEQ ID N°14	P5075_hTERT	AVOWLCHQAFLLKLTRHRVTVVPLLGLSLRTAQ TQLSRK
SEQ ID N°15	P4373_hTERT	LGSRPWMPGT PRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQC BYG
SEQ ID N°16	P4453_hTERT	RRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRLVPPGLWGSRH
SEQ ID N°17	P4540_hTERT	HRLREEILAKFLHWLMSVYVVELRSFFYVTETTFQKNR
SEQ ID N°18	P4575_hTERT	TFQKNRLFFYRKSVWSKLOSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVR
SEQ ID N°19	P4695_hTERT	RAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQD RLTEVIASII
SEQ ID N°20	P4759_hTERT	HGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVI
SEQ ID N°21	P4939_hTERT	GLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFRNGFKAGR NMRRK
SEQ ID N°22	P5400_MAGE1	PARYEFLWGPRALAETSYKVLEYVIKVSARVRF FFP SIREA
SEQ ID N°23	P5232_MAGE1	IILESLFRAVITKKVADLVGFLLLKYRAREPVTKAEMLESVIK
SEQ ID N°24	P103_P53	APSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCT
SEQ ID N°25	P154_P53	PVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTEVVR
SEQ ID N°26	P205_P53	SDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGS
SEQ ID N°27	P262_P53	MGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRV
SEQ ID N°28	P805_NY_ESO1	RGPESRLLEFYLAMPFATPMEEAELARRSLAQDAPPLPV PG
SEQ ID N°29	P830_NY_ESO1	LARRSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHQ
SEQ ID N°30	P991_SURVIVIN	AFLSVKKQFEELTLGEFLKLDRERAKNKIAKETNNKKKE
SEQ ID N°31	P1331_WT1	GAQYRIHTHGVFRGIQDVRRVPGVAPTLVRSA SETSEKRPF
SEQ ID N°32	P1575_HER	VQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVL
SEQ ID N°33	P1632_HER	GGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI FHKN
SEQ ID N°34	P1930_HER	GRILHNGAYS LTLQGLG I SWLGLRSLREL GSGLALIH HNTHL
SEQ ID N°35	P2200_HER	SGAMPNQAQM RILKETELRKVKVLGSGAF GTVYKGIWI PDGEN
SEQ ID N°36	P2238_HER	GENVKIPVAIKV LRENTSPKANKEI ILDEAYVMAGVGSPY VSRKK
SEQ ID N°37	P2262_HER	KEILDEAYVMAGVGSPYVS RLLGICLTSTVQLT QLMPY
SEQ ID N°38	P2316_HER	SQDLLNWCMQIAKGM SYLEDVRLVH RDLAARNVLVKS PNHV KI
SEQ ID N°39	P5525_LAGE1	RLLQLHITMPFSSPMEAE LVRRI LS RDAAPLPRPGAVL
SEQ ID N°40	P-HAGE	QTGTGKTLCYLM PGFIHLVQPSLKQ RNRP GMLV
SEQ ID N°41	p5449-LAGE	AEGQGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGEAGAT
SEQ ID N°42	P5566_LAGE1	RPGAVLKDF TVSGNLLFMSVRDQDREGAGRMRVVGWLGSASP

10

20

30

40

SEQ ID N° 43	p3150-MUC	HGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA
SEQ ID N° 44	p1692_HER	CSPMCKGSRCWGESSEDQSLTRTVAGGCARCKGPLP
SEQ ID N° 45	P2380_HER	KVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPY
SEQ ID N° 46	P750-NYESO	PDGPGGNAGGPGEAGATGGRGRGPRGAGAARASGPGGGAP
SEQ ID N° 47	P75-P53	TEDPGPDEAPRMPEAAPVAPPAPAAAPTAAAPAPAPSWP
SEQ ID N° 48	P590_MAGE3	LGLSYDGLLGDNQIMPKAGLIIVLAIIAREGD

【 0 1 9 3 】

(SEQ ID N は配列番号)

10

添付 B

P-P4020-TERT			
P4020_hTERT-1 RAVRSLRLSHYREVLPLA	49	P4020_hTERT-2 RSHYREVLPLATFVRR	50 P4020_hTERT-3 REVLPLATFVRLGPQGWRL
P4020_hTERT-4 TFVRRRLGPQGWRLVQRGDPA	52	P4020_hTERT-5 PQGWRLVQRGDPAAFRA	53
P-P4540-TERT			
P4540-TERT_1 HRLREEILAKFLHWLMSV	54	P4540-TERT_2 ILAKFLHWLMSVYVVELLKKK	55 P4540-TERT_3 HWLMSVYVVELLRSFFYVKKK
P4540-TERT_4 YVVELLRSFFYVTETTFQ	57	P4540-TERT_5 LRSFFYVTETTFQKNR	58
P-P4575-TERT			
P4575-TERT_1 TFQKNRLFFYRKSVWSK	59	P4575-TERT_2 RLFFYRKSVWSKLQSIGI	60 P4575-TERT_3 KSVWSKLQSIGIRQHLKR
P4575-TERT_4 LOSIGIRQHLKRVOLREL	62	P4575-TERT_5 ROHLKRVQLRELSEAEVR	63
P-P4616-TERT			
P4616_hTERT-1 HREARPALLTSRLRFIPK	64	P4616_hTERT-2 ALLTSRLRFIPKPDGLRPI	65 P4616_hTERT-3 FIPKPDGLRPIVNMDYVV
P4616_hTERT-4 LRPVVNMDYVVGARTFRREK	67		
P-P4650-TERT			
P4650_hTERT-1 RTFRREKRAERLTSRVKAL	68	P4650_hTERT-2 AERLTSRVKALFSVLNY	69 P4650_hTERT-3 SRVKALFSVLNYERARRPGL
P4650_hTERT-4 SVLNYERARRPGLLGASV	71	P4650_hTERT-5 ARRPGLLGASVLGLDDI	72
P-P4862-TERT			
P4862_hTERT-1 AGIRR DGLLRLVDDFLVLT	73	P4862_hTERT-2 LLLRLVDDFLVTPHLTHA	74 P4862_hTERT-3 FLLVTPHLTHAKTFLRTL
P4862_hTERT-4 HLTHAKTFLRTLVRGVPEYG	76		
P-P513-MAGE3			
P513-MAGE-3_1 EFQAALSRKVAELVHFLL	77	P513-MAGE-3_2 SRKVAELVHFLLKYRAR	78 P513-MAGE-3_3 LVHFLLKYRAREPVTKA
P513-MAGE-3_4 LKYRAREPVTKAEMLG	80		
P-P550-MAGE3			
P550_MAGE3-1 GSVGNWQYFFPVIFSK	81	P550_MAGE3-2 WQYFFPVIFSKASSSQLV	82 P550_MAGE3-3 FSKASSSQLVFGIELMEV
P550_MAGE3-4 LQLVFGIELMEVDPIGHLYIF	84		
P-P590-MAGE3			
P590_MAGE3-1 KKKSYDGLLGDNQIMPKAGLII	85	P590_MAGE3-2 KKKGDNQIMPKAGLIIVLAIKK	86 P590_MAGE3-3 KKKAGLIIVLAIIAREGDKKK
P-P679-MAGE3			
P679-MAGE-3_1 YEFLWGPRALVETSYVKV	88	P679-MAGE-3_2 PRALVETSYVKVLHHMVK	89 P679-MAGE-3_3 TSYVKVLHHMVKISGGPH
P679-MAGE-3_4 LHHMVKISGGPHISYPPLH	91		

【 0 1 9 4 】

20

30

40

P-P991-SURVIVIN				
P991_SURVIVIN-1 SAFLSVKKQFEELTLGEFL	92	P991_SURVIVIN-2 KQFEELTLGEFLKLDRERAKN	93	P991_SURVIVIN-3 FLKLDRERAKNKIAKETN
P991_SURVIVIN-4 RERAKNKIAKETNNKKKE	95			94
P-P1331-WT1				
P1331_WT1-1 GAQYRIHTHGVFRGIQDVR	96	P1331_WT1-2 HGVFRGIQDVRVPGV	97	P1331_WT1-3 GIQDVRVPGVAPTLVRS
P1331_WT1-4 VPGVAPTLVRSASETSEKRPF	99			98
P-P5525-LAGE1				
P5525_LAGE1-1 RLLQLHITMPFSSPMEAEL	100	P5525_LAGE1-2 ITMPFSSPMEAELVRRILSR	101	P5525_LAGE1-3 MEAELVRRILSRDAAPL
P5525_LAGE1-4 RRILSRDAAPLPRPGAVL	103			102
P-P2753-MUC1				
P2753_MUC1-1 KKKMTPTGTQSPFFLLLLLTVLTK KK	104	P2753_MUC1-2 KKKFFLLLLLTVLTVVTGSGHK K	105	P2753_MUC1-3 KKKTVLTVVTGSGHASSTPGGK KK
P-P3698-MUC1				
P3698_MUC1-1 PALGSTAPPVHNVTSASGSA	107	P3698_MUC1-2 PPVHNVTSASGSASGSAS	108	P3698_MUC1-3 SASGSASGSASTLVHNGT
P3698_MUC1-4 GSASTLVHNGTSARATT	110	P3698_MUC1-5 TLVHNGTSARATTTASK	111	
P-P3776-MUC-1				
P3776-MUC-1_1 TSSNHSTSPQLSTGVSFF	112	P3776-MUC-1_2 TSPQLSTGVSFFFSLFHI	113	P3776-MUC-1_3 TGVFFFSLFHISNLQFNS
P3776-MUC-1_4 LSFHISNLQFNSSLEDPST	115			114
P-P3825-MUC-1				
P3825-MUC-1_1 EMFLQIYKQGGFLGLSNI	116	P3825-MUC-1_2 YKQGGFLGLSNIKFRPGS	117	P3825-MUC-1_3 LGLSNIKFRPGSVVVQLT
P3825-MUC-1_4 KFRPGSVVVQLTLAFREG	119	P3825-MUC-1_5 VVVQLTLAFREGTINVH	120	
P-P750-NYESO				
P750-NYESO-1 PDGPAGNAGGPGEAGATG	121	P750-NYESO-2 AGGPGEAGATGGRGPRGA	122	P750-NYESO-3 GATGGRGPRGAGAARASG
P750-NYESO-4 PRGAGAARASGPGGGAP	124			123
P-P805-NYESO				
P805-NY-ESO-1_1 RGPESLRLEFYLAMPFAT	125	P805-NY-ESO-1_2 LLEFYLAMPFATPMEEALKKK	126	P805-NY-ESO-1_3 AMPFATPMEEALKARRSLAQD
P805-NY-ESO-1_4 EAELARRSLAODAPPLPVPG	128			127
P-P830-NYESO				
P830_NY_ESO1-1 LARSLAQDAPPLPVPGV	129	P830_NY_ESO1-2 DAPPLPVPGVLLKEFTVS	130	P830_NY_ESO1-3 PGVLLKEFTVSGNILTIR
P830_NY_ESO1-4 EFTVSGNILTIRTAADHRQ	132			131
P-P5232-MAGE1				
P5232_MAGE1-1 SILESLFRAVITKKVADLVGF	133	P5232_MAGE1-2 ITKKVADLVGFLKKYRA	134	P5232_MAGE1-3 DLVGFLKKYRAREPVTK
P5232_MAGE1-4 LKYRAREPVTKAEMLEVIK	136			135
P-P5400-MAGE1				
P5400-MAGE1_1 PARYEFLWGPRALAETSY	137	P5400-MAGE1_2 LWGPRALAETSYVKLEY	138	P5400-MAGE1_3 LAETSYVKLEYVIKVSA
P5400-MAGE1_4 VKVLEYVIKVSARVRFFF	140	P5400-MAGE1_5 VIKVSARVRFFFSLREA	141	
P-P1575-HER				
P1575-HER_1	142	P1575-HER_2	143	P1575-HER_3
				144

10

20

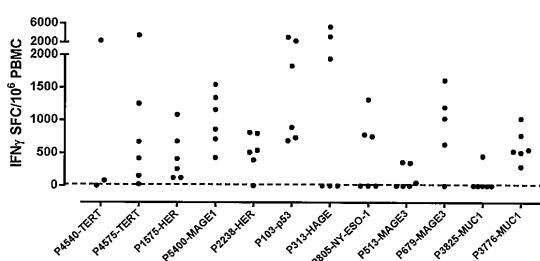
30

40

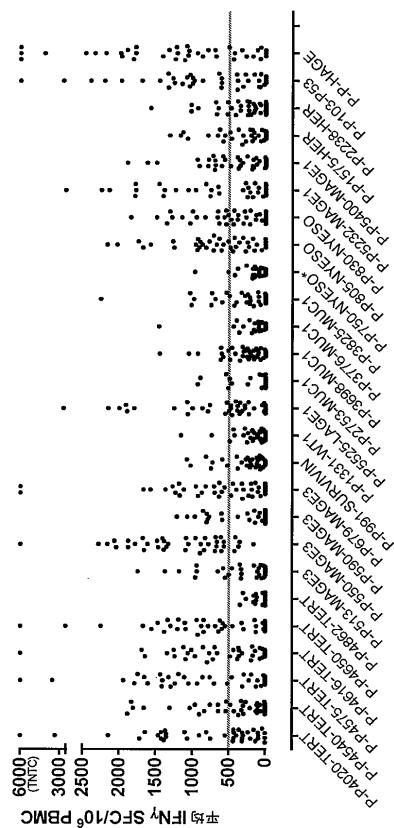
VQGYVILAHNQVRQVP P1575-HER_4 RLRIVRGTLFEDNYALAVL P-P2238-HER	145	VLIAHNQVRQVPLQLRLRI	VRQVPLQLRLIVRGTLF
P2238-HER_1 GENVKIPVAIKVLRENTS	146	P2238-HER_2 PVAIKVLRENTSPKANKE	P2238-HER_3 148 LRENTSPKANKEILDEAY
P2238-HER_4 PKANKEILDEAYVMAGVG	149	P2238-HER_5 ILDEAYVMAGVGSPYVSRRKK	150
P-P103-P53			
P103-P53_1 APSWPLSSSVPSQKTYQG	151	P103-P53_2 SSSVPSQKTYQGSYGFRL	P103-P53_3 153 KTYQGSYGFRLGFLHSGT
P103-P53_4 YGFRLGFLHSGTAKSVTCT	154		
P-P-HAGE			
P313-HAGE_1 AQTTGKTLCYLMPGFIH	155	P313-HAGE_2 KTLCYLMPGFIHLVLQPSKKK	P313-HAGE_3 157 MPGFIHLVLQPSLKGQRN
P313-HAGE_4 LVLQPSLKGQRNRPGMLV	158		

10

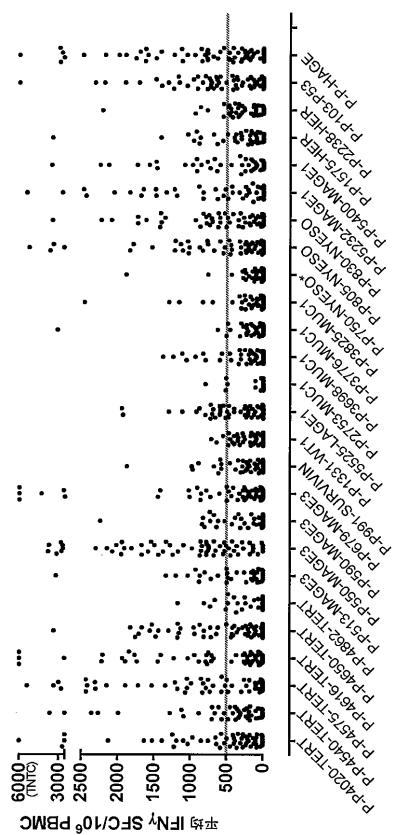
(図 1)



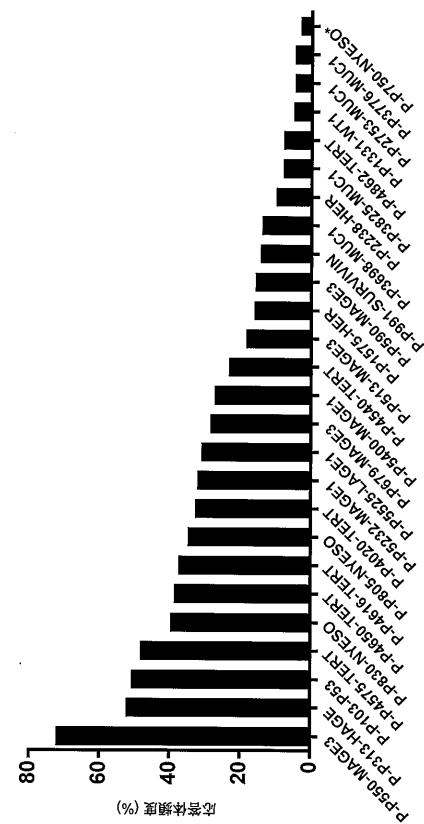
(2)



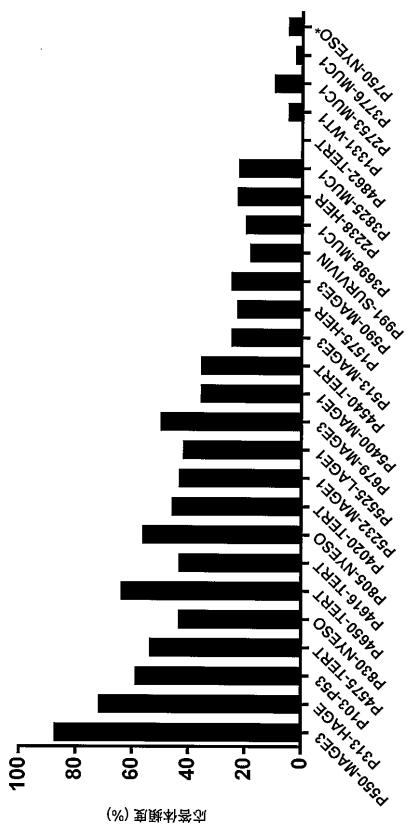
【図3】



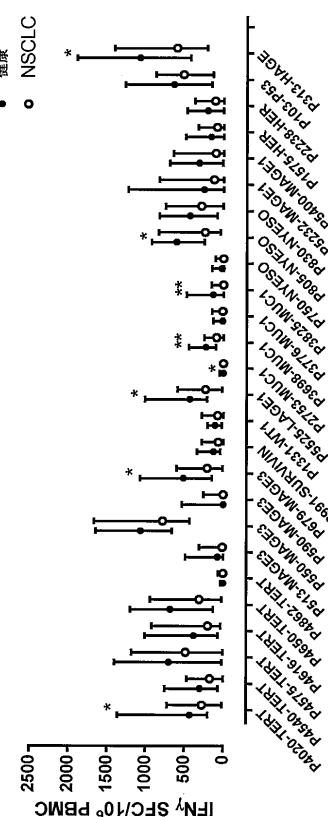
【 図 4 】



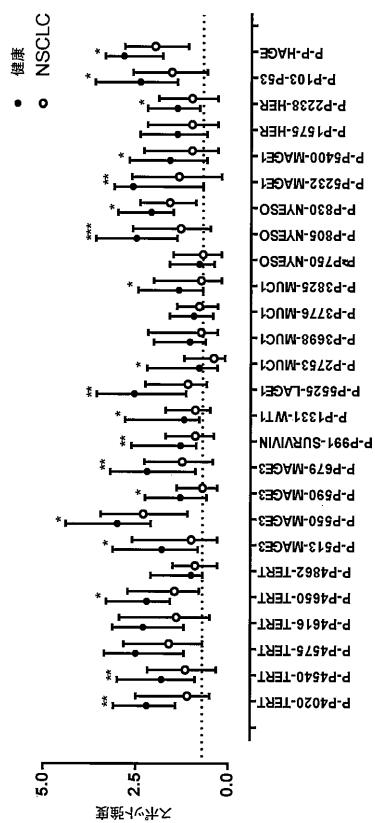
【 四 5 】



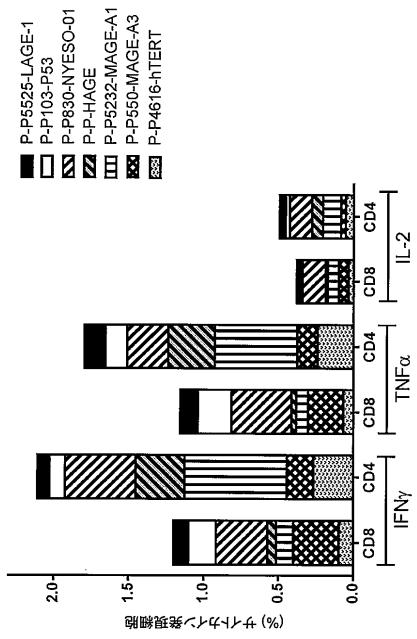
【 図 6 】



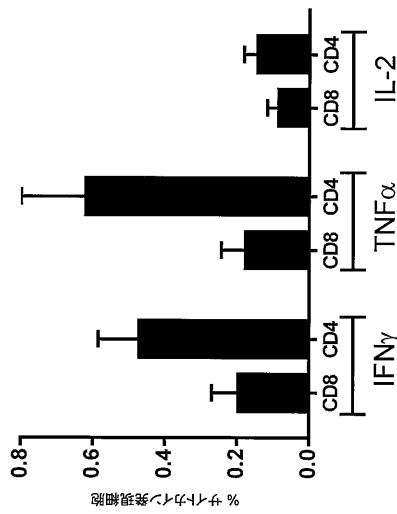
【図7】



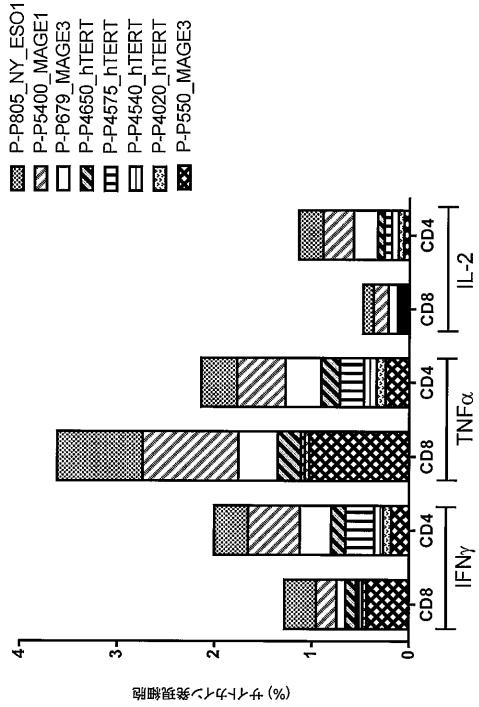
【図8】



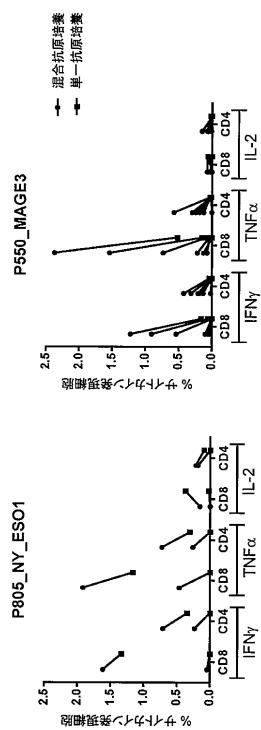
【図9】



【図10】



【図 1 1】



【配列表】

2016530290000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2014/052675						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/16 A61K39/00 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 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> MORGAN G MATHIEU ET AL: "HAGE, a cancer/testis antigen with potential for melanoma immunotherapy: identification of several MHC class I/III HAGE-derived immunogenic peptides", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 56, no. 12, 9 May 2007 (2007-05-09), pages 1885-1895, XP019561038, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-007-0331-2 table 1 ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;">1-38</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	MORGAN G MATHIEU ET AL: "HAGE, a cancer/testis antigen with potential for melanoma immunotherapy: identification of several MHC class I/III HAGE-derived immunogenic peptides", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 56, no. 12, 9 May 2007 (2007-05-09), pages 1885-1895, XP019561038, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-007-0331-2 table 1 ----- -/-/	1-38
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	MORGAN G MATHIEU ET AL: "HAGE, a cancer/testis antigen with potential for melanoma immunotherapy: identification of several MHC class I/III HAGE-derived immunogenic peptides", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 56, no. 12, 9 May 2007 (2007-05-09), pages 1885-1895, XP019561038, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-007-0331-2 table 1 ----- -/-/	1-38						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
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						
10 December 2014		12/01/2015						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schnack, Anne						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/052675

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOBAYASHI H ET AL: "Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 20, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 221-227, XP022710083, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/J.COI.2008.04.011 [retrieved on 2008-05-20] table 1 -----	1-38
X	P. SABBATINI ET AL: "Phase I Trial of Overlapping Long Peptides from a Tumor Self-Antigen and Poly-ICLC Shows Rapid Induction of Integrated Immune Response in Ovarian Cancer Patients", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 18, no. 23, 2 October 2012 (2012-10-02), pages 6497-6508, XP055157602, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2189 *Synthetic peptides*; page 6499, column 2 -----	1-38
X	MARIETTE I E VAN POELGEEST ET AL: "HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 11, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), page 88, XP055157607, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1007/s11523-012-0208-y abstract *Vaccine and treatment scheme*; page 2, column 2 -----	1-38
X	S. GNJATIC ET AL: "Cross-Presentation of HLA Class I Epitopes from Exogenous NY-ESO-1 Polypeptides by Nonprofessional APCs", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 170, no. 3, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 1191-1196, XP055157610, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.170.3.1191 *Materials and Methods* ----- -/-	1-38
1		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/052675

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GNJATIC SACHA ET AL: "Antigen depots: T cell traps?", April 2013 (2013-04), NATURE MEDICINE APR 2013, VOL. 19, NR. 4, PAGE(S) 397 - 398, XP002733580, ISSN: 1546-170X the whole document -----	1-38
X	WO 01/90197 A1 (UNIV AUSTRALIAN [AU]; THOMSON SCOTT ANTHONY [AU]; RAMSHAW IAN ALISTAIR) 29 November 2001 (2001-11-29) sequences 1296,1300 -----	1-38
A	WO 2007/129093 A2 (UNIV BIRMINGHAM [GB]; BALL SIMON [GB]) 15 November 2007 (2007-11-15) abstract -----	1-38
X	WO 2009/143843 A1 (HERLEV HOSPITAL [DK]; ANDERSEN MADS HALD [DK]; STRATEN PER THOR [DK]) 3 December 2009 (2009-12-03) claims 1-30 -----	1-38
X	US 2011/229505 A1 (FRITSCHE JENS [DE] ET AL) 22 September 2011 (2011-09-22) paragraphs [0088] - [0092]; claims 1-26 -----	1-38
A	WO 99/58658 A2 (EPIMMUNE INC [US]) 18 November 1999 (1999-11-18) the whole document -----	1-38
A	WO 99/53061 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]) 21 October 1999 (1999-10-21) page 36, line 15 - page 41, line 4 table VI -----	1-38
X	US 2006/013820 A1 (BONNET DOMINIQUE [FR] ET AL) 19 January 2006 (2006-01-19) claims 1-23 -----	1-38
A	US 2010/040641 A1 (TSUNODA TAKUYA [JP] ET AL) 18 February 2010 (2010-02-18) claims 1-32 -----	1-38
X	US 2012/328660 A1 (TSUJI TAKEMASA [US] ET AL) 27 December 2012 (2012-12-27) paragraphs [0075] - [0079] examples 1-5 claims 1-4 -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2014/052675

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0190197	A1	29-11-2001	AT 502961 T CA 2408125 A1 EP 1285004 A1 JP 2004506410 A NZ 522542 A US 2004054137 A1 WO 0190197 A1	15-04-2011 29-11-2001 26-02-2003 04-03-2004 26-11-2004 18-03-2004 29-11-2001
WO 2007129093	A2	15-11-2007	CN 101484183 A EP 2026836 A2 EP 2436394 A1 ES 2520020 T3 US 2010215619 A1 US 2014295550 A1 WO 2007129093 A2	15-07-2009 25-02-2009 04-04-2012 11-11-2014 26-08-2010 02-10-2014 15-11-2007
WO 2009143843	A1	03-12-2009	AU 2009253539 A1 CA 2721150 A1 CN 102088994 A CN 104056261 A EP 2280721 A1 JP 2011520783 A NZ 588757 A US 2011318372 A1 WO 2009143843 A1	03-12-2009 03-12-2009 08-06-2011 24-09-2014 09-02-2011 21-07-2011 25-05-2012 29-12-2011 03-12-2009
US 2011229505	A1	22-09-2011	TW 201209410 A US 2011229505 A1 WO 2011113882 A1	01-03-2012 22-09-2011 22-09-2011
WO 9958658	A2	18-11-1999	AT 518956 T AU 4078599 A CA 2331846 A1 CA 2685270 A1 EP 1078092 A2 JP 2002520000 A US 6534482 B1 US 2003216342 A1 US 2003216343 A1 US 2003220285 A1 WO 9958658 A2	15-08-2011 29-11-1999 18-11-1999 18-11-1999 28-02-2001 09-07-2002 18-03-2003 20-11-2003 20-11-2003 27-11-2003 18-11-1999
WO 9953061	A2	21-10-1999	AU 3560399 A EP 1073734 A2 JP 2002511266 A WO 9953061 A2	01-11-1999 07-02-2001 16-04-2002 21-10-1999
US 2006013820	A1	19-01-2006	AU 2005232428 A1 CA 2562784 A1 CN 1980695 A DK 1740207 T3 EP 1740207 A2 EP 2374477 A1 ES 2398220 T3 JP 4993746 B2 JP 2007532614 A PT 1740207 E SI 1740207 T1	27-10-2005 27-10-2005 13-06-2007 21-01-2013 10-01-2007 12-10-2011 14-03-2013 08-08-2012 15-11-2007 28-01-2013 30-04-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/052675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2006013820 A1	19-01-2006
		US 2010183650 A1	22-07-2010
		US 2010183708 A1	22-07-2010
		US 2012034259 A1	09-02-2012
		US 2012315293 A1	13-12-2012
		WO 2005099752 A2	27-10-2005
<hr/>			
US 2010040641 A1	18-02-2010	AU 2009283762 A1	25-02-2010
		CA 2734515 A1	25-02-2010
		CN 102186977 A	14-09-2011
		EP 2326718 A1	01-06-2011
		JP 2012500001 A	05-01-2012
		KR 20110063456 A	10-06-2011
		RU 2011110504 A	27-09-2012
		SG 193214 A1	30-09-2013
		TW 201008574 A	01-03-2010
		US 2010040641 A1	18-02-2010
		US 2011280898 A1	17-11-2011
		US 2012321649 A1	20-12-2012
		US 2013189291 A1	25-07-2013
		US 2014141027 A1	22-05-2014
		US 2014248300 A1	04-09-2014
		WO 2010021111 A1	25-02-2010
<hr/>			
US 2012328660 A1	27-12-2012	US 2012328660 A1	27-12-2012
		US 2014255436 A1	11-09-2014
<hr/>			

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/06 (2006.01)	A 6 1 K 47/06	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 14/73 (2006.01)	C 0 7 K 14/73	Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,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,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100182992

弁理士 江島 孝毅

(72)発明者 ジョルジュ , バートランド , ヴィクター , ギルバート

イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイチ ロンドン , ロイヤル カレッジ ストリート 2 ,
ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター

(72)発明者 ブラウン , カールトン , ブラッドリー

イギリス国 エヌダブリュ1 0エヌエイチ ロンドン , ロイヤル カレッジ ストリート 2 ,
ロンドン バイオサイエンス イノベーション センター

F ターム(参考) 4C076 AA11 AA17 AA22 AA24 AA36 AA53 AA72 BB01 BB02 BB13

BB14 BB15 BB16 BB25 BB27 BB29 BB30 CC07 CC27 DD35

DD51 EE59 FF65

4C084 AA01 AA02 AA19 BA18 BA19 BA20 BA44 CA62 DA01 DC50

MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA32 MA35 MA37 MA52 MA56

MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZB271

ZB272

4C085 AA03 AA14 AA38 BB01 CC21 CC23 DD59 EE01 EE03 EE06

FF24 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08

4C086 AA01 AA02 DA35 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MA13 MA17

MA22 MA23 MA32 MA35 MA37 MA52 MA56 MA59 MA60 MA63

MA66 NA14 ZB09 ZB26 ZB27

4H045 AA11 AA30 BA17 BA18 BA19 CA40 DA86 EA20