

(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2018-529320

(P2018-529320A)

(43) 公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115 Z	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-505723 (P2018-505723)	(71) 出願人	506258073
(86) (22) 出願日	平成28年8月5日(2016.8.5)		イマティクス バイオテクノロジーズ ゲーエムベーハー
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月2日(2018.2.2)		ドイツ, 72076 テュービンゲン, パウル-エンリヒェンシュトラッセ 15
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/068727	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開番号	W02017/021527		弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開日	平成29年2月9日(2017.2.9)	(74) 代理人	100124453
(31) 優先権主張番号	62/201,289		弁理士 資延 由利子
(32) 優先日	平成27年8月5日(2015.8.5)	(74) 代理人	100135208
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大杉 卓也
(31) 優先権主張番号	1513921.5	(74) 代理人	100163544
(32) 優先日	平成27年8月6日(2015.8.6)		弁理士 平田 緑
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺がんおよびその他のがんに対する免疫療法において使用するための新規ペプチドおよびペプチドの組み合わせ

(57) 【要約】

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

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 配列番号 48、および配列番号 1 ~ 配列番号 48 と少なくとも 88% 相同的なその変異配列の群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドおよびその薬学的に許容可能な塩であって；前記変異体が、主要組織適合性複合体（MHC）分子と結合し、および/または T 細胞を前記変異体ペプチドと交差反応させ；前記ペプチドが完全長ポリペプチドでない、ペプチド。

【請求項 2】

MHC クラス I または II 分子に結合する能力を有し、前記 MHC に結合すると、CD4 および/または CD8 T 細胞によって認識されることができるようになる、請求項 1 に記載のペプチド。

10

【請求項 3】

そのアミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 48 のいずれか 1 つに記載の一続きのアミノ酸を含んでなる、請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたはその変異体。

【請求項 4】

前記ペプチドまたはその変異体が、8 ~ 100、好ましくは 8 ~ 30、より好ましくは 8 ~ 16 のアミノ酸の全長を有し、最も好ましくは前記ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 48 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体。

【請求項 5】

前記ペプチドが、修飾され、および/または非ペプチド結合を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体。

20

【請求項 6】

前記ペプチドが、特に HLA - DR 抗原関連不変鎖（Ii）の N 末端アミノ酸を含んでなる融合タンパク質の一部である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体をエンコードする核酸であって、任意選択的に異種プロモーター配列と結合する、核酸。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を発現する能力がある、発現ベクター。

30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 7 に記載の核酸または請求項 8 に記載の発現ベクターを含んでなり、好ましくは樹状細胞などの抗原提示細胞である、組換え宿主細胞。

【請求項 10】

医療において使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体、請求項 7 に記載の核酸、請求項 8 に記載の発現ベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドを提示する、または請求項 7 に記載の核酸を発現する、または請求項 8 に記載の発現ベクターを有する、請求項 9 に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記ペプチドまたはその変異体を前記宿主細胞またはその培養液から単離するステップとを含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体を製造する方法。

40

【請求項 12】

T 細胞を、適切な抗原提示細胞の表面に、または抗原提示細胞を模倣する人工コンストラクトの表面に発現される抗原負荷ヒトクラス I または II MHC 分子に、前記 T 細胞を抗原特異的様式で活性化するのに十分な時間にわたり、生体外で接触させるステップを含んでなり、前記抗原が、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチドである、活性化

50

Tリンパ球を製造するインビトロ法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを提示する細胞を選択的に認識する、請求項 12 に記載の方法によって製造される活性化Tリンパ球。

【請求項 14】

請求項 13 で定義される活性T細胞の有効数を患者に投与するステップを含んでなる、その標的細胞が、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを提示する患者において、標的細胞を死滅させる方法。

【請求項 15】

MHC分子と結合すると、好ましくは請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体の特異的に認識する、特に可溶性または膜結合抗体である、抗体。

【請求項 16】

がんの診断および/または治療において使用するための、またはがんに対する薬剤の製造において使用するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 7 に記載の核酸、請求項 8 に記載の発現ベクター、請求項 9 に記載の細胞、請求項 13 に記載の活性化Tリンパ球または請求項 15 に記載の抗体の使用。

【請求項 17】

がんが、ペプチド配列番号 1 ~ 配列番号 48 がそれに由来するタンパク質の過剰発現を示す、前立腺がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、結腸直腸がん、食道がん、腎臓がん、肝臓がん、肺がん (NSCLC、SCLC)、卵巣がん、子宮がん、膵臓がん、胃がん、胆嚢がん、胆管がん、黒色腫、メルケル細胞がん、白血病 (AML、CLL) およびその他の腫瘍の群から選択される、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

(a) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のペプチド変異体、請求項 7 に記載の核酸、請求項 8 に記載の発現ベクター、請求項 10 に記載の細胞、請求項 13 に記載の活性化Tリンパ球、または請求項 15 に記載の抗体を含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥形態で含んでなる容器；

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

(c) 任意選択的に、配列番号 1 ~ 配列番号 59 からなる群から選択される少なくとももう一つのペプチド、および

(d) 任意選択的に、(i) 前記溶液の使用、または(ii) 前記凍結乾燥製剤の再構成および/または使用のための取扱説明書を含んでなるキット。

【請求項 19】

(iii) 緩衝液、(iv) 希釈剤、(v) フィルター、(vi) 針、または(v) シリンジの 1 つまたは複数を含んでなる、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記ペプチドが、配列番号 1 ~ 配列番号 48 からなる群から選択される、請求項 18 または 19 に記載のキット。

【請求項 21】

a) 前記個々の患者からの腫瘍サンプルによって提示される、腫瘍関連ペプチド (TUMAP) を同定するステップと；

b) a) で同定された前記ペプチドを、正常組織との比較で腫瘍における免疫原性および/または過剰提示について予備選別されたペプチド貯蔵庫と比較するステップと；

c) 少なくとも一つのペプチドを、前記患者において同定されたTUMAPと一致する前記貯蔵庫から選択するステップと；

d) ステップ c) に基づいて、個別化ワクチンまたは化合物ベースのまたは細胞療法を製造および/または処方するステップとを含んでなる、個々の患者のための化合物ベース

10

20

30

40

50

のおよび / または細胞療法のための個別化抗がんワクチンを製造する方法。

【請求項 2 2】

前記 T U M A P が、

a 1) 前記腫瘍サンプルからの発現データを前記腫瘍サンプルの組織型に対応する正常組織サンプルからの発現データと比較して、前記腫瘍サンプルにおいて過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質を同定するステップと；

a 2) 前記発現データを、前記腫瘍サンプル中の M H C クラス I / またはクラス II 分子と結合している M H C リガンドの配列と関連させて、前記腫瘍によって過剰発現されまたは異常に発現されるタンパク質に由来する M H C リガンドを同定するステップとによって同定される、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 3】

結合ペプチドを前記腫瘍サンプルから単離された M H C 分子から溶出させて、前記溶出したリガンドを配列決定することで、M H C リガンドの配列が同定される、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記腫瘍サンプルの組織型に対応する前記正常組織が、前記同一患者から得られる、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記貯蔵庫に含まれる前記ペプチドが、

a a . 正常組織または組織群と比較して悪性組織で過剰発現される遺伝子を同定するステップを含んでなる、マイクロアレイまたは配列決定ベース発現プロファイリングなどの高度並列法によって、ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸 (m R N A) 発現解析を実施するステップと；

20

a b . ステップ a a で検出された、選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、ペプチドを選択するステップと；

a c . 健常ドナーまたは前記患者からのヒト T 細胞を使用した生体外免疫原性アッセイを含んでなる、前記選択されたペプチドによる生体内 T 細胞応答の誘導を判定するステップ；または

b a . H L A リガンドを前記腫瘍サンプルから質量分析を使用して同定するステップと；

30

b b . 正常組織または組織群と比較して悪性組織で過剰発現される遺伝子を同定するステップを含んでなる、マイクロアレイまたは配列決定ベース発現プロファイリングなどの高度並列法によって、ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸 (m R N A) 発現解析を実施するステップと；

b c . 前記同定された H L A リガンドを前記遺伝子発現データと比較するステップと；

b d . ステップ b c で検出された、選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、ペプチドを選択するステップと；

b e . ステップ b d から選択された T U M A P を腫瘍組織上で再検出し、健常組織上の検出欠如または希な検出が、m R N A レベルにおける過剰発現の関連性を裏付けるステップと；

40

b f . 健常ドナーまたは前記患者からのヒト T 細胞を使用した生体外免疫原性アッセイを含んでなる、前記選択されたペプチドによる生体内 T 細胞応答の誘導を判定するステップと

に基づいて同定される、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記貯蔵庫に含まれる前記ペプチドの免疫原性が、生体外免疫原性アッセイ、個々の H L A 結合についての患者免疫モニタリング、M H C 多量体染色、E L I S P O T アッセイおよび / または細胞内サイトカイン染色を含んでなる方法によって判定される、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

50

前記貯蔵庫が、配列番号 1 ~ 配列番号 59 からなる群から選択される複数のペプチドを含んでなる、請求項 21 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記個々の患者からの正常な対応する組織と比較して前記腫瘍サンプルに特有の少なくとも 1 つの変異を同定するステップと、前記ワクチンに包含するために、または細胞療法を作成するために、前記変異に関連があるペプチドを選択するステップとをさらに含んでなる、請求項 21 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも 1 つの変異が、全ゲノム配列決定によって同定される、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 30】

T 細胞受容体、好ましくは可溶性または膜結合 T 細胞受容体であって、HLA リガンドと反応性であり、前記リガンドが配列番号 1 ~ 配列番号 48 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 75 % の同一性を有する、T 細胞受容体。

【請求項 31】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 48 と少なくとも 88 % 同一である、請求項 30 に記載の T 細胞受容体。

【請求項 32】

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 59 のいずれかからなる、請求項 30 または 31 に記載の T 細胞受容体。

20

【請求項 33】

前記 T 細胞受容体が可溶性分子として提供され、任意選択的に、免疫刺激ドメインまたは毒素などのさらなるエフェクター機能を保有する、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の T 細胞受容体。

【請求項 34】

請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の TCR をエンコードする核酸であって、任意選択的に異種プロモーター配列と結合する、核酸。

【請求項 35】

請求項 34 に記載の核酸を発現できる、発現ベクター。

【請求項 36】

請求項 34 に記載の核酸、または請求項 15 に記載の抗体をコードする核酸、または請求項 35 に記載の発現ベクターを含んでなる、好ましくは T 細胞または NK 細胞である、宿主細胞。

30

【請求項 37】

請求項 36 に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記 T 細胞受容体を前記宿主細胞および/またはその培養液から単離するステップとを含んでなる、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の T 細胞受容体を製造する方法。

【請求項 38】

- a) 配列番号 1 ~ 配列番号 48 からなる群から選択されるペプチド；
- b) a) に記載のペプチドおよび/またはペプチド MHC 複合体と反応性の T 細胞受容体；
- c) a) に記載のペプチドと、HLA - DR 抗原関連不変鎖 (I i) の N 末端のアミノ酸 1 ~ 80 とを含んでなる融合タンパク質；
- d) a) ~ c) のいずれかをコードする核酸、または前記核酸を含んでなる発現ベクター；
- e) d) の発現ベクターを含んでなる宿主細胞；
- f) T 細胞を、抗原特異的様式で T 細胞を活性化するのに十分な時間にわたり、適切な抗原提示細胞の表面に発現される a) に記載のペプチドと生体外で接触させるステップを含んでなる方法、ならびにこれらの活性化 T 細胞を自己または他の患者に移入する方法によって得られる、活性化 T リンパ球；

40

50

g) a) に記載のペプチドおよび/またはペプチド - M H C 複合体および/または a) に記載のペプチドを提示する細胞と反応性であり、例えば、免疫活性化ドメインまたは毒素との融合によって潜在的に修飾される、抗体、または可溶性 T 細胞受容体；

h) 配列番号 1 ~ 配列番号 4 8 からなる群から選択されるペプチドを認識し、および/または配列番号 1 ~ 配列番号 4 8 からなる群から選択されるペプチドと M H C 分子との複合体を認識する、アダマー；

i) a) ~ h) のいずれかに記載の結合または標識ペプチドまたはスキファールドからなる群から選択される、少なくとも 1 つの活性成分と、薬学的に許容できる担体、および任意選択的に、薬学的に許容可能な賦形剤および/または安定剤とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 39】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体、好ましくは M H C 分子と結合している請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその変異体を特異的に認識する、アダマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【0002】

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

【背景技術】

【0003】

前立腺がんは、世界で 2 番目に頻りに診断されるがんであって、男性では 5 番目に頻度の高いがん死亡原因であり、2012 年には 110 万件の新たな症例 (男性における全てのがんの 15%) および 30 万人のがん死亡 (男性における全死亡の 7%) が推定されている。同時期には、世界の 84 ヶ国、主に、高いまたは非常に高い人間開発レベルに達した国々で、男性における最も頻度の高いがんのタイプであったが、中部および南部アフリカの数ヶ国でも同様であった。米国がん協会によれば、2015 年には、220,800 件の前立腺がんの新規症例および 27,540 人の前立腺がんによる死亡が推定される。前立腺がんのリスク因子は、年齢、家族歴、および人種である (World Cancer Report, 2014; SEER Stat facts, 2014; American Cancer Society, 2015) 。

【0004】

ほぼ全ての前立腺がんは、前立腺の腺細胞から発生する腺がんである。まれな形態の前立腺がんとしては、肉腫、小細胞がん、神経内分泌腫瘍 (小細胞がんを除く) または移行上皮がんが挙げられる (American Cancer Society, 2015) 。

【0005】

前立腺がんのための治療戦略は、主にがん病期に左右される。局所的に限定された非転移性前立腺がんでは、治療選択肢としては、積極的サーベイランス (待機および

10

20

30

40

50

監視)、前立腺の完全外科的切除、および近接照射療法存在下または不在下における局所高用量放射線療法が挙げられる高リスク患者では、ホルモン除去療法および術後局所放射線療法がさらなる可能性に相当する。転移前立腺がんの標準的治療法はまた、前立腺の完全外科的切除、局所高線量放射線、およびホルモン除去療法を含んでなる。ホルモン枯渇に应答しない腫瘍は、去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)と称される。CRPC患者には、ドセタキセル、アピラテロン、および樹状細胞ベースのワクチンであるシプロイセルTが投与される。骨転移は、ラジウム223単独で、あるいはラジウム223またはドセタキセルまたはアピラテロンのいずれかとビスホスホネートまたはデノスマブとの組み合わせで、治療される(S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014)。

10

【0006】

樹状細胞ベースのワクチンであるシプロイセルTは、FDAによって認可された最初の抗がんワクチンであった。CRPCがある患者の生存期間に対するその好ましい効果のために、さらなる免疫療法の開発に向けた多大な努力がなされている。ワクチン接種ストラテジーについては、ペプチドワクチンである前立腺特異的抗原(PSA)-TRICOM、個別化ペプチドワクチンであるPPV、DNAワクチンであるpTVG-HP、およびGM-CSF発現全細胞ワクチンであるGVAXが、異なる臨床試験で有望な結果を示した。さらに、シプロイセルT以外の樹状細胞ベースのワクチン、すなわちBPX-101およびDCVAC/Paは、前立腺がん患者において、臨床的奏効を引き起こすことが示された。イピリマブおよびニボルマブのような免疫チェックポイント阻害物質が、単剤療法として、ならびにアンドロゲン奪取療法、局所放射線療法、PSA-TRICOM、およびGVAXをはじめとするその他の治療法との併用で、現在臨床試験で評価されている。第II相試験で進行を有意に遅延させ、無憎悪生存期間を延長させた免疫調節物質タスキニモドは、現在第III相試験でさらに研究されている。もう一つの免疫修飾物質であるレナリドミドは、初期臨床試験で有望な効果をもたらしたが、第III相試験では生存率を改善できなかった。これらの期待外れな結果にもかかわらず、さらなるレナリドミド試験が継続されている(Quinn et al., 2015)。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

がんの治療に伴う重度の副作用および費用を考慮すると、がん全般、そして特に前立腺がんの治療に使用し得る要素を同定する必要がある。がんのより良い診断、予後の評価、および治療成功の予測につながる、がん全般、特に前立腺がんのためのバイオマーカーに相当する要素を同定する必要性もまたある。

30

【0008】

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

【0009】

腫瘍関連抗原(TAA)の現行の分類は、次の主要群を含んでなる：

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

40

b) 分化抗原：これらのTAAは、腫瘍と、それから腫瘍が生じる正常組織との間で共有される。既知の分化抗原のほとんどは、黒色腫および正常メラノサイトに見いだされる。これらのメラノサイト系関連タンパク質の多くは、メラニン生合成に関与し、したがって腫瘍特異的でないが、それでもなおがん免疫療法のために広く利用されている。例として

50

は、黒色腫に対するチロシナーゼとMelan-A/MART-1、または前立腺がんに対するPSAが挙げられるが、これに限定されるものではない。

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

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

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

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

【0010】

T細胞ベースの免疫療法は、主要組織適合性複合体(MHC)の分子によって提示される、腫瘍関連または腫瘍特異的タンパク質由来ペプチドエピトープを標的とする。腫瘍特異的Tリンパ球によって認識される抗原、すなわちそれらのエピトープは、酵素、受容体、転写因子などの全てのタンパク質クラスに由来する分子であり得て、それはそれぞれの腫瘍細胞において発現されて、同一起源の非改変細胞と比較して、通常、上方制御される。

【0011】

生命維持に必要な臓器または組織から発達する全てのがん実体と同様に、前立腺特異的抗原は、がん免疫療法のための優れた選択肢であってもよいが、これは前立腺特異的抗原が、前立腺切除された患者における腫瘍特異的標的に相当するためである。前立腺切除術を受けていないがん患者では、前立腺が重要臓器と見なされないことから、このような抗原もまた興味深くあってもよく、黒色腫では、メラノサイト分化抗原による同様のアプローチが採用されている。例えば、腫瘍抗原として使用される前立腺酸ホスファターゼを含んでなる、DendreonからのシプロイセルT(プロベンジ)など、前立腺特異抗原または高度前立腺関連抗原が安全な標的であることを示すいくつかの例がある(Westdorpet al., 2014)。この抗原は、前立腺で排他的に発現されるのではなく、その他の組織と対比して前立腺対において1〜2桁高いレベルで過剰発現される(Graddiset al., 2011)。

【0012】

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

10

20

30

40

50

【0013】

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

10

【0014】

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

【0015】

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

20

【0016】

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

30

【0017】

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

40

【0018】

例えば、マウスなどの哺乳類動物モデルにおいて、CD8陽性Tリンパ球の不在下であっても、インターフェロン(IFN)の分泌による血管新生阻害を通じて腫瘍発現を阻害するには、CD4陽性T細胞で十分であることが示された(Beatty and Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999)。CD4 T細胞が、直接抗腫瘍エフェクターであるという証拠がある(Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014)。

【0019】

HLAクラスII分子の構成的発現は、通常、免疫細胞に限定されるので、原発性腫瘍からクラスIIペプチドを直接単離する可能性があり得るとは、これまで考えられなかつ

50

た。しかし、Dengjel et al. は、いくつかのMHCクラスIIエピトープを腫瘍から直接成功裏に同定した（国際公開第2007/028574号パンフレット、欧州特許第1760088B1号明細書）。

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

したがって、TAAは、腫瘍ワクチンをはじめとするが、これに限定されるものではない、T細胞ベースの治療法開発の出発点である。TAAを同定し特性決定する方法は、通常は、患者または健常人から単離され得るT細胞の使用に基づき、またはそれらは、腫瘍と正常組織との間の示差的転写プロファイル、または差次的ペプチド発現パターンの生成に基づく。しかし、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株において過剰発現され、またはこのような組織または細胞株において選択的に発現される遺伝子の同定は、免疫療法においてこれらの遺伝子から転写される抗原の使用に関する、正確な情報を提供しない。これは、これらの抗原のエピトープの個々の垂集団のみが、このような用途に適するためであり、その理由は、対応するTCRを有するT細胞が存在しなくてはならず、この特定のエピト-

10

20

30

40

50

ブに対する免疫寛容が不在または最小でなくてはならないからである。したがって本発明の非常に好ましい実施形態では、それに対する機能性および/または増殖性T細胞が見いだされる、過剰にまたは選択的に提示されるペプチドのみを選択することが、重要である。このような機能性T細胞は、特異的抗原による刺激時にクローン増殖され得て、エフェクター機能を果たすことができるT細胞（「エフェクターT細胞」）と定義される。

【0026】

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

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明の第1の態様では、本発明は、配列番号1～配列番号48、または配列番号1～配列番号48と少なくとも77%、好ましくは少なくとも88%相同的な（好ましくは少なくとも77%または少なくとも88%同一の）その変異配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなるペプチドに関し、その中で前記変異体は、MHCと結合し、および/またはT細胞と前記ペプチドまたはその薬学的に許容可能な塩との交差反応を誘導し、その中で前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

【0028】

本発明は、配列番号1～配列番号48、または配列番号1～配列番号48と少なくとも77%、好ましくは少なくとも88%相同的な（好ましくは少なくとも77%または少なくとも88%同一の）その変異体からなる群から選択される配列を含んでなる、本発明のペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたはその変異型は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14アミノ酸の全長を有する。

【0029】

続く表は、本発明によるペプチド、それらの各配列番号、およびそれらのペプチドの予測される起源（基礎）遺伝子を示す。表1、表3、および表5の全てのペプチドは、HLA-A*02に結合する。表2、表4、および表6の全てのペプチドは、HLA-A*24に結合する。表3および4のペプチドは、高い誤り率があるまたはアルゴリズムを使用して計算された、ハイスループットスクリーニングの結果としての大きなリスト中で以前開示されているが、これまでがんとは全く関連付けられていなかった。表5および表6のペプチドは、本発明のその他のペプチドとの組み合わせで有用であってもよい追加的なペプチドである。表7および8のペプチドは、それぞれの基礎ポリペプチドの過剰発現または過剰提示を伴う様々なその他の悪性腫瘍の診断および/または治療においてさらに有用である。

【0030】

表1: 本発明によるHLA-A*02ペプチド

10

20

30

【表 1】

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
1	VTAQIGIVAV	81285	OR51E2
2	SMLGEEIQL	9687	GREB1
3	HLLEDIAHV	4744	NEFH
4	ALLTFVWKL	79054	TRPM8
5	KIFSRLIYI	79054	TRPM8
6	ALLESRVNL	50940	PDE11A
7	TLLQVVGVS	10257	ABCC4
8	LLDFSLADA	1674	DES
9	GMLNEAEGKAIKL	4629	MYH11
10	TLWRGPVVV	261729	STEAP2
11	YLEECPAT	563	AZGP1
12	SLNEEIAFL	1674	DES
13	AMAPNHAVV	4057	LTF
14	KMDEASAQLL	54682	MANSC1
15	KMDEASAQLLA	54682	MANSC1
16	KMDEASAQL	54682	MANSC1
17	RLGKPEVS	1466	CSR2
18	GLSEFTEYL	4131	MAP1B
19	LLPPPPLLA	23245	ASTN2
20	SLLSHQVLL	57221	KIAA1244
21	YLNDLRHV	283078	MKX
22	SLYDSIAFI	56978	PRDM8
23	AVAGADVITV	1428	CRYM

10

20

【0031】

表2: 本発明によるHLA-A*24ペプチド

【表 2】

配列番号	配列	遺伝子 ID	公式遺伝子記号
24	SYNDALLTF	79054	TRPM8
25	IYEPYLAMF	79054	TRPM8
26	RYADDTFTPAF	5865	RAB3B
27	GYLQGLVSF	9622	KLK4
28	YYAKEIHKF	7043	TGFB3
29	RYGSPINTF	647024	C6orf132
30	SYSPAARL	2624	GATA2
31	AYTSPPSFF	171024	SYNP02
32	PYQLNASLTF	171024	SYNP02
33	QYGKDFLTL	79088	ZNF426
34	AFSPDSHYLLF	3679	ITGA7
35	IYTRVYYL	64499, 7177	TPSB2, TPSAB1
36	RYMWINQEL	374654	KIF7
37	RYLQDLLAW	5339	PLEC
38	VYSDKLWIF	8216	LZTR1
39	SYIDVAVKL	57544	TXNDC16

30

40

【0032】

表3: がん関連性が以前知られていない本発明による追加的なHLA-A*02ペプチド。J = ホスホセリン

【表 3】

配列番号	配列	遺伝子ID	公式遺伝子記号
40	RTFJPTYGL	23336	SYNM

50

【 0 0 3 3 】

表4: がん関連性が以前知られていない本発明による追加的なHLA-A*24ペプチド。

【表4】

配列番号	配列	遺伝子ID	公式遺伝子記号
41	RYLQKIEEF	3755	KCNG1
42	TYIGQGYII	60681	FKBP10
43	AYIKNGQLF	56978	PRDM8
44	VYNTVSEGFHF	25800	SLC39A6
45	RYFKTPRKF	25792	CIZ1
46	VYEEILHQI	116496	FAM129A
47	SYTPVLNQF	10497	UNC13B
48	AWAPKPYHKF	23043, 50488, 9448	TNIK, MINK1, MAP4K4

10

【 0 0 3 4 】

表5: 例えば個別化がん治療で有用なHLA-A*02ペプチド

【表5】

配列番号	配列	遺伝子ID	公式遺伝子記号
49	SLFHPEDTGQV	354	KLK3
50	TLGPASFLV	389816	LRRC26
51	AMFDKQVQL	23336	SYNM
52	ALGDLVQSV	7782	SLC30A4
53	YLLKDKGEYTL	2316	FLNA

20

【 0 0 3 5 】

表6: 例えば個別化がん治療で有用なHLA-A*24ペプチド

【表6】

配列番号	配列	遺伝子ID	公式遺伝子記号
54	AYSEKVTEF	3817	KLK2
55	LYFEKGEYF	55	ACPP
56	LFHPEDTGQVF	354	KLK3
57	KYADKIYSI	2346	FOLH1
58	GYIDKVRQL	4744	NEFH
59	IYPDVTYAF	1135	CHRNA2

30

【 0 0 3 6 】

表7A: 本発明によるペプチド、およびその他の増殖性疾患、特にがん性疾患における、それらの具体的使用。表は、選択されたペプチドについて、測定された腫瘍サンプルの5%超で過剰提示されるか、または測定された腫瘍サンプルの5%超で3を超える腫瘍対正常組織の幾何学平均比で提示されるかのどちらかである、それらがその上で発見された追加的な腫瘍型を示す。過剰提示は、最大提示がある正常サンプルと比較して、より高い腫瘍サンプル上の提示と定義される。それに対する過剰提示が試験された正常（非がん性）組織は、脂肪組織、副腎、動脈、骨髄、脳、中枢神経、結腸、十二指腸、食道、眼、胆嚢、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、単核白血球細胞、膵臓、副甲状腺、末梢神経、腹膜、下垂体、胸膜、直腸、唾液腺、骨格筋、皮膚、小腸、脾臓、胃、甲状腺、気管、尿管、膀胱、および静脈から選択された。

40

【表 7】

配列番号	配列	その他の関連臓器/疾患
1	VTAQIGIVAV	SCLC、黒色腫
2	SMLGEEIQL	HCC、BRCA、黒色腫、子宮がん
3	HLLEDIAHV	MCC、子宮がん
5	KIFSRLIYI	黒色腫
6	ALLESRVNL	HCC、PC
7	TLLQVVGVVSV	子宮がん、胆嚢がん、胆管がん
8	LLDFSLADA	CRC、BRCA、黒色腫、膀胱がん、子宮がん
10	TLWRGPVVV	NSCLC、RCC、CRC、HCC、白血病、OC、食道がん、胆嚢がん、胆管がん、CLL
12	SLNEEIAFL	SCLC、PC、膀胱がん、胆嚢がん、胆管がん
13	AMAPNHAVV	脳がん
16	KMDEASAQL	膀胱がん
17	RLGIKPESV	脳がん、HCC、BRCA、子宮がん
18	GLSEFTEYL	脳がん
19	LLPPPPLLA	脳がん、黒色腫、膀胱がん
20	SLLSHQVLL	SCLC、CRC、HCC、膀胱がん、BRCA、食道がん、子宮がん
22	SLYDSIAFI	脳がん、白血病、AML
26	RYADDTFTPAF	HCC
27	GYLQGLVSF	HCC
28	YYAKEIHKF	NSCLC、HCC
29	RYGSPINTF	NSCLC、GC、HCC
31	AYTSPPSFF	GC、HCC
33	QYGKDFLTL	NSCLC、脳がん、HCC
34	AFSPDSHYLLF	NSCLC、RCC、脳がん、HCC
35	IYTRVTYYL	NSCLC、GC
36	RYMWINQEL	NSCLC、脳がん、HCC
37	RYLQDLLAW	NSCLC、RCC、脳がん
38	VYSDKLWIF	NSCLC、脳がん、GC、HCC
40	RTFJPTYGL	膀胱がん
41	RYLQKIEEF	NSCLC、RCC、脳がん
42	TYIGQGYII	NSCLC、脳がん、GC、HCC
43	AYIKNGQLF	脳がん
44	VYNTVSEGTHF	NSCLC、脳がん、HCC
45	RYFKTPRKF	HCC
47	SYTPVLNQF	HCC
48	AWAPKPYHKF	NSCLC、RCC、脳がん、HCC

10

20

30

NSCLC = 非小細胞肺癌、SCLC = 小細胞肺癌、RCC = 腎臓がん、CRC = 結腸または直腸がん、HCC = 肝臓がん、PC = 膵臓がん、BRCA = 乳がん、MCC = メルケル細胞がん、OC = 卵巣がん、AML = 急性骨髄性白血病、CLL = 慢性リンパ球性白血病、GC = 胃がん； J = ホスホセリン (phosphoserine)

40

【0037】

本発明は、さらに、例えば、肺がん、小細胞肺癌、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、CRC、膀胱がん、非小細胞肺癌、腎臓がん、白血病（例えば、AMLまたはCLL）、卵巣がん、食道がん、脳がん、および胃（胃）がんなどの増殖性疾患の治療において使用するための本発明によるペプチドに一般に関する。

【0038】

特に好ましいのは、配列番号1～配列番号48からなる群から選択される、本発明によ

50

る単独のまたは組み合わされたペプチドである。より好ましいのは、配列番号 1 ~ 配列番号 6 (表 1 を参照されたい) および配列番号 24 ~ 配列番号 28 (表 2 を参照されたい) または配列番号 1、4、5、6、49、および 52 または配列番号 2、3、および 54 からなる群から選択される単独のまたは組み合わせのペプチドと、肺がん、小細胞肺がん、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、CRC、膀胱がん、非小細胞肺がん、腎臓がん、白血病 (例えば、AML または CLL)、卵巣がん、食道がん、脳がん、および胃 (胃) がん、最も好ましくは前立腺がんの免疫療法におけるそれらの使用である。上の表 7 に示されるように、本発明によるペプチドの多くは、その他の腫瘍型上にもまた見いだされ、したがって、その他の適応症のための免疫療法においても使用され得る。図 1 および実施例 1 もまた、参照されたい。

10

【0039】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、非小細胞肺がんの併用療法のための、配列番号配列番号 1、12、および 20 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

【0040】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、黒色腫の併用療法のための、配列番号 1、2、5、8、および 19 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

【0041】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、肝臓がんの併用療法のための、配列番号 2、6、10、17、20、26、27、28、29、31、33、34、36、38、42、44、45、47、および 48 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

20

【0042】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、乳がんの併用療法のための、配列番号 2、8、17、および 20 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

【0043】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、子宮がんの併用療法のための、配列番号 2、3、7、8、17、および 20 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

30

【0044】

したがって、本発明の別の態様は、MCC 治療のための、配列番号 3 に記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

【0045】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、PC の併用療法のための、配列番号 6、および 12 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

【0046】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、胆嚢がんおよび / または胆管がんの併用療法のための、配列番号配列番号 7、10、および 12 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

40

【0047】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、CRC の併用療法のための、配列番号配列番号 8、10、および 20 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

【0048】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、白血病の併用療法のための、配列番号 10、および 22 のいずれか 1 つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも 1 つの使用に関する。

50

【0049】

したがって、本発明の別の態様は、OC治療のための、配列番号10に記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0050】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、食道がんの併用療法のための、配列番号10、および20のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0051】

したがって、本発明の別の態様は、CLL治療のための、配列番号10に記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

10

【0052】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、PCの併用療法のための、配列番号6、および12のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0053】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、NSCLCの併用療法のための、配列番号10、28、29、33、34、35、36、37、38、41、42、44、および48のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0054】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、RCCの併用療法のための、配列番号10、34、37、41、および48のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

20

【0055】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、脳がんの併用療法のための、配列番号13、17、18、19、22、33、34、36、37、38、41、42、43、44、および48のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0056】

したがって、本発明の別の態様は、AML治療のための、配列番号22に記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

30

【0057】

したがって、本発明の別の態様は、好ましい一実施形態では、GCの併用療法のための、配列番号29、31、35、38、および42のいずれか1つに記載の本発明によるペプチドの少なくとも1つの使用に関する。

【0058】

したがって、本発明の別の態様は、好ましくは肺がん、小細胞肺がん、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、CRC、膀胱がん、非小細胞肺がん、腎臓がん、白血病（例えば、AMLまたはCLL）、卵巣がん、食道がん、脳がん、および胃（胃）がん、最も好ましくは前立腺がんの群から選択される増殖性疾患の併用療法のための本発明によるペプチドの使用に関する

40

【0059】

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

【0060】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは（それぞれ）配列番号1～配列番号48に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる。

【0061】

本発明は、本発明によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、修飾され、および／

50

または非ペプチド結合を含む。

【0062】

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

【0063】

本発明の別の実施形態は、非天然ペプチドに関し、前記ペプチドは、配列番号1~配列番号48に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になり、薬学的に許容可能な塩として合成的に生産される(例えば、合成される)。ペプチドを合成的に生産する方法は、当該技術分野で周知である。生体内で生成されるペプチドは塩でないため、本発明によるペプチドの塩は、ペプチドの生体内での状態と実質的に異なる。ペプチドの非天然塩形態は、特に、ペプチドを含んでなる医薬組成物、例えば、本明細書で開示されるペプチドワクチンなどの文脈で、ペプチドの溶解性を媒介する。治療される対象にペプチドを効率的に提供するためには、ペプチドの十分に少なくとも実質的な溶解性が必要である。好ましくは、塩はペプチドの薬学的に許容可能な塩である。本発明によるこれらの塩としては、アニオン PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 I^- 、 SCN^- 及びカチオン NH_4^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cs^+ 、 Li^+ 、 Zn_2^+ 、 Mg_2^+ 、 Ca_2^+ 、 Mn_2^+ 、 Cu_2^+ 、および Ba_2^+ としてのホフマイスター系列の塩などのアルカリ塩およびアルカリ土類塩が挙げられる。特に塩類は、 $(NH_4)_3PO_4$ 、 $(NH_4)_2HPO_4$ 、 $(NH_4)H_2PO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4CH_3COO 、 NH_4Cl 、 NH_4Br 、 NH_4NO_3 、 NH_4ClO_4 、 NH_4I 、 NH_4SCN 、 Rb_3PO_4 、 Rb_2HPO_4 、 RbH_2PO_4 、 Rb_2SO_4 、 Rb_4CH_3COO 、 Rb_4Cl 、 Rb_4Br 、 Rb_4NO_3 、 Rb_4ClO_4 、 Rb_4I 、 Rb_4SCN 、 K_3PO_4 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 KCH_3COO 、 KCl 、 KBr 、 KNO_3 、 $KClO_4$ 、 KI 、 $KSCN$ 、 Na_3PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 $NaCH_3COO$ 、 $NaCl$ 、 $NaBr$ 、 NaN_3 、 $NaClO_4$ 、 NaI 、 $NaSCN$ 、 $ZnCl_2$ 、 Cs_3PO_4 、 Cs_2HPO_4 、 CsH_2PO_4 、 Cs_2SO_4 、 $CsCH_3COO$ 、 $CsCl$ 、 $CsBr$ 、 $CsNO_3$ 、 $CsClO_4$ 、 CsI 、 $CsSCN$ 、 Li_3PO_4 、 Li_2HPO_4 、 LiH_2PO_4 、 Li_2SO_4 、 $LiCH_3COO$ 、 $LiCl$ 、 $LiBr$ 、 $LiNO_3$ 、 $LiClO_4$ 、 LiI 、 $LiSCN$ 、 Cu_2SO_4 、 $Mg_3(PO_4)_2$ 、 Mg_2HPO_4 、 $Mg(H_2PO_4)_2$ 、 Mg_2SO_4 、 $Mg(CH_3COO)_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $MgBr_2$ 、 $Mg(NO_3)_2$ 、 $Mg(ClO_4)_2$ 、 MgI_2 、 $Mg(SCN)_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、 Ca_2HPO_4 、 $Ca(H_2PO_4)_2$ 、 $CaSO_4$ 、 $Ca(CH_3COO)_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $CaBr_2$ 、 $Ca(NO_3)_2$ 、 $Ca(ClO_4)_2$ 、 CaI_2 、 $Ca(SCN)_2$ 、 $Ba_3(PO_4)_2$ 、 Ba_2HPO_4 、 $Ba(H_2PO_4)_2$ 、 $BaSO_4$ 、 $Ba(CH_3COO)_2$ 、 $BaCl_2$ 、 $BaBr_2$ 、 $Ba(NO_3)_2$ 、 $Ba(ClO_4)_2$ 、 BaI_2 、および $Ba(SCN)_2$ から選択される。特に好ましいのは、例えば、塩化物塩または酢酸塩(トリフルオロ酢酸塩)などのNH酢酸塩、 $MgCl_2$ 、 KH_2PO_4 、 Na_2SO_4 、 KCl 、 $NaCl$ 、および $CaCl_2$ である。

【0064】

一般に、ペプチドおよび変異体(少なくともアミノ酸残基間にペプチド結合を含有するもの)は、Lukas et al. (Lukas et al., 1981)によって、そしてその中で引用される参考文献によって開示される、Fmoc-ポリアミド様式の固相ペプチド合成によって合成されてもよい。一時的なN-アミノ基保護は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基によってもたらされる。この高度に塩基不安定性の保護基の反復性切断は、N,N-ジメチルホルムアミド中の20%ピペリジンを使用して実施される。側鎖官能基は、それらのブチルエーテル(セリン、スレオニン、およびチロシンの場合)、ブチルエステル(グルタミン酸およびアスパラギン酸の場合)、ブチルオキシカルボニル誘導体(リジンおよびヒスチジンの場合)、トリチル誘導体(シ

10

20

30

40

50

ステインの場合)、および4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン誘導体(アルギニンの場合)として保護されてもよい。グルタミンまたはアスパラギンがC末端残基である場合、側鎖アミド官能基を保護するために、4,4'-ジメトキシベンズヒドリル基が活用される。固相担体は、ジメチルアクリルアミド(主鎖単量体)、ビスアクリロイルエチレンジアミン(架橋剤)、およびアクリロイルサルコシメチルエステル(機能化因子)の3つの単量体から構成される、ポリジメチル-アクリルアミドポリマーをベースとする。使用されるペプチド-対-樹脂の切断可能な結合因子は、酸不安定性4-ヒドロキシメチル-フェノキシ酢酸誘導体である。逆転N,N-ジシクロヘキシル-カルボジイミド/1ヒドロキシベンゾトリアゾール媒介共役手順を使用して付加されるアスパラギンおよびグルタミンを除いて、全てのアミノ酸誘導体は、それらのあらかじめ形成された対称的な無水物誘導体として付加される。全ての共役および脱保護反応は、ニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸またはイサチン(isotinin)試験手順を使用してモニターされる。合成完了時に、ペプチドは樹脂担体から切断され、同時に、50%スカベンジャー混合物を含有する95%トリフルオロ酢酸での処理によって、側鎖保護基が除去される。一般に使用されるスカベンジャーとしては、エタンジチオール、フェノール、アニソール、および水が挙げられ、正確な選択は、合成されるペプチドの構成アミノ酸に左右される。ペプチドの合成のための固相法と溶液相法の組み合わせもまた、可能である(例えば、(Bruckdorfer et al., 2004)、およびその中で引用される参考文献を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

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

【0068】

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

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

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

【0072】

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

。

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

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

【0076】

本発明は、抗原提示細胞が、配列番号1～配列番号48を含有する、好ましくは、配列番号1～配列番号6（表1を参照されたい）および配列番号24～配列番号28（表2を参照されたい）または変異アミノ酸配列を含有する、前記ペプチドを発現する能力がありまたは発現する、発現ベクターを含んでなる、本発明による方法にさらに関する。

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

好ましくは、前記薬剤は、可溶性TCRまたは抗体ベースの、細胞療法、ワクチンまたはタンパク質である。

【0081】

本発明は、本発明による使用にさらに関し、前記がん細胞は、肺がん、小細胞肺がん、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、CRC、膀胱がん、非小細胞肺がん、腎臓がん、白血病（例えば、AMLまたはCLL）、卵巣がん、食道がん、脳がん、および胃（胃）がん、最も好ましくは前立腺がん細胞である。

【0082】

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

【0083】

10

20

30

40

50

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

【0084】

本発明はまた、がん治療の文脈におけるこれらの新規標的の使用に関する。

【0085】

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

【0086】

A T P 結合カセット、サブファミリー C (C F T R / M R P)、メンバー 4 (A B C C 4) - A B C C 4 は、多種多様な抗ウイルス、細胞分裂阻害、抗生物質、および心臓脈管薬ならびに細胞シグナル伝達に關与する分子をはじめとする、多種多様な内在性および生体異物性有機アニオン性化合物を細胞外に排出することができ、したがって A B C C 4 に、細胞保護および細胞外シグナル伝達経路における重要な機能を付与する (R u s s e l e t a l . , 2 0 0 8)。A B C C 4 レベルは、前立腺がんにおいて上昇し、発現は生体外アンドロゲン治療によって調節されることが示されている。その結果、アンドロゲン除去治療は、前立腺がん組織における A B C C 4 発現を低下させる。さらに、A B C C 4 レベルは、前立腺がんの進行に際して減少する (H o e t a l . , 2 0 0 8 ; M o n t a n i e t a l . , 2 0 1 3)。A B C C 4 過剰発現は、例えば、肺がんなどの他のがん型で実証されている (Z h a o e t a l . , 2 0 1 4)。A B C C 4 発現の抑制は、A B C C 4 を過剰発現するがん細胞の増殖を生体外で阻害して (Z h a o e t a l . , 2 0 1 4)、薬剤耐性細胞株における化学療法剤に対する感受性を回復させる (Z h a n g e t a l . , 2 0 1 4) ことが示された。

10

20

【0087】

アストロタクチン 2 (A S T N 2) - A S T N 2 は、神経細胞移動において機能することが示唆されている (W i l s o n e t a l . , 2 0 1 0)。

【0088】

- 2 - 糖タンパク質 1、亜鉛結合 (A Z G P 1) - A S T N 2 は、脂肪細胞の脂質分解を刺激し、一部の進行したがんに伴う多大な脂肪の損失を引き起こす (U n i P r o t , 2 0 1 5)。A Z G P 1 発現は前立腺がんにおいて増加し、これは血清試サンプル中でも検出可能であり、潜在的なバイオマーカーとして示唆されている (H a l e e t a l . , 2 0 0 1)。高悪性度腫瘍ではレベルが低下し、A Z G P 1 の発現は、前立腺がん患者における死亡率の低下および腫瘍再発の減少と関連している (L a p o i n t e e t a l . , 2 0 0 4 ; S e v e r i e t a l . , 2 0 1 4)。A Z G P 1 は、乳がんのバイオマーカーとして示唆されており、A Z G P 1 レベルは低分化腫瘍において減少する (H a s s a n e t a l . , 2 0 0 8)。

30

【0089】

染色体 6 オープンリーディングフレーム 132 (C 6 o r f 1 3 2) - C 6 o r f 1 3 2 は、染色体 6 p 2 1 . 1 上に位置する (R e f S e q , 2 0 0 2)。

【0090】

C D K N 1 A 相互作用ジンクフィンガータンパク質 1 (C I Z 1) - C I Z 1 は、腫瘍抑制因子として機能する C D K N 1 A 相互作用ジンクフィンガータンパク質をコードする (N i s h i b e e t a l . , 2 0 1 3)。結腸直腸がんでは、C I Z 1 は、細胞増殖、細胞周期、アポトーシス、およびコロニー形成を調節することによって、がん進行に關与することが示唆された (Y i n e t a l . , 2 0 1 3)。C 末端ドメインの一部を欠く C I Z 1 変異体は、初期段階でさえも肺がん細胞中に見いだされ、バイオマーカーとしての可能性を有する (H i g g i n s e t a l . , 2 0 1 2)。

40

【0091】

クリスタリン、 μ (C R Y M) - C R Y M は、イミン結合の還元を特異的に触媒する (H a l l e n e t a l . , 2 0 1 1)。C R Y M はアンドロゲン調節遺伝子であり、その発現は前立腺がんでは上昇するが、去勢療法耐性腫瘍では下方制御される (M a l i n

50

owska et al., 2009)。CRYMは、非小細胞肺癌において、および子宮平滑筋肉腫の転移において、原発性腫瘍と比較して過剰発現された (Chong et al., 2006; Davidson et al., 2014)。CRYM発現は乳がんサンプル中에서도見いだされ、CRYMはSEREX分析で乳がん患者の血清によって認識された (Forti et al., 2002)。

【0092】

システインおよびグリシンに富むタンパク質2 (CSRP2) - CSRP2は、CSRP遺伝子のファミリーに属し、LIMドメイン含有タンパク質をコードする。CSRP2の過剰発現は、肝細胞がんの脱分化に関連する (Midorikawa et al., 2002)。

10

【0093】

デスミン (DES) - DESは、筋細胞に見いだされるクラスIII中間体フィラメントである。それらは、筋原線維を互いに、およびZ線構造の周辺から原形質膜に接続する繊維状ネットワークを形成する (Clemen et al., 2015)。DES発現は前立腺がん組織で減少し、低いDES発現はより短い無病期間に関連付けられている (Wu et al., 2014)。結腸直腸がんでは、おそらく微小血管密度の増加、ひいては周皮細胞レベルの上昇のために、進行期の腫瘍においてDES発現が上昇した (Arentz et al., 2011)。さらに、上昇したDESレベルは、結腸直腸がんにおける生存率低下に関連付けられている (Ma et al., 2009)。

20

【0094】

配列類似性129を有するファミリー、メンバーA (FAM129A) - FAM129Aは、染色体1q25上に位置する (RefSeq, 2002)。FAM129Aの過剰発現は、頭頸部扁平上皮がん (Ito et al., 2010a)、甲状腺腫瘍 (Matsumoto et al., 2006)、および腎細胞がん (Adachi et al., 2004)において実証されている。

【0095】

FK506結合タンパク質10 (FKBP10) - FKBP10は、FKBP型ペプチジル-プロリルシス/トランスイソメラーゼファミリーに属するFK506結合タンパク質10をコードする。FKBP10遺伝子産物は、小胞体に局在して、分子シャペロンの役割を果たす (RefSeq, 2002)。FKBP10は、白血病細胞におけるアドリアマイシン耐性表現型の獲得および維持に関与する新規遺伝子として同定される (Sun et al., 2014)。FKBP10は、その上方制御を通じて、結腸直腸がんに関連付けられている (Olesen et al., 2005)。対照的に、FKBP10の低発現は上皮性卵巣がんの特徴的であった (Quinn et al., 2013)。

30

【0096】

GATA結合タンパク質2 (GATA2) - GATA2は造血に極めて重要であり、GATA2の変異は骨髄異形成症候群および骨髄性白血病と関連している (Bresnick et al., 2012)。固形腫瘍では、GATA2の過剰発現が乳がんにおいて記載されており、結腸直腸がんおよび神経膠芽腫における予後不良と相関した (Chen et al., 2013; Wang et al., 2015; Wang et al., 2012)。対照的に、その他の報告は、むしろ新生物組織におけるGATA2の発現の減少を示唆し、肝細胞がん、膀胱がん、または腎細胞がんにおけるGATA2減少と、腫瘍侵襲性および転帰不良との関連性を報告する (Kandimalla et al., 2012; Peters et al., 2014; Li et al., 2014)。

40

【0097】

乳がん (GREB1)におけるエストロゲンによる成長調節 - GREB1は、エストロゲン受容体調節経路における初期応答遺伝子である、エストロゲン応答遺伝子である。それは、ホルモン応答性組織およびがんにおいて、重要な役割を果たすと考えられる (Re

50

fSeq, 2002)。GREB1は、前立腺がんおよび良性前立腺肥大において過剰発現され、前立腺がん細胞のアンドロゲン誘導性増殖に關与する(Rae et al., 2006)。GREB1はまた、卵巣がんおよび乳がん細胞のエストロゲン刺激性増殖を媒介する(Laviolette et al., 2014)。

【0098】

インテグリン7(ITGA7) - ITGA7は、ラミニン-1受容体二量体インテグリン-7/-1の鎖である。ITGA7は、悪性腫瘍の増殖抑制に重要な腫瘍抑制遺伝子である。変異解析は、前立腺がん、肝細胞がん、軟部組織平滑筋肉腫、および多形性神経膠芽細胞腫中のITGA7変異を明らかにした。ITGA7は、非転移性前立腺がんおよび平滑筋肉腫中で下方制御された(Tan et al., 2013)。

10

【0099】

カリウム電圧-ゲート型チャネル、サブファミリーG、メンバー1(KCNG1) - KCNG1は、骨格筋で豊富に発現される(Gutman et al., 2005)。

【0100】

KIAA1244 - KIAA1244は、ARFGEFファミリーメンバー3をコードして、染色体6q23.3上に位置する(RefSeq, 2002)。KIAA1244は、大多数の乳がんにおいて過剰発現されることが判明した(Nishidate et al., 2004)。

【0101】

キネシンファミリーメンバー7(KIF7) - KIF7は、ジュベール症候群、Hydrolethalus症候群、および先端脳梁症候群をはじめとする様々な疾患に關与する。それはまた、一次繊毛形成にも關与する(Klejnot and Kozielecki, 2012)。その中でKIF7が重要な役割を果たす、ヘッジホッグシグナル伝達経路の異常な活性化は、皮膚基底細胞がん、胃がん、および膵臓がんなどの様々なヒト腫瘍において病理学的帰結をもたらす(Li et al., 2012; Katoh and Katoh, 2005)。

20

【0102】

カリクレイン関連ペプチダーゼ4(KLK4) - KLK4は、その遺伝子が染色体19上のクラスターに位置する、15のカリクレインサブファミリーメンバーの1つである(Huet al., 2000)。KLK4は、乳がん、卵巣がん、および前立腺がんにおいて上昇する(Schmitt et al., 2013)。前立腺がんでは、KLK4は、アンドロゲンおよびmTORシグナル伝達と相互作用する(Jin et al., 2013)。

30

【0103】

ラクトランスフェリン(LTF) - LTFは、ミルク中では最も高いレベルで、その他の粘液中では低濃度で見いだされる多機能性タンパク質である。LTFは、抗菌および抗炎症活性を発揮することが示されており、鉄恒常性に關与し、細胞増殖および分化において、およびがん発生および転移からの保護において、役割を果たす(Ward et al., 2005)。LTFは、良性前立腺肥大と比較して、前立腺がん組織および血清において下方制御される。さらに、低下したLTFレベルは、患者の生存率の低下と關する(Shaheduzzaman et al., 2007)。LTFは、おそらくNF- κ BおよびAktシグナル伝達の阻害をはじめとするいくつかの機序を通じて、細胞周期の進行を妨げることによって細胞増殖を阻害する(Deng et al., 2013; Ye et al., 2014)。さらに、LTFは、カスパーゼ-3およびJNKシグナル伝達の活性化をはじめとする、アポトーシス促進効果もまた発現する(Sakai et al., 2005; Wang et al., 2011)。

40

【0104】

ロイシン-ジッパー様転写調節因子1(LZTR1) - LZTR1は、Ras/MAPK経路の調節において役割を果たすかもしれない(Yamamoto et al., 2015)。LZTR1は、神経膠芽腫において頻繁に変異または欠失する(Frattini

50

ni et al., 2013)。

【0105】

MANSCドメイン含有1 (MANSC1) - MANSC1は、染色体12p13.2上に位置する (RefSeq, 2002)。MANSC1は、前立腺腫瘍において有意に下方制御され；それは前立腺がんの開始または進行にとって重要であってもよい (Kibel et al., 2004)。様々な血液悪性腫瘍を有する患者において、MANSC1は発現増加を示す (Haferlach et al., 2011)。

【0106】

微小関連タンパク質1B (MAP1B) - MAP1Bは、中枢神経系の発達および軸索機能において重要な役割を果たす微小管安定化タンパク質である (Halpain および Dehmel, 2006)。小児小円形細胞腫瘍の免疫組織化学的分析は、MAP1Bが、神経芽腫、横紋筋肉腫、およびウィルムス腫瘍において発現されるが、ユーング肉腫では発現されないことを示唆した (Willoughby et al., 2008)。

マイトジェン - 活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ4 (MAP4K4) MAP4K4は、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼファミリーのメンバーであり、TNF - シグナル伝達経路を媒介する (RefSeq, 2002)。MAP4K4は、前立腺がんの侵襲性のバイオマーカーとして示唆されている (Rizzardi et al., 2014)。

【0107】

Misshapen様キナーゼ1 (MINK1) - MINK1は、細胞骨格の組織化および腫瘍遺伝子誘発性細胞老化を調節する。それは細胞質分裂に不可欠である (Hyodo et al., 2012)。MINK1は、成長停止および老化中に、Rasによって活性化されてp38活性化を媒介する (Nicke et al., 2005)。

【0108】

モホークホメオボックス (MKX) - MKXは、骨、骨格筋、および軟骨構造の発達における報告された役割を有する転写因子である (Ito et al., 2010b)。

【0109】

ミオシン、重鎖11、平滑筋 (MYH11) - MYH11は、染色体領域16q12に割り当てられてヒト臍動脈、膀胱、食道、および気管で発現される (Matsuo et al., 1993)。MYH11染色体の遺伝子座 (inv(16); CBF B - MYH11) における反転は、急性骨髄性白血病で頻繁に見いだされ、コア結合因子 (CBF -) とMYH11の発がん性キメラタンパク質の形成をもたらす (Liu et al., 1993)。低いMYH11発現レベルは、結腸直腸がんにおける予後不良に関連している (Wang et al., 2014)。

【0110】

ニューロフィラメント、重鎖ポリペプチド (NEFH) - ニューロフィラメントは、軽、中、および重鎖から構成されるIV型中間径フィラメントヘテロ重合体である。神経フィラメントは、軸索骨格を構成し、神経細胞口径を機能的に維持する。それらはまた、軸索および樹状突起への細胞内輸送において役割を果たしてもよい。NEFHは重いニューロフィラメントタンパク質をコードする (RefSeq, 2002)。転移性腎細胞がんを有する患者では、NEFH CpGアイランドのメチル化は、腫瘍特異的増加、進行した疾患および遠隔転移との関連を示し、無増悪生存期間不良および全生存期間短縮と有意に関連した (Dubrowskaja et al., 2014)。

【0111】

嗅覚受容体、ファミリー51、サブファミリーE、メンバー2 (OR51E2) - OR51E2は、ヒト前立腺において優勢に発現され、前立腺がんにおいて頻繁に過剰発現されるGタンパク質共役嗅覚受容体ファミリーのメンバーである (Weng et al., 2005)。OR51E2由来ペプチドは、抗がんワクチンの開発のための診断マーカーおよび免疫標的として使用されてもよい (Matsueda et al., 2012)

10

20

30

40

50

)。

【0112】

ホスホジエステラーゼ11A (PDE11A) - PDE11AはcAMPおよびcGMPの加水分解を触媒し、したがってそれぞれのシグナル伝達経路を下方制御する (Fawcett et al., 2000)。PDE11Aの変異は、副腎皮質過形成ならびに家族性精巣胚細胞腫瘍と関連している (Greene et al., 2010; Horvath and Stratakis, 2008)。一研究ではまた、前立腺がん患者の30%において、PDE11Aのミスセンス変異も同定されている。変異体は、生体外PDE11A活性の低下を示すものとして特徴付けられ、それらの生体内での発現レベルは減少した (Faucz et al., 2011)。

10

【0113】

Plectin (PLEC) - PLECは、細胞骨格および接着複合体の架橋および組織化に参与するタンパク質である、プラキンファミリーのメンバー、プレクチンをコードする (Bouameur et al., 2014)。PLECは、結腸直腸腺がん、頭頸部扁平上皮がん、および膵臓がんにおいて過剰発現される (Lee et al., 2004; Katada et al., 2012; Bausch et al., 2011)。

【0114】

PRドメイン含有8 (PRDM8) - PRDM8は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する転写リプレッサーである。PRDM8は、Notch-Hes経路によって調節され、CNS発達において役割を果たす (Kinameri et al., 2008)。

20

RAB3B、メンバーRAS発がん遺伝子ファミリー (RAB3B) - RAB3Bは、開口分泌の調節に参与するとされている低分子量GTP結合タンパク質である (Rotondo et al., 2009)。RAB3Bは前立腺がん患者において過剰発現され、AR、FoxA1、およびNKX3-1に加えて、RAB3Bが前立腺がん進行の重要な調節因子であることが示唆される (Tan et al., 2012)。

【0115】

溶質輸送体ファミリー39 (亜鉛輸送体)、メンバー6 (SLC39A6) - SLC39A6は、可溶性増殖因子下流のエフェクター分子である、亜鉛輸送体ZIP6をコードする (Lue et al., 2011)。乳がんでは、SLC39A6の過剰発現は、より短い再発時間ならびに疾患関連死亡までの時間の短縮と関連している (Andres et al., 2013)。

30

【0116】

前立腺2 (STEAP2) の6回膜貫通上皮抗原 - STEAP2は、細胞質ゾル中でゴルジ装置、原形質膜、および小胞管状構造に局在する、複数回貫通膜タンパク質をコードする (RefSeq, 2002)。進行した疾患を有する前立腺がん患者では、STEAP2発現が上昇する。STEAP2の過剰発現は、生体外で細胞増殖ならびに移動性および浸潤能を増加させることが実証されている一方で、ノックダウンは細胞増殖を阻害して、アポトーシスを促進するかもしれない (Wang et al., 2010; Whiteland et al., 2014)。STEAPタンパク質ファミリーのその他のメンバーと共に、STEAP2は、その他のがん型においても過剰発現される。さらに、STEAPは、がんバイオマーカーおよびがん免疫療法の潜在的標的として研究されている (Grünwald et al., 2012)。

40

【0117】

Synemin、中間フィラメントタンパク質 (SYNM) - SYNMはデスミンと細胞外マトリックスを連結し、筋肉において重要な構造的役割を果たす (Bhosle et al., 2006)。SYNM発現は、乳がんおよび肝細胞がんにおいて下方制御され、生存率低下、リンパ節転移、および進行したグレードと相関した (Noetzel et al., 2010; Liu et al., 2011)。

50

【0118】

シナプトポドン2 (SYNPO2) - SYNPO2はmyopodinとしても知られており、走化性刺激に応答して細胞移動を調節する役割を果たす、アクチン結合タンパク質である (Kai et al., 2015)。SYNPO2は腫瘍抑制遺伝子と考えられ、前立腺がんにおけるSYNPO2の非存在は、浸潤性および臨床的再発と相関している (Yu et al., 2006)。

【0119】

形質転換成長因子3 (TGFB3) - TGFB3は、少なくとも3つのTGF-イソ型の内の1つである。正常細胞では、TGF-シグナル伝達は、G1期において細胞周期を停止させて増殖を停止させ、分化を誘導し、またはアポトーシスを促進する (Hananan and Weinberg, 2000)。NSCLCにおいて、TGFB3は浸潤促進因子である (Petrella et al., 2012)。

TRAF2およびNCK相互作用キナーゼ (TNIK) - TNIKは胚中心キナーゼであり、アクチン細胞骨格の調節に潜在的に関与する (Fu et al., 1999)。TNIKは、Wnt標的遺伝子の不可欠かつ特異的なアクチベーターである。TNIKは、TRAF6依存性のJNKおよびNF- κ Bシグナル伝達の中心的存在、およびヒトB細胞におけるシグナルの活性化および変換のトランスデューサーとして記載されている (Shkoda et al., 2012)。ホルモン受容体陰性乳がんでは、TNIKは、成長および増殖に影響を及ぼす潜在的ながん遺伝子として同定された (Jiao et al., 2013)。

トリプターゼ1 (TPSAB1)、トリプターゼ2 (TPSB2) - TPSAB1およびTPSB2は、どちらも主に肥満細胞によって発現されるセリンプロテアーゼである。腫瘍組織におけるトリプターゼ陽性肥満細胞の存在は、黒色腫、子宮内膜がん、乳がん、胃がんおよび結腸直腸がんをはじめとする、いくつかのがん型における血管新生と相関する (Ammendola et al., 2014)。

【0120】

一過性受容体潜在的カチオンチャネル、サブファミリーM、メンバー8 (TRPM8) - TRPM8は、寒冷刺激に応答して活性化されるナトリウムおよびカルシウムチャネルである。TRPM8は、主に前立腺上皮細胞で発現され、いくつかの感覚ニューロンにおいても発現される (Prevarskaya et al., 2007)。TRPM8は、前立腺がん、そして乳がん、結腸がん、肺がん、および皮膚腫瘍などのその他のがん型において、過剰発現されることが報告されている (Tsavaler et al., 2001)。

【0121】

チオレドキシンドメイン含有16 (TXNDC16) - TXNDC16は、推定チオレドキシンドメインがある858アミノ酸のタンパク質をコードする；その機能は不明である。髄膜腫患者において、TXNDC16に対する自己抗体が検出されている (Comtesse et al., 2005)。

【0122】

Unc-13ホモログB (UNC13B) - UNC13Bはシナプス小胞開口分泌による神経伝達物質放出を制御するシナプス前活性領域のタンパク質複合体の構成要素である (Sudhof, 2012)。

【0123】

ジンクフィンガータンパク質426 (ZNF426) - ZNF426は転写制御タンパク質である (Yang and Wood, 2007)。

【発明を実施するための形態】

【0124】

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

10

20

30

40

50

ために目下探求されている。

【0125】

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

【0126】

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

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

「ペプチド」という用語は、「オリゴペプチド」もまた含むものとする。「オリゴペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の α -アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合によって互いに連結する、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。オリゴペプチドの長さは、その中で正しいエピトープまたはエピトープが保持されれば、本発明には重要でない。オリゴペプチドは、典型的に、約30アミノ酸残基長未満であり、約15アミノ酸長を超える。

【0131】

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

【0132】

ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質またはこのような分子をコードするポリヌクレオチドは、免疫応答を誘導できれば「免疫原性」である(したがって本発明における「免疫原」である)。本発明では、免疫原性は、より具体的には、T細胞応答を誘導する能力

10

20

30

40

50

と定義される。したがって「免疫原」は、免疫応答を誘導できる分子であり、本発明では、T細胞応答を誘導できる分子である。別の態様では、免疫原は、それに対する特異的抗体またはTCRを生じさせるのに使用される、ペプチド、ペプチドとMHCの複合体、オリゴペプチド、および/またはタンパク質であり得る。

【0133】

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

10

【0134】

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

【0135】

表8: HLA-A*02およびHLA-A*24の発現頻度F、および最も高頻度のHLA-DR血清型。頻度は、ハーディ・ワインベルグの式 $F = 1 - (1 - Gf)^2$ を用いて、Mori et al. (Mori et al., 1997)から適応された米国人集団内のハプロタイプ頻度Gfから推定された。連鎖不均衡のために、A*02またはA*24と特定のHLA-DR対立遺伝子との組み合わせは、それらの単一頻度から予測されるよりも、豊富でありまたは低頻度であるかもしれない。詳細については、Chanock et al. (Chanock et al., 2004)を参照されたい。

20

【表 8 - 1】

対立遺伝子	集団	対立遺伝子出現頻度から 計算された表現型
A*02	白人 (北米)	49.1%
A*02	アフリカ系米国人(北米)	34.1%
A*02	アジア系米国人(北米)	43.2%
A*02	ラテン系米国人(北米)	48.3%
DR1	白人 (北米)	19.4%
DR2	白人 (北米)	28.2%
DR3	白人 (北米)	20.6%
DR4	白人 (北米)	30.7%
DR5	白人 (北米)	23.3%
DR6	白人 (北米)	26.7%
DR7	白人 (北米)	24.8%
DR8	白人 (北米)	5.7%
DR9	白人 (北米)	2.1%
DR1	アフリカ系 (北) 米人	13.20%
DR2	アフリカ系 (北) 米人	29.80%
DR3	アフリカ系 (北) 米人	24.80%
DR4	アフリカ系 (北) 米人	11.10%
DR5	アフリカ系 (北) 米人	31.10%
DR6	アフリカ系 (北) 米人	33.70%
DR7	アフリカ系 (北) 米人	19.20%
DR8	アフリカ系 (北) 米人	12.10%
DR9	アフリカ系 (北) 米人	5.80%
DR1	アジア系 (北) 米人	6.80%
DR2	アジア系 (北) 米人	33.80%
DR3	アジア系 (北) 米人	9.20%
DR4	アジア系 (北) 米人	28.60%
DR5	アジア系 (北) 米人	30.00%
DR6	アジア系 (北) 米人	25.10%
DR7	アジア系 (北) 米人	13.40%
DR8	アジア系 (北) 米人	12.70%
DR9	アジア系 (北) 米人	18.60%
DR1	ラテン系 (北) 米人	15.30%
DR2	ラテン系 (北) 米人	21.20%
DR3	ラテン系 (北) 米人	15.20%
DR4	ラテン系 (北) 米人	36.80%
DR5	ラテン系 (北) 米人	20.00%
DR6	ラテン系 (北) 米人	31.10%
DR7	ラテン系 (北) 米人	20.20%
DR8	ラテン系 (北) 米人	18.60%
DR9	ラテン系 (北) 米人	2.10%

10

20

30

40

【表 8 - 2】

対立遺伝子	集団	対立遺伝子出現頻度から 計算された表現型
A*24	フィリピン	65%
A*24	ロシアネネツ	61%
A*24:02	日本	59%
A*24	マレーシア	58%
A*24:02	フィリピン	54%
A*24	インド	47%
A*24	韓国	40%
A*24	スリランカ	37%
A*24	中国	32%
A*24:02	インド	29%
A*24	オーストラリア西部	22%
A*24	米国	22%
A*24	ロシアサマラ	20%
A*24	南米	20%
A*24	欧州	18%

10

【0136】

本発明のペプチドは、好ましくは、本明細書に記載される本発明のワクチンに含まれる場合、HLA-A*02またはHLA-A*24に結合する。ワクチンはまた、汎結合MHCクラスIIペプチドを含んでもよい。したがって、本発明のワクチンを使用して、A*02陽性の患者においてがんを治療し得る一方で、これらのペプチドの汎結合特性のために、MHCクラスIIアロタイプを選択する必要はない。

20

【0137】

本発明のA*02ペプチドが、例えばA*24などの別の対立遺伝子に結合するペプチドと組み合わせられた場合、MHCクラスI対立遺伝子のいずれか単独による対処と比較して、任意の患者集団のより高い割合を治療し得る。大多数の集団では、対立遺伝子のいずれか単独によって、50%未満の患者が対処され得た一方で、HLA-A*24およびHLA-A*02エピトープを含んでなるワクチンは、任意の妥当な集団で、少なくとも60%の患者を治療し得る。具体的には、以下の様々な地域において、これらの対立遺伝子の少なくとも1つが、以下の百分率の患者で陽性である：米国61%、西欧62%、中国75%、韓国77%、日本86%。(www.alllele frequencies.netから計算された)。

30

【0138】

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

【0139】

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

40

【0140】

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

【0141】

50

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

【0142】

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

【0143】

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

【0144】

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

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

「単離」という用語は、物質が、その元の環境（例えば、それが天然起源であれば天然環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然システムで共存する物質の一部または全部から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得て、および/またはこのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であり得るが、このようなベクターまたは組成物がその天然環境の一部でないという意味では、なおも単離されている。

【0150】

本発明によって開示されるポリヌクレオチド、および組換えまたは免疫原性ポリペプチドは、「精製」形態であってもよい。「精製」という用語は、完全に純粋である必要はなく；むしろ、それは相対的定義であることが意図されて、これらの用語が当業者によって理解されるように、高度に精製された調製物、または部分的にのみ精製された調製物を含

10

20

30

40

50

み得る。例えば、cDNAライブラリーから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一に、従来法で精製されている。少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁までの、出発原料または天然物質の精製が明示的に検討される。さらに、重量基準で、好ましくは99.999%、または少なくとも99.99%または99.9%；さらに望ましくは99%以上の純度を有する、特許請求されるポリペプチドが明示的に包含される。

【0151】

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

10

20

【0152】

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

30

【0153】

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

$$\text{同一性百分率} = 100 [1 - (C/R)]$$

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

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

40

(ii) 参照配列中の各ギャップ、および

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

(iiii) アライメントは、整合配列の1位から開始しなくてはならず；

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

【0154】

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

50

が存在したとしても、比較配列は、参照配列との特定の最小同一性百分率を有する。

【0155】

したがって上述したように、本発明は、配列番号1～配列番号48、または配列番号1～配列番号48と88%相同的であるその変異体、またはT細胞を前記ペプチドと交差反応させるその変異体からなる群から選択される配列を含んでなる、ペプチドを提供する。本発明のペプチドは、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子または前記ペプチドの伸長バージョンをクラスIIに結合する能力を有する。

【0156】

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

10

【0157】

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

20

【0158】

所与のアミノ酸配列の「変異型」によって、本発明者らは、ペプチドが、配列番号1～配列番号48からなる所与のアミノ酸配列からなるペプチドと実質的に同様に、HLA分子となおも結合できるように、(例えば、それらを別の天然アミノ酸残基の側鎖で、またはその他の側鎖で置換することにより)例えば、アミノ酸の1つまたは2つの残基の側鎖が変化することを意味する。例えば、ペプチドは、それがHLA-A*02または-DRなどの適切なMHC分子の結合溝と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、活性化CTLのTCRに結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。

【0159】

これらのT細胞は、引き続いて細胞と交差反応して、本発明の態様で定義される同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を殺滅し得る。学術文献およびデータベース(Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997)から演繹され得るように、HLA結合ペプチドの特定の位置は、典型的に、アンカー残基であり、結合溝を構成するポリペプチド鎖の極性、電気物理的、疎水性、および空間特性によって画定されるHLA受容体の結合モチーフと適合する、コア配列を形成する。したがって、当業者は、既知のアンカー残基を保つことで、配列番号1～配列番号48に記載されるアミノ酸配列を修飾でき、このような変異型がMHCクラスIまたはII分子に結合する能力を維持するかどうかを判定できるであろう。本発明の変異型は、活性化T細胞のTCRに結合する能力を維持し、それは引き続いて、本発明の態様で定義されるような同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞と交差反応して、それを殺滅し得る。

30

40

【0160】

本明細書で開示される元の(未修飾)ペプチドは、特に明記されない場合は、ペプチド鎖内の異なる、おそらくは選択的な部位における、1つまたは複数の残基の置換によって修飾され得る。好ましくはこれらの置換は、アミノ酸鎖の末端に位置する。このような置換は、保存的性質であってもよく、例えば、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸によって置換されるなど、構造および特徴の類似したアミノ酸によってアミノ酸が置換される。さらにより保存的な置換は、ロイシンのイソロイシンによる置換などの、同一または類似サイズおよび化学的性質のアミノ酸の置換である。天然起源相同タンパク質ファミリーの

50

配列多様性の研究では、特定のアミノ酸置換は、他よりも耐容されることが多く、これらは、元のアミノ酸とその置換物との間のサイズ、電荷、極性、および疎水性の類似性との相関を示すことが多く、これが「保存的置換」の定義の基礎である。

【0161】

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

10

【0162】

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

【0163】

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

20

【0164】

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

【0165】

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

30

【0166】

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

40

【0167】

表9：配列番号2、4、および8に記載のHLA-A*02ペプチドの好ましい変種およびモチーフ：

【表 9 - 1】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
配列番号 2	S	M	L	G	E	E	I	Q	L	
変種									V	
									I	
									A	
		L								
		L							V	
		L							I	
		L							A	
		A								
		A							V	
		A							I	
		A							A	
		V								
		V							V	
		V							I	
		V							A	
		T								
		T							V	
		T							I	
	T							A		
	Q									
	Q							V		
	Q							I		
	Q							A		
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
配列番号 4	A	L	L	T	F	V	W	K	L	
変種									V	
									I	
									A	
		M								
		M							V	
		M							I	
		M							A	
		A								
		A							V	
		A							I	
		A							A	
		V								
		V							V	
		V							I	
		V							A	
		T								
		T							V	
		T							I	
	T							A		

【表 9 - 2】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Q							
		Q							V
		Q							I
		Q							A
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号 8	L	L	D	F	S	L	A	D	A
変種									I
									L
									V
		M							
		M							I
		M							L
		M							V
		A							
		A							I
		A							L
		A							V
		V							
		V							I
		V							L
		V							V
		T							
		T							I
		T							L
		T							V
		Q							
	Q							I	
	Q							L	
	Q							V	

10

20

30

【0168】

表10：配列番号25、30、および34に記載のHLA-A*24ペプチドの好ましい変種およびモチーフ：

【表 10】

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
配列番号 25	I	Y	E	P	Y	L	A	M	F		
変種									I		
									L		
		F									
		F							I		
	F							L			
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
配列番号 30	S	Y	S	P	A	H	A	R	L		
変種									I		
									F		
		F									
		F							I		
	F							F			
位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
配列番号 34	A	F	S	P	D	S	H	Y	L	L	F
変種		Y									I
		Y									L
		Y									
											I
											L

10

20

【0169】

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

30

【0170】

本発明のペプチドは、最大4個のアミノ酸によって伸長させ得て、すなわち4：0～0：4の間のあらゆる組み合わせで、どちらかの末端に1、2、3または4個のアミノ酸が付加され得る。本発明による伸長の組み合わせは、表11にある。

【0171】

表11：本発明のペプチドの伸長の組み合わせ

【表 11】

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

40

【0172】

伸長／延長のためのアミノ酸は、元のタンパク質配列のペプチドまたは任意のその他の

50

アミノ酸であり得る。伸長を利用して、ペプチドの安定性または溶解度を高め得る。

【0173】

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

【0174】

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

【0175】

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

【0176】

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

【0177】

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

【0178】

本発明の特に好ましい実施形態では、ペプチドは、配列番号に1~配列番号48に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる。

【0179】

「から本質的になる」は、本発明によるペプチドが、配列番号1~配列番号48のいずれかに記載の配列またはその変異体に加えて、MHC分子エピトープのエピトープとして機能するペプチドの一部を必ずしも構成しない、追加的なNおよび/またはC末端に位置するアミノ酸の一連の配列を含有することを意味するものとする。

【0180】

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

【0181】

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

【0182】

10

20

30

40

50

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

10

【0183】

非ペプチド結合は、例えば、-CH₂-NH、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-である。米国特許第4,897,445号明細書は、標準手順によって合成されるポリペプチド、およびNaCNBH₃の存在下でアミノアルデヒドとアミノ酸を反応させることで合成される非ペプチド結合が關与する、ポリペプチド鎖中の非ペプチド結合(-CH₂-NH)を固相合成する方法を提供する。

【0184】

上述の配列を含んでなるペプチドは、それらのアミノおよび/またはカルボキシ末端に存在する追加的な化学基と共に合成して、ペプチドの安定性、生物学的利用能、および/または親和性を高めてもよい。例えば、カルボベンゾキシル、ダンシル、またはt-ブチルオキシカルボニル基などの疎水性基が、ペプチドのアミノ末端に付加されてもよい。同様に、アセチル基または9-フルオレニルメトキシ-カルボニル基が、ペプチドのアミノ末端に配置されてもよい。さらに、疎水性基、t-ブチルオキシカルボニル、またはアミド基が、ペプチドのカルボキシ末端に付加されてもよい。

20

【0185】

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

30

【0186】

同様に、本発明のペプチドまたは変異体は、ペプチド合成の前または後のどちらかに、特定のアミノ酸を反応させることで化学的に修飾されてもよい。このような修飾の例は、当該技術分野で周知であり、例えば、参照により本明細書に援用される、R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004)に要約される。アミノ酸の化学修飾としては、これに限定されるものではないが(although without limitation thereto)、アシル化、アミジン化、リジンのピリドキシル化、還元アルキル化、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)によるアミノ基のトリニトロベンジル化、システインのシステイン酸への過ギ酸酸化によるカルボキシル基のアミド修飾およびスルフヒドリル修飾、水銀誘導体形成、その他のチオール化合物との混合ジスルフィド形成、マレイミドとの反応、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化、およびアルカリ性pHでのシアネートによるカルバモイル化による修飾が挙げられるが、これに限定されるものではない(is not limited to)。この点において、当業者は、タンパク質の化学修飾に関するより詳細な手順について、Chapter 15 of Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY

40

50

1995-2000) (Coligan et al., 1995) を参照されたい。

【0187】

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

10

【0188】

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

20

【0189】

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

【0190】

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

30

【0191】

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

【0192】

ペプチドが修飾されまたは非ペプチド結合を含む、ペプチドまたは変異体は、本発明の好ましい実施形態である。一般に、ペプチドおよび変異体(少なくともアミノ酸残基間にペプチド結合を含有するもの)は、Lukas et al. (Lukas et al., 1981) によって、そしてその中で引用される参考文献によって開示される、Fmoc-ポリアミド様式の固相ペプチド合成によって合成されてもよい。一時的なN-アミノ基保護は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基によってもたらされる。この高度に塩基不安定性の保護基の反復性切断は、N,N-ジメチルホルムアミド中の20%ピペリジンを使用して実施される。側鎖官能基は、それらのブチルエーテル(セリン、スレオニン、およびチロシンの場合)、ブチルエステル(グルタミン酸およびアスパラギン酸の場合)、ブチルオキシカルボニル誘導体(リジンおよびヒスチジンの場合)、トリチル誘導体(システインの場合)、および4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン誘導体(アルギニンの場合)として保護されてもよい。グルタミンまたはアスパラギンがC末端残基である場合、側鎖アミド官能基を保護するために、4,

40

50

4'-ジメトキシベンズヒドリル基が活用される。固相担体は、ジメチルアクリルアミド（主鎖単量体）、ビスアクリロイルエチレンジアミン（架橋剤）、およびアクリロイルサルコシメチルエステル（機能化因子）の3つの単量体から構成される、ポリジメチルアクリルアミドポリマーをベースとする。使用されるペプチド-対-樹脂の切断可能な結合因子は、酸不安定性4-ヒドロキシメチル-フェノキシ酢酸誘導体である。逆転N,N-ジシクロヘキシル-カルボジイミド/1ヒドロキシベンゾトリアゾール媒介共役手順を使用して付加されるアスパラギンおよびグルタミンを除いて、全てのアミノ酸誘導体は、それらのあらかじめ形成された対称的な無水物誘導体として付加される。全ての共役および脱保護反応は、ニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸またはイサチン(isotinin)試験手順を使用してモニターされる。合成完了時に、ペプチドは樹脂担体から切断され、同時に、50%スカベンジャー混合物を含有する95%トリフルオロ酢酸での処理によって、側鎖保護基が除去される。一般に使用されるスカベンジャーとしては、エタンジチオール、フェノール、アニソール、および水が挙げられ、正確な選択は、合成されるペプチドの構成アミノ酸に左右される。ペプチドの合成のための固相法と溶液相法の組み合わせもまた、可能である(例えば、(Bruckdorfer et al., 2004)、およびその中で引用される参考文献を参照されたい)。

10

【0193】

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

20

【0194】

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

【0195】

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

30

【0196】

過剰提示ペプチドを選択するために、中央値サンプル提示ならびに反復試験変動を示す、提示プロファイルが計算される。プロファイルは、目的腫瘍実体のサンプルを正常なサンプルのベースラインに並置させる。次に、線形混合効果モデルのp値を計算し(Pinheiro et al., 2015)、偽発見率によって複数試験について補正することで(Benjamini and Hochberg, 1995)、これらの各プロファイルが過剰提示スコアに統合され得る(実施例1参照)。

【0197】

質量分析によるHLAリガンドの同定と相対的定量化のために、衝撃凍結サンプルからのHLA分子が精製されて、HLA関連ペプチドが単離された。前立腺特異的抗原に由来するペプチドは、その良性または悪性状態に関わりなく、任意の前立腺組織において同定され得るので、前立腺特異的抗原によってコードされるペプチドを同定する目的で、前立腺がん組織検体に加えて、良性前立腺肥大サンプルもまた分析された。単離ペプチドを分離して、オンラインナノエレクトロスプレーイオン化(nanoESI)液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)実験によって配列を同定した。得られたペプチド配列は、前立腺がんサンプル(N=34 A*02陽性サンプルおよびN=37 A*24陽性サンプル)ならびに追加的な良性前立腺肥大(N=10 A*02陽性サンプルおよびN=3 A*24陽性サンプル)から記録された天然TUMAPのフラグメンテーションパターンと

40

50

、同一配列の対応する合成標準ペプチドのフラグメンテーションパターンとの比較によって確認された。ペプチドは、腫瘍性組織のHLA分子のリガンドとして直接同定されたので、これらの結果は、前立腺腫瘍を有する70人の患者から得られた腫瘍組織上で同定されたペプチドの天然プロセッシングと提示の直接的証拠を提供する。

【0198】

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

10

【0199】

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

【0200】

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

20

【0201】

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

30

【0202】

さらに、発見パイプラインX PRESIDENT（登録商標）v2.xは、がんまたはその他の感染組織上で、MHC拘束性、好ましくはHLA拘束性のペプチドレベルの直接絶対定量化ができるようにする。簡単に述べると、分析された組織サンプルの全DNA含有量から、総細胞数が計算された。組織サンプル中のTUMAPの全ペプチド量は、天然TUMAPと、既知量のTUMAPの同位体標識バージョン、いわゆる内標準との比率として、ナノLC-MS/MSによって測定された。TUMAP単離の効率は、TUMAP単離手順の可能な限り早い時点で、全ての選択されたTUMAPのペプチド：MHC複合体を組織溶解産物に添加して、ペプチド単離手順の完了に続く、ナノLC-MS/MSによるそれらの検出によって判定された。総細胞数および全ペプチド量は、組織サンプル当たり三連の測定から計算された。ペプチド単離効率は、それぞれ三連で測定された、10回の添加実験からの平均として計算された（実施例6を参照されたい）。

40

【0203】

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

【0204】

それにペプチドが由来する、起源遺伝子/タンパク質の多く（「完全長タンパク質」ま

50

たは「基本的タンパク質」とも称される)は、正常組織と比較して、腫瘍において非常に過剰発現されることが示され、本発明との関連で「正常組織」は、起源遺伝子の高度な腫瘍関連性を示す、正常な非前立腺組織細胞を意味するものとする(実施例2を参照されたい)。さらに、ペプチド自体は、腫瘍組織上では強く過剰提示されるが、正常組織上では過剰提示されず、「腫瘍組織」は、本発明との関連で、前立腺腫瘍に罹患している患者に由来するサンプルを意味するものとする(実施例1を参照されたい)。

【0205】

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

【0206】

本発明のペプチドは、T細胞応答を刺激でき、および/または過剰提示されることが示されており、したがって本発明に従って、抗体および/または可溶性TCRなどのTCRの製造のために使用され得る(実施例3、実施例4を参照されたい)。さらに、ペプチドは、それぞれのMHCと複合体化した場合に、本発明による抗体および/またはTCR、特にTCR製造のためにも使用され得る。それぞれの方法は当業者に良く知られており、それぞれの参考文献にもまた見られる。したがって本発明のペプチドは、それによって腫瘍細胞が破壊され得る、患者における免疫応答を生じさせるのに有用である。患者における免疫応答は、理想的には免疫原性を増強する薬剤(すなわちアジュバント)との組み合わせで、記載されるペプチド、または適切な前駆体(例えば伸長ペプチド、タンパク質、またはこれらのペプチドをコードする核酸)を患者に直接投与することで、誘導され得る。本発明の標的ペプチドは、正常非前立腺組織上では同等のコピー数で提示されないので、このような治療的ワクチン接種から生じる免疫応答は、腫瘍細胞に対して高度に特異的であることが予測され得て、患者の正常細胞に対する望まれない自己免疫反応のリスクを防止する。前立腺特異的抗原は、前立腺切除された患者における腫瘍特異的標的に相当することから、前立腺特異的抗原は、前立腺がんのがん免疫療法のための優れた選択肢であってもよい。前立腺切除術を受けていない前立腺がん患者でも、前立腺は重要臓器と見なされないため、このような抗原が興味深くあってもよい。

【0207】

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

【0208】

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

【0209】

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

【0210】

別の態様における説明は、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞または人工抗原提示細胞の表面に発現されるクラスIまたはII MHC分子上に抗原が負荷され、または抗原/クラスIまたはII MHC複合体モノマーを四量体化することで、クラスIまたはII MHC四量体上に抗原が負荷される、本明細書に記載の方法に関する。

【0211】

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

【0212】

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

10

【0213】

本明細書のTCRは、好ましくは、約1 μ M以下、約0.01 μ M以下、約25 μ M以下、または約10 μ M以下の結合親和性(KD)で、発明のペプチド-HLA分子複合体に結合する。より好ましいのは、約1 μ M以下、約100nM以下、約50nM以下、約25nM以下の結合親和性を有する、高親和性TCRである。本発明のTCRの好ましい結合親和性範囲の非限定的例としては、約1nM~約10nM；約10nM~約20nM；約20nM~約30nM；約30nM~約40nM；約40nM~約50nM；約50nM~約60nM；約60nM~約70nM；約70nM~約80nM；約80nM~約90nM；および約90nM~約100nMが挙げられる。

20

【0214】

本明細書の用法では、本明細書のTCRとの関連で、「特異的結合」およびそれらの文法的変種は、発明のペプチド-HLA分子複合体に対して、1 μ M以下の結合親和性(KD)を有するTCRを意味するために使用される。

【0215】

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

30

【0216】

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

40

【0217】

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

【0218】

一実施形態では、鎖に少なくとも1つの変異を有し、および/または鎖に少なくとも1つの変異を有する本明細書のTCRは、非変異TCRと比較して修飾されたグリコシル化を有する。

【0219】

一実施形態では、TCR 鎖および/またはTCR 鎖に少なくとも1つの変異を含ん

50

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

10

【0220】

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

20

【0221】

本明細書は、本明細書に従って TCR を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、その T 細胞がマウス TCR 欠損を補償する多様なヒト TCR レパートリーを発現する、全ヒト TCR 遺伝子遺伝子座 (1.1 および 0.7 Mb) を有する遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを HAVCR1 - 001 で免疫化するステップと、四量体フィコエリトリン (PE) を有する遺伝子組換えマウスから得られた PBM C をインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞選別 (FACS) Calibur 分析によって単離するステップとを含んでなる。

【0222】

一態様では、本明細書の TCR を発現する T 細胞を得るために、本明細書の TCR - および / または TCR - 鎖をコードする核酸が、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの発現ベクターにクローン化される。組換えウイルスが生成され、次に、抗原特異性および機能性結合活性などの機能について試験される。次に、最終生成物のアリコートを使用して、標的 T 細胞集団（一般に患者の PBM C から精製される）が形質導入され、それは患者への輸液前に増殖される。

30

【0223】

別の態様では、本明細書の TCR を発現する T 細胞を得るために、例えば、生体外転写システムなどの当該技術分野で公知の技術によって、TCR RNA が合成される。次に生体外で合成された TCR RNA は、健常ドナーから得られた原発性 CD8 + T 細胞内に電気穿孔によって導入され、腫瘍特異的 TCR - および / または TCR - 鎖が再発現される。

40

【0224】

発現を増加させるために、本明細書の TCR をコードする核酸は、レトロウイルス長末端反復 (LTR)、サイトメガロウイルス (CMV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV) U3、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、 β -アクチン、ユビキチン、およびシミアンウイルス 40 (SV40) / CD43 複合プロモーター、伸長因子 (EF) - 1a、および脾臓フォーカス形成ウイルス (SFFV) プロモーターなどの強力なプロモーターと作動可能に連結されてもよい。好ましい実施形態では、プロモーターは、発現される核酸に対して異種である。

【0225】

50

強力なプロモーターに加えて、本明細書のTCR発現カセットは、レンチウイルスコンストラクトの核転座を促進する、中央ポリプリントラクト(cPPT)(Folienziet al., 2000)、およびRNA安定性を増大させることで導入遺伝子発現のレベルを高める、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子(wPRE)(Zufferey et al., 1999)をはじめとする導入遺伝子発現を高め得る追加的な要素を含有してもよい。

【0226】

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

【0227】

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

【0228】

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

【0229】

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

【0230】

誤対合を減少させるために、本明細書の導入TCR鎖のC末端領域は、鎖間親和性を高める一方で、導入鎖が内因性TCRと対形成する能力を低下させるために、修飾されてもよい。これらの戦略は、ヒトTCR - およびTCR - のC末端領域をそれらのマウス対応物(マウス化C末端領域)で置換する；導入TCRのTCR - およびTCR - 鎖の双方に第2のシステイン残基を導入することで、C末端領域に第2の鎖間ジスルフィド結合を生成する(システイン修飾)；TCR - およびTCR - 鎖C末端領域内の相互作用残基を交換する(「ノブ・イン・ホール」)；そしてTCR - およびTCR - 鎖の可変領域をCD3 に直接融合させる(CD3 融合)を含んでもよい。(Schmitt et al., 2009)。

【0231】

一実施形態では、宿主細胞は、本細書のTCRを発現するように遺伝子操作される。好ましい実施形態では、宿主細胞は、ヒトT細胞またはT細胞前駆細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞またはT細胞前駆細胞は、がん患者から得られる。その他の実施形態では、T細胞またはT細胞前駆細胞は、健常ドナーから得られる。本明細書の宿主細胞は、治療される患者に関して、同種異系または自己由来であり得る。一実施形態では、宿

10

20

30

40

50

主は、 / TCRを発現するように形質転換された / T細胞である。

【0232】

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

【0233】

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

10

【0234】

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

20

【0235】

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

30

40

【0236】

一態様では、ワクチンは、配列番号1～配列番号48に記載されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのペプチドと、少なくとも1つの追加的なペプチド、好ましくは2～50、より好ましくは2～25、なおもより好ましくは2～20、最も好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18個のペプチドとを含んでなる。ペプチドは、1つまたは複数の特異的TAAから誘導されてもよく、MHCクラスI分子に結合してもよい。

【0237】

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

50

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

【0238】

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

10

【0239】

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

【0240】

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

20

【0241】

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

30

【0242】

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

40

【0243】

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

50

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

【0244】

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

【0245】

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

10

【0246】

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

【0247】

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

20

30

【0248】

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

40

【0249】

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

50

れ得て、MHC IとMHC IIの双方が関与する免疫応答を誘導してもよい。

【0250】

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

10

20

【0251】

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

30

【0252】

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

40

【0253】

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

【0254】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞または抗原提示細胞

50

である。前立腺酸性ホスファターゼ (P A P) を含有する組換え融合タンパク質が負荷された A P C は、無症候性または微小症候性転移性 H R P C を治療するために、米国食品医薬品局 (F D A) によって 2 0 1 0 年 4 月 2 0 日に認可された (シプロイセル T) (R i n i e t a l . , 2 0 0 6 ; S m a l l e t a l . , 2 0 0 6) 。

【 0 2 5 5 】

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

【 0 2 5 6 】

別の実施形態では、本発明のペプチド、核酸または発現ベクターは、医療において使用される。例えば、ペプチドまたはその変異体は、静脈内 (i . v .) 注射、皮下 (s . c .) 注射、皮内 (i . d .) 注射、腹腔内 (i . p .) 注射、筋肉内 (i . m .) 注射のために調合されてもよい。ペプチド注射の好ましい方法としては、s . c . 、 i . d . 、 i . p . 、 i . m . 、 および i . v . が挙げられる。DNA注射の好ましい方法としては、i . d . 、 i . m . 、 s . c . 、 i . p . 、 および i . v . が挙げられる。例えば、50 μ g ~ 1 . 5 m g 、好ましくは 1 2 5 μ g ~ 5 0 0 μ g のペプチドまたはDNAの用量が投与されてもよく、それぞれのペプチドまたはDNAに左右される。この範囲の用量は、以前の治験で成功裏に使用された (W a l t e r e t a l . , 2 0 1 2) 。

【 0 2 5 7 】

活性ワクチン接種のために使用されるポリヌクレオチドは、実質的に純粋であってもよく、または適切なベクターまたは送達系に含有されてもよい。核酸は、DNA、cDNA、PNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってもよい。このような核酸をデザインして導入する方法は、当該技術分野で周知である。概説は、例えば、Teufel et al . (Teufel et al . , 2 0 0 5) によって提供される。ポリヌクレオチドワクチンは調製が容易であるが、免疫応答誘導におけるこれらのベクターの作用機序は、完全には分かっていない。適切なベクターおよび送達系としては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、または2つ以上のウイルスの構成要素を含有するハイブリッドベースのシステムなどのウイルスDNAおよび/またはRNAが挙げられる。非ウイルス送達系としては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマーが挙げられ、DNA送達技術分野において周知である。「遺伝子銃」などを通じた物理的送達もまた、使用されてもよい。核酸によってコードされるペプチド (単数) またはペプチド (複数) は、例えば、上述のように、それぞれの逆CDRのT細胞を刺激する、エピトープとの融合タンパク質であってもよい。

【 0 2 5 8 】

本発明の薬剤は、1つまたは複数のアジュバントもまた含んでもよい。アジュバントは、免疫応答 (例えば、CD8陽性T細胞およびヘルパーT (T H) 細胞によって媒介される抗原に対する免疫応答を非特異的に促進または増強する物質であり、したがって本発明の薬剤中で有用であると見なされる。適切なアジュバントとしては、1 0 1 8 I S S 、アルミニウム塩、A M P L I V A X (登録商標) 、 A S 1 5 、 B C G 、 C P - 8 7 0 , 8 9 3 、 C p G 7 9 0 9 、 C y a A 、 d S L I M 、フラジェリンまたはフラジェリン由来 T L R 5 リガンド、F L T 3 リガンド、G M - C S F 、 I C 3 0 、 I C 3 1 、イミキモド (A L D A R A (登録商標)) 、レシキモド、I m u F a c t I M P 3 2 1 、 I L - 2 や L - 1 3 や I L - 2 1 などのインターロイキン、インターフェロン - または - またはそれらのPEG化誘導体、I S パッチ、I S S 、 I S C O M A T R I X 、 I S C O M 、 J u v I m m u n e (登録商標) 、 L i p o V a c 、 M A L P 2 、 M F 5 9 、モノホスホリルリピドA、モンタニド I M S 1 3 1 2 、モンタニド I S A 2 0 6 、モンタニド I S A 5 0 V 、モンタニド I S A - 5 1 、油中水型および水中油型エマルション、O K - 4 3 2 、 O M - 1 7 4 、 O M - 1 9 7 - M P - E C 、 O N T A K 、 O s p A 、 P e p T e l (登録商標) ベクター系、ポリ (ラクチドコグリコリド) [P L G] ベースおよびデキストラン微粒子、タラクトフェリン S R L 1 7 2 、ピロソームおよびその他のウイルス様粒子、Y

10

20

30

40

50

F-17D、VEGFトラップ、R848、 α -グルカン、Pam3Cys、サポニンに由来するAquila's QS21 stimulation、マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁模倣体、およびRibi's DetoxまたはQuilまたはSuperfosなどのその他の独自の補佐剤が挙げられるが、これに限定されるものではない。フロイントまたはGM-CSFなどのアジュバントが好ましい。樹状細胞およびそれらの調製物に対して特異的な、いくつかの免疫学的アジュバント（例えばMF59）が、以前記載されている（Allison and Krummel, 1995）。サイトカインもまた使用されてもよい。数種のサイトカインは、樹状細胞のリンパ組織（例えばTNF- α ）への移動に影響を与えること、Tリンパ球（例えば、GM-CSF、IL-1、およびIL-4）のための効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟を加速すること（その内容全体が参照により本明細書に具体的に援用される、米国特許第5,849,589号明細書）、および免疫増強剤（例えば、IL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN- γ 、IFN- α ）として作用することと、直接関連付けられている（Gabrilovich et al., 1996）。

【0259】

CpG免疫賦活性オリゴヌクレオチドもまた、ワクチン環境において、アジュバント効果を増強することが報告されている。理論により拘束されることなく、CpGオリゴヌクレオチドは、Toll様受容体（TLR）、主にTLR9を通じた、内在的（非適応性）免疫系の活性化によって作用する。CpG誘導性TLR9活性化は、ペプチドまたはタンパク質抗原、生きたまたは死滅ウイルス、樹状細胞ワクチン、自己細胞ワクチン、そして予防的および治療的ワクチンの双方における多糖コンジュゲートをはじめとする多種多様な抗原に対する、抗原特異的体液性および細胞性応答を増強する。より重要なことには、それは樹状細胞の成熟と分化を増強し、CD4⁺T細胞援助の不在下であってさえも、TH1細胞の活性化の促進、および強力な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）生成をもたらす。TLR9刺激によって誘導されるTH1バイアスは、通常はTH2バイアスを促進するミョウバンまたは不完全フロイントアジュバント（IFA）などのワクチンアジュバント存在下であってさえも、維持される。CpGオリゴヌクレオチドは、その他のアジュバントと調合されまたは同時投与された際に、または微粒子、ナノ粒子、脂質エマルションなどの配合物、または類似配合物中で、なおもより高いアジュバント活性を示し、それは、抗原が比較的弱い場合、強力な応答を誘導するのに特に必要である。それらは免疫応答もまた加速し、いくつかの実験では、CpGなしのワクチン総量と同等の抗体応答で、抗原用量のほぼ2桁分の低減を可能にする（Krieg, 2006）。米国特許第6,406,705B1号明細書は、抗原特異的免疫応答を誘導するためのCpGオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバント、および抗原の併用を記載する。CpG TLR9拮抗薬は、本発明の医薬組成物の好ましい構成要素である、Mologen（Berlin, Germany）製のdSLIM（二重ステムループ免疫調節剤）である。RNA結合TLR7、TLR8および/またはTLR9などのその他のTLR結合分子もまた、使用されてもよい。

【0260】

有用なアジュバントその他の例としては、化学修飾CpG（例えば、CpR、Idera）；ポリ（I:C）などのdsRNAアナログおよびそれらの誘導體（例えばAmpligen（登録商標）、Hiltonol（登録商標）、ポリ（ICLC）、ポリ（IC-R）、ポリ（I:C12U）、非CpG細菌DNAまたはRNA；ならびにシクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ（登録商標）、セレブレックス、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ、テモゾロマイド、テムシロリムス、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、VEGF Trap、ZD2171、AZD2171、抗CTLA4などの免疫活性小型分子および抗体；免疫系の重要な構造体を標的にするその他の抗体（例えば、抗CD40、抗TGF- β 、抗TNF受容体）；SC58175が挙げられるが、これに限定されるものではなく、これらは治療的におよび/またはアジュバントとして作用してもよい。本発明の文脈で有用なア

10

20

30

40

50

ジュバントおよび添加剤の量と濃度は、過度の実験を実施することなく、当業者によって容易に判定され得る。

【0261】

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

【0262】

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

10

【0263】

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

20

【0264】

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

30

【0265】

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

40

【0266】

本明細書の用法では、「スキャフォールド」という用語は、(例えば、抗原性)決定因子に特異的に結合する分子を指す。一実施形態では、スキャフォールドはまた、それが付

50

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

10

【0267】

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

20

【0268】

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

【0269】

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

30

【0270】

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

【0271】

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

40

【0272】

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

【0273】

DNAアプタマーは、様々ながん細胞、特に固形腫瘍に由来するものに対して広域スベ

50

クトル認識特性を示す一方で、非腫瘍発生性および主要健常細胞を認識しないように選択され得る。同定されたアプタマーが、特異的腫瘍サブタイプを認識するだけでなく、むしろ一連の腫瘍と相互作用する場合、これは、アプタマーをいわゆる広域スペクトル診断薬および治療薬として応用可能にする。

【0274】

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

【0275】

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

10

【0276】

アプタマーは、細胞 S E L E X (試験管内進化法) 技術を使用して、細胞および組織などの複合体標的に対して、および本発明による配列番号 1 ~ 配列番号 48 のいずれかに記載の配列と M H C 分子とを含んでなり、好ましくはそれからなるペプチド複合体などに対して、選択され得る。

【0277】

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

20

【0278】

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

30

【0279】

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

【0280】

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

40

【0281】

好ましくは、抗体は、20 ナノモル濃度未満、好ましくは 10 ナノモル濃度未満の結合親和性で複合体に結合し、それは本発明の文脈で「特異的」とも見なされる。

50

【0282】

本発明は、配列番号1～配列番号48からなる群から選択される配列、または配列番号1～配列番号48と少なくとも88%相同的な(好ましくは同一の)その変異体を含んでなるペプチド、またはT細胞を前記ペプチドと交差反応させるその変異体に関し、前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

【0283】

本発明は、配列番号1～配列番号48からなる群から選択される配列、または、配列番号1～配列番号48と少なくとも88%相同的な(好ましくは同一の)その変異体を含んでなるペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたは変異体は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14アミノ酸の全長を有する。

10

【0284】

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

【0285】

本発明は、ペプチドが、配列番号1～配列番号48に記載のアミノ酸配列からなり、またはそれから本質的になる、本発明によるペプチドにさらに関する。

【0286】

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

【0287】

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

20

【0288】

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

【0289】

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

【0290】

本発明は、本発明による核酸を発現できる、発現ベクターにさらに関する。

30

【0291】

本発明は、医療、特に前立腺がんの治療で使用するための、本発明によるペプチド、本発明による核酸、または本発明による発現ベクターにさらに関する。

【0292】

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

【0293】

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

40

【0294】

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

【0295】

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

【0296】

本発明は、抗原提示細胞が、配列番号1～配列番号48または前記異アミノ酸配列を含

50

有する、前記ペプチドを発現できる、発現ベクターを含んでなる、本発明による方法にさらに関する。

【0297】

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

【0298】

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

10

【0299】

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

【0300】

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

【0301】

本発明は、発明による使用にさらに関し、前記がん細胞は、好ましくは前立腺がん細胞であり、または肺がん、小細胞肺がん、黒色腫、肝臓がん、乳がん、子宮がん、メルケル細胞がん、膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、CRC、膀胱がん、非小細胞肺がん、腎臓がん、白血病（例えば、AMLまたはCLL）、卵巣がん、食道がん、脳がん、および胃（胃）がん、最も好ましくは前立腺がん細胞などのその他の固形または血液学的腫瘍細胞である。

20

【0302】

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

30

【0303】

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

【0304】

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

40

【0305】

例えば、配列番号1～配列番号48ポリペプチドに記載のペプチドなどの本発明によるペプチドをコードするcDNA；またはその変異体またはフラグメントが、原核細胞（例えば、細菌）または真核細胞（例えば、酵母、昆虫、または哺乳類細胞）で発現され得て

50

、その後、組換えタンパク質が精製されて、本発明による抗体を生成するために使用される、前立腺がんマーカーポリペプチドに特異的に結合する、モノクローナルまたはポリクローナル抗体製剤を生成するために使用され得る。

【0306】

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

10

【0307】

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

20

【0308】

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

30

【0309】

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

【0310】

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

40

【0311】

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

50

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

【0312】

本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含んでなってもよい。非ヒト（例えばマウス）抗体などのヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（抗体のFv、Fab、Fab'またはその他の抗原結合部分配列など）である。ヒト化抗体としては、
10
その中でレシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト生物種（ドナー抗体）のCDRからの残基によって置換される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が挙げられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体または移入CDRまたはフレームワーク配列のどちらにも見いだされない、残基を含んでなってもよい。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つおよび典型的に2つの可変領域の実質的に
20
全てを含んでなり、その中では、CDR領域の全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン共通配列のものである。ヒト化抗体は、至適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部もまた含んでなる。

【0313】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野で周知である。通常、ヒト化抗体は、非ヒト起源から導入された、1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と称され、それは典型的に「移入」可変領域から得られる。ヒト化は、齧歯類CDR（複数）またはCDR（単数）配列を対応するヒト抗体配列によって置換することで、基本的実施され得る。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（米国特許第4,816,567号明細書）であり、その中では、実質的に非損傷ヒト可変領域未満が、非ヒト生物種からの対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的にヒト抗体であり、その中ではいくつかのCDR残
30
基と、おそらくはいくつかのFR残基とが、齧歯類抗体中の類似部位からの残基によって置換される。

【0314】

免疫化に際して、内因性免疫グロブリン生成不在下で、ヒト抗体の完全レパートリーを産生できる遺伝子組換え動物（例えばマウス）を用い得る。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける、抗体重鎖連結領域遺伝子のホモ接合型欠失が、内因性抗体生成の完全阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖細胞系変異マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの転写は、抗原チャレンジに際してヒト抗体の産生をもたらす。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー中でも産生され
40
得る。

【0315】

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

【0316】

10

20

30

40

50

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

【0317】

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

【0318】

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

【0319】

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

【0320】

抗体またはTCRはまた、生体内診断アッセイのために使用されてもよい。通常、抗体は、腫瘍が位置確認され得るように、免疫シンチグラフィ(immunoscintigraphy)を使用して、放射性ヌクレオチド(^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{31}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S など)で標識される。一実施形態では、抗体またはそれらのフラグメントは、上述のタンパク質からなる群から選択されるタンパク質の2つ以上の標的の細胞外ドメインに結合し、親和性(Kd)は $1 \times 10 \mu\text{M}$ 未満である。

【0321】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0322】

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

【0323】

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

20

【0324】

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

【0325】

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

30

【0326】

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

【0327】

抗原提示細胞が、このようなエピトープを発現するために形質移入される場合、好ましくは、細胞は、配列番号1～配列番号48、またはその変異アミノ酸配列を含有するペプチドを発現できる発現ベクターを含んでなる。

40

【0328】

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

50

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

10

【0329】

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

20

【0330】

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

【0331】

上記方法によって製造される活性化T細胞は、配列番号1～配列番号48のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現する細胞を選択的に認識する。

【0332】

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

30

【0333】

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

40

【0334】

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

【0335】

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

50

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

【0336】

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

【0337】

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

10

【0338】

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

【0339】

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

20

【0340】

本発明は、

- (a) 溶液中のまたは凍結乾燥形態の上述の医薬組成物を含有する容器；
 - (b) 任意選択的に、凍結乾燥製剤のための希釈剤または再構成溶液を含有する第2の容器；および
 - (c) 任意選択的に、(i) 溶液の使用、または(ii) 凍結乾燥製剤の再構成および/または使用のための取扱説明書
- を含んでなるキットをさらに目的とする。

30

【0341】

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

【0342】

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

40

【0343】

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

【0344】

50

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

【0345】

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

10

【0346】

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

20

【0347】

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

【0348】

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

30

【0349】

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

【0350】

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

40

【0351】

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

【0352】

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

50

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

10

【0353】

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

20

1. 腫瘍性物質からのHLAリガンドを質量分析法によって同定した
2. ゲノム規模メッセンジャーリボ核酸(mRNA)発現解析を使用して、一連の正常器官および組織と比較して悪性組織(前立腺がん)中の遺伝子過剰発現を同定した
3. 同定されたHLAリガンドを遺伝子発現データと比較した。好ましくは、ステップ2で検出されたような選択的に発現されまたは過剰発現される遺伝子によってコードされる、腫瘍組織上で過剰提示されまたは選択的に提示されるペプチドが、多重ペプチドワクチンのための適切なTUMAP候補と見なされた。
4. 同定されたペプチドのTUMAPとしての妥当性を支持する追加的な証拠を同定するために、文献調査を実施した
5. mRNAレベルでの過剰発現の関連性をステップ3からの選択されたTUMAPの腫瘍組織上における再検出と、健常組織における検出の欠如(またはまれな)検出によって確認した。
6. 選択されたペプチドによる生体内T細胞応答の誘導が可能かどうかを評価するために、健常ドナーならびに前立腺がん患者からのヒトT細胞を使用して、生体外免疫原性アッセイを実施した。

30

【0354】

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

40

【0355】

この方法は、稀ながんに、そして稀な発現プロファイルを有する患者にとって、好ましい。一定組成を有する多重ペプチド混合物とは対照的に、現在開発されている貯蔵庫は、腫瘍における抗原の実際の発現とワクチンとの顕著により高いマッチングを可能にする。多標的アプローチでは、各患者のために、選択された単一のまたは組み合わせられた数種の「既製」ペプチドが利用される。理論上は、例えば50個の抗原性ペプチドのライブラリーからの5個の異なる抗原性ペプチドの選択に基づくアプローチは、それだけでおよそ1

50

700万個の可能な医薬品(DP)組成物をもたらす。

【0356】

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

【0357】

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

10

【0358】

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

20

【0359】

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

30

40

50

いて試験され得て、適切な免疫原性を保持する候補 T U M A P が、ワクチンへの包含のために選択される。

【 0 3 6 0 】

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

10

【 0 3 6 1 】

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

【 0 3 6 2 】

ひとたび個別化ペプチドベースのワクチンのためのペプチドを選択したら、ワクチンを製造する。ワクチンは、好ましくは、約 3 3 % D M S O などの 2 0 ~ 4 0 % D M S O 、好ましくは約 3 0 ~ 3 5 % D M S O に溶解された、個々のペプチドからなる液体製剤である。

20

【 0 3 6 3 】

製品に包含される各ペプチドを D M S O に溶解する。単一ペプチド溶液の濃度は、製品に包含されるペプチド数に応じて選択しなくてはならない。単一ペプチド D M S O 溶液を等量で混合し、ペプチド当たり約 2 . 5 m g / m l の濃度で、製品に包含される全てのペプチドを含有する溶液を得る。次に、混合溶液を注射用水で 1 : 3 に希釈して、3 3 % D M S O 中でペプチド当たり 0 . 8 2 6 m g / m l の濃度を得る。希釈溶液を 0 . 2 2 μ m の無菌フィルターを通して濾過する。最終バルク溶液を得る。

【 0 3 6 4 】

最終バルク溶液をバイアルに充填して、使用時まで - 2 0 で保存する。1本のバイアルは、0 . 5 7 8 m g の各ペプチドを含有する 7 0 0 μ L の溶液を含有する。この内、5 0 0 μ L (ペプチド当たりおよそ 4 0 0 μ g) を皮内注射のために適用する。

30

【 0 3 6 5 】

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

【 0 3 6 6 】

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

40

【 0 3 6 7 】

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

【 0 3 6 8 】

50

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

【0369】

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

【図面の簡単な説明】

【0370】

【図1A】図1A-Cは、正常組織（白色バー）および前立腺がん組織および良性前立腺肥大組織（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。

【図1B】同上

【図1C】同上

【図1D】図1D-Eは、例示的ペプチド（SLLSHQVLL(A*02)（配列番号20）およびSLLSHQVLL(A*24)（配列番号20））が検出された、全ての細胞株、正常組織およびがん組織を示す。図1A) 遺伝子：OR51E2、ペプチド：VTAQIGIVAV(A*02；配列番号1) - 組織左から右：1脂肪組織、3副腎、6動脈、5骨髄、7脳、3乳房、1中枢神経、13結腸、1十二指腸、8食道、2胆嚢、5心臓、16腎臓、21肝臓、46肺、4リンパ節、4白血球サンプル、4卵巣、7膵臓、4末梢神経、1腹膜、3脳下垂体、4胎盤、3胸膜、6直筋、7唾液腺、4骨格筋、6皮膚、2小腸、4脾臓、7胃、4精巣、3胸腺、4甲状腺、10気管、3尿管、6膀胱、2子宮、2静脈、3前立腺、44腫瘍性前立腺。ペプチドは、小細胞肺癌上でも見いだされた（図示せず）。図1B) 遺伝子：MANSC1、ペプチド：KMDEASAQLL(A*02；配列番号14) - 組織左から右：1脂肪組織、3副腎、6動脈、5骨髄、7脳、3乳房、1中枢神経、13結腸、1十二指腸、8食道、2胆嚢、5心臓、16腎臓、21肝臓、46肺、4リンパ節、4白血球サンプル、4卵巣、7膵臓、4末梢神経、1腹膜、3脳下垂体、4胎盤、3胸膜、6直筋、7唾液腺、4骨格筋、6皮膚、2小腸、4脾臓、7胃、4精巣、3胸腺、4甲状腺、10気管、3尿管、6膀胱、2子宮、2静脈、3前立腺、44腫瘍性前立腺。図1C) 遺伝子：TRPM8、ペプチド：SYNDALLTF(A*24；配列番号24) - 組織左から右：2副腎、1動脈、4脳、1乳房、5結腸、1心臓、13腎臓、9肝臓、9肺、3膵臓、1脳下垂体、2直筋、3皮膚、1脾臓、12胃、1胸腺、2子宮、40腫瘍性前立腺。ペプチドは、非小細胞肺癌上でも見いだされた（図示せず）。図1D) 遺伝子：KIAA1244、ペプチド：SLLSHQVLL(A*02；配列番号20) - 組織左から右：1膵臓細胞株、20がん組織（1脳がん、1乳がん、2結腸がん、1食道がん、1腎臓がん、1肝臓がん、3肺がん、8前立腺がん、1胃がん、1膀胱がん）。正常組織のセットはA~Bと同じであったが、ペプチドはいずれの正常組織でも検出されなかった。図1E) 遺伝子：KIAA1244、ペプチド：QYKDFLTL(A*24；配列番号33) - 組織左から右：3良性前立腺肥大組織、3正常組織（1肝臓、1肺、1直腸）、31がん組織（5脳がん、4肝臓がん、15肺がん、7前立腺がん）。正常組織のセットはCと同じであったが、検出のなかった組織は図示されない。

【図1E】同上

【図1F】図1F-Kは、正常組織（白色バー）および前立腺がん組織および良性前立腺肥大組織（黒色バー）における様々なペプチドの過剰提示を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 G】同上

【図 1 H】同上

【図 1 I】同上

【図 1 J】同上

【図 1 K】同上

【図 1 L】図 1 L - S は、様々なペプチドが検出された、全ての細胞株、正常組織、およびがん組織を示す。図 1 F) 遺伝子：NEFH、ペプチド：HLLEDIAHV (A*02 ; 配列番号 3) - 組織左から右：1 脂肪組織、3 副腎、6 動脈、5 骨髄、7 脳、3 乳房、1 中枢神経、1 3 結腸、1 十二指腸、8 食道、2 胆嚢、5 心臓、1 6 腎臓、4 白血球サンプル、2 1 肝臓、4 6 肺、4 リンパ節、3 卵巣、7 膵臓、4 末梢神経、1 腹膜、3 脳下垂体、2 胎盤、3 胸膜、6 直腸、7 唾液腺、4 骨格筋、5 皮膚、2 小腸、4 脾臓、7 胃、4 精巣、3 胸腺、4 甲状腺、9 気管、3 尿管、6 膀胱、2 子宮、2 静脈、3 前立腺、3 3 前立腺がん組織、および 1 0 良性前立腺肥大組織。図 1 G) 遺伝子：PDE11A、ペプチド：ALLESRVNL (A*02 ; 配列番号 6) - 組織左から右：1 脂肪組織、3 副腎、6 動脈、5 骨髄、7 脳、3 乳房、1 中枢神経、1 3 結腸、1 十二指腸、8 食道、2 胆嚢、5 心臓、1 6 腎臓、4 白血球サンプル、2 1 肝臓、4 6 肺、4 リンパ節、3 卵巣、7 膵臓、4 末梢神経、1 腹膜、3 脳下垂体、2 胎盤、3 胸膜、6 直腸、7 唾液腺、4 骨格筋、5 皮膚、2 小腸、4 脾臓、7 胃、4 精巣、3 胸腺、4 甲状腺、9 気管、3 尿管、6 膀胱、2 子宮、2 静脈、3 前立腺、3 3 前立腺がん組織、および 1 0 良性前立腺肥大組織。図 1 H) 遺伝子：KLK4、ペプチド：GYLQGLVSF (A*24 ; 配列番号 27) - 組織左から右：2 副腎、1 動脈、4 脳、1 乳房、5 結腸、1 心臓、1 3 腎臓、9 肝臓、9 肺、3 膵臓、1 脳下垂体、2 直腸、3 皮膚、1 脾臓、1 2 胃、1 胸腺、2 子宮、3 7 前立腺がん組織、および 3 良性前立腺肥大組織。図 1 I) 遺伝子：TGFB3、ペプチド：YYAKEIHKF (A*24 ; 配列番号 28) - 組織左から右：2 副腎、1 動脈、4 脳、1 乳房、5 結腸、1 心臓、1 3 腎臓、9 肝臓、9 肺、3 膵臓、1 脳下垂体、2 直腸、3 皮膚、1 脾臓、1 2 胃、1 胸腺、2 子宮、3 7 前立腺がん組織、および 3 良性前立腺肥大組織。図 1 J) 遺伝子：KLK3、ペプチド：SLFHPEDTGQV (A*02 ; 配列番号 49) - 組織左から右：1 脂肪組織、3 副腎、6 動脈、5 骨髄、7 脳、3 乳房、1 中枢神経、1 3 結腸、1 十二指腸、8 食道、2 胆嚢、5 心臓、1 6 腎臓、4 白血球サンプル、2 1 肝臓、4 6 肺、4 リンパ節、3 卵巣、7 膵臓、4 末梢神経、1 腹膜、3 脳下垂体、2 胎盤、3 胸膜、6 直腸、7 唾液腺、4 骨格筋、5 皮膚、2 小腸、4 脾臓、7 胃、4 精巣、3 胸腺、4 甲状腺、9 気管、3 尿管、6 膀胱、2 子宮、2 静脈、3 前立腺、3 3 前立腺がん組織、および 1 0 良性前立腺肥大組織。図 1 K) 遺伝子：KLK2、ペプチド：AYSEKVFTEF (A*24 ; 配列番号 54) - 組織左から右：2 副腎、1 動脈、4 脳、1 乳房、5 結腸、1 心臓、1 3 腎臓、9 肝臓、9 肺、3 膵臓、1 脳下垂体、2 直腸、3 皮膚、1 脾臓、1 2 胃、1 胸腺、2 子宮、3 7 前立腺がん組織、および 3 良性前立腺肥大組織。図 1 L) 遺伝子：GREB1、ペプチド：SMLGEEIQL (A*02 ; 配列番号 2) - 組織左から右：1 良性前立腺肥大組織 (BPH)、3 細胞株 (3 皮膚)、1 正常組織 (1 子宮)、2 6 がん組織 (2 乳がん、2 肝臓がん、1 肺がん、1 卵巣がん、1 3 前立腺がん、6 皮膚がん、1 子宮がん)。図 1 M) 遺伝子：TRPM8、ペプチド：ALLTFVWKL (A*02 ; 配列番号 4) - 組織左から右：3 良性前立腺肥大組織 (BPH)、1 3 がん組織 (1 脳がん、1 2 前立腺がん)。図 1 N) 遺伝子：TRPM8、ペプチド：KIFSRLLIYI (A*02 ; 配列番号 5) - 組織左から右：4 良性前立腺肥大組織 (BPH)、1 0 がん組織 (1 脳がん、8 前立腺がん、1 皮膚がん)。図 1 O) 遺伝子：MANSC1、ペプチド：KMDEASAQL (A*02 ; 配列番号 16) - 組織左から右：2 1 がん組織 (2 0 前立腺がん、1 膀胱がん)。図 1 P) 遺伝子：Corf132、ペプチド：RYGSPINTF (A*24 ; 配列番号 29) - 組織左から右：4 良性前立腺肥大組織 (BPH)、5 4 がん組織 (1 肝臓がん、2 4 肺がん、2 6 前立腺がん、3 胃がん)。図 1 Q) 遺伝子：ITGA7、ペプチド：AFSPDSHYLLF (A*24 ; 配列番号 34) - 組織左から右：5 良性前立腺肥大組織 (BPH)、4 4 がん組織 (1 0 脳が

10

20

30

40

50

ん、1腎臓がん、4肝臓がん、18肺がん、11前立腺がん)。図1R) 遺伝子: TPSB2、TPSAB1、ペプチド: IYTRVTYYL (A*24; 配列番号35) - 組織左から右: 3良性前立腺肥大組織(BPH)、59がん組織(36肺がん、14前立腺がん、9胃がん)。図1S) 遺伝子: SLC30A4、ペプチド: ALGDLVQSV (A*02; 配列番号52) - 組織左から右: 1良性前立腺肥大組織(BPH)、11がん組織(1リンパ節がん、9前立腺がん、1皮膚がん)。

【図1M】同上

【図1N】同上

【図1O】同上

【図1P】同上

【図1Q】同上

【図1R】同上

【図1S】同上

【図2A】図2A-Eは、正常組織および20前立腺がんサンプルのパネルで、前立腺がんにおいて高度に過剰発現されまたは排他的に発現される本発明の起源遺伝子の例示的発現プロファイル(正常な腎臓と比較した相対発現)を示す。組織左から右: 副腎、動脈、骨髄、脳(全体)、乳房、結腸、食道、心臓、腎臓(三連)、白血球、肝臓、肺、リンパ節、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、膀胱、子宮頸部、子宮、静脈、20前立腺がんサンプル。図2A) NEFH; 図2B) ABC C4; 図2C) RAB3B; 図2D) OR51E2; および図2E) K L K 2。

【図2B】同上

【図2C】同上

【図2D】同上

【図2E】同上

【図3】例示的免疫原性データを示す: ペプチド特異的多量体染色後の: フローサイトメトリー結果。A) TYIGQGYYII (FKBP10; 配列番号42); B) IYTRVTYYL (TPSB2、TPSAB1; 配列番号35)。

【図4-1】図4A-Cは、健常HLA-A*02+ドナーのペプチド特異的生体外CD8+T細胞応答の例示的結果を示す。CD8+T細胞は、それぞれ配列番号1ペプチド(A、左側パネル)、配列番号3ペプチド(B、左側パネル)または配列番号5ペプチド(C、左側パネル)と複合体形成する、抗CD28mAbおよびHLA-A*02で被覆された、人工APCを用いてプライミングされた。3サイクルの刺激後、A*02/配列番号1(A)、A*02/配列番号3(B)またはA*02/配列番号5(C)を用いた2D多量体染色によって、ペプチド反応性細胞の検出を実施した。右パネル(A、B、およびC)は、無関係のA*02/ペプチド複合体で刺激された細胞の対照染色を示す。生存一重細胞は、CD8+リンパ球についてゲートされた。プリアンゲートは、異なるペプチドに対して特異的な多量体によって検出された、擬陽性事象の排除を助けた。CD8+リンパ球の中の特異的な多量体+細胞の頻度が示される。

【図4-2】同上

【図5】図5A-Bは、健常HLA-A*24+ドナーのペプチド特異的生体外CD8+T細胞応答の例示的結果を示す。CD8+T細胞は、それぞれ配列番号24ペプチド(A、左側パネル)または配列番号27ペプチド(B、左側パネル)と複合体形成する、抗CD28mAbおよびHLA-A*24で被覆された、人工APCを用いてプライミングされた。3サイクルの刺激後、ペプチド反応性細胞の検出は、A*24/配列番号24(A)、またはA*24/配列番号27(B)を用いた、2D多量体染色によって実施された。右側パネル(AおよびB)は、無関係のA*24/ペプチド複合体で刺激された細胞の調節染色を示す。生存一重細胞は、CD8+リンパ球についてゲートされた。プリアンゲートは、異なるペプチドに対して特異的な多量体によって検出された、擬陽性事象の排除を助けた。CD8+リンパ球の中の特異的な多量体+細胞の頻度が示される。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0371】

実施例 1

細胞表面に提示される腫瘍関連ペプチドの同定および定量化
組織サンプル

患者の前立腺腫瘍組織は、Asterand (Detroit, USA and Royston, Herts, UK); BioServe (Beltsville, MD, USA); Geneticist Inc. (Glendale, CA, USA); Indivumed GmbH (Hamburg, Germany); Saint Savas Hospital, Athens, Greece, University Hospital of Tübingen から入手された。正常組織は、Asterand (Detroit, USA and Royston, Herts, UK); Bio-Options Inc, CA, USA; BioServe, Beltsville, MD, USA; Capital BioScience Inc, Rockville, MD, USA; Geneticist Inc., Glendale, CA, USA; University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM); Osaka City University (OCU); University Hospital Munich; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, USA; Tissue Solutions Ltd., Glasgow, United Kingdom; University Hospital of Tübingen から入手された。全ての患者の告知に基づく同意書は、外科手術または検死解剖前に得られた。組織は切除の直後に衝撃凍結されて、TUMAPの単離まで -70 未満で保存された。

10

20

30

40

50

【0372】

組織サンプルからのHLAペプチドの単離

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

【0373】

質量分析

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

した。

【0374】

イオン計数によって、すなわち LC - MS 特性の抽出と解析 (Mueller et al., 2007) によって、無標識相対 LC - MS 定量化を実施した。方法は、ペプチドの LC - MS シグナル面積が、サンプル中のその存在量と相関すると仮定する。抽出された特性は、電荷状態デコンボリューションと滞留時間アライメント (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008) によってさらに処理した。最終的に、全ての LC - MS 特性を配列同定結果と相互参照して、異なるサンプルの定量的データと、組織からペプチドへの提示プロファイルとを組み合わせた。定量的データは、技術的および生物学的反復試験内の変動を考慮した中心傾向に従って、二段法で正規化された。このようにして、それぞれの同定されたペプチドが定量的データに関連付けられ得て、サンプルと組織との間の相対定量化ができるようになる。さらに、ペプチド候補について得られた全ての定量的データを手動で検査し、データ整合性を保証して自動解析の確度を確認した。各ペプチドについて提示プロファイルを計算し、平均サンプル提示ならびに反復試験変動を示した。プロファイルは、前立腺がんサンプルおよび良性前立腺肥大サンプルを、正常組織サンプルのベースラインに並置する。例示的過剰提示ペプチドの提示プロファイルは、図 1 に示される。例示的ペプチドの提示スコアは、表 12 および表 13 に示される。

10

【0375】

表12: 提示スコア。表は、正常組織パネルと比較して腫瘍上で非常に高度に過剰提示され(+++)、正常組織パネルと比較して腫瘍上で高度に過剰提示され(++)、正常組織パネルと比較して腫瘍上で過剰提示される(+)、HLA-A*02ペプチドを列挙する。

20

【表 1 2】

配列番号	配列	ペプチド提示
1	VTAQIGIVAV	+++
2	SMLGEEIQL	+++
3	HLLEDIAHV	+++
4	ALLTFVWKL	+++
5	KIFSRLIYI	+++
6	ALLESRVNL	+++
7	TLLQVVGVVSV	+++
8	LLDFSLADA	+++
9	GMLNEAEGKAIKL	++
10	TLWRGPVVV	+++
11	YLEEECPAT	+++
12	SLNEEIAFL	+++
14	KMDEASAQLL	+++
15	KMDEASAQLLA	+++
17	RLGIKPESV	++
18	GLSEFTEYL	+++
19	LLPPPPLLA	+++
20	SLLSHQVLL	+++
21	YLNDSLRHV	+++
22	SLYDSIAFI	+++
23	AVAGADVIITV	+
40	RTFJPTYGL	++

30

40

【0376】

表13: 提示スコア。表は、正常組織パネルと比較して腫瘍上で非常に高度に過剰提示され(+++)、正常組織パネルと比較して腫瘍上で高度に過剰提示され(++)、正常組織パネルと比較して腫瘍上で過剰提示される(+)、HLA-A*24ペプチドを列挙する。

50

【表 1 3】

配列番号	配列	ペプチド提示
24	SYNDALLTF	+++
25	IYEPYLAMF	+
26	RYADDTFTPAF	+++
27	GYLQGLVSF	+++
28	YYAKEIHKF	+++
29	RYGSPINTF	+++
30	SYSPA HARL	+++
31	AYTSPPSFF	+++
32	PYQLNASLFTF	+++
34	AFSPDSHYLLF	+++
35	IYTRVYYL	+++
36	RYMWINQEL	++
37	RYLQDLLAW	+++
38	VYSDKLWIF	++
39	SYIDVAVKL	+
41	RYLQKIEEF	+++
42	TYIGQGYII	+++
43	AYIKNGQLF	+++
44	VYNTVSEGTHF	+
45	RYFKTPRKF	++
46	VYEEILHQI	++
47	SYTPVLNQF	++
48	AWAPKPYHKF	++

10

20

【0377】

実施例 2

本発明のペプチドをコードする遺伝子発現プロファイリング

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

30

【0378】

RNA起源および調製

外科的に除去された組織標本は、告知に基づく同意書が各患者から入手された後に、上述の通り提供された（実施例1を参照されたい）。腫瘍組織標本を手術直後にスナップ凍結し、その後、液体窒素下で乳鉢と乳棒を用いて均質化した。TRI試薬（Ambion, Darmstadt, Germany）を使用して、これらのサンプルから全RNAを調製し、RNeasy（QIAGEN, Hilden, Germany）による精製がそれに続き；どちらの方法も製造業者のプロトコルに従って実施した。

40

【0379】

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

【0380】

全てのRNAサンプルの品質および量は、RNA 6000 Pico Lab Chi

50

pキット (Agilent) を使用して、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Germany) 上で評価した。

【0381】

マイクロアレイ実験

全ての腫瘍および正常組織RNAサンプルの遺伝子発現解析は、Affymetrix Human Genome (HG) U133AまたはHG-U133 Plus 2.0オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) によって実施した。全てのステップは、Affymetrixマニュアルに従って実施した。簡単に述べると、マニュアルに記載されるようにして、SuperScript RTII (Invitrogen) およびオリゴdT-T7プライマー (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) を使用して、5~8 μgの全RNAから二本鎖cDNAを合成した。生体外転写は、U133AアレイのためのBioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, USA) を用いて、またはU133 Plus 2.0のためのGeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) を用いて実施し、cRNA断片化、ハイブリダイゼーション、そしてストレプトアビジン-フィコエリトリンとビオチン化抗ストレプトアビジン抗体 (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) とを用いた染色がそれに続いた。Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) またはAffymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0) で画像をスキャンして、全てのパラメータについてデフォルト設定を使用して、GCOSソフトウェア (Affymetrix) によってデータを解析した。正規化のために、Affymetrixによって提供される100個のハウスキーピング遺伝子を使用した。ソフトウェアによって与えられるシグナルlog比から、相対的発現値を計算し、正常な腎臓サンプルを自由裁量で1.0に設定した。前立腺がんにおいて高度に過剰発現され、または排他的に発現される、本発明の起源遺伝子の例示的発現プロファイルが、図2A~Eに示される。さらなる例示的遺伝子の発現スコアは、表14に示される。

【0382】

表14: 発現スコア。表は、正常組織パネルと比較して腫瘍において非常に高度に過剰発現され(+++)、正常組織パネルと比較して腫瘍において高度に過剰発現され(++)、正常組織パネルと比較して腫瘍において過剰発現される(+)、遺伝子に由来するペプチドを列挙する。

【表14】

配列番号	配列	遺伝子発現
1	VTAQIGIVAV	++
2	SMLGEEIQL	++
3	HLLEDIAHV	+++
4	ALLTFVWKL	+
5	KIFSRLIYI	+
7	TLLQVVGVS	++
11	YLEEECPAT	+
19	LLPPPPLLA	+
24	SYNDALLTF	+
25	IYEPYLAMF	+
26	RYADDTFTPAF	++
28	YYAKEIHKF	+
44	VYNTVSEGTHF	++

【0383】

実施例3

MHCクラスI提示ペプチドの生体外免疫原性

本発明のTUMAPの免疫原性に関する情報を得るために、本発明者らは、ペプチド/MHC複合体および抗CD28抗体を負荷した人工抗原提示細胞(aAPC)によるCD8+T細胞の反復刺激に基づく、生体外T細胞プライミングアッセイを用いて研究を実施した。このようにして、本発明者らは、いくつかの選択されたTUMAPについて、本発明のHLA-A*0201拘束性およびHLA-A*24拘束性TUMAPに対する免疫原性を示し得て、これらのペプチドが、それに対するCD8前駆体T細胞がヒトに存在する、T細胞エピトープであることが実証された(表15A+B)。

【0384】

CD8+T細胞の生体外プライミング

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

【0385】

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

【0386】

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

【0387】

製造会社(Perbio, Bonn, Germany)が推奨する通りにスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミドピオチンを使用して、精製共刺激マウスIgG2a抗ヒトCD28Ab9.3(Jung et al., 1987)を化学的にピオチン化した。使用されたビーズは、直径5.6µmのストレプトアビジン被覆ポリスチレン粒子(Bang Laboratories, Illinois, USA)であった。

【0388】

陽性および陰性対照刺激のために使用されたpMHCは、それぞれ、A*0201/M LA-001(修飾Melan-A/MART-1に由来するペプチドELAGIGILT V(配列番号60))およびA*0201/DDX5-001(DDX5に由来するYLLPAIVHI、配列番号61)であった。

【0389】

4×12.5ngの異なるピオチンpMHCの存在下で、800,000個のビーズ/200µlを96ウェルプレート内で被覆し、洗浄して、引き続いて200µlの容量中で600ngのピオチン抗CD28を添加した。5ng/mlのIL-12(PromoCell)を添加した200µlのTCM中で、1×10⁶のCD8+T細胞を2×10⁵個の洗浄被覆ビーズと、37で3日間にわたり同時インキュベートすることで、96ウェルプレート内で刺激を開始した。次に80U/mlのIL-2を添加した新鮮TCMで培地の半分を交換し、37で4日間にわたり培養を継続した。この刺激サイクルを合

10

20

30

40

50

計3回実施した。条件当たり8種の異なるpMHC分子を使用したpMHC多量体読み取りでは、5種の異なる蛍光色素への共役を包含するわずかな修正を加えて、以前記載されたような(Andersen et al., 2012)二次元コンビナトリアルコーディングアプローチを使用した。最後に、Live/dead近赤外染料(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)、CD8-FITC抗体クローンSK1(BD, Heidelberg, Germany)、および蛍光性pMHC多量体による細胞の染色によって多量体解析を実施した。解析では、適切なレーザーおよびフィルターを装着したBD LSRII-SORP血球計数器を使用した。ペプチド特異的細胞を全CD8+細胞の百分率として計算した。FlowJoソフトウェア(Tree Star, Oregon, USA)を使用して、多量体解析の評価を実施した。特異的多量体+CD8+リンパ球の生体外初回刺激は、陰性対照刺激と比較することで(by by)検出された。1人の健常ドナーの少なくとも1つの評価可能生体外刺激ウェルが、生体外刺激後に、特異的CD8+T細胞株を含有することが判明したら、所与の抗原の免疫原性が検出された(すなわちこのウェルは、CD8+T細胞内に少なくとも1%の特異的多量体+を含有し、特異的多量体+細胞の百分率は、陰性対照刺激の中央値の少なくとも10倍であった)。

10

20

30

40

50

【0390】

前立腺がんペプチドの生体外免疫原性

HLAクラスIペプチドを試験するために、ペプチド特異的T細胞株の生成によって生体外免疫原性が実証され得た。本発明の2種のペプチドの、TUMAP特異的多量体染色後の例示的フローサイトメトリー結果は、対応する陰性対照と共に図3に示される。本発明からの5種のペプチドの結果は、表15Aに要約される。本発明からの6種のペプチドのさらなる結果は、表15Bに要約される。

【0391】

表15A: 本発明のHLAクラスIペプチドの生体外免疫原性

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

【表15A】

配列番号	配列	ウェル	ドナー
17	RLGIKPESV	++	++++
29	RYGSPINTF	+	+++
34	AFSPDSHYLLF	+	+++
35	IYTRVTYYL	++	++++
42	TYIGQGYII	+	++++

【0392】

表15B: 本発明のHLAクラスIペプチドの生体外免疫原性

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

【表15B】

配列番号	配列	ウェル陽性 [%]
1	VTAQIGIVAV	++++
3	HLLEDIAHV	++
5	KIFSRLIYI	+++
6	ALLESRVNL	+
24	SYNDALLTF	+++
27	GYLQGLVSF	++

【0393】

実施例 4

ペプチドの合成

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

【0394】

実施例 5

MHC 結合アッセイ

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

【0395】

96 ウェル MAXI Sorp プレート (NUNC) を PBS 中の $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトアビジンにより室温で一晩被覆して 4 回洗浄し、ブロック緩衝液を含有する 2% BSA 中で 37 °C で 1 時間ブロックした。再折りたたみされた HLA-A*020102:01 / MLA-001 単量体が、 $15 \sim 500 \text{ ng}/\text{ml}$ の範囲をカバーする標準物質の役割を果たした。UV 交換反応のペプチド-MHC 単量体をブロック緩衝液で 100 倍に希釈した。サンプルを 37 °C で 1 時間インキュベートして 4 回洗浄し、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の HRP 共役結合抗 2 m と共に 37 °C で 1 時間インキュベートして再度洗浄し、 NH_2SO_4 で停止させた TMB 溶液で検出した。吸収は、 450 nm で測定された。抗体またはそれらのフラグメント、および / または T 細胞受容体またはそれらのフラグメントの生成および製造のためには、高い交換収率 (好ましくは 50% より高い、最も好ましくは 75% より高い) を示す候補ペプチドが、MHC 分子に対する十分な結合活性を示して MHC 複合体の分離を防止することから、一般に好ましい。

【0396】

表 16A: MHC クラス I 結合スコア

HLA クラス I 拘束性ペプチドと HLA-A*24 との結合は、ペプチド交換収率によって評価された:
 : >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++

10

20

30

【表 1 6 A】

配列番号	配列	ペプチド交換
24	SYNDALLTF	+++
25	IYEPYLAMF	+++
26	RYADDTFTPAF	+++
27	GYLQGLVSF	++++
28	YYAKEIHKF	++++
29	RYGSPINTF	+++
30	SYSPA HARL	+++
31	AYTSPPSFF	+++
32	PYQLNASLTF	++++
33	QYGKDFLTL	+++
34	AFSPDSHYLLF	+++
35	IYTRVTYYL	++
36	RYMWINQEL	+++
41	RYLQKIEEF	+++
42	TYIGQGYII	+++
43	AYIKNGQLF	+++
44	VYNTVSEGTHF	+++
45	RYFKTPRKF	++
47	SYTPVLNQF	++++
48	AWAPKPYHKF	+++
54	AYSEKVTEF	+++
55	LYFEKGEYF	++++
56	LFHPEDTGQVF	++
58	GYIDKVRQL	++
59	IYPDVTYAF	+++

10

20

30

【 0 3 9 7 】

表16B: MHCクラスI結合スコア

HLAクラスI拘束性ペプチドとHLA-A*02との結合は、ペプチド交換収率によって評価された
 : >10% = +; >20% = ++; >50 = +++; > 75% = ++++

40

【表 1 6 B】

配列番号	配列	ペプチド交換
1	VTAQIGIVAV	++++
2	SMLGEEIQL	++++
3	HLLEDIAHV	++++
4	ALLTFVWKL	++++
5	KIFSRLIYI	+++
6	ALLESRVNL	++++
7	TLLQVVGVS	++
9	GMLNEAEGKAIKL	+++
10	TLWRGPVVV	+++
11	YLEEECPAT	++
13	AMAPNHAVV	+++
14	KMDEASAQLL	++
15	KMDEASAQLLA	+++
16	KMDEASAQL	+++
20	SLLSHQVLL	+++
21	YLNDSLRHV	++
22	SLYDSIAFI	++++
49	SLFHPEDTGQV	+++
52	ALGDLVQSV	+++
53	YLLKDKGEYTL	+++

10

20

【 0 3 9 8 】

実施例 6

細胞表面に提示される腫瘍関連ペプチドの絶対定量化

抗体および/または TCR などのバインダーの生成は、骨の折れる工程であり、いくつかの選択された標的に対してのみ実施されてもよい。腫瘍関連および特異的ペプチドの場合、選択基準としては、提示の排他性および細胞表面に提示されるペプチドの密度が挙げられるが、これに限定されない。本明細書に記載されるようなペプチドの単離および相対定量化に加えて、本発明者らは、記載されるように、細胞当たりの絶対ペプチドコピー数を分析した。固形腫瘍サンプル中の細胞当たりの TUMAP コピーの定量化は、単離された TUMAP の絶対定量化、TUMAP 単離の効率、および分析される組織サンプルの細胞計数を必要とする。

30

【 0 3 9 9 】

ナノ LC - MS / MS によるペプチド定量化

質量分析によるペプチドの正確な定量化のために、内標準法を使用して各ペプチドの検量線を作成した。内標準は各ペプチドの二重同位体標識変異体であり、すなわち、2つの同位体標識アミノ酸が TUMAP 合成に含まれた。それは、腫瘍関連ペプチドとはその質量異なるのみであるが、他の物理化学的性質に差異を示さない (Anderson et al., 2012)。内標準を各 MS サンプルに添加して、全ての MS シグナルを内標準の MS シグナルに対して正規化し、MS 実験間の潜在的な技術的変動を平準化した。

40

【 0 4 0 0 】

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

【 0 4 0 1 】

組織サンプルからの腫瘍関連ペプチドの定量化のためには、それぞれのサンプルにも内標準が添加され、MS シグナルが、内標準に対して正規化され、ペプチド検量線を使用し

50

て定量化された。

【0402】

ペプチド/MHC単離の効率

あらゆるタンパク質精製処理と同様に、組織サンプルからのタンパク質の単離には、目的タンパク質のいくらかの損失が伴う。TUMAP単離の効率を判定するために、絶対定量化のために選択された全てのTUMAPについて、ペプチド/MHC複合体を生成した。添加されたものを天然ペプチド/MHC複合体から識別できるように、TUMAPの単一同位体標識バージョンが使用され、すなわち、1つの同位体標識アミノ酸がTUMAP合成に含まれた。これらの複合体は、新鮮に調製された組織溶解産物に、すなわち、TUMAP単離手順の可能な限り早い時点で添加され、次に、以下の親和性精製において、天然ペプチド/MHC複合体のように捕捉された。したがって単一標識TUMAPの回収率を測定することで、個々の天然TUMAPの単離効率に関する結論が可能になる。

10

【0403】

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

【0404】

固体冷凍組織中の細胞数測定

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

20

30

【0405】

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

【0406】

細胞当たりペプチドコピー数

前述の実験のデータを用いて、本発明者らは、サンプルの全ペプチド量を総細胞数で除算して、それに続いて単離効率により除算することで、細胞当たりのTUMAPコピー数を算出した。選択されたペプチドの細胞コピー数は、表17に示される。

40

【0407】

表17: 絶対コピー数。表は、腫瘍サンプル中の絶対ペプチド定量化の結果を列挙する。細胞当たりコピー数の中央値が、各ペプチドについて示される: <100 = +; >=100 = ++; >=1,000 = +++; >=10,000 = ++++。評価可能な高品質MSデータが利用できるサンプル数が示される。

【表 17】

配列番号	ペプチドコード	細胞当たりコピー数 (中央値)	サンプル数
1	OR51E2-001	+	13
2	GREB-001	++	14
3	NEFH-001	++	11
4	TRPM8-002	+++	6
5	TRPM8-003	++	6
6	PDE11-001	+	10
24	TRPM8-004	+++	15
26	RAB3B-001	++	15
27	KLK4-001	++++	16
28	TGFB3-001	+++	16
42	FKBP10-002	++	19
49	KLK3-004	+	15
50	LRRC26-001	++	13
54	KLK2-001	+++	16
55	ACPP-002	+++	15
56	KLK3-005	+++	16
57	FOLH1-005	+++	16

10

20

【 0 4 0 8 】

参考文献一覧

- Adachi, H. et al., *Oncogene* 23 (2004): 3495-3500
- Allison, J. P. et al., *Science* 270 (1995): 932-933
- American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
- Ammendola, M. et al., *Biomed.Res.Int.* 2014 (2014): 154702
- Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* 7 (2012): 891-902
- Andres, S. A. et al., *BMC.Cancer* 13 (2013): 326
- Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* 36 (2006): 1805-1814
- Arentz, G. et al., *Clin Proteomics.* 8 (2011): 16
- Banchereau, J. et al., *Cell* 106 (2001): 271-274
- Bausch, D. et al., *Clin Cancer Res.* 17 (2011): 302-309
- Beatty, G. et al., *J Immunol* 166 (2001): 2276-2282
- Beggs, J. D., *Nature* 275 (1978): 104-109
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, Vol.57 (1995): 289-300
- Bhosle, R. C. et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 346 (2006): 768-777
- Bouameur, J. E. et al., *J Invest Dermatol.* 134 (2014): 885-894
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16 (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bresnick, E. H. et al., *Nucleic Acids Res.* 40 (2012): 5819-5831
- Brossart, P. et al., *Blood* 90 (1997): 1594-1599

30

40

50

- Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004): 29-43
- Card, K. F. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 345-357
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004): 1211-1223
- Chen, L. et al., *Med.Oncol* 30 (2013): 498
- Chong, I. W. et al., *Oncol Rep.* 16 (2006): 981-988
- Clemen, C. S. et al., *Acta Neuropathol.* 129 (2015): 297-315
- Cohen, C. J. et al., *J Mol.Recognit.* 16 (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol.* 170 (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995) 10
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006): 2730-2738
- Davidson, B. et al., *Hum.Pathol.* 45 (2014): 691-700
- Deng, M. et al., *Oncogene* 32 (2013): 4273-4283
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol.* 171 (2003): 2197-2207
- Dubrowskaja, N. et al., *Cancer Med.* (2014)
- Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991): 290-296
- Faucz, F. R. et al., *J Clin Endocrinol.Metab* 96 (2011): E135-E140
- Fawcett, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000): 3702-3707
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001): 8809-8814 20
- Forti, S. et al., *Breast Cancer Res Treat.* 73 (2002): 245-256
- Frattini, V. et al., *Nat Genet.* 45 (2013): 1141-1149
- Fu, C. A. et al., *J Biol.Chem.* 274 (1999): 30729-30737
- Gabrilovich, D. I. et al., *Nat.Med* 2 (1996): 1096-1103
- Gattinoni, L. et al., *Nat.Rev.Immunol.* 6 (2006): 383-393
- Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
- Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997): 905-911
- Graddis, T. J. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 4 (2011): 295-306
- Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual 4th* (2012)
- Greene, M. H. et al., *Endocr.Relat Cancer* 17 (2010): R109-R121 30
- Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual 2nd* (2014)
- Grunewald, T. G. et al., *Biol.Cell* 104 (2012): 641-657
- Gutman, G. A. et al., *Pharmacol.Rev.* 57 (2005): 473-508
- Haferlach, C. et al., *Haematologica* 96 (2011): 829-836
- Hale, L. P. et al., *Clinical Cancer Research* 7 (2001): 846-853
- Hallen, A. et al., *J Neurochem.* 118 (2011): 379-387
- Halpain, S. et al., *Genome Biol.* 7 (2006): 224
- Hanahan, D. et al., *Cell* 100 (2000): 57-70
- Hassan, M. I. et al., *Mol Cancer Res* 6 (2008): 892-906
- Higgins, G. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109 (2012): E3128-E3135 40
- Ho, L. L. et al., *Prostate* 68 (2008): 1421-1429
- Horvath, A. et al., *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 15 (2008): 227-233
- Hu, J. C. et al., *Gene* 251 (2000): 1-8
- Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838
- Hyodo, T. et al., *J Biol.Chem.* 287 (2012): 25019-25029
- Ito, S. et al., *Head Neck* 32 (2010a): 96-103
- Ito, Y. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 107 (2010b): 10538-10542
- Jiao, X. et al., *BMC.Genomics* 14 (2013): 165
- Jin, Y. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 110 (2013): E2572-E2581
- Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611-4615 50

- Kai, F. et al., *Oncotarget*. 6 (2015): 11162-11174
- Kandimalla, R. et al., *Eur.Urol*. 61 (2012): 1245-1256
- Katada, K. et al., *J Proteomics*. 75 (2012): 1803-1815
- Katoh, Y. et al., *Cancer Biol.Ther*. 4 (2005): 1050-1054
- Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients rd* (2000)
- Kibel, A. S. et al., *Int.J Cancer* 109 (2004): 668-672
- Kinameri, E. et al., *PLoS.ONE*. 3 (2008): e3859
- Klejnot, M. et al., *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr*. 68 (2012): 154-159
- Krieg, A. M., *Nat.Rev.Drug Discov*. 5 (2006): 471-484
- Lapointe, J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (2004): 811-816 10
- Laviolette, L. A. et al., *Int.J Cancer* 135 (2014): 1072-1084
- Lee, K. Y. et al., *J Med*. 35 (2004): 141-149
- Li, Y. W. et al., *PLoS.ONE*. 9 (2014): e87505
- Li, Z. J. et al., *Development* 139 (2012): 4152-4161
- Liddy, N. et al., *Nat.Med*. 18 (2012): 980-987
- Liu, P. et al., *Science* 261 (1993): 1041-1044
- Liu, Y. H. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun*. 404 (2011): 488-493
- Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med* 162 (1985): 1745-1759
- Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci*. 690 (1993): 276-291
- Lue, H. W. et al., *PLoS.ONE*. 6 (2011): e27720 20
- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
- Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification 3rd* (2004)
- Ma, Y. et al., *Mol Cell Proteomics*. 8 (2009): 1878-1890
- Malinowska, K. et al., *Prostate* 69 (2009): 1109-1118
- Matsumoto, F. et al., *Hum.Pathol*. 37 (2006): 1592-1600
- Matsuoka, R. et al., *Am.J Med.Genet*. 46 (1993): 61-67
- Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237
- Midorikawa, Y. et al., *Jpn.J Cancer Res*. 93 (2002): 636-643
- Montani, M. et al., *Virchows Arch*. 462 (2013): 437-443
- Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006): 126-129 30
- Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027
- Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res*. 12 (2006): 3435-3443
- Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res*. 7 (2008): 51-61
- Mueller, L. N. et al., *Proteomics*. 7 (2007): 3470-3480
- Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999): 8633-8638
- Nicke, B. et al., *Mol.Cell* 20 (2005): 673-685
- Nishibe, R. et al., *FEBS Lett*. 587 (2013): 1529-1535
- Nishidate, T. et al., *Int.J Oncol* 25 (2004): 797-819
- Noetzel, E. et al., *Oncogene* 29 (2010): 4814-4825
- Olesen, S. H. et al., *Mol Cell Proteomics*. 4 (2005): 534-544 40
- Peters, I. et al., *Target Oncol* (2014)
- Petrella, B. L. et al., *Cancer Lett*. 325 (2012): 220-226
- Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>)* (2015)
- Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787
- Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
- Prevarskaya, N. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1772 (2007): 937-946
- Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol* 33 (2015): 245-260
- Quinn, M. C. et al., *Int.J Oncol* 42 (2013): 912-920
- Rae, J. M. et al., *Prostate* 66 (2006): 886-894 50

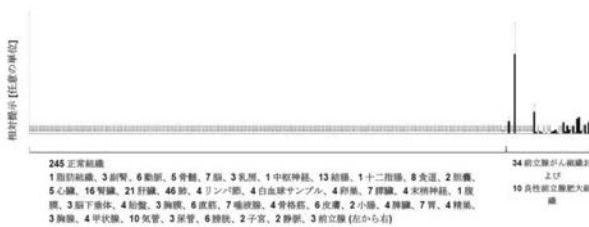
- Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219
- RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>
- Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006): 67-74
- Rizzardi, A. E. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014): 244
- Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990): 918-921
- Rotondo, F. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 17 (2009): 185-188
- Russel, F. G. et al., *Trends Pharmacol.Sci.* 29 (2008): 200-207
- S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 043/0220L, (2014)
- Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988): 487-491 10
- Sakai, T. et al., *J Pharmacol.Sci.* 98 (2005): 41-48
- Schmitt, M. et al., *Radiol.Oncol.* 47 (2013): 319-329
- Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999): 571-576
- SEER Stat facts, (2014), <http://seer.cancer.gov/>
- Severi, G. et al., *Cancer Med.* 3 (2014): 1266-1274
- Shaheduzzaman, S. et al., *Cancer Biol.Ther* 6 (2007): 1088-1095
- Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
- Shkoda, A. et al., *PLoS.Biol.* 10 (2012): e1001376
- Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 187-195 20
- Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006): 3089-3094
- Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* 9 (2008): 163
- Sudhof, T. C., *Neuron* 75 (2012): 11-25
- Sun, Z. et al., *J Proteome.Res* 13 (2014): 1593-1601
- Tan, L. Z. et al., *Am.J Pathol.* 183 (2013): 831-840
- Tan, P. Y. et al., *Mol.Cell Biol.* 32 (2012): 399-414
- Teufel, R. et al., *Cell Mol.Life Sci.* 62 (2005): 1755-1762
- Tran, E. et al., *Science* 344 (2014): 641-645
- Tsavalier, L. et al., *Cancer Research* 61 (2001): 3760-3769
- UniProt, (2015), <http://www.uniprot.org/> 30
- Walter, S. et al., *J.Immunol.* 171 (2003): 4974-4978
- Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 1254-1261
- Wang, J. et al., *Arch.Pharm.Res* 34 (2011): 987-995
- Wang, L. et al., *Cancer Research* 70 (2010): 5818-5828
- Wang, R. J. et al., *Asian Pac.J Cancer Prev.* 15 (2014): 7223-7228
- Wang, Y. et al., *Hum.Mol.Genet.* 21 (2012): 569-576
- Wang, Z. et al., *Med.Oncol* 32 (2015): 87
- Ward, P. P. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 2540-2548
- Weng, J. et al., *Int.J Cancer* 113 (2005): 811-818
- Westdorp, H. et al., *Front Immunol.* 5 (2014): 191 40
- Whiteland, H. et al., *Clin Exp.Metastasis* 31 (2014): 909-920
- Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999): 2418-2423
- Willoughby, V. et al., *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 16 (2008): 344-348
- Wilson, P. M. et al., *J Neurosci.* 30 (2010): 8529-8540
- World Cancer Report, (2014)
- Wu, J. P. et al., *Asian J Androl* 16 (2014): 710-714
- Yamamoto, G. L. et al., *J Med.Genet.* 52 (2015): 413-421
- Yang, Z. et al., *J Virool.* 81 (2007): 6294-6306
- Ye, Q. et al., *PLoS.ONE.* 9 (2014): e103298
- Yin, J. et al., *Mol.Med.Rep.* 8 (2013): 1630-1634 50

Yu, Y. P. et al., Urology 68 (2006): 578-582
 Zaremba, S. et al., Cancer Res. 57 (1997): 4570-4577
 Zhang, G. et al., Oncol Rep. (2014)
 Zhao, X. et al., Onco.Targets.Ther 7 (2014): 343-351

【 図 1 A 】

図1A

ペプチド: VTAQIGIVAV (A*02)
配列番号: 1



【 図 1 B 】

図1B

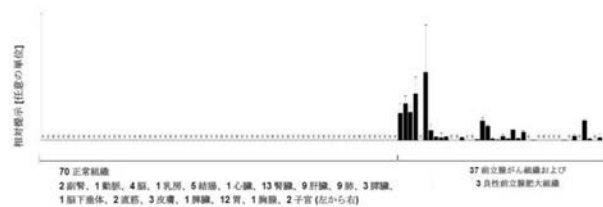
ペプチド: KMDEASAQLL (A*02)
配列番号: 14



【 図 1 C 】

図1C

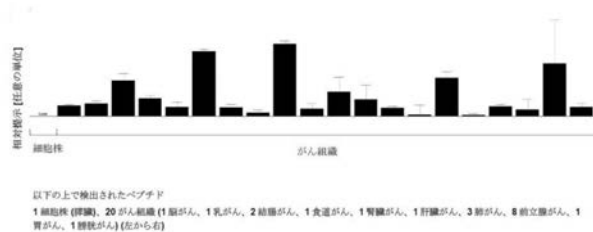
ペプチド: SYNDALLTF (A*24)
配列番号: 24



【 図 1 D 】

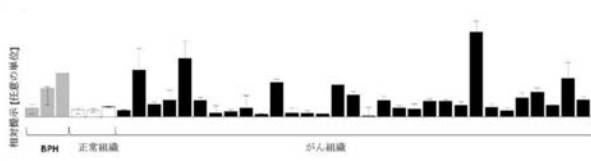
図1D

ペプチド: SLLSHQVLL (A*02)
配列番号: 20



【 図 1 E 】

図1E
ペプチド: QYGKDFLL (A*24)
配列番号: 33



以下の上で検出されたペプチド
3 良性前立腺肥大組織 (BPH), 3 正常組織 (1 肝臓, 1 脾, 1 直腸), 31 がん組織 (5 脳がん, 4 肝臓がん, 15 肺がん, 7 前立腺がん) (左から右)

【 図 1 F 】

図1F
ペプチド: HLLEDIAHV (A*02)
配列番号: 3



240 正常組織
1 脳脊髄液, 3 脳脊髄, 6 脳筋, 5 骨髄, 7 脳, 3 乳房, 1 中脳神経, 13 結核, 1 十二指腸, 8 食道, 2 胆嚢, 5 心臓, 16 腎臓, 4 白血球サンプル, 21 肝臓, 46 脾, 4 リンパ節, 3 脾臓, 7 脾臓, 4 末梢神経, 1 腹膜, 3 脳下垂体, 2 胎盤, 3 胸腺, 6 直腸, 7 唾液腺, 4 骨格筋, 5 皮膚, 2 小腸, 4 脾臓, 7 胃, 4 精巣, 3 胸腺, 4 甲状腺, 9 気管, 3 尿管, 6 膀胱, 2 子宮, 2 膀胱, 3 前立腺 (左から右)

【 図 1 I 】

図1I
ペプチド: YYAKEIHKF (A*24)
配列番号: 28



70 正常組織
2 脳脊髄, 1 脳筋, 4 脳, 1 乳房, 5 結核, 1 心臓, 13 腎臓, 9 肝臓, 9 脾, 3 脾臓, 1 脳下垂体, 2 直腸, 3 皮膚, 1 脾臓, 12 胃, 1 胸腺, 2 子宮 (左から右)

【 図 1 J 】

図1J
ペプチド: SLFHPEDTGQV (A*02)
配列番号: 49



240 正常組織
1 脳脊髄液, 3 脳脊髄, 6 脳筋, 5 骨髄, 7 脳, 3 乳房, 1 中脳神経, 13 結核, 1 十二指腸, 8 食道, 2 胆嚢, 5 心臓, 16 腎臓, 4 白血球サンプル, 21 肝臓, 46 脾, 4 リンパ節, 3 脾臓, 7 脾臓, 4 末梢神経, 1 腹膜, 3 脳下垂体, 2 胎盤, 3 胸腺, 6 直腸, 7 唾液腺, 4 骨格筋, 5 皮膚, 2 小腸, 4 脾臓, 7 胃, 4 精巣, 3 胸腺, 4 甲状腺, 9 気管, 3 尿管, 6 膀胱, 2 子宮, 2 膀胱, 3 前立腺 (左から右)

【 図 1 G 】

図1G
ペプチド: ALLESRVNL (A*02)
配列番号: 6



240 正常組織
1 脳脊髄液, 3 脳脊髄, 6 脳筋, 5 骨髄, 7 脳, 3 乳房, 1 中脳神経, 13 結核, 1 十二指腸, 8 食道, 2 胆嚢, 5 心臓, 16 腎臓, 4 白血球サンプル, 21 肝臓, 46 脾, 4 リンパ節, 3 脾臓, 7 脾臓, 4 末梢神経, 1 腹膜, 3 脳下垂体, 2 胎盤, 3 胸腺, 6 直腸, 7 唾液腺, 4 骨格筋, 5 皮膚, 2 小腸, 4 脾臓, 7 胃, 4 精巣, 3 胸腺, 4 甲状腺, 9 気管, 3 尿管, 6 膀胱, 2 子宮, 2 膀胱, 3 前立腺 (左から右)

【 図 1 H 】

図1H
ペプチド: GYLQGLVSF (A*24)
配列番号: 27



70 正常組織
2 脳脊髄, 1 脳筋, 4 脳, 1 乳房, 5 結核, 1 心臓, 13 腎臓, 9 肝臓, 9 脾, 3 脾臓, 1 脳下垂体, 2 直腸, 3 皮膚, 1 脾臓, 12 胃, 1 胸腺, 2 子宮 (左から右)

【 図 1 K 】

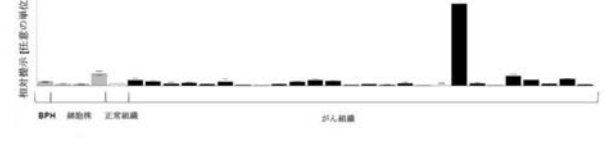
図1K
ペプチド: AYSEKVTFF (A*24)
配列番号: 54



70 正常組織
2 脳脊髄, 1 脳筋, 4 脳, 1 乳房, 5 結核, 1 心臓, 13 腎臓, 9 肝臓, 9 脾, 3 脾臓, 1 脳下垂体, 2 直腸, 3 皮膚, 1 脾臓, 12 胃, 1 胸腺, 2 子宮 (左から右)

【 図 1 L 】

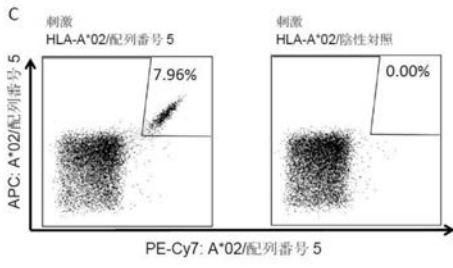
図1L
ペプチド: SMLGEEIQL (A*02)
配列番号: 2



以下の上で検出されたペプチド
1 良性前立腺肥大組織 (BPH), 3 脳筋 (3 皮膚), 1 正常組織 (1 子宮), 26 がん組織 (2 乳がん, 2 肺がん, 1 脾がん, 1 肺腺がん, 13 前立腺がん, 6 皮膚がん, 1 子宮がん) (左から右)

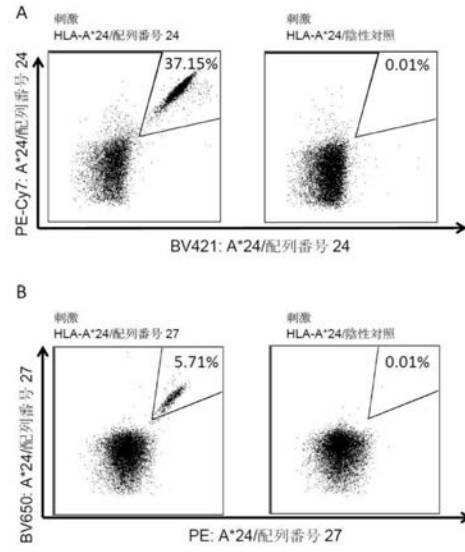
【 図 4 - 2 】

図4 (続き)



【 図 5 】

図5



【 配列表 】

2018529320000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/068727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 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) C07K A61K		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/079878 A2 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]; WEINSCHENK TONI [DE]; LEWANDROWSKI) 21 June 2012 (2012-06-21) paragraphs [0094], [0158], [0161], [0183]	4-6, 12-20, 30-39
A	----- SATOKO MATSUEDA ET AL: "Identification of Prostate-Specific G-Protein Coupled Receptor as a Tumor Antigen Recognized by CD8+ T Cells for Cancer Immunotherapy", PLOS ONE, vol. 7, no. 9, 20 September 2012 (2012-09-20), page e45756, XP055312427, DOI: 10.1371/journal.pone.0045756 page 8, left-hand column - right-hand column; table 1 ----- -/--	4-6, 12-20, 30-39
<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 16 March 2017		Date of mailing of the international search report 24/03/2017
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 Fuhr, Christian

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/068727

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 01/34802 A2 (CORIXA CORP [US]; XU JIANGCHUN [US]; DILLON DAVIN C [US]; MITCHAM JENN) 17 May 2001 (2001-05-17) page 22, line 18; compound P790P; sequence 527 -----	1-3,7-11
X	WO 01/74904 A2 (CURAGEN CORP [US]; MAJUMDER KUMUD [US]; VERNET CORINE A M [US]; CASMAN) 11 October 2001 (2001-10-11) table 8M; sequence 65 -----	1-3,7-11
X	WO 2011/119484 A1 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 29 September 2011 (2011-09-29) sequences 1116764,1393026,311538,1124277 -----	1,2,4,10
X	WO 2013/040142 A2 (IOGENETICS LLC [US]; BREMEL ROBERT D [US]; HOMAN JANE [US]) 21 March 2013 (2013-03-21) sequences 1116764,1393026,311538,1124277 -----	1,2,4,10
X	WO 2007/053570 A2 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV [BE]; QIN NING [US]; FLORES CHRISTOPHER M [US]) 10 May 2007 (2007-05-10) page 6, line 22 - page 7, line 19; claims 7-18; sequence 9 -----	1-4,7-11
X,P	WO 2016/107740 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 7 July 2016 (2016-07-07) the whole document -----	1-38
X	US 2004/172684 A1 (KOVALIC DAVID K [US] ET AL) 2 September 2004 (2004-09-02) sequence 41461 -----	1,2
X	WO 2006/092175 A1 (ALTANA PHARMA AG [DE]; SCHULTZ JOACHIM [DE]; GROSS-LANGENHOFF MARCO [D]) 8 September 2006 (2006-09-08) sequence 10 -----	1,2
X	EP 1 862 804 A1 (LINK GENOMICS INC [JP]; UNIV OSAKA [JP]; PCA INTERMED INC [JP]) 5 December 2007 (2007-12-05) paragraph [0001]; sequence 25 -----	18,19
X	WO 2010/037395 A2 (DAKO DENMARK AS [DK]; BRIX LISELOTTE [DK]; SCHOELLER JOERGEN [DK]; PED) 8 April 2010 (2010-04-08) page 837, line 21 - line 26; sequence 3364 -----	18,19
X	US 2003/219738 A1 (CHALLITA-EID PIA M [US] ET AL) 27 November 2003 (2003-11-27) paragraph [0411] - paragraph [0414]; table VII; sequence 101 -----	18,19

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2016/068727**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.:
1-20, 30-39(all partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP2016/ 068727

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-20, 30-39(all partially)

peptide comprising an amino acid sequence as disclosed in SEQ ID No 1 or at least 88 % homologous thereof, the nucleic acid encoding said peptide, the expression vector for expressing the nucleic acid, the host cell comprising the peptide, the nucleic acid or the expression vector, medical uses of said compounds, methods of producing said compounds, methods of producing T lymphocytes using said compounds, antibodies against said peptides, kit comprising any of said compounds.

T-cell receptors binding to ligand, wherein the ligand is a peptide having sequence of SEQ ID No 1, or has 75 % homology thereto, nucleic acid, vector, cell and methods employing said T-cell receptor.

aptamer to a compound as describe above and pharmaceutical compositions comprising any of said compounds

2-48. claims: 1-20, 30-39(all partially)

peptide comprising an amino acid sequence as disclosed in SEQ ID No 2-48 or at least 88 % homologous thereof, the nucleic acid encoding said peptide, the expression vector for expressing the nucleic acid, the host cell comprising the peptide, the nucleic acid or the expression vector, medical uses of said compounds, methods of producing said compounds, methods of producing T lymphocytes using said compounds, antibodies against said peptides, kit comprising any of said compounds.

T-cell receptors binding to ligand, wherein the ligand is a peptide having sequence of SEQ ID No 1, or has 75 % homology thereto, nucleic acid, vector, cell and methods employing said T-cell receptor.

aptamer to a compound as describe above and pharmaceutical compositions comprising any of said compounds

49. claims: 21-29

A method of producing a personal anti-cancer vaccine using peptides different to those of SEQ ID Nos 1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/068727

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012079878 A2	21-06-2012	AU 2011344652 A1	23-05-2013
		CA 2821582 A1	21-06-2012
		CN 103547283 A	29-01-2014
		JP 6032853 B2	30-11-2016
		JP 2014502961 A	06-02-2014
		KR 20130126671 A	20-11-2013
		NZ 609916 A	27-03-2015
		SG 191154 A1	31-07-2013
		WO 2012079878 A2	21-06-2012
WO 0134802 A2	17-05-2001	AU 1656501 A	06-06-2001
		CA 2391369 A1	17-05-2001
		EP 1230364 A2	14-08-2002
		JP 2004537252 A	16-12-2004
		WO 0134802 A2	17-05-2001
WO 0174904 A2	11-10-2001	CA 2404541 A1	11-10-2001
		EP 1274844 A2	15-01-2003
		JP 2003534779 A	25-11-2003
		WO 0174904 A2	11-10-2001
WO 2011119484 A1	29-09-2011	EP 2550529 A1	30-01-2013
		US 2013330335 A1	12-12-2013
		WO 2011119484 A1	29-09-2011
WO 2013040142 A2	21-03-2013	EP 2771349 A2	03-09-2014
		WO 2013040142 A2	21-03-2013
WO 2007053570 A2	10-05-2007	AU 2006308863 A1	10-05-2007
		CN 101351473 A	21-01-2009
		EP 1948687 A2	30-07-2008
		JP 2009514529 A	09-04-2009
		US 2007105155 A1	10-05-2007
WO 2016107740 A1	07-07-2016	TW 201631320 A	01-09-2016
		US 2016187351 A1	30-06-2016
		WO 2016107740 A1	07-07-2016
US 2004172684 A1	02-09-2004	NONE	
WO 2006092175 A1	08-09-2006	AU 2005328605 A1	08-09-2006
		CA 2598593 A1	08-09-2006
		EP 1856254 A1	21-11-2007
		JP 2008531025 A	14-08-2008
		KR 20070107783 A	07-11-2007
		US 2009298108 A1	03-12-2009
		WO 2006092175 A1	08-09-2006
EP 1862804 A1	05-12-2007	EP 1862804 A1	05-12-2007
		US 2009130662 A1	21-05-2009
		WO 2006098464 A1	21-09-2006
WO 2010037395 A2	08-04-2010	EP 2337795 A2	29-06-2011
		US 2011318380 A1	29-12-2011
		WO 2010037395 A2	08-04-2010
US 2003219738 A1	27-11-2003	AU 2002246708 A1	12-08-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/068727

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 7510840 B1	31-03-2009
		US 2003219738 A1	27-11-2003
		WO 02060953 A2	08-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 7
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 38/08 (2006.01)	A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	N
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	T
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D

(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, RO, 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, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (72)発明者 メア, アンドレア
ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, キルシェンヴェーク 2 2
- (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 スホール, オリバー
ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, アイヒハルデンシュトラーセ 1 9
- (72)発明者 フリッチェ, イェンス
ドイツ, 7 2 1 4 4 ドゥスリンゲン, レルヒエンヴェーク 1 1
- (72)発明者 シン, ハープリート
アメリカ, 7 7 0 0 5 ヒューストン, 5 1 2 2 モーニングサイド ディーアール, エーピーテ
ィー. 5 2 5
- (72)発明者 ミュラー, フィリップ
ドイツ, 3 4 1 1 7 カッセル, オーベレ カールスシュトラーセ 1 4
- (72)発明者 ライボルト, ユリア
オーストリア, 6 2 5 0 クントル, アウシュトラーセ 8
- (72)発明者 ゴールドフィンゲル, ヴァレンティーナ
ドイツ, 7 2 0 7 2 テュービンゲン, マリーエンブルガー シュトラーセ 9

Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24

4B065	AA90X	AB01	AC14	BA02	CA24	CA25	CA44	CA45	CA46	
4C076	AA11	AA16	AA30	CC27	CC29	GG06				
4C084	AA02	AA03	AA13	BA01	BA02	BA08	BA17	BA23	BA41	MA17
	MA44	NA14	ZB26							
4C085	AA03	AA13	AA14	DD84	DD90	EE01				
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	MA17	MA44	NA14	ZB26	
4C087	AA01	AA02	CA12	CA20	MA17	MA44	NA14	ZB26		
4H045	AA10	AA20	AA30	BA10	BA41	CA40	DA75	DA76	EA20	EA31
	EA50	FA33	FA58	FA74	GA21					

专利名称(译)	新型肽和肽的组合用于针对前列腺癌和其他癌症的免疫疗法		
公开(公告)号	JP2018529320A	公开(公告)日	2018-10-11
申请号	JP2018505723	申请日	2016-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	伊玛提克斯生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Imatikusu生物技术有限公司		
[标]发明人	メアアンドレア ヴァインシエンクトニ スホールオリバー フリッチェイエンス シンハープリート ミュラーフィリップ ライボルトユリア ゴールドフィンゲルヴァレンティーナ		
发明人	メア,アンドレア ヴァインシエンク,トニ スホール,オリバー フリッチェ,イエンス シン,ハープリート ミュラー,フィリップ ライボルト,ユリア ゴールドフィンゲル,ヴァレンティーナ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/13 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/115 C07K19/00 C07K16/18 C12P21/02 C12N5/10 C12N5/0783 A61P35/00 A61K38/08 A61K31/7088 A61K48/00 A61K35/76 A61K35/12 A61K35/17 A61K39/395 A61K9/08 A61K9/10 A61K9/19 A61K39/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/0011 A61P35/00 C07K14/4748 C07K14/7051 C07K2319/00 C12N15/115 C12N2310/16 G01N33/57407 A61K35/17 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/30 C07K2317/34 C12N5/0636 G01N33/574 G01N33/6848 A61K2039/5158 A61K2039/572 C07K14/47 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/5748 G01N2570/00 G01N2800/52		
FI分类号	C12N15/09.ZNA.Z C12N15/13 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N15/115.Z C07K19/00 C07K16/18 C12P21/02.C C12N5/10 C12N5/0783 A61P35/00 A61K38/08 A61K31/7088 A61K48/00 A61K35/76 A61K35/12 A61K35/17.A A61K39/395.E A61K39/395.N A61K39/395.T A61K9/08 A61K9/10 A61K9/19 A61K39/00.H G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C076/AA11 4C076/AA16 4C076/AA30 4C076/CC27 4C076/CC29 4C076/GG06 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/MA17 4C084/MA44 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD84 4C085/DD90 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA44 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/CA12 4C087/CA20 4C087/MA17 4C087/MA44 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA58 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	62/201289 2015-08-05 US		

其他公开文献

JP2018529320A5

外部链接

Espacenet

摘要(译)

本发明涉及用于免疫疗法的肽，蛋白质，核酸和细胞。特别地，本发明涉及癌症免疫疗法。本发明进一步涉及单独或与其他肿瘤相关肽组合的肿瘤相关T细胞肽表位，其例如在体外对患者刺激抗肿瘤免疫应答或刺激T细胞。可以用作疫苗组合物的活性药物成分。与主要组织相容性复合物 (MHC) 的分子结合的肽或这些肽本身也可以成为抗体，可溶性T细胞受体和其他结合分子的靶标。

(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2018-529320 (P2018-529320A)
	(43) 公表日	平成30年10月11日 (2018. 10. 11)
(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/09	Z N A Z 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006. 01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/115 (2010. 01)	C 1 2 N 15/115	Z 4 C 0 8 5
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-505723 (P2018-505723)	(71) 出願人 506258073
(86) (22) 出願日	平成28年8月5日 (2016. 8. 5)	イマテイクス バイオテクノロジーズ
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月2日 (2018. 2. 2)	ーエムペーハー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/068727	ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, パ
(87) 国際公開番号	W02017/021527	ウルーエンリヒェンシュトラーセ 1 5
(87) 国際公開日	平成29年2月9日 (2017. 2. 9)	(74) 代理人 100088904
(31) 優先権主張番号	62/201, 289	弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成27年8月5日 (2015. 8. 5)	(74) 代理人 100124453
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 實延 由利子
(31) 優先権主張番号	1513921. 5	(74) 代理人 100135208
(32) 優先日	平成27年8月6日 (2015. 8. 6)	弁理士 大杉 卓也
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人 100163544
		弁理士 平田 緑
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	前立腺がんおよびその他のがんに対する免疫療法において使用するための新規ペプチドおよびペプチドの組み合わせ	