

(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2015-524652

(P2015-524652A)

(43) 公表日 平成27年8月27日(2015.8.27)

(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 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47 Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-501989 (P2015-501989)	(71) 出願人	502240113 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成25年7月9日(2013.7.9)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月4日(2015.3.4)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/004249	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02014/010232	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成26年1月16日(2014.1.16)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/669,995	(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(32) 優先日	平成24年7月10日(2012.7.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Th 1細胞のLY6Kエピトープペプチドおよびこれを含有するワクチン

(57) 【要約】

Th 1細胞誘導能を有する単離されたLY6K由来のエピトープペプチドが本明細書において開示される。そのようなペプチドは、MHCクラスII分子によって認識され、Th 1細胞を誘導することができる。好ましい態様では、本発明のそのようなペプチドは、MHCクラスII分子にプロミスカスに結合することができ、Th 1細胞に加えてLY6K特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導することができる。そのようなペプチドは、したがって、対象において免疫応答を増強するのに使用することに適しており、したがってがん免疫療法において、特にがんワクチンとして使用することができる。前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド、そのようなペプチドによって誘導されるAPCおよびTh 1細胞ならびにそれに関連する誘導の方法も本明細書で開示される。前記成分のいずれかを有効成分として含有する医薬組成物は、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん(NSCLC)、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍(HNMT)を含むがんまたは腫瘍の治療および/または予防において使用される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10～30アミノ酸長を有し、配列番号：8のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列から選択される9を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、Tヘルパー1型(Th1)細胞を誘導する能力を有するペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、請求項1に記載の単離されたペプチド。

【請求項 3】

前記MHCクラスII分子が、HLA-DP5、HLA-DR15、HLA-DR8およびHLA-DQの1つから成る群より選択される、請求項2に記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

LY6K特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の単離されたペプチド。

【請求項 5】

(a) 配列番号：1および2から成る群より選択されるアミノ酸配列；および

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の単離されたペプチド。

【請求項 6】

前記ペプチドが配列番号：6のアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の単離されたペプチド。

【請求項 7】

請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

(i) Th1細胞、

(ii) CTL、

(iii) Th1細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞(APC)、および

(iv) CTLを誘導する能力を有するAPC

から成る群より選択される細胞の少なくとも1つを誘導するための組成物であって、請求項1から6のいずれか一項に記載の1つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 9】

(a) 請求項1から6のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；

(b) 請求項7に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のAPC；

(d) 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPCを認識する1つまたは複数のTh1細胞；および

(e) 前記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有し、ならびに

(i) がんの治療、

(ii) がんの予防、

10

20

30

40

50

(i i i) がんににおける術後再発の予防、および

(i v) 前記 (i) から (i i i) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

【請求項 1 0】

M H C クラス I I 分子として H L A - D P 5、H L A - D R 1 5 および H L A - D R 8 から成る群より選択される少なくとも 1 つを有する対象への投与用に製剤化されている、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

C T L 誘導能を有する 1 つまたは複数のペプチドをさらに含有する、請求項 9 または 1 0 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 2】

M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、

(a) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) 請求項 7 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ；

(d) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 前記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する組成物。

20

【請求項 1 3】

T h 1 細胞を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、A P C を請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階を含む方法。

【請求項 1 4】

C T L を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、

(a) A P C を請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階；および

(b) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階

から成る群より選択される段階を含む方法。

30

【請求項 1 5】

T h 1 細胞を誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞を、M H C クラス I I 分子と請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する A P C と共培養する段階；および

(b) T 細胞受容体 (T C R) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで T C R が、細胞表面に提示される M H C クラス I I 分子と請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階

から成る群より選択される段階を含む方法。

40

【請求項 1 6】

C T L を誘導するための方法であって、

(a) C D 4 陽性 T 細胞および C D 8 陽性 T 細胞の両方を、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階；ならびに

(b) C D 8 陽性 T 細胞を、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階

から成る群より選択される段階を含む方法。

【請求項 1 7】

50

MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、
 (a) 請求項1から6のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；
 (b) 請求項7に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のAPC；
 (d) 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPCを認識する1つまたは複数のTh1細胞；および
 (e) 前記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せ
 から成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法。

【請求項18】

MHCクラスII分子と請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離されたAPC。

【請求項19】

請求項13または14に記載の方法によって誘導されるAPC。

【請求項20】

APCの表面に提示された請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離されたTh1細胞。

【請求項21】

請求項15に記載の方法によって誘導されるTh1細胞。

【請求項22】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、
 (a) 請求項1から6のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；
 (b) 請求項7に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のAPC；
 (d) 請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPCを認識する1つまたは複数のTh1細胞；および
 (e) 前記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せ
 から成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有する組成物を前記対象に投与する段階を含む方法。

【請求項23】

請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

【請求項24】

請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項25】

請求項24に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項26】

請求項1から6のいずれか一項に記載のペプチド、請求項7に記載のポリヌクレオチドまたは請求項23に記載の抗体を含む、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物科学の分野、より詳細にはがん療法の分野に関する。特に、本発明は、がんワクチンとして極めて有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬剤に関する。

優先権

本出願は、2012年7月10日出願の米国特許仮出願第61/669,995号の恩典を主張し、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

C D 8 陽性細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) は、主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) クラス I 分子上で見いだされる腫瘍関連抗原 (T A A) に由来するエピトープペプチドを認識し、その後腫瘍細胞を死滅させることが示されている。T A A の最初の例として黒色腫瘍抗原 (M A G E) ファミリーが発見されて以来、多くの他の T A A が、主として免疫学的アプローチを通して、発見されてきた (非特許文献 1、2)。これらの T A A のいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発が進められている。

【0003】

がん細胞の増殖および生存に不可欠な T A A は、免疫療法のための標的として有用であり、というのは、そのような T A A の使用は、治療的に行われる免疫選択の結果としての T A A の欠失、突然変異または下方制御に起因するがん細胞の免疫回避の広く記述されている危険性を最小限に抑え得るからである。

したがって、強力で特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができる新しい T A A の同定はさらなる発展が保証される。そこで、様々なタイプのがんに対するペプチドワクチン戦略の臨床適用が進行中である (非特許文献 3 ~ 10)。現在までに、これらの腫瘍関連抗原由来ペプチドを使用した臨床試験のいくつかの報告がある。残念ながら、これまでのところ、これらのがんワクチンの治験は、今までにこれらのがんワクチン治験で認められてきた低い客観的応答率しかもたしていない (非特許文献 11 ~ 13)。したがって、免疫療法標的としての使用に適する新しい T A A が当分野において依然として必要である。

【0004】

L Y 6 K は、最初は、注釈づけられていない転写産物としていくつかのグループによって同定された (アクセション番号 N M _ 0 1 7 5 2 7 ; 配列番号 : 7 によってコードされる配列番号 : 8)。バイオインフォマティクスによる最近の解析は、L Y 6 K を、低分子量 G P I アンカー型分子に高い相同性を有する L Y 6 ファミリーに属するメンバーとして分類した (非特許文献 14)。L Y 6 ファミリーの他のメンバーと同様に、L Y 6 K は、保存された位置に 10 個のシステイン残基を有し、理論的には、G P I アンカリングを決定する配列構造を保有する。L Y 6 ファミリーのメンバーは、細胞シグナル伝達および / または細胞接着に関連する機能を有すると考えられたが (非特許文献 15)、肺発癌における L Y 6 K の正確な役割または正常細胞におけるその生理的機能は現在のところ不明である。L Y 6 K 遺伝子は、肺がんの半数以上におけるアレル獲得の領域である、染色体 8 q 2 4 に位置するので (非特許文献 16)、その過剰発現はこの遺伝子座における増幅または染色体異常から生じ得る。

【0005】

23,040 遺伝子を含むゲノムワイド c D N A マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析を通して、L Y 6 K は、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん (N S C L C)、骨肉腫、膵がんおよび軟組織腫瘍などのいくつかのがんにおいて上方制御されることが最近示された (特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3)。

【0006】

合わせて考慮すると、このデータは、L Y 6 K が新規の潜在的な普遍的がん抗原であることを示唆する。したがって、L Y 6 K 由来のエピトープペプチドは、幅広いがんの治療のためのがん免疫療法として適用可能であり得る。

最近、健常ボランティアの P B M C から腫瘍反応性かつ H L A - A 2 (A * 0 2 : 0 1) 拘束性の細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) を誘導することができる高度免疫原性の L Y 6 K 由来の C T L エピトープ (特許文献 1) が同定された。さらに、L Y 6 K 由来の H L A - A 2 4 拘束性 C T L エピトープも同定されている (非特許文献 17、特許文献 4)。それゆえ、L Y 6 K は、がん免疫療法に適用できる依然として魅力的な標的分子である。

【0007】

10

20

30

40

50

腫瘍特異的CD4⁺ヘルパーT(Th)細胞、特にTヘルパー1型(Th1)細胞は、CTL媒介性抗腫瘍免疫の効率的な誘導に重要な役割を果たす(非特許文献18)。Th1細胞によって主として産生されるIFN- γ は、長く持続するCTL応答の誘導と維持のために必須であり、免疫記憶の維持において重要な多数の相互作用を通して支援を提供する(非特許文献19、20)。Th1細胞によって分泌されるIFN- γ は、直接の抗腫瘍作用または抗血管新生作用も媒介する(非特許文献21)。さらに、Th細胞は、腫瘍部位におけるCTLの侵入のために道を開かなければならないことが示されている(非特許文献22)。それゆえ、特異的Th1細胞を活性化することができる腫瘍関連抗原(TAA)由来Th細胞エピトープの同定は、腫瘍担持宿主における有効な腫瘍免疫の誘導のために重要である；理想的には、有効なワクチンの設計は、CTLとTh1細胞の両方を刺激する複数のエピトープを含むべきである(非特許文献23)。しかしながら、LY6Kに由来するそのようなエピトープは未だ同定されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2008/102557号

【特許文献2】国際公開第2009/016691号

【特許文献3】国際公開第2004/031413号

【特許文献4】国際公開第2006/090810号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2):177-80

【非特許文献2】Boon T and van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3):725-9

【非特許文献3】Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20):1442-55

【非特許文献4】Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42

【非特許文献5】Visser J L et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21):5554-9

【非特許文献6】van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9):3308-14

【非特許文献7】Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20):4465-8

【非特許文献8】Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2):169-72

【非特許文献9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):459-66

【非特許文献10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):387-94

【非特許文献11】Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20):4169-80

【非特許文献12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188:33-42

【非特許文献13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15

【非特許文献14】de Nooij-van Dalen AG, et al. Int J Cancer. 2003 Mar 1; 103(6):768-74

【非特許文献15】Bamezai A & Rock KL. Proc Natl A

10

20

30

40

50

cad Sci U S A . 1995 May 9 ; 92 (10) : 4294 - 8

【非特許文献16】Balsara BR, et al. Cancer Res . 1997 Jun 1 ; 57 (11) : 2116 - 20

【非特許文献17】Suda, et al. Cancer Sci . 2007 Nov ; 98 (11) : 1803 - 8

【非特許文献18】Chamoto K et al. Cancer Res 2004 ; 64 : 386 - 90

【非特許文献19】Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004 ; 4 : 595 - 602

【非特許文献20】Shedlock DJ and Shen H. Science 2003 ; 300 : 337 - 9 10

【非特許文献21】Street SE et al. Blood 2001 ; 97 : 192 - 7

【非特許文献22】Bos R, and Sherman LA. Cancer Res ; 70 : 8368 - 77

【非特許文献23】Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008 ; 8 : 351 - 60

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】 20

本発明に関連して、本発明者らは、がん免疫療法のための理想的なペプチドワクチンは、両者が互いに天然で近位である、CTLとTh1細胞の両方のエピトープを含む単一ポリペプチドを含むものであると考えた (Kenter GG et al. N Engl J Med 2009 ; 361 : 1838 - 47)。

【0011】

そのために、本発明者らは、プロミスキヤスな (promiscuous) HLAクラスII分子との関連で認識され、CTLエピトープを含む、新規LY6K由来Th1細胞エピトープを同定する戦略を設計し、そのようにして特徴づけられたエピトープがより効率的なT細胞媒介性腫瘍免疫を誘導するという仮定の下で研究を進めた。HLAクラスII結合ペプチドを予測するコンピュータアルゴリズムおよびHLA-A24 (A*24 : 02) 拘束性CTLによって認識される公知のCTLエピトープ配列を使用して、候補となる、CTLエピトープを含有するプロミスキヤスなHLAクラスII拘束性Th1細胞エピトープを選択した。 30

【0012】

本発明は、少なくとも一部には、Th1細胞応答を誘導するための免疫療法の標的として役立つ適切なエピトープペプチドの発見に基づく。LY6K遺伝子は、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん (NSCLC)、骨肉腫、膵がんおよび軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍 (HNMT) を含む多くのがん型で上方制御されることが認められているので、本発明は、リンパ球抗原6複合体、K遺伝子座 (lymphocyte antigen 6 complex) (LY6K) 遺伝子の遺伝子産物、より詳細にはGenBankアクセッション番号NM_017527 (配列番号 : 7) の遺伝子によってコードされる配列番号 : 8 に示すポリペプチドをさらなる分析のための標的とする。対応する分子に特異的なTh1細胞を誘発するエピトープペプチドを含むLY6K遺伝子産物をさらなる試験のために特に選択した。例えば、健常ドナーまたはHNMT患者から得られた末梢血単核細胞 (PBMC) を、ヒトLY6Kに由来するプロミスキヤスなHLA-DR、DPおよび/またはDQ結合ペプチドを用いて刺激した。それぞれの候補ペプチドでパルスしたHLA-DR、DPまたはDQ陽性標的細胞を認識するTh1細胞を樹立し、LY6Kに対する強力な特異的な免疫応答を誘導することができるHLA-DR、DPおよび/またはDQ拘束性エピトープペプチドを同定した。これらの結果は、LY6Kが強力な免疫原性をもち、そのエピトープはTh1細胞応答を通して 40 50

媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを明らかにする。付加的な試験は、少なくとも1つのCTLエピトープを含むプロミスキャスなHLA-D Rおよび/またはD Q結合ペプチドが、同じドナーにおいてLY6K特異的にCTL応答を刺激できることも明らかにした。これらの結果は、LY6Kが強く免疫原性であること、ならびにTh1細胞およびCTLエピトープの両方を含むそのエピトープが、Th1細胞およびCTL応答の両方を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを確認する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

それゆえ、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供することが本発明の1つの目的である。本発明は、改変されたペプチド、すなわち最大30アミノ酸までの長さであり、配列番号：8(LY6K)のアミノ酸配列から選択される連続するアミノ酸配列を有する、Th1細胞誘導能を備えたペプチド、ならびにその機能的等価物を企図する。あるいは、本発明はまた、Th1細胞およびCTL誘導能の両方を有するペプチドも提供する。いくつかの態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1または2のアミノ酸配列または、Th1細胞を誘導する能力を維持しつつ、1、2もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加されている、その改変型に対応する。

10

【0014】

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、好ましくは1つまたは複数の抗原提示細胞(APC)の表面に提示され、次にこれがTh1細胞を誘導する。本発明のペプチドが少なくとも1つのCTLエピトープをさらに含む場合、そのようなAPCはまた、本発明のペプチドから生成されるCTLエピトープを提示し、したがってそれぞれのペプチドを標的とするCTLを誘導するようにペプチドをプロセッシングする。それゆえ、本発明のペプチドのいずれかまたはその断片を提示する抗原提示細胞、ならびに抗原提示細胞を誘導するための方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

20

【0015】

本発明の1つまたは複数のペプチドもしくはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそのようなペプチドもしくはその断片を提示する抗原提示細胞の投与は、強力な抗腫瘍免疫応答の誘導をもたらす。したがって、以下の1つまたは複数を含む有効成分として含有する薬剤または医薬組成物を提供することが本発明のさらにもう1つの目的である：(a)本発明の1つまたは複数のペプチド、(b)そのようなペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド、および(c)本発明の1つまたは複数の抗原提示細胞。そのような本発明の薬剤または医薬組成物は、ワクチンとして特に有用である。

30

【0016】

がん(すなわち腫瘍)の治療および/もしくは予防(すなわち防止)、ならびに/またはその術後再発の予防のための方法を提供することが本発明のなおさらなる目的である。本発明の1つまたは複数のペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示細胞または薬剤もしくは医薬組成物を投与する段階を含む、Th1細胞を誘導するまたは抗腫瘍免疫を誘導するための方法も企図される。さらに、本発明のTh1細胞はがんに対するワクチンとしても使用され、がんの例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍(HNMT)が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0017】

本発明の特に企図される目的の例には以下が含まれる：

[1] 10~30アミノ酸長を有し、配列番号：8のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって：

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列から選択される9を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列

50

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、Tヘルパー1型（Th1）細胞を誘導する能力を有するペプチド。

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド。

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-DP5、HLA-DR15、HLA-DR8およびHLA-DQの1つから成る群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド。

[4] 前記ペプチドが、LY6K特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1]から[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド。

10

[5] 前記ペプチドが、

(a) 配列番号：1および2から成る群より選択されるアミノ酸配列；および

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の単離されたペプチド。

[6] 前記ペプチドが配列番号：6のアミノ酸配列を含む、[5]に記載の単離されたペプチド。

[7] [1]から[6]のいずれか1つに記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

[8]

20

(i) Th1細胞、

(ii) CTL、

(iii) Th1細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞（APC）、および

(iv) CTLを誘導する能力を有するAPC

から成る群より選択される細胞の少なくとも1つを誘導するための組成物であって、[1]から[6]のいずれか1つに記載の1つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物、または

(i) Th1細胞、

(ii) CTL、

(iii) Th1細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞（APC）、および

(iv) CTLを誘導する能力を有するAPC

から成る群より選択される少なくとも1種類の細胞を誘導するための組成物であって、[1]から[5]のいずれか1つに記載の1つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

30

[9]

(a) [1]から[6]のいずれか1つに記載の1つまたは複数のペプチド；

(b) [7]の1つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1]から[6]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のAPC；

(d) [1]から[6]のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPCを認識する1つまたは複数のTh1細胞；および

40

(e) 上記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有し、ならびに

(i) がんの治療、

(ii) がんの予防、

(iii) がんにおける術後再発の予防、および

(iv) 上記(i)から(iii)の任意の2つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

[10] 前記組成物が、MHCクラスII分子としてHLA-DP5、HLA-DR15およびHLA-DR8から成る群より選択される少なくとも1つを有する対象への投与

50

のために製剤化されている [9] に記載の医薬組成物、または前記組成物が、H L A - D P 5、H L A - D R 1 5 および H L A - D R 8 から成る群より選択される少なくとも1つのM H CクラスI I分子を有する対象への投与のために製剤化されている [9] に記載の医薬組成物。

[1 1] 前記組成物が、C T L 誘導能を有する1つまたは複数のペプチドをさらに含有する、[9] または [1 0] に記載の医薬組成物。

[1 2] M H CクラスI I分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、

(a) [1] から [6] のいずれか1つに記載の1つまたは複数のペプチド；

(b) [7] に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のA P C；

(d) [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P Cを認識する1つまたは複数のT h 1細胞；および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の2つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有する組成物。

[1 3] T h 1細胞を誘導する能力を有するA P Cを誘導するための方法であって、A P Cを [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階を含む方法。

[1 4] C T Lを誘導する能力を有するA P Cを誘導するための方法であって、

(a) A P Cを [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階；および

(b) [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをA P Cに導入する段階から成る群より選択される段階を含む方法。

[1 5] T h 1細胞を誘導するための方法であって、

(a) C D 4陽性T細胞を、M H CクラスI I分子と [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示するA P Cと共培養する段階；および

(b) T細胞受容体 (T C R) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、またはT C Rサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをC D 4陽性T細胞に導入する段階であって、ここでT C Rが、細胞表面に提示されるM H CクラスI I分子と [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階

から成る群より選択される段階を含む方法、またはT h 1細胞を誘導するための方法であって、

(a) C D 4陽性T細胞を、M H CクラスI I分子と [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示するA P Cと共培養する段階；および

(b) 両方のT細胞受容体 (T C R) サブユニットをコードする単一ポリヌクレオチド、または各々別々のT C Rサブユニットをコードする複数のポリヌクレオチドをC D 4陽性T細胞に導入する段階であって、ここでT C Rが、A P Cの細胞表面に提示されるM H CクラスI I分子と [1] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階から成る群より選択される段階を含む方法。

[1 6] C T Lを誘導するための方法であって、

(a) C D 4陽性T細胞およびC D 8陽性T細胞の両方を、[4] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドと接触させたA P Cと共培養する段階；ならびに

(b) C D 8陽性T細胞を、[4] から [6] のいずれか1つに記載のペプチドと接触させたA P Cと共培養する段階

10

20

30

40

50

から成る群より選択される段階を含む方法。

[1 7] M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、

(a) [1] から [6] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) [7] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ；

(d) [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法。

[1 8] M H C クラス I I 分子と [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離された A P C 。

[1 9] [1 3] または [1 4] に記載の方法によって誘導される A P C 。

[2 0] A P C の表面に提示された [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離された T h 1 細胞。

[2 1] [1 5] に記載の方法によって誘導される T h 1 細胞。

[2 2] がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、

(a) [1] から [6] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) [7] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ；

(d) [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞；および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する組成物を対象に投与する段階を含む方法。

[2 3] [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

[2 4] [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

[2 5] [2 4] に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

[2 6] [1] から [6] のいずれか 1 つに記載のペプチド、 [7] に記載のポリヌクレオチドまたは [2 3] に記載の抗体を含む、診断キット。

【 0 0 1 8 】

上記に加えて、本発明の他の目的および特徴は、以下の詳細な説明を付属の図面および実施例と併せて読めばより十分に明らかになる。しかしながら、本発明の前記概要および以下の詳細な説明はどちらも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、ここでいくつかの特定の態様を参照して本発明を説明するが、説明は本発明を例証するものであり、本発明の限定とは解釈されないことが認識される。様々な変更および適用が、付属の特許請求の範囲に記載されている本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者に想起され得る。同様に、本発明の他の目的、特徴、利益および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかであり、また当業者には容易に明白である。そのような目的、特徴、利益および利点は、単独でまたは本明細書に組み込まれる参考文献を考慮して、付属の実施例、データ、図面およびそれらから引き出されるすべての妥当な推論と併せて上記から明らかとなるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

10

20

30

40

50

【0019】

本発明の様々な局面および適用は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明とその好ましい態様を考慮した上で当業者に明らかになるであろう。

【0020】

【図1A】図1は、コンピュータアルゴリズム（IEDB推奨方法）によって予測されるプロミスキャスなHLAクラスII結合LY6K由来ペプチドを示す。パートAは、コンピュータアルゴリズム（IEDB解析リソース、コンセンサス法、http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html)を用いたヒトLY6Kタンパク質のアミノ酸配列の解析の結果を示す。横軸の数字は、LY6K由来の15merペプチドのN末端のアミノ酸残基位置を示す。より高いコンセンサスパーセンタイル順位は、HLAクラスII分子へのより強い結合親和性を示す。

10

【0021】

【図1B】パートBは、複数のHLAクラスIIアリル産物（DPB1*05:01、DRB1*08:03、DRB1*9:01およびDRB1*15:02）についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセンタイル順位を有する2つのオーバーラップする24merおよび20mer長鎖ペプチド（LY6K(119-142)およびLY6K(172-191))を、パネルAにおいて1および2の番号を付した黒いバーによって示されるように選択し、プロミスキャスなHLAクラスII拘束性Th細胞エピトープを同定するために合成したことを示す。LY6K(172-191)は、CTLによってHLA-A24に関連して認識される10merペプチドを含む。

20

【0022】

【図2A】図2は、LY6K(119-142)ペプチドでの末梢CD4⁺T細胞の刺激によるLY6K(119-142)特異的CD4⁺T細胞株の誘導および抗原提示HLAクラスII分子の同定を示す。CD4⁺T細胞株を、LY6K(119-142)での末梢CD4⁺T細胞の少なくとも3回の刺激後に様々なHLAクラスII遺伝子型を有する3名の健常ドナーから生成し、IFN- γ 産生CD4⁺T細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。パートAでは、LY6K(119-142)に対する応答を3名の健常ドナーについて示す。CD4⁺T細胞を、自己PBMC単独（ペプチドなし）、LY6K(119-142)(10 μ g/ml)でパルスしたPBMC、またはHLA-DPもしくはHLA-DQに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下にLY6K(119-142)でパルスしたPBMCで刺激した。

30

【0023】

【図2B1】パートBでは、様々なHLAクラスII分子によって拘束されるTh細胞によるLY6K(119-142)ペプチドの認識を示す。3名の健常ドナーから樹立したLY6K(119-142)特異的CD4⁺T細胞株を、LY6K(119-142)でパルスしたもしくはパルスしていない指示されているHLAクラスII分子（DP5、DR4、DR8またはDR15）を発現するL細胞、抗HLA-DR、抗HLA-DPもしくは抗HLAクラスIIブロッキングmAbの存在下にLY6K(119-142)でパルスしたL細胞、またはEBNA-DP5でパルスしたL-DP5と共培養した。IFN- γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。ドナーのHLA型を各パネルの上部に表示した。データは、2回または3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

40

【0024】

【図2B2】図2B2は図2B1の続きである。

【0025】

【図3A】図3は、LY6K(172-191)ペプチドでの末梢CD4⁺T細胞の刺激によるLY6K(172-191)特異的CD4⁺T細胞株の誘導および抗原提示HLAクラスII分子の同定を示す。CD4⁺T細胞株を、様々なHLAクラスII遺伝子型を

50

有する3名の健常ドナーから生成した。LY6K(172-191)での末梢CD4⁺T細胞の少なくとも3回の刺激後、IFN- γ 産生CD4⁺T細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。パートAにおいて、上の部分；左側のパネル；LY6K(172-191)に対する応答をHLA-DR8陽性かつHLA-DR15陽性の健常ドナーについて示す。CD4⁺T細胞を、自己PBMC単独(-)、LY6K(172-191)(10 μ g/ml)でパルスしたPBMC、またはHLA-DR、DPもしくはDQに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下にLY6K(172-191)でパルスしたPBMCで刺激した。右側のパネル；HLA-DR15分子によって拘束されるTh細胞によるLY6K(172-191)ペプチドの認識。健常ドナーHDL3から樹立したLY6K(172-191)特異的CD4⁺T細胞株を、LY6K(172-191)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR8もしくはL-DR15、または抗HLA-DRもしくは抗HLAクラスIブロッキングmAbの存在下にLY6K(172-191)でパルスしたL-DR15細胞と共培養した。パートAにおいて、下の部分；HLA-DR15拘束性LY6K(172-191)LP特異的Th細胞をHDL2から生成した。

【0026】

【図3B】パートBでは、LY6K(172-191)に対する応答を健常ドナーHDL4について示す。CD4⁺T細胞を、自己PBMC単独(ペプチドなし)、LY6K(172-191)(10 μ g/ml)でパルスしたPBMC、またはHLA-DR、HLA-DPもしくはHLA-DQに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下にLY6K(172-191)でパルスしたPBMCで刺激した。IFN- γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。ドナーのHLA型を各パネルの上部に表示した。データは、2回または3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0027】

【図4】図4は、LY6K(168-192)ペプチドでの末梢CD4⁺T細胞の刺激によるLY6K(168-192)特異的CD4⁺T細胞の誘導および抗原提示HLAクラスII分子の同定を示す。CD4⁺T細胞株を健常ドナーHDL4から生成した。LY6K(168-192)での末梢CD4⁺T細胞の少なくとも3回の刺激後、IFN- γ 産生CD4⁺T細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。LY6K(168-192)に対する応答をHLA-DR8(DRB1*08:03)およびHLA-DR14(DRB1*14:05)陽性健常ドナーについて示す。CD4⁺T細胞を、自己PBMC単独(ペプチドなし)、LY6K(168-192)(10 μ g/ml)でパルスしたPBMC、またはHLA-DR、DPもしくはDQに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下にLY6K(168-192)でパルスしたPBMCで刺激した。

【0028】

【図5A1】図5は、バルクLY6K(119-142)特異的CD4⁺Th細胞株またはLY6K(172-191)LP特異的Thクローンの機能的特性を示す。パートAでは、LY6K(119-142)でパルスしたL-DP5(5 \times 10⁴)と共培養したT細胞(1 \times 10⁴)の20時間のインキュベーション期間後、培養上清を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、MIP1、IL-2、IL-4およびIL-7)の濃度を測定した。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。

【0029】

【図5A2】図5A2は図5A1の続きである。

【0030】

【図5B】パートBでは、コグネイトペプチドの存在下での自己PBMC(HLA-DQ拘束性LY6K(172-191)LP特異的Thクローンに関して)の24時間のインキュベーション後、培養上清を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、GM-CSFおよびMIP1)の濃度を測定した。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。

10

20

30

40

50

【0031】

【図5C】パートCは、抗原刺激後にCD4⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を表示する。上のパネルでは、細胞をLY6K(119-142)LPまたは無関係なペプチドで再刺激した。プロットの内部の数字は、象限の特徴を有する細胞集団(CD4⁺CD107a⁺T細胞)のパーセンテージを示す。下のパネルでは、細胞をLY6K(172-191)LPまたは無関係なペプチドで再刺激した。プロットの内部の数字は、象限の特徴を有する細胞集団(CD4⁺CD107a⁺T細胞)のパーセンテージを示す。

【0032】

【図6A】図6は、インビトロおよびインビボでLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の増殖を誘導するLY6K(172-191)LPを示す。パートAでは、PBMC(2×10⁶/ウェル)を、いずれのサイトカインも添加せずにLY6K(172-191)LP(7μM)と共に2週間インキュベートした。0日目と7日目にLY6K(172-191)LPを添加し、次にLPペプチドでのインビトロ刺激の14日目に細胞を回収して、FITC標識抗ヒトCD8 mAbと組み合わせてHLA-A24(A*24:02)/LY6K-A24(177-186)ペプチド複合体のPE標識テトラマーで染色し、フローサイトメトリによって分析した。右上象限のドットはCD8⁺テトラマー⁺T細胞を表す。示されている事象はCD8⁺T細胞にゲートをかけている。プロットの内部の数字は、右上象限の特徴を有する細胞集団(CD8⁺テトラマー⁺T細胞)のパーセンテージを示す。データは、HLA-A24陽性健常ドナーから同様の結果を得た2つの独立した実験を代表する。

【図6B】パートBは、LY6K(172-191)LPが、LY6K-A24(177-186)SPでワクチン接種した頭頸部がん患者に由来する抗原特異的CD8⁺T細胞のインビトロ増殖を誘導することを示す。LY6K-A24(177-186)SPで能動免疫した患者から単離したPBMC中のLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLを、エキスピボでHLA-A24(A*24:02)/LY6K-A24(177-186)複合体のPE標識テトラマーによって検出した。LY6K(172-191)LPでのPBMCの短期(1週間)刺激後、PBMCを回収し、その後LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLもテトラマーによって検出した。

【0033】

【図6C】パートCは、LY6K(172-191)LPで免疫したHLA-A24 TgmにおけるLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの増殖を表示する。HLA-A24 Tgmを、尾の基部で、IFA中に乳化したLY6K(172-191)LPを用いて免疫した。LY6K(172-191)LPでの2回目のワクチン接種の7日後、鼠径リンパ節中のCD8⁺T細胞をポジティブ単離し、LY6K-A24(177-186)SPまたは無関係なペプチドでパルスしたC1R-A2402細胞と共培養して、IFN-γ産生CD8⁺T細胞の数をエキスピボELISPOTアッセイによって分析した。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0034】

【図7】図7は、LY6K-A24(177-186)短鎖ペプチドでワクチン接種した頭頸部がん患者から単離したPBMCにおけるLY6K長鎖ペプチド特異的T細胞の存在を示す。パートAでは、LY6K特異的T細胞応答を、LY6K-A24(177-186)短鎖ペプチドでワクチン接種した6名の頭頸部がん患者、対照としてワクチン接種していない患者および3名の健常ドナーにおいて評価した。LY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LPの混合物での短期刺激(1週間)後、個々のLY6K特異的T細胞の頻度をIFN-γELISPOTアッセイを用いて検出した。結果は、バックグラウンドを差し引いた後の特異的IFN-γスポットを表した。IFN-γスポットが10より多くかつバックグラウンドの2倍を上回る場合は、応答を陽性とみなした。プロットの各群内の線は中央値を示す。パートBは、IFN-γ産生T細胞のHLA拘束を明らかにする。LPで1週間刺激したPBMCを、HLA-DR、HLA-DPま

10

20

30

40

50

たはHLAクラスIに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下に各々のペプチド(10 μ g/ml)で再刺激した。IFN- γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。結果は、バックグラウンドを差し引いた後の特異的IFN- γ スポットを表した。同様の結果を得た3名のがん患者からの3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0035】

【図8A】HNMT患者から得たPBMCにおけるLY6K-LP特異的Th細胞の存在を示す。パートAでは、LY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LPの混合物でのPBMCの1週間のインビトロ刺激後、LY6K-LP特異的Th細胞の頻度をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検出した。

10

【0036】

【図8B1】パートBは、LY6K-LP特異的Th細胞のHLAクラスII拘束を示す。LY6K-LPで1週間刺激した新鮮PBMCを、HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQまたはHLAクラスIに特異的なmAbの存在下に各々のLY6K-LPで再刺激した。Th細胞によるLY6K-LP特異的IFN- γ 産生は、7名のHNMT患者において抗HLAクラスII mAbの添加によって有意に阻害されたが、抗HLAクラスI mAbでは阻害されなかった(LY6K(119-142)LP、HNMT31、41、107; LY6K(172-191)LP、HNMT26、31、41、42、103、107、108)。

20

【0037】

【図8B2】図8B2は図8B1の続きである。

【0038】

【図8C】パートCでは、HNMT患者は、正常で健康な個人と比較してLY6K-LP特異的Th細胞免疫の上昇を示す。LY6K-LP(119-142)LPまたはLY6K(172-191)LPに应答した患者および健常ドナー(対照)の割合を示す棒グラフである。p値はフィッシャーの正確確率検定を用いて算出した。

【図8D】パートDでは、LY6K-LP特異的Th細胞应答を23名のHNMT患者において評価した。LY6K-A24(177-186)SPでワクチン接種した20名のHNMT患者(ワクチン接種後)、11名のHNMT患者(ワクチン接種前)、および9名の健常ドナー(対照)を試験した。結果は、バックグラウンドを差し引いた後の特異的IFN- γ スポットを示す。各々のドットは個々のドナーを表す。水平の線は中央値を示し、p値はノンパラメトリックのマン-ホイットニーU検定からの統計結果を表す。n.s.、有意でない。

30

【0039】

【図8E】パートE~Gは、ワクチン接種前および接種後のHNMT患者から得たPBMCにおけるLY6K-LP特異的Th細胞の存在を示す。LY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LPの混合物でのPBMCの1週間のインビトロ刺激後、LY6K-LP特異的Th細胞の頻度をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検出した。パートEにおいて、ワクチン接種後のHNMT患者は、正常で健康な個人と比較してLY6K-LP特異的Th細胞免疫の上昇を示した。ワクチン接種後のHNMT患者におけるLY6K(172-191)LP特異的免疫应答の頻度は、ワクチン接種前のHNMT患者におけるよりも有意に高かった。LY6K(119-142)LPまたはLY6K(172-191)LPに应答した患者および健常ドナー(対照)の割合を示す棒グラフである。p値はフィッシャーの正確確率検定を用いて算出した。

40

【0040】

【図8F】パートFにおいて、CTLエピトープペプチドワクチンの反復接種は、LY6K(119-142)LP(黒い棒)およびLY6K(172-191)LP(白い棒)特異的Th細胞应答を増大させるかまたは誘発した。

【0041】

【図8G】パートGは、進行したがんを有するワクチン接種したHNMT患者(CTR-

50

8379、進行、 $n = 13$)と術後アジュバント免疫療法を受けているワクチン接種したHNMT患者(CTR-8380、術後、 $n = 8$)の間でのLY6K-LP特異的IFN-スポットの数の比較を表示する。LY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LPの混合物でのPBMCの1週間のインビトロ刺激後、個々のLY6K-LP特異的Th細胞の頻度をIFN-ELISPOTアッセイによって検出した。結果は、バックグラウンドを差し引いた後の特異的IFN-スポットを示す。各々のドットは個々のドナーを表す。水平の線は中央値を示し、 p 値はノンパラメトリックのマン-ホイットニー-U検定からの統計結果を表す。 $n.s.$ 、有意でない。

【0042】

【図9】図9は、LY6K-LPが天然にプロセッシングされるTh細胞エピトープを包含することを示す。パートAは、HDL1から樹立したHLA-DP5拘束性LY6K(119-142)LP特異的バルクTh細胞が、組換えLY6Kタンパク質をロードした自己DCを特異的に認識したことを明らかにする。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。パートBは、HLA-DR15(左側、HDL2)またはHLA-DQ(右側、HDL4)拘束性LY6K(172-191)LP特異的Thクローンが、組換えLY6Kタンパク質をロードした自己DCを認識したことを明らかにする。同様の結果を得た5つの独立した実験からの代表的なデータを示す。コグネイトLY6K-LPをIFN-ELISPOTアッセイにおける陽性対照として使用した。

10

【0043】

【図10A】図10は、LY6K(172-191)LPがインビトロおよびインビボでLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の効率的な増殖を誘導することを示す。パートAは、DCによるLY6K(172-191)LPの取込みと交差提示を表示する。固定していないまたは固定したDCをLY6K(172-191)LPまたはLY6K-A24(177-186)SPで3時間パルスした。HDL3から生成したバルクLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLを6時間共培養して、応答をIFN-標識によって測定した。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

20

【図10B】パートBは、LY6K(172-191)LPがインビトロでLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の効率的な増殖を誘導することを明らかにする。HDL3(HLA-A24⁺およびDR15⁺)から樹立したLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCTLを、LY6K(172-191)LP(中央のパネル)または無関係なLP(右側のパネル)でパルスした自己DCを用いてインビトロで刺激した。LP刺激前(0日目;左側のパネル)およびLP刺激後7日目に、培養した細胞のアリコート(1×10^5 細胞)を、抗ヒトCD8 mAbと組み合わせたLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマーで染色した。同様の結果を得た3つの独立した実験からの0日目と7日目の代表的なデータを示す。事象はCD8⁺T細胞にゲートをかけている。

30

【0044】

【図10C】パートCは、LY6K(172-191)LPがHNMT患者においてLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLのインビトロ増殖を誘導することを明らかにする。LY6K-A24(177-186)SPでワクチン接種したHNMT患者(HNMT108)からの新鮮なPBMCをLY6K(172-191)LPと共に培養した。0日目(エキスビボ)および7日目に、PBMCをテトラマーHLA-A*24:02/LY6K-A24(177-186)複合体または対照テトラマーで染色した。(CD8⁺T細胞にゲートをかけている;ドットプロット)。7日目に、LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの頻度もIFN-ELISPOTアッセイによって検出した(棒グラフ)。同様の結果を有する4名のワクチン接種したHNMT患者(表1、HNMT43、105、108および110)からの代表的なデータを示す。

40

【0045】

【図10D】パートDでは、CD8⁺テトラマー⁺細胞の割合の増加(増加倍数)を示す

50

。

【0046】

【図10E】パートE～Gは、LY6K-LPがHNMT患者においてLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLのインビトロ増殖を誘導することを明らかにする。パートEでは、LY6K-A24(177-186)SPでワクチン接種したHNMT患者(HNMT29)からの新鮮なPBMCを、LY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LPの混合物と共に培養した。0日目(エキスピボ)および7日目(LY6K-LPでのインビトロ刺激後)に、PBMCをテトラマーHLA-A*24:02/LY6K-A24(177-186)複合体で染色した(CD8⁺T細胞にゲートをかけている)。7日目に、LY6K-A24(177-186)特異的CTLの頻度もIFN- γ ELISPOTアッセイによって検出した(棒グラフ)。詳細な方法は「補足材料および方法」に示されている。同様の結果を有する9名のワクチン接種したHNMT患者(HNMT20、26、29、31、34、39、41、102および108)からの代表的なデータを示す。

10

【0047】

【図10F】パートFでは、CD8⁺テトラマー⁺細胞の割合の増加(倍数増加)を示す。

。

【0048】

【図10G】パートGでは、ワクチン接種前のHNMT患者(HNMT42)からの新鮮なPBMCをLY6K-LPの混合物で刺激した。

20

【図10H】パートHは、LY6K(172-191)LPがインビトロでCTLの効率的なクロスプライミングを誘導することを明らかにする。HDL3から得たPBMCをLY6K(172-191)LPと共に2週間インキュベートした。0日目と7日目にLY6K(172-191)LPを添加し、次に14日目に細胞を回収して、LY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマーで染色した。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。HDL1およびHDL4からも同様の結果を得た。

【0049】

【図10I】パートIは、LY6K(172-191)LPで免疫したマウスにおけるLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの誘導を示す。HLA-A24 TgmをLY6K(172-191)LPで免疫した。LY6K(172-191)LPでの3回目のワクチン接種後、鼠径リンパ節中のマウスCD8⁺T細胞を、LY6K-A24(177-186)SPでパルスしたBM-DC(骨髄由来DC)で刺激した。IFN- γ 産生マウスCD8⁺T細胞の数をエキスピボELISPOTによって分析した。同様の結果を得た8つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

30

【0050】

【図11A】図11は、LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの誘導へのLY6K-LPの相乗作用を示す。パートAは、活性化バルクLY6K-LP特異的CD4⁺T細胞によるLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの誘導増強を明らかにする。HLA-A24⁺/DR15⁺のHDL3に由来するLY6K(119-142)LP特異的またはLY6K(172-191)LP特異的バルクCD4⁺T細胞およびLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCD8⁺T細胞を、いずれのサイトカインも添加せずにLY6K-A24(177-186)SP(SP)単独、LY6K-A24(177-186)SP+対照LP(対照LP+SP)、またはLY6K-A24(177-186)SP+LY6K-LP(LY6K-LP+SP)の存在下で自己DCと共に培養した。ペプチドとの1週間のインビトロ培養後、培養した細胞を、HLA-A*24:02/LY6K-A24(177-186)複合体のPE標識テトラマーおよびFITC標識抗ヒトCD8 mAbで染色した。いずれのペプチドも加えずに培養した細胞の結果も示した(ペプチドなし)。刺激前の棒は、この実験で使用したLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCD8⁺T細胞株のテトラマー⁺CD8⁺T細胞/ウェルの絶対数を示す。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示して

40

50

いる（棒グラフ）。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0051】

【図11B】パートBは、LY6K特異的CTLの誘導へのLY6K-LPの相乗作用を明らかにする。LY6K-A24(177-186)SPでワクチン接種したHNMT43から得た新鮮PBMCを96ウェルの丸底培養プレートに播種し(1×10^5 細胞/ウェル)、次いでいずれのサイトカインも添加せずにLY6K-A24(177-186)SP単独($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)、LY6K-A24(177-186)SP+対照LP($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)、LY6K-A24(177-186)SP+LY6K(119-142)LP($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)、またはLY6K-A24(177-186)SP+LY6K(172-191)LP($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)を加えた。培養の7日目に、細胞をLY6K-A24(177-186)特異的テトラマーで染色した。代表的なLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマー染色を示す(CD8⁺T細胞にゲートをかけている;ドットプロット)。

10

【0052】

【図11C】パートCは、テトラマー⁺CD8⁺細胞/ウェルの絶対数を示す棒グラフを表示する。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0053】

【図11D】パートDでは、2名のワクチン接種したHNMT患者(上のパネル、HNMT42;下のパネル、HNMT31)から得た新鮮PBMCを、LY6K-A24(177-186)SP(SP)またはSP+LY6K-LP(SP+LP)と共に7日間培養した。同様の結果を有する2連のウェルから得た代表的なLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマー染色(CD8⁺T細胞にゲートをかけている)を示す。

20

【0054】

【図12】図12はHNMT患者の臨床特徴を示す。「材料および方法」の章で詳述するIFN- γ ELISPOTアッセイによって測定したLY6K特異的T細胞応答を示す。陽性および陰性応答をそれぞれ(+)および(-)によって表す。No.、回数;CTR、臨床試験登録;vac.、ワクチン接種;HNMT、頭頸部悪性腫瘍;M/F、男性/女性;LP、長鎖ペプチド;n.t.、試験せず。

【発明を実施するための形態】

30

【0055】

態様の説明

本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似または等価の任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をここに記述する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本発明が本明細書で述べる特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコル等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。また、本記載で用いる用語は、特定のバージョンまたは態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図されず、本発明の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

40

【0056】

本明細書で言及する各々の公報、特許または特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。しかしながら、本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によるそのような開示に先行する権利がないことの承認と解釈されるべきではない。

【0057】

I. 定義

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。しかしながら、矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。

50

本明細書で使用する「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という語は、特に明確に示されない限り「少なくとも1つの」を意味する。

【0058】

ある物質（例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等）に関して使用する「単離された」および「精製された」という用語は、その物質が、さもなければ天然源中に含まれる少なくとも1つの物質を実質的に含まないことを指示する。したがって、単離されたまたは精製されたペプチドは、そのペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの糖質、脂質もしくは他の混入タンパク質などの細胞材料を実質的に含まない、または化学合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。「細胞物質を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、そのペプチドが単離されたまたは組換え生産された細胞の細胞成分から切り離されている、ペプチドの調製物を包含する。したがって、細胞物質を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%または5%（乾燥重量）未満の異種タンパク質（本明細書では「混入タンパク質」とも称する）を有するポリペプチドの調製物を包含する。ペプチドが組換え生産される場合は、ペプチドは、好ましくは培地も実質的に含まず、ペプチド調製物の容積の約20%、10%または5%未満の培地を含むペプチドの調製物を包含する。ペプチドが化学合成によって生産される場合は、ペプチドは、好ましくは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、そのペプチドの合成に参与する化学的前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容積の約30%、20%、10%または5%（乾燥重量）未満含むペプチドの調製物を包含する。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドを含むことは、例えばタンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の単一バンドの出現およびゲルのクマシーブリリアントブルー染色等によって示され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは単離または精製されている。

10

20

【0059】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書ではアミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。本用語は、天然のアミノ酸ポリマーに加えて、1つもしくは複数のアミノ酸残基が改変された残基であるアミノ酸ポリマー、または対応する天然のアミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基にも適用される。

30

【0060】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびに細胞内で翻訳後に修飾されたもの（例えばヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基およびR基に結合した炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチルメチオニンスルホニウム）を有する化合物を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様に機能する化合物を指す。

40

アミノ酸は、本明細書ではIUPAC-IUB生化学命名法委員会によって推奨される、一般に公知の3文字表記、または1文字表記によって言及され得る。

【0061】

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、一般に受け入れられている1文字コードによって言及される。「剤」および「組成物」という用語は、本明細書では、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組合せから直接または間接的に生じる任意の生成物を指すために互換的に使用される。医薬組成物に関するそのような用語は、有効成分、および担体を構成する不活性成分を含む生成物、ならびに成分の任意の2つもしくはそれ以上の組合せ、錯体形成もしくは凝集から、または成分の1つもしくは複数の解離か

50

ら、または成分の1つもしくは複数の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図されている。したがって、本発明の医薬組成物は、本発明の化合物と医薬的または生理学的に許容される担体とを混合することによって作製される任意の組成物を包含する。

【0062】

「有効成分」という用語は、本明細書では生物学的または生理学的に活性な組成物中の物質を指す。特に、医薬組成物に関連して、「有効成分」という用語は、目的の薬理学効果を示す成分物質を指す。例えば、がんの治療または予防における使用のための医薬組成物の場合、組成物中の有効成分は、直接または間接的にがん細胞および/または組織に対する少なくとも1つの生物学的または生理学的作用をもたらし得る。好ましくは、そのような作用は、がん細胞増殖を低減するまたは阻害すること、がん細胞および/または組織を損傷するまたは死滅させること等を含み得る。典型的には、有効成分の間接的な作用は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答の誘導である。製剤化される前は、「有効成分」は「バルク」、「原薬」または「原体」とも称され得る。本明細書で使用する「医薬的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料を含むがこれらに限定されない、医薬的または生理学的に許容される材料、組成物、物質またはビヒクルを意味する。

10

【0063】

特に定義されない限り、「がん」という用語は、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍(HNMT)を含む、LY6K遺伝子を過剰発現するがんを指す。特に定義されない限り、「頭頸部悪性腫瘍(HNMT)」および「頭頸部がん」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

20

特に定義されない限り、「Tリンパ球」および「T細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0064】

特に定義されない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」および「CTL」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に指示されない限り、非自己細胞(例えば腫瘍細胞、ウイルス感染細胞)を認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球のサブグループを指す。CTLは、CD8⁺Tリンパ球と区別され、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドを認識することができる。

30

特に定義されない限り、「HLA-A24」という用語は、サブタイプを含むHLA-A24型を指し、その例には、HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425およびHLA-A*2488が含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

特に定義されない限り、本明細書で使用する「HLA-A2」という用語は、典型的にはサブタイプを指し、その例には、HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A*0213、HLA-A*0216、HLA-A*0218、HLA-A*0219、HLA-A*0228およびHLA-A*0250が含まれるが、これらに限定されない。

40

特に定義されない限り、「Tヘルパー1型細胞」および「Th1細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドを認識することができ、細胞性免疫に関連するCD4⁺Tリンパ球のサブグループを指す。特に定義されない限り、「Th細胞」、「CD4⁺T細胞」および「CD4⁺ヘルパーT細胞」という用語も本明細書では互換的に使用される。Th1細胞は、細胞性免疫に関する他の免疫細胞(例えばCTL、マクロファージ)の活性化および/または刺激を助けるために様々なサイトカイン(例えばIFN-、IL-2、T

50

N F - 、 G M - C S F、 T N F - 等)を分泌する。

【 0 0 6 6 】

特に定義されない限り、「 H L A - D R 4 」という用語はサブタイプを指し、その例には、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 1、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 2、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 3、 L A - D R B 1 * 0 4 : 0 4、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 5、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 6、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 7、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 8、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 0 9、 H L A - D R B 1 * 0 4 : 1 0 および H L A - D R B 1 * 0 4 : 1 1 が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「 H L A - D R 8 」という用語はサブタイプを指し、その例には、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 0 1、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 0 2、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 0 3、 L A - D R B 1 * 0 8 : 0 4、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 0 5、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 0 6、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 0 7、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 1 0、 H L A - D R B 1 * 0 8 : 1 1 および H L A - D R B 1 * 0 8 : 1 2 が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「 H L A - D R 9 」という用語はサブタイプを指し、その例には、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 1、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 2、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 3、 L A - D R B 1 * 0 9 : 0 4、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 5、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 6、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 7、 H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 8 および H L A - D R B 1 * 0 9 : 0 9 が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「 H L A - D R 1 5 」という用語はサブタイプを指し、その例には、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 1、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 2、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 3、 L A - D R B 1 * 1 5 : 0 4、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 5、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 6、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 7、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 8、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 0 9、 H L A - D R B 1 * 1 5 : 1 0 および H L A - D R B 1 * 1 5 : 1 1 が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「 H L A - D P 2 」という用語はサブタイプを指し、その例には H L A - D P B 1 * 0 2 0 1 および H L A - D P B 1 * 0 2 : 0 2 が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「 H L A - D P 5 」という用語はサブタイプを指し、その例には H L A - D P B 1 * 0 5 0 1 が含まれるが、これに限定されない。

【 0 0 6 7 】

特に定義されない限り、「 M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答」という語句は、 M H C クラス I I 分子によるペプチドの提示によって誘導される免疫応答を指す。本明細書では、「 M H C クラス I I 抗原によって媒介される免疫応答」は、 C D 4 + T 細胞、特に T h 1 細胞によって誘導される免疫応答を含む。そのような免疫応答の例には、サイトカイン(例えば I F N - 、 I L - 2、 T N F - 、 G M - C S F、 T N F - 等)の産生ならびに他の免疫細胞(例えば C T L、マクロファージ等)の活性化および/または刺激が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「 L Y 6 K に特異的な T h 1 細胞」という語句は、 L Y 6 K に由来するペプチドを提示する抗原提示細胞によって特異的に活性化されるが、他の抗原提示細胞では特異的に活性化されない T h 1 細胞を指す。

特に定義されない限り、「 L Y 6 K 特異的 C T L」という語句は、 L Y 6 K を発現する標的細胞に対して特異的に細胞傷害性を示す C T L を指す。

【 0 0 6 8 】

特に定義されない限り、ペプチドに関連して使用される場合、「 C T L 誘導能」という語句は、抗原提示細胞上に提示された場合 C T L を誘導するペプチドの能力を指す。

特に定義されない限り、本明細書で使用する「キット」という用語は、試薬と他の材料の組合せに関して用いられる。キットは、マイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが本明細書で企図される。「キット」という用語は、試薬および/または材料の特定の組合せに限定されることを意図しない。

10

20

30

40

50

【0069】

本発明に関連して、「抗体」という用語は、指定されるタンパク質またはそのペプチドに特異的に反応性である免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体は、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射性標識に融合した抗体、および抗体断片を含み得る。さらに、本明細書における抗体はその最も広い意味で使用され、特に無傷モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えばIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）を指示する。

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0070】

II. ペプチド

以下で詳細に説明する本発明のペプチドは、「LY6Kペプチド」または「LY6Kポリペプチド」と称され得る。

LY6Kに由来するペプチドがTヘルパー1型（Th1）細胞によって認識される抗原として機能することを明らかにするため、LY6Kに由来するペプチド（配列番号：8）を、これらがMHCクラスII分子によってプロミスキャスに拘束される抗原エピトープであるかどうかを判定するために分析した。LY6Kに由来するプロミスキャスなMHCクラスII結合ペプチドの候補を、HLA-DP5、HLA-DR15、HLA-DR8および1つまたはいくつかのHLA-DQへの結合親和性に基づいて同定した。これらのペプチドをロードした樹状細胞（DC）によるCD4⁺T細胞のインビトロ刺激後、以下のペプチドの各々を用いてTh1細胞を成功裏に樹立した：

LY6K（119-142）/KWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQ（配列番号：1）、および

LY6K（172-191）/KCCKIRYCNLEGPPINSSVF（配列番号：2）。

【0071】

上述したこれらの樹立されたTh1細胞は、それぞれのペプチドでパルスした抗原提示細胞の刺激に応答して強力な特異的Th1細胞活性を示した。さらに、前記ペプチドは、日本人において高頻度に認められるいくつかのHLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQ分子（例えばHLA-DP5、HLA-DR15、HLA-DR8）によって拘束されるTh1細胞を刺激することができた。これらの結果は、LY6KがTh1細胞によって認識される抗原であること、およびペプチドが、いくつかのHLAクラスII分子（例えばHLA-DP5、HLA-DR15、HLA-DR8、および1つまたはいくつかのHLA-DQなど）によってプロミスキャスに拘束されるLY6Kのエピトープペプチドであることを明らかにする；したがって、そのようなペプチドは、CTLによる細胞傷害作用の標的抗原として有効であり得る。

上記で同定したペプチドは、LY6Kに特異的なCTLを誘導する能力を有するCTLエピトープのアミノ酸配列を付加的に含み、本明細書で明らかにするように、そのようなペプチドは、Th1細胞に加えてLY6Kに特異的なCTLも誘導することができる。したがって、これらのペプチドは、LY6Kを発現するがんに対する免疫応答の誘導のための適切なペプチドであり得る。LY6K遺伝子は、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍（HNMT）を含む大部分のがん組織で過剰発現されるので、免疫療法のための良好な標的である。

【0072】

したがって、本発明は、LY6Kに特異的なTh1細胞を誘導する能力を有するペプチドを提供する。本発明のペプチドは、少なくとも1つのMHCクラスII分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。あるいは、本発明のペプチドの断片は、少

10

20

30

40

50

なくとも1つのMHCクラスII分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。ペプチドのこれらの断片は、抗原提示細胞内でのプロセッシングによって生成される。好ましい態様では、本発明のペプチドまたはその断片は、2またはそれ以上の種類のMHCクラスII分子（例えばHLA-DP5およびHLA-DR15、HLA-DR8およびHLA-DR15、HLA-DP5およびHLA-DR8、HLA-DR15およびHLA-DQの1つ、またはHLA-DP5、HLA-DR15およびHLA-DR8）に結合する能力を有する。言い換えると、本発明のペプチドは、2またはそれ以上の種類のMHCクラスII分子によって拘束されるTh1細胞を誘導する能力を有し得る。別の態様では、本発明のペプチドは、LY6K特異的CTL誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む。LY6K特異的CTL誘導能を有するようなペプチドの典型的な例には、配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

10

【0073】

MHCクラスII分子における結合溝は両端で開いているので、MHCクラスII結合ペプチドはその長さに柔軟性を有し得る。MHCクラスII分子についてのコア結合モチーフは9個のアミノ酸残基から成り、MHCクラスII結合ペプチドは一般に、コア結合モチーフと隣接する他のアミノ酸残基を有する。隣接アミノ酸残基の数は限定されない。したがって、配列番号：1または2のすべてのアミノ酸残基がMHCクラスII分子に結合するために必ずしも必要ではない。したがって、本発明のペプチドは、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチドであり得、そのようなペプチドは以下から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む：

20

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列からの9個より多い連続するアミノ酸を有するアミノ酸配列；および

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列。

【0074】

MHCクラスII結合ペプチドの長さは一般に10~30アミノ酸である。配列番号：1および2のアミノ酸配列はLY6Kのアミノ酸配列（配列番号：8）の一部から成るので、本発明のペプチドは以下の[1]~[6]に記載のペプチドであり得る：

[1] 10~30アミノ酸長を有し、配列番号：8のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

30

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列から選択される9を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチド；

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド；

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-DP5、DR15、DR8およびHLA-DQの1つから成る群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド；

40

[4] 前記ペプチドが、LY6K特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1]から[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド；ならびに

[5] 前記ペプチドが、

(a) 配列番号：1および2から成る群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列；および

[6] 前記ペプチドが配列番号：6のアミノ酸配列を含む、[5]に記載の単離されたペプチド。

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の単離されたペプチド。

50

【0075】

本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞はLY6Kに特異的である。それゆえ、いくつかの態様において、本発明は、配列番号：8のアミノ酸配列の部分アミノ酸配列から成る30アミノ酸残基未満のペプチドであって、配列番号：1または2のアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

【0076】

一般に、インターネット上で現在利用可能なソフトウェアプログラム、例えばWang P et al. 2008. PLoS Comput Biol. 4(4): e1000048. 11:568; およびWang P et al. 2010. BMC Bioinformatics. に記載されているソフトウェアプログラムを使用して、様々なペプチドとHLA抗原との間の結合親和性をインシリコで算出することができる。HLA抗原との結合親和性は、例えばNielsen M and Lund O. 2009. BMC Bioinformatics. 10:296.; Nielsen M et al. 2007. BMC Bioinformatics. 8:238. Bui HH, et al. 2005. Immunogenetics. 57:304-314. Sturmiolo T et al. 1999. Nat Biotechnol. 17(6):555-561 およびNielsen M et al. 2008. PLoS Comput Biol. 4(7) e1000107に記載されているように測定することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムを用いて同定されたHLA抗原と結合すると決定されたLY6Kのペプチドを包含する。

【0077】

上述したように、MHCクラスII結合ペプチドはその長さに柔軟性があるので、配列番号：1または2のアミノ酸配列は、生じるペプチドが必須のTh1細胞誘導能を保持する限り、場合により付加的なアミノ酸残基と隣接していてもよい。Th1細胞誘導能を有するそのようなペプチドは、典型的には約30アミノ酸未満、しばしば約29アミノ酸未満、通常は約28または27アミノ酸未満である。配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列に隣接する特定のアミノ酸配列は、そのような隣接アミノ酸配列がもとのペプチドのTh1細胞誘導能を損なわない限り、限定されず、任意の種類のアミノ酸で構成され得る。典型的な態様では、そのような隣接アミノ酸配列は、配列番号：1または2のアミノ酸配列に隣接する配列番号：8のアミノ酸配列の中から選択され得る；しかし、本発明はそれに限定されない。そこで、本発明はまた、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

他方で、MHCクラスII分子についてのコア結合モチーフは9個のアミノ酸残基から成るので、配列番号：1または2のアミノ酸配列の全長がMHCクラスII分子に結合するためおよびTh1細胞の誘導のために必ずしも必要ではない。したがって、本発明のペプチドは、必須のTh1細胞誘導能を保持することを条件として、配列番号：1または2の9個より多い連続するアミノ酸を有するアミノ酸の形態をとることができる。Th1細胞誘導能を有するペプチドは、典型的には約10より多いアミノ酸、しばしば11または12より多いアミノ酸、通常は13または14より多いアミノ酸である。したがって、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能を有し、かつ配列番号：1または2のアミノ酸配列からの9、10、11、12、13または14個より多い連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、ペプチドであり得る。

【0078】

タンパク質中の1、2またはそれ以上のアミノ酸の改変はタンパク質の機能に影響を及ぼさず、一部の場合にはもとのタンパク質の所望の機能を増強することさえあることは一般に公知である。実際に、改変されたペプチド(すなわちもとの参照配列と比較して1、2または数個のアミノ酸残基が改変されている(すなわち置換、付加、欠失または挿入されている)アミノ酸配列から成るペプチド)が、もとのペプチドの生物学的活性を保持することは知られている(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nu

cleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadi
e-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci US
A 1982, 79: 6409-13)。したがって、1つの態様では、本発明のペプチ
ドは、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列
の両方を有し得、1、2またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、挿入、欠失および/ま
たは置換されている。あるいは、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能ならびに配列番
号：1または2のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が付加、挿入、欠失
および/または置換されているアミノ酸配列の両方を有し得る。

【0079】

当業者は、単一アミノ酸または小さな割合のアミノ酸を改変するアミノ酸配列への個々
の付加または置換は、もとのアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識
する。そこで、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、タンパ
ク質の改変は、もとのタンパク質と類似の機能を有する改変されたペプチドを生じさせる
。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野において周知である。ア
ミノ酸側鎖の特性の例は、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親
水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、および以下の共通する
官能基または特徴を有する側鎖：脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；ヒドロキシル
基含有側鎖（S、T、Y）；硫黄原子含有側鎖（C、M）；カルボン酸およびアミド含有
側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；ならびに芳香族含有側鎖（H、
F、Y、W）である。加えて、以下の8群は各々相互に保存的置換であるアミノ酸を含む
：

- 1) アラニン（A）、グリシン（G）；
- 2) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；
- 3) アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；
- 4) アルギニン（R）、リシン（K）；
- 5) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；
- 6) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；
- 7) セリン（S）、トレオニン（T）；および
- 8) システイン（C）、メチオニン（M）（例えば Creighton, Protei
ns 1984 参照）。

【0080】

そのような保存的に改変されたペプチドも本発明のペプチドとみなされる。しかし、本
発明のペプチドはそれらに限定されず、改変されたペプチドがもとのペプチドのTh1細胞
誘導能を保持する限り、非保存的改変も含み得る。さらに、改変されたペプチドは、L
Y6Kの多型変異体、種間相同体およびアシルのTh1細胞誘導性ペプチドを除外すべき
ではない。

【0081】

必須のTh1細胞誘導能を保持するために、少数の（例えば1、2もしくは数個）また
は低い割合のアミノ酸を改変する（挿入、付加、欠失および/または置換する）ことがで
きる。本明細書では、「数個」という用語は、5またはそれ以下のアミノ酸、例えば4ま
たは3またはそれ以下のアミノ酸を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは2
0%もしくはそれ以下、より好ましくは15%もしくはそれ以下、さらに一層好ましくは
10%もしくは8%もしくはそれ以下、または1~5%である。

【0082】

本発明の好ましいペプチド、すなわち配列番号：1および2（LY6K 119-14
2、172-191）のホモロジー解析は、これらのペプチドが他の公知のヒト遺伝子産
物に由来するペプチドと有意の相同性を有さないことを確認する。したがって、免疫療法
に使用した場合、これらのペプチドが未知のまたは望ましくない免疫応答を生じる可能性
は有意に低い。したがって、これらのペプチドは、がん患者においてLY6Kに対する免
疫を誘発するために極めて有用であると期待される。

【0083】

免疫療法に関連して使用する場合、本発明のペプチドまたはその断片は、抗原提示細胞の表面に、好ましくはHLAクラスII抗原との複合体として、提示されなければならない。それゆえ、Th1細胞を誘導するだけでなく、HLAクラスII抗原に高い結合親和性も有するペプチドを選択することが好ましい。そのために、ペプチドをアミノ酸残基の置換、挿入、欠失および/または付加によって改変し、改善された結合親和性を有する改変されたペプチドを生成することができる。

【0084】

本発明はまた、上述したペプチドのN末端および/またはC末端への1~2個のアミノ酸の付加を企図する。高いHLA抗原結合親和性を有し、Th1細胞誘導能を保持するそのような改変ペプチドも本発明に含まれる。

例えば、本発明は、HLAクラスII抗原に結合し、Th1細胞誘導能を有し、配列番号：1および2から成る群より選択されるアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列を含む、31、30、29、28、27または26未満のアミノ酸長の単離されたペプチドを提供する。

これらのペプチドはまた、APCと接触するかまたはAPCに導入された場合、APC中でプロセッシングされて、プロセッシングされた断片をその上に提示し得る。例えば、本発明のペプチドは、APCの表面に提示される通常11~26(典型的には15~25)アミノ酸残基から成る断片にプロセッシングされ得る。

【0085】

しかしながら、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫疾患および/または特定の物質に対するアレルギー症状などの負の副作用を誘導し得る。それゆえ、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列とマッチする状況を回避するために、利用可能なデータベースを用いて最初にホモロジー検索を実施することが望ましいと考えられる。目的のペプチドと比較して同一のペプチドまたは1もしくは2個のアミノ酸相違を有するペプチドが自然界に存在しないことがホモロジー検索から明らかになった場合は、そのような副作用の危険性を伴わずにHLA抗原とのその結合親和性を高めるためならびに/またはそのTh1細胞および/もしくはCTL誘導能を高めるために目的のペプチドを改変することができる。

【0086】

上述したHLAクラスII抗原に高い結合親和性を有するペプチドは極めて有効であると期待されるが、指標として高い結合親和性の存在に従って選択した候補ペプチドを、Th1細胞誘導能の存在に関してさらに検討する。本明細書では、「Th1細胞誘導能」という語句は、APCと接触した場合、APC上でTh1細胞を誘導する能力を付与するペプチドの能力を示す。さらに、「Th1細胞誘導能」は、Th1細胞の活性化および/またはTh1細胞の増殖を誘導する、IFN- γ 産生を含むTh1細胞媒介性サイトカイン産生を促進して他の細胞(例えばCTL、マクロファージ)を助けるおよび/または刺激する、ペプチドの能力を含む。

【0087】

Th1細胞誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を担持する抗原提示細胞(例えばBリンパ球、マクロファージおよび樹状細胞(DC))、またはより詳細にはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、ペプチドで刺激した後、CD4陽性T細胞(CD4⁺T細胞)と混合して、次にCD4⁺T細胞によって産生され、放出されたIFN- γ を測定することによって達成できる。あるいは、ペプチドのTh1細胞誘導能は、Th1細胞によるCTL活性化に基づいて評価することができる。例えば、CD4⁺T細胞を試験ペプチドで刺激したDCと共培養し、次にCTLおよびCTLの標的細胞と混合する。標的細胞は、⁵¹Crなどで放射性標識することができ、Th1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化されたCTLの細胞傷害活性を、標的細胞から放出された放射能から算出することができる。あるいは、Th1細胞誘導能は、試験ペプチドで刺激した抗原提示細胞(APC)の存在下でTh1細胞によって産生され、放出されたIFN- γ を測定し、抗IF

10

20

30

40

50

N - モノクローナル抗体を用いて培地上の阻害領域を可視化することによって評価できる。

【0088】

上述した改変に加えて、本発明のペプチドはまた、生じる結合ペプチドがもとのペプチドのTh1細胞誘導能を保持する限り、他の物質に結合することもできる。適切な物質の例には、例えばペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成ポリマー等が含まれる。本発明のペプチドは、修飾がもとのペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化等のような修飾を含み得る。これらの種類の修飾は、付加的な機能（例えば標的化機能および送達機能）を付与するまたはペプチドを安定化するために実施できる。

10

【0089】

例えば、ペプチドのインピボでの安定性を高めるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体または非天然アミノ酸を導入することは当技術分野において公知である；この概念は本発明のペプチドにも適合させ得る。ペプチドの安定性は多くの方法で評価することができる。例えば、ペプチダーゼならびにヒト血漿および血清などの様々な生物学的媒質を用いて安定性を試験することができる（例えばVerhoeft et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11:291-302参照）。

【0090】

本発明のペプチドは、HLAクラスII抗原と組み合わせた複合体としてAPCの表面に提示され、その後Th1細胞を誘導し得る。それゆえ、APCの表面でHLAクラスII抗原と複合体を形成するペプチドも本発明に含まれる。本発明のペプチドを提示するAPCをワクチンとして接種することができる。

20

【0091】

上記複合体に含まれるHLA抗原の型は、治療および/または予防を必要とする対象の型とマッチしなければならない。例えば、日本人においては、HLA-DP5、DR8およびDR15が一般的であり、それゆえ日本人患者の治療に適する。典型的には、臨床において、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を前もって検査し、これにより特定のHLAクラスII抗原への結合能力を有するペプチドの適切な選択が可能になる。好ましい態様では、本発明のペプチドはTh1細胞をプロミスキャスに誘導することができる。本明細書では、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって拘束されるTh1細胞を誘導することができる場合、このペプチドのTh1細胞誘導能は「プロミスキャス」である。言い換えると、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される場合、そのような抗原認識は「プロミスキャス」とみなされる。ペプチドに関連して使用する場合、「少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される」という語句は、ペプチドまたはその断片が少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子に結合できることを示す。例えば、LY6K(119-142)(配列番号:1)およびLY6K(172-191)(配列番号:2)は、それぞれHLA-DP5、DR15およびDR8、ならびにHLA-DR15および1つまたはいくつかのHLA-DQによって認識される。それゆえ、これらのペプチドは「プロミスキャス」なエピトープの典型的な例である。

30

40

【0092】

HLA-DP5、HLA-DR15またはHLA-DR8陽性APCを使用する場合は、配列番号:1のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましく使用される。他方で、HLA-DR15陽性APCを使用する場合は、好ましいペプチドは配列番号:2のアミノ酸配列を有するペプチドである。

したがって、好ましい態様では、配列番号:1のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にHLA-DP5、HLA-DR15またはHLA-DR8を有すると同定された対象においてTh1細胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号:2のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にHLA-DR15を有すると同定された対象において

50

Th 1 細胞の誘導のために使用し得る。

【0093】

III. LY6Kペプチドの調製

本発明のペプチドは周知の技術を用いて調製することができる。例えば、本発明のペプチドは、組換えDNA技術または化学合成を用いて、合成によって調製することができる。本発明のペプチドは、個別にまたは2もしくはそれ以上のペプチドから成るより長いポリペプチドとして合成することができる。本発明のペプチドを、次に、他の天然の宿主細胞タンパク質およびその断片、または他の何らかの化学物質を実質的に含まないようにするために、単離する、すなわち精製することができる。

本発明のペプチドは、修飾がもとの参照ペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために使用できる、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の組み込みが含まれる。

【0094】

本発明のペプチドは、選択したアミノ酸配列に基づく化学合成を通して得ることができる。この合成に適合させ得る従来のペプチド合成法の例には以下が含まれる：

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966;

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

(iii) 「ペプチド合成」(日本語)、丸善、1975;

(iv) 「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語)、丸善、1985;

(v) 「医薬品の開発」(日本語)、続第14巻(ペプチド合成)、広川書店、;

(vi) 国際公開第99/67288号;および

(vii) Barany G. & Merrifield R. B., Peptide Synthesis Vol. 2, 「Solid Phase Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1980, 100-118。

【0095】

あるいは、本発明のペプチドは、ペプチドを作製するための任意の公知の遺伝子工学的方法を適合させて得ることができる(例えばMorrisson J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al) 1983, 101:347-62)。例えば、最初に、発現可能な形態で(例えばプロモーター配列に対応する調節配列の下流に)目的のペプチドをコードするポリヌクレオチドを保有する適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に形質転換する。次に宿主細胞を培養して関心対象のペプチドを生産させる。本発明のペプチドはまた、インビトロ翻訳系を採用してインビトロで作製することもできる。

【0096】

IV. ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明の前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供する。これらには、天然のLY6K遺伝子(GenBankアクセッション番号NM_017527(配列番号:7))に由来するポリヌクレオチド、ならびにその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書では、「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重に起因して、数多くの機能的に同一の核酸が所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって特定されるあらゆる位置で、コドンを、コードされるポリペプチドを変化させることなく前述した対応するコドンのいずれかに変化させることができる。そのような核酸変異は、保存的に改変された変異の一種である、「サイレント変異」である。ペプチドをコードする本明細

10

20

30

40

50

書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレント変異も表す。当業者は、核酸中の各々のコドン（通常メチオニンの唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く）を、機能的に同一の分子を生じるように改変できることを認識する。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、各々の開示される配列において暗黙のうちに表現される。

【0097】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNAおよびそれらの誘導体で構成され得る。当技術分野において周知のように、DNAはA、T、CおよびGなどの塩基で適切に構成され、Tは、RNAではUに置き換えられる。当業者は、非天然の塩基もポリヌクレオチドに含まれ得ることを認識する。

10

【0098】

本発明のポリヌクレオチドは、その間に介在アミノ酸配列を含んでまたは含まずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在アミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位（例えば酵素認識配列）を提供することができる。さらに、ポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードするコード配列に加えて任意の付加的な配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであり得るか、またはマーカー遺伝子などを含む発現ベクター（プラスミド）であり得る。一般に、そのような組換えポリヌクレオチドは、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを使用する従来の組換え技術を通じたポリヌクレオチドの操作によって調製することができる。

20

【0099】

組換えおよび化学合成の両方の技術が、本発明のポリヌクレオチドを作製するために使用できる。例えば、ポリヌクレオチドは適切なベクターへの挿入によって作製でき、これをコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現させ得る。あるいは、PCR技術または適切な宿主における発現を用いてポリヌクレオチドを増幅することができる（例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989参照）。あるいは、ポリヌクレオチドは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5に記載されているように、固相技術を用いて合成することができる。

30

【0100】

V. 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞 (APC) も提供する。本発明のペプチドと接触させることによって得られるAPCは、治療および/または予防の対象である患者に由来することができ、それだけでまたは本発明のペプチド、Th1細胞またはCTLを含む他の薬剤と組み合わせてワクチンとして投与することができる。

【0101】

APCは特定の種類の細胞に限定されず、樹状細胞 (DC)、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞および活性化T細胞を含み、これらは、リンパ球によって認識されるためにタンパク質性抗原をその細胞表面に提示することが公知である。DCはAPCの中で最も強力なTh1細胞誘導活性を有する代表的なAPCであるので、DCは本発明のAPCとして有用である。

40

【0102】

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、MHCクラスI抗原によって媒介されるCTL応答ならびにTh1 (クラスII) を誘導することもできる。一般に、MHCクラスI抗原によって認識されるエピトープの長さは、MHCクラスII抗原のもの (15またはそれ以上のアミノ酸残基) より短い (例えば8~10アミノ酸残基) ことが周知である。それゆえ、本発明のペプチドのプロセッシングされた産物はCTLの誘導をも

50

たらず。実際に、LY6K(172-191; 配列番号: 2) から誘導されるCTLは、CTL認識エピトープとして既に同定されている断片(RYCNLEGGPI; 配列番号: 3) を認識する。したがって、本発明のペプチドは、Th1を誘導するだけでなく、APC内でのプロセッシング後にCTLも誘導する。言い換えると、本発明のペプチドと接触したAPCは、本発明のペプチドをプロセッシングして、MHCクラスII抗原と共にそれらの断片を提示し、ならびにMHCクラスII抗原と共にそれらの全体を提示する。その結果として、MHCクラスII抗原と共にAPCに提示される本発明のペプチドを認識するTh1、およびペプチドのプロセッシングされた断片を介して誘導されるCTLの両方が、本発明のペプチドを使用して誘導され得る。

【0103】

例えば、APCは、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボまたはインビボで本発明のペプチドと接触させる(刺激する)ことによって得られる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドまたはその断片を提示するAPCが対象の体内で誘導される。本明細書では、「APCを誘導する」という語句は、APCを本発明のペプチドと接触させて(で刺激して)、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体をAPCの表面に提示させることを含む。あるいは、本発明のペプチドをAPCに導入して、本発明のペプチドまたはその断片をAPCに提示させた後、APCをワクチンとして対象に投与することができる。例えば、エクスピボ投与は、

- a: 最初の対象からAPCを回収する段階、
- b: 段階aのAPCを本発明のペプチドと接触させる段階、および
- c: ペプチドをロードしたAPCを2番目の対象に投与する段階

を含み得る。

【0104】

最初の対象と2番目の対象は同じ個体であってもよく、または異なる個体でもよい。あるいは、本発明によれば、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、前記方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。段階(b)によって得たAPCをワクチンとして対象に投与することができる。

【0105】

本発明の1つの側面として、本発明のAPCは高レベルのTh1細胞誘導能を有する。本明細書では、「高レベルのTh1細胞誘導能」という語句において、高レベルとは、ペプチドと接触していないAPC、またはTh1細胞を誘導することができないペプチドと接触したAPCによるTh1細胞誘導能のレベルと比較したものである。本明細書では、APCに関連して使用する場合、「Th1細胞誘導能」という語句は、CD4⁺T細胞と接触した場合にTh1細胞を誘導するAPCの能力を示す。高レベルのTh1細胞誘導能を有するそのようなAPCは、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をインビトロでAPCに移入する段階を含む方法によって調製することができる。導入する遺伝子はDNAまたはRNAの形態であり得る。導入のための方法の例には、特に限定されることなく、この分野で従来実施されている様々な方法が含まれ、例えばリポフェクション、エレクトロポレーションおよびリン酸カルシウム法などが使用できる。より詳細には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第2000-509281号に記載されているように実施することができる。遺伝子をAPCに移入することにより、遺伝子は細胞内で転写、翻訳を受け、その後得られたタンパク質はMHCクラスIIまたはクラスIIによってプロセッシングされて、提示経路を通してペプチドの提示へと進む。あるいは、本発明のAPCは、APCを本発明のペプチドと接触させる段階を誘導する方法によって調製することができる。

【0106】

好ましい態様では、本発明のAPCは、HLA-DP5、HLA-DR15およびHLA-DR8の群から選択されるMHCクラスII分子と本発明のペプチド（配列番号：1から選択されるアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示するAPCであり得る。別の態様では、本発明のAPCは、HLA-DR15およびHLA-DQの1つの群から選択されるMHCクラスII分子と本発明のペプチド（配列番号：2のアミノ酸配列を含む）の複合体を自らの表面に提示するAPCであり得る。好ましくは、HLA-DP5、HLA-DR15およびHLA-DR8は、それぞれHLA-DPB1*05:01、HLA-DRB1*15:02およびHLA-DRB1*08:03であり得る。

【0107】

VI. Tヘルパー1型細胞（Th1細胞）

本発明のペプチドのいずれかに対して誘導されるTh1細胞は、インビボでがん細胞を標的とするCTLを含むエフェクター細胞のいずれかの免疫応答を強化し、したがってペプチド自体と同様の方法で、ワクチンとして役立つ。そこで、本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかによって特異的に誘導されるまたは活性化される単離されたTh1細胞も提供する。

【0108】

そのようなTh1細胞は、（1）1つまたは複数の本発明のペプチドを対象に投与し、対象からTh1細胞を回収すること、（2）APCおよびCD4⁺T細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ（で刺激し）、その後Th1細胞を単離すること、（3）CD4⁺T細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のAPCと接触させること、または（4）T細胞受容体（TCR）サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドもしくはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをCD4⁺T細胞に導入することによって得られ、ここで、TCRはMHCクラスII分子と本発明のペプチドの複合体に結合することができる。（3）の方法のためのそのようなAPCは上述した方法によって調製することができる。（4）の方法の詳細は、以下の「VII. T細胞受容体（TCR）」の章で述べる。

【0109】

本発明のAPCでの刺激によって誘導されたTh1細胞は、治療および/または予防の対象である患者に由来してもよく、作用を調節するために単独でまたは本発明のペプチドを含む他の薬剤と組み合わせて投与することができる。得られたTh1細胞は、細胞性免疫に關与する免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ）を活性化するおよび/または刺激することができる。本発明のTh1細胞によって活性化され得るそのような免疫細胞には、がん細胞などの標的細胞に対して細胞傷害性を示すCTLが含まれる。例えば、そのようなCTLの標的細胞は、内因性にLY6Kを発現する細胞（例えばがん細胞）、またはLY6K遺伝子をトランスフェクトされた細胞であり得る。好ましい態様では、本発明のペプチドは、CTLエピトープペプチドの少なくとも1つのアミノ酸配列を含むことができ、Th1細胞に加えて、がん細胞などのLY6K発現細胞に対するCTLも誘導することができる。この場合、本発明のペプチドは、Th1細胞およびCTLをインビボで同時にまたは連続的に誘導することができ、誘導されたTh1細胞は、誘導されたCTLを有効に活性化することができる。したがって、CTLエピトープペプチドの少なくとも1つのアミノ酸配列を含むそのようなペプチドは、がん免疫療法のための適切なペプチドである。

【0110】

さらに、本発明のTh1細胞は、他の標的細胞に対する何らかのCTLを抗原非依存的に活性化するおよび/または刺激する様々なサイトカイン（例えばIFN- γ ）を分泌する。したがって、本発明のTh1細胞は、LY6K以外の腫瘍関連抗原（TAA）を発現する細胞を標的とするCTL活性を増強することにも寄与し得る。したがって、本発明のTh1細胞は、本発明のペプチドおよびAPCと同様に、LY6Kを発現する腫瘍だけでなく、他のTAAを発現する腫瘍のための免疫療法にも有用である。

10

20

30

40

50

【0111】

いくつかの態様において、本発明のTh1細胞は、HLA-DR、HLA-DPまたはHLA-DQ抗原と本発明のペプチドの複合体を提示する細胞を認識するTh1細胞である。Th1細胞に関連して、「細胞を認識する」という語句は、そのTCRを介した細胞表面のMHCクラスII分子と本発明のペプチドの複合体の結合および抗原特異的に活性化されることを指す。本明細書では、「抗原特異的に活性化される」という語句は、特定のMHCクラスII分子とペプチドに反応して活性化されることを指し、活性化されたTh1細胞からのサイトカイン産生が誘導される。好ましい態様では、HLA-DRは、HLA-DR8およびHLA-DR15から成る群より選択され得る。好ましくは、HLA-DR8およびHLA-DR15は、それぞれHLA-DRB1*08:03およびHLA-DRB1*15:02であり得る。他方で、HLA-DP5はHLA-DP抗原の好ましい例である。より好ましくは、HLA-DP5はHLA-DPB1*05:01であり得る。

10

【0112】

VII. T細胞受容体(TCR)

本発明はまた、T細胞受容体(TCR)のサブユニットを形成することができる1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する組成物、およびこれを使用する方法を提供する。そのようなTCRサブユニットは、LY6Kペプチドを提示するAPCに対する特異性をCD4⁺T細胞に付与するTCRを形成する能力を有する。当技術分野において公知の方法を用いることにより、本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞のTCRサブユニットとして鎖および鎖の核酸を同定することができる(国際公開第2007/032255号およびMorgan et al., J Immunol, 171, 3288(2003))。誘導体TCRは、LY6Kペプチドを提示するAPCに高い結合力で結合することができ、場合により効率的なサイトカイン産生を媒介することができる。

20

【0113】

TCRサブユニットをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド(すなわちTCRサブユニットの両方をコードする単一ポリヌクレオチドまたは各々別々のTCRサブユニットをコードする複数のポリヌクレオチド)を適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは当技術分野において周知である。ポリヌクレオチドまたはそれらを含むベクターは、CD4⁺T細胞、例えば患者由来のCD4⁺T細胞に有用に移入することができる。好都合には、本発明は、患者自身のT細胞(または別の哺乳動物のT細胞)の速やかな改変を可能にし、優れたがん細胞死滅特性を有する改変されたT細胞を迅速かつ容易に生産する、すぐに入手可及な組成物を提供する。

30

【0114】

本発明はさらに、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドでの形質導入によって調製されるTh1細胞を提供し、ここで、TCRサブユニットはLY6Kペプチド(例えばHLA-DP5、HLA-DR15もしくはHLA-DR8に関しては配列番号:1、およびHLA-DR15もしくはHLA-DQの1つに関しては配列番号:2)に結合することができる。形質導入されたTh1細胞は、インビボでがん細胞にホーミングすることができ、インビトロで周知の培養方法によって増殖させることができる(例えばKawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461(1989))。上述したように調製したTh1細胞は、治療または保護を必要とする患者においてがんを治療するまたは予防する上で有用な免疫原性組成物を形成するために使用できる。

40

【0115】

VII. 薬剤または医薬組成物

本発明の方法および組成物ががんの「治療」に関連して有用性を有する限り、治療が臨床上の利益、例えばLY6K遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、有病率または転移能の低減を導く場合、治療は「有効」とみなされる。治療が予防的に適用

50

される場合、「有効」は、がんの形成を遅延させるもしくは予防するまたはがんの臨床症状を予防するもしくは軽減することを意味する。有効性は、特定の腫瘍型を診断するまたは治療するための任意の公知の方法に関連して決定される。

【0116】

本発明の方法および組成物ががんの「予防」(preventionおよびprophylaxis)に関連して有用性を有する限り、そのような用語は、本明細書では、疾患による死亡率または罹患率の負荷を低減させる任意の行為を指すために互換的に使用される。予防(preventionおよびprophylaxis)は、「一次、二次および三次予防レベルで」行われ得る。一次予防(preventionおよびprophylaxis)は疾患の発生を回避し、一方二次および三次レベルの予防(preventionおよびprophylaxis)は、疾患の進行および症状の出現の予防(preventionおよびprophylaxis)、ならびに機能を回復させ、疾患に関連する合併症を減少させることによって既存の疾患の負の影響を低減することを目指す活動を包含する。あるいは、予防(preventionおよびprophylaxis)は、特定の障害の重症度を軽減すること、例えば腫瘍の増殖および転移を低減すること、血管新生を減少させることを目指す広範囲の予防的治療を含む。

10

【0117】

本発明に関連して、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/またはその術後再発の防止は、以下の段階、例えばがん細胞の外科的除去、がん性細胞の成長の阻害、腫瘍の退縮または後退、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退行、ならびに転移の低減または阻害などの段階のいずれかを含む。がんの有効な治療および/または予防は、がんを有する個体の死亡率を低下させ、予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、がんに伴う検出可能な症状を軽減する。例えば、有効な治療および/または予防を構成する症状の低減または改善は、10%、20%、30%もしくはそれ以上の低減または安定な疾患を含む。

20

【0118】

上述したように、本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞を助けることができる。Th1細胞によって分泌されるサイトカインは抗原非依存的にCTLに影響を及ぼし得るので、そのような免疫細胞には、LY6Kを発現するがん細胞に対するCTLだけでなく、他のTAAを発現するがん細胞に対するCTLも含まれる。したがって、本発明は、少なくとも1つの本発明のペプチドを含有する薬剤または医薬組成物を提供する。薬剤または医薬組成物において、そのようなペプチドは治療的または医薬的に有効な量で存在する。本発明の薬剤または組成物によって誘導されるTh1細胞は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞に影響を及ぼすサイトカインを分泌することができるので、本発明の薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞(例えばCTL、マクロファージ)を助ける、刺激するおよび/または増強するために有用である。それゆえ、本発明の薬剤または組成物は、CTLを含むそのような免疫細胞によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するあらゆる目的に有用である。例えば、本発明の薬剤または組成物は、そのような免疫細胞によって媒介されるがんまたは腫瘍に対する免疫応答を増強するまたは促進することができるので、本発明は、がん

30

40

【0119】

さらに、図6に示すように、本発明の過程で同定されたLY6K由来ペプチドは、CTLエピトープ単独での刺激と比較してCTL誘導を増強することが確認されている。それゆえ、本発明はまた、HLA-A24などのMHCクラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物も提供する。別の態様では、本発明はさらに、MHCクラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激する

50

ための薬剤または組成物を製造するための本発明のペプチドの使用を提供する。

【0120】

好ましい態様において、本発明の過程で同定されたLY6K由来ペプチドは、Th1細胞ならびにLY6K発現細胞に対するCTLを含み得る。したがって、本発明はまた、LY6Kを発現するがんまたは腫瘍に対するCTLの誘導における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物も提供する。

【0121】

さらに、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するのに使用することができる。

LY6Kの発現は、正常組織と比較して、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、骨肉腫、膵がんおよび軟組織腫瘍を含むいくつかのがん型において特異的に上昇するので(国際公開第2008/102557号、国際公開第2009/016691号および国際公開第2004/031413号)、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の防止のために使用することができる。したがって、本発明は、本発明のペプチドの1つまたは複数または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の防止のための薬剤または医薬組成物を提供する。あるいは、本発明のペプチドを、薬剤または医薬組成物としての使用のために、APCなどの前記細胞のいずれかの表面で発現させることができる。加えて、前記Th1細胞も、本発明の薬剤または医薬組成物の有効成分として使用することができる。

【0122】

別の態様では、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤の製造における、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分の使用を提供する。

【0123】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するのに使用するための、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分を提供する。

【0124】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、有効成分として、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分と医薬的または生理学的に許容される担体を製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

【0125】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分を医薬的または生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程も提供する。

10

【0126】

あるいは、本発明の医薬組成物または薬剤は、がんまたは腫瘍の予防およびその術後再発の防止のいずれかまたは両方のために使用し得る。

【0127】

本発明の薬剤または医薬組成物はワクチンとして使用される。本発明に関連して、「ワクチン」(免疫原性組成物とも称される)という語句は、動物に接種した場合抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する組成物を指す。

【0128】

本発明の薬剤または医薬組成物は、対象または患者においてがんもしくは腫瘍を治療するおよび/もしくは予防する、ならびに/またはその術後再発もしくは転移性再発を防止するために使用できる。そのような対象の例には、ヒトならびに、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒヒおよびチンパンジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含むがこれらに限定されない他の哺乳動物が含まれる。

20

【0129】

本発明の過程で、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、いくつかのHLA-DR1、HLA-DPおよび/またはHLA-DQ分子(すなわちHLA-DP5、HLA-DR8、HLA-DR15、1つまたはいくつかのHLA-DQ)によって拘束されるプロミスキャスなTh1細胞エピトープであることが見出され、これらは、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答に起因する、がんに対する強力で特異的な免疫応答を誘導することができる候補であり得る。それゆえ、配列番号：1または2のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含む本発明の薬剤または医薬組成物は、MHCクラスII分子としてHLA-DP5、HLA-DR15、HLA-DR8の中から選択される少なくとも1つを有する対象への投与に特に適する。さらに、本明細書で明らかにするように、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチド(配列番号：6のアミノ酸配列を有するペプチドを含む)は、未知のHLA-DQ分子に結合することが確認された(図3)。それゆえ、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを含む薬剤または医薬組成物は、HLA-DR15を有さない対象への投与に適し得る。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む薬剤または医薬組成物にも当てはまる。

30

40

【0130】

あるいは、好ましい態様では、本発明の過程で同定されたペプチドは、HLA-A24を有する対象に適用された場合、LY6Kに特異的なCTLを誘導することもできる。したがって、本発明のペプチドの投与を通して、Th1細胞の誘導に加えてLY6Kを発現するがんに対するCTL応答が誘導され得ることがさらに期待される。さらに、本発明のペプチドは、LY6K発現細胞に対するCTL応答を、そのプロセッシングを介して誘導することができるだけでなく、それによって媒介されるTh1細胞誘導により、CTL応答を増強することもできる。したがって、同じ対象においてTh1細胞およびLY6K特異的CTLの両方の誘導を達成するために、例えば、治療される対象は、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを投与する場合は、好ましくはMHCクラスII分子として

50

H L A - D R 1 5 を有し、および M H C クラス I 分子として H L A - A 2 4 を有する。さらに、配列番号：2 のアミノ酸配列を有するペプチド（配列番号：6 のアミノ酸配列を有するペプチドを含む）は、1 つまたはいくつかの H L A - D Q 分子に結合することができるので、そのようなペプチドは、M H C クラス I 分子として H L A - A 2 4 を有し、および M H C クラス I I 分子として H L A - D R 1 5 を有さない対象において T h 1 細胞および C T L を誘導し得る。

【0131】

別の態様では、本発明は、T h 1 細胞誘導に依存するがん免疫療法を提供する。本発明によって提供される治療戦略は、T h 1 細胞から分泌されるサイトカインによって活性化される免疫細胞が目的のがん細胞を標的とする限り、L Y 6 K 発現とは無関係に任意のがんに適用でき、有効である。

10

本発明の薬剤または医薬組成物によって治療されるべきがんまたは腫瘍には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん（N S C L C）、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍（H N M T）が含まれるがこれらに限定されず、そのようながんの好ましい例には、例えば膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん（N S C L C）、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍（H N M T）を含む、L Y 6 K を発現する任意の種類のがんまたは腫瘍が含まれる。

【0132】

本発明の薬剤または医薬組成物は、前記有効成分に加えて、T h 1 細胞または C T L を誘導する能力を有する他のペプチド、前記他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、前記他のペプチドまたはその断片を提示する他の細胞等を含むし得る。T h 1 細胞または C T L を誘導する能力を有するそのような「他の」ペプチドの例には、がん特異抗原（例えば同定された T A A）に由来するペプチドが含まれるが、これに限定されない。

20

【0133】

必要に応じて、本発明の薬剤または医薬組成物は、有効成分、例えば本発明のペプチドのいずれかの抗腫瘍作用を他の治療物質が阻害しない限り、場合により他の治療物質を付加的な有効成分として含んでもよい。例えば、製剤は、抗炎症薬、鎮痛剤、化学療法剤等を含み得る。医薬自体に他の治療物質を含めることに加えて、本発明の医薬を1つまたは複数の他の薬理的剤と連続的にまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理的作用物質の量は、例えば、使用される薬理的剤の種類、治療される疾患、ならびに投与のスケジュールおよび投与経路に依存する。

30

【0134】

当業者は、本明細書で特に言及する成分に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物が、対象となる製剤の種類を考慮して当技術分野において慣例的な他の剤（例えば増量剤、結合剤、希釈剤、賦形剤等）も含み得ることを認識する。

【0135】

本発明の1つの態様では、本発明の薬剤または医薬組成物を、治療する疾患、例えばがんの病的状態を治療するために有用な材料を含む製品およびキットに含めることができる。前記製品は、ラベルを付した本発明の薬剤または医薬組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器上のラベルは、剤が疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防に使用されることが示されるべきである。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

40

【0136】

上述した容器に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物を含むキットは、場合により医薬的に許容される希釈剤を収容する第二の容器をさらに含んでもよい。第二の容器は、使用のための指示書と共に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0137】

50

薬剤または医薬組成物は、所望する場合は、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置中に包装することができる。パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与のための指示書が添付され得る。

【0138】

(1) ペプチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明のペプチドは、薬剤もしくは医薬組成物として直接投与することができるか、または必要な場合は、従来製の製剤方法によって製剤化される。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬剤に通常使用される担体、賦形剤などが、特に制限されることなく適宜含まれ得る。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれるが、これらに限定されない。さらに、薬剤または医薬組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、防腐剤、界面活性剤などを含有し得る。本発明の薬剤または医薬組成物は抗がん目的に用いることができる。

10

【0139】

本発明のペプチドは、インビボでTh1細胞を誘導する本発明のペプチドの2つまたはそれ以上で構成される、組合せとして調製することができる。ペプチドの組合せはカクテルの形態をとってもよく、または標準的な技術を用いて互いに複合化し得る。例えば、ペプチドを化学的に連結するかまたは単一融合ポリペプチド配列として発現させることができる。組合せ中のペプチドは、同じであってもよくまたは異なってもよい。

20

【0140】

本発明のペプチドを投与することにより、ペプチドまたはその断片がAPC上のHLAクラスII抗原によって高密度で提示され、次に提示されたペプチドとHLAクラスII抗原との間で形成された複合体に対して特異的に反応するTh1細胞が誘導される。あるいは、対象からAPC(例えばDC)を取り出し、次に本発明のペプチドによって刺激して、本発明のペプチドまたはその断片のいずれかを自らの表面に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再投与して、対象においてTh1細胞を誘導することができ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

【0141】

本発明のペプチドを有効成分として含む、がんまたは腫瘍の治療および/または予防のための薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫を有効に樹立することが公知のアジュバントも含み得る。あるいは、薬剤または医薬組成物は、他の有効成分と共に投与することができ、または顆粒に製剤化することによって投与できる。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に(または連続的に)投与した場合、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。本明細書で企図されるアジュバントには、文献(Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89)に記載されているものが含まれる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、不完全フロイントアジュバント(IFA)、完全フロイントアジュバント(CFA)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、水中油型エマルジョン等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0142】

さらに、リポソーム製剤、ペプチドが直径数マイクロメートルのビーズに結合している顆粒製剤、および脂質がペプチドに結合している製剤を好都合に使用し得る。

40

【0143】

本発明の別の態様では、本発明のペプチドはまた、医薬的に許容される塩の形態で投与し得る。好ましい塩の例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸(例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸等)との塩、および無機酸(例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等)との塩が含まれる。本明細書で使用する場合、「医薬的に許容される塩」という語句は、化合物の生物学的有効性および特性を保持し、無機酸または無機塩基、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン

50

酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等との反応によって得られる塩を指す。

【0144】

いくつかの態様において、本発明の薬剤または医薬組成物は、Th1細胞および場合によりCTLをプライミングする成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでTh1細胞および場合によりCTLをプライミングすることができる剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリシン残基の - アミノ基および - アミノ基に結合し、次に本発明のペプチドに連結することができる。その後、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子中で直接投与する、リポソーム中に組み込む、またはアジュバント中に乳化することができる。Th1細胞および場合によりCTL応答の脂質プライミングの別の例として、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン(P3CSS)などの大腸菌(E. coli)リポタンパク質が、適切なペプチドに共有結合した場合、Th1細胞および場合によりCTLをプライミングするために使用できる(例えばDerese et al., Nature 1989, 342: 561-4参照)。

10

【0145】

適切な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹腔内および静脈内注射など、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与(すなわち直接注入)が含まれるが、これらに限定されない。投与は、単回投与によって実施でき、または反復投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量のペプチドを、LY6Kを発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはLY6Kを発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のペプチドを、LY6Kを発現するがんを担持する対象に投与することができる。本発明のペプチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日から数ヶ月に1回投与することができる。当業者は、適切で最適な用量を容易に決定することができる。

20

【0146】

(2)ポリヌクレオチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

30

本発明の薬剤または医薬組成物はまた、本明細書で開示するペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能な形態で含有し得る。本明細書では、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞内に導入された場合、抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてインビボで発現されることを意味する。例示的な態様では、関心対象のポリヌクレオチドの核酸配列は、ポリヌクレオチドの発現に必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムへの安定な組み込みを達成するのに必要なものを備え得る(相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12参照)。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 米国特許第5,580,859号; 同第5,589,466号; 同第5,804,566号; 同第5,739,118号; 同第5,736,524号; 同第5,679,647号; および国際公開第98/04720号参照。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA」、促進(プピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性)送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性(「遺伝子銃」)または圧力媒介性送達が含まれる(例えば米国特許第5,922,687号参照)。

40

【0147】

本発明のペプチドは、ウイルスベクターまたは細菌ベクターによっても発現され得る。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。このアプローチは、例えば本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するベクターとしての、ワクシニアウイルスの使用を含む。宿主への導入後、組

50

換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を惹起する。免疫プロトコルに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターはBCG(カルメット・ゲラン桿菌)である。BCGベクターは、Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60に記載されている。治療的投与または免疫のために有用である多種多様な他のベクター、例えばアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌(Salmonella typhi)ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えばShata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85参照。

10

【0148】

対象へのポリヌクレオチドの送達は、直接的であってもよく、この場合対象はポリヌクレオチドを担持するベクターに直接暴露され、または間接的であってもよく、この場合は最初にインピトコで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次に細胞を対象に移植する。これら2つのアプローチは、それぞれインピボおよびエクスピボ遺伝子治療として公知である。

【0149】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215参照)。本発明にも使用できる、組換えDNA技術の分野で一般に公知の方法は、eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; およびKrieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990に記載されている。

20

30

【0150】

ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与は、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内および/または腹腔内注射などによって実施してよく、全身投与もしくは標的部位の近傍への局所投与も使用される。投与は、単回投与によって実施でき、または複数回投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量のポリヌクレオチドを、LY6Kを発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはLY6Kを発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のポリヌクレオチドを、LY6Kを発現するがんを担持する対象に投与することができる。適切な担体または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日ごとに1回から数ヶ月ごとに1回投与することができる。当業者は、適切で最適な投与量を容易に決定することができる。

40

【0151】

IX. ペプチド、APCまたはTh1細胞を使用する方法

本発明のペプチドおよびそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のAPCおよびTh1細胞を誘導するために使用できる。本発明のAPCはまた、本発明

50

の T h 1 細胞を誘導するためにも使用できる。ペプチド、ポリヌクレオチドおよび A P C は、任意の他の化合物がこれらの T h 1 細胞誘導能を阻害しない限り、任意の他の化合物と組み合わせて使用することができる。したがって、本発明の前記薬剤または医薬組成物のいずれかを、T h 1 細胞を誘導するために使用でき、それに加えて、ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものも、以下で論じるように A P C を誘導するために使用できる。

【 0 1 5 2 】

(1) 抗原提示細胞 (A P C) を誘導する方法 :

本発明は、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用して A P C を誘導する方法を提供する。A P C の誘導は、「 V . 抗原提示細胞」の章で上述したように実施することができる。本発明はまた、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するための方法も提供し、前記 A P C の誘導は、「 V . 抗原提示細胞」、前出の項目でも言及されている。

あるいは、本発明は、T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 (A P C) を調製するための方法であって、以下の段階 :

(a) A P C を本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階 ; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階の 1 つを含み得る方法を提供する。

【 0 1 5 3 】

あるいは、本発明は、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するための方法であって

(a) A P C を本発明のペプチドと接触させる段階 ; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階

から成る群より選択される段階を含む方法を提供する。

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで実施することができる。

好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。好ましい態様では、T h 1 細胞誘導能を有する A P C の誘導のために使用する A P C は、好ましくは M H C クラス I I 分子として H L A - D P 5、H L A - D R 1 5、H L A - D R 8 および H L A - D Q の 1 つの中から選択される少なくとも 1 つを発現する A P C であり得る。そのような A P C は、M H C クラス I I 分子として H L A - D P 5、H L A - D R 1 5、H L A - D R 8 および H L A - D Q の 1 つの中から選択される少なくとも 1 つを有する対象から得た末梢血単核細胞 (P B M C) から、当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導される A P C は、本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原 (例えば H L A - D P 5、H L A - D R 1 5、H L A - D R 8、H L A - D Q の 1 つ) の複合体を自らの表面に提示する A P C であり得る。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために、本発明の方法によって誘導された A P C を対象に投与する場合、対象は、好ましくは A P C が由来するのと同じ対象である。しかし、対象が A P C ドナーと同じ H L A 型を有する限り、対象は A P C ドナーとは異なる対象であってもよい。

【 0 1 5 4 】

別の態様では、本発明は、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するのに使用するための剤または組成物を提供し、そのような剤または組成物は、本発明の 1 つまたは複数のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

別の態様では、本発明は、A P C を誘導するために製剤化される剤または組成物の製造における、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。

【 0 1 5 5 】

あるいは、本発明はさらに、T h 1 細胞誘導能を有する A P C を誘導するのに使用するための本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリペプチドを提供する。

好ましい態様では、本発明のペプチドは、T h 1 応答を誘導するだけでなく、それらを

プロセッシングした後にCTL応答も誘導する。したがって、好ましい態様では、本発明の方法によって調製されるAPCは、がん細胞を含む、LY6K発現細胞に対するCTLを誘導するためにも有用であり得る。例えば、配列番号：3のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、HLA-A24を発現するAPCがLY6K特異的CTLを誘導するのに適する。

【0156】

(2) Th1細胞を誘導する方法：

さらに、本発明は、本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは本発明のペプチドもしくはその断片を提示するAPCを用いてTh1細胞を誘導するための方法を提供する。本発明はまた、本発明のペプチドとHLAクラスII抗原の複合体を認識するT細胞受容体(TCR)サブユニットを形成することができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用してTh1細胞を誘導するための方法も提供する。好ましくは、Th1細胞を誘導するための方法は、

a：CD4陽性T細胞を、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞と接触させる段階、および

b：TCRが本発明のペプチドまたはその断片とHLAクラスII抗原の複合体を認識するまたは複合体に結合することができる、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをCD4陽性T細胞に導入する段階

から成る群より選択される少なくとも1つの段階を含む。

【0157】

本発明のペプチドを対象に投与した場合、対象の体内でTh1細胞が誘導され、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答(例えばがん細胞を標的とする免疫応答)が増強される。あるいは、本発明のペプチドおよび本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをエクスピボ治療法に使用することができ、この治療法では、対象由来のAPCおよびCD4陽性細胞、または末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ(本発明のペプチドで刺激し)、Th1細胞を誘導した後、活性化したTh1細胞を対象に戻す。例えば、前記方法は、

a：対象からAPCを回収する段階；

b：段階aのAPCを本発明のペプチドと接触させる段階；

c：段階bのAPCをCD4⁺T細胞と混合し、Th1細胞を誘導するために共培養する段階；および

d：段階cの共培養物からCD4⁺T細胞を回収する段階を含み得る。

さらに、Th1細胞は、TCRが本発明のペプチドまたはその断片とHLAクラスII抗原の複合体に結合することができる、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをCD4陽性T細胞に導入することによって誘導できる。そのような形質導入は、「VII.T細胞受容体(TCR)」の章で上述したように実施することができる。

【0158】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。Th1細胞の誘導のために使用するCD4陽性T細胞は、対象から得たPBMCから当技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様では、CD4陽性T細胞のドナーは、MHCクラスII分子としてHLA-DP5、HLA-DR15およびHLA-DR8の中から選択される少なくとも1つを有する対象であり得る。配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドは1つまたはいくつかのHLA-DQに結合することができるので、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを使用する場合は、CD4陽性T細胞のドナーは必ずしも上記MHCクラスII分子を有していなくてもよい。本発明の方法によって誘導されるTh1細胞は、本発明のペプチドまたはその断片とHLAクラスII抗原

10

20

30

40

50

の複合体を自らの表面に提示するA P Cを認識することができるT h 1細胞であり得る。対象においてがんに対する免疫応答（またはM H CクラスI分子によって媒介される免疫応答）を誘導するために、本発明の方法によって誘導されたT h 1細胞を対象に投与する場合、対象は、好ましくはC D 4陽性T細胞が由来するのと同じ対象である。しかし、対象がC D 4陽性T細胞ドナーと同じH L A型を有する限り、対象はC D 4陽性T細胞ドナーとは異なる対象であってもよい。

【0159】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、L Y 6 K発現細胞に対するC T LならびにT h 1細胞を誘導することができる。それゆえ、本発明はさらに、C T Lを誘導するための方法であって、

a : C D 4陽性T細胞およびC D 8陽性T細胞の両方を、本発明のペプチドと接触させたA P Cと共培養する段階；ならびに

b : C D 8陽性T細胞を本発明のペプチドと接触させたA P Cと共培養する段階から成る群より選択される少なくとも1つの段階を含む方法を提供する。

C T Lを誘導するような方法では、本発明のペプチドはA P C内でプロセッシングされてC T Lエピトープペプチドを生成し、生成されたC T LエピトープペプチドはA P Cの表面に提示される。

【0160】

あるいは、本発明によれば、T h 1細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、T h 1細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、T h 1細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。

【0161】

本発明の方法によって誘導されるC D 4⁺T細胞は、ワクチンとして対象に投与することができる。

本発明に関連して、L Y 6 Kを過剰発現するがんをこれらの有効成分で治療することができる。そのようながんの例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん（N S C L C）、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍（H N M T）が含まれるが、これらに限定されない。したがって、有効成分を含有するワクチンまたは医薬組成物の投与の前に、治療されるがん細胞または組織におけるL Y 6 Kの発現レベルが同じ器官の正常細胞と比較して増大しているかどうかを確認することが好ましい。したがって、1つの態様では、本発明は、L Y 6 Kを（過剰）発現するがんを治療するための方法であって、

i) 治療されるべきがんを有する対象から得たがん細胞または組織におけるL Y 6 Kの発現レベルを測定する段階；

i i) L Y 6 Kの発現レベルを正常対照と比較する段階；および

i i i) 上記(a) ~ (d)から成る群より選択される少なくとも1つの成分を、正常対照と比較してL Y 6 Kを過剰発現するがんを有する対象に投与する段階

を含み得る方法を提供する。あるいは、本発明は、L Y 6 Kを過剰発現するがんを有する対象に投与するのに使用するための、上記(a) ~ (d)から成る群より選択される少なくとも1つの成分を含有するワクチンまたは医薬組成物を提供し得る。言い換えると、本発明はさらに、本発明のL Y 6 Kポリペプチドで治療されるべき対象を同定するための方法であって、対象由来のがん細胞または組織におけるL Y 6 Kの発現レベルを測定する段階を含み、遺伝子の正常対照レベルと比較したレベル上昇が、対象が本発明のL Y 6 Kポリペプチドで治療し得るがんを有することを指示する方法を提供する。本発明のがんを治療する方法を以下でより詳細に説明する。

【0162】

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドを投与する前に対象のH L A型を同定し得る。例えば、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくはH L A - D

10

20

30

40

50

P 5、H L A - D R 1 5 または H L A - D R 8 を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：2 のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは H L A - D R 1 5 を有すると同定された対象に投与する。

目的の L Y 6 K の転写または翻訳産物を含む限り、任意の対象由来の細胞または組織を L Y 6 K 発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、血液、唾液および尿などの体組織および体液が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、対象由来の細胞または組織試料は、上皮細胞、より好ましくはがん性上皮細胞またはがん性であることが疑われる組織由来の上皮細胞を含む細胞集団を含有する。さらに、必要な場合は、得られた体組織および体液から細胞を精製し、その後対象由来試料として使用してもよい。

【0163】

本発明の方法によって治療される対象は、好ましくは哺乳動物である。例示的な哺乳動物には、例えばヒト、非ヒト霊長動物、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマおよびウシが含まれるが、これらに限定されない。

本発明によれば、対象から得たがん細胞または組織における L Y 6 K の発現レベルを測定する。発現レベルは、当技術分野において公知の方法を用いて、転写（核酸）産物レベルで測定することができる。例えば、L Y 6 K の m R N A は、ハイブリダイゼーション法（例えばノーザンハイブリダイゼーション）によりプローブを用いて定量化し得る。検出はチップまたはアレイ上で実施し得る。L Y 6 K の発現レベルを検出するにはアレイの使用が好ましい。当業者は、L Y 6 K の配列情報を利用してそのようなプローブを調製することができる。例えば、L Y 6 K の c D N A をプローブとして使用し得る。必要な場合は、プローブを色素、蛍光物質および同位体などの適切な標識で標識化してもよく、遺伝子の発現レベルをハイブリダイズした標識の強度として検出し得る。

【0164】

さらに、L Y 6 K の転写産物（例えば配列番号：7）は、増幅に基づく検出方法（例えば R T - P C R）によってプライマーを使用して定量化し得る。そのようなプライマーは、利用可能な遺伝子の配列情報に基づいて調製し得る。

詳細には、本発明の方法に使用するプローブまたはプライマーは、ストリンジентな条件下、中等度にストリンジентな条件下または低ストリンジентな条件下で L Y 6 K の m R N A にハイブリダイズする。本明細書で使用する場合、「ストリンジентな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジентな条件は配列依存的であり、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高温で認められる。一般に、ストリンジентな条件の温度は、規定のイオン強度および p H で特定の配列の熱融解温度（ T_m ）よりも約 5 低くなるように選択される。 T_m とは、（規定のイオン強度、p H および核酸濃度下で）標的配列に相補的なプローブの 50% が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である。標的配列は一般に過剰に存在するので、 T_m では、プローブの 50% が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジентな条件とは、塩濃度が p H 7.0 ~ 8.3 で約 1.0 M 未満のナトリウムイオン、典型的には約 0.01 ~ 1.0 M のナトリウムイオン（または他の塩）であり、および温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば 10 ~ 50 ヌクレオチド）については少なくとも約 30 であり、より長いプローブまたはプライマーの場合は少なくとも約 60 である条件である。ストリンジентな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によっても達成し得る。

【0165】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出してもよい。例えば、L Y 6 K タンパク質（配列番号：8）の量を測定し得る。翻訳産物としてのタンパク質の量を測定するための方法には、タンパク質を特異的に認識する抗体を使用する免疫測定法が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変抗体が L Y 6 K タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型（例えばキメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ')₂、F v 等）を検出に使用し得る。タ

10

20

30

40

50

ンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。

翻訳産物に基づきLY6K遺伝子の発現レベルを検出する別の方法として、LY6Kタンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学分析を介して染色の強度を測定し得る。すなわち、この測定では、強い染色は、タンパク質の存在/レベルの増大、および同時に、LY6K遺伝子の高い発現レベルを指す。

がん細胞における標的遺伝子、例えばLY6K遺伝子の発現レベルは、標的遺伝子の対照レベル（例えば正常細胞におけるレベル）から、例えば10%、25%もしくは50%増大している場合、または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超もしくはそれ以上に増大している場合、増大していると決定され得る。

【0166】

対照レベルは、疾患状態（がん性または非がん性）が既知である対象から以前に採取され、保存されていた試料を使用することによって、がん細胞と同時に測定し得る。加えて、治療されるべきがんを有する器官の非がん性領域から得た正常細胞を正常対照として使用してもよい。あるいは、疾患状態が既知である対象由来の試料において以前に測定されたLY6K遺伝子の発現レベルを分析することによって得られた結果に基づき、統計学的方法によって対照レベルを決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験した細胞からの発現パターンのデータベースから導き出すことができる。さらに、本発明の1つの態様によれば、生物学的試料におけるLY6K遺伝子の発現レベルを、複数の参照試料から決定した複数の対照レベルと比較し得る。対象由来の生物学的試料のものと類似の組織型に由来する参照試料から決定した対照レベルを使用することが好ましい。さらに、疾患状態が既知である集団におけるLY6K遺伝子の発現レベルの標準値を使用することが好ましい。標準値は当技術分野において公知の任意の方法によって入手し得る。例えば、平均±2S.D.または平均±3S.D.の範囲を標準値として使用し得る。

【0167】

本発明に関連して、非がん性であることが既知の生物学的試料から決定した対照レベルを「正常対照レベル」と称する。他方で、対照レベルをがん性生物学的試料から決定した場合は、それを「がん性対照レベル」と称する。試料の発現レベルと対照レベルの差は、発現レベルが細胞のがん性または非がん性状態に依存して異なることが公知の対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して基準化することができる。例示的な対照遺伝子には、 α -アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼおよびリボソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

【0168】

LY6K遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比べて増大しているか、またはがん性対照レベルと類似/同等である場合、対象は、治療されるべきがんを有すると診断され得る。

より詳細には、本発明は、(i)対象が治療されるべきがんを有するか否かを診断する、および/または(ii)がん治療のための対象を選択する方法であって、

a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるLY6Kの発現レベルを測定する段階；

b) LY6Kの発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；

c) LY6Kの発現レベルが正常対照レベルと比較して増大している場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

d) 段階c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階

を含む方法を提供する。

【0169】

あるいは、そのような方法は、

a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織にお

ける L Y 6 K の発現レベルを測定する段階；

b) L Y 6 K の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；

c) L Y 6 K の発現レベルががん性対照レベルと類似または同等である場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

d) 段階 c) において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階を含む。

【0170】

いくつかの態様において、そのような方法は、上記で定義した段階 a) ~ d) の後または前に、H L A - D P 5、H L A - D R 1 5 および H L A - D R 8 から成る群より選択される H L A を有する対象を同定する段階をさらに含み得る。本発明によるがん療法は、L Y 6 K を過剰発現するがん罹患しており、ならびに H L A - D P 5、H L A - D R 1 5 および H L A - D R 8 のいずれか 1 つを有する対象にとって好ましい。H L A タイピングの方法は当技術分野において周知である。例えば、H L A アリルをタイピングするための P C R に基づく方法は周知である。各々の H L A 分子に特異的な抗体も、対象の H L A 型を同定するための適切なツールである。

本発明はまた、本発明の L Y 6 K ポリペプチドで治療することができるがん罹患している対象を決定するためのキットも提供し、そのようなキットは、特定のがん療法、より詳細には、がん免疫療法の効果を評価するおよび/またはモニタリングするのにも有用であり得る。適切ながんの説明例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌 (N S C L C)、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍 (H N M T) が含まれるが、これらに限定されない。より詳細には、キットは、好ましくは対象由来のがん細胞における L Y 6 K 遺伝子の発現を検出するための少なくとも 1 つの試薬を含み、そのような試薬は、

(a) L Y 6 K 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；

(b) L Y 6 K タンパク質を検出するための試薬；および

(c) L Y 6 K タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬

の群より選択される。

【0171】

L Y 6 K 遺伝子の m R N A を検出するのに適した試薬の例には、L Y 6 K m R N A に特異的に結合するまたは L Y 6 K m R N A を同定する核酸、例えば L Y 6 K m R N A の一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、L Y 6 K m R N A に特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製し得る。必要な場合は、L Y 6 K m R N A を検出するための試薬を固体マトリックス上に固定化し得る。さらに、L Y 6 K m R N A を検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

【0172】

他方で、L Y 6 K タンパク質を検出するのに適した試薬の例には、L Y 6 K タンパク質に対する抗体が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変された抗体が L Y 6 K タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型 (例えばキメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ')₂、F v 等) を試薬として使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。さらに、直接結合または間接標識技術により、抗体をシグナル生成分子で標識してもよい。標識、ならびに抗体を標識し、その標的への抗体の結合を検出するための方法は当分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明のために利用し得る。さらに、L Y 6 K タンパク質を検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

【0173】

キットは、前記試薬の複数を含んでもよい。例えば、がんを有さないまたはがん罹患している対象から得た組織試料は、有用な対照試薬として役立ち得る。本発明のキットは、使用のための指示書と共に、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書（例えば書面、テープ、CD-ROM等）を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。これらの試薬などは、ラベルを付した容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

【0174】

本発明の1つの態様として、試薬がLY6K mRNAに対するプローブである場合、少なくとも1つの検出部位を形成するために試薬を多孔性ストリップなどの固体マトリックス上に固定化し得る。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、各々が核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。試験ストリップはまた、陰性対照および/または陽性対照のための部位を含んでもよい。あるいは、対照部位は、試験ストリップから隔てられたストリップ上に配置し得る。場合により、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含んでもよく、すなわち、第一検出部位ではより高い量を含み、それに続く部位ではより少ない量を含んでもよい。試験試料の添加後、検出可能なシグナルを提示する部位の数により、試料中に存在するLY6K mRNAの量の定量的指標が提供される。検出部位は、任意の適切な検出可能形状に構成することができ、典型的には、試験ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

10

【0175】

本発明のキットは、陽性対照試料またはLY6K標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、LY6K陽性試料を採取し、次にそのLY6Kレベルを検定することによって調製し得る。あるいは、精製されたLY6Kタンパク質またはポリヌクレオチドを、LY6Kを発現しない細胞に添加して、陽性試料またはLY6K標準試料を形成してもよい。本発明では、精製LY6Kは組換えタンパク質であり得る。陽性対照試料のLY6Kレベルは、例えばカットオフ値を上回る。

20

【0176】

X. 抗体：

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、本発明のペプチドに特異的に結合し、他のペプチドには結合しない（または弱く結合する）。あるいは、抗体は、本発明のペプチドならびにそのホモログに結合する。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断アッセイおよび予後判定アッセイならびに画像化法において使用され得る。同様に、そのような抗体は、LY6Kががん患者において発現されるまたは過剰発現される限り、他のがんの治療、診断および/または予後判定において使用され得る。さらに、細胞内で発現される抗体（例えば一本鎖抗体）は、LY6Kの発現が関与するがんを処置する際に治療的に使用され得、その例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍（HNMT）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0177】

本発明はまた、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列から成るポリペプチドを含むLY6Kタンパク質（配列番号：8）またはその断片の検出および/または定量化のための様々な免疫学的アッセイも提供する。そのようなアッセイは、適宜に、LY6Kタンパク質またはその断片を認識し、結合することができる1つまたは複数の抗LY6K抗体を含み得る。本発明において、LY6Kポリペプチドに結合する抗LY6K抗体は、好ましくは他のペプチドを排除して、好ましくは配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列から成るポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は阻害試験で確認することができる。すなわち、分析する抗体と全長LY6Kポリペプチドの間の結合が配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有する任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、抗体は断片に「特異的に結合する」とみなされる。本発明に関連して、そのような免疫学的アッセイは、様々なタイプの放射免疫測定法、免疫クロ

40

50

マトグラフィ技術、固相酵素免疫検定法（E L I S A）、酵素結合免疫蛍光検定法（E L I F A）等を含むがこれらに限定されない、当技術分野において周知の様々な免疫学的アッセイ形式内で実施される。

【0178】

本発明の関連する免疫学的であるが抗体を使用しないアッセイには、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）ならびにMHC結合アッセイも含まれ得る。加えて、本発明の標識抗体を用いたラジオシンチグラフィ画像化法を含むがこれに限定されない、LY6Kを発現するがんを検出することができる免疫学的画像化法も本発明によって提供される。そのようなアッセイは、LY6Kを発現するがんの検出、モニタリングおよび予後判定において臨床的に使用することができ、そのようながんの例には、膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍（HNMT）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0179】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体も提供する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で使用することができ、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ヒト抗体ならびに遺伝的組換えによって作製されるヒト化抗体を包含する。

【0180】

抗体を得るための抗原として使用する本発明のペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくはヒト、マウスまたはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のペプチドは、本明細書で開示するヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手し得る。

20

本発明によれば、本発明のポリペプチドの完全なペプチドおよび部分ペプチドは免疫化抗原として役立つ。適切な部分ペプチドの例には、例えば本発明のペプチドのアミノ（N）末端断片またはカルボキシ（C）末端断片が含まれる。

【0181】

本明細書では、抗体は、全長LY6KペプチドまたはLY6Kペプチドの断片のいずれかと反応するタンパク質と定義される。好ましい態様では、本発明の抗体は、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するLY6Kの断片ペプチドを認識することができる。オリゴペプチドを合成する方法は当技術分野において周知である。合成後、ペプチドを、場合により免疫原として使用する前に精製してもよい。本発明では、オリゴペプチド（例えば24merまたは26mer）を、免疫原性を増強するために担体と複合化または連結してもよい。キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）は担体として周知である。KLHとペプチドを複合化する方法も当技術分野において周知である。

30

【0182】

あるいは、本発明のペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに挿入してもよく、次にそれを使用して本明細書で述べるような宿主細胞を形質転換する。所望のペプチドまたはその断片を任意の標準的な方法によって宿主細胞の外部または内部から回収することができ、その後抗原として使用し得る。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体またはその溶解物または化学合成したペプチドを抗原として使用してもよい。

40

【0183】

任意の哺乳動物を抗原で免疫し得るが、好ましくは細胞融合のために使用する親細胞との適合性を考慮に入れる。一般に、げっ歯目（Rodentia）、ウサギ目（Lagomorpha）または霊長目（Primate）科の動物を使用し得る。げっ歯目科の動物には、例えばマウス、ラットおよびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目科の動物には、例えばカニクイザル（Macaca fascicularis）、アカゲザル、マントヒヒおよびチンパンジーなどの狭鼻下目（Catarhini）のサル（旧世界ザル）が含まれる。

【0184】

50

抗原で動物を免疫する方法は当技術分野において公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射が哺乳動物の免疫のための標準的な方法である。より詳細には、抗原を適切な量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、生理食塩水等に希釈し、懸濁し得る。所望する場合は、抗原懸濁液を適切な量の標準的なアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化して、その後哺乳動物に投与してもよい。好ましくは、それに続いて、適切な量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を4~21日ごとに数回投与する。適切な担体も免疫のために使用し得る。上記のように免疫した後、血清を、所望抗体の量の増加に関して標準的な方法によって検査し得る。

【0185】

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望抗体の増加に関して検査した免疫哺乳動物から血液を採取し、任意の従来の方法で血液から血清を分離することによって調製し得る。ポリクローナル抗体には、ポリクローナル抗体を含有する血清、ならびに血清から単離し得るポリクローナル抗体を含有する画分が含まれる。免疫グロブリンGまたはMは、例えば本発明のペプチドと結合したアフィニティカラムを用いて本発明のペプチドだけを認識する画分から調製することができ、プロテインAまたはプロテインGカラムを用いてこの画分をさらに精製し得る。

10

【0186】

本発明に関する使用のためのモノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を採取し、上述したように血清中の所望抗体のレベル上昇を検査して、細胞融合に供する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記免疫細胞と融合させる他の好ましい親細胞には、例えば哺乳動物の骨髄腫細胞、より好ましくは薬剤による融合細胞の選択のための獲得特性を有する骨髄腫細胞が含まれる。上記免疫細胞と骨髄腫細胞を公知の方法に従って、例えばMilstein et al.の方法(Galfrè and Milstein, Methods Enzymol 73:3-46(1981))に従って融合させることができる。

20

【0187】

生じる細胞融合によって得られたハイブリドーマは、それらを標準的な選択培地、例えばHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン含有培地)で培養することによって選択し得る。細胞培養を、典型的には数日間から数週間、すなわち所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞(非融合細胞)を死滅させるのに十分な時間、HAT培地中で継続する。その後、標準的な限界希釈を実施して、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、クローン化し得る。

30

【0188】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記方法に加えて、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したものをインビトロでペプチド、ペプチド発現細胞またはそれらの溶解物で免疫し得る。次に、免疫したリンパ球を、U266などの無限に分裂することができるヒト由来骨髄腫細胞と融合させて、ペプチドに結合することができる所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを生成し得る(特開昭63-17688号)。

【0189】

得られたハイブリドーマを、その後マウスの腹腔に移植し、腹水を抽出し得る。得られたモノクローナル抗体を、例えば硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィまたは本発明のペプチドを結合させたアフィニティカラムによって精製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドの精製および検出に使用できるだけでなく、本発明のペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても用いることができる。あるいは、抗体を産生する、免疫リンパ球などの免疫細胞をがん遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体を調製するために使用してもよい。

40

【0190】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子工学技術を用いて組換えによっ

50

て調製することもできる（例えば *Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by MacMillan Publishers LTD (1990)* 参照）。例えば、抗体をコードする DNA を免疫細胞、例えば抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫リンパ球などからクローン化し、適切なベクターに挿入して、宿主細胞に導入し、組換え抗体を調製し得る。本発明はまた、上述したように調製される組換え抗体も提供する。

【0191】

本発明の抗体は、抗体の断片または改変された抗体が本発明のペプチドの1つまたは複数に結合する限り、抗体の断片または改変された抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖とL鎖からのFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であり得る（*Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-83 (1988)*）。より詳細には、抗体断片は、抗体をパインまたはペプシンなどの酵素で処理することによって生成し得る。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入して、適切な宿主細胞において発現させてもよい（例えば *Coet al., J Immunol 152:2968-76 (1994)*; *Better and Horwitz, Methods Enzymol 178:476-96 (1989)*; *Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178:497-515 (1989)*; *Lamoyi, Methods Enzymol 121:652-63 (1986)*; *Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:663-9 (1986)*; *Bird and Walker, Trends Biotechnol 9:132-7 (1991)* 参照）。

10

20

【0192】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)などの様々な分子との結合によって修飾し得る。本発明はそのような修飾された抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得られ得る。これらの修飾方法は当技術分野において慣例的である。

【0193】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の変領域とヒト抗体由来の定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常領域を含むヒト化抗体として入手し得る。そのような抗体は公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、げっ歯動物のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置き換えることによって実施できる（例えば *Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)*）。したがって、そのようなヒト化抗体は、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ない部分が非ヒト種からの対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。

30

【0194】

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えてヒト可変領域を含む完全ヒト抗体も使用できる。そのような抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を用いて作製することができる。例えば、インビトロ法は、バクテリオファージ上に提示されるヒト抗体断片の組換えライブラリの使用を含む（例えば *Hoogenboom & Winter, J Mol Biol 227:381 (1991)* 参照）。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスに導入することによって作製できる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号；同第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号に記載されている。

40

【0195】

上述したようにして得られた抗体を均一に精製し得る。例えば、抗体の分離および精製

50

は、一般的なタンパク質に用いられる分離および精製方法に従って実施できる。例えば、抗体を、アフィニティークロマトグラフィ、フィルター、限外ろ過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動などの、しかしこれらに限定されないカラムクロマトグラフィの適切に選択し、組み合わせた使用によって分離および単離し得る (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティカラムとして使用することができる。使用される例示的なプロテインAカラムには、例えばHyper D、POROSおよびSephacrose F.F. (Pharmacia) が含まれる。

10

【0196】

適切なクロマトグラフィ技術の例には、アフィニティークロマトグラフィを除いて、例えばイオン交換クロマトグラフィ、疎水性クロマトグラフィ、ゲルろ過、逆相クロマトグラフィ、吸着クロマトグラフィ等が含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Mars hak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィ手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィによって実施することができる。

【0197】

例えば、吸光度の測定、固相酵素免疫検定法 (ELISA)、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA) および / または免疫蛍光法を用いて本発明の抗体の抗原結合活性を測定し得る。ELISAでは、本発明の抗体をプレートに固定化し、本発明のペプチドをプレートに塗布して、次に所望の抗体を含有する試料、例えば抗体産生細胞の培養上清または精製抗体を適用する。その後、一次抗体を認識する、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体を適用し、プレートをインキュベートする。次に、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。C末端またはN末端断片などのペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として使用し得る。BIACore (Pharmacia) を、本発明による抗体の活性を評価するために使用してもよい。

20

30

【0198】

上記方法は、本発明の抗体を、本発明のペプチドを含むと推測される試料に曝露し、抗体とペプチドによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のペプチドの検出または測定を可能にする。本発明によるペプチドの検出または測定の方法は、ペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法はペプチドを用いる様々な実験で使用することができる。

【0199】**XI. ベクターおよび宿主細胞**

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドを導入するベクターおよび宿主細胞も提供する。本発明のベクターは、本発明のペプチドを発現するためまたは遺伝子治療のために本発明のヌクレオチドを投与するための、宿主細胞における本発明のヌクレオチド、特にDNAの担体として有用である。

40

【0200】

大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌 (例えばJM109、DH5、HB101またはXL1Blue) において大量に増幅し、生産する場合、ベクターは、大腸菌における増幅に適した「複製起点 (ori)」および形質転換した大腸菌を選択するのに適したマーカー遺伝子 (例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等のような薬剤によって選択される薬剤耐性遺伝子) を有するべきである。例えば、M13シリーズのベクター、pUCシリーズのベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script等が使用できる。加えて、pGEM-T

50

、pDIRECTおよびpT7も、上述したベクターと同様に、cDNAをサブクローニングし、抽出するために使用できる。本発明のタンパク質を生産するためにベクターを使用する場合は、発現ベクターが使用できる。例えば、大腸菌で発現される発現ベクターは、大腸菌において増幅される上記特徴を有するべきである。JM109、DH5、HB101またはXL1 Blueなどの大腸菌を宿主細胞として使用する場合、ベクターは、大腸菌において所望の遺伝子を効率的に発現することができるプロモーター、例えばlacZプロモーター(Ward et al., Nature 341:544-6(1989); FASEB J 6:2422-7(1992))、araBプロモーター(Better et al., Science 240:1041-3(1988))、T7プロモーター等を有するべきである。その点に関して、pGEX-5X-1(Pharmacia)、*「QIAexpress system」*(Qiagen)、pEGFPおよびpET(この場合、宿主は、好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である)が、例えば、上記ベクターの代わりに使用できる。加えて、ベクターはまた、ペプチド分泌のためのシグナル配列も含み得る。ペプチドが大腸菌のペリプラズムに分泌されるように指令する例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列である(Liet al., J Bacteriol 169:4379(1987))。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

【0201】

大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター(例えばpcDNA3(Invitrogen)およびpEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17):5322(1990))、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えばpHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えばpZIpneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)ならびに枯草菌(Bacillus subtilis)由来の発現ベクター(例えばpPL608、pKTH50)が、本発明のポリペプチドを生産するために使用できる。

【0202】

CHO、COSまたはNIH3T3細胞などの動物細胞においてベクターを発現するために、ベクターは、そのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MMLV-LTRプロモーター、EF1プロモーター(Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMVプロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子(例えば、薬剤(例えばネオマイシン、G418)によって選択される薬剤耐性遺伝子)を担持すべきである。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSVおよびpOP13が含まれる。

【0203】

以下では、特定の実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。しかし、以下の実験材料、方法および実施例は、当業者が本発明の特定の態様を作製し、使用することを助けるのに役立つが、本発明の態様を例示することだけを意図し、したがっていかなる意味でも本発明の範囲を限定するものではない。当業者は容易に認識するように、本明細書で述べるものと類似または等価の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

【実施例】

【0204】

10

20

30

40

50

材料および方法

患者および臨床試験

ペプチドに基づくがん免疫療法の2つの第I相臨床試験は、熊本大学（熊本、日本）の治験審査委員会によって審査され、承認された（承認番号841および1124）。頭頸部がんに罹患している患者はすべて、書面によるインフォームドコンセントを得た後、HLA-A24の保有に基づいて選択した。腫瘍の病期および悪性度は、国際対がん連合（International Union against cancer）（UICC）の分類に従って決定した。標準的な治療に抵抗性であった、再発性または転移性腫瘍を有する手術不可能な進行した頭頸部がんに罹患している患者を一方の治験（841）に登録した。手術可能な進行した頭頸部がんに罹患している患者を別の治験（1124）に登録した。この治験（1124）におけるこれらの患者は、術後ペプチドワクチン免疫療法で治療されたことがあった。患者は、再発性または転移性腫瘍を有する手術不可能な進行したHNMTに罹患しており、標準的な治療に抵抗性であった；これらの患者を大学病院医療情報ネットワーク臨床試験登録システム（UMIN-CTR）番号000008379（CTR-8379）の下で治験に登録した。根治的切除術を受けたHNMT患者は、UMIN-CTR番号000008380（CTR-8380）の下で治験に登録した。後者の治験では、HNMT患者を、S-1、イフォスファミドまたはドキソルビシンと組み合わせた術後ペプチドワクチンで治療した。ワクチン接種のカクテルは、HLA-A24拘束性CTLによって認識されかつCDCA1（CDCA1-A24（56-64））、KOC1（KOC1-A24（508-516））およびLY6K（LY6K-A24（177-186））に由来する、3つの合成短鎖ペプチド（SP）から成る（Suda T, et al. Cancer Sci 2007）。ペプチド（各々1mg）をMontanide ISA51 500μL中に乳化し、0、7、14、28、42、56、63および70日目、ならびにその後は腫瘍の進行または毒性が観察されるまで月に1回、皮下（s.c.）注射する。これらの臨床試験および試験の解析は現在も進行中である。これらの治験に参加した23名の患者から血液試料を採取し、LY6K由来ペプチドに反応性のTh細胞の免疫応答を検討した。

10

20

【0205】

細胞株および抗体

微量の内因性HLAクラスI分子を発現するヒトBリンパ芽球様細胞株C1RのHLA-A24形質転換体であるC1R-A2402細胞（Karakaki S, et al. Immunogenetics 1993; 37: 139-42）は、滝口雅文博士（熊本大学、熊本、日本）の厚意により贈られた。抗原提示細胞（APC）として、DR4（DRB1*04:05）、DR8（DRB1*08:03）、DR15（DRB1*15:02）、またはDP5（DPB1*05:01）のいずれかを発現するように遺伝的に操作されたマウス線維芽細胞株であるL細胞；L-DR4、L-DR8、L-DR15、またはL-DP5を使用した。

30

【0206】

HLAクラスII結合ペプチドのアルゴリズムによる予測

潜在的なプロミスキャスHLA-DRおよびHLA-DPに結合するヒトLY6K由来ペプチドを予測するため、コンピュータアルゴリズム（IEBD解析リソース、コンセンサス法、http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html）を用いてヒトLY6Kタンパク質のアミノ酸配列を解析した（Wang P et al. BMC Bioinformatics; 11: 568. Wang P et al. PLoS Comput Biol 2008; 4: e1000048）。プログラムは、タンパク質全体を包含する15アミノ酸長配列のオフセットを解析した。DRB1*09:01またはDRB1*15:02アレルによってコードされる複数のHLAクラスII分子についてオーバーラップする高いコンセンサスパークンシル順位を有し、かつLY6K由来の10mer CTLエピトープを天然に含む20アミノ酸長ペプチドを選択し、合成して、CTLエピト

40

50

ープを含むプロミスキャスなヘルパーT細胞エピートープを同定した(Harao M, et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616-25)。DPB1*05:01、DRB1*08:03、DRB1*09:01またはDRB1*15:02によってコードされる複数のHLAクラスII分子についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセントイル順位を有するが、CTLエピートープを含まない、別の24アミノ酸長のLY6K由来LPも合成した。

【0207】

合成ペプチドおよび組換えタンパク質

HLA-A24に結合するヒトLY6K由来の短鎖ペプチド(SP)である、LY6K-A24(177-186)、RYCNLEGPPI(配列番号:3)を合成した(純度>95%、Biomatik, Canada)。2つのLPである、LY6K(119-142)、KWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQ(配列番号:1); LY6K(172-191)、KCKKIRYCNLEGPPIINSVF(配列番号:2)を合成し(純度>90%)、LY6K特異的ヒトCD4⁺T細胞を刺激する能力に関して試験した。HLA-A24(HIV-A24、RYLRDQQLL)(配列番号:4)に結合するHIVペプチドを陰性対照SPとして使用した(Tomita Y, et al. Cancer Sci; 102: 697-705. Tomita Y, et al. Cancer Sci; 102: 71-8)。DP5に結合するEBNA(エプスタイン-バーウイルス核抗原)由来のLPであるEBNA-DP5(FLQTHIFAELKDAIKDL)(配列番号:5)およびプロミスキャスなHIV由来のLPを陰性対照LPとして使用した(Fujiki F, et al. J Immunother 2007; 30: 282-93)。ペプチドを10µg/µLの濃度でジメチルスルホキシドに溶解した。組換え全LY6KおよびCDCA1タンパク質を、pET28aベクター(Novagen)を用いて大腸菌(Escherichia coli)BL21によって発現させた。CDCA1タンパク質を対照として用いた。各々の組換えタンパク質を精製し、SDS-PAGEによって評価した。

【0208】

健常ドナーからのTAA特異的CD4⁺T細胞株の生成

健常ドナーから末梢血単核細胞(PBMC)を採取し、使用するための研究プロトコルは、熊本大学の治験審査委員会によって承認された。9名の健常ドナーから、書面によるインフォームドコンセントを得た後で血液試料を得た。この試験で検討した健常ドナーのHLA-A、DRB1およびDPB1アレルを、ポリメラーゼ連鎖反応およびアレル特異的プローブハイブリダイゼーションを用いてHLA遺伝子変異のDNAタイピングによって決定し、表1に示す。健常ボランティアおよび患者からのPBMCを以前に述べられているように(Inoue M, et al. Int J Cancer; 127: 1393-403)単離した。CD4⁺T細胞を、抗CD4モノクローナル抗体(Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)と結合した磁気マイクロビーズを用いて陽性選択によってPBMCから精製した。単球由来の樹状細胞(DC)を、以前に述べられているように(Harao M, et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616-25)インビトロ培養によってCD14⁺細胞から生成し、抗原提示細胞(APC)として使用して、TAA特異的CD4⁺T細胞を誘導した。DC(1×10⁴/ウェル)を10µg/mlのLPで3時間パルスし、照射して(45Gy)、その後96ウェル平底培養プレートの各ウェルにおいて5%ヒト補体除去血漿を添加したAIM-V 200µL中の自己CD4⁺T細胞(3×10⁴/ウェル)と混合した。7日後、培地の半分を各培養物から取り出し、次に、ペプチド(10µg/ml)および5ng/mlのヒト組換え(hr)IL-7でパルスした、照射した(50Gy)自己PBMC(1×10⁵)を含む新鮮培地(100µL/ウェル)を培養物に添加した。ペプチドでの2回目の刺激の2日後に、hr IL-2を10IU/mlの最終濃度で各ウェルに添加した。1週間後、各ウェル中の刺激したCD4⁺T細胞を、インターフェロン(IFN)-酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイにおいて特異性について分

10

20

30

40

50

析した。コグネイトペプチドに特異的応答を示すT細胞を24ウェルプレートに移し、10 IU/mlのhr IL-2および5 ng/mlのhr IL-7を添加した培地中、ペプチド(10 µg/ml)でパルスした照射自己PBMC(1 × 10⁶/ウェル)を用いて週1回の間隔で再刺激した。

【0209】

【表1】

健常ドナーのHLA-A、HLA-DR、およびHLA-DP遺伝子型

	<i>HLA-A</i> 遺伝子型	<i>HLA-DRB1</i> 遺伝子型	<i>HLA-DPB1</i> 遺伝子型
ドナー HDL1	A*02:01/24:02	DRB1*04:05/-	DPB1*05:01/-
ドナー HDL2	A*11:01/31:01	DRB1*08:03/15:02	DPB1*02:01/09:01
ドナー HDL3	A*24:02/-	DRB1*08:02/15:02	DPB1*05:01/09:01
ドナー HDL4	A*24:02/31:01	DRB1*08:03/14:05	DPB1*02:02/05:01
ドナー HDL5	A*02:01/02:06	DRB1*04:05/09:01	DPB1*02:01/04:02
ドナー HDL6	n.t.	DRB1*04:06/08:03	DPB1*02:01/04:02
ドナー HDL7	A*26:01/33:03	DRB1*04:05/13:02	DPB1*04:01/09:01
ドナー HDL8	A*26:01/-	DRB1*04:10/08:02	DPB1*02:01/05:01
ドナー HDL9	A*31:01/33:03	DRB1*09:01/13:02	DPB1*03:01/04:01

HLA、ヒト組織適合性白血球抗原

【0210】

ペプチドに対するT細胞応答の評価

ペプチドでパルスしたAPCに対するTh細胞の免疫応答を、以前に述べられているように(Tomita Y et al. Cancer Sci; 102:697-705) IFN-ELISPOTアッセイ(Human IFN-ELISPOTキット、BD Biosciences)によって評価した。簡単に述べると、ペプチドでパルスしたPBMC(3 × 10⁴細胞/ウェル)での刺激後の3 × 10⁴のバルクCD4⁺T細胞、またはペプチドでパルスしたHLA-DRまたはDPを発現するL細胞(5 × 10⁴/ウェル)での刺激後の1 × 10⁴のバルクCD4⁺T細胞当たりの、IFN-を産生するペプチド特異的CD4⁺T細胞の頻度を分析した。抗原提示に關与する拘束HLA分子を決定するため、抗原誘導性IFN-産生のブロッキングを、抗HLA-DR mAb(L243、Biolegend)、抗HLA-DP mAb(B7/21、abcam)、抗ヒトHLA-DQ mAb(SP V-L3、abcam)または抗HLAクラスI mAb(W6/32、abcam)を添加することによって検査した。すべてのmAbを5 µg/mlの最終濃度で使用した。HIV由来のペプチドと共に培養した細胞を陰性対照として使用した。PMA(100 ng/ml; Sigma-Aldrich)およびイオノマイシン(500 ng/ml; Sigma-Aldrich)と共に培養した細胞を陽性対照として使用した。IFN-ELISPOTアッセイのすべての評価は2連または3連に実施し、結果は平均値に対応した。

【0211】

サイトカインアッセイ

T細胞(1 × 10⁴/ウェル)を、96ウェル培養プレートにおいてLY6K(119-142)の存在下でL-DP5(5 × 10⁴/ウェル)と共に培養した。20時間後、培養上清を採取し、サイトカイン(IFN-、GM-CSF、TNF-、MIP1、IL-2、IL-4、IL-17)レベルを、Bio-Plexシステム(Bio-Rad)を製造者の使用説明書に従って使用して測定した。

【0212】

LY6K(119-142)LP特異的バルクTh細胞(3 × 10⁴細胞/ウェル)およびLY6K(172-191)LP特異的Th細胞クローン(Thクローン、1 × 10⁴細胞/ウェル)を、96ウェル培養プレートにおいてコグネイトペプチドの存在下で自

10

20

30

40

50

己P B M C (3×10^4 細胞 / ウェル) と共に培養した。24時間後、培養上清を回収し、Bio-Plexシステム (Bio-Rad) を製造者の使用説明書に従って使用して、サイトカイン (I L - 2、I F N - γ 、G M - C S F、T N F - α および M I P 1) レベルを測定した。

【0213】

CD107a 動員アッセイ

LPで刺激された脱顆粒CD4⁺Tリンパ球を同定するため、細胞表面に露出されたCD107aをフローサイトメトリによって分析した。(Rubio V et al. Nat Med 2003; 9: 1377-82. Betts MR, et al. J Immunol Methods 2003; 281: 65-78) 簡単に述べると、CD107a 動員アッセイを以前に述べられているように実施した。(Tomita Y et al. Cancer Sci 2011; 102(1): 71-8) LY6K由来ペプチドまたは対照ペプチド ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) を刺激剤として添加し、FITC標識抗ヒトCD107a mAbまたはFITC標識アイソタイプ対照マウスIgG1およびモネンシンを各ウェルに添加した。細胞を37℃で5時間培養した。培養後、ペプチドで刺激したTh細胞またはCTLをPE結合抗ヒトCD4抗体 (e B i o s c i e n c e , S a n D i e g o , C A) で染色し、フローサイトメトリ (F A C S c a n ; B D B i o s c i e n c e s) によって分析した。

10

【0214】

LY6K (172 - 191) 長鎖ペプチドでのP B M C の刺激

インビトロでのLY6K (172 - 191) LPでの刺激によるHLA-A24陽性ドナーからのLY6K-A24 (177 - 186) SP特異的CTLの誘導を評価するため、P B M C (24ウェルプレートで 2×10^6 / ウェル) を、いずれのサイトカインも添加せずにLY6K (172 - 191) LP ($7 \mu\text{M}$) と共に2週間インキュベートした。0日目と7日目にLY6K (172 - 191) LP ($7 \mu\text{M}$) を添加し、次にLY6K (172 - 191) LPでのインビトロ刺激の14日目に細胞を回収して、FITC標識抗ヒトCD8 mAbと組み合わせたHLA-A24 (A * 24 : 02) / LY6K-A24 (177 - 186) 複合体のPE標識テトラマーで染色し、フローサイトメトリによって分析した。

20

【0215】

HNMT患者におけるLY6K-LPでの刺激によるLY6K-A24 (177 - 186) SP特異的CTLの増殖

LY6K-A24 (177 - 186) SPでワクチン接種した11名のHNMT患者からのP B M C を、24ウェルプレート (2×10^6 / ウェル) においてLY6K (119 - 142) LPとLY6K (172 - 191) LP (各々 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$) の混合物と共に培養した; rhIL-2 ($20 \text{IU} / \text{mL}$) およびrhIL-7 ($5 \text{ng} / \text{mL}$) を0日目と2日目に添加した。0日目 (エクスピボ) および7日目に、P B M C を、FITC標識抗ヒトCD8 mAbとHLA-A*24:02 / LY6K-A24 (177 - 186) 複合体とのPE標識テトラマー (M B L、名古屋、日本) で染色した。

30

【0216】

インビボクロスプライミングアッセイ

HLA-A24 Tgmは、F. A. Lemonnier博士の厚意により提供された (Jung KO, et al. J Virol; 86: 7616-24)。ペプチドワクチン接種のため、マウスに、7日の間隔で、IFA中に乳化したLY6K (172 - 191) LP ($100 \mu\text{g} / \text{mouse}$) 溶液を尾の基部で皮内注射した。LY6K (172 - 191) LPでの2回目のワクチン接種の7日後に、マウスを犠牲させて鼠径リンパ球を得、CD8⁺T細胞を磁気マイクロビーズでポジティブ単離した。LY6K-A24 (177 - 186) SPまたはHIV-A24 SPでパルスしたC1R-A2402細胞 (2×10^4 / ウェル) での刺激後にIFN- γ 産生CD8⁺T細胞 (3×10^5 / ウェル) の数をELISPOTアッセイによって計数した。

40

50

【0217】

HLA-A24 (HHH)トランスジェニックマウス (Tgm) は、F. A. Lemonnier 博士の厚意により提供された (Jung KO, et al. J Virol ; 86 : 7616 - 24)。マウスに、7日の間隔で3回、不完全フロイントアジュバント (IFA) 中に乳化したLY6K (172 - 191) LP溶液 (100 µg / マウス) を尾の基部で皮内注射した。LY6K (172 - 191) LPでの3回目のワクチン接種の7日後に、CD8⁺T細胞を、磁気マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) での陽性選択によって鼠径リンパ節から単離した。LY6K-A24 (177 - 186) SPでパルスしたBM-DC (2 × 10⁴ 細胞 / ウェル) での刺激に应答したIFN-γ 産生CD8⁺T細胞 (1 × 10⁵ 細胞 / ウェル) の数をエキスピボELISPOTアッセイによって計数した (Inoue M, et al. Immunol Lett 2009 ; 126 : 67 - 72 ; Harao M, et al. Int J Cancer 2008 ; 123 : 2616 - 25)。

10

【0218】

LY6K由来のSPで能動免疫した頭頸部がん患者におけるLY6K特異的CD4⁺T細胞应答の評価

がん患者または健常ドナーからのPBMCを、5%ヒト補体除去血漿を添加したAIM-V中、24ウェルプレート (2 × 10⁶ / ウェル) において10 µg / mLのLY6K由来LPの混合物と共に培養し、IL-7およびIL-2を0日目と2日目に添加した。1週間の細胞培養後、PBMCを回収し、LY6K特異的T細胞の存在をIFN-γ ELISPOTアッセイによって測定した。短期培養したPBMC (1 × 10⁵ / ウェル) を洗浄し、抗ヒトIFN-γモノクローナル抗体で前被覆したELISPOTプレートにおいて培地中のLY6K (172 - 191) またはLY6K (119 - 142) LPと共に18時間培養した。HIV-A24と共に培養した細胞を陰性対照として使用した。スポット形成細胞 / 10⁵ 細胞として表した特異的T細胞の数を、陰性対照値 (バックグラウンド) を差し引いた後に算出した。HLAクラスII拘束の判定のため、HLA-DR、HLA-DPまたはHLAクラスIに特異的な以下のブロッキング抗体を、ELISPOTアッセイの間に細胞培養物に添加した。IFN-γ が10より多くかつバックグラウンドの2倍を上回る場合は、应答を陽性と評価した。がん患者におけるすべての実験は、単一ウェルまたは2連のウェルで実施した。患者の細胞に関するELISPOTアッセイは、使用可能な細胞の数が限られていたため、1連、2連または3連のウェルで実施した。IFN-γ が15より多くかつバックグラウンドの2倍を上回る場合は、应答を陽性と評価した。この試験は、探索的研究の原則 (exploratory research principles) の下で活動する研究室で行い、研究プロトコルを用いて実施した。本発明者らは、ヒトT細胞アッセイに関する枠組みを報告した「T細胞アッセイについての最小限情報 (Minimal Information About T-cell Assay)」(MIATA) の推奨 (Britten CM et al., Immunity 2012 ; 37 : 1 - 2) に同意する。

20

30

【0219】

テトラマー染色

LY6K-A24 (177 - 186) SP特異的T細胞受容体 (TCR) の発現を、HLA-A*24:02 / LY6K-A24 (177 - 186) SP複合体のPE標識テトラマー (MBL、名古屋、日本) を使用して製造者の使用説明書に従ってFACSCalibur (BD Biosciences) で検査した。HLA-A*24:02 / HIV-A24 (RYLRDQQLL: 配列番号: 4) 複合体のPE標識テトラマーを陰性対照として使用した。

40

【0220】

インビトロ交差提示アッセイ

LY6K-A24 (177 - 186) SPでの刺激によるHLA-A24⁺かつHLA-DR15⁺HDL3からのLY6K-A24 (177 - 186) SP反応性CTLの誘

50

導を、記述されているように (Tomita Y, et al, Cancer Sci 2011; 102: 71-8., Imai K, et al., Clin Cancer Res 2008; 14: 6487-95) 実施した。以前に述べられているように (Harao M, et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616-25)、単球由来のDCをインビトロ培養によってCD14⁺細胞から生成した。自己未熟DCを、生存状態に保持するかまたは0.1%グルタルアルデヒド (Sigma-Aldrich) 中で3分間固定し、LY6K-A24 (177-186) SP、LY6K (172-191) - LPまたは対照LP (各々16 μM) で3時間パルスして、3回洗浄した。ペプチドパルスの間およびパルス後にOK432 (0.1 KE/mL) を添加し、DCの成熟を誘導した。公知のCTLエピトープを含まないLY6K (119-142) LPを対照LPとして使用した。LY6K-A24 (177-186) SP反応性バルクCTLを、10 μg/mLのプレフェルジンA (Sigma-Aldrich) を含む培地中に2:1の比率で6時間添加した。LY6K-A24 (177-186) SP特異的CTLによるIFN- γ 産生を細胞内標識によって測定した。細胞を、PerCP標識抗ヒトCD8 mAb (BioLegend) およびPE標識LY6K-A24 (177-186) SP特異的テトラマーと組み合わせたFITC標識抗ヒトIFN- γ mAb (BioLegend) で染色した。

10

【0221】

HNMT患者におけるLY6K (172-191) - LPでの刺激によるLY6K-A24 (177-186) SP特異的CTLの増殖

20

LY6K-A24 (177-186) SPでワクチン接種した5名のHNMT患者からのPBMCを、96ウェルプレートにおいて (1×10^5 / ウェル) LY6K (172-191) LP (各々10 μg/mL) と共に培養した; rhIL2 (20 IU/mL) およびrhIL-7 (5 ng/mL) を0日目と2日目に添加した。0日目 (エクスピボ) および7日目に、PBMCを、FITC標識抗ヒトCD8 mAbとHLA-A*24:02 / LY6K-A24 (177-186) 複合体とのPE標識テトラマーで染色した。

【0222】

LY6K (172-191) - LPでのPBMCの刺激によるLY6K-A24 (177-186) SP特異的CTLのインビトロ誘導

インビトロでのLY6K (172-191) LPでの刺激によるHLA-A24⁺ ドナー (HDL1、HDL3およびHDL4) からのLY6K-A24 (177-186) SP特異的CTLの誘導を評価するため、PBMC (24ウェルプレートで 2×10^6 細胞 / ウェル) を、いずれのサイトカインも添加せずにLY6K (172-191) LP (7 μM) と共に2週間インキュベートした。7日目にLY6K (172-191) LP (7 μM) を添加し、次にLY6K (172-191) LPでのインビトロ刺激の14日目に細胞を回収して、FITC標識抗ヒトCD8 mAbとのPE標識LY6K-A24 (177-186) SP特異的テトラマーで染色した。

30

【0223】

LY6K特異的CTLの誘導に対するLY6K-LPの相乗作用

LY6K-LPがLY6K-A24 (177-186) SP特異的CTLの誘導を増強することができるかどうかを試験するため、HDL3由来のLY6K (119-142) LP特異的またはLY6K (172-191) LP特異的バルクCD4⁺ T細胞 (1×10^5 細胞 / ウェル、48ウェルプレート) およびLY6K-A24 (177-186) SP特異的バルクCD8⁺ T細胞 (1×10^5 細胞 / ウェル) を、LY6K-A24 (177-186) SP (10 μg/mL)、LY6K-A24 (177-186) SP + 対照LP (10 μg/mL)、またはLY6K-A24 (177-186) SP + LY6K-LP (10 μg/mL) の存在下で自己DC (2×10^4 細胞 / ウェル) と共に培養した。ペプチドとの1週間のインビトロ培養後、培養した細胞をLY6K-A24 (177-186) SP特異的テトラマーで染色した。

40

LY6K-A24 (177-186) SPでワクチン接種したHNMT患者から得た新

50

鮮PBMCを、96ウェル丸底培養プレートに播種し(1×10⁵細胞/ウェル)、次いで、サイトカインを添加せずに5%ヒト補体除去血漿を添加した最終容量200μLのAIM-V中のLY6K-A24(177-186)SP単独(10μg/mL)、LY6K-A24(177-186)SP+対照LP(10μg/mL)、LY6K-A24(177-186)SP+LY6K(119-142)LP(10μg/mL)、またはLY6K-A24(177-186)SP+LY6K(172-191)LP(10μg/mL)を添加した。培養の7日目に、細胞をLY6K-A24(177-186)特異的テトラマーで染色した。

【0224】

統計解析

データを、両側スチューデントt検定(棒グラフ)、フィッシャーの正確確率検定、またはノンパラメトリックのマン-ホイットニーU検定によって比較した。すべての検定に関してP値<0.05の差を統計的に有意とみなした。

【0225】

結果

潜在的なプロミスカスHLAクラスII結合ペプチドの予測および選択

LY6Kの潜在的かつプロミスカスなHLAクラスII結合Th細胞エピトープを同定するため、本発明者らは、最初に、図1Aおよび表2に示すようにコンピュータアルゴリズムを用いて(Wang P, et al. BMC Bioinformatics; 11:568. Wang P, et al. PLoS Comput Biol 2008; 4:e1000048)LY6Kのアミノ酸配列を検討した。興味深いことに、本発明者らは、コンピュータアルゴリズムによって強力なプロミスカスHLAクラスII結合ペプチドと予測された1つのLY6K由来ペプチドLY6K(172-191)が、CTLエピトープであるLY6K-A24(177-186)に非常に近位であることを見出した(図1B)。それゆえ、本発明者らは、複数のHLAクラスII分子HLA-DR9(DRB1*09:01)およびHLA-DR15についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセントイル順位を有し、かつHLA-A24拘束性CTLによって認識される天然の10merペプチドを含む、候補LPであるLY6K(172-191)(図1Aおよび表2)を、その後の分析のために選択し、合成した。CTLエピトープを含まないが、複数のHLAクラスII分子についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセントイル順位を有する、別のLPであるLY6K(119-142)も合成し、このLPがLY6K特異的Th細胞を生成することができるかどうかを評価した。

【0226】

10

20

30

【表 2】
LY6Kに由来する長いペプチドのアルゴリズムスコア

LY6Kの アミノ酸 残基の 位置	パーセントイル順位			
	HLA-DP5 (DPB1*05:01)	HLA-DR8 (DRB1*08:03)	HLA-DR9 (DRB1*09:01)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)
119-133	35.0	20.1	1.4	5.0
120-134	36.2	14.8	3.3	5.0
121-135	30.9	4.1	1.1	5.0
122-136	8.4	3.0	1.1	5.0
123-137	8.0	1.8	3.7	5.0
124-138	3.0	1.0	3.4	0.02
125-139	1.9	1.2	15.1	0.02
126-140	1.5	1.4	15.2	0.02
127-141	1.2	2.3	15.4	0.02
128-142	1.2	4.7	28.2	0.02
172-186	37.7	36.6	16.1	3.6
173-187	37.9	42.7	13.2	3.6
174-188	43.9	45.7	10.5	3.6
175-189	67.8	48.2	9.1	3.6
176-190	75.5	65.6	13.7	3.6
177-191	90.2	72.6	18.9	3.6
178-192	77.2	80.5	29.3	3.6

示されたHLAクラスII分子のペプチド結合アルゴリズムスコアは、LY6K (119-142) およびLY6K (172-192) ペプチドの各15アミノ酸の配列について示されている。

【0227】

CTLエピトープを天然に含むLY6K由来のプロミスキラスなHLAクラスII結合Th細胞エピトープの同定

本発明者らは、これら2つの選択した合成LPがLY6K特異的Th細胞を生成することができるかどうかを評価した。3名の健常ドナーのPBMCから単離したCD4⁺T細胞を、週1回の間隔で、LY6K (119-142) ペプチドでパルスした自己DCおよびPBMCで刺激した。少なくとも3回の刺激後、培養したCD4⁺Th細胞のLY6K (119-142) 特異的応答をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検査した。HLA-DP5陽性かつDR4陽性の健常ドナーにおいて、生成されたTh細胞株は、LY6K (119-142) に応答して有意の量のIFN- γ を産生した(図2A)。Th細胞株のHLA拘束を明らかにするため、HLA-DRまたはHLA-DPに特異的なmAbを使用した。LY6K (119-142) に応答したTh細胞株のIFN- γ 産生は、HLA-DP特異的mAbを添加した場合有意に減少したが、HLA-DR特異的mAbは影響を示さなかった(図2A)。

【0228】

HLA拘束をさらに分析するため、本発明者らは、ペプチドでパルスしたL-DP5またはL-DR4細胞に対するTh細胞の反応性を試験した。DP5陽性健常ドナーから生成したバルクLY6K (119-142) 特異的Th細胞株は、LY6K (119-142) でパルスしたL-DP5細胞を特異的に認識したが、L-DR4細胞、無関係なペプチド(EBNA-DP5)でパルスしたL-DP5細胞、LY6K (119-142) ペプチドでパルスしたL-DR4細胞は認識しなかった。LY6K (119-142) でパルスしたL-DP5細胞の認識におけるTh細胞株のIFN- γ 産生は、抗HLA-DP mAbの添加によって有意に阻害されたが、抗HLAクラスI mAbでは阻害されなかった(図2B)。これらの結果は、これらのTh細胞株においてLY6K (119-1

10

20

30

40

50

42) が H L A - D P 5 によって提示されることを明らかに示した。

【0229】

LY6K (119-142) が他の H L A クラス I I 分子に結合して、T h 細胞応答を誘導することができるかどうかを調べるため、2名の他の健常ドナーからの C D 4 + T 細胞を、LY6K (119-142) でパルスした自己 D C および P B M C で刺激した。H L A - D R 8 陽性ドナー H D L 2 から生成した T h 細胞株は、LY6K (119-142) でパルスした P B M C および L - D R 8 細胞に反応して有意の量の I F N - を特異的に産生したが、LY6K (119-142) でパルスした L - D R 15 細胞では有意の量の I F N - は産生されなかった。LY6K (119-142) でパルスした P B M C または L - D R 8 細胞に反応した T h 細胞株の I F N - 産生は、抗 H L A - D R m A b の添加によって有意に阻害されたが、H L A - D P または H L A - クラス I 特異的 m A b では阻害されなかった (図 2 A および B)。これらの結果は、この T 細胞株において LY6K (119-142) が H L A - D R 8 によって提示されることを明らかに示した。

10

【0230】

LY6K (119-142) での刺激によって H L A - D R 15 陽性ドナー H D L 3 から生成した T h 細胞株も、LY6K (119-142) でパルスした P B M C および L - D R 15 細胞に反応して有意の量の I F N - を特異的に産生したが、LY6K (119-142) でパルスしたまたはパルスしていない L - D R 8 細胞では有意の量の I F N - は産生されなかった。LY6K (119-142) でパルスした P B M C または L - D R 15 細胞に対する T h 細胞株の I F N - 産生は、抗 H L A - D R m A b の添加によって有意に阻害されたが、H L A - D P、H L A - D Q または H L A クラス I 特異的 m A b では阻害されなかった (図 2 A および B)。これらの結果は、この T 細胞株において LY6K (119-142) が H L A - D R 15 によって提示されたことを明らかに示す。

20

したがって、LY6K (119-142) は、H L A - D P 5、H L A - D R 8 および H L A - D R 15 分子に結合する能力を有しており、このことは、LY6K (119-142) が日本人群におけるプロミスキラスで高頻度の H L A クラス I I 分子によって提示される T h 細胞エピトープであることを示す。

【0231】

次に、本発明者らは、別のペプチドである、H L A - A 2 4 拘束性 C T L によって認識されるエピトープを含む LY6K (172-191) が、特異的 T h 1 細胞を生成することができるかどうかを評価した。2名の健常ドナーからの P B M C の C D 4 + T 細胞を、LY6K (172-191) でパルスした自己 D C および P B M C で刺激した。

30

LY6K (172-191) での刺激によって H L A - D R 15 陽性ドナー H D L 3 から生成した T h 細胞株は、LY6K (172-191) でパルスした P B M C および L - D R 15 細胞に反応して有意の量の I F N - を特異的に産生したが、LY6K (172-191) でパルスしたまたはパルスしていない L - D R 8 細胞では有意の量の I F N - は産生されなかった。LY6K (172-191) でパルスした P B M C または L - D R 15 細胞に対する T h 細胞株の I F N - 産生は、抗 H L A - D R m A b の添加によって有意に阻害されたが、H L A - D P、H L A - D Q または H L A - クラス I 特異的 m A b では阻害されなかった (図 3 A の上のパネル)。H L A - D R 15 + ドナー (H D L 2) から生成した T h 細胞は、LY6K (172-191) L P でパルスした P B M C に反応して、H L A - D R 依存的に有意の量の I F N - を産生した。バルク T h 細胞は、H L A - D R 依存的に、LY6K (172-191) L P でパルスした L - D R 15 細胞を特異的に認識した (図 3 A の下のパネル)。これらの結果は、この T 細胞株において LY6K (172-191) が H L A - D R 15 によって提示されたことを明らかに示す。

40

【0232】

LY6K (172-191) が別の H L A クラス I I 分子に結合し、T h 細胞応答を誘導することができるかどうかを調べるため、H L A - D R 15 陰性健常ドナーからの C D 4 + T 細胞を、LY6K (172-191) でパルスした自己 D C および P B M C で刺激した。生成された T h 細胞は、LY6K (172-191) でパルスした自己 P B M C に

50

応答して有意の量のIFN- γ を産生したが、パルスしていないPBMCでは有意の量のIFN- γ は産生されなかった(図3B)。Th細胞株のこのIFN- γ 産生は、抗HLA-DQ mAbの添加によって有意に阻害されたが、抗HLA-DRまたは抗HLA-DPでは阻害されなかった。これらの結果は、このTh細胞がHLA-DQ分子によって拘束されることを示した。

【0233】

天然の対応するタンパク質のN末端およびC末端の両方で伸長させた25アミノ酸(a)長の合成ペプチドLY6K(168-192)、FFYLKCKIRYCNLEGPPIINSVFK(配列番号:6)を合成し、同じくLY6K特異的ヒトCD4⁺T細胞を刺激する能力に関して試験した。興味深いことに、この伸長したLPは、同じドナーにおいてペプチド特異的DQ拘束性Th細胞だけでなく、DR拘束性Th細胞も誘導することができた(図4)。したがって、より長いペプチドLY6K(168-192)は、LY6K(172-191)よりもプロミスキャスにTh細胞を誘導することができると考えられる。

合わせて考慮すると、ここで提示したこれらの結果は、2つのペプチドLY6K(119-142)およびLY6K(172-191)が、HLA-DP5、HLA-DR8、HLA-DR15およびHLA-DQ拘束性Th細胞を刺激する能力を有することを明らかに示し、これらのペプチドが、プロミスキャスなHLAクラスII分子によってTh細胞に提示され得ることおよび多くの患者のがん免疫療法に使用可能であり得ることを示唆する。

【0234】

LY6K(119-142)ペプチドはTh1型CD4⁺T細胞を刺激する

LY6Kペプチド誘導性Th細胞をさらに特徴づけるため、本発明者らは、Bio-plexシステムにより、コグネイトペプチドでのLY6K特異的バルクCD4⁺Th細胞株の刺激に反応したいくつかのサイトカインを測定した。ドナーHDL1から生成したLY6K特異的バルクTh株は、コグネイトペプチドでパルスしたL-DP5での再刺激により、大量のIFN- γ 、TNF- α 、GM-CSFおよびMIP-1 α を産生し、IL-2を有意に産生したが、IL-4およびIL-17の産生はより少なく、このことは、LY6Kペプチドによって誘導されるTh細胞のTh1分極特性を示した(図5A)。

図5Bに示すように、HDL4からのLY6K(172-191)LP特異的Thクローンは、刺激後に大量のこれらのサイトカインを産生し、このことは、LY6K(172-191)LPが多機能性Th1細胞を誘導できることを示唆した。同様の結果を、HDL3から樹立したLY6K(172-191)LP特異的Th細胞から得た(データは示していない)。

【0235】

興味深いことに、抗ウイルス性CD4⁺エフェクターおよび腫瘍浸潤性リンパ球について示されたのと同様に(Casazza JP, et al. J Exp Med 2006; 203: 2865-77; Attig S, et al. Cancer Res 2009; 69: 8412-9; Widenmeyer M, et al. Int J Cancer; 131: 140-9)、細胞傷害性マーカーCD107aも、コグネイトペプチドで刺激したLY6K(119-142)特異的バルクTh細胞株上で検出することができた(図5C、上のパネル)。LY6K(172-191)LPに関しては、抗ウイルス性CD4⁺エフェクターおよび腫瘍浸潤性リンパ球について以前に明らかにされたのと同様に(Casazza JP, et al., J Exp Med 2006; 203: 2865-77; Attig S, et al., Cancer Res 2009; 69: 8412-9; Widenmeyer M, et al., Int J Cancer 2012; 131: 140-9; Martorelli D, et al., Int Rev Immunol 2010; 29: 371-402)、CD107aが、コグネイトペプチドで刺激したLY6K(172-191)LP特異的バルクTh1細胞(HDL4)上でも検出された(図5C、下のパネル、データは示していない)。全体

10

20

30

40

50

として、これらのデータは、LY6K特異的Th1細胞がヘルパー機能および直接の細胞傷害活性を及ぼすことができることを示唆し、これらはどちらもがん免疫療法のために有益である。

【0236】

LY6K(172-191)LPはインビトロおよびインビボでLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の増殖を刺激する

次にLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の増殖を刺激するLY6K(172-191)LPの能力を検討した。7μMのLY6K(172-191)LPでのPBMCの2回の刺激は、無関係なペプチドでのPBMCの刺激と比較してHLA-A24拘束性かつLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の増殖を誘導した(図6A)。

10

【0237】

本発明者らはまた、LY6K(172-191)LPが、LY6K-A24(177-186)SPを用いてインビボで能動免疫した頭頸部がん患者において生成されたLY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞のインビトロでの増殖を刺激することができるかどうかも試験した。この患者からエキスビボで単離したPBMCにおけるLY6K-A24(177-186)SP特異的かつHLA-A24拘束性CTLの存在を、HLA-A24(A*24:02)/LY6K-A24(177-186)複合体のPE標識テトラマーで染色することによって検出した(図6B、左側)。これらのPBMCをLY6K(172-191)LPと共に短期間(1週間)培養し、LY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞をテトラマーによって検出した。図6Bの右側に示すように、LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLはLY6K(172-191)LPでの短期インビトロ刺激によって有意に増殖した。

20

【0238】

次に、LY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞を刺激するLY6K(172-191)LPの能力をインビボで検討した。HLA-A24 Tgmを、7日の間隔で、IFA中に乳化したLY6K(172-191)LPを用いて尾の基部で2回免疫した。LPでの2回目のワクチン接種の7日後に、鼠径LN中のIFN-分泌CD8⁺T細胞の数をエキスビボELISPOTアッセイによって測定した。図6Cに示すように、LY6K(172-191)LPでのHLA-A24 Tgmの2回の免疫によって刺激したCD8⁺T細胞は、LY6K-A24(177-186)SPでパルスしたC1R2402での再刺激に応答してIFN-を特異的に産生したが、無関係なHIV-A24ペプチドでパルスしたC1R2402ではIFN-を産生せず、このことは、LY6K(172-191)LPが、おそらくHLA-A24 Tgmにおけるインビボでの交差提示によって、有意の割合のIFN-産生LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLを誘導したことを示唆した。

30

合わせて考慮すると、これらの結果は、LY6K(172-191)LPがインビトロおよびインビボの両方でLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLをクロスプライミングすることができることを示唆する。

【0239】

LY6K-A24(177-186)短鎖ペプチドでワクチン接種した頭頸部がん患者におけるLY6K特異的T細胞の存在

最近、Godet Y. et al. は、肺がん患者における自発的な腫瘍特異的Th細胞応答の存在および天然に生じるTAA特異的Th免疫応答が臨床転帰に影響を及ぼすことを報告した(Godet Y, et al. Clin Cancer Res; 18:2943-53)。そこで、本発明者らは、LY6K特異的Th細胞応答が、LY6K由来のCTLエピトープワクチンでのがん患者の能動免疫によって効率的に誘導され得ると考えた。患者における抗原特異的応答を検出するため、7名の頭頸部がん患者から単離したPBMCを回収し、LY6K(119-142)LP特異的Th細胞をIFN-ELISPOTアッセイによって検出した。3名の健常ボランティアから単離したPBMC

40

50

Cを対照として使用した。IFN- γ 分泌細胞の数が陰性対照の少なくとも2倍である場合、応答を陽性とみなした。この実験計画により、LY6K特異的Th細胞記憶応答を測定することが可能となる。図7Aに示すように、LY6K(119-142)LP特異的記憶免疫応答が6名の患者のうち5名(83%)で観察され、LY6K(172-191)LP特異的記憶免疫応答はすべての患者(100%)で観察されたが、3名の連続的な健常ドナーおよび1名のワクチン接種していないがん患者ではLY6Kに対する特異的IFN- γ 応答は検出されなかった(図7A)。Th細胞株のこれらのIFN- γ 産生は、抗HLA-DR mAbの添加によって有意に阻害されたが、抗HLA-DP、HLA-DQまたは抗HLAクラスIでは阻害されなかった(図7B)。これらの結果は、これらの抗原特異的IFN- γ 産生がHLA-DR分子によって拘束されるCD4⁺細胞に由来することを明らかに指示した。これらの所見はまた、これら2つのLY6K由来LPが天然にプロセッシングされ、がん患者においてインビボでCD4⁺T細胞に提示されることを示した。

10

【0240】

LY6K-A24(177-186)SPでのワクチン接種前および接種後のHNMT患者におけるLY6K特異的Th細胞の存在

本発明者らは、LY6K-A24(177-186)SPを用いた2つのペプチドワクチン治験に登録された21名のHNMT患者からの末梢血におけるLY6K-LPに特異的なTh細胞応答を評価した。ドナーの特徴を図12に要約する。LY6K-LPでのPBMCのインビトロ刺激の1週間後、個々のLY6K-LP特異的Th細胞の頻度をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検出した(図8A)。IFN- γ 分泌細胞の数が陰性対照の少なくとも2倍である場合に応答を陽性とみなした。LY6K特異的CD4⁺T細胞応答がHNMT患者において存在することが認められた。図8Bに示すように、7名のHNMT患者においてTh細胞によるLY6K-LP特異的IFN- γ 産生は抗HLAクラスII mAbの添加によって有意に阻害されたが、抗HLAクラスI mAbによっては阻害されなかった。興味深いことに、3名のHNMT患者におけるLY6K(119-142)LP特異的HLA-DRまたはDQ拘束性Th細胞のHLAクラスIIアレルは、HLA-DR8およびHLA-DR15によって共有されていなかった(図8B; LY6K(119-142)LP; HNMT31、41および107)。5名のHNMT患者におけるLY6K(172-191)LP特異的HLA-DR拘束性Th細胞のHLAクラスIIアレルは、HLA-DR15によって共有されなかった(図8B; LY6K(172-191)LP; HNMT31、41、42、107および108)。これらの結果は、LY6K(119-142)LPおよびLY6K(172-191)LPが、この試験におけるインビトロ実験によって同定されなかったいくつかのHLAクラスII拘束性Th細胞エピトープを包含する可能性があり、多くのがん患者をカバーし得ることを示唆する。

20

30

【0241】

LY6K-LPでの短期インビトロ刺激後、有意の頻度(LY6K(119-142)LP、23名のうち10名、44%; LY6K(172-191)LP、23名のうち16名、70%)のLY6K-LP特異的免疫応答がHNMT患者で検出されたが、9名の健常ドナーではLY6K-LPに対する特異的IFN- γ 応答は検出されなかった(図8Cおよび図12)。ワクチン接種した患者でのLY6K(119-142)LPおよびLY6K(172-191)LPに対する特異的スポットの数も、健常ドナーにおけるよりも有意に多かった(図8D)。ワクチン接種した患者におけるLY6K(172-191)LP特異的スポットの数は、ワクチン接種前のHNMT患者におけるよりも有意に多かった(図8D、右側のパネル)が、ワクチン接種した患者におけるLY6K(119-142)LP特異的スポットの数は、ワクチン接種前のHNMT患者におけるものと比較して有意ではなかった(図8D、左側のパネル)。ワクチン接種後のHNMT患者におけるLY6K(172-191)LP特異的免疫応答の頻度は、ワクチン接種前のHNMT患者におけるものよりも有意に高かった(図8E)。LY6L-LP特異的応答がワクチン

40

50

接種前の一部の患者で検出されたが、頻度は低かった(図12; LY6K(119-142)LP、11名のうち2名、18%; LY6K(172-191)LP、11名のうち1名、9%)。興味深いことに、LY6K-LPに特異的な応答は反復ワクチン接種によって誘発または増大された(図8F)。進行したがんを有するワクチン接種したHNMT患者(CTR-8379、n=13)および術後アジュバント免疫療法を受けているワクチン接種したHNMT患者(CTR-8380、n=8)におけるLY6K-LP特異的IFN-スポットの数の比較では、術後アジュバント免疫療法を受けているHNMT患者におけるLY6K-LP特異的IFN-スポットの数が、進行したがんを有するワクチン接種したHNMT患者におけるよりも有意に多かった(図8G)。合わせて考慮すると、これらの所見は、HNMTを有する患者がLY6K特異的CD4⁺T細胞応答を開始させることができることを示唆する。

10

【0242】

LY6K-LPは天然にプロセッシングされるTh細胞エピトープを包含する

本発明者らは続けて、DCがLY6Kタンパク質を取り込み、プロセッシングして、LY6K-LP特異的Th細胞を刺激することができるかどうかを評価した。組換えLY6Kタンパク質をロードした自己DCを調製し、IFN-ELISPOTアッセイにおけるAPCとして使用した(Tomita Y et al., Cancer Sci 2011; 102:71-8; Harao M et al., Int J Cancer 2008; 123:2616-25)。HLA-DP5拘束性LY6K(119-142)LP反応性バルクTh細胞は、LY6Kタンパク質をロードしたDCをHLA-DP 20
依存的に効率よく認識したが、対照タンパク質をロードしたDCは認識せず、このことは、LY6K(119-142)LPが、天然にプロセッシングされかつHLA-DP5分子によって提示されるエピトープを包含することを示している(図9A)。HLA-DR15またはHLA-DQ拘束性LY6K(172-191)LP特異的Thクローンも、LY6Kタンパク質をロードした自己DCを認識し、このことは、LY6K(172-191)LPが、天然にプロセッシングされかつHLA-DR15およびHLA-DQ分子によって提示されるエピトープを包含することを示している(図9B)。

20

【0243】

LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLは、インビトロでLY6K(172-191)LPの交差提示を通して刺激された

30

次に、本発明者らは、LY6K(172-191)LPでパルスしたDCが、LY6K(172-191)LPの交差提示を通してLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCTLを刺激するかどうかを試験した。

LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLによるIFN- γ 産生を細胞内標識によって測定した。T細胞応答におけるLP分解産物の外因性提示の寄与を排除するまたは評価するために、LY6K-A24(177-186)SPを交差提示することはできないが生存DCと同程度に効率的に提示することができる固定DC(図10A、固定DC+SP)を使用した。LY6K(172-191)LPは、非固定DC(DC+LP)によって交差提示された場合のみ、有意の割合のIFN- γ 分泌性テトラマー⁺CD8⁺T細胞を誘導した。LY6K(172-191)LPでパルスした固定DCは、対照LPでパルスした非固定DCと同様に、LY6K-A24(177-186)特異的CTLを刺激することができなかつた(固定DC+LPおよびDC+対照LP)。

40

【0244】

本発明者らは、LY6K(172-191)LPがLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCTLの増殖を誘導することができるかどうかを評価した。HLA-A24⁺HDL3の精製CD8⁺T細胞から生成したLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCTLを、LY6K(172-191)LPでパルスした自己DCで再刺激した。図10Bに示すように、LY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマー⁺CD8⁺細胞の集団は、7日目にLY6K(172-191)LPでパルスしたDCでの刺激によって有意に増殖したが、LY6K-A24(177-186)SP特

50

異的バルクCTLを対照LPでパルスしたDCで刺激した場合は減少した。これらの結果は、LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの増殖がDCによるLY6K(172-191)LPの交差提示によって誘導されたことを示唆する。

【0245】

LY6K(172-191)LPはHNMT患者においてLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの効率的な増殖を誘導する

本発明者らは、LY6K(172-191)LPが6名のHNMT患者のPBMCにおけるLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLのインビトロでの増殖を誘導することができるかどうかを評価した。LY6K-A24(177-186)SPでワクチン接種した5名のHNMT患者からの新鮮なPBMCをLY6K(172-191)LP(10 μ g/mL)と共に培養した。rhIL-2(20IU/mL)およびrhIL-7(5ng/mL)を0日目と2日目に添加した。0日目(エキスビボ)および7日目に、PBMCをLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマーで染色した。図10Cに示すように、HNMT108から単離したPBMCを、インビトロ培養の前に(エキスビボで)LY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマーで染色した場合、テトラマー⁺細胞の頻度はCD8⁺T細胞の0.05%に過ぎなかった。テトラマー⁺細胞は、LY6K-A24(177-186)SPを添加せずにLY6K(172-191)LPでPBMCを1週間インビトロ刺激することによって有意に増殖した。LY6K-A24(177-186)特異的CTLの頻度はCD8⁺T細胞の0.35%に有意に増加した。該細胞を7日目にLY6K-A24(177-186)SPで刺激した場合、抗原特異的IFN- γ 産生も検出された。2倍を上回るテトラマー⁺CD8⁺細胞の割合の増加は、ワクチン接種後の5名のHNMT患者のうち4名で観察された(図10D; HNMT43、105、108および110)。これらの結果は、HNMT患者のLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの増殖がDCによるLY6K(172-191)LPの交差提示によって誘導された可能性があることを示唆する。PBMCをLY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LP(各々10 μ g/mL; 図10E~F)の混合物と共に培養した場合、ワクチン接種後の11名のHNMT患者のうち9名から同様の結果を得た。興味深いことに、LY6K-A24(177-186)SPでのワクチン接種前のHNMT42におけるLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマー⁺細胞も、LY6K(119-142)LPとLY6K(172-191)LPの混合物での刺激によって有意に増殖した(図10G)。

【0246】

LY6K(172-191)LPの交差提示はインビトロおよびインビボでLY6K特異的CD8⁺T細胞を効率的にプライミングする

その後、LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLを誘導するLY6K(172-191)LPの能力をテトラマー標識によって検査した。HLA-A24拘束性LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLは、3名のHLA-A24⁺健常ドナー(HDL1、HDL3、HDL4; 図10H、データは示していない)におけるLY6K(172-191)LPと共に2週間培養したPBMC中で有意に誘導された。

LY6K-A24(177-186)SP特異的CTLをプライミングするLY6K(172-191)LPの能力をエキスビボIFN- γ ELISPOTアッセイによって検査した。HLA-A24 Tgmは、LY6K(172-191)LPで3回免疫した。LY6K(172-191)LPでワクチン接種したHLA-A24 TgmのCD8⁺T細胞は、LY6K-A24(177-186)SPでパルスしたBM-DCでの刺激に応答してIFN- γ を産生した(図10I)。これらの結果は、LY6K(172-191)LPの取込み後、APCがインビトロおよびインビボでLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLをクロスプライミングすることができることを明らかにする。

【0247】

LY6K-LP特異的Th細胞によるLY6K-A24(177-186)特異的CT

Lの誘導増強

本発明者らは、LY6K-LPがLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの誘導を増強することができるかどうかを試験した。HDL3由来のLY6K-LP特異的バルクCD4⁺T細胞およびLY6K-A24(177-186)SP特異的バルクCD8⁺T細胞を、LY6K-A24(177-186)SP、LY6K-A24(177-186)SP+対照LP、またはLY6K-A24(177-186)SP+LY6K-LPの存在下で自己DCと共に培養した。ペプチドとの1週間のインビトロ培養後、培養した細胞をLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマーで染色した。図11Aに示すように、LY6K-A24(177-186)SP+LY6K(119-142)LPまたはLY6K-A24(177-186)SP+LY6K(172-191)LPの添加は、LY6K-A24(177-186)SP単独またはLY6K-A24(177-186)SP+対照LPの添加と比較して、LY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の絶対数を有意に増加させた。活性化LY6K(172-191)LP特異的Th細胞によるHLA-A24⁺HDL4でのLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマー⁺T細胞の誘導増強が観察された(データは示していない)。

10

【0248】

次に、ワクチン接種後のHNMT患者(HNMT31、42および43)からのPBMCにおけるLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの誘導に対するLY6K-LPの相乗効果を評価した。免疫後2か月目にHNMT43から採取したPBMCを、LY6K-A24(177-186)SP単独、LY6K-A24(177-186)SP+対照LP、LY6K-A24(177-186)SP+LY6K(119-142)LP、またはLY6K-A24(177-186)SP+LY6K(172-191)LPと共に7日間培養した。ペプチドとの1週間のインビトロ培養後、細胞をLY6K-A24(177-186)SP特異的テトラマーで染色した(図11B)。PBMCをLY6K-A24(177-186)SP+LY6K(172-191)LPと共に培養した場合、LY6K-A24(177-186)SP特異的CD8⁺T細胞の絶対数は、LY6K-A24(177-186)SP単独またはLY6K-A24(177-186)SP+対照LPと共に培養した場合と比較して有意に増大した(図11C)。HNMT43におけるLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの誘導に対するLY6K(119-142)LPの相乗作用は存在しなかった。本発明者らが免疫後1か月目に評価した場合も同様の結果を得た(データは示していない)。LY6K-A24(177-186)SPへのLY6K(119-142)LPまたはLY6K(172-191)LPの添加により、HNMT31およびHNMT42において同様の結果を得た(図11D)。これらの結果は、LY6K-LPがLY6K-A24(177-186)SP特異的CTLの相乗的誘導を生じさせ得ることを示唆する。

20

30

【0249】

考察

最も魅力的なワクチン化合物は、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の治療的免疫応答を誘導することができるTAAの配列に対応する合成LPであると考えられる(Kenter GG, et al. *N Engl J Med* 2009; 361: 1838-47. Melief CJ and van der Burg SH. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 351-60)。これらのLPの注射後、患者のDCがLPを取り込み、プロセッシングして、様々なHLAクラスI分子およびHLAクラスII分子に関連するすべての可能なCTLエピトープおよびThエピトープをそれぞれ提示すると考えられる。したがって、本発明者らは、がん免疫療法のための理想的なペプチドワクチンは、最も一般的に認められるHLAによって拘束されるCTLおよびTh1細胞の両方を誘導することができる単一ポリペプチドであるべきだと考えた。

40

この試験において、本発明者らは、CTLエピトープを含むLY6K由来のLPを同定し、このLY6K由来のLPがプロミスキャスなHLAクラスII拘束性Th1細胞によ

50

って認識され得ることを見出した。さらに本発明者らは、2つのLY6K由来LPに対するT細胞応答が、LY6K由来のCTLエピトープペプチドで能動的にワクチン接種した、進行した頭頸部がん患者において見出されることを認めた。これらの結果は、ワクチン接種で活性化されたCTLによって誘導される腫瘍溶解が、抗原提示細胞による取込みおよびLY6K由来LPをCD4⁺T細胞に提示するためのLY6Kタンパク質のプロセッシングを促進すること、ならびにLY6K特異的CTL応答とTh応答の間での相乗作用がインビボで起こったことを示唆する。

【0250】

結論として、本発明者らは、プロミスキラスなHLAクラスII拘束性CD4⁺Th細胞によって認識される2つのLY6K由来ペプチドを初めて同定し、これらの1つはCTLエピトープを含んでおり、このことは、これらのTh1エピトープが、LY6K特異的Th1細胞だけでなく、起こり得る交差提示によってLY6K特異的CTLの増殖のための良好なツールも提供することを示唆する。これらの所見は、今後、様々な種類のがんのためのLY6Kペプチドに基づく免疫療法の臨床試験を促進するであろう。

10

【産業上の利用可能性】

【0251】

本発明は、強力な抗腫瘍免疫応答を誘導することができ、したがって多種多様ながん型に適用可能性を有する、LY6K由来のTh1細胞エピトープペプチドを記述する。そのようなペプチドは、がん、特にLY6Kを発現するがんに対するペプチドワクチンとしてのさらなる開発に値する。本発明のペプチドは、Th1細胞応答を誘導することができ、したがって、Th1細胞によって分泌されるサイトカインが、抗原依存的に細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞を助けるかまたは活性化することができる。それゆえ、本発明によって提供される免疫治療戦略は、疾患がMHCクラスII分子によって媒介される免疫応答によって改善され得る限り、がんを含む任意の疾患に適用することができる。特に、本発明のTh1細胞は、CTLによって惹起される免疫応答を改善することができる。それゆえ、本発明のペプチドは、対象においてがんを含む疾患に対するCTL応答を増強するのに有益である。

20

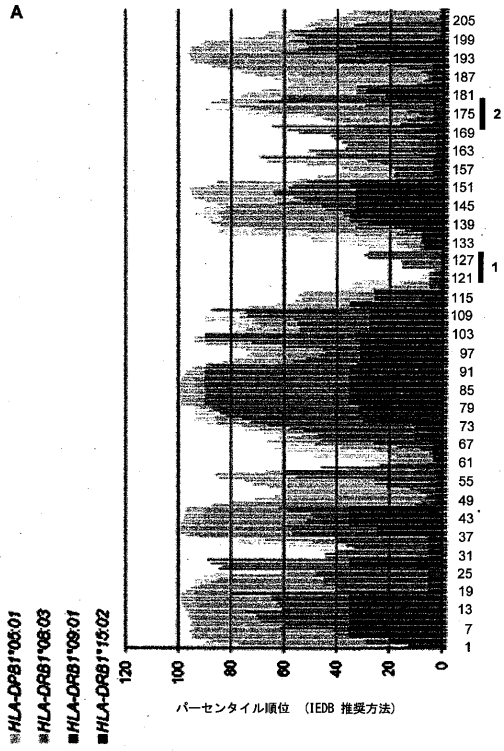
さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、Th1細胞だけでなく、LY6K発現細胞に対するCTLも誘導することができる。本発明のそのようなペプチドは、LY6Kに関連する疾患、例えばがん、より詳細には膀胱がん、子宮頸がん、胆管細胞がん、食道がん、胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、骨肉腫、膵がん、軟組織腫瘍および頭頸部悪性腫瘍の治療のためにも有用であり得る。

30

【0252】

本発明を、詳細におよびその特定の態様を参照して本明細書で説明したが、前記説明は本質的に例示的および説明的であり、本発明とその好ましい態様を例証することを意図する。日常的な実験を通して、当業者は、その境域および境界が添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされ得ることを容易に認識するであろう。

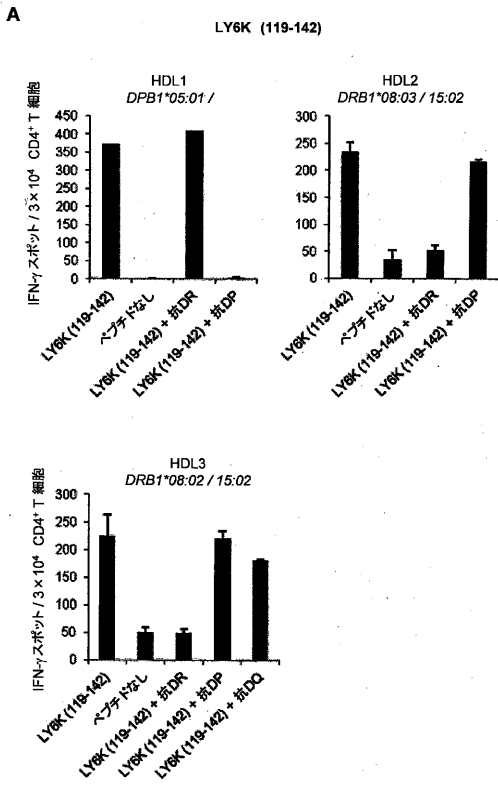
【 図 1 A 】



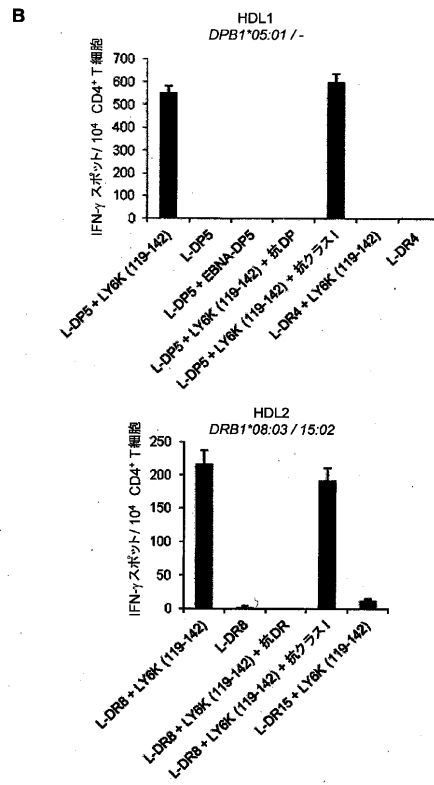
【 図 1 B 】

- B**
1. LY6K (119-142): KWTEPYCVIAAVKIFPRPFMVAKQ (配列番号:1)
 2. LY6K (172-191): KCCKIRYCNLEGGPPINSSVF (配列番号:2)
HLA-A24

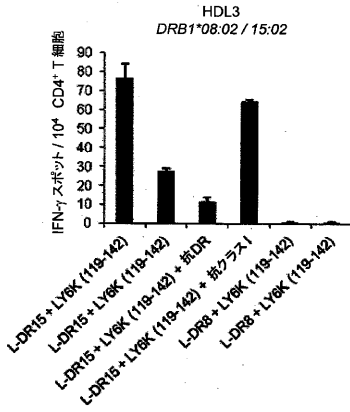
【 図 2 A 】



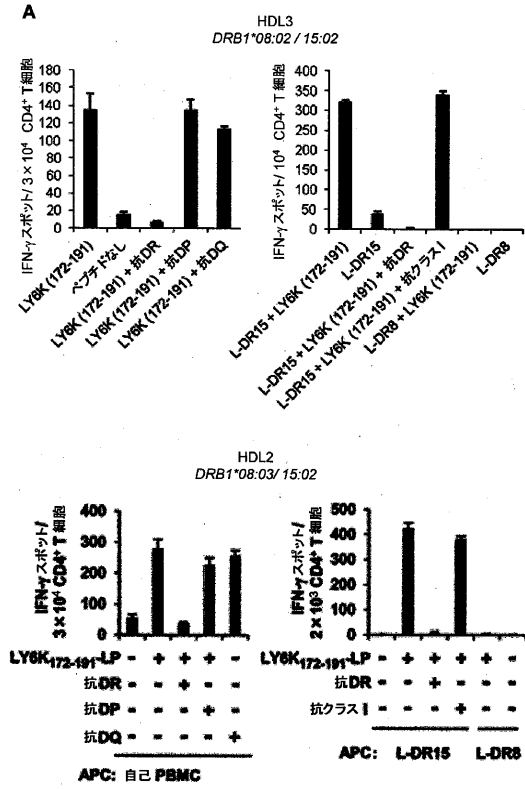
【 図 2 B 1 】



【 図 2 B 2 】

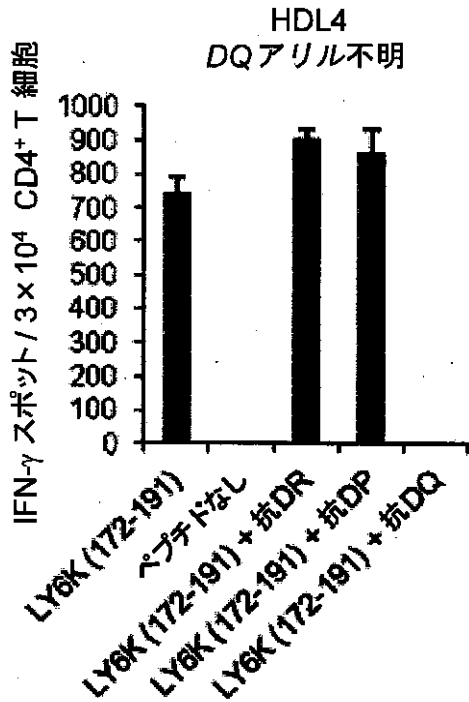


【 図 3 A 】

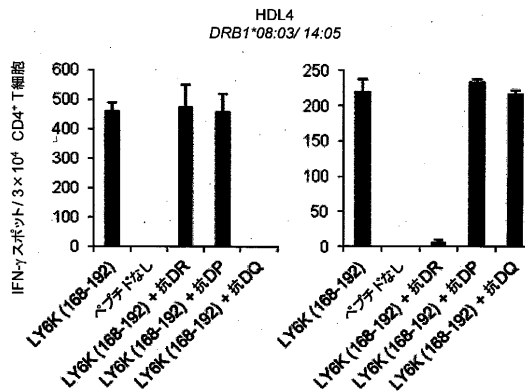


【 図 3 B 】

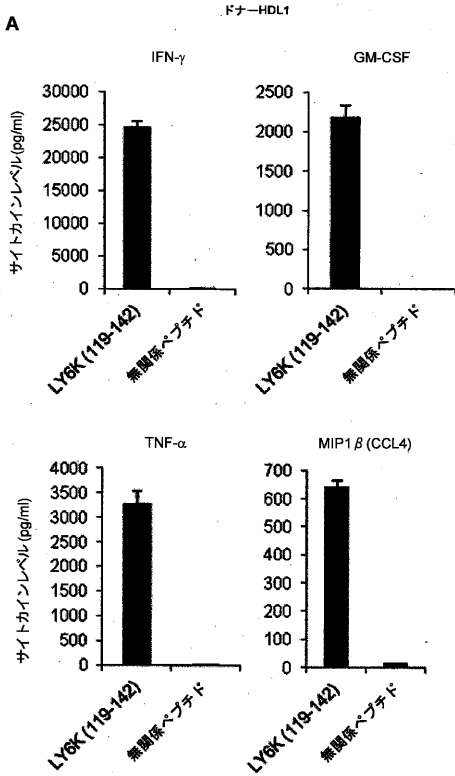
B



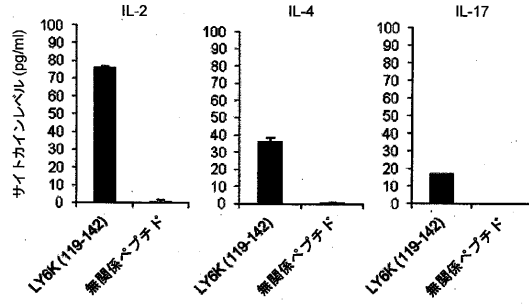
【 図 4 】



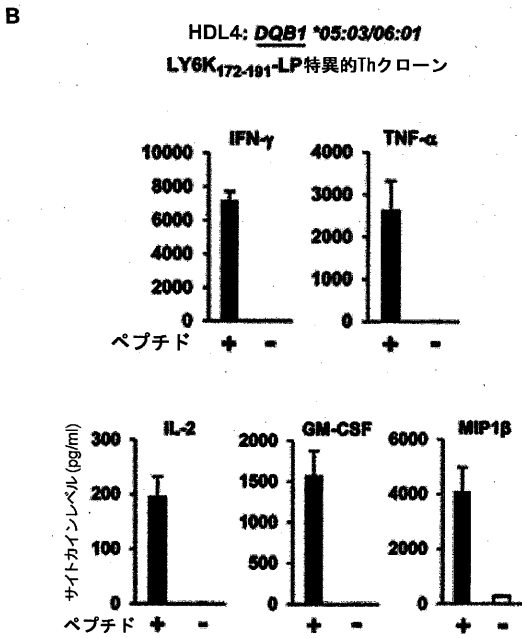
【 図 5 A 1 】



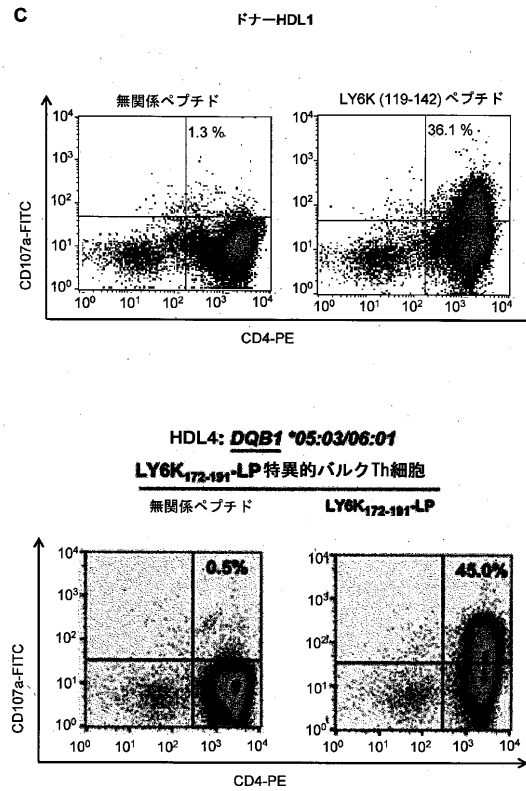
【 図 5 A 2 】



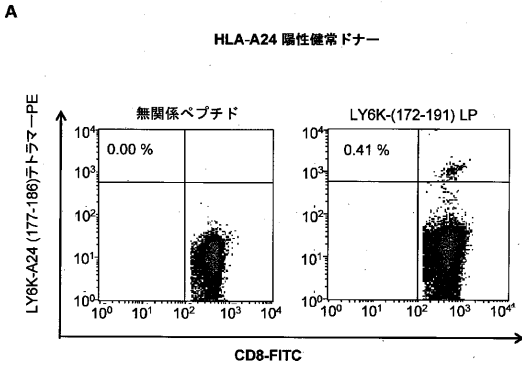
【 図 5 B 】



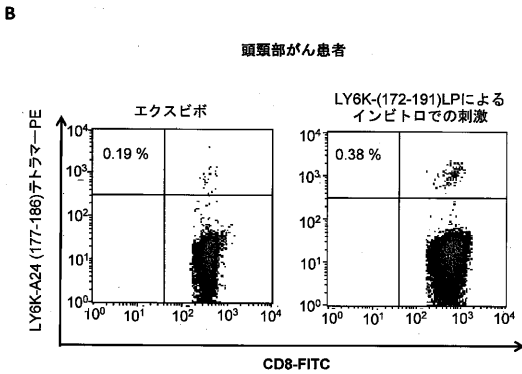
【 図 5 C 】



【 図 6 A 】

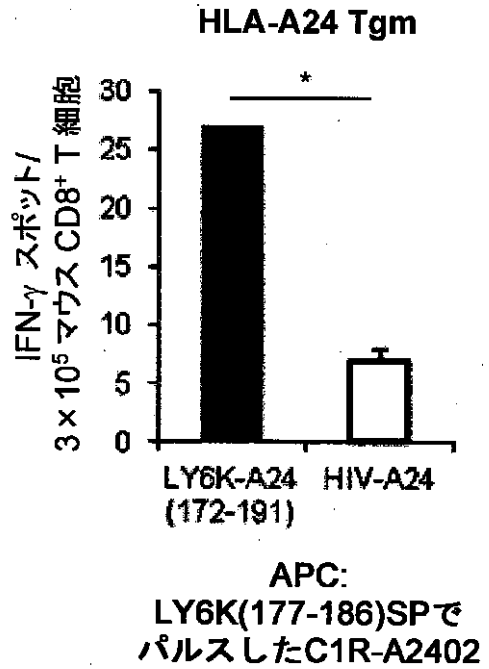


【 図 6 B 】

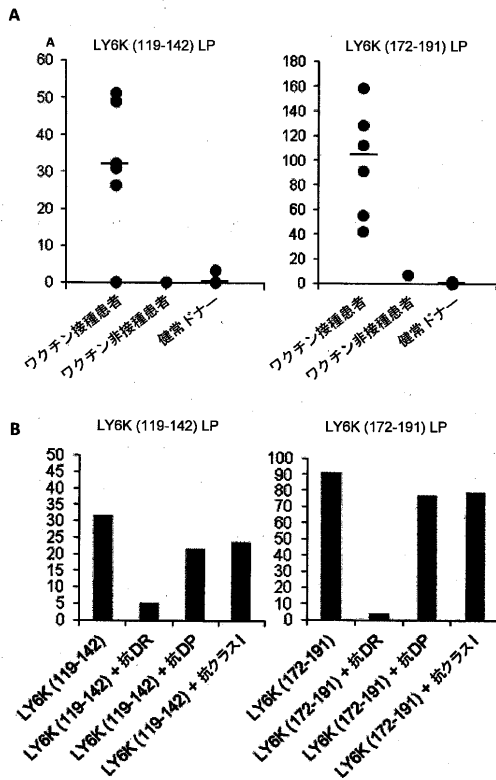


【 図 6 C 】

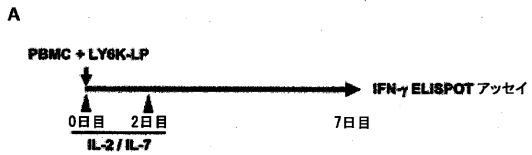
C



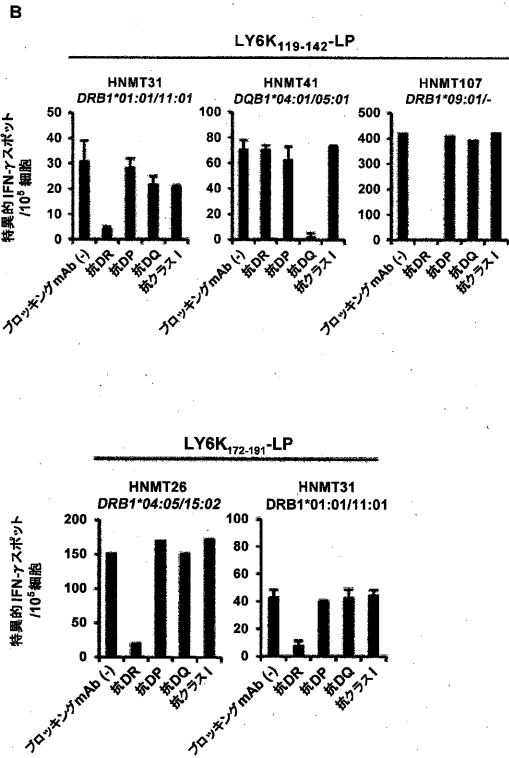
【 図 7 】



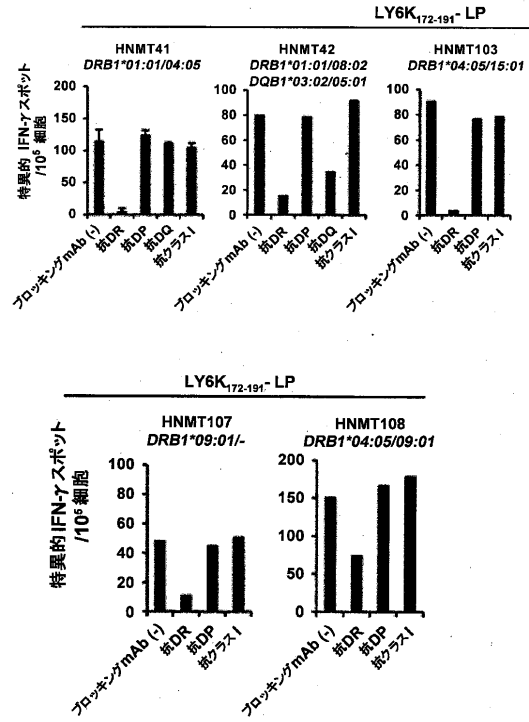
【 図 8 A 】



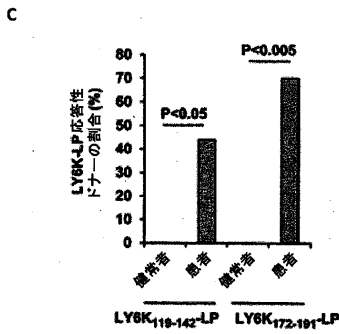
【 図 8 B 1 】



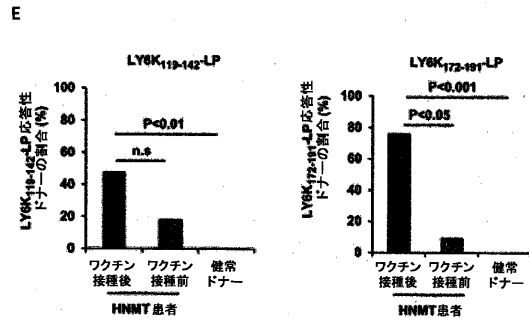
【 図 8 B 2 】



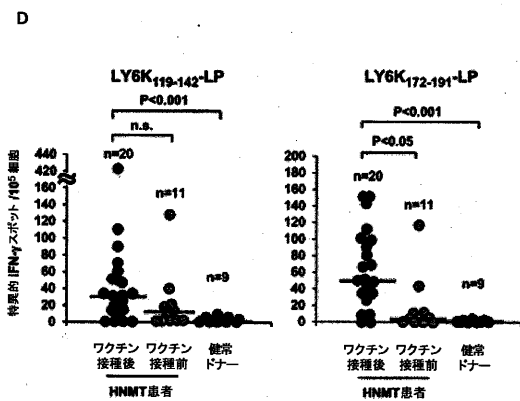
【 図 8 C 】



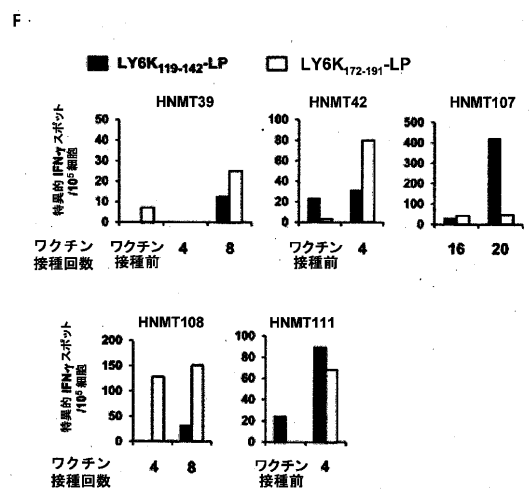
【 図 8 E 】



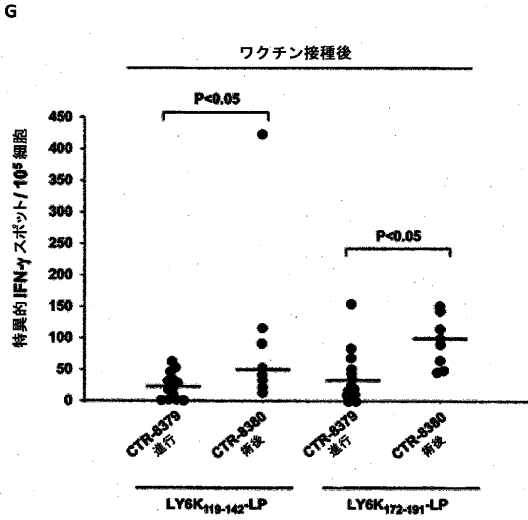
【 図 8 D 】



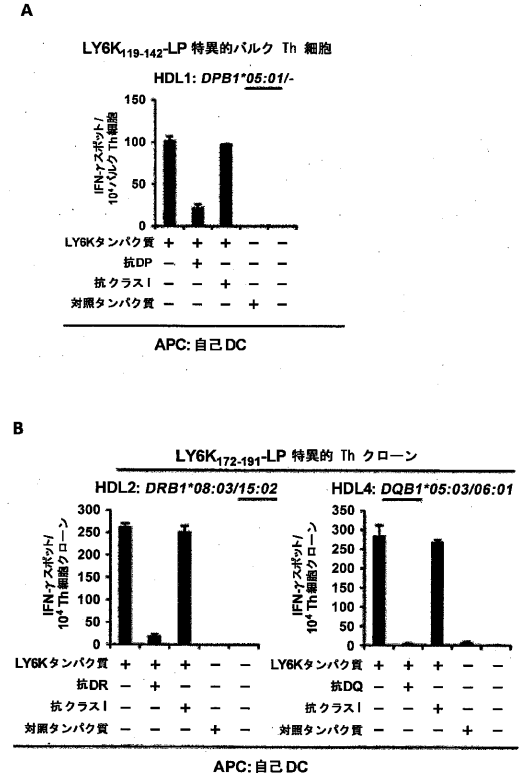
【 図 8 F 】



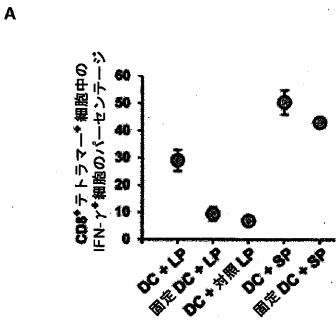
【 図 8 G 】



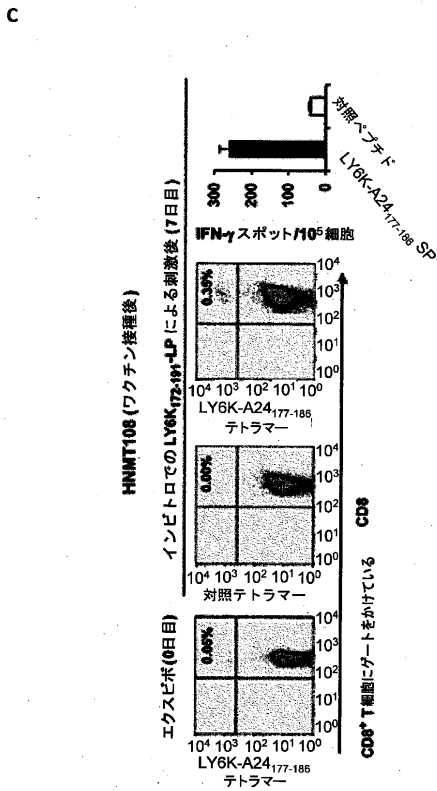
【 図 9 】



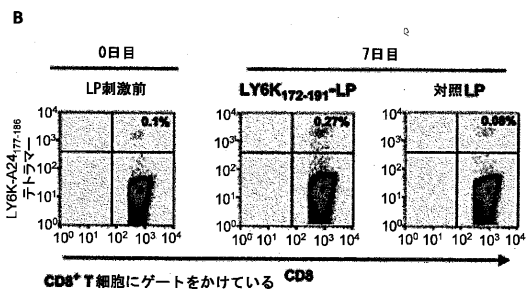
【 図 10 A 】



【 図 10 C 】

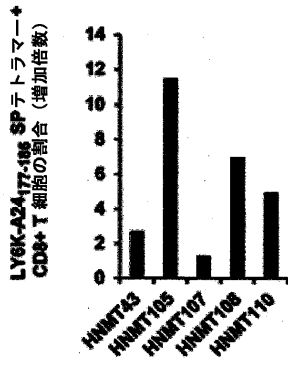


【 図 10 B 】



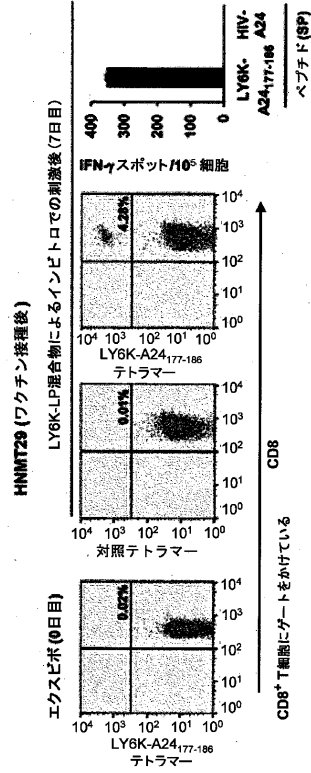
【図10D】

D



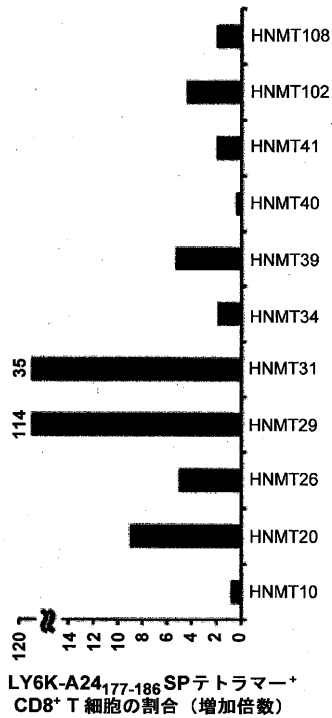
【図10E】

E



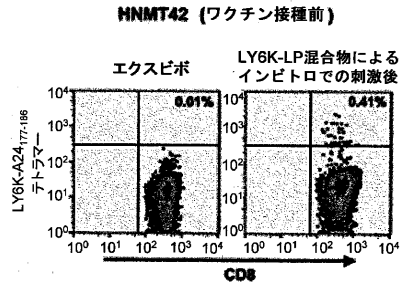
【図10F】

F



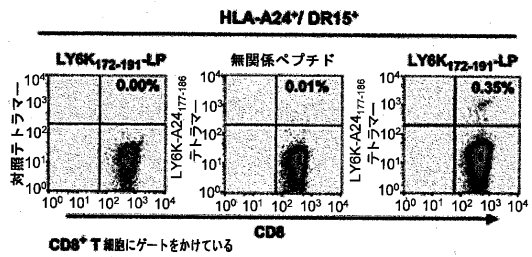
【図10G】

G

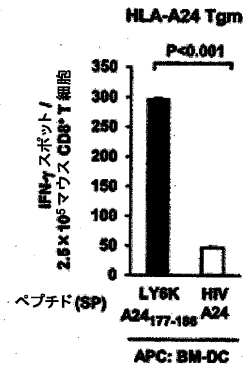


【図10H】

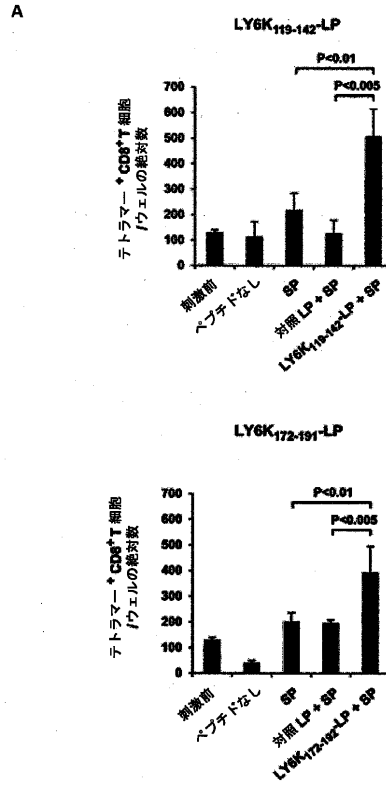
H



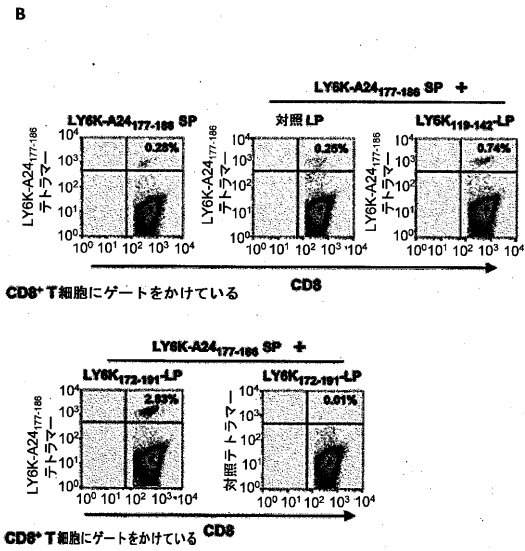
【 図 1 0 I 】



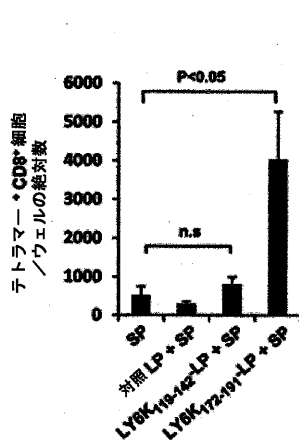
【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】

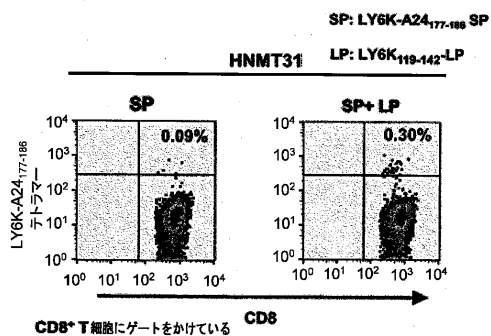
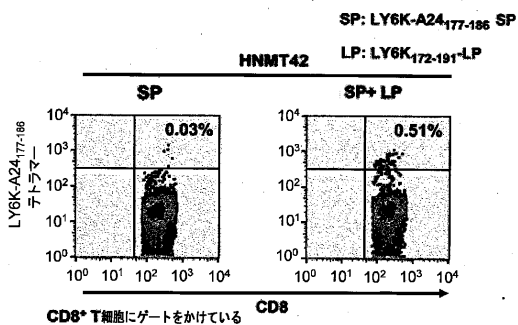


【 図 1 1 C 】



【 1 1 D 】

D



【 1 2 】

HNMT患者の臨床的特徴

患者ID	年齢/性別	LY6K陽性CD8 ⁺ T細胞比率		ワグネル陽性率	HLA-DPB1	HLA-DPB1
		LY6K ₁₀₃₋₁₁₂ -LP	LY6K ₁₀₃₋₁₁₂ -LP			
CTR-4379 + CTR-4380						
患者数(n%)		10/23 (44%)	16/23 (70%)			
CTR-4379	ワグネル陽性率	ワグネル陽性率	ワグネル陽性率	ワグネル陽性率	ワグネル陽性率	ワグネル陽性率
	2/7 (29%)	4/13 (31%)	1/7 (14%)	8/13 (62%)		
HNMT10	51M	n.l.	n.l.	+	n.l.	0/01/04/05 05/01/-
HNMT20	57F	n.l.	n.l.	+	n.l.	0/01/20/01 02/01/05/01
HNMT26	70M	n.l.	n.l.	+	n.l.	04/05/16/02 05/01/09/01
HNMT29	64F	n.l.	n.l.	+	n.l.	09/01/14/34 02/01/05/01
HNMT34	65M	n.l.	n.l.	+	n.l.	01/01/17/01 02/01/04/02
HNMT35	85F	n.l.	n.l.	+	n.l.	04/05/08/02 05/01/-
HNMT39	77M	n.l.	n.l.	+	n.l.	04/05/14/54 05/01/19/01
HNMT40	76M	+	+	+	+	01/01/09/01 04/02/05/01
HNMT41	51F	+	+	+	+	01/01/04/05 04/02/06/01
HNMT42	50F	+	+	+	+	01/01/08/02 04/02/05/01
HNMT43	50M	+	+	+	+	08/02/09/01 05/01/-
HNMT44	52M	+	+	+	+	01/01/23/02 04/01/05/01
HNMT45	62M	+	+	+	+	04/02/14/03 05/01/-
CTR-4380						
患者数(n%)		0/4 (0%)	6/6 (75%)	0/4 (0%)	8/8 (100%)	
HNMT102	80F	n.l.	n.l.	+	n.l.	05/01/09/01 15/05/-
HNMT103	79F	n.l.	n.l.	+	n.l.	04/05/15/01 02/01/05/01
HNMT105	50M	n.l.	n.l.	+	n.l.	04/05/19/02 03/01/04/01
HNMT107	41M	n.l.	n.l.	+	n.l.	09/01/17/01 02/01/02/02
HNMT108	41M	n.l.	n.l.	+	n.l.	04/05/09/02 03/01/05/01
HNMT109	60F	+	+	+	+	04/02/04/03 03/01/05/01
HNMT110	72F	+	+	+	+	04/10/15/02 03/01/05/01
HNMT111	70F	+	+	+	+	09/01/15/02 05/01/-
HNMT112	54M	+	n.l.	+	n.l.	08/02/15/01 02/01/04/01

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/004249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. See extra sheet 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) Int.Cl. C07K14/47, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K16/44, C12N5/0783, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2013 Registered utility model specifications of Japan 1996-2013 Published registered utility model applications of Japan 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLus/JMEDPLus/JST/580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2006/090810 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2006.08.31, & JP 2008-530975 A & US 2009/0202576 A1 & EP 2325305 A1	1-12, 16, 23-25 1-12, 15-16, 18, 20-21, 23-26
X Y	WO 2008/102557 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2008.08.28, & JP 2010-519176 A & US 2010/0040641 A1 & EP 2565203 A1 & KR 10-2013-0023407 A & CN 101663315 A	1- 6 1-12, 15-16, 18, 20-21, 23-26
X Y	SUDA Takako, et al., "Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy", Cancer Sci., 2007, Vol.98, No.11, p.1803-1808	1- 6 1-12, 15-16, 18, 20-21, 23-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 12.09.2013	Date of mailing of the international search report 24.09.2013	
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Keiji TORII Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448	4B 4045

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/004249
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG Peng, et al., "A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach", PLoS Computational Biology, 2008, Vol.4, No.4, p.e1000048	1-12, 15-16, 18, 20-21, 23-26
Y	MELIEF J.M. Cornelis, et al., "Immunotherapy of established [pre]malignant disease by synthetic long peptide vaccines", Nat. Rev. Cancer, 2008, Vol.8, p.351-360	1-12, 15-16, 18, 20-21, 23-26
A	IWAHASHI Makoto, et al., "Vaccination with peptides derived from cancer-testis antigens in combination with CpG-7909 elicits strong specific CD8+ T cell response in patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma", Cancer Sci., 2010, Vol.101, No.12, p.2510-2517	1-12, 15-16, 18, 20-21, 23-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/004249

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
	<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:</p> <p>a. (means)</p> <p><input type="checkbox"/> on paper</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> in electronic form</p> <p>b. (time)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> in the international application as filed</p> <p><input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form</p> <p><input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/004249

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.: 13-14, 17, 19, 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 13-14, 17, 19, 22 relate to a method for treatment of the human or animal body by therapy, which does not require an international search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
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:

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/004249

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/47(2006.01) i, A61K38/00(2006.01) i, A61K39/00(2006.01) i,
A61P35/00(2006.01) i, C07K16/44(2006.01) i, C12N5/0783(2010.01) i,
C12N15/09(2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
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, 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 西村 泰治

熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 富田 雄介

熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 大沢 龍司

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 CA01 CA11 DA02 EA04 GA11 HA17

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR40 QS34

4B065 AA94X AA94Y AB01 AC20 BA02 BA30 BD39 CA45

4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA23 DC50 MA02

NA05 NA14 ZB261

4C087 AA01 AA02 BB37 CA04 MA02 NA05 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 CA41 DA76 DA86

EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	Th1细胞的LY6K表位肽和含有它的疫苗		
公开(公告)号	JP2015524652A	公开(公告)日	2015-08-27
申请号	JP2015501989	申请日	2013-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	西村泰治 富田雄介 大沢龍司		
发明人	西村 泰治 富田 雄介 大沢 龍司		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N5/0783 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 A61K38/00 A61K48/00 A61K35/17 A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/435 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/55566 A61K2039/57 A61K2039/70 C07K14/4748 C07K16/18 C07K16/2833 C12N5/0634		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/47.ZNA C12N5/00.202.L C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12Q1/68.A A61K37/02 A61K48/00 A61K35/17.Z A61P35/00 A61P37/04 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QS34 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/BD39 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/CA04 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/669995 2012-07-10 US		
其他公开文献	JP6255594B2 JP2015524652A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了分离的LY6K衍生的表位肽，其具有Th1细胞诱导能力。这些肽被MHC II类分子识别并且可以诱导Th1细胞。在一个优选的实施方案中，本发明的此类肽能够与MHC II类分子混杂结合，并且除Th1细胞外还能诱导LY6K特异性细胞毒性T淋巴细胞（CTL）。因此，这些肽适用于增强受试者的免疫应答，因此可用于癌症免疫疗法，特别是用作癌症疫苗。编码任何所述肽的多核苷酸，诱导这样的肽的方法是APC和Th1细胞和它们的相关联的本文诱导也被公开。

(21) 出願番号	特願2015-501989 (P2015-501989)	(71) 出願人	502240113
(86) (22) 出願日	平成25年7月9日 (2013. 7. 9)		オンコセラビー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月4日 (2015. 3. 4)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/004249	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開番号	W02014/010232		弁理士 春名 雅夫
(87) 国際公開日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/669, 995		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成24年7月10日 (2012. 7. 10)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く