(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-508181
(P2018-508181A)
(43)公表日　平成30年3月29日(2018.3.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B063
C07K 7/04	(2006.01)	C07K	7/04		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C084
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 80 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-518379 (P2017-518379)
(86)(22)出願日　平成27年12月4日 (2015.12.4)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月5日 (2017.4.5)
(86)国際出願番号　PCT/JP2015/006029
(87)国際公開番号　WO2016/092787
(87)国際公開日　平成28年6月16日 (2016.6.16)
(31)優先権主張番号　特願2014-248759 (P2014-248759)
(32)優先日　平成26年12月9日 (2014.12.9)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(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
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(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

(54)【発明の名称】Ｔｈ１細胞のためのＧＰＣ３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】
Ｔｈ１細胞誘導能を有する単離されたＧＰＣ３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、Ｔｈ１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分子にプロミスキャスに結合することができ、Ｔｈ１細胞に加えてＧＰＣ３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Ｔｈ１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、例えば肝細胞がんおよびメラノーマ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。
【選択図】なし

【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：９または１１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、２、３、４または５のアミノ酸配列から選択される９アミノ酸を超える長さを有する連続するアミノ酸配列；ならびに
（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
からな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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からな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】
ＧＰＣ３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から５からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに
（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
からな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】
請求項１から５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７】
（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
からな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５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８】
（ａ）請求項１から５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６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５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５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）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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、かつ
（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
からな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９】
ＭＨＣクラスＩＩ分子としてＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からな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８に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
ＣＴＬ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８または９に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
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組成物であって、
（ａ）請求項１から５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６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５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５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）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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。
【請求項１２】
Ｔｈ１細胞を誘導する能力を有するＡＰＣを誘導するための方法であって、ＡＰＣを請求項１から５のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エクスビボまたはインビボで接触させる段階を含む、方法。
【請求項１３】
ＣＴＬを誘導する能力を有するＡＰＣを誘導するための方法であって、
（ａ）ＡＰＣを請求項１から５のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エクスビボまたはインビボで接触させる段階；および
（ｂ）請求項１から５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ＡＰＣに導入する段階
からなる群より選択される段階を含む、方法。
【請求項１４】
Ｔｈ１細胞を誘導するための方法であって、
（ａ）ＣＤ４陽性Ｔ細胞を、ＭＨＣクラスＩＩ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ＡＰＣと共培養する段階；および
（ｂ）両方のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）サブユニット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であって、ここでＴＣＲが、細胞表面に提示されるＭＨＣクラスＩＩ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に結合することができる、段階
からなる群より選択される段階を含む、方法。
【請求項１５】
ＣＴＬを誘導するための方法であって、
（ａ）ＣＤ４陽性Ｔ細胞およびＣＤ８陽性Ｔ細胞の両方を、請求項４または５に記載のペプチドと接触させたＡＰＣと共培養する段階；ならびに
（ｂ）ＣＤ８陽性Ｔ細胞を、請求項４または５に記載のペプチドと接触させたＡＰＣと共培養する段階
からなる群より選択される段階を含む、方法。
【請求項１６】
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５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６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５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５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）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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１７】
ＭＨＣクラスＩＩ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、単離されたＡＰＣ。
【請求項１８】
請求項１２または１３に記載の方法によって誘導されるＡＰＣ。
【請求項１９】
ＡＰＣの表面に提示された請求項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を認識する、単離されたＴｈ１細胞。
【請求項２０】
請求項１４に記載の方法によって誘導されるＴｈ１細胞。
【請求項２１】
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５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６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５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５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）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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２２】
請求項１から５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２３】
請求項１から５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２４】
請求項２３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２５】
請求項１から５のいずれか一項に記載のペプチド、請求項６に記載のポリヌクレオチドまたは請求項２２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。
【０００２】
優先権
本出願は、２０１４年１２月９日出願の日本特許出願第２０１４－２４８７５９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。

【背景技術】
【０００３】
ＣＤ８陽性細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）クラスＩ分子上で見いだされる腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）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。ＴＡＡの最初の例として黒色腫抗原（ＭＡＧＥ）ファミリーが発見されて以来、多くの他のＴＡＡ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ＴＡＡ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。
【０００４】
がん細胞の増殖および生存に不可欠なＴＡＡは、免疫療法のための標的として有用である。なぜなら、そのようなＴＡＡの使用は、治療的に行われる免疫選択の結果としてのＴＡＡ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規ＴＡＡの同定はさらなる発展を保証する。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奏効率しかもたらしていない（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規ＴＡＡが当分野において依然として必要である。
【０００５】
近年、本発明者らは、ゲノムワイドｃＤＮＡマイクロアレイ解析を用いることにより、肝細胞がん（ＨＣＣ）、メラノーマおよび様々な他の悪性腫瘍において高頻度で過剰発現するがん胎児抗原、グリピカン３（ＧＰＣ３）を同定した（非特許文献１４～１７）。本発明者らはまた、ＨＣＣ患者の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）からＨＬＡ－Ａ２（Ａ＊０２：０１）拘束性ＣＴＬおよびＨＬＡ－Ａ２４（Ａ＊２４：０２）拘束性ＣＴＬを誘導することができる、高い免疫原性を示すＧＰＣ３由来短鎖ペプチド（ＳＰ）を同定した（特許文献１、２）。ＧＰＣ３由来ＳＰを用いた、進行ＨＣＣ患者のためのがん免疫療法第Ｉ相臨床試験において、これらのペプチドワクチンが耐性良好であり、重要な免疫応答および抗腫瘍効果を誘導することを示している（非特許文献１８～２０）。それらはまた、高ＧＰＣ３特異的ＣＴＬの頻度が、ＧＰＣ３－ＳＰワクチンを接種した進行ＨＣＣ患者において、長期全生存率と相関関係があることを示している。上記２つのＧＰＣ３－ＳＰを用いた、治癒手術を受けたＨＣＣ患者のためのアジュバントがん免疫療法の第ＩＩ相臨床試験が進行中である（非特許文献２０）。
【０００６】
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２１）。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２２、２３）。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２４）。さらに、Ｔｈ細胞は、腫瘍部位におけるＣＴＬの侵入のための道筋をつけているであろうことが示されている（非特許文献２５）。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２６）。しかしながら、ＧＰＣ３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】
【０００７】

【特許文献１】WO2004/018667
【特許文献２】WO2007/018199
【非特許文献】
【０００８】
【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】Vissers JL 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】Belli 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】Okabe H, et al., Cancer Res 2001; 61:2129-37.
【非特許文献１５】Sung YK, et al., Cancer Sci 2003; 94:259-62
【非特許文献１６】Nakatsura T, et al., Biochem Biophys Res Commun 2003; 306:16-25
【非特許文献１７】Midorikawa Y, et al., Int J Cancer 2003; 103:455-65
【非特許文献１８】Nakatsura T, et al., Clin Cancer Res 2004; 10:8630-40
【非特許文献１９】Komori H, et al. Clin Cancer Res 2006; 12:2689-97
【非特許文献２０】Sawada Y, et al. Clin Cancer Res 2012; 18:3686-96
【非特許文献２１】Chamoto K et al. Cancer Res 2004;64: 386-90
【非特許文献２２】Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004;4: 595-602
【非特許文献２３】Shedlock DJ and Shen H. Science 2003;300: 337-9
【非特許文献２４】Street SE et al. Blood 2001;97: 192-7
【非特許文献２５】Bos R, and Sherman LA. Cancer Res;70: 8368-77
【非特許文献２６】Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008;8: 351-60
【発明の概要】
【０００９】
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）。
【００１０】
そのために、本発明者らは、プロミスキャスな（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ＧＰＣ３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）またはＨＬＡ－Ａ２（Ａ＊０２：０１）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ャスなＨＬＡクラスＩＩ拘束性Ｔｈ１細胞エピトープを選択した。
【００１１】
本発明は、少なくとも部分的には、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。ＧＰＣ３遺伝子は、ＨＣＣおよび

メラノーマ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、ＧＰＣ３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＿００１１６４６１７．１（配列番号：９）またはアクセッション番号ＮＭ＿００４４８４．３（配列番号：１１）の遺伝子によってコードされる配列番号：８または１０に例示的に示すポリペプチドをさらなる解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ＧＰＣ３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、健常ドナーから得られた末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、ヒトＧＰＣ３に由来するプロミスキャスなＨＬＡ－ＤＲおよび／またはＤＰ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またはＤＰ陽性標的細胞を認識するＴｈ１細胞を樹立し、ＧＰＣ３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ＨＬＡ－ＤＲおよび／またはＤＰ拘束性エピトープペプチドを同定した。これらの結果は、ＧＰＣ３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－ＤＲおよび／またはＤＰ結合ペプチドが、同じドナーにおいてＧＰＣ３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、ＧＰＣ３が強い免疫原性を示すこと、ならびにＴｈ１細胞エピトープおよびＣＴＬエピトープの両方を含むそのＧＰＣ３由来ペプチドが、Ｔｈ１細胞応答および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裏付ける。

【００１２】

それゆえ、Ｔｈ１細胞誘導能ならびに配列番号：１から５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：６（ＧＰＣ３）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細胞誘導能および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から５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。

【００１３】

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。

【００１４】

本発明の１つもしくは複数のペプチドまたはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはそのようなペプチドまた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。

【００１５】

がん（すなわち腫瘍）の治療および／もしくは予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ）（すなわち予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ））、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つもしくは複数のペプチド、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また企図される。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、ＨＣＣおよびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。

【００１６】

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：９または１１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、２、３、４または５のアミノ酸配列から選択される９アミノ酸を超える長さを有する連続するアミノ酸配列；ならびに

（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な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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からなる群より選択される、［２］に記載の単離されたペプチド。

［４］ＧＰＣ３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。

［５］

（ａ）配列番号：１から５からなる群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

（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

からな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］［１］から［５］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。

［７］

（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

からな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［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、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

からな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。

［８］

（ａ）［１］から［５］のいずれか１つに記載の１つまたは複数のペプチド；

（ｂ）［６］に記載の１つまたは複数のポリヌクレオチド；

（ｃ）［１］から［５］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［５］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

（ｅ）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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、かつ
（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
からな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。

［９］ＭＨＣクラスＩＩ分子としてＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からな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のために製剤化されている［８］に記載の医薬組成物、またはＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からなる群より選択される少なくとも１つのＭＨＣクラスＩＩ分子を有する対象への投与用に製剤化されている［８］に記載の医薬組成物。

［１０］ＣＴＬ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、［８］または［９］に記載の医薬組成物。

［１１］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組成物であって、
（ａ）［１］から［５］のいずれか１つに記載の１つまたは複数のペプチド；
（ｂ）［６］に記載の１つまたは複数のポリヌクレオチド；
（ｃ）［１］から［５］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［５］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
（ｅ）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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。

［１２］Ｔｈ１細胞を誘導する能力を有するＡＰＣを誘導するための方法であって、ＡＰＣを［１］から［５］のいずれか１つに記載のペプチドとインビトロ、エクスビボまたはインビボで接触させる段階を含む、方法。

［１３］ＣＴＬを誘導する能力を有するＡＰＣを誘導するための方法であって、
（ａ）ＡＰＣを［１］から［５］のいずれか１つに記載のペプチドとインビトロ、エクスビボまたはインビボで接触させる段階；および
（ｂ）［１］から［５］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ＡＰＣに導入する段階
からなる群より選択される段階を含む、方法。

［１４］Ｔｈ１細胞を誘導するための方法であって、
（ａ）ＣＤ４陽性Ｔ細胞を、ＭＨＣクラスＩＩ分子と［１］から［５］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ＡＰＣと共培養する段階；および
（ｂ）両方のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）サブユニット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であって、ここでＴＣＲが、細胞表面に提示されるＭＨＣクラスＩＩ分子と［１］から［５］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
からなる群より選択される段階を含む、方法、または、Ｔｈ１細胞を誘導するための方法であって、
（ａ）ＣＤ４陽性Ｔ細胞を、ＭＨＣクラスＩＩ分子と［１］から［５］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ＡＰＣと共培養する段階；および
（ｂ）両方のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）サブユニットをコードする単一ポリヌクレオチ

ド、または各々が別々の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ＣＤ４陽性Ｔ細胞に導入する段階であって、ここでＴＣＲが、ＡＰＣの細胞表面に提示されるＭＨＣクラスＩＩ分子と［１］から［５］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
からなる群より選択される段階を含む、方法。
［１５］ＣＴＬを誘導するための方法であって、
（ａ）ＣＤ４陽性Ｔ細胞およびＣＤ８陽性Ｔ細胞の両方を、［４］または［５］に記載のペプチドと接触させたＡＰＣと共培養する段階；ならびに
（ｂ）ＣＤ８陽性Ｔ細胞を、［４］または［５］に記載のペプチドと接触させたＡＰＣと共培養する段階
からなる群より選択される段階を含む、方法。
［１６］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）［１］から［５］のいずれか１つに記載の１つまたは複数のペプチド；
（ｂ）［６］に記載の１つまたは複数のポリヌクレオチド；
（ｃ）［１］から［５］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［５］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
（ｅ）上記（ａ）から（ｄ）
の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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。
［１７］ＭＨＣクラスＩＩ分子と［１］から［５］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ＡＰＣ。
［１８］［１２］または［１３］に記載の方法によって誘導されるＡＰＣ。
［１９］ＡＰＣの表面に提示された［１］から［５］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Ｔｈ１細胞。
［２０］［１４］に記載の方法によって誘導されるＴｈ１細胞。
［２１］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［５］のいずれか１つに記載の１つまたは複数のペプチド；
（ｂ）［６］に記載の１つまたは複数のポリヌクレオチド；
（ｃ）［１］から［５］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［５］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
（ｅ）上記（ａ）から（ｄ）の任意の２つまたはそれ以上の組合せ
からな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。
［２２］［１］から［５］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。
［２３］［１］から［５］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。
［２４］［２３］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。
［２５］［１］から［５］のいずれか１つに記載のペプチド、［６］に記載のポリヌクレオチドまたは［２２］に記載の抗体を含む、診断キット。
【００１７】
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】

【００１８】

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。

【００１９】

【図１Ａ】図１は、健常ドナーからのＧＰＣ３－ＬＰ特異的ヘルパーＴ細胞の誘導を示す。図に示すように、ＧＰＣ３特異的ヘルパー（Ｔｈ）細胞を、単離されたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞をＧＰＣ３－ＬＰで刺激することによって、健常ドナー（ＨＤ）から生成した。生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰでパルスされた自己ＰＢＭＣによって再刺激された。ＩＦＮ－γ産生Ｔｈ細胞の数はＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって解析された。同様の結果を示した少なくとも３つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのＨＬＡクラスＩＩ遺伝子型をパネル上部に示す。下線の引かれたＨＬＡ－クラスＩＩアリルは、図２から取り入れられるＴｈ細胞にペプチドを提示したＨＬＡ－クラスＩＩ分子をコードする。（Ａ）ＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ１特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲＢ１*０７：０１／１３：０２$^{+}$健常ドナー（ＨＤ１０、左パネル）のＰＢＭＣおよびＨＬＡ－ＤＲＢ１*０４：０５／０９：０１$^{+}$健常ドナー（ＨＤ５、右パネル）のＰＢＭＣから生成した。

【図１Ｂ】（Ｂ）ＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞を、ＨＤ１０（上左パネル）、ＨＬＡ－ＤＲＢ１*０８：０３／１４：０５$^{+}$健常ドナー（ＨＤ４、下左パネル）およびＨＬＡ－ＤＲＢ１*０９：０１／１４：５４$^{+}$健常ドナー（ＨＤ１１、下右パネル）のＰＢＭＣから生成した。ＨＬＡ－ＤＰ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲＢ１*０２：０１／０４：０２$^{+}$健常ドナー（ＨＤ５、上右パネル）のＰＢＭＣから生成した。

【図１Ｃ】（Ｃ）ＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ３特異的Ｔｈ細胞を、ＨＤ１０（左パネル）およびＨＤ５（右パネル）のＰＢＭＣから生成した。

【図１Ｄ】（Ｄ）ＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ４特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲＢ１*０８：０２／１５：０２$^{+}$健常ドナー（ＨＤ３、左パネル）およびＨＤ１０（右パネル）のＰＢＭＣから生成した。

【図１Ｅ】（Ｅ）ＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ５特異的Ｔｈ細胞を、ＨＤ１０（左パネル）およびＨＤ５（右パネル）から生成した。

【図２Ａ】図２は、ＧＰＣ３特異的Ｔｈ細胞の拘束ＨＬＡクラスＩＩ分子の正確な同定を示す。ＧＰＣ３特異的ヘルパー（Ｔｈ）細胞は、図１に示されるように、磁気ビーズ単離されたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞をＧＰＣ３－ＬＰで刺激することによって健常ドナー（ＨＤ）から生成された。ＨＤから生成されたＴｈ細胞を、個々のＧＰＣ３－ＬＰでパルスした自己ＰＢＭＣまたは同種異系のＰＢＭＣまたはＬ細胞で再刺激した。ＩＦＮ－γ産生Ｔｈ細胞の数はＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって解析された。同様の結果を示した少なくとも２つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのＨＬＡクラスＩＩ遺伝子型をパネル上部に示す。下線の引かれたＨＬＡ－クラスＩＩアリルは、ペプチドをＴｈ細胞に提示したＨＬＡ－クラスＩＩ分子をコードする。（Ａ）ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂおよびＤＲ９拘束性

ＧＰＣ３－ＬＰ１特異的Ｔｈ細胞は、ＨＤ１０（左パネル）およびＨＤ５（右パネル）のＰＢＭＣから生成された。
【図２Ｂ】（Ｂ）ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂおよびＤＰ２拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞は、ＨＤ１０（左パネル）およびＨＤ５（右パネル）のＰＢＭＣから生成された。
【図２Ｃ】（Ｃ）ＨＬＡ－ＤＲ７／５３およびＤＲ９拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ３特異的Ｔｈ細胞は、ＨＤ１０（上パネル）およびＨＤ５（下パネル）のＰＢＭＣから生成された。
【図２Ｄ】（Ｄ）ＨＬＡ－ＤＲ１５／５１およびＤＲ１３拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ４特異的Ｔｈ細胞は、ＨＤ３（上パネル）およびＨＤ１０（下パネル）のＰＢＭＣから生成された。
【図２Ｅ】（Ｅ）ＨＬＡ－ＤＲ１３およびＤＲ９拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ５特異的Ｔｈ細胞は、ＨＤ１０（上パネル）およびＨＤ５（下パネル）のＰＢＭＣから生成された。
【図３Ａ】図３はＧＰＣ３－ＬＰ１、２および４特異的Ｔ細胞クローンによって産生されたサイトカインプロファイルを示す。コグネイトペプチドでパルスした自己ＰＢＭＣとのＴｈ細胞の２４時間の共培養後、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－β）の濃度を測定した。データは２連のアッセイの平均±ＳＤとして提示している。
【図３Ｂ】図３（続き）
【図３Ｃ】図３（続き）
【図４】図４は、組換えヒトＧＰＣ３タンパク質をロードしたＤＣによるＧＰＣ３－ＬＰの天然プロセシングおよび提示を示す。（Ａ）ドナーＨＤ１０から樹立したＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ（ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０２：０２）拘束性およびＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈクローンが、組換えヒトＧＰＣ３タンパク質をロードした自己ＤＣを認識した。同様の結果を示す、２連で行った２つの独立した実験からの代表的なデータを示す。（Ｂ）ドナーＨＤ１０から樹立したＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ１特異的Ｔｈクローンが、組換えヒトＧＰＣ３タンパク質をロードした自己ＤＣを認識した。（Ｃ）ドナーＨＤ１０から樹立したＨＬＡ－ＤＲ１３拘束性およびＧＰＣ３－ＬＰ４特異的Ｔｈクローンが、組換えヒトＧＰＣ３タンパク質をロードした自己ＤＣを認識した。同様の結果を示した、２連で行った３つの独立した実験からの代表的なデータを示す。（Ｄ）ドナーＨＤ１０から樹立したＨＬＡ－ＤＲ１３拘束性およびＧＰＣ３－ＬＰ５特異的Ｔｈ細胞が、組換えヒトＧＰＣ３タンパク質をロードした自己ＤＣを認識した。
【図５Ａ】図５は、ＤＣが、インビトロでＡ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$－ＳＰ特異的およびＨＬＡ－Ａ２拘束性ＣＴＬに対するＧＰＣ３－ＬＰ２の効率的な交差提示およびＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍにおいてインビボでクロスプライミングを誘導することを示す。（Ａ）健常ドナーであるＨＤ５（ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$およびＨＬＡ－ＤＰ２$^{+}$）から樹立されたＡ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$ＳＰ特異的ＣＴＬは、インビトロにおいて、リポソームに封入されたＧＰＣ３－ＬＰ２（Ｌｉｐ－ＧＰＣ３－ＬＰ２）、リポソームに封入されたＩＭＰ３$_{507-527}$ＬＰ（Ｌｉｐ－ｃｏｎｔｒｏｌ　ＬＰ）、リポソームおよび水溶性のＧＰＣ３－ＬＰ２（Ｌｉｐ＋ＧＰＣ３－ＬＰ２）またはリポソーム単独（Ｌｉｐ）でパルスされた自己ＤＣによって刺激された。同様の結果を示した３つの独立した実験からの代表的なデータを示す。（Ｂ～Ｄ）ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍマウスは、ＩＦＡ（ＳＰ－ＩＦＡ－ＰＢＳ）で乳化されたＡ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$ＳＰ、ＧＰＣ３－ＬＰ２（ＬＰ２－ＩＦＡ－ＰＢＳ）またはＩＦＡ（ＩＦＡ－ＰＢＳ）で乳化されたＰＢＳで免疫された。２回目の免疫から７日後、マウスＣＤ４$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞をプールされた鼠径リンパ節から単離し、エクスビボでＧＰＣ３－ＬＰ２もしくはＧＰＣ３－ＬＰ５（対照ＬＰ）およびＡ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$ＳＰ、Ａ２－ＣＤＣＡ１－ＳＰまたはＡ２－ＨＩＶ－ＳＰでパルスしたＢＭＤＣで刺激した。ＩＦＮ－γ産生マウスＣＤ４$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の数はエクスビボＥＬＩＳＰＯＴによって解析された。同様の結果を示す、２連または３連で行った、少なくとも２～４つの独立した実験（各々のグループにおいて２から３匹のマウス）からの代表的なデータを示す。
【図５Ｂ】（Ｂ）等量のＳＰとＬＰ分子が、免疫化のために使用された。

【図５Ｃ】（Ｃ）等モル用量のペプチドを用いた場合、ＧＰＣ３－ＬＰ２免疫は、インビボでＧＰＣ３－Ａ２－ＳＰの免疫化と比較してＳＰ特異的ＣＴＬ応答の増加を誘導した。
【図５Ｄ】（Ｄ）同じプールされた鼠径リンパ節から単離されたＧＰＣ３－ＬＰ２特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞の応答。
【図６Ａ】図６は、ＧＰＣ３－ＳＰをワクチン接種した肝細胞がん（ＨＣＣ）患者のＰＢＭＣにおけるＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞の存在を示す（Ａ～Ｃ）。ＧＰＣ３－ＳＰ（表３）をワクチン接種したＨＣＣ患者由来の凍結末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）をインビトロでＧＰＣ３－ＬＰ１、２、３、４および５の混合物ならびにＩＬ－２およびＩＬ－７で刺激した。７日後、（Ａ）で要約されるように、個々のＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔ細胞の頻度を、ＩＦＮ－γＥＬＩＳＰＯＴアッセイで検出した。Ｔｈ細胞応答は、試験した１８人のＨＣＣ患者のうち１１人で観察された。ＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞のＨＬＡクラスＩＩ拘束は、ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱまたはＤＰ特異的モノクローナル抗体を使用したブロッキングアッセイによって決定された。
【図６Ｂ】ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞応答。
【図６Ｃ】ＧＰＣ３－ＬＰ３特異的Ｔｈ細胞応答。
【図６Ｄ】ＧＰＣ３－ＬＰ４特異的Ｔｈ細胞応答。
【図６Ｅ】ＧＰＣ３－ＬＰ５特異的Ｔｈ細胞応答。
【図７Ａ】図７は、コンピュータアルゴリズムによって予測された、ＣＴＬエピトープを網羅したＧＰＣ３由来およびプロミスキャスなＨＬＡクラスＩＩ結合ペプチドを示す。（Ａ）図７Ａにおいて、矢印はアスパラギンまたはセリンにおいてグリコシル化の可能性がある部位を示し、そのアミノ酸位置は、１２４、２４１、４１８、４９５および５０９である。
【図７Ｂ】ヒトＧＰＣ３タンパク質のアミノ酸配列を、アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｔｏｏｌｓ．ｉｍｍｕｎｅｅｐｉｔｏｐｅ．ｏｒｇ／ｍｈｃｉｉ／）を用いて解析した。横軸の数字は、ＧＰＣ３由来の１５ｍｅｒペプチドのＮ末端のアミノ酸位置を示す。小さく番号付けられたコンセンサスパーセンタイル順位は、ＨＬＡクラスＩＩ分子への高い結合親和性を示す。候補ペプチドの選択のため、アスパラギンおよびセリンにおける潜在的なグリコシル化部位を含む領域を避けた（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ／ｕｎｉｐｒｏｔ／Ｐ５１６５４）。（Ｂ）複数のＨＬＡクラスＩＩアリル産物（ＤＲＢ１＊０９：０１、ＤＲＢ１＊０４：０５、ＤＲＢ１＊０７：０１、ＤＲＢ１＊１３：０２、ＤＲＢ１＊１５：０２、ＤＰＢ１＊０２：０１およびＤＲＢ１＊０５：０１）について高いコンセンサスパーセンタイル順位を有し、かつＨＬＡ－Ａ２または－Ａ２４拘束性ＣＴＬによって認識される９ｍｅｒペプチド（Ａ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$、Ａ２４－ＧＰＣ３$_{298-306}$）を有する、ＬＰ、ＧＰＣ３－ＬＰ１；ＧＰＣ３$_{92-116}$（２５－ｍｅｒ）、ＧＰＣ３－ＬＰ２；ＧＰＣ３$_{137-161}$（２５－ｍｅｒ）、ＧＰＣ３－ＬＰ３；ＧＰＣ３$_{289-313}$（２５－ｍｅｒ）、ＧＰＣ３－ＬＰ４；ＧＰＣ３$_{386-412}$（２７－ｍｅｒ）およびＧＰＣ３$_{556-576}$（２１－ｍｅｒ）を個々に（Ａ）では棒で示し、（Ｂ）では太字下線を引いて示す。
【図８Ａ】図８は、健常ドナーからのＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞の誘導を示す。ＧＰＣ３－ＬＰによる刺激によって、健常ドナーのＰＢＭＣからＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞を生成した。生成されたＴｈ細胞を、ＧＰＣ３－ＬＰでパルスした自己ＰＢＭＣまたは同種異系のＰＢＭＣで再度刺激した。ＩＦＮ－γ産生Ｔｈ細胞の数はＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって解析された。同様の結果を示した少なくとも３つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのＨＬＡクラスＩＩ遺伝子型をパネル上部に示す。下線の引かれたＨＬＡ－クラスＩＩアリルは、ペプチドをＴｈ細胞に提示したＨＬＡ－クラスＩＩ分子をコードする。（Ａ）ＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ３特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲ９／１４$^{+}$健常ドナー（ＨＤ１１）から生成した（図１に関連する）。
【図８Ｂ】（Ｂ）ＨＬＡ－ＤＲ１３／５２ｂ拘束性ＧＰＣ３特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲ７／１３$^{+}$健常ドナー（ＨＤ１０）のＰＢＭＣから生成した。ＨＤ１０は、Ｌ細胞を用いて、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂであることが後ほど確認された。

【図８Ｃ】（Ｃ）ＨＬＡ－ＤＰ２拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＰ２$^{+}$健常ドナー（ＨＤ５）のＰＢＭＣから生成した。
【図８Ｄ】（Ｄ）ＨＬＡ－ＤＲ８拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０３／１４：０５$^{+}$健常ドナー（ＨＤ４）から生成した（（Ｂ）から（Ｄ）は、図２に関連する）。
【図８Ｅ】（Ｅ）ＨＬＡ－ＤＲ８拘束性ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０３／１４：０５$^{+}$健常ドナー（ＨＤ４）から生成した。
【図９】図９は、ＧＰＣ３－ＬＰ２の免疫化が、等モルのペプチド用量を使用した場合に、Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰの免疫化と比較して、インビボにおいてＳＰ特異的ＣＴＬ応答の増大を誘導することを示す。ＨＬＡ－Ａ２／（Ｉ－Ａ^{b}）Ｔｇｍ（３マウス／グループ）を、ＩＦＡ中に乳化した等モル用量のＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰ（ＳＰ－ＩＦＡ－ＰＢＳ　５０μｇ）、ＧＰＣ３－ＬＰ２（ＬＰ２－ＩＦＡ－ＰＢＳ、１３２．５μｇ）またはＰＢＳ（ＩＦＡ－ＰＢＳ）のみにて７日間隔で２回免疫した。（Ａ）２回目の免疫の７日後に、マウスＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を磁気ビーズ（陽性選択）を用いて、３匹のマウスのプールされた鼠径リンパ節から単離し、エクスビボにて、Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰまたはＡ２－ＣＤＣＡ１－ＳＰでパルスしたＢＭＤＣで刺激した。（Ｂ）同じプールされた鼠径リンパ節から単離したＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞をＧＰＣ３－ＬＰ２またはＧＰＣ３－ＬＰ５でパルスしたＢＭＤＣで刺激した（対照ＬＰ）。ＩＦＮ－γ産生マウスＣＤ８$^{+}$またはＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の数をエクスビボＥＬＩＳＰＯＴによって解析した。同様の結果を示した、３連で行った２つの独立した実験（３マウス／グループ）からの代表的なデータを示す。
【図１０Ａ－１】図１０は、ＧＰＣ３－ＳＰをワクチン接種したＨＣＣ患者のＰＢＭＣにおける、ＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞の存在を示す（Ａ～Ｃ）。ＧＰＣ３－ＳＰ（表３）をワクチン接種したＨＣＣ患者由来の凍結末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を、インビトロにおいて、ＧＰＣ３－ＬＰ１、２、３、４および５の混合物ならびにＩＬ－２およびＩＬ－７で刺激した。７日後、個々のＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔ細胞の頻度をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって検出した。ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的（Ａ）、ＬＰ３特異的（Ｂ）、ＬＰ４特異的（Ｃ）、ＬＰ５特異的（Ｄ）Ｔｈ細胞応答が、ＨＣＣ患者で観察された。ＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞のＨＬＡクラスＩＩ拘束は、ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱまたはＤＰ特異的モノクローナル抗体を用いたブロッキングアッセイによって決定した。
【図１０Ａ－２】図１０Ａ（続き）
【図１０Ｂ】ＧＰＣ３－ＬＰ３特異的Ｔｈ細胞応答。
【図１０Ｃ】ＧＰＣ３－ＬＰ４特異的Ｔｈ細胞応答。
【図１０Ｄ】ＧＰＣ３－ＬＰ５特異的Ｔｈ細胞応答。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
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。
【００２１】
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。
【００２２】

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。

【００２３】

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。

【００２４】

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得る少なくとも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。

【００２５】

「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関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。

【００２６】

「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。

【００２７】

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、γ－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α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。

【００２８】

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。

【００２９】

「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。

【００３０】

「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。

【００３１】

特に定義されない限り、「がん」という用語は、例えばＨＣＣおよびメラノーマを含む、ＧＰＣ３遺伝子を発現するがんを指す。ＧＰＣ３遺伝子を発現するがんはまた、ＧＰＣ３を発現するがんまたは、ＧＰＣ３をコードする遺伝子を発現するがんとも称される。

【００３２】

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。

【００３３】

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Ｉ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。

【００３４】

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＊２４：０１、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０２、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０３、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０４、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０７、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０８、ＨＬＡ－Ａ＊２４：２０、ＨＬＡ－Ａ＊２４：２５およびＨＬＡ－Ａ＊２４：８８が含まれるが、これらに限定されない。

【００３５】

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＊０２：０１、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０２、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０３、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０４、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０５、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０６、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０７、ＨＬＡ－Ａ＊０２：１０、ＨＬＡ－Ａ＊０２：１１、ＨＬＡ－Ａ＊０２：１３、ＨＬＡ－Ａ＊０２：１６、ＨＬＡ－Ａ＊０２：１８、

ＨＬＡ－Ａ＊０２：１９、ＨＬＡ－Ａ＊０２：２８およびＨＬＡ－Ａ＊０２：５０が含まれるが、これらに限定されない。

【００３６】

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－γ、ＩＬ－２、ＴＮＦ－β、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α等）を分泌する。

【００３７】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ８」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０６、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０７、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：１０、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：１１およびＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：１２が含まれるが、これらに限定されない。

【００３８】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ９」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０６、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０７、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０８およびＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０９が含まれるが、これらに限定されない。

【００３９】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ１３」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１３：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１３：０８およびＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１３：１０が含まれるが、これらに限定されない。

【００４０】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ１４」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０６、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０７、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０８およびＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：１０が含まれるが、これらに限定されない。

【００４１】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０２：０２が含まれるが、これらに限定されない。

【００４２】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ８」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０６、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０７、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：１０、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：１１およびＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：１２が含まれるが、これらに限定されない。

【００４３】

特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＲ１５」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０６、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０７、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０８、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０９、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：１０およびＨＬＡ－Ｄ

ＲＢ１＊１５：１１が含まれるが、これらに限定されない。
【００４４】
特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＰ２」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０２：０１およびＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０２：０２が含まれるが、これらに限定されない。
【００４５】
特に定義されない限り、「ＨＬＡ－ＤＰ５」という用語はサブタイプを指し、その例には、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０５：０１が含まれるが、これに限定されない。
【００４６】
特に定義されない限り、「ＭＨＣクラスＩＩ分子によって媒介される免疫応答」という語句は、ＭＨＣクラスＩＩ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、「ＭＨＣクラスＩＩ抗原によって媒介される免疫応答」は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、特にＴｈ１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ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＴＮＦ－β、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α等）の産生ならびに他の免疫細胞（例えばＣＴＬ、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。
【００４７】
特に定義されない限り、「ＧＰＣ３に特異的なＴｈ１細胞」という語句は、ＧＰＣ３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活性化されないＴｈ１細胞を指す。
【００４８】
特に定義されない限り、「ＧＰＣ３特異的ＣＴＬ」という語句は、ＧＰＣ３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ＣＴＬを指す。
【００４９】
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、「ＣＴＬ誘導能」という語句は、抗原提示細胞上に提示された場合にＣＴＬを誘導するペプチドの能力を指す。
【００５０】
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。
【００５１】
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の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、特にインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、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）を指す。
【００５２】
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。
【００５３】
ＩＩ．ペプチド
以下で詳細に説明する本発明のペプチドは、「ＧＰＣ３ペプチド」または「ＧＰＣ３ポリペプチド」と称され得る。
ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３に由来するペプチド（配列番号：９または１１）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。ＧＰＣ３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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５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：
$GPC3_{92-116}$－ＬＰ／ＬＬＱＳＡＳＭＥＬＫＦＬＩＩＱＮＡＡＶＦＱＥＡＦＥ（配列番号：１）、
$GPC3_{137-161}$－ＬＰ／ＬＴＰＱＡＦＥＦＶＧＥＦＦＴＤＶＳＬＹＩＬＧＳＤＩ（配列番号：２）、
$GPC3_{289-313}$－ＬＰ／ＶＶＥＩＤＫＹＷＲＥＹＩＬＳＬＥＥＬＶＮＧＭＹＲＩ（配列番号：３）
$GPC3_{386-412}$－ＬＰ／ＳＲＲＲＥＬＩＱＫＬＫＳＦＩＳＦＹＳＡＬＰＧＹＩＣＳＨ（配列番号：４）、および
$GPC3_{556-576}$－ＬＰ／ＧＮＶＨＳＰＬＫＬＬＴＳＭＡＩＳＶＶＣＦＦ（配列番号：５）。

【００５４】

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およびＨＬＡ－ＤＰ分子（例えばＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５）によって拘束されるＴｈ１細胞を刺激することができた。本明細書におけるこれらの結果は、ＧＰＣ３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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５）によってプロミスキャスに拘束されるＧＰＣ３のエピトープペプチドであることを明らかにする。

【００５５】

上記で同定したペプチドのいくつかは、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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。ＧＰＣ３遺伝子は、例えばＨＣＣおよびメラノーマ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。

【００５６】

したがって、本発明は、ＧＰＣ３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シングによって生成され得る。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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５）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、ＧＰＣ３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。ＧＰＣ３特異的ＣＴＬ誘導能を有するそのようなペプチドの典型的な例には、配列番号：６または７のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

【００５７】
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、２、３、４または５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なる群より選択されるアミノ酸配列を含む：
（ａ）配列番号：１、２、３、４または５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。
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から５のアミノ酸配列はＧＰＣ３のアミノ酸配列（配列番号：９または１１）の一部からなるので、本発明のペプチドは以下の［１］～［５］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：９または１１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、２、３、４または５のアミノ酸配列から選択される９アミノ酸を超える長さ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
からな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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からな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、ＧＰＣ３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］
（ａ）配列番号：１から５からな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、
からな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。
【００５８】
本発明のペプチドによって誘導されるＴｈ１細胞はＧＰＣ３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：９または１１のアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなる３０アミノ酸残基未満のペプチドであって、配列番号：１、２、３、４または５のアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。
【００５９】
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．Ｓｔｕｒｎｉｏｌｏ 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ＧＰＣ３のペプチドを包含する。

【００６０】

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、２、３、４または５のアミノ酸配列は、生じるペプチドが必要な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から５の中より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、２、３、４または５のアミノ酸配列に隣接する配列番号：９または１１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から５の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

【００６１】

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なるので、配列番号：１、２、３、４または５のアミノ酸配列の必ずしも全長が、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要であるというわけではない。したがって、本発明のペプチドは、必要なＴｈ１細胞誘導能を保持することを条件として、配列番号：１、２、３、４または５のアミノ酸配列から９個より多い連続するアミノ酸を有するペプチド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、２、３、４または５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。

【００６２】

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）アミノ酸配列からなるペプチド）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，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １９８２，１０：６４８７－５００；Ｄａｌｂａｄｉｅ－ＭｃＦａｒｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ 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から５の中から選択されるアミノ酸配列の両方を有し得、この配列において、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、２、３、４または５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。すなわち、いくつかの態様において、本発明のペプチドは、Ｔｈ１細胞誘導能ならびに配列番号：１、２、３、４または５のアミノ酸配列に対して、付加、挿入、欠失およ

び置換からなる群より選択される１、２または数個の改変が行われたアミノ酸配列を有し得る。

【００６３】

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タンパク質を生じさせる。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，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　１９８４参照）。

【００６４】

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、ＧＰＣ３の多型変異体、種間相同体およびアリルのＴｈ１細胞誘導性ペプチドを除外すべきではない。

【００６５】

必要な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２０％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。

【００６６】

本発明の好ましいペプチド、すなわち配列番号：１から５（ＧＰＣ３$_{92-116}$－ＬＰ、ＧＰＣ３$_{137-161}$－ＬＰ、ＧＰＣ３$_{289-313}$－ＬＰ、ＧＰＣ３$_{386-412}$－ＬＰおよびＧＰＣ３$_{556-576}$－ＬＰ）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ＧＰＣ３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。

【００６７】

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。

【００６８】

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。

【００６９】

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から５からな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。

【００７０】

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中でプロセシングされて、プロセ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）アミノ酸残基からなる断片にプロセシングされ得る。

【００７１】

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。

【００７２】

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、Ｔｈ１細胞を誘導する能力をＡＰＣに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。

【００７３】

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））、好ましく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、^{51}Ｃｒ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ＩＦＮ－γ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。

【００７４】

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。

【００７５】

例えば、ペプチドのインビ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Ｖｅｒｈｏｅｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ　Ｊ　Ｄｒｕｇ　Ｍｅｔａｂ　Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎ　１９８６，１１：２９１－３０２参照）。

【００７６】

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。

【００７７】

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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５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、$GPC3_{92-116}$－ＬＰ（配列番号：１）は、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂおよびＨＬＡ－ＤＲ９によって認識され、かつ$GPC3_{137-161}$－ＬＰ（配列番号：２）は、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５およびＨＬＡ－ＤＰ５によって認識され、$GPC3_{289-313}$－ＬＰ（配列番号：３）は、ＨＬＡ－ＤＲ９によって認識され、$GPC3_{386-412}$－ＬＰ（配列番号：４）は、ＨＬＡ－ＤＲ１３によって認識され、$GPC3_{556-576}$－ＬＰ（配列番号：５）は、ＨＬＡ－ＤＲ１３およびＨＬＡ－ＤＲ９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。

【００７８】

ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂまたはＨＬＡ－ＤＲ９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は使用される。ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５またはＨＬＡ－ＤＰ５陽性ＡＰＣを使用する場合は、配列番号：２のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。ＨＬＡ－ＤＲ９陽性ＡＰＣを使用する場合は、配列番号：３のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。ＨＬＡ

－ＤＲ１３陽性ＡＰＣを使用する場合は、配列番号：４のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。ＨＬＡ－ＤＲ１３またはＨＬＡ－ＤＲ９陽性ＡＰＣを使用する場合は、配列番号：５のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましくは使用される。

【００７９】

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－ＤＲ５２ｂまたはＨＬＡ－ＤＲ９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－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５またはＨＬＡ－ＤＰ５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：３のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にＨＬＡ－ＤＲ９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：４のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にＨＬＡ－ＤＲ１３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：５のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にＨＬＡ－ＤＲ１３またはＨＬＡ－ＤＲ９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。

【００８０】

ＩＩＩ．ＧＰＣ３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な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。

【００８１】

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、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。これらの修飾は、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

【００８２】

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．，Ｐｅｐｔｉｄｅｓ Ｖｏｌ．２，「Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８０，１００－１１８。

【００８３】

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Ｍｏｒｒｉｓｏｎ 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。

【００８４】

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ＧＰＣ３遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＮＭ＿００１１６４６１７．１（配列番号：８）またはＮＭ＿００４４８４．３（配列番号：１０））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。

【００８５】

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。

【００８６】

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し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。

【００８７】

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 １９９２，４８：２２３－３１１；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。

【００８８】

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。

【００８９】

ＡＰＣは特定の種類の細胞に限定されず、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知られている、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細胞を含む。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。

【００９０】

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ＩＩ抗原によって媒介されるＴｈ１細胞応答と同様に、ＭＨＣクラスＩ抗原によって媒介されるＣＴＬ応答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シングされた産物はＣＴＬの誘導をもたらすであろう。実際に、$GPC3_{137-161}$－ＬＰ（配列番号：２）は断片（ＦＶＧＥＦＦＴＤ：配列番号：６）を認識するＣＴＬを誘導し、$GPC3_{289-313}$－ＬＰ（配列番号：３）は断片（ＥＹＩＬＳＬＥＥＬ：配列番号：７）を認識するＣＴＬを誘導する。したがって、本発明のペプチドは、Ｔｈ１細胞を誘導するだけでなく、ＡＰＣ内でのプロセシング後にＣＴＬも誘導することができる。言い換えると、本発明の上記ペプチドと接触したＡＰＣは、ＭＨＣクラスＩＩ抗原と共にそのようなペプチドを提示し、同時にＭＨＣクラスＩ抗原と共にそれらの断片を提示する。その結果として、Ｔｈ１細胞とＣＴＬの両方が、本発明の上記のペプチドを使用することによって誘導され得る。

【００９１】

例えば、ＡＰＣは、末梢血単核細胞からＤＣを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスビ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、エクスビボ投与は：

（ａ）第１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段階（ｂ）のＡＰＣを第２の対象に投与する段階

を含みうる。

【００９２】

第１の対象と第２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。

【００９３】

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、翻訳などを受け、その後得られたタンパク質はＭＨＣクラスＩまたはクラスＩＩによってプロセシングされて、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。

【００９４】

好ましい態様では、本発明のＡＰＣは、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂおよびＨＬＡ－ＤＲ９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。別の態様において、本発明のＡＰＣは、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５およびＨＬＡ－ＤＰ５の中から選択される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。別の態様において、本発明のＡＰＣは、ＨＬＡ－ＤＲ９のＭＨＣクラスＩＩ分子と本発明のペプチド（配列番号：３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。別の態様において、本発明のＡＰＣは、ＨＬＡ－ＤＲ１３のＭＨＣクラスＩＩ分子と本発明のペプチド（配列番号：４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。別の態様において、本発明のＡＰＣは、ＨＬＡ－ＤＲ１３およびＨＬＡ－ＤＲ９の中から選択されるＭＨＣクラスＩＩ分子と本発明のペプチド（配列番号：５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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５は、それぞれＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０２：０２、ＨＬＡ－ＤＲ１＊０９：０１、ＨＬＡ－ＤＲ１＊１３：０２、ＨＬＡ－ＤＲ１＊１４：０５、ＨＬＡ－ＤＲ１＊１５：０２、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０２：０１およびＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０５：０１であり得る。

【００９５】

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。

【００９６】

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）両方のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）サブユニットを

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（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）、によって得ることができる。（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。

【００９７】

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、細胞性免疫に関与する免疫細胞（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ＧＰＣ３を発現する細胞（例えばがん細胞）、またはＧＰＣ３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ＧＰＣ３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。

【００９８】

さらに、本発明のＴｈ１細胞は、他の標的細胞に対するいずれのＣＴＬも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、ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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。

【００９９】

いくつかの態様において、本発明のＴｈ１細胞は、ＨＬＡ－ＤＲまたはＨＬＡ－ＤＰ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を介して細胞表面のＭＨＣクラスＩＩ分子と本発明のペプチドの複合体の結合し、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分子とペプチドに応答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およびＨＬＡ－ＤＰは、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からなる群より選択され得る。

【０１００】

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、ＧＰＣ３ペプチドを提示するＡＰＣに対するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞にＧＰＣ３に対する特異性を付与する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α鎖およびβ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、ＧＰＣ３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を媒介することができる。

【０１０１】

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（すなわち両方のＴＣＲ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が別々の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、すぐに入手可能な組成物を提供する。

【０１０２】

本発明はさらに、両方のＴＣＲサブユニット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ＧＰＣ３ペプチド（例えばＨＬＡ－ＤＲ５２ｂもしくはＨＬＡ－ＤＲ９に関しては配列番号：１、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４，ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５もしくはＨＬＡ－ＤＰ５に関しては配列番号：２、ＨＬＡ－ＤＲ９に関しては配列番号：３、ＨＬＡ－ＤＲ１３に関しては配列番号：４およびＨＬＡ－ＤＲ１３もしくはＨＬＡ－ＤＲ９に関しては配列番号：５）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．，ＪＩｍｍｕｎｏｌ．，１４２，３４５２－３４６１（１９８９））。上述したように調製したＴｈ１細胞は、治療または予防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。

【０１０３】

ＶＩＩＩ．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ＧＰＣ３遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、広がりあるい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。

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。

【０１０４】

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。

【０１０５】

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、ＧＰＣ３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。

【０１０６】

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、がんの治療および／または予防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を提供する。そのような薬剤または組成物中のペプチドの量は、ＧＰＣ３を発現するがんを担持する対象において免疫応答を有意に増強するまたは刺激するのに有効な量であり得る。

【０１０７】

本発明はまた、ＨＬＡ－Ａ２および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。

【０１０８】

好ましい態様において、本発明の過程で同定されたＧＰＣ３由来ペプチドは、Ｔｈ１細胞ならびにＧＰＣ３発現細胞に対するＣＴＬを誘導することができる。したがって、本発明はまた、ＧＰＣ３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。

【０１０９】

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。

【０１１０】

ＧＰＣ３の発現は、正常組織と比較して、ＨＣＣおよびメラノーマ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２００４／０３１４１３号、国際公開第２００７／０１３６６５号、国際公開第２００７／０１３６７１号、Ｔｏｍｉｔａ　Ｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｃｉ　２０１１；１０２：７１－８および本発明者らのマイクロアレイデータ（データは示さず））、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、本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチドの１つまたは複数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。

【０１１１】

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。

【０１１２】

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。

【０１１３】

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。

【０１１４】

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。

【０１１５】

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。

【０１１６】

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。

【０１１７】

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。

【０１１８】

本発明の過程で、配列番号：１から５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－ＤＲおよび／またはＨＬＡ－ＤＰ分子（例えばＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５）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から５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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５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。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。

【０１１９】

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－Ａ２またはＨＬＡ－Ａ２４を有する対象に適用された場合、ＧＰＣ３に特異的なＣＴＬを誘導することもできる。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ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３発現細胞に対するＣＴＬ応答を、そのプロセ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ＧＰＣ３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ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５およびＨＬＡ－ＤＰ５を有し、およびＭＨＣクラスＩ分子としてＨＬＡ－Ａ２を有する。したがって、同じ対象においてＴｈ１細胞およびＧＰＣ３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：３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ＨＬＡ－ＤＲ９を有し、およびＭＨＣクラスＩ分子としてＨＬＡ－Ａ２４を有する。

【０１２０】

本発明において、本発明のペプチドが、ＭＨＣクラスＩＩ抗原によって媒介される免疫応答を促進すること、具体的には、以下に示すような組み合わせにおけるＨＬＡ型拘束様式で促進することが確認された：

ＧＰＣ３－ＬＰ１：ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂおよびＨＬＡ－ＤＲ９

ＧＰＣ３－ＬＰ２：ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９／１４およびＨＬＡ－ＤＲ８／１５

ＧＰＣ３－ＬＰ３：ＨＬＡ－ＤＲ９

ＧＰＣ３－ＬＰ４：ＨＬＡ－ＤＲ１３およびＨＬＡ－ＤＲ５１

ＧＰＣ３－ＬＰ５：ＨＬＡ－ＤＲ１３およびＨＬＡ－ＤＲ９

【０１２１】

したがって、ＧＰＣ３－ＬＰ１、－ＬＰ２、－ＬＰ３、－ＬＰ４および－ＬＰ５ならびに配列番号１から５のアミノ酸配列のいずれか１つを含むペプチドは、上記組み合わせに示される、それらに一致するＨＬＡサブタイプから選択される、少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する患者において、ＧＰＣ３を発現するがんの治療に有用である。あるいは、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんの治療のための医薬組成物を提供し、そ

の組成物は本発明のペプチドからなる群から選択されるペプチドのいずれか１つを含み、患者は、上記組み合わせで示される、当該ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する。

【０１２２】

さらに、本発明はまた、上記の組み合わせに示される、ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する患者においてＧＰＣ３を発現するがんの治療用組成物の製造のための、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドの使用を提供する。さらに、いくつかの態様において、本発明は、上記の組み合わせに示される、ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する患者においてＧＰＣ３を発現するがんの治療において使用するために、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドを提供する。さらなる態様において、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんを治療するための方法を提供し、その方法は、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドを、上記の組み合わせにある、当該ペプチドのＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する患者に投与する段階を含む。

【０１２３】

加えて、いくつかの態様において、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんを治療するための医薬組成物の製造または製剤化のための方法を提供し、その組成物は本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドのいずれか１つを含み、患者は、上記の組み合わせで示される、当該ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する。本発明の方法は、例えば、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドのいずれか１つおよび医薬的に許容される担体を混合するまたは製剤化するための段階を含み得る。

【０１２４】

前述の通り、Ｔｈ１細胞は、腫瘍を有する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ことは周知である。本発明のペプチドは、ＨＬＡ拘束性様式でＴｈ１細胞誘導能を有しており、本発明のそれぞれのペプチドの特異的ＨＬＡ拘束パターンは上記に示している。したがって、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんに対するＴｈ１細胞応答を促進するまたは増強する組成物を提供し、その組成物は、本発明のペプチドからなる群から選択されるペプチドのいずれか１つを含み、患者は、上記に示される、当該ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する。

【０１２５】

さらに、本発明はまた、患者においてＧＰＣ３を発現するがんに対するＴｈ１細胞応答を促進するまたは増強するための組成物を製造するための、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドの使用を提供し、その患者は、上記組み合わせに示される、当該ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも1つのＨＬＡアリルを有する。さらに、いくつかの態様において、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんに対するＴｈ１細胞応答を促進するまたは増強することにおける使用のための、本発明のペプチドからなる群より選択されたペプチドを提供し、その患者は、上記組み合わせに示される、当該ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択された少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する。さらなる態様において、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんに対するＴｈ１細胞応答を促進するまたは増強するための方法を提供し、その方法は、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドを、上記の組み合わせにある、当該ペプチドのＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する患者に投与する段階を含む。

【０１２６】

加えて、いくつかの態様において、本発明は、患者においてＧＰＣ３を発現するがんに対するＴｈ１細胞応答を促進するまたは増強するための医薬組成物を製造するまたは製剤化するための方法を提供し、その組成物は、本発明のペプチドからなる群より選択される

ペプチドのいずれか１つを含み、患者は、上記組み合わせに示される、当該ペプチドに対応するＨＬＡサブタイプから選択される少なくとも１つのＨＬＡアリルを有する。本発明の方法は、例えば、本発明のペプチドからなる群より選択されるペプチドのいずれか１つおよび医薬的に許容される担体を混合するまたは製剤化するための段階を含みうる。

【０１２７】

別の態様では、本発明は、Ｔｈ１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、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る免疫細胞が目的のがん細胞を標的とする限り、ＧＰＣ３発現とは無関係に任意のがんに適用でき、有効である。

【０１２８】

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、例えばＨＣＣおよびメラノーマが含まれるがこれらに限定されないＧＰＣ３を発現する任意の種類のがんまたは腫瘍が含まれる。

【０１２９】

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、Ｔｈ１細胞またはＣＴＬ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有し得る。Ｔｈ１細胞またはＣＴＬ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ＴＡＡ）に由来するペプチドが含まれるが、これに限定されない。

【０１３０】

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。医薬および薬理的剤の量は、例えば、使用される薬理的剤の種類、治療される疾患、および投与のスケジュールおよび投与経路に依存する。

【０１３１】

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。

【０１３２】

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。

【０１３３】

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。

【０１３４】

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、ブ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。

【０１３５】

（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。

【０１３６】

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いてもよい。

【０１３７】

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。

【０１３８】

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、水中油型エマルション等が含まれるが、これらに限定されない。

【０１３９】

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。

【０１４０】

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。

【０１４１】

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ε－アミノ基およびα－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Ｄｅｒｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　１９８９，３４２：５６１－４参照）。

【０１４２】

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、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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。

【０１４３】

（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：

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発現可能な形態でコードするポリヌクレオチドを含有し得る。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（ブピバカイン、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）。

【０１４４】

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。

【０１４５】

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ビトロ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、それぞれインビボおよびエクスビボ遺伝子治療として公知である。

【０１４６】

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。

【０１４７】

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本発明のポリヌクレオチドを、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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。

【０１４８】

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、本発明のＴｈ１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ＡＰＣは、任意の他の化合物がこれらのＴｈ１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、Ｔｈ１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ＡＰＣを誘導するために使用できる。

【０１４９】
（１）抗原提示細胞（ＡＰＣ）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ＡＰＣを誘導する方法を提供する。ＡＰＣ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、Ｔｈ１細胞誘導能を有するＡＰＣを誘導するための方法も提供し、前記ＡＰＣ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。
【０１５０】
あるいは、本発明は、Ｔｈ１細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞（ＡＰＣ）を調製するための方法であって、以下の段階：
（ａ）ＡＰＣを本発明のペプチドとインビトロ、エクスビ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ＡＰＣに導入する段階
の１つを含み得る方法を提供する。
あるいは、本発明は、Ｔｈ１細胞誘導能を有するＡＰＣを誘導するための方法であって、
（ａ）ＡＰＣ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ＡＰＣに導入する段階
からなる群より選択される段階を含む方法を提供する。
【０１５１】
本発明の方法は、インビトロ、エクスビ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ビボで実施できる。好ましい態様では、Ｔｈ１細胞誘導能を有するＡＰＣの誘導のために使用するＡＰＣは、好ましくはＭＨＣクラスＩＩ分子としてＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５の中から選択される少なくとも１つを発現するＡＰＣであり得る。そのようなＡＰＣは、ＭＨＣクラスＩＩ分子としてＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５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（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。本発明の方法によって誘導されるＡＰＣは、本発明のペプチドまたはその断片とＨＬＡクラスＩＩ抗原（例えばＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５）の複合体を自らの表面に提示するＡＰＣ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ＡＰＣを対象に投与する場合、対象は、好ましくはＡＰＣが由来するのと同じ対象である。しかし、対象がＡＰＣドナーと同じＨＬＡ型を有する限り、対象はＡＰＣドナーとは異なる対象であってもよい。
【０１５２】
別の態様では、本発明は、Ｔｈ１細胞誘導能を有するＡＰＣ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。
【０１５３】
別の態様では、本発明は、ＡＰＣ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。
【０１５４】
あるいは、本発明はさらに、Ｔｈ１細胞誘導能を有するＡＰＣ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。
【０１５５】
好ましい態様では、本発明のペプチドは、Ｔｈ１応答を誘導するだけでなく、ＡＰＣに

おいてプロセシングされた後に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、ＧＰＣ３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：６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－Ａ２を発現するＡＰＣがＧＰＣ３特異的ＣＴＬを誘導するのに適する。あるいは、配列番号：７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ＧＰＣ３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、両方のＴＣＲサブユニット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

からな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ビ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、両方のＴＣＲサブユニット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、エクスビ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ビボで実施できる。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－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５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。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

原の複合体を自らの表面に提示するＡＰＣを認識することができるＴｈ１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ＭＨＣ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Ｔｈ１細胞を対象に投与する場合、対象は、好ましくはＣＤ４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ＣＤ４陽性Ｔ細胞ドナーと同じＨＬＡ型を有する限り、対象はＣＤ４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、ＧＰＣ３発現細胞に対するＣＴＬならびにＴｈ１細胞を誘導することができる。それゆえ、本発明はさらに、ＣＴＬを誘導するための方法であって：

（ａ）ＣＤ４陽性Ｔ細胞およびＣＤ８陽性Ｔ細胞の両方を、本発明のペプチドと接触させたＡＰＣと共培養する段階；ならびに

（ｂ）ＣＤ８陽性Ｔ細胞を本発明のペプチドと接触させたＡＰＣと共培養する段階。

からな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。

【０１６０】

ＣＴＬを誘導するそのような方法では、本発明のペプチドはＡＰＣ内でプロセシングされてＣＴＬエピトープペプチドを生成し、生成されたＣＴＬエピトープペプチドはＡＰＣの表面に提示される。

【０１６１】

あるいは、本発明によれば、Ｔｈ１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、Ｔｈ１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、Ｔｈ１細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。

【０１６２】

本発明の方法によって誘導されるＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、ワクチンとして対象に投与することができる。

【０１６３】

本発明に関連して、ＧＰＣ３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、ＨＣＣおよびメラノーマが含まれるが、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ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３の発現レベルを測定する段階；

ｉｉ）ＧＰＣ３の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

ｉｉｉ）上記（ａ）～（ｄ）からな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ＧＰＣ３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。

【０１６４】

あるいは、本発明は、ＧＰＣ３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）からな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ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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ＧＰＣ３ポリペプチドで治療し得るがんを有することを示す方法を提供する。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。

【０１６５】

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ＨＬＡ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ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂまたはＨＬＡ－ＤＲ９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ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ１５、またはＨＬＡ－ＤＰ５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：３のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくはＨＬＡ－ＤＲ９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：４のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくはＨＬＡ－ＤＲ１３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：５のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくはＨＬＡ－ＤＲ１３およびＨＬＡ－ＤＲ９を有すると同定された対象に投与する。

【０１６６】

目的のＧＰＣ３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ＧＰＣ３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。

【０１６７】

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。

【０１６８】

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ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３のｍＲＮＡ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。ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３のｃＤＮＡ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。

【０１６９】

さらに、ＧＰＣ３の転写産物（例えば配列番号：８または１０）は、増幅に基づく検出方法（例えばＲＴ－ＰＣＲ）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。

【０１７０】

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、ストリンジェントな条件下、中等度にストリンジェントな条件下または低ストリンジェントな条件下でＧＰＣ３のｍＲＮＡにハイブリダイズする。本明細書で使用する場合、「ストリンジェントな（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。ストリンジェント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、ストリンジェントな条件の温度は、規定のイオン強度およびｐＨで特定の配列の熱融解温度（Ｔｍ）よりも約５℃低くなるように選択される。Ｔｍとは、（規定のイオン強度、ｐＨ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、Ｔｍでは、プローブの５０％が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、塩濃度がｐＨ７．０～８．３で約１．０Ｍ未満のナトリウムイオン、典型的には約０．０１～１．０Ｍ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。ストリンジェントな条件は、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。

【０１７１】

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、ＧＰＣ３タンパク質（配列番号：９または１１）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ＧＰＣ３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、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ'）$_2$、Ｆｖ等）を検出に使用し得る。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。

【０１７２】

翻訳産物に基づきＧＰＣ３遺伝子の発現レベルを検出する別の方法として、ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３遺伝子の高い発現レベルを指す。

【０１７３】

がん細胞における標的遺伝子、例えばＧＰＣ３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。

【０１７４】

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ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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。

【０１７５】

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らない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、β－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。

【０１７６】

ＧＰＣ３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。

【０１７７】
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ＧＰＣ３の発現レベルを測定する段階；
（ｂ）ＧＰＣ３の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；
（ｃ）ＧＰＣ３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。
【０１７８】
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ＧＰＣ３の発現レベルを測定する段階；
（ｂ）ＧＰＣ３の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；
（ｃ）ＧＰＣ３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。
【０１７９】
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、ＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５からなる群より選択されるＨＬＡ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、ＧＰＣ３を過剰発現するがんに罹患しており、ならびにＨＬＡ－ＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＲ１４、ＨＬＡ－ＤＲ９、ＨＬＡ－ＤＲ１３、ＨＬＡ－ＤＲ１５、ＨＬＡ－ＤＰ２およびＨＬＡ－ＤＰ５のいずれか１つを有する対象にとって好ましい。ＨＬＡ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、ＨＬＡアリルをタイピングするためのＰＣＲに基づく方法は周知である。各々のＨＬＡ分子に特異的な抗体も、対象のＨＬＡ型を同定するための適切なツールである。
【０１８０】
本発明はまた、本発明のＧＰＣ３ポリペプチドで治療することができるがんに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、ＨＣＣおよびメラノーマが含まれるが、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ＧＰＣ３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）ＧＰＣ３遺伝子のｍＲＮＡを検出するための試薬；
（ｂ）ＧＰＣ３タンパク質を検出するための試薬；および
（ｃ）ＧＰＣ３タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬、からなる群から選択される。
【０１８１】
ＧＰＣ３遺伝子のｍＲＮＡを検出するのに適した試薬の例には、ＧＰＣ３　ｍＲＮＡに特異的に結合するまたはＧＰＣ３　ｍＲＮＡを同定する核酸、例えばＧＰＣ３　ｍＲＮＡ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、ＧＰＣ３　ｍＲＮＡ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、ＧＰＣ３　ｍＲＮＡ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、ＧＰＣ３　ｍＲＮＡを検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

【０１８２】

他方で、ＧＰＣ３タンパク質を検出するのに適した試薬の例には、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ'）$_2$、Ｆｖ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、ＧＰＣ３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。

【０１８３】

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に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。

【０１８４】

本発明の１つの態様として、試薬がＧＰＣ３　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ＧＰＣ３　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。

【０１８５】

本発明のキットは、陽性対照試料またはＧＰＣ３標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、ＧＰＣ３陽性試料を採取し、次にそのＧＰＣ３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ＧＰＣ３タンパク質またはポリヌクレオチドを、ＧＰＣ３を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはＧＰＣ３標準試料を形成してもよい。本発明では、精製ＧＰＣ３は組換えタンパク質であり得る。陽性対照試料のＧＰＣ３レベルは、例えばカットオフ値を上回る。

【０１８６】

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、ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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、ＨＣＣおよびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。

【０１８７】

本発明はまた、配列番号：１から５の中から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むＧＰＣ３タンパク質（配列番号：９または１１）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、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３抗体を含み得る。本発明において、ＧＰＣ３ポリペプチドに結合する抗ＧＰＣ３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から５の中から選択されるアミノ酸配列からな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ＧＰＣ３ポリペプチドの間の結合が配列番号：１から５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、免疫クロマトグラフィ技術、酵素結合免疫検定法（ＥＬＩＳＡ）、酵素結合免疫蛍光検定法（ＥＬＩＦＡ）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。

【０１８８】

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、ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３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、ＨＣＣおよびメラノーマが含まれるが、これらに限定されない。

【０１８９】

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。

【０１９０】

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。

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ち得る。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。

【０１９１】

本明細書では、抗体は、全長ＧＰＣ３ペプチドまたはＧＰＣ３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から５の中から選択されるアミノ酸配列を有するＧＰＣ３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。

【０１９２】

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。

【０１９３】

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（Ｃａｔａｒｒｈｉｎｉ）のサル（旧世界ザル）が含まれる。

【０１９４】

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。

【０１９５】

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。

【０１９６】

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（Ｇａｌｆｒｅ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ ７３：３－４６（１９８１））に従って融合させることができる。

【０１９７】

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。

【０１９８】

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）。

【０１９９】

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。

【０２００】

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。

【０２０１】

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Ｃｏ ｅｔ 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）。

【０２０２】

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。

【０２０３】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の可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。

【０２０４】
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。

【０２０５】
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Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｆ．Ｆ．（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）が含まれる。

【０２０６】
適切なクロマトグラフィ技術の例には、アフィニティ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．Ｍａｒｓｈａｋ　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。

【０２０７】
例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫検定法（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（ＩＦ）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。

【０２０８】
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。例えば、患者から得られたがん細胞または組織において、本発明のペプチドが検出され

る場合、それらに対するＴｈ１細胞（またはＣＴＬ細胞）が、がん免疫療法において効果的なツールであることが期待される。

【０２０９】

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。

【０２１０】

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、ＤＨ５α、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、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、ＤＨ５α、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（Ｌｅｉ　ｅｔ　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。

【０２１１】

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産生するために使用できる。

【０２１２】

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（１９

７９））、ＭＭＬＶ－ＬＴＲプロモーター、ＥＦ１α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。

【０２１３】

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ち得るが、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】

【０２１４】

材料および方法

細胞株

抗原提示細胞（ＡＰＣ）として、ＤＲ４（ＤＲＢ１＊０４：０５）、Ｌ－ＤＲ４；ＤＲ８（ＤＲＢ１＊０８：０３）、Ｌ－ＤＲ８；ＤＲ１３（ＤＲＢ１＊１３：０２）、Ｌ－ＤＲ１３またはＤＲ１５（ＤＲＢ１＊１５：０２）、Ｌ－ＤＲ１５；およびＤＰ５（ＤＰＡ１＊０２：０２／ＤＰＢ１＊０５：０１）、Ｌ－ＤＰ５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（Ｌ細胞）を使用した。これらのＬ細胞は、インビトロにおいて１０％ＦＣＳを加えたＤＭＥＭにて維持された。ＤＲ７（ＤＲＢ１＊０７：０１）、Ｌ－ＤＲ７；ＤＲ１３（ＤＲＢ１＊１３：０１）、Ｌ－ＤＲ１３；ＤＲ５２ａ（ＤＲＢ３＊０１：０１）、Ｌ－ＤＲ５２ａ；ＤＲ５２ｂ（ＤＲＢ３＊０２：０２）、ＲＭ３－ＤＲ５２ｂ；ＤＲ１５（ＤＲＢ１＊１５：０１）、Ｌ－ＤＲ１５；ＤＰ２（ＤＰＡ１＊０１：０３／ＤＰＢ１＊０２：０１）、Ｌ－ＤＰ－２を発現するＬ細胞およびＤＰ４（ＤＰＡ１＊０１：０３／ＤＰＢ１＊０４：０１）を発現するＲＭ３細胞は、アメリカ、カルフォルニアのＬａ Ｊｏｌｌａ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ ＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙのＡｌｅｓｓａｎｄｒｏ Ｓｅｔｔｅ博士のご厚意により提供された（ＭｃＫｉｎｎｅｙ ＤＭ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ２０１３；６５：３５７－７０）。Ｌａ Ｊｏｌｌａ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ由来のトランスフェクトされた細胞株は、２ｍＭのグルタミン、１％（ｖ／ｖ）非必須アミノ酸、１％（ｖ／ｖ）ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン（５０Ｕ／ｍＬ）、ストレプトマイシン（５０μｇ／ｍＬ）（すべてライフテクノロジー）および、１０％熱失活させたウシ胎児血清（Ｒ１０）と最終濃度２００μｇ／ｍｌのＧ－４１８硫酸塩（和光）を加えたＲＰＭＩ１６４０培地において培養された。ＲＭ３形質転換体株は、最終濃度７００μｇ／ｍｌのＧ－４１８および１２μｇ／ｍｌのブラストサイジン（シグマ）を加えたＲ１０中で培養された（ＭｃＫｉｎｎｅｙ ＤＭ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ２０１３；６５：３５７－７０）。

【０２１５】

ＨＬＡクラスＩＩ結合ペプチドの予測

潜在的なプロミスキャスＨＬＡクラスＩＩに結合するヒトＧＰＣ３由来ペプチドを予測するため、近年開発されたコンピュータアルゴリズム（ＩＥＤＢ解析リソース、ＩＥＤＢ推奨法、ｔｏｏｌｓ．ｉｍｍｕｎｅｅｐｉｔｏｐｅ．ｏｒｇ／ｍｈｃｉｉ／）でヒトＧＰＣ３タンパク質のアミノ酸配列を解析した（Ｗａｎｇ Ｐ ｅｔ ａｌ．ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２０１０；１１：５６８．Ｗａｎｇ Ｐ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｃｏｍｐｕｔ Ｂｉｏｌ ２００８；４：ｅ１０００００４８）。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。ＤＰＢ１＊０５：０

１、ＤＲＢ１＊０７：０１、ＤＲＢ１＊０８：０３、ＤＲＢ１＊０９：０１、ＤＲＢ１＊１３：０２またはＤＲＢ１＊１５：０２アリ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センタイル順位を有する５つのＧＰＣ３－ＬＰｓ、$GPC3_{92-116}$（ＬＰ１）、$GPC3_{137-161}$（ＬＰ２）、$GPC3_{289-313}$（ＬＰ３）、$GPC3_{386-412}$（ＬＰ４）、$GPC3_{556-576}$（ＬＰ５）を選択した（図７および表１）。

【０２１６】

IEDBにより推奨されるコンセンサス法を使用して得られた、GPC3由来ペプチドのHLAクラスII結合順位スコア

GPC3-LP1 アミノ酸残基	HLA-DR4 (*DRB1*04:05*)	HLA-DR7 (*DRB1*07:01*)	HLA-DR8 (*DRB1*08:03*)	HLA-DR9 (*DRB1*09:01*)	HLA-DR13 (*DRB1*13:02*)	HLA-DR14 (*DRB1*14:05*)	HLA-DR15 (*DRB1*15:02*)	HLA-DP2 (*DPB1*02:01*)	HLA-DP5 (*DPB1*05:01*)
92-106	23.48	1.1	56	5.4	17.81	45.49	3.6	0.54	6.79
93-107	17.71	49.19	43.84	33.73	71.13	39.91	20.99	0.55	6.62
94-108	5.31	64.58	27.59	32.75	57.12	25.81	9.96	0.53	6.02
95-109	5.04	40.87	13.78	32.75	57.47	12.79	9.96	0.61	6.02
96-110	0.78	2.72	5.42	1.17	3.36	4.03	0.71	2.09	7.09
97-111	0.56	2.89	4.12	1.11	1.02	2.43	0.71	8.08	9.29
98-112	0.65	3.41	3.76	1.09	0.89	1.55	0.71	14.69	10.11
99-113	0.84	4.9	4.56	1.12	0.88	1.73	0.71	15.63	13.64
100-114	1.23	5.87	4.94	1.15	0.95	1.83	0.71	16.84	17.36
101-115	4.27	7.28	6.24	4.43	1.02	2.14	0.71	14.79	22.79
102-116	4.44	7.39	16.66	4.92	1.09	6.96	0.71	15.7	21.13

コンセンサスパーセンタイル順位

GPC3-LP2 アミノ酸残基	HLA-DR4 (*DRB1*04:05*)	HLA-DR7 (*DRB1*07:01*)	HLA-DR8 (*DRB1*08:03*)	HLA-DR9 (*DRB1*09:01*)	HLA-DR13 (*DRB1*13:02*)	HLA-DR14 (*DRB1*14:05*)	HLA-DR15 (*DRB1*15:02*)	HLA-DP2 (*DPB1*02:01*)	HLA-DP5 (*DPB1*05:01*)
137-151	36.54	34.58	84.97	56.04	80.98	87.13	8.84	3.11	2.32
138-152	17.16	33.04	81.65	33.39	80.03	82.62	5.83	0.02	2.81
139-153	16.19	37.04	81.46	28.03	80.17	81.13	5.83	0.01	2.78
140-154	16.03	26.04	81.25	20.75	75.65	81.60	5.83	0.01	3.27
141-155	16.61	27.73	76.57	32.05	71.65	74.17	5.83	0.01	3.75
142-156	6.74	5.39	41.58	8.44	11.92	44.70	1.37	0.02	4.73
143-157	6.74	4.96	34.55	8.33	11.92	33.74	1.37	0.16	5.07
144-158	6.74	7.71	32.16	10.35	11.92	27.57	1.37	1.24	4.72
145-159	6.74	10.48	30.49	19.99	11.92	23.67	1.37	4.47	4.38
146-160	6.74	13.07	32.86	24.24	11.92	28.53	1.37	4.56	4.57
147-161	6.74	10.95	32.80	33.31	11.92	32.84	1.37	4.56	7.62

表示されるHLAクラスII分子に対するペプチド結合アルゴリズムスコアは各15mer GPC3ペプチドに関して示されている

IEDBにより推奨されるコンセンサス法を使用して得られた、GPC3由来ペプチドのHLAクラスII結合順位スコア

				コンセンサスパーセンタイル順位					
GPC3-LP3	**HLA-DR4**	**HLA-DR7**	**HLA-DR8**	**HLA-DR9**	**HLA-DR13**	**HLA-DR14**	**HLA-DR15**	**HLA-DP2**	**HLA-DP5**
アミノ酸残基	(***DRB1*04:05***)	(***DRB1*07:01***)	***(DRB1*08:03)***	***(DRB1*09:01)***	***(DRB1*13:02)***	***(DRB1*14:05)***	***(DRB1*15:02)***	***(DPB1*02:01)***	***(DPB1*05:01)***
289-303	14.24	11.46	19.34	40.53	32.56	20.63	3.9	2.14	6.03
290-304	5.32	11.69	24.49	25.27	33.05	31.16	3.9	2.08	6.81
291-305	5.19	11.65	31.28	23.93	47.64	35.77	3.9	2.14	5.2
292-306	5.19	11	35.34	23.31	47.63	36.27	3.9	2.18	4.63
293-307	2.44	9.46	44.42	4.16	15.47	35.01	3.9	2.46	4.55
294-308	2.29	9.46	45.22	3.83	15.47	30.77	3.9	2.84	4.84
295-309	3.26	9.46	53.89	4.31	15.72	32.22	3.9	4.92	12.15
296-310	3.75	42.56	56.47	4.6	15.49	28.19	5.03	12.92	12.15
297-311	6.69	42.49	57.31	6.06	18.14	30.23	14.56	13.3	12.15
298-312	11.11	49.12	60.21	8.43	28.19	38.61	14.56	15.98	18.5
299-313	12.64	48.59	55.91	14.48	25.13	39.02	14.56	13.64	24.32

				コンセンサスパーセンタイル順位					
GPC3-LP4	**HLA-DR4**	**HLA-DR7**	**HLA-DR8**	**HLA-DR9**	**HLA-DR13**	**HLA-DR14**	**HLA-DR15**	**HLA-DP2**	**HLA-DP5**
アミノ酸残基	(***DRB1*04:05***)	(***DRB1*07:01***)	***(DRB1*08:03)***	***(DRB1*09:01)***	***(DRB1*13:02)***	***(DRB1*14:05)***	***(DRB1*15:02)***	***(DPB1*02:01)***	***(DPB1*05:01)***
386-400	4.51	11.33	1.2	3.91	26.62	1.73	3.92	33.14	2.66
387-401	4.44	11.03	0.75	3.76	26.46	0.68	3.92	32.19	1.53
388-402	4.33	10.65	0.6	3.76	26.06	0.37	3.92	26.2	6.41
389-403	1.38	7.81	0.6	0.87	26.14	0.48	0.5	14.3	0.9
390-404	1.38	8.84	1.25	0.89	37.94	1.44	0.5	14.3	0.89
391-405	1.38	4.14	1.98	0.89	39.07	2.24	0.5	7.51	0.93
392-406	0.3	4.14	3.94	0.07	43.64	5.4	0.5	6.33	1.06
393-407	0.36	4.14	4.93	8.11	30.8	6.72	0.5	7.07	1.14
394-408	0.38	4.14	5.58	7.99	30.69	5.86	0.5	6.63	4.18
395-409	0.39	0.5	3.95	0.48	12.65	4.27	0.5	6.53	5.71
396-410	0.62	0.59	6.63	0.03	12.45	5.45	2.03	7.24	14.61
397-411	1.49	0.74	10.07	0.1	14.11	7.26	2.03	8.62	21.78
398-412	2.2	1.06	15.69	0.11	16.03	10.3	2.03	9.28	25.47

表示されるHLAクラスII分子に対するペプチド結合アルゴリズムスコアは各15mer GPC3ペプチドに関して示されている

IEDBにより推奨されるコンセンサス法を使用して得られた、GPC3由来ペプチドのHLAクラスII結合順位スコア

	コンセンサスパーセンタイル順位									
GPC3-LP5 アミノ酸残基	HLA-DR4 *(DRB1*04:05)*	HLA-DR7 *(DRB1*07:01)*	HLA-DR8 *(DRB1*08:03)*	HLA-DR9 *(DRB1*09:01)*	HLA-DR13 *(DRB1*13:02)*	HLA-DR14 *(DRB1*14:05)*	HLA-DR15 *(DRB1*15:02)*	HLA-DP2 *(DPB1*02:01)*	HLA-DP5 *(DPB1*05:01)*
556-570	1.25	0.56	4.85	1.21	6.63	5.19	0.4	38.86	33.92
557-571	1.23	0.68	3.6	1.07	6.6	3.51	0.4	12.73	23.87
558-572	1.13	0.68	2.32	0.86	3.42	2.73	0.4	12.73	23.87
559-573	0.99	0.76	2.93	0.94	3.42	2.58	0.4	12.73	23.87
560-574	1.02	1.2	5.78	1.38	3.42	5.38	0.4	12.73	23.87
561-575	2.36	1.26	9.94	2.47	3.42	9.79	0.4	13.87	23.87
562-576	2.43	1.26	23.43	4.64	3.42	29.45	0.4	12.73	23.87

表示されるHLAクラスII分子に対するペプチド結合アルゴリズムスコアは各15mer GPC3ペプチドに関して示されている

【０２１７】

合成ペプチドおよび組換えタンパク質

ＨＬＡ－Ａ２（Ａ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$；Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰ）またはＨＬＡ－Ａ２４（Ａ２４－ＧＰＣ３$_{298-306}$；Ａ２４－ＧＰＣ３－ＳＰ）によって提示さ

れる２つのヒトＧＰＣ３由来ＳＰおよび５つのＧＰＣ３－ＬＰ（$GPC3_{92-116}$；$_{137-161}$；$_{289-313}$；$_{386-412}$；$_{556-576}$）を合成した（ＭＢＬ、名古屋、日本；純度＞９５％；図７Ｂ）。ＨＬＡ－Ａ２に結合するヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）－ＳＰ（Ａ２－ＨＩＶ）およびＣＤＣＡ１由来ＳＰ（Ａ２－ＣＤＣＡ１）を陰性対照ＳＰとして使用した（Ｔｏｍｉｔａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ ２０１１；１０２：７１－８；Ｔｏｍｉｔａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ ２０１１；１０２：６９７－７０５）。しばしば、$IMP3_{507-527}$－ＬＰは対照ＬＰとして使用される。ペプチドを１０ｍｇ／ｍＬの濃度でジメチルスルホキシドに溶解し、－８０℃で保管した。組換え全長ＧＰＣ３タンパク質はＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社（ミネアポリス、アメリカ：純度＞９０％）から購入し、０．２％ＦＣＳを含んだ滅菌ＰＢＳで１ｍｇ／ｍＬに再構成した。組換えヒト全長ＣＤＣＡ１タンパク質を前述の通り対照として使用した（Ｔｏｍｉｔａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｓｃｉ２０１１；１０２：６９７－７０５）。ＧＰＣ３－ＬＰ２：$GPC3_{137-161}$および対照としてのＩＭＰ－$3_{507-527}$－ＬＰを搭載したリポソームは、前記の通り生成された（Ｙｕｂａ Ｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１３；３４：３０４２－５２；）。

【０２１８】

健常ドナーからの抗原特異的$CD4^+$Ｔ細胞の生成

健常ドナーから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。１１名の健常ドナーからのＰＢＭＣは書面によるインフォームドコンセントを得た。ＨＬＡ－Ａ、ＤＲＢ１およびＤＰＢ１アリルの遺伝子型判定はＨＬＡ研究所（京都、日本）で行われた（表２）。抗原特異的$CD4^+$Ｔ細胞の誘導を、いくつか変更を加えて、以前に述べられているように行った（Ｚａｒｏｕｒ ＨＭ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０００；６０：４９４６－５２）。$CD4^+$Ｔ細胞を、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（Ｍｉｌｔｅｎｙｉｌ Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ，ＵＳＡ）（Ｉｎｏｕｅ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ２０１０；１２７：１３９３－４０３）。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、前記のように抗原特異的$CD4^+$Ｔ細胞を誘導した（Ｔｏｍｉｔａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１３；１９：４５０８－２０）。場合によっては、Ｔ細胞は、以前に述べられているように、さらなる研究のために限界希釈によってクローン化した（Ｔａｂａｔａ Ｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９８；５９：５４９－６０）。

【０２１９】

【表２】

健常ドナーのHLA-A、-DR、および-DP遺伝子型

ドナー ID[a]	*HLA-A* 遺伝子型	*HLA-DRB1* 遺伝子型	*HLA-DPB1* 遺伝子型
HD1	*A*02:01 / 24:02*	*DRB1*04:05 / DR53*	*DPB1*05:01 / -*
HD2	*A*11:01 / 31:01*	*DRB1*08:03 / 15:02*	*DPB1*02:01 / 09:01*
HD3	*A*24:02 / -*	*DRB1*08:02 / 15:02*	*DPB1*05:01 / 09:01*
HD4	*A*24:02 / 31:01*	*DRB1*08:03 / 14:05*	*DPB1*02:02 / 05:01*
HD5	*A*02:01 / 02:06*	*DRB1*04:05 / 09:01/DR53*[c]	*DPB1*02:01 / 04:02*
HD6	n.t.[b]	*DRB1*04:06 / 08:03/DR53*	*DPB1*02:01 / 04:02*
HD7	*A*26:01 / 33:03*	*DRB1*04:05 / 13:02/DR53*	*DPB1*04:01 / 09:01*
HD8	*A*26:01 / -*	*DRB1*04:10 / 08:02/DR53*	*DPB1*02:01 / 05:01*
HD9	*A*31:01 / 33:03*	*DRB1*09:01 / 13:02/DR53*	*DPB1*03:01 / 04:01*
HD10	*A*01:01 / 68:01*	*DRB1*07:01 / 13:02/DR53/DR52b*[d]	*DPB1*02:01 / 04:01*
HD11	*A*02:06 / 24:02*	*DRB1*09:01 / 14:54/DR53*	*DPB1*04:02 / 05:01*

[a] 健常ドナー（HD1～HD11）に由来するPBMCは誘導アッセイにおよび同種異系APCとして使用した；[b]n.t. 試験していない；
[c] DR53の遺伝子型は *DRB4*01:03* であり、[d] DR52bの遺伝子型は *DRB3*02:02* である。

【０２２０】

ペプチドおよびタンパク質に対するＴ細胞応答の評価

ペプチド（１０μｇ／ｍｌ）またはタンパク質（１０μｇ／ｍｌ）でパルスした抗原提

示細胞（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 ２０１１；１０２：６９７－７０５）ＩＦＮ－γ酵素結合免疫スポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）アッセイ（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（３×１０^{4}）での刺激後の３×１０^{4}のバルクＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、またはペプチドでパルスしたＨＬＡ－ＤＲを発現するＬ細胞（５×１０^{4}個／ウェル）もしくはＲＭ３（５×１０^{4}個／ウェル）での刺激後の１×１０^{4}のバルクＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞当たりの、ＩＦＮ－γを産生するペプチド特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の頻度を前期の通りに分析した（Ｔｏｓｏｌｉｎｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１１；７１：１２６３－７１）。

【０２２１】

サイトカインアッセイ

ＧＰＣ３－ＬＰ特異的バルクＴｈ細胞またはＴｈ細胞クローン（３×１０^{4}個／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でパルスした自己ＰＢＭＣの存在下で培養した。２４時間後、培養上清を採取し、サイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＭＩＰ１β）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。

【０２２２】

インビトロクロスプライミングアッセイ

Ｙｕｂａら（Ｙｕｂａ Ｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１３；３４：３０４２－５２）は、ＤＣの交差提示の効率を高めるため腫瘍抗原を含む改変されたｐＨ感受性リポソームを開発した。ＧＰＣ３－ＬＰ２：ＧＰＣ３$_{137-161}$の交差提示を評価するために、リポソームに封入されたＬＰでパルスされたＤＣを利用した。リポソームは以前に述べられているように調整した（Ｙｕｂａ Ｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１３；３４：３０４２－５２）。簡単に述べると、Ｎ、Ｎ-ジメチルホルムアミドまたは脱イオン水（５ｍｇ／ｍＬ）に溶解したペプチド（０．２２μｍｏｌ）をＥＹＰＣ／ＣＨｅｘＰＧ－ＰＥ（９７／３，ｍｏｌ／ｍｏｌ；６．２５μｍｏｌ）の乾燥した薄いメンブレンに加え、その後溶媒は真空下で３時間以上除去した。得られた脂質とペプチドの混合物を、浴槽タイプのソニケーターを用いてＰＢＳ（５００μＬ）中に２分間の超音波処理で分散させ、ペプチド含有リポソーム懸濁液をもたらした。リポソーム懸濁液は、凍結および融解することによってさらに水和し、１００ｎｍの孔サイズのポリカルボネートメンブレンを通して押し出した。遊離したペプチドを除去するために、リポソーム懸濁液に対し４℃、５５，０００ｒｐｍで１．５時間の遠心分離を２回行った。脂質およびペプチドの濃度は、リン脂質Ｃ（和光）およびマイクロＢＣＡプロテインアッセイ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって各々決定した。

【０２２３】

未成熟ＤＣは、ポジティブ単離したＣＤ１４$^{+}$細胞から調製した（０日目）。ＣＤ１４$^{+}$細胞は、ＩＬ－４（１０ｎｇ／ｍｌ）およびＧＭ－ＣＳＦ（１００ ｎｇ／ｍｌ）の存在下で培養された。未成熟ＤＣは、５日目に剥離され、リポソームに封入されたＬＰ（ＬＰ２０μｇ／ｍＬと同量）で４時間パルスされた。リポソームに封入されたＧＰＣ３－ＬＰ２でロードしたＤＣに対する応答における、IFN－γ産生Ａ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$－ＳＰ特異的バルクＣＴＬの数をＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって計数した。ＳＰをパルスしたＤＣは、陽性対照として使用され、パルスされていないＤＣ、リポソーム単独、溶解したＧＰＣ３－ＬＰ２と混合したリポソームをパルスしたＤＣ、およびリポソームに封入されたＩＭＰ３$_{502-527}$－ＬＰでパルスされたＤＣは、陰性対照として使用された。

【０２２４】

インビボクロスプライミングおよびＬＰ特異的マウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の誘導

ＨＬＡ－Ａ２（ＨＤＤ）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（Ｐａｓｃｏｌｏ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １９９７；１８５：２０４３－５１）。マウスに、７日の間隔で、不完全フロ

インドアジュバント（ＩＦＡ）中に乳化したＧＰＣ３－ＬＰ２溶液またはＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰ溶液（ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍ、５０μｇ／マウスまたは０．５ｍＭ／１００μＬ）を尾基底部へ皮下注射した。ＳＰおよびＬＰ２の等モル（０．５ｍＭ／１００μＬ）の投与は、それらの免疫原性との比較に用いられる。ＩＦＡ－ＰＢＳは、陰性対象として使用され、前述したように分析された（Ｔｏｍｉｔａ　Ｙ，ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２０１３；１９：４５０８－２０；　Ｔｏｓｏｌｉｎｉ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２０１１；７１：１２６３－７１；Ｔｏｍｉｔａ　Ｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０１４；３：ｅ２８１００－１５）。

【０２２５】

ＡＦＡまたはＡ２４－ＧＰＣ３－ＳＰで免疫したＨＣＣ患者におけるＧＰＣ３－ＬＰ特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の評価

ＨＣＣ患者から単離した凍結ＰＢＭＣを解凍後、５％ヒト補体除去血漿を添加した最終量２ｍｌのＡＩＭ－Ｖにおいて５つのＧＰＣ３－ＬＰ（各々１０μｇ／ｍＬ）の混合液と共に細胞を３７℃で培養した（２×１０^{6}個／ウェル、２４穴プレート）；ＩＬ－２とＩＬ－７は、０日目と２日目に加えられた。細胞培養の１週間後、細胞を回収し、洗浄し、および個々のＧＰＣ３－ＬＰまたは対照ＬＰと共にＥＬＩＳＰＯＴプレートにおいて１８時間培養した（１×１０^{5}個／ウェル）。ＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞の数は前述の通りに評価した（Ｔｏｍｉｔａ　Ｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　２０１４；１３４：３５２－６６）。

【０２２６】

統計解析

本発明者らは、データを、両側スチューデントｔ検定（棒グラフ）、またはノンパラメトリックのマン－ホイットニーＵ検定（散布図）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。

【０２２７】

結果

潜在的なプロミスキャスＨＬＡクラスＩＩ結合ＧＰＣ３－ＬＰの予測および選択

ＧＰＣ３の潜在的かつプロミスキャスなＨＬＡクラスＩＩ結合Ｔｈ細胞エピトープを同定するため、ＧＰＣ３のアミノ酸配列を、近年開発されたコンピュータアルゴリズムを用いて最初に調べた（図７Ａおよび表１）（Ｗａｎｇ　Ｐ，ｅｔ　ａｌ．ＢＭＣ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ２０１０；１１：５６８．Ｗａｎｇ　Ｐ，ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｃｏｍｐｕｔ　Ｂｉｏｌ　２００８；４：ｅ１０００００４８）。コンピュータアルゴリズムによって強力なプロミスキャスＨＬＡクラスＩＩ結合ペプチドであると予測された、２つの領域であるＧＰＣ３－ＬＰ２：ＧＰＣ３$_{137-161}$およびＧＰＣ３－ＬＰ３：ＧＰＣ３$_{289-313}$が、ＨＬＡ－Ａ２またはＡ２４拘束性ＣＴＬによって認識される既知の９マーまたは１０マーのＣＴＬエピトープに近位であると同定された。（図７Ｂ）。３つのＬＰ（ＧＰＣ３－ＬＰ１：ＧＰＣ３$_{92-116}$、ＧＰＣ３－ＬＰ４：ＧＰＣ３$_{386-412}$およびＧＰＣ３－ＬＰ５：ＧＰＣ３$_{556-576}$）もまた、既知のＣＴＬエピトープ配列に含まれない強力なプロミスキャスＨＬＡクラスＩＩ結合ペプチドと予測された。すべての５つのペプチドが、その後の分析で合成された。

【０２２８】

プロミスキャスなＧＰＣ３由来Ｔｈ細胞エピトープの同定

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、ＧＰＣ３－ＬＰ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、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のＧＰＣ３－ＬＰ特異的応答をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって調べた。

ＧＰＣ３－ＬＰ１：ＧＰＣ３$_{92-116}$は、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に健常ドナー（ＨＤ１０）ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から抗原特異的Ｔｈ細胞を生成することができる（図１Ａ）。ＧＰＣ３－ＬＰ１もまた、ＨＬＡ－ＤＲ依存的にＨＤ５：ＤＲＢ１＊０４：０５／０９：０１／ＤＲ５３から抗原特異的Ｔｈ細胞を生成するこ

とができる（図１Ａ）。

【０２２９】

ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２由来のＧＰＣ３－ＬＰ２：ＧＰＣ３$_{137-161}$誘導Ｔｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ２でパルスしたＰＢＭＣに応答してＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｂ）。他のＨＬＡクラスＩＩ分子によって拘束されるＴｈ細胞において、ＧＰＣ３－ＬＰ２が応答を誘導するかどうかを調べるために、ＨＬＡ－ＤＲ１３陰性健常ドナーからのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を試験した。ＨＤ５：ＤＰＢ１＊０２：０１／０４：０２から生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ２でパルスしたＰＢＭＣに応答してＨＬＡ－ＤＰ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｂ）。ＧＰＣ３－ＬＰ２が、健常ドナー、ＨＤ４：ＤＲＢ１＊０８：０３／１４：０５（図１Ｂ）およびＨＤ１１：ＤＲＢ１＊０９：０１／１４：５４／ＤＲ５３（図１Ｂ）から、特異的Ｔｈ細胞をＨＬＡ－ＤＲ依存的に生成させたこともまた、認められた。ＨＤ３：ＤＲＢ１＊０８：０２／１５：０２からのＰＢＭＣにおけるペプチド特異的応答もまた検出された（データ示さず）。

【０２３０】

次に、我々はＧＰＣ３－ＬＰ３；ＧＰＣ３$_{289-313}$がペプチド特異的Ｔｈ細胞を生成することができるかどうかについて評価した。ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ３でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｃ）。ＨＤ５：ＤＲＢ１＊０４：０５／０９：０１／ＤＲ５３から産生されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ３でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｃ）。ＨＤ１１：ＤＲＢ１＊０９：０１／１４：５４／ＤＲ５３から産生されたＴｈ細胞もまた、ＧＰＣ３－ＬＰ３でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図８Ａ）。

【０２３１】

抗原特異的Ｔｈ細胞を生成するＧＰＣ３－ＬＰ４；ＧＰＣ３$_{386-412}$の能力についてもまた評価した。ＨＤ３：ＤＲＢ１＊０８：０２／１５：０２から生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ４でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｄ）。ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ４でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｄ）。

【０２３２】

次に、抗原特異的Ｔｈ細胞を生成するＧＰＣ３－ＬＰ５；ＧＰＣ３$_{556-576}$の能力について評価した。ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ５でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｅ）。ＨＤ５：ＤＲＢ１＊０４：０５／０９：０１／ＤＲ５３から生成されたＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ５でパルスしたＰＢＭＣ応答において、ＨＬＡ－ＤＲ依存的に有意な量のＩＦＮ－γを産生した（図１Ｅ）。

【０２３３】

ＧＰＣ３特異的Ｔｈ細胞の拘束ＨＬＡクラスＩＩ分子の正確な同定

ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２由来のバルクＧＰＣ３－ＬＰ１特異的Ｔｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ１でパルスされたＲＭ３－ＤＲ５２ｂ細胞（図２Ａ）をＨＬＡ－ＤＲ依存的に特異的に認識したが（データ示さず）、しかし、Ｌ－ＤＲ７、Ｌ－ＤＲ１３、Ｌ－ＤＲ５３、Ｌ－ＤＲ５２ａでパルスしたＧＰＣ３－ＬＰ１は認識しなかった。ＨＤ５：ＤＲＢ１＊０４：０５／０９：０１／ＤＲ５３由来の他のバルクＧＰＣ３－ＬＰ１特異的Ｔｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ１でパルスされたＬ－ＤＲ９細胞をＨＬＡ－ＤＲ依存的に特異的に認識したが、しかし、Ｌ－ＤＲ８またはＬ－ＤＲ５３でパルスされたＧＰＣ３－ＬＰ１は認識しなかった（図２Ａ）。これらの結果は、ＧＰＣ３－ＬＰ１が少なくともＨＬＡ－ＤＲ５２ｂおよびＨＬＡ－ＤＲ９によって提示されてい

ることを示している。

【０２３４】

ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から生成されたバルクＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔ細胞の拘束ＨＬＡクラスＩＩ分子を同定するために、Ｔｈ細胞クローン（Ｔｈクローン）を生成した。Ｔｈクローン細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ２でパルスしたＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ（ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０２：０２）がトランスフェクションされたＲＭ３細胞株および２人のＨＬＡ－ＤＲ１３$^{+}$ＤＲ７$^{-}$健常ドナーからの同種異系ＰＢＭＣを特異的に認識した（図２Ｂ、図８Ｂ）。これらの結果は、ＧＰＣ３－ＬＰ２がＨＬＡ－ＤＲ５２ｂによって提示されたことを示している。ＨＤ５：ＤＰＢ１＊０２：０１／０４：０２から生成された、ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔ細胞からのＴｈクローンは、ＧＰＣ３－ＬＰ２でパルスされた、Ｌ－ＤＰ細胞、および共通のＨＬＡ－ＤＰ２分子を有する同種異系ＰＢＭＣを特異的に認識することができるが、ＧＰＣ３をパルスしたＲＭ３－ＤＰ４細胞もＨＬＡ－ＤＰ２がない同種異系ＰＢＭＣも認識しない。ＧＰＣ３－ＬＰ２はＨＬＡ－ＤＰ２拘束性Ｔｈ細胞を誘導することが確認された（図２Ｂ、図８Ｃ）。ＧＰＣ３－ＬＰ２は、ＡＰＣとしての同種異系ＰＢＭＣおよびＬ細胞トランスフェクタントの両方によって確認される、ＨＬＡ－ＤＲ８－（ＤＲＢ１＊０８：０３）拘束性Ｔｈ細胞を生成した（図８Ｄ、図８Ｅ）。したがって、ＧＰＣ３－ＬＰ２がＨＬＡ－ＤＲ５２ｂ、ＨＬＡ－ＤＰ２、ＨＬＡＤＲ８、ＨＬＡ－ＤＲ９／１４およびＨＬＡ－ＤＲ８／１５と結合すること（データ示さず）は、ＧＰＣ３－ＬＰ２が、いくつかの高頻度ＨＬＡクラスＩＩ分子（Ｓａｉｔｏ Ｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ ２０００；５６：５２２－９．；Ｍａｃｋ ＳＪ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ ２０００；５５：３８３－４００）によって提示されるプロミスキャスなＴｈ細胞エピトープであることを示唆する。

【０２３５】

ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から生成されたＧＰＣ３－ＬＰ３特異的バルクＴｈ細胞は、２人のＨＬＡ－ＤＲ１３$^{+}$ドナー（ＨＤ７、ＨＤ９）からの同種異系ＰＢＭＣを認識することができず、ＧＰＣ３－ＬＰ３がＨＬＡ－ＤＲ７またはＤＲ５３拘束性Ｔｈ細胞を生成することが結論付けられた（図２Ｃ）。ＨＤ５：ＤＲＢ１＊０４：０５／０９：０１／ＤＲ５３からのＧＰＣ３－ＬＰ３特異的バルクＴｈ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ３でパルスしたＬ－ＤＲ９細胞をＨＬＡ－ＤＲ依存的に特異的に認識するが、ＧＰＣ３－ＬＰ３でパルスしたＬ－ＤＲ４またはＬ－ＤＲ５３細胞は認識しなかった（図２Ｃ）。これらの結果は、ＧＰＣ３－ＬＰ３が、ＨＬＡ－ＤＲ９によって提示されることを示す。

【０２３６】

ＧＰＣ３－ＬＰ４反応性Ｔｈクローンは、ＨＤ３：ＤＲＢ１＊０８：０２／１５：０２から生成されたバルクＴｈ細胞から確立された。次に、同種異系ＰＢＭＣは、共通のＨＬＡ－ＤＲ分子による拘束を決定するためのＡＰＣとして用いられた。ＧＰＣ３－ＬＰ４はＨＬＡ－ＤＲ１５またはＤＲ５１拘束性Ｔｈ細胞を生成することが確認された（図２Ｄ）。ＧＰＣ３－ＬＰ４反応性Ｔｈクローンはまた、ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から樹立された。ＧＰＣ３－ＬＰ４反応性Ｔｈクローンは、Ｌ－ＤＲ１３を特異的に認識し、ＧＰＣ３－ＬＰ４でパルスしたＬ－ＤＲ７を認識しなかった。ＧＰＣ３－ＬＰ４がＨＬＡ－ＤＲ１３拘束性Ｔｈ細胞を生成することが結論付けられた（図２Ｄ）。

【０２３７】

ＨＤ１０：ＤＲＢ１＊０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２由来のＧＰＣ３－ＬＰ５反応性ＴｈクローンはＬ－ＤＲ１３を認識することができたが（図２Ｅ）、ＧＰＣ３－ＬＰ５でパルスしたＬ－ＤＲ７、Ｌ－ＤＲ５３、Ｌ－ＤＲ５２ａ細胞もＲＭ３－ＤＲ５２ｂ細胞も認識できなかった。もう一つのＨＤ５：ＤＲＢ１＊０４：０５／０９：０１／ＤＲ５３由来のＧＰＣ３－ＬＰ５反応性ＴｈクローンはＬ－ＤＲ９を認識することができたが、ＧＰＣ３－ＬＰ５でパルスしたＬ－ＤＲ－４細胞もＬ－ＤＲ５３細胞を認識する

ことができなかった。したがって、ＧＰＣ３－ＬＰ５はＨＬＡ－ＤＲ１３およびＨＬＡ－ＤＲ９拘束性Ｔｈ細胞を生成すると結論付けられた（図２Ｅ）。

【０２３８】

ＧＰＣ３－ＬＰは、Ｔｈ１型ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を刺激する

ＧＰＣ３－ＬＰに反応するＴｈ細胞を特徴づけるために、培養液中でコグネイトペプチドでパルスされた自己ＰＢＭＣによる刺激に応答したＴｈ細胞によって分泌されたサイトカインのレベルを測定した。ＨＤ１０から生成されたＧＰＣ３－ＬＰ１、ＬＰ２、ＬＰ４特異的Ｔ細胞クローンは、コグネイトペプチドでの再刺激後に、大量のＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＧＭ－ＣＳＦおよびＭＩＰ１βを産生し、このことは、Ｔｈ１分極特性を示した（図３）。

【０２３９】

ＤＣによるＧＰＣ３－ＬＰの天然のプロセシングおよび提示の可能性

ＤＣがＧＰＣ３タンパク質を取り込み、プロセシングして、ＬＰによる刺激によって生成されたＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞を刺激するかどうかを評価した。組換えＧＰＣ３タンパク質をロードしたＤＣを調製し、ＩＦＮ－γ　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．）。ＨＤ１０：ＤＲＢ１*０７：０１／１３：０２／ＤＲ５３／ＤＲ５２から生成された４つのＧＰＣ３－ＬＰ（ＧＰＣ３－ＬＰ１、３、４および５）反応性Ｔｈ細胞は、ＧＰＣ３タンパク質をロードしたＤＣを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、これらのエピトープが、ＧＰＣ３タンパク質から天然にプロセシングされることを示している（図４）。この結果はＧＰＣ３－ＬＰ１、３、４および５がＧＰＣ３タンパク質から天然にプロセシングされ、ＤＣによって提示されることを示唆している。

【０２４０】

ヒトＤＣを用いたインビトロクロスプレゼンテーションアッセイ

ＣＴＬエピトープを担持するＧＰＣ３－ＬＰ２が、Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰ特異的ＣＴＬを刺激できるかどうかを評価した。Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰ特異的ＣＴＬを刺激するＧＰＣ３－ＬＰ２の能力を、「材料および方法」の項に記載の通りにＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイで調べた。図５Ａに示すように、ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$ドナー由来のＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰ特異的バルクＣＴＬは、リポソームに封入されたＧＰＣ３－ＬＰ２でロードしたＤＣで刺激した応答において、ＩＦＮ－γを産生したが、リポソームに封入された対照ＬＰでロードしたＤＣでは産生しなかった。特異的ＩＦＮ－γ産生は、抗ＨＬＡクラスＩ　ｍＡｂの添加によって特異的に阻害されたが、抗ＨＬＡ－ＤＲ　ｍＡｂでは阻害されず、したがって、このことはＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰ反応性ＣＴＬはインビトロにおいて、ＤＣによるＧＰＣ３－ＬＰ２の交差提示を通して刺激されたことを示唆する。

【０２４１】

ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスを用いたインビボクロスプライミングアッセイ

Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰ特異的ＣＴＬをプライミングするＧＰＣ３－ＬＰ２の能力を、エクスビボＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイで調べた。ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍを、ＩＦＡ中に乳化したＧＰＣ３－ＬＰ２で２回免疫した。ＧＰＣ３－ＬＰ２でワクチン接種したＨＬＡ－Ａ２　ＴｇｍのＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は、Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰでパルスしたＢＭ－ＤＣでの刺激に応答してＩＦＮ－γを特異的に産生した（図５Ｂ）。これらの結果は、ＧＰＣ３－ＬＰ２の取込み後、ＡＰＣがＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍにおいてインビボでａ２－ＧＰＣ３－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。

【０２４２】

ＧＰＣ３－ＬＰ２によるＣＴＬのインビボでの増加およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の誘導

等モルのＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰおよびＧＰＣ３－ＬＰ２を上記のようにマウスを免疫化するために用いた場合、単離したＣＤ８$^{+}$細胞において、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって評価したＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰ特異的ＣＴＬの数は、Ａ２－ＧＰＣ３－Ｓ

Ｐで免疫化したマウスと比較して、ＧＰＣ３－ＬＰ２で免疫したマウスで増加した（図５Ｃ）。ＧＰＣ３－ＬＰ２特異的Ｔｈ細胞をプライミングするＧＰＣ３－ＬＰ２の能力を、エクスビボＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイで調べた。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、磁気ビーズを用いて、ＧＰＣ３－ＬＰ２を用いて免疫化したＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍから単離した。これらＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、ＧＰＣ３－ＬＰ２（図５Ｄ）でパルスしたマウスＢＭＤＣの刺激に応答してＩＦＮ－γを特異的に産生したが、対照ＧＰＣ３－ＬＰ５では産生しなかった。これらの結果は、ＧＰＣ３－ＬＰ２もまた、ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍにおいて、インビボでＧＰＣ３－ＬＰ２特異的に、およびおそらくはＩ－Ａ^{b}拘束性Ｔｈ細胞をプライミングすることができることを示唆する。

【０２４３】

Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰまたはＡ２４－ＧＰＣ３－ＳＰをワクチン接種したＨＣＣ患者におけるＧＰＣ３特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞の存在

拘束性エピトープをワクチン接種したがん患者はしばしばワクチン内には存在しないＴ細胞応答を生じる（Ｃｏｒｂｉｅｒｅ　Ｖ，ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２０１１；７１：１２５３－６２；　Ｒｉｂａｓ　Ａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　２００３；２４：５８－６１；　Ｈｕｎｄｅｒ　ＮＮ，ｅｔ　ａｌ．Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　２００８；３５８：２６９８－７０３）。がん患者におけるＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞応答を検出するために、Ａ２－ＧＰＣ３－ＳＰまたはＡ２４－ＧＰＣ３－ＳＰをワクチン接種したＨＣＣ患者から単離されたＰＢＭＣを回収した。ドナーの特性を表３に要約する。インビトロでのＧＰＣ３－ＬＰを用いたＰＢＭＣの刺激の７日後、各々のＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔ細胞の頻度を、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって検出した（図６Ａ～Ｅ）。応答は、ＩＦＮ－γ分泌細胞の数が上記の陰性対照よりも少なくとも２倍増加したときに陽性とみなされた。ＧＰＣ３－ＬＰ特異的免疫応答は、ワクチン接種した患者１８人中１１人で観察された（図６および表３）。Ｔ細胞によるＧＰＣ３－ＬＰ特異的ＩＦＮ－γ産生は、抗ＨＬＡクラスＩＩｍＡｂの添加によって有意に阻害されたが（図６、図１０）、しかし抗ＨＬＡクラスＩｍＡｂでは阻害されなかった（データ示さず）。これらの結果は、ＧＰＣ３－ＬＰ特異的ＩＦＮ－γ産生が抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞由来であることを明確に示している。

【０２４４】

【表３】

A2-GPC3-SPまたはA24-GPC3-SPを用いてワクチン接種されたHCC患者から単離されたPBMCのGPC3-LP特異的応答および患者のHLA遺伝子型

患者 ID	GPC3-LPの特異性	HLA-クラスII拘束	ワクチン接種の No.	*HLA-A**	*HLA-DRB1**		*HLA-DPB1**	
Ph-I-16	GPC3-LP2	DP	7	*02:01*	*04:05*	*16:02*	*02:01*	*05:01*
Ph-I-20	(-)	-	5	*24:02*	*04:07*	*15:02*	*02:01*	*09:01*
Ph-I-24	GPC3-LP2	DP	5	*02:07*	*04:05*	*08:03*	*05:01*	-
Ph-I-25	GPC3-LP2	DR	5	*02:06*	*08:02*	*14:54*	*02:02*	*04:02*
Ph-II-6	GPC3-LP3	DR	3	*24:02*	*15:02*	*16:02*	*05:01*	*09:01*
Ph-II-7	GPC3-LP2	DR	3	*24:02*	*14:54*	*15:01*	*03:01*	*05:01*
Ph-II-12	(-)	-	3	*24:02*	*04:05*	*13:02*	*04:01*	*04:02*
Ph-II-20	(-)	-	3	*24:02*	*04:05*	*09:01*	*02:01*	*03:01*
Ph-II-26	GPC3-LP2, LP4, LP5	DR	3	*24:02*	*04:03*	*09:01*	*02:01*	*05:01*
Ph-II-30	GPC3-LP2, LP4, LP5	DR	3	*02:07*	*08:03*	*11:01*	*02:02*	*14:01*
Ph-II-36	GPC3-LP2	DP	3	*02:01/24:02*	*01:01*	*04:05*	*02:01*	*04:02*
Ph-II-42	GPC3-LP2	DP	3	*02:06/24:02*	*14:54*	*15:01*	*02:01*	*02:02*
Ph-II-45	(-)	-	3	*24:02*	*15:02*	-	*02:01*	*09:01*
Ph-II-47	(-)	-	3	*02:01*	*04:05*	*14:03*	*05:01*	-
Ph-II-48	(-)	-	3	*24:02*	*04:05*	*09:01*	*02:01*	-
Ph-II-49	(-)	-	3	*24:02*	*04:01*	*04:05*	*02:01*	*05:01*
Ph-II-52	GPC3-LP2	DP	3	*02:06*	*04:05*	*04:06*	*02:01*	*04:02*
Ph-II-53	GPC3-LP3	DR	3	*24:02*	*04:05*	*08:02*	*04:02*	*05:01*
Ph-II-55			3	*24:02*	*09:01*	*15:02*	*05:01*	*09:01*
Ph-II-56			3	*02:06*	*08:02*	*09:01*	*03:01*	*05:01*

(-), 陰性の応答 ; No., 数 ; Ph-I, 第1相試験 ; Ph-II, 第2相試験

【０２４５】

ＧＰＣ３－ＳＰに基づいたがん免疫療法の臨床試験（Ｙｕ Ｓａｗａｄａ，ｅｔ ａｌ，２０１２）に登録されている２０名の患者由来のＣＤ４＋Ｔｈ細胞のＧＰＣ３－ＬＰ特異的免疫応答が以下のように試験された。ＧＰＣ３－ＬＰ特異的Ｔｈ細胞応答は、ＩＦＮ－γ ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって測定された。要約すると、患者由来のＰＢＭＣを、示されたＧＰＣ３－ＬＰで刺激した。応答は、ＩＦＮ－γスポットの平均数が１５を超え、かつバックグラウンドに対して２倍を超えた場合に陽性として評価した。

【０２４６】

考察

ＧＰＣ３由来ＳＰは、進行期のＨＣＣ患者においてＳＰ特異的ＣＴＬを誘発することができた（Ｓａｗａｄａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１２；１８：３６８６－９６）。これらのメモリーＣＴＬの誘導と維持は、腫瘍特異的ＣＤ４＋Ｔｈ細胞の助けを誘導することによって改善することができる。したがって本研究は、ヒトＧＰＣ３タンパク質由来のＣＤ４＋Ｔｈ細胞エピトープの同定に焦点を当てた。

【０２４７】

本発明の重要所見は、以下の通りである。

（１）ＬＰ特異的Ｔｈ１型ＣＤ４＋Ｔｈ細胞応答を誘発しうる５つのプロミスキャスな免疫原性のＧＰＣ３－ＬＰが同定され、そのうちの４つは、インビトロで、ＤＣによってＧＰＣ３タンパク質から天然にプロセシングされ、１つはインビボで天然にプロセシングされることが示された。（２）天然のＨＬＡ－Ａ２拘束性ＣＴＬエピトープを有するＧＰＣ３－ＬＰ２は、リポソームに封入された場合に首尾良く交差提示される。ＩＦＡ中に乳化されたこのペプチドはさらに、ＨＬＡ－Ａ２ Ｔｇｍで免疫された場合、インビボで効率

的にクロスプライミングされる。（３）ＩＦＡに乳化されたＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰを含むＧＰＣ３－ＬＰ２によるＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍの免疫化は、ＩＦＡ中に乳化されたＡ２－ＧＰＣ３－ＳＰによる免疫と比較して、ＳＰ特異的ＣＴＬを誘発する点で優れていた。（４）この増大した応答の一部は、免疫化したＨＬＡ－Ａ２　ＴｇｍにおいてＧＰＣ３－ＬＰ２特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞応答が観察されたため、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の助けに起因する可能性がある。および、（６）ＧＰＣ３－ＬＰ特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞応答の存在は、ＧＰＣ３－ＳＰでワクチン接種されたがん患者において観察された。

【０２４８】

ＭＨＣクラスＩＩタンパク質は、高度に多型性である。それゆえ、多数の人に有用であることが可能であるように、天然においてプロミスキャスであることはペプチドまたはペプチドカクテルにとって重要である。本研究では、５つのペプチドが少なくとも２つの異なったＨＬＡクラスＩＩ拘束性ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞を誘導可能であることが見出された（表４、図２）。限定された数の健常ドナーで免疫原性を確認したところ、５つのペプチドが日本人集団においてより広い適用範囲を示した。これらの５つのペプチドは、少なくとも７つの異なったＨＬＡクラスＩＩ拘束性Ｔｈ細胞を誘導することができ（表４）、それは日本人の人口の７０％以上をカバーする（表５）（Ｆｕｍｉａｋｉ　Ｎａｋａｊｉｍａ　ＪＮ，ｅｔ　ａｌ．，ＭＨＣ　２００１；８：１－３２）。そのうえ、大部分がオーバーラップするペプチドを共有するいくつかの一般的なＨＬＡ－ＤＲ型が存在する（Ｓｏｕｔｈｗｏｏｄ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１９９８；１６０：３３６３－７３）。それらは、オーバーラップするコグネイトペプチドによって３つにグループ化できる。１つ目のグループ：ＤＲＢ１＊０１：０１、ＤＲ５＊０１：０１、ＤＲＢ１＊１５：０１、ＤＲＢ１＊０４：０１、ＤＲＢ１＊１３：０２、ＤＲＢ１＊０７：０１、ＤＲＢ１＊０９：０１、２つ目のグループ：ＤＲＢ１＊０４：０５、ＤＲＢ１＊０８：０２、ＤＲＢ１＊１３：０２、３つ目のグループ：ＤＲＢ１＊１２：０１およびＤＲＢ１＊０３：０１。上記データは、ほんの３つのペプチドが、世界人口において存在するＨＬＡクラスＩＩアリルのほとんどをカバーし得ることを示している。長鎖ペプチドの特性を考慮すると、この研究で研究された５つのペプチドは、抗腫瘍特性を有するペプチド特異的Ｔｈ１細胞を誘導するために多くの人口をカバーする可能性があると結論付けることができる。

【０２４９】

【表４】

CTLエピトープを含む、GPC3に由来するプロミスキャスなCD4$^+$Thヘルパー細胞エプトープの同定

長鎖ペプチド(LP)の名称	アミノ酸残基の位置	配列	アミノ酸の長さ	T細胞ドナー	[a]ドナー HLA/マウスMHC	免疫応答	拘束分子	天然のプロセシング
GPC3-LP1	92-116	LLQSASMELKFLIIQNAAVFQEAFE	25	HD3	*DRB1*08:02/15:02*	陰性		
				HD10	*DRB1*07:01/13:02*	陽性	*DRB3*02:02* (L)	インビトロで陽性
				HD5	*DRB1*04:05/09:01*	陽性	*DRB1*09:01*(L)	n.t.
GPC3-LP2	137-161	LTPQAFE**FVGEFFTD**VSLYILGSDI [b]CTL epitope:A2-GPC3$_{144-152}$	25	HD3	*DRB1*08:02/15:02*	陽性		
				HD10	*DRB1*07:01/13:02*	陽性	*DRB3*02:02* (L, allo)	インビトロで陽性
				HD5	*DPB1*02:01/04:02*	陽性	*DPB1*02:01*(L, allo)	n.t.
				HD4	*DRB1*08:03/14:05*	陽性	*DRB1*08:03*(L, allo)	n.t.
				HD11	*DRB1*09:01/14:54*	陽性	n.t.	
				Tgm	I-A^b	陽性	I-A^b	
GPC3-LP3	289-313	VVEIDKYWR**EYILSLEEL**VNGMYRI [c]CTL epitope:A24-GPC3$_{298-306}$	25	HD3	*DRB1*08:02/15:02*	陰性		
				HD10	*DRB1*07:01/13:02*	陽性	n.t.	
				HD5	*DRB1*04:05/09:01*	陽性	*DRB1*09:01*(L)	インビトロで陽性（患者中）
				HD4	*DRB1*08:03/14:05*	陰性		
				HD11	*DRB1*09:01/14:54*	陽性	n.t.	
GPC3-LP4	386-412	SRRRELIQKLKSFISFYSALPGYICSH	27	HD3	*DRB1*08:02/15:02*	陽性	*DRB1*15:02*(allo)	n.t.
				HD10	*DRB1*07:01/13:02*	陽性	*DRB1*13:02* (L)	インビトロで陽性
				HD5	*DRB1*04:05/09:01*	陰性		
GPC3-LP5	556-576	GNVHSPLKLLTSMAISVVCFF	21	HD3	*DRB1*08:02/15:02*	陰性		
				HD10	*DRB1*07:01/13:02*	陽性	*DRB1*13:02* (L)	インビトロで陽性
				HD5	*DRB1*04:05/09:01*	陽性	*DRB1*09:01*(L)	n.t.

[a]ドナーのHLAアリルの詳細は表２に示されている；下線が引かれた太字の配列はCTLエピトープである（[b]Komori H, et al., 2006,[c]Nakatsura T et al., 2004); aa, アミノ酸; n.t.,試験していない; L, 拘束 HLAクラスII分子は単一のHLAクラスII分子を発現するL細胞株によって確認した; allo, HLAクラスIIアリルのうちの少なくとも1つをドナーと共有する同種異系PBMCによって確認した; Tgm, トランスジェニックマウス。

【０２５０】

10 20 30 40

【表５】

日本人人口における5つのGPC3-LPの提示に関与する
HLAクラスII分子の頻度 (http://www/hla.or.jp/)

HLA 型	抗原頻度	頻度の順位	提示ペプチド
DR9	26.6%	3	GPC3-LP1, LP3, LP5
DR15	33.3%	2	GPC3-LP4
DR8	23.5%	4	GPC3-LP2
DR13	12.6%	6	GPC3-LP4, LP5
DRB3*02:02[a]	25.4%	3	GPC3-LP1, LP2
DP2	42.4%	2	GPC3-LP2
DP5	62.1%	1	GPC3-LP2

[a] Nakajima et al. MHC 2001; 8:1-32.

【０２５１】

がん性組織にＴｈ１細胞の強い浸潤を有するがん患者は、長くＣＴＬ応答を維持し続けることによって長期の無病生存率（Ｔｏｓｏｌｉｎｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１１；７１：１２６３－７１）を示すことが報告されている（Ｂｅｖａｎ ＭＪ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００４；４：５９５－６０２）。我々の実験データは、ＧＰＣ３－ＬＰが、Ｔｈ１様細胞を誘導する可能性を有することを示しており（図３）、そして、ペプチドに基づいたがん免疫療法によって誘導された抗腫瘍免疫の強化の助けになるかもしれないことを示している。

【０２５２】

組換えＧＰＣ３タンパク質でパルスされたＤＣに応答することにより、５つのペプチド特異的Ｔ細胞のうち４つがＩＦＮ－γを分泌することも見出した。これらの観察は、ＬＰによって刺激されたことにより生成されたこれらＴｈ細胞が、ＧＰＣ３タンパク質からＤＣによって天然にプロセシングされたペプチドを認識し得ることを示している（図３）。ＧＰＣ３－ＬＰ３特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答は、インビトロでのこのペプチドによるＰＢＭＣの刺激の１週間後にＨＣＣ患者から単離されたＰＢＭＣで観察された（図６Ｃ）。この応答は、ペプチドでＰＢＭＣを刺激した１週間後に観察されたので、二次免疫応答である可能性が最も高い。したがって、患者のＣＤ４$^+$Ｔ細胞は、ＨＬＡクラスＩＩ分子との関連において、ＨＣＣ細胞から放出されたＧＰＣ３タンパク質をＧＰＣ３－ＬＰの提示のために天然でプロセシングしたＤＣによって、インビボにおいて感作されたことを示唆する。

【０２５３】

ＣＴＬ誘導の増加と関連している抗腫瘍免疫の誘導は、おそらく長期およびＤＣ集中的な抗原提示に起因することが報告されている（Ｂｉｊｋｅｒ ＭＳ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００８；３８：１０３３－４２）。ＧＰＣ３－ＬＰ２でパルスされたＤＣはインビトロの試験でＣＴＬエピトープを交差提示できないので、ＧＰＣ３－ＬＰ２のインビトロにおける交差提示能力を評価するために、リポソームに封入されたＬＰが使用された。ｐＨ感受性リポソームは、卵黄ホスファチジルコリンリポソームの表面を３－メチルグルタリル化残基を有するｐＨ感受性デキストラン誘導体（ＭＧｌｕ－Ｄｅｘ）で修飾することによって産生された。ＭＧｌｕ－Ｄｅｘで修飾したリポソームは、樹状細胞によって効率的に取り込まれ、封入されたオボアルブミン（ＯＶＡ）分子をサイトゾルへ送達すると報告されている（Ｙｕｂａ Ｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ２０１３；３４：３０４２－５２）。ＧＰＣ３－ＬＰ２は、このリポソームに封

入された場合、十分に交差提示した。これはまた、ＨＬＡ－Ａ２　ＴｇｍがＧＰＣ３－ＬＰ２およびＩＦＡを用いて免疫化された場合、インビボにおいて、ＧＰＣ３－ＳＰ特異的ＣＴＬを効果的にクロスプライミングすることも見出された（図５Ａ、図５Ｂ）。次に、ＳＰ；Ａ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$を包含する等モル用量のＧＰＣ３－ＬＰ２またはＧＰＣ３－ＬＰ２が、免疫応答の誘導において、よりよい効果を有するかどうかを評価した。ＧＰＣ３－ＬＰ２のアミノ酸配列；ＧＰＣ３$_{137-161}$は、マウスおよびヒトの間で完全に保存されていた。ＧＰＣ３－ＬＰ２で免疫化されたマウスにおいては、ＳＰ単独で免疫化された場合と比較して、ＳＰ特異的ＣＴＬが増加していることが見出された（図５Ｃ）。この増大した応答の一部は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の助けに起因する可能性がある。なぜならＧＰＣ３－ＬＰ２は、インビボにおいてＧＰＣ３－ＬＰ２特異的マウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答を刺激したからである（図５Ｄ）。ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇｍはたったひとつの ＭＨＣクラスＩＩ分子、Ｉ－Ａ^{b}のみを発現するので、ＧＰＣ３－ＬＰ２はＩ－Ａ^{b}分子によってマウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に提示されることが、強く示唆された。

【０２５４】

拘束性エピトープをワクチン接種したがん患者において、ワクチンに含まれないペプチドに対するＴ細胞応答がしばしば産生された（Ｃｏｒｂｉｅｒｅ Ｖ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１１；７１：１２５３－６２；Ｒｉｂａｓ Ａ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００３；２４：５８－６１）。ＧＰＣ３－ＬＰ特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞応答の存在が、エピトープ拡大および予測されるＧＰＣ３－ＬＰの天然の存在の可能性に対処するために確認された。興味深いことに、ＧＰＣ３－ＬＰ特異的応答は、試験した１８人の患者のうち１１人に見られた。また、患者のほとんどがＧＰＣ３－ＬＰ２に対する応答を示した（図６、図１０）。このことは、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の両方において、ＧＰＣ３－ＬＰ２がプロミスキャスな応答を誘導する単一のペプチドとして用いられ得ることを示唆している。がん患者におけるＧＰＣ３－ＬＰ特異的応答は、ワクチンとしてのＬＰの使用が、ＧＰＣ３－ＳＰに基づいたがん免疫療法の効果を改善するであろうことを示している。

ＬＰの使用は、最小のＣＴＬエピトープペプチドよりもいくつかの利点を有する（Ｓｒｉｎｉｖａｓａｎ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９３；２３：１０１１－６；Ｚｗａｖｅｌｉｎｇ Ｓ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００２；１６９：３５０－８；Ｊａｎｓｓｅｎ ＥＭ，ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ ２００５；４３４：８８－９３；Ｋｅｎｔｅｒ ＧＧ，ｅｔ ａｌ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２００９；３６１：１８３８－４７）。Ａ２－ＧＰＣ３$_{144-152}$ＳＰおよびＡ２４－ＧＰＣ３$_{298-306}$ＳＰを用いた第Ｉ相臨床試験の結果は、末梢血におけるＧＰＣ３ペプチド特異的ＣＴＬの存在を示している（Ｓａｗａｄａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１２；１８：３６８６－９６）。ＧＰＣ３－ＳＰをワクチン接種した後、強力な特異的ＣＴＬ反応を示した患者において、顕著な抗腫瘍効果が観察されたにもかかわらず、進行性ＨＣＣの唯一の治療としてＧＰＣ３－ＳＰが使用された場合に、完全奏功ではないことが観察された（Ｓａｗａｄａ Ｙ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｖａｃｃｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ ２０１３；９）。ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞エピトープの両方を有するＧＰＣ３－ＬＰ、またはＧＰＣ３－ＳＰおよびＬＰワクチンの組み合わせの使用は、ＧＰＣ３ペプチドに基づくがん免疫療法を改善し得ることが示された。

【産業上の利用可能性】

【０２５５】

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、ＧＰＣ３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ＧＰＣ３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、抗原非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。

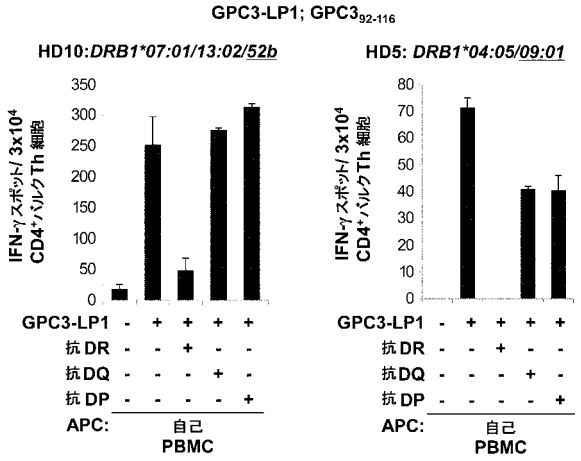
【０２５６】

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、ＧＰＣ３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、ＧＰＣ３に関連する疾患、例えばＧＰＣ３を発現するがん、より詳細にはＨＣＣおよびメラノーマの治療のためにも有用であり得る。

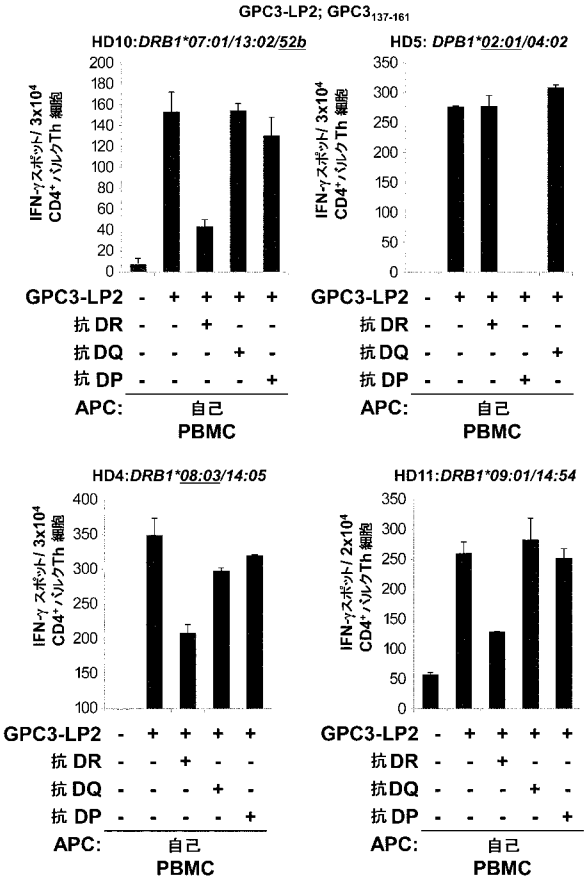
【０２５７】

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。

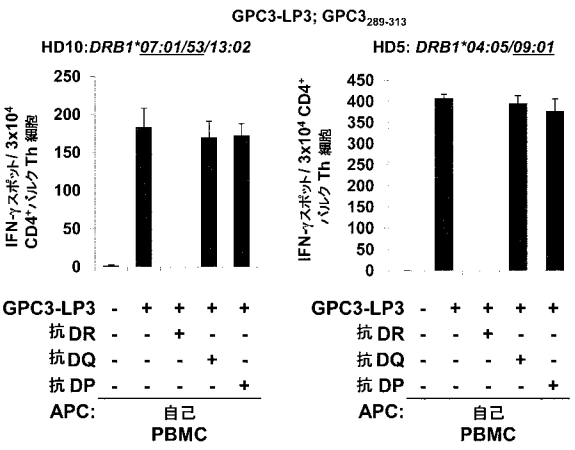
【図１Ａ】



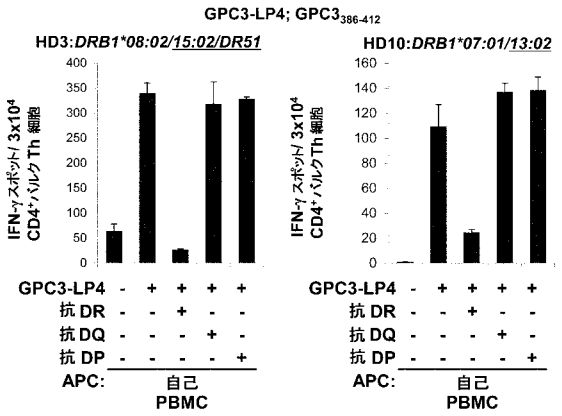
【図１Ｂ】



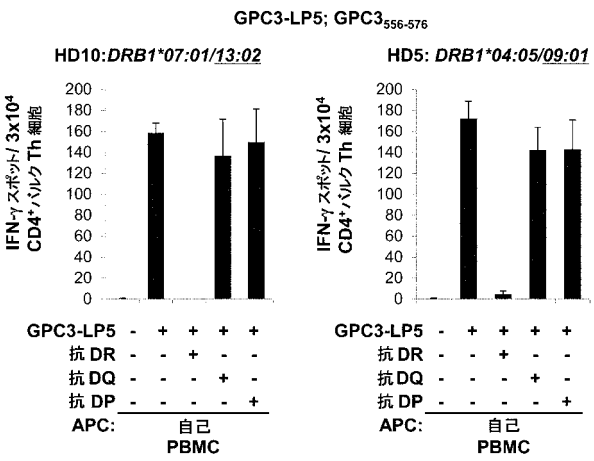
【図１Ｃ】



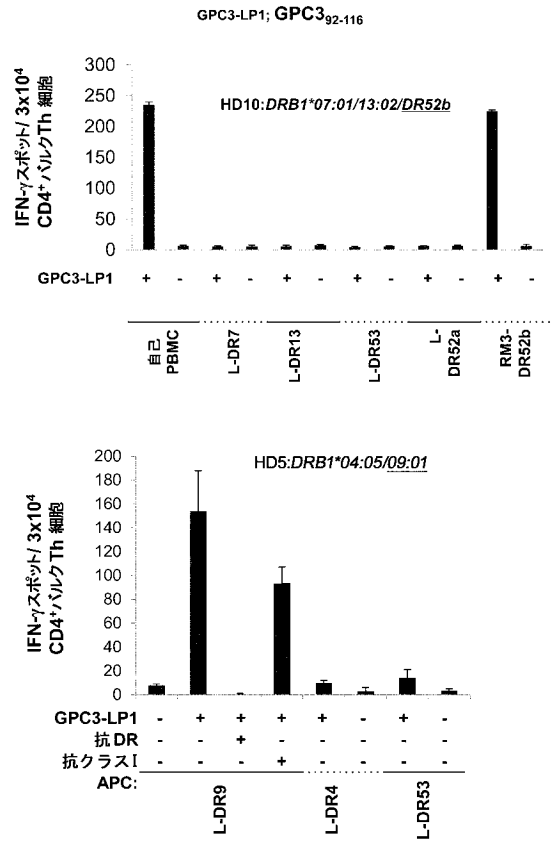
【図１Ｄ】



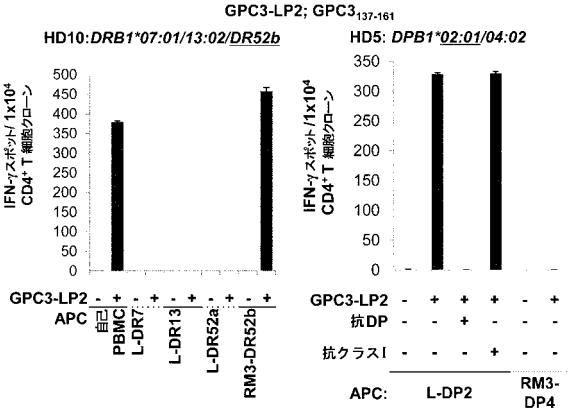
【図１Ｅ】



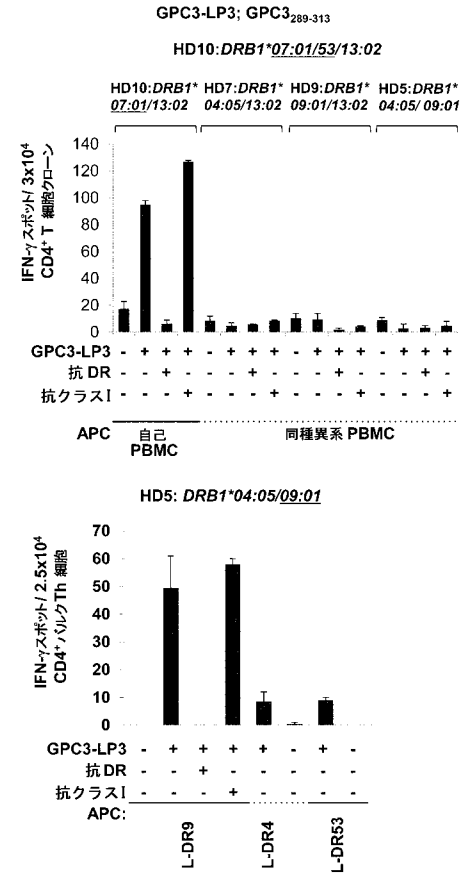
【図２Ａ】



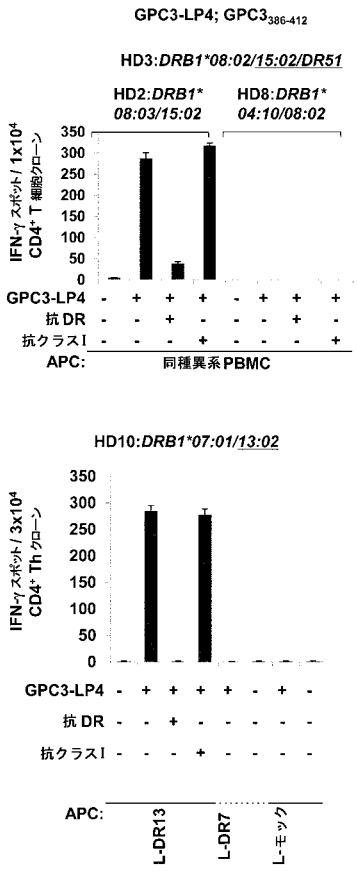
【図２Ｂ】



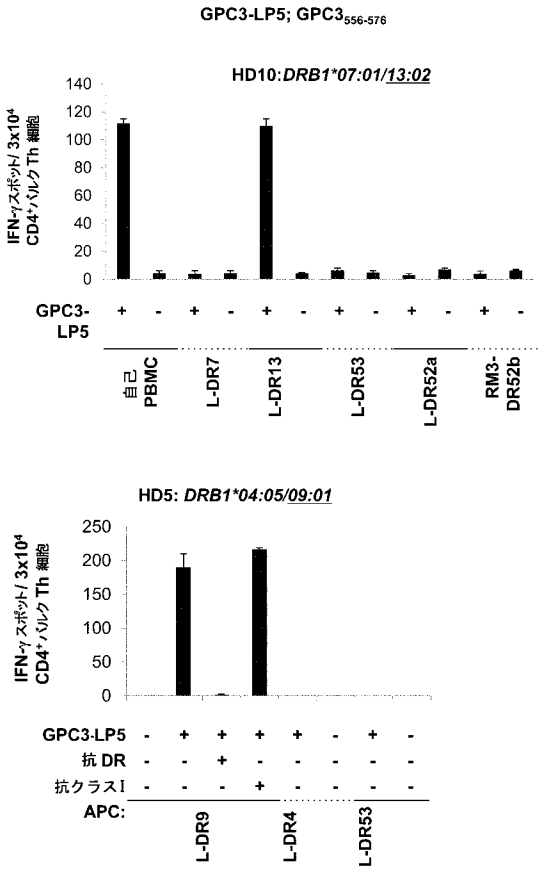
【図２Ｃ】



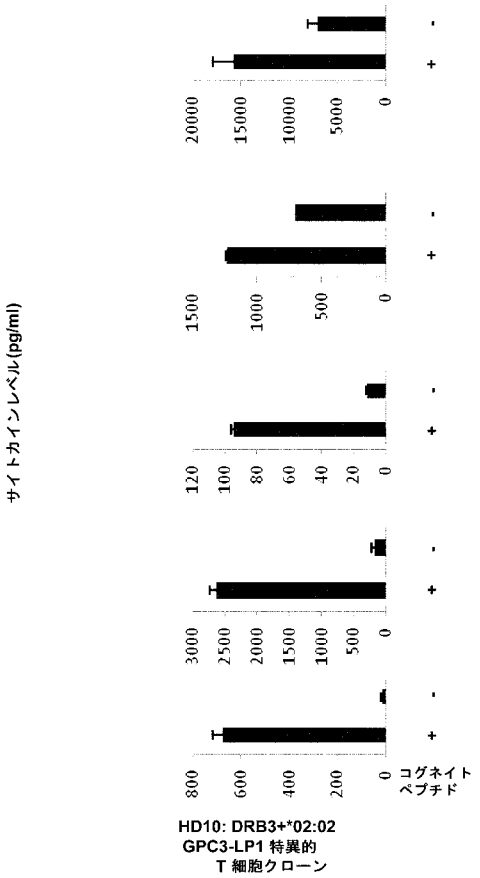
【図２Ｄ】



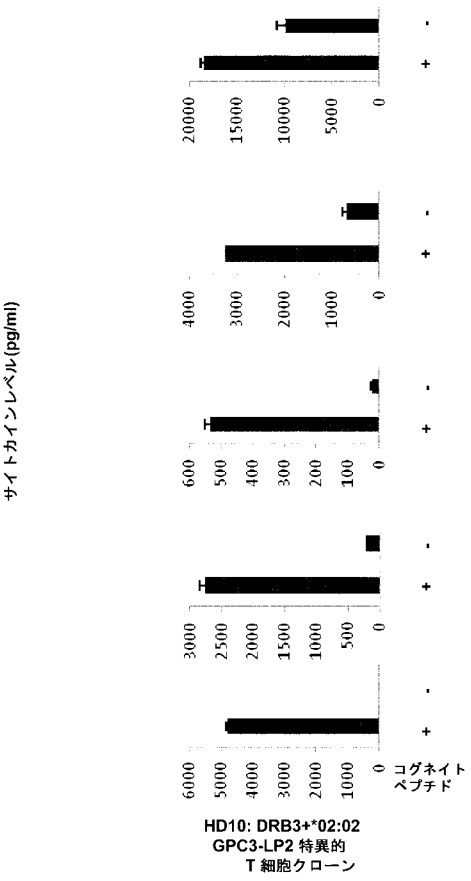
【図２Ｅ】



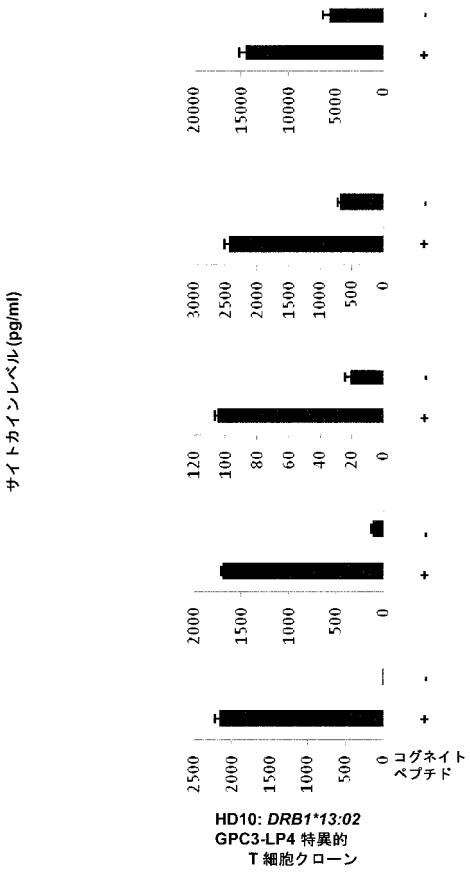
【図３Ａ】



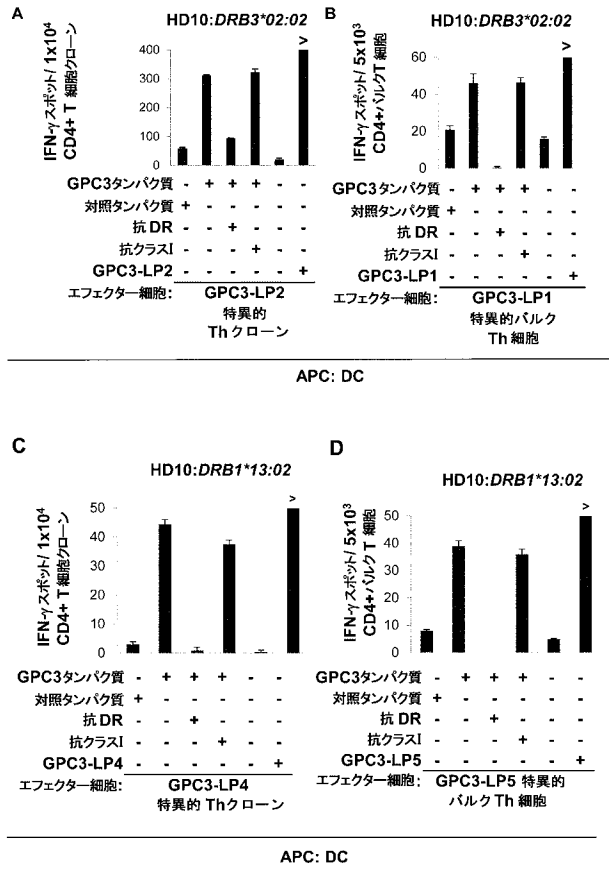
【図３Ｂ】



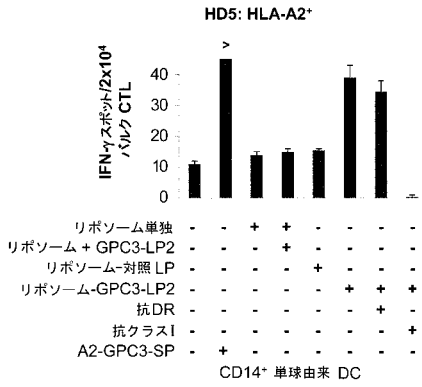
【図３Ｃ】



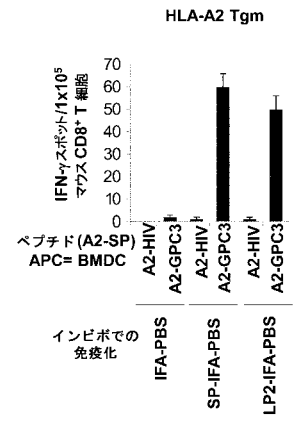
【図４】



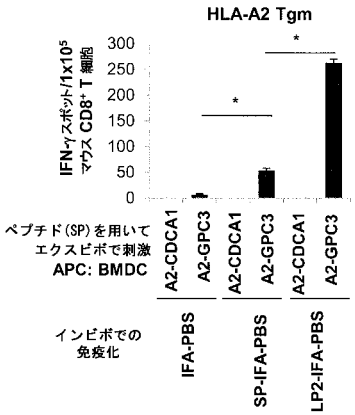
【図５Ａ】



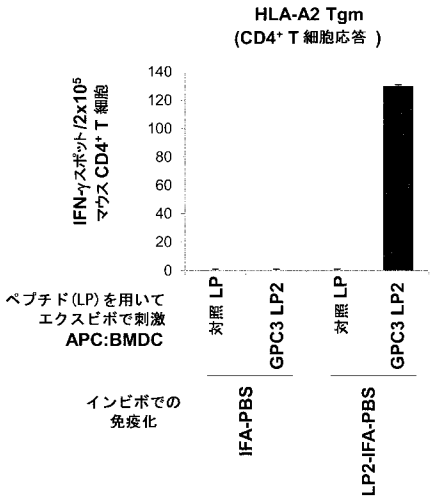
【図５Ｂ】



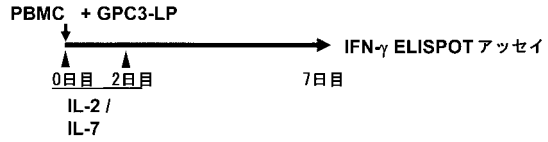
【図５Ｃ】



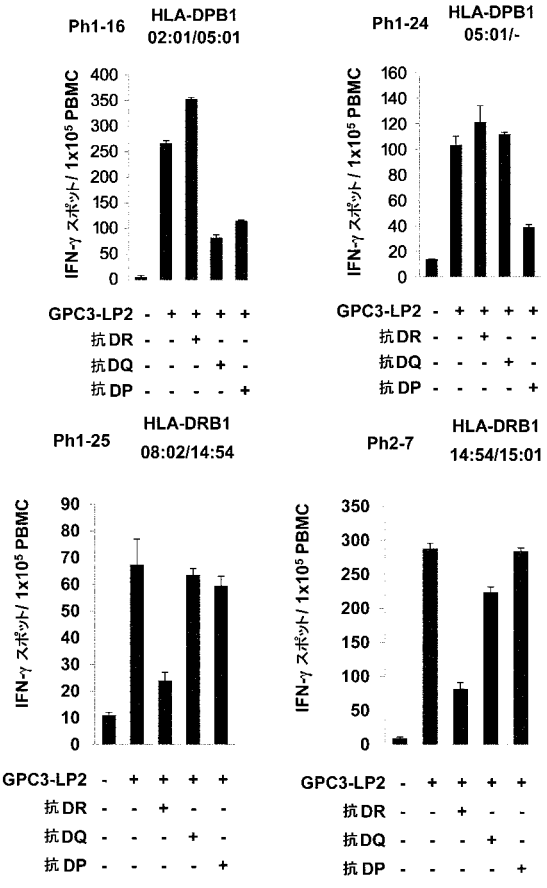
【図５Ｄ】



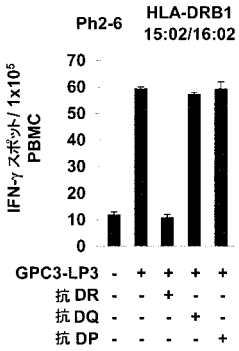
【図６Ａ】



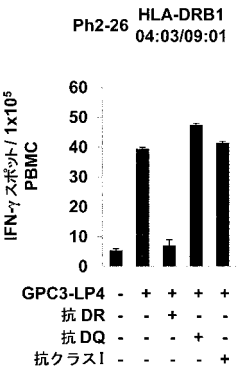
【図６Ｂ】



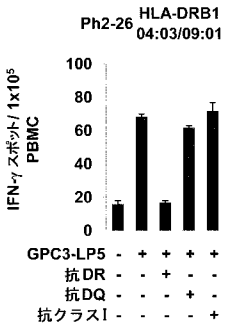
【図６Ｃ】



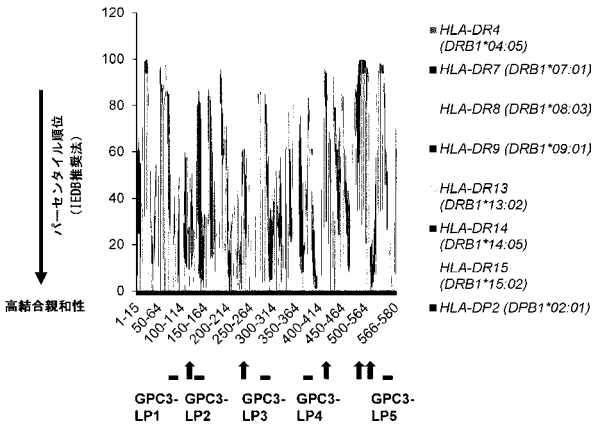
【図６Ｄ】



【図６Ｅ】



【図７Ａ】



【図７Ｂ】

GPC3-LP1, GPC3$_{92-116}$: LLQSASMELKFLIIQNAAVFQEAFE （配列番号：1）

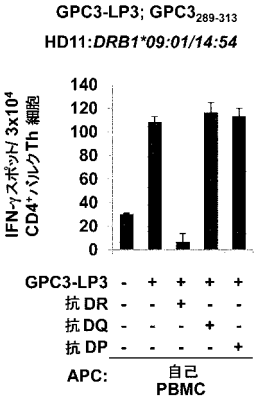
GPC3-LP2, GPC3$_{137-161}$: LTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDI （配列番号：2）
A2-GPC3$_{144-152}$

GPC3-LP3, GPC3$_{289-313}$: VVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRI （配列番号：3）
A24-GPC3$_{298-306}$

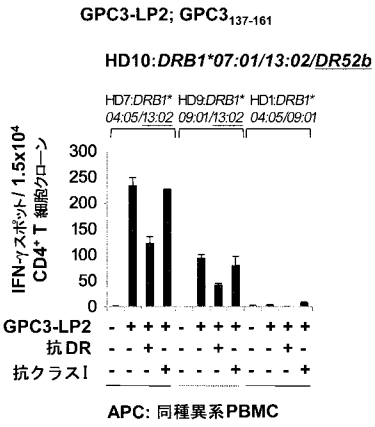
GPC3-LP4, GPC3$_{386-412}$: SRRRELIQKLKSFISFYSALPGYICSH （配列番号：4）

GPC3-LP5, GPC3$_{556-576}$: GNVHSPLKLLTSMAISVVCFF （配列番号：5）

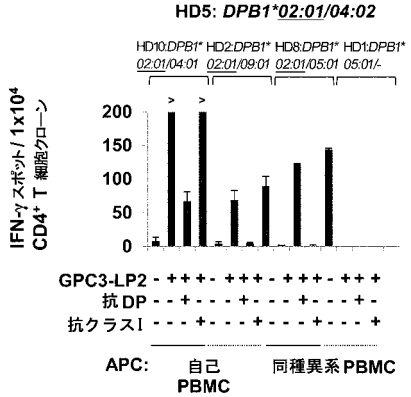
【図８Ａ】



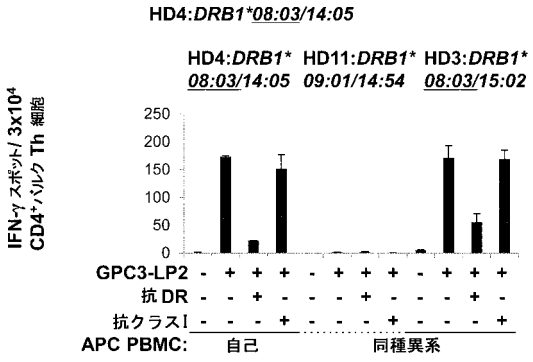
【図８Ｂ】



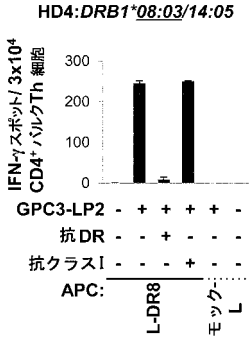
【図８Ｃ】



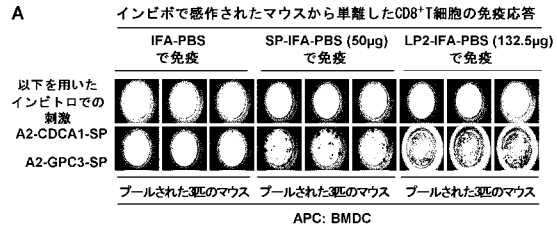
【図８Ｄ】

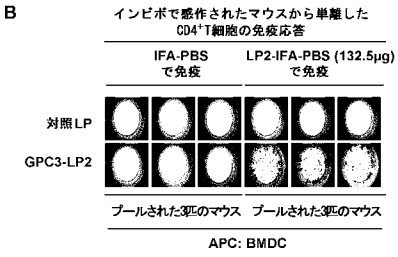


【図８Ｅ】

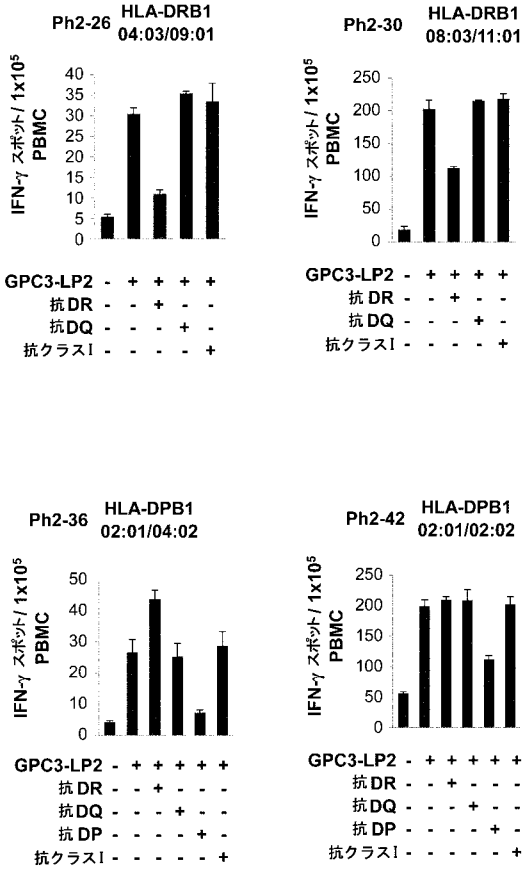


【図９】

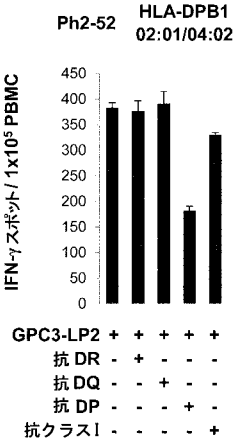




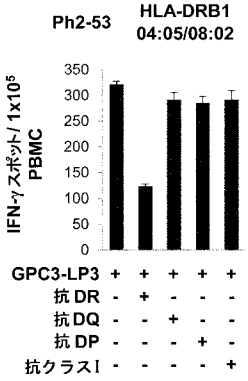
【図１０Ａ－１】



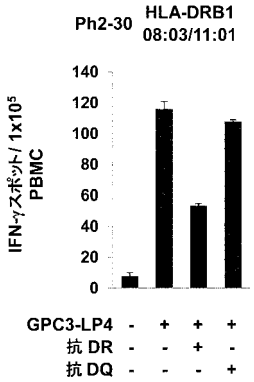
【図１０Ａ－２】



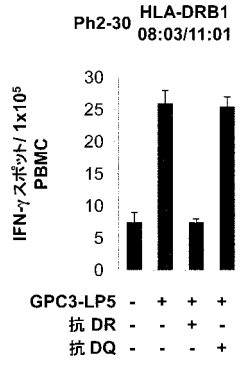
【図１０Ｂ】



【図１０Ｃ】



【図１０Ｄ】



【配列表】
2018508181000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/006029

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. C07K7/06, A61K31/7088, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/68

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 1971-2016
Registered utility model specifications of Japan 1996-2016
Published registered utility model applications of Japan 1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAWADA Y. et al., Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival., Clinical Cancer Research, 2012, vol.18, no.13, pp.3686-3696, p.3687 left column	1-25
Y	WO 2009/069302 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.06.04, Abstract, Claims & JP 2011-504875 A & US 2011/0052614 A1 & EP 2247725 A1	1-25

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17.02.2016	01.03.2016

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	FUKUMA Nobuko 4N 3539 Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/006029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/126413 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2008.10.23, Abstract, Claims & JP 2010-523471 A & JP 5320544 B & US 2012/0093843 A1 & EP 2155872 A1	1-25
Y	WO 2011/125334 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011.10.13, Abstract, Claims & JP 2013-523084 A & US 2013/0108664 A1 & EP 2556084 A1	1-25
A	WO 2014/097648 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2014.06.26, & US 2015/0285806 A1 & EP 2937697 A1	1-25
A	WO 2004/018667 A1 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) 2004.03.04, & AU 2003254950 A & TW 200413406 A	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/006029

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K7/06(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21		4H045
C07K 16/00	*(2006.01)*	C07K	16/00		
C12Q 1/68	*(2018.01)*	C12Q	1/68	A	
C07K 14/47	*(2006.01)*	C07K	14/47		
A61K 39/00	*(2006.01)*	A61K	39/00	H	
A61K 35/17	*(2015.01)*	A61K	35/17	Z	
A61K 35/15	*(2015.01)*	A61K	35/15	Z	
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00		
G01N 33/15	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	

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

(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 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(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 冨田 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) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR32 QR35 QR42
QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
4B065 AA94X AA99Y AB01 AC14 BA02 BA03 CA24 CA45
4C084 AA13 NA14 ZB261
4C085 AA03 BA01 EE01 EE03
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 BA18 CA41 DA76 DA86 EA22 EA28 FA33
FA74

专利名称(译)	用于Th1细胞的GPC3表位肽和含有它们的疫苗		
公开(公告)号	JP2018508181A	公开(公告)日	2018-03-29
申请号	JP2017518379	申请日	2015-12-04
[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 冨田雄介 大沢龍司		
发明人	西村 泰治 冨田 雄介 大沢 龍司		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/04 C12N5/10 C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C07K16/00 C12Q1/68 C07K14/47 A61K39/00 A61K35/17 A61K35/15 A61K48/00 A61P35/00 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/7088 A61K39/0011 A61P35/00 A61K48/00 C07K14/4725 C12N2510/00 C07K7/06 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/57492 G01N33/68 A61K2039/844 A61K2039/876 C12N15/09		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/04 C12N5/10 C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C07K16/00 C12Q1/68.A C07K14/47 A61K39/00.H A61K35/17.Z A61K35/15.Z A61K48/00 A61P35/00 G01N33/15.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA94X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA03 4C085/BA01 4C085/EE01 4C085/EE03 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB37 4C087/CA04 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA18 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA33 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 五十岚弘		
优先权	2014248759 2014-12-09 JP		
其他公开文献	JP2018508181A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了一种分离的能够诱导Th1细胞的GPC3衍生的表位肽。 此类肽可被II类MHC分子识别并诱导Th1细胞。 在一个优选的实施方案中，除Th1细胞外，本发明的此类肽能够混杂地结合II类MHC分子，并且能够诱导GPC3特异性细胞毒性T淋巴细胞（CTL）。 。 因此，这样的肽适合用于增强受试者的免疫应答，因此可以用于癌症免疫疗法，特别是作为癌症疫苗。 本文还公开了编码任何上述肽，由这些肽诱导的APC和Th1细胞的多核苷酸，以及与之相关的诱导方法。 包含任何以上成分作为活性成分的药物组合物例如用于治疗和/或预防包括肝细胞癌和黑素瘤的癌症或肿瘤。 [选择图]无

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-508181
(P2018-508181A)
(43)公表日　平成30年3月29日(2018.3.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B063
C07K 7/04	(2006.01)	C07K	7/04		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C084
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 80 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-518379(P2017-518379)
(86)(22)出願日　平成27年12月4日(2015.12.4)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月5日(2017.4.5)
(86)国際出願番号　PCT/JP2015/006029
(87)国際公開番号　WO2016/092787
(87)国際公開日　平成28年6月16日(2016.6.16)
(31)優先権主張番号　特願2014-248759(P2014-248759)
(32)優先日　平成26年12月9日(2014.12.9)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(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
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(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

(54)【発明の名称】ＴｈＬ細胞のためのＧＰＣ３エピトープペプチドおよびこれを含有するワクチン