

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-502499

(P2016-502499A)

(43) 公表日 平成28年1月28日(2016.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06	2G045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024
<b>C12N 15/00 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNA	4B063
<b>C12N 5/0783 (2010.01)</b>	C12N 5/00 2O2L	4B064
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 1O1	4B065
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-528112 (P2015-528112)	(71) 出願人	502240113 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成25年12月2日 (2013.12.2)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月23日 (2015.7.23)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/007051	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02014/087626	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成26年6月12日 (2014.6.12)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/733, 279	(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(32) 優先日	平成24年12月4日 (2012.12.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SEMA5Bペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【要約】

がんに対するペプチドワクチンを本明細書に記載する。特に、CTLを誘発し、したがってがん免疫療法との関連において使用するのに適している、SEMA5B遺伝子由来の単離されたエピトープペプチドを提供する。本発明のペプチドは、SEMA5B由来ペプチド、および、その改変型が元の配列の必要なCTL誘導能を保持するという条件で、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されているそのような改変型の両方を包含する。さらに、そのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、および有効剤として任意のそのようなペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を提供する。抗原提示細胞、およびそのようなペプチドを標的とした単離されたCTL、および該抗原提示細胞またはCTLを誘導するための方法もまた、提供する。さらに、本発明は、SEMA5Bに由来するペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくは該ペプチドを提示する抗原提示細胞、または本発明の薬学的組成物を使用して、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCのようながん(腫瘍)を治療および/もしくは予防(prophylaxis)(すなわち、予防(prevention))する、ならびに/またはその転移もしくは術後のその再発を予防するための方法、ならびにCTLを誘導するための方法、抗腫瘍免疫を誘導するための方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下の (a) または (b) のアミノ酸配列を含む、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能を有する、15 アミノ酸長未満の単離されたペプチド：

(a) 配列番号：41、2、3、4、8、9、10、13、20、40、47 および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号：41、2、3、4、8、9、10、13、20、40、47 および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1個、2個、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。

**【請求項 2】**

以下の特徴の一方または両方を有する、請求項 1 に記載のペプチド：

(a) N 末端から 2 番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンである；および

(b) C 末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

**【請求項 3】**

ノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項 1 または 2 に記載のペプチド。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 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 5】**

CTL を誘導するための組成物であって、以下からなる群より選択される少なくとも 1 種の有効成分を含む組成物：

(a) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド；

(b) 請求項 4 に記載のポリヌクレオチド；

(c) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示する、抗原提示細胞 (APC)；および

(d) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム。

**【請求項 6】**

がんの治療および/もしくは予防、ならびに/または術後のその再発の予防のための薬学的組成物であって、以下からなる群より選択される少なくとも 1 種の有効成分を含む薬学的組成物：

(a) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド；

(b) 請求項 4 に記載のポリヌクレオチド；

(c) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示する APC；

(d) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；および

(e) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドを提示する細胞を認識することができる CTL。

**【請求項 7】**

H LA 抗原が H LA - A 2 4 である対象への投与のために製剤化される、請求項 6 に記載の薬学的組成物。

**【請求項 8】**

以下からなる群より選択される段階を含む、CTL 誘導能を有する APC を誘導するための方法：

(a) APC を、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドと接触させる段階；および

(b) 請求項 1 ~ 3 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

10

20

30

40

50

A P C に導入する段階。

【請求項 9】

以下からなる群より選択される段階を含む、C T L を誘導するための方法：

( a ) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C と共培養する段階；

( b ) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエクソソームと共培養する段階；および

( c ) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドを、C D 8 陽性 T 細胞に導入する段階であって、該サブユニットによって形成される T C R は、細胞表面上の請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドと H L A 抗原との複合体に結合することができる、段階。

10

【請求項 10】

H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された A P C 。

【請求項 11】

請求項 8 に記載の方法によって誘導される、請求項 10 に記載の A P C 。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドを標的とする、単離された C T L 。

【請求項 13】

請求項 9 に記載の方法によって誘導される、請求項 12 に記載の C T L 。

20

【請求項 14】

がんに対する免疫応答を対象において誘導する方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を該対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 3 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活性断片。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 3 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。

30

【請求項 17】

請求項 16 に記載のベクターにより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 18】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 15 に記載の抗体もしくは免疫学的活性断片を含む、診断キット。

【請求項 19】

S E M A 5 B 由来の断片を提示する細胞に対する特異的細胞傷害活性を有する C T L を誘導する能力を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む、方法：

40

( i ) 配列番号：41、2、3、4、8、9、10、13、20、40、47 および 54 からなる群より選択される元のアミノ酸配列に対して 1 個、2 個、または数個のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入および / または付加することによって改変されたアミノ酸配列からなる候補配列を提供する段階；

( i i ) S E M A 5 B 以外のいかなる公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドとも実質的に有意な相同性を有さない候補配列を選択する段階；

( i i i ) 段階 ( i i ) において選択された前記候補配列からなるペプチドを抗原提示細胞と接触させる段階；

( i v ) 段階 ( i i i ) の前記抗原提示細胞を C D 8 陽性 T 細胞と接触させる段階；ならびに

50

(v) CTL誘導能が、前記元のアミノ酸配列からなるペプチドと同じであるかまたはそれよりも高いペプチドを特定する段階。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物科学の分野、より具体的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有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍の治療および/または予防のいずれかまたは両方のための薬物に関する。

【0002】

優先権

本出願は、2012年12月4日に提出された米国仮出願第61/733,279号の恩典を主張し、その全内容は参照によって本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

CD8陽性細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子に見出される腫瘍関連抗原(TAA)由来のエピトープペプチドを認識し、その後、腫瘍細胞を殺傷することが示されている。TAAの最初の例としてメラノーマ抗原(MAGE)ファミリーが発見されて以来、他の多くのTAAが、主として免疫学的アプローチによって発見されている(非特許文献1、非特許文献2)。これらのTAAのうちのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発の過程にある。

【0004】

好ましいTAAは、がん細胞の増殖および生存に不可欠なTAAである。そのようなTAAを免疫療法の標的として用いることにより、療法によって誘発さ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し得るがん細胞の免疫回避の詳細されているリスクが最小限に抑えられ得る。したがって、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し得る新規TAAの同定により、さらなる開発が保証される。それゆえに、様々な種類のがんに対するペプチドワクチン戦略の臨床応用が進行中である(非特許文献3~非特許文献10)。現在までに、これらのTAA由来ペプチドを用いた臨床試験がいくつか報告されている。残念ながら現在までに、これらのがんワクチンの治験においては低い客観的奏効率しか得られていない(非特許文献11~非特許文献13)。したがって、免疫療法の標的としての使用に適した新規TAAが依然として必要とされている。

【0005】

SEMA5Bは、神経発生中の軸索誘導に関わる分泌型および膜型タンパク質に分類されるセマフォリンタンパク質ファミリーのメンバーの1つである(非特許文献14)。最近の研究により、セマフォリンファミリータンパク質の機能が神経系だけではなく、器官形成、血管新生およびがんの発生にも関連していることが示唆された。

【0006】

23,040遺伝子からなるcDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析による腎細胞がん(RCC)の分子メカニズムを明らかにする過程で、SEMA5Bは、RCCにおいて高頻度で上方制御されていることが発見された。

【0007】

RCC患者由来のcDNAサンプルにおけるこの遺伝子のRT-PCR解析では、SEMA5BがRCCサンプルのすべてにおいて上方制御されていることが実証された。

その後の、SEMA5BのcDNA断片をプローブとして用いたノーザンブロット解析では、RCC組織では高発現したが、胎児脳と腎臓を除く正常ヒト組織においてはほとんど検出されなかったSEMA5B転写産物が明らかになった(特許文献1)。

さらに、RCC細胞株におけるsiRNAによるSEMA5Bのノックダウンは、RCC細胞の増殖を減衰させた(非特許文献15)。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

## 【0008】

【特許文献1】WO2007/013575

【非特許文献】

## 【0009】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【非特許文献14】O'Connor TP et al., Neural Dev. 2009, 23(4): 18

【非特許文献15】Hirota E. et al., Int J Oncol. 2006, 29(4): 799-827

【発明の概要】

## 【0010】

本発明は、免疫療法の適切な標的として役立つ可能性のある新規ペプチドの発見に少なくとも一部基づいている。TAAは一般に免疫系によって「自己」として認識され、そのため多くの場合は自然免疫原性を有しないため、適切な標的の発見は依然として重要である。本発明の過程において、SEMA5B（典型的アミノ酸配列は、配列番号：75、78または80に示す；典型的ヌクレオチド配列は、配列番号：74、76、77または79に示す（GenBankアクセッション番号NM\_001031702、NM\_001256346、NM\_001256347またはNM\_001256348））は、食道がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、腎細胞がん（RCC）および小細胞肺癌（SCLC）を例に含むがこれらに限定されないがんにおいて特異的に過剰発現されることが実証されている（表1）。したがって、本発明は、がん/腫瘍免疫療法の候補標的としてSEMA5Bに着目する。

## 【0011】

そのため、本発明は、少なくとも部分的には、SEMA5B由来のペプチドの中でSEMA5B特異的な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を誘導する能力を有する特異的エピト

10

20

30

40

50

ーペプチドの同定を対象としている。以下で詳述するように、健常ドナーから得られた末梢血単核細胞(PBMC)を、SEMA5B由来のHLA-A\*2402結合候補ペプチドを用いて刺激した。その後、各候補ペプチドをパルスしたHLA-A24陽性標的細胞に対する特異的細胞傷害性を有するCTL株を樹立した。本明細書の結果は、これらのペプチドが、SEMA5Bを発現する細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導することができるHLA-A24拘束性エピトープペプチドであることを実証している。これらの結果はさらに、SEMA5Bは免疫原性が強く、そのエピトープは、がん/腫瘍免疫療法の効果的な標的であることを示している。

**【0012】**

したがって、HLA抗原と結合することができ、かつSEMA5B(配列番号:75、78または80)由来のアミノ酸配列を含む単離されたペプチドを提供することは、本発明の1つの目的である。そのようなペプチドは、CTL誘導能を有すると予測され、それゆえインビトロもしくはエクスピボでCTLを誘導するために使用され得る、または、インビボでがん、その例には食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCが含まれるがこれらに限定されないがんに対する免疫応答を誘導するために対象に直接投与され得る。

10

**【0013】**

本発明のペプチドは、一般的に15、14、13、12、11または10アミノ酸長未満である。好ましいペプチドは、ノナペプチドおよびデカペプチドであり、より好ましくは、配列番号:2~69の中より選択されるアミノ酸配列を有するノナペプチドおよびデカペプチドである。これらのうち、配列番号:2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが特に好ましい。

20

**【0014】**

本発明はまた、得られる改変ペプチドが元の未改変ペプチドの必要なCTL誘導能およびHLA結合能を保持するという条件で、配列番号:2~69の中より選択されるアミノ酸配列において、1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列を有する改変ペプチドも企図する。

**【0015】**

1つの態様において、元のペプチドが9mer(例えば、配列番号:2、3、4、8、9、10、13および20のうちの1つ)の場合、改変ペプチドのサイズは、好ましくは9~40アミノ酸の範囲、例えば9~20アミノ酸の範囲、例えば9~15アミノ酸の範囲である。同様に、元のペプチドが10mer(例えば、配列番号:40、41、47および54のうちの1つ)の場合、改変ペプチドのサイズは、好ましくは10~40アミノ酸の範囲、例えば10~20アミノ酸の範囲、例えば10~15アミノ酸の範囲である。

30

**【0016】**

本発明はさらに、本発明のペプチドのいずれか1種をコードする単離されたポリヌクレオチドを包含する。これらのポリヌクレオチドは、CTL誘導能を有する抗原提示細胞(APC)を誘導または調製するために使用され得る。本発明のペプチドと同様に、そのようなAPCはがんに対する免疫応答を誘導するために対象に投与され得る。

**【0017】**

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、各ペプチドを標的とするCTLを誘導するように、APCの表面上に提示され得る。したがって、本発明の1つの目的は、本発明の1種もしくは複数種のペプチドもしくはそのようなペプチドをコードする1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む剤または組成物を提供することである。剤または組成物はCTLを誘導するために使用され得る。そのような剤または組成物は、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/またはその転移もしくは術後のその再発の予防に用いることができる。本発明によって企図される標的となるがんの例には、限定されないが、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCが含まれる。

40

**【0018】**

本発明はさらに、本発明の1種または複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む

50

、薬学的組成物または薬学的剤を企図する。薬学的組成物または薬学的剤は、がん、さらに好ましくは、原発性がんの治療および/もしくは予防、ならびに/またはその転移もしくは術後のその再発の予防における使用のために好ましくは製剤化される。本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの代わりにまたはそれに加えて、本発明の薬学的剤または薬学的組成物は、本発明のペプチドのいずれかを提示するAPCまたはエクソソームを有効成分として含み得る。

【0019】

本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドは、例えば、対象由来のAPCを本発明のペプチドと接触させるか、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APCに導入することにより、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示するAPCを誘導するために用いることができる。そのようなAPCは、標的ペプチドをその表面上に提示する細胞を特異的に認識するCTLを誘導する能力を有し、がん免疫療法に有用である。したがって、本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための方法、ならびにそのような方法によって得られるAPCを包含する。

加えて、本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための剤または組成物を包含し、そのような剤または組成物は、本発明のいずれかのペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

【0020】

CTLを誘導するための方法を提供することは本発明のさらなる目的であり、そのような方法は、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエクソソームと共培養する段階、またはT細胞受容体(TCR)サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドもしくはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドを導入する段階であって、該TCRは、細胞表面上に提示された本発明のペプチドとHLA抗原との複合体に結合することができる、段階を含む。そのような方法によって得られるCTLは、食道がん、NSCLC、RCC、およびSCLCを例に含むがこれらに限定されないがんの治療および/または予防において用いられ得る。したがって、本発明は、CTLを誘導するための方法、およびそのような方法によって得られたCTLの両方を包含する。

HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示する単離されたAPCを提供することは、本発明のさらに別の目的である。本発明はさらに、本発明のペプチドを標的とする単離されたCTLを提供する。そのようなCTLはまた、細胞表面上の本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識する(または、に結合する)ことができるCTLとしても定義され得る。これらのAPCおよびCTLは、がん免疫療法に用いることができる。

【0021】

必要とする対象において、がんに対する免疫応答を誘導するための方法を提供することは、本発明のさらに別の目的であり、そのような方法は、(a)本発明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、(b)そのようなペプチドを提示するAPCまたはエクソソーム、および(c)本発明のペプチドを自身の表面上に提示するそのような細胞を認識することができるCTLの中から選択される少なくとも1つの成分を含む剤または組成物を対象に投与する段階を含む。

【0022】

本発明の1つの局面は、医薬として使用するための、本発明のペプチド、そのようなペプチドを含む剤または組成物に関する。

本発明の適用性は、これらに限定はされないが、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCを例に含むがんのような、SEMA5Bの過剰発現に関連する、またはSEMA5Bの過剰発現から生じる多数の疾患のいずれにも及ぶ。

【0023】

さらに具体的には、本発明は以下を提供する：

10

20

30

40

50

[ 1 ] 以下の ( a ) または ( b ) のアミノ酸配列を含む、細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 誘導能を有する、単離されたペプチド :

( a ) S E M A 5 B の免疫学的活性断片のアミノ酸配列 ;

( b ) S E M A 5 B の免疫学的活性断片のアミノ酸配列において、1 個、2 個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、

該ペプチドによって誘導される C T L は、S E M A 5 B 由来の断片を提示する細胞に対して特異的な細胞傷害活性を有する ;

[ 2 ] 以下の ( a ) または ( b ) のアミノ酸配列を含む、[ 1 ] に記載のペプチド :

( a ) 配列番号 : 2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47 および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列 ;

( b ) 配列番号 : 2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47 および 54 からなる群より選択されるアミノ酸配列において 1 個、2 個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アミノ酸配列 ;

[ 3 ] 以下の特徴の一方または両方を有する [ 2 ] に記載のペプチド :

( a ) N 末端から 2 番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンもしくはトリプトファンである ; および

( b ) C 末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンもしくはメチオニンである ;

[ 4 ] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[ 1 ] から [ 3 ] のいずれか一項に記載のペプチド ;

[ 5 ] [ 1 ] から [ 4 ] 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 ;

[ 6 ] 以下からなる群より選択される少なくとも 1 種の有効成分を含む、C T L を誘導するための組成物 :

( a ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチド ;

( b ) [ 5 ] に記載のポリヌクレオチド ;

( c ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示する抗原提示細胞 ( A P C ) ; および

( d ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム ;

[ 7 ] がんの治療および / もしくは予防、ならびに / または術後のその再発の予防、あるいは上記のがんに対する免疫応答の誘導のための薬学的組成物であって、以下からなる群より選択される少なくとも 1 種の有効成分を含む、薬学的組成物 :

( a ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチド ;

( b ) [ 5 ] に記載のポリヌクレオチド ;

( c ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示する A P C ;

( d ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム ; および

( e ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを提示する細胞を認識することができる C T L ;

[ 8 ] H L A 抗原が H L A - A 2 4 である対象に投与するために製剤化される、[ 7 ] に記載の薬学的組成物 ;

[ 9 ] 以下からなる群より選択される段階を含む、C T L 誘導能を有する A P C を誘導するための方法 :

( a ) A P C を、[ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドと接触させる段階 ; および

( b ) [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階 ;

[ 10 ] 以下からなる群より選択される段階を含む、C T L を誘導するための方法 :

10

20

30

40

50

( a ) C D 8 陽性 T 細胞を、 H L A 抗原と [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C と共培養する段階；

( b ) C D 8 陽性 T 細胞を、 H L A 抗原と [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエクソソームと共培養する段階；および

( c ) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドを、 C D 8 陽性 T 細胞に導入する段階であって、該サブユニットによって形成される T C R は、細胞表面上の [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドと H L A 抗原との複合体に結合することができる、段階；

[ 1 1 ] H L A 抗原と [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された A P C ；

[ 1 2 ] [ 9 ] に記載の方法によって誘導される、 [ 1 1 ] に記載の A P C ；

[ 1 3 ] [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを標的とする、単離された C T L ；

[ 1 4 ] [ 1 0 ] に記載の方法によって誘導される、 [ 1 3 ] に記載の C T L ；

[ 1 5 ] がんに対する免疫応答を対象において誘導する方法であって、 [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を該対象に投与する段階を含む、方法；

[ 1 6 ] [ 1 ] から [ 4 ] 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活性断片；

[ 1 7 ] [ 1 ] から [ 4 ] 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；

[ 1 8 ] [ 1 7 ] に記載のベクターにより形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞；

[ 1 9 ] [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチド、 [ 5 ] に記載のポリヌクレオチド、または [ 1 6 ] に記載の抗体もしくは免疫学的活性断片を含む、診断キット；

[ 2 0 ] S E M A 5 B 由来の断片を提示する細胞に対する特異的細胞傷害活性を有する C T L を誘導する能力を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法；

( i ) 配列番号： 2、 3、 4、 8、 9、 1 0、 1 3、 2 0、 4 0、 4 1、 4 7 および 5 4 からなる群より選択される元のアミノ酸配列に対して 1 個、 2 個または数個のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入および / または付加することによって改変されたアミノ酸配列からなる候補配列を提供する段階；

( i i ) S E M A 5 B 以外のいかなる公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドとも実質的に有意な相同性を有さない候補配列を選択する段階；

( i i i ) 段階 ( i i ) において選択された前記候補配列からなるペプチドを抗原提示細胞と接触させる段階；

( i v ) 段階 ( i i i ) の前記抗原提示細胞を C D 8 陽性 T 細胞と接触させる段階；ならびに

( v ) C T L 誘導能が、前記元のアミノ酸配列からなるペプチドと同じであるかまたはそれよりも高いペプチドを特定する段階；

[ 2 1 ] [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチドを含む薬学的組成物；

[ 2 2 ] 医薬として使用するための [ 1 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載のペプチド；ならびに

[ 2 3 ] 医薬として使用するための [ 5 ] に記載のポリヌクレオチドまたは [ 1 7 ] に記載のベクター。

#### 【 0 0 2 4 】

あるいは、別の態様において、本発明はまた、以下のペプチドおよびその使用方法を提供する。

[ 1 ] 以下の ( a ) または ( b ) のアミノ酸配列を含む、細胞傷害性 T リンパ球 ( C T

10

20

30

40

50

L) 誘導能を有する、15アミノ酸長未満の単離されたペプチド：

(a) 配列番号：41、2、3、4、8、9、10、13、20、40、47および54からなる群から選択されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号：41、2、3、4、8、9、10、13、20、40、47および54からなる群から選択されるアミノ酸配列において、1個、2個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。

[2] 以下の特徴の一方または両方を有する[1]に記載のペプチド：

(a) N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンである；および

(b) C末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである；

[3] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1]または[2]に記載のペプチド。

【0025】

本発明のその他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことによって、より十分に明らかになるであろう。前述の発明の概要および以下の詳細な説明はいずれ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。

【0026】

特に、本発明をいくつかの特定の態様を参照して本明細書において説明するが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが理解されよう。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明のその他の目的、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になり、当業者には容易に明白になるであろう。そのような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図面、およびそれらから引き出されるあらゆる妥当な推論と併せて上記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

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ならびに本発明の詳細な説明およびその好ましい態様を考慮することで、当業者に明白となるであろう。

【0028】

【図1-1】図1は、SEMA5B由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるインターフェロン(IFN) - 酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイの結果を示す、一連の写真(a)~(m)から構成される。SEMA5B-A24-9-512(配列番号：2)で誘導されたウェル番号#7(a)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号：3)で誘導されたウェル番号#3(b)、SEMA5B-A24-9-196(配列番号：4)で誘導されたウェル番号#3(c)、SEMA5B-A24-9-723(配列番号：8)で誘導されたウェル番号#4(d)、SEMA5B-A24-9-280(配列番号：9)で誘導されたウェル番号#5(e)、およびSEMA5B-A24-9-293(配列番号：10)で誘導されたウェル番号#3(f)におけるCTLはそれぞれ、対照と比較して強力なIFN - 産生を示した。これらの写真のウェル上の四角は、対応するウェルからの細胞を、CTL株を樹立するために増殖させたことを示す。対照的に、典型的な陰性データとして、SEMA5B-A24-9-247(配列番号：1)で刺激したCTLからは、特異的IFN - 産生は観察されなかった(m)。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN - 産生を示す。

【0029】

【図1-2】図1は、SEMA5B由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるイン

10

20

30

40

50

ターフェロン (IFN) - 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイの結果を示す、一連の写真 (a) ~ (m) から構成される。SEMA5B - A24 - 9 - 470 (配列番号: 13) で誘導されたウェル番号 # 6 (g)、SEMA5B - A24 - 9 - 558 (配列番号: 20) で誘導されたウェル番号 # 3 (h)、SEMA5B - A24 - 10 - 354 (配列番号: 40) で誘導されたウェル番号 # 4 (i)、SEMA5B - A24 - 10 - 290 (配列番号: 41) で誘導されたウェル番号 # 6 (j)、SEMA5B - A24 - 10 - 1044 (配列番号: 47) で誘導されたウェル番号 # 5 (k) および SEMA5B - A24 - 10 - 489 (配列番号: 54) で誘導されたウェル番号 # 4 (l) における CTL はそれぞれ、対照と比較して強力な IFN - 産生を示した。これらの写真のウェル上の四角は、対応するウェルからの細胞を、CTL 株を樹立するために増殖させたことを示す。対照的に、典型的な陰性データとして、SEMA5B - A24 - 9 - 247 (配列番号: 1) で刺激した CTL からは、特異的 IFN - 産生は観察されなかった (m)。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する IFN - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する IFN - 産生を示す。

10

#### 【0030】

【図2】図2は、SEMA5B - A24 - 9 - 512 (配列番号: 2) (a)、SEMA5B - A24 - 9 - 1010 (配列番号: 3) (b)、SEMA5B - A24 - 9 - 293 (配列番号: 10) (c) および SEMA5B - A24 - 10 - 290 (配列番号: 41) (d) で刺激した CTL 株の IFN - 産生を示す、一連の折れ線グラフ (a) ~ (d) から構成される。CTL が産生した IFN - の量は IFN - 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって測定した。結果は、それぞれのペプチドの刺激によって樹立された CTL 株が、対照と比較して強力な IFN - 産生を示したことを実証する。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する IFN - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する IFN - 産生を示す。

20

#### 【0031】

【図3】図3は、SEMA5B - A24 - 9 - 512 (配列番号: 2) (a)、SEMA5B - A24 - 9 - 1010 (配列番号: 3) (b) および SEMA5B - A24 - 10 - 290 (配列番号: 41) (c) で刺激した CTL 株から限界希釈によって樹立された CTL クローンの IFN - 産生を示す、一連の折れ線グラフ (a) ~ (c) から構成される。結果は、それぞれのペプチドでの刺激によって樹立された CTL クローンが、対照と比較して強力な IFN - 産生を示したことを実証する。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する IFN - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する IFN - 産生を示す。

30

#### 【0032】

【図4】図4は、SEMA5B および HLA - A \* 2402 を発現する標的細胞に対する CTL クローンの特異的 CTL 活性を示す折れ線グラフである。HLA - A \* 2402 または全長 SEMA5B 遺伝子をトランスフェクトした COS7 細胞を対照として調製した。SEMA5B - A24 - 10 - 290 (配列番号: 41) を用いて樹立された CTL クローンは、SEMA5B および HLA - A \* 2402 の両方をトランスフェクトした COS7 細胞に対して特異的 CTL 活性を示した (菱形)。一方、HLA - A \* 2402 (三角) または SEMA5B (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対しては、有意な特異的 CTL 活性は検出されなかった。

40

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0033】

##### 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のまたは同等のいかなる方法および材料も用いることができるが、好ましい方法、装置、および材料をここに記載する。しかしながら、本発明の材料および方法を記載する前に、これらの記載が説明のものにすぎず、限定されるものではないことが理解されるべきで

50

ある。本明細書に記載の特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコー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も理解されるべきである。さらに、本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図しない。

本明細書において言及される各出版物、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入れられる。しかしながら、本明細書中のいかなるものも、本発明が先行発明によりそのような開示に先行する権利を与えられないと承認するものとしては解釈されるべきではない。

#### 【0034】

別段の定めのない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている用語と同じ意味を有する。矛盾する場合には、定義を含め、本明細書が優先される。加えて、材料、方法、および例は、単に例証するためのものであり、限定することは意図しない。

#### 【0035】

##### I. 定義

本明細書で用いる「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単語は、特に別段の指定のない限り「少なくとも1つ」を意味する。

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、該物質が、そうでなければ天然源中に含まれ得る少なくとも1種の物質を実質的に含まないことを示す。したがって、単離または精製されたペプチドは、細胞材料、例えば糖質、脂質、またはペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの他の混入タンパク質を実質的に含まないかまたは化学合成される場合には化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。

#### 【0036】

「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、それが単離された細胞または組換え産生された細胞の細胞成分から分離されたペプチドの調製物を含む。したがって、細胞材料を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%、または5%(乾燥重量ベースで)未満の異種タンパク質(本明細書において「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含む。ペプチドを組換え産生する場合、ペプチドは、好ましくは、培養培地も実質的に含まず、培養培地をペプチド調製物の容量の約20%、10%、または5%未満で有するペプチドの調製物を含む。ペプチドを化学合成によって生成する場合、ペプチドは、好ましくは、化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、ペプチドの合成に關与する化学物質前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容量の約30%、20%、10%、5%(乾燥重量ベースで)未満で有するペプチドの調製物を含む。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およびゲルのクーマシーブリリアントブルー染色等の後の単一バンドの出現によって示すことができる。好ましい態様において、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る。

#### 【0037】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。本用語は、1個もしくは複数個のアミノ酸残基が修飾された残基であり得るか、または対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基であり得るアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーに適用される。

#### 【0038】

本明細書で用いる「オリゴペプチド」という用語は、20アミノ酸残基またはそれ未満、典型的には15アミノ酸残基またはそれ未満のアミノ酸残基から構成されるペプチドを指す。本明細書において「ノナペプチド」という用語は9アミノ酸残基から構成されるペ

10

20

30

40

50

プチドを指し、「デカペプチド」という用語は10アミノ酸残基から構成されるペプチドを指す。

【0039】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸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。アミノ酸は、L-アミノ酸またはD-アミノ酸のいずれでもよい。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、および細胞内で翻訳後に修飾されたアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基に結合した炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格を有する化合物（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、メチオニンメチルスルホニウム）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、同様の機能を有する化合物を指す。

10

アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)の推奨する、一般に公知の3文字表記または1文字表記で記載されてもよい。

【0040】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、特に別段の指定のない限り、一般に受け入れられている1文字コードで記載される。

20

「剤」および「組成物」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、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み合わせから直接または間接的に生じる任意の生成物を指す。そのような用語は、修飾語「薬学的」（「薬学的剤」および「薬学的組成物」におけるように）に関連して使用される場合には、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、ならびに任意の2つもしくはそれ以上の成分の組み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、1つもしくは複数の成分の解離から、または1つもしくは複数の成分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る。したがって、本発明との関連において、「薬学的剤」および「薬学的組成物」という用語は、本発明の分子または化合物と薬学的または生理学的に許容される担体を混合することによって生成された任意の生成物を指す。

30

【0041】

本明細書における「有効成分」という用語は、生物学的活性または生理的活性のある、剤または組成物中の物質を指す。特に、薬学的な剤または組成物との関連において、「有効成分」という用語は、目的の薬理学的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用いるための薬学的な剤または組成物の場合、剤または組成物中の有効成分は、がん細胞および/または組織に対して直接的または間接的に、少なくとも1つの生物学的作用または生理的作用をもたらす。好ましくは、そのような作用には、がん細胞増殖を減少させることまたは阻害すること、がん細胞および/またはがん組織を損傷または殺傷することなどが含まれ得る。典型的には、有効成分の間接的効果は、がん細胞を認識または殺傷することができるCTLの誘導である。製剤化される前には、「有効成分」は「バルク」、「原薬」、または「原体」とも称することができる。

40

【0042】

本明細書で使用する「薬学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、液体または固体増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、および封入材料を含むがこれらに限定されない、薬学的または生理学的に許容される材料、組成物、物質または媒体を意味する。

【0043】

本発明のいくつかの薬学的な剤または組成物は、特にワクチンとして用いられる。本発明との関連において、「ワクチン」（「免疫原性組成物」とも称される）という用語は、動物に接種した際に抗腫瘍免疫を改善、増強および/または誘導する機能を有する剤また

50

は組成物を指す。

【0044】

別段の定めのない限り、「がん」という用語は、SEMA5B遺伝子を過剰発現するがんまたは腫瘍を指し、その例には、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCが含まれるが、これらに限定されない。

別段の定めのない限り、「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において互換的に用いられ、特に別段の指定のない限り、非自己細胞（例えば、腫瘍/がん細胞、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。

【0045】

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「HLA-A24」という用語は、その例には、HLA-A\*2401、HLA-A\*2402、HLA-A\*2403、HLA-A\*2404、HLA-A\*2407、HLA-A\*2408、HLA-A\*2420、HLA-A\*2425およびHLA-A\*2488が含まれるが、これらに限定されないサブタイプを指す。

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「キット」という用語は、試薬と他の材料との組み合わせに関して用いられる。本明細書では、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み合わせに限定されないことが意図される。

【0046】

対象または患者との関連において、本明細書で用いる「対象の（または患者の）HLA抗原はHLA-A24である」という語句は、対象または患者がHLA-A24抗原遺伝子をホモ接合的またはヘテロ接合的に保有し、HLA-A24抗原が対象または患者の細胞においてHLA抗原として発現していることを指す。

【0047】

本発明の方法および組成物ががんの「治療」との関連において有用である限り、治療が、対象におけるがんの大きさ、広がり、もしくは転移能の減少、生存期間の延長、転移の抑制または術後再発の抑制などの臨床的利点をもたらす場合に、治療は「有効である」と見なされる。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、がんの形成が遅延されるもしくは妨げられるか、またはがんの臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、特定の腫瘍の種類を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。

【0048】

本発明の方法および組成物ががんの「予防（preventionおよびprophylaxis）」との関連において有用である限り、そのような用語は本明細書において互換的に用いられ、疾患による死亡率または罹患率の負荷を軽減させる任意の働きを指す。予防（preventionおよびprophylaxis）は、「第一次、第二次、および第三次の予防レベル」で行われ得る。第一次の予防（preventionおよびprophylaxis）は疾患の発生を回避するのに対し、第二次および第三次レベルの予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患の進行および症状の出現を予防することに加え、機能を回復させ、かつ疾患関連の合併症を減少させることによって、既存の疾患の悪影響を低下させることを目的とした働きを包含する。あるいは、予防（preventionおよびprophylaxis）は、特定の障害の重症度を緩和すること、例えば腫瘍の増殖および転移を減少させることを目的とした広範囲の予防的療法を含み得る。

【0049】

本発明との関連において、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/またはその転移もしくは術後のその再発の予防は、がん細胞の外科的切除、がん性細胞の増殖の阻害、腫瘍の退行または退縮、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退縮、ならびに転移の低減または阻害、術後のがんの再発の抑制、ならびに生存期間の延長などの事象をもたら

10

20

30

40

50

すいかなる活動も含む。がんの効果的な治療および/または予防は、死亡率を減少させ、がんを有する個体の予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、かつがんに伴う検出可能な症状を緩和する。例えば、症状の軽減または改善は効果的な治療および/または予防を構成し、10%、20%、30%、もしくはそれ以上の軽減または安定した疾患を含む。

#### 【0050】

本発明との関連において、「抗体」という用語は、指定のタンパク質またはそのペプチドと特異的に反応する免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体には、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標識と融合させた抗体、および抗体断片が含まれ得る。さらに、本明細書において抗体は広義で 10  
使用され、具体的には完全なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの完全な抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を包含し、また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）を示す。

別段の定めのない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている用語と同じ意味を有する。

#### 【0051】

##### II. ペプチド

以下に詳細に記載する本発明のペプチドは、「SEMA5Bペプチド」または「SEMA5Bポリペプチド」と称される場合もある。 20

#### 【0052】

SEMA5B由来のペプチドがCTLによって認識される抗原として機能することを実証するために、SEMA5B（配列番号：75）由来のペプチドを解析して、それらが、一般に見られるHLAアリルであるHLA-A24（Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994）によって拘束される抗原エピトープであるかどうかを判定した。

SEMA5B由来のHLA-A24結合ペプチドの候補を、HLA-A24に対するこれらの結合親和性に基づいて同定した。以下の候補ペプチドを同定した：配列番号：2～ 30  
69。

#### 【0053】

上記のうち、下記のペプチドをパルスした（負荷した）樹状細胞（DC）によるT細胞のインピトロでの刺激後、これらのペプチドによりCTLの樹立に成功した：

SEMA5B-A24-9-512（配列番号：2）、SEMA5B-A24-9-1010（配列番号：3）、SEMA5B-A24-9-196（配列番号：4）、SEMA5B-A24-9-723（配列番号：8）、SEMA5B-A24-9-280（配列番号：9）、SEMA5B-A24-9-293（配列番号：10）、SEMA5B-A24-9-470（配列番号：13）、SEMA5B-A24-9-558（配列番号：20）、SEMA5B-A24-10-354（配列番号：40）、SEMA5B-A24-10-290（配列番号：41）、SEMA5B-A24-10-1044（配列番号：47）およびSEMA5B-A24-10-489（配列番号：54）。 40

#### 【0054】

上記に記載の樹立されたCTLは、各ペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な特異的CTL活性を示す。これらの結果は、SEMA5BがCTLによって認識される抗原であること、および上記のペプチドがHLA-A24によって拘束されるSEMA5Bのエピトープペプチドであることを実証している；したがってそのようなペプチドは、CTLによる細胞毒性のための標的抗原として効果的となり得る。

#### 【0055】

SEMA5B遺伝子は、例えば食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCを含むが 50

ん細胞およびがん組織において過剰発現され、ほとんどの正常器官においては発現されないため、免疫療法の優れた標的となる。したがって、本発明はS E M A 5 B由来のC T L認識エピトープに対応するノナペプチド(9個のアミノ酸残基から構成されるペプチド)およびデカペプチド(10個のアミノ酸残基から構成されるペプチド)を提供する。あるいは、本発明は、C T Lを誘導することができるペプチドであって、S E M A 5 Bの免疫学的活性断片から構成される、単離されたペプチドを提供する。いくつかの態様において、本発明は、配列番号: 2 ~ 69の中から選択されたアミノ酸配列を含むペプチドを提供し、さらに好ましいペプチドは、配列番号: 2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54の中から選択されたアミノ酸配列を含む。好ましい態様において、本発明のペプチドは、配列番号: 2 ~ 69の中から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号: 2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54の中から選択されるアミノ酸配列を含む、ノナペプチドあるいはデカペプチドである。本発明のペプチドの好ましい例として、配列番号: 2 ~ 69の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0056】

一般的に、例えば、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、Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75および、Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17に記載されるソフトウェアプログラムなどを用いて、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を、例えば、Parker KC et al., J Immunol 1994, 152(1): 163-75, Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81, Larsen MV et al., BMC Bioinformatics. 2007; 8: 424, Buus S et al., Tissue Antigens., 62: 378-84, 2003, Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17およびNielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796に記載されるように測定することができ、これらは、例えば、Lafuente E M et al., Current Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220に要約されている。結合親和性を求めるための方法が、例えば、Journal of Immunological Methods(1995, 185: 181-190)、および、Protein Science(2000, 9: 1838-1846)に記載される。したがって、当業者はそのようなソフトウェアプログラムを使用して、HLA抗原との高い結合親和性を有するS E M A 5 B由来のそのような断片を選択することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムによってHLA抗原と結合することが決定されるであろう、S E M A 5 B由来の任意の断片から構成されるペプチドを包含する。さらに、そのようなペプチドには、全長のS E M A 5 B配列からなるペプチドが含まれ得る。

#### 【0057】

本発明のペプチド、特に本発明のノナペプチドおよびデカペプチドは、結果として生じるペプチドがそのC T L誘導能を保持する限り、付加的なアミノ酸残基を隣接させることができる。具体的な付加的なアミノ酸残基は、それらが元のペプチドのC T L誘導能を損なわない限り、任意の種類のアミノ酸から構成され得る。したがって、本発明は、C T L誘導能を有するペプチド、特にS E M A 5 B由来のペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば、約40アミノ酸未満であり、多くの場合は約20アミノ酸未満であり、通常は約15アミノ酸未満である。

#### 【0058】

一般的に、ペプチドにおける1個、2個、数個、またはそれ以上のアミノ酸の改変はペプチドの機能に影響を及ぼさず、また、場合によっては元のペプチドの所望される機能を増強することさえあることが知られている。実際に、改変ペプチド(すなわち、元の参照

配列と比較して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が改変された（すなわち、置換、付加、欠失、および/または挿入された）アミノ酸配列から構成されるペプチド）が、元のペプチドの生物学的活性を保持することが知られている（Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10:6487-500; Dalbadié-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:6409-13）。したがって、1つの態様において、本発明のペプチドは、CTL誘導能を有し、かつ、1個、2個、またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加および/または置換されている配列番号：2～69の中より選択されるアミノ酸配列を有する。別の言い方をすれば、元のペプチドのCTL誘導能を改変ペプチドが保持するという条件で、本発明のペプチドは、CTL誘導能と、配列番号：2～69の中より選択されるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54からなる群より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、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との両方を有する。

#### 【0059】

当業者は、単一のアミノ酸またはアミノ酸配列全体のわずかな割合を変更する、アミノ酸配列に対する個々の改変（すなわち、欠失、挿入、付加および/または置換）が、元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であろう。したがって、これらは慣例的に「保存的置換」または「保存的改変」と称され、この場合、タンパク質の変化によって元のタンパク質と類似の機能を有するタンパク質が生じる。機能的に類似しているアミノ酸を提示する保存的置換の表は、当技術分野において周知である。保存することが望ましいアミノ酸側鎖の特性の例には、例えば、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）、ならびに、以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖が含まれる：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を含有する側鎖（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）。加えて、以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるとして当技術分野で認められているアミノ酸を含む：

- 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）、リジン（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）、スレオニン（T）；および
- 8) システイン（C）、メチオニン（M）（例えば、Creighton, Proteins 1984を参照されたい）。

#### 【0060】

このような保存的改変ペプチドもまた、本発明のペプチドとみなされる。しかしながら、本発明のペプチドはこれらに限定されず、得られた改変ペプチドが元の未改変ペプチドの必要なCTL誘導能を保持する限り、非保存的な改変を含み得る。さらに、改変ペプチドは、SEMA5Bの多型変異体、種間相同体、およびアリル由来のCTL誘導可能なペプチドを排除すべきではない。

#### 【0061】

より高い結合親和性を達成するために、本発明のペプチドに対してアミノ酸残基を挿入、置換および/または付加してもよく、あるいは本発明のペプチドからアミノ酸残基を欠失させてもよい。必要なCTL誘導能を保持するために、当業者は好ましくは少数の（例えば、1個、2個、または数個の）またはわずかな割合のアミノ酸のみを改変（すなわち

、欠失、挿入、付加および/または置換)する。本明細書において、「数個」という用語は、5個またはそれ未満のアミノ酸、例えば4個、3個、またはそれ未満を意味する。改変されるアミノ酸の割合は、例えば30%またはそれ未満、好ましくは20%またはそれ未満、より好ましくは15%またはそれ未満、さらにより好ましくは10%またはそれ未満、例えば1~5%であり得る。

#### 【0062】

がん免疫療法との関連で用いられる場合、本発明のペプチドは、HLA抗原との複合体として、細胞またはエクソソームの表面上に提示され得る。したがって、CTLを誘導するだけでなく、HLA抗原に対する高い結合親和性を保有するペプチドを選択することが好ましい。その目的のために、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て、HLA抗原に対する改善された結合親和性を有する改変ペプチドを得ることができる。天然に提示されるペプチドに加えて、HLA抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であることから(J Immunol 1994, 152:3913; Immunogenetics 1995, 41:178; J Immunol 1994, 155:4307)、そのような規則性に基づいた改変を本発明の免疫原性ペプチドに導入してもよい。

#### 【0063】

例えば、高いHLA-A24結合親和性を保有するペプチドは、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンで置換されたN末端から2番目のアミノ酸を有する傾向がある。同様に、C末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、またはメチオニンで置換されたペプチドも高いHLA-A24結合親和性を有する傾向がある。したがって、HLA-A24結合親和性を高めるためには、N末端から2番目のアミノ酸をフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンで置換すること、および/またはC末端のアミノ酸を、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、もしくはメチオニンで置換することが望ましい可能性がある。したがって、配列番号のアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニンもしくはトリプトファンで置換されている、および/または該配列番号のアミノ酸配列のC末端がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンもしくはメチオニンで置換されている、配列番号:2~69の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、本発明に包含される。同様に、本発明は、配列番号:2~69において1個、2個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を含むペプチドであって、(a)N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニンもしくはトリプトファンである;および(b)C末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンもしくはメチオニンである、との特徴の一方または両方を有するペプチドを包含する。好ましい態様において、本発明のペプチドは、配列番号:2~69のアミノ酸配列においてN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンで置換されている、および/またはC末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンもしくはメチオニンで置換されているアミノ酸配列を含む。

#### 【0064】

末端のアミノ酸においてだけでなく、ペプチドの潜在的なT細胞受容体(TCR)認識部位においても、置換を導入することができる。いくつかの研究は、例えばCAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)またはgp100(209-217)など、アミノ酸置換を有するペプチドが元のものと同等であるかまたはより優れている機能を有し得ることを実証している(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997; T.K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002); 168(3):1338-47., S.O. Dionne et al. Cancer Immunol Immunother. (2003) 52:199-206、およびS.O. Dionne et al. Ca

10

20

30

40

50

ncer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

【0065】

本発明はまた、1個、2個または数個のアミノ酸の付加を本発明のペプチドのN末端および/またはC末端に対する付加とし得ることも企図する。高いHLA抗原結合親和性を有しかつCTL誘導能を保持するそのような改変ペプチドもまた、本発明に含まれる。

【0066】

例えば、本発明は、CTL誘導能を有し、かつ以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む15、14、13、12、11、または10アミノ酸長未満の単離されたペプチドを提供する：

(i) 配列番号：2～39からなる群より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列；および

(ii) 以下の特徴の一方または両方を有する、(i)に記載のアミノ酸配列：

(a) 前記配列番号のN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(b) 前記配列番号のC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている。

【0067】

本発明はまた、CTL誘導能を有し、かつ以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む15、14、13、12、または11アミノ酸長未満の単離されたペプチドも提供する：

(i') 配列番号：40～69からなる群より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列；および

(ii') 以下の特徴の一方または両方を有する、(i')に記載のアミノ酸配列：

(a) 前記配列番号のN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(b) 前記配列番号のC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、またはそのアミノ酸であるように改変されている。

これらのペプチドは、これらのペプチドをAPCと接触させ、またはAPCに導入した場合、APCにおいてプロセッシングされてAPC上に(i)から(ii)および(i')から(ii')からなる群より選択されるペプチドが提示される。

【0068】

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、自己免疫障害および/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が誘発される可能性がある。したがって、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列と一致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相同性検索を行うことが好ましい場合がある。目的ペプチドと同一であるか、あるいは、目的ペプチドと比較して1個または2個のアミノ酸が異なるペプチドが自然界に存在しないことが相同性検索から明らかになった場合、該目的ペプチドは、そのような副作用の危険性を何ら伴うことなく、HLA抗原とのその結合親和性を増大させるために、および/または、そのCTL誘導能を増大させるために改変することができる。

【0069】

上記のようにHLA抗原に対する高い結合親和性を有するペプチドは、非常に効果的であると予測されるが、高い結合親和性の存在を指標として選択された候補ペプチドを、CTL誘導能の有無についてさらに調べる。本明細書において「CTL誘導能」という語句

10

20

30

40

50

は、抗原提示細胞（APC）上に提示された場合に、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を誘導するペプチドの能力を示す。さらに、「CTL誘導能」は、CTL活性化を誘導する、CTL増殖を誘導する、CTLによる標的細胞の溶解を促進する、およびCTLによるIFN- $\gamma$ 産生を増加させる、ペプチドの能力を含む。

【0070】

CTL誘導能の確認が、ヒトMHC抗原を保有するAPC（例えば、Bリンパ球、マクロファージおよび樹状細胞（DC））、またはより具体的にはヒト末梢血単核白血球に由来するDCを誘導し、APCを試験ペプチドで刺激した後、APCをCD8陽性T細胞と混合してCTLを誘導し、その後、標的細胞に対してCTLによって産生および放出されたIFN- $\gamma$ を測定することによって達成される。反応系として、ヒトHLA抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物（例えば、Ben Mohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auge C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000, 61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A\*0201/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) responseに記載されるトランスジェニック動物）を用いることができる。あるいは、標的細胞を $^{51}\text{Cr}$ などで放射標識することができ、標的細胞から放出された放射活性からCTLの細胞傷害活性を算出することができる。あるいは、固定化したペプチドを保有する細胞の存在下で、CTLによって産生および放出されたIFN- $\gamma$ を測定し、抗IFN- $\gamma$ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻止帯を可視化することによって、CTL誘導能を評価することができる。

10

20

【0071】

上記のようにペプチドのCTL誘導能を調べた結果として、配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54によって示されるアミノ酸配列を有するそれらのペプチドの中より選択されるノナペプチドまたはデカペプチドが、HLA抗原に対する高い結合親和性に加えて、特に高いCTL誘導能を示すことが発見された。したがって、これらのペプチドは本発明の好ましい態様として例示される。

【0072】

さらに、相同性解析結果から、そのようなペプチドが、他のいかなる公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドとも有意な相同性を有していないことが実証された。このことで、免疫療法に用いた場合に、未知の、または望ましくない免疫応答が起こる可能性が低くなる。したがって、この局面からもまた、これらのペプチドは、がん患者においてSEMA5Bに対する免疫を誘発させるために有用である。したがって、配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくは本発明に含有される。

30

【0073】

上記の改変に加えて、本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチドが、元のペプチドの必要なCTL誘導能を保持する限り、より好ましくは、必要なHLA結合能を保持する限り、他のペプチドに連結させることもできる。「他の」適切なペプチドの例には、本発明のペプチドまたは他のTAAに由来するCTL誘導性ペプチドが含まれる。本発明のペプチドは、直接的またはリンカーを介して間接的に、1個あるいは複数の「他の」ペプチドに連結させることができる。ペプチド間リンカーは当技術分野で周知であり、例えばAA $\gamma$  (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (配列番号：81) (R. P. M. Sutmulder et al., J Immunol. 2000, 165:7308-7315)、またはK (S. Ota, et al., Can Res. 62, 1471-1476、K. S. Kawamura, et al., J Immunol. 2002, 168:5709-5715)を含む。

40

50

## 【0074】

例えば、S E M A 5 Bではない腫瘍関連抗原に由来するペプチドもまた、H L A クラス I および / またはクラス I I を介する免疫応答を増大させるために、続いてまたは同時に使用することができる。がん細胞が2種類以上の腫瘍関連遺伝子を発現し得ることは、当技術分野において周知である。したがって、特定の対象がさらなる腫瘍関連遺伝子を発現するかどうかを判定すること、そしてその後、そのような遺伝子の発現産物に由来するH L A クラス I および / またはH L A クラス I I 結合ペプチドを本発明のS E M A 5 B 組成物またはワクチン中に含めることは、当業者の慣例的な実験法の範囲内である。

## 【0075】

H L A クラス I およびH L A クラス I I 結合ペプチドの例は当業者に公知であり（例えば、C o u l i e , S t e m C e l l s 13 : 393 - 403 , 1995を参照されたい）、本明細書に開示したものと同様の様式で本発明に関連して使用することができる。当業者は、1種もしくは複数種のS E M A 5 B ペプチドおよび1種もしくは複数種のS E M A 5 B ではないペプチドを含むポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードする核酸を、従来の分子生物学の手順を使用して調製することができる。

10

## 【0076】

上記の連結ペプチドを本明細書では「ポリトープ」と称し、これはすなわち、様々な配置（例えば、連鎖状、重複）で連結され得る、2つまたはそれ以上の潜在的な免疫原性ペプチドまたは免疫応答刺激性ペプチドの群である。ポリトープ（またはポリトープをコードする核酸）を標準的な免疫化プロトコールに従って例えば動物に投与して、免疫応答の刺激、増強、および / または誘発における該ポリトープの有効性を試験することができる。

20

## 【0077】

ペプチドを直接的にまたは隣接配列の使用により連結して、ポリトープを形成することができ、ポリトープのワクチンとしての使用は当技術分野において周知である（例えば、T h o m s o n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A 92 (13) : 5845 - 5849 , 1995 ; G i l b e r t e t a l . , N a t u r e B i o t e c h n o l . 15 (12) : 1280 - 1284 , 1997 ; T h o m s o n e t a l . , J I m m u n o l . 157 (2) : 822 - 826 , 1996 ; T a r n e t a l . , J E x p . M e d . 171 (1) : 299 - 306 , 1990を参照されたい）。様々な数および組み合わせのエピトープを含むポリトープを調製することができ、C T L による認識について、および免疫応答の増大における有効性について試験することができる。

30

## 【0078】

本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチドが、元のペプチドの必要なC T L 誘導能を保持する限り、他の物質に連結させることもできる。好適な物質の例には、例えば：ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマー等が含まれる。ペプチドは、修飾によって元のペプチドの生物学的活性が損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含み得る。このような種類の修飾は、付加的な機能（例えば、標的化機能および送達機能）を付与するために、またはペプチドを安定化するために実施し得る。

40

## 【0079】

例えば、ペプチドのインビボ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が当技術分野において公知であり、この概念を本発明のペプチドに対して適合することもできる。ペプチドの安定性は、いくつかの方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼ、ならびにヒトの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、V e r h o e f e t a l . , E u r J D r u g M e t a b P h a r m a c o k i n 1986 , 11 : 291 - 302を参照されたい）。

## 【0080】

50

さらに、上述したように、1個、2個、または数個のアミノ酸残基により置換、欠失、挿入または付加されている改変ペプチドの中から、元のペプチドと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元のものと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有する改変ペプチドをスクリーニングまたは選択する方法を提供する。例示的方法は以下の段階を含む：

- a：本発明のペプチドの少なくとも1個のアミノ酸残基を改変（すなわち置換、欠失、挿入および/または付加）する段階、
- b：段階aで改変されたペプチドの活性を測定する段階、および
- c：元のペプチドと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するペプチドを選択する段階。

10

#### 【0081】

好ましい態様において、本発明は、SEMA5B由来の断片を提示する細胞に対して特異的細胞傷害活性を有するCTLを誘導するための能力を有するペプチドのスクリーニングの方法を提供し、その方法は以下の段階を含む：

(i)元のアミノ酸配列に対して、1個、2個または数個のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入および/または付加することによって改変されたアミノ酸配列からなる候補配列を提供する段階であって、元のアミノ酸配列は、配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54からなる群より選択される、段階；

(ii)SEMA5B以外のいかなる公知のヒト遺伝子産物由来のペプチドとも実質的に有意な相同性を有さない候補配列を選択する段階；

20

(iii)段階(ii)において選択された候補配列からなるペプチドを抗原提示細胞と接触させる段階；

(iv)段階(iii)の抗原提示細胞をCD8陽性T細胞と接触させる段階；および

(v)CTL誘導能が、元のアミノ酸配列からなるペプチドと同じであるかもしくはそれよりも高いペプチドを特定する段階、または元のアミノ酸配列からなるペプチドと同じであるかもしくはそれよりも高いCTL誘導能を有するペプチドを特定する段階。

本明細書において、アッセイされる活性には、MHC結合活性、およびAPCまたはCTL誘導能、および細胞傷害活性が含まれ得る。好ましくは、ペプチドの活性はCTL誘導能である。

30

#### 【0082】

##### III. SEMA5Bペプチドの調製

周知の技法を用いて、本発明のペプチドを調製することができる。例えば、組換えDNA技術または化学合成を用いて、ペプチドを合成的に調製することができる。本発明のペプチドは、個々に、または2つもしくはそれ以上のペプチドを含むより長いポリペプチドとして、合成することができる。その後ペプチドを単離、すなわち、他の天然の宿主細胞タンパク質およびそれらの断片、または他のいかなる化学物質も実質的に含まないように精製または単離することができる。

40

#### 【0083】

本発明のペプチドは、修飾によって元のペプチドの生物学的活性が損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために用いることができる、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の組み込みが含まれる。

#### 【0084】

選択されたアミノ酸配列に基づいた化学合成によって、本発明のペプチドを得ることができる。例えば、該合成に採用され得る従来のペプチド合成法には、以下のものが含まれる：

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

50

(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 続第14巻(ペプチド合成)(日本語)、広川書店、1991;

(vi) WO99/67288;および

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

【0085】

10

あるいは、ペプチドを産生するための任意の公知の遺伝子工学的方法を採用して、本発明のペプチドを得ることもできる(例えば、Morrisson J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al.) 1983, 101:347-62)。例えば、最初に、目的のペプチドを発現可能な形態で(例えば、プロモーター配列に相当する調節配列の下流に)コードするポリヌクレオチドを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。そのようなベクターおよび宿主細胞もまた、本発明によって提供される。次いで、該宿主細胞を培養して、関心対象のペプチドを産生させる。インビトロ翻訳系を採用して、ペプチドをインビトロで作製することもできる。

20

【0086】

#### IV. ポリヌクレオチド

本発明はまた、前述の本発明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提供する。これらには、天然SEMA5B遺伝子(GenBankアクセッション番号NM\_001031702、NM\_001256346、NM\_001256347またはNM\_001256348(配列番号:74、76、77または79))由来のポリヌクレオチド、および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。本明細書において「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一の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。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一の核酸が任意の特定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、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、あるコドンによってアラニンが指定されるあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、該コドンを、記載された対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に改変された変異の一種である。ペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、該核酸のあらゆる可能なサイレント変異をも表す。核酸中の各コドン(通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く)を改変して、機能的に同一の分子を得ることができることを、当業者は認識するであろう。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、開示した各配列において非明示的に表されている。

30

40

【0087】

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から構成され得る。当技術分野において周知の通り、DNAはA、T、C、およびGなどの塩基から適切に構成され、RNAではTはUに置き換えられる。当業者は、非天然塩基もまたポリヌクレオチドに含まれ得ることを認識する。

【0088】

本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を伴って、または伴わずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在するアミノ酸配列は、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)を提供し得る。さらに、本発明の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対する任意

50

の付加的配列を含み得る。例えば、本発明の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ってもよく、またはマーカ-遺伝子等を有する発現ベクター(プラスミド)であってもよい。一般に、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いる従来の組換え技法によりポリヌクレオチドを操作することによって、そのような組換えポリヌクレオチドを調製することができる。

#### 【0089】

組換え技法および化学合成技法のいずれを用いても、本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、適切なベクターに挿入することによって本発明のポリヌクレオチドを作製することができ、これは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れ得る。あるいは、PCR技法または適切な宿主内での発現を用いて、本発明のポリヌクレオチドを増幅することもできる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989を参照されたい)。あるいは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5に記載されている固相技法を用いて、本発明のポリヌクレオチドを合成することもできる。

10

#### 【0090】

##### V. エクソソーム

本発明はさらに、本発明のペプチドとHLA抗原との間で形成される複合体を自身の表面上に提示する、エクソソームと称される細胞内小胞を提供する。エクソソームは、例えば日本特許出願特表平11-510507号およびWO99/03499に詳述されている方法を用いて調製することができ、治療および/または予防の対象となる患者から得られたAPCを用いて調製することができる。本発明のエクソソームは、本発明のペプチドと同様の様式で、ワクチンとして接種することができる。

20

#### 【0091】

複合体中に含まれる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ものとは一致しなければならない。例えば日本人集団では、HLA-A24、特にHLA-A\*2402が広く一般的であり、したがってこれは日本人患者の治療に適していると考えられる。日本人および白人の間で高発現するHLA-A24型の使用は、有効な結果を得るのに好ましく、HLA-A\*2402のサブタイプもまた使用される。典型的には、臨床において、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を予め調べることにより、特定の抗原に対して高レベルの結合親和性を有する、または抗原提示によるCTL誘導能を有するペプチドの適切な選択が可能となる。さらに、高い結合親和性およびCTL誘導能の両方を有するペプチドを得るために、天然のSEMA5B部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて、1個、2個、または数個のアミノ酸の置換、挿入、欠失および/または付加を行うことができる。

30

#### 【0092】

本発明のエクソソームに対してHLA-A24型のHLA抗原を用いる場合、配列番号: 2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54の中より選択される配列を有するペプチドが特に有用である。

40

いくつかの態様において、本発明のエクソソームは、本発明のペプチドとHLA-A24抗原との複合体を自身の表面上に提示する。

#### 【0093】

##### VI. 抗原提示細胞(APC)

本発明はまた、HLA抗原と本発明のペプチドとの間で形成される複合体を自身の表面上に提示する単離された抗原提示細胞(APC)を提供する。APCは、治療および/または予防の対象となる患者に由来してもよく、単独で、または本発明のペプチド、エクソソーム、もしくはCTLを含む他の薬物と組み合わせて、ワクチンとして投与することができる。

50

## 【0094】

A P Cは特定の種類の細胞に限定されず、これには、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている樹状細胞(D C)、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細胞が含まれる。D Cは、A P Cの中で最も強力なC T L誘導活性を有する代表的なA P Cであるため、D Cは本発明のA P Cとして適している。

## 【0095】

例えば、末梢血単球からD Cを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボ、またはインピボで本発明のペプチドと接触させる(で刺激する)ことによって、本発明のA P Cを得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与する場合、本発明のペプチドを提示するA P Cが該対象の体内で誘導される。したがって、本発明のA P Cは、本発明のペプチドを対象に投与した後、該対象からA P Cを回収することによって得ることができる。あるいは、本発明のA P Cは、対象から回収されたA P Cを本発明のペプチドと接触させることによって得ることもできる。

10

## 【0096】

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A P Cを単独で、または本発明のペプチド、エクソソーム、もしくはC T Lを含む他の薬物と組み合わせて、対象に投与することができる。例えば、エクスピボ投与は以下の段階を含み得る：

- a：第1の対象からA P Cを回収する段階、
- b：段階aのA P Cを本発明のペプチドと接触させる段階、および
- c：段階bのA P Cを第2の対象に投与する段階。

20

## 【0097】

第1の対象と第2の対象は同一の個体であってもよく、または異なる個体であってもよい。段階bによって得られるA P Cは、限定されないが、食道がん、N S C L C、R C CおよびS C L Cなどのがんを治療および/または予防するためのワクチンとして製剤化および投与することができる。

## 【0098】

本発明との関連において、抗原提示細胞を誘導し得る薬学的組成物を製造するために本発明のペプチドを利用することができる。本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための薬学的組成物を製造するための方法または工程を提供し、該方法は、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含む。

30

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の使用を提供する。

## 【0099】

本発明の一局面によれば、本発明のA P CはC T L誘導能を有する。A P Cとの関連において、「C T L誘導能」という語句は、C D 8陽性T細胞と接触した場合にC T Lを誘導するA P Cの能力を指す。さらに、「C T L誘導能」は、C T L活性化、C T L増殖を誘導する、C T Lによる標的細胞の溶解を促進する、およびC T LによるI F N - 産生を増強するA P Cの能力を含む。C T L誘導能を有するそのようなA P Cは、上記の方法に加え、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A P Cに導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、D N AまたはR N Aの形態であってもよい。導入の方法の例には、特に限定されることなく、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の、この分野において従来より実施されている様々な方法が含まれ、それらを使用することができる。より具体的には、C a n c e r R e s 1996, 56: 5672-7; J I m m u n o l 1998, 161: 5607-13; J E x p M e d 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、それを実施することができる。遺伝子をA P Cに導入することによって、該遺伝子は細胞内で転写、翻訳を受け、次いで、得られたタンパク質はM H CクラスIまたはクラスIIによってプロセシングされて、提示経路を経て部分ペプチドが提示される。あるいは、本発明のA P Cは、A P Cを本発明のペプチドと単純に接触させる段階を含む方法によって調製され得る。

40

50

## 【 0 1 0 0 】

いくつかの態様において、本発明の A P C は、 H L A - A 2 4 抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する。

## 【 0 1 0 1 】

V I I . 細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L )

本発明のペプチドのいずれか 1 種に対して誘導された C T L は、インビボでがん細胞を標的とする免疫応答を増強するため、ペプチド自体と同様の様式でワクチンとして用いることができる。したがって本発明は、本発明のペプチドのいずれか 1 種によって特異的に誘導または活性化された、単離された C T L を提供する。

## 【 0 1 0 2 】

そのような C T L は、( 1 ) 本発明のペプチドを対象に投与すること、( 2 ) 対象由来の A P C および C D 8 陽性 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る(で刺激する)こと、( 3 ) C D 8 陽性 T 細胞もしくは末梢血単核白血球を、H L A 抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C もしくはエクソソームとインビトロで接触させること、または( 4 ) T 細胞受容体( T C R ) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、もしくは T C R サブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドを C D 8 陽性 T 細胞に導入すること(そのようなサブユニットによって形成される T C R は、細胞表面上の本発明のペプチドと H L A 抗原と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。そのような A P C またはエクソソームは上記の方法によって調製することができる。( 4 ) の方法の詳細は、「 V I I . T 細胞受容体( T C R ) 」の章において以下に記載する。

## 【 0 1 0 3 】

本発明の C T L は、治療および/または予防の対象となる患者に由来してよく、かつ単独で投与することができ、または効果を調節する目的で本発明のペプチド、A P C もしくはエクソソームを含む他の薬物と組み合わせて投与することができる。得られた C T L は、本発明のペプチド、例えば誘導に用いた同一のペプチドを提示する標的細胞に対して特異的に作用する。標的細胞は、がん細胞のような S E M A 5 B を内因的に発現する細胞、または S E M A 5 B 遺伝子をトランスフェクトした細胞であってよく、かつ本発明のペプチドによる刺激によって該ペプチドを細胞表面上に提示する細胞もまた、活性化された C T L の攻撃の標的として機能し得る。

## 【 0 1 0 4 】

いくつかの態様において、本発明の C T L は、H L A - A 2 4 抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞を認識する。C T L との関連において、「細胞を認識する」という語句は、細胞表面上の H L A - A 2 4 抗原と本発明のペプチドとの複合体にその T C R を介して結合し、その細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すことを指す。本明細書において、「特異的細胞傷害活性」は、H L A - A 2 4 抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞に対して細胞傷害活性を示すが、他の細胞には示さないことを指す。したがって、本発明のペプチドを提示する細胞に対する特異的細胞傷害活性を示す C T L は、本発明に含まれる。

## 【 0 1 0 5 】

V I I I . T 細胞受容体( T C R )

本発明はまた、T C R サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたは T C R サブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチド(そのようなサブユニットによって形成される T C R は細胞表面上の H L A 抗原と本発明のペプチドとの複合体に結合することができる)を 1 個または複数含む組成物を提供する。それを使用する方法もまた企図されている。そのような T C R サブユニットは、S E M A 5 B を発現する腫瘍細胞に対する特異性を T 細胞に付与する T C R を形成する能力を有する。当技術分野における公知の方法を用いることにより、本発明の 1 種もしくは複数種のペプチドで誘導された C T L の T C R サブユニットの鎖および鎖の各々をコードするポリヌクレオチドを同定することができる(国際公開公報第 2 0 0 7 / 0 3 2 2 5 5 号、および M o r g a n e t a

10

20

30

40

50

1. , J Immunol , 171 , 3288 ( 2003 ) ) 。例えば、TCRを解析するためにはPCR法が好ましい。解析のためのPCRプライマーは、例えば、5'側プライマーとしての5'-Rプライマー(5'-gtctaccaggcatttcgcttcat-3') (配列番号:70)、および3'側プライマーとしての、TCR鎖C領域に特異的な3-TRa-Cプライマー(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3') (配列番号:71)、TCR鎖C1領域に特異的な3-TRb-C1プライマー(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3') (配列番号:72)、またはTCR鎖C2領域に特異的な3-TR-C2プライマー(5'-ctagccctctggaaatcctttctctt-3') (配列番号:73)であってよいが、これらに限定されない。TCR誘導体は、本発明のペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ任意で、本発明のペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビボおよびインビトロで媒介する。

#### 【0106】

TCRサブユニットの両方をコードする1種の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複数種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。該ポリヌクレオチドまたはそれらを有用に含むベクターを、T細胞(例えば、CD8陽性T細胞)、例えば患者由来のT細胞に導入することができる。有利には、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)の迅速な改変により、優れたがん細胞殺傷特性を有する改変T細胞を迅速かつ容易に作製することを可能にする容易に入手可能な組成物を提供する。

#### 【0107】

本発明のペプチドに対する特異的TCRは、TCRがT細胞の表面上に提示された場合に、本発明のペプチドとHLA分子との複合体を特異的に認識して、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を提示する標的細胞に対する特異的活性をT細胞に付与し得るべきである。上記複合体の特異的認識は任意の公知の方法によって確認することができ、好ましい例として、HLA分子および本発明のペプチドを用いるHLA多量体染色解析、ならびにELISPOTアッセイが含まれる。ELISPOTアッセイを行うことにより、細胞表面上にTCRを発現するT細胞がそのTCRによって細胞を認識すること、およびシグナルが細胞内で伝達されることを確認することができる。上述した複合体が、その複合体がT細胞表面上に存在する場合にそのT細胞に細胞傷害活性を付与することができることの確認もまた、公知の方法によって行うこともできる。好ましい方法には、例えば、クロム放出アッセイのようなHLA陽性標的細胞に対する細胞傷害活性の測定が含まれる。

#### 【0108】

また、本発明は、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、またはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドの形質導入によって調製されるCTLを提供する。該TCRサブユニットによって形成されるTCRは、SEMA5Bペプチド、例えば、HLA-A24との関連において配列番号:2~69に結合することができる。

#### 【0109】

形質導入されたCTLは、インビボでがん細胞にホーミングすることができ、かつ周知の培養法によってインビトロで増殖させることができる(例えば、Kawakami et al. , J Immunol. , 142 , 3452 - 3461 (1989))。本発明のCTLは、療法または防御を必要としている患者におけるがんの治療および予防のいずれかまたは両方に有用な免疫原性組成物を形成するために用いることができる(WO2006/031221参照、その内容は参照により本明細書に組み入れられる)。

#### 【0110】

##### IX. 薬学的組成物

SEMA5Bの発現は、正常組織と比較して、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCを例に含むが必ずしもこれらに限定されないがんにおいて特異的に上昇するため、

10

20

30

40

50

本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを、がんまたは腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するため、したがってがんもしくは原発性がんの治療および／もしくは予防、ならびに／またはその転移もしくは術後のその再発の予防に役立つ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ポリヌクレオチドの少なくとも１種を有効成分として含む、がんの治療および／もしくは予防のための、ならびに／またはその転移もしくは術後のその再発の予防のための製剤化された薬学的組成物または薬学的剤を提供する。あるいは、薬学的組成物または薬学的剤として使用するために、本発明のペプチドを、前述のエクソソームまたはAPCなどの細胞のいずれかの表面上に発現させることができる。加えて、本発明のペプチドのいずれか１種を標的とした前述のCTLもまた、本発明の薬学的組成物または薬学的剤の有効成分として使用することができる。

10

## 【0111】

したがって、本発明は、以下の中より選択される少なくとも１種の有効成分を含む剤または組成物を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に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；
- (c) 本発明のAPCまたはエクソソーム；および
- (d) 本発明のCTL。

薬学的組成物または薬学的剤において、そのようなペプチド、ポリヌクレオチド、APCおよびCTLは治療的または薬学的に有効な量で存在する。

20

## 【0112】

本発明の薬学的組成物または薬学的剤はまた、ワクチンとしても使用される。本発明との関連において、「ワクチン」という語句（「免疫原性組成物」とも称される）は、動物に接種した際に抗腫瘍免疫を改善、増強および／または誘導する機能を有する剤または組成物を指す。換言すれば、本発明は、対象においてがんに対する免疫応答を誘導するための薬学的剤または薬学的組成物を提供する。

## 【0113】

本発明の薬学的剤または薬学的組成物は、ヒト、ならびに非限定的にマウス、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任意の他の哺乳動物を含む対象または患者において、がんを治療および／もしくは予防するため、ならびに／またはその転移もしくは術後のその再発を予防するために用いることができる。いくつかの態様において、本発明の薬学的剤または薬学的組成物は、HLA抗原がHLA-A24である対象への投与のために製剤化することができる。

30

## 【0114】

別の態様において、本発明はまた、がんもしくは腫瘍を治療および／もしくは予防する、ならびに／またはその転移もしくは術後のその再発を予防するための薬学的組成物または薬学的剤の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に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；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエクソソーム；および
- (d) 本発明のCTL。

40

## 【0115】

あるいは、本発明はさらに、がんもしくは腫瘍の治療および／もしくは予防、ならびに／またはその転移もしくは術後のその再発の予防において使用するための、以下の中より選択される有効成分を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に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

50

;

(c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示する A P C またはエクソソーム ; および

(d) 本発明の C T L 。

## 【 0 1 1 6 】

あるいは、本発明はさらに、がんもしくは腫瘍を治療および / もしくは予防する、ならびに / またはその転移もしくは術後のその再発を予防するために製剤化される薬学的組成物または薬学的剤を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体とともに製剤化する段階を含む方法または工程を提供する :

(a) 本発明のペプチド ;

(b) 本明細書に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

;

(c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示する A P C またはエクソソーム ; および

(d) 本発明の C T L 。

## 【 0 1 1 7 】

別の態様において、本発明はまた、がんもしくは腫瘍を治療および / もしくは予防する、ならびに / またはその転移もしくは術後のその再発を予防するために製剤化される薬学的組成物または薬学的剤の製造のための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分と薬学的または生理学的に許容される担体とを混合する段階を含む方法または工程を提供する :

(a) 本発明のペプチド ;

(b) 本明細書に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

;

(c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示する A P C またはエクソソーム ; および

(d) 本発明の C T L T 細胞。

## 【 0 1 1 8 】

別の態様において、本発明はまた、がんもしくは腫瘍を治療および / もしくは予防する、ならびに / またはその転移もしくは術後のその再発を予防するための方法であって、以下の中より選択される少なくとも 1 種の有効成分を対象に投与する段階を含む方法を提供する :

(a) 本発明のペプチド ;

(b) 本明細書に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

;

(c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示する A P C またはエクソソーム ; および

(d) 本発明の C T L 。

## 【 0 1 1 9 】

本発明によれば、配列番号 : 2 ~ 6 9 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが、対象において、H L A - A 2 4 および S E M A 5 B を発現するがんに対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得る候補として役立つ H L A - A 2 4 拘束性エピトープペプチドであることが示される。したがって、配列番号 : 2 ~ 6 9 の中より選択された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薬学的組成物または薬学的剤は、H L A 抗原が H L A - A 2 4 である対象への投与のために特に適している。そのようながんもしくは組成物におけるペプチドの量は、S E M A 5 B を発現するがんを有する対象において強力かつ特異的な免疫学的応答を十分に誘導するのに効果的な量でありうる。

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 (すなわち、本発明のポリヌクレオチド) を含む薬学的組成物または薬学的剤にも当てはまる。

10

20

30

40

50

## 【0120】

本発明の薬学的組成物または薬学的剤により治療および/または予防することができるがんは限定されず、SEMA5Bが関与する全ての種類のがんを含み、それらの例には、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCが含まれるがこれらに限定されない。

## 【0121】

本発明の薬学的組成物または薬学的剤は、前述の有効成分に加えて、がん性細胞に対するCTLを誘導する能力を有する他のペプチド、該他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、該他のペプチドを提示する他の細胞等を含み得る。がん性細胞に対する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、限定はされないが、がん特異的抗原（例えば、同定されたTAA）由来のペプチドが含まれる。

10

## 【0122】

必要に応じて、本発明の薬学的組成物または薬学的剤は、他の治療物質が、本発明の有効成分、例えば本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エクソソーム、APC、CTLの抗腫瘍効果を阻害しない限り、有効成分としてそのような他の治療物質を任意に含み得る。例えば、製剤は、抗炎症物質、鎮痛剤、化学療法薬等を含み得る。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組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理的組成物の量は、例えば、使用する薬理的組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に依存する。

## 【0123】

当業者は、本明細書で特に言及する成分に加えて、本発明の薬学的組成物または薬学的剤が、対象となる製剤の種類を考慮した上で、当技術分野において慣例的な他の物質を含み得ることを認識するであろう。

20

## 【0124】

本発明の1つの態様において、本発明の薬学的組成物または薬学的剤を、例えばがんなどの治療されるべき疾患の病態を治療するのに有用な材料を含む製品およびキット中に包装することができる。該製品は、ラベルを有する本発明の薬学的組成物または薬学的剤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。該容器は、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。容器上のラベルには、組成物または剤が、疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防のために用いら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。

30

## 【0125】

本発明の薬学的組成物または薬学的剤を含むキットは、上記の容器に加えて、任意で、薬学的に許容される希釈剤を収容した第2の容器をさらに含み得る。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明を記載した添付文書を含む、商業上の観点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。

## 【0126】

必要に応じて、有効成分を含む1個または複数個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に、本発明の薬学的組成物または剤を包装することができる。該パックは、例えば、プリスターパックのように金属ホイル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、投与に関する説明書が添付され得る。

40

## 【0127】

(1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的組成物：

本発明のペプチドは、薬学的組成物または薬学的剤として直接投与してもよく、または必要であれば、従来製の製剤化法によって製剤化してもよい。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬物に通常用いられる担体、賦形剤等が特に制限なく必要に応じて含まれる。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、培養液等が含まれるがこれらに限定されない。さらに、本発明の薬学的組成物または薬学的剤は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤等を含み得る。本発明の薬学的組成物または薬学的剤は、抗がん目的に用いることができる。

50

## 【0128】

インビボでCTLを誘導するために、本発明のペプチドを、本発明のペプチドの2つまたはそれ以上を含む組み合わせとして調製することができる。ペプチドは、カクテルであってもよく、または標準的な技法を用いて互いに結合させてもよい。例えば、ペプチドを化学的に連結させてもよく、または単一の融合ポリペプチドとして発現させてもよい。組み合わせにおけるペプチドは、同一であってもよく、または異なってもよい。本発明のペプチドを投与することにより、ペプチドはHLA抗原によってAPC上に高密度で提示され、次いで、提示されたペプチドとHLA抗原との間で形成される複合体に対して特異的に反応するCTLが誘導される。あるいは、APC(例えば、DC)を対象から取り出し、続いて本発明のペプチドで刺激して、本発明のペプチドのいずれかを自身の細胞表面上に提示するAPCを得てもよい。これらのAPCは、対象においてCTLを誘導するために対象に再び投与することができ、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。

10

## 【0129】

有効成分として本発明のいずれかのペプチドを含む、がんの治療および/または予防のための薬学的組成物または薬学的剤は、細胞性免疫を効率的に確立するようにアジュバントもまた含み得る。あるいは、本発明の薬学的組成物または薬学的剤は、他の有効成分と共に投与してもよく、または顆粒内へ製剤化することによって投与してもよい。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(または連続して)投与した場合に、該タンパク質に対する免疫応答を増強するいかなる化合物、物質または組成物をも指す。本明細書において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、IFA(不完全フロイントアジュバント)、CFA(完全フロイントアジュバント)、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、O/Wエマルジョン等が含まれるが、これらに限定されない。

20

さらに、リポソーム製剤、直径数マイクロメートルのビーズにペプチドが結合している顆粒製剤、およびペプチドに脂質が結合している製剤を好都合に用いてもよい。

## 【0130】

別の態様において、本発明のペプチドはまた、薬学的に許容される塩の形態で投与してもよい。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、アミンとの塩、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、メタンスルホン酸など)との塩、および、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸など)との塩が含まれるがこれらに限定されない。本明細書で使用される「薬学的に許容される塩」という語句は、その化合物の生物学的な有効性および特性を保持し、かつ、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、サリチル酸などの無機または有機の酸または塩基との反応によって得られる塩を指す。

30

## 【0131】

いくつかの態様において、本発明の薬学的組成物または薬学的剤は、CTLを刺激する(prime)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CTLを刺激し得る組成物として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリジン残基のアミノ基およびアミノ基に付着させ、次に本発明のペプチドに連結させることができる。次いで、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子の状態直接投与するか、リポソーム中に取り込ませて投与するか、またはアジュバント中に乳化させて投与することができる。脂質の他の例として、適切なペプチドに共有結合している場合、トリパルミトイル-S-グリセリルシステニル-セリル-セリン(P3CSS)などの大腸菌(E.coli)リポタンパク質を用いてCTLを刺激することができる(例えば、Derese et al., Nature 1989, 342: 561-4を参照されたい)。

40

## 【0132】

50

適切な投与方法の例としては、必ずしも限定はされないが、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹膜および静脈内注射等、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与（例えば直接注射）が含まれる。投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によってブーストすることもできる。ペプチドの、薬学的または治療的に効果的な量を、SEMA5Bを発現するがんの治療を必要としている対象において投与することができる。または、SEMA5Bを発現するがんまたは腫瘍に対するCTLを誘導するために十分な本発明のペプチドの量が、SEMA5Bを発現しているがんを保持している対象に投与可能である。本発明のペプチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常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~数ヶ月に1度、例えば1週間に1度投与することができる。当業者は、適切かつ最適な用量を容易に決定することができる。

10

#### 【0133】

(2)有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物：

本発明の薬学的組成物または薬学的剤はまた、本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸を含み得る。本明細書において、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞に導入された場合に、抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてインピボで発現することを意味する。例示的態様において、関心対象のポリヌクレオチドの核酸配列は、該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。ポリヌクレオチドには、標的細胞のゲノムへの安定した挿入が達成されるように、必要なものを備えさせることができる（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を参照されたい）。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247:1465-8; 米国特許第5,580,859号;第5,589,466号;第5,804,566号;第5,739,118号;第5,736,524号;第5,679,647号;およびWO98/04720を参照されたい。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA」、促進された（プピカイン、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」）または圧力媒介性の送達が含まれる（例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい）。

20

#### 【0134】

ウイルスベクターまたは細菌ベクターによって、本発明のペプチドを発現させることもできる。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、ペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターとして、ワクシニアウイルスの使用を伴う。宿主に導入すると、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誘発する。免疫化プロトコー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。治療的な投与または免疫化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を参照されたい。

30

40

#### 【0135】

ポリヌクレオチドの患者内への送達は、直接的であってもよく、この場合にはポリヌクレオチドを保有するベクターに患者を直接曝露し、または間接的であってもよく、この場合にはまずインピボで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次いで該細胞を患者内に移植する。これら2つのアプローチはそれぞれ、インピボおよびエクスピボの

50

遺伝子治療として公知である。

【0136】

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を参照されたい。本発明に適用可能な、組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、Ausubel et al.の*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY, 1993); およびKriegerの*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual* (Stockton Press, NY, 1990)に記載されている。

10

【0137】

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/または腹腔注射等で実施でき、かつ、全身投与または標的部位の近傍への局所投与(例えば直接注射)で実施できる。投与は、単回投与によって行うこともでき、または複数回投与によってブーストすることもできる。ポリヌクレオチドの、薬学的または治療的に効果的な量を、SEMA5Bを発現するがんの治療を必要としている対象に投与することができる。あるいは、SEMA5Bを発現するがんあるいは腫瘍に対するCTLを誘導するために十分な本発明のポリヌクレオチドの量が、SEMA5Bを発現しているがんを保持している対象に投与可能である。適切な担体もしくは本発明のペプチドをコードしたポリヌクレオチドで形質転換された細胞におけるポリヌクレオチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日に1度~数ヶ月に1度、たとえば1週間に1度投与することができる。当業者は、適切かつ最適な用量を容易に決定することができる。

20

30

【0138】

X. ペプチド、エクソソーム、APC、およびCTLを用いる方法

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは、APCおよびCTLを調製または誘導するために使用可能である。本発明のエクソソームおよびAPCもまた、CTLを調製または誘導するために使用可能である。ペプチド、ポリヌクレオチド、エクソソームおよびAPCは、それらのCTL誘導能を他の化合物が阻害しない限り、該他の化合物と組み合わせて用いることができる。したがって、前述の本発明の薬学的組成物または薬学的剤のいずれかを用いてCTLを調製または誘導することができる。それに加えて、前記ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものを用いて、以下に説明するように、APCを調製または誘導することもできる。

40

【0139】

(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ポリヌクレオチドを用いて、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法を提供する。

本発明の方法は、APCを本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボ、またはインピボで接触させる段階を含む。例えば、APCを該ペプチドとエクスピボで接触させる方法は、以下の段階を含み得る：

- a: 対象からAPCを回収する段階、および
- b: 段階aのAPCをペプチドと接触させる段階。

【0140】

50

A P C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ように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られているD C、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。A P Cの中で最も強力なC T L誘導能を有することから、好ましくはD Cを用いることができる。本発明のペプチドのいずれか1種を、単独で、あるいは本発明の1種もしくは複数種の他のペプチドおよび/またはS E M A 5 B以外のT A A由来の1種もしくは複数種のC T L誘導性ペプチドと組み合わせて用いることができる。

【0141】

一方、本発明のペプチドを対象に投与すると、A P Cは、ペプチドとインピボで接触し、その結果、C T L誘導能を有するA P Cが対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は、対象の体内においてC T L誘導能を有するA P Cを誘導するために本発明のペプチドを対象に投与する段階を含み得る。同様に、本発明のポリヌクレオチドを発現可能な形態で対象に投与すると、本発明のペプチドがインピボで発現してA P Cと接触し、その結果、C T L誘導能を有するA P Cが対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は、対象の体内においてC T L誘導能を有するA P Cを誘導するために本発明のポリヌクレオチドを対象に投与する段階を含み得る。「発現可能な形態」という語句は、「I X . 薬学的組成物(2)有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物」の章に上述されている。

10

【0142】

さらに、本発明の方法は、本発明のポリヌクレオチドをA P Cに導入してC T L誘導能を有するA P Cを誘導する段階を含み得る。例えば、方法は以下の段階を含み得る：

20

a : 対象からA P Cを回収する段階、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段階aにおいて回収されたA P Cに導入する段階。

段階bは、「V I . 抗原提示細胞」の章に上述したように行うことができる。

【0143】

あるいは、本発明の方法は、以下の段階のうちの1つを介して、S E M A 5 Bに対して細胞傷害活性を示すC T Lを特異的に誘導する抗原提示細胞(A P C)を調製する段階を含み得る：

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

30

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

【0144】

あるいは、本発明の方法は、C T L誘導能を有するA P Cを誘導する段階を含み得、そのような方法は以下の中から選択された段階を含む：

(a) A P Cを本発明のペプチドと接触させる段階；および

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

【0145】

本発明の方法は、インピボ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法は、インピボまたはエクスピボで実施することができる。C T L誘導能を有するA P Cの誘導に使用するA P Cは、好ましくは、H L A - A 2 4抗原を発現するA P Cであってよい。そのようなA P Cは、H L A抗原がH L A - A 2 4である対象から得られた末梢血単核細胞(P B M C)から当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導したA P Cは、本発明のペプチドとH L A抗原(H L A - A 2 4抗原)との複合体を自身の表面上に提示するA P Cであってよい。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したA P Cを対象に投与する場合、対象は、好ましくは、A P Cが由来する同一の対象である。しかしながら、対象は、該対象がA P Cドナーと同一のH L A型を有する限り、A P Cドナーと異なる対象でもよい。

40

【0146】

50

別の態様において、本発明は、CTL誘導能を有するAPCの誘導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種または複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

別の態様において、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該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。

あるいは本発明は、CTL誘導能を有するAPCの誘導に使用するための本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリペプチドをさらに提供する。

#### 【0147】

##### (2) CTLを誘導する方法

本発明はまた、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、またはエクソソームもしくはAPCを用いてCTLを誘導するための方法を提供する。

本発明はまた、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、またはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチド(そのようなサブユニットによって形成されるTCRは細胞表面上の本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識する(に結合する)ことができる)を使用してCTLを誘導するための方法を提供する。好ましくは、CTLを誘導するための方法は、以下の中より選択される少なくとも1つの段階を含み得る：

a：CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する抗原提示細胞と接触させる段階

b：CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエクソソームと接触させる段階；および

c：TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、またはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチド(そのようなサブユニットによって形成されるTCRは、細胞表面上の本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識する(に結合する)ことができる)を、CD8陽性T細胞に導入する段階。

#### 【0148】

本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、またはエクソソームを対象に投与すると、該対象の体内でCTLが誘導され、SEMA5Bを発現するがん細胞を標的とする免疫応答の強度が増強される。したがって本発明の方法は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、またはエクソソームを対象に投与する段階を含み得る。

#### 【0149】

あるいはCTLは、それらをエキスピボまたはインビトロで用いることによって誘導することもでき、CTLを誘導した後、活性化CTLを対象に戻すことができる。例えば、方法は以下の段階を含み得る：

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、および

c：段階bのAPCをCD8陽性T細胞と共培養する段階。

#### 【0150】

上記の段階cにおいてCD8陽性T細胞と共培養するAPCは、「VI. 抗原提示細胞」の章に上述したように、本発明のポリヌクレオチドをAPCに導入することによって調製することもできるが、本発明はこれに限定されず、したがってHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に効果的に提示する任意のAPCを包含する。

#### 【0151】

前述のAPCの代わりに、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエクソソームを任意に利用し得る。すなわち、本発明は、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエクソソームおよびCD8陽性T細胞を共培養する段階を含み得る。そのようなエクソソームは、「V. エクソソーム」の章に上述した方法によって調製することができる。本発明の方法において適切なAPCおよびエクソソームは、本発明のペプチドとHLA-A24との複合体を自身の表面上に提示する。

10

20

30

40

50

## 【0152】

さらに、CTLは、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、またはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチド（そのようなサブユニットによって形成されるTCRは、細胞表面上の本発明のペプチドとHLA抗原との複合体に結合することができる）を、CD8陽性T細胞に導入することによって誘導することができる。そのような形質導入は、「VII.T細胞受容体（TCR）」の章に上述したように行うことができる。

## 【0153】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法は、インビトロまたはエクスピボで実施することができる。CTLの誘導に用いるCD8陽性T細胞は、対象から得たPBM Cから当技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様において、CD8陽性T細胞のためのドナーは、HLA抗原がHLA-A24である対象であってよい。本発明の方法によって誘導したCTLは、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識し得るCTLであってよい。そのようなCTLは、本発明のペプチドをその表面上に提示する細胞に対して特異的細胞傷害活性を示すことができ、したがってSEMA5Bを発現する細胞（例えばがん細胞）に対して特異的細胞傷害活性を示すことができる。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したCTLを対象に投与する場合、対象は、好ましくは、CD8陽性T細胞が由来する同一の対象である。しかしながら、対象は、対象がCD8陽性T細胞ドナーと同一のHLA型を有する限り、CD8陽性T細胞ドナーと異なる対象でもよい。

## 【0154】

加えて、本発明は、CTLを誘導するための薬学的組成物または薬学的剤を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

## 【0155】

別の態様において、本発明は、CTLを誘導するための剤または組成物であって、本発明の1種もしくは複数種のペプチド、1種もしくは複数種のポリヌクレオチド、1種もしくは複数種のAPC、および/または1種もしくは複数種のエクソソームを含む剤または組成物を提供する。

別の態様において、本発明は、CTLの誘導の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、ポリヌクレオチド、APCまたはエクソソームの使用を提供する。

あるいは本発明は、CTLの誘導に用いられる本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APCまたはエクソソームをさらに提供する。

## 【0156】

XI. 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、SEMA5Bに関連する疾患に対して免疫応答を誘導する方法を提供する。疾患には、がんが含まれ、その例には食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCが含まれるが、これらに限定されない。

本発明の方法は、本発明のペプチドのいずれかまたはそれらをコードするポリヌクレオチドのいずれかを含む剤または組成物を投与する段階を含み得る。本発明の方法はまた、本発明のペプチドのいずれかを提示するエクソソームまたはAPCの投与も企図する。詳細については、「IX. 薬学的組成物」の項、特に本発明の薬学的組成物のワクチンとしての使用について記載している部分を参照されたい。加えて、免疫応答を誘導するために本発明の方法に使用することができるエクソソームおよびAPCは、上記「V. エクソソーム」、「VI. 抗原提示細胞（APC）」、ならびに「X. ペプチド、エクソソーム、APC、およびCTLを用いる方法」の（1）および（2）の項において詳述している。

## 【0157】

本発明はまた、がんに対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物または薬学的剤を

製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含み得る方法を提供する。

【0158】

あるいは、本発明の方法は、以下を含む本発明のワクチンまたは薬学的組成物もしくは薬学的剤を投与する段階を含み得る：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に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；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエクソソーム；または
- (e) 本発明のCTL。

10

【0159】

本発明との関連において、SEMA5B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、食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCが含まれるが、これらに限定されない。したがって、前述の有効成分のいずれかを含むワクチンまたは薬学的組成物もしくは薬学的剤を投与する前に、治療すべき対象から回収したがん性細胞または組織において、SEMA5Bの発現レベルが、同じ対象から回収した正常な細胞または組織と比較して上昇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つの態様において、本発明は、SEMA5Bを（過剰）発現するがんの治療が必要とされる患者においてSEMA5Bを（過剰）発現するがんを治療するための方法

20

であって、以下の段階を含む方法を提供する：

- i) 治療すべきがんを有する対象から得られた生物学的試料中のSEMA5Bの発現レベルを決定する段階；
- ii) SEMA5Bの発現レベルを正常対照と比較する段階；および
- iii) 上記の(a)～(e)の中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SEMA5Bを過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

【0160】

あるいは本発明は、SEMA5Bを過剰発現するがんを有する対象へ投与することができる、上記の(a)～(e)の中より選択される少なくとも1つの成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を提供する。換言すれば、本発明はさらに、本発明のペプチドで治療すべき対象を同定するための方法であって、対象由来の生物学的試料中のSEMA5Bの発現レベルを決定する段階を含み、発現レベルが、該遺伝子の正常対照レベルと比較して上昇していることにより、該対象が本発明のペプチドで治療され得るがんを有し得ることが示される方法を提供する。本発明のがんを治療する方法は、以下にさらに詳述される。

30

【0161】

SEMA5Bの転写産物または翻訳産物を含みうる限り、対象由来の任意の細胞または組織をSEMA5B発現レベルの測定に使用することができる。適切な試料の例には、身体組織、ならびに血液、痰、および尿などの体液が含まれるが、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、またはがん性組織に由来する上皮細胞を含む細胞集団を含む。さらに、必要に応じて、得られた身体組織および体液から細胞を精製し、その後これを対象由来試料として用いてもよい。

40

【0162】

本発明の方法によって治療すべき対象は、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、非ヒト霊長類、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。

【0163】

本発明によれば、対象から得られた生物学的試料中のSEMA5Bの発現レベルを決定することができる。SEMA5Bの発現レベルは、当技術分野で公知の方法を用いて、転写（核酸）産物レベルで決定することができる。例えば、SEMA5BのmRNAを、八

50

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）によってプローブを用いて定量することができる。検出は、チップまたはアレイにおいて行うことができる。アレイの使用は、S E M A 5 Bの発現レベルを検出するのに好ましい。当業者は、S E M A 5 B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、S E M A 5 Bのc D N Aをプローブとして用いることができる。必要に応じて、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してもよく、S E M A 5 B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てもよい。

【0164】

さらに、増幅に基づく検出法（例えば、R T - P C R）によりプライマーを用いて、S E M A 5 Bの転写産物を定量してもよい。そのようなプライマーは、S E M A 5 Bの入手可能な配列情報に基づいて調製することができる。

10

【0165】

具体的には、本発明の方法に用いられ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、中程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、S E M A 5 Bのm R N Aとハイブリダイズする。本明細書で使用する「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とはハイブリダイズするが、その他の配列と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に依存し、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、短い配列よりも高い温度で観察される。一般に、ストリンジェントな条件の温度は、所定のイオン強度およびp Hにおける特定の配列の熱融解温度（ $T_m$ ）よりも約5 低くなるように選択する。 $T_m$ とは、平衡状態で、標的配列に相補的なプローブの50%が標的配列とハイブリダイズする（所定のイオン強度、p H、および核酸濃度における）温度である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 $T_m$ では、平衡状態でプローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、p H 7.0 ~ 8.3において塩濃度がナトリウムイオン約1.0 M未満、典型的にはナトリウムイオン（または他の塩）約0.01 ~ 1.0 Mであり、かつ温度が、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）に関しては少なくとも約30、およびより長いプローブまたはプライマーに関しては少なくとも約60 である条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化物質の添加によって達成してもよい。

20

30

【0166】

本発明のプローブまたはプライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、少なくとも約2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50、または25の連続するS E M A 5 B配列を含む核酸のセンス鎖ヌクレオチド配列、またはS E M A 5 B配列を含む核酸のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列、またはそれらの配列の天然の変異体とハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。特に、例えば、好ましい態様において、5 ~ 50 b（塩基）の長さを有するオリゴヌクレオチドを、検出すべき遺伝子を増幅するためのプライマーとして用いることができる。より好ましくは、S E M A 5 B遺伝子のm R N Aまたはc D N Aは、特定のサイズ、一般には15 ~ 30 b長のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーによって検出することができる。サイズは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチドの範囲であってよく、プローブおよびプライマーのサイズは5 ~ 10ヌクレオチド、10 ~ 15ヌクレオチド、15 ~ 20ヌクレオチド、20 ~ 25ヌクレオチド、および25 ~ 30ヌクレオチドの範囲にわたってよい。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーの長さは、15 ~ 25ヌクレオチドから選択することができる。そのようなオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いることによって遺伝子を検出するためのアッセイ手順、装置、または試薬は、周知である（例えばオリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはP C R）。これらのアッセイにおい

40

50

て、プローブまたはプライマーはタグまたはリンカー配列も含み得る。さらに、プローブまたはプライマーは、検出可能な標識または捕捉することができる親和性リガンドで修飾することができる。あるいは、ハイブリダイゼーションに基づく検出手順において、数百（例えば、約100～200）塩基から数千（例えば、約1000～2000）塩基長を有するポリヌクレオチドも、プローブに用いることができる（例えば、ノーザンブロッティングアッセイまたはcDNAマイクロアレイ解析）。

#### 【0167】

あるいは、本発明の方法によって治療すべき対象の同定のために、SEMA5Bの翻訳産物を検出することができる。例えば、SEMA5Bタンパク質（配列番号：75、78または80）の量を測定することができる。翻訳産物としてSEMA5Bタンパク質の量を測定する方法として、SEMA5Bタンパク質を特異的に認識する抗体を用い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ってよい。さらに、断片または改変抗体がSEMA5B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物（例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv等）を検出に用いることができる。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、任意の方法を使用して、そのような抗体およびそれらの等価物を調製することができる。

10

#### 【0168】

SEMA5Bの発現レベルをその翻訳産物に基づいて検出する別の方法として、SEMA5Bタンパク質に対する抗体を用いる免疫組織化学的解析により、染色の強度を測定してもよい。すなわちこの測定では、強度の染色により、SEMA5Bタンパク質の存在/レベルの増加が示され、それと同時にSEMA5Bの高発現レベルが示される。

20

#### 【0169】

対象由来の試料におけるSEMA5B遺伝子の発現レベルは、その発現レベルが、SEMA5Bの対照レベル（例えば、正常細胞中の発現レベル）から例えば10%、25%、もしくは50%上昇するか；または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超、もしくはそれ以上まで上昇する場合に、上昇していると判定され得る。

#### 【0170】

対照レベルは、健常対象から予め採取し保存しておいた試料を用いることにより、がん細胞と同時に決定することができる。加えて、治療すべきがんを有する器官の非がん性領域から得られた正常細胞を、正常対照として用いてもよい。あるいは、対照レベルは、疾患状態が判明している対象に由来する試料中のSEMA5Bの予め決定された発現レベルを解析することによって得られた結果に基づいて、統計的方法により決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験された細胞に由来する発現パターンのデータベースに由来し得る。さらに、本発明の一面によれば、生物学的試料中のSEMA5Bの発現レベルを、複数の参照試料から決定された複数の対照レベルと比較することもできる。対象由来の生物学的試料の組織型と類似の組織型に由来する参照試料から決定された対照レベルを用いることが好ましい。さらに、疾患状態が判明している集団におけるSEMA5B遺伝子の発現レベルの基準値を用いることが好ましい。基準値は、当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。例えば、平均値 $\pm$ 2SD、または平均値 $\pm$ 3SDの範囲を、基準値として用いることができる。

30

40

#### 【0171】

本発明との関連において、がん性でないと判明している生物学的試料から決定された対照レベルは、「正常対照レベル」と称される。一方、対照レベルががん性生物学的試料から決定される場合には、これは「がん性対照レベル」と称される。試料の発現レベルと対照レベルとの差を、その発現レベルが細胞のがん性状態または非がん性状態に応じて異なることが判明している対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して正規化することができる。例示的な対照遺伝子には、 $\alpha$ -アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素、およびリポソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

50

## 【0172】

SEM A 5 B の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇している場合、その対象は本発明の薬学的組成物または薬学的剤を投与することにより治療すべきがんを有する対象であると同定され得る。

## 【0173】

本発明はまた、前述の薬学的組成物または薬学的剤を用いたがんの治療のための対象を選択する方法を提供し、その方法は以下の段階を含む：

a) がんを有する対象から得られた生物学的試料中の SEM A 5 B の発現レベルを決定する段階；

b) 段階 a) で決定した SEM A 5 B の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；および

c) SEM A 5 B の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇している場合に、本発明の薬学的組成物または薬学的剤によるがんの治療のために該対象を選択する段階。

## 【0174】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物または薬学的剤で治療され得るがんに罹患している、またはがんが発生するリスクのある対象を同定または判定するための診断キットを提供し、該キットはまた、がん免疫療法の効果または適用性を評価および/またはモニターするのに有用であり得る。好ましくは、がんには食道がん、NSCLC、RCC および SCLC 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、対象由来の試料中の SEM A 5 B の発現レベルを検出するための少なくとも 1 種の試薬を好ましくは含み、そのような試薬は以下からなる群より選択され得る：

(a) SEM A 5 B の mRNA を検出するための試薬；

(b) SEM A 5 B タンパク質を検出するための試薬；および

(c) SEM A 5 B タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

## 【0175】

SEM A 5 B mRNA の検出に適した試薬の例には、SEM A 5 B mRNA の一部に対する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドなどの、SEM A 5 B mRNA に特異的に結合するか、または SEM A 5 B mRNA を同定する核酸が含まれる。このような種類のオリゴヌクレオチドは、SEM A 5 B 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。このような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することができる。必要に応じて、SEM A 5 B mRNA を検出するための試薬を固体基質上に固定化することができる。さらに、SEM A 5 B mRNA を検出するための 2 つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

## 【0176】

一方、SEM A 5 B タンパク質を検出するのに適した試薬の例には、SEM A 5 B タンパク質に対する抗体が含まれ得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。さらに、断片または改変抗体が SEM A 5 B 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物（例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 等）を試薬として用いることもできる。SEM A 5 B タンパク質を検出するためのこのような種類の抗体を調製する方法は、当該技術分野において周知であり、本発明において任意の方法を使用して、そのような抗体およびそれらの等価物を調製することができる。さらに、直接連結技法または間接標識技法により、抗体をシグナル発生分子で標識することができる。標識、および抗体を標識し、標的に対する抗体の結合を検出する方法は当該技術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に使用することができる。さらに、SEM A 5 B タンパク質を検出するための 2 つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

## 【0177】

キットは、前述の試薬のうちの 2 つ以上を含み得る。キットはさらに、SEM A 5 B mRNA に対するプローブまたは SEM A 5 B タンパク質に対する抗体を結合させるための固体基質および試薬、細胞を培養するための培地および容器、陽性および陰性対照試薬

10

20

30

40

50

、ならびに S E M A 5 B タンパク質に対する抗体を検出するための二次抗体を含み得る。例えば、がんを有さない対象から得られた組織試料は、有用な対照試薬として役立ち得る。本発明のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明書を備えた包装封入物（例えば、文書、テープ、C D - R O M 等）を含む、商業上の観点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。これらの試薬等は、ラベルを貼っ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得る。該容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成される。

【 0 1 7 8 】

一つの態様において、試薬が S E M A 5 B m R N A に対するプローブである場合には、該試薬を多孔性ストリップなどの固体基質上に固定化して、少なくとも1つの検出部位を形成させることができる。多孔性ストリップの測定または検出領域は、それぞれが核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。検査ストリップはまた、陰性および/または陽性対照用の部位を含み得る。あるいは、対照部位は、検査ストリップとは別のストリップ上に位置し得る。任意で、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含み得る、すなわち、第1検出部位ではより多い量の固定化核酸を、および以降の部位ではより少ない量の固定化核酸を含み得る。試験試料を添加すると、検出可能なシグナルを呈する部位の数により、試料中に存在する S E M A 5 B m R N A の量の定量的指標が提供される。検出部位は、適切に検出可能な任意の形状で構成することができ、典型的には、検査ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

10

【 0 1 7 9 】

本発明のキットは、陽性対照試料または S E M A 5 B 標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、S E M A 5 B 陽性試料を回収し、次にそれらの S E M A 5 B レベルをアッセイすることによって調製することができる。あるいは、精製 S E M A 5 B タンパク質またはポリヌクレオチドを、S E M A 5 B を発現しない細胞に添加して、陽性試料または S E M A 5 B 標準試料を形成してもよい。本発明において、精製 S E M A 5 B は組換えタンパク質であってよい。陽性対照試料の S E M A 5 B レベルは、例えばカットオフ値よりも高い。

20

【 0 1 8 0 】

1つの態様において、本発明はさらに、本発明の1種または複数種のペプチドを含む診断キットを提供する。

30

がんは、対象由来の試料（例えば、血液、組織）において、本発明のペプチドを使用して、本発明のペプチドに対する抗体を検出することによって診断することができる。

【 0 1 8 1 】

上記のように、がんの診断は、抗 S E M A 5 B 抗体の量と、対応する対照試料中の抗 S E M A 5 B 抗体の量との差を測定することにより、実施することができる。対象由来の試料（例えば、血液試料）が、本発明のペプチドに対する抗体を含み、その抗体の量が対照レベルと比較してカットオフ値よりも高いと判定される場合に、該対象ががん罹患していることが疑われる。

【 0 1 8 2 】

別の態様において、本発明の診断キットは、本発明のペプチドおよびそれに結合する H L A 分子を含み得る。抗原性ペプチドおよび H L A 分子を使用して抗原特異的 C T L を検出するための方法は、既に確立されている（例えば、A l t m a n J D e t a l . , S c i e n c e . 1 9 9 6 , 2 7 4 ( 5 2 8 4 ) : 9 4 - 6 ）。したがって、腫瘍抗原特異的 C T L を検出するための検出法に、本発明のペプチドと H L A 分子との複合体を適用することができ、それによってがんの再発および/または転移のより早期の発見が可能になる。さらに、本発明のペプチドを有効成分として含む医薬を適用できる対象を選択するために、または医薬の治療効果を評価するために、これを使用することができる。

40

【 0 1 8 3 】

詳細には、公知の方法に従って（例えば、A l t m a n J D e t a l . , S c i e n c e . 1 9 9 6 , 2 7 4 ( 5 2 8 4 ) : 9 4 - 6 を参照されたい）、放射標識された

50

H L A分子と本発明のペプチドとの、テトラマーなどのオリゴマー複合体を調製することができる。この複合体を用いて、例えば、がん罹患している疑いのある対象に由来する末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的C T Lを定量することにより、診断を行うことができる。

**【0184】**

本発明はさらに、本明細書に記載されるペプチドエピトープを使用することによって、対象の免疫学的応答を評価するための方法および診断用の剤を提供する。本発明の1つの態様において、本明細書に記載するようなH L A - A 2 4拘束性ペプチドを、対象の免疫応答を評価または予測するための試薬として用いることができる。評価される免疫応答は、免疫原を免疫担当細胞とインビトロまたはインビボで接触させることにより誘導される。好ましい態様において、免疫学的応答を評価するための免疫担当細胞は、末梢血、末梢血リンパ球(P B L)、および末梢血単核細胞(P B M C)から選択し得る。そのような免疫担当細胞を収集または単離するための方法は当技術分野において周知である。いくつかの態様において、ペプチドエピトープを認識して結合する抗原特異的C T Lの産生をもたらし得る任意の剤を、試薬として用いてもよい。ペプチド試薬を免疫原として使用することを必要としない。そのような解析に用いられるアッセイ系には、テトラマー、細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン放出アッセイ、またはE L I S P O Tアッセイなどの比較的最近の技術開発が含まれる。好ましい態様において、ペプチド試薬と接触させるための免疫担当細胞は、樹状細胞を含む抗原提示細胞であり得る。

10

**【0185】**

例えば、本発明のペプチドをテトラマー染色アッセイにおいて使用して、腫瘍細胞抗原または免疫原への曝露後の抗原特異的C T Lの存在について末梢血単核細胞を評価することができる。H L Aテトラマー複合体を使用して、抗原特異的C T Lを直接可視化し(例えば、O g g e t a l . , S c i e n c e 2 7 9 : 2 1 0 3 - 2 1 0 6 , 1 9 9 8 ; およびA l t m a n e t a l , S c i e n c e 1 7 4 : 9 4 - 9 6 , 1 9 9 6を参照されたい)、末梢血単核細胞の試料中の抗原特異的C T L集団の頻度を測定することができる。本発明のペプチドを使用するテトラマー試薬は、以下に記載するように作製することができる。

20

**【0186】**

H L A分子に結合するペプチドは、対応するH L A重鎖および2 - ミクログロブリンの存在下で再び折り畳まれて、3分子複合体を生成する。この複合体において、該重鎖のカルボキシル末端の前もってタンパク質中に作製した部位をビオチン化する。次にストレプトアビジンを該複合体に添加して、3分子複合体およびストレプトアビジンから構成されるテトラマーを形成する。蛍光標識ストレプトアビジンの手法によって、このテトラマーを使用して、抗原特異的細胞を染色することができる。次いで、この細胞を例えばフローサイトメトリーによって同定することができる。そのような解析を、診断または予後予測目的に使用することができる。この手順によって同定された細胞を治療目的に使用することもできる。

30

**【0187】**

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、免疫リコール応答を評価するための試薬を提供する(例えば、B e r t o n i e t a l , J . C l i n . I n v e s t . 1 0 0 : 5 0 3 - 5 1 3 , 1 9 9 7、およびP e n n a e t a l . , J E x p . M e d . 1 7 4 : 1 5 6 5 - 1 5 7 0 , 1 9 9 1を参照されたい)。例えば、治療すべきがんを有する個体から得た患者P B M C試料を、特異的ペプチドを用いて抗原特異的C T Lの存在について解析する。P B M Cを培養し、該細胞を本発明のペプチドで刺激することによって、単核細胞を含む血液試料を評価することができる。適切な培養期間後、増殖した細胞集団を例えばC T L活性について解析することができる。

40

**【0188】**

ペプチドは、ワクチンの有効性を評価するための試薬として用いることもできる。免疫原をワクチン接種した患者から得られたP B M Cを、例えば上記の方法のいずれかを用い

50

て解析することができる。患者のHLA型を決定し、該患者に存在するアリル特異的分子を認識するペプチドエピトープ試薬を解析のために選択する。ワクチンの免疫原性は、PBM C試料中のエピトープ特異的CTLの存在によって示され得る。

【0189】

本発明のペプチドは、当技術分野で周知の技法を用いて抗体を作製するために使用することもでき（例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley / Greene, NY; および Antibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい）、この抗体は、がんを診断、検出、またはモニターするための試薬として有用であり得る。そのような抗体は、HLA分子との関連でペプチドを認識する抗体、すなわちペプチド-MHC複合体に結合する抗体を含み得る。

10

【0190】

本発明のペプチドおよび組成物はさらなる用途をいくつか有し、そのうちの一部を本明細書に記載する。例えば、本発明は、SEMA5B免疫原性ポリペプチドの量によって特徴づけられる障害を診断または検出するための方法を提供する。これらの方法は、生物学的試料中でのSEMA5Bペプチドの量、またはSEMA5BペプチドとHLAクラスI分子との複合体の量を測定する段階を含む。ペプチドまたはペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現は、該ペプチドまたは該複合体の結合パートナーを用いてアッセイすることによって、測定または検出することができる。好ましい態様において、ペプチドまたは複合体の結合パートナーは、ペプチドを認識しかつペプチドに特異的に結合する抗体であってもよい。腫瘍生検材料などの生物学的試料中のSEMA5Bの発現は、SEMA5Bプライマーを用いる標準的なPCR増幅プロトコールによって試験することもできる。腫瘍発現の例は本明細書に提示してあり、SEMA5B増幅のための例示的な条件およびプライマーのさらなる開示は、国際公開公報第2003/27322号に見出すことができる。

20

【0191】

好ましくは、診断法は、対象から単離された生物学的試料をSEMA5Bペプチドに特異的な剤と接触させて、該生物学的試料中のSEMA5Bペプチドの存在を検出する段階を含む。本明細書で使用する「接触させる」とは、剤と、生物学的試料中に存在するSEMA5Bペプチドとの間の特異的相互作用が可能となるように、生物学的試料を、例えば濃度、温度、時間、イオン強度の適切な条件下で、該剤に十分に近接させて配置することを意味する。一般に、剤と生物学的試料を接触させるための条件は、分子と生物学的試料中のその同族物（例えば、タンパク質とその受容体同族物、抗体とそのタンパク質抗原同族物、核酸とその相補的配列同族物）との間の特異的相互作用を促進するための、当業者に公知の条件である。分子とその同族物との間の特異的相互作用を促進するための最適条件は、Lowらに対して発行された米国特許第5,108,921号に記載される。

30

【0192】

本発明の診断法は、インビボおよびインビトロの一方または両方で行うことができる。したがって、生物学的試料は、本発明においてインビボまたはインビトロに位置し得る。例えば、生物学的試料はインビボの組織であってよく、かつSEMA5B免疫原性ポリペプチドに特異的な剤を用いて、組織中のそのような分子の存在を検出することができる。あるいは、生物学的試料をインビトロで採取または単離することができる（例えば、血液試料、腫瘍生検材料、組織抽出物）。特に好ましい態様において、生物学的試料は細胞を含む試料であってよく、より好ましくは、診断または治療する対象から採取された腫瘍細胞を含む試料であってよい。

40

【0193】

あるいは、フルオレセイン標識HLA多量体複合体で染色することによって、抗原特異的T細胞の直接的な定量を可能にする方法により、診断を行うこともできる（例えば、Altman, J. D. et al., 1996, Science 274: 94; Altman

50

an, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:10330; )。細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン - 放出アッセイ、またはELISPOTアッセイもまた提供されている。テトラマー染色、細胞内リンホカイン染色、およびELISPOTアッセイはすべて、より慣例的なアッセイより少なくとも10倍感度が高いようである (Murali - Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8:177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413)。五量体 (例えば、米国特許出願公開第2004-209295号A)、デキストラマー (dextramer) (例えば、国際公開公報第02/07263号)、およびストレプタマー (streptamer) (例えば、Nature medicine 6:631-637 (2002)) を使用することもできる。

10

#### 【0194】

例として、いくつかの態様において、本発明は、本発明のSEMA5Bペプチドの少なくとも1種を投与された対象の免疫学的応答を診断または評価するための方法を提供し、該方法は以下の段階を含む：

(a) 免疫原を、該免疫原に対して特異的なCTLの誘導に適した条件下で免疫担当細胞と接触させる段階；

(b) 段階(a)で誘導されたCTLの誘導レベルを検出または決定する段階；および

20

(c) 対象の免疫学的応答をCTL誘導レベルと関連させる段階。

#### 【0195】

本発明との関連において、免疫原は、好ましくは、(a) 配列番号：2～69のアミノ酸配列の中より選択されるSEMA5Bペプチド、そのようなアミノ酸配列を有するペプチド、およびそのようなアミノ酸配列が1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸置換によって改変されたペプチド、のうち少なくとも1つを含む。一方、免疫原特異的CTLの誘導に適した条件は当技術分野において周知である。例えば、免疫担当細胞を、免疫原特異的CTLを誘導するために免疫原の存在下でインビトロで培養してもよい。免疫原特異的CTLを誘導する目的で、任意の刺激因子を細胞培養物に添加してもよい。例えば、IL-2は、CTL誘導のための好ましい刺激因子である。

30

#### 【0196】

いくつかの態様において、ペプチドがん療法によって治療される対象の免疫学的応答をモニターまたは評価する段階は、治療前、治療中、および/または治療後に行うことができる。一般に、がん療法プロトコール中、免疫原性ペプチドは、治療される対象に繰り返し投与される。例えば、免疫原性ペプチドを3～10週間にわたって毎週投与してもよい。したがって、対象の免疫学的応答は、がん療法プロトコール中に評価またはモニターされ得る。あるいは、がん療法に対する免疫学的応答を評価またはモニターする段階が、療法プロトコールの完了時であってもよい。

#### 【0197】

本発明によれば、免疫原特異的CTLの誘導が対照と比較して増強されていることにより、評価または診断される対象が、投与された免疫原に対して免疫学的に応答したことが示される。免疫学的応答を評価するのに適した対照には、例えば、免疫担当細胞をペプチドと接触させていない場合の、またはいかなるSEMA5Bペプチドとも異なるアミノ酸配列 (例えば、ランダムなアミノ酸配列) を有する対照ペプチドと接触させている場合の、CTL誘導レベルが含まれ得る。1つの好ましい態様においては、対象に投与された各免疫原間で免疫学的応答を比較することにより、対象の免疫学的応答を配列特異的な様式で評価する。特に、いくつかの種類のSEMA5Bペプチドについての混合物を対象に投与する場合であっても、免疫学的応答はペプチドに依存して異なる可能性がある。その場合には、各ペプチド間で免疫学的応答を比較することにより、対象がより強い応答を示すペプチドを同定することができる。

40

50

## 【 0 1 9 8 】

## X I I . 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、他のペプチドとは結合しない（または弱く結合する）。あるいは、抗体は本発明のペプチドおよびその相同体に結合し得る。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断および予後予測のアッセイならびに画像化方法論においても使用され得る。同様に、そのような抗体は、S E M A 5 B ががん患者において同じく発現または過剰発現する限り、他のがんの治療、診断、および/または予後予測において使用され得る。さらに、細胞内で発現する抗体（例えば、一本鎖抗体）は、S E M A 5 B の発現が関与するがんの治療において治療的に使用することができ、このがんの例には食道がん、N S C L C、R C C および S C L C が含まれるが、これらに限定されない。

10

## 【 0 1 9 9 】

本発明はまた、配列番号：2～69からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、好ましくは配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54からなる群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む、S E M A 5 B タンパク質（配列番号：75、78または80）もしくはその断片を検出および/または定量するための様々な免疫学的アッセイを提供する。そのようなアッセイは、必要に応じて、S E M A 5 B タンパク質またはその断片を認識してそれと結合し得る1種または複数種の抗S E M A 5 B 抗体を含み得る。本発明との関連において、S E M A 5 B ポリペプチドに結合する抗S E M A 5 B 抗体は、好ましくは他のペプチドを除外して、配列番号：2～69、特に配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54からなる群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドを好ましくは認識する。抗体の結合特異性を阻害試験によって確認することができる。すなわち、解析される抗体と全長のS E M A 5 B ポリペプチドとの間の結合が、配列番号：2～69のアミノ酸配列からなるいずれかの断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、この抗体は該断片と特異的に結合するとみなされる。本発明との関連において、そのような免疫学的アッセイは、様々な種類の放射免疫測定法、免疫クロマトグラフ技法、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）、酵素結合免疫蛍光測定法（E L I F A）などを含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の様々な免疫学的アッセイ形式の範囲内で行われる。

20

30

## 【 0 2 0 0 】

本発明の免疫学的であるが非抗体性の関連アッセイには、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）およびM H C 結合アッセイが含まれ得る。加えて、本発明は、S E M A 5 B 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を企図し、そのような方法の例には、本発明の標識された抗体を使用する放射性シンチグラフィ画像化法が含まれるが、これに限定されない。そのようなアッセイは、S E M A 5 B を発現するがんの検出、モニタリングおよび予後予測において臨床的に使用され、そのようながんの例には食道がん、N S C L C、R C C および S C L C が含まれるが、これらに限定されない。

## 【 0 2 0 1 】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体として任意の形態で用いることができ、これには、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り得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えにより作製されたヒト化抗体がさらに含まれ得る。

40

## 【 0 2 0 2 】

抗体を得るための抗原として用いられ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、本明細書に開示するヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から得ることができる。

## 【 0 2 0 3 】

50

本発明によれば、本発明の完全なペプチドおよび部分ペプチドが免疫化抗原として機能し得る。好適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。

#### 【0204】

本明細書において、抗体は、SEMA5Bペプチドの全長または断片のいずれかと反応するタンパク質と定義される。好ましい態様において、本発明の抗体は、配列番号：2～69からなる群より選択されるアミノ酸配列、より好ましくは配列番号：2、3、4、8、9、10、13、20、40、41、47および54のアミノ酸配列を有する、SEMA5B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、免疫原として使用する前にペプチドを任意に精製してもよい。本発明との関連において、免疫原性を高めるために、オリゴペプチド（例えば、9merまたは10mer）を担体と結合または連結させてもよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）が周知である。KLHとペプチドを結合するための方法もまた、当技術分野において周知である。

10

#### 【0205】

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することができ、次にこれを用いて本明細書に記載のように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り宿主細胞の外部または内部から回収することができ、後にこれを抗原として用いることができる。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体もしくはそれらの溶解物、または化学合成したペプチドを抗原として用いてもよい。

20

#### 【0206】

任意の哺乳動物を抗原により免疫することができるが、細胞融合のために使用される親細胞との適合性を考慮に入れることが好ましい。一般に、齧歯目（Rodentia）、ウサギ目（Lagomorpha）、または霊長目（Primate）の動物を使用することができる。齧歯目科の動物には、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）（旧世界ザル）のサルが含まれる。

30

#### 【0207】

動物を抗原で免疫する方法は、当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物を免疫するための標準的な方法である。より具体的には、抗原を適量のリン酸緩衝食塩水（PBS）、生理食塩水などで希釈し、懸濁させることができる。必要に応じて、抗原懸濁液を、フロイント完全アジュバントなどの適量の標準的アジュバントと混合し、乳化した後、哺乳動物に投与することができる。その後、適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日毎に数回投与することが好ましい。免疫化には、適切な担体を用いてもよい。上記のように免疫した後、血清を、所望の抗体の量の増加に関して標準的方法で調べることができる。

#### 【0208】

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望の抗体の増加に関して調べた免疫後の哺乳動物から血液を回収し、任意の従来法により血液から血清を分離することによって、調製することができる。ポリクローナル抗体はポリクローナル抗体を含む血清を含んでよく、またポリクローナル抗体を含む画分を該血清から単離してもよい。免疫グロブリンGまたはMは、本発明のペプチドのみを認識する画分から、例えば、本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた上で、この画分をプロテインAまたはプロテインGカラムを用いてさらに精製して、調製することができる。

40

#### 【0209】

本発明との関連における使用のためのモノクローナル抗体を調製するためには、免疫細胞を、抗原で免疫した哺乳動物から回収し、上記のように血清中の所望の抗体の増大した

50

レベルについて調べ、細胞融合に供する。細胞融合に用いる免疫細胞は、好ましくは脾臓から得ることができる。上記の免疫細胞と融合すべき他の好ましい親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髄腫細胞、およびより好ましくは薬物による融合細胞の選択のための特性を獲得した骨髄腫細胞が含まれる。

【0210】

公知の方法、例えば、Milsteinらの方法(Galfrè and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))に従って、上記の免疫細胞および骨髄腫細胞を融合させることができる。

【0211】

細胞融合によって結果として得られたハイブリドーマは、それらをHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地)などの標準的な選択培地において培養することによって選択することができる。細胞培養は典型的に、HAT培地中で、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)が死滅するのに十分な期間である数日間から数週間にわたって継続する。その後、標準的な限界希釈を行い、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およびクローニングすることができる。

10

【0212】

ハイブリドーマを調製するために、非ヒト動物が抗原で免疫される上記方法に加えて、EBウイルスを感染させたヒトリンパ球などのヒトリンパ球が、ペプチド、ペプチド発現細胞またはそれらの溶解物によりインビトロにおいて免疫される場合がある。次いで、免疫化されたリンパ球を、U266などの無限に分裂することができるヒト由来の骨髄腫細胞と融合させて、該ペプチドに結合し得る所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる(特開昭63-17688号)。

20

【0213】

得られたハイブリドーマは続いてマウスの腹腔内に移植され、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、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ー、または本発明のペプチドを結合させたアフィニティークラムにより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のためだけではなく、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使用することができる。

30

【0214】

あるいは、免疫したリンパ球などの抗体を産生する免疫細胞を癌遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を用いて組換えにより調製することもできる(例えば、MacMillan Publishers LTD(1990)により英国で刊行された、Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodiesを参照されたい)。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫化リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製される組換え抗体を提供する。

40

【0215】

本発明の抗体は、本発明のペプチドの1種または複数種に結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、または、H鎖およびL鎖に由来するFv断片が適切なリンカーによって連結される一本鎖Fv(scFv)であってよい(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。より具体的には、抗体断片は、抗体をパインまたはペプシンなどの酵素で処理することにより作製することができる。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、適切な宿主細胞内で発現させることができる(例えば、Coet al., J Immunol

50

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)を参照されたい。

【0216】

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することができる。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で慣例的である。

10

【0217】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体に由来する相補性決定領域(CDR)と、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域(FR)および定常領域とを含むヒト化抗体として得ることもできる。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、齧歯類のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することによって行うことができる(例えば、Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988)を参照されたい)。したがって、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全には満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されたキメラ抗体である。

20

【0218】

ヒトのフレームワーク領域および定常領域に加えて、ヒト可変領域をも含む完全なヒト抗体を用いることもできる。そのような抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を用いて作製することができる。例えば、インビトロの方法には、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用が含まれる(例えば、Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991))。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、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たトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することもできる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号、第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号に記載されている。

30

【0219】

上記のようにして得られた抗体は、均質になるまで精製してもよい。例えば、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って、抗体の分離および精製を行うことができる。例えば、これらに限定されないが、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、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の使用を適切に選択および組み合わせることによって、抗体を分離および単離することができる(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ークロマトグラフィーとして使用することができる。使用すべき例示的なプロテインAカラムには、例えば、Hyper D, POROSおよび、Sephacrose F.F.(Pharmacia)が含まれる。

40

【0220】

適切なクロマトグラフィー法の例には、アフィニティークロマトグラフィー以外に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーなどが含まれる(Strategies for Protein Purification and Characterizat

50

ion: A Laboratory Course Manual. 編者: Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)). クロマトグラフィー手順は、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC および FPLC によって実施することができる。

#### 【0221】

例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、および/または免疫蛍光法を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISA の場合、本発明の抗体をプレート上に固定化し、本発明のペプチドを該プレートに添加し、次に抗体産生細胞の培養上清または精製抗体といった所望の抗体を含有する試料を添加する。次いで、一次抗体を認識し、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を該プレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。抗体の結合活性を評価するために、C末端断片またはN末端断片などのペプチド断片を抗原として用いてもよい。本発明の抗体の活性を評価するために、BIACore (Pharmacia) を使用してよい。

10

#### 【0222】

本発明の抗体を本発明のペプチドを含有すると考えられる試料に対して曝露し、該抗体と該ペプチドと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って、上記の方法によって本発明のペプチドの検出または測定が可能になる。

20

本発明のペプチドを検出または測定する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、該ペプチドを使用する種々の実験において使用され得る。

#### 【0223】

##### XIII. 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ポリヌクレオチドが導入されたベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明のベクターは、本発明のペプチドを発現させるための、または、遺伝子治療のために本発明のポリ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のキャリア、とりわけ、DNA のキャリアとしての有用性が見出される。

30

#### 【0224】

大腸菌が宿主細胞として選択され、かつ、ベクターが大腸菌 (例えば、JM109、DH5、HB101 または XL1 Blue) において増幅され、また、大量に生成される場合、ベクターは、大腸菌内における増幅のために適する「複製起点」と、形質転換された大腸菌を選択するため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、カナマイシンまたはクロラムフェニコールなどの薬物によって選択される薬物耐性遺伝子) とを有する必要がある。例えば、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などを用いることができる。加えて、pGEM-T、pDIRECT、および pT7 もまた上記のベクターと同様に、cDNA のサブクローニングおよび抽出に用いることができる。ベクターを本発明のタンパク質の産生に用いる場合には、発現ベクターが使用され得る。例えば、大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。大腸菌 (例えば、JM109、DH5、HB101 または XL1 Blue など) が宿主細胞として使用される場合、ベクターは、所望の遺伝子を大腸菌において効率的に発現させ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 プロモーターなどを有する必要がある。この点に関して、例えば、pGEX-5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpress システム」(Qiagen)、pEGFP、および pET (この場合、宿主は好まし

40

50

くはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である)を上記のベクターの代わりに用いることができる。さらにベクターは、ペプチド分泌のためのシグナル配列を含んでもよい。ペプチドを大腸菌のペリプラズムに分泌させる例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列(Lei et al., J Bacteriol 169:4379(1987))である。ベクターを標的宿主細胞に導入する手段には、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。

#### 【0225】

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、「ピキア(Pichia)発現キット」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)および枯草菌(Bacillus subtilis)由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)を、本発明のポリペプチドを産生させるために使用することができる。

10

#### 【0226】

ベクターを動物細胞(例えば、CHO細胞、COS細胞またはNIH3T3細胞など)において発現させるために、ベクターは、そのような細胞における発現のために必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター(Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MMLV-LTRプロモーター、EF1プロモーター(Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMVプロモーターなど、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、薬物(例えば、ネオマイシン、G418)によって選択される薬物耐性遺伝子)を有する必要がある。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。

20

#### 【0227】

本明細書中下記において、本発明が、実施例を参照して、より詳細に記載される。しかしながら、下記の材料、方法および実施例は、本発明の特定の態様を行い、または使用することにおいて当業者を助けるために役立つが、本発明の態様を例示することが意図されるだけであり、したがって、本発明の範囲を限定することは決して意図されない。当業者が容易に認識するように、本明細書に記載される方法および材料と類似するか、または同等である方法および材料を、本発明を実施することまたは試験することにおいて使用することができる。

30

#### 【実施例】

#### 【0228】

##### 実験1

40

##### 材料および方法

##### 細胞株

HLA-A\*2402陽性Bリンパ芽球様細胞株であるTISIを、IHWG Cell and Gene Bank(Seattle, WA)から購入した。アフリカミドリザル腎細胞株であるCOS7は、ATCCから購入した。

#### 【0229】

##### SEMA5B由来ペプチドの候補選択

HLA-A\*2402分子と結合するSEMA5B由来の9merおよび10merペプチドを、結合予測ソフトウェア「BIMAS」([http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind))(Parker et a

50

l. (J Immunol 1994, 152(1):163-75)、Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6):1872-81) および「NetMHC3.2」(<http://www.cbs.dtu.dk/service/NetMHC/>) (Buus et al. (Tissue Antigens, 62:378-84, 2003)、Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004)) を使用して予測した。これらのペプチドは、Biosynthesis (Lewisville, Texas) により、標準的な固相合成法に従って合成され、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製された。該ペプチドの純度 (>90%) および同一性を、それぞれ分析用 HPLC および質量分析によって決定した。ペプチドをジメチルスルホキシドに 20 mg/ml で溶解し、-80 で保存した。

10

20

30

40

50

### 【0230】

#### インビトロでのCTL誘導

単球由来の樹状細胞 (DC) を抗原提示細胞として用いて、ヒト白血球抗原 (HLA) 上に提示されたペプチドに対する細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 応答を誘導した。他所に記載されているように、DC をインビトロで作製した (Nakahara S et al., Cancer Res 2003 JUL 15, 63(14):4112-8)。具体的には、Ficoll-Plus (Pharmacia) 溶液によって健常なボランティア (HLA-A\*2402 陽性) から単離した末梢血単核細胞を、プラスチック製の組織培養ディッシュ (Becton Dickinson) へ附着させることによって分離し、それらを単球画分として濃縮した。2% の加熱非働化した自己血清 (AS) を含む AIM-V 培地 (Invitrogen) 中、1000 IU/ml の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (R&D System) および 1000 IU/ml のインターロイキン (IL) - 4 (R&D System) の存在下で、単球が濃縮された集団を培養した。7 日間の培養後、サイトカインで誘導した DC に、AIM-V 培地中で 37 で 3 時間、3 μg/ml の 2-ミクログロブリンの存在下で、20 μg/ml の各合成ペプチドをパルスした。作製された細胞は、自身の細胞表面上に、CD80、CD83、CD86、および HLA クラス II などの DC 関連分子を発現しているようであった (データは示さず)。次いで、ペプチドパルスしたこれらの DC を X 線照射 (20 Gy) により不活化し、CD8 Positive Isolation Kit (Dyna) を用いた陽性選択によって得られた自己 CD8+ T 細胞と 1:20 の比率で混合した。これらの培養物を 48 ウェルプレート (Corning) 中に準備し、各ウェルは、0.5 ml の AIM-V / 2% AS 培地中に、 $1.5 \times 10^4$  個のペプチドパルスした DC、 $3 \times 10^5$  個の CD8+ T 細胞、および 10 ng/ml の IL-7 (R&D System) を含んだ。3 日後、これらの培養物に、IL-2 (CHIRON) を最終濃度 20 IU/ml まで添加した。7 日目および 14 日目に、ペプチドパルスした自己 DC で T 細胞をさらに刺激した。DC は上記と同じ方法によって毎回調製した。21 日目に、3 回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスした TISI 細胞に対して CTL を試験した (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

### 【0231】

#### CTL 増殖手順

Riddellら (Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16):1038-44; Riddell SR et

t al., Nat Med 1996 Feb, 2(2): 216-23) によって記載されている方法と類似の方法を用いて、CTLを培養下で増殖させた。40 ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体(Pharmingen)の存在下で、マイトマイシンCによって不活化した2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株と共に、合計 $5 \times 10^4$ 個のCTLを25 mlのAIM-V/5%AS培地中に懸濁した。培養開始1日後に、120 IU/mlのIL-2を該培養物に添加した。5、8、および11日目に、30 IU/mlのIL-2を含む新たなAIM-V/5%AS培地を、該培養物に供給した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1): 94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8): 1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

#### 【0232】

##### CTLクローンの樹立

96丸底マイクロタイタープレート(Nalge Nunc International)においてCTL0.3個、1個、および3個/ウェルとなるように、希釈を行った。CTLを、 $1 \times 10^4$ 個細胞/ウェルの2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株、30 ng/mlの抗CD3抗体、および125 IU/mlのIL-2と共に、合計150  $\mu$ l/ウェルの5%AS含有AIM-V培地中で培養した。10日後、50  $\mu$ l/ウェルのIL-2を、IL-2の最終濃度が125 IU/mlに到達するように該培地に添加した。14日目にCTL活性を試験し、上記と同じ方法を用いてCTLクローンを増殖させた(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

#### 【0233】

##### 特異的CTL活性

特異的CTL活性を調べるために、IFN-ELISPOTアッセイおよびIFN-ELISAを行った。ペプチドパルスしたTISI( $1 \times 10^4$ 個/ウェル)を刺激細胞として調製した。48ウェル中の培養細胞を応答細胞として使用した。IFN-ELISPOTアッセイおよびIFN-ELISAは、製造業者の手順に従って行った。

#### 【0234】

##### 標的遺伝子およびHLA-A24のいずれか一方または両方を強制的に発現する細胞の樹立

標的遺伝子またはHLA-A\*2402のオープンリーディングフレームをコードするcDNAをPCRによって増幅した。PCR増幅産物を発現ベクターにクローニングした。製造業者の推奨する手順に従ってリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いて、標的遺伝子ヌルおよびHLA-A\*2402ヌル細胞株であるCOS7に該プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから2日後、トランスフェクトした細胞をベルセン(Invitrogen)を用いて回収し、CTL活性アッセイのための刺激細胞( $5 \times 10^4$ 細胞/ウェル)として使用した。

#### 【0235】

##### 結果

##### がんにおけるSEMA5B発現の増強

cDNAマイクロアレイを用いて様々ながんから得られた包括的遺伝子発現プロファイルデータにより、SEMA5B(GenBankアクセッション番号NM\_001031702; 配列番号: 74)の発現ががん組織において、対応する正常組織と比較して特異

的に上昇していることが明らかになった。SEMA5Bの発現は、2例の食道がんのうち1例、1例のNSCLCのうち1例、17例のRCCのうち14例、および4例のSCLCのうち4例において確かに上昇していた(表1)。

【0236】

【表1】

対応する正常組織と比較して、がん性組織においてSEMA5Bの上方制御が観察された症例の割合

がん/腫瘍	割合
食道がん	1/2
NSCLC	1/1
RCC	14/17
SCLC	4/4

10

【0237】

SEMA5B由来のHLA-A24結合ペプチドの予測

表2aおよび2bは、HLA-A24に結合するSEMA5Bの9merおよび10merペプチドを、結合親和性の高い順に示す。エピトープペプチドを決定するために、HLA-A24結合能を有する可能性がある合計69種のペプチドを選択して調べた。

【0238】

【表 2 a】

## SEMA5B由来のHLA-A24結合性9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	配列番号
247	LYAATVIDF	99	1
512	CYLEELHVL	244	2
1010	PYSEIPVIL	404	3
196	VFMCGTNAF	429	4
355	YYNELQSAF	502	5
139	IVGARNYLF	554	6
412	AWLPIANPI	583	7
723	IFWASWGSW	829	8
280	KWLNEPNFV	922	9
293	IGLFAYFFL	1370	10
374	VFTTNVNSI	1401	11
1093	YTPMEFKTL	1488	12
470	RFSHLVVDL	1570	13
371	IYGVFTTNV	1865	14
1126	TYYPSPLNK	2037	15
29	GWTVGGWLL	2062	16
533	ILHSARALF	3110	17
110	DLQPWVSNF	3118	18
590	NMSLWTQNI	3324	19
558	AYRSQGACL	3481	20
667	WTPWSSWAL	3501	21
1055	VYLSCQHCQ	3692	22
1122	VYTTTYYP	3705	23
1099	KTLNKNNLI	3716	24
273	RTAQYNSKW	3825	25
291	YDIGLFAYF	3843	26
24	QQLRCGWTV	4294	27
525	REPLRSLRI	4296	28
1114	FYPLQQTNV	4449	29
144	NYLFRSLA	4680	30
331	LLEDWTTF	4761	31
490	YIGTESGTI	4985	32

10

20

30

40

開始位置	アミノ酸配列	結合スコア	配列番号
362	AFHLPEQDL	24	33
404	RYQENPRAA	18	34
440	RSLQDAQRL	14.4	35
1092	KYTPMEFKT	13.2	36
532	RILHSARAL	12	37
264	RSLGSGPPL	12	38
184	NYVRVLIVA	10.5	39

10

開始位置は、SEMA5BのN末端からのアミノ酸残基数を示す。

結合スコアおよび解離定数 [ Kd ( nM ) ] は「BIMAS」および「NetMHC3.2」から導き出している。

【 0 2 3 9 】

【 表 2 b 】

SEMA5B由来のHLA-A24結合性10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	配列番号
354	FYYNELQSAF	121	40
290	AYDIGLFAYF	136	41
404	RYQENPRAAW	294	42
1114	FYPLQQTNVY	329	43
666	AWTPWSSWAL	1299	44
291	YDIGLFAYFF	2015	45
138	LIVGARNYLF	2129	46
1044	CFLGSGLLTL	2237	47
119	TYPGARDFSQ	2264	48
335	TWTTFMKARL	2436	49
117	NFTYPGARDF	2683	50
532	RILHSARALF	2696	51
297	AYFFLRENAV	2699	52
330	FLLEDTWTF	2919	53
489	LYIGTESGTI	3355	54
246	ELYAATVIDF	4738	55
440	RSLQDAQRLF	4857	56

20

30

開始位置	アミノ酸配列	結合スコア	配列番号
1092	KYTPMEFKTL	576	57
797	RFRFTCRAPL	40	58
286	NFVAAYDIGL	30	59
540	LFVGLRDGVL	30	60
1097	EFKTLNKNNL	24	61
500	KALSTASRSL	12	62
803	RAPLADPHGL	12	63
27	RCGWTVGGWL	11.2	64
898	EYQDCNPQAC	10.8	65
52	RTAEGPIMVL	9.6	66
747	RACENGNSCL	9.6	67
1127	YYPSPLNKHS	9	68
144	NYLFRLSLAN	9	69

10

開始位置は、SEMA5BのN末端からのアミノ酸残基数を示す。

結合スコアおよび解離定数 $[K_d(nM)]$ は「BIMAS」および「NetMHC3.2」から導き出している。

20

#### 【0240】

##### HLA-A\*2402拘束性のSEMA5B由来予測ペプチドによるCTL誘導

SEMA5B由来のそれらのペプチドに対するCTLを、「材料および方法」に記載されるプロトコールに従って作製した。ペプチド特異的なCTL活性をIFN- $\gamma$ のELISPOTアッセイによって検出した(図1a~l)。SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)を用いたウェル番号#7(a)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)を用いたウェル番号#3(b)、SEMA5B-A24-9-196(配列番号:4)を用いたウェル番号#3(c)、SEMA5B-A24-9-723(配列番号:8)を用いたウェル番号#4(d)、SEMA5B-A24-9-280(配列番号:9)を用いたウェル番号#5(e)、SEMA5B-A24-9-293(配列番号:10)を用いたウェル番号#3(f)、SEMA5B-A24-9-470(配列番号:13)を用いたウェル番号#6(g)、SEMA5B-A24-9-558(配列番号:20)を用いたウェル番号#3(h)、SEMA5B-A24-10-354(配列番号:40)を用いたウェル番号#4(i)、SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)を用いたウェル番号#6(j)、SEMA5B-A24-10-1044(配列番号:47)を用いたウェル番号#5(k)およびSEMA5B-A24-10-489(配列番号:54)を用いたウェル番号#4(l)は、対照ウェルと比較して強力なIFN- $\gamma$ 産生を実証した。一方で、表2aおよび表2bに示される他のペプチドはHLA-A\*2402との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドによる刺激では、特異的なCTL活性は検出されなかった。典型的な陰性データとして、SEMA5B-A24-9-247(配列番号:1)により刺激されたCTLからは、特異的なIFN- $\gamma$ 産生は観察されなかった(m)。まとめると、これらの結果は、SEMA5B由来の12種の選択されたペプチドが強力なCTLを誘導できたことを示す。

30

40

#### 【0241】

##### SEMA5B由来ペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイによって検出されたペプチド特異的なCTL活性を示した、SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)を用いたウェル番号#7、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)を用いたウェル番号#3、SEMA5B-A24-9-293(配列番号:10)を用いたウェル番号#3およびSEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)を用いたウェル番号#6における細胞を

50

増殖させ、CTL株を樹立した。これらのCTL株のCTL活性をIFN- $\gamma$ のELISAによって測定した(図2)。CTL株は、ペプチドパルスしなかった標的細胞と比較して、SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)(a)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)(b)、SEMA5B-A24-9-293(配列番号:10)(c)およびSEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)(d)ペプチドでパルスした標的細胞に対して強力なIFN- $\gamma$ 産生を実証した。さらに、「材料および方法」に記載した通りに、CTL株から限界希釈によってCTLクローンを樹立し、ペプチドによってパルスされた標的細胞に対するCTLクローンからのIFN- $\gamma$ 産生をIFN- $\gamma$  ELISAによって測定した。強力なIFN- $\gamma$ 産生は、SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)(a)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)(b)、およびSEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)(c)で刺激したCTLクローンから観察された(図3)。

10

#### 【0242】

SEMA5BおよびHLA-A\*2402を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)ペプチドに対して産生された樹立CTL株を、SEMA5BおよびHLA-A\*2402分子を発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長SEMA5BおよびHLA-A\*2402遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞(SEMA5BおよびHLA-A\*2402遺伝子が発現する標的細胞の特異的モデル)を刺激細胞として調製し、全長SEMA5BまたはHLA-A\*2402のどちらか一方をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として使用した。図4において、SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)で刺激したCTL株は、SEMA5BおよびHLA-A\*2402の両方が発現するCOS7細胞に対して強力なCTL活性を示した。一方、対照に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった。したがって、このデータにより、SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)ペプチドが内因的にプロセッシングされ、HLA-A\*2402分子とともに標的細胞上に発現され、CTLによって認識されたことが明確に実証される。これらの結果は、SEMA5Bに由来するこのペプチドが、SEMA5Bを発現する腫瘍を有する患者にがんワクチンを適用するために利用可能であり得ることを示した。

20

#### 【0243】

##### 抗原ペプチドの相同性解析

SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)、SEMA5B-A24-9-196(配列番号:4)、SEMA5B-A24-9-723(配列番号:8)、SEMA5B-A24-9-280(配列番号:9)、SEMA5B-A24-9-293(配列番号:10)、SEMA5B-A24-9-470(配列番号:13)、SEMA5B-A24-9-558(配列番号:20)、SEMA5B-A24-10-354(配列番号:40)、SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)、SEMA5B-A24-10-1044(配列番号:47)およびSEMA5B-A24-10-489(配列番号:54)で刺激したCTLは、有意かつ特異的なCTL活性を示した。これらの結果は、SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)、SEMA5B-A24-9-196(配列番号:4)、SEMA5B-A24-9-723(配列番号:8)、SEMA5B-A24-9-280(配列番号:9)、SEMA5B-A24-9-293(配列番号:10)、SEMA5B-A24-9-470(配列番号:13)、SEMA5B-A24-9-558(配列番号:20)、SEMA5B-A24-10-354(配列番号:40)、SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)、SEMA5B-A24-10-1044(配列番号:47)およびSEMA5B-A24-10-489(配列番号:54)の配列が、ヒト免疫系を感作することが知られている他の分子に由来するペプチドと相同的であるという事実に起因する可能性がある。この可能性を排除するために、BLASTアルゴリズム(<http://b>

30

40

50

last.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)を用いて、クエリーとしてのこれらのペプチド配列に対して相同性解析を行ったが、有意な相同性を有する配列は認められなかった。相同性解析の結果は、SEMA5B-A24-9-512(配列番号:2)、SEMA5B-A24-9-1010(配列番号:3)、SEMA5B-A24-9-196(配列番号:4)、SEMA5B-A24-9-723(配列番号:8)、SEMA5B-A24-9-280(配列番号:9)、SEMA5B-A24-9-293(配列番号:10)、SEMA5B-A24-9-470(配列番号:13)、SEMA5B-A24-9-558(配列番号:20)、SEMA5B-A24-10-354(配列番号:40)、SEMA5B-A24-10-290(配列番号:41)、SEMA5B-A24-10-1044(配列番号:47)およびSEMA5B-A24-10-489(配列番号:54)の配列が固有のものであることを示し、したがって本発明者らの知る限りでは、これらの分子が、何らかの非関連分子に対して意図しない免疫学的応答を引き起こす可能性はほとんどない。

10

**【0244】**

結論として、本明細書において同定されたSEMA5B由来の新規HLA-A\*2402エピトープペプチドは、がん免疫療法の分野で有用であることが見いだされ得る。

**【産業上の利用可能性】****【0245】**

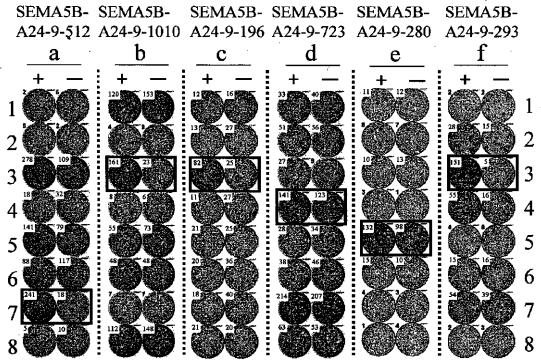
本発明は、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し、かつ幅広いがんの種類に対する適用性を有し得る、SEMA5B由来の新規エピトープペプチドを提供する。そのようなペプチドは、SEMA5Bに関連する疾患、例えばがん、より詳細には食道がん、NSCLC、RCCおよびSCLCに対するペプチドワクチンとして利用することができる。

20

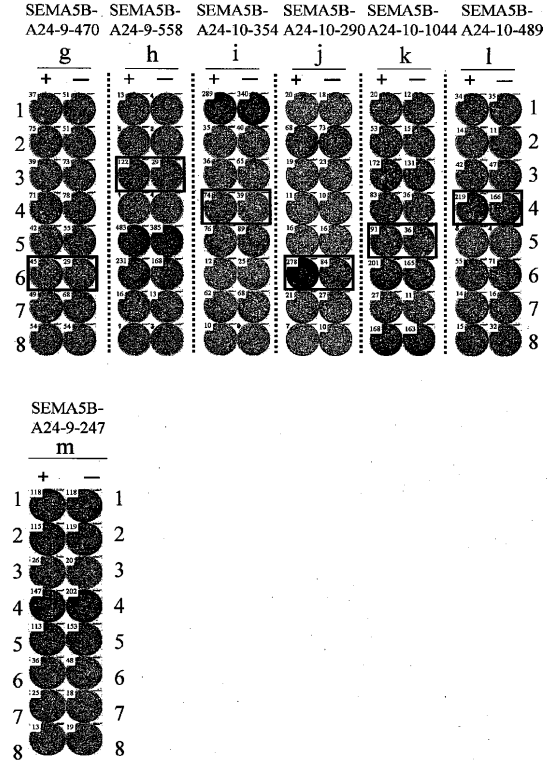
**【0246】**

本明細書において、本発明をその特定の態様に関して詳細に説明しているが、前述の説明は本質的に例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。慣例的な実験を通して、当業者は、その境界および限界が添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変がその中でなされ得ることを容易に認識するであろう。

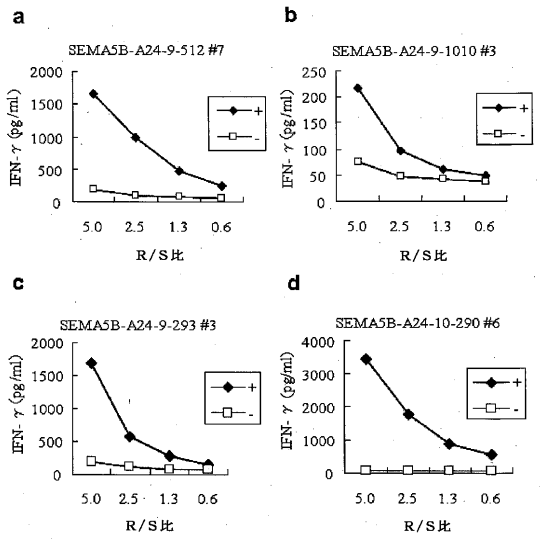
【 図 1 - 1 】



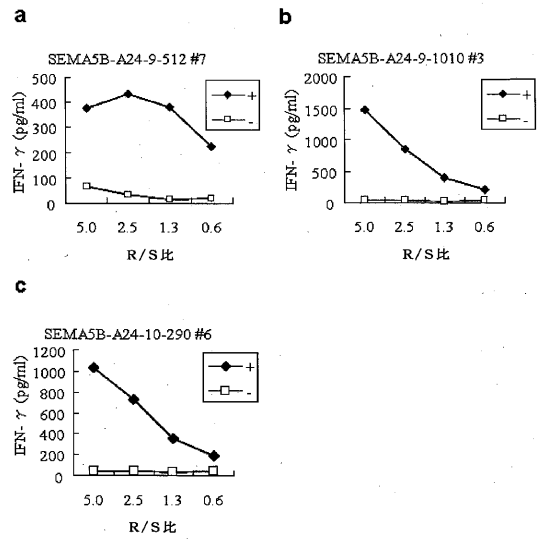
【 図 1 - 2 】



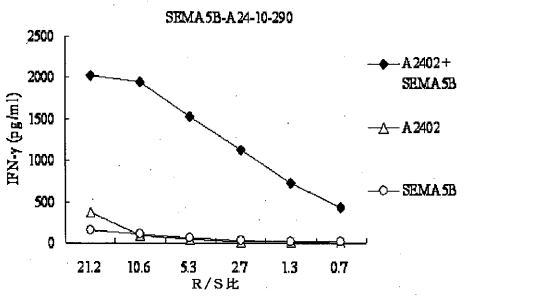
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2013/007051

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. C07K7/00, A61K31/7088, A61K39/00, A61P35/00, C07K16/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N15/09  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2014 Registered utility model specifications of Japan 1996-2014 Published registered utility model applications of Japan 1994-2014  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST/580(JDreamIII), WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/013575 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2007.02.01, p. 106, line 14-17 & JP 2009-502112 A & EP 1907580 A & CN 101278059 A	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2002/074237 A2 (CORIXA CORPORATION) 2002.09.26, EXAMPLE 6 & US 2003/0109434 A1 & AU 2002254482 A	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2006/100089 A2 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG) 2006.09.28, EXAMPLE 6, Fig. 16-17 & JP 2008-537546 A & JP 2012-207020 A & JP 2013-99331 A & JP 5253999 B & US 2009/0214550 A1 & EP 1861118 A & EP 2311487 A2 & EP 2314309 A2 & EP 2314310 A2 & EP 2327417 A2 & DE 102005013846 A	1-7, 10-13, 15-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12.02.2014	Date of mailing of the international search report 25.02.2014	
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office</b> 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer <b>HAMADA, Mitsuhiro</b> Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448	4B 3763

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/007051
--

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 2005/030250 A2 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG) 2005.04.07, EXAMPLE 8, Fig. 16-17 & JP 2007-506417 A & JP 2012-110324 A & JP 5144933 B & JP 2013-63975 A & US 2008/0166340 A1 & US 2011/0135640 A1 & EP 1664113 A & DE 10344799 A & CA 2539837 A & AU 2004275500 A & CA 2814269 A & AU 2011213901 A & AU 2012233057 A	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2009/069302 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.06.04, Claims & JP 2011-504875 A & US 2011/0052614 A1 & EP 2247725 A & AU 2008330996 A & CA 2706835 A & MX 2010005816 A & CN 101952429 A & KR 10-2010-0101609 A	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2008/126413 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2008.10.23, Claims & JP 2010-523471 A & US 2012/0093843 A1 & EP 2155872 A & EP 2508601 A2	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2004/024766 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2004.03.25, Claims & JP 2007-191485 A & JP 3971769 B & JP 2007-277251 A & US 2006/0216301 A1 & US 2009/0252752 A1 & US 2010/0215676 A1 & US 2012/0328636 A1 & US 2013/0028923 A1 & EP 1548032 A1	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2011/074236 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011.06.23, Claims & JP 2013-513549 A & US 2012/0308591 A1 & EP 2513136 A	1-7, 10-13, 15-19
Y	WO 2011/125334 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2011.10.13, Claims & JP 2013-523084 A & US 2013/0108664 A1 & EP 2556084 A	1-7, 10-13, 15-19
P, X	WO 2012/169200 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2012.12.13, Table 2a SEQ ID NO 1045 and 46 & TW 201302800 A	1-7, 10-13, 15-19

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/007051

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i,  
A61P35/00(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i,  
C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/007051
--

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 8, 9, 14  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claims 8, 9, 14 relates to a method of immunotherapy which involves a procedure in which a chemical substance (peptide) is administered to the human body, which does not require an international search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a) (i) and [Rule 39.1 (iv)].
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-7, 10-13, 15-19 relate to 12 antigenic peptides having cytotoxic T lymphocyte (CTL) inducibility, and use thereof. Since these peptides have no structural feature in common, it is recognized that these peptides are common to each other exclusively in being antigenic peptides originating in SEMA5B. The difference of origin is not taken account on novelty of chemical compound invention, and many nona- or deca-peptides having CTL inducibility are already reported (see D5-D9)

Therefore, originating in SEMA5B cannot be considered as a special technical feature common to the 12 peptides as described above. As a result, the present case has 12 groups of inventions respectively having the 12 peptides per se, and this international application doesn't satisfy the requirement for unity of invention (Regulations Rule 13 (PCT Rules 13.1, 13.2, and 13.3)).

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

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 M	
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
A 6 1 K 47/46 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/46	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 35/17 Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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 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 角田 卓也

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

(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

(72)発明者 吉村 祥子

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

(72)発明者 渡辺 朝久

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) 2G045 AA25 DA36

4B024 AA01 AA12 BA36 BA43 BA54 CA02 CA09 DA02 DA03 EA04

	GA03	GA04	GA11							
4B063	QA01	QA19	QQ03	QQ08	QQ96	QR55	QR77	QR90	QS28	QS33
	QX02									
4B064	AG27	CA10	CA20	CC24	DA01	DA13				
4B065	AA94X	AA99Y	AB01	AB04	AC12	AC14	AC20	BA02	BA08	CA24
	CA25	CA44	CA46							
4C076	AA99	BB01	BB13	BB15	BB16	CC27	EE57	FF34		
4C084	AA13	NA14	ZB261	ZC411						
4C085	AA03	BA99	CC32	EE01	GG02	GG03	GG04	GG05	GG06	GG08
4C087	AA01	AA02	BB37	MA52	MA66	ZB26	ZC41			
4H045	AA10	AA30	BA15	CA40	DA76	DA86	EA28	FA33	FA74	

专利名称(译)	SEMA 5 B肽和包含它的疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016502499A</a>	公开(公告)日	2016-01-28
申请号	JP2015528112	申请日	2013-12-02
[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	角田卓也 大沢龍司 吉村祥子 渡辺朝久		
发明人	角田 卓也 大沢 龍司 吉村 祥子 渡辺 朝久		
IPC分类号	C07K7/06 C12N15/09 C12N15/00 C12N5/0783 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/15 C12N1/19 C12Q1/02 C07K16/18 C12N5/0784 C12N5/071 A61K39/00 A61K48/00 A61K47/46 A61P35/00 A61P43/00 A61K35 /17 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K7/06 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/53 C07K14 /4703 C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/34 G01N33/505		
FI分类号	C07K7/06 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C12N5/00.202.L C12N5/00.101 C12N1/21 C12N1/15 C12N1 /19 C12Q1/02 C07K16/18 C12N5/00.202.M C12N5/00.202.A C12N5/00.102 A61K39/00.H A61K48/00 A61K47/46 A61P35/00 A61P43/00.111 A61K35/17.Z G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA43 4B024/BA54 4B024 /CA02 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ96 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063 /QR90 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA94X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC12 4B065 /AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA99 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/CC27 4C076/EE57 4C076 /FF34 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC411 4C085/AA03 4C085/BA99 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C087 /AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/MA52 4C087/MA66 4C087/ZB26 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 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 五十嵐弘		
优先权	61/733279 2012-12-04 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本文描述了抗癌的肽疫苗。特别地，它提供了来自SEMA 5B基因的分离的表位肽，其适于诱导CTL并因此与癌症免疫疗法相关。本发明中，SEMA5B衍生的肽，并且，与修改后的条件的肽保留原始序列的必要的CTL诱导能力，一个，两个，或几个氨基酸被取代，缺失，插入或者添加两种这样的修改形式。还提供了药物组合物，其包含编码这种肽的多核苷酸和任何此类肽或多核苷酸作为活性剂。还提供了靶向这些肽的抗原呈递细胞和分离的CTL以及用于诱导所述抗原呈递细胞或CTL的方法。此外，本发明使用的肽的药物组合物，抗原呈递细胞呈递多核苷酸或肽编码肽或本发明中，从SEMA5B，食道癌，非小细胞肺癌，肾癌和衍生癌症（肿瘤）如SCLC的治疗和/或预防（即易感）为了证明（预防），和/或用于防止转移或手术后其复发，以及方法用于诱导CTL的方法，它提供了用于诱导抗肿瘤免疫的方法。

(21) 出願番号	特願2015-528112 (P2015-528112)	(71) 出願人	502240113
(86) (22) 出願日	平成25年12月2日 (2013.12.2)		オンコセラビー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月23日 (2015.7.23)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/007051	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開番号	W02014/087626		弁理士 春名 雅夫
(87) 国際公開日	平成26年6月12日 (2014.6.12)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/733,279		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成24年12月4日 (2012.12.4)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く