

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6124149号  
(P6124149)

(45) 発行日 平成29年5月10日 (2017.5.10)

(24) 登録日 平成29年4月14日 (2017.4.14)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 7/06 (2006.01)		C O 7 K 7/06	
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)		C 1 2 N 5/0784	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	

請求項の数 14 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-520419 (P2014-520419)  
 (86) (22) 出願日 平成24年10月25日 (2012.10.25)  
 (65) 公表番号 特表2014-533095 (P2014-533095A)  
 (43) 公表日 平成26年12月11日 (2014.12.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/006853  
 (87) 国際公開番号 W02013/061594  
 (87) 国際公開日 平成25年5月2日 (2013.5.2)  
 審査請求日 平成27年10月14日 (2015.10.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/552, 817  
 (32) 優先日 平成23年10月28日 (2011.10.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 502240113  
 オンコセラピー・サイエンス株式会社  
 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一  
 (74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TOPKペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 28および27からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる単離されたペプチド。

【請求項2】

請求項1記載の単離された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3】

CTLを誘導するための組成物であって、請求項1記載の1種もしくは複数種のペプチドまたは請求項2記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項4】

- (a) 請求項1記載の1種もしくは複数種のペプチド、
- (b) 請求項2記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチド、
- (c) 請求項1記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する1種もしくは複数種の抗原提示細胞(APC)、
- (d) 請求項1記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する1種もしくは複数種のエキソソーム、または
- (e) 請求項1記載のペプチドと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することができる1種もしくは複数種のCTL

を、薬学的に許容される担体との組合せで含む薬学的組成物であって、

がんの治療および/もしくは予防、術後のその再発の予防、ならびに/または、がんに対

する免疫応答の誘導のために製剤化される、薬学的組成物。

【請求項 5】

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製剤化される、請求項 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

以下からなる群より選択される段階を含む、C T L 誘導能を有する抗原提示細胞 ( A P C ) をインビトロで誘導するための方法：

( a ) A P C を、請求項 1 記載のペプチドと、インビトロで接触させる段階；および

( b ) 請求項 1 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。

【請求項 7】

以下からなる群より選択される段階を含む、C T L をインビトロで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 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 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キ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 ) サブユニットポリペプチドによって形成される T C R が H L A 抗原と請求項 1 記載のペプチドとの複合体に細胞表面上で結合することができる、該 T C R サブユニットポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを C D 8 陽性 T 細胞に導入する段階。

【請求項 8】

H L A 抗原と請求項 1 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 9】

請求項 1 記載のペプチドを標的とする、単離された C T L 。

【請求項 10】

がんに対する免疫応答を対象において誘導するための組成物であって、請求項 1 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。

【請求項 11】

請求項 1 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 12】

請求項 1 記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 13】

請求項 1 2 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 14】

請求項 1 記載のペプチド、請求項 2 記載のポリヌクレオチド、または請求項 1 1 記載の抗体を含む、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物科学の分野、より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、腫瘍の治療および予防のどちらかまたは両方のための薬物に関する。

【0002】

優先権

本出願は、2011年10月28日に出願された米国仮特許出願第61/552,817号の恩典を主張し、その全内容が参照によって本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

C D 8 陽性の細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) は、主要組織適合複合体 ( M H C ) クラ

10

20

30

40

50

スI分子上の腫瘍関連抗原(TAA)に由来するエピトープペプチドを認識し、その後、腫瘍細胞を殺傷することが実証されている。メラノーマ抗原(MAGE)ファミリーがTAAの最初の例として発見されて以来、多くの他のTAAが免疫学的アプローチによって発見されており(非特許文献1、非特許文献2)、これらのTAAのいくつかが目下、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使用することによって、療法により生じる免疫選択の結果としてのTAAの欠失、突然変異および/または下方制御に起因し得るがん細胞の免疫回避の詳述されているリスクが最小限に抑えられる場合がある。したがって、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができる新しいTAAを特定することにより、さらなる開発が保証される。したがって、様々なタイプのがんにおいてペプチドワクチン接種戦略の臨床適用が進行中である(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、今までのところ、これらのがんワクチン治験は低い客観的奏効率しか示していない(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使用するために好適である新規TAAが、当技術分野では依然として必要とされている。

#### 【0005】

TOPK(T-LAK細胞起源プロテインキナーゼ、T-LAK cell-originated protein kinase)は、MAPKキナーゼ(MAPKK)3/6に関連したMAPKKファミリーのメンバーであるセリン/トレオニンキナーゼである。このキナーゼは、p38 MAPKをリン酸化し、細胞周期チェックポイントの調節に参与している(非特許文献14、非特許文献15)。臨床試料を使用したTOPKの遺伝子発現分析では、TOPKがいくつかの悪性がん、例えば、乳癌、胆管癌、肝細胞癌、白血病、結腸直腸癌および黒色腫などにおいて過剰発現されることが示された(非特許文献16~非特許文献19)。キナーゼ活性が乳癌発生において重要な役割を果たすことを示す近年の研究によって、TOPKなどのがん関連キナーゼに対する研究的関心が復活した。これを受けて、ノーザンブロット分析によって、TOPK転写物が乳癌細胞において高発現しているが、精巢を除く正常なヒト組織ではほとんど検出できないことが明らかにされている。加えて、乳癌細胞株におけるsiRNAによる内在性TOPKの発現のノックダウンは、がん細胞の細胞質分裂を減弱し、アポトーシスを引き起こすことを示している(非特許文献20)。

#### 【先行技術文献】

##### 【非特許文献】

#### 【0006】

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

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

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

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

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

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

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

【非特許文献8】Fujie T et al., Int J Cancer 1999

10

20

30

40

50

- Jan 18, 80 (2) : 169 - 72
- 【非特許文献9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81 (3) : 459 - 66
- 【非特許文献10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81 (3) : 387 - 94
- 【非特許文献11】Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20 (20) : 4169 - 80
- 【非特許文献12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188 : 33 - 42
- 【非特許文献13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10 (9) : 909 - 15 10
- 【非特許文献14】Abe Y et al., J Bio Chem. 2000 July 14 : 21525 - 21531
- 【非特許文献15】Ayllon V and O'Connor R., Oncogene. 2007 May 24 ; 26 (24) : 3451 - 61
- 【非特許文献16】He F et al., Hum Pathol. 2010 Mar ; 41 (3) : 415 - 24
- 【非特許文献17】Li G et al., Ann Hematol. 2006 Sep ; 85 (9) : 583 - 90
- 【非特許文献18】Minoo P et al., Int J Oncol. 2010 Sep ; 37 (3) : 707 - 18 20
- 【非特許文献19】Zykova TA et al., Clin Cancer Res. 2006 Dec 1 ; 12 (23) : 6884 - 93
- 【非特許文献20】Park JH et al., Cancer Res. 2006 Sep 15 ; 66 (18) : 9186 - 95

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

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さないため、適切な標的の発見は極めて重要である。本発明を通して、TOPK (GenBankアクセッション番号NM\_018492 (SEQ ID NO: 85) の遺伝子によってコードされるSEQ ID NO: 86) が、がん細胞において、特に、限定されないが、急性骨髄性白血病 (AML)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、小細胞肺癌 (SCLC) および軟部組織腫瘍において特異的に過剰発現されることが明らかにされる。したがって、本発明は、がん/腫瘍免疫療法の適切な候補標的としてTOPKに着目する。

【0008】

その目的のために、本発明は、TOPKの遺伝子産物の中で、TOPKに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、特異的なエピトープペプチドの同定に少なくとも一部向けられている。以下にさらに詳述するように、健常ドナーから得た末梢血単核細胞 (PBMC) を、TOPKに由来するHLA (ヒト白血球抗原) - A\*2402またはHLA - A\*0201結合候補ペプチドを使用して刺激した。その後、各候補ペプチドをパルスしたHLA - A24またはHLA - A2陽性標的細胞に対する特異的な細胞傷害性を有するCTL株を樹立した。本明細書における結果は、これらのペプチドが、TOPKを発現する細胞に対する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拘束性またはHLA - A2拘束性の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、TOPKは免疫原性が強く、かつ、そのエピトープが腫瘍免疫療法の有効な標的であることを示している。

30

40

50

## 【0009】

したがって、HLA抗原と結合する能力を有し、かつ、TOPK配列(SEQ ID NO:86)またはその免疫原性活性断片を含む、単離されたペプチドを提供することが、本発明の1つの目的である。これらのペプチドは、CTL誘導能を有することが予測され、したがって、インビトロ、エクスピボまたはインピボにおいてCTLを誘導するために使用することができ、あるいは、がんに対する免疫応答をインピボにおいて誘導するために対象に対して直接投与するために使用することができ、この場合、そのようながんの例には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

10

## 【0010】

好ましいペプチドが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、SEQ ID NO:2~40および42~84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、SEQ ID NO:2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76の中より選択されるアミノ配列を有するペプチドが最も好ましい。

## 【0011】

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誘導能を保持する限り、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SEQ ID NO:2~40および42~84の中より選択されるアミノ酸配列を有する改変ペプチドも企図する。

20

## 【0012】

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することができる。上記の本発明のペプチドと同様に、そのようなAPCを、がんに対する免疫応答を誘導するために対象に投与することができる。

## 【0013】

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、好ましくはAPCの表面上に提示される。したがって、本発明の1つの目的は、CTLを誘導する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また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組成物または剤を提供することである。そのような剤または組成物は、原発性がん、その転移、または術後のその再発の治療および/または予防のために用いることができる。本発明によって企図される、標的とされるがんの例には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

30

## 【0014】

本発明はさらに、上記の原発性がん、転移または術後再発がんの治療および/または予防のために製剤化される、本発明の1種もしくは複数種のペプチドまたは1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む薬学的な組成物または剤を企図する。本発明の薬学的な剤または組成物は、有効成分として、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの代わりに、あるいは、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドに加えて、本発明のペプチドのいずれかを提示するAPCおよび/またはエキソソームを含み得る。

40

## 【0015】

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って、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られ得る。そのようなAPCは、標的ペプチドに対する高いCTL誘導能を有し、がん免疫療法に有用である。したがって、本発明は、CTL誘導

50

能を有するAPCを誘導するための方法、ならびに該方法によって得られるAPCを包含する。

【0016】

本発明のさらなる目的は、CTLを誘導するための方法であって、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キソソームと共培養する段階、あるいは、T細胞受容体(TCR)サブユニットポリペプチドによって形成されるTCRが本発明のペプチドに結合することができる、該TCRサブユニットポリペプチドをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを導入する段階を含む、方法を提供することである。そのような方法によって得られるCTLは、がんの治療および/または予防において使用が見出され、より具体的には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍の治療および/または予防において使用が見出される。したがって、本発明は、CTLを誘導するための方法、ならびに、該方法によって得られるCTL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。これらのAPCおよびCTLは、がん免疫療法に使用することができる。

10

【0017】

本発明のさらに別の目的は、がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、本発明のペプチド、そのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなペプチドを提示するエキソソームまたはAPC、および、そのようなペプチドを自身の表面上に提示する細胞を認識することができるCTLの中より選択される少なくとも1つの成分を含む組成物を該対象に投与する段階を含む、方法を提供することである。

20

【0018】

本発明の適用性は、TOPKの過剰発現に関連するか、または、TOPKの過剰発現から生じる多数の疾患のいずれにも及び、例えば、TOPKを発現するがんなどに及び、この場合、そのようながんの例には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

30

本発明の目的および特徴が、下記の詳細な説明を、添付の図面および実施例と併せて読んだとき、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下記の詳細な説明はともに例示的な態様についてであり、本発明または本発明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なければならない。

【0019】

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。

40

【図面の簡単な説明】

【0020】

本発明の様々な局面および適用が、下記の図面の簡単な説明ならびに本発明およびその好ましい態様の詳細な説明を考慮することで、当業者には明らかになるであろう。

【0021】

50

【図1】図1は、TOPK由来のペプチドを用いて誘導されたCTLに対す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)~(e)から構成される。TOPK-A24-9-230(SEQ ID NO:2)により誘導されるウェル番号#8(a)、TOPK-A24-9-130(SEQ ID NO:3)により誘導されるウェル番号#3(b)、TOPK-A24-9-232(SEQ ID NO:6)により誘導されるウェル番号#3(c)、TOPK-A24-10-288(SEQ ID NO:27)により誘導されるウェル番号#2(d)、および、TOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)により誘導されるウェル番号#4(e)におけるCTLは、対照と比較して、強力なIFN - 産生をそれぞれ示した。これらの写真のウェルにおける四角は、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、TOPK-A24-9-289(SEQ ID NO:1)により刺激されたCTLからは、特異的なIFN - 産生が認められなかった(f)。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

## 【0022】

【図2-1】図2は、TOPK由来のペプチドを用いて誘導されたCTLに対す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)~(o)から構成される。TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)により誘導されるウェル番号#7(a)、TOPK-A02-9-19(SEQ ID NO:45)により誘導されるウェル番号#4(b)、TOPK-A02-9-183(SEQ ID NO:47)により誘導されるウェル番号#2(c)、TOPK-A02-9-235(SEQ ID NO:50)により誘導されるウェル番号#8(d)、TOPK-A02-9-12(SEQ ID NO:51)により誘導されるウェル番号#4(e)、TOPK-A02-9-285(SEQ ID NO:53)により誘導されるウェル番号#3(f)、TOPK-A02-9-47(SEQ ID NO:54)により誘導されるウェル番号#3(g)、TOPK-A02-10-236(SEQ ID NO:62)により誘導されるウェル番号#5(h)、TOPK-A02-10-231(SEQ ID NO:63)により誘導されるウェル番号#3(i)、TOPK-A02-10-47(SEQ ID NO:64)により誘導されるウェル番号#8(j)、TOPK-A02-10-239(SEQ ID NO:66)により誘導されるウェル番号#1(k)、および、TOPK-A02-10-272(SEQ ID NO:71)により誘導されるウェル番号#1(l)におけるCTLは、対照と比較して、強力なIFN - 産生をそれぞれ示した。これらの写真のウェルにおける四角は、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、TOPK-A02-9-55(SEQ ID NO:41)により刺激されたCTLからは、特異的なIFN - 産生が認められなかった(o)。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

30

40

## 【0023】

【図2-2】図2は、TOPK由来のペプチドを用いて誘導されたCTLに対す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)~(o)から構成される。TOPK-A02-10-88(SEQ ID NO:72)により誘導されるウェル番号#4(m)、および、TOPK-A02-10-142(SEQ ID NO:76)により誘導されるウェル番号#4(n)におけるCTLは、対照と比較して、強力なIFN - 産生をそれぞれ示した。これらの写真のウェルにおける四角は、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、TOPK-A02-9-55(SEQ ID NO:41)により刺激されたCTLからは、特異的なIFN - 産

50

生が認められなかった(○)。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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生を示す。

【0024】

【図3】図3は、TOPK-A24-9-230(SEQ ID NO:2)(a)、TOPK-A24-9-130(SEQ ID NO:3)(b)、TOPK-A24-9-232(SEQ ID NO:6)(c)、TOPK-A24-10-288(SEQ ID NO:27)(d)およびTOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)(e)により刺激されたCTL株のIFN- $\gamma$ 産生を示す一連の折れ線グラフ(a)~(e)から構成される。CTLが産生したIFN- $\gamma$ の量をIFN- $\gamma$ の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。これらの結果は、各ペプチドによる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- $\gamma$ 産生を示すことを実証している。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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生を示す。R/S比は応答細胞(CTL株)および刺激細胞の数の比率を示す。

10

【0025】

【図4】図4は、TOPK-A24-9-130(SEQ ID NO:3)(a)、TOPK-A24-10-288(SEQ ID NO:27)(b)およびTOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)(c)により刺激されたCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローンのIFN- $\gamma$ 産生を示す一連の折れ線グラフ(a)~(c)から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる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- $\gamma$ 産生を示すことを実証している。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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生を示す。R/S比は応答細胞(CTLクローン)および刺激細胞の数の比率を示す。

20

【0026】

【図5-1】図5-1は、TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)(a)、TOPK-A02-9-19(SEQ ID NO:45)(b)、TOPK-A02-9-235(SEQ ID NO:50)(c)、TOPK-A02-9-12(SEQ ID NO:51)(d)、TOPK-A02-9-285(SEQ ID NO:53)(e)およびTOPK-A02-9-47(SEQ ID NO:54)(f)により刺激されたCTL株のIFN- $\gamma$ 産生を示す一連の折れ線グラフ(a)~(f)から構成される。CTLが産生したIFN- $\gamma$ の量をIFN- $\gamma$ の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。これらの結果は、各ペプチドによる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- $\gamma$ 産生を示すことを実証している。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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生を示す。R/S比は応答細胞(CTL株)および刺激細胞の数の比率を示す。

30

【0027】

【図5-2】図5-2は、TOPK-A02-10-236(SEQ ID NO:62)(g)、TOPK-A02-10-231(SEQ ID NO:63)(h)、TOPK-A02-10-47(SEQ ID NO:64)(i)、TOPK-A02-10-239(SEQ ID NO:66)(j)およびTOPK-A02-10-88(SEQ ID NO:72)(k)により刺激されたCTL株のIFN- $\gamma$ 産生を示す一連の折れ線グラフ(g)~(k)から構成される。CTLが産生したIFN- $\gamma$ の量をIFN- $\gamma$ の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。これらの結果は、各ペプチドによる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- $\gamma$ 産生を示すことを実証している。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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生を示す。R/S比は応答細胞(CTL株)および刺激細胞の

40

50

数の比率を示す。

【0028】

【図6】図6は、TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)(a)およびTOPK-A02-9-285(SEQ ID NO:53)(b)により刺激されたCTL株から限界希釈によって樹立されたCTLクローンのIFN- $\gamma$ 産生を示す一対の折れ線グラフ(a)および(b)から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる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- $\gamma$ 産生を示すことを実証している。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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生を示す。R/S比は応答細胞(CTLクローン)および刺激細胞の数の比率を示す。

10

【0029】

【図7】図7は、TOPK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TOPK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。TOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)を用いて樹立されたCTLクローンは、TOPKおよびHLA-A\*2402の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞(菱形)に対する特異的CTL活性を示した。一方で、HLA-A\*2402(三角)またはTOPK(丸)のどちらか一方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。

20

【0030】

【図8】図8は、TOPKおよびHLA-A\*0201を発現する標的細胞に対するCTL株の特異的CTL活性を示す折れ線グラフである。HLA-A\*0201または全長TOPK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。TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)を用いて樹立されたCTL株は、TOPKおよびHLA-A\*0201の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞(菱形)に対する特異的CTL活性を示した。一方で、HLA-A\*0201(三角)またはTOPK(丸)のどちらか一方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。

【発明を実施するための形態】

30

【0031】

態様の説明

上記概要に加え、以下のものを提供することは、本発明の目的である：

[1] CTL誘導能を有する単離されたペプチドであって、TOPKのアミノ酸配列またはその免疫学的活性断片からなる、単離されたペプチド。

[2] SEQ ID NO:2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[1]に記載の単離されたペプチド。

[3] 下記の(i)および(ii)からなる群より選択される単離されたペプチド：

(i) 下記の(a)または(b)の単離されたペプチド：

40

(a) SEQ ID NO:2、3、6、27および28からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離されたペプチド、

(b) 1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および/または付加されているSEQ ID NO:2、3、6、27および28からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、CTL誘導能を有する、単離されたペプチド、

(ii) 下記の(c)または(d)の単離されたペプチド：

(c) SEQ ID NO:42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離されたペプチド、

(d) 1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、挿入、欠失および/または付加されて

50

いるSEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、CTL誘導能を有する、単離されたペプチド。

[4] 以下の特徴の一方または両方を有する、[3]に記載の単離されたペプチド:

(a) SEQ ID NO: 2、3、6、27および28からなる群より選択されるアミノ酸配列の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ように置換されている、ならびに

(b) SEQ ID NO: 2、3、6、27および28からなる群より選択されるアミノ酸配列の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ように置換されている。

10

[5] 以下の特徴の一方または両方を有する、[3]に記載の単離されたペプチド:

(a) SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76からなる群より選択されるアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸が、ロイシ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ように置換されている、ならびに

(b) SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76からなる群より選択されるアミノ酸配列のC末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸であるように置換されている。

20

[6] HLA抗原に結合する能力を有する、[1]~[5]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド。

[7] 前記HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である、[6]に記載の単離されたペプチド。

[8] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1]~[7]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド。

[9] [1]~[8]のいずれか1つに記載の単離されたペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

[10] CTLを誘導するための組成物であって、[1]~[8]のいずれか1つに記載の1種もしくは複数種のペプチドまたは[9]に記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物。

30

[11]

(a) [1]~[8]のいずれか1つに記載の1種もしくは複数種のペプチド、

(b) [9]に記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチド、

(c) [1]~[8]のいずれか1つに記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する1種もしくは複数種のAPC、

(d) [1]~[8]のいずれか1つに記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する1種もしくは複数種のエキソソーム、または

(e) [1]~[8]のいずれか1つに記載のペプチドと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することができる1種もしくは複数種のCTL

40

を、薬学的に許容される担体との組合せで含む薬学的組成物であって、

がんの治療および/もしくは予防、術後のその再発の予防、ならびに/または、がんに対する免疫応答の誘導のために製剤化される、薬学的組成物。

[12] HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である対象への投与のために製剤化される、[11]に記載の薬学的組成物。

[13] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTL誘導能を有する抗原提示細胞(APC)を誘導するための方法:

(a) APCを、[1]~[8]のいずれか1つに記載のペプチドと、インビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階; および

(b) [1]~[8]のいずれか1つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを

50

A P C に導入する段階。

[ 1 4 ] 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 [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つ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 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つ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キ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 ) サブユニットポリペプチドによって形成される T C R が H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドとの複合体に細胞表面上で結合することができる、該 T C R サブユニットポリペプチドをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを C D 8 陽性 T 細胞に導入する段階。

10

[ 1 5 ] H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つ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 6 ] [ 1 3 ] に記載の方法によって誘導される、[ 1 5 ] に記載の A P C 。

[ 1 7 ] [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドを標的とする、単離された C T L 。

[ 1 8 ] [ 1 4 ] に記載の方法によって誘導される、[ 1 7 ] に記載の C T L 。

[ 1 9 ] 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 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つに記載のペプチド、その免疫学的活性断片、または該ペプチドもしくは該断片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。

[ 2 0 ] [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的活性断片。

20

[ 2 1 ] [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

[ 2 2 ] [ 2 1 ] 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。

[ 2 3 ] [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 つに記載のペプチド、[ 9 ] に記載のポリヌクレオチド、または [ 2 0 ] に記載の抗体を含む、診断キット。

[ 2 4 ] T O P K 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。

30

( i ) S E Q I D N O : 2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72 および 76 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 ) T O P K 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 ) において選択される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

40

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前記ペプチドを特定する段階。

#### 【 0 0 3 2 】

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ためのものにすぎず、限定することは意図していないことが理解されるべきである。本発明は、本明細書に記載される特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコールなどに限定されないこともまた理解されなければならない。これは

50

、これらが慣例的な実験法および最適化に従って変更可能であるからである。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ていない。

### 【0033】

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。

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の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、単に例証であり、限定することは意図していない。

### 【0034】

#### 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、ポリヌクレオチドなど)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、そうでなければその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、単離されたペプチドまたは精製されたペプチドは、該ペプチドが由来する細胞源または組織源からの例えば、炭水化物、脂質または他の混入タンパク質などの細胞材料を実質的に含まないペプチド、あるいは、化学合成された場合には化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まないペプチドを示す。

### 【0035】

「細胞材料を実質的に含まない」という用語には、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ている、ペプチドの調製物が含まれる。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%未満(乾燥重量ベースで)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%未満(乾燥重量ベースで)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有することは、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など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ている。

### 【0036】

「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。これらの用語は、1個もしくは複数個のアミノ酸残基が1個もしくは複数個の修飾された残基であるか、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。

本明細書において時として用いられる「オリゴペプチド」という用語は、長さが20アミノ酸残基またはそれ未満であり、典型的には15アミノ酸残基またはそれ未満であるペプチドを指すために使用され、典型的には約8個~約11個のアミノ酸残基から構成され、多くの場合には9個または10個のアミノ酸残基から構成される。後者は本明細書にお

10

20

30

40

50

いて「ノナペプチド」および「デカペプチド」とそれぞれ称される。

【0037】

本明細書で用いる「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-アミノ酸のいずれかであり得る。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文字表記によって参照されてもよい。

【0038】

「遺伝子」、「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、本明細書では互換的に用いられ、特に別段の定めのない限り、それらの一般に受け入れられている1文字コードによって示される。

「剤」および「組成物」という用語は本明細書では互換的に用いられ、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合せから直接的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、（「薬学的な剤」および「薬学的組成物」の場合のように）「薬学的（な）」という修飾語に関連して使用されるとき、有効成分と、担体を構成する不活性成分とを含む生成物、ならびに、任意の2つもしくはそれ以上の成分の組合せ、複合体化または凝集から、あるいは、1つもしくは複数の成分の解離から、あるいは、1つもしくは複数の成分の他の種類の反応または相互作用から直接的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、「薬学的な剤」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とを混合することによって作製される任意の生成物を指す。

20

30

【0039】

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おいて使用するための薬学的な剤または組成物の場合、そのような剤または組成物における有効成分は、がん細胞および/またはがん組織に対する少なくとも1つの生物学的作用または生理学的作用を直接的または間接的にもたらし得る。好ましくは、そのような作用には、がん細胞増殖の低下または阻害、がん細胞および/または組織の損傷または殺傷などが含まれ得る。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」と称することもできる。

40

【0040】

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、液体もしくは固体増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入材料を含むがこれらに限定されない、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。

いくつかの本発明の薬学的な剤または組成物は、特にワクチンとして使用される。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）という語句は、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。

50

## 【0041】

別段の定めのない限り、「がん」という用語は、TOPK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、急性骨髄性白血病(AML)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)および軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0042】

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。

10

## 【0043】

別段の定めのない限り、「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含むHLA-A24型を指す。

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「HLA-A2」という用語は、典型的にはサブタイプを指し、その例には、HLA-A\*0201、HLA-A\*0202、HLA-A\*0203、HLA-A\*0204、HLA-A\*0205、HLA-A\*0206、HLA-A\*0207、HLA-A\*0210、HLA-A\*0211、HLA-A\*0213、HLA-A\*0216、HLA-A\*0218、HLA-A\*0219、HLA-A\*0228およびHLA-A\*0250が含まれるが、これらに限定されない。

20

## 【0044】

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、試薬と他の物質との組合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、マーカーなど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/または物質の特定の組合せに限定することを意図しない。

## 【0045】

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(または患者)のHLA抗原がHLA A24またはHLA-A2である」という語句は、対象または患者がHLA-A24抗原遺伝子またはHLA-A2抗原遺伝子をMHC(主要組織適合複合体)クラスI分子としてホモ接合的またはヘテロ接合的に保有し、HLA-A24抗原またはHLA-A2抗原がHLA抗原として対象または患者の細胞において発現していることを指す。

30

## 【0046】

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性がある限り、治療が、TOPK遺伝子の発現の低下、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、がんの進行の遅延、がんの臨床症状の緩和、生存期間の延長、術後再発の抑制などの臨床的利点をもたらすならば、その治療は「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。

40

## 【0047】

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は、疾患の進行および

50

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。

【0048】

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/または術後のその再発の予防は、以下の段階、例えば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などの段階のいずれかを含む。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もしくは安定した疾患を含む。

10

【0049】

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

20

別段の定めのない限り、本明細書で使用され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一の意味を有する。

【0050】

II. ペプチド

下記において詳しく記載される本発明のペプチドは「TOPKペプチド」または「TOPKポリペプチド」と称される場合がある。

TOPK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、TOPK(SEQ ID NO: 86)に由来するペプチドを解析して、それらが、一般に見られるHLAアレルであるHLA-A24またはHLA-A2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(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)。

30

【0051】

HLA-A24に対するそれらの結合親和性に基づいて同定されたTOPK由来のHLA-A24結合性ペプチドの候補には、下記のものが含まれる:

TOPK-A24-9-230(SEQ ID NO: 2)、TOPK-A24-9-130(SEQ ID NO: 3)、TOPK-A24-9-237(SEQ ID NO: 4)、TOPK-A24-9-155(SEQ ID NO: 5)、TOPK-A24-9-232(SEQ ID NO: 6)、TOPK-A24-9-174(SEQ ID NO: 7)、TOPK-A24-9-73(SEQ ID NO: 8)、TOPK-A24-9-235(SEQ ID NO: 9)、TOPK-A24-9-19(SEQ ID NO: 10)、TOPK-A24-9-205(SEQ ID NO: 11)、TOPK-A24-9-77(SEQ ID NO: 12)、TOPK-A24-9-270(SEQ ID NO: 13)、TOPK-A24-9-58(SEQ ID NO: 14)、TOPK-A24-9-81(SEQ ID NO: 15)、TOPK-A24-9-278(SEQ ID NO: 16)、TOPK-A24-9-183(SEQ ID NO: 17)、TOPK-A24-9-227(SEQ ID NO: 18)、

40

50

TOPK - A24 - 9 - 13 (SEQ ID NO: 19)、TOPK - A24 - 9 - 146 (SEQ ID NO: 20)、TOPK - A24 - 9 - 140 (SEQ ID NO: 21)、TOPK - A24 - 9 - 103 (SEQ ID NO: 22)、TOPK - A24 - 9 - 105 (SEQ ID NO: 23)、TOPK - A24 - 9 - 118 (SEQ ID NO: 24)、TOPK - A24 - 10 - 31 (SEQ ID NO: 25)、TOPK - A24 - 10 - 155 (SEQ ID NO: 26)、TOPK - A24 - 10 - 288 (SEQ ID NO: 27)、TOPK - A24 - 10 - 289 (SEQ ID NO: 28)、TOPK - A24 - 10 - 130 (SEQ ID NO: 29)、TOPK - A24 - 10 - 47 (SEQ ID NO: 30)、TOPK - A24 - 10 - 73 (SEQ ID NO: 31)、TOPK - A24 - 10 - 102 (SEQ ID NO: 32)、TOPK - A24 - 10 - 39 (SEQ ID NO: 33)、TOPK - A24 - 10 - 4 (SEQ ID NO: 34)、TOPK - A24 - 10 - 77 (SEQ ID NO: 35)、TOPK - A24 - 10 - 241 (SEQ ID NO: 36)、TOPK - A24 - 10 - 12 (SEQ ID NO: 37)、TOPK - A24 - 10 - 148 (SEQ ID NO: 38)、TOPK - A24 - 10 - 145 (SEQ ID NO: 39)およびTOPK - A24 - 10 - 114 (SEQ ID NO: 40)。

【0052】

上記のうち、下記のペプチドにより、これらのペプチドを負荷した樹状細胞 (DC) によるT細胞のインビトロでの刺激の後、CTLの樹立に成功した：

TOPK - A24 - 9 - 230 (SEQ ID NO: 2)、TOPK - A24 - 9 - 130 (SEQ ID NO: 3)、TOPK - A24 - 9 - 232 (SEQ ID NO: 6)、TOPK - A24 - 10 - 288 (SEQ ID NO: 27)およびTOPK - A24 - 10 - 289 (SEQ ID NO: 28)。

【0053】

HLA - A2に対するそれらの結合親和性に基づいて同定されたTOPK由来のHLA - A2結合性ペプチドの候補には、下記のものが含まれる：

TOPK - A2 - 9 - 240 (SEQ ID NO: 42)、TOPK - A2 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 43)、TOPK - A2 - 9 - 236 (SEQ ID NO: 44)、TOPK - A2 - 9 - 19 (SEQ ID NO: 45)、TOPK - A2 - 9 - 134 (SEQ ID NO: 46)、TOPK - A2 - 9 - 183 (SEQ ID NO: 47)、TOPK - A2 - 9 - 81 (SEQ ID NO: 48)、TOPK - A2 - 9 - 149 (SEQ ID NO: 49)、TOPK - A2 - 9 - 235 (SEQ ID NO: 50)、TOPK - A2 - 9 - 12 (SEQ ID NO: 51)、TOPK - A2 - 9 - 227 (SEQ ID NO: 52)、TOPK - A2 - 9 - 285 (SEQ ID NO: 53)、TOPK - A2 - 9 - 47 (SEQ ID NO: 54)、TOPK - A2 - 9 - 310 (SEQ ID NO: 55)、TOPK - A2 - 9 - 132 (SEQ ID NO: 56)、TOPK - A2 - 9 - 242 (SEQ ID NO: 57)、TOPK - A2 - 9 - 156 (SEQ ID NO: 58)、TOPK - A2 - 9 - 138 (SEQ ID NO: 59)、TOPK - A2 - 9 - 142 (SEQ ID NO: 60)、TOPK - A2 - 10 - 190 (SEQ ID NO: 61)、TOPK - A2 - 10 - 236 (SEQ ID NO: 62)、TOPK - A2 - 10 - 231 (SEQ ID NO: 63)、TOPK - A2 - 10 - 47 (SEQ ID NO: 64)、TOPK - A2 - 10 - 234 (SEQ ID NO: 65)、TOPK - A2 - 10 - 239 (SEQ ID NO: 66)、TOPK - A2 - 10 - 290 (SEQ ID NO: 67)、TOPK - A2 - 10 - 37 (SEQ ID NO: 68)、TOPK - A2 - 10 - 20 (SEQ ID NO: 69)、TOPK - A2 - 10 - 241 (SEQ ID NO: 70)、TOPK - A2 - 10 - 272 (SEQ ID NO: 71)、TOPK - A2 - 10 - 88 (SEQ ID NO: 72)、TOPK - A2 - 10 - 81 (SEQ ID NO: 73)、TOPK - A2 - 10 - 313 (SEQ ID

10

20

30

40

50

NO:74)、TOPK-A2-10-54(SEQ ID NO:75)、TOPK-A2-10-142(SEQ ID NO:76)、TOPK-A2-10-35(SEQ ID NO:77)、TOPK-A2-10-110(SEQ ID NO:78)、TOPK-A2-10-223(SEQ ID NO:79)、TOPK-A2-10-274(SEQ ID NO:80)、TOPK-A2-10-173(SEQ ID NO:81)、TOPK-A2-10-141(SEQ ID NO:82)、TOPK-A2-10-292(SEQ ID NO:83)およびTOPK-A2-10-180(SEQ ID NO:84)。

【0054】

上記のうち、下記のペプチドにより、これらのペプチドを負荷した樹状細胞(DC)によるT細胞のインビトロでの刺激の後、CTLの樹立に成功した：

TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)、TOPK-A02-9-19(SEQ ID NO:45)、TOPK-A02-9-183(SEQ ID NO:47)、TOPK-A02-9-235(SEQ ID NO:50)、TOPK-A02-9-12(SEQ ID NO:51)、TOPK-A02-9-285(SEQ ID NO:53)、TOPK-A02-9-47(SEQ ID NO:54)、TOPK-A02-10-236(SEQ ID NO:62)、TOPK-A02-10-231(SEQ ID NO:63)、TOPK-A02-10-47(SEQ ID NO:64)、TOPK-A02-10-239(SEQ ID NO:66)、TOPK-A02-10-272(SEQ ID NO:71)、TOPK-A02-10-88(SEQ ID NO:72)およびTOPK-A02-10-142(SEQ ID NO:76)。

【0055】

上記の樹立されたCTLは、それぞれのペプチドでパルスされた標的細胞に対する強力な特異的CTL活性を示した。これらの結果は、TOPKが、CTLによって認識される抗原であること、および、これらのペプチドが、HLA-A24またはHLA-A2拘束性のTOPKのエピトープペプチドであることを明らかにする；したがって、そのようなペプチドは、CTLによる細胞傷害性のための標的抗原として有効であり得る。

【0056】

TOPK遺伝子が、例えばAML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍を含む、がん細胞およびがん組織において過剰発現され、ほとんどの正常な器官では発現されないため、TOPK遺伝子は免疫療法のための優れた標的である。したがって、本発明は、CTLにより認識されるTOPK由来の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。本発明のノナペプチドおよびデカペプチドの特に好ましい例には、SEQ ID NO:2~40および42~84の中より選択されるアミノ酸配列を有するそのようなペプチドが含まれる。

【0057】

一般に、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抗原との間における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: 10

10

20

30

40

50

07-17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 EM 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、HLA抗原との高い結合親和性を有するTOPK由来のそのような断片を、そのようなソフトウェアプログラムを使用して選択するために、そのようなソフトウェアプログラムを容易に利用することができる。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、TOPK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TOPK配列から構成されるペプチドが含まれ得る。

10

**【0058】**

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CTL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CTL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、CTL誘導能を有するペプチド、特にTOPK由来のペプチド(例えば、SEQ ID NO: 2, 3, 6, 27, 28, 42, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 62, 63, 64, 66, 71, 72または76のアミノ酸配列を含むペプチド)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。

20

**【0059】**

一般に、あるペプチドにおける1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸の改変は該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タンパク質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、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が元の参照配列と比較して改変された(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、またはさらにそれより多くのアミノ酸が付加、欠失、挿入および/または置換されているSEQ ID NO: 2~40および42~84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、本発明のペプチドは、CTL誘導能を有し、かつ、改変ペプチドが元のペプチドの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、SEQ ID NO: 2~40および42~84の中より選択されるアミノ酸配列において置換、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。

30

40

**【0060】**

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。そのため、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、この場合、タンパク質の変更に より、元のタンパク質と類似の機能を有する改変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)

50

、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）。

10

#### 【0061】

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見なされる。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、TOPKの多型変異体、種間相同体およびアレルに由来するCTL誘導可能なペプチドを排除すべきではない。

20

#### 【0062】

より高い結合親和性を達成するために、アミノ酸残基が本発明のペプチドに対して挿入、置換および/または付加される場合があり、あるいは、アミノ酸残基が本発明のペプチドから欠失される場合がある。必要なCTL誘導能を保持するために、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好ましくは20%もしくはそれ未満であり、より好ましくは15%もしくはそれ未満であり、さらにより好ましくは10%もしくはそれ未満であり、例えば、1~5%である。

30

#### 【0063】

免疫療法との関連で用いられた場合、本発明のペプチドは、好ましくはHLA抗原との複合体として、細胞またはエキソソームの表面上に提示されるべきである。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、結合親和性が改善された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抗原に対する結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既に公知であるので（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することができる。

40

#### 【0064】

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が、高いHLA-A24結合親和性を保有する傾向がある。したがって、HLA-A24結合親和性を高めるために、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場合

50

がある。したがって、SEQ ID NO: 2 ~ 40 (とりわけ、SEQ ID NO: 2、3、6、27および28)の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、前記SEQ ID NO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、前記SEQ ID NO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ペプチドが、本発明によって包含される。また、本発明は、1個、2個、または数個のアミノ酸が、SEQ ID NO: 2 ~ 40 (とりわけ、SEQ ID NO: 2、3、6、27および28)の中より選択されるアミノ酸配列において置換、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、以下の特徴の一方または両方を有するそのようなペプチドを包含する: (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。好ましい態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO: 2 ~ 40 (とりわけ、SEQ ID NO: 2、3、6、27および28)の中より選択される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。

10

#### 【0065】

20

同様に、高いHLA-A2結合親和性を示すペプチドは、ロイシンもしくはメチオニンで置換されたN末端から2番目のアミノ酸および/またはバリンもしくはロイシンで置換されたC末端のアミノ酸を有する傾向がある。あるいは、HLA-A2結合親和性を高めるためには、N末端から2番目のアミノ酸をロイシンもしくはメチオニンで置換すること、および/またはC末端のアミノ酸をバリンもしくはロイシンで置換することが望ましい。したがって、SEQ ID NO: 42 ~ 84 (とりわけ、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76)の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、前記SEQ ID NOのアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および/または、前記SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端がバリンもしくはロイシンで置換されているペプチドが、本発明によって包含される。また、本発明は、1個、2個、または数個のアミノ酸が、SEQ ID NO: 42 ~ 84 (とりわけ、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76)の中より選択されるアミノ酸配列において置換、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、以下の特徴の一方または両方を有するそのようなペプチドも包含する: (a) N末端から2番目のアミノ酸がロイシンまたはメチオニンである; および (b) C末端アミノ酸がバリンまたはロイシンである。好ましい態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO: 42 ~ 84 (とりわけ、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76)の中より選択されるアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および/または、C末端アミノ酸がバリンもしくはロイシンで置換されているアミノ酸配列を含む。

30

40

#### 【0066】

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、アミノ酸置換を有するペプチドが、例えば、CAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)またはgp100(209-217)などでは、元のペプチドと同等もしくはそれより優れたものであり得ることを実証している(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997, T. K. Hoffman

50

n 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. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-314)。

【0067】

本発明はまた、1個、2個、または数個のアミノ酸を本発明のペプチドのN末端および/またはC末端に加えることもできる付加も企図する。CTL誘導能を有するそのような改変ペプチドもまた、本発明に含まれる。

【0068】

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、長さが、15、14、13、12、11または10アミノ酸未満の単離されたペプチドを提供する：

(i) SEQ ID NO: 2~24および42~60の中より選択されるアミノ酸配列、

(ii) 1個、2個、または数個のアミノ酸が、SEQ ID NO: 2~24および42~60からなる群より選択されるアミノ酸配列において改変されているアミノ酸配列であって、ペプチドが、細胞傷害性Tリンパ球を誘導する能力を有するアミノ酸配列、

(iii) HLA-A24との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(ii)のアミノ酸配列：

(a) 前記SEQ ID NO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、そのようなアミノ酸であるように改変されている、および

(b) 前記SEQ ID NO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、そのようなアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(iv) HLA-A2との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(ii)のアミノ酸配列：

(c) 前記SEQ ID NOのN末端から2番目のアミノ酸が、ロイシ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、そのようなアミノ酸であるように改変されている；および

(d) 前記SEQ ID NOのC末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、または、そのようなアミノ酸であるように改変されている。

【0069】

さらに、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、長さが、15、14、13、12、または11アミノ酸未満の単離されたペプチドも提供する：

(i') SEQ ID NO: 25~40および61~84の中より選択されるアミノ酸配列、

(ii') 1個、2個、または数個のアミノ酸が、SEQ ID NO: 25~40および61~84からなる群より選択されるアミノ酸配列において改変されているアミノ酸配列であって、ペプチドが、細胞傷害性Tリンパ球を誘導する能力を有するアミノ酸配列、

(iii') HLA-A24との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(ii')のアミノ酸配列：

(a') 前記SEQ ID NO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、そのようなアミノ酸であるように改変されている、ならびに

(b') 前記SEQ ID NOの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

10

20

30

40

50

か、または、そのようなアミノ酸であるように改変されている。

【0070】

(i v') H L A - A 2 との関連において、以下の特徴の一方または両方を有する、(i i') のアミノ酸配列：

(c') 前記 S E Q I D N O の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシ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、そのようなアミノ酸であるように改変されている；ならびに

(d') 前記 S E Q I D N O の C 末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、または、そのようなアミノ酸であるように改変されている。

10

【0071】

これらのペプチドは、それらのペプチドを A P C と接触させた場合、A P C 上で H L A 抗原と結合して、H L A 抗原との複合体として A P C 上に提示される。あるいは、それらのペプチドは、それらのペプチドを A P C と接触させた場合、A P C の中に取り入れられ、A P C において ( i ) ~ ( i v ) および ( i ' ) ~ ( i v ' ) の中より選択されるアミノ酸配列を有する断片にプロセッシングされて、H L A 抗原との複合体として A P C 上に提示される。結果的に、そのようなペプチドに特異的な C T L が誘導される。

【0072】

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タンパク質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、負の副作用、例えば、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が誘発されることがある。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、H L A 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 C T L 誘導能を増大させるために改変することができる。

20

【0073】

上記のように H L A 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、C T L 誘導能の有無についてさらに調べる。本明細書において「C T L 誘導能」という語句は、抗原提示細胞 ( A P C ) 上に提示された場合に、細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) を誘導するペプチドの能力を示す。さらに、「C T L 誘導能」は、C T L 活性化を誘導する、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 の I F N - 産生を増加させる、ペプチドの能力を含む。

30

【0074】

C T L 誘導能の確認が、ヒト M H C 抗原を保有する A P C ( 例えば、B リンパ球、マクロファージおよび樹状細胞 ( D C ) )、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 D C を誘導し、A P C を試験ペプチドで刺激した後、A P C を C D 8 陽性 T 細胞と混合して C T L を誘導し、その後、標的細胞に対して C T L によって産生および放出された I F N - を測定することによって達成される。反応系として、ヒト H L A 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 ) を使用するこ

40

50

とができる。あるいは、標的細胞を<sup>51</sup>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能から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APC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。

#### 【0075】

上記のようにペプチドのCTL誘導能を調べた結果として、SEQ ID NO: 2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76によって示されるアミノ酸配列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と同様に、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。

10

#### 【0076】

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。そのため、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生じる可能性は低くなっている。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TOPK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、本発明のペプチドの好ましい例には、SEQ ID NO: 2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチド、ならびに、それらの改変ペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0077】

上述のように、本発明のペプチドは、TOPKに特異的なCTLを誘導する能力を有する。例えば、SEQ ID NO: 2、3、6、27および28の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドは、HLA-A24を介してTOPK由来のペプチドを提示する細胞（例えば、TOPKおよびHLA-A24を発現する細胞）に対する特異的な細胞傷害活性を示すことができるCTLを誘導する能力を有する。そのような細胞の例には、HLA-A24陽性のがん細胞が含まれる。同様に、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドは、HLA-A2を介してTOPK由来のペプチドを提示する細胞（例えば、TOPKおよびHLA-A2を発現する細胞）に対する特異的な細胞傷害活性を示すことができるCTLを誘導する能力を有する。そのような細胞の例には、HLA-A2陽性のがん細胞が含まれる。

30

#### 【0078】

上記の改変に加えて、本発明のペプチドはまた、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結合能もまた保持する限り、他のペプチドに連結することができる。好適な「他の」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、リンカーを介して直接的または間接的に「他の」ペプチドに連結させることができる。好適なペプチド間リンカーは当技術分野では周知であり、これらには、例えば、AA<sub>n</sub>Y (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5: 26)、AAA、NK<sub>n</sub>RK (R. P. M. Suttmuller 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) が含まれる。

40

#### 【0079】

例えば、TOPK以外の腫瘍関連抗原ペプチドもまた、HLAクラスIおよび/または

50

クラスII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、十分に確立されている。したがって、当業者が、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、そのような遺伝子産物に由来するHLAクラスII結合ペプチドおよび/またはHLAクラスII結合ペプチドを本発明の薬学的組成物またはワクチンに含めることは、慣例的な実験法の範囲内である。

【0080】

HLAクラスII結合ペプチドおよびHLAクラスII結合ペプチドの一部が当業者には公知であり(例えば、Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995を参照されたい)、本明細書に開示される様式と同様の様式で本発明において用いることができる。したがって、当業者は、1種もしくは複数種のTOPKペプチドおよび1種もしくは複数種の非TOPK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、分子生物学の標準的な手順を用いて容易に調製することができる。

10

【0081】

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)で一緒に連結され得る、2つまたはそれ以上の潜在的な免疫原性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で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

【0082】

ペプチドを直接的にまたは隣接配列の使用によって連結して、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、Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J. Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J. Exp. Med. 171(1):299-306, 1990を参照されたい)。様々な数および組合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、CTL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

【0083】

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、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、天然ポリマーおよび合成ポリマーなどが含まれる。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。

【0084】

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様々な生物学的媒質、例えばヒトの血漿および血清を使用して、安定性を試験することができる(例えば、Verhoeff et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 1986, 11:291-302を参照されたい)。

40

【0085】

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

50

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る（すなわち、置換、欠失、挿入または付加する）段階、
- b：ペプチドの活性を測定する段階、
- c：元のペプチドと比較して同じ活性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。

#### 【0086】

好ましい態様において、本発明は、TOPK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CTL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、方法を提供する：

(i) SEQ ID NO：2、3、6、27、28、42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76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、

(ii) TOPK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（または配列同一性）を有さない候補配列を選択する段階、

(iii) 段階(ii)において選択される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、

(iv) 段階(iii)の前記抗原提示細胞をCD8陽性T細胞と接触させる段階、ならびに

(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前記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、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、アッセイされるペプチドの活性はCTL誘導能である。

#### 【0087】

III. TOPK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る、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。

#### 【0088】

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1種もしくは複数種の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。

#### 【0089】

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。該合成に採用され得る従来のペプチド合成法の例には、以下のものが含まれる：

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

(ii) The Proteins, 第2巻, Academic Press, New York, 1976；

(iii) ペプチド合成（日本語）, 丸善, 1975；

10

20

30

40

50

(iv) ペプチド合成の基礎と実験 (日本語), 丸善, 1985;  
 (v) 医薬品の開発 (日本語), 続第14巻 (ペプチド合成), 広川書店, 1991;  
 (vi) WO99/67288; および  
 (vii) Barany G. & Merrifield R. B., Peptides  
 第2巻, 「Solid Phase Peptide Synthesis», Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【0090】

あるいは、本発明のペプチドは、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適合化して得ることができる (例えば、Morrisson J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (Wu et al. 編) 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。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。

【0091】

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、天然のTOPK遺伝子 (例えば、GenBankアクセッション番号NM\_018492 (SEQ ID NO: 85)) に由来するポリヌクレオチド、同様にまた、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説明されている。

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、およびそれらの誘導體から構成され得る。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。

【0092】

本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を間に伴って、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、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の付加的配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであってもよく、またはマーカー遺伝子など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。

【0093】

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、ポリヌクレオチドを、PCR技法または適切な宿主における発現を用いて増幅することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989を参照されたい）。あるいは、ポリヌクレオチドを、Beaucage SL&Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5に記載されるような固相技法を用いて合成することができる。

10

【0094】

## V. エキソソーム

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、エキソソームと称される細胞内小胞を提供する。エキソソームは、例えば公表特許公報特表平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。本発明のエキソソームは、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。

【0095】

20

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およびHLA-A2、特にHLA-A\*2402およびHLA-A\*0201およびHLA-A\*0206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型の使用が、有効な結果を得るために好ましく、HLA-A\*2402、HLA-A\*0201およびHLA-A\*0206などのサブタイプもまた使用される。典型的には、クリニックにおいて、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、

30

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、天然のTOPK部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて行うことができる。

【0096】

本発明のエキソソームがHLA-A24型を抗原として有する場合、SEQ ID NO: 2~40（とりわけ、SEQ ID NO: 2、3、6、27および28）の中より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが特に有用である。

あるいは、本発明のエキソソームがHLA-A2型を抗原として有する場合、SEQ ID NO: 42~84（とりわけ、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76）の中より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが特に有用である。

40

【0097】

いくつかの態様において、本発明のエキソソームは、本発明のペプチドとHLA-A24またはHLA-A2抗原との複合体を自身の表面上に提示するエキソソームである。典型的な態様において、本発明のエキソソームは、SEQ ID NO: 2、3、6、27または28のアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）とHLA-A24との複合体を自身の表面上に提示する。他の態様において、本発明のエキソソームは、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72または76のアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）とHLA-A2との複合体を自身の表面上に提示する。

【0098】

50

## 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に形成された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、かつ、単独で、または、本発明のペプチド、エキソソームもしくは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。

### 【0099】

APCは特定の種類の細胞に限定されない。APCの例には、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（DC）、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞および活性化T細胞が含まれるが、これらに限定されない。DCは、APCの中で最も強力なCTL誘導活性を有する代表的なAPCであるため、好ましくは、DCを本発明のAPCとして使用することができる。

10

### 【0100】

例えば、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボ、またはインビボで本発明のペプチドと接触させる（本発明のペプチドで刺激する）ことによって、本発明のAPC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APCが該対象の体内で誘導される。本明細書において、「APCを誘導する」という語句は、抗原提示細胞を本発明のペプチドと接触させること（本発明のペプチドで刺激すること）、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抗原提示細胞に導入して、APCに、HLA抗原と本発明のペプチドとの間で形成された複合体を自身の表面上に提示させることを含む。例えば、本発明のAPCは、本発明の1種もしくは複数種のペプチドを対象に投与した後、該対象からAPC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APCは、対象から回収されたAPC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ができる。

20

### 【0101】

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APCを単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくはCTL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APCを回収する段階、
- b：段階aのAPCをペプチドと接触させる段階、および
- c：段階bのAPCを第2の対象に投与する段階。

30

### 【0102】

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APCは、限定はされないが、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、SCLC、軟部組織腫瘍および精巣腫瘍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し、投与することができる。

### 【0103】

本発明との関連において、本発明の1種もしくは複数種のペプチドが、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に利用される場合がある。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が本明細書において提供され、該方法または工程は好ましくは、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。

40

### 【0104】

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。

本発明の一面によれば、本発明のAPCはCTL誘導能を有する。APCとの関連において、「CTL誘導能」という語句は、CD8陽性T細胞と接触させたときにCTLを誘導するAPCの能力を示す。さらに、「CTL誘導能」には、CTL活性化を誘導するAPCの能力、CTL増殖を誘導するAPCの能力、CTLによる標的細胞の溶解を促進

50

するAPCの能力、および、CTLによるIFN- $\gamma$ 産生を増加させるAPCの能力が含まれる。特に、本発明のAPCは、TOPKに特異的なCTLを誘導する能力を有する。

【0105】

CTL誘導能を有するそのようなAPC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APC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。導入されるポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAの形態であることが可能である。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、当技術分野において従来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、Cancer Res 1996, 56:5672-7; J Immunol 1998, 161:5607-13; J Exp Med 1996, 184:465-72; 公表特許公報第2000-509281号に記載されているように、それを実施することができる。本発明のペプチドをコードする遺伝子をAPCに移入することによって、遺伝子は細胞内で転写、翻訳などを受け、次いで、得られたタンパク質はMHCクラスIまたはクラスIIによってプロセッシングされ、提示経路を経て、本発明のペプチドが提示される。あるいは、本発明のAPCは、APCを本発明のペプチドと接触させる段階を誘導する方法によって調製することができる。

10

【0106】

いくつかの態様において、本発明のAPCは、HLA-A24またはHLA-A2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である。典型的な態様において、本発明のAPCは、SEQ ID NO: 2、3、6、27または28のアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）とHLA-A24との複合体を自身の表面上に提示する。他の態様において、本発明のAPCは、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72または76のアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）とHLA-A2との複合体を自身の表面上に提示する。

20

【0107】

VII. 細胞傷害性Tリンパ球(CTL):

本発明のペプチドのいずれか1種に対して誘導されたCTL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る単離されたCTLを提供する。

30

【0108】

そのようなCTL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APCおよびCD8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こと、(3)CD8陽性T細胞もしくは末梢血単核白血球を、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もしくはエキソソームとインビトロで接触させること、または、(4)細胞表面上でHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体に結合する能力を有するT細胞受容体(TCR)を形成することができるTCRサブユニットをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを導入することによって得ることができる。(3)の方法のためのそのようなAPCまたはエキ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)の方法の詳細が、以下の「VII. T細胞受容体(TCR)」の節で説明される。

40

【0109】

本発明のCTL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、効果を調節するという目的のために、単独で、または、上記のペプチド、APC、もしくはエキ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CTL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、例えばがん細胞のように、TOPKを内因的に発現する細胞、または、TOPK遺伝子をトランスフェクトした細胞であってよく、また、本発明の

50

ペプチドによる刺激に起因して該ペプチドを細胞表面上に提示する細胞はまた、活性化されたCTL攻撃の標的として役立ち得る。

【0110】

いくつかの態様において、本発明のCTLは、HLA-A24抗原またはHLA-A2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細胞を認識することができる。CTLとの関連において、「細胞を認識する」という語句は、細胞表面上でHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体にそのTCRを介して結合すること、および該細胞に対する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、「特異的な細胞傷害活性」は、HLA-A24抗原またはHLA-A2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、他の細胞に対して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な細胞傷害活性を示すCTLが本発明に含まれる。

10

【0111】

典型的な態様において、本発明のCTLは、SEQ ID NO: 2、3、6、27または28のアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）を、HLA-A24を介して提示する細胞を認識することができる。好ましい態様において、本発明のそのようなCTLは、TOPKおよびHLA-A24を発現する細胞（例えば、HLA-A24陽性のがん細胞）を認識することができる。

他の態様において、本発明のCTLは、SEQ ID NO: 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72または76のアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）を、HLA-A2を介して提示する細胞を認識することができる。好ましい態様において、本発明のそのようなCTLは、TOPKおよびHLA-A2を発現する細胞（例えば、HLA-A2陽性のがん細胞）を認識することができる。

20

【0112】

VIIIT細胞受容体(TCR)：

本発明はまた、T細胞受容体(TCR)のサブユニットを形成することができるポリペプチドをコードする1種または複数種のポリヌクレオチドを含む組成物、および、それを使用する方法を提供する。そのようなTCRサブユニットは、TOPK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TCR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使用することによって、本発明のペプチドにより誘導されたCTLのTCRサブユニットとしての鎖および鎖のそれぞれ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(WO2007/032255、および、Morgan et al., 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、5'-Rプライマー(5'-gtctaccaggcattcgccttcatt-3')(SEQ ID NO: 87)、および3'側プライマーとしてTCRの鎖C領域に特異的な3-TRa-Cプライマー(5'-tcagctggaccacagccgcaagcgt-3')(SEQ ID NO: 88)、TCRの鎖C1領域に特異的な3-TRb-C1プライマー(5'-tcagaaatcctttctctttgac-3')(SEQ ID NO: 89)、または、TCRの鎖C2領域に特異的な3-TR-C2プライマー(5'-ctagcctctggaaatcctttctcttt-3')(SEQ ID NO: 90)であってよいが、これらに限定されない。TCR誘導体は、TOPK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、場合により、本発明のTOPK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において媒介し得る。

30

40

【0113】

TCRサブユニットをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド（すなわち、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、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）を、適切なベクターに、例えば、レトロウイルス

50

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、該ポリヌクレオチドを有用に含むベクターを、T細胞（例えば、CD8陽性T細胞）に、例えば、患者由来のT細胞に移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）の迅速な改変によって、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利用可能な組成物を提供する。

#### 【0114】

本発明のペプチドに対する特異的なTCRは、TCRがT細胞の表面上に発現される場合、本発明のペプチドとHLA抗原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な活性をT細胞に与えることができるだろう。そのようなTCRのサブユニットをコードするポリペプチドを導入することによって調製されたCTLがそのような標的細胞を特異的に認識することができる任意の公知の方法によって、必要な活性を確認することができる。そのような方法の好ましい例には、例えば、HLA分子および本発明のペプチドを使用するテトラマー解析、ならびに、ELISPOTアッセイが含まれる。ELISPOTアッセイによって、上記のような方法により調製されたCTLが標的細胞を特異的に認識し得ること、および、そのような認識によって生じたシグナルが細胞内に伝達され得ることを確認することができる。さらに、上記方法によって調製されたCTLが標的細胞に対する特異的な細胞傷害活性を有することを公知の方法によって確認することができる。そのような方法の例には、例えば、TOPKおよびHLA-A24またはHLA-A2の両方を発現する細胞を使用するク

10

20

#### 【0115】

1つの局面において、本発明は、TCRサブユニットポリペプチドをコードする1つまたは複数のポリペプチド（すなわち、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）による形質導入によって調製されるCTLを提供し、ここで、そのようなTCRサブユニットによって形成されるTCRは、細胞表面上で、SEQ ID NO: 2~40の中より選択されるアミノ酸配列を有するTOPKペプチドとHLA-A24抗原との複合体に結合することができるか、または、細胞表面上で、SEQ ID NO: 42~84の中より選択されるアミノ酸配列を有するTOPKペプチドとHLA-A2抗原との複合体に結合

30

#### 【0116】

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どちらかまたは両方において有用な免疫原性組成物を形成するために使用し得る（WO2006/031221を参照されたい。その内容は参照により本明細書に組み入れられる）。

#### 【0117】

IX. 薬学的な剤または組成物：

TOPKの発現が、正常な組織と比較して、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍がその例として含まれるが、これらに必ずしも限定されないがんにおいて特異的に上昇しているため、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドは、がんに対する免疫応答を誘導するために使用される場合があり、したがって、がんの治療および/もしくは予防のために、ならびに/または、その転移もしくは術後再発の予防のために役立つ場合がある。したがって、本発明は、がんの治療および/もしくは予防のために、ならびに/または、術後のその再発予防のために製剤化される薬学的な組成物または

40

50

は複数種の有効成分として含む組成物または剤を提供する。あるいは、本発明のペプチドは、薬学的な組成物または剤として用いるために、前述のエキソソームまたは細胞（例えば、APCなど）のいずれかの表面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種を標的とする前述のCTLはまた、本発明の薬学的な組成物または剤の有効成分として用いることができる。

【0118】

したがって、本発明は、下記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1種または複数種のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードする1種または複数種のポリヌクレオチド；
- (c) 本発明の1種または複数種のAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の1種または複数種のCTL。

10

【0119】

本発明の薬学的な組成物または剤はまた、ワクチンとしての使用が見出される。本発明との関連において、「ワクチン」（これは「免疫原性組成物」とも称される）という語句は、動物に接種した際に抗腫瘍免疫性を改善、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。換言すると、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な剤または組成物を提供する。

【0120】

20

本発明の薬学的な組成物または剤は、対象または患者において、がんの治療および/もしくは予防のために、ならびに/または、術後のその再発もしくは転移再発の予防のために使用することができる。そのような対象の例には、ヒト、ならびに、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ウシ、サル、ヒヒおよびチンパンジーが含まれるが、これらに限定されない他の哺乳動物、特に、商業的に重要な動物または飼育動物が含まれる。いくつかの態様において、本発明の薬学的な剤または組成物は、HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である対象への投与のために製剤化することができる。

【0121】

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/もしくは予防するための、ならびに/または、術後のその再発を予防するための薬学的な組成物または剤を製造することにおける、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

30

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明の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キソソーム；および
- (e) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0122】

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予防のどちらかまたは両方、ならびに/または、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：

40

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明の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キソソーム；および
- (e) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0123】

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/もしくは予防するための、ならびに/または、術後のその再発を予防するための薬学的な組成物または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とともに、薬学的ま

50

たは生理学的に許容される担体を製剤化する段階を含む方法または工程を提供する：

- ( a ) 本発明のペプチド；
- ( b ) 本発明の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 ；
- ( d ) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- ( e ) 本発明の細胞傷害性 T 細胞。

【 0 1 2 4 】

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／もしくは予防するための、ならびに／または、術後のその再発を予防するための薬学的な組成物または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または生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する：

- ( a ) 本発明のペプチド；
- ( b ) 本発明の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 ；
- ( d ) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- ( e ) 本発明の細胞傷害性 T 細胞。

【 0 1 2 5 】

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／もしくは予防するための、ならびに／または、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 ) 本発明の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 ；
- ( d ) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- ( e ) 本発明の細胞傷害性 T 細胞。

【 0 1 2 6 】

本発明によれば、SEQ ID NO：2～40の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、HLA-A24拘束性エピトープペプチドであり得る。これらのペプチドの中で、SEQ ID NO：2、3、6、27および28の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが、HLA-A24およびTOPKを発現するがんに対する強力かつ特異的な免疫応答を対象において効果的に誘導することができる。同様に、SEQ ID NO：42～84の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、HLA-A2拘束性エピトープペプチドであり得る。これらのペプチドの中で、SEQ ID NO：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが、HLA-A2およびTOPKを発現するがんに対する強力かつ特異的な免疫応答を対象において効果的に誘導することができる。したがって、SEQ ID NO：2～40（とりわけ、SEQ ID NO：2、3、6、27および28）の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドおよびそれらの改変ペプチドのいずれかを含む薬学的な組成物または剤が、HLA抗原がHLA-A24である対象への投与のために特に適している。同様に、SEQ ID NO：42～84（とりわけ、SEQ ID NO：42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72および76）の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドおよびそれらの改変ペプチドのいずれかを含む薬学的な組成物または剤は、HLA抗原がHLA-A2である対象への投与のために特に適している。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）を含有する薬学的な組成物または剤にも当てはまる。

【 0 1 2 7 】

本発明の薬学的な組成物または剤によって治療されるがんには、TOPKが関与するすべての種類のがんが含まれ、これらには、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCL

10

20

30

40

50

Cおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

【0128】

本発明の薬学的な組成物または剤は、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、そのような他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、そのような他のペプチドを提示する他の細胞などを含有することができる。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、がん特異的抗原（例えば、同定されたTAA）が含まれるが、これに限定されない。

【0129】

必要ならば、本発明の薬学的な組成物または剤は、他の治療物質が有効成分（例えば、本発明のペプチドのいずれか）の抗腫瘍効果を阻害しない限り、付加的な有効成分としてそのような他の治療物質を任意に含むことができる。例えば、製剤は、抗炎症性物質、鎮痛剤、化学療法薬などを含むことができる。他の治療物質を医薬自体に含めることに加えて、本発明の医薬はまた、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ができる。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、投与スケジュールおよび投与経路に依存する。

【0130】

当業者は、本明細書において特に言及された成分に加えて、本発明の薬学的な組成物または剤が、対象となる製剤の種類を考慮して当技術分野において慣用的である他の物質（例えば、増量剤、結合剤、希釈剤、賦形剤など）を含み得ることを認識するであろう。

【0131】

本発明の1つの態様において、本発明の薬学的な組成物または剤を、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に含めることができる。該製品は、ラベルを有する本発明の薬学的な組成物または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、投与などに関する指示も示し得る。

【0132】

本発明の薬学的な組成物または剤を含むキットは、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その他の材料をさらに含み得る。

薬学的な組成物または剤は、所望されるならば、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含むことができるパックまたはディスペンサー装置に詰めることができる。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。

【0133】

(1) 有効成分としてペプチドを含有する薬学的な剤または組成物：

本発明のペプチドは、薬学的な組成物または剤として直接に投与ことができ、あるいは、必要であれば、従来の製剤化法によって製剤化される場合がある。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、賦形剤などが特に制限なく必要に応じて含まれ得る。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれるが、これらに限定されない。さらに、薬学的な組成物または剤は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤などを含有し得る。本発明の薬学的な組成物または剤は、抗がん目的に用いることができる。

【0134】

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つまたはそれ以上から構成される組合せとして調製することができる。ペプチドの組合せはカクテルの形態をとってもよく、または標準的な技法を用いて互いに結合させてもよい。例

10

20

30

40

50

えば、ペプチドを化学的に結合させても、または単一の融合ポリペプチド配列として発現させてもよい。組合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抗原との間に形成された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、その後、本発明のペプチドによって刺激して、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を得る。これらのAPCを対象に再投与し、対象においてCTLを誘導させ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増加させることができる。

#### 【0135】

有効成分として本発明のいずれかのペプチドを含有する、がんの治療および/または予防のための薬学的な組成物または剤は、細胞性免疫を効率的に確立することが知られているアジュバントもまた含み得る。あるいは、薬学的な組成物または剤は、他の有効成分と共に投与してもよく、または顆粒内に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化合物を指す。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）に記載されるアジュバントが含まれる。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）、ISCOM atrix、GM-CSF、CpG、O/W型エマルジョンなどが含まれるが、これらに限定されない。

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使用してもよい。

#### 【0136】

本発明の別の態様において、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、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、硫酸など）との塩が含まれる。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酸または無機塩基との反応によって得られるそのような塩を指す。

#### 【0137】

いくつかの態様において、本発明の薬学的な組成物または剤はさらに、CTLを抗原刺激（prime）する成分を含む場合がある。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでCTLを抗原刺激することができる物質として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリシン残基の - アミノ基および - アミノ基に結合し、次いで本発明のペプチドに連結することができる。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に直接投与するか、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。CTL応答の脂質による抗原刺激の別の一例として、大腸菌（E. coli）のリポタンパク質、例えば、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）などを、適切なペプチドに共有結合させたときにはCTLを抗原刺激するために使用することができる（例えば、Derese et al., Nature 1989, 342: 561-4を参照されたい）。

#### 【0138】

適切な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹膜および静脈内注射など、ならびに、全身投与または標的部近傍への局所投与（すなわち、直接注射）が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。投与は、単回投与によって行うこともできるし

10

20

30

40

50

、または複数回投与によってブーストすることもできる。本発明のペプチドの用量は、治療されるべき疾患、患者の年齢、体重、投与方法など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度投与することができる。当業者は、適切かつ最適な投薬量を容易に決定することができる。

#### 【0139】

(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含有する薬学的な剤または組成物：

本発明の薬学的な組成物または剤はまた、本発明のペプチドを発現可能な形態でコードする核酸も含み得る。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ビボで発現することを意味する。例示的な態様において、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のために必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムへの安定した挿入を達成するように、必要なものを備えることができる(相同組換えカセットベクターの説明については、例えば、Thomas KR & Capecci 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; 同第5,589,466号; 同第5,804,566号; 同第5,739,118号; 同第5,736,524号; 同第5,679,647号; および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(プピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介)送達、カチオン性脂質複合体、および、粒子媒介送達(「遺伝子銃」)または圧力媒介送達が含まれる(例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい)。

#### 【0140】

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おいて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などが明らかである。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。

#### 【0141】

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ビトロで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次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、インビボおよびエクスピボの遺伝子治療として公知である。

#### 【0142】

遺伝子治療の方法の一般的な総説については、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 & A

10

20

30

40

50

Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5):155-215を参照されたい。本発明に適用可能である組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法が、Ausubel et al.によって、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, 1993)に記載されており、また、Kriegerによって、Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, NY, 1990)に記載されている。

#### 【0143】

ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与が、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内および/または腹腔注射などによって行われる場合があり、また、全身投与または標的部近傍への局所投与は使用が見出される。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。適切な担体におけるポリヌクレオチドの用量、または、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞におけるポリヌクレオチドの用量は、治療されるべき疾患、患者の年齢、体重、投与方法など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、数日毎に1回から数ヶ月毎に1回までで投与することができる。当業者は、適切かつ最適な投薬量を容易に決定することができる。

#### 【0144】

X. ペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、APCおよびCTLを使用する方法：  
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することができる。本発明のエキソソームおよびAPCはまた、CTLを調製または誘導するために使用することができる。ペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、CTL誘導能を他の化合物が阻害しない限り、該化合物と組み合わせる用いることができる。したがって、前述の本発明の薬学的な組成物または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。それらに加えて、前記ペプチドまたはポリヌクレオチドを含むものもまた、以下で議論されるように、APCを調製または誘導するために使用することができる。

#### 【0145】

##### (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、高い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、エキスビボ、またはインビボで接触させる段階を含む。例えば、APCをエキスビボで誘導する方法は、以下の段階を含み得る：

- a: APCを対象から回収する段階；および
- b: 段階aのAPCを本発明のペプチドと接触させる段階。

#### 【0146】

APCは特定の種類の細胞に限定されない。APCの例には、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、DC、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞および活性化T細胞が含まれるが、これらに限定されない。APCの中で最も強力なCTL誘導能を有することから、好ましくはDC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、または、本発明の他のペプチドもしくはTOPK以外のTAAに由来するCTL誘導性ペプチドと組み合わせる用いることができる。

#### 【0147】

一方で、本発明のペプチドが対象に投与される場合、APCが該ペプチドとインビボで接触し、その結果、CTL誘導能を有するAPCが対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は、本発明のペプチドを対象に投与して、CTL誘導能を有するAPCを

10

20

30

40

50

対象の体内で誘導する段階を含んでもよい。同様に、本発明のポリヌクレオチドが発現可能な形態で対象に投与される場合、本発明のペプチドがインピボで発現し、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、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与して、C T L誘導能を有するA P Cを対象の体内で誘導する段階を含んでもよい。「発現可能な形態」という語句は、上記において、「I X . 薬学的な剤または組成物、( 2 ) 有効成分としてポリヌクレオチドを含有する薬学的な剤または組成物」の節で記載された。

【 0 1 4 8 】

あるいは、本発明の方法は、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に導入して、C T L誘導能を有するA P Cを誘導する段階を含んでもよい。例えば、本方法は、以下の段階を含み得る：

a : A P Cを対象から回収する段階；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 のA P Cに導入する段階。

段階 b は、上記において「V I . 抗原提示細胞」の節に記載されるように実施することができる。

【 0 1 4 9 】

あるいは、本発明の方法は、以下の段階のうちの一つにより、T O P Kに対するC T L活性を特異的に誘導することができる抗原提示細胞 ( A P C ) を調製する段階を含んでもよい：

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

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

【 0 1 5 0 】

あるいは、本発明の方法は、以下の段階の中より選択される段階を含み、C T L誘導能を有するA P Cを誘導するために役立つ場合がある：

( a ) A P C を本発明のペプチドと接触させる段階；

( 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。

【 0 1 5 1 】

好ましい態様において、本発明は、C T L誘導能を有するA P Cを誘導または調製する方法であって、以下の段階の一つを含む方法を提供する：

( a ) H L A - A 2 4 を発現するA P C を、S E Q I D N O : 2 ~ 4 0 ( とりわけ、S E Q I D N O : 2、3、6、2 7 および 2 8 ) の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドと、インピボ、エクスビボまたはインピボで接触させる段階；および

( b ) S E Q I D N O : 2 ~ 4 0 ( とりわけ、S E Q I D N O : 2、3、6、2 7 および 2 8 ) の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドをコードするポリヌクレオチドを、H L A - A 2 を発現するA P Cに導入する段階。

上記方法によって誘導されるA P C は、そのようなペプチドを、H L A - A 2 4 を介して自身の表面上に提示し、H L A - A 2 4 および T O P K を発現する細胞に対する特異的な細胞傷害活性を有するC T Lを誘導することができる。

【 0 1 5 2 】

別の態様において、本発明は、C T L誘導能を有するA P Cを誘導または調製する方法であって、以下の段階の一つを含む方法を提供する：

( a ) H L A - A 2 を発現するA P C を、S E Q I D N O : 4 2 ~ 8 4 ( とりわけ、S E Q I D N O : 4 2、4 5、4 7、5 0、5 1、5 3、5 4、6 2、6 3、6 4、6 6、7 1、7 2 および 7 6 ) の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドと、インピボ、エクスビボまたはインピボで接触させる段階；および

( b ) S E Q I D N O : 4 2 ~ 8 4 ( とりわけ、S E Q I D N O : 4 2、4 5、4 7、5 0、5 1、5 3、5 4、6 2、6 3、6 4、6 6、7 1、7 2 および 7 6 ) の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドをコードするポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを、HLA-A2を発現するAPCに導入する段階。

上記方法によって誘導されるAPCは、そのようなペプチドを、HLA-A2を介して自身の表面上に提示し、HLA-A2およびTOPKを発現する細胞に対する特異的な細胞傷害活性を有するCTLを誘導することができる。

【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誘導能を有するAPCの誘導に使用するAPCは、好ましくは、HLA-A24またはHLA-A2抗原を発現するAPCであってよい。そのようなAPCは、HLA抗原がHLA-A24またはHLA-A2である対象から得られた末梢血単核細胞(PBMC)から当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導したAPCは、本発明のペプチドとHLA抗原(HLA-A24またはHLA-A2抗原)との複合体を自身の表面に提示するAPCであり得る。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために本発明の方法によって誘導されたAPCを対象に投与する場合、対象は、好ましくは、APCが由来する同一の対象である。しかし、対象は、対象がAPCドナーと同一のHLA型を有する限り、APCドナーと異なる対象であってもよい。

10

【0154】

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。

20

別の態様において、本発明は、APC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の誘導に使用され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ペプチドをさらに提供する。

【0155】

(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、エキソソームまたはAPCを用いてCTLを誘導する方法を提供する。

本発明はまた、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識し得るT細胞受容体(TCR)を形成し得るポリペプチド(すなわち、TCRサブユニット)をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを使用してCTLを誘導する方法を提供する。好ましくは、CTLを誘導する方法は、以下の中より選択される少なくとも1つの段階を含む：

30

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キソソームと接触させる段階；および

c：本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識することができるTCRを形成し得るポリペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。

40

【0156】

本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APCまたはエキソソームが対象に投与される場合、CTLが該対象の体内で誘導され、TOPK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、前述の段階に代えて、本発明の方法は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APCまたはエキソソームを対象に投与する段階を含んでもよい。

【0157】

あるいは、CTLはまた、それらをエクスピボまたはインピボで用いて誘導することができ、CTL誘導後、活性化されたCTLが対象に戻される。例えば、本方法は、以下の段階を含み得る：

50

- a : A P C を対象から回収する段階 ;  
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 C D 8 陽性 T 細胞と共培養する段階。

**【 0 1 5 8 】**

上記の段階 c において C D 8 陽性 T 細胞と共培養されるための A P C はまた、上記において「 V I . 抗原提示細胞」の節で記載されるように、本発明のポリヌクレオチドを A P C に移入することによって調製することができるが、本発明はこれに限定されず、したがって、 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効果的に提示する任意の A P C を包含する。

**【 0 1 5 9 】**

上述の A P C の代わりに、任意で、 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エキソソームを利用してもよい。すなわち、本発明は、 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エキソソームを共培養する段階を含み得る。そのようなエキソソームは、「 V . エキソソーム」の節に上述した方法によって調製することができる。本発明の方法のための好適な A P C およびエキソソームは、本発明のペプチドと H L A - A 2 4 または H L A - A 2 との複合体を自身の表面上に提示する。例えば、 H L A - A 2 4 と、 S E Q I D N O : 2、3、6、27 および 28 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）との複合体を自身の表面上に提示する A P C またはエキソソームを好ましくは、 H L A - A 2 4 および T O P K を発現する細胞に対する特異的な細胞傷害活性を有する C T L を誘導するために利用することができる。同様に、 H L A - A 2 と、 S E Q I D N O : 42、45、47、50、51、53、54、62、63、64、66、71、72 および 76 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチド（またはその改変ペプチド）との複合体を自身の表面上に提示する A P C またはエキソソームを好ましくは、 H L A - A 2 および T O P K を発現する細胞に対する特異的な細胞傷害活性を有する C T L を誘導するために利用することができる。

**【 0 1 6 0 】**

さらに、本発明の C T L は、 T C R サブユニットをコードする 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを C D 8 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、ここで、そのような T C R サブユニットによって形成される T C R は、細胞表面上で、 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。そのような形質導入は、上記において「 V I I I . T 細胞受容体 ( T C R )」の節で記載されるように実施することができる。

**【 0 1 6 1 】**

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。 C T L の誘導のために使用される C D 8 陽性 T 細胞は、対象から得られる P B M C から当該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、 C D 8 陽性 T 細胞のためのドナーは、 H L A 抗原が H L A - A 2 4 または H L A - A 2 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 C T L は、本発明のペプチドと H L A 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 C T L であってよい。そのような C T L は、本発明のペプチドを自身の表面上に提示する細胞に対する特異的な細胞傷害活性を示すことができ、したがって、 T O P K を発現する細胞（例えば、がん細胞）に対する特異的な細胞傷害活性を示すことができる。本発明の方法によって誘導される C T L が、対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために該対象に投与される場合、該対象は好ましくは、 C D 8 陽性 T 細胞が由来する同一の対象である。しかし、対象が C D 8 陽性 T 細胞ドナーと同一の H L A 型を有する限り、該対象は C D 8 陽性 T 細胞ドナーと異なる対象でよい。

**【 0 1 6 2 】**

加えて、本発明は、 C T L を誘導する薬学的な組成物または剤を製造するための方法ま

10

20

30

40

50

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を提供する。

【0163】

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または1種もしくは複数種のAPCもしくはエキ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、またはAPCもしくはエキソソームの使用を提供する。

あるいは本発明は、CTLの誘導に使用される本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、またはAPCもしくはエキソソームをさらに提供する。

10

【0164】

(3) 免疫応答を誘導する方法

さらに、本発明は、TOPK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。企図される疾患にはがんが含まれ、その例として、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

【0165】

本発明の方法は、本発明のペプチド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有する剤または組成物を投与する段階を含み得る。あるいは、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キソソームまたはAPCを投与する段階を含み得る。詳細については、「IX. 薬学的な剤または組成物」の項目、特に、ワクチンとしての本発明の薬学的組成物の使用を記載す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用いることができるエキソソームおよびAPCが、上記の「V. エキソソーム」、「VI. 抗原提示細胞 (APC)」、ならびに、「X. ペプチド、エキソソーム、APCおよびCTLを使用する方法」の(1)および(2)の項目において詳述されている。

20

【0166】

本発明はまた、がんに対する免疫応答を誘導する薬学的な組成物または剤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またはポリヌクレオ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。

30

【0167】

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な組成物もしくは剤を投与する段階を含み得る：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明の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キソソーム；または
- (e) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0168】

40

本発明との関連において、TOPK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、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。したがって、上記有効成分を含むワクチンまたは薬学的な組成物もしくは剤を投与する前に、治療すべき対象におけるTOPKの発現レベルが増強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、TOPKを(過剰)発現するがんの治療を、それを必要とする患者において行なうための方法であって、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におけるTOPKの発現レベルを決定する段階；

50

i i ) T O P K の発現レベルを正常な対照と比較する段階；および

i i i ) 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、正常な対照と比較して T O P K を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

【 0 1 6 9 】

あるいは、本発明は、T O P K を過剰発現するがんを有する対象に投与するための、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 T O P K ポリ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における T O P K の発現レベルを決定する段階を含み、該レベルが該遺伝子の正常対照レベルと比較して増強していることにより、該対象が、本発明の T O P K ポリ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を、以下に、より詳細に説明する。

10

【 0 1 7 0 】

目的とする T O P K の転写産物または翻訳産物を含む限り、対象由来の任意の細胞または組織を、T O P K の発現を決定するため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、またはがんの疑いがある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、次いでこれを対象由来試料として使用してよい。

20

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、ヒト以外の霊長類、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。

【 0 1 7 1 】

本発明によれば、対象から得られた生物学的試料における T O P K の発現レベルが決定され得る。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、T O P K の m R N A を、ハイブリダイゼーション法 ( 例えば、ノーザンハイブリダイゼーション ) によってプローブを用いて定量し得る。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、T O P K の発現レベルを検出するために好ましい。当業者は、そのようなプローブを、T O P K の配列情報を利用して調製することができる。例えば、T O P K 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、適切な標識、例えば色素、蛍光物質および同位体で標識してよく、該遺伝子の発現レベルを、ハイブリダイズした標識の強度として検出してもよい。

30

さらに、T O P K の転写産物を、増幅に基づく検出法 ( 例えば、R T - P C R ) によってプライマーを用いて定量し得る。そのようなプライマーは、該遺伝子の利用可能な配列情報に基づいて調製することができる。

【 0 1 7 2 】

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 T O P K の m R N A にハイブリダイズする。本明細書で使用する「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 5 0 % 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 5 0 % 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

40

50

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。

#### 【0173】

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のもとで、少なくとも約2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50もしくは25の連続する、TOPK配列を含む核酸のセンス鎖ヌクレオチド配列、または、TOPK配列を含む核酸のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列に、または、これらの配列の天然の変異体に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、TOPK遺伝子のmRNAまたはcDNAを、特定のサイズ、一般に長さが15b ~ 30bのオリゴヌクレオチドプローブまたはオリゴヌクレオチドプライマーにより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オリゴヌクレオチドプライマーを使用す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、周知のものである（例えば、オリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはPCR）。これらのアッセイにおいて、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され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また、プローブに使用することができる（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）。

#### 【0174】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出することができる。例えば、TOPKタンパク質（SEQ ID NO: 86）またはその免疫学的断片の量が測定され得る。翻訳産物としてタンパク質の量を測定する方法には、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TOPK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を（例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなどを）検出に用いることができる。本発明のペプチドに対するそのような抗体およびその断片も本発明によって提供される。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。

#### 【0175】

TOPK遺伝子の発現レベルをその翻訳産物に基づいて検出するための別の方法として、TOPK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、強い染色により、該タンパク質の増大した存在/レベルが示され、それと同時に、TOPK遺伝子の高い発現レベルが示される。

#### 【0176】

がん細胞における、標的遺伝子、例えば、TOPK遺伝子のがん細胞における発現レベ

10

20

30

40

50

ルは、そのレベルが、標的遺伝子の対照レベル（例えば、正常な細胞におけるレベル）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に上昇する場合には上昇していると判定され得る。

【0177】

対照レベルは、疾患状態（がん性または非がん性）が判明している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におけるTOPK遺伝子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学的方法によって決定してもよい。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1つの局面によれば、生物学的試料におけるTOPK遺伝子の発現レベルを、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してもよい。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TOPK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。

【0178】

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、およびリボソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

TOPK遺伝子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か、または、がん性対照レベルと類似している/同等である場合、該対象は、治療すべきがんを有すると診断され得る。

【0179】

本発明はまた、(i)治療すべきがんを有する疑いのある対象を診断する方法、および/または(ii)がん治療のための対象を選択する方法を提供し、該方法は以下の段階を含み得る：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られた生物学的試料におけるTOPKの発現レベルを決定する段階；
- b) TOPKの発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；
- c) TOPK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、該対象を、治療すべきがんを有すると診断する段階；および
- d) 段階c)において対象が治療すべきがんを有すると診断される場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

【0180】

あるいは、そのような方法は以下の段階を含み得る：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られた生物学的試料におけるTOPKの発現レベルを決定する段階；
- b) TOPKの発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；
- c) TOPKの発現レベルががん性対照レベルと類似しているか、または同等である場合、該対象を、治療すべきがんを有すると診断する段階；および
- d) 段階c)において対象が治療すべきがんを有すると診断される場合に、がん治療のた

10

20

30

40

50

めに該対象を選択する段階。

【0181】

本発明はまた、本発明のTOPKポリペプチドにより治療され得るがんに罹患している、もしくは罹患していることが疑われるか、または、本発明のTOPKポリペプチドにより治療され得るがんを発症する危険性がある、もしくはそのような危険性があることが疑われる対象を、診断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の評価およびモニターの一方または両方において有用であり得る。好ましくは、そのようながんには、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。より詳細には、キットは好ましくは、対象由来の細胞におけるTOPK遺伝子の発現を検出するための少なくとも1つの試薬を含み、そのような試薬は以下の群より選択される場合がある：

- (a) TOPK遺伝子のmRNAを検出するための試薬；
- (b) TOPKタンパク質またはその免疫学的断片を検出するための試薬；および
- (c) TOPKタンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【0182】

TOPK遺伝子のmRNAを検出するために適した試薬の例には、TOPK 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、TOPK mRNAに特異的に結合するか、または、TOPK mRNAを同定する核酸が含まれ得る。このような種類のオリゴヌクレオチドは、TOPK 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、TOPK mRNAを検出するための試薬は固体マトリックス上に固定化され得る。さらに、TOPK mRNAを検出するための2つ以上の試薬がキットに含まれる場合がある。

【0183】

一方で、TOPKタンパク質またはその免疫学的断片を検出するために適した試薬の例には、TOPKタンパク質またはその免疫学的断片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TOPKタンパク質またはその免疫学的断片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を（例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなどを）試薬として用い得る。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、TOPKタンパク質を検出するための2つ以上の試薬をキットに含めることもできる。

【0184】

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、TOPK遺伝子に対するプローブまたはTOPKペプチドに対する抗体を結合させるための固体マトリックスおよび試薬、細胞を培養するための培地および容器、陽性および陰性の対照試薬、ならびに、TOPKペプチド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、またはがん罹患している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、および使用説明を記載した添付文書（例えば、文書、テープ、CD-ROMなど）を含む、商業上の観点および使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含み得る。これらの試薬などは、ラベルを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得る。

【0185】

本発明の1つの態様において、試薬が、TOPK mRNAに対するプローブである場合、該試薬を、固体マトリックス（例えば、多孔性ストリップなど）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。試験試料が添加されると、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TOPK mRNA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

## 【0186】

本発明のキットはさらに、陽性対照試料またはTOPK標準試料を含み得る。本発明の陽性対照試料は、TOPK陽性試料を回収し、次にそれらのTOPKレベルをアッセイすることによって調製され得る。あるいは、精製されたTOPKタンパク質またはTOPKポリヌクレオチドを、TOPKを発現しない細胞に添加して、陽性試料またはTOPK標準試料を形成してもよい。本発明において、精製されたTOPKは組換えタンパク質である場合がある。陽性対照試料のTOPKレベルは、例えば、カットオフ値よりも高い。

## 【0187】

一つの態様において、本発明はさらに、本発明の抗体またはその断片によって特異的に認識されるタンパク質またはその部分タンパク質を含む診断キットを提供する。

20

本発明のタンパク質の部分ペプチドの例には、本発明のタンパク質のアミノ酸配列における少なくとも8個、好ましくは15個、より好ましくは20個の連続したアミノ酸から構成されるポリペプチドが含まれる。本発明のタンパク質またはペプチド（ポリペプチド）を用いて試料（例えば、血液、組織）中の抗体を検出することにより、がんを診断することができる。本発明のタンパク質およびペプチドを調製するための方法は、上記の通りである。

## 【0188】

本発明のがん診断方法は、抗TOPK抗体の量と、上記のような対応する対照試料における抗TOPK抗体の量との差を測定することによって実施することができる。対象の細胞または組織が該遺伝子の発現産物（TOPK）に対する抗体を含み、抗TOPK抗体の量が、正常対照中の抗TOPK抗体の量と比較してカットオフ値のレベルよりも高いと判定される場合、該対象は、がん罹患していることが疑われる。

30

## 【0189】

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HLA分子を含み得る。抗原性ペプチドおよびHLA分子を使用して抗原特異的CTLを検出するための方法が既に確立されている（例えば、Altman J D et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6）。したがって、腫瘍抗原特異的CTLを検出するための検出法に、本発明のペプチドとHLA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、これを用いることができる。

40

## 【0190】

詳細には、公知の方法に従って（例えば、Altman J D et al., Science, 1996, 274(5284): 94-6を参照されたい）、放射標識されたHLA分子と本発明のペプチドとのオリゴマー複合体（例えば、四量体など）を調製することができる。この複合体を使用して、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に特異的なCTLを定量することによって、診断を行うことができる。

## 【0191】

50

本発明はさらに、本明細書に記載されるような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、本明細書に記載されるようなHLA-A24拘束性ペプチドまたはHLA-A2拘束性ペプチドが、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られる。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(PBL)、および末梢血単核細胞(PBMC)から選択し得る。そのような免疫担当細胞を回収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は、ペプチドエピトープを認識して結合する抗原特異的CTLの産生をもたらす任意の剤を、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しなくてもよい。そのような解析に用いられるアッセイ系には、四量体、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免疫担当細胞は、樹状細胞を含む抗原提示細胞であってよい。

10

#### 【0192】

例えば、本発明のペプチドを四量体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CTL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。HLA四量体複合体を使用して、抗原特異的CTLを直接に可視化し(例えば、Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998; およびAltman et al., Science 174:94-96, 1996を参照されたい)、末梢血単核細胞の試料中の抗原特異的CTL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四量体試薬は、以下に記載するように作製することができる。

20

#### 【0193】

HLA分子に結合するペプチドは、対応するHLA重鎖および $\beta$ 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ピオチン化する。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四量体を形成する。蛍光標識ストレプトアビジンの手法によって、この四量体を使用して、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

#### 【0194】

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、Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100:503-513, 1997およびPenna et al., J. Exp. Med. 174:1565-1570, 1991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られる患者PBMC試料が、特異的ペプチドを使用して抗原特異的CTLの存在について解析される。PBMC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CTL活性について解析することができる。

40

#### 【0195】

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PBMCを、例えば上記の方法のいずれかをを用いて解析することができる。患者のHLA型を決定し、その患者に存在するアレ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、PBMC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。

#### 【0196】

50

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。

【0197】

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、TOPK免疫原性ポリペプチドの発現を特徴とす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、生物学的試料においてTOPK HLA結合ペプチド、または、TOPK HLA結合ペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現を測定することを伴う。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、該ペプチドを認識してこれに特異的に結合する抗体である。腫瘍生検などの生物学的試料におけるTOPKの発現はまた、TOPK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ができる。腫瘍発現の一例が本明細書に示されており、TOPK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をWO 2003/27322に見出すことができる。

【0198】

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、TOPK HLA結合ペプチドに特異的な剤と接触させて、該生物学的試料におけるTOPK HLA結合ペプチドの存在を検出することを伴う。本明細書で使用する「接触させる」とは、剤と、生物学的試料に存在するTOPK HLA結合ペプチドとの間における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の十分な近傍に置くことを意味する。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における特異的相互作用を促進させるための最適な条件が、Lowらに発行された米国特許第5,108,921号に記載される。

【0199】

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、TOPK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、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、診断または治療すべき対象から回収された腫瘍細胞を含む試料であってよい。

【0200】

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って診断を行うことができる（例えば、Altman, J. D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J. D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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。四量体染色、細胞内リンホカイン染色およびELISPOTアッセイはすべてが、より慣例的なアッセイより少

10

20

30

40

50

なくとも10倍高感度であるようである (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、US2004-209295A)、デキストラマー (dextramer) (例えば、WO02/072631) およびストレプトマー (streptamer) (例えば、Nature medicine 6: 631-637 (2002)) を使用することもできる。

#### 【0201】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明のTOPKペプチドの少なくとも1つが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

(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。

#### 【0202】

本発明との関連において、免疫原は好ましくは、(a) SEQ ID NO: 2~40 および42~84のアミノ酸配列の中より選択されるTOPKペプチド、そのようなアミノ酸配列を有するペプチド、ならびに、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り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。

#### 【0203】

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よい。

#### 【0204】

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ための適した対照には、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、または、いかなるTOPK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。一つの好ましい態様において、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TOPKペプチド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って、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。

#### 【0205】

XII. 抗体：

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は本発明のペプチドに特異的に結合し、他のペプチドには結合しない (または、弱く結合する)。あるいは、抗体は、本発明のペプチド、ならびにその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アッセイ、ならびに、画像化方法論において

10

20

30

40

50

使用が見出され得る。同様に、そのような抗体は、TOPK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）が、TOPKの発現が関与するがんの治療において治療的使用が見出されることがあり、そのようながんの例には、AML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0206】

本発明はまた、SEQ ID NO: 2~40および42~84からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、TOPKタンパク質（SEQ ID NO: 86）また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TOPKタンパク質またはその断片を認識し、それと結合することができる1種または複数種の抗TOPK抗体を含み得る。本発明との関連において、TOPKポリペプチドに結合する抗TOPK抗体は、好ましくは他のペプチドを除外して、SEQ ID NO: 2~40および42~84からなる群より選択されるアミノ酸配列を有す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TOPKポリペプチドとの間における結合が、SEQ ID NO: 2~40および42~84のアミノ酸配列を有す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（ELISA）、酵素結合免疫蛍光測定法（ELIFA）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。

#### 【0207】

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MHC結合アッセイもまた含まれ得る。加えて、本発明は、TOPK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、この場合、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、TOPKを発現するがんの検出、モニタリングおよび予後において臨床的な使用が見いだされ、そのようながんの例にはAML、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLCおよび軟部組織腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0208】

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。

#### 【0209】

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。

本発明によれば、タンパク質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）末端断片が含まれ得る。

#### 【0210】

本明細書において、抗体は、TOPK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、SEQ ID NO

10

20

30

40

50

: 2 ~ 40 および 42 ~ 84 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する T O P K 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（K L H）が周知である。K L H 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。

#### 【0211】

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。

10

#### 【0212】

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。

20

#### 【0213】

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、懸濁させ得る。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。

30

#### 【0214】

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

#### 【0215】

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。

公知の方法、例えば、Milstein 他の方法（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。

50

## 【0216】

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。

## 【0217】

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髓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）。

## 【0218】

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、腹水が取り出される。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カ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。

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。

## 【0219】

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。

## 【0220】

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 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）。

## 【0221】

10

20

30

40

50

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。

#### 【0222】

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。

10

#### 【0223】

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。

20

#### 【0224】

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ラム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。

30

#### 【0225】

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 Characterization: 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。

40

#### 【0226】

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

50

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。

#### 【0227】

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。

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。

#### 【0228】

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。

#### 【0229】

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XL1Blue）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XL1Blue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)）または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。

#### 【0230】

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（In

10

20

30

40

50

vitrogen) 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

#### 【0231】

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

#### 【0232】

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】

#### 【0233】

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。HLA-A\*0201陽性Bリンパ芽球様細胞株であるT2、および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。

#### 【0234】

TOPK由来ペプチドの候補選択

TOPK (GenBankアクセッション番号NM\_018492; 例えば、SEQ ID NO: 85) に由来する9merペプチドおよび10merペプチドで、HLA-A\*2402分子およびHLA-A\*0201分子のどちらかまたは両方に結合するものを、「NetMHC3.0」結合予測サーバー (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (Buus et al., Tissue Antigens. 2003 Nov, 62(5): 378-84; Nielsen et al., Protein Sci. 2003 May, 12(5): 1007-17, Bioinformatics. 2004 Jun 12: 20(9): 1388-97) を用いて予測した。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よって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製した。該ペプチドの純度 (>90%) および

40

50

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。

#### 【0235】

##### 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。DCを、他所に記載されているように、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、健常なボランティア(HLA-A\*2402陽性またはHLA-A\*0201陽性)からFicoll-Plus(Pharmacia)溶液によって単離され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)へ付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、1000U/mlの顆粒球マクローファージコロニー刺激因子(R&D System)および1000U/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37で3時間、3μg/mlの2-ミクログロブリンの存在下で、20μg/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(20Gy)によって不活化し、CD8 Positive Isolation Kit(Dynal)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、0.5ml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10ng/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20IU/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細胞またはT2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)。

#### 【0236】

##### 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 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。40ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体(Pharming)の存在下で、マイトマイシンCによって不活化された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25mlのAIM-V/5%AS培地中に懸濁した。培養開始1日後に、120IU/mlのIL-2を該培養物に添加した。5、8、および11日目に、30IU/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

10

20

30

40

50

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 ) 。

#### 【0237】

##### 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CTL 0.3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、30ng/mlの抗CD3抗体、および125U/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125U/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、上記と同一の方法を用いて、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 ) 。

10

#### 【0238】

##### 特異的CTL活性

特異的CTL活性を調べるために、IFN- $\gamma$  のELISPOTアッセイおよびIFN- $\gamma$  のELISAを行った。ペプチドパルスしたTISI細胞またはT2細胞 ( $1 \times 10^4$  個/ウェル) を刺激細胞として調製した。48ウェルプレート中の培養細胞、CTL株、およびCTLクローンを応答細胞として使用した。IFN- $\gamma$  のELISPOTアッセイおよびIFN- $\gamma$  のELISAを製造業者の手順に従って実施した。

20

#### 【0239】

##### 標的遺伝子およびHLA-A\*2402またはHLA-A\*0201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、HLA-A\*2402、またはHLA-A\*0201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。製造業者の手順に従って、リポフェクタミン2000 (Invitrogen) を使用して、標的遺伝子欠損、HLA-A\*0201欠損、かつHLA-A\*2402欠損の細胞株である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、トランスフェクトされた細胞を、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として使用した ( $5 \times 10^4$  細胞/ウェル) 。

30

#### 【0240】

##### TOPKおよびHLA-A\*2402またはHLA-A\*0201を内因的に発現した標的細胞株を認識するCTLの能力

TOPKおよびHLA-A\*2402またはHLA-A\*0201を内因的に発現する標的細胞を認識するCTLクローンの能力について調べた。樹立されたCTLクローンを2晩にわたって標的細胞株 ( $5 \times 10^4$  個/ウェル) と共に培養した。インキュベーション後、培養培地中のIFN- $\gamma$  をELISAによって測定した。製造業者の手順に従って、IFN- $\gamma$  のELISAを実施した。

40

#### 【0241】

##### 結果

##### がんにおけるTOPK発現の上昇

cDNAマイクロアレイを使用し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、TOPK (GenBankアクセッション番号NM\_018492 ; 例えば、SEQ ID NO : 85) の発現が、対応する正常組織と比較してがん組織に

50

において特異的に上昇していることが明らかにされた。TOPKの発現が、15例中1例のAML、18例中15例の膀胱癌、40例中36例の乳癌、6例中2例の子宮頸癌、6例中6例の胆管細胞癌、6例中2例の結腸直腸癌、1例中1例のびまん性胃癌、5例中5例のNSCLC、2例中1例のリンパ腫、11例中7例の骨肉腫、19例中12例の前立腺癌、12例中3例の腎癌、14例中14例のSCLC、および29例中15例の軟部組織腫瘍において確かに上昇していた(表1)。

【0242】

【表1】

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

がん/腫瘍	割合
AML	1/15
膀胱癌	15/18
乳癌	36/40
子宮頸癌	2/6
胆管細胞癌	6/6
結腸直腸癌	2/6
びまん性胃癌	1/1
NSCLC	5/5
リンパ腫	1/2
骨肉腫	7/11
前立腺癌	12/19
腎癌	3/12
SCLC	14/14
軟部組織腫瘍	15/29

10

20

【0243】

TOPK由来のHLA-A24結合ペプチドの予測

表2aおよび表2bは、HLA-A24に結合するTOPKの9merペプチドおよび10merペプチドを結合親和性の高い順に示す。HLA-A24結合能を有する可能性のある合計40個のペプチドを、エピトープペプチドを決定するために選択し、調べた。

【0244】

30

【表 2 a】

TOPK由来のHLA-A24結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
289	SYQKVIELF	21	1
230	IFAFGLTLW	363	2
130	RYKASQDPF	451	3
237	LWEMMTLSI	1351	4
155	KYLHQEKKL	1906	5
232	AFGLTLWEM	3946	6
174	VIKGFETI	4496	7
73	HYRSVYQKR	4663	8
235	LTLWEMMTL	4781	9
19	SVLCSTPTI	6522	10
205	CYIGTEPWK	7254	11
77	VYQKRLMDE	8604	12
270	AYYAALGTR	8621	13
58	HSPWAVKKI	9096	14
81	RLMDEAKIL	12527	15
278	RPPINMEEL	19706	16
183	KICDVGVS	25266	17
227	KADIFAFGL	25408	18
13	LSEKKKSVL	26380	19
146	VALNMARGL	26693	20
140	AAIILKVAL	28349	21
103	FTEANDGSL	29275	22
105	EANDGSLCL	29821	23
118	GGEKSLNDL	35171	24

【 0 2 4 5 】

10

20

30

## 【表 2 b】

## TOPK由来のHLA-A24結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
31	ASPFMQKLGf	4764	25
155	KYLHQEKkLL	8099	26
288	ESYQKVIElF	9466	27
289	SYQKVIElFS	9631	28
130	RYKASQDPfP	9917	29
47	YLMKRSPRGL	10978	30
73	HYRSVYQKRL	11919	31
102	AFTEANDGSL	14375	32
39	GFGTGVNVYL	21925	33
4	ISNFKTPSKL	21974	34
77	VYQKRLMDEA	23521	35
241	MTLSIPHINL	27049	36
12	KLSEKKKSVL	28153	37
148	LNMARGLKYL	30397	38
145	KVALNMARGL	32052	39
114	AMEYGG EKSL	32705	40

10

20

開始位置はTOPKのN末端からのアミノ酸残基数を示す。

解離定数 [Kd (nM)] は「NetMHC3.0」から導き出している。

## 【0246】

TOPK由来のHLA-A02結合ペプチドの予測

表3aおよび表3bは、HLA-A02結合性のTOPKの9merペプチドおよび10merペプチドをそれぞれ結合親和性の高い順に示す。HLA-A02結合能を有する可能性のある合計44個のペプチドを、エピトープペプチドを決定するために選択し、調べた。

30

## 【0247】

【表 3 a】

TOPK由来のHLA-A02結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
55	GLSHSPWAV	13	41
240	MMTLSIPHI	37	42
34	FMQKLGFGT	76	43
236	TLWEMMTLS	150	44
19	SVLCSTPTI	230	45
134	SQDPFPAAI	238	46
183	KICDVGVS�	415	47
81	RLMDEAKIL	470	48
149	NMARGLYL	524	49
235	LTLWEMMTL	648	50
12	KLSEKKKSV	775	51
227	KADIFAFGL	1542	52
285	ELDESYQKV	1902	53
47	YLMKRSPRG	2476	54
310	SAAHIVEAL	3199	55
132	KASQDPFPA	3496	56
242	TLSIPHINL	3753	57
156	YLHQEKLL	4077	58
138	FPAAILKV	4228	59
142	IILKVALNM	4330	60

10

20

【 0 2 4 8 】

【表 3 b】

## TOPK由来のHLA-A02結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
190	SLPLDENMTV	30	61
236	TLWEMMTLSI	32	62
231	FAFGLTLWEM	41	63
47	YLMKRSPRGL	64	64
234	GLTLWEMMTL	74	65
239	EMMTLSIPHI	93	66
290	YQKVIELFSV	101	67
37	KLGFGTGVNV	192	68
20	VLCSTPTINI	290	69
241	MTLSIPHINL	310	70
272	YAALGTRPPI	1347	71
88	ILKSLHHPNI	1656	72
81	RLMDEAKILK	1720	73
313	HIVEALETDV	2345	74
54	RGLSHSPWAV	2364	75
142	IILKVALNMA	2428	76
35	MQKLGFGTGV	2432	77
110	SLCLAMEYGG	3236	78
223	VITDKADIFA	3422	79
274	ALGTRPPINM	3575	80
173	VVIKGFETI	3955	81
141	AIILKVALNM	4247	82
292	KVIELFSVCT	4637	83
180	ETIKICDVG	4911	84

10

20

30

開始位置はTOPKのN末端からのアミノ酸残基数を示す。  
解離定数 [Kd (nM)] は「NetMHC3.0」から導き出している。

## 【0249】

HLA-A\*2402拘束性のTOPK由来予測ペプチドによるCTL誘導

TOPK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1)。TOPK-A24-9-230(SEQ ID NO:2)を用いたウェル番号#8(a)、TOPK-A24-9-130(SEQ ID NO:3)を用いたウェル番号#3(b)、TOPK-A24-9-232(SEQ ID NO:6)を用いたウェル番号#3(c)、TOPK-A24-10-288(SEQ ID NO:27)を用いたウェル番号#2(d)、および、TOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)を用いたウェル番号#4(e)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活性が検出されなかった。典型的な陰性データとして、TOPK-A24-9-289(SEQ ID NO:1)により刺激されたCTLからは、特異的なIFN- $\gamma$ 産生が認められなかった(f)。まとめると、これらの結果は、TOPK由来の5個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唆する。

40

50

## 【0250】

H L A - A \* 0 2 0 1 拘束性の T O P K 由来予測ペプチドによる C T L 誘導

ペプチド特異的な C T L 活性を I F N - の E L I S P O T アッセイによって検出した ( 図 2 ) 。 T O P K - A 0 2 - 9 - 2 4 0 ( S E Q I D N O : 4 2 ) を用いたウェル番号 # 7 ( a ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 1 9 ( S E Q I D N O : 4 5 ) を用いたウェル番号 # 4 ( b ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 1 8 3 ( S E Q I D N O : 4 7 ) を用いたウェル番号 # 2 ( c ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 2 3 5 ( S E Q I D N O : 5 0 ) を用いたウェル番号 # 8 ( d ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 1 2 ( S E Q I D N O : 5 1 ) を用いたウェル番号 # 4 ( e ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 2 8 5 ( S E Q I D N O : 5 3 ) を用いたウェル番号 # 3 ( f ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 4 7 ( S E Q I D N O : 5 4 ) を用いたウェル番号 # 3 ( g ) 、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 2 3 6 ( S E Q I D N O : 6 2 ) を用いたウェル番号 # 5 ( h ) 、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 2 3 1 ( S E Q I D N O : 6 3 ) を用いたウェル番号 # 3 ( i ) 、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 4 7 ( S E Q I D N O : 6 4 ) を用いたウェル番号 # 8 ( j ) 、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 2 3 9 ( S E Q I D N O : 6 6 ) を用いたウェル番号 # 1 ( k ) 、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 2 7 2 ( S E Q I D N O : 7 1 ) を用いたウェル番号 # 1 ( l ) 、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 8 8 ( S E Q I D N O : 7 2 ) を用いたウェル番号 # 4 ( m ) 、 および、 T O P K - A 0 2 - 1 0 - 1 4 2 ( S E Q I D N O : 7 6 ) を用いたウェル番号 # 4 ( n ) は、対照ウェルと比較して強力な I F N - 産生を実証した。一方で、表 3 a および表 3 b に示される他のペプチドは H L A - A \* 0 2 0 1 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 C T L 活性が検出されなかった。典型的な陰性データとして、T O P K - A 0 2 - 9 - 5 5 ( S E Q I D N O : 4 1 ) により刺激された C T L からは、特異的な I F N - 産生が認められなかった ( o ) 。まとめると、これらの結果は、T O P K 由来の 1 4 個の選択されたペプチドが強力な C T L を誘導できたことを示唆する。

## 【0251】

T O P K 由来ペプチドに対する C T L 株および C T L クローンの樹立

I F N - の E L I S P O T アッセイにおいてペプチド特異的な C T L 活性を示した、T O P K - A 2 4 - 9 - 2 3 0 ( S E Q I D N O : 2 ) を用いたウェル番号 # 8 ( a ) 、 T O P K - A 2 4 - 9 - 1 3 0 ( S E Q I D N O : 3 ) を用いたウェル番号 # 3 ( b ) 、 T O P K - A 2 4 - 9 - 2 3 2 ( S E Q I D N O : 6 ) を用いたウェル番号 # 3 ( c ) 、 T O P K - A 2 4 - 1 0 - 2 8 8 ( S E Q I D N O : 2 7 ) を用いたウェル番号 # 2 ( d ) 、 および、 T O P K - A 2 4 - 1 0 - 2 8 9 ( S E Q I D N O : 2 8 ) を用いたウェル番号 # 4 ( e ) における細胞を増殖させ、C T L 株を樹立した。これらの C T L 株の C T L 活性を I F N - の E L I S A によって測定した ( 図 3 ) 。 C T L 株は、ペプチドパルスしなかった標的細胞と比較して、対応するペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な I F N - 産生を実証した。さらに、「材料および方法」に記載されるように、C T L クローンを C T L 株から限界希釈によって樹立し、対応するペプチドをパルスした T I S I 細胞に対する C T L クローンからの I F N - 産生を I F N - の E L I S A によって測定した。強力な I F N - 産生が、T O P K - A 2 4 - 9 - 1 3 0 ( S E Q I D N O : 3 ) ( a ) 、 T O P K - A 2 4 - 1 0 - 2 8 8 ( S E Q I D N O : 2 7 ) ( b ) 、 および T O P K - A 2 4 - 1 0 - 2 8 9 ( S E Q I D N O : 2 8 ) ( c ) により刺激された C T L クローンから認められた ( 図 4 ) 。

## 【0252】

I F N - の E L I S P O T アッセイにおいてペプチド特異的な C T L 活性を示した、T O P K - A 0 2 - 9 - 2 4 0 ( S E Q I D N O : 4 2 ) を用いたウェル番号 # 7 ( a ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 1 9 ( S E Q I D N O : 4 5 ) を用いたウェル番号 # 4 ( b ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 2 3 5 ( S E Q I D N O : 5 0 ) を用いたウェル番号 # 8 ( c ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 1 2 ( S E Q I D N O : 5 1 ) を用いたウェル番号 # 4 ( d ) 、 T O P K - A 0 2 - 9 - 2 8 5 ( S E Q I D N O : 5 3 ) を用

いたウェル番号#3(e)、TOPK-A02-9-47(SEQ ID NO:54)を用いたウェル番号#3(f)、TOPK-A02-10-236(SEQ ID NO:62)を用いたウェル番号#5(g)、TOPK-A02-10-231(SEQ ID NO:63)を用いたウェル番号#3(h)、TOPK-A02-10-47(SEQ ID NO:64)を用いたウェル番号#8(i)、TOPK-A02-10-239(SEQ ID NO:66)を用いたウェル番号#1(j)、および、TOPK-A02-10-88(SEQ ID NO:72)を用いたウェル番号#4(k)における細胞を増殖させ、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5)。CTL株は、ペプチドパルスしなかった標的細胞と比較して、対応するペプチドを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」に記載されるように、CTLクローンをCTL株から限界希釈によって樹立し、対応するペプチドをパルスしたT2細胞に対するCTLクローンからのIFN- $\gamma$ 産生をIFN- $\gamma$ のELISAによって測定した。強力なIFN- $\gamma$ 産生が、TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)(a)およびTOPK-A02-9-285(SEQ ID NO:53)(b)により刺激されたCTLクローンから認められた(図6)。

#### 【0253】

TOPKおよびHLA-A\*2402またはHLA-A\*0201を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

TOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)ペプチドに対して産生された樹立CTLクローンを、TOPK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ついて調べた。全長のTOPKとHLA-A\*2402遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞(TOPKおよびHLA-A\*2402遺伝子が発現する標的細胞のための特異的モデル)を刺激細胞として調製し、全長のTOPK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7において、TOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)により刺激されたCTLクローンは、TOPK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、これらのデータは、TOPK-A24-10-289(SEQ ID NO:28)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提示され、CTLによって認識されることを明確に実証する。TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)ペプチドに対して産生された樹立CTL株を、TOPKおよびHLA-A\*0201分子を発現する標的細胞を認識する能力について調べた。全長のTOPKとHLA-A\*0201遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞(TOPKおよびHLA-A\*0201遺伝子が発現する標的細胞のための特異的モデル)を刺激細胞として調製し、全長のTOPKまたはHLA-A\*0201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8において、TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)により刺激されたCTL株は、TOPKおよびHLA-A\*0201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、これらのデータは、TOPK-A02-9-240(SEQ ID NO:42)ペプチドが内因的にプロセッシングされ、HLA-A\*0201分子とともに標的細胞上に提示され、CTLによって認識されることを明確に実証する。これらの結果は、TOPK由来のこれらのペプチドが、TOPK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ている。

#### 【0254】

抗原ペプチドの相同性解析

TOPK-A24-9-230(SEQ ID NO:2)、TOPK-A24-9-130(SEQ ID NO:3)、TOPK-A24-9-232(SEQ ID N

10

20

30

40

50

O : 6 )、TOPK - A 2 4 - 1 0 - 2 8 8 (SEQ ID NO : 2 7 )、TOPK - A 2 4 - 1 0 - 2 8 9 (SEQ ID NO : 2 8 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 2 4 0 (SEQ ID NO : 4 2 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 1 9 (SEQ ID NO : 4 5 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 1 8 3 (SEQ ID NO : 4 7 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 2 3 5 (SEQ ID NO : 5 0 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 1 2 (SEQ ID NO : 5 1 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 2 8 5 (SEQ ID NO : 5 3 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 4 7 (SEQ ID NO : 5 4 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 3 6 (SEQ ID NO : 6 2 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 3 1 (SEQ ID NO : 6 3 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 4 7 (SEQ ID NO : 6 4 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 3 9 (SEQ ID NO : 6 6 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 7 2 (SEQ ID NO : 7 1 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 8 8 (SEQ ID NO : 7 2 )またはTOPK - A 0 2 - 1 0 - 1 4 2 (SEQ ID NO : 7 6 )により刺激されたCTLは、有意かつ特異的なCTL活性を示した。この結果は、これらの配列が、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に対して相通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://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/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ついて相同性解析を行い、これにより、有意な相同性を有する配列が認められないことが明らかにされた。相同性解析の結果は、TOPK - A 2 4 - 9 - 2 3 0 (SEQ ID NO : 2 )、TOPK - A 2 4 - 9 - 1 3 0 (SEQ ID NO : 3 )、TOPK - A 2 4 - 9 - 2 3 2 (SEQ ID NO : 6 )、TOPK - A 2 4 - 1 0 - 2 8 8 (SEQ ID NO : 2 7 )、TOPK - A 2 4 - 1 0 - 2 8 9 (SEQ ID NO : 2 8 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 2 4 0 (SEQ ID NO : 4 2 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 1 9 (SEQ ID NO : 4 5 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 1 8 3 (SEQ ID NO : 4 7 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 2 3 5 (SEQ ID NO : 5 0 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 1 2 (SEQ ID NO : 5 1 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 2 8 5 (SEQ ID NO : 5 3 )、TOPK - A 0 2 - 9 - 4 7 (SEQ ID NO : 5 4 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 3 6 (SEQ ID NO : 6 2 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 3 1 (SEQ ID NO : 6 3 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 4 7 (SEQ ID NO : 6 4 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 3 9 (SEQ ID NO : 6 6 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 2 7 2 (SEQ ID NO : 7 1 )、TOPK - A 0 2 - 1 0 - 8 8 (SEQ ID NO : 7 2 )およびTOPK - A 0 2 - 1 0 - 1 4 2 (SEQ ID NO : 7 6 )の配列は、固有のものであることを示し、したがって、本発明者らが知る限り、これらの分子が、いくつかの非関連分子に対する意図されない免疫学的応答を引き起こす可能性がほとんどないことを示している。結論として、本明細書において同定されるTOPK由来の新規なHLA - A 2 4 エピトープペプチドまたはHLA - A 0 2 エピトープペプチドは、がん免疫療法の分野において有用性が見出され得る。

【産業上の利用可能性】

【0255】

本発明は、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し、したがって、幅広い様々ながんタイプに対する適用性を有する可能性がある新規TAA、特に、TOPK由来の新規TAAを提供する。そのようなTAAは、TOPKに関連する疾患、例えば、がん、より具体的には、急性骨髄性白血病(AML)、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、結腸直腸癌、びまん性胃癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、小細胞肺癌(SCLC)および軟部組織腫瘍に対するペプチドワクチンとしての使用が見出され得る。

【0256】

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、

10

20

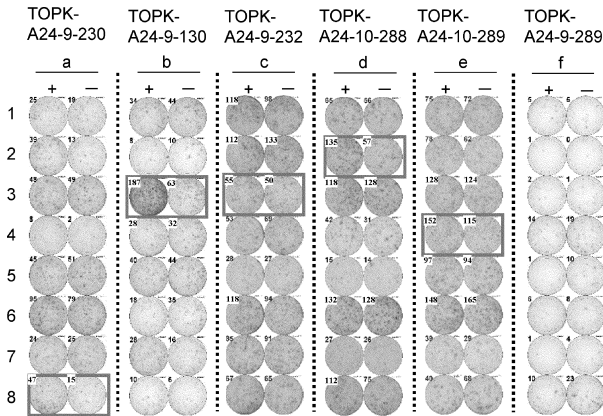
30

40

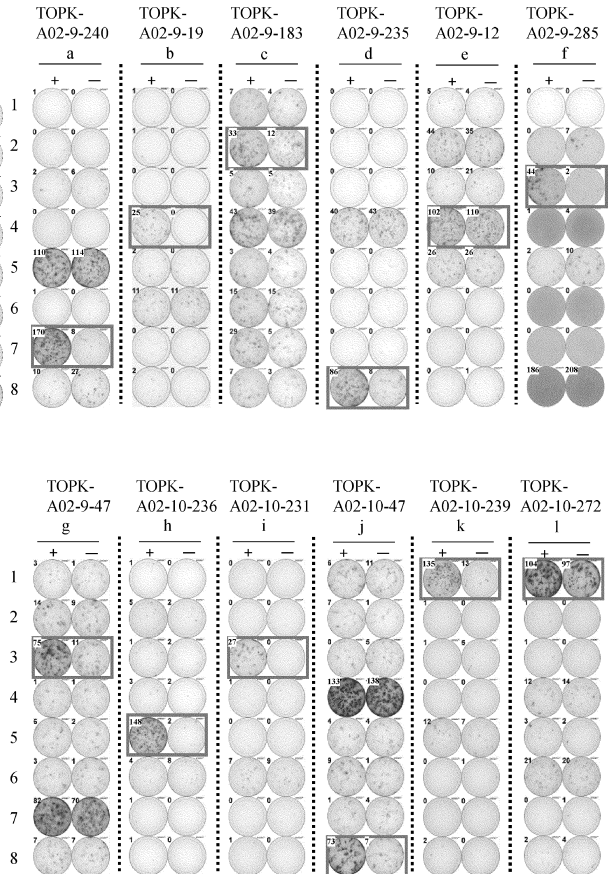
50

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。

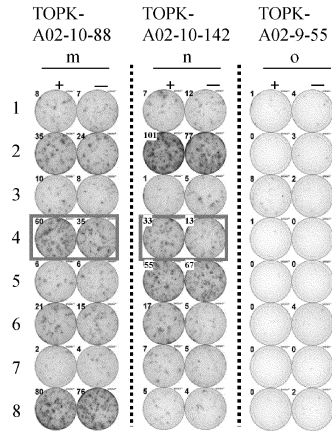
【図1】



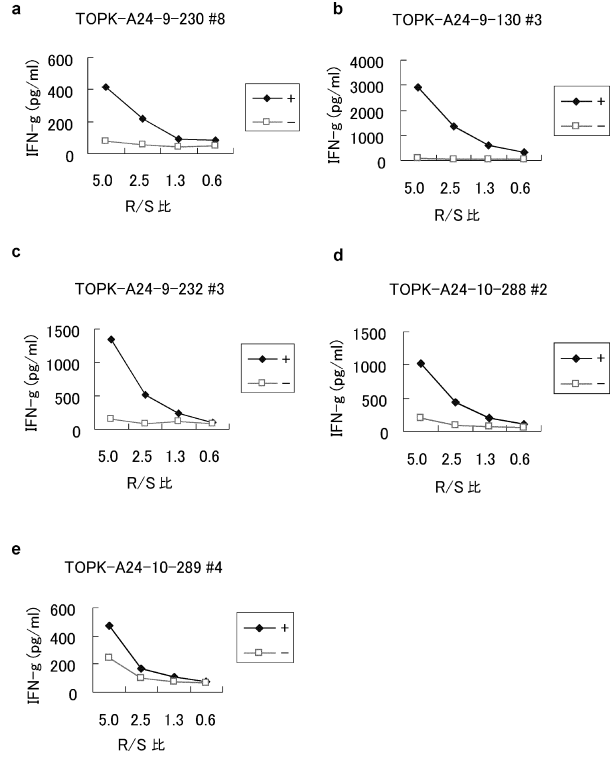
【図2-1】



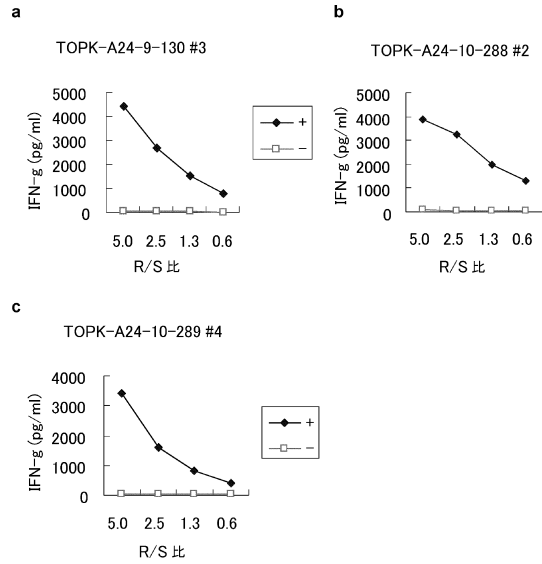
【 図 2 - 2 】



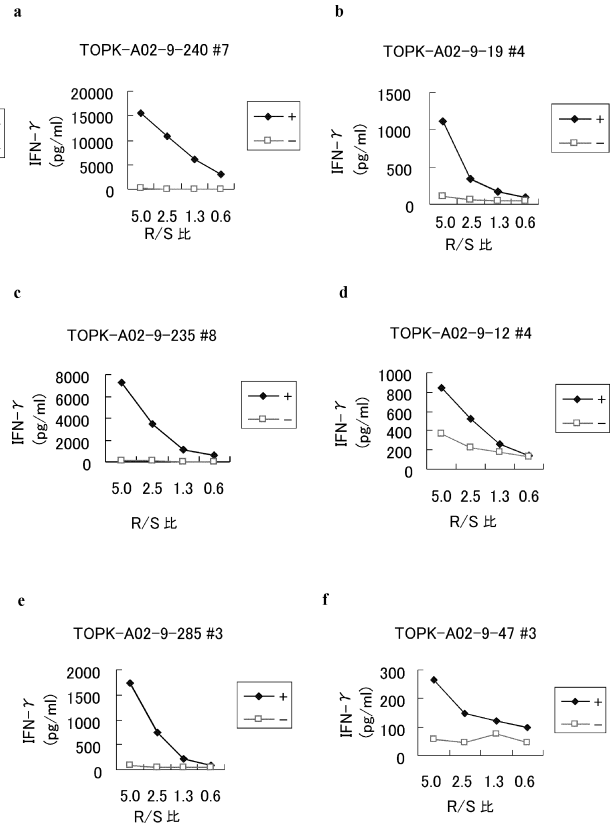
【 図 3 】



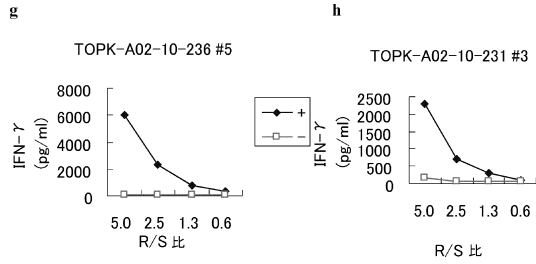
【 図 4 】



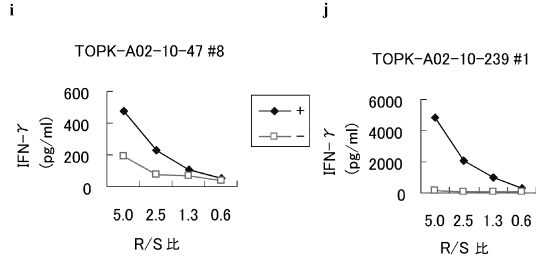
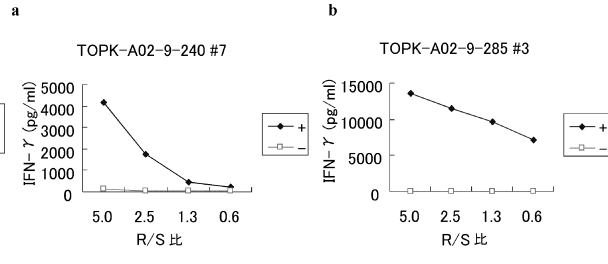
【 図 5 - 1 】



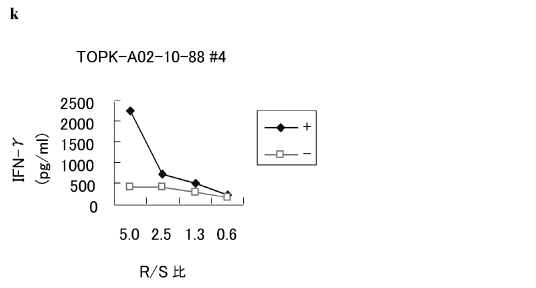
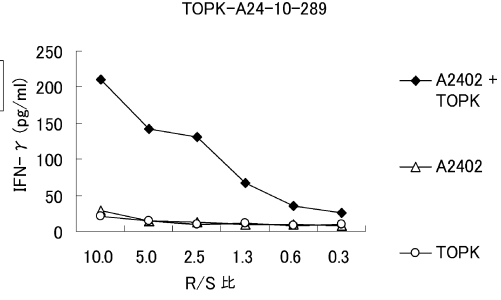
【 図 5 - 2 】



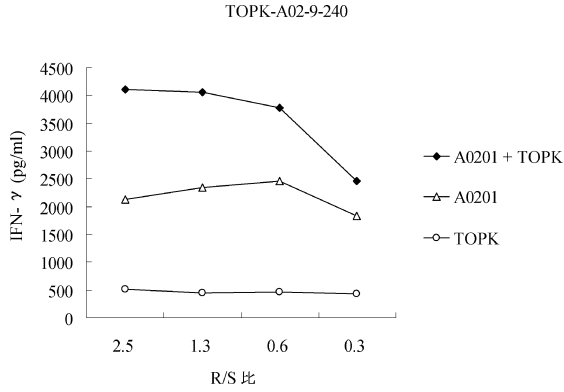
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

0006124149000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 H
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D

(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 中村 祐輔

東京都港区白金台四丁目6番1号 国立大学法人東京大学 医科学研究所内

(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

(72)発明者 中山 岳

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

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 国際公開第2011/113819(WO, A1)

欧州特許出願公開第01972639(EP, A1)

特表2007-506424(JP, A)

特表2004-510442(JP, A)

J Biol Chem, 2000年, Vol.275, No.28, p.21525-21531

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 0 7 K 1/00 - 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	TOPK肽和包含其的疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP6124149B2</a>	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	JP2014520419	申请日	2012-10-25
[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		
当前申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	中村祐輔 角田卓也 大沢龍司 吉村祥子 渡辺朝久 中山岳		
发明人	中村 祐輔 角田 卓也 大沢 龍司 吉村 祥子 渡辺 朝久 中山 岳		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C12N5/0784 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12N5/0783 C07K16/30 C07K16/40 A61K38/00 A61P35/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/0005 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/572 C07K7/06 C07K14/4748 C07K16/18 C07K16/40 C07K2317/34 C12N9/12 C12N9/1205 C12Y207/12002 G01N33/505 G01N33/574 A61P35/00 A61P37/04 A61K39/005 C12N5/0638 C12N15/85 A61K39/001162		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C12N5/0784 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12N5/0783 C07K16/30 C07K16/40 A61K37/02 A61P35/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/00.H G01N33/53.D		
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		
审查员(译)	伊藤凉子		
优先权	61/552817 2011-10-28 US		
其他公开文献	JP2014533095A JP2014533095A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了来源于TOPK的分离的表位肽及其免疫原性片段具有诱导细胞毒性T淋巴细胞 ( CTL ) 的能力，因此适用于癌症免疫治疗，更特别地用作癌症疫苗。本发明的肽包括包含TOPK衍生的氨基酸序列的肽及其修饰形式，其中一个，两个或几个氨基酸被取代，缺失，插入和/或添加，条件是这些修饰形式具有CTL诱导性。还提供了编码任何上述肽的多核苷酸以及包含任何上述肽或多核苷酸的药物组合物。本发明的肽，多核苷酸和药物组合物在治疗和预防多种癌症中的任何一种或两种中具有特别的用途。

(45) 発行日 平成29年5月10日 (2017.5.10)

(24) 登録日 平成29年4月14日 (2017.4.14)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A
<b>C O 7 K</b>	<b>7/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	7/06	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/0784</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N	5/0784	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	5/10	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 14 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-520419 (P2014-520419)	(73) 特許権者	502240113
(86) (22) 出願日	平成24年10月25日 (2012.10.25)		オンコセラピー・サイエンス株式会社
(65) 公表番号	特表2014-533095 (P2014-533095A)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(43) 公表日	平成26年12月11日 (2014.12.11)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/006853		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02013/061594	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開日	平成25年5月2日 (2013.5.2)		弁理士 春名 雅夫
審査請求日	平成27年10月14日 (2015.10.14)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	61/552,817		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成23年10月28日 (2011.10.28)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊
前置審査		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TOPKペプチドおよびそれを含むワクチン