

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-523083

(P2013-523083A)

(43) 公表日 平成25年6月17日 (2013.6.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-544968 (P2012-544968)	(71) 出願人	502240113
(86) (22) 出願日	平成22年10月26日 (2010.10.26)		オンコセラピー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成24年10月1日 (2012.10.1)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/006313	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02011/125139		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成23年10月13日 (2011.10.13)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/322, 099		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成22年4月8日 (2010.4.8)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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】 C L U A P 1 ペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【要約】

本明細書は、がんに対するペプチドワクチンを記載する。特に、C T L を誘発する C L U A P 1 遺伝子に由来するエピトープペプチドを提供する。また、そのようなペプチドを標的とする抗原提示細胞および単離された C T L、ならびに該抗原提示細胞または CTL を誘導するための方法も、提供する。本発明はさらに、C L U A P 1 に由来する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有効成分として含む、薬学的組成物を提供する。さらに本発明は、がん（腫瘍）の治療および／もしくは予防のための方法、ならびに／またはその術後再発の予防のための方法、ならびに、C L U A P 1 由来のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ペプチドを提示する抗原提示細胞、または本発明の薬学的組成物を用いた、CTL を誘導するための方法、抗がん免疫を誘導するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C T L 誘導能を有する単離されたペプチドであって、C L U A P 1 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。

【請求項 2】

S E Q I D N O : 2 ~ 2 3 および 2 5 ~ 4 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載の単離されたペプチド。

【請求項 3】

1 個、2 個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されている、請求項 1 および 2 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

10

【請求項 4】

H L A - A 2 4 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、請求項 3 記載の単離されたペプチド：

(a) N 末端から 2 番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸となるよう改変されている；ならびに

(b) C 末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、またはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、または該アミノ酸となるよう改変されている。

【請求項 5】

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、請求項 3 記載の単離されたペプチド：

(a) 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；ならびに

(b) C 末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。

20

【請求項 6】

ノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

【請求項 7】

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

30

【請求項 8】

C T L を誘導するための組成物であって、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の 1 種もしくは複数種のペプチド、または請求項 7 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 9】

がんの治療および / もしくは予防、ならびに / または術後のその再発の予防のための薬学的組成物であって、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の 1 種もしくは複数種のペプチド、または請求項 7 記載の 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、薬学的組成物。

【請求項 10】

H L A 抗原が H L A - A 2 4 または H L A - A 2 である対象への投与のために製剤化される、請求項 9 記載の薬学的組成物。

40

【請求項 11】

がんの治療のために製剤化される、請求項 9 または 10 記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

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) を誘導するための方法：

(a) A P C を、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エキスピボ、またはインピボで接触させる段階；および

(b) 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P

50

C に導入する段階。

【請求項 13】

以下からなる群より選択される段階を含む方法によって、CTL を誘導するための方法：

(a) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1～6 のいずれか一項記載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；

(b) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1～6 のいずれか一項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) 請求項 1～6 のいずれか一項記載のペプチドと結合する T 細胞受容体 (TCR) サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、T 細胞に導入する段階。

10

【請求項 14】

HLA 抗原と請求項 1～6 のいずれか一項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 APC。

【請求項 15】

請求項 12 記載の方法によって導入される、請求項 14 記載の APC。

【請求項 16】

請求項 1～6 のいずれか一項記載のペプチドを標的とする、単離された CTL。

【請求項 17】

請求項 13 記載の方法によって誘導される、請求項 16 記載の CTL。

20

【請求項 18】

対象においてがんに対する免疫応答を誘導する方法であって、請求項 1～6 のいずれか一項記載のペプチド、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。

【請求項 19】

請求項 1～6 のいずれか一項記載のペプチドのいずれかに対する、抗体またはその断片。

【請求項 20】

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

30

【請求項 21】

請求項 20 記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 1～6 のいずれか一項記載のペプチド、請求項 7 記載のヌクレオチド、または請求項 19 記載の抗体を含む、診断キット。

【請求項 23】

SEQ ID NO: 3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および 38 からなる群より選択される、請求項 1～6 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

【発明の詳細な説明】

40

【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非常に有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍を治療および予防するための薬物に関する。

【0002】

優先権

本出願は、2010年4月8日に出願された米国仮出願第 61/322,099 号の恩典を主張し、その全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

50

【 0 0 0 3 】

C D 8 陽性 C T L は、主要組織適合複合体 (M H C) クラス I 分子上の腫瘍関連抗原 (T A A) 由来のエピトープペプチドを認識し、その後、腫瘍細胞を殺傷することが実証されている。T A A の最初の例としてメラノーマ抗原 (M A G E) ファミリーが発見されて以来、他の多くの T A A が、免疫学的アプローチによって発見されており (Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2): 177-80 (非特許文献 1) ; Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3): 725-9 (非特許文献 2))、これらの T A A のうちのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発の過程にある。

【 0 0 0 4 】

強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し得る新規 T A A の同定により、様々な種類のがんに対するペプチドワクチン接種戦略のさらなる開発および臨床研究の前進が保証される (Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20): 1442-55 (非特許文献 3) ; Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13): 3134-42 (非特許文献 4) ; Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9 (非特許文献 5) ; van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9): 3308-14 (非特許文献 6) ; Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20): 4465-8 (非特許文献 7) ; Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2): 169-72 (非特許文献 8) ; Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 459-66 (非特許文献 9) ; Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3): 387-94 (非特許文献 10))。現在までに、これらの T A A 由来ペプチドを用いた臨床試験がいくつか報告されている。残念ながら、現在のがんワクチン治療の多くは低い客観的奏効率しか示していない (Belli F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80 (非特許文献 11) ; Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42 (非特許文献 12) ; Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15 (非特許文献 13))。したがって、免疫療法の標的としての新規 T A A が依然として必要である。

【 0 0 0 5 】

この目的のために、23,040個の遺伝子を含むゲノム全域にわたる c D N A マイクロアレイを用いた結腸直腸癌の発現プロファイル解析により、C L U A P 1 (G e n B a n k アクセス番号 NM_015041 または NM_024793)、クラステリン関連タンパク質 1 (c l u s t e r i n - a s s o c i a t e d p r o t e i n 1) が、結腸癌において頻繁にトランス活性化される遺伝子として同定された (Takahashi M et al., Oncogene. 2004 Dec 9;23(57): 9289-94 (非特許文献 14))。ノーザンブロット解析により、C L U A P 1 の発現は、細胞周期の S 期後期 ~ G 2 / M 期に徐々に増加し、G 0 / G 1 期には基底レベルまで戻ることが観察されている。さらに、s i R N A による C L U A P 1 の抑制が、トランスフェクトした腫瘍細胞において増殖遅延をもたらすことが示されている。C L U A P 1 の過剰発現も、骨肉腫、卵巣癌、および肺癌で観察されている (Ishikura H et al., Int J Oncol. 2007 Feb; 30(2):461-7 (非特許文献 15))。総合すると、これらの事実から、C L U A P 1 は複数のがんにおいてがん免疫療法のための有用な標的であり得ることが示唆される。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 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 】 Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21): 5554-9

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

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

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

10

20

30

40

50

- 【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】Bellì F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20): 4169-80
【非特許文献 12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188: 33-42
【非特許文献 13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9): 909-15
【非特許文献 14】Takahashi M et al., Oncogene. 2004 Dec 9;23(57): 9289-94
【非特許文献 15】Ishikura H et al., Int J Oncol. 2007 Feb; 30(2):461-7

【発明の概要】

【0007】

本発明は、免疫療法の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り「自己」として認知され、そのため多くの場合は先天的免疫原性を有しないため、適切な標的の発見は極めて重要である。上述のとおり、CLUAP1 (GenBankアクセッション番号NM_015041またはNM_024793の遺伝子 (例えばSEQ ID NO: 44) によりコードされる、SEQ ID NO: 45) が、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌を含むがこれらに限定されないがんにおいて上方制御されると同定されている。したがって本発明は、がん/腫瘍免疫療法の標的候補としてCLUAP1に着目する。

【0008】

本発明はさらに、CLUAP1に特異的なCTLを誘導する能力を有する、CLUAP1の遺伝子産物の特異的エピトープペプチドの同定に関する。以下に詳述するように、健康ドナーから得た末梢血単核細胞(PBMC)を、CLUAP1由来のHLA-A*2402またはHLA-A*0201結合候補ペプチドを用いて刺激した。その後、各候補ペプチドをパルスしたHLA-A24またはHLA-A2陽性標的細胞に対する特異的細胞傷害性を有するCTL株を樹立した。これらの結果は、これらのペプチドが、CLUAP1を発現する細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24拘束性またはHLA-A2拘束性エピトープペプチドであることを実証している。さらにこれらの結果は、CLUAP1が強い免疫原性を有し、かつそのエピトープががん/腫瘍免疫療法の有効な標的であることを示している。

【0009】

したがって、HLA抗原と結合する単離されたペプチド、特にCLUAP1 (SEQ ID NO: 45) またはその免疫学的活性断片を含むものを提供することが、本発明の1つの目的である。これらのペプチドはCTL誘導能を有すると予想され、したがってこれを用いて、エキスピボでCTLを誘導することもでき、または、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌などのがんに対する免疫応答の誘導のために対象に投与されることもできる。好ましいペプチドはノナペプチドまたはデカペプチドであり、より好ましくは、SEQ ID NO: 2~23および25~43の中より選択されるアミノ酸配列を有するものである。中でも、SEQ ID NO: 3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが特に強力なCTL誘導能を示し、そのため、特に好ましい。

【0010】

本発明のペプチドは、結果として得られる改変ペプチドが元のCTL誘導能を保持している限り、1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、または付加されたものを包含する。

本発明はまた、本発明の任意のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドも提供する。これらのポリヌクレオチドを、CTL誘導能を有するAPCを誘導もしくは調製するために用いることができ、または、本発明のペプチドと同様に、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。

【0011】

10

20

30

40

50

対象に投与された場合、本発明のペプチドは好ましくは、各ペプチドを標的とするCTLを誘導するように、APCの表面上に提示される。したがって、本発明の1つの目的は、CTLを誘導する組成物または物質を提供することであり、そのような組成物は、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ポリヌクレオチドを含む。本発明はさらに、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ポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を企図し、そのような組成物は、がんの治療および/または予防、ならびにその術後再発の予防のために製剤化され、そのようながんは、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌を含むがこれらに限定されるわけではない。本発明の薬学的組成物または物質は、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またはそれに加えて、本発明のペプチドのいずれかを提示するAPCまたはエキソソームを含み得る。

10

20

30

40

50

【0012】

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは、例えば、対象由来のAPCを該ペプチドと接触させるか、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入することにより、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体をその表面上に提示するAPCを誘導することができる。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、そのためがん免疫療法に有用である。したがって本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための方法、ならびにそのような方法によって得られるAPCの両方を意図している。

【0013】

本発明はまた、CTLを誘導するための方法、すなわちCD8陽性細胞を、1つまたは複数の本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームと共培養する段階、または本発明のペプチドと結合するT細胞受容体(TCR)サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を導入する段階を含む方法も提供する。そのような方法によって得られるCTLは、例として乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌を含むがこれらに限定されないがんの治療および予防において有用であり得る。したがって本発明は、本方法によって得られるCTLを包含する。

【0014】

さらに、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、CLUP1ポリペプチドまたはその免疫学的活性断片を含む組成物または物質、CLUP1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびCLUP1ポリペプチドを提示するエキソソームまたはAPCを該対象に投与する段階を含むそのような方法を提供することは、本発明の別の目的である。

本発明の適用性は、CLUP1過剰発現に関連するかまたはCLUP1過剰発現から生じる、がんなどのいくつかの疾患のいずれにも及び、がんの例としては、これらに限定されるわけではないが乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌が含まれる。

【0015】

より具体的には、本発明は以下を提供する：

[1] CTL誘導能を有する単離されたペプチドであって、CLUP1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 ~ 23および25 ~ 43からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、[1]の単離されたペプチド、

[3] 1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、または付加されている、[1]および[2]のいずれか1つの単離されたペプチド、

[4] 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、[3]の単離されたペプチド：

(a) N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、また

はトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸となるよう改変されている；ならびに

(b) C末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、またはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、または該アミノ酸となるよう改変されている、

[5] 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、[3]の単離されたペプチド：

(a) 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；ならびに

(b) C末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される、

[6] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1]～[5]のいずれか1つの単離されたペプチド、

[7] [1]～[6]のいずれか1つのペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、

[8] CTLを誘導するための組成物であって、[1]～[6]のいずれか1つの1種もしくは複数種のペプチド、または[7]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、

[9] がんの治療および/もしくは予防、ならびに/または術後のその再発の予防のための薬学的組成物であって、[1]～[6]のいずれか1つの1種もしくは複数種のペプチド、または[7]の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、薬学的組成物、

[10] 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、[9]の薬学的組成物、

[11] がんの治療のために製剤化される、[9]または[10]の薬学的組成物、

[12] 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]～[6]のいずれか1つのペプチドとインビトロ、エクスビボ、またはインビボで接触させる段階；および

(b) [1]～[6]のいずれか1つのペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階、

[13] 以下からなる群より選択される段階を含む方法によって、CTLを誘導するための方法：

(a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[6]のいずれか1つ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；

(b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[6]のいずれか1つ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) [1]～[6]のいずれか1つのペプチドと結合するT細胞受容体(TCR)サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を、T細胞に導入する段階、

[14] HLA抗原と[1]～[6]のいずれか1つ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APC、

[15] [12]の方法によって導入される、[14]のAPC、

[16] [1]～[6]のいずれか1つのペプチドを標的とする、単離されたCTL、

[17] [13]の方法によって誘導される、[16]のCTL、

[18] 対象においてがんに対する免疫応答を誘導する方法であって、[1]～[6]のいずれか1つのペプチド、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、

[19] [1]～[6]のいずれか1つのペプチドのいずれかに対する、抗体またはその断片、

[20] [1]～[6]のいずれか1つ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、

10

20

30

40

50

[2 1] [2 0] の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞、
[2 2] [1] ~ [6] のいずれか 1 つのペプチド、[7] のヌクレオチド、または [1
9] の抗体を含む、診断キット、ならびに
[2 3] S E Q I D N O : 3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、2
3、30、33、34、35、36、および 38 からなる群より選択される、[1] ~ [6]
のいずれか 1 つの単離されたペプチド。

【 0 0 1 6 】

前述した本発明の概要および後述する詳細な説明は例示的な態様であり、本発明や本発明のその他の代替的な態様を制限するものではないことを理解されたい。

【 0 0 1 7 】

上記に加え、本発明のその他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことによって、より十分に明らかになるであろう。しかし、前述の発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、本発明をいくつかの特定の態様を参照して本明細書において説明するが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが理解されよう。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明のその他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかになり、当業者には容易に明白になるであろう。そのような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図面、およびそれらから引き出されるあらゆる妥当な推論と併せて上記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

本発明の様々な局面および適用は、図面の簡単な説明ならびに本発明の詳細な説明およびその好ましい態様を考慮することで、当業者に明白となるであろう。

【 図 1 a - f 】 図 1 a ~ f は、C L U A P 1 由来のペプチドを用いて誘導した C T L における I F N - γ E L I S P O T アッセイの結果を示している、一連の写真 (a) ~ (f) からなる。以下のウェルにおける C T L は、対照と比較して強力な I F N - γ 産生を示した : C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 5 5 (S E Q I D N O : 3) で刺激したウェル # 6 (a)、C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 8 3 (S E Q I D N O : 4) で刺激した # 2 (b)、C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 3 1 (S E Q I D N O : 5) で刺激した # 2 (c)、C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 1 6 8 (S E Q I D N O : 8) で刺激した # 4 (d)、C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 6 4 (S E Q I D N O : 9) で刺激した # 4 (e)、および C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 1 6 (S E Q I D N O : 1 0) で刺激した # 1 (f)。長方形の枠で示したウェルにおける細胞を、C T L 株を樹立するために増殖させた。対照的に、典型的な陰性データの例として、C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 5 8 (S E Q I D N O : 1) で刺激した C T L からの特異的 I F N - γ 産生は示されなかった (k)。図中、「 + 」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する I F N - γ 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 I F N - γ 産生を示す。

【 図 1 g - k 】 図 1 g ~ k は、C L U A P 1 由来のペプチドを用いて誘導した C T L における I F N - γ E L I S P O T アッセイの結果を示している、一連の写真 (g) ~ (j) からなる。以下のウェルにおける C T L は、対照と比較して強力な I F N - γ 産生を示した : C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 4 (S E Q I D N O : 1 4) で刺激したウェル # 6 (g)、C L U A P 1 - A 2 4 - 1 0 - 9 1 (S E Q I D N O : 1 5) で刺激した # 2 (h)、C L U A P 1 - A 2 4 - 1 0 - 1 0 4 (S E Q I D N O : 1 6) で刺激した # 4 (i)、および C L U A P 1 - A 2 4 - 1 0 - 1 2 5 (S E Q I D N O : 1 8) で刺激した # 5 (j)。長方形の枠で示したウェルにおける細胞を、C T L 株を

樹立するために増殖させた。対照的に、典型的な陰性データの例として、CLUAP1 - A24 - 9 - 258 (SEQ ID NO: 1) で刺激したCTLからの特異的IFN- γ 産生は示されなかった(k)。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- γ 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- γ 産生を示す。

【図2】図2は、CLUAP1 - A24 - 9 - 255 (SEQ ID NO: 3) (a)、CLUAP1 - A24 - 9 - 168 (SEQ ID NO: 8) (b)、CLUAP1 - A24 - 9 - 64 (SEQ ID NO: 9) (c)、CLUAP1 - A24 - 9 - 154 (SEQ ID NO: 14) (d)、およびCLUAP1 - A24 - 10 - 91 (SEQ ID NO: 15) (e) で刺激したCTL株のIFN- γ 産生を実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示している、一連の折れ線グラフ(a) ~ (e)からなる。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株が、対照と比較して強力なIFN- γ 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- γ 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- γ 産生を示す。

【図3】図3は、CLUAP1 - A24 - 9 - 255 (SEQ ID NO: 3) (a)、CLUAP1 - A24 - 9 - 64 (SEQ ID NO: 9) (b)、およびCLUAP1 - A24 - 10 - 91 (SEQ ID NO: 15) (c) で刺激したCTL株からの限界希釈によって樹立したCTLクローンのIFN- γ 産生を実証するIFN- γ ELISAアッセイの結果を示している、一連の折れ線グラフ(a) ~ (c)からなる。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- γ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、各ペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- γ 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- γ 産生を示す。

【図4】図4は、CLUAP1およびHLA - A*2402を外因的に発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示している折れ線グラフである。HLA - A*2402または全長CLUAP1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。CLUAP1 - A24 - 9 - 255 (SEQ ID NO: 3) を用いて樹立されたCTL株は、CLUAP1およびHLA - A*2402の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した(黒菱形)。一方、HLA - A*2402(三角)またはCLUAP1(丸)のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった。

【図5 a - f】図5 a ~ fは、CLUAP1由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるIFN- γ ELISPOTアッセイの結果を示している、一連の写真(a) ~ (f)からなる。以下のウェルにおけるCTLは、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した：CLUAP1 - A02 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23) を用いたウェル番号#3(a)、CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30) を用いた#6(b)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33) を用いた#2(c)、CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34) を用いた#3(d)、CLUAP1 - A02 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35) を用いた#2(e)、およびCLUAP1 - A02 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36) を用いた#2(f)。長方形の枠で示したウェルにおける細胞を、CTL株を樹立するために増殖させた。対照的に、典型的な陰性データの例として、CLUAP1 - A02 - 9 - 58 (SEQ ID NO: 24) で刺激したCTLからの特異的IFN- γ 産生は示されなかった(h)。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- γ 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- γ 産生を示す。

【図5 g - h】図5 g ~ hは、CLUAP1由来のペプチドを用いて誘導したCTLにおけるIFN- γ ELISPOTアッセイの結果を示している、一連の写真(g)からなる。以下のウェルにおけるCTLは、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した：C

10

20

30

40

50

LUAP1 - A02 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 38) を用いたウェル番号 # 5 (g)。長方形の枠で示したウェルにおける細胞を、CTL 株を樹立するために増殖させた。対照的に、典型的な陰性データの例として、CLUAP1 - A02 - 9 - 58 (SEQ ID NO: 24) で刺激した CTL からの特異的 IFN- γ 産生は示されなかった (h)。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- γ 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- γ 産生を示す。

【図 6】図 6 は、CLUAP1 - A02 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23) (a)、CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30) (b)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33) (c)、CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34) (d)、CLUAP1 - A02 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35) (e)、および CLUAP1 - A02 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36) (f) で刺激した CTL 株の IFN- γ 産生を実証する IFN- γ ELISA アッセイの結果を示している、一連の折れ線グラフ (a) ~ (f) からなる。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 株が、対照と比較して強力な IFN- γ 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- γ 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- γ 産生を示す。

【図 7】図 7 は、CLUAP1 - A02 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23) (a)、CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30) (b)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33) (c)、および CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34) (d) で刺激した CTL 株からの限界希釈によって樹立した CTL クローンの IFN- γ 産生を示している、一連の折れ線グラフ (a) ~ (d) からなる。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- γ 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- γ 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- γ 産生を示す。

【図 8】図 8 は、CLUAP1 および HLA - A*0201 を外因的に発現する標的細胞に対する特異的 CTL 活性を示している、一連の折れ線グラフ (a) ~ (d) からなる。HLA - A*0201 または全長 CLUAP1 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。CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30) (a)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33) (b)、CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34) (c)、および CLUAP1 - A02 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36) (d) を用いて樹立された CTL 株は、CLUAP1 および HLA - A*0201 の両方をトランスフェクトした COS7 細胞に対して特異的 CTL 活性を示した (四角)。一方、HLA - A*0201 (三角) または CLUAP1 (丸) のいずれかを発現する標的細胞に対して、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】

【0019】

態様の説明

本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等のいかなる方法および材料も用いることができるが、好ましい方法、装置、および材料をここに記載する。しかし、本発明の材料および方法について記載する前に、本明細書に記載の特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコール等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図しないことも、また理解されるべきである。

本明細書において言及される全ての出版物、特許、または特許出願は、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、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。

【0020】

I. 定義

別段の定めのない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている用語と同じ意味を有する。しかしながら、矛盾する場合には、定義を含め本明細書が優先される。

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。

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。本用語は、1個または複数個のアミノ酸残基が修飾されていてもよい残基であるか、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。

【0021】

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-アミノ酸のいずれであってもよい。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、および細胞内で翻訳後に修飾されたアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基に結合した α 炭素）を有するが、1つまたは複数の修飾された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。

【0022】

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文字表記により参照されてもよい。

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、特に別段の指定のない限り、アミノ酸と同様に、一般に受け入れられている1文字コードにより参照される。

【0023】

本明細書で用いる「組成物」という用語は、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組み合わせから直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。「薬学的組成物」に関するそのような用語は、有効成分と担体を構成する任意の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み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、1つもしくは複数の成分の解離から、または1つもしくは複数の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。したがって、本発明との関連において、「薬学的組成物」という用語は、本発明の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り作製される任意の組成物を指す。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、ポリファーマコフォアにスクヤフォールドされた対象をある器官または身体の一部から別の器官または身体の一部へ運搬または輸送することに関与する、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。

【0024】

別段の定めのない限り、「がん」という用語は、C L U A P 1 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、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

別段の定めのない限り、「細胞傷害性Ｔリンパ球」、「細胞傷害性Ｔ細胞」、および「ＣＴＬ」という用語は本明細書において互換的に用いられ、特に別段の指定のない限り、非自己細胞（例えば、腫瘍／がん細胞、ウイルス感染細胞）を認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるＴリンパ球のサブグループを指す。

別段の定めのない限り、「H L A - A 2 4」という用語は、H L A - A * 2 4 0 2 などのサブタイプを含むH L A - A 2 4 型を指す。

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「H L A - A 2」という用語は、典型的には、H L A - A * 0 2 0 1 およびH L A - A * 0 2 0 6 などのサブタイプを指す。

【 0 0 2 5 】

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み合わせに関して用いられる。本明細書では、キットはマイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが企図される。「キット」という用語は、試薬および／または物質の特定の組み合わせに限定されないことが意図される。

本発明の方法および組成物ががんの「治療」との関連において有用である限り、治療が、C L U A P 1 遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、広がり、もしくは転移能の減少などの臨床的利点をもたらす場合に、治療は「有効である」と見なされる。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、がんの形成が遅延されるもしくは妨げられるか、またはがんの臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、特定の腫瘍の種類を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。

【 0 0 2 6 】

本発明の方法および組成物ががんの「予防（p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s）」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（p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s）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（p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s）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（p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s）は、疾患の進行および症状の出現を予防することに加え、機能を回復させ、かつ疾患関連の合併症を減少させることによって、既存の疾患の悪影響を低下させることを目的とした働きを包含する。あるいは、予防（p r e v e n t i o n および p r o p h y l a x i s）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。

【 0 0 2 7 】

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、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。

【 0 0 2 8 】

本発明との関連において、「抗体」という用語は、指定のタンパク質またはそのペプチドと特異的に反応する免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体には、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射標識と融合させた抗体、および抗体断片が含まれ得る。さらに、本明細書において抗体は広義で

10

20

30

40

50

使用され、具体的には完全なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも２つの完全な抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を包含し、また所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えば、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、およびIg M）を示す。

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

【 0 0 2 9 】

II . ペプチド

CLUAP 1 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、CLUAP 1 (SEQ ID NO : 45) 由来のペプチドを解析して、
10
それらが、通常見られるHLAアリルであるHLA - A 2 4またはHLA - A 2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)。

【 0 0 3 0 】

CLUAP 1 由来のHLA - A 2 4 結合ペプチドの候補を、HLA - A 2 4 に対するこれらの結合親和性に基づいて同定した。以下のペプチドを候補とみなす：

CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 2 4 4 (SEQ ID NO : 2)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 2 5 5 (SEQ ID NO : 3)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 2 8 3 (SEQ ID NO : 4)、
20
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 3 1 (SEQ ID NO : 5)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 8 (SEQ ID NO : 6)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 2 6 (SEQ ID NO : 7)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 6 8 (SEQ ID NO : 8)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 6 4 (SEQ ID NO : 9)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 2 1 6 (SEQ ID NO : 10)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 3 3 5 (SEQ ID NO : 11)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 8 6 (SEQ ID NO : 12)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 7 1 (SEQ ID NO : 13)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 4 (SEQ ID NO : 14)、
30
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 9 1 (SEQ ID NO : 15)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 10 4 (SEQ ID NO : 16)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 3 1 (SEQ ID NO : 17)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 12 5 (SEQ ID NO : 18)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 17 (SEQ ID NO : 19)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 2 8 9 (SEQ ID NO : 20)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 2 5 8 (SEQ ID NO : 21)、および
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 6 3 (SEQ ID NO : 22)。

【 0 0 3 1 】

さらに、これらのペプチドをパルスした（負荷した）樹状細胞（DC）によるT細胞の
40
インビトロでの刺激後、以下の各ペプチドを用いてCTLの樹立に成功した：

CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 1 - 2 5 5 (SEQ ID NO : 3)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 2 - 2 8 3 (SEQ ID NO : 4)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 3 - 3 1 (SEQ ID NO : 5)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 6 - 1 6 8 (SEQ ID NO : 8)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 7 - 6 4 (SEQ ID NO : 9)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 8 - 2 1 6 (SEQ ID NO : 10)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 9 - 1 6 3 - 1 5 4 (SEQ ID NO : 14)、
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 1 6 6 - 9 1 (SEQ ID NO : 15)、
50
CLUAP 1 - A 2 4 - 10 - 1 6 7 - 10 4 (SEQ ID NO : 16)、および

CLUAP1 - A24 - 10 - 169 - 125 (SEQ ID NO: 18)。

【0032】

CLUAP1由来のHLA-A2結合ペプチドの候補を、HLA-A2に対するそれらの結合親和性に基づいて同定した。以下のペプチドを候補ペプチドとみなす：

CLUAP1 - A2 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 95 (SEQ ID NO: 25)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 85 (SEQ ID NO: 26)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 290 (SEQ ID NO: 27)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 265 (SEQ ID NO: 28)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 297 (SEQ ID NO: 29)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 188 (SEQ ID NO: 31)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 96 (SEQ ID NO: 32)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 72 (SEQ ID NO: 37)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 38)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 41 (SEQ ID NO: 39)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 233 (SEQ ID NO: 40)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 183 (SEQ ID NO: 41)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 343 (SEQ ID NO: 42)、および
 CLUAP1 - A2 - 10 - 222 (SEQ ID NO: 43)。

10

20

【0033】

さらに、これらのペプチドをパルスした（負荷した）樹状細胞（DC）によるT細胞のインビトロでの刺激後、以下の各ペプチドを用いてCTLの樹立に成功した：

CLUAP1 - A2 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23)、
 CLUAP1 - A2 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35)、
 CLUAP1 - A2 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36)、および
 CLUAP1 - A2 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 38)。

30

【0034】

樹立されたこれらのCTLは、各ペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な特異的CTL活性を示す。本明細書におけるこれらの結果は、CLUAP1がCTLによって認識される抗原であること、および試験されたペプチドがHLA-A24またはHLA-A2拘束性CLUAP1のエピトープペプチドであることを実証している。

【0035】

CLUAP1遺伝子は、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌を含むがこれらに限定されないがんの細胞および組織では過剰発現されるが、ほとんどの正常器官では発現されないため、これはがん免疫療法の優れた標的となる。したがって、本発明は、CTLによって認識されるCLUAP1由来のエピトープに相当するノナペプチド（9個のアミノ酸残基から構成されるペプチド）およびデカペプチド（10個のアミノ酸残基から構成されるペプチド）を提供する。あるいは本発明は、HLA抗原に結合して細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を誘導する単離されたペプチドであって、SEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を有するかまたはその免疫学的活性断片である、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: 3、4、5、8、9、10、14、15、16

40

50

、 18、23、30、33、34、35、36、および38の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

【0036】

一般に、Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75およびNielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17に記載されているソフトウェアプログラムなど、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を用いて、様々なペプチドとHLA抗原との間の結合親和性をインシリコで算出することができる。HLA抗原との結合親和性は、例えば、Parker KC et al., J Immunol 1994 Jan 1, 152(1): 163-75、Kuzushima K et al., Blood 2001, 98(6): 1872-81、Larsen MV et al. BMC Bioinformatics. 2007 Oct 31; 8: 424、Buus S et al. Tissue Antigens., 62:378-84, 2003、Nielsen M et al., Protein Sci 2003; 12: 1007-17、およびNielsen M et al. PLoS ONE 2007; 2: e796に記載されてい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において要約されている。結合親和性を測定するための方法は、例えば、Journal of Immunological Methods, 1995, 185: 181-190; およびProtein Science, 2000, 9: 1838-1846に記載されている。したがって、そのようなソフトウェアプログラムを用いて、HLA抗原との高い結合親和性を有するCLUP1由来の断片を選択することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムによる、HLA抗原と結合するCLUP1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は、CLUP1の全長ペプチドを含み得る。

【0037】

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誘導能を保持している限り、付加的なアミノ酸残基に隣接させることができる。該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、CLUP1由来のペプチドを含む、HLA抗原に対する結合親和性を有する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。

【0038】

一般に、あるペプチド中の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、場合によっては元のタンパク質の所望の機能を増強することさえある。実際に、改変ペプチド(すなわち、元の参照配列と比較して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が改変された(すなわち、置換、付加、欠失、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)は、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; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13)。したがって、一態様において、本発明のペプチドは、CTL誘導能を有し得、かつ1個、2個、またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、欠失、および/または置換されている、SEQ ID NO: 3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38の中より選択されるアミノ酸配列を有する。

【0039】

当業者は、単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を変更する、アミノ酸配列に対する個々の付加、欠失、または置換が、元のアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識するであろう。したがって、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、タンパク質の変化により、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。保存的であることが望ましいアミノ酸側鎖の特性の例には、例えば、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、ならびに以下の官能基

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含有側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；ならびに芳香族基含有側鎖（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

【0040】

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、本発明のペプチドはこれらに限定されず、結果として生じた改変ペプチドが元のペプチドの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、CLUAP1の多型変異体、種間相同体、およびアシルのCTL誘導可能なペプチドを排除しない。

20

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を改変（挿入、付加、欠失、および/または置換）することができる。本明細書において、「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個または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、より好ましくは15%もしくはそれ未満、さらにより好ましくは10%もしくはそれ未満、または1~5%である。

【0041】

がん免疫療法との関連で用いられる場合、本発明のペプチドは、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も包含するペプチドを選択することが好ましい。この目的のために、アミノ酸残基の置換、挿入、および/または付加によってペプチドを改変し、結合親和性が向上し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抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であることから（J Immunol 1994, 152: 3913; Immunogenetics 1995, 41: 178; J Immunol 1994, 155: 4307）、そのような規則性に基づいた改変を本発明の免疫原性ペプチドに導入することができる。

30

【0042】

例えば、HLA-A24との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可能性がある。したがって、SEQ ID NO: 1~22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おり、かつ/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、本発明に包含される。

40

【0043】

あるいは、HLA-A2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

50

しくはロイシンで置換することが望ましい可能性がある。したがって、SEQ ID NO: 23および25～43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おり、かつ/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、本発明に包含される。

【0044】

末端のアミノ酸においてだけでなく、ペプチドの潜在的なT細胞受容体(TCR)認識部位においても、置換を導入することができる。いくつかの研究は、例えばCAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)、またはgp100(209-217)など、アミノ酸置換を有するペプチドが元の機能と同等であるかまたはより優れた機能を有し得ることを実証している(Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997、T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1;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)。

10

本発明はまた、1個、2個、または数個のアミノ酸の付加もまた本発明のペプチドのN末端および/またはC末端に付加され得ることも企図する。高いHLA抗原結合親和性を有し、かつCTL誘導能を保持するような改変ペプチドもまた、本発明に含まれる。

【0045】

しかし、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫障害または特定の物質に対するアレルギー症状などの副作用が誘発される可能性がある。したがって、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列と一致する状況を回避するために、利用可能なデータベースを用いて相同性検索を行うことが好ましい。相同性検索から、対象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でさえも存在しないことが明らかになった場合には、そのような副作用の危険を全く伴うことなしに、HLA抗原とのその結合親和性を増大させるため、および/またはそのCTL誘導能を増大させるために、該対象ペプチドを改変してもよい。

20

【0046】

上記のようにHLA抗原に対する高い結合親和性を有するペプチドは、非常に効果的であると予測されるが、高い結合親和性の存在を指標として選択された候補ペプチドを、CTL誘導能の有無についてさらに調べる。本明細書において「CTL誘導能」という語句は、抗原提示細胞(APC)上に提示された場合に、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導するペプチドの能力を示す。さらに、「CTL誘導能」は、CTL活性化を誘導する、CTL増殖を誘導する、CTLによる標的細胞の溶解を促進する、およびCTLのIFN- γ 産生を増加させる、ペプチドの能力を含む。

30

【0047】

CTL誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を保有するAPC(例えば、Bリンパ球、マクロファージ、および樹状細胞(DC))、またはより具体的にはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、ペプチドで刺激した後、CD8陽性細胞と混合し、その後、標的細胞に対してCTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定することにより達成される。反応系として、ヒトHLA抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物(例えば、BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auye C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug, 61(8): 764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependent on MHC (HLA) class II restricted T(H) responseに記載されているもの)を用いることができる。例えば、標的細胞を⁵¹Cr等で放射標識してもよく、標的細胞から放出された放射能から細胞傷害活性を算出してもよい。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- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻止帯を可視化することによ

40

50

って、CTL誘導能を評価することができる。

【0048】

上記のようにペプチドのCTL誘導能を調べた結果、SEQ ID NO: 3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38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に対する高い結合親和性に加えて、特に高いCTL誘導能を示すことが判明した。したがって、これらのペプチドは本発明の好ましい例示的態様である。

さらに、相同性解析の結果から、これらの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示された。よって、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CLUP1に対する免疫を誘発するのに有用である。したがって、本発明のペプチドは、好ましくは、SEQ ID NO: 3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38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る。

10

【0049】

上記の改変に加えて、本発明のペプチドを、結果として得られる連結ペプチドが元のペプチドの必要なCTL誘導能を保持している限り、他のペプチドに連結させることもできる。他の適切なペプチドの例には、本発明のペプチドまたは他のTAAに由来するCTL誘導性ペプチドが含まれる。適切なペプチド間リンカーは当技術分野で周知であり、例えばAAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (R. P. M. Suttmüller 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)である。

20

【0050】

例えば、HLAクラスIおよび/またはクラスIIを介する免疫応答を増大させるために、CLUP1ではない腫瘍関連抗原ペプチドを実質的に同時に使用することもできる。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、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、ならびに続いて本発明によるCLUP1組成物またはワクチン中に、そのような遺伝子の発現産物に由来するHLAクラスIおよび/またはHLAクラスII結合ペプチドを含めることは、当業者の慣例的な実験法の範囲内である。

30

【0051】

HLAクラスIおよびHLAクラスII結合ペプチドの例は当業者に公知であり(例えば、Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995を参照されたい)、本明細書に開示したもの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CLUP1ペプチドおよび1種もしくは複数種のCLUP1ではないペプチドを含むポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードする核酸を、分子生物学の標準的手法を用いて容易に調製することができる。

【0052】

上記の連結ペプチドを本明細書では「ポリトープ」と称し、これはすなわち、様々な配置(例えば、連鎖状、重複)で連結され得る、2つまたはそれ以上の潜在的な免疫原性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ルで例えば動物に投与して、免疫応答の促進、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。

40

ペプチドを直接的にまたは隣接配列の使用により連結して、ポリトープを形成することができ、ポリトープのワクチンとしての使用は当技術分野において周知である(例えば、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

50

々な数および組み合わせのエピトープを含むポリトープを調製することができ、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。

【0053】

本発明のペプチドは、結果として得られる連結ペプチドが元のペプチドの必要なCTL誘導能を保持している限り、他の物質に連結させることもできる。適切な物質の例には、例えば、ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマー等が含まれる。本ペプチドは、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という条件で、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含んでもよい。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、またはペプチドを安定化するために行うことができる。

例えば、ポリ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、この概念は本発明のポリペプチドにも適合し得る。ポリペプチドの安定性は、いくつかの方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼ、ならびにヒトの血漿および血清などの様々な生物学的媒質を用いて、安定性を試験することができる（例えば、Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302を参照されたい）。

【0054】

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、または付加されている改変ペプチドの中から、元のペプチドと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元のものと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有する改変ペプチドをスクリーニングまたは選択する方法を提供する。例示的な方法は以下の段階を含み得る：

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置換、欠失、または付加する段階、

b：ペプチドの活性を測定する段階、および

c：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ペプチドを選択する段階。

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。

本明細書において、本発明のペプチドはまた、「CLUAP1ペプチド」または「CLUAP1ポリペプチド」と記載することもできる。

【0055】

III. CLUAP1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。

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

【0056】

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。該合成に適合させることのでき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；

10

20

30

40

50

(i i) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
(i i i) 「ペプチド合成」(日本語) , 丸善, 1975 ;
(i v) 「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語) , 丸善, 1985 ;
(v) 「続医薬品の開発」(日本語) , 第 1 4 巻 (ペプチド合成) , 広川書店, 1991 ;
(v i) W O 9 9 / 6 7 2 8 8 ; および
(v i i) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, "Solid Phase Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1980, 100-118.

【 0 0 5 7 】

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

10

【 0 0 5 8 】

I V . 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 C L U A P 1 遺伝子 (G e n B a n k アクセッション番号 N M _ 0 1 5 0 4 1 または N M _ 0 2 4 7 9 3 (例えば、S E Q I D N O : 4 4)) 由来のポリヌクレオチド、およびその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一の核酸が任意の特定のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A 、 G C C 、 G C G 、および G C U 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任意の位置において、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 A U G 、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 T G G 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。

20

30

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、またはそれらの誘導体から構成され得る。当技術分野で周知の通り、DNA 分子は天然塩基 A 、 T 、 C 、および G などの塩基から構成され、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ることを認識する。

40

【 0 0 5 9 】

本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を伴って、または伴わずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在するアミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位 (例えば、酵素認識配列) を提供し得る。さらに、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等を有する発現ベクター (プラスミド) であってもよい。一般に、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いる従来の組換え技法によりポリヌクレオチドを操作することによって、そのような組換えポリヌクレオチドを調製することができる。

50

【 0 0 6 0 】

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る。あるいは、PCR技法または適切な宿主内での発現を用いて、ポリヌクレオチドを増幅することもできる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989を参照されたい）。あるいは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5に記載されている固相技法を用いて、ポリヌクレオチドを合成することもできる。

10

【 0 0 6 1 】

V. エキソソーム

本発明はさらに、本発明のペプチドとHLA抗原との間に形成された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 1 1 - 5 1 0 5 0 7 号およびWO 9 9 / 0 3 4 9 9 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。

【 0 0 6 2 】

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-A 2 4 およびHLA-A 2、特にHLA-A * 2 4 0 2、HLA-A * 0 2 0 1、およびHLA-A * 0 2 0 6 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A 2 4 型またはA 2 型の使用は、有効な結果を得るのに好ましく、A * 2 4 0 2、HLA-A * 0 2 0 1、およびHLA-A * 0 2 0 6 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、天然のCLUP 1 部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて、1 個、2 個、または数個のアミノ酸の置換、挿入、欠失、および/または付加を行うことができる。

20

30

【 0 0 6 3 】

本発明のエキソソームに対してA 2 4 型HLA抗原を用いる場合、SEQ ID NO : 1 ~ 2 2 の中より選択される配列を有するペプチドが使用される。

あるいは、本発明のエキソソームに対してA 2 型HLA抗原を用いる場合、SEQ ID NO : 2 3 および2 5 ~ 4 3 の中より選択される配列を有するペプチドが使用される。

【 0 0 6 4 】

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で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。

40

APCは特定の種類の細胞に限定されず、これには、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている樹状細胞 (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。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、DCは本発明のAPCとして使用される。

【 0 0 6 5 】

50

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、エキスピボ、またはインピボで本発明のペプチドと接触させる（で刺激する）ことによって、本発明の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。「APCを誘導する」という語句には、細胞を本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするヌクレオチドと接触させて（で刺激して）、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細胞表面上に提示させることが含まれる。したがって、本発明のAPCは、本発明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もできる。

10

【0066】

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、該対象に投与することができる。例えば、エキ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。

【0067】

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。あるいは、本発明によれば、抗原提示細胞を誘導する薬学的組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、抗原提示細胞を誘導する薬学的組成物を製造するための方法または課程を提供する。さらに、本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドを提供する。段階bによって得られるAPCは、がん、例えば乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌を治療および/または予防するためのワクチンであり得る。

20

本発明の一局面によると、APCは高レベルのCTL誘導能を有する。「高レベルのCTL誘導能」という用語における高レベルとは、ペプチドと接触させていないAPC、またはCTLを誘導しない可能性のあるペプチドと接触させたAPCによるCTL誘導能のレベルと比較したものである。高レベルの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。導入する遺伝子は、DNAまたはRNAの形態であってもよい。当分野において従来より実施されている様々な方法、例えば、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を含む、導入の方法の例を、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。遺伝子をAPCに導入することによって、該遺伝子は細胞内で転写、翻訳等を受け、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て、提示経路を経て本発明の部分ペプチドが提示される。

30

【0068】

40

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に対して誘導されたCTLは、インピ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によって特異的に誘導または活性化された、単離されたCTLを提供する。

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、または(2)対象由来のAPC、およびCD8陽性細胞、もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させる（で刺激する）こと、または(3)CD8陽性細胞もしくは末梢血単核白血球を、HLA抗原と該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)本発明のペプチドに

50

結合するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を導入することによって、得ることができる。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、（４）の方法の詳細は後述の「ＶＩＩＩ．Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）」の章に記載される。

【００６９】

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、かつ単独で投与すること、または効果を調節する目的で本発明のペプチド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、がん細胞のようにＣＬＵＡＰ１を内因的に発現する細胞、またはＣＬＵＡ

10

【００７０】

ＶＩＩＩ．Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）

本発明はまた、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）のサブユニットを形成し得るポリペプチドをコードする核酸を含む組成物、およびそれを使用する方法を提供する。ＴＣＲサブユニットは、ＣＬＵＡＰ１を提示してい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用いることにより、本発明の１種または複数種のペプチドで誘導されたＣＴＬのＴＣＲサブユニットとしてα鎖およびβ鎖の核酸を同定することができる（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の５'-Ｒプライマー（５'-g t c t a c c a g g c a t t c g c t t c a t - 3'）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６）、および３'側プライマーとしての、ＴＣＲα鎖Ｃ領域に特異的な３-ＴＲα-Ｃプライマー（５'-t c a g c t g g a c c a c a g c c g c a g c g t - 3'）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７）、ＴＣＲβ鎖Ｃ１領域に特異的な３-ＴＲβ-Ｃ１プライマー（５'-t c a g a a a t c c t t t c t c t t g a c - 3'）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８）、またはＴＣＲβ鎖Ｃ２領域に特異的な３-ＴＲβ-Ｃ２プライマー（５'-c t a g c c t c t g g a a t c c t t t c t c t t - 3'）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）であ

20

30

【００７１】

ＴＣＲサブユニットをコードする核酸を、適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込んでもよい。これらのベクターは、当技術分野において周知である。該核酸またはそれらを有用に含むベクターを、Ｔ細胞、例えば患者由来のＴ細胞に導入してもよい。有利には、本発明は、患者自身のＴ細胞（または別の哺乳動物のＴ細胞）の迅速な改変により、優れたがん細胞殺傷特性を有する改変Ｔ細胞を迅速かつ容易に作製することを可能にする容易に入手可能な組成物を提供する。

40

【００７２】

特異的ＴＣＲとは、ＴＣＲがＴ細胞の表面上に提示されている場合に、本発明のペプチドとＨＬＡ分子との複合体を特異的に認識して、標的細胞に対する特異的活性をＴ細胞に付与し得る受容体である。上記複合体の特異的認識は任意の公知の方法によって確認することができ、その好ましい例には、ＨＬＡ分子および本発明のペプチドを用いるＨＬＡマルチマー染色解析、ならびにＥＬＩＳＰＯＴアッセイが含まれる。ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを行うことにより、細胞表面上にＴＣＲを発現するＴ細胞がそのＴＣＲによって細胞を認識すること、およびシグナルが細胞内で伝達されることを確認することができる。上述した複合体が、その複合体がＴ細胞表面上に存在する場合にＴ細胞に細胞傷害活性を付与することができることの確認を、公知の方法によって行うこともできる。好ましい方法に

50

は、例えば、HLA陽性標的細胞に対する細胞傷害活性の測定、例えばクロム放出アッセイなどが含まれる。

【0073】

また、本発明は、例えば、HLA-A24との関連においてSEQ ID NO: 3、4、5、8、9、10、14、15、16、および18のCLUAP1ペプチド、かつまたHLA-A2との関連においてSEQ ID NO: 23、30、33、34、35、36、および38のCLUAP1ペプチドと結合するTCRサブユニットポリペプチドをコードする核酸の形質導入によって調製されるCTLも提供する。

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、Kwakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989)）。本発明のCTLは、治療または予防を必要としている患者におけるがんの療法または予防に有用な免疫原性組成物を形成するために用いることができる（WO2006/031221）。

10

【0074】

予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患による死亡率または罹患率の負荷を軽減する任意の行為を含む。予防（preventionおよびprophylaxis）は、「第一次、第二次、および第三次の予防レベルで」行われ得る。第一次の予防（preventionおよびprophylaxis）が疾患の発生を回避するのに対し、第二次および第三次レベルの予防（preventionおよびprophylaxis）は、疾患の進行および症状の出現を予防（preventionおよびprophylaxis）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軽減することによって、既存の疾患の悪影響を軽減することを目的とした行為を包含する。あるいは、予防（preventionおよびprophylaxis）は、特定の障害の重症度を軽減すること、例えば腫瘍の増殖および転移を減少させること、血管新生を軽減することを目的とした広範囲の予防的治療を含む。

20

【0075】

がん予防のためおよび/またはその術後再発の予防のための治療とは、以下の、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を構成し、および/または予防は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。

30

【0076】

IX. 薬学的な物質または組成物

CLUAP1の発現は、正常組織と比較して、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌を例として含むがそれらに限定されないがんにおいて特異的に上昇するため、本発明のペプチドまたはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドを、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に用いることができる。したがって、本発明は、その術後再発の治療および/または予防のための薬学的な物質または組成物を提供し、そのような組成物は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの1種または複数種を有効成分として含む。あるいは、薬学的な物質または組成物として用いるために、本発明のペプチドを、前述のエキソソームまたはAPCなどの細胞のいずれかの表面上に発現させることができる。加えて、本発明のペプチドのいずれかを標的とする前述のCTLもまた、本発明の薬学的な物質または組成物の有効成分として用いることができる。

40

本発明の薬学的な物質および組成物はまた、ワクチンとしても有用であり得る。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誘導する機能を有する物質を指す。

【0077】

50

本発明の薬学的な物質または組成物は、ヒト、ならびにマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒヒ、およびチンパンジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含む任意の他の哺乳動物を含むがそれらに限定されない対象または患者において、がんを治療および／もしくは予防するため、ならびに／または術後のその再発を予防するために用いることができる。

【0078】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療または予防するための薬学的な組成物または物質の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

10

【0079】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍の治療または予防において用いるための、以下の中より選択される有効成分を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

20

【0080】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療または予防するための薬学的な組成物または物質を製造するための方法または課程であって、有効成分として以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体とともに製剤化する段階を含む方法または課程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

30

【0081】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療または予防するための薬学的な組成物または物質を製造するための方法または課程であって、以下の中より選択される有効成分と薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを混合する段階を含む方法または課程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

【0082】

本発明により、SEQ ID NO：2～22の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24拘束性エピトープペプチドまたはその候補であることが見出され、またSEQ ID NO：23および25～43の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A2拘束性エピトープペプチドまたはその候補であることが見出された。したがって、SEQ ID NO：3、4、5、8、9、10、14、15、16、18および23、30、33、34、35、36、38のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含む本発明の薬学的な物質または組成物は、それぞれ、HLA抗原がHLA-A24および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）を含む薬学的な物質または組成物にも当てはまる。

40

50

【 0 0 8 3 】

本発明の薬学的な物質または組成物によって治療されるがんは、限定的でなく、C L U A P 1 が関与する（例えば、過剰発現する）任意のがんを含み、これには、例えば、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【 0 0 8 4 】

本発明の薬学的な物質または組成物は、前述の有効成分に加えて、がん性細胞に対するC T Lを誘導する能力を有するその他のペプチド、該その他のペプチドをコードするその他のポリヌクレオチド、該その他のペプチドを提示するその他の細胞等を含み得る。本明細書において、がん性細胞に対するC T Lを誘導する能力を有するその他のペプチドは、がん特異的抗原（例えば、同定されたT A A）によって例示されるが、これに限定されるわけではない。

10

必要に応じて、本発明の薬学的な物質または組成物は、その他の治療物質が、例えば本発明のペプチドのいずれかなどの有効成分の抗腫瘍効果を阻害しない限り、有効成分として該治療物質を任意に含み得る。例えば、製剤は、抗炎症物質または抗炎症組成物、鎮痛剤、化学療法薬等を含み得る。医薬自体におけるその他の治療物質に加えて、本発明の医薬を、1つまたは複数のその他の薬理学的な物質または組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理学的な物質または組成物の量は、例えば、使用する薬理学的な物質または組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に左右される。

20

【 0 0 8 5 】

本明細書において具体的に言及される成分に加えて、本発明の薬学的な物質または組成物は、対象となる製剤の種類を考慮して、当技術分野において慣例的なその他の物質または組成物も含み得ることが理解されるべきである。

本発明の一態様において、本発明の薬学的な物質または組成物を、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物質または組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。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。容器表面のラベルには、該物質または組成物が、疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防のために用いられることが示されるべきである。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

30

【 0 0 8 6 】

本発明の薬学的な物質または組成物を含むキットは、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、および使用説明書を備えた包装封入物を含む、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。

必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るバックまたはディスペンサー装置にて、薬学的な組成物を提供することができる。該バックは、例えば、プリスターバ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。バックまたはディスペンサー装置には、投与に関する説明書が添付され得る。

40

【 0 0 8 7 】

（1）有効成分としてペプチドを含む薬学的な物質または組成物

本発明のペプチドは、薬学的な物質または組成物として直接投与してもよく、または必要であれば、従来の製剤化法によって製剤化してもよい。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬物に通常用いられる担体、賦形剤等が特に制限なく必要に応じて含まれ得る。そのような担体の例は、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等である。さらに、薬学的な物質または組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤等を含み得る。本発明の薬学的な物質または組成物は、抗がん目的に用いることができる。

【 0 0 8 8 】

インビボでC T L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

50

たはそれ以上で構成される組み合わせとして調製することができる。ペプチドの組み合わ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。例えば、ペプチドを化学的に結合させてもよく、または、リンカー（例えば、リジンリンカー：K. S. Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168: 5709-5715）として1つもしくは複数のアミノ酸を有し得る単一の融合ポリペプチド配列として発現させてもよい。組み合わせにおけるペプチドは、同一であってもよく、または異なってもよい。本発明のペプチドを投与することにより、ペプチドはHLA抗原によってAPC上に高密度で提示され、次いで、提示されたペプチドとHLA抗原との間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た後、本発明のペプチドで刺激して、本発明のペプチドのいずれかをその細胞表面上に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再投与して該対象内でCTLを誘導し、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

10

【0089】

有効成分として本発明のペプチドを含む、がんの治療および/または予防のための薬学的な物質または組成物は、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、薬学的な組成物は、他の有効成分と共に投与してもよく、または顆粒内へ製剤化することによって投与してもよい。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続して）投与した場合に、該タンパク質に対する免疫応答を増強する任意の化合物、物質、または組成物を指す。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）に記載されている

20

【0090】

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

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。塩の好ましい例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸との塩、および無機酸との塩が含まれる。本明細書で使用する「薬学的に許容される塩」とは、その化合物の生物学的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塩を指す。

30

【0091】

いくつかの態様において、本発明の薬学的な物質または組成物は、CTLを刺激する（prime）成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでCTLを刺激し得る物質または組成物として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリジン残基のεアミノ基およびαアミノ基に付着させ、次に本発明のペプチドに連結させることができる。次いで、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子の状態で直接投与するか、リボ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

40

【0092】

投与方法は、経口、皮内、皮下、静脈内注射等、および全身投与または標的部位の近傍への局所投与であってもよい。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。本発明のペプチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1,000mg、例えば0.1mg~10mgであり、数日~数ヶ月に1度投与

50

することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

【0093】

(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的な物質または組成物

本発明の薬学的な物質または組成物はまた、本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸を含み得る。本明細書において、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞に導入された場合に、抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてイン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に必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドには、標的細胞のゲノムへの安定した挿入が達成されるように、必要なものを備えさせることができる(相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThom 10
as KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12を参照されたい。同じく例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8; 米国特許第5,580,859号;第5,589,466号;第5,804,566号;第5,739,118号;第5,736,524号;第5,679,647号;およびWO 98/04720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(ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性)送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性(「遺伝子銃」)または圧力媒介性の送達が含まれる(例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい)。

【0094】

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 20
イルス宿主が含まれる。このアプローチは、例えば、ペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターとして、ワクシニアウイルスの使用を伴う。宿主に導入すると、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を誘発する。免疫化プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターはBCG(カルメット・ゲラン桿菌)である。BCGベクターは、Stover et al., Nature 1991, 351: 456-60に記載されている。治療的な投与または免疫化に有用である多種多様な他のベクター、例えば 30
アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌(Salmonella typhi)ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えば、Shata et al., Mol Med Today 2000, 6: 66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68: 793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14: 571-85を参照されたい。

【0095】

患者へのポリヌクレオチドの送達は、直接的であってもよく、この場合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。

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33: 573-96; Mulligan, Science 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62: 191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5): 155-215を参照されたい。本発明にも用いることのできる、組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、eds. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993; およびKrieger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY, 1990に記載されている。 40

【0096】

投与方法は、経口、皮内、皮下、静脈内注射等であってもよく、全身投与または標的部位の近傍への局所投与が使用される。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。適切な担体中のポリヌクレオチドの用 50

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中のポリヌクレオチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1000mg、例えば0.001mg~1000mg、例えば0.1mg~10mgであり、数日に1度~数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

【0097】

X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法

APCおよびCTLを調製または誘導するために、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを用いることができる。本発明のエキソソームおよびAPCを用いて、CTLを誘導することもできる。ペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、そのCTL誘導能を阻害しない限り、任意の他の化合物と組み合わせて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物質または組成物のいずれかを用いてCTLを誘導することができ、それに加えて、前記ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものを用いて、後述のようにAPCを誘導することもできる。

【0098】

(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、エキスピボ、またはインビボで接触させる段階を含む。例えば、APCを該ペプチドとエキスピボで接触させる方法は、以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階；および

b：段階aのAPCを該ペプチドと接触させる段階。

【0099】

APCは特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識される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細胞を含む。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。本発明の任意のペプチドを、単独で、または本発明の他のペプチドと共に用いることができる。

【0100】

一方、本発明のペプチドを対象に投与すると、APCは該ペプチドとインビボで接触し、その結果、高いCTL誘導能を有するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって本発明は、本発明のペプチドを対象に投与する段階を含む。同様に、本発明のポリヌクレオチドを発現可能な形態で対象に投与すると、本発明のペプチドはインビボで発現してAPCと接触し、その結果、高いCTL誘導能を有するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって、本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与する段階も含み得る。「発現可能な形態」とは、上記の「IX. 薬学的な物質または組成物、(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的な物質または組成物」の章で説明されている。

【0101】

本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するために、本発明のポリヌクレオチドをAPCに導入する段階を含み得る。例えば、本方法は以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階；および

b：本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。

段階bは、「VI. 抗原提示細胞」の章に上述したように行うことができる。

あるいは本発明は、以下の段階のうちの1つを含み得る、CLUAP1に対するCTL活性を特異的に誘導する抗原提示細胞 (APC) を調製するための方法を提供する：

(a) APCを、本発明のペプチドとインビトロ、エキスピボ、またはインビボで接触させる段階；および

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

【0102】

(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。

【0103】

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するT細胞受容体(TCR)サブユニットを形成し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、CTLを誘導する方法を提供する。好ましくは、CTLを誘導するための方法は、以下の中より選択される少なくとも1つの段階を含み得る：

a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する抗原提示細胞および/またはエキソソームと接触させる段階；ならびに

b) 本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を認識するTCRサブユニットを形成し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをCD8陽性細胞に導入する段階。

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

【0104】

あるいは、それらをエキスピボで用いることによってCTLを誘導することもでき、CTLの誘導後に活性化CTLを対象に戻すこともできる。例えば、本方法は以下の段階を含み得る：

a：対象からAPCを回収する段階；

b：段階aのAPCをペプチドと接触させる段階；および

c：段階(b)のAPCをCD8陽性細胞と共培養する段階。

【0105】

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

そのようなAPCの代わりに、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを用いることもできる。すなわち、本発明は、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを共培養する段階も含むことができる。そのようなエキソソームは、「V. エキソソーム」の章で上述した方法によって調製することができる。

【0106】

さらに、本発明のペプチドに結合するTCRサブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をCD8陽性細胞に導入することによって、CTLを誘導することができる。そのような形質導入は、「V.I.I. T細胞受容体(TCR)」の章に上述したように行うことができる。

加えて、本発明は、CTLを誘導する薬学的な物質または組成物を製造するための方法または過程であって、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。

【0107】

(3) 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、CLUP1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。適切な疾患にはがんが含まれ、その例には、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0108】

本発明の方法は、本発明のペプチドのいずれかまたはそれらをコードするポリヌクレオチドのいずれかを含む物質または組成物を投与する段階を含み得る。本発明の方法はまた

10

20

30

40

50

、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の投与も企図する。詳細については、「ＩＸ．薬学的な物質または組成物」の項、特に本発明の薬学的な物質または組成物のワクチンとしての使用について記載している部分を参照されたい。加えて、免疫応答を誘導するために本発明の方法に使用することができるエキソソームおよびＡＰＣは、上記「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を用いる方法」の（１）および（２）の項において詳述している。

本発明はまた、免疫応答を誘導する薬学的な物質または組成物を製造するための方法または過程であって、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含み得る方法を提供する。

10

【０１０９】

あるいは、本発明の方法は、以下を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する段階を含み得る：

- （ａ）本発明のペプチド；
- （ｂ）本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；
- （ｃ）本発明のペプチドを自身の表面上に提示するＡＰＣもしくはエキソソーム；または
- （ｄ）本発明の細胞傷害性Ｔ細胞。

【０１１０】

本発明との関連において、ＣＬＵＡＰ１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。このようながんの例には、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膵癌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。したがって、有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する前に、治療すべき細胞または組織中のＣＬＵＡＰ１の発現レベルが同じ器官の正常細胞と比較して増強され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、それを必要とする患者においてＣＬＵＡＰ１を（過剰）発現するがんを治療するための方法を提供し、そのような方法は以下の段階を含み得る：

20

- i) 治療すべきがんを有する対象から得られた細胞または組織中のＣＬＵＡＰ１の発現レベルを決定する段階；
- i i) ＣＬＵＡＰ１の発現レベルを正常対照と比較する段階；および
- i i i) 上記の（ａ）～（ｄ）の中より選択される少なくとも１つの成分を、正常対照と比較してＣＬＵＡＰ１を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

30

【０１１１】

あるいは本発明は、ＣＬＵＡＰ１を過剰発現するがんを有する対象に投与される、上記の（ａ）～（ｄ）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ＣＬＵＡＰ１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、対象由来の細胞または組織中のＣＬＵＡＰ１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上昇していることにより、該対象が本発明のＣＬＵＡＰ１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、より詳細に説明する。

40

【０１１２】

目的とするＣＬＵＡＰ１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ＣＬＵＡＰ１発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、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、これらに限定されるわけではない。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、その後これを対象由来試料として用いてもよい。

【０１１３】

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

50

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、 β -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、これらに限定されるわけではない。

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

10

【0114】

本発明によれば、対象から得られた細胞または組織中のCLUAP1の発現レベルを決定してもよい。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、CLUAP1のmRNA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することができる。検出は、チップまたはアレイなどにおいて行うことができる。アレイの使用は、CLUAP1の発現レベルを検出するのに好ましい可能性がある。当業者は、CLUAP1の配列情報を利用して、そのようなプローブを調製することができる。例えば、CLUAP1のcDNAをプローブとして用いることができる。必要に応じて、プローブを、色素、蛍光物質、および同位体などの適切な標識で標識してもよく、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。

20

さらに、増幅に基づく検出法（例えば、RT-PCR）により、プライマーを用いてCLUAP1の転写産物（例えばSEQ ID NO: 44）を定量してもよい。そのようなプライマーを、該遺伝子の入手可能な配列情報に基づいて調製してもよい。

【0115】

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、CLUAP1のmRNAとハイブリダイズする。本明細書で使用する「ストリンジェントな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列とはハイブリダイズするが、その他の配列とはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列に依存し、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高い温度で観察される。一般に、ストリンジェントな条件の温度は、所定のイオン強度およびpHにおける特定の配列の融解温度（ T_m ）よりも約5℃低くなるように選択する。 T_m とは、平衡状態で、標的配列に相補的なプローブの50%が標的配列とハイブリダイズする（所定のイオン強度、pH、および核酸濃度における）温度である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 T_m では、平衡状態でプローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、pH 7.0~8.3において塩濃度がナトリウムイオン約1.0M未満、典型的にはナトリウムイオン（または他の塩）約0.01~1.0M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。

30

40

【0116】

プローブまたはプライマーは特定のサイズのものであってよい。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。

50

【 0 1 1 7 】

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、C L U A P 1 タンパク質 (S E Q I D N O : 4 5) またはその免疫学的断片の量を測定することができる。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 C L U A P 1 タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変物 (例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ') 2、F v 等) 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このような抗体またはその断片もまた、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。

10

【 0 1 1 8 】

C L U A P 1 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別の方法として、C L U A P 1 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、強力な染色により、該タンパク質の存在 / レベルの増加が示され、それと同時に C L U A P 1 遺伝子の高発現レベルが示される。

標的遺伝子、例えば C L U A P 1 遺伝子のがん細胞における発現レベルは、そのレベルが、該標的遺伝子の対照レベル (例えば、正常細胞中のレベル) から例えば 1 0 %、2 5 %、もしくは 5 0 % 上昇するか ; または 1 . 1 倍超、1 . 5 倍超、2 . 0 倍超、5 . 0 倍超、1 0 . 0 倍超、もしくはそれ以上まで上昇する場合に、上昇していると判定され得る。

20

【 0 1 1 9 】

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中の C L U A P 1 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、統計的方法により決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験された細胞に由来する発現パターンのデータベースに由来し得る。さらに、本発明の一面によれば、生物学的試料中の C L U A P 1 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することもできる。対象由来の生物学的試料の組織型と類似の組織型に由来する参照試料から決定された対照レベルを用いることが好ましい。さらに、疾患状態が判明している集団における C L U A P 1 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 + / - 2 S . D . または平均値 + / - 3 S . D . の範囲を、基準値として用いることができる。

30

C L U A P 1 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。

40

【 0 1 2 0 】

本発明はまた、(i) 対象が治療すべきがんを有すると疑われるかどうかを診断する方法、および / または (i i) 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細胞または組織中の C L U A P 1 の発現レベルを決定する段階 ;
- b) C L U A P 1 の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階 ;
- c) C L U A P 1 の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇している場合に、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

50

めに該対象を選択する段階。

【0121】

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細胞または組織中の C L U A P 1 の発現レベルを決定する段階；
- b) C L U A P 1 の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；
- c) C L U A P 1 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に、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。

10

【0122】

本発明はまた、本発明の C L U A P 1 ポリペプチドで治療され得るがんに罹患しているかまたは罹患してい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、該診断キットはまた、がんの予後を評価する、および/またはがん療法、特にがん免疫療法の有効性もしくは適用性をモニターするのにも有用であり得る。適切ながんの具体例には、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。より詳細には、本キットは、対象由来の細胞中の C L U A P 1 遺伝子の発現を検出するための少なくとも1つの試薬を含み得ることが好ましく、そのような試薬は以下の群より選択される：

20

- (a) C L U A P 1 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；
- (b) C L U A P 1 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) C L U A P 1 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【0123】

C L U A P 1 遺伝子の m R N A を検出するのに適した試薬の例には、C L U A P 1 m R N A 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、C L U A P 1 m R N A に特異的に結合するか、または C L U A P 1 m R N A 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、C L U A P 1 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブによって例証される。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、C L U A P 1 m R N A を検出するための試薬を固体基質上に固定化することができる。さらに、C L U A P 1 m R N A を検出するための2つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

30

【0124】

一方、C L U A P 1 タンパク質またはその免疫学的断片を検出するのに適した試薬の例には、C L U A P 1 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 C L U A P 1 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（例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ')₂、F v 等）を試薬として用いることもできる。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、C L U A P 1 タンパク質を検出するための2つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

40

【0125】

本キットは、前述の試薬のうちの2つ以上を含み得る。本キットはさらに、C L U A P 1 遺伝子に対するプローブまたは C L U A P 1 ペプチドに対する抗体を結合させるための固体基質および試薬、細胞を培養するための培地および容器、陽性および陰性対照試薬、ならびに C L U A P 1 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

50

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、および使用説明書を備えた包装封入物（例えば、文書、テープ、CD-ROM等）を含む、商業上の観点および使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含み得る。これらの試薬等は、ラベルを貼った容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれ得る。該容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。

【0126】

本発明の一態様において、試薬がCLUP1 mRNAに対するプローブである場合には、該試薬を多孔性ストリップなどの固体基質上に固定化して、少なくとも1つの検出部位を形成させることができる。多孔性ストリップの測定または検出領域は、それぞれが核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。検査ストリップはまた、陰性および/または陽性対照用の部位を含み得る。あるいは、対照部位は、検査ストリップとは別のストリップ上に位置し得る。任意で、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含み得る、すなわち、第1検出部位ではより多い量の固定化核酸を、および以降の部位ではより少ない量の固定化核酸を含み得る。試験試料を添加すると、検出可能なシグナルを呈する部位の数により、試料中に存在するCLUP1 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

【0127】

本発明のキットは、陽性対照試料またはCLUP1標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、CLUP1陽性試料を回収し、次にそれらのCLUP1レベルをアッセイすることによって調製することができる。あるいは、精製CLUP1タンパク質またはポリヌクレオチドを、CLUP1を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはCLUP1標準試料を形成してもよい。本発明において、精製CLUP1は組換えタンパク質であってよい。陽性対照試料のCLUP1レベルは、例えばカットオフ値よりも高い。

20

【0128】

一態様において、本発明はさらに、本発明の抗体またはその免疫原性断片を特異的に認識することができ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。

30

本明細書において企図される本発明のタンパク質の部分ペプチドおよび免疫原性断片の例には、本発明のタンパク質のアミノ酸配列中の少なくとも8個、好ましくは15個、およびより好ましくは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。本発明のペプチドまたはタンパク質を調製するための方法は、上記の通りである。

【0129】

抗CLUP1抗体の量と、上記のような対応する対照試料中の抗CLUP1抗体の量との差を測定することにより、本発明のがんを診断する方法を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（CLUP1）に対する抗体を含み、この抗CLUP1抗体の量が正常対照中の抗CLUP1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に、該対象ががん罹患していることが疑われる。

40

【0130】

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している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を検出するのに適した方法は、既に確立されている（例えば、Altman JD 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

50

評価するために、これを使用することができる。

詳細には、公知の方法に従って（例えば、Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284): 94-6を参照されたい）、放射標識HLA分子と本発明のペプチドとの四量体などのオリゴマー複合体を調製することができる。この複合体を用いて、がん罹患している疑いのある対象に由来する末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLを定量することができる。

【0131】

本発明はさらに、本明細書に記載されるペプチドエピトープを用いて、対象の免疫学的応答を評価するための方法または診断試薬を提供する。本発明の一態様において、本明細書に記載するようなHLA拘束性ペプチドを、対象の免疫応答を評価または予測するための試薬として用いることができる。評価される免疫応答は、免疫原を免疫担当細胞とインビトロまたはインビボで接触させることにより誘導され得る。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)の中で選択し得る。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。特定の態様においては、試薬として用いられる物質または組成物は、ペプチドエピトープを認識して結合する抗原特異的CTLの産生をもたらす得る組成物であってよい。ペプチド試薬を免疫原として使用する必要はない。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

20

【0132】

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。

【0133】

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末端の前もってタンパク質中に作製した部位をビオチン化する。次にストレプトアビジンを該複合体に添加して、3分子複合体およびストレプトアビジンから構成される四量体を形成する。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、診断または予後診断目的に使用することができる。この手法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

【0134】

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の患者PBMC試料を、特異的ペプチドを用いて抗原特異的CTLの有無について解析することができる。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

【0135】

本ペプチドを、ワクチンの有効性を評価するための試薬として用いてもよい。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用いて解

50

析することができる。患者のHLA型を決定し、該患者に存在するアリルト異的分子を認識するペプチドエピトープ試薬を解析のために選択する。ワクチンの免疫原性は、PBM C試料中のエピトープ特異的CTLの存在によって示され得る。本発明のペプチドは、当技術分野で周知の技法を用いて抗体を作製するために使用することもでき（例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; およびAntibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい）、この抗体は、がんを診断、検出、またはモニターするための試薬として使用され得る。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。

【0136】

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、CLUAP1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方法を提供する。そのような方法は、生物学的試料中のCLUAP1 HLA結合ペプチド、またはCLUAP1 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段階を含む。ペプチドまたはペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現は、該ペプチドまたは該複合体の結合パートナーを用いてアッセイすることによって、測定または検出することができる。好ましい態様において、ペプチドまたは複合体の結合パートナーは、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ってよい。腫瘍生検材料などの生物学的試料中のCLUAP1の発現は、CLUAP1プライマーを用いる標準的なPCR増幅プロトコールによって試験することもできる。腫瘍発現の例は本明細書に提示してあり、CLUAP1増幅のための例示的な条件およびプライマーのさらなる開示は、WO2003/27322に見出すことができる。

【0137】

好ましい診断法は、対象から単離された生物学的試料をCLUAP1 HLA結合ペプチドに特異的な物質と接触させて、該生物学的試料中のCLUAP1 HLA結合ペプチドの存在を検出する段階を含む。本明細書で使用する「接触させる」とは、剤と生物学的試料中に存在するCLUAP1 HLA結合ペプチドとの間の特異的相互作用が可能となるように、生物学的試料を、例えば濃度、温度、時間、イオン強度の適切な条件下で、剤に十分に近接させて配置することを意味する。一般に、剤と生物学的試料を接触させるための条件は、分子と生物学的試料中のその同族物（例えば、タンパク質とその受容体同族物、抗体とそのタンパク質抗原同族物、核酸とその相補的配列同族物）との間の特異的相互作用を促進するための、当業者に公知の条件である。分子とその同族物との間の特異的相互作用を促進するための例示的な条件は、Lowらに対して発行された米国特許第5,108,921号に記載されている。

【0138】

本発明の診断法は、インビボおよびインビトロの一方または両方で行うことができる。したがって、生物学的試料は、本発明においてインビボまたはインビトロに位置し得る。例えば、生物学的試料はインビボの組織であってよく、かつCLUAP1免疫原性ポリペプチドに特異的な剤を用いて、組織中のそのような分子の存在を検出することができる。あるいは、生物学的試料をインビトロで採取または単離することができる（例えば、血液試料、腫瘍生検材料、組織抽出物）。特に好ましい態様において、生物学的試料は細胞を含む試料であってよく、より好ましくは、診断または治療する対象から採取された腫瘍細胞を含む試料であってよい。

【0139】

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り抗原特異的T細胞の直接的な定量を可能にする方法を用いて、診断を行うこともできる（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- γ 放出アッセイ、またはELISPOTアッセイもまた提供されている。多量体染色、細胞内リンホカイン染色、およびELISPOTアッセイはすべて、より慣例的なアッセイよ

10

20

30

40

50

り少なくとも10倍感度が高いようである (Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8: 177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 859; Dunbar, P. R. et al., 1998, Curr. Biol. 8: 413)。五量体 (例えば、US 2004 - 209295A)、デキストラマー (dextramer) (例えば、WO 02 / 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。

【0140】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明のCLUAP1ペプチドの少なくとも1つを投与された対象の免疫学的応答を診断または評価するための方法を提供し、該方法は以下の段階を含む：

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

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

(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。

【0141】

本発明において、免疫原は、(a) SEQ ID NO: 2 ~ 23および25 ~ 43のアミノ酸配列の中より選択されるCLUAP1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って改変されたペプチド、のうち少なくとも1つである。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。

【0142】

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、療法プロトコルの完了時であってもよい。

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強化されていることにより、評価または診断される対象が、投与された免疫原に対して免疫学的に応答したことが示される。免疫学的応答を評価するのに適した対照には、例えば、免疫担当細胞をペプチドと接触させていない場合の、またはいかなるCLUAP1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る。

【0143】

1つの好ましい態様においては、対象に投与された各免疫原間で免疫学的応答を比較することにより、対象の免疫学的応答を配列特異的な様式で評価する。特に、いくつかの種類のCLUAP1ペプチドについての混合物を対象に投与する場合であっても、免疫学的応答はペプチドに応じて異なる可能性がある。その場合には、各ペプチド間で免疫学的応答を比較することにより、対象がより強い応答を示すペプチドを同定することができる。

【0144】

XI. 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、本発明のペプチドではないものには結合しない (または弱く結合する)。あるいは、抗体は本発明のペプチドおよびその相同体に結合する。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断および予後診断のアッセイ、ならびに画像化方法論において使用され得る。同様に、そのような抗体は、CLUAP1ががん患者において

10

20

30

40

50

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／または予後診断において使用され得る。さらに、細胞内で発現する抗体（例えば、一本鎖抗体）は、CLUAP1の発現が関与するがんの治療において治療的に使用することができ、そのようながんの例には、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0145】

本発明はまた、CLUAP1タンパク質（SEQ ID NO：45）、またはSEQ ID NO：3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38の中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、CLUAP1タンパク質またはその断片を認識してそれと結合し得る1種または複数種の抗CLUAP1抗体を含み得る。本発明との関連において、CLUAP1ポリペプチドに結合する抗CLUAP1抗体は、好ましくは、SEQ ID NO：3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38の中より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は、阻害試験で確認することができる。すなわち、解析される抗体と全長CLUAP1ポリペプチドとの間の結合が、SEQ ID NO：3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、36、および38の中より選択されるアミノ酸配列を有する任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、この抗体が該断片に特異的に結合することが示される。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）等を含むがこれらに限定されるわけではない、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。

【0146】

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、CLUAP1を発現するがんを検出できる免疫学的画像化法を企図し、その例には、本発明の標識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、これに限定されるわけではない。そのようなアッセイは、CLUAP1を発現するがんの検出、モニタリング、および予後診断において臨床的に使用することができ、そのようながんの例には、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、膀胱癌が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0147】

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、任意の形態で、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用いることができ、かつさらに、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を含み得る。

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。

【0148】

本発明によれば、免疫抗原として用いられるペプチドは、完全なタンパク質または該タンパク質の部分ペプチドであってよい。部分ペプチドは、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）末端断片を含み得る。

本明細書では、抗体を、CLUAP1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する。好ましい態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：3、4、5、8、9、10、14、15、16、18、23、30、33、34、35、

36、および38の中より選択されるアミノ酸配列を有するCLUAP1の断片ペプチドを認識し得る。オリゴペプチドを合成する方法は、当技術分野において周知である。合成後、免疫原として使用する前にペプチドを任意に精製してもよい。本発明との関連において、免疫原性を高めるために、オリゴペプチド（例えば、9merまたは10mer）を担体と結合または連結させてもよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）が周知である。KLHとペプチドを結合する方法もまた、当技術分野において周知である。

【0149】

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

【0150】

任意の哺乳動物を抗原で免疫することができるが、細胞融合に用いら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

【0151】

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）、生理食塩水等で希釈し、懸濁させる。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、適量のアジュバントと混合した抗原を、4～21日ごとに数回投与することが好ましい。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な方法で調べることができる。

30

【0152】

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

【0153】

モノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を回収し、上記のように血清中の所望の抗体のレベル上昇について確かめた上で、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させる別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 et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981))の方法に従って、上記の免疫細胞と骨髄腫細胞とを融合させることができる。

【0154】

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（ヒボキ

50

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中で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。

【0155】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したリンパ球などのヒトリンパ球を、ペプチド、ペプチドを発現している細胞、またはそれらの溶解物でインビトロにおいて免疫することもできる。次いで、免疫後のリンパ球を、U266などの無限に分裂可能なヒト由来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)。

10

【0156】

続いて、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のペプチドを結合させたアフィニティークラムにより精製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドの精製および検出のためだけでなく、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。

20

【0157】

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用いることもできる。

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を用いて組換えにより調製することもできる(例えば、MacMillan Publishers LTD (1990)により英国で刊行された、Borrebäck 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た組換え抗体を提供する。

30

【0158】

さらに、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')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であってよい(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epsinまたはpepsin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、Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい)。

40

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。

【0159】

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

50

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。

【0160】

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。

【0161】

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、これらに限定されるわけではないが、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し組み合わせることにより、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。用いられる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。

【0162】

例示的なクロマトグラフィーには、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等が含まれる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)）。クロマトグラフィー手法は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うことができる。

【0163】

例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、および/または免疫蛍光法を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAの場合、本発明の抗体をプレート上に固定化し、本発明のペプチドを該プレートに添加し、次に抗体産生細胞の培養上清または精製抗体といった所望の抗体を含む試料を添加する。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)を用いてもよい。

【0164】

本発明の抗体を本発明のペプチドを含む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り、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。

本発明による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。

【0165】

XII. 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、宿主細胞中に本発明のヌクレオチド、特にDNAを保持するため、本発明のペプチドを発現させるため、または遺伝子治療用に本発明のヌクレオチドを投与するために使用され得る。

【0166】

大腸菌が宿主細胞であり、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1Blue）内で増幅して大量に生成する場合、ベクターは、大腸菌内で増幅するための「複製起点（ori）」と、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の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等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。

【0167】

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。JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現し得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989); FASEB J 6: 2422-7 (1989)）、araBプロモーター（Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)）、T7プロモーター等を有する必要がある。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。

【0168】

大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen）、およびpEGF-BOS（Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990)）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」（GIBCO BRL）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「ピキア（Pichia）発現キット」（Invitrogen）、pNV11、SP-Q01）、および枯草菌（Bacillus subtilis）由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）を、本発明のポリペプチドの産生に使用することができる。

【0169】

ベクターをCHO、COS、またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターはこのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター（Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979)）、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター（Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18: 5322 (19

10

20

30

40

50

90))、CMVプロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子(例えば、薬物(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。

以下の実施例は、本発明を説明するため、ならびに本発明の作製および使用において当業者を支援するために提示される。本実施例は、本発明の範囲を別に限定することを決して意図するものではない。

【実施例】

【0170】

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は、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。

【0171】

CLUAP1由来ペプチドの候補選択

HLA-A*2402またはHLA-A*0201分子と結合するCLUAP1由来の9merおよび10merペプチドを、結合予測ソフトウェア「BIMAS」(www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) (Parker et al. (J Immunol 1994, 152(1): 163-75)、Kuzushima et al. (Blood 2001, 98(6): 1872-81))および「NetMHC 3.0」(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/) (Buus et al. (Tissue Antigens., 62:378-84, 2003)、Nielsen et al. (Protein Sci., 12:1007-17, 2003, Bioinformatics, 20(9):1388-97, 2004))を用いて予測した。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(DMSO)に20mg/mlで溶解し、-80℃で保存した。

【0172】

インビトロでのCTL誘導

単球由来の樹状細胞(DC)を抗原提示細胞として用いて、ヒト白血球抗原(HLA)上に提示されたペプチドに対する細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答を誘導した。他所に記載されているように、DCをインビトロで作製した(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14): 4112-8)。具体的には、Ficol1-Plaque (Pharmacia)溶液によって健常なボランティア(HLA-A*2402またはHLA-A*0201陽性)から単離した末梢血単核細胞(PBMC)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%の加熱非動化した自己血清(AS)を含むAIM-V培地(Invitrogen)中、1,000U/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(R&D System)および1,000U/mlのインターロイキン(IL)-4(R&D System)の存在下で、単球が濃縮された集団を培養した。7日間の培養後、サイトカインで誘導したDCに、AIM-V培地中で37℃で3時間、3μg/mlのβ2-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。

【0173】

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)により不活化し、CD8 Positive Isolation Kit (Dyna1)を用いた陽性選択によっ

10

20

30

40

50

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、 1.5×10^4 個のペプチドパルスしたDC、 3×10^5 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。

【0174】

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(A24)またはT2細胞(A2)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)。

10

【0175】

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によって不活化した2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株と共に、合計 5×10^4 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 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)。

20

【0176】

CTLクローンの樹立

96丸底マイクロタイタープレート(Nalge Nunc International)においてCTL0.3個、1個、および3個/ウェルとなるように、希釈を行った。CTLを、 1×10^4 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150μl/ウェルの5%AS含有AIM-V培地中で培養した。10日後、50μl/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、上記と同じ方法を用いてCTLクローンを増殖させた(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24): 8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5): 411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8): 498-506)。

30

【0177】

特異的CTL活性

特異的CTL活性を調べるために、インターフェロン(IFN)-γ酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイおよびIFN-γ酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を行った。具体的には、ペプチドパルスしたTISI(A24)またはT2(A2)(1×10^4 個/ウェル)を刺激細胞として調製した。48ウェル中の培養細胞を応答細胞として使用した。IFN-γ ELISPOTアッセイおよびIFN-γ ELISAアッセイは、製造業者の手順に従って行った。

40

【0178】

標的遺伝子およびHLA-A24またはHLA-A2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

50

標的遺伝子、H L A - A 2 4、またはH L A - A 2 のオープンリーディングフレームをコードするc D N AをP C Rによって増幅した。P C R増幅産物をベクターにクローニングした。製造業者の推奨する手順に従ってリポフェクタミン2 0 0 0 (I n v i t r o g e n)を用いて、標的遺伝子およびH L A - A 2 4およびH L A - A 2 - ヌル細胞株であるC O S 7に該プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから2日後、トランスフェクトした細胞をベルセン (I n v i t r o g e n)を用いて回収し、C T L活性アッセイのための標的細胞 (5×10^4 個細胞/ウェル)として使用した。

【0179】

結果1

がんにおけるC L U A P 1発現の増強

10

c D N Aマイクロアレイを用いて様々ながんから得られた広範な遺伝子発現プロファイルデータにより、C L U A P 1 (G e n B a n kアクセッション番号N M _ 0 1 5 0 4 1またはN M _ 0 2 4 7 9 3 ; 例えば、S E Q I D N O : 4 4) の発現が上昇していることが明らかになった。C L U A P 1発現は、77例の乳癌のうち17例、19例の子宮頸癌のうち15例、19例の結腸直腸癌のうち12例、19例の食道癌のうち12例、25例の胃癌のうち7例、5例の浸潤型胃癌のうち5例、18例のリンパ腫のうち5例、16例の神経芽細胞腫のうち2例、9例の脾癌のうち4例において、対応する正常組織と比較して確かに上昇していた (表1)。

【0180】

(表1) 対応する正常組織と比較してがん性組織においてC L U A P 1の上方制御が観察された症例の比

20

癌／腫瘍	比
乳癌	17/77
子宮頸癌	15/19
結腸直腸癌	12/19
食道癌	12/19
胃癌	7/25
浸潤型胃癌	5/5
リンパ腫	5/18
神経芽細胞腫	2/16
脾癌	4/9

30

【0181】

結果2

C L U A P 1由来のH L A - A 2 4結合ペプチドの予測

表2 aおよび2 bは、H L A - A 2 4に結合するC L U A P 1の9 m e rおよび10 m e rペプチドを、結合親和性の高い順に示す。S E Q I D N O : 1 ~ 1 1およびS E Q I D N O : 1 5 ~ 2 2のペプチドはB I M A Sによって予測し、S E Q I D N O : 1 2 ~ 1 4のペプチドはN e t M H C 3 . 0によって予測した。エピトープペプチドを決定するために、H L A - A 2 4結合能を潜在的に有する合計22種のペプチドを選択して調べた。

40

【0182】

(表2 a) C L U A P 1に由来するH L A - A 2 4結合9 m e rペプチド

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
258	TYLEKFQNL	518.4	1
244	EYEKTEEEL	330	2
255	QYDTYLEKF	110	3
283	RFEEAKNTL	86.4	4
31	NFGLVSEVL	28	5
8	NFTEMMRAL	24	6
26	NFRTPNFGL	20	7
168	RTEAIARPL	16.8	8
64	FFIKAIAQF	15	9
216	KIEKRKLEL	13.2	10
335	KPQTAMEML	12	11
開始位置	アミノ酸配列	Kd (nM)	SEQ ID NO
86	LYQADGYAV	473	12
71	QFMATKAHI	1477	13
154	LYDLLGMEV	1564	14

10

20

【 0 1 8 3 】

(表 2 b) C L U A P 1 に由来する H L A - A 2 4 結合 1 0 m e r ペプチド

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
91	GYAVKELLKI	55	15
104	LYNAMKTKGM	37.5	16
31	NFGLVSEVLL	20	17
125	KFKFDLGSKI	13.2	18
17	GYPRHISMEN	11.6	19
289	NTLCLIQNKL	11.1	20
258	TYLEKFQNLT	10.8	21
63	VFFIKAIAQF	10	22

30

開始位置は、C L U A P 1 の N 末端からのアミノ酸残基の番号を示す。

結合スコアおよび解離定数 [K d (n M)] は「 B I M A S 」および「 N e t M H C 3 . 0 」に由来する。

【 0 1 8 4 】

H L A - A * 2 4 0 2 拘束性の C L U A P 1 由来の予測ペプチドによる C T L の誘導

C L U A P 1 由来のペプチドに対する C T L を、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。I F N - γ E L I S P O T アッセイによって、ペプチド特異的な C T L 活性を測定した (図 1 a ~ j) 。以下のウェル番号は、対照ウェルと比較して強力な I F N - γ 産生を示した : C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 5 5 (S E Q I D N O : 3) で刺激したウェル番号 # 6 (a) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 8 3 (S E Q I D N O : 4) で刺激した # 2 (b) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 3 1 (S E Q I D N O : 5) で刺激した # 2 (c) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 1 6 8 (S E Q I D N O : 8) で刺激した # 4 (d) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 6 4 (S E Q I D N O : 9) で刺激した # 4 (e) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 2 1 6 (S E Q I D N O : 1 0) で刺激した # 1 (f) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 9 - 1 5 4 (S E Q I D N O : 1 4) で刺激した # 6 (g) 、 C L U A P 1 - A 2 4 - 1 0 - 9 1 (S E Q

40

50

ＩＤ　ＮＯ：１５）で刺激した＃２（ｈ）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－１０－１０４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６）で刺激した＃４（ｉ）、およびＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－１０－１２５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８）で刺激した＃５（ｊ）。一方、表２aおよび２bに示されるその他のペプチドは、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、それらのペプチドでの刺激では特異的なCTL活性は測定されなかった。陰性データの典型的な例として、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２５８（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）で刺激したCTLからは特異的ＩＦＮ－γ産生が観察されなかった（図１k）。結果として、ＣＬＵＡＰ１に由来する１０種のペプチドが、強力なCTLを誘導することができるペプチドとしてスクリーニングされたことが示された。

【０１８５】

ＣＬＵＡＰ１由来のペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

上記「材料および方法」の章に記載した通りに、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２５５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）を用いたウェル番号＃６（a）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－１６８（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）を用いた＃４（b）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－６４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）を用いた＃４（c）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－１５４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４）を用いた＃６（d）、およびＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－１０－９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５）を用いた＃２（e）において、ＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより検出されるペプチド特異的CTL活性を示した細胞を増殖させ、限界希釈によってCTL株を樹立した。これらのCTL株のCTL活性をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＡアッセイによって測定した（図２a～e）。すべてのCTL株は、ペプチドを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－γ産生を示した。さらに、「材料および方法」に記載したとおりCTL株から限界希釈によってCTLクローンを樹立し、ペプチドをパルスした標的細胞に対するCTLクローンからのＩＦＮ－γ産生をＩＦＮ－γ　ＥＬＩＳＡアッセイによって測定した。図３において、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２５５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－６４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、およびＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－１０－９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５）で刺激したCTLクローンから強力なＩＦＮ－γ産生が測定された。

【０１８６】

ＣＬＵＡＰ１およびＨＬＡ－Ａ＊２４０２を外因的に発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

これらのペプチドに対して産生された樹立CTL株を、ＣＬＵＡＰ１およびＨＬＡ－Ａ＊２４０２分子を内因的に発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長ＣＬＵＡＰ１およびＨＬＡ－Ａ＊２４０２分子の遺伝子両方をトランスフェクトしたCOS7細胞（ＣＬＵＡＰ１およびＨＬＡ－Ａ＊２４０２遺伝子を外因的に発現する標的細胞の特異的モデル）に対する特異的CTL活性を、対応するペプチドによって産生されたCTL株を用いて試験した。全長ＣＬＵＡＰ１遺伝子またはＨＬＡ－Ａ＊２４０２のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。図４において、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２５５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）で刺激したCTLは、ＣＬＵＡＰ１およびＨＬＡ－Ａ＊２４０２の両方を発現する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、これらのデータにより、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２５５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）がＨＬＡ－Ａ＊２４０２分子とともに標的細胞上で天然に発現され、CTLによって認識されることが明確に実証された。これらの結果は、ＣＬＵＡＰ１に由来するこのペプチドが、ＣＬＵＡＰ１を発現する腫瘍を有する患者に対するがんワクチンとして適している可能性を示している。

【０１８７】

抗原ペプチドの相同性解析

ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２５５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－２８３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、ＣＬＵＡＰ１－Ａ２４－９－３１（ＳＥＱ

10

20

30

40

50

ID NO: 5)、CLUAP1-A24-9-168 (SEQ ID NO: 8)、
 CLUAP1-A24-9-64 (SEQ ID NO: 9)、CLUAP1-A24-
 9-216 (SEQ ID NO: 10)、CLUAP1-A24-9-154 (SEQ
 ID NO: 14)、CLUAP1-A24-10-91 (SEQ ID NO: 15
)、CLUAP1-A24-10-104 (SEQ ID NO: 16)、およびCLU
 AP1-A24-10-125 (SEQ ID NO: 18)で刺激したCTLは、有意
 かつ特異的なCTL活性を示した。この結果は、CLUAP1-A24-9-255 (S
 EQ ID NO: 3)、CLUAP1-A24-9-283 (SEQ ID NO: 4
)、CLUAP1-A24-9-31 (SEQ ID NO: 5)、CLUAP1-A2
 4-9-168 (SEQ ID NO: 8)、CLUAP1-A24-9-64 (SEQ
 ID NO: 9)、CLUAP1-A24-9-216 (SEQ ID NO: 10)
 、CLUAP1-A24-9-154 (SEQ ID NO: 14)、CLUAP1-A
 24-10-91 (SEQ ID NO: 15)、CLUAP1-A24-10-104
 (SEQ ID NO: 16)、およびCLUAP1-A24-10-125 (SEQ
 ID NO: 18)の配列が、ヒト免疫系を感作することが知られている他の分子に由来
 するペプチドと相同的であるという事実に起因する可能性がある。この可能性を排除する
 ために、BLASTアルゴリズム (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対して相同性解析を行ったが、有意な相同性を
 有する配列は認められなかった。この相同性解析の結果は、CLUAP1-A24-9-
 255 (SEQ ID NO: 3)、CLUAP1-A24-9-283 (SEQ ID
 NO: 4)、CLUAP1-A24-9-31 (SEQ ID NO: 5)、CLUA
 P1-A24-9-168 (SEQ ID NO: 8)、CLUAP1-A24-9-6
 4 (SEQ ID NO: 9)、CLUAP1-A24-9-216 (SEQ ID N
 O: 10)、CLUAP1-A24-9-154 (SEQ ID NO: 14)、CLU
 AP1-A24-10-91 (SEQ ID NO: 15)、CLUAP1-A24-1
 0-104 (SEQ ID NO: 16)、およびCLUAP1-A24-10-125
 (SEQ ID NO: 18)の配列が固有のものであること、およびしたがって、本発
 明者らの知る限りでは、これらの分子が、ある非関連分子に対して意図しない免疫学的応
 答を引き起こす可能性はほとんどないことを示している。

結論として、CLUAP1に由来する新規HLA-A24エピトープペプチドが同定さ
 れている。さらに、本明細書における結果は、CLUAP1のエピトープペプチドががん
 免疫療法における使用に適し得ることを実証している。

【0188】

結果3

CLUAP1由来のHLA-A02結合ペプチドの予測

表3aおよび3bは、HLA-A02に結合するCLUAP1の9merおよび10m
 erペプチドを、結合親和性の高い順に示す。エピトープペプチドを決定するために、H
 LA-A02結合能を有する可能性がある合計21種のペプチドを選択して調べた。

【0189】

(表3a) CLUAP1に由来するHLA-A02結合9merペプチド

10

20

30

40

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
34	LVSEVLLWL	164.809	23
58	TEQDRVFFI	61.024	24
95	KELLKITSV	40.281	25
85	KLYQADGYA	39.784	26
290	TLCLIQNKL	21.362	27
265	NLTYLEQQL	21.362	28
297	KLKEEEKRL	10.729	29
99	KITSVLYNA	5.499	30
188	AIKEILTQV	3.156	31
96	ELLKITSVL	2.431	32

10

【 0 1 9 0 】

(表 3 b) C L U A P 1 に由来する H L A - A 0 2 結合 1 0 m e r ペプチド

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
153	SLYDLLGMEV	912.522	33
85	KLYQADGYAV	778.982	34
34	LVSEVLLWL	731.711	35
33	GLVSEVLLWL	270.234	36
72	FMATKAHIKL	70.971	37
80	KLNTKKLYQA	39.992	38
41	WLVKRYEPQT	34.279	39
233	TLQSVRPCFM	27.324	40
183	KVMRIAIKEI	27.19	41
343	LMQGRPGKRI	12.809	42
222	LELERNRKRL	10.712	43

20

30

開始位置は、C L U A P 1 の N 末端からのアミノ酸残基の番号を示す。

結合スコアは「B I M A S」に由来する。

【 0 1 9 1 】

H L A - A * 0 2 0 1 拘束性の C L U A P 1 由来の予測ペプチドによる C T L の誘導

C L U A P 1 由来のペプチドに対する C T L を、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。I F N - γ E L I S P O T アッセイによって、ペプチド特異的な C T L 活性を測定した (図 5 a ~ g)。以下のウェル番号は、対照ウェルと比較して強力な I F N - γ 産生を示した: C L U A P 1 - A 0 2 - 9 - 3 4 (S E Q I D N O : 2 3) を用いたウェル番号 # 3 (a)、C L U A P 1 - A 0 2 - 9 - 9 9 (S E Q I D N O : 3 0) を用いた # 6 (b)、C L U A P 1 - A 0 2 - 1 0 - 1 5 3 (S E Q I D N O : 3 3) を用いた # 2 (c)、C L U A P 1 - A 0 2 - 1 0 - 8 5 (S E Q I D N O : 3 4) を用いた # 3 (d)、C L U A P 1 - A 0 2 - 1 0 - 3 4 (S E Q I D N O : 3 5) を用いた # 2 (e)、C L U A P 1 - A 0 2 - 1 0 - 3 3 (S E Q I D N O : 3 6) を用いた # 2 (f)、および C L U A P 1 - A 0 2 - 1 0 - 8 0 (S E Q I D N O : 3 8) を用いた # 5 (g)。一方、表 3 a および 3 b に示されるその他のペプチドは、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、それらのペプチドでの刺激では、特異的な C T L 活性を測定することができなかった。陰性データの典型例として、C L U A P 1 - A 0 2 - 9 - 5 8 (S E Q I D N O : 2 4) で刺激した C T L からは特異的 I F N - γ 産生が観察されなかった (h)。結果と

40

50

して、CLUAP1に由来する7種のペプチドが、強力なCTLを誘導することができるペプチドとしてスクリーニングされたことが示された。

【0192】

CLUAP1由来ペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

上記「材料および方法」の章に記載した通りに、CLUAP1-A02-9-34 (SEQ ID NO: 23) を用いたウェル番号#3 (a)、CLUAP1-A02-9-99 (SEQ ID NO: 30) を用いた#6 (b)、CLUAP1-A02-10-153 (SEQ ID NO: 33) を用いた#2 (c)、CLUAP1-A02-10-85 (SEQ ID NO: 34) を用いた#3 (d)、CLUAP1-A02-10-34 (SEQ ID NO: 35) を用いた#2 (e)、およびCLUAP1-A02-10-33 (SEQ ID NO: 36) を用いた#2 (f) において、IFN- γ ELISPOTアッセイにより検出されるペプチド特異的CTL活性を示した細胞を増殖させ、限界希釈によってCTL株を樹立した。これらのCTL株のCTL活性をIFN- γ ELISAアッセイによって測定した (図6a~f)。これらのCTL株は、ペプチドを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- γ 産生を示した。さらに、「材料および方法」に記載した通りに、CTL株から限界希釈によってCTLクローンを樹立し、ペプチドをパルスした標的細胞に対するCTLクローンからのIFN- γ 産生をIFN- γ ELISAアッセイによって測定した。CLUAP1-A02-9-34 (SEQ ID NO: 23) (a)、CLUAP1-A02-9-99 (SEQ ID NO: 30) (b)、CLUAP1-A02-10-153 (SEQ ID NO: 33) (c)、およびCLUAP1-A02-10-85 (SEQ ID NO: 34) (d) で刺激したCTLクローンから強力なIFN- γ 産生が測定された (図7a~d)。

【0193】

CLUAP1およびHLA-A*0201を外因的に発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

各ペプチドに対して産生された樹立CTL株およびクローンを、CLUAP1およびHLA-A*0201分子を内因的に発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長CLUAP1およびHLA-A*0201遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞 (CLUAP1およびHLA-A*0201遺伝子を外因的に発現する標的細胞の特異的モデル) に対する特異的CTL活性を、対応するペプチドによって産生されたCTL株およびクローンをを用いて試験した。全長CLUAP1またはHLA-A*0201のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。

【0194】

図8において、CLUAP1-A02-9-99 (SEQ ID NO: 30) (a)、CLUAP1-A02-10-153 (SEQ ID NO: 33) (b)、CLUAP1-A02-10-85 (SEQ ID NO: 34) (c)、およびCLUAP1-A02-10-33 (SEQ ID NO: 36) (d) で刺激したCTL株は、CLUAP1およびHLA-A*0201の両方を発現する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、これらのデータにより、CLUAP1-A02-9-99 (SEQ ID NO: 30) (a)、CLUAP1-A02-10-153 (SEQ ID NO: 33) (b)、CLUAP1-A02-10-85 (SEQ ID NO: 34) (c)、およびCLUAP1-A02-10-33 (SEQ ID NO: 36) (d) の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で発現され、CTLによって認識されることが明確に実証された。これらの結果は、CLUAP1を発現する腫瘍を有する患者に対するがんワクチンに適用するために、CLUAP1由来のこれらのペプチドが利用可能であり得ることを示した。

【0195】

抗原ペプチドの相同性解析

10

20

30

40

50

CLUAP1 - A02 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23)、CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33)、CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34)、CLUAP1 - A02 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35)、CLUAP1 - A02 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36)、およびCLUAP1 - A02 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 38)で刺激したCTLは、有意かつ特異的なCTL活性を示した。この結果は、CLUAP1 - A02 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23)、CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33)、CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34)、CLUAP1 - A02 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35)、CLUAP1 - A02 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36)、およびCLUAP1 - A02 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 38)の配列が、ヒト免疫系を感作することが知られている他の分子に由来するペプチドと相同的であるという事実

10

に起因する可能性がある。

【0196】

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のペプチド配列に対して相同性解析を行ったが、有意な相同性を有する配列は認められなかった。この相同性解析の結果は、CLUAP1 - A02 - 9 - 34 (SEQ ID NO: 23)、CLUAP1 - A02 - 9 - 99 (SEQ ID NO: 30)、CLUAP1 - A02 - 10 - 153 (SEQ ID NO: 33)、CLUAP1 - A02 - 10 - 85 (SEQ ID NO: 34)、CLUAP1 - A02 - 10 - 34 (SEQ ID NO: 35)、CLUAP1 - A02 - 10 - 33 (SEQ ID NO: 36)、およびCLUAP1 - A02 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 38)の配列が固有であること、およびしたがって、本発明者らの知る限りでは、これらの分子が、ある非関連分子に対して意図しない免疫学的応答を引き起こす可能性はほとんどないことを示している。

20

【0197】

結論として、本発明者らは、CLUAP1に由来する新規HLA - A * 0201エピートープペプチドを同定した。さらに、CLUAP1のエピートープペプチドががん免疫療法に適用可能であり得ることが実証された。

30

【0198】

産業上の利用可能性

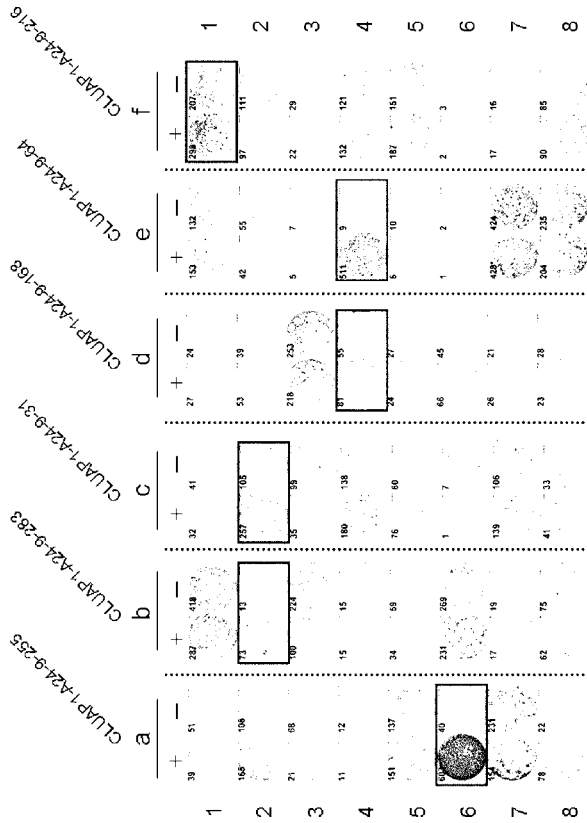
本発明は、新規TAA、特に、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し得、かつ広範ながんの種類に対する適用性を有する、CLUAP1由来の新規TAAを提供する。このようなTAAは、CLUAP1に関連した疾患、例えばがん、より詳細には乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、浸潤型胃癌、リンパ腫、神経芽細胞腫、脾癌に対するペプチドワクチンとして有用であり得る。

【0199】

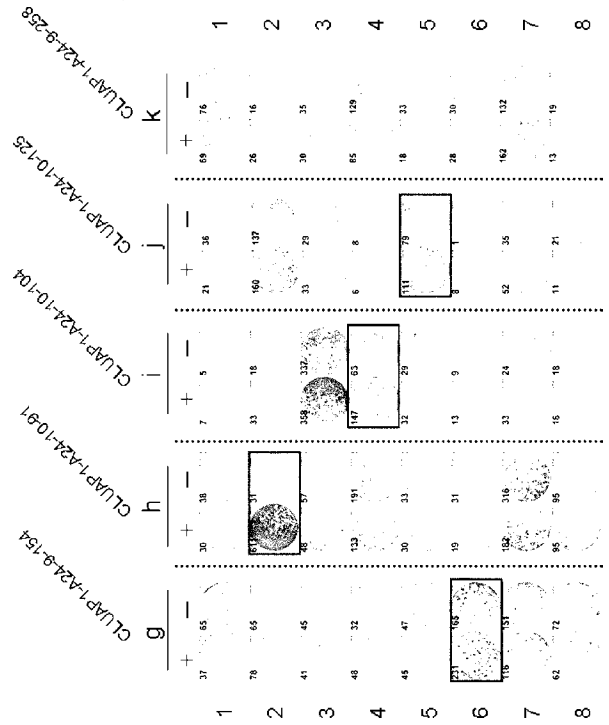
本明細書において、本発明をその特定の態様に関して詳細に説明しているが、前述の説明は本質的に例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。慣例的な実験を通して、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変がその中でなされ得ることを容易に認識すると考えられ、その境界は、添付の特許請求の範囲によって規定される。

40

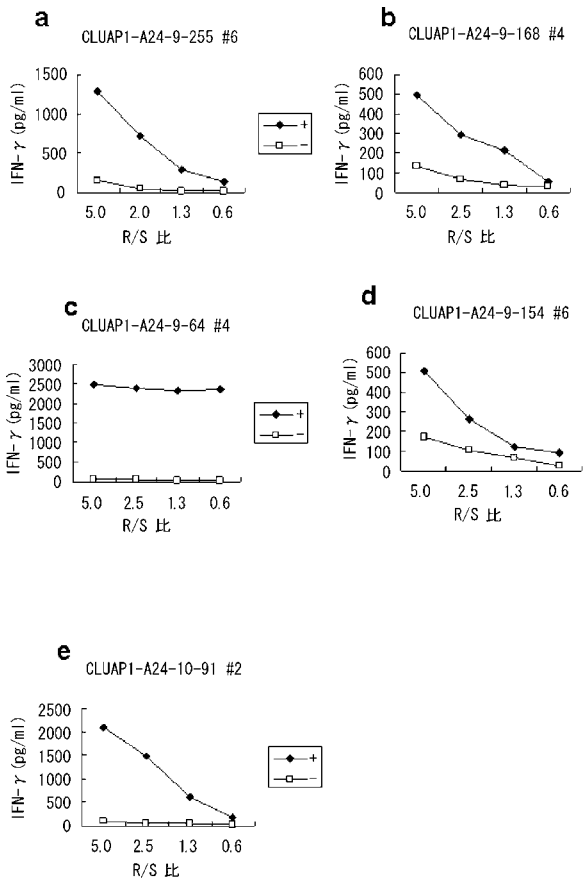
【図 1 a - f】



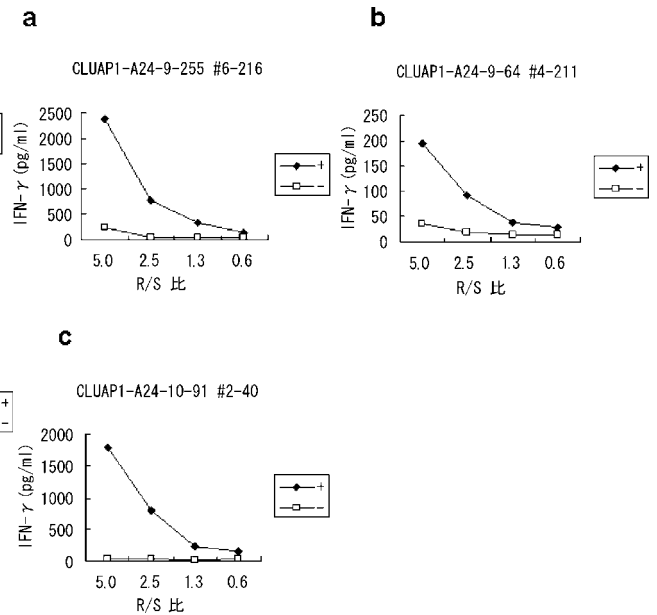
【図 1 g - k】



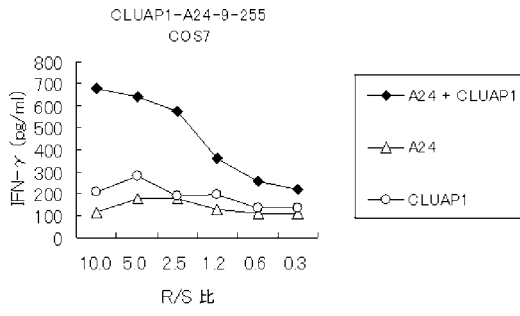
【図 2】



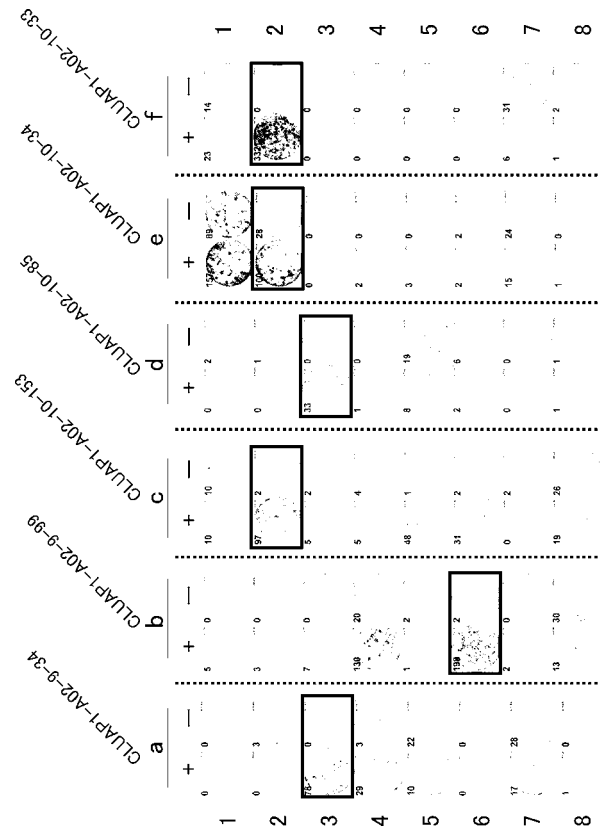
【図 3】



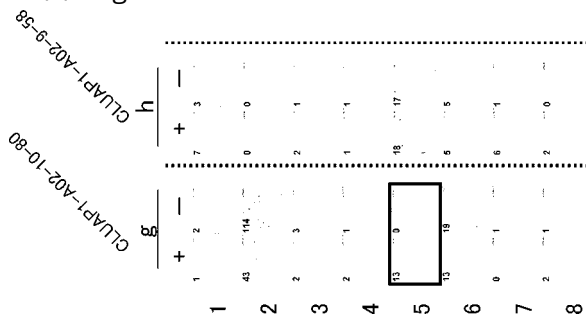
【図 4】



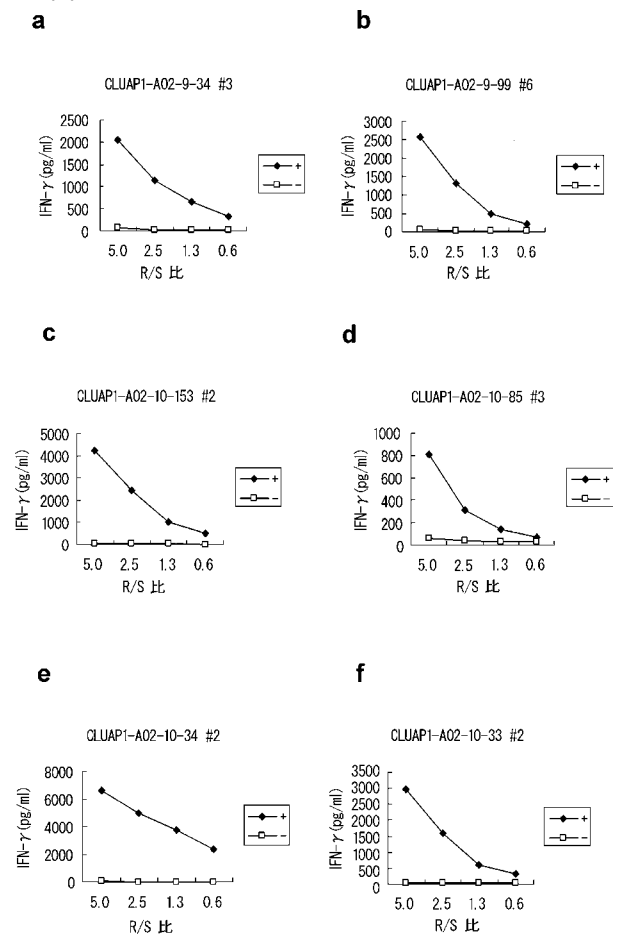
【図 5 a - f】



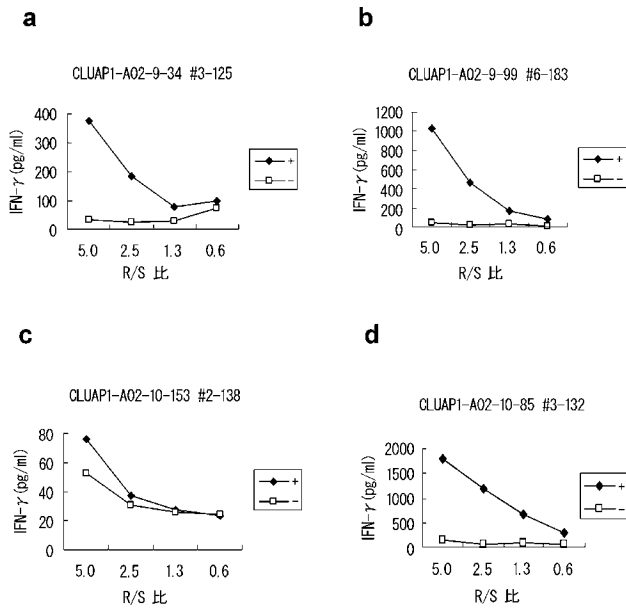
【図 5 g - h】



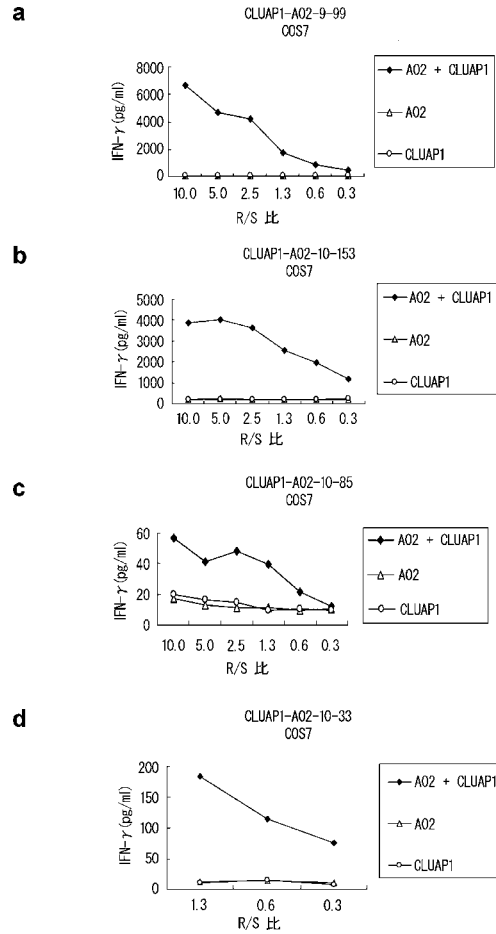
【図 6】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配 列 表 】

2013523083000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/006313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. C07K7/06, A61K39/00, A61P35/00, C07K14/705, C07K16/00, C12N5/10, C12N15/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2011 Registered utility model specifications of Japan 1996-2011 Published registered utility model applications of Japan 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ISHIKURA H. et al., Identification of CLUAP1 as a human osteosarcoma tumor-associated antigen recognized by the humoral immune system., Int. J. Oncol., 2007, vol.30, no.2, p.461-467	1-11,14-17,19-23
Y	TAKAHASHI M. et al., Isolation and characterization of a novel gene CLUAP1 whose expression is frequently upregulated in colon cancer., Oncogene, 2004, vol.23, no.57, p.9289-9294	1-11,14-17,19-23
Y	WO 2004/024766 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2004.03.25, & US 2006/0216301 A1 & US 2010/0215676 A & US 2009/0252752 A1 & EP 1548032 A1	1-11,14-17,19-23
Y	WO 2009/150835 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.12.17, (No Family)	1-11,14-17,19-23
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11.01.2011		Date of mailing of the international search report 25.01.2011
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer FUKUMA Nobuko Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448
		4B 3539

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/006313

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 12,13,18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 12,13,18 relates to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, which does not require an intentional search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and [Rule 39.1(iv)].
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/006313

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/06(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
C07K14/705(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
C12N15/00(2006.01)i

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 J	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	

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

(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 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(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
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人 東京大学内

(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

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA80 CA01 GA11 HA01
4B065 AA90X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA44 CA45
4C084 AA13 NA14 ZB262
4C085 AA03 BB01 CC32 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 BA15 DA86 EA20 FA74

专利名称(译)	CLUAP 1肽和包含其的疫苗		
公开(公告)号	JP2013523083A	公开(公告)日	2013-06-17
申请号	JP2012544968	申请日	2010-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	中村祐輔 角田卓也 大沢龍司 吉村祥子 渡辺朝久		
发明人	中村 祐輔 角田 卓也 大沢 龍司 吉村 祥子 渡辺 朝久		
IPC分类号	C12N15/09 C07K7/06 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/078 A61K39/00 A61K48/00 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0011 A61P35/00 C07K14/4748 G01N2333/47 G01N2333/775		
FI分类号	C12N15/00.A C07K7/06.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.202.J A61K39/00 A61K48/00 A61P35/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA15 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡辺真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/322099 2010-04-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本说明书描述了针对癌症的肽疫苗。特别地，它提供了衍生自CLUAP1基因的表位肽，其诱导CTL。还提供了靶向这些肽的抗原呈递细胞和分离的CTL，以及衍生所述抗原呈递细胞或CTL的方法。本发明进一步提供药物组合物，其包含衍生自CLUAP1的肽或编码该肽的多核苷酸作为活性成分。本发明涉及一种用于从CLUAP1，编码所述肽的多核苷酸衍生出的治疗和/或预防癌症（肿瘤），和/或方法用于预防术后复发的，以及肽的方法，或者，使用呈递肽的抗原呈递细胞或本发明的药物组合物，诱导CTL的方法和诱导抗癌免疫的方法。

察された症例の比

癌／腫瘍	比
乳癌	17/77
子宮頸癌	15/19
結腸直腸癌	12/19
食道癌	12/19
胃癌	7/25
浸潤型胃癌	5/5
リンパ腫	5/18
神経芽細胞腫	2/16
膀胱癌	4/9