

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-515742
(P2018-515742A)

(43) 公表日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A P 2 G O 4 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C O 8 4
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-558088 (P2016-558088)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月4日 (2016.3.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年12月27日 (2016.12.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/020987
 (87) 国際公開番号 W02016/153761
 (87) 国際公開日 平成28年9月29日 (2016.9.29)
 (31) 優先権主張番号 14/985,303
 (32) 優先日 平成27年12月30日 (2015.12.30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 14/658,095
 (32) 優先日 平成27年3月13日 (2015.3.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US15/20613
 (32) 優先日 平成27年3月13日 (2015.3.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516276236
 ブライアン ジェイ ツェルニキ
 CZERNIECKI, Brian,
 J.
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
 8033 ハッドンフィールド チューズ
 ランディング ロード 77
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100181272
 弁理士 神 絢一郎
 (74) 代理人 100193437
 弁理士 高木 義和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌のCD4 + Tヘルパー1型応答の監視方法および免疫回復

(57) 【要約】

癌を発症した、またはおそれのある哺乳動物被験体を診断または治療するための方法であって：前記被験体の血液試料由来の抗原提示細胞 (APC) またはその前駆体及びCD4 + T細胞から、インターフェロン - (IFN -) の分泌を引き起こす循環抗癌CD4 + Th1 応答を生成するステップ；及び前記抗癌CD4 + Th1 応答を検出して前記応答が抑制されたかを決定するステップ；を含む方法。HER2 特異的CD4 + のTh1 免疫応答の回復を、その必要のあるHER2 陽性乳癌患者において行う方法であって：前記患者の抗HER2 CD4 + Th1 応答を上昇させるために、免疫原性HER2 MHCクラスII 結合ペプチドをパルスした自己DC を含有する治療的有効量のDC ワクチンを前記患者に投与 (DC ワクチン接種) するステップ；及び前記応答の増加量を決定するために、前記患者のDC ワクチン接種前後の前記抗HER2 CD4 + Th1 応答を測定するステップ；を含む方法。

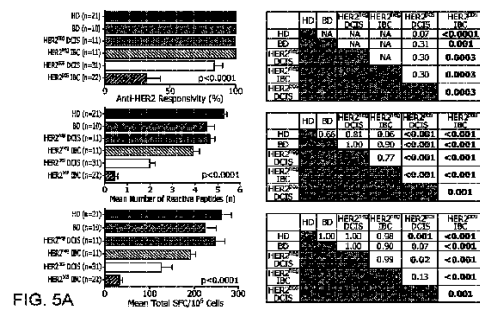


FIG. 5A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を発症した、またはおそれのある哺乳動物被験体を診断または治療するための方法であって：

前記被験体の血液試料由来の抗原提示細胞（APC）またはその前駆体及びCD4⁺T細胞から、インターフェロン-（IFN-）の分泌を引き起こす循環抗癌CD4⁺Th1応答を生成するステップ；及び

前記抗癌CD4⁺Th1応答を検出して前記応答が抑制されたかを決定するステップ；を含む方法。

【請求項 2】

10

前記生成ステップがさらに：

前記血液試料から非培養の末梢血単核細胞（PBMC）を単離するステップ；及び

前記PBMCおよびその中のAPC前駆体の単球を、前記被験体が罹患した癌の種類に基づく免疫原性MHCクラスII結合ペプチドを含む組成物でパルスし、それによって前記PBMCにおけるCD4⁺Th1細胞を活性化してIFN-を分泌させるステップ；を含み、ならびに

前記検出ステップが、前記分泌されたIFN-を検出するステップ；を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

20

前記生成ステップがさらに：

前記被験体試料由来の精製したCD4⁺T細胞を、前記被験体が罹患した癌の種類に基づく免疫原性MHCクラスII結合ペプチドを含む組成物でパルスした前記被験体試料由来のAPC、未成熟または成熟樹状細胞（DC）とともに共培養し、それにより、前記CD4⁺T細胞を活性化してIFN-を分泌するステップ；を含み、及び

前記検出ステップが前記分泌されたIFN-を検出するステップ；を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記癌が、乳癌、脳腫瘍、膀胱癌、食道癌、肺癌、膵臓癌、肝臓癌、前立腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、および胃癌から成る群から選択される、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記癌がHER2発現である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記癌がHER2陽性乳癌であり、前記被験体がヒト女性であり、そして前記免疫原性MHCクラスII結合ペプチドがHER2分子に基づく、請求項2に記載の方法。

【請求項 7】

前記癌がHER2陽性乳癌であり、前記被験体がヒト女性であり、そして前記免疫原性MHCクラスIIペプチドがHER2分子に基づく、請求項3に記載の方法。

【請求項 8】

40

前記組成物がさらに：

ペプチド42～56：HLDMLRHL YQG CQVV（配列番号：1）；

ペプチド98～114：RLRIVRGTQL FEDNYAL（配列番号：2）；

ペプチド328～345：TQRCEKCSKPCARVCYGL（配列番号：3）；

ペプチド776～790：GVGSPYVSRLLGICL（配列番号：4）；

ペプチド927～941：PAREIPDLL EKGERL（配列番号：5）；

およびペプチド1166～1180：TLERP K T L S P G K N G V（配列番号：6

）；

を含むHER2 MHCクラスII結合ペプチドを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

前記組成物がさらに：

50

ペプチド 42 ~ 56 : H L D M L R H L Y Q G C Q V V (配列番号 : 1) ;
 ペプチド 98 ~ 114 : R L R I V R G T Q L F E D N Y A L (配列番号 : 2) ;
 ペプチド 328 ~ 345 : T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L (配列番号 : 3) ;
 ペプチド 776 ~ 790 : G V G S P Y V S R L L G I C L (配列番号 : 4) ;
 ペプチド 927 ~ 941 : P A R E I P D L L E K G E R L (配列番号 : 5) ;
 およびペプチド 1166 ~ 1180 : T L E R P K T L S P G K N G V (配列番号 : 6) ;

を含む H E R 2 M H C クラス I I 結合ペプチドを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 I F N - の分泌が、I F N - 酵素結合免疫アッセイ (E L I S P O T) によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 11】

H E R 2 特異的 C D 4 + の T h 1 免疫応答の回復を、その必要のある H E R 2 陽性乳癌患者において行う方法であって：

前記患者の抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を上昇させるために、免疫原性 H E R 2 M H C クラス I I 結合ペプチドをパルスした自己 D C を含有する治療的有効量の D C ワクチンを前記患者に投与 (D C ワクチン接種) するステップ；及び

前記応答の増加量を決定するために請求項 8 に記載の方法に従って、前記患者の D C ワクチン接種前後の前記抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を測定するステップ；を含む方法。

20

【請求項 12】

H E R 2 特異的 C D 4 + の T h 1 免疫応答の回復を、その必要のある H E R 2 陽性乳癌患者において行う方法であって：

前記患者の抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を上昇させるために、免疫原性 H E R 2 M H C クラス I I 結合ペプチドをパルスした自己 D C を含有する治療的有効量の D C ワクチンを前記患者に投与 (D C ワクチン接種) するステップ；及び

前記応答の増加量を決定するために請求項 9 に記載の方法にしたがって、前記患者の D C ワクチン接種前後の前記抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を測定するステップ；を含む方法。

30

【請求項 13】

1 または複数の追加の時間間隔で、請求項 8 に記載の方法を行うことにより前記患者の D C ワクチン接種後の前記抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答の回復状態を測定して前記応答の回復を監視するステップをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

1 または複数の追加の時間間隔で、請求項 9 に記載の方法を行うことにより前記患者の D C ワクチン接種後の前記抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答の回復状態を測定して前記応答の回復を監視するステップをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

乳癌または他の癌のために個体をスクリーニングする方法であって：

請求項 1 に記載の方法に従って、前記個体の抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を検出して健常な個体と比較して前記応答が抑制されているかを判断するステップ；を含む方法。

40

【請求項 16】

乳癌またはその他の癌を発症するリスクのある個体をスクリーニングする方法であって：

請求項 1 に記載の方法に従って前記個体の抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を検出して健常な個体と比較して前記応答が抑制されているかを判断するステップ；を含む方法。

【請求項 17】

H E R 陽性乳癌患者が、化学療法及びトラスツズマブのような標準的な非免疫療法に十分に応答するかを予測する方法であって：

請求項 1 に記載の方法に従って、前記患者の抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を検出す

50

るステップ；を含む方法。

【請求項 18】

トラスツズマブ及び化学療法で治療された H E R 2 陽性侵襲性乳癌 (H E R 2 p o s - I B C) 患者における新しい乳房イベントを予測する方法であって：

請求項 1 に記載の方法に従って前記患者の前記抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答を測定して前記応答が抑制されたかを判断するステップ；を含む方法。

【請求項 19】

H E R 2 陽性乳癌患者において術前補助療法のトラスツズマブ及び化学療法 (T / C) 後の H E R 2 陽性乳癌の病理学的応答を予測する方法であって：

請求項 1 に記載の方法に従って、前記 T / C 治療後の前記患者における抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答の程度を測定して、前記応答が、術前補助療法の病理学的完全奏効 (術後の病理で残存浸潤性乳癌がない) と関連する有意に高い抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答であるか、又は非病理学的完全奏効に関連するより低い応答であるかを判断するステップ；を含む、方法。

10

【請求項 20】

前記患者における非病理学的完全奏効の場合には、前記患者の抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答が、請求項 11 の方法に従って、D C ワクチン接種によって回復される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

癌を有するまたは発症するリスクがある哺乳動物被験体を診断または治療するための方法であって：

20

前記被験体から血液を得るステップ；

その後抗癌 C D 4 + T h 1 応答の抑制を測定する血液検査を行うステップ、及び、抑制の場合には；

前記被験体に、D C ワクチン、トラスツズマブのような標的癌治療、化学療法のような従来の癌治療、外科手術及び放射線照射からなる群から選択される癌治療薬を有効量で投与するステップ；を含む、方法。

【請求項 22】

標的乳がん治療に加え化学療法を完了した後に前記癌の再発リスクを評価するために H E R 2 p o s I B C 患者を監視する方法であって、請求項 1 の方法に従って前記治療後の患者における抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答度を測定して、前記応答が前記癌の再発と相関する有意に抑制された抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答か又は非再発と相関するより高い抗 H E R 2 C D 4 + T h 1 応答かを決定するステップを含む、方法。

30

【請求項 23】

前記標的治療が、前記患者への薬剤トラスツズマブの投与を含む、請求項 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【優先権主張】

【0001】

この出願は 2014 年 3 月 14 日に提出された米国仮特許出願シリアル番号 61 / 953726 から優先権を主張し利益を得る。

40

【0002】

承認

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成金番号 R01CA096997 の下で部分的に政府の支援で開発された。政府は本発明において一定の権利を有する。

【技術分野】

【0003】

本発明の実施形態は、癌における免疫応答の進行性の喪失、特に、H E R 2 駆動乳癌における抗 H E R 2 / n e u C D 4 + T ヘルパー 1 型 (T h 1) 応答の損失及びその回復、ならびにそれに基づく診断監視方法、治療方法及びツールを対象とする。

50

【背景技術】

【0004】

乳がん（BC）は、世界中の癌関連死亡率の主因である。Jemal, A., et al., *Global Cancer Statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 61: 69 - 90 (2011) を参照。遺伝子発現符号の発達により、乳房腫瘍の少なくとも4つの広範な表現型：管腔A及びB、基底様、及びヒト上皮成長因子受容体2/neu (HER2^{pos}) が、現在認められている。Perou, CM., et al., *Nature* 406: 747 - 52 (2000) を参照。BCの約20～25%を含むいくつかの腫瘍タイプの分子オンコドライバーである、HER2の過剰発現 (Meric, F., et al., *J. Am Coll Surg.* 194: 488 - 501 (2002)) は、高悪性度の臨床経過、化学療法に対する耐性、及びBCにおける不十分な全体的な予後と関連している。Henson, E. S., *Clin. Can. Res.* 12: 845 - 53 (2006) (Henson, et al.) 及び Wang, G. S., *Mol. Med. Rep.* 6: (4): 779 - 82 (2012) (Wang, G. S et al.) を参照。初期のBCでは、HER2過剰発現は強化された侵襲性 (Roses, R. E., et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 18 (5): 1386 - 9 (2009))、腫瘍細胞の遊走 (Wolf-Yadlin, A., et al., *Molecular Systems Biology* 2: 54 (2006))、及び血管新生因子 (Wen, X. F., et al., *Oncogene* 25: 6986 - 96 (2006)) の発現と関連しており、腫瘍原生環境を促進することにおけるHER2の重要な役割を示唆している。化学療法との併用で、HER2標的療法（すなわち、ハーセプチン（登録商標）/トラスツズマブ）、は、HER2^{pos} BC患者において大幅に改善された生存率を有する (Piccart-Gebhart, M. J., et al., *N. Eng. J. Med.* 353: (16): 1659 - 72 (2005)) (Piccart-Gebhart et al.) けれども、患者のかなりの割合が、このような治療に耐性を持つようになる (Pohlmann, P. R., et al., *Clin. Can. Res.* 15: 7479 - 91 (2009) (Pohlman, et al.))。HER2標的療法に対する応答速度を向上させるための新たなアプローチと同様に、治療不全のリスクが高い患者のサブグループを同定する戦略が必要とされている。

【0005】

多くの証拠は、腫瘍微小環境における頑強な細胞性免疫応答がBC、特にHER2^{pos} サブタイプ、での改善された転帰に関連していることを示す。Alexe, G., et al., *Can. Res.* 67: 10669 - 76 (2007) を参照。そのために、これらの抗腫瘍効果の個々の免疫メディエーターを解明することに進歩が見られている。歴史的に、細胞傷害性CD8⁺Tリンパ球 (CTL) が、抗腫瘍免疫の主要なエフェクターであると考えられたが (Mahmoud, S. M., et al., *J. Clin. Oncol.* 29: 1949 - 55 (2011))、HER2駆動BCにおいてペプチドワクチンでCTL応答をブーストすると、最小限の臨床的影響をもたらした (Amin, A., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 57 (12): 1817 - 25 (2008))、おそらく、Bos, R., et al., *Cancer Res.* 70: 8368 - 77 (2010) によって報告されたように、CTLは適切なCD4⁺Tリンパ球の助けなしに準最適に機能するからである。CTLの発生及び持続のために重要であることに加えて、CD4⁺Tヘルパー (Th) 細胞は、直接細胞傷害性殺腫瘍活性、抗腫瘍サイトカイン応答の変調、および長期的な免疫記憶の増強を含む、他のメカニズムを通して抗腫瘍作用を媒介する (Cintolo, J. A., et al., *Future Oncol.* 8: 1273 - 99 (2012))。免疫グロブリンのクラススイッチを促進することによって、Th細胞はまた、体液性抗腫瘍免疫およびエフェクターB細胞応答に寄与する。Parker, D. C., et al., *Ann. Rev Immunol.* 11: 331 - 60 (1993) (Parker, et al.) を

参照。実際、腫瘍微小環境中のインターフェロン（IFN）- 産生CD4⁺Tヘルパー1型（Th1）細胞の浸潤は、BCにおける予後の改善と関連している。Gu-Trantien, C, et al., J. Clin. Inv. 123: 2873-92 (2013) を参照。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Henson, E. S., Clin. Can. Res. 12: 845-53 (2006) (「Henson, et al」)

【非特許文献2】Wang, G. S., Mol. Med. Rep. 6: 779-82 (2012)

10

【非特許文献3】Roses, R. E., et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev. 18(5): 1386-9 (2009)

【非特許文献4】Wolf-Yadlin, A., et al, Molecular Systems Biology 2: 54 (2006)

【非特許文献5】Wen, X. F., et al, Oncogene 25: 6986-96 (2006)

【非特許文献6】Piccart-Gebhart, M. J., et al, N. Eng. J. Med. 353: 1659-72 (2005)

【非特許文献7】Pohlmann, P. R., et al, Clin. Can. Res. 15: 7479-91 (2009)

20

【非特許文献8】Gu-Trantien, C, et al., J. Clin. Inv. 123: 2873-92 (2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

HER2駆動の乳房腫瘍形成における全身抗HER2 CD4⁺Th1応答の役割は、しかし、不明なままである。トラスツズマブと化学療法によるHER2標的治療に対する応答速度を改善するアプローチと同様に、治療不全のリスクが高い患者のサブグループを予測する戦略のための、満たされていない必要性が残っている。したがって、1つまたはそれ以上の本発明の実施形態は、本明細書で特定された問題の一つ以上に対処することを対象にする。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

ある広範な態様において、癌を発症した、またはおそれのある哺乳動物被験体を診断または治療するための方法であって：前記被験体の血液試料由来の抗原提示細胞（APC）またはその前駆体及びCD4⁺T細胞から、インターフェロン-（IFN-）の分泌を引き起こす循環抗腫瘍CD4⁺Th1応答を生成するステップ；及び前記抗腫瘍CD4⁺Th1応答を検出して前記応答が抑制されたかを決定するステップ；を含む方法が提供される。

40

【0009】

別の態様において、前記生成ステップがさらに：前記血液試料から非培養の末梢血単核細胞（PBMC）を単離するステップ；及び前記PBMCおよびその中のAPC前駆体の単球を、前記被験体が罹患した癌の種類に基づく免疫原性MHCクラスII結合ペプチドを含む組成物でパルスし、それによって前記PBMCにおけるCD4⁺Th1細胞を活性化してIFN-を分泌させるステップ；を含み、ならびに前記検出ステップが、前記分泌されたIFN-を検出するステップ；を含む。

【0010】

代替の態様において、前記生成ステップがさらに：前記被験体試料由来の精製したCD4⁺T細胞を、前記被験体が罹患した癌の種類に基づく免疫原性MHCクラスII結合ペ

50

プチドを含む組成物でパルスした前記被験体試料由来のAPC、未成熟または成熟樹状細胞(DC)とともに共培養し、それにより、前記CD4⁺T細胞を活性化してIFN- γ を分泌するステップ；を含み、前記検出ステップが前記分泌されたIFN- γ を検出するステップを含む。

【0011】

ほかの態様において、前記癌が、乳癌、脳腫瘍、膀胱癌、食道癌、肺癌、膵臓癌、肝臓癌、前立腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、および胃癌から成る群から選択される、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0012】

ほかの態様において、前記癌がHER2発現である。

10

【0013】

さらなる態様において、前記癌がHER2陽性乳癌であり、前記被験体がヒト女性であり、そして前記免疫原性MHCクラスII結合ペプチドがHER2分子に基づく。

【0014】

好ましい実施形態において、前記組成物がさらに：ペプチド42~56(配列番号：1)；ペプチド98~114(配列番号：2)；ペプチド328~345(配列番号：3)；ペプチド776~790(配列番号：4)；ペプチド927~941(配列番号：5)；およびペプチド1166~1180(配列番号：6)；を含むHER2 MHCクラスII結合ペプチドを含む。

【0015】

好ましい実施形態において、前記IFN- γ の産生が、IFN- γ 酵素結合免疫アッセイ(ELISPOT)によって測定される。

20

【0016】

ほかの態様において、HER2特異的CD4⁺のTh1免疫応答の回復を、その必要のあるHER2陽性乳癌患者において行う方法であって：前記患者の抗HER2 CD4⁺Th1応答を上昇させるために、免疫原性HER2 MHCクラスII結合ペプチドをパルスした自己DCを含有する治療的有効量のDCワクチンを前記患者に投与(DCワクチン接種)するステップ；及び前記応答の増加量を決定するために上記態様の生成及び検出ステップに従って、前記患者のDCワクチン接種前後の前記抗HER2 CD4⁺Th1応答を測定するステップ；を含む方法であって、前記回復を行う方法はさらに：1または複数の追加の時間間隔で、上記態様の生成及び検出ステップを行うことにより前記患者のDCワクチン接種後の前記抗HER2 CD4⁺Th1応答の回復状態を測定して前記応答の回復を監視するステップを含む、方法がある。

30

【0017】

ほかの態様において、乳癌または他の癌のために個体をスクリーニングする方法であって：上記態様の生成及び検出ステップに記載の方法に従って前記個体の抗HER2 CD4⁺Th1応答を検出して健常な個体と比較して前記応答が抑制されているかを判断するステップ；を含む方法がある。

【0018】

ほかの態様において、乳癌またはその他の癌を発症するリスクのある個体をスクリーニングする方法であって：上記態様の生成及び検出ステップに記載の方法に従って前記個体の抗HER2 CD4⁺Th1応答を検出して健常な個体と比較して前記応答が抑制されているかを判断するステップ；を含む方法がある。

40

【0019】

ほかの態様において、HER2陽性乳癌患者が、化学療法及びトラスツズマブのような標準的な非免疫療法に十分に応答するかを予測する方法であって：上記態様の生成及び検出ステップに記載の方法に従って、前記患者の抗HER2 CD4⁺Th1応答を検出するステップ；を含む方法がある。

【0020】

ほかの態様において、トラスツズマブ及び化学療法で治療されたHER2陽性侵襲性乳

50

癌 (HER2^{pos} - IBC) 患者における新しい乳房イベントを予測する方法であって：上記態様の生成及び検出ステップに記載の方法に従って、前記患者の前記抗HER2 CD4⁺Th1 応答を測定して前記応答が抑制されたかを判断するステップ；を含む方法がある。

【0021】

ほかの態様において、HER2 陽性乳癌患者において術前補助療法のトラスツズマブ及び化学療法 (T/C) 後のHER2 陽性乳癌の病理学的応答を予測する方法であって：上記態様の生成及び検出ステップに記載の方法に従って、前記T/C治療後の前記患者における抗HER2 CD4⁺Th1 応答の程度を測定して、前記応答が、術前補助療法の病理学的完全奏効 (術後の病理で残存浸潤性乳癌がない) と関連する有意に高い抗HER2 CD4⁺Th1 応答であるか、又は非病理学的完全奏効に関連するより低い応答であるかを判断するステップ；を含み、さらに、前記患者における非病理学的完全奏効の場合には、前記患者の抗HER2 CD4⁺Th1 応答が、DCワクチン接種によって回復される、方法がある。

10

【0022】

さらにほかの広範な態様において、癌を有するまたは発症するリスクがある哺乳動物被験体を診断または治療するための方法であって：前記被験体から血液を得るステップ；その後抗癌CD4⁺Th1 応答の抑制を測定する血液検査を行うステップ、及び、抑制の場合には；前記被験体にDCワクチン、トラスツズマブのような標的癌治療、化学療法のような従来の癌治療、外科手術及び放射線照射からなる群から選択される癌治療薬を有効量で投与するステップ；を含む、方法がある。

20

【0023】

ほかの態様において標的乳がん治療に加えて化学療法を完了した後に前記癌の再発リスクを評価するためにHER2^{pos} IBC患者を監視する方法であって、上記態様の生成及び検出ステップに記載の方法に従って、前記治療後の患者における抗HER2 CD4⁺Th1 応答度を測定して前記応答が前記癌の再発と相関する有意に抑制された抗HER2 CD4⁺Th1 応答か又は非再発と相関するより高い抗HER2 CD4⁺Th1 応答かを決定するステップを含む、方法がある。さらなる態様において、前記標的治療は、前記患者への薬剤トラスツズマブの投与を含む。

【0024】

例示的な実施形態のより良い理解のために、それらの他の及びさらなる特徴および利点とともに、参照は、添付の図面と併せて、以下の記載に言及し、そして請求される実施形態の範囲は、添付の特許請求の範囲において指摘されるであろう。

30

【0025】

添付の図面と併せて読むと、好ましい実施形態の以下の詳細な説明がより良く理解されるであろう。実施形態を説明するために、図面において示される現在好ましい実施例がある。しかしながら、好ましい実施形態は、図面に示された正確な配置および手段に限定されないことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、本明細書に記載の参考例研究に含まれる患者/ドナー群を示す階層図である。コホートをA~Hでラベルする。採血時と同様に、コホートG及びHの治療予定を、赤色のコールアウトボックスに示す。具体的には、T/C治療HER2^{pos} - IBCコホート (G) において、患者は術前補助T/C (続いて手術がある) 及び術後補助トラスツズマブの完了のいずれの治療も受けた：患者を手術 - 最初のアプローチが完了した術後補助T/Cのために選択した。術後補助トラスツズマブ療法の完了から6ヶ月未満又は6ヶ月以上のどちらかで採血を行った。

40

【図2】図2は、樹状細胞 (DC) ワクチン接種戦略を示す。患者の単球を最初に白血球搬出法及び水簸により、他の白血球細胞から分離する。これらの単球をその後、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 及びインターロイキン (IL) - 4 と共

50

に無血清培地 (SFM) で培養して未成熟樹状細胞 (IDC又はiDC) にする。これらの細胞をその後、6個のHER2 MHCクラスII結合ペプチドでパルスし、患者に注射して戻す前に完全なDC活性化を達成するためにインターフェロン (IFN) - 及びリポ多糖 (LPS) を加えて成熟及び活性化プロセスを完了した。Fracol, M., et al, Ann. Surg. Oncol. 20 (10) : 3233 (2013) を参照。HLA-A2pos患者の場合には、細胞の半分をMHCクラスI結合ペプチドでパルスし、他の半分を異なるMHCクラスI結合ペプチドでパルスした。

【図3】図3A及び図3Bは、ELISPOTのアッセイ間の精度を示すグラフである。図3Aの研究のために、3つの対応する同型培養を3日以上、ELISPOTアッセイにおいて、既知の様々な抗HER2反応性を有する (異なる記号で表される) 5人のドナー由来の試料について実施した。生体外でHER2細胞外ドメイン (ECD) ペプチドミックス ((ペプチド42~56 (配列番号: 1)、ペプチド98~114 (配列番号: 2)、及びペプチド328~345 (配列番号: 3))) で刺激したドナーを対象とした累積抗HER2 Th1応答 (平均SFC (スポット形成細胞) / 2×10^5 細胞) に対して、分散係数の平均 (CV平均) をプロットした。エラーバーは、複製物の標準偏差 (SD) を表す。図3Bは、アッセイ間の変動性の尺度として、各ドナー (異なる記号で表される) を対象とした累積Th1応答 (平均SFC / 2×10^5 細胞) に対してプロットした、別々の日の3個のアッセイの標準偏差 (SD) を示す。実線は、平行点線で示される回帰の95%信頼区間を伴う、生成されたSDの線形回帰を表す。

【図4】図4は、ELISPOTの直線性を示すグラフを示す。2人の高応答HER2反応性ドナー (ドナー#1、(三角形) とドナー#2、(円)) 由来の末梢血単核細胞 (PBMC) の3通りの試料をシリアル既知の同種異系非HER2応答者 (すべてのアッセイを対象として同じPBMCドナー) 由来のPBMCに連続的に希釈し、そしてHER2 ECDペプチド混合物 (ペプチド42~56 (配列番号: 1)、ペプチド98~114 (配列番号: 2)、及びペプチド328~345 (配列番号: 3)) を用いて生体外で刺激した。未刺激の背景は、ELISPOTアッセイにおける各希釈ポイントについて差し引いた。

【図5】図5A~5Dは、抗HER2 CD4⁺Th1応答およびIgG1/IgG4の反応がHER2^{pos}乳房腫瘍形成において進行的に失われていることを示す。図5Aは、全身のCD4⁺T細胞及び抗HER2 CD4⁺Th1応答のIFN-ELISPOT分析のヒストグラム (左のパネル) を示す; 患者群間での対応する事後シェフェp値の比較をヒストグラム (右パネル) と並んで示す。研究患者群は、HD (健康なドナー); BD (良性の乳房生検); HER2^{neg}DCIS; HER2^{neg}IBC (明確なHER2^{neg} (HER2、0および1+) 浸潤性乳癌); HER2^{pos}DCIS (インサイツHER2^{pos}の乳管癌); およびHER2^{pos}IBC (ステージI/II HER2^{pos}浸潤性乳癌) : であった。上のヒストグラムは全体の抗HER2応答 (100%) (1以上の反応性ペプチドに反応する患者の割合) を示す (抗HER2応答性とも呼ばれる)。中央のヒストグラムは、反応性ペプチドの平均数 (n) を示す (前記群の患者が全体として反応する、反応性ペプチドの平均数 (n)) (応答レパートリーとも呼ばれる); そして、下のヒストグラムは平均総SFC / 10^6 細胞 (各被験者群由来のすべての6個のMHCクラスII結合ペプチドからの反応性スポットの総和 (IFN-ELISPOT解析による 10^6 個の細胞あたりのスポット形成細胞SFC) を示す (累積応答とも呼ばれる) (すべての分散分析で $p < 0.001$)。抗HER2応答性、応答レパートリー、および累積応答によって評価した場合、HER2^{pos}乳房腫瘍形成におけるCD4⁺Th1応答の進行性の喪失が示されている (すなわち、HD/BD HER2^{pos}-DCIS HER2^{pos}-IBC)。Th1応答の差異はHER2^{neg}-DCIS及びHER2^{neg}-IBC (IHC0/1+) ならびにHD/BDの被験者の間で見られなかった。図5Bは、T/C治療したHER2^{pos}-IBC患者群を加えた (T/Cは、トラスツズマブ及び化学療法を意味する)、図5Aと同様のそれぞれの患者群におけるELISPOTによるIFN-産生 (累積応答 (平均総SFC / 2

10

20

30

40

50

$\times 10^5$ 細胞))を示す。結果を、箱ひげ図において 2×10^5 細胞あたりの中央値 \pm 四分位範囲(IQR)IFN-SFCとして提示する。図5Cは、ドナーの年齢によって層別化した(50歳未満V.50歳以上)HD/BDにおける抗HER2Th1累積応答の変動のヒストグラム(左上のパネル)、閉経状態(閉経前V.閉経後)(右上のパネル)、人種(白人V.他)(左下パネル)および妊娠回数(ゼロV.>1妊娠)(右下パネル)それぞれのTh1内で、結果は割合または平均値(\pm SEM)として表現される。図5Dは、組換えHER2ECDペプチドに対する血清反応性のELISAの結果を示す。ELISA測定値を1:100の血清希釈液で光学密度(OD)として示す(水平直線が平均ODを示す、グループ化された散布図)。抗HER2のIgG1抗体レベル(上のパネル)及び抗HER2IgG4の抗体レベル(下のパネル)を、HD(円/左)、HER2^{pos}-DCIS(四角/中央)、およびHER2^{pos}-IBC(三角/右)患者で測定した(* * *適用可能な場合は事後シェフェテストを伴う独立t検定または分散分析により $p < 0.001$)。有意に上昇した抗HER2IgG1およびIgG4の抗体レベルは、HDと比較してHER2^{pos}-IBC患者に存在し、HER2^{pos}-DCIS患者では減衰した。

【図6】図6はHER2^{pos}乳房腫瘍形成における累積CD4⁺Th1免疫に対する個々のHER2ペプチドの寄与が、HD(健康なドナー);BD(良性の乳房生検);HER2^{neg}-DCIS;HER2^{neg}-IBC(明確なHER2^{neg}(HER2、0および1+)浸潤性乳癌);HER2^{pos}-DCIS(インサイツHER2^{pos}の乳管癌);及び、HER2^{pos}-IBC(ステージI/II HER2^{pos}浸潤性乳癌)の患者にとって、免疫彫刻(immune sculpting)を反映するものではない。HER2細胞外ドメイン(ECD)-制限ペプチドおよび細胞内ドメイン(ICD)-制限ペプチドを使用した。Th1反応性プロファイルは、ECDペプチド42~56(ECDp42~56)(配列番号:1)(左上)、ECDペプチド98~114(ECDp98~114)(配列番号:2)(中央左)及びECDペプチド328~345(ECDp328~345)(配列番号:3)(左下)に対して、ならびにICDペプチド776~790(ICDp776~790)(配列番号:4)(右上)、ICDペプチド927~941(ICDp927~941)(配列番号:5)(右中央)及びICDペプチド1166~1180(ICDp1166~1180)(配列番号:6)(右下)に対して示される。個々のペプチド特異的な応答は、ELISPOTにより 2×10^5 のPBMCあたりの平均IFN-SFCとして示される。Th1反応性プロファイルは、HER2^{pos}乳房腫瘍形成における(分散分析により、すべて $p < 0.005$)連続体全体で(HD BD HER2^{neg}-DCIS HER2^{neg}-IBC HER2^{pos}-DCIS HER2^{pos}-IBC)抗HER2Th1免疫における有意な段階的な減衰を示す。結果を平均値 \pm SEMとして表す。

【図7】図7は、ドナー抗HER2Th1応答における最小限の時間的な変動を示す。少なくとも6ヶ月離れて得られた血液サンプルから生成したドナーをマッチさせた抗HER2Th1累積応答(左パネル)および応答レパートリー(右パネル)を、対になったHD(緑の三角形;n=4)及び未治療HER2^{pos}-IBC被験者(青い四角、n=4)のためにプロットした。最小限のドナー内Th1応答の変動が、HDおよび未治療HER2^{pos}-IBC被験者の両方で時間と共に観察された(全て、 $p = NS$)。

【図8】図8A-8EはHER2^{pos}-IBCにおける抗HER2Th1の欠乏が免疫能の欠如または免疫抑制表現型の増加に起因せず、しかし、IFN- γ :IL-10-産生表現型における機能的なシフトに関連することを示す。図8Aは、IFN-ELISPOTで破傷風トキソイドまたはカンジダ・アルピカンスの刺激をリコールする累積Th1応答を(平均総SFC/ 10^5 細胞)を測定することによる、IFN- γ 産生を示す。結果を、箱髭図で 2×10^5 個の細胞あたりIFN-SFC中央値 \pm 四分位範囲(IQR)として提示する。未治療およびT/C治療済みの両方の、HER2^{pos}-IBC患者由来のPBMCは、HDのものとは有意差が認められなかった。図8Bの上のパネルは、免疫表現型を決定するために、HD、HER2^{pos}-IBC(ステージI/II)及び

10

20

30

40

50

HER2^{pos}-IBCs/pT/C (T/C治療した患者)由来のPBMCを用いた代表的なフローサイトメトリ染色を示す。CD4⁺(CD3⁺CD4⁺) (上の染色)又はCD8⁺(CD3⁺CD8⁺) T細胞(下の染色)の相対的な割合を下ヒストグラムに図示して表現し、その下のヒストグラムはそれぞれ、患者群: HD(暗いバー)、ステージI/II HER2^{pos}-IBC(中間のバー)およびHER2^{pos}-IBCのs/pT/C(明るいバー)を対象としたCD4⁺(CD3⁺CD4⁺) T細胞(左)およびCD8⁺(CD3⁺CD8⁺) T細胞(右)の相対的な割合を示す。未治療およびT/C治療後の両方の、HER2^{pos}-IBC患者由来のPBMCは、HDのものとは有意差は認められなかった。図8Cの上のパネルは、それらの免疫表現型を決定するために、HD、HER2^{pos}-IBC(ステージI/II)及びHER2^{pos}-IBCs/pT/C由来のPBMCを使用する代表的なフローサイトメトリ染色を示す。制御性T細胞(Treg: CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (上の染色)及び骨髄由来のサブレッサー細胞(「MDS C」; CD11b⁺CD33⁺HLA-DR-CD83⁻) (下の染色)の相対的な割合を下ヒストグラムに図示して表現し、その下のヒストグラムはそれぞれ、患者群: HD(暗いバー)、ステージI/II HER2^{pos}-IBC(中間のバー)およびHER2^{pos}-IBCのs/pT/C(明るいバー)を対象とした制御性T細胞(Treg: CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (左)及び骨髄由来のサブレッサー細胞(「MDS C」; CD11b⁺CD33⁺HLA-DR-CD83⁻) (右)の相対的な割合を示す。未治療およびT/C治療の両方の、HER2^{pos}-IBC患者由来のPBMCは、HDのものとは有意差は認められなかった。図8Dは、循環HER2特異的IL-10産生が患者群の間で差がないことを示す。未治療(HER2^{pos}-IBC)およびT/C治療を受けた(HER2^{pos}-IBCs/pT/C)の両方の、HER2^{pos}-IBC患者由来のPBMCは、全体的な抗HER2応答性(上)、レパトリー(中央)、および累積応答(下)によって評価された、ELISPOTを介した抗HER2 IL-10産生においてHDと有意差はなかった。結果を割合又は平均値±SEMとして表現する。図8EはHER2^{pos}乳房腫瘍形成における相対的なHER2特異的IFN- γ およびIL-10産生を示す。HD、HER2^{pos}-IBC(未治療)、およびHER2^{pos}-IBCs/pT/C(T/C治療)患者における6個のHER2 HER2クラスIIペプチド全体でドナーをマッチさせた累積IFN- γ 産生およびIL-10産生(SFC/10⁶細胞)を比較した。棒グラフは、HER2抗原特異的反応(上のパネル)およびポジティブコントロール(CD3またはCD8/28)(下のパネル)のための患者群;(IFN- γ 産生(緑); IL-10産生(赤))全体で、SFCの寄与の割合を介してIL-10に対するHER2特異的IFN- γ の相対的な割合を示す(グラフに%で示されている)。IL-10に対する相対的なHER2特異的IFN- γ の割合は、HDからT/C治療の有無にかかわらずHER2^{pos}-IBC患者へ有意に減少した。IFN- γ : IL-10産生比率の絶対値は6.6:1(HD)から0.97:1(T/C治療)及び0.74:1(HER2^{pos}-IBC)へ、それぞれ変化した(上のパネル)。IFN- γ : IL-10産生の有意な相対的なシフトはポジティブコントロール(抗CD3/抗CD3/CD28)(下のパネル)に対して認められなかった。

【図9】図9A-9Bは、抗HER2 CD4⁺TH1サブセットにおける全身性の損失がHER2^{pos}乳房病変における不均衡な腫瘍周囲のTリンパ球輸送とは関係ないことを示す。図9Aは、HER2^{pos}-DCIS病変(上)及びHER2^{pos}-IBC腫瘍(下)由来の組織サンプルの代表的なヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色の2つの写真を示す(倍率バー25 μ m)。矢印は、免疫組織化学染色によるHER2^{pos}-DCIS病変(上)と比較して、HER2^{pos}-IBC腫瘍の腫瘍周囲の間質(下)で観察されたリンパ球浸潤の相対的な不足を指す。評価可能なHER2^{pos}-DCIS(n=14)及びHER2^{pos}-IBC(n=8)における間質性リンパ球浸潤は、隣接するテーブル内の低い(15%未満の関与)、中等度(15~24%)及び高い(25%以上)として定量化される。図9Bは、代表的なHER2^{pos}-DCIS(左)及びHER2^{pos}-IBC(右)病変における多重標識免疫蛍光の結果の4つの写真を示す。

CD4⁺T細胞（緑色シグナル）の著しい不足が5/5（100%）のHER2^{pos}-IBC腫瘍において観察され、そこで優勢な浸潤性および間質性リンパ球浸潤は、CD8⁺（黄信号）である。比較すると、CD4⁺T細胞の浸潤は、主にDCISを含有するダクト（4/4腫瘍）で見られた。代表的なHER2^{pos}-DCIS及びIBC病変が示され；多重標識された画像は、上記対応するH&E切片（倍率バー25μm）に示される。

【図10】図10A~10Dは、HER2^{low}ではなく、HER2^{high}のヒトおよびマウス乳癌細胞のCD4⁺Th1誘導アポトーシスを示す。図10Aは、切断されたカスパーゼ-3の検出のためのウエスタンブロット分析の写真の結果（上のパネル）を示す。SK-BR-3細胞を：レーン1）-完全な培地単独（完全培地）；レーン2）-10⁶ CD4⁺T細胞のみ（CD4⁺のみ）；レーン3および4）-10⁶ CD4⁺T細胞に加えて10⁵ HER2 Class IIペプチド（iDC H）-または無関係なClass II BRAFペプチド（iDC B）-、それぞれをパルスした未成熟DC（iDC）；レーン5および6）-10⁶ CD4⁺T細胞に加えて10⁵のHER2（DC1 H）-又はBRAF（DC1 B）-、それぞれをパルスしたDCIS；レーン7）-CD4⁺10⁶のDC1 H10⁵+IFN- & TNF- 中性抗体及びレーン8）-CD4⁺10⁶のDC1 H10⁵+IgGアイソタイプコントロール抗体：と共培養した。DC1 B、iDC H、またはiDC B群ではなく、DC1 H：CD4⁺T細胞と共培養したとき、増加したカスパーゼ3の切断は、SK-BR-3細胞の用量依存性のアポトーシスを示した。ピンキュリンを、ローディングコントロールとして使用した。表示されたウエスタンブロットは、3回の実験の代表である。中央のパネルのバーグラフ（赤いバー）は、上のパネルのウエスタンブロットレーン1~6に対応する、アポトーシスの誘導倍率を示す平均カスパーゼ-3/ピンキュリン比±SEMとして表現した結果を示す（Image Jソフトウェアを用いて定量化した）。右の棒グラフで（黒いバー）（上のパネルのウエスタンブロットレーン7-8に対応）、バーは、3つの実験に亘るアポトーシス/平均カスパーゼ3/ピンキュリン比±SEM（31.4±5.3%IFN-/TNF- 中和対コントロール）の救出%を表す。IgGアイソタイプコントロールと比較して、CD4⁺：DC1 H-誘導SK-BR-3アポトーシスをIFN- およびTNF- を中和することによって大幅に救出した。下のパネルは、ELISAによる、それぞれの共培養におけるIFN-（左y軸）（無地のバー）およびTNF-（右y軸）（裏地のバー）の対応する産生を示す。結果は、3回の実験を代表するものであり、pg/mlで表現される。図10Bは、「CD4⁺のみ」、「CD4⁺+DC1 B」、「および「CD4⁺+DC1 H」細胞群の細胞の写真を示す。アポトーシス細胞をDAPI染色により明らかにした。CD4⁺+DC1 H群では、CD4⁺+DC1 BまたはCD4⁺のみの群と比較したとき、より多くのアポトーシス細胞（アスタリスク）を観察した。棒グラフ（右）は、視覚的な結果と相関するCD4⁺+DC1 H群を対象としたアポトーシスの25倍の増加と共に、描写された3つの細胞群のためのアポトーシス細胞のアポトーシス細胞%（誘導倍率）を示す。結果は3回の実験を代表するものであり、平均値アポトーシス細胞%±SEMとして表した。図10Cは、HER2^{high} SK-BR-3、HER2^{intermediate} MCF-7、およびHER2^{low} MDA-MB-231ヒトBC細胞が一律にIFN- RαおよびTNF- R1受容体の発現を維持したウエスタンブロット分析の結果である写真を示す。ピンキュリンを、ローディングコントロールとして使用した。図10DはトランスジェニックマウスHER2^{high}乳癌TUBO（上のグラフ）及びMMC15（HER2^{high}）細胞（中央のグラフ）において、組換えマウス（rm）Th1サイトカインrmIFN- 及びrmTNF- との併用治療が、未治療の対照（no Rx）又はいずれかのサイトカインを単独で用いた治療と比較して、有意に高いアポトーシスをもたらしたことを示した。この効果は、マウスHER2^{low}/neg細胞4T1（下のグラフ）における二重のrmIFN- +rmTNF- 治療で再現されなかった。結果は3回の実験を代表するものであり、フローサイトメトリーによるPI^{pos}/Annexin V^{pos}細

胞の割合によって検出された、平均アポトーシス細胞% ± SEMとして表した (* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001)。

【図11】図11A~11CはHER2^{low}でなく、HER2^{high}ヒトBC細胞がTh1産生サイトカインIFN- およびTNF- によってCD4⁺Th1媒介アポトーシスに感受性が高いことを示す。図11A(上パネル)は、切断されたカスパーゼ-3の検出のためのウエスタンブロット分析の写真的結果を示す。トランスウェルシステムを使用して、50×10³ MCF-7(HER2^{intermediate})及び50×10³ MDA-MB-231(HER2^{low})細胞を、培地単独(完全培地)、10⁶ CD4⁺T細胞単独(CD4⁺のみ)、及び10⁶ CD4⁺T細胞に、10⁵のHER2(DC1H)-またはBRAFコントロール(DC1B)の各々をパルスしたDC1と共培養した。ウエスタンブロットにおいて示された以下の対応する棒グラフ(下のパネル)で表されたカスパーゼ3の切断は、DC1H:CD4⁺T細胞と共培養したとき、MDA-MB-231細胞(右のパネル)でなく、MCF-7(左のパネル)の増加したアポトーシスを示した。ピンキュリンを、ローディングコントロールとして使用した。表示されたウエスタンブロットは、3回の実験を代表するものであり、結果は平均カスパーゼ3/ピンキュリン比±SEMとして表現した(アポトーシスの誘導倍率を示す)。図11Bは、図10Aの次の処理条件([完全培地単独; 10⁶ CD4⁺T細胞単独(CD4⁺のみ); CD4⁺T細胞に加えて、HER2-パルスiDC(iDCH); CD4⁺T細胞に加えてBRAF-パルスiDC(iDCB); CD4⁺T細胞に加えて10⁵ HER2-パルスDC1(DC1H); およびCD4⁺T細胞に加えて10⁵ BRAF-パルスDC1(DC1B)]を50×10³ SK-BR-3細胞と共培養した。)由来の上清とSK-BR-3細胞を共培養したウエスタンブロットの結果を示す。DC1B, iDCH, iDCB, またはCD4⁺のみの群と比較して、DC1H:CD4⁺群は比較的高い切断されたカスパーゼ3レベルが検出された。結果は3回の実験を代表するものである。図11Cは、培養SK-BR-3(左)、MCF-7(中央)、及びMDA-MB-231細胞(右)を示された量のTNF- およびIFN- と培養した、切断されたカスパーゼ-3の検出のためのウエスタンブロットの結果の写真(上パネル)を示す。下のパネルのバーグラフのバーが上のパネルに表示されたウエスタンブロットのレーンに対応する。Th1サイトカインIFN- 及びTNF- との併用治療は、未処理の対照と比較して、SK-BR-3(HER2^{high}; 10ng/mLのTNF- + 100U/mLのIFN-)及びMCF-7(HER2^{intermediate}; 100ng/mL TNF- + 1000U/mL IFN-)細胞により大きなアポトーシスをもたらした。MDA-MB-231細胞(HER2^{low}; 200ng/mL TNF- + 2000U/mL IFN-)は、二重のIFN- + TNF- 処理により大部分は影響を受けないうまだった。結果は、3回の実験を代表するものである。(* P < 0.05、** P < 0.001)。

【図12】図12A-12Eは、抗HER2 CD4⁺Th1免疫がHER2標的療法ではなく、HER2パルスDC1ワクチン接種後に差動的に回復することを示す。図12Aは、全体的な抗HER2応答性(上)、応答レパートリー(中央)、及び累積応答(下)によって評価した、未治療HER2^{pos}-IBC患者(notxHER2^{pos}-IBC)(黒)及びトラスツズマブ及び化学療法を受けているHER2^{pos}-IBC患者(t/C治療HER2^{pos}-IBC)におけるCD4⁺Th1応答のグラフである(赤)。未治療ステージI/II HER2^{pos}-IBC患者(notx)と比較して、抗HER2応答性(上)、レパートリー(中央)、または累積応答(下)によって示される抗HER2Th1応答は、ステージI-II HER2^{pos}-IBC患者(T/C治療)においてT/C治療後に全体的に増強されなかった。HER2特異的および破傷風(ポジティブコントロール)の刺激後のIFN- : IL-10反応性細胞の相対比率(下のパネルのヒストグラムに示される%; IFN- : 無地; IL-10: 斜線)は、txなし(n=5)と比較してT/C治療(n=5)で改善しなかった。図12Bは、全体的な抗HER2応答性(上)、応答レパートリー(中央)、および累積応答(下)によ

10

20

30

40

50

て評価した、HER2パルスDC1ワクチン接種の直前及び直後(HER2^{POS}-IBC
C PRE vax)(黒)及び(HER2^{POS}-IBC POST vax)(緑)それぞれのHER2^{POS}-IBC患者におけるCD4⁺Th1応答のグラフである。1
1人のステージI HER2^{POS}-IBC(PRE vax)患者においてHER2パ
ルスDC1ワクチン接種直後に(POST vax)、すべての抗HER2Th1免疫指
標における大幅な改善が観察された。破傷風刺激後のIL:10反応性細胞に対するIFN-
の相対的な割合(下のパネルのヒストグラムに示される%; IFN- :裏地; I
L-10:斜線)は、認め得るほどに変化しなかった一方、PRE vax(n=5)患
者と比較してPOST vax(n=5)患者において、HER2-パルスワクチン接種
はIFN-のIL:10反応性細胞に対する相対的な割合を大幅に増加させた。図12
Cは、抗HER2Th1免疫へのDCワクチン接種およびトラスツズマブ/化学療法のス
テージを一致させた効果を示す。AJCCステージI未治療(No tx)、T/C治療
(T/C治療)、およびHER2-パルスDC1ワクチン接種(POST-vax)HE
R2^{POS}-IBC患者間での一致させた比較を全体的な抗HER2応答(上)、応答レ
ポートリー(中央)、および累積応答(下)によって評価した。T/C治療でなく、HE
R2パルスDC1予防接種後の差動的なTh1回復は、ステージI HER2^{POS}-I
BC患者におけるステージを一致させた比較に持続した。結果は割合または平均値±SE
Mとして表現した。(**p<0.01、***P<0.001)。図12D及び12E
はDCワクチン接種後のCD4⁺Th1免疫応答の耐久性を示す。免疫応答を、ステー
ジI/II HER2^{POS}-IBC患者DCワクチン接種前(PREVACCINE)、
DCワクチン接種直後(IMMEDIATE POST VACCINE)及びワクチン
接種後6ヶ月以上(6 MO POSTVACCINE)で比較した。ワクチン接種直
後の期間を超えて、この時点(破線の矢印)で、すべての患者における全身性の化学療法
の開始/終了にかかわらず、11人中9人の評価可能なワクチン接種後6ヶ月以上の患者
において抗HER2 CD4⁺Th1免疫は永続的に増強されたままだった。散布図は、
個々のワクチン接種を受けた被験者のための応答レポートリー(図12D)及び累積応答
(図12E)によりCD4⁺Th1反応性プロファイルを示す。

【図13】図13A-13Eは、T/C治療後の抑制された抗HER2Th1応答が有害
な臨床的および病理学的結果と相関することを示す。図13A-13Dのグラフは、図1
3A-化学療法の配列(術前補助対術後補助)、図13B-トラスツズマブの完了から研
究への登録までの時間(6ヶ月未満対6ヶ月以上)、図13C-エストロゲン受容体の状
態(ER^{POS}対ER^{NEG})及び図13D-病理学的状態(I対II対III)によっ
て層別化するとき、T/C治療HER2^{POS}-IBC患者のサブグループ解析が認め得
るほどの抗HER2応答性(上のグラフ)、レポートリー(中央のグラフ)、または累積
応答(下のグラフ)の違いを実証しなかったことを示す。図13Eは、T/Cの完了後乳
房イベントが発生しなかった(No BE)HER2^{POS}-IBC患者と比較して、B
Eが発生した患者(+BE)の抗HER2応答(左上のグラフ)及び累積Th1応答(左
下のグラフ)が大幅に落ち込んだことを示す。術前補助T/C後に病理学的完全奏功(p
CR)を達成したHER2^{POS}-IBC患者において、抗HER2 Th1応答レポ
ートリー(右中央のグラフ)及び累積応答(右下のグラフ)は、非-pCRの患者と比較し
て有意に大きかった。

【図14】図14は、95人のHER2^{POS}乳癌患者が登録された実験例2のための研
究集団のフロー図である。すべての腫瘍は組織学的にHER2過剰発現(3+または2+
/FISH陽性)の浸潤性乳癌であると確認された。採血時点を赤の吹き出しボックスに
示す。トラスツズマブと化学療法(T+C)とで治療したコホートにおける経過観察の中
央値は、44(IQR31)ヶ月だった。

【図15】図15A-15DはHER2^{POS}-IBC非再発および再発患者コホートの
抗HER2 CD4⁺ Th1応答における変化を示す。図15Aは、HER2^{POS}-
IBC乳癌患者コホート(未治療[n=22]、再発[n=25]、および非再発[n=
48])間の抗HER2応答(上のパネル)、応答のレポートリー(中央のパネル)、お

10

20

30

40

50

よび累積応答（下のパネル）によって層別化した、IFN- γ 抗HER2 CD4⁺ T細胞応答の変化を示す。結果を、割合（%）または平均 \pm SEMとして表現する。 $* P < 0.05$ 、 $*** P < 0.001$ 事後ボンフェローニテストで、一元配置分散分析のp値を並べて表示する。図15Bは、ELISPOTを用いて抗CD3/抗CD28刺激（上のパネル）又は破傷風トキソイド（左下パネル）およびカンジダ・アルビカンス（右下のパネル）のリコール刺激に対するIFN- γ 産生を測定することによって、非再発および再発コホート由来のPBMCの間には、免疫能における有意差が認められなかったことを示す。結果を、中央値 \pm 四分位範囲（IQR）IFN- γ SFC/ 2×10^5 細胞として提示する。図15Cは、非再発および再発コホートのPBMCにおけるHER2ペプチド特異的IFN- γ 細胞に対するTh1（T-bet⁺IFN- γ ）「T-bet」対Th2（GATA-3⁺IFN- γ ）「GATA-3」表現型の相対的な寄与を示す。CD4⁺細胞上でゲーティングした後のこれらのグループ内の代表的な染色を示す（上のパネル）；隣接するヒストグラムにおける結果を、示されたとおり平均比率（%） \pm SEMとして表す（中央パネル）。下のパネルは、抗HER2のTh1応答性（左）、レパートリー（中央）、および累積応答（右）によって評価した場合、循環HER2特異的IL-4産生が非再発と再発コホートとの間で変化しないことを示す。結果を比率または平均 \pm SEMとして表す。図15Dは、フローサイトメトリーによるTreg（CD4⁺CD25⁺のFoxP3⁺）の相対的な割合を示す。グループ内の代表的な染色を示す（上のパネル）；隣接ヒストグラムにおける結果を、平均比率（%） \pm SEMとして表す（中央パネル）。下のパネルは、HER2特異的なIL-10産生が、非再発及び再発コホート間で、すべての3個のTh1特定基準全体で類似することを示す。結果を割合または平均 \pm SEMとして表現する。

【図16】図16は、完全に治療されたHER2^{pos}乳癌患者における、抗HER2Th1応答性によって層別化された無病生存期間（DFS）のCox比例ハザードモデルを示すグラフである。Th1応答性でない患者は、Th1応答性の患者と比較して顕著に亢進したリスク調整後のDFSを示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

なお、本実施形態の図面、画像および説明が本発明の実施例に見出すことができる多くの他の要素を、明確にする目的で、排除する一方、明確な理解に関連する要素を説明するために簡略化されていることを理解すべきである。関連技術の当業者は、本発明の実施形態を実現するために他の要素が望ましい及び/又は必要であることを認識するであろう。しかしながら、そのような要素は当技術分野でよく知られており、そのような要素は、本発明の実施形態の理解を容易にしないので、そのような要素の議論は、本明細書において提供されない。

【0028】

「一実施形態」または「実施形態」または実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性を意味する同類のものなどの本明細書全体を通しての参照は少なくとも1つの実施形態に含まれる。したがって、「実施形態において」または「一実施形態では」または本明細書全体を通して様々な場所での同様の語句の出現は必ずしも全てが同じ実施形態に言及されない。

【0029】

さらに、本開示の原理の理解を促進する目的で、参照は、現在本明細書において示されて記載された実施形態になされ、特定の言語が同じものを説明するために使用されるであろう。それにもかかわらず、本開示の範囲の限定がそれによって意図されないことが理解されるであろう；任意の変更、説明または図示された実施形態のさらなる改変および本明細書に示された本開示の原理のさらなる応用は、本開示が関係する当業者に通常起こるであろうと考慮される。すべての範囲の制限は、一つ以上の発行された特許の最終的な特許請求の範囲に従って、及び最終的な特許請求の範囲で表されるように決定されるべきである。

10

20

30

40

50

【0030】

定義 別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、一般的に、本開示の発明の主題が属する技術分野の当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の任意の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法および材料が記載される。

【0031】

一般に、本明細書中で使用される用語と、細胞培養、分子遺伝学、有機化学、および核酸化学およびハイブリダイゼーションにおける実験手順は、それらの技術分野でよく知られており、一般的に用いられるものである。

10

【0032】

標準的な技術は、核酸及びペプチド合成のために使用される。技術および手順は、一般に、当該技術分野における従来の方法および種々の一般的参考文献 (Sambrook and Russell, 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, and Ausubel et al., 2012, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY) に従って行われ、これは、本明細書を通じて提供される。

【0033】

本明細書中で使用される命名法及び以下に記載される分析化学および有機合成で使用される実験手順は、当該技術分野でよく知られており、一般的に使用されるものである。標準技術またはその改良は、化学合成および化学分析に使用される。

20

【0034】

本明細書で使用される場合、以下の用語の各々は、この節でそれと関連する意味を有する。

【0035】

冠詞「a」および「an」は、1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)という冠詞の文法上の目的を指すために本明細書において使用される。一例として、「an element」は一つの要素または複数の要素を意味する。

30

【0036】

量、一時的な持続時間などのような測定可能な値に言及する場合、本明細書において使用される「約」は、規定値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、または $\pm 5\%$ 、または $\pm 1\%$ 、または $\pm 0.1\%$ の変動を、そのような変動が開示された方法を実行するのに適切であるように、包含することを意味する。

【0037】

本明細書において使用される乳癌の「術後補助療法」は、一次療法(すなわち、外科手術)後に行われる任意の治療を指して長期生存の可能性を増加させる。「術前補助療法」は、一次治療の前に行われる治療である。

【0038】

本明細書において使用される用語「抗原」または「ag」は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答は、抗体産生、または特定の免疫学的にコンピテントな細胞の活性化のいずれか、またはその両方を含むことができる。当業者は、実質的に全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が、抗原として働くことができることを理解するであろう。さらに、抗原は、組換えまたはゲノムDNAに由来してもよい。当業者は任意のDNAであって、当該DNAが免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を含み、従って本明細書においてその用語が使用されるように「抗原」をエンコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の全長ヌクレオチド配列のみでエンコードされる必要がないことを理解するだろう。本発明の実施形態は、限定されないが、1つ以上の遺伝子の部分的なヌクレ

40

50

オチド配列の使用を含み、これらのヌクレオチド配列は、所望の免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることが容易に分かるだろう。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解するであろう。抗原を生成または合成することができ、または生物学的試料に由来してもよいことが容易に分かる。そのような生物学的サンプルは、限定されるものではないが、組織試料、腫瘍試料、細胞または生物学的液体を含むことができる。

【0039】

「抗原提示細胞」または「APC」は、T細胞を活性化することができ、限定されるものではないが、単球/マクロファージ、B細胞及び樹状細胞(DC)を含みうる、細胞である。

10

【0040】

「抗原パルスAPC」または「抗原負荷APC」は、抗原に曝露して抗原により活性化されているAPCが含まれる。例えば、APCは、生体外で、例えば抗原の存在下での培養中、抗原負荷になることができる。APCはまた、抗原への曝露により生体内でロードすることもできる。「抗原負荷APC」は、伝統的に、2つの方法のいずれかで調整する：(1)抗原ペプチドとして知られる小ペプチドフラグメントを、APCの外側に直接「パルス」する：または(2)APCを、その後APCによって摂取される全タンパク質またはタンパク質粒子と共にインキュベートする。これらのタンパク質は、APCにより小ペプチドフラグメントに消化され、最終的に搬送され、APCの表面に提示される。加えて、抗原負荷APCはまた、細胞へ抗原をコードするポリヌクレオチドを導入することによって生成することもできる。

20

【0041】

「抗HER2応答」は、具体的には、HER2タンパク質に対する免疫応答である。

【0042】

本明細書において使用される用語「抗腫瘍効果」は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移の数の減少、平均余命の増加、または癌状態に関連する様々な生理的症状の改善によって明らかにすることができる生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、そもそも腫瘍の発生の予防における結合ペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によって明らかにすることもできる。

30

【0043】

「アポトーシス」は、プログラム細胞死のプロセスである。カスパーゼ3は、頻繁に活性化される細胞死プロテアーゼである。

【0044】

本明細書において使用する場合、用語「自己」は、そこに後で導入されるのと同じ個体に由来する任意の材料を指す。

【0045】

本明細書において使用される用語「B細胞」は、骨髄および/または脾臓に由来する細胞として定義される。B細胞は抗体を産生する形質細胞に発達することができる。

【0046】

結合ペプチドに関しては「HER2結合ペプチド」を参照。

40

【0047】

本明細書において使用される用語「癌」は、正常なコントロールの損失というその独特の特色が、無秩序な増殖、分化の欠如、局所組織浸潤、および/または転移をもたらす細胞の過剰増殖として定義される。例としては、限定するものではないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膀胱癌、食道癌、膵臓癌、結腸直腸癌、胃癌、腎臓癌、肝臓癌、脳腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌、胚細胞腫瘍、等を含む。

【0048】

「CD4⁺Th1細胞」、「Th1細胞」、「CD4⁺Tヘルパー1型細胞」、「CD4⁺T細胞」などは、表面タンパク質CD4を発現し、高レベルのサイトカインIFN- γ を産生するヘルパーT細胞のサブタイプとして定義される。「ヘルパーT細胞」も

50

参照。

【0049】

「累積応答」は、与えられた患者群由来の全ての6個のMHCクラスII結合ペプチドからの反応スポットの総和（IFN-ELISPOT分析での 10^6 個の細胞当たりのスポット形成細胞「SFC」）として表現される、患者群の複合免疫応答を意味する。

【0050】

「DCワクチン接種（DC vaccination）」、「DC免疫化（DC immunization）」、「DC1免疫化（DC1 immunization）」などは、自己樹状細胞を用いて特定の分子を認識してそれらに対して特異的応答を開始する免疫システムを利用する戦略を指す。

10

【0051】

用語「樹状細胞」または「DC」は、生体内、試験管内、生体外、又は宿主ならびに対象内に存在する、または造血幹細胞または単球に由来することができる抗原提示細胞である。樹状細胞およびそれらの前駆体は、骨髄や末梢血からと同様に、種々のリンパ器官、例えば、脾臓、リンパ節から単離することができる。DCは、樹状細胞本体から離れた複数方向に伸びる薄いシート（葉状仮足）を有する特徴的な形態を持つ。一般には、樹状細胞は、高いレベルのMHCおよび共刺激（例えば、B7-1およびB7-2）分子を発現する。樹状細胞は、試験管内でのT細胞の抗原特異的な分化を誘導し、試験管内および生体内での一次T細胞応答を開始することができる。ワクチン生産との関連において、「活性化されたDC」は、リポ多糖（LPS）などのToll様受容体アゴニストに暴露されたDCである。活性化されたDCは、抗原が付加されてもよくされなくてもよい。「成熟DC」も参照。

20

【0052】

「DC-1極性化樹状細胞」、「DC1」及び「1型極性化DC」は、IL-12、IL-18、およびIL-23などのTh1-駆動サイトカインを分泌する成熟DCを指す。DC1は、細胞性免疫を完全に促進することができる。本明細書中の好ましい実施形態で、DC1はHER2 MHCクラスII結合ペプチドでパルスされる。

【0053】

「エストロゲン受容体（ER）陽性」または「ER^{pos}」癌はエストロゲンの発現について陽性を感知する癌である。「ER陰性」癌はそのような発現について陰性を感知する。ER状態の分析は、当技術分野で公知の任意の方法によって行うことができる。

30

【0054】

「HER2」は、ヒト上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーの一員である。HER2は、ヒト乳癌の約20%~25%で過剰発現されており、多くの他の癌において発現される。

【0055】

本明細書中で使用される「HER2結合ペプチド」、「HER2 MHCクラスII結合ペプチド」、「結合ペプチド」、「HER2ペプチド」、「免疫原性MHCクラスII結合ペプチド」、「抗原結合ペプチド」、「HER2エピトープ」、「反応性ペプチド」、及び同様のものは、約20~25パーセントの全ヒト乳癌およびその等価物で見られる標的である、HER2/neuタンパク質の配列に由来するか又は基づくMHCクラスIIペプチドを指す。HER2細胞外ドメイン「ECD」は、細胞膜に固定、または循環中のいずれかである細胞の外側にあるHER2のドメインを指し、それらの断片を含む。HER2細胞内ドメイン「ICD」は、細胞の細胞質内のHER2/neuタンパク質のドメインを指す。好ましい実施形態によれば、HER2エピトープまたは他の結合ペプチドは、3個のHER2 ECDペプチド及び3個のHER2のICDペプチドを含む6個のHER2結合ペプチドから構成される。

40

好ましいHER2 ECDペプチドは：

ペプチド42~56：HLDMLRHL YQGCVV（配列番号：1）；

ペプチド98~114：RLRIVRG TQLFEDNYAL（配列番号：2）；及び

50

ペプチド 328 ~ 345 : T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L (配列番号 : 3) を含み ;

好ましい H E R 2 I C D ペプチドは :

ペプチド 776 ~ 790 : G V G S P Y V S R L L G I C L (配列番号 : 4) ;

ペプチド 927 ~ 941 : P A R E I P D L L E K G E R L (配列番号 : 5) ; 及び

ペプチド 1166 ~ 1180 : T L E R P K T L S P G K N G V (配列番号 : 6) を含む

。

ドナーが H L A A 2 . 1 血液型 (H L A - A 2 ^{P o s}) を有する実施態様においては、H E R 2 M H C クラス I ペプチド又はエピトープは :

ペプチド 369 - 377 : K I F G S L A F L (配列番号 : 7) 及び

ペプチド 689 - 697 : R L L Q E T E L V (配列番号 : 8) を含む。

【 0 0 5 6 】

「 H E R 2 ^{P o s} 」は、多数の他のタイプの癌と同様に、乳癌の分類又は分子サブタイプである。H E R 2 陽性は、現在 F I S H (蛍光インサイツハイブリダイゼーション) アッセイによる遺伝子増幅によって定義され、病理学的染色の強度で 2 + または 3 + である。

【 0 0 5 7 】

「 H E R 2 ^{N e g} 」は F I S H による遺伝子増幅の欠如によって定義され、ほとんどの場合 0 から 2 + の病理学的染色の範囲を包含することができる。

【 0 0 5 8 】

「単離された」とは、天然の状態から変更されたまたは除去されたことを意味する。例えば、生きている動物中に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離された」ではないが、その自然の状態の共存している材料から部分的に又は完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離された」である。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または、例えば、宿主細胞のような非天然環境で存在することができる。

【 0 0 5 9 】

本明細書中で使用される用語「主要組織適合遺伝子複合体」または「M H C」は、遺伝子の特定のクラスターとして定義され、その多くは組織適合性の最も重要な決定要因の一つである抗原提示に關与する進化的に關連する表面タンパク質をコードする。クラス I M H C、または M H C クラス I は、主に C D 8 T リンパ球への抗原提示に機能する。クラス II M H C、または M H C クラス II は、主に C D 4 ⁺ T リンパ球 (T ヘルパー細胞) への抗原提示に機能する。

【 0 0 6 0 】

本明細書中で使用される「成熟 D C」は、高いレベルの M H C クラス II、C D 8 0 (B 7 . 1) および C D 8 6 (B 7 . 2) 分子を含む、分子を発現する樹状細胞を意味する。これとは対照的に、未成熟 D C (「 i D C」または「 I D C」) は、低レベルの M H C クラス II、C D 8 0 (B 7 . 1) および C D 8 6 (B 7 . 2) 分子を発現し、まだ依然として抗原を取り入れることができる。「成熟 D C」はまた、生体内、試験管内、生体外、又は宿主ならびに対象内に存在する抗原提示細胞を指し、D C 1 極性化であってもよい。(すなわち、細胞性免疫を完全に促進することができる。)

【 0 0 6 1 】

C D 4 ⁺ T h 1 応答 (または T h 1 応答) の「測定基準」は、抗 H E R 2 C D 4 ⁺ T h 1 免疫応答を分析した各被験者グループを対象に定義される : 各被験者グループ由来の 6 個の M H C クラス II から結合ペプチドで (a) 全体的な抗 H E R 2 応答 (1 以上の反応性ペプチドに反応する被験者のパーセントとして表される) ; (b) 応答レポーター (各被験者グループによって認識された反応性ペプチド (n) の平均数として表される) ; 及び (c) 累積応答 (反応性スポットの総和 (I F N - E L I S P O T 解析での 1 0 ⁶ 個の細胞当たりのスポット形成細「 S F C」) として表される)

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

「明確なHER2^{neg}」は遺伝子増幅されず、病理学的染色で0または1+であるとして定義される。「曖昧なHER2^{neg}」は遺伝子増幅されないが、病理学的染色で2+であるとして定義される。

【0063】

「応答性」または「抗HER2応答」は本明細書中で交換可能に使用され、6個の結合ペプチドの少なくとも1つに応答する被験者の割合を意味する。

【0064】

「応答レポーター」は各被験者グループによって認識される反応性ペプチドの平均数(n)として定義される。

【0065】

本明細書中で使用される「サンプル」または「生物学的試料」は、限定されるものではないが、血液、臓器、組織、エキソソーム、血漿、唾液、尿および他の体液を含む、被験者由来の生物学的材料を意味する。試料は、対象から得られた材料の任意の供給源となりうる。

【0066】

用語「被験者」、「患者」、「個体」及び同様のものは、本明細書中で交換可能に使用され、本明細書に記載の方法に適した、それらの任意の動物、または、試験管内であろうとインサイツであろうとその細胞を指す。特定の非限定的な実施形態では患者、被験者又は個体は、ヒトである。

【0067】

本明細書で使用される用語「標的療法」は、薬物または他の物質を使用する癌治療を指し、それは抗腫瘍効果を達成するために通常正常細胞にはほとんどダメージを与えない一方、癌細胞の増殖に関与する特定の標的分子に干渉する。伝統的な細胞傷害性化学療法薬は、対照的に、すべての活発に分裂する細胞に対して作用する。乳癌治療モノクローナル抗体では、具体的にはトラスツズマブ/ハーセプチン(登録商標)がHER2/neu膜受容体を標的とする。

【0068】

「T/C」は、トラスツズマブ及び化学療法と定義される。これは、乳癌手術前/後にトラスツズマブ及び化学療法の両方を受けた患者を指す。

【0069】

本明細書で使用される用語「T細胞」または「T細胞」は、種々の細胞性免疫反応に関与する胸腺由来の細胞として定義される。

【0070】

用語「Tヘルパー細胞」、「ヘルパーT細胞」、「Th細胞」等は、本明細書中で細胞に関して使用され、当業者によって同定可能な異なる細胞型を含む、リンパ球のサブグループ(白血球細胞または白血球のタイプ)を示す。具体的には、Tヘルパー細胞は、その主な機能が他のBおよびTリンパ球および/またはマクロファージの活性化および機能を促進することであるエフェクターT細胞である。ヘルパーT細胞は、「Th1」または「タイプ1」および「Th2」または「タイプ2」表現型として知られている二つの主要なサブタイプの細胞に分化する。これらのTh細胞は、他の白血球を刺激するまたは相互作用するサイトカイン、タンパク質、またはペプチドを分泌する。本明細書中で使用される「Th1細胞」、「CD4⁺Th1細胞」、「CD4⁺Tヘルパー1型細胞」、「CD4⁺T細胞」及び同様のものは、表面糖タンパク質CD4を発現した成熟T細胞を指す。樹状細胞などの抗原提示ペプチド(APC)の表面上に発現したMHCクラスII分子によりペプチド抗原が提示されるときにCD4⁺Tヘルパー細胞は活性化する。MHC抗原複合体によるCD4⁺Tヘルパー細胞の活性化の際に、それは高レベルのインターフェロン- γ (IFN- γ)のようなサイトカインを分泌する。このような細胞は、宿主細胞内に住む、ヒトの癌における抗腫瘍応答において重要である特定の疾患を引き起こす微生物に対して非常に有効であると考えられる。

【0071】

10

20

30

40

50

「Treg」、「T_reg」および「制御性T細胞」は、本明細書中で使用されて免疫系の警察官であり、免疫系の抗癌活性を調節するように作用する細胞を指す。彼らは、特定の癌で増加し、これらの癌の型の免疫療法に対する抵抗性を仲介する。

【0072】

「治療有効量」または「有効量」は、本明細書中で互換的に使用され、本明細書に記載されるように、患者に投与したときに特定の生物学的結果を達成するのに有効である、化合物、製剤、物質、または組成物の量を意味する。本明細書中に記載された化合物、製剤、物質、または組成物の量は、これは「治療有効量」を構成し、化合物、製剤、物質、または組成物に応じて変化する、疾患状態およびその重症度、治療すべき患者の年齢、などによって変わる。治療有効量は、当該技術分野の当業者によって彼/彼女自身の知識及び本開示を考慮して通常決定され得る。

10

【0073】

用語「治療する(treat)」、「治療すること(treating)」および「治療(treatment)」は、本明細書に記載された治療または予防の基準を指す。「治療」の方法は、そのような治療を必要とする、被験体へ本発明の実施形態の組成物を投与すること又は本発明の実施形態の方法を採用する、例えば、疾患または障害に罹患した被験者、または最終的にこのような疾患または障害を獲得する可能性がある被験体、が予防、治療、遅延、その重症度を低下させる、または障害または再発障害の1以上の症状を回復する、またはそのような治療が存在しない場合に予想される生存期間を超えて被験者の生存期間を延長するためである。

20

【0074】

本明細書で使用される用語「ワクチン」は動物好ましくは哺乳動物、そしてより好ましくはヒトへの物質の投与後に免疫応答を誘発するために使用される材料、として定義される。被験体への導入の際に、ワクチンは、限定するものではないが、抗体、サイトカインおよび/またはほかの細胞応答を含む、免疫応答を誘発することができる。

【0075】

範囲：本開示を通して、実施形態の様々な態様を範囲形式で提示することができる。範囲形式での記載は便宜と簡潔さのためだけであり、実施形態の範囲の柔軟性のない限定として解釈されるべきではないことを理解する必要がある。したがって、範囲の記載は、その範囲内の個々の数値と同様にすべての可能な部分的な範囲を具体的に開示していると考えられる必要がある。例えば、1から6のような範囲の記載は、その範囲内の個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6と同様に、1から3まで、1から4まで、1から5まで、2から4まで、2から6まで、3から6までなどのように具体的に開示された部分範囲を有すると考える必要がある。これは、範囲の広さにかかわらず適用される。

30

【0076】

参照は、現在いくつかの実施形態に詳細にされており、その例は添付の図面、写真、および/または、図にも示されている。

【0077】

説明

40

乳癌発症の生涯リスクはほぼ8に1である。erb-B2癌遺伝子(HER-2/neu)は、分子作動体であり、それは乳癌、卵巣癌、胃食道癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌および他の固形腫瘍のかなりの数で過剰発現される。乳癌の約20~25%を含むいくつかの腫瘍タイプにおける分子オンコドライバーである、HER2の過剰発現(HER2^{pos})は、より臨床的に悪性度の高い疾患、化学療法に対する抵抗性、高い割合での再発や転移、及びより悪い全体的な予後と関連する。初期乳癌において、HER2の過剰発現は、強化された浸潤性、腫瘍細胞の遊走、及び腫瘍形成性環境を促進するHER2の重要な役割を示唆する、血管新生促進因子の発現と関連する。非浸潤性乳管癌(DCIS)患者のレトロスペクティブ分析において、HER2を過剰発現するDCIS病変は、HER2を過剰発現しないDCIS病変よりも浸潤性の高い乳癌と6倍以上関連がある可能性が高

50

かった。

【0078】

HER2を標的とする分子標的療法、すなわちトラスツズマブは、このタイプの乳癌に多大な正の臨床効果をもたらしているけれども、進行した疾患状態における既存のHER2療法に対するほぼ普遍的な抵抗、加えて前記標的療法を受けた女性のかかりの割合での疾病再発は、HER2を標的とする追加の戦略の必要性を証明する。HER2に対する免疫系を活性化し腫瘍の進行を軽減するワクチンの可能性及び再発の防止は、求められているが、未だに完全には理解されていない。したがって、HER2乳癌を診断および治療するための追加の試験および治療の必要性が依然として存在する。本明細書において説明した本実施形態は、これらの問題に対処する。

10

【0079】

HER2主導の乳房腫瘍形成における全身性の抗HER2 CD4⁺Th1応答の役割は、しかし、依然として不明である。本明細書に記載の実施形態は、HER2^{pos}乳癌における腫瘍形成の連続体全体で抗HER2 CD4⁺Th1応答の進行性喪失の同定に基づき、それはHER2特異的および調節性T細胞(T_{reg})非依存性であるように思われる。具体的には、抗HER2 CD4⁺Th1応答と、HER2発現及び疾患進行の間には負の相関がある。さらに、HER2^{pos}浸潤性乳癌における抑制された抗HER2のTh1応答は、HER2パルス1型に極性化した樹状細胞「DC1」のワクチン接種後に、差動的に回復した、しかし、抑制された応答は、本明細書中にまたは外科的切除や放射線などのような他の標準的な治療によって詳述されるように、続くトラスツズマブと化学療法(T/C)とのHER2標的療法後に回復されなかった。回復した抗HER2のTh1応答はまた、少なくとも約6ヶ月以上耐久性があるように思われる。

20

【0080】

本明細書に記載の好ましい実施形態は、哺乳類の循環抗腫瘍CD4⁺Th1応答を発生し、検出する物質及び方法を提供する。循環抗腫瘍CD4⁺Th1応答(すなわち、IFN-分泌)を生成する血液検査/アッセイが提供され、生じたIFN-産生が検出され、測定される。他の好ましい実施形態では、CD4⁺Th1細胞および抗原提示細胞またはその前駆体を含む被験体の血液試料は、被験体が罹患している癌の種類に基づき、被験体に免疫応答を誘導することができるMHCクラスII免疫原性ペプチドでパルスされる。好ましくは、抗原提示細胞またはその前駆体は、成熟あるいは未成熟樹状細胞又はそれらの単球前駆体である。特に好ましい実施形態において、癌は好ましくはHER2発現で、哺乳動物被験体は好ましくはヒトであり、より好ましくは、癌はHER2^{pos}乳癌で、ヒト被験体は女性である。

30

【0081】

本明細書中で同定された抗HER2 CD4⁺Th1応答の減少は、このような血液検査で発生した検出された免疫応答が、癌診断/応答の予測因子として単独で又はまたは患者の免疫応答を回復する専門のワクチンの使用と並行して、使用することができる。本明細書に記載された好ましい実施形態は、このように、癌の診断および治療の焦点を癌に対する免疫応答を決定しおよび/または予測するための患者の免疫および血液検査の使用に移動し、腫瘍細胞の同定に依存している診断及び治療方法とは対照的に、患者に再発の危険性があるかを含む。

40

【0082】

好ましい実施形態は、哺乳動物被験体における循環抗HER2 CD4⁺Th1応答を生成するために、被験体から増殖されていない末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、HER2由来のMHCクラスII抗原結合ペプチドを含む組成物をPBMCへパルスし、被験体内で免疫応答を発生することができるようにすることによって提供される。いかなる特定の理論に拘泥するものではないが、前記結合ペプチドが前記PBMCサンプル中に存在するCD4⁺Th1細胞に提示されるとき、前記CD4⁺Th1細胞を活性化し、活性化されたCD4⁺Th1細胞がインターフェロン(IFN-)を生成する。被験体のPBMC試料に含まれる前駆体多能性単球由来のDC1(1型極性化樹状細胞)は、抗原

50

提示細胞 (APC) であり、前記結合ペプチドへの暴露時に MHC クラス II 抗原結合ペプチドを試料中の被験体の CD4⁺ Th1 細胞に提示し、これにより CD4⁺ Th1 細胞を活性化し IFN- γ を産生 / 分泌する抗原負荷 APC となる。それによって産生された IFN- γ は、その後分析のために測定される。

【0083】

別の好ましい実施形態では、循環抗 HER2 CD4⁺ Th1 応答は、被験体の血液試料由来の刺激されていない精製された CD4⁺ T 細胞を、被験体中で免疫応答を生成することができる HER2 由来の MHC クラス II 抗原結合ペプチドを含む組成物でパルスした自家未成熟または成熟樹状細胞 (「iDC」または「成熟 DC」、総称して、「DC」とあらかじめ共培養することによって、哺乳動物被験体中で生成される。いかなる特定の理論に拘泥するものではないが、前記結合ペプチドが T 細胞試料中に存在する CD4⁺ Th1 細胞に提示されたとき、CD4⁺ Th1 細胞を活性化し、活性化された CD4⁺ Th1 細胞は、IFN- γ を分泌 / 生成する。前記未成熟 DC は、DC1 に成熟し、サンプル中に存在する被験体の CD4⁺ Th1 細胞へ MHC クラス II 結合ペプチドを提示し、それによって CD4⁺ Th1 細胞を活性化し IFN- γ を産生させ、それはその後分析のために測定される。

10

【0084】

被験体中で抗 HER2 免疫応答を生成するための両方の別の好ましい実施形態では、他の検出方法が使用されてもよいことは当業者によって理解されるべきであるが、抗 HER2 CD4⁺ Th1 細胞によって産生される IFN- γ は、IFN- γ 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイによって検出及び測定される。例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、および免疫蛍光法 (IF) が免疫応答を監視するために使用することができる。代わりに、患者の免疫モニタリングの実例で、全 CD4⁺ 細胞のスポットを示す ELISPOT のような直線の IFN- γ 試験とは対照的に、又は加えて、IL-10 に対する IFN- γ の比を測定することが有利であり得る (参考例で行われ、図 8E で示されたように)。このような試験は、リスクのある患者にとって特に有利であろう。さらに、免疫蛍光法の使用は、蛍光で結果を読み取る ELISPOT リーダーの使用を介して免疫応答を測定し、視覚化する他の方法を提供する。このような場合に、結果は 2 つ、3 つ、またはそれ以上のサイトカイン / 他の分泌された免疫分子を表示するように配置することができ、各々は同じ患者試料中で、異なる色で示される。

20

30

【0085】

当業者は、他の適当な APC が、樹状細胞に加えて、例えばマクロファージ等の単球及び B 細胞を使用できることを容易に理解することができる。

【0086】

好ましい実施形態では、IFN- γ ELISPOT アッセイは、IFN- γ 産生を検出するために実行される (正のペプチド応答: 最小閾値 20 SFC / 2×10^5 及び刺激されていない対照よりも 2 倍大きい)。結果は、好ましくは、Th1 応答の 3 つの指標として表現される: (a) 全体の抗 HER2 応答 (1 以上の反応性ペプチドに反応した被験体のパーセントとして表現される); (b) 応答レパートリー (各被験体グループによって認識された反応性ペプチド (n) の平均数として表現される); そして、(c) 累積応答 (各被験体グループからすべての 6 の MHC クラス II 結合ペプチドからの反応スポット (IFN- γ ELISPOT 解析から 10^6 個の細胞あたりのスポット形成細胞「SFC」) の総和として表現される)。

40

【0087】

HER2⁺ 癌のための好ましい実施形態では、DC、未成熟または 1 型極性化 DC は、HER2 に由来するか基づき患者中に免疫応答を生成することができる 6 MHC クラス II 結合ペプチドを含む組成物でパルスされる。

HER2 MHC クラス II 結合ペプチドまたはエピトープは、
ペプチド 42-56: HLDMLRHL YQGCQVV (配列番号: 1);

50

ペプチド 98 - 114 : R L R I V R G T Q L F E D N Y A L (配列番号 : 2) ;
 ペプチド 328 - 345 : T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L (配列番号 : 3) ;
 ペプチド 776 - 790 : G V G S P Y V S R L L G I C L (配列番号 : 4) ;
 ペプチド 927 - 941 : P A R E I P D L L E K G E R L (配列番号 : 5) ; 及び
 ペプチド 1166 - 1180 : T L E R P K T L S P G K N G V (配列番号 : 6) を含
 む。

ドナーが A 2 . 1 の血液型を有する実施形態では、HER2 MHCクラスIペプチドま
 たはエピトープは、

ペプチド 369 - 377 : K I F G S L A F L (配列番号 : 7) ; 及び
 ペプチド 689 - 697 : R L L Q E T E L V (配列番号 : 8) を含む。

10

【0088】

本明細書でさらに記載されるように、好ましい実施形態のHER2結合ペプチド/エピ
 トープは、6個の上記参照ペプチドに限定されるものではなく、本明細書でより詳細に説
 明するように、配列番号1~6によって同定された結合ペプチドの機能的同等物または代
 替物であるペプチドも含む。A2.1及びA3.1血液型及び他の血液型(例えば、A5
 、A6)を有する被験体のために使用することができる、任意の表現型に結合するクラス
 Iペプチドを含む追加のクラスIペプチドがある。

【0089】

乳癌に加えて、例えば、脳、膀胱、食道、肺、膵臓、肝臓、前立腺、卵巣、結腸直腸、
 及び胃、およびその他のような、他の多くのHER2⁺固形癌があり、それらのため
 に本明細書に記載の実施形態の材料及び方法を、診断および治療のために使用すること
 ができる。

20

【0090】

ワクチンは、上述の同じ抗HER2結合ペプチドを用いてHER2発現腫瘍を標的化す
 るために開発することができ、または例えば、DNA、RNA、ペプチド、またはタンパ
 ク質もしくはICDおよびECDのドメインのようなその構成要素などのような免疫原性
 であるHER2の任意の組成物を使用することができる。例えば、被験体は全HER2タ
 ンパク質に対するワクチン投与を受け、6個の上述した結合ペプチドは、患
 者の免疫応答をモニターするために使用することができる。同様に、ワクチンは、HER
 1、HER3、およびc-METを含むHER2ファミリーの他のメンバーのような他の
 タイプの癌のために開発することができる。

30

【0091】

現在の好ましい実施形態は、女性のHER2⁺乳がんを治療し、診断することに関
 しているが、本発明の実施形態は、女性の人間に限定されないことは当業者によって直
 ちに理解されるべきである。現在好ましい実施形態は、男性のヒト、例えば、HER2を
 発現する前立腺癌を、ならびに他の哺乳動物被験体を含む。

【0092】

組成物

好ましい実施形態は、HER2タンパク質に由来するか、またはそうでなければ基づい
 て単離されたペプチドの使用を含む。好ましい実施形態の結合ペプチドは、対応するHE
 R2タンパク質のエピトープを提示する。現在好ましい実施形態は、6つのHER2 M
 HCクラスII結合ペプチド/エピトープを備えているが、患者において免疫学的に十分
 に活性である限り、HER2分子全体の任意の成分が他の結合ペプチドの供給源として使
 用することができ、他の可能なMHCクラスII HER2ペプチドが、本実施形態で使
 用されうる。

40

【0093】

好ましい実施形態では、HER2結合ペプチドは配列:

ペプチド 42 ~ 56 : H L D M L R H L Y Q G C Q V V (配列番号 : 1) ;
 ペプチド 98 ~ 114 : R L R I V R G T Q L F E D N Y A L (配列番号 : 2) ;
 ペプチド 328 ~ 345 : T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L (配列番号 : 3) ;

50

ペプチド 776 ~ 790 : G V G S P Y V S R L L G I C L (配列番号 : 4) ;
 ペプチド 927 ~ 941 : P A R E I P D L L E K G E R L (配列番号 : 5) ; 及び
 ペプチド 1166 ~ 1180 : T L E R P K T L S P G K N G V (配列番号 : 6)
 を有する6個のHER2 MHCクラスII結合ペプチドを含む。

【0094】

配列番号 : 1によって識別されるHER2エピトープはHER2タンパク質の42 ~ 56の位置を表す。配列番号 : 2によって識別されるHER2エピトープはHER2タンパク質の98 ~ 114の位置を表す。配列番号 : 3によって識別されるHER2エピトープはHER2タンパク質の328 ~ 345の位置を表す。配列番号 : 4によって識別されるHER2エピトープはHER2タンパク質の776 ~ 790の位置を表す。配列番号 : 5
 によって識別されるHER2エピトープはHER2タンパク質の927 ~ 941の位置を表す。配列番号 : 6によって識別されるHER2エピトープはHER2タンパク質の1166 ~ 1180の位置を表す。

10

【0095】

さらに、当業者は、本明細書に記載の実施形態は、本明細書の好ましい実施形態に関連して記載された全6個の結合ペプチドを使用することに限定されるものではないことを理解することができる。IFN- γ の産生を引き起こすために、患者のCD4⁺T細胞に十分な免疫学的活性がなければならぬことを注意して、低域が2つまたは3つ程度の任意の数の記載された結合ペプチドが、患者の血液検査に使用されうる。したがって、本明細書の好ましい実施形態に関連して記載された一組の6個のものより少ない及び又は異なるHER由来クラスII結合ペプチドが使用されている場合には、結合ペプチドの数は、被験体で生成された免疫応答に応じておそらく実質的に6よりも小さいか大きいだろう。

20

【0096】

本明細書に記載されたように、好ましい実施形態のHER2結合ペプチドはまた、配列番号 : 1 ~ 6によって同定されるペプチドの機能的等価物であるペプチドを包含する。このような機能的等価物は、対応するHER2ペプチド配列中の1以上のアミノ酸が置換されるか、または、1以上のアミノ酸が対応する基準配列から削除されるか、または、加えられるという改変された配列を有していてもよい。例えば、1 ~ 3個のアミノ酸がアミノ末端、カルボキシル末端、またはその両方に加えられてもよい。いくつかの例では、HER2ペプチドはグリコシル化することができる。

30

【0097】

前記HER2結合ペプチド又は本実施形態に従う任意のペプチドは、環化されても直鎖状であってもよい。環化したとき、エピトープは、任意の適切な方法で環化することができる。例えば、ジスルフィド結合は所望のコンフォメーション (c o n f i r m a t i o n) を提供するために選択されたシステイン (C y s) 対の間に形成されてもよい。環化エピトープの形成は、免疫応答を改善するコンフォメーションを提供することができると考えられている。

【0098】

他の例では、HER2結合ペプチドは、HER2結合ペプチドのレトロ - インベルソ異性体であってもよい。レトロ - インベルソ修飾は、ペプチド骨格内のすべてのアミド結合の逆転を含む。この逆転は、配列の方向を反転し、L - アミノ酸の代わりにD - アミノ酸を使用して、各アミノ酸残基のキラリティーを反転することによって達成することができる。このレトロ - インベルソ異性体形態は、少なくとも一部のペプチド結合の平面性と配座制限を保持することができる。

40

【0099】

非保存的アミノ酸置換および/または保存的置換もまた、行うことができる。置換されたアミノ酸が基準配列中の対応するアミノ酸と類似の構造または化学的特性を有する場合、置換は、保存的アミノ酸置換である。一例として、保存的アミノ酸置換は、1つの脂肪族または疎水性アミノ酸、例えば、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンのほかのものとの置換 ; 1つのヒドロキシル含有アミノ酸、例えば、セリン及びスレオニンのほ

50

かのものとの置換；1つの酸性残基、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸のほかのものとの置換；1つのアミド含有残基、例えば、アスパラギンおよびグルタミンのほかのものとの置換；1つの芳香族残基、例えば、フェニルアラニンおよびチロシンのほかのものとの置換；1つの塩基性残基、例えば、リジン、アルギニン及びヒスチジンのほかのものとの置換；1つの小さなアミノ酸、例えば、アラニン、セリン、トレオニン、メチオニン、及びグリシンのほかのものとの置換、を含む。

【0100】

いくつかの例では、好ましい実施形態の結合ペプチドの配列の一つのアミノ末端、カルボキシ末端、またはその両方で欠失および付加がある。例えば、HER2結合ペプチド等価物は、対応するHER2結合ペプチド配列と少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する。少なくとも90%同一である配列は1以上の変更、すなわち、基準配列の10アミノ酸あたりの欠失、付加および置換の任意の組み合わせ、を有していない。パーセント同一性は、当技術分野で知られているか開発されたプログラムを使用して、基準配列と変異体のアミノ酸配列を比較することによって決定される

10

【0101】

対応するHER2結合ペプチド配列よりも長い機能的等価物については、前記機能的等価物は、HER2ペプチド配列に対して少なくとも90%同一である配列を有することができ前記配列は野生型HER2タンパク質におけるHER2ペプチド配列に隣接する。

20

【0102】

ペプチドの配列を変更し、その後、CD4⁺Th1細胞への結合ペプチド/エピトープを提示する被験体の単球、樹状細胞または他の抗原提示細胞を刺激する能力について、得られたポリペプチドをアッセイすることによってHER2結合ペプチドの機能的等価物を識別することができる。

【0103】

他の実施形態によれば、キメラペプチドおよび1つ以上のキメラペプチドを含む組成物が提供される。様々な実施形態によれば、キメラペプチドは、HER2ペプチド、別のペプチド、および他のペプチドのHER2ペプチドを結合するリンカーを含む。さらに、任意の適当なリンカーが使用されてもよいことが理解されるであろう。例えば、使用されるペプチドに依存して、HER2結合ペプチドは、他の結合ペプチドのアミノまたはカルボキシ末端のいずれかに結合してもよい。他のペプチドの位置及び選択は、HER2ペプチドがアルファヘリックス状かβ-ターン状か鎖状かという構造的特徴に依存する。

30

【0104】

別の実施形態において、リンカーは、長さで約2から約15のアミノ酸、約2から約10個のアミノ酸、約2から約6個のアミノ酸のペプチドでありうる。キメラペプチドは直鎖状でも環化していてもよい。さらに、HER2ペプチド、他のペプチド、および/またはリンカーが、レトロインベルソ形であってもよい。このように、HER2ペプチドは、沿ってレトロインベルソ形であってもよい。あるいは、HER2ペプチドと他のペプチドは、レトロインベルソ形であってもよい。別の例では、HER2ペプチド、他のエピトープ、およびリンカーはレトロインベルソ形であってもよい。

40

【0105】

キメラペプチドを含むペプチドは、周知の技術を用いて調製することができる。例えば、ペプチドは、組換えDNA技術または化学合成のいずれかを用いて、合成的に調製することができる。本発明の実施形態のペプチドは、個々に合成されるか、または2以上のペプチドから構成されるより長いポリペプチドとして、合成されうる。現在好ましい実施形態のペプチドは、好ましくは単離される、すなわち、他の天然に存在する宿主細胞タンパク質およびそれらの断片を実質的に含まない。

【0106】

50

本発明の実施形態のペプチドおよびキメラペプチドは、市販のペプチド合成機を使用して合成することができる。例えば、Kaumaya, P. T. P., et al, 「De Novo」 Engineering of Peptide Immunogenic and Antigenic Determinants as Potential Vaccines, in Peptides, Design, Synthesis and Biological Activity, pp133 - 164 (1994)に記載された化学的方法を使用することができる。例えば、HER2結合ペプチドは、キメラペプチドを形成するために他の結合ペプチドと共直線的に合成することができる。ペプチド合成は、Fmoc/T-But化学を用いて行うことができる。ペプチドおよびキメラペプチドは、任意の適切な方法で環化することができる。例えば、異なるように保護されたシステイン残基、ヨウ素酸化、Ac基の除去を高めるための水の添加、及びジスルフィド結合の付随的形成、および/またはシリクロライド-スルホキシド法を使用することによって、ジスルフィド結合を達成することができる。

10

20

30

40

50

【0107】

ペプチドおよびキメラペプチドは、無細胞翻訳系と、エピトープまたは結合ペプチドをコードしたDNA構築物に由来するRNA分子を使用して製造することができる。あるいは、エピトープまたはキメラペプチドを、各エピトープまたはキメラペプチドをコードするDNA配列を含む発現ベクターで宿主細胞をトランスフェクトし、その後、宿主細胞におけるポリペプチドの発現を誘導することによって作製することができる。組換え体の生産のために、結合性ペプチドエピトープ、キメラペプチド、またはその変異体をコードする1つ以上の配列を含む組換え構築物が、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング、弾丸導入又は感染などの従来の方法により宿主細胞に導入される。

【0108】

本発明の実施形態の結合ペプチドは、結合ペプチドの生物学的活性を破壊しない限り、グリコシル化、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含んでもよい。他の修飾は、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の取り込みを含む。

【0109】

実施形態の結合ペプチドは、2つ以上のペプチドを含む組合せとして調製することができる。ペプチドは、カクテルであってもよく、または標準的な技術を用いて互いに結合させてもよい。例えば、ペプチドは、単一のポリペプチド配列として発現させることができる。組み合わせにおけるペプチドは、同一でも異なってもよい。

【0110】

本発明の実施形態もまた、得られたペプチド(またはDNA)が本明細書に記載された配列と同一ではなく、しかし、本明細書に開示されるペプチドと同じ生物学的特性を有するような、1個以上のアミノ酸で改変されたペプチドである(または、同じものをコードするヌクレオチド配列に言及する場合、一つ以上の塩基対で改変する)前記実施形態の前記ペプチドの(または同じものをコードしたDNAの)「変異体」、「誘導體」、および「バリエーション」を包含すると解釈されるべきである。

【0111】

いくつかの実施形態はまた、配列番号: 1~6のいずれか1つ以上の配列を有するペプチドから選択された少なくとも1つのペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。核酸配列は、RNAに転写されるDNA配列及びペプチドに翻訳されるRNA配列の両方を含む。他の実施形態によれば、ポリヌクレオチドは、好ましい態様のペプチドのアミノ酸配列から推測される。当技術分野で知られているように、冗長コドンが原因で、翻訳されたペプチドの生物学的活性を保持しながら、いくつかの代替的なポリヌクレオチドが可能である。

【0112】

さらに、好ましい実施形態では、本明細書に開示される結合ペプチドと実質的な相同性

を有するペプチドをコードする単離された核酸を包含する。好ましくは、本発明のペプチドをコードする単離された核酸のヌクレオチド配列は、好適な実施形態の結合ペプチドをコードする単離された核酸のヌクレオチド配列と「実質的に相同」で、すなわち、約60%の相同性、より好ましくは約70%の相同性、さらにより好ましくは約80%の相同性、より好ましくは約90%の相同性、さらにより好ましくは、約95%の相同性、さらにより好ましくは約99%相同である。

【0113】

元の結合ペプチドの免疫学的活性を保持しなければならないという規定のもとで、好ましい実施形態の範囲は、より短い及びより長いペプチドおよびポリヌクレオチドを含む、ホモログ、アナログ、バリエーション、誘導体および塩を、同様に一又は複数のアミノ酸又は核酸が置換されたペプチドおよびポリヌクレオチド類似体を、同様に、当技術分野で知られているようなアミノ酸または核酸の誘導体、非天然アミノ酸または核酸および合成アミノ酸、または核酸を包含することは、明示的に理解されるべきである。具体的には、アクティブな活性結合ペプチドの断片だけでなく、拡張物、抱合体および混合物が本明細書に記載の原理に従って包含される。

10

【0114】

好ましい実施形態は、これらの相同なDNAが、本明細書に開示される結合ペプチドの生物学的活性を有するならば、本明細書に記載され参照された核酸に相同な、任意のおよび全ての単離された核酸を含むと解釈されるべきである。

【0115】

当業者は好ましい実施形態の核酸は好ましい実施形態様のペプチドをコードするRNAまたはDNA配列及びそれらの任意の、無細胞である場合または細胞と関連しているときにヌクレオチド配列をより安定にするDNAまたはRNAの化学修飾を含む、改変型を包含することを理解するだろう。ヌクレオチドの化学修飾はまた、ヌクレオチド配列が細胞によって取り込まれる効率、または細胞内で発現される効率強化するために使用されてもよい。任意の及び全てのヌクレオチド配列の改変の組み合わせは、好ましい実施形態において熟慮される。

20

【0116】

さらに、例えば、上記のSambrookおよびRussellによるおよび上記のAusubelらによるもののような当該分野で周知の組換えDNA方法論を用いて、あらゆる手順を好ましい実施形態のペプチドの変異体、誘導体もしくは変異型の生成に使用することができる。ポリペプチドをコードするDNA配列を改変することによりペプチドまたはポリペプチド中のアミノ酸の変化を導入するための手順は、当技術分野で周知であり、これらの、またはほかの論文にも記載されている。

30

【0117】

好ましい実施形態の結合ペプチドをコードする核酸は、例えばレトロウイルスベクターのような適切なベクターに組み込むことができる。これらのベクターは、当該分野で周知である。核酸またはそれらを含むベクターは、有効に所望の細胞に導入することができ、細胞は好ましくは患者由来である。

40

【0118】

凍結保存

PBMCを被験体から得て、分離した後、本明細書に記載された任意の血液検査/アッセイを実行する前に、当業者に周知の方法を使用して凍結保存することができる。

【0119】

診断/予後/治療モニタリングツールとしての使用 本明細書に記載されるように、循環HER2-反応性IFN- γ CD4⁺ Th1細胞の減少は、早くもDCIS乳癌で始まり、実質的に早期侵襲ステージIのHER2⁺ 腫瘍で減少することが見出された。より具体的には、健康なドナーからHER2⁺ DCIS（非浸潤性乳管癌）を経てHER2⁺ IBC（浸潤性乳癌）への乳房の腫瘍形成における連続体にわたり、段階的な抗HER2 CD4⁺ Th1応答の減少がある。免疫応答のこの損失は起因する

50

ものがなく、すなわち、癌関連免疫抑制によるものではなく、おそらく侵襲病変への転位の増加に関連しておらず、調節性T細胞とは無関係である。

【0120】

抗HER2 CD4⁺のTh1免疫応答の損失のこの知見に基づいた実施形態は、明らかに健康な個人のための、マンモグラフィまたは他のスクリーニング手法を介して検出されないかもしれない乳癌および他の癌のスクリーニング方法を提供し、好ましい実施形態の血液検査は抗HER2 CD4⁺のTh1応答を検出するためのものである、迅速な免疫試験/アッセイを実行することを含む。健康な個人のものよりも低くなっている個人試験結果により、より決定的なテストが可能になり、より迅速な治療オプションの実行が可能になるだろう。例えば、本明細書中の血液検査は、有利には、ワクチン接種がHER-2発現乳癌のリスクを低減することが考えられる、リスクのある患者を同定するために使用されることができる。例えば、リスクのある患者は応答を減少させる授乳、妊娠、およびその他の生活のストレスイベントの完了後のものであってもよい。

10

【0121】

このようなスクリーニング方法は、遺伝的素質や生活要因のような要因により乳癌を発症するリスクが高い患者にとって有益であり得る。診断の観点から、免疫バイオマーカーは、高リスク患者の抗HER2 Th1免疫の変動をスクリーニングするために開発することができる。IHC染色や乳房生検標本のFISHプロファイリングは、腫瘍の進化の分離したスナップショットのみを提供しているが、(例えばこの潜在的なバイオマーカーと同様に)免疫プロファイリングでは、腫瘍の自然史及び免疫影響を垣間見ることができる。任意の乳癌と診断された患者が、HER2発現する新しい乳房イベントまたは再発のための危険にさらされる可能性があるかどうかを予測するために使用することができる。

20

【0122】

別の実施形態では、抗HER2 Th1応答の喪失に基づく診断またはモニタリング試験は、HER2^{pos}乳癌患者が化学療法+トラスツズマブなどのような標準的な非免疫療法によく応答するかどうかを予測するために使用することができる。

【0123】

さらなる実施形態によれば、本明細書に詳細に説明するように、標的(例えば、トラスツズマブ)又は従来(すなわち、化学療法)乳癌の治療と比べて、HER2由来クラスIIペプチド(DC1免疫)と自家DC1のワクチン接種を経て、CD4⁺のTh1応答を優先的に復元することが可能である。このように、HER2^{pos}-IBC患者において、HER2-パルスDCワクチン接種後はCD4⁺のTh1応答が効果的に回復したが、トラスツズマブ/細胞毒性化学療法(「T/C」)治療後は回復しなかった。好ましい実施形態の血液検査は、したがって、Th1免疫応答の回復、または非回復の程度を決定するために、ワクチン接種前とワクチン接種後に実行される、したがって、患者は乳癌治療後本明細書における血液検査を介して以前に見つかったCD4⁺Th1免疫損失がワクチン接種によって回復したかどうかを測定することで簡単に自分のCD4⁺Th1応答を再評価することができる。

30

【0124】

別の実施形態では、抗HER2 CD4⁺Th1応答の減少に依存する血液検査は、DC1のワクチン接種が抗HER2免疫を癌のさらなる侵入に対する保護を提供することができるレベルに十分に回復し増加したかを決定するために使用されてもよい。DC1ワクチン接種後、患者のCD4⁺Th1免疫状態を追跡するために、好ましい実施形態の血液検査を好ましくは患者の医師によって推奨されるスケジュールで、何度も行いうることができる。これらの追加の試験は、ワクチン接種後、ワクチンが誘導したHER2腫瘍標的に対する感作の耐久性と長期間にわたる保護の可能性のために、例えば、少なくとも約60ヶ月以上まで、何ヶ月も行いうることができる。

40

【0125】

本明細書における血液検査を使用することは、HER2発現浸潤性乳癌患者の化学/トラスツズマブ治療後のHER2-反応の程度を示すために使用されてもよい。相関はこの

50

ような患者が治療にどの程度よく応答するかで本明細書に示されており、それによって、結果を予測する。例えば、抑制された抗HER2 Th1応答は、免疫補助T/C治療を受けた患者におけるその後の再発のリスク増加を予測する。

【0126】

他の実施形態は、HER2^{pos}浸潤性乳癌の患者に見られる抗HER2 CD4⁺Th1損失を増強または復元するための免疫戦略、すなわち、DCワクチン接種のための方法を提供する。「免疫回復」のためのこの能力は、治療のために現在のトラスツズマブ療法と組み合わせて利用することができる。また、化学療法+トラスツズマブを含む標準的な治療法と予防接種を組み合わせるための論理的根拠も提供するのである。

【0127】

別の実施形態は、新しい乳房イベントのリスクを予測するための免疫相関を示唆する。化学療法/トラスツズマブで処置されたHER2^{pos}-IBC患者において、応答の変動、より具体的には、抑制された抗HER2 CD4⁺Th1応答が、新規乳癌イベントのリスク増加と関連していることが示された。したがって、そのような抑制された応答は、患者がおそらく新しい乳房イベントに耐えるかどうかのような結果を予測するために使用することができ、そうであれば、おそらく追加の治療が必要になる。バイオマーカーを、このようにそれに基づいて開発することができる。

【0128】

さらに、IFN- γ およびTNF受容体を発現している、HER2^{pos}乳癌細胞が、Th1由来サイトカイン(Th1細胞によって産生される原型サイトカイン、IFN- γ 及びTNF- α を含む)に曝露されるとアポトーシスを起こすという、本明細書に記載の観測は、乳房退縮などの生理学的プロセス中に抗HER2 Th1細胞がHER2発現細胞を制御または排除することに有用であることを示唆する。IFN- γ およびTNF- α 受容体の発現は、本明細書に記載のように試験したすべてのHER2^{pos}乳癌細胞株で見出され、これらの抗HER2 CD4⁺Th1細胞は、HER2発現乳癌細胞株のアポトーシスを引き起こす可溶性因子を産生することがわかった。これは、抗HER2 Th1は、乳房退縮などの生理学的プロセス中にHER2発現細胞を制御または排除することに役立っていることを示唆し、クラスI^{ne}クラスI^{po}腫瘍細胞を認識することはできない、CD4⁺Th1細胞がそれにもかかわらずどのように腫瘍細胞の破壊を媒介することができるのか説明することができる。

【0129】

本明細書に詳細に記載されるように、さらなる実施形態は、HER2^{pos}乳癌における標準術前補助療法に対する病理学的応答性を予測するための免疫相関を提供する。実験はHER2発現侵襲乳癌患者のための化学/トラスツズマブ治療後のHER2応答度が、治療への応答度とどれだけ相関するかを研究するために設計された。このような実験は、標準術前補助療法に対する病理学的応答性を予測するための免疫相関を明らかにした。関連性は、病理学的完全寛解を有さなかった患者と比較したときに、術前補助完全反応者と有意に高い抗HER2 CD4⁺のTh1応答との間に見出された。

【0130】

T/C処理HER2^{pos}-IBC患者のHER2特異的なTh1抑制の大きさが、新しい乳房イベントの続く再発の危険性の増加と相関する一方、対照的に、抗HER2 CD4⁺のTh1免疫の上述の保存は術前補助化学療法に対する完全な病理学的応答と関連する。まとめると、これらのデータは、抗HER2 Th1免疫反応性を臨床的または病理学的障害のリスクがある脆弱な患者のサブグループを同定するためのバイオマーカーとして使用することができる旨示唆する。

【0131】

本明細書に記載された本発明の実施形態は、HER2発現乳腺腫瘍の特定の参照例を含むことができるけれども、当業者によって理解されるべきであるように、例示するだけだが、卵巣、胃、食道、肺、膵臓、肝臓、前立腺および他の固形腫瘍のような他のタイプのHER2発現腫瘍が、本発明の実施形態の教示から利益を得ることができる。同様に、当

10

20

30

40

50

業者は、本明細書の教示をトリプルネガティブ及びHER陽性、ならびに他の腫瘍を含むHER2発現乳癌に拡張できることを理解できる。

【0132】

さらに、好ましい実施形態に従って使用することができる受容体チロシンキナーゼファミリーの他のHERファミリーのターゲットが存在する。HERファミリーは、4つの関連するシグナル伝達分子から構成される：種々の癌に關与しているHER1、HER2、HER3、およびHER4。過剰発現HER-2が乳癌の約20%から25%に見られることが知られているが、他のHERファミリーメンバーが他の癌と同様に、初期および浸潤性両方の乳癌に關与していることが判明した。例えば、HER1は、少数の乳癌に発現し、一般的にトリプルネガティブである。C-Metは、HER3を活性化する多くの癌の再発に關与する成長因子受容体である。HER3は、結腸癌、前立腺癌、乳癌および黒色腫で過剰発現される。HER3は、DCIS病変および乳癌の大多数において発現される。HER3は、DC1 HER2ワクチン接種を受けた一部の患者における手術の時点で残存DCISにおいて検出されうる。したがって、乳癌および他の固形がんを引き起こすような、HER3、HER1およびc-Metのような他のHERファミリーターゲットは、有益に標的とされ、本明細書に記載されたHER2でなされたように、これらの他のターゲットに対するペプチドワクチンが開発されうる。従って、患者の乳房の腫瘍で発現している分子の同定のためのHER2、HER3、HER1およびC-Metのようなオンコドライバー/提案されたオンコドライバーを含む乳癌パネルを、治療の補助剤として開発することができ、ワクチン標的分子として使用することができる。従って、HER2のために本明細書に記載されたDC1ワクチンに加えて、同様のワクチンを、非HER2発現乳癌タイプのために開発することができることが期待される。

10

20

【実施例】

【0133】

実施例

好ましい実施形態は、以下の実験実施例を参照してさらに詳細に記載される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供され、特記しない限り限定することを意図するものではない。したがって、好ましい実施形態は以下の実施例に決して限定されるべきでなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変更を包含すると解釈されるべきである。

30

【0134】

さらに説明することなく、当業者は、前述の説明及び以下の例示的な実施例を使用して、本発明の実施形態を作成し、利用し、そして請求項に記載された方法を実行することができる。以下の実施例は、したがって、特に好ましい実施形態を指摘し、そしていかなる方法でも開示の残りを限定するものとして解釈されるべきではない。

【0135】

以下の参考例は、方法、結果、及び考察のセクションを含む。

【0136】

参考例

方法

患者の選択と研究計画

40

【0137】

ペンシルベニア大学の施設内審査委員会による承認の後、現在記載されている研究に参加するために143人の患者が連続して募集され、インフォームドコンセントが得られた。健康なドナー(HD)(n=21)、及び良性乳房疾患(BD)(n=10)、HER2^{neg}-DCIS(n=11)、HER2^{neg}(0/1+)IBC(n=11)、HER2^{pos}-DCIS(n=31)を有する患者、及びHER2^{pos}-IBC(n=22)の患者における抗HER2 CD4⁺Th1(Th1)の応答を試験した。患者のTh1応答を、HER2^{pos}-DCISのための術前補助DC1免疫試験に登録し、手術でステージIのHER2^{pos}-IBCを有することが判明した(n=11)免疫前後

50

に（すぐに及び6ヶ月以降に）分析した。未処置のHER2^{pos}-IBC患者におけるTh1応答をT/C処置されたステージI-II HER2^{pos}-IBC患者（n=37）における応答と比較した。図1は、研究適格患者とドナーコホートを示す。T/C治療HER2^{pos}-IBC患者は、任意の局所のまたは遠隔の再発として定義される、BEの発生のため調査した。以下の表1は、本研究集団の人口統計学的及び腫瘍関連特性を示す（個々の患者のサブグループにとっての年齢、人種、AJCC病理学的段階、ホルモン受容体の状態、化学療法のタイミング及びトラスツズマブの完了からの時間（適用できる場合））（「IBC」：浸潤性乳癌；「DCIS」：非浸潤性乳管癌；「T/C」：トラスツズマブ/化学療法）。T/C治療後、HER2^{pos}-IBC患者は、任意の局所領域または遠隔の再発として定義される、その後の乳房イベント（BE）の発生のために観察された。すべての被験者のTh1免疫応答が発生し、将来に向かって分析を行った。

【0138】

【表1】

表1

特性	健康なドナー n=21		良性肺疾患 n=10		HER2neg-DCIS n=11		HER2neg-IBC (0または1+) n=11		HER2pos-DCIS n=31		HER2posIBC n=22		T/C-治療 HER2posIBC n=37	
年齢														
平均±SE	45.1±2.7		42.3±4.6		53.3±2.4		58.5±5.7		54.3±1.8		56.8±3.1		53.0±2.2	
範囲	28~63		22~66		21~54		28~83		35~83		36~88		28~85	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
人種/民族性														
白人	15	71.4	8	80.0	8	72.7	10	90.9	26	83.9	16	72.7	30	81.1
アフリカ系アメリカ人	1	4.8	2	20.0	1	9.1	1	9.1	4	12.9	3	13.6	5	13.5
アジア人	5	23.8	0	0	1	9.1	0	0	1	3.2	2	9.1	0	0.0
ラテンアメリカ系	0	0	0	0	1	9.1	0	0	0	0	1	4.5	2	5.4
AJCC状態														
ステージ1							9	81.8			16	72.7	8	21.6
ステージ2							1	9.1			6	27.3	20	54.1
ステージ3							1	9.1			0	0	9	24.3
ホルモン受容体状態														
ERpos					11	100	9	81.8	19	61.3	12	54.5	21	56.8
PRpos					11	100	9	81.8	17	54.8	11	50.0	19	51.4
化学療法の順序														
術前補助							0	0					12	32.4
術後補助							5	45.5					25	67.6
なし							6	54.5					0	0
トラスツズマブ治療の完了から研究登録までの時間														
6か月未満													16	43.2
6か月以上													21	56.8

【0139】

ワクチン試験計画とワクチン接種手順 HER2^{pos}-DCISを有する患者のための、HER2-パルス、1型-極性化DCワクチン接種の二つの術前補助試験が行われた。DCワクチンは、以前に記載したように調製した。Koski, G. K., et al, J. Immunother. 35(1): 54(2012) (Koski, et al.); Sharma, A., et al, Cancer 118(17): 4354(2012) (Sharma, et al.); Fracol, M., et al., Ann. Surg. Oncol. 20(10): 3233(2013); Lee, M. K. 4th, et al, Expert Rev 8(11): e74698(2013); Czerniecki, B. J., et al, Cancer Res. 67(4): 1842(2007); Czerniecki, B. J., et al, Cancer Res. 67(14): 6531(2007); and U.S. Published Application US2013/0183343A1を参照する。

【0140】

本研究で使用されるDCワクチン接種戦略は図2に示される。そこで示されるように、タンデム白血球搬出/向流遠心エルトリエーションを経由して被験体から単球DC前駆体(CD14⁺末梢血単核細胞)を得た。DCを、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)(250IU/mL; Berlex, Wayne, NJ)及びIL-4(1000u/mL、R&Dシステムズ、ミネソタ州ミネアポリス) - これらは、未成熟DC(iDC)と考えられているとともに、マクロファージ無血清培地(SFM)(CELLGRO/メディアテック、バージニア州マナッサス)で一晩培養した。次の日iDCを、6個のHER2 MHCクラスII結合ペプチドでパルスした(42~56(配列番号:1)、98~114(配列番号:2)、及び328~345(配列番号:3)(HER2の細胞外ドメイン)、及び776~790(配列番号:4)、927~941(配列番号:5)、及び1166~1180(配列番号:6)(HER2の細胞内ドメイン))(Disis, M. L., et al., Clin. Can. Res. 5(6):1289(1999))(Disis et al)(United Biochemical Research, Seattle, WA; peptides stored lyophilized and reconstituted in sterile PBS for use、を参照する)。インキュベーションの8~12時間後に、IFN-(1,000U/mL)を添加した。次の日、回収の6時間前にNIH標準試料リポ多糖(LPS)を添加し(10ng/mL)、1型極性化表現型(DC1)への完全なDC活性化を達成した。HLA-A2.1^{POS}患者に対して、2つの追加のMHCクラスII結合ペプチド(ペプチド369~377(配列番号:7)及びペプチド689~697(配列番号:8)でDC1をパルスした。回収した細胞を洗浄し、70%を超える生存率、グラム染色陰性、及びエンドトキシン5EU/キ口未満のロット放出基準を確認した。

10

20

30

40

50

【0141】

Koskiらにより記載されたように、節内及び/または病巣内のワクチン注射を行った。簡潔にいうと、ワクチン接種は、ペンシルバニア大学病院の国立衛生研究所が指定した総合臨床研究センターで投与した。注射薬は、1mlの滅菌生理食塩水に懸濁された10~20百万個のHER2パルスDCを含み、鼠径部リンパ節、乳房、または両方に超音波誘導によって投与された。ワクチン接種は、6週間にわたって週1回投与され、そして全ての患者は、6回のワクチン接種を完了した。ワクチン接種関連の安全性及び毒性データは、シャルマらによって以前に報告されている。

【0142】

免疫応答の検出

上記で参照した6個のHER2クラスII結合ペプチドでパルスした患者の非培養の末梢血単核細胞(PBMC)から、酵素結合免疫吸着スポット(ELISPOT)アッセイを用いてIFN- γ 産生を測定することによって循環抗HER2 CD4⁺Th1応答を生成した。ELISPOTはKoskiらにより記載された方法に従って行った。簡潔にいうと、PVDフメンプレート(マブテック社、シンシナティ、OH)を、抗IFN- γ 捕捉抗体(1-D1K(Mabtech社))により一晩コーティングした。密度勾配遠心分離を用いて単離した凍結保存PBMCを、5%ヒト血清を補充した予熱DME M中で解凍した。プレートを洗浄し、ブロッキングした後、PBMCをトリプリケートで播種し(2x10⁵細胞/ウェル)、プレートを24~36時間37℃でHER2由来クラスII結合ペプチド(4 μ g)(ペプチド42~56(配列番号:1)、ペプチド98~114(配列番号:2)、ペプチド328~345(配列番号:3)、ペプチド776~790(配列番号:4)、ペプチド927~941(配列番号:5)、及びペプチド1166~1180(配列番号:6)、培地単独(無刺激対照)で、又は陽性対照(抗ヒトCD3及び抗CD28抗体、(各0.5 μ g/mL)、共にBD Pharmingen社、San Diego, CA)と共にインキュベートした。洗浄後、検出抗体(7B6-1-ビオチン(マブテック社); 100 μ g/mL)を各ウェルに添加し、プレートを37℃で2時間インキュベートした。次に、PBS+0.5%FCS中で1:1000に希釈したストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼをインキュ

ベーション前に37℃で追加の1時間添加した。その後、TMB基質溶液(Kirkgaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を添加しスポット形成を明らかにした。発色後、ウェルを水道水で洗浄した。スポット形成細胞(SFC)は、自動ELISPOTリーダー(ImmunoSpot CTL, Cleveland, OH)を用いて計数した。

【0143】

さらに、リコール(recall)Th1応答を、特定の患者のサブセット由来の評価可能なPBMCを1:100に希釈した呼び戻し刺激カンジダ・アルビカンス(Allermed Laboratories, San Diego, CA)及び破傷風トキソイド(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)で刺激することで、試験した。Treg及び/又はTh2表現型の相対的機能活性を決定するために、IL-10産生をGuerkov, R.E., et al, J. Immunol. Meth. 279:111(2003)に記載されたように、2.5 µg/mLの抗CD3抗体を陽性対照として使用して、ELISPOTで測定した。

10

【0144】

ELISPOTアッセイにおける複製間の可変性は小さいので(データは示さず)、抗原特異的応答を決定する経験的方法を行った。個々のHER2クラスIIペプチドに対する正の応答を(1)刺激されていないバックグラウンドを差し引いた後の実験ウェルにおける、20 SFC/2X10⁵細胞の最小閾値;及び(2)バックグラウンドを超える抗原特異的なSFCの少なくとも2倍の増加、と定義した。各患者群に対するCD4⁺Th1応答の3つの別々の測定基準は:(A)全体の抗HER2応答性(1つより多いペプチドに反応する患者の割合)(応答性)、(B)反応性ペプチドの平均数(応答レポーター)、及び(C)6個のペプチド全体の累積応答(SFC/10⁶細胞として報告)(累積応答)、と定義した。

20

【0145】

ELISPOTのアッセイ間の精度

ELISPOTのアッセイ間の精度は前述のように、Maecker, H.T., et al. BMC Immunology 9:9(2008)(Maecker, et al.)によって実行した。平均分散(CV)(3日間で3つの並列複製)を、HER2細胞外ドメイン(ECD)ペプチドミックス(ペプチド42~56(配列番号:1);ペプチド98~114(配列番号:2);及びペプチド328~345(配列番号:3))で生体外で刺激した5人のドナーの累積Th1応答に対してプロットしたとき、特徴的な非直線関係が観測された。図3Aに示すように、累積応答がゼロに近づくとき平均CVは劇的に増加した。CVと累積応答レベルとの間の非直線関係のため、別の3日間の3回のアッセイの標準偏差(SD)をアッセイ間の可変性の尺度として累積Th1応答に対してプロットした。同上。図3Bに示すように、SDは累積応答と直線関係であることが見出された(実線は、平行点線で示される回帰の95%信頼区間を伴う、生成されたSDの線形回帰を表す)。(R² = 0.96, p < 0.0001)

30

【0146】

直線性の研究は、その研究において2人の高応答HER2-反応性の応答者から提供されたPBMCのトリPLICATEサンプルを既知で同種の非HER2応答者からのPBMCに連続的に希釈し、そしてex vivoでHER2 ECDペプチドミックス(ペプチド42~56(配列番号:1)、ペプチド98~114(配列番号:2)及びペプチド328~345(配列番号:3))で刺激して、行われた。同じ非応答ドナーをすべてのアッセイに使用した。刺激されていないバックグラウンドを各希釈ポイントについて差し引いた。両方のドナー(#1:三角; #2:丸)において、Th1応答と希釈濃度の間には有意な線形関係が観察された。まとめると、これらのデータは、ELISPOTアッセイは、正確で信頼性が高く、再現性があることを示唆している。

40

【0147】

HER2抗体検出

50

ELISAを、内因性のIgG1及びIgG4抗HER2抗体について患者の血清を試験するために実施した。EIA/RIAプレートを、重炭酸塩緩衝液中のHER2 ECDペプチド(5 µg/ml、Speed Biosystems社、Rockville、MD)でコーティングし、室温(RT)で一晩インキュベートした。翌日、プレートをPBS中の1%カゼインでブロックし、血清(1:100希釈)をブロッキング緩衝液に四重(quadruplicate)に添加し、2時間インキュベートし、1:500希釈のIgG1またはIgG4(ライフテクノロジーズ、グランドアイランド、NY)のいずれかに特異的なHRP結合抗ヒト二次抗体を添加する前に、3回洗浄した。1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、TMB基質溶液(カークガード&ペリー・ラボラトリーズ)を用いて現像した。

10

【0148】

フローサイトメトリー

PBMC懸濁液を、FACS緩衝液(PBS+1%FCS+0.01%アジド)中で調製し、抗ヒト-CD3、-CD4、-CD8、-CD83、-HLA-DR、-CD11b、-CD33、-CD19、-CD56、-CD16(全てBD Biosciences社、San Jose, CA)、-CD4、及びCD25(ともにBiolegend、サンディエゴ、CA)を使用し、相対的なPBMCの免疫表現型を決定した。洗浄後、細胞を、抗体の混合物と室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で3回洗浄し、2%パラホルムアルデヒドで固定した。染色した試料を、24時間以内に分析した。FoxP3固定/透過処理キット(Biolegend)を使用して抗FoxP3(eBioscience社、San Diego, CA)を有するPBMCの細胞内染色を、製造業者の指示に従って行った。フローサイトメトリー分析は、BD LSR-IIサイトメーターを用いて行い、データセットは、セルクエストプロTMソフトウェア(BD Biosciences)を用いて分析した。

20

【0149】

病理学的染色

HER2^{pos}-DCISと-IBC腫瘍由来のホルマリン固定、パラフィン包埋組織ブロックの薄片を作り、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)で染色し、腫瘍周囲のリンパ球浸潤を評価した。HER2^{pos}-DCISと-IBC腫瘍由来のサンプルケースにおいて、多重標識IF(パーキンエルマー、マサチューセッツ州ウォルサム)を使用してリンパ球亜集団を調べた(以下を参照、Wang, C, et al., Journal for Immunotherapy of Cancer 118:1(Suppl. 1)54(2013)(Wang, C, et al.)). 腫瘍は、チラミドシグナル増幅を用いる同種の蛍光標識で、CD4、CD8、CD20及び4'6'-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)について染色した。画像は、ベクトラマルチスペクトル顕微鏡を用いて、腫瘍、間質、及びT-/B-リンパ球を識別するパターン認識ソフトウェアで分析した。

30

【0150】

アポトーシスアッセイ

HER2発現のスペクトラムを有するBC細胞株((Ithimakina, S., et al., Can. Res. 73:1635-46(2013))-HER2^{high}SK-BR-3、HER2^{intermediate}MCF-7、HER2^{low}MDA-MB-231(American Type Culture Collection)-をRPMI-1640+10%FBS(CELLGRO/メディアテック、バージニア州マナッサス)で培養した。50x10³BC細胞をトランスウェルシステム(BD Biosciences社)に播種し、そして、10⁶CD4⁺T細胞及び10⁵DC1(成熟DC)またはiDC(未成熟DC)と共培養した。DC1、iDC及びCD4⁺T細胞を、シャルマらにより記載されるように、ワクチン接種後の選択した患者から得た。DC1/iDCを、クラスIIHER2または無関係の対照BRAFペプチド(20 µg/ml)で37 24時間パルスした。具体的には、Figure 10Aに示すように、5

40

50

0×10^3 SK-BR-3細胞を、培地のみ（完全培地）、 10^6 ヒトCD4⁺T細胞のみ（CD4⁺のみ）、 10^6 CD4⁺T細胞 + 10^5 の各HER2クラスIIペプチド（iDCH） - または無関係なクラスII BRAFペプチド（iDCB） - パルスiDC、及び 10^6 CD4⁺T細胞 + 10^5 の各HER2（DC1H） - またはBRAF（DC1B） - パルスDCIと共培養した。DC1/iDCを、クラスII HER2または無関係な対照BRAFペプチド（ $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で37[°]24時間パルスした。対照ウェルは、培地またはCD4⁺T細胞のみを含有した。

【0151】

ポリクローナルヤギIgG抗ヒトTNF- α （ $0.75 \text{ ng}/\text{mL}$ TNF- α あたり $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びIFN- γ （ $5 \text{ ng}/\text{mL}$ IFN- γ あたり $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）抗体（R&Dシステムズ、ミネソタ州ミネアポリス）を使用してヤギIgGアイソタイプを対照としてTh1サイトカインを中和した。処置後、BC細胞を溶解し、切断されたカスパーゼ3を検出するためのウエスタンブロット分析に供した。核の断片化の程度は、DAPI染色により評価した。さらに、(i) iDC:CD4⁺又はDC1:CD4⁺T細胞共培養由来の上清、又は(ii) TNF- α （示されるように $10 - 200 \text{ ng}/\text{mL}$ ）+ IFN- γ （示されるように $100 - 2000 \text{ U}/\text{mL}$ ）（R&D Systems）とインキュベートした 50×10^3 BC細胞のアポトーシスを、切断されたカスパーゼ3の検出によって試験した。

10

【0152】

高レベルのげっ歯類HER2/ErbB2（HER2^{high}TUBO及びMMC15 [後者はLi-Xin Wang, Cleveland Clinicの寛大な支援]）及びHER2^{low/neg}（4T1）を発現したトランスジェニックマウス乳癌細胞株を、培地単独（RPMI-1640 + 10% FCS）、組換えマウスrmTNF- α （ $1 \text{ ng}/\text{mL}$; Peprotech社製）単独、rmIFN- γ （ $12.5 \text{ ng}/\text{mL}$; Peprotech社製）単独、またはrmTNF- α + rmIFN- γ の組み合わせとともに37[°]で72時間インキュベートした。トリプシン処理後、回収した細胞を洗浄し、FACS緩衝液に再懸濁し、FITCアネキシンV（ $4 \mu\text{M}$ ）及びPI（ $2 \mu\text{M}$ ）を添加した。細胞を、20分間、4[°]でインキュベートし、2回洗浄し、フローサイトメトリーに供した。アポトーシス細胞は、両方のマーカーについて陽性染色されたものと定義した。ピンキュリンは、ローディングコントロールとして使用した。アポトーシスの誘導倍率を示す、対応する平均カスパーゼ3/ピンキュリン比 \pm SEMを、イメージJソフトウェアを用いて定量した。

20

30

【0153】

ELISA

IFN- γ 及びTNF- α （BD Pharmingen社製）用の捕捉及びビオチン化検出抗体及び標準物質を製造業者のプロトコルに従って使用した。

【0154】

統計解析

記述統計を、患者の特性、免疫応答変数の分布を要約するために使用した。連続変数は平均、SEM、及び頻度と割合による範囲及びカテゴリの変数によって要約した。データ変換（自然対数または平方根）は、パラメトリック試験の仮定を満たすために必要なときに、適用した。事後Schefféペアテスト（パラメトリック）又はKruskal-Wallisテスト（ノンパラメトリック）を有する分散分析は、3より大きい群の連続変数を比較するために使用した。スチューデントのt検定は、2群の比較のために使用した。フィッシャーの正確確率検定は、マルチレベルのテーブルにおけるカテゴリ変数を比較するために使用した。スチューデントのペアt検定とマクネマーの正確確率検定はTh1応答変数における患者内ペアの変化を評価するために使用された（例えば、ワクチン接種前対ワクチン接種後）。p値 $p < 0.05$ は、統計的に有意とみなした。すべての試験を両側で行った。統計分析は、SPSS（IBM社製）またはStatXact（Cytel社カリフォルニア州サンディエゴ）のいずれかでいった。

40

50

【0155】

結果

患者の特性

ランダムで継続的な登録後、143人の被験者が試験の包含基準を満たした。参加者の平均年齢は 53.1 ± 1.4 (範囲、21~88)歳で大部分(79.0%)は白人種だった。採血された時点での患者/ドナーコホートは、図1及び上記の方法の節のセクションに示される。研究参加者のドナーの人口統計学及び腫瘍関連特性は、上記表1に詳述される。HER2^{pos}-DCIS及び-IBCコホートの、それぞれの26人(83.9%)及び11人(50.0%)の患者は、それぞれ以前に、HER2^{pos}-DCISのための術前補助1型極性化(DC1)ワクチン接種試験に登録していて、彼らの患者/腫瘍特性はSharmaらによって報告されている。

10

【0156】

全身性の抗HER2のTh1免疫の損失は、乳房腫瘍形成の進行と相関する

末梢血単核細胞(PBMC)を使用して、腫瘍形成の連続体に亘って全身抗HER2 CD4⁺Th1応答の変化を生体外でのHER2ペプチド刺激IFN-ELISPOTアッセイ法により、予め調べた。3個のTh1応答の測定基準をグループ間で比較した：(a)全体の抗HER2応答(1より多いペプチドに反応する患者の割合)、(b)反応性ペプチドの平均数(レポーター)、及び(c)上述した6個のクラスIIペプチドに亘る累積応答。健康なドナー(HD)、または良性乳房疾患(BD)患者と比較したとき(図1、コホートA)、Th1応答における有意な段階的な減少がHER2^{pos}乳癌患者において観察された。未治療HER2^{pos}-DCIS(図1、コホートC)で開始し、治療ナীবステージI/II HER2^{pos}-IBC(図1、コホートF)における低点に達し、Th1免疫のこの進行性の損失は、すべてのTh1応答の測定基準全体に均一に観察された。例えば、全体的な抗HER2応答は、HD/BDにおける100%からHER2^{pos}-DCISにおける84%に、HER2^{pos}-IBC患者における32%に減少した($p < 0.0001$)。同様の有意な段階的な減衰応答レポーター(5.2 ± 0.2 対 4.5 ± 0.4 対 2.0 ± 0.3 対 0.4 ± 0.2 、 $p < 0.0001$)及び累積応答(259.9 ± 23.5 対 225.1 ± 25.5 対 126.1 ± 24.4 対 32.3 ± 5.4 、スポット形成細胞(SFC)/ 10^6 細胞、 $p < 0.0001$)が、HD、BD、HER2^{pos}-DCIS、及びステージI/II HER2^{pos}-IBC患者に亘る、それぞれに、図5Aに示すように全体で観察された。事後の比較では、応答レポーター($p < 0.001$)及び累積応答($P = 0.001$)によって評価して全体的な応答性($P = 0.07$)で評価しないとき、HER2^{pos}-DCIS患者におけるTh1応答は、HDにおける応答よりも有意に低かった。HER2^{pos}-IBC患者でのTh1応答は、これらの患者が、HER2^{pos}-DCIS患者と比較して有意に低い全体的な応答性($P = 0.0003$)、レポーター($p = 0.001$)、及び累積応答($p < 0.001$)を示したことでさらに抑制された。 10^6 のPBMCあたりの反応性細胞の割合は、HDにおける0.03%からHER2^{pos}-IBC患者における0.03%に及んだ。

20

30

【0157】

未治療HER2^{neg}-DCIS(図1コホートB)またはHER2^{neg}-IBC(図1コホートD)の患者及びHD/BD患者におけるTh1応答は感知できるほどに変化しなかったことに留意すべきである。HER2^{neg}-DCIS患者と比較して、しかしながら、HER2^{pos}-DCIS患者は有意に低い抗HER2のTh1レポーター($p < 0.001$)及び累積応答($p = 0.02$)を実証した。同様に、HER2^{neg}-IBC患者と比較して、HER2^{pos}-IBC患者は、図5Aに示されるように低い応答性($P = 0.0003$)、レポーター($P < 0.001$)、及び累積応答($p < 0.001$)を有した。

40

【0158】

患者グループ全体で累積Th1応答への個々のHER2ペプチド特異的な貢献は、図6

50

に示すように、すべてのHER2細胞外ドメイン(ECD)と細胞内ドメイン(ICD)ペプチド応答プロファイル($P < 0.0050$)に亘って、HD/BDからHER2^{pos}-IBC患者と類似の段階的なTh1減衰を明らかにした。不均衡なDCIS/IBC患者における選択HER2エピトープに対するTh1免疫応答の集束は、HER2^{pos}腫瘍形成における進行性のTh1損失を説明できないことがある。

【0159】

HD/BDドナーにおけるTh1応答が特定のサブグループ内で不釣り合いに高いかを調べるため、応答を、年齢(<50歳($n = 16$)、>50歳($n = 15$))、閉経状態(閉経前($n = 16$)、閉経後($n = 15$))、人種(白人($n = 23$)、その他(黒人/アジア人/など; $n = 8$))、または妊娠回数(ゼロ($n = 12$)、>1($n = 19$)妊娠)によって比較した。抗HER2のTh1レパートリーまたは累積応答において有意差は年齢、人種、または閉経状態によって層別化したHDサブグループにおいては観察されなかった。しかし、妊娠ドナー(すなわち>1妊娠)は、非妊娠ドナー(図5(c))に比べ有意に高い抗HER2のTh1レパートリー(5.3 ± 0.2 対 4.6 ± 0.2 、 $P = 0.01$)及び累積応答(293.1 ± 21.2 対 178.2 ± 19.0 、 $P = 0.0008$)を有していた。HD/BD及びHER2^{pos}-IBCドナー(各 $n = 4$)におけるTh1応答の時間的な可変性を調べた。図7に見られるように、同じ患者から>6ヶ月の間隔で採取した血液で、比較的变化のないTh1レパートリーと累積応答が時間をかけて観察した。HER2^{pos}-IBCにおいて、抗HER2 IgG1及びIgG4抗体応答が失われた。

10

20

【0160】

HER2^{pos}乳房腫瘍形成を減衰するHD内の既存の抗HER2のTh1応答に注目した後、HD、HER2^{pos}-DCIS及びHER2^{pos}-IBC患者由来の入手可能な血清を用いて、組換えHER2 ECDペプチドに対する血清反応性を試験した。Th1免疫に関連したIgG1及び慢性抗原曝露に関連したIgG4の両方を評価した。HD($n = 12$)及び未処置HER2^{pos}-IBCの患者($n = 7$)と比較して、HER2^{pos}-DCIS患者($n = 10$ IgG1、 $n = 11$ IgG4)において、抗HER2 IgG1及びIgG4(共に $p < 0.0001$ 両方)の両方のレベルにおける相対的な増加を図5Dに示されるようにELISAによって観察した。HER2^{pos}-IBC患者における比較的低い抗HER2抗体レベルは内因性抗HER2応答が疾患の進行の際に失われたことを示唆する。

30

【0161】

曖昧なHER2発現IBC患者におけるCD4⁺Th1応答は明確なHER2^{neg}-IBCと著しく異なる

HER2^{neg}-IBC患者におけるTh1プロファイルを、抗HER2Th1免疫力の相対的低下を伴うサブグループを識別するために調べた。明確なHER2^{neg}-IBC(IHC0/1+)患者($n = 11$)と比較して、曖昧なHER2発現(IHC2+/FISH陰性)IBC患者($n = 7$)は、有意に低い全体的な応答性(28.6% [IHC2+]対 100% [IHC0/1+]、 $P = 0.002$)、レパートリー(0.3 ± 0.2 対 3.9 ± 0.3 、 $p < 0.0001$)、及び累積応答(21.4 ± 6.5 対 191.2 ± 11.7 SFC/ 10^6 細胞、 $p = 0.002$)を示した。曖昧なHER2発現IBC患者におけるTh1応答は、図5Aに示されるHER2^{pos}-IBC患者に見られるものと同様だった。ELISPOTにより測定されるIL-10産生及びフローサイトメトリーによるT_{reg}(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)細胞の相対比率によって測定されるIL-10産生は、曖昧なHER2^{neg}-IBC患者及び明確なHER2^{neg}-IBC患者の間で有意差はなかった(データは示さず)。

40

【0162】

Th1応答の損失は、ホストレベルのT細胞免疫反応不顕性、又は増加した免疫抑制性の循環免疫表現型に関係するものではない

評価可能なドナーのサブグループにおける免疫力をIFN-ELISPOTを介して

50

抗CD3 / 抗CD28に対するTh1応答を測定することによって評価した；これらの応答はまた、すべてのELISPOTアッセイにおけるドナー特異的ポジティブコントロールとしての機能も果たした。抗CD3 / CD28応答のメディアンは、それぞれ図5(b)に見られるように、HD / BD (n = 31)、HER2^{neg} - DCIS (n = 11)、HER2^{neg} - IBC (n = 11)、HER2^{pos} - DCIS (n = 5) HER2^{pos} - IBC (n = 11)、及びT / C治療HER2^{pos} - IBC (n = 37)のコホートとの間に、差がなかった(1098対1104対1032対1099対1318対1032 SFC / 2 × 10⁵細胞、p = 0.22)。さらに、刺激をリコールするためのTh1応答は[破傷風トキソイド(105 ± 17.0対96 ± 15.6対101 ± 11.3 SFC / 2 × 10⁵)、及びカンジダ・アルビカンス(185 ± 10.2対199 ± 15.3対181 ± 14.6 SFC / 2 × 10⁵)]、それぞれ図8Aに見られるように、評価したHD (n = 10)、HER2^{pos} - IBC (n = 11)、及びT / C治療IBC (n = 10)のコホート間で同様だった。まとめると、これらのデータは、HER2ドライブBCにおける進行性の抗HER2 Th1応答の損失が、ホストレベルのT細胞免疫反応不顕性またはIBC患者のPBM C中の損なわれた抗原提示能に起因するものではないことを示唆している。

【0163】

フローサイトメトリーを用いて、CD3 + CD4 + (72.8 ± 2.3%対62.6 ± 3.2%対63.3 ± 6.9%、P = 0.26)及びCD3 + CD8 + (25.1 ± 2.9%対37.9 ± 4.7%対38.2 ± 6.6%、P = 0.15)の細胞の平均割合は、それぞれ図8Bに示されているように、HD、HER2^{pos} - IBC、およびT / C治療HER2^{pos} - IBCのコホートからのPBM Cの間で有意な差はなかった。グループ間でB細胞(CD19+)またはナチュラルキラー(NK)細胞(CD3 - CD16+)の割合に差は観察されなかった(データは示さず)。その後、全身の免疫抑制表現型を次のグループ間で比較した。図8Cに示すようにHD、HER2^{pos} - IBC、及びT / C - 治療HER2^{pos} - IBCのサブグループの間で、それぞれ、CD4 + CD25 + FoxP3 + 細胞(Treg細胞)(1.8 ± 0.3%対1.5 ± 0.2%対1.7 ± 0.3%、P = 0.78)、及びCD11b + CD33 + HLA - DR - CD83 - 細胞(骨髄由来サブレッサー細胞「MDSC」)(0.6 ± 0.1%対1.0 ± 0.3%対0.9 ± 0.1%、P = 0.33)の平均の割合に有意差は認められなかった。

【0164】

HER2特異的IL-10産生、Tヘルパー2型(Th2)及び/またはTreg機能の代用もまた、ELISPOTを介して患者サブグループ間で試験した。図8Dは、抗HER2応答性(すべて100%)、レパートリー(1.8 ± 0.4対1.8 ± 0.2対2.0 ± 0.3)、及び累積応答(77.4 ± 15.2対66.6 ± 8.2対92.8 ± 4.7)は、それぞれ、HD、HER2^{pos} - IBC、及びT / C治療IBCコホート間で有意差がなかったことを示している。図8Eは、抗CD3刺激に対するIL-10産生がすべての評価グループ間で類似していたことを示している。全体的なIL-10産生はサブグループ間で差はなかったが、ドナーが一致したHER2特異的IFN-γ : IL-10産生比はHDにおける6.6 : 1(相対的なTh1に有利な表現型)から、未処理及びT / C治療HER2^{pos} - IBC患者における、それぞれ0.74 : 1及び0.97 : 1(相対的にTreg / Th2に有利な表現型)へ劇的に変化した(P = 0.009)(上パネル)。

【0165】

全身のTh1応答の損失は、HER2^{pos} - IBC病変への不均衡なTリンパ球の輸送とは無関係である

全身IFN-γ^{pos} CD4⁺ 応答の損失がIBC病変への不均衡なリンパ球輸送に関連しているかを決定するために、病理学的レビューのために利用可能な14個のHER2^{pos} - DCIS及び8個のHER2^{pos} - IBC病変の免疫組織化学(IHC)分析を実施した。結果を図9Aに示す。中程度(>15%の間質の関与)から高程度(>25

10

20

30

40

50

%) のリンパ球のレベルが、評価可能な患者 (上、矢印で示す) の大部分 (12 / 14 ; 85.7%) における DCIS 含有管の外側の間質領域で集約することが観察された一方、リンパ球 (矢印) の相対的な不足は、全 8 人の IBC 患者において侵襲病巣の周りに見られた (98 / 8 ; 100%) (下)。

【0166】

リンパ球の表現型を、腫瘍及び間質領域を識別する新規な多重標識免疫蛍光 (IF) イメージング技術によって分析し、Wang, C, らにより記載されるように相対的な CD4⁺ (緑信号)、CD8⁺ (黄色)、及び CD20⁺ (赤) の亜集団を確実に検出した。結果を図 9B に示す。HER2^{pos} - IBC 腫瘍における間質性 (StL) 及び腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の大部分は CD8⁺ 細胞 (右上のパネル) から構成されていた。また、CD4⁺ TIL / StL の相対的な不足が、DCIS 病変 (左上のパネル) と比較して HER2^{pos} - IBC 腫瘍で観察された。HER2^{pos} - IBC 病変への不釣り合いな腫瘍周囲 CD4⁺ T 細胞の輸送では、IFN-^{pos} CD4⁺ T 細胞サブセットの全身枯渇を説明できないかもしれない。

10

【0167】

高 / 中度 HER2 発現であるが低 HER2 発現でない BC 細胞は、CD4⁺ Th1 媒介アポトーシスに対して感受性がある

試験管内での HER2^{high} SK-BR-3、HER2^{intermediate} MCF-7、及び HER2^{low} MDA-MB-231 BC 細胞株の Th1 媒介効果もまた評価した。HER2 パルス DC1 で感作した HER2 クラス II ペプチド特異的 CD4⁺ Th1 細胞の増加割合を、上記のタイプの HER 発現 BC 細胞と、トランスウェル培養系を用いて共培養したところ、図 10A で示されるウエスタンブロット分析でカスパーゼ 3 が増加していることから証明されているように SK-BR-3 は著しい用量依存性アポトーシスを起こし、図 11A で認められるように MCF-7 で著しい用量依存性アポトーシスを起こすが MDA-MB-231 BC 細胞株で起こさなかった。対照的に、図 10A 及び 11A に見られるように、未成熟 DC (iDC_H 及び iDC_B) または対照クラス II ペプチド (BRAFF) パルス DC1 (DC1_B) で感作した CD4⁺ T 細胞と共培養した BC 細胞においては、アポトーシスは比較的わずかであった。ELISA によるこれらの共培養上清中でなされた Th1 サイトカインの定量から、図 10A に示される CD4⁺ : BRAFF 制御 DC1、共培養に比べて、CD4⁺ T 細胞 : HER2 パルス DC1 からの IFN-⁺ 及び TNF-⁺ 産生が有意に増加することが示され、これは観察されたアポトーシスの程度に相当するものであった。

20

30

【0168】

図 11B に示すように、CD4⁺ T 細胞 : HER2 パルス DC1 共培養由来の上清と共にインキュベートした場合も、SK-BR-3 細胞において同様に特異的なアポトーシスを観察したが、CD4⁺ : HER2 - iDC または CD4⁺ : BRAFF 制御 - DC1 共培養では観測されなかった。図 10B、右の写真とバーグラフに見られるように、対照と比較して、HER2 特異的 Th1 細胞は、DAPI 染色によって証明されるように SK-BR-3 のアポトーシスにおいて 2.5 倍の増加を生じた。まとめると、これらのデータは抗 HER2 CD4⁺ Th1 細胞は、低 HER2 発現ではなく高 / 中度 HER2 発現した乳癌細胞のアポトーシスを仲介する可溶性因子を産生することを示唆する。

40

【0169】

重要なことに、HER2^{high} SK-BR-3 のアポトーシスは図 10A に見られるように、IFN-⁺ 及び TNF-⁺ を中和することによって有意に救出され得、HER2 特異的細胞のアポトーシスを媒介することにおいて、多面的な Th1 サイトカインの重要な役割を示唆している。これらの知見をさらに調査するために、BC 細胞に対する IFN-⁺ 及び TNF-^a 治療の影響を試験した。HER2 発現にかかわらず、図 10C に見られるように、ヒト BC 細胞は一樣に、IFN-⁺ 及び TNF-^a 受容体の発現を維持した。図 11C に見られるように、IFN-⁺ 及び TNF-^a 処理は、HER2^{high} SK-BR-3 及び HER2^{intermediate} MCF-7 の有意なアポトーシスを生

50

じたが、HER2^{low}MDA-MB-231細胞のアポトーシスを生じなかった。次に、MDA-MB-231細胞におけるHER2発現の復元が、Th1サイトカイン媒介性アポトーシスに対する感受性を回復するかを評価するために、MDA-MB-231細胞を野生型HER2プラスミド(pCDNA-HER2)または対照空ベクター(pCDNA3; Mark I. Greeneの寛大な贈与、ペンシルバニア大学)で安定的に形質移入し、IFN- γ 及びTNF- α (それぞれ、2000U/ml及び200ng/ml; 図11CでMDA-MB-231細胞に対して使用したものと同等の用量)で処理した。HER2を形質移入したMDA-MB-231細胞においては、著しいIFN- γ /TNF- α 誘導アポトーシスを観察したが、ベクターを形質移入した細胞においては観察しなかった(データは示さず)。

10

【0170】

最後に、このTh1サイトカイン媒介HER2特異的アポトーシスは、トランスジェニックマウス乳癌細胞で裏付けられた。図10Dに見られるように、いずれかのサイトカイン単独でなく、組換えマウスIFN- γ 及びTNF- α を用いた二重処置により、HER2^{high}TUBO及びMMC15の有意なアポトーシスを生じたが、HER2^{low}/neg4T1細胞のアポトーシスは生じなかった。

【0171】

HER2^{pos}-IBCにおけるTh1応答損失は、HER2パルスDCワクチン接種した後に回復するが、HER2標的又は従来の治療後は回復しない

T/C治療及びHER2パルスDC1ワクチン接種後のHER2^{pos}-IBC患者におけるTh1応答の差動効果を分析し、結果を図12A、上パネルに示した。未治療ステージI/II HER2^{pos}-IBC患者(n=22; 図1コホートF)及びT/C治療ステージI-II HER2^{pos}-IBC患者(n=37; 図1コホートG)は、抗HER2応答性(31.6%未処理対45.9%のT/C治療、P=0.39)、レポトリ(0.4±0.2対0.8±0.2、P=0.24)、または累積応答(32.3±5.4対54.5±12.0 SFC/10⁶、P=0.97)で有意に異ならなかった。しかしながら、図12B、上パネルに示すように、11人のステージI HER2^{pos}-IBC患者(図1コホートH)におけるHER2パルスDC1ワクチン接種後は、抗HER2応答性(18.2%ワクチン前対90.9%ワクチン後、p=0.0035)、レポトリ(0.3±0.2対3.7±0.5、p<0.0001)、及び累積応答(29.7±7.9対162.8±33.7 SFC/10⁶、P<0.0001)において、著しい改善が認められた。T/C治療後でなく、DC1ワクチン接種後の著しいTh1回復効果は、図12Cに見られるように、ステージI未処理(n=11)、T/C治療(n=8)、及びワクチン接種(n=11)HER2^{pos}-IBC患者間のステージ対応比較で持続した。

20

30

【0172】

T/Cの治療後と比較して、DC1ワクチン接種後のIFN- γ :IL-10^{pos}応答性T細胞の相対的な割合の違いを試験した。同時に行われたドナーを一致させた比較では、HER2特異的IFN- γ (196.8±56.8ワクチン後対32.1±6.1プレワクチンSFC/10⁶、p=0.02)及びIL-10(79.0±7.4対33.8±5.1 SFC/10⁶、P=0.001)の両方の応答がHER2パルスDC1ワクチン接種後に増強された一方、相対的なIFN- γ :IL-10応答比は、0.95:1(相対的にT_{reg}/Th2に有利な)ワクチン接種前から、2.5:1(Th1に有利な)ワクチン接種後(P=0.008)にシフトした。しかし、相対的なIFN- γ :IL-10応答比は、未処理(0.74:1、p=0.78)のHER2^{pos}-IBC患者と比較して、T/C治療後では、Th1有利な表現型に向けた有意なシフトを示さなかった(0.97:1)。図12A及び12Bの下部水平棒グラフを参照。

40

【0173】

ワクチン接種後6カ月以上の長期的なTh1免疫評価が、9人(81.8%)の患者に対して可能だった。図12D及び12Eに示すように、すべての患者においてワクチン接

50

種後の術後化学療法が完了したにもかかわらず、耐久性のある抗HER2Th1応答を16月(6-60の範囲)の中央値対ワクチン接種前ベースラインで観測した:抗HER2応答性(100%ワクチン後6カ月以下対22.2%ワクチン前、 $p = 0.008$)、レパートリー(4.0 ± 0.4 対 0.3 ± 0.2 、 $p < 0.0001$)、累積応答(255.1 ± 49.2 対 33.8 ± 9.2 SFC/ 10^6 、 $P = 0.006$)。

【0174】

一連の化学療法(術前補助療法または術後補助療法)によるTh1応答性の変化を調査するために、T/C治療したコホートのサブグループ解析を行った:登録を検討するための所定のトラスツズマブの完了からの時間(6ヶ月未満又は6ヶ月以上);エストロゲン受容体の状態(ER^{pos}またはER^{neg});及び病理学的ステージ(-III)。図13Aは、化学療法のシーケンス(術前補助療法[n=12]対術後補助療法[n=25];)が、図13Bは、トラスツズマブ完了からの時間(<6ヶ月を超える[n=16]対6ヶ月以下[n=21];)が、または図13Cは、ER状態(ER^{pos}[n=21]対ER^{neg}[n=16];)が、抗HER2Th1応答、レパートリー、または累積応答(全て $p = NS$)に影響を与えないことを示す。重要なことに、図13DはAJCCステージI(n=8)、ステージII(n=20)、またはステージIII(n=9)T/C-治療患者が、任意のTh1計量によって差は認められず、HER2^{pos}-IBCで観察された抗HER2Th1の欠乏が疾病負荷とは無関係であったことを示唆している。また、これらのデータはまとめて、特定のサブグループの支配的なTh1反応性プロファイルはT/C治療HER2^{pos}-IBC患者において包括的に観察された免疫回復の不足の原因とならないことを示唆している。

【0175】

抑制された抗HER2のTh1応答は有害臨床病理学的結果と相関する

これらの知見のトランスレーショナルな(translational)関連性を評価するために、T/C治療HER2^{pos}-IBC患者におけるTh1応答の変動がその後の乳房イベント(BE;任意の局所領域/遠隔再発と定義する)の発生に関連するか判断するために評価を行った。追跡期間の中央値は33.5(四分位範囲「IQR」25.5~45.8)か月だった。以下の表2に示すように(トラスツズマブ及び化学療法後に、引き続き乳がんイベント(任意の局所領域または全身再発として定義される)を受けるHER2^{pos}-IBC患者の人口統計学的及び臨床的特徴を示す)、8人の患者(21.6%)が29(IQR16.2~36)か月持続時間の中央値でT/C治療後のBEを負った。図13Eの左のパネル、BEのない患者と比較して、BEを受ける患者は抗HER2応答性(上)(12.5%+BE対55.2%BEなし; $P = 0.048$)及び累積応答(下)(9.4 ± 3.6 対 66.9 ± 14.5 SFC/ 10^6 ; $P = 0.046$)が大幅に抑制されたが、応答レパートリー(中央)(1.03 ± 0.3 対 0.13 ± 0.1 ; $P = 0.11$)はそうでなかった、ことを示す。

【0176】

10

20

30

【表 2】

表2

患者番号	研究登録時の年齢 (yrs)	再発のタイプ	遠隔再発の場合の位置	初期診断時のステージ	T/Cを受けたタイミング	再発の時間
1	64	全身性	骨、脳	3	術後補助	26
2	63	局所領域	—	3	術後補助	31
3	53	局所領域	—	2	術後補助	21
4	43	局所領域	—	2	術後補助	12
5	49	局所領域、全身性	骨	2	術後補助	31
6	67	局所領域	—	1	術後補助	102
7	85	局所領域	—	3	術後補助	36
8	34	局所領域	—	3	術前補助	14

10

【0177】

術前補助療法 T/C を受けた 12 人の (32.4%) T/C 治療 HER2^{pos}-IBC 患者において、抗 HER-2 の Th1 応答を、病理学的完全応答者 (pCR; 術後の病態上残留浸潤性 BC の証拠がない患者として定義される) と非-pCR 患者間で比較した。図 13E、右パネルにおける結果は、4 人の患者 (33.3%) において達成された、pCR が、非-pCR の患者と比較して、有意に高い抗 HER2 レポートリー (3.3 ± 1.1 対 0.13 ± 0.13、P = 0.002) (中央) 及び累積応答 (193.1 ± 64.9 対 13.6 ± 4.6、P = 0.002) (下) と関連付けられ、抗 HER2 応答 (100% 対 25%、P = 0.06) (上) は、統計的有意性に達しなかったことを示す。

20

【0178】

考察

チェックポイント阻害剤の出現 (Topalian, S. L., et al., N. Eng. J. Med. 366: 2443-54 (2012))、及び組織特異的エピトープに対するワクチン (Kantoff, P. W., et al., N. Eng. J. Med. 363: 411-22 (2010))、Toll 様受容体アゴニスト又は養子 T 細胞療法 (Kalos, M., et al., Sci. Transl. Med. 3(95): 95ra73 (2011) and Rosenberg, S. A., Nature Reviews Clinical Oncology 8: 577-85 (2011)) のような免疫調節戦略の使用はより効果的な癌免疫療法のためのお膳立てをする。これらの治療の多くは、広範な免疫調節を対象としている。これらの発見と同時に、ゲノムプロファイリングは、V-RAF マウス肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ-BL (BRAF)、上皮成長因子受容体 (EGFR)、肝細胞増殖因子受容体 (C-MET)、及び HER2 を含む、腫瘍形成の特異的分子ドライバを特定してきた。治療法は、このような「オンコドライバー (oncodrivers)」を標的とした治療方法は応答速度を奨励することを達成する一方、その成功は相対的に短命である、なぜなら多くの腫瘍は最終的に再発するか、または治療抵抗性になるからである (Pohlmann, et al. and Flaherty, K. T., et al., N. Eng. J. Med. 363: 809-19 (2010))。腫瘍の発生時にオンコドライバー特異的な免疫欠陥を特定することは、特定の癌サブタイプに合わせた治療の機会を提供しうる。本明細書に記載されるのは、既定の BC 表現型、すなわち HER2/neu の分子オンコドライバーに特異的な腫瘍形成において CD4⁺ Th1 免疫欠陥を識別する第 1 の研究であると考えられる。

30

40

【0179】

抗 HER2 CD4⁺ Th1 免疫における減衰は、前悪性 DCIS 段階で始まり、そして次第に早期侵襲性疾患状態で失われる。さらに、Th1 免疫は、HER2 過剰発現の表現型において特異的に失われたように思われる。広範な腫瘍形成性連続体を利用して、HER2^{neg}-DCIS 及び HER2^{neg}-IBC 患者 (IHC 0/1+) における抗

50

HER2 Th1 応答が HD / BD ドナーにおいて見られるものに酷似しており、HER2^{Pos} (IHC3+ または 2+ / FISH 陽性) DCIS 及びIBC 患者それぞれにおいて見られる Th1 応答よりも有意に高かったことが本明細書において実証されている：そのうえ、Th1 免疫は曖昧な HER2 発現 (IHC2+ / FISH 陰性) 個体において失われ、HER2^{Pos} - IBC 患者において見られるそれと似ているように思われる。特に、HER2^{neg} - IBC 患者における HER2 特異的 CD4⁺ 免疫の維持は、部分的には、CD8⁺ T 細胞を活性化することを目的とした HER2 ペプチドでのワクチン接種後のその改善された臨床転帰を説明しうる。Benavides, L. C., et al, Clin. Can. Res. 15: 2895 - 904 (2009) を参照。

【0180】

幾分驚くべきことに、HD / BD は、容易に識別できる循環抗 HER2 Th1 細胞の集団を維持した。HER2 は、通常は妊娠及び授乳期間中の分岐乳管細胞における膜成分であるので (Press, M. F., et al, Oncogene 5: 953 - 62 (1990))、HD / BD における既存の CD4⁺ T 細胞応答が、乳房内の抗原提示細胞 (APC) による HER2 エピトープ提示の結果として生成されることは妥当である。実際、年齢、人種、または閉経状態とは独立しているが、HD / BD における既存の抗 HER2 Th1 免疫は、非妊娠ドナーと比較して妊娠中に高かった。特に、後者は、BC の発生のためのリスクが高い集団である。さらに、in vitro で IFN- γ / TNF 受容体を発現している、HER2^{low} でなく、HER2^{high} BC 細胞株における、サイトカイン IFN- γ 及び TNF- α を介した HER2 特異的 Th1 の著しいアポトーシス促進効果は抗 HER2 Th1 が、乳房退縮などの生理学的プロセス中で HER2 過剰発現細胞を制御または除去することに役立つことを暗示する。したがって、HD における既存の抗 HER2 Th1 免疫は、抗 HER2 Th1 機能の抑止が腫瘍駆動機構を表して HER2^{Pos} 腫瘍形成時の免疫監視を回避しうる一方、腫瘍形成イベントに対する保護を与えうる。興味深いことに、最近の証拠は、循環腫瘍関連抗原 (例えば、MAGE6、EphA2) 特異的 CD4⁺ Th1 の優先的な死プログラミングが活動性疾患に罹患したメラノーマ患者において観察される免疫機能障害に貢献しうることを示唆している (Wesa, A. K., et al, Front. Oncol. 4: 266 (2014))。同様のメカニズムが本研究において観察された抗 HER2 CD4⁺ Th1 免疫の損失に関与している可能性がある。そのような機構を解釈したり、標的化することは、一次 BC 防止を目的とした免疫介入の開発のために重要でありうる。これらのメカニズムは、乳房の恒常性における抗 HER2 Th1 細胞の機能的意義と同様に、さらなる研究を保証する。

【0181】

HD / BD において、先行する HER2 Th1 免疫は維持されたものの、HER2 - 反応性液性応答は維持されなかった。健康乳房においては、非炎症性の設定での APC による CD4⁺ Th1 細胞のプライミングは、IFN- γ / TNF- α 分泌を介して、HER2 発現細胞の恒常性に寄与する一方、抗体産生を駆動しない場合がある。しかし、HER2^{Pos} - DCIS では、HER2 - 反応性 IgG1 / IgG4 の相対的な増加が非存在ではなく、中間の Th1 応答と関連していた。発生している腫瘍上の HER2 抗原性刺激の出現、その後の炎症性環境に残存する Th1 細胞への APC による提示により、一過性の抗体産生が可能となり得る。最終的に、HER2^{Pos} - IBC において、CD4⁺ T 細胞ヘルプの漸減は、抗体の継続的な生産を侵食し、それらの最終的な消失を生じうる。適応免疫の両腕のこの散逸により、原発性腫瘍の予防及び調節ができないこのような患者となり得る。

【0182】

上述のものに加えて、抗 HER2 の Th1 免疫の損失は、慢性的な T 細胞の枯渇、共阻害シグナル (例えば、TIM、PD-L1、CTLA-4 など) を引き起こす末梢性耐性又は HER2 反応性免疫表現型における変化、等の他のメカニズムを反映しうる。実際に、全体的な IL-10 応答は、腫瘍形成連続体にわたって維持されているが、抗原特異的

10

20

30

40

50

IFN- γ : IL-10の比率で評価した場合、HER2特異的応答は、強くTh1に有利な(HD/BDにおいて)表現型から、相対的にTh2/Tregに有利な(HER2^{pos}-IBCにおいて)表現型へ機能的にシフトする。したがって、7/22(32%)のHER2^{pos}-IBC患者における、弱められているとはいえ無傷のTh1応答は、腫瘍形成時のTh1抗腫瘍免疫防御と免疫寛容誘導性とのTreg/Th2寄与との間の進行中のバランス(Levings, M, K, et al, Blood 105:1162-9(2005))を反映している可能性がある。

【0183】

それにもかかわらず、抗HER2Th1免疫の損失は、HER2^{pos}-IBC患者における循環免疫抑制集団の絶対的な増加に起因しなかった。以前の研究は、進行(ステージIII/IV)BC(Liyanage, U.K., et al, J. Immunol. 169:2756-61(2002))及び他の固形腫瘍(Zhang, B., et al, PLOS ONE 8(2):e57114(2013))におけるより高いレベルのTreg及び/またはMDS Cを報告しているが、本研究では、初期段階(ステージI/II)のIBC患者は、HDに匹敵する免疫抑制プロファイルを持っているように思われる。これらの患者における抗HER2Th1応答の劇的な減少は、従って、より一層説得力がある。さらに、末梢血液中の抗HER2 IFN- γ CD4⁺T細胞のサブセットにおけるこの減少は、(i)進行腫瘍形成に対する選択的HER2ペプチド反応性に対してバイアスが観察されないため免疫変形には無関係であり、または、浸潤性腫瘍へ輸送するCD4⁺T細胞が極めて多いこととは無関係であった。しかし、後者の知見は、これらのデータが腫瘍微小環境におけるHER2特異的CD4⁺TILの隔離または枯渇を説明できるものではなく、注意して解釈されるべきである。最後に、IBC患者における全身性のホストレベルT細胞免疫反応不顕性によって、抗HER2Th1免疫抑制を説明することができないかもしれない。しかし、本研究では、この現象の可能な説明として、抗原特異的な細胞レベルの免疫反応不顕性を完全に除外することはできない。

【0184】

重要なことは、この抗HER2Th1抑制が、T/C治療HER2^{pos}-IBC患者における局所領域または遠隔再発のリスク増加と関連していたことである。対照的に、抗HER2Th1の保存は、術前補助T/C後のpCRに相関した。まとめると、これらのデータは、HER2指向療法後の抗HER2Th1免疫反応性を監視することが臨床的または病理学的障害のリスクがある脆弱なサブグループを識別しうることを示唆している。さらに、抗HER2Th1欠陥と良好でない臨床病理学的結果との関連性から、このような免疫欠陥を反転しうる治療戦略の探索が保証される。

【0185】

疾病負担(すなわち、病理学的段階)について制御した後でさえも、HER2^{pos}-IBC患者における抑制された抗HER2Th1応答は、外科手術、放射線照射、化学療法、またはHER2標的トラスツズマブによって包括的に影響を受けないままである。複数の研究で、HER2^{pos}腫瘍において成長を低減シアポトーシスを誘導するトラスツズマブの能力(Dogan, I., et al., Mol. Cell. Biochem. 347:41-51(2011))や、HER2^{pos}細胞を細胞毒性化学療法の殺腫瘍効果に感作するトラスツズマブの能力が実証されている(Henson, E.S., et al, Clin. Cancer Res. 12:645-53(2006))。これらの利点にもかかわらず、トラスツズマブの使用は、ステージI疾患を有するものを含む、大多数の患者においてHER2特異的なTh1免疫を認めうるほどには回復しなかった、その上、これらのHER2標的治療に対するほぼ普遍的な耐性が、進行した疾患状態で観察された。Pohlmanら。HER2を標的とする追加の戦略が、したがって、必要とされる。

【0186】

本明細書で記載されたそのような戦略は、HER2由来のクラスIIペプチドを用いた自家DC1免疫であってもよい。HER2^{pos}-IBC患者における術前補助HER2

10

20

30

40

50

- パルスDC1ワクチン接種に続いて(手術が続く)、抗HER2Th1免疫の耐久性の回復が、ワクチン接種後最大60ヶ月まで観察された。要するに、これらのデータは、(i)適切な免疫学的介入で矯正され得ることから、このHER2特異的CD4⁺Th1免疫欠陥が、免疫学的に「固定された」ものでないことを示唆しており、更に、(ii)既存の体液性に基づくHER2-標的療法とワクチン接種(または他の免疫調節戦略)との組み合わせにより、この疾患における長期的結果を改善し得ること示唆している。実際に、マウスモデルにおいて、細胞性のHER2指向免疫(IFN- γ -producing CD4⁺, but not CD8⁺, T-cells (Sakai, Y., et al, Cancer Res. 64: 8022-8 (2004))及び体液性のHER2指向免疫の協働は、HER2^{pos}腫瘍の根絶に必須である(Reilly, R.T., et al, Cancer Res. 61: 880-3 (2001))。

【0187】

まとめると、現在の知見は、HER2^{pos}-BC患者の免疫監視及び治療の選択のための意味を有する。考察したように、それは、HER2-駆動BCを有する高リスク集団における標準的なHER2標的療法に対する抗HER2免疫の追加を正当化する。確かに、試験では、術前補助T/C後の残存疾患を有するHER2^{pos}-IBC患者、及び術後補助療法後の進行性疾患を有するものにおいて、そのような組み合わせを検査することが始められてきている。また、従来ofのサーベイランス戦略(放射線画像、乳房生検標本のIHC/FISHプロファイリングなど)は、腫瘍の進化の単離したスナップショットを提供するのみであるが、高リスク患者の抗HER2Th1免疫をリアルタイムの変動で監視することで、腫瘍の自然史及び免疫影響を垣間見る機会が提供され得る。CD4⁺Th1免疫検出プロトコルを将来のBC臨床試験設計へ思慮深く組み込むことは正当と思われる。

【0188】

要約すると、本明細書は、我々の知る限り、乳房腫瘍形成の間の分子オンコドライバーに対するCD4⁺Th1免疫の進行性及び特異的な損失についての最初の記述であると考えられる。抑制した抗HER2Th1免疫に関連した好ましくない臨床的及び病理学的転帰への警見は、ワクチン接種または他の免疫調節戦略を有する免疫回復は腫瘍の進行を緩和するまたは再発を防止するために、これらの高リスク患者において探求する価値があるかもしれないことを暗示する。抗HER2 CD4⁺応答が他のHER2^{pos}癌(すなわち、卵巣、胃、など)で失われるのかを判断、及び他の分子オンコドライバーに対するTh1免疫について腫瘍形成中に全身性の損失があるかの判断をする更なる研究が保証される。

【0189】

実験例1

抗HER2 CD4⁺Th1応答は、HER2陽性乳癌における術前補助療法後の病理的応答に相関する新規免疫である

現代的な治療では、より大きな切除可能な腫瘍を有する患者は、多くの場合、トラスツズマブと化学療法(T/C)の術前補助投与から、ほぼ40%~60%病理学的完全応答(pCR)を達成する恩恵を受ける。Gianni, L., et al, Lancet 375: 377-84 (2010); Untch, M., et al, J. Clin. Oncol. 28: 2024-31 (2010); Untch, M., et al, J. Clin. Oncol. 29: 3351-7 (2011)を参照。外科手術での残留疾患の事実(<pCR)と比較することで、術前補助T/C後のpCRの達成は、減少した再発及び改善された長期生存のための確立された代理である。

【0190】

上記参考例は、HER2^{pos}乳房癌における腫瘍形成連続体に亘る抗HER2 CD4⁺ Tヘルパー1型(Th1)免疫における進行性の損失を実証した。特に興味深いのは、このHER2特異的なTh1応答が、HER2^{neg}(0-1+)浸潤性乳癌(IBC)を宿す患者と同様に、健康なボランティアで保存されていることである。HER2^p

°^s - IBC患者において、この抗HER2Th1欠陥は、外科的切除、放射線照射、またはT/C治療等の標準的治療の影響を受けないが、代わりにHER2パルス1型極性化樹状細胞(DC1)のワクチン接種後に「復元」され得る。さらに、抑制された抗HER2Th1応答が、術後補助T/C治療患者におけるその後の再発リスクの増加を予測していることも示された。これらの知見は、同様の抑制された抗HER2Th1応答が、別の既知の再発の前兆、すなわち、術前補助T/C後の<pCR状況(Kim, M.M., et al, Ann. Oncol. 24: 1999 - 2004 (2013))においても観察されるものであるかの研究を促した。逆に、抗HER2Th1応答の保存/回復をpCRに関連付け得ると仮定された。従って、pCRと<pCR患者との間の抗HER2Th1応答における違いを試験して病理的応答に相関する変更可能な免疫を同定した。

10

【0191】

87人のHER2^{pos} - IBC患者(3⁺または2⁺/FISH陽性)を対象に抗HER2 CD4⁺Th1応答を前向きに分析し、ステージI/II HER2^{pos} - IBC患者(n=22)とステージI-II T/C治療HER2^{pos} - IBC患者(n=65)との間で応答を比較した。抗HER2Th1応答を、術後補助トラスツズマブの完了後に生成したT/C治療コホートにおいて、応答は、化学療法のタイミングによって層別化し(すなわち、術後補助対術前補助)、さらに術前補助コホート内のpCR状態及び<pCR状態によりサブ層別化した。pCRを、切除乳房標本及び採取リンパ節の病理学的検査で残留浸潤癌が存在しないことと定義した(すなわち、ypT0/Tisy pNO)。

20

【0192】

<pCRコホートにおける四人の患者を補充して術後補助HER2パルス1型極性化DC(DC1)ワクチン接種試験(NCT02061423)に参加させた。これらの患者における抗HER2Th1応答を、免疫前後に分析した。

【0193】

方法

参考例に記載のように、循環抗HER2 CD4⁺Th1応答を、生体外で6個のHER2由来クラスIIペプチド(ペプチド42~56、ペプチド98~114、ペプチド328~345、776~790ペプチド、ペプチド927~941、及びペプチド1166~1180)(配列番号:1-6)でパルスした非培養PBMCにおいて、酵素結合免疫吸着スポット(ELISPOT)アッセイを介してIFN- γ 産生を測定することによって試験した。参考例に記載のようにELISPOTを行った。HLA-A2.1ポスター由来のPBMCを、PMA(50ng/ml)及びイオノマイシン(1 μ g/mlシグマアルドリッチ)を陽性対照として;二つのHER2由来クラスIIペプチド:ペプチド369~377(配列番号:7)及びペプチド689~697(配列番号:8)で刺激した。

30

【0194】

抗原特異的応答を決定するための経験的方法を用いた。個々のHER2ペプチドに対する正の応答を次のように定義した:(1)未刺激のバックグラウンドを差し引いた後の実験ウェルにおける20 SFC/2 \times 10⁵細胞の最小閾値;及び(2)バックグラウンドを超える抗原特異的なSFCの2倍以下の増加。Th1応答の測定基準は、参考例で説明したように、抗HER2応答性、反応性ペプチドの数(レパートリー)、及び6ペプチド全体の累積応答(SFC/10⁶細胞)だった。術後補助HER2-パルス1型極性化樹状細胞(DC1)ワクチン接種を受けた<pCR患者(n=4)のTh1応答を免疫前/後に分析した。

40

【0195】

結果

研究は、87人の患者を含んでいた。未治療HER2^{pos} - IBC患者(n=22)における抑制された抗HER2Th1応答は、T/C治療(n=65)の後に、全体的に改善しなかった。術後補助T/Cと比較して、術前補助T/C(61.5%)はより高い

50

Th1レパートリー(1.5対0.8、 $P = 0.048$)と関連していた。pCR($n = 16$)及び<pCR($n = 24$)患者は、人口統計学的/臨床的特性において差が認められなかった一方、pCR患者はER⁺腫瘍をより持っているようだった。pCR患者は<pCR患者と比較して、劇的に高い抗HER2応答性(94%対33%、 $P = 0.0002$)、レパートリー(3.3対0.3、 $p < 0.0001$)、及び累積応答(148.2対22.4、 $p < 0.0001$)を示した。この相違は、CD4⁺T-bet⁺IFN-⁺表現型によって媒介され、<pCR患者の免疫不全、ホストレベルのT細胞免疫反応不顕性、または増加した免疫抑制集団に起因しなかった。4人の<pCR患者において、Th1レパートリー(3.7対0.5、 $P = 0.014$)及び累積応答(192.3対33.9、 $P = 0.014$)はHER2-パルスDC1ワクチン接種後に有意に改善した。

10

【0196】

結論

抗HER2 Th1応答は、術前補助T/C後の病理学的応答と相関する新規の免疫である。<pCR患者で術前補助療法を受けたHER-2発現患者において、抑制されたTh1応答は、HER2 Th1免疫介入で復元することができ、pCRまたは再発率を改善させることができる。

【0197】

したがって、高リスクの<pCRサブグループのために術前補助T/C療法への及び/又は術後補助設定においてHER2標的Th1免疫介入の付加を、正当化することができる。さらに、抑制された抗HER2 Th1免疫が、術後補助T/C-治療患者におけるその後の再発と相関するという、参考例における実証を考慮すると、抗HER2 Th1免疫におけるリアルタイムの変動のために高リスク<pCR患者を監視することは、既存のX線撮影の監視を補完し、治療的に介入する重要な手段を特定するのに役立つ。

20

【0198】

要約すると、これは、HER2⁺-IBC患者において、術前補助T/C後の抗HER2 CD4⁺Th1免疫とpCRとの間の重要な関連性を最初に記載したものと考えられる。因果関係は確認できないが、術前補助T/C後の<pCR患者において観察される劇的なIFN-⁺抗HER2 Th1欠陥は、HER2 Th1介入による免疫救出により、これらの高リスク患者における結果を改善することで、標準的なHER2標的戦略を補完できる可能性を提起している。

30

【0199】

実験例2

抑制された抗HER2 CD4⁺ Tヘルパー1型応答は完全に治療したHER2-陽性乳癌患者の再発と関連する-免疫監視の新しい役割

【0200】

前向きなコホートを用いる本明細書の参考例において示されるように、HER2⁺-BCにおける腫瘍形成の連続全体で(健康なドナーからHER2⁺-DCISを通して、そして最終的にHER2⁺侵襲BC患者へ及び)、抗HER2 CD4⁺ Tヘルパー1型(Th1)免疫における進行性の喪失がある。Datta, J., et al., *Oncology* 4:8 e1022301 (2015) DOI:10.1080/2162402X.2015.1022301 (Datta, J., et al. *Oncology*)を参照。また、本明細書の実験例1において、抑制された抗HER2 Th1免疫は、不利な臨床病理学的な結果である手術時の残留疾患と相関する一方、抗HER2 Th1応答は、HER2⁺-BCにおける術前補助トラスツズマブ/化学療法(T+C)後の病理学的応答と相関する新規免疫であることが示される。Datta, J., et al., *Breast Cancer Res.* 17(1):71 (2015) (Datta, et al. *Breast Cancer Res.*)を参照。

40

【0201】

50

これらの観察に照らして、抗HER2Th1免疫がまた、完全に処理されたHER2^P^o^s-BC患者における局所領域および/または遠隔再発と関連する可能性があるという仮説を立てた。探索性のコホートにおいて、免疫が疾患の再発と関連があるかを識別するために、再発及び無病のHER2^P^o^s-BC患者間の相違を検査した。

【0202】

方法

試験計画

ペンシルベニア大学の施設内倫理委員会による承認の後、インフォームドコンセントを得た後95人のHER2^P^o^s-BC患者を、非バイアスされた方法で募集した。適格患者は、組織学的に確認された浸潤性乳癌(IBC)及びHER2/neuの過剰発現(10
IHC3+または2+/FISH陽性)を有し、免疫抑制薬を受けていなかった。未治療(すなわち、登録時に決定的な治療を受けていない)のステージI-II HER2^P^o^s-IBC患者(n=22)における抗HER2CD4⁺Th1応答をT+C治療を完了したステージI-IV HER2^P^o^s-IBC患者(n=73;すなわち、術前補助又は術後補助のT+C決定的な治療)のTh1応答と比較した。T+C治療を受けた患者では、分析は再発状態によって層別化した。

【0203】

HER2^P^o^s-確認された再発を、任意の局所領域(乳房/胸壁中での再発、腋窩不全)又は遠隔(肺、骨、脳転移など)の乳房イベント、またはその両方として定義した。再発に陥ったすべての患者は、追加の化学療法、HER2標的療法、または実験的(例え
20
ば、HER2パルス樹状細胞ワクチン接種)プロトコルの開始前に登録された。非再発患者は、彼らが最短24ヶ月の経過観察で無病であった場合にのみ、分析の対象とした。図14は、本実験例のための研究集団のフロー図である。

【0204】

トラスツズマブ及び化学療法計画の予定と投与

T+C-治療を受けた患者は、以下の療法のいずれかを術前または術後のいずれかで受けた:(1)AC/TH:アドリアマイシン/シクロフォスファミド(4サイクルで2週
30
毎)その後タキソールとトラスツズマブの併用(12週間、毎週)。(2)TCH:トラスツズマブを併用したタキソール/カルボプラチン(6サイクルで3週間毎)、または(3)TC-H:トラスツズマブを併用したタキソール/シクロフォスファミド(4サイクルごとに3週間)。すべての患者は、通年の治療を完了するために追加のトラスツズマブ単独(3週間毎)治療を受けた。

【0205】

免疫反応検出

参考例で上述したように、末梢血抗HER2CD4⁺Th1応答を、生体外で6個のHER2由来MHCクラスII-ペプチド(42~56、98~114、328~345、
776~790、927~941、1166~1180)でパルスした非培養のPBMCで、ELISPOTを介してIFN- γ 産生を測定することによって、試験した;Datta,
40
J., et al., *Oncology*; Datta, J., et al., *Breast Cancer Res.*, and Koski, et al.も参照。簡潔にいうと、25~30mLの全血を各研究参加者から、5本のヘパリン添加収集チューブ(BDバイオサイエンス)に回収した。静脈切開の直後(<4-6時間)、PBMCを製造業者の指示に従って密度勾配遠心分離(すなわち、フィコール-バック法、Fisher Scientific社)を用いて単離し、-80℃で、10%DMSOヒト血清中に10⁶細胞/mLで凍結保存した。すべてのPBMCを凍結保存から4週間以内に利用した。解凍時の生存率は、60~80%だった。PVDF膜プレート(Mabtech社)を、抗IFN- γ 捕捉抗体で一晩コーティングした。凍結保存したPBMCを、予熱したDMEM+5%ヒト血清中で解凍し、前記培地中で1⁶のPBMCで調製した。プレートを洗浄してブロックした後、PBMCをトリプレートで播種し(2⁵細胞/ウェル)、いずれかのHER2ペプチド(複数可)(4 μ gの、
50

GenScript社、ピスカタウェイ、NJ)、培地単独(非刺激対照)、または陽性対照(抗ヒトCD3/CD28抗体[0.5 μg/mL; BD Pharmingen社製])と共に24~48時間37℃でインキュベートした。

【0206】

評価可能な患者では、1:100に希釈したカンジダ・アルピカンス[Allermed研究所]および破傷風トキソイド[サントクルズ]のリコール刺激に対するTh1応答を参考例に記載の通り試験した。Datta, J., et al., Breast Cancer Resらにより記載されたように、Tヘルパー2型(Th2)および制御性T細胞(Treg)の機能の代替物である、HER2特異的IL-4およびIL-10産生をELISPOTによって測定した。

10

【0207】

抗HER2Th1応答性を参考例に記載のように経験的方法論を用いて決定した。個々のHER2ペプチドに対する陽性/反応性応答を、刺激されていないバックグラウンドを差し引いた後の実験ウェル中20スポット形成細胞[SFC]/ 2×10^5 PBMCと定義した。3個の抗HER2Th1応答の測定基準:(a)応答性(6個のペプチドの少なくとも1つに応答する患者の割合)、(b)レポーター(反応性ペプチドの平均数)、(c)6個のペプチド全体の累積応答(SFC/ 10^6 細胞)を測定した。

【0208】

フローサイトメトリー

PBMCをFACSバッファー(PBS+1%FCS+0.01%アジド)内に懸濁した。PE/FITC/Cy5の共役マウス抗ヒトCD3、CD4、CD25、T-bet、GATA-3、IFN-γ、またはサブクラス適合対照(BDバイオサイエンス)を、Datta, J., et al., Breast Cancer Resに記載されたように相対PBMC免疫表現型を決定するために使用した。FoxP3の固定/透過化キット(Biolegend)を使用して、抗FoxP3の細胞内染色を、製造業者の指示に従って行った。分析は、BD LSR-IIサイトメーターを使用して実行し、データセットをCellQuestソフトウェアを用いて分析した。

20

【0209】

Th1対Th2サブタイプの機能的寄与

PBMCを24ウェルプレートにDMEM+5%ヒト血清中 1.2×10^6 細胞/mLで再懸濁し、HER2クラスIIペプチド混合物(24 μg/mL)でパルスした。刺激を受けていない及び各ドナーからの抗CD3/CD28抗体をパルスしたPBMCを、それぞれ、負および正の対照とした。37℃で6時間インキュベーションした後、タンパク質輸送阻害剤プレフェルジンA(シグマアルドリッチ;を10 μg/mL)を各試料に添加し、一晩インキュベートした。洗浄後、細胞を室温で30分間、抗ヒトCD4で染色した。細胞をその後、製造者の指示に従って二回洗浄し、Foxp3固定/透過化キット(Biolegend)を用いて固定し、透過処理し、そして、抗T-bet、抗GATA-3、および抗IFN-γ(Biolegend)で30分間染色した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、BD LSR-IIサイトメーターで分析した。

30

【0210】

統計解析

記述統計により、患者の特性および免疫応答変数の分布を要約した。示されるように、非再発と再発HER2^{pos}-IBCコホート間の比較を行った:(a)2群/単変量試験-独立スチューデントのt検定(パラメトリック連続)、ウィルコクソン順位和検定(ノンパラメトリック連続)、および χ^2 検定(カテゴリカル)。(b)2群未満のテスト-事後ボンフェローニテストと一方向分散分析。単変量試験で $p < 0.1$ を持つ変数を、前方に段階的多変量ロジスティック回帰モデルに入力して再発に対する独立した相関を決定した(バイナリ結果 はい/いいえ)。

40

【0211】

単変量無病生存率(DFS)の推定値は、抗HER2のTh1応答性およびその他の共

50

変量によって層別化し、カプラン・マイヤー法により調べた。非再発患者（最小24ヶ月の経過観察）の観測は、最後の既知の経過観察で打ち切られた。多様な経過観察のためのすべての変数と対照の即時的な危険性を分析するために、Cox比例ハザードモデリングを行った。Coxモデルの仮定を経時的なハザードの相互作用や比例を含め、評価した。P < 0.05は、統計的に有意とみなした。すべての試験を両側検定で行った。分析は、SPSS V22 (IBM社、アーモック、NY)を用いて行った。

【0212】

結果

患者の特性

全体のコホート (n = 95) の人口統計および腫瘍関連の特性を以下の表3に詳述する。T + C治療患者 (n = 73) では年齢の中央値は49歳 (範囲、24 ~ 85) で、大部分が白人だった (87.5%)。患者の大多数は、エストロゲン/プロゲステロン受容体陽性 (ER/PR^{pos}) 腫瘍 (58.9%) を有し、局所的な進行/リンパ節陽性疾患を提示する (臨床ステージI : 9.6%、II : 47.9%、III : 42.5%)。術前補助T + Cを37人 (50.7%) の患者に投与した。単純または非定型的乳房切除術を最も頻繁に (53.4%) 行い、アドリマイシン/シクロフォスファミド/タキソール/ハーセプチンは、一般に利用されるT + C措置 (57.5%) だった。

【0213】

【表3】

表3: 研究集団の人口統計および腫瘍関連の特徴。

研究集団のための年齢、人種、AJCC病理ステージ、ホルモン受容体の状態、およびトラスツマブ (適用可能 なとき) の完了からの時間。

特徴	未治療HER2 ^{pos} -IBC (n=22)		T+C治療HER2 ^{pos} -IBC (n=73)			
			非再発 (n=48)		再発 (n=25)	
年齢						
平均±SE	54.7±3.1		49.6±1.8		47.2±2.2	
範囲	24-88		25-85		24-80	
	#	%	#	%	#	%
人種/民族性						
白人	17	77.3	39	87.5	18	72.0
アフリカ系アメリカ人/アジア人/ラテンアメリカ	5	22.7	9	7.5	7	28.0
診断時点でのAJCC状態 [*]						
ステージ1	14	63.6	5	10.4	2	8.0
ステージ2	6	27.3	23	47.9	12	48.0
ステージ3	2	9.1	20	41.7	11	44.0
ホルモン受容体の状態						
ER/PR ^{pos}	12	54.5	26	54.2	17	68.0
ER/PR ^{neg}	10	45.5	22	45.8	8	32.0
トラスツマブの完了から研究への登録までの時間						
6ヶ月未満			23	47.9	11	44.0
6ヶ月以上			25	52.1	14	56.0

^{*} 全てのコホートに対して示された臨床ステージ

略語: HER2^{pos}: ヒト上皮成長因子受容体2 過剰発現; IBC: 浸潤性乳癌; T+C: トラスツマブ及び化学療法; AJCC: 癌米国会同委員会; ER: エストロゲン受容体; PR: プロゲステロン受容体

【0214】

25人 (34.2%) の患者が以下の表4に示すように、局所領域での再発、遠隔再発、または両方を負った; これらの患者の大多数 (n = 21、84%) でのTh1応答を、再発の診断時に決定した。

【0215】

【表 4】

表4 トラスツズマブと化学療法(T+C)後に再発を招いたHER2過剰発現乳癌患者の人口統計、腫瘍関連および治療特性

患者番号	年齢(歳)	最初の診断時のステージ	T+Cを受けた時のタイミング	ER/PR	最初の手術	最初のHER2薬剤	再発の型	遠隔の場合の部位	再発までの時間(月)	再発後の救済療法
1	48	3	術前補助	+	L MRM, R simple	Trast	遠隔	骨	22	化学、ラパチニブ
2	51	2	術後補助	+	L BCS	Trast	局所領域	—	16	トラスツズマブ、AI
3	24	2	術前補助	-	R BCS	Trast	局所領域	—	49	化学、トラスツズマブ
4	52	2	術前補助	-	L BCS	Trast	局所領域、遠隔	肺	16	化学、トラスツズマブ
5	35	3	術前補助	-	R MRM	Trast	遠隔	肺、肝臓、骨	27	化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ
6	58	2	術前補助	+	L MRM	Trast	遠隔	肺、骨	43	フルベストラント、化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ
7	80	2	術前補助	+	両側BCS	Trast	遠隔	骨	48	トラスツズマブ、ペルツズマブ
8	39	2	術前補助	+	L BCS+ALND	Trast	局所領域、遠隔	肺	42	化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ
9	47	3	術後補助	-	R BCS	Trast	局所領域	—	64	化学、トラスツズマブ
10	41	3	術後補助	+	L BCS+ALND	Trast	局所領域	—	113	化学、トラスツズマブ
11	52	1	術後補助	+	R BCS+ALND	Trast	局所領域	—	82	化学、AIトラスツズマブ
12	30	2	術後補助	+	L BCS	Trast	局所領域	—	43	HER2-DC1ワクチン
13	50	3	術後補助	-	R BCS+ALND	Trast	局所領域	—	42	切除単独
14	55	2	術後補助	+	R MRM	Trast	局所領域	—	26	化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ ラパチニブ
15	49	3	術後補助	-	L MRM, R simple	Trast, Lap	局所領域	—	13	化学、ラパチニブ、TDM-1
16	54	3	術後補助	+	R MRM	Trast, TDM-1	局所領域	—	19	切除、HER2-DC1ワクチン
17	42	2	術後補助	+	R MRM, L simple	Trast, TDM-1	遠隔	肺	51	化学、ペルツズマブ、HER2-DC1ワクチン
18	45	3	術後補助	-	L MRM	Trast, Lap	遠隔	肺、脳	60	AI、トラスツズマブ、ペルツズマブ、 HER2-DC1ワクチン
19	34	1	術後補助	+	L BCS	Trast	局所領域	—	47	切除+HER2-DC1ワクチン
20	41	2	術後補助	-	L MRM	Trast, Lap	遠隔	肝臓	16	化学、トラスツズマブ、ラパチニブ、 カドサイラ、CDK4/6阻害剤
21	42	3	術後補助	+	L MRM	Trast	局所領域、遠隔	骨、脳	23	AIトラスツズマブ、TDM-1
22	51	3	術後補助	+	L MRM, R BCS	Trast	遠隔	肺、骨	58	化学、AIトラスツズマブ、ラパチニブ、 ペルツズマブ
23	54	3	術後補助	+	L BCS+ALND	Trast	遠隔	骨	53	化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ
24	44	2	術後補助	+	R MRM	Trast	局所領域、遠隔	肺	10	化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ、 TDM-1
25	62	2	術後補助	+	R BCS	Trast	遠隔	肝臓、肺	46	化学、トラスツズマブ、ペルツズマブ

略語: T+C: トラスツズマブ及び化学療法; ER: エストロゲン受容体; PR: プロゲステロン受容体; Neoadj: 術前補助; Adj: 術後補助; MRM: 非定型的乳房切除術; Simple: 乳房切除; BCS: 乳房温存手術; ALND: 腋窩リンパ節切除; Trast: トラスツズマブ; AI: アロマターゼ阻害剤; DC1: 1型極性化樹状細胞ワクチン。

【0216】

抗HER2 CD4⁺のTh1応答は、再発を負ったHER2^{pos}IBC患者において抑制される。

図15Aにおいて、未治療(n=22)、T+C治療非再発(n=48)、及びT+C治療再発(n=25)患者の間で抗HER2Th1応答性、レパートリー、および累積応答を比較した。未治療患者からの抗HER2Th1応答を「ベースライン」として使用して、再発のない患者と比較して、再発を負ったHER2^{pos}-IBC患者において、大幅に抑制された抗HER2Th1応答性(未治療: 36.4%対再発: 8.0%対非再発: 83.3%、P<0.0001)(上)、レパートリー(0.6±0.2対0.1±0.1対1.5±0.2、P<0.0001)(中央)、および累積応答(32.8±4.7対14.8±2.0対80.2±11.0、P<0.0001)(下)をそれぞれ、観察した。

【0217】

図15Bにおいて、抗CD3/抗CD28刺激(P=0.57)、破傷風トキソイド(P=0.41)、およびカンジダ(P=0.74)に対するIFN-⁺の応答は、それぞれ、非再発と再発コホート間で有意差は見られず、観察された抗HER2Th1の相違が再発を負った患者における免疫不全またはホストレベルのT細胞アネルギーに起因しないことを示唆している。

【0218】

10

20

30

40

50

再発患者における抑制された抗HER2 T細胞応答は、Th2またはTregではなく、Th1表現型に起因する。

図15Cは、T-bet (Th1転写因子 (Szabo, S. J., et al, Science 295 (5553) : 338 - 342 (2002)) またはGATA-3 (Th2転写因子 (Zheng, W., et al, Cell 89 (4) : 587 - 596 (1997)) を参照) 及び細胞内IFN- γ の共発現についてフローサイトメトリーにより評価したHER2刺激PBM Cを示す(上)。非再発コホートと比較して再発コホートにおいて、それぞれ、HER2特異的CD4⁺GATA-3⁺のIFN- γ ⁺またはCD4⁺GATA-3⁺のIFN- γ ⁻ではなくCD4⁺T-bet⁺のIFN- γ ⁺ (0.25 \pm 0.1%対0.02 \pm 0.01%、P=0.039) 表現型の大幅の割合の減少が観察された(中央)。HER2-刺激IL-4⁺応答性 (P=1.00)、レパトリー (P=0.84)、および累積応答 (P=0.46) - Th2機能の基準 - は非再発と再発コホートとの間で差がなかった(下)。

10

【0219】

さらに、図15Dは、循環Treg (すなわち、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) 表現型の絶対的な割合が非再発と再発コホートとの間でそれぞれが差がなかったことを示す (1.3 \pm 0.3対1.6 \pm 0.4、P=0.61)。HER2-刺激IL-10⁺応答性 (P=1.00)、レパトリー (P=0.74)、および累積応答 (P=0.66) - Treg機能の基準 - は2つのコホート間で類似していた。

20

【0220】

抗HER2Th1応答は、無病生存率と独立して関連する

関連する人口統計学的/臨床病理学的特徴から交絡調整により、抗HER2Th1応答と再発との間の関連の独立性を試験した。一変量テストで、再発及び非再発コホートにおいて年齢、閉経状態、人種、肥満度指数、併存疾患、臨床ステージ、ホルモン受容体状態、LVIの存在、核異型度、または乳房切除の必要によって差は認められなかった。しかし、術後補助T+Cを受けた患者 (P=0.021) および術前補助療法後に残存病変を有するもの (P=0.006) の間で再発はより高頻度に見られた。多変量回帰を介してこれらの関連の変数を調節すると、以下の表5に見られるようにT+C療法の順序 (P=0.304) ではなく抗HER2Th1応答 (P<0.0001) が、依然として再発と独立して関連していた。

30

【0221】

【表 5】

表5: 疾患再発を伴うまたは伴わないHER2^{pos}-IBC患者の間の人口統計および腫瘍関連特性の単変量比較。
 p<0.10の変数を多変量ロジスティック回帰に入力し、疾患再発に対する独立した相関を識別した。

特性	非再発 n(%)又は 中央値(IQR)	再発 n(%)又は中央 値(IQR)	単変量の p値	OR(95% CI)	多変量の p値
全体の人口	48(65.8)	25(34.2)	--	--	--
年齢 中央値(歳)	49.5(39-57)	48.0(41-53)	0.518		
BMI 中央値(kg/m ²)	27(25-32)	27.3(24.2-31.0)	0.506		
人種 白人黒人/アジア人/ラテンアメリカ系	39(81.3) 9(18.8)	18(72.0) 7(28.0)	0.365		
チャールソン併存疾患指数 0 ≥1	27(56.3) 21(43.7)	12(48.0) 13(52.0)	0.532		
閉経状態 閉経前 閉経後	24(50.0) 24(50.0)	13(52.0) 12(48.0)	0.871		
AJCC臨床状態‡ I II III	5(10.4) 23(47.9) 20(41.7)	2(8.0) 12(48.0) 11(44.0)	0.941		
ER/PR状態‡ 陽性 陰性	22(45.8) 26(54.2)	8(32.0) 17(68.0)	0.254		
リンパ管浸潤※ 非存在 存在	14(34.1) 27(65.9)	11(55.0) 9(45.0)	0.120		
核異型度 低い/中程度 高い	15(31.3) 33(68.8)	11(44.0) 14(56.0)	0.280		
化学療法の順序 術前補助T+C 術後補助T+C	29(60.4) 19(39.6)	8(32.0) 17(68.0)	0.021	2.11(0.51-8.79)	0.304
病理学的反応(術前補助の場合)※※ 不完全応答 完全応答	13(44.8) 16(55.2)	8(100.0) 0(0.0)	0.006	--	--
手術手法‡ BCS+XRT 乳房切除±XRT	23(47.9) 25(52.1)	11(44.0) 14(56.0)	0.750		
抗HER2Th1応答性 非応答 応答	8(16.7) 40(83.3)	23(92.0) 2(8.0)	<0.0001	0.02(0.00-0.10)	<0.0001

※※術前補助T+Cを受けた患者にのみ変数が知られているので、多変量ロジスティック回帰分析には含まず
 ‡多変量ロジスティック回帰分析に含まれ再発への独立した相関を決定する

【0222】

図16は解析的コホートを中央値44カ月(IQR31)で抗HER2Th1応答性によって階層化すると、Th1応答性の患者と比較してTh1非応答性の患者が、有意に亢進した無病生存期間(DFS)(中央値47対113ヶ月、P<0.0001)を実証したことを示す、この関連はコックスモデリングによって裏付けられた-Th1非応答コホートを対象とした危険率:15.2、95%CI3.5-66.7(P<0.001)。

【0223】

議論

この分析では、循環抗HER2CD4⁺Th1応答が完全に治療されたHER2^{pos}-IBC患者における乳癌再発と相関がある新規免疫となりうることを示されている

10

20

30

40

50

。免疫不全またはホストレベルのT細胞アネルギーに起因しない一方、再発を被る患者における抑制された抗HER2 T細胞応答はTh2又はT_{reg}でなく、主にTh1表現型によって駆動される。関連する人口統計学的/臨床病理学的因子を制御すると、抗IT_{ER2}Th1応答は、独立して再発と関連していた、リスク調整後の分析で、Th1-非応答性の患者はTh1応答性患者と比較して有意に亢進したDFSを実証した。これは疾患の再発と乳房腫瘍経営における既知のオンコドライバーすなわちHER2/neuと特異的に関連するホストレベルの免疫との間の相関の最初の証明であるようだ。

【0224】

これらのデータは、トラスツズマブからの利益(術後補助(Perez, E. A., et al, J. Clin. Oncol. 33(7):701-708(2015) DOL 10.1200/JCO.2014.57.6298)又は術前補助(Gianni, L., et al, Cancer Res. 72(24 Supplement):S6-7(2012)設定の両方)は、Th1遺伝子がIFN- /TNFに特に支配的な役割を付与している、免疫に富む腫瘍のコホートに制限される可能性があることを示唆しているという最近の証拠に照らして特に興味深い。Perezらを参照。まとめると、循環抗HER2のTh1免疫の欠乏と同様に、腫瘍レベルのTh1遺伝子発現の非存在がHER2標的療法の失敗を予測しうるようである。これらの観察は、Th1サイトカインIFN- /TNF- がHER2特異的CD8⁺T細胞が媒介するトラスツズマブで治療したHER2過剰発現乳癌のターゲティングを促進する上で決定的に必要であることを示す、試験管内での証拠により部分的に説明することができる。Datta, J., et al, Yale J. Biol. Med. 87(4):491-518(2014); Datta, J., et al, Front. Immunol. 6:271(2015); and Datta, J., et al., Cancer Immunol. Res. 3(5):455-463(2015)を参照。したがって、抗HER2Th1免疫におけるリアルタイムの変動のため完全に治療されたHER2^{pos}BC患者を監視することは、臨床病理学的障害の危険性のある脆弱な集団を明らかにすることができる。このような免疫監視は、既存の放射線監視を補完しないことがありうるが、抗HER2Th1標的免疫介入などの治療的介入のための重要な機会を、同定することができる。Datta, et al. Breast Cancer Res. を参照。

【0225】

免疫応答は、疾患の再発時に調べたので、これらの患者における抗HER2Th1免疫が指標トラスツズマブ療法の完了後に抑制されるのかまたは再発の発生と同時に減少したのかは依然として不明のままである。HER2標的療法の完了前後の抗HER2Th1応答の長期的な調査は、将来の臨床試験の文脈において必要とされているようである。その他の制限に言及する必要がある。第1に、この実験例に関する研究計画の性質上、本明細書における調査結果は、仮説生成と解釈すべきであり大規模な検証が必要とされる。第2に、この研究は、別のHER2標的薬(例えば、ラパチニブ、ペルツズマブなど)で治療した後の抗HER2Th1免疫の影響に対処することはできない。最後に、これらの患者における抗HER2Th1免疫監視の場合約はやむをえないが、本研究では、このような監視のための数値上の閾値を設けることができない。しかし、当業者は、更なる研究により医師が本明細書に記載されるような血液検査で監視するために従うことができ、おそらく、本明細書に記載の樹状細胞に基づく抗HER2ワクチンのような、抗HER2追加免疫療法を受けた患者を治療して抗HER2応答性を回復することができる、数値上の閾値の確立につながると理解することができる

【0226】

要するに、抑制された抗HER2 CD4⁺Th1応答はHER2標的療法の完了後のHER2^{pos}IBC患者における再発に関連する新規な免疫である。この実験例のデータは、(既存の放射線監視を補完し、臨床病理学的障害のリスクを有する脆弱な集団を同定するために)完全に治療されたHER2^{pos}-IBC患者における免疫監視の役割を強調する。

10

20

30

40

50

【0227】

全体的に要約すると、循環抗HER2Th1免疫は、完全に治療されたHER2^{pos}-BC患者における免疫監視および治療選択のための有望な意味合いを有する、トラスツズマブ療法後の再発に動的な相関があることが本明細書に示される。HER2陽性乳癌患者は、その免疫状態を治療前、中及び後の血液検査で監視させて医師や他の医療従事者が再発のリスクを測定し、例えばDCワクチンまたは他の癌ワクチンのような、抗HER2免疫を高める治療により再発のリスクを低減することを可能にする。

【0228】

実験例3

抗HER2Th1応答は、HER2陽性乳癌患者における術前補助化学療法に対する応答を評価する点で乳房MRIよりも優れている

10

【0229】

術前化学療法(nCT)は、40~67%に至るまで、完全な病理学的応答(PCR)を実現する。Yuan Y, et al, Am. J. Radiol. 195(1):260-268(2010)。治療後の乳房磁気共鳴画像(pMRI)は、現在、特異性(90.7%)が高く、感度(63.1%)が低いゴールドスタンダードと考えられている。Hylton, N.M., et al, Radiology 263(3):663-72(2012 Jun)。抗HER2Th1応答は、HER2⁺BC患者におけるnCT治療後の病理学的応答と関連する。Datta, J., et Breast Cancer Res. 17:71. doi:10.1186/s13058-015-0584-1(2015 May 23) pCRを有する患者を識別することは、その後の治療を調整するのに役立つ。これは、術前補助治療後をガイドする敏感なツールを開発するのに欠かせない。この研究において、HER2⁺BC患者における完全な病理学的応答の評価のために治療後のMRIを、抗HER2Th1応答と比較した。

20

【0230】

方法

ペンシルバニア大学で30人の患者を遡及的に組織学的に確認されたIBCと同定し、HER2/neuの過剰発現を確認した。いずれの患者においても、遠隔転移の証拠はなく、いずれも免疫抑制薬物療法を受けていなかった。患者に、偏りのない方法で抗HER2TH1分析を行った。最初の治療後のMRIレポートを収集し、画像診断は、PCRおよび免疫応答を知らされていない乳房の放射線科医によって検討された。画像処理に基づく腫瘍応答を、標準RECIST基準に基づいて評価し、これは固体の病変と同様に非質量増大評価を含むように変更された。完全な病理学的応答は、切除乳房検体および試料採取されたリンパ節の病理学的検査での残留浸潤癌の不存在として定義した(すなわち、ypT0/TisのypN0)。参考例に記載されたように、循環抗HER2CD4⁺Th1応答を、累積応答を決定するために酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイを介してIFN- γ 産生を測定することによって、生体外で6個のHER2由来MHCクラスIIペプチド(ペプチド42~56、ペプチド98~114、ペプチド328~345、ペプチド776~790、ペプチド927~941、およびペプチド1166~1180)(配列番号:1~6)でパルスした非刺激PBMCにおいて検討した。参考例に記載のようにELISPOTを行った。MRIおよび抗HER2Th1応答は、病理学的応答と相関し、標準的な診断の指標が計算された。

30

40

【0231】

最も一般的に利用される治療計画はアドリアマイシン/シクロフォスファミド/タキソール/ハーセプチンである。最も一般的な外科介入は乳房切除術だった。患者の特徴は以下の通りである:

【0232】

【表 6】

患者の特徴		
歳、年齢、平均±標準誤差		45.3±2.1
歳、年齢、範囲		24-80
BMI,平均±標準誤差(kg/m ²)		2.3±2.1
人種、民族性、数(%)		
白人		35(87.5)
アフリカ系アメリカ人		3(7.5)
アジア人		1(2.5)
ラテンアメリカ系		1(2.5)
診断時点でのAJCC状態、数(%)		
ステージ1		0(0)
ステージ2		21(52.5)
ステージ3		19(47.5)
ホルモン受容体の状態、数(%)		
ER/Prpos		18(45.0)
ER/Prneg		22(55.0)
リンパ管浸潤の存在、数(%)		7(17.5)
トラスツマブの完了から研究への登録までの時間、数(%)		
6ヶ月未満		18(45.0)
6ヶ月以上		22(55.0)

10

20

【0233】

結果

完全な病理学的応答 (PathCR) による被験者のHER2累積応答の分布は、13人の患者がPathCRを有しており (平均値±SD = 167.0 ± 115.6 SFC / 10⁶ 細胞、最小値 = 53.0 SFC / 10⁶、最大値 = 418.0 SFC / 10⁶ 細胞)、17人の患者がPathCRを有していなかった (平均値±SD = 23.9 ± 15.2 SFC / 10⁶ 細胞、最小値 = 0.4 SFC / 10⁶、最大値 = 53.3 SFC / 10⁶ 細胞)。患者は、50 SFC / 10⁶ 細胞のカットポイントに二分された (「低」 < 50、「高」 > 50)。

30

【0234】

HER2患者のMRIおよびHER2累積応答の診断特性は以下の通りである。PPV = 陽性予測値; NPV = 陰性予測値

【0235】

【表 7】

1 MRIの結果対病理学的結果(ゴールドスタンダード)、N=30患者

a.13人は病理学的に著効だった

b.17人は病理学的に著効ではない

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
MRIで病理学的に著効ではない	11	8	19
MRIで病理学的に著効	6	5	11
合計	17	13	30

i. 感度	5/13=38.5%
ii. 特異性	11/17=64.7%
iii. PPV	6/11=54.5%
iv. NPV	11/19=57.9%
v. 全体の精度	16/30=53.3%

10

2 ER陰性、N=11患者

a.8人は病理学的に著効だった

b.3人は病理学的に著効ではない

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
MRIで病理学的に著効ではない	2	6	8
MRIで病理学的に著効	1	2	3
合計	3	8	11

i. 感度	2/8=25.0%
ii. 特異性	2/3=66.7%
iii. PPV	2/3=66.7%
iv. NPV	2/8=25.0%
v. 全体の精度	4/11=36.3%

20

3 ER陽性、N=19患者

a.5人は病理学的に著効だった

b.14人は病理学的に著効ではない

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
MRIで病理学的に著効ではない	9	2	11
MRIで病理学的に著効	5	3	8
合計	14	5	19

i. 感度	3/5=60.0%
ii. 特異性	9/14=64.3%
iii. PPV	3/8=37.5%
iv. NPV	9/11=81.8%
v. 全体の精度	12/19=63.2%

30

4 バイナリー-HER2累積応答結果対病理学的結果(ゴールドスタンダード)、N=30患者

a.13人は病理学的に著効だった

b.17人は病理学的に著効ではない

c.16人は「低応答」(50未満)と分類された

d.14人は「高応答」(50以上)と分類された

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
HER2応答 低い	16	0	16
HER2応答 高い	1	13	14
合計	17	13	30

i. 感度	13/13=100%
ii. 特異性	16/17=94.1%
iii. PPV	13/14=92.9%
iv. NPV	16/16=100%
v. 全体の精度	29/30=96.7%

40

5 ER陰性、N=11患者

- a.8人は病理学的に著効だった
 b.3人は病理学的に著効ではない
 c.3人は「低応答」(50未満)と分類された
 d.8人は「高応答」(50以上)と分類された

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
HER2応答 低い	3	0	3
HER2応答 高い	0	8	8
合計	3	8	11

- i. 感度 $8/8=100.0\%$
 ii. 特異性 $3/3=100.0\%$
 iii. PPV $8/8=100.0\%$
 iv. NPV $3/3=100.0\%$
 v. 全体の精度 $11/11=100.0\%$

10

6 ER陽性、N=19患者

- a.5人は病理学的に著効だった
 b.14人は病理学的に著効ではない
 c.13人は「低応答」(50未満)と分類された
 d.6人は「高応答」(50以上)と分類された

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
HER2応答 低い	13	0	13
HER2応答 高い	1	5	6
合計	14	5	19

- i. 感度 $5/5=100.0\%$
 ii. 特異性 $13/14=92.9\%$
 iii. PPV $5/6=83.3\%$
 iv. NPV $13/13=100\%$
 v. 全体の精度 $18/19=94.7\%$

20

7 新しく調査したMRI(new MRI)結果対病理学的結果
(ゴールドスタンダード)、N=30患者

- a.13人は病理学的に著効だった
 b.17人は病理学的に著効ではない

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
新しいMRIで病理学的に著効ではない	11	7	18
新しいMRIで病理学的に著効	6	6	12
合計	17	13	30

- i. 感度 $6/13=46.2\%$
 ii. 特異性 $11/17=64.7\%$
 iii. PPV $6/12=50.0\%$
 iv. NPV $11/18=61.1\%$
 v. 全体の精度 $17/30=56.7\%$

30

8 ER陰性、N=11患者

- a.8人は病理学的に著効だった
 b.3人は病理学的に著効ではない

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
新しいMRIで病理学的に著効ではない	11	7	18
新しいMRIで病理学的に著効	6	6	12
合計	17	13	30

- i. 感度 $3/8=37.5\%$
 ii. 特異性 $2/3=66.7\%$
 iii. PPV $3/4=75.0\%$

40

iv. NPV 2/7=28.6%
v. 全体の精度 5/11=45.5%

9 ER陽性、N=19患者
a.8人は病理学的に著効だった
b.3人は病理学的に著効ではない

	病理学的に著効ではない	病理学的に著効	合計
新しいMRIで病理学的に著効ではない	9	2	11
新しいMRIで病理学的に著効	5	3	8
合計	14	5	19

i. 感度 3/5=60.0%
ii. 特異性 9/14=64.3%
iii. PPV 3/8=37.5%
iv. NPV 9/11=81.1%
v. 全体の精度 12/19=63.1%

10

【 0 2 3 6 】

【 表 8 】

以下の表に全ての患者のデータをまとめた。

20

	感度	特異性	PPV	NPV	全体の精度
全患者					
最初のpMRIの報告 (上記番号1のデータ)	38.50%	64.70%	54.50%	57.90%	53.30%
盲検再審査pMRI (上記番号8のデータ)	46.20%	64.70%	50.00%	61.10%	56.70%
抗HER2Th1応答 (上記番号5のデータ)	100.00%	94.10%	92.90%	100.00%	96.70%

30

【 0 2 3 7 】

最初の p M R I は、上記の表に示すように、抗 H E R 2 T h 1 応答と比較して P C R のためにはるかに低い診断結果となった。盲検化した再審査 p M R I の 2 8 人の患者のサブセットにおいては、P C R の診断結果は、抗 H E R 2 T h 1 応答より著しく劣ったままであった（感度 4 6 . 2 % 対 1 0 0 . 0 %、特異度 6 4 . 7 % 対 9 4 . 1 %、全体の精度 9 6 . 7 % 対 5 6 . 7 %）。患者を、エストロゲン受容体の状態によって層別化した場合にも、同様の所見が観察された、番号 2 , 3 , 4 , 7 及び 9 の番号のデータ参照。

【 0 2 3 8 】

結論

抗 H E R 2 T h 1 免疫応答は、治療後の M R I と比較して著しく正確な診断指標を実証した。「高い」抗 H E R 2 T h 1 応答の存在は、H E R 2 + B C における P C R の評価において治療後に M R I を使用することより優れている。当業者は、本明細書に提示される方法を用いて、H E R 2 + B C 患者の術前補助化学療法に対する応答を評価する点で、患者の免疫応答を監視する利点を理解するであろう。

40

【 0 2 3 9 】

本明細書において引用される各々及びすべての特許、特許出願及び刊行物の開示は、本明細書によりその全体が参照により本明細書の中に組み込まれる。

【 0 2 4 0 】

本開示は、例示及び記述の目的のために提示されているが、排出又は限定を意図するも

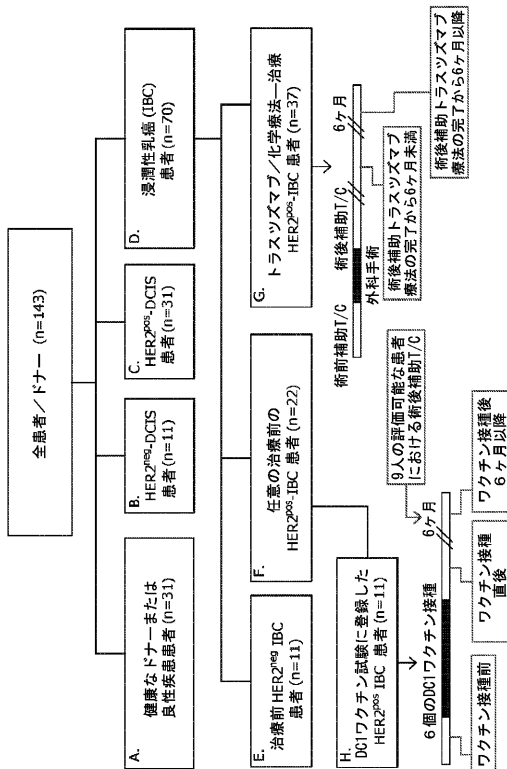
50

のではない。多くの変更及び変形が当業者には明らかであろう。実施形態は、原則及び実践的な応用を説明するために、そして当業者である他人が考えられる特定の用途に適した様々な変形を有する様々な実施形態の開示を理解するために、選択され説明された。

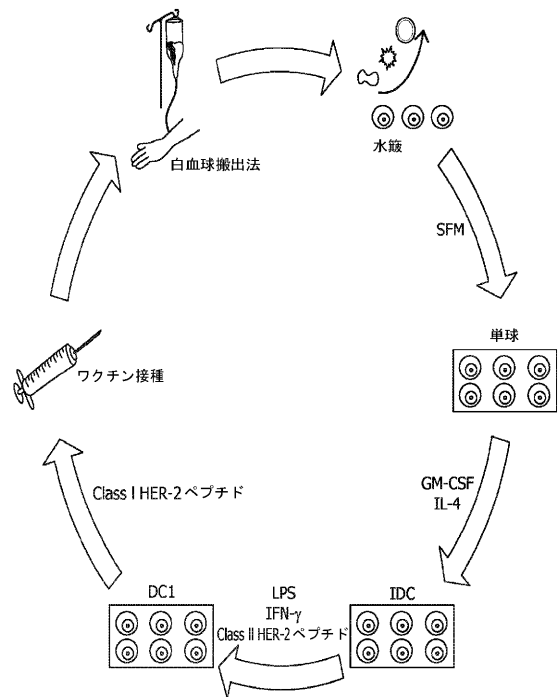
【0241】

例示的な実施形態は、添付の図面を参照して本明細書に記載されているが、実施形態はこれらの特定の記述に限定されず、様々な他の変更及び改変は当業者によって開示の範囲または精神を逸脱せず、その中に考案されてもよいことを理解すべきである。添付の特許請求の範囲は全てのそのような実施形態及び同等の変形を含むと解釈されることを意図する。

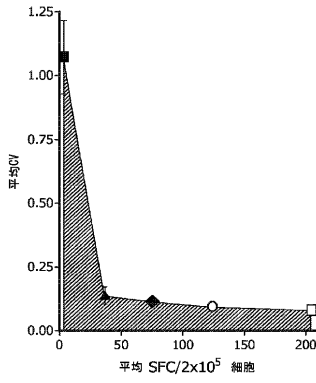
【図1】



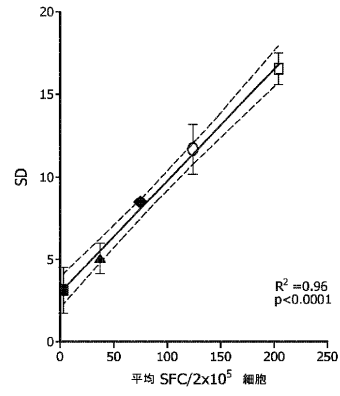
【図2】



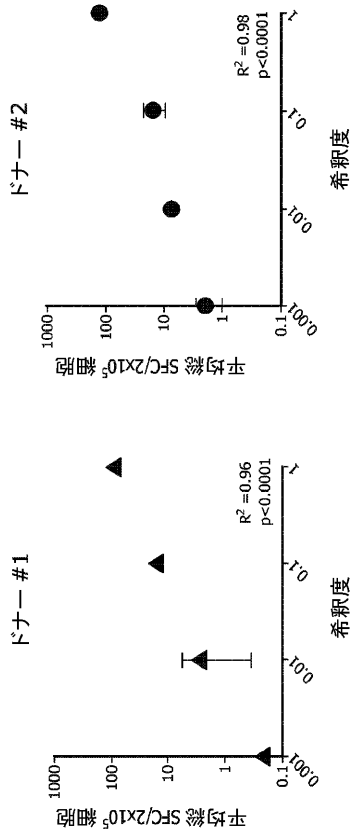
【 図 3 A 】



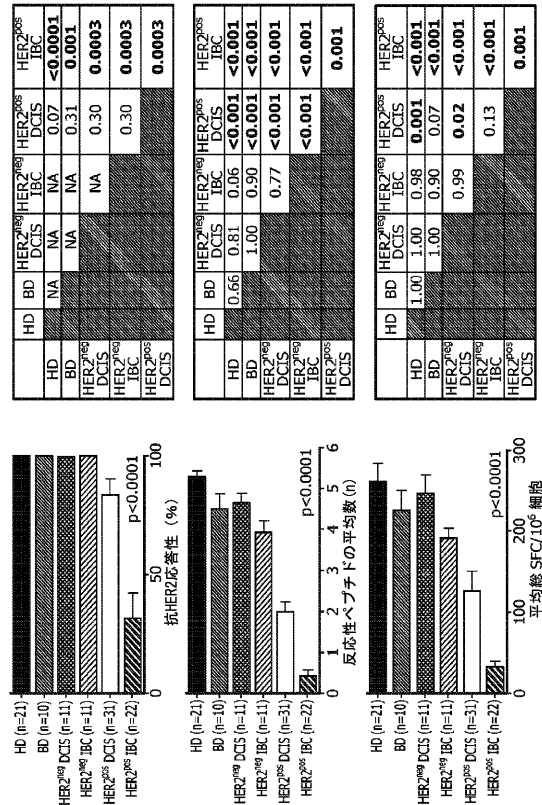
【 図 3 B 】



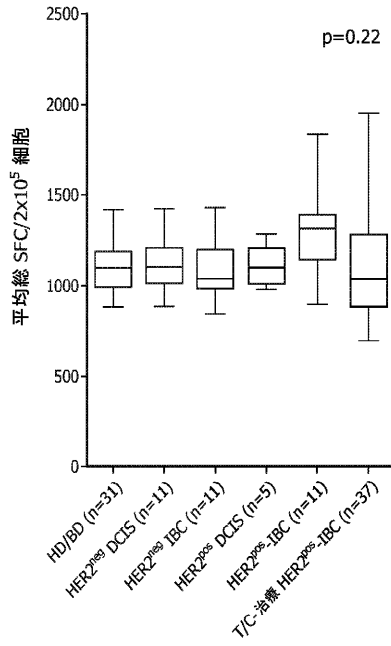
【 図 4 】



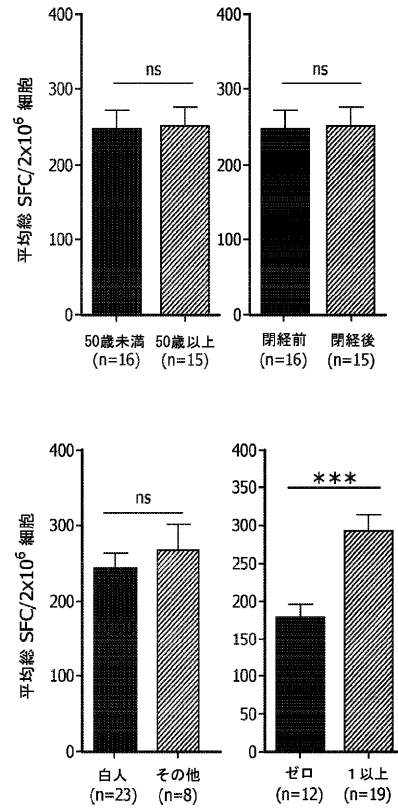
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 5 C 】



【 図 5 D 】

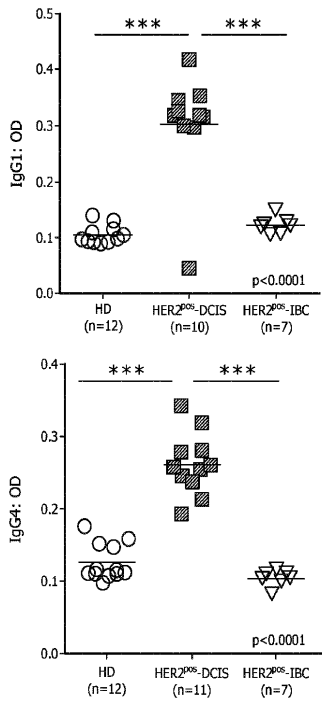
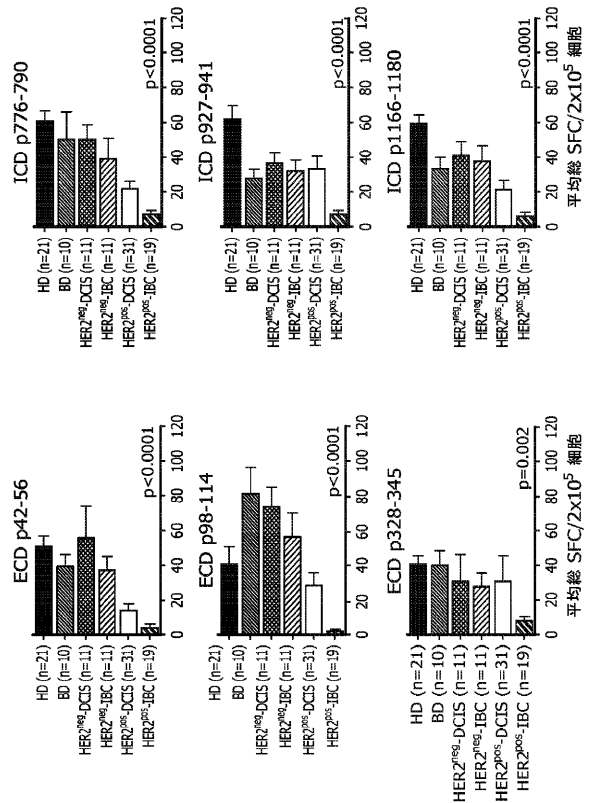
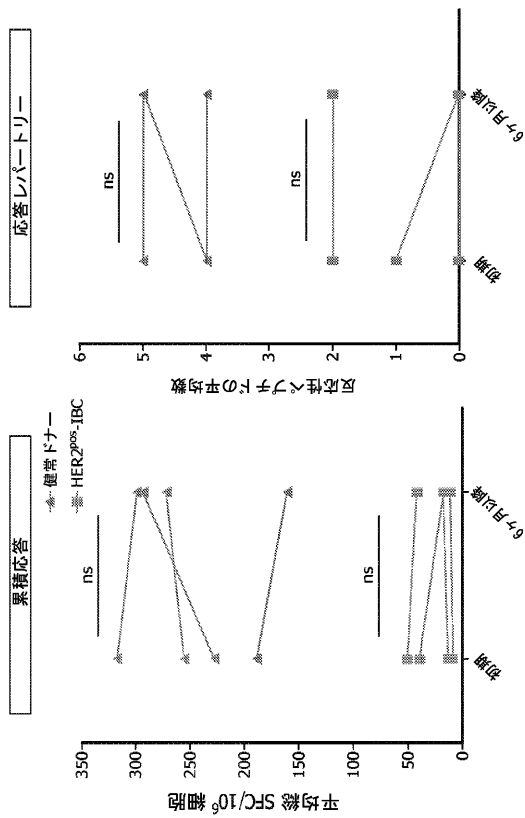


FIG. 5D

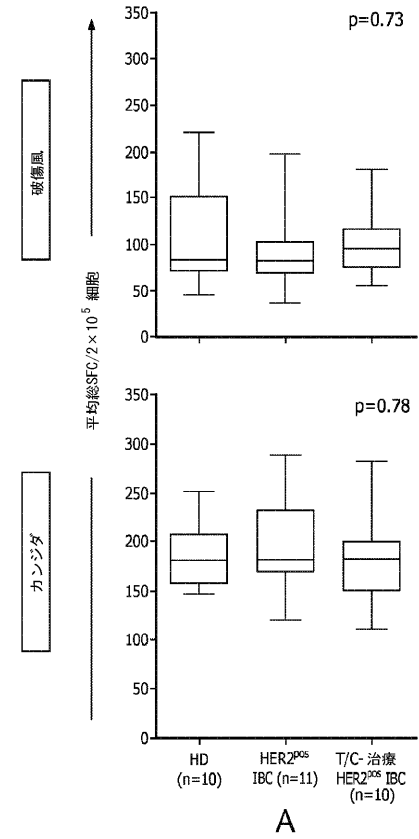
【 図 6 】



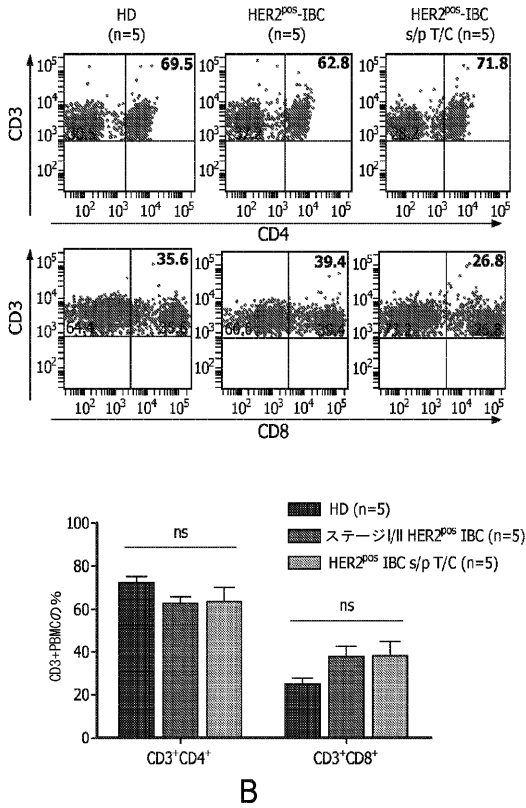
【 図 7 】



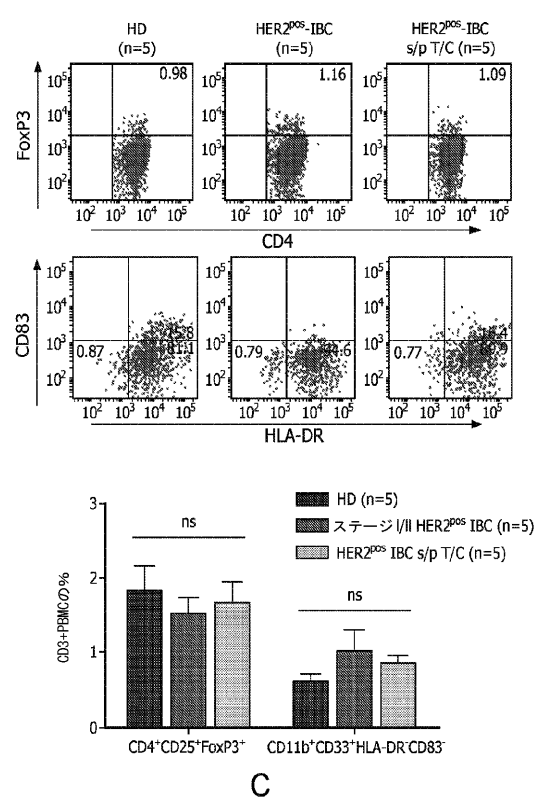
【 図 8 A 】



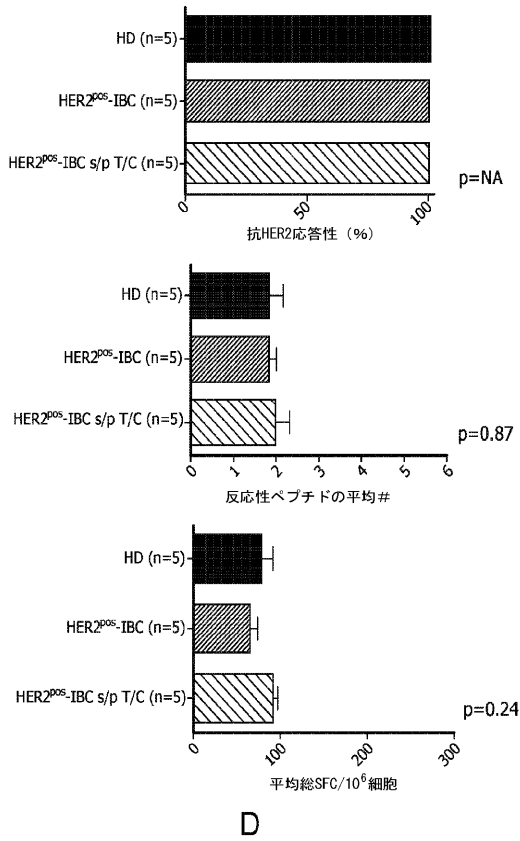
【 図 8 B 】



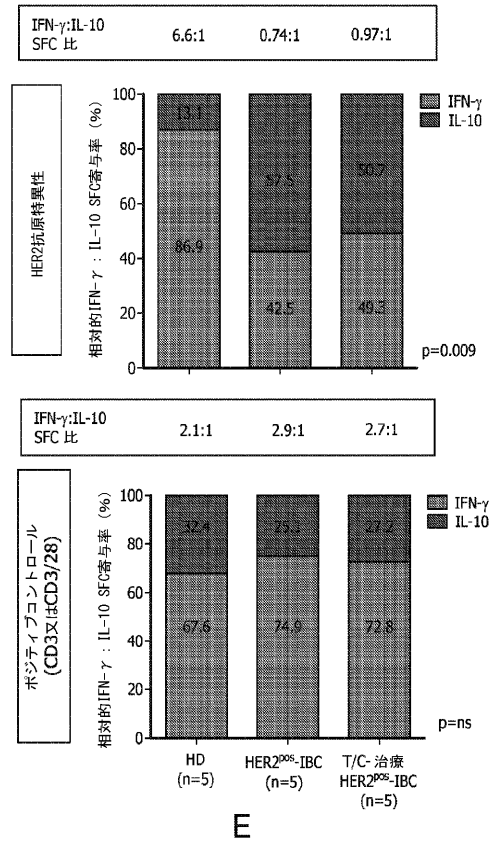
【 図 8 C 】



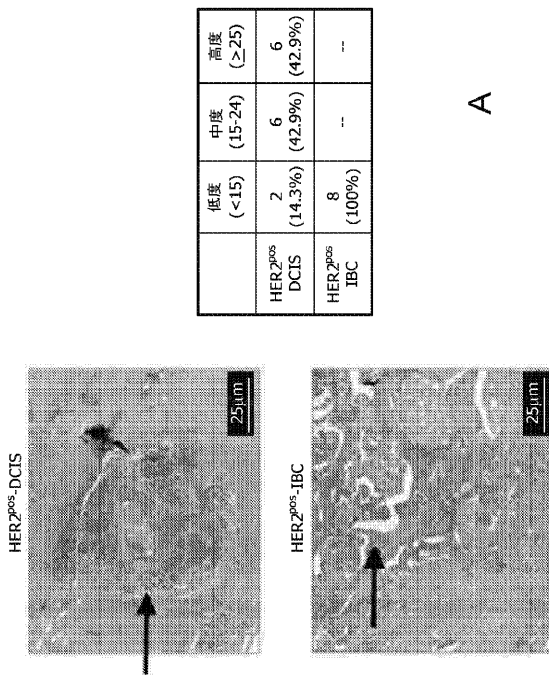
【 図 8 D 】



【 図 8 E 】



【 図 9 A 】



【 図 9 B 】

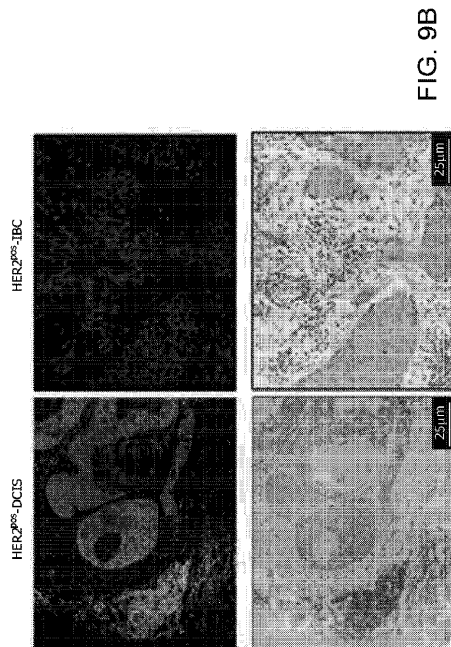
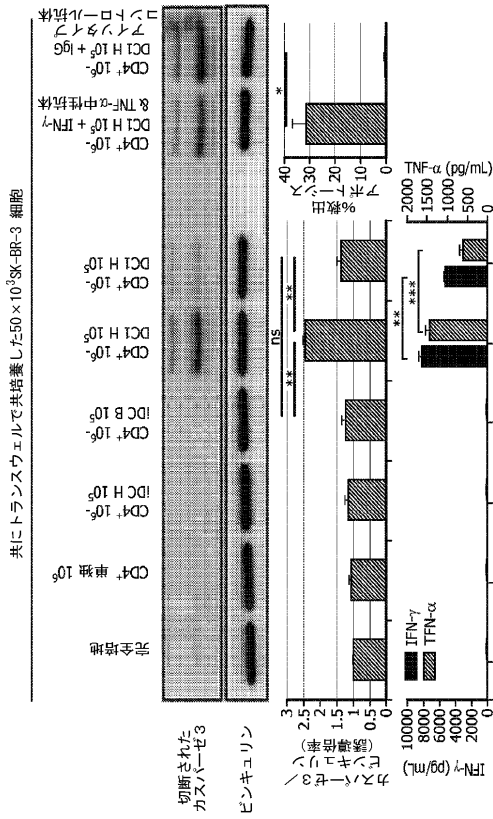
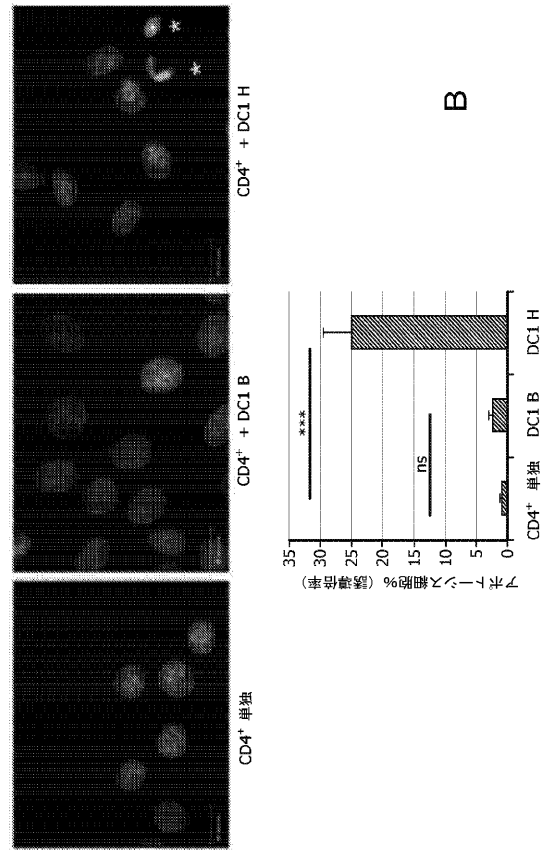


FIG. 9B

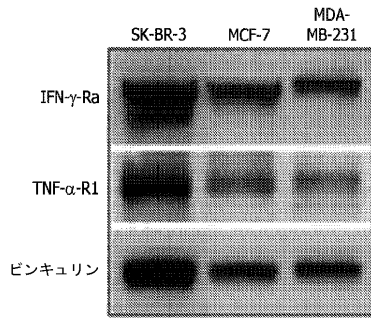
【図10A】



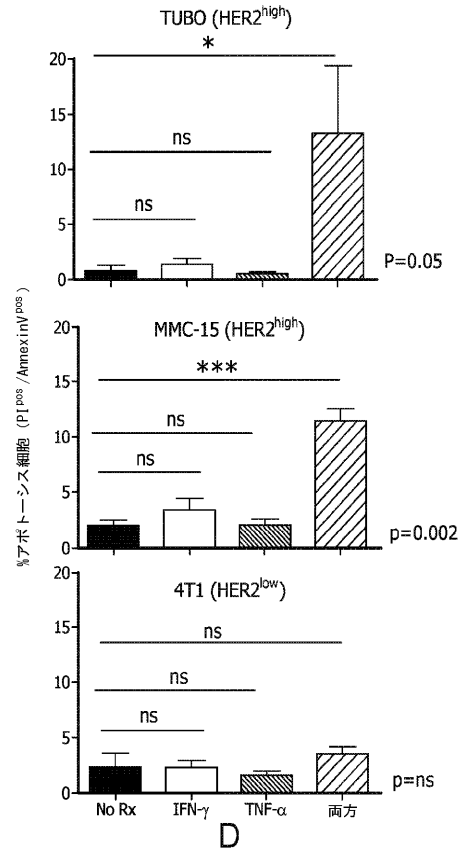
【図10B】



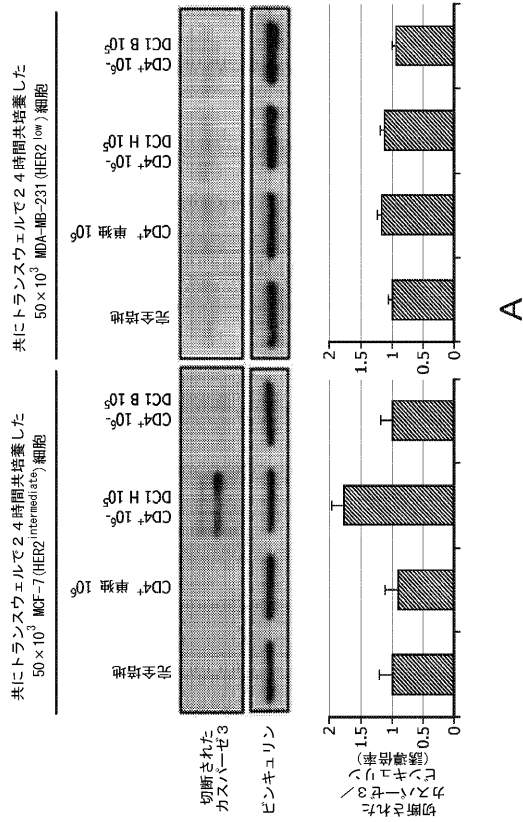
【図10C】



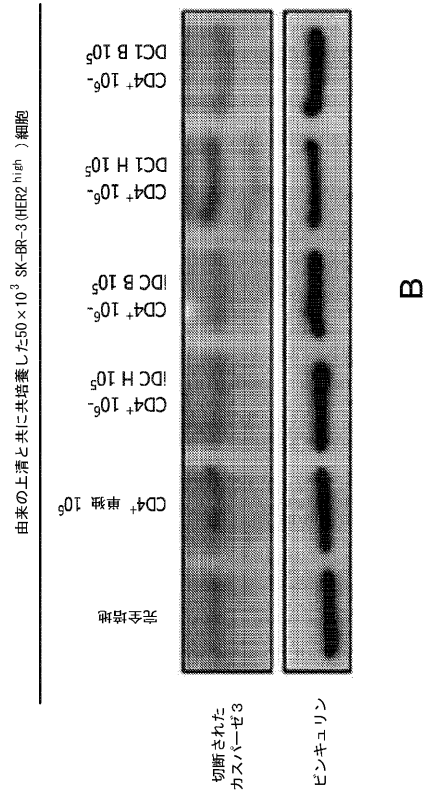
【図10D】



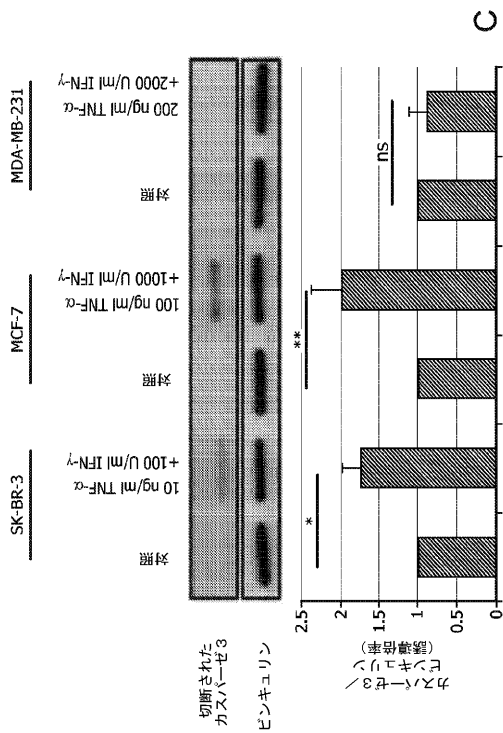
【 図 1 1 A 】



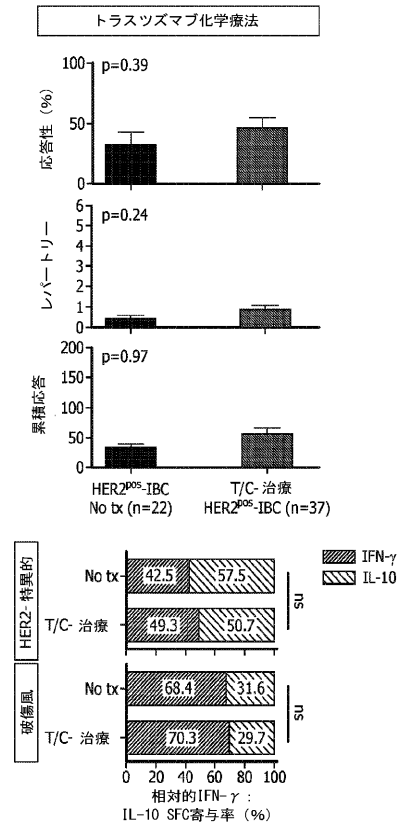
【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 C 】

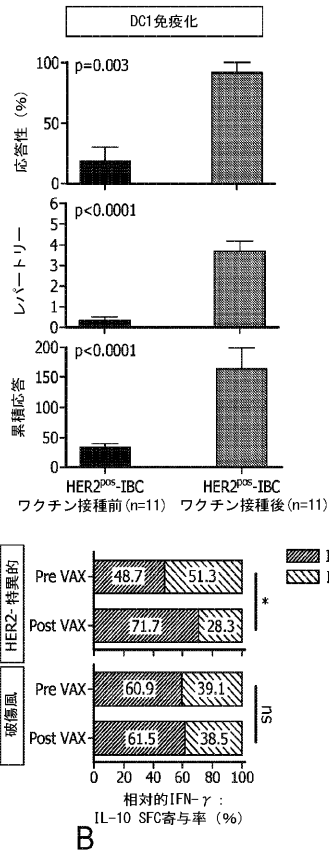


【 図 1 2 A 】

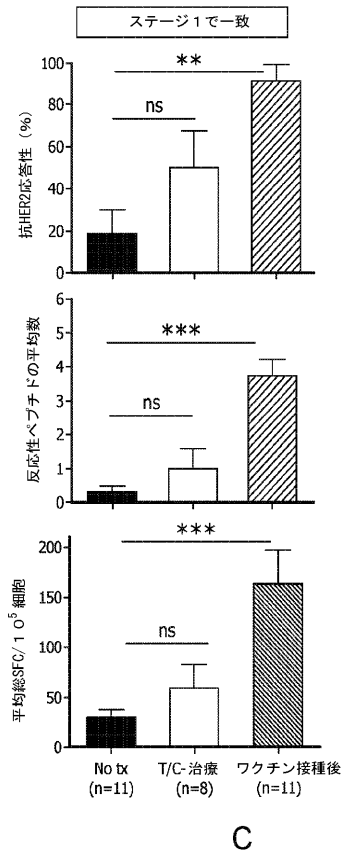


A

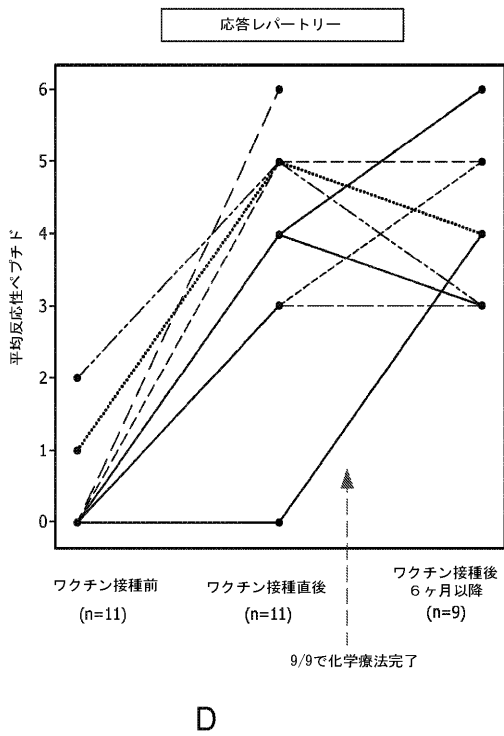
【 図 1 2 B 】



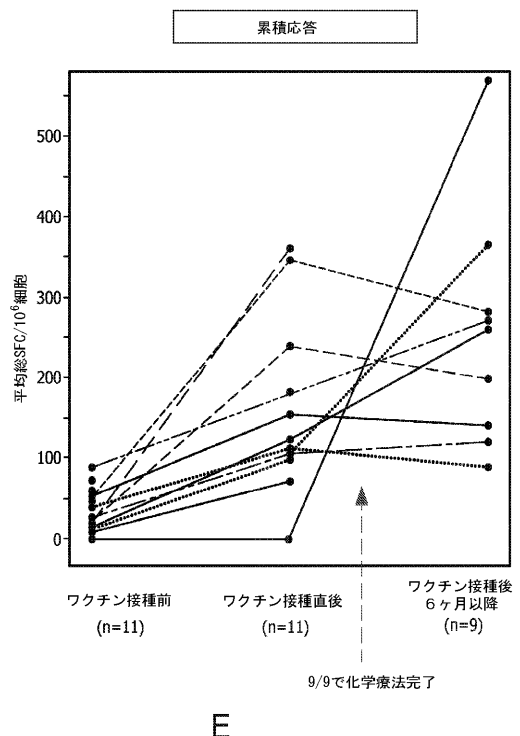
【 図 1 2 C 】



【 図 1 2 D 】



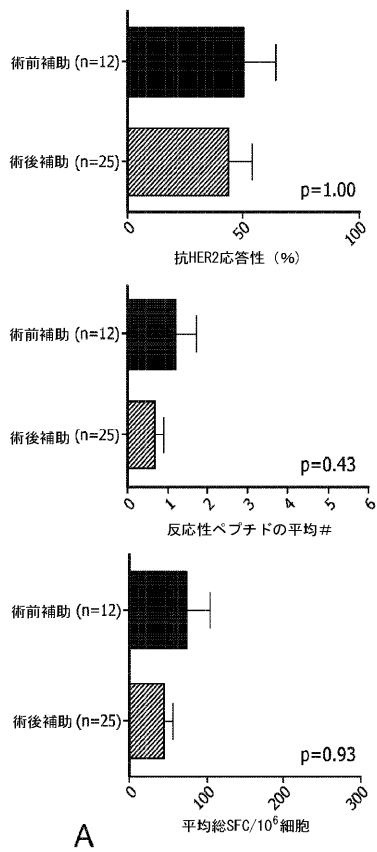
【 図 1 2 E 】



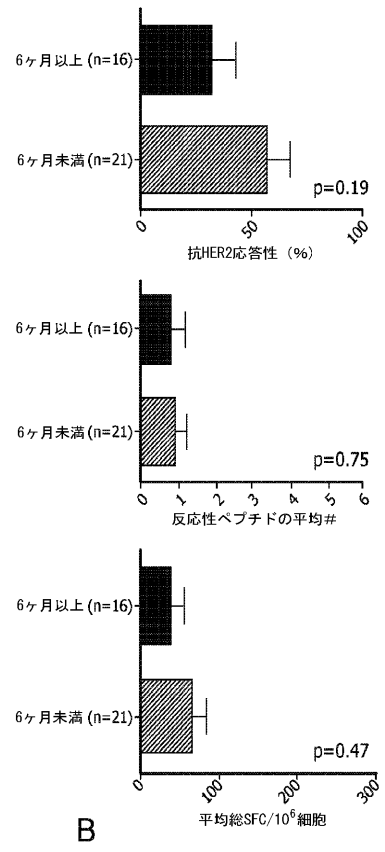
D

E

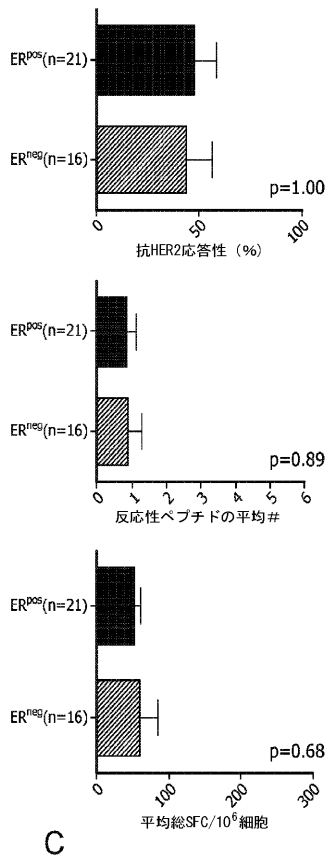
【 図 1 3 A 】



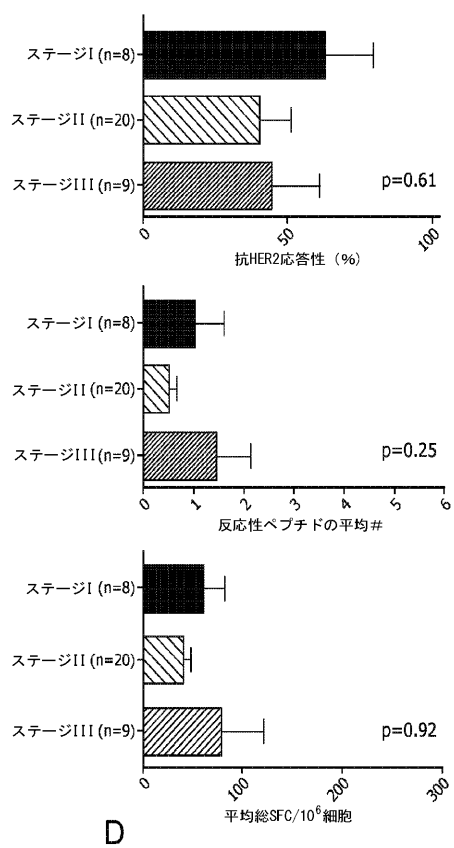
【 図 1 3 B 】



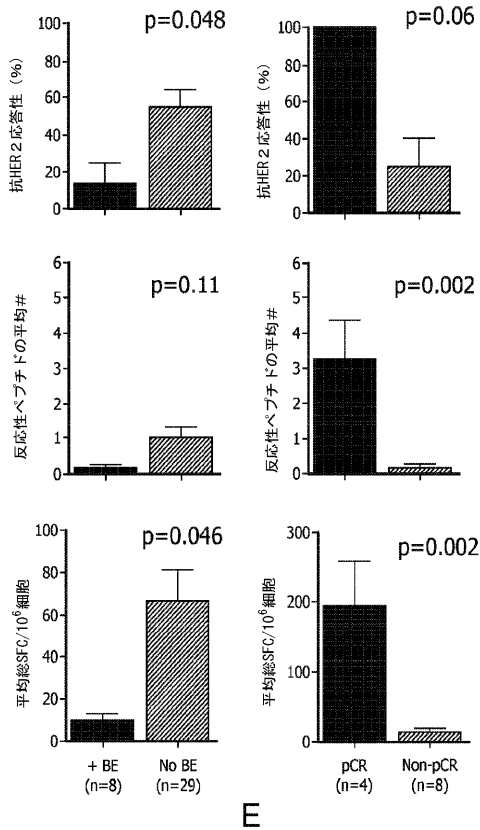
【 図 1 3 C 】



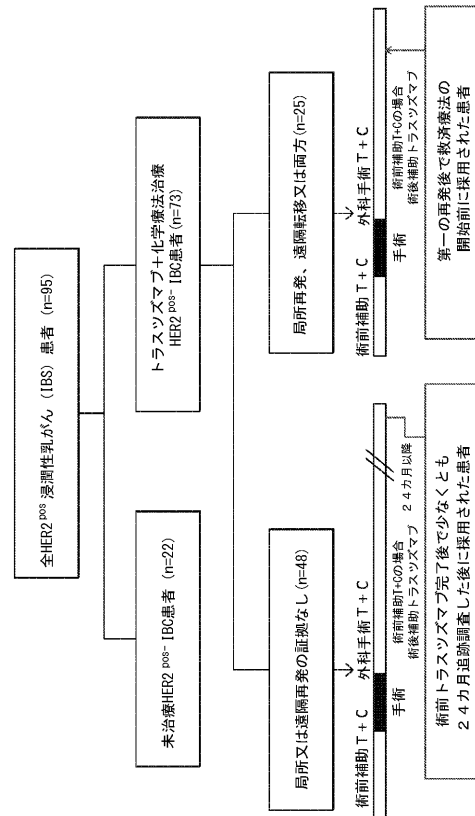
【 図 1 3 D 】



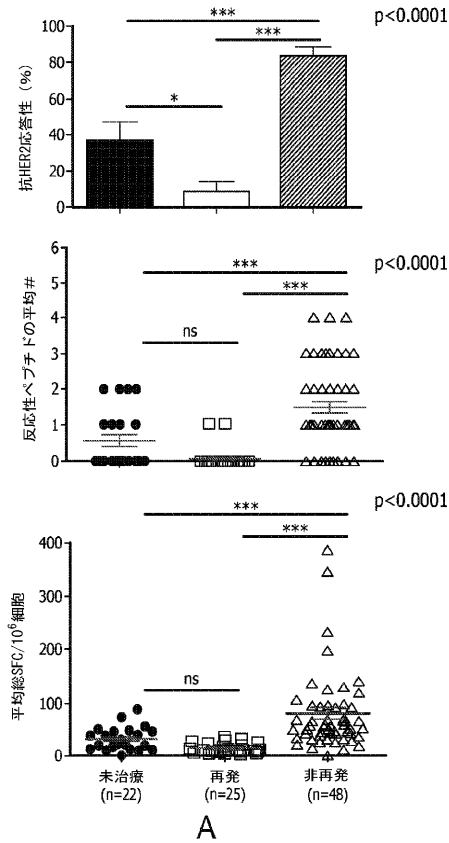
【 図 1 3 E 】



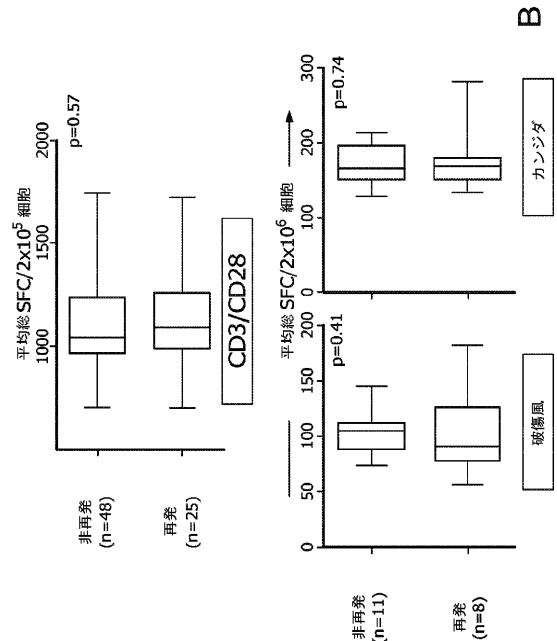
【 図 1 4 】



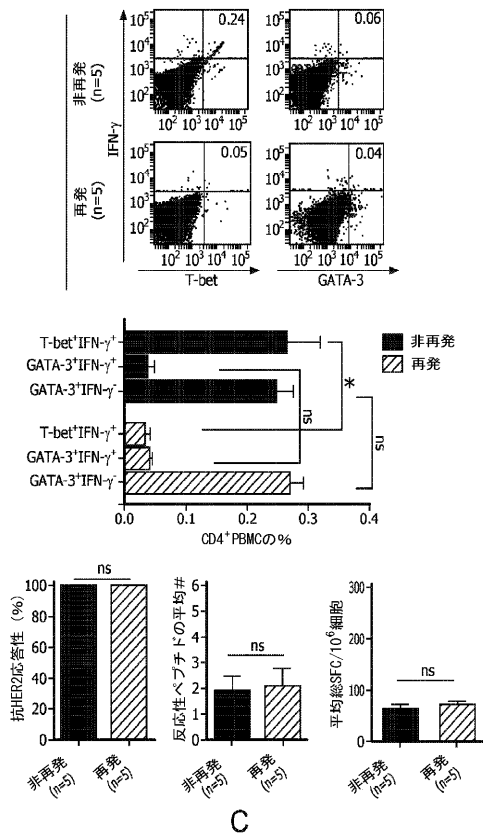
【 図 1 5 A 】



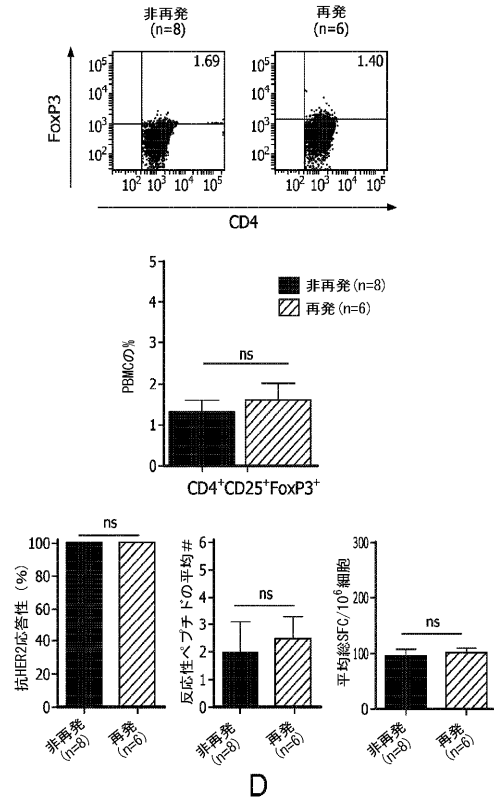
【 図 1 5 B 】



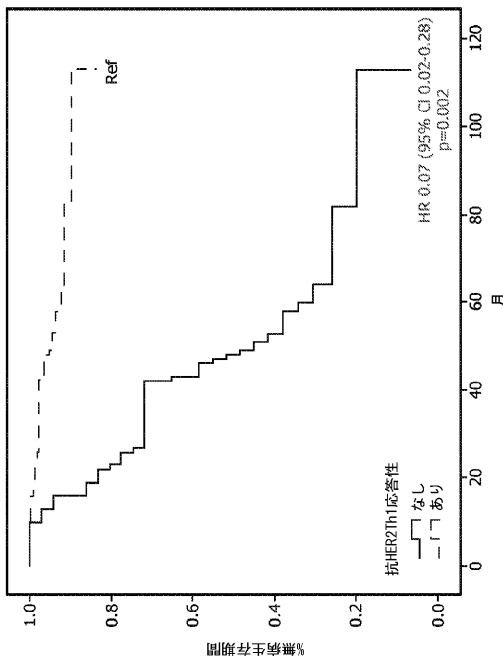
【 図 1 5 C 】



【 図 1 5 D 】



【 図 1 6 】



【配列表】

2018515742000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/20987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC(8) - C12N 5/078, 5/0784; A61K 35/12, 35/17, 38/19, 38/20 (2016.01)	
CPC - C12N 5/0636, 5/0637; A61K 35/12, 35/17, 38/19, 38/208	
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)	
IPC (8): C12N 5/078, 5/0784; A61K 35/12, 35/17, 38/19, 38/20, 39/00; C07K 16/32; G01N 33/68 (2016.01)	
CPC: C12N 5/0636, 5/0637; A61K 35/12, 35/17, 38/19, 38/208, 39/0011; C07K 16/32, 2317/24; G01N 2333/57, 2800/50, 33/56972	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)	
PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPAQOC Data); Google Scholar; Pubmed; EBSCO	
Keywords: PMBC, peripheral blood mononuclear cell*, dendritic cell*, antigen presenting cell, APC, interferon gamma, IFN, MHC class binding peptide*, cancer, detect*, interleukin, IL, trastuzumab, chemotherapy	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	(KOSKI, GK et al.) A Novel Dendritic Cell-Based Immunization Approach for the Induction of Durable Th1-Polarized Anti-HER-2/neu Responses in Women with Early Breast Cancer. <i>Journal of Immunotherapy</i> . January 2012, Vol. 35, No. 1; pages 1-22; abstract; page 2, paragraph 1 - page 3, paragraph 3; page 4, paragraphs 3-4; page 5, paragraph 4; page 7, paragraphs 2-3; page 9, paragraph 3 - page 10, paragraph 1; page 10, paragraph 4; DOI: 10.1097/CJI.0b013e318235f512
Y	US 2010/0087621 A1 (CHEEVER, MA et al.) 8 April 2010; paragraph [0051]
Y	(GEBHART, MJP et al.) Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy In HER2-Positive Breast Cancer. <i>New England Journal of Medicine</i> . 20 October 2005, Vol. 353, No. 16; pages 1659-1672; abstract; page 1660, column 1, paragraph 1; page 1660, column 2, paragraph 2; DOI: 10.1056/NEJMoa052306
	Relevant to claim No.
	1-7, 10, 15-16, 21
	8-9, 11-14, 17-20, 22-23
	8-9, 11-14
	17-20, 22-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
31 May 2016 (31.05.2016)	24 JUN 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSF: 571-272-7774

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	
C 0 7 K 7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. タキソール
2. タキソテール

(72)発明者 ブライアン ジェイ ツェルニキ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 0 3 3 ハッドンフィールド チューズ ランディン
グ ロード 77

(72)発明者 ガリー ケイ コスキ
アメリカ合衆国 オハイオ州 4 4 3 3 3 アクロン グレンジャー ロード 4 5 8 5

(72)発明者 ジャショディープ ダッタ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 2 9 フィラデルフィア ドリフトウッド ドライブ
4 4 2 7

Fターム(参考) 2G045 AA26 BA11 BB20 CA11 DA36
4C084 AA17 NA06 NA20 ZA81 ZB09 ZC37
4C085 AA14 BB01 CC23 EE01
4H045 AA11 AA30 BA17 CA40 DA50 DA86 EA20 EA51 FA34 FA74

专利名称(译)	监测癌症CD4 + T辅助细胞1型反应和免疫恢复的方法		
公开(公告)号	JP2018515742A	公开(公告)日	2018-06-14
申请号	JP2016558088	申请日	2016-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	CZERNIECKI BRIAN J		
[标]发明人	ブライアンジェイツェルニキ ガリーケイコスキ ジャシヨディープダッタ		
发明人	ブライアン ジェイ ツェルニキ ガリー ケイ コスキ ジャシヨディープ ダッタ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61P37/04 A61P35/00 A61P15/00 A61K45/00 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/574 C07K7/08		
CPC分类号	A61K35/12 A61K35/15 A61K35/17 A61K38/20 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61P15/00 A61P35/00 A61P37/04 G01N33/5091 G01N33/57419 G01N2333/57 G01N2800/52 G01N2800/54 A61K39/001106		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.P A61K39/00.H A61P37/04 A61P35/00 A61P15/00 A61K45/00 A61K39/395.T G01N33 /50.Z G01N33/574 C07K7/08		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BA11 2G045/BB20 2G045/CA11 2G045/DA36 4C084/AA17 4C084/NA06 4C084 /NA20 4C084/ZA81 4C084/ZB09 4C084/ZC37 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045 /EA51 4H045/FA34 4H045/FA74		
代理人(译)	杉村健二 高木义		
优先权	14/985303 2015-12-30 US 14/658095 2015-03-13 US PCT/US2015/020613 2015-03-13 WO		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于诊断或治疗已经发展或可能发展癌症的哺乳动物受试者的方法，所述方法包括：提供来自所述受试者的血液样品的抗原呈递细胞（APC）或其前体和CD4 + Th细胞产生引起干扰素-γ（IFN-γ）分泌的循环抗癌CD4 + Th1应答，并检测所述抗癌CD4 + Th1应答以确定所述应答是否已被抑制。一种在有需要的HER2阳性乳腺癌患者中恢复HER2特异性CD4 + Th1免疫应答的方法，所述方法包括：为了增加CD4 + Th1应答，向患者施用治疗有效量的含有免疫原性HER2 MHC II类结合肽脉冲的自体DC的DC疫苗（DC疫苗接种）；并且为了确定所述反应的增加，在所述患者的DC疫苗接种之前和之后的所述抗HER2测量CD4 + Th1应答。

