

(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2015-529629

(P2015-529629A)

(43) 公表日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/82 (2006.01)	C07K 14/82 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
C12N 5/0783 (2010.01)	C12N 5/00 2O2L	4B065
C07K 16/32 (2006.01)	C07K 16/32	4C084
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C087
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-501988 (P2015-501988)	(71) 出願人	502240113 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成25年7月9日(2013.7.9)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月4日(2015.3.4)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/004244	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02014/010229	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成26年1月16日(2014.1.16)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/669,971	(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(32) 優先日	平成24年7月10日(2012.7.10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Th1細胞のCDCA1エピトープペプチドおよびこれを含有するワクチン

(57) 【要約】

Th1細胞誘導能を有する単離されたCDCA1由来のエピトープペプチドが本明細書において開示される。そのようなペプチドは、MHCクラスII分子によって認識され、Th1細胞を誘導することができる。好ましい態様では、本発明のそのようなペプチドは、MHCクラスII分子にプロミスカスに結合することができ、Th1細胞に加えてCDCA1特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導することができる。そのようなペプチドは、したがって、対象において免疫応答を増強するのに使用することに適しており、したがってがん免疫療法において、特にがんワクチンとして使用することができる。前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド、そのようなペプチドによって誘導されるAPCおよびTh1細胞ならびにそれに関連する誘導の方法も本明細書で開示される。前記成分のいずれかを有効成分として含有する医薬組成物は、例えば乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)および頭頸部がん(HNC)を含むがんまたは腫瘍の治療および/または予防において使用される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10 ~ 30 アミノ酸長を有し、配列番号：10 のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1 または 2 のアミノ酸配列から選択される 9 を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) (a) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、T ヘルパー 1 型 (Th1) 細胞を誘導する能力を有するペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドまたはその断片が少なくとも 2 種類の MHC クラス II 分子に結合する能力を有する、請求項 1 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 3】

前記 MHC クラス II 分子が、HLA - DR 4、HLA - DR 9、HLA - DR 15 および HLA - DP 2 から成る群より選択される、請求項 2 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

CDC 1 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離されたペプチド。

【請求項 5】

(a) 配列番号：1 および 2 から成る群より選択されるアミノ酸配列；および

(b) (a) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の単離されたペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

(i) Th1 細胞、

(ii) CTL、

(iii) Th1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 (APC)、および

(iv) CTL を誘導する能力を有する APC

から成る群より選択される細胞の少なくとも 1 つを誘導するための組成物であって、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 8】

(a) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のペプチド；

(b) 請求項 6 に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド；

(c) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の APC；

(d) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する APC を認識する 1 つまたは複数の Th1 細胞；および

(e) 前記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有し、ならびに

(i) がんの治療、

(ii) がんの予防、

(iii) がんにおける術後再発の予防、および

(iv) 前記 (i) から (iii) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

MHCクラスII分子としてHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2から成る群より選択される少なくとも1つを有する対象への投与用に製剤化されている、請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

CTL誘導能を有する1つまたは複数のペプチドをさらに含有する、請求項8または9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、
 (a) 請求項1から5のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；
 (b) 請求項6に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のAPC；
 (d) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPCを認識する1つまたは複数のTh1細胞；および
 (e) 前記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有する組成物。

10

【請求項12】

Th1細胞を誘導する能力を有するAPCを誘導するための方法であって、APCを請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エキスビボまたはインビボで接触させる段階を含む方法。

20

【請求項13】

CTLを誘導する能力を有するAPCを誘導するための方法であって、
 (a) APCを請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドとインビトロ、エキスビボまたはインビボで接触させる段階；および
 (b) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階から成る群より選択される段階を含む方法。

【請求項14】

Th1細胞を誘導するための方法であって、
 (a) CD4陽性T細胞を、MHCクラスII分子と請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示するAPCと共培養する段階；および
 (b) T細胞受容体(TCR)サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、またはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをCD4陽性T細胞に導入する段階であって、ここでTCRが、細胞表面に提示されるMHCクラスII分子と請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階から成る群より選択される段階を含む方法。

30

【請求項15】

CTLを誘導するための方法であって、
 (a) CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞の両方を、請求項4または5に記載のペプチドと接触させたAPCと共培養する段階；ならびに
 (b) CD8陽性T細胞を、請求項4または5に記載のペプチドと接触させたAPCと共培養する段階から成る群より選択される段階を含む方法。

40

【請求項16】

MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、
 (a) 請求項1から5のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド；
 (b) 請求項6に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド；
 (c) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に

50

提示する1つまたは複数のA P C ;

(d) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P Cを認識する1つまたは複数のT h 1細胞 ; および

(e) 前記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法。

【請求項17】

M H CクラスI I分子と請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離されたA P C。

【請求項18】

請求項12または13に記載の方法によって誘導されるA P C。

10

【請求項19】

A P Cの表面に提示された請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離されたT h 1細胞。

【請求項20】

請求項14に記載の方法によって誘導されるT h 1細胞。

【請求項21】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、

(a) 請求項1から5のいずれか一項に記載の1つまたは複数のペプチド ;

(b) 請求項6に記載の1つまたは複数のポリヌクレオチド ;

(c) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する1つまたは複数のA P C ;

20

(d) 請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するA P Cを認識する1つまたは複数のT h 1細胞 ; および

(e) 前記(a)から(d)の任意の2つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも1つの有効成分を含有する組成物を前記対象に投与する段階を含む方法。

【請求項22】

請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

【請求項23】

請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

30

【請求項24】

請求項23に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項25】

請求項1から5のいずれか一項に記載のペプチド、請求項6に記載のポリヌクレオチドまたは請求項22に記載の抗体を含む、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は生物科学の分野、より詳細にはがん療法の分野に関する。特に、本発明は、がんワクチンとして極めて有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬剤に関する。

優先権

本出願は、2012年7月10日出願の米国特許仮出願第61/669,971号の恩典を主張し、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

C D 8陽性細胞傷害性Tリンパ球(C T L)は、主要組織適合遺伝子複合体(M H C)クラスI分子上で見いだされる腫瘍関連抗原(T A A)に由来するエピトープペプチドを

50

認識し、その後腫瘍細胞を死滅させることが示されている。TAAの最初の例として黒色腫抗原(MAGE)ファミリーが発見されて以来、多くの他のTAAが、主として免疫学的アプローチを通して、発見されてきた(非特許文献1、2)。これらのTAAのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発が進められている。

【0003】

がん細胞の増殖および生存に不可欠なTAAは、免疫療法のための標的として有用であり、というのは、そのようなTAAの使用は、治療的に行われる免疫選択の結果としてのTAAの欠失、突然変異または下方制御に起因するがん細胞の免疫回避の広く記述されている危険性を最小限に抑え得るからである。したがって、強力で特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができる新しいTAAの同定はさらなる発展が保証される。そこで、様々なタイプのがんに対するペプチドワクチン戦略の臨床適用が進行中である(非特許文献3~10)。現在までに、これらの腫瘍関連抗原由来ペプチドを使用した臨床試験のいくつかの報告がある。残念ながら、これまでのところ、これらのがんワクチンの治験は、今までにこれらのがんワクチン治験で認められてきた低い客観的応答率しかもたしていない(非特許文献11~13)。したがって、免疫療法の標的としての使用に適する新しいTAAが当分野において依然として必要である。

10

【0004】

細胞分裂周期関連1(cell division cycle associate 1)としても知られるCDC A1遺伝子は、細胞周期遺伝子、例えばCDC2、サイクリン、トポイソメラーゼIIその他と共発現される遺伝子のクラスのメンバーとして同定されている(非特許文献14)。CDC A1は特に、有糸分裂HeLa細胞の動原体に関連することが認められ、それゆえ酵母Nuf2の機能的相同体とみなされた(非特許文献15)。

20

【0005】

加えて、23,040遺伝子を含むゲノムワイドcDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析を通して(非特許文献16)、CDC A1はまた、乳がん(特許文献1)、膀胱がん(特許文献2)、食道がん(特許文献3)、小細胞肺がん(SCLC)および非小細胞肺がん(NSCLC)(特許文献4)において上方制御される新規分子としても同定されており、そのような開示の内容は参照により本明細書に組み込まれる。CDC A1の発現は、特にSCLC、NSCLCおよび腫瘍細胞株で上方制御されることが認められたが、23の正常組織では精巢を除いて発現が検出されなかった。さらに、siRNAによるCDC A1発現の下方制御は、CDC A1発現肺がん細胞株における細胞増殖抑制を引き起こすことが示されている(特許文献4)。

30

【0006】

合わせて考慮すると、これらのデータは、CDC A1が新規の潜在的な普遍的がん抗原であることを示唆する。したがって、CDC A1由来のエピトープペプチドは幅広いがんの治療のためのがん免疫療法として適用可能であり得る。

最近、肺がん患者のPBMCから腫瘍反応性かつHLA-A2(A*02:01)拘束性の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導することができる高度免疫原性のCDC A1由来のCTLエピトープ(非特許文献17、特許文献6)が同定された。さらに、CDC A1由来のHLA-A24拘束性CTLエピトープも同定されている(特許文献7)。それゆえ、CDC A1は、がん免疫療法に適用できる依然として魅力的な標的分子である。

40

腫瘍特異的CD4⁺ヘルパーT(Th)細胞、特にTh1細胞は、CTL媒介性抗腫瘍免疫の効率的な誘導に重要な役割を果たす(非特許文献18)。Th1細胞によって主として産生されるIFN- γ は、長く持続するCTL応答の誘導と維持のために必須であり、免疫記憶の維持において重要な多数の相互作用を通して支援を提供する(非特許文献19、20)。Th1細胞によって分泌されるIFN- γ は、直接の抗腫瘍作用または抗血管新生作用も媒介する(非特許文献21)。さらに、Th細胞は、腫瘍部位におけるCTLの侵入のために道を開かなければならないことが示されている(非特許文献22)。それゆえ、特異的Th1細胞を活性化することができる腫瘍関連抗原(

50

T A A) 由来 T h 細胞エピトープの同定は、腫瘍担持宿主における有効な腫瘍免疫の誘導のために重要である；理想的には、有効なワクチンの設計は、CTL と T h 1 細胞の両方を刺激する複数のエピトープを含むべきである（非特許文献 2 3）。しかしながら、C D C A 1 に由来するそのようなエピトープは未だ同定されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】国際公開第 2005/028676 号

【特許文献 2】国際公開第 2006/085684 号

【特許文献 3】国際公開第 2007/013671 号

【特許文献 4】国際公開第 2007/013665 号

【特許文献 5】国際公開第 2005/089735 号

【特許文献 6】国際公開第 2009/025117 号

【特許文献 7】国際公開第 2009/153992 号

【非特許文献】

【0008】

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

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

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

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

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

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

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

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

【非特許文献 9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81 (3): 459 - 66

【非特許文献 10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81 (3): 387 - 94

【非特許文献 11】Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20 (20): 4169 - 80

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

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

【非特許文献 14】Walker et al., Curr Cancer Drug Targets 2001 May; 1 (1): 73 - 83

【非特許文献 15】J Cell Biol 2001 Jan 22; 152 (2): 349 - 60

【非特許文献 16】Cancer Res 2006 Nov 1; 66 (21): 10339 - 48

【非特許文献 17】Harao M et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616 - 25

10

20

30

40

50

【非特許文献18】Chamoto K et al. Cancer Res 2004 ; 64 : 386 - 90

【非特許文献19】Bevan MJ. Nat Rev Immunol 2004 ; 4 : 595 - 602

【非特許文献20】Shedlock DJ and Shen H. Science 2003 ; 300 : 337 - 9

【非特許文献21】Street SE et al. Blood 2001 ; 97 : 192 - 7

【非特許文献22】Bos R, and Sherman LA. Cancer Res 2010 ; 70 : 8368 - 77

【非特許文献23】Melief CJ et al. Nat Rev Cancer 2008 ; 8 : 351 - 60

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明に関連して、本発明者らは、がん免疫療法のための理想的なペプチドワクチンは、両者が互いに天然で近位である、CTLとTh1細胞の両方のエピトープを含む単一ポリペプチドを含むものであると考えた(Kenter GG et al. N Engl J Med 2009 ; 361 : 1838 - 47)。

【0010】

そのために、本発明者らは、プロミスキャスな(promiscuous)HLAクラスII分子との関連で認識され、CTLエピトープを含む、新規CDCA1由来Th1細胞エピトープを同定する戦略を設計し、そのようにして特徴づけられたエピトープがより効率的なT細胞媒介性腫瘍免疫を誘導するという仮定の下で研究を進めた。HLAクラスII結合ペプチドを予測するコンピュータアルゴリズムおよびHLA-A24(A*24:02)またはHLA-A2拘束性CTLによって認識される公知のCTLエピトープ配列を使用して、候補となる、CTLエピトープを含有するプロミスキャスなHLAクラスII拘束性Th1細胞エピトープを選択した。

【0011】

本発明は、少なくとも一部には、Th1細胞応答を誘導するための免疫療法の標的として役立つ適切なエピトープペプチドの発見に基づく。CDCA1遺伝子は、乳がん、膀胱がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、食道がんおよび頭頸部がんを含む多くのがん型で上方制御されることが認められているので、本発明は、細胞分裂周期関連1(cell division cycle associated 1)(CDCA1)遺伝子の遺伝子産物、より詳細にはGenBankアクセッション番号NM_145697(配列番号:9)の遺伝子によってコードされる配列番号:10に示すポリペプチドをさらなる分析のための標的とする。対応する分子に特異的なTh1細胞を誘発するエピトープペプチドを含むCDCA1遺伝子産物をさらなる試験のために特に選択した。例えば、健常ドナーから得られた末梢血単核細胞(PBMC)を、ヒトCDCA1に由来するプロミスキャスなHLA-DRおよび/またはDP結合ペプチドを用いて刺激した。それぞれの候補ペプチドでパルスしたHLA-DRまたはDP陽性標的細胞を認識するTh1細胞を樹立し、CDCA1に対する強力な特異的な免疫応答を誘導することができるHLA-DRおよび/またはDP拘束性エピトープペプチドを同定した。これらの結果は、CDCA1が強力な免疫原性をもち、そのエピトープはTh1細胞応答を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを明らかにする。付加的な試験は、少なくとも1つのCTLエピトープを含むプロミスキャスなHLA-DRおよび/またはDP結合ペプチドが、同じドナーにおいてCDCA1特異的にCTL応答を刺激できることも明らかにした。これらの結果は、CDCA1が強く免疫原性であること、ならびにTh1細胞およびCTLエピトープの両方を含むそのエピトープが、Th1細胞およびCTL応答の両方を通して媒介される腫瘍免疫療法のために有効であることを確認する。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0012】

それゆえ、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供することが本発明の1つの目的である。本発明は、改変されたペプチド、すなわち最大30アミノ酸までの長さであり、配列番号：10（CDC A1）のアミノ酸配列から選択される連続するアミノ酸配列を有する、Th1細胞誘導能を備えたペプチド、ならびにその機能的等価物を企図する。あるいは、本発明はまた、Th1細胞およびCTL誘導能の両方を有するペプチドも提供する。いくつかの態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1または2のアミノ酸配列または、Th1細胞を誘導する能力を維持しつつ、1、2もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加されている、その改変型に対応する。

10

【0013】

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、好ましくは1つまたは複数の抗原提示細胞の表面に提示され、次にこれがTh1細胞を誘導する。本発明のペプチドが少なくとも1つのCTLEpitopeをさらに含む場合、そのようなAPCはまた、本発明のペプチドから生成されるCTLEpitopeを提示し、したがってそれぞれのペプチドを標的とするCTLを誘導するようにペプチドをプロセッシングする。それゆえ、本発明のペプチドのいずれかまたはその断片を提示する抗原提示細胞、ならびに抗原提示細胞を誘導するための方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

【0014】

本発明の1つまたは複数のペプチドもしくはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそのようなペプチドもしくはその断片を提示する抗原提示細胞の投与は、強力な抗腫瘍免疫応答の誘導をもたらす。したがって、以下の1つまたは複数を含む有効成分として含有する薬剤または医薬組成物を提供することが本発明のさらにもう1つの目的である：(a)本発明の1つまたは複数のペプチド、(b)そのようなペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド、および(c)本発明の1つまたは複数の抗原提示細胞。そのような本発明の薬剤または医薬組成物は、ワクチンとして特に有用である。

20

【0015】

がん（すなわち腫瘍）の治療および/もしくは予防（すなわち防止）、ならびに/またはその術後再発の予防のための方法を提供することが本発明のなおさらなる目的である。本発明の1つまたは複数のペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示細胞または薬剤もしくは医薬組成物を投与する段階を含む、Th1細胞を誘導するまたは抗腫瘍免疫を誘導するための方法も企図される。さらに、本発明のTh1細胞はがんに対するワクチンとしても使用され、がんの例には、乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺癌（SCLC）、非小細胞肺癌（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0016】

本発明の特に企図される目的の例には以下が含まれる：

[1] 10～30アミノ酸長を有し、配列番号：10のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって：

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列から選択される9を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) (a)のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、Tヘルパー1型（Th1）細胞を誘導する能力を有するペプチド。

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド。

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2から成る群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド

40

50

。

[4] 前記ペプチドが、C D C A 1 特異的細胞傷害性Tリンパ球 (C T L) 誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1] から [3] のいずれか 1 つに記載の単離されたペプチド。

[5] 前記ペプチドが、

(a) 配列番号 : 1 および 2 から成る群より選択されるアミノ酸配列 ; および

(b) (a) のアミノ酸配列において 1、2 または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および / または付加されているアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4] に記載の単離されたペプチド。

[6] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。 10

[7]

(i) T h 1 細胞、

(i i) C T L、

(i i i) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 (A P C)、および

(i v) C T L を誘導する能力を有する A P C

から成る群より選択される細胞の少なくとも 1 つを誘導するための組成物であって、[1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物、または

(i) T h 1 細胞、 20

(i i) C T L、

(i i i) T h 1 細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞 (A P C)、および

(i v) C T L を誘導する能力を有する A P C

から成る群より選択される少なくとも 1 種類の細胞を誘導するための組成物であって、[1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つもしくは複数のペプチド、またはそれらをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを含む、組成物。

[8]

(a) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド ;

(b) [6] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド ;

(c) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ; 30

(d) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞 ; および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有し、ならびに

(i) がんの治療、

(i i) がんの予防、

(i i i) がんにおける術後再発の予防、および

(i v) 上記 (i) から (i i i) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せ

から成る群より選択される目的のために製剤化されている、医薬組成物。 40

[9] 前記組成物が、M H C クラス I I 分子として H L A - D R 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 5 および H L A - D P 2 から成る群より選択される少なくとも 1 つを有する対象への投与のために製剤化されている [8] に記載の医薬組成物、または前記組成物が、H L A - D R 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 5 および H L A - D P 2 から成る群より選択される少なくとも 1 つの M H C クラス I I 分子を有する対象への投与のために製剤化されている [8] に記載の医薬組成物。

[1 0] 前記組成物が、C T L 誘導能を有する 1 つまたは複数のペプチドをさらに含有する、[8] または [9] に記載の医薬組成物。

[1 1] M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための組成物であって、

- (a) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド ;
- (b) [6] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド ;
- (c) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ;
- (d) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞 ; および
- (e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する組成物。
- [1 2] T h 1 細胞を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、A P C を [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階を含む方法。 10
- [1 3] C T L を誘導する能力を有する A P C を誘導するための方法であって、
- (a) A P C を [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階 ; および
- (b) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階から成る群より選択される段階を含む方法。
- [1 4] T h 1 細胞を誘導するための方法であって、
- (a) C D 4 陽性 T 細胞を、M H C クラス I I 分子と [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する A P C と共培養する段階 ; および 20
- (b) T 細胞受容体 (T C R) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで T C R が、細胞表面に提示される M H C クラス I I 分子と [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階から成る群より選択される段階を含む方法、または T h 1 細胞を誘導するための方法であって、
- (a) C D 4 陽性 T 細胞を、M H C クラス I I 分子と [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する A P C と共培養する段階 ; および 30
- (b) T 細胞受容体 (T C R) サブユニットの両方をコードする単一ポリヌクレオチド、または各々別々の T C R サブユニットをコードする複数のポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階であって、ここで T C R が、A P C の細胞表面に提示される M H C クラス I I 分子と [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体に結合することができる、段階から成る群より選択される段階を含む方法。
- [1 5] C T L を誘導するための方法であって、
- (a) C D 4 陽性 T 細胞および C D 8 陽性 T 細胞の両方を、[4] または [5] に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階 ; ならびに 40
- (b) C D 8 陽性 T 細胞を、[4] または [5] に記載のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階から成る群より選択される段階を含む方法。
- [1 6] M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答を増強するための方法であって、
- (a) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド ;
- (b) [6] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド ;
- (c) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ;
- (d) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表 50

面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞 ; および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法。

[1 7] M H C クラス I I 分子と [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する、単離された A P C 。

[1 8] [1 2] または [1 3] に記載の方法によって誘導される A P C 。

[1 9] A P C の表面に提示された [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を認識する、単離された T h 1 細胞。

[2 0] [1 4] に記載の方法によって誘導される T h 1 細胞。

[2 1] がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であつて、

(a) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載の 1 つまたは複数のペプチド ;

(b) [6] に記載の 1 つまたは複数のポリヌクレオチド ;

(c) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する 1 つまたは複数の A P C ;

(d) [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示する A P C を認識する 1 つまたは複数の T h 1 細胞 ; および

(e) 上記 (a) から (d) の任意の 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含有する組成物を対象に投与する段階を含む方法。

[2 2] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的に活性な断片。

[2 3] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

[2 4] [2 3] に記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

[2 5] [1] から [5] のいずれか 1 つに記載のペプチド、 [6] に記載のポリヌクレオチドまたは [2 2] に記載の抗体を含む、診断キット。

【 0 0 1 7 】

上記に加えて、本発明の他の目的および特徴は、以下の詳細な説明を付属の図面および実施例と併せて読めばより十分に明らかになる。しかしながら、本発明の前記概要および以下の詳細な説明はどちらも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、ここでいくつかの特定の態様を参照して本発明を説明するが、説明は本発明を例証するものであり、本発明の限定とは解釈されないことが認識される。様々な変更および適用が、付属の特許請求の範囲に記載されている本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者に想起され得る。同様に、本発明の他の目的、特徴、利益および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかであり、また当業者には容易に明白である。そのような目的、特徴、利益および利点は、単独でまたは本明細書に組み込まれる参考文献を考慮して、付属の実施例、データ、図面およびそれらから引き出されるすべての妥当な推論と併せて上記から明らかとなるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 8 】

本発明の様々な局面および適用は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明とその好ましい態様を考慮した上で当業者に明らかになるであろう。

【 0 0 1 9 】

【 図 1 A 】 図 1 は、コンピュータアルゴリズム (コンセンサス法) によって予測される C T L エピトープを含むプロミスキャスな H L A クラス I I 結合 C D C A 1 由来ペプチドを示す。パート A は、コンピュータアルゴリズム (I E B D 解析リソース、コンセンサス法、<http://tools.immuneepitope.org/analyze/>

10

20

30

40

50

html/mhc__II__binding.html)を用いたヒトCDCA1タンパク質のアミノ酸配列の解析の結果を表示する。横軸の数字は、CDCA1由来の15merペプチドのN末端のアミノ酸残基位置を示す。より高いコンセンサスペンタイル順位は、HLAクラスII分子へのより強い結合親和性を示す。

【0020】

【図1B】パートBは、複数のHLAクラスIIアレル産物(DRB1*04:05、DRB1*15:02およびDPB1*02:01)についてオーバーラップする高いコンセンサスペンタイル順位を有し、かつCTLによってHLA-A24またはHLA-A2に関連して認識される9merペプチドを含む、オーバーラップする26merおよび24merの2つの長鎖ペプチド(CDCA1(39-64)およびCDCA1(55-78))を選択し(A、黒いバー)、CTLエピトープを含むプロミスキャスなHLAクラスII拘束性Th細胞エピトープを同定するために合成したことを示す。

10

【0021】

【図2A】図2は、長鎖ペプチドでの刺激によるCDCA1特異的CD4⁺T細胞の誘導および拘束HLAクラスII分子の同定を示す。CD4⁺T細胞株を、CDCA1(55-78)またはCDCA1(39-64)での少なくとも3回の刺激後に様々なHLAクラスII遺伝子型を有する3名の健常ドナーから生成し、IFN γ 産生CD4⁺T細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。パートAでは、CDCA1(55-78)に対する応答を3名の健常ドナーについて示す。CD4⁺T細胞を、自己PBMC単独(-)、CDCA1(55-78)(10 μ g/ml)でパルスしたPBMC、またはHLA-DR、HLA-DPもしくはHLA-DQに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下にCDCA1(55-78)でパルスしたPBMCで刺激した。

20

【0022】

【図2B】パートBでは、CDCA1(55-78)に対する応答を2名の健常ドナーについて示す。CD4⁺T細胞を、自己PBMC単独(-)、CDCA1(55-78)(10 μ g/ml)でパルスしたPBMC、またはHLA-DRもしくはHLA-DPに特異的な5 μ g/mlのmAbの存在下にCDCA1(55-78)でパルスしたPBMCで刺激した。

【図2C】パートCでは、CDCA1(39-64)に対する応答を2名の健常ドナーについて示す。ドナーのHLA型を各パネルの上部に表示した。データは、2回または3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

30

【0023】

【図3A】図3は、様々なHLAクラスII分子によって拘束されるTh細胞によるCDCA1(55-78)およびCDCA1(39-64)ペプチドの認識を示す。パートAでは、健常ドナーHD1から樹立したCDCA1(55-78)特異的CD4⁺T細胞株を、抗HLA-DRもしくは抗HLAクラスIIブロッキングmAbの存在下にCDCA1(55-78)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR4、WT1ペプチドでパルスしたL-DR4、またはCDCA1(55-78)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR53と共培養した。IFN γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した(上のパネル)。健常ドナーHD-2からのCDCA1(55-78)特異的CD4⁺T細胞株を、抗HLA-DRもしくは抗HLAクラスIIブロッキングmAbの存在下にCDCA1(55-78)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR15、またはCDCA1(55-78)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR8と共培養した(下のパネル)。

40

【0024】

【図3B】パートBでは、ドナーHD3に由来するHLA-DP拘束性およびCDCA1(55-78)特異的CD4⁺Tクローンを、HLA-DP2陽性または陰性の5名のドナーからの抗HLA-DRまたは抗HLA-DPブロッキングmAbの存在下にCDCA1(55-78)でパルスしたまたはパルスしていない同種PBMCと共培養した。

50

【0025】

【図3C】パートCは、HLA-DR4拘束性Th細胞によるCDCA1(55-78)ペプチドの認識を表示する。健常ドナーHD4および健常ドナーHD5に由来するCDCA1(55-78)特異的CD4⁺T細胞を、抗HLA-DRもしくは抗HLAクラスIブロッキングmAbの存在下にCDCA1(55-78)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR4、WT1ペプチドでパルスしたL-DR4、CDCA1(55-78)でパルスしたL-DR1、またはCDCA1(55-78)でパルスしたL-DR53と共培養した。IFN- γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。ドナーのHLA型を各パネルの上部に表示した。データは、2回または3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

10

【0026】

【図3D】パートDでは、ドナーHD1に由来するCDCA1(39-64)特異的CD4⁺T細胞クローンを、HLA-DP9陽性または陰性の2名のドナーからの抗HLA-DRまたは抗HLA-DPブロッキングmAbの存在下にCDCA1(39-64)でパルスしたまたはパルスしていない同種PBMCと共培養した(上のパネル)。ドナーHD3に由来するCDCA1(39-64)特異的CD4⁺T株を、抗HLA-DRもしくは抗HLAクラスIブロッキングmAbの存在下にCDCA1(39-64)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR15、またはCDCA1(39-64)でパルスしたもしくはパルスしていないL-DR8と共培養した(下のパネル)。ドナーのHLA型を各パネルの上部に表示した。データは、2回または3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

20

【0027】

【図4A】図4は、バルクCDCA1(55-78)特異的CD4⁺Th細胞株の機能的特性を示す。パートA~Dでは、CDCA1(55-78)または無関係なペプチド(WT1-0405もしくはHIV-LP)でパルスしたL-DR4(パートAおよびD)または自己PBMC(パートBおよびC)と共培養したT細胞の20時間のインキュベーション期間後、培地を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、MIP1- α 、IL-4、IL-7)の濃度を測定した。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。パートE~Hは、抗原刺激後にCD4⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を表示する。示されている事象はCD4⁺T細胞にゲートをかけている。細胞をCDCA1(55-78)または無関係なペプチド(例えばWT1-0405)で再刺激した。プロットの内部の数字は、象限の特徴を有する細胞集団(CD4⁺CD107a⁺T細胞)のパーセンテージを示す。

30

【0028】

【図4B】パートBでは、CDCA1(55-78)または無関係なペプチド(WT1-0405またはHIV-LP)でパルスした自己PBMCと共培養したT細胞の20時間のインキュベーション期間後、培地を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、MIP1- α 、IL-4、IL-7)の濃度を測定した。

40

【0029】

【図4C】パートCでは、CDCA1(55-78)または無関係なペプチド(WT1-0405またはHIV-LP)でパルスした自己PBMCと共培養したT細胞の20時間のインキュベーション期間後、培地を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α 、MIP1- α 、IL-4、IL-7)の濃度を測定した。

【0030】

【図4D】パートDでは、CDCA1(55-78)または無関係なペプチド(WT1-

50

0405またはHIV-LP)でパルスしたL-DR4と共培養したT細胞の20時間のインキュベーション期間後、培地を回収し、Bio-Plexアッセイシステムを用いてサイトカイン(IFN-、GM-CSF、TNF-、MIP1-、IL-4、IL-7)の濃度を測定した。

【0031】

【図4E】パートEは、抗原刺激後にCD4⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を表示する。

【0032】

【図4F】パートFは、抗原刺激後にCD4⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を表示する。

【0033】

【図4G】パートGは、抗原刺激後にCD4⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を表示する。

【0034】

【図4H】パートHは、抗原刺激後にCD4⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を表示する。

【0035】

【図5A】図5は、CDCA1タンパク質をロードした自己DCを認識するドナーHD1から樹立したCDCA1(55-78)およびCDCA1(39-64)特異的Thクローンを示す。パートAでは、HLA-DR4拘束性CDCA1(55-78)特異的ThクローンまたはHLA-DR9拘束性CDCA1(39-64)特異的Thクローン(2×10⁴/ウェル)を、抗HLA-DRもしくは抗HLAクラスIブロッキングmAbの存在下に組換えCDCA1タンパク質(50μg/ml)をロードした自己DC(5×10³/ウェル)、対照タンパク質、またはロードしていないDCと共培養した。IFN-産生Thクローンの数をELISPOTアッセイによって分析した。

【図5B】パートBにおいて、ドナーHD3から樹立したHLA-DP2拘束性CDCA1(55-78)特異的Th細胞クローンは、CDCA1タンパク質をロードした自己DCを認識する。HLA-DP2拘束性CDCA1(55-78)特異的Th細胞クローンを、CDCA1タンパク質をロードした自己DCと共培養し、IFN-産生Th細胞クローンの数をELISPOTアッセイによって分析した。データは2回のアッセイの平均±SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0036】

【図6A】図6は、インビトロおよびインビボでCTLの効率的なクロスプライミングを誘導するCDCA1-LPを示す。パートAでは、HLA-2陽性かつHLA-DR4陽性のドナーHD1から単離したCD8⁺T細胞を、CDCA1(55-78)LPをロードしたDCで刺激した。3回の刺激後、生成されたCTL株を、抗HLAクラスIまたは抗HLA-DRブロッキングmAbまたは無関係なペプチド(HIV-A2)の存在下にCDCA1-A2(65-73)SPでパルスしたT2細胞と共培養し、IFN-産生CTLの数をELISPOTアッセイによって分析した。2名のHLA-2陽性かつHLA-DR4陽性の健常ドナーのPBMCを使用して得た同様の結果を有する3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【図6B】パートBでは、IFA中に乳化したCDCA1(55-78)LPで免疫したマウスにおけるCDCA1(65-73)SP特異的CTLの増殖を示す。HLA-A2 Tgmを、尾の基部で、IFA中に乳化したCDCA1(55-78)LPを用いて免疫した。CDCA1(55-78)LPでの2回目または3回目のワクチン接種の7日後、鼠径リンパ節中のCD8⁺T細胞をポジティブ単離し、CDCA1-A2(65-73)SPでパルスしたBM-DCまたは無関係なペプチドと共培養して、IFN-産生CD8⁺T細胞の数をエクスピボELISPOTアッセイによって分析した。同様の結果を得た7つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

10

20

30

40

50

【0037】

【図6C】パートCにおいて、CDCA1(55-78)LPはHLA-A24⁺/A2⁺/DR4⁺HD5においてCDCA1特異的CTLの効率的なクロスプライミングを誘導する。HD5から単離した精製CD8⁺T細胞を、CDCA1(55-78)LPをロードした自己DCで刺激した。3回の刺激後、生成されたCTLを、CDCA1-A2(65-73)SPでパルスしたT2細胞、CDCA1-A24(56-64)SPでパルスしたC1R-A2402細胞、または対照SPでパルスした標的細胞で再刺激した。IFN- γ 産生CTLの数をELISPOTアッセイによって分析した。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【図6D】パートDでは、HLA-A24 TgmをCDCA1(55-78)LP(左側のパネル)またはCDCA1(39-64)LP(右側のパネル)で免疫した。CDCA1-LPでの2回目のワクチン接種後、鼠径リンパ節中のマウスCD8⁺T細胞を、CDCA1-A24(56-64)SPまたはHIV-A24 SPでパルスしたBM-DCまたはC1R-A2402で刺激した。

【0038】

【図6E】パートEでは、CDCA1-LPワクチンによるCDCA1特異的CTLの優れた誘導を示す。HLA-A24 TgmをCDCA1(55-78)LP、CDCA1(39-64)LP、またはCDCA1-A24(56-64)(300nmol/マウス)で免疫した。CDCA1由来ペプチドでの2回目のワクチン接種後、鼠径リンパ節中のマウスCD8⁺T細胞を、CDCA1-A24(56-64)SPまたはHIV-A24 SP(バックグラウンド)でパルスしたBM-DCで刺激した。結果は、バックグラウンドを差し引いた後の特異的IFN- γ スポットを表す。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た3つの独立した実験を代表するものを示す。

【0039】

【図7A】図7は、CDCA1(55-78)LPおよびCDCA1(55-78)LP特異的CD4⁺Th細胞クローンでの刺激によるCDCA1-A2(65-73)、CDCA1-A2(351-359)またはCDCA1-A24(56-64)特異的CTLの誘導の増強を示す。パートAでは、HLA-DR4拘束性CDCA1(55-78)特異的CD4⁺Th細胞クローンを作製したHLA-A2かつDR4陽性の健常ドナーHD1からのPBMCを、CDCA1-A2(65-73)およびCDCA1-A2(351-359)の混合物(混合SP、それぞれ20 μ g/ml)、混合SP+CDCA1(55-78)(LP、20 μ g/ml)、混合SP+CDCA1(55-78)特異的CD4⁺T細胞クローン(Thクローン、5 \times 10⁵/ウェル)、または混合SP+LP+Thクローンと共に11日間培養した。7日間の培養後、これらのペプチド(上記で示したのと同じ濃度)およびIL-2(20U/ml)を添加し(2回目の刺激)、次にIL-15(5ng/ml)を9日目に添加した。培養の11日目に、細胞を、FITC標識抗ヒトCD8 mAbと組み合わせてHLA-A*02:01/CDCA1-A2(65-73)ペプチド複合体またはHLA-A*02:01/CDCA1-A2(351-359)ペプチド複合体のPE標識テトラマーで染色し、フローサイトメトリによって分析した。右上象限のドットはCD8⁺テトラマー⁺T細胞を表す。示されている事象はCD8⁺T細胞にゲートをかけている。プロットの内部の数字は、右上象限の特徴を有する細胞集団(CD8⁺テトラマー⁺T細胞)のパーセンテージを示す。データは、同様の結果を得た3つの独立した実験を代表する。

【0040】

【図7B】パートBでは、CD8⁺テトラマー⁺細胞の増加(増加倍数)の値を示す。

【0041】

【図7C】パートCでは、培養の14日目に、これらのペプチド(上記で示したのと同じ濃度)およびIL-2(20U/ml)を添加し(3回目の刺激)、次にIL-15(5ng/ml)を16日目に添加した。培養の18日目に、細胞を、FITC標識抗ヒトC

10

20

30

40

50

D8 mAbと組み合わせてPE標識テトラマーで染色した(上のパネル)。18日目のCDCA1-A2反応性T細胞のIFN- γ ELISPOTアッセイ。棒は、生成された株をCDCA1-A2(65-73)、CDCA1-A2(351-359)または無関係なHIV-A2ペプチド(黒い棒)をロードしたT2細胞で再刺激した場合のIFN- γ スポットの数を示す。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。統計的に有意の差($p < 0.05$)を星印で示す(下のパネル)。

【0042】

【図7D】パートDでは、抗原刺激後にCD8⁺T細胞の細胞表面に露出されたCD107aの検出を示す。示されている事象はCD8⁺T細胞にゲートをかけている。細胞をCDCA1-A2(65-73)、CDCA1-A2(351-359)または無関係なHIV-A2ペプチドで再刺激した。プロットの内部の数字は、象限の特徴を有する細胞集団(CD8⁺CD107a⁺T細胞)のパーセンテージを示す。

10

【0043】

【図7E1】パートEでは、活性化CDCA1(55-78)LP特異的CD4⁺T細胞によるCDCA1-A24(56-64)SP特異的CTLの誘導増強を示す。HLA-A24^{*}/DR15^{*}HD2由来のCDCA1(55-78)LP特異的バルクCD4⁺T細胞およびCDCA1-A24(56-64)SP特異的バルクCD8⁺T細胞を、いずれのサイトカインも添加せずに、CDCA1-A24(56-64)SP(SP単独)、CDCA1-A24(56-64)SP+対照LP(対照+LP)またはCDCA1-A24(56-64)SP+CDCA1(55-78)LP(CDCA1(55-78)LP+SP)の存在下で自己DCと共に培養した。ペプチドとの1週間のインビトロ培養後、培養細胞をHLA-A*24:02/CDCA1-A24(56-64)複合体のPE標識テトラマーおよびFITC標識抗ヒトCD8 mAbで染色した。ペプチドなしで培養した細胞(ペプチドなし)の結果も示した。刺激前の棒は、この実験で使用したCDCA1-A24(56-64)SP特異的バルクCD8⁺T細胞株のテトラマー⁺CD8⁺T細胞/ウェルの絶対数を示す。代表的なCDCA1-A24(56-64)SP特異的テトラマー染色を示す(CD8⁺T細胞にゲートをかけている、ドットプロット)。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

20

【0044】

30

【図7E2】図7E2は図7E1の続きである。

【0045】

【図8A】図8は、健常ドナーからのCDCA1特異的Th細胞の誘導を示す。パートAでは、CDCA1特異的Th細胞を、CDCA1(55-78)LPでの刺激によってDR4⁺健常ドナー(HD1)から生成した。生成したTh細胞を、CDCA1(55-78)LPでパルスした自己PBMCまたはL細胞で再刺激した。WT1ペプチドを対照ペプチドとして使用した。IFN- γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。HD1から得た同様の結果を有する少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。他の2名のDR4⁺ドナーからも同様の結果を得た(表1; HD4およびHD5)。ドナーHD1のHLAクラスII遺伝子型をパネルの上方に示す。下線を付したHLAクラスIIアレルは、Th細胞にペプチドを提示するHLAクラスII分子をコードする。HLA-DQ mAbによるブロック作用は、HD1では試験しなかった。

40

【0046】

【図8B】パートBでは、CDCA1特異的Th細胞を、CDCA1(55-78)LPでの刺激によってDR4陰性、DR15陽性健常ドナー(HD2)から生成した。同様の結果を得た少なくとも5つの独立した実験からの代表的なデータを示す。

【0047】

【図8C1】パートCでは、HLA-DP2拘束性およびCDCA1(55-78)LP特異的バルクTh細胞株(C-1)またはTh細胞クローン(C-2)をHD3から樹立

50

した。HLA-DP拘束性Thクローンを、CDCA1(55-78)LPでパルスした／パルスしていないHLA-DP2陽性または陰性ドナー由来の同種PBMCと共培養した。

【0048】

【図8C2】パートC2では、HLA-DP2拘束性およびCDCA1(55-78)LP特異的バルクTh細胞クローンをHD3から樹立した。

【0049】

【図8D】パートDでは、CDCA1(39-64)LP特異的Th細胞を、CDCA1(39-64)LPでの刺激によってDR15⁺健常ドナー(HD3)から生成した。

【0050】

【図8E】パートEでは、HLA-DR9拘束性CDCA1(39-64)LP特異的バルクTh細胞(左側のパネル)またはTh細胞クローン(右側のパネル)をHD1から樹立した。HLA-DR拘束性Thクローンを、HLA-DR9陽性または陰性ドナーからのCDCA1(39-64)LPでパルスしたまたはパルスしていない同種PBMCと共培養した。HD1から生成したこのHLA-DR拘束性Th細胞クローンは、CDCA1(39-64)LPでパルスしたL-DR4細胞に対する応答を示さなかった(データは示していない)。IFN- γ 産生Th細胞の数をELISPOTアッセイによって分析した。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。同様の結果を得た少なくとも3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。ドナーのHLAクラスII遺伝子型をパネルの上方に示した。下線を付したHLAクラスIIアリルは、Th細胞にペプチドを提示するHLAクラスII分子をコードする。

10

20

【0051】

【図9A】図9は、CDCA1-LPがインビトロでCDCA1-A24(56-64)SP特異的CD8⁺T細胞の効率的な増殖を誘導することを示す。パートAでは、HD2(HLA-A24⁺およびDR15⁺)から樹立したCDCA1-A24(56-64)特異的バルクCTLを、CDCA1(55-78)LP(黒い丸)または無関係なLP(白い丸)でパルスした自己DCを用いてインビトロで刺激した。LP刺激の前(0日目)ならびに刺激後5、7、8および10日目に、培養した細胞(1 \times 10⁵細胞)のCD8⁺T細胞のアリコート、抗ヒトCD8 mAbと組み合わせてCDCA1-A24(56-64)特異的テトラマーで染色した。3つの独立した実験からの0日目と10日目の代表的なデータを示す(右側のパネル)。事象はCD8⁺T細胞にゲートをかけている。CD8⁺T細胞中のテトラマー⁺細胞のパーセンテージを線で表示する(左側のパネル)。

30

40

【0052】

【図9B】パートBでは、CDCA1(55-78)LPは、インビトロでCDCA1-A24(56-64)SP特異的CD8⁺T細胞の効率的な増殖を誘導する。HD5(HLA-A24⁺およびDR4⁺)から樹立したCDCA1-A24(56-64)SP特異的バルクCTLを、CDCA1(55-78)LP(右の棒)または対照LP(中央の棒)でパルスした自己DCを用いてインビトロで刺激した。LP刺激の前(LP刺激前、0日目;左の棒)および刺激後7日目(中央および右の棒)に、CDCA1-A24(56-64)SPでパルスしたまたはHIV-A24 SP(バックグラウンド)でパルスしたC1R-A2402細胞(2 \times 10⁴/ウェル)での刺激後のIFN- γ 産生CD8⁺T細胞(1 \times 10⁵/ウェル)の数をELISPOTアッセイによって計数した。3つの独立した実験からの代表的なデータを示す。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。

【0053】

【図9C】パートCでは、CDCA1-A24(56-64)SPでワクチン接種したHNC患者(HNC29)からのPBMCを、CDCA1(55-78)LPとCDCA1(39-64)LPの混合物と共に培養した。0日目(エキスビボ)および7日目(CDCA1-LPでのインビトロ刺激後)に、PBMCをテトラマーHLA-A*24:02

50

/CDCA1 - A24 (56 - 64) 複合体または対照テトラマーで染色した (CD8⁺ T細胞にゲートをかけた)。7日目に、IFN- γ ELISPOTアッセイによってCDCA1 - A24 (56 - 64) SP特異的CTLの頻度も検出した (右側のパネル、棒グラフ)。データは3回のアッセイの平均 \pm SDとして提示している。

【0054】

【図9D】パートD～Gでは、CDCA1 - A24 (56 - 64) SPでワクチン接種したHNC患者 (HNC26、31、39および109) からのPBMCを、CDCA1 (55 - 78) LPとCDCA1 (39 - 64) LPの混合物と共に培養した。0日目 (エクスピボ) および7日目 (CDCA1 - LPでのインビトロ刺激後) に、細胞をテトラマー-HLA-A*24:02/CDCA1 - A24 (56 - 64) 複合体または対照テトラマーで染色した (CD8⁺ T細胞にゲートをかけた)。

10

【0055】

【図9E】パートEでは、CDCA1 - A24 (56 - 64) SPでワクチン接種したHNC患者 (HNC31) からのPBMCを、CDCA1 (55 - 78) LPとCDCA1 (39 - 64) LPの混合物と共に培養した。

【0056】

【図9F】パートFでは、CDCA1 - A24 (56 - 64) SPでワクチン接種したHNC患者 (HNC39) からのPBMCを、CDCA1 (55 - 78) LPとCDCA1 (39 - 64) LPの混合物と共に培養した。

【0057】

20

【図9G】パートGでは、CDCA1 - A24 (56 - 64) SPでワクチン接種したHNC患者 (HNC109) からのPBMCを、CDCA1 (55 - 78) LPとCDCA1 (39 - 64) LPの混合物と共に培養した。

【0058】

【図10A】図10は、DCによるCDCA1 - LPの交差提示を示す。パートAでは、DCによるCDCA1 (55 - 78) LPの取込みと交差提示を示す。固定していないまたは固定したDCをCDCA1 (55 - 78) LPまたはCDCA1 - A24 (56 - 64) SPで3時間パルスした。パルクCDCA1 - A24 (56 - 64) 特異的CTLを6時間共培養し、応答をIFN- γ 標識によって測定した。事象はCD8⁺ テトラマー⁺ T細胞にゲートをかけており、プロットの内部の数字はIFN- γ T細胞のパーセンテージを示す。

30

【0059】

【図10B】パートBでは、DCによるCDCA1 (39 - 64) LPの交差提示を示す。固定していないまたは固定したDCをCDCA1 (39 - 64) LPまたはCDCA1 - A24 (56 - 64) SPで3時間パルスした。パルクCDCA1 - A24 (56 - 64) SP特異的CTLを6時間共培養し、応答をIFN- γ 標識によって測定した。事象はCD8⁺ テトラマー⁺ T細胞にゲートをかけており、プロットの内部の数字はIFN- γ T細胞のパーセンテージを示す。

【0060】

【図11A】図11は、CDCA1 - A24 (56 - 64) SPでワクチン接種したHNC患者から単離したPBMCにおけるCDCA1 - LP特異的Th細胞の存在を示す。パートAでは、CDCA1 (39 - 64) LPとCDCA1 (55 - 78) LPの混合物でPBMCを1週間インビトロ刺激した後、個々のCDCA1 - LP特異的T細胞の頻度をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検出した。

40

【図11B】パートBにおいて、HNC患者は、正常で健康な個人と比較してCDCA1特異的CD4⁺ T細胞免疫の上昇を示す。CDCA1 - LPに応答する健常ドナー (対照) およびHNC患者の割合を示す棒グラフである。p値はフィッシャーの正確確率検定からの統計結果を表す。

【0061】

【図11C】パートCでは、CDCA1特異的Th細胞応答を、CDCA1 - A24 (5

50

6 - 64) SPでワクチン接種した16名のHNC患者(ワクチン接種後)、7名の非ワクチン接種患者(ワクチン接種前)、および10名の健常ドナーにおいて評価した。結果は、バックグラウンドを差し引いた後の特異的IFN-スポットを表す。各々のドットは個々のドナーを表す。水平の線は中央値を示し、p値はノンパラメトリックのマン-ホイットニーU検定からの統計結果を表す。19名のHNC患者のうち7名(HNC10、26、34、37、38、40および103)における実験は単一ウェルで実施した。

【0062】

【図11D】パートDでは、IFN-産生T細胞のHLAクラスII拘束を示す。LPで1週間刺激したPBMCを、HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQまたはHLAクラスIIに特異的なmAbの存在下に各々のCDCA1-LPで再刺激した。同様の結果を有する12名のHNC患者(HNC26、29、31、34、35、39、40、42、103、105、107および108)から得た20の棒グラフのうち6つを示す。12名のHNC患者のうち6名(HNC26、34、40、103および107)における実験は単一ウェルで実施した。CDCA1₃₉₋₆₄-LP; 10名のHNC患者(HNC26、29、31、34、39、40、42、103、107および108)からの代表的な3つの棒グラフ。CDCA1(55-78)LP; 10名のHNC患者(HNC26、29、31、34、35、39、40、103、105および108)からの代表的な3つの棒グラフ。

10

【0063】

【図11E】パートEにおいて、CTLエピトープワクチンの反復接種は、CDCA1特異的Th細胞応答を誘導する(HNC39、40、42および109)または増強する(HNC107および108)(CDCA1(39-64)LP、白い棒; CDCA1(55-78)-LP、黒い棒)。6名のHNC患者のうち3名(HNC40、108および109)における実験は単一ウェルで実施した。

20

【0064】

【図11F】パートFでは、HNC患者の臨床的特徴を示す。「材料および方法」で詳述するIFN-ELISPOTアッセイによって測定したCDCA1特異的T細胞応答を示す。19名のHNC患者のうち7名(HNC10、26、34、37、38、40および103)における実験は単一ウェルで実施した。ワクチン接種回数「0」は、ワクチン接種前の患者を示す。(+)および(-)は陽性および陰性応答を示す。下線を付したHLAクラスIIアリルは、健常ドナーにおいてTh細胞にCDCA1-LPを提示するHLAクラスII分子をコードする(図8; HLA-DRB1*04:05、DRB1*09:01、DRB1*15:02およびDPB1*02:01)。No.、回数; CTR、臨床試験登録; vac.、ワクチン接種; HNC、頭頸部がん; M/F、男性/女性; LP、長鎖ペプチド; n.t.、試験せず

30

【発明を実施するための形態】

【0065】

態様の説明

本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似または等価の任意の方法および材料を使用することができるが、好ましい方法、装置および材料をここに記載する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本発明が本明細書で述べる特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコル等は慣例的な実験法および最適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。また、本記載で用いる用語は、特定のバージョンまたは態様を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図されず、本発明の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

40

【0066】

本明細書で言及する各々の公報、特許または特許出願の開示は、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。しかしながら、本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によるそのような開示に先行する権利がないことの承認と解釈されるべきではない

50

。
【0067】

I. 定義

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。しかしながら、矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。

本明細書で使用する「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という語は、特に明確に示されない限り「少なくとも1つの」を意味する。

【0068】

ある物質（例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等）に関して使用する「単離された」および「精製された」という用語は、その物質が、さもなければ天然源中に含まれる少なくとも1つの物質を実質的に含まないことを示す。したがって、単離されたまたは精製されたペプチドは、そのペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの糖質、脂質もしくは他の混入タンパク質などの細胞材料を実質的に含まない、または化学合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。

10

【0069】

「細胞物質を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、そのペプチドが単離されたまたは組換え生産された細胞の細胞成分から切り離されている、ペプチドの調製物を包含する。したがって、細胞物質を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%または5%（乾燥重量）未満の異種タンパク質（本明細書では「混入タンパク質」とも称する）を有するポリペプチドの調製物を包含する。ペプチドが組換え生産される場合は、ペプチドは、好ましくは培地も実質的に含まず、ペプチド調製物の容積の約20%、10%または5%未満の培地を含むペプチドの調製物を包含する。ペプチドが化学合成によって生産される場合は、ペプチドは、好ましくは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、そのペプチドの合成に關与する化学的前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容積の約30%、20%、10%または5%（乾燥重量）未満含むペプチドの調製物を包含する。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドを含むことは、例えばタンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の単一バンドの出現およびゲルのクマシーブリリアントブルー染色等によって示され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは単離または精製されている。

20

30

【0070】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書ではアミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用される。本用語は、天然のアミノ酸ポリマーに加えて、1つもしくは複数のアミノ酸残基が修飾された残基であるアミノ酸ポリマー、または対応する天然のアミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基にも適用される。

【0071】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびに細胞内で翻訳後に修飾されたもの（例えばヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基およびR基に結合した炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチルメチオニンスルホニウム）を有する化合物を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様に機能する化合物を指す。

40

【0072】

アミノ酸は、本明細書ではIUPAC-IUB生化学命名法委員会によって推奨される、一般に公知の3文字表記、または1文字表記によって言及され得る。

50

【0073】

「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、一般に受け入れられている1文字コードによって言及される。

「剤」および「組成物」という用語は、本明細書では、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組合せから直接または間接的に生じる任意の生成物を指すために互換的に使用される。医薬組成物に関するそのような用語は、有効成分、および担体を構成する不活性成分を含む生成物、ならびに成分の任意の2つもしくはそれ以上の組合せ、錯体形成もしくは凝集から、または成分の1つもしくは複数の解離から、または成分の1つもしくは複数の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図されている。したがって、本発明の医薬組成物は、本発明の化合物と医薬的または生理学的に許容される担体とを混合することによって作製される任意の組成物を包含する。

10

【0074】

「有効成分」という用語は、本明細書では生物学的または生理学的に活性な組成物中の物質を指す。特に、医薬組成物に関連して、「有効成分」という用語は、目的の薬理学的効果を示す成分物質を指す。例えば、がんの治療または予防における使用のための医薬組成物の場合、組成物中の有効成分は、直接または間接的にがん細胞および/または組織に対する少なくとも1つの生物学的または生理学的作用をもたらし得る。好ましくは、そのような作用は、がん細胞増殖を低減するまたは阻害すること、がん細胞および/または組織を損傷するまたは死滅させること等を含み得る。典型的には、有効成分の間接的効果は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答の誘導である。製剤化される前は、「有効成分」は「バルク」、「原薬」または「原体」とも称され得る。

20

本明細書で使用する「医薬的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料を含むがこれらに限定されない、医薬的または生理学的に許容される材料、組成物、物質またはビヒクルを意味する。

【0075】

特に定義されない限り、「がん」という用語は、例えば乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)および頭頸部がん(HNC)を含む、CDCA1遺伝子を過剰発現するがんを指す。

30

特に定義されない限り、「Tリンパ球」および「T細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

【0076】

特に定義されない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」および「CTL」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、非自己細胞(例えば腫瘍細胞、ウイルス感染細胞)を認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球のサブグループを指す。CTLは、CD8⁺Tリンパ球と区別され、MHCクラスI分子によって提示されるペプチドを認識することができる。

40

【0077】

特に定義されない限り、「HLA-A24」という用語は、サブタイプを含むHLA-A24型を指し、その例には、HLA-A*2401、HLA-A*2402、HLA-A*2403、HLA-A*2404、HLA-A*2407、HLA-A*2408、HLA-A*2420、HLA-A*2425およびHLA-A*2488が含まれるが、これらに限定されない。

【0078】

特に定義されない限り、本明細書で使用する「HLA-A2」という用語は、典型的にはサブタイプを指し、その例には、HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0204、HLA-A*0205、HLA-A*0206、HLA-A*0207、HLA-A*0210、HLA-A*0211、HLA-A

50

* 0 2 1 3、H L A - A * 0 2 1 6、H L A - A * 0 2 1 8、H L A - A * 0 2 1 9、H L A - A * 0 2 2 8 および H L A - A * 0 2 5 0 が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 9 】

特に定義されない限り、「Tヘルパー1型細胞」および「Th1細胞」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特に明確に示されない限り、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドを認識することができ、細胞性免疫に関連するCD4⁺Tリンパ球のサブグループを指す。特に定義されない限り、「Th細胞」、「CD4⁺T細胞」および「CD4⁺ヘルパーT細胞」という用語も本明細書では互換的に使用される。Th1細胞は、細胞性免疫に関する他の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ）の活性化および/または刺激を助けるために様々なサイトカイン（例えばIFN-、IL-2、TNF-、GM-CSF、TNF-等）を分泌する。

10

【 0 0 8 0 】

特に定義されない限り、「HLA-DR4」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB1*04:02、HLA-DRB1*04:03、LA-DRB1*04:04、HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*04:06、HLA-DRB1*04:07、HLA-DRB1*04:08、HLA-DRB1*04:09、HLA-DRB1*04:10およびHLA-DRB1*04:11が含まれるが、これらに限定されない。

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

20

特に定義されない限り、「HLA-DR15」という用語はサブタイプを指し、その例には、HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB1*15:02、HLA-DRB1*15:03、HLA-DRB1*15:04、HLA-DRB1*15:05、HLA-DRB1*15:06、HLA-DRB1*15:07、HLA-DRB1*15:08、HLA-DRB1*15:09、HLA-DRB1*15:10およびHLA-DRB1*15:11が含まれるが、これらに限定されない。

特に定義されない限り、「HLA-DP2」という用語はサブタイプを指し、その例にはHLA-DPB1*0201およびHLA-DPB1*02:02が含まれるが、これらに限定されない。特に定義されない限り、「MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答」という語句は、MHCクラスII分子によるペプチドの提示によって誘導される免疫応答を指す。本明細書では、「MHCクラスII抗原によって媒介される免疫応答」は、CD4⁺T細胞、特にTh1細胞によって誘導される免疫応答を含む。そのような免疫応答の例には、サイトカイン（例えばIFN-、IL-2、TNF-、GM-CSF、TNF-等）の産生ならびに他の免疫細胞（例えばCTL、マクロファージ等）の活性化および/または刺激が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 8 1 】

特に定義されない限り、「CDCA1に特異的なTh1細胞」という語句は、CDCA1に由来するペプチドを提示する抗原提示細胞によって特異的に活性化されるが、他の抗原提示細胞では特異的に活性化されないTh1細胞を指す。

40

特に定義されない限り、「CDCA1特異的CTL」という語句は、CDCA1を発現する標的細胞に対して特異的に細胞傷害性を示すCTLを指す。

特に定義されない限り、ペプチドに関連して使用される場合、「CTL誘導能」という語句は、抗原提示細胞上に提示された場合CTLを誘導するペプチドの能力を指す。

特に定義されない限り、本明細書で使用する「キット」という用語は、試薬と他の材料の組合せに関して用いられる。キットは、マイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが本明細書で企図される。「キット」という用語は、試薬および/または材料の特定の組合せに限定されることを意図しない。

50

【0082】

本発明に関連して、「抗体」という用語は、指定されるタンパク質またはそのペプチドに特異的に反応性である免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体は、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射性標識に融合した抗体、および抗体断片を含み得る。さらに、本明細書における抗体はその最も広い意味で使用され、特に無傷モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、すべてのクラス（例えばIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）を示す。

特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術および学術用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0083】

II. ペプチド

以下で詳細に説明する本発明のペプチドは、「CDCA1ペプチド」または「CDCA1ポリペプチド」と称され得る。

CDCA1に由来するペプチドがTヘルパー1型（Th1）細胞によって認識される抗原として機能することを明らかにするため、CDCA1に由来するペプチド（配列番号：10）を、これらがMHCクラスII分子によってプロミスキャスに拘束される抗原エピートープであるかどうかを判定するために分析した。

CDCA1に由来するプロミスキャスなMHCクラスII結合ペプチドの候補を、HLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2への結合親和性に基づいて同定した。これらのペプチドをロードした樹状細胞（DC）によるCD4⁺T細胞のインビトロ刺激後、以下のペプチドの各々を用いてTh1細胞を成功裏に樹立した：

CDCA1 / IVYGI RLEHFY MMPVNSEVMYPHL（55 - 78；配列番号：1）、および

CDCA1 / NPKPEVLHMIYMRALQIVYGI RLEHF（39 - 64；配列番号：2）。

【0084】

上述したこれらの樹立されたTh1細胞は、それぞれのペプチドでパルスした抗原提示細胞の刺激に反応して強力な特異的Th1細胞活性を示した。さらに、前記ペプチドは、日本人において高頻度に認められるいくつかのHLA-DRおよびHLA-DP分子（例えばHLA-DR4、HLA-DR15、HLA-DR9およびHLA-DP2）によって拘束されるTh1細胞を刺激することができた。これらの結果は、CDCA1がTh1細胞によって認識される抗原であること、およびペプチドが、いくつかのHLAクラスII分子（例えばHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2など）によってプロミスキャスに拘束されるCDCA1のエピートープペプチドであることを明らかにする；したがって、そのようなペプチドは、CTLによる細胞傷害作用の標的抗原として有効であり得る。

【0085】

上記で同定したペプチドは、CDCA1に特異的なCTLを誘導する能力を有するCTLEピートープのアミノ酸配列を付加的に含み、本明細書で明らかにするように、そのようなペプチドは、Th1細胞に加えてCDCA1に特異的なCTLも誘導することができる。したがって、これらのペプチドは、CDCA1を発現するがんに対する免疫応答の誘導のための適切なペプチドであり得る。CDCA1遺伝子は、例えば乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺がん（SCLC）、非小細胞肺がん（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）を含む大部分のがん組織で過剰発現されるので、免疫療法のための良好な標的である。

したがって、本発明は、CDCA1に特異的なTh1細胞を誘導する能力を有するペプチドを提供する。

【0086】

10

20

30

40

50

本発明のペプチドは、少なくとも1つのMHCクラスII分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。あるいは、本発明のペプチドの断片は、少なくとも1つのMHCクラスII分子に結合することができ、抗原提示細胞上に提示され得る。ペプチドのこれらの断片は、抗原提示細胞内でのプロセッシングによって生成され得る。好ましい態様では、本発明のペプチドまたはその断片は、2またはそれ以上の種類のMHCクラスII分子（例えばHLA-DR9とHLA-DR15、HLA-DR4とHLA-DR15、HLA-DR4とHLA-DP2、HLA-DR15とHLA-DP2、またはHLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2）に結合する能力を有する。言い換えると、本発明のペプチドは、2またはそれ以上の種類のMHCクラスII分子によって拘束されるTh1細胞を誘導する能力を有し得る。別の態様では、本発明のペプチドは、CDC A1特異的CTL誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む。CDC A1特異的CTL誘導能を有するそのようなペプチドの典型的な例には、配列番号：3または5のアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。

10

20

30

40

50

【0087】

MHCクラスII分子における結合溝は両端で開いているので、MHCクラスII結合ペプチドはその長さに柔軟性を有し得る。MHCクラスII分子についてのコア結合モチーフは9個のアミノ酸残基から成り、MHCクラスII結合ペプチドは一般に、コア結合モチーフと隣接する他のアミノ酸残基を有する。隣接アミノ酸残基の数は限定されない。したがって、配列番号：1または2のすべてのアミノ酸残基がMHCクラスII分子に結合するために必ずしも必要ではない。

したがって、本発明のペプチドは、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチドであり得、そのようなペプチドは以下から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む：

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列からの9個より多い連続するアミノ酸を有するアミノ酸配列；および

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列。

【0088】

MHCクラスII結合ペプチドの長さは一般に10~30アミノ酸である。配列番号：1および2のアミノ酸配列はCDC A1のアミノ酸配列（配列番号：10）の一部から成るので、本発明のペプチドは以下の[1]~[5]に記載のペプチドであり得る：

[1] 10~30アミノ酸長を有し、配列番号：10のアミノ酸配列の一部を含む単離されたペプチドであって、

(a) 配列番号：1または2のアミノ酸配列から選択される9を超えるアミノ酸長を有する連続するアミノ酸配列；および

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、Th1細胞を誘導する能力を有するペプチド；

[2] 前記ペプチドまたはその断片が少なくとも2種類のMHCクラスII分子に結合する能力を有する、[1]に記載の単離されたペプチド；

[3] 前記MHCクラスII分子がHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2から成る群より選択される、[2]に記載の単離されたペプチド；

[4] 前記ペプチドが、CDC A1特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導能を有するペプチドのアミノ酸配列を含む、[1]から[3]のいずれか1つに記載の単離されたペプチド；ならびに

[5] 前記ペプチドが、

(a) 配列番号：1および2から成る群より選択されるアミノ酸配列；ならびに

(b) 1、2または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されている(a)のアミノ酸配列

から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、[4]に記載の単離されたペプチド。

【 0 0 8 9 】

本発明のペプチドによって誘導される T h 1 細胞は C D C A 1 に特異的である。それゆえ、いくつかの態様において、本発明は、配列番号： 1 0 のアミノ酸配列の部分アミノ酸配列から成る 3 0 アミノ酸残基未満のペプチドであって、配列番号： 1 または 2 のアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

【 0 0 9 0 】

一般に、インターネット上で現在利用可能なソフトウェアプログラム、例えば Wang P e t a l . 2 0 0 8 . P L o S C o m p u t B i o l . 4 (4) : e 1 0 0 0 0 4 8 . 1 1 : 5 6 8 ; および Wang P e t a l . 2 0 1 0 . B M C B i o i n f o r m a t i c s . に記載されているソフトウェアプログラムを使用して、様々なペプチドと H L A 抗原との間の結合親和性をインシリコで算出することができる。H L A 抗原との結合親和性は、例えば Nielsen M a n d L u n d O . 2 0 0 9 . B M C B i o i n f o r m a t i c s . 1 0 : 2 9 6 . ; Nielsen M e t a l . 2 0 0 7 . B M C B i o i n f o r m a t i c s . 8 : 2 3 8 . B u i H H , e t a l . 2 0 0 5 . I m m u n o g e n e t i c s . 5 7 : 3 0 4 - 3 1 4 . S t u r n i o l o T e t a l . 1 9 9 9 . N a t B i o t e c h n o l . 1 7 (6) : 5 5 5 - 5 6 1 および Nielsen M e t a l . 2 0 0 8 . P L o S C o m p u t B i o l . 4 (7) e 1 0 0 0 1 0 7 に記載されているように測定することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムを用いて同定された H L A 抗原と結合すると決定された C D C A 1 のペプチドを包含する。

【 0 0 9 1 】

上述したように、M H C クラス I I 結合ペプチドはその長さに柔軟性があるので、配列番号： 1 または 2 のアミノ酸配列は、生じるペプチドが必須の T h 1 細胞誘導能を保持する限り、場合により付加的なアミノ酸残基と隣接していてもよい。T h 1 細胞誘導能を有するそのようなペプチドは、典型的には約 3 0 アミノ酸未満、しばしば約 2 9 アミノ酸未満、通常は約 2 8 または 2 7 アミノ酸未満である。配列番号： 1 および 2 の中から選択されるアミノ酸配列に隣接する特定のアミノ酸配列は、そのような隣接アミノ酸配列がもとのペプチドの T h 1 細胞誘導能を損なわない限り、限定されず、任意の種類のアミノ酸で構成され得る。典型的な態様では、そのような隣接アミノ酸配列は、配列番号： 1 または 2 のアミノ酸配列に隣接する配列番号： 1 0 のアミノ酸配列の中から選択され得る；しかし、本発明はそれに限定されない。そこで、本発明はまた、T h 1 細胞誘導能ならびに配列番号： 1 および 2 の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

【 0 0 9 2 】

他方で、M H C クラス I I 分子についてのコア結合モチーフは 9 個のアミノ酸残基から成るので、配列番号： 1 または 2 のアミノ酸配列の全長が M H C クラス I I 分子に結合するためおよび T h 1 細胞の誘導のために必ずしも必要ではない。したがって、本発明のペプチドは、必須の T h 1 細胞誘導能を保持することを条件として、配列番号： 1 または 2 の 9 個より多い連続するアミノ酸を有するアミノ酸の形態をとることができる。T h 1 細胞誘導能を有するペプチドは、典型的には約 1 0 より多いアミノ酸、しばしば 1 1 または 1 2 より多いアミノ酸、通常は 1 3 または 1 4 より多いアミノ酸である。したがって、本発明のペプチドは、T h 1 細胞誘導能を有し、かつ配列番号： 1 または 2 のアミノ酸配列からの 9、1 0、1 1、1 2、1 3 または 1 4 個より多い連続するアミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり得る。

【 0 0 9 3 】

タンパク質中の 1、2 またはそれ以上のアミノ酸の改変はタンパク質の機能に影響を及ぼさず、一部の場合にはもとのタンパク質の所望の機能を増強することさえあることは一般に公知である。実際に、改変されたペプチド（すなわちもとの参照配列と比較して 1、2 または数個のアミノ酸残基が改変されている（すなわち置換、付加、欠失または挿入されている）アミノ酸配列から成るペプチド）が、もとのペプチドの生物学的活性を保持す

ることは知られている (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10:6487-500; Dalbadié-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79:6409-13)。したがって、1つの態様では、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列の両方を有し得、1、2またはさらにそれ以上のアミノ酸が付加、挿入、欠失および/または置換されている。あるいは、本発明のペプチドは、Th1細胞誘導能ならびに配列番号：1または2のアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が付加、挿入、欠失および/または置換されているアミノ酸配列の両方を有し得る。

10

【0094】

当業者は、単一アミノ酸または小さな割合のアミノ酸を改変するアミノ酸配列への個々の付加または置換は、もとのアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識する。そこで、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、タンパク質の改変は、もとのタンパク質と類似の機能を有する改変されたペプチドを生じさせる。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は当技術分野において周知である。アミノ酸側鎖の特性の例は、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、および以下の共通する官能基または特徴を有する側鎖：脂肪族側鎖 (G、A、V、L、I、P)；ヒドロキシル基含有側鎖 (S、T、Y)；硫黄原子含有側鎖 (C、M)；カルボン酸およびアミド含有側鎖 (D、N、E、Q)；塩基含有側鎖 (R、K、H)；ならびに芳香族含有側鎖 (H、F、Y、W)である。加えて、以下の8群は各々相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：

20

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、トレオニン (T)；および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M) (例えば Creighton, Proteins 1984 参照)。

30

【0095】

そのような保存的改変ペプチドも本発明のペプチドとみなされる。しかし、本発明のペプチドはそれらに限定されず、改変されたペプチドがもとのペプチドのTh1細胞誘導能を保持する限り、非保存的改変も含み得る。さらに、改変されたペプチドは、CDCA1の多型変異体、種間相同体およびアレルのTh1細胞誘導性ペプチドを除外すべきではない。

【0096】

必須のTh1細胞誘導能を保持するために、少数の(例えば1、2もしくは数個)または低い割合のアミノ酸を改変する(挿入、付加、欠失および/または置換する)ことができる。本明細書では、「数個」という用語は、5またはそれ以下のアミノ酸、例えば4または3またはそれ以下のアミノ酸を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは20%もしくはそれ以下、より好ましくは15%もしくはそれ以下、さらに一層好ましくは10%もしくは8%もしくはそれ以下、または1~5%である。

40

【0097】

本発明の好ましいペプチド、すなわち配列番号：1および2 (CDCA1 55-78、39-64)のホモロジー解析は、これらのペプチドが他の公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドと有意の相同性を有さないことを確認する。したがって、免疫療法に使用した場合、これらのペプチドが未知のまたは望ましくない免疫応答を生じる可能性は有意

50

に低い。したがって、これらのペプチドは、がん患者においてCDCA1に対する免疫を誘発するために極めて有用であると期待される。

【0098】

免疫療法に関連して使用する場合、本発明のペプチドまたはその断片は、抗原提示細胞の表面に、好ましくはHLAクラスII抗原との複合体として、提示されなければならない。それゆえ、Th1細胞を誘導するだけでなく、HLAクラスII抗原に高い結合親和性も有するペプチドを選択することが好ましい。そのために、ペプチドをアミノ酸残基の置換、挿入、欠失および/または付加によって改変し、改善された結合親和性を有する改変されたペプチドを生成することができる。

【0099】

本発明はまた、上述したペプチドのN末端および/またはC末端への1~2個のアミノ酸の付加を企図する。高いHLA抗原結合親和性を有し、Th1細胞誘導能を保持するそのような改変ペプチドも本発明に含まれる。

例えば、本発明は、HLAクラスII抗原に結合し、Th1細胞誘導能を有し、配列番号：1および2から成る群より選択されるアミノ酸配列において1、2または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列を含む、31、30、29、28、27または26未満のアミノ酸長の単離されたペプチドを提供する。

これらのペプチドはまた、APCと接触するかまたはAPCに導入された場合、APC中でプロセシングされて、プロセシングされた断片をその上に提示し得る。例えば、本発明のペプチドは、APCの表面に提示される通常11~26(典型的には15~25)アミノ酸残基から成る断片にプロセシングされ得る。

【0100】

しかしながら、ペプチド配列が、異なる機能を有する内因性または外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫疾患および/または特定の物質に対するアレルギー症状などの負の副作用を誘導し得る。それゆえ、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列とマッチする状況を回避するために、利用可能なデータベースを用いて最初にホモロジー検索を実施することが望ましいと考えられる。目的のペプチドと比較して同一のペプチドまたは1もしくは2個のアミノ酸相違を有するペプチドが自然界に存在しないことがホモロジー検索から明らかになった場合は、そのような副作用の危険性を伴わずにHLA抗原とのその結合親和性を高めるためならびに/またはそのTh1細胞および/もしくはCTL誘導能を高めるために目的のペプチドを改変することができる。

【0101】

上述したHLAクラスII抗原に高い結合親和性を有するペプチドは極めて有効であると期待されるが、指標として高い結合親和性の存在に従って選択した候補ペプチドを、Th1細胞誘導能の存在に関してさらに検討する。本明細書では、「Th1細胞誘導能」という語句は、APCと接触した場合、APC上でTh1細胞を誘導する能力を付与するペプチドの能力を示す。さらに、「Th1細胞誘導能」は、Th1細胞の活性化および/またはTh1細胞の増殖を誘導する、IFN- γ 産生を含むTh1細胞媒介性サイトカイン産生を促進して他の細胞(例えばCTL、マクロファージ)を助けるおよび/または刺激する、ペプチドの能力を含む。

【0102】

Th1細胞誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を担持する抗原提示細胞(例えばBリンパ球、マクロファージおよび樹状細胞(DC))、またはより詳細にはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、ペプチドで刺激した後、CD4陽性T細胞(CD4⁺T細胞)と混合して、次にCD4⁺T細胞によって産生され、放出されたIFN- γ を測定することによって達成できる。あるいは、ペプチドのTh1細胞誘導能は、Th1細胞によるCTL活性化に基づいて評価することができる。例えば、CD4⁺T細胞を試験ペプチドで刺激したDCと共培養し、次にCTLおよびCTLの標的細胞と混合する。標的細胞は、⁵¹Crなどで放射性標識することができ、Th1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化されたCTLの細胞傷害活性を、標的細胞から放出された放射能から算出するこ

10

20

30

40

50

とができる。あるいは、Th1細胞誘導能は、試験ペプチドで刺激した抗原提示細胞（APC）の存在下でTh1細胞によって産生され、放出されたIFN- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻害領域を可視化することによって評価できる。

【0103】

上述した改変に加えて、本発明のペプチドはまた、生じる結合ペプチドがもとのペプチドのTh1細胞誘導能を保持する限り、他の物質に結合することもできる。適切な物質の例には、例えばペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成ポリマー等が含まれる。本発明のペプチドは、修飾がもとのペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化等のような修飾を含み得る。これらの種類の修飾は、付加的な機能（例えば標的化機能および送達機能）を付与するまたはペプチドを安定化するために実施できる。

10

【0104】

例えば、ペプチドのインビボでの安定性を高めるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体または非天然アミノ酸を導入することは当技術分野において公知である；この概念は本発明のペプチドにも適合させ得る。ペプチドの安定性は多くの方法で評価することができる。例えば、ペプチダーゼならびにヒト血漿および血清などの様々な生物学的媒質を用いて安定性を試験することができる（例えばVerhoeft et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11:291-302参照）。

20

【0105】

本発明のペプチドは、HLAクラスII抗原と組み合わせた複合体としてAPCの表面に提示され、その後Th1細胞を誘導し得る。それゆえ、APCの表面でHLAクラスII抗原と複合体を形成するペプチドも本発明に含まれる。本発明のペプチドを提示するAPCをワクチンとして接種することができる。

【0106】

上記複合体に含まれるHLA抗原の型は、治療および/または予防を必要とする対象の型とマッチしなければならない。例えば、日本人においては、HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2が一般的であり、それゆえ日本人患者の治療に適する。典型的には、臨床において、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を前もって検査し、これにより特定のHLAクラスII抗原への結合能力を有するペプチドの適切な選択が可能になる。好ましい態様では、本発明のペプチドはTh1細胞をプロミスキャスに誘導することができる。本明細書では、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって拘束されるTh1細胞を誘導することができる場合、このペプチドのTh1細胞誘導能は「プロミスキャス」である。言い換えると、ペプチドが少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される場合、そのような抗原認識は「プロミスキャス」とみなされる。ペプチドに関連して使用する場合、「少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子によって認識される」という語句は、ペプチドまたはその断片が少なくとも2つの異なる種類のMHCクラスII分子に結合できることを示す。例えば、CDCA1ペプチド（55-78；配列番号：1）およびCDCA1ペプチド（39-64；配列番号：2）は、それぞれHLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2、ならびにHLA-DR9およびHLA-DR15によって認識される。それゆえ、これらのペプチドは「プロミスキャス」なエピトープの典型的な例である。

30

40

【0107】

HLA-DR4、HLA-DR15またはHLA-DP2陽性APCを使用する場合は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドが好ましく使用される。他方で、HLA-DR9またはHLA-DR15陽性APCを使用する場合は、好ましいペプチドは配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドである。

したがって、好ましい態様では、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘

50

導の前にHLA-DR4、HLA-DR15またはHLA-DP2を有すると同定された対象においてTh1細胞の誘導のために使用し得る。同様に、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを、誘導の前にHLA-DR9またはHLA-DR15を有すると同定された対象においてTh1細胞の誘導のために使用し得る。

【0108】

III. CDC A1ペプチドの調製

本発明のペプチドは周知の技術を用いて調製することができる。例えば、本発明のペプチドは、組換えDNA技術または化学合成を用いて、合成によって調製することができる。本発明のペプチドは、個別にまたは2もしくはそれ以上のペプチドから成るより長いポリペプチドとして合成することができる。本発明のペプチドを、次に、他の天然の宿主細胞タンパク質およびその断片、または他の何らかの化学物質を実質的に含まないようにするために、単離する、すなわち精製することができる。

10

【0109】

本発明のペプチドは、修飾がもとの参照ペプチドの生物学的活性を損なわない限り、グリコシル化、側鎖酸化またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えばペプチドの血清半減期を延長させるために使用できる、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の組み込みが含まれる。

【0110】

本発明のペプチドは、選択したアミノ酸配列に基づく化学合成を通して得ることができる。この合成に適合させ得る従来のペプチド合成法の例には以下が含まれる：

20

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

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976;

(iii) 「ペプチド合成」(日本語)、丸善、1975;

(iv) 「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語)、丸善、1985;

(v) 「医薬品の開発」(日本語)、続第14巻(ペプチド合成)、広川書店、1991;

(vi) 国際公開第99/67288号;および

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

30

【0111】

あるいは、本発明のペプチドは、ペプチドを作製するための任意の公知の遺伝子工学的方法を適合させて得ることができる(例えばMorrisson J, J Bacteriology 1977, 132:349-51; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (eds. Wu et al) 1983, 101:347-62)。例えば、最初に、発現可能な形態で(例えばプロモーター配列に対応する調節配列の下流に)目的のペプチドをコードするポリヌクレオチドを保有する適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に形質転換する。次に宿主細胞を培養して関心対象のペプチドを生産させる。本発明のペプチドはまた、インビトロ翻訳系を採用してインビトロで作製することもできる。

40

【0112】

IV. ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明の前記ペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供する。これらには、天然のCDC A1遺伝子(GenBankアクセッション番号NM_145697(配列番号：9))に由来するポリヌクレオチド、ならびにその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書では、「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重に起因して、数多くの機能的に同一の核酸が

50

所与のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G および G C U はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって特定されるあらゆる位置で、コドンを、コードされるポリペプチドを変化させることなく前述した対応するコドンのいずれかに変化させることができる。そのような核酸変異は、保存的に改変された変異の一種である、「サイレント変異」である。ペプチドをコードする本明細書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレント変異も表す。当業者は、核酸中の各々のコドン（通常メチオニンの唯一のコドンである A U G、および通常トリプトファンの唯一のコドンである T G G を除く）を、機能的に同一の分子を生じるように改変できることを認識する。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、各々の開示される配列において暗黙のうちに表現される。

10

【0113】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA およびそれらの誘導体で構成され得る。当技術分野において周知のように、DNA は A、T、C および G などの塩基で適切に構成され、T は、RNA では U に置き換えられる。当業者は、非天然の塩基もポリヌクレオチドに含まれ得ることを認識する。

【0114】

本発明のポリヌクレオチドは、その間に介在アミノ酸配列を含んでまたは含まずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在アミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位（例えば酵素認識配列）を提供することができる。さらに、ポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードするコード配列に加えて任意の付加的な配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであり得るか、またはマーカー遺伝子などを含む発現ベクター（プラスミド）であり得る。一般に、そのような組換えポリヌクレオチドは、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを使用する従来の組換え技術を通したポリヌクレオチドの操作によって調製することができる。

20

【0115】

組換えおよび化学合成の両方の技術が、本発明のポリヌクレオチドを作製するために使用できる。例えば、ポリヌクレオチドは適切なベクターへの挿入によって作製でき、これをコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現させ得る。あるいは、PCR 技術または適切な宿主における発現を用いてポリヌクレオチドを増幅することができる（例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989 参照）。あるいは、ポリヌクレオチドは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3: 801-5 に記載されているように、固相技術を用いて合成することができる。

30

【0116】

V. 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLA クラス II 抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞 (APC) も提供する。本発明のペプチドと接触させることによって得られる APC は、治療および/または予防の対象である患者に由来することができ、それだけでまたは本発明のペプチド、Th1 細胞または CTL を含む他の薬剤と組み合わせてワクチンとして投与することができる。

40

【0117】

APC は特定の種類の細胞に限定されず、樹状細胞 (DC)、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B 細胞および活性化 T 細胞を含み、これらは、リンパ球によって認識されるためにタンパク質性抗原をその細胞表面に提示することが公知である。DC は APC の中で最も強力な Th1 細胞誘導活性を有する代表的な APC であるので、DC は本発明の APC として有用である。

【0118】

50

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、MHCクラスI抗原によって媒介されるCTL応答ならびにTh1(クラスII)を誘導することもできる。一般に、MHCクラスI抗原によって認識されるエピトープの長さは、MHCクラスII抗原のもの(15またはそれ以上のアミノ酸残基)より短い(例えば8~10アミノ酸残基)ことが周知である。それゆえ、本発明のペプチドのプロセシングされた産物はCTLの誘導をもたらす。実際に、CDCA1ペプチド(55-78;配列番号:1)から誘導されるCTLは、CTL認識エピトープとして既に同定されている断片(YMMPVNSEV;配列番号:3)を認識する。同様に、CDCA1ペプチド(39-64;配列番号:2)も、そのアミノ酸配列内にCTL認識エピトープ配列VYGI RLEHF(配列番号:5)を含む。したがって、本発明のペプチドは、Th1を誘導するだけでなく、APC内でのプロセシング後にCTLも誘導する。言い換えると、本発明のペプチドと接触したAPCは、本発明のペプチドをプロセシングして、MHCクラスI抗原と共にそれらの断片を提示し、ならびにMHCクラスII抗原と共にそれらの全体を提示する。その結果として、MHCクラスII抗原と共にAPCに提示される本発明のペプチドを認識するTh1、およびペプチドのプロセシングされた断片を介して誘導されるCTLの両方が、本発明のペプチドを使用して誘導され得る。

10

【0119】

例えば、APCは、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボまたはインビボで本発明のペプチドと接触させる(刺激する)ことによって得られる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドまたはその断片を提示するAPCが対象の体内で誘導される。本明細書では、「APCを誘導する」という語句は、APCを本発明のペプチドと接触させて(で刺激して)、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との間で形成される複合体をAPCの表面に提示させることを含む。あるいは、本発明のペプチドをAPCに導入して、本発明のペプチドまたはその断片をAPCに提示させた後、APCをワクチンとして対象に投与することができる。例えば、エクスピボ投与は、

20

a: 最初の対象からAPCを回収する段階、

b: 段階aのAPCを本発明のペプチドと接触させる段階、および

c: ペプチドをロードしたAPCを2番目の対象に投与する段階

を含み得る。

30

【0120】

最初の対象と2番目の対象は同じ個体であってもよく、または異なる個体でもよい。あるいは、本発明によれば、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、抗原提示細胞を誘導する医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、前記方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。段階(b)によって得たAPCをワクチンとして対象に投与することができる。

【0121】

本発明の1つの側面として、本発明のAPCは高レベルのTh1細胞誘導能を有する。本明細書では、「高レベルのTh1細胞誘導能」という語句において、高レベルとは、ペプチドと接触していないAPC、またはTh1細胞を誘導することができないペプチドと接触したAPCによるTh1細胞誘導能のレベルと比較したものである。本明細書では、APCに関連して使用する場合、「Th1細胞誘導能」という語句は、CD4⁺T細胞と接触した場合にTh1細胞を誘導するAPCの能力を示す。高レベルのTh1細胞誘導能を有するそのようなAPCは、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をインビトロでAPCに移入する段階を含む方法によって調製することができる。導入する遺伝子はDNAまたはRNAの形態であり得る。導入のための方法の例には、特に限定されることなく、この分野で従来実施されている様々な方法が含まれ、例えばリポフェクション、エレクトロポレーションおよびリン酸カルシウム法などが使用できる。より

40

50

詳細には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第2000-509281号に記載されているように実施することができる。遺伝子をAPCに移入することにより、遺伝子は細胞内で転写、翻訳を受け、その後得られたタンパク質はMHCクラスIIまたはクラスIIによってプロセシングされて、提示経路を通してペプチドの提示へと進む。あるいは、本発明のAPCは、APCを本発明のペプチドと接触させる段階を誘導する方法によって調製することができる。

【0122】

好ましい態様では、本発明のAPCは、HLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2の群から選択されるMHCクラスII分子と本発明のペプチド(配列番号: 1から選択されるアミノ酸配列を含む)の複合体を自らの表面に提示するAPCであり得る。別の態様では、本発明のAPCは、HLA-DR9およびHLA-DR15の群から選択されるMHCクラスII分子と本発明のペプチド(配列番号: 2から選択されるアミノ酸配列を含む)の複合体を自らの表面に提示するAPCであり得る。好ましくは、HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2は、それぞれHLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*15:02およびHLA-DPB1*02:01であり得る。

【0123】

VI. Tヘルパー1型細胞(Th1細胞)

本発明のペプチドのいずれかに対して誘導されるTh1細胞は、インビボでがん細胞を標的とするCTLを含むエフェクター細胞のいずれかの免疫応答を強化し、したがってペプチド自体と同様の方法で、ワクチンとして役立つ。そこで、本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかによって特異的に誘導されるまたは活性化される単離されたTh1細胞も提供する。

【0124】

そのようなTh1細胞は、(1)1つまたは複数の本発明のペプチドを対象に投与し、対象からTh1細胞を回収すること、(2)APCおよびCD4⁺T細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ(で刺激し)、その後Th1細胞を単離すること、(3)CD4⁺T細胞もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のAPCと接触させること、または(4)T細胞受容体(TCR)サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドもしくはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドをCD4⁺T細胞に導入することによって得られ、ここで、TCRはMHCクラスII分子と本発明のペプチドの複合体に結合することができる。(3)の方法のためのそのようなAPCは上述した方法によって調製することができる。(4)の方法の詳細は、以下の「VII. T細胞受容体(TCR)」の章で述べる。

【0125】

本発明のAPCでの刺激によって誘導されたTh1細胞は、治療および/または予防の対象である患者に由来してもよく、作用を調節するために単独でまたは本発明のペプチドを含む他の薬剤と組み合わせて投与することができる。得られたTh1細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞(例えばCTL、マクロファージ)を活性化するおよび/または刺激することができる。本発明のTh1細胞によって活性化され得るそのような免疫細胞には、がん細胞などの標的細胞に対して細胞傷害性を示すCTLが含まれる。例えば、そのようなCTLの標的細胞は、内因性にCDCA1を発現する細胞(例えばがん細胞)、またはCDCA1遺伝子をトランスフェクトされた細胞であり得る。好ましい態様では、本発明のペプチドは、CTLエピトープペプチドの少なくとも1つのアミノ酸配列を含むことができ、Th1細胞に加えて、がん細胞などのCDCA1発現細胞に対するCTLも誘導することができる。この場合、本発明のペプチドは、Th1細胞およびCTLをインビボで同時にまたは連続的に誘導することができ、誘導されたTh1細胞は、誘導されたCTLを有効に活性化することができる。したがって、CTLエピトープペプチドの少なくとも1つのアミノ酸配列を含むそのようなペプチドは、がん免疫療法のための適切なペプ

チドである。

【0126】

さらに、本発明のTh1細胞は、他の標的細胞に対する何らかのCTLを抗原非依存的に活性化するおよび/または刺激する様々なサイトカイン(例えばIFN-)を分泌する。したがって、本発明のTh1細胞は、CDCA1以外の腫瘍関連抗原(TAA)を発現する細胞を標的とするCTL活性を増強することにも寄与し得る。したがって、本発明のTh1細胞は、本発明のペプチドおよびAPCと同様に、CDCA1を発現する腫瘍だけでなく、他のTAAを発現する腫瘍のための免疫療法にも有用である。

【0127】

いくつかの態様において、本発明のTh1細胞は、HLA-DRまたはHLA-DP抗原と本発明のペプチドの複合体を提示する細胞を認識するTh1細胞である。Th1細胞に関連して、「細胞を認識する」という語句は、そのTCRを介した細胞表面のMHCクラスII分子と本発明のペプチドの複合体の結合および抗原特異的に活性化されることを指す。本明細書では、「抗原特異的に活性化される」という語句は、特定のMHCクラスII分子とペプチドに反応して活性化されることを指し、活性化されたTh1細胞からのサイトカイン産生が誘導される。好ましい態様では、HLA-DRは、HLA-DR4、HLA-DR9およびHLA-DR15から成る群より選択され得る。好ましくは、HLA-DR4、HLA-DR9およびHLA-DR15は、それぞれHLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*15:02であり得る。他方で、HLA-DP2はHLA-DP抗原の好ましい例である。より好ましくは、HLA-DP2はHLA-DPB1*02:01であり得る。

【0128】

VII. 細胞傷害性T細胞(細胞傷害性Tリンパ球またはCTL)

本発明のペプチドの断片のいずれかに対して誘導される細胞傷害性T細胞は、インビボでがん細胞を標的とする免疫応答を強化し、したがってペプチド自体と同様の方法でワクチンとして使用することができる。そこで、本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかによって特異的に誘導または活性化される、単離された細胞傷害性T細胞を提供する。

【0129】

そのような細胞傷害性T細胞は、(1)1つまたは複数の本発明のペプチドを対象に投与し、対象から細胞傷害性T細胞を回収すること、または(2)対象由来のAPCおよびCD8陽性細胞または末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ(で刺激し)、その後細胞傷害性T細胞を単離することによって得られ得る。

【0130】

本発明のペプチドを提示するAPCでの刺激によって誘導された細胞傷害性T細胞は、治療および/または予防の対象である患者に由来してもよく、作用を調節するために単独でまたは本発明のペプチドを含む他の薬剤と組み合わせて投与することができる。得られた細胞傷害性T細胞は、本発明のペプチド、例えば誘導のために使用した同じペプチドを提示する標的細胞に対して特異的に作用する。標的細胞は、内因性にCDCA1を発現する細胞、またはCDCA1遺伝子をトランスフェクトされた細胞であり得る;そしてペプチドによる刺激によって細胞表面に本発明のペプチドを提示する細胞は、活性化CTLの攻撃の標的としても役立つ。

【0131】

いくつかの態様において、本発明のCTLは、HLA-A2またはA24抗原と本発明のペプチドの複合体を提示する細胞を認識するCTLである。CTLとの関連において、「細胞を認識する」という語句は、そのTCRを介して細胞表面上のHLA-A2またはA24抗原と本発明のペプチドの複合体に結合することおよび細胞に対して特異的細胞傷害活性を示すことを指す。本明細書では、「特異的細胞傷害活性」は、HLA-A2またはA24抗原と本発明のペプチドの複合体を提示する細胞に対して細胞傷害活性を示すが、他の細胞には細胞傷害活性を示さないことを指す。例えば、配列番号:1および2は、HLA-A2認識エピトープのアミノ酸配列を含む。したがって、配列番号:1または2

を含むペプチドから、HLA-A2のための好ましい断片が生成される。

【0132】

VIII. T細胞受容体 (TCR)

本発明はまた、T細胞受容体 (TCR) のサブユニットを形成することができる1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する組成物、およびこれを使用する方法を提供する。そのようなTCRサブユニットは、CDCA1ペプチドを提示するAPCに対する特異性をCD4⁺T細胞に付与するTCRを形成する能力を有する。当技術分野において公知の方法を用いることにより、本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞のTCRサブユニットとして鎖および鎖の核酸を同定することができる (国際公開第2007/032255号およびMorgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003))。誘導体TCRは、CDCA1ペプチドを提示するAPCに高い結合力で結合することができ、場合により効率的なサイトカイン産生を媒介することができる。

10

【0133】

TCRサブユニットをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド (すなわちTCRサブユニットの両方をコードする単一ポリヌクレオチドまたは各々別々のTCRサブユニットをコードする複数のポリヌクレオチド) を適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは当技術分野において周知である。ポリヌクレオチドまたはそれらを含むベクターは、CD4⁺T細胞、例えば患者由来のCD4⁺T細胞に有用に移入することができる。好都合には、本発明は、患者自身のT細胞 (または別の哺乳動物のT細胞) の速やかな改変を可能にし、優れたがん細胞死滅特性を有する改変されたT細胞を迅速かつ容易に生産する、すぐに入手可能な組成物を提供する。

20

【0134】

本発明はさらに、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドでの形質導入によって調製されるTh1細胞を提供し、ここで、TCRサブユニットはCDCA1ペプチド (例えばHLA-DR4、HLA-DR15もしくはHLA-DP2に関しては配列番号: 1、およびまたはHLA-DR9もしくはHLA-DR15に関しては配列番号: 2) に結合することができる。形質導入されたTh1細胞は、インビボでがん細胞にホーミングすることができ、インビトロで周知の培養方法によって増殖させることができる (例えばKawakami et al., J Immunol., 142, 3452-3461 (1989))。上述したように調製したTh1細胞は、治療または保護を必要とする患者においてがんを治療するまたは予防する上で有用な免疫原性組成物を形成するために使用できる。

30

【0135】

IX. 薬剤または医薬組成物

本発明の方法および組成物ががんの「治療」に関連して有用性を有する限り、治療が臨床上の利益、例えばCDCA1遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、有病率または転移能の低減を導く場合、治療は「有効」とみなされる。治療が予防的に適用される場合、「有効」は、がんの形成を遅延させるもしくは予防するまたはがんの臨床症状を予防するもしくは軽減することを意味する。有効性は、特定の腫瘍型を診断するまたは治療するための任意の公知の方法に関連して決定される。

40

本発明の方法および組成物ががんの「予防」 (preventionおよびprophylaxis) に関連して有用性を有する限り、そのような用語は、本明細書では、疾患による死亡率または罹患率の負荷を低減させる任意の行為を指すために互換的に使用される。予防 (preventionおよびprophylaxis) は、「一次、二次および三次予防レベルで」行われ得る。一次予防 (preventionおよびprophylaxis) は疾患の発生を回避し、一方二次および三次レベルの予防 (preventionおよびprophylaxis) は、疾患の進行および症状の出現の予防 (preventionおよびprophylaxis)、ならびに機能を回復させ、疾患に関連する合併症を減少させることによって既存の疾患の負の影響を低減することを目指す行為

50

を包含する。あるいは、予防 (prevention および prophylaxis) は、特定の障害の重症度を軽減すること、例えば腫瘍の増殖および転移を低減すること、血管新生を減少させることを目指す広範囲の予防的治療を含む。

【0136】

本発明に関連して、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/またはその術後再発の防止は、以下の段階、例えばがん細胞の外科的除去、がん性細胞の成長の阻害、腫瘍の退縮または後退、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退行、ならびに転移の低減または阻害などの段階のいずれかを含む。がんの有効な治療および/または予防は、がんを有する個体の死亡率を低下させ、予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、がんに伴う検出可能な症状を軽減する。例えば、有効な治療および/または予防を構成する症状の低減または改善は、10%、20%、30%もしくはそれ以上の低減または安定な疾患を含む。

10

【0137】

上述したように、本発明のペプチドによって誘導されるTh1細胞は、細胞性免疫に関与する免疫細胞を助けることができる。Th1細胞によって分泌されるサイトカインは抗原非依存的にCTLに影響を及ぼし得るので、そのような免疫細胞には、CDCA1を発現するがん細胞に対するCTLだけでなく、他のTAAを発現するがん細胞に対するCTLも含まれる。したがって、本発明は、少なくとも1つの本発明のペプチドを含有する薬剤または医薬組成物を提供する。薬剤または医薬組成物において、そのようなペプチドは治療的または医薬的に有効な量で存在する。

20

【0138】

本発明の薬剤または組成物によって誘導されるTh1細胞は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞に影響を及ぼすサイトカインを分泌することができるので、本発明の薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫に関与する任意の免疫細胞(例えばCTL、マクロファージ)を助ける、刺激するおよび/または増強するために有用である。それゆえ、本発明の薬剤または組成物は、CTLを含むそのような免疫細胞によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するあらゆる目的に有用である。例えば、本発明の薬剤または組成物は、そのような免疫細胞によって媒介されるがんまたは腫瘍に対する免疫応答を増強するまたは促進することができるので、本発明は、がんの治療および/または予防における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物を提供する。そのような薬剤または組成物中のペプチドの量は、CDCA1を発現するがんを担持する対象において免疫応答を有意に増強するまたは刺激するのに有効な量であり得る。

30

【0139】

さらに、図6に示すように、本発明の過程で同定されたCDCA1由来ペプチドは、CTLエピトープ単独での刺激と比較してCTL誘導を増強することが確認されている。それゆえ、本発明はまた、HLA-A2およびHLA-A24などのMHCクラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物も提供する。別の態様では、本発明はさらに、MHCクラスI抗原によって媒介される免疫応答を増強するまたは刺激するための薬剤または組成物を製造するための本発明のペプチドの使用を提供する。

40

【0140】

好ましい態様において、本発明の過程で同定されたCDCA1由来ペプチドは、Th1細胞ならびにCDCA1発現細胞に対するCTLを含み得る。したがって、本発明はまた、CDCA1を発現するがんまたは腫瘍に対するCTLの誘導における使用のための、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物も提供する。

さらに、本発明のペプチドの少なくとも1つを含有する薬剤または組成物は、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答を増強するまたは促進するのに使用することができる。

【0141】

CDCA1の発現は、正常組織と比較して、乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺が

50

ん（SCLC）および非小細胞肺癌（NSCLC）を含むいくつかのがん型において特異的に上昇するので（Cancer Res 2006 Nov 1; 66(21): 10339-48、国際公開第2005/028676号、国際公開第2005/089735号、国際公開第2006/085684号、国際公開第2007/013665号、国際公開第2007/013671号）、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の防止のために使用することができる。したがって、本発明は、本発明のペプチドの1つまたは複数または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、がんもしくは腫瘍の治療および/もしくは予防のため、ならびに/またはその術後再発の防止のための薬剤または医薬組成物を提供する。あるいは、本発明のペプチドを、薬剤または医薬組成物としての使用のために、APCなどの前記細胞のいずれかの表面で発現させることができる。加えて、前記Th1細胞も、本発明の薬剤または医薬組成物の有効成分として使用することができる。

10

【0142】

別の態様では、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤の製造における、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

20

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分の使用を提供する。

【0143】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するのに使用するための、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分を提供する。

30

【0144】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、有効成分として、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分と医薬的または生理学的に許容される担体を製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

40

【0145】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍を治療するための医薬組成物または薬剤を製造するための方法または工程であって、

(a) 本発明のペプチド、

(b) 本明細書で開示するようなペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド、

(c) 本発明のペプチドまたはその断片を自らの表面に提示するAPC、および

(d) 本発明のTh1細胞

の中から選択される有効成分を医薬的または生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程も提供する。

50

【 0 1 4 6 】

あるいは、本発明の医薬組成物または薬剤は、がんまたは腫瘍の予防およびその術後再発の防止のいずれかまたは両方のために使用し得る。

【 0 1 4 7 】

本発明の薬剤または医薬組成物はワクチンとして使用される。本発明に関連して、「ワクチン」（免疫原性組成物とも称される）という語句は、動物に接種した場合抗腫瘍免疫を誘導する機能を有する組成物を指す。

【 0 1 4 8 】

本発明の薬剤または医薬組成物は、対象または患者においてがんもしくは腫瘍を治療するおよび/もしくは予防する、ならびに/またはその術後再発もしくは転移性再発を防止するために使用できる。そのような対象の例には、ヒトならびに、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒヒおよびチンパンジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含むがこれらに限定されない他の哺乳動物が含まれる。

【 0 1 4 9 】

本発明の過程で、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、いくつかのHLA-DRおよび/またはHLA-DP分子（すなわちHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15、HLA-DP2）によって拘束されるプロミスカスなTh1細胞エピトープであることが見出され、これらは、MHCクラスII分子によって媒介される免疫応答に起因する、がんに対する強力で特異的な免疫応答を誘導することができる候補であり得る。それゆえ、配列番号：1または2のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含有本発明の薬剤または医薬組成物は、MHCクラスII分子としてHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2の中から選択される少なくとも1つを有する対象への投与に特に適する。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む薬剤または医薬組成物にも当てはまる。

【 0 1 5 0 】

あるいは、好ましい態様では、本発明の過程で同定されたペプチドは、HLA-A2またはHLA-A24を有する対象に適用された場合、CDCA1に特異的なCTLを誘導することもできる。したがって、本発明のペプチドの投与を通して、Th1細胞の誘導に加えてCDCA1を発現するがんに対するCTL応答が誘導され得ることがさらに期待される。さらに、本発明のペプチドは、CDCA1発現細胞に対するCTL応答を、そのプロセッシングを介して誘導することができるだけでなく、それによって媒介されるTh1細胞誘導により、CTL応答を増強することもできる。したがって、同じ対象においてTh1細胞およびCDCA1特異的CTLの両方の誘導を達成するために、例えば、治療される対象は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドを投与する場合は、好ましくはMHCクラスII分子としてHLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2の中から選択される少なくとも1つ、ならびにMHCクラスII分子としてHLA-A2またはHLA-A24を有する。同様に、MHCクラスII分子としてHLA-DR9および/またはHLA-DR15を、ならびにMHCクラスII分子としてHLA-A24を有する対象に配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドを投与することにより、Th1細胞およびCDCA1特異的CTLの両方の誘導が対象において達成され得る。

【 0 1 5 1 】

別の態様では、本発明は、Th1細胞誘導に依存するがん免疫療法を提供する。本発明によって提供される治療戦略は、Th1細胞から分泌されるサイトカインによって活性化される免疫細胞が目的のがん細胞を標的とする限り、CDCA1発現とは無関係に任意のがんに適用でき、有効である。

本発明の薬剤または医薬組成物によって治療されるべきがんまたは腫瘍には、限定されないが、そのようながんの好ましい例には、例えば乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺がん（SCLC）、非小細胞肺がん（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）を含む

10

20

30

40

50

、C D C A 1を発現する任意の種類のがんまたは腫瘍が含まれる。

【0152】

本発明の薬剤または医薬組成物は、前記有効成分に加えて、T h 1細胞またはC T Lを誘導する能力を有する他のペプチド、前記他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、前記他のペプチドまたはその断片を提示する他の細胞等を含有し得る。T h 1細胞またはC T Lを誘導する能力を有するそのような「他の」ペプチドの例には、がん特異抗原（例えば同定されたT A A）に由来するペプチドが含まれるが、これに限定されない。

【0153】

必要に応じて、本発明の薬剤または医薬組成物は、有効成分、例えば本発明のペプチドのいずれかの抗腫瘍作用を他の治療物質が阻害しない限り、場合により他の治療物質を付加的な有効成分として含んでもよい。例えば、製剤は、抗炎症薬、鎮痛剤、化学療法剤等を含み得る。医薬自体に他の治療物質を含めることに加えて、本発明の医薬を1つまたは複数の他の薬理的剤と連続的にまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理的剤の量は、例えば、使用される薬理的剤の種類、治療される疾患、ならびに投与のスケジュールおよび投与経路に依存する。

10

【0154】

当業者は、本明細書で特に言及する成分に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物が、対象となる製剤の種類を考慮して当技術分野において慣例的な他の剤（例えば増量剤、結合剤、希釈剤、賦形剤等）も含み得ることを認識する。

【0155】

本発明の1つの態様では、本発明の薬剤または医薬組成物を、治療する疾患、例えばがんの病的状態を治療するために有用な材料を含む製品およびキットに含めることができる。前記製品は、ラベルを付した本発明の薬剤または医薬組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器上のラベルは、剤が疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防に使用されることが示されるべきである。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。

20

【0156】

上述した容器に加えて、本発明の薬剤または医薬組成物を含むキットは、場合により医薬的に許容される希釈剤を収容する第二の容器をさらに含んでもよい。第二の容器は、使用のための指示書と共に、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

30

【0157】

薬剤または医薬組成物は、所望する場合は、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置中に包装することができる。パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与のための指示書が添付され得る。

【0158】

(1) ペプチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明のペプチドは、薬剤もしくは医薬組成物として直接投与することができるか、または必要な場合は、従来の製剤方法によって製剤化される。後者の場合、本発明のペプチドに加えて、薬剤に通常使用される担体、賦形剤などが、特に制限されることなく適宜含まれ得る。そのような担体の例には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液などが含まれるが、これらに限定されない。さらに、薬剤または医薬組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、防腐剤、界面活性剤などを含有し得る。本発明の薬剤または医薬組成物は抗がん目的に用いることができる。

40

【0159】

本発明のペプチドは、インビボでT h 1細胞を誘導する本発明のペプチドの2つまたはそれ以上で構成される、組合せとして調製することができる。ペプチドの組合せはカクテルの形態をとってもよく、または標準的な技術を用いて互いに複合化し得る。例えば、ペ

50

プチドを化学的に連結するかまたは単一融合ポリペプチド配列として発現させることができる。組合せ中のペプチドは、同じであってもよくまたは異なってもよい。

【0160】

本発明のペプチドを投与することにより、ペプチドまたはその断片がAPC上のHLAクラスII抗原によって高密度で提示され、次に提示されたペプチドとHLAクラスII抗原との間で形成された複合体に対して特異的に反応するTh1細胞が誘導される。あるいは、対象からAPC（例えばDC）を取り出し、次に本発明のペプチドによって刺激して、本発明のペプチドまたはその断片のいずれかを自らの表面に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再投与して、対象においてTh1細胞を誘導することができ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増大させることができる。

10

【0161】

本発明のペプチドを有効成分として含む、がんまたは腫瘍の治療および/または予防のための薬剤または医薬組成物は、細胞性免疫を有効に樹立することが公知のアジュバントも含み得る。あるいは、薬剤または医薬組成物は、他の有効成分と共に投与することができ、または顆粒に製剤化することによって投与できる。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続的に）投与した場合、タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。本明細書で企図されるアジュバントには、文献（Clin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89）に記載されているものが含まれる。適切なアジュバントの例には、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、不完全フロイントアジュバント（IFA）、完全フロイントアジュバント（CFA）、ISCOMatrix、GM-CSF、CpG、水中油型エマルジョン等が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0162】

さらに、リポソーム製剤、ペプチドが直径数マイクロメートルのビーズに結合している顆粒製剤、および脂質がペプチドに結合している製剤を好都合に使用し得る。

本発明の別の態様では、本発明のペプチドはまた、医薬的に許容される塩の形態で投与し得る。好ましい塩の例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸（例えば酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸等）との塩、および無機酸（例えば塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等）との塩が含まれる。本明細書で使用する場合、「医薬的に許容される塩」という語句は、化合物の生物学的有効性および特性を保持し、無機酸または無機塩基、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸等との反応によって得られる塩を指す。

30

【0163】

いくつかの態様において、本発明の薬剤または医薬組成物は、Th1細胞および場合によりCTLをプライミングする成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでTh1細胞および場合によりCTLをプライミングすることができる剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリシン残基の - アミノ基および - アミノ基に結合し、次に本発明のペプチドに連結することができる。その後、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子中で直接投与する、リポソーム中に組み込む、またはアジュバント中に乳化することができる。Th1細胞および場合によりCTL応答の脂質プライミングの別の例として、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン（P3CSS）などの大腸菌（E. coli）リポタンパク質が、適切なペプチドに共有結合した場合、Th1細胞および場合によりCTLをプライミングするために使用できる（例えばDerese et al., Nature 1989, 342: 561-4参照）。

40

【0164】

適切な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹腔内および静脈内注射など、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与（すなわち直接注入）が含ま

50

れるが、これらに限定されない。投与は、単回投与によって実施でき、または反復投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量のペプチドを、CDCA1を発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはCDCA1を発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のペプチドを、CDCA1を発現するがんを担持する対象に投与することができる。

本発明のペプチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日から数ヶ月に1回投与することができる。当業者は、適切で最適な用量を容易に決定することができる。

10

【0165】

(2) ポリヌクレオチドを有効成分として含有する薬剤または医薬組成物：

本発明の薬剤または医薬組成物はまた、本明細書で開示するペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現可能な形態で含有し得る。本明細書では、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞内に導入された場合、抗腫瘍免疫を誘導するポリペプチドとしてインピボで発現されることを意味する。例示的な態様では、関心対象のポリヌクレオチドの核酸配列は、ポリヌクレオチドの発現に必要な調節エレメントを含む。ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムへの安定な組み込みを達成するのに必要なものを備え得る（相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capocchi MR, Cell 1987, 51:503-12参照）。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247:1465-8; 米国特許第5,580,859号; 同第5,589,466号; 同第5,804,566号; 同第5,739,118号; 同第5,736,524号; 同第5,679,647号; および国際公開第98/04720号参照。DNAに基づく送達技術の例には、「裸のDNA」、促進（ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性）送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性（「遺伝子銃」）または圧力媒介性送達が含まれる（例えば米国特許第5,922,687号参照）。

20

【0166】

本発明のペプチドは、ウイルスベクターまたは細菌ベクターによっても発現され得る。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。このアプローチは、例えば本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現するベクターとしての、ワクシニアウイルスの使用を含む。宿主への導入後、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を惹起する。免疫プロトコルに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターはBCG（カルメット・ゲラン桿菌）である。BCGベクターは、Stover et al., Nature 1991, 351:456-60に記載されている。治療的投与または免疫のために有用である多種多様な他のベクター、例えばアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌（Salmonella typhi）ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えばShata et al., Mol Med Today 2000, 6:66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68:793-806; Hipp et al., In Vivo 2000, 14:571-85参照。

30

40

【0167】

対象へのポリヌクレオチドの送達は、直接的であってもよく、この場合対象はポリヌクレオチドを担持するベクターに直接暴露され、または間接的であってもよく、この場合は最初にインピボで細胞を関心対象のポリヌクレオチドで形質転換し、次に細胞を対象に移植する。これら2つのアプローチは、それぞれインピボおよびエクスピボ遺伝子治療として公知である。

50

【0168】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488 - 505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87 - 95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573 - 96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926 - 32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191 - 217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155 - 215 参照)。本発明にも使用できる、組換えDNA技術の分野で一般に公知の方法は、eds. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; および Krieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990 に記載されている。

10

【0169】

ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与は、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内および/または腹腔内注射などによって実施してよく、全身投与もしくは標的部位の近傍への局所投与も使用される。投与は、単回投与によって実施でき、または複数回投与によって強化することもできる。医薬的または治療的に有効な量のポリヌクレオチドを、CDCA1を発現するがんの治療を必要とする対象に投与することができる。あるいは、Th1細胞によって媒介される免疫応答を増強もしくは刺激する、および/またはCDCA1を発現するがんもしくは腫瘍に対するCTLを誘導するのに十分な量の本発明のポリヌクレオチドを、CDCA1を発現するがんを担持する対象に投与することができる。適切な担体または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療する疾患、患者の年齢、体重、投与方法などに従って適切に調整することができ、通常は0.001mg ~ 1000mg、例えば0.01mg ~ 100mg、例えば0.1mg ~ 10mg、例えば0.5mg ~ 5mgであり、数日ごとに1回から数ヶ月ごとに1回投与することができる。当業者は、適切で最適な投与量を容易に決定することができる。

20

【0170】

X. ペプチド、APCまたはTh1細胞を使用する方法

本発明のペプチドおよびそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のAPCおよびTh1細胞を誘導するために使用できる。本発明のAPCはまた、本発明のTh1細胞を誘導するためにも使用できる。ペプチド、ポリヌクレオチドおよびAPCは、任意の他の化合物がこれらのTh1細胞誘導能を阻害しない限り、任意の他の化合物と組み合わせて使用することができる。したがって、本発明の前記薬剤または医薬組成物のいずれかを、Th1細胞を誘導するために使用でき、それに加えて、ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものも、以下で論じるようにAPCを誘導するために使用できる。

30

【0171】

(1) 抗原提示細胞(APC)を誘導する方法:

本発明は、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用してAPCを誘導する方法を提供する。APCの誘導は、「VI. 抗原提示細胞」の章で上述したように実施することができる。本発明はまた、Th1細胞誘導能を有するAPCを誘導するための方法も提供し、前記APCの誘導は、「VI. 抗原提示細胞」、前出の項目でも言及されている。

40

あるいは、本発明は、Th1細胞を誘導する能力を有する抗原提示細胞(APC)を調製するための方法であって、以下の段階:

(a) APCを本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階; および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階

50

の1つを含み得る方法を提供する。

あるいは、本発明は、Th1細胞誘導能を有するAPCを誘導するための方法であって

(a) APCを本発明のペプチドと接触させる段階；および

(b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階

から成る群より選択される段階を含む方法を提供する。

【0172】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。好ましい態様では、Th1細胞誘導能を有するAPCの誘導のために使用するAPCは、好ましくはMHCクラスII分子としてHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2の中から選択される少なくとも1つを発現するAPCであり得る。そのようなAPCは、MHCクラスII分子としてHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2の中から選択される少なくとも1つを有する対象から得た末梢血単核細胞(PBMC)から、当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導されるAPCは、本発明のペプチドまたはその断片とHLAクラスII抗原(例えばHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15、HLA-DP2)の複合体を自らの表面に提示するAPCであり得る。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために、本発明の方法によって誘導されたAPCを対象に投与する場合、対象は、好ましくはAPCが由来するのと同じ対象である。しかし、対象がAPCドナーと同じHLA型を有する限り、対象はAPCドナーとは異なる対象であってもよい。

10

20

【0173】

別の態様では、本発明は、Th1細胞誘導能を有するAPCを誘導するのに使用するための剤または組成物を提供し、そのような剤または組成物は、本発明の1つまたは複数のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

別の態様では、本発明は、APCを誘導するために製剤化される剤または組成物の製造における、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。

【0174】

あるいは、本発明はさらに、Th1細胞誘導能を有するAPCを誘導するのに使用するための本発明のペプチドまたは本発明のペプチドをコードするポリペプチドを提供する。

好ましい態様では、本発明のペプチドは、Th1応答を誘導するだけでなく、それらをプロセッシングした後にCTL応答も誘導する。したがって、好ましい態様では、本発明の方法によって調製されるAPCは、がん細胞を含む、CDCA1発現細胞に対するCTLを誘導するためにも有用であり得る。例えば、配列番号：3のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、HLA-A2を発現するAPCがCDCA1特異的CTLを誘導するのに適する。あるいは、配列番号：5のアミノ酸配列を含むペプチドによって誘導する場合は、HLA-A24を発現するAPCがCDCA1特異的CTLを誘導するのに適する。

30

40

【0175】

(2) Th1細胞を誘導する方法：

さらに、本発明は、本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは本発明のペプチドもしくはその断片を提示するAPCを用いてTh1細胞を誘導するための方法を提供する。本発明はまた、本発明のペプチドとHLAクラスII抗原の複合体を認識するT細胞受容体(TCR)サブユニットを形成することができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使用してTh1細胞を誘導するための方法も提供する。好ましくは、Th1細胞を誘導するための方法は、

a：CD4陽性T細胞を、HLAクラスII抗原と本発明のペプチドまたはその断片との複合体を自らの表面に提示する抗原提示細胞と接触させる段階、および

50

b : T C R が本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原の複合体を認識するまたは複合体に結合することができる、T C R サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたは T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入する段階から成る群より選択される少なくとも 1 つの段階を含む。

【 0 1 7 6 】

本発明のペプチドを対象に投与した場合、対象の体内で T h 1 細胞が誘導され、M H C クラス I I 分子によって媒介される免疫応答（例えばがん細胞を標的とする免疫応答）が増強される。あるいは、本発明のペプチドおよび本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをエクスピボ治療法に使用することができ、この治療法では、対象由来の A P C および C D 4 陽性細胞、または末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ（本発明のペプチドで刺激し）、T h 1 細胞を誘導した後、活性化した T h 1 細胞を対象に戻す。例えば、前記方法は、

- a : 対象から A P C を回収する段階；
 - b : 段階 a の A P C を本発明のペプチドと接触させる段階；
 - c : 段階 b の A P C を C D 4 + T 細胞と混合し、T h 1 細胞を誘導するために共培養する段階；および
 - d : 段階 c の共培養物から C D 4 + T 細胞を回収する段階
- を含み得る。

さらに、T h 1 細胞は、T C R が本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原の複合体に結合することができる、T C R サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたは T C R サブユニットの各々をコードするポリヌクレオチドを C D 4 陽性 T 細胞に導入することによって誘導できる。そのような形質導入は、「V I I I . T 細胞受容体 (T C R) 」の章で上述したように実施することができる。

【 0 1 7 7 】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法はインビトロまたはエクスピボで実施できる。T h 1 細胞の誘導のために使用する C D 4 陽性 T 細胞は、対象から得た P B M C から当技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様では、C D 4 陽性 T 細胞のドナーは、M H C クラス I I 分子として H L A - D R 4、H L A - D R 9、H L A - D R 1 5 および H L A - D P 2 の中から選択される少なくとも 1 つを有する対象であり得る。本発明の方法によって誘導される T h 1 細胞は、本発明のペプチドまたはその断片と H L A クラス I I 抗原の複合体を自らの表面に提示する A P C を認識することができる T h 1 細胞であり得る。対象においてがんに対する免疫応答（または M H C クラス I 分子によって媒介される免疫応答）を誘導するために、本発明の方法によって誘導された T h 1 細胞を対象に投与する場合、対象は、好ましくは C D 4 陽性 T 細胞が由来するのと同じ対象である。しかし、対象が C D 4 陽性 T 細胞ドナーと同じ H L A 型を有する限り、対象は C D 4 陽性 T 細胞ドナーとは異なる対象であってもよい。

【 0 1 7 8 】

好ましい態様では、本発明のペプチドは、C D C A 1 発現細胞に対する C T L ならびに T h 1 細胞を誘導することができる。それゆえ、本発明はさらに、C T L を誘導するための方法であって、

- a : C D 4 陽性 T 細胞および C D 8 陽性 T 細胞の両方を、本発明のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階；ならびに
 - b : C D 8 陽性 T 細胞を本発明のペプチドと接触させた A P C と共培養する段階
- から成る群より選択される少なくとも 1 つの段階を含む方法を提供する。

C T L を誘導するような方法では、本発明のペプチドは A P C 内でプロセッシングされて C T L エピトープペプチドを生成し、生成された C T L エピトープペプチドは A P C の表面に提示される。

【 0 1 7 9 】

10

20

30

40

50

あるいは、本発明によれば、T h 1細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、T h 1細胞を誘導する薬剤または医薬組成物を製造するための方法または工程を提供し、方法は、本発明のペプチドを医薬的に許容される担体と混合するまたは製剤化するための段階を含む。さらに、本発明はまた、T h 1細胞を誘導するための本発明のペプチドも提供する。

【0180】

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

【0181】

本発明に関連して、CDCA1を過剰発現するがんをこれらの有効成分で治療することができる。そのようながんの例には、乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺癌（SCLC）、非小細胞肺癌（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）が含まれるが、これらに限定されない。したがって、有効成分を含有するワクチンまたは医薬組成物の投与前に、治療されるがん細胞または組織におけるCDCA1の発現レベルが同じ器官の正常細胞と比較して増大しているかどうかを確認することが好ましい。したがって、1つの態様では、本発明は、CDCA1を（過剰）発現するがんを治療するための方法であって、

i) 治療されるべきがんを有する対象から得たがん細胞または組織におけるCDCA1の発現レベルを測定する段階；

ii) CDCA1の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

iii) 上記(a)～(d)から成る群より選択される少なくとも1つの成分を、正常対照と比較してCDCA1を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階を含み得る方法を提供する。

【0182】

あるいは、本発明は、CDCA1を過剰発現するがんを有する対象に投与するのに使用するための、上記(a)～(d)から成る群より選択される少なくとも1つの成分を含有するワクチンまたは医薬組成物を提供し得る。言い換えると、本発明はさらに、本発明のCDCA1ポリペプチドで治療されるべき対象を同定するための方法であって、対象由来のがん細胞または組織におけるCDCA1の発現レベルを測定する段階を含み、遺伝子の正常対照レベルと比較したレベル上昇が、対象が本発明のCDCA1ポリペプチドで治療し得るがんを有することを示す方法を提供する。本発明のがんを治療する方法を以下でより詳細に説明する。

さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドを投与する前に対象のHLA型を同定し得る。例えば、配列番号：1のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくはHLA-DR4、HLA-DR15またはHLA-DP2を有すると同定された対象に投与する。あるいは、配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチドは、好ましくはHLA-DR9またはHLA-DR15を有すると同定された対象に投与する。

【0183】

目的のCDCA1の転写または翻訳産物を含む限り、任意の対象由来の細胞または組織をCDCA1発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、血液、唾液および尿などの体組織および体液が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、対象由来の細胞または組織試料は、上皮細胞、より好ましくはがん性上皮細胞またはがん性であることが疑われる組織由来の上皮細胞を含む細胞集団を含有する。さらに、必要な場合は、得られた体組織および体液から細胞を精製し、その後対象由来試料として使用してもよい。

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

【0184】

本発明によれば、対象から得たがん細胞または組織におけるCDCA1の発現レベルを測定する。発現レベルは、当技術分野において公知の方法を用いて、転写（核酸）産物レ

10

20

30

40

50

ベルで測定することができる。例えば、CDC A 1のmRNAは、ハイブリダイゼーション法（例えばノーザンハイブリダイゼーション）によりプローブを用いて定量化し得る。検出はチップまたはアレイ上で実施し得る。CDC A 1の発現レベルを検出するにはアレイの使用が好ましい。当業者は、CDC A 1の配列情報を利用してそのようなプローブを調製することができる。例えば、CDC A 1のcDNAをプローブとして使用し得る。必要な場合は、プローブを色素、蛍光物質および同位体などの適切な標識で標識化してもよく、遺伝子の発現レベルをハイブリダイズした標識の強度として検出し得る。

【0185】

さらに、CDC A 1の転写産物（例えば配列番号：9）は、増幅に基づく検出方法（例えばRT-PCR）によってプライマーを使用して定量化し得る。そのようなプライマーは、利用可能な遺伝子の配列情報に基づいて調製し得る。

詳細には、本発明の方法に使用するプローブまたはプライマーは、ストリンジентな条件下、中等度にストリンジентな条件下または低ストリンジентな条件下でCDC A 1のmRNAにハイブリダイズする。本明細書で使用する場合、「ストリンジентな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジентな条件は配列依存的であり、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高温で認められる。一般に、ストリンジентな条件の温度は、規定のイオン強度およびpHで特定の配列の熱融解温度（ T_m ）よりも約5℃低くなるように選択される。 T_m とは、（規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度下で）標的配列に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である。標的配列は一般に過剰に存在するので、 T_m では、プローブの50%が平衡状態で占有される。典型的には、ストリンジентな条件とは、塩濃度がpH 7.0~8.3で約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01~1.0Mのナトリウムイオン（または他の塩）であり、および温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば10~50ヌクレオチド）については少なくとも約30℃であり、より長いプローブまたはプライマーの場合は少なくとも約60℃である条件である。ストリンジентな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によっても達成し得る。

【0186】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出してもよい。例えば、CDC A 1タンパク質（配列番号：10）の量を測定し得る。翻訳産物としてのタンパク質の量を測定するための方法には、タンパク質を特異的に認識する抗体を使用する免疫測定法が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変抗体がCDC A 1タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型（例えばキメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等）を検出に使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。

翻訳産物に基づきCDC A 1遺伝子の発現レベルを検出する別の方法として、CDC A 1タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学分析を介して染色の強度を測定し得る。すなわち、この測定では、強い染色は、タンパク質の存在/レベルの増大、および同時に、CDC A 1遺伝子の高い発現レベルを指す。

がん細胞における標的遺伝子、例えばCDC A 1遺伝子の発現レベルは、標的遺伝子の対照レベル（例えば正常細胞におけるレベル）から、例えば10%、25%もしくは50%増大している場合、または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超もしくはそれ以上に増大している場合、増大していると決定され得る。

【0187】

対照レベルは、疾患状態（がん性または非がん性）が既知である対象から以前に採取され、保存されていた試料を使用することによって、がん細胞と同時に測定し得る。加えて、治療されるべきがんを有する器官の非がん性領域から得た正常細胞を正常対照として使

用してもよい。あるいは、疾患状態が既知である対象由来の試料において以前に測定されたCDC A 1遺伝子の発現レベルを分析することによって得られた結果に基づき、統計学的方法によって対照レベルを決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験した細胞からの発現パターンからデータベースから導き出すことができる。さらに、本発明の1つの局面によれば、生物学的試料におけるCDC A 1遺伝子の発現レベルを、複数の参照試料から決定した複数の対照レベルと比較し得る。対象由来の生物学的試料のものと類似の組織型に由来する参照試料から決定した対照レベルを使用することが好ましい。さらに、疾患状態が既知である集団におけるCDC A 1遺伝子の発現レベルの標準値を使用することが好ましい。標準値は当技術分野において公知の任意の方法によって入手し得る。例えば、平均 \pm 2 S . D . または平均 \pm 3 S . D . の範囲を標準値として使用し得る。

10

【0188】

本発明に関連して、非がん性であることが既知の生物学的試料から決定した対照レベルを「正常対照レベル」と称する。他方で、対照レベルをがん性生物学的試料から決定した場合は、それを「がん性対照レベル」と称する。試料の発現レベルと対照レベルの差は、発現レベルが細胞のがん性または非がん性状態に依存して異なることが公知の対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子の発現レベルに対して基準化することができる。例示的な対照遺伝子には、 α -アクチン、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼおよびリポソームタンパク質P1が含まれるが、これらに限定されない。

【0189】

CDC A1遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比べて増大しているか、またはがん性対照レベルと類似/同等である場合、対象は、治療されるべきがんを有すると診断され得る。

20

より詳細には、本発明は、(i)対象が治療されるべきがんを有するか否かを診断する、および/または(ii)がん治療のための対象を選択する方法であって、

a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるCDC A1の発現レベルを測定する段階；

b) CDC A1の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；

c) CDC A1の発現レベルが正常対照レベルと比較して増大している場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

d) 段階c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階を含む方法を提供する。

30

【0190】

あるいは、そのような方法は、

a) 治療されるべきがんを有することが疑われる対象から得たがん細胞または組織におけるCDC A1の発現レベルを測定する段階；

b) CDC A1の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；

c) CDC A1の発現レベルががん性対照レベルと類似または同等である場合、対象を、治療されるべきがんを有すると診断する段階；および

d) 段階c)において、対象が治療されるべきがんを有すると診断された場合、その対象をがん治療のために選択する段階を含む。

40

【0191】

いくつかの態様において、そのような方法は、上記で定義した段階a)~d)の後または前に、HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2から成る群より選択されるHLAを有する対象を同定する段階をさらに含み得る。本発明によるがん療法は、CDC A1を過剰発現するがん罹患しており、ならびにHLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2のいずれか1つを有する対象にとって好ましい。HLAタイピングの方法は当技術分野において周知である。例えば、HLAアレルをタイピングするためのPCRに基づく方法は周知である。各々のHLA分

50

子に特異的な抗体も、対象のHLA型を同定するための適切なツールである。

【0192】

本発明はまた、本発明のCDCA1ポリペプチドで治療することができるがんに罹患している対象を決定するためのキットも提供し、そのようなキットは、特定のがん療法、より詳細には、がん免疫療法の効果を評価するおよび/またはモニタリングするのにも有用であり得る。適切ながんの説明例には、乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺癌（SCLC）、非小細胞肺癌（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）が含まれるが、これらに限定されない。より詳細には、キットは、好ましくは対象由来のがん細胞におけるCDCA1遺伝子の発現を検出するための少なくとも1つの試薬を含み、そのような試薬は、

10

- (a) CDCA1遺伝子のmRNAを検出するための試薬；
- (b) CDCA1タンパク質を検出するための試薬；および
- (c) CDCA1タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬

の群より選択される。

【0193】

CDCA1遺伝子のmRNAを検出するのに適した試薬の例には、CDCA1 mRNAに特異的に結合するまたはCDCA1 mRNAを同定する核酸、例えばCDCA1 mRNAの一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、CDCA1 mRNAに特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。これらの種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製し得る。必要な場合は、CDCA1 mRNAを検出するための試薬を固体マトリックス上に固定化し得る。さらに、CDCA1 mRNAを検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

20

【0194】

他方で、CDCA1タンパク質を検出するのに適した試薬の例には、CDCA1タンパク質に対する抗体が含まれる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。さらに、抗体の断片または改変された抗体がCDCA1タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変型（例えばキメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv等）を試薬として使用し得る。タンパク質の検出のためのこれらの種類の抗体を調製する方法は当技術分野において周知であり、本発明ではそのような抗体およびその等価物を調製するために任意の方法を使用し得る。さらに、直接結合または間接標識技術により、抗体をシグナル生成分子で標識してもよい。標識、ならびに抗体を標識し、その標的への抗体の結合を検出するための方法は当技術分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明のために利用し得る。さらに、CDCA1タンパク質を検出するための複数の試薬をキットに含めてもよい。

30

【0195】

キットは、前記試薬の複数を含んでもよい。例えば、がんを有さないまたはがん罹患している対象から得た組織試料は、有用な対照試薬として役立ち得る。本発明のキットは、使用のための指示書と共に、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジおよび添付文書（例えば書面、テープ、CD-ROM等）を含む、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。これらの試薬などは、ラベルを付した容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアルおよび試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

40

【0196】

本発明の1つの態様として、試薬がCDCA1 mRNAに対するプローブである場合、少なくとも1つの検出部位を形成するために試薬を多孔性ストリップなどの固体マトリックス上に固定化し得る。多孔性ストリップの測定領域または検出領域は、各々が核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。試験ストリップはまた、陰性対照および/または陽性対照のための部位を含んでもよい。あるいは、対照部位は、試験ストリップから隔てられたストリップ上に配置し得る。場合により、異なる検出部位は異なる量の固定化核

50

酸を含んでもよく、すなわち、第一検出部位ではより高い量を含み、それに続く部位ではより少ない量を含んでもよい。試験試料の添加後、検出可能なシグナルを提示する部位の数により、試料中に存在するCDC A 1 mRNAの量の定量的指標が提供される。検出部位は、任意の適切な検出可能形状に構成することができ、典型的には、試験ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

【0197】

本発明のキットは、陽性対照試料またはCDC A 1標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、CDC A 1陽性試料を採取し、次にそのCDC A 1レベルを検定することによって調製し得る。あるいは、精製されたCDC A 1タンパク質またはポリヌクレオチドを、CDC A 1を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはCDC A 1標準試料を形成してもよい。本発明では、精製CDC A 1は組換えタンパク質であり得る。陽性対照試料のCDC A 1レベルは、例えばカットオフ値を上回る。

10

【0198】

XI. 抗体:

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は、本発明のペプチドに特異的に結合し、他のペプチドには結合しない（または弱く結合する）。あるいは、抗体は、本発明のペプチドならびにそのホモログに結合する。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断アッセイおよび予後判定アッセイならびに画像化法において使用され得る。同様に、そのような抗体は、CDC A 1ががん患者において発現されるまたは過剰発現される限り、他のがんの治療、診断および/または予後判定において使用され得る。さらに、細胞内で発現される抗体（例えば一本鎖抗体）は、CDC A 1の発現が関与するがんを処置する際に治療的に使用され得、その例には、乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺がん（SCLC）、非小細胞肺がん（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0199】

本発明はまた、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列から成るポリペプチドを含むCDC A 1タンパク質（配列番号：10）またはその断片の検出および/または定量化のための様々な免疫学的アッセイも提供する。そのようなアッセイは、適宜に、CDC A 1タンパク質またはその断片を認識し、結合することができる1つまたは複数の抗CDC A 1抗体を含み得る。本発明において、CDC A 1ポリペプチドに結合する抗CDC A 1抗体は、好ましくは他のペプチドを排除して、好ましくは配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列から成るポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は阻害試験で確認することができる。すなわち、分析する抗体と全長CDC A 1ポリペプチドの間の結合が配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有する任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、抗体は断片に「特異的に結合する」とみなされる。本発明に関連して、そのような免疫学的アッセイは、様々なタイプの放射免疫測定法、免疫クロマトグラフィ技術、固相酵素免疫検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光検定法（ELIFA）等を含むがこれらに限定されない、当技術分野において周知の様々な免疫学的アッセイ形式内で実施される。

30

【0200】

本発明の関連する免疫学的であるが抗体を使用しないアッセイには、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）ならびにMHC結合アッセイも含まれ得る。加えて、本発明の標識抗体を用いたラジオシンチグラフィ画像化法を含むがこれに限定されない、CDC A 1を発現するがんを検出することができる免疫学的画像化法も本発明によって提供される。そのようなアッセイは、CDC A 1を発現するがんの検出、モニタリングおよび予後診断において臨床的に使用することができ、そのようながんの例には、乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺がん（SCLC）、非小細胞肺がん（NSCLC）および頭頸部がん（HNC）が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0201】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体も提供する。本発明の抗体は、モノク

50

ローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で使用することができ、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することによって得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナルおよびモノクローナル抗体、ヒト抗体ならびに遺伝的組換えによって作製されるヒト化抗体を包含する。

【0202】

抗体を得るための抗原として使用する本発明のペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくはヒト、マウスまたはラットなどの哺乳動物、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のペプチドは、本明細書で開示するヌクレオチドまたはアミノ酸配列から入手し得る。

本発明によれば、本発明のポリペプチドの完全なペプチドおよび部分ペプチドは免疫化抗原として役立つ。適切な部分ペプチドの例には、例えば本発明のペプチドのアミノ(N)末端断片またはカルボキシ(C)末端断片が含まれる。

【0203】

本明細書では、抗体は、全長CDCA1ペプチドまたはCDCA1ペプチドの断片のいずれかと反応するタンパク質と定義される。好ましい態様では、本発明の抗体は、配列番号：1および2の中から選択されるアミノ酸配列を有するCDCA1の断片ペプチドを認識することができる。オリゴペプチドを合成する方法は当技術分野において周知である。合成後、ペプチドを、場合により免疫原として使用する前に精製してもよい。本発明では、オリゴペプチド(例えば24merまたは26mer)を、免疫原性を増強するために担体と複合化または連結してもよい。キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)は担体として周知である。KLHとペプチドを複合化する方法も当技術分野において周知である。

【0204】

あるいは、本発明のペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに挿入してもよく、次にそれを使用して本明細書で述べるような宿主細胞を形質転換する。所望のペプチドまたはその断片を任意の標準的な方法によって宿主細胞の外部または内部から回収することができ、その後抗原として使用し得る。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体またはその溶解物または化学合成したペプチドを抗原として使用してもよい。

【0205】

任意の哺乳動物を抗原で免疫し得るが、好ましくは細胞融合のために使用する親細胞との適合性を考慮に入れる。一般に、げっ歯目(Rodentia)、ウサギ目(Lagomorpha)または霊長目(Primate)科の動物を使用し得る。げっ歯目科の動物には、例えばマウス、ラットおよびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目科の動物には、例えばカニクイザル(Macaca fascicularis)、アカゲザル、マントヒヒおよびチンパンジーなどの狭鼻下目(Catarrhini)のサル(旧世界ザル)が含まれる。

【0206】

抗原で動物を免疫する方法は当技術分野において公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射が哺乳動物の免疫のための標準的な方法である。より詳細には、抗原を適切な量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、生理食塩水等に希釈し、懸濁し得る。所望する場合は、抗原懸濁液を適切な量の標準的なアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化して、その後哺乳動物に投与してもよい。好ましくは、それに続いて、適切な量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を4~21日ごとに数回投与する。適切な担体も免疫のために使用し得る。上記のように免疫した後、血清を、所望抗体の量の増加に関して標準的な方法によって検査し得る。

【0207】

本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、血清中の所望抗体の増加に関して検査した免疫哺乳動物から血液を採取し、任意の従来の方法で血液から血清を分離することによって調製し得る。ポリクローナル抗体には、ポリクローナル抗体を含有する血清、ならびに血清から単離し得るポリクローナル抗体を含有する画分が含まれる。免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ンGまたはMは、例えば本発明のペプチドと結合したアフィニティカラムを用いて本発明のペプチドだけを認識する画分から調製することができ、プロテインAまたはプロテインGカラムを用いてこの画分をさらに精製し得る。

【0208】

本発明に関する使用のためのモノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を採取し、上述したように血清中の所望抗体のレベル上昇を検査して、細胞融合に供する。細胞融合に使用する免疫細胞は、好ましくは脾臓から得られる。上記免疫細胞と融合させる他の好ましい親細胞には、例えば哺乳動物の骨髄腫細胞、より好ましくは薬剤による融合細胞の選択のための獲得特性を有する骨髄腫細胞が含まれる。

上記免疫細胞と骨髄腫細胞を公知の方法に従って、例えばMilstein et al.の方法(Galfrè and Milstein, Methods Enzymol 73:3-46(1981))に従って融合させることができる。

【0209】

生じる細胞融合によって得られたハイブリドーマは、それらを標準的な選択培地、例えばHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン含有培地)で培養することによって選択し得る。細胞培養を、典型的には数日間から数週間、すなわち所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞(非融合細胞)を死滅させるのに十分な時間、HAT培地中で継続する。その後、標準的な限界希釈を実施して、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、クローン化し得る。

【0210】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記方法に加えて、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したものをインビトロでペプチド、ペプチド発現細胞またはそれらの溶解物で免疫し得る。次に、免疫したリンパ球を、U266などの無限に分裂することができるヒト由来骨髄腫細胞と融合させて、ペプチドに結合することができる所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを生成し得る(特開昭63-17688号)。

【0211】

得られたハイブリドーマを、その後マウスの腹腔に移植し、腹水を抽出し得る。得られたモノクローナル抗体を、例えば硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィまたは本発明のペプチドを結合させたアフィニティカラムによって精製することができる。本発明の抗体は、本発明のペプチドの精製および検出に使用できるだけでなく、本発明のペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても用いることができる。

あるいは、抗体を産生する、免疫リンパ球などの免疫細胞をがん遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体を調製するために使用してもよい。

【0212】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子工学技術を用いて組換えによって調製することもできる(例えばBorrebäck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by Macmillan Publishers LTD(1990)参照)。例えば、抗体をコードするDNAを免疫細胞、例えば抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫リンパ球などからクローン化し、適切なベクターに挿入して、宿主細胞に導入し、組換え抗体を調製し得る。本発明はまた、上述したように調製される組換え抗体も提供する。

【0213】

本発明の抗体は、抗体の断片または修飾された抗体が本発明のペプチドの1つまたは複数に結合する限り、抗体の断片または修飾された抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖とL鎖からのFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であり得る(Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-83(1988)

10

20

30

40

50

))。より詳細には、抗体断片は、抗体をパepsinまたはペプシンなどの酵素で処理することによって生成し得る。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入して、適切な宿主細胞において発現させてもよい(例えばCo et al., J Immunol 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178:497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121:652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9:132-7(1991)参照)。

10

【0214】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)などの様々な分子との結合によって修飾し得る。本発明はそのような修飾された抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得られ得る。これらの修飾方法は当技術分野において慣例的である。

【0215】

あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体由来の相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR)および定常領域を含むヒト化抗体として入手し得る。そのような抗体は公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、げっ歯動物のCDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置き換えることによって実施できる(例えばVerhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988))。したがって、そのようなヒト化抗体は、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ない部分が非ヒト種からの対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。

20

【0216】

ヒトフレームワーク領域および定常領域に加えてヒト可変領域を含む完全ヒト抗体も使用できる。そのような抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を用いて作製することができる。例えば、インビトロ法は、バクテリオファージ上に提示されるヒト抗体断片の組換えライブラリの使用を含む(例えばHoogenboom & Winter, J Mol Biol 227:381(1991)参照)。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスに導入することによって作製できる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号;同第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号に記載されている。

30

【0217】

上述したようにして得られた抗体を均一に精製し得る。例えば、抗体の分離および精製は、一般的なタンパク質に用いられる分離および精製方法に従って実施できる。例えば、抗体を、アフィニティークロマトグラフィ、フィルター、限外ろ過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動などの、しかしこれらに限定されないカラムクロマトグラフィの適切に選択し、組み合わせた使用によって分離および単離し得る(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティカラムとして使用することができる。使用される例示的なプロテインAカラムには、例えばHyper D、POROSおよびSephacrose F.F.(Pharmacia)が含まれる。

40

【0218】

適切なクロマトグラフィ技術の例には、アフィニティークロマトグラフィを除いて、例えばイオン交換クロマトグラフィ、疎水性クロマトグラフィ、ゲルろ過、逆相クロマトグラ

50

フィ、吸着クロマトグラフィ等が含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Mars hak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィ手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィによって実施することができる。

【0219】

例えば、吸光度の測定、固相酵素免疫検定法 (ELISA)、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA) および / または免疫蛍光法を用いて本発明の抗体の抗原結合活性を測定し得る。ELISAでは、本発明の抗体をプレートに固定化し、本発明のペプチドをプレートに塗布して、次に所望の抗体を含有する試料、例えば抗体産生細胞の培養上清または精製抗体を適用する。その後、一次抗体を認識する、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体を適用し、プレートをインキュベートする。次に、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質をプレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。C末端またはN末端断片などのペプチドの断片を、抗体の結合活性を評価するための抗原として使用し得る。BIACore (Pharmacia) を、本発明による抗体の活性を評価するために使用してもよい。

10

【0220】

上記方法は、本発明の抗体を、本発明のペプチドを含むと推測される試料に曝露し、抗体とペプチドによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、本発明のペプチドの検出または測定を可能にする。

20

本発明によるペプチドの検出または測定の方法は、ペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法はペプチドを用いる様々な実験で使用することができる。

【0221】

XII. ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドを導入するベクターおよび宿主細胞も提供する。本発明のベクターは、本発明のペプチドを発現するためまたは遺伝子治療のために本発明のヌクレオチドを投与するための、宿主細胞における本発明のヌクレオチド、特にDNAの担体として有用である。

30

【0222】

大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌 (例えばJM109、DH5、HB101またはXL1Blue) において大量に増幅し、生産する場合、ベクターは、大腸菌における増幅に適した「複製起点 (ori)」および形質転換した大腸菌を選択するのに適したマーカー遺伝子 (例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等のような薬剤によって選択される薬剤耐性遺伝子) を有するべきである。例えば、M13シリーズのベクター、pUCシリーズのベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script等が使用できる。加えて、pGEM-T、pDIRECTおよびpT7も、上述したベクターと同様に、cDNAをサブクローニングし、抽出するために使用できる。本発明のタンパク質を生産するためにベクターを使用する場合は、発現ベクターが使用できる。例えば、大腸菌で発現される発現ベクターは、大腸菌において増幅される上記特徴を有するべきである。JM109、DH5、HB101またはXL1Blueなどの大腸菌を宿主細胞として使用する場合、ベクターは、大腸菌において所望の遺伝子を効率的に発現することができるプロモーター、例えばlacZプロモーター (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989)); FASEB J 6: 2422-7 (1992)、araBプロモーター (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988))、T7プロモーター等を有するべきである。その点に関して、pGEX-5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpress system」(Qiagen)、pEGFPおよびpET (この場合、宿主は、好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するB

40

50

L21である)が、例えば、上記ベクターの代わりに使用できる。加えて、ベクターはまた、ペプチド分泌のためのシグナル配列も含み得る。ペプチドが大腸菌のペリプラズムに分泌されるように指令する例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列である(Leiet al., J Bacteriol 169:4379(1987))。ベクターを標的宿主細胞に導入するための手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

【0223】

大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター(例えばpcDNA3(Invitrogen)およびpEGF-BOS(Nucleic Acids Res 18(17):5322(1990))、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えばpHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えばpZIpneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば「Pichia Expression Kit」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)ならびに枯草菌(Bacillus subtilis)由来の発現ベクター(例えばpPL608、pKTH50)が、本発明のポリペプチドを生産するために使用できる。

10

【0224】

CHO、COSまたはNIH3T3細胞などの動物細胞においてベクターを発現するために、ベクターは、そのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulligan et al., Nature 277:108(1979))、MMLV-LTRプロモーター、EF1プロモーター(Mizushima et al., Nucleic Acids Res 18:5322(1990))、CMVプロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子(例えば、薬剤(例えばネオマイシン、G418)によって選択される薬剤耐性遺伝子)を担持すべきである。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSVおよびpOP13が含まれる。

20

【0225】

以下では、特定の実施例を参照して本発明をより詳細に説明する。しかし、以下の実験材料、方法および実施例は、当業者が本発明の特定の態様を作製し、使用することを助けるのに役立つが、本発明の態様を例示することだけを意図し、したがっていかなる意味でも本発明の範囲を限定するものではない。当業者は容易に認識するように、本明細書で述べるものと類似または等価の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

30

【実施例】

【0226】

材料および方法

細胞株および抗体

TAP欠損およびHLA-A2陽性細胞株T2をRiken Cell Bankから購入した。抗原提示細胞(APC)として、DR1(DRB1*01:01);L-DR1、DR4(DRB1*04:05);L-DR4、DR8(DRB1*08:03);L-DR8、DR15(DRB1*15:02);L-DR15またはDR53(DRB4*01:03);L-DR53のいずれかを発現するように遺伝的に操作されたマウス線維芽細胞株であるL細胞を使用した。微量の内因性HLAクラスI分子を発現するヒトBリンパ芽球様細胞株C1RのHLA-A24形質転換体であるC1R-A2402細胞は、滝口雅文博士(熊本大学、熊本、日本)より贈られた。T2細胞およびC1R-A2402細胞を標的細胞として使用した。これらの細胞を、37、5%CO₂雰囲気、10%FCSを添加したDMEM(L細胞)またはRPMI 1640(T2およびC1

40

50

R - A 2 4 細胞) 中にインビトロで維持した。

【0227】

患者

2つのペプチドワクチン治験に登録した19名のHNC患者から血液試料を採取し、CDCA1-LPに反応性のTh細胞の免疫応答を調べた。がん精巢抗原に由来する3つのHLA-A24結合SP(臨床グレードの9~10アミノ酸長ペプチド)、CDCA1(CDCA1-A24(56-64)、本試験で報告した、図1)、IMP-3(IMP-3-A24(508-516))およびLY6K(LY6K-A24(177-186))(Suda T, et al. Cancer Sci 2007; 10: 1803-8)を用いたがん免疫療法のこれらの第I/II相臨床試験は、熊本大学(熊本、日本)の治験審査委員会によって審査され、承認された。ペプチド(各抗原1mg)をMontanide ISA51 500µL中に乳化し、0、7、14、28、42、56、63および70日目、その後は腫瘍の進行または毒性が観察されるまで月に1回、皮下(s.c.)注射する。すべてのHNC患者を、書面によるインフォームドコンセントを得た後、HLA-A24の保有に基づいて選択した。患者は、再発性または転移性腫瘍を有する手術不可能な進行HNCに罹患しており、標準的な治療に抵抗性であった;これらの患者を大学病院医療情報ネットワーク臨床試験登録システム(UMIN-CTR)番号000008379(CTR-8379)の下で治験に登録した。根治的切除術を受けたHNC患者は、UMIN-CTR番号000008380(CTR-8380)の下で治験に登録した。後者の治験では、HNC患者を、S-1、イフォスファミドまたはドキシソルピシンと組み合わせた術後ペプチドワクチン免疫療法で治療した。これらの臨床試験および解析は進行中である。

10

20

【0228】

HLAクラスII結合ペプチドのアルゴリズムによる予測

潜在的なプロミスキャスHLA-DRまたはHLA-DPに結合するヒトCDCA1由来ペプチドを予測するため、コンピュータアルゴリズム(IEBD解析リソース、コンセンサス法、http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html)を用いてヒトCDCA1タンパク質のアミノ酸配列を解析した(Wang P et al. BMC Bioinformatics; 11: 568., Wang P et al. PLoS Comput Biol 2008; 4: e1000048)。プログラムは、タンパク質全体を包含する15アミノ酸長配列のオフセットを解析した。DRB1*04:05、DRB1*15:02またはDPB1*02:01アリルによってコードされる複数のHLAクラスII分子についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセントイル順位を有し、かつCDCA1由来の9merCTLエピトープを天然に含む24および26アミノ酸長ペプチドを選択し、合成して、CTLエピトープを含むプロミスキャスなヘルパーT細胞エピトープを同定した(Harao M, et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616-25)。

30

【0229】

合成ペプチドおよび組換えタンパク質

HLA-A2に結合する、CDCA1-A2(65-73)、YMMPVNSEV(配列番号:3);CDCA1-A2(351-359)、KLATAQFKI(配列番号:4)、およびHLA-A24に結合する、CDCA1-A24(56-64)、VYGI RLEHF(配列番号:5)の3つのヒトCDCA1由来短鎖ペプチド(SP)を合成した(純度>95%、Biomatik, Canada)。2つのオーバーラップする長鎖ペプチド(LP)である、CDCA1(55-78)、IVYGI RLEHFYMMPVNSEVMYPHL(配列番号:1);CDCA1(39-64)、NPKPEVLHMIYMRA LQIVYGI RLEHF(配列番号:2)を合成し(純度>90%)、CDCA1特異的ヒトCD4⁺T細胞をインビトロで刺激するその能力に関して試験した。HLA-A24(HIV-A24、RYLRDQQLL(配列番号:6))およびHLA-

40

50

A 2 (HIV - A 2、S L Y N T Y A T L (配列番号：7)) に結合する2つのHIVペプチドを陰性対照SPとして使用した (Tomita Y, et al. Cancer Sci; 102: 697 - 705., Tomita Y et al. Cancer Sci; 102: 71 - 8)。LPである、DR4に結合するWT1由来ペプチド、WT1ペプチド (K R Y F K L S H L Q M H S R K H (配列番号：8)) を陰性対照LPとして使用した (Fujiki F et al. J Immunother 2007; 30: 282 - 93)。ペプチドを10 μ g / μ Lまたは20 μ g / μ Lの濃度でジメチルスルホキシドに溶解し、-80 で保存した。

6Hisタグ組換え全CDCA1タンパク質ならびにCDCA1 (55 - 78) およびCDCA1 (39 - 64) 特異的Th細胞によって認識される両方のCDCA1由来Thエピトープを欠く切断型CDCA1タンパク質を、それぞれのcDNA断片を有するpET28aベクター (Novagen) を用いて大腸菌BL21株によって発現させた。切断型CDCA1タンパク質を対照タンパク質として使用した。各々の組換えタンパク質を、HisTrap FFカラム (GE Healthcare) を製造者の使用説明書に従って用いて精製した。タンパク質の純度をSDS - PAGEによって確認した。

【0230】

TAA特異的CD4⁺T細胞株およびクローンの作製

健常ドナーから末梢血単核細胞 (PBMC) を採取し、使用するための研究プロトコルは、熊本大学の治験審査委員会によって承認された。本発明者らは、12名の健常ドナーから、書面によるインフォームドコンセントを得た後で血液試料を得た。この試験で検討した健常ドナーのHLA - A、DRB1およびDPB1アレルを、ポリメラーゼ連鎖反応およびアレル特異的プローブハイブリダイゼーションを用いてHLA遺伝子変異のDNAタイピングによって決定し、表1に示す。健常ボランティアからのPBMCを以前に述べられているように (Inoue M, et al. Int J Cancer; 127: 1393 - 403) 単離した。CD4⁺T細胞を、抗CD4モノクローナル抗体 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) と結合した磁気マイクロビーズを用いて陽性選択によってPBMCから精製した。単球由来の樹状細胞 (DC) を、以前に述べられているように (Harao M, et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616 - 25) インビトロ培養によってCD14⁺細胞から生成し、抗原提示細胞 (APC) として使用して、TAA特異的CD4⁺T細胞を誘導した。DC (1 \times 10⁴ / ウェル) を10 μ g / mlのLPで3時間パルスし、照射して (45 Gy)、その後96ウェル平底培養プレートの各ウェルにおいて5%ヒト補体除去血漿を添加したAIM - V 200 μ l中の自己CD4⁺T細胞 (3 \times 10⁴ / ウェル) と混合した。7日後、培地の半分を各培養物から取り出し、次に、ペプチド (10 μ g / ml) および5 ng / mlのヒト組換え (hr) IL - 7でパルスした、照射した (50 Gy) 自己PBMC (1 \times 10⁵) を含む新鮮培地 (100 μ l / ウェル) を培養物に添加した。ペプチドでの2回目の刺激の2日後に、hr IL - 2を10 IU / mlの最終濃度で各ウェルに添加した。1週間後、各ウェル中の刺激したCD4⁺T細胞を、酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイにおいて特異性について分析した。コグネイトペプチドに特異的応答を示すT細胞を24ウェルプレートに移し、10 IU / mlのhr IL - 2および5 ng / mlのhr IL - 7を添加した培地中、ペプチド (10 μ g / ml) でパルスした照射自己PBMC (1 \times 10⁶ / ウェル) を用いて週1回の間隔で再刺激した。一部の場合は、以前に述べられているように (Tabata H et al. Hum Immunol 1998; 59: 549 - 60) さらなる試験のためにT細胞を限界希釈によってクローン化した。

【0231】

【表1】
 健常ドナーのHLA-A、HLA-DR、およびHLA-DP遺伝子型

	HLA-A 遺伝子型	HLA-DRB1 遺伝子型	HLA-DPB1 遺伝子型
ドナー HD1	A*02:01/02:06	DRB1*04:05/09:01/DR53	DPB1*02:01/DPB1*04:02
ドナー HD2	A*24:02/-	DRB1*08:02/15:02	DPB1*05:01/09:01
ドナー HD3	A*11:01/A31:01	DRB1*08:03/15:02	DPB1*02:01/09:01
ドナー HD4	n.t.	DRB1*01:01/04:05/DR53	DPB1*05:01/09:01
ドナー HD5	A*24:02/A02:01	DRB1*04:05/DR53	DPB1*05:01/-
ドナー HD6	A*02:06/A31:01	DRB1*04:01/09:01/DR53	DPB1*02:01/-
ドナー HD7	n.t.	DRB1*04:06/DR*08:03	DPB1*02:01/04:02
ドナー HD8	A*24:02/31:01	DRB1*08:03/14:05	DPB1*02:02/05:01
ドナー HD9	A*26:01/33:03	DRB1*04:05/13:02	DPB1*04:01/09:01
ドナー HD10	A*26:01/-	DRB1*04:10/08:02	DPB1*02:01/05:01
ドナー HD11	A*31:01/33:03	DRB1*09:01/13:02	DPB1*03:01/04:01
ドナー HD12	A*01:01/68:01	DRB1*07:01/13:02	DPB1*02:01/04:01

10

HLA, ヒト白血球抗原; n. t., 試験せず

【0232】

ペプチドおよびタンパク質に対するT細胞応答の評価

ペプチドおよびタンパク質でパルスしたAPCに対するTh細胞の免疫応答を、以前に述べているように(Tomita Y et al. Cancer Sci; 102: 697-705) IFN-ELISPOTアッセイ(Human IFN-ELISPOTキット、BD Biosciences)によって評価した。簡単に述べると、ペプチドでパルスしたPBMC (3×10^4 / ウェル)での刺激後の 3×10^4 のバルクCD4⁺T細胞、またはペプチドでパルスしたHLA-DRを発現するL細胞 (5×10^4 / ウェル)での刺激後の 1×10^4 のバルクCD4⁺T細胞当たりの、インターフェロン(IFN)を産生するペプチド特異的CD4⁺T細胞の頻度を分析した。ペプチドでパルスしたT2細胞 (2×10^4 / ウェル)での刺激後の 1×10^5 のCTL当たりの、インターフェロン(IFN)を産生する細胞の頻度も分析した。あるいは、タンパク質をロードした 5×10^3 のDCを 2×10^4 CD4⁺T細胞クローン/ウェルと共培養した。タンパク質をロードした成熟DCを、以前に述べているように(Harao M, et al. Int J Cancer 2008; 123: 2616-25)ポジティブ単離したCD14⁺細胞(0日目)から調製した。5日目に、組換えCDCA1 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)およびOK432の存在下でDCを培養した。タンパク質をロードした成熟DCを7日目に回収し、洗浄して、IFN-ELISPOTアッセイにおける刺激物質として使用した。抗原提示に関与する拘束HLA分子を決定するため、抗原誘導性IFN-産生のブロックングを、抗HLA-DR mAb (L243、Biolegend)、抗HLA-DP mAb (B7/21、abcam)、抗ヒトHLA-DQ mAb (SPV-L3、abcam)または抗HLAクラスI mAb (W6/32、abcam)を添加することによって検査した。すべてのmAbを $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で使用した。IFN-ELISPOTアッセイのすべての評価は2連または3連で実施し、結果は平均値に対応した。

20

30

40

【0233】

ペプチド ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) でまたはCDCA1タンパク質をロードしたヒトDC ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) でパルスしたPBMC、L細胞およびマウスBM-DCに対するT細胞の免疫応答を、製造者の使用説明書に従っておよび以前に述べているように(Zarour HM et al., Cancer Res 2000; 60: 4946-52)、IFN-ELISPOTアッセイ(BD Biosciences, San Jose, CA)によって評価した。簡単に述べると、ペプチドでパルスしたPBMC (3×10^4 / ウェル)、L細胞 (5×10^4 / ウェル)、T2細胞 (2×10^4 / ウェル)、

50

C1R-A24細胞 (2×10^4 / ウェル)、骨髄由来DC (BM-DC、 2×10^4 / ウェル)、またはタンパク質をロードしたDC (5×10^3 / ウェル)を、APCまたは標的細胞としてELISPOTプレートに3連または2連で接種した。抗原提示に關与するHLA分子を決定するため、抗原誘導性IFN- γ 産生を、APCまたは標的細胞の接種後に抗HLA-DRモノクローナル抗体 (mAb) (L243、BioLegend)、抗HLA-DP mAb (B7/21、Abcam)、抗ヒトHLA-DQ mAb (SPV-L3、Abcam)、または抗HLAクラスI mAb (W6/32、Abcam)を添加することによってブロックした。すべてのmAbを $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で使用した。APCまたは標的細胞をmAbと共に室温で1時間インキュベートした。次に、応答T細胞を回収し、洗浄して、図面に示されている数でELISPOTプレートに移した。18時間のインキュベーション後、スポット数を計数した。HIV-A2、HIV-A24またはWT1由来LPを陰性対照ペプチドとして使用した。一部の実験では、パルスしていないPBMCまたはL細胞を陰性対照として使用した。PMA ($100 \text{ ng}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich)およびイオノマイシン ($500 \text{ ng}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich)と共に培養した細胞をIFN- γ ELISPOTアッセイのすべての評価において陽性対照として使用した。結果を平均 \pm SDとして示す。

10

【0234】

HNC患者に關するELISPOTアッセイにおいて、CDCA1-LPとの1週間の細胞培養後に、細胞を採取し、洗浄して、ELISPOTプレート (1×10^5 / ウェル)においてCDCA1 (55-78)-LP、CDCA1 (39-64)-LPまたは対照LP (HIV-LP)と共に18時間培養した。スポット形成細胞/ 10^5 細胞として表したCDCA1-LP特異的Th細胞の数を、対照値 (バックグラウンド)を差し引いた後に算出した。IFN- γ スポットの平均数が15より多く、バックグラウンドの2倍を上回る場合は、応答を陽性と採点した。HNC患者の細胞に關するELISPOTアッセイは、使用可能な細胞の数が限られていたため、1連、2連または3連のウェルで実施した。

20

【0235】

健常ドナーにおけるCDCA1 (55-78)-LPでの刺激によるCDCA1-A24 (56-64)SP特異的CTLの増殖

A: CDCA1-A24 (56-64)SPでの精製CD8⁺T細胞の刺激によるCDCA1-A24 (56-64)SP反応性CTLの誘導を、以前に述べられているように実施した。(Tomita Y, et al. Cancer Sci 2011; 102: 71-8, Imai K, et al. Clin Cancer Res 2008; 14: 6487-95) CDCA1 (55-78)-LPでパルスしたDCでの刺激によるCDCA1-A24 (56-64)SP特異的CTLの増殖能力を評価するため、HLA-A24⁺ドナーから得たCDCA1-A24 (56-64)SP特異的バルクCTL (HD2; 2×10^6 / ウェル、24ウェルプレート、HD5; 2×10^5 / ウェル、48ウェルプレート)を、 $16 \mu\text{M}$ CDCA1 (55-78)-LPまたは対照LPでパルスした自己DC (HD2; 2×10^5 / ウェル、HD5; 5×10^4 / ウェル)で刺激した。LPでパルスした成熟DC (3時間)を照射し、洗浄して、その後抗原提示細胞 (APC)として使用した。1日目と7日目に、rhIL2 ($20 \text{ IU}/\text{mL}$)およびrhIL-7 ($5 \text{ ng}/\text{mL}$)を添加した。HD2およびHD5からCTLを樹立した後、それらの認識特異性および細胞傷害活性を以下のプロトコル (B) および (C) によってそれぞれ評価した。

30

40

【0236】

B (HD2); LP刺激の前 (0日目)ならびに刺激後5、7、8および10日目に、培養した細胞のアリコート (1×10^5 細胞)を、FITC標識抗ヒトCD8 mAb (クローンT8、Beckman Coulter, Brea, CA)とHLA-A*24:02/CDCA1-A24 (56-64)複合体のPE標識テトラマー (MBL、名古屋、日本)で染色した。HLA-A24 (A*24:02) / HIV-A24 (RYLR

50

D Q Q L L ; 配列番号 : 6) 複合体の P E 標識テトラマーを陰性対照として使用した。

【 0 2 3 7 】

C (H D 5) ; 1 週間の細胞培養後、細胞を回収し、洗浄して、E L I S P O T プレート (1×10^5 / ウェル) において 1 8 時間培養した。C D C A 1 - A 2 4 _{5 6} - 6 4 S P でパルスしたまたは H I V - A 2 4 S P (バックグラウンド) でパルスした C 1 R - A 2 4 0 2 細胞 (2×10^4 / ウェル) で刺激した後の I F N - 産生 C D 8 ⁺ T 細胞の数を E L I S P O T アッセイによって計数した。 (D o b r z a n s k i M J . e t a l . F r o n t i e r s i n o n c o l o g y 2 0 1 3 ; 3 : 6 3) スポット形成細胞 / 10^5 細胞として表した C D C A 1 - A 2 4 _{5 6} - 6 4 S P 特異的 C D 8 ⁺ T 細胞の数を、対照値 (バックグラウンド) を差し引いた後に算出した。H I V - A 2 4 S P を陰性対照 S P として使用した。

10

【 0 2 3 8 】

C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P でワクチン接種した H N C 患者における C D C A 1 - L P での刺激による C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P 特異的 C T L の増殖
C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P でワクチン接種した 5 名の H N C 患者 (H N C 2 6 、 2 9 、 3 1 、 3 9 、 1 0 9) からの P B M C を、2 4 ウェルプレート (2×10^6 / ウェル) において C D C A 1 (5 5 - 7 8) - L P と C D C A 1 (3 9 - 6 4) - L P の混合物 (各々 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$) と共に培養し、0 日目と 2 日目に r h I L - 2 および r h I L - 7 を添加した。0 日目 (エクスピボ) および 7 日目に、P B M C を C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) 特異的テトラマーで染色した。

20

【 0 2 3 9 】

サイトカインアッセイ

T 細胞 (1×10^4 / ウェル) を、9 6 ウェル培養プレートにおいて C D C A 1 (5 5 - 7 8) の存在下で L - D R 4 (5×10^4 / ウェル) と共に培養した。2 0 時間後、培養上清を採取し、サイトカイン (I F N - 、 G M - C S F 、 T N F - 、 M I P 1 、 I L - 4 、 I L - 1 7) レベルを、B i o - P l e x システム (B i o - R a d) を製造者の使用説明書に従って使用して測定した。

【 0 2 4 0 】

C D 1 0 7 a 動員アッセイ

ペプチドで刺激された脱顆粒 C D 8 ⁺ または C D 4 ⁺ T リンパ球を同定するため、細胞表面に露出された C D 1 0 7 a をフローサイトメトリによって分析した。 (R u b i o V e t a l . N a t M e d 2 0 0 3 ; 9 : 1 3 7 7 - 8 2 . , B e t t s M R , e t a l . J I m m u n o l M e t h o d s 2 0 0 3 ; 2 8 1 : 6 5 - 7 8) 簡単に述べると、C D 1 0 7 a 動員アッセイを以前に述べられているように実施した。 (T o m i t a Y e t a l . C a n c e r S c i . 2 0 1 1 J a n ; 1 0 2 (1) : 7 1 - 8) C D C A 1 由来ペプチドまたは対照ペプチド ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$) を刺激剤として添加し、F I T C 標識抗ヒト C D 1 0 7 a m A b または F I T C 標識アイソタイプ対照マウス I g G 1 およびモネンシンを各ウェルに添加した。細胞を 3 7 で 5 時間培養した。培養後、ペプチドで刺激した T h 細胞または C T L を P E 結合抗ヒト C D 4 抗体 (e B i o s c i e n c e , S a n D i e g o , C A) および P E 結合抗ヒト C D 8 抗体 (B i o l e g e n d) でそれぞれ染色し、フローサイトメトリ (F A C S c a n ; B D B i o s c i e n c e s) によって分析した。

30

40

【 0 2 4 1 】

インビトロ交差提示アッセイおよびヒト C T L 応答分析

H L A - A 2 4 ⁺ ドナー (H D 2) 由来の D C を、生存状態に保持するかまたは 0 . 1 % グルタルアルデヒド (S i g m a - A l d r i c h) 中で 3 分間固定し、ペプチド ($16 \mu\text{M}$) で 3 時間パルスして、3 回洗浄した。ペプチドパルスの間およびパルス後に O K 4 3 2 (0 . 1 K E / m L 、 中外製薬、東京、日本) を添加し、D C の成熟を誘導した。C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) 反応性バルク C T L を、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のプレフェルジン A (S i g m a - A l d r i c h) を含む培地中に 2 : 1 の比率で 6 時間添加した。

50

ブレフェルジン A は、刺激の間のタンパク質分泌を阻害するために添加した。CDCA1-A24 (56-64) 特異的 CTL による IFN- γ 産生を細胞内標識によって測定した。細胞を、PerCP 標識抗ヒト CD8 mAb (BioLegend) および PE 標識 CDCA1-A24 (56-64) 特異的 テトラマーと組み合わせた FITC 標識抗ヒト IFN- γ mAb (BioLegend) で染色した。データの取得は FACSCalibur (BD Biosciences) で実施し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR) を用いてデータファイルを解析した。

【0242】

CDCA1 (55-78) LP の交差提示によるインビトロでの CDCA1-A2 (65-73) SP または CDCA1-A24 (56-64) SP 反応性 CTL の誘導を評価するため、HLA-A2 または A24 陽性ドナーから単離した、CDCA1 (55-78) LP をロードした DC を APC として使用した。CD14⁺ 細胞を単離し (0 日目)、hr IL4 (10 ng/ml) および GM-CSF (100 ng/ml) の存在下で培養した。CDCA1 (55-78) (10 μ g/ml) および OK432 を 5 日目に添加した。LP をロードした成熟 DC を 7 日目に回収し、洗浄して、APC として使用した。HLA-A2 陽性健常ドナーからの、LP をロードした DC でのヒト CD8⁺ T 細胞の刺激を、以前に述べられているように実施した (Imai K, et al. Br J Cancer; 104:300-7)。CDCA1 (55-78) LP をロードした DC での CD8⁺ T 細胞の 3 回の刺激後、CDCA1-A2 (65-73)、HIV-A2 ペプチドでパルスした T2 または CDCA1-A24 (56-64) SP でパルスした C1R-A2402 細胞での刺激後の IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞の数を ELISPOT アッセイによって計数した。

【0243】

インビボ交差提示アッセイ

HLA-A2 (HHD) および HLA-A24 (HHH) トランスジェニックマウス (Tgm) は、F. A. Lemonnier 博士の厚意により提供された。(Firat H, et al. Eur J Immunol 1999; 29:3112-21., Jung KO, et al. J Virol 2012; 86:7616-24)。マウスに、7 日の間隔で、不完全フロイントアジュバント (IFA) 中に乳化した CDCA1-LP 溶液 (HLA-A2 Tgm、50 μ g/マウス; HLA-A24 Tgm、100 μ g/マウス) を尾の基部で皮内注射した。CDCA1 由来 LP での 2 回目または 3 回目のワクチン接種の 7 日後に、CD8⁺ T 細胞を、磁気マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を用いた陽性選択によって鼠径リンパ節から単離した。SP でパルスした BM-DC または C1R-A2402 細胞での刺激に応答した IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞の数をエクスピボ ELISPOT アッセイによって計数した。

【0244】

CDCA1 特異的 CTL の誘導への CDCA1 (55-78) - LP の相乗作用

CDCA1 (55-78) - LP 特異的 Th 細胞クローン (Th クローン) を生成した、HLA-A2⁺/DR4⁺ HD1 から得た PBMC を 24 ウェルプレートに播種し (3 \times 10⁶ /ウェル)、次いで SP 単独 (CDCA1-A2 (351-359)、20 μ g/ml)、SP+LP (CDCA1 (55-78) - LP、20 μ g/ml)、SP+Th クローン (5 \times 10⁵ /ウェル)、または SP+LP+Th クローンを 2 mL の最終容量で添加した。7 日間の培養後、これらのペプチドと IL-2 (20 U/ml) を添加し、次に 9 日目に IL-15 (5 ng/ml) を添加した。11 日目に、FITC 標識抗ヒト CD8 mAb と HLA-A*02:01/CDCA1-A2 (351-359) 複合体の PE 標識 テトラマーで細胞を染色した。溶解活性を標準的なクロム放出アッセイにおいて試験した。(Inoue M et al., Immunol Lett 2009; 126:67-72., Monji M et al., Clin Cancer Res 2004; 10:6047-57)。

【0245】

HD2由来のCDCA1(55-78)LP特異的バルクCD4⁺T細胞(1×10⁵細胞/ウェル、48ウェルプレート)およびCDCA1-A24(56-64)SP特異的バルクCD8⁺T細胞(1×10⁵細胞/ウェル)を、いずれのサイトカインも添加せずに、CDCA1-A24(56-64)SP単独(10μg/mL;SP)、CDCA1-A24₅₆₋₆₄SP+対照LP(各々10μg/mL;対照LP+SP)、またはCDCA1-A24(56-64)SP+CDCA1(55-78)LP(各々10μg/mL;CDCA1(55-78)LP+SP)の存在下で自己DC(2×10⁴細胞/ウェル)と共に培養した。CDCA1-A24(56-64)SPでの刺激によるHLA-A24⁺/DR15⁺ドナー(HD2)からのCDCA1-A24(56-64)SP特異的バルクCTLの誘導を、以前に述べられているように実施した。(Shedlock DJ, Shen H. Science 2003; 300: 337-9)ペプチドとの1週間のインビトロ培養後、培養した細胞を、HLA-A*24:02/CDCA1-A24₅₆₋₆₄複合体(MBL、名古屋、日本)のPE標識テトラマーおよびFITC標識抗ヒトCD8 mAb(BioLegend)で染色した。

10

【0246】

CDCA1-A24(56-64)SPで免疫したHNC患者におけるCDCA1-LP特異的CD4⁺T細胞応答の評価

HNC患者のヘパリン添加血液からのPBMCをフィコール-コンレイ密度勾配遠心分離によって単離した。HNC患者または健常ドナーからの新鮮なPBMCを、5%ヒト補体除去血漿を添加した最終容量2mlのAIM-V中、CDCA1(39-64)-LPとCDCA1(55-78)-LP(各々10μg/mL)の混合物と共に37℃で培養した(2×10⁶/ウェル、24ウェルプレート);IL-2およびIL-7を0日目と2日目に添加した。1週間の細胞培養後、抗原特異的IFN-γ産生T細胞の数をELISPOTアッセイによって計数した。この試験は、探索的研究の原則(exploratory research principles)の下で活動する研究室で行い、研究プロトコルを用いて実施した。本発明者らは、ヒトT細胞アッセイに関する枠組みを報告した「T細胞アッセイについての最小限情報(Minimal Information About T-cell Assay)」(MIATA)の推奨(Britten CM et al., Immunity 2012; 37: 1-2)に同意する。

20

30

【0247】

誘導されたTAA特異的CTLに関するテトラマーアッセイ

CDCA1(55-78)特異的Th細胞クローンを生成したHLA-A2かつDR4陽性健常ドナーHD1からのPBMCを24ウェルプレートに3×10⁶/ウェルの濃度で播種した後、混合SP単独(CDCA1-A2(65-73)+CDCA1-A2(351-359)、それぞれ20μg/ml)、混合SP+CDCA1(55-78)LP(20μg/ml)、混合SP+Thクローン(5×10⁵/ウェル)、または混合SP+CDCA1(55-78)LP+Thクローンを2mlの最終容量で細胞培養物に添加した。7日間の培養後、これらのペプチドとhrIL-2(20U/ml)を添加し、次にhrIL-15(5ng/ml)を9日目に添加した。培養の11日目に、細胞を回収し、FITC標識抗ヒトCD8 mAb(クローンT8、Beckman Coulter, Brea, CA)と組み合わせたHLA-A*02:01/CDCA1-A2(65-73)ペプチド複合体またはHLA-A*02:01/CDCA1-A2(351-359)ペプチド複合体のPE標識テトラマー(MBL、名古屋、日本)で染色し、フローサイトメトリによって分析した。CDCA1(55-78)特異的Th細胞クローンを生成した別のドナーからのPBMCを上記した手順に基づいて試験した。

40

【0248】

統計解析

両側スチューデントt検定(棒グラフ)、フィッシャーの正確確率検定、またはノンパラメトリックのマン-ホイットニーU検定(散布点グラフ)を用いてELISPOTデー

50

タにおける差の統計的有意性を評価した。0.05未満のP値を統計的に有意とみなした。統計解析は、市販の統計ソフトウェアパッケージ (StatView 5.0、Abacus Concepts, Calabasas, CA) を用いて実施した。

【0249】

結果

CDCA1のCTLエピトープを含む潜在的なプロミスキャスHLAクラスII結合ペプチドの予測および選択

CDCA1の潜在的なプロミスキャスHLAクラスII結合Th細胞エピトープを同定するため、本発明者らは、最初に、コンピュータアルゴリズム (Wang P, et al. BMC Bioinformatics; 11:568., Wang P, et al. PLoS Comput Biol 2008; 4:e1000048) を用いてCDCA1のアミノ酸配列を検討した。興味深いことに、本発明者らは、コンピュータアルゴリズムによって強力なプロミスキャスHLAクラスII結合ペプチドと予測されたCDCA1タンパク質配列の1つの領域 (CDCA1 (39-78)) がCTLエピトープに非常に近位であることを見出した (図1)。それゆえ、本発明者らは、複数のHLAクラスII分子、HLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2 (DPB1*02:01) についてオーバーラップする高いコンセンサスパーセントイル順位を有し、かつHLA-A2またはHLA-A24拘束性CTLによって認識される天然の9merペプチドを含む、2つの候補LP (CDCA1 (39-64) およびCDCA1 (55-78)) (図1Aおよび表2) をその後の分析のために選択し、合成した。

10

20

【0250】

【表 2】

CDCA1に由来する長いペプチドのアルゴリズムスコア

アミノ酸 残基の 位置	アルゴリズムスコア		
	HLA-DR4 (DRB1*04:05)	HLA-DR15 (DRB1*15:02)	HLA-DP2 (DPB1*02:01)
39-53	7.0	1.7	29.5
40-54	6.9	1.7	13.0
41-55	2.7	0.5	10.2
42-56	2.6	0.5	10.2
43-57	2.2	0.5	10.2
44-58	2.3	0.5	10.2
45-59	2.3	0.5	10.2
46-60	3.8	0.5	10.2
47-61	3.0	0.5	10.2
48-62	6.0	0.5	11.1
49-63	6.2	0.5	10.2
50-64	8.2	0.5	4.5
51-65	8.2	0.5	4.1
52-66	13.8	0.5	4.2
53-67	14.0	0.5	3.8
54-68	24.4	1.1	4.5
55-69	8.9	1.0	6.0
56-70	8.9	1.0	8.1
57-71	8.9	1.0	11.1
58-72	0.1	1.0	11.4
59-73	0.06	1.0	10.4
60-74	0.04	1.0	12.6
61-75	0.03	1.0	14.7
62-76	0.06	1.4	35.4
63-77	0.1	1.4	30.9
64-78	0.4	1.4	35.3

10

20

示されたHLAクラスII遺伝子型のペプチド結合アルゴリズムスコアは、CDCA1 (39-78) ペプチドの各15アミノ酸の配列について示されている。

30

【0251】

CTLエピトープを天然に含むCDCA1由来のプロミスキヤスなHLAクラスII結合Th細胞エピトープの同定

本発明者らは、これら2つの選択した合成LPがCDCA1特異的Th細胞を生成することができるかどうかを評価した。5名の健常ドナーからのPBMCのCD4⁺T細胞を、週1回の間隔で、CDCA1 (55-78) ペプチドでパルスした自己DCおよびPBMCで刺激した。少なくとも3回の刺激後、培養したCD4⁺Th細胞のCDCA1 (55-78) 特異的応答をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検査した。3名のHLA-DR4陽性の健常ドナーにおいて、生成されたTh細胞株は、CDCA1 (55-78) に応答して有意の量のIFN- γ を産生した (図2AおよびB)。Th細胞株のHLA拘束を明らかにするため、HLA-DRまたはHLA-DPに対するmAbを使用した。CDCA1 (55-78) に対するTh細胞株のIFN- γ 産生は、HLA-DR特異的mAbを添加した場合有意に減少したが、HLA-DP特異的mAbは影響を示さなかった (図2AおよびB)。

40

【0252】

HLA拘束をさらに分析するため、ペプチドでパルスしたL-DR4、L-DR53またはL-DR1細胞に対するTh細胞の反応性を試験した。3名のDR4陽性健常ドナーから生成したバルクTh細胞株は、CDCA1 (55-78) でパルスしたL-DR4細胞を特異的に認識したが、L-DR4細胞、無関係なペプチド (WT1ペプチド) でパルスしたL-DR4細胞、CDCA1 (55-78) ペプチドでパルスしたL-DR53細胞

50

胞またはCDCA1(55-78)でパルスしたL-DR1細胞は認識しなかった。CDCA1(55-78)でパルスしたL-DR0405細胞に対するTh細胞株のIFN- γ 産生は、抗HLA-DR mAb(L243)の添加によって有意に阻害されたが、抗HLAクラスI mAb(W6/32)では阻害されなかった(図3A、BおよびC)。これらの結果は、これらのTh細胞株においてCDCA1(55-78)がHLA-DR4によって提示されることを明らかに示した。

【0253】

CDCA1(55-78)が他のHLAクラスII分子に結合して、Th細胞応答を誘導することができるかどうかを調べるため、HLA-DR4陰性の2名の健常ドナーからのCD4⁺T細胞を、CDCA1(55-78)でパルスした自己DCおよびPBMCで刺激した。HLA-DR15陽性ドナーHD2から生成したTh細胞株は、CDCA1(55-78)でパルスしたPBMCおよびL-DR15細胞に应答して有意の量のIFN- γ を特異的に産生したが、CDCA1(55-78)でパルスしたL-DR8細胞では有意の量のIFN- γ は産生されなかった。CDCA1(55-78)でパルスしたPBMCまたはL-DR15細胞に対するTh細胞株のIFN- γ 産生は、抗HLA-DR mAbの添加によって有意に阻害されたが、HLA-DP、HLA-DQまたはHLA-クラスI特異的mAbでは阻害されなかった(図2Aおよび図3A、B)。これらの結果は、このT細胞株においてCDCA1(55-78)がHLA-DR15によって提示されたことを明らかに示す。

【0254】

CDCA1(55-78)での刺激によってHLA-DP2陽性ドナーHD3から生成されたTh細胞株も、CDCA1(55-78)に应答して有意の量のIFN- γ を特異的に産生し、この応答は抗HLA-DP mAbの添加によって有意に阻害されたが、HLA-DR特異的mAbでは阻害されなかった(図2A)。本発明者らはL細胞にHLA-DP2およびHLA-DR9遺伝子を形質導入しなかったので、APCとして5名の異なるドナーからの同種PBMCを使用して、共通の拘束HLA-DP分子を決定した。ドナーHD3からのこのDP拘束性バルクCD4⁺Th細胞株の限界希釈によってCDCA1(55-78)特異的クローンを得た。その結果として、CDCA1(55-78)特異的クローンは、IFN- γ ELISPOTアッセイにおいてDP2を発現する同種PBMCの存在下でのみCDCA1(55-78)ペプチドに特異的応答を示し、IFN- γ 産生は、抗HLA-DP mAbの添加によって有意に阻害されたが、HLA-DR特異的mAbでは阻害されなかった。これらの結果は、ドナーHD3に由来するDP拘束性Th細胞株がHLA-DP2によって拘束されることを示唆する(図3A、B)。

【0255】

したがって、CDCA1(55-78)はHLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2に結合する能力を有しており、このことはCDCA1(55-78)が日本人群におけるプロミスキャスで高頻度のHLAクラスII分子によって提示されるTh細胞エピトープであることを示唆する。

【0256】

次に、本発明者らは、別のペプチドである、CDCA1(39-64)が特異的Th1細胞を生成することができるかどうかを評価した。2名の健常ドナーからのPBMCのCD4⁺T細胞を、週1回の間隔で、CDCA1(39-64)でパルスした自己DCおよびPBMCで刺激した。培養したCD4⁺Th細胞のCDCA1(39-64)特異的応答をIFN- γ ELISPOTアッセイにおいて検査した。HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR53陽性健常ドナーHD1において、生成されたTh細胞株は、CDCA1(39-64)に应答して有意の量のIFN- γ を産生し(図2C)、この応答は、HLA-DR特異的mAbを添加した場合有意に低減したが、HLA-DP特異的mAbは影響を示さなかった。HLA拘束をさらに分析するため、ペプチドでパルスしたL-DR4およびL-DR53に対するTh細胞の反応性を試験したが、このドナーから生成されたこのDR拘束性バルクCD4⁺Th細胞は、CDCA1(39-64)でパルス

10

20

30

40

50

した L - DR 4 および L - DR 5 3 細胞を認識しなかった（データは示していない）。それゆえ、本発明者らは、この CD 4 + T h 細胞株が H L A - DR 9 拘束性 T h 細胞であると考えた。これを確認するため、この DR 拘束性バルク CD 4 + T h 細胞株の限界希釈によって CD C A 1 (3 9 - 6 4) 特異的クローンを得た。その結果として、T h クローンは、I F N - E L I S P O T アッセイにおいて DR 9 を発現する同種 P B M C の存在下でのみ CD C A 1 (3 9 - 6 4) に特異的応答を示し、I F N - 産生は抗 H L A - D R m A b の添加によって有意に阻害されたが、抗 H L A - D P m A b では阻害されなかった。これらの結果は、この T h クローンが DR 9 によって拘束されることを示した（図 3 D）。

【 0 2 5 7 】

CD C A 1 (3 9 - 6 4) が別の H L A クラス I I 分子に結合し、T h 細胞応答を誘導することができるかどうかを調べるため、H L A - DR 9 陰性健常ドナーからの CD 4 + T 細胞を、CD C A 1 (3 9 - 6 4) でパルスした自己 DC および P B M C で刺激した。CD C A 1 (3 9 - 6 4) での刺激によって生成された T h 細胞は、CD C A 1 (3 9 - 6 4) でパルスした P B M C および L - DR 1 5 細胞に応答して有意の量の I F N - を特異的に産生したが、CD C A 1 (3 9 - 6 4) ペプチドでパルスした L - DR 8 細胞では有意の量の I F N - は産生されなかった。T h 細胞株のこの I F N - 産生は、抗 H L A - DR m A b の添加によって有意に阻害されたが、抗 H L A - D P、抗 H L A - D Q または抗 H L A - クラス I m A b では阻害されなかった（図 2 C および図 3 D）。これらの結果は、この T h 細胞が H L A - DR 1 5 によって拘束されることを示した。

【 0 2 5 8 】

合わせて考慮すると、ここで提示したこれらの結果は、2 つのオーバーラップするペプチド、CD C A 1 (3 9 - 6 4) および CD C A 1 (5 5 - 7 8) が H L A - DR 4、H L A - DR 9、H L A - DR 1 5 および H L A - D P 2 拘束性 T h 細胞を刺激する能力を有することを明らかに示し、これらのペプチドが、プロミスキャスな H L A クラス I I 分子によって T h 細胞に提示され得ることおよび多くの患者のがん免疫療法に使用可能であることを示唆する。

H L A - DR 4、H L A - DR 9、H L A - DR 1 5 および H L A - D P 2 拘束性 T h 細胞を刺激する CD C A 1 (3 9 - 6 4) および CD C A 1 (5 5 - 7 8) の能力を確認するため、本試験者らは、無関係なペプチドを H L A クラス I I 分子拘束性 T h 細胞誘導についての対照として用いて実験を行った。

【 0 2 5 9 】

健常ドナーの P B M C から単離した CD 4 + T 細胞を、週 1 回の間隔で、CD C A 1 (5 5 - 7 8) L P でパルスした自己 DC および P B M C で刺激した。少なくとも 3 回の刺激後、培養した CD 4 + T 細胞の CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P 特異的応答を I F N - E L I S P O T アッセイによって検査した。H L A - DR 4 陽性健常ドナー（H D 1）において、生成された T h 細胞は、CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P でパルスした P B M C に応答して H L A - DR 依存的に有意の量の I F N - を産生した。バルク T h 細胞は、H L A - DR 依存的に、CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P でパルスした L - DR 4 細胞を特異的に認識したが、無関係なペプチドでパルスした L - DR 4 細胞または CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P でパルスした L - DR 5 3 細胞は認識しなかった（図 8 A）。同様の結果を他の 2 名の DR 4 + ドナーから得た（表 1；H D 4 および H D 5）。これらの結果は、CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P が H L A - DR 4 拘束性 T h 細胞エピトープを含有することを示唆する。

【 0 2 6 0 】

CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P が他の H L A クラス I I 分子によって拘束される T h 細胞において応答を誘導するかどうかを調べるため、H L A - DR 4 陰性健常ドナーからの CD 4 + T 細胞を試験した。本発明者らは、CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P が H L A - DR 1 5 拘束性 T h 細胞を生成することを確認した（図 8 B）。CD C A 1 (5 5 - 7 8) - L P はまた、H L A - D P 2 拘束性 T h 細胞も生成する（図 8 C）。H L A - D P

10

20

30

40

50

2を形質導入したL細胞は入手できなかった；そのため、CDCA1(55-78)-LP反応性Th細胞クローン(Thクローン)を樹立し、5名の異なるドナーからの同種PBMCをAPCとして使用して、共通のHLA-DP分子による拘束を測定した。したがって、CDCA1(55-78)-LPはHLA-DR4、HLA-DR15およびHLA-DP2に結合し、このことは、CDCA1(55-78)-LPが、日本人/太平洋アジア人における高頻度のHLAクラスII分子によって提示されるTh細胞エピトープを含有することを示唆する(Saito S et al., Tissue Antigens 2000; 56:522-9., Mack S J et al., Tissue Antigens 2000; 55:383-400)。

【0261】

次に、本発明者らは、上述した方法を用いてCDCA1(39-64)-LPがHLA-DR9およびHLA-DR15拘束性Th細胞を生成できることを評価し、確認した(図8DおよびE)。合わせて考慮すると、これらの結果は、これらのオーバーラップするLPが、HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2拘束性Th細胞を刺激することができることを明らかに示す。この試験において、健常ドナーから生成したCDCA1-LP特異的Th細胞は、CDCA1-LPに包埋したCDCA1-A24(56-64)SPに応答しなかった(図8A、B、D、E)。

これらの結果も、CDCA1(39-64)およびCDCA1(55-78)が、HLA-DR4、HLA-DR9、HLA-DR15およびHLA-DP2拘束性Th細胞を誘導する能力を有することを示した。

【0262】

CDCA1(55-78)ペプチドはTh1型CD4⁺T細胞を刺激する。

CDCA1ペプチド誘導性Th細胞をさらに特徴づけるため、本発明者らは、Bio-plexシステムにより、コグネイトペプチドでのCDCA1(55-78)特異的バルクCD4⁺Th細胞株の刺激に反応したいくつかのサイトカインを測定した。ドナーからのCDCA1(55-78)特異的バルクHTL株は、コグネイトペプチドでバルスしたL-DR0405での再刺激により、大量のIFN-、GM-CSF、TNF-およびMIP-1を産生したが、IL-4およびIL-7の産生はより少なく、Th1の分極特性を示した(図4A~D)。興味深いことに、細胞傷害性マーカーCD107aも、コグネイトペプチドで刺激したCDCA1(55-78)特異的バルクTh細胞株上で検出することができた(図4E~H)。したがって、CDCA1(55-78)ペプチド特異的Th1細胞は、この培養条件において顕著に活性化された。

【0263】

CDCA1(55-78)およびCDCA1(39-64)は天然にプロセッシングされるエピトープである。

本発明者らは、自己DCがCDCA1タンパク質を取り込み、プロセッシングして、CDCA1ペプチド特異的Th1細胞クローンを刺激することができるかどうかを評価することへと進んだ。CDCA1(55-78)LPをロードした成熟DCを調製し、IFN-ELISPOTアッセイにおけるAPCとして使用した。図5Aに示すように、HLA-DR4拘束性CDCA1(55-78)反応性Th細胞クローンは、CDCA1タンパク質をロードしたDCを効率的に認識し、IFN-を特異的に産生したが、対照タンパク質をロードしたDCまたはタンパク質をロードしていないDCは認識しなかった。加えて、DCによって提示される天然にプロセッシングされたCDCA1抗原を認識するこのTh細胞クローンの能力は、抗HLA-DR抗体によって有効にブロックされたが、対照抗HLAクラスI抗体ではブロックされず、エピトープがHLA-DR4分子を介して提示されることを確認した。HLA-DP2拘束性およびCDCA1(55-78)反応性Th細胞クローンを用いて同様の分析を実施した。このTh細胞クローンは、CDCA1タンパク質をロードしたDCを効率的に認識し、IFN-を産生したが、対照タンパク質をロードしたDCは認識せず、HLA-DP2拘束性Th細胞エピトープも、DCにおいてCDCA1タンパク質から天然にプロセッシングされることを示唆した(図5B)。

10

20

30

40

50

【0264】

H L A - D R 9 拘束性 C D C A 1 (3 9 - 6 4) 反応性 T h 細胞クローンは、C D C A 1 タンパク質をロードした D C に応答したが、対照タンパク質をロードした D C には応答しなかった。加えて、T h 細胞のこの応答は、抗 H L A - D R 抗体によって有効にブロックされたが、対照抗 H L A クラス I 抗体によってはブロックされず、エピトープが H L A - D R 9 分子を介して提示されることを確認した。

要約すると、全体的な結果は、T h 細胞エピトープである、C D C A 1 (5 5 - 7 8) および C D C A 1 (3 9 - 6 4) が C D C A 1 タンパク質から D C によって天然にプロセッシングされ、D C の細胞表面で H L A クラス I I 分子によって提示されることを示す。

【0265】

C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P は、インビトロおよびインビボでナイーブ C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的 C D 8 + T 細胞の効率的なクロスプライミングを誘導する。

本発明者らは、C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P が、インビトロで D C による L P の交差提示によって C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的 C T L を誘導することができるかどうかを評価した。これを確認するため、本発明者らは、C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P をロードした D C での刺激によって 2 名の H L A - A 2 陽性ドナー由来の末梢血 C D 8 + T 細胞から C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的 C T L を生成することを試みた。L P をロードした D C での 3 回の刺激後、生じた C T L 株における C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P に特異的な C D 8 + T 細胞の頻度を I F N - E L I S P O T アッセイによって検査した。図 6 A に示すように、C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P をロードした D C での刺激によって生成される C T L は、C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P でパルスした T 2 細胞での再刺激に応答して I F N - を特異的に産生したが、無関係なペプチドでパルスした T 2 細胞では I F N - を産生しなかった。I F N - 産生は、抗 H L A クラス I m A b の添加によって有意に阻害されたが、抗 H L A - D R m A b では阻害されず、したがって、本発明者らがインビトロで D C による L P の交差提示を通して C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的 C D 8 + T 細胞を刺激することに成功したことを示した。

【0266】

次に、C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的細胞を刺激する C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P の能力をインビボで検討した。H L A - A 2 T g m を、7 日の間隔で、I F A 中に乳化した C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P を用いて尾の基部で 2 回または 3 回免疫した。C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P での 2 回目または 3 回目のワクチン接種の 7 日後に、鼠径 L N における I F N - 分泌性 C D 8 + T 細胞の数をエクスピボ E L I S P O T アッセイによって測定した。図 6 B に示すように、C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P での H L A - A 2 T g m の 2 回の免疫によって生成された C T L は、C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P でパルスした B M - D C での再刺激に応答して I F N - を特異的に産生したが、無関係な H I V - A 2 ペプチドでパルスした B M - D C では I F N - を産生しなかった。加えて、特異的に I F N - を産生する T 細胞の数は、3 回目のワクチン接種後に増大した。

合わせて考慮すると、これらの結果は、C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P が、インビトロでのヒト D C およびインビボでの H L A - A 2 T g m における B M - D C の両方による交差提示後に、有意の割合の I F N - を産生する C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的 C T L を誘導することを示した。

【0267】

C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P による C D C A 1 特異的および H L A 拘束性 C T L の誘導の増強

次に、本発明者らは、C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P が C D C A 1 特異的および H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導を増強することができるかどうかを試験した。H L A - A 2 陽性かつ D R 4 陽性ドナーからの P B M C を C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P と C D C

10

20

30

40

50

A 1 - A 2 (3 5 1 - 3 5 9) S P 単独の混合物で刺激した場合、これら 2 つの S P 特異的テトラマー⁺細胞の頻度は、それぞれ C D 8⁺ T 細胞の 0 . 0 1 % および 0 . 0 5 % であった (図 7 A) 。 P B M C を S P および C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P の両方で共刺激した場合、これらの S P 特異的テトラマー陽性細胞の頻度は、それぞれ 0 . 0 3 % および 0 . 1 2 % に上昇した (S P 単独で刺激したものと比較してそれぞれ 3 倍および 2 . 4 倍の頻度上昇) (図 7 A および B) 。 テトラマー⁺細胞の絶対数も、S P 単独で刺激したものと比較して、C D C A 1 (5 5 - 7 8) を添加するだけで有意に増加した (データは示していない) 。 P B M C をこれら 2 つの S P および C D C A 1 (5 5 - 7 8) 特異的 T h クローンの両方で共刺激した場合、S P 特異的テトラマー⁺細胞の頻度は、それぞれ 0 . 0 5 % および 0 . 1 9 % に上昇した (それぞれ 5 倍および 3 . 8 倍の上昇) 。 さらに、P B M C を S P 、 C D C A 1 (5 5 - 7 8) および C D C A 1 (5 5 - 7 8) 特異的 T h クローンで共刺激した場合、S P 特異的テトラマー⁺細胞の頻度は、それぞれ 0 . 1 % および 0 . 6 % に有意に上昇した (それぞれ 1 0 倍および 1 2 倍の上昇) 。 テトラマー⁺細胞の頻度に関して、培養物への C D C A 1 (5 5 - 7 8) ヘルパーペプチドまたは T h クローンの添加は、それぞれ頻度のわずかな上昇を誘導したが、これらの両方 (C D C A 1 (5 5 - 7 8) + T h クローン) の添加は特異的 C T L の頻度を著しく上昇させた。これらの結果は、本発明者らが異なる C D C A 1 (5 5 - 7 8) 特異的 T h クローンを使用した場合も再現可能に観察された (データは示していない) 。

10

【 0 2 6 8 】

S P 、 C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P および C D C A 1 (5 5 - 7 8) 特異的 T h クローンの混合物での刺激によって成功裏に誘導された C D C A 1 特異的 C T L 株を、14 日目に S P および C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P で再刺激し (3 回目の刺激) 、 C D C A 1 特異的および H L A - A 2 拘束性 C T L を増殖させた。テトラマー⁺細胞の頻度は、特に C D C A 1 - A 2 (3 5 1 - 3 5 9) 特異的テトラマー⁺細胞において、それぞれ 0 . 1 % および 5 . 4 % に有意に上昇した (図 7 C 、 D) 。 重要な点として、ペプチド特異的 I F N - 産生および細胞傷害性マーカー C D 1 0 7 a の両方を、コグネイトペプチドで刺激したこの C D C A 1 特異的 C T L 株上で検出することができた (図 7 C 、 D) 。

20

【 0 2 6 9 】

これらの結果は、培養物中の C D C A 1 (5 5 - 7 8) T h 細胞エピトープペプチドまたは C D C A 1 (5 5 - 7 8) 特異的 T h クローンでの刺激によって活性化された C D 4⁺ T 細胞が、C D C A 1 - A 2 (6 5 - 7 3) S P 特異的 C T L および C D C A 1 - A 2 (3 5 1 - 3 5 9) S P 特異的 C T L の両方の誘導を増強することができ、ならびに C D C A 1 (5 5 - 7 8) L P と T h 細胞クローンの両方の存在下で増強が最大であったことを明らかに示す。

30

【 0 2 7 0 】

C D C A 1 - A 2 4 特異的 C T L の誘導に対する相乗効果も、C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) 特異的テトラマーを使用して H L A - A 2 4⁺ / D R 1 5⁺ H D 2 において試験した。C D C A 1 (5 5 - 7 8) - L P 特異的バルク C D 4⁺ T 細胞および C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P 特異的バルク C D 8⁺ T 細胞を、いずれのサイトカインも添加せずに、C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P 単独 (S P) 、 C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P + 対照 L P (対照 L P + S P) または C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P + C D C A 1 (5 5 - 7 8) - L P (C D C A 1 (5 5 - 7 8) - L P + S P) の存在下で自己 D C と共に培養した。ペプチドとの 1 週間のインビトロ培養後、「材料および方法」の章で述べたように、培養細胞を H L A - A 2 4 (A * 2 4 : 0 2) / C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) 複合体のテトラマーおよび抗ヒト C D 8 m A b で染色した。図 7 E に示すように、C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P + C D C A 1 (5 5 - 7 8) - L P (C D C A 1 (5 5 - 7 8) - L P + S P) の添加は、S P 単独または対照 L P + S P の添加と比較して、C D C A 1 - A 2 4 (5 6 - 6 4) S P 特異的 C D 8⁺ T 細胞の絶対数を有意に増加させた。これらの結果は、活性化された C D C A 1 特異的 T h 細胞が C D C A 1 - A 2 4 特異的 C T L の誘導を増強できる可能性があることを示唆する。

40

50

合わせて考慮すると、これらの結果は、CDCA1(55-78)LPおよびCDCA1(55-78)LPでの刺激による活性化CDCA1特異的CD4⁺T細胞が、個々にまたは協力して、CDCA-1特異的およびHLA拘束性CTLの誘導を増強し得ることを明らかに示した。

【0271】

CDCA1-LPはCDCA1-A24(56-64)SP特異的CTLの効率的な増殖を誘導する。

次に、CDCA1-LPがCDCA1特異的バルクCTLの増殖を誘導し得る可能性を評価した。HD2(HLA-A24⁺/DR15⁺)の精製CD8⁺T細胞から生成したCDCA1-A24(56-64)SP特異的バルクCTLを、CDCA1(55-78)LPでパルスした自己DCと共に1週間培養した。図9Aに示すように、CDCA1-A24(56-64)テトラマー⁺CD8⁺細胞の集団は、CDCA1(55-78)LPでパルスしたDCでの刺激によって増殖したが、対照LPでパルスしたDCでバルクCTLを刺激した場合は減少した。同様の結果をIFN-ELSPOTアッセイにおいてHLA-A24⁺/DR4⁺HD5から得た(図9B)。この実験の詳細な方法は「材料および方法」の中で述べられている。

【0272】

本発明者らはまた、CDCA1-LPが、CDCA1-A24(56-64)SPでワクチン接種したHNC患者のPBMCにおいてCDCA1-A24(56-64)SP特異的CTLのインビトロでの増殖を誘導することができるかどうかを試験した。ワクチン接種したHNC患者からのPBMCを、CDCA1(55-78)LPとCDCA1(39-64)LPの混合物と共に培養した。HNC29から単離した新鮮なPBMCを、インビトロ培養(エクスピボ)の前にCDCA1-A24(56-64)特異的テトラマーで染色した場合、テトラマー⁺細胞の頻度はCD8⁺T細胞の0.09%に過ぎなかった。興味深いことに、HNC29からのPBMC中のテトラマー⁺CD8⁺T細胞は、CDCA1(55-78)LPとCDCA1(39-64)LPの混合物でのPBMCの1週間のインビトロ刺激によって有意に増殖した。CDCA1-A24(56-64)SP特異的CTLの頻度はCD8⁺T細胞の3.07%に上昇した(図9C;7日目)。培養した細胞をCDCA1-A24(56-64)SPで刺激した場合、T細胞のCDCA1-A24(56-64)SP特異的IFN-産生も検出された(図9C;棒グラフ、7日目)。同様の結果がHNC26、31、39および109においても得られた(図9D~G)。これらの結果は、CDCA1-A24(56-64)SP特異的CTLの増殖がDCによるCDCA1-LPの交差提示によって誘導され得ることを示唆する。

【0273】

CDCA1-LPの交差提示はインビトロおよびインビボでCDCA1特異的CD8⁺T細胞を効率的にプライミングする。

DCによるCDCA1-LPの交差提示を、CDCA1-A24(56-64)特異的テトラマー⁺CD8⁺T細胞のIFN-応答に関連して評価した。交差提示することはできないが、生存DCと同程度に効率的にCDCA1-A24(56-64)SPを提示することができる固定DC(図10A、固定DC+SP)を、T細胞応答におけるLP分解産物の外因的提示の寄与を排除するまたは評価するために使用した。CDCA1(55-78)LP(図10A)およびCDCA1(39-64)LP(図10B)は、非固定DC(DC+LP)によって交差提示された場合にのみ、有意の割合のIFN-分泌性テトラマー⁺CD8⁺T細胞を誘導した。CDCA1-LPでパルスした固定DCは、無関係なLPでパルスした非固定DCと同様に、CDCA1-A24(56-64)特異的CTLを刺激することができなかった(固定DC+LPおよびDC+無関係なLP)。

【0274】

CDCA1特異的CTLのクロスプライミングを調べるため、本発明者らは、CDCA1(55-78)LPがCDCA1-A24特異的CTLをプライミングすることができるかどうかを検討した。CDCA1-LPでパルスした固定DCは、無関係なLPでパル

10

20

30

40

50

スした非固定DCと同様に、CDCA1-A24(56-64)特異的CTLを刺激することができなかつた(固定DC+LPおよびDC+無関係なLP)。CDCA1(55-78)-LPをロードしたDCも、HLA-A24⁺/A2⁺/DR4⁺ドナー(HD5;図6C)においてCDCA1-A24(56-64)SP特異的CTLおよびCDCA1-A2(65-73)SP特異的CTLをプライミングすることができた。

【0275】

CDCA1(55-78)LPでワクチン接種したHLA-A24 TgmのCD8⁺T細胞も、CDCA1-A24(56-64)SPでパルスしたBM-DCおよびC1R-A2402細胞での刺激に应答してIFN- γ を特異的に産生した(図6D、左側のパネル)。HLA-A24 TgmをCDCA1(39-64)LPでワクチン接種した場合も同様の結果を得た(図6D、右側のパネル)。HLA-A24 TgmのCDCA1-A24(56-64)SP特異的スポットの数はHLA-A2 Tgmのものよりも少なかったため、HLA-A24 Tgmを2倍量のCDCA1-LPで免疫した。さらに、CDCA1-LPでのワクチン接種は、SP特異的CTLの誘導においてCDCA1-A24(56-64)SPを上回っていた(図6E)。これらの結果は、CDCA1-LPの取込み後、APCがインビトロおよびインビボでCDCA1特異的CTLをクロスプライミングできることを明らかにする。

【0276】

CDCA1-A24(56-64)SPでワクチン接種したHNC患者におけるCDCA1特異的Th細胞の存在

がん免疫療法に関連して、拘束性エピートプを使用したワクチンが、ワクチン中には存在しない抗原に対する幅広いCD8⁺T細胞応答を生じさせ得ることを示唆する強力な証拠が存在する(Corbier V, et al. Cancer Res 2011; 71:1253-62., Ribas A, et al. Trends Immunol 2003; 24:58-61., Hunder NN, et al. N Engl J Med 2008; 358:2698-703)。そこで、本発明者らは、CDCA1特異的Th細胞応答がCDCA1由来のCTLEपीトプペプチドでのワクチン接種によって効率的に誘導され得ると考えた。患者におけるCDCA1特異的Th細胞応答を検出するため、CDCA1-A24(56-64)でワクチン接種した16名のHNC患者およびワクチン接種前の7名のHNC患者から単離したPBMCを採取した。ドナーの特徴を図11Fの表に要約する。CDCA1-LPでのPBMCの1週間のインビトロ刺激後、個々のCDCA1-LP特異的T細胞の頻度をIFN- γ ELISPOTアッセイによって検出した(図11A)。10名の健常ボランティアから単離したPBMCを対照として使用した。IFN- γ 分泌細胞の数が陰性対照の少なくとも2倍である場合に応答を陽性とみなした。

有意の頻度のCDCA1-LP特異的免疫応答がHNC患者において観察されたが(CDCA1(39-64)LP、19名のうち14名、74%; CDCA1(55-78)LP、19名のうち13名、68%; 図11BおよびF)、10名の健常ドナーではCDCA1-LPに対する特異的IFN- γ 応答は検出されなかつた。ワクチン接種前の数名の患者において、CDCA1-LP特異的Th細胞応答が検出可能であった(CDCA1(39-64)LP、7名のうち2名、29%; CDCA1(55-78)LP、7名のうち2名、29%; 図11F)。他方で、CDCA1-A24(56-64)SPでのワクチン接種後の多くのHNC患者において、CDCA1-LP特異的Th細胞応答が検出された(CDCA1(39-64)LP、16名のうち12名、75%; CDCA1(55-78)LP、16名のうち12名、75%; 図11F)。ワクチン接種後の患者におけるCDCA1-LP特異的IFN- γ 産生細胞の数は、ワクチン接種前の患者および健常ドナーにおけるよりも有意に多かつた(図11C)。T細胞によるIFN- γ 産生は、抗HLAクラスII mAbの添加によって有意に阻害されたが、抗HLAクラスI mAbによっては阻害されなかつた(図11D)。これらの結果は、CDCA1-LP特異的IFN- γ 産生がCDCA1-LP特異的CD4⁺T細胞に由来したことを示す。興味

10

20

30

40

50

深いことに、一部のHNC患者では反復ワクチン接種によってCDCA1-LPに対する特異的応答が誘導または増大された(図11E)。これらの所見は、APCが、ワクチンが誘導したCTLによって死滅した腫瘍細胞に由来するCDCA1抗原を収集し、プロセシングして、その後インビボでCDCA1特異的Th細胞を活性化したことを示唆する。

【0277】

考察

最も魅力的なワクチン化合物は、治療的CD4⁺およびCD8⁺応答を誘導することができるTAAの配列に対応する合成LPであると考えられる(Melief CJ and van der Burg SH, Nat Rev Cancer 2008; 8: 351-60., Kenter GG, Welters MJ, et al. N Engl J Med 2009; 361: 1838-47)。これらのLPの注射後、患者のDCがLPを取り込み、プロセシングして、様々なHLAクラスIおよびHLAクラスIIにおいてすべての可能なCLEピトープおよびThエピトープをそれぞれ提示すると考えられる。したがって、本発明者らは、がん免疫療法のための理想的なペプチドワクチンは、最も一般的に認められるHLAによって拘束されるCTLおよびTh1細胞の両方を誘導することができる単一ポリペプチドであるべきだと考えた。

10

【0278】

この試験において、本発明者らは、プロミスキラスなHLAクラスII拘束性Th1細胞によって認識されるCLEピトープを含むCDCA1由来のLPを同定した。

結論として、本発明者らは、CDCA1特異的Th1細胞だけでなく交差提示によってCDCA1特異的CTLも増殖させ、活性化するための良好なツールとなる、CLEピトープを含むCDCA1由来のヘルパーペプチドを初めて同定した。これらの所見は、今後、様々な種類のがんに対するCDCA1ペプチドに基づく免疫療法の臨床試験に寄与するであろう。

20

【産業上の利用可能性】

【0279】

本発明は、強力な抗腫瘍免疫応答を誘導することができ、したがって多種多様ながん型に適用可能性を有する、CDCA1由来のTh1細胞エピトープペプチドを記述する。そのようなペプチドは、がん、特にCDCA1を発現するがんに対するペプチドワクチンとしてのさらなる開発に値する。本発明のペプチドは、Th1細胞応答を誘導することができ、したがってTh1細胞によって分泌されるサイトカインが、抗原依存的に細胞性免疫に關与する任意の免疫細胞を助けるかまたは活性化することができる。それゆえ、本発明によって提供される免疫治療戦略は、疾患がMHCクラスII分子によって媒介される免疫応答によって改善され得る限り、がんを含む任意の疾患に適用することができる。特に、本発明のTh1細胞は、CTLによって惹起される免疫応答を改善することができる。それゆえ、本発明のペプチドは、対象においてがんを含む疾患に対するCTL応答を増強するのに有益である。

30

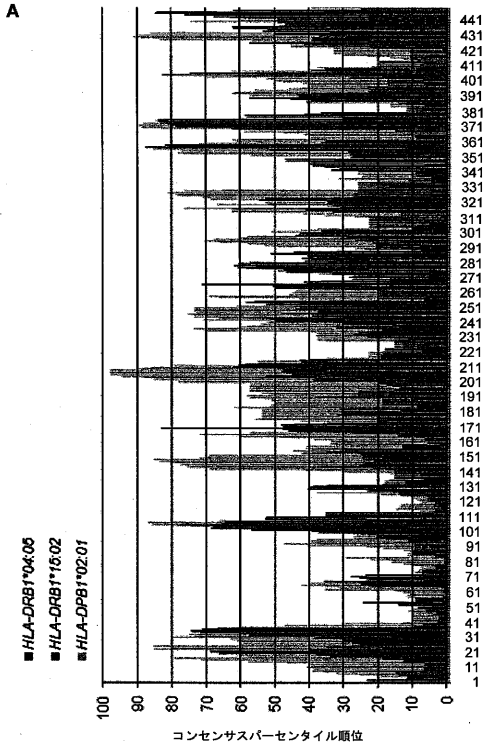
さらに、好ましい態様では、本発明のペプチドはまた、Th1細胞だけでなく、CDCA1発現細胞に対するCTLも誘導することができる。本発明のそのようなペプチドは、CDCA1に関連する疾患、例えばがん、より詳細には乳がん、膀胱がん、食道がん、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)および頭頸部がん(HNC)の治療のためにも有用であり得る。

40

【0280】

本発明を、詳細におよびその特定の態様を参照して本明細書で説明したが、前記説明は本質的に例示的および説明的であり、本発明とその好ましい態様を例証することを意図する。日常的な実験を通して、当業者は、その境域および境界が添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および修正がなされ得ることを容易に認識するであろう。

【 図 1 A 】



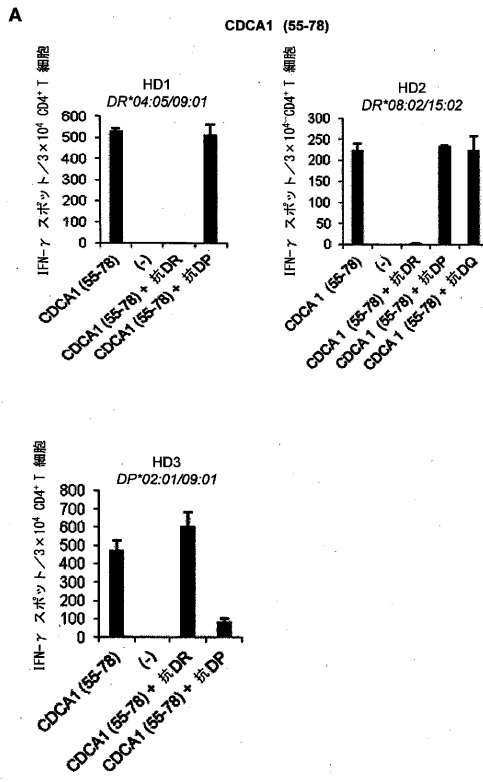
【 図 1 B 】

B

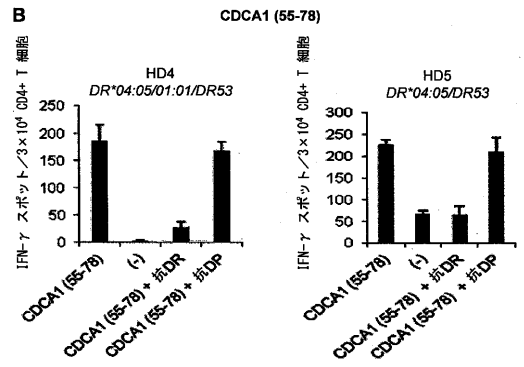
CDCA1 (39-64): NPKPEVLHMIYMRALQI**IVYGIRLEHF** (配列番号: 2)
HLA-A24

CDCA1 (55-78): **IVYGIRLEHF**YMMMPVNSEVMYPHL (配列番号: 1)
HLA-A24 HLA-A2

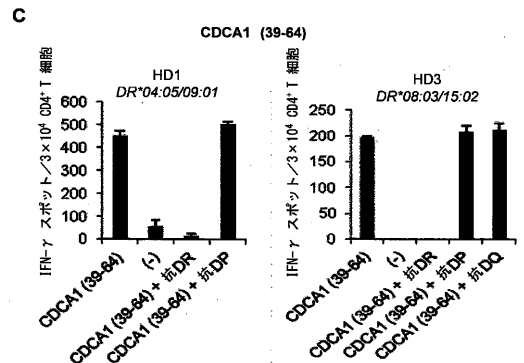
【 図 2 A 】



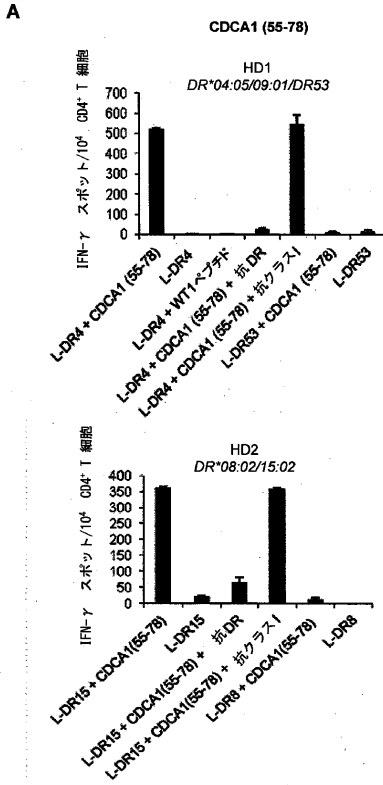
【 図 2 B 】



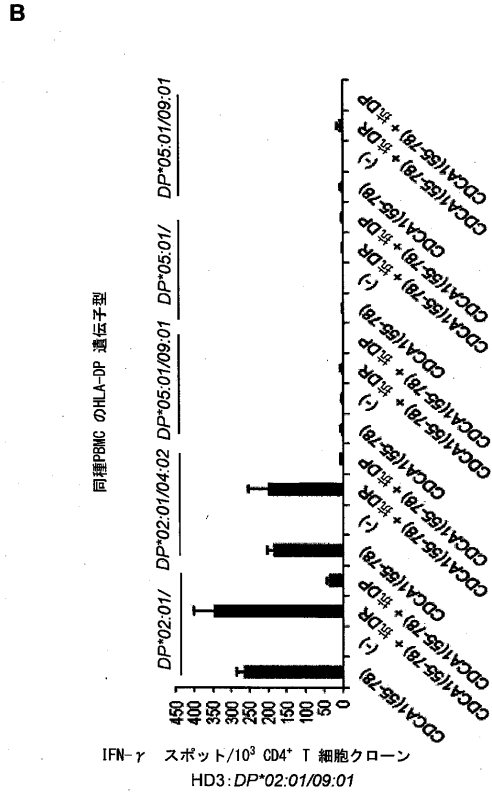
【 図 2 C 】



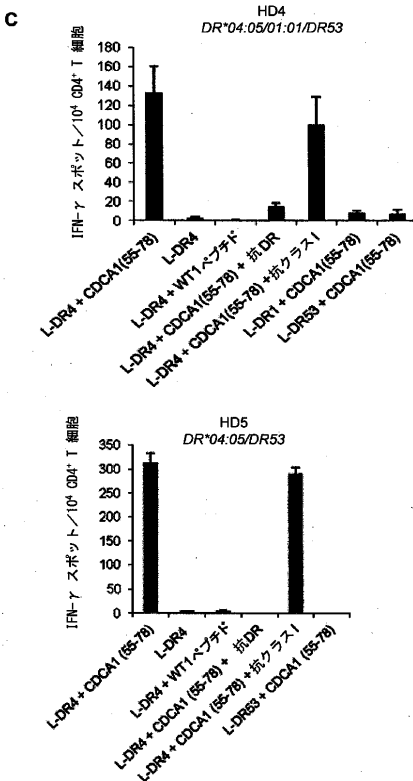
【 図 3 A 】



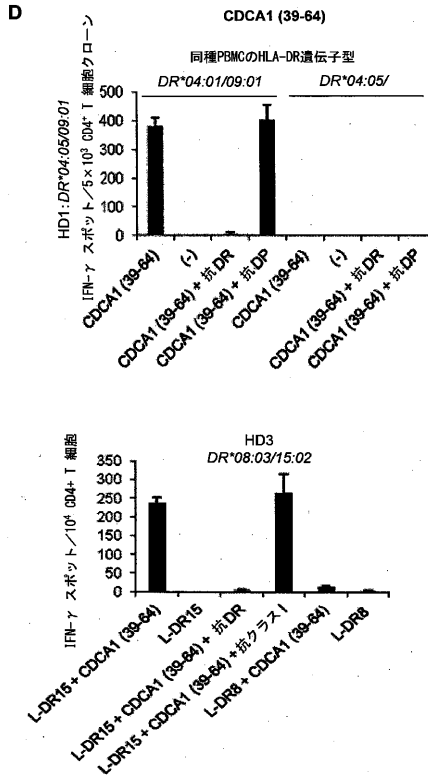
【 図 3 B 】



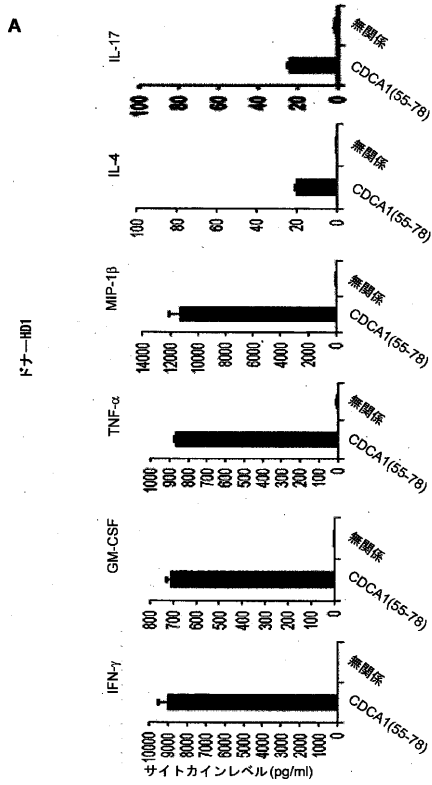
【 図 3 C 】



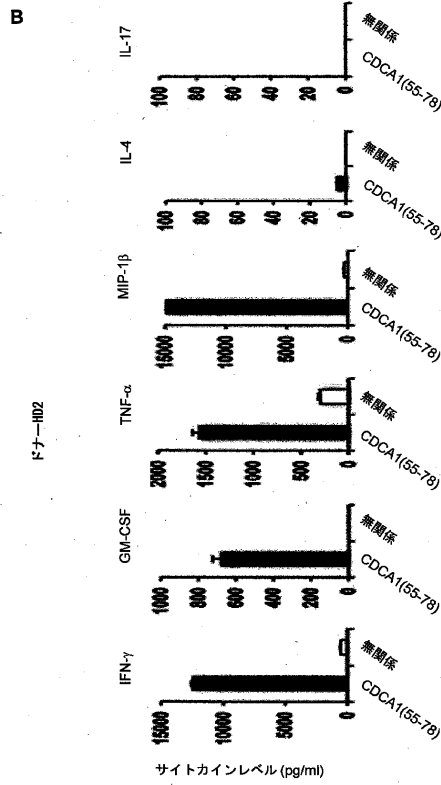
【 図 3 D 】



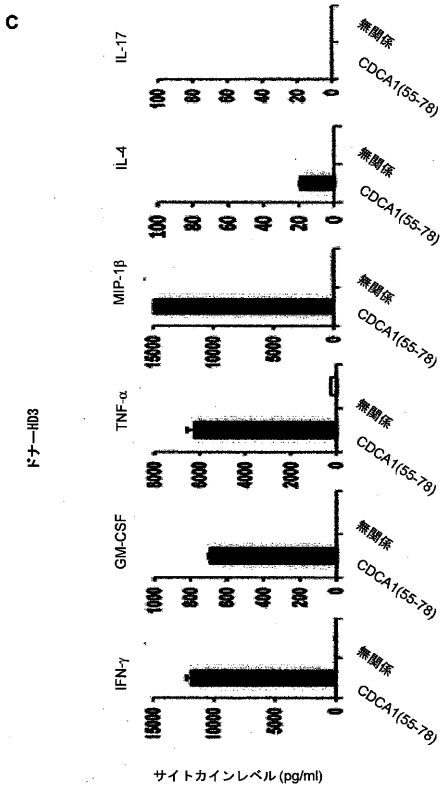
【 図 4 A 】



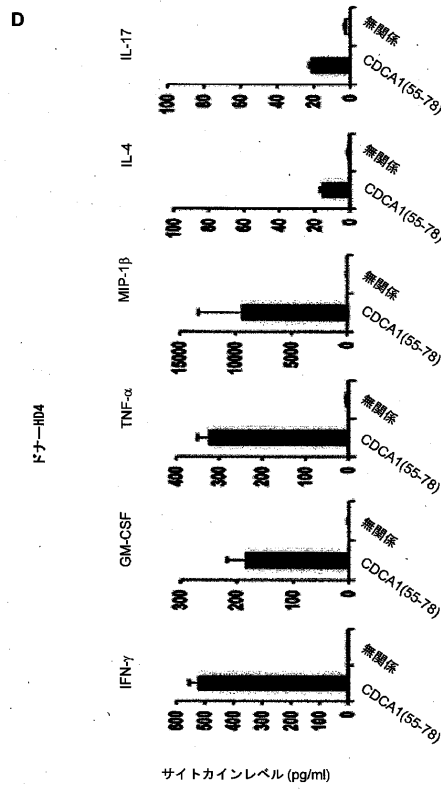
【 図 4 B 】



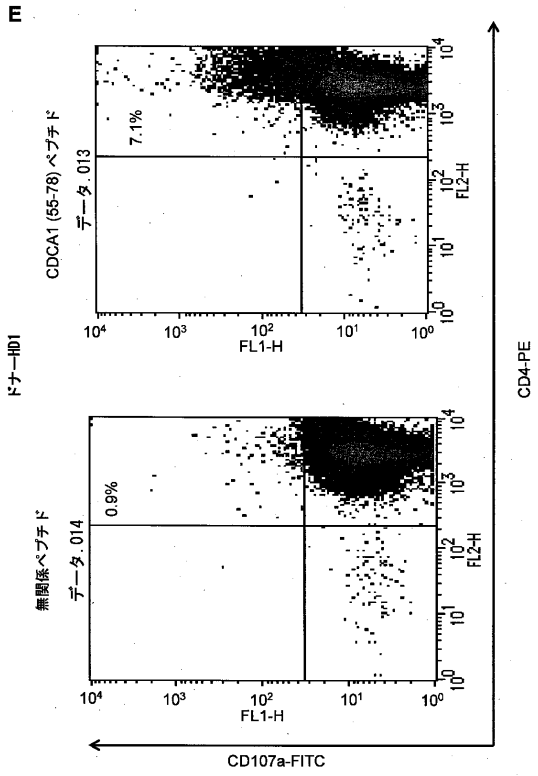
【 図 4 C 】



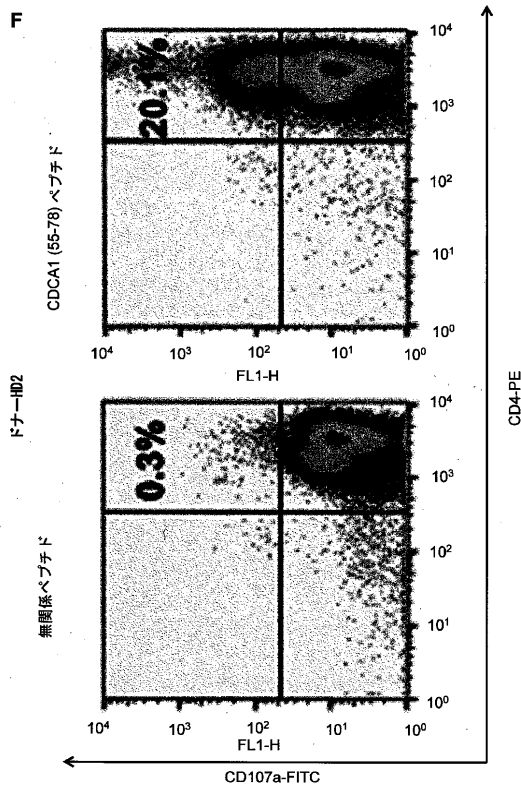
【 図 4 D 】



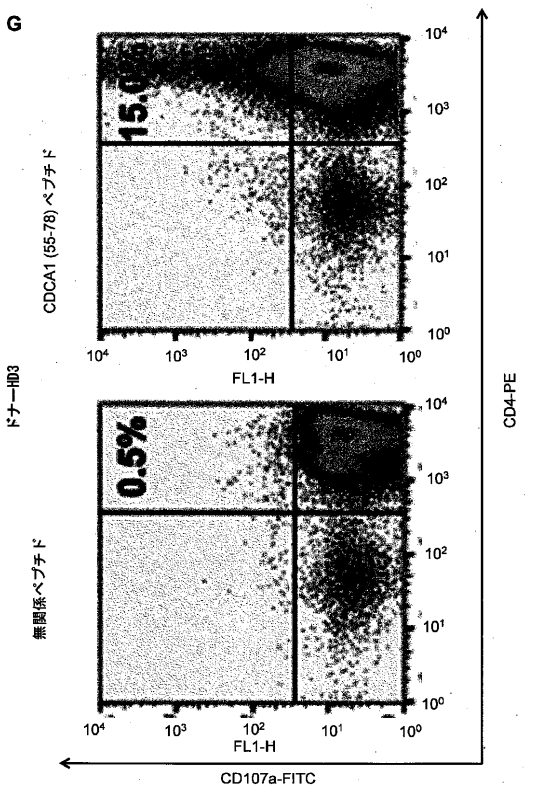
【 図 4 E 】



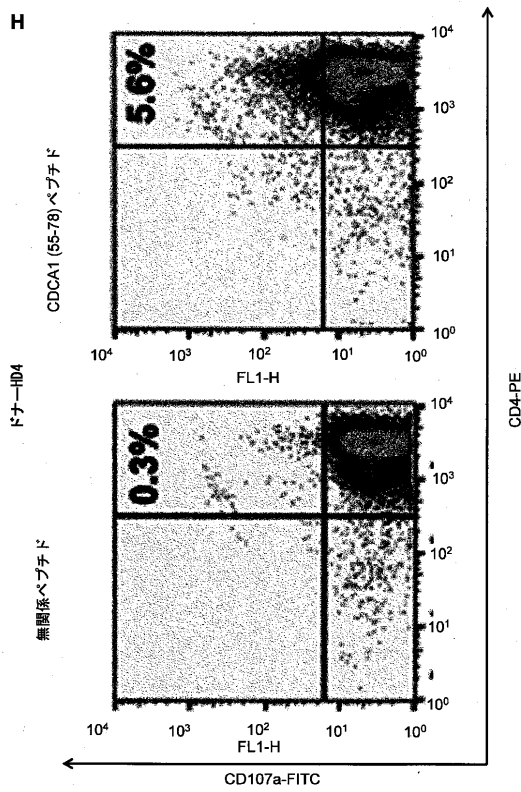
【 図 4 F 】



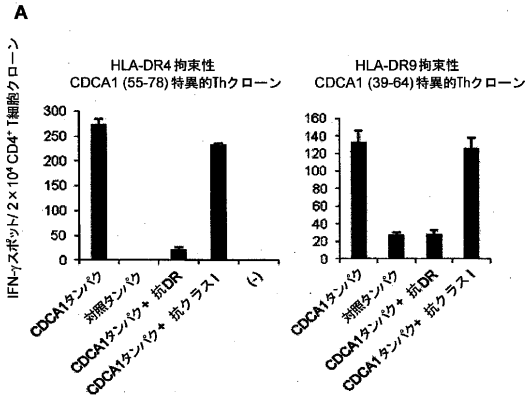
【 図 4 G 】



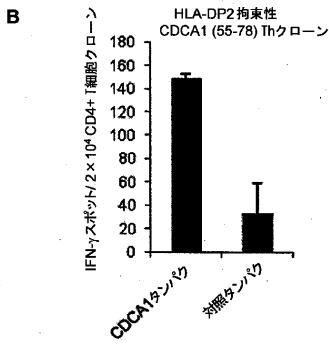
【 図 4 H 】



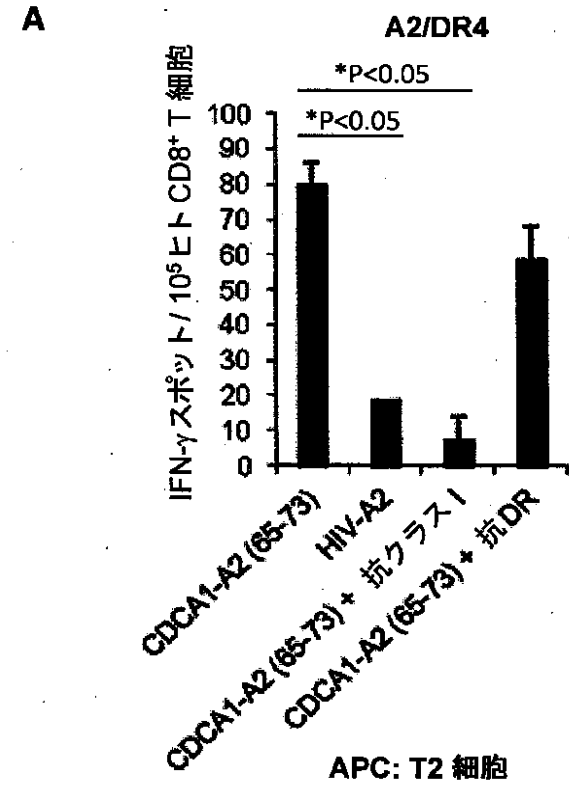
【 図 5 A 】



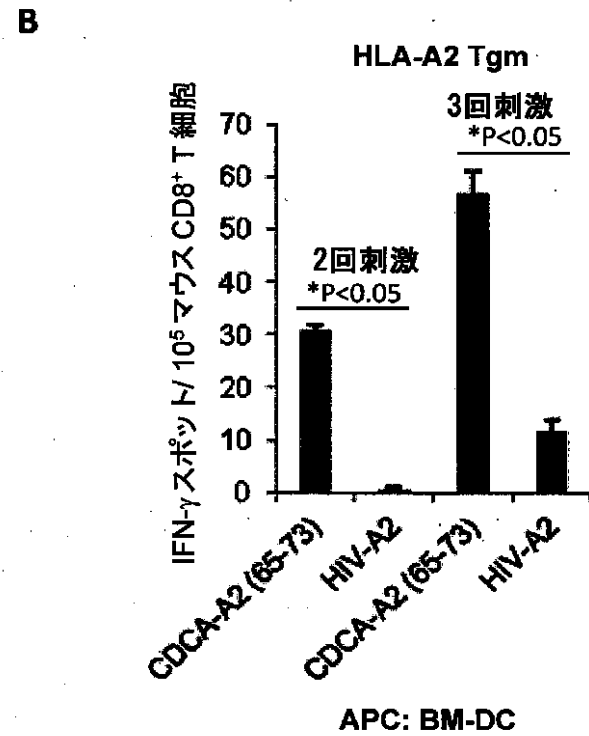
【 図 5 B 】



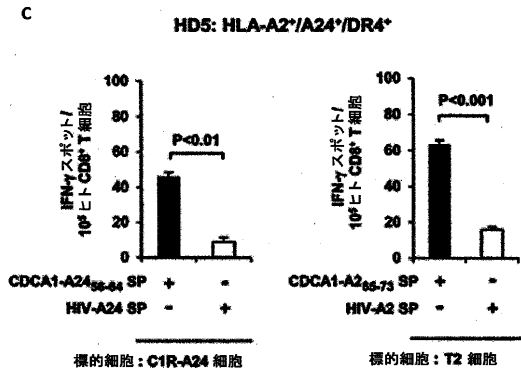
【 図 6 A 】



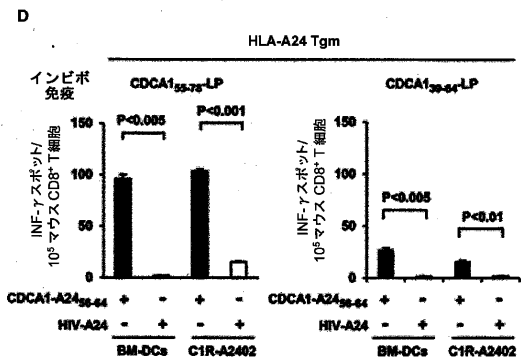
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】

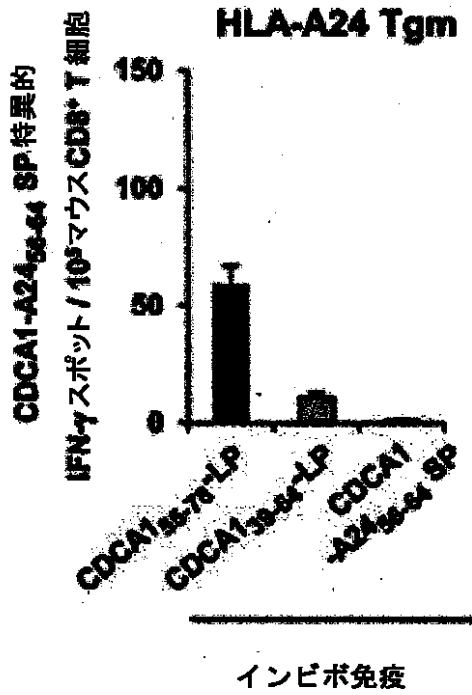


【 図 6 D 】

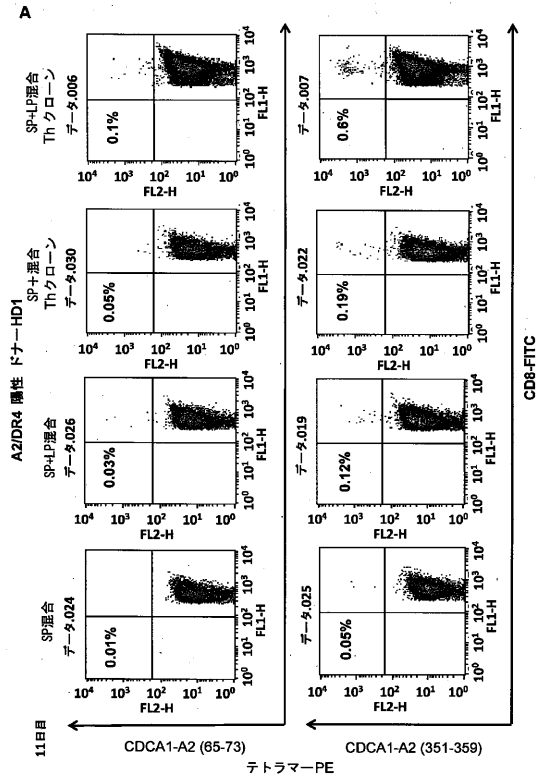


【 図 6 E 】

E

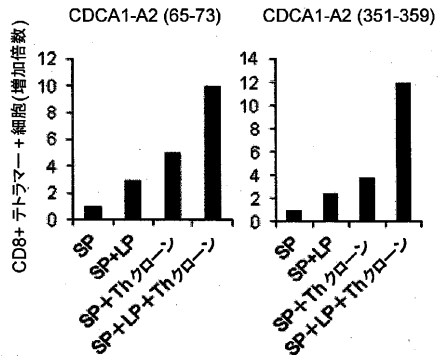


【 図 7 A 】

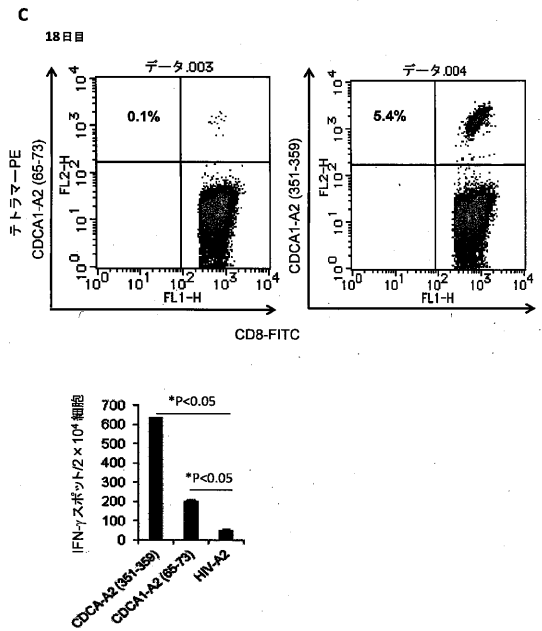


【 図 7 B 】

B

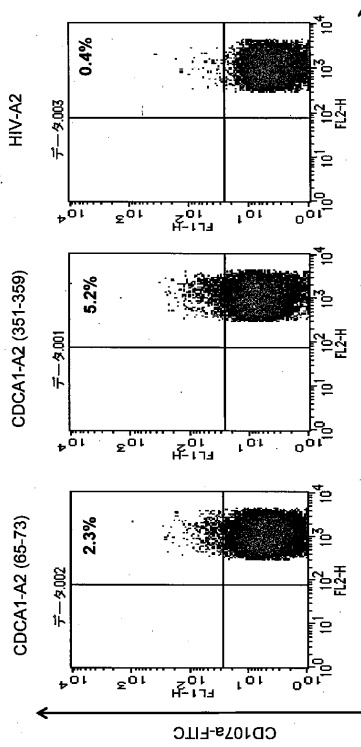


【 図 7 C 】



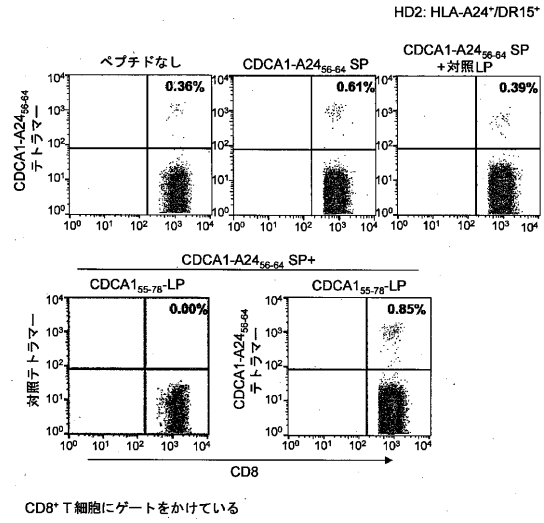
【 図 7 D 】

D



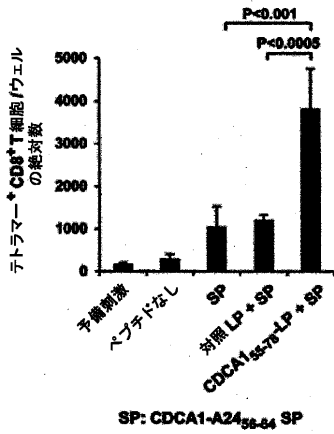
【 図 7 E 1 】

E



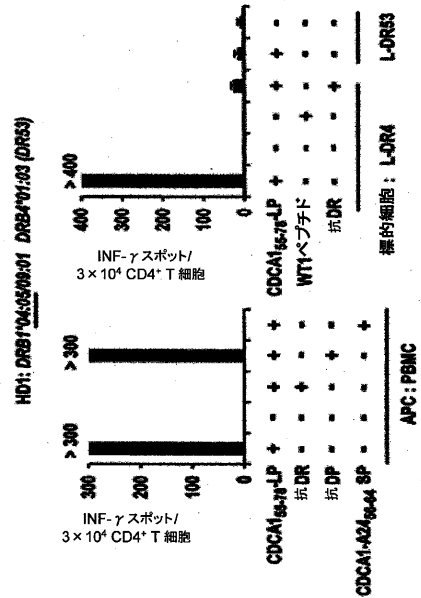
【 図 7 E 2 】

E



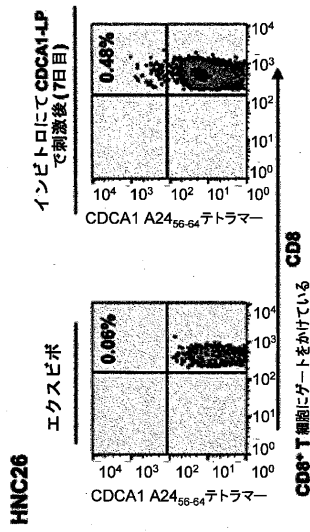
【 図 8 A 】

A



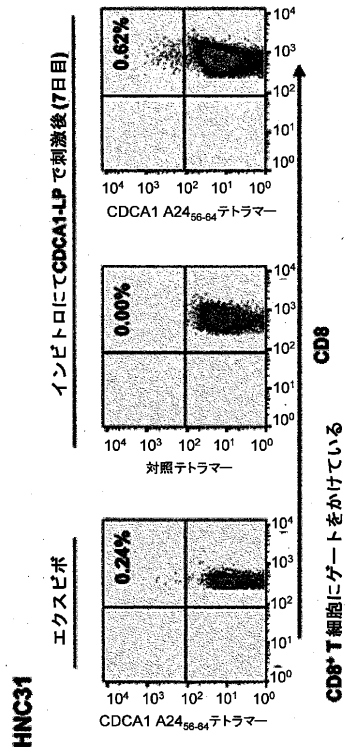
【 図 9 D 】

D



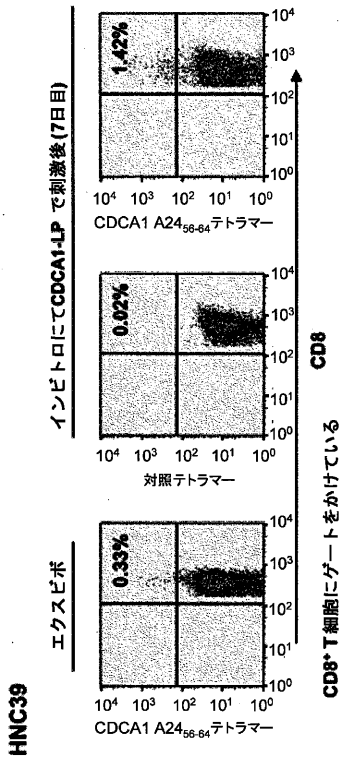
【 図 9 E 】

E



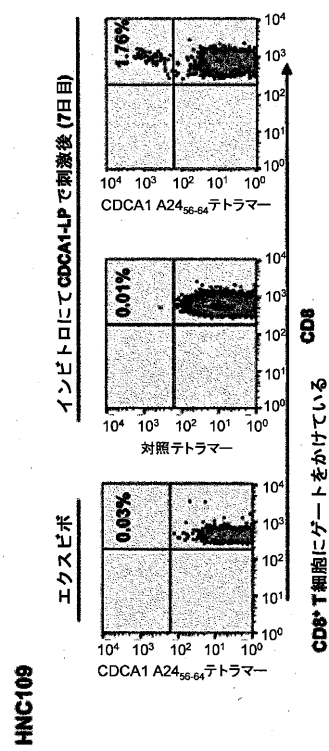
【 図 9 F 】

F

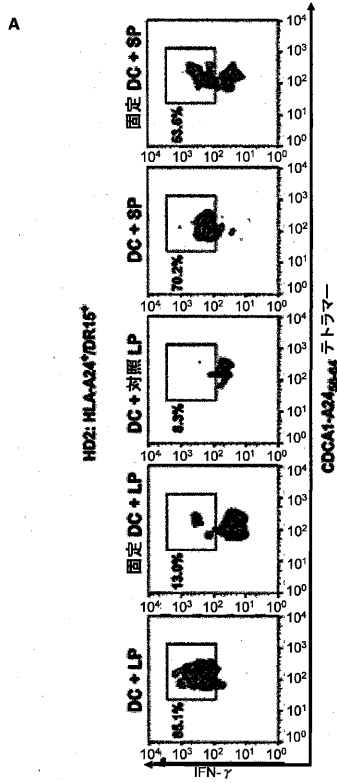


【 図 9 G 】

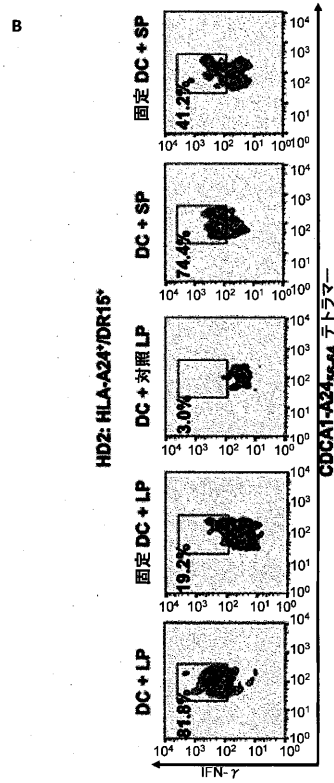
G



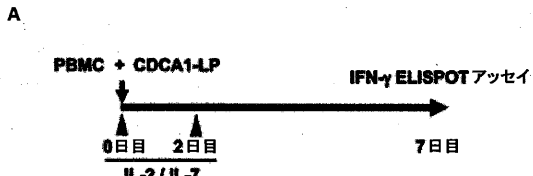
【図10A】



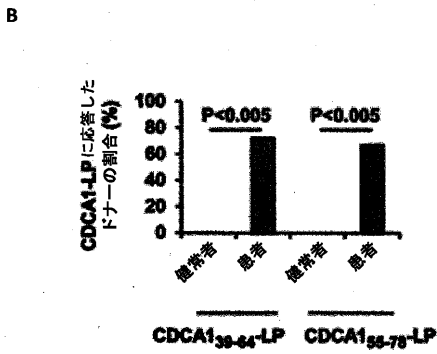
【図10B】



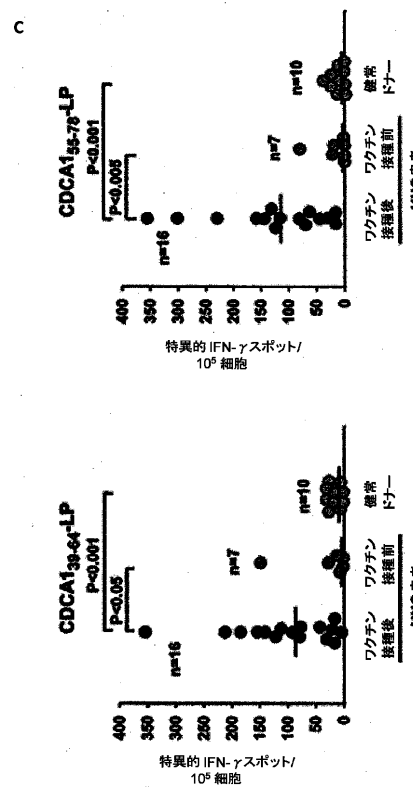
【図11A】



【図11B】

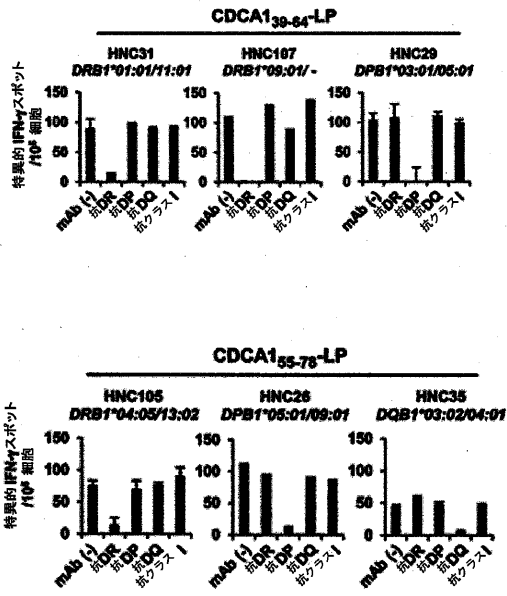


【図11C】



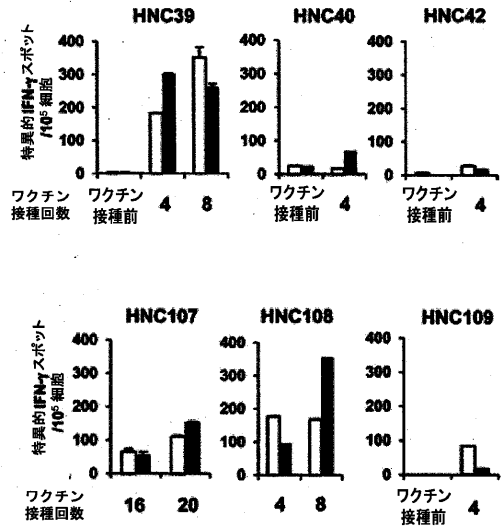
【 1 1 D 】

D



【 1 1 E 】

E



【 1 1 F 】

F

HNC患者の臨床的特徴

患者ID	年齢/性別	CDCA1 ₃₉₋₆₄ -LP		CDCA1 ₅₅₋₇₈ -LP		ワクチン接種回数	HLA-DRB1	HLA-DQB1
		陽性/陰性, %	陽性/陰性, %	陽性/陰性, %	陽性/陰性, %			
CTR-R379 + CTR-R380								
陽性/陰性, %		14/19, 74%		13/19, 68%				
CTR-R379								
陽性/陰性, %		2/6, 33%	7/10, 70%	2/6, 33%	7/10, 70%			
HNC10	51/M	n.l.	+	n.l.	+	6	01:01/04:05	05:01/-
HNC20	57/F	n.l.	+	n.l.	+	32	01:01/08:01	02:01/05:01
HNC28	70/M	n.l.	+	n.l.	+	24	04:05/13:02	05:01/09:01
HNC31	64/F	n.l.	+	n.l.	+	18	09:01/14:54	03:01/05:01
HNC34	65/M	n.l.	+	n.l.	+	15	01:01/11:01	02:01/04:02
HNC35	85/F	n.l.	+	n.l.	+	12	09:01/13:02	02:01/05:01
HNC37	35/F	n.l.	-	n.l.	-	8	04:05/06:02	05:01/-
HNC38	55/M	n.l.	-	n.l.	-	0	04:05/13:02	02:01/05:01
HNC39	77/M	n.l.	+	n.l.	+	8	05:01/-	02:01/05:01
HNC40	75/M	+	+	+	+	4	04:05/14:54	03:01/19:01
HNC51	51/F	+	+	+	+	4	01:01/09:01	04:02/05:01
HNC42	39/F	-	+	-	-	4	01:01/08:02	04:02/05:01
CTR-R390								
陽性/陰性, %		0/1, 0%	5/6, 83%	0/1, 0%	5/6, 83%			
HNC103	50/F	n.l.	+	n.l.	+	33	15:02/-	02:01/09:01
HNC104	70/F	n.l.	+	n.l.	+	20	04:05/15:01	02:01/05:01
HNC105	65/M	n.l.	+	n.l.	+	20	04:05/13:02	03:01/04:01
HNC107	20/M	n.l.	+	n.l.	+	20	05:01/-	02:01/02:02
HNC108	41/M	n.l.	+	n.l.	+	8	04:05/09:01	05:01/-
HNC108	72/F	-	+	-	+	4	04:10/15:02	03:01/09:01

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/004244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. See extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. C07K14/47, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K16/44, C12N5/0783, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2013 Registered utility model specifications of Japan 1996-2013 Published registered utility model applications of Japan 1994-2013		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST/580(JDreamIII), UniProt/GeneSeq, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2009/153992 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.12.23, & JP 2011-524737 A & US 2011/0189214 A1 & EP 2303912 A1 & CN 102119171 A & KR 10-2011-0031314 A	<u>1-11, 15, 23-25</u> 1-11, 14-15, 17, 19-20, 22-25
X Y	WO 2009/025117 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.02.26, & US 2011/0152199 A1 & EP 2186889 A1 & CN 101835892 A & KR 10-2010-0063060 A	<u>1-5, 7-11</u> 1-11, 14-15, 17, 19-20, 22-25
X Y	HARAO Michiko, et al., "HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testisantigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL", Int. J. Cancer, 2008, Vol.123, p.2616-2625	<u>1-5, 7-11</u> 1-11, 14-15, 17, 19-20, 22-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
12.09.2013	24.09.2013	
Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer	4B 4045
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Keiji TORII Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/004244
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG Peng, et al, "A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach", PLoS Computational Biology, 2008, Vol.4, No.4, p.e1000048	1-11, 14-15, 17, 19-20, 22-25
Y	MELIEF J.M. Cornelis et al, "Immunotherapy of established [pre]malignant disease by synthetic long peptide vaccines", Nat. Rev. Cancer, 2008, Vol.8, p.351-360	1-11, 14-15, 17, 19-20, 22-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/004244

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 12-13, 16, 18, 21 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: The subject matter of claim 12-13, 16, 18, 21 relate to a method for treatment of the human or animal body by therapy, which does not require an international search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/004244

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/47(2006.01) i, A61K38/00(2006.01) i, A61K39/00(2006.01) i,
A61P35/00(2006.01) i, C07K16/44(2006.01) i, C12N5/0783(2010.01) i,
C12N15/09(2006.01) i

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 西村 泰治

熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 富田 雄介

熊本県熊本市中央区本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内

(72)発明者 大沢 龍司

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA04 DA02 DA06 EA02 EA04 FA02

GA11 HA03 HA11 HA12 HA15

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34

QX02

4B065 AA26X AA90X AA90Y AB01 BA01 CA24 CA25 CA45 CA46

4C084 AA02 AA13 BA01 BA03 BA08 BA17 BA18 BA19 BA23 DC50

MA02 NA05 NA14 ZB261

4C087 AA01 AA02 BB37 CA04 MA02 NA05 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 CA41 DA76 EA31

EA50 FA74

专利名称(译)	Th1细胞的CDCA1表位肽和含有它的疫苗		
公开(公告)号	JP2015529629A	公开(公告)日	2015-10-08
申请号	JP2015501988	申请日	2013-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	西村泰治 富田雄介 大沢龍司		
发明人	西村 泰治 富田 雄介 大沢 龍司		
IPC分类号	C07K14/82 C12N15/09 C12N5/0783 C07K16/32 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K35/17 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61K2039/57 A61K2039/70 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/47 C07K16/2833 C07K2317/76 C12N5/0636 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/00 C07K14/4702 C07K16/30 C12N5/0634 C12N5/0637 C12N5/0638 C12N2501/405 C12N2502/11		
FI分类号	C07K14/82.ZNA C12N15/00.A C12N5/00.202.L C07K16/32 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61P35/00 A61K37/02 A61K48/00 A61K35/17.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA03 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/CA04 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/669971 2012-07-10 US		
其他公开文献	JP6255593B2 JP2015529629A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了衍生自分离的CDCA1的表位肽，其具有诱导Th1细胞的能力。这些肽被MHC II类分子识别并且可以诱导Th1细胞。在一个优选的实施方案中，本发明的这样的肽可以诱导可耦合到II混杂MHC类分子中，除了Th1细胞CDCA1特异性细胞毒性T淋巴细胞（CTL）。这样的肽，因此，适合用于增强受试者的免疫应答，因此在癌症免疫疗法，尤其可以用作癌症疫苗。本文还公开了编码

由这些肽诱导的任何所述肽，APC和Th1细胞的多核苷酸，以及与其相关的诱导方法。含有任何组分作为活性成分的药物组合物，例如乳腺癌，膀胱癌，食道癌，小细胞肺癌（SCLC），非小细胞肺癌（NSCLC）和头和颈癌（HNC）在治疗和/或预防涉及的癌症或肿瘤中。

(21) 出願番号	特願2015-501988 (P2015-501988)	(71) 出願人	502240113
(86) (22) 出願日	平成25年7月9日 (2013. 7. 9)		オンコセラビー・サイエンス株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月4日 (2015. 3. 4)		神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/004244	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開番号	WO2014/010229		弁理士 春名 雅夫
(87) 国際公開日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	61/669, 971		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成24年7月10日 (2012. 7. 10)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699
			弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く