

(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2014-504146

(P2014-504146A)

(43) 公表日 平成26年2月20日(2014.2.20)

| (51) Int.Cl.            | F I                   | テーマコード (参考)     |
|-------------------------|-----------------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4       |
| C O 7 K 7/06 (2006.01)  | C O 7 K 7/06          | 4 B O 6 5       |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)  | C 1 2 N 5/00 1 O 2    | 4 C O 8 4       |
| C O 7 K 16/18 (2006.01) | C O 7 K 16/18         | 4 C O 8 5       |
| A 6 1 K 38/00 (2006.01) | A 6 1 K 37/02         | 4 C O 8 7       |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求     |                       | (全 58 頁) 最終頁に続く |

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2013-518619 (P2013-518619) | (71) 出願人 | 502240113<br>オンコセラピー・サイエンス株式会社<br>神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年10月20日 (2011.10.20)     | (74) 代理人 | 100102978<br>弁理士 清水 初志                               |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成25年6月14日 (2013.6.14)       | (74) 代理人 | 100102118<br>弁理士 春名 雅夫                               |
| (86) 国際出願番号   | PCT/JP2011/005866            | (74) 代理人 | 100160923<br>弁理士 山口 裕孝                               |
| (87) 国際公開番号   | W02012/053206                | (74) 代理人 | 100119507<br>弁理士 刑部 俊                                |
| (87) 国際公開日    | 平成24年4月26日 (2012.4.26)       | (74) 代理人 | 100142929<br>弁理士 井上 隆一                               |
| (31) 優先権主張番号  | 61/405,517                   | (74) 代理人 | 100148699<br>弁理士 佐藤 利光                               |
| (32) 優先日      | 平成22年10月21日 (2010.10.21)     |          |  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |  |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 WDHD1ペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【要約】

がんに対するペプチドワクチンを本明細書に記載する。特に、HLA抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導するSEQ ID NO: 32由来の単離されたエピトープペプチドまたは免疫原性断片を提供する。関心対象のペプチドのアミノ酸配列は、任意で、1個、2個、または数個のアミノ酸配列の置換、欠失、挿入、または付加によって改変されていてもよい。そのようなペプチドを含む、がんを治療する薬学的組成物および方法も提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

SEQ ID NO: 32 のアミノ酸配列またはその免疫学的活性断片を含む単離されたペプチドであって、HLA 抗原に結合し得、かつ細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能を誘導し得る、単離されたペプチド。

## 【請求項 2】

以下の (a) または (b) の単離されたペプチド:

(a) SEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19 および 29 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたペプチド;

(b) HLA 抗原に結合し、かつ細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能を誘導する能力を保持する改変ペプチドを得るように SEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19 および 29 からなる群より選択されるアミノ酸配列において 1 個、2 個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されているアミノ酸配列を含む、単離されたペプチド。

10

## 【請求項 3】

HLA 抗原が HLA - A 24 である、請求項 1 または 2 記載の単離されたペプチド。

## 【請求項 4】

ノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の単離されたペプチド。

20

## 【請求項 5】

以下からなる群より選択される少なくとも 1 つの置換を有する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項記載のペプチド:

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

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

## 【請求項 6】

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

30

## 【請求項 7】

CTL を誘導するための組成物であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の 1 種もしくは複数種のペプチド、または請求項 6 記載の 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物。

## 【請求項 8】

(a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の 1 種もしくは複数種のペプチド;

(b) 請求項 6 記載の 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチド;

(c) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドと HLA 抗原との複合体を自身の表面上に提示する 1 種もしくは複数種の APC またはエキソソーム; または

40

(d) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドと HLA 抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する 1 種もしくは複数種の CTL、を含み、薬学的に許容される担体と組み合わせて

(i) 現存するがんの治療、

(ii) がんの予防、

(iii) 術後のがんの再発の予防、および

(vi) それらの組み合わせ

からなる群より選択される目的のために製剤化される、薬学的組成物。

## 【請求項 9】

HLA 抗原が HLA - A 24 である対象への投与のために製剤化される、請求項 8 記載

50

の薬学的組成物。

【請求項 10】

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

(a) APC を請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エキスピボまたはインビボで接触させる段階、および

(b) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを APC に導入する段階。

【請求項 11】

以下からなる群より選択される段階を含む、CTL を誘導するための方法：

(a) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する APC と共培養する段階、

(b) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、および

(c) T 細胞受容体 (TCR) サブユニットポリペプチドによって形成される TCR が細胞表面で HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体に結合することができる、該 TCR サブユニットポリペプチドをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを T 細胞に導入する段階。

【請求項 12】

HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された APC。

【請求項 13】

以下からなる群より選択される段階を含む方法によって誘導される、請求項 12 記載の APC：

(a) APC を請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エキスピボまたはインビボで接触させる段階、および

(b) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを APC に導入する段階。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドを標的とする、単離された CTL。

【請求項 15】

以下からなる群より選択される段階を含む方法によって誘導される、請求項 14 記載の CTL：

(a) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する APC と共培養する段階；

(b) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

(c) T 細胞受容体 (TCR) サブユニットポリペプチドによって形成される TCR が細胞表面で HLA 抗原と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体に結合することができる、該 TCR サブユニットポリペプチドをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを T 細胞に導入する段階。

【請求項 16】

対象においてがんに対する免疫応答を誘導する方法であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドもしくはその免疫学的活性断片、または該ペプチドもしくは該断片をコードするポリヌクレオチドを該対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドと HLA 抗原とを含む複合体を提示する、エキソソーム。

【請求項 18】

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

10

20

30

40

50

ター。

【請求項 19】

請求項 18 記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチドに対する抗体、またはその免疫学的活性断片。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載のペプチド、請求項 6 記載のポリヌクレオチド、または請求項 20 記載の抗体もしくは免疫学的活性断片を含む、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物科学の分野、より具体的にはがん療法の分野に関する。特に本発明は、がんワクチンとして非常に有効な新規ペプチド、ならびに腫瘍を治療および予防するための薬物に関する。

【0002】

優先権

本出願は、2010年10月21日に提出された米国仮特許出願第61/405,517号の恩典を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

CD8陽性CTLは、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子上の腫瘍関連抗原(TAA)由来のエピトープペプチドを認識し、その後、腫瘍細胞を殺傷することが実証されている。TAAの最初の例としてメラノーマ抗原(MAGE)ファミリーが発見されて以来、他の多くのTAAが、免疫学的アプローチによって発見されており(非特許文献1、2)、これらのTAAのいくつかは、現在、免疫療法標的として目下臨床開発の過程にある。

【0004】

好ましいTAAは、がん細胞の増殖および生存に不可欠なTAAである。そのようなTAAを免疫療法の標的として用いることにより、療法によって誘発される免疫選択の結果としてのTAAの欠失、突然変異、または下方制御に起因し得るがん細胞の免疫回避の詳述されているリスクが最小限に抑えられ得る。したがって、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し得る新規TAAの同定により、更なる開発が保証され、したがって様々な種類のがんに対するペプチドワクチン接種戦略の臨床適用が行われている(非特許文献3~10)。現在までに、これらのTAA由来ペプチドを用いたいくつかの臨床試験が報告されている。残念ながら、現在のがんワクチン治験の多くは低い客観的奏効率しか示していない(非特許文献11~13)。したがって、免疫療法の標的として有用な新規TAAの同定が依然として必要とされている。

【0005】

WDリピートおよび高モビリティグループボックスDNA結合タンパク質1から構成されるWDHD1遺伝子(GenBankアクセッション番号NM\_007086またはNM\_001008396)は、肺癌および食道癌においてかなりの割合で過剰発現される遺伝子としてゲノムワイド遺伝子発現プロファイル解析より同定された。さらに、WDHD1は、肺癌および食道癌において細胞周期制御因子として、およびホスホイノシチド3-キナーゼ/AKT経路における下流の分子として重要な役割を担う可能性が高い(非特許文献14)。以上を総合すると、このデータは、WDHD1はがん免疫療法、特に肺癌および食道癌免疫療法に適した標的であり得ることを示唆する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1】Boon T, Int J Cancer 1993,54(2):177-80
- 【非特許文献 2】Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996,183(3):725-9
- 【非特許文献 3】Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996,88(20):1442-55
- 【非特許文献 4】Butterfield LH et al., Cancer Res 1999,59(13):3134-42
- 【非特許文献 5】Vissers JL et al., Cancer Res 1999,59(21):5554-9
- 【非特許文献 6】van der Burg SH et al., J Immunol 1996,156(9):3308-14
- 【非特許文献 7】Tanaka F et al., Cancer Res 1997,57(20):4465-8
- 【非特許文献 8】Fujie T et al., Int J Cancer 1999,80(2):169-72
- 【非特許文献 9】Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999,81(3):459-66
- 【非特許文献 10】Oiso M et al., Int J Cancer 1999,81(3):387-94
- 【非特許文献 11】Belli F et al., J Clin Oncol 2002,20(20):4169-80
- 【非特許文献 12】Coulie PG et al., Immunol Rev 2002,188:33-42
- 【非特許文献 13】Rosenberg SA et al., Nat Med 2004,10(9):909-15
- 【非特許文献 14】Sato N et al. Clin Cancer Res. 2010;16(1):226-39

【発明の概要】

【0007】

本発明は、免疫療法の適切な標的として役立つ可能性のある新規ペプチドの発見に少なくとも一部基づいている。TAAは一般に免疫系にとって「自己」として認識され、そのため多くの場合は自然免疫原性を有しないため、適切な標的の発見は極めて重要である。上記の通り、WDHD1（例えば、GenBankアクセッション番号NM\_007086にも示されるSEQ ID NO:31および32、またはGenBankアクセッション番号NM\_001008396にも示されるSEQ ID NO:37および38）は、がんにおいて上方制御されるものとして同定されており、このがんには、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、慢性骨髄性白血病（CML）、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC（小細胞肺癌）、NSCLC（非小細胞肺癌）および精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。したがって、本発明は、適切ながんマーカーおよび免疫療法の標的の候補としてのWDHD1に着目する。

【0008】

本発明の過程において、WDHD1に特異的なCTLを誘導する能力を有するWDHD1の遺伝子産物の特異的エピトープペプチドが同定された。以下にさらに詳述するように、健常ドナーから得た末梢血単核細胞（PBMC）を、WDHD1由来のHLA-A\*2402結合候補ペプチドを用いて刺激した。次いで、各候補ペプチドをパルスしたHLA-A24陽性標的細胞に対する特異的細胞傷害性を有するCTL株を樹立した。本明細書における結果は、これらのペプチドが、WDHD1を発現する細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24拘束性エピトープペプチドであることを実証している。これらの結果は、WDHD1は免疫原性が強く、かつそのエピトープは腫瘍免疫療法の有効な標的であることをさらに示している。

【0009】

したがって、HLA抗原に結合し、WDHD1のアミノ酸配列（SEQ ID NO:32）またはその免疫学的活性断片を含む単離されたペプチドを提供することは、本発明の1つの目的である。そのようなペプチドは、CTL誘導能を有すると予測され、したがって、インビトロまたはエクスピボにおいてCTLを誘導するため、またはがんに対する免疫応答を誘導するために対象に投与するために使用することができ、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。好ましいペプチドは、ノナペプチドまたはデカペプチドであり、より好ましくは、SEQ ID NO:2~30の中より選択されるアミノ酸配列を有するノナペプチドまたはデカペプチドである。これらの中で、SEQ ID NO:6、8、12、13、14、19および29のペプチドが、特に強力なCTL誘導能を示し、したがって特に好ましい。

。

10

20

30

40

50

## 【0010】

本発明はまた、改変ペプチドが元の未改変ペプチドの必要なCTL誘導能を保持する限り、1個、2個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されているWDHD1の免疫学的活性断片のアミノ酸配列を有する改変ペプチドを企図する。これらの中で、1個、2個またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されているSEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19または29のアミノ酸配列を有するペプチドが特に好ましい。

## 【0011】

さらに、本発明は、本発明のペプチドのいずれかをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。これらのポリヌクレオチドは、CTL誘導能を有するAPCを誘導または調製するために使用することができる。上記の本発明のペプチドと同様に、そのようなAPCを、がんに対する免疫応答を誘導するために対象に投与してもよい。

10

## 【0012】

対象に投与された場合、本発明のペプチドは、各ペプチドを標的とするCTLを誘導するように、APCの表面上に提示される。したがって、CTLを誘導するために本発明によって提供されるいずれかのペプチドまたはポリヌクレオチドを含む組成物または剤を提供することは、本発明の1つの目的である。いずれかのペプチドまたはポリヌクレオチドを含むそのような組成物または剤は、がんの治療および/もしくは予防またはがんの術後の再発の予防に使用することができ、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されず、および/またはそれらの術後の再発の予防に使用することができる。

20

## 【0013】

本発明はまた、がん、特に原発性がんの治療および/もしくは予防、または術後のその再発の予防のために製剤化される本発明の1種または複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む薬学的な剤または組成物を企図する。本発明の薬学的な剤または組成物は任意で、有効成分として、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの代わりにまたはそれに加えて、本発明のペプチドのいずれかを提示するAPCまたはエキソソームを含み得る。

## 【0014】

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを、例えば、対象由来のAPCを本発明のペプチドと接触させるか、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入することにより、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示するAPCを誘導するために用いることができる。そのようなAPCは、標的ペプチドに対する高いCTL誘導能を有し、がん免疫療法に有用である。したがって、本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための方法、ならびにそのような方法によって得られるAPCの両方を企図する。

30

## 【0015】

本発明のさらに別の目的は、CTLを誘導するための方法を提供することであり、そのような方法は、CD8陽性細胞を本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームと共培養する段階、またはT細胞受容体(TCR)サブユニットポリペプチドによって形成されるTCRが細胞表面でHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体に結合することができる、該TCRサブユニットポリペプチドをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを導入する段階を含む。そのような方法によって得られるCTLは、がんの治療および予防において有用であり、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

40

## 【0016】

本発明のさらに別の目的は、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示する単離されたAPCを提供することである。本発明はさらに、本発明のペプチドを標的

50

とする単離されたCTLを提供する。これらのAPCおよびCTLは、がん免疫療法に用いることができる。

【0017】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、本発明の1種もしくは複数種のペプチド、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を提示するエキソソームもしくはAPCを含む組成物または剤を対象に投与する段階を含むそのような方法を提供することは、本発明のさらに別の目的である。

【0018】

本発明の適用性は、WDHD1の過剰発現に関連するかまたはWDHD1の過剰発現から生じるいくつかの疾患、例えばがんのいずれにも及び、例示的ながんには、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

10

【課題を解決するための手段】

【0019】

より具体的には、本発明は、以下の[1]～[21]を提供する。

[1] SEQ ID NO: 32のアミノ酸配列またはその免疫学的活性断片を含む単離されたペプチドであって、HLA抗原に結合し得、かつ細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を誘導し得る、単離されたペプチド；

[2] 以下の(a)または(b)の単離されたペプチド；

20

(a) SEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19および29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたペプチド；

(b) HLA抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を誘導する能力を保持する改変ペプチドを得るようにSEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19および29からなる群より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されているアミノ酸配列を含む、単離されたペプチド；

[3] HLA抗原がHLA-A24である、[1]または[2]の単離されたペプチド；

[4] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1]～[3]のいずれか1つの単離されたペプチド；

30

[5] 以下からなる群より選択される少なくとも1つの置換を有する、[2]～[4]のいずれか1つのペプチド；

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

(b) C末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンおよびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸であるか、または前記アミノ酸になるように改変されている；

[6] [1]～[5]のいずれか1つのペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド；

40

[7] CTLを誘導するための組成物であって、[1]～[5]のいずれか1つの1種もしくは複数種のペプチド、または[6]の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物；

[8] (a) [1]～[5]のいずれか1つの1種もしくは複数種のペプチド；

(b) [6]の1種もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[5]のいずれか1つのペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する1種もしくは複数種のAPCまたはエキソソーム；または

(d) [1]～[5]のいずれか1つのペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する1種もしくは複数種のCTL、を含み、薬学的に許容される担体と組み合わせて

50

- ( i ) 現存するがんの治療、  
 ( i i ) がんの予防、  
 ( i i i ) 術後のがんの再発の予防、および  
 ( v i ) それらの組み合わせ  
 からなる群より選択される目的のために製剤化される、薬学的組成物；  
 [ 9 ] H L A 抗原が H L A - A 2 4 である対象への投与のために製剤化される、[ 8 ] の薬学的組成物；  
 [ 1 0 ] 以下からなる群より選択される段階を含む、C T L 誘導能を有する抗原提示細胞 ( A P C ) を誘導するための方法：  
 ( a ) A P C を [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドとインビトロ、エキスピボまたはインビボで接触させる段階、および  
 ( b ) [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階；  
 [ 1 1 ] 以下からなる群より選択される段階を含む、C T L を誘導するための方法：  
 ( a ) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C と共培養する段階、  
 ( b ) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれか 1 つのペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、および  
 ( c ) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットポリペプチドによって形成される T C R が細胞表面で H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 5 ] に記載のいずれか 1 つのペプチドとの複合体に結合することができる、該 T C R サブユニットポリペプチドをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチドを T 細胞に導入する段階；  
 [ 1 2 ] H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された A P C ；  
 [ 1 3 ] 以下からなる群より選択される段階を含む方法によって誘導される、[ 1 2 ] の A P C ；  
 ( a ) A P C を [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドとインビトロ、エキスピボまたはインビボで接触させる段階、および  
 ( b ) [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階；  
 [ 1 4 ] [ 1 ] ~ [ 5 ] のペプチドのいずれかを標的とする、単離された C T L ；  
 [ 1 5 ] 以下からなる群より選択される段階を含む方法によって誘導される、[ 1 4 ] の C T L ；  
 ( a ) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C と共培養する段階；  
 ( b ) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および  
 ( c ) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットポリペプチドによって形成される T C R が [ 1 ] ~ [ 5 ] に記載のいずれか 1 つのペプチドに結合することができる、該 T C R サブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを T 細胞に導入する段階；  
 [ 1 6 ] 対象においてがんに対する免疫応答を誘導する方法であって、[ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドもしくはその免疫学的活性断片、または該ペプチドもしくは該断片をコードするポリヌクレオチドを該対象に投与する段階を含む、方法；  
 [ 1 7 ] [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドと H L A 抗原とを含む複合体を提示するエキソソーム；  
 [ 1 8 ] [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター；  
 [ 1 9 ] [ 1 8 ] のベクターで形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞；  
 [ 2 0 ] [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチドに対する抗体、またはその免疫学的活

10

20

30

40

50

性断片；ならびに

[ 2 1 ] [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれか 1 つのペプチド、[ 6 ] のポリヌクレオチド、または [ 2 0 ] の抗体もしくは免疫学的活性断片を含む、診断キット。

【 0 0 2 0 】

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

10

【 0 0 2 1 】

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

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

【 図 1 】 図 1 は、WDHD 1 に由来するペプチドで誘導した CTL に対する IFN - ELISPOT アッセイの結果を示す一連の写真 ( a ) ~ ( h ) から構成される。WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 7 3 1 ( SEQ ID NO : 6 ) を用いたウェル番号 # 1 ( a )、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 6 1 1 ( SEQ ID NO : 8 ) を用いた # 2 ( b )、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 2 3 7 ( SEQ ID NO : 1 2 ) を用いた # 6 ( c )、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 8 4 4 ( SEQ ID NO : 1 3 ) を用いた # 1 ( d )、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 2 7 3 ( SEQ ID NO : 1 4 ) を用いた # 4 ( e )、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 7 2 7 ( SEQ ID NO : 1 9 ) を用いた # 6 ( f ) および WDHD 1 - A 2 4 - 1 0 - 6 2 5 ( SEQ ID NO : 2 9 ) を用いた # 3 ( g ) における CTL は、それぞれ対照と比較して強力な IFN - 産生を示した。これらの写真のウェル上の四角は、対応するウェルからの細胞を、CTL 株を樹立するために増殖させたことを示す。対照的に、典型的な陰性データの例として、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 7 9 8 ( SEQ ID NO : 1 ) で刺激した CTL ( h ) からは特異的 IFN - 産生が示されなかった。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する IFN - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する IFN - 産生を示す。

30

【 図 2 】 図 2 は、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 2 3 7 ( SEQ ID NO : 1 2 ) ( a )、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 8 4 4 ( SEQ ID NO : 1 3 ) ( b ) および WDHD 1 - A 2 4 - 1 0 - 6 2 5 ( SEQ ID NO : 2 9 ) ( c ) で刺激した CTL 株の IFN - 産生を順に実証する、IFN - ELISA アッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ ( a ) ~ ( c ) から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立された CTL 株が、対照と比較して強力な IFN - 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対する IFN - 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対する IFN - 産生を示す。

40

【 図 3 】 図 3 は、WDHD 1 - A 2 4 - 9 - 8 4 4 ( SEQ ID NO : 1 3 ) で刺激した CTL 株からの限定希釈によって樹立された CTL クローンの IFN - 産生を示す折れ線グラフである。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立された CTL

50

クローンが、対照と比較して強力なIFN- $\gamma$ 産生を示すことを実証している。図中、「+」は、適切なペプチドをパルスした標的細胞に対するIFN- $\gamma$ 産生を示し、「-」は、いずれのペプチドもパルスしていない標的細胞に対するIFN- $\gamma$ 産生を示す。

【図4】図4は、WDHD1およびHLA-A\*2402の両方を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す折れ線グラフである。HLA-A\*2402または全長WDHD1遺伝子をトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として調製した。WDHD1-A24-9-844(SEQ ID NO:13)を用いて樹立されたCTLクローンは、WDHD1およびHLA-A\*2402の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞に対して特異的CTL活性を示した(黒菱形)。一方、HLA-A\*2402(三角)またはWDHD1(丸)のいずれかを発現する標的細胞に対して、有意な特異的CTL活性は検出されなかった。

【発明を実施するための形態】

#### 【0023】

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

#### 【0024】

本明細書において言及されるすべての出版物、特許、または特許出願は、その全体が参照によって本明細書に明確に組み入れられる。しかしながら、本明細書中のいかなるものも、本発明が先行発明によりそのような開示に先行する権利を与えられないと承認するものとしては解釈されるべきではない。

#### 【0025】

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

#### 【0026】

##### I. 定義

別段の定めのない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている用語と同一の意味を有する。しかし、矛盾する場合には、定義を含め、本明細書が優先される。

#### 【0027】

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

#### 【0028】

物質(例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等)に関して使用する「単離された」および「精製された」という用語は、該物質がそうでなければ天然源中に含まれ得る少なくとも1種の物質を実質的に含まないことを示す。したがって、単離または精製されたペプチドは、細胞材料、例えば糖質、脂質、またはペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの他の混入タンパク質を実質的に含まないかまたは化学合成される場合に化学物質前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、ペプチドが、(それが)単離された細胞または組換え産生された細胞の細胞成分から分離されたペプチドの調製物を含む。したがって、細胞材料を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%、または5%(乾燥重量ベースで)未

10

20

30

40

50

満の異種タンパク質（本明細書において「混入タンパク質」とも称する）を有するポリペプチドの調製物を含む。ペプチドを組換え産生する場合、ペプチドは、好ましくは、培養培地も実質的に含まず、培養培地をペプチド調製物の容量の約20%、10%、または5%未満で有するペプチドの調製物を含む。ペプチドを化学合成によって生成する場合、ペプチドは、好ましくは、化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、ペプチドの合成に關与する化学物質前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容量の約30%、20%、10%、5%（乾燥重量ベースで）未満で有するペプチドの調製物を含む。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドを含むことは、例えば、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクーマシーブリリアントブルー染色等の後の単一バンドの出現によって示すことができる。好ましい態様において、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは、単離または精製される。

10

## 【0029】

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

## 【0030】

本明細書で時として用いる「オリゴペプチド」という用語は、長さが20残基またはそれ未満、典型的には15残基またはそれ未満の本発明のペプチド、および典型的には約8~約11残基、しばしば9または10残基から構成される本発明のペプチドを指すのに用いられる。後者はそれぞれ、本明細書において「ノナペプチド」および「デカペプチド」と称される。

20

## 【0031】

本明細書で使用する「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。アミノ酸は、L-アミノ酸またはD-アミノ酸のいずれでもよい。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、および細胞内で翻訳後に修飾されたアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 $\alpha$ -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同一の基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基に結合した炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様の機能を有する化合物を指す。

30

## 【0032】

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

## 【0033】

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

40

## 【0034】

本明細書で使用する「組成物」という用語は、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組み合わせから直接または間接的に生じる任意の生成物を指す。「薬学的組成物」に関するそのような用語は、有効成分と担体を構成する任意の不活性成分とを含む生成物、ならびに任意の2種もしくはそれ以上の成分の組み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、1種もしくは複数種の成分の解離から、または1種もしくは複数種の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を

50

包含することが意図される。したがって、本発明との関連において、「薬学的組成物」という用語は、本発明の化合物と薬学的または生理学的に許容される担体とを混合することによって作製される任意の組成物を指す。

【0035】

本明細書における「有効成分」という用語は、生物学的活性または生理的活性のある、剤または組成物中の物質を指す。特に、薬学的な剤または組成物との関連において、「有効成分」という用語は、目的の薬理学的効果を示す物質を指す。例えば、がんの治療または予防に使用するための薬学的な剤または組成物の場合、剤または組成物中の有効成分は、がん細胞および/または組織に対して直接的または間接的に、少なくとも1種の生物学的作用または生理的作用をもたらす得る。好ましくは、そのような作用には、がん細胞増殖の低下または阻害、がん細胞および/または組織の損傷または殺傷などが含まれ得る。典型的には、有効成分の間接的効果は、がん細胞を認識または殺傷するCTLの誘導である。製剤化される前には、「有効成分」は「バルク」、「原薬」、または「原体」とも称される。

10

【0036】

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

【0037】

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

20

【0038】

別段の定めのない限り、「がん」という用語は、WDHD1遺伝子を過剰発現するがんを指し、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【0039】

別段の定めのない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」および「CTL」という用語は本明細書において互換的に使用され、特に別段の指定のない限り、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。

30

【0040】

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

40

【0041】

別段の定めのない限り、本明細書で用いる「キット」という用語は、試薬と他の材料との組み合わせに関して用いられる。本明細書では、キットはマイクロアレイ、チップ、マーカー等を含み得ることが意図される。「キット」という用語は、試薬および/または材料の特定の組み合わせに限定されないことが意図される。

【0042】

対象または患者との関連において、本明細書で使用される「対象の（または患者の）HLA抗原はHLA-A24である」という語句は、対象または患者がMHC（主要組織適合複合体）クラスI分子としてのHLA-A24抗原遺伝子をホモ接合的またはヘテロ接合的に保有し、かつHLA-A24抗原が対象または患者の細胞においてHLA抗原とし

50

て発現されることを指す。

【0043】

本発明の方法および組成物ががんの「治療」との関連において有用である限り、治療が臨床的利点、例えばWDHD1遺伝子の発現の低下、または対象におけるがんの大きさ、広がり、もしくは転移能の減少をもたらす場合に、治療は「有効である」と見なされる。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、がんの形成が遅延されるもしくは妨げられるか、またはがんの臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、特定の腫瘍の種類を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。

【0044】

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

【0045】

本発明との関連において、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/または術後のその再発の予防は、以下の段階、がん細胞の外科的切除、がん性細胞の増殖の阻害、腫瘍の退行または退縮、寛解の誘導およびがんの発生の抑制、腫瘍退縮、ならびに転移の低減または阻害などの段階のいずれかを含む。がんの効果的な治療および/または予防は、死亡率を減少させ、がんを有する個体の予後を改善し、血中の腫瘍マーカーのレベルを低下させ、かつがんに伴う検出可能な症状を緩和する。例えば、症状の軽減または改善は効果的な治療および/または予防を構成し、10%、20%、30%もしくはそれ以上の軽減もしくは安定した疾患を含む。

【0046】

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

【0047】

別段の定めのない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている用語と同一の意味を有する。

【0048】

II. ペプチド

以下に詳細に記載する本発明のペプチドは、「WDHD1ペプチド」と称することができる。

【0049】

WDHD1由来のペプチドがCTLによって認識される抗原として機能することを実証するために、WDHD1 (SEQ ID NO: 32) 由来のペプチドを解析して、それ

10

20

30

40

50

らが、一般的に見られるHLAアレルであるHLA-A24によって拘束される抗原エピトープであるかどうかを判定した(Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994)。

【0050】

WDHD1由来のHLA-A24結合ペプチドの候補を、HLA-A24に対するそれらの結合親和性に基づく情報を使用して同定した。以下の候補ペプチドを同定した：

WDHD1 - A24 - 9 - 798 (SEQ ID NO: 1)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 289 (SEQ ID NO: 2)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 143 (SEQ ID NO: 3)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 734 (SEQ ID NO: 4)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 767 (SEQ ID NO: 5)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 731 (SEQ ID NO: 6)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 318 (SEQ ID NO: 7)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 611 (SEQ ID NO: 8)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 9 (SEQ ID NO: 9)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 193 (SEQ ID NO: 10)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 227 (SEQ ID NO: 11)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 237 (SEQ ID NO: 12)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO: 13)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 273 (SEQ ID NO: 14)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 971 (SEQ ID NO: 15)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 136 (SEQ ID NO: 16)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 94 (SEQ ID NO: 17)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 549 (SEQ ID NO: 18)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 727 (SEQ ID NO: 19)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 280 (SEQ ID NO: 20)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 457 (SEQ ID NO: 21)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 798 (SEQ ID NO: 22)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 131 (SEQ ID NO: 23)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 778 (SEQ ID NO: 24)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 445 (SEQ ID NO: 25)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 988 (SEQ ID NO: 26)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 80 (SEQ ID NO: 27)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 748 (SEQ ID NO: 28)、  
 WDHD1 - A24 - 10 - 625 (SEQ ID NO: 29) および  
 WDHD1 - A24 - 10 - 518 (SEQ ID NO: 30)。

【0051】

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

WDHD1 - A24 - 9 - 731 (SEQ ID NO: 6)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 611 (SEQ ID NO: 8)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 237 (SEQ ID NO: 12)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO: 13)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 273 (SEQ ID NO: 14)、  
 WDHD1 - A24 - 9 - 727 (SEQ ID NO: 19) および  
 WDHD1 - A24 - 10 - 625 (SEQ ID NO: 29)。

【0052】

樹立されたこれらのCTLは、各ペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な特異的CTL活性を示した。本明細書におけるこれらの結果は、WDHD1がCTLによって認

10

20

30

40

50

識される抗原であること、および試験されたペプチドがHLA-A24拘束性WDHD1のエピトープペプチドであることを実証している。

【0053】

WDHD1遺伝子は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されないがんの細胞および組織では過剰発現されるが、ほとんどの正常器官では発現されないため、これは免疫療法の優れた標的である。したがって、本発明は、CTLによって認識されるWDHD1からのエピトープのノナペプチド(9個のアミノ酸残基から構成されるペプチド)およびデカペプチド(10個のアミノ酸残基から構成されるペプチド)を提供する。あるいは、本発明はHLA抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導する単離されたペプチドであって、SEQ ID NO:32のアミノ酸配列を有するかまたはその免疫学的活性断片である、単離されたペプチドを提供する。具体的には、本発明は、SEQ ID NO:6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列のアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。より具体的には、いくつかの態様において、本発明は、SEQ ID NO:6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを提供する。

10

【0054】

一般に、例えば、インターネット上で現在利用可能なソフトウェアプログラム、例えばParker KC et al., J Immunol 1994,152(1):163-75に記載されているものを使用して、様々なペプチドとHLA抗原との間の結合親和性をインシリコで算出することができる。HLA抗原との結合親和性は、例えば、Parker KC et al., J Immunol 1994,152(1):163-75; およびKuzushima K et al., Blood 2001,98(6):1872-81、Larsen MV et al. BMC Bioinformatics.2007;8:424、およびBuus S et al. Tissue Antigens.,62:378-84,2003に記載されているように測定することができる。結合親和性を測定するための方法は、例えば、Journal of Immunological Methods,1995,185:181-190; およびProtein Science,2000,9:1838-1846に記載されている。したがって、そのようなソフトウェアプログラムを容易に利用して、HLA抗原との高い結合親和性を有するWDHD1由来の断片を選択することができる。したがって、本発明は、そのような公知のプログラムによって決定された、HLA抗原との高い結合親和性を有するWDHD1由来の任意の断片から構成されるペプチドを包含する。さらに、そのようなペプチドは、全長のWDHD1配列(例えば、SEQ ID NO:32または38)を含み得る。

20

30

【0055】

本発明のペプチド、特に本発明のノナペプチドおよびデカペプチドは、ペプチドがそのCTL誘導能を保持する限り、付加的なアミノ酸残基を隣接させることができる。具体的な付加的なアミノ酸残基は、それらが元のペプチドのCTL誘導能を損なわない限り、任意の種類のアミノ酸から構成され得る。したがって、本発明は、HLA抗原に対する結合親和性を有するペプチド、特にWDHD1由来のペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば、約40アミノ酸未満であり、多くの場合は約20アミノ酸未満であり、通常は約15、14、13、12、11、または10アミノ酸未満である。

40

【0056】

一般に、あるペプチド中の1個または複数個のアミノ酸の改変は該ペプチドの機能に影響を及ぼさず、または場合によっては元のタンパク質の所望の機能を増強することさえあることが公知である。実際に、改変ペプチド(すなわち、元の参照配列に対して1個、2個または数個のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入または付加することによって改変されたアミノ酸配列から構成されるペプチド)は、元のペプチドの生物学的活性を保持することが知られている(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984,81:5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982,10:6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982,79:6409-13)。したがって、本発明の一態様によれば、本発明のCTL誘導能を有するペプチドは、SEQ ID NO:6、8、12、13、14、19および2

50

9の中より選択されるアミノ酸配列からなり、1個、2個またはそれ以上のアミノ酸が付加、欠失、挿入および/または置換されているペプチドから構成されてよい。

【0057】

当業者は、単一のアミノ酸またはアミノ酸配列全体のわずかな割合を変更する、アミノ酸配列に対する個々の改変（すなわち、欠失、挿入、付加および/または置換）が、元のアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらすことを認識し；したがって、それは「保存的置換」または「保存的改変」と称され、この場合、タンパク質の変化は類似の機能を有するタンパク質をもたらす。機能的に類似しているアミノ酸を提示する保存的置換の表は、当技術分野において周知である。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）、ならびに以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖である：脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；ヒドロキシル基含有側鎖（S、T、Y）；硫黄原子含有側鎖（C、M）；カルボン酸およびアミド含有側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；ならびに芳香族含有側鎖（H、F、Y、W）。加えて、以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：

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

【0058】

このような保存的改変ペプチドもまた、本発明のペプチドと見なされる。しかしながら、本発明のペプチドはこれらに限定されず、得られた改変ペプチドが元の未改変ペプチドのCTL誘導能を保持する限り、非保存的改変を含み得る。さらに、改変ペプチドは、WDHD1の多型変異体、種間相同体、およびアリル由来のCTL誘導可能なペプチドを排除しない。

【0059】

より高い結合親和性を達成するために、本発明のペプチドに対してアミノ酸残基を挿入、置換または付加してもよく、あるいは本発明のペプチドからアミノ酸残基を欠失させてよい。必要なCTL誘導能を保持するために、好ましくは少数の（例えば、1個、2個または数個の）またはわずかな割合のアミノ酸のみを改変（すなわち、欠失、挿入、付加または置換）する。本明細書において、「数個」という用語は、5個またはそれ未満のアミノ酸、例えば3個またはそれ未満を意味する。改変されるアミノ酸の割合は、好ましくは20%もしくはそれ未満、より好ましくは15%もしくはそれ未満、例えば10%もしくはそれ未満、例えば1~5%である。

【0060】

免疫療法において用いられた場合、本発明のペプチドは、HLA抗原との複合体として、細胞またはエキソソームの表面上に提示される。天然に提示されるペプチドに加えて、HLA抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であることから（J Immunol 1994,152:3913; Immunogenetics 1995,41:178; J Immunol 1994,155:4307）、そのような規則性に基づいた改変を本発明の免疫原性ペプチドに導入することができる。

【0061】

例えば、高いHLA-A24結合親和性を保有するペプチドは、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンで置換されたN末端から2番目のアミノ酸を有する傾向がある。同様に、C末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、またはメチオニンで置換されたペプチドもまた、好都合に用いられ

得る。したがって、SEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドであって、前記SEQ ID NOのアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンで置換されている、および/または前記SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、もしくはメチオニンで置換されているペプチドが、本発明に包含される。

【0062】

末端のアミノ酸においてだけでなく、ペプチドの潜在的なT細胞受容体(TCR)認識部位においても、置換を導入することができる。いくつかの研究は、例えばCAP1、p53(264-272)、Her-2/neu(369-377)、またはgp100(209-217)など、アミノ酸置換を有するペプチドが元のペプチドと同等であるかまたはより優れたものであり得る可能性があることを実証している(Zaremba et al. Cancer Res. 57,4570-4577,1997、T.K.Hoffmann et al. J Immunol.(2002);168(3):1338-47.、S.O.Dionne et al. Cancer Immunol immunother.(2003)52:199-206、およびS.O.Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy(2004)53,307-314)。

10

【0063】

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

【0064】

例えば、本発明は、CTL誘導能を有し、かつ以下の中より選択されるアミノ酸配列を含む14、13、12、11、または10個未満のアミノ酸長の単離されたペプチドを提供する：

20

(i) アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 6、8、12、13、14および19の中より選択される；

(ii) SEQ ID NO: 6、8、12、13、14および19の中より選択されるアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列、ならびに

(iii) 以下の特徴の一方または両方を有する、(ii)のアミノ酸配列：

(a) 前記SEQ ID NOのN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびトリプトファンの中より選択される、ならびに

30

(b) 前記SEQ ID NOのC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、およびメチオニンの中より選択される。

【0065】

さらに、本発明はまた、CTL誘導能を有し、かつ以下の中より選択されるアミノ酸配列を含む15、14、13、12、または11個未満のアミノ酸長の単離されたペプチドも提供する：

(i') SEQ ID NO: 29のアミノ酸配列；

(ii') SEQ ID NO: 29のアミノ酸配列において1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されているアミノ酸配列、ならびに

40

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

(a) 前記SEQ ID NOのN末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンおよびトリプトファンの中より選択される、ならびに

(b) 前記SEQ ID NOのC末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンおよびメチオニンの中より選択される。

【0066】

これらのペプチドは、それらのペプチドをAPCと接触させた場合、APC上でHLA抗原と結合してAPC上にHLA抗原との複合体として提示される。あるいは、それらのペプチドは、それらのペプチドをAPCと接触させた場合、APCに導入され、(i)~(iii)および(i')~(iii')の中より選択されるアミノ酸配列からなる断片に

50

A P CにおいてプロセッシングされてA P C上にH L A抗原との複合体として提示される。結果的に、そのようなペプチドに特異的なC T Lが誘導される。

【0067】

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、副作用、例えば自己免疫障害または特定の物質に対するアレルギー症状が誘発される可能性がある。したがって、ペプチドの配列が別のタンパク質のアミノ酸配列と一致する状況を回避するために、利用可能なデータベースを使用して相同性検索を実施することができる。相同性検索から、対象ペプチドと1個または2個のアミノ酸が異なるペプチドでさえも存在しないことが明らかになった場合には、そのような副作用の危険を全く伴うことなしに、H L A抗原とのその結合親和性を増加させるため、および/またはそのC T L誘導能を増加させるために、該対象ペプチドを改変することができる。

10

【0068】

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

20

【0069】

C T L誘導能の確認は、ヒトM H C抗原を保有するA P C(例えば、Bリンパ球、マクロファージ、および樹状細胞(D C))、またはより具体的にはヒト末梢血単核白血球由来のD Cを誘導し、ペプチドで刺激した後、C D 8陽性細胞と混合し、次いで標的細胞に対してC T Lによって産生および放出されたI F N - を測定することによって達成することができる。反応系として、ヒトH L A抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物(例えば、BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auyeung C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA-A\*2402/DR1 transgenic mice: dependence on HLA class II restricted T(H) responseに記載されているもの)を使用することができる。例えば、標的細胞を<sup>51</sup>Cr等で放射標識することができ、標的細胞から放出された放射能から細胞傷害活性を算出することができる。あるいは、固定化したペプチドを保有するA P Cの存在下で、C T Lによって産生および放出されたI F N - を測定し、抗I F N - モノクローナル抗体を使用して培地上の阻止帯を可視化することによって、細胞傷害活性を試験することができる。

30

【0070】

上記のようにペプチドのC T L誘導能を調べることによって、S E Q I D N O : 6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列を有するノナペプチドまたはデカペプチドが、H L A抗原に対する高い結合親和性に加えて、特に高いC T L誘導能を示すことが見出された。したがって、これらのペプチドは本発明の好ましい態様として例示される。

40

【0071】

さらに、相同性解析は、そのようなペプチドが、他のいかなる公知のヒト遺伝子産物に由来するペプチドとも有意な相同性を有さないことを実証した。そのため、免疫療法に使用した場合に未知のまたは望ましくない免疫応答が生じる可能性は低くなっている。したがって、この局面からも、これらのペプチドはがん患者においてW D H D 1に対する免疫を誘発するのに使用される。したがって、本発明の好ましいペプチドは、S E Q I D N O : 6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列を有するそれらのペプチドである。

【0072】

50

上記の本発明のペプチドの改変に加えて、本発明のペプチドは、それらが、CTL誘導能を保持する限り、より好ましくは、必要なHLA結合も保持する限り、他のペプチドに連結させることもできる。「他の」適切なペプチドの例には、本発明のペプチドまたは他のTAAに由来するCTL誘導性ペプチドが含まれる。ペプチド間のリンカーは当技術分野で周知であり、例えばAA Y (P.M.Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NK R K (R.P.M.Sutmuller et al., J Immunol. 2000, 165:7308-7315)、またはK (S.Ota et al., Can Res. 62, 1471-1476、K.S.Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168:5709-5715)である。

【0073】

例えば、HLAクラスIおよび/またはクラスIIを介する免疫応答を増加させるために、WDHD1ではない腫瘍関連抗原ペプチドを実質的に同時に使用することもできる。がん細胞が2種以上の腫瘍関連遺伝子を発現し得ることは、十分に確立されている。したがって、特定の対象がさらなる腫瘍関連遺伝子を発現するかどうかを判定すること、ならびに次いでWDHD1組成物またはワクチン中に、そのような遺伝子の発現産物に由来するHLAクラスIおよび/またはHLAクラスII結合ペプチドを含めることは、当業者の慣例的な実験法の範囲内である。

【0074】

HLAクラスIおよびHLAクラスII結合ペプチドの例は当業者に公知であり(例えば、Coulie, Stem Cells 13:393-403, 1995を参照されたい)、したがって本明細書に開示したものと同様の様式で本発明において使用することができる。したがって、当業者は、1種もしくは複数種のWDHD1ペプチドおよび1種もしくは複数種のWDHD1ではないペプチドを含むポリペプチド、またはそのようなポリペプチドをコードする核酸を、分子生物学の標準的な手順を使用して容易に調製することができる。

【0075】

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

【0076】

ペプチドを直接的にまたは隣接配列の使用によって連結して、ポリトープを形成することができ、ポリトープのワクチンとしての使用は当技術分野において周知である(例えば、Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13):5845-5849, 1995; Gilbert et al., Nature Biotechnol. 15(12):1280-1284, 1997; Thomson et al., J Immunol. 157(2):822-826, 1996; Tarn et al., J Exp. Med. 171(1):299-306, 1990を参照されたい)。様々な数および組み合わせのエピトープを含むポリトープを調製することができ、CTLによる認識について、および免疫応答の増大における有効性について試験することができる。

【0077】

本発明のペプチドはさらに、それらが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、他の物質にさらに連結させることもできる。好適な物質の例には、ペプチド、脂質、糖および糖鎖、アセチル基、天然および合成のポリマー等が含まれ得る。ペプチドは、修飾によって本明細書に記載のペプチドの生物学的活性が損なわれない限り、修飾、例えば糖鎖付加、側鎖酸化、および/またはリン酸化を含むことができる。このような種類の修飾は、付加的な機能(例えば、標的化機能および送達機能)を付与すること、および/またはポリペプチドを安定化するように実施することができる。

【0078】

例えば、ポリペプチドのインビボ安定性を増加させるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体または非天然アミノ酸を導入することが当技術分野において公知であり; この概念を本発明のポリペプチドに対しても採用することができる。ポリペプチドの安定性は、いくつかの方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼならびに様々な生物学

10

20

30

40

50

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

【0079】

さらに、上述したように、1個、2個または数個のアミノ酸残基により置換、欠失、挿入または付加されている改変ペプチドの中から、元のペプチドと比較して同一かまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元のものと比較して同一かまたはそれよりも高い活性を有する改変ペプチドをスクリーニングまたは選択する方法を提供する。例えば、本方法は、以下の段階を含み得る：

a：本発明のペプチドの少なくとも1個のアミノ酸残基を置換、欠失、挿入、または付加する段階、

b：前記ペプチドの活性を測定する段階、および

c：元のペプチドと比較して同一かまたはそれよりも高い活性を有するペプチドを選択する段階。

本明細書において、前記活性には、MHC結合活性、APCまたはCTL誘導能、および細胞傷害活性が含まれ得る。

【0080】

III. WDHD1ペプチドの調製

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

【0081】

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

【0082】

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

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

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

(iii) ペプチド合成（日本語）、丸善、1975；

(iv) ペプチド合成の基礎と実験（日本語）、丸善、1985；

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

(vi) WO 99 / 67288；および

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

【0083】

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

10

20

30

40

50

ンビトロ翻訳系を採用して、ペプチドをインビトロで産生させることもできる。

【0084】

#### IV. ポリヌクレオチド

本発明は、前述の本発明のペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。これらには、天然WDHD1遺伝子（例えば、SEQ ID NO: 31 (GenBankアクセッション番号NM\_007086)またはSEQ ID NO: 37 (GenBankアクセッション番号NM\_001008396))由来のポリヌクレオチド、およびその保存的改変ヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において「保存的改変ヌクレオチド配列」という語句は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一の核酸が任意の特定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、あるコドンによってアラニンが指定されるあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、該コドンを、記載された対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的改変変異の一種である。ペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、該核酸のあらゆる可能なサイレント変異をも表す。核酸中の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く）を改変して、機能的に同一の分子を得ることができることを、当業者は認識するであろう。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、開示した各配列において非明示的に表されている。

10

20

【0085】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、およびそれらの誘導体から構成され得る。当技術分野において周知のとおり、DNA分子は塩基、例えば天然塩基A、T、C、およびGから構成され、RNAではTがUに置き換えられる。当業者は、非天然塩基もまたポリヌクレオチドに含まれることを認識する。

【0086】

本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を伴って、または伴わずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在するアミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位（例えば、酵素認識配列）を提供し得る。さらに、ポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードするコード配列に対する任意の付加的配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであってよく、またはマーカー遺伝子等を有する発現ベクター（プラスミド）であってよい。一般に、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを使用する従来の組換え技法によりポリヌクレオチドを操作することによって、そのような組換えポリヌクレオチドを調製することができる。

30

【0087】

組換え技法および化学合成技法のいずれを使用しても、本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、適切なベクターに挿入することによってポリヌクレオチドを作製することができ、これはコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現され得る。あるいは、PCR技法または適切な宿主内での発現を使用して、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を参照されたい）。あるいは、Beaucage SL & Iyer RP, Tetrahedron 1992, 48:2223-311; Matthes et al., EMBO J 1984, 3:801-5に記載されている固相技法を使用して、ポリヌクレオチドを合成することができる。

40

【0088】

#### V. エキソソーム

本発明はさらに、本発明のペプチドとHLA抗原との間に形成された複合体を自身の表面上に提示する、エキソソームと称される細胞内小胞を提供する。エキソソームは、例えば公表特許公報 特表平11-510507号およびWO99/03499に詳述されて

50

いる方法を使用して調製することができ、治療および/または予防の対象となる患者から得られたAPCを使用して調製することができる。本発明のエキソソームは、本発明のペプチドと同様に、ワクチンとして接種することができる。

#### 【0089】

複合体中に含まれるHLA抗原の型は、治療および/または予防を必要とする対象のものとは一致しなければならない。例えば日本人集団では、HLA-A24、特にHLA-A\*2402が広く一般的であり、したがってこれは日本人患者の治療に適していると考えられる。日本人および白人集団の間で高発現するHLA-A24型の使用は、有効な結果を得るのに好ましく、HLA-A\*2402などのサブタイプも使用される。典型的には、クリニックにおいて、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を予め調べることによって、この抗原に対して高レベルの結合親和性を有する、または抗原提示によるCTL誘導能を有するペプチドの適切な選択が可能となる。さらに、高い結合親和性およびCTL誘導能を示すペプチドを得るために、天然のWDHD1部分ペプチドのアミノ酸配列に基づいて、1個、2個、または数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入または付加を行うことができる。

10

#### 【0090】

本発明のエキソソームがHLA-A24型をHLA抗原として有する場合、SEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドが特に有用である。

#### 【0091】

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

20

#### 【0092】

##### VI. 抗原提示細胞 (APC)

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

#### 【0093】

APCは、特定の種類の細胞に限定されない。APCの例には、限定されないが、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている樹状細胞 (DC)、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞が含まれる。DCは、APCの中で最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCであるため、DCは本発明のAPCとして使用される。

30

#### 【0094】

例えば、末梢血単球からDCを誘導し、次いで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 (で刺激する) ことによって、本発明のAPCを得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与する場合、本発明のペプチドを提示するAPCが該対象の体内で誘導される。「APCを誘導する」という語句は、細胞を本発明のペプチドと接触させ (で刺激し)、または、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドを細胞に導入してHLA抗原と本発明のペプチドとの間で形成された複合体を細胞表面上に提示させることを含む。したがって、本発明のAPCは、本発明のペプチドを対象に投与した後、該対象からAPCを回収することによって得ることができる。あるいは、本発明のAPCは、対象から回収されたAPCを本発明のペプチドと接触させることによって得ることができる。

40

#### 【0095】

対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために、本発明のAPCを単独で、または本発明のペプチド、エキソソームもしくはCTLを含む他の薬物と組み合わせて、対象に投与することができる。例えば、エクスピボ投与は、以下の段階を含み得る：

50

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

## 【 0 0 9 6 】

第 1 の対象と第 2 の対象は同一の個体であってもよく、または異なる個体であってもよい。段階 b によって得られる A P C は、がんの治療および / または予防のためのワクチンとして機能し得、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、S C L C、N S C L C および精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

## 【 0 0 9 7 】

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

本発明はまた、抗原提示細胞を誘導するための本発明のペプチドの使用を提供する。

## 【 0 0 9 8 】

本発明の一局面によれば、本発明の A P C は高レベルの C T L 誘導能を有する。「高レベルの C T L 誘導能」という語句における「高レベル」とは、C T L 誘導能がペプチドと接触させていない A P C において検出されるレベルと比較して相対的に高いことを意味する。高レベルの C T L 誘導能を有するそのような A P C は、上記の方法に加え、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをインビトロで A P C に導入する段階を含む方法によって調製することができる。導入するポリヌクレオチドは、D N A または R N A の形態であってよい。導入の方法の例には、特に限定されることなく、リポフェクション、エレクトロポレーション、およびリン酸カルシウム法などの、当分野において従来より実施されている様々な方法が含まれ、それらを使用することができる。より具体的には、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 2 0 0 0 - 5 0 9 2 8 1 号に記載されているように、それを実施することができる。本発明のペプチドをコードする遺伝子を A P C に導入することによって、該遺伝子は細胞内で転写、翻訳等を受け、次いで、得られたタンパク質は M H C クラス I またはクラス II によってプロセッシングされて、提示経路を経て本発明のペプチドが提示される。あるいは、本発明の A P C は、A P C を本発明のペプチドと接触させる段階を含む方法によって調製することができる。

## 【 0 0 9 9 】

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

## 【 0 1 0 0 】

V I I . 細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L )

本発明のペプチドのいずれかに対して誘導された C T L は、インビボでがん細胞を標的とする免疫応答を増強するため、ペプチド自体と同様にワクチンとして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いずれかによって特異的に誘導または活性化された、単離された C T L を提供する。

## 【 0 1 0 1 】

そのような C T L は、( 1 ) 本発明のペプチドを対象に投与すること、( 2 ) 対象由来の A P C、および C D 8 陽性細胞、もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させる ( で刺激する ) こと、( 3 ) C D 8 陽性細胞もしくは末梢血単核白血球を、H L A 抗原とペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C もしくはエキソソームとインビトロで接触させること、または ( 4 ) T 細胞受容体 ( T C R ) サブユニットによって形成される T C R が、細胞表面上の H L A 抗原と本発明のペプチドとの複合体に結合し得る、該 T C R サブユニットをコードする 1 つもしくは複数のポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

を導入すること、によって得ることができる。(3)の方法についてのそのようなAPCまたはエキソソームは、上記の方法によって調製することができる。(4)の方法の詳細は「VIIIT細胞受容体(TCR)」の章において以下に記載する。

#### 【0102】

本発明のCTLは、治療および/または予防の対象となる患者に由来してよく、かつ単独で投与すること、または効果を調節する目的で本発明のペプチドもしくはエキソソームを含む他の薬物と組み合わせて投与することができる。得られたCTLは、本発明のペプチド、例えば誘導に使用した同一のペプチドを提示する標的細胞に対して特異的に作用する。標的細胞は、がん細胞のようにWDHD1を内因的に発現する細胞、またはWDHD1遺伝子をトランスフェクトした細胞であってよく、かつ本発明のペプチドによる刺激によって該ペプチドを細胞表面上に提示する細胞も、活性化されたCTLの攻撃の標的として機能し得る。

10

#### 【0103】

いくつかの態様において、本発明のCTLは、HLA-A24抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する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、細胞表面上のHLA-A24抗原と本発明のペプチドとの複合体にそのTCRを介して結合し、その細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すことを指す。本明細書では、「特異的な細胞傷害活性」は、HLA-A24抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞に対して細胞傷害活性を示すが、他の細胞には示さないことを指す。

20

#### 【0104】

##### VIIIT細胞受容体(TCR)

本発明はまた、T細胞受容体(TCR)のサブユニットを形成し得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物、およびそれを使用する方法を提供する。そのようなTCRサブユニットは、WDHD1を発現する腫瘍細胞に対する特異性をT細胞に付与するTCRを形成する能力を有する。当技術分野における公知の方法を使用することによって、本発明のペプチドで誘導されたCTLのTCRサブユニットの鎖および鎖のそれぞれをコードするポリヌクレオチドを同定することができる(WO2007/032255およびMorgan et al., J Immunol, 171, 3288(2003))。例えば、TCRを解析するためにはPCR法が好ましい。解析のためのPCRプライマーは、例えば、5'側プライマーとしての5'-Rプライマー(5'-gtctaccaggcatttcgcttcat-3')(SEQ ID NO:33)、および3'側プライマーとしての、TCR鎖C領域に特異的な3-TRa-Cプライマー(5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3')(SEQ ID NO:34)、TCR鎖C1領域に特異的な3-TRb-C1プライマー(5'-tcagaaatcctttctcttgac-3')(SEQ ID NO:35)、またはTCR鎖C2領域に特異的な3-TR-C2プライマー(5'-ctagcctctggaatcctttctctt-3')(SEQ ID NO:36)であってよいが、これらに限定されない。TCR誘導体は、本発明のWDHD1ペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ任意で、本発明のWDHD1ペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビボおよびインビトロで媒介する。

30

40

#### 【0105】

TCRサブユニットをコードするポリヌクレオチド(すなわち、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチド)を、適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは、当技術分野において周知である。該ポリヌクレオチドまたはそれらを有用に含むベクターを、T細胞(例えば、CD8陽性T細胞)、例えば患者由来のT細胞に導入することができる。有利には、本発明は、患者自身のT細胞(または別の哺乳動物のT細胞)の迅速な改変によって、優れたがん細胞殺傷特性を有する改変T細胞を迅速かつ容易に作製することを可能にする容易に利用可能な組成物を提供する。

50

## 【0106】

本発明のペプチドに対して特異的なTCRは、TCRがT細胞の表面上に発現される場合に、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を特異的に認識して、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を提示する標的細胞に対する特異的活性をT細胞に付与し得る受容体である。そのようなTCRサブユニットをコードするポリペプチドを導入することによって調製されたCTLがそのような標的細胞を特異的に認識することができることは、任意の公知の方法によって確認することができる。そのような方法の好ましい例には、例えば、HLA分子および本発明のペプチドを使用するテトラマー解析、ならびにELISPOTアッセイが含まれる。ELISPOTアッセイによって、上記方法によって調製されたCTLが標的細胞を特異的に認識することができること、およびそのような認識によって生じたシグナルが細胞内に伝達され得ることを確認することができる。さらに、上記方法によって調製されたCTLが標的細胞に対する特異的細胞傷害活性を有することを公知の方法によって確認することができる。そのような方法の例には、例えば、HLA-A24抗原およびWDHD1の両方を発現する細胞を使用するクロム放出アッセイが含まれる。

10

## 【0107】

一局面において、本発明は、TCRサブユニットポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、TCRサブユニットの両方をコードするポリヌクレオチドまたはTCRサブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチド）による形質導入によって調製されたCTLであって、そのようなTCRサブユニットによって形成されたTCRは、細胞表面上のSEQ ID NO: 6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列を有するWDHD1ペプチドとHLA-A24抗原との複合体に結合し得るCTLを提供する。

20

## 【0108】

形質導入されたCTLは、インビボでがん細胞にホーミングすることができ、かつ周知のインビトロ培養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)）。本発明のCTLは、療法または防御を必要としている患者におけるがんの治療および予防のいずれかまたは両方に有用な免疫原性組成物を形成するために使用することができる（WO2006/031221）。

30

## 【0109】

IX. 薬学的な剤または組成物

WDHD1の発現は、正常組織と比較して、その例に膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されないがんにおいて特異的に上昇するため、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/または術後のその再発の予防に使用することができる。したがって、本発明は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの1種または複数種を有効成分として含む、がんの治療および/もしくは予防のため、ならびに/または術後のその再発の予防のために製剤化される薬学的な剤または組成物を提供する。あるいは、薬学的な剤または組成物として使用するために、本発明のペプチドを、前述のエキソソームまたはAPCなどの細胞のいずれかの表面上に発現させることができる。加えて、本発明のペプチドのいずれかを標的とする前述のCTLも、本発明の薬学的な剤または組成物の有効成分として使用することができる。

40

## 【0110】

本発明の薬学的組成物は、ワクチンとしても使用される。本発明との関連において、「ワクチン」（「免疫原性組成物」とも称される）という語句は、動物に接種した際に抗腫瘍免疫を改善、増強、および/または誘導する機能を有する組成物を指す。

## 【0111】

本発明の薬学的組成物は、ヒト、ならびに限定されないがマウス、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

50

ジー、特に商業的に重要な動物または家畜を含む任意の他の哺乳動物を含む対象または患者において、がんを治療および/もしくは予防するため、ならびに/または術後のその再発を予防するために使用することができる。

【0112】

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薬学的な組成物または剤の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

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

10

【0113】

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

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

【0114】

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

20

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

【0115】

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

30

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

【0116】

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

40

【0117】

本発明によれば、SEQ ID NO：6、8、12、13、14、19および29の中より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24拘束性エピトープペプチドまたはその候補であることが見出された。したがって、SEQ ID NO：6、8、12、13、14、19および29のアミノ酸配列を有するこれらのペプチドのいずれかを含む本発明の薬学的な剤または組成物は、HLA抗原がHLA-A24である対象への投与のために特に適している。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド（すなわち、本発明のポリヌクレオチド）を含む薬学的な剤または組成物にも当てはまる。

50

## 【0118】

本発明の薬学的な剤または組成物によって治療されるがんは限定されず、WDHD1が関与する（例えば、過剰発現される）任意のがんを含み、このがんには、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

## 【0119】

本発明の薬学的な剤または組成物は、前述の有効成分に加えて、がん性細胞に対するCTLを誘導する能力を有する他のペプチド、該他のペプチドをコードする他のポリヌクレオチド、該他のペプチドを提示する他の細胞等を含み得る。がん性細胞に対するCTLを誘導する能力を有するそのような「他の」ペプチドの例には、がん特異的抗原（例えば、同定されたTAA）が含まれるが、これに限定されない。

10

## 【0120】

必要に応じて、本発明の薬学的な剤または組成物は、他の治療物質が、有効成分、例えば本発明のペプチドのいずれかの抗腫瘍効果を阻害しない限り、有効成分として該治療物質を任意に含み得る。例えば、製剤は、抗炎症物質または組成物、鎮痛剤、化学療法薬等を含み得る。医薬自体に他の治療物質を含めることに加えて、本発明の医薬を、1種または複数種の他の薬理的組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理的組成物の量は、例えば、使用する薬理的組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に依存する。

## 【0121】

当業者は、特に本明細書に言及された成分に加えて、本発明の薬学的な剤または組成物がさらに当該製剤化の型を考慮して当技術分野において慣例的な他の物質（例えば、増量剤、結合剤、希釈剤等）を含み得ることを容易に認識する。

20

## 【0122】

本発明の一態様において、本発明の薬学的な剤または組成物を、治療すべき疾患、例えばがんの病態を治療するのに有用な材料を含む製品に、例えばキットとして包装することができる。該製品は、ラベルを有する本発明の薬学的な剤または組成物のいずれかの容器を含み得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。該容器は、種々の材料、例えばガラスまたはプラスチックから形成され得る。容器上のラベルには、剤または組成物が、疾患の1種または複数種の状態の治療または予防のため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。

30

## 【0123】

本発明の薬学的な剤または組成物を含むキットは、上記の容器に加えて、任意で、薬学的に許容される希釈剤を収容した第2の容器をさらに含み得る。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明書を記載した添付文書を含む、商業上の観点および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

## 【0124】

必要に応じて、有効成分を含む1種または複数種の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置にて、薬学的組成物を提供することができる。該パックは、例えば、プリスターパックのように金属ホイルまたはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与に関する説明書が添付され得る。

40

## 【0125】

(1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的な剤または組成物

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

## 【0126】

50

インビボでCTLを誘導するために、本発明のペプチドを、本発明のペプチドの2種またはそれ以上を含む組み合わせとして調製することができる。ペプチドはカクテルであってもよく、または標準的な技法を使用して互いに結合させてもよい。例えば、ペプチドは化学的に結合させ、または1個もしくは数個のアミノ酸をリンカーとして有し得る単一の融合ポリペプチド配列として発現させることができる(例えば、リジンリンカー: K.S.Kawamura et al. J. Immunol. 2002, 168:5709-5715)。組み合わせにおけるペプチドは、同一であってよく、または異なっていてよい。本発明のペプチドを投与することによって、ペプチドはHLA抗原によってAPC上に高密度で提示され、次いで、提示されたペプチドとHLA抗原との間に形成された複合体に対して特異的に反応するCTLが誘導される。あるいは、APC(例えば、DC)を対象から取り出し、次いで本発明のペプチドによって刺激して、本発明のペプチドのいずれかを自身の細胞表面上に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再び投与し、対象においてCTLを誘導させ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増加させることができる。

10

**【0127】**

有効成分として本発明のいずれかのペプチドを含む、がんの治療および/または予防のための薬学的な剤または組成物はさらに、細胞性免疫が効率的に樹立されるようにアジュバントを含み得、またはそれらは他の有効成分とともに投与してよく、または顆粒に製剤化することによって投与してよい。アジュバントとは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に(または連続して)投与した場合に、該タンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。適用することができ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。例示的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

**【0128】**

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

**【0129】**

本発明の別の態様において、本発明のペプチドは、薬学的に許容される塩の形態で投与してもよい。塩の好ましい例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との塩、有機酸との塩、および無機酸との塩が含まれる。本明細書で使用される「薬学的に許容される塩」という語句は、その化合物の生物学的有効性および特性を保持し、かつ塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などの無機酸または無機塩基との反応によって得られる塩を指す。

30

**【0130】**

いくつかの態様において、本発明の薬学的な剤または組成物は、CTLを刺激する(prime)成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでCTLをプライミングし得る物質または組成物として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をリジン残基のアミノ基およびアミノ基に付着させ、次いで本発明のペプチドに連結させることができる。次いで、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子の状態で直接投与するか、リポソーム中に取り込ませて投与するか、またはアジュバント中に乳化させて投与することができる。CTL応答の脂質による刺激の別の例として、適切なペプチドに共有結合している場合、大腸菌(E. coli)リポタンパク質、例えばトリパルミトイル-S-グリセリルシステイニル-セリル-セリン(P3CSS)を使用してCTLをプライミングすることができる(例えば、Deres et al., Nature 1989, 342:561-4を参照されたい)。

40

**【0131】**

適当な投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹膜、および静脈内注射等、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与が含まれるが、必ずしもこれら

50

に限定されない。投与は、単回投与によって実施することができ、または複数回投与によってブーストすることができる。本発明のペプチドの用量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1,000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日~数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

#### 【0132】

(2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的な剤または組成物

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

10

20

30

40

50

#### 【0133】

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

#### 【0134】

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

#### 【0135】

遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 1991, 3:87-95; Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993, 33:573-96; Mulligan, Science 1993, 260:926-32; Morgan & Anderson, Ann Rev Biochem 1993, 62:191-217; Trends in Biotechnology 1993, 11(5):155-215を参照されたい。本発明に適用可能な組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、Ausubel et al.によってCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 1993に; およびKriegerによってGene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton P

ress, NY, 1990に記載されている。

【0136】

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、骨内、腹膜および/または静脈内注射等で実施することができ、例えば全身投与または標的部位の近傍への局所投与が使用される。投与は、単回投与によって実施することができ、または複数回投与によってブーストすることができる。適切な担体中のポリヌクレオチドの用量、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg~1000mg、例えば0.01mg~100mg、例えば0.1mg~10mg、例えば0.5mg~5mgであり、数日に1度~数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

10

【0137】

X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを使用する方法

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを使用して、APCおよびCTLを調製または誘導することができる。本発明のエキソソームおよびAPCを使用して、CTLを誘導することもできる。ペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、CTL誘導能を他の任意の化合物が阻害しない限り、該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、前述の本発明の薬学的な剤または組成物のいずれかを使用してCTLを誘導することができる。それに加えて、前記ペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものを使用して、以下に説明するように、APCを誘導することもできる。

20

【0138】

(1) 抗原提示細胞(APC)を誘導する方法

本発明は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを使用して、高いCTL誘導能を有するAPCを誘導する方法を提供する。

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

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

30

【0139】

APCは、特定の種類の細胞に限定されない。APCの例には、限定されないが、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られているDC、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞が含まれる。APCの中で最も強力なCTL誘導能を有することから、好ましくはDCを使用することができる。本発明の任意のペプチドを単独で、または本発明の他のペプチドとともに使用することができる。

【0140】

一方、本発明のペプチドを対象に投与する場合、APCが、インピボで該ペプチドと接触し、結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は本発明のペプチドを対象に投与することを含み得る。同様に、本発明のポリヌクレオチドを対象に発現可能な形態で投与する場合、本発明のペプチドがインピボで発現してAPCと接触し、結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが対象の体内で誘導される。したがって、前述の段階に代えて、本発明の方法は本発明のポリヌクレオチドを対象に投与することを含み得る。「発現可能な形態」は、「IX. 薬学的な剤または組成物、(2)有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的な剤または組成物」の章に上述されている。

40

【0141】

あるいは、本発明の方法は、本発明のポリヌクレオチドをAPCに導入して、CTL誘導能を有するAPCを誘導することを含み得る。例えば、本方法は、以下の段階を含み得

50

る：

- a：対象からAPCを回収する段階；および
- b：本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。

段階bは、「VI. 抗原提示細胞」の章に上述したように実施することができる。

【0142】

あるいは本発明は、以下の段階のうちの1つを含む、WDHD1に対するCTL活性を特異的に誘導する抗原提示細胞（APC）を調製するための方法を提供する：

- (a) APCを、本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる段階；および
- (b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

10

【0143】

あるいは、本発明は、以下の中より選択される段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための方法を提供する：

- (a) APCを本発明のペプチドと接触させる段階；
- (b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

【0144】

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

20

【0145】

別の態様において、本発明は、CTL誘導能を有するAPCの誘導に使用するための剤または組成物を提供し、そのような剤または組成物は、本発明の1種または複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む。

30

【0146】

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

【0147】

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

【0148】

- (2) CTLを誘導する方法

40

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

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

50

プチドをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。

【0149】

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

【0150】

あるいはCTLは、それらをエキスピボで使用するによって誘導することもでき、CTLを誘導した後、活性化CTLを対象に戻す。例えば、本方法は、以下の段階を含み得る：

- a：対象からAPCを回収する段階；
- b：段階aのAPCを該ペプチドと接触させる段階；および
- c：段階bのAPCをCD8陽性T細胞と共培養する段階。

【0151】

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

【0152】

上述のAPCの代わりに、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを任意で利用することもできる。すなわち、本発明は、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを共培養する段階を含み得る。そのようなエキソソームは、「V. エキソソーム」の章に上述した方法によって調製することができる。

【0153】

さらに、TCRサブユニットをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入することによって、本発明のCTLを誘導することができ、そのようなTCRサブユニットによって形成されたTCRは、細胞表面上のHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体に結合し得る。そのような形質導入は、「V.I.I. T細胞受容体(TCR)」の章に上述したように実施することができる。

【0154】

本発明の方法は、インビトロ、エキ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キスピボで実施することができる。CTLの誘導に使用するCD8陽性T細胞は、対象から得たPBMCから当該技術分野において周知の方法によって調製することができる。好ましい態様において、CD8陽性T細胞のためのドナーは、HLA抗原がHLA-A24である対象であってよい。本発明の方法によって誘導したCTLは、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識し得るCTLであってよい。対象においてがんに対する免疫応答を誘導するために本発明の方法によって誘導したCTLを対象に投与する場合、対象は、好ましくは、CD8陽性T細胞が由来する同一の対象である。しかしながら、対象は、対象がCD8陽性T細胞ドナーと同一のHLA型を有する限り、CD8陽性T細胞ドナーと異なる対象でもよい。

【0155】

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

【0156】

別の態様において、本発明は、CTLを誘導するための剤または組成物であって、本発明の1種もしくは複数種のペプチド、1種もしくは複数種のポリヌクレオチド、または1

10

20

30

40

50

種もしくは複数種の A P C もしくはエキソソームを含む剤または組成物を提供する。

【 0 1 5 7 】

別の態様において、本発明は、 C T L の誘導のために製剤化される剤または組成物の製造における、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、または A P C もしくはエキソソームの使用を提供する。

【 0 1 5 8 】

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

【 0 1 5 9 】

( 3 ) 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、 W D H D 1 に関連する疾患に対して免疫応答を誘導するための方法を提供する。適当な疾患にはがんが含まれ、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、 C M L 、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、 S C L C 、 N S C L C および精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 1 6 0 】

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

【 0 1 6 1 】

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

【 0 1 6 2 】

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

( a ) 本発明のペプチド；

( b ) 本明細書に開示するペプチドを発現可能な形態でコードする核酸；

( c ) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示する A P C もしくはエキソソーム；または

( d ) 本発明の細胞傷害性 T 細胞。

【 0 1 6 3 】

本発明との関連において、 W D H D 1 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、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、 C M L 、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、 S C L C 、 N S C L C および精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。したがって、有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する前に、治療すべき細胞または組織中の W D H D 1 の発現レベルが同一器官の正常細胞と比較して増強されているかどうかを確認することが好ましい。したがって一態様において、本発明は、 W D H D 1 を ( 過剰 ) 発現するがんを治療するための方法を提供し、該方法は以下の段階を含み得る：

i ) 治療すべきがんを有する対象から得られた細胞または組織中の W D H D 1 の発現レベルを決定する段階；

i i ) W D H D 1 の発現レベルを正常対照と比較する段階；および

i i i ) 上記の ( a ) ~ ( d ) の中より選択される少なくとも 1 つの成分を、正常対照と比較して W D H D 1 を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

10

20

30

40

50

## 【0164】

あるいは本発明は、WDHD1を過剰発現するがんを有する対象への投与に使用するための、上記の(a)~(d)の中より選択される少なくとも1つの成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を提供する。換言すれば、本発明はさらに、本発明のWDHD1ポリペプチドで治療すべき対象を同定するための方法であって、対象由来の細胞または組織中のWDHD1の発現レベルを決定する段階を含み、該レベルが、該遺伝子の正常対照レベルと比較して増加していることによって、該対象が本発明のWDHD1ポリペプチドで治療され得るがんを有することが示される方法を提供する。本発明のがんを治療する方法を、以下、より詳細に説明する。

## 【0165】

目的とするWDHD1の転写産物または翻訳産物を含む限り、対象由来の任意の細胞または組織をWDHD1発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、身体組織および体液、例えば血液、痰および尿が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、対象由来の細胞または組織試料は、上皮細胞、より好ましくはがん性上皮細胞、またはがんの疑いがある組織に由来する上皮細胞を含む細胞集団を含む。さらに、必要に応じて、得られた身体組織および体液から細胞を精製し、次いでこれを対象由来試料として用いてもよい。

## 【0166】

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

## 【0167】

本発明によれば、対象から得られたがん細胞または組織中のWDHD1の発現レベルが決定される。発現レベルは、当技術分野で公知の方法を使用して、転写(核酸)産物レベルで決定することができる。例えば、WDHD1のmRNAを、ハイブリダイゼーション法(例えば、ノーザンハイブリダイゼーション)によってプローブを用いて定量することができる。検出は、チップまたはアレイにおいて行うことができる。アレイの使用は、WDHD1の発現レベルを検出するのに好ましい。当業者は、WDHD1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、WDHD1のcDNAをプローブとして用いることができる。必要に応じて、プローブを、適切な標識、例えば色素、蛍光物質および同位体で標識してもよく、該遺伝子の発現レベルを、ハイブリダイズした標識の強度として検出してもよい。

## 【0168】

さらに、増幅に基づく検出法(例えば、RT-PCR)によってプライマーを使用して、WDHD1の転写産物を定量してもよい。そのようなプライマーは、該遺伝子の入手可能な配列情報に基づいて調製することができる。

## 【0169】

具体的には、本発明の方法に用いられるプローブまたはプライマーは、ストリンジェントな条件下、中程度にストリンジェントな条件下、または低ストリンジェントな条件下で、WDHD1のmRNAとハイブリダイズする。本明細書で使用する「ストリンジェントな(ハイブリダイゼーション)条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列とはハイブリダイズするが、他の配列とはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列に依存し、異なる状況下では異なる。より長い配列の特異的ハイブリダイゼーションは、短い配列よりも高い温度で観察される。一般に、ストリンジェントな条件の温度は、所定のイオン強度およびpHにおける特定の配列の熱融解温度( $T_m$ )よりも約5%低くなるように選択する。 $T_m$ とは、平衡状態で、標的配列に相補的なプローブの50%が標的配列とハイブリダイズする(所定のイオン強度、pHおよび核酸濃度における)温度である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 $T_m$ では、平衡状態でプローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件とは、pH7.0~8.3において塩濃度がナトリウムイオン約1.0M未満、典型的にはナトリウムイ

10

20

30

40

50

オン（または他の塩）約 0.01 ~ 1.0 M であり、かつ温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば、10 ~ 50ヌクレオチド）に関しては少なくとも約 30、およびより長いプローブまたはプライマーに関しては少なくとも約 60 である条件である。ストリンジェントな条件はまた、不安定化物質、例えばホルムアミドの添加によって達成してもよい。

#### 【0170】

本発明のプローブまたはプライマーは、典型的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、少なくとも約 2000、1000、500、400、350、300、250、200、150、100、50、または25の連続する、WDHD1配列を含む核酸のセンス鎖ヌクレオチド配列、またはWDHD1配列を含む核酸のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列、またはそれらの配列の天然の変異体とハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。特に、例えば、好ましい態様において、5 ~ 50の長さを有するオリゴヌクレオチドを、検出される遺伝子を増幅するためのプライマーとして用いることができる。より好ましくは、WDHD1遺伝子のmRNAまたはcDNAは、特定のサイズ、一般には15 ~ 30b長のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーによって検出することができる。サイズは少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも12ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチドの範囲であってよく、プローブおよびプライマーのサイズは5 ~ 10ヌクレオチド、10 ~ 15ヌクレオチド、15 ~ 20ヌクレオチド、20 ~ 25ヌクレオチドおよび25 ~ 30ヌクレオチドの範囲にわたってよい。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーの長さは、15 ~ 25から選択することができる。そのようなオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを用いることによって遺伝子を検出するためのアッセイ手順、装置、または試薬は、周知である（例えばオリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはPCR）。これらのアッセイにおいて、プローブまたはプライマーはタグまたはリンカー配列も含み得る。さらに、プローブまたはプライマーは、検出可能な標識または捕捉することができる親和性リガンドで修飾することができる。あるいは、ハイブリダイゼーションに基づく検出手順において、数百（例えば、約100 ~ 200）塩基から数千（例えば、約1000 ~ 2000）塩基長を有するポリヌクレオチドも、プローブに用いることができる（例えば、ノーザンブロッティングアッセイまたはcDNAマイクロアレイ解析）。

10

20

30

40

#### 【0171】

あるいは、本発明の診断のために翻訳産物を検出することができる。例えば、WDHD1タンパク質（SEQ ID NO: 32）またはその免疫学的断片の量を測定することができる。翻訳産物としてタンパク質の量を測定するための方法には、タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる免疫測定法が含まれる。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。さらに、断片または改変抗体がWDHD1タンパク質への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変物（例えば、キメラ抗体、scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv等）を検出に用いることができる。本発明のペプチドに対するそのような抗体およびその断片も本発明によって提供される。タンパク質を検出するためのこのような種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明において任意の方法を使用して、そのような抗体およびそれらの等価物を調製することができる。

#### 【0172】

WDHD1遺伝子の発現レベルをその翻訳産物に基づいて検出する別の方法として、WDHD1タンパク質に対する抗体を用いる免疫組織化学的解析によって、染色の強度を測定してもよい。すなわちこの測定では、強度の染色によって、該タンパク質の存在/レベルの増加が示され、それと同時にWDHD1遺伝子の高発現レベルが示される。

#### 【0173】

標的遺伝子、例えばWDHD1遺伝子のがん細胞における発現レベルは、そのレベルが

50

、標的遺伝子の対照レベル（例えば、正常細胞中のレベル）から例えば10%、25%、もしくは50%増加するか；または1.1倍超、1.5倍超、2.0倍超、5.0倍超、10.0倍超、もしくはそれ以上まで増加する場合に、増加していると判定され得る。

【0174】

本発明との関連において、がん性でないと判明している生物学的試料から決定された対照レベルは「正常対照レベル」と称される。一方、対照レベルががん性生物学的試料から決定される場合には、これは「がん性対照レベル」と称される。

【0175】

対照レベルは、疾患状態（がん性または非がん性）が判明している対象から予め回収し保存しておいた試料を使用することによって、がん細胞と同時に決定することができる。加えて、治療すべきがんを有する器官の非がん性領域から得られた正常細胞を、正常対照として使用してよい。あるいは、対照レベルは、疾患状態が判明している対象に由来する試料中のWDHD1遺伝子の予め決定された発現レベルを解析することによって得られた結果に基づいて、統計的方法によって決定してもよい。さらに、対照レベルは、以前に試験された細胞に由来する発現パターンのデータベースに由来し得る。さらに、本発明の一面によれば、生物学的試料中のWDHD1遺伝子の発現レベルを、複数の参照試料から決定された複数の対照レベルと比較することができる。対象由来の生物学的試料の組織型と類似の組織型に由来する参照試料から決定された対照レベルを使用することが好ましい。さらに、疾患状態が判明している集団におけるWDHD1遺伝子の発現レベルの基準値を使用することが好ましい。基準値は、当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。例えば、平均値 $\pm$ 2SD、または平均値 $\pm$ 3SDの範囲を、基準値として使用することができる。

10

20

【0176】

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

30

WDHD1遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比較して増加しているか、またはがん性対照レベルと類似している/同等である場合、該対象は治療すべきがんを有すると診断され得る。

【0177】

本発明はまた、(i)対象が治療すべきがんを有するかどうかを診断する方法、および/または(ii)がん治療のための対象を選択する方法を提供し、該方法は以下の段階を含む：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られた細胞または組織中のWDHD1の発現レベルを決定する段階；
- b) WDHD1の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；
- c) WDHD1の発現レベルが正常対照レベルと比較して増加している場合に、該対象を治療すべきがんを有すると診断する段階；および
- d) 段階c)において対象が治療すべきがんを有すると診断される場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

40

【0178】

あるいは、そのような方法は以下の段階を含む：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られた細胞または組織中のWDHD1の発現レベルを決定する段階；
- b) WDHD1の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；

50

c) W D H D 1 の発現レベルががん性対照レベルと類似しているか、または同等である場合に、該対象を治療すべきがんを有すると診断する段階；および

d) 段階 c) において対象が治療すべきがんを有すると診断される場合に、がん治療のために該対象を選択する段階。

【 0 1 7 9 】

本発明はまた、本発明の W D H D 1 ポリペプチドで治療され得るがんに罹患している、または罹患している疑いのある対象を診断または判定するための診断キットを提供し、該キットはまた、がんの予後を評価する、および/またはがん療法、特にがん免疫療法の有効性または適用性をモニターするのにも有用であり得る。適切ながんの具体例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、S C L C、N S C L C および精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。より詳細には、キットは、対象由来の細胞中の W D H D 1 遺伝子の発現を検出するための少なくとも 1 つの試薬を含むことが好ましく、そのような試薬は以下の群より選択される：

( a ) W D H D 1 遺伝子の m R N A を検出するための試薬；

( b ) W D H D 1 タンパク質またはその免疫学的断片を検出するための試薬；および

( c ) W D H D 1 タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【 0 1 8 0 】

W D H D 1 遺伝子の m R N A を検出するのに適した試薬の例には、W D H D 1 m R N A の一部に対する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドなどの、W D H D 1 m R N A に特異的に結合するか、または W D H D 1 m R N A を同定する核酸が含まれる。このような種類のオリゴヌクレオチドは、W D H D 1 m R N A に特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。このような種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製することができる。必要に応じて、W D H D 1 m R N A を検出するための試薬を固体基質上に固定化することができる。さらに、W D H D 1 m R N A を検出するための 2 つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

【 0 1 8 1 】

一方、W D H D 1 タンパク質またはその免疫学的断片を検出するのに適した試薬の例には、W D H D 1 タンパク質またはその免疫学的断片に対する抗体が含まれ得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。さらに、断片または改変抗体が W D H D 1 タンパク質またはその免疫学的断片への結合能を保持する限り、抗体の任意の断片または改変物（例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F v 等）を試薬として使用することもできる。タンパク質を検出するためのこのような種類の抗体を調製する方法は、当技術分野において周知であり、本発明において任意の方法を使用して、そのような抗体およびそれらの等価物を調製することができる。さらに、直接連結技法または間接標識技法によって、抗体をシグナル発生分子で標識することができる。標識、および抗体を標識し、標的に対する抗体の結合を検出する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に用いることができる。さらに、W D H D 1 タンパク質を検出するための 2 つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

【 0 1 8 2 】

キットは、前述の試薬のうちの 2 つ以上を含み得る。キットはさらに、W D H D 1 遺伝子に対するプローブまたは W D H D 1 ペプチドに対する抗体を結合させるための固体基質および試薬、細胞を培養するための培地および容器、陽性および陰性対照試薬、ならびに W D H D 1 ペプチドに対する抗体を検出するための二次抗体を含み得る。例えば、がんを有さない対象、またはがん罹患している対象から得られた組織試料は、有用な対照試薬として役立つ。本発明のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明書を記載した添付文書（例えば、文書、テープ、C D - R O M 等）を含む、商業上の観点および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。これらの試薬等は、ラベルを貼った容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれる。該容器は、種々の材料、例えばガラスまたはプラスチックから形成され得る。

10

20

30

40

50

## 【0183】

本発明の一態様において、試薬がWDHD1 mRNAに対するプローブである場合には、該試薬を固体基質、例えば多孔性ストリップ上に固定化して、少なくとも1つの検出部位を形成させることができる。多孔性ストリップの測定または検出領域は、それぞれが核酸（プローブ）を含む複数の部位を含み得る。検査ストリップはまた、陰性および/または陽性対照用の部位を含み得る。あるいは、対照部位は、検査ストリップとは別のストリップ上に位置し得る。任意で、異なる検出部位は異なる量の固定化核酸を含み得る、すなわち、第1検出部位ではより多い量の固定化核酸を、および以降の部位ではより少ない量の固定化核酸を含み得る。試験試料を添加すると、検出可能なシグナルを呈する部位の数によって、試料中に存在するWDHD1 mRNAの量の定量的指標が提供される。検出部位は、適切に検出可能な任意の形状で構成することができ、典型的には、検査ストリップの幅全体にわたるバーまたはドットの形状である。

10

## 【0184】

本発明のキットは、陽性対照試料またはWDHD1標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、WDHD1陽性試料を回収し、次いでそれらのWDHD1レベルをアッセイすることによって調製することができる。あるいは、精製WDHD1タンパク質またはポリヌクレオチドを、WDHD1を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはWDHD1標準試料を形成してよい。本発明において、精製WDHD1は組換えタンパク質であってよい。陽性対照試料のWDHD1レベルは、例えばカットオフ値よりも高い。

20

## 【0185】

一態様において、本発明はさらに、本発明の抗体またはその断片によって特異的に認識されるタンパク質またはその部分タンパク質を含む診断キットを提供する。

## 【0186】

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

30

## 【0187】

本発明は、抗WDHD1抗体の量と、上記のような対応する対照試料中の抗WDHD1抗体の量との差を測定することによって実施できるがんを診断するための方法を提供する。対象の細胞または組織が該遺伝子の発現産物（WDHD1）に対する抗体を含み、この抗WDHD1抗体の量が正常対照中の抗WDHD1抗体の量と比較してカットオフ値のレベルよりも高いと判定される場合に、該対象ががんに罹患していることが疑われる。

## 【0188】

別の態様において、本発明の診断キットは、本発明のペプチドおよびそれに結合しているHLA分子を含み得る。抗原性ペプチドおよびHLA分子を使用して抗原特異的CTLを検出するための方法は、既に確立されている（例えば、Altman JD et al., Science. 1996, 274(5284):94-6）。したがって、腫瘍抗原特異的CTLを検出する検出法に、本発明のペプチドとHLA分子との複合体を適用することができ、それによってがんの再発および/または転移のより早期の発見が可能になる。さらに、本発明のペプチドを有効成分として含む医薬を適用可能な対象を選択するために、または医薬の治療効果を評価するために、これを用いることができる。

40

## 【0189】

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

50

## 【0190】

本発明はさらに、本明細書に記載されるペプチドエピトープを使用することによって、対象の免疫学的応答を評価するための方法または診断用の剤を提供する。本発明の一態様において、本明細書に記載するようなHLA A-24拘束性ペプチドを、対象の免疫応答を評価または予測するための試薬として使用する。評価される免疫応答は、免疫原を免疫担当細胞とインビトロまたはインビボで接触させることによって誘導される。好ましい態様において、免疫学的応答を評価するための免疫担当細胞は、末梢血、末梢血リンパ球(PBL)、および末梢血単核細胞(PBMC)の中より選択し得る。そのような免疫担当細胞を回収または単離するための方法は当技術分野において周知である。いくつかの態様においては、ペプチドエピトープを認識して結合する抗原特異的CTLの産生をもたらし得る任意の剤を、試薬として用いてよい。ペプチド試薬を免疫原として使用しなくてもよい。そのような解析に使用されるアッセイ系には、比較的最近の技術開発、例えば四量体、細胞内リンホカイン染色およびインターフェロン放出アッセイ、またはELISPOTアッセイが含まれる。好ましい態様において、ペプチド試薬と接触させる免疫担当細胞は、樹状細胞を含む抗原提示細胞であってよい。

10

## 【0191】

例えば、本発明のペプチドを四量体染色アッセイにおいて使用して、腫瘍細胞抗原または免疫原への曝露後の抗原特異的CTLの存在について末梢血単核細胞を評価することができる。HLA四量体複合体を使用して、抗原特異的CTLを直接可視化し(例えば、Ogg et al., Science 279:2103-2106, 1998; および Altman et al., Science 174:94-96, 1996を参照されたい)、末梢血単核細胞の試料中の抗原特異的CTL集団の頻度を測定することができる。本発明のペプチドを使用する四量体試薬は、以下の通り作製することができる:

20

## 【0192】

HLA分子に結合するペプチドは、対応するHLA重鎖および $\beta$ -2-ミクログロブリンの存在下で再び折り畳まれて、3分子複合体を生成する。この複合体において、該重鎖のカルボキシル末端をタンパク質中に予めエンジニアリングした部位においてピオチン化する。次いでストレプトアビジンを該複合体に添加して、3分子複合体およびストレプトアビジンから構成される四量体を形成する。蛍光標識ストレプトアビジンの手法によって、この四量体を使用して、抗原特異的細胞を染色することができる。次いで、この細胞を例えばフローサイトメトリーによって同定することができる。そのような解析を、診断または予後目的に使用することができる。この手順によって同定された細胞を治療目的に使用することもできる。

30

## 【0193】

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、免疫リコール応答を評価するための試薬を提供する(例えば、Bertoni et al., J. Clin. Invest. 100:503-513, 1997およびPenna et al., J. Exp. Med. 174:1565-1570, 1991を参照されたい)。例えば、治療すべきがんを有する個体からの患者PBMC試料を、特異的ペプチドを使用して抗原特異的CTLの存在について解析する。PBMCを培養し、該細胞を本発明のペプチドで刺激することによって、単核細胞を含む血液試料を評価することができる。適切な培養期間後、増殖した細胞集団を例えばCTL活性について解析することができる。

40

## 【0194】

ペプチドは、ワクチンの有効性を評価するための試薬として使用することもできる。免疫原をワクチン接種した患者から得られたPBMCを、例えば上記の方法のいずれかを使用して解析することができる。患者のHLA型を決定し、該患者に存在するアリル特異的分子を認識するペプチドエピトープ試薬を解析のために選択する。ワクチンの免疫原性は、PBMC試料中のエピトープ特異的CTLの存在によって示され得る。

## 【0195】

本発明のペプチドは、当技術分野で周知の技法を使用して抗体を作製するために使用することもでき(例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY; およびAnt

50

ibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい)、この抗体は、がんを診断またはモニターするための試薬として有用であり得る。そのような抗体は、HLA分子との関連でペプチドを認識する抗体、すなわちペプチド-MHC複合体に結合する抗体を含み得る。

#### 【0196】

本発明のペプチドおよび組成物はさらなる用途をいくつか有し、そのうちの一部を本明細書に記載する。例えば、本発明は、WDHD1免疫原性ポリペプチドの発現を特徴とする障害を診断または検出するための方法を提供する。これらの方法は、生物学的試料中のWDHD1 HLA結合ペプチド、またはWDHD1 HLA結合ペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現を測定することを含む。ペプチドまたはペプチドとHLAクラスI分子との複合体の発現は、該ペプチドまたは該複合体の結合パートナーを用いてアッセイすることによって、測定または検出することができる。好ましい態様において、ペプチドまたは複合体の結合パートナーは、該ペプチドを認識してこれに特異的に結合する抗体である。腫瘍生検などの生物学的試料中のWDHD1の発現は、WDHD1プライマーを用いる標準的なPCR増幅プロトコールによって試験することもできる。腫瘍発現の例は本明細書に提示してあり、WDHD1増幅のための例示的な条件およびプライマーのさらなる開示は、WO2003/27322に見出すことができる。

#### 【0197】

好ましくは診断法は、対象から単離された生物学的試料をWDHD1 HLA結合ペプチドに特異的な剤と接触させて、該生物学的試料中のWDHD1 HLA結合ペプチドの存在を検出することを含む。本明細書で使用する「接触させる」とは、剤と生物学的試料中に存在するWDHD1 HLA結合ペプチドとの間の特異的相互作用が可能となるように、生物学的試料を、例えば濃度、温度、時間、イオン強度の適切な条件下で、剤に十分に近接させて配置することを意味する。一般に、剤と生物学的試料を接触させるための条件は、分子と生物学的試料中のその同族物（例えば、タンパク質およびその受容体同族物、抗体およびそのタンパク質抗原同族物、核酸およびその相補的配列同族物）との間の特異的相互作用を促進するための、当業者に公知の条件である。分子とその同族物との間の特異的相互作用を促進するための最適な条件は、Lowらに対して発行された米国特許第5,108,921号に記載されている。

#### 【0198】

本発明の診断法は、インビボおよびインビトロの一方または両方で実施することができる。したがって、生物学的試料は、本発明においてインビボまたはインビトロに位置し得る。例えば、生物学的試料はインビボの組織であってよく、かつWDHD1免疫原性ポリペプチドに特異的な剤を使用して、組織中のそのような分子の存在を検出することができる。あるいは、生物学的試料をインビトロで採取または単離することができる（例えば、血液試料、腫瘍生検、組織抽出物）。特に好ましい態様において、生物学的試料は細胞を含む試料であってよく、より好ましくは、診断または治療される対象から回収された腫瘍細胞を含む試料であってよい。

#### 【0199】

あるいは、フルオレセイン標識HLA多量体複合体で染色することによって、抗原特異的T細胞の直接的な定量を可能にする方法によって、診断を行うことができる（例えば、Altman, J.D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J.D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330）。細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン-放出アッセイまたはELISPOTアッセイも提供されている。四量体染色、細胞内リンホカイン染色およびELISPOTアッセイはすべて、より慣例的なアッセイより少なくとも10倍感度が高いようである（Murali-Krishna, K. et al., 1998, Immunity 8:177; Lalvani, A. et al., 1997, J. Exp. Med. 186:859; Dunbar, P.R. et al., 1998, Curr. Biol. 8:413）。五量体（例えば、US2004-209295A）、デキストラマー（dextramer）（例えば、WO02/072631）、およびストレプタマー（streptamer）（例えば、Nature medicine 6.631-637(2002)）を使用することもできる。

10

20

30

40

50

## 【0200】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明のWDHD1ペプチドの少なくとも1つを投与された対象の免疫学的応答を診断または評価するための方法を提供し、以下の段階を含む方法を提供する：

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

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

(c) 対象の免疫学的応答をCTL誘導レベルと関連させる段階。

## 【0201】

本発明において、免疫原は、好ましくは、(a) SEQ ID NO: 2~30のアミノ酸配列の中より選択されるWDHD1ペプチド、そのようなアミノ酸配列を有するペプチド、ならびにそのようなアミノ酸配列が1個、2個またはそれ以上のアミノ酸置換によって改変されたペプチド、のうち少なくとも1つを含む。一方、免疫原特異的CTLの誘導に適した条件は当技術分野において周知である。例えば、免疫担当細胞を、免疫原特異的CTLを誘導するために免疫原の存在下でインビトロで培養してもよい。免疫原特異的CTLを誘導する目的で、任意の刺激因子を細胞培養物に添加してもよい。例えば、IL-2は、CTL誘導のための好ましい刺激因子である。いくつかの態様において、ペプチドががん療法によって治療される対象の免疫学的応答をモニターまたは評価する段階は、治療前、治療中および/または治療後に実施することができる。一般に、がん療法プロトコール中、免疫原性ペプチドは、治療される対象に繰り返し投与される。例えば、免疫原性ペプチドを3~10週間にわたって毎週投与してよい。したがって、対象の免疫学的応答は、がん療法プロトコール中に評価またはモニターされ得る。あるいは、がん療法に対する免疫学的応答を評価またはモニターする段階が、療法プロトコールの完了時であってよい。

## 【0202】

本発明によれば、免疫原特異的CTLの誘導が対照と比較して増強されていることによって、評価または診断される対象が、投与された免疫原に対して免疫学的に応答したことが示される。免疫学的応答を評価するのに適した対照には、例えば、免疫担当細胞をペプチドと接触させていない場合の、またはいかなるWDHD1ペプチドとも異なるアミノ酸配列(例えば、ランダムなアミノ酸配列)を有する対照ペプチドと接触させている場合の、CTL誘導レベルが含まれ得る。好ましい態様においては、対象に投与された各免疫原間で免疫学的応答を比較することによって、対象の免疫学的応答を配列特異的な様式で評価する。特に、いくつかの種類のWDHD1ペプチドについての混合物を対象に投与する場合であっても、免疫学的応答はペプチドに依存して異なる可能性がある。その場合には、各ペプチド間で免疫学的応答を比較することによって、対象がより強い応答を示すペプチドを同定することができる。

## 【0203】

XI. 抗体

本発明は、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は本発明のペプチドに特異的に結合し、本発明のペプチドではないものには結合しない(または弱く結合する)。あるいは、抗体は本発明のペプチドおよびその相同体に結合する。

## 【0204】

本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断および予後のアッセイ、ならびに画像化方法論において使用され得る。同様に、そのような抗体は、WDHD1ががん患者において同じく発現または過剰発現する限り、他のがんの治療、診断、および/または予後において使用され得る。さらに、細胞内で発現する抗体(例えば、一本鎖抗体)は、WDHD1の発現が関与するがんの治療において治療的に有用であり、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

## 【0205】

10

20

30

40

50

本発明はまた、WDHD1タンパク質(SEQ ID NO:32)、またはSEQ ID NO:2~30の中より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むその断片を検出および/または定量するための様々な免疫学的アッセイを提供する。そのようなアッセイは、必要に応じて、WDHD1タンパク質またはその断片を認識してそれと結合し得る1種または複数種の抗WDHD1抗体を含み得る。本発明との関連において、WDHD1ポリペプチドに結合する抗WDHD1抗体は、好ましくは、SEQ ID NO:2~30の中より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを認識する。抗体の結合特異性は、阻害試験で確認することができる。すなわち、解析される抗体と全長WDHD1ポリペプチドとの間の結合が、SEQ ID NO:2~30の中より選択されるアミノ酸配列を有する任意の断片ポリペプチドの存在下で阻害される場合、この抗体が該断片に特異的に結合することが示される。本発明との関連において、そのような免疫学的アッセイは、様々な種類の放射免疫測定法、免疫クロマトグラフ技法、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、酵素結合免疫蛍光測定法(ELIFA)等を含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の様々な免疫学的アッセイ形式の範囲内で実施される。

10

20

30

40

50

#### 【0206】

本発明の免疫学的であるが非抗体性の関連アッセイには、T細胞免疫原性アッセイ(阻害性または刺激性)および主要組織適合複合体(MHC)結合アッセイも含まれる。加えて、WDHD1を発現するがんを検出し得る免疫学的画像化法も、本発明によって提供され、これには、本発明の標識抗体を使用する放射性シンチグラフィ画像化法が含まれるが、これに限定されない。そのようなアッセイは、WDHD1を発現するがんの検出、モニタリング、および予後において臨床的に有用であり、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0207】

本発明は、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、任意の形態、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体で使用することができ、これには、動物、例えばウサギ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抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えによって産生されたヒト化抗体が含まれる。

#### 【0208】

抗体を得るための抗原として用いられる本発明のペプチドは、任意の動物種に由来し得るが、好ましくは哺乳動物、例えばヒト、マウス、またはラット、より好ましくはヒトに由来する。ヒト由来のペプチドは、本明細書に開示するヌクレオチド配列またはアミノ酸配列から得ることができる。

#### 【0209】

本発明によれば、免疫抗原として使用されるペプチドは、完全なタンパク質または該タンパク質の部分ペプチドであってよい。部分ペプチドは、例えば、本発明のペプチドのアミノ(N)末端断片またはカルボキシ(C)末端断片を含み得る。

#### 【0210】

本明細書では、抗体を、WDHD1ペプチドの全長または断片のいずれかと反応するタンパク質と定義する。好ましい態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO:2~30の中より選択されるアミノ酸配列を有するWDHD1の断片ペプチドを認識する。オリゴペプチドを合成する方法は、当技術分野において周知である。合成後、免疫原として使用する前にペプチドを任意に精製してよい。本発明において、免疫原性を増強するために、オリゴペプチド(例えば、9merまたは10mer)を担体と結合または連結させてよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)が周知である。KLHおよびペプチドを結合するための方法も、当技術分野において周知である。

#### 【0211】

あるいは、本発明のペプチドまたはその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクターに挿入することができ、次いでこれを使用して本明細書に記載のように宿主細胞を形質転

換する。所望のペプチドまたはその断片を、任意の標準的な方法によ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、後にこれを抗原として使用することができる。あるいは、ペプチドを発現する細胞全体もしくはそれらの溶解物または化学合成したペプチドを抗原として使用してよい。

#### 【0212】

任意の哺乳動物を抗原で免疫することができるが、細胞融合に使用される親細胞との適合性を考慮に入れることが好ましい。一般に、齧歯目 (Rodentia)、ウサギ目 (Lagomorpha) または霊長目 (Primate) の動物が使用される。齧歯目の動物には、例えばマウス、ラットおよびハムスターが含まれる。ウサギ目の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目の動物には、例えば狭鼻下目 (Catarrhini) のサル (旧世界ザル)、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が含まれる。

10

#### 【0213】

動物を抗原で免疫する方法は、当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物を免疫するための標準的な方法である。より具体的には、抗原を適量のリン酸緩衝食塩水 (PBS)、生理食塩水等で希釈し、懸濁させる。必要に応じて、抗原懸濁液を、適量の標準的アジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化し、次いで哺乳動物に投与することができる。その後、適量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を、4~21日ごとに数回投与することが好ましい。免疫化には、適切な担体を使用してもよい。上記のように免疫した後、血清を、所望の抗体の量の増加に関して標準的方法で調べる。

20

#### 【0214】

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

30

#### 【0215】

モノクローナル抗体を調製するには、抗原で免疫した哺乳動物から免疫細胞を回収し、上記のように血清中の所望の抗体のレベル増加について確かめた上で、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る。上記の免疫細胞と融合され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、およびより好ましくは薬物による融合細胞の選択のための特性を獲得した骨髄腫細胞が含まれる。

#### 【0216】

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

#### 【0217】

細胞融合によって結果として得られたハイブリドーマは、それらを標準的な選択培地、例えばHAT培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地) 中で培養することによって選択することができる。細胞培養は典型的に、HAT培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な期間である数日間から数週間にわたって継続する。次いで、標準的な限界希釈を実施し、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングおよびクローニングする。

40

#### 【0218】

ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記の方法に加えて、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したリンパ球を、ペプチド、ペプチドを発現する細胞、またはそれらの溶解物でインビトロにおいて免疫することもできる。次いで、免疫後のリンパ球を、無限に分裂し得るヒト由来骨髄腫細胞、例えばU266と融合させて、

50

該ペプチドに結合し得る所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる（特開昭63-17688号）。

【0219】

続いて、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィーまたは本発明のペプチドを結合させたアフィニティークラムによ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のためだけでなく、本発明のペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストの候補としても使用することができる。

【0220】

あるいは、抗体を産生する免疫細胞、例えば免疫したリンパ球を癌遺伝子によって不活化し、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。

【0221】

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を使用して組換えによって調製することもできる（例えば、MacMillan Publishers LTD (1990)によって英国で刊行された、Borrebaeck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodiesを参照されたい）。例えば、抗体をコードするDNAを、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化リンパ球からクローニングし、適切なベクターに挿入して、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製された組換え抗体を提供する。

【0222】

さらに、本発明の抗体は、本発明のペプチドの1種または複数種に結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、FvまたはH鎖およびL鎖由来のFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(scFv)であってよい（Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-83(1988)）。より具体的には、抗体断片は、抗体を酵素、例えばパパインまたはペプシンで処理することによって作製することができる。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞内で発現させることができる（例えば、Coet al., J Immunol 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178:497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121:652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9:132-7(1991)を参照されたい）。

【0223】

抗体は、様々な分子、例えばポリエチレングリコール(PEG)との結合によって修飾することができる。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で慣例的である。

【0224】

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

【0225】

ヒトのフレームワーク領域および定常領域に加えて、ヒト可変領域をも含む完全なヒト抗体を使用することもできる。そのような抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を使用

10

20

30

40

50

して産生させることができる。例えば、インビトロの方法には、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用が含まれる（例えば、Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381(1991)）。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することができる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号、第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号に記載されている。

#### 【0226】

上記のようにして得られた抗体は、均質になるまで精製してよい。例えば、一般的なタンパク質に対して使用される分離法および精製法に従って、抗体の分離および精製を実施することができる。例えば、これらに限定されないが、カラムクロマトグラフィー、例えばアフィニティークロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動および等電点電気泳動の使用を適切に選択しかつ組み合わせることによって、抗体を分離および単離することができる（Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)）。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティークラムとして使用することができる。使用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Sepharose F.F. (Pharmacia)が含まれる。

#### 【0227】

適当なクロマトグラフィー法には、アフィニティークロマトグラフィー以外に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が含まれる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996)）。クロマトグラフィー手順は、液相クロマトグラフィー、例えばHPLCおよびFPLCによって実施することができる。

#### 【0228】

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

#### 【0229】

本発明の抗体を本発明のペプチドを含むと考えられる試料に対して曝露し、該抗体と該ペプチドとによって形成される免疫複合体を検出または測定することによって、上記の方法によって本発明のペプチドの検出または測定が可能になる。

#### 【0230】

本発明によるペプチドを検出または測定する方法はペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法は、該ペプチドを使用する種々の実験において有用であり得る。

#### 【0231】

##### XII. ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチドが導入されたベクターおよび宿主細胞を提供する。本発明のベクターは、宿主細胞中に本発明のヌクレオチド、特にDNAを保持するため、本発明のペプチドを発現させるため、または遺伝子治療用に本発

10

20

30

40

50

明のヌクレオチドを投与するために有用である。

【0232】

大腸菌が宿主細胞であり、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5<sup>+</sup>、HB101またはXL1Blue）内で増幅して大量に生成する場合、ベクターは、大腸菌内で増幅するための「複製起点」と、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の薬物によって選択される薬物耐性遺伝子）とを有する必要がある。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script等を使用することができる。加えて、pGEM-T、pDIRECTおよびpT7も上記のベクターと同様に、cDNAのサブクローニングおよび抽出に使用することができる。ベクターを本発明のタンパク質の産生に使用する場合には、発現ベクターが特に有用である。例えば、大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。大腸菌、例えばJM109、DH5<sup>+</sup>、HB101またはXL1Blueを宿主細胞として使用する場合、ベクターは、大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現し得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Ward et al., Nature 341:544-6(1989); FASEB J 6:2422-7(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必要がある。この点に関して、例えば、pGEX-5X-1（Pharmacia）、「QIAexpressシステム」（Qiagen）、pEGFPおよびpET（この場合、宿主は好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である）を上記のベクターの代わりに使用することができる。さらにベクターは、ペプチド分泌のためのシグナル配列を含んでもよい。ペプチドを大腸菌のペリプラズムに分泌させる例示的なシグナル配列は、pepBシグナル配列（Lei et al., J Bacteriol 169:4379(1987)）である。ベクターを標的宿主細胞に導入する手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

10

20

【0233】

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

30

【0234】

ベクターをCHO、COS、またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターはこのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター（Mulligan et al., Nature 277:108(1979)）、MMLV-LTRプロモーター、EF1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、薬物（例えば、ネオマイシン、G418）によって選択される薬物耐性遺伝子）を有する必要がある。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSVおよびpOP13が含まれる。

40

【0235】

本発明を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等の方法および材料を使用することができるが、適切な方法および材料を記載する。本明細書に挙げたすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参照によって組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含め、本明細書が優先される。

50

加えて、材料、方法、および例は、単に例証するためのものであり、限定することは意図しない。

【0236】

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

【実施例】

【0237】

材料および方法

細胞株

H L A - A \* 2 4 0 2 陽性 B リンパ芽球様細胞株である T I S I は、I H W G C e l l a n d G e n e B a n k ( S e a t t l e , W A ) から購入した。アフリカミドリザル腎細胞株である C O S 7 は、A T C C から購入した。

【0238】

W D H D 1 由来ペプチドの候補選択

H L A - A \* 2 4 0 2 分子に結合する W D H D 1 ( G e n B a n k アクセッション番号 N P \_ 0 0 9 0 1 7 ( S E Q I D N O : 3 5 ) ) 由来の 9 m e r および 1 0 m e r ペプチドを、結合予測ソフトウェア「B I M A S」( [http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) ) ( P a r k e r e t a l . ( J I m m u n o l 1 9 9 4 , 1 5 2 ( 1 ) : 1 6 3 - 7 5 ) , K u z u s h i m a e t a l . ( B l o o d 2 0 0 1 , 9 8 ( 6 ) : 1 8 7 2 - 8 1 ) ) を使用した。これらのペプチドは、B i o s y n t h e s i s ( L e w i s v i l l e , T e x a s ) により、標準的な固相合成法によって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー ( H P L C ) によって精製した。該ペプチドの純度 ( > 9 0 % ) および同一性を、それぞれ分析用 H P L C および質量分析によって決定した。ペプチドをジメチルスルホキシドに 2 0 m g / m l で溶解し、- 8 0 で保存した。

【0239】

インビトロでの C T L 誘導

単球由来の樹状細胞 ( D C ) を抗原提示細胞として使用して、ヒト白血球抗原 ( H L A ) 上に提示されたペプチドに対する細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 応答を誘導した。他所に記載されているように、D C をインビトロで作製した ( N a k a h a r a S e t a l . , C a n c e r R e s 2 0 0 3 , 6 3 ( 1 4 ) : 4 1 1 2 - 8 ) 。具体的には、F i c o l l - P l a q u e ( P h a r m a c i a ) 溶液によって健常なボランティア ( H L A - A \* 2 4 0 2 陽性 ) から単離した末梢血単核細胞を、プラスチック製の組織培養ディッシュ ( B e c t o n D i c k i n s o n ) へ附着させることによって分離し、それらを単球画分として濃縮した。2 % の加熱不活化した自己血清 ( A S ) を含む A I M - V 培地 ( I n v i t r o g e n ) 中、1 0 0 0 U / m l の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 ( R & D S y s t e m ) および 1 0 0 0 U / m l のインターロイキン ( I L ) - 4 ( R & D S y s t e m ) の存在下で、単球が濃縮された集団を培養した。7 日間の培養後、サイトカインで誘導した D C に、A I M - V 培地中で 3 7 で 3 時間、3 μ g / m l の 2 - ミクログロブリンの存在下で 2 0 μ g / m l の各合成ペプチドをパルスした。作製された細胞は、自身の細胞表面上に、C D 8 0 、 C D 8 3 、 C D 8 6 および H L A クラス I I などの D C 関連分子を発現しているようであった ( データは示さず ) 。次いで、ペプチドパルスしたこれらの D C を X 線照射 ( 2 0 G y ) によって不活化し、C D 8 P o s i t i v e I s o l a t i o n K i t ( D y n a l ) を用いた陽性選択によって得られた自己 C D 8 + T 細胞と 1 : 2 0 の比率で混合した。これらの培養物を 4 8 ウェルプレート ( C o r n i n g ) 中に準備し、各ウェルは、0 . 5 m l の A I M - V / 2 % A S 培地中に、1 . 5 × 1 0 <sup>4</sup> 個のペプチドパルスした D C 、 3 × 1 0 <sup>5</sup> 個の C D 8 + T 細胞および 1 0 n g / m l の I L - 7 ( R & D S y s t e m ) を含んだ。3 日後、これらの培養物に、I L - 2 ( C H I R O N ) を最終濃度 2 0 I U / m l まで添加した。7 日目および 1 4 日目に、ペプチドパルスした自己 D C で T 細胞をさらに刺激した。D C は上記と同一の方法によって毎回調製した。2 1 日

10

20

30

40

50

目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたT I S I細胞に対してCTLを試験した (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

#### 【0240】

##### CTL増殖手順

Riddellら (Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16):1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2):216-23) によって記載されている方法と類似の方法を使用して、CTLを培養下で増殖させた。40 ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体 (Pharmingén) の存在下で、マイトマイシンCによって不活化した2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株とともに、合計  $5 \times 10^4$  個のCTLを25 mlのAIM-V/5% AS培地中に懸濁した。培養開始1日後に、120 IU/mlのIL-2を該培養物に添加した。5、8および11日目に、30 IU/mlのIL-2を含む新たなAIM-V/5% AS培地を、該培養物に供給した (Tanaka H et al., Br J Cancer 2001, 84(1):94-9; Umano Y et al., Br J Cancer 2001, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

10

#### 【0241】

##### CTLクローンの樹立

96丸底マイクロタイプレート (Nalge Nunc International) においてCTL 0.3個、1個、および3個/ウェルとなるように、希釈を行った。CTLを、 $1 \times 10^4$  個細胞/ウェルの2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株、30 ng/mlの抗CD3抗体、および125 U/mlのIL-2とともに、合計150  $\mu$ l/ウェルの5% AS含有AIM-V培地中で培養した。10日後、50  $\mu$ l/ウェルのIL-2を、IL-2の最終濃度が125 U/mlに到達するように該培地に添加した。14日目にCTL活性を試験し、上記と同一の方法を使用してCTLクローンを増殖させた (Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005, 96(8):498-506)。

20

#### 【0242】

##### 特異的CTL活性

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

30

#### 【0243】

標的遺伝子およびHLA-A\*24のいずれか一方または両方を強制的に発現する細胞の樹立

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

40

#### 【0244】

##### 結果1

##### がんにおけるWDHD1発現の増強

cDNAマイクロアレイを使用して様々ながんから得られた包括的遺伝子発現プロファ

50

イルデータによって、WDHD1 (GenBankアクセッション番号NM\_007086、NM\_001008396;例えば、SEQ ID No:31)の発現が上昇していることが明らかになった。WDHD1発現は、膀胱癌11例中4例、乳癌5例中1例、子宮頸癌8例中8例、胆管細胞癌12例中1例、CML22例中19例、食道癌34例中15例、胃癌3例中3例、リンパ腫3例中1例、骨肉腫11例中5例、前立腺癌27例中2例、腎癌11例中2例、SCLC7例中3例、NSCLC1例中のうち1例、精巣腫瘍3例中3例において、対応する正常組織と比較して確かに上昇していた(表1)。

【0245】

【表1】

対応する正常組織として、がん性組織においてWDHD1の上方制御が観察された症例の割合

10

| 癌     | 割合    |
|-------|-------|
| 膀胱癌   | 4/11  |
| 乳癌    | 1/5   |
| 子宮頸癌  | 8/8   |
| 胆管細胞癌 | 1/12  |
| CML   | 19/22 |
| 食道癌   | 15/34 |
| 胃癌    | 3/3   |
| リンパ腫  | 1/3   |
| 骨肉腫   | 5/11  |
| 前立腺癌  | 2/27  |
| 腎癌    | 2/11  |
| SCLC  | 3/7   |
| NSCLC | 1/1   |
| 精巣腫瘍  | 3/3   |

20

【0246】

結果2

30

WDHD1由来のHLA-A24結合ペプチドの予測

表2aおよび2bは、WDHD1のHLA-A24結合9merおよび10merペプチドを、結合親和性の高い順に示す。エピトープペプチドを決定するために、HLA-A24結合能を有する可能性がある合計30種のペプチドを選択して調べた。

【0247】

【表 2 a】

WDHD1に由来するHLA-A24結合9merペプチド

| 開始位置 | アミノ酸配列     | スコア   | SEQ ID NO |
|------|------------|-------|-----------|
| 798  | KYASRSRKL  | 440   | 1         |
| 289  | SYTDAEGNL  | 240   | 2         |
| 143  | SFDPKDIFL  | 24    | 3         |
| 734  | IFHNHLDYL  | 20    | 4         |
| 767  | KMLALSCKL  | 15.84 | 5         |
| 731  | RSVIFHNHL  | 14.4  | 6         |
| 318  | RVEKDYNL   | 14.4  | 7         |
| 611  | KQILHGDPL  | 12    | 8         |
| 9    | RYGHTEGHT  | 10    | 9         |
| 193  | AWQPKSGKL  | 7.92  | 10        |
| 227  | NFISQTLNI  | 7.5   | 11        |
| 237  | TWSPCGQYL  | 5.76  | 12        |
| 844  | GYSNTATEW  | 5.5   | 13        |
| 273  | GYAICGLAW  | 5     | 14        |
| 971  | KQASAASYF  | 4     | 15        |
| 136  | DAPVLSLSF  | 3.6   | 16        |
| 94   | TTNANHVVVF | 3     | 17        |
| 549  | TSALLLRLF  | 2.4   | 18        |
| 727  | EQFWRSVIF  | 2     | 19        |
| 280  | AWHPTCGRI  | 1.2   | 20        |

10

20

【 0 2 4 8 】

【表 2 b】

WDHD1に由来するHLA-A24結合10merペプチド

| 開始位置 | アミノ酸配列     | スコア  | SEQ ID NO |
|------|------------|------|-----------|
| 457  | CYNDEQDNAI | 108  | 21        |
| 798  | KYASRSRCLI | 100  | 22        |
| 131  | TFRGHDAPVL | 20   | 23        |
| 778  | EFRCVELADL | 20   | 24        |
| 445  | RFMVWNSIGI | 15   | 25        |
| 988  | KTEEVKEENL | 14.4 | 26        |
| 80   | TFPEGVPDGI | 12.6 | 27        |
| 748  | EYEESTKNQA | 10.8 | 28        |
| 625  | SYLAWIGFSA | 10.5 | 29        |
| 518  | SWDSSKEWII | 1    | 30        |

30

40

開始位置は、WDHD1のN末端からのアミノ酸残基数を示す。

結合スコアは「BIMAS」から得られる。

【 0 2 4 9 】

HLA-A\*2402拘束性のWDHD1由来予測ペプチドによるCTLの誘導

WDHD1由来のペプチドに対するCTLを、「材料および方法」に記載したプロトコールに従って作製した。IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を測定した(図1a~g)。以下のウェル番号が、対照ウェルと比較して強力なIFN- $\gamma$ 産生を実証した: WDHD1-A24-9-731(SEQ ID NO: 6)を用いたウェル番号#1(a)、WDHD1-A24-9-611(SEQ ID NO: 8)を用いた#2(b)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO: 12)を用いた#3(c)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO: 12)を用いた#4(d)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO: 12)を用いた#5(e)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO: 12)を用いた#6(f)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO: 12)を用いた#7(g)。

50

O : 12) を用いた # 6 (c)、WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13) を用いた # 1 (d)、WDHD1 - A24 - 9 - 273 (SEQ ID NO : 14) を用いた # 4 (e)、WDHD1 - A24 - 9 - 727 (SEQ ID NO : 19) を用いた # 6 (f) および WDHD1 - A24 - 10 - 625 (SEQ ID NO : 29) を用いた # 3 (g)。一方、表 2 a および 2 b に示される他のペプチドは、HLA - A \* 2402 との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドでの刺激によっては、特異的な CTL 活性が測定されなかった。陰性データの典型例として、WDHD1 - A24 - 9 - 798 (SEQ ID NO : 1) で刺激した CTL (h) からは特異的 IFN - 産生が観察されなかった。結果として、WDHD1 由来の 7 種のペプチドが強力な CTL を誘導し得るペプチドとして選択されることが示された。

10

#### 【0250】

##### WDHD1 由来ペプチドに対する CTL 株およびクローンの樹立

上記「材料および方法」の章に記載した通りに、WDHD1 - A24 - 9 - 237 (SEQ ID NO : 12) を用いたウェル番号 # 6 (a)、WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13) を用いた # 1 (b) および WDHD1 - A24 - 10 - 625 (SEQ ID NO : 29) を用いた # 3 (c) における IFN - ELISA アッセイによって検出されたペプチド特異的 CTL 活性を示した細胞を増殖させ、限定希釈によって CTL 株を樹立した。これらの CTL 株の CTL 活性を IFN - ELISA アッセイによって測定した (図 2 a ~ c)。これらの CTL 株は、ペプチドをパルスしなかった標的細胞と比較して、対応するペプチドをパルスした標的細胞に対して強力な IFN - 産生を示した。さらに、「材料および方法」に記載した通りに、CTL 株から限界希釈によって CTL クローンを樹立し、ペプチドをパルスした標的細胞に対する CTL クローンからの IFN - 産生を IFN - ELISA アッセイによって測定した。WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13) で刺激した CTL クローンから強力な IFN - 産生が測定された (図 3)。

20

#### 【0251】

##### WDHD1 および HLA - A \* 2402 を発現する標的細胞に対する特異的 CTL 活性

各ペプチドに対して産生された樹立 CTL 株およびクローンを、WDHD1 および HLA - A \* 2402 分子を発現する標的細胞を認識する能力に関して調べた。全長 WDHD1 および HLA - A \* 2402 遺伝子の両方をトランスフェクトした COS7 細胞 (WDHD1 および HLA - A \* 2402 遺伝子が発現する標的細胞の特異的モデル) に対する特異的 CTL 活性を、対応するペプチドによって産生された CTL 株およびクローンをを用いて試験した。全長 WDHD1 または HLA - A \* 2402 のいずれかをトランスフェクトした COS7 細胞を対照として調製した。図 4 において、WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13) で刺激した CTL クローンは、WDHD1 および HLA - A \* 2402 の両方を発現する COS7 細胞に対して強力な CTL 活性を示した。一方、対照に対して有意な特異的 CTL 活性は検出されなかった。したがって、このデータによって、WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13) が内因的にプロセッシングされ、HLA - A \* 2402 分子とともに標的細胞上に提示され、CTL によって認識されることが明確に実証された。これらの結果は、WDHD1 に由来する WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13) が、WDHD1 を発現する腫瘍を有する患者に対するがんワクチンとして適している可能性を示している。

30

40

#### 【0252】

##### 抗原ペプチドの相同性解析

WDHD1 - A24 - 9 - 731 (SEQ ID NO : 6)、WDHD1 - A24 - 9 - 611 (SEQ ID NO : 8)、WDHD1 - A24 - 9 - 237 (SEQ ID NO : 12)、WDHD1 - A24 - 9 - 844 (SEQ ID NO : 13)、WDHD1 - A24 - 9 - 273 (SEQ ID NO : 14)、WDHD1 - A24 - 9 - 727 (SEQ ID NO : 19) および WDHD1 - A24 - 10 - 625 (SEQ ID NO : 29) で刺激した CTL は、有意かつ特異的な CTL 活性を示した。こ

50

の結果は、WDHD1-A24-9-731(SEQ ID NO:6)、WDHD1-A24-9-611(SEQ ID NO:8)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO:12)、WDHD1-A24-9-844(SEQ ID NO:13)、WDHD1-A24-9-273(SEQ ID NO:14)、WDHD1-A24-9-727(SEQ ID NO:19)およびWDHD1-A24-10-625(SEQ ID NO:29)の配列が、ヒト免疫系を感作することが知られている他の分子に由来するペプチドと相同であるという事実に起因する可能性がある。この可能性を排除するために、BLASTアルゴリズム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)を使用して、クエリーとしてのこのペプチド配列に対して相同性解析を実施したが、有意な相同性を有する配列は認められなかった。相同性解析の結果は、WDHD1-A24-9-731(SEQ ID NO:6)、WDHD1-A24-9-611(SEQ ID NO:8)、WDHD1-A24-9-237(SEQ ID NO:12)、WDHD1-A24-9-844(SEQ ID NO:13)、WDHD1-A24-9-273(SEQ ID NO:14)、WDHD1-A24-9-727(SEQ ID NO:19)およびWDHD1-A24-10-625(SEQ ID NO:29)の配列が固有のものであることを示し、したがって本発明者らの知る限りでは、これらの分子が、ある非関連分子に対して意図しない免疫学的応答を引き起こす可能性はほとんどない。

10

**【0253】**

結論として、WDHD1に由来する新規HLA-A\*2402エピトープペプチドが同定された。さらに、本明細書における結果は、WDHD1のエピトープペプチドががん免疫療法における使用に適している可能性があることを実証している。

20

**【産業上の利用可能性】****【0254】**

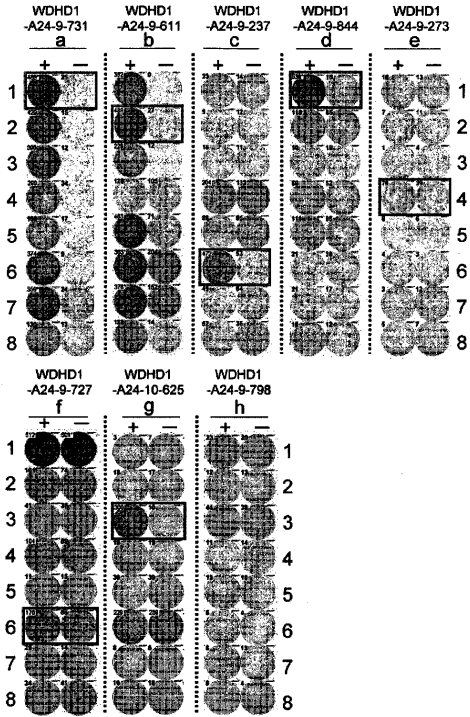
本発明は、新規TAA、特に、強力かつ特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導し、かつ幅広いがんの種類に対する適用性を有する、WDHD1由来の新規TAAを提供する。そのようなTAAは、WDHD1に関連する疾患、例えば、がん、より詳細には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、食道癌、胃癌、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌、SCLC、NSCLCおよび精巣腫瘍に対するペプチドワクチンとして有用である。

**【0255】**

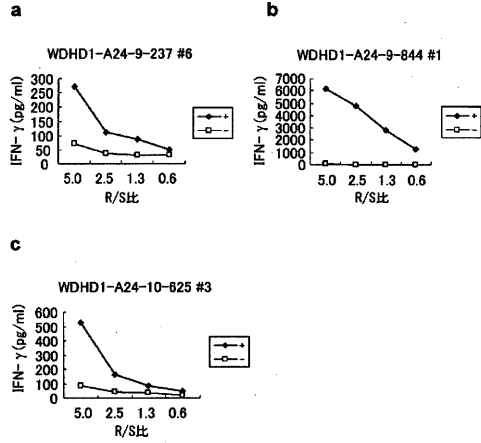
本明細書において、本発明をその特定の態様に関して詳細に説明しているが、前述の説明は本質的に例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。慣例的な実験を通して、当業者は、その境界および限界が添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変がその中でなされ得ることを容易に認識するであろう。

30

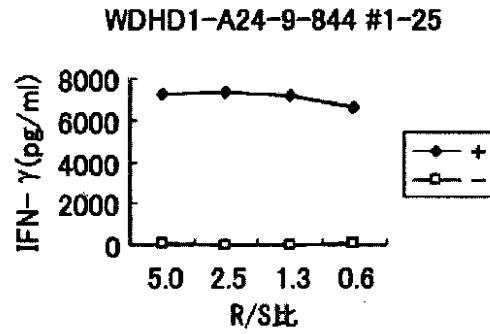
【 図 1 】



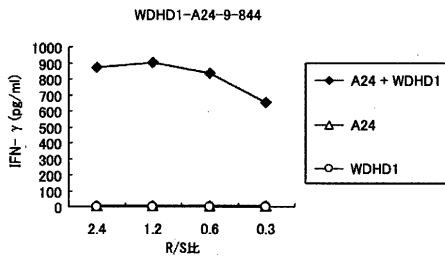
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/005866

|   |   |
|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER   |   |
| Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n                                     |   |
| 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. C12N15/09, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K7/06, C07K14/47   |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  |   |
| CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST/580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq  |   |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  |
| Y/ A  | SATO N. et al., Activation of WD repeat and high-mobility group box DNA binding protein 1 in pulmonary and esophageal carcinogenesis., Clin. Cancer Res. (Jan. 2010) vol. 16, pages 226-239   |
| Y/ A  | WO 2009/028581 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2009.03.05, the whole document & JP 2010-536367 A & US 2011/0160280 A1 & EP 2190985 A   |
| Y/ A  | MIYAZAWA M. et al., Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer., Cancer Sci. (Feb. 2010) vol. 101, pages 433-439 |
| Y/ A  | YOKOMINE K. et al., The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy., Int. J. Cancer (May 2010) vol. 126,   |
|   | 1, 3-15, 17-21/2  |
|   | 1, 3-15, 17-21/2  |
|   | 1, 3-15, 17-21/2  |
|   | 1, 3-15, 17-21/2  |
| <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  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention   |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date   | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art        |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  | "&" document member of the same patent family   |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |   |
| Date of the actual completion of the international search   | Date of mailing of the international search report  |
| 12.01.2012  | 24.01.2012  |
| Name and mailing address of the ISA/JP  | Authorized officer  |
| <b>Japan Patent Office</b>  | Satoshi Ishimaru  |
| 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan  | Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448   |
|   | 4B 3777   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|  |
|--|
| International application No.<br>PCT/JP2011/005866 |
|--|

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|   | pages 2153-2163  |                       |
| Y/ A  | HARANO M. et al., HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL., Int. J. Cancer (2008) vol. 123, pages 2616-2625                      | 1, 3-15, 17-21/<br>2  |
| Y/ A  | IMAI K. et al., Identification of a novel tumor-associated antigen, cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers., Clin. Cancer Res. (2008) vol. 14, pages 6487-6495             | 1, 3-15, 17-21/<br>2  |
| Y/ A  | SUDA T. et al., Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy., Cancer Sci. (2007) vol. 98, pages 1803-1808 | 1, 3-15, 17-21/<br>2  |
| Y/ A  | WO 2004/018667 A1 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) 2004.03.04, & JP 4406607 B & AU 2003254950 A & TWB 00I333958   | 1, 3-15, 17-21/<br>2  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|  |
|--|
| International application No.<br>PCT/JP2011/005866 |
|--|

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

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

1.  Claims Nos.: 16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 16 relates to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, which does not require an intentional search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and [Rule 39.1(iv)].
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.              | F I           | テーマコード(参考) |
|--------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)  | A 6 1 K 48/00 | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 K 39/00 (2006.01)  | A 6 1 K 39/00 | H          |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P 35/00 |            |
| A 6 1 K 35/76 (2006.01)  | A 6 1 K 35/76 |            |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01)  | G 0 1 N 33/53 | D          |
| C 0 7 K 14/47 (2006.01)  | C 0 7 K 14/47 |            |
| C 1 2 N 5/0784 (2010.01) | C 1 2 N 5/00  | 2 0 2 M    |
| C 1 2 N 5/0786 (2010.01) | C 1 2 N 5/00  | 2 0 2 N    |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01)   | C 1 2 N 1/15  |            |
| 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 5/0783 (2010.01) | C 1 2 N 5/00  | 1 0 1      |
|                          | C 1 2 N 5/00  | 2 0 2 L    |

(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, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, 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, VN

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 中村 祐輔  
東京都港区白金台四丁目6番1号 国立大学法人東京大学 医科学研究所内

(72)発明者 角田 卓也  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72)発明者 大沢 龍司  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72)発明者 吉村 祥子  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72)発明者 渡辺 朝久  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA36 BA45 CA04 CA05 DA03 DA05 DA11 DA12  
EA02 EA04 GA11 HA01 HA17  
4B065 AA93X AA93Y AA94X AB01 AC14 BA02 BB19 CA45 CA46

|       |      |      |      |      |      |       |       |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|
| 4C084 | AA01 | AA02 | AA13 | BA17 | NA14 | ZB261 | ZB262 |      |      |      |
| 4C085 | AA01 | AA03 | BB01 | CC21 | DD62 | EE01  | GG01  | GG08 |      |      |
| 4C087 | AA01 | AA02 | BC83 | NA14 | ZB26 |       |       |      |      |      |
| 4H045 | AA10 | AA20 | AA30 | BA15 | CA40 | DA75  | DA86  | EA31 | EA51 | FA74 |

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | WDHD1肽和包含其的疫苗  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014504146A</a>  | 公开(公告)日 | 2014-02-20 |
| 申请号            | JP2013518619   | 申请日     | 2011-10-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 肿瘤疗法科学股份有限公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | ONCO疗法科学股份有限公司   |         |            |
| [标]发明人         | 中村祐輔<br>角田卓也<br>大沢龍司<br>吉村祥子<br>渡辺朝久   |         |            |
| 发明人            | 中村 祐輔<br>角田 卓也<br>大沢 龍司<br>吉村 祥子<br>渡辺 朝久  |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C07K7/06 C12N5/10 C07K16/18 A61K38/00 A61K48/00 A61K39/00 A61P35/00 A61K35/76 G01N33/53 C07K14/47 C12N5/0784 C12N5/0786 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/0783  |         |            |
| CPC分类号         | A61K38/00 A61K39/0011 A61P35/00 C07K14/47 C07K7/06   |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A C07K7/06 C12N5/00.102 C07K16/18 A61K37/02 A61K48/00 A61K39/00.H A61P35/00 A61K35/76 G01N33/53.D C07K14/47 C12N5/00.202.M C12N5/00.202.N C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.202.L   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/DA03 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB19 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA17 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA01 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷<br>井上隆一<br>佐藤俊光<br>小林智彦<br>渡边真一<br>正人大关<br>五十嵐弘   |         |            |
| 优先权            | 61/405517 2010-10-21 US  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2014504146A5   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |
| 摘要(译)          |  |         |            |

本文描述了抗癌的肽疫苗。特别地，提供了分离的表位肽或衍生自SEQ ID NO：32的免疫原性片段，其结合HLA抗原并诱导细胞毒性T淋巴细胞（CTL）。目标肽的氨基酸序列可任选地通过一个，两个或几个氨基酸序列的取代，缺失，插入或添加来修饰。还提供了用于治疗癌症的药物组合物和方法，包括此类肽。

#### WDHD1に由来するHLA-A24結合10merペプチド

| 開始位置 | アミノ酸配列     | スコア  | SEQ ID NO |
|------|------------|------|-----------|
| 457  | CYNDEQDNAI | 108  | 21        |
| 798  | KYASRSRKLJ | 100  | 22        |
| 131  | TFRGHDPVL  | 20   | 23        |
| 778  | EFRCVELADL | 20   | 24        |
| 445  | RFMVWNSIGI | 15   | 25        |
| 988  | KTEEVKEENL | 14.4 | 26        |
| 80   | TFEGVPDGI  | 12.6 | 27        |
| 748  | EYEESTKNQA | 10.8 | 28        |
| 625  | SYLAWIGFSA | 10.5 | 29        |
| 518  | SWDSSKEWII | 1    | 30        |

開始位置は、WDHD1のN末端からのアミノ酸残基数を示す。

結合スコアは「BIMAS」から得られる。