

(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2014-510513

(P2014-510513A)

(43) 公表日 平成26年5月1日(2014.5.1)

(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 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-508319 (P2013-508319)	(71) 出願人	502240113 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成24年8月9日 (2012.8.9)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月12日 (2013.7.12)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/005076	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02013/024582	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013.2.21)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/522, 991	(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(32) 優先日	平成23年8月12日 (2011.8.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MPHOSPH1ペプチドおよびそれを含むワクチン

(57) 【要約】

本明細書に詳述するように、MPHOSPH1由来の単離されたエピトープペプチドは、HLA抗原に結合し、かつ細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導し、したがってがん免疫療法との関連における使用、より詳細にはがんワクチンに適している。本発明のペプチドは、上述のMPHOSPH1由来アミノ酸配列、および、改変型が元の配列の必要なCTL誘導能を保持する限り、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その改変型の両方を包含する。さらに、上述のペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドおよび上述のペプチドまたはポリヌクレオチドのいずれかを含む薬学的な剤または組成物が提供される。本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、および薬学的な剤または組成物は、例えば膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍を含むがんおよび腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方において特に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) または (b) の単離されたペプチド :

(a) S E Q I D N O : 5、14、64、73、77、79、97、103 および 120 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド ;

(b) S E Q I D N O : 5、14、64、73、77、79、97、103 および 120 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、および / または付加されているアミノ酸配列を含むペプチドであって、かつ、細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) 誘導能を有する、ペプチド。

【請求項 2】

以下の特徴の一方または両方を有する、請求項 1 記載の単離されたペプチド :

(a) S E Q I D N O 5、14、64、73、77、79、97、103 および 120 からなる群より選択されるアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される ; ならびに

(b) S E Q I D N O 5、14、64、73、77、79、97、103 および 120 からなる群より選択されるアミノ酸配列の C 末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。

【請求項 3】

ノナペプチドまたはデカペプチドである、請求項 1 または 2 記載の単離されたペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 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。

【請求項 5】

C T L を誘導するための組成物であって、請求項 1 ~ 3 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 4 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 6】

C T L 誘導能を有する A P C を誘導するための組成物であって、請求項 1 ~ 3 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 4 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 7】

以下からなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含む、薬学的組成物 :

(a) 請求項 1 ~ 3 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 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドをコードする 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチド ;

(c) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する 1 種もしくは複数種の A P C またはエキソソーム ; および

(d) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する 1 種もしくは複数種の C T L 。

【請求項 8】

がんの治療および予防のいずれかもしくは両方において、または対象におけるがんに対する免疫応答の誘導において使用するための、請求項 7 記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

H L A 抗原が H L A - A 2 である対象への投与のために製剤化される、請求項 7 または 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

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であって、以下からなる群より選択される段階を含む、方法 :

(a) A P C を請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エクスピボ

10

20

30

40

50

またはインビボで接触させる段階、および

(b) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階。

【請求項 1 1】

C T L を誘導するための方法であって、以下からなる群より選択される段階を含む、方法：

(a) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 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 A P C と共培養する段階；

(b) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 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 (T C R) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドを、C D 8 陽性 T 細胞に導入する段階であって、該 T C R が、細胞表面上に提示された、H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドとの複合体に結合し得る、段階。

【請求項 1 2】

H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 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 A P C 。

【請求項 1 3】

請求項 1 0 記載の方法によって誘導される、請求項 1 2 記載の A P C 。

【請求項 1 4】

H L A 抗原と請求項 1 ~ 3 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細胞を認識する、単離された C T L 。

【請求項 1 5】

請求項 1 1 記載の方法によって誘導される、請求項 1 4 記載の C T L 。

【請求項 1 6】

対象におけるがんの治療および予防のいずれかまたは両方の方法であって、対象に薬学的有効量の

(a) 請求項 1 ~ 3 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 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドをコードする 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する 1 種もしくは複数種の A P C またはエキソソーム；または

(d) 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する 1 種もしくは複数種の C T L

を投与する段階を含む方法。

【請求項 1 7】

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を該対象に投与する段階を含む、方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 3 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 1 9】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 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 2 1】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載のペプチド、請求項 4 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 1 8 記載の抗体を含む診断キット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【0002】

優先権

本出願は、2011年8月12日に出願された米国仮特許出願第61/522,991号の恩典を主張し、その全内容は参照によって本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、主要組織適合複合体(MHC)クラスI分子上に見出される腫瘍関連抗原(TAA)由来のエピトープペプチドを認識し、次いで腫瘍細胞を殺傷することが示されている。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いる(非特許文献1、Boon T, Int J Cancer 1993 May 8, 54(2):177-80; 非特許文献2、Boon T & van der Bruggen P, J Exp Med 1996 Mar 1, 183(3):725-9)。これらのTAAのうちのいくつかは、現在、免疫療法の標的として臨床開発の過程にある。

【0004】

有望なTAAは、がん細胞の増殖および生存に不可欠である。そのようなTAAを免疫療法の標的として使用することによって、療法によ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の同定によって、進行中の様々な種類のがんに対するペプチドワクチン接種戦略のさらなる開発および臨床適用が保証される(非特許文献3、Harris CC, J Natl Cancer Inst 1996 Oct 16, 88(20):1442-55; 非特許文献4、Butterfield LH et al., Cancer Res 1999 Jul 1, 59(13):3134-42; 非特許文献5、Vissers JL et al., Cancer Res 1999 Nov 1, 59(21):5554-9; 非特許文献6、van der Burg SH et al., J Immunol 1996 May 1, 156(9):3308-14; 非特許文献7、Tanaka F et al., Cancer Res 1997 Oct 15, 57(20):4465-8; 非特許文献8、Fujie T et al., Int J Cancer 1999 Jan 18, 80(2):169-72; 非特許文献9、Kikuchi M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):439-66; 非特許文献10、Oiso M et al., Int J Cancer 1999 May 5, 81(3):387-94)。現在までに、これらの腫瘍関連抗原由来ペプチドを使用した臨床試験がいくつか報告されている。残念ながら、現在のがんワクチン治療の多くは低い客観的奏効率しか示していない(非特許文献11、Bellini F et al., J Clin Oncol 2002 Oct 15, 20(20):4169-80; 非特許文献12、Coulie PG et al., Immunol Rev 2002 Oct, 188:33-42; 非特許文献13、Rosenberg SA et al., Nat Med 2004 Sep, 10(9):909-15)。したがって、免疫療法標的としての新規TAAが当技術分野において依然として必要とされている。

【0005】

MPHOSPH1(M期リンタンパク質1(M-phase phosphoprotein 1)); GenBankアクセッション番号NM_016195およびNP_057279、SEQ ID NO:125および126)は、G2/M遷移において特異的にリン酸化されたタンパク質の1つとして同定され、プラス方向指向キネシン関連タンパク質として明らかにされた(非特許文献14、Abaza A et al., J Biol Chem 2003, 278:27844-52)。より詳細には、MPHOSPH1は、細胞質分裂において重要な役割を担い、HeLa細胞内で後期から終期の間に紡錘体の中間帯内に蓄積するプラス方向指向分子モーターであると報告されている(非特許文献14、Abaza A et al., J Biol Chem 2003, 278:27844-5; 非特許文献15、Kamimoto T et al., J Biol Chem 2001, 276:37520-8)。23,040個の遺伝子を含むゲノムワイドcDNAマイクロアレイを使用する遺伝

10

20

30

40

50

子発現プロファイル解析の過程において、MPHOSPH1は、膀胱癌において上方制御される新規分子として同定された（非特許文献16、Kanehira M et al., Cancer Res. 2007 Apr 1;67(7):3276-85；特許文献1、WO2006/085684）。さらに、ノザンプロット解析により、MPHOSPH1遺伝子産物の発現は、精巣に限定され、正常な重要器官には見られないことが見出された。

【0006】

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導能を有するMPHOSPH1由来のいくつかのペプチド断片が、以前に同定された（特許文献2、WO2008/047473）。これらのペプチド断片は、同族ペプチド断片で刺激した細胞に対してCTLを誘導する能力を実証した。しかしながら、以前の研究は、ペプチド断片が、MPHOSPH1遺伝子およびHLA-A2抗原を発現する腫瘍細胞を標的とするCTLを誘導する能力を有するか否かを確認していなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO2006/085684

【特許文献2】WO2008/047473

【非特許文献】

【0008】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【非特許文献14】Abaza A et al., J Biol Chem 2003, 278:27844-5.

【非特許文献15】Kamimoto T et al., J Biol Chem 2001, 276:37520-8

【非特許文献16】Kanehira M et al., Cancer Res. 2007 Apr 1;67(7):3276-85.

【発明の概要】

【0009】

本発明は、免疫療法の適切な標的として役立つ新規ペプチドの発見に少なくとも一部基づいている。TAAは一般に免疫系によって「自己」として認識され、したがって多くの場合は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。上記のとおり、MPHOSPH1（例えば、GenBankアクセッション番号NM_016195（SEQ ID NO:125）の遺伝子によってコードされるSEQ ID NO:126）は、がんにおいて上方制御されると同定されており、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、慢性骨髄性白血病（CML）、結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。したがって、本発明は、がん/腫瘍免疫療法の候補標的としてのMPHOSPH1、より詳細には、適切な免疫療法標的として役立つ新規MPHOSPH1エピトープペプチドを対象とする。

【0010】

この目的のために、本発明は、MPHOSPH1由来のペプチドのうち、MPHOSP

H1に特異的なCTLを誘導する能力を保有する特異的エピトープペプチドの同定に少なくとも一部向けられている。以下により詳述するように、健常ドナーから得た末梢血単核細胞(PBMC)を、MPHOSPH1由来のHLA-A*0201結合候補ペプチドを使用して刺激した。次いで、各候補ペプチドをパルスしたHLA-A2陽性標的細胞に対する特異的細胞傷害性を有するCTL株を樹立した。本明細書におけるこれらの結果は、これらのペプチドが、MPHOSPH1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-A2拘束性エピトープペプチドであることを実証している。これらの結果は、MPHOSPH1は免疫原性が強く、かつそのエピトープはがん/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。

【0011】

したがって、HLA抗原と結合し、かつCTLを誘導する単離されたペプチドであって、MPHOSPH1(SEQ ID NO:126)の免疫学的活性断片を含む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、インビトロもしく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インビボで誘導するために対象に直接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、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【0012】

本発明のペプチドは、一般に、15、14、13、12、11、または10未満のアミノ酸長である。本発明の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る。特に好ましいペプチドは、SEQ ID NO:5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列を有する。それらのペプチドがHLA-A2抗原に結合し、かつCTLを誘導することを実証したためである。

【0013】

したがって、いくつかの態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列を有する15、14、13、12、11、または10未満のアミノ酸長のペプチドである。典型的な態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:5、14、64、73、77、79、97、103および120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。さらに、本明細書において実証されるとおり、SEQ ID NO:120のアミノ酸配列を有するペプチドは、MPHOSPH1およびHLA-A2抗原を発現する腫瘍細胞を標的とするCTLを誘導することが確認された。したがって、好ましい態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO:120のアミノ酸配列を有するペプチドである。

【0014】

本発明のペプチドは、抗原提示細胞(APC)とインビトロ、エクスピボまたはインビボで接触させる場合、APC上のHLA-A2抗原と結合し、HLA-A2抗原との複合体としてAPC上に提示される。あるいは、本発明のペプチドは、APCによって吸収され、APC内でSEQ ID NO:5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列から構成される断片にプロセッシングされ、HLA-A2抗原との複合体としてAPC上に提示され得る。結果的に、そのようなペプチドに特異的なCTLが誘導され、そのようなCTLは本発明の要素とみなされる。

【0015】

本発明はまた、改変ペプチドが元の未改変ペプチドと同等のCTL誘導能を保持する限り、SEQ ID NO:5、14、64、73、77、79、97、103および120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置換、欠失、挿入および/または付加されているアミノ酸配列を有する改変ペプチドを企図する。この目的のため、本発明は、15、14、13、12、11、または10未満のアミノ酸長の単離されたペプチドであって、CTL誘導能を有し、かつ以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを提供する：

10

20

30

40

50

(i) S E Q I D N O : 5、14 および 64 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されているアミノ酸配列、ならびに
(i i) 以下の特徴の一方または両方を有する、(i) のアミノ酸配列 :

(a) 前記 S E Q I D N O の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される ; ならびに

(b) 前記 S E Q I D N O の C 末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。

【 0 0 1 6 】

さらに、本発明はまた、15、14、13、12、または11未満のアミノ酸長の単離されたペプチドであって、CTL誘導能を有し、かつ以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを提供する :

(i ') S E Q I D N O : 73, 77, 79, 97, 103 および 120 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されているアミノ酸配列、ならびに

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

(a) 前記 S E Q I D N O の N 末端から 2 番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される ; ならびに

(b) 前記 S E Q I D N O の C 末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される。

【 0 0 1 7 】

本明細書において実証されるとおり、そのようなペプチドは、APC上のHLA-A2抗原と結合し、HLA-A2抗原との複合体としてAPC上に提示され得る。あるいは、そのようなペプチドは、それらのペプチドをAPCと接触させる場合、APCによって吸収され、APC内で(i)、(ii)、(i')、および(ii')の中より選択されるアミノ酸配列から構成される断片にプロセッシングされ、HLA-A2抗原との複合体としてAPC上に提示され得る。結果的に、そのようなペプチドに特異的なCTLが誘導され、そのようなCTLは本発明の要素とみなされる。

本発明はさらに、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包含する。これらのポリヌクレオチドは、CTL誘導能を有する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は、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よい。

【 0 0 1 8 】

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、APCおよびCTLのいずれかまたは両方を誘導するために本発明によって提供される1種もしくは複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む剤または組成物を提供することは、本発明の1つの目的である。そのような剤または組成物は、がんの治療、がんの予防、およびがんの術後再発の予防の中より選択される1つまたはそれ以上の目的に使用することもできる。標的とされるがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。したがって、がんの治療およびがんの予防のいずれかまたは両方のための薬学的な剤または組成物であって、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ように製剤化されるそのような薬学的な剤または組成物を提供することは、本発明のさらに別の目的である。本発明の薬学的な剤または組成物は、有効成分として、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの代わりに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。

【 0 0 1 9 】

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを、例えば、APCを本発明のペプチドと接触させるか、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入することによって、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を表面上に提示するAPCを誘

10

20

30

40

50

導するために使用することができる。そのようなA P Cは、自身の表面上に標的ペプチドを提示する細胞を特異的に認識するC T Lを誘導する能力を有し、がん免疫療法において使用される。したがって、本発明は、C T L誘導能を有するA P C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A P Cを包含する。加えて、本発明はまた、A P Cの誘導において使用される剤または組成物であって、本発明の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剤または組成物を包含する。

【0020】

C T Lを誘導するための方法を提供することは、本発明のさらなる目的であり、該方法は、C D 8陽性T細胞を、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と共培養する段階、またはT細胞受容体(T C R)サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、もしくはT C R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導入する段階であって、該T C Rが、細胞表面上に提示された、本発明のペプチドとH L A抗原との複合体に結合し得る段階、を含む。そのような方法によって得られるC T Lは、がんの治療およびがんの予防のいずれかまたは両方において使用され得る。がんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、胃癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0021】

表面上にH L A抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する単離されたA P Cを提供することは、本発明のさらに別の目的である。本発明はさらに、本発明のペプチドを標的とする単離されたC T Lを提供する。これらのA P CおよびC T Lは、がん免疫療法との関連において利用される。

20

がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導するための方法であって、本発明のペプチド、そのようなペプチドをコードするポリヌクレオチド、そのようなペプチドを提示するエキソソームまたはA P Cおよびそのようなペプチドを自身の表面上に提示する細胞を認識するC T Lの中より選択される少なくとも1つの成分を含む剤または組成物を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。

【0022】

本発明の適用性は、M P H O S P H 1の過剰発現に関連するかまたはM P H O S P H 1の過剰発現から生じる多数の疾患、例えばがんのいずれにも及び、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、結腸直腸癌、胃癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0023】

より具体的には、本発明は、以下を提供する：

[1] 以下の(a)または(b)の単離されたペプチド：

(a) S E Q I D N O : 5、14、64、73、77、79、97、103および120からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド；

(b) S E Q I D N O : 5、14、64、73、77、79、97、103および120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、および/または付加されているアミノ酸配列を含むペプチドであって、かつ、細胞傷害性Tリンパ球(C T L)誘導能を有する、ペプチド、

40

[2] 以下の特徴の一方または両方を有する、[1]に記載の単離されたペプチド：

(a) S E Q I D N O 5、14、64、73、77、79、97、103および120からなる群より選択されるアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択される；ならびに

(b) S E Q I D N O 5、14、64、73、77、79、97、103および120からなる群より選択されるアミノ酸配列のC末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択される、

[3] ノナペプチドまたはデカペプチドである、[1]または[2]に記載の単離された

50

ペプチド、

[4] [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、

[5] C T L を誘導するための組成物であって、[1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の 1 種もしくは複数種のペプチド、または [4] に記載の 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物、

[6] C T L 誘導能を有する A P C を誘導するための組成物であって、[1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の 1 種もしくは複数種のペプチド、または [4] に記載の 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチドを含む、組成物、

[7] (a) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の 1 種または複数種のペプチド；

(b) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードする 1 種または複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する 1 種もしくは複数種の A P C またはエキソソーム；および

(d) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する 1 種もしくは複数種の C T L

からなる群より選択される少なくとも 1 つの有効成分を含む薬学的組成物、

[8] がんの治療および予防のいずれかもしくは両方において、または対象におけるがんに対する免疫応答の誘導において使用するための、[7] に記載の薬学的組成物、

[9] H L A 抗原が H L A - A 2 である対象への投与のために製剤化される、[7] または [8] に記載の薬学的組成物、

[1 0] 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であって、以下からなる群より選択される段階を含む、方法：

(a) A P C を [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドとインビトロ、エクスピボまたはインピボで接触させる段階、および

(b) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを A P C に導入する段階、

[1 1] C T L を誘導するための方法であって、以下からなる群より選択される段階を含む、方法：

(a) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する A P C と共培養する段階；

(b) C D 8 陽性 T 細胞を、H L A 抗原と [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

(c) T 細胞受容体 (T C R) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、または T C R サブユニットのそれぞれをコードするポリヌクレオチドを、C D 8 陽性 T 細胞に導入する段階であって、該 T C R が、細胞表面上に提示された、H L A 抗原と [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドとの複合体に結合し得る、段階、

[1 2] H L A 抗原と [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された A P C、

[1 3] [1 0] に記載の方法によって誘導される、[1 2] に記載の A P C、

[1 4] H L A 抗原と [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する、単離された C T L、

[1 5] [1 1] に記載の方法によって誘導される、[1 4] に記載の C T L、

[1 6] 対象におけるがんの治療および予防のいずれかまたは両方の方法であって、対象に薬学的有効量の

(a) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載の 1 種もしくは複数種のペプチド；

(b) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードする 1 種もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する 1 種もしくは複数種の A P C もしくはエキソソーム；または

10

20

30

40

50

(d) [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドと H L A 抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する 1 種もしくは複数種の C T L を投与する段階を含む方法、

[17] がんに対する免疫応答を、それを必要とする対象において誘導する方法であって、[1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を該対象に投与する段階を含む、方法、

[18] [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的活性断片、

[19] [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター、

[20] [19] に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、ならびに

[21] [1] ~ [3] のいずれか 1 つに記載のペプチド、[4] に記載のポリヌクレオチドまたは [18] に記載の抗体を含む診断キット。

【0024】

本発明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。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示するものであり、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る。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明のその他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかになり、当業者には容易に明白になる。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。

【図面の簡単な説明】

【0025】

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。

【0026】

【図1】図1はMPHOSPH1由来のペプチドで誘導したCTLにおけるIFN-ELISPOTアッセイの結果を示す一連の写真(a)~(j)から構成される。MPHOSPH1-A02-9-850(SEQ ID NO:5)で刺激したウェル番号#7(a)、MPHOSPH1-A02-9-129(SEQ ID NO:14)で刺激した#5(b)、MPHOSPH1-A02-9-846(SEQ ID NO:64)で刺激した#5(c)、MPHOSPH1-A02-10-460(SEQ ID NO:73)で刺激した#2(d)、MPHOSPH1-A02-10-770(SEQ ID NO:77)で刺激した#1(e)、MPHOSPH1-A02-10-407(SEQ ID NO:79)で刺激した#1(f)、MPHOSPH1-A02-10-923(SEQ ID NO:97)で刺激した#4(g)、MPHOSPH1-A02-10-1484(SEQ ID NO:103)で刺激した#5(h)およびMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)で刺激した#8(i)におけるCTLが、それぞれ対照と比較して強力なIFN-産生を示した。これらの画像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、MPHOSPH1-A02-9-575(SEQ ID NO:1)で刺激したCTL(j)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I

10

20

30

40

50

FN - 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。

【0027】

【図2a-f】図2a-fは、MPHOSPH1-A02-9-850(SEQ ID NO:5)(a)、MPHOSPH1-A02-9-129(SEQ ID NO:14)(b)、MPHOSPH1-A02-9-846(SEQ ID NO:64)(c)、MPHOSPH1-A02-10-460(SEQ ID NO:73)(d)、MPHOSPH1-A02-10-770(SEQ ID NO:77)(e)、およびMPHOSPH1-A02-10-407(SEQ ID NO:79)(f)で刺激したCTL株のIFN - 産生を実証する、IFN - ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ(a)~(f)から構成される。CTL株が産生したIFN - の量は、IFN - 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN - 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。R/S比は、応答細胞(CTL株)および刺激細胞の数の比を示す。

10

【0028】

【図2g-i】図2g-iは、MPHOSPH1-A02-10-923(SEQ ID NO:97)(g)、MPHOSPH1-A02-10-1484(SEQ ID NO:103)(h)およびMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)(i)で刺激したCTL株におけるIFN - 産生を実証する、IFN - ELISAアッセイの結果を示す一連の折れ線グラフ(g)~(i)から構成される。CTL株が産生したIFN - の量は、IFN - 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって測定した。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTL株が、対照と比較して強力なIFN - 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。R/S比は、応答細胞(CTL株)および刺激細胞の数の比を示す。

20

【0029】

【図3】図3は、MPHOSPH1-A02-9-850(SEQ ID NO:5)(a)、MPHOSPH1-A02-9-846(SEQ ID NO:64)(b)、MPHOSPH1-A02-10-460(SEQ ID NO:73)(c)、MPHOSPH1-A02-10-770(SEQ ID NO:77)(d)およびMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)(e)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(a)~(e)から構成される。これらの結果は、各ペプチドによる刺激によって樹立されたCTLクローンが、対照と比較して強力なIFN - 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。R/S比は、応答細胞(CTLクローン)および刺激細胞の数の比を示す。

30

40

【0030】

【図4】図4は腫瘍細胞株に対する特異的CTL活性を示す折れ線グラフである。MPHOSPH1およびHLA-A*0201の両方を発現するJ82細胞、MPHOSPH1を発現するがHLA-A*0201を発現しないHT1376細胞ならびにHLA-A*0201を発現するがMPHOSPH1を発現しないT2細胞を、刺激細胞として使用した。MPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)を用いて樹立したCTLクローンは、J82細胞に対して特異的CTL活性を示した。一方、HT1376およびT2細胞に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった。R/S比は、応答細胞(CTLクローン)および刺激細胞の数の比を示す。

50

【 0 0 3 1 】

【図5】図5は腫瘍細胞株に対するCTLの細胞傷害活性を示す折れ線グラフである。MPHOSPH1およびHLA-A*0201の両方を発現するUMUC-3細胞、MPHOSPH1を発現するがHLA-A*0201を発現しないMKN45細胞ならびにHLA-A*0201を発現するがMPHOSPH1を発現しないT2を、標的細胞として使用した。MPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)を用いて樹立したCTLクローンは、UMUC-3細胞に対して強力な細胞傷害活性を示した。一方、MKN45およびT2細胞に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった。E/T比は、エフェクター細胞(CTLクローン)および標的細胞の数の比を示す。

【 0 0 3 2 】

【図6】図6はMPHOSPH1およびHLA-A*0206を発現する標的細胞に対するCTLの細胞傷害活性を示す折れ線グラフである。HLA-A*0206または全長MPHOSPH1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。MPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)を用いて樹立されたCTL株は、MPHOSPH1およびHLA-A*0206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*0206(三角)またはMPHOSPH1(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】

【 0 0 3 3 】

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。しかしながら、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示にすぎず、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、プロトコール等は慣例的な実験法および/または最適化に従って変動し得るため、本発明がこれらに限定されないことも理解されるべきである。さらに、本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 3 4 】

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

別段の定めのない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている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、単に例示するためのものであり、限定することは意図しない。

【 0 0 3 5 】

I. 定義:

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

物質(例えばペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等)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、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、例えば炭水化物、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汚染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」という用語には、ペプチドが、それが単離された細胞または組換え産生された細胞の細胞成分から分離されている、ペプチドの調製物が含まれる。したがって、細胞材料を

10

20

30

40

50

実質的に含まないペプチドには、約30%、20%、10%、または5%未満（乾燥重量ベースで）の異種タンパク質（本明細書において「混入タンパク質」とも称する）を有するポリペプチドの調製物が含まれる。ペプチドを組換え産生する場合、ペプチドは、好ましくは、培養培地も実質的に含まず、培養培地をペプチド調製物の容量の約20%、10%、または5%未満で有するペプチドの調製物を含む。ペプチドを化学合成によって生成する場合、ペプチドは、好ましくは、化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、ペプチドの合成に關与する化学物質前駆体または他の化学物質をペプチド調製物の容量の約30%、20%、10%、5%未満（乾燥重量ベース）で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よびゲルのクーマシーブ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

【0036】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、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、例えば対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体などの非天然残基であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーに適用される。

本明細書で時として使用する「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、しばしば約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使用される。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

【0037】

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、 α -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリン）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基に結合した炭素）を有するが、1つまたは複数の修飾されたR基または修飾された骨格を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニン、スルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様の機能を有する化合物を指す。

30

【0038】

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。

40

「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使用され、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。

【0039】

「剤」および「組成物」という用語は本明細書で互換的に使用され、特定量の特定成分を含む生成物、ならびに特定量の特定成分の組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。そのような用語は、修飾語「薬学的」に関して使用される場合（「薬学的剤」および「薬学的組成物」におけるものとして）、有効成分と担体を構成する任意の不活性成分とを含む生成物、ならびに任意の2つもしくはそれ以上の成分の組み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、または1つもしくは複数の成分の解離から、または1

50

つもしくは複数の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。したがって、本発明との関連において、「薬学的剤」および「薬学的組成物」という用語は、本発明の分子または化合物と薬学的もしく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。

【0040】

本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、薬学的または生理学的に許容される材料、組成物、物質、または媒体、例として限定されないが液体もしくは固体増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、または封入材料を意味する。

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誘導する機能を有する剤または組成物を指す。

【0041】

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用い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つ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「パルク」、「原薬」、または「原体」と称することもできる。

【0042】

別段の定めのない限り、「がん」という用語は、MPHOSPH1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、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

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

【0043】

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

【0044】

別段の定めのない限り、本明細書で使用する「キット」という用語は、試薬と他の材料との組み合わせに関して使用される。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。

対象または患者との関連において、本明細書で使用する「対象の（または患者の）HLA抗原はHLA-A2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-A2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-A2抗原が対象または患者の細胞においてHLA抗原として発現されることを指す。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

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、例えば対象おけるがんの大きさ、広がり、もしくは転移能の減少、がんの進行遅延、がんの臨床症状の緩和、生存時間の延長、術後再発の抑制等をもたらす場合に、治療は「有効である」とみなされる。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、がんの形成が遅延されるもしくは妨げられるか、またはがんの臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、特定の腫瘍の種類を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。

【 0 0 4 6 】

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。

10

20

【 0 0 4 7 】

本発明との関連において、がんの治療および/もしくは予防、ならびに/または術後のその再発の予防は、例えば、以下のイベント、例えば、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、がんの発生の抑制、腫瘍退縮、転移の低減または阻害、がんの術後再発の抑制、ならびに生存時間の延長をもたらす任意の活性を含む。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。

30

【 0 0 4 8 】

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

40

【 0 0 4 9 】

II. ペプチド:

以下に詳述する本発明のペプチドは、「MPHOSPH1ペプチド」または「MPHOSPH1ポリペプチド」と称することができる。

MPHOSPH1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、MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126) 由来のペプチドを解析して、それらが、一般的に見られるHLAアリルであるHLA-A2によって拘束される抗原エピトープであるかどうかを判定した (Date Y et al., Tissue Antigens 47:93-101, 1996; Kondo A et al., J Immunol 155:4307-12, 1995; Kubo RT et al., J Immunol 152:3913-24, 1994)。

MPHOSPH1由来のHLA-A2結合ペプチドの候補を、HLA-A2に対するそ

50

これらの結合親和性に基づいて同定した。

【0050】

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

M P H O S P H 1 - A 2 - 9 - 8 5 0 (S E Q I D N O : 5) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 9 - 1 2 9 (S E Q I D N O : 1 4) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 9 - 8 4 6 (S E Q I D N O : 6 4) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 1 0 - 4 6 0 (S E Q I D N O : 7 3) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 1 0 - 7 7 0 (S E Q I D N O : 7 7) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 1 0 - 4 0 7 (S E Q I D N O : 7 9) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 1 0 - 9 2 3 (S E Q I D N O : 9 7) 、
 M P H O S P H 1 - A 2 - 1 0 - 1 4 8 4 (S E Q I D N O : 1 0 3) および
 M P H O S P H 1 - A 2 - 1 0 - 2 8 2 (S E Q I D N O : 1 2 0) 。

10

【0051】

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。これらの結果は、MPHOSPH1がCTLによって認識される抗原であること、および試験されたペプチドがHLA-A2拘束性MPHOSPH1エピーペプチドであることを実証しており、したがって、これらのペプチドはCTLによる細胞傷害性についての標的抗原として有効であり得る。さらに、MPHOSPH1-A2-10-282 (SEQ ID NO: 120) は、MPHOSPH1およびHLA-A2抗原の両方をMHCクラスI分子として発現するがん細胞に対して強力な細胞傷害活性を有するCTLを誘導した。この結果は、MPHOSPH1-A2-10-282ペプチドがインビボで天然に生じて、HLA-A2抗原（例えば、HLA-A*0201またはHLA-A*0206）によってMPHOSPH1を発現するがん細胞上に提示されることを示唆している。これらの知見によれば、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、またはその誘導體、突然変異体、変異体もしくは改変ペプチドは、MPHOSPH1およびHLA-A2抗原を発現するがんを治療するための免疫療法との関連において有用である。本発明のある形態において、本明細書に開示するアミノ酸配列から構成されるペプチドは、がんの免疫療法に使用することができる。治療すべき癌の例には、例えば、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。しかしながら、本発明のペプチドは、がんがMPHOSPH1およびHLA-A2抗原を発現する限り、いずれのがんにも適用することができる。

20

30

【0052】

MPHOSPH1遺伝子はがん細胞、例えば膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍において過剰発現されるが、多くの正常器官では発現されないため、それは免疫療法についての良好な標的である。したがって、本発明は、MPHOSPH1からのCTL認識エピーペプチドのノナペプチド（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、MPHOSPH1 (SEQ ID NO: 126) の免疫学的活性断片から構成される、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: 5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。好ましい態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO: 120のアミノ酸配列を含むペプチドである。

40

【0053】

50

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 Jan 1, 152(1):163-75およびNielsen M et al.(Protein Sci 2003;12:1007-17)に記載されているものを使用して、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 Jan 1, 152(1):163-75、Kuzushima K et al., Blood 2001,98(6):1872-81、Larsen MV et al.BMC Bioinformatics.2007 Oct 31; 8:424、Buus S et al. Tissue Antigens.,62:378-84,2003、Nielsen M et al.,Protein Sci 2003;12:1007-17、およびNielsen M et al. PLoS ONE 2007;2:e796(これらは、例えばLafuente EM et al., Currennt Pharmaceutical Design, 2009, 15, 3209-3220にまとめられている)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利用して、HLA抗原との高い結合親和性を有するMPHOSPH1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HLA抗原と結合することが決定されたMPHOSPH1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MPHOSPH1配列から構成されるペプチドを含み得る。

10

【0054】

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、CTL誘導能を有するペプチドであって、MPHOSPH1由来のアミノ酸配列を含むペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば、約40アミノ酸未満であり、多くの場合は約20アミノ酸未満であり、通常は約15アミノ酸未満である。

20

【0055】

一般に、あるペプチド中の1個、2個、数個またはそれ以上のアミノ酸の改変は該ペプチドの機能に影響を及ぼさず、または場合によっては元のペプチド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1個、2個または数個のアミノ酸残基を置換、挿入、欠失および/または付加することによって改変されたアミノ酸配列から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-McFrland et al.,Proc Natl Acad Sci USA 1982,79:6409-13)。したがって、本発明の一態様において、本発明のCTL誘導能を有するペプチドは、1個、2個または数個のアミノ酸が付加、欠失、挿入および/または置換されているSEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドから構成されてよい。別の態様において、本発明のペプチドは、改変ペプチドが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120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置換、欠失、挿入、および/または付加されているアミノ酸配列を含むペプチドであり得る。好ましい態様において、本発明のペプチドは、改変ペプチドが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、SEQ ID NO: 120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置換、欠失、挿入、および/または付加されているアミノ酸配列を含むペプチドであり得る。

30

40

【0056】

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、付加、挿入、欠失および/または置換)が、元のアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向があることを認識し;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

50

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）。

このような保存的改変ペプチドも、本発明のペプチドとみなされる。しかしながら、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、MPHOSPH1の多型変異体、種間相同体、またはアリル由来のCTL誘導可能なペプチドを排除すべきでない。

【0057】

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、欠失および/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（挿入、欠失、付加および/または置換）する。本明細書において、「数個」という用語は、5個またはそれ未満のアミノ酸、例えば4個または3個またはそれ未満を意味する。改変すべきアミノ酸の割合は、例えば、20%もしくはそれ未満、好ましくは15%もしくはそれ未満、より好ましくは10%もしくはそれ未満、よりいっそう好ましくは1~5%であり得る。

【0058】

がん免疫療法との関連で使用された場合、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得る。したがって、CTLを誘導するだけでなく、HLA抗原に対する高い結合親和性も保有するペプチドを選択することが好ましい。この目的のために、ペプチドを、改善された結合親和性を有する改変ペプチドが得られるようにアミノ酸残基の置換、挿入、欠失および/または付加によって改変することができる。天然に提示されるペプチドに加えて、HLA抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であることから（J Immunol 1994,152:3913; Immunogenetics 1995,41:178; J Immunol; 1994,155:4307）、そのような規則性に基づいた改変を本発明の免疫原性ペプチドに導入することができる。

【0059】

例えば、高いHLA-A2結合親和性を示すペプチドは、ロイシンまたはメチオニンで置換されたN末端から2番目のアミノ酸を有する傾向がある。同様に、C末端アミノ酸がバリンまたはロイシンで置換されたペプチドも好ましく使用することができる。したがって、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120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、該SEQ ID NOのアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および/または該SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端がバリンもしくはロイシンで置換されているペプチドが、本発明によって企図される。別の態様において、本

10

20

30

40

50

発明は、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および/または該SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端がバリンもしくはロイシンで置換されているアミノ酸配列を有するペプチドを包含する。好ましい態様において、本発明のペプチドは、SEQ ID NO: 120のアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および/または該SEQ ID NOのアミノ酸配列のC末端がバリンもしくはロイシンで置換されているアミノ酸配列を含み得る。

【0060】

一態様において、本発明は、CTL誘導能を有するペプチドであって、以下の(1)~(9)からなる群より選択される一般式を有するペプチドを提供する：

(1)MPHOSPH1-A2-9-850 (SEQ ID NO: 5) に対応

F [X1] L T I E N E [X2]、

(2)MPHOSPH1-A2-9-129 (SEQ ID NO: 14) に対応

F [X1] G C I M Q P [X2]、

(3)MPHOSPH1-A2-9-846 (SEQ ID NO: 64) に対応

G [X1] R A F L L T [X2]、

(4)MPHOSPH1-A2-10-460 (SEQ ID NO: 73) に対応

Y [X1] A Y D E T L N [X2]、

(5)MPHOSPH1-A2-10-770 (SEQ ID NO: 77) に対応

K [X1] I C N E T V E [X2]

(6)MPHOSPH1-A2-10-407 (SEQ ID NO: 79) に対応

L [X1] T L G K C I N [X2]

(7)MPHOSPH1-A2-10-923 (SEQ ID NO: 97) に対応

K [X1] S N E I E T A [X2]

(8)MPHOSPH1-A2-10-1484 (SEQ ID NO: 103) に対応

Q [X1] V A A L E I Q [X2]、および

(9)MPHOSPH1-A2-10-282 (SEQ ID NO: 120) に対応

Y [X1] Y D L F V P V [X2]。

【0061】

一般式(1)~(9)において、[X1]はロイシンまたはメチオニンであり、[X2]はバリンまたはロイシンである。本発明の特に好ましい態様において、一般式はSEQ ID NO: 120に対応する(9)であり得る。本発明はさらに、上記定義の一般式(1)~(9)によって表される単離されたペプチドであって、そのN末端およびC末端のいずれかまたは両方において1個、2個、または数個のアミノ酸が付加されているペプチドを提供する。代替的な態様において、本発明は、一般式(1)~(9)によって表される単離されたペプチドであって、そのN末端およびC末端のいずれかまたは両方において1個、2個、または数個のアミノ酸残基が欠失されているペプチドを提供する。本発明はまた、一般式(1)~(9)によって表される単離されたペプチドであって、該配列のいずれかにおいて1個、2個、または数個のアミノ酸が挿入または欠失されているペプチドを提供する。

【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機能と同等であるかまたはより優れた機能を有し得ることを実証している(Zaremba et al. Cancer Res.57,4570-4577,1997、T.K.Hoffmann et al.J Immunol.(2002)Feb 1;168(3):1338-47、S.O.Dionne et al.Cancer Immunol immunother.(2003)52:199-206、およびS.O.Dionne et al.Cancer Imm

10

20

30

40

50

unology, Immunotherapy(2004)53,307-314)。

本発明はまた、本発明のペプチドのN末端およびC末端のいずれかまたは両方に対する1個、2個、または数個のアミノ酸の付加を企図し、これらを付加することもできる。CTL誘導能を保持するような改変ペプチドも、本発明に含まれる。

【0063】

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、有害な副作用、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同源性検索を行うことが望ましい場合がある。同源性検索から、対象ペプチドと同一であるかまたは1個もしくは2個のアミノ酸が異なるペプチドでさえも事実上存在しないことが明らかになった場合には、そのような副作用の危険を全く伴うことなしに、HLA抗原とのその結合親和性を増加させるため、および/またはそのCTL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。

【0064】

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

【0065】

CTL誘導能の確認は、ヒトMHC抗原を保有するAPC(例えば、Bリンパ球、マクロファージ、および樹状細胞(DC))、またはより具体的にはヒト末梢血単核白血球由来のDCを誘導し、APCを試験ペプチドで刺激した後、APCをCD8陽性細胞と混合してCTLを誘導し、次いで、標的細胞に対してCTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定することによって達成される。反応系として、ヒトHLA抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物(例えば、BenMohamed L, Krishnan R, Longmate J, Auyeung C, Low L, Primus J, Diamond DJ, Hum Immunol 2000 Aug;61(8):764-79, Related Articles, Books, Linkout Induction of CTL response by a minimal epitope vaccine in HLA A*0201/DR1 transgenic mice: dependence on MHC(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。あるいは、標的細胞を ^{51}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CTLの細胞傷害活性を算出することができる。あるいは、固定化したペプチドを保有する細胞の存在下で、CTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を使用して培地上の阻止帯を可視化することによって、その活性を試験することができる。

【0066】

上記のようにペプチドのCTL誘導能を試験した結果、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120によって示されるアミノ酸配列を有するそれらのペプチドの中より選択されるノナペプチドおよびデカペプチドが、CTL誘導能およびHLA抗原に対する高い結合親和性を示すことが発見された。したがって、これらのペプチドは本発明の好ましい態様として例示される。

【0067】

さらに、同源性解析の結果は、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同源性を共有してい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の可能性は低くなっている。したがって、この局面からもまた、これらのペプチドはがん患者においてMPHOSH1に対する免疫を誘発するのに有用である。したがって、SEQ ID NO: 5、1

10

20

30

40

50

4、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが、本発明によって包含される。

【0068】

上記の改変に加えて、本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチドが、元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、他のペプチドに連結させることができる。「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。本発明のペプチドは、「他の」ペプチドにリンカーを介して直接または間接的に連結させることができる。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。

10

【0069】

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、MPHOSPH1ではない腫瘍関連抗原由来のペプチドを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することは、当技術分野において周知である。そのようなTAA由来のいくつかのCTL誘導可能なペプチドが単離されている(例えば、WO2008/047473、WO2010/047062、WO2008/102557、WO2009/025116)。したがって、本発明のペプチドに連結された「他の」ペプチドの例には、MHPOSPH1以外のTAA由来のCTL誘導可能なペプチドが含まれるがこれに限定されない。本発明において、「他の」ペプチドは、MHCクラスI拘束性ペプチドであるだけでなく、MHCクラスII拘束性ペプチドでもあり得る。当業者は、1種もしくは複数種のMPHOSPH1ペプチドおよび1種もしくは複数種のMPHOSPH1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、従来の分子生物学の手順を使用して調製することができる。

20

【0070】

上記の連結ペプチドを本明細書では「ポリトープ」と称し、これはすなわち、様々な配置(例えば、連鎖状、重複)で連結され得る、2つまたはそれ以上の潜在的な免疫原性または免疫応答刺激性ペプチドの群である。ポリトープ(またはポリトープをコードする核酸)を標準的な免疫化プロトコールに従って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。

30

【0071】

ペプチドを直接的にまたは隣接配列の使用を介して連結して、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; Thomsom 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加における有効性について試験することができる。

40

【0072】

本発明のペプチドは、それらが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。そのような「他の」物質の具体例には、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るがこれらに限定されない。ペプチドは、修飾によって本明細書に記載する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、またはポリペプチドを安定化するように行うことができる。

【0073】

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

50

を本発明のポリペプチドに対して採用することもできる。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）。

本発明のペプチドがシステイン残基を含む場合、それらのペプチドはシステイン残基のS H基間のジスルフィド結合を介して二量体を形成する傾向がある。したがって、本発明のペプチドの二量体も、本発明のペプチドに含まれる。

【0074】

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って置換、欠失、挿入および/または付加されている改変ペプチドの中から、元のペプチドと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元のものと比較して同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改変（すなわち、置換、欠失、挿入または付加）する段階、

b：段階（a）において改変された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、活性には、MHC結合活性およびAPCまたはCTL誘導能が含まれ得る。好ましくは、ペプチドの活性はCTL誘導能である。

【0075】

III. M P H O S P H 1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、本発明のペプチドを合成的に調製することができる。本発明のペプチドは、個々に、または2つもしくはそれ以上のペプチドを含むより長いポリペプチドとして、合成することができる。ペプチドを単離する、すなわち、他の天然の宿主細胞タンパク質およびそれらの断片、または他のいかなる化学物質も実質的に含まないように精製または単離することができる。

【0076】

本発明のペプチドは、そのような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。

【0077】

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(第2版)(日本語), 続第14巻(ペプチド合成), 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.

【0078】

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採用して、本発明のペプチドを得ることもできる（例えば、Morrison J, J Bacteriology 1977,132:349-

10

20

30

40

50

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。

【0079】

IV. ポリヌクレオチド:

本発明は、上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。本発明のポリヌクレオチドには、天然MPHOSPH1遺伝子(例えば、GenBankアクセッション番号NM_001031702(SEQ ID NO:125))由来のポリヌクレオチドまたはその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれ得る。本明細書において「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一の核酸が任意の特定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、あるコドンによってアラニンが指定されるあらゆる位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、該コドンを、記載された対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は当技術分野において「サイレント変異」と称され、保存的に改変された変異体の1種を表す。ペプチドをコードする本明細書に記載する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、当業者は容易に認識する。したがって、開示したペプチドをコードする各核酸配列は、それに関連するサイレント変異の非明示的な開示を表す。

【0080】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、およびそれらの誘導體から構成され得る。当技術分野において周知のとおり、DNA分子は塩基、例えば天然塩基A、T、C、およびGから適切に構成され、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。

【0081】

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、本発明の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あらゆる付加的配列を含み得る。例えば、本発明の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。

【0082】

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、本発明のペプチドのコード配列を有するポリヌクレオチドを適切なベクターに挿入することによって本発明の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、本発明のポリヌクレオチドを、PCR技法を使用して増幅し、または適切な宿主内で複製させることができる(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 1984,3:80

10

20

30

40

50

1-5に記載されている固相技法を使用して、本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。

【0083】

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に詳述されている方法を使用することによっ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。

10

【0084】

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。例えば日本人では、HLA-A2、特にHLA-A*0201およびHLA-A*0206が適切であることが多い。日本人および白人の間で高発現するHLA-A2型の使用は、有効な結果を得るのに好ましく、サブタイプ、例えばHLA-A*0201およびHLA-A*0206が使用される。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MPHOSPH1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、もしくは付加を行うことができる。

20

【0085】

本発明のエキソソームについてHLA-A2型HLA抗原を使用する場合、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120のいずれか1つのアミノ酸配列を有するペプチドが特に有用である。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-A2抗原との複合体を自身の表面上に提示するエキソソームである。そのような複合体中に含まれるHLA-A2抗原の典型例には、HLA-A*0201およびHLA-A*0206が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0086】

VI. 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLA抗原および本発明のペプチドによって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。

【0087】

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

40

【0088】

例えば、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エクスピボまたはインピボで本発明のペプチドと接触させる(で刺激する)ことによって、本発明のAPCを得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与する場合、本発明のペプチドを提示するAPCが該対象の体内で誘導される。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。

【0089】

50

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 A P C 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 C T L 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、エキスビボ投与は以下の段階を含み得る：

- 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 を本発明のペプチドと接触させる段階、および
- c：段階 b の A P C を第 2 の対象に投与する段階。

【 0 0 9 0 】

第 1 の対象と第 2 の対象は同一の個体であってよく、または異なる個体であってよい。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投与ことができ、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、C M L、結腸直腸癌、胃癌、N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

本発明はまた、A P C 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 0 9 1 】

本発明の一局面によると、本発明の A P C は C T L 誘導能を有する。A P C との関連において、語句「C T L 誘導能を有する」は、ペプチドと接触させていない A P C におけるものよりも高い C T L 誘導能を示すことを指す。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。導入する遺伝子は、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、当技術分野において従来より実施されている様々な方法、例えばリポフェクション、エレクトロポレーション、またはリン酸カルシウム法が含まれ、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、それを行うことができる。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 I I によってプロセッシングされて、提示経路を経て部分ペプチドが提示される。

いくつかの態様において、本発明の A P C は、H L A - A 2 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 A P C である。そのような複合体中に含まれる H L A - A 2 抗原の典型例には、H L A - A * 0 2 0 1 および H L A - A * 0 2 0 6 が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 9 2 】

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、本発明の本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 0 9 3 】

そのような C T L は、(1) 本発明のペプチドを対象に投与し、(2) 対象由来の A P C、および C D 8 陽性 T 細胞、もしくは末梢血単核白血球をインビトロで本発明のペプチドと接触させ(で刺激し)、(3) C D 8 陽性 T 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、または(4) T 細胞受容体 (T C R) サブユニットの両方をコードするポリヌクレオチド、もしくは T C R 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導入することによって得ることができ、該 T C R は、細胞表面上の、本発明のペプチドと H L A - A 2 抗原との複合体と結合し得る。C T L の調製において使用すべきそのような A P C 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「V I I I . T 細胞受容体 (T C R)」の章において以下に記載する。

【0094】

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、APCもしくはエキソソームを含む他の薬物と組み合わせて投与することができる。得られたCTLは、本発明のペプチド、例えば誘導に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、MPHOSPH1を内因的に発現する細胞、例えばがん細胞、またはMPHOSPH1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起因し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役立ち得る。

【0095】

いくつかの態様において、本発明のCTLは、HLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する。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-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体にそのTCRを介して結合し、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-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞に対して細胞傷害活性を示すが、他の細胞には示さないことを指す。そのような複合体中に含まれるHLA-A2抗原の典型例には、HLA-A*0201およびHLA-A*0206が含まれるがこれらに限定されない。

【0096】

VII. T細胞受容体(TCR) :

本発明はまた、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含み、該TCRが、細胞表面上の、HLA-A2抗原と本発明のペプチドとの複合体に結合し得る、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、MPHOSPH1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、PCR法を好ましく使用することができる。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'-gtctaccag g c a t t c g c t t c a t - 3') (SEQ ID NO:127)、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'-t c a g c t g g a c c a c a g c c g c a g c g t - 3') (SEQ ID NO:128)、TCR鎖C1領域に特異的な3'-TRb-C1プライマー(5'-t c a g a a a t c c t t t c t c t t g a c - 3') (SEQ ID NO:129)、またはTCR鎖C2領域に特異的な3'-TR-C2プライマー(5'-c t a g c c t c t g g a a t c c t t t c t c t t - 3') (SEQ ID NO:130)であってよいが、これらに限定されない。TCR誘導體は、本発明の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。

【0097】

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入手可能な組成物を提供する。

【0098】

10

20

30

40

50

本発明のペプチドに対して特異的なTCRは、TCRがT細胞の表面上に提示される場合に、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得るべきであり、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。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必要な活性は、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HLA多量体染色解析、ならびにELISPOTアッセイが含まれる。ELISPOTアッセイを行うことによって、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を細胞内に伝達することができ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もできる。そのような方法の例には、例えば、HLA-A2抗原およびMPHOSPH1の両方を発現する細胞を使用するCr放出アッセイが含まれる。

10

20

30

40

50

【0099】

一局面において、本発明は、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、該TCRが、細胞表面上の、SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドとHLA-A2抗原との複合体に結合し得る、CTL、を提供する。

【0100】

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、療法または保護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）。

【0101】

IX. 薬学的組成物：

MPHOSPH1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、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるが必ずしも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、がんの治療および予防のいずれかまたは両方に使用することができる。したがって、本発明は、がんの治療および予防のいずれかまたは両方のために製剤化される薬学的な剤または組成物であって、本発明の1種もしくは複数種のペプチドまたはポリヌクレオチドを有効成分として含むそのような剤または組成物を提供する。あるいは、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を提示する前述のエキソソームまたはAPCのいずれかを、薬学的な剤または組成物のための有効成分として使用することができる。さらに、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を提示する細胞を認識し得る前述のCTLを、本発明の薬学的な剤または組成物のための有効成分として使用することもできる。

【0102】

したがって、本発明は、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分を含む剤または組成物を提供する：

- (a) 本発明の1種または複数種のペプチド；
- (b) 本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1種または複数種のポリヌクレオチド；
- (c) 本発明の1種または複数種のAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の1種または複数種のCTL。

【0103】

本発明の薬学的な剤または組成物は、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組成物を指す。換言すれば、本発明は、対象においてがんに対する免疫応答を誘導するための本発明の薬学的な剤または組成物を提供する。

【0104】

本発明の薬学的な剤または組成物は、対象におけるがんの治療および予防のいずれかまたは両方のために使用することができる。薬学的な剤または組成物を適用することができるそのような対象の例には、ヒト、ならびに他の哺乳動物、例としてマウス、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が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの態様において、本発明の薬学的な剤または組成物は、HLA抗原がHLA-A2である対象への投与のために製剤化することができる。

10

【0105】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍、例としてその術後再発の治療および予防のいずれかまたは両方のために製剤化される薬学的な剤または組成物の製造における、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ポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソーム；および
- (d) 本発明の細胞傷害性T細胞。

20

【0106】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方において使用される、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ポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC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。

【0107】

あるいは、本発明はさらに、がんまたは腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬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、薬学的にまたは生理学的に許容される担体を以下の中より選択される有効成分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：

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ポリヌクレオチド；
- (c) 本発明の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。

【0108】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための薬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：

40

- (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ポリヌクレオチド；
- (c) 本発明の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。

【0109】

別の態様において、本発明はまた、がんまたは腫瘍の治療および予防のいずれかまたは両方のための方法であって、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法を提供する：

50

- (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ポリヌクレオチド ;
- (c) 本発明の A P C 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。

【 0 1 1 0 】

本発明によれば、 S E Q I D N O : 5、14、64、73、77、79、97、103 および 120 の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、 H L A - A 2 拘束性エピトープペプチドであり、したがって対象において H L A - A 2 および M P H O S P H 1 を発現するがんに対する特異的免疫応答を誘導し得る候補として役立つことが見出された。したがって、 S E Q I D N O : 5、14、64、73、77、79、97、103 または 120 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、 H L A 抗原が H L A - A 2 である対象への投与のために特に適している。これらのペプチドの特に好ましい例は、 H L A - A 2 抗原および M P H O S P H 1 を発現するがん細胞を標的とする C T L を誘導する能力を有することが確認された S E Q I D N O : 120 のアミノ酸配列を有するペプチドである。したがって、好ましい態様において、本発明の薬学的な剤または組成物は、 S E Q I D N O : 120 のアミノ酸配列を有するペプチドもしくはその改変型を含み、またはそのようなペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。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。

10

20

【 0 1 1 1 】

本発明の薬学的な剤または組成物によって治療すべきがんには、 M P H O S P H 1 が発現される（例えば、過剰発現される）任意のがんが含まれ、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、結腸直腸癌、胃癌、 N S C L C、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 1 1 2 】

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、例えばがん性細胞に対する C T L 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 C T L を誘導する能力を有するそのような「他の」ペプチドの例には、がん特異的抗原（例えば、同定された T A A）が含まれるが、これに限定されない。

30

【 0 1 1 3 】

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、本発明の有効成分（すなわち、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、 A P C、 C T L）の抗腫瘍効果を阻害しない限り、追加の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、抗炎症剤、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つまたは複数の他の薬理学的な剤または組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。医薬および薬理学的な剤または組成物の量は、例えば、使用する薬理学的な剤または組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に依存する。

40

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ける従来の他の物質（例えば、増量剤、結合剤、希釈剤、添加剤等）を含み得ることを容易に認識する。

【 0 1 1 4 】

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、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。容器上のラベルには、剤または組成物が、疾患の1つまたは複数の状態の治療または予防のために使用されること

50

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。

【0115】

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。

必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置にて、本発明の薬学的な剤または組成物を包装することができる。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。

10

【0116】

(1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的組成物：

本発明のペプチドは、薬学的な剤または組成物として直接投与してよく、または必要であれば、従来の製剤化法によって製剤化してよい。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には、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等が含まれるがこれらに限定されない。さらに、薬学的な物質、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。

【0117】

20

インビボでCTLを誘導するために、本発明のペプチドを、本発明のペプチドの2つまたはそれ以上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よく、または標準的な技法を使用して互いに結合させてよい。例えば、ペプチドは化学的に連結させ、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. 2992, 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を得ることができる。これらのAPCを対象に再投与して対象においてCTLを誘導することができ、結果として、腫瘍関連内皮に対する攻撃性を増加させることができる。

30

【0118】

有効成分として本発明のいずれかのペプチドを含む本発明の薬学的な剤または組成物は、細胞性免疫が効率的に樹立されるようにアジュバントも含み得る。あるいは、本発明の薬学的な剤または組成物は、他の有効成分とともに投与してよく、または顆粒内へ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ともに(または連続して)投与した場合に、該タンパク質に対する免疫応答を増強する任意の化合物、物質または組成物を指す。適用することができるアジュバントには、文献(Clin Microbiol Rec 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、O/Wエマルション等が含まれるが、これらに限定されない。

40

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

【0119】

本発明の別の態様において、本発明のペプチドはまた、薬学的に許容される塩の形態で投与してもよい。塩の好ましい例には、アルカリ金属との塩、金属との塩、有機塩基との

50

塩、アミンとの塩、有機酸（酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸等）との塩、および無機酸（塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等）との塩が含まれる。本明細書で使用する「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、無機または有機の酸または塩基との反応によって得られる塩を指す。

【0120】

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をプライミングする成分を含む。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）。

10

【0121】

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（すなわち、直接注射）が含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。投与は、単回投与によって行うことができ、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であり、数日~数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切かつ最適な投与量を容易に決定することができる。

20

【0122】

（2）有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物：

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ポリヌクレオチドを含み得る。本明細書において、「発現可能な形態」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。具体的な態様において、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。ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムへの安定した挿入を達成するように備えることができる（相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capecci MR, *Cell* 1987,51:503-12を参照されたい。例えば、Wolff et al., *Science* 1990,247:1465-8；米国特許第5,580,859号；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WO98/04720）も参照されたい。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）。

30

40

【0123】

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

50

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。

【0124】

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つのアプローチはそれぞれ、インビボおよびエクスピボの遺伝子療法として公知である。

【0125】

遺伝子療法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 ; およびKriegerによって Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY,1990に記載されている。

【0126】

ペプチドの投与と同様に、ポリヌクレオチドの投与は、経口、皮内、皮下、静脈内、筋肉内、骨内、および/または腹腔注射等によって、ならびに全身投与または標的部位の近傍への局所投与を介して行うことができ、これらが使用される。投与は、単回投与によって行うことができ、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る、これらは通常0.001mg ~ 1000mg、例えば0.01mg ~ 100mg、例えば0.1mg ~ 10mgであり、数日に1度 ~ 数ヶ月に1度投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

【0127】

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誘導能を任意の他の化合物が阻害しない限り、この追加の化合物と組み合わせて使用することができる。したがって、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、該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。

【0128】

(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、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ビボで接触させる段階を含む。例えば、APCを本発明のペプチドとエクスピボで接触させる段階を含む方法は、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を本発明のペプチドと接触させる段階。

【0129】

10

20

30

40

50

A P Cは特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られているD C、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞を含む。A P Cの中で最も強力なC T L誘導能を有することから、好ましくはD Cを使用することができる。本発明のペプチドのいずれか1つを単独で、もしくは本発明の他のペプチドまたはM P H O S P H 1以外のT A A由来のC T L誘導可能なペプチドと組み合わせ使用することができる。

【0130】

一方、本発明のペプチドを対象に投与する場合、A P Cは、インビボでペプチドと接触させ、結果的に、C T L誘導能を有するA P Cが対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は、本発明のペプチドを対象に投与して対象の体内でC T L誘導能を有するA P Cを誘導することを含む。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ビボで発現してA P Cと接触し、結果的に、C T L誘導能を有するA P Cが対象の体内で誘導される。したがって、本発明の方法は、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与して対象の体内でC T L誘導能を有するA P Cを誘導することも含む。「発現可能な形態」という語句は、「I X . 薬学的組成物、(2)有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物」の章に上記されている。

10

【0131】

さらに、本発明の方法は、本発明のポリヌクレオチドをA P Cに導入してC T L誘導能を有するA P Cを誘導することを含み得る。例えば、該方法は以下の段階を含み得る：

a : 対象からA P C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A P Cに導入する段階。

20

段階bは、「V I . 抗原提示細胞」の章に上述したように行うことができる。

【0132】

あるいは本発明は、M P H O S P H 1に対するC T L活性を特異的に誘導する抗原提示細胞(A P C)を調製するための方法であって、以下の段階のうちの1つを含み得る方法を提供する：

(a) A P C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A P Cに導入する段階。

あるいは、本発明は、C T L誘導能を有するA P Cを誘導するための方法であって、以下の中より選択される段階を含む方法を提供する：

30

(a) A P Cを本発明のペプチドと接触させる段階；

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

【0133】

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。C T L誘導能を有するA P Cの誘導に使用されるA P Cは、好ましくは、H L A - A 2抗原を発現するA P Cであってよい。そのようなA P Cは、H L A抗原がH L A - A 2である対象から得られた末梢血単核細胞(P B M C)から当技術分野において周知の方法によって調製することができる。本発明の方法によって誘導したA P Cは、本発明のペプチドとH L A抗原(H L A - A 2抗原)との複合体を自身の表面上に提示するA P C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A P Cを対象に投与する場合、対象は、好ましくは、A P C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A P Cドナーと同一のH L A型を有する限り、A P Cドナーと異なる対象でよい。

40

別の態様において、本発明は、C T L誘導能を有するA P Cの誘導に使用される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。

【0134】

別の態様において、本発明は、A P Cを誘導するために製剤化される剤または組成物の

50

T細胞受容体（TCR）」の章に上述したように行うことができる。

【0141】

本発明の方法は、インビトロ、エクスピボまたはインピボで実施することができる。好ましくは、本発明の方法は、インビトロまたはエクスピボで実施することができる。CTL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-A2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よい。

10

【0142】

加えて、本発明は、CTLを誘導するための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または工程を提供する。

別の態様において、本発明は、CTLを誘導するための剤または組成物であって、本発明の1種もしくは複数種のペプチド、1種もしくは複数種のポリヌクレオチド、または1種もしくは複数種のAPCもしくはエキソソームを含む剤または組成物を提供する。

20

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

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

【0143】

(3)免疫応答を誘導する方法：

さらに本発明は、MPPH1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。企図される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、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0144】

本発明の方法は、本発明のペプチドのいずれかまたはそれらをコードするポリヌクレオチドのいずれかを含む剤または組成物を対象に投与する段階を含み得る。本発明の方法はまた、本発明のペプチドのいずれかを提示するエキソソームまたはAPCの投与を企図する。詳細については、「IX.薬学的組成物」の項、特に本発明の薬学的な剤および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APCは、上記「V.エキソソーム」、「VI.抗原提示細胞（APC）」、ならびに「X.ペプチド、エキソソーム、APCおよびCTLを使用する方法」の(1)および(2)の項において詳述している。

40

好ましい形態において、本発明の方法によって治療される対象は、HLA抗原がHLA-A2である対象であり得る。

【0145】

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、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを薬学的に許容される担体とともに混合または製剤化する段階を含み得る方法を提供する。

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

(a)本発明のペプチド；

50

(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(ポリヌクレオチド) ;

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

(d) 本発明のCTL。

【0146】

本発明との関連において、MPHOSPH1を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、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。したがって、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MPHOSPH1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、MPHOSPH1を発現するがんを治療するための方法であって、以下の段階を含み得る方法を提供する :

i) 治療すべきがんを有する対象から得られたがん細胞または組織中のMPHOSPH1の発現レベルを決定する段階 ;

ii) MPHOSPH1の発現レベルを正常対照と比較する段階 ; および

iii) 上記の段階(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MPHOSPH1を過剰発現するがんを有する対象に投与する段階。

【0147】

あるいは本発明はまた、MPHOSPH1を過剰発現するがんを有する対象への投与において使用される、上記の(a)~(d)の中より選択される少なくとも1つの成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を提供する。換言すれば、本発明はさらに、本発明のMPHOSPH1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MPHOSPH1の発現レベルを決定する段階を含み、該レベルが、該遺伝子の正常対照レベルと比較して上昇していることによって、該対象が本発明のMPHOSPH1ポリペプチドで治療され得るがんを有し得ることが示されるそのような方法を提供する。本発明のがんを治療すべき対象を同定する方法を、以下、より詳細に説明する。

【0148】

目的とするMPHOSPH1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MPHOSPH1発現の測定に使用することができる。適切な試料の例には、身体組織、ならびに体液、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、細胞集団、例として上皮細胞、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。さらに、必要に応じて、得られた身体組織および体液から細胞を精製し、次いでこれを対象由来試料として使用してもよい。

本発明の方法によって治療すべき対象は、好ましくは哺乳動物である。具体的な哺乳動物には、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。

【0149】

本発明によれば、対象から得られた細胞または組織中のMPHOSPH1の発現レベルを決定することができる。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、MPHOSPH1のmRNAを、ハイブリダイゼーション法(例えば、ノザンハイブリダイゼーション)によってプローブを使用して定量することができる。検出は、チップ、アレイ等において実施することができる。アレイの使用は、MPHOSPH1の発現レベルを検出するのに好ましい場合がある。当業者は、MPHOSPH1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、MPHOSPH1のcDNAをプローブとして使用することができる。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

10

20

30

40

50

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。

【0150】

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、MPHOSPH1（例えば、SEQ ID NO: 125）の転写産物を定量してよい。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。

具体的には、本発明の方法に使用されるプローブまたはプライマーは、ストリンジেন্টな条件下、中程度にストリンジেন্টな条件下、または低ストリンジেন্টな条件下で、MPHOSPH1のmRNAとハイブリダイズする。本明細書で使用する「ストリンジेंटな（ハイブリダイゼーション）条件」という語句は、プローブまたはプライマーがその標的配列とはハイブリダイズするが、その他の配列とはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジेंट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、ストリンジेंटな条件の温度は、所定のイオン強度およびpHにおける特定の配列の融解温度（ T_m ）よりも約5℃低くなるように選択する。 T_m とは、平衡状態で、標的配列に相補的なプローブの50%が標的配列とハイブリダイズする（所定のイオン強度、pH、および核酸濃度における）温度である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 T_m では、平衡状態でプローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジेंटな条件とは、pH 7.0 ~ 8.3において塩濃度がナトリウムイオン約1.0 M未満、典型的にはナトリウムイオン（または他の塩）約0.01 ~ 1.0 Mであり、かつ温度が、短いプローブまたはプライマー（例えば、10 ~ 50ヌクレオチド）に関しては少なくとも約30℃、およびより長いプローブまたはプライマーに関しては少なくとも約60℃である条件である。ストリンジेंट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よい。

【0151】

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、ストリンジेंट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、MPHOSPH1を含む核酸のセンス鎖ヌクレオチド配列、またはMPHOSPH1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、検出すべき遺伝子を増幅するためのプライマーとして使用することができる。より好ましくは、MPHOSPH1遺伝子のmRNAまたはcDNAは、特定のサイズ、一般には15 ~ 30 b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であってよい。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使用することによって遺伝子を検出するためのアッセイ手順、装置、または試薬は、周知である（例えばオリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはPCR）。これらのアッセイにおいて、プローブまたはプライマーはタグまたはリンカー配列も含み得る。さらに、プローブまたはプライマーは、検出可能な標識または捕捉される親和性リガンドで修飾することができる。あるいは、ハイブリダイゼーションに基づく検出手順において、数百（例えば、約100 ~ 200）塩基から数千（例えば、約1000 ~ 2000）塩基長を有するポリヌクレオチドも、プローブに使用することができる（例えば、ノザンプロットティングアッセイまたはcDN

10

20

30

40

50

A マイクロアレイ解析)。

【0152】

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、MPHOSPH1タンパク質(SEQ ID NO: 126)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使用する免疫測定法が含まれる。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよい。さらに、断片または改変抗体がMPHOSPH1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')₂、Fv等)を検出に使用することができる。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。

10

【0153】

MPHOSPH1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、MPHOSPH1タンパク質に対する抗体を使用する免疫組織化学的解析によって、染色の強度を測定してよい。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MPHOSPH1遺伝子の高発現レベルが示される。

標的遺伝子、例えばMPHOSPH1遺伝子のがん細胞における発現レベルは、そのレベルが、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る。

20

【0154】

対照レベルは、疾患状態(がん性または非がん性)が判明している対象から予め採取し保存しておいた試料を使用して、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もよい。あるいは、対照レベルは、疾患状態が判明している対象に由来する試料中のMPHOSPH1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MPHOSPH1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MPHOSPH1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+/-2S.D.または平均値+/-3S.D.の範囲を、基準値として使用することができる。

30

【0155】

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、 α -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。

40

MPHOSPH1遺伝子の発現レベルが正常対照レベルと比較して上昇しているか、またはがん性対照レベルと類似している/同等である場合、該対象は治療すべきがんを有す

50

ると診断され得る。

【0156】

本発明はまた、(i)対象が治療すべきがんを有する疑いがあ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であって、以下の段階を含み得る方法を提供する：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られた細胞または組織中のMPHOSPH1の発現レベルを決定する段階；
- b) MPHOSPH1の発現レベルを正常対照レベルと比較する段階；
- c) MPHOSPH1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。

10

【0157】

あるいは、そのような方法は以下の段階を含み得る：

- a) 治療すべきがんを有する疑いのある対象から得られた細胞または組織中のMPHOSPH1の発現レベルを決定する段階；
- b) MPHOSPH1の発現レベルをがん性対照レベルと比較する段階；
- c) MPHOSPH1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。

20

【0158】

本発明はまた、本発明のMPHOSPH1ポリペプチドで治療され得るがんに罹患しているか、または該がんに罹患している疑いがあるか、または該がんを発症するリスクのある対象を診断または判定するための診断キットであって、がん免疫療法の有効性または適用性を評価および/またはモニターするのにも使用され得るキットを提供する。好ましくは、がんには、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。より詳細には、キットは、好ましくは、対象由来細胞中のMPHOSPH1遺伝子の発現を検出するための少なくとも1つの試薬を含み得、その試薬は以下の群より選

30

- (a) MPHOSPH1遺伝子のmRNAを検出するための試薬；
- (b) MPHOSPH1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) MPHOSPH1タンパク質の生物学的活性を検出するための試薬。

【0159】

MPHOSPH1遺伝子のmRNAを検出するのに適した試薬の例には、MPHOSPH1 mRNAに特異的に結合するか、またはMPHOSPH1 mRNAを同定する核酸、例えばMPHOSPH1 mRNAの一部に対する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれ得る。このような種類のオリゴヌクレオチドは、MPHOSPH1 mRNAに特異的なプライマーおよびプローブによって例示される。このような種類のオリゴヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法に基づいて調製することができる。必要に応じて、MPHOSPH1 mRNA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、MPHOSPH1 mRNAを検出するための2つ以上の試薬をキット中に含めることもできる。

40

【0160】

一方、MPHOSPH1タンパク質を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、MPHOSPH1タンパク質に対する抗体またはその免疫学的断片が含まれ得る。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MPHOSPH1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

50

り、抗体の任意の断片または改変物（例えば、キメラ抗体、s c F v、F a b、F (a b ')₂、F v等）を試薬として使用することができる。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方法は当技術分野において周知であり、任意の標識および方法を本発明に使用することができる。さらに、M P H O S P H 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。

【0161】

キットは、前述の試薬のうち2つ以上を含み得る。キットはさらに、M P H O S P H 1遺伝子に対するプローブまたはM P H O S P H 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M P H O S P H 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その他の材料をさらに含み得る。これらの試薬等は、ラベルを貼った容器中に保持され得る。適切な容器には、ボトル、バイアル、および試験管が含まれ得る。該容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。

【0162】

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

【0163】

本発明のキットは、陽性対照試料またはM P H O S P H 1標準試料をさらに含み得る。本発明の陽性対照試料は、M P H O S P H 1陽性試料を回収し、次にそれらのM P H O S P H 1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M P H O S P H 1タンパク質またはポリヌクレオチドを、M P H O S P H 1を発現しない細胞に添加して、陽性試料またはM P H O S P H 1標準試料を形成してよい。本発明との関連において、精製M P H O S P H 1は組換えタンパク質であってよい。陽性対照試料のM P H O S P H 1レベルは、例えばカットオフ値よりも高い。

【0164】

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。

【0165】

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、およびより好ましくは20個の連続したアミノ酸から構成されるポリペプチドが含まれる。本発明のタンパク質またはペプチド（ポリペプチド）を使用して試料（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

10

20

30

40

50

のとおりである。

【0166】

抗MPHOSPH1抗体の量と、上記のような対応する対照試料中の抗MPHOSPH1抗体の量との差を測定することによって、本発明のがんを診断するための方法を行うことができる。対象の細胞または組織が該遺伝子の発現産物(MPHOSPH1)に対する抗体を含み、この抗MPHOSPH1抗体の量が正常対照中の抗MPHOSPH1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、該対象のがんに罹患していることが疑われる。

【0167】

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を検出するための検出法に、本発明のペプチドとHLA分子との複合体を適用することができ、それによってがんの再発および/または転移のより早期の発見が可能になる。さらに、本発明のペプチドを有効成分として含む医薬を適用できる対象を選択するために、または医薬の治療効果を評価するために、これを使用することができる。

【0168】

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

【0169】

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および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-A2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ことができる。評価される免疫応答は、免疫原を免疫担当細胞とインビトロまたはインビボで接触させることによって誘導され得る。ある態様においては、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物質または組成物を、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。そのような解析に用いられるアッセイ系には、四量体、細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン放出アッセイ、またはELISPOTアッセイなどの比較的最近の技術開発が含まれる。好ましい態様において、免疫学的応答を評価するための免疫担当細胞は、末梢血、末梢血リンパ球(PBL)、および末梢血単核細胞(PBMC)から選択し得る。そのような免疫担当細胞を回収または単離するための方法は当技術分野において周知である。代替的な好ましい態様において、ペプチド試薬と接触させるべき免疫担当細胞には、抗原提示細胞、例えば樹状細胞が含まれる。

【0170】

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

【0171】

HLA分子に結合するペプチドは、対応するHLA重鎖および β 2-ミクログロブリンの存在下で再び折り畳まれて、3分子複合体を生成する。この複合体において、該重鎖のカルボキシ末端を前もってタンパク質中に作製した部位でビオチン化する。次にストレブ

10

20

30

40

50

トアビジンを該複合体に添加して、3分子複合体およびストレプトアビジンから構成される四量体を形成する。蛍光標識ストレプトアビジンの手法によって、この四量体を使用して、抗原特異的細胞を染色することができる。次いで、この細胞を例えばフローサイトメトリーによって同定することができる。そのような解析を、診断または予後診断目的に使用することができる。この手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。

【0172】

本発明はまた、本発明のペプチドを含む、免疫リコール応答を評価するための試薬を提供する（例えば、Bertoni et al, J.Clin. Invest. 100:503-513, 1997、およびPenna et al., J. Exp. Med. 174:1565-1570, 1991を参照されたい）。例えば、治療すべきがんを有する個体から得られた患者P B M C試料を、特異的ペプチドを使用して抗原特異的C T Lの存在について解析することができる。P B M C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C T L活性について解析することができる。

10

【0173】

本発明のペプチドは、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P B M C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H L A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、P B M C試料中のエピトープ特異的C T Lの存在によって示され得る。本発明のペプチドは、当技術分野で周知の技法を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, Willey/Greene, NY; およびAntibodies A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989を参照されたい）、この抗体は、がんを診断、検出、またはモニターするための試薬として使用され得る。そのような抗体は、H L A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 - M H C複合体に結合する抗体を含み得る。

20

【0174】

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、そのうちの一部分を本明細書に記載する。例えば、本発明は、M P H O S P H 1免疫原性ポリペプチドの量の特徴とする障害を診断または検出する方法を提供する。これらの方法は、生物学的試料中のM P H O S P H 1ペプチド、またはM P H O S P H 1ペプチドとH L AクラスI分子との複合体の量を測定することを含む。ペプチドまたはペプチドとH L AクラスI分子との複合体の発現は、該ペプチドまたは該複合体の結合パートナーを用いてアッセイすることによって、測定または検出することができる。好ましい態様において、ペプチドまたは複合体の結合パートナーは、該ペプチドを認識してこれに特異的に結合する抗体であってよい。生物学的試料、例えば腫瘍生検中のM P H O S P H 1の発現は、M P H O S P H 1プライマーを使用する標準的なP C R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、M P H O S P H 1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、内容が参照によって本明細書に組み入れられるW O 2 0 0 3 / 2 7 3 2 2に見出すことができる。

30

40

【0175】

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M P H O S P H 1ペプチドに特異的な物質と接触させて、該生物学的試料中のM P H O S P H 1ペプチドの存在を検出する段階を含む。本明細書で使用する「接触させる」とは、剤と生物学的試料中に存在するM P H O S P H 1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、生物学的試料中の分子と生物学的試料中のその同族物（例えば、タンパク質とその受容体同族物、抗体とそのタンパク質抗原同族物、核酸とその相補的配列同族物）との間の特異的相互作用を促進するための、当業者に公知の条件である。分子とその同族物との間の特異的相互作用

50

用を促進するための最適な条件は、内容が参照によって本明細書に組み入れられる、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。

【0176】

本発明の診断法は、インビボおよびインビトロの一方または両方で行うことができる。したがって、生物学的試料は、本発明においてインビボまたはインビトロに位置し得る。例えば、生物学的試料はインビボの組織であってよく、かつMPHOSPH1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、診断または治療する対象から採取された腫瘍細胞を含む試料であってよい。

10

【0177】

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、診断を行うこともできる（例えば、Altman, J.D. et al., 1996, Science 274:94; Altman, J.D. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330）。細胞内リンホカイン染色、およびインターフェロン-放出アッセイ、またはELISPOTAッセイもまた提供されている。多量体染色、細胞内リンホカイン染色、およびELISPOTA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（dextrans）（例えば、WO02/072631）、およびストレプタマー（streptamers）（例えば、Nature medicine 6.631-637(2002)）を使用することもできる。

20

【0178】

したがって、いくつかの態様において、本発明は、本発明のMPHOSPH1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であって、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誘導レベルと相関させる段階。

30

【0179】

本発明の関連において、免疫原は、好ましくは、(a) SEQ ID NO: 5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるMPHOSPH1ペプチド、ならびに(b)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そのようなアミノ酸配列を有するペプチド、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。

40

【0180】

いくつかの態様において、ペプチドがん療法によって治療される対象の免疫学的応答をモニターまたは評価する段階は、治療前、治療中、および/または治療後に行うことができる。一般に、がん療法プロトコール中、免疫原性ペプチドは、治療される対象に繰り返し投与される。例えば、免疫原性ペプチドを3~10週間にわたって毎週投与してもよい。したがって、対象の免疫学的応答は、がん療法プロトコール中に評価またはモニターされ得る。あるいは、がん療法に対する免疫学的応答を評価またはモニターする段階が、療法プロトコールの完了時であってもよい。

【0181】

50

本発明によれば、免疫原特異的CTLの誘導が対照と比較して強化されていることによって、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MPHOSPH1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。1つの好ましい態様においては、対象に投与された各免疫原間で免疫学的応答を比較することによって、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MPHOSPH1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。

10

【0182】

XI. 抗体：

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい抗体は本発明のペプチドに特異的に結合し、他のペプチドには結合しない（または弱く結合する）。あるいは、抗体は本発明のペプチドおよびその相同体に結合し得る。本発明のペプチドに対する抗体は、がんの診断および予後診断のアッセイ、ならびに画像化方法論において使用され得る。同様に、そのような抗体は、MPHOSPH1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/または予後診断において使用され得る。さらに、細胞内で発現する抗体（例えば、一本鎖抗体）は、MPHOSPH1の発現が関与するがんの治療において治療的に使用され得、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0183】

本発明はまた、MPHOSPH1タンパク質（SEQ ID NO：126）またはその断片、例としてSEQ ID NO：5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列から構成されるポリペプチドを検出および/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、MPHOSPH1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MPHOSPH1抗体を含み得る。本発明との関連において、MPHOSPH1ポリペプチドに結合する抗MPHOSPH1抗体は、好ましくは、SEQ ID NO：5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列から構成されるポリペプチドを認識するが、他のペプチドは除外する。抗体の結合特異性は、阻害試験によって確認することができる。すなわち、解析すべき抗体と全長MPHOSPH1ポリペプチドとの間の結合が、SEQ ID NO：5、14、64、73、77、79、97、103および120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行われる。

30

40

【0184】

本発明の免疫学的であるが非抗体性の関連アッセイには、T細胞免疫原性アッセイ（阻害性または刺激性）およびMHC結合アッセイもまた含まれ得る。加えて、MPHOSPH1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、MPHOSPH1を発現するがんの検出、モニタリング、および予後診断において臨床的に使用され得、このがんの例には、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、胆管細胞癌、CML、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

50

【0185】

本発明はまた、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で使用することができ、これには、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することによ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作製されたヒト化抗体が含まれる。

【0186】

抗体を得るための抗原として使用さ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。

10

【0187】

本発明によれば、完全なタンパク質およびタンパク質の部分ペプチドが免疫抗原として役立ち得る。適切な部分ペプチドの例には、例えば、本発明のペプチドのアミノ(N)末端断片またはカルボキシ(C)末端断片が含まれる。

本明細書では、抗体を、MPHOSPH1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: 5、14、64、73、77、79、97、103および120の中より選択されるアミノ酸配列を有するMPHOSPH1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もよい。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もよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)が周知である。KLHとペプチドを結合する方法も、当技術分野において周知である。

20

【0188】

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もよい。

30

【0189】

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

40

【0190】

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

【0191】

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

50

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、および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。

【0192】

本発明との関連において使用される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、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ことができる。上記の免疫細胞と融合させる別の好ましい親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髄腫細胞、およびより好ましくは薬物による融合細胞の選択のための特性を獲得した骨髄腫細胞が含まれる。

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

【0193】

細胞融合によって結果として得られたハイブリドーマは、それらをHAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地)などの標準的な選択培地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行い、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングおよびクローニングすることができる。

【0194】

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、ペプチドを発現している細胞またはそれらの溶解物でインビトロにおいて免疫することもできる。次いで、免疫後のリンパ球を、無限に分裂可能なヒト由来骨髄腫細胞、例えばU266と融合させて、該ペプチドに結合し得る所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる(特開昭63-17688号)。

【0195】

次いで、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出することができる。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムによ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。

【0196】

あるいは、免疫したリンパ球などの、抗体を産生する免疫細胞を癌遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体の調製に使用することもできる。

このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を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、Borrebäck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodiesを参照されたい)。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫化リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製された組換え抗体を提供する。

【0197】

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')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv(

10

20

30

40

50

s c F v) 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、Co et al., J Immunol 152:2968-76(1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178:476-96(1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178:497-515(1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121:652-63(1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121:663-9(1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9:132-7(1991)を参照されたい)。

【0198】

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。

10

【0199】

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

20

【0200】

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

30

【0201】

上記のようにして得られた抗体は、均質になるまで精製してもよい。例えば、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って、抗体の分離および精製を行うことができる。例えば、これらに限定されないが、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および等電点電気泳動の使用を適切に選択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。用いられるべき例示的なプロテイン A カラムには、例えば、Hyper D、POROS および Sepharose F.F. (Pharmacia) が含まれる。

40

【0202】

適切なクロマトグラフィー技法の例には、アフィニティークロマトグラフィー以外に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization:A Laboratory Course Manual.Ed Daniel R.Mars hak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィ

50

一手順は、液相クロマトグラフィー、例えばHPLCおよびFPLCによって行うことができる。

【0203】

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もよい。本発明の抗体の活性を評価するために、BIACORE(Pharmacia)を使用してもよい。

10

【0204】

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

本発明のペプチドを検出または測定する方法はペプチドを特異的に検出または測定することができるため、この方法は、該ペプチドを使用する種々の実験において使用され得る。

20

【0205】

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ベクターおよび本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターは、宿主細胞中における本発明のポリヌクレオチド担体、特にDNAとして、本発明のペプチドを発現させるため、または遺伝子療法用に本発明のポリヌクレオチドを投与するために有用である。

【0206】

大腸菌を宿主細胞として選択し、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5、HB101またはXL1Blue)内で増幅して大量に作製する場合、ベクターは、大腸菌内での増幅に適した「複製起点」と、選択された形質転換大腸菌の選択に適したマーカー遺伝子(例えば、薬物、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または同様のもの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、発現ベクターが使用され得る。例えば、大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。大腸菌、例えばJM109、DH5、HB101またはXL1Blue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T7RNA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、pelBシグナル配列(Lei et al., J Bacteriol 169:4379(1987))である

30

40

50

。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。

【0207】

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、p c D N A 3 (I n v i t r o g e n)、および p E G F - B O S (N u c l e i c A c i d s R e s 18(17):5322(1990))、p E F、p C D M 8)、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「B a c - t o - B A C バキュロウイルス発現系」(G I B C O B R L)、p B a c P A K 8)、植物由来の発現ベクター（例えば、p M H 1、p M H 2)、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、p H S V、p M V、p A d e x L c w)、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、p Z I p n e o)、酵母由来の発現ベクター（例えば、「ピキア (P i c h i a) 発現キット」(I n v i t r o g e n)、p N V 1 1、S P - Q 0 1)、および枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) 由来の発現ベクター（例えば、p P L 6 0 8、p K T H 5 0) 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。

10

【0208】

ベクターを C H O、C O S、または N I H 3 T 3 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、S V 4 0 プロモーター (M u l l i g a n e t a l . , N a t u r e 277:108(1979))、M M L V - L T R プロモーター、E F 1 プロモーター (M i z u s h i m a e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s 18:5322(1990))、C M V 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、G 4 1 8) によって選択される薬物耐性遺伝子）を保有する必要がある。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えば p M A M、p D R 2、p B K - R S V、p B K - C M V、p O P R S V および p O P 1 3 が含まれる。

20

【0209】

以下、実施例を参照して本発明をより詳細に記載する。しかしながら、以下の材料、方法および実施例は、本発明のある形態の作製および使用において当業者を支援するために役立つ一方、本発明の局面を説明するためのものにすぎず、したがって本発明の範囲を決して限定することを意図しない。当業者は容易に認識するため、本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

30

【実施例】

【0210】

材料および方法 細胞株

T 2、H L A - A * 0 2 0 1 陽性 B リンパ芽球様細胞株、H L A - A * 0 2 0 6 陽性 B リンパ芽球様細胞株、H T 1 3 7 6、J 8 2、C O S 7 および U M - U C 3 は、A T C C から購入した。M K N - 4 5 は J C R B から購入した。

【0211】

M P H O S P H 1 由来ペプチドの候補選択

H L A - A * 0 2 0 1 分子に結合する M P H O S P H 1 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) (P a r k e r e t a l . , J I m m u n o l 1994, 152(1):163-75、K u z u s h i m a e t a l . , B l o o d 2001, 98(6):1872-81) を使用して予測した。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) によって、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。

40

【0212】

インビトロでの C T L 誘導

50

単球由来の樹状細胞(DC)を抗原提示細胞として使用して、ヒト白血球抗原(HLA)上に提示されたペプチドに対して応答する細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導した。他所に記載されているように、DCをインビトロで作製した(Nakahara S et al., Cancer Res 2003 Jul 15, 63(14):4112-8)。具体的には、Ficol1-Plaque plus (Pharmacia)溶液によって健常なボランティア(HLA-A*0201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(Becton Dickinson)へ付着させることによって分離し、それらを単球画分として濃縮した。2%の加熱非働化した自己血清(AS)を含むAIM-V培地(Invitrogen)中、1000U/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(R&D System)および1000U/mlのインターロイキン(IL)-4(R&D System)の存在下で、単球が濃縮された集団を培養した。7日間の培養後、サイトカインで誘導したDCに、AIM-V培地中で37℃で3時間、3μg/mlの2-マイクログロブリンの存在下で20μg/mlの各合成ペプチドをパルスした。作製された細胞は、自身の細胞表面上に、DC関連分子、例えばCD80、CD83、CD86およびHLAクラスIIを発現しているようであった(データは示さず)。次いで、ペプチドパルスしたこれらのDCをX線照射(20Gy)によって不活化し、CD8 Positive Isolation Kit(Dynal)を用いた陽性選択によって得られた自己CD8⁺T細胞と1:20の比率で混合した。これらの培養物を48ウェルプレート(Corning)中に準備し、各ウェルは、0.5mlのAIM-V/2%AS培地中に、1.5×10⁴個のペプチドパルスしたDC、3×10⁵個のCD8⁺T細胞および10ng/mlのIL-7(R&D System)を含んだ。3日後、これらの培養物に、IL-2(CHIRON)を最終濃度20IU/mlまで添加した。7日目および14日目に、ペプチドパルスした自己DCでT細胞をさらに刺激した。DCは上記と同じ方法によって毎回調製した。21日目に、3回目のペプチド刺激後、ペプチドパルスしたT2細胞に対してCTLを試験した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umno Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

10

20

30

40

50

【0213】

CTL増殖手順

Riddellら(Walter EA et al., N Engl J Med 1995 Oct 19, 333(16):1038-44; Riddell SR et al., Nat Med 1996 Feb, 2(2):216-23)によって記載されている方法と類似の方法を使用して、CTLを培養下で増殖させた。40ng/mlの抗CD3モノクローナル抗体(Pharminogen)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5×10⁴個のCTLを25mlのAIM-V/5%AS培地中に懸濁した。培養開始1日後に、120IU/mlのIL-2を該培養物に添加した。5、8、および11日目に、30IU/mlのIL-2を含む新たなAIM-V/5%AS培地を、該培養物に供給した(Tanaka H et al., Br J Cancer 2001 Jan 5, 84(1):94-9; Umno Y et al., Br J Cancer 2001 Apr 20, 84(8):1052-7; Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

【0214】

CTLクローンの樹立

96丸底マイクロタイタープレート(Nalge Nunc International)においてCTL0.3個、1個、および3個/ウェルとなるように、希釈を行った。CTLを、1×10⁴個細胞/ウェルの2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株、30ng/mlの抗CD3抗体、および125U/mlのIL-2とともに、合計150μl/ウェルの5%AS含有AIM-V培地中で培養した。10日後、50μl/ウェルのIL-2を、IL-2の最終濃度が125U/mlに到達するように該培地に添加した。14日

目にCTL活性を試験し、上記と同じ方法を使用してCTLクローンを増殖させた(Uchida N et al., Clin Cancer Res 2004 Dec 15, 10(24):8577-86; Suda T et al., Cancer Sci 2006 May, 97(5):411-9; Watanabe T et al., Cancer Sci 2005 Aug, 96(8):498-506)。

【0215】

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)を行った。ペプチドパルスしたT2(1×10^4 個/ウェル)を刺激細胞として調製した。48ウェルプレート中の培養細胞、CTL株およびCTLクローンを応答細胞として使用した。IFN - 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行った。

10

【0216】

MPHOSPH1およびHLA - A*0201を内因的に発現する標的細胞株を認識するCTL能力

CTLクローンを、MPHOSPH1およびHLA - A*0201を内因的に発現する標的細胞を認識するその能力について調べた。樹立したCTLクローンを、標的細胞株(5×10^4 個/ウェル)とともに二晩培養した。インキュベート後、培養培地中のIFN - をELISAによって測定した。IFN - ELISAは、製造業者の手順のもと行った。

20

【0217】

細胞傷害活性

CTLクローンを、MPHOSPH1およびHLA - A*0201を内因的に発現する腫瘍細胞を殺傷するその能力について調べた。標的細胞(腫瘍細胞株)を $100 \mu\text{-Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer)で CO_2 インキュベーター内で1時間標識した。ペプチドパルスした標的細胞は、細胞を $20 \mu\text{g/ml}$ のペプチドとともに標識前に16時間インキュベートすることによって調製した。 ^{51}Cr で標識した標的細胞をリンスし、96ウェル丸底マイクロタイタープレート中で $200 \mu\text{l}$ の最終容量でCTLクローンと混合した。プレートを遠心分離(800rpm で4分)して細胞間接触を増加させ、 CO_2 インキュベーター内に配置した。4時間のインキュベート後、 $50 \mu\text{l}$ の上清を各ウェルから回収し、放射能をガンマカウンター(Perkin Elmer)で測定した。特異的細胞傷害性の割合は、以下の式によって特異的 ^{51}Cr 放出の割合を算出することによって決定した： $\{(\text{試験試料放出のcpm} - \text{自然放出のcpm}) / (\text{最大放出のcpm} - \text{自然放出のcpm})\} \times 100$ 。自然放出は、標的細胞を単独で、エフェクター細胞の非存在下でインキュベートすることによって決定した。最大放出は、標的を 1N HCl とインキュベートすることによって得た。すべての測定は二重で行った。

30

【0218】

標的遺伝子およびHLA - A*0206のいずれか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*0206のオープンリーディングフレームをコードするcDNAをPCRによって増幅した。PCR増幅産物を発現ベクターにクローニングした。製造業者の手順に従ってリポフェクタミン2000(Invitrogen)を使用して、標的遺伝子およびHLA - A*0206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刺激細胞(5×10^4 個細胞/ウェル)として使用した。

40

【0219】

MPHOSPH1およびHLA - A*0206を内因的に発現する標的細胞株を認識するCTL能力

CTLクローンを、MPHOSPH1およびHLA - A*0206を内因的に発現する

50

標的細胞を認識するその能力について調べた。樹立したCTL株およびクローンを、標的細胞株(5 × 10⁴個/ウェル)とともに二晩培養した。インキュベート後、培養培地中のIFN-γをELISAによって測定した。IFN-γ ELISAは、製造業者の手順のもと行った。

【0220】

結果

がんにおけるMPHOSPH1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な遺伝子発現プロファイルデータによって、MPHOSPH1(GenBankアクセッション番号NM_016195; SEQ ID No: 125)発現が、対応する正常組織と比較してがん組織内で特異的に上昇していることが明らかになった。MPHOSPH1発現は、31例の膀胱癌のうち30例、36例の乳癌のうち8例、18例の子宮頸癌のうち18例、17例の胆管細胞癌のうち5例、31例のCMLのうち25例、11例の結腸直腸癌のうち6例、14例の胃癌のうち6例、5例のNSCLCのうち5例、7例のリンパ腫のうち7例、10例の骨肉腫のうち6例、22例の前立腺癌のうち7例、18例の腎癌のうち10例、および21例の軟組織腫瘍のうち15例において、確かに上昇していた(表1)。

10

【0221】

【表1】

対応する正常組織と比較して、がん性組織においてMPHOSPH1の上方制御が観察された症例の割合

20

がん/腫瘍	割合
膀胱癌	30/31
乳癌	8/36
子宮頸癌	18/18
胆管細胞癌	5/17
CML	25/31
結腸直腸癌	6/11
胃癌	6/14
NSCLC	5/5
リンパ腫	7/7
骨肉腫	6/10
前立腺癌	7/22
腎癌	10/18
軟組織腫瘍	15/21

30

【0222】

MPHOSPH1由来のHLA-A02結合ペプチドの予測

表2aおよび2bは、HLA-A02に結合するMPHOSPH1の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-A02結合能を有する可能性がある合計47種のペプチドを選択して調べた。

40

【0223】

【表 2 a】

MPHOSPH1 に由来するHLA-A02結合9merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
575	KLLDLIEDL	1278.3	1
282	YIYDLFVPV	1096.6	2
298	KMLRLSQDV	650.5	3
218	ALLRQIKEV	591.9	4
850	FLLTIENEL	363.6	5
1108	ALSELTQGV	285.2	6
331	KLGIKHQSV	243.4	7
1689	TLQKFGDFL	218.8	8
1251	KLTDAKKQI	149.7	9
638	RLAIFKDLV	129.5	10
1467	QLTEKSDSL	87.6	11
1195	NLQDMKHELL	87.6	12
270	SVWVSFFEI	83.5	13
129	FQGCIMQPV	74.6	14
839	VLQENNEGL	73.0	15
1094	TLDVQIQHV	64.0	16
1019	AIWEECKEI	48.8	17
1696	FLQHSPSIL	40.3	18
528	DLMEDEDLV	38.8	19
406	SLLTLGKCI	38.6	20
1400	KLTNLQDEL	36.6	21
170	GILPRTLNV	35.4	22
171	ILPRTLNVL	34.2	23
786	KICSERKRV	33.5	24
880	SLSEKKNLT	30.6	25
944	LMHTKIDEL	29.6	26
1422	WLEEKMLLI	29.0	27
466	TLNVLKFSAS	28.8	28
1539	KLQTEPLST	26.1	29
132	CIMQPVKDL	25.0	30
1260	KQVQKEVSV	24.7	31
1184	KLKEEITQL	24.7	32
888	TLSKEVQQI	24.0	33
280	NEYIYDLFV	23.8	34

10

20

30

40

552	LLDEDLDKT	23.4	35
461	LAYDETLNV	21.5	36
980	NLPNTQLDL	21.4	37
409	TLGKCINVL	20.1	38
175	TLNVLFDSL	19.9	39
923	KLSNEIETA	19.6	40
1389	KEHENNTDV	19.4	41
987	DLLGNDYLV	19.3	42
920	KIMKLSNEI	18.6	43
1703	ILQSKAKKI	17.7	44
512	ILNVKRATI	17.7	45
1124	KELETILET	17.7	46
453	IVNISQCYL	17.5	47
771	LICNETVEV	16.3	48
623	TLLQEREIL	15.9	49
560	TLEENKAFI	15.1	50
1415	YNADRKKWL	14.5	51
307	KGYSFIKDL	13.7	52
133	IMQPVKDLL	12.9	53
1594	KMAVKHPGC	12.6	54
365	SEMSRVIRV	11.5	55
1191	QLTNNLQDM	11.4	56
871	QIVHFQQEL	11.2	57
245	NISEFEESI	11.0	58
484	TLNSSQEKL	10.5	59
764	SLIINNCLI	10.4	60
587	LINEKKEKL	10.0	61
263	MANSIKFSV	9.525	62
1354	VLEAKLEEV	8.528	63
846	GLRAFLITI	6.93	64
83	ILDSQTVVL	5.956	65
1562	VLDSECVST	5.067	66
15	YVFSADPIA	3.033	67
1741	YTSEISSPI	2.733	68
959	SQISNIDLL	2.441	69
82	HILDSQTVV	2.022	70

10

20

30

40

【表 2 b】

MPHOSPH1 に由来するHLA-A02結合10merペプチド

開始位置	アミノ酸配列	スコア	SEQ ID NO
1274	KLLRiKINEL	636.3	71
551	KLLDeDLDKT	445.9	72
460	YLAYdETLNV	319.9	73
943	KLMHtKIDEL	311.8	74
262	NMANsIKFSV	291.3	75
178	VLFDsLQERL	269.9	76
770	KLICnETVEV	243.4	77
34	KLDLsHEFSL	173.5	78
407	LLTLgKCINV	118.2	79
1714	TMSSsKLSNV	115.5	80
1353	QVLEaKLEEV	104.0	81
880	SLSEkKNLTL	87.6	82
235	TLYGsLTNSL	68.4	83
1019	AIWEeCKEIV	65.4	84
552	LLDEdLDKTL	59.6	85
1093	VTLDvQIQHV	57.3	86
559	KTLEeNKAFI	42.3	87
1332	KIIEdMRMTL	42.2	88
152	GLTNsGKTYT	41.0	89
830	NIAEiEDIRV	39.2	90
586	KLINeKKEKL	36.6	91
182	SLQErLYTKM	30.6	92
1043	QQIEkLQAEV	28.9	93
870	KQIVhFQQEL	28.8	94
1318	QQYErACKDL	28.4	95
452	MIVNiSQCYL	27.5	96
923	KLSNeIETAT	26.1	97
1257	KQIKqVQKEV	24.7	98
980	NLPNtQLDLL	24.1	99
985	QLDLIGNDYL	23.0	100
1427	MMLItQAKEA	22.6	101
1523	QIMDiKPKRI	21.8	102
1484	QLVAaLEIQL	21.4	103
466	TLNVIKFSAI	19.8	104

10

20

30

40

511	KILNvKRATI	18.6	105
1340	TLEEqEQTQV	18.3	106
372	RVSEISLCDL	17.6	107
1561	VVLDsCEVST	16.8	108
309	YSFIkDLQWI	14.7	109
353	SIFTvKILQI	12.2	110
1094	TLDVqIQHV	11.4	111
1688	GTLQkFGDFL	11.2	112
311	FIKDIQWIQV	10.7	113
1079	TLIQqLKEEL	10.5	114
1128	TILEtQKVEC	10.4	115
1487	AALEiQLKAL	10.4	116
170	GILPrTLNVL	10.2	117
503	SLDSNSNSKI	4.173	118
1107	RALSELTQGV	3.574	119
282	YIYDLFVPVS	2.216	120
160	YTFQGTEENI	1.208	121
174	RTLNVLFDSL	1.022	122
82	HILDSQTVVL	0.621	123
128	FFQGCIMQPV	0.511	124

10

20

開始位置はMPHOSPH1のN末端からのアミノ酸残基数を示す。
結合スコアは「BIMAS」に由来する。

【0225】

HLA-A*0201拘束性のMPHOSPH1由来の予測ペプチドによるCTLの誘導

30

MPHOSPH1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-ELISPOTアッセイによって、ペプチド特異的なCTL活性を検出した(図1)。MPHOSPH1-A02-9-850(SEQ ID NO:5)で刺激したウェル番号#7(a)、MPHOSPH1-A02-9-129(SEQ ID NO:14)で刺激した#5(b)、MPHOSPH1-A02-9-846(SEQ ID NO:64)で刺激した#5(c)、MPHOSPH1-A02-10-460(SEQ ID NO:73)で刺激した#2(d)、MPHOSPH1-A02-10-770(SEQ ID NO:77)で刺激した#1(e)、MPHOSPH1-A02-10-407(SEQ ID NO:79)で刺激した#1(f)、MPHOSPH1-A02-10-923(SEQ ID NO:97)で刺激した#4(g)、MPHOSPH1-A02-10-1484(SEQ ID NO:103)で刺激した#5(h)およびMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)で刺激した#8(i)が、対照ウェルと比較して強力なIFN-産生を実証した。一方、表2aおよびbに示される他のペプチドは、HLA-A*0201との結合活性を有する可能性があるにもかかわらず、それらのペプチドでの刺激では、特異的なCTL活性は検出されなかった。典型的な陰性データの例として、MPHOSPH1-A02-9-575(SEQ ID NO:1)で刺激したCTL(j)からは特異的IFN-産生は観察されなかった。以上を総合すると、これらの結果は、MPHOSPH1由来の10種の選択ペプチドが強力なCTLを誘導し得ることを示唆している。

40

50

【0226】

MPHOSPH1由来ペプチドに対するCTL株およびクローンの樹立

IFN-ELISPOTアッセイにおいてペプチド特異的なCTL活性を示した、MPHOSPH1-A02-9-850(SEQ ID NO:5)で刺激したウェル番号#7(a)、MPHOSPH1-A02-9-129(SEQ ID NO:14)で刺激した#5(b)、MPHOSPH1-A02-9-846(SEQ ID NO:64)で刺激した#5(c)、MPHOSPH1-A02-10-460(SEQ ID NO:73)で刺激した#2(d)、MPHOSPH1-A02-10-770(SEQ ID NO:77)で刺激した#1(e)、MPHOSPH1-A02-10-407(SEQ ID NO:79)で刺激した#1(f)、MPHOSPH1-A02-10-923(SEQ ID NO:97)で刺激した#4(g)、MPHOSPH1-A02-10-1484(SEQ ID NO:103)で刺激した#5(h)およびMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)で刺激した#8(i)における細胞を増殖させ、CTL株を樹立した(図2)。これらのCTL株のCTL活性をIFN-ELISAによって測定した。CTL株は、ペプチドをパルスしなかったT2細胞と比較して、対応するペプチドをパルスしたT2細胞に対して強力なIFN- γ 産生を実証した。さらに、「材料および方法」に記載したとおりに、CTL株から限界希釈によってCTLクローンを樹立し、対応するペプチドをパルスしたT2細胞に対するCTLクローンからのIFN- γ 産生をIFN-ELISAによって測定した。MPHOSPH1-A02-9-850(SEQ ID NO:5)(a)、MPHOSPH1-A02-9-846(SEQ ID NO:64)(b)、MPHOSPH1-A02-10-460(SEQ ID NO:73)(c)、MPHOSPH1-A02-10-770(SEQ ID NO:77)(d)およびMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)(e)で刺激したCTLクローンから強力なIFN- γ 産生が観察された(図3)。

10

20

【0227】

MPHOSPH1およびHLA-A*0201を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

樹立したCTLクローンを、MPHOSPH1およびHLA-A*0201分子を発現する標的細胞を認識する能力について調べた。MPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)を用いて刺激したCTLクローンは、MPHOSPH1およびHLA-A*0201の両方を発現するJ82細胞に対して強力なCTL活性を示した。一方、MPHOSPH1を発現するがHLA-A*0201を発現しないHT1376細胞およびHLA-A*0201を発現するがMPHOSPH1を発現しないT2細胞に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった(図4)。したがって、このデータによって、MPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)ペプチドが内因的にプロセッシングされ、HLA-A*0201分子とともに標的細胞上に発現され、CTLによって認識されることが明確に実証された。

30

【0228】

MPHOSPH1およびHLA-A*0201を発現する腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性

樹立したCTLクローンを、MPHOSPH1およびHLA-A*0201を発現する腫瘍細胞株を認識し、殺傷するその能力について調べた。MPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)を用いて刺激したCTLクローンは、MPHOSPH1およびHLA-A*0201の両方を発現するUMUC-3細胞に対して強力な細胞傷害活性を示した。一方、MPHOSPH1を発現するがHLA-A*0201を発現しないMKN45細胞およびHLA-A*0201を発現するがMPHOSPH1を発現しないT2細胞に対して、両方のCTLクローンについて有意な細胞傷害活性は検出されなかった(図5)。これらの結果は、MPHOSPH1由来のMPHOSPH1-A02-10-282(SEQ ID NO:120)ペプチドがMPHOSPH1発現腫

40

50

瘍を有する患者のためのがんワクチンに適用可能であり得ることを示している。

【0229】

MPHOSPH1およびHLA-A*0206を発現する標的細胞に対する特異的CTL活性

MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) ペプチドに対して産生された樹立CTL株を、MPHOSPH1およびHLA-A*0206分子を発現する標的細胞を認識する能力について調べた。全長MPHOSPH1およびHLA-A*0206遺伝子の両方をトランスフェクトしたCOS7細胞 (MPHOSPH1およびHLA-A*0206遺伝子が発現する標的細胞についての特異的モデル) を刺激細胞として調製し、全長MPHOSPH1またはHLA-A*0206のいずれかをトランスフェクトしたCOS7細胞を対照として使用した。図6において、MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) を用いて刺激したCTLクローンは、MPHOSPH1およびHLA-A*0206の両方が発現するCOS7細胞に対して強力なCTL活性を示した。一方、対照に対して有意な特異的CTL活性は検出されなかった。したがって、このデータによって、MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) ペプチドが内因的にプロセッシングされ、HLA-A*0206分子とともに標的細胞上に発現され、CTLによって認識されることが明確に実証された。

10

【0230】

抗原ペプチドの相同性解析

MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5)、MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14)、MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64)、MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73)、MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77)、MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79)、MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97)、MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) および MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) を用いて刺激したCTLは、有意かつ特異的なCTL活性を示した。この結果は、MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5)、MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14)、MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64)、MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73)、MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77)、MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79)、MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97)、MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) および MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) の配列が、ヒト免疫系を感作することが知られている他の分子に由来するペプチドと相同的であるという事実に起因する可能性がある。この可能性を排除するために、BLASTアルゴリズム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) を用いて、クエリーとしてのこれらのペプチド配列に対して相同性解析を行ったが、有意な相同性を有する配列は認められなかった。相同性解析の結果は、MPHOSPH1-A02-9-850 (SEQ ID NO: 5)、MPHOSPH1-A02-9-129 (SEQ ID NO: 14)、MPHOSPH1-A02-9-846 (SEQ ID NO: 64)、MPHOSPH1-A02-10-460 (SEQ ID NO: 73)、MPHOSPH1-A02-10-770 (SEQ ID NO: 77)、MPHOSPH1-A02-10-407 (SEQ ID NO: 79)、MPHOSPH1-A02-10-923 (SEQ ID NO: 97)、MPHOSPH1-A02-10-1484 (SEQ ID NO: 103) および MPHOSPH1-A02-10-282 (SEQ ID NO: 120) の配列が固有のものであること、したがって本発明者らの知る限りでは、この分子が、ある非関

20

30

40

50

連分子に対して意図しない免疫学的応答を引き起こす可能性はほとんどないことを示している。

【0231】

結論として、本明細書で同定された、MPHOSPH1に由来する新規HLA-A*0201エピートープペプチドが、がん免疫療法の分野において利用され得る。

【産業上の利用可能性】

【0232】

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、したがって幅広いがんの種類に対する適用性を有し得る、MPHOSPH1由来の新規TAAを提供する。そのようなTAAは、MPHOSPH1関連疾患、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、結腸直腸癌、胃癌、NSCLC、リンパ腫、骨肉腫、前立腺癌、腎癌および軟組織腫瘍に対するペプチドワクチンとして使用され得る。

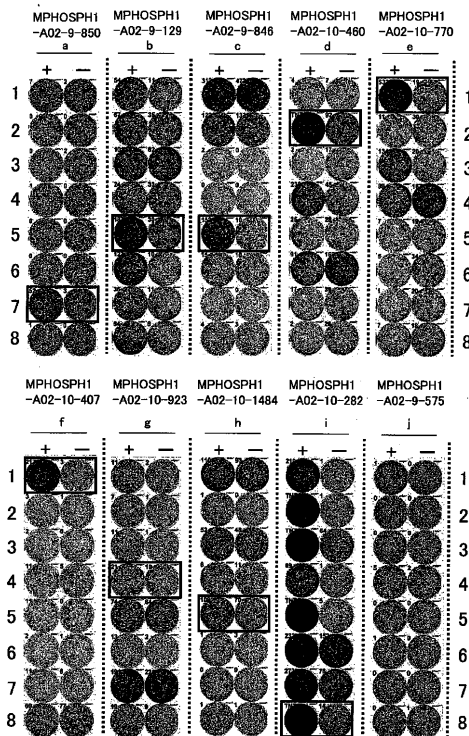
10

【0233】

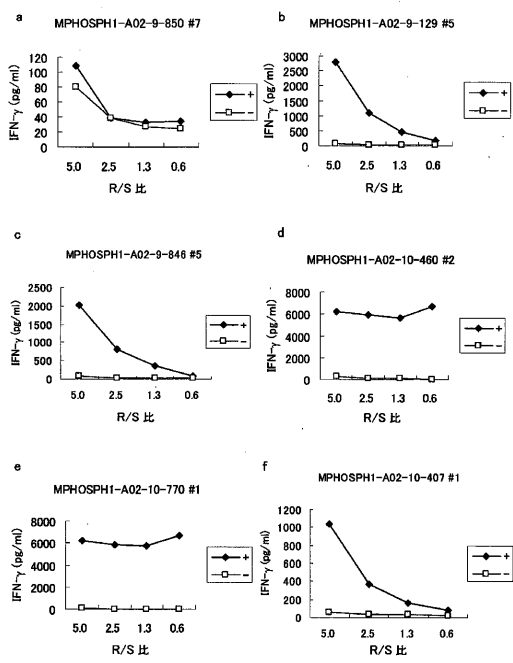
本明細書において、本発明をその特定の態様に関して詳細に説明しているが、前述の説明は本質的に例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。慣例的な実験を通して、当業者は、その境界および限界が添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変がその中でなされ得ることを容易に認識する。

20

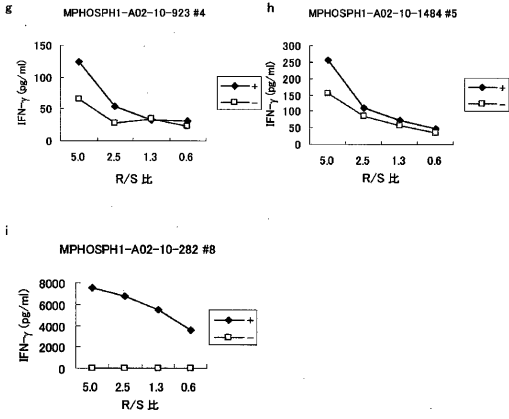
【図1】



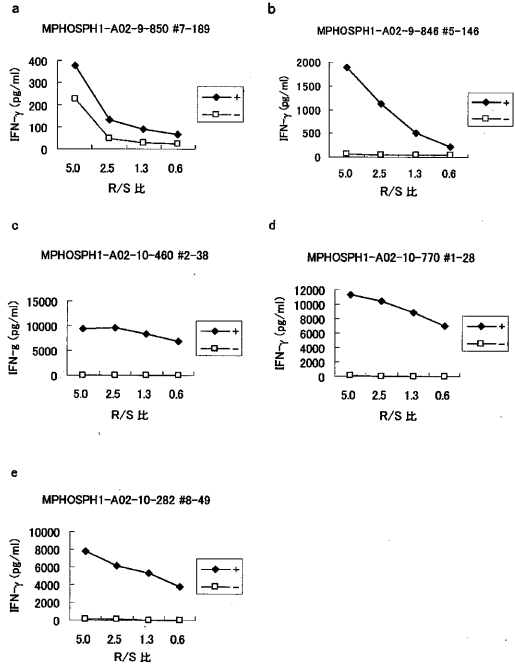
【図2 a - f】



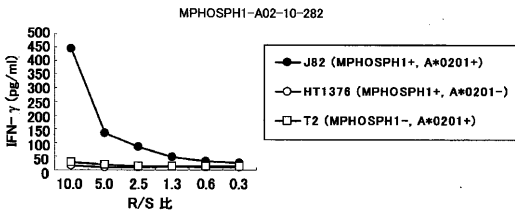
【 図 2 g - i 】



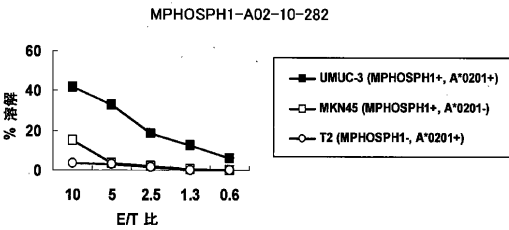
【 図 3 】



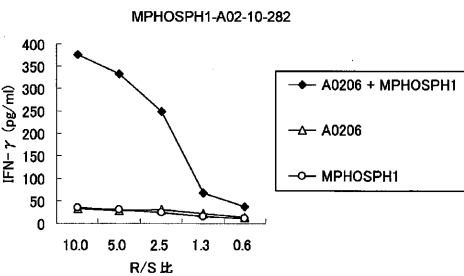
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【手続補正書】【提出日】平成25年9月2日(2013.9.2)【手続補正1】【補正対象書類名】特許請求の範囲【補正対象項目名】全文【補正方法】変更【補正の内容】【特許請求の範囲】【請求項1】SEQ ID NO: 120に記載のアミノ酸配列からなる、単離されたペプチド。【請求項2】

SEQ ID NO: 120に記載のアミノ酸配列において1個または2個のアミノ酸が置換されているアミノ酸配列をからなるペプチドであって、かつ、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)誘導能を有し、以下の特徴の一方または両方を有する、単離されたペプチド：

(a) SEQ ID NO: 120に記載のアミノ酸配列のN末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；
ならびに

(b) SEQ ID NO: 120に記載のアミノ酸配列のC末端アミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。

【請求項3】請求項1または2に記載のペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。【請求項4】CTLを誘導するための組成物であって、請求項1または2に記載の1種もしくは複数種のペプチド、または請求項3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5】CTL誘導能を有する抗原提示細胞(APC)を誘導するための組成物であって、請求項1または2に記載の1種もしくは複数種のペプチド、または請求項3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6】以下からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む、薬学的組成物：(a) 請求項1または2に記載の1種もしくは複数種のペプチド；(b) 請求項1または2に記載のペプチドをコードする1種もしくは複数種のポリヌクレオチド；(c) 請求項1または2に記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する1種もしくは複数種のAPCまたはエキソソーム；および(d) 請求項1または2に記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する1種もしくは複数種のCTL。【請求項7】がんの治療および予防のいずれかもしくは両方において、または対象におけるがんに対する免疫応答の誘導において使用するための、請求項6記載の薬学的組成物。【請求項8】HLA抗原がHLA-A2である対象への投与のために製剤化される、請求項6または7記載の薬学的組成物。【請求項9】CTL誘導能を有する抗原提示細胞(APC)をインビトロで誘導するための方法であって、以下からなる群より選択される段階を含む、方法：(a) APCを請求項1または2に記載のペプチドとインビトロまたはエキスビボで接触させる段階、および

(b) 請求項 1 または 2 に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを APC に導入する段階。

【請求項 10】

CTL をインビトロで誘導するための方法であって、以下からなる群より選択される段階を含む、方法：

(a) CD8 陽性 T 細胞を、HLA 抗原と請求項 1 または 2 に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する 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 または 2 に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

(c) T 細胞受容体 (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、CD8 陽性 T 細胞に導入する段階であって、該 TCR が、細胞表面上に提示された、HLA 抗原と請求項 1 または 2 に記載のペプチドとの複合体に結合し得る、段階。

【請求項 11】

HLA 抗原と請求項 1 または 2 に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する、単離された APC。

【請求項 12】

請求項 9 記載の方法によって誘導される、請求項 11 記載の APC。

【請求項 13】

HLA 抗原と請求項 1 または 2 に記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する細胞を認識する、単離された CTL。

【請求項 14】

請求項 10 記載の方法によって誘導される、請求項 13 記載の CTL。

【請求項 15】

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組成物であって、請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物。

【請求項 16】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドに対する抗体またはその免疫学的活性断片。

【請求項 17】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 18】

請求項 17 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 19】

請求項 1 または 2 に記載のペプチド、請求項 3 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 16 記載の抗体を含む診断キット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/005076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i		
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, A61P35/00, A61P43/00, C07K7/06		
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/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/047473 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2008.04.24, & JP 2010-506826 A & EP 2091965 A1	1-9,11-15, 18-21
A	WO 2006/085684 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.) 2006.08.17, & JP 2008-532477 A & US 2009/0175844 A1 & EP 1856278 A1	1-9,11-15, 18-21
A	NISHIU M et al., Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: Identification of genes related to disease progression, Jpn. J. Cancer Res., 2002, Vol.93, pp.894-901	1-9,11-15, 18-21
<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	
21.09.2012	02.10.2012	
Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer	4N 3435
Japan Patent Office	Akiko NISHIMURA	
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/005076

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	OBARA W et al., Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for bladder cancer., Japanese journal of clinical oncology, Vol.42, No.7, 2012.07, pp.591-600, Electronic Publication: 2012.05.25 (abstract) Medline[online][retrieved on 2012.09.21] Medline Accession no.2012666365	1-9,11-15, 18-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2012/005076
--

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.: 10, 16, 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claims 10,16,17 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and [Rule 39.1(iv)].
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)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 J	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531 A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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 角田 卓也

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72) 発明者 大沢 龍司

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72) 発明者 吉村 祥子

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72) 発明者 渡辺 朝久

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1 オンコセラピー・サイエンス株式会社内

(72) 発明者 中村 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

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02

DA05 DA11 EA04 GA11 HA01 HA09 HA11

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35

QR55 QR62 QS25 QS32 QX01

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44

CA45 CA46

4C084 AA13 NA14 ZB262 ZB272

4C085 AA03 BB11 CC21 DD62 EE01 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA20 EA50 FA33 FA74

专利名称(译)	MPHOSPH1肽和包含其的疫苗		
公开(公告)号	JP2014510513A	公开(公告)日	2014-05-01
申请号	JP2013508319	申请日	2012-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	角田卓也 大沢龍司 吉村祥子 渡辺朝久 中村祐輔		
发明人	角田 卓也 大沢 龍司 吉村 祥子 渡辺 朝久 中村 祐輔		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/071 C12N5/078 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 A61K39/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/531		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.202.A C12N5/00.202.J C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68.A A61K39/00.H A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA09 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084 /AA13 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/522991 2011-08-12 US		
其他公开文献	JP5564730B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

如本文更详细讨论的，衍生自MPHOSPH1的分离的表位肽与HLA抗原结合并诱导细胞毒性T淋巴细胞（CTL），因此适用于癌症免疫疗法，更特别是癌症疫苗。本发明的肽包括上述MPHOSPH1衍生的氨基酸序列及其修饰形式，其中一个，两个或几个氨基酸被取代，缺失，插入或添加，条件是这些修饰形式保留了所需的CTL诱导能力。原始序列。还提供了编码任何上述肽的多核苷酸以及包含任何上述肽或多核苷酸的药剂或组合物。本发明的肽，多核苷酸和药剂或组合物特别适用于治疗和预防癌症和肿瘤，包括例如

膀胱癌，乳腺癌，宫颈癌，胆管细胞癌，CML，结肠直肠癌。癌症，胃癌，NSCLC，淋巴瘤，骨肉瘤，前列腺癌，肾癌和软组织肿瘤。

がん／腫瘍	割合
膀胱癌	30/31
乳癌	8/36
子宮頸癌	18/18
胆管細胞癌	5/17
CML	25/31
結腸直腸癌	6/11
胃癌	6/14
NSCLC	5/5
リンパ腫	7/7
骨肉腫	6/10
前立腺癌	7/22
腎癌	10/18
軟組織腫瘍	15/21