

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520152

(P2018-520152A)

(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/08 (2006.01)	A 6 1 K 38/08	4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-568045 (P2017-568045)	(71) 出願人	513207091 アンスティテュ ギュスターブ ルシ フランス国 94805 ヴィルジュイフ リュ カミーユ デムーラン 39
(86) (22) 出願日	平成28年7月4日 (2016.7.4)	(74) 代理人	100106002 弁理士 正林 真之
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月28日 (2018.2.28)	(74) 代理人	100120891 弁理士 林 一好
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/065733	(74) 代理人	100165157 弁理士 芝 哲央
(87) 国際公開番号	W02017/005702	(74) 代理人	100126000 弁理士 岩池 満
(87) 国際公開日	平成29年1月12日 (2017.1.12)	(72) 発明者	マミーシュエブ ファティア フランス国 92340 ブール ラレ ーヌ アヴェニュー デュ シャトー 54 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	15176174.9		
(32) 優先日	平成27年7月9日 (2015.7.9)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 免疫原性プレプロカルシトニンペプチド

(57) 【要約】

本発明は、MHCにより提示される抗原プレプロカルシトニンのT細胞エピトープを持つペプチドの組み合わせに関する。これらのペプチドは、抗腫瘍免疫療法において使用することができる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 ~ 18 の配列より選択される少なくとも二つのペプチド配列を含む組成物であって、前記配列の各々は、8 ~ 15 個のアミノ酸のペプチドの形態で存在するか、またはマルチエピトープキメラポリペプチドに含まれることを特徴とする、組成物。

## 【請求項 2】

8 ~ 15 個のアミノ酸のペプチドの混合物を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

配列番号 1 ~ 18 の配列より選択される少なくとも二つの配列を含むキメラポリペプチドを含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物であって、前記配列は、隣接するか、1 ~ 5 個のアミノ酸からなる連結要素により連結されるか、またはプレプロカルシトニン以外のタンパク質のエピトープを含む配列によって隔てられることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

10

## 【請求項 4】

配列番号 1 ~ 7 の配列より選択される少なくとも二つのペプチド配列を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

配列番号 1 ~ 7 の配列より選択される少なくとも三つのペプチド配列を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

20

## 【請求項 6】

配列番号 4 および 5、ならびに配列番号 6 の配列より選択される少なくとも一つの配列を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

配列番号 1、2、3、5 および 6 の配列の組み合わせ、配列番号 1、3、4、5 および 6 の配列の組み合わせ、配列番号 1、2、5 および 6 の配列の組み合わせ、配列番号 1、3、5 および 6 の配列の組み合わせ、ならびに配列番号 3、4、5 および 6 の配列の組み合わせより選択されるペプチド配列の組み合わせを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

配列番号 1 ~ 18 の配列より選択される 8 ~ 15 個のアミノ酸の少なくとも二つのペプチドをコードするか、または請求項 3 に記載のキメラポリペプチドをコードする少なくとも一つの核酸分子を含む、組成物。

30

## 【請求項 9】

前記ポリペプチド配列をロードした抗原提示細胞を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 10】

少なくとも一つの免疫チェックポイント阻害剤をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 11】

配列番号 19、20 および / または 21 のペプチド配列のうちの少なくとも一つをさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

40

## 【請求項 12】

薬物として使用するための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 13】

抗腫瘍免疫療法における使用のための、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 14】

前記組成物は、カルシトニンを発現する腫瘍、またはカルシトニン、プレカルシトニンもしくはプレプロ - - C G R P の高い血清中濃度を伴う病変の免疫療法を対象とするこ

50

とを特徴とする、請求項 13 と同じ使用のための、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物は、甲状腺髄様癌腫または肺癌腫の免疫療法を対象とすることを特徴とする、請求項 13 または 14 と同じ使用のための、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記組成物は、TAP ペプチド輸送体を発現しない細胞を有する腫瘍の免疫療法を対象とすることを特徴とする、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項と同じ使用のための、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記組成物は、HLA - A \* 0201 患者の治療を対象とすることを特徴とする、請求項 12 ~ 16 のいずれか一項と同じ使用のための、請求項 12 に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プレプロカルシトニン (ppCT; preprocalcitonin) のエピトープの組み合わせおよび抗腫瘍免疫療法におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ワクチン接種またはペプチド免疫療法は現在、癌の予防または治療の領域において高い関心が集まる治療的アプローチである。その原理は、細胞障害性Tリンパ球 (CTL; cytotoxic T lymphocytes) により認識される腫瘍抗原のT細胞エピトープを再生するペプチドによる免疫化に基づき、細胞障害性Tリンパ球 (CTL) は、これらの抗原を表面で発現する癌細胞の排除に主要な役割を果たす。

20

【0003】

CTLは、タンパク質抗原全体ではなく、様々な細胞の表面で発現される主要組織適合複合体 (MHC; major histocompatibility complex) の分子により提示されるそのペプチド断片を認識することが思い出されよう。これらは、T細胞エピトープを構成するペプチド断片である。

【0004】

これらのペプチドの提示は、以下の三つの主なステップを含む「抗原プロセッシング」と呼ばれる複雑なプロセスの結果生じる：

30

- プロテアソームと呼ばれる多酵素複合体による抗原の細胞質ゾルでの分解、
- この分解の結果生じるペプチドの、TAP輸送体による小胞体 (ER; endoplasmic reticulum) 内への移動、
- これらペプチドとMHC分子との結合による、安定したペプチド/MHC複合体の形成と、その細胞表面への搬出。

【0005】

クラスI主要組織適合複合体 (MHC I) により提示されるエピトープは通常、8 ~ 11個のアミノ酸 (aa; amino acids) を有し、細胞障害性応答の主要な成分であるCD8 + T細胞により認識される。クラスII主要組織適合複合体 (MHC II) により提示されるエピトープは通常、13 ~ 18個のアミノ酸を有し、CD4 + T細胞により認識される。

40

【0006】

これらのエピトープの同定は、抗腫瘍免疫療法組成物の開発に必須のステップである。

【0007】

プレプロカルシトニンは、神経ペプチド「カルシトニン遺伝子関連ペプチド」の型 (- CGRP; calcitonin gene-related peptide) もコードするCALCA遺伝子によりコードされる。この遺伝子は、5つのイントロンおよび6つのエキソンを含み、その転写一次産物は、選択的組織特異的スプライシングの対象である。エキソン1、2、3および4の連結は、甲状腺C細胞においてカルシトニンmR

50

NAを生産するが、エキソン1、2、3、5および6の連結は、ニューロンにおいて - CGRP mRNAを生産する(非特許文献1)。

【0008】

カルシトニンmRNAは、141個のアミノ酸の前駆体であるプレプロカルシトニンをコードし、このプレプロカルシトニンは25残基のN末端シグナル配列を含み、このN末端シグナル配列の切断により116aaプロカルシトニンが生じる。プロカルシトニンはN末端領域の57aa、続いて成熟32aaカルシトニン、21aaC末端ペプチドのカタルシンを含む(非特許文献2)。成熟形態の - CGRPは、多数の組織に見られる血管拡張効果をもつ37aaペプチドである(非特許文献3)。プレプロカルシトニンのシグナル配列も、プレプロホルモン - CGRP内にみられる。

10

【0009】

カルシトニンの生理学的役割は主に、成長、妊娠および授乳等の「カルシウムストレス」の期間中に骨格を保護することである。カルシトニンは、甲状腺髄様癌腫(MTC; medullary thyroid carcinoma)細胞およびある特定の肺癌腫によっても大量に生産される(非特許文献4; 非特許文献5)。高い血漿カルシトニン濃度は、これらの腫瘍における診断マーカーおよび予後マーカーである。

【0010】

MTC免疫療法のために、成熟カルシトニンでパルスした樹状細胞の使用が提案されている(非特許文献6)。より最近では、本発明者らのチームが、プレプロカルシトニンシグナルペプチドから誘導される10アミノ酸の抗原ペプチドを同定している。このペプチドは、プロテアソームおよびTAP輸送体とは独立した機序により小胞体でプロセッシングされるエピトープに対応する(特許文献1)。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2009010874号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】MORRIS et al., Nature, 308, 746-8, 1984

30

【非特許文献2】ROSENFELD et al., Nature, 304, 129-35, 1983

【非特許文献3】ZAIDI et al., Crit Rev Clin Lab Sci, 28, 109-74, 1990

【非特許文献4】COOMBES et al., Lancet, 1, 1080-3, 1974

【非特許文献5】MILHAUD et al., Lancet, 1, 462-3, 1974

【非特許文献6】SCHOTT et al., Cancer Immunol Immunother, 51, 663-8, 2002

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明者らはこれまでに、抗腫瘍免疫応答の誘導に關与するプレプロカルシトニンの他の領域を同定し、異なるエピトープの組み合わせがより良好な抗腫瘍免疫応答を可能にすることを明らかにした。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、以下より選択される少なくとも二つのペプチド配列を含む組成物に関する：

- 以下ではppCT1-15とも呼称されるMGFQKFSPFLALSL (配列

50

番号 1 ) ;

- 以下では p p C T 7 1 - 8 5 と呼称される E R E G S S L D S P R S K R C ( 配列番号 2 ) ;

- 以下では p p C T 8 6 - 1 0 0 と呼称される G N L S T C M L G T Y T Q D F ( 配列番号 3 ) ;

- 以下では p p C T 9 - 1 7 と呼称される F L A L S I L V L ( 配列番号 4 ) ;

- 以下では p p C T 1 6 - 2 5 と呼称される V L L Q A G S L H A ( 配列番号 5 ) ;

;

- 以下では p p C T 5 0 - 5 9 と呼称される L L A A L V Q D Y V ( 配列番号 6 ) ;

;

- 以下では p p C T 9 1 - 1 0 0 と呼称される C M L G T Y T Q D F ( 配列番号 7 ) ;

- 以下では p p C T 4 5 - 6 0 と呼称される E A R L L L A A L V Q D Y V Q ( 配列番号 8 ) ;

- 以下では p p C T 1 - 1 0 と呼称される M G F Q K F S P F L ( 配列番号 9 ) ;

- 以下では p p C T 3 - 1 2 と呼称される F Q K F P F L A L ( 配列番号 1 0 ) ;

- 以下では p p C T 5 - 1 4 と呼称される K F S P F L A L S I ( 配列番号 1 1 ) ;

;

- 以下では p p C T 6 - 1 5 と呼称される F S P F L A L S I L ( 配列番号 1 2 ) ;

;

- 以下では p p C T 8 7 - 9 6 と呼称される N L S T C M L G T Y ( 配列番号 1 3 ) ;

- 以下では p p C T 8 8 - 9 7 と呼称される L S T C M L G T Y T ( 配列番号 1 4 ) ;

- 以下では p p C T 9 6 - 1 0 5 と呼称される Y T Q D F N K F H T ( 配列番号 1 5 ) ;

- 以下では p p C T 4 1 - 5 0 と呼称される T L S E D E A R L L ( 配列番号 1 6 ) ;

- 以下では p p C T 5 3 - 6 2 と呼称される A L V Q D Y V Q M K ( 配列番号 1 7 ) ; および

- 以下では p p C T 5 8 - 6 6 と呼称される Y V Q M K A S E L ( 配列番号 1 8 ) ;

。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明による組成物においては、前記配列の各々が 8 ~ 1 5 個のアミノ酸のペプチドの形態で存在するか、またはマルチエピトープキメラポリペプチドに含まれる。ここではキメラポリペプチドは、自然には存在しないアミノ酸の連なりと定義される。ここで理解されるキメラポリペプチドは、配列番号 1 ~ 1 8 の配列より選択される少なくとも二つの配列を含むことができ、前記配列は、前記ポリペプチドにおいて、隣接するか、1 ~ 5 個のアミノ酸からなる連結要素により連結されるか、またはプレプロカルシトニン以外のタンパク質のエピトープを含む配列によって隔てられる。

#### 【 0 0 1 6 】

したがって本発明による組成物は、マルチエピトープであり、好ましくは少なくとも一部の個人においてポリ特異的応答を生成できる。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の好ましい実施形態によれば、本組成物は、プロテアソームおよび T A P 輸送体とは独立した機序により小胞体でプロセシングされるエピトープに対応する配列番号 4 および 5 の配列等の少なくとも一つの配列を含む。本組成物は、プロテアソームおよび T A P 輸送体に依存する機序により小胞体でプロセシングされるエピトープに対応する配列番号 3 および 6 の配列等の少なくとも一つの配列をさらに含むのがなお好ましい。本発明による組成物は、好ましくは配列番号 6 の配列を含み、この配列は上記のようにこの配列が

10

20

30

40

50

らなるペプチドの形態に含まれるか、またはキメラポリペプチドに含まれる。

【0018】

本発明の特定の実施形態によれば、本組成物は9～15個のアミノ酸のペプチドの混合物を含む。この混合物は、凍結乾燥されるか、医薬用途に適した溶液に懸濁されうる。

【0019】

本発明のもう一つの好ましい実施形態によれば、本組成物は、配列番号1～18の配列より選択される少なくとも二つの配列を含むキメラポリペプチドを含み、前記配列は、隣接するか、1～5個のアミノ酸からなる連結要素により連結されるか、またはプレプロカルシトニン以外のタンパク質のエピトープを含む配列によって隔てられる。該当する場合には、キメラポリペプチドは同じ配列の複数のコピーを含みうる。また、本発明によるキメラポリペプチドにおいては、免疫原性配列の少なくとも一部が、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) のアデニル酸シクラーゼ (AC; adenylate cyclase) に挿入されうる。AC受容体はCD11bの受容体と同じであり、樹状細胞はCD11b受容体を発現するため、このような構築物は、免疫原性エピトープを樹状細胞に直接導くことを可能にする。(DADAGLIO et al., Int. Immunol, 15, 1423-1430, 2003)。

10

【0020】

本発明による組成物は、SPFLALSIL (配列番号19またはppCT7-15)、EARLLAL (配列番号20またはppCT46-54)、および/またはSPRSKRCGNL (配列番号21またはppCT79-88)の配列のうちの一つ等、前述の配列と異なる少なくとも一つの他のペプチド配列、特にHLA分子、例えばHLA-B7と結合できる配列を任意に含み、前記ペプチド配列は、単離ペプチドの形態であるか、または本発明によるマルチエピトープキメラペプチドに含まれる。

20

【0021】

異なるHLAアレルをもつ個人からなる人口に広く使用できるように、本発明によるマルチエピトープ組成物は、異なるMHC分子により提示されるエピトープを含みうる。

【0022】

本発明の好ましい実施形態によれば、本組成物は、少なくとも一つの免疫チェックポイント阻害剤、例えば限定はされないが分子PD-1、PDL-1またはCTLA4、好ましくはヒト分子hPD-1、hPDL-1またはhCTLA4に対する抗PD-1、抗PDL-1または抗CTLA4、特に抗体、好ましくはモノクローナル抗体も含む。本発明による組成物は、抗PD-1、特に抗PD-1モノクローナル抗体、好ましくは抗hPD-1を含むのが有利である。

30

【0023】

本発明によるキメラポリペプチドは、それ自体公知の方法により、特に従来 of 組換えDNA技術により容易に得られる。

【0024】

本発明による組成物は、配列番号1～7の配列より選択される少なくとも二つのペプチド配列を含むのが好ましく、これらの配列のうち少なくとも3つを含むのがより好ましい。プレプロカルシトニンの完全な配列に対する配列番号1～7のペプチドの位置が図1に示される。

40

【0025】

本発明による組成物中に存在する配列の組み合わせの非限定的な例には、以下の組み合わせ：

- 配列番号1、2、3、5および6の配列の組み合わせ；
- 配列番号1、3、4、5および6の配列の組み合わせ；
- 配列番号1、2、5および6の配列の組み合わせ；
- 配列番号1、3、5および6の配列の組み合わせ；
- 配列番号3、4、5および6の配列の組み合わせ

が含まれ、これらの組み合わせは、前述の配列および上記のような少なくとも一つの免

50

疫チェックポイント阻害剤、特に抗PD-1モノクローナル抗体、好ましくは抗hPD-1抗体、ならびに/または配列番号19、20および/もしくは21の配列のうちの一つを含む。

【0026】

本発明は、免疫原性ペプチドの混合物、または上記のようなキメラポリペプチドをコードする核酸分子、ならびにそれを含む組成物にも関する。これらのポリヌクレオチドは、細胞または宿主生物における免疫原性ペプチドまたは本発明のキメラポリペプチドの発現を可能にするために、転写調節または適切なプロモータの下で発現ベクターに挿入される。発現ベクターの選択は、特に発現が求められる細胞または生物（原核生物または真核生物）に依存する。治療される患者に直接ポリヌクレオチドを投与することが計画される場合には、裸のDNAプラスミド、または一時的発現を可能にするベクター、例えばアデノウイルスまたはワクシニアウイルス由来のベクターが使用されるのが好ましい。したがって本発明は、配列番号1~18の配列より選択される9~15個のアミノ酸の少なくとも二つのペプチドをコードするか、または上述のキメラポリペプチドをコードする少なくとも一つの核酸分子を含む組成物にも関する。

10

【0027】

本発明による他の組成物は、本発明のペプチドまたはマルチエピトープ組成物をロードしたか、または適切な発現ベクターに挿入された本発明のポリヌクレオチドで形質転換された樹状細胞を含むこともできる。本発明のペプチドまたはマルチエピトープ組成物をロードした人工抗原提示細胞を含むこともできる。人工抗原提示細胞は、特に、国際特許出願公開第1999/003499号に記載される腫瘍細胞由来のベシクル（テキソソーム）、またはVIAUD et al.の出版物（J Immunother, 34, 65-75, 2011）に記載される樹状細胞由来のエキソソームでありうる。

20

【0028】

本発明のもう一つの態様は、薬物として、具体的には抗腫瘍免疫療法を対象とした薬物としての、より具体的にはカルシトニンおよび/または - CGRPを発現する腫瘍の治療における、上述の組成物の使用である。これには、特に小細胞または非小細胞肺癌腫のほか、甲状腺髄様癌腫が含まれる。本発明による組成物は、以下の癌病変等のカルシトニンもしくはプロカルシトニンまたはプロ - CGRPの高い血清中濃度を伴う病変の治療にも使用されうる：腎癌、乳癌、消化器癌（TABOLLI et al, Tumori, 69, 227-230, 1983）、膵臓癌、前立腺癌（SIM et al, Ann Clin Lab Sci., 26, 487-95, 1996）、肝臓癌（CONTE et al, Acta Endocrinol, 106, 109-11, 1984）または慢性骨髄性白血病（TAKUBO et al, Haematologia, 31, 177-9, 2001）、急性未分化型骨髄芽球性白血病（KIEFER et al, Leuk Lymphoma. 13, 501-507, 1994）、神経内分泌系腫瘍および肝臓癌（GHILLIANI et al, Cancer Res, 49, 6845-6851, 1989）。

30

【0029】

本発明による組成物は、細胞がTAPペプチド輸送体を発現しない腫瘍の免疫療法のために特に有利な様式で使用できる。

40

【0030】

上述の組成物は、HLA-A\*0201の患者の治療に特に適する。

【0031】

本発明は、薬物、特に抗腫瘍免疫療法、特にカルシトニンおよび/または - CGRPを発現する腫瘍の治療を対象とした薬物を得るための、本発明による少なくとも二つの免疫原性ペプチドエピトープのマルチエピトープ組成物または核酸分子の使用にも関する。これには、特に小細胞または非小細胞肺癌腫のほか、甲状腺髄様癌腫が含まれる。前記薬物は、以下の癌病変等のカルシトニンもしくはプレカルシトニンまたはプレプロ - CGRPの高い血清中濃度を伴う病変の治療にも使用されうる：腎癌、乳癌、消化器癌（TAB

50

OLLIE et al, Tumori, 69, 227 - 230, 1983)、膵臓癌、前立腺癌 (SIM et al, Ann Clin Lab Sci., 26, 487 - 95, 1996)、肝臓癌 (CONTE et al, Acta Endocrinol, 106, 109 - 11, 1984) または慢性骨髄性白血病 (TAKUBO et al, Haematologia, 31, 177 - 9, 2001)、急性未分化型骨髄芽球性白血病 (KIEFER et al, Leuk Lymphoma. 13, 501 - 507, 1994)、神経内分泌系腫瘍および肝臓癌 (GHILLIANI et al, Cancer Res, 49, 6845 - 6851, 1989)。

【0032】

本発明は、本発明による少なくとも一つの免疫原性ペプチド、組成物または核酸分子を活性物質として含む薬物も含む。

10

【0033】

本発明の好ましい実施形態によれば、前記薬物はワクチンであり、特に治療ワクチンである。

【0034】

本発明による薬物は、免疫療法において通常使用され、例えば活性物質の投与、その安定化、その免疫原性の増加などを促進する一般的な賦形剤およびアジュバントをさらに含む。使用可能なアジュバントの例には、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、アポトーシス誘導因子 (AIF; apoptosis-inducing factor)、熱ショックタンパク質 (HSP; heat shock proteins)、TLR3アゴニスト (ポリI:C) 等の toll 様受容体 (TLR; toll-like receptors)、IL-7、IL-12、IL-15 および GM-CSF ならびに CCL5 (RANTES) 等のサイトカインおよびケモカインが含まれる。

20

【0035】

本発明は、本発明による免疫原性ペプチドの混合物の同定を示した非限定的な例に言及する以下のさらなる説明の助けを借りてよりよく理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】プレプロカルシトニンの完全な配列に対する配列番号1~7のペプチドの位置を示す。

30

【図2A】配列番号4~7のペプチドを用いた患者のPBMCの *in vitro* 刺激を示す。A~C: 9人の肺非小細胞癌 (NSCLC; non-small cell lung cancer) 患者のPBMCをそれぞれ4つのペプチドで刺激した後、CD8<sup>+</sup>/IFN<sup>+</sup>細胞の数をフローサイトメトリで分析した。各ポイント(n)は、8つの独立した刺激ウェルに対応する。各患者および各ペプチドのこれらのポイント(n=12)の中央値を表す。統計的に有意な増加を示す (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.005)。

【図2B】配列番号4~7のペプチドを用いた患者のPBMCの *in vitro* 刺激を示す。A~C: 9人の肺非小細胞癌 (NSCLC; non-small cell lung cancer) 患者のPBMCをそれぞれ4つのペプチドで刺激した後、CD8<sup>+</sup>/IFN<sup>+</sup>細胞の数をフローサイトメトリで分析した。各ポイント(n)は、8つの独立した刺激ウェルに対応する。各患者および各ペプチドのこれらのポイント(n=12)の中央値を表す。統計的に有意な増加を示す (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.005)。

40

【図2C】配列番号4~7のペプチドを用いた患者のPBMCの *in vitro* 刺激を示す。A~C: 9人の肺非小細胞癌 (NSCLC; non-small cell lung cancer) 患者のPBMCをそれぞれ4つのペプチドで刺激した後、CD8<sup>+</sup>/IFN<sup>+</sup>細胞の数をフローサイトメトリで分析した。各ポイント(n)は、8つの独立した刺激ウェルに対応する。各患者および各ペプチドのこれらのポイント(n=12)の中央値を表す。統計的に有意な増加を示す (\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*

50



\*  $p < 0.005$  )。

【図3】HLA-A2分子のトランスジェニックマウスモデルにおいて *in vitro* および *in vivo* で試験した異なるペプチドの組み合わせのまとめを示す。

【図4A】9~10個のアミノ酸の短鎖ペプチドまたは異なるペプチドの組み合わせによる患者のPBMCの *in vitro* 刺激を示す。A~C:患者3(A)、10(B)および11(C)のPBMCを、配列番号4~6のペプチドのうちの一つだけにより、または図3に記載の組み合わせ1~6のうちの一つにより刺激し、その後IFN $\gamma$ 分泌細胞の数をELISPOTにより分析した。統計的に有意な増加を示す(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ )。

【図4B】9~10個のアミノ酸の短鎖ペプチドまたは異なるペプチドの組み合わせによる患者のPBMCの *in vitro* 刺激を示す。A~C:患者3(A)、10(B)および11(C)のPBMCを、配列番号4~6のペプチドのうちの一つだけにより、または図3に記載の組み合わせ1~6のうちの一つにより刺激し、その後IFN $\gamma$ 分泌細胞の数をELISPOTにより分析した。統計的に有意な増加を示す(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ )。

【図4C】9~10個のアミノ酸の短鎖ペプチドまたは異なるペプチドの組み合わせによる患者のPBMCの *in vitro* 刺激を示す。A~C:患者3(A)、10(B)および11(C)のPBMCを、配列番号4~6のペプチドのうちの一つだけにより、または図3に記載の組み合わせ1~6のうちの一つにより刺激し、その後IFN $\gamma$ 分泌細胞の数をELISPOTにより分析した。統計的に有意な増加を示す(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ )。

【図5A】異なるペプチドの組み合わせを使用したHLA-A2分子のトランスジェニックマウスの免疫化を示す。A.単独または組み合わせでの各ペプチドによる脾細胞の *ex vivo* 再刺激後のCD8 $\gamma$ /IFN $\gamma$  Tリンパ球の割合。B', B'' および B''' .異なるペプチドの組み合わせ(C1~C6)によるマウスの免疫化後のCD8 Tリンパ球の細胞障害性応答。

【図5B-1】異なるペプチドの組み合わせを使用したHLA-A2分子のトランスジェニックマウスの免疫化を示す。A.単独または組み合わせでの各ペプチドによる脾細胞の *ex vivo* 再刺激後のCD8 $\gamma$ /IFN $\gamma$  Tリンパ球の割合。B', B'' および B''' .異なるペプチドの組み合わせ(C1~C6)によるマウスの免疫化後のCD8 Tリンパ球の細胞障害性応答。

【図5B-2】異なるペプチドの組み合わせを使用したHLA-A2分子のトランスジェニックマウスの免疫化を示す。A.単独または組み合わせでの各ペプチドによる脾細胞の *ex vivo* 再刺激後のCD8 $\gamma$ /IFN $\gamma$  Tリンパ球の割合。B', B'' および B''' .異なるペプチドの組み合わせ(C1~C6)によるマウスの免疫化後のCD8 Tリンパ球の細胞障害性応答。

【図5B-3】異なるペプチドの組み合わせを使用したHLA-A2分子のトランスジェニックマウスの免疫化を示す。A.単独または組み合わせでの各ペプチドによる脾細胞の *ex vivo* 再刺激後のCD8 $\gamma$ /IFN $\gamma$  Tリンパ球の割合。B', B'' および B''' .異なるペプチドの組み合わせ(C1~C6)によるマウスの免疫化後のCD8 Tリンパ球の細胞障害性応答。

【図6】HLA-A2分子のトランスジェニックマウスモデルにおけるペプチドの組み合わせC6の抗腫瘍効果を示す。1 $\times$ 10 $^6$ 個のD122-ppCT腫瘍細胞を、0日目(D0)にトランスジェニックマウスの側腹部皮下に移植した。その後、D0、D3、D4およびD14に、組み合わせC6に含まれる各ペプチド100 $\mu$ Mおよびアジュバント25 $\mu$ gを用いてマウスの皮下にワクチン接種した。腫瘍のサイズは、長さ $\times$ 幅 $\times$ 深さの式により定義する。腫瘍成長の統計的に有意な差を示す(\*  $p < 0.05$ )。

【図7A】組み合わせ免疫療法による抗腫瘍応答および腫瘍成長制御の強化を示す。A.組み合わせ療法が腫瘍成長の制御を最適化する。NOD-scid Il2r $^{-/-}$  (NSG)マウスの側腹部にHeu-nIR腫瘍断片を移植した後、10日目に健常ドナ

10

20

30

40

50

ーからのヒトPBM Cを養子移入し、その後11日目にペプチド混合物C6に基づくワクチンを用いた静脈内ワクチン接種を、12日目からの抗PD1モノクローナル抗体と組み合わせて、または組み合わせずに行った。実験の終わりまで、二日ごとに腫瘍成長を記録した。

【図7B】B．組み合わせ療法（ワクチン+抗PD-1）で処置したマウスは、ワクチンのみ（\* p < 0.04）または抗PD-1のみ（\* p < 0.03）で処置したマウスと比較して、腫瘍重量の最も強い減少がみられた。

【図7C】C．in vivo組み合わせ療法により誘導されるサイトカイン産生。実験の終了前に処置または無処置マウスの血清中のヒトIFN- $\gamma$  プラスミド濃度をELISAにより決定した（\* p < 0.01）。

【図7D】D．処置および無処置マウスの脾細胞によるIFN- $\gamma$ 、グランザイムB（GrmB）およびパーフォリン（Perf）の産生IFN- $\gamma$ 、グランザイムB（GrmB）およびパーフォリン（Perf）を産生するCD8<sup>+</sup>T細胞を、細胞内蛍光分析により評価した。値は、平均蛍光強度（MFI；mean fluorescence intensity）に対応する。\* p < 0.05；\*\* p < 0.001。

【図8A】組み合わせ免疫療法による腫瘍成長制御の強化を示す。A．組み合わせ療法が腫瘍成長の制御を最適化する。NOD-scid Il2r<sup>nu11</sup>（NSG）マウスの側腹部にHeu-nIR腫瘍断片を移植した後、10日目に健常ドナーからのヒトPBM Cを養子移入し、その後11日目にペプチド混合物C6aに基づくワクチンを用いた静脈内ワクチン接種を、12日目からの抗PD1モノクローナル抗体と組み合わせて、または組み合わせずに行った。実験の終わりまで、二日ごとに腫瘍成長を記録した。

【図8B】B．組み合わせ療法（ワクチン+抗PD-1）で処置したマウスは、抗PD-1のみで処置したマウスと比較して腫瘍重量の最も強い減少がみられた。

【実施例】

【0037】

実施例1 プレプロカルシトニンの9または10アミノ酸ペプチドによる患者のPBM Cのin vitro刺激

【0038】

材料および方法

ペプチド

以下のペプチドを選択した：

- ppCT9-17 FLALSILVL（配列番号4）；
- ppCT16-25 VLLQAGSLHA（配列番号5）；
- ppCT50-59 LLAAALVQDYV（配列番号6）；
- ppCT91-100 CMLGTYTQDF（配列番号7）。

【0039】

使用した細胞および刺激

Ficollにより11人の肺非小細胞癌（NSCLC）患者の末梢血単核細胞（PBM C；peripheral blood mononuclear cells）を末梢血から分離した。ペプチドごとに、20 $\mu$ MのペプチドによりPBM Cを二回（D0およびD7）刺激した。PBM Cを96ウェルプレートで2週間、2,000万細胞/プレートの割合で、完全培地（RPMI1640、10%SAB、1%ピルビン酸ナトリウム、0.1%ペニシリン/ストレプトアビジン）でIL-2（20IU/ml）+IL-4（10ng/ml）+IL-7（10ng/ml）の存在下で培養した。

【0040】

サイトメトリによる分析

15日後に、PBM Cを、100 $\mu$ g/mlのプレフェルジンAの存在下で、第一刺激ステップの間に使用したペプチド2.5 $\mu$ Mで再び刺激し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で6時間インキュベートした。その後、細胞を抗CD8-APC抗体で20分間インキュベートし、その後PBS中で洗浄し、PBS-ホルムアルデヒド2%で固定し、BSA/サポニン

10

20

30

40

50

により透過処理する。その後、細胞を抗IFN- $\gamma$ -PE抗体でインキュベートする。フローサイトメトリにより分析を行う。マン-ホイットニー検定を用いて統計研究を行い、統計的に有意な増加を示す(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ )。

【0041】

結果

結果を図2に示す。

【0042】

様々な9または10アミノ酸ペプチドによる刺激に対する応答のフローサイトメトリによる分析により、ppCT9-17、ppCT16-25、ppCT50-59およびppCT91-100ペプチドによる刺激が被験患者のCD8<sup>+</sup>/INF $\gamma$ <sup>+</sup>Tリンパ球のベースレベルの1~4.5倍の増加をもたらすことが示された。異なる刺激ウェルの分析により、このCD8<sup>+</sup> INF $\gamma$ <sup>+</sup> Tリンパ球の増加が統計学に有意であることが示された(\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.005$ )。しかしながら、異なる患者が各ペプチドに同じように応答するわけではない。患者1、2、6、8および9は、試験した全てのペプチドによる刺激の後にCD8<sup>+</sup> Tリンパ球によるINF $\gamma$ の分泌を誘発するが、患者4、5および7は、ペプチドppCT9-17およびppCT50-59による刺激の後にのみリンパ球応答を誘発し、患者3はペプチドppCT50-59およびppCT91-100で応答を誘発する。

10

【0043】

結論として、ペプチドは被験患者によっては免疫原性であり、CD8<sup>+</sup> Tリンパ球を介した免疫応答を可能にするようである。異なるペプチドに対する応答のばらつき故に、ペプチドの組み合わせは、含まれる患者の大多数において抗ppCT応答を誘導する可能性がより高いと考えられる。

20

【0044】

実施例2 短鎖9AAまたは10AAペプチドまたは異なるペプチドの組み合わせによる患者のIN VITRO刺激

【0045】

材料および方法

ペプチド

以下のペプチドを選択した：

- ppCT1-15 : MGFQKFSPLALSIL (配列番号1) ;
- ppCT71-85 : EREGSSLDSPRSKRC (配列番号2) ;
- ppCT86-100 : GNLSSTCMLGTYTQDF (配列番号3) ;
- ppCT9-17 FLALSILVL (配列番号4) ;
- ppCT16-25 VLLQAGSLHA (配列番号5) ;
- ppCT50-59 LLAAALVQDYV (配列番号6) ;
- ppCT91-100 CMLGTYTQDF (配列番号7)。

30

【0046】

使用した細胞および刺激

Ficollにより3人の肺非小細胞癌患者の末梢血単核細胞(PBMC)を末梢血から分離し、その後、図3に記載の各ペプチド20 $\mu$ Mで、または等モル濃度の20 $\mu$ Mの各ペプチドで、二回(D0およびD7)刺激した。PBMCを96ウェルプレートで2週間、2,000万細胞/プレートの割合で、完全培地(RPMI1640、10%SAB、1%ピルビン酸ナトリウム、0.1%ペニシリン/ストレプトアビジン)でIL-2(20IU/ml)+IL-4(10ng/ml)+IL-7(10ng/ml)の存在下で培養する。

40

【0047】

E L I S P O Tによる分析

15日後にPBMCを回収し、ELISPOTプレートで100,000細胞/ウェル

50

の割合で、2.5 μMの各ペプチドまたは刺激のために使用した2.5 μMの各ペプチドの等モルの組み合わせを含む培地の存在下でインキュベートする。プレートを、37 °Cおよび5% CO<sub>2</sub>で15~18時間インキュベートする。製造業者の指示(Gen-Probe Diacclone)にしたがってIFNスポットを明らかにする。C.T.L Immunospotシステム(Cellular Technology Ltd)を使用して、IFN分泌細胞により形成されるスポットを計数および分析する。マン-ホイットニー検定を用いて統計研究を行い、統計的に有意な増加を示す(\* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.005)。

【0048】

#### 結果

結果は図4に示される。

10

【0049】

図3に記載の組み合わせを使用した3人の患者のPBMCの刺激後のIFN分泌細胞の数の分析により、異なる組み合わせがこれらのペプチドによる特定のリンパ球の刺激については増幅を可能にすることが示された。実際、患者11では3つの組み合わせで、患者10では4つの組み合わせで、患者3では6つの組み合わせで、IFN分泌細胞の数の有意な増加が観察される。

【0050】

さらに、組み合わせC2、C5およびC6による刺激は、ペプチド単独による刺激と比較してもIFN分泌細胞の数を増加させる。これらの応答は、患者に依存する。実際、組み合わせC2、C5およびC6による患者3のPBMCの刺激は、IFN分泌細胞の数をC2で6倍、C5で3倍、C6で2倍増加させる一方、患者10については、組み合わせC2によるPBMCの刺激のみがIFN分泌細胞の数を3倍増加させ、組み合わせC5およびC6による患者11のPBMCの刺激は、IFN分泌細胞の数をC5で3倍、C6で2倍増加させる。

20

【0051】

この結果は、ppCT抗原に由来する複数のペプチドの組み合わせがCD8 Tリンパ球により進行する免疫応答を増加させることを示す。さらに、これらの結果は、大多数の患者において免疫応答を誘起するための、一つのペプチドと比較したペプチドの組み合わせを使用する利点も示す。

30

【0052】

実施例3 異なるペプチドの組み合わせによるトランスジェニックマウスの免疫化

【0053】

#### 材料および方法

##### ペプチド

以下のペプチドを選択した：

- ppCT1-15：MGFQKFSPLALSIL（配列番号1）；
- ppCT71-85：EREGSSLDSPRSKRC（配列番号2）；
- ppCT86-100：GNLSTCMLGTYTQDF（配列番号3）；
- ppCT9-17 FLALSILVL（配列番号4）；
- ppCT16-25 VLLQAGSLHA（配列番号5）；
- ppCT50-59 LLAA LVQDYV（配列番号6）；
- ppCT91-100 CMLGTYTQDF（配列番号7）。

40

【0054】

#### 使用した細胞

抗原ppCTを発現する（甲状腺腫瘍からの）ヒトT腫瘍細胞株および（患者HeuのNSCLC腫瘍から分離された）IGR-Heu腫瘍細胞株を標的細胞として使用する。（慢性骨髄性白血病の患者からの）K562細胞株を陰性対照として使用する。（患者HeuのBリンパ球からの）Heu-EBV株を溶解の特異性を決定するために使用する。<sup>51</sup>Crで標識後、Heu-EBV細胞を、（図4に記載される）20 μMの各ペ

50

プチドを含む等モル混合物でインキュベートする。

【0055】

マウスの免疫化

H L A - A 2分子のトランスジェニックマウスに、100 μ Mの各ペプチドの等モル混合物を含む100 μ lのペプチドの組み合わせとアジュバント(25 μ gのPoly(I : C))とを用いて、側腹部皮下に4回(D0、D7、D14およびD21)免疫化を行った(図4)。最初の注射の28日後に、マウスを屠殺して脾細胞を回収し、完全培地(RPMI 1640、10% FBS、1%ピルビン酸ナトリウム、0.1%ペニシリン/ストレプトアビジン)でIL-2(20 IU/ml)の存在下で一晩培養した。

【0056】

サイトメトリによる分析および細胞障害性テストによる分析

翌日、10 μ g/mlのブレフェルジンAの存在下で、単独または組み合わせでの2.5 μ Mの各ペプチドで脾細胞を刺激し、37、5%CO<sub>2</sub>で6時間インキュベートした。その後、細胞を抗CD8-PE抗体で20分間インキュベートし、その後PBS中で洗浄し、PBS-ホルムアルデヒド2%で固定し、BSA/サポニンで透過処理する。その後、細胞を抗IFN-γ-APC抗体でインキュベートする。フローサイトメトリにより分析を行う。

【0057】

細胞毒性活性の分析のために、ネガティブディプリション(Miltenyi Biotech)により脾細胞からCD8 Tリンパ球を分離した。このように得られたCD8 Tリンパ球の細胞毒性活性を、クロム51(<sup>51</sup>Cr)溶出試験により評価した。標的細胞(上記の段落に記載)を、20 μ Mの<sup>51</sup>Crの存在下で、37で1時間インキュベートする。その後、細胞をRPMIで洗浄した後、50:1、25:1および12:1のエフェクタ/標的比でCD8 Tリンパ球とともに37で共培養する。4時間のインキュベーションの後、共培養上清中に溶出した<sup>51</sup>Crの濃度を測定する。以下の式を用いて溶解率を計算する:

【0058】

【数1】

$$\text{溶解率} = \frac{(\text{クロム溶出} - \text{最小クロム溶出})}{(\text{最大クロム溶出} - \text{最小クロム溶出})} \times 100$$

【0059】

結果

ペプチドの組み合わせC1~C6によるマウスの免疫化後に分離された脾細胞のフローサイトメトリ分析は、IFN-γを発現するCD8 Tリンパ球の割合の増加を示す(図5A)。この増加は使用される組み合わせに依存し、3~13倍(C1で4.8倍、C2で3倍、C3で3.4倍、C4で5.5倍、C5で4.3倍およびC6で13.6倍)の変化を含む。これらの結果は、異なるペプチドの組み合わせによるトランスジェニックマウスの免疫化が、CD8 Tリンパ球の誘導を通じて免疫応答の進行を可能にすることを示す。

【0060】

さらに、組み合わせからの各ペプチドによるex vivo刺激により、組み合わせのさらなる効果を示される。組み合わせC1では、ex vivo刺激後の応答が、ペプチドppCT1-15、ppCT71-85およびppCT86-100によるex vivo刺激と比較してそれぞれ4.2倍、5.2倍および4.6倍に増加することが分かる。全ての組み合わせでCD8 Tリンパ球を介した免疫応答の有効性について同じ観察がなされうる。にもかかわらず、いずれの組み合わせもペプチドppCT50-59に対する効果は示さないが、これはペプチドppCT50-59が自然に誘導する強い応答に特に起因するものである。

10

20

30

40

50

## 【0061】

最後に、ペプチドの組み合わせによるマウスの免疫化により生成されたCD8 Tリンパ球は、IGR-HeuおよびTT等の抗原ppCTを発現する細胞を特異的様式で認識および溶解することができる(図5B)。実際、図5Bは、非免疫化マウスの脾細胞からのCD8 Tリンパ球は、免疫化マウスの脾細胞からのCD8 Tリンパ球と異なり、IGR-Heu腫瘍株もTT腫瘍株も溶解できないことを示す。免疫化条件に応じて、リンパ球は、抗原ppCTを発現する細胞を7~15%溶解する。K562細胞またはHeu-EBV細胞にペプチドの組み合わせがロードされた場合を除き、Tリンパ球はK562細胞またはHeu-EBV細胞を溶解しない。この結果は、抗原ppCTを発現する腫瘍細胞に対して得られた溶解の特異性を示す。

10

## 【0062】

トランスジェニックマウスの免疫化により得られた全ての結果が、ペプチドの組み合わせの使用によりCD8 Tリンパ球が抗原ppCTを発現する細胞に対して及ぼす免疫応答が活性化および増加しうることを示す。

## 【0063】

実施例4 組み合わせC6によるトランスジェニックマウスのワクチン接種

## 【0064】

材料および方法

ペプチド

以下のペプチドを選択した：

- ppCT1-15 : MGFQKFSPLALSIL (配列番号1)；
- ppCT86-100 : GNLSSTCMLGTYTQDF (配列番号3)；
- ppCT9-17 FLALSILVL (配列番号4)；
- ppCT16-25 VLLQAGSLHA (配列番号5)；
- ppCT50-59 LLAAALVQDYV (配列番号6)。

20

## 【0065】

使用した細胞

分子HLA-A2(株D122)のトランスジェニックマウス株LL2(ルイス肺癌種)に、GFPを発現しヒト抗原ppCTをコードするレンチウイルスに感染させた。その後、 $10^6$ 個の細胞をマウスの側腹部の皮下に注入した。

30

## 【0066】

マウスの免疫化

HLA-A2分子のトランスジェニックマウスに、 $100\mu\text{M}$ の各ペプチドの等モル混合物を含む $100\mu\text{l}$ のペプチドの組み合わせC6とアジュバント( $25\mu\text{g}$ のPoly(I:C))とを用いて、側腹部皮下に4回(D0、D4、D7およびD14)ワクチン接種を行った。

## 【0067】

腫瘍成長のモニタリング

腫瘍細胞の移植後、マウスの体重を毎日モニタリングし、腫瘍を7日目から開始して2~3日毎に測定した。サイズを次の方法で $\text{mm}^3$ で計算する：長さ×幅×深さ。統計的に有意な腫瘍成長差をt検定により計算し示す(\* $p < 0.05$ )。

40

## 【0068】

結果

ppCTを発現する腫瘍を有するHLA-A2分子のトランスジェニックマウスモデルにおいて、組み合わせC6によるワクチン接種は、ワクチン接種していないマウスと比較して有意な腫瘍成長の減少を誘導する。実際、21日の終わりには、ワクチン接種した三匹中一匹のマウスが $190\text{mm}^3$ のサイズの腫瘍を有し、三匹の対照マウスは $350\text{mm}^3$ の平均サイズの腫瘍ができていた(図6)。

## 【0069】

この結果は、ppCTを発現する腫瘍に対して有効な免疫応答を生成する組み合わせC

50

6によるワクチン接種の能力を示し、抗腫瘍免疫療法においてこれらの組み合わせを使用する利点を示す。

【0070】

実施例5 組み合わせC6のみまたは抗PD-1と組み合わせた組み合わせC6によるヒト化マウスのワクチン接種

【0071】

材料および方法

マウス、ヒト腫瘍移植およびヒトPBMCの移入。

生後3~4週のNOD-scid IL2r<sup>nu11</sup>マウス(NSG; Jackson Laboratory)に、Tリンパ球による腫瘍の浸潤および標的細胞と相互作用する能力を最適化するために炎症性細胞遊走因子CCL5(RANTES)および接着分子ICAM-1で予めトランスフェクションし、ヌードマウス(Franciszkiewicz et al., Cancer Res. 2009, 69, 6249-6255)に維持したヒト腫瘍細胞株IGR-Heuの移植により生成されたヒト腫瘍Heu-nIRを皮下移植した。それから10日後に腫瘍が触知可能となったときに、抗原ペプチドppCTに対するCD8<sup>+</sup>T細胞の応答を誘導する能力を*in vitro*で予め試験した健常同種異系ヒトドナーからの2.10<sup>7</sup>個の末梢血単核細胞(PBMC)をマウスの尾に静脈内注入した。その後、T細胞の生存を促進するために組換えIL-15(3μg/マウス/日)を腹腔内投与した。

10

【0072】

ペプチド

使用したペプチドは、

- HLA-A拘束性エピトープを含むペプチドppCT9-17、ppCT16-25およびppCT50-59と長鎖ペプチドppCT1-15およびppCT86-100とからなる組み合わせC6、ならびに

- 組み合わせC6のペプチドを同様に含み、HLA-B7拘束性の三つのペプチド: ppCT7-15(配列番号19)、ppCT46-54(配列番号20)およびppCT79-88(配列番号21)を含む、組み合わせC6a

である。

20

【0073】

マウスの免疫化および腫瘍成長のモニタリング

Heu-nIR腫瘍移植およびPBMCの養子移入を受けたNSGマウスに、PBMCの移入から一日後に、各ペプチドの等モル混合物とアジュバント(25μgのポリ(I:C))とを含む100μlのペプチドの組み合わせC6またはC6aを用いて、一週間間隔で2回ワクチン接種した。組み合わせ療法のために、ワクチン接種したマウスを、PBMCの移入の二日後から二日毎に、抗hPD-1抗体(220mg/注入)または同じアイソタイプの対照抗体(220mgの非関連hIgG4)で静脈内処置した。

30

【0074】

移植片対宿主病(GVHD; graft-versus-host disease)を回避するために3または4週間だけマウスの体重を毎日モニタリングし、腫瘍を2日毎に測定した。実験の最終日にマウスの屠殺前に血漿サンプルをとり、使用まで-80で保存した。マウスを屠殺し、腫瘍を秤量した後、フローサイトメトリによる浸潤Tリンパ球(TIL; infiltrating T lymphocytes)の分析のために分離した。並行して脾臓のサンプルをとり、ペプチドの組み合わせでの*ex vivo*刺激の後にガンインターフェロン(IFN-)を分泌する脾細胞の能力を試験した。

40

【0075】

ELISA試験

ワクチン接種したマウスおよびワクチン接種していないマウスの血漿中ヒトIFN-濃度を、市販のELISAキット(Human IFN- ELISA Set; BD OptEIA(商標), BD Biosciences)を使用して、製造業者の推奨

50

にしたがって測定した。すべてのサンプルをデュプリケートで測定した。

【0076】

#### 抗体および免疫蛍光分析

使用した抗体は、ヒトモノクローナル抗体抗CD45、CD3、CD8、CD4、CD44、PD-1、パーフォリン、グランザイムBおよびIFN- $\gamma$ 、ならびにアイソタイプのマウスおよびウサギ対照(Miltenyi)ならびにヒトモノクローナル抗体抗CD69、CD62L、CD49a、CD45ROおよびCCR7(Invitrogen)である。ヒトモノクローナル抗体抗PD-1および同じいずれかのタイプの非関連対照抗体でブロック実験を行った。これらの表現型分析は、BD(商標)LSRIIFローサイトメータを用いて、直接免疫蛍光法によって行った。FlowJo(登録商標)ソフトウェアを使用してデータを分析した。

10

【0077】

#### 統計分析

Prism6.0ソフトウェア(GraphPad software)を使用して統計分析を行った。異なる群からの結果を、独立サンプルのt検定を用いて比較する。両側試験で $P < 0.05$ の値が統計的に有意であると考えられる。

【0078】

#### 結果

ブレプロカルシトニンの抗原ペプチドに基づくペプチドワクチンの抗腫瘍効果を、ヒト化マウスモデルNOD-scid Il2r<sup>nu11</sup>(NSG)で評価した。活性Tリンパ球の枯渇を逆転させ、癌に対するワクチンの有益な治療効果を有利に強化するために、この能動免疫療法戦略を臨床的に使用される抗PD1モノクローナル抗体と組み合わせた。NSGマウスに、Heu-nIR腫瘍を移植後、健常HLA-A2+ドナーからのPBMCの養子移入を行い、それから組み合わせC6またはC6aに基づくワクチンを単独で、またはPD-1免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせ用いて免疫化した。

20

【0079】

結果は、組み合わせ免疫療法によるヒト化マウスの処置により、単独療法のそれぞれよりもはるかに強い腫瘍成長に対する応答が誘導されることを示す(図7A)。腫瘍成長の制御は、ワクチンまたは抗PD1単独で処置したマウスと比較して、組み合わせ療法で処置したマウスの腫瘍の重量の減少と相関する(図7B)。

30

【0080】

それから三つのマウス群によるヒトIFN- $\gamma$ の産生を評価して、腫瘍成長の減少が免疫応答の増加に関連するか否かを分析した。組み合わせ免疫療法で処置したマウスの血清では、各療法単独で処置したマウスと比較して、血漿中ヒトIFN- $\gamma$ 濃度の2倍の増加が検出された(図7C)。加えて、組み合わせ療法で処置したマウスの脾細胞の細胞内染色は、CD8+T細胞がIFN- $\gamma$ 、グランザイムBおよびパーフォリンをより高いレベルで発現することを示す(図7D)。これらの結果は、二つの単独療法と比較して、組み合わせ療法は腫瘍の成長を制御するためにより有効であり、この効果がT細胞のより有効な機能と相関することを示す。

【0081】

試験したペプチドの二つの組み合わせ、すなわちHLA-A2拘束性ペプチドと長鎖ペプチドとを含む組み合わせC6(図7Aおよび7B)、および組み合わせC6のペプチドに加えてHLA-B7拘束性ペプチドも含む組み合わせC6a(図8Aおよび8B)により、組み合わせ療法の抗腫瘍効果を観察する。

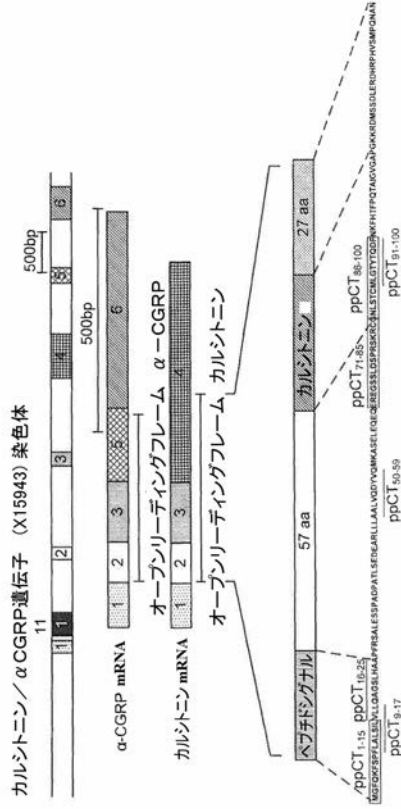
40

【0082】

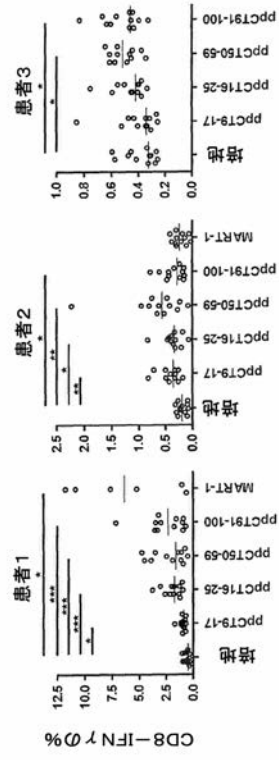
組み合わせアプローチは、腫瘍成長の減少と相関する、CD8 T細胞によるIFN- $\gamma$ の分泌および活性T細胞による腫瘍の浸潤の増加を誘導する。したがって、組み合わせ療法は、CD8 T細胞免疫または従来免疫療法を逃れた腫瘍を治療するための興味深い戦略である。



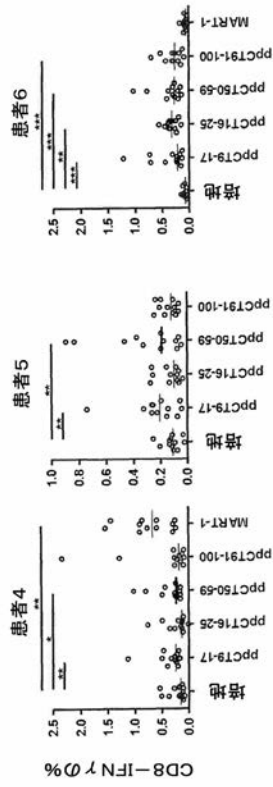
【 図 1 】



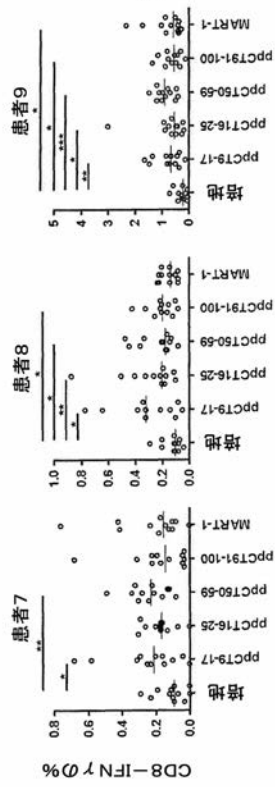
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 2 C 】





【 図 5 B - 1 】

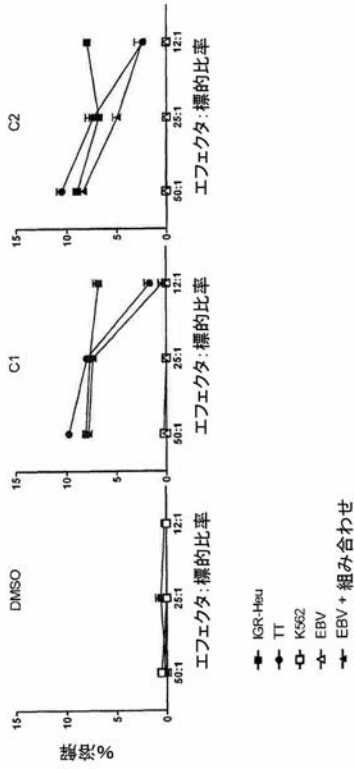


図5B'

【 図 5 B - 2 】

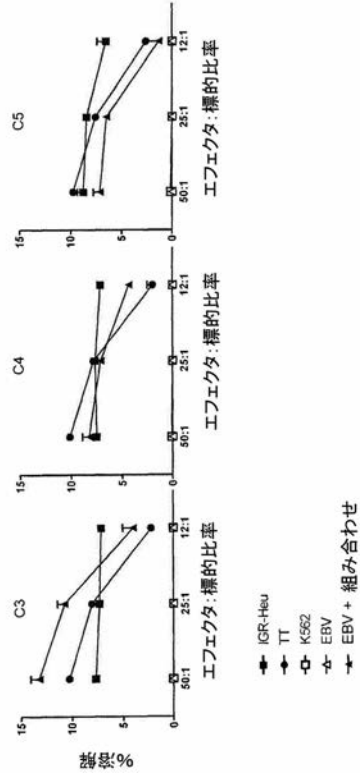


図5B''

【 図 5 B - 3 】

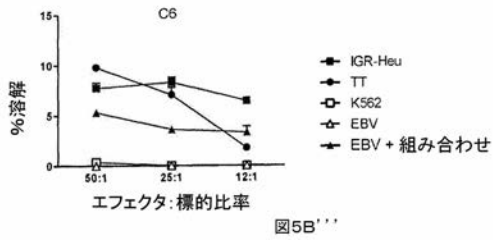
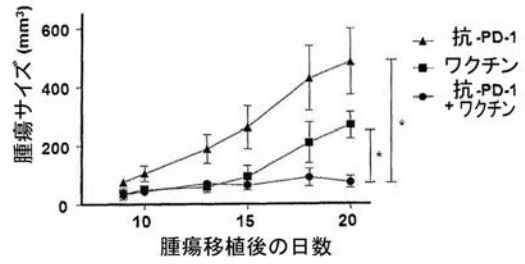
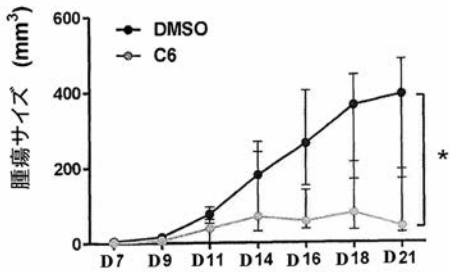


図5B'''

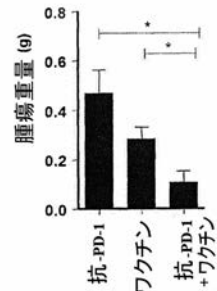
【 図 7 A 】



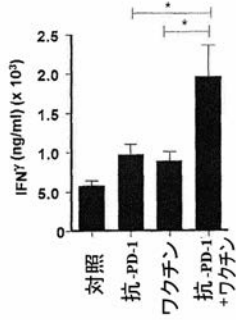
【 図 6 】



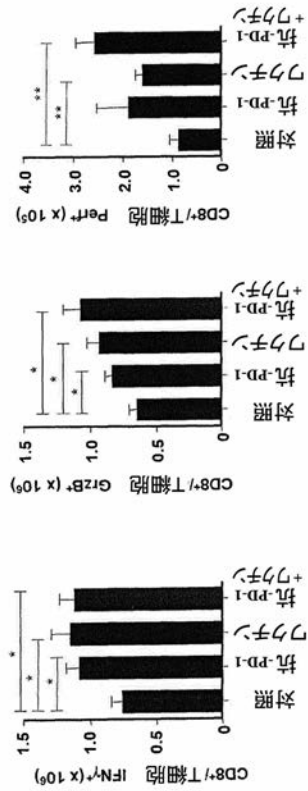
【 図 7 B 】



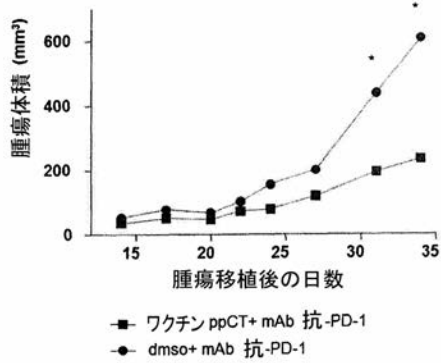
【 図 7 C 】



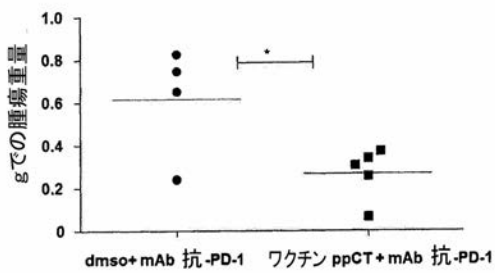
【 図 7 D 】



【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【配列表】

2018520152000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2016/065733

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/75179 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]; ROUSSY INST) 11 October 2001 (2001-10-11) page 9, peptide 28-36 page 11, peptides 9-17 et 16-25 page 15, peptide 91-100 page 20, last paragraph - page 21, last paragraph claim 14 ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 July 2016		05/08/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Mata Vicente, Teresa

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/065733

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PAPEWALIS C ET AL: "Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma",  HORMONE AND METABOLIC RESEARCH,  vol. 40, no. 2, February 2008 (2008-02),  pages 108-116, XP008173300,  ISSN: 0018-5043  page 113, right-hand column, last paragraph - page 114, paragraph 1  page 115</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/065733

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0175179	A2	11-10-2001	AU 5385201 A	15-10-2001
			EP 1301624 A2	16-04-2003
			WO 0175179 A2	11-10-2001
-----				



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/065733

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. A61K39/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/75179 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]; ROUSSY INST) 11 octobre 2001 (2001-10-11) page 9, peptide 28-36 page 11, peptides 9-17 et 16-25 page 15, peptide 91-100 page 20, dernier alinéa - page 21, dernier alinéa revendication 14  ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
29 juillet 2016		05/08/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Mata Vicente, Teresa

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/065733

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PAPEWALIS C ET AL: "Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma",  HORMONE AND METABOLIC RESEARCH,  vol. 40, no. 2, février 2008 (2008-02),  pages 108-116, XP008173300,  ISSN: 0018-5043  page 113, colonne de droite, dernier  alinéa - page 114, alinéa 1  page 115  -----</p>	1-17

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2016/065733

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0175179	A2	AU 5385201 A	15-10-2001
		EP 1301624 A2	16-04-2003
		WO 0175179 A2	11-10-2001
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 35/26 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/26	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
	C 0 7 K 7/08	

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

(72)発明者 デュロー オレリー

フランス国 9 1 4 0 0 オルセー ケミン デュ ボイ デ ラメ 3 4 レジデンス レコ  
トー バット 7

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC20 BA30 CA45  
4C084 AA02 AA03 AA22 BA01 BA08 BA17 BA18 BA23 MA01 MA02  
NA05 NA14 ZA59 ZB09 ZB26 ZB27 ZC06  
4C085 AA03 AA13 AA14 EE03  
4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 MA02 NA05 NA14 ZA59 ZB09 ZB26  
ZB27 ZC06  
4H045 AA11 AA30 BA15 BA16 BA17 BA41 CA40 DA76 DA86 EA22  
EA28