明　細　書

発明の名称 ： ＷＴ１抗原ペプチドコンジュゲートワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、癌免疫療法の分野に属し、ペプチド分解酵素ＥＲＡＰ１によりトリミングを受け得る、ＷＴ１抗原タンパク質由来の癌抗原ペプチド前駆体を硫黄－硫黄共有結合を介して複合化した、細胞傷害性Ｔ細胞を効率的に誘導する複合化（コンジュゲート）ワクチンに関する。

背景技術

[0002] 生体による癌細胞の排除には、主として細胞性免疫、特に細胞傷害性Ｔ細胞（細胞傷害性Ｔリンパ球、Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔ－ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ、Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔ－ｃｅｌｌ。以下、ＣＴＬと称する）が重要な働きをしている。ＣＴＬは、癌抗原タンパク質由来の抗原ペプチド（癌抗原ペプチド）とＭＨＣクラスＩ分子により形成される複合体を認識した前駆体Ｔ細胞が分化増殖して生成されるものであり、癌細胞を攻撃する。

[0003] Ｗｉｌｍｓ腫瘍の癌抑制遺伝子ＷＴ１（ＷＴ１遺伝子）は、白血病および固形癌における新しい癌抗原タンパク質であると考えられている（非特許文献１参照）。

[0004] 当該ＷＴ１タンパク質に関して、例えば、以下のＭＨＣクラスＩに結合し提示される癌抗原ペプチドが報告されている（特許文献１、２参照）。

ＷＴ１$_{126-134}$ペプチド：ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu）（配列番号：２）、

ＷＴ１$_{235-243}$ペプチド：ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ（Cys-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu）（配列番号：３）、

ＷＴ１$_{10-18}$ペプチド：ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ（Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Pro-Ser-Leu）（配列番号：５）、

ＷＴ１$_{187-195}$ペプチド：ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ（Ser-Leu-Gly-Glu-Gln-Gln-Tyr-Ser-Val）（配列番号：６）、

ＷＴ１$_{302-310}$ペプチド：ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ（Arg-Val-Pro-Gly-Val-Ala-Pro-Thr-Leu）（配列番号：７）など。

[0005] 癌免疫療法においてヘルパーＴ細胞（ｈｅｌｐｅｒ　Ｔ　ｃｅｌｌ）の活性化も、ＣＴＬを含む他のＴ　ｃｅｌｌの機能亢進に重要である。一般的に、抗原タンパク質は細胞内リソソームで分解され、１３～１７残基程度のアミノ酸からなるペプチドで構成される断片ペプチドの一部が、抗原ペプチドとしてＭＨＣクラスＩＩ分子に結合し、ｈｅｌｐｅｒ　Ｔ　ｃｅｌｌのＴＣＲ・ＣＤ３複合体へ提示されることでｈｅｌｐｅｒ　Ｔ　ｃｅｌｌを活性化する。ＷＴ１タンパク質に関して、例えば、以下のＭＨＣクラスＩＩに結合し提示される癌抗原ペプチドが報告されている（特許文献３～５参照）。

ＷＴ１$_{332-347}$ペプチド：ＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ（Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His）（配列番号：８）、

ＷＴ１$_{328-349}$ペプチド：ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ（Pro-Gly-Cys-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His-Thr-Gly）（配列番号：１０）、

ＷＴ１$_{122-140}$ペプチド：ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ（Ser-Gly-Gln-Ala-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-Pro-Ser-Cys-Leu-Glu-Ser）（配列番号：１１）など。

[0006] ＷＴ１のワクチン抗原として、主に抗原タンパク質そのものまたは前述したような抗原タンパク質由来の抗原ペプチドが用いられる（非特許文献２参照）。タンパク質を用いた癌ワクチンは、通常多様な癌抗原ペプチドを含むため、複数のＣＴＬやｈｅｌｐｅｒ　Ｔ　ｃｅｌｌを同時に誘導可能である一方で、安定した供給や品質の管理に課題を有するため、製造・品質管理が容易なペプチドが、ＷＴ１の癌抗原として汎用されている。しかし、一般的に、これまでのペプチドワクチンは、主に単一のＭＨＣクラスＩ提示ペプチド抗原で構成されており、ＣＴＬを効率良く誘導するには、更なる改良が必要である事が近年指摘されている（非特許文献３参照）。

[0007] その解決策の一つとして、多価抗原ペプチド提示型ＷＴ１ペプチド癌ワクチンが挙げられる。このようなペプチド癌ワクチンとしては、ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩに提示されるペプチド抗原を複数混合したカクテルワクチン（非特許文献４参照）、ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩに提示されるペプチド抗原をアミド結合で連結した長鎖ペプチドワクチンなどが報告されている（非特許文献５参照）。しかし、カクテルワクチンの場合、多様なアミノ酸から組成された各ペプチド抗原が様々な物性を示すため、効率良くそれらに対応するＣＴＬを誘導する最適な製剤の開発が困難である場合が多い。また、長鎖ペプチドワクチンの場合、タンパク質と同様にその製造に課題を抱える場合があり、さらに、長鎖ペプチドワクチンはクラスＩおよびクラスＩＩに提示されるペプチド抗原を任意のペプチドスペーサーを介して結合するため細胞内酵素による切断部位の制御および予測が困難である。一方で、２つのペプチド単量体が相互にジスルフィド結合により結合しているペプチド二量体が報告されている（特許文献６参照）。これらは、カクテルワクチンと異なり、単一ペプチド２つが結合されているため、単一の物性を有しかつ簡便に製造可能である。その一方で、複合化するには、ＷＴ１癌抗原ペプチドはそのアミノ酸配列内にシステインを含む必要があり、その汎用性は低い。さらに、癌抗原ペプチドのＮ末端システインを、システイン、グルタチオンまたはチオグリコール酸とジスルフィド結合で縮合させて得られた改変体も報告されている（特許文献７参照）。

[0008] ＭＨＣクラスＩへの癌抗原ペプチド提示には複数のペプチダーゼが関与する。それらペプチダーゼの内、Ｅｎｄｏｐｌａｓｍｉｃ ｒｅｔｉｃｕｌｕｍ ａｍｉｎｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ １（以下、ＥＲＡＰ１と称する）は、小胞体（Ｅｎｄｏｐｌａｓｍｉｃ ｒｅｔｉｃｕｌｕｍ。以下、ＥＲと称する）内のトリミング酵素の一つであり、特定の抗原ペプチド配列およびペプチドの長さを認識し、癌抗原ペプチド前駆体をＮ－末端から切断し、ＭＨＣクラスＩへの結合に最適な長さに調節することが報告されている（非特許文献６－８参照）。しかし、これまでに、ＥＲＡＰ１によるトリミング機能に

より、Ｎ－末端から長さ調節されるシステインを含むＷＴ１ペプチド癌抗原前駆体の報告はなかった。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第００／０６６０２号

特許文献2：国際公開第００／１８７９５号

特許文献3：国際公開第２００５／０４５０２７号

特許文献4：国際公開第２００７／０４７７６４号

特許文献5：国際公開第２００７／１２０６７３号

特許文献6：国際公開第２００４／０６３２１７号

特許文献7：国際公開第２００７／０６３９０３号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２０００；１６４（４）；１８７３－１８８０

非特許文献2：Ｔｈｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｓｔ，２０１２；１７（２）；２５０－２５９

非特許文献3：Ｃａｎｃｅｒ Ｊｏｕｒｎａｌ，２０１１；１７（５）；３４３－３５０

非特許文献4：Ｂｌｏｏｄ，２０１０；１６６（２）；１７１－１７９

非特許文献5：Ｃａｎｃｅｒｓ，２０１１；３；３９９１－４００９

非特許文献6：Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ，２００５；１０２（４７）；１７１０７－１７１１２

非特許文献7：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００９；１８３；５５２６－５５３６

非特許文献8：Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２０１０；１８４；４７２５－４７３２

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、ＣＴＬを効率良く誘導するＷＴ１コンジュゲートワクチンを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、コンジュゲートワクチンを採用することを検討する中で、ＷＴ１癌抗原ペプチドにシステインを付加することを着想し、さらにＥＲＡＰ１が、細胞内でのジスルフィド結合の還元的開裂により生じたＷＴ１癌抗原ペプチド前駆体のＮ－末端からシステインを切断し、癌抗原ペプチドへ効率良く変換することが、ｉｎ ｖｉｖｏ動物モデルでの薬理試験などの結果により強く示唆されることを確認したことで、体内でＣＴＬを誘導できる多価抗原ペプチド提示型コンジュゲートワクチンの発見に至り、本発明を完成した。

具体的には、上記課題の解決策を検討する過程で、異なる２つのＷＴ１癌抗原ペプチドを複合化する際に、必要なシステインを、ＭＨＣクラスＩへの抗原提示に影響することなく、Ｎ－末端またはＣ－末端へ任意の位置へ導入する方法を着想した。更なる検討の結果、ＷＴ１癌抗原ペプチドのＮ末端にシステインを含む０～５個のアミノ酸を導入したペプチドや、当該ペプチドのシステインを介したジスルフィド結合を含むコンジュゲート体を創製した。そして、当該ペプチドやコンジュゲート体が、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ ｖｉｖｏでＥＲＡＰ１によるトリミングを受け易く、その結果癌抗原ペプチドを生成することを、本発明者らが初めて確認し、本発明が完成された。

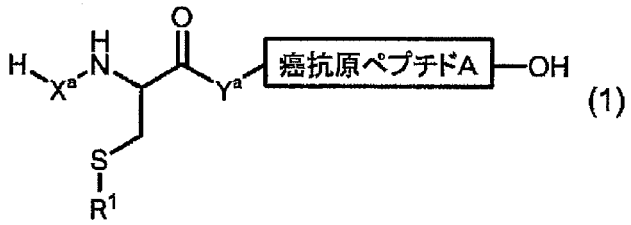
製造容易で、汎用性に優れ、かつＣＴＬを効率良く誘導する新規な多価ＷＴ１抗原ペプチド提示型ペプチド癌ワクチンの開発が望まれていたところ、本発明者らが発明したコンジュゲート体により、ＣＴＬが効率よく誘導され、物理化学的性質に優れ、製造が容易で、製造の管理も容易で、汎用性に優れたＷＴ１コンジュゲートワクチンを開発することが可能となった。

[0013] すなわち、本発明は、以下のものに関する。

[0014] １．第一態様

[0015] 項１．式（１）：

[0016] [化1]

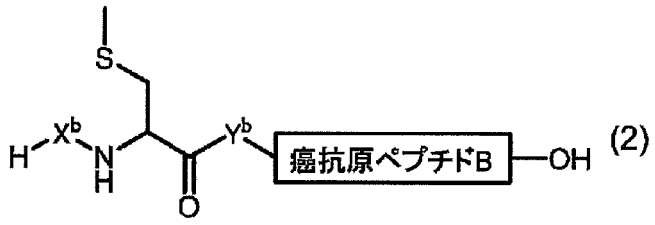


[0017] ［式中、X^aおよびY^aは、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表し、X^aのアミノ酸残基数とY^aのアミノ酸残基数の和は０～４の整数であり、

癌抗原ペプチドＡは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＡのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（１）中のY^aと結合し、癌抗原ペプチドＡのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１）中の水酸基と結合し、

R^1は、水素原子、式（２）：

[0018] [化2]



[0019] （式中、X^bおよびY^bは、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表し、X^bのアミノ酸残基数とY^bのアミノ酸残基数の和は０～４の整数であり、

癌抗原ペプチドＢは、癌抗原ペプチドＡとは配列が異なり且つ７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＢのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（２）中のY^bと結合し、癌抗原ペプチドＢのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（２）中の水酸基と結合し、

式（２）中のチオエーテル基が、式（１）中のチオエーテル基と結合する。）

で表される基、または癌抗原ペプチドＣを表し、

癌抗原ペプチドＣは、癌抗原ペプチドＡとは配列が異なり且つ１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドまたは１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基が式（１）中のチオエーテル基と結合する。

但し、R^1が水素原子である場合、式（１）で表される化合物の配列はＷＴ１タンパクの部分配列と同一ではない。］

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0020] 項２．X^aが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^aが単結合であるか、X^aおよびY^aが独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^aが単結合であり且つY^aが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^aが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^aが単結合であるか、X^aが単結合であり且つY^aが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、またはX^aおよびY^aが単結合である、項１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0021] 項３．X^aが単結合であり、Y^aが単結合、アラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である、項１または２に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0022] 項４．X^aが単結合または１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり、Y^aが単結合である、項１または２に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0023] 項５．X^aおよびY^aが単結合である、項１～４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0024] 項６．癌抗原ペプチドＡが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～５のいずれか一項に記載の化合物、ま

たはその薬学上許容される塩；

[0025] 項７．癌抗原ペプチドＡが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであるか、または配列番号：２、３、５、６および７の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドである、項１～６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0026] 項８．癌抗原ペプチドＡが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0027] 項９．R^1が水素原子である、項１～８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0028] 項１０．式（１）で表される化合物が、以下のアミノ酸配列：

ＣＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：１３）、

ＣＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：１４）、

ＣＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：１５）、

ＣＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：１６）、

ＣＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：１７）および

ＣＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：１８）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～９のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0029] 項１１．R^1が式（２）で表される基である、項１～８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0030] 項１２．X^bが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^bが単結合であるか、X^bおよびY^bが独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^bが単結合であり且つY^bが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^bが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^bが単結合であるか、X^bが単結合であり且つY^bが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、またはX^bおよびY^bが単結合である、項１～８および１１のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0031] 項１３．X^bが単結合であり、Y^bが単結合、アラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である、項１～８および１１～１２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0032] 項１４．X^bが単結合または１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり、Y^bが単結合である、項１～８および１１～１２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0033] 項１５．X^bおよびY^bが単結合である、項１～８および１１～１４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0034] 項１６．癌抗原ペプチドＢが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～８および１１～１５のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0035] 項１７．癌抗原ペプチドＢが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであるか、または配列番号：２、３、５、６および７の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドである、項１～８および１１～１６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0036] 項１８．癌抗原ペプチドＢが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

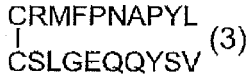
ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～８および１１～１７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0037] 項１９．式（１）で表される化合物が、式（３）：

[0038] [化3]



[0039] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８および１１～１８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0040] 項２０．R^1が癌抗原ペプチドＣである、項１～８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0041] 項２１．癌抗原ペプチドＣが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラス

Ｉ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～８および２０のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0042] 項２２．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）

を含むペプチドであるか、または配列番号：３のアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドである、項１～８および２０～２１のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0043] 項２３．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：

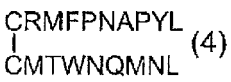
ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）および

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～８および２０～２２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0044] 項２４．式（１）で表される化合物が、式（４）：

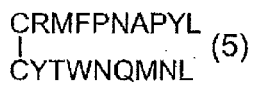
[0045] [化4]



[0046] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、または式（５）：

[0047] [化5]



[0048] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８および２０～２３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0049] 項２５．癌抗原ペプチドＣが１４～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～８および２０のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0050] 項２６．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであるか、または配列番号：１０～１１および１９～２４の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つヘルパーＴ細胞誘導活性を有するペプチドである、項１～８、２０および２５のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0051] 項２７．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

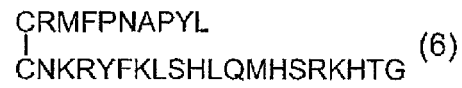
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～８、２０および２５～２６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0052] 項２８．式（１）で表される化合物が、式（６）：

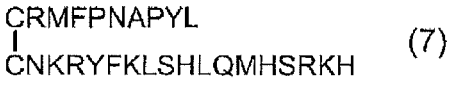
[0053] [化6]



[0054] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（７）：

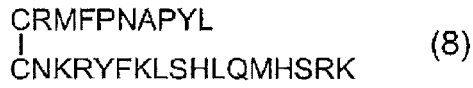
[0055] [化7]



[0056] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（８）：

[0057] [化8]



[0058] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物または式（９）：

[0059] [化9]



[0060] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８、２０および２５～２７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0061] 項２９．項１～２８のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩、および薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物；

[0062] 項３０．癌ワクチンとして使用される、項２９に記載の医薬組成物；

[0063] 項３１．項１～２８のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩の、癌ワクチンを製造するための使用；

[0064] 項３２．癌を治療または予防するための方法であって、項１～２８のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩の治療または予防に有

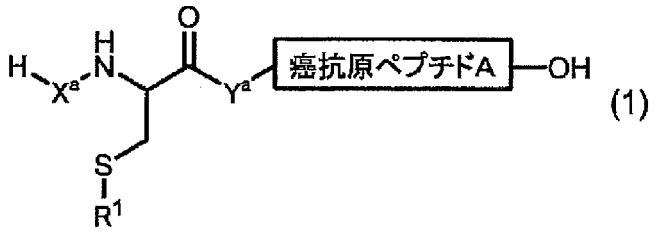
効な量を、それを必要としているＷＴ１陽性の癌患者に投与することからなる方法；および

[0065] 項３３．項１～２８のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩を、ＥＲＡＰ１と反応させることにより、２つの異なるＭＨＣクラスＩ拘束性エピトープまたはＭＨＣクラスＩ拘束性エピトープおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性エピトープを得る方法、

[0066] ２．第二態様

[0067] 項１．式（１）：

[0068] [化10]



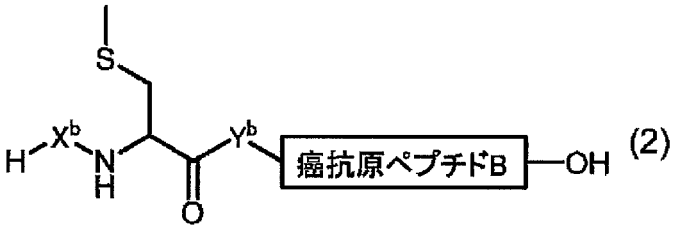
(1)

[0069] ［式中、Ｘ[a]およびＹ[a]は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表し、Ｘ[a]のアミノ酸残基数とＹ[a]のアミノ酸残基数の和は０～４の整数であり、

癌抗原ペプチドＡは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＡのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（１）中のＹ[a]と結合し、癌抗原ペプチドＡのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１）中の水酸基と結合し、

Ｒ[1]は、水素原子、式（２）：

[0070] [化11]



(2)

[0071] （式中、Ｘ[b]およびＹ[b]は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表し、Ｘ[b]のアミノ酸残基数とＹ[b]のアミノ酸残基

数の和は０～４の整数であり、

癌抗原ペプチドＢは、癌抗原ペプチドＡとは配列が異なり且つ７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＢのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（２）中のY^bと結合し、癌抗原ペプチドＢのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（２）中の水酸基と結合し、式（２）中のチオエーテル基が、式（１）中のチオエーテル基と結合する。

）

で表される基、または癌抗原ペプチドＣを表し、

癌抗原ペプチドＣは、癌抗原ペプチドＡとは配列が異なり且つ１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドまたは１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基が式（１）中のチオエーテル基と結合する。

但し、R^1が水素原子である場合、式（１）で表される化合物の配列はＷＴ１タンパクの部分配列と同一ではない。］

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0072] 項２．X^aが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^aが単結合であるか、X^aおよびY^aが独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^aが単結合であり且つY^aが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^aが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^aが単結合であるか、X^aが単結合であり且つY^aが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、またはX^aおよびY^aが単結合である、項１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0073] 項３．X^aが単結合であり、Y^aが単結合、アラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である、項１または２に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0074] 項４．X^aが単結合または１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり、Y^aが単結合である、項１または２に記載の化合物、またはその薬学上許容

される塩；

[0075] 項５．X^aおよびY^aが単結合である、項１～４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0076] 項６．癌抗原ペプチドＡが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～５のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0077] 項７．癌抗原ペプチドＡが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであるか、または配列番号：２、３、５、６および７の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドである、項１～６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0078] 項８．癌抗原ペプチドＡが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0079] 項９．R^1が水素原子である、項１～８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0080] 項１０．式（１）で表される化合物が、以下のアミノ酸配列：

ＣＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：１３）、

ＣＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：１４）、

ＣＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：１５）、

ＣＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：１６）、

ＣＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：１７）および

ＣＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：１８）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～９のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0081] 項１１．Ｒ[1]が式（２）で表される基である、項１～８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0082] 項１２．Ｘ[b]が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ[b]が単結合であるか、Ｘ[b]およびＹ[b]が独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、Ｘ[b]が単結合であり且つＹ[b]が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、Ｘ[b]が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ[b]が単結合であるか、Ｘ[b]が単結合であり且つＹ[b]が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、またはＸ[b]およびＹ[b]が単結合である、項１～８および１１のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0083] 項１３．Ｘ[b]が単結合であり、Ｙ[b]が単結合、アラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である、項１～８および１１～１２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0084] 項１４．Ｘ[b]が単結合または１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり、Ｙ[b]が単結合である、項１～８および１１～１２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0085] 項１５．Ｘ[b]およびＹ[b]が単結合である、項１～８および１１～１４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0086] 項１６．癌抗原ペプチドＢが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラス

Ｉ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～８および１１～１５のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0087] 項１７．癌抗原ペプチドＢが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであるか、または配列番号：２、３、５、６および７の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドである、項１～８および１１～１６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0088] 項１８．癌抗原ペプチドＢが、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）、

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

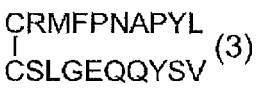
ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～８および１１～１７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0089] 項１９．式（１）で表される化合物が、式（３）：

[0090] [化12]



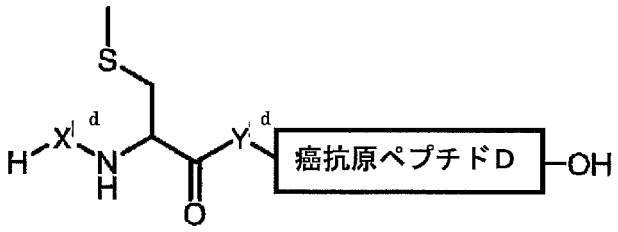
[0091] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８および１１～１８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0092] 項２０．Ｙ^{b}がアラニン残基である、項１３に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0093] 項２１．癌抗原ペプチドＢが、１つのシステイン残基を含むＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである場合、癌抗原ペプチドＢ中のチオエーテル基が、式（１６）：

[0094] [化13]



（１６）

[0095] （式中、Ｘ^{d}およびＹ^{d}は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表し、Ｘ^{d}のアミノ酸残基数とＹ^{d}のアミノ酸残基数の和は０～４の整数であり、

癌抗原ペプチドＤは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＤのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（１６）中のＹ^{d}と結合し、癌抗原ペプチドＤのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１６）中の水酸基と結合する。）

中のチオエーテル基と結合している、または１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである癌抗原ペプチドＥのシステイン残基のチオエーテル基と結合している、項１～８、１１～１３および２０のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0096] 項２２．癌抗原ペプチドＢが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項２１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0097] 項２３．癌抗原ペプチドＢが、以下のアミノ酸配列：

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）および

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項２１～２２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0098] 項２４．Ｘ^{d}が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ^{d}が単結合であるか、Ｘ^{d}およびＹ^{d}が独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、Ｘ^{d}が単結合であり且つＹ^{d}が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、Ｘ^{d}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ^{d}が単結合であるか、Ｘ^{d}が単結合であり且つＹ^{d}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、またはＸ^{d}およびＹ^{d}が単結合である、項２１～２３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0099] 項２５．Ｘ^{d}が単結合であり、Ｙ^{d}が単結合、アラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である、項２１～２４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0100] 項２６．Ｘ^{d}が単結合または１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり、Ｙ^{d}が単結合である、項２１～２４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0101] 項２７．Ｘ^{d}およびＹ^{d}が単結合である、項２１～２６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0102] 項２８．癌抗原ペプチドＤが、１４～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項２１～２７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0103] 項２９．癌抗原ペプチドＤが、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）、

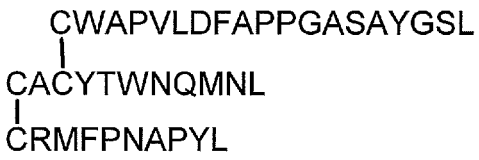
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項２１～２８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0104] 項３０．式（１）で表される化合物が、式（１５）：

[0105] [化14]



（１５）

[0106] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８、１１～１３および２０～２９のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0107] 項３１．癌抗原ペプチドＥが、１４～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項２１～２３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0108] 項３２．癌抗原ペプチドＥが、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）
の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項２１～２３および３１のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0109] 項３３．Ｒ[1]が癌抗原ペプチドＣである、項１～８のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

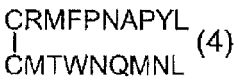
[0110] 項３４．癌抗原ペプチドＣが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～８および３３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0111] 項３５．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：
ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）
を含むペプチドであるか、または配列番号：３のアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドである、項１～８および３３～３４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0112] 項３６．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：
ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）および
ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）
の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～８および３３～３５のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0113] 項３７．式（１）で表される化合物が、式（４）：

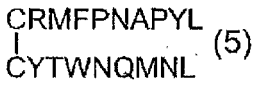
[0114] [化15]



[0115] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、または式（５）：

[0116] [化16]

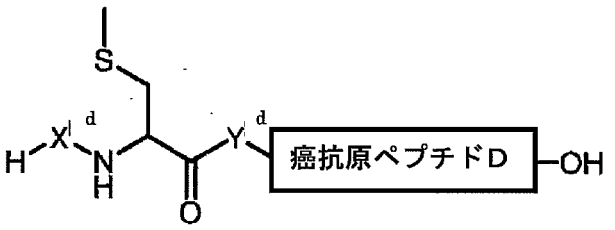


[0117] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８および３３～３６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0118] 項３８．１つのシステイン残基を含む１～４残基のアミノ酸からなるペプチドが癌抗原ペプチドＣのＮ末端にさらに結合している場合、癌抗原ペプチドＣのＮ末端に結合しているペプチドのシステイン残基のチオエーテル基が、式（１６）：

[0119] [化17]



（１６）

[0120] （式中、Ｘ^{d}およびＹ^{d}は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表し、Ｘ^{d}のアミノ酸残基数とＹ^{d}のアミノ酸残基数の和は０～４の整数であり、

癌抗原ペプチドＤは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、癌抗原ペプチドＤのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（１６）中のＹ^{d}と結合し、癌抗原ペプチドＤのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１６）中の水酸基と結合する。）

中のチオエーテル基と結合している、または１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである癌抗原ペプチドＥのシステイン残基のチオエーテル基と結合している、項１～８および３３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0121] 項３９．癌抗原ペプチドＣのＮ末端に結合している１つのシステイン残基を含む１～４残基のアミノ酸からなるペプチドが、ＣＡからなるジペプチドである、項３８に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0122] 項４０．癌抗原ペプチドＣが７～１５残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項３８～３９のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0123] 項４１．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）および

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項３８～４０のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0124] 項４２．X^dが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^dが単結合であるか、X^dおよびY^dが独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^dが単結合であり且つY^dが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、X^dが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^dが単結合であるか、X^dが単結合であり且つY^dが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であるか、またはX^dおよびY^dが単結合である、項３８～４１のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0125] 項４３．X^dが単結合であり、Y^dが単結合、アラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である、項３８～４２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0126] 項４４．X^dが単結合または１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり、Y^dが単結合である、項３８～４２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0127] 項４５．X^dおよびY^dが単結合である、項３８～４４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0128] 項４６．癌抗原ペプチドＤが、１４～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣク

ラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項３８～４５のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0129] 項４７．癌抗原ペプチドＤが、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）、

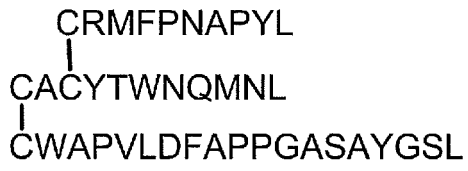
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項３８～４６のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0130] 項４８．式（１）で表される化合物が、式（１４）：

[0131] [化18]



（１４）

[0132] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項３８～４７のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0133] 項４９．癌抗原ペプチドＥが、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

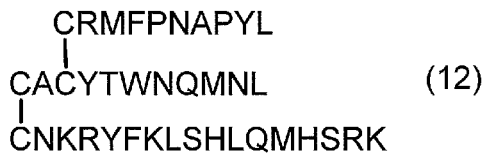
ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）
の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項３８～４１および４４のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0134] 項５０．式（１）で表される化合物が、式（１２）：

[0135] [化19]



(12)

[0136] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）
で表される化合物である、項３８～４１および４９のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0137] 項５１．癌抗原ペプチドＣが１４～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである、項１～８および３３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

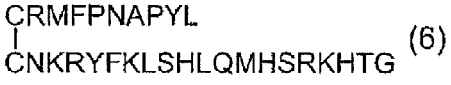
[0138] 項５２．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：
ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、
ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）
の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであるか、または配列番号：１０～１１および１９～２４の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つヘルパーＴ細胞誘導活性を有するペプチドである、項１～８、３３および５１のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0139] 項５３．癌抗原ペプチドＣが、以下のアミノ酸配列：
ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、
ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、
ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、
ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、
ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および
ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）
の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドである、項１～８、３３および５１～５２のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0140] 項５４．式（１）で表される化合物が、式（６）：

[0141] [化20]

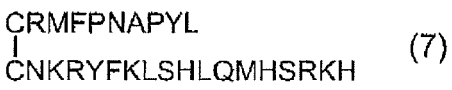


(6)

[0142] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）
で表される化合物、式（７）：

[0143]

[化21]

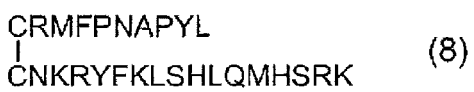


(7)

[0144] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（８）：

[0145] [化22]

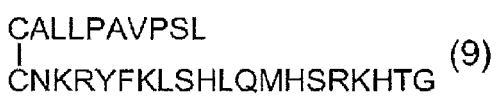


(8)

[0146] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物または式（９）：

[0147] [化23]



(9)

[0148] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１～８、３３および５１～５３のいずれか一項に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0149] 項５５．７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドの改変体；

[0150] 項５６．以下のアミノ酸配列：

ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４２）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ　（配列番号：２４３）

である、項５５に記載の改変体；

[0151] 項５７．式（１０）：

[0152] [化24]



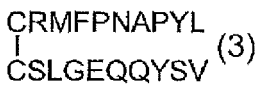
（１０）

[0153] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0154] 項５８．式（３）：

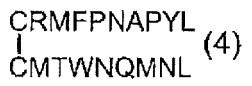
[0155] [化25]



[0156] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（４）：

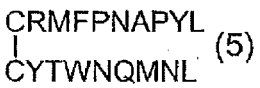
[0157] [化26]



[0158] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、および式（５）：

[0159] [化27]



[0160] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物からなる群から選択される化合物と以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：２４）、

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４４）、

ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４２）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ （配列番号：２４３）、

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを含む組成物；

[0161] 項５９．項１～５４および５７のいずれか一項に記載の化合物もしくはその薬学上許容される塩または項５８に記載の組成物、および薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物；

[0162] 項６０．癌ワクチンとして使用される、項５９に記載の医薬組成物；

[0163] 項６１．項１～５４および５７のいずれか一項に記載の化合物もしくはその薬学上許容される塩または項５８に記載の組成物の、癌ワクチンを製造するための使用；

[0164] 項６２．癌を治療または予防するための方法であって、項１～５４および５７のいずれか一項に記載の化合物もしくはその薬学上許容される塩または項５８に記載の組成物の治療または予防に有効な量を、それを必要としているＷＴ１陽性の癌患者に投与することからなる方法；

[0165] 項６３．項１～５４および５７のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩を、ＥＲＡＰ１と反応させることにより、２つの異なるＭＨＣクラスＩ拘束性エピトープまたはＭＨＣクラスＩ拘束性エピトープおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性エピトープを得る方法；および

[0166] 項６４．以下の工程を含む、化合物の合成方法：

（１）Ｆｍｏｃ－Ｃ（Ｍｍｔ）Ａ－ＳＢｎおよび癌抗原ペプチドＣを用いて、Ｃ（Ｍｍｔ）ＡのＣ末端アミノ酸のカルボニル基と癌抗原ペプチドＣのＮ末端アミノ基が結合したペプチドを合成する工程であって、抗原ペプチドＣは、１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドまたは１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表す工程、

（２）前記工程（１）で得られたペプチドおよびＮｐｙｓ基で保護された１つのシステイン残基がＮ末端に結合している癌抗原ペプチドＡを用いて、前記工程（１）で得られたペプチド中の癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基と癌抗原ペプチドＡのＮ末端に結合しているシステイン残基のチオエーテル基が結合したペプチドを合成する工程であって、癌抗原ペプチドＡは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表す工程、および

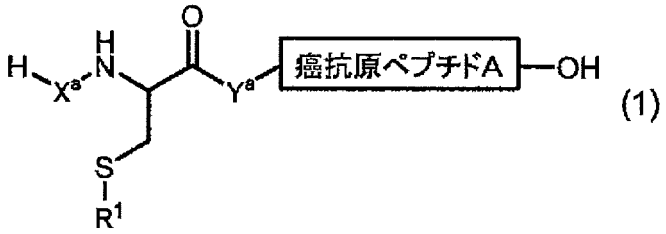
（３）前記工程（２）で得られたペプチドおよびＳＰｙ基で保護されたシステイン残基を含む癌抗原ペプチドＤを用いて、前記工程（２）で得られたペプチド中の癌抗原ペプチドＡのＮ末端に結合しているシステイン残基のチオエーテル基と癌抗原ペプチドＤのシステイン残基のチオエーテル基が結合したペプチドを合成する工程であって、癌抗原ペプチドＤは、１つのシステイン残基がＮ末端に結合している７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラ

スＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドまたは１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表す工程、

[0167] ３．第三態様

[0168] 項１．式（１）：

[0169] [化28]



(1)

[0170] ［式中、Ｘ^{a}およびＹ^{a}は、単結合を表し、

癌抗原ペプチドＡは、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：２）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ　（配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ　（配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ　（配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドを表し、癌抗原ペプチドＡのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（１）中のＹ^{a}と結合し、癌抗原ペプチドＡのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１）中の水酸基と結合し、

Ｒ^{1}は、癌抗原ペプチドＣを表し、

癌抗原ペプチドＣは、癌抗原ペプチドＡとは配列が異なり且つ以下のアミノ酸配列：

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：３）および

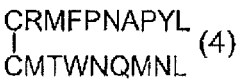
ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ　（配列番号：４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドを表し、癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基が式（１）中のチオエーテル基と結合する。］

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0171] 項２．式（１）で表される化合物が、式（４）：

[0172] [化29]



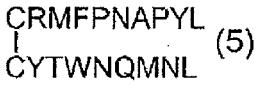
(4)

[0173] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0174] 項３．式（１）で表される化合物が、式（５）：

[0175] [化30]



(5)

[0176] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、項１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩；

[0177] 項４．項１～３のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩、および薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物；

[0178] 項５．項４に記載の医薬組成物であって、

以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）、

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）、

ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４２）および

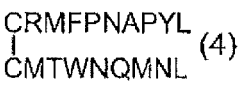
ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ　（配列番号：２４３）、

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを一つ以上含む組成物；および

[0179] 項６．式（４）：

[0180]

[化31]

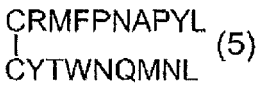


(4)

（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、および式（５）：

[0181] [化32]



(5)

[0182] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物からなる群から選択される化合物と、

以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）、

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）、

ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４２）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ　（配列番号：２４３）、

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを一つ以上含む組成物、

に関する。

発明の効果

[0183] 本発明により、癌免疫療法剤として有用な前記の式（１）で表される化合物（以下、本発明の化合物ということもある。）を、提供することが可能となった。本発明の化合物により、インビボおよびインビトロでＣＴＬを効率的に誘導する癌ワクチンや癌免疫療法剤を提供することが可能となった。詳しくは、本発明の化合物により、配列の異なる２つのＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドもしくは配列の異なる２つのＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ、ＭＨＣクラスＩＷＴ１拘束性ペプチドおよびＭＨＣクラスＩＩ拘

束性ＷＴ１ペプチド、ＭＨＣクラスＩＷＴ１拘束性ＷＴ１エピトープおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１エピトープ、配列の異なる２つのＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド、または配列の異なる２つのＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１エピトープを、インビボおよびインビトロで生成し、ＣＴＬを効率的に誘導することが可能となった。

中でも、配列の異なる２つのＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドのＨＬＡのサブタイプに関し、Ａ０２タイプ（Ａ－０２０１、Ａ０２０６など）のペプチドとＡ２４タイプ（Ａ－２４０２など）のペプチドと組み合わせ得られる本発明の化合物（コンジュゲート体）が、特に好ましい。欧米人（Ｃａｕｃａｓｉａｎ）においては、ＨＬＡ－Ａ０２０１タイプまたはＨＬＡ－Ａ０２０６タイプであるＰｏｐｕｌａｔｉｏｎが約４７％と最も多く、次いでＨＬＡ－Ａ２４０２タイプが約１３％であり、これらのタイプの総和は、重複（すなわち両方のタイプを有するヒトを二重に計算すること）を除くと約５６％を占める（Ｈｕｍａｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　６２：１００９;２００１）。一方日本人などにおいては、ＨＬＡ－Ａ２４０２であるＰｏｐｕｌａｔｉｏｎが約６０％と最も多く、次いでＨＬＡ－Ａ０２０１またはＨＬＡ－Ａ０２０６が約３９％であり、これらのタイプの総和は、重複（すなわち両方のタイプを有するヒトを二重に計算すること）を除くと約８１％を占める（ｗｗｗ．ｂｍｄｃ．ｉｒｃ．ｏｒ．ｊｐ／ＧＦ－Ａ．ｈｔｍ）。従って、本発明の化合物の利点としては、具体的には、より大きなＰｏｐｕｌａｔｉｏｎを一つの本発明の化合物でカバーするという利点、および必ずしも投与の事前に患者のＨＬＡのサブタイプを選別することが必須ではなくなり得るという利点などが挙げられる。本発明の化合物のこのような利点の観点で、式（３）、式（４）または式（５）で表される化合物が好ましく、式（５）で表される化合物がより好ましい。

また、本発明の化合物により、物理化学的性質や安定性に優れ、製造やその制御が容易な癌ワクチンの有効成分を提供することが可能となった。これ

により、癌ワクチンの製剤化も容易となった。

具体的には、物理化学的性質としては、溶解度、溶液の粘度、これに伴う精製の容易さ、凍結乾燥後の取り扱い易さ、これに伴う精製の容易さなどが挙げられる。安定性として、塩置換した後の安定性、吸湿性、熱安定性、エマルション形成後の安定性などが挙げられる。さらに薬理活性としては、癌ワクチンとしての薬効、ＡＰＩ（Ａｃｔｉｖｅ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔ、医薬品有効成分）によって生じる違い、製剤中の添加剤との相互作用などが挙げられる。このうちＡＰＩによって生じる違いとは、ＡＰＩによる癌ワクチンとしての違いであり、具体的には、溶解度が大きく異なる２つのＡＰＩにおいては、溶解度が小さいＡＰＩの場合析出し易く、医薬品には必須要件であるメンブランフィルターの濾過による滅菌処理ができなくなる可能性が十分予想される。または、辛うじて溶解度が小さいＡＰＩの濾過による滅菌処理を行っても、濾液に含まれるＡＰＩの量が大きく減少し、癌ワクチンとして必須のＣＴＬ誘導能も著しく低下すると考えられる。よって、溶解度が小さいＡＰＩでは、生産上の効率が著しく低下するというデメリットが容易に予想される。

図面の簡単な説明

[0184] [図1]図１は、試験例１において、実施例２～５で合成された配列番号：１３、１６、１７および１８の各ペプチドについて、ＥＲＡＰ１によるＮ末端アミノ酸のトリミング経時変化を試験した結果を示す図である。

[図2]図２は、試験例２において、実施例１で合成された式（５）で表される化合物について、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙによるｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図3]図３は、試験例２において、実施例１で合成された式（５）で表される化合物について、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙによるｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図4]図４は、試験例４において、実施例６で合成された式（３）で表される化合物について、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図5]図５は、試験例５において、実施例７で合成された式（６）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでの配列番号：２４のペプチド反応性細胞の誘導能を試験した結果を示す図である。

[図6]図６は、試験例５において、実施例７で合成された式（６）で表される化合物について、配列番号：２４のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでの配列番号：２４のペプチド反応性細胞の誘導能を試験した結果を示す図である。

[図7]図７は、試験例６において、実施例９で合成された式（８）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図8]図８は、試験例６において、実施例９で合成された式（８）で表される化合物について、配列番号：２２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでの配列番号：２２のペプチド反応性細胞の誘導能を試験した結果を示す図である。

[図9]図９は、試験例８において、実施例８で合成された式（７）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図であ

る。

[図10]図１０は、試験例８において、実施例８で合成された式（７）で表される化合物について、配列番号：２３のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでの配列番号：２３のペプチド反応性細胞の誘導能を試験した結果を示す図である。

[図11]図１１は、試験例９において、実施例１０で合成された式（９）で表される化合物について、配列番号：５のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図12]図１２は、試験例９において、実施例１０で合成された式（９）で表される化合物について、配列番号：２４のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでの配列番号：２４のペプチド反応性細胞の誘導能を試験した結果を示す図である。

[図13]図１３は、比較例１において、参考例８および９で合成された配列番号：２３８および２３９で表されるペプチドについて、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図14]図１４は、比較例１において、参考例８および９で合成された配列番号：２３８および２３９で表されるペプチドについて、配列番号：４のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図15]図１５は、比較例２において、参考例１０および１１で合成された配列番号：２４０および２４１で表されるペプチドについて、配列番号：２の

ペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図16]図１６は、比較例２において、参考例１０および１１で合成された配列番号：２４０および２４１で表されるペプチドについて、配列番号：４のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図17]図１７は、試験例１１において、実施例１３で合成された式（１０）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図18]図１８は、比較例３において、参考例１２で合成された式（１１）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図19]図１９は、試験例１２において、実施例１４で合成された式（１２）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図20]図２０は、試験例１２において、実施例１４で合成された式（１２）で表される化合物について、配列番号：４のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図21]図２１は、試験例１３において、実施例１５で合成された式（１４）で表される化合物について、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図22]図２２は、試験例１３において、実施例１５で合成された式（１４）で表される化合物について、配列番号：４のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図23]図２３は、試験例１４において、実施例１で合成された式（５）で表される化合物と参考例１で合成された配列番号：２２で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンについて、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図24]図２４は、試験例１５において、実施例１で合成された式（５）で表される化合物と参考例１３で合成された配列番号：２４４で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンについて、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図25]図２５は、試験例１６において、実施例１で合成した式（５）で表される化合物と参考例２で合成した配列番号：２４で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンについて、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図26]図２６は、試験例１７において、実施例１で合成した式（５）で表される化合物と実施例１１で合成した配列番号：２４２で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンについて、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

[図27]図２７は、試験例１８において、実施例１で合成した式（５）で表される化合物と実施例１１で合成した配列番号：２４３で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンについて、配列番号：２のペプチドのパルスまたは非パルスでの、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙによるｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能を試験した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0185] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0186] 本発明における「アミノ酸残基」とは、ペプチドまたはタンパク質分子上で、ペプチドまたはタンパク質を構成しているアミノ酸の一単位に当たる部分を意味する。「アミノ酸残基」としては、天然もしくは非天然のα－アミノ酸残基、β－アミノ酸残基、γ－アミノ酸残基またはδ－アミノ酸残基が挙げられる。具体的には、天然のα－アミノ酸残基、オルニチン残基、ホモセリン残基、ホモシステイン残基、β－アラニン、γ－アミノブタン酸またはδ－アミノペンタン酸などが挙げられる。「アミノ酸残基」に、光学活性体があり得る場合、Ｌ体、Ｄ体の何れであってもよいが、Ｌ体が好ましい。

[0187] 本発明における「アミノ酸残基」を略号で表示する場合、次の略号で記述する。

AlaまたはＡ：アラニン残基

ArgまたはＲ：アルギニン残基

AsnまたはＮ：アスパラギン残基

AspまたはＤ：アスパラギン酸残基

CysまたはＣ：システイン残基

GlnまたはＱ：グルタミン残基

GluまたはＥ：グルタミン酸残基

GlyまたはＧ：グリシン残基

HisまたはＨ：ヒスチジン残基

IleまたはＩ：イソロイシン残基

LeuまたはＬ：ロイシン残基

LysまたはＫ：リジン残基

MetまたはＭ：メチオニン残基

PheまたはＦ：フェニルアラニン残基

ProまたはＰ：プロリン残基

SerまたはＳ：セリン残基

ThrまたはＴ：スレオニン残基

TrpまたはＷ：トリプトファン残基

TyrまたはＹ：チロシン残基

ValまたはＶ：バリン残基

Ａｂｕ：２－アミノ酪酸残基（α－アミノ酪酸残基とも言う）

Ｏｒｎ：オルニチン残基

Ｃｉｔ：シトルリン残基

[0188] 本発明における「ペプチド」のアミノ酸配列は、常法に従って、Ｎ末端アミノ酸のアミノ酸残基が左側に位置し、Ｃ末端アミノ酸のアミノ酸残基が右側に位置するように記述する。また「ペプチド」において、特に断りの無い限り、Ｎ末端アミノ酸のアミノ酸残基のアミノ基は水素原子と結合し、Ｃ末端アミノ酸のアミノ酸残基のカルボニル基は水酸基と結合している。ペプチドの二価基とは、Ｎ末端アミノ酸のアミノ酸残基のアミノ基およびＣ末端アミノ酸のアミノ酸残基のカルボニル基を介して結合する基を意味する。

本発明の化合物において、たとえば式（３）～（９）で表される化合物において、その部分構造にあたるペプチドについても、特に断りの無い限り、

Ｎ末端アミノ酸のアミノ酸残基のアミノ基は水素原子と結合し、Ｃ末端アミノ酸のアミノ酸残基のカルボニル基は水酸基と結合している。

[0189] 本発明における「Ｘ^{a}」および「Ｙ^{a}」は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表す。Ｘ^{a}のアミノ酸残基数とＹ^{a}のアミノ酸残基数の和は０～４の整数である。例えば、当該和が０の整数であるとは、Ｘ^{a}およびＹ^{a}が単結合であることを意味する。また、当該和が４の整数である場合としては、例えばＸ^{a}およびＹ^{a}が独立して２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、Ｘ^{a}が３残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ^{a}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、Ｘ^{a}が４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ^{a}が単結合である場合などが挙げられる。

当該和の整数として、好ましくは０～２が挙げられ、より好ましくは０～１が挙げられ、最も好ましくは０が挙げられる。すなわち、Ｘ^{a}およびＹ^{a}としては、共に単結合である場合が最も好ましい。

当該和の整数が２である場合としては、Ｘ^{a}が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ^{a}が単結合である場合、Ｘ^{a}およびＹ^{a}が独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、またはＸ^{a}が単結合であり且つＹ^{a}が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合が挙げられる。

当該和の整数が１である場合としては、Ｘ^{a}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹ^{a}が単結合である場合、またはＸ^{a}が単結合であり且つＹ^{a}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合が挙げられる。このうち好ましくは、Ｘ^{a}が単結合であり且つＹ^{a}がアラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である場合が挙げられる。

[0190] 本発明における「癌抗原ペプチドＡ」とは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである。式（１）において癌抗原ペプチドＡは、Ｎ末端アミノ酸のアミノ基が式（１）中のＹ^{a}と結合し、Ｃ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１）中の水酸基と結合する。

[0191] まず、本発明における「ＭＨＣクラスＩ拘束性」とは、主要組織適合抗原（Ｍａｊｏｒ Ｈｉｓｔｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ Ｃｏｍｐｌｅｘ、ＭＨＣ）のクラスＩであるＭＨＣクラスＩ分子と結合してＣＴＬを誘導する特性を意味する。

[0192] ＭＨＣは、ヒトではヒト白血球型抗原（ＨＬＡ）と呼ばれる。ＭＨＣクラスＩ分子に相当するＨＬＡは、ＨＬＡ－Ａ、Ｂ、Ｃｗ、ＦおよびＧなどのサブタイプに分類される。「ＭＨＣクラスＩ拘束性」として、好ましくは、ＨＬＡ－Ａ拘束性、ＨＬＡ－Ｂ拘束性またはＨＬＡ－Ｃｗ拘束性が挙げられる。

ＨＬＡの各サブタイプについて、多型（対立遺伝子）が知られている。ＨＬＡ－Ａの多型としては、ＨＬＡ－Ａ１、ＨＬＡ－Ａ０２０１、ＨＬＡ－Ａ２４などの２７種以上が挙げられ、ＨＬＡ－Ｂの多型としては、ＨＬＡ－Ｂ７、ＨＬＡ－Ｂ４０、ＨＬＡ－Ｂ４４０３などの５９種以上が挙げられ、ＨＬＡ－Ｃｗの多型としては、ＨＬＡ－Ｃｗ０３０１、ＨＬＡ－Ｃｗ０４０１、ＨＬＡ－Ｃｗ０６０２などの１０種以上が挙げられる。これら多型の中、好ましくは、ＨＬＡ－Ａ０２０１やＨＬＡ－Ａ２４が挙げられる。

[0193] 次に、本発明における「ＷＴ１ペプチド」とは、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列において連続する７～３０残基のアミノ酸からなる部分ペプチドである。

[0194] よって、本発明における「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」とは、インビトロおよび／またはインビボで、ＭＨＣクラスＩ抗原に結合し、複合体として提示されるペプチドであり、且つ該複合体が前駆体Ｔ細胞に認識された結果ＣＴＬを誘導するペプチドを意味する。「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」のアミノ酸残基数は、７～３０であり、好ましくは７～１５であり、より好ましくは８～１２であり、更に好ましくは８～１１であり、最も好ましくは８または９である。

[0195] ７～１２残基または好ましくは９残基のアミノ酸からなる「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」は、「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」

とも呼ばれる。本発明における「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」とは、ＭＨＣクラスＩ抗原と結合し複合体として提示されるペプチドそのものを意味する。すなわち、「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」が、インビトロおよび／またはインビボで、Ｇａｍｍａ－Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ－ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｌｙｓｏｓｏｍａｌ Ｔｈｉｏｌ Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ（ＧＩＬＴ，ＧＬＴ）などのプロテオソームおよび／もしくはプロテアーゼによる細胞内での本発明化合物の分解（Ｐｒｏｔｅｏｌｙｓｉｓ、ジスルフィド結合の還元的開裂）、ならびに／またはＥｎｄｏｐｌａｓｍｉｃ ｒｅｔｉｃｕｌｕｍ ａｍｉｎｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ １（ＥＲＡＰ１、ＥＲ－ａｍｉｎｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ １）による最適な残基数への切断（トリミングとも言う。）によって、「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」を生成する。当該生成においては、まずプロテオソームおよび／もしくはプロテアーゼによる分解の結果「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」のＣ末端アミノ酸が生じ、次にＥＲＡＰ１によるトリミング（切断）の結果「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」のＮ末端アミノ酸が生じるという生成過程が主に考えられる。ただし、当該生成においては、当該生成過程以外の過程も経由し得る。尚、現在、ＥＲＡＰ１は、ＥＲＡＡＰ（ＥＲ ａｍｉｎｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ａｎｔｉｇｅｎ ｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ）とも呼ばれ、かつては、Ａ－ＬＡＰ、ＰＩＬＳ－ＡＰまたはＡＲＴＳ－１とも呼ばれていた。

[0196] よって、「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」としては、７～１２残基のアミノ酸からなる「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」のＣ末端アミノ酸のカルボニル基に１～２３残基のアミノ酸が付加されて生成される７～３０残基のアミノ酸からなるペプチドが好ましい。

[0197] 「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」としては、例えば、表１～４４に記載されたペプチドが挙げられる。各表中、「位置」とは、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列における位置を示す。

[0198]

[表1]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
2－10	GSDVRDLNA	26	A1
3－11	SDVRDLNAL	27	B40、B60、B61、B3701、B4403、Cw0301、Cw0602
4－12	DVRDLNALL	28	A24、A68.1、A3302、B7、B8、B3501、B3701、Cw0401、Cw0602
6－14	RDLNALLPA	29	B40、B61、B3701
7－15	DLNALLPAV	30	A0201、B62、B5201
10－18	ALLPAVPSL	5	A0201、A0205、A24、A3、B14、B7、B8、B3801、B3901、B3902、Cw0301、Cw0401、Cw0602

[0199] [表2]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
17－25	SLGGGGGCA	31	B62
18－26	LGGGGGCAL	32	B60、B7、B3801、B5101、B5102
20－28	GGGGCALPV	33	B61、B5101、B5102、B5201

[0200]

[表3]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
23－31	GCALPVSGA	34	B40、B61
24－32	CALPVSGAA	35	B40、B5102、Cw0301
26－34	LPVSGAAQW	36	B40、B3501、B5801
29－37	SGAAQWAPV	37	B5101、B5102、B5201、B61
30－38	GAAQWAPVL	38	B40、B60、B7、B8、B3902、B5101、B5102、Cw0301、Cw0602

[0201] [表4]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
32－40	AQWAPVLDF	39	A3、A3101、B62、B2702、B2705、B3902、B5201
33－41	QWAPVLDFA	40	Cw0702
37－45	VLDFAPPGA	41	A1、A0201
38－46	LDFAPPGAS	42	B40、B3701
39－47	DFAPPGASA	43	Cw0401
40－48	FAPPGASAY	44	A1、B62、B3501、B4403、B5801、Cw0702

[0202] [表5]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
47－55	AYGSLGGPA	45	A24

[0203] [表6]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
６３－７１	ＰＰＰＰＰＰＨＳＦ	４６	Ｃｗ０４０１
６４－７２	ＰＰＰＰＰＨＳＦＩ	４７	Ｂ５１０１、Ｂ５１０２、Ｂ５２０１
６５－７３	ＰＰＰＰＨＳＦＩＫ	４８	Ａ１１０１
７０－７８	ＳＦＩＫＱＥＰＳＷ	４９	Ｃｗ０４０１

[0204] [表7]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
７３－８１	ＫＱＥＰＳＷＧＧＡ	５０	Ａ１、Ａ０２０５
８０－８８	ＧＡＥＰＨＥＥＱＣ	５１	Ａ１

[0205] [表8]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
８１－８９	ＡＥＰＨＥＥＱＣＬ	５２	Ａ０２０５、Ｂ４０、Ｂ６０、Ｂ６１、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３
８２－９０	ＥＰＨＥＥＱＣＬＳ	５３	Ｂ３５０１、Ｂ５１０１
８３－９１	ＰＨＥＥＱＣＬＳＡ	５４	Ｂ３８０１
８４－９２	ＨＥＥＱＣＬＳＡＦ	５５	Ｂ４０、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３、Ｃｗ０７０２
８５－９３	ＥＥＱＣＬＳＡＦＴ	５６	Ｂ４０、Ｂ６０、Ｂ６１、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３
８６－９４	ＥＱＣＬＳＡＦＴＶ	５７	Ａ０２０１、Ｂ６２、Ｂ５２０１
８８－９６	ＣＬＳＡＦＴＶＨＦ	５８	Ａ３、Ｂ６２

[0206]

[表9]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
92－100	FTVHFSGQF	59	B62、B5801、Cw0301
93－101	TVHFSGQFT	60	A0201、A0205
96－104	FSGQFTGTA	61	B5801、B4403
98－106	GQFTGTAGA	62	A0205、B40、B62、B2702、B5201
99－107	QFTGTAGAC	63	Cw0401
100－108	FTGTAGACR	64	A68．1、A1101、A3101、A3302

[0207] [表10]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
101－109	TGTAGACRY	65	B62、B4403、Cw0702
104－112	AGACRYGPF	66	B4403、B5201
107－115	CRYGPFGPP	67	B2702
110－118	GPFGPPPPS	68	B5101、B5102

[0208] [表11]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
118－126	SQASSGQAR	69	A68．1、A1101、A3101、A3302
119－127	QASSGQARM	70	B3501、B5101、B51022
120－128	ASSGQARMF	71	B3501、B3801、B4403、B5801

[0209] [表12]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
123－131	GQARMFPNA	72	B62
125－133	ARMFPNAPY	73	B14、B2702、B2705、Cw0702
126－134	RMFPNAPYL	2	A0201、A0205、A24、A3、B14、B7、B2702、B2705、B3901、B3902、Cw0301
128－136	FPNAPYLPS	74	B5101
130－138	NAPYLPSCL	75	A24、B60、B7、B8、B3902、B5101、B5102、Cw0301、Cw0602、Cw0702

[0210] [表13]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
136－144	SCLESQPAI	76	B8、B3901、B5102、Cw0301
137－145	CLESQPAIR	77	A1、A3、A68．1、A1101、A3101、A3302
138－146	LESQPAIRN	78	B60、B61
139－147	ESQPAIRNQ	79	A3302

[0211]

[表14]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
141－149	QPAIRNQGY	80	B8、B3501、B4403、Cw0401、Cw0702
143－151	AIRNQGYST	81	B7
144－152	IRNQGYSTV	82	B14、B2702、B2705、B3901
146－154	NQGYSTVTF	83	B62、B2702、B3902、B5201

[0212] [表15]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
152－160	VTFDGTPSY	84	A1、A3、B62、B3501、B4403、B5801、Cw0702

[0213] [表16]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
161－169	GHTPSHHAA	85	B3801
163－171	TPSHHAAQF	86	B3501、B3801、Cw0401、Cw0702
165－173	SHHAAQFPN	87	B3801
168－176	AAQFPNHSF	88	B5801
169－177	AQFPNHSFK	89	A3、A68.1、A1101、A3101、B2705

[0214] [表17]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
174－182	HSFKHEDPM	90	B14、B3501、B5801
177－185	KHEDPMGQQ	91	B3801
179－187	EDPMGQQGS	92	B3701
180－188	DPMGQQGSL	93	A24、B14、B60、B7、B8、B3501、B3801、B3901、B3902、B5101、B5102、Cw0301、Cw0401、Cw0602

[0215] [表18]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
185－193	QGSLGEQQY	94	B4403、Cw0702
187－195	SLGEQQYSV	6	A0201、A0205、A3、B62

[0216] [表19]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
191－199	QQYSVPPPV	95	A0201、A0205、B61、B62、B2702、B2705、B5201
192－200	QYSVPPPVY	96	A24、Cw0401、Cw0702
194－202	SVPPPVYGC	97	A0205、A3

[0217] [表20]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
202－210	CHTPTDSCT	98	B3801
204－212	TPTDSCTGS	99	B5101
206－214	TDSCTGSQA	100	B40、B61、B3701
207－215	DSCTGSQAL	101	A24、A3302、B60、B7、B8、B3501、B3901、B3902、Cw0602
208－216	SCTGSQALL	102	B60、B7、B8、B3701、B3801、B3901、B3902
209－217	CTGSQALLL	103	B60、B7、B3701、B3902
210－218	TGSQALLLR	104	A3302

[0218] [表21]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
211－219	GSQALLLRT	105	B5801
213－221	QALLLRTPY	106	A1、B3501、B4403、B5801、Cw0602、Cw0702
217－225	LRTPYSSDN	107	B2702
218－226	RTPYSSDNL	108	A24、B60、B7、B3902、B5801
219－227	TPYSSDNLY	109	B3501、B5101、B5102、Cw0401、Cw0702

[0219] [表22]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
２２１－２２９	ＹＳＳＤＮＬＹＱＭ	１１０	Ｂ６０、Ｂ３５０１
２２２－２３０	ＳＳＤＮＬＹＱＭＴ	１１１	Ａ１、Ｂ５８０１
２２３－２３１	ＳＤＮＬＹＱＭＴＳ	１１２	Ｂ３７０１
２２５－２３３	ＮＬＹＱＭＴＳＱＬ	１１３	Ａ０２０１、Ａ０２０５、Ａ２４、Ｂ１４、Ｂ７、Ｂ８、Ｂ３８０１、Ｂ３９０１、Ｂ３９０２、Ｃｗ０３０１、Ｃｗ０６０２
２２７－２３５	ＹＱＭＴＳＱＬＥＣ	１１４	Ａ０２０１、Ａ０２０５、Ｂ６２
２２８－２３６	ＱＭＴＳＱＬＥＣＭ	１１５	Ａ０２０１
２３０－２３８	ＴＳＱＬＥＣＭＴＷ	１１６	Ｂ５８０１

[0220]

[表23]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
232－240	QLECMTWNQ	117	A1
233－241	LECMTWNQM	118	B40、B60、B61、B3701、B4403
235－243	CMTWNQMNL	3	A0201、A0205、A24、A3、B7
239－247	NQMNLGATL	119	A0201、A0205、A24、B14、B60、B62、B7、B2702、B2705、B3901、B3902、B5201、Cw0301、Cw0602
240－248	QMNLGATLK	120	A24、A3、A1101、A3101

[0221] [表24]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
242－250	NLGATLKGV	121	A0201、A0205、B62、Cw0602
243－251	LGATLKGVA	122	B5201
244－252	GATLKGVAA	123	B61、B8
250－258	VAAGSSSSV	124	B61、B5101、B5102

[0222]

[表25]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
251－259	AAGSSSSVK	125	A68．1、A1101
252－260	AGSSSSVKW	126	B5801
260－268	WTEGQSNHS	127	A1

[0223] [表26]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
261－269	TEGQSNHST	128	B40、B60、B61、B4403
263－271	GQSNHSTGY	129	A3、B62、B2702、Cw0702
269－277	TGYESDNHT	130	B5102、B5201
270－278	GYESDNHTT	131	A24

[0224] [表27]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
272－280	ESDNHTTPI	132	A1、A3302、B5101
273－281	SDNHTTPIL	133	B40、B60、B3701、B5201
276－284	HTTPILCGA	134	B5801
278－286	TPILCGAQY	135	B3501、B4403、Cw0401、Cw0702
279－287	PILCGAQYR	136	A3101
280－288	ILCGAQYRI	137	A0201、A0205、A3、B62、B5101

[0225]

[表28]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
285－293	QYRIHTHGV	138	A24、Cw0401
286－294	YRIHTHGVF	139	B14、B2702、B2705、B5201、Cw0301
287－295	RIHTHGVFR	140	A3、A1101、A3101、A3302
289－297	HTHGVFRGI	141	B5801

[0226] [表29]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
292－300	GVFRGIQDV	142	A0201、A0205、A3、A68．1、A1101、B3901、B5102、B5201、Cw0602
293－301	VFRGIQDVR	143	A3101
294－302	FRGIQDVRR	144	B2705
295－303	RGIQDVRRV	145	B61、B5101、B5102、B5201、Cw0602
298－306	QDVRRVPGV	146	B61、B3701
299－307	DVRRVPGVA	147	A68．1、A3302、B7、B8

[0227]

[表30]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
３０１－３０９	ＲＲＶＰＧＶＡＰＴ	１４８	Ｂ１４、Ｂ２７０２、Ｂ２７０５、Ｃｗ０３０１
３０２－３１０	ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ	７	Ａ０２０５、Ａ２４、Ｂ７、Ｂ３７０１、Ｂ３８０１、Ｂ３９０１、Ｂ３９０２
３０３－３１１	ＶＰＧＶＡＰＴＬＶ	１４９	Ｂ７、Ｂ３５０１、Ｂ５１０２、Ｂ５２０１、Ｃｗ０４０１
３０６－３１４	ＶＡＰＴＬＶＲＳＡ	１５０	Ｂ４４０３
３０９－３１７	ＴＬＶＲＳＡＳＥＴ	１５１	Ａ０２０１、Ａ０２０５

[0228] [表31]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
３１２－３２０	ＲＳＡＳＥＴＳＥＫ	１５２	Ａ６８．１、Ａ１１０１
３１３－３２１	ＳＡＳＥＴＳＥＫＲ	１５３	Ａ３１０１、Ａ３３０２
３１５－３２３	ＳＥＴＳＥＫＲＰＦ	１５４	Ｂ４０、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３
３１６－３２４	ＥＴＳＥＫＲＰＦＭ	１５５	Ｂ８、Ｂ３５０１
３１７－３２５	ＴＳＥＫＲＰＦＭＣ	１５６	Ａ１、Ｂ５８０１
３１８－３２６	ＳＥＫＲＰＦＭＣＡ	１５７	Ｂ４０、Ｂ６０、Ｂ６１、Ｂ４４０３
３１９－３２７	ＥＫＲＰＦＭＣＡＹ	１５８	Ｃｗ０６０２、Ｃｗ０７０２

[0229]

[表32]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
３２４－３３２	ＭＣＡＹＰＧＣＮＫ	１５９	Ａ６８．１、Ａ１１０１
３２５－３３３	ＣＡＹＰＧＣＮＫＲ	１６０	Ａ１、Ａ６８．１、Ａ１１０１、Ａ３１０１、Ａ３３０２
３２６－３３４	ＡＹＰＧＣＮＫＲＹ	１６１	Ａ２４、Ｃｗ０４０１、Ｃｗ０７０２
３２７－３３５	ＹＰＧＣＮＫＲＹＦ	１６２	Ｂ３５０１、Ｂ３８０１、Ｂ５２０１、Ｃｗ０４０１、Ｃｗ０７０２
３２９－３３７	ＧＣＮＫＲＹＦＫＬ	１６３	Ａ２４、Ｂ１４、Ｂ６０、Ｂ７、Ｂ８、Ｂ３９０２、Ｃｗ０３０１

[0230] [表33]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
３３２－３４０	ＫＲＹＦＫＬＳＨＬ	１６４	Ｂ１４、Ｂ８、Ｂ２７０２、Ｂ２７０５、Ｂ３９０１、Ｂ３９０２、Ｃｗ０３０１、Ｃｗ０６０２
３３４－３４２	ＹＦＫＬＳＨＬＱＭ	１６５	Ｃｗ０４０１
３３７－３４５	ＬＳＨＬＱＭＨＳＲ	１６６	Ａ６８．１、Ａ３３０２
３４０－３４８	ＬＱＭＨＳＲＫＨＴ	１６７	Ａ０２０１、Ａ０２０５

[0231]

[表34]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
343－351	HSRKHTGEK	168	A68.1
345－353	RKHTGEKPY	169	Cw0702
347－355	HTGEKPYQC	170	B8、B5801
349－357	GEKPYQCDF	171	B40、B3701、B4403

[0232] [表35]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
351－359	KPYQCDFKD	172	B5102
354－362	QCDFKDCER	173	A1、A68.1、A3101、A3302
356－364	DFKDCERRF	174	A24、Cw0401
358－366	KDCERRFSR	175	A3101

[0233] [表36]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
362－370	RRFSRSDQL	176	B2702、B2705、B3901、Cw0301、Cw0602
363－371	RFSRSDQLK	177	A1101
364－372	FSRSDQLKR	178	A68.1、A3302
366－374	RSDQLKRHQ	179	A1
368－376	DQLKRHQRR	180	A68.1、A3101、A3302

[0234]

[表37]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
371－379	KRHQRRHTG	181	B14
372－380	RHQRRHTGV	182	B14、B3801、B3901
373－381	HQRRHTGVK	183	A1101、A3101、B2705
375－383	RRHTGVKPF	184	B2702、B2705、Cw0702
379－387	GVKPFQCKT	185	A68.1

[0235] [表38]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
383－391	FQCKTCQRK	186	A3、A1101、A3101、B2705
384－392	QCKTCQRKF	187	B62、B8
386－394	KTCQRKFSR	188	A1、A3、A68.1、A1101、A3101
387－395	TCQRKFSRS	189	B8
389－397	QRKFSRSDH	190	B2702、B2705
390－398	RKFSRSDHL	191	B14、B3901、B3902、Cw0301

[0236] [表39]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
391－399	KFSRSDHLK	192	A1101、A3101
394－402	RSDHLKTHT	193	A1、B5801
396－404	DHLKTHTRT	194	B3801、B3901

[0237] [表40]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
４０１－４０９	ＨＴＲＴＨＴＧＫＴ	１９５	Ｂ８
４０６－４１４	ＴＧＫＴＳＥＫＰＦ	１９６	Ｂ５２０１
４０８－４１６	ＫＴＳＥＫＰＦＳＣ	１９７	Ａ０２０１、Ｂ５８０１
４０９－４１７	ＴＳＥＫＰＦＳＣＲ	１９８	Ａ１、Ａ６８．１、Ａ３３０２
４１０－４１８	ＳＥＫＰＦＳＣＲＷ	１９９	Ｂ４０、Ｂ４４０３

[0238] [表41]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
４１２－４２０	ＫＰＦＳＣＲＷＰＳ	２００	Ｂ３５０１、Ｂ５１０２
４１５－４２３	ＳＣＲＷＰＳＣＱＫ	２０１	Ａ１１０１
４１６－４２４	ＣＲＷＰＳＣＱＫＫ	２０２	Ｂ２７０２、Ｂ２７０５
４１７－４２５	ＲＷＰＳＣＱＫＫＦ	２０３	Ａ２４、Ｂ３８０１、Ｃｗ０４０１
４１８－４２６	ＷＰＳＣＱＫＫＦＡ	２０４	Ｂ５１０２
４１９－４２７	ＰＳＣＱＫＫＦＡＲ	２０５	Ａ３３０２
４２０－４２８	ＳＣＱＫＫＦＡＲＳ	２０６	Ｂ８

[0239]

[表42]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
423－431	KKFARSDEL	207	B14、B3901、B3902、Cw0301、Cw0602
424－432	KFARSDELV	208	Cw0401
425－433	FARSDELVR	209	A68.1、A1101、A3101、A3302
426－434	ARSDELVRH	210	B2702、B2705
427－435	RSDELVRHH	211	A1
428－436	SDELVRHHN	212	B3701
429－437	DELVRHHNM	213	B14、B40、B60、B61、B3701、B4403、Cw0301

[0240] [表43]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
432－440	VRHHNMHQR	214	B2705
433－441	RHHNMHQRN	215	B3801
434－442	HHNMHQRNM	216	B3901
436－444	NMHQRNMTK	217	A3、A1101、A3101
437－445	MHQRNMTKL	218	B14、B3701、B3901、B3902、Cw0301
439－447	QRNMTKLQL	220	B14、B2702、B2705、B3901、Cw0602
440－448	RNMTKLQLA	221	B61

[0241]

[表44]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
４４１－４４９	ＮＭＴＫＬＱＬＡＬ	２２２	Ａ０２０１、Ａ０２０５、Ａ２４、Ａ３、Ｂ７、Ｂ３９０２、Ｃｗ０６０２

[0242] 「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」として、好ましくは、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２）、

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：３）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ （配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ （配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ （配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド、または配列番号：２、３、５、６および７の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドが挙げられる。さらに好ましくは、配列番号：２、３、５、６および７の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0243] 本発明における「アミノ酸配列を含むペプチド」とは、通常のように、当該アミノ酸配列のＮ末端アミノ酸および／またはＣ末端アミノ酸に更なるアミノ酸が付加されたペプチドを意味する。「癌抗原ペプチドＡ」および「癌抗原ペプチドＢ」における「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」が付加される場合、Ｃ末端側に付加されたペプチドが好ましい。「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープ」が付加される場合、Ｃ末端側への付加が好ましい。

[0244] 本発明における「アミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変ア

ミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチド」は、「改変キラーペプチド」とも呼ばれる。当該改変キラーペプチドは、アミノ酸配列において、１～３個のアミノ酸が、欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列からなり、ＭＨＣクラスＩに結合し、ＣＴＬを誘導するペプチドを意味する。置換されるアミノ酸の置換位置としては、９残基のアミノ酸からなるペプチドの場合、１位（Ｎ末端）、２位、３位および９位が挙げられる。付加（挿入も包含される）されるアミノ酸の数は好ましくは１または２であり、より好ましくは１である。好ましい付加位置としては、Ｃ末端が挙げられる。欠失されるアミノ酸の数は好ましくは１である。改変において、付加されるアミノ酸または置換されるアミノ酸は、遺伝子によりコードされる２０種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸であってもよい。

[0245] ＨＬＡのサブタイプの多型ごとに、ＨＬＡ抗原に結合できるペプチドのアミノ酸配列の規則性（結合モチーフ）が存在することが知られている。例えば、ＨＬＡ－Ａ２４の結合モチーフとして、８～１１残基のアミノ酸からなるペプチドにおいて、２位のアミノ酸が、Tyr、Phe、MetまたはTrpであり、Ｃ末端のアミノ酸が、Phe、Leu、Ile、TrpまたはMetであることが知られている（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２，ｐ３９１３，１９９４、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５５，ｐ４３０７，１９９４、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ，４１，ｐ１７８，１９９５）。よって、例えば９残基のアミノ酸からなるペプチドの場合、２位がTyr、Phe、MetまたはTrpにより、および／または９位がPhe、Leu、Ile、TrpまたはMetにより、置換することが可能であり、当該置換がなされたペプチドが改変キラーペプチドとして好ましい。同様に、ＨＬＡ－Ａ０２０１の結合モチーフとして、８～１１残基のアミノ酸からなるペプチドにおいて、２位のアミノ酸が、LeuまたはMetであり、Ｃ末端のアミノ酸が、ValまたはLeuであることが知られていることから、例えば９残基のアミノ酸からなるペプチドの場合、２位がLeuまたはMetにより、および／または９位がValまたはLeuにより、置換することが可能であり、当該置換がなされたペプチドが改変キラーペプチドとして好ましい。

[0246] 改変キラーペプチドとしては例えば、次のようなペプチドが挙げられる。

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２）の改変キラーペプチドである

ＲＹＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２２３）（国際公開０３／１０６６８２号参照）；

ＦＭＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２２４）、

ＲＬＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２２５）、

ＲＭＭＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２２６）、

ＲＭＦＰＮＡＰＹＶ （配列番号：２２７）もしくは

ＹＭＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２２８）（国際公開第２００９／０７２６１０号参照）；

[0247] ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：３）の改変キラーペプチドである

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：４）（国際公開第０２／７９２５３号参照）；

Xaa-Met-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu （配列番号：２２９）

（本配列中XaaはSerまたはAlaを表す）もしくは

Xaa-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu （配列番号：２３０）

（本配列中XaaはSer、Ala、Abu、Arg、Lys、Orn、Cit、Leu、PheまたはAsnを表す）（国際公開２００４／０２６８９７号参照）；

[0248] ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ （配列番号：５）の改変キラーペプチドである

ＡＹＬＰＡＶＰＳＬ （配列番号：２３１）（国際公開第２００３／１０６６８２号参照）；

[0249] ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ （配列番号：６）の改変キラーペプチドである

ＦＬＧＥＱＱＹＳＶ （配列番号：２３２）、

ＳＭＧＥＱＱＹＳＶ （配列番号：２３３）もしくは

ＳＬＭＥＱＱＹＳＶ （配列番号：２３４）（国際公開第２００９／０７２６１０号参照）；または

[0250] ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ （配列番号：７）の改変キラーペプチドである

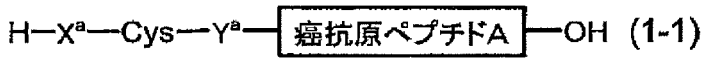
ＲＹＰＧＶＡＰＴＬ （配列番号：２３５）（国際公開第２００３／１０６

６８２号参照）。

[0251] 本発明における「R^1」は、水素原子、前記の式（２）で表される基または癌抗原ペプチドＣを表し、好ましくは、前記の式（２）で表される基または癌抗原ペプチドＣが挙げられる。

[0252] R^1が水素原子である場合、式（１）の化合物は、式（１－１）：

[0253] [化33]



[0254] （式中、X^a、Y^aおよび癌抗原ペプチドＡは、式（１）における前記と同義であり、Cysはシステイン残基を表す。）
で表される化合物すなわちペプチドである。

[0255] R^1が水素原子である式（１）の化合物すなわち式（１－１）で表されるペプチドについては、その配列はＷＴ１タンパクの部分配列と同一ではない。式（１）の要件「配列はＷＴ１タンパクの部分配列と同一ではない」とは、式（１－１）で表されるペプチドが配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列において連続する８～３５残基のアミノ酸からなる部分ペプチドではないことを意味する。

すなわち、R^1が水素原子である式（１）の化合物は、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列において連続する８～３５残基のアミノ酸からなる部分ペプチドではない。癌抗原ペプチドＡが$WT1_{138-146}$ペプチドである場合を例に挙げて、具体的に説明する。$WT1_{138-146}$ペプチドは、そのアミノ酸配列がＬＥＳＱＰＡＩＲＮ（配列番号：７８）であり、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列における１３８位～１４６位の連続する９残基のアミノ酸からなる部分ペプチドである。配列番号：１においては、$WT1_{138-146}$ペプチドのＮ末端側に連続する１３７位はＣである。よって、$WT1_{137-146}$ペプチド（ＣＬＥＳＱＰＡＩＲＮ）（配列番号：２３６）は、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列において連続する１０残基のアミノ酸からなる部分ペプチドに該当する。一方、本願発

明の要件「R^1が水素原子である式（１）の化合物は、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列において連続する８～３５残基のアミノ酸からなる部分ペプチドではない」に基づき、R^1が水素原子である式（１）の化合物において、癌抗原ペプチドＡがＷＴ$1_{138-146}$ペプチド（ＬＥＳＱＰＡＩＲＮ）（配列番号：７８）である場合には、ＷＴ$1_{137-146}$ペプチド（ＣＬＥＳＱＰＡＩＲＮ）（配列番号：２３６）は本願発明の化合物から除かれることから、X^aおよびY^aが同時に単結合になることはない。

[0256] R^1が水素原子である式（１）の化合物として、以下のアミノ酸配列：

ＣＲＭＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：１３）、

ＣＣＭＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：１４）、

ＣＣＹＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：１５）、

ＣＡＬＬＰＡＶＰＳＬ （配列番号：１６）、

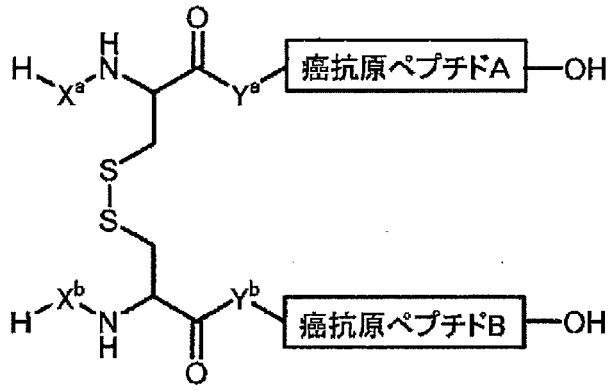
ＣＳＬＧＥＱＱＹＳＶ （配列番号：１７）および

ＣＲＶＰＧＶＡＰＴＬ （配列番号：１８）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい。

[0257] 「R^1」が前記の式（２）で表される基である場合、式（１）の化合物は、式（１－２）：

[0258] [化34]



(1-2)

[0259] （式中、X^a、Y^aおよび癌抗原ペプチドＡは、式（１）における前記と同義であり、X^b、Y^bおよび癌抗原ペプチドＢは、式（２）における前記と同義である。）で表される化合物である。

[0260] 本発明における「Ｘᵇ」および「Ｙᵇ」は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表す。Ｘᵇのアミノ酸残基数とＹᵇのアミノ酸残基数の和は０～４の整数である。例えば、当該和が０の整数であるとは、ＸᵇおよびＹᵇが単結合であることを意味する。また、当該和が４の整数である場合としては、例えばＸᵇおよびＹᵇが独立して２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、Ｘᵇが３残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹᵇが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、Ｘᵇが４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹᵇが単結合である場合などが挙げられる。

当該和の整数として、好ましくは０～２が挙げられ、より好ましくは０～１が挙げられ、最も好ましくは０が挙げられる。すなわち、ＸᵇおよびＹᵇとしては、共に単結合である場合が最も好ましい。

当該和の整数が２である場合としては、Ｘᵇが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹᵇが単結合である場合、ＸᵇおよびＹᵇが独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、またはＸᵇが単結合であり且つＹᵇが２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合が挙げられる。

当該和の整数が１である場合としては、Ｘᵇが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つＹᵇが単結合である場合、またはＸᵇが単結合であり且つＹᵇが１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合が挙げられる。このうち好ましくは、Ｘᵇが単結合であり且つＹᵇがアラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である場合が挙げられる。

[0261] 本発明における「癌抗原ペプチドＢ」とは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである。当該「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」については、前記と同義である。但し、式（１）で表される化合物において、癌抗原ペプチドＡと癌抗原ペプチドＢが同時に同じペプチドであることはない。すなわち、癌抗原ペプチドＢは、「癌抗原ペプチドＡとは異なり」との要件で限定される。

癌抗原ペプチドＡと癌抗原ペプチドＢが同時に同じペプチドであることはないことから、Ｒ[1]が前記の式（２）で表される基である式（１）の化合物は、仮にＸ[a]およびＸ[b]が同じで且つＹ[a]およびＹ[b]が同じであっても、ホモダイマーではなく、ヘテロダイマーである。ホモダイマーは、同じペプチド単量体が二量体化された二量体を意味し、ヘテロダイマーは、異なるペプチド単量体が二量体化された二量体を意味する。

[0262] 癌抗原ペプチドＢにおいて、Ｎ末端アミノ酸のアミノ基は式（２）中ではＹ[b]と結合し（すなわち式（１－２）中でもＹ[b]と結合し）、Ｃ末端アミノ酸のカルボニル基が式（２）中の水酸基と結合する。

[0263] Ｒ[1]が式（２）で表される基である場合の式（１）の化合物、すなわち式（１－２）の化合物として、好ましくは、式（３）：

[0264] [化35]

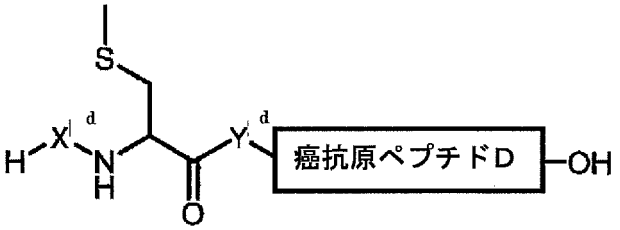


[0265] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物が挙げられる。

[0266] また、本発明において、「癌抗原ペプチドＢ」が、１つのシステイン残基を含むＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである場合、式（１）の化合物は、癌抗原ペプチドＢ中のチオエーテル基が、式（１６）：

[0267] [化36]



（１６）

[0268] 中のチオエーテル基と結合している化合物、または癌抗原ペプチドＥのシステイン残基のチオエーテル基と結合している化合物であってもよい。

[0269] 本発明における「Ｘ[d]」および「Ｙ[d]」は、独立して、単結合または１～４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基を表す。Ｘ[d]のアミノ酸残基数とＹ

^{d}のアミノ酸残基数の和は０～４の整数である。例えば、当該和が０の整数であるとは、X^{d}およびY^{d}が単結合であることを意味する。また、当該和が４の整数である場合としては、例えばX^{d}およびY^{d}が独立して２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、X^{d}が３残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^{d}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、X^{d}が４残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^{d}が単結合である場合などが挙げられる。

当該和の整数として、好ましくは０～２が挙げられ、より好ましくは０～１が挙げられ、最も好ましくは０が挙げられる。すなわち、X^{d}およびY^{d}としては、共に単結合である場合が最も好ましい。

当該和の整数が２である場合としては、X^{d}が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^{b}が単結合である場合、X^{d}およびY^{d}が独立して１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合、またはX^{d}が単結合であり且つY^{d}が２残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合が挙げられる。

当該和の整数が１である場合としては、X^{d}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基であり且つY^{d}が単結合である場合、またはX^{d}が単結合であり且つY^{d}が１残基のアミノ酸からなるペプチドの二価基である場合が挙げられる。このうち好ましくは、X^{d}が単結合であり且つY^{d}がアラニン残基、ロイシン残基またはメチオニン残基である場合が挙げられる。

[0270] 本発明における「癌抗原ペプチドＤ」とは、７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである。式（１６）において癌抗原ペプチドＤは、Ｎ末端アミノ酸のアミノ基が式（１６）中のY^{d}と結合し、Ｃ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１６）中の水酸基と結合する。

[0271] 本発明における「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性」とは、ＭＨＣクラスＩＩ分子と結合してヘルパーＴ細胞を誘導する特性を意味し、後述する「癌抗原ペプチドＣ」における定義と同義である。

[0272] ＭＨＣクラスＩＩ分子に相当するＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱおよびＤ

Ｐなどのサブタイプに分類される。「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性」として、好ましくは、ＨＬＡ－ＤＲ拘束性、ＨＬＡ－ＤＱ拘束性またはＨＬＡ－ＤＰ拘束性が挙げられる。

[0273] よって、本発明における「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」とは、インビトロおよび／またはインビボで、ＭＨＣクラスＩＩ抗原に結合し、ヘルパーＴ細胞を誘導するペプチドを意味する。「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」のアミノ酸残基数は、７～３０であり、好ましくは１４～３０である。

[0274] 「癌抗原ペプチドＤ」としては、後述する「癌抗原ペプチドＣ」において挙げられるアミノ酸配列と同様に、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ （配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ （配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：２４）および

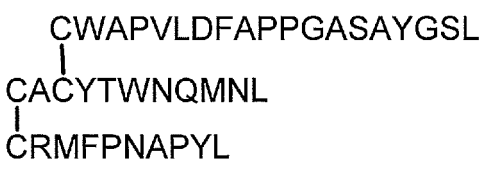
ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0275] 式（１）の化合物において、「癌抗原ペプチドＢ」が、１つのシステイン残基を含むＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである場合、癌抗原ペプチドＢ中のチオエーテル基が、式（１６）中のチオエーテル基と結合している化合物として、好ましくは、式（１５）：

[0276]

[化37]



（１５）

[0277] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物が挙げられる。

[0278] 本発明における「癌抗原ペプチドＥ」とは、１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表し、後述する「癌抗原ペプチドＣ」における「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」の定義と同義である。

[0279] 「癌抗原ペプチドＥ」としては、後述する「癌抗原ペプチドＣ」において挙げられるアミノ酸配列と同様に、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ （配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ （配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２３）および

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：２４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0280] R^1が癌抗原ペプチドＣである場合、癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基が式（１）中のチオエーテル基と結合する。

癌抗原ペプチドＣは、１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドまたは１つのシステイン残

基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを表す。

[0281] 本発明の「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」においては、当該ペプチドのアミノ酸配列において、少なくとも１つのシステイン残基を含んでいればよく、含まれるシステイン残基数としては、１～３が好ましく、１～２がより好ましく、１が最も好ましい。当該「ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」については、前記と同義である。R^1が「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」である式（１）の化合物も、ホモダイマーではなく、ヘテロダイマーである。

[0282] 「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」としては、好ましくは、表４５～５２に記載されたペプチドが挙げられる。各表中、「位置」とは、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列における位置を示す。

[0283] [表45]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
１７－２５	ＳＬＧＧＧＧＧＣＡ	３１	Ｂ６２
１８－２６	ＬＧＧＧＧＧＣＡＬ	３２	Ｂ６０、Ｂ７、Ｂ３８０１、Ｂ５１０１、Ｂ５１０２
２０－２８	ＧＧＧＧＣＡＬＰＶ	３３	Ｂ６１、Ｂ５１０１、Ｂ５１０２、Ｂ５２０１
２３－３１	ＧＣＡＬＰＶＳＧＡ	３４	Ｂ４０、Ｂ６１
２４－３２	ＣＡＬＰＶＳＧＡＡ	３５	Ｂ４０、Ｂ５１０２、Ｃｗ０３０１

[0284]

[表46]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
８０－８８	ＧＡＥＰＨＥＥＱＣ	５１	Ａ１
８１－８９	ＡＥＰＨＥＥＱＣＬ	５２	Ａ０２０５、Ｂ４０、Ｂ６０、Ｂ６１、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３
８２－９０	ＥＰＨＥＥＱＣＬＳ	５３	Ｂ３５０１、Ｂ５１０１
８３－９１	ＰＨＥＥＱＣＬＳＡ	５４	Ｂ３８０１
８４－９２	ＨＥＥＱＣＬＳＡＦ	５５	Ｂ４０、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３、Ｃｗ０７０２
８５－９３	ＥＥＱＣＬＳＡＦＴ	５６	Ｂ４０、Ｂ６０、Ｂ６１、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３
８６－９４	ＥＱＣＬＳＡＦＴＶ	５７	Ａ０２０１、Ｂ６２、Ｂ５２０１
８８－９６	ＣＬＳＡＦＴＶＨＦ	５８	Ａ３、Ｂ６２
９９－１０７	ＱＦＴＧＴＡＧＡＣ	６３	Ｃｗ０４０１
１００－１０８	ＦＴＧＴＡＧＡＣＲ	６４	Ａ６８．１、Ａ１１０１、Ａ３１０１、Ａ３３０２

[0285]

[表47]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
１０１－１０９	ＴＧＴＡＧＡＣＲＹ	６５	Ｂ６２、Ｂ４４０３、Ｃｗ０７０２
１０４－１１２	ＡＧＡＣＲＹＧＰＦ	６６	Ｂ４４０３、Ｂ５２０１
１０７－１１５	ＣＲＹＧＰＦＧＰＰ	６７	Ｂ２７０２
１３０－１３８	ＮＡＰＹＬＰＳＣＬ	７５	Ａ２４、Ｂ６０、Ｂ７、Ｂ８、Ｂ３９０２、Ｂ５１０１、Ｂ５１０２、Ｃｗ０３０１、Ｃｗ０６０２、Ｃｗ０７０２
１３６－１４４	ＳＣＬＥＳＱＰＡＩ	７６	Ｂ８、Ｂ３９０１、Ｂ５１０２、Ｃｗ０３０１
１３７－１４５	ＣＬＥＳＱＰＡＩＲ	７７	Ａ１、Ａ３、Ａ６８．１、Ａ１１０１、Ａ３１０１、Ａ３３０２
１９４－２０２	ＳＶＰＰＰＶＹＧＣ	９７	Ａ０２０５、Ａ３

[0286]

[表48]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
202－210	CHTPTDSCT	98	B3801
204－212	TPTDSCTGS	99	B5101
206－214	TDSCTGSQA	100	B40、B61、B3701
207－215	DSCTGSQAL	101	A24、A3302、B60、B7、B8、B3501、B3901、B3902、Cw0602
208－216	SCTGSQALL	102	B60、B7、B8、B3701、B3801、B3901、B3902
209－217	CTGSQALLL	103	B60、B7、B3701、B3902
227－235	YQMTSQLEC	114	A0201、A0205、B62
228－236	QMTSQLECM	115	A0201

[0287]

[表49]

位置	アミノ酸配列	配列番号	ＨＬＡサブタイプ
２３０－２３８	ＴＳＱＬＥＣＭＴＷ	１１６	Ｂ５８０１
２３２－２４０	ＱＬＥＣＭＴＷＮＱ	１１７	Ａ１
２３３－２４１	ＬＥＣＭＴＷＮＱＭ	１１８	Ｂ４０、Ｂ６０、Ｂ６１、Ｂ３７０１、Ｂ４４０３
２３５－２４３	ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ	３	Ａ０２０１、Ａ０２０５、Ａ２４、Ａ３、Ｂ７
２７６－２８４	ＨＴＴＰＩＬＣＧＡ	１３４	Ｂ５８０１
２７８－２８６	ＴＰＩＬＣＧＡＱＹ	１３５	Ｂ３５０１、Ｂ４４０３、Ｃｗ０４０１、Ｃｗ０７０２
２７９－２８７	ＰＩＬＣＧＡＱＹＲ	１３６	Ａ３１０１
２８０－２８８	ＩＬＣＧＡＱＹＲＩ	１３７	Ａ０２０１、Ａ０２０５、Ａ３、Ｂ６２、Ｂ５１０１

[0288]

[表50]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLA サブタイプ
317－325	TSEKRPFMC	156	A1、B5801
318－326	SEKRPFMCA	157	B40、B60、B61、B4403
319－327	EKRPFMCAY	158	Cw0602、Cw0702
324－332	MCAYPGCNK	159	A68.1、A1101
325－333	CAYPGCNKR	160	A1、A68.1、A1101、A3101、A3302
326－334	AYPGCNKRY	161	A24、Cw0401、Cw0702
327－335	YPGCNKRYF	162	B3501、B3801、B5201、Cw0401、Cw0702
329－337	GCNKRYFKL	163	A24、B14、B60、B7、B8、B3902、Cw0301
347－355	HTGEKPYQC	170	B8、B5801
349－357	GEKPYQCDF	171	B40、B3701、B4403

[0289]

[表51]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
351－359	KPYQCDFKD	172	B5102
354－362	QCDFKDCER	173	A1、A68.1、A3101、A3302
356－364	DFKDCERRF	174	A24、Cw0401
358－366	KDCERRFSR	175	A3101
379－387	GVKPFQCKT	185	A68.1
383－391	FQCKTCQRK	186	A3、A1101、A3101、B2705
384－392	QCKTCQRKF	187	B62、B8
386－394	KTCQRKFSR	188	A1、A3、A68.1、A1101、A3101
387－395	TCQRKFSRS	189	B8

[0290] [表52]

位置	アミノ酸配列	配列番号	HLAサブタイプ
408－416	KTSEKPFSC	197	A0201、B5801
409－417	TSEKPFSCR	198	A1、A68.1、A3302
410－418	SEKPFSCRW	199	B40、B4403
412－420	KPFSCRWPS	200	B3501、B5102
415－423	SCRWPSCQK	201	A1101
416－424	CRWPSCQKK	202	B2702、B2705
417－425	RWPSCQKKF	203	A24、B3801、Cw0401
418－426	WPSCQKKFA	204	B5102
419－427	PSCQKKFAR	205	A3302
420－428	SCQKKFARS	206	B8

[0291] 「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」として、より好ましくは、以下のアミノ酸配列：

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：３）

を含むペプチド、または配列番号：３のアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチドが挙げられる。当該「アミノ酸配列を含む」および「アミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つＣＴＬ誘導活性を有するペプチド」は、前記と同義である。最も好ましくは、以下のアミノ酸配列：

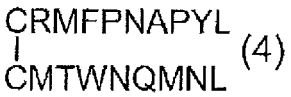
ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：３）および

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0292] Ｒ[1]が「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」である場合の式（１）の化合物として、好ましくは、式（４）：

[0293] [化38]

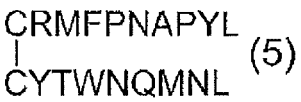


(4)

[0294] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、または式（５）：

[0295] [化39]



(5)

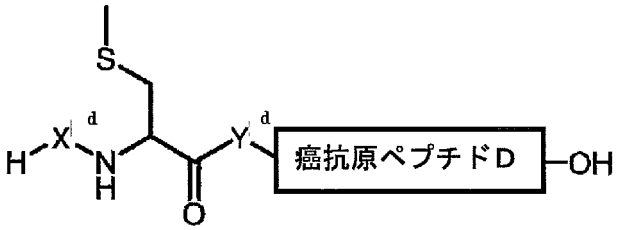
[0296] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物が挙げられる。このうち、式（５）で表される化合物がより好ましい。

[0297] また、本発明において、ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである「癌

抗原ペプチドＣ」のＮ末端に１つのシステイン残基を含む１～４残基のアミノ酸からなるペプチドがさらに結合している場合、前記の式（１）の化合物は、癌抗原ペプチドＣのＮ末端に結合しているペプチドのシステイン残基のチオエーテル基が、式（１６）：

[0298] [化40]



（１６）

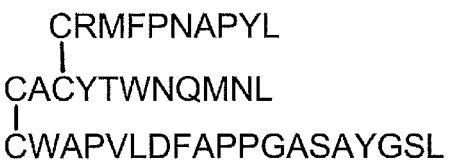
[0299] 中のチオエーテル基と結合している化合物、または癌抗原ペプチドＥのシステイン残基のチオエーテル基と結合している化合物であってもよい。

[0300] 本発明における「Ｘ^{d}」、「Ｙ^{d}」、「癌抗原ペプチドＤ」および「癌抗原ペプチドＥ」は、前記の「Ｘ^{d}」、「Ｙ^{d}」、「癌抗原ペプチドＤ」および「癌抗原ペプチドＥ」における定義と同義である。

[0301] 本発明において、ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである「癌抗原ペプチドＣ」のＮ末端に結合している「１つのシステイン残基を含む１～４残基のアミノ酸からなるペプチド」は、好ましくは、ＣＡからなるジペプチドである。

[0302] 式（１）の化合物において、ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである「癌抗原ペプチドＣ」のＮ末端に１つのシステイン残基を含む１～４残基のアミノ酸からなるペプチドがさらに結合している場合、癌抗原ペプチドＣのＮ末端に結合しているペプチドのシステイン残基のチオエーテル基が、前記式（１６）中のチオエーテル基と結合している化合物として、好ましくは、式（１４）：

[0303] [化41]

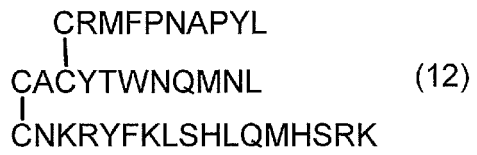


（１４）

[0304] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）
で表される化合物が挙げられる。

[0305] また、式（１）の化合物において、ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドである「癌抗原ペプチドＣ」のＮ末端に１つのシステイン残基を含む１～４残基のアミノ酸からなるペプチドがさらに結合している場合、癌抗原ペプチドＣのＮ末端に結合しているペプチドのシステイン残基のチオエーテル基が、「癌抗原ペプチドＥ」中のチオエーテル基と結合している化合物として、好ましくは、式（１２）：

[0306] [化42]



(12)

[0307] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）
で表される化合物が挙げられる。

[0308] 本発明の「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」においては、当該ペプチドのアミノ酸配列において、少なくとも１つのシステイン残基を含んでいればよく、含まれるシステイン残基数としては、１～３が好ましく、１～２がより好ましく、１が最も好ましい。

[0309] 本発明における「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性」とは、ＭＨＣクラスＩＩ分子と結合してヘルパーＴ細胞を誘導する特性を意味する。

[0310] ＭＨＣクラスＩＩ分子に相当するＨＬＡは、ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱおよびＤＰなどのサブタイプに分類される。「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性」として、好ましくは、ＨＬＡ－ＤＲ拘束性、ＨＬＡ－ＤＱ拘束性またはＨＬＡ－ＤＰ拘束性が挙げられる。

[0311] よって、本発明における「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」とは、インビトロおよび／またはインビボで、ＭＨＣクラスＩＩ抗原に結合し、ヘルパーＴ細胞を誘導するペプチドを意味する。「ＭＨＣクラスＩＩ拘束性

ＷＴ１ペプチド」のアミノ酸残基数は、７～３０であり、好ましくは１４～３０である。

[0312] 「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」の例としては、例えば、表５３に記載されたペプチドが挙げられる。各表中、「位置」とは、配列番号：１に記載のヒトのＷＴ１のアミノ酸配列における位置を示す。

[0313] [表53]

位置	アミノ酸配列	配列番号
１１７－１３９	ＰＳＱＡＳＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥ	２３７
１２２－１４０	ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ	１１
２０２－２３３	ＣＨＴＰＴＤＳＣＴＧＳＱＡＬＬＬＲＴＰＹＳＳＤＮＬＹＱＭＴＳＱＬ	９
３２８－３４９	ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ	１０
４２１－４４１	ＣＱＫＫＦＡＲＳＤＥＬＶＲＨＨＮＭＨＱＲＮ	２１９

[0314] 「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」として、好ましくは、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１１）および

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：１０）、

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド、または配列番号：１０～１１の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つヘルパーＴ細胞誘導活性を有するペプチドが挙げられる。

[0315] 「アミノ酸配列を含むペプチド」とは、前記のとおり、当該アミノ酸配列のＮ末端アミノ酸および／またはＣ末端アミノ酸に更なるアミノ酸が付加されたペプチドを意味する。「１つのシステイン残基を含むＭＨＣクラスＩＩ

拘束性ＷＴ１ペプチド」においては、付加される場合、Ｎ末端側または／およびＣ末端側に付加されてよい。

[0316] 本発明における「アミノ酸配列中にアミノ酸残基の改変を含有する改変アミノ酸配列を含み且つヘルパーＴ細胞誘導活性を有するペプチド」は、「改変ヘルパーペプチド」とも呼ばれる。当該改変ヘルパーペプチドは、アミノ酸配列において、１～３個のアミノ酸が、欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列からなり、ＭＨＣクラスＩＩに結合し、ヘルパーＴ細胞を誘導するペプチドを意味する。付加（挿入も包含される）されるアミノ酸の数は好ましくは１～３である。欠失されるアミノ酸の数は好ましくは１～５である。改変において、付加されるアミノ酸または置換されるアミノ酸は、遺伝子によりコードされる２０種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸であってもよい。

[0317] 改変ヘルパーペプチドとしては例えば、次のようなペプチドが挙げられる。

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１１）の改変ヘルパーペプチドである

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ （配列番号：１２）（特許文献６参照）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ （配列番号：１９）もしくは

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ （配列番号：２５）；または

[0318] ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：１０）の改変ヘルパーペプチドである

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２１）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２３）もしくは

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：２４）。

[0319] 「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣク

ラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」として、より好ましくは、以下のアミノ酸配列：

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：１９）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣ　（配列番号：２５）、

ＳＧＱＡＲＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１１）、

ＳＧＱＡＹＭＦＰＮＡＰＹＬＰＳＣＬＥＳ　（配列番号：１２）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２０）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２１）、

ＰＧＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：１０）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）および

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0320] Ｒ[1]が「１つのシステイン残基を含む７～３０残基のアミノ酸からなるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド」である場合の式（１）の化合物として、好ましくは、式（６）：

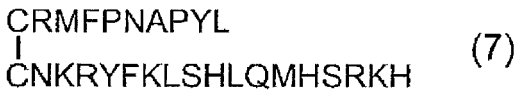
[0321] [化43]



[0322] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（７）：

[0323] [化44]

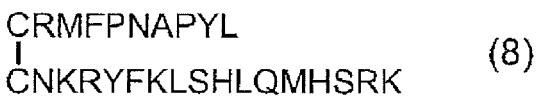


[0324] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（８）：

[0325]

[化45]

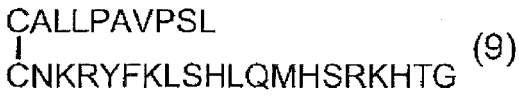


(8)

[0326] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、または式（９）：

[0327] [化46]



(9)

[0328] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

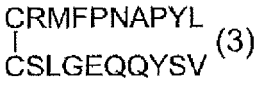
で表される化合物が挙げられる。

[0329] 本発明はまた、本発明の化合物と１つ以上のＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドを含む組成物を提供する。

[0330] 本発明の組成物に含まれる本発明の化合物としては、

[0331] 式（３）：

[0332] [化47]

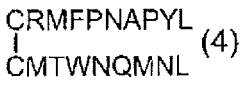


(3)

[0333] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、式（４）：

[0334] [化48]

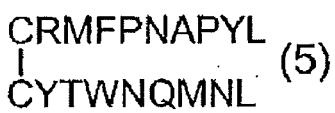


(4)

[0335] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、および式（５）：

[0336] [化49]



(5)

[0337] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物が挙げられる。

[0338] 本発明の組成物に含まれるＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドとしては、以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：２４）、

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４４）、

ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４２）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ （配列番号：２４３）

が挙げられる。

[0339] 本発明はまた、２つの異なるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチドおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド、または２つの異なるＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１エピトープおよびＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１エピトープをそれぞれジスルフィド結合を介して結合させた化合物の合成方法を提供する。本発明の方法は以下の工程（１）～（３）を含む。

[0340] 本発明の工程（１）においては、Ｆｍｏｃ－Ｃ（Ｍｍｔ）Ａ－ＳＢｎおよび癌抗原ペプチドＣを用いて、Ｃ（Ｍｍｔ）ＡのＣ末端アミノ酸のカルボニル基と癌抗原ペプチドＣのＮ末端アミノ基が結合したペプチドを合成する。

[0341] 「癌抗原ペプチドＣ」は、前記の「癌抗原ペプチドＣ」の定義と同義である。「Ｆｍｏｃ」は、９－フルオレニルメトキシカルボニル基を表す。「Ｍｍｔ」は、モノメトキシトリチル基を表す。「ＳＢｎ」は、チオベンジル基を表す。

[0342] 本発明の工程（２）においては、前記工程（１）で得られたペプチドおよびＮｐｙｓ基で保護された１つのシステイン残基がＮ末端に結合している癌抗原ペプチドＡを用いて、前記工程（１）で得られたペプチド中の癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基と癌抗原ペプチドＡのＮ末端に結合しているシステイン残基のチオエーテル基が結合したペプチドを合成する。

[0343] 「癌抗原ペプチドＡ」は、前記の「癌抗原ペプチドＡ」の定義と同義である。「Ｎｐｙｓ」は、３－ニトロ－２－ピリジルチオ基を表す。

[0344] 本発明の工程（３）においては、前記工程（２）で得られたペプチドおよびＳＰｙ基で保護されたシステイン残基を含む癌抗原ペプチドＤを用いて、前記工程（２）で得られたペプチド中の癌抗原ペプチドＡのＮ末端に結合しているシステイン残基のチオエーテル基と癌抗原ペプチドＤのシステイン残基のチオエーテル基が結合したペプチドを合成する。

[0345] 「癌抗原ペプチドＤ」は、前記の「癌抗原ペプチドＤ」の定義と同義である。「ＳＰｙ」は、２－ピリジルスルフィド基を表す。

[0346] 本発明の化合物およびペプチドならびにそれらの中間体にあたるペプチドは、本明細書の実施例に記載された方法、または通常のペプチド合成において用いられる方法に準じて製造することができる。製造方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス（Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ），Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９６６；ザ・プロテインズ（Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ），Ｖｏｌ ２，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７６；ペプチド合成，丸善（株），１９７５；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株），１９８５；医薬品の開発 続 第１４巻・ペプチド合成，広川書店，１９９１）などに記載されている方法が挙げられる。

例えば、Ｆｍｏｃ法もしくはＢｏｃ法を用いて固相合成機で製造する方法や、Ｂｏｃ－アミノ酸もしくはＺ－アミノ酸を液相合成法で逐次縮合させて製造する方法が挙げられる（Ｆｍｏｃは９－フルオレニルメトキシカルボニル基、Ｂｏｃはｔ－ブトキシカルボニル基、Ｚはベンジルオキシカルボニル基をそれぞれ表わす）。

本発明の化合物を製造するための中間体において、アミノ基、カルボキシ基、メルカプト基などの官能基は、必要に応じて保護、脱保護の技術を用い、適当な保護基で保護し、また脱保護することができる。好適な保護基、保護する方法、および脱保護する方法としては、「Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒ

oups in Organic Synthesis 2nd Edition (John Wiley & Sons, Inc.;1990)」などに詳細に記載されている。たとえば、メルカプト基の保護基としてはアセトアミドメチル基またはトリチル基などが挙げられる。

[0347] 本発明の化合物がジスルフィド結合を有する場合、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて、システイン残基を含む異なる2つのペプチド間で、またはシステイン残基を含むペプチドとシステイン間で、当該ジスルフィド結合を形成することができる。ジスルフィド結合の形成方法は、文献(ペプタイド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966;ザ・プロテインズ(The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976;ペプチド合成, 丸善(株), 1975;ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株), 1985;医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991)などに記載されている方法が挙げられる。

[0348] 具体的には、ペプチドに含まれるシステイン残基が1個の場合、システイン側鎖上のメルカプト基の保護基を含むすべての保護基を除去した後、不活性溶媒中で酸化させることにより、ジスルフィド結合を有する化合物(ジスルフィド化合物)を製造することができる。また、メルカプト基を持つ2つの中間体を適当な溶媒中に混合し酸化することにより製造することができる。当該酸化の方法としては、通常のペプチド合成でジスルフィド結合を形成させる公知の方法を適宜選択すればよい。例えば、ヨウ素酸化、アルカリ条件下で空気酸化反応に付す方法、またはアルカリ性もしくは酸性条件下酸化剤を添加してジスルフィド結合を形成する方法などが挙げられる。ここで、酸化剤としては、ヨウ素、ジメチルスルホキシド(DMSO)、フェリシアン化カリウムなどが挙げられる。溶媒としては水、酢酸、メタノール、クロロホルム、DMFもしくはDMSOなど、またはこれらの混合液を用いることができる。酸化反応によりしばしば、対称、非対称性ジスルフィド化合物

の混合物を与える。目的の非対称性ジスルフィド化合物は種々のクロマトグラフィー、または再結晶などで精製することによって得ることができる。あるいは活性化されたメルカプト基をもつ中間体とメルカプト基をもつ中間体を混合することにより選択的なジスルフィド結合を形成することができる。活性化されたメルカプト基をもつ中間体としては、Ｎｐｙｓ基（３－ニトロ－２－ピリジンスルフェニル基）が結合したメルカプト基などが挙げられる。あるいは、あらかじめ一方の中間体と例えば２，２’－ジチオビス（５－ニトロピリジン）を混合することによりメルカプト基を活性化した後、他方の中間体を加えることにより選択的なジスルフィド結合を形成することができる（Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ．　Ｖｏｌ．　３７．　Ｎｏ．　９，　ｐｐ．　１３４７－１３５０）。

[0349] ペプチドに含まれるシステイン残基が２個以上の場合も、前記と同様の方法を用いることができる。この場合はジスルフィド結合様式が異なる異性体が得られる。システイン側鎖の保護基を特定の組み合わせにすることにより、目的のシステイン残基間でジスルフィド結合を形成した二量体を得ることができる。前記保護基の組み合わせとしては、ＭｅＢｚｌ（メチルベンジル）基とＡｃｍ（アセトアミドメチル）基、Ｔｒｔ（トリチル）基とＡｃｍ基、Ｎｐｙｓ（３－ニトロ－２－ピリジルチオ）基とＡｃｍ基、Ｓ－Ｂｕ－ｔ（Ｓ－ｔｅｒｔ－ブチル）基とＡｃｍ基などが挙げられる。例えばＭｅＢｚｌ基とＡｃｍ基の組み合わせの場合、まずＭｅＢｚｌ基とシステイン側鎖以外のその他の保護基を除去した後、ペプチド単量体を含む溶液を空気酸化反応に付して脱保護されたシステイン残基間にジスルフィド結合を形成し、次いでヨウ素による脱保護および酸化を行ってＡｃｍ基で保護されていたシステイン残基間にジスルフィド結合を形成する方法などが挙げられる。

[0350] 得られた本発明の化合物、ペプチドおよび中間体は、当業者に公知の方法や通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて精製することができる。例えば、種々のクロマトグラフィー（例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過、もしくは逆相ク

ロマトグラフィー）、または再結晶などで精製することができる。例えば、再結晶溶媒としては、メタノール、エタノールもしくは２－プロパノールなどのアルコール系溶媒、ジエチルエーテルなどのエーテル系溶媒、酢酸エチルなどのエステル系溶媒、ベンゼンもしくはトルエンなどの芳香族炭化水素系溶媒、アセトンなどのケトン系溶媒、ヘキサンなどの炭化水素系溶媒、ジメチルホルムアミドもしくはアセトニトリルなどの非プロトン系溶媒、水、またはこれらの混合溶媒などを用いることができる。その他精製方法としては、実験化学講座（日本化学会編、丸善）１巻などに記載された方法などを用いることができる。

ジスルフィド化合物の精製方法は、文献（ペプタイド・シンセシス（Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ），Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９６６；ザ・プロテインズ（Ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ），Ｖｏｌ ２，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９７６；ペプチド合成，丸善（株），１９７５；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株），１９８５；医薬品の開発 続 第１４巻・ペプチド合成，広川書店，１９９１）などに記載されている。中でも、ＨＰＬＣが好ましい。

[0351] 本発明の化合物において、１つ以上の不斉点がある場合、通常の方法に従って、その不斉点を有する原料（アミノ酸）を用いることによって、製造することができる。また、本発明の化合物の光学純度を上げるために、製造工程の適当な段階で光学分割などを行ってもよい。光学分割法として例えば、本発明の化合物もしくはその中間体を不活性溶媒中（例えばメタノール、エタノール、もしくは２－プロパノールなどのアルコール系溶媒、ジエチルエーテルなどのエーテル系溶媒、酢酸エチルなどのエステル系溶媒、トルエンなどの炭化水素系溶媒、またはアセトニトリルなどの非プロトン系溶媒、およびこれらの混合溶媒）、光学活性な酸（例えば、マンデル酸、Ｎ－ベンジルオキシアラニン、もしくは乳酸などのモノカルボン酸、酒石酸、ｏ－ジイソプロピリデン酒石酸もしくはリンゴ酸などのジカルボン酸、またはカンファースルフォン酸もしくはブロモカンファースルフォン酸などのスルホン酸

）と塩を形成させるジアステレオマー法により行うことができる。本発明の化合物または中間体がカルボキシ基などの酸性官能基を有する場合は、光学活性なアミン（例えばα－フェネチルアミン、キニン、キニジン、シンコニジン、シンコニン、ストリキニーネなどの有機アミン）と塩を形成させることにより光学分割を行うこともできる。

[0352] 塩を形成させる温度としては、室温から溶媒の沸点までの範囲から選択される。光学純度を向上させるためには、一旦、溶媒の沸点付近まで温度を上げることが望ましい。析出した塩を濾取する際、必要に応じて冷却し収率を向上させることができる。光学活性な酸、またはアミンの使用量は、基質に対し約０．５～約２．０当量の範囲、好ましくは１当量前後の範囲が適当である。必要に応じ結晶を不活性溶媒中（例えばメタノール、エタノール、２－プロパノールなどのアルコール系溶媒、ジエチルエーテルなどのエーテル系溶媒、酢酸エチルなどのエステル系溶媒、トルエンなどの炭化水素系溶媒、アセトニトリルなどの非プロトン系溶媒およびこれらの混合溶媒）で再結晶し、高純度の光学活性な塩を得ることもできる。また、必要に応じて光学分割した塩を通常の方法で酸または塩基で処理しフリー体として得ることもできる。

[0353] 本発明における「薬学上許容される塩」としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。例えば、酸付加塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩などの無機酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩などの有機酸塩が挙げられ、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩などの無機塩基塩、トリエチルアンモニウム塩、トリエタノールアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩などの有機塩基塩などが挙げられ、さらにはアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などの塩基性あるいは酸性アミノ酸といったアミノ酸塩が挙げられる。

[0354] 本発明の化合物またはその薬学上許容される塩の水和物、エタノール溶媒和物などの溶媒和物も、本発明に含まれる。さらに、本発明は、式（１)で表される化合物のあらゆるジアステレオマー、エナンチオマーなどの存在し得るあらゆる立体異性体、およびあらゆる態様の結晶形も包含している。

[0355] 一般にペプチドの製造においては、光学活性なα－アミノ酸を縮合する工程、種々の保護基を除去する工程またはペプチドを樹脂から切り出す工程などで、アミノ酸が欠損したペプチド、加水分解や酸化などにより分解したペプチド、アミノ酸がラセミ化したペプチドなど種々の副生成物が生ずる。実験室スケールでは、種々のクロマトグラフィー（例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過、もしくは逆相クロマトグラフィー）を組み合わせることによって、これらの不純物を除去し高純度のペプチドや化合物を得ることができる。しかしながら、医薬品として提供するために工業的なスケールで高純度のペプチドや化合物を得ることは容易ではない。

本発明の化合物は、その物理化学的性質においても、医薬品原薬として大量製造可能な性質を有する。具体的には、溶解性が高い、溶液中安定性に優れている、または濃縮された際にゲル化しにくいなどの性質を有し、逆相ＨＰＬＣなどのカラムクロマトグラフィーによる精製工程で、大量スケールにおいても容易に高純度の化合物を原薬として製造することができる。

[0356] このようにして製造された本発明の化合物は、システイン残基がジスルフィド結合を形成していることなどにより、溶液中での酸化剤などに対する安定性に優れており、医薬品原料として一定の品質と効率的なＣＴＬ誘導活性を保持するものである。

本発明の化合物は、癌免疫療法におけるＣＴＬ誘導剤の有効成分として、癌ワクチンの有効成分として、また医薬組成物の有効成分として有用である。すなわち本発明の化合物は、本明細書の実施例に示すとおり、優れた免疫原性を有し、優れたＣＴＬ誘導活性を効率よく示すことができる。また、本発明の化合物によって誘導されるＣＴＬは、驚くべきことに、癌細胞が本来

保有するＷＴ１の天然型部分ペプチドを認識することができる。

ＣＴＬ誘導活性は、ＨＬＡテトラマー法（Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ：１００，５６５－５７０（２００２））または限界希釈法（Ｎａｔ．Ｍｅｄ．：４，３２１－３２７（１９９８））によりＣＴＬの数を測定することにより確認することができる。あるいは、例えばＨＬＡ－Ａ２４拘束性のＣＴＬ誘導活性の場合、国際公開第０２／４７４７４号およびＩｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ：１００，５６５－５７０（２００２）に記述されたＨＬＡ－Ａ２４モデルマウスを用いることなどにより調べることができる。

[0357] 従って、本発明の化合物は、ＷＴ１遺伝子が発現している癌やＷＴ１遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌の治療薬または予防薬（再発防止薬）として用いることができる。当該癌としては、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫もしくは悪性リンパ腫などの血液性癌、または胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌もしくは脳腫瘍などの固形癌が挙げられる。

[0358] 本発明の化合物またはその薬学上許容される塩は、各化合物または各塩に応じて適切な形態とすることにより、癌の細胞性免疫療法におけるＣＴＬ誘導剤の有効成分、癌ワクチンの有効成分または／および医薬組成物の有効成分とすることができる。

[0359] 本発明の化合物の細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントとともに投与することができる。アジュバントとしては、文献（Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．，７：２７７-２８９，１９９４）に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、ＧＭ-ＣＳＦ、インターロイキン－２、インターロイキン－７もしくはインターロイキン－１２などのサイトカイン、植物由来成分、海洋生物由来成分、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルジョン製剤）などを挙げることができる。菌体由来成分としては、リピドＡ（ｌｉｐｉｄ　Ａ）、その誘導体であるモノホスホリ

ルリピドＡ（ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌ　ｌｉｐｉｄ　Ａ）、細菌（ＢＣＧ菌などのＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属細菌が挙げられる）の死菌、細菌由来のタンパク質、ポリヌクレオチド、フロイント不完全アジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ　Ｉｎｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｄｊｕｖａｎｔ）、フロイント完全アジュバント（Ｆｒｅｕｎｄ’ｓ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ａｄｊｕｖａｎｔ）、細胞壁骨格成分（例えばＢＣＧ-ＣＷＳなどが挙げられる）、トレハロースジミコレート（ＴＤＭ）などが挙げられる。

また本発明の化合物は、リポソーム製剤、直径数μｍのビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤などにして投与することもできる。

さらに本発明の化合物（コンジュゲート体）は、ＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）と共に投与することができる。共に投与する方法としては、コンジュゲート体とヘルパーペプチドを個別に投与することも可能であるが、一つの医薬組成物の中にコンジュゲート体とヘルパーペプチドを含むカクテル製剤（カクテル剤、カクテル）がより好ましい。本カクテル製剤は、ＭＨＣクラスＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちキラーペプチド）を生じ得るコンジュゲート体およびＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）を含むものである。よって、癌免疫療法における癌ワクチンとして、ヘルパーペプチドを含有した本カクテル製剤を投与することによって、ＣＴＬを含む他のＴ　ｃｅｌｌの機能亢進に重要であるヘルパーＴ細胞（ｈｅｌｐｅｒ　Ｔ　ｃｅｌｌ）の活性化も可能となり、コンジュゲート体の機能・薬効（細胞性免疫能など）を向上させることができる。

ＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）については、本願明細書中に記載したとおりである。本カクテル製剤のヘルパーペプチドとしては、以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）、
ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）、
ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４２）および
ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ　（配列番号：２４３）
が挙げられる。中でも、ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）が好ましい。

本カクテル製剤は、細胞性免疫能などの癌ワクチンとしての薬効が向上されたものであることを、一例として本願明細書の実施例や試験例として示したように、確認できた。

[0360] 製剤中の本発明の化合物の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重などにより適宜調整することができるが、通常０．０００１ｍｇ～１０００ｍｇ、好ましくは０．００１ｍｇ～１０００ｍｇ、より好ましくは０．１ｍｇ～１０ｍｇである。

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経皮投与などが挙げられる。ＣＴＬを効率良く誘導する皮内投与や皮下投与が好ましい。投与回数および投与間隔は、治療または予防目的の疾患、患者の個体差により適宜調整することができるが、通常複数回であり、数日ないし数月に１回投与するのが好ましい。

このような本発明の化合物を有効成分とする医薬組成物をＷＴ１陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供することができる。

実施例

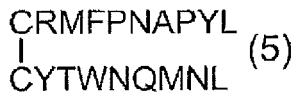
[0361] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。

[0362] 実施例１

式（５）：

[0363]

[化50]



(5)

[0364] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物の合成

[0365] 工程１．　H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OHの合成

（Ｃ(Npys)ＲＭＦＰＮＡＰＹＬの合成）

Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＡｌｋｏＴ樹脂（Ａｌｋｏはｐ－アルコキシベンジルアルコール）２８２ｍｇ（渡辺化学製；０．７１ｍｍｏｌ／ｇ、０．２ｍｍｏｌ）を出発原料としＦｍｏｃ／ｔＢｕ法による固相合成によりペプチド鎖の組上げを行った。固相合成にはＣＳ　Ｂｉｏ社製ＣＳ３３６Ｘ型ペプチド合成機を用い、Ｆｍｏｃ基の脱保護は２０％ピペリジンのＤＭＦ溶液で５分間および２０分間処理することにより行った。保護アミノ酸のカップリングは１．０５ｍｍｏｌの保護アミノ酸、１ｍｍｏｌのＨＢＴＵ、２ｍｍｏｌのＤＩＰＥＡのＤＭＦ溶液と１時間反応させることにより行った。得られた樹脂をＤＭＦおよびエーテルで洗浄後減圧乾燥することにより、Boc-Cys(Npys)-Arg(Pmc)-Met-Phe-Pro-Asn(Trt)-Ala-Pro-Tyr(tBu)-Leu-Alko-樹脂６３０ｍｇを得た。このペプチド樹脂にＴＦＡ／H_2O／ＴＩＳ＝９５／２．５／２．５の混合液１０ｍｌを加え、室温にて２時間振とうした。樹脂を濾去後、反応液を減圧濃縮した。反応液を氷冷しジエチルエーテル５０ｍｌを加えた。生じた沈殿物を濾取しエーテルで洗浄後減圧乾燥することにより粗ペプチド２１７ｍｇを得た。得られた粗ペプチド溶液を２０％酢酸水７ｍｌとアセトニトリル１ｍｌの混合液に溶解し逆相ＨＰＬＣにて精製した。

ポンプ：Ｓｈｉｍａｄｚｕ製；ＬＣ－８Ａ型

カラム：ＹＭＣ　ＯＤＳ－Ａ　３ｃｍφ×２５ｃｍＬ，１０μｍ

溶出液１：H_2O／０．１％ＴＦＡ

溶出液２：CH_3CN／０．１％ＴＦＡ

流速：２０ｍｌ／ｍｉｎ

検出：ＵＶ２２０ｎｍ

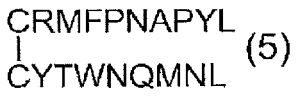
２液濃度１５％で平衡化させたカラムに粗ペプチド溶液を注入した。その後２液濃度を１０分間で３７％に上昇させ、その後１分間あたり０．２４％の割合で上昇させた。目的物を含む画分を集め凍結乾燥することにより、H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH　５３ｍｇを得た。

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ　＝１３６６．１ [Ｍ＋１]$^{+}$　（理論値＝１３６６．６）

[0366] 工程２．　(H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) disulfide bondの合成

〔すなわち式（５）：

[0367] [化51]



(5)

[0368] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物の合成〕

工程１で得たH-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH　５０ｍｇと公知の方法(例えばＷＯ０７／０６３９０３)で合成したH-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH（すなわちＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４））　４３ｍｇを混合し、ＤＭＳＯ　１ｍＬを加え、室温にて２０分間攪拌した。反応液を０．１％ＴＦＡ水　５ｍｌで希釈し逆相ＨＰＬＣにて精製した。

ポンプ：Ｓｈｉｍａｄｚｕ製；ＬＣ－８Ａ型

カラム：ＹＭＣ　ＯＤＳ－Ａ　３ｃｍφ×２５ｃｍＬ，１０μｍ

溶出液１：$Ｈ_{2}Ｏ$／０．１％ＴＦＡ

溶出液２：$ＣＨ_{3}ＣＮ$／０．１％ＴＦＡ

流速：２０ｍｌ／ｍｉｎ

検出：ＵＶ２２０ｎｍ

２液濃度２５％で平衡化させたカラムに当該反応液を注入した。その後２

液濃度を１分間あたり０．２５％の割合で上昇させた。目的物を含む画分を集め凍結乾燥した後、逆相ＨＰＬＣによる再精製、凍結乾燥を行うことにより、(H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH)(H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) disulfide bond（すなわち式（５）で示される化合物）　２１ｍｇを得た。

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ　＝１１９１．８ $[M+2]^{2+}$　（理論値＝１１９１．９）

[0369] 実施例２

以下のアミノ酸配列：

ＣＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：１３）

からなるペプチドの合成

[0370] 工程１．　Ｆｍｏｃ－Ｌｅｕ－ＡｌｋｏＴ樹脂（Ａｌｋｏはｐ－アルコキシベンジルアルコール）３３８ｍｇ(渡辺化学製；０．７４ｍｍｏｌ／ｇ、０．２５ｍｍｏｌ)を出発原料とし、実施例１に記載の方法と同様な固相合成を２回行うことによりH-Cys(Trt)-Arg(Pmc)-Met-Phe-Pro-Asn(Trt)-Ala-Pro-Tyr(tBu)-Leu -Alko-樹脂　１．５４ｇを得た。このペプチド樹脂にＴＦＡ／H_2O／ＴＩＳ＝９５／２．５／２．５の混合液　１５ｍｌを加え、室温にて３時間振とうした。樹脂を濾去後、反応液を減圧濃縮した。反応液を氷冷しジエチルエーテル　５０ｍｌを加えた。生じた沈殿物を濾取しエーテルで洗浄後減圧乾燥することにより粗ペプチド６３７ｍｇを得た。

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ＝１２１１．９　$[M+1]^{+}$　（理論値＝１２１２．５）

[0371] 工程２．　工程１で得られた粗ペプチド３２１ｍｇをＴＦＡ　１０ｍｌに溶解し、ＨＰＬＣ（Ｓｈｉｍａｄｚｕ製；ＬＣ６ＡＤ型）１液＝H_2O／０．１％ＴＦＡで平衡化しているＹＭＣ－ＰＡＣＫ　ＯＤＳ－Ａ　３ｃｍφ×２５ｃｍＬのカラムにＨＰＬＣのポンプでチャージした。その状態で約２０分間保ち、２０分後、２液＝CH_3CN／０．１％ＴＦＡの濃度を２７％迄上昇した。その後、目的とするペプチドの溶出液を２２０ｎｍのＵＶでモニターし

ながら、２液濃度を１分間あたり０．２５％の割合で上昇させ、目的物を含む分画を集めた。凍結乾燥後に得られたペプチド１００ｍｇを再度同じ条件で逆相精製し、アセトニトリルを減圧留去し凍結乾燥することにより目的とするペプチド（ＣＲＭＦＰＮＡＰＹＬ　（配列番号：１３））３７．２ｍｇを得た。

ポンプ：Ｓｈｉｍａｄｚｕ製；ＬＣ－６Ａ型

カラム：ＹＭＣ　ＯＤＳ－Ａ　３ｃｍφ×２５ｃｍＬ，１０μｍ

溶出液１：H_2O／０．１％ＴＦＡ

溶出液２：CH_3CN／０．１％ＴＦＡ

流速：２０ｍｌ／ｍｉｎ検出：ＵＶ２２０ｎｍ

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ　＝１２１２．０［Ｍ＋１］$^+$　（理論値＝１２１１．６）

[0372] 実施例３～５

実施例２と同様の方法で、配列番号：１６、１８または１７のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。表５４に、合成量および質量分析結果を示した。

[0373] [表54]

実施例番号	アミノ酸配列	配列番号	合成量（ｍｇ）	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ	質量分析：理論値
3	ＣＡＬＬＰＡＶＰＳＬ	１６	４２	９８３．８［Ｍ＋１］$^+$	９８３．２
4	ＣＲＶＰＧＶＡＰＴＬ	１８	５３	１０１２．７［Ｍ＋１Ｈ］$^+$	１０１２．２
5	ＣＳＬＧＥＱＱＹＳＶ	１７	３１	１１１３．７［Ｍ＋１］$^+$	１１１３．２

[0374] 試験例１

ＥＲＡＰ１によるＮ末端アミノ酸のトリミングの経時変化

実施例２～５にて合成した配列番号：１３、１６、１８および１７の各ペプチドについて、ＥＲＡＰ１（ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　Ｎｏｖｅｍｂｅｒ　２００

８，ｖｏｌ．３，Ｉｓｓｕｅ １１，ｅ３６５８）によるN末端アミノ酸のトリミングを評価した。

３０μｌのＥＲＡＰ１（２．０ｍｇ／ｍｌ）ＰＢＳバッファー溶液を２５８μｌのＴｒｉｓ・ＨＣｌバッファーに加えた。１０ｍＭの各ペプチドのＤＭＳＯ溶液１２．０μｌを上述のＥＲＡＰ１溶液に加えて、良く混和した後に室温で静置した。１．０，２．０，４．０，８．０時間後に５０μｌのサンプルを１５０μｌのＭｅＯＨに加えて反応を停止し、２５μｌをＵＦＬＣ（分析条件は以下に示す。）に打ち込み、目的とするペプチドのＡＵＣを求めた。トリミングによって得られるペプチドを別に化学的に合成し、酵素の無い同様の条件で分析して得られたＡＵＣを基にして、トリミングによって得られたペプチドの生成率を求めた。

分析条件

ポンプ：Ｓｈｉｍａｄｚｕ社製　ＵＦＬＣ

カラム：Ｓｈｉｍ－ｐａｃｋ　ＸＲ－ＯＤＳ　３．０ｍｍｉ．ｄ．ｘ７５ｍｍ

溶液：０．１％　ＴＦＡ H_2O（Ａ）－　０．１％　ＴＦＡ　CH_3CN（Ｂ）

オーブン温度：４０℃

流速：１．０ｍｌ／ｍｉｎ

検出波長：λ＝２２０ｎｍ

グラジエント：

１．０．０ｍｉｎから５．０ｍｉｎでＢ液濃度を１．０％から７０％まで上昇

２．０．０ｍｉｎから５．０ｍｉｎでＢ液濃度を１．０％から５０％まで上昇

目的のペプチド：

実施例２～５にて合成したペプチドについて、ＥＲＡＰ１によるN末端アミノ酸のトリミングにより得られたペプチドのアミノ酸配列を、表５５に示

した。

[0375] [表55]

トリミング試験に用いたペプチド			トリミングにより得られたペプチド	
実施例番号	アミノ酸配列	配列番号	アミノ酸配列	配列番号
2	CRMFPNAPYL	13	RMFPNAPYL	2
3	CALLPAVPSL	16	ALLPAVPSL	5
4	CRVPGVAPTL	18	RVPGVAPTL	7
5	CSLGEQQYSV	17	SLGEQQYSV	6

[0376] トリミングにより得られたペプチドの生成率の経時変化を、表５６および図１に示した。

[0377] [表56]

実施例番号	配列番号	グラジエント	生成率 (%) 1時間後	2時間後	4時間後	8時間後
2	13	1	25.5	35.2	46.2	47.6
3	16	1	65.5	50.6	13.5	0
4	18	1	59.1	57.5	30.1	7.80
5	17	2	77.6	72.8	46.0	7.90

[0378] 本トリミング結果は、いずれのＣｙｓ延長ペプチド（配列番号：１３、１６、１７および１８）においても、延長されたＮ末端のＣｙｓをＥＲＡＰ－１が選択的に切断、すなわち、Ｃｙｓ延長ペプチドが、ペプチド配列に大きく依存されることなく、ＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、最終的に目的の癌抗原ペプチド（配列番号：２、５、６および７）へ変換されることを強く示唆する。

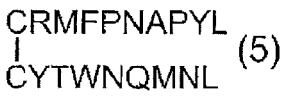
[0379] 試験例２

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0380] 実施例１で合成した式（５）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス

を用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0381] [化52]



(5)

[0382] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＢがＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４拘束性エピトープＷＴ１ペプチドである。

[0383] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス（Ｃ５７ＢＬ／６ＣｒＨＬＡ－Ａ２．１ＤＲ１）は、マウスのＭＨＣを欠損し、ヒトのＭＨＣであるＨＬＡ－Ａ０２０１とマウスＭＨＣであるＨ－２Ｄ^{b}のキメラＨＬＡおよびＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０１０１を発現するマウスであり、本マウスを用いることで、ＨＬＡ－Ａ０２陽性のヒトでＣＴＬを誘導し得るペプチドの選択が可能である（Ｅｕｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４；３４：３０６０－９）。一方、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス（Ｃ５７ＢＬ／６ＣｒＨＬＡ－Ａ２４０２／Ｋ^{b})は、ヒトのＭＨＣであるＨＬＡ－Ａ２４０２とマウスＭＨＣであるＨ－２Ｋ^{b}のキメラＨＬＡを発現するマウスであり、本マウスを用いることで、ＨＬＡ－Ａ２４陽性のヒトでＣＴＬを誘導し得るペプチドの選択が可能である（Ｉｎｔ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ．２００２；１００：５６５－７０）。

[0384] 式（５）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２、４）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。

[0385] 具体的には、式（５）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で５ｍｇ／ｍＬに希釈した

のち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に２５０μｇ／ｓｉｔｅで４箇所投与した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．１５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を１×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、４）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。また、希釈したペプチド（配列番号：４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、２０時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ．Ｔ．Ｌ．社製）によって測定した。

[0386] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図２に、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図３に示した。

各図において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を、図３の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞

を配列番号：４で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物の投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

各図中において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。

[0387] これより、式（５）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチド特異的なＣＴＬおよび配列番号：４で表されるペプチド特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。式（５）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２および配列番号：４のペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。

すなわち、本発明の化合物の一例である式（５）で表される化合物は、異なる２種のＷＴ１ペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいて異なる２種のＣＴＬを誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが、明らかとなった。

[0388] 参考例１～７

実施例２と同様の方法で、配列番号：２２、２４、２３、２、４、６および５の各アミノ酸配列からなる各ペプチドを合成した。表５７に質量分析結果を示した。配列番号：２２、２４、２３、２、４、６および５は本願発明の化合物ではないことから、いずれも参考例として記載した。

[0389]

[表57]

参考例番号	アミノ酸配列	配列番号	質量分析：LC－ESI／MS m／z	質量分析：理論値
1	CNKRYFKLSHLQMHSRK	22	1089．1 $[M+2H]^+$	1089．3
2	CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	24	825．1 $[M+3H]^+$	824．8
3	CNKRYFKLSHLQMHSRKH	23	772．4 $[M+3H]^+$	772．2
4	RMFPNAPYL	2	1109．0 $[M+H]^+$	1109．3
5	CYTWNQMNL	4	1172．9 $[M+H]^+$	1173．4
6	SLGEQQYSV	6	1010．9 $[M+H]^+$	1011．1
7	ALLPAVPSL	5	881．0 $[M+H]^+$	881．1

[0390] 実施例６～９

実施例１と同様の方法で、式（３）、（６）、（７）および（８）で表される各化合物（コンジュゲート体）を合成した。表５８に質量分析結果を示した。（各式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

[0391] [表58]

実施例番号	構造式	式番号	質量分析：LC－ESI／MS m／z	質量分析：理論値
6	CRMFPNAPYL | CSLGEQQYSV	(3)	1162．3 $[M+2H]^+$	1162．0
7	CRMFPNAPYL | CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	(6)	1228．0 $[M+3H]^+$	1227．6
8	CRMFPNAPYL | CNKRYFKLSHLQMHSRKH	(7)	705．8 $[M+5H]^+$	705．3
9	CRMFPNAPYL | CNKRYFKLSHLQMHSRK	(8)	1129．8 $[M+3H]^+$	1129．2

[0392] 試験例３

溶解度測定

工程１．等張緩衝液の調製

１．７５％リン酸水素二ナトリウム水溶液と５．５３％クエン酸水溶液を混合し、ｐＨ６．０および７．４の各緩衝液を調製した。

工程２．試験溶液の調製

被験物を１ｍｇ程度秤量し、等張緩衝液を０．５ｍＬ加えこれを試験溶液とした。調製した試験溶液は室温にて９０分間振とう（振とう条件： TAITEC社製RECIPRO SHAKER SR-1N, Speed=８）後、遠心分離（１５０００ｒｐｍ、５分間、室温）を行い、遠心分離後の上清を試験溶液とした。

工程３．標準液の調製

被験物約1ｍｇを精秤し、０．１％ＴＦＡ水／アセトニトリル＝１／１にて溶解し、全量を１０ｍＬとし、これを被験物の標準液として用いた。

工程４．被験物の濃度測定

被験物の標準液および試験溶液をＨＰＬＣ（分析条件は表５９に記載）にて分析し、標準液のピーク面積比より被験物の溶解度を算出した。

ＨＰＬＣ測定条件

カラム：ChemcoPack Quicksorb(４．６ ｍｍφ×１５０ ｍｍ，５ μｍ）ケムコ株式会社製

移動相：Ａ液；０．１％ＴＦＡ水、Ｂ液；０．１％ＴＦＡアセトニトリル溶液

カラム温度：室温

流速：1ｍＬ/ｍｉｎ

検出波長：ＵＶ ２５４ｎｍ,２３０ｎｍ（２波長検出）

サンプル注入量：１０μＬ

[0393] [表59]

グラジェント分析条件		
時間（分）	Ａ液（%）	Ｂ液（%）
０．００	８０	２０
１０．００	０	１００
１５．００	０	１００
１５．０１	８０	２０
２５．００	８０	２０
２５．０１	ＳＴＯＰ	

[0394] 参考例１～２および４～７にて合成したペプチドならびに実施例１、７および９にて合成した化合物（コンジュゲート体）について、上記の溶解度測定を行い、各溶解度を表６０に示した。

[0395] [表60]

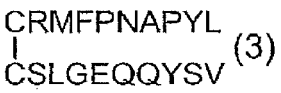
参考例番号または実施例番号	アミノ酸配列または構造式	配列番号または式番号	pH 6.0 (mg/mL)	pH 7.4 (mg/mL)
参考例6	SLGEQQYSV	配列番号：6	>1.0	>1.0
参考例7	ALLPAVPSL	配列番号：5	>1.0	>1.0
参考例2	CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	配列番号：24	>1.0	0.556
参考例1	CNKRYFKLSHLQMHSRK	配列番号：22	>1.0	0.931
実施例7	CRMFPNAPYL | CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	式（6）	>1.0	0.279
実施例9	CRMFPNAPYL | CNKRYFKLSHLQMHSRK	式（8）	>1.0	0.789
参考例4	RMFPNAPYL	配列番号：2	>1.0	>1.0
参考例5	CYTWNQMNL	配列番号：4	0.106	0.167
実施例1	CRMFPNAPYL | CYTWNQMNL	式（5）	0.511	0.200

[0396] 試験例４

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0397] 実施例６で合成した式（３）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（３）：

[0398] [化53]



[0399] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＢがＳＬＧＥＱＱＹＳＶ（配列番号：６）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）およびＳＬＧＥＱＱＹＳＶ（配列番号：６）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドである。

[0400] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２に記したとおりである。

[0401] 式（３）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２、６）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（３）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、６）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。

[0402] 具体的には、式（３）で表される化合物を注射用水で１０ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に５００μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．７５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、６）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２、６）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、２０時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色し

たスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0403] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図４に示した。

図４において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図４の黒棒、斜線棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２、６で表される各ペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒または斜線棒と白棒の値の差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、式（３）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２、６で表される各ペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図４において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：２、６で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。

[0404] これより、式（３）で表される化合物は配列番号：２、６で表される各ペプチド特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。式（３）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２および６で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。すなわち、本発明の化合物の一例である式（３）で表される化合物は、異なる２種のペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいて異なる２種のＣＴＬを誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが、明らかとなった。

[0405] 試験例５

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0406] 実施例７で合成した式（６）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ

－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（６）：

[0407] [化54]



(6)

[0408] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＣがＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ（配列番号：２４）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0409] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２に記したとおりである。本マウスを用いることで、ＨＬＡ－Ａ０２陽性のヒトでＣＴＬを誘導し得るペプチドの選択が可能であることに加え、ヒトのＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０１０１に結合してヘルパーＴ細胞を誘導し得るヘルパーペプチドのＣＴＬ誘導増強効果を評価することも可能である。

[0410] 式（６）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬおよびヘルパーペプチド（配列番号：２４）反応性の細胞が誘導されるか否かは、式（６）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、２４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（６）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、配列番号：２で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較した。

[0411] 具体的には、配列番号：２で表されるペプチドを注射用水で６ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合し

エマルション化させた。エマルション化させたペプチドを、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（６）で表される化合物を注射用水で１９．８ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に４９５μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（６）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる配列番号：２のペプチドの物質量は、配列番号：２で表されるペプチドのマウス１匹あたりの投与量に含まれる物質量と等しくなるよう調整した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌあるいは０．５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、２４）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２、２４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、２０時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ．Ｔ．Ｌ．社製）によって測定した。

[0412] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図５および６に示した。

図５および６において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を、横軸はマウスに投与した化合物またはペプチドを示す。図５の黒棒はＨＬＡ－Ａ０

２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、配列番号：２で表されるペプチドまたは式（６）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図５において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。また、図５において式（６）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、配列番号：２で表されるペプチドの投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

さらに、図６の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２４で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド反応性細胞の数を示し、式（６）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２４で表されるヘルパーペプチド反応性の細胞が誘導され、配列番号：２で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２４で表されるペプチド反応性の細胞が誘導されなかったことを示す。図６において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。

[0413] これより、式（６）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬと、配列番号：２４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞を誘導し得ることが明らかとなった。式（６）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミ

ングを受けて、配列番号：２および２４で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。式（６）で表される化合物から生成された配列番号：２４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強され、配列番号：２で表されるペプチドを投与した場合と比較して多くの配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が認められたものと推察された。

すなわち、本発明の化合物の一例である式（６）で表される化合物は、異なる２種のペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが、明らかとなった。

[0414] 試験例６

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0415] 実施例９で合成した式（８）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（８）：

[0416] [化55]



(8)

[0417] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＣがＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ（配列番号：２２）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ（配列番号：２２）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である

。

[0418] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0419] 式（８）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬおよびヘルパーペプチド（配列番号：２２）反応性の細胞が誘導されるか否かは、式（８）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、２２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（８）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、配列番号：２で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較した。

[0420] 具体的には、配列番号：２で表されるペプチドを注射用水で６ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させたペプチドを、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（８）で表される化合物を注射用水で１８ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に４５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（８）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる配列番号：２のペプチドの物質量は、配列番号：２で表されるペプチドのマウス１匹あたりの投与量に含まれる物質量と等しくなるよう調整した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙ ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌあるいは０．５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプ

チド（配列番号：２、２２）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２、２２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、２０時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0421] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図７および８に示した。

図７および８において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を、横軸はマウスに投与した化合物またはペプチドを示す。図７の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、配列番号：２で表されるペプチドまたは式（８）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図７において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。また、図７において式（８）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、配列番号：２で表されるペプチドの投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

さらに、図８の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞

を配列番号：２２で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド反応性細胞の数を示し、式（８）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２２で表されるヘルパーペプチド反応性の細胞が誘導され、配列番号：２で表されるペプチドの投与によってマウス生体内において配列番号：２２で表されるペプチド反応性の細胞が誘導されなかったことを示す。図８において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。

[0422] これより、式（８）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬと、配列番号：２２で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞を誘導し得ることが明らかとなった。式（８）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２および２２で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。式（８）で表される化合物から生成された配列番号：２２で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強され、配列番号：２で表される化合物を投与した場合と比較して多くの配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が認められたものと推察された。

すなわち、本発明の化合物の一例である式（８）で表される化合物は、異なる２種のペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが、明らかとなった。

[0423] 実施例１０

実施例１と同様の方法で、式（９）で表される各化合物（コンジュゲート体）を合成した。表６１に質量分析結果を示した。（式中、ＣとＣの間の結

合はジスルフィド結合を表す。）

[0424] [表61]

実施例番号	構造式	式番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ	質量分析：理論値
１０	CALLPAVPSL | CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	９	１１５１．９ ［M＋３H］$^{3+}$	１１５２．０

[0425] 参考例８～９

実施例２と同様の方法で、配列番号２３８～２３９のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。表６２に質量分析結果を示した。表に記載のペプチドは本発明の化合物ではないことから参考例として記載した。

[0426] [表62]

参考例番号	アミノ酸配列	配列番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ	質量分析：理論値
８	ＲＭＦＰＮＡＰＹＬＣＹＴＷＮＱＭＮＬ	２３８	１１３２．２ ［M＋２H］$^{2+}$	１１３２．３
９	ＣＹＴＷＮＱＭＮＬＲＭＦＰＮＡＰＹＬ	２３９	１１３３．０ ［M＋２H］$^{2+}$	１１３２．３

[0427] 参考例１０～１１

実施例２と同様の方法で、配列番号２４０～２４１のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。表６３に質量分析結果を示した。表に記載のペプチドは本発明の化合物ではないことから参考例として記載した。

[0428]

[表63]

参考例番号	アミノ酸配列	配列番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ	質量分析：理論値
１０	RMFPNAPYLGGGGGG CYTWNQMNL	２４０	１３０３．７ [M+2H]$^{2+}$	１３０３．５
１１	CYTWNQMNLGGGGGG RMFPNAPYL	２４１	１３０３．０ [M+2H]$^{2+}$	１３０３．５

[0429] 表６３に示すペプチドは非特許文献Cancer Science January 2012, Vol. 103, no. 1, 150-153. を参考に合成した。

[0430] 試験例７

コンジュゲート体及びカクテル化ワクチンの安定性試験

[0431] 工程１

コンジュゲート体（式番号：（６））２．４　ｍｇを１２０μＬ注射用水に溶解し、遮光下室温にて保存した。

工程２

カクテル化ワクチンとして配列番号：２で表されるペプチド１．１　ｍｇを１８０　μＬの注射用水に溶解し、これを１２３　μＬ用いて配列番号：２４で表されるペプチド１．３　ｍｇを溶解し、遮光下室温にて保存した。

工程３

工程１および工程２で得られた溶液２．５　μＬを注射用水５０　μＬで希釈した後、ＨＰＬＣによる分析（分析条件は以下に示す。）を行い、保存開始直後の面積値を１００％として、コンジュゲート体及びペプチドの水溶液中の含有率を測定し、コンジュゲート体の含有率を表６４に、カクテル化ワクチン中の各ペプチドの含有率を表６５に記載した。

分析条件

ポンプ：Ｓｈｉｍａｄｚｕ社製　ＵＦＬＣ

カラム：Ｋｉｎｅｔｅｘ　２．６ｕ　Ｃ１８　１００Ａ　３．０ｍｍｉ．ｄ．ｘ７５ｍｍ

移動相：Ａ液；０．１％ＴＦＡ水、Ｂ液；０．１％ＴＦＡアセトニトリル溶液

カラム温度：４０　℃

流速：１　ｍＬ/ｍｉｎ

検出波長：ＵＶ　２２０、２５４　ｎｍ（２波長検出）

サンプル注入量：１０　μＬ

[0432] [表64]

経過時間	式番号（６）含有率（％）
１日	１０７
２週間	９６

[0433] [表65]

経過時間	配列番号：２含有率（％）	配列番号：２４含有率（％）
１日	９７	６５
１週間	９９	９
２週間	９４	６

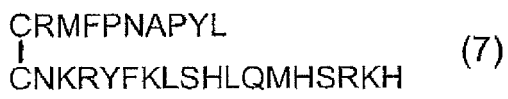
[0434] 試験例７において式番号（６）で表されるコンジュゲート体は溶液調製後２週間時点で、式（６）で表される化合物が９６％残存していた。これに対して、カクテル化ワクチンである配列番号２と配列番号２４の混合溶液においては１日経過時点で配列番号２４の含有率が６５％まで低下し、２週間後には６％まで低下していた。これらの結果から、水溶液にて保存されたコンジュゲート体は同条件にて保存されたカクテル化ワクチンに比べ安定であることが示された。

[0435] 試験例８

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0436] 実施例８で合成した式（７）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（７）：

[0437] [化56]



[0438] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＣがＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ（配列番号：２３）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ（配列番号：２３）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0439] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0440] 式（７）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬおよびヘルパーペプチド（配列番号：２３）反応性の細胞が誘導されるか否かは、式（７）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、２３）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（７）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、配列番号：２で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較した。

[0441] 具体的には、配列番号：２で表されるペプチドを注射用水で６ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させたペプチドを、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（７）で表される化合物

を注射用水で１９ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に４７５μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（７）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる配列番号：２のペプチドの物質量は、配列番号：２で表されるペプチドのマウス１匹あたりの投与量に含まれる物質量と等しくなるよう調整した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌあるいは０．５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、２３）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２、２３）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１７時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ．Ｔ．Ｌ．社製）によって測定した。

[0442] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図９および１０に示した。図９および１０において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を、横軸はマウスに投与した化合物またはペプチドを示す。図９の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の

差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、配列番号：２で表されるペプチドまたは式（７）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図９において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。また、図９において式（７）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、配列番号：２で表されるペプチドの投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

さらに、図１０の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２３で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド反応性細胞の数を示し、式（７）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２３で表されるヘルパーペプチド反応性の細胞が誘導され、配列番号：２で表されるペプチドの投与によってマウス生体内において配列番号：２３で表されるペプチド反応性の細胞が誘導されなかったことを示す。図１０において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。

[0443] これより、式（７）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬと、配列番号：２３で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞を誘導し得ることが明らかとなった。式（７）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２および２３で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。式（７）で表される化合物から生成された配列番号：２３で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことに

よって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強され、配列番号：２で表される化合物を投与した場合と比較して多くの配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が認められたものと推察された。

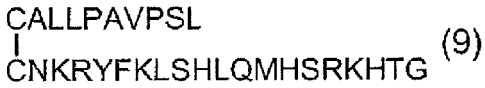
すなわち、本発明の化合物の一例である式（７）で表される化合物は、異なる２種のペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが、明らかとなった。

[0444] 試験例９

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0445] 実施例１０で合成した式（９）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（９）：

[0446] [化57]



[0447] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＡＬＬＰＡＶＰＳＬ（配列番号：５）であり且つ癌抗原ペプチドＣがＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＧ（配列番号：２４）である化合物である。ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ（配列番号：５）はＨＬＡ－Ａ０２０１およびＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＧ（配列番号：２４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0448] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0449] 式（９）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：５）に対するＣＴＬおよびヘルパーペプチド（配列番号：２４）反応性の細胞が誘導されるか否かは、式（９）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：５、２４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（９）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、配列番号：５で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：５）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較した。

[0450] 具体的には、配列番号：５で表されるペプチドを注射用水で６ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させたペプチドを、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（９）で表される化合物を注射用水で２３．６ｍｇ／ｍＬに溶解したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に５９０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（９）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる配列番号：５のペプチドの物質量は、配列番号：５で表されるペプチドのマウス１匹あたりの投与量に含まれる物質量と等しくなるよう調整した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌあるいは０．７５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：５、２４）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：５、２４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬ

でＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１７時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0451] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図１１および１２に示した。図１１および１２において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を、横軸はマウスに投与した化合物またはペプチドを示す。図１１の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：５で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、配列番号：５で表されるペプチドまたは式（９）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：５で表されるペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図１１において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：５で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。また、図１１において式（９）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：５で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、配列番号：５で表されるペプチドの投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

さらに、図１２の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２４で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド反応性細胞の数を示し、式（９）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２４で表されるヘルパーペプチド反応性の細

胞が誘導され、配列番号：５で表されるペプチドの投与によってマウス生体内において配列番号：２４で表されるペプチド反応性の細胞が誘導されなかったことを示す。図１２において白棒の値はほとんど認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。

[0452] これより、式（９）で表される化合物は配列番号：５で表されるペプチドに特異的なＣＴＬと、配列番号：２４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞を誘導し得ることが明らかとなった。式（９）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：５および２４で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。式（９）で表される化合物から生成された配列番号：２４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：５で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強され、配列番号：５で表される化合物を投与した場合と比較して多くの配列番号：５で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が認められたものと推察された。

すなわち、本発明の化合物の一例である式（９）で表される化合物は、異なる２種のペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが、明らかとなった。

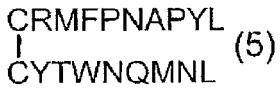
[0453] 比較例１

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0454] 実施例１で合成した式（５）で表される化合物、および、参考例８および９で合成した配列番号：２３８および２３９で表されるペプチドのＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。

式（５）：

[0455] [化58]



(5)

[0456] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物については、試験例２に記したとおりである。配列番号：２３８および２３９で表されるペプチドは、ＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）およびＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであるＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）をアミド結合で連結した長鎖ペプチドである。

[0457] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスについては、試験例２に記したとおりである。

[0458] 式（５）で表される化合物および配列番号：２３８、２３９で表されるペプチドの投与により、目的のペプチド（配列番号：２、４）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物および配列番号：２３８、２３９で表されるペプチドを投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。

[0459] 具体的には、式（５）で表される化合物および配列番号：２３８、２３９で表されるペプチドをそれぞれジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で５ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に２５０μｇ／ｓｉｔｅで４箇所投与した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙ ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２

０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、４）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。また、希釈したペプチド（配列番号：４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１８時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0460] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図１３に、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図１４に示した。

各図において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図１３の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を、図１４の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：４で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物および配列番号：２３８、２３９で表されるペプチドの投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

各図中において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表

される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生がそれぞれ確認された。一方で、配列番号２３８で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認されたものの、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞と比較するとその数は非常に少なかった。配列番号２３８で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。配列番号２３９で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生は認められたものの、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞と比較するとその数は少なかった。配列番号２３９で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。

[0461] これより、本発明の式（５）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチド特異的なＣＴＬおよび配列番号：４で表されるペプチド特異的なＣＴＬを双方とも効率よく誘導し得ることが明らかとなった。一方で、配列番号：２３８、２３９で表される長鎖ペプチドは、配列番号：２で表されるペプチド特異的なＣＴＬおよび配列番号：４で表されるペプチド特異的なＣＴＬを双方とも効率よく誘導することはできなかった。

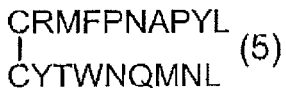
[0462] 比較例２

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0463] 実施例１で合成した式（５）で表される化合物、および、参考例１０および１１で合成した配列番号：２４０および２４１で表されるペプチドのＣＴ

Ｌ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0464] [化59]



(5)

[0465] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物については、試験例２に記したとおりである。配列番号：２４０および２４１で表されるペプチドは、ＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）およびＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであるＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）を、ペプチドスペーサーとして６個のグリシンを介してアミド結合で連結した長鎖ペプチドである。

[0466] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスについては、試験例２に記したとおりである。

[0467] 式（５）で表される化合物および配列番号：２４０、２４１で表されるペプチドの投与により、目的のペプチド（配列番号：２、４）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物および配列番号：２４０、２４１で表されるペプチドを投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。

[0468] 具体的には、式（５）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で１０ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に５００μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。また、配列番号：２４０、２４１で表されるペプチドをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で１１ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量の不完全フロ

イントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に５５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を１．５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、４）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。また、希釈したペプチド（配列番号：４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１７時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0469] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図１５に、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図１６に示した。

各図において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図１５の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を、図１６の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：４で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培

養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物および配列番号：２４０、２４１で表されるペプチドの投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

各図中において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生がそれぞれ確認された。一方で、配列番号２４０で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生は極めて少なかったが、配列番号２４０で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。また、配列番号２４１で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生は極めて少なく、配列番号２４１で表されるペプチドを投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認されたものの、式（５）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞と比較するとその数は非常に少なかった。

[0470] これより、本発明の式（５）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチド特異的なＣＴＬおよび配列番号：４で表されるペプチド特異的なＣＴＬを双方とも効率よく誘導し得ることが明らかとなった。一方で、配列番号：２４０、２４１で表されるペプチドスペーサーを含む長鎖ペプチドは、配列番号：２で表されるペプチド特異的なＣＴＬおよび配列番号：４で表さ

れるペプチド特異的なＣＴＬを双方とも効率よく誘導することはできなかった。

[0471] 試験例１０

参考例３にて合成したペプチドならびに実施例６および９にて合成した化合物（コンジュゲート体）について、試験例３と同様の方法にて溶解度測定を行い、各溶解度を表６６に示した。

[0472] [表66]

実施例番号及び参考例番号	アミノ酸配列または構造式	配列番号または式番号	ｐＨ ６．０（ｍｇ／ｍＬ）	ｐＨ ７．４（ｍｇ／ｍＬ）
参考例３	ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ	配列番号：２３	＞１．０	０．７１２
実施例６	CRMFPNAPYL | CSLGEQQYSV	式（３）	＞１．０	＞１．０
実施例１０	CALLPAVPSL | CNKRYFKLSHLQMHSRKHTG	式（９）	＞１．０	０．５６５

[0473] 実施例１１～１２

実施例２と同様の方法で、配列番号２４２～２４３のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。表６７に質量分析結果を示した。表６７に記載のペプチドは本発明の化合物である。

[0474]

[表67]

実施例番号	アミノ酸配列	配列番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　m／z	質量分析：理論値
１１	CWAPVLDFAPPGASAYGSL	２４２	１９２３．５ $[M+H]^{1+}$	１９２３．２
１２	WAPVLDFAPPGASAYGSLC	２４３	１９２３．６ $[M+H]^{1+}$	１９２３．２

[0475] 実施例１３

実施例１と同様の方法で、式１０で表される各化合物（コンジュゲート体）を合成した。表６８に質量分析結果を示した。（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

[0476] [表68]

実施例番号	構造式	式番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　m／z	質量分析：理論値
１３	CRMFPNAPYL | CWAPVLDFAPPGASAYGSL	１０	１５６６．６ $[M+2H]^{2+}$	１５６６．８

[0477] 参考例１２

実施例１と同様の方法で、式１１で表される各化合物（コンジュゲート体）を合成した。表６９に質量分析結果を示した。（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）表に記載のペプチドは本発明の化合物ではないことから参考例として記載した。

[0478]

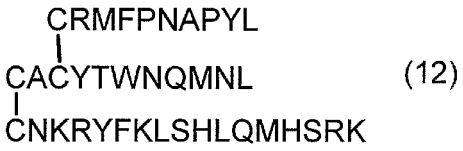
[表69]

参考例番号	構造式	式番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ ｍ／ｚ	質量分析：理論値
１２	WAPVLDFAPPGASAYGSLC CRMFPNAPYL	１１	１０４４．８[Ｍ＋３Ｈ]$^{3+}$	１０４４．９

[0479] 実施例１４

式（１２）

[0480] [化60]



(12)

[0481] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物の合成

[0482] 工程１．Fmoc-Cys(Mmt)-Ala-SBnの合成（Mmtは4-Methoxytrityl）

（Ｆｍｏｃ－Ｃ（Ｍｍｔ）Ａ－ＳＢｎの合成）

Ｆｍｏｃ－Ｃｙｓ（Ｍｍｔ）－ＯＨ（４．８０ｇ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２．５６ｍＬ）、ヘキサフルオロリン酸（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウム（４．５０ｇ）及び公知の方法（例えばJournal of Organic Chemistry, Vol. 64, No. 24 8761-8769）にて合成されたＨ－Ａｌａ－ＳＢｎのクロロホルム（２０ｍＬ）溶液を室温にて１時間撹拌した。反応液をカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒はヘキサン／酢酸エチル）にて精製することで目的化合物であるＦｍｏｃ－Ｃ（Ｍｍｔ）Ａ－ＳＢｎ（２．８０ｇ）を得た。

ＮＭＲ：^{1}H NMR (CDCl$_3$) δ 7.72 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.54 (d, J =

7.2 Hz, 1H), 7.38-7.34 (m, 7H), 7.29-7.25 (m, 6H), 7.23-7.15 (m, 7H), 6.76 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.95 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.57 (quin, J = 7.6 Hz, 1H), 4.35 (d, J = 6.8 Hz, 2H) 4.19-4.17 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.72 (dd, J = 13.2, 8.4 Hz, 1H), 2.61 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 1.31 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

[0483] 工程２．H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OHの合成

（Ｃ（Ｍｍｔ）ＡＣＹＴＷＮＱＭＮＬの合成）

工程１で得たFmoc-Cys(Mmt)-Ala-SBn（１１ｍｇ）と公知の方法（例えばＷＯ０７／０６３９０３）で合成したH-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH（２１ｍｇ）、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２００μＬ）、３，３’，３’’－フォスファネトリルトリプロパン酸塩酸塩（１ｍｇ）、４－メルカプトフェニル酢酸（１ｍｇ）及び０．１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．５、２００μＬ）のＤＭＦ（４００μＬ）溶液を室温にて４時間撹拌した。反応液にジエチルアミン（２００μＬ）を加え更に１５分撹拌した。反応液を逆相ＨＰＬＣにて精製することで、目的化合物であるＣ（Ｍｍｔ）ＡＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（７ｍｇ）を得た。

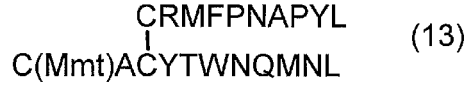
質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ＝８１０．２　$[M+2H]^{2+}$

（理論値＝８１０．５）

[0484] 工程３．(H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) disulfide bondの合成

〔すなわち式（１３）：

[0485] [化61]



(13)

[0486] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物の合成〕

工程２で得たH-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH（５１ｍｇ）と実施例１工程１で得た(H-Cys(Npys)-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-

Pro-Tyr-Leu-OH（４３ｍｇ）のＤＭＦ（４ｍＬ）溶液を室温にて２時間撹拌した。反応液を逆相ＨＰＬＣにて精製することで目的化合物である(H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) disulfide bond〔すなわち式（１３）で示される化合物〕を３９ｍｇを得た。

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ＝１４１４．４　［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

（理論値＝１４１５．２）

[0487] 工程４．H-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OHの合成

（Ｃ（ＳＰｙ）ＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫの合成）

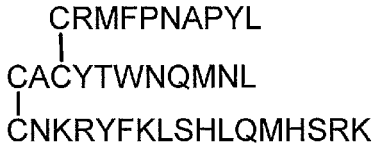
参考例１で得たH-Cys-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH（１８２ｍｇ）と２，２’－ジピリジルビスルフィド（０．２Ｍイソプロパノール溶液、５４４μＬ）の２０％ｗ／ｗ酢酸水（４ｍＬ）溶液を室温にて１７時間撹拌した。反応液を逆相ＨＰＬＣにて精製することで目的化合物であるH-Cys(SPy)-Asn-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OHを１７７ｍｇ得た。

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ＝１１４３．５　［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$

（理論値＝１１４２．９）

[0488] 工程５．式（１２）：

[0489] [化62]



(12)

[0490] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）で表される化合物の合成

工程３で得た(H-Cys(Mmt)-Ala-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH) (H-Cys-Arg-Met-Phe-Pro-Asn-Ala-Pro-Tyr-Leu-OH) disulfide bond〔すなわち式（１３）で示される化合物〕（９ｍｇ）、工程４で得たH-Cys(SPy)-As

n-Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-OH（２４ｍｇ）及びトリイソプロピルシラン（１０μＬ）のトリフルオロ酢酸（１９０μＬ）溶液を室温にて１時間撹拌した。反応液を逆相ＨＰＬＣにて精製することで目的化合物である式（１２）で表される化合物を５ｍｇ得た。

質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ＝１５７７．２　$[M+3H]^{3+}$（理論値＝１５７７．９）

[0491] 実施例１５～１６

実施例１４と同様の方法で、式１４～１５で表される各化合物（コンジュゲート体）を合成した。表７０に質量分析結果を示した。（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

[0492] [表70]

実施例番号	構造式	式番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ	質量分析：理論値
１５	CRMFPNAPYL | CACYTWNQMNL | CWAPVLDFAPPGASAYGSL	１４	１４９２．５ $[M+3H]^{3+}$	１４９３．１
１６	CWAPVLDFAPPGASAYGSL | CACYTWNQMNL | CRMFPNAPYL	１５	１４９２．５ $[M+3H]^{3+}$	１４９３．１

[0493] 参考例１３

実施例２と同様の方法で、配列番号２４４のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。表７１に質量分析結果を示した。表に記載のペプチドは本発明の化合物ではないことから参考例として記載した。

[0494]

[表71]

参考例番号	アミノ酸配列	配列番号	質量分析：ＬＣ－ＥＳＩ／ＭＳ　ｍ／ｚ	質量分析：理論値
１３	ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ	２４４	１８１９．８［Ｍ＋Ｈ］＋	１８１９．１

[0495] 試験例１１

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0496] 実施例１３で合成した式（１０）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（１０）：

[0497] [化63]



（１０）

[0498] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＢがＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0499] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0500] 式（１０）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（１０）で表される化合物を

投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、ヘルパーペプチド（配列番号：２４４）が生体内で作用しているか否かは、式（１０）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、配列番号：２で表されるペプチドを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0501] 具体的には、配列番号：２で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で３ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。また、式（１０）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で８．５ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量の不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ）と混合しエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に４２５μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（１０）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる配列番号：２のペプチドの物質量は、配列番号：２で表されるペプチドのマウス１匹あたりの投与量に含まれる物質量と等しくなるよう調整した。また、各エマルションに含まれるＤＭＳＯ濃度も一定にした。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．１２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希

釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１９時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0502] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図１７に示した。図１７において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を、横軸はマウスに投与した化合物またはペプチドを示す。図１７の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、配列番号：２で表されるペプチドまたは式（１０）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図１７において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。また、図１７において式（１０）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、配列番号：２で表されるペプチドの投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0503] これより、式（１０）で表される化合物は配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また、式（１０）で表される化合物を投与した場合に配列番号：２で表されるペプチドを投与した場合と比較して配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産

生細胞が多く認められたのは、式（１０）で表される化合物から生成された配列番号：２４４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（１０）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２および２４４で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。

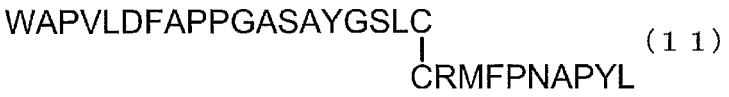
すなわち、本発明の化合物の一例である式（１０）で表される化合物は、異なる２種のペプチドを式（１）に示されたようなジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが明らかとなった。

[0504] 比較例３

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0505] 参考例１２で合成した式（１１）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（１１）：

[0506] [化64]



（１１）

[0507] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物は、前記の式（１）に照らすと、特に癌抗原ペプチドＡがＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）であり且つ癌抗原ペプチドＣがＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ（配列番号：２４３）である化合物である。ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチ

ド）である。

[0508] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0509] 式（１１）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（１１）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、ヘルパーペプチド（配列番号：２４４）が生体内で作用しているか否かは、式（１１）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、配列番号：２で表されるペプチドを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0510] 試験例１１と同様の方法でＣＴＬ誘導試験を行った。

[0511] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図１８に示した。図１８において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を、横軸はマウスに投与した化合物またはペプチドを示す。図１８の黒棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表されるペプチドをパルスしながら培養した結果を示し、白棒は非パルスで培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差がペプチド特異的ＣＴＬの数を示し、配列番号：２で表されるペプチドまたは式（１１）で表される化合物の投与によってマウス生体内において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬが誘導されたことを示す。図１８において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチドをパルスしない場合にはＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスの脾細胞は全く反応しなかったことを示している。本試験の結果、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞において配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγの産生が確認された。一方、図１８において式（１１）で表される化合物の投与では、配列番号：２で表されるペプチドの投与によって誘導された配列番号

：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の増加は確認されなかった。

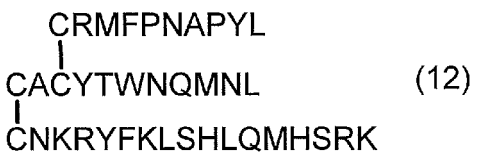
[0512] 試験例１１と比較例３の結果より、ＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチドとしてＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）を用いる場合、前記式（１）において癌抗原ペプチドＢがＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）である方が、癌抗原ペプチドＣがＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ（配列番号：２４３）に比べ、より好ましい発明の実施形態であることが示唆された。

[0513] 試験例１２

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0514] 実施例１４で合成した式（１２）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたｉｎ ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（１２）：

[0515] [化65]



(12)

[0516] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ（配列番号：２２）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0517] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0518] 式（１２）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：

２、４）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（１２）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、ヘルパーペプチド（配列番号：２２）が生体内で作用しているか否かは、式（１２）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２、４）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0519] 具体的には、式（５）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で３ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。また、式（１２）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で６ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に３００μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。式（１２）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる式（５）の化合物の物質量は、式（５）で表される化合物のマウス１匹あたりの投与量に含まれる物質量と等しくなるよう調整した。また、各エマルションに含まれるＤＭＳＯ濃度も一定にした。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞、およびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を各々０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２、４）をＤＭＳＯで

４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。また、希釈したペプチド（配列番号：４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１７時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定した。

[0520] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図１９に、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図２０に示した。

各図において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図１９の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を、図２０の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：４で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）および式（１２）で表される化合物の投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

各図中において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）および式（１２）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が、式（５）および式（１２）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的

なＩＦＮγ産生がそれぞれ確認された。また、図１９において式（１２）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。一方、図２０において式（１２）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：４で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数と比べて大きな差は認められなかった。

[0521] これより、式（１２）で表される化合物は配列番号：２、４で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また、式（１２）で表される化合物を投与した場合に式（５）で表される化合物を投与した場合と比較して配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、式（１２）で表される化合物から生成された配列番号：２２で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。一方、式（１２）で表される化合物を投与した場合と式（５）で表される化合物を投与した場合を比較して配列番号：４で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞数に大きな差が認められなかったのは、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスはヒトのＭＨＣクラスＩＩを発現していないことから配列番号：２２で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されなかったためと推察された。従って、式（１２）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２、４および２２で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。

すなわち、本発明の化合物の一例である式（１２）で表される化合物は、異なる３種のペプチドをジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ　ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンで

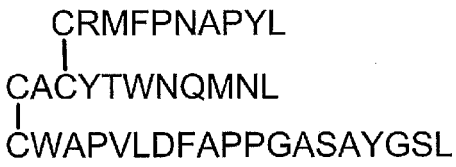
あることが明らかとなった。

[0522] 試験例１３

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0523] 実施例１５で合成した式（１４）で表される化合物のＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（１４）：

[0524] [化66]



（１４）

[0525] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0526] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスおよびＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0527] 式（１４）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２、４）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（１４）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２、４）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、ヘルパーペプチド（配列番号：２４４）が生体内で作用しているか否かは、式（１４）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判

断した。

[0528] 試験例１２と同様の方法でＣＴＬ誘導試験を行った。ただし、式（１４）で表される化合物はジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で５．６ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に２８０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。

[0529] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙの結果を図２１に、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴ ａｓｓａｙの結果を図２２に示した。

各図において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２１の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を、図２２の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：４で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）および式（１４）で表される化合物の投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

各図中において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）および式（１４）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が、式（５）および式（１４）で表される化合物を投与したＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：４で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生がそれぞれ確認された。また、図２１、２２において式（１４）で表される化合物の投与によって誘導された配列番号：２、４で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物

の投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0530] これより、式（１４）で表される化合物は配列番号：２、４で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また、式（１４）で表される化合物を投与した場合に式（５）で表される化合物を投与した場合と比較して配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、式（１４）で表される化合物から生成された配列番号：２４４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。一方、式（１４）で表される化合物を投与した場合に式（５）で表される化合物を投与した場合と比較して配列番号：４で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスで発現するマウスＭＨＣクラスＩＩに配列番号：２４４で表されるペプチドが結合し、ヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：４で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（１４）で表される化合物は、マウス生体内でジスルフィド結合の切断とＥＲＡＰ－１による適切なトリミングを受けて、配列番号：２、４および２４４で表されるペプチドへ実際に生成されることが強く示唆された。

すなわち、本発明の化合物の一例である式（１４）で表される化合物は、異なる３種のペプチドをジスルフィド結合を介して複合化されたコンジュゲート体であり、実際にｉｎ ｖｉｖｏにおいてＣＴＬおよびヘルパーペプチド反応性細胞を誘導できるＷＴ１癌抗原ペプチドコンジュゲートワクチンであることが明らかとなった。

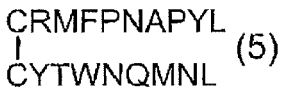
[0531] 試験例１４

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0532] 実施例１で合成した式（５）で表される化合物と参考例１で合成した配列

番号：２２で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンのＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0533] [化67]



(5)

[0534] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ（配列番号：２２）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0535] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0536] 式（５）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（５）と混合したヘルパーペプチド（配列番号：２２）が生体内で作用しているか否かは、式（５）で表される化合物を単独投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物と配列番号：２２で表されるペプチドのカクテルワクチンを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0537] 具体的には、式（５）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で３ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。また、式（５）で表される化合物と配列番号：２２

で表されるペプチドをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解後、注射用水で希釈後の濃度が式（５）で表される化合物が３ｍｇ／ｍＬ、配列番号：２２で表されるペプチドが２．７ｍｇ／ｍＬになるよう混合した。この希釈液を等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。この式（５）で表される化合物が１５０μｇ／ｓｉｔｅ、配列番号：２２で表されるペプチドが１３７μｇ／ｓｉｔｅ含まれるカクテルワクチンをマウスの尾根部皮内に２箇所投与した。各エマルションに含まれるＤＭＳＯ濃度は一定にした。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１７時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ．Ｔ．Ｌ．社製）によって測定した。

[0538] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図２３に示した。

図２３において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２３の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果

を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物およびヘルパーペプチド（配列番号：２２）を含むカクテルワクチンの投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

図２３において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を単独投与、およびヘルパーペプチド（配列番号：２２）を含むカクテルワクチンを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。また、図２３においてヘルパーペプチド（配列番号：２２）を含むカクテルワクチンの投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の単独投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0539] これより、式（５）で表される化合物と配列番号：２２で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンは配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また式（５）で表される化合物を単独投与した場合と比較してカクテルワクチンを投与した場合に配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、カクテルワクチンに含まれる配列番号：２２で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（５）で表される化合物とヘルパーペプチドを含むカクテルワクチンは式（５）で表される化合物の単独投与と比べて、マウス生体内で強くＣＴＬを誘導することができることが明らかとなった。

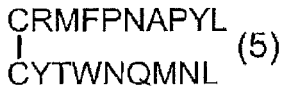
[0540] 試験例１５

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0541] 実施例１で合成した式（５）で表される化合物と参考例１３で合成した配

列番号：２４４で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンのＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0542] [化68]



(5)

[0543] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0544] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0545] 式（５）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（５）と混合したヘルパーペプチド（配列番号：２４４）が生体内で作用しているか否かは、式（５）で表される化合物を単独投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物と配列番号：２４４で表されるペプチドのカクテルワクチンを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0546] 試験例１４と同様の方法でＣＴＬ誘導試験を行った。ただし、カクテルワクチンは式（５）で表される化合物と配列番号：２４４で表されるペプチドをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解後、注射用水で希釈後の濃度が式（５）で表される化合物が３ｍｇ／ｍＬ、配列番号：２

４４で表されるペプチドが２．３ｍｇ／ｍＬになるよう混合した。この希釈液を等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。この式（５）で表される化合物が１５０μｇ／ｓｉｔｅ、配列番号：２４４で表されるペプチドが１１５μｇ／ｓｉｔｅ含まれるカクテルワクチンをマウスの尾根部皮内に２箇所投与した。

[0547] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図２４に示した。

図２４において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２４の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物およびヘルパーペプチド（配列番号：２４４）を含むカクテルワクチンの投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

図２４において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を単独投与、およびヘルパーペプチド（配列番号：２４４）を含むカクテルワクチンを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。また、図２４においてヘルパーペプチド（配列番号：２４４）を含むカクテルワクチンの投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の単独投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0548] これより、式（５）で表される化合物と配列番号：２４４で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンは配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また式（５）で表される化合物を単独投与した場合と比較してカクテルワクチンを投与した場合に配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められた

のは、カクテルワクチンに含まれる配列番号：２４４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（５）で表される化合物とヘルパーペプチドを含むカクテルワクチンは式（５）で表される化合物の単独投与と比べて、マウス生体内で強くＣＴＬを誘導することができることが明らかとなった。

[0549] ２つのＷＴ１抗原ペプチドを含有するワクチンを作成する場合の一例として、２つの異なるペプチドを一つの製剤にするカクテル化ワクチンがあげられる。カクテル化ワクチンを作成する際、問題となるのが混合する癌抗原ペプチドの物性が一つの問題となる。表６０及び表６６に示した通り、２つＷＴ１抗原ペプチドをカクテル化する際には溶解度、すなわち物性の異なる２つのペプチドを一つの製剤にすることになる。これに対し、本発明のコンジュゲート体は２つのＷＴ１抗原ペプチドをジスルフィド結合により結合した化合物であり、単一の溶解度すなわち物性を示した。このことは本発明のコンジュゲート体が単一の物性である上に試験例２に示すように２つのＷＴ１抗原ペプチドに対する応答する性質を有することを示している。この点において、本発明のコンジュゲート体はカクテル化ワクチンのように２つのＷＴ１抗原ペプチド同士の相互作用などを考慮することなく２つのＷＴ１抗原ペプチドに対する応答を引き起こすことができる化合物であることが示された。

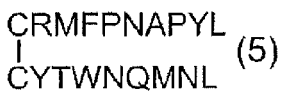
[0550] 試験例１６

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0551] 実施例１で合成した式（５）で表される化合物と参考例２で合成した配列番号：２４で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンのＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0552]

[化69]



(5)

[0553] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）
で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＴＧ（配列番号：２４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0554] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0555] 式（５）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（５）と混合したヘルパーペプチド（配列番号：２４）が生体内で作用しているか否かは、式（５）で表される化合物を単独投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物と配列番号：２４で表されるペプチドのカクテルワクチンを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0556] 具体的には、式（５）で表される化合物をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに注射用水で３ｍｇ／ｍＬに希釈したのち、等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。エマルション化させた化合物を、マウスの尾根部皮内に１５０μｇ／ｓｉｔｅで２箇所投与した。また、式（５）で表される化合物と配列番号：２４で表されるペプチドをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解後、注射用水で希釈後の濃度が式（５）で表される化合物が３ｍｇ／ｍＬ、配列番号：２４で表されるペプチドが３．１１ｍｇ／ｍＬになるよう

混合した。この希釈液を等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。この式（５）で表される化合物が１５０μｇ／ｓｉｔｅ、配列番号：２４で表されるペプチドが１５６μｇ／ｓｉｔｅ含まれるカクテルワクチンをマウスの尾根部皮内に２箇所投与した。各エマルションに含まれるＤＭＳＯ濃度は一定にした。１週間後に、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いた。脾細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングした。調製したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を０．２５×10^6ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで、ブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種した。ペプチド（配列番号：２）をＤＭＳＯで４０ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈した。希釈したペプチド（配列番号：２）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞に添加した。ペプチドを添加した脾細胞を、１９時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加えた。培養後に上清を除き、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させた。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ．Ｔ．Ｌ．社製）によって測定した。

[0557] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図２５に示した。

図２５において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２５の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物およびヘルパーペプチド（配列番号：２４）を含むカクテルワクチンの投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

図２５において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を単独投与、およびヘルパーペプチド（配列番号：２４）を含むカクテルワクチンを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。また、図２５においてヘルパーペプチド（配列番号：２４）を含むカクテルワクチンの投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の単独投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0558] これより、式（５）で表される化合物と配列番号：２４で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンは配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また式（５）で表される化合物を単独投与した場合と比較してカクテルワクチンを投与した場合に配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、カクテルワクチンに含まれる配列番号：２４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（５）で表される化合物とヘルパーペプチドを含むカクテルワクチンは式（５）で表される化合物の単独投与と比べて、マウス生体内で強くＣＴＬを誘導できることが明らかとなった。

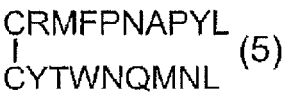
[0559] 試験例１７

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0560] 実施例１１で合成した配列番号：２４２は配列番号：２４４のＮ末端システイン延長体である。また、配列番号：２４４は試験例１５に示したカクテルワクチンにおいてＣＴＬ誘導の増強効果を示している。そこで本試験では実施例１で合成した式（５）で表される化合物と配列番号：２４２で表され

るペプチドを混合したカクテルワクチンのＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0561] [化70]



[0562] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４２）に含まれるＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0563] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0564] 式（５）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（５）と混合したヘルパーペプチド（配列番号：２４２）が生体内で作用しているか否かは、式（５）で表される化合物を単独投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物と配列番号：２４２で表されるペプチドのカクテルワクチンを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0565] 試験例１６と同様の方法でＣＴＬ誘導試験を行った。ただし、カクテルワクチンは式（５）で表される化合物と配列番号：２４２で表されるペプチドをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解後、注射用水

で希釈後の濃度が式（５）で表される化合物が３ｍｇ／ｍＬ、配列番号：２４２で表されるペプチドが２．４２ｍｇ／ｍＬになるよう混合した。この希釈液を等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。この式（５）で表される化合物が１５０μｇ／ｓｉｔｅ、配列番号：２４２で表されるペプチドが１２１μｇ／ｓｉｔｅ含まれるカクテルワクチンをマウスの尾根部皮内に２箇所投与した。

[0566] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴａｓｓａｙの結果を図２６に示した。

図２６において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２６の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物およびヘルパーペプチド（配列番号：２４２）を含むカクテルワクチンの投与によってマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

図２６において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を単独投与、およびヘルパーペプチド（配列番号：２４２）を含むカクテルワクチンを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。また、図２６においてヘルパーペプチド（配列番号：２４２）を含むカクテルワクチンの投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の単独投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0567] これより、式（５）で表される化合物と配列番号：２４２で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンは配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また式（５）で表される化合物を単独投与した場合と比較してカクテルワクチンを投与した場合に配列

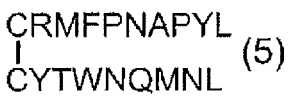
番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、カクテルワクチン中の配列番号：２４２で表されるペプチドに含まれる配列番号：２４４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（５）で表される化合物とヘルパーペプチドを含むカクテルワクチンは式（５）で表される化合物の単独投与と比べて、マウス生体内で強くＣＴＬを誘導できることが明らかとなった。

[0568] 試験例１８

ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

[0569] 実施例１２で合成した配列番号：２４３は配列番号：２４４のＣ末端システイン延長体である。また、配列番号：２４４は試験例１５に示したカクテルワクチンにおいてＣＴＬ誘導の増強効果を示している。そこで本試験では実施例１で合成した式（５）で表される化合物と配列番号：２４３で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンのＣＴＬ誘導能を、ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたｉｎ　ｖｉｖｏＣＴＬ誘導試験によって評価した。式（５）：

[0570] [化71]



(5)

[0571] （式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物に含まれるＲＭＦＰＮＡＰＹＬ（配列番号：２）はＨＬＡ－Ａ０２０１拘束性ＷＴ１ペプチド、ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ（配列番号：４）はＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性ＷＴ１ペプチドであり、ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ（配列番号：２４３）に含まれるＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ（配列番号：２４４）はＭＨＣクラスＩＩ拘束性ＷＴ１ペプチド（すなわちヘルパーペプチド）である。

[0572] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスについては、試験例２、５に記したとおりである。

[0573] 式（５）で表される化合物の投与により、目的のペプチド（配列番号：２）に対するＣＴＬが誘導されるか否かは、式（５）で表される化合物を投与した上記マウス由来の脾細胞をペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合にＩＦＮγを産生するか測定することで判断した。また、式（５）と混合したヘルパーペプチド（配列番号：２４３）が生体内で作用しているか否かは、式（５）で表される化合物を単独投与した上記マウス由来の脾細胞と、式（５）で表される化合物と配列番号：２４３で表されるペプチドのカクテルワクチンを投与した上記マウス由来の脾細胞を、ペプチド（配列番号：２）で再刺激を行った場合のＩＦＮγ産生細胞数を比較することで判断した。

[0574] 試験例１６と同様の方法でＣＴＬ誘導試験を行った。ただし、カクテルワクチンは式（５）で表される化合物と配列番号：２４３で表されるペプチドをジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）で８０ｍｇ／ｍＬに溶解後、注射用水で希釈後の濃度が式（５）で表される化合物が３ｍｇ／ｍＬ、配列番号：２４３で表されるペプチドが２．４２ｍｇ／ｍＬになるよう混合した。この希釈液を等量のモンタナイドＩＳＡ５１ＶＧと混合してエマルション化させた。この式（５）で表される化合物が１５０μｇ／ｓｉｔｅ、配列番号：２４３で表されるペプチドが１２１μｇ／ｓｉｔｅ含まれるカクテルワクチンをマウスの尾根部皮内に２箇所投与した。

[0575] ＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウスを用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙの結果を図２７に示した。

図２７において、縦軸は播種細胞数中に反応した細胞数を示す。図２７の黒棒および白棒はＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞を配列番号：２で表される目的のペプチドの存在下および非存在下で培養した結果を示す。即ち、黒棒と白棒の値の差が、式（５）で表される化合物およびヘルパーペプチド（配列番号：２４３）を含むカクテルワクチンの投与によっ

てマウス生体内で誘導された目的の各ペプチド特異的ＣＴＬの数を示す。

図２７において白棒の値は認められていない。このことは目的のペプチド非存在下ではそれぞれの遺伝子導入マウスの脾細胞は反応しなかったことを示している。本試験の結果、式（５）で表される化合物を単独投与、およびヘルパーペプチド（配列番号：２４３）を含むカクテルワクチンを投与したＨＬＡ－Ａ０２０１遺伝子導入マウス由来の脾細胞においては配列番号：２で表される目的のペプチド特異的なＩＦＮγ産生が確認された。また、図２７においてヘルパーペプチド（配列番号：２４３）を含むカクテルワクチンの投与によって誘導された配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞の数は、式（５）で表される化合物の単独投与によって誘導されたペプチド特異的なＩＦＮγ産生細胞の数より多かった。

[0576] これより、式（５）で表される化合物と配列番号：２４３で表されるペプチドを混合したカクテルワクチンは配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬを誘導し得ることが明らかとなった。また式（５）で表される化合物を単独投与した場合と比較してカクテルワクチンを投与した場合に配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＩＦＮγ産生細胞が多く認められたのは、カクテルワクチン中の配列番号：２４３で表されるペプチドに含まれる配列番号：２４４で表されるヘルパーペプチドに反応性の細胞が誘導されたことによって、配列番号：２で表されるペプチドに特異的なＣＴＬの誘導が増強されたためと推察された。従って、式（５）で表される化合物とヘルパーペプチドを含むカクテルワクチンは式（５）で表される化合物の単独投与と比べて、マウス生体内で強くＣＴＬを誘導できることが明らかとなった。

[0577] ２つのＷＴ１抗原ペプチドを含有するワクチンを作成する場合の一例として、２つの異なるペプチドを一つの製剤にするカクテル化ワクチンがあげられる。カクテル化ワクチンを作成する際、問題となるのが混合する癌抗原ペプチドの物性が一つの問題となる。表６０及び表６６に示した通り、２つＷＴ１抗原ペプチドをカクテル化する際には溶解度、すなわち物性の異なる２

つのペプチドを一つの製剤にすることになる。これに対し、本発明のコンジュゲート体は２つのＷＴ１抗原ペプチドをジスルフィド結合により結合した化合物であり、単一の溶解度すなわち物性を示した。このことは本発明のコンジュゲート体が単一の物性である上に試験例２に示すように２つのＷＴ１抗原ペプチドに対する応答する性質を有することを示している。この点において、本発明のコンジュゲート体はカクテル化ワクチンのように２つのＷＴ１抗原ペプチド同士の相互作用などを考慮することなく２つのＷＴ１抗原ペプチドに対する応答を引き起こすことができる化合物であることが示された。

[0578] 試験例１９

フィルター濾過を経た後に、ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスを用いた、ｉｎ　ｖｉｖｏでのＣＴＬ誘導能の評価

ジスルフィド結合を介して形成した配列番号４のホモダイマーおよび式（５）で表される化合物を３－１０ｍｇ／ｍＬとなるように注射用水にて溶解する。各化合物の薬理活性を、CTL誘導活性を指標としてＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス（Ｃ５７ＢＬ／６ＣｒＨＬＡ－Ａ２４０２／Ｋ^{b})を利用して評価する。ＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスに投与するにあたり、注射用水で溶解した化合物をタンパク質低結合性のフィルター（注射剤の滅菌処理を目的としたグレードのメンブランフィルター）にて濾過滅菌したのち、不完全フロイントアジュバントと混合しエマルション化させる。

エマルション化させた化合物はＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウスの尾根部皮内に投与する。投与１週間後、マウスをCO_2ガスにより安楽死させたのち脾臓あるいは鼠蹊部リンパ節を摘出し、脾細胞あるいはリンパ節細胞を調製する。ＩＦＮγ産生の測定には、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ　ａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いる。細胞調製の前日に、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを抗マウスＩＦＮγ抗体で処理し、当日に１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地でブロッキングする。調製したマウス由来の細胞をブロッキングしたＥＬＩＳＰＯＴプレートに播種する。ペプチド（配列番号：４）をＤＭＳＯで４０

ｍｇ／ｍＬに溶解し、さらに１０％ＦＢＳを含むＲＰＭＩ１６４０培地で４０μｇ／ｍＬに希釈する。希釈したペプチド（配列番号：４）を、最終濃度１０μｇ／ｍＬでＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子導入マウス由来の脾細胞あるいはリンパ節細胞に添加する。ペプチドを添加した細胞を、１６－２０時間、３７℃、５％ CO_2下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるペプチド再刺激を加える。培養後に上清を除いたのち、ＥＬＩＳＰＯＴプレートを、添付のプロトコールに従って発色させる。発色したスポット数は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ　Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ｃ.Ｔ.Ｌ.社製）によって測定する。

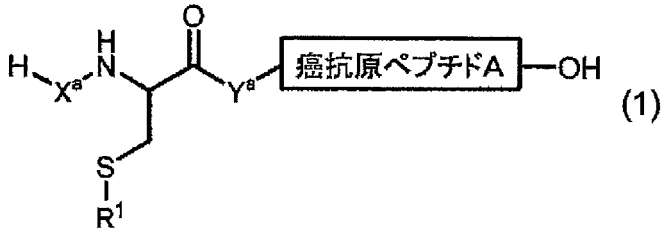
産業上の利用可能性

[0579] 本発明の化合物は、ＣＴＬを効率良く誘導し且つ製造が容易な癌ワクチンの有効成分として、有用である。本出願は、日本で出願された特願２０１３－０７２１７３（出願日：平成２５年３月２９日）および特願２０１３－１５８３８３（出願日：平成２５年７月３１日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 式（１）：

[化1]



(1)

［式中、Ｘ^{a}およびＹ^{a}は、単結合を表し、

癌抗原ペプチドＡは、以下のアミノ酸配列：

ＲＭＦＰＮＡＰＹＬ （配列番号：２）、

ＡＬＬＰＡＶＰＳＬ （配列番号：５）、

ＳＬＧＥＱＱＹＳＶ （配列番号：６）および

ＲＶＰＧＶＡＰＴＬ （配列番号：７）

の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドを表し、

癌抗原ペプチドＡのＮ末端アミノ酸のアミノ基が式（１）中のＹ^{a}と結合し、癌抗原ペプチドＡのＣ末端アミノ酸のカルボニル基が式（１）中の水酸基と結合し、

Ｒ^{1}は、癌抗原ペプチドＣを表し、

癌抗原ペプチドＣは、癌抗原ペプチドＡとは配列が異なり且つ以下のアミノ酸配列：

ＣＭＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：３）および

ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ （配列番号：４）

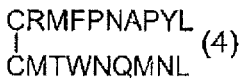
の中から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドを表し、

癌抗原ペプチドＣのシステイン残基のチオエーテル基が式（１）中のチオエーテル基と結合する。］

で表される化合物、またはその薬学上許容される塩。

[請求項2] 式（１）で表される化合物が、式（４）：

[化2]



(4)

（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、請求項１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[請求項3] 式（１）で表される化合物が、式（５）：

[化3]



(5)

（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物である、請求項１に記載の化合物、またはその薬学上許容される塩。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学上許容される塩、および薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物。

[請求項5] 請求項４に記載の医薬組成物であって、

以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ （配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ （配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ （配列番号：２４）、

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４４）、

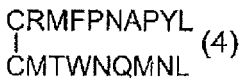
ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ （配列番号：２４２）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ （配列番号：２４３）、

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを一つ以上含む組成物。

[請求項6] 式（４）：

[化4]

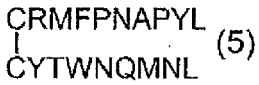


(4)

（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物、および式（５）：

[化5]



(5)

（式中、ＣとＣの間の結合はジスルフィド結合を表す。）

で表される化合物からなる群から選択される化合物と、

以下のアミノ酸配列：

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫ　（配列番号：２２）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨ　（配列番号：２３）、

ＣＮＫＲＹＦＫＬＳＨＬＱＭＨＳＲＫＨＴＧ　（配列番号：２４）、

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４４）、

ＣＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬ　（配列番号：２４２）および

ＷＡＰＶＬＤＦＡＰＰＧＡＳＡＹＧＳＬＣ　（配列番号：２４３）、

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドを一つ以上含む組成物。