

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-514094  
(P2016-514094A)

(43) 公表日 平成28年5月19日(2016.5.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 35/15 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/15 Z N A	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 7
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 N	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-558102 (P2015-558102)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月7日 (2015. 10. 7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/016032  
 (87) 国際公開番号 W02014/127006  
 (87) 国際公開日 平成26年8月21日 (2014. 8. 21)  
 (31) 優先権主張番号 61/763, 629  
 (32) 優先日 平成25年2月12日 (2013. 2. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 14/178, 407  
 (32) 優先日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510048509  
 テキサス テック ユニヴァーシティー  
 システム  
 TEXAS TECH UNIVERS I  
 TY SYSTEM  
 アメリカ国 テキサス79409-200  
 7 ラボック ピー. オー. ボックス42  
 007 オフィス オブ テクノロジー  
 トランスファー アンド インテレクチュ  
 アルプロパティー  
 (74) 代理人 100107984  
 弁理士 廣田 雅紀  
 (74) 代理人 100102255  
 弁理士 小澤 誠次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺がんの診断及び免疫療法のための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、1種又は2種以上の肺がん細胞によって発現されたSP17、AKAP-4、又はPTTG1の少なくとも1種に対する細胞傷害性Tリンパ球特異的な免疫応答を生じさせる、組換え腫瘍関連抗原を取り込んだ抗原提示細胞を用いた、肺がんの診断及び処置のための組成物及び方法を包含する。

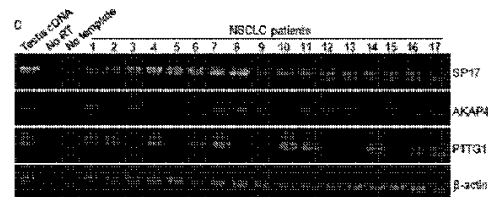


FIGURE 1C

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の少なくとも 1 種の腫瘍関連抗原を提示するようにロードされている、単離された抗原提示細胞であって、それぞれ 1 種又は 2 種以上の肺がん細胞によって発現された前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の少なくとも 1 種に対する細胞傷害性 T リンパ球特異的な免疫応答を生じさせる前記抗原提示細胞を含む、肺がんの処置のための組成物。

## 【請求項 2】

抗原提示細胞が、樹状細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

抗原提示細胞が、自己樹状細胞である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

抗原提示細胞にロードされた N Y E S O - 1、X A G E - 1、A D A M 2 9 及び M A G E C 1 抗原の少なくとも 1 種をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

組換え S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原をコードするヌクレオチド配列を含み、かつ前記組換え S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 が、抗原提示細胞で発現される、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

肺がんを有する疑いがある、又は少なくとも肺がんを発症するリスクを有するヒト対象を同定するための方法であって、

前記対象から試料を得るステップと、

抗 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の少なくとも 1 種に特異的な、前記試料中の特異的免疫グロブリンの存在又は非存在を決定するステップであって、前記試料中の抗 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 特異的免疫グロブリンの少なくとも 1 種の存在が、前記対象が肺がん罹患しているか又は少なくとも肺がんを発症するリスクがあることを示す、ステップと

を含む、前記方法。

## 【請求項 7】

がんに罹っている個体の腫瘍マーカープロファイルの決定のための方法であって、

前記個体から体液の試料を得るステップと、

前記個体からの前記体液の試料を、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも 1 種と接触させるステップと、

前記体液の試料中に存在する 1 種又は 2 種以上の自己抗体に結合した前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも 1 種の複合体の存在又は非存在を決定するステップであって、前記 1 種又は 2 種以上の自己抗体が、前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも 1 種に免疫学的に特異的であり、前記複合体の存在が、前記個体の前記腫瘍マーカープロファイルを提供し、前記腫瘍マーカープロファイルが、疾患の経過の指標として決定される、ステップと、

前記個体に、前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の少なくとも 1 種に特異的な抗原提示細胞又は細胞傷害性 T 細胞を提供するステップとを含む、前記方法。

## 【請求項 8】

複合体の存在が、がんの検出を示す、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

がんが、肺がんである、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 10】

1 種又は 2 種以上の肺がん細胞に特異的な S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 特異的細胞傷害性 T リンパ球を生成することが可能な、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも 1 種を含む、がんの処置のための免疫療法用組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 1】

少なくとも 1 種の抗原提示細胞をさらに含む、請求項 1 0 に記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 1 2】

抗原提示細胞が、樹状細胞である、請求項 1 1 に記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 1 3】

少なくとも 1 種の抗原提示細胞が、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原をコードするペプチド又は発現構築物でパルスされているか、又はそれらをロードしている、請求項 1 0 に記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 1 4】

S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも 1 種が、非小細胞肺がんから単離される、請求項 1 0 に記載の免疫療法用組成物。

10

## 【請求項 1 5】

対象において肺がんを検出するための方法であって、

前記対象から試料を得るステップと、

前記試料中の S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の存在又は非存在を決定するステップであって、前記試料中の前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の存在が、前記対象が肺がん罹患しているか又は少なくとも肺がんを発症するリスクがあることを示す、ステップと、

個体に、前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の少なくとも 1 種に特異的な抗原提示細胞又は細胞傷害性 T 細胞を提供するステップと

20

## 【請求項 1 6】

試料が、血液試料である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

免疫刺激抗原を発現した核酸ベクターを含む組成物であって、前記抗原が、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 肺がん関連抗原の少なくとも 1 種をコードするヌクレオチド配列を含む、前記組成物。

## 【請求項 1 8】

抗原が、ペプチド抗原である、請求項 1 7 に記載の組成物。

## 【請求項 1 9】

がんの処置のための方法であって、

それを必要とする哺乳動物に、希釈剤、媒体、賦形剤、又は不活性成分の少なくとも 1 種に加えて、相乗的な治療有効量の肺がん抗原を投与するステップと、

前記肺がん抗原から、特異的な細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) を生成するステップと、

前記特異的な細胞傷害性 T リンパ球で 1 種又は 2 種以上の腫瘍細胞を標的化するステップと

を含む、前記方法。

30

## 【請求項 2 0】

肺がん抗原が、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 である、請求項 1 9 に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明の一実施形態は、一般的に肺がんの検出及びその免疫療法の分野に関し、詳細には肺がんの診断及び処置のための方法及び組成物に関する。

## 【0 0 0 2】

コンパクトディスクで提出された資料の参照による組み込み

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I フォーマットで提出されており、その全

50

体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を包含する。\_\_\_\_\_に作製された前記 A S C I I コピーは、\_\_\_\_\_と名付けられ、\_\_\_\_\_キロバイトのサイズである。

【背景技術】

【0003】

本発明の範囲を限定することなく、本発明の背景は、肺がんの診断及び処置のための方法及び組成物に関して記載される。

【0004】

肺がんは、世界的にがん関連死の主な原因である。米国では、2012年に、およそ226,160件の新規症例と160,340人の死亡が見込まれている (Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62:10-29)。世界保健機関は、肺がんを、4つの主要な組織型：(1)扁平上皮がん (SCC, squamous cell carcinoma)、(2)腺がん、(3)大細胞がん、及び(4)小細胞肺がん (SCLC, small cell lung carcinoma) に分類している。非小細胞肺がん (NSCLC, non-small cell lung carcinoma) という用語は、扁平上皮、腺がん及び大細胞がんを包含する。

10

【0005】

米国では乳がんの発生は若干多く起こるが、肺がんは、男性にとっては前立腺がんに次いで2位であり、女性にとっては乳がん及び結腸直腸がんに次いで3位である。肺がんは、依然としてがん死の最も一般的な原因である。典型的には、肺がんを診断するのにX線と喀痰細胞診との組合せが使用される。残念ながら、がんは、その症状のために患者が医療の助けを求めるところには通常治療不能な進行した状態にある。

20

【0006】

肺がんの症例の大多数 (85%) は非小細胞肺がん (NSCLC) 型に属しており、NSCLCと診断された全患者の5年生存率は、20%未満と推定される。NSCLCの標準的な処置としては、化学療法、放射線療法、外科手術又はこれらの処置の組合せが挙げられる。残念ながら、これらの治療的介入は顕著な副作用を伴い (Chrischilles EA, Pendergast JF, Kahn KL, Wallace RB, Moga DC, Harrington DP, et al. Adverse events among the elderly receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2010;28:620-7)、一般的に限られた利益しか患者にもたらさない (Gadgeel SM. The optimal chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer patients. Curr Oncol Rep. 2011;13:272-9)。近年、本発明者らの医療装備に分子標的療法が追加されたが、より最近になって、NSCLCに対する医療装備に標的療法が追加されている。残念ながら、これらの薬剤、例えばモノクローナル抗体であるペバシズマブをベースとしたものは、治療上の利点があるにもかかわらず、化学療法のレシピエントの16.5%にしか使用できない (Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62:10-29、Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2012;62:10-29)。NSCLCは、それでもなお世界中でがん関連死の主な原因である。それゆえに、この破壊的な疾患に罹っている患者にとってより有効な療法を開発する緊急の必要性がある。

30

【0007】

「Lung cancer marker」という表題の米国特許第5,773,579号明細書は、ヒト肺がん細胞に特異的な新規のタンパク質に対する単離及び精製された核酸配列並びに対応するアミノ酸配列を開示している。この遺伝子は、これらの細胞において、テストされた正常な肺細胞、他の正常な組織及び他の腫瘍細胞株の場合よりもかなり高いレベルで発現される。またこの遺伝子及びタンパク質の3種の追加の組換え形態も開示されており、その第1の2種のケースでは、膜貫通領域が除去されており、第3のケースでは、インビトロでの変異誘発によってアミノ酸が変化している。

40

【0008】

「Lung Cancer Diagnosis」という表題の米国特許出願公開第2012/0100558号明細書は、症状の発症前の対象における肺がんの診断を対象としており、ここで、そ

50

の方法は、L A M R 1、並びに場合によっては、それに加えて若しくはその代わりにアネキシン I 及び / 若しくは 1 4 - 3 - 3 - シータを含む 1 種又は 2 種以上の診断前肺がん指標タンパク質、並びに / 又は規定された抗原としてそこで開示されているような他の診断前肺がん指標タンパク質に特異的な自己抗体の存在に関して、対象からの生体液をスクリーニングすることを包含する。

【 0 0 0 9 】

「Cancer-testis antigens」という表題の米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 7 7 0 7 9 号明細書は、がん精巣抗原及びそれらをコードする核酸分子を開示している。この発明はまた、がんなどの疾患の診断及び処置のための方法及び組成物における、核酸分子、ポリペプチド及びそれらの断片の使用にも関する。より詳細には、この発明は、新規のがん精巣 ( C T , cancer-testis ) 抗原の発見に関する。

10

【 0 0 1 0 】

「Composition for Treating Lung Cancer, Particularly of Non-Small Lung Cancers (NSCLC)」という表題の米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 9 1 1 5 6 号明細書は、哺乳動物において ( 適応 ) 免疫応答を惹起することが可能な少なくとも 2 種の ( 好ましくは異なる ) 抗原をコードする少なくとも 1 種の R N A 、好ましくは m R N A を含む活性 ( 免疫刺激 ) 組成物を対象とする。またこの発明は、前記活性 ( 免疫刺激 ) 組成物を含むワクチン、並びに ( ワクチン調製のための ) 前記活性 ( 免疫刺激 ) 組成物の使用、及び / 又は肺がん、特に好ましくは 3 つの主要なサブタイプ、すなわち扁平上皮肺がん、腺がん及び大細胞肺がんから選択される非小細胞肺がん ( N S C L C ) 、又はそれに関連する障害の処置のための ( 適応 ) 免疫応答を惹起するためのワクチンの使用を教示するとともに述べられている。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 5 , 7 7 3 , 5 7 9 号明細書

【 特許文献 2 】 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 0 0 5 5 8 号明細書

【 特許文献 3 】 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 7 7 0 7 9 号明細書

【 特許文献 4 】 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 9 1 1 5 6 号明細書

【 非特許文献 】

30

【 0 0 1 2 】

【 非特許文献 1 】 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62:10-29

【 非特許文献 2 】 Chrischilles EA, Pendergast JF, Kahn KL, Wallace RB, Moga DC, Harrington DP, et al. Adverse events among the elderly receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2010;28:620-7

【 非特許文献 3 】 Gadgeel SM. The optimal chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer patients. Curr Oncol Rep. 2011;13:272-9

【 非特許文献 4 】 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2012;62:10-29

40

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

一実施形態において、本発明は、肺がんの処置のための組成物であって、少なくとも 1 種の S P 1 7 、 A K A P - 4 、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原を提示するようにロードされており、それぞれ 1 種又は 2 種以上の肺がん細胞によって発現された S P 1 7 、 A K A P - 4 、又は P T T G 1 の少なくとも 1 種に対する細胞傷害性 T リンパ球特異的な免疫応答を生じさせる、単離された抗原提示細胞を含む、組成物を包含する。一態様において、抗原提示細胞は、樹状細胞である。別の態様において、抗原提示細胞は、自己樹状細胞である。別の態様において、本組成物は、 N Y E S O - 1 、 X A G E - 1 、 A D A M 2 9 及び

50

M A G E C 1 抗原の少なくとも1種をさらに含む。別の態様において、本組成物は、組換え S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0014】

別の実施形態において、本発明は、肺がんを有する又は少なくとも肺がんを発症するリスクを有する疑いがあるヒト対象を同定するための方法であって、前記対象から試料を得るステップと、抗 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の少なくとも1種に特異的な、前記試料中の特異的免疫グロブリンの存在又は非存在を決定するステップであって、前記試料中の抗 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 特異的免疫グロブリンの少なくとも1種の存在が、前記対象が肺がん罹患しているか又は少なくとも肺がんを発症するリスクがあることを示す、ステップとを含む、方法を包含する。

10

【0015】

本発明の別の実施形態は、がん罹患している個体の腫瘍マーカープロファイルの決定のための方法であって、前記個体から体液の試料を得るステップと、前記個体からの前記体液の試料を、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも1種と接触させるステップと、前記体液の試料中に存在する1種又は2種以上の自己抗体に結合した前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも1種の複合体の存在又は非存在を決定するステップであって、前記1種又は2種以上の自己抗体が、前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも1種に免疫学的に特異的であり、前記複合体の存在が、前記個体の前記腫瘍マーカープロファイルを提供し、前記腫瘍マーカープロファイルが、疾患の経過の指標として決定される、ステップとを含む、方法を包含する。一態様において、複合体の存在は、がんの検出を示す。別の態様において、がんは、肺がんである。

20

【0016】

本発明のさらに別の実施形態は、1種又は2種以上の肺がん細胞に特異的な S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 特異的細胞傷害性 T リンパ球を生成することが可能な S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも1種を含む、がんの処置のための免疫療法用組成物を包含する。一態様において、本組成物は、少なくとも1種の抗原提示細胞をさらに含む。一態様において、抗原提示細胞は、樹状細胞である。別の態様において、少なくとも1種の抗原提示細胞は、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原をコードするペプチド又は発現構築物でパルスされているか、又はそれをロードしている。別の態様において、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 腫瘍関連抗原の少なくとも1種は、非小細胞肺がんから単離される。

30

【0017】

本発明の別の実施形態は、対象において肺がんを検出するための方法であって、前記対象から試料を得るステップと、前記試料中の S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の存在又は非存在を決定するステップであって、前記試料中の前記 S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 の存在が、前記対象が肺がん罹患しているか又は少なくとも肺がんを発症するリスクがあることを示す、ステップとを含む、方法を包含する。一態様において、試料は、血液試料である。

40

【0018】

本発明の別の実施形態は、免疫刺激抗原を発現した核酸ベクターを含む組成物であって、前記抗原が、S P 1 7、A K A P - 4、又は P T T G 1 肺がん関連抗原の少なくとも1種をコードするヌクレオチド配列を含む、組成物を包含する。別の態様において、抗原は、ペプチド抗原である。

【0019】

本発明のさらに別の実施形態は、がんの処置のための方法であって、それを必要とする哺乳動物に、希釈剤、媒体、賦形剤、又は不活性成分の少なくとも1種に加えて、相乗的な治療有効量の肺がん抗原を投与するステップと、前記肺がん抗原から、特異的な細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L , cytotoxic T lymphocyte ) を生成するステップと、前記特異

50

的な細胞傷害性Tリンパ球で1種又は2種以上の腫瘍細胞を標的化するステップとを含む、方法を包含する。一態様において、肺がん抗原は、SP17、AKAP-4、又はPTTG1である。

【図面の簡単な説明】

【0020】

本発明の特徴及び利点をより十分に理解するために、ここで添付の図面と共に発明の詳細な説明について述べる。

【図1A-1C】がん/精巣抗原(CTA, Cancer/testis antigen)の発現のRT-PCR分析を示す画像である。

【図2】示された抗体及び対応するアイソタイプ対照と共にインキュベートした細胞のフローサイトメトリー分析を示す図である。

【図3】NSCLC細胞株であるCRL-5928、CRL-5922、正常な気管支上皮に由来する細胞であるCRL-2503、及び1人の代表的な患者で行われた免疫蛍光法を示す。

【図4A-4C】循環するCTA特異的IgGを検出するための酵素結合免疫吸着検査法(ELISA, enzyme linked immunosorbent assay)データのグラフである。

【図5A-5F】細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の活性及び特異性の分析のグラフである。

【図6A-6F】示されたサイトカインのレベルに関して分析したELISAと、患者のCTLと自己腫瘍細胞とを共培養することによるIFN- $\gamma$ 発現のELISPOT分析とを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下で本発明の様々な実施形態の作製及び使用を詳細に論じるが、本発明は、多種多様の具体的な状況において具体化できる多くの適用可能な発明概念を提供することが理解されるものとする。本明細書で論じられた具体的な実施形態は、本発明を作製及び使用するための具体的な方法の単なる例示にすぎず、本発明の範囲を限定しない。

【0022】

本発明を理解しやすくするために、以下でいくつかの用語を定義する。本明細書で定義された用語は、本発明に関連する分野の当業者に一般的に理解されるような意味を有する。「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「この(the)」などの用語は、単数形の実体のみを指すことは意図されず、一般的な分類を包含し、その具体的な例は、例示のために使用される可能性がある。本明細書に記載の用語は、本発明の具体的な実施形態を説明するのに使用されるが、それらの使用は、特許請求の範囲で概説される場合を除いて、本発明を限定しない。

【0023】

用語「抗原」及び用語「エピトープ」は、本明細書で使用される場合、免疫応答を刺激できる分子又は物質を指す。一例において、エピトープとしては、これらに限定されないが、ポリペプチド及びポリペプチドをコードする核酸が挙げられ、この場合、核酸がポリペプチドに発現されると、ポリペプチドがプロセッシングされて主要組織適合複合体(MHC, Major Histocompatibility Complex)分子に提示されたときに免疫応答を刺激できる。一般的に、エピトープは、それらがT細胞受容体及びそれぞれのT細胞のアクセサリー分子と相互作用できるように、MHCクラスI又はクラスIIの結合溝に非共有結合で結合した細胞の表面に提示されたペプチドを包含する。しかしながら、抗原の特異的構造に結合する抗体の抗原結合部分を論じる場合、抗原及びエピトープも当てはまる。

【0024】

抗原のタンパク質分解性プロセッシング。MHCによって抗原提示細胞に表示されたエピトープは、それより大きいペプチド又はタンパク質抗原前駆体の切断ペプチド又は切断生成物である。MHC Iエピトープの場合、タンパク質抗原は、細胞中にあるプロテアソームによって消化されることが多い。細胞内プロテアソームによる消化は、約3~23ア

10

20

30

40

50

ミノ酸長のペプチド断片を産生し、次いでこれらはMHCタンパク質上にロードされる。これらの断片はさらに、細胞内の、又は細胞外環境における追加のタンパク質分解活性によってトリミング及びプロセッシングされる可能性がある。MHCクラスIIエピトープのプロセッシングは、一般的に、リソソーム/エンドソーム区画からの細胞内プロテアーゼを介して起こる。本発明は、一実施形態において、免疫応答の強化が求められるペプチドを抗原提示細胞に指向させる、抗CD40抗体（又はそれらの断片）に結合されている予めプロセッシングされたペプチドを包含する。

#### 【0025】

免疫原性化合物として潜在的に有効なエピトープを同定するために、MHC結合単独の予測が有用であるが、不十分であることが多い。本発明は、抗原提示細胞及びレスポンダーT細胞の特異的な供給源を探索する免疫応答をもたらす可能性が最も高い抗原内のエピトープを特異的に同定するための方法を包含する。

10

#### 【0026】

本発明は、患者自身の抗原提示細胞及びT細胞レパトリーを使用して望ましい免疫応答を起こす可能性が最も高いエピトープを同定するための、迅速で簡単なアッセイを可能にする。本発明の組成物及び方法はいかなるタンパク質配列にも適用可能であり、それにより使用者は、MHCに結合して、抗原に反応すると予想されるT細胞に適切に提示させることができるエピトープの同定が可能である。したがって、本発明は、いかなる特定の標的又は病状に限定されることはなく、その代わりにいかなる有用な供給源からのMHCエピトープも包含する。

20

#### 【0027】

ここ数年にわたり、免疫療法は、黒色腫、腎細胞がん、より近年には肺がんなどの数種のタイプのがんにとって有望な療法として存在し続けてきた (Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 2011;480:480-9)。特異的な腫瘍関連抗原に対する抗腫瘍免疫応答の発生は、正常な組織に有害な作用をほとんど起こさず、最小の傷害性で、新生細胞死を促進する潜在性を有する (Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 2011;480:480-9)。がん/精巣抗原 (CTA) は、発現が精巣に限定されており、正常な組織ではごくわずかしか発現しないタンパク質のファミリーである。興味深いことに、CTAは、多くの腫瘍においてmRNA及びタンパク質レベルで頻繁に発現される (Chiriva-Internati M, Yu Y, Miranda la L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. Prostate. 2012;72:12-23、Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci. 2009;100:2014-21、Chiriva-Internati M. Sperm protein 17: clinical relevance of a cancer/testis antigen, from contraception to cancer immunotherapy, and beyond. Int Rev Immunol. 2011;30:138-49、Mathieu MG, Miles AK, Li G, McArdle SE, Rees RC. Cancer/testis antigens for therapeutic use. J Buon. 2009;14:S97-102、Mirandola L, M JC, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. Int Rev Immunol. 2011;30:127-37)。つい最近になって、非小細胞肺がん (NSCLC) の原発腫瘍においてCTAであるNY-ESO-1及びMAGE-A2/3/4/6が検出され、それらの免疫原性は、それらが潜在的に有効な肺がんワクチンにとっての有望な標的であることを示唆し暗示するものである (Bhan S, Negi SS, Shao C, Glazer CA, Chuang A, Gaykalova DA, et al. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. Clin Cancer Res. 2011;17:4267-76、Chinnasamy N, Wargo JA, Yu Z, Rao M, Frankel TL, Riley JP, et al. A TCR targeting the HLA-A\*0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer. J Immunol. 2011;186:685-96、Kim SH, Lee S, Lee CH, Lee MK, Kim YD, Shin DH, et al. Expression o

30

40

50

f cancer-testis antigens MAGE-A3/6 and NY-ESO-1 in non-small-cell lung carcinoma s and their relationship with immune cell infiltration. *Lung*. 2009;187:401-11、 Rao M, Chinnasamy N, Hong JA, Zhang Y, Zhang M, Xi S, et al. Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells: implications for adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res*. 2011;71:4192-204)。本発明者らはこれまでに、卵巣がん、多発性骨髄腫、及び前立腺がんにおける潜在的な免疫療法標的としての、CTAであるSP17、AKAP4、ロップリン(Ropporin)、及びPTTG1を検証してきた(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. *J Immunother*. 2011;34:490-9、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One*. 2010;5、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, et al. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. *J Transl Med*. 2008;6:15)。肺がんの免疫療法のための潜在的な標的として活用できる新規の抗原を同定しようとする努力において、本発明者らは本明細書において、NSCLC細胞株及びNSCLC患者からの原発腫瘍試料におけるSP17、AKAP4及びPTTG1のRNA及びタンパク質の発現パターン、加えて肺がん患者の血清中のCTA特異的抗体(Ab, antibody)の存在を測定することによってそれらの免疫原性を実証し、さらに自己末梢血単核細胞(PBMC, peripheral blood mononucleated cell)を使用してインビトロでのCTA特異的な細胞傷害性の抗腫瘍応答を起こす実行可能性を実証する。

10

20

30

40

50

#### 【0028】

NSCLCは、歴史的に腫瘍浸潤T細胞の頻度が低いために弱い免疫原性しかないと考えられてきたが(Kim J, Raz D, Jablons D. Unmet need in lung cancer: can vaccines bridge the gap? *Clin Lung Cancer*. 2008;9:S6-12)、マウスNSCLCモデルを使用した研究から、DCベースのアプローチを利用して有効な免疫応答を活性化することが示された(Miller PW, Sharma S, Stolina M, Butterfield LH, Luo J, Lin Y, et al. Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum Gene Ther*. 2000;11:53-65、Yasumoto K, Hanagiri T, Takenoyama M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;57:449-457)。加えて、腫瘍抗原特異的なT細胞応答は、NSCLCを有する患者で検出されており(Yasumoto K, Hanagiri T, Takenoyama M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;57:449-457)、これは、特異的なNSCLC関連抗原を同定して、それらを最適な様式で免疫系に提示させることが、一般的にこの疾患においては存在しないか又は不活性な腫瘍特異的なエフェクターT細胞を生成することになり得ることを示す(Raez LE, Fein S, Podack ER. Lung cancer immunotherapy. *Clin Med Res*. 2005;3:221-8)。患者の生存を向上させ、標準的な処置に関連する罹患率の低下における免疫療法の潜在的な役割が、近年のNSCLC患者における臨床的なワクチン試験のメタ分析によって実証されてきた(Wang J, Zou ZH, Xia HL, He JX, Zhong NS, Tao AL. Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. *PLoS One*. 2012;7:5)。免疫療法ベースの抗がん戦略を研究する際、ワクチンによって標的化しようとする抗原の選択は、重要なステップである(Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes o

f age. *Nature*. 2011;480:480-9)。理想的な標的は、がん細胞では選択的に発現されるが正常細胞では発現されない高度に免疫原性なタンパク質であると予想される (Mellman I, Coukos G, Dranoff G. *Cancer immunotherapy comes of age. Nature*. 2011;480:480-9, Mirandola L, M JC, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. *Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. Int Rev Immunol*. 2011;30:127-37)。CTAは、それらの高度に腫瘍に限定された発現パターンとそれらの免疫原性のために、腫瘍の免疫療法にとって特に好適な腫瘍関連抗原である (Caballero OL, Chen YT. *Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci*. 2009;100:2014-21, Mathieu MG, Miles AK, Li G, McArdle SE, Rees RC. *Cancer/testis antigens for therapeutic use. J Buon*. 2009;14:S97-102)。

#### 【 0 0 2 9 】

本発明は、NSCLCの免疫療法における3種のCTA、すなわちSP17、AKAP4、及びPTTG1の使用を提供する。本発明者らは、正常組織、3種のNSCLC細胞株、1種の正常な気管支細胞株、17人のNSCLC患者からの原発腫瘍細胞、及び8人の健常な対象からの気管支上皮細胞のパネルにおいて、3種のCTA、すなわちSP17、AKAP4、及びPTTG1の差次的な発現を初めて分析した。精巢を除いて、いずれの非腫瘍性組織も選択されたCTAのRNAレベルを発現しなかった (Caballero OL, Chen YT. *Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci*. 2009;100:2014-21, Mirandola L, M JC, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. *Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. Int Rev Immunol*. 2011;30:127-37)。NSCLC細胞株は、SP17、AKAP4、並びにPTTG1の転写物及びタンパク質を発現したが、一方で正常な気管支上皮細胞株は、SP17のRNA発現だけを弱く示した。これは、SP17が気道上皮などの線毛を有する体細胞上皮で発現されることを示した本発明者らの以前の報告と一致する (Grizzi F, Chiriva-Internati M, Franceschini B, Bumm K, Colombo P, Ciccarelli M, et al. *Sperm protein 17 is expressed in human somatic ciliated epithelia. J Histochem Cytochem*. 2004;52:549-54)。興味深いことに、独立した前臨床研究から、14のSP17に向けられた免疫療法は、線毛細胞においてSP17発現に関するいかなる毒性も生じないことが強く示唆されている (Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. *Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. PLoS One*. 2010;5: Song JX, Cao WL, Li FQ, Shi LN, Jia X. *Anti-Sp17 monoclonal antibody with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity activities against human ovarian cancer cells. Med Oncol*. 2011;24:24, Dadabayev AR, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Robinson WR, Lim SH. *Cancer immunotherapy targeting Sp17: when should the laboratory findings be translated to the clinics? Am J Hematol*. 2005;80:6-11)。患者に由来する全ての肺がん組織が、転写及び翻訳レベルでのSP17発現を実証したが、一方で検体の大部分はAKAP4及びPTTG1発現も示した。タンパク質発現の結果をフローサイトメトリーと免疫蛍光法で独立して確認したところ、結果が一致した。17人のNSCLC対象のうち16人からの腫瘍が、研究された3種のCTAの少なくとも2種の発現を示したことから、これら2種は、この疾患において潜在的な重要性を有することが示唆される。タンパク質を免疫療法のための標的として役立たせるには、免疫原性として知られている特徴である強く測定可能な免疫応答の惹起を可能にすべきである。本発明者らは、NSCLC患者の血清の大部分が少なくとも2種のCTA特異的抗体に関して陽性であり、5番の患者だけが抗SP17を示し、抗AKAP4又は抗PTTG1 IgGを示さなかったことを見出した。腫瘍組織におけるmRNA及びタンパク質発現データは完全に一致したが、血清中の抗CTA抗体として測定された体液性抗腫瘍応答はより不均質な結果となった。例えば、3人のNSCLC患者(2番、13番、14番)は抗SP17陰性と分類されたが、それらの腫瘍はSP17を発現した。

興味深いことに、全てのAKAP4陽性又はPTTG1陽性患者も、それらの血清中で対応する特異的な自己抗体を示した。Shan Q et al.による近年の研究は(Shan Q, Lou X, Xiao T, Zhang J, Sun H, Gao Y, et al. A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer. Cancer letters. 2012)、72種のCTAを含有する低密度タンパク質マイクロアレイを作製し、それをNSCLC患者及び健常な対象からの血清で探索した。これらの研究者は、NSCLC患者の血清においてNYESO-1、XAGE-1、ADAM29及びMAGEC1抗体(Ab)が検出されたことを報告した。これらの発見は、抗CTA抗体は、NSCLCにおける診断ツールとして活用できることを示す。

#### 【0030】

SP17、AKAP4、及びPTTG1の免疫原性がCTA/腫瘍特異的なCTL応答を生じさせる可能性があるのかどうかを決定するために、本発明者らは、CTAをロードした樹状細胞(DC)に対するT細胞応答を試験した。DCの適用は、腫瘍抗原特異的なT細胞応答の刺激のための広く認識された方法であり、本発明者らはこれまで、この技術をMM、子宮頸がん及び前立腺がんで使用してきた(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. Prostate. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. J Immunother. 2011;34:490-9、Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. J Virol. 1999;73:5402-10、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma. Scand J Immunol. 2002;56:429-33)。PBM CからのCTA特異的CTL生成の実行可能性を研究するために、本発明者らは、腫瘍細胞におけるSP17、AKAP4、又はPTTG1タンパク質発現に関して陽性と出た5人の患者を選択した。患者のPBM Cが、自己肺がん細胞及びNSCLC由来細胞株に対して有意な溶解活性を示すCTAを提示するDCで刺激された。観察された細胞傷害性効果は、抗HLAクラスII抗体ではなく抗HLAクラスIで遮断されたことから、HLAクラスI陽性標的に限定された。CTA陰性CRL-2503細胞に対して、又は非パルス化DC若しくはHPV E7抗原をロードしたDCのいずれかに晒された後に、CTLが細胞傷害性応答を生じさせることができないことによって、CTL溶解活性に関する抗原特異性が確認された。サイトカイン発現分析から、IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\alpha$ の増加並びにIL-4、IL-5、及びIL-10レベルの減少によって確認されたように、本発明者らのDCベースのCTL生成プロトコールが、刺激されたPBM Cにおいて強いTh-1の極性を誘導したことが解明された(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. Prostate. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. PLoS One. 2010;5、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Bumm K, Barlogie B, Lim SH. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. Blood. 2002;100:961-5、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation

10

20

30

40

50

n for Sp17-positive multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2002;56:429-33、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Yu Y, Hamrick C, Gagliano N, Grizzi F, et al. AKAP-4: a novel cancer testis antigen for multiple myeloma: *Br J Haematol.* 2008 Feb;140(4):465-8、Chiriva-Internati M, Liu Y, Weidanz JA, Grizzi F, You H, Zhou W, et al. Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood.* 2003;102:3100-7)。NSCLC患者は、免疫療法に対する重要な応答 (Ortegel JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP. Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002;36:17-25) に悪影響を与える異常なTh-2-タイプのサイトカインパターンを示すことから (Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 1998;77:7-12)、T-ヘルパーTh-1プロファイルを刺激するCTAをロードしたDCの能力は、臨床的に意義がある可能性がある (ただし本発明を限定しない) (Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, et al. The role of tumor infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:824-33)。さらにエフェクターTリンパ球の活性化は、CTAをロードしたDCで刺激され自己腫瘍細胞に晒されたPBMCにおいて高頻度のIFN- $\gamma$  発現細胞を明らかにしたELISPOT分析によって実証された。IFN- $\gamma$  は、NSCLC成長において有意な阻害作用を及ぼすことが示されているために (Chen J, Hou J, Zhang J, An Y, Zhang X, Yue L, et al. Atorvastatin synergizes with IFN-gamma in treating human non-small cell lung carcinomas via potent inhibition of RhoA activity. *Eur J Pharmacol.* 2012;682:161-70)、この発見は意義がある。インビトロで活性化CTA特異的免疫応答を生じさせる実行可能性は、NSCLC細胞によるCTA発現は治療的関連性を有し、この疾患に対する新規の免疫療法戦略を設計するための基準として役立つ可能性があることを示す。さらに、エフェクターT細胞にCTAが効果的に提示されるようにインビトロで操作されたDCは、NSCLC腫瘍の微環境で見られる免疫抑制を克服する可能性があることから、この疾患に対する有効なワクチン接種戦略の開発が可能になる (Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel PA, Enk AH, Ring S, et al. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment by upregulating B7-H3. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1162-8、Holt GE, Podack ER, Raez LE. Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Therapy.* 2011;8:43-54、Dubinett S, Sharma S. Towards effective immunotherapy for lung cancer: simultaneous targeting of tumor-initiating cells and immune pathways in the tumor microenvironment: *Immunotherapy.* 2009 Sep;1(5):721-5)。

#### 【0031】

本発明は、CTA: SP17、AKAP-4、及びPTTG1は、NSCLCで選択的に発現されること、及びそれらの発現は、特異的なCTL介在抗腫瘍応答を生じさせるのに活用できることを提供する。多発性骨髄腫、卵巣及び前立腺がんにおける (Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D' Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate.* 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One.* 2010;5、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, et al. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. *J Transl Med.* 2008;6:15、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E

10

20

30

40

50

, Bumm K, Barlogie B, Lim SH. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:961-5、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma. *Scand J Immunol*. 2002;56:429-33、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Yu Y, Hamrick C, Gagliano N, Grizzi F, et al. AKAP-4: a novel cancer testis antigen for multiple myeloma: *Br J Haematol*. 2008 Feb;140(4):465-8)、さらに現在ではNSCLCにおける、SP17、AKAP4、及びPTTG1の発現及び免疫原性は、CTAによって推進されるワクチン接種戦略でのこれらのCTAを発現する腫瘍の標的化の使用を暗示するものである。

10

## 【0032】

NSCLC細胞株であるCRL-5928(扁平上皮がん)、CRL-5922(腺がん)、及び不死化した非腫瘍形成性ヒト気管支上皮細胞株であるCRL-2503(複製欠損SV40ラージTプラスミドでのトランスフェクションにより確立された)を、American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)から得て、10%V/VのFBS(Invitrogen社製、Carlsbad, CA, USA)を補充したRPMI-1640培地(Invitrogen社製、Carlsbad, CA, USA)中で、37及び5%CO<sub>2</sub>で保持した。

## 【0033】

本発明者らは、外科手術に由来する17種のNSCLC腫瘍試料と、気管支生検を受けた健常な対象からの8種の試料とを評価した。慣例的な血液テストのときに、既報のとおり(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23)血清を収集した。地域倫理委員会の承認と患者のインフォームド Consentのもとに、ヒト対象からの材料を得た。パンチ生検を細かく刻み、組織断片を完全培地(10%FBS、20mMのHEPES緩衝液、100U/mLのペニシリン、100mg/mLのストレプトマイシンを補充したRPMI-1640培地)中にプレATINGした。分析前に、細胞を5%CO<sub>2</sub>中及び37で24時間保持した。正常組織パネルをApplied Biosystems社(Foster City, CA)から得た。SP17:5'Sp17PCR配列番号1-5'-GGCAGTCTCTACCAA GAA GAT-3';3'Sp17PCR配列番号2-5'-GGAGGTAAAACCAGTGCTC-3';AKAP4:配列番号3-5'-GCGTACTTCTGATACTACAATGATG-3'及び配列番号4-5'-GGG6GTTTGTGAAAGTCA-3';PTTG1:配列番号5-5'-GGTTTAAC CAGGAGTGC CGC-3'及び配列番号6-5'-AAT TCAACA TCCAGG GTCGACAG-3'; -アクチン:配列番号7-5'-CGTCTTCCCCTCATCG-3'及び配列番号8-5'-CTCGTTAATGTCACG CAC-3'(35サイクル、55のアニーリング温度)。エチジウムブロマイドアガロースゲル上でPCR産物を期待されるサイズのDNAバンドとして可視化した。3回の独立したRT-PCR実験で全ての結果を確認した。

20

30

## 【0034】

およそ400,000個の細胞を1xPBSで洗浄し、緩衝化したパラホルムアルデヒド(1xPBS中4%W/V、pH=7.4)で固定した。次いで透過化緩衝液(PBS中0.3%V/Vサポニン)を用いて氷上で5分間細胞を透過性にし、特異的な一次Ab:ヤギ抗ヒトSP17、ヤギ抗ヒトAKAP4(両方ともSanta Cruz Biotechnology社製、Santa Cruz, CA, USA)、又はウサギ抗ヒトPTTG1(Novus Biologicals社製、LLC, Littleton, CO, USA)と共にインキュベートした。等量の適合するアイソタイプAb(Novus Biologicals社製、LLC, Littleton, CO, USA)と共にインキュベートした細胞を用いて、陰性対照を得た。氷上で1時間インキュベートした後、細胞を透過化緩衝液で3回洗浄し、次いで適切なFITCコンジュゲート二次抗体(BD Biosciences社製、San Jose, CA, USA)と共に氷上で20分間インキュベートした。FACS-Cantoフローサイトメーター(BD社製)を使用して蛍光強度を測定した。

40

50

## 【0035】

これまでに述べられたようにして (Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. *J Immunother.* 2011;34:490-9) C T A 発現の免疫蛍光法の評価を行った。20,000個の細胞をサイトスピンにかけ、SlideRite (Fisher社製) で固定し、一晚風乾させた。各試料を0.1% Triton X-100クエン酸ナトリウム緩衝液中で4で15分間かけて透過性にし、次いで細胞を、加湿したチャンパー中で、フローサイトメトリー法で説明した特異的な一次抗体 (PBS / BSA 0.1%で1:100希釈) と共に、次いでフィコエリトリンコンジュゲートウサギ IgG 二次抗体 (1:500希釈、7、Abcam社製) と共に4で一晚インキュベートした。結果を倒立蛍光顕微鏡 (Olympus社製のレーザーを備えたIX71倒立顕微鏡) で分析し、60xの対物倍率で写真を撮った。標準的なDAPI染色を使用して核を検出した。

10

## 【0036】

ポリスチレン96-ウェルプレートを、50μLの炭酸コーティング緩衝液 (10μg / ウェル) 中で23で2時間、穏やかにかき混ぜながら、ヒト組換えタンパク質 (SP17、AKAP4又はPTTG1、全てNovus Biologicals社製、LLC, Littleton, CO, USA) でコーティングした。100μLのPBSで2回洗浄した後、非特異的な結合部位を、PBS中1% W / VのBSAで、23で1時間ブロックした。次いでBSAを除去し、50μLの血清を添加した (PBSで1:5に希釈)。34で1時間インキュベートした後、プレートを100μLの洗浄緩衝液 (PBS中0.05% V / VのTween-20) で2回洗浄し、HRP結合マウス抗ヒトIgG (Abcam社製、PBSで1:4,000に希釈) と共にインキュベートした。暗所にて22で1時間インキュベートした後、プレートを100μLの洗浄緩衝液で2回洗浄し、次いで暗所にてHRP基質溶液 (Kpl ABST (登録商標) ペルオキシダーゼ基質システム) と共に22で5分間インキュベートした。405nmで吸光度を読み取った (0.1秒 / ウェル)。血清と共にインキュベートしたウェルで得られた吸光度から、陰性対照 (市販の抗体と共にインキュベートした抗原非含有のウェル) の吸光度を差し引いた。

20

## 【0037】

ヘパリン添加した血液をFicoll-Hypaque密度勾配で遠心分離して、5人の患者からPBMCを分離した。6-ウェル培養プレートに、PBMCを、3mLのRPMI-1640培地及び10% FBSと共に細胞8~10x10<sup>6</sup>個 / ウェルで播種した。37及び5% CO<sub>2</sub>で2時間後、本発明者らは非付着細胞を除去し、10% FBS、1000 IU / mL インターロイキン4 (IL-4) 及び800 IU / mL 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子8 (GM-CSF, granulocytes-macrophage colony-stimulating factor) を補充したRPMI-1640中で付着細胞を培養した。1週間培養した後、DCを回収し、記載されているようにして (Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate.* 2012;72:12-23, Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. *J Immunother.* 2011;34:490-9)、ヒト組換えSP17、AKAP4又はPTTG1でパルスした。

30

40

## 【0038】

DCを2回洗浄し、50mLのポリプロピレンチューブ中に置いた。組換えタンパク質を、カチオン脂質DOTAP (Roche社製、Mannheim, Germany) と室温で20分間かけて混合し、37で3時間かけて時々かき混ぜながらDCに添加した。

## 【0039】

抗原でパルスされたDCを、新鮮な自己PBMCと共に、10%自己血清、10 IU / mLのIL-2及び5 ng / mLのIL-7を含むRPMI-1640で1:10の比率で、37、5% CO<sub>2</sub>で培養した (Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Har

50

dwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23)。放射線照射した自己PBMCFीडァー細胞及び組換えCTA(50 µg/mL)を週1回添加し、IL-2を3日毎に添加した。ToxinSensorクロモジェニックLALエンドトキシソアッセイキット(GenScript USA社製、08854、NJ)で行われた内毒素検出アッセイによって確認したところ、組換えCTAは内毒素非含有であった。

#### 【0040】

CTAで刺激されたT細胞の細胞傷害性活性をテストするために、本発明者らは、製造元の指示(Perkin Elmer社、USA)に従って、DELFI(A登録商標)EuTDAシステムを使用したEUROPIUMベースの細胞傷害性アッセイを行った。標的細胞には、自己DC(刺激されていない、又は肺がんとは関係のないHPV-E/抗原でパルスされた)、及び自己腫瘍細胞(エフェクター標的細胞との比率は40:1、20:1、又は10:1)が包含されていた。HLAクラスIに対する抗体(W6/32)及びHLAクラスIIに対する抗体(L243)を、25 µg/mLの濃度で添加して、固定された20:1のエフェクター:標的の比率で、HLA拘束性細胞傷害性を評価した。

#### 【0041】

活性化されたPBMCFと自己腫瘍細胞とを4時間共培養したもの(20:1のエフェクター:標的の比率)の上清に対してELISAを行った。ヒトIL-4、IL-5、IL-10、インターフェロン(IFN, interferon)、及び腫瘍壊死因子(TNF, tumor necrosis factor)の検出のために、製造元の指示に従って、U-CyTechサンドイッチELISAキット(U-CyTech社製、Utrecht、The Netherlands)を使用した。TMBマイクロウェル基質を添加することによって反応を進行させ、2MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加によって反応を止めた。450nmで吸光度を読み取った。データは、活性化PBMCFを用いて測定されたODを、抗原なしで自己DCと共にインキュベートしたPBMCFを用いて得られたODで割ったもの(OD比)として表示される。

#### 【0042】

本発明者らが他所で記載したように製造元の指示に従ってELISPOTアッセイ(U-CyTech社製、Utrecht、The Netherlands)を使用して、患者のCTL(20:1のエフェクター:標的の比率)によるIFN-γ発現を評価した(Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. *J Immunother*. 2011;34:490-9)。AID ELISPOTリーダーシステム(Cell Technology社製、Columbia、MD)を用いてスポットの計数を行った。

#### 【0043】

図1A~1Cは、CTA発現のRT-PCR分析を示す画像である。図1Aは、正常組織パネルから調製されたcDNAにおけるPCRを示すゲルの画像である。図1Bは、NSCLC細胞株であるCRL-5928(Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics*, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:10-29)、CRL-5922(Chrischilles EA, Pendergast JF, Kahn KL, Wallace RB, Moga DC, Harrington DP, et al. Adverse events among the elderly receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:620-7)、又は正常な気管支上皮に由来する細胞であるCRL-2503(Gadgeel SM. The optimal chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer patients. *Curr Oncol Rep*. 2011;13:272-9)からのcDNAにおけるPCRを示すゲルの画像である。図1Cは、NSCLC原発腫瘍からのcDNAにおけるPCRを示すゲルの画像である。陽性対照は、精巢から調製されたcDNAであり、一方で陰性対照は、事前の逆転写を行わないRNAを用いて行われたPCR(RTなし)、及びテンプレートを用いずに行われたPCR(テンプレートなし)であった。-アクチンを使用して、成功した逆転写を確認した。SP17/AKAP4/PTTG1のRNAは、NSCLC細胞株及び原発腫瘍によって選択的に発現されたが、非腫瘍性の細胞株及び組織では選択的に発現されなかったことが見出された。SP17、AKAP4、及びP

10

20

30

40

50

TTG 1 の遺伝子発現を、図 1 A に見られるように正常組織のパネルからの RNA を使用した RT - PCR で決定した。図 1 B に、3 種の細胞株 ( 2 種は NSCLC に由来し、1 種は正常な気管支上皮に由来する ) を示し、図 1 C に、新たに NSCLC と診断された 17 人の患者のコホートを示す。本発明者らは、陽性対照として、精巣における CTA 発現を分析し ( Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D' Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One*. 2010;5、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, et al. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. *J Transl Med*. 2008;6:15 )、一方で陰性対照は、逆転写を受けていない ( 混入したゲノム DNA が増幅する可能性を排除するため ) テンプレートなしで RT - PCR を行った RNA のプールを使用して得られた。SP17、AKAP - 4 及び PTTG 1 の検出可能な RNA レベルを発現した正常組織はなかった ( 図 1 A 参照 )、正常な気管支細胞株である CRL - 2503 は、SP17 の RNA の弱い発現を実証した ( 図 1 B 参照 )。NSCLC 細胞株である CRL - 5928 及び CRL - 5922 は、評価された 3 種の CTA の有意な RNA 発現を実証した ( 図 1 B 参照 )。さらに、17 人全ての NSCLC 患者からの腫瘍は SP17 に関して陽性であったが、腫瘍の 65 % が AKAP 4 を発現し ( 17 人中 11 人 )、59 % が PTTG 1 を発現した ( 17 人中 10 人 ) ( 図 1 C 参照 )。

#### 【 0 0 4 4 】

図 2 は、示された抗体 ( 有色のヒストグラム ) 又は対応するアイソタイプ対照 ( 黒色のヒストグラム ) と共にインキュベートした細胞のフローサイトメトリー分析を示す。FACS -Canto フローサイトメーター ( BD 社製 ) を使用して FL1 チャネル ( 対数スケール ) 中の FSC / SSC でゲーティングした細胞 ( 10 , 000 の事象 ) の蛍光強度を測定した。プロットは、細胞株及び患者の初代試料中の SP17、AKAP 4 及び PTTG 1 に従って整列させる。SP17、AKAP 4 及び PTTG 1 は、NSCLC 細胞株と患者の初代試料によってタンパク質レベルで発現されるが、正常な気管支上皮では発現されない。CTA パネルの発現をタンパク質レベルで研究するために、本発明者らは、透過性細胞の CTA 特異的抗体染色によるフローサイトメトリー分析を行った。図 2 は、SP17、AKAP 4 及び PTTG 1 は、NSCLC 由来細胞株によっては発現されるが、正常気管支由来細胞株によっては発現されないことを示す。注目すべきことに、非腫瘍性 CRL - 2503 細胞は、SP17 遺伝子が弱く発現されていたにもかかわらず、SP17 タンパク質に関して陰性であった ( 図 1 B 及び 2 )。本発明者らが患者由来 NSCLC 腫瘍 / 組織に類似の分析を行ったところ、RT - PCR データと完全に一致した。図 2 は、3 人の患者からの代表的な結果を示す。CTA 発現の特異性を、評価された健常な個体のうち 1 人に由来する組織中の SP17、AKAP 4、及び PTTG 1 の陽性染色の非存在によって確認した ( Bhan S, Negi SS, Shao C, Glazer CA, Chuang A, Gaykalova DA, et al. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4267-76 ) ( 例えば、図 2 に代表的な結果を示す )。腫瘍及び正常細胞における選択された CTA の発現をさらに評価するために、本発明者らは、サイトスピンした NSCLC 細胞株、正常な気管支細胞株、及び原発腫瘍に由来する細胞の免疫蛍光法分析を行った。

#### 【 0 0 4 5 】

図 3 は、NSCLC 細胞株である CRL - 5928、CRL - 5922、正常な気管支上皮に由来する細胞である CRL - 2503、及び 1 人の代表的な患者で行われた免疫蛍光法を示す。代表的な免疫蛍光法は、NSCLC 細胞株である CRL - 5928、CRL - 5922、正常な気管支上皮に由来する細胞である CRL - 2503、及び 1 人の代表

10

20

30

40

50

的な患者（7番）に行われた。本発明者らは、細胞質中でのSP17、AKAP4、及びPTTG1の陽性染色（緑色のシグナル）を示す。倒立蛍光顕微鏡（Olympus社製のIX71）により60xの倍率で写真を撮った。SP17、AKAP4、及びPTTG1に対して起こり得る体液性応答を測定するために、本発明者らは、間接ELISAによって、NSCLC患者からの血清中の循環するCTA特異的IgG自己抗体のレベルを健常な対象からのものと比較した。ELISAシグナルが健常な対象に見出される中央値のシグナルよりも少なくとも3高い標準偏差を有する場合、対象を陽性とみなした（Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Zanolini A, Ravaggi A, Siegel ER, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. J Virol. 2008;82:1968-79）。

10

## 【0046】

図4A～4Cは、SP17、AKAP4、及びPTTG1に関する循環するCTA特異的IgGを検出するためのELISAデータのグラフである。図4A～4Cは、循環するCTA特異的IgGを検出するためのELISAである。グラフは、3連で実行された研究から計算された平均OD値を表示する（四角、NSCLC患者の血清；ひし形、健常な対象の血清）。水平線は、健常な対照グループから得られた中央値の3倍として計算された陽性カットオフを表す。RT-PCR、フローサイトメトリー及び免疫蛍光法からの発現データと一致して、図4A～4Cは、NSCLC患者の大部分がCTA特異的な循環する自己抗体を提示したことを示す。

## 【0047】

図5A～5Fは、CTL活性及び特異性の分析のグラフである。ヒストグラムは、指示された様々な条件下での非放射性EUROPIUMベースのアッセイを介して得られた特異的溶解のパーセンテージを示す。左のパネルは、エフェクター（E）：標的22（T）細胞の様々な比率におけるCTL活性を示す。バーは、3連で実行された実験の平均を表し、エラーバーは、標準偏差を表す。右のパネルは、CTL特異性の分析を示す。バーは、選択された5人の患者で実行された実験から得られた平均値を表し、一方でエラーバーは、標準偏差を表す。HLA拘束性細胞傷害性を評価するために、HLAクラスIに対する抗体（W6/32）及びHLAクラスIIに対する抗体（L243）を25µg/mLの濃度で添加した。CTLは、細胞傷害性Tリンパ球を示し；DCは、樹状細胞を示し；HLAは、ヒト白血球抗原を示し；E7は、HPV E7抗原を示し；PBM Cは、末梢血単核細胞を示す。図5A～Fの左列に見られるように、本発明者らは、5人の患者からの自己腫瘍細胞を効率的に死滅させることができるCTLの生成に成功した。この分析のために、本発明者らは、それらの腫瘍細胞においてタンパク質レベルで特異的なCTA発現を示した患者を選択した。細胞傷害性効果の特異性は、自己腫瘍細胞及びNSCLC由来細胞株の溶解の高いパーセンテージ（40%～80%超）によって裏付けられたが、それに対して非腫瘍細胞（DC、関係のないHPV-E7抗原、及び正常気管支由来細胞株CRL-2503でパルスされたDC）の溶解は10%未満であった（図5A～F、右）。HLAクラスI拘束性は、図5A～Fの右列に見られるように、単一構造のHLAクラスI分子には向かうがHLAクラスII分子には向かわない抗体12での溶解障害によって示された。

20

30

40

## 【0048】

図6A、6C及び6Eは、提示されたサイトカインのレベルに関して分析したELISAであり、図6B、6D及び6Fは、患者のCTLと自己腫瘍細胞とを共培養することによるIFN- $\gamma$ 発現のELISPOT分析である。図6A、6C及び6Eは、自己腫瘍細胞と、CTAでパルスされたDC又は未改変DCで刺激したPBM Cとの共培養（20：1のエフェクター：標的の比率）からの上清のELISAであり、示されたサイトカインのレベルに関して分析された。全ての測定を3連で実行した。結果は、活性化PBM Cで測定された平均ODを、抗原なしで自己DCと共にインキュベートしたPBM Cを用いて得られた平均ODで割ったもの（OD<sub>450</sub>比）として表示される。図6B、6D及び6Fは、患者のCTLと自己腫瘍細胞とを共培養することによる（20：1エフェクター：標的の

50

比率) I F N - 発現のELISPOT分析であり、材料及び方法の章で詳述したようなELISPOTアッセイを使用して評価した。AID ELISPOTリーダーシステム (Cell Technology社製、Columbia, MD) を用いてスポットの計数を行い、106個のP B M C当りに標準化した。結果は、3連で実行されたアッセイの平均±標準偏差を表す。T h 1エフェクター表現型へのT細胞の活性化及び極性化が、サイトカイン発現のE L I S Aベースの測定によって示された: C T AでパルスされたD Cで刺激して腫瘍細胞と共培養した後、I F N - 及びT N F - のレベルが50倍より多く増加したが、それに対してI L - 4、I L - 5、及びI L - 10は実質的に変わらなかった(図6 A、6 C及び6 E参照)。さらにI F N - に関するELISPOTの結果から、自己腫瘍細胞と共培養されたロツポリン提示D Cで活性化されたP B M CにおけるI F N - 産生細胞の高発生頻度の増加が確認された(図6 A、6 C及び6 E)。

10

## 【0049】

S P 1 7 / A K A P 4 / P T T G 1のR N Aは、N S C L C細胞株及び原発腫瘍によって選択的に発現されるが、非腫瘍性の細胞株及び組織ではそうではない。

## 【0050】

S P 1 7、A K A P 4、及びP T T G 1の遺伝子発現を、正常組織(図1 A)、3種の細胞株(2種はN S C L Cに由来し、1種は正常な気管支上皮に由来する、図1 B)、及び新たにN S C L Cと診断された17人の患者のコホート(図1 C)のパネルからのR N Aを使用したR T - P C Rで決定した。陽性対照として、本発明者らは、精巣におけるC T A発現を分析し(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D' Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. Prostate. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. PLoS One. 2010;5、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, et al. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. J Transl Med. 2008;6:15)、一方で陰性対照は、逆転写を受けていない(混入したゲノムD N Aが増幅する可能性を排除するため)テンプレートなしでR T - P C Rを行ったR N Aのプールを使用して得た(図1 A ~ C)。S P 1 7、A K A P - 4及びP T T G 1の検出可能なR N Aレベルを発現した正常組織はなかったが(図1 A)、正常な気管支細胞株であるC R L - 2 5 0 3は、S P 1 7のR N Aの弱い発現を実証した(図1 B)。N S C L C細胞株であるC R L - 5 9 2 8及びC R L - 5 9 2 2は、評価された3種のC T Aの有意なR N A発現を実証した(図1 B)。さらに、17人全てのN S C L C患者からの腫瘍はS P 1 7に関して陽性であったが、腫瘍の65%がA K A P 4を発現し(17人中11人)、59%がP T T G 1を発現した(17人中10人)(図1 C)。

20

30

## 【0051】

S P 1 7 / A K A P 4 / P T T G 1は、N S C L C細胞株と患者の初代試料によってタンパク質レベルで発現されるが、正常な気管支上皮では発現されない。

## 【0052】

本発明者らのC T Aパネルの発現をタンパク質レベルで研究するために、本発明者らは、透過性細胞のC T A特異的抗体染色によるフローサイトメトリー分析を行った。図2は、S P 1 7 / A K A P 4 / P T T G 1は、N S C L C由来細胞株によっては発現されるが、正常気管支由来細胞株によっては発現されないことを示す。注目すべきことに、非腫瘍性C R L - 2 5 0 3細胞は、S P 1 7遺伝子が弱く発現されていたにもかかわらず、S P 1 7タンパク質に関して陰性であった(図1 B及び2)。次いで本発明者らは、患者に由来するN S C L C腫瘍/組織に類似の分析を行ったところ、R T - P C Rデータと完全に一致した。図2は、3人の患者からの代表的な結果を示す。C T A発現の特異性を、評価された健常個体のうち1人に由来する組織中のS P 1 7 / A K A P 4 / P T T G 1陽性染色の非存在によって確認した(図2に代表的な結果を示す)。腫瘍及び正常細胞における

40

50

選択されたCTAの発現をさらに評価するために、本発明者らは、サイトスピンしたNSCLC細胞株、正常な気管支細胞株、及び原発腫瘍に由来する細胞の免疫蛍光法分析を行った。図3は、腫瘍細胞におけるSP17/AKAP4/P TTG1の細胞質内局在化を示すが、フローサイトメトリーからの結果によれば正常な気管支細胞株であるCRL-2503におけるシグナルは存在しないか基準に満たない。

#### 【0053】

NSCLC患者の血清において、循環するCTA特異的の自己抗体は検出可能である。

#### 【0054】

SP17/AKAP4/P TTG1に対して起こり得る体液性応答を測定するために、本発明者らは、間接ELISAによって、NSCLC患者からの血清中の循環するCTA特異的IgG自己抗体のレベルを健常な対象からのものと比較した。ELISAシグナルが健常な対象に見出される中央値のシグナルよりも少なくとも3高い標準偏差を有する場合、対象を陽性とみなした(Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Zanolini A, Ravaggi A, Siegel ER, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. *J Virol.* 2008;82:1968-79)。RT-PCR、フローサイトメトリー及び免疫蛍光法からの発現データと一致して、図4A~Cは、NSCLC患者の大部分が、CTA特異的な循環する自己抗体を提示したことを示す。

#### 【0055】

患者のPBMCからのCTA特異的CTLの生成

本発明者らは、5人の患者からの自己腫瘍細胞を効率的に死滅させることができるCTLの生成に成功した(図5A~F、左)。この分析のために、本発明者らは、それらの腫瘍細胞でタンパク質レベルで特異的なCTA発現を示した患者を選択した。細胞傷害性効果の特異性は、自己腫瘍細胞及びNSCLC由来細胞株の溶解の高いパーセンテージ(40%~80%超)によって裏付けられたが、それに対して非腫瘍細胞(DC、関係のないHPV-E7抗原、及び正常な気管支に由来する細胞株CRL-2503でパルスされたDC)の溶解は10%未満であった(図5A~F、右)。HLAクラスI拘束性は、単一構造のHLAクラスI分子には向かうがHLAクラスII分子には向かわない抗体での溶解阻害によって示された(図5A~F、右)。Th1エフェクター表現型へのT細胞の活性化及び極性化が、サイトカイン発現のELISAベースの測定によって示された:CTAでパルスされたDCで刺激して腫瘍細胞と共培養した後、IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\alpha$ のレベルが50倍より多く増加したが、それに対してIL-4、IL-5、及びIL-10は実質的に変わらなかった(図6A~F、左)。さらにIFN- $\gamma$ に関するELISPOTの結果から、自己腫瘍細胞と共培養されたロツポリン提示DCで活性化されたPBMCにおけるIFN- $\gamma$ 産生細胞の高発生頻度の増加が確認された(図6A~F、右)。

#### 【0056】

NSCLCは、歴史的に腫瘍浸潤T細胞の頻度が低いために弱い免疫原性しかないと考えられてきたが(Kim J, Raz D, Jablons D. Unmet need in lung cancer: can vaccines bridge the gap? *Clin Lung Cancer.* 2008;9:S6-12)、マウスNSCLCモデルを使用した研究から、DCベースのアプローチを利用して有効な免疫応答を活性化することができることが示された(Miller PW, Sharma S, Stolina M, Butterfield LH, Luo J, Lin Y, et al. Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum Gene Ther.* 2000;11:53-65, Yasumoto K, Hanagiri T, Takenoyama M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;57:449-457)。加えて、腫瘍抗原特異的なT細胞応答は、NSCLCを有する患者で検出されており(Yasumoto K, Hanagiri T, Takenoyama M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;57:449-457)、これは、特異的なNSCLC関連抗原を同定して、そ

10

20

30

40

50

れらを最適な様式で免疫系に提示させることが、一般的にこの疾患においては存在しないか又は不活性な腫瘍特異的なエフェクターT細胞を生成することになり得るということを示す (Raez LE, Fein S, Podack ER. Lung cancer immunotherapy. Clin Med Res. 2005; 3:221-8)。患者の生存を向上させ、標準的な処置に関連する罹患率を低下させることにおける免疫療法の潜在的な役割が、近年のNSCLC患者における12の臨床的なワクチン試験のメタ分析によって実証されてきた (Wang J, Zou ZH, Xia HL, He JX, Zhong NS, Tao AL. Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. PLoS One. 2012;7:5)。免疫療法ベースの抗がん戦略を研究する際、ワクチンによって標的化しようとする抗原の選択は、重要なステップである (Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 2011;480:480-9)。理想的な標的は、がん細胞では選択的に発現されるが正常細胞では発現されない高度に免疫原性タンパク質であると予想される (Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 2011;480:480-9, Mirandola L, M JC, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. Int Rev Immunol. 2011;30:127-37)。CTAは、それらの高度に腫瘍に限定された発現パターンとそれらの免疫原性のために、腫瘍の免疫療法にとって特に好適な腫瘍関連抗原である (Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci. 2009;100:2014-21, Mathieu MG, Miles A K, Li G, McArdle SE, Rees RC. Cancer/testis antigens for therapeutic use. J Buon. 2009;14:S97-102)。

10

20

#### 【 0 0 5 7 】

この研究において、本発明者らは、NSCLCの免疫療法における3種のCTA、すなわちSP17、AKAP4、及びPTTG1の使用を示す。本発明者らは、正常組織、3種のNSCLC細胞株、1種の正常な気管支細胞株、17人のNSCLC患者からの原発腫瘍細胞、及び8人の健常な対象からの気管支上皮細胞のパネルにおいて、3種のCTA、すなわちSP17、AKAP4、PTTG1の差次的な発現を初めて分析した。予想通りに、精巢を除いて、いずれの非腫瘍性組織も選択されたCTAのRNAレベルを発現しなかった (Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci. 2009;100:2014-21, Mirandola L, M JC, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. Int Rev Immunol. 2011;30:127-37)。NSCLC細胞株は、SP17/AKAP4/PTTG1転写物及びタンパク質を発現したが、一方で正常な気管支上皮細胞株は、SP17のRNA発現だけを弱く示した。これは、SP17が気道上皮などの線毛を有する体細胞上皮で発現されることを示した本発明者らの以前の報告と一致する (Grizzi F, Chiriva-Internati M, Franceschini B, Bumm K, Colombo P, Ciccarelli M, et al. Sperm protein 17 is expressed in human somatic ciliated epithelia. J Histochem Cytochem. 2004;52:549-54)。興味深いことに、独立した前臨床研究から、SP17に向けられた免疫療法は、線毛細胞においてSP17発現に関するいかなる毒性も生じないことが強く示唆されている (Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. PLoS One. 2010;5, Song JX, Cao WL, Li FQ, Shi LN, Jia X. Anti-Sp17 monoclonal antibody with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity activities against human ovarian cancer cells. Med Oncol. 2011;24:24, Dadabayev AR, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Robinson WR, Lim SH. Cancer immunotherapy targeting Sp17: when should the laboratory findings be translated to the clinics? Am J Hematol. 2005;80:6-11)。患者に由来する全ての肺がん組織が、転写及び翻訳レベルでSP17発現を実証したが、一方で検体の大部分はAKAP4及びPTTG1発現も示した。タンパク質発現の結果をフローサイトメトリーと免疫蛍光法で独立して

30

40

50

確認したところ、結果が一致した。17人のNSCLC対象のうち16人からの腫瘍が、研究された3種のCTAの少なくとも2種の発現を示したことから、これら2種は、この疾患において潜在的重要性を有することが示唆される。タンパク質を免疫療法のための標的として役立たせるには、免疫原性として知られている特徴である強く測定可能な免疫応答の惹起を可能にすべきである。本発明者らは、NSCLC患者の血清の大部分が少なくとも2種のCTA特異的抗体に関して陽性であり、5番の患者だけが抗SP17を示し、抗AKAP4又は抗PTTG1 IgGを示さなかったことを見出した。腫瘍組織におけるmRNA及びタンパク質発現データは完全に一致したが、血清中の抗CTA抗体として測定された体液性抗腫瘍応答はより不均質な結果となった。例えば、3人のNSCLC患者(2番、13番、14番)は抗SP17陰性と分類されたが、それらの腫瘍はSP17を発現した。興味深いことに、全てのAKAP4陽性又はPTTG1陽性患者も、それらの血清中で対応する特異的な自己抗体を示した。Shan Q et al.による近年の研究は(Shan Q, Lou X, Xiao T, Zhang J, Sun H, Gao Y, et al. A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer. *Cancer letters*. 2012)、72種のCTAを含有する低密度タンパク質マイクロアレイを作製し、それをNSCLC患者及び健常な対象からの血清で探索した。これらの研究者は、NSCLC患者の血清においてNYESO-1、XAGE-1、ADAM29及びMAGEC1抗体が検出されたことを報告した。これらの発見は、抗CTA抗体は、NSCLCにおける診断ツールとして活用できることを示す。

#### 【0058】

SP17/AKAP4/PTTG1の免疫原性がCTA/腫瘍特異的なCTL応答を生じさせる可能性があるのかどうかを決定するために、本発明者らは、CTAをロードした樹状細胞(DC)に対するT細胞応答を試験した。DCの適用は、腫瘍抗原特異的なT細胞応答の刺激のための広く認識された方法であり、本発明者らはこれまで、この技術をMM、子宮頸がん及び前立腺がんで使用してきた(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. *J Immunother*. 2011;34:490-9、Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J Virol*. 1999;73:5402-10、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma. *Scand J Immunol*. 2002;56:429-33)。PBM CからのCTA特異的CTL生成の実行可能性を研究するために、本発明者らは、腫瘍細胞におけるSP17、AKAP4、又はPTTG1タンパク質発現に関して陽性と出た5人の患者を選択した。予想通りに、患者のPBM Cが、自己肺がん細胞及びNSCLC由来細胞株に対して有意な溶解活性を示すCTAを提示するDCで刺激された。観察された細胞傷害性効果は、抗HLAクラスII抗体ではなく抗HLAクラスIで遮断されたことから、HLAクラスI陽性標的に限定された。CTA陰性CRL-2503細胞に対して、又は非パルス化DC若しくはHPVE7抗原をロードしたDCのいずれかに晒された後に、CTLが細胞傷害性応答を生じさせることができないことによって、CTL溶解活性に関する抗原特異性が確認された。サイトカイン発現分析から、IFN-及びTNF-の増加並びにIL-4、IL-5、及びIL-10レベルの減少によって確認されたように、本発明者らのDCベースのCTL生成プロトコールが、刺激されたPBM Cにおいて強いTh-1の極性を誘導したことが解明された(Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cu

10

20

30

40

50

nha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One*. 2010;5、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Bumm K, Barlogie B, Lim SH. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:961-5、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma. *Scand J Immunol*. 2002;56:429-33、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Yu Y, Hamrick C, Gagliano N, Grizzi F, et al. AKAP-4: a novel cancer testis antigen for multiple myeloma: *Br J Haematol*. 2008 Feb;140(4):465-8、Chiriva-Internati M, Liu Y, Weidanz JA, Grizzi F, You H, Zhou W, et al. Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood*. 2003;102:3100-7)。NSCLC患者は、免疫療法に対する重要な応答 (Ortegel JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP. Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;36:17-25) に悪影響を与える異常なTh-2タイプのサイトカインパターンを示すことから (Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayon I G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*. 1998;77:7-12)、CTAをロードしたDCは、T-ヘルパーTh-1プロファイルを刺激する能力を有することが可能であるが、本発明を限定しない (Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, et al. The role of tumor infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6:824-33)。さらにエフェクターT細胞の活性化は、CTAをロードしたDCで刺激され自己腫瘍細胞に晒されたPBM Cにおいて高頻度のIFN- $\gamma$  発現細胞を明らかにしたELISPOT分析によって実証された。IFN- $\gamma$  は、NSCLC成長において有意な阻害作用を及ぼすことが示されているために (Chen J, Hou J, Zhang J, An Y, Zhang X, Yue L, et al. Atorvastatin synergizes with IFN-gamma in treating human non-small cell lung carcinomas via potent inhibition of RhoA activity. *Eur J Pharmacol*. 2012;682:161-70)、この発見は意義がある。

#### 【 0 0 5 9 】

インビトロで活性化CTA特異的免疫応答を生じさせる実行可能性は、NSCLC細胞によるCTA発現は治療的関連性を有し、この疾患に対する新規の免疫療法戦略を設計するための基準として役立つ可能性があることを示す。さらに、エフェクターT細胞にCTAが効果的に提示されるようにインビトロで操作されたDCは、NSCLC腫瘍の微環境で見られる免疫抑制を克服する可能性があることから、この疾患に対する有効なワクチン接種戦略の開発が可能になる (Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel PA, Enk AH, Ring S, et al. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment by upregulating B7-H3. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1162-8、Holt GE, Podack ER, Raez LE. Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Therapy*. 2011;8:43-54、Dubinett S, Sharma S. Towards effective immunotherapy for lung cancer: simultaneous targeting of tumor-initiating cells and immune pathways in the tumor microenvironment: *Immunotherapy*. 2009 Sep;1(5):721-5)。インビボでCTA特異的CTL応答を生じさせて、この疾患で観察された免疫寛容を克服するかどうかを決定するために、NS

C L C のための C T A 依存性免疫療法を開発できる ( O'Callaghan DS, O'Donnell D, O'Connell F, O'Byrne KJ. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5:2024-36、Sautes-Fridman C, Dieu-Nosjean MC, Damotte D, Fisson S, Fridman WH. The immune microenvironments of lung and intraocular tumors. *Bull Cancer.* 2011;98:58-61、Becker S, Markova B, Wiewrodt R, Hoffarth S, Hahnel PS, Pleiner S, et al. Functional and clinical characterization of the putative tumor suppressor WWOX in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1976-83、Xiang R, Mizutani N, Luo Y, Chiodoni C, Zhou H, Mizutani M, et al. A DNA vaccine targeting surviving combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res.* 2005;65:553-61. 21 )。すなわちこれらの結果から、C T A である S P 1 7、A K A P - 4、及び P T T G 1 は、N S C L C で選択的に発現されること、及びそれらの発現は、特異的な C T L 媒介抗腫瘍応答を生じさせるのに活用できることが実証される。本発明者らがこれまでに、多発性骨髄腫、卵巣及び前立腺がんにおける ( Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate.* 2012;72:12-23、Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One.* 2010;5、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, et al. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. *J Transl Med.* 2008;6:15、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Bumm K, Barlogie B, Lim SH. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood.* 2002;100:961-5、Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2002;56:429-33、Chiriva-Internati M, Ferrari R, Yu Y, Hamrick C, Gagliano N, Grizzi F, et al. AKAP-4: a novel cancer testis antigen for multiple myeloma: *Br J Haematol.* 2008 Feb;140(4):465-8 )、さらに現在では N S C L C における S P 1 7、A K A P 4、及び P T T G 1 の発現及び免疫原性を確認したという事実は、C T A によって推進されるワクチン接種戦略で C T A を発現する腫瘍を標的化できることを示す。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 6 0 】

本明細書で論じられたいかなる実施形態も、本発明のいかなる方法、キット、試薬、又は組成物に対して実施できることが考慮され、その逆も同様である。さらに、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するのに使用できる。

#### 【 0 0 6 1 】

本明細書に記載した特定の実施形態は、本発明の限定としてではなく例証として示されていることが理解される。本発明の主要な特徴は、本発明の範囲から逸脱することなく様々な実施形態で採用され得る。当業者であれば、最低限の慣例的な実験を使用して、本明細書に記載した特定の手法に相当する多数の均等物を認識するか、又はそれらを確認することが可能である。このような均等物は本発明の範囲内であるとみなされ、特許請求の範囲に包含される。

#### 【 0 0 6 2 】

明細書に記載された全ての出版物及び特許出願は、本発明が関与する分野の当業者の能力のレベルを示す。全ての出版物及び特許出願は、それぞれ個々の出版物又は特許出願が具体的且つ個々に提示されて参照により組み込まれたのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 0 6 3 】

「1つの(a)」又は「1つの(an)」という言葉の使用は、特許請求の範囲及び/又は明細書中で「～を含む」という用語と共に使用される場合、「1つの」を意味する場合があるが、「1つ又は2つ以上の」、「少なくとも1つの」、及び「1つの、又は1つより多くの」という意味とも一致する。特許請求の範囲における「又は」という用語の使用は、選択肢のみを指すか、又は選択肢が相互排他的であると明確に指定されない限り、「及び/又は」を意味するのに使用されるが、本開示は、選択肢のみと「及び/又は」を指すという定義を支持する。本出願全体にわたり、用語「約」は、値が、その値を決定するのに採用される装置や方法にとって固有の誤差の変動、又は研究対象間に存在する変動を包含することを示すのに使用される。

【0064】

本明細書及び特許請求の範囲で使用されるように、「～を含む(comprising)」(及びcomprisingの任意の形態、例えば「comprise」及び「comprises」)、「～を有する(having)」(及びhavingの任意の形態、例えば「have」及び「has」)、「～を包含する(including)」(及びincludingの任意の形態、例えば「includes」及び「include」)又は「～を含有する(containing)」(及びcontainingの任意の形態、例えば「contains」及び「contain」という言葉は、包括的であるか又はオープンエンドであり、追加の列挙されていない要素又は方法ステップを排除しない。

【0065】

用語「又はそれらの組合せ」は、本明細書で使用される場合、その用語の前に列挙された項目の全ての順列及び組合せを指す。例えば、「A、B、C、又はそれらの組合せ」は、A、B、C、A B、A C、B C、又はA B Cの少なくとも1つを包含することが意図され、特定の状況において順番が重要である場合、さらにB A、C A、C B、C B A、B C A、A C B、B A C、又はC A Bも包含することが意図される。この例で続けると、1又は2以上の項目又は用語の反復を含有する組合せ、例えばB B、A A A、A B、B B C、A A A B C C C C、C B B A A A、C A B A B Bなども明示的に包含される。当業者であれば、文脈からそうではないことが明らかでない限り、典型的には、いかなる組合せにおける項目又は用語の数には制限がないことを理解する。

【0066】

本明細書で開示され特許請求された組成物及び/又は方法は全て、余計な実験を行うことなく、本発明の開示を考慮して作製及び実施が可能である。本発明の組成物及び方法を好ましい実施形態に関して記載してきたが、本発明の概念、本質及び範囲から逸脱することなく、本明細書で記載された組成物及び/又は方法に対して変更を施してもよいし、本明細書で記載された方法のステップにおいて、又は本明細書で記載された方法のステップの順序において変更を施してもよいことは、当業者には明らかである。当業者には明らかなこのような全ての類似の置き換え及び改変は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような本発明の本質、範囲及び概念の範囲内とみなされる。

【0067】

(参考文献)

- 1 . Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62:10-29
- 2 . Chrischilles EA, Pendergast JF, Kahn KL, Wallace RB, Moga DC, Harrington DP, et al. Adverse events among the elderly receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2010;28:620-7
- 3 . Gadgeel SM. The optimal chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer patients. Curr Oncol Rep. 2011;13:272-9
- 4 . Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2012;62:10-29
- 5 . Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 2011;480:480-9
- 6 . Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, D'Cunha N, Hardwicke F, Cannon MJ, et

10

20

30

40

50

- t al. Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*. 2012;72:12-23
- 7 . Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 2009;100:2014-21
- 8 . Chiriva-Internati M. Sperm protein 17: clinical relevance of a cancer/testis antigen, from contraception to cancer immunotherapy, and beyond. *Int Rev Immunol*. 2011;30:138-49
- 9 . Mathieu MG, Miles AK, Li G, McArdle SE, Rees RC. Cancer/testis antigens for therapeutic use. *J Buon*. 2009;14:S97-102
- 10 . Mirandola L, M JC, Cobos E, Bernardini G, Jenkins MR, Kast WM, et al. Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. *Int Rev Immunol*. 2011;30:127-37
- 11 . Bhan S, Negi SS, Shao C, Glazer CA, Chuang A, Gaykalova DA, et al. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4267-76
- 12 . Chinnasamy N, Wargo JA, Yu Z, Rao M, Frankel TL, Riley JP, et al. A TCR targeting the HLA-A\* 0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer. *J Immunol*. 2011;186:685-96
- 13 . Kim SH, Lee S, Lee CH, Lee MK, Kim YD, Shin DH, et al. Expression of cancer-testis antigens MAGE-A3/6 and NY-ESO-1 in non-small-cell lung carcinomas and their relationship with immune cell infiltration. *Lung*. 2009;187:401-11
- 14 . Rao M, Chinnasamy N, Hong JA, Zhang Y, Zhang M, Xi S, et al. Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells: implications for adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res*. 2011;71:4192-204
- 15 . Chiriva-Internati M, Mirandola L, Yu Y, Jenkins MR, Gornati R, Bernardini G, et al. Cancer testis antigen, ropporin, is a potential target for multiple myeloma immunotherapy. *J Immunother*. 2011;34:490-9
- 16 . Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One*. 2010;5
- 17 . Chiriva-Internati M, Ferrari R, Prabhakar M, Yu Y, Baggoni L, Moreno J, et al. The pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG-1): an immunological target for multiple myeloma. *J Transl Med*. 2008;6:15
- 18 . Paillard C, Halle P, Tchirkov A, Confland C, Veyrat-Masson R, Quainon F, et al. NK cytotoxicity and alloreactivity against neuroblastoma cell lines in vitro: Comparison of Europium fluorometry assay and quantification by RT-PCR. *J Immunol Methods*. 2012;380:56-64
- 19 . Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Bumm K, Barlogie B, Lim SH. Sperm protein 17 (Sp17) is a suitable target for immunotherapy of multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:961-5
- 20 . Santin AD, Bellone S, Palmieri M, Zanolini A, Ravaggi A, Siegel ER, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial. *J Virol*. 2008;82:1968-79
- 21 . Kim J, Raz D, Jablons D. Unmet need in lung cancer: can vaccines bridge the gap? *Clin Lung Cancer*. 2008;9:S6-12
- 22 . Miller PW, Sharma S, Stolina M, Butterfield LH, Luo J, Lin Y, et al. Intra

- tumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augments specific antitumor immunity and achieves tumor eradication. *Hum Gene Ther.* 2000;11:53-65
- 23 . Yasumoto K, Hanagiri T, Takenoyama M. Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;57:449-457
- 24 . Raez LE, Fein S, Podack ER. Lung cancer immunotherapy. *Clin Med Res.* 2005;3:221-8
- 25 . Wang J, Zou ZH, Xia HL, He JX, Zhong NS, Tao AL. Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. *PLoS One.* 2012;7:5 10
- 26 . Grizzi F, Chiriva-Internati M, Franceschini B, Bumm K, Colombo P, Ciccarelli M, et al. Sperm protein 17 is expressed in human somatic ciliated epithelia. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:549-54
- 27 . Song JX, Cao WL, Li FQ, Shi LN, Jia X. Anti-Sp17 monoclonal antibody with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity activities against human ovarian cancer cells. *Med Oncol.* 2011;24:24
- 28 . Dadabayev AR, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Robinson WR, Lim SH. Cancer immunotherapy targeting Sp17: when should the laboratory findings be translated to the clinics? *Am J Hematol.* 2005;80:6-11 20
- 29 . Shan Q, Lou X, Xiao T, Zhang J, Sun H, Gao Y, et al. A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer. *Cancer letters.* 2012
- 30 . Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, et al. Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J Virol.* 1999;73:5402-10
- 31 . Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, Wroblewski D, Lim SH. Successful generation of sperm protein 17 (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumour-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2002;56:429-33 30
- 32 . Chiriva-Internati M, Ferrari R, Yu Y, Hamrick C, Gagliano N, Grizzi F, et al. AKAP-4: a novel cancer testis antigen for multiple myeloma: *Br J Haematol.* 2008 Feb;140(4):465-8
- 33 . Chiriva-Internati M, Liu Y, Weidanz JA, Grizzi F, You H, Zhou W, et al. Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood.* 2003;102:3100-7
- 34 . Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, et al. Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 1998;77:7-12 40
- 35 . Orteguel JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP. Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytolytic activity against human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002;36:17-25
- 36 . Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T, Sirera R, Al-Saad S, Andersen S, et al. The role of tumor infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:824-33 50

37 . Chen J, Hou J, Zhang J, An Y, Zhang X, Yue L, et al. Atorvastatin synergizes with IFN-gamma in treating human non-small cell lung carcinomas via potent inhibition of RhoA activity. *Eur J Pharmacol.* 2012;682:161-70

38 . Schneider T, Hoffmann H, Dienemann H, Schnabel PA, Enk AH, Ring S, et al. Non-small cell lung cancer induces an immunosuppressive phenotype of dendritic cells in tumor microenvironment by upregulating B7-H3. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1162-8

39 . Holt GE, Podack ER, Raez LE. Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Therapy.* 2011;8:43-54

40 . Dubinett S, Sharma S. Towards effective immunotherapy for lung cancer: simultaneous targeting of tumor-initiating cells and immune pathways in the tumor microenvironment: *Immunotherapy.* 2009 Sep;1(5):721-5

41 . O'Callaghan DS, O'Donnell D, O'Connell F, O'Byrne KJ. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5:2024-36

42 . Sautes-Fridman C, Dieu-Nosjean MC, Damotte D, Fisson S, Fridman WH. The immune microenvironments of lung and intraocular tumors. *Bull Cancer.* 2011;98:58-61

43 . Becker S, Markova B, Wiewrodt R, Hoffarth S, Hahnel PS, Pleiner S, et al. Functional and clinical characterization of the putative tumor suppressor WWOX in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:1976-83

44 . Xiang R, Mizutani N, Luo Y, Chiodoni C, Zhou H, Mizutani M, et al. A DNA vaccine targeting surviving combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res.* 2005;65:553-61. 21

10

20

【 図 1 A - 1 C 】

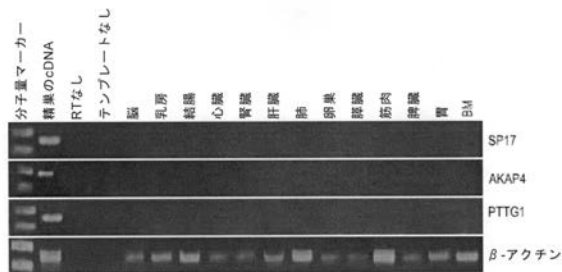


FIG. 1A

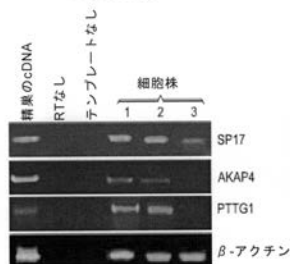


FIG. 1B

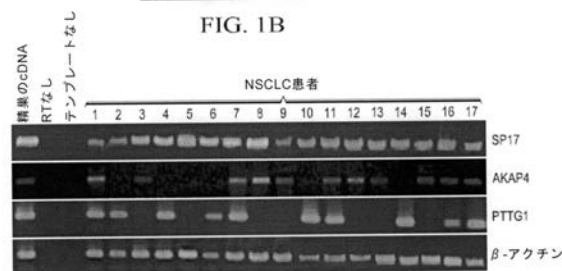


FIG. 1C

【 図 2 】

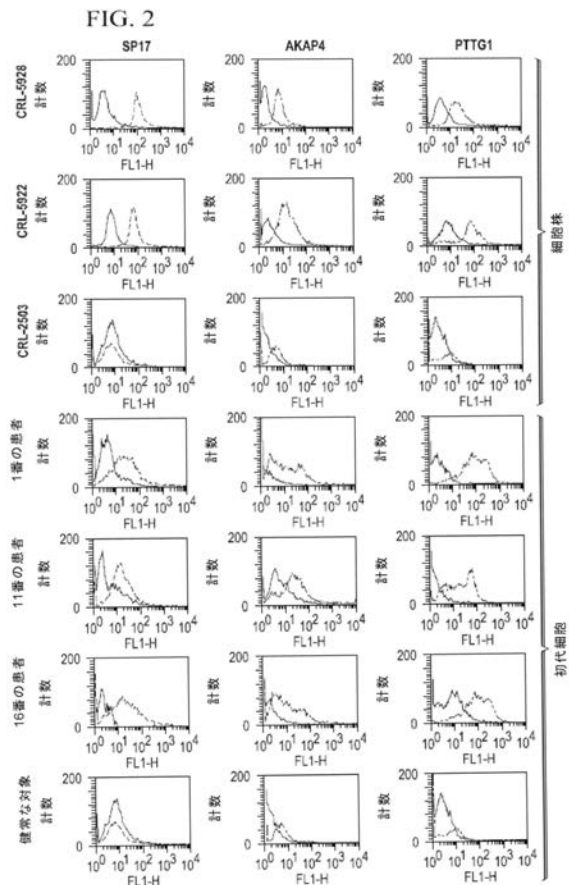


FIG. 2

【 図 3 】

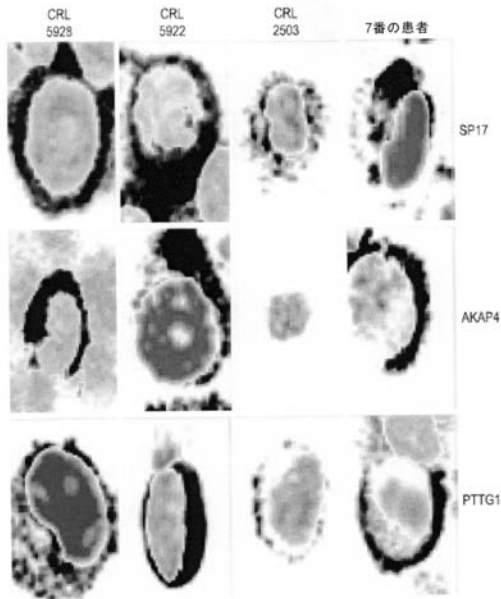


FIG. 3

【 図 4 A - 4 C 】

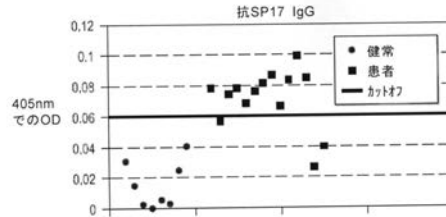


FIG. 4A

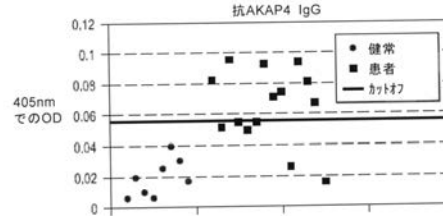


FIG. 4B

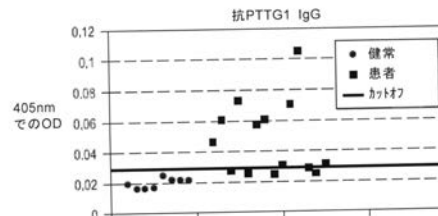


FIG. 4C

【 図 5 A - 5 F 】

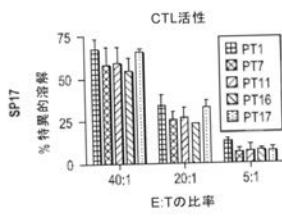


FIG. 5A

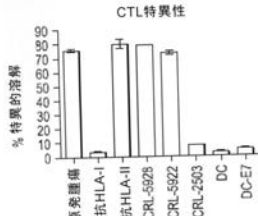


FIG. 5B

【 図 6 A - 6 F 】

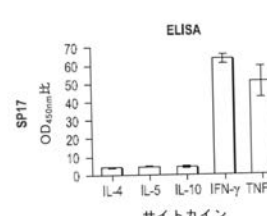


FIG. 6A

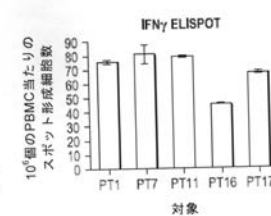


FIG. 6B

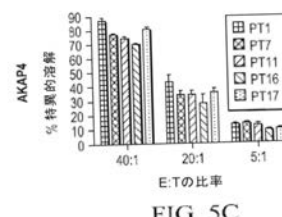


FIG. 5C

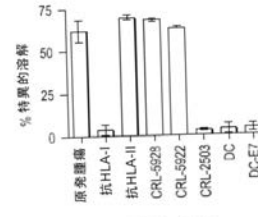


FIG. 5D

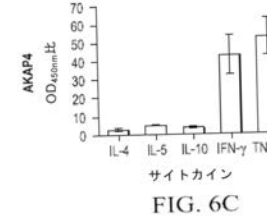


FIG. 6C

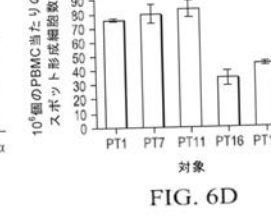


FIG. 6D

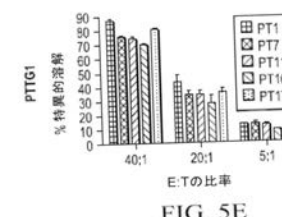


FIG. 5E

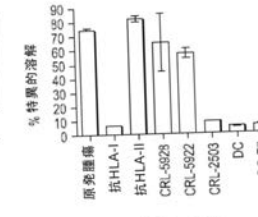


FIG. 5F

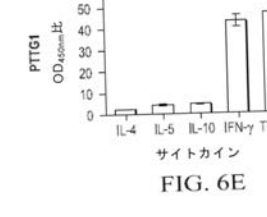


FIG. 6E

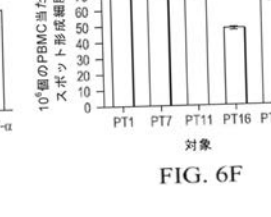


FIG. 6F

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年10月26日(2015.10.26)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1の少なくとも1種の腫瘍関連抗原を提示するようにロードされている、単離された抗原提示細胞であって、それぞれ1種又は2種以上の肺がん細胞によって発現された前記S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1の少なくとも1種に対する細胞傷害性Tリンパ球特異的な免疫応答を生じさせる前記抗原提示細胞を含む、肺がんの処置のための組成物。

【請求項2】

抗原提示細胞が、樹状細胞である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

抗原提示細胞が、自己樹状細胞である、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

抗原提示細胞にロードされたN Y E S O - 1、X A G E - 1、A D A M 2 9及びM A G E C 1抗原の少なくとも1種をさらに含む、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

組換えS P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1腫瘍関連抗原をコードするヌクレオチド配列を含み、かつ前記組換えS P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1が、抗原提示細胞で発現される、請求項1～4のいずれかに記載の組成物。

【請求項6】

肺がんを有する疑いがある、又は少なくとも肺がんを発症するリスクを有するヒト対象を同定するためのデータを収集する方法であって、

抗S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1の少なくとも1種に特異的な、前記対象から得られた試料中の特異的免疫グロブリンの存在又は非存在を決定するステップであって、前記試料中の抗S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1特異的免疫グロブリンの少なくとも1種の存在が、前記対象が肺がん罹患しているか又は少なくとも肺がんを発症するリスクがあることを示す、ステップを含む、前記方法。

【請求項7】

がん罹患している個体の腫瘍マーカープロファイルの決定のためのデータを収集する方法であって、

前記個体から得られた体液の試料を、S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1腫瘍関連抗原の少なくとも1種と接触させるステップと、

前記体液の試料中に存在する1種又は2種以上の自己抗体に結合した前記S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1腫瘍関連抗原の少なくとも1種の複合体の存在又は非存在を決定するステップであって、前記1種又は2種以上の自己抗体が、前記S P 1 7、A K A P - 4、又はP T T G 1腫瘍関連抗原の少なくとも1種に免疫学的に特異的であり、前記複合体の存在が、前記個体の前記腫瘍マーカープロファイルを提供し、前記腫瘍マーカープロファイルが、疾患の経過の指標として決定される、ステップと、

を含む、前記方法。

【請求項8】

複合体の存在が、がんの検出を示す、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

がんが、肺がんである、請求項7又は8に記載の方法。

## 【請求項 10】

1種又は2種以上の肺がん細胞に特異的なSP17、AKAP-4、又はPTTG1特異的細胞傷害性Tリンパ球を生成することが可能な、SP17、AKAP-4、又はPTTG1腫瘍関連抗原の少なくとも1種を含む、がんの処置のための免疫療法用組成物。

## 【請求項 11】

少なくとも1種の抗原提示細胞をさらに含む、請求項10に記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 12】

抗原提示細胞が、樹状細胞である、請求項11に記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 13】

少なくとも1種の抗原提示細胞が、SP17、AKAP-4、又はPTTG1腫瘍関連抗原をコードするペプチド又は発現構築物でパルスされているか、又はそれらをロードしている、請求項10～12のいずれかに記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 14】

SP17、AKAP-4、又はPTTG1腫瘍関連抗原の少なくとも1種が、非小細胞肺がんから単離される、請求項10～13のいずれかに記載の免疫療法用組成物。

## 【請求項 15】

対象において肺がんを検出するためのデータを収集する方法であって、前記対象から得られた試料中のSP17、AKAP-4、又はPTTG1の存在又は非存在を決定するステップであって、前記試料中の前記SP17、AKAP-4、又はPTTG1の存在が、前記対象が肺がん罹患しているか又は少なくとも肺がんを発症するリスクがあることを示す、ステップを含む、前記方法。

## 【請求項 16】

試料が、血液試料である、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

免疫刺激抗原を発現した核酸ベクターを含む組成物であって、前記抗原が、SP17、AKAP-4、又はPTTG1肺がん関連抗原の少なくとも1種をコードするヌクレオチド配列を含む、前記組成物。

## 【請求項 18】

抗原が、ペプチド抗原である、請求項17に記載の組成物。

## 【請求項 19】

非ヒト哺乳動物におけるがんの処置のための方法であって、それを必要とする非ヒト哺乳動物に、希釈剤、媒体、賦形剤、又は不活性成分の少なくとも1種に加えて、相乗的な治療有効量の肺がん抗原を投与するステップと、前記肺がん抗原から、特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を生成するステップと、  
前記特異的な細胞傷害性Tリンパ球で1種又は2種以上の腫瘍細胞を標的化するステップとを含む、前記方法。

## 【請求項 20】

肺がん抗原が、SP17、AKAP-4、又はPTTG1である、請求項19に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016514094000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2014/016032****Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

## a. a sequence listing filed or furnished

- on paper  
 in electronic form

## b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. <b>PCT/US2014/016032</b>
---

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

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

1.  Claims Nos.: 6-9, 15-16, 19-20  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 6-9, 15-16, 19-20 are directed to a treatment method of the human body by therapy or surgery, as well as diagnostic methods practiced on the human body, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search (PCT Article 17(2)(a)(i), PCT Rule 39.1(iv)).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2014/016032**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 39/395(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 39/395; C40B 30/00; C12N 5/06; A61K 35/12; A61K 39/00; A61P 35/00; C07K 14/705; C12N 15/00; C40B 30/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: lung cancer, tumor-associated antigen, antigen presenting cell (APC), immunotherapy, cytotoxic T lymphocyte, SPI7, AKAP-4, PTTG1, cancer testis antigen		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012-0263757 A1 (CHIRIVA-INTERNATI, M.) 18 October 2012 See abstract, paragraph [0010], claims 1-3, 5, 10-13, 16-18.	1-5, 10-14, 17-18
Y	CHIRIVA, M. et al., "Identification of new cancer/testis antigens in non-small cell lung cancer", The Journal of Immunology, 2011, Vol. 186, Meeting Abstract No. 165.16 See abstract.	1-5, 10-14, 17-18
Y	NAKAGAWA, K. et al., "XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients", Clinical Cancer Research, 2005, Vol. 11, Pages 5496-5503 See abstract.	4
A	US 2009-0017000 A1 (CAI, Z. et al.) 15 January 2009 See abstract, claims 1, 5-7, paragraphs [0010], [0018], [0023].	1-5, 10-14, 17-18
A	WO 2011-127418 A1 (AMGEN INC.) 13 October 2011 See abstract, page 42, lines 3-30.	1-5, 10-14, 17-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2014 (28.05.2014)		Date of mailing of the international search report <b>28 May 2014 (28.05.2014)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer CHOI, Sung Hee Telephone No. +82-42-481-8740

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
**PCT/US2014/016032**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FIGUEIREDO, D. L. A. et al., "High expression of cancer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO-1, and GAGE in advanced squamous cell carcinoma of the larynx", HEAD & NECK, 2011, Vol. 33, Pages 702-707 See abstract, page 706, right-column.	1-5,10-14,17-18
A	ERRINGTON, J. A. et al., "Expression of cancer-testis antigens (MAGE-A1, MAGE-A3/6, MAGE-A4, MAGE-C1 and NY-ESO-1) in primary human uveal and conjunctival melanoma", British Journal of Ophthalmology, 2012, Vol. 96, Pages 451-458 See abstract.	1-5,10-14,17-18
A	US 2011-0287967 A1 (WEINHAUSEL, A. et al.) 24 November 2011 See abstract, claims 16, 19.	1-5,10-14,17-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2014/016032**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0263757 A1	18/10/2012	None	
US 2009-0017000 A1	15/01/2009	AU 2007-307206 A1 CA 2665568 A1 CN 101548008 A CN 101548008 B EP 2079830 A2 IL 197845 A IL 223376 D JP 2010-505845 A KR 10-2009-0060450 A MX 2009003764 A NZ 575571 A US 2012-115223 A1 US 8124408 B2 US 8357533 B2 WO 2008-045286 A2 WO 2008-045286 A3	17/04/2008 17/04/2008 30/09/2009 17/04/2013 22/07/2009 30/04/2013 03/02/2013 25/02/2010 12/06/2009 22/04/2009 25/11/2011 10/05/2012 28/02/2012 22/01/2013 17/04/2008 18/12/2008
WO 2011-127418 A1	13/10/2011	AU 2011-237365 A1 CA 2795789 A1 EP 2556086 A1 JP 2013-528360 A MX 2012011688 A US 2013-0101590 A1	18/10/2012 13/10/2011 13/02/2013 11/07/2013 23/11/2012 25/04/2013
US 2011-0287967 A1	24/11/2011	CA 2750978 A1 CA 2750979 A1 EP 2233590 A1 EP 2391728 A1 EP 2391729 A1 US 2011-0287968 A1 WO 2010-086388 A1 WO 2010-086389 A1	05/08/2010 05/08/2010 29/09/2010 07/12/2011 07/12/2011 24/11/2011 05/08/2010 05/08/2010

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/574	A
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(74) 代理人 100096482  
弁理士 東海 裕作

(74) 代理人 100188352  
弁理士 松田 一弘

(74) 代理人 100131093  
弁理士 堀内 真

(74) 代理人 100150902  
弁理士 山内 正子

(74) 代理人 100141391  
弁理士 園元 修一

(74) 代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕

(74) 代理人 100172797  
弁理士 有馬 昌広

(72) 発明者 チリーバ - インタナティ マウリツィオ  
アメリカ国 テキサス 7 9 4 3 0 ラボック セカンドストリート 5 7 2 2

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA20 DA03 EA04 GA11 HA11  
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QS33 QX02  
4C085 AA02 BB01 CC32 EE01  
4C087 AA01 AA02 CA04 CA12 DA02 NA05 ZA59 ZB26

专利名称(译)	用于诊断肺癌和免疫疗法的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016514094A</a>	公开(公告)日	2016-05-19
申请号	JP2015558102	申请日	2014-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	德州理工盐湖城大学系统		
申请(专利权)人(译)	德州理工盐湖城大学系统		
[标]发明人	チリーバインタナティマウリツィオ		
发明人	チリーバ-インタナティ マウリツィオ		
IPC分类号	A61K35/15 A61P35/00 A61P11/00 A61K39/00 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/02 C12N15/09		
CPC分类号	A61K35/15 A61K39/0011 A61K2039/5154 A61P11/00 A61P35/00 C07K16/3023 C12N9/12 G01N33/57423 G01N33/57488 A61K2039/572 C07K14/47 C07K14/705 G01N2333/47 G01N2333/705 G01N2333/912		
FI分类号	A61K35/15.ZNA A61P35/00 A61P11/00 A61K39/00.H G01N33/53.N G01N33/574.A C12Q1/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX02 4C085/AA02 4C085/BB01 4C085/CC32 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/DA02 4C087/NA05 4C087/ZA59 4C087/ZB26		
代理人(译)	堀内申 马萨科·亚莫 Enmoto修一 华宇正弘		
优先权	61/763629 2013-02-12 US 14/178407 2014-02-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了重组肿瘤相关抗原，其对由一个或多个肺癌细胞表达的SP17，AKAP-4或PTTG1中的至少一种产生细胞毒性T淋巴细胞特异性免疫应答。本发明包括使用已掺入其中的抗原呈递细胞诊断和治疗肺癌的组合物和方法。

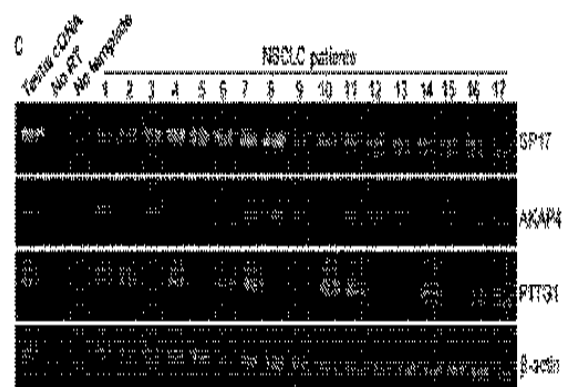


FIGURE 1C