

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6634287号  
(P6634287)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月20日(2019.12.20)

(51) Int.Cl.

F I

<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N	33/53	Z N A N
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	39/00	H
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00	
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	35/02	
<b>C O 7 K</b>	<b>14/82</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	14/82	

請求項の数 14 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-517076 (P2015-517076)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月12日 (2014.5.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/062630  
 (87) 国際公開番号 W02014/185387  
 (87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014.11.20)  
 審査請求日 平成28年11月7日 (2016.11.7)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-101566 (P2013-101566)  
 (32) 優先日 平成25年5月13日 (2013.5.13)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 505443953  
 株式会社癌免疫研究所  
 大阪府吹田市江の木町13番9号  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (72) 発明者 杉山 治夫  
 大阪府箕面市船場西2-19-30  
 (72) 発明者 尾路 祐介  
 大阪府豊中市玉井町1-5-24

審査官 大瀧 真理

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫療法の臨床効果の予測法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(1)~(4)の工程を含む、WT1ペプチド免疫療法における臨床効果を判定するための方法：

(1) WT1ペプチドワクチン投与被験者由来の試料を、前記被験者に投与したWT1ペプチドワクチンと同一配列を含み、かつアミノ酸数が5~30である、あるいは該WT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列由来の5以上の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含み、かつアミノ酸数が5~30である、WT1抗原ペプチドまたはその変異体に接触する工程、

(2) 前記試料と前記WT1抗原ペプチドまたはその変異体とを結合させる工程、

(3) 前記試料中の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価を測定する工程、

(4) 工程(3)の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が上昇していることが、臨床効果が良好であると判定するための指標とする工程。

【請求項2】

測定される抗WT1抗原ペプチドIgG抗体のサブクラスがIgG1、IgG3およびIgG4であり、IgG1およびIgG3がそれぞれIgG4の2倍以上であることが、臨床効果が良好であると判定するための指標とすることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

IgG1がIgG3の2倍未満であり、かつIgG3がIgG1の2倍未満であること

10

20

が、臨床効果が良好であると判定するための指標とすることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

WT1 ペプチドワクチン投与から 8 - 14 週後の抗 WT1 抗原ペプチド IgG 抗体価が測定される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

WT1 ペプチドワクチン投与から 12 - 14 週後の抗 WT1 抗原ペプチド IgG 抗体価が測定される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

被験者に投与される WT1 ペプチドワクチンが配列番号 2 ~ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 7】

WT1 抗原ペプチドが配列番号 7 ~ 56、58 ~ 60、62、63、および 65 ~ 71 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

WT1 抗原ペプチドが配列番号 20、21、27、31、32、42、43、58 ~ 60、62、63、および 65 ~ 71 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

試料が、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプルまたは尿サンプルである、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 10】

試料が血清サンプルである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

被験者が WT1 関連疾患患者である、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

WT1 関連疾患が、白血病、造血器腫瘍、または固形癌である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

WT1 関連疾患が、再発悪性神経膠腫、胸腺癌または膵臓癌である、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

WT1 抗原ペプチドまたはその変異体を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法を実施するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2013年5月13日に出願された日本特許出願2013-101566号の優先権を主張するものであり、その明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として、取り入れるものである。

40

【0002】

本発明は、WT1 ペプチド免疫療法における臨床効果の予測法などに関する。

【背景技術】

【0003】

WT1 遺伝子 (Wilms' tumor 1 gene) は、小児の腎癌であるウィルムス腫瘍の責任遺伝子として同定された遺伝子であり (非特許文献 1 および 2)、ジンクフィンガー構造を有する転写因子である。当初、WT1 遺伝子は癌抑制遺伝子であるとされたが、その後の研究 (非特許文献 3 ~ 6) により、造血器腫瘍や固形癌においてはむしろ癌遺伝子として働くことが示された。

【0004】

50

近年、WT1 遺伝子産物あるいはその断片を用いたWT1 ペプチド免疫療法が行われている。免疫療法開始後の長期にわたる治療戦略を立案するために、臨床効果の程度を予測することは、臨床的に重要な意義を有している。そのため、精度の高い臨床効果の予測法の確立が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許第3728439号明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Daniel A. Haber et al., Cell. 1990 Jun 29; 61(7): 1257-69.

【非特許文献2】Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9; 60(3): 509-20.

【非特許文献3】Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998; 181: 151-212. Review.

【非特許文献4】Yamagami T et al., Blood. 1996 Apr 1; 87(7): 2878-84.

【非特許文献5】Inoue K et al., Blood. 1998 Apr 15; 91(8): 2969-76.

【非特許文献6】Tsuboi A et al., Leuk Res. 1999 May; 23(5): 499-505.

【非特許文献7】Fujiki F et al., J Immunother. 2007 Apr; 30(3): 282-93.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の解決課題は、WT1 ペプチドワクチンを投与される被験者の長期的な臨床効果を、より高精度に予測する方法を提供することである。また、臨床効果をより高精度に予測するためのキットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、被験者に投与されたWT1 ペプチドワクチンに対応するWT1 抗原ペプチドを用いて、WT1 ペプチドに対するIgG抗体を測定する系を確立し、本発明を完成させた。特に、WT1 抗原ペプチドに対するIgG1、IgG3およびIgG4抗体価を測定し、その値を指標とする系を確立した。

【0009】

すなわち、本発明は、以下のものを提供するものである：

(1) 以下の工程：

a) 被験者由来の試料を、WT1 抗原ペプチドまたはその変異体と接触させる工程；および

b) 前記試料と前記WT1 抗原ペプチドまたはその変異体との結合を検出し、それにより前記試料中に存在する抗WT1 抗原ペプチドIgG抗体価を測定する工程を含む、WT1 ペプチド免疫療法における被験者に対する臨床効果を予測するための方法であって、

被験者における抗WT1 抗原ペプチドIgG抗体価が上昇していることが、臨床効果が良好であると判定することを特徴とする、方法；

(2) 測定される抗WT1 抗原ペプチドIgG抗体のサブクラスがIgG1、IgG3およびIgG4であり、IgG1およびIgG3がそれぞれIgG4の2倍以上であることが、臨床効果が良好であると判定することを特徴とする、(1)に記載の方法；

10

20

30

40

50

(3) IgG1がIgG3の2倍未満であり、かつIgG3がIgG1の2倍未満であることが、臨床効果が良好であると判定することを特徴とする、(2)に記載の方法；

(4) WT1ペプチドワクチン投与から8 - 14週後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が測定される、(1)～(3)のいずれかに記載の方法；

(5) WT1ペプチドワクチン投与から12 - 14週後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が測定される、(4)に記載の方法；

(6) 被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンが配列番号2～6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる、(1)～(5)のいずれかに記載の方法；

(7) WT1抗原ペプチドが配列番号7～71のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、(1)～(6)のいずれかに記載の方法；

(8) WT1抗原ペプチドが配列番号20、21、27、31、32、42、43または57～71のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む、(7)に記載の方法；

(9) 試料が、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプルまたは尿サンプルである、(1)～(8)のいずれかに記載の方法；

(10) 試料が血清サンプルである、(9)に記載の方法；

(11) 被験者がWT1関連疾患患者である、(1)～(10)のいずれかに記載の方法；

(12) WT1関連疾患が、慢性骨髄性白血病などの白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、または食道癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、胆道癌、頭頸部癌、皮膚癌、肉腫、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、甲状腺癌、カルチノイド、肺芽腫、肝芽腫、脳腫瘍あるいは胸腺癌などの固形癌である、(11)に記載の方法；

(13) WT1関連疾患が、再発悪性神経膠腫、胸腺癌または膵臓癌である、(12)に記載の方法；および

(14) WT1抗原ペプチドまたはその変異体を含む、(1)～(13)のいずれかに記載の方法を実施するためのキット。

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明によれば、WT1ペプチドワクチンを投与された被験者の長期臨床効果を、従来法に比べて、より高精度に予測する方法を提供することが可能になる。また、臨床効果をより高精度に予測するためのキットを提供することができる。これにより、WT1ペプチドワクチンの継続投与の是非などを、より適切に判断することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0011】

【図1】図1は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の推移を表すグラフである。

【図2】図2は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与8 - 9週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、全生存率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群（抗体価上昇群）、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群（抗体価非上昇群）を示す。

【図3】図3は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12 - 14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、全生存率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群（抗体価上昇群）、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群（抗体価非上昇群）を示す。

【図4】図4は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与8 - 9週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、無増悪生存率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群（抗体価上昇群）、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群（抗体価非

10

20

30

40

50

上昇群)を示す。

【図5】図5は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、無増悪生存率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群(抗体価上昇群)、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群(抗体価非上昇群)を示す。

【図6】図6は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与8-9週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、WT1ペプチドワクチン投与継続率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群(抗体価上昇群)、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇し

10

なかった群(抗体価非上昇群)を示す。

【図7】図7は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、WT1ペプチドワクチン投与継続率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群(抗体価上昇群)、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇し

なかった群(抗体価非上昇群)を示す。

【図8】図8は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体のタイプと、全生存率の関係を表すグラフである。黒四角はTh1タイプ、白四角は非Th1タイプを示す。

【図9】図9は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体のタイプと、無増悪生存率の関係を表すグラフである。黒四角はTh1タイプ、白四角は非Th1タイプを示す。

20

【図10】図10は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価を測定した場合における、Th1タイプ/非Th1タイプそれぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を表すグラフである。黒四角はTh1タイプ、白四角は非Th1タイプを示す。

【図11】図11は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗体価を測定した場合における、IgG1タイプ/IgG3タイプ/IgG1&IgG3タイプそれぞれの全生存率を表すグラフである。黒四角はIgG1タイプ、黒丸はIgG3タイプ、黒三角はIgG1&IgG3タイプを示す。

30

【図12】図12は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗体価を測定した場合における、IgG1タイプ/IgG3タイプ/IgG1&IgG3タイプそれぞれの無増悪生存率を表すグラフである。黒四角はIgG1タイプ、黒丸はIgG3タイプ、黒三角はIgG1&IgG3タイプを示す。

【図13】図13は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12-14週後の抗体価を測定した場合における、IgG1タイプ/IgG3タイプ/IgG1&IgG3タイプそれぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を表すグラフである。黒四角はIgG1タイプ、黒丸はIgG3タイプ、黒三角はIgG1&IgG3タイプを示す。

【図14】図14は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチンおよびWT1<sub>332</sub>(ヘルパー)ペプチドワクチン併用投与4-8週後の抗体価を測定した場合における、抗WT1-235ペプチドIgG抗体価上昇群/非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を表すグラフである。黒四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した群(抗体価上昇群)、白四角は抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群(抗体価非上昇群)を示す。

40

【図15】図15は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチンおよびWT1<sub>332</sub>(ヘルパー)ペプチドワクチン併用投与4-8週後の抗体価を測定した場合における、抗WT1-325ペプチドIgG抗体価上昇群/非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を表すグラフである。黒四角は抗WT1-325ペプチドIgG抗体価が上昇した群(抗体価上昇群)、白四角は抗WT1-325ペプチドIgG

50

抗体価が上昇しなかった群（抗体価非上昇群）を示す。

【図16】図16は、再発悪性神経膠腫患者について、WT1<sub>332</sub>（ヘルパー）ペプチドワクチン投与12 - 14週後の抗体価を測定した場合における、抗WT1 - 325ペプチドIgG抗体価上昇群 / 非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を表すグラフである。黒四角は抗WT1 - 325ペプチドIgG抗体価が上昇した群（抗体価上昇群）、白四角は抗WT1 - 325ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群（抗体価非上昇群）を示す。

【図17】図17は、胸腺癌患者について、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン投与12 - 14週後の抗WT1 - 235ペプチドIgG抗体価の上昇と、WT1ペプチドワクチン投与継続率の関係を表すグラフである。黒四角は抗WT1 - 235ペプチドIgG抗体価が上昇した群（抗体価上昇群）、白四角は抗WT1 - 235ペプチドIgG抗体価が上昇しなかった群（抗体価非上昇群）を示す。

【図18】図18は、WT1<sub>332</sub>（ヘルパー）ペプチドワクチンの投与を受けた悪性神経膠腫患者における、変異型WT1抗原ペプチドを用いた抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体価の測定結果を表すグラフである。白四角はWT1 - frg3、黒丸はWT325 - 342、白三角はWT332 - 347、黒四角はWT334 - 342、白丸はWT332 - 338を、それぞれ抗原として用いたELISAの結果を示す。

【図19】図19は、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチンの投与を受けた胸腺癌患者における、変異型WT1抗原ペプチドを用いた抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体価の測定結果を表すグラフである。白四角はWT1 - frg2、黒丸はWT235 - 252、白三角はWK235 - 243、黒四角はWT237 - 243を、それぞれ抗原として用いたELISAの結果を示す。

【図20】図20は、WT1<sub>126</sub>ペプチドワクチンと抗癌剤の併用療法を受けた膵臓癌患者における、変異型WT1抗原ペプチドを用いた抗WT1<sub>126</sub>ペプチドIgG抗体価の測定結果を表すグラフである。白四角はWT1 - frg1、黒丸はWT118 - 135、黒三角はWK126 - 134、黒四角はWT126 - 131、白丸はWT129 - 134、白三角はWT126 - 130を、それぞれ抗原として用いたELISAの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

1つの態様において、本発明は、以下の工程：a)被験者由来の試料を、WT1抗原ペプチドまたはその変異体と接触させる工程；およびb)前記試料と前記WT1抗原ペプチドまたはその変異体との結合を検出し、それにより前記試料中に存在する抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価を測定する工程を含む、WT1ペプチド免疫療法における被験者に対する臨床効果を予測するための方法であって、被験者における抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が上昇していることが、臨床効果が良好であると判定することを特徴とする、方法に関する。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、前記a)工程およびb)工程を含む、WT1ペプチド免疫療法における被験者に対する臨床効果を予測するための方法であって、測定される抗WT1抗原ペプチドIgG抗体のサブクラスがIgG1、IgG3およびIgG4であり、IgG1およびIgG3がそれぞれIgG4の2倍以上であることが、臨床効果が良好であると判定することを特徴とする、方法に関する。好ましくは、前記方法は、IgG1がIgG3の2倍未満であり、かつIgG3がIgG1の2倍未満であることが、臨床効果が良好であると判定することを特徴とする。

【0014】

好ましい実施形態において、WT1ペプチドワクチン投与から8 - 14週後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価の測定が行われる。より好ましい実施形態において、WT1ペプチドワクチン投与から12 - 14週後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価の測定が行われる。

10

20

30

40

50

## 【0015】

本発明において、用語「WT1ペプチドワクチン」とは、WT1ペプチド免疫療法においてワクチンとして被験者に投与される、WT1遺伝子産物（配列番号1）由来のペプチドおよびそれらの改変ペプチドをさす。WT1ペプチドワクチンには、例えば、WT1<sub>235-243</sub>ペプチドワクチン（配列番号2）、WT1-CTLペプチド（改変型mp235-243）ワクチン（配列番号3）（特許文献1）、WT1<sub>126</sub>ペプチドワクチン（配列番号4）、WT1<sub>187</sub>ペプチドワクチン（配列番号5）などが挙げられる。あるいは、WT1ペプチドワクチンはWT1<sub>332</sub>ヘルパーペプチドワクチン（配列番号6）（非特許文献7）であってもよい。WT1ペプチドワクチンは、特に制限されることなく、WT1ペプチド免疫療法で用いられるワクチンとして当業者によく知られたもの、または将来使用され得るものを用いることができる。

10

## 【0016】

本発明において、用語「WT1ペプチドワクチンに対応するWT1抗原ペプチド」および「WT1抗原ペプチド」は同義的に用いられる。WT1抗原ペプチドは、被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列由来の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであり、かかるWT1ペプチドワクチンに対する抗体を検出することができるペプチドである。連続するアミノ酸とは、数個、例えば、5、6、7、8、9個またはそれ以上の連続するアミノ酸である。本発明におけるWT1抗原ペプチドは、上記特徴を有する限り、そのアミノ酸配列および長さは特に限定されないが、例えば5～200アミノ酸、5～190アミノ酸、5～185アミノ酸、5～184アミノ酸、5～183アミノ酸、5～182アミノ酸、5～181アミノ酸、5～180アミノ酸、5～170アミノ酸、5～160アミノ酸、5～150アミノ酸、5～140アミノ酸、5～130アミノ酸、5～120アミノ酸、5～110アミノ酸、5～100アミノ酸、5～90アミノ酸、5～80アミノ酸、5～70アミノ酸、5～60アミノ酸、5～50アミノ酸、5～40アミノ酸、5～30アミノ酸、6～27アミノ酸、7～24アミノ酸である。「WT1抗原ペプチド」は、被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチドであってもよい。あるいは、WT1抗原ペプチドは、被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。すなわち、WT1抗原ペプチドは、被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列からなるペプチドそのものであってもよく、あるいはかかるWT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列の全部または一部分を含むペプチドであってもよい。

20

30

## 【0017】

さらに本発明において、WT1抗原ペプチドは、被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンの変異体も包含する。変異体は、例えば、WT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列において、数個、例えば、10個、9個、8個、7個、6個、5個、好ましくは、4個、3個、さらに好ましくは2個、より好ましくは1個のアミノ酸が、置換および/もしくは欠失された、ならびに/または200個、190個、180個、170個、160個、150個、140個、130個、120個、110個、100個、90個、80個、70個、60個、50個、40個、30個、20個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、好ましくは、4個、3個、さらに好ましくは2個、より好ましくは1個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドを含み得る。変異体は、被験者に投与されるWT1ペプチドワクチンのアミノ酸配列に対してローカルアラインメント（Local Alignment）を実施した場合に、50%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より一層好ましくは85%以上、特に好ましくは90%以上（例えば、95、96、97、98または99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドである。アミノ酸配列の相同性は、例えば、FASTA、BLAST、DNASIS（日立ソフトウェアエンジニアリング（株）製）、GENETYX（（株）ジェネティクス製）を用いて測定することができる。あるいは、単純に配列を比較し、計算することもできる。変異体の長さは特に限定されないが

40

50

、例えば5～200アミノ酸、5～190アミノ酸、5～185アミノ酸、5～184アミノ酸、5～183アミノ酸、5～182アミノ酸、5～181アミノ酸、5～180アミノ酸、5～170アミノ酸、5～160アミノ酸、5～150アミノ酸、5～140アミノ酸、5～130アミノ酸、5～120アミノ酸、5～110アミノ酸、5～100アミノ酸、5～90アミノ酸、5～80アミノ酸、5～70アミノ酸、5～60アミノ酸、5～50アミノ酸、5～40アミノ酸、5～30アミノ酸、6～27アミノ酸、7～24アミノ酸である。本明細書において、かかる変異体は「変異型WT1抗原ペプチド」とも称される。

#### 【0018】

また、本発明において、WT1抗原ペプチドとして、本発明のWT1抗原ペプチドの変異体を用いてもよい。かかる変異体は、例えば、本発明のWT1抗原ペプチドのアミノ酸配列において、数個、例えば、10個、9個、8個、7個、6個、5個、好ましくは、4個、3個、さらに好ましくは2個、より好ましくは1個のアミノ酸が、置換、欠失および/または付加されたアミノ酸配列を有するペプチドを含み得る。

#### 【0019】

好ましい実施形態において、WT1抗原ペプチドは配列番号7～71のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドであり、例えば、配列番号7～71のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。より好ましい実施形態において、WT1抗原ペプチドは、配列番号20、21、27、31、32、42、43または57～71のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドであり、例えば、配列番号20、21、27、31、32、42、43または57～71のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。さらに好ましい実施形態において、WT1抗原ペプチドは配列番号20、32、42、または57～71のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドであり、例えば、配列番号20、32、42、または57～71のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドである。本発明において、WT1抗原ペプチドを構成するアミノ酸のいずれかのアミノ酸が適宜修飾されたものであってもよい。アミノ酸残基の修飾は、公知の方法にて実施することができる。

#### 【0020】

本明細書において、「抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が上昇した」とは、(1)WT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が、予め設定された値以上となった場合、あるいは、(2)WT1ワクチン投与前と比較してWT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が、予め設定された値以上増加した場合をいう。本発明におけるこの値は、測定対象(被験者の数、年齢、性別、体重、状態等)や測定方法、測定条件、統計的手法などの諸条件により変動するものであるため、これらに応じて予め設定する必要がある。かかる値は集積したデータに基づいて経験的に決められる。したがって、本発明の属する技術分野に属する当業者であれば、通常の実験を行うことで、所望の特異性と感度、使用する試料の種類、その調製法等、および、本明細書に記載した他の要因に基づいて、特定の値を選択することができるということを、当然に理解できるだろう。例えば、抗WT1ペプチドIgG抗体価が陰性であると考えられる試料を用いて抗WT1ペプチドIgG抗体価を測定し、その結果に基づき計算された、平均値+標準偏差の2倍の値を参照して、このような特定の値を決定することができる。当業者であればまた、上述のWT1抗原ペプチドを用いて行う抗WT1抗原ペプチド抗体の測定が、前記WT1抗原ペプチドが対応するWT1ペプチドワクチンに対する抗体の測定を意味するものであることを、当然に理解することができるだろう。

#### 【0021】

本発明の方法において、試料としては、被験者由来のサンプルであって、一般に抗体が存在することが知られている体液を用いることができる。好ましくは、血液サンプル、血漿サンプル、血清サンプルまたは尿サンプルである。より好ましくは、血清サンプルである。かかる試料は、例えばパッファーなどを用いて、本発明の方法において用いるために適した状態へと調製されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0022】

本発明の1つの態様において、被験者はWT1関連疾患患者である。好ましい実施形態において、被験者は慢性骨髄性白血病などの白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、または食道癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、胆道癌、頭頸部癌、皮膚癌、肉腫、腎臓癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、甲状腺癌、カルチノイド、肺芽腫、肝芽腫、脳腫瘍あるいは胸腺癌などの固形癌の患者である。より好ましい実施形態において、被験者は、再発悪性神経膠腫（GBM）、胸腺癌または膵臓癌の患者である。

## 【0023】

本発明の方法における抗体価の測定は、抗体の測定技術において慣用されている様々な方法を用いて実施することができる。かかる方法には免疫学的測定法が挙げられる。具体例として、ELISA、ラジオイムノアッセイ（RIA）などが挙げられる。

10

## 【0024】

ELISAは、例えば以下のように実施される。まず、測定対象とする抗WT1抗原ペプチド抗体と特異的に抗原抗体反応し得るWT1抗原ペプチドを固相化する。これに試料を加える。これにより、固相化されたWT1抗原ペプチドと試料中の抗体との間で、抗原抗体反応が起こり、試料中に存在する抗WT1抗原ペプチド抗体が固相化されたWT1抗原ペプチドに結合する。次に、結合した抗WT1抗原ペプチド抗体を、抗体検出試薬を用いて検出し、試料中に存在する抗体量を測定する。

## 【0025】

あるいは、抗体検出試薬を固相化し、これにより試料中の抗体を補足し、次いでWT1抗原ペプチドを加えて補足された抗体中の抗WT1抗原ペプチド抗体に結合させ、さらに該抗原に対する特異的な抗体の標識体を結合させることにより、試料中に存在する目的のWT1抗原ペプチド抗体を検出、測定することもできる。

20

## 【0026】

これらの測定手法における手段の選択、改変などは、いずれも当業者によく知られている。本発明において、上記に挙げられた方法に制限されることなく、様々な手法を採用し得る（「臨床検査法提要」（改訂第33版）、金原出版、2010年など参照）。

## 【0027】

抗WT1抗原ペプチド抗体を検出するための抗体検出試薬は、特に制限されることなく、一般に使用されている様々な試薬を用いることができる。例えば、測定対象とするヒトIgG、IgG1、IgG3および/またはIgG4などに特異的に結合する抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgG1抗体、抗ヒトIgG3抗体および/または抗ヒトIgG4抗体からなる調製物を用いることができる。これらは市販品として入手でき、また調製することもできる。このような抗体検出試薬の調製法は、当業者によく知られている。好ましい実施形態において、本発明で用いられる抗体検出試薬は、標識された二次抗体である。より好ましい実施形態では、本発明で用いられる抗体検出試薬は、標識された二次抗体と、該二次抗体を検出する標識された三次抗体との組み合わせである。

30

## 【0028】

本発明の方法において、WT1抗原ペプチドまたはその変異体は、固相法や液相法などに従って化学的に合成してもよい。固相法の場合、ペプチドは、N末端保護アミノ酸の活性化、カップリング、洗浄、脱保護基、活性化の操作を、所望のペプチドが完成するまで繰り返し、固相上で合成される。該産物は、固相から脱離され、HPLC等を用いて精製される。次いで、配列検定および生物学的試験のようなさらなる研究に移される。

40

## 【0029】

あるいは、WT1抗原ペプチドまたはその変異体は、無細胞翻訳系により合成してもよい。また、WT1抗原ペプチドをコードするヌクレオチド配列に基づき、遺伝子工学的に製造してもよい。また、これらの方法を組み合わせ得てもよい。遺伝子工学的手法によるWT1抗原ペプチドの製造は、一般的な遺伝子組換え技術に従うことができる。より詳細には、所望の、WT1抗原ペプチドをコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できるよう

50

な組換えDNA分子を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養することにより、形質転換体の細胞内または細胞外に所望のWT1抗原を発現産物として生産させることができる。

【0030】

ここで採用され得る各操作、例えば遺伝子断片の化学合成、切断、削除、付加および結合を目的とする酵素処理、単離、精製、選択など、組換えDNAの宿主細胞への導入および形質転換細胞の培養などは、いずれも当業者によく知られている（例えば、Molecular Cloning, by T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1982) など参照）。

【0031】

また所望により、WT1抗原ペプチドまたはその変異体は、その物理的・化学的性質などを利用した各種分離操作に従って、上記発現産物などから分離、精製することもできる。

【0032】

本発明の方法において、試料中の抗WT1抗原ペプチド抗体量の測定は、さらに、公知の手法、手段、それらで利用される測定試薬などを好適に利用することができる。

【0033】

例えば、上記測定法において、固相法を採用する場合、測定系の抗原または抗体は、当業者によく知られた方法に従って固相に固定化される。該固相には、通常使用される不溶性、不活性の担体が広く利用され得る。これには、例えばガラス、セルロース粉末、セファデックス、セファロース、ポリスチレン、濾紙、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂、デキストラン、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ナイロン、ガラスビーズ、絹、ポリアミン-メチルビニルエーテル-マレイン酸共重合体、アミノ酸共重合体、エチレン-マレイン酸共重合体などの種々の素材からなるスティック、ビーズ、マイクロプレート、試験管などが包含される。

【0034】

抗原あるいは抗体の固定化方法も、特に制限されることなく、物理的結合および化学的結合のいずれも利用できる。代表的には、例えば共有結合法としてジアゾ法、ペプチド法（酸アミド誘導体法、カルボキシルクロライド樹脂法、カルボジイミド樹脂法、無水マレイン酸誘導体法、イソシアナート誘導体法、臭化シアン活性化多糖体法、セルロースカルボナート誘導体法、縮合試薬を使用する方法など）、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法（架橋試薬としてグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンイソシアナートなどを用いる）、Ugi反応による担体結合法などの化学的反応を利用する方法；イオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法；ガラスビーズなどの多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法などが挙げられる。

【0035】

各測定系における標識剤も、特に制限されることなく、当業者によく知られたもの、または将来使用され得るもののいずれを用いることができる。具体例としては、免疫測定法において慣用の各種放射性同位元素類、アルカリホスファターゼ（ALP）、ペルオキシダーゼ（POX）などの酵素類、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（RITC）などの蛍光物質類、その他、1N-(2,2,6,6-テトラメチル-1-オキシル-4-ピペリジル)-5N-(アスパルテート)-2,4-ジニトロベンゼン（TOPA）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、マイクロペルオキシダーゼ、キモトリプシノーゲン、プロカルボキシペプチダーゼ、グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、アミラーゼ、ホスホリラーゼ、D-ナーゼ、P-ナーゼなどを用いてもよい。これらの標識物質による標識方法は、公知の方法に従って実施できる。

【0036】

また、酵素活性の測定も、使用する酵素の種類に応じて公知の方法に従って実施することができる。例えば標識酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合は、基質としてABT

10

20

30

40

50

S J ( 2 , 2 ' - アジノ - ピ ( 3 ' - エチルベンツチアゾリンスルホン酸 ) ) を用いて、アルカリホスファターゼを用いる場合は、基質として p - ニトロフェニルホスフェートを用いて、各基質の分解を分光光度計などを用いて測定する方法などによることができる。

【 0 0 3 7 】

上記酵素標識の代わりに、放射性同位元素、蛍光物質などを標識体として用いる場合も、当該標識体の測定は、当業者によく知られた方法に従って実施することができる。

【 0 0 3 8 】

上記測定系において使用される溶媒としては、反応に悪影響を与えないものであれば一般的に使用されるものを用いることができる。具体的にはクエン酸バッファー、リン酸バッファー、トリスバッファー、酢酸バッファーなどの pH 約 5 - 9 程度のバッファーが好適に利用され得る。

10

【 0 0 3 9 】

免疫反応 ( 結合 ) 条件も、特に制限されることなく、一般にこの種の測定法で用いられる通常の条件が採用され得る。一般には 4 5 以下、好ましくは約 4 - 4 0 の温度条件下で約 1 - 4 0 時間程度反応させる。

【 0 0 4 0 】

本発明の方法は、上記のようにして測定された、試料における抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 抗体価を、W T 1 ペプチド免疫療法における臨床効果を予測するための臨床指標とすることを最大の特徴とする。

【 0 0 4 1 】

特に、本発明者らは、W T 1 ペプチド免疫療法を受けている被験者では、投与された W T 1 ペプチドに対して抗 W T 1 ペプチド I g G 抗体が産生され、ある時点での抗 W T 1 ペプチド I g G 抗体価と臨床効果に相関関係があることを見出した。すなわち、投与された W T 1 ペプチドに対応する W T 1 抗原ペプチドまたはその変異体を用いて測定された抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 抗体価が、W T 1 ペプチド免疫療法における臨床効果の予測に有効な指標となることを見出した。また、本発明者らは、産生された抗 W T 1 ペプチド I g G 抗体のサブクラスを解析し、非 T h 1 タイプよりも T h 1 タイプの方が、W T 1 ペプチド免疫療法における臨床効果が良好であることを見出した。さらに、本発明者らは、T h 1 タイプをさらに詳細に解析し、I g G 1 タイプおよび I g G 3 タイプよりも I g G 1 & I g G 3 タイプの方が、W T 1 ペプチド免疫療法における臨床効果が良好であることを見出した。

20

30

【 0 0 4 2 】

用語「T h 1 タイプ」とは、T h 1 タイプサブクラスである I g G 1 抗体もしくは I g G 3 抗体が、T h 2 タイプサブクラスである I g G 4 抗体の 2 倍以上であるものをさす。すなわち、「T h 1 タイプ」とは、下記式 ( I ) または式 ( I I ) を満たす場合をいう。

( I ) 抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 1 抗体価 / 抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 4 抗体価  
2 . 0

( I I ) 抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 3 抗体価 / 抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 4 抗体価  
2 . 0

【 0 0 4 3 】

用語「非 T h 1 タイプ」とは、上記式 ( I ) および式 ( I I ) のいずれも満たさない場合をいう。

40

【 0 0 4 4 】

用語「I g G 1 タイプ」とは、T h 1 タイプのうち、I g G 1 抗体が I g G 3 抗体の 2 倍以上のものをさす。すなわち、T h 1 タイプのうち、下記式 ( I I I ) を満たす場合をいう。

( I I I ) 抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 1 抗体価 / 抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 3 抗体価  
2 . 0

【 0 0 4 5 】

用語「I g G 3 タイプ」とは、T h 1 タイプのうち、I g G 3 抗体が I g G 1 抗体の 2

50

倍以上のものをさす。すなわち、Th1タイプのうち、下記式(IV)を満たす場合をいう。

(IV) 抗WT1抗原ペプチドIgG3抗体価 / 抗WT1抗原ペプチドIgG1抗体価  
2.0

【0046】

用語「IgG1 & IgG3タイプ」とは、Th1タイプのうち、上記式(III)および式(IV)のいずれも満たさない場合をいう。

【0047】

さらなる態様において、本発明は、WT1抗原ペプチドを含む、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。かかるキットは、WT1抗原ペプチドを有効成分として含み、該WT1抗原ペプチドは測定対象である抗WT1抗原ペプチドIgG抗体と抗原抗体反応するものである。また、かかるキットは、本発明の方法における測定系に利用される抗体検出試薬などの任意の試薬を含んでもよい。さらに、測定の実施を簡便にするための適当な試薬、例えば抗体希釈液、反応希釈液、バッファー、洗浄剤、標識体検出試薬などを含んでもよい。またさらに、本発明の方法の実行に必要な説明書などの資材を含んでもよい。前記キットは、好ましくは免疫学的測定法に基づきIgG抗体価を測定するものである。より好ましくは、前記キットはELISAに基づきIgG抗体価を測定するものである。このようなキットのために、上述されるWT1抗原ペプチドの変異体を用いてもよい。また、WT1抗原ペプチドあるいはその変異体を構成するアミノ酸のいずれかのアミノ酸が適宜修飾されたものであってもよい。アミノ酸残基の修飾は、公知の方法にて実施することができる。

10

20

【0048】

以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【実施例1】

【0049】

#### WT1抗原ペプチドの合成

表1-1および表1-2に示されるWT1抗原ペプチドを、株式会社ピーエイチジャパンにて合成した。表1-1および表1-2において、開始部位および終了部位とは、野生型ヒトWT1タンパク質のアミノ酸配列(配列番号1)における対応するアミノ酸残基の位置を示す。

30

【表 1 - 1】

抗原ペプチド	開始部位 (aa)	終了部位 (aa)	アミノ酸配列	配列番号
WT1-01	1	18	MGSDVVRDLNALLPAVPSL	7
WT1-10	10	27	ALLPAVPSLGGGGGCALP	8
WT1-19	19	36	GGGGGCALPVSGAAQWAP	9
WT1-28	28	45	VSGAAQWAPVLDFAPPGA	10
WT1-37	37	54	VLDFAPPGASAYGSLGGP	11
WT1-46	46	63	SAYGSLGGPAPPPAPPPP	12
WT1-55	55	72	APPPAPPPPPPPPHSFI	13
WT1-64	64	81	PPPPPHSFIKQEPSWGGA	14
WT1-73	73	90	KQEPSWGGAEPHEEQCLS	15
WT1-82	82	99	EPHEEQCLSAFTVHFSGQ	16
WT1-91	91	108	AFTVHFSGQFTGTAGACR	17
WT1-100	100	117	FTGTAGACRYGPFPGPPP	18
WT1-109	109	126	YGPFGPPPPSQASSGQAR	19
WT1-118	118	135	SQASSGQARMFPNAPYLP	20
WT1-127	127	144	MFPNAPYLPSCLESPAI	21
WT1-136	136	153	SCLESQPAIRNQGYSTVT	22
WT1-145	145	162	RNQGYSTVTFDGTPSYGH	23
WT1-154	154	171	FDGTPSYGHTPSHHAAQF	24
WT1-163	163	180	TPSHHAAQFPNHSFKHED	25
WT1-172	172	189	PNHSFKHEDPMGQQGSLG	26
WT1-181	181	198	PMGQQGSLGEQQYSVPPP	27
WT1-199	199	216	VYGCHTPTDSTGSQALL	28
WT1-208	208	225	SCTGSQALLLRTPYSSDN	29
WT1-217	217	234	LRTPYSSDNLYQMTSQLE	30

10

20

【表 1 - 2】

抗原ペプチド	開始部位 (aa)	終了部位 (aa)	アミノ酸配列	配列番号
WT1-226	226	243	LYQMTSQLECMTNQMN	31
WT1-235	235	252	CMTWNQMNLGATLKGVA	32
WT1-244	244	261	GATLKGVAAGSSSSVKT	33
WT1-253	253	270	GSSSSVKTWTEGQSNHST	34
WT1-262	262	279	EGQSNHSTGYESDNHTTP	35
WT1-271	271	288	YESDNHTTPILCGAQYRI	36
WT1-280	280	297	ILCGAQYRIHTHGVRFGI	37
WT1-289	289	306	HTHGVRFGIQDVRVPGV	38
WT1-298	298	315	QDVRVPGVAPTLVRSAS	39
WT1-307	307	324	APTLVRSASETSEKRPFM	40
WT1-316	316	333	ETSEKRPFMCAYPGCNKR	41
WT1-325	325	342	CAYPGCNKRYFKLSHLQM	42
WT1-334	334	351	YFKLSHLQMSRKHTGEK	43
WT1-343	343	360	HSRKHTGEKPYQCDFKDC	44
WT1-352	352	369	PYQCDFKDCERRFSRSDQ	45
WT1-361	361	378	ERRFSRSDQLKRHRHT	46
WT1-370	370	387	LKRHRHTGVKPFQCKT	47
WT1-379	379	396	GVKPFQCKTCQRKFSRSD	48
WT1-388	388	405	CQRKFSRSDHLKTHTRTH	49
WT1-397	397	414	HLKTHTRHTGKTSEKPF	50
WT1-406	406	423	TGKTSEKPFSCRWPSCQK	51
WT1-415	415	432	SCRWPSCQKKFARSDELV	52
WT1-424	424	441	KFARSDELVRHHNMHQRN	53
WT1-433	433	449	RHHNMHQRNMTKLQLAL	54
WT1-E5min	241		MNLGATLKGHSTGYESDN	55
WT1-KT5min	399		KTHTRHTGKPFSCRWP	56

## 【実施例 2】

## 【0050】

再発悪性神経膠腫 (GBM) 患者における WT1 ペプチドワクチン投与後の抗 WT1 抗原ペプチド抗体価と臨床効果

本発明者らは、GBM 患者について、WT1 ペプチドワクチン投与後の抗 WT1 抗原ペプチド IgG 抗体価と臨床効果の関係を確認するために、以下の検討を行った。

## 【0051】

## 1. 材料および方法

1-1 GBM 患者 72 名を対象に、WT1<sub>235</sub> ペプチド (WT1-CTL ペプチド (改変型 mp235-243) (配列番号 3)) を WT1 ペプチドワクチンとして、WT1 ペプチド免疫療法を実施した。3mg の WT1<sub>235</sub> ペプチド (WT1-CTL ペプチド (改変型 mp235-243)) を不完全アジュバントであるモンタナイド ISA51 と重量比 1:1 で混合し、エマルジョンを調製した。このエマルジョンを 1 週間ごとに 1 回、皮内投与によって、12 週間投与した。ワクチン投与前および投与後の所定の時期に患者より採血し、遠心分離により血清を得た。得られた血清は -80℃ 以下で凍結保存し、測定時に融解して用いた。なお、効果が見られた場合には、12 週間を超えて、2~4 週ごとに WT1 ペプチドワクチンの投与を継続した。

## 【0052】

1-2 抗 WT1-235 ペプチド IgG 抗体 (抗 WT1<sub>235</sub> ペプチド IgG 抗体)

### の測定 (ELISA)

底面にアミノ基が表出したペプチドコーティングキット (TaKaRa) 付属 96 ウェルリアクションプレートに、ペプチドコーティングキット付属リアクションバッファーに溶解した WT1-235 ペプチド溶液 (4 µg/mL) を 1 ウェルあたり 50 µL 添加した。カップリング試薬を 1 ウェルあたり 30 µL 添加し、室温で 2 時間反応させた。蒸留水で洗浄し、抗原を固相化した。ブロッキングワン (ナカライテスク) を用いて、室温で 2 時間振盪させることにより、ブロッキングを行った。次いで、0.05% TBST (40 mM トリス、0.15 M 塩化ナトリウム、0.05% Tween-20、pH 8.0) で洗浄した。その後、ペプチドコーティングキット付属ブロッキング液で 100 倍希釈した血清を、1 ウェルあたり 100 µL 入れた。4 で一晩反応させた。0.05% TBST で洗浄した後、二次抗体と室温で 2 時間反応させた。二次抗体として、ペプチドコーティングキット付属ブロッキング液で 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgG 抗体 (sc-2769、Santa Cruz Biotechnology、400 µg/mL) を用いた。次いで、0.05% TBST で洗浄した。その後、三次抗体と室温で 2 時間反応させた。三次抗体として、0.05% TBST で 1000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (sc-2004、Santa Cruz Biotechnology、400 µg/mL) を用いた。0.05% TBST で洗浄した後、TMB キット (KPL) を用いて発色させた。1 N HCl で反応を停止後、マイクロプレートリーダー (CORONA ELECTRIC MTP-310 Lab) を用いて、450 nm の吸光度を測定した。

#### 【0053】

さらに、本発明者らは、抗 WT1 抗原ペプチド IgG 抗体レベルの上昇により検出される WT1 特異的免疫応答の誘導が、Th1 タイプであるのか非 Th1 タイプであるのかを確認するため、以下の方法によって、抗 WT1 抗原ペプチド IgG 抗体の IgG サブクラスを解析した。

#### 【0054】

1-3 WT1-235 ペプチドに対する IgG1、IgG3 および IgG4 の測定 (ELISA)

上記 1-2 と同様の方法で ELISA を行った。二次抗体として、それぞれ、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG1 (#9052-05 mouse mAb clone 4E3、Southern Biotech)、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG3 (#9210-05 mouse mAb clone HP6050、Southern Biotech) またはペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG4 抗体 (#9190-05 mouse mAb clone HP6023、Southern Biotech) を用いた。ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG1 およびペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG4 はペプチドコーティングキット付属ブロッキング液で 2000 倍希釈して、ペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG3 はペプチドコーティングキット付属ブロッキング液で 1000 倍希釈して用いた。また、三次抗体として、0.05% TBST で 2500 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Promega、W4028、1 mg/mL) を用いた。

#### 【0055】

##### 2. 統計学的解析

二群間の比較はマン・ホイットニ検定を用いて行った。レスポナー群、ノンレスポナー群における抗 WT1 抗原ペプチド抗体上昇率の違いについて、2 方向の要因の関連性の検定をフィッシャーの直接確率計算法を用いて行った。また、WT1 ペプチドワクチン継続率、無増悪生存率および全生存率の比較を、ログランク検定を用いて行った。なお、抗 WT1 抗原ペプチド抗体が陰性である血清 (WT1 ペプチド免疫療法開始前の患者血清) を用いて抗 WT1 抗原ペプチド抗体価を測定したところ、平均値 + 標準偏差の 2 倍 = 0.045 であった。これより、(1) WT1 ワクチン投与後の抗 WT1 抗原ペプチド IgG 抗体価が 0.05 以上となった場合、あるいは、(2) WT1 ワクチン投与前と比較し

てWT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上増加した場合を、「抗WT1抗原ペプチド抗体価が上昇した」と定義した。

【0056】

3. 結果

(I) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価(抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体価)の上昇と臨床効果

(i) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の推移(図1)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価を表すグラフを図1に示す。WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与前と比較して、投与後の日数の経過(治療の経過)に伴い、抗WT1-235ペプチドIgG抗体価が上昇した。投与2ヶ月後および3ヶ月後では、投与前に比べ、抗体価が有意に上昇した。

10

【0057】

(ii) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と全生存率(図2および図3)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、全生存率の関係を表すグラフを図2および図3に示す。観察期間中、投与8-9週後の抗体価を指標とした場合(図2)および12-14週後の抗体価を指標とした場合(図3)のいずれも、抗体価上昇群が抗体価非上昇群に比べ、有意に高い全生存率を示した。また、投与8-9週後よりも投与12-14週後の抗体価を指標とした場合の方が、抗体価上昇群と抗体価非上昇群との間の差がより明確であった。

20

【0058】

(iii) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と無増悪生存率(図4および図5)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、無増悪生存率の関係を表すグラフを図4および図5に示す。観察期間中、投与8-9週後の抗体価を指標とした場合では、抗体価上昇群が抗体価非上昇群に比べ、より高い無増悪生存率を示す傾向が見られた(図4)。投与12-14週後の抗体価を指標とした場合では、抗体価上昇群が抗体価非上昇群に比べ、有意に高い無増悪生存率を示した(図5)。

30

【0059】

(iv) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇とWT1ペプチドワクチン投与継続率(図6および図7)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と、WT1ペプチドワクチン投与継続率の関係を表すグラフを図6および図7に示す。観察期間中、投与8-9週後の抗体価を指標とした場合では、抗体価上昇群が抗体価非上昇群に比べ、より高いワクチン投与継続率を示す傾向が見られた(図6)。投与12-14週後の抗体価を指標とした場合では、抗体価上昇群が抗体価非上昇群に比べ、有意に高いワクチン投与継続率を示した(図7)。

40

【0060】

(II) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体(抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体)のタイプ(Th1タイプ/非Th1タイプ)と臨床効果

(i) Th1タイプ/非Th1タイプと全生存率(図8)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価を指標とした場合における、Th1タイプ/非Th1タイプそれぞれの全生存率を図8に示す。観察期間中、Th1タイプが非Th1タイプに比べ、より高い全生存率を示す傾向が見られた。

【0061】

50

( i i ) T h 1 タイプ / 非 T h 1 タイプ と 無 増 悪 生 存 率 ( 図 9 )

W T 1<sub>235</sub> ペプチドワクチン ( W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) ) 投与 1 2 - 1 4 週後の抗 W T 1 - 2 3 5 ペプチド I g G 抗体価を指標とした場合における、T h 1 タイプ / 非 T h 1 タイプそれぞれの無増悪生存率を図 9 に示す。観察期間中、T h 1 タイプが非 T h 1 タイプに比べ、より高い無増悪生存率を示す傾向が見られた。

【 0 0 6 2 】

( i i i ) T h 1 タイプ / 非 T h 1 タイプ と W T 1 ペプチドワクチン投与継続率 ( 図 1 0 )

W T 1<sub>235</sub> ペプチドワクチン ( W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) ) 投与 1 2 - 1 4 週後の抗 W T 1 - 2 3 5 ペプチド I g G 抗体価を指標とした場合における、T h 1 タイプ / 非 T h 1 タイプそれぞれの W T 1 ペプチドワクチン投与継続率を図 1 0 に示す。観察期間中、T h 1 タイプが非 T h 1 タイプに比べ、有意に高いワクチン投与継続率を示した ( 図 1 0 ) 。

【 0 0 6 3 】

( I I I ) I g G サブクラスの解析

( i ) 抗 W T 1 - 2 3 5 ペプチド I g G サブクラス抗体価の上昇と全生存率 ( 図 1 1 )

W T 1<sub>235</sub> ペプチドワクチン ( W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) ) 投与 1 2 - 1 4 週後の抗体価を指標とした場合における、I g G 1 タイプ / I g G 3 タイプ / I g G 1 & I g G 3 タイプそれぞれの全生存率を図 1 1 に示す。観察期間中、I g G 1 & I g G 3 タイプが、有意に高い全生存率を示した。

【 0 0 6 4 】

( i i ) 抗 W T 1 - 2 3 5 ペプチド I g G サブクラス抗体価の上昇と無増悪生存率 ( 図 1 2 )

W T 1<sub>235</sub> ペプチドワクチン ( W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) ) 投与 1 2 - 1 4 週後の抗体価を指標とした場合における、I g G 1 タイプ / I g G 3 タイプ / I g G 1 & I g G 3 タイプそれぞれの無増悪生存率を図 1 2 に示す。観察期間中、I g G 1 & I g G 3 タイプが、より高い無増悪生存率を示す傾向が見られた。

【 0 0 6 5 】

( i i i ) 抗 W T 1 - 2 3 5 ペプチド I g G サブクラス抗体価の上昇と W T 1 ペプチドワクチン投与継続率 ( 図 1 3 )

W T 1<sub>235</sub> ペプチドワクチン ( W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) ) 投与 1 2 - 1 4 週後の抗体価を指標とした場合における、I g G 1 タイプ / I g G 3 タイプ / I g G 1 & I g G 3 タイプそれぞれの W T 1 ペプチドワクチン投与継続率を図 1 3 に示す。観察期間中、I g G 1 & I g G 3 タイプが、有意に高い W T 1 ペプチドワクチン投与継続率を示した。

【 実施例 3 】

【 0 0 6 6 】

再発悪性神経膠腫 ( G B M ) 患者における W T 1 ペプチドワクチンおよび W T 1 ヘルパーペプチドワクチン併用投与後の抗 W T 1 抗原ペプチド抗体価と臨床効果

本発明者らは、G B M 患者について、W T 1 ペプチドワクチンおよびヘルパーペプチドワクチン併用投与後の抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 抗体価と臨床効果の関係を確認するために、以下の検討を行った。

【 0 0 6 7 】

1 . 材料および方法

1 - 1 G B M 患者 1 5 名を対象に、W T 1 ペプチドワクチンとして W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) ( 配列番号 3 ) を、ヘルパーペプチドワクチンとして W T 1<sub>332</sub> ペプチド ( 配列番号 6 ) を用い、W T 1 ペプチド免疫療法を実施した。W T 1 - C T L ペプチド ( 改変型 m p 2 3 5 - 2 4 3 ) は 3 m g / b o d y で、1 週間ごとに 1 回、皮内投与によって、計 5 回投与した。W T 1<sub>332</sub> ヘルパーペプチドは、0 . 7 5 m g ( n = 7 )、1 . 5 m g ( n = 4 ) または 3 m g ( n = 4 ) で、用量増加 ( d o s

10

20

30

40

50

e e s c a l a t i o n ) を行い、2週間ごとに1回、皮内投与によって、計3回投与した。なお、WT1ヘルパーペプチドワクチンの投与は、WT1-CTLペプチドと混合して投与された。ワクチン投与前および投与後の所定の時期に患者より採血し、遠心分離により血清を得た。得られた血清は-80以下で凍結保存し、測定時に融解して用いた。なお、効果が見られた場合には、その後、2~4週間ごとに、WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243)の単独投与、ならびにWT1-CTLペプチド(改変型mp235-243)およびWT1<sub>332</sub>ヘルパーペプチドの併用投与を交互に繰り返した。

#### 【0068】

1-2 抗WT1-235ペプチドIgG抗体(抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体)および抗WT1-325ペプチドIgG抗体(抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体)の測定(ELISA)

10

実施例2と同様の方法で抗体価を測定した。抗WT1-235ペプチドIgG抗体を測定する際には、WT1抗原ペプチドとしてWT1-235ペプチドを、抗WT1-325ペプチドIgG抗体を測定する際には、WT1抗原ペプチドとしてWT1-325ペプチドを、それぞれ用いた。WT1-325ペプチドは、投与したWT1<sub>332</sub>ペプチドの一部(1~11番目のアミノ酸)を含むペプチドである。従って、抗WT1-325ペプチドIgG抗体の測定は、投与したWT1<sub>332</sub>ペプチドに対する抗体(抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体)の測定を意味する。

#### 【0069】

20

#### 2. 統計学的解析

実施例2と同様の方法で統計学的解析を行った。なお、臨床試験脱落症例数(0.75mg投与群のうち3例、および3mg投与群のうち1例)を除く11例についての解析を行った。また、実施例2と同様に、(1)WT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上となった場合、あるいは、(2)WT1ワクチン投与前と比較してWT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上増加した場合を、「抗WT1抗原ペプチド抗体価が上昇した」と定義した。

#### 【0070】

#### 3. 結果

(I) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価(抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体価)の上昇と臨床効果

30

(i) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇とWT1ペプチドワクチン投与継続率(図14)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))およびWT1<sub>332</sub>(ヘルパー)ペプチドワクチン併用投与4-8週後の抗体価を指標とした場合における、抗WT1-235ペプチドIgG抗体価上昇群/非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を図14に示す。観察期間中、抗体価上昇群が非上昇群に比べ、より高いWT1ペプチドワクチン投与継続率を示す傾向が見られた。

#### 【0071】

(II) 抗WT1-325ペプチドIgG抗体価(抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体価)の上昇と臨床効果

40

(i) 抗WT1-325ペプチドIgG抗体価の上昇とWT1ペプチドワクチン投与継続率(図15)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))およびWT1<sub>332</sub>(ヘルパー)ペプチドワクチン併用投与4-8週後の抗体価を指標とした場合における、抗WT1-325ペプチドIgG抗体価上昇群/非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を図15に示す。観察期間中、上昇群が非上昇群に比べ、より高いWT1ペプチドワクチン投与継続率を示す傾向が見られた。

#### 【実施例4】

#### 【0072】

50

## 再発悪性神経膠腫（GBM）患者におけるWT1ヘルパーペプチドワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチド抗体価と臨床効果

本発明者らはさらに、GBM患者について、WT1ヘルパーペプチドワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価と臨床効果の関係を確認するために、以下の検討を行った。

### 【0073】

#### 1. 材料および方法

1-1 GBM患者14名を対象に、WT1ヘルパーペプチドワクチンとしてWT1<sub>332</sub>ペプチドを用い、WT1ペプチド免疫療法を実施した。0.75mg（n=4）、1.5mg（n=4）、3mg（n=6）のいずれかのWT1<sub>332</sub>ペプチドを不完全アジュバントであるモンタナイドISA51と重量比1:1で混合し、エマルジョンを調製した。このエマルジョンを2週間ごとに1回、皮内投与によって、計3回投与した。ワクチン投与前および投与後の所定の時期に患者より採血し、遠心分離により血清を得た。得られた血清は-80℃以下で凍結保存し、測定時に融解して用いた。なお、効果が見られた場合には、その後、2~4週間ごとにWT1<sub>332</sub>ヘルパーペプチドの投与を継続した。

### 【0074】

1-2 抗WT1-325ペプチドIgG抗体（抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体）の測定（ELISA）

実施例2と同様の方法で抗体価を測定した。WT1抗原ペプチドとしてWT1-325ペプチドを用いた。WT1-325ペプチドは、投与したWT1<sub>332</sub>ペプチドの一部（1~11番目のアミノ酸）を含むペプチドである。従って、抗WT1-325ペプチドIgG抗体の測定は、投与したWT1<sub>332</sub>ペプチドに対する抗体（抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体）の測定を意味する。

### 【0075】

#### 2. 統計学的解析

実施例2と同様の方法で統計学的解析を行った。なお、臨床試験脱落症例数（1.5mg投与群のうち2例、および3mg投与群のうち4例）を除く8例についての解析を行った。また、実施例2と同様に、（1）WT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上となった場合、あるいは、（2）WT1ワクチン投与前と比較してWT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上増加した場合を、「抗WT1抗原ペプチド抗体価が上昇した」と定義した。

### 【0076】

#### 3. 結果

（I）抗WT1-325ペプチドIgG抗体価（抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体価）の上昇と臨床効果

（i）抗WT1-325ペプチドIgG抗体価の上昇とWT1ペプチドワクチン投与継続率（図16）

WT1<sub>332</sub>（ヘルパー）ペプチドワクチン投与12-14週後の抗体価を指標とした場合における、抗WT1-325ペプチドIgG抗体価上昇群/非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を図16に示す。観察期間中、上昇群が非上昇群に比べ、より高いWT1ペプチドワクチン投与継続率を示す傾向が見られた。

### 【実施例5】

### 【0077】

## 胸腺癌患者におけるWT1ペプチドワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチド抗体価と臨床効果

本発明者らは胸腺癌患者について、同様に、WT1ペプチドワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価と臨床効果の関係を確認するため、以下の検討を行った。

### 【0078】

#### 1. 材料および方法

1-1 胸腺癌患者10名を対象に、実施例2と同様に、WT1-CTLペプチド（改

10

20

30

40

50

変型mp235-243)(配列番号3)をWT1ペプチドワクチンとして、WT1ペプチド免疫療法を実施した。ワクチン投与前および投与後の所定の時期に患者より採血し、遠心分離により血清を得た。実施例2と同様の方法(ELISA)で、得られた血清中に含まれる抗WT1-235ペプチドIgG抗体価を測定した。

【0079】

## 2. 統計学的解析

実施例2と同様の方法で統計学的解析を行った。なお、実施例2と同様に、(1)WT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上となった場合、あるいは、(2)WT1ワクチン投与前と比較してWT1ワクチン投与後の抗WT1抗原ペプチドIgG抗体価が0.05以上増加した場合を、「抗WT1抗原ペプチド抗体価が上昇した」と定義した。

10

【0080】

## 3. 結果

(I) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価(抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体価)の上昇と臨床効果

(i) 抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇とWT1ペプチドワクチン投与継続率(図17)

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))投与12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価を指標とした場合における、抗WT1-235ペプチドIgG抗体価上昇群/非上昇群それぞれのWT1ペプチドワクチン投与継続率を図17に示す。観察期間中、抗体価上昇群が抗体価非上昇群に比べ、より高いワクチン投与継続率を示す傾向が見られた(図17)。

20

【0081】

## 考察

WT1<sub>235</sub>ペプチド(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))を用いたWT1ペプチド免疫療法において、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチンの投与後に抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇が見られた群が、良好な臨床効果を示すことがわかった。またこれは、ワクチン投与から8-9週後の抗体価およびワクチン投与から12-14週後の抗体価のいずれにも当てはまることであった。その中でも、ワクチン投与から12-14週後の抗体価に基づく場合、臨床効果との相関性がより高いことがわかった。

30

【0082】

さらに、抗WT1-235ペプチドIgG抗体のうち、IgG4よりもIgG1またはIgG3が上昇する群(Th1タイプ)が、良好な臨床効果を示すことがわかった。その中でもさらに、IgG1&IgG3タイプがより良好な臨床効果を示すことがわかった。

【0083】

また、WT1<sub>332</sub>ヘルパーペプチドをWT1<sub>235</sub>ペプチド(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-243))ワクチンと併用投与した場合、あるいはWT1<sub>332</sub>ヘルパーペプチドを単独投与した場合でも、同様の結果が得られることがわかった。

40

【実施例6】

【0084】

変異型WT1抗原ペプチドを用いた抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体の測定(図18)

本発明者らは、変異型WT1抗原ペプチドを用いても抗WT1<sub>332</sub>ペプチドIgG抗体の測定が可能であることを確認するため、以下の検討を行った。

【0085】

## 1. 材料および方法

### 1-1 血清

WT1<sub>332</sub>ペプチドワクチン(配列番号6)を投与された悪性神経膠腫の患者1名から、ワクチン投与前、投与後4週目、投与後1年2ヶ月目に、血清検体を得た。陰性対照として、WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1-CTLペプチド(改変型mp235-

50

243) (配列番号3)のみを投与された胸腺悪性腫瘍の患者1名から、同様に血清検体を得た。血清検体は測定まで-20で保管した。

【0086】

1-2 変異型WT1抗原ペプチドの作製

以下の表に示される変異型WT1抗原ペプチドを作製した。

【表2】

変異型 WT1抗原ペプチド	アミノ酸配列	アミノ酸長	配列番号	特徴
WT1-frag3	SEKRPFCAYPGCNKRYFKLSH <b>LQMSRKHT</b> GEKPYQCDFKDC ERRFSRSDQLKRHQRRHTGVKPF QCKTCQRKFRSDHLKTHTRTHT GKTSEKPFSCRWPSCQKKFARSD ELVRHHNHQRNMTKLQLAL	132	57	投与したWT1 <sub>332</sub> ペプチドの全長を含む長鎖ペプチド
WT325-342 (WT1-325)	CAYPGCNKRYFKLSHLQ <b>M</b>	18	42	投与したWT1 <sub>332</sub> ペプチドの一部分(1-11番目のアミノ酸)を含むペプチド
WT332-347	<b>KRYFKLSHLQMSRKH</b>	16	58	投与したWT1 <sub>332</sub> ペプチドの全長からなるペプチド
WT334-342	<b>YFKLSHLQ<b>M</b></b>	9	59	投与したWT1 <sub>332</sub> ペプチドの一部分(3-11番目のアミノ酸)を含むペプチド
WT332-338	<b>KRYFKLS</b>	7	60	投与したWT1 <sub>332</sub> ペプチドの一部分(1-7番目のアミノ酸)を含むペプチド
投与したWT1ペプチドワクチン	アミノ酸配列	アミノ酸長	配列番号	
WT1 <sub>332</sub> ペプチド	KRYFKLSHLQMSRKH	16	6	

WT332-347(配列番号58)、WT334-342(配列番号59)およびWT332-338(配列番号60)は、GL Biochemにて合成した。WT1-frag3(配列番号57)は、以下の方法により作製した。

10

20

30

40

50

## 【0087】

## (方法)

WT1 - f r g 3 (配列番号57)をGSTタグ付タンパク質として発現するベクターを、pGEX - 5 X - 3ベクター(GE Health care)を用いて構築した。作製したベクターは、コンピテントセルDH5 にヒートショックにて導入した。ベクターを導入した大腸菌を培養し、OD<sub>600</sub>値が0.4~0.6となった時点で、イソプロピル - D - チオガラクトシド(IPTG)を終濃度1mMとなるよう培地に加え、タンパク発現を誘導した。さらに3時間培養した。遠心分離により集菌後、SDSサンプルバッファー(0.125M トリス - HCl、0.1M DTT、4% SDS、10% スクロース、プロモフェノールブルー、pH6.8)で溶解した。これをディスク型電気泳動装置NA - 1800(日本エイドー)を用いてSDS - PAGEによる分子量分画を行った。採取した各分画の一部分を、SDS - PAGE後、CBB染色を行い、WT1が含まれている分画を回収した。精製したタンパクをELISA用固相バッファー(10mM NaCO<sub>3</sub>、30mM NaHCO<sub>3</sub>、0.02% NaN<sub>3</sub>、pH9.6)に溶解し、ELISA用の抗原として用いた。

10

## 【0088】

## 1 - 3 抗体価の測定

## 1 - 3 - 1 WT1 - f r g 3 (配列番号57)を用いた抗体価の測定

ELISA用96ウェルプレートに、GST - WT1 f r a g 1タンパク溶液(10ng/μL)を1ウェルあたり100μL入れた。37℃で一晩放置して抗原を固相した。0.05% TBSTで洗浄後、ブロッキングバッファー(1%ゼラチン/0.05% TBST)で室温2時間振盪し、ブロッキングを行った。その後、0.05% TBSTで100倍希釈した血清を1ウェルあたり100μL入れた。4℃で一晩反応させた。二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体(Santa Cruz Biotechnology)を室温で2時間反応させた。その後、TMBキット(KPL)を用いて発色させた。1N HClで反応を停止後、マイクロプレートリーダー(CORONA ELECTRIC MTP - 32)を用いて、450nmの吸光度を測定した。

20

## 【0089】

1 - 3 - 2 WT332 - 347(配列番号58)、WT334 - 342(配列番号59)またはWT332 - 338(配列番号60)を用いた抗体価の測定

30

底面にアミノ基(-NH<sub>2</sub>)が表出したペプチドコーティングキット(Takara)付属96ウェルリアクションプレートに、ペプチドコーティングキット付属リアクションバッファーに溶解したWT1ペプチド溶液(4μg/mL)を1ウェルあたり50μL添加した。カップリング試薬をウェルあたり30μL添加し、室温で2時間反応させた。蒸留水で洗浄し、抗原を固相化した。ブロッキングワン(ナカライテスク)を用いて、室温で2時間振盪させることにより、ブロッキングを行った。次いで、0.05% TBSTで洗浄した。その後、ペプチドコーティングキット付属ブロッキング液で100倍希釈した血清を、1ウェルあたり100μL入れた。4℃で一晩反応させた。0.05% TBSTで洗浄した後、二次抗体として、ペプチドコーティングキット付属ブロッキング液で1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG抗体sc - 2769、Santa Cruz Biotechnology、400μg/mL)を室温で2時間反応させた。0.05% TBSTで洗浄した後、TMBキット(KPL)を用いて発色させた。1N HClで反応を停止後、マイクロプレートリーダー(CORONA ELECTRIC MTP - 310 Lab)を用いて、450nmの吸光度を測定した。

40

## 【0090】

## 2. 結果

(I) WT1 - f r g 3 (配列番号57)を用いた抗体価の測定

WT1<sub>332</sub>ペプチドで免疫した1名の患者およびWT1<sub>235</sub>ペプチド(WT1 - CTLペプチド(改変型mp235 - 243)(配列番号3))のみで免疫した1名の患者

50

の、免疫前および免疫後の時点での血清中の抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体価を、WT1 - frg3 (配列番号57)を抗原とするELISAで測定した。その結果、WT1<sub>332</sub>ペプチドで免疫した患者では、免疫後、抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体価が上昇していた(図18)。一方、WT1<sub>332</sub>ペプチドで免疫をしていない患者では、抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体価は上昇していなかった。これらの結果から、WT1 - frg3 (配列番号57)をWT1抗原ペプチドとして用いるELISAにより、患者血清中の抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体レベルを測定できることが示された。

【0091】

(II) WT332 - 347 (配列番号58)、WT334 - 342 (配列番号59)またはWT332 - 338 (配列番号60)を用いた抗体価の測定

10

いずれのペプチドを用いたELISAによる測定でも、WT1<sub>332</sub>ペプチドで免疫した患者では、免疫後、抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体価が上昇していた(図18)。一方、WT1<sub>332</sub>ペプチドで免疫をしていない患者では、抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体価は上昇していなかった。これらの結果から、WT332 - 347 (配列番号58)、WT334 - 342 (配列番号59)およびWT332 - 338 (配列番号60)をWT1抗原ペプチドとして用いるELISAにより、患者血清中の抗WT1<sub>332</sub> IgG抗体レベルを測定できることが示された。

【実施例7】

【0092】

変異型WT1抗原ペプチドを用いた抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体の測定(図19)

20

本発明者らは、変異型WT1抗原ペプチドを用いても抗WT1<sub>235</sub>ペプチドIgG抗体の測定が可能であるかを確認するため、以下の検討を行った。

【0093】

1. 材料および方法

1-1 血清

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチン(WT1 - CTLペプチド(改変型mp235 - 243)(配列番号3))の投与を受けた胸腺悪性腫瘍の患者1名から、ワクチン投与後4週目、投与後7ヶ月目に、血清検体を得た。血清検体は測定まで - 20 で保管した。

【0094】

1-2 変異型WT1抗原ペプチドの作製

30

以下の表に示される変異型WT1抗原ペプチドを作製した。

【表3】

変異型 WT1抗原ペプチド	アミノ酸配列	アミノ酸長	配列番号	特徴
WT1-frg2	DPMGQQGSLGEQQYVPPVW GCHTPTDSCITGSQALLRTPYS SDNLYQM <del>T</del> SQLE <b>CMTWNQM</b> <b>N</b> LGATLKGVAAGSSSVK <del>W</del> TE GQSNHSTGYESDNHITPILCGA QYRIHTHG <del>V</del> FRGIQD <del>V</del> RRVPGV APTLVRSASETSEKRPFM	145	61	投与したWT1 <sub>235</sub> ペプチドの全長(2番目のアミノ酸をYからMに置換)を含む長鎖ペプチド
WT235-252 (WT1-235)	<b>CMTWNQM</b> NL <del>G</del> ATLKG <del>V</del> A	18	32	投与したWT1 <sub>235</sub> ペプチドの全長(2番目のアミノ酸をYからMに置換)を含むペプチド
WK235-243	<b>CMTWNQM</b> N <b>K</b>	9	62	投与したWT1 <sub>235</sub> ペプチドの全長(2番目のアミノ酸をYからMに置換、9番目のアミノ酸をLからKに置換)からなるペプチド
WT237-243	<b>TWNQM</b> NL	7	63	投与したWT1 <sub>235</sub> ペプチドの一部分(3-9番目のアミノ酸)を含むペプチド
投与したWT1ペプチドワクチン WT1 <sub>235</sub> ペプチド	アミノ酸配列 CYTWNQMNL	アミノ酸長 9	配列番号 3	

WK235-243(配列番号62)およびWT237-243(配列番号63)は、GL Biochemにて合成した。WT1-frg2(配列番号61)は、上述したWT1-frg3(配列番号57)と同様の方法により作製した。

## 【0095】

## 1-3 抗体価の測定

WT1-frg2(配列番号61)を用いた抗体価の測定は、上述したWT1-frg3(配列番号57)と同様の方法により行った。WK235-243(配列番号62)またはWT237-243(配列番号63)を用いた抗体価の測定は、上述したWT332-347(配列番号58)等と同様の方法により行った。

## 【0096】

10

20

30

40

50

## 2. 結果

### (I) WT1 - f r g 2 (配列番号61)を用いた抗体価の測定

WT1 - f r g 2 (配列番号61)を抗原とし、WT1<sub>235</sub>ペプチドを投与された患者における抗WT1<sub>235</sub>IgG抗体価をELISAにより測定した。その結果、抗WT1<sub>235</sub>IgG抗体価の上昇が検出された(図19)。また、上述の実施例で用いられたWT1 - 235ペプチド(WT235 - 243)を抗原として用いた場合と、同様の結果が示された。これらの結果から、WT1 - f r g 2 (配列番号61)をWT1抗原ペプチドとして用いるELISAにより、患者血清中の抗WT1<sub>235</sub>IgG抗体レベルを測定できることが示された。

【0097】

10

### (II) WK235 - 243 (配列番号62)またはWT237 - 243 (配列番号63)を用いた抗体価の測定

これらのペプチドを抗原として用いた場合も、抗WT1<sub>235</sub>IgG抗体価の上昇が検出された(図19)。また、上述の実施例で用いられたWT1 - 235ペプチド(WT235 - 243)を抗原として用いた場合と、同様の結果が示された。これらの結果から、WK235 - 243 (配列番号62)またはWT237 - 243 (配列番号63)をWT1抗原ペプチドとして用いるELISAにより、患者血清中の抗WT1<sub>235</sub>IgG抗体レベルを測定できることが示された。

【実施例8】

【0098】

20

### 変異型WT1抗原ペプチドを用いた抗WT1<sub>126</sub>ペプチドIgG抗体の測定(図20)

本発明者らは、変異型WT1抗原ペプチドを用いても抗WT1<sub>126</sub>ペプチドIgG抗体の測定が可能であるかを確認するため、以下の検討を行った。

【0099】

#### 1. 材料および方法

##### 1-1 血清

WT1<sub>126</sub>ペプチドと抗癌剤の併用療法を受けた膵臓癌患者から、ワクチン投与前、投与後7ヶ月目に、血清検体を得た。血清検体は測定まで-20で保管した。

【0100】

##### 1-2 変異WT1抗原ペプチドの作製

30

以下の表に示される変異型WT1抗原ペプチドを作製した。

【表 4 - 1】

変異型 WT1抗原ペプチド	アミノ酸配列	アミノ酸長	配列番号	特徴
WT1-frg1	MGSDVRLNALLPAVPSLGGG GGCALPVSGAAQWAPVLDLDFAP PGASAYGSLGGPAPPAPPPPPPP PPPHSFIKQEPSWGGAEPHEEQ CLSAFTVHFGSQFTGTAGACRY GPFGPPPSQASSGQ <b>RMFPN</b> <b>APYLP</b> SCLESQPAIRNQGYSTV TFDGTPSYGHTPSHHAAQFPNH SFKHEDPM	182	64	投与したWT1 <sub>126</sub> ペプチドの全長を含む鎖ペプチド
WT118-135 (WT1-118)	SQASSGQ <b>RMFPNAPYLP</b>	18	20	投与したWT1 <sub>126</sub> ペプチドの全長を含むペプチド
WT126-134	<b>RMFPNAPYL</b>	9	65	投与したWT1 <sub>126</sub> ペプチドの全長からなるペプチド
WK126-134	<b>RMFPNAPYK</b>	9	66	投与したWT1 <sub>126</sub> ペプチドの全長(9番目のアミノ酸をLからKに置換)からなるペプチド

10

20

30

40

【表 4 - 2】

変異型	アミノ酸配列	アミノ酸長	配列番号	特徴
WT1抗原ペプチド				
WT128-134	FPNAPYL	7	67	投与したWT1126ペプチドの一部(3-9番目のアミノ酸)を含むペプチド
WT126-132	RMFPNAP	7	68	投与したWT1126ペプチドの一部(1-7番目のアミノ酸)を含むペプチド
WT129-134	PNAPYL	6	69	投与したWT1126ペプチドの一部(4-9番目のアミノ酸)を含むペプチド
WT126-131	RMFPNA	6	70	投与したWT1126ペプチドの一部(1-6番目のアミノ酸)を含むペプチド
WT126-130	RMFPN	5	71	投与したWT1126ペプチドの一部(1-5番目のアミノ酸)を含むペプチド

投与したWT1ペプチドワクチン	アミノ酸配列	アミノ酸長	配列番号
WT1126ペプチド	RMFPNAPYL	9	4

WT126-134(配列番号65)、WK126-134(配列番号66)、WT128-134(配列番号67)、WT126-132(配列番号68)、WT129-134(配列番号69)、WT126-131(配列番号70)およびWT126-130(配列番号71)は、GL Biochemにて合成した。WT1-frg1(配列番号64)は、上述したWT1-frg3(配列番号57)と同様の方法により作製した。

## 【0101】

## 1-3 抗体価の測定

WT1-frg1(配列番号64)を用いた抗体価の測定は、上述したWT1-frg3(配列番号57)と同様の方法により行った。WT126-134(配列番号65)、

10

20

30

40

50

W K 1 2 6 - 1 3 4 ( 配列番号 6 6 )、W T 1 2 8 - 1 3 4 ( 配列番号 6 7 )、W T 1 2 6 - 1 3 2 ( 配列番号 6 8 )、W T 1 2 9 - 1 3 4 ( 配列番号 6 9 )、W T 1 2 6 - 1 3 1 ( 配列番号 7 0 ) または W T 1 2 6 - 1 3 0 ( 配列番号 7 1 ) を用いた抗体価の測定は、上述した W T 3 3 2 - 3 4 7 ( 配列番号 5 8 ) 等と同様の方法により行った。

【 0 1 0 2 】

2 . 結果

( I ) W T 1 - f r g 1 ( 配列番号 6 4 ) を用いた抗体価の測定

W T 1 - f r g 1 ( 配列番号 6 4 ) を抗原とし、W T 1<sub>1 2 6</sub> ペプチドを投与された患者における抗 W T 1<sub>1 2 6</sub> I g G 抗体価を E L I S A により測定した。その結果、ワクチン投与後に抗 W T 1<sub>1 2 6</sub> I g G 抗体価の上昇が検出された ( 図 2 0 )。これらの結果から、W T 1 - f r g 1 ( 配列番号 6 4 ) を W T 1 抗原ペプチドとして用いる E L I S A により、患者血清中の抗 W T 1<sub>1 2 6</sub> I g G 抗体レベルを測定できることが示された。

10

【 0 1 0 3 】

( I I ) W T 1 2 6 - 1 3 4 ( 配列番号 6 5 )、W K 1 2 6 - 1 3 4 ( 配列番号 6 6 )、W T 1 2 8 - 1 3 4 ( 配列番号 6 7 )、W T 1 2 6 - 1 3 2 ( 配列番号 6 8 )、W T 1 2 9 - 1 3 4 ( 配列番号 6 9 )、W T 1 2 6 - 1 3 1 ( 配列番号 7 0 ) または W T 1 2 6 - 1 3 0 ( 配列番号 7 1 ) を用いた抗体価の測定

これらのペプチドを抗原として用いた場合も、ワクチン投与後に抗 W T 1<sub>1 2 6</sub> I g G 抗体価の上昇が検出された ( 図 2 0 )。これらの結果から、上記ペプチドを W T 1 抗原ペプチドとして用いる E L I S A により、患者血清中の抗 W T 1<sub>1 2 6</sub> I g G 抗体レベルを測定できることが示された。

20

【 0 1 0 4 】

以上より、W T 1 ペプチドワクチン投与後に、投与された W T 1 ペプチドワクチンに対応する W T 1 抗原ペプチドを用いて抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 抗体の抗体価を測定することで、W T 1 ワクチン療法の臨床効果を予測することが可能であることが示された。また、I g G 抗体をサブクラス ( I g G 1、I g G 3 および I g G 4 ) 別に測定することで、より精度の高い予測が可能であることが示された。また、変異型 W T 1 抗原ペプチドを用いても抗 W T 1 抗原ペプチド I g G 抗体の抗体価を測定することができ、同様に、W T 1 ワクチン療法の臨床効果を予測することが可能であることが示された。

30

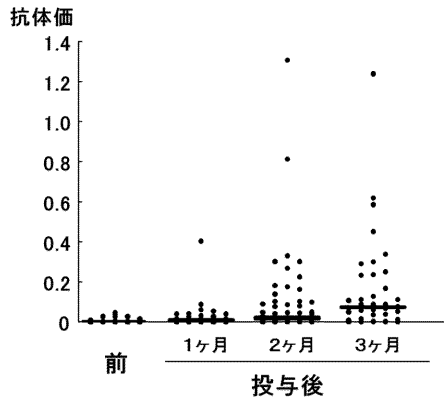
【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 0 5 】

本発明によれば、W T 1 ワクチン療法における臨床効果を予測する、より精度の高い予測方法の提供が可能になる。被験体における抗 W T 1 抗原ペプチド抗体を測定し、その値を指標とすることで、より精度の高い予測を行うことができる。したがって、本発明は、W T 1 関連疾患患者に対する W T 1 ワクチン療法の是非についての検査、その臨床効果の予測において利用可能である。

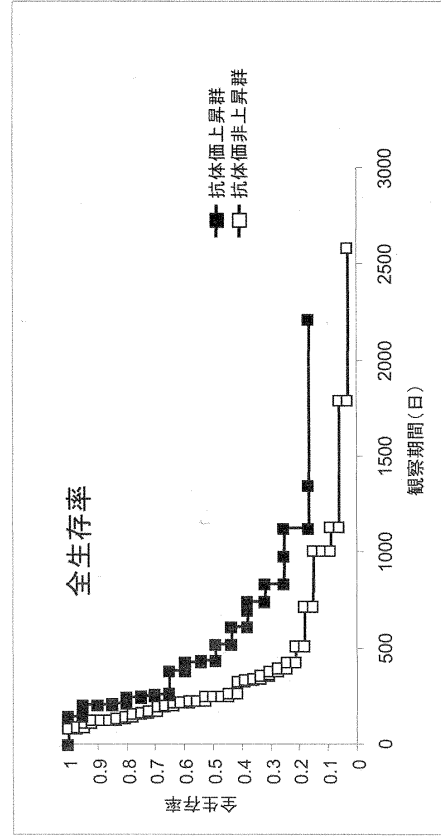
【 図 1 】

抗WT1-235ペプチドIgG抗体



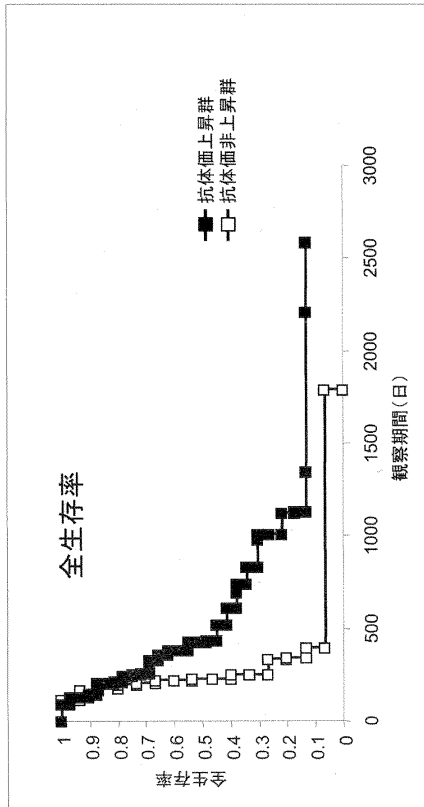
【 図 2 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 8-9週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と全生存率



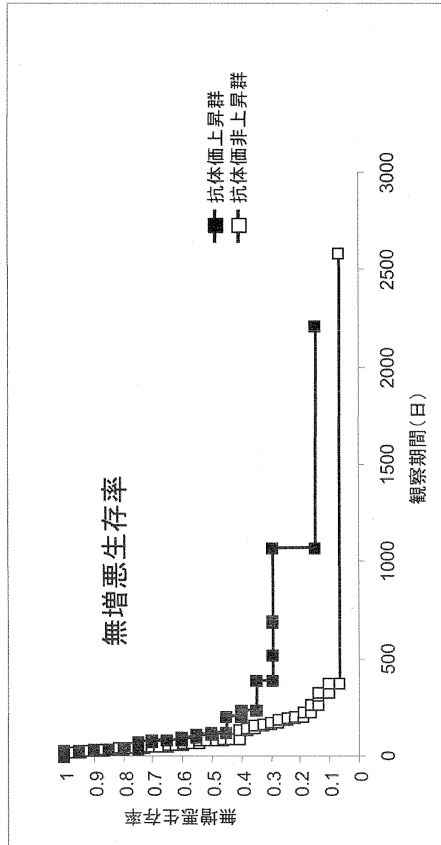
【 図 3 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と全生存率



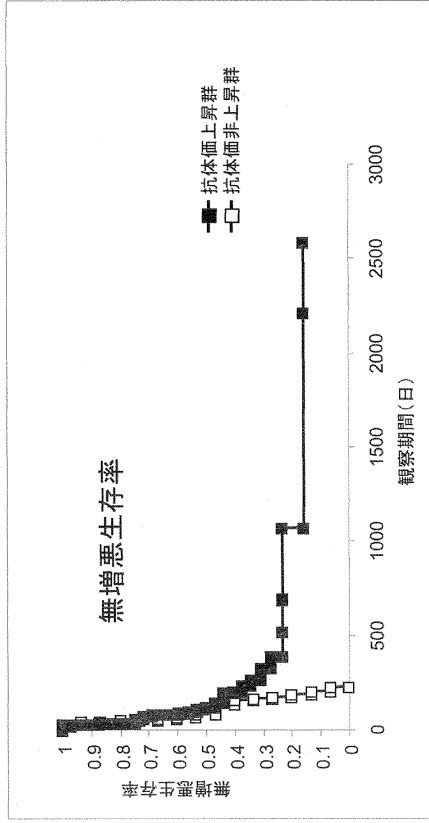
【 図 4 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 8-9週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇と無増悪生存率



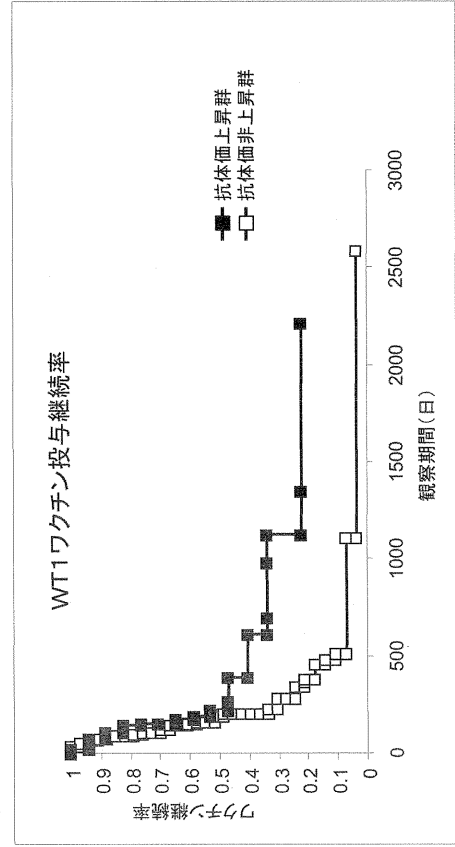
【 図 5 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇  
と無増悪生存率



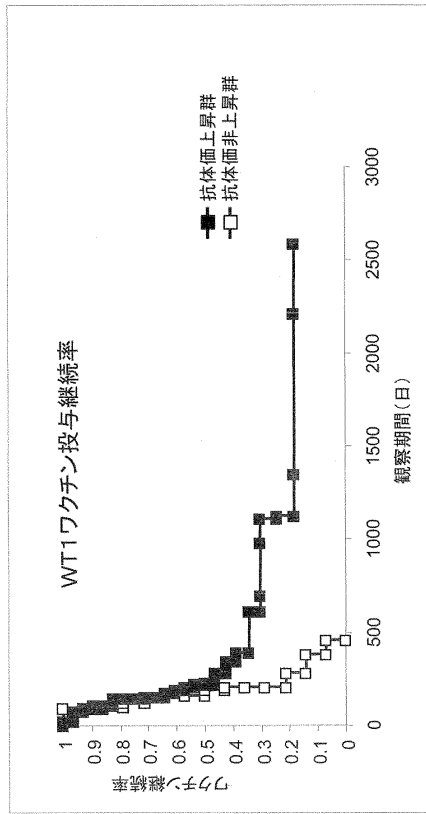
【 図 6 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 8-9週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇  
とWT1ワクチン投与継続率



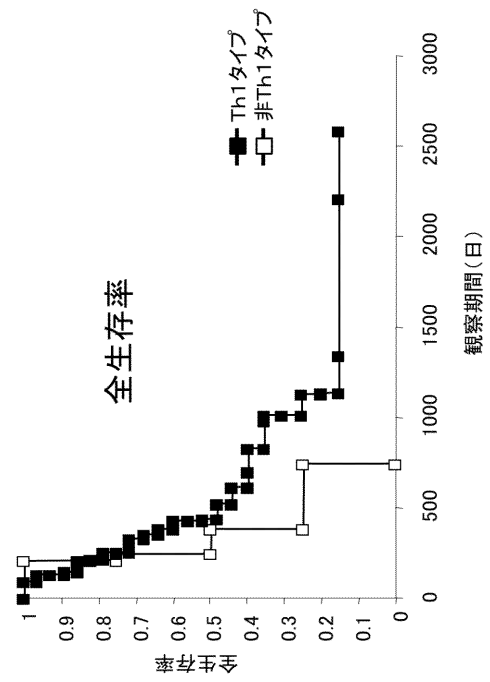
【 図 7 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体価の上昇  
とWT1ワクチン投与継続率



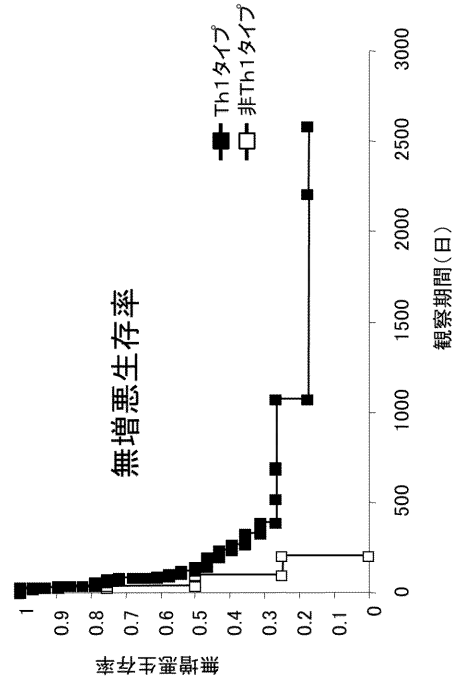
【 図 8 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体  
のタイプ(Th1/非Th1)と全生存率



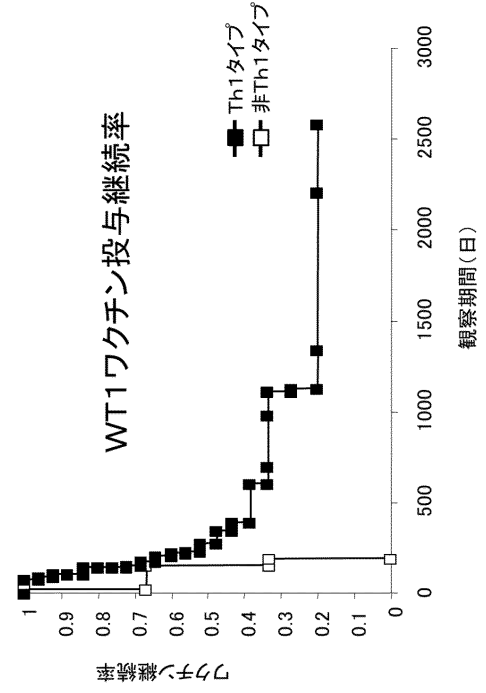
【 図 9 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体のタイプ(Th1/非Th1)と無増悪生存率



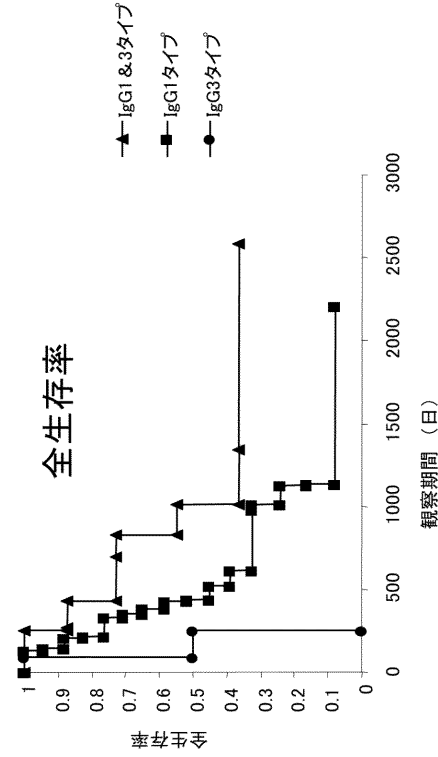
【 図 10 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgG抗体のタイプ(Th1/非Th1)とWT1ワクチン投与継続率



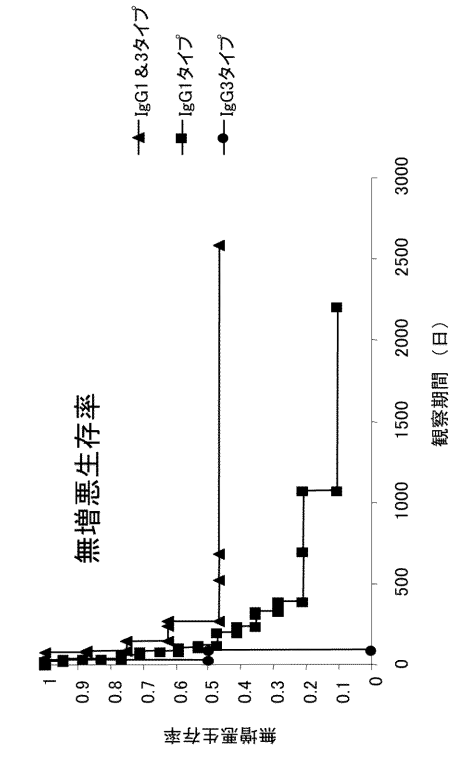
【 図 11 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgGサブクラス抗体価の上昇と全生存率



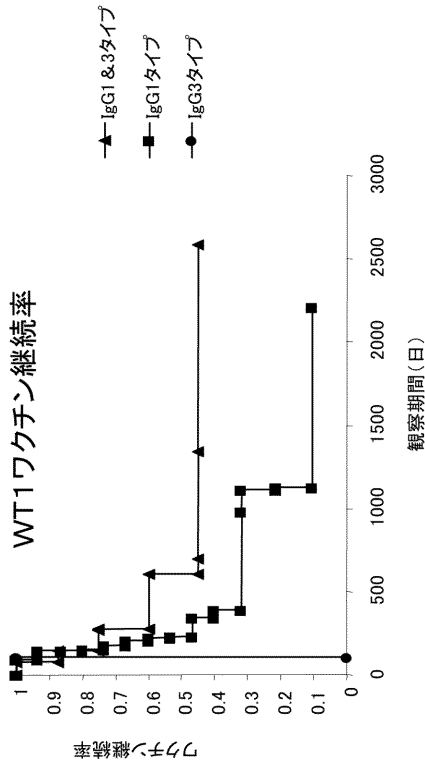
【 図 12 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgGサブクラス抗体価の上昇と無増悪生存率



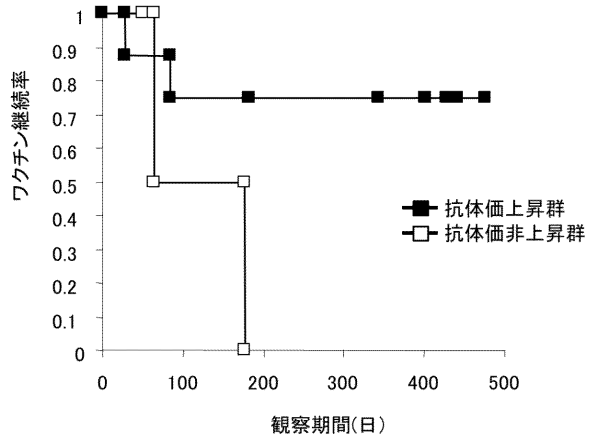
【 図 1 3 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチドIgGサブクラス抗体価の上昇とWT1ワクチン継続率



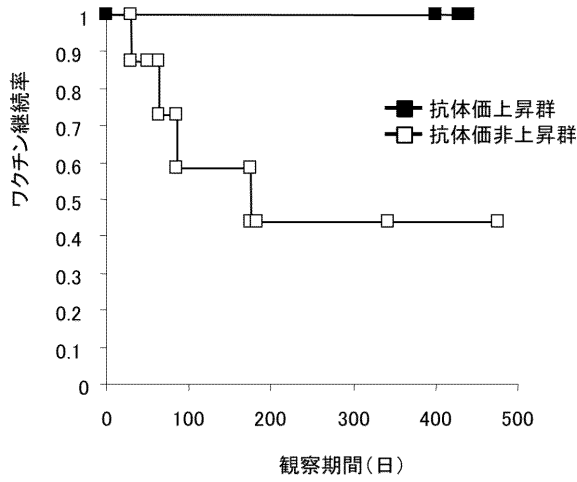
【 図 1 4 】

抗WT1-235ペプチドIgG抗体価 4-8週



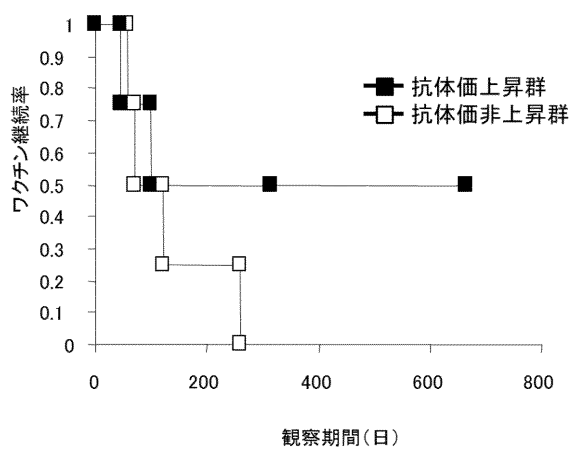
【 図 1 5 】

抗WT1-325ペプチドIgG抗体価 4-8週



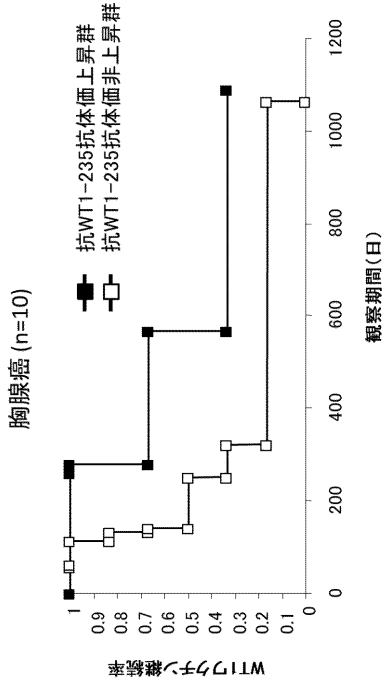
【 図 1 6 】

抗WT1-325ペプチドIgG抗体価 12-14週後



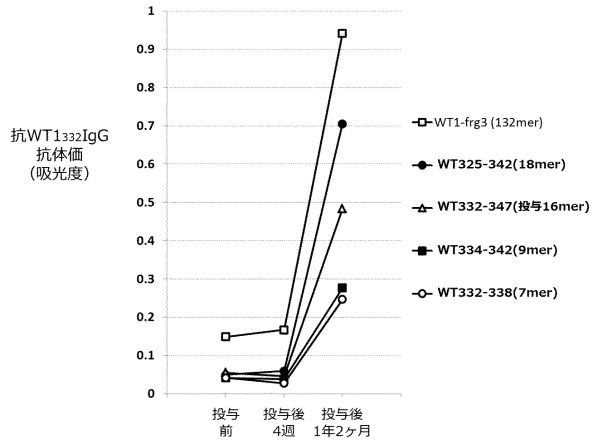
【 図 1 7 】

WT1<sub>235</sub>ペプチド投与 12-14週後の抗WT1-235ペプチド抗体価の上昇とWT1ワクチン継続率



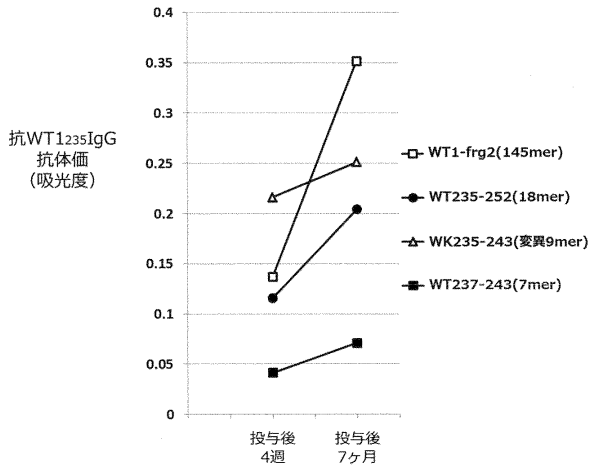
【 図 1 8 】

WT1<sub>332</sub>ペプチドワクチンの投与を受けた悪性神経膠腫患者における抗体価の変化



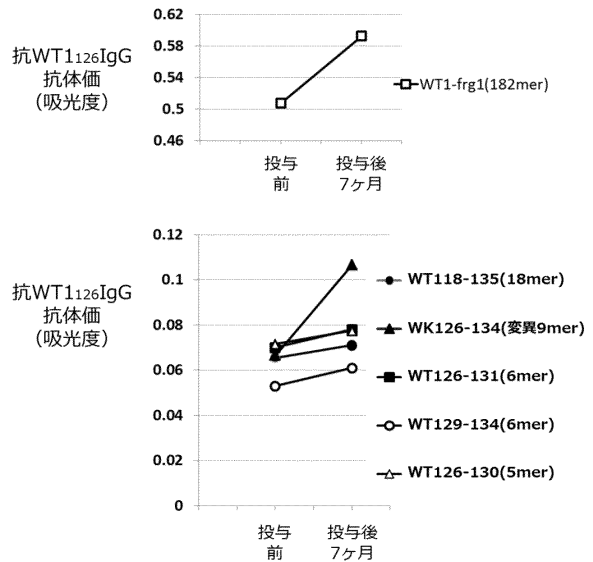
【 図 1 9 】

WT1<sub>235</sub>ペプチドワクチンの投与を受けた胸腺悪性腫瘍患者における抗体価の変化



【 図 2 0 】

WT1<sub>126</sub>ペプチドワクチンと抗癌剤の併用療法を受けた膵臓癌患者における抗体価の変化



【配列表】

0006634287000001.app

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 0 7 K 7/08 (2006.01) C 0 7 K 7/08

(56) 参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 9 1 6 6 ( W O , A 1 )  
特開 2 0 0 6 - 2 6 7 1 2 4 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 2 6 1 0 ( W O , A 1 )  
国際公開第 2 0 1 2 / 1 7 6 8 7 9 ( W O , A 1 )  
WU, F et al. , Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product  
in the patients with hematopoietic malignancies , Leukemia , 2 0 0 5 年 2 月 , 19(2) , 2  
68-274

(58) 調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 7 7  
C A / B I O S I S / M E D L I N E ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	预测免疫疗法的临床疗效		
公开(公告)号	<a href="#">JP6634287B2</a>	公开(公告)日	2020-01-22
申请号	JP2015517076	申请日	2014-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社癌免疫研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社癌免疫研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社癌免疫研究所		
[标]发明人	杉山治夫 尾路祐介		
发明人	杉山 治夫 尾路 祐介		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/82 C07K7/08		
CPC分类号	C07K14/4748 G01N33/57407 G01N2500/00 G01N33/57496 G01N2333/47		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N A61K39/00.H A61P35/00 A61P35/02 C07K14/82 C07K7/08		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2013101566 2013-05-13 JP		
其他公开文献	JPWO2014185387A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

提供了一种预测WT1肽免疫疗法对受试者的临床效果的方法，所述方法包括：a) 使源自受试者的样品与WT1抗原肽或其变体接触的步骤；b) 检测样品与WT1抗原肽或其变体的结合并因此测量样品中存在的抗WT1抗原肽IgG抗体滴度的步骤，其特征在于抗WT1抗原肽IgG增加 受试者中的抗体滴度决定了良好的临床效果。还提供了用于执行根据本发明的方法的试剂盒，所述试剂盒包含WT1抗原肽或其变体。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6634287号 (P6634287)
(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)	(24) 登録日 令和1年12月20日(2019.12.20)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A N	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C O 7 K 14/82 (2006.01)	C O 7 K 14/82	
請求項の数 14 (全 35 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-517076(P2015-517076)	(73) 特許権者 505443853 株式会社癌免疫研究所 大阪府吹田市江の木町1-3番9号	
(86) (22) 出願日 平成26年5月12日(2014.5.12)	(74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄	
(88) 国際出願番号 PCT/JP2014/062630	(74) 代理人 100084146 弁理士 山崎 宏	
(87) 国際公開番号 W02014/185387	(74) 代理人 100122301 弁理士 富田 憲史	
(87) 国際公開日 平成26年11月20日(2014.11.20)	(72) 発明者 杉山 治夫 大阪府箕面市船場西2-19-30	
審査請求日 平成28年11月7日(2016.11.7)	(72) 発明者 尾路 祐介 大阪府豊中市玉井町1-5-24	
(31) 優先権主張番号 特願2013-101566(P2013-101566)	審査官 大瀧 真理	
(32) 優先日 平成25年5月13日(2013.5.13)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 免疫療法の臨床効果の予測法