

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-172716

(P2013-172716A)

(43) 公開日 平成25年9月5日(2013.9.5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 07 K 14/705 (2006.01)	C 07 K 14/705	4 B 0 5 0
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68 A	4 B 0 6 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 47 O L (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-41406 (P2013-41406)
 (22) 出願日 平成25年3月4日 (2013.3.4)
 (62) 分割の表示 特願2012-213517 (P2012-213517)
 原出願日 平成15年3月12日 (2003.3.12)
 (31) 優先権主張番号 102 11 088.3
 (32) 優先日 平成14年3月13日 (2002.3.13)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(71) 出願人 504346260
 ガニメド ファーマシューティカルズ ア
 ーゲー
 ドイツ連邦共和国 55131 マインツ
 、フライリヒラートシュトラーゼ 12
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 ザビン, ウグール
 ドイツ連邦共和国 55116 マインツ
 、フィリップ フォン ザバーン ブラッ
 ツ 1
 (72) 発明者 ティレチ, エズレム
 ドイツ連邦共和国 55116 マインツ
 、フィリップ フォン ザバーン ブラッ
 ツ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍において示差的に発現される遺伝子産物およびこの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】腫瘍関連抗原、これらをコードする核酸または腫瘍関連抗原に対する抗体、療法および診断方法の提供。

【解決手段】腫瘍関連抗原は特定の配列を含む核酸、核酸によりコードされた特定のアミノ酸配列を有する。核酸および遺伝子産物は、腫瘍細胞に関連して発現され、既知の遺伝子の変化したスプライシング(スプライスバリエント)または代替のオープンリーディングフレームを用いての変化した翻訳により產生される。療法および/または診断のための好ましい疾患は、本発明において同定された1種または2種以上の腫瘍関連抗原が、選択的に発現しているか、または異常に発現しているものである。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

医薬組成物であって、腫瘍関連抗原の発現または活性を阻害する剤を含み、前記腫瘍関連抗原が：

- (a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、
- (b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、
- (c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および
- (d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記医薬組成物。

10

【請求項 2】

医薬組成物であって、腫瘍阻害活性を有し、腫瘍関連抗原を発現するか、または異常に発現する細胞に対して選択性である剤を含み、前記腫瘍関連抗原が、

- (a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

20

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記医薬組成物。

【請求項 3】

剤が、細胞死の誘発、細胞増殖の減少、細胞膜への損傷またはサイトカインの分泌を生じる、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

剤が、腫瘍関連抗原をコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

剤が、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 6】

剤が、腫瘍関連抗原に選択的に結合する補体活性化抗体である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

医薬組成物であって、投与された際に、HLA 分子と、腫瘍関連抗原またはこの一部との間の複合体の量を選択的に増大させる剤を含み、前記腫瘍関連抗原が：

- (a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

40

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記医薬組成物。

【請求項 8】

剤が：

(i) 肿瘍関連抗原またはこの一部、

(ii) 肿瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸、

(iii) 肿瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞、および

(iv) 肿瘍関連抗原またはこの一部と HLA 分子との間の単離された複合体

からなる群から選択された 1 種または 2 種以上の成分を含む、請求項 7 に記載の医薬組成

50

物。

【請求項 9】

剤が、各々の場合において、異なる腫瘍関連抗原の発現または活性を選択的に阻害し、各々の場合において、異なる腫瘍関連抗原を発現する細胞に選択的であり、または HLA 分子と異なる腫瘍関連抗原またはこの一部との間の複合体の量を増大させる、2種または3種以上の剤を含み、前記腫瘍関連抗原の少なくとも1種が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、請求項1、2または7に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

医薬組成物であつて：

(i) 腫瘍関連抗原またはこの一部、

(ii) 腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸、

(iii) 腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する抗体、

(iv) 腫瘍関連抗原をコードする核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸、

(v) 腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞、および

(vi) 腫瘍関連抗原またはこの一部と HLA 分子との間の単離された複合体

からなる群から選択された1種または2種以上の成分を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記医薬組成物。

【請求項 11】

(i) の核酸が、発現ベクター中に存在する、請求項8または10に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

(i) の核酸が、プロモーターに機能的に結合している、請求項8または10に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

宿主細胞が、腫瘍関連抗原またはこの一部を分泌する、請求項8または10に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

宿主細胞が、さらに、腫瘍関連抗原またはこの一部に結合するHLA分子を発現する、請求項8または10に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

宿主細胞が、HLA分子および/または腫瘍関連抗原またはこの一部を、組み換え方式で発現する、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

宿主細胞が HLA 分子を内在性に発現する、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

宿主細胞が抗原提示細胞である、請求項8、10、14または16に記載の医薬組成物

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 8】

抗原提示細胞が、樹状細胞またはマクロファージである、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

宿主細胞が非増殖性である、請求項 8、10 および 13 ~ 18 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 5 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

抗体がキメラまたはヒト化抗体である、請求項 5 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

抗体が天然の抗体のフラグメントである、請求項 5 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

抗体が治療剤または診断剤に結合している、請求項 5 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

アンチセンス核酸が、腫瘍関連抗原をコードする核酸の 6 ~ 50 の近接するヌクレオチドの配列を含む、請求項 4 または 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

前記医薬組成物により提供された、腫瘍関連抗原またはこの一部が、異常な量の前記腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する細胞の表面上の MHC 分子に結合している、請求項 8 および 10 ~ 13 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

結合が、細胞溶解反応を生じ、および / またはサイトカイン放出を誘発する、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

さらに、薬学的に許容し得る担体および / またはアジュバントを含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

アジュバントが、サポニン、GM-CSF、CpG、サイトカインまたはケモカインである、請求項 2 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患の処置に用いることができる、請求項 1 ~ 2 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

疾患が癌である、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

疾患が、肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、黒色腫、大腸腫瘍、大腸腫瘍の転移、腎臓細胞癌腫または子宮頸癌腫、大腸癌腫または乳房癌腫である、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

腫瘍関連抗原が、配列番号：6 ~ 13、14 ~ 18、22 ~ 24、30、34 ~ 36、38、41、58 ~ 61、64、65、71、75、80 ~ 84、89 ~ 100 からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 3 3】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を診断する方法であつて、この方法が、

(i) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする核酸の検出、および / または

(i i) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部の検出、および / または

10

20

30

40

50

(i i i) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部に対する抗体の検出、および／または
 (i v) 患者から単離された生物学的試料中の腫瘍関連抗原またはこの一部に特異的な、細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球の検出

を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

10

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

【請求項 3 4】

検出が、

(i) 生物学的試料を、腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸、腫瘍関連抗原もしくはこの一部、抗体または細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球に特異的に結合する剤と接触させること、および

(i i) この剤と、核酸またはこの一部、腫瘍関連抗原またはこの一部、抗体または細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球との間の複合体の形成を検出することを含む、請求項 3 3 に記載の方法。

20

【請求項 3 5】
 検出を、相当する正常な生物学的試料における検出と比較する、請求項 3 3 または 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

疾患を、2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけ、検出が、前記2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする2種もしくは3種以上の核酸の検出、2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原もしくはこの一部の検出、前記2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原もしくはこの一部に結合する2種もしくは3種以上の抗体の検出または前記2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原に特異的な2種もしくは3種以上の細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球の検出を含む、請求項 3 3 ～ 3 5 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 3 7】

核酸またはこの一部を、前記核酸またはこの前記一部に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを用いて検出する、請求項 3 3 ～ 3 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

ポリヌクレオチドプローブが、腫瘍関連抗原をコードする核酸の6～50の近接する又クレオチドの配列を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

核酸またはこの一部を、前記核酸またはこの前記一部を選択的に増幅することにより検出する、請求項 3 3 ～ 3 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

検出するべき腫瘍関連抗原またはこの一部が、MHC分子との複合体中にある、請求項 3 3 ～ 3 6 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 4 1】

MHC分子がHLA分子である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

腫瘍関連抗原またはこの一部を、前記腫瘍関連抗原またはこの前記一部に特異的に結合する抗体を用いて検出する、請求項 3 3 ～ 3 6 および 4 0 ～ 4 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 3】

抗体を、前記抗体に特異的に結合するタンパク質またはペプチドを用いて検出する、請

50

求項 33～36 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患の退行、経過または発症を決定する方法であって、該方法が、前記疾患を患っているか、または前記疾患に罹患していることが疑われる患者からの試料を：

(i) 腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸の量、

(ii) 腫瘍関連抗原またはこの一部の量、

(iii) 腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する抗体の量、および

(iv) 腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との間の複合体に特異的な細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞の量

10

からなる群から選択された1種または2種以上のパラメーターに関してモニタリングすることを含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

20

【請求項 45】

第1の時点における第1の試料および第2の時点におけるさらなる試料におけるパラメーター(1または2以上)を決定することを含み、疾患の経過を、前記の2種の試料を比較することにより決定する、請求項44に記載の方法。

【請求項 46】

疾患を、2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけ、モニタリングが、

(i) 前記2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする2種または3種以上の核酸の量、

(ii) 前記2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部の量、

(iii) 前記2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する2種または3種以上の抗体の量、および／または

(iv) 前記2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との間の複合体に特異的な、2種または3種以上の細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞の量

30

をモニタリングすることを含む、請求項44または45に記載の方法。

【請求項 47】

核酸またはこの一部の量を、前記核酸またはこの前記一部に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを用いてモニタリングする、請求項44～46のいずれかに記載の方法。

【請求項 48】

ポリヌクレオチドプローブが、腫瘍関連抗原をコードする核酸の6～50の近接するヌクレオチドの配列を含む、請求項47に記載の方法。

40

【請求項 49】

核酸またはこの一部の量を、前記核酸またはこの前記一部を選択的に増幅することによりモニタリングする、請求項44～46のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

腫瘍関連抗原またはこの一部の量を、前記腫瘍関連抗原またはこの前記一部に特異的に結合する抗体を用いてモニタリングする、請求項44～46のいずれかに記載の方法。

【請求項 51】

抗体の量を、抗体に特異的に結合するタンパク質またはペプチドを用いてモニタリング

50

する、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞溶解性またはサイトカイン放出性 T 細胞の量を、腫瘍関連抗原またはこの一部と MHC 分子との間の複合体を提示する細胞を用いてモニタリングする、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 3】

ポリスクリオチドプローブ、抗体、タンパク質またはペプチドまたは細胞を、検出可能な方式で標識する、請求項 3 7 ~ 3 8 、 4 2 ~ 4 3 、 4 7 ~ 4 8 および 5 0 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

検出可能なマーカーが、放射活性マーカーまたは酵素的マーカーである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

試料が、体液および / または体組織を含む、請求項 3 3 ~ 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患の処置方法であって、該方法が、請求項 1 ~ 3 2 のいずれかに記載の医薬組成物を投与することを含み、前記腫瘍関連抗原が :

(a) 配列番号 : 1 ~ 5 、 1 9 ~ 2 1 、 2 9 、 3 1 ~ 3 3 、 3 7 、 3 9 、 4 0 、 5 4 ~ 5 7 、 6 2 、 6 3 、 7 0 、 7 4 、 8 5 ~ 8 8 からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a) または (b) の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a) 、 (b) または (c) の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

【請求項 5 7】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を処置し、診断し、またはモニタリングする方法であって、該方法が、前記腫瘍関連抗原またはこの一部に結合し、治療剤または診断剤と結合した抗体を投与することを含み、前記腫瘍関連抗原が :

(a) 配列番号 : 1 ~ 5 、 1 9 ~ 2 1 、 2 9 、 3 1 ~ 3 3 、 3 7 、 3 9 、 4 0 、 5 4 ~ 5 7 、 6 2 、 6 3 、 7 0 、 7 4 、 8 5 ~ 8 8 からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a) または (b) の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a) 、 (b) または (c) の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

【請求項 5 8】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 4 2 、 5 0 または 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

抗体がキメラまたはヒト化抗体である、請求項 4 2 、 5 0 または 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

抗体が天然の抗体のフラグメントである、請求項 4 2 、 5 0 または 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を患っている患者を処置する方法であって、該方法が :

(i) 免疫反応性細胞を含む試料を前記患者から採取すること、

(i i) 前記試料を、前記腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞と、前記腫瘍関連抗原またはこの一部に対して、細胞溶解性またはサイトカイン放出性 T 細胞の產生を好む条件下で接触させること、および

10

20

30

40

50

(i i i) 細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞を、患者中に、腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する細胞を溶解するのに適する量で導入することを含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

10

【請求項62】

宿主細胞が、腫瘍関連抗原またはこの一部に結合するHLA分子を組み換えるに発現する、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

宿主細胞が、腫瘍関連抗原またはこの一部に結合するHLA分子を内在性に発現する、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を患っている患者を処置する方法であって、該方法が：

(i) 前記疾患と関連する細胞により発現された核酸を同定し、前記核酸が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択されていること、

(i i) 宿主細胞を、前記核酸またはこの一部をトランスフェクトすること、

(i i i) トランスフェクトした宿主細胞を、前記核酸の発現のために培養すること、および

(i v) 宿主細胞またはこの抽出液を、患者に、疾患に関連する患者の細胞に対する免疫応答を増大させるのに適する量で導入すること

を含む、前記方法。

30

【請求項65】

さらに、腫瘍関連抗原またはこの一部を提示するMHC分子を同定することを含み、宿主細胞が、同定されたMHC分子を発現し、腫瘍関連抗原またはこの一部を提示する、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

免疫応答が、B細胞応答またはT細胞応答を含む、請求項64または65に記載の方法。

40

【請求項67】

免疫応答が、腫瘍関連抗原もしくはこの一部を提示する宿主細胞に特異的な、または腫瘍関連抗原もしくはこの一部を発現する患者の細胞に特異的な、細胞溶解性もしくはサイトカイン放出性T細胞の產生を含むT細胞応答である、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

宿主細胞が非増殖性である、請求項61～67のいずれかに記載の方法。

【請求項69】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を処置する方法であって、該方法が：

(i) 異常な量の腫瘍関連抗原を発現する細胞を患者から同定すること、

50

(i i) 前記細胞の試料を単離すること、
 (i i i) 前記細胞を培養すること、および
 (i v) 前記細胞を患者中に、細胞に対する免疫応答を誘発するのに適する量で導入することを含み、前記腫瘍関連抗原が：
 (a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、
 (b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、
 (c) (a) または(b) の核酸に対して縮重している核酸、および
 (d) (a)、(b) または(c) の核酸に相補的な核酸
 からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。
 10

【請求項 7 0】

疾患が癌である、請求項33～69のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 1】

患者における癌の進行を阻害する方法であって、該方法が、請求項1～32のいずれかに記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 7 2】

腫瘍関連抗原が、配列番号：6～13、14～18、22～24、30、34～36、38、41、58～61、64、65、71、75、80～84、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項33～71のいずれかに記載の方法。
 20

【請求項 7 3】

核酸であつて：

(a) 配列番号：2～5、20～21、31～33、37、39、54～57、62、63、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、
 (b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、
 (c) (a) または(b) の核酸に対して縮重している核酸、および
 (d) (a)、(b) または(c) の核酸に相補的な核酸
 からなる群から選択されている、前記核酸。

【請求項 7 4】

核酸であつて、配列番号：7～13、14～18、23～24、34～36、58～61、64、65、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含むタンパク質またはポリペプチドをコードする、前記核酸。
 30

【請求項 7 5】

請求項73または74に記載の核酸を含む、組み換えDNAまたはRNA分子。

【請求項 7 6】

ベクターである、請求項75に記載の組み換えDNA分子。

【請求項 7 7】

ベクターが、ウイルスベクターまたはバクテリオファージである、請求項76に記載の組み換えDNA分子。
 40

【請求項 7 8】

さらに、核酸の発現を制御する発現制御配列を含む、請求項75～77のいずれかに記載の組み換えDNA分子。

【請求項 7 9】

発現制御配列が、核酸と相同性、または非相同性である、請求項78に記載の組み換えDNA分子。

【請求項 8 0】

宿主細胞であつて、請求項73もしくは74に記載の核酸または請求項75～79のいずれかに記載の組み換えDNA分子を含む、前記宿主細胞。

【請求項 8 1】

10

20

30

40

50

さらに、H L A 分子をコードする核酸を含む、請求項 8 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 2】

請求項 7 3 に記載の核酸によりコードされた、タンパク質またはポリペプチド。

【請求項 8 3】

配列番号：7 ~ 1 3、1 4 ~ 1 8、2 3 ~ 2 4、3 4 ~ 3 6、5 8 ~ 6 1、6 4、6 5、8 9 ~ 1 0 0 からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、タンパク質またはポリペプチド。

【請求項 8 4】

請求項 8 2 または 8 3 に記載のタンパク質またはポリペプチドの、免疫原性フラグメント。

10

【請求項 8 5】

ヒト H L A レセプターまたはヒト抗体に結合する、請求項 8 2 または 8 3 に記載のタンパク質またはポリペプチドのフラグメント。

【請求項 8 6】

剤であって、タンパク質もしくはポリペプチドまたはこの一部に特異的に結合し、前記タンパク質またはポリペプチドが：

(a) 配列番号：1 ~ 5、1 9 ~ 2 1、2 9、3 1 ~ 3 3、3 7、3 9、4 0、5 4 ~ 5 7、6 2、6 3、7 0、7 4、8 5 ~ 8 8 からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

20

(c) (a) または (b) の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b) または (c) の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされている、前記剤。

【請求項 8 7】

タンパク質またはポリペプチドが、配列番号：6 ~ 1 3、1 4 ~ 1 8、2 2 ~ 2 4、3 0、3 4 ~ 3 6、3 8、4 1、5 8 ~ 6 1、6 4、6 5、7 1、7 5、8 0 ~ 8 4、8 9 ~ 1 0 0 からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項 8 6 に記載の剤。

【請求項 8 8】

抗体である、請求項 8 6 または 8 7 に記載の剤。

30

【請求項 8 9】

抗体が、モノクローナル、キメラもしくはヒト化抗体または抗体のフラグメントである、請求項 8 8 に記載の剤。

【請求項 9 0】

抗体であって：

(i) タンパク質もしくはポリペプチドまたはこの一部および

(i i) 前記タンパク質もしくはポリペプチドまたはこの前記一部が結合する M H C 分子の複合体に選択的に結合し、前記抗体は、(i) または (i i) 単独には結合せず、前記タンパク質またはポリペプチドが：

(a) 配列番号：1 ~ 5、1 9 ~ 2 1、2 9、3 1 ~ 3 3、3 7、3 9、4 0、5 4 ~ 5 7、6 2、6 3、7 0、7 4、8 5 ~ 8 8 からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

40

(b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a) または (b) の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b) または (c) の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされている、前記抗体。

【請求項 9 1】

タンパク質またはポリペプチドが、配列番号：6 ~ 1 3、1 4 ~ 1 8、2 2 ~ 2 4、3 0、3 4 ~ 3 6、3 8、4 1、5 8 ~ 6 1、6 4、6 5、7 1、7 5、8 0 ~ 8 4、8 9 ~ 1 0 0 からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項

50

90に記載の抗体。

【請求項92】

モノクローナル、キメラもしくはヒト化抗体または抗体のフラグメントである、請求項90または91に記載の抗体。

【請求項93】

請求項86～89のいずれかに記載の剤または請求項90～92のいずれかに記載の抗体と、治療剤または診断剤との間の複合体。

【請求項94】

治療剤または診断剤が毒素である、請求項93に記載の複合体。

【請求項95】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現を検出するためのキットであって、このキットが

、
(i) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする核酸、

(ii) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部、

(iii) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部に結合する抗体、および／または

(iv) 腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との間の複合体に特異的なT細胞の検出のための剤を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記キット。

【請求項96】

腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸の検出のための剤が、前記核酸の選択的增幅のための核酸分子である、請求項95に記載のキット。

【請求項97】

核酸の選択的增幅のための核酸分子が、腫瘍関連抗原をコードする核酸の6～50の近接するヌクレオチドの配列を含む、請求項96に記載のキット。

【請求項98】

組み換えDNA分子であって、配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列から由来するプロモーター領域を含む、前記組み換えDNA分子。

【請求項99】

医薬組成物であって、腫瘍抗原TPE、配列番号：19、22の発現または活性を阻害する剤を含む、前記医薬組成物。

【請求項100】

医薬組成物であって、TPEの移動活性および転移活性を阻害する剤を含む、前記医薬組成物。

【請求項101】

抗体である、請求項99または100に記載の剤。

【請求項102】

抗体が、モノクローナル、キメラもしくはヒト化抗体または抗体のフラグメントである、請求項101に記載の剤。

【請求項103】

抗体であって、配列番号81～82の配列を含む細胞外タンパク質領域に結合する、前記抗体。

【請求項104】

TPEをコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である、請

10

20

30

40

40

50

求項 99 または 100 に記載の剤。

【請求項 105】

アンチセンス核酸が、T P T E をコードする核酸の 6 ~ 50 の近接ヌクレオチドの配列を含む、請求項 104 に記載の剤。

【請求項 106】

R N A 干渉 (R N A i) である、請求項 99 または 100 に記載の剤。

【請求項 107】

R N A i が、「ショートヘアピン」構造 (s h R N A) を含む、請求項 106 に記載の剤。

【請求項 108】

s h R N A が、発現ベクターでのトランスフェクションの後の転写により產生される、請求項 107 に記載の剤。

【請求項 109】

s h R N A が、レトロウイルスの転写により產生される、請求項 107 に記載の剤。

【請求項 110】

s h R N A が、レンチウイルス系により媒介される、請求項 107 に記載の剤。

【請求項 111】

小さい化学的分子である、請求項 99 または 100 に記載の剤。

【請求項 112】

小さい化学的分子が、T P T E に結合している、請求項 111 に記載の剤。

【請求項 113】

小さい化学的分子が、配列番号：81 ~ 82 を含む細胞外領域に結合している、請求項 112 に記載の剤。

【請求項 114】

T P T E の発現または異常な発現により特徴づけられる腫瘍の転移を処置、診断またはモニタリングする方法であって、該方法が、T P T E に、またはこの一部に結合し、治療または診断剤に結合する抗体を投与することを含み、前記 T P T E が：

(a) 配列番号：19 を含む核酸配列から選択された核酸、この一部または誘導体、

(b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a) または (b) の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b) または (c) の核酸に相補的な核酸

からなる核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

【請求項 115】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

抗体がキメラまたはヒト化抗体である、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 117】

抗体が天然の抗体のフラグメントである、請求項 114 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

古典的な治療手順の学際的な方法および徹底的な使用にもかかわらず、癌は、尚、死の主要な原因の 1 つである。一層最近の治療的概念は、組み換え腫瘍ワクチンおよび他の特定の手段、例えば抗体療法を用いることにより、患者の免疫系を全体の治療的概念中に導入することを目的としている。このような方策の成功のための必要条件は、エフェクター機能が介入的に増強されるべき患者の免疫系による、腫瘍特異的または腫瘍関連抗原もしくはエピトープの認識である。腫瘍細胞は、起源であるこれらの悪性でない細胞とは、生物学的に実質的に異なる。これらの差異は、腫瘍発育の間に必要とされる遺伝子的变化のためであり、特にまた、癌細胞における定性的または定量的に変化した分子構造の形成をもたらす。

10

20

30

40

50

【0002】

腫瘍保有宿主の特定の免疫系により認識される、この種類の腫瘍関連構造は、腫瘍関連抗原として言及される。腫瘍関連抗原の特異的認識は、2つの機能的に相互連結された単位である細胞性および体液性機構を伴う：C D 4⁺ および C D 8⁺ Tリンパ球は、それぞれ M H C (主要組織適合性複合体) クラス I I および I 分子に提示された、プロセシングされた抗原を認識する一方、Bリンパ球は、プロセシングされていない抗原に直接結合する循環抗体分子を産生する。腫瘍関連抗原の潜在的な臨床的・治療的重要性は、免疫系による腫瘍性細胞における抗原の認識により、細胞障害性エフェクター機構の開始がもたらされ、ヘルパーT細胞の存在下で、癌細胞の消失を生じ得るという事実から起因する(Pardoll, Nat. Med. 4:525-31, 1998)。

10

【0003】

従って、腫瘍免疫学の中心的な目的は、これらの構造を分子的に明らかにすることである。これらの抗原の分子的性質は、長期間にわたり謎であった。適切なクローニング手法の開発の後にのみ、細胞障害性Tリンパ球 (CTL) の標的構造を分析することにより (van der Bruggen et al., Science 254:1643-7, 1991)、またはプローブとして循環自己抗体 (Sahin et al., Curr. Opin. Immunol. 9:709-16, 1997) を用いることにより、腫瘍関連抗原のための腫瘍の cDNA 発現ライブラリーを系統的にスクリーニングすることが可能であった。このために、cNA 発現ライブラリーを、新鮮な腫瘍組織から作成し、好適な系中のタンパク質として組み換えて発現させた。患者から単離された免疫エフェクター (immunoefector)、即ち腫瘍特異的溶解パターンを有する CTL クローニングまたは循環する自己抗体を、それぞれの抗原をクローニングするために用いた。

20

【0004】

近年、多数の抗原が、これらの方法により、種々の腫瘍において明らかにされた。癌 / 精巣抗原 (CTA) の種は、ここでは、大いに興味深い。CTA およびこれらをコードする遺伝子 (癌 / 精巣遺伝子または CTG) は、これらの特徴的発現パターンにより定義される [Tureci et al., Mol Med Today. 3:342-9, 1997]。これらは、精巣および胚細胞を除いて、正常な組織においては見出されず、多くのヒトマリグノーマ (malignoma) において、腫瘍タイプ特異的にではなく、極めて異なる起源の腫瘍実体において異なる頻度で発現している (Chen & Old, Cancer J. Sci. Am. 5:16-7, 1999)。CTA に対する血清反応性はまた、健康な対照においては見出されず、腫瘍患者においてのみ見出される。この種の抗原は、特にこの組織分布により、免疫治療プロジェクトに特に有用であり、現在の臨床的患者研究において試験されている (Marchand et al., Int. J. Cancer 80:219-30, 1999; Knuth et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 46:p46-51, 2000)。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、上記で例示した古典的な方法における抗原同定のために用いられるプローブは、通常はすでに進行した癌を患っている患者からの免疫エフェクター (循環自己抗体または CTL クローニング) である。多くのデータは、腫瘍により、例えば、T細胞の寛容化およびアネルギー化 (anergization) がもたらされ得、疾患の経過の間に、特に有効な免疫認識を生じ得るこれらの特異性が、免疫エフェクターレパートリーから失われることを示している。現在の患者の研究によっては、以前に見出され、用いられた腫瘍関連抗原の真実の作用の確かな証拠が、未だ何も得られていない。従って、自発的な免疫応答を惹起するタンパク質が、誤った標的構造であることは、無視できない。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の目的は、癌の診断および療法のための標的構造を提供することにあった。

本発明において、この目的は、特許請求の範囲の主題により達成される。

【0007】

本発明において、腫瘍に関連して発現される抗原およびこれらをコードする核酸を同定

50

し、提供する方策が、追求された。この方策は、通常は成体の組織において無変化である、実際には精巣および従って胚細胞特異的遺伝子が、腫瘍細胞中で、異所性のおよび禁じられた方式で再活性化されるという事実に基づいている。先ず、データマイニングにより、すべての既知の精巣特異的遺伝子のリストが、可能な限り完全に得られ、これを次に、腫瘍におけるこれらの異常な活性化について、特定の RT - PCR による発現分析により評価する。データマイニングは、腫瘍関連遺伝子を同定する既知の方法である。しかし、慣用の方策において、正常な組織ライブラリーのトランск립トームは、通常、腫瘍組織ライブラリーから電子的に減じられ、残りの遺伝子が腫瘍特異的であることが推測される(Schmitt et al., Nucleic Acids Res. 27:4251-60, 1999; Vasmatzis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:300-4, 1998. Scheurle et al., Cancer Res. 60:4037-43, 2000)。

10

【0008】

しかし、はるかに一層好首尾であることが明らかになった、本発明の概念は、データマイニングをすべての精巣特異的遺伝子を電子的に抽出するために用い、次に前記遺伝子を腫瘍における異所性の発現について評価することに基づいている。

【0009】

従って、本発明は、1つの観点において、腫瘍において示差的に発現される遺伝子を同定するための方策に関する。前述の方策は、公開されている配列ライブラリーのデータマイニング(「インシリコ(in silico)」)をその後実験室実験的(「ウェットベンチ(wet bench)」)試験を評価することと組み合わせる。

20

【0010】

本発明において、2種の異なる生物情報学的スクリプトに基づく、組み合わされた方策により、癌 / 精巣 (CT) 遺伝子群の新たな要素を同定することが可能になった。これらは、以前に、純粋に精巣、胚細胞または精子特異的であると分類されていた。これらの遺伝子が、腫瘍細胞において異常に活性化されるという発見により、これらが、実質的に新たな性質に機能的暗示を付与することが可能になる。本発明において、これらの腫瘍関連遺伝子およびこれによりコードされた遺伝子産物は、免疫原性作用とは独立して、同定され、提供された。

【0011】

本発明により同定された腫瘍関連抗原は、(a)配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、(b)(a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、(c)(a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および(d)(a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸からなる群から選択された核酸によりコードされたアミノ酸配列を有する。好みの態様において、本発明により同定された腫瘍関連抗原は、配列番号：1～5、19～21、29、31～33、37、39、40、54～57、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸によりコードされたアミノ酸配列を有する。他の好みの態様において、本発明により同定された腫瘍関連抗原は、配列番号：6～13、14～18、22～24、30、34～36、38、41、58～61、64、65、71、75、80～84、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む。

30

【0012】

本発明は、一般的に、本発明により同定された腫瘍関連抗原もしくはこの一部、これをコードする核酸または前述のコード核酸に対して用いられる核酸または本発明により同定された腫瘍関連抗原に対する抗体もしくはこの一部の、療法および診断への使用に関する。この使用は、個別のもの、しかしあた2種または3種以上のこれらの抗原、機能的フラグメント、核酸、抗体などの組み合わせ、また1つの態様において他の腫瘍関連遺伝子および診断、療法および進行抑制のための抗原との組み合わせに関してもよい。

40

療法および/または診断のための好みの疾患は、本発明において同定された1種また

50

は2種以上の腫瘍関連抗原が、選択的に発現しているか、または異常に発現しているものである。

【0013】

本発明はまた、腫瘍細胞に関連して発現され、既知の遺伝子の変化したスプライシング（スライスバリエント）または代替のオープンリーディングフレームを用いての変化した翻訳により産生される、核酸および遺伝子産物に関する。前述の核酸は、配列表の（配列番号：2～5、20、21、31～33、54～57、85～88）による配列を含む。さらに、遺伝子産物は、配列表の（配列番号：7～13、23、24、34～36、58～61、89～100）による配列を含む。本発明のスライスバリエントを、本発明において、腫瘍性疾患の診断および療法のための目的として用いることができる。

10

【0014】

極めて異なる機構、例えば
 - 可変転写開始部位の使用、
 - 追加のエクソンの使用、
 - 1つまたは2つまたは3つ以上のエクソンからの完全な、または不完全なスプライシング、
 - 突然変異（新たなドナー／アクセプター配列の欠失または発生）により変化したスライス調節配列、
 - イントロン配列の不完全な除去
 により、スライスバリエントが産生され得る。

20

【0015】

遺伝子の変化したスプライシングにより、変化した転写配列（スライスバリエント）が得られる。この変化した配列の領域におけるスライスバリエントの翻訳の結果、もとのタンパク質とは構造および機能において明確に異なり得る、変化したタンパク質が得られる。腫瘍関連スライスバリエントにより、腫瘍関連転写物および腫瘍関連タンパク質／抗原が産生され得る。これらを、腫瘍細胞の検出、および腫瘍の治療的標的化の両方のための分子マーカーとして用いることができる。例えば血液、血清、骨髄、痰、気管支洗浄、体の分泌物および組織生検における腫瘍細胞の検出を、本発明において、例えばスライスバリエント特異的オリゴヌクレオチドでのPCR増幅による核酸の抽出の後に、実施することができる。本発明において、すべての配列依存的検出システムは、検出に適する。これらは、PCRは別として、例えば遺伝子チップ／マイクロアレイシステム、ノーザンプロット、RNAseプロテクションアッセイ（RDA）および他のものである。

30

【0016】

すべての検出システムは、検出が、少なくとも1種のスライスバリエント特異的核酸配列との特異的なハイブリダイゼーションに基づくという点で共通する。しかし、腫瘍細胞はまた、本発明において、スライスバリエントによりコードされた特定のエピトープを認識する抗体により検出され得る。前述の抗体は、前述のスライスバリエントに特異的な免疫化ペプチドを用いることにより産生され得る。免疫化に好適なのは、特に、エピトープが、好ましくは健康な細胞中で産生される遺伝子産物のバリエント（1種または2種以上）とは明確に異なるアミノ酸である。腫瘍細胞の抗体での検出を、ここでは、患者から単離された試料に対して、または静脈内に投与された抗体での画像化として実施することができる。診断的使用可能性に加えて、新たな、または変化したエピトープを有するスライスバリエントは、免疫療法のための魅力的な標的である。本発明のエピトープを、治療的に活性なモノクローナル抗体またはTリンパ球を標的化するために用いることができる。受動免疫療法において、スライスバリエント特異的エピトープを認識する抗体またはTリンパ球は、ここで養子的に移される。

40

【0017】

他の抗原の場合におけるように、抗体を、また、これらのエピトープを含むポリペプチドを用いた標準的な技術（動物の免疫化、組み換え抗体の単離のためのパニング方策）を用いることにより、生じさせることができる。あるいはまた、前述のエピトープを含む才

50

リゴまたはポリペプチドをコードする核酸を免疫化するために用いることが可能である。エピトープ特異的Tリンパ球のインビトロまたはインビボでの產生のための種々の手法は、知られており、例えば(Kessler JH, et al. 2001, Sahin et al., 1997)に詳細に記載されており、同様に前述のオリゴもしくはポリペプチドをコードするスライスバリアント特異的エピトープまたは核酸を含むオリゴあるいはポリペプチドを用いることに基づく。前述のポリペプチドをコードするスライスバリアント特異的エピトープもしくは核酸を含むオリゴまたはポリペプチドを、また、活性免疫療法(ワクチン接種、ワクチン療法)における薬学的に活性な物質としての使用に用いることができる。

【0018】

1つの観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原を認識し、好ましくは、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現を有する細胞に選択的である剤を含む医薬組成物に関する。特定の態様において、前述の剤は、細胞死の誘発、細胞増殖の減少、細胞膜に対する損傷またはサイトカインの分泌を生じ得、好ましくは腫瘍阻害活性を有する。1つの態様において、この剤は、腫瘍関連抗原をコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である。他の態様において、この剤は、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体、特に腫瘍関連抗原に選択的に結合する補体活性化抗体である。

10

【0019】

他の態様において、この剤は、各々異なる腫瘍関連抗原を選択的に認識し、この少なくとも1種が本発明により同定された腫瘍関連抗原である2種または3種以上の剤を含む。認識は、活性の阻害または抗原の発現を直接伴う必要はない。本発明のこの観点において、腫瘍に選択的に限定される抗原は、好ましくは、この特異的な位置に対するエフェクター機構を補強するための標識として作用する。好ましい態様において、この剤は、HLA分子上の抗原を認識し、このようにして標識された細胞を溶解する細胞障害性Tリンパ球である。他の態様において、この剤は、腫瘍関連抗原に選択的に結合し、従って前述の細胞に対する天然の、または人工的なエフェクター機構を補強する抗体である。他の態様において、この剤は、前述の抗原を特異的に認識する他の細胞のエフェクター機能を増強するヘルパーTリンパ球である。

20

【0020】

1つの観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または活性を阻害する剤を含む医薬組成物に関する。好ましい態様において、この剤は、腫瘍関連抗原をコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である。他の態様において、この剤は、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体である。他の態様において、この剤は、各々異なる腫瘍関連抗原の発現または活性を選択的に阻害し、この少なくとも1種が、本発明により同定された腫瘍関連抗原である、2種または3種以上の剤を含む。

30

【0021】

本発明は、さらに、投与された際に、HLA分子と、本発明により同定された腫瘍関連抗原からのペプチドエピトープとの間の複合体の量を選択的に増大させる剤を含む、医薬組成物に関する。1つの態様において、この剤は、(i)腫瘍関連抗原またはこの一部、(ii)前述の腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸、(iii)前述の腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞、および(iv)前述の腫瘍関連抗原からのペプチドエピトープとMHC分子との間の単離された複合体からなる群から選択された1種または2種以上の成分を含む。1つの態様において、この剤は、各々MHC分子と異なる腫瘍関連抗原のペプチドエピトープとの間の複合体の量を選択的に増大させ、この少なくとも1種が本発明により同定された腫瘍関連抗原である、2種または3種以上の剤を含む。

40

【0022】

本発明は、さらに、医薬組成物であって、(i)本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部、(ii)本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸、(iii)本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する抗

50

体、(i v)本発明により同定された腫瘍関連抗原をコードする核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸、(v)本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞、および(v i)本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部とHLA分子との間の単離された複合体からなる群から選択された1種または2種以上の成分を含む、前記医薬組成物に関する。

【0023】

本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸は、医薬組成物において発現ベクター中に存在し、プロモーターに機能的に結合していてもよい。

本発明の医薬組成物中に存在する宿主細胞は、腫瘍関連抗原またはこの一部を分泌し、これを表面上で発現することができるか、またはさらに、前述の腫瘍関連抗原またはこの前述の一部に結合するHLA分子を発現することができる。1つの態様において、宿主細胞は、HLA分子を内在性に発現する。他の態様において、宿主細胞は、HLA分子および/または腫瘍関連抗原またはこの一部を、組み換え方式で発現する。宿主細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい態様において、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球またはマクロファージである。

10

【0024】

本発明の医薬組成物中に存在する抗体は、モノクローナル抗体であることができる。他の態様において、抗体は、キメラまたはヒト化抗体、天然の抗体または合成抗体のフラグメントであり、このすべては、結合手法により製造することができる。この抗体を、治療的に、または診断的に有用な剤に結合させることができる。

20

本発明の医薬組成物中に存在するアンチセンス核酸は、6~50、特に10~30、15~30および20~30の、本発明により同定された腫瘍関連抗原をコードする核酸の近接する(contiguous)ヌクレオチドの配列を含むことができる。

【0025】

他の態様において、本発明の医薬組成物により提供された腫瘍関連抗原またはこの一部は、直接または核酸の発現を介して、細胞の表面上のMHC分子に結合し、前述の結合は、好ましくは、細胞溶解性応答を生じ、および/またはサイトカイン放出を誘発する。

本発明の医薬組成物は、薬学的に適合性の担体および/またはアジュバントを含むことができる。アジュバントは、サポニン、GM-CSF、CpGヌクレオチド、RNA、サイトカインまたはケモカインから選択することができる。本発明の医薬組成物を、好ましくは、腫瘍関連抗原の選択的発現または異常な発現により特徴づけられる疾患の処置のために用いる。好ましい態様において、疾患は、癌である。

30

【0026】

本発明は、さらに、1種または2種以上の腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を処置または診断する方法に関する。1つの態様において、処置は、本発明の医薬組成物を投与することを含む。

【0027】

1つの観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を診断する方法に関する。この方法は、(i)腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする核酸の検出、および/または(ii)腫瘍関連抗原もしくはこの一部の検出、および/または(iii)腫瘍関連抗原もしくはこの一部に対する抗体の検出、および/または(iv)患者から単離された生物学的試料中の腫瘍関連抗原またはこの一部に特異的な、細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球の検出を含む。特定の態様において、検出は、(i)生物学的試料を、腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする核酸、前述の腫瘍関連抗原またはこの前述の一部、腫瘍関連抗原またはこの一部に特異的な抗体または細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球に特異的に結合する剤と接触させること、および(ii)この剤と、核酸またはこの一部、腫瘍関連抗原またはこの一部、抗体または細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球との間の複合体の形成を検出することを含む。

40

【0028】

50

1つの態様において、疾患は、2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられ、検出は、前述の2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原をコードする2種もしくは3種以上の核酸、またはこの一部の検出、2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部の検出、前述の2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する2種もしくは3種以上の抗原の検出あるいは前述の2種もしくは3種以上の異なる腫瘍関連抗原に特異的な2種もしくは3種以上の細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球の検出を含む。他の態様において、患者から単離された生物学的試料を、相当する正常な生物学的試料と比較する。

【0029】

他の観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患の退行、経過または発症を決定する方法であって、該方法が、前述の疾患を患っているか、または前述の疾患に罹患していることが疑われる患者からの試料を、(i)腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸の量、(ii)腫瘍関連抗原またはこの一部の量、(iii)腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する抗体の量、および(iv)腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との間の複合体に特異的な細胞溶解性T細胞またはヘルパーT細胞の量からなる群から選択された1種または2種以上のパラメーターに関してモニタリングすることを含む、前記方法に関する。

10

【0030】

この方法は、好ましくは、第1の時点における第1の試料および第2の時点におけるさらなる試料におけるパラメーター(1または2以上)を決定することを含み、ここで疾患の経過を、前記の2種の試料を比較することにより決定する。特定の態様において、疾患有、2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけ、モニタリングは、(i)前述の2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする2種または3種以上の核酸の量、および/または(ii)前述の2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部の量、および/または(iii)前述の2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する2種または3種以上の抗体の量、および/または(iv)前述の2種または3種以上の異なる腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との間の複合体に特異的な、2種または3種以上の細胞溶解性T細胞またはヘルパーT細胞の量をモニタリングすることを含む。

20

【0031】

本発明において、核酸もしくはこの一部の検出または核酸もしくはこの一部の量のモニタリングを、前述の核酸もしくはこの前述の一部に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを用いて実施することができるか、または、前述の核酸もしくはこの前述の一部の選択的増幅により実施することができる。1つの態様において、ポリヌクレオチドプローブは、6～50、特に10～30、15～30および20～30の、前述の核酸の近接する(contiguous)ヌクレオチドの配列を含む。

30

【0032】

特定の態様において、検出するべき腫瘍関連抗原またはこの一部は、細胞内に、または細胞表面上に存在する。本発明において、腫瘍関連抗原もしくはこの一部の検出または腫瘍関連抗原もしくはこの一部の量のモニタリングを、前述の腫瘍関連抗原またはこの前述の一部に特異的に結合する抗体を用いて、実施することができる。

40

【0033】

他の態様において、検出するべき腫瘍関連抗原またはこの一部は、MHC分子、特にHLA分子との複合体中に存在する。

本発明において、抗体の検出または抗体の量のモニタリングを、前述の抗体に特異的に結合するタンパク質またはペプチドを用いて実施することができる。

【0034】

本発明において、細胞溶解性T細胞もしくはヘルパーT細胞の検出または、抗原もしくはこの一部とMHC分子との間の複合体に特異的な、細胞溶解性T細胞もしくはヘルパーT細胞の量のモニタリングを、前述の抗原またはこの前述の一部とMHC分子との間の複

50

合体を提示する細胞を用いて、実施することができる。

【0035】

検出またはモニタリングのために用いられる、ポリヌクレオチドプローブ、抗体、タンパク質またはペプチドまたは細胞を、好ましくは、検出可能な方式で標識する。特定の態様において、検出可能なマーカーは、放射活性マーカーまたは酵素的マーカーである。Tリンパ球を、さらに、これらの増殖、これらのサイトカイン産生並びにMHCおよび腫瘍関連抗原またはこの一部の複合体での特定の刺激により誘発されるこれらの細胞障害性活性を検出することにより、検出することができる。また、Tリンパ球を、組み換えMHC分子または、他に1種もしくは2種以上の腫瘍関連抗原の特定の免疫原性フラグメントを負荷させ、特定のT細胞レセプターを接触させることにより特定のTリンパ球を同定することができる、2種もしくは3種以上のMHC分子の複合体により、検出することができる。

10

【0036】

他の観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を処置し、診断し、またはモニタリングする方法であって、該方法が、前述の腫瘍関連抗原またはこの一部に結合し、治療剤または診断剤と結合した抗体を投与することを含む、前記方法に関する。抗体は、モノクローナル抗体であることができる。他の態様において、抗体は、キメラもしくはヒト化抗体または天然の抗体のフラグメントである。

20

【0037】

本発明はまた、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を患っている患者を処置する方法であって、該方法が、(i)免疫反応性細胞を含む試料を前述の患者から採取すること、(ii)前述の試料を、前述の腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞と、前述の腫瘍関連抗原またはこの一部に対して、細胞溶解性T細胞の産生を好む条件下で接触させること、および(iii)細胞溶解性T細胞を、患者中に、腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する細胞を溶解するのに適する量で導入することを含む、前記方法に関する。本発明は、同様に、腫瘍関連抗原に対する細胞溶解性T細胞のT細胞レセプターをクローニングすることに関する。前述のレセプターを、このようにして所望の特異性を受け、(iv)の下のように、患者中に導入することができる他のT細胞に導入することができる。

30

【0038】

1つの態様において、宿主細胞は、HLA分子を内在性に発現する。他の態様において、宿主細胞は、HLA分子および/または腫瘍関連抗原またはこの一部を、組み換えるに発現する。宿主細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい態様において、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球またはマクロファージである。

【0039】

他の観点において、本発明は、腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を患っている患者を処置する方法であって、該方法が、(i)本発明により同定された腫瘍関連抗原をコードし、前述の疾患に関連する細胞により発現された核酸を同定すること、(ii)宿主細胞に、前述の核酸またはこの一部をトランスフェクトすること、(iii)トランスフェクトした宿主細胞を、前述の核酸の発現のために培養すること(これは、高い速度のトランスフェクションが得られる際には、必須ではない)、および(iv)宿主細胞またはこの抽出液を、患者中に、疾患に関連する患者の細胞に対する免疫応答を増大させるのに適する量で導入することを含む、前記方法に関する。この方法は、さらに、腫瘍関連抗原またはこの一部を提示するMHC分子を同定することを含み、宿主細胞は、同定されたMHC分子を発現し、前述の腫瘍関連抗原またはこの一部を提示する。免疫応答は、B細胞応答またはT細胞応答を含むことができる。さらに、T細胞応答は、腫瘍関連抗原もしくはこの一部を提示する宿主細胞に特異的であるか、または前述の腫瘍関連抗原もしくはこの一部を発現する患者の細胞に特異的である、細胞溶解性T細胞および/またはヘルパーT細胞の産生を含むことができる。

40

50

【0040】

本発明はまた、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を処置する方法であって、該方法が、(i)異常な量の腫瘍関連抗原を発現する細胞を患者から同定すること、(ii)前述の細胞の試料を単離すること、(iii)前述の細胞を培養すること、および(iv)前述の細胞を患者中に、細胞に対する免疫応答を誘発するのに適する量で導入することを含む、前記方法に関する。

好ましくは、本発明において用いる宿主細胞は、非増殖性であるか、または非増殖性とされる。腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患は、特に癌である。

【0041】

本発明は、さらに、核酸であって、(a)配列番号：2～5、20～21、31～33、39、54～57、62、63、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、(b)(a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、(c)(a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および(d)(a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸からなる群から選択されている、前記核酸に関する。本発明は、さらに、核酸であって、配列番号：7～13、14～18、23～24、34～36、58～61、64、65、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含むタンパク質またはポリペプチドをコードする、前記核酸に関する。

【0042】

他の観点において、本発明は、本発明の核酸のプロモーター配列に関する。これらの配列は、他の遺伝子に、好ましくは発現ベクターにおいて機能的に連結されていることができ、従って前述の遺伝子の適切な細胞中での選択的発現が確実になる。

他の観点において、本発明は、本発明の核酸を含む組み換え核酸分子、特にDNAまたはRNA分子に関する。

【0043】

本発明はまた、本発明の核酸または本発明の核酸を含む組み換え核酸分子を含む、宿主細胞に関する。

宿主細胞はまた、HLA分子をコードする核酸を含むことができる。1つの態様において、宿主細胞は、HLA分子を内在性に発現する。他の態様において、宿主細胞は、HLA分子および/または本発明の核酸またはこの一部を、組み換えるに発現する。好ましくは、宿主細胞は、非増殖性である。好ましい態様において、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球またはマクロファージである。

【0044】

他の態様において、本発明は、本発明により同定された核酸とハイブリダイズし、遺伝子的プローブとして、または「アンチセンス」分子として用いることができるオリゴヌクレオチドに関する。本発明により同定された核酸またはこの一部とハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマーまたは競合性試料の形態での核酸分子を、本発明により同定された前述の核酸に対して相同的な核酸を見出すために用いることができる。PCR増幅、サザンおよびノーザンハイブリダイゼーションを、相同的な核酸を見出すために用いることができる。ハイブリダイゼーションを、低いストリンジエンシー(stringency)の下で、一層好ましくは中程度のストリンジエンシーの下で、最も好ましくは高いストリンジエンシー条件の下で実施することができる。本発明における用語「ストリンジエントな条件」は、ポリヌクレオチド間の特異的なハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。

【0045】

他の観点において、本発明は、タンパク質またはポリペプチドであって、(a)配列番号：2～5、20～21、31～33、39、54～57、62、63、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、(b)(a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、(c)(a)または(b)の核

10

20

30

40

50

酸に対して縮重している核酸、および(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸からなる群から選択されている核酸によりコードされた、前記タンパク質またはポリペプチドに関する。好ましい態様において、本発明は、タンパク質またはポリペプチドであって、配列番号：7～13、14～18、23～24、34～36、58～61、64、65、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む、前記タンパク質またはポリペプチドに関する。

【0046】

他の観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原の免疫原性フラグメントに関する。前述のフラグメントは、好ましくは、ヒトH L A レセプターまたはヒト抗体に結合する。本発明のフラグメントは、好ましくは、少なくとも6個、特に少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個または少なくとも50個のアミノ酸の配列を含む。

10

【0047】

他の観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する剤に関する。好ましい態様において、この剤は、抗体である。他の態様において、この抗体は、結合手法により產生されたキメラ、ヒト化抗体もしくは抗体であるか、または抗体のフラグメントである。さらに、本発明は、(i)本発明により同定された腫瘍関連抗原またはこの一部、および(i i)本発明により同定された前述の腫瘍関連抗原またはこの前述の一部が結合したM H C 分子の複合体に選択的に結合する抗体に関し、前述の抗体は、(i)または(i i)単独には結合しない。本発明の抗体は、モノクローナル抗体であることができる。他の態様において、抗体は、キメラもしくはヒト化抗体または天然の抗体のフラグメントである。

20

【0048】

本発明は、さらに、本発明により同定された腫瘍関連抗原もしくはこの一部または本発明の抗体に結合する本発明の剤と、治療または診断剤との間の複合体に関する。1つの態様において、治療または診断剤は、毒素である。

30

【0049】

他の観点において、本発明は、本発明により同定された腫瘍関連抗原の発現または異常な発現を検出するためのキットであって、このキットが、(i)腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする核酸、(i i)腫瘍関連抗原もしくはこの一部、(i i i)腫瘍関連抗原もしくはこの一部に結合する抗体、および/または(i v)腫瘍関連抗原またはこの一部とM H C 分子との間の複合体に特異的なT細胞の検出のための剤を含む、前記キットに関する。1つの態様において、核酸またはこの一部の検出のための剤は、前述の核酸の選択的増幅のための核酸分子であり、これは、特に、6～50、特に10～30、15～30および20～30の、前述の核酸の近接する(contiguous)ヌクレオチドの配列を含む。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】e C T のクローン化の図式的表示である。

40

【図2】L D H C のスプライシングを示す図である。

【図3】可能なL D H - C タンパク質のアラインメントを示す図である。

【図4】リアルタイムP C Rによる種々の組織におけるL D H C の定量のグラフである。

【図5】T P T E バリアントのエクソン構成を示す図である。

【図6】可能なT P T E タンパク質のアラインメントを示す図である。

【図7 a】ヌクレオチドレベルでのT S B P バリアントのアラインメントを示す図である。

【図7 b】ヌクレオチドレベルでのT S B P バリアントのアラインメントを示す図である。

50

【図8】タンパク質レベルでのT S B P バリアントのアラインメントを示す図である。

【図9】M S 4 A 1 2についてのR T - P C Rを示す図である。

【図10】B R C O 1についてのR T - P C Rを示す図である。

【図11】M O R C 、T P X 1 、L D H C 、S G Y - 1についてのR T - P C Rを示す図である。

【図12】M C F - 7乳癌細胞株におけるL D H Cのミトコンドリアの局在を示す図である。

【図13】M C F - 7細胞の細胞表面上のT P T Eの予測されたトポロジーおよび細胞内局在を示す図である。

【図14】細胞膜上のM S 4 A 1 2の局在を示す図である。

10

【0051】

発明の詳説

本発明において、腫瘍細胞において選択的にまたは異常に発現され、腫瘍関連抗原である遺伝子が、記載される。

本発明において、これらの遺伝子またはこれらの誘導体は、治療的方法に好ましい標的構造である。概念的に、前述の治療的方法は、選択的に発現された腫瘍関連遺伝子産物の活性を阻害することを目的とすることができます。これは、前述の異常なそれぞれの選択的な発現が腫瘍病理学において機能的に重要である場合、およびこの連結が対応する細胞の選択的損傷に伴う場合に、有用である。他の治療的概念は、腫瘍関連抗原を、腫瘍細胞に選択的に細胞損傷能力を有するエフェクター機構を補強する標識として意図する。ここで、標的分子自体の機能および腫瘍進展におけるこの作用は、完全に無関係である。

20

【0052】

核酸の「誘導体」は、本発明において、単一の、または多数のヌクレオチド置換、欠失および／または付加が、前述の核酸中に存在することを意味する。さらに、用語「誘導体」はまた、ヌクレオチド塩基、糖またはリン酸塩における核酸の化学的誘導体化を含む。用語「誘導体」はまた、天然に存在しないヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を含む核酸を含む。

【0053】

本発明において、核酸は、好ましくは、デオキシリボ核酸（D N A）またはリボ核酸（R N A）である。核酸は、本発明において、ゲノムD N A、c D N A、m R N A、組み換え的に產生された、および化学的に合成された分子を含む。本発明において、核酸は、一本鎖または二本鎖および直線状または共有的な閉環分子として、存在することができる。

30

【0054】

本発明において記載されている核酸は、好ましくは単離されている。用語「単離された核酸」は、本発明において、核酸が、(i)インビトロで、例えばポリメラーゼ連鎖反応（P C R）により増幅され、(ii)クローニングにより組み換え的に产生され、(iii)例えば切断およびゲル電気泳動的分画により精製され、または(iv)例えば化学的合成により合成されたことを意味する。単離された核酸は、組み換えD N A手法により操作するのに利用できる核酸である。

40

【0055】

核酸は、2つの配列がハイブリダイズして、互いに安定な二重鎖を形成することができ、ハイブリダイゼーションが、好ましくは、ポリヌクレオチド間の特異的なハイブリダイゼーションが可能である条件（ストリンジエントな条件）下で実施される場合に、他の核酸と「相補的」である。ストリンジエントな条件は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989またはCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York中に記載されており、例えば、6.5におけるハイブリダイゼーション緩衝液（3.5×S S C、0.02%フィコール(Ficoll)、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5 mM NaH₂PO₄(pH 7)、0.5% SDS、2 mM

50

EDTA) 中でのハイブリダイゼーションを意味する。SSC は、0.15M 塩化ナトリウム / 0.15M クエン酸ナトリウム、pH 7 である。ハイブリダイゼーションの後に、DNA がトランスファーされた膜を、例えば、2 × SSC 中で、室温において、次に 0.1 ~ 0.5 × SSC / 0.1 × SDS 中で、68 ℃ までの温度において、洗浄する。

【0056】

本発明において、相補的核酸は、少なくとも 40%、特に少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% および好ましくは少なくとも 95%、少なくとも 98% または少なくとも 99% の同一のヌクレオチドを有する。

【0057】

腫瘍関連抗原をコードする核酸は、本発明において、単独で、または他の核酸、特に非相同性核酸と組み合わせて、存在し得る。好ましい態様において、核酸は、前述の核酸に対して相同性であるかまたは非相同性であることができる発現制御配列または調節配列に、機能的に連結されている。コーディング配列および調節配列は、これらが、前述のコーディング配列の発現または転写が、前述の調節配列の制御下または影響下にあるように、互いに共有結合している場合には、互いに「機能的に」連結されている。コーディング配列が機能的なタンパク質に翻訳されるべきである場合には、前述のコーディング配列に機能的に連結された調節配列と共に、前述の調節配列の誘導により、前述のコーディング配列の転写がもたらされ、コーディング配列または、所望のタンパク質もしくはペプチドに翻訳することができない前述のコーディング配列におけるフレームシフトを生じない。

10

20

【0058】

用語「発現制御配列」または「調節配列」は、本発明において、遺伝子の発現を調節するプロモーター、エンハンサーおよび他の制御要素を含む。本発明の特定の態様において、発現制御配列を、調節することができる。調節配列の正確な構造は、種または細胞の種類の機能として変化するが、一般的に、それぞれ転写および翻訳の開始に関与する 5' 非転写および 5' 非翻訳配列、例えば TATA ボックス、キャッピング配列、CAAT 配列などを含む。さらに特に、5' 非転写調節配列は、機能的に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を誘発するプロモーター領域を含む。調節配列はまた、エンハンサー配列または上流活性化配列を含むことができる。

30

【0059】

従って、一方で、本明細書中に例示した腫瘍関連抗原を、すべての発現制御配列およびプロモーターと組み合わせることができる。しかし他方、本明細書中に例示した腫瘍関連遺伝子産物のプロモーターは、本発明において、すべての他の遺伝子と組み合わせることができる。これにより、これらのプロモーターの選択的活性を用いることが可能になる。

【0060】

本発明において、核酸は、さらに、宿主細胞からの前述の核酸によりコードされたタンパク質またはポリペプチドの分泌を制御するポリペプチドをコードする、他の核酸と組み合わせて存在することができる。本発明において、核酸はまた、コードされたタンパク質またはポリペプチドを、宿主細胞の細胞膜上に固定させるか、または前述の細胞の特定の細胞小器官に区画化させるポリペプチドをコードする、他の核酸と組み合わせて、存在することができる。

40

【0061】

好ましい態様において、組み換え DNA 分子は、本発明において、適切な場合にはプロモーターを有するベクターであり、これは、核酸、例えば本発明の腫瘍関連抗原をコードする核酸の発現を制御する。用語「ベクター」は、本明細書中では、この最も一般的な意味で用いられ、前述の核酸が、例えば原核および / または真核細胞中に導入され、適切な場合には、ゲノム中に組み込まれるのを可能にする核酸のための、すべての媒介ビヒクルを含む。この種類のベクターは、好ましくは、細胞内で複製され、および / または発現される。媒介ビヒクルは、例えば、エレクトロポレーションにおいて、微粒子での銃において、リポソーム投与において、アグロバクテリウム (agrobacteria) を用いた導入において

50

、またはDNAもしくはRNAウイルスを介しての挿入において用いるように適合させることができる。ベクターは、プラスミド、ファージミドまたはウイルスゲノムを含む。

【0062】

本発明により同定された腫瘍関連抗原をコードする核酸を、宿主細胞のトランスフェクションのために用いることができる。核酸は、ここでは、組み換えDNAおよびRNAの両方を意味する。組み換えRNAを、DNA鑄型のインビトロ転写により製造することができる。さらに、これを、適用の前に配列を安定化し、キャッピングおよびポリアデニル化することにより改変することができる。本発明において、用語「宿主細胞」は、外来性核酸で形質転換またはトランスフェクトすることができるすべての細胞に関する。用語「宿主細胞」は、本発明において、原核細胞（例えば大腸菌）または真核細胞（例えば樹状細胞、B細胞、CHO細胞、COS細胞、K562細胞、酵母細胞および昆虫細胞）を含む。特に好ましいのは、哺乳類細胞、例えばヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、靈長類からの細胞である。この細胞は、多数の種類の組織に由来し、初代細胞および細胞株を含むことができる。特定の例は、ケラチノサイト、末梢血白血球、骨髄の幹細胞および胚幹細胞を含む。他の態様において、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球またはマクロファージである。核酸は、宿主細胞中に、単一のコピーまたは2つもしくは3つ以上のコピーの形態で存在することができ、1つの態様において、宿主細胞で発現される。

10

【0063】

本発明において、用語「発現」は、この最も一般的な意味で用いられ、RNAまたはRNAおよびタンパク質の産生を含む。これはまた、核酸の部分的発現を含む。さらに、発現は、一過性に、または安定に行うことができる。哺乳類細胞における好ましい発現系は、pCDNA3.1およびpRC/CMV(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含み、これは、選択的マーク、例えばG418に対する耐性を付与する（および従って安定にトランスフェクトした細胞株を選択することを可能にする）遺伝子およびサイトメガロウイルス(CMV)のエンハンサープロモーター配列を含む。

20

【0064】

HLA分子が腫瘍関連抗原またはこの一部を提示する、本発明の場合において、発現ベクターはまた、前述のHLA分子をコードする核酸配列を含むことができる。HLA分子をコードする核酸配列は、腫瘍関連抗原もしくはこの一部をコードする核酸と同一の発現ベクター上に存在することができるか、または、両方の核酸は、異なる発現ベクター上に存在することができる。後者の場合において、2種の発現ベクターを、細胞中にコトランスフェクトする(cotransfect)ことができる。宿主細胞が、腫瘍関連抗原またはこの一部も、HLA分子も発現しない場合には、これをコードする両方の核酸を、同一の発現ベクターまたは異なる発現ベクターのいずれかにより、細胞中にトランスフェクトさせる。細胞が、すでにHLA分子を発現する場合には、腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸配列のみを、細胞中にトランスフェクトすることができる。

30

【0065】

本発明はまた、腫瘍関連抗原をコードする核酸の増幅のためのキットを含む。このようなキットは、例えば、腫瘍関連抗原をコードする核酸にハイブリダイズする増幅プライマーの対を含む。プライマーは、好ましくは、6～50、特に10～30、15～30および20～30の、核酸の近接する(contiguous)ヌクレオチドの配列を含み、非重複性であって、プライマー二量体の形成を回避する。プライマーの1つは、腫瘍関連抗原をコードする核酸の1本の鎖にハイブリダイズし、他方のプライマーは、腫瘍関連抗原をコードする核酸の増幅を可能にする配置において、相補的な鎖にハイブリダイズする。

40

【0066】

「アンチセンス」分子または「アンチセンス」核酸を、核酸の発現を調節、特に減少させるために用いることができる。用語「アンチセンス分子」または「アンチセンス核酸」は、本発明において、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、改変オリゴリボヌクレオチドまたは改変オリゴデオキシリボヌクレオチドであり、生理学的条件

50

件下で、特定の遺伝子を含むDNAまたは前述の遺伝子のmRNAにハイブリダイズし、これにより前述の遺伝子の転写および/または前述のmRNAの翻訳を阻害するオリゴヌクレオチドを意味する。本発明において、「アンチセンス分子」はまた、核酸またはこの一部を、この天然のプロモーターに関して逆の配向で含むコンストラクトを含む。核酸またはこの一部のアンチセンス転写物は、酵素を特定し、従ってmRNAの活性酵素への蓄積または翻訳を抑制する、天然に存在するmRNAとの二重鎖を形成することができる。他の可能性は、核酸を不活性化させるためのリボザイムを用いることである。本発明において好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、6～50、特に10～30、15～30および20～30の、標的核酸の近接する(contiguous)ヌクレオチドの配列を有し、好ましくは、標的核酸またはこの一部に完全に相補的である。

10

【0067】

好ましい態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、N末端または5'上流部位、例えば翻訳開始部位、転写開始部位またはプロモーター部位とハイブリダイズする。他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、3'非翻訳領域またはmRNAスプライシング部位とハイブリダイズする。

【0068】

1つの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはこれらの組み合わせからなり、1つのヌクレオチドの5'末端および他のヌクレオチドの3'末端は、互いに、ホスホジエステル結合により結合している。これらのオリゴヌクレオチドは、慣用の方法で合成するか、または組み換えることでできる。

20

【0069】

好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、「改变された」オリゴヌクレオチドである。ここで、オリゴヌクレオチドは、極めて異なる方法で改变することができ、その標的に結合する能力を損ねず、例えばその安定性または治療効率を増大させる。本発明において、用語「改变されたオリゴヌクレオチド」は、(i)このヌクレオチドの少なくとも2つが、互いに、合成ヌクレオシド間結合(即ち、ホスホジエステル結合ではないヌクレオシド間結合)により結合しており、および/または(ii)通常は核酸中には見出されない化学基が、オリゴヌクレオチドに共有結合しているオリゴヌクレオチドを意味する。好ましい合成ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、リン酸エステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホラミデート(phosphoramidate)、カルバメート、カーボネート、リン酸トリエ斯特ル、アセトアミデート、カルボキシメチルエ斯特ルおよびペプチドである。

30

【0070】

用語「改变されたオリゴヌクレオチド」はまた、共有的に改变された塩基および/または糖を有するオリゴヌクレオチドを含む。「改变されたオリゴヌクレオチド」は、例えば、3'位において水酸基以外の低分子量有機基および5'位においてリン酸基に共有結合した糖残基を有するオリゴヌクレオチドを含む。改变されたオリゴヌクレオチドは、例えば、リボース、例えばアラビノースの代わりに2'-O-アルキル化されたリボース残基または他の糖を含むことができる。

40

【0071】

好ましくは、本発明において記載したタンパク質およびポリペプチドは、単離されている。用語「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」は、タンパク質またはポリペプチドが、この天然の環境から分離されていることを意味する。単離されたタンパク質またはポリペプチドは、本質的に精製された状態であることができる。用語「本質的に精製された」は、タンパク質またはポリペプチドが、本質的に、これが天然にまたはインビオで関連する他の物質を本質的に含まないことを意味する。

【0072】

このようなタンパク質およびポリペプチドは、例えば、抗体の产生において、および免疫学的もしくは診断学的アッセイにおいて、または治療薬として用いることができる。本

50

発明において記載したタンパク質およびポリペプチドを、生物学的試料、例えば組織または細胞ホモジネートから単離することができ、また、多数の原核または真核発現系において組み換えることによって発見することができる。

【0073】

本発明の目的のために、タンパク質もしくはポリペプチドまたはアミノ酸配列の「誘導体」は、アミノ酸挿入バリエント、アミノ酸欠失バリエントおよび/またはアミノ酸置換バリエントを含む。

【0074】

アミノ酸挿入バリエントは、アミノおよび/またはカルボキシ末端融合およびまた1個の、または2個もしくは3個以上のアミノ酸の、特定のアミノ酸配列中の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列バリエントの場合において、1個または2個以上のアミノ酸残基が、アミノ酸配列中の特定の部位中に挿入されるが、得られた産物の適切なスクリーニングを伴う無秩序な挿入がまた、可能である。アミノ酸欠失バリエントは、配列からの1個または2個以上のアミノ酸の除去により特徴づけられる。アミノ酸置換バリエントは、配列中の少なくとも1個の残基が除去され、他の残基がこの場所に挿入されることにより、特徴づけられる。好ましいのは、相同性のタンパク質またはポリペプチド間に保存されないアミノ酸配列中の位置にある変更である。好ましいのは、アミノ酸を、同様の特性、例えば疎水性、親水性、電気陰性度、側鎖の大きさなどを有する他のもので置換することである（保存的置換）。保存的置換は、例えば、1個のアミノ酸の、置換されるべきアミノ酸と同一の群における、以下に列挙する他のアミノ酸での交換に関する：

10

20

20

【0075】

1. 小さい脂肪族、無極性またはわずかに極性の残基：A l a、S e r、T h r (P r o)、G l y)
2. 負に帯電した残基およびこれらのアミド：A s n、A s p、G l u、G l n
3. 正に帯電した残基：H i s、A r g、L y s
4. 大きい脂肪族無極性残基：M e t、L e u、I l e、V a l (C y s)
5. 大きい芳香族残基：P h e、T y r、T r p。

30

【0076】

タンパク質構造物中のこれらの特定の部分のために、3種の残基を、かっこ中に示す。G l y は、側鎖を有しない唯一の残基であり、従って鎖に柔軟性を付与する。P r o は、通常でない幾何学的形状を有し、これは、鎖を大いに制限する。C y s は、ジスルフィド架橋を形成することができる。

【0077】

上記に記載したアミノ酸バリエントを、既知のペプチド合成手法を用いて、例えば固相合成(Merrifield, 1964)および同様の方法または組み換えD N A操作により、容易に製造することができる。置換突然変異体を、所定の部位において、既知の、または部分的に既知の配列を有するD N A中に導入するための手法は、十分知られており、例えばM 1 3変異原性を含む。置換、挿入または欠失を有するタンパク質を製造するためのD N A配列の操作は、例えばSambrook et al. (1989)中に詳細に記載されている。

40

【0078】

本発明において、タンパク質またはポリペプチドの「誘導体」はまた、酵素に関連するすべての分子、例えば炭水化物、脂質および/またはタンパク質またはポリペプチドの单一の、または多数の置換、欠失および/または付加を含む。用語「誘導体」はまた、前述のタンパク質またはポリペプチドのすべての機能的な化学的な等価物に拡張される。

【0079】

本発明において、腫瘍関連抗原の一部またはフラグメントは、これに由来するポリペプチドの機能的特性を有する。このような機能的特性は、抗体との相互作用、他のポリペプチドまたはタンパク質との相互作用、核酸の選択的結合および酵素活性を含む。特定の特性は、H L Aとの複合体を形成する能力であり、適切な場合には、免疫応答を発生する。この免疫応答は、細胞障害性またはヘルパーT細胞を刺激することに基づくことができる

50

。本発明の腫瘍関連抗原の一部またはフラグメントは、好ましくは、少なくとも 6 個、特に少なくとも 8 個、少なくとも 10 個、少なくとも 12 個、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 30 個または少なくとも 50 個の、腫瘍関連抗原の連續したアミノ酸の配列を含む。

【 0 0 8 0 】

腫瘍関連抗原をコードする核酸の一部またはフラグメントは、本発明において、核酸の一部に関し、これは、上記に定義したように、少なくとも腫瘍関連抗原および / または前述の腫瘍関連抗原の一部またはフラグメントをコードする。

【 0 0 8 1 】

腫瘍関連抗原をコードする遺伝子の単離および同定はまた、1種または2種以上の腫瘍関連抗原の発現により特徴づけられる疾患の診断を可能にする。これらの方は、腫瘍関連抗原をコードする1種または2種以上の核酸を決定すること、および / またはこれに由来する、コードされた腫瘍関連抗原および / またはペプチドを決定することを含む。核酸を、ポリメラーゼ連鎖反応または標識したプローブとのハイブリダイゼーションによるものを含む、慣用の方法において、決定することができる。これから由来する腫瘍関連抗原またはペプチドを、抗原および / またはペプチドを認識することに関して患者の抗血清をスクリーニングすることにより、決定することができる。これらを、また、患者のT細胞を、対応する腫瘍関連抗原に対する特異性についてスクリーニングすることにより、決定することができる。

【 0 0 8 2 】

本発明はまた、前述の腫瘍関連抗原の抗体および細胞結合パートナーを含む、本明細書中に記載した腫瘍関連抗原に結合するタンパク質を単離することを可能にする。

【 0 0 8 3 】

本発明において、特定の態様は、腫瘍関連抗原に由来する「ドミナントネガティブ(dominant negative)」ポリペプチドを提供することを含むべきである。ドミナントネガティブポリペプチドは、細胞機構と相互作用することにより、活性タンパク質を細胞機構とのこの相互作用から追い出し、または活性タンパク質と競合し、これにより前述の活性タンパク質の効果を減少させる、不活性なタンパク質バリエントである。例えば、リガンドに結合するが、リガンドへの結合に対する応答としてのシグナルを発生しない、ドミナントネガティブレセプターは、前述のリガンドの生物学的效果を低減し得る。同様に、通常は標的タンパク質と相互作用するが、前述の標的タンパク質をリン酸化しない、ドミナントネガティブの触媒的に不活性なキナーゼは、細胞シグナルに対する応答としての前述の標的タンパク質のリン酸化を減少させ得る。同様に、遺伝子の制御領域中のプロモーター部位に結合するが、前述の遺伝子の転写を増大させない、ドミナントネガティブの転写因子は、正常な転写因子の効果を、転写を増大させずに、プロモーター結合部位を占有することにより低減し得る。

【 0 0 8 4 】

細胞中のドミナントネガティブポリペプチドの発現の結果は、活性タンパク質の機能の減少である。当業者は、タンパク質のドミナントネガティブのバリエントを、例えば慣用の変異原性方法により、およびバリエントポリペプチドのドミナントネガティブの効果を評価することにより製造することができる。

【 0 0 8 5 】

本発明はまた、腫瘍関連抗原に結合するポリペプチドなどの物質を含む。このような結合物質を、例えば、腫瘍関連抗原および腫瘍関連抗原のこれらの結合パートナーとの複合体を検出するためのスクリーニングアッセイにおいて、並びに前述の腫瘍関連抗原およびこれらとこれらの結合パートナーとの複合体の精製において、用いることができる。このような物質を、また、腫瘍関連抗原の活性を阻害するために、例えばこのような抗原に結合することにより、用いることができる。

【 0 0 8 6 】

従って、本発明は、腫瘍関連抗原に選択的に結合することができる結合物質、例えば抗

10

20

30

40

50

体または抗体フラグメントを含む。抗体は、慣用の方式で製造されるポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む。

【0087】

抗体分子の小さい部分であるパラトープのみが、抗体のこのエピトープへの結合に関与することは、知られている(Clark, W. R. (1986), *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), *Essential Immunology*, 第7版、Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照)。pFc'およびFc領域は、例えば、完全なカスケードのエフェクターであるが、抗原結合に関与しない。F(ab')₂フラグメントと呼ぶ、pFc'領域が酵素的に除去されたか、またはpFc'領域を有せずに產生された抗体は、完全な抗体の両方の抗原結合部位を有する。同様に、Fabフラグメントと呼ぶ、Fc領域が酵素的に除去されたか、または前述のFc領域を有せずに产生された抗体は、インタクトな(intact)の抗体分子の1つの抗原結合部位を有する。さらに、Fabフラグメントは、抗体の共有結合した軽鎖およびFdと呼ぶ、前述の抗体の重鎖の一部からなる。Fdフラグメントは、抗体特異性の主要な決定因子であり(単一のFdフラグメントは、10個までの異なる軽鎖と、抗体の特異性を変化せずに関連することができ)、Fdフラグメントは、単離された際に、エピトープに結合する能力を維持する。

10

【0088】

抗体の抗原結合部位内に位置するのは、抗原エピトープおよびフレームワーク領域(FRs)と直接相互作用し、パラトープの三次構造を維持する、相補性決定領域(CDRs)である。重鎖のFdフラグメントおよびIgG免疫グロブリンの軽鎖の両方は、各々の場合において、3つの相補性決定領域(CDR1～CDR3)により分離された、4つのフレームワーク領域(FR1～FR4)を含む。CDRおよび、特にCDR3領域および尚一層特定的には、重鎖のCDR3領域は、かなりの程度で、抗体特異性に関与する。

20

【0089】

哺乳類抗体の非CDR領域は、同一の、または異なる特異性を有する抗体の同様の領域により置換されることができ、もとの抗体のエピトープについての特異性は維持されると知られている。これにより、非ヒトCDRがヒトFRおよび/またはFc/pFc'領域に共有結合して、機能的抗体を产生する、「ヒト化された」抗体を発生させることができた。

30

【0090】

例えば、WO 92/04381には、少なくとも一部のマウスFR領域が、ヒト由来のFR領域で置換された、ヒト化マウスRSV抗体の产生および使用が記載されている。抗原結合能力を有するインタクトな抗体のフラグメントを含むこの種類の抗体は、しばしば、「キメラ」抗体と呼ばれる。

【0091】

本発明はまた、Fcおよび/またはFRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、相同性ヒトまたは非ヒト配列で置換された、抗体のF(ab')₂、Fab、FvおよびFdフラグメント、キメラ抗体、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、相同性ヒトまたは非ヒト配列で置換された、キメラF(ab')₂フラグメント抗体、FRおよび/またはCDR1および/またはCDR2および/または軽鎖CDR3領域が、相同性ヒトまたは非ヒト配列で置換された、キメラFabフラグメント抗体、およびFRおよび/またはCDR1および/またはCDR2領域が、相同性ヒトまたは非ヒト配列で置換された、キメラFdフラグメント抗体を提供する。本発明はまた、「単鎖」抗体を含む。

40

【0092】

本発明はまた、腫瘍関連抗原に特異的に結合するポリペプチドを含む。この種類のポリペプチド結合物質は、例えば、単に、固定された形態で溶液中に、またはファージディスプレイライブラリーとして製造することができる、縮重ペプチドライブラリーにより、提供することができる。同様に、1種または2種以上のアミノ酸を有するペプチドの組み合

50

わせライブラーを製造することも可能である。ペプトイドおよび非ペプチド性合成残基のライブラーもまた、製造することができる。

【0093】

ファージディスプレイは、本発明の結合ペプチドを同定するのに特に有効であり得る。これに関して、例えば、長さが4～約80アミノ酸残基である挿入物を提示するファージライブラーを製造する（例えば、M13、fdまたはラムダファージを用いて）。次に、腫瘍関連抗原に結合するインサートを有するファージを、選択する。このプロセスを、腫瘍関連抗原に結合するファージの再選択の2つまたは3つ以上のサイクルにより、繰り返すことができる。繰り返されたラウンドにより、特定の配列を有するファージの濃縮がもたらされる。DNA配列の分析を実施して、発現されたポリペプチドの配列を同定することができる。腫瘍関連抗原に結合する配列の最小の直線状部分を、決定することができる。酵母の「ツーハイブリッドシステム(two-hybrid system)」を、また、腫瘍関連抗原に結合するポリペプチドを同定するために用いることができる。本発明において記載された腫瘍関連抗原またはこのフラグメントを、ファージディスプレイライブラーを含むペプチドライブラーをスクリーニングするために用いて、腫瘍関連抗原のペプチド結合パートナーを同定し、選択することができる。このような分子を、例えば、スクリーニングアッセイ、精製プロトコルのために、腫瘍関連抗原の機能の阻害および当業者に知られている他の目的のために、用いることができる。

10

【0094】

上記に記載した抗体および他の結合分子を、例えば、腫瘍関連抗原を発現する組織を同定するために用いることができる。また、抗体は、腫瘍関連抗原を発現する細胞および組織を示すための特定の診断物質に結合させることができる。また、これらを、治療的に有用な物質に結合させることができる。診断物質には、非限定的に、硫酸バリウム、ヨーセタミン酸(iocetamic acid)、ヨーパノ酸、カルシウムイポデート(calcium ipodate)、ナトリウムジアトリゾエート(sodium diatrizoate)、メグルミンジアトリゾエート(meglumine diatrizoate)、メトリザミド(metrizamide)、ナトリウムチロパノエート(sodium tyropanoate)並びに陽電子放射体、例えばフッ素-18および炭素-11、ガンマ線放射体、例えばヨウ素-123、テクネチウム-99m、ヨウ素-131およびインジウム-111、核磁気共鳴のための核種、例えばフッ素およびガドリニウムを含む放射性診断薬が含まれる。

20

【0095】

本発明において、用語「治療的に有用な物質」は、所望のように、抗癌剤、放射活性ヨウ素標識化合物、毒素、細胞分裂停止または細胞溶解薬などを含む、1種または2種以上の腫瘍関連抗原を発現する細胞に選択的に送達されるすべての治療分子を意味する。抗癌剤には、例えば、アミノグルテチミド、アザチオプリン、硫酸ブレオマイシン、ブスルファン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シクロスボリン、シタラビジン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビン、ドキソルビシン、タキソール、エトポシド、フルオロウラシル、インターフェロン-、ロムスチン、メルカブトプリン、メトトレキセート、マイトタン、プロカルバジンHC1、チオグアニン、硫酸ビンプラスチンおよび硫酸ビンクリスチンが含まれる。他の抗癌剤は、例えば、Goodman and Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 第8版、1990, McGraw-Hill, Inc.、特に第52章(Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. C. Habner))に記載されている。毒素は、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、コレラ毒素、百日咳毒素、リシン、ゲロニン、アブリン、ジフテリア外毒素またはブソイドモナス(Pseudomonas)外毒素などのタンパク質であることができる。毒素残基はまた、高エネルギーを放射する放射性核種、例えばコバルト-60であることができる。

30

40

【0096】

用語「患者」は、本発明において、ヒト、非ヒト霊長類または他の動物、特に哺乳類、例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたはげっ歯動物、例えばマウスおよびラットを意味する。特に好ましい態様において、患者は、ヒトである。

50

【0097】

本発明において、用語「疾患」は、腫瘍関連抗原が発現されるかまたは異常に発現されるすべての病理学的状態を意味する。「異常な発現」は、本発明において、発現が、健康な個体における状態と比較して、変化した、好ましくは増大したことを意味する。発現の増大は、少なくとも10%、特に少なくとも20%、少なくとも50%または少なくとも100%の増大を意味する。1つの態様において、腫瘍関連抗原は、罹患した個体の組織においてのみ発現される一方、健康な個体における発現は抑制されている。このような疾患の1つの例は、癌、特に精上皮腫、黒色腫、奇形腫、神経膠腫、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌および肺癌である。

【0098】

本発明において、生物学的試料は、組織試料および/または細胞試料であることができ、本明細書中に記載した種々の方法において用いるために、慣用の方法で、例えばパンチ生検を含む組織生検により、および血液、気管支吸引液、尿、糞便または他の体液を採取することにより得ることができる。

【0099】

本発明において、用語「免疫反応性細胞」は、好適な刺激で免疫細胞（例えばB細胞、ヘルパーT細胞または細胞溶解性T細胞）に成熟することができる細胞を意味する。免疫反応性細胞は、CD34⁺造血幹細胞、未成熟および成熟T細胞並びに未成熟および成熟B細胞を含む。腫瘍関連抗原を認識する細胞溶解性またはヘルパーT細胞の産生が望ましい場合には、免疫反応性細胞を、腫瘍関連抗原を発現する細胞と、細胞溶解性T細胞およびヘルパーT細胞の産生、分化および/または選択を好む条件下で、接触させる。抗原に暴露された際の、T細胞前駆体の細胞溶解性T細胞への分化は、免疫系のクローニング的選択に類似する。

【0100】

いくつかの治療方法は、患者の免疫系の反応に基づいており、これは、抗原提示細胞、例えば1種または2種以上の腫瘍関連抗原を提示する癌細胞の溶解をもたらす。これに関連して、例えば腫瘍関連抗原とMHC分子との複合体に特異的な自己細胞障害性Tリンパ球を、細胞的異常を有する患者に投与する。このような細胞障害性Tリンパ球のインビトロでの産生は、知られている。T細胞を分化させる方法の例は、WO-A-9633265中に見出すことができる。一般的に、血液細胞などの細胞を含む試料を、患者から採取し、細胞を、複合体を提示し、細胞障害性Tリンパ球の増殖を生じさせることができるもの（例えば樹状細胞）と接触させる。標的細胞は、COS細胞などのトランスフェクトした細胞であることができる。これらのトランスフェクトした細胞は、これらの表面上に所望の複合体を提示し、細胞障害性Tリンパ球と接触した際には、後者の増殖を刺激する。次に、クローニング的に増殖した自己細胞障害性Tリンパ球を、患者に投与する。

【0101】

抗原特異的な細胞障害性Tリンパ球を選択する他の方法において、MHCクラスI分子/ペプチド複合体の蛍光を発生する四量体を、細胞障害性Tリンパ球の特定のクローニングするためには、(Altman et al., Science 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Curr. Biol. 8:413-416, 1998)。可溶性MHCクラスI分子は、インビトロで、前述のクラスI分子に結合する β_2 ミクログロブリンおよびペプチド抗原の存在下で折り畳まれる。MHC/ペプチド複合体を精製し、次にビオチンで標識する。四量体は、ビオチン化されたペプチド-MHC複合体を標識したアビシン（例えばフィコエリスリン）と、4:1のモル比で混合することにより、形成される。次に、四量体を、細胞障害性Tリンパ球、例えば末梢血液またはリンパ節と接触させる。四量体は、ペプチド抗原/MHCクラスI複合体を認識する細胞障害性Tリンパ球に結合する。四量体に結合した細胞を、蛍光制御されたセルソーティング(cell sorting)により分類して、反応性の細胞障害性Tリンパ球を単離することができる。次に、単離された細胞障害性Tリンパ球を、インビトロで増殖させることができる。

【0102】

10

20

30

40

50

養子移入と呼ばれる治療方法において(Greenberg, J. Immunol. 136(5):1917, 1986; Riddel et al., Science 257:238, 1992; Lynch et al., Eur. J. Immunol. 21:1403-1410, 1991; Kast et al., Cell 59:603-614, 1989)、所望の複合体を提示する細胞(例えば樹状細胞)を、処置するべき患者の細胞障害性Tリンパ球と混ぜ合わせ、特定の細胞障害性Tリンパ球の増殖をもたらす。次に、増殖された細胞障害性Tリンパ球を、特定の複合体を提示する特定の異常な細胞により特徴づけられる、細胞異常を有する患者に投与する。次に、細胞障害性Tリンパ球は、異常な細胞を溶解し、これにより所望の治療効果が達成される。

【0103】

しばしば、患者のT細胞レパートリーの中で、この種類の特定の複合体に対する低い親和性を有するT細胞のみが増殖し得る。その理由は、高い親和性を有するT細胞は、耐容性の発生により消滅したからである。ここで、代替物は、T細胞レセプター自体の導入であることができる。また、このために、所望の複合体を提示する細胞(例えば樹状細胞)を、健康な個体の細胞障害性Tリンパ球と混ぜ合わせる。ドナーが特定の複合体と以前に接觸したことがない場合には、これにより、高い親和性を有する特定の細胞障害性Tリンパ球の増殖がもたらされる。これらの増殖した特定のTリンパ球の高親和性T細胞レセプターをクローニングし、遺伝子導入により、例えばレトロウイルスベクターを用いて、所望のように他の患者のT細胞中に形質導入することができる。次に、養子移入を、これらの遺伝子的に変化したTリンパ球を用いて実施する(Stanislawski et al., Nat Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels et al., Nat Immunol. 2:957-61, 2001)。

10

20

【0104】

上記の治療概念は、患者の異常な細胞の少なくともいくらかが、腫瘍関連抗原とHLA分子との複合体を提示するという事実から開始する。このような細胞を、自体公知の方法で単離することができる。複合体を提示する細胞が同定されると直ちに、これらを、細胞障害性Tリンパ球を含む、患者からの試料と混ぜ合わせることができる。細胞障害性Tリンパ球が、複合体を提示する細胞を溶解する場合には、腫瘍関連抗原が提示されていると推測することができる。

30

【0105】

養子移入は、本発明において用いることができる療法の唯一の形態ではない。また、細胞障害性Tリンパ球を、インビオで、自体公知の方法で生成することができる。1つの方法は、複合体を発現する非増殖性細胞を用いる。ここで用いられる細胞は、通常複合体を発現する細胞、例えば照射された腫瘍細胞または複合体(即ち、抗原性ペプチドと提示HLA分子)の提示に必要な一方もしくは両方の遺伝子をトランスフェクトされた細胞である。種々の種類の細胞を用いることができる。さらに、目的とする遺伝子の一方または両方を有するベクターを用いることが、可能である。特に好ましいのは、ウイルス性または細菌性ベクターである。例えば、腫瘍関連抗原またはこの一部をコードする核酸を、特定の種類の組織または細胞において、前述の腫瘍関連抗原またはこのフラグメントの発現を制御するプロモーターおよびエンハンサー配列に、機能的に結合させることができる。

40

【0106】

核酸は、発現ベクター中に導入することができる。発現ベクターは、外来性核酸を挿入することができる、改変されていない染色体外核酸、プラスミドまたはウイルスゲノムであることができる。また、腫瘍関連抗原をコードする核酸を、レトロウイルスゲノム中に挿入することができ、これにより、核酸を、標的組織または標的細胞のゲノム中に組み込むことが可能になる。これらの系において、微生物、例えばワクシニアウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルスまたはアデノウイルスは、目的とする遺伝子を運び、事実上宿主細胞に「感染」させる。他の好ましい形態は、例えば、リポソームを用いた導入により、またはエレクトロポレーションにより細胞中に導入することができる、組み換えRNAの形態の腫瘍関連抗原の導入である。得られた細胞は、関連する複合体を提示し、次に増殖する自己細胞障害性Tリンパ球により認識される。

【0107】

50

同様の効果を、腫瘍関連抗原またはこのフラグメントを、アジュバントと組み合わせて、インビボでの抗原提示細胞中への導入を可能にすることにより、達成することができる。腫瘍関連抗原またはこのフラグメントを、タンパク質として、DNA（例えばベクター内）として、またはRNAとして表すことができる。腫瘍関連抗原はプロセシングされ、HLA分子のためのペプチドパートナーを产生し、一方、このフラグメントを、さらなるプロセシングを必要とせずに提示することができる。後者は、特に、これらがHLA分子に結合することができる場合である。好ましいのは、完全な抗原がインビボで、樹状細胞によりプロセシングされる投与形態である。その理由は、これはまた、有効な免疫応答のために必要であるヘルパーT細胞応答を生じ得るからである(Ossendorp et al., Immunol Lett. 74:75-9, 2000; Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187:693-702, 1998)。

10

【0108】

一般的に、有効量の腫瘍関連抗原を、患者に、例えば皮内注射により投与することができる。しかし、注射をまた、リンパ節中に、節内に(*intranodally*)実施することができる(Maloy et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:3299-303, 2001)。また、これを、樹状細胞中への取り込みを容易にする試薬と組み合わせて実施することができる。インビボでの好ましい腫瘍関連抗原は、同種癌抗血清または多くの癌患者のT細胞と反応するものを含む。しかし、特に興味深いものは、自発的免疫応答が予め存在しないものである。明らかに、腫瘍を溶解することができるこれらの免疫応答に対して誘発することが可能である(Keogh et al., J. Immunol. 167:787-96, 2001; Appella et al., Biomed Pept Proteins Nucleic Acids 1:177-84, 1995; Wentworth et al., Mol Immunol. 32:603-12, 1995)。

20

【0109】

また、本発明により記載された医薬組成物を、免疫化のためのワクチンとして用いることができる。本発明において、用語「免疫化」または「ワクチン接種」は、抗原に対する免疫応答の増大または活性化を意味する。腫瘍関連抗原またはこれをコードする核酸を用いることにより、癌に対する免疫化効果を試験するために、動物モデルを用いることが可能である。例えば、ヒト癌細胞を、マウスに導入して、腫瘍を発生させることができ、腫瘍関連抗原をコードする1種または2種以上の核酸を、投与することができる。癌細胞に対する効果（例えば腫瘍の大きさの減少）を、核酸による免疫化の有効性についての基準として測定することができる。

30

【0110】

免疫化のための組成物の一部として、1種または2種以上の腫瘍関連抗原またはこの刺激フラグメントを、免疫応答を誘発するための、または免疫応答を増大させるための1種または2種以上のアジュバントと共に投与する。アジュバントは、抗原中に導入されるか、または後者と共に投与され、免疫応答を増大させる物質である。アジュバントは、免疫応答を、抗原貯留（細胞外またはマクロファージ中）を提供し、マクロファージを活性化させ、特定のリンパ球を刺激することにより増強することができる。アジュバントは、知られており、非限定的に、モノホスホリル脂質A(MPL, SmithKline Beecham)、サポニン、例えばQS21(SmithKline Beecham)、DQS21(SmithKline Beecham; WO 96/33739)、QS7、QS17、QS18およびQS-L1(So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997)、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、ビタミンE、モンタニド、アルム、CpGオリゴヌクレオチド(Kreig et al., Nature 374:546-9, 1995を参照)および生物学的に分解可能な油、例えばスクアレンおよび/またはトコフェロールから製造された、種々の油中水エマルジョンを含む。好ましくは、ペプチドを、DQS21/MPLとの混合物で投与する。DQS21のMPLに対する比率は、典型的には、約1:10~10:1、好ましくは約1:5~5:1および特に約1:1である。ヒトへの投与には、ワクチン配合物は、典型的には、DQS21およびMPLを、約1μg~約100μgの範囲内で含む。

40

【0111】

また、患者の免疫応答を刺激する他の物質を、投与することができる。例えば、ワクチ

50

ン接種中のサイトカインを、リンパ球に対するこれらの調節特性により用いることが可能である。このようなサイトカインは、例えば、ワクチンの保護作用を増大することが示された、インターロイキン-12 (IL-12) (Science 268:1432-1434, 1995を参照)、GM-CSF および IL-18 を含む。

【0112】

免疫応答を増強し、従ってワクチン接種において用いることができる、多くの化合物がある。前述の化合物は、タンパク質または核酸の形態で提供された同時刺激分子を含む。このような同時刺激分子の例は、樹状細胞 (DC) 上で発現され、T細胞上で発現されたCD28分子と相互作用する、B7-1 および B7-2 (それぞれCD80 および CD86) である。この相互作用は、抗原 / MHC / TCR により刺激された (シグナル1) T細胞のための同時刺激 (シグナル2) を提供し、これにより、前述のT細胞の増殖およびエフェクター機能を増強する。B7 はまた、T細胞上のCTLA4 (CD152) と相互作用し、CTLA4 および B7 リガンドに関与する研究により、B7-CTLA4 相互作用が、抗腫瘍免疫性および CTL 増殖を増強し得ることが実証される (Zheng, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998))。

10

【0113】

B7 は、典型的には、腫瘍細胞上では発現されず、従って、これらは、T細胞についての有効な抗原提示細胞 (APCs) ではない。B7 発現の誘発により、腫瘍細胞が、細胞障害性 T リンパ球の増殖およびエフェクター機能を、一層有効に刺激することが可能になる。B7 / IL-6 / IL-12 の組み合わせによる同時刺激により、T細胞集団中の IFN-ガンマおよび Th1 - サイトカインプロファイルの誘発が明らかになり、さらに増強された T 細胞活性がもたらされた (Gajewski et al., J. Immunol. 154:5637-5648 (1995))。

20

【0114】

細胞障害性 T リンパ球の完全な活性化および完全なエフェクター機能は、前述のヘルパー T 細胞上の CD40 リガンドと、樹状細胞により発現された CD40 分子との間の相互作用を介した、ヘルパー T 細胞の関与を必要とする (Ridge et al., Nature 393:474 (1998), Bennett et al., Nature 393:478 (1998), Schoenberger et al., Nature 393:480 (1998))。この同時刺激シグナルの機構は、おそらく、前述の樹状細胞 (抗原提示細胞) による B7 産生および関連する IL-6 / IL-12 産生の増大に関連する。従って、CD40 - CD40L 相互作用は、シグナル1 (抗原 / MHC - TCR) およびシグナル2 (B7 - CD28) の相互作用を補完する。

30

【0115】

樹状細胞を刺激するための抗 CD40 抗体の使用は、通常は炎症応答の範囲外にあるか、または非専門的抗原提示細胞 (腫瘍細胞) により提示される腫瘍抗原に対する応答を直接増強すると予測される。これらの刺激において、ヘルパー T および B7 同時刺激シグナルは、提供されない。この機構を、抗原でパルスされた樹状細胞に基づく療法と一緒に、またはヘルパー T エピトープが既知の TRA 前駆体において明らかにされていない状態において、用いることができる。

30

【0116】

本発明はまた、核酸、ポリペプチドまたはペプチドの投与を提供する。ポリペプチドおよびペプチドを、自体公知の方法で投与することができる。1つの態様において、核酸を、エクスピボ方法により、即ち細胞を患者から採りだし、前述の細胞を遺伝子的に改変して、腫瘍関連抗原を導入し、変化した細胞を患者中に再び導入することにより、投与する。これは、一般的に、遺伝子の機能的コピーを患者の細胞中にインビトロで導入し、遺伝子的に変化した細胞を患者中に再び導入することを含む。遺伝子の機能的コピーは、遺伝子が、遺伝子的に変化した細胞中で発現されることを可能にする調節要素の機能的制御の下にある。トランスフェクションおよび形質導入方法は、当業者に知られている。本発明はまた、核酸をインビボで、ウイルスなどのベクターおよび標的制御リポソームを用いることにより投与することを提供する。

40

50

【0117】

好ましい態様において、腫瘍関連抗原をコードする核酸を投与するためのウイルスベクターを、アデノウイルス、アデノ隨伴ウイルス、ワクシニアウイルスおよび弱毒ポックスウイルスを含むポックスウイルス、セムリキフォレスト(Semliki Forest)ウイルス、レトロウイルス、シンドビス(Sindbis)ウイルス並びにT yウイルス様粒子からなる群から選択する。特に好ましいのは、アデノウイルスおよびレトロウイルスである。レトロウイルスは、典型的には、複製欠乏性である（即ち、これらは、感染性粒子を発生することができない）。

【0118】

種々の方法を用いて、本発明において、核酸を細胞中に、インピトロまたはインピボで導入することができる。この種類の方法は、核酸CaPO₄沈殿物のトランスフェクション、DEAEと関連する核酸のトランスフェクション、目的とする核酸を担持する前述のウイルスでのトランスフェクションまたは感染、リポソーム媒介トランスフェクションなどを含む。特定の態様において、好ましいのは、核酸を特定の細胞に送達させることである。このような態様において、核酸を細胞（例えばレトロウイルスまたはリポソーム）に投与するために用いられる担体は、結合した標的制御分子を有することができる。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体または標的細胞上のレセプターに対するリガンドなどの分子を、核酸担体中に組み込むか、またはこれに付着させることができる。好ましい抗体は、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体を含む。核酸のリポソームを介しての投与が望ましい場合には、エンドサイトーシスと関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、リポソーム配合物中に導入して、標的制御および／または取り込みを可能にすることができる。このようなタンパク質は、特定の種類の細胞に特異的なカブシドタンパク質またはこのフラグメント、インターナリゼーションするタンパク質に対する抗体、細胞内部位に向けられるタンパク質などを含む。

10

20

30

【0119】

本発明の治療組成物を、薬学的に適合性の製剤において投与することができる。このような製剤は、通常、塩、緩衝物質、保存剤、担体、補充免疫性増強物質、例えばアジュvant、CpGおよびサイトカイン並びに、適切な場合には、他の治療的に活性な化合物の薬学的に適合性の濃縮物を含むことができる。

【0120】

本発明の治療的に活性な化合物を、注射または注入によるものを含む、すべての慣用の経路により投与することができる。投与を、例えば、経口的に、静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に、または経皮的に実施することができる。好ましくは、抗体を、肺エアロゾルにより治療的に投与する。アンチセンス核酸を、好ましくは、ゆっくりとした静脈内投与により投与する。

40

【0121】

本発明の組成物を、有効な量で投与する。「有効な量」は、所望の反応または所望の効果を、単独で、またはさらなる用量と共に達成する量を意味する。1種または2種以上の腫瘍関連抗原の発現により特徴づけられる、特定の疾患または特定の症状の処置において、所望の反応は、疾患の経過の阻害に関連する。これは、疾患の進行の低速化および、特に疾患の進行の中止を含む。また、疾患または症状の処置における所望の反応は、前述の疾患または前述の症状の発症の遅延または発症の抑制であってもよい。

【0122】

本発明の組成物の有効な量は、処置されるべき症状、疾患の重篤度、年齢、生理学的状態、大きさおよび体重、処置の継続期間、随伴する療法のタイプ（存在する場合）、投与の特定の経路および同様の要因を含む患者の個別のパラメーターに依存する。

40

【0123】

本発明の医薬組成物は、好ましくは無菌であり、所望の反応または所望の効果を生じさせるのに有効な量の治療的に活性な物質を含む。

【0124】

50

本発明の組成物の投与される用量は、種々のパラメーター、例えば投与のタイプ、患者の症状、投与の所望の期間などに依存することができる。患者における反応が、最初の用量で不十分な場合には、一層高い用量（または異なる一層局所的な投与経路により達成される有効な一層高い用量）を用いることができる。

【0125】

一般的に、 $1\text{ng} \sim 1\text{mg}$ 、好ましくは $10\text{ng} \sim 100\mu\text{g}$ の腫瘍関連抗原の用量を、処置のために、または免疫応答を発生させるか、もしくは増強するために処方し、投与する。腫瘍関連抗原をコードする核酸（DNAおよびRNA）の投与が望ましい場合には、 $1\text{ng} \sim 0.1\text{mg}$ の用量を、処方し、投与する。

【0126】

本発明の医薬組成物を、一般的に、薬学的に適合性の量で、および薬学的に適合性の組成物中で投与する。用語「薬学的に適合性の」は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない無毒性物質を意味する。この種類の製剤は、通常、塩、緩衝物質、保存剤、担体および、適切な場合には、他の治療的に活性な化合物を含むことができる。医薬において用いる際には、塩は、薬学的に適合性でなければならない。しかし、薬学的に適合性ではない塩を、薬学的に適合性の塩を製造するために用いることができ、これは、本発明に含まれる。この種類の薬理学的および薬学的に適合性の塩には、非限定的に、以下の酸から製造されるものが含まれる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸など。また、薬学的に適合性の塩を、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩、例えばナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩として調製することができる。

10

20

【0127】

本発明の医薬組成物は、薬学的に適合性の担体を含むことができる。本発明において、用語「薬学的に適合性の担体」は、ヒトへの投与に適する1種または2種以上の適合性の固体または液体充填剤、希釈剤またはカプセル封入物質を意味する。用語「担体」は、活性成分が適用を容易にするために混ぜ合わされる、天然の、または合成の性質を有する有機または無機成分を意味する。本発明の医薬組成物の成分は、通常、所望の薬学的効能を実質的に損なう相互作用が発生しないようになっている。

【0128】

本発明の医薬組成物は、好適な緩衝物質、例えば塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸および塩中のリン酸を含むことができる。

30

医薬組成物は、適切な場合には、また、好適な保存剤、例えば塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベンおよびチメロサールを含むことができる。

医薬組成物は、通常、均一な投薬形態で提供され、自体公知の方法で製造することができる。本発明の医薬組成物は、例えば、カプセル、錠剤、トローチ剤、懸濁液、シロップ、エリクシルの形態またはエマルジョンの形態であることができる。

【0129】

非経口投与に適する組成物は、通常、活性化合物の無菌の水性または非水性製剤を含み、これは、好ましくは、受容者の血液と等張である。適合性担体および溶媒の例は、リンガー溶液および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに、通常無菌の、固定油(fixed oil)を、溶液または懸濁媒体として用いる。

40

本発明を、以下の図面および例により詳細に記載し、これは、例示目的でのみ用い、限られたことの意味しない。この記載および例のために、本発明に同様に含まれるさらなる態様は、当業者により到達可能である。

【0130】

図面：

図1：eCTのクローニングの図式的表示。この方法は、データベース中の候補遺伝子（GOI = 「目的とする遺伝子(Genes of interest)」）を同定し、前述の遺伝子を、RT-PCRにより試験することを含む。

図2：LDH-Cのスプライシング。オルタナティブスプライシングにより、エクソン3

50

(配列番号：2)、2つのエクソン3および4(配列番号：3)、エクソン3、6および7(配列番号：4)ならびにエクソン7(配列番号：5)の欠如がもたらされる。ORF = オープンリーディングフレーム、aa = アミノ酸。

【0131】

図3：可能なLDH-Cタンパク質のアライメント。配列番号：8および配列番号：10は、原型タンパク質(配列番号：6)のトランケートされた(truncated)部分である。配列番号7：配列番号：9、配列番号：11、配列番号：12および配列番号：13のタンパク質配列を、さらに変化させ、これは、腫瘍特異的エピトープ(太字で印刷した)のみを含む。触媒中心を枠で囲む。

図4：リアルタイムPCRによる種々の組織におけるLDH-Cの定量。精巣以外の正常な組織において、転写物は検出されず、顕著なレベルの発現が、腫瘍において検出された。

【0132】

図5：TPTEバリアントのエクソン構成。本発明において、スプライスバリアントを同定し(配列番号：20、配列番号：21、配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57)、これは、精巣組織において、および腫瘍において発現され、これは、フレームシフトしており、従って変化した配列領域を有する。

図6：可能なTPTEタンパク質のアライメント。オルタナティブスプライシングにより、コードされたタンパク質の変化がもたらされ、リーディングフレームは、原則として保持されている。推定される膜貫通ドメインを、太字で記載し、触媒ドメインを枠で囲む。

【0133】

図7：ヌクレオチドレベルでのTSPBバリアントのアライメント。本発明において見出されたTSPBバリアントのヌクレオチド配列(配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33)の、既知の配列(NM_006781、配列番号：29)に対する差異を、太字で記載する。

図8：タンパク質レベルでのTSPBバリアントのアライメント。本発明において見出されたTSPBバリアントによりコードされるタンパク質(配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36)において、フレームシフトにより、上記に記載したタンパク質(配列番号：30、NM_006781)に対する実質的な差異が生じ、これを、太字で示す。

【0134】

図9：MS4A12についてのRT-PCR。発現を、精巣、大腸および結腸直腸癌腫(carcinoma)(大腸癌腫)においてのみ試験した組織において、検出した。示した6種の肝臓組織試料の1つにおいて、この試料が、大腸癌腫転移により浸潤していたため、陽性(positive)の検出を、MS4A12について実施した。また、後の研究により、大腸癌腫転移における明確な発現が例証された。

図10：BRCA1についてのRT-PCR。BRCA1は、正常な乳腺組織における発現と比較して、乳房腫瘍において、明確に過剰発現されている。

【0135】

図11：MORC、TPX1、LDHC、SGY-1についてのRT-PCR。種々の正常組織の研究により、精巣のみにおける発現が明らかである(1皮膚、2小腸、3大腸、4肝臓、5肺、6胃、7乳房、8腎臓、9卵巣、10前立腺、11甲状腺、12白血球、13胸腺、14ネガティブコントロール、15精巣)。腫瘍の試験(1~17肺腫瘍、18~29黒色腫、30ネガティブコントロール、31精巣)により、個別のeCTについての異なる頻度を有する前述の腫瘍における異所性発現が明らかである。

図12：MCF-7乳癌細胞株におけるLDHCのミトコンドリアの局在。MCF-7細胞に、LDHC発現プラスミドを、一過性トランスフェクトした。抗原をLDHC特異的抗体で検出し、これは、ミトコンドリア呼吸鎖酵素であるチトクロームCオキシダーゼとの明確な共局在(colocalization)を示した。

【0136】

10

20

30

40

50

図13：MCF-7細胞の細胞表面におけるTPTEの予測されたトポロジー(topology)および細胞内局在。左側の図式は、4つの推定されるTPTE膜貫通ドメイン(矢印)を示す。MCF-7細胞にTPTE発現プラスミドを一過性にトランスフェクトした。抗原を、TPTE特異的抗体を用いて検出し、これは、細胞表面上に位置するMHC-I分子との明確な共局在を示した。

図14：細胞膜上のMS4A12の局在。腫瘍細胞に、GFPタグ付MS4A12コンストラクトを一過性にトランスフェクトし、これは、共焦点免疫蛍光顕微鏡観察において、原形質膜マーカーとの完全な共局在を示した。

【0137】

例：

10

材料および方法

用語「インシリコ(in silico)」、「電子的」および「仮想(virtual)クローニング」は、単に、データベースに基づく方法を用いることを意味し、これはまた、実験室実験的プロセスを模擬するために用いることができる。

他に明確に定義しない限り、すべての他の用語および表現を、当業者により理解されるように用いる。述べた手法および方法は、自体公知の方法で実施し、これは、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。キットおよび試薬を用いることを含むすべての方法は、製造者の情報に従って実施する。

【0138】

20

eCT(電子的にクローン化された癌/精巣遺伝子)を決定するためのデータマイニングに基づく方法

2種のインシリコ方法、即ちGenBankキーワード検索およびcDNAxProfilerを、組み合わせた(図1)。NCBI ENTREZ Search and Retrieval System(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)を用いて、GenBank検索を、精巣組織中で特異的に発現するとして注釈を付された候補遺伝子について、実施した(Wheeler et al., Nucleic Acids Research 28:10-14, 2000)。

キーワード「testis-specific gene(精巣特異的遺伝子)」、「sperm-specific gene(精子特異的遺伝子)」、「spermatogonia-specific gene(精原細胞特異的遺伝子)」でのクエリーを実施して、候補遺伝子(GOI、目的とする遺伝子)を、データベースから抽出した。検索は、これらのデータベースの全体的な情報の一部に、生物体について「ホモサピエンス」、および分子のタイプについて「mRNA」の制限を用いることにより、限定された。

30

見出されたGOIのリストを、同一の配列について異なる名称を決定し、このような過剰なものを除去することにより、実施した。

【0139】

キーワード検索により得られたすべての候補遺伝子を、次に、これらの組織分布に関して、「電子的ノーザン」(eNorthern)方法により研究した。eNorthernは、EST(expressed sequence tag)(発現配列タグ)データベースを用いてGOIの配列をアライメントすることに基づく(Adams et al., Science 252:1651, 1991)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。GOIに相同性であると見出された各々のESTの組織起源を、決定することができ、このようにして、すべてのESTの合計により、GOIの組織分布の予備的な評価が得られる。さらなる研究を、胎盤および胎性組織を除いて、非精巣正常組織からESTへの相同性を有しないGOIについてのみ、実施した。また、公開されているドメインが、誤って注釈を付けられたcDNAライブラリーを含むというこの評価を、考慮した(Scheurle et al., Cancer Res. 60:4037-4043, 2000)(www.fau.edu/cmbb/publications/cancergenes6.html)。

40

【0140】

用いた第2のデータマイニング方法は、NCBI Cancer Genome Anatomy ProjectのcDNA x Profiler(<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>) (Hillier et al., Genome Res

50

earch 6:807-828, 1996; Pennisi, Science 276:1023-1024, 1997)であった。これにより、理論的オペレータにより互いに関連するべきデータベースにおいて蓄積されたトランスクリプトームのプールが可能になる。本発明者らは、精巣から作成されたすべての発現ライブラリーが、混合されたライブラリーを除いて割り当てられたプールAを、定義した。精巣、卵巣または胎性組織以外の正常な組織から作成されたすべてのcDNAライブラリーを、プールBに割り当てた。一般的に、すべてのcDNAライブラリーを、基礎を構成する作成方法とは独立して用いたが、>1000の大きさを有するもののみとした。プールBを、プールAから、BUT NOTオペレータによりデジタルに減じた。また、このようにして見出されたGOIのセットを、eNorthern研究に付し、文献研究により検証した。

【0141】

10

この組み合わされたデータマイニングは、公共のドメインにおける約13 000の全長遺伝子のすべてを含み、これらの遺伝子から、潜在的に精巣特異的発現を有する合計140の遺伝子を予測する。後者の中に、CT遺伝子群の25の以前から知られている遺伝子があり、これにより、本発明者らの方法の有効性が強調された。

すべての他の遺伝子を、先ず、特定のRT-PCRにより、正常な組織において評価した。非精巣正常組織において発現していることが明らかになった、すべてのGOIを、フォルスポジティブ(false-positive)と見なさなければならず、これを、さらなる研究から除外した。残りのものを、広範囲の腫瘍組織の大きいパネルにおいて研究した。以下に示す抗原は、ここでは、腫瘍細胞において異所的に活性化されたことが明らかになった。

【0142】

20

RNA抽出、ポリ-d(T)プライマーを用いたcDNAの調製およびRT-PCR分析

全RNA(total RNA)を、生来の組織材料から、カオトロビック剤としてイソチオシアニ酸グアニジウムを用いることにより抽出した(Chomczynski & Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-9, 1987)。酸性フェノールで抽出し、イソプロパノールで沈殿させた後に、前述のRNAを、DEPC処理水に溶解した。

2~4μgの全RNAからの一本鎖cDNA合成を、20μlの反応混合物において、Superscript II (Invitrogen)により、製造者の情報に従って実施した。用いたプライマーは、dT(18)オリゴヌクレオチドであった。cDNAの完全性および品質を、p53の30サイクルPCR(センスCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCG、アンチセンスCCTAACCAAGCTGCCAACCTGTAG、ハイブリダイゼーション温度67)における増幅により、チェックした。

30

【0143】

一本鎖cDNAの記録を、多くの正常組織および腫瘍実体から作成した。発現研究のために、これらのcDNAの0.5μlを、30μlの反応混合物中で、GOI特異的性プライマー(以下を参照)および1UのHotStarTaq DNAポリメラーゼ(Qiagen)を用いて、増幅した。各々の反応混合物は、0.3mMのdNTP、0.3μMの各々のプライマーおよび3μlの10×反応緩衝液を含んでいた。

プライマーを、2つの異なるエクソン中に位置するように選択し、フォルスポジティブの結果の理由となる、ゲノムDNAのコンタミネーションによる干渉がないことを、鑄型として逆転写されていないDNAを試験することにより確認した。HotStarTaq DNAポリメラーゼを活性化するために95で15分後、35サイクルのPCRを実施した(94で1分、特定のハイブリダイゼーション温度で1分、72で2分および72で6分の最終的な伸長)。

40

この反応のうちの20μlを、分画し、臭化工チジウムで染色したアガロースゲル上で分析した。

【0144】

以下のプライマーを、対応する抗原の発現分析のために、示したハイブリダイゼーション温度で用いた。

【表1】

LDH-C (67°C)
センス TGCGTAGGCATGGCTTGTGC, アンチセンス CAACATCTGAGACACCATTCC
TPTE (64°C)
センス TGGATGTCACTCTCATCCTTG, アンチセンス CCATAGTTCCCTGTTCTATCTG
TSBP (63°C)
センス TCTAGCACTGTCGATCAAG, アンチセンス TGCCTCTGGTACATCTGAC
MS4A12 (66°) 10
センス CTGTGTCAGCATCCAAGGAGC, アンチセンス TTCACCTTGCCAGCATGTAG
BRCO1 (60°C)
センス CTTGCTCTGAGTCATCAGATG, アンチセンス CACAGAATATGAGGCCATACAG
TPX1 (65°C)
センス TTTGTCTATGGTAGGACC, アンチセンス GGAATGGCAATGATGTTACAG

【0145】

ランダムヘキサーブライマーを用いたcDNAの調製および定量的リアルタイムPCR
LDHC発現を、リアルタイムPCRにより定量した。 20

【0146】

ABI PRISM Sequence Detection System (PE Biosystems, USA)を用いた定量的リアルタイムPCRの原理は、蛍光レポーター染料の放出による、PCR産物の直接的および特定的な検出のためのTaq DNAポリメラーゼの5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を用いる。センスおよびアンチセンスプライマーに加えて、PCRは、二重に蛍光的に標識したプローブ(TaqManプローブ)を用い、これは、PCR産物の配列にハイブリダイズする。プローブを、5'をレポーター色素(例えばFAM)で、および3'をクエンチャーカラー色素(例えばTAMRA)で標識する。プローブが不变である場合には、レポーターのクエンチャーに対する空間的近接性により、レポーター蛍光の放出が抑制される。プローブがPCR産物に、PCRの間にハイブリダイズする場合には、前述のプローブは、Taq DNAポリメラーゼの5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性により切断され、レポーター蛍光の抑制が除去される。目的の増幅の結果としてのレポーター蛍光の増大を、各々のPCRサイクルの後に測定し、定量のために用いる。 30

【0147】

目的遺伝子の発現を、絶対的に、または研究されるべき組織における定常的な発現を有するコントロール遺伝子の発現に対して定量する。LDHC発現は、試料を「ハウスキーピング」遺伝子としての18s RNAに対して標準化した後に、 $-C_t$ 方法(PE Biosystems, USA)により計算した。反応を、二重鎖混合物において実施し、デュプリケートで決定した。cDNAを、製造者の情報に従い、High Capacity cDNA Archive Kit (PE Biosystems, USA)をおよびヘキサーブライマー用いて合成した。各々の場合において、5 μlの希釈されたcDNAを、PCRに、25 μlの合計容積中で用いた：センスプライマー(GGTGTCACTTCTGTGCCCTTCT)300 nM；アンチセンスプライマー(CGGCACCAAGTTCCAAATAG)300 nM；TaqManプローブ(CAAAGGTTCTCCAAATGT)250 nM；センスプライマー-18s RNA 50 nM；アンチセンスプライマー-18s RNA 50 nM；18s RNA 50 nM；18s RNA試料250 nM；12.5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix；最初の変性95(10分)；95(15秒)；60(1分)；40サイクル。エクソン1およびエクソン2の境界を越えての、128 bp産物の増幅のために、記載したすべてのLDHCスプライスバリエントが、定量に含まれた。 40

【0148】

10

20

30

40

50

クローン化および配列分析

全長遺伝子および遺伝子フラグメントを、一般的な方法によりクローン化した。配列を、対応する抗原を p f u プルーフリー・ディング(proof-reading)ポリメラーゼ(Stratagene)により増幅させることにより、決定した。P C R の完了の後に、アデノシンを、HotStar Taq D N A ポリメラーゼにより、単位複製配列の末端につないで、フラグメントを T O P O - T A ベクター中に、製造者の情報に従ってクローン化した。市販のサービスにより、配列決定を実施した。配列を、一般的な予測プログラムおよびアルゴリズムにより分析した。

【 0 1 4 9 】

例 1 : L D H C の新たな腫瘍抗原としての同定

L D H C (配列番号 : 1) およびこの翻訳産物 (配列番号 : 6) は、乳酸脱水素酵素ファミリーの精巣特異的イソ酵素として記載されていた。配列は、GenBankにおいて、アクセッション番号 N M _ 0 1 7 4 4 8 の下に公開されていた。酵素は、1 4 0 k D a の分子量を有するホモテトラマーを形成する(Goldberg, E. et al., Contraception 64(2):93-8, 2001; Cooker et al., Biol. Reprod. 48(6):1309-19, 1993; Gupta, G.S., Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 34(6):361-85, 1999)。

【 0 1 5 0 】

関連した、および遍在的に発現されたイソ酵素 L D H A および L D H B をクロス増幅せず、上記に精巣特異的であると記載した、L D H C 原型配列 N M _ 0 1 7 4 4 8 に基づく、プライマー対 (5 ' - T G C C G T A G G C A T G G C T T G T G C - 3 ' , 5 ' - C A A C A T C T G A G A C A C C A T T C C - 3 ') を用いた発現分析についての R T - P C R 研究により、本発明において、試験したすべての正常な組織の発現が欠如していることが確認され、体細胞におけるこの抗原の厳密な転写抑制が、腫瘍の場合において除去されていることが示された ; 表 1 を参照。C T 遺伝子について古典的に記載されているように、L D H C は、多くの腫瘍実体において発現している。

【 0 1 5 1 】

【表 2 】

表 1. 腫瘍におけるLDHCの発現

組 織	試験した合計	陽 性 (positive)	%
黒色腫	16	7	44
乳房癌腫	20	7	35
結腸直腸腫瘍	20	3	15
前立腺癌腫	8	3	38
気管支癌腫	17	8	47
腎臓細胞癌腫	7	4	57
卵巣癌腫	7	3	43
甲状腺癌腫	4	1	25
子宮頸癌腫	6	5	83
黒色腫細胞株	8	5	63
気管支癌腫細胞株	6	2	33

【 0 1 5 2 】

10

20

30

40

50

増幅産物の予測された大きさは、前述の P C R プライマーを用いて、 8 2 4 b p である。しかし、本発明において、多数の追加のバンドの増幅が、腫瘍において観察されたが、精巣においては観察されなかった。このことが、オルタナティブスプライスバリエントの存在を示すため、完全なオープンリーディングフレームを、 L D H - C 特異的プライマー (5 ' - T A G C G C C T C A A C T G T C G T T G G - 3 ' 、 5 ' - C A A C A T C T G A G A C A C C A T T C C - 3 ') を用いて増幅し、独立した全長クローンを、配列決定した。記載した L D H - C 配列の原型 O R F (配列番号 : 1) および染色体 11 上のゲノム配列とのアライメントにより、追加のスプライスバリエントが確認される (配列番号 : 2 ~ 5) 。オルタナティブスプライシングにより、エクソン 3 (配列番号 : 2) 、 2 つのエクソン 3 および 4 (配列番号 : 3) 、エクソン 3 、 6 および 7 (配列番号 : 4) またはエクソン 7 (配列番号 : 5) の欠如がもたらされる (図 2 を参照) 。

10

【 0 1 5 3 】

これらの新たなスプライスバリエントは、専ら、腫瘍中で発生するが、精巣においては発生しない。オルタナティブスプライシングにより、リーディングフレームにおける変化が生じ、配列番号 : 7 ~ 13 に示すアミノ酸配列をコードする新たな可能な O R F がもたらされる (配列番号 : 7 についての O R F : 配列番号 : 2 およびそれぞれ配列番号 : 4 のヌクレオチド位置 5 9 ~ 2 1 4 ; 配列番号 : 8 についての O R F : 配列番号 : 2 のヌクレオチド位置 2 8 9 ~ 9 3 9 ; 配列番号 : 9 についての O R F : 配列番号 : 3 のヌクレオチド位置 5 9 ~ 1 9 6 ; 配列番号 : 1 0 についての O R F : 配列番号 : 3 のヌクレオチド位置 5 3 5 ~ 7 6 5 ; 配列番号 : 1 1 についての O R F : 配列番号 : 4 のヌクレオチド位置 2 8 9 ~ 6 1 8 ; 配列番号 : 1 2 についての O R F : 配列番号 : 4 のヌクレオチド位置 4 9 7 ~ 6 9 7 ; 配列番号 : 1 3 についての O R F : 配列番号 : 5 のヌクレオチド位置 5 9 ~ 7 8 4) (図 2 、 3) 。中途での終了に加えて、また、代替の開始コドンを用いることも起こり得るため、コードされたタンパク質は、 N 末端および C 末端の両方においてトランケートされうる。

20

【 0 1 5 4 】

配列番号 : 8 および配列番号 : 1 0 が、原型タンパク質のトランケートされた部分を表す一方、配列番号 : 7 、配列番号 : 9 、配列番号 : 1 1 、配列番号 : 1 2 および配列番号 : 1 3 のタンパク質配列は、さらに変化し、これは、腫瘍特異的エピトープのみを含む (図 3 において太字で記載した) 。腫瘍特異的エピトープをもたらすことができるペプチド領域は、以下の通りである (フレームシフトにより得られた厳密な腫瘍特異的の部分に、下線を付す) :

30

【 表 3 】

配列番号 : 14: GAVGMACAISILLKITVYLQTPE (配列番号 : 7 の)

配列番号 : 15: GAVGMACAISILLKWIF (配列番号 : 9 の)

配列番号 : 16: GWIIGEHGDSSGIIWNKRRTLSQYPLCLGAEWCLRCCEN

(配列番号 : 11 の)

配列番号 : 17: MVGLLENMVILVGLYGIKEELFL (配列番号 : 12 の)

配列番号 : 18: EHWKNIHKQVIQRDYME (配列番号 : 13 の)

40

【 0 1 5 5 】

これらの領域は、潜在的に、 T リンパ球により M H C I または M H C I I 分子上で認識することができ、厳密に腫瘍特異的な応答をもたらすエピトープを含むことができる。

【 0 1 5 6 】

予測されたタンパク質のすべてが、嫌気性解糖の最後の段階を表す、ピルビン酸塩の乳酸への N A D H 依存性代謝のための触媒乳酸脱水素酵素ドメインを有するとは限らない。このドメインは、乳酸脱水素酵素としての酵素的機能に必要である (図 3 において枠で

50

囲んだ）。例えばTMpredおよびpSORT (Nakai & Kanehisa, 1992)などのアルゴリズムを用いた、他の分析により、推定されたタンパク質についての種々の細胞内局在が予測される。

【0157】

本発明において、発現のレベルを、リアルタイムPCRにより、特定のプライマー - 試料セットを用いて定量した。単位複製配列が、エクソン1とエクソン2との間の接合部に存在し、従ってすべてのバリアント（配列番号：1～5）を検出する。これらの研究はまた、精巣を除く正常な組織における転写物を検出しない。これらは、腫瘍における発現の顕著なレベルを確認する（図4）。

【0158】

LDHC特異的ポリクローナル抗体を、本発明において、極めてN末端の領域MSTVKEQLIEKLIEDDENSQ（配列番号：80）からペプチドを選択することにより、產生した。LDHC特異的抗体を、ウサギにおいて、このペプチドを用いて產生した。タンパク質発現に対するその後の研究により、精巣および種々の腫瘍における選択的LDHC発現が確認された。さらに、本発明による免疫組織学的研究により、ミトコンドリア中でLDHCのチトクロームCオキシダーゼとの明確な共局在が明らかになった。これは、LDHCが、腫瘍の呼吸鎖における重要な役割を奏することを示す。

10

【0159】

例2：TPTEの新たな腫瘍抗原としての同定

TPTE転写物（配列番号：19）およびこの翻訳産物（配列番号：22）の配列は、GenBankにおいて、アクセション番号NM_013315の下に公開されている(Walker, S.M. et al., Biochem. J. 360(Pt 2):277-83, 2001; Guipponi M. et al., Hum. Genet. 107(2):127-31, 2000; Chen H. et al., Hum. Genet. 105(5):399-409, 1999)。TPTEは、可能な膜貫通チロシンホスファターゼをコードする遺伝子として記載され、精巣特異的発現は、染色体21、13、15、22およびYの動原体周囲領域中に位置する(Chen, H. et al., Hum. Genet. 105:399-409, 1999)。さらに、本発明のアライメント研究により、染色体3および7上の相同性ゲノム配列が明らかである。

20

【0160】

本発明において、PCRプライマー（5' - TGGATGTCACCTCTCATCCCTTG - 3' および 5' - CCCATAGTTCCCTGTTCTATCTG - 3'）を、TPTE（配列番号：19）の配列に基づいて作製し、多くのヒト組織において、RT-PCR分析（95℃、15分；94℃、1分；63℃、1分；72℃、1分；35サイクル）のために用いた。正常組織における発現は、精巣に限定されることが示された。他のeCTについて記載したように、TPTEバリエントは、本発明において、多くの腫瘍組織において異所的に活性化されることが示された；表2を参照。本発明において、他のTPTEスプライスバリエントを同定し（配列番号：20、配列番号：21、配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57）、これは、精巣組織および腫瘍において発現され、これは、フレームシフトおよび変化した配列領域を有する（図5）。

30

【0161】

40

【表4】

表2. 腫瘍におけるTPTEの発現

組織	試験した合計	陽性 (positive)	%
黒色腫	18	9	50
乳房癌腫	20	4	20
結腸直腸腫瘍	20	0	0
前立腺癌腫	8	3	38
気管支癌腫	23	9	39
腎臓細胞癌腫	7	0	0
卵巣癌腫	7	2	29
甲状腺癌腫	4	0	0
子宮頸癌腫	6	1	17
黒色腫細胞株	8	4	50
気管支癌腫細胞株	6	2	33
哺乳類癌腫細胞株	5	4	80

10

20

30

40

50

【0162】

TPTEゲノム配列は、24のエクソンからなる（アクセッショング番号NT_029430）。配列番号：19中に示した転写物は、これらのエクソンをすべて含む。配列番号：20中に示したスプライスバリアントを、エクソン7をスプライシングすることにより產生される。配列番号：21中に示したスプライスバリアントは、エクソン15の下流のイントロンの部分的導入を示す。バリアント配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57が示すように、あるいはまた、エクソン18、19、20および21をスプライスすることも可能である。

【0163】

これらのオルタナティブスプライシングにより、コードされたタンパク質の変化がもたらされ、リーディングフレームは、原則として維持される（図6）。例えば、配列番号：20中に示した配列によりコードされた翻訳産物（配列番号：23）は、配列番号：22中に示した配列と比較して、13個のアミノ酸の欠失を有する。配列番号：21中に示した配列によりコードされた翻訳産物（配列番号：24）は、分子の中心領域に付加的な挿入を有しており、これにより、他のバリアントと14個のアミノ酸が異なる。

【0164】

バリアント配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57の翻訳産物、即ちタンパク質配列番号：58、配列番号：59、配列番号：60、配列番号：61は、同様に変化する。

機能的ドメインを予測するための分析により、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：58、配列番号：60についてチロシンホスファターゼドメインが存在するが、配列番号：59、配列番号：61については存在しないことが明らかである。すべてのバリアントについて、3～4個の膜貫通ドメインが予測される（図6）。

【0165】

特定の抗体を用いた、TPTE抗原発現の分析により、精巣および多くの異なる腫瘍における選択的発現が確認された。さらに、共局在研究により、本発明において、TPTE

が、クラスI免疫グロブリンと共に、腫瘍細胞の細胞表面上に位置することが明らかになった。以前は、T P T Eは、ゴルジ関連タンパク質として記載されているに過ぎなかった。腫瘍細胞の細胞表面上でのT P T E発現のために、この腫瘍抗原は、本発明において、診断および治療モノクローナル抗体を開発するための顕著な標的として、適する。T P T Eの予測された膜トポロジーのために、細胞外に露出した領域は、本発明のこの目的のために特に適する。本発明において、これは、ペプチドF T D S K L Y I P L E Y R S(配列番号：81)およびF D I K L L R N I P R W T(配列番号：82)を含む。

【0166】

さらに、T P T Eは、腫瘍細胞の移動を促進することが示された。このために、真核プロモーターの制御下で、T P T Eをトランスフェクトされた腫瘍細胞およびコントロールの細胞を、「ボイデンチャンバー(Boyden chamber)」移動実験において、これらが直接的な移動を示すか否かについて研究した。ここで、T P T Eがトランスフェクトされた細胞は、本発明によれば、4回の独立した実験において移動が顕著に(3倍)増大していた。これらの機能的データは、T P T Eが、腫瘍の転移における重要な役割を奏することを示す。従って、例えばアンチセンスRNA、発現ベクターまたはレトロウイルスによるRNA干渉(RNAi)の種々の方法を用いることによる、および小さい分子を用いることによる、本発明において腫瘍細胞の内在性T P T E活性を阻害するプロセスにより、減少した転移がもたらされ得、および従って治療的に極めて重要であり得る。腫瘍におけるホスファターゼの活性と、増大した移動および転移の増大した形成との間の偶然の関係が、最近、P T E Nチロシンホスファターゼについて確立された(Iijima and Devreotes Cell 109:599-610, 2002)。

10

20

20

30

【0167】

例3：T S B P の新たな腫瘍抗原としての同定

本発明において用いる電子的クローニング方法により、T S B P(配列番号：29)およびこれから由来するタンパク質(配列番号：30)が得られた。遺伝子は、以前に、精巣特異的に調節されると記載されている(アクセション番号NM_006781)。遺伝子は、塩基性タンパク質をコードし、M H C複合体(C6orf10)をコードする配列に近い染色体6上に位置すると予測された(Stammers M. et al., Immunogenetics 51(4-5):373-82, 2000)。本発明において、以前に記載された配列は、不正確であることが示された。本発明の配列は、実質的に、既知の配列とは異なる。本発明において、3種の異なるスプライシングバリエントを、クローニングした。本発明において見出されたT S B Pバリエントのヌクレオチド配列(配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33)の、既知の配列(NM_006781、配列番号：29)に対する差異を、図7に示す(差異を、太字で示す)。これらは、フレームシフトをもたらし、従って、本発明において見出されたT S B Pバリエントによりコードされたタンパク質(配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36)は、以前に記載されたタンパク質(配列番号：30)とは実質的に異なる(図8)。

30

【0168】

本発明において、この抗原は、正常組織において厳密に転写的に抑制されていることが確認された(P C Rプライマー-5'-T C T A G C A C T G T C T C G A T C A A G -3'、および5'-T G T C C T C T T G G T A C A T C T G A C -3')。しかし、研究した25の正常組織において、T S B Pは、精巣に加えて、正常なリンパ節組織においても発現していた。本発明において、T S B Pの腫瘍における異所性の活性化もまた、検出され、従って、これは、腫瘍マーカーまたは腫瘍関連抗原として適格である(表3)。

40

【0169】

T S B P発現が、初代腫瘍組織において見出されたが、これは、対応する腫瘍実体の永久的な細胞株においては見出されない。さらに、遺伝子は、ノック4の直接的な近隣にあり、これは、動脈において特異的に発現され、血管の形態形成に関与する。これらは、これが、特異的な内皮細胞についてのマーカーであることを顕著に示す。従って、T S B Pは、腫瘍内皮および新生血管の標的化についての潜在的なマーカーとして作用し得る。

50

【0170】

従って、T S B P プロモーターを、リンパ節における選択的発現が望ましい他の遺伝子産物にクローニングすることができる。

特異的な抗体を用いた、T S B P 抗原発現の分析により、精巣およびリンパ節における、並びにまた黒色腫および気管支癌腫におけるタンパク質の選択的局在が確認された。さらに、G F P タグ付 T S B P を用いた免疫組織学的研究により、明確な核周囲(perinuclear)蓄積が明らかになった。

【0171】

【表5】

表3. 腫瘍におけるTSBPの発現

組 織	試験した合計	陽 性 (positive)	%
黒色腫	12	2	16
乳房癌腫	15	0	-
結腸直腸癌腫	15	0	-
前立腺癌腫	8	0	-
気管支癌腫	7	17	41
腎臓細胞癌腫	7	0	-
卵巣癌腫	7	0	-
甲状腺癌腫	4	0	-
子宮頸癌腫	6	0	-
黒色腫細胞株	8	0	-
気管支癌腫細胞株	6	0	-

10

20

30

【0172】

例4：M S 4 A 1 2 の新たな腫瘍抗原としての同定

M S 4 A 1 2 (配列番号：37、アクセッション番号N M _ 0 1 7 7 1 6) およびこの翻訳産物(配列番号：38)は、以前に、B細胞特異的抗原C D 2 0 、造血細胞特異的タンパク質H T m 4 および高親和性I g E レセプターの鎖に関する多遺伝子ファミリーの要素として記載されている。すべてのファミリーの要素は、少なくとも4つの潜在的膜貫通ドメインにより特徴づけられており、C末端およびN末端の両方は、細胞質性である(Liang Y. et al., Immunogenetics 53(5):357-68, 2001; Liang Y. & Tedder, Genomics 7 2(2):119-27, 2001)。本発明において、M S 4 A 1 2 に対するR T - P C R 研究を、実施した。プライマーを、公開されたM S 4 A 1 2 配列(N M _ 0 1 7 7 1 6) (センス：C T G T G T C A G C A T C C A A G G A G C 、アンチセンス：T T C A C C T T G C C A G C A T G T A G)に基づいて選択した。試験した組織において、発現を、精巣、大腸(6 / 8) および結腸直腸癌腫(大腸癌腫)(16 / 20)において、並びに大腸転移(12 / 15)においてのみ検出した(図9)。

40

【0173】

大腸転移の高い発生率により、T S B P が、魅力的な診断および治療標的になる。本発明において、タンパク質配列G V A G Q D Y W A V L S G K G (配列番号：83)を含む予測された細胞外領域は、モノクローナル抗体および小さい化学的阻害剤を産生するのに特に適する。また、本発明において、細胞膜上のM S 4 A 1 2 タンパク質の細胞内局在が、共焦点免疫蛍光における原形質膜マーカーを用いて、蛍光の重ね合わせにより確認され

50

た。

【0174】

【表6】

表4. 正常組織および結腸直腸癌腫および転移におけるMS4A12の発現

回腸	+
大腸	+
肝臓	-
肺	-
リンパ節	-
胃	-
脾臓	-
副腎	-
腎臓	-
食道	-
卵巣	-
直腸	+
精巢	+
胸腺	-
皮膚	-
乳房	-
膵臓	-
PBMC	-
PBMC act.	-
前立腺	-
甲状腺	-
管	-
子宮	-
大脳	-
小脳	-
結腸直腸腫瘍	16/20
結腸直腸腫瘍転移	12/15

10

20

30

40

【0175】

従って、MS4A12は、正常な大腸上皮のための細胞膜に位置する示差抗原であり、これはまた、結腸直腸腫瘍および転移において発現される。

【0176】

例5：BRCO1の新たな腫瘍抗原としての同定

BRCO1およびこの翻訳産物は、以前には記載されていない。本発明のデータマイニング方法により、EST(expressed sequence tag)(発現配列タグ) A I 6 6 8 6 2 0 が得られた。特異的なプライマー(センス: C T T G C T C T G A G T C A T C A G A T G

50

、アンチセンス：C A C A G A A T A T G A G C C A T A C A G)を用いたR T - P C R研究を、発現分析のために実施した。本発明において、特異的な発現が、精巣組織およびさらに正常な乳腺において見出された(表5)。すべての他の組織において、この抗原は、転写的に抑制されている。これは、同様に、乳腺腫瘍において検出される(20/20)。B R C O 1は、正常な乳腺組織における発現と比較して、乳房腫瘍において明確に過剰発現される(図10)。

【0177】

E S T コンティグ(contig)(以下のE S Tが含まれた：A W 1 3 7 2 0 3、B F 3 2 7 7 9 2、B F 3 2 7 7 9 7、B E 0 6 9 0 4 4、B F 3 3 0 6 6 5)を用いて、1500 b pを超えるこの転写物を、本発明において、電子的全長クローニ化(配列番号：39)によりクローニ化した。配列は、染色体10 p 11 - 12に位置づけられる。同一の領域において、すぐ近接して、乳房示差抗原についての遺伝子であるN Y - B R - 1が、以前に記載されている(NM_052997; Jager, D. et al., Cancer Res. 61(5):2055-61, 2001)。

10

【0178】

【表7】

表5. 正常組織および乳房腫瘍における
BRCA1の発現

回腸	-
大腸	-
肝臓	-
肺	-
リンパ節	-
胃	-
脾臓	-
副腎	-
腎臓	-
食道	-
卵巣	-
直腸	-
精巣	+
胸腺	-
皮膚	-
乳房	+
膵臓	-
PBMC	-
PBMC act.	-
前立腺	-
甲状腺	-
管	-
子宮	-
大脳	-
小脳	-
乳房癌腫	++ (20/20)

10

20

30

40

【0179】

整合した対（乳房癌腫および隣接する正常な組織）の研究により、正常な組織と比較して70%の乳房癌腫におけるBRCA1過剰発現が、明らかになった。

従って、BRCA1は、正常な乳腺上皮についての新たな示差抗原であり、これは、乳房腫瘍において過剰発現される。

【0180】

例6：TPX1の新たな腫瘍抗原としての同定

TPX1の配列（アクセシション番号NM_003296；配列番号：40）およびこの翻訳産物の配列（配列番号：41）は、知られている。抗原は、以前に精巣特異性であるとして、即ち外側纖維および精子の先体の要素としてのみ記載されている。以前に、精子のセルトリ細胞への付着における接着分子としての関与が、前述の抗原に帰した(O'Bry

50

an, M.K. et al., Mol. Reprod. Dev. 58(1):116-25, 2001; Maeda, T. et al., Dev. Growth Differ. 41(6):715-22, 1999)。本発明により、初めて、固体腫瘍におけるTPX1の異常な発現が明らかである(表6)。TPX1と好中球特異性マトリックス糖タンパク質SGP28との間の顕著なアミノ酸相同性のために(Kjeldsen et al., FEBS Lett 380: 246-259, 1996)、ペプチドS R E V T T N A Q R(配列番号: 84)を含むTPX1特異的タンパク質配列は、本発明において、診断および治療分子を製造するのに適する。

【0181】

【表8】

表6. 腫瘍におけるTPX1の発現

10

組織	試験した 合計	陽性 (positive)	%
黒色腫	16	1	6
乳房癌腫	20	3	15
結腸直腸腫瘍	20	0	0
前立腺癌腫	8	3	37
気管支癌腫	17	2	11
腎臓細胞癌腫	7	1	14
卵巣癌腫	7	1	14
甲状腺癌腫	4	0	0
子宮頸癌腫	6	1	16
黒色腫細胞株	8	2	25
気管支癌腫細胞株	6	1	16

20

30

【0182】

例7: BRCO2の新たな腫瘍遺伝子産物としての同定

BRCO2およびこの翻訳産物は、以前は記載されていなかった。本発明の方法により、EST(expressed sequence tag)(発現配列タグ)BE069341、BF330573およびAA601511が得られた。特定のプライマー(センス:AGACATGGCTCAGATGTCAG、アンチセンス:GGAAATTAGCAAGGCTCTCGC)を用いたRT-PCR研究を、発現分析のために実施した。本発明において、特異的な発現は、精巣組織において、およびさらに正常な乳腺において見出された(表7)。すべての他の組織において、この遺伝子産物は、転写的に抑制されている。これは、乳腺腫瘍において、同様に検出される。ESTコンティグ(contig)(以下のESTが含まれた:BF330573、AL044891およびAA601511)を用いて、1300bpのこの転写物を、本発明において、電子的全長クローニング(配列番号62)によりクローニングした。配列は、染色体10p11-12に位置づけられる。同一の領域において、すぐ近接して、乳房示差遺伝子産物についての遺伝子であるNY-BR-1が、以前に記載され(NM_052997; Jager, D. et al., Cancer Res. 61(5):2055-61, 2001)、ここでは、例6の下の上記のBRCO1を、位置させる。さらなる遺伝子的分析により、本発明において、配列番号:62の下に列挙された配列が、NY-BR-1遺伝子の3'非翻訳領域を表すことが明らかになり、これは、以前には記載されていなかった。

40

【0183】

【表9】

表7. 正常組織および乳房腫瘍におけるBRCA2の発現

組織	発現
精巣	+
乳房	+
皮膚	-
肝臓	-
前立腺	-
胸腺	-
脳	-
肺	-
リンパ節	-
脾臓	-
副腎	-
卵巣	-
白血球	-
大腸	-
食道	-
子宮	-
骨格筋	-
精巣上体	-
膀胱	-
腎臓	-
乳房癌腫	+

10

20

30

【0184】

B R C O 2 は、正常な乳腺上皮についての新たな示差遺伝子産物であり、これはまた、乳房腫瘍において発現される。

【0185】

例8：P C S C の新たな腫瘍遺伝子産物としての同定

P C S C (配列番号：63) およびこの翻訳産物は、以前には記載されていなかった。本発明のデータマイニング方法により、E S T (expressed sequence tag (発現配列タグ)) B F 0 6 4 0 7 3 が得られた。特定のプライマー (センス：T C A G G T A T T C C C T G C T C T T A C 、アンチセンス：T G G G C A A T T C T C T C A G G C T T G) を用いたR T - P C R 研究を、発現分析のために実施した。本発明において、特異的な発現は、正常な大腸およびさらに大腸癌腫において見出された (表5)。すべての他の組織において、この遺伝子産物は、転写的に抑制されている。P C S C は、2種の推定上のO R F (配列番号64および配列番号65)をコードする。配列番号64の配列分析により、C X C サイトカインに対する構造的相同性が明らかになった。さらに、4種のオルタナティブP C S C c D N A フラグメントを、クローニングした (配列番号：85～88)。各々の場合において、本発明において、各々のc D N A は、配列番号：89～100に示すポリペプチドをコードする3種の推定上のO R F を含む。

40

50

【0186】

【表10】

表8. 正常組織および結腸直腸癌腫および転移におけるPCSCの発現

回腸	+
大腸	+
肝臓	-
肺	-
リンパ節	-
胃	-
脾臓	-
副腎	-
腎臓	-
食道	-
卵巢	-
直腸	+
精巣	-
胸腺	-
皮膚	-
乳房	-
膵臓	-
PBMC	-
PBMC act.	-
前立腺	-
甲状腺	-
管	-
子宮	-
大脳	-
小脳	-
結腸直腸腫瘍	19/20
結腸直腸腫瘍転移	15/15

10

20

30

40

【0187】

従って、PCSCは、また結腸直腸腫瘍および研究したすべての大腸転移において発現される、正常な大腸上皮についての示差抗原である。本発明によりすべての結腸直腸転移において検出されたPCSC発現により、この腫瘍抗原は、転移する大腸腫瘍の予防および処置のための、極めて興味深い目的となる。

【0188】

例9：SGY-1の新たな腫瘍抗原としての同定

50

SGY-1 転写物の配列（配列番号：70）およびこの翻訳産物の配列（配列番号：71）は、GenBankにおいて、アクセッション番号AF177398の下で公開されている（Krupnik et al., Gene 238, 301-313, 1999）。Soggy-1は、Wntファミリーのタンパク質の阻害剤およびアンタゴニストとして作用する、Dickkopfタンパク質ファミリーの要素として、以前に記載されている。次に、Wntタンパク質は、胚発生において重要な機能を有する。SGY-1の配列（配列番号：70）に基づいて、PCRプライマー（5' - C T C C T A T C C A T G A T G C T G A C G - 3' および 5' - C C T G A G G A T G T A C A G T A A G T G - 3'）を、本発明において作製し、多くのヒト組織において、RT-PCR分析（95、15分；94、1分；63、1分；72、1分；35サイクル）のために用いた。正常組織における発現は、精巣に限定されたことが示された。他のeCTについて記載したように、SGY-1は、本発明において、多くの腫瘍組織において、異所的に活性化されていることが示された；表9を参照。

10

20

30

50

【0189】

【表11】

表9. 腫瘍におけるSGY-1の発現

組織	試験した合計	陽性 (positive)	%
黒色腫	16	4	25
乳房癌腫	20	4	20
結腸直腸腫瘍	20	0	0
前立腺癌腫	8	1	13
気管支癌腫	32	3	18
腎臓細胞癌腫	7	0	0
卵巣癌腫	7	4	57
甲状腺癌腫	4	0	0
子宮頸癌腫	6	2	33
黒色腫細胞株	8	2	25
気管支癌腫細胞株	6	2	33
哺乳類癌腫細胞株			

【0190】

例10：MORCの新たな腫瘍抗原としての同定

MORC転写物の配列（配列番号：74）およびこの翻訳産物の配列（配列番号：75）は、GenBankにおいて、アクセッション番号XM_037008の下で公開された（Inoue et al., Hum Mol Genet. Jul;8(7):1201-7, 1999）。

MORCは、最初は、精子形成に関与すると記載されていた。マウス系におけるこのタンパク質の変異の結果、生殖腺の発育不全（underdevelopment）がもたらされる。

MORCの配列（配列番号：74）に基づいて、PCRプライマー（5' - C T G A G T A T C A G C T A C C A T C A G - 3' および 5' - T C T G T A G T C C T T C A C A T A T C G - 3'）を、本発明により作製し、これを、多くのヒト組織において、RT-PCR分析（95、15分；94、1分；63、1分；72、1分；35サイクル）のために用いた。正常な組織における発現は、精巣に限定されたことが示された。

他のeCTについて記載したように、MORCは、本発明において、多くの腫瘍組織において、異所的に活性化されていることが示された：表10を参照。

【0191】

【表12】

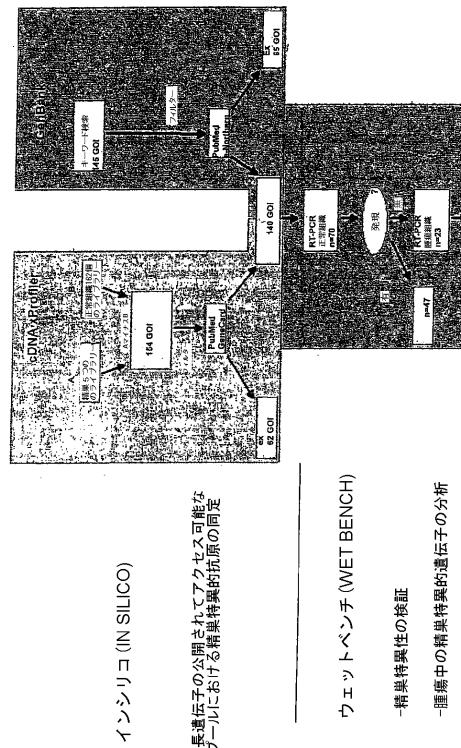
表10. 腫瘍におけるMORCの発現

組織	試験した合計	陽性(positive)	%
黒色腫	16	3	18
乳房癌腫	20	0	0
結腸直腸腫瘍	20	0	0
前立腺癌腫	8	0	0
気管支癌腫	17	3	18
腎臓細胞癌腫	7	0	0
卵巣癌腫	7	1	14
甲状腺癌腫	4	0	0
子宮頸癌腫	6	0	0
黒色腫細胞株	8	1	12
気管支癌腫細胞株	6	1	17

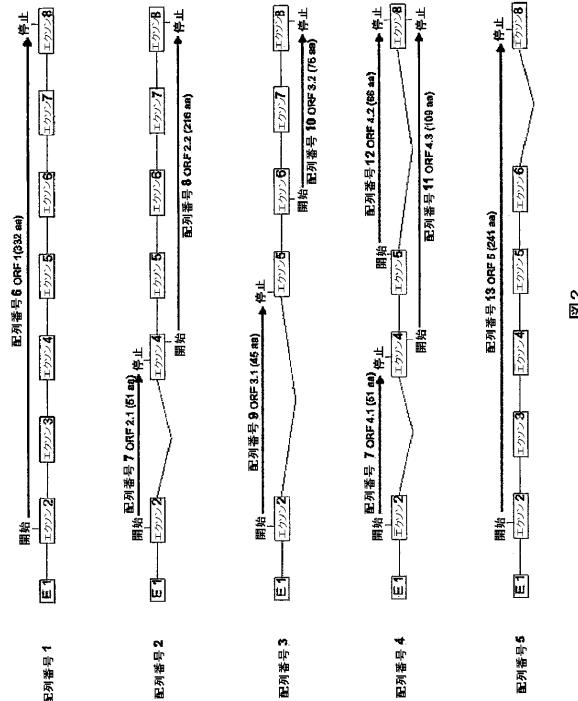
10

20

【図1】



【図2】



2

〔 义 3 〕

【 四 5 】

TPTE ブラスバリアント

TPTE

TPTE ブラスバリアント

別番号 19

別番号 20

別番号 21

外番号 54

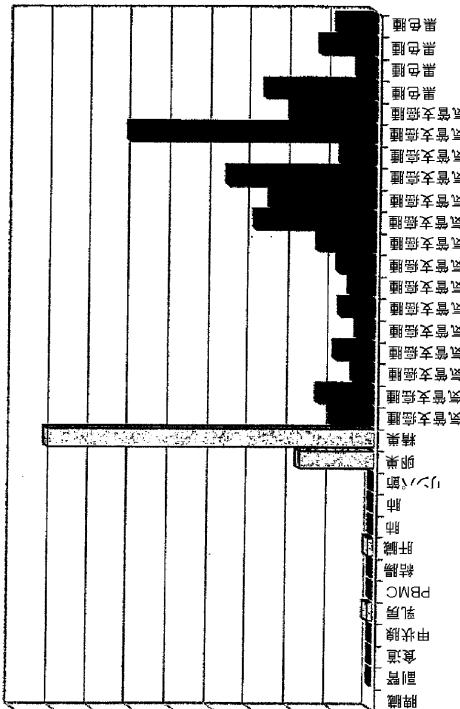
別番号 55

別番号 56

外番号 57

図5

(义 4)



3

【 四 6 】

四

(55)

【 义 7 a 】

MS4A12

N 大腸、正常
T 結腸直腸腫瘍

514

9

10

图 7b

【図 10】

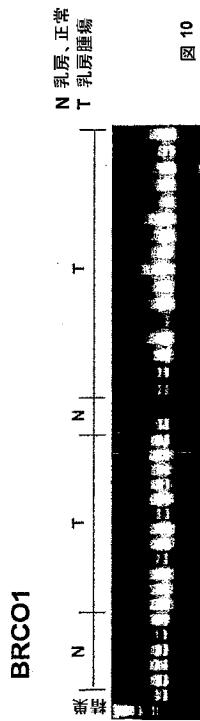


図 10

【図 11】

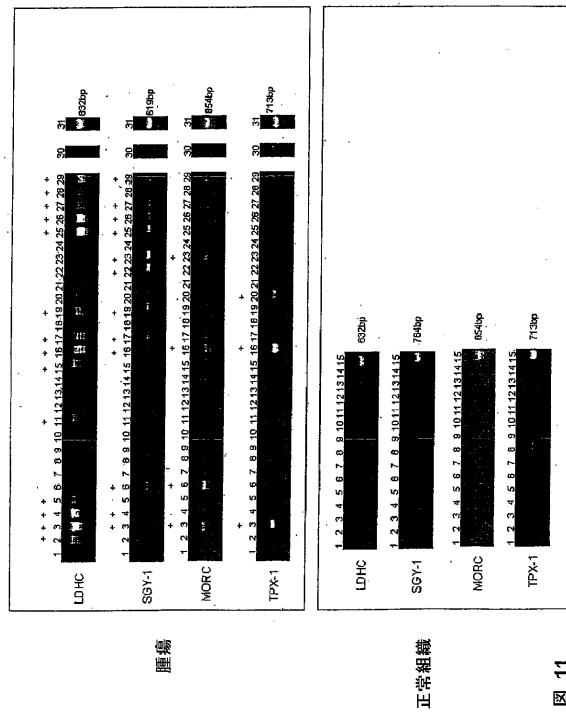


図 11

【図 12】



図 12

【図 13】

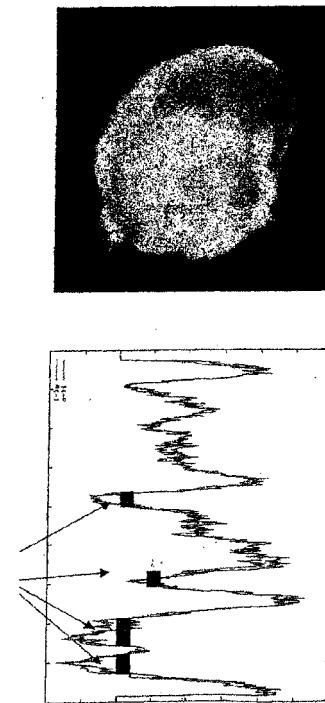


図 13

【図 14】

14
図

【配列表】

2013172716000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年4月3日(2013.4.3)

【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】

医薬組成物であって、(I)腫瘍関連抗原の発現または活性を阻害するか、(II)腫瘍阻害活性を有し、腫瘍関連抗原を発現するもしくは異常に発現する細胞に選択的であるか、または(III)投与された際に、HLA分子と、腫瘍関連抗原またはこの一部との複合体の量を選択的に増大させる剤を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：19～21、54～57、1～5、29、31～33、37、39、40、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記医薬組成物。

【請求項2】

(II)の剤が、細胞死の誘発、細胞増殖の減少、細胞膜への損傷またはサイトカインの分泌を生じる、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

(I) または (II) の剤が、腫瘍関連抗原をコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

(I) または (II) の剤が、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

(III) の剤が：

(i) 腫瘍関連抗原またはこの一部、

(ii) 腫瘍関連抗原をコードする核酸またはこの一部、

(iii) 腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞、および

(iv) 腫瘍関連抗原またはこの一部とHLA分子との単離された複合体

からなる群から選択された1種または2種以上の成分を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

剤が、各々の場合において、異なる腫瘍関連抗原の発現または活性を選択的に阻害し、各々の場合において、異なる腫瘍関連抗原を発現する細胞に選択的であり、またはHLA分子と異なる腫瘍関連抗原またはこの一部との複合体の量を増大させる、2種または3種以上の剤を含み、前記腫瘍関連抗原の少なくとも1種が：

(a) 配列番号：19～21、54～57、1～5、29、31～33、37、39、40、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

医薬組成物であって：

(i) 腫瘍関連抗原またはこの一部、

(ii) 腫瘍関連抗原をコードする核酸またはこの一部、

(iii) 腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する抗体、

(iv) 腫瘍関連抗原をコードする核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸、

(v) 腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞、および

(vi) 腫瘍関連抗原またはこの一部とHLA分子との間の単離された複合体

からなる群から選択された1種または2種以上の成分を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：19～21、54～57、1～5、29、31～33、37、39、40、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記医薬組成物。

【請求項8】

(i) の核酸が、発現ベクター中に存在する、請求項5または7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

宿主細胞が、腫瘍関連抗原またはこの一部を分泌する、請求項5または7に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

宿主細胞が、さらに、腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する HLA 分子を発現する、請求項 5 または 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

宿主細胞が、HLA 分子および / または腫瘍関連抗原またはこの一部を、組み換え方式で発現する、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

宿主細胞が HLA 分子を内在性に発現する、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

宿主細胞が抗原提示細胞である、請求項 5、7、10 または 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

抗体がモノクローナル抗体、キメラもしくはヒト化抗体、または抗体のフラグメントである、請求項 4 または 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

抗体が治療剤または診断剤に結合している、請求項 4 または 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

さらに、薬学的に許容し得る担体および / またはアジュバントを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

腫瘍性疾患もしくは癌性疾患の処置、および / または腫瘍性疾患もしくは癌性疾患に対するワクチン接種に用いることができる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

疾患が、肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、黒色腫、大腸腫瘍、大腸腫瘍の転移、腎臓細胞癌腫、子宮頸癌腫、大腸癌腫または乳房癌腫である、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

腫瘍関連抗原が、配列番号 : 22 ~ 24、58 ~ 61、81、82、6 ~ 13、14 ~ 18、30、34 ~ 36、38、41、64、65、71、75、80、83、84、89 ~ 100 からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を診断する方法であつて、この方法が、患者から単離された生物学的試料中の

- (i) 腫瘍関連抗原をコードする核酸もしくはこの一部の検出、および / または
- (ii) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部の検出、および / または
- (iii) 腫瘍関連抗原もしくはこの一部に対する抗体の検出、および / または
- (iv) 腫瘍関連抗原またはこの一部に特異的な、細胞障害性もしくはヘルパー T リンパ球の検出

を含み、前記腫瘍関連抗原が :

- (a) 配列番号 : 19 ~ 21、54 ~ 57、1 ~ 5、29、31 ~ 33、37、39、40、62、63、70、74、85 ~ 88 からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、
 - (b) (a) の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、
 - (c) (a) または (b) の核酸に対して縮重している核酸、および
 - (d) (a)、(b) または (c) の核酸に相補的な核酸
- からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

【請求項 21】

検出が、

- (i) 生物学的試料を、腫瘍関連抗原をコードする核酸またはこの一部、腫瘍関連抗原もしくはこの一部、抗体または細胞障害性もしくはヘルパー T リンパ球に特異的に結合する

剤と接触させること、および

(i i) この剤と、核酸またはこの一部、腫瘍関連抗原またはこの一部、抗体または細胞障害性もしくはヘルパーTリンパ球との複合体の形成を検出することを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

核酸またはこの一部を、前記核酸またはこの前記一部に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを用いて、または前記核酸またはこの前記一部を選択的に増幅することにより検出する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項23】

腫瘍関連抗原またはこの一部を、前記腫瘍関連抗原またはこの前記一部に特異的に結合する抗体を用いて検出する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項24】

抗体を、前記抗体に特異的に結合するタンパク質またはペプチドを用いて検出する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項25】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患の退行、経過または発症を決定する方法であって、該方法が、前記疾患を患っているか、または前記疾患に罹患していることが疑われる患者からの試料を：

(i) 腫瘍関連抗原をコードする核酸またはこの一部の量、

(i i) 腫瘍関連抗原またはこの一部の量、

(i i i) 腫瘍関連抗原またはこの一部に結合する抗体の量、および

(i v) 腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との複合体に特異的な細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞の量

からなる群から選択された1種または2種以上のパラメーターに関してモニタリングすることを含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：19～21、54～57、1～5、29、31～33、37、39、40、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記方法。

【請求項26】

核酸またはこの一部の量を、前記核酸またはこの前記一部に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを用いて、または前記核酸またはこの前記一部を選択的に増幅することによりモニタリングする、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

腫瘍関連抗原またはこの一部の量を、前記腫瘍関連抗原またはこの前記一部に特異的に結合する抗体を用いてモニタリングする、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

抗体の量を、抗体に特異的に結合するタンパク質またはペプチドを用いてモニタリングする、請求項25に記載の方法。

【請求項29】

ポリヌクレオチドプローブ、抗体またはタンパク質もしくはペプチドが、検出可能な方式で標識されている、請求項22～24および26～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を処置し、診断し、またはモニタリングするための、前記腫瘍関連抗原またはこの一部に結合し、治療剤または診断剤と結合した抗体であって、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：19～21、54～57、1～5、29、31～33、37、39、40

0、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記抗体。

【請求項31】

抗体がモノクローナル抗体、キメラもしくはヒト化抗体、または抗体のフラグメントである、請求項23もしくは27に記載の方法または請求項30に記載の抗体。

【請求項32】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現により特徴づけられる疾患を患っている患者を処置するための細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞であって、該処置が：

(i) 免疫反応性細胞を含む試料を前記患者から採取すること、

(ii) 前記試料を、前記腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する宿主細胞と、前記腫瘍関連抗原またはこの一部に対して、細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞の產生を好む条件下で接触させること、および

(iii) 細胞溶解性またはサイトカイン放出性T細胞を、患者中に、腫瘍関連抗原またはこの一部を発現する細胞を溶解するのに適する量で導入すること

を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a) 配列番号：19～21、54～57、1～5、29、31～33、37、39、40、62、63、70、74、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記細胞。

【請求項33】

疾患が腫瘍性疾患または癌性疾患である、請求項20～29および31のいずれか一項に記載の方法、請求項30もしくは31に記載の抗体、または請求項32に記載の細胞。

【請求項34】

腫瘍関連抗原が、配列番号：22～24、58～61、81、82、6～13、14～18、30、34～36、38、41、64、65、71、75、80、83、84、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項20～29、31および33のいずれか一項に記載の方法、請求項30、31および33のいずれか一項に記載の抗体、または請求項32もしくは33に記載の細胞。

【請求項35】

核酸であつて：

(a) 配列番号：20～21、54～57、2～5、31～33、37、39、62、63、85～88からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択されている、前記核酸。

【請求項36】

核酸であつて、配列番号：23～24、58～61、7～13、14～18、34～36、64、65、89～100からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含むタンパク質またはポリペプチドをコードする、前記核酸。

【請求項37】

宿主細胞であつて、請求項35または36に記載の核酸を含む、前記宿主細胞。

【請求項38】

請求項3_3に記載の核酸によりコードされた、タンパク質もしくはポリペプチド、またはその免疫原性フラグメント。

【請求項4_9】

配列番号：2_3～2_4、5_8～6_1、8_1、8_2、7～1_3、1_4～1_8、3_4～3_6、6_4、6_5、8_9～1_0_0からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、タンパク質もしくはポリペプチド、またはその免疫原性フラグメント。

【請求項4_0】

剤であって、タンパク質もしくはポリペプチドまたはこの一部に特異的に結合し、前記タンパク質またはポリペプチドが：

(a) 配列番号：1_9～2_1、5_4～5_7、1～5、2_9、3_1～3_3、3_7、3_9、4_0、6_2、6_3、7_0、7_4、8_5～8_8からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされている、前記剤。

【請求項4_1】

タンパク質またはポリペプチドが、配列番号：2_3～2_4、5_8～6_1、8_1、8_2、6～1_3、1_4～1_8、3_0、3_4～3_6、3_8、4_1、6_4、6_5、7_1、7_5、8_0、8_3、8_4、8_9～1_0_0からなる群から選択されたアミノ酸配列、この一部または誘導体を含む、請求項4_0に記載の剤。

【請求項4_2】

抗体である、請求項4_0または4_1に記載の剤。

【請求項4_3】

抗体が、モノクローナル、キメラもしくはヒト化抗体または抗体のフラグメントである、請求項4_2に記載の剤。

【請求項4_4】

請求項4_0～4_3のいずれか一項に記載の剤と、治療剤または診断剤との複合体。

【請求項4_5】

治療剤または診断剤が毒素である、請求項4_4に記載の複合体。

【請求項4_6】

腫瘍関連抗原の発現または異常な発現を検出するためのキットであって、このキットが

、(i)腫瘍関連抗原をコードする核酸もしくはこの一部、

(ii)腫瘍関連抗原もしくはこの一部、

(iii)腫瘍関連抗原もしくはこの一部に結合する抗体、および／または

(iv)腫瘍関連抗原またはこの一部とMHC分子との複合体に特異的なT細胞の検出のための剤を含み、前記腫瘍関連抗原が：

(a)配列番号：1_9～2_1、5_4～5_7、1～5、2_9、3_1～3_3、3_7、3_9、4_0、6_2、6_3、7_0、7_4、8_5～8_8からなる群から選択された核酸配列を含む核酸、この一部または誘導体、

(b) (a)の核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(c) (a)または(b)の核酸に対して縮重している核酸、および

(d) (a)、(b)または(c)の核酸に相補的な核酸

からなる群から選択された核酸によりコードされた配列を有する、前記キット。

【請求項4_7】

腫瘍関連抗原をコードする核酸またはこの一部の検出のための剤が、前記核酸の選択的増幅のための核酸分子である、請求項4_6に記載のキット。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1	4 C 0 8 7
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 39/39		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 35/14		
C 1 2 N 9/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N	
	G 0 1 N 33/53	K	
	G 0 1 N 33/574	A	
	C 1 2 N 9/04	F	
	C 0 7 K 16/30		

(72)発明者 コスロフスキ , ミヒヤエル

ドイツ連邦共和国 5 0 9 9 9 ケルン、ロッダーヴェーク 2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA09 CA20 HA12 HA14
 4B050 DD11 LL01 LL03
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ43 QQ79 QR32 QR56 QR62 QR66
 QS25 QX01 QX02
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA95X AA98X AB01 AC14 BA02 CA44
 CA46
 4C084 AA13 AA16 MA05 NA14 ZB212 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB01 BB31 FF13 FF14 FF18
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26
 4C087 AA01 BB37 NA14 ZB21 ZB26
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 DA86 DA89 EA20 EA50

专利名称(译)	肿瘤中差异表达的基因产物及其用途		
公开(公告)号	JP2013172716A	公开(公告)日	2013-09-05
申请号	JP2013041406	申请日	2013-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	加尼梅德药物公司		
申请(专利权)人(译)	Ganimedo制药公司		
[标]发明人	ザヒンウグール ティレチエズレム コスロフスキーミヒヤエル		
发明人	ザヒン,ウグール ティレチ,エズレム コスロフスキー,ミヒヤエル		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K45/00 A61P43/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/395 A61P35/00 A61K39/39 A61K39/00 A61K35/14 G01N33/53 G01N33/574 C12N9/04 C07K16/30 A61K38/00 C07K14/435 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/28 C12N5/06		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 C07K14/4748 C07K16/30 C12Q1/6886 G01N33/574 A61K39/39558 C07K16/3015 C07K16/3023 C07K16/3053 C07K16/3069 C07K2317/34 C07K2317/76 C12Q2600/112 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K45/00 A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61K39/39 A61K39/00.H A61K35/14 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/53.K G01N33 /574.A C12N9/04.F C07K16/30 A61K35/12 A61K35/17 C07K14/82 C07K16/32 C12N15/00.A C12N15 /00.AZN.A C12N5/10 C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA12 4B024 /HA14 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS25 4B063 /QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA95X 4B065 /AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/MA05 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085 /BB31 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF18 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/BB37 4C087/NA14 4C087/ZB21 4C087 /ZB26 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	10211088 2002-03-13 DE		
其他公开文献	JP5793158B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

含有药剂 (A) 的药物组合物 , 其具有 : (a) 抑制肿瘤相关抗原 (TAg) 的表达或活性; (b) 对具有 (异常) TAg 表达的细胞具有选择性肿瘤抑制活性;或 (c) 增加HLA (人白细胞抗原) 分子与 TAg 或其片段之间形成的复合物的量是新的。或 (c) 增加HLA (人白细胞抗原) 分子与 TAg 或其片段之间形成的复合物的量。 TAg 由核酸 (NA) 编码 , 其中 : (a) 包含说明书中给出的 28 种定义序列中的任一种 , 或其片段; (b) 可在严格条件下与 (a) 杂交; (c) 是 (a) 或 (b) 的简并版本;或 (d) 与 (a) - (c) 互补。还包括以下独立权利要求 : (1) 含有一种或多种 TAg , NA 编码 TAg , 结合 TAg 的抗体 , NA 特异性反义序列 , 表达 TAg 的宿主细胞或 TAg 与 HLA 的分离复合物的药物组合物分子 (TAg 可能总是由片段组成); (2) 诊断相关疾病 (异常) 表达 TAg (M1); (3) 确定

与TAg (M2) (异常) 表达相关的疾病的消退 , 进展或爆发; (4) 治疗与TAg (M3) (异常) 表达有关的疾病; (5) NA作为新化合物; (6) 编码35种特定肽序列或其片段中的任何一种的核酸 (NA1); (7) 包含NA或NA1的重组DNA或RNA (NA2); (8) 含有NA , NA1或NA2的宿主细胞; (9) 由NA1编码的蛋白质及其片段 , 其具有免疫原性或可与HLA受体或人抗体结合; (10) 与NA编码的蛋白质特异性结合的药剂 (B); (11) 与以下复合物特异性结合的抗体 (Ab): (a) 由NA编码的蛋白质或其片段; (b) 与 (a) 单独结合但不与 (i) 或 (ii) 结合的主要组织相容性 (MHC) 分子; (12) (B) 或Ab与诊断剂或治疗剂之间的缀合物 (C); (13) 用于检测 (异常) TAg表达的试剂盒; (14) 包含来自NA的启动子区的重组DNA; (15) 与TPTE (异常) 表达相关的转移性癌症的治疗 , 诊断和监测。 - 活动 : 细胞抑制。没有给出生物学数据。 - 作用机制 : 疫苗; 反义/抗体抑制基因表达或活动。

組 織	試験した合計	陽 性 (positive)	%
黑色腫	16	7	44
乳房癌腫	20	7	35
結腸直腸癌腫	20	3	15
前立腺癌腫	8	3	38
気管支癌腫	17	8	47
腎臓細胞癌腫	7	4	57
卵巣癌腫	7	3	43
甲状腺癌腫	4	1	25
子宮頸癌腫	6	5	83
黑色腫細胞株	8	5	63
気管支癌腫細胞株	6	2	33