

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-527411

(P2014-527411A)

(43) 公表日 平成26年10月16日(2014.10.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-527664 (P2014-527664)	(71) 出願人	305060279 グラクソスミスクライン バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 89
(86) (22) 出願日	平成24年8月30日 (2012. 8. 30)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月24日 (2014. 4. 24)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/066920	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 国際公開番号	W02013/030310	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 国際公開日	平成25年3月7日 (2013. 3. 7)	(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子
(31) 優先権主張番号	1114919.2		
(32) 優先日	平成23年8月30日 (2011. 8. 30)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌における PRAME 遺伝子発現の検出

(57) 【要約】

本発明は、新規な診断キット及び方法において使用するためのPRAME特異的プライマー及びプローブに関する。本発明はさらに、PRAME発現腫瘍を患う癌患者の特定の集団の治療に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：5～7のいずれかのヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号：5～7のいずれかのヌクレオチド配列を含む、プライマー。

【請求項 3】

配列番号：5及び6を含む、プライマー対。

【請求項 4】

配列番号：5～7のいずれかのヌクレオチド配列を含む、プローブ。

【請求項 5】

(i) 配列番号：5及び配列番号：6を含む、又はからなるプライマー対：並びに

(ii) 配列番号：7を含む、又はからなるプローブ：

を含む、キット。

【請求項 6】

(i) 配列番号：5を含む、又はからなるフォワードプライマー：

(ii) 配列番号：6を含む、又はからなるリバースプライマー：及び

(iii) 配列番号：7を含む、又はからなるプローブ：

を含む、キット。

【請求項 7】

PRAME遺伝子が生物学的サンプルで発現しているか否かを決定するための方法であって、生物学的サンプルから得られる又は由来のヌクレオチド配列と：

(i) 本明細書に記載のプライマーの少なくとも一つ；

(ii) 本明細書に記載のプライマーのセット；

(iii) 本明細書に記載のプローブ；及び / 又は

(iv) 本明細書に記載のキット

を接触させるステップを含む、上記方法。

【請求項 8】

患者の診断方法であって、患者由来の生物学的サンプルから得られる又は由来のヌクレオチド配列と、以下の(i)～(iv)の成分：

(i) 本明細書に記載のプライマーの少なくとも一つ；

(ii) 本明細書に記載のプライマーのセット；

(iii) 本明細書に記載のプローブ；及び / 又は

(iv) 本明細書に記載のキット

の一以上を接触させるステップを含む、上記方法。

【請求項 9】

患者由来の生物学的サンプルにおけるPRAME陽性腫瘍組織の有無を決定するための方法であって、患者由来の生物学的サンプルから得られる又は由来のヌクレオチド配列と、以下の(i)～(iv)の成分：

(i) 本明細書に記載のプライマーの少なくとも一つ；

(ii) 本明細書に記載のプライマーのセット；

(iii) 本明細書に記載のプローブ；及び / 又は

(iv) 本明細書に記載のキット

の一以上を接触させるステップを含む、上記方法。

【請求項 10】

ヌクレオチド配列を増幅するステップ、及び増幅されたヌクレオチド配列をサンプルにおいて検出するステップをさらに含む、請求項7、8、又は9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

in situハイブリダイゼーション用いて、ヌクレオチド配列が成分(iii)とハイブリダイズするかを検出するステップをさらに含む、請求項7、8、又は9のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

生物学的サンプルが、ホルマリン固定パラフィン包埋組織である、請求項7~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 3】

請求項7~12のいずれか1項に記載の方法を用いて、PRAME陽性腫瘍組織を有する患者を選択するステップ、及びその後、該患者にPRAME免疫療法を行うステップを含む、患者の治療方法。

【請求項 1 4】

PRAME発現腫瘍を患う患者の治療における使用のためのPRAME免疫療法を含む組成物であって、該患者が請求項7~12のいずれか1項に記載の方法を用いてPRAME発現腫瘍組織を有すると同定される、上記組成物。

10

【請求項 1 5】

PRAME免疫療法が、PRAME抗原又はそのペプチドを含む、請求項7~14のいずれか1項に記載の方法又は組成物。

【請求項 1 6】

PRAME抗原又はペプチドが担体タンパク質に融合又は結合される、請求項15に記載の方法又は組成物。

【請求項 1 7】

担体タンパク質が、タンパク質D、NS1、若しくはCLytA又はそれらの断片から選択される、請求項16に記載の方法又は組成物。

20

【請求項 1 8】

組成物が、さらにアジュバントを含む、請求項7~17のいずれか1項に記載の方法又は組成物。

【請求項 1 9】

アジュバントが：3D-MPL；アルミニウム塩；CpG含有オリゴヌクレオチド；QS21又はISCOM等のサポニン含有アジュバント；水中油エマルション；及びリボソームのー以上又は組み合わせを含む、請求項18に記載の方法又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、PRAMEの検出のための診断方法及び組成物、並びにPRAME発現腫瘍を患う患者の集団の免疫療法的治療に関する。

【背景技術】

【0002】

「メラノーマ優先発現抗原 (PReferentially expressed Antigen in MElanoma)」、即ち「PRAME」はPRAME遺伝子によってコードされる腫瘍抗原である。

【0003】

PRAMEは多くの種類の腫瘍、例えばメラノーマ、肺癌、及び白血病で過剰発現される抗原である (Ikeda et al., Immunity 1997, 6 (2) 199-208)。高レベルのPRAME発現が、幾つかの固形腫瘍、例えば卵巣癌、乳癌、肺癌及びメラノーマ、髄芽腫、肉腫、頭部及び頸部癌、神経細胞芽腫、腎臓癌、及びウィルムス腫瘍並びに血液系腫瘍、例えば急性リンパ性白血病及び急性骨髄性白血病 (ALL及びAML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、ホジキン病、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病 (CLL) 及びマントル細胞リンパ腫において報告されている。

40

【0004】

PRAMEは幾つかの通常組織、例えば精巣、副腎、卵巣、及び子宮内膜においても非常に低いレベルで発現される。

【0005】

メラノーマ

遠隔転移において悪性メラノーマを示す患者 (American Joint Committee on Cancer

50

(AJCC)の分類に従えば、ステージIV)は、一年の生存期間中央値を有し、長期生存率はわずか5%である。ステージIVのメラノーマに対する標準的な化学療法は、わずか8~25%しか治療応答を示さないだけでなく、全生存期間には全く効果がない。局所転移を有する患者(ステージIII)は、二~三年の生存期間中央値を有し、第一及び局所転移の適切な外科的管理の後であっても、長期生存率はかなり低い。ステージI~IIIメラノーマの患者のほとんどは、その腫瘍が外科的に取り除かれるが、これらの患者は、再発の実質的リスクを維持している。

【0006】

肺癌

肺癌には二つの種類：非小細胞肺癌(NSCLC)及び小細胞肺癌(SCLC)がある。これらの名前は、単純に腫瘍でみられる細胞種を表している。NSCLCとしては、扁平細胞の細胞癌、腺癌、及び大細胞癌が挙げられ、肺癌の約80%を占める。NSCLCは治療が難しく、可能な治療は、可能な限り寿命を延ばし、疾患の症状を軽減する事を目的としている。NSCLCは肺がんの最も一般的な種類であり、ほとんど症状を伴わない。全てのNSCLC患者の中で、約25%が診断時に局所領域的な疾患を有し、まだ外科的切除が可能である(AJCC分類に従って、ステージIB、IIA、又はIIB)。しかしながら、これらの患者の50%以上が、完全な外科的切除の後二年以内に再発する。

【0007】

PRAME発現

新鮮な組織においてPRAMEの発現のレベルを測定するためのリアルタイムPCRアッセイにおいて使用するためのプライマーが開発された。例えば、全血においてPRAMEを検出するのに使用するためのプライマー：

AF 5' -CCA TGA CAA AGA AGC GAA AA-3' (配列番号：1)及び

AR 5' -CAT CTG GCC CAG GTA AGG AG-3' (配列番号：2)

が記載されているPaydas et al., Leukemia Research 31 (2007) 365-369を参照されたい。

【0008】

RT-PCR産物の半定量分析も、報告されている(Proto-Siqueira et al., Leukemia Research 27 (2003) 393-396)。この半定量アッセイでは、以下のプライマーがPRAME遺伝子の発現レベルを測定するために用いられた：

5' -CTGTACTCATTTCAGAGCCAGA-3' (配列番号：3)及び

5' -TATTGAGAGAGGGTTTCCAAGGGGTT-3' (配列番号：4)。

【0009】

臨床施設において腫瘍組織保存の一般的な方法である、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍組織の使用の際に、困難性が生じる。ホルマリン中での固定は、組織中のRNA分子の構造を変化させ、架橋及び部分的な分解をももたらす。部分的な分解は、100~300塩基対のRNAのより小さな部分の生成をももたらす。RNAへのこれらの構造的変化は、FFPE組織から抽出したRNAの、従来の診断技術における使用を困難にする。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Ikeda et al., Immunity 1997, 6 (2) 199-208

【非特許文献2】Paydas et al., Leukemia Research 31 (2007) 365-369

【非特許文献3】Proto-Siqueira et al., Leukemia Research 27 (2003) 393-396

【発明の概要】

【0011】

PRAME遺伝子産物、例えばmRNA等の核酸、又はタンパク質が発現される組織を同定するための方法及び組成物が、本発明により提供される。

【0012】

本発明の一実施形態では、配列番号：5、6、若しくは7のいずれかのヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含む、から実質的になる、又はからなるオリゴヌクレオチドが提供される。本発明の一実施形態では、アッセイ条件で配列番号：8、9、若しくは10、又は配列番号：5、6、若しくは7の標的配列と結合することができるオリゴヌクレオチドが提供される。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド配列は、PRAMEポリヌクレオチド配列の完全長を含まない。

【0013】

幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号：5、6、7、8、9、及び10からなる群より選択されるヌクレオチド配列の少なくとも6個のヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、該少なくとも6個のヌクレオチドは、配列番号：5、6、7、8、9、及び10の6個の3'ヌクレオチドである。

10

【0014】

本開示は、さらに配列番号：5及び/又は配列番号：6を含むプライマー対を提供する。

【0015】

さらなる側面では、配列番号：5若しくは配列番号：7、又は配列番号：6の逆相補（配列番号：9）のいずれかのヌクレオチド配列を含むプローブが提供される。

【0016】

幾つかの実施形態では、プローブは、ポリメラーゼによる伸長を防ぐために、化学的に修飾される。

【0017】

一実施形態では、

20

- (i) 配列番号：5及び配列番号：6を含む、又はからなるプライマー対：並びに
 - (ii) 配列番号：7を含む、又はからなるプローブ：
- を含む、オリゴヌクレオチドセットが提供される。

【0018】

一実施形態では、

- (i) 配列番号：5を含む、又はからなるフォワードプライマー：
 - (ii) 配列番号：6を含む、又はからなるリバースプライマー：及び
 - (iii) 配列番号：7を含む、又はからなるプローブ：
- を含む、オリゴヌクレオチドセットが提供される。

30

【0019】

本発明のさらなる実施形態では、PRAME遺伝子が生物学的サンプルで発現しているか否かを決定するための方法であって、生物学的サンプルから得られる又は由来のヌクレオチド配列と：

- (i) 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも一つ；
 - (ii) 本明細書に記載のプライマーのセット；
 - (iii) 本明細書に記載のプローブ；及び/又は
 - (iv) 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドセット
- を接触させるステップを含む、上記方法が提供される。

【0020】

さらなる実施形態では、患者の診断方法であって、患者由来の生物学的サンプルから得られる又は由来のヌクレオチド配列と、以下の(i)~(iv)の成分：

40

- (i) 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも一つ；
 - (ii) 本明細書に記載のプライマーのセット；
 - (iii) 本明細書に記載のプローブ；及び/又は
 - (iv) 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドセット
- の以上を接触させるステップを含む、上記方法が提供される。

【0021】

本発明のさらなる実施形態では、患者由来の生物学的サンプルにおけるPRAME陽性腫瘍組織の有無を決定するための方法であって、患者由来の生物学的サンプルから得られる又は由来のヌクレオチド配列と、以下の(i)~(iv)の成分：

50

- (i) 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも一つ；
 - (ii) 本明細書に記載のプライマーのセット；
 - (iii) 本明細書に記載のプローブ；及び/又は
 - (iv) 本明細書に記載のオリゴヌクレオチドセット
- の一以上を接触させるステップを含む、上記方法が提供される。

【0022】

本明細書に記載の方法の幾つかの実施形態では、ヌクレオチド配列と(i)~(iv)の成分の一以上を接触させるステップは、アッセイ条件下におけるヌクレオチド配列と(i)~(iv)の成分の一以上の結合を含む。

【0023】

フォワードプライマー及びプローブの配列がPRAME核酸の配列を認識し、リバースプライマーの配列がPRAME核酸の配列の逆相補を認識すること、並びに、このことが本明細書に開示されるプライマー及びプローブ配列を用いる使用、方法、アッセイ、又はオリゴヌクレオチドセットが開発される時に考慮されるべきであることは、当業者には明らかであろう。

【0024】

本明細書に記載される実施形態では、プライマーのセットはPRAMEのヌクレオチド配列の一部(アンプリコン)を増幅し得、プローブはアッセイ条件でアンプリコンのヌクレオチド配列と結合し得る。

【0025】

プライマー又はプローブがサンプルに由来する核酸と結合すれば、サンプルはPRAME抗原を発現している(PRAME陽性)と同定され得る。したがって、本明細書に記載の方法の適用によって、及び/又は本明細書に記載の方法の結果の分析によって、サンプルはPRAME陽性腫瘍組織として同定され得る。

【0026】

一実施形態では、本方法は、ヌクレオチド配列が本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの少なくとも一つと結合するか否かを検出するためのin situハイブリダイゼーションのステップを含む。

【0027】

本明細書に記載の方法は、本方法の結果の分析に従ってPRAMEがサンプルで発現されているか否かを決定するステップを、さらに含み得る。

【0028】

本明細書に記載の方法は、本方法の結果の分析に従ってPRAME陽性腫瘍組織の有無を決定するステップを、さらに含み得る。

【0029】

本明細書に記載の方法は、新鮮な、又は凍結されているか若しくは凍結された生物学的サンプルにおいて使用され得る。代わりに、又はさらに、本明細書に記載の方法は、パラフィン保存の、例えばホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)の生物学的サンプルにおいて実行され得る。

【0030】

本明細書に記載の方法に従って、患者由来の腫瘍組織がPRAME遺伝子を発現するか否かを決定し、その後、該患者に本明細書に記載のPRAME免疫療法を行うステップを含む、患者の治療方法もまた提供される。

【0031】

さらなる実施形態では、本明細書に記載の方法を用いてPRAME遺伝子を発現する組織(「PRAME発現腫瘍組織」)を有すると同定された患者の治療において使用するためのPRAME免疫療法が提供される。

【0032】

本使用又は治療方法の一実施形態では、患者は非切除のPRAME発現腫瘍組織(活動性疾患)を有し得る。さらなる実施形態では、患者はPRAME発現腫瘍組織の外科的切除を受け

10

20

30

40

50

ていても良い（アジュバント設定）。さらなる実施形態では、患者は、腫瘍組織を標的とする化学療法又は放射線療法を初めに又は同時に受け得る。

【0033】

本開示は、PRAME発現腫瘍の再発に感受性のある、PRAME発現腫瘍組織を取り除く／治療するために処置されている患者の治療方法であって：本明細書に記載の方法を用いて患者の腫瘍組織がPRAMEを発現するか否かを決定し、その後、該患者にPRAME特異的免疫療法を含む組成物を投与するステップを含む、上記方法をさらに提供する。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】AM及びGSKリアルタイムPRAMEオリゴデザインの分析感受性の比較。

10

【図2】AM及びGSKリアルタイムPRAMEオリゴデザインの分析感受性の比較。

【図3】AM対GSKオリゴセットにおいて得られるPRAME Ctの結果についての相関分析。

【発明を実施するための形態】

【0035】

表及び配列の説明

表1は、本発明の一実施形態のフォワード及びリバースプライマーの配列を示す表である。

【0036】

配列番号：5は、PRAMEのcDNA発現産物を検出するためのフォワードプライマーの、連続する5'～3'の核酸配列である。

20

【0037】

配列番号：6は、PRAMEのcDNA発現産物を検出するためのリバースプライマーの、連続する5'～3'の核酸配列である。

【0038】

配列番号：7は、PRAMEのcDNA発現産物を検出するためのプローブの、連続する5'～3'の核酸配列である。

【0039】

配列番号：8は、配列番号：5のプライマー配列によって認識されるPRAME遺伝子の、連続する5'～3'の核酸配列（「配列番号：5の標的配列」）である。

【0040】

配列番号：9は、配列番号：6のプライマー配列の逆相補によって認識されるPRAME遺伝子の、連続する5'～3'の核酸配列（「配列番号：6の標的配列」）である。

30

【0041】

配列番号：10は、配列番号：7のプローブ配列によって認識されるPRAME遺伝子の、連続する5'～3'の核酸配列（「配列番号：7の標的配列」）である。

【表1】

TRAME 2 Taqman セット		配列識別名
フォワード	5'-GAG-GCC-GCC-TGG-ATC-AG-3'	配列番号：5
リバース	5'-CGG-CAG-TTA-GTT-ATT-GAG-AGG-GTT-T-3'	配列番号：6
プローブ配列。 FAM レポーターダイ、 ヌクレオチド配列、及び MGB プローブを示す	5'-FAM_TGC-TCA-GGC-ACG-TGA-T_MGB-3'	配列番号：7
プローブヌクレオチド 配列のみ	TGC-TCA-GGC-ACG-TGA-T	配列番号：7（上記の 通り。ダイ及びプロ ーブを含まない）

40

【0042】

50

詳細な説明

「生物学的サンプル」は、被験者から取り出されたか又は単離された、被験者由来の組織又は細胞のサンプルを意味する。幾つかの実施形態では、被験者はヒト患者である。「PRAME陽性腫瘍組織」は、患者から単離されたPRAME遺伝子又はPRAME抗原を発現するあらゆる組織、例えば腫瘍組織又は腫瘍細胞を意味する。

【0043】

一実施形態では、腫瘍組織はメラノーマ；乳癌；膀胱癌、例えば移行上皮癌；肺癌、例えば非小細胞肺癌（NSCLC）；頭部及び頸部癌、例えば食道癌；扁平上皮癌；肝癌；多発性骨髄腫及び／又は結腸癌である。

【0044】

一実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物は、このような癌、特に肺癌及びメラノーマにおけるアジュバント（手術後の）設定での患者の治療において、又は転移性癌の治療において用いられ得る。

【0045】

一実施形態では、ヌクレオチド配列は、生物学的サンプル、例えば腫瘍組織サンプルから単離若しくは精製されるか、又は単離若しくは精製された。RT-PCRでは、ゲノムDNAによるコンタミネーションが偽陽性の結果をもたらし得る。一実施形態では、ゲノムDNAは、本明細書に開示される方法に含まれるか又は試験されるサンプルから、取り除かれるか又は実質的に取り除かれる。

【0046】

用語「から得られる又は由来の」は、包含的に使用されることを意味する。すなわち、該用語は腫瘍サンプルから直接単離されるあらゆるヌクレオチド配列、又は、例えばmRNA又はcDNAを生産するための逆転写の使用によって該サンプルに由来するあらゆるヌクレオチド配列を包含することを意図する。

【0047】

本明細書で使用される用語「標的配列」は、プローブ又はプライマーの配列が部分的に（すなわち、ある程度のミスマッチを有する）又は全体的に同一性を有する、[ただし、リバースプライマーは、認識する配列の逆相補（又は、上記の通り、ある程度のミスマッチを有する）である]、PRAME核酸配列（DNA又はRNA、例えばゲノムDNA、メッセンジャーRNA、又はそれらの増幅物）の領域である。

【0048】

好適には、プライマー又はプローブは、プライマー又はプローブの全長で標的配列に対し少なくとも95%同一であり得、好適には、標的PRAME配列に対しその全長で95%以上の同一性、他えは96%、97%、98%、99%、及び最も好適には100%の同一性を有し得る。本発明のプライマー又はプローブは、プライマー又はプローブの全てのヌクレオチド位置で標的配列と同一であり得、又は、例えば、プローブの長さ、温度、反応条件、及びアッセイの要件に依存して1若しくは2以上のミスマッチを有し得る。ただし、もちろん、リバースプライマーはプライマー配列の逆相補である場合に、該領域に対してこれらの条件を満たす。

【0049】

本明細書で用いられる用語「プライマー」は、例えば、PCR技術においてプライマーとして用いられ得る、あらゆる単鎖オリゴヌクレオチド配列を意味する。したがって、本発明に従う「プライマー」は、コピーされる核酸鎖と、（フォワードプライマーについては）実質的に同一であり、（リバースプライマーについては）実質的に逆相補である、プライマー伸長産物の合成の開始点として作用し得る単鎖オリゴヌクレオチド配列を意味する。プライマーのデザイン（長さ及び特異的配列）は、DNA及び／又はRNA標的の性質、並びにプライマーが用いられる条件（例えば、温度及びイオン強度）に依存する。

【0050】

プライマーは、配列番号：5、6、若しくは7で示されるヌクレオチド配列からなり得るか、又は、アッセイ条件下でPRAMEヌクレオチド配列中の標的配列に特異的に結合するのに好適である限り、配列番号：5、6、若しくは7の配列を含む若しくは属する、約若しく

10

20

30

40

50

はちょうど10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、若しくは100以上のヌクレオチドを含み得るか、又ははからなり得る。必要であれば、与えられた状況下で必要な特異性及び感受性を維持するために、プライマー若しくはプローブの長さ又は配列の少しの変更が行われ得る。本明細書に記載の配列番号5~6のプローブ及びプライマー配列は、いずれかの向きで、例えば1、2、3、4、又は5以上のヌクレオチド長の分だけ伸長若しくは削減され得る。

【0051】

幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは配列番号：5、6、7、8、9、及び10からなる群より選択されるヌクレオチド配列の少なくとも6個のヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、該少なくとも6個のヌクレオチドは、配列番号：5、6、7、8、9、及び10のヌクレオチドの6個の3'ヌクレオチドである。

10

【0052】

プローブの、PRAMEヌクレオチド配列の領域への「結合」は、プライマー又はプローブが、使用されるアッセイ条件下で、この領域の一部若しくは全体領域と二本鎖（二本鎖ヌクレオチド配列）を形成すること、並びにこれらの条件下でプライマー又はプローブが分析されるサンプルに存在するヌクレオチド配列の他の領域と安定な二本鎖を形成しないことを意味する。PRAMEヌクレオチド配列のある領域内での特異的ハイブリダイゼーションのためにデザインされる本発明のプライマー及びプローブが、該領域に全体的に属し得るか、又は、該領域とかなりの程度重複し得る（すなわち、該領域の内側のみならず外側のヌクレオチドとも二本鎖を形成する）ことが、理解されるべきである。

20

【0053】

本発明のさらなる側面では、配列番号：5若しくは配列番号：7、又は配列番号：6の逆相補（配列番号：9）のいずれかのヌクレオチド配列を含むプローブが提供される。

【0054】

用語「プローブ」は、本明細書において、例えば、PCR技術において、核酸と結合し得、かつプローブとして用いられ得るあらゆる単鎖オリゴヌクレオチド配列を意味するのに用いられ：該プローブは、配列番号：7で示されるヌクレオチド配列からなり得るか、又は、PRAMEヌクレオチド配列中の標的配列に特異的に結合するのに好適である限り、配列番号：5若しくは7、又は配列番号：6の逆相補（配列番号：9）の配列を含むか若しくは属する、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 or 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、若しくは100以上の塩基対であり得る。

30

【0055】

プローブがプライマー対と組み合わせた方法において用いられる本発明の一実施形態では、該プライマー対は、プローブが結合することができるか又はプローブが固体支持体上で固定されるPRAMEポリヌクレオチド断片の一部又は全ての増幅を可能とするべきである。

【0056】

プライマー及び/又はプローブは、プローブの検出を可能とするマーカーをさらに含み得る。

40

【0057】

用いられ得るマーカーの例として：蛍光マーカー、例えば、6-カルボキシフルオレセイン（6FAMTM）、NEDTM（Applera Corporation）、HEXTM又はVICTM（Applied Biosystems）、TET及びTAMRATMマーカー（Applied Biosystems）；化学発光マーカー、例えばルテニウムプローブ；並びに放射性標識、例えばトリチウム標識チミジンの形のトリチウムが挙げられる。³²-リンもまた、放射標識として用いられ得る。プローブの検出を可能とする限り、あらゆるマーカーが用いられ得る。

【0058】

本発明の一実施形態では、プローブは、その5'-末端に蛍光レポーターダイ、及びその3'-末端にクエンチャーダイ（quencher dye）を含み得る。蛍光レポーターダイは、6-カル

50

ボキシフルオレセイン (6FAM) を含み得、クエンチャーダイは非蛍光クエンチャー (non-fluorescent quencher (NFQ)) を含み得る。任意に、マイナーグループバインダータンパク質 (Minor Groove Binder protein (MGBTM; Applied Biosystems)) がプローブ、例えばプローブの3'末端に付加され得る。

【0059】

一実施形態では、MGBTM Eclipseプローブ (Epoch Biosciences, WA, USA) が用いられ得る。MGBTM Eclipseプローブは、プローブの5'末端に位置するEclipseTMダーククエンチャー及びMGBTM部分を有する。蛍光レポーターダイは、プローブの3'末端に位置する。

【0060】

一実施形態では、本発明のプライマー及びプローブ配列は、天然起源のヌクレオチド構造又は塩基、例えば、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)、及びウラシル (U) を含み得る。好適には、プライマー又はプローブの各ヌクレオチドは、その対応標的ヌクレオチドと水素結合を形成し得る。

10

【0061】

好適には、プライマー又はプローブの標的配列との相補性は、アデニン (A) ヌクレオチドがチミン (T) と対合するように、及びグアニン (G) ヌクレオチドがシトシン (C) と対合するように、又はその逆も同じように、A:T及びC:Gの塩基の対合の程度によって評価される。RNAの場合には、TはU (ウラシル) によって置き換えられ得る。

【0062】

イノシンは、ユニバーサルプローブにおいて用いられ得、例えば、この場合、相補性はイノシン (プローブ) - 標的ヌクレオチドの相互作用の程度によっても評価され得る。

20

【0063】

さらなる実施形態では、ヌクレオチド構造又は塩基の合成又は修飾アナログもまた、プローブの配列に含まれ得る。「合成又は修飾」は、非天然起源のヌクレオチド構造又は塩基を意味する。このような合成又は修飾塩基は、プローブ配列の塩基の1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は全てを置換し得る。一実施形態では、シトシンは5-メチルdCによって置換され得、チミンは5-プロピニルdUによって置換され得る。BHQ2クエンチャーもまた、配列中に含まれ得る。

【0064】

一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、プローブベースのアッセイにおけるプローブとして用いられ得る。プローブベースのアッセイは、特異的な配列へのオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを利用し、後にプローブがハイブリダイズする配列を検出するために用いられ得る。オリゴヌクレオチドプローブは、本分野において知られるあらゆる検出システムを用いて標識され得る。これらには、限定されるものではないが、蛍光部分、放射性同位体標識部分、生物発光部分、発光部分、化学発光部分、酵素、基質、受容体、又はリガンドが含まれる。

30

【0065】

プローブとして使用するためのオリゴヌクレオチドは、配列番号:5若しくは7、又は配列番号:6の逆相補 (配列番号:9) のいずれかのヌクレオチド配列を含み、から実質的になり、又はからなり得る。

40

【0066】

本発明のプライマー及びプローブは、核酸又は核酸の産物、例えば増幅によって得られる産物と直接ハイブリダイズし得る。増幅産物が検出される前に、さらなる精製ステップ、例えば沈降ステップも存在し得る。

【0067】

本発明の方法は、ヌクレオチド配列を増幅するステップを、さらに含み得る。一実施形態では、ヌクレオチド配列はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅される。代わりに、又はさらに、本発明の方法は、増幅されたヌクレオチド配列を、本明細書に記載の一以上のプローブと接触させるステップをさらに含み得る。

【0068】

50

本発明の方法は、PRAME陽性腫瘍組織を検出するのに好適である。本発明の一実施形態では、PRAME陽性腫瘍組織は、in situハイブリダイゼーションを用いて検出され得る。「in situハイブリダイゼーション」は、患者から単離された、そのままの染色体、細胞、又は組織に、本発明に従うプライマー又はプローブを用いて、特定のDNA若しくはRNA配列の形態学的部位の直接的視覚化のために行われるハイブリダイゼーション反応を意味する。

【0069】

ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、任意の好適なハイブリダイゼーション法及び検出システムを用いて行われ得る。ハイブリダイゼーションシステムの例として、従来のドットプロット、サザンプロット、及びサンドイッチ法が挙げられる。例えば、好適な方法として、タイプ特異的なプローブが公知の特徴的な位置（ドット、ライン、又は他の形状）で固体支持体に固定され、かつハイブリッドの形成を検出するために増幅されたポリ核酸が標識される、逆ハイブリダイゼーションアプローチが挙げられる。PRAME特異的核酸配列、例えば本明細書に記載のプローブ又はプライマーは、ビオチンで標識され得、ハイブリッドは、非放射性発色システムによるビオチン - ストレプトアビジンカップリングにより検出され得る。しかしながら、例えばGravitt et al (Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36 (10) : 3020-3027) に記載されるような他の逆ハイブリダイゼーションシステムもまた用いられ得、その内容もまた参照により組み込む。標準的なハイブリダイゼーション及び洗浄条件はKleter et al, Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37 (8) : 2508-2517に記載されており、プローブ及びプライマーの長さ及び配列によって要求される特異性及び感受性を維持するために、与えられた状況下で最適化される。

10

20

【0070】

本明細書に記載の方法は、新鮮な組織、凍結組織、パラフィン保存組織、及びノ又はエタノール保存組織での使用に好適であり得る。公知の抽出及び精製手順が、サンプルからのRNA又はDNAの単離に利用可能である（例えば、Sambrook et al, 1989）。RNA又はDNAは、サンプルからの抽出後直接、又はより好適には、ポリヌクレオチド増幅（例えばPCR）ステップの後、用いられ得る。特定の場合、例えば逆ハイブリダイゼーションアッセイでは、増幅の前にRNAをcDNAに逆転写することが必要となり得る。後者の両方の場合において、増幅されたポリヌクレオチドは、サンプルに「由来」する。

30

【0071】

本発明は、本明細書に記載の方法を用いて患者の腫瘍組織がPRAMEを発現しているか否かを決定するステップ、及び前記患者に本明細書に記載のPRAME免疫療法を行うステップを含む、患者の治療方法をさらに提供する。患者は、PRAME発現腫瘍組織を有し得るか（活動性疾患設定）、又はPRAME発現腫瘍組織を取り除く／治療するために治療されたが、PRAME発現腫瘍の再発に感受性があり得る（アジュバント設定）。

【0072】

本発明は、PRAME発現腫瘍を患うか、又はPRAME発現腫瘍の再発に感受性の患者の治療のための薬剤の製造におけるPRAME免疫療法の使用であって、該患者が本明細書に記載の診断方法、キット、プライマー、又はプローブを用いてPRAME発現腫瘍組織を有している又は有していたと同定される上記使用を、さらに提供する。

40

【0073】

したがって、本発明は、ヒト患者の組織サンプルの、PRAMEの発現の有無についての、臨床適用におけるスクリーニングのための方法を提供する。かかるサンプルは、例えば、コア針生検、外科的切除サンプル又はリンパ節組織からなり得る。例えば、これらの方法は、全細胞集団の約80%まで腫瘍細胞を濃縮するためにクリオスタット切開によって任意に断片化される生検を得るステップを含む。幾つかの実施形態では、核酸は本分野で公知の技術を用いてこれらのサンプルから抽出され得る。他の実施形態では、組織サンプルから抽出された核酸は、本分野で公知の技術を用いて増幅され得る。PRAME発現のレベルは検出され得、統計的に有効な群及びノ又はPRAME陰性患者の対照と比較され得る。

50

【 0 0 7 4 】

一実施形態では、診断方法は、例えば対応するmRNA及び/又は遺伝産物のタンパク質のレベルを検出することにより、被験者がPRAME遺伝子産物を発現しているか否かを決定するステップを含む。例えば、ノーザンブロット分析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、半定量RT-PCR、定量RT-PCR、TaqMan PCR、in situハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウエスタンブロット分析、又は免疫組織化学等の技術が用いられる。かかる方法に従って、被験者から細胞又は組織が得られ得、mRNA及び/又はタンパク質のレベルが、PRAMEを発現していない組織の該レベルと比較され得る。

【 0 0 7 5 】

TaqMan PCR技術

10

Taq DNAポリメラーゼは、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する。Taqman PCRアッセイは、このエキソヌクレアーゼ活性を、PCR増幅の間に標的配列にアニールされた二重標識プローブを開裂するために利用する。

【 0 0 7 6 】

手短かに言えば、RNAがサンプルから抽出され、cDNAが合成される(逆転写)。その後、cDNAは標準的なPCR成分(例えば、Roche(CA, USA)に供給されるTaqman PCRの成分を参照されたい)を含むPCR反応混合物に加えられる。反応混合物は、二つのプライマーの間の鋳型ヌクレオチド配列(すなわち、PCR反応によって増幅される配列、「アンプリコン」)にアニールするプローブをさらに含む。プローブは、5'末端に蛍光レポーターダイ、及び3'末端にクエンチャーダイを含む。クエンチャーは、二つのダイが互いに近接する(これはインタクトプローブにおいて生じる)ときのみ、レポーターの蛍光をクエンチすることができる。

20

【 0 0 7 7 】

増幅の間及び後、プローブはTaq DNAポリメラーゼによって分解され、全ての蛍光が検出される。

【 0 0 7 8 】

定量的な測定のために、蛍光がベースライン放射の標準偏差の10倍である閾値に達するPCRサイクル数が用いられる。サイクル閾値(Ct)と呼ばれるこのサイクル数は、標的cDNAの初期量と反比例し、cDNAの量の測定を可能とする。基本的に、サンプルにより多くの標的RNAが存在するほど、より小さなCt値が得られる。

30

【 0 0 7 9 】

Ctについて得られる測定値は、ハウスキーピング遺伝子について得られた値と比較される。これは、(波長吸光度に基づいて)各逆転写反応に加えられる総RNAの量及びその質(すなわち、分解)に基づくあらゆる誤差を許容し、その両方を、初期物質を測定するための信頼性のあるパラメーターでないものにする。したがって、ハウスキーピング遺伝子の転写物が、内在性コントロールとして定量化される。他の遺伝子も用いられ得るが、ベータ-アクチンは、最もよく使われる非特異的ハウスキーピング遺伝子の一つである。

【 0 0 8 0 】

免疫療法(剤)

40

一実施形態では、本発明において使用するためのPRAME免疫療法(剤)は、PRAME抗原、ペプチド、又はそれらのエピトープを含む組成物(能動的免疫療法)であり得る。代替の実施形態では、PRAME免疫療法は、PRAME抗原を特異的に認識することができる抗原結合タンパク質、又は抗原結合タンパク質の断片(受動的免疫療法)であり得る。抗原結合タンパク質は、自然抗体又はその機能性断片若しくは等価物の構造にフォーマットされ得る、本発明の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み得る。

【 0 0 8 1 】

一実施形態では、PRAME抗原、ペプチド、又はエピトープは、融合パートナー又は担体タンパク質に融合若しくは結合され得る。例えば、融合パートナー又は担体タンパク質は、タンパク質D、NS1、若しくはCLytA、又はそれらの断片から選択され得る。

【 0 0 8 2 】

50

PRAMEタンパク質は509アミノ酸を有し、一実施形態では、PRAMEの全509アミノ酸が用いられ得る。しかしながら、保存的置換を有するPRAME構築物もまた用いられ得る。一実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、又は9以上のアミノ酸が置換され得る。PRAME構築物は、さらに、又は代わりに、野生型のPRAME配列と比較してアミノ酸配列中に欠失又は挿入を含み得る。一実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、又は9以上のアミノ酸が挿入又は欠失され得る。

【0083】

一実施形態では、PRAME抗原の配列は、天然起源のPRAMEと80%又は80%以上、例えば85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であり得る。

【0084】

一側面では、本発明において使用するためのPRAME抗原は、本明細書に記載の融合パートナータンパク質及びPRAME抗原又はその免疫原断片を含む。

【0085】

一実施形態では、PRAME抗原は：

a) PRAME又はその免疫原断片、及び

b) タンパク質Dに由来する異種性の融合パートナー

を含み、かつタンパク質Dの分泌配列（シグナル配列）を含まない融合タンパク質である。タンパク質Dの分泌配列若しくはシグナル配列、又は分泌シグナルは、タンパク質DのN末端の19アミノ酸を意味する。したがって、本発明の融合パートナータンパク質は、タンパク質Dの完全長タンパク質の残りを含み得るか、又はタンパク質DのN末端の約1/3の残りを含み得る。例えば、タンパク質DのN末端の1/3の残りは、タンパク質Dのほぼ又は約アミノ酸20～127を含み得る。一実施形態では、タンパク質D配列はタンパク質DのN末端アミノ酸20～127を含む。

【0086】

抗原及び融合パートナーは、化学的に結合され得るか、又は組み換え融合タンパク質として発現され得る。抗原及び融合パートナーが組み換え融合タンパク質として発現される実施形態では、これにより、非融合タンパク質と比較して、発現システムにおいて生産されるレベルの増加が可能となり得る。したがって、融合パートナーは、Tヘルパーエピトープ、例えばヒトによって認識されるTヘルパーエピトープを提供するのを補助し得（免疫学的融合パートナー）、及び/又は融合パートナーは、ネイティブな組み換えタンパク質よりも高収率でタンパク質を発現するのを補助し得る（発現エンハンサー）。一実施形態では、融合パートナーは、免疫学的融合パートナー及び発現エンハンサーパートナーの両方であり得る。

【0087】

本発明の一実施形態では、用いられ得る免疫学的融合パートナーは、グラム陰性菌であるインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）Bの表面タンパク質であるタンパク質D（W091/18926）、又はその誘導体に由来する。タンパク質D誘導体は、該タンパク質の初めの1/3、又は該タンパク質の初めのほぼ1/3を含み得る。一実施形態では、タンパク質Dの初めの109残基が、追加の外因性T細胞エピトープを有するPRAME抗原を提供し、*E. coli*での発現レベルを増加する（したがって、発現エンハンサーとしても作用する）ために、融合パートナーとして用いられ得る。別の実施形態では、タンパク質D誘導体は、N末端の初めの100～110アミノ酸又はN末端の初めの約若しくはほぼ100～110アミノ酸を含み得る。一実施形態では、タンパク質D又はその誘導体は、脂質付加され、リボタンパク質Dが用いられ得る（脂質テイルは、抗原提示細胞への抗原の最適な提示を確実にし得る）。

【0088】

一実施形態では、PRAMEは、N末端からC末端にかけて：Met-Asp-Proアミノ酸 - タンパク質Dの20～127アミノ酸 - PRAME（509アミノ酸又は本明細書に記載の実施形態）、及び任意にリンカー、及び生産工程の間の融合タンパク質の精製を促進するために含まれ得るポリヒスチジンテール（His）を含む融合タンパク質である、タンパク質D-PRAME/Hisであり得る。

10

20

30

40

50

【0089】

PRAMEは、N末端にタンパク質Dを有し、C末端に7個のヒスチジン残基の配列（Hisテイル）を有する融合タンパク質として発現され得る。

【0090】

本発明の一実施形態では、免疫療法はタンパク質D - PRAME融合タンパク質を含む。

【0091】

本発明のさらなる実施形態では、免疫療法は本明細書に記載のPRAME特異的腫瘍関連抗原をコードする核酸分子を含む。本発明の一実施形態では、配列は好適な発現ベクターに挿入され得、DNA/RNAワクチン接種に用いられ得る。該核酸を発現する微生物ベクターもまた、ベクター送達免疫療法として用いられ得る。

10

【0092】

好適なウイルスベクターの例として、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルスを含むヘルペスウイルス、アルファ - ウイルス、カナリアボックス等のボックスウイルス、及びワクシニアウイルスベースのシステムが挙げられる。これらのウイルスを用いる遺伝子転移技術は、当業者に知られている。例えば、レトロウイルスベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主ゲノムに安定的に組み込むのに用いられ得るが、このような組み換えは好適ではない。対照的に、複製欠損アデノウイルスベクターは、エピソームにとどまり、したがって一過性発現を可能とする。昆虫細胞（例えばバキュロウイルスベクター）、ヒト細胞、酵母、又は細菌において発現を誘導可能なベクターは、本発明のポリヌクレオチドにコードされるPRAMEタンパク質の、例えばサブユニットワクチン又は免疫アッセイにおいて使用するための量を生産するために用いられ得る。

20

【0093】

核酸配列を得るための従来を組み換え技術、及び発現ベクターの生産は、Maniatis et al, Molecular Cloning - A Laboratory Manual ; Cold Spring Harbor, 1982-1989に記載されている。

【0094】

タンパク質ベースの免疫療法では、本発明のタンパク質は、液体形態又は凍結乾燥形態のいずれかで提供される。

【0095】

各ヒト用量は、1~1000 µgのタンパク質を含み得る。一実施形態では、該用量は、30~300 µgのタンパク質を含み得る。

30

【0096】

本発明の一実施形態では、PRAME抗原を含む組成物は、アジュバントをさらに含み得る。例えば、アジュバントは：3D-MPL；アルミニウム塩；CpG含有オリゴヌクレオチド；QS21又はISCOM等のサポニン含有アジュバント；水中油エマルション；及びリポソームの一以上又は組み合わせを含み得る。一実施形態では、アジュバントは、リポソーム製剤中に3D-MPL、CpG含有オリゴヌクレオチド、及びQS21を含み得る。

【0097】

本発明において使用するための好適なワクチンアジュバント、例えば、フロイント不完全アジュバント及び完全アジュバント（Difco Laboratories, Detroit, MI）；Merckアジュバント65（Merck and Company, Inc., Rahway, NJ）；AS-2（SmithKline Beecham, Philadelphia, PA）；水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）又はリン酸アルミニウム等のアルミニウム塩；カルシウム、鉄、又は亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アシル化糖；カチオン又はアニオン誘導体化ポリ多糖；ポリホスファゼン；生分解性マイクロスフェア；モノホスホリルリピドA及びquil Aが市販されている。サイトカイン、例えばGM-CSF又はインターロイキン2、7、又は12及びケモカインもまた、アジュバントとして用いられ得る。

40

【0098】

本発明において使用するためのアジュバントは、モノホスホリルリピドA、例えば3 - 脱

50

- O - アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MPL) とアルミニウム塩との組み合わせを含み得る。3D-MPL、又はアミノアルキルグルコサミニドホスフェート等の他の toll 様受容体4 (TLR4) リガンドもまた用いられ得る。

【0099】

用いられ得る他の公知のアジュバントとして、非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチド等のTLR9アンタゴニストが挙げられる。該オリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドがメチル化されていないという特徴を有する。このようなオリゴヌクレオチドは公知であり、例えばWO 96/02555に記載されている。

【0100】

製剤は、水中油エマルジョン及び/又はトコフェロールをさらに含み得る。

10

【0101】

用いられ得る他のアジュバントは、サポニン、例えばQS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA) であり、これは単独で、又は他のアジュバントと組み合わせて用いられ得る。例えば、一つのシステムは、モノホスホリルリピドA及びサポニン誘導体の組み合わせ、例えばWO 94/00153に記載されているQS21及び3D-MPLの組み合わせ、又はWO 96/33739に記載されているQS21がコレステロールにより抑えられた反応性の低い組成物を含む。他の製剤は、水中油エマルジョン及びトコフェロールを含む。本発明で用いられ得る一つのアジュバント製剤は、水中油エマルジョン中にQS21、3D-MPL、及びトコフェロールを含み、WO 95/17210に記載されている。

【0102】

20

他の実施形態では、アジュバントはリポソーム組成物中に製剤化され得る。用いられる3D-MPLの量は一般に少ないが、免疫療法製剤に依存して、用量当たり1~1000 µg、好適には用量当たり1~500 µg、及びより好適には用量当たり1~100 µgの範囲であり得る。

【0103】

一実施形態では、アジュバントは3D-MPL、QS21、及び免疫刺激性CpGオリゴヌクレオチドの一以上を含み得る。一実施形態では、三つの免疫刺激剤の全てが存在する。他の実施形態では、CpGオリゴヌクレオチドの非存在下で、3D-MPL及びQS21が水中油エマルジョン中に存在する。本発明の一実施形態では、WO 95/17210に記載されているように、アジュバントは、リポソーム製剤又は水中油エマルジョンのいずれかの中に、CpGオリゴヌクレオチド、3D-MPL、及びQS21を含む。

30

【0104】

本発明のアジュバント又は免疫療法中のCpG又は免疫刺激オリゴヌクレオチドの量は一般に少ないが、免疫療法製剤に依存して、用量当たり1~1000 µg、好適には用量当たり1~500 µg、及びより好適には用量当たり1~100 µgであり得る。

【0105】

本発明のアジュバントにおいて使用するためのサポニンの量は、用量当たり1~1000 µg、好適には用量当たり1~500 µg、及びより好適には用量当たり1~250 µg、及び最も好適には用量当たり1~100 µgであり得る。

【0106】

一般に、各ヒト用量は、0.1~1000 µg、例えば0.1~500 µg、0.1~100 µg、又は0.1~50 µgの抗原を含み得る。特定の免疫療法の最適な量は、ワクチン接種された被験者における適切な免疫応答の観察を含む標準的な研究により確かめられ得る。最初のワクチン接種に続いて、被験者は適切な間隔をあけた一又は複数の追加免疫を受け得る。

40

【0107】

他の好適なアジュバントとして、Montanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, California, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、Ribi Detox, RC-529 (GSK, Hamilton, MT) 及び他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート (AGP) が挙げられる。

【0108】

本明細書及び添付の特許請求の範囲を通じて、文脈が他に必要としない限り、単語「含

50

む」及びその変化形は、記載された要素若しくはステップ、又は要素若しくはステップの群の包含を意味するが、他のあらゆる要素若しくはステップ、又は要素若しくはステップの群の排除を意味しないと理解される。

【0109】

本発明は、以下の非限定的な図及び実施例を参照して、さらに記載される。

【実施例】

【0110】

実施例1 - AM及びGSKリアルタイムPRAMEオリゴデザインの分析感受性の比較

目的

本実験の目的は、リアルタイムPRAMEアッセイについてのAbbott Molecular (AM) 及びGlaxoSmithKline (GSK) のオリゴデザインの分析感受性を比較することであった。そのため、各オリゴデザインを、一定レベルのベータ - アクチンRNA及び減少するレベルのPRAME RNAを含む希釈パネルを試験するために用いた。このデザインを通じて、特徴的な Ct 値 (PRAME CtとActin Ctとの差) を有するパネルメンバーが評価される。

【0111】

方法

評価されるCSKオリゴヌクレオチドセットは、PRAME mRNAエクソンの5/6領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのPRAMEフォワードプライマー (配列番号: 5)、一つのPRAMEリバースプライマー (配列番号: 6)、及び一つのPRAMEプローブ (配列番号: 7) を含む。GSKオリゴヌクレオチドセットは、ベータ - アクチン (内在性コントロール) のmRNAエクソンの5/6領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのベータ - アクチンフォワードプライマー、一つのベータ - アクチンリバースプライマー、及び一つのベータ - アクチンプローブもまた含む。

【0112】

評価されるAMオリゴヌクレオチドセットは、PRAME mRNAエクソンの3/4領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのPRAMEフォワードプライマー、一つのPRAMEリバースプライマー、及び一つのPRAMEプローブを含む。AMオリゴヌクレオチドセットは、ベータ - アクチンmRNAエクソンの4/5領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのベータ - アクチンフォワードプライマー、一つのベータ - アクチンリバースプライマー、及び一つのベータ - アクチンプローブもまた含む。

【0113】

AM及びGSKオリゴデザインの性能を直接比較するために、二つのマスター混合物を調製した。プライマー及びプローブを除いて、各マスター混合物は同じロットのPCR反応物を同じ濃度で含んでいた。

【0114】

この実験のための試験サンプルを調製するために、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) A549細胞由来のPRAME陽性RNAを、PRAME mRNAを有さない細胞株MDA-MB-231由来の30ng/rxnのRNAで順次希釈した。100%未満の検出となる最小PRAME RNA濃度を達成するために、5つの10倍連続希釈A549 RNA (3000pg ~ 0.3pg/rxn) を作成した。A549 RNAを含まない30ng/rxnのMDA-MB-231 RNAを、PRAME陰性対照として含めた。

【0115】

各希釈レベルを、PRAME及びベータ - アクチンレベルを評価するために、同じm2000rt機器において、各マスター混合物の4反復で試験した。

【0116】

線形回帰を、平均PRAME Ct値とA549濃度 (pg/rxn) の \log_{10} との相関から計算した。

【0117】

結果

各希釈パネルでのPRAME検出率は、両方のオリゴデザインにおいて同様であり、それぞれ30pg A549 RNA/rxnで100%の検出 (4反復中4) を示し、3pg A549 RNA/rxnで50% (4反復中2) の検出を示した。0.3pg A549 RNA/rxnにおいて、CSKデザインは少しもPRAMEを検出

10

20

30

40

50

しなかったが、AMデザインは、一反復でPRAMEを検出した。PRAMEは、各デザインについて、MDA-MB-231陰性対照では検出されなかった。各オリゴセットによって得られたPRAME Ct値は、検出可能なパネル範囲で線形 ($r^2 > 0.99$) であった。結果を表2並びに図1及び2に示す。

【表2】

Pg A549 FFPE RNA/rxn	Pg MDA RNA/rxn	Abbott - PRAME						GSK - PRAME					
		CT1	CT2	CT3	CT4	CT 平均	CT SD	CT1	CT2	CT3	CT4	CT 平均	CT SD
3000	30000	23.6	26.0	24.3	26.6	25.1	1.4	26.8	26.7	27.0	26.9	26.8	0.1
300	30000	30.3	29.9	30.2	30.2	30.1	0.2	30.4	30.6	30.5	30.3	30.4	0.2
30	30000	33.8	34.1	33.2	33.6	33.7	0.4	34.9	33.3	33.3	33.7	33.8	0.8
3	30000	39.2	n/a	38.7	n/a	38.9	0.4	n/a	n/a	36.1	36.2	36.2	0.1
0.3	30000	n/a	50.8	n/a	n/a	50.8	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
0	30000	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

10

【0118】

結論

最も高い希釈において、PRAMEが検出されるサンプルのCtは、Abbottプライマーよりも、GSKプライマーにおいてより低い。したがって、細胞株RNAについてのGSKプライマーセットの感受性は、AMプライマーセットの感受性よりも高い。

20

【0119】

100%の効率性を有するPCR反応についてのCt対 \log_{10} (濃度)の回帰の理論的傾きは、-3.322である。(%)でのPCR反応の効率性は、以下の方程式： $Eff\% = (10^{(-1/\text{傾き})} - 1) * 100$ を用いて計算され得る。Abbottプライマーについての回帰直線の傾きは、-4.5063であり、これは66.7%のPCR効率に相当する(図1)。GSKプライマーについて、傾きは-3.13であり、これは108.7%のPCR効率に相当する(図2)。GSKプライマーの効率は、Abbottプライマーの効率よりも、理論的効率に近い。90%未満の効率のPCR反応は再設計されるべきであるということもまた、一般に受け入れられている(例えば、<http://www.dorak.info/genetics/glosrt.html>)。

30

【0120】

実施例2 - 7つのFFPE NSCLCサンプルを用いるAbbott及びGSKオリゴの比較

目的

本実験の目的は、リアルタイムPRAMEアッセイについてのAbbott Molecular (AM) 及びGlaxoSmithKline (GSK) オリゴデザインの性能を比較することであった。そのために、各オリゴデザインを、7つのマクロ解剖されていない(non-macrodissected)ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)非小肺癌(NSCLC)検体からのRNA溶出液を試験するために用いた。

40

【0121】

方法

評価されるCSKオリゴヌクレオチドセットは、PRAME mRNAエクソンの5/6領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのPRAMEフォワードプライマー、一つのPRAMEリバースプライマー、及び一つのPRAMEプローブを含む。GSKオリゴヌクレオチドセットは、ベータ-アクチン(内在性コントロール)mRNAエクソンの5/6領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのベータ-アクチンフォワードプライマー、一つのベータ-アクチンリバースプライマー、及び一つのベータ-アクチンプローブもまた含む。

【0122】

評価されるAMオリゴヌクレオチドセットは、PRAME mRNAエクソンの3/4領域の逆転写、P

50

CR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのPRAMEフォワードプライマー、一つのPRAMEリバースプライマー、及び一つのPRAMEプローブを含む。AMオリゴヌクレオチドセットは、ベータ - アクチンmRNAエクソンの4/5領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのベータ - アクチンフォワードプライマー、一つのベータ - アクチンリバースプライマー、及び一つのベータ - アクチンプローブもまた含む。

【0123】

AM及びGSKオリゴデザインのリアルタイムPCRの性能を直接比較するために、二つのマスター混合物を調製した。プライマー及びプローブを除いて、各マスター混合物は同じロットのPCR反応物を同じ濃度で含んでいた。

【0124】

本実験のための試験サンプルを調製するために、7つのFFPE NSCLC検体のそれぞれに由来する組織切片を脱パラフィンし、Nuclear Fast Redで染色した。その後、RNAを（マクロ解剖されていない）全組織切片から抽出し、Nanodrop分光光度計を用いて定量した。

【0125】

PRAME及びベータ - アクチンレベルを評価するために、各検体由来の10ngのRNAを、m2000rt機器において各マスター混合物で3反復で試験した。

【0126】

結果

試験した各PCR反復において、AM及びGSKオリゴセットにより得られたPRAMEサイクル閾値（Ct）及び Ct（PRAME Ctとベータ - アクチンCtとの差）を、表3及び4に示す。試験された7サンプルのうち3つについて、PRAMEシグナル（Ct）は、どちらのオリゴセットでも検出不可能であった。検出可能なPRAMEシグナルが得られた4つのサンプルのうち、1つは各オリゴセットにおいて、3反復全てで検出され；1つは、AMオリゴによって1反復で検出され、GSKオリゴで3反復で検出され；2つは、AMオリゴによって2反復で検出され、GSKオリゴで1反復で検出された。

【表3】

サンプル ID	サンプル入力	Abbott - PRAME				GSK - PRAME			
		CT1	CT2	CT3	CT平均	CT1	CT2	CT3	CT平均
1	10ng	-1	-1	36.97	36.97	37	35.95	35	35.98
2	10ng	32.02	32.55	33.53	32.7	33.02	33.35	34.03	33.47
3	10ng	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
4	10ng	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
5	10ng	-1	37.51	37.4	37.46	-1	35.82	-1	35.82
8	10ng	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	10ng	-1	38.33	34.73	36.53	-1	36.11	-1	36.11

10

20

30

【表 4】

サンプル ID	サンプル入力	Abbott - PRAME				GSK - PRAME			
		ΔCT1	ΔCT2	ΔCT3	ΔCT 平均	ΔCT1	ΔCT2	ΔCT3	ΔCT 平均
1	10ng	n/a	n/a	14.31	14.31	13.78	12.67	11.80	12.75
2	10ng	9.76	10.33	11.30	10.46	10.11	10.42	11.16	10.56
3	10ng	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4	10ng	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
5	10ng	n/a	16.32	16.23	16.28	n/a	14.15	n/a	14.17
8	10ng	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
9	10ng	n/a	15.36	11.90	13.66	n/a	12.66	n/a	12.71

10

【0127】

結論

最も高い希釈において、GSKオリゴは、AMアッセイよりも低いCt及びより低いデルタCt値で標的PRAMEを検出する。したがって、臨床サンプルについてのGSKアッセイの感受性は、AMアッセイの感受性よりも優れている。

【0128】

実施例 3 - 50のFFPE NSCLCサンプルを用いるAbbott及びGSKオリゴの比較目的

本実験の目的は、リアルタイムPRAMEアッセイについてのAbbott Molecular (AM) 及びGlaxoSmithKline (GSK) オリゴデザインの性能を比較することであった。そのために、各オリゴデザインを、50のマクロ解剖された (macrodissected) ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 非小肺癌 (NSCLC) 検体からのRNA溶出液を試験するために用いた。

【0129】

方法

評価されるCSKオリゴヌクレオチドセットは、PRAME mRNAエクソンの5/6領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのPRAMEフォワードプライマー、一つのPRAMEリバースプライマー、及び一つのPRAMEプローブを含む。

【0130】

評価されるAMオリゴヌクレオチドセットは、PRAME mRNAエクソンの3/4領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのPRAMEフォワードプライマー、一つのPRAMEリバースプライマー、及び一つのPRAMEプローブを含む。

【0131】

本実験において、両方のオリゴヌクレオチドセットとも、ベータ - アクチン (内在性コントロール) mRNAエクソンの5/6領域の逆転写、PCR増幅、及びリアルタイム蛍光検出に関する、一つのベータ - アクチンフォワードプライマー、一つのベータ - アクチンリバースプライマー、及び一つのベータ - アクチンプローブもまた含む。

【0132】

AM及びGSKオリゴデザインのリアルタイムPCRの性能を直接比較するために、二つのマスター混合物を調製した。PRAMEプライマー及びプローブを除いて、各マスター混合物は同じロットのPCR反応物を同じ濃度で含んでいた。

【0133】

本実験のための試験サンプルを調製するために、50のFFPE NSCLC検体のそれぞれに由来する組織切片を脱パラフィンし、Nuclear Fast Redで染色し、少なくとも50mm²の範囲中に少なくとも50%の腫瘍細胞となるように、マクロ解剖した。その後、RNAをマクロ解剖された全検体のそれぞれから抽出し、Nanodrop分光光度計を用いて定量した。

【0134】

50

十分なサンプルの欠如により一反復のみが試験された二検体、及び二反復のそれぞれの十分なサンプルの欠如により25ngが試験された一検体を除いて、50ngのRNAを、PRAME及びベータ - アクチンレベルを評価するために、各マスター混合物で、2反復でm2000rt機器において試験した。PCRプレートの空間的制限のために、検体を、各マスター混合物において、二つの独立バッチで試験した。

【 0 1 3 5 】

結果

50検体のうち48において、試験したPCR反復の100%で、AMオリゴセットはPRAMEシグナル (Ct) を検出した。残りの二つの検体において、AMオリゴセットはPCRの二反復の一方でPRAMEシグナルを検出した。AMオリゴセットは、全ての検体において、試験した全てのPCR反復においてベータ - アクチンシグナルを検出した。GSKオリゴセットは、全ての検体において、試験した全てのPCR反復においてPRAMEシグナル及びベータ - アクチンシグナルを検出した。

10

【 0 1 3 6 】

試験した各検体において、AM及びGSKオリゴセットにより得られる平均PRAMEサイクル閾値 (Ct)、平均ベータ - アクチンCt、及び Ct (平均のPRAME Ctと平均のベータ - アクチンCtの差) を、表5及び6に示す。

【 0 1 3 7 】

AM対GSKオリゴセットにより得られるPRAME Ctの結果の相関分析を図3に示す。

【表 5】

20

患者 ID	RNA ID	Abbot マスターミックス			GSK マスターミックス		
		PRAME_CY5_Ct	ACTIN_FAM_Ct	D ct	PRAME_CY5_Ct	ACTIN_FAM_Ct	D ct
31	93197	26.48	15.05	11.43	24.83	14.99	9.84
32	93264	24.92	13.85	11.07	23.56	14.09	9.47
33	93451	35.18	15.07	20.11	31.82	15.03	16.80
42	83286	23.20	14.23	8.97	21.65	14.25	7.40
43	83287	21.00	14.959	6.05	20.12	14.86	5.26
71	83060	29.51	16.38	13.13	26.89	16.15	10.74
73	87858	23.81	14.26	9.55	22.10	14.33	7.77
74	90724	25.14	15.29	9.86	24.49	15.28	9.21
89	91970	34.96	16.25	18.72	32.85	16.09	16.77
95	82840	25.83	15.63	10.20	23.86	15.46	8.40
98	87020	24.81	14.91	9.90	23.10	14.78	8.32
101	89659	23.44	13.14	10.30	23.43	13.39	10.04
135	100205	#32.3	19.61	12.69	#29.44	19.45	#9.995
141	92803	35.67	15.40	20.27	33.91	15.35	18.56
252	83226	22.65	14.46	8.19	22.38	14.40	97.98
253	83457	24.56	15.57	9.00	24.24	15.61	8.63
255	91148	27.58	16.01	11.58	25.92	15.93	9.99
256	89167	22.34	14.44	7.90	20.90	14.44	6.46
258	91820	38.26 (1)	15.65	22.61	35.33	15.40	19.94
259	95217	32.64	14.61	18.03	31.07	14.40	16.68
	water	NA	NA	NA	NA	NA	NA

30

40

(n) = 括弧の中の数字は、100%未満の検出の時での (2のうちの) 検出された反復を示す。

十分なサンプルの不足のため、25ng サンプル/ウェルを用いた。

【表 6】

患者 ID	RNA ID	Abbot マスターミックス			GSK マスターミックス		
		PRAME_CY5_Ct	ACTIN_FAM_Ct	D ct	PRAME_CY5_Ct	ACTIN_FAM_Ct	D ct
260	98823	25.42	14.34	11.12	23.48	14.06	9.42
261	98833	23.07	15.06	8.13	23.04	15.03	8.01
262	99835	30.82	14.64	16.29	30.37	14.65	15.72
305	84520	36.16	16.52	19.69	33.68	16.42	17.26
313	100332	*26.33	*17.71	*8.62	*25.00	*17.45	*7.55
357	95347	22.88	14.39	8.61	22.27	14.21	8.06
456	82315	29.51	17.51	12.03	28.15	17.26	10.89
523	91128	29.56	17.10	12.51	26.98	16.82	10.16
601	85029	25.39	15.47	10.04	24.79	15.21	9.58
602	87515	38.11 (1)	17.77	20.47	34.95	17.41	17.54
605	89024	28.23	15.03	13.26	26.44	14.91	11.54
608	93474	27.80	16.42	11.33	25.83	16.44	9.40
633	87017	29.01	16.36	12.58	27.41	16.36	11.05
636	92375	31.55	17.98	13.55	28.70	17.80	10.91
661	85031	25.01	14.58	10.46	23.96	14.60	9.37
662	85030	25.14	13.70	11.52	23.35	13.66	9.69
664	87300	26.30	15.32	10.91	25.57	15.55	10.02
665	87608	23.49	14.31	9.10	21.85	14.41	7.44
697	92554	27.57	17.38	10.18	27.21	17.37	9.84
699	100595	25.82	18.80	6.96	24.69	18.61	6.08
798	87505	24.41	14.34	9.97	23.71	14.40	9.31
800	88347	24.33	14.88	9.36	22.65	14.95	7.70
809	94956	33.88	16.30	17.57	31.01	16.19	14.82
834	100357	28.35	15.06	12.99	27.95	15.22	12.73
852	93781	*29.24	*19.18	*10.03	*27.59	*18.87	*8.72
1203	85757	24.71	14.41	10.33	24.64	14.58	10.06
1205	86473	26.60	14.53	12.10	24.70	14.50	10.20
1207	87510	32.00	14.79	17.31	31.38	14.70	16.68
1212	93262	21.86	14.29	7.60	21.54	14.34	7.20
1216	101054	23.50	14.04	9.44	22.90	14.20	8.70
	Water	NA	NA	NA	NA	NA	NA

(n) = 括弧の中の数字は、100%未満の検出の時での (2 のうちの) 検出された反復を示す。

十分なサンプルの不足のため、一反復のみを試験した。

【0138】

結論

臨床サンプルにおけるPRAMEの検出率は、AMアッセイにおいて96%であり、GSKアッセイにおいて100%である。

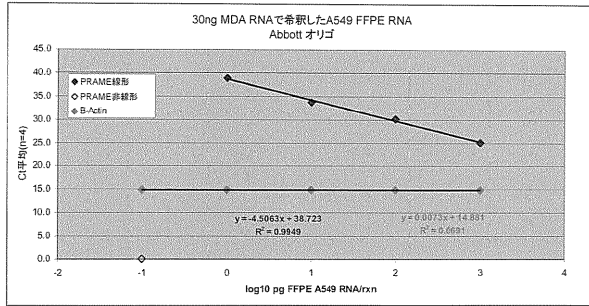
【0139】

AM Ct値に対するGSK Ct値の回帰の切片は、2.2である。したがって、臨床サンプルにおけるPRAMEの検出は、AMアッセイよりも、GSKアッセイにおいて平均で2.2 Ct早く生じる。これは、臨床サンプルにおけるGSKアッセイのより優れた感受性を裏付ける。

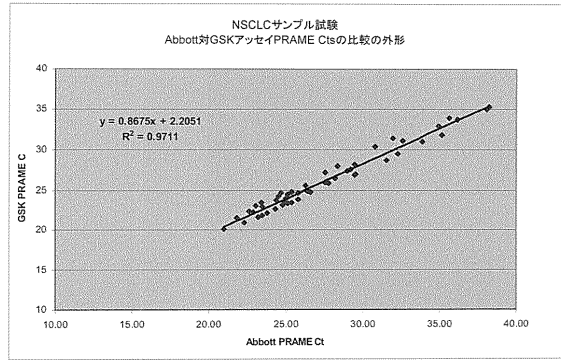
【0140】

AM Ct値に対するGSK Ct値の回帰の傾きは、0.8675である。GSK及びPRAMEアッセイが同等であれば、傾きは1となるだろう。これは、PRAME濃度の減少にともなって、AMアッセイにおけるCt値が、GSKアッセイのCt値よりも速く (13.3%) 増加することを意味する。これもまた、GSKプライマーのより優れた性能を強調する。

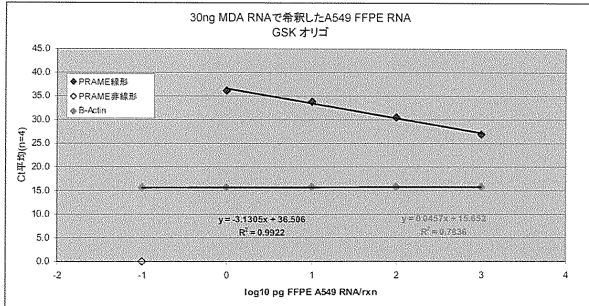
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2014527411000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/066920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12Q1/68 C07K14/47 C07K16/30 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2008/147205 A1 (AGENDIA B V [NL]; ROEPMAN PAUL [NL]; VAN ZANDWIJK NICO [AU]; GLAS ANNU) 4 December 2008 (2008-12-04) SEQ ID NO:146 comprises SEQ ID NO:6; table 3 ----- -/--	1,2,4, 7-10,12 3,5,6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 October 2012		Date of mailing of the international search report 25/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gabriels, Jan

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/066920

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARNINCI P ET AL: "NORMALIZATION AND SUBTRACTION OF CAP-TRAPPER-SELECTED CDNAS TO PREPARE FULL-LENGTH CDNA LIBRARIES FOR RAPID DISCOVERY OF NEW GENES", GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol. 10, no. 10, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 1617-1630, XP002944079, ISSN: 1088-9051, DOI: 10.1101/GR.145100 Accession number HY028994 which is 480 bp in length comprises SEQ I D NO:5 fom bp 4 to 20. -----	1,2,4
X	WO 03/078662 A1 (GENOMIC HEALTH [US]; BAKER JOFFRE B [US]; CRONIN MAUREEN T [US]; KIEFE) 25 September 2003 (2003-09-25) SEQ ID NO:34 is the PRAME gene sequence and comprises SEQ ID NO:7.; page 56 - page 62; example 3 -----	1,2,4, 7-12
Y	SEQ ID NO:34 is the PRAME gene sequence and comprises SEQ ID NO:7.; page 56 - page 62; example 3 -----	3,5,6
X	WO 2011/062634 A2 (MANNKIND CORP [US]; KERTESZ NATHALIE [US]; ZHU SUTAO [US]; CHIANG CHIH) 26 May 2011 (2011-05-26) paragraph [0034] - paragraph [0035]; example 5 -----	13-19
X	WO 2008/087102 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BLAIS NORMAND [CA]; MARTIN DENIS [CA];) 24 July 2008 (2008-07-24) the whole document -----	13-19
X	WO 02/081646 A2 (CTL IMMUNOTHERAPIES CORP [US] MANNKIND CORP [US]) 17 October 2002 (2002-10-17) tables 55,56 -----	13-19
X	WO 2004/112825 A2 (MANNKIND CORP [US]; CHIANG CHIH-SHENG [US]; BOT ADRIAN [US]; SIMARD JO) 29 December 2004 (2004-12-29) claim 1 -----	13-19
Y	WO 2004/074518 A1 (GENOMIC HEALTH INC [US]; SCOTT RANDAL W [US]; KIEFER MICHAEL C [US]; B) 2 September 2004 (2004-09-02) page 27, line 28 - page 33, line 21; examples 1,2 -----	3,5,6
A	page 27, line 28 - page 33, line 21; examples 1,2 -----	12

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/066920

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2008147205 A1	04-12-2008	AT 543913 T	15-02-2012		
		CA 2689714 A1	04-12-2008		
		EP 2171084 A1	07-04-2010		
		JP 2010528602 A	26-08-2010		
		US 2010184052 A1	22-07-2010		
		WO 2008147205 A1	04-12-2008		
		WO 03078662 A1	25-09-2003	AT 529535 T	15-11-2011
AU 2003253986 A1	29-09-2003				
CA 2478850 A1	25-09-2003				
DK 1918386 T3	02-01-2012				
EP 1488007 A1	22-12-2004				
EP 1918386 A1	07-05-2008				
EP 2241636 A1	20-10-2010				
EP 2258872 A2	08-12-2010				
EP 2258873 A2	08-12-2010				
EP 2261368 A1	15-12-2010				
EP 2261369 A2	15-12-2010				
ES 2374311 T3	15-02-2012				
HK 1120567 A1	27-01-2012				
JP 4753741 B2	24-08-2011				
JP 2005519624 A	07-07-2005				
JP 2006129880 A	25-05-2006				
JP 2011250809 A	15-12-2011				
US 2003225528 A1	04-12-2003				
US 2007059737 A1	15-03-2007				
US 2007065845 A1	22-03-2007				
US 2007065846 A1	22-03-2007				
US 2007141587 A1	21-06-2007				
US 2007141588 A1	21-06-2007				
US 2007141589 A1	21-06-2007				
US 2008182255 A1	31-07-2008				
US 2010209920 A1	19-08-2010				
WO 03078662 A1	25-09-2003				
WO 2011062634 A2	26-05-2011			AU 2010322415 A1	07-06-2012
				CA 2781248 A1	26-05-2011
				EP 2501724 A2	26-09-2012
				WO 2011062634 A2	26-05-2011
WO 2008087102 A1	24-07-2008	AR 064862 A1	29-04-2009		
		AU 2008207025 A1	24-07-2008		
		BR P10806463 A2	06-09-2011		
		CA 2674552 A1	24-07-2008		
		CL 1042008 A1	18-07-2008		
		CO 6210757 A2	20-10-2010		
		CR 10971 A	09-09-2009		
		DO P2009000167 A	08-09-2009		
		EA 200900795 A1	26-02-2010		
		EP 2114993 A1	11-11-2009		
		JP 2010515444 A	13-05-2010		
		KR 20090101313 A	24-09-2009		
		MA 31093 B1	04-01-2010		
		NZ 578285 A	22-12-2011		
		PE 16862008 A1	25-12-2008		
		TW 200902048 A	16-01-2009		
		US 2008187535 A1	07-08-2008		
		WO 2008087102 A1	24-07-2008		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/066920

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 02081646	A2	17-10-2002	AU 2002254570 A1	21-10-2002
			CA 2442386 A1	17-10-2002
			CN 1512891 A	14-07-2004
			CN 101948841 A	19-01-2011
			EP 1383528 A2	28-01-2004
			EP 2394655 A2	14-12-2011
			EP 2465520 A2	20-06-2012
			JP 4874508 B2	15-02-2012
			JP 2005509404 A	14-04-2005
			JP 2009060910 A	26-03-2009
			JP 2010110330 A	20-05-2010
			MX PA03009042 A	15-10-2004
			US 2003220239 A1	27-11-2003
			US 2005142144 A1	30-06-2005
			US 2005221440 A1	06-10-2005
			WO 02081646 A2	17-10-2002
			WO 03008537 A2	30-01-2003
WO 2004112825	A2	29-12-2004	AT 546153 T	15-03-2012
			AU 2004249254 A1	29-12-2004
			AU 2010227059 A1	04-11-2010
			CA 2529056 A1	29-12-2004
			EP 1633387 A2	15-03-2006
			EP 2338506 A2	29-06-2011
			JP 2007524613 A	30-08-2007
			US 2005118186 A1	02-06-2005
			US 2009148478 A1	11-06-2009
			WO 2004112825 A2	29-12-2004
			WO 2004074518	A1
AU 2004213871 A1	02-09-2004			
CA 2516553 A1	02-09-2004			
DK 1597391 T3	12-01-2009			
EP 1597391 A1	23-11-2005			
ES 2314378 T3	16-03-2009			
JP 4568716 B2	27-10-2010			
JP 2006518602 A	17-08-2006			
JP 2007075127 A	29-03-2007			
PT 1597391 E	19-12-2008			
US 2004191817 A1	30-09-2004			
WO 2004074518 A1	02-09-2004			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	

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

(72) 発明者 ミンゲ, キャサリン

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティテュ 8 9, グラクソスミスク
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA04 CA09 CA20 EA02 HA08 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02
4C076 CC27 EE41 EE59 FF02
4C084 AA13 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA01 AA38 BB01 CC21 EE01 FF02 FF14 FF17 GG01

专利名称(译)	检测PRAME基因在癌症中的表达		
公开(公告)号	JP2014527411A	公开(公告)日	2014-10-16
申请号	JP2014527664	申请日	2012-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品兴业ANONYME		
[标]发明人	ミンゲキャサリン		
发明人	ミンゲ, キャサリン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 A61K39/00 A61K48/00 A61K47/48 A61K39/39 A61P35/00 A61P35/02		
CPC分类号	C12Q1/6886 C07K14/4748 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/53.M A61K39/00.H A61K48/00 A61K47/48 A61K39/39 A61P35/00 A61P35/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/EA02 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C085/AA01 4C085/AA38 4C085/BB01 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/FF02 4C085/FF14 4C085/FF17 4C085/GG01		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	2011014919 2011-08-30 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及PRAME特异性引物和探针，诊断试剂盒和方法。本发明还涉及治疗患有表达PRAME的肿瘤的癌症患者的特定群体。

TRAME 2 Taqman セット		配列識別名
フォワード	5'-GAG-GCC-GCC-TGC-ATC-AG-3'	配列番号: 5
リバース	5'-CGG-CAG-TTA-GTT-AIT-GAG-AGG-GTT-T-3'	配列番号: 6
プローブ配列。 FAM レポーターダイ、 ヌクレオチド配列、及び MGB プローブを示す	5'-FAM_TGC-TCA-GGC-ACG-TGA-T_MGB-3'	配列番号: 7
プローブヌクレオチド 配列のみ	TGC-TCA-GGC-ACG-TGA-T	配列番号: 7 (上記の 通り。ダイ及びプロ ーブを含まない)