

(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2017-534616

(P2017-534616A)

(43) 公表日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 31/711 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/711	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 31/713 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/713	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-521498 (P2017-521498)  
 (86) (22) 出願日 平成27年10月19日 (2015.10.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年6月20日 (2017.6.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/074136  
 (87) 国際公開番号 W02016/062659  
 (87) 国際公開日 平成28年4月28日 (2016.4.28)  
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2014/072419  
 (32) 優先日 平成26年10月20日 (2014.10.20)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 515145032  
 バイオエヌテック エールエヌアー ファ  
 ーマシューティカルズ ゲーエムペーハー  
 B I O N T E C H R N A P H A R M A  
 C E U T I C A L S G M B H  
 ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ  
 アン デア ゴルトグルーベ 1 2  
 A n d e r G o l d g r u b e 1 2  
 5 5 1 3 1 M a i n z G e r m a n  
 y

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の診断および処置のための方法および組成物

## (57) 【要約】

本発明は、腫瘍組織、特に中枢神経系 (CNS) の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫に特有であり、および被験体における腫瘍疾患の治療または診断のための標的である、核酸およびアミノ酸配列の同定に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腫瘍抗原の発現および/または活性の阻害剤を含有する医薬組成物であって、前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：1もしくは2に記載の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む、医薬組成物。

## 【請求項 2】

(i) 腫瘍抗原の発現の前記阻害剤が、配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸に選択的にハイブリダイズする阻害性核酸であり、前記阻害性核酸が、好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、iRNA、siRNAもしくはこれらをコードするDNAから成る群より選択される、または(iii) 腫瘍抗原の活性の前記阻害剤が、前記腫瘍抗原に特異的に結合する抗体である、請求項1に記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 3】

腫瘍抗原のリガンドまたは腫瘍抗原をコードする核酸のリガンドを含有する医薬組成物であって、

前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含み、および

腫瘍抗原の前記リガンドまたは腫瘍抗原をコードする核酸のリガンドが1つ以上の治療エフェクター部分に結合しており、前記治療エフェクター分子が、好ましくは放射性標識、細胞毒または細胞毒性酵素である、医薬組成物。

20

## 【請求項 4】

腫瘍抗原の前記リガンドが、前記腫瘍抗原に特異的に結合する抗体を含む、または腫瘍抗原をコードする核酸の前記リガンドが、前記核酸に選択的にハイブリダイズする核酸である、請求項3に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

(i) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド、または前記ペプチドの誘導体、

(ii) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをコードする核酸、または前記核酸の誘導体、

(iii) 腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをコードする宿主細胞、

30

(iv) 腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをコードするウイルス、

(v) 腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドまたは前記ペプチドの誘導体を提示する細胞、

(vi) 腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体またはT細胞受容体、

(vii) 腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識するようにインビトロで感作された免疫反応性細胞、および

(viii) 腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識するT細胞受容体をコードする核酸で形質導入されたエフェクター細胞または幹細胞

40

から成る群より選択される1つ以上の作用物質を含有する医薬組成物であって、

前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含み、および

前記腫瘍抗原ペプチドが、前記腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む、医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記ペプチドが、MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドであるか、またはMHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得る、

50

請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記宿主細胞が、前記コードされたペプチドまたはそのプロセッシング産物に結合する MHC 分子を発現する、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナル、キメラ、ヒトもしくはヒト化抗体であるか、または抗体のフラグメントまたは合成抗体である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

治療用または予防用腫瘍ワクチンの形態である、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 10】

腫瘍疾患を処置するまたは予防するのに使用するための、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

腫瘍疾患を有するまたは腫瘍疾患を発症するリスクがある患者を処置する方法であって、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記患者に投与することを含み、前記投与することが、好ましくは配列表の配列番号：1 もしくは 2 の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む腫瘍抗原をクラス I MHC と共に提示することを特徴とする腫瘍に対する CTL 活性を誘導するまたは促進する、方法。

20

【請求項 12】

腫瘍疾患の診断、検出または観測のための方法であって、

(i) 腫瘍抗原のアミノ酸配列を含むペプチドをコードする核酸、

(ii) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド、

(iii) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体、

(iv) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識する T 細胞、および/または

(v) 腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを提示する細胞

30

から成る群より選択される 1 つ以上のパラメータを、患者から単離した生物学的試料中で検出するおよび/またはその量を測定することを含み、

前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：1 もしくは 2 の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含み、および

前記腫瘍抗原ペプチドが、前記腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 13】

前記生物学的試料が組織または器官に由来しており、前記組織または器官が腫瘍を含まない場合、その細胞は、前記腫瘍抗原および/または前記腫瘍抗原をコードする核酸を実質的に発現しない、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記検出および/または前記量の測定が、

(i) 前記生物学的試料を、検出されるべきおよび/またはその量を測定されるべき前記核酸、前記ペプチド、前記抗体、前記 T 細胞または前記細胞に特異的に結合する作用物質と接触させること、ならびに

(ii) 前記作用物質と、検出されるべきまたはその量を測定されるべき前記核酸、前記ペプチド、前記抗体、前記 T 細胞または前記細胞との複合体の形成を検出することおよび/または前記複合体の量を測定すること

を含む、請求項 12 または 13 に記載の方法。

50

## 【請求項 15】

(i) 前記核酸に特異的に結合する前記作用物質が、前記核酸に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む、

(ii) 前記ペプチドに特異的に結合する前記作用物質が、前記ペプチドに特異的に結合する抗体を含む、

(iii) 前記抗体に特異的に結合する前記作用物質が、前記抗体に特異的に結合するペプチドを含む、または

(iv) 前記 T 細胞に特異的に結合する前記作用物質が、MHC 分子と前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドとの複合体を提示する細胞を含む、請求項 14 に記載の方法。

10

## 【請求項 16】

前記作用物質が検出可能な標識をさらに含む、請求項 14 または 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

(i) 腫瘍抗原のアミノ酸配列を含むペプチドをコードする核酸、

(ii) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド、

(iii) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体、

(iv) 腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識する T 細胞、および/または

20

(v) 腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを提示する細胞

に特異的に結合する作用物質を含む診断試験キットであって、前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：1 もしくは 2 の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含み、および

前記腫瘍抗原ペプチドが、前記腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含み、

前記作用物質が、好ましくは検出可能な標識をさらに含む、診断試験キット。

## 【請求項 18】

腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドに結合する作用物質であって、

30

前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：1 もしくは 2 の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含み、および

前記腫瘍抗原ペプチドが、前記腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含み、

前記作用物質が、好ましくは抗体、より好ましくはモノクローナル、キメラ、ヒトもしくはヒト化抗体、抗体のフラグメントまたは合成抗体である、作用物質。

## 【請求項 19】

請求項 18 に記載の作用物質と治療エフェクター部分または検出可能標識とのコンジュゲート。

40

## 【請求項 20】

前記腫瘍抗原が、配列表の配列番号：3 もしくは 4 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む、

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物、請求項 11 から 16 のいずれか一項に記載の方法、請求項 17 に記載の診断試験キット、請求項 18 に記載の作用物質、または請求項 19 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 21】

前記腫瘍疾患が中枢神経系の腫瘍疾患である、

請求項 10 もしくは 20 に記載の医薬組成物、または請求項 11 から 16 および 20 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 2 2】

前記腫瘍疾患が神経膠腫、特に神経膠芽腫である、

請求項 1 0、2 0 もしくは 2 1 に記載の医薬組成物、または請求項 1 1 から 1 6、2 0 および 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、癌疾患、特に神経膠腫などの中枢神経系の癌疾患の処置および診断に関する。より特定すると、本発明は、癌処置のための新規標的、特に免疫療法のための腫瘍抗原としてそれらの使用に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

多形性神経膠芽腫 ( G B M ) は、中枢神経系 ( C N S ) の最も一般的で致死的な原発性悪性疾患であり、新規症例の年間発生率は約 1 9 0 , 0 0 0 例にのぼる。

## 【0 0 0 3】

G B M は、星状細胞腫瘍の群に起因し、世界保健機関 ( W H O ) によってグレード I V 神経膠腫と分類されている、神経上皮組織の腫瘍である。W H O グレード I V の指定は、細胞学的に悪性で、有糸分裂的に活性であり、典型的には急速な術前および術後の疾患増悪ならびに致死転帰に結びつく壊死傾向を示す新生物に割り当てられる。

20

## 【0 0 0 4】

G B M を有する患者に対する現在の標準的なケアには、外科的切除術、それに続く切除腔への放射線療法 ( R T ) とテモゾロミド ( T M Z ) での化学療法の併用および T M Z の数回の補助サイクルによる継続的な処置が含まれる。

## 【0 0 0 5】

外科的切除術単独では約 6 か月の平均生存期間をもたらす。外科的切除術と R T の併用は、平均生存期間を 1 2 . 1 か月に延長させる。T M Z の追加は平均生存期間を 1 4 . 6 か月までさらに延長させる。

## 【0 0 0 6】

外科的切除術および化学療法と放射線療法による積極的処置の実証されている効果に比べると、予後は非常に不良のままである。選択的な処置様式として、標的療法、免疫療法および遺伝子療法を含む新規の治療アプローチが開発された。

30

## 【0 0 0 7】

免疫療法は、癌療法における最も洗練された概念の 1 つである。中心となる発想は、癌に対抗するために宿主の免疫系の反応性を動員し、回復させることに基づく。いくつかの免疫治療アプローチが臨床の場に導入されて成功をおさめ、腫瘍学における最も有望な治療法として浮上してきた。治療用ワクチンの開発に関する制限因子は、腫瘍関連抗原の同定である。

## 【0 0 0 8】

腫瘍細胞は、生物学的に、それらの起源の非悪性細胞とは実質的に異なる。これらの相違は、腫瘍発生の際に獲得された遺伝子改変によるものであり、中でも特に、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体の形成をもたらす。さらに腫瘍細胞はまた、局所サイトカインレベルを調節することによって周囲の間質細胞が癌進行を伝播するように誘導することもでき、これは、これらの遺伝的に未変化の間質細胞中に非癌性組織とは異なる変化した分子構造体を生じさせる。腫瘍を保持する宿主の特異的免疫系によって認識される、この種の腫瘍関連構造体は、腫瘍関連抗原と称される。腫瘍関連抗原の特異的認識は、2 つの機能的に相互に連携するユニットである細胞性機構と体液性機構を含む：C D 4 + および C D 8 + T リンパ球は、それぞれ M H C ( 主要組織適合遺伝子複合体 ) クラス I I および I の分子上に提示されるプロセッシングされた抗原を認識し、一方 B リンパ球は、プロセッ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 - 治療的重要性は、免疫系による新生細胞上の抗原の認識が細胞傷

40

50

害性エフェクター機構の開始をもたらし、Tヘルパー細胞の存在下で、癌細胞の除去を引き起こすことができるという事実から生じる (Pardoll, Nat. Med. 4: 525-31, of the 1998)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

中枢神経系 (CNS) の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の、特異的で信頼できる、感受性の高い診断および治療アプローチのデザインを可能にする、これらの疾患の遺伝子マーカーおよび標的が当分野で必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の治療および診断に関する。特に、本発明は、中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫に関連し、これらの疾患の診断および治療アプローチの標的としての役割を果たすことができる分子構造体の同定に関する。

【0011】

本発明は、中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の腫瘍組織に特徴的であり、被験体における中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の治療または診断の標的である核酸およびアミノ酸配列の同定に関する。

【0012】

腫瘍細胞に関連して発現される、本発明に従って同定される核酸は、配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む。好ましくは、腫瘍細胞に関連して発現される、本発明に従って同定される核酸は、配列表の配列番号：3もしくは4のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含むペプチドをコードする。これらの核酸は、本明細書では「腫瘍関連核酸」または単に「腫瘍核酸」とも称される。

【0013】

別の態様では、本発明は、本明細書では「腫瘍関連抗原」または単に「腫瘍抗原」とも称される、本発明に従って同定される腫瘍核酸によってコードされるペプチドに関する。したがって、本発明に従って同定される腫瘍抗原は、配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む。好ましくは、本発明に従って同定される腫瘍抗原は、配列表の配列番号：3もしくは4のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。

【0014】

1つの態様では、本発明は、本明細書で「腫瘍抗原ペプチド」とも称される、本発明に従って同定される腫瘍抗原の配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。好ましくは、本発明の腫瘍抗原ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする細胞に対する細胞応答を刺激することができ、および/またはそれ自体でもしくは免疫原性担体に結合して使用される場合、本発明に従って同定される腫瘍抗原に特異的に結合する抗体を惹起することができる。好ましい腫瘍抗原ペプチドは、直接またはプロセッシング後に、クラスI MHC分子と共に提示され得る。好ましくは、本発明による腫瘍抗原ペプチドは、MHCクラスIおよび/もしくはクラスII提示ペプチドであるか、またはMHCクラスIおよび/もしくはクラスII提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得る。好ましくは、本発明による腫瘍抗原ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む。好ましくは、本発明に従って同定される腫瘍抗原の前記フラグメントは、MHCクラスIおよび/もしくはクラスII提示ペプチドであるか、または前記フラグメントに結合する抗体を惹起することができる免疫原である。好ましくは、本発明による腫瘍抗原ペプチドは、そのようなフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含み、そのようなフラグメント、すなわち本発明に従って同定される腫瘍抗原由来のMHCクラスIおよび/もしくはクラスII提示ペプチドまたは前記フ

10

20

30

40

50

ラグメントに結合する抗体を惹起することができる、本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する免疫原を生成するようにプロセッシングされる。したがって、本発明による腫瘍抗原ペプチドは、配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む核酸によってコードされるアミノ酸配列を含有する腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含み、および好ましくは、配列表の配列番号：3もしくは4のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む腫瘍抗原のフラグメントのアミノ酸配列に実質的に対応するアミノ酸配列を含む。1つの実施形態では、本発明による腫瘍抗原ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。

**【0015】**

本発明は一般に、腫瘍核酸または腫瘍抗原を標的とすることによる、中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の処置および/または診断を包含する。これらの方法は、そのような腫瘍核酸および/または腫瘍抗原に関連する細胞の選択的検出および/または根絶を提供し、それによりそのような腫瘍核酸および/または腫瘍抗原に関連しない正常細胞への有害作用を最小限に抑える。したがって、治療または診断のための好ましい疾患は、本発明に従って同定される腫瘍核酸および/または腫瘍抗原の1つ以上が中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫に関連するものである。

**【0016】**

本発明の1つの態様は、腫瘍疾患、特に中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の処置のための治療法であって、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現および/または活性の阻害剤の投与を含む治療法に関する。

**【0017】**

この態様では、本発明は、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現および/または活性の阻害剤を含有する医薬組成物に関する。1つの実施形態では、前記阻害剤は、本発明に従って同定される腫瘍核酸に特異的である。別の実施形態では、前記阻害剤は、本発明に従って同定される腫瘍抗原に特異的である。本発明によれば、「発現および/または活性を阻害する」という語句は、発現および/または活性の完全なまたは基本的に完全な阻害ならびに発現および/または活性の低下を包含する。好ましくは、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現の前記阻害は、本発明に従って同定される腫瘍抗原をコードする転写産物、すなわちmRNAの産生を阻害することもしくは転写産物のレベルを低下させることによって、例えば転写を阻害するもしくは転写産物の分解を誘導することによって、および/または本発明に従って同定される腫瘍抗原の産生を阻害することによって、例えば本発明に従って同定される腫瘍抗原をコードする転写産物の翻訳を阻害することによって起こり得る。

**【0018】**

好ましくは、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現および/または活性の前記阻害は、腫瘍細胞増殖を低減し、および/または腫瘍細胞死を誘導し、したがって腫瘍阻害作用または腫瘍破壊作用を及ぼす。

**【0019】**

特定の実施形態では、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現の阻害剤は、本発明に従って同定される腫瘍核酸に選択的にハイブリダイズし、前記腫瘍核酸に特異的であって、それによりその転写および/または翻訳を阻害する(例えば低減する)阻害性核酸(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、iRNA、siRNAまたはこれらをコードするDNA)である。

**【0020】**

本発明の阻害性核酸は、標的核酸に対してアンチセンス方向の配列を有するオリゴヌクレオチドを包含する。適切な阻害性オリゴヌクレオチドは、長さが、典型的には5から数百ヌクレオチド長、より典型的には約20～70ヌクレオチド長またはそれ未満、さらにより典型的には約10～30ヌクレオチド長にわたる。これらの阻害性オリゴヌクレオチドは、遊離(裸の)核酸としてまたは保護形態で、例えばリボソームに封入して投与し得

10

20

30

40

50

る。リボソームまたは他の保護形態の使用は、インビボ安定性を高め、したがって標的部位への送達を容易にし得るので、好都合であり得る。

【0021】

また、標的腫瘍核酸は、対応する mRNA の切断を標的とするリボザイムを設計するのに使用し得る。同様に、これらのリボザイムは、遊離（裸の）形態でまたは安定性および/もしくは標的化を増強する送達システム、例えばリボソームの使用によって投与し得る。

【0022】

また、標的腫瘍核酸は、腫瘍核酸の発現を阻害する（例えば低減する）ことができる siRNA を設計するのに使用し得る。siRNA は、遊離（裸の）形態でまたは安定性および/もしくは標的化を増強する送達システム、例えばリボソームの使用によって投与し得る。これらはまた、これらの前駆体またはこれらをコードする DNA の形態でも投与し得る。

10

【0023】

siRNA は、好ましくはセンス RNA 鎖およびアンチセンス RNA 鎖を含み、ここでセンス RNA 鎖とアンチセンス RNA 鎖は RNA 二本鎖を形成し、センス RNA 鎖は、本発明に従って同定される腫瘍核酸、好ましくは標的腫瘍抗原をコードする mRNA 中の約 19 ~ 約 25 個の連続するヌクレオチドの標的配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を含む。

【0024】

さらなる実施形態では、本発明に従って同定される腫瘍抗原の活性の阻害剤は、前記腫瘍抗原に特異的に結合する抗体である。腫瘍抗原への抗体の結合は、例えば結合活性または触媒活性を阻害することによって、腫瘍抗原の機能を妨げることができる。

20

【0025】

また、別の態様での本発明は、腫瘍疾患、特に中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の処置のための治療法であって、標的分子、すなわち本発明に従って同定される腫瘍核酸または腫瘍抗原のリガンドの投与を含む治療法に関する。これに関して、これらの標的を発現する細胞、例えば腫瘍細胞を選択的に標的とし、死滅させるために、治療エフェクター部分、例えば放射性標識、細胞毒、細胞毒性酵素等に結合した、標的核酸に選択的にハイブリダイズする核酸を投与し得るか、または標的抗原に特異的に結合する抗体を投与し得る。

30

【0026】

この態様では、本発明は、本発明に従って同定される腫瘍核酸または腫瘍抗原のリガンドを含有する医薬組成物であって、前記リガンドが 1 つ以上の治療エフェクター部分に結合している医薬組成物に関する。好ましくは、前記リガンドは、前記腫瘍核酸または腫瘍抗原に特異的である。1 つの実施形態では、腫瘍核酸または腫瘍抗原の前記リガンドは、腫瘍細胞増殖を低減し、および/または腫瘍細胞死を誘導し、したがって腫瘍阻害作用または腫瘍破壊作用を及ぼす。

【0027】

本発明のさらなる態様によれば、腫瘍核酸および腫瘍抗原の同定は、同定された抗原に関連する腫瘍細胞を攻撃し、それにより腫瘍疾患の発症を遅延させるもしくは予防するまたは腫瘍細胞を根絶することに基づく、特異的免疫療法を開発することを可能にする。免疫療法は、腫瘍細胞破壊的免疫応答を惹起するという共通の目標を有する様々な介入処置および技術を包含する。以下で要約するようにこれらの核酸および抗原を利用した様々な臨床アプローチが可能である。癌免疫療法へのアプローチは能動と受動のカテゴリーに分けることができる。能動免疫療法は、腫瘍に対する免疫応答を強化するために抗原またはそのような抗原をコードする核酸での患者の直接免疫を含み得る。受動免疫療法は、抗腫瘍応答を直接媒介することを目的とした免疫試薬の投与を指す。本発明は両方のアプローチを企図する。

40

【0028】

50

この態様では、本発明は、(i)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド、または前記ペプチドの誘導体、(ii)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをコードする核酸、または前記核酸の誘導体、(iii)本発明に従って同定される腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをコードする宿主細胞、(iv)本発明に従って同定される腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをコードするウイルス、(v)本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドまたは前記ペプチドの誘導体を提示する細胞、(vi)本発明に従って同定される腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体またはT細胞受容体、(vii)本発明に従って同定される腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識するようにインビトロで感作された免疫反応性細胞、および(viii)本発明に従って同定される腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識するT細胞受容体をコードする核酸で形質導入されたエフェクター細胞(または幹細胞)から成る群より選択される1つ以上の作用物質を含有する医薬組成物に関する。

10

**【0029】**

1つの実施形態では、(i)に従うペプチドは、腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドであるか、または腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチド、好ましくは腫瘍抗原特異的MHCクラスI提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得る。好ましくは、前記ペプチドは、MHCクラスIもしくはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応する配列を有するか、またはそのような配列を有するペプチドフラグメントを生成するようにプロセッシングされ得る。好ましくは、前記ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対する細胞応答を刺激することができ、および/または本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現を特徴とする腫瘍に対する体液性免疫応答を刺激することができる。1つの実施形態では、前記ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。

20

30

**【0030】**

1つの実施形態では、(ii)に従う核酸は、腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドをコードするか、または腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチド、好ましくは腫瘍抗原特異的MHCクラスI提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得るペプチドをコードする。好ましくは、前記ペプチドは、MHCクラスIもしくはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応する配列を有するか、またはそのような配列を有するペプチドフラグメントを生成するようにプロセッシングされ得る。好ましくは、前記ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対する細胞応答を刺激することができ、および/または本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現を特徴とする腫瘍に対する体液性免疫応答を刺激することができる。1つの実施形態では、前記ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。そのような核酸は、プラスミドまたは発現ベクター中に存在してよく、プロモーターに機能的に連結され得る。

40

**【0031】**

1つの実施形態では、(iii)に従う宿主細胞は、腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドをコードするか、または腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチド、好ましくは腫瘍抗原特異的MHCクラスI提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得るペプチドをコードする。好ましくは、前記ペプチ

50

ドは、MHCクラスIもしくはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応する配列を有するか、またはそのような配列を有するペプチドフラグメントを生成するようにプロセッシングされ得る。好ましくは、前記ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対する細胞応答を刺激することができ、および/または本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現を特徴とする腫瘍に対する体液性免疫応答を刺激することができる。1つの実施形態では、前記ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。宿主細胞は組換え細胞であり得、コードされるペプチドまたはそのプロセッシング産物を分泌することができ、それを表面上に発現することができ、および好ましくは前記ペプチドまたはそのプロセッシング産物に結合して、好ましくは前記ペプチドまたはそのプロセッシング産物を細胞表面上に提示するMHC分子を付加的に発現し得る。1つの実施形態では、宿主細胞はMHC分子を内因性に発現する。さらなる実施形態では、宿主細胞は、MHC分子および/またはペプチドもしくはそのプロセッシング産物を組換えによって発現する。宿主細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい実施形態では、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

20

30

40

50

**【0032】**

1つの実施形態では、(iv)に従うウイルスは、腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドをコードするか、または腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチド、好ましくは腫瘍抗原特異的MHCクラスI提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得るペプチドをコードする。好ましくは、前記ペプチドは、MHCクラスIもしくはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応する配列を有するか、またはそのような配列を有するペプチドフラグメントを生成するようにプロセッシングされ得る。好ましくは、前記ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対する細胞応答を刺激することができ、および/または本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現を特徴とする腫瘍に対する体液性免疫応答を刺激することができる。1つの実施形態では、前記ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。

**【0033】**

1つの実施形態では、(v)に従う細胞は、MHC分子を内因性に発現する。さらなる実施形態では、細胞は、MHC分子および/または本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを組換えによって発現する。好ましくは、細胞は、本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドまたは前記ペプチドの誘導体をMHC分子によってその表面上に提示する。好ましくは、提示されるペプチドは、MHCクラスIまたはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応する配列を有するペプチドである。細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい実施形態では、細胞は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞、単球またはマクロファージである。したがって、好ましい実施形態では、(v)に従う細胞は、クラスI MHCと共に提示される、本明細書で述べる腫瘍抗原ペプチドを含む抗原提示細胞である。

**【0034】**

1つの実施形態では、(vi)に従う抗体はモノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、抗体は、キメラ、ヒトもしくはヒト化抗体であるか、または抗体のフラグメントまたは合成抗体である。抗体は、治療エフェクター部分または検出可能な標識に連結され得る。好ましくは、(vi)に従う抗体またはT細胞受容体は、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応するペプチド中の配列に結合する。1つの実施形態では、前記抗体またはT細胞受容体は、配列表の配列番号：5～62から成る群よ

り選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含むペプチドに結合する。

【0035】

好ましくは、(vii)に従う細胞は、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応するペプチド中の配列に結合し、前記フラグメントは、好ましくはMHCクラスIまたはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される。1つの実施形態では、(vii)に従う細胞は、(a)患者からまたは同じ種の別の個体、特に健常個体、または異なる種の個体のいずれかから得た、免疫反応性細胞を含有する試料を提供する工程、(b)前記試料を、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応するアミノ酸配列を含むペプチドまたは前記ペプチドの誘導体を提示する細胞と、前記ペプチドに対するCTLの産生を促進する条件下で接触させる工程、および(c)CTLを、腫瘍抗原を発現し、好ましくはそれをクラスI MHCと共に提示する細胞、例えば腫瘍細胞を溶解するのに適した量で患者に導入する工程を含む方法によって入手し得る。

10

【0036】

1つの実施形態では、前記方法は、得られたCTLのT細胞受容体をクローニングし、T細胞受容体をコードする核酸を、前記患者からまたは同じ種の別の個体、特に健常個体、または異なる種の個体のいずれかから得た、CTLまたは未熟CTLなどのエフェクター細胞に移入することを含み、前記エフェクター細胞は、したがって所望の特異性を受け取り、患者に導入され得る。(viii)に従うエフェクター細胞はこのようにして作製することができる。

20

【0037】

上述した作用物質を使用したワクチン接種は、特に腫瘍細胞などの細胞中で発現された場合、本発明に従って同定される腫瘍抗原に対するCD4+ヘルパーT細胞応答および/またはCD8+T細胞応答を惹起することができるMHCクラスII提示エピトープを提供し得る。あるいはまたは加えて、上述した作用物質を使用したワクチン接種は、特に腫瘍細胞などの細胞中で発現された場合、本発明に従って同定される腫瘍抗原に対するCD8+T細胞応答を惹起することができるMHCクラスI提示エピトープを提供し得る。さらに、上述した作用物質を使用したワクチン接種は、本発明に従って同定される腫瘍抗原に特異的な抗体を惹起し得る。

【0038】

1つの実施形態では、本発明の医薬組成物は、好ましくは免疫調節剤またはこれをコードする核酸をさらに含有する治療用または予防用抗腫瘍ワクチンである。1つの実施形態では、免疫調節剤は、正の共刺激分子のアゴニスト、例えばCTLの共刺激をもたらすことができるIg融合タンパク質である。別の実施形態では、共刺激剤は、負の共刺激分子のアンタゴニスト、例えばCTL共刺激の阻害を低減することができる抗体である。好ましい実施形態では、免疫調節剤は抗CTLA4抗体である。

30

【0039】

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容される担体を含んでよく、および場合により1つ以上のアジュバント、安定剤等を含んでもよい。

【0040】

本発明の別の態様は、腫瘍疾患、特に中枢神経系の腫瘍、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の予防的および/または治療的処置のための、本明細書で述べる作用物質および組成物の使用を含む。

40

【0041】

1つの態様では、本発明は、腫瘍疾患を有するまたは腫瘍疾患を発症する危険性が高い患者を処置する治療的および予防的方法を提供する。1つの態様では、本発明は腫瘍増殖を阻害するための方法を提供する。1つの態様では、本発明は腫瘍細胞死を誘導するための方法を提供する。

【0042】

好ましくは、腫瘍疾患は、中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫で

50

ある。好ましくは、腫瘍疾患は、好ましくは中枢神経系の癌から成る群より選択される癌疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫である。

【0043】

様々な実施形態によれば、本発明の方法は、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現および/もしくは活性の阻害剤、本発明に従って同定される腫瘍核酸もしくは腫瘍抗原のリガンドならびに/または1つ以上の本明細書で述べる免疫治療薬の投与を含む。1つの実施形態では、前記方法は、本明細書で述べる医薬組成物を患者に投与することおよび好ましくは本明細書で述べる抗腫瘍ワクチンで患者をワクチン接種することを含む。当分野で公知の多種多様なワクチン接種方法のいずれかを本発明に従って使用し得る。本発明の抗腫瘍ワクチンは、好ましくは本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対するCTL活性を誘導するまたは促進することができる。これらはアジュバントと組み合わせて使用してもよく、アジュバントは、直接またはAPCを介してT細胞に作用することによって免疫系の刺激を容易にする。アジュバントには、本明細書で述べる正の免疫調節作用を有する免疫調節物質が含まれる。

10

【0044】

様々な実施形態において、本発明の方法は、本発明に従って同定される腫瘍抗原に関連し、および好ましくは本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示する腫瘍、特に腫瘍細胞に対する抗腫瘍CTL応答の刺激、本発明に従って同定される腫瘍抗原に関連し、および好ましくは本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示する腫瘍、特に腫瘍細胞の増殖の阻害、ならびに/または本発明に従って同定される腫瘍抗原に関連し、および好ましくは本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示する腫瘍、特に腫瘍細胞の死滅の誘導を含む。

20

【0045】

1つの態様では、本発明は、本明細書で述べる処置の方法における使用のための、本発明に従って同定される腫瘍抗原の発現および/もしくは活性の阻害剤、本発明に従って同定される腫瘍核酸もしくは腫瘍抗原のリガンドならびに/または1つ以上の本明細書で述べる免疫治療薬を提供する。1つの実施形態では、本発明は、本明細書で述べる処置の方法における使用のための、本明細書で述べる医薬組成物を提供する。

【0046】

腫瘍核酸または腫瘍抗原を標的とすることに基づく処置、例えば本明細書で述べる免疫療法は、外科的切除術および/または放射線および/または伝統的化学療法と併用することができる。

30

【0047】

本発明の別の目的は、腫瘍疾患、特に中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の診断、検出または観測、すなわち退縮、進行、経過および/または発症を判定するための方法を提供することである。好ましくは、前記方法は、標的分子に特異的に結合するモノクローナル抗体および核酸プローブなどのリガンドの使用を含む。適切な標的分子は、(i)本発明に従って同定される腫瘍核酸、(ii)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくはそれに由来する腫瘍抗原ペプチド、(iii)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくはそれに由来する腫瘍抗原ペプチドに対する抗体、(iv)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくはそれに由来する腫瘍抗原ペプチドを認識するT細胞および/または(v)本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドをクラスIもしくはクラスII MHC、好ましくはクラスI MHCと共に提示する細胞である。そのような方法は、被験体が腫瘍疾患、特に中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫を有するもしくは腫瘍疾患を発症する危険性がある(危険性が高い)かどうか、または、例えば処置レジメンが有効であるかどうかを検出するために使用し得る。

40

【0048】

したがって、本発明は、腫瘍疾患、特に中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の診断、検出または観測のための方法であって、患者から、好ましくは腫瘍疾

50

患を有している、腫瘍疾患を有しているもしくは腫瘍疾患に罹患している疑いがあるまたは腫瘍疾患の潜在的可能性を有する患者から単離した生物学的試料において、(i)本発明に従って同定される腫瘍核酸の核酸配列を含む核酸/本発明に従って同定される腫瘍抗原のアミノ酸配列を含むペプチドをコードする核酸、(ii)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド、(iii)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドに結合する抗体、(iv)本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識するT細胞および/または(v)本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドをクラスIもしくはクラスII MHC、好ましくはクラスI MHCと共に提示する細胞から成る群より選択される1つ以上のパラメータを検出するおよび/またはその量を測定することを含み、前記腫瘍疾患が、好ましくは中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫である方法に関する。

【0049】

1つの実施形態では、(i)に従う核酸は、腫瘍抗原特異的MHCクラスIまたはクラスII提示ペプチド、好ましくは腫瘍抗原特異的MHCクラスI提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされるペプチドをコードする。

【0050】

1つの実施形態では(ii)に従うペプチドは、腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチドであるか、または腫瘍抗原特異的MHCクラスIもしくはクラスII提示ペプチド、好ましくは腫瘍抗原特異的MHCクラスI提示ペプチドを生成するようにプロセッシングされ得る。

【0051】

好ましくは、(iv)に従うT細胞は、MHCクラスIまたはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応するペプチド中の配列を認識する。

【0052】

1つの実施形態では、(v)に従う細胞は、MHCクラスIまたはクラスII、好ましくはMHCクラスIによってペプチドをその表面に提示する。細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい実施形態では、細胞は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞、単球またはマクロファージである。したがって、好ましい実施形態では、(v)に従う細胞は、クラスI MHCと共に提示される、本明細書で述べる腫瘍抗原ペプチドを含む抗原提示細胞である。別の実施形態では、細胞は腫瘍細胞である。

【0053】

1つの実施形態では、(i)に従う核酸または(ii)に従うペプチドは、細胞、好ましくは腫瘍細胞中でインサイチュにて検出されるまたはその量を測定される。1つの実施形態では、(ii)に従うペプチドは、細胞の表面で、MHCクラスIまたはクラスII、好ましくはMHCクラスIとの複合体中でインサイチュにて検出されるまたはその量を測定される。

【0054】

好ましくは、本発明の方法を用いて診断、検出または観測される腫瘍疾患は、中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫である。好ましくは、腫瘍疾患は、好ましくは中枢神経系の癌から成る群より選択される癌疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫である。

【0055】

本発明による腫瘍疾患の診断、検出または観測のための方法の1つの実施形態では、生物学的試料および/または対照/参照試料は、腫瘍疾患による罹患に関して診断、検出または観測されるべき組織または器官に対応する組織または器官に由来する；例えば診断、検出または観測されるべき腫瘍疾患は脳の癌であり、生物学的試料および/または対照/

10

20

30

40

50

参照試料は脳組織である。

【0056】

診断、検出または観測のための前記方法は、量的および/または定性的評価、例えば標的分子の絶対的および/または相対的測定、例えば腫瘍核酸または腫瘍抗原の発現レベルの測定を可能にする。

【0057】

前記検出および/または量の測定を達成するための手段は、本明細書で説明され、当業者に明らかになる。

【0058】

好ましくは、本発明の方法における検出および/または量の測定は、(i)生物学的試料を、検出されるべきおよび/またはその量を測定されるべき核酸、ペプチド、抗体、T細胞または細胞に特異的に結合する作用物質と接触させること、ならびに(ii)作用物質と、検出されるべきまたはその量を測定されるべき核酸、ペプチド、抗体、T細胞または細胞との複合体の形成を検出することおよび/または複合体の量を測定することを含む。

10

【0059】

典型的には、生物学的試料中の標的分子のレベルを参照レベルと比較し、前記参照レベルからの逸脱は被験体における腫瘍疾患の存在および/または病期を示す。参照レベルは、対照試料(例えば健常組織または健常被験体からの)中で測定されるレベルまたは健常被験体からの平均レベルであり得る。前記参照レベルからの「逸脱」は、何らかの有意の変化、例えば少なくとも10%、20%または30%、好ましくは少なくとも40%または50%、さらにはそれ以上の増大または減少を表す。好ましくは、前記生物学的試料中の核酸、ペプチド、抗体、T細胞および/もしくは細胞の存在または参照試料と比較して増大している生物学的試料中の核酸、ペプチド、抗体、T細胞および/もしくは細胞の量は、腫瘍疾患の存在を示す。

20

【0060】

典型的には、本発明の方法における検出および/または量の測定は、標的分子に特異的に結合する標識リガンド、例えば標的核酸にハイブリダイズする標識核酸プローブおよび/または標的ペプチドに特異的に結合する標識抗体もしくはそのフラグメント/誘導体の使用を含む。

30

【0061】

本発明によれば、核酸の検出または核酸の量の測定は、公知の核酸検出方法、例えばハイブリダイゼーションまたは核酸増幅技術を含む方法を用いて実施し得る。1つの実施形態では、RT-PCRまたはノーザンブロット分析を用いてmRNA転写産物を検出するまたはその量を測定する。

【0062】

そのような核酸検出方法は、標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの使用を含み得る。適切なオリゴヌクレオチドは、典型的には5から数百ヌクレオチド長、より典型的には約20~70ヌクレオチド長またはそれ未満、さらにより典型的には約10~30ヌクレオチド長にわたる。

40

【0063】

本発明によれば、ペプチドの検出またはペプチドの量の測定は、前記ペプチドに特異的に結合する抗体を使用した免疫検出を含むがこれに限定されない、多くの方法で実施し得る。好ましくは、抗体は、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応する配列に結合する。

【0064】

ペプチドを検出するために抗体を使用する方法は周知であり、ELISA、競合結合アッセイ等を含む。一般に、そのようなアッセイは、標的ペプチドに特異的に結合する抗体または抗体フラグメントを直接使用するか、または間接的に、検出を提供する標識、例えば指示酵素、放射性標識、発蛍光団または常磁性粒子に結合した標的ペプチドに特異的に

50

結合する抗体または抗体フラグメントを使用する。

【0065】

本発明によれば、抗体の検出または抗体の量の測定は、前記抗体に特異的に結合するペプチドを使用して実施し得る。

【0066】

T細胞は、患者の末梢血、リンパ節、組織試料、例えば生検および切除術に由来する組織試料、または他の供給源から単離し得る。反応性アッセイは、一次T細胞または他の適切な誘導体に関して実施し得る。例えば、T細胞を融合してハイブリドーマを作製し得る。T細胞応答性を測定するためのアッセイは当分野で公知であり、増殖アッセイおよびサイトカイン放出アッセイを含む。

10

【0067】

1つの実施形態では、本発明に従って同定される腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドを認識するT細胞は、腫瘍抗原応答性CTLである。

【0068】

CTLは、以下の好ましい実施形態を含むがこれらに限定されない、多くの方法で検出し、その量を測定し得る。1つの実施形態では、適切な蛍光腫瘍抗原ペプチド/MHC四量体を使用してCTLを直接染色する。別の実施形態では、「TRAP」アッセイ（「タンパク質転移によるAPCのT細胞認識」を使用する（例えばBeadling et al. Nature Medicine 12:1208(2006)参照）。別の実施形態では、Yuan et al. (Cytotherapy 8:498, 2006)によって概説された方法を用いて血液試料中のT細胞の検出を実施する。反応性T細胞を検出するためのアッセイおよび指標は公知であり、IFN-ELISPOTおよびIFN-細胞内サイトカイン染色の使用を含むが、これらに限定されない。

20

【0069】

T細胞クローンが特定の抗原性ペプチドに応答するかどうかを測定するための他の様々な方法が当分野において公知である。典型的には、ペプチドをT細胞の懸濁液に1~3日間添加する。T細胞の応答は、増殖、例えば標識チミジンの取込みによって、またはサイトカイン、例えばIL-2の放出によって測定し得る。放出されたサイトカインの存在を検出するために様々なアッセイが利用可能である。

30

【0070】

T細胞の細胞傷害性アッセイは、腫瘍抗原に特異性を有する細胞傷害性T細胞を検出するために使用できる。1つの実施形態では、細胞傷害性T細胞を、腫瘍抗原ペプチドをMHCクラスI分子と共に提示する標的細胞を死滅させるそれらの能力に関して試験する。腫瘍抗原ペプチドを提示する標的細胞を標識し、患者試料からのT細胞の懸濁液に添加し得る。溶解細胞からの標識の放出を定量することによって細胞毒性を測定し得る。自発的放出および総放出についての対照をアッセイに含めてもよい。

【0071】

ペプチドを提示する細胞は、細胞応答を誘導する、例えばT細胞を活性化するその能力を試験することによって、またはそのような細胞に特異性を有するCTLによる細胞の溶解を測定することによって検出し、その量を測定し得る。

40

【0072】

検出されるべきおよび/もしくはその量を測定されるべき前記核酸、前記ペプチド、前記抗体、前記T細胞および/もしくは前記細胞の存在、ならびに/または参照レベルと比較して、例えば腫瘍疾患を有さない患者と比較して増大している前記核酸、前記ペプチド、前記抗体、前記T細胞および/もしくは前記細胞の量は、前記患者における腫瘍疾患の存在または腫瘍疾患の危険性（すなわち腫瘍疾患を発症する潜在的可能性）を示し得る。

【0073】

1つの実施形態では、生物学的試料は組織または器官に由来し、前記組織または器官が腫瘍を含まない場合、その細胞は、本発明に従って同定される腫瘍抗原および/または本

50

発明に従って同定される腫瘍核酸を実質的に発現しない。本発明の方法による、患者における腫瘍疾患の存在または腫瘍疾患の危険性の指示は、腫瘍疾患が前記組織もしくは器官中に存在することまたは前記組織もしくは器官に前記腫瘍疾患の危険性があることを示し得る。

【0074】

本発明による観測の方法は、好ましくは最初の時点での第一試料中および2番目の時点でのさらなる試料中で上記に挙げたパラメータの1つ以上を検出するおよび/またはその量を測定することを含み、2つの試料を比較することによって腫瘍疾患の退縮、進行、経過および/または発症を測定し得る。

【0075】

患者から以前に採取した生物学的試料と比較して、生物学試料中で減少している前記核酸、前記ペプチド、前記抗体、前記T細胞および/または前記細胞の量は、前記患者における腫瘍疾患の退縮、良好な経過、例えば処置の成功または発症の危険性の低下を示し得る。

【0076】

1つの実施形態では、生物学的試料は組織または器官に由来し、前記組織または器官が腫瘍を含まない場合、その細胞は本発明に従って同定される腫瘍抗原および/または本発明に従って同定される腫瘍核酸を実質的に発現しない。1つの実施形態では、腫瘍疾患は前記組織または器官中に存在する。

【0077】

患者から以前に採取した生物学的試料と比較して、生物学試料中で増大している前記核酸、前記ペプチド、前記抗体、前記T細胞および/または前記細胞の量は、前記患者における腫瘍疾患の進行、好ましくない経過、例えば処置の不成功、再発または転移挙動、発症または発症の危険性を示し得る。

【0078】

1つの実施形態では、生物学的試料は組織または器官に由来し、前記組織または器官が腫瘍を含まない場合、その細胞は本発明に従って同定される腫瘍抗原および/または本発明に従って同定される腫瘍核酸を実質的に発現しない。1つの実施形態では、腫瘍疾患は前記組織または器官中に存在する。

【0079】

特定の態様では、本発明は、腫瘍疾患の検出のため、すなわち腫瘍疾患の位置または部位、例えば特定の組織または器官を決定するための方法に関する。1つの実施形態では、前記方法は、本発明に従って同定される腫瘍抗原に結合する、検出可能な標識に連結された抗体を患者に投与することを含む。抗体はモノクローナル抗体であり得る。さらなる実施形態では、抗体は、キメラ、ヒトもしくはヒト化抗体、抗体のフラグメントまたは合成抗体である。

【0080】

前記患者における組織または器官の標識化は、前記組織または器官における腫瘍疾患の存在または腫瘍疾患の危険性を示し得る。

【0081】

1つの実施形態では、組織または器官は、組織または器官が腫瘍を含まない場合、その細胞が本発明に従って同定される腫瘍抗原および/または本発明に従って同定される腫瘍核酸を実質的に発現しない組織または器官である。

【0082】

本発明の方法を使用する、上述した腫瘍疾患の陽性診断は、本明細書で述べる処置の方法に適する腫瘍疾患を示し得る。

【0083】

本発明のさらなる目的は、本発明の診断、検出または観測のための方法において有用な診断試験キットに関する。1つの実施形態においてこれらのキットは、上記で定義した標的分子に特異的に結合するリガンドおよび、場合により、検出可能な標識、例えば指示酵

10

20

30

40

50

素、放射性標識、発蛍光団または常磁性粒子を含む。特定の実施形態では、リガンドは、上述した標的核酸分子に特異的な核酸プライマーもしくはプローブ、または上述した標的ペプチドに特異的な抗体もしくはその誘導体を含む。キットは、情報を提供するパンフレット、例えば本明細書で開示する方法を実施するために試薬をどのように使用するかを知らせるパンフレットを含み得る。

【0084】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従って同定される腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドまたは前記ペプチドの誘導体に関する。1つの実施形態では、前記ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。

10

【0085】

さらなる態様では、本発明は、腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含有する前記ペプチドをコードする核酸を含む組換え核酸分子、特にDNAまたはRNA分子に関する。

【0086】

本発明はまた、本発明の組換え核酸分子を含む宿主細胞に関する。好ましくは、そのような宿主細胞は、コードされるペプチドを発現する。

【0087】

宿主細胞は組換え細胞であり得、コードされるペプチドを分泌することができ、それを表面上に発現することができ、および好ましくは前記ペプチドまたはそのプロセッシング産物に結合するMHC分子を付加的に発現し得る。1つの実施形態では、宿主細胞はMHC分子を内因性に発現する。さらなる実施形態では、宿主細胞は、MHC分子および/またはペプチドもしくはそのプロセッシング産物を組換えによって発現する。宿主細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい実施形態では、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。

20

【0088】

さらなる態様では、本発明は、本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチド、または前記ペプチドの誘導体に結合する作用物質に関する。好ましい実施形態では、前記作用物質は、タンパク質またはペプチド、特に抗体、T細胞受容体またはMHC分子である。さらなる実施形態では、抗体は、モノクローナル、キメラ、ヒトもしくはヒト化抗体、コンビナトリアル技術によって作製される抗体、抗体のフラグメントまたは合成抗体である。

30

【0089】

本発明はさらに、本発明に従って同定される腫瘍抗原もしくは前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列を含むペプチドまたは前記ペプチドの誘導体に結合する本発明の作用物質と、治療エフェクター部分または検出可能標識とのコンジュゲートに関する。

【0090】

本発明を以下の図面および実施例によって詳細に説明するが、これらは例示のためのみ使用されるものであり、限定を意図されない。図面の説明および実施例により、同様に本発明に包含されるさらなる実施形態が当業者にアクセス可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】種々の腫瘍組織におけるCOL20A1の発現 COL20A1の発現を、示されている腫瘍組織においてプライマー6303(5'-TTCACGCTCTTCAAGGACGC)および6304(5'-TGGAAAGTCCTCGGCTGTCAAT)を使用して、定量的リアルタイムPCRを用いて分析し、HPRT(ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ)をハウスキーピング遺伝子として使用して相対発現を計算した。脳腫瘍は神経膠芽腫を指し、TNBCはトリプルネガティブ乳癌を指す。

【図2】神経膠芽腫組織におけるCOL20A1の発現 COL20A1発現を、71の神経膠芽腫組織においてプライマー6303(5'-TTCACGCTCTTCAAGG

50

ACGC)および6304(5'-TGGAAGTCCTCGGCTGTCA T)を使用して、定量的リアルタイムPCRを用いて分析し、HPRT(ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ)をハウスキーピング遺伝子として使用して相対発現を計算した。

【図3】正常組織におけるCOL20A1の発現 発現の高さを多くの個別発現レベルに関してカラーコード化している(図面の上部のカラーコード参照)。

【図4A】COL20A1の他のタンパク質との相同性 COL20A1の他のコラーゲンタンパク質との相同性を、NCBI Protein Reference Sequencesを参照として使用してBlastpによって評価した。

【図4B】COL20A1の他のタンパク質との相同性 COL20A1のCOL14A1との相同性。COL20A1のCOL14A1との相同性をBlastpによって評価し、これは、同一の連続するタンパク質配列を示さなかった。

【図5】COL20A1の予測上のHLA-A\*02:01 T細胞エピトープ SYFPEITHIを用いてHLA-A\*02:01 T細胞エピトープを予測し、20より高いスコアを有する、COL20A1にユニークなTCREピトープだけを示している。

【図6】COL20A1 mRNAはヒト細胞から翻訳され得る HEK-293 T細胞を、COL20A1をコードする配列を含むベクター(レーン1)またはベクター単独(レーン2)でトランスフェクトした。

【発明を実施するための形態】

【0092】

本発明を以下で詳細に説明するが、本発明は、本明細書で述べる特定の方法、プロトコルおよび試薬に限定されず、これらは異なり得ることが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明することだけを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術および学術用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0093】

以下において、本発明の要素を説明する。これらの要素を特定の実施形態と共に列挙するが、それらを任意の方法および任意の数で組み合わせる付加的な実施形態を創製し得ることが理解されるべきである。様々に説明される実施例および好ましい実施形態は、本発明を明確に説明される実施形態だけに限定すると解釈されるべきではない。この説明は、明確に説明される実施形態を、多くの開示されるおよび/または好ましい要素と組み合わせた実施形態を裏付け、包含することが理解されるべきである。さらに、本出願で述べるすべての要素の任意の順序および組合せが、文脈上特に指示されない限り、本出願の説明によって開示されると見なされるべきである。

【0094】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Koelbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995)に記載されているように定義される。

【0095】

本発明の実施は、特に指示されない限り、当該分野の文献中で説明される化学、生化学、細胞生物学、免疫学および組換えDNA技術の従来の方法を用いる(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989参照)。

## 【0096】

本明細書および以下の特許請求の範囲全体を通して、文脈上特に必要とされない限り、「含む」という語および「含むこと」などの変形は、記述される成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群の包含を意味するが、いかなる他の成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群の排除も意味しないことが理解され、ただし一部の実施形態では、そのような他の成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群が排除され得る、すなわち主題は、記述される成員、整数もしくは工程または成員、整数もしくは工程の群の包含に存する。本発明を説明することに関連して（特に特許請求の範囲に関連して）使用される「1つの」および「その」という用語および同様の言及は、本明細書で特に指示されない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を含むと解釈されるべきである。本明細書中の数値の範囲の列挙は、単にその範囲内に属する各々別々の数値を個別に言及することの簡略化された方法であることが意図されている。本明細書で特に指示されない限り、各個別の数値は、本明細書で個別に列挙されているがごとくに本明細書に組み込まれる。本明細書で述べるすべての方法は、本明細書で特に指示されない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例または例示的な言語（例えば「など」）の使用は、単に本発明をよりよく説明することを意図し、特許請求される本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、本発明の実施に必須の特許請求されない要素を指示すると解釈されるべきではない。

10

## 【0097】

いくつかの資料が本明細書の本文全体にわたって引用される。上記または下記で、本明細書において引用される資料の各々は（すべての特許、特許出願、学術出版物、製造者の仕様書、指示書等を含む）、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明を理由にそのような開示に先行する権利を有さないことの承認と解釈されるべきではない。

20

## 【0098】

本発明の一部の態様は、以下のように要約できる能動または受動免疫治療アプローチを用いて、本発明に従って同定される腫瘍核酸および腫瘍抗原を利用した腫瘍疾患、特に癌疾患、特に中枢神経系の腫瘍または癌疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫の免疫療法を想定する：

30

## 免疫療法

## I. 能動免疫療法（「癌ワクチン」）

以下による免疫：

- i) 抗原またはペプチド（天然または修飾）
- ii) 抗原またはペプチドをコードする核酸
- iii) 抗原またはペプチドをコードする組換え細胞
- iv) 抗原またはペプチドをコードする組換えウイルス

v) 抗原もしくはペプチド（天然もしくは修飾）でパルスしたまたは抗原もしくはペプチドをコードする核酸でトランスフェクトした抗原提示細胞

40

## II. 受動免疫療法（「養子免疫療法」）

- vi) 抗原を認識する抗体またはT細胞受容体の移入
- vii) インビトロで抗原に感作した細胞（バルクまたはクローン化集団）の導入
- viii) 抗原を認識し、好ましくは腫瘍特異的クラスI MHC提示ペプチドに応答性であるT細胞受容体をコードする核酸で形質導入したエフェクター細胞（または幹細胞）の移入

## 【0099】

この数年、腫瘍免疫におけるCD8+T細胞の役割が注目を集めてきた。腫瘍特異的CD8+CTLは、動物モデルにおいてインビボで腫瘍細胞を直接溶解し、腫瘍塊を根絶できることが示されている。しかし、CD4+T細胞も重要な役割を果たすと考えられ、最適な癌ワクチンはCD4+およびCD8+T細胞の両方の関与を必要とすると考えられる

50

。

## 【0100】

無傷または実質的に無傷の腫瘍抗原での免疫は、クラスIおよびクラスIIの両方のエピトープに対して同時に免疫するという潜在的利点を有するが、大量の腫瘍抗原を精製するには多大の労力と時間が必要である。腫瘍抗原内のMHCクラスIおよびクラスIIペプチドの同定は、高レベルの純粋な合成ペプチドで免疫することを可能にする。ペプチドアプローチはまた、どのエピトープを用いるかを選択することによってMHCクラスI型およびクラスII型応答（または混合型）のいずれかを選択できるという利点も有する。ペプチドでの免疫はまた、異なるサブセットのT細胞を刺激するためにサブドミナントおよび/または潜在性エピトープを選択できる（抗原プロセッシングの必要性を回避し得るまたは「トリミング」の役割に低減し得るため）ことも意味する。またペプチドを、その免疫原性を高めるように修飾し得る（例えばそのHLAクラスIまたはIIアンカー部位において）。

10

## 【0101】

本発明は、腫瘍特異的クラスI MHC提示ペプチドおよびそれらを使用する方法、ならびに腫瘍特異的クラスI MHC提示ペプチドに応答性の細胞傷害性Tリンパ球（CTL）およびそれらを使用する方法に関する。

## 【0102】

1つの態様では、本発明は、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対する細胞応答を刺激することができる抗腫瘍ワクチンを提供する。本発明の抗腫瘍ワクチンは、好ましくは腫瘍抗原ペプチドまたは腫瘍抗原ペプチド核酸を含有する。

20

## 【0103】

本発明はまた、本発明に従って同定される腫瘍抗原の1つ以上またはそれに由来する1つ以上の腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸の使用を包含する。そのようにコードされる抗原またはペプチドは、治療用または予防用抗腫瘍ワクチンとして有効であると予想される。例えば、これらの核酸の特定の企図される適用は、そのような抗原に対するCTL応答などの細胞応答および/または体液性免疫応答の誘導を含む。

## 【0104】

プラスミドDNAでの免疫は、CD8+T細胞、CD4+T細胞および抗体から成る抗原特異的免疫応答を惹起することができる。DNAは、遺伝子銃法の免疫によって投与することができる。遺伝子銃免疫では、プラスミドDNAを金粒子に被覆し、続いてDNA被覆粒子を高圧のヘリウム駆動遺伝子銃によって皮膚内に送達し得る。

30

## 【0105】

分子生物学における進歩は、本明細書で述べる腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをコードする組換えウイルスを構築することを可能にした。現在までにいくつかの組換えウイルスワクチンが使用されている。

## 【0106】

いくつかのウイルスベクターは、悪性疾患の免疫療法を増強する潜在的可能性に関して有望な結果を示している。複製可能ウイルスおよび複製能力のないウイルスを使用することができ、後者の群が好ましい。ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レオウイルスおよびニューカッスル病ウイルスは、本発明に従って有用な好ましいウイルスの例である。

40

## 【0107】

樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞（APC）においては、MHCクラスI提示ペプチドもしくは腫瘍溶解物のいずれかをロードする、または腫瘍抗原をコードするアデノウイルスを用いた形質導入などによって核酸を形質導入することができる。

## 【0108】

好ましい実施形態では、本発明の抗腫瘍ワクチンは、腫瘍抗原ペプチドをロードしたAPCを含有する。これに関して、プロトコルは、人為的に腫瘍抗原ペプチドを提示するよ

50

うに操作されたDCのインビトロ培養/分化に基づき得る。遺伝的に操作されたDCの作製は、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸をDCに導入することを含み得る。mRNAでのDCのトランスフェクションは、強力な抗腫瘍免疫を刺激する有望な抗原ロード技術である。

【0109】

樹状細胞(DC)は、末梢組織中で捕捉された抗原を、MHCクラスIIおよびクラスIの両抗原提示経路を介してT細胞に提示する白血球集団である。DCが免疫応答の強力な誘導物質であり、これらの細胞の活性化が抗腫瘍免疫の誘導に必須の工程であることは周知である。DCの成熟は、そのような抗原提示DCがT細胞のプライミングをもたらすDC活性化状態と称され、一方未熟DCによるその提示は寛容を生じさせる。DC成熟は、主として固有の受容体によって検出される細菌特徴を有する生体分子(細菌DNA、ウイルスRNA、内毒素等)、プロ炎症性サイトカイン(TNF、IL-1、IFN)、CD40LによるDC表面でのCD40の連結、およびストレスによる細胞死を起こしている細胞から放出される物質によって引き起こされる。DCは、骨髄細胞を顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)および腫瘍壊死因子などのサイトカインと共にインビトロで培養することによって誘導できる。

10

【0110】

本発明のさらに別の実施形態は、上記で定義した標的抗原に対する抗体、好ましくはモノクローナル抗体の調製を含む。そのようなモノクローナル抗体は、従来の方法によって作製することができ、限定されることなく、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、一本鎖抗体、例えばscFv、ならびにFabおよびFab'フラグメントなどの抗原結合抗体フラグメントを含む、そのフラグメントまたは誘導体を包含する。モノクローナル抗体の調製の方法は当分野で公知である。一般に、モノクローナル抗体の調製は、適切な宿主を対象抗原で免疫し、免疫細胞を宿主から単離して、そのような免疫細胞を用いてモノクローナル抗体を単離し、そのような抗原のいずれかに特異的に結合するモノクローナル抗体に関してスクリーニングすることを含む。抗体フラグメントは、公知の方法、例えばモノクローナル抗体の酵素的切断によって調製し得る。

20

【0111】

これらのモノクローナル抗体およびフラグメントは、受動抗腫瘍免疫療法のために有用であるか、または標的化細胞毒性、すなわち腫瘍細胞の死滅を提供するために治療エフェクター部分、例えば放射性標識、細胞毒、治療用酵素、アポトーシスを誘導する作用物質等に結合し得る。本発明の1つの実施形態では、そのような抗体またはフラグメントを、標識または非標識形態にて、単独でまたは他の治療薬、例えば癌治療に適したシスプラチン、メトトレキサート、アドリアマイシン等のような化学療法剤と共に投与する。

30

【0112】

受動抗腫瘍免疫療法のために使用される場合、抗体は治療エフェクター部分に結合されてもよくまたは結合されなくてもよい。好ましくは、本明細書で述べる抗体は、補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、同型接着および/または食作用を誘導することによって、好ましくはCDC媒介性溶解および/またはADCC媒介性溶解を誘導することによって細胞の死滅を媒介する。本明細書で述べる抗体は、好ましくは免疫系の成分と、好ましくはADCCまたはCDCを介して相互作用する。しかし、本発明の抗体はまた、単に細胞表面の腫瘍抗原と結合することによって、したがって、例えば細胞の増殖をブロックすることによって作用を及ぼし得る。

40

【0113】

ADCCは、本明細書で述べるエフェクター細胞、特にリンパ球の細胞死滅能力を表し、これは、好ましくは標的細胞が抗体によって印付けられることを必要とする。

【0114】

ADCCは、好ましくは、抗体が腫瘍細胞上の抗原に結合し、抗体のFcドメインが免

50

疫エフェクター細胞の表面のFc受容体(FcR)に係合したときに起こる。Fc受容体のいくつかのファミリーが同定されており、特定の細胞集団は、定められたFc受容体の特徴的に発現する。ADCCは、様々な程度の即時腫瘍破壊を直接誘導する機構と見なすことができ、前記機構はまた、抗原提示および腫瘍に対するT細胞応答の誘導ももたらす。好ましくは、ADCCのインビボでの誘導は、腫瘍に対するT細胞応答および宿主由来の抗体応答をもたらす。

#### 【0115】

CDCは、抗体によって指令され得るもう1つの細胞死滅方法である。IgMは、補体活性化のために最も有効なアイソタイプである。IgG1およびIgG3も、古典的補体活性化経路を介してCDCを指令するのに非常に有効である。好ましくは、このカスケードにおいて、抗原-抗体複合体の形成は、IgG分子などの関与抗体分子のC<sub>H</sub>2ドメイン上のごく近接した多数のC1q結合部位の暴露を生じさせる(C1qは補体C1の3つのサブ成分の1つである)。好ましくは、これらの暴露されたC1q結合部位は、それまでの低親和性C1q-IgG相互作用を高いアビジティのものへと変換し、これが、一連の他の補体タンパク質を含む事象のカスケードを引き起こし、エフェクター細胞化学走性/活性化物質C3aおよびC5aのタンパク質分解性放出をもたらす。好ましくは、補体カスケードは、細胞内および細胞外への水と溶質の自由な通過を促進し、アポトーシスをもたらし得る細胞膜の孔を作り出す、膜傷害性複合体の形成で終了する。

10

#### 【0116】

腫瘍抗原を認識することができる免疫細胞(場合により遺伝的に修飾された)での受動免疫療法は、選択された患者において癌の退縮を媒介するのに有効である。これらの技術は、腫瘍反応性T細胞のクローン化またはポリクローナル培養物のエクスピボでの再活性化および増殖に基づき得る。培養後、T細胞をIL-2と共に患者に再注入し得る。ヒトリンパ球を、抗原提示細胞上に提示される腫瘍抗原ペプチドにインビトロで感作するインビトロ技術が開発されている。反復インビトロ刺激によって、ヒト腫瘍抗原を認識する大きな能力を備えた細胞を誘導することができる。これらの細胞の養子移入は、従来通りに増殖させた細胞よりもインビボで腫瘍退縮を媒介するのに有効であり得る。

20

#### 【0117】

1つの実施形態では、自己細胞傷害性リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球を、癌を有する患者から入手し得る。リンパ球を培養下で増殖させ、腫瘍抗原応答性CTLを、単独でまたは少なくとも1つの免疫調節剤と組み合わせて、好ましくは付加的にサイトカインと組み合わせて、MHCクラスIと共に提示される腫瘍抗原ペプチドの存在下で培養することによって増殖させ得る。腫瘍抗原応答性CTLを、次に、患者における腫瘍を低減するまたは排除するのに有効な量で患者に注入して戻す。

30

#### 【0118】

既存の応答が不十分である場合は、リンパ球を採取する前に抗腫瘍ペプチドワクチンで患者を予備刺激することができる。養子移入したCTLは、低用量から中用量のIL-2注入によって最も良好に生存すると予想される。

#### 【0119】

「腫瘍抗原応答性CTL」とは、例えば腫瘍細胞の表面に、クラスI MHCと共に提示される、前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドに対して応答性であるCD8+T細胞を意味する。

40

#### 【0120】

本発明によれば、CTL応答性は、持続的カルシウム流入、細胞分裂、IFN- およびTNF- などのサイトカインの産生、CD44およびCD69などの活性化マーカーの上方調節、ならびに標的細胞を発現する腫瘍抗原の特異的細胞溶解性死滅を含み得る。CTL応答性はまた、CTL応答性を正確に示す人工レポーターを使用して測定し得る。

#### 【0121】

「腫瘍抗原ペプチド」または「腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチド」とは、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントまたはペプチドのアミノ酸配列に実質的に対応

50

するアミノ酸配列を含むオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。好ましくは、腫瘍抗原ペプチドは、本明細書で同定される腫瘍抗原をクラスⅠ MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍に対する細胞応答、好ましくは腫瘍抗原応答性CTLを刺激することができ、ならびに/またはそれ自体でもしくは免疫原性担体に結合して使用された場合、本発明に従って同定される腫瘍抗原に特異的に結合する抗体を惹起することができる。本発明による腫瘍抗原ペプチドは、配列表の配列番号：3もしくは4のアミノ酸配列のフラグメントの配列に実質的に対応する配列を含むペプチドであるか、または前記ペプチドの誘導体である。1つの実施形態では、前記ペプチドは、配列表の配列番号：5～62から成る群より選択されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む。腫瘍抗原ペプチドは任意の長さであってよい。

10

#### 【0122】

腫瘍抗原ペプチドが直接、すなわちプロセッシングされずに、特に切断されずに提示される場合、腫瘍抗原ペプチドは、MHC分子、特にクラスⅠ MHC分子に結合するのに適した長さを有し、好ましくは7～20アミノ酸長、より好ましくは7～12アミノ酸長、より好ましくは8～11アミノ酸長、特に9または10アミノ酸長である。好ましくは、直接提示される腫瘍抗原ペプチドの配列は、本発明に従って同定される腫瘍抗原のアミノ酸配列に由来する、すなわちその配列は本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応し、好ましくは完全に同一である。腫瘍抗原ペプチドがプロセッシング後に、特に切断後に提示される場合、プロセッシングによって生成されるペプチドは、MHC分子、特にクラスⅠ MHC分子に結合するのに適した長さを有し、好ましくは7～20アミノ酸長、より好ましくは7～12アミノ酸長、より好ましくは8～11アミノ酸長、特に9または10アミノ酸長である。好ましくは、プロセッシング後に提示されるペプチドの配列は、本発明に従って同定される腫瘍抗原のアミノ酸配列に由来する、すなわちその配列は本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応し、好ましくは完全に同一である。したがって、1つの実施形態において本発明による腫瘍抗原ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応し、好ましくは完全に同一である、7～20アミノ酸長、より好ましくは7～12アミノ酸長、より好ましくは8～11アミノ酸長、特に9または10アミノ酸長の配列を含み、腫瘍抗原ペプチドのプロセッシング後に提示ペプチドを形成する。しかし、腫瘍抗原ペプチドはまた、上記で述べた配列よりもさらに長い、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメントに実質的に対応し、好ましくは完全に同一である配列を含み得る。1つの実施形態では、腫瘍抗原ペプチドは、本発明に従って同定される腫瘍抗原の配列全体を含み得る。

20

30

#### 【0123】

好ましくは、腫瘍抗原ペプチドは、直接またはプロセッシング後に、クラスⅠ MHC分子と共に提示され得、そのように提示された場合、腫瘍抗原応答性CTLを刺激することができる。クラスⅠ MHCによって提示されるペプチドの配列に実質的に対応するアミノ酸配列を有するペプチドは、クラスⅠ MHCによって提示されるペプチドのTCR認識のためまたはMHCへのペプチドの結合のために必須ではない1つ以上の残基において異なり得る。そのような実質的に対応するペプチドも、腫瘍抗原応答性CTLを刺激することができる。TCR認識に影響を及ぼさないが、MHCへの結合の安定性を改善する残基において提示ペプチドと異なるアミノ酸配列を有するペプチドは、腫瘍抗原ペプチドの免疫原性を改善することができ、本明細書では「最適化ペプチド」と称され得る。これらの残基のいずれがMHCまたはTCRのどちらかへの結合に影響を及ぼす可能性がより高いと考えられるかについての既存の知識を利用して、実質的に対応するペプチドの設計への合理的なアプローチを用いることができる。生じた機能性のペプチドは、腫瘍抗原ペプチドとして企図される。

40

#### 【0124】

本発明によれば、「免疫反応性細胞」という用語は、適切な刺激によって免疫細胞（例えばB細胞、ヘルパーT細胞またはCTL（細胞溶解性T細胞）など）へと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<sup>+</sup>造血幹細胞、未熟および成熟T

50

細胞ならびに未熟および成熟B細胞を含む。腫瘍抗原を認識する細胞溶解性T細胞またはヘルパーT細胞の産生を所望する場合は、免疫反応性細胞を、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/または選択を促進する条件下で腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを提示する細胞(例えば腫瘍抗原を発現する細胞)と接触させる。抗原に暴露された場合のT細胞前駆体の細胞溶解性T細胞への分化は、免疫系のクローン選択に類似する。

【0125】

「T細胞」および「Tリンパ球」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ヘルパーT細胞(CD4+T細胞)および細胞溶解性T細胞を含む細胞傷害性T細胞(CTL、CD8+T細胞)を包含する。

10

【0126】

「腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする細胞」または「腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示する細胞」または同様の表現は、腫瘍細胞または、MHCクラスI分子に関連して、その細胞が発現する腫瘍抗原を提示するもしくは、例えば腫瘍抗原のプロセッシングによって、前記腫瘍抗原に由来するフラグメントを提示する抗原提示細胞などの細胞を意味する。同様に、「腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする腫瘍」という用語は、腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする細胞を含む腫瘍を表す。

【0127】

「提示される、本発明に従って同定される腫瘍抗原のフラグメント」または同様の表現は、フラグメントが、例えば抗原提示細胞に直接添加された場合、MHCクラスIまたはクラスII、好ましくはMHCクラスIによって提示され得ることを意味する。1つの実施形態では、フラグメントは、本発明に従って同定される腫瘍抗原を発現する細胞、例えば腫瘍細胞によって天然に提示されるフラグメントである。

20

【0128】

「腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識する細胞」または「腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識する免疫反応性細胞」または同様の表現は、特にMHC分子に関連して、例えば抗原提示細胞または腫瘍細胞の表面上に提示された場合、前記腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドをある程度の特異性で認識することができる細胞を意味する。好ましくは、前記認識は、腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識する細胞が応答性であることを可能にする。細胞が、MHCクラスII分子に関連して腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識する受容体を担持するヘルパーT細胞(CD4+T細胞)である場合、そのような応答性は、サイトカインの放出ならびに/またはCD8+リンパ球(CTL)および/もしくはB細胞の活性化を含み得る。細胞がCTLである場合、そのような応答性は、例えばアポトーシスまたはパーフォリン媒介性細胞溶解による、MHCクラスI分子に関連して提示される細胞、すなわち腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする細胞の除去を含み得る。腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識し、応答性であるそのようなCTLは、本明細書では「腫瘍抗原応答性CTL」とも称される。細胞がB細胞である場合、そのような免疫応答性は免疫グロブリンの放出を含み得る。

30

40

【0129】

「腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識するT細胞受容体」とは、特にMHC分子に関連して提示された場合、前記腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドをある程度の特異性で認識することができるT細胞受容体を意味する。好ましくは、前記認識は、上記で概説したように腫瘍抗原または前記腫瘍抗原に由来する腫瘍抗原ペプチドを認識するT細胞受容体を担持する細胞が応答性であることを可能にする。

【0130】

「腫瘍抗原に対する細胞応答」は、腫瘍抗原をクラスIまたはクラスII MHCと共に

50

に提示することを特徴とする細胞に対する細胞応答を包含することが意図されている。細胞応答は、「ヘルパー」または「キラー」のいずれかとして働く、T細胞またはTリンパ球と呼ばれる細胞に関する。ヘルパーT細胞(CD4+T細胞とも称される)は、免疫応答を調節することによって中心的役割を果たし、キラー細胞(細胞傷害性T細胞、細胞溶解性T細胞、CD8+T細胞またはCTLとも称される)は、腫瘍細胞を死滅させ、より多くの腫瘍細胞の産生を阻止する。両方の免疫応答が必要であると考えられるが、癌を制御するためにはCTL応答がより重要であると考えられる。

#### 【0131】

いくつかの治療方法は、疾患細胞、例えば腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示する癌細胞の溶解を生じさせる、患者の免疫系の反応に基づく。これに関連して、例えば腫瘍抗原ペプチドとMHC分子との複合体に特異的な自己細胞傷害性Tリンパ球を、腫瘍疾患を有する患者に投与し得る。インビトロでのそのような細胞傷害性Tリンパ球の産生は公知である。T細胞を分化させる方法の一例は、国際公開第WO-A-9633265号に見出される。一般に、血液細胞などの細胞を含有する試料を患者から採取し、その細胞を、前記複合体を提示し、細胞傷害性Tリンパ球(例えば樹状細胞)の増殖を生じさせることができる細胞と接触させる。標的細胞は、COS細胞などのトランスフェクト細胞であり得る。これらのトランスフェクト細胞は、所望の複合体をそれらの表面に提示し、細胞傷害性Tリンパ球と接触した場合、後者の増殖を刺激する。その後、クローン増殖させた自己細胞傷害性Tリンパ球を患者に投与する。

10

#### 【0132】

細胞傷害性Tリンパ球を選択する別の方法では、細胞傷害性Tリンパ球の特異的クローンを得るためにMHCクラスI分子/ペプチド複合体の蛍光四量体を使用する(Altman et al., Science 274:94-96, 1996; Dunbar et al., Curr. Biol. 8:413-416, 1998)。

20

#### 【0133】

さらに、所望の複合体を提示する細胞(例えば樹状細胞)は、高い親和性で特異的細胞傷害性Tリンパ球の増殖を生じさせ得る健常個体または別の種(例えばマウス)の細胞傷害性Tリンパ球と組み合わせ得る。これらの増殖した特異的Tリンパ球の高親和性T細胞受容体をクローニングし、場合により種々の程度にヒト化して、このようにして得られたT細胞受容体を、次に、例えばレトロウイルスベクターを使用して、遺伝子導入によって患者のT細胞に形質導入し得る。その後、これらの遺伝的に改変されたTリンパ球を使用して養子移入を実施し得る(Stanislawski et al., Nat Immunol. 2:962-70, 2001; Kessels et al., Nat Immunol. 2:957-61, 2001)。

30

#### 【0134】

細胞傷害性Tリンパ球はまた、それ自体公知の方法でインビボにて生成し得る。1つの方法は、MHCクラスI/ペプチド複合体を発現する非増殖性細胞を使用する。本明細書で使用する細胞は、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の提示に必要な一方もしくは両方の遺伝子(すなわち抗原性ペプチドと提示MHC分子)をトランスフェクトした細胞である。別の好ましい形態は、例えばリポソーム移入によってまたは電気穿孔法によって細胞に導入し得る組換えRNAの形態での腫瘍抗原の導入である。生じた細胞は、対象とする複合体を提示し、自己細胞傷害性Tリンパ球によって認識され、その後自己細胞傷害性Tリンパ球が増殖する。

40

#### 【0135】

同様の作用は、抗原提示細胞への組み込みをインビボで可能にするために、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをアジュバントと組み合わせることによって達成できる。腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドは、タンパク質として、DNA(例えばベクター内の)としてまたはRNAとして存在し得る。腫瘍抗原は、MHC分子のペプチドパートナーを生成するようにプロセシングされ得るが、そのフラグメントは、さらなるプロセシングを必要とせず

50

な抗原がインビボで樹状細胞によってプロセッシングされる投与形態が好ましく、というのはこれが、有効な免疫応答に必要とされるヘルパーT細胞応答も生じさせ得るからである (Ossendorp et al., Immunol Lett. 74: 75-9, 2000; Ossendorp et al., J. Exp. Med. 187: 693-702, 1998)。一般に、例えば皮内注射によって、有効量の腫瘍抗原を患者に投与することが可能である。しかし、注射はまた、リンパ節内にも実施し得る (Maloy et al., Proc Natl Acad Sci USA 98: 3299-303, 2001)。

#### 【0136】

本発明によれば、参照試料または参照生物などの「参照品」は、試験試料または試験生物、すなわち患者から本発明の方法において得られた結果を相互に関連付け、比較するのに使用し得る。典型的には、参照生物は健常生物、特に腫瘍疾患に罹患していない生物である。

10

#### 【0137】

「参照値」または「参照レベル」は、十分に大きな数の参照品を測定することによって参照品から経験的に決定することができる。好ましくは、参照値は、少なくとも2、好ましくは少なくとも3、好ましくは少なくとも5、好ましくは少なくとも8、好ましくは少なくとも12、好ましくは少なくとも20、好ましくは少なくとも30、好ましくは少なくとも50、または好ましくは少なくとも100の参照品を測定することによって決定される。

20

#### 【0138】

本発明によれば、「結合」という用語は、好ましくは特異的結合に関する。「特異的結合」は、抗体などの作用物質が、それが特異的であるエピトープなどの標的に対して、別の標的への結合と比較してより強く結合することを意味する。ある作用物質は、第一の標的に対して、第二の標的に対する解離定数 ( $K_D$ ) より低い解離定数で結合する場合、第二標的と比較して第一標的により強く結合する。好ましくは、作用物質が特異的に結合する標的に対する解離定数 ( $K_D$ ) は、その作用物質が特異的に結合しない標的に対する解離定数 ( $K_D$ ) よりも  $10^2$  倍、 $10^3$  倍、 $10^4$  倍、 $10^5$  倍、 $10^6$  倍、 $10^7$  倍、 $10^8$  倍、 $10^9$  倍または  $10^{10}$  倍以上低い。

30

#### 【0139】

「COL20A1」という用語は、コラーゲン遺伝子、好ましくはヒトコラーゲン遺伝子に関する。好ましくは、「COL20A1」という用語は、好ましくは配列表の配列番号：1もしくは2の核酸配列または前記核酸配列の変異体を含む、好ましくは前記核酸配列または前記変異体から成る核酸、およびこの核酸によってコードされるタンパク質、好ましくは配列表の配列番号：3もしくは4のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列の変異体を含む、好ましくは前記アミノ酸配列または前記変異体から成るタンパク質に関する。

40

#### 【0140】

本発明によれば、腫瘍核酸または腫瘍抗原は、前記腫瘍核酸または腫瘍抗原が細胞または腫瘍に空間的に連結されている場合、特に前記腫瘍核酸または腫瘍抗原が細胞または腫瘍中に存在する場合、前記細胞または腫瘍と結合している。前記腫瘍核酸または腫瘍抗原は、前記細胞または腫瘍によって発現され得る。前記細胞は、腫瘍細胞または間質細胞などの腫瘍細胞と結合している細胞であり得る。

40

#### 【0141】

本発明によれば、核酸は、好ましくはデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) である。核酸は、本発明によれば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換え生産されたおよび化学合成された分子を含む。本発明によれば、核酸は、一本鎖または二本鎖としておよび直鎖状または共有結合閉環状分子として存在し得る。

#### 【0142】

「本発明に従って同定される腫瘍核酸」および「本発明に従って同定される腫瘍抗原をコードする核酸」という用語は、同様の意味を有する。

50

## 【0143】

本明細書で使用される場合、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、 $\beta$ -D-リボフラノース部分の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA、例えば部分的に精製されたRNA、基本的に純粋なRNA、合成RNA、組換え生産されたRNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変によって天然に存在するRNAとは異なる改変RNAを包含する。そのような改変は、例えばRNAの末端へのまたは内部での、例えばRNAの1つ以上のヌクレオチドにおける非ヌクレオチド物質の付加を包含し得る。RNA分子中のヌクレオチドはまた、非標準ヌクレオチド、例えば天然には存在しないヌクレオチドまたは化学合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドも含み得る。これらの改変RNAは、類似体または天然に存在するRNAの類似体と称され得る。

10

## 【0144】

本明細書で核酸の検出または核酸の量の測定に言及する場合、実際に検出されるべきまたは実際にその量を測定されるべきである核酸は、好ましくはmRNAである。しかし、これは、mRNAが間接的に検出されるまたはmRNAの量が間接的に測定される実施形態を包含し得ることが理解されるべきである。例えば、mRNAをcDNAに形質転換し、そのcDNAを検出してもよく、またはその量を測定してもよい。mRNAは、本明細書ではcDNAの等価物と見なされる。当業者は、cDNA配列がmRNA配列と等価であり、本明細書では同じ目的に、例えば検出されるべき核酸にハイブリダイズするプローブの作製に使用できることを理解する。したがって、本明細書で配列表に示す配列に言及する場合、これは、前記配列のRNA等価物も包含するものとする。

20

## 【0145】

本発明に従って述べる核酸は、好ましく単離されている。「単離された核酸」という用語は、本発明によれば、核酸が、(i)例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、インビトロで増幅された、(ii)クローニングによって組換え生産された、(iii)例えば切断とゲル電気泳動による分離によって、精製された、または(iv)例えば化学合成によって、合成されたことを意味する。単離された核酸は、組換えDNA技術による操作に使用可能な核酸である。

30

## 【0146】

例えば核酸およびアミノ酸配列に関して「変異体」という用語は、本発明によれば、任意の変異体、特に突然変異体、スプライス変異体、立体配座変異体、アイソフォーム、対立遺伝子変異体、種変異体および種ホモログ、特に天然に存在するものを包含する。対立遺伝子変異体は、遺伝子の正常な配列の変化に関するが、その重要性は不明確であることが多い。完全な遺伝子配列決定は、しばしば所与の遺伝子について多数の対立遺伝子変異体を同定する。種ホモログは、所与の核酸またはアミノ酸配列のものとは異なる種を起源とする核酸またはアミノ酸配列である。

## 【0147】

核酸分子に関して、「変異体」という用語は縮重核酸配列を包含し、本発明による縮重核酸は、遺伝暗号の縮重のためにコドン配列が参照核酸とは異なる核酸である。

40

## 【0148】

さらに、本発明による特定核酸配列の「変異体」は、単一または複数の、例えば少なくとも2、少なくとも4または少なくとも6、好ましくは3まで、4まで、5まで、6まで、10まで、15までまたは20までのヌクレオチド置換、欠失および/または付加を含む核酸配列を包含する。

## 【0149】

好ましくは、所与の核酸配列と前記所与の核酸配列の変異体である核酸配列との間の同一性の程度は、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%または最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%である。同一

50

性の程度は、好ましくは少なくとも約30、少なくとも約50、少なくとも約70、少なくとも約90、少なくとも約100、少なくとも約150、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約300または少なくとも約400ヌクレオチドの領域に対して与えられる。好ましい実施形態では、同一性の程度は参照核酸配列の全長に対して与えられる。

#### 【0150】

「配列類似性」は、同一であるかまたは保存的アミノ酸置換であるアミノ酸のパーセントを示す。2つのポリペプチドまたは核酸配列の間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸またはヌクレオチドのパーセントを示す。

#### 【0151】

「同一性パーセント」という用語は、最良のアラインメント後に得られた、比較する2つの配列の間で同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセントを表すことが意図されており、このパーセントは純粹に統計的であって、2つの配列の間の相違は、ランダムにおよびそれらの全長にわたって分布する。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の配列比較は、従来、これらの配列を最適に整列した後に比較することによって実施され、前記比較は、配列類似性の局所領域を同定し、比較するためにセグメントごとにまたは「比較ウィンドウ」ごとに実施される。比較のための配列の最適アラインメントは、手作業による以外に、Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482の局所相同性アルゴリズムによって、Neddleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443の局所相同性アルゴリズムによって、Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444の類似性検索法によって、またはこれらのアルゴリズムを使用したコンピュータプログラム(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFASTA)によって生成し得る。

#### 【0152】

同一性パーセントは、比較する2つの配列の間で同一の位置の数を決定し、これら2つの配列間の同一性パーセントを得るためにこの数を比較する位置の数で除して、得られた結果に100を乗じることによって計算される。

#### 【0153】

核酸は、この核酸ともう1つ別の核酸の2つの配列が互いに相補的である場合、前記別の核酸に「ハイブリダイズすることができる」または「ハイブリダイズする」。核酸は、この核酸ともう1つ別の核酸の2つの配列が互いと安定な二本鎖を形成することができる場合、前記別の核酸に「相補的」である。本発明によれば、ハイブリダイゼーションは、好ましくはポリヌクレオチド間の特異的ハイブリダイゼーションを許容する条件(ストリンジентな条件)下で実施される。ストリンジентな条件は、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 2nd Edition, 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に記載されており、例えばハイブリダイゼーション緩衝液(3.5×SSC、0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドン、0.02%ウシ血清アルブミン、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7)、0.5%SDS、2mM EDTA)中65°Cでのハイブリダイゼーションを指す。SSCは、0.15M塩化ナトリウム/0.15Mクエン酸ナトリウム、pH7である。ハイブリダイゼーション後、DNAを転写した膜を、例えば2×SSC中で室温にて、次に0.1~0.5×SSC/0.1×SDS中で68°Cまでの温

10

20

30

40

50

度にて洗浄する。

【0154】

相補性パーセントは、第二の核酸配列と水素結合（例えばワトソン-クリック塩基対合）を形成することができる核酸分子内の連続する残基のパーセントを示す（例えば10個のうち5、6、7、8、9、10個が50%、60%、70%、80%、90%および100%相補的である）。「完全に相補的」とは、核酸配列のすべての連続する残基が第二核酸配列内の同じ数の連続する残基と水素結合することを意味する。好ましくは、本発明による相補性の程度は、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%または最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%である。最も好ましくは、本発明による相補性の程度は100%である。

10

【0155】

「誘導体」という用語は、ヌクレオチド塩基上、糖鎖上またはリン酸塩上での核酸の任意の化学的誘導体化を含む。「誘導体」という用語はまた、天然には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包含する。好ましくは、核酸の誘導体化はその安定性を高める。

【0156】

腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸は、本発明によれば、単独でまたは他の核酸、特に異種核酸と組み合わせ存在し得る。好ましくは、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸は、前記腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドを発現する。好ましい実施形態では、核酸は、前記核酸に関して同種または異種であってよい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。コード配列と調節配列は、それらが、前記コード配列の発現または転写が前記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で連結されている場合、互いに「機能的に」連結されている。コード配列が機能的タンパク質に翻訳される場合、調節配列が前記コード配列に機能的に連結されていれば、前記調節配列の誘導は、コード配列内にフレームシフトを引き起こすことなくまたは前記コード配列が所望のタンパク質もしくはペプチドに翻訳されるのを不可能にすることなく、前記コード配列の転写をもたらす。

20

【0157】

「発現制御配列」または「調節配列」という用語は、本発明によれば、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エレメントを含む。本発明の特定の実施形態では、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、種または細胞型によって異なり得るが、一般にはそれぞれ転写および翻訳の開始に参与する5'非転写配列および5'非翻訳配列、例えばTATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等を含む。より具体的には、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含有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も含み得る。

30

【0158】

本発明によれば、核酸はさらに、前記核酸によってコードされるタンパク質またはペプチドの宿主細胞からの分泌を制御するペプチドをコードする別の核酸と組み合わせ存在し得る。本発明によれば、核酸はまた、コードされるタンパク質またはペプチドが宿主細胞の細胞膜上に固定されるまたは前記細胞の特定小器官に分画されることを生じさせるペプチドをコードする別の核酸と組み合わせ存在し得る。同様に、レポーター遺伝子または任意の「タグ」である核酸との組合せが可能である。

40

【0159】

好ましい実施形態では、組換え核酸分子は、本発明によれば、核酸、例えば本発明に従って同定される腫瘍抗原をコードする核酸の発現を制御する、適切な場合にはプロモーターを有する、ベクターである。「ベクター」という用語は、本明細書ではその最も一般的な意味で使用され、核酸が、例えば原核細胞および/または真核細胞に導入され、および適切な場合は、ゲノムに組み込まれることを可能にする、前記核酸のための任意の中間ピ

50

ヒクルを含む。この種のベクターは、好ましくは細胞内で複製および/または発現される。中間ビヒクルは、例えば電気穿孔法、パーティクルガン法、リボソーム投与、アグロバクテリアを用いた導入、またはDNAもしくはRNAウイルスを介した挿入における使用に適合させ得る。ベクターは、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージまたはウイルスゲノムを含む。

**【0160】**

本発明に従って同定される腫瘍抗原をコードする核酸は、宿主細胞のトランスフェクションに使用し得る。本明細書における核酸は、組換えDNAおよびRNAの両方を意味する。組換えRNAは、DNA鋳型のインビトロ転写によって作製し得る。さらに、適用の前に配列の安定化、キャップ形成およびポリアデニル化によって修飾してもよい。

10

**【0161】**

本発明によれば、「宿主細胞」という用語は、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任意の細胞に関する。「宿主細胞」という用語は、本発明によれば、原核細胞（例えば大腸菌（*E. coli*））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。哺乳動物細胞、例えばヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、霊長動物からの細胞が特に好ましい。細胞は様々な組織型に由来してよく、一次細胞および細胞株を含み得る。具体的な例は、ケラチノサイト、末梢血白血球、骨髄の幹細胞および胚性幹細胞を含む。さらなる実施形態では、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、単一コピーまたは2以上のコピーの形態で宿主細胞内に存在してよく、1

20

**【0162】**

本発明によれば、「発現」という用語は、その最も一般的な意味で使用され、RNAの産生またはRNAとタンパク質の産生を含む。この用語は核酸の部分的発現も含む。さらに、発現は一過性にまたは安定に実施され得る。哺乳動物細胞における好ましい発現系は、G418に対する耐性を付与する遺伝子などの選択マーカー（したがって安定にトランスフェクトされた細胞株を選択することを可能にする）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有する、pCDNA3.1、pCDNA3.3およびpRc/CMV（Invitrogen, Carlsbad, CA）を含む。

**【0163】**

MHC分子が腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドを提示する本発明の場合、発現ベクターは、前記MHC分子をコードする核酸配列も含み得る。MHC分子をコードする核酸配列は、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸と同じ発現ベクター上に存在してもよく、または2つの核酸が異なる発現ベクター上に存在してもよい。後者の場合、2つの発現ベクターを細胞に共トランスフェクトし得る。宿主細胞が腫瘍抗原もしくは腫瘍抗原ペプチドまたはMHC分子のいずれも発現しない場合、それぞれをコードする2つの核酸を同じ発現ベクターまたは異なる発現ベクターで細胞にトランスフェクトし得る。細胞が既にMHC分子を発現する場合は、腫瘍抗原または腫瘍抗原ペプチドをコードする核酸配列だけを細胞にトランスフェクトすることができる。

30

**【0164】**

「アンチセンス分子」または「アンチセンス核酸」は、核酸の発現を調節する、特に低減するために使用し得る。「アンチセンス分子」または「アンチセンス核酸」という用語は、本発明によれば、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、修飾オリゴリボヌクレオチドまたは修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドであって、特定の遺伝子を含むDNAまたは前記遺伝子のmRNAに生理的条件下でハイブリダイズし、それにより前記遺伝子の転写および/または前記mRNAの翻訳を阻害するオリゴヌクレオチドを指す。本発明によれば、「アンチセンス分子」はまた、その天然プロモーターに対して逆方向に核酸またはその一部を含む構築物も包含する。核酸またはその一部のアンチセンス転写産物は、天然に存在するmRNAと二本鎖を形成することができ、したがってmRNAの蓄積または翻訳を妨げ得る。別の可能性は、核酸を不活性化するためのリボザイ

40

50

ムの使用である。

【0165】

好ましい実施形態では、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、転写開始部位もしくはプロモーター部位とハイブリダイズする。さらなる実施形態では、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。

【0166】

1つの実施形態では、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それらの組合せから成り、1つのヌクレオチドの5'末端と別のヌクレオチドの3'末端がホスホジエステル結合によって互いに連結されている。これらのオリゴヌクレオチドは、従来の方法で合成され得るかまたは組換えによって生産され得る。

10

【0167】

好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは「修飾」オリゴヌクレオチドである。本明細書では、オリゴヌクレオチドを、例えばその安定性または治療効果を高めるために、その標的に結合する能力を損なわずに非常に異なる方法で修飾し得る。本発明によれば、「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、(i)そのヌクレオチドの少なくとも2個が合成ヌクレオシド間結合(すなわちホスホジエステル結合ではないヌクレオシド間結合)によって互いに連結されている、および/または(ii)通常は核酸内で認められない化学基がオリゴヌクレオチドに共有結合で連結されている、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、ホスホルアミデート、カルバメート、カーボネート、リン酸トリエステル、アセトアミデート、カルボキシメチルエステルおよびペプチドである。

20

【0168】

「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、共有結合で修飾された塩基および/または糖を有するオリゴヌクレオチドも包含する。「修飾オリゴヌクレオチド」は、例えば3'位のヒドロキシル基および5'位のリン酸基以外の低分子量有機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。修飾オリゴヌクレオチドは、例えば2'-O-アルキル化リボース残基またはリボースの代わりにアラビノースなどの別の糖を含有し得る。

30

【0169】

オリゴヌクレオチドに関して上記で述べたすべての実施形態はポリヌクレオチドにも適用し得ることが理解されるべきである。

【0170】

本明細書で使用される「低分子干渉RNA」または「siRNA」とは、標的遺伝子または分解されるべきmRNAを同定するために使用される、好ましくは10ヌクレオチド長より大きい、より好ましくは15ヌクレオチド長より大きい、最も好ましくは18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド長の単離されたRNA分子を意味する。19~25ヌクレオチドの範囲がsiRNAの最も好ましい大きさである。

40

【0171】

本発明によるsiRNAは、部分的に精製されたRNA、実質的に純粋なRNA、合成RNAまたは組換え生産されたRNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/もしくは改変によって天然に生じるRNAとは異なる改変RNAを含み得る。そのような改変は、siRNAの末端またはsiRNAの1つ以上の内部ヌクレオチドなどへの非ヌクレオチド物質の付加；siRNAをヌクレアーゼ消化に対して抵抗性にする修飾(例えば2'置換リボヌクレオチドの使用もしくは糖-リン酸骨格への修飾)；またはデオキシリボヌクレオチドによるsiRNA中の1つ以上のヌクレオチドの置換を包含し得る。さらに、siRNAは、修飾オリゴヌクレオチドに関して上述したようにその安定性を高めるために、特に1つ以上のホスホロチオエート結合を導入することによって

50

修飾し得る。

【0172】

s i R N A の一方の鎖または両方の鎖は 3 ' 突出部も含み得る。本明細書で使用される場合、「3 ' 突出部」は、RNA 鎖の 3 ' 末端から伸びる少なくとも 1 つの不对ヌクレオチドを指す。したがって 1 つの実施形態では、s i R N A は、1 ~ 約 6 ヌクレオチド ( リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを包含する ) 長、好ましくは 1 ~ 約 5 ヌクレオチド長、より好ましくは 1 ~ 約 4 ヌクレオチド長、特に好ましくは約 2 ~ 約 4 ヌクレオチド長の少なくとも 1 つの 3 ' 突出部を含む。s i R N A 分子の両方の鎖が 3 ' 突出部を含む実施形態では、突出部の長さは各々の鎖について同じであってもよくまたは異なってもよい。最も好ましい実施形態では、3 ' 突出部は s i R N A の両方の鎖上に存在し、2 ヌクレオチド長である。例えば、本発明の s i R N A の各々の鎖は、ジデオキシチミジル酸 ( 「 T T 」 ) またはジウリジル酸 ( 「 u u 」 ) の 3 ' 突出部を含み得る。

10

【0173】

s i R N A の安定性を高めるために、3 ' 突出部を分解に対して安定化することもできる。1 つの実施形態では、プリンヌクレオチド、例えばアデノシンまたはグアノシンヌクレオチドを含めることによって突出部を安定化する。あるいは、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば 2 ' - デオキシチミジンによる 3 ' 突出部内のウリジンヌクレオチドの置換は耐容され、RNA i 分解の効率に影響を及ぼさない。特に、2 ' - デオキシチミジン内に 2 ' - ヒドロキシルが存在しないことは、組織培養培地中での 3 ' 突出部のヌクレアーゼ耐性を有意に増強する。

20

【0174】

s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖は、2 つの相補的な一本鎖 RNA 分子を含み得るか、または 2 つの相補的な部分が塩基対合し、一本鎖「ヘアピン」領域によって共有結合で連結されている単一分子を含み得る。すなわち、センス領域とアンチセンス領域はリンカー分子を介して共有結合で連結され得る。リンカー分子は、ポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリナーであり得る。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、後者のタイプの s i R N A 分子のヘアピン領域は、「ダイサー」タンパク質 ( またはその等価物 ) によって細胞内で切断され、2 つの個別の塩基対合 RNA 分子の s i R N A を形成すると考えられる。

30

【0175】

本明細書で使用される場合、「標的 mRNA」は、下方調節の標的である RNA 分子を指す。

【0176】

p o l I I I プロモーターからの RNA の発現は、最初の転写ヌクレオチドがプリンである場合にのみ効率的であると考えられるので、標的とする部位を変化させずに p o l I I I 発現ベクターから s i R N A を発現させることができる。

【0177】

本発明による s i R N A は、標的 mRNA 配列 ( 「標的配列」 ) のいずれかにおける約 19 ~ 25 個の連続するヌクレオチドの任意のストレッチを標的とすることができる。s i R N A の標的配列を選択するための技術は、例えば、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、2002年10月11日に改訂された、Tuschl T. et al., "The siRNA User Guide" に示されている。"The siRNA User Guide" は、ワールドワイドウェブ上の Dr. Thomas Tuschl, Laboratory of RNA Molecular Biology, Rockefeller University, New York, USA によって運営されているウェブサイト入手可能であり、the Rockefeller University のウェブサイトアクセスして、「siRNA」のキーワードで検索することによって見出すことができる。したがって、本発明の s i R N A のセンス鎖は、標的 mRNA 内の約 19 ~ 約 25 ヌクレオチドの任意の連続するストレッチと実質的に同一のヌクレオチド配列を含む。

40

50

## 【0178】

一般に、標的 mRNA 上の標的配列は、好ましくは開始コドンから 50 ~ 100 ヌクレオチド下流（すなわち、3' 方向）から始まる、標的 mRNA に対応する所与の cDNA 配列から選択できる。標的配列は、しかし、5' もしくは 3' 非翻訳領域、または開始コドンの近傍の領域に位置し得る。

## 【0179】

s i R N A は、当業者の公知の多くの技術を用いて入手できる。例えば、s i R N A は、化学合成することができるかまたは当分野で公知の方法を用いて、例えばその開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、T u s c h l e t a l . の米国特許出願公開第 2002 / 0086356 号に記載されているショウジョウバエ ( D r o s o p h i l a ) インピトク系を用いて組換え生産することができる。

10

## 【0180】

好ましくは、s i R N A は、適切に保護されたリボヌクレオシドホスホルアミダイトおよび従来の DNA / RNA 合成装置を用いて化学合成される。s i R N A は、2 個の別々の相補的な RNA 分子として、または 2 つの相補的な領域を有する 1 個の RNA 分子として合成することができる。

## 【0181】

あるいは、s i R N A はまた、任意の適切なプロモーターを使用して組換え環状または直鎖状 DNA プラスミドから発現させることができる。そのような実施形態は、本明細書で s i R N A の投与または医薬組成物への s i R N A の組込みに言及する場合に、本発明に従って包含される。プラスミドから本発明の s i R N A を発現するための適切なプロモーターは、例えば U 6 または H 1 R N A p o l I I I プロモーター配列およびサイトメガロウイルスプロモーターを含む。

20

## 【0182】

他の適切なプロモーターの選択は当分野の技術範囲内である。本発明の組換えプラスミドは、特定の組織または特定の細胞内環境における s i R N A の発現のための誘導的プロモーターまたは調節可能なプロモーターも含むことができる。

## 【0183】

組換えプラスミドから発現される s i R N A は、培養細胞発現系から標準的な技術によって単離され得るか、または細胞内で発現され得る。s i R N A をインピボで細胞に送達するための組換えプラスミドの使用を以下でより詳細に論じる。s i R N A は、2 個の別々の相補的な RNA 分子として、または 2 つの相補的な領域を有する 1 個の RNA 分子として組換えプラスミドから発現され得る。

30

## 【0184】

s i R N A を発現するのに適したプラスミドの選択、s i R N A を発現するための核酸配列をプラスミドに挿入する方法、および対象とする細胞に組換えプラスミドを送達する方法は、当分野の技術範囲内である。

## 【0185】

s i R N A はまた、インピボで組換えウイルスベクターから細胞内で発現され得る。組換えウイルスベクターは、s i R N A をコードする配列および s i R N A 配列を発現するための任意の適切なプロモーターを含む。組換えウイルスベクターは、特定の組織または特定の細胞内環境における s i R N A の発現のための誘導的プロモーターまたは調節可能なプロモーターも含み得る。s i R N A は、2 個の別々の相補的な RNA 分子として、または 2 つの相補的な領域を有する 1 個の RNA 分子として組換えウイルスベクターから発現され得る。

40

## 【0186】

「ペプチド」という用語は、オリゴペプチドおよびポリペプチドを含み、ペプチド結合によって共有結合で連結された 2 個以上、好ましくは 3 個以上、好ましくは 4 個以上、好ましくは 6 個以上、好ましくは 8 個以上、好ましくは 10 個以上、好ましくは 13 個以上、好ましくは 16 個以上、好ましくは 21 個以上、および好ましくは 8、10、20、3

50

0、40または50個まで、特に100個までのアミノ酸を含む物質を指す。「タンパク質」という用語は、大きなペプチド、好ましくは100個を超えるアミノ酸残基を有するペプチドを指すが、一般に「ペプチド」と「タンパク質」という用語は同義語であり、本明細書では交換可能に使用される。

【0187】

好ましくは、本発明に従って述べるタンパク質およびペプチドは単離されている。「単離されたタンパク質」または「単離されたペプチド」という用語は、タンパク質またはペプチドがその天然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ペプチドは、基本的に精製された状態であり得る。「基本的に精製された」という用語は、タンパク質またはペプチドが、自然界でまたはインビボで結合している他の物質を基本的に含まないことを意味する。

10

【0188】

そのようなタンパク質およびペプチドは、例えば抗体の作製において、および免疫学的アッセイもしくは診断アッセイにおいて、または治療薬として使用し得る。本発明に従って述べるタンパク質およびペプチドは、組織または細胞ホモジネートなどの生物学的試料から単離することができ、また、多くの原核生物または真核生物発現系においても組換え発現され得る。

【0189】

本発明のために、タンパク質もしくはペプチドまたはアミノ酸配列の「変異体」は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸欠失変異体および/またはアミノ酸置換変異体を包含する。

20

【0190】

アミノ酸挿入変異体は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端融合ならびに特定のアミノ酸配列における単一アミノ酸または2個以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変異体の場合は、1個以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列内の特定の部位に挿入されるが、生じる産物の適切なスクリーニングを伴うランダムな挿入も可能である。

【0191】

アミノ酸欠失変異体は、配列からの1個以上のアミノ酸の除去を特徴とする。

【0192】

アミノ酸置換変異体は、配列内の少なくとも1個の残基が除去され、別の残基がその位置に挿入されていることを特徴とする。相同なタンパク質またはペプチドの間で保存されていないアミノ酸配列内の位置に修飾が存在することおよび/またはアミノ酸を類似の性質を有する他のアミノ酸で置換することが好ましい。

30

【0193】

好ましくは、タンパク質変異体におけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち類似の荷電または非荷電アミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、その側鎖が関連するアミノ酸のファミリーの1つの置換を含む。天然に存在するアミノ酸は一般に4つのファミリーに分けられる：酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リシン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性アミノ酸（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、および非荷電極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、シスチン、セリン、トレオニン、チロシン）。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、時に芳香族アミノ酸として一緒に分類されることもある。

40

【0194】

好ましくは、所与のアミノ酸配列と前記所与のアミノ酸配列の変異体であるアミノ酸配列との間の類似性の程度、好ましくは同一性の程度は、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%または最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%である。類似性または同一性の程度は、好ましくは少なくとも約20、少なくとも約40、少なくとも約60、少なくとも約80、少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも

50

約140、少なくとも約160、少なくとも約200または250アミノ酸の領域に対して与えられる。好ましい実施形態では、類似性または同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長に対して与えられる。

【0195】

本明細書で述べるペプチドおよびアミノ酸変異体は、公知のペプチド合成技術を用いて、例えば固相合成(Merrifield, 1964)および類似の方法によってまたは組換えDNA操作によって容易に作製し得る。置換、挿入または欠失を有するタンパク質およびペプチドを作製するためのDNA配列の操作は、例えばSambrook et al. (1989)の中で詳細に説明されている。

【0196】

本発明によれば、タンパク質およびペプチドの「誘導體」は、タンパク質およびペプチドの修飾形態である。そのような修飾は、任意の化学修飾を包含し、タンパク質またはペプチドに関連する任意の分子、例えば炭水化物、脂質および/またはタンパク質もしくはペプチドの単一または複数の置換、欠失および/または付加を含む。「誘導體」という用語はまた、前記タンパク質およびペプチドのすべての機能性の化学的等価物に及ぶ。好ましくは、修飾ペプチドは増大した安定性および/または増大した免疫原性を有する。

【0197】

本発明によれば、核酸もしくはアミノ酸配列の変異体、実質的に対応するアミノ酸配列またはペプチドのフラグメントもしくは誘導體は、好ましくは、それぞれ、それが由来する核酸もしくはアミノ酸配列、アミノ酸配列またはペプチドの機能的特性を有する。そのような機能的特性は、抗体との相互作用、他の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。1つの実施形態では、核酸もしくはアミノ酸配列の変異体、実質的に対応するアミノ酸配列またはペプチドのフラグメントもしくは誘導體は、それぞれ、それが由来する核酸もしくはアミノ酸配列、アミノ酸配列またはペプチドと免疫学的に等価である。1つの実施形態では、機能的特性は免疫学的特性である。特定の特性は、MHC分子と複合体を形成し、適切な場合、好ましくは細胞傷害性細胞またはヘルパーT細胞を刺激することによって、免疫応答を生じさせる能力である。腫瘍抗原のフラグメントは、好ましくは腫瘍抗原の少なくとも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個の連続するアミノ酸の配列を含む。腫瘍抗原のフラグメントは、好ましくは腫瘍抗原の8個まで、特に10個まで、12個まで、15個まで、20個まで、30個までまたは55個までの連続するアミノ酸の配列を含む。腫瘍抗原のフラグメントは、好ましくは、MHC分子と共に提示され得、そのように提示された場合、細胞応答を刺激することができる腫瘍抗原の一部である。

【0198】

腫瘍抗原の好ましいフラグメントは、インビボでの細胞傷害性Tリンパ球の刺激に適するが、エキスピボでの治療的養子移入のための、増殖され、刺激されたTリンパ球の生産にも適する。

【0199】

標的タンパク質に特異的に結合する特異的抗体を含有する抗血清は、様々な標準的工程によって調製できる；例えば、“Monoclonal Antibodies: A Practical Approach” by Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9；“Antibodies: A Laboratory Manual” by Ed Harlow, David Lane, ISBN: 0879693142および“Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO” by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN 0879695447参照。それにより、複合体膜タンパク質をそれらの天然形態で認識するアフィンおよび特異的抗体を作製することも可能である(Azorsa et al., J. Immunol. Methods 229: 35-48, 1

10

20

30

40

50

999; Anderson et al., J. Immunol. 143:1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods 234:107-116, 2000)。これは、治療的に使用される予定の抗体の作製のために特に適切であるが、多くの診断適用にも適切である。これに関して、全タンパク質、細胞外部分配列ならびに生理的に折りたたまれた形態で標的分子を発現する細胞で免疫することが可能である。

【0200】

モノクローナル抗体は、伝統的にハイブリドーマ技術を用いて作製される（技術的詳細に関しては：“Monoclonal Antibodies: A Practical Approach” by Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; “Antibodies: A Laboratory Manual” by Ed Harlow, David Lane, ISBN: 0879693142; “Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO” by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447参照）。

10

【0201】

抗体分子の小さな部分であるパラトープだけが、抗体のそのエピトープへの結合に関与することは公知である（Clark, W. R. (1986), The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991), Essential Immunology, 7th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford参照）。pFc'およびFc領域は、例えば、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合には関与しない。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントと称される、pFc'領域が酵素的に除去されたまたはpFc'領域なしで生成された抗体は、完全な抗体の両方の抗原結合部位を担持する。同様に、Fabフラグメントと称される、Fc領域が酵素的に除去されたまたは前記Fc領域なしで生成された抗体は、無傷抗体分子の一方の抗原結合部位を担持する。さらに、Fabフラグメントは、共有結合で連結された抗体の軽鎖および、Fdと称される、前記抗体の重鎖の一部から成る。Fdフラグメントは抗体特異性の主要決定基であり（1つのFdフラグメントは、抗体の特異性を変化させずに10までの異なる軽鎖と結合できる）、Fdフラグメントは、単離された場合、エピトープに結合する能力を保持する。

20

30

【0202】

抗体の抗原結合部分内に位置するのは、抗原エピトープと直接相互作用する相補性決定領域(CDR)およびパラトープの三次構造を維持するフレームワーク領域(FR)である。IgG免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の両方のFdフラグメントが、各々の場合に3つの相補性決定領域(CDR1~CDR3)によって分けられた4つのフレームワーク領域(FR1~FR4)を含む。CDR、特にCDR3領域、さらにより詳細には重鎖のCDR3領域が抗体特異性に大きく関与する。

【0203】

哺乳動物抗体の非CDR領域を、もとの抗体のエピトープに対する特異性を保持しつつ、同じかまたは異なる特異性を有する抗体の類似領域によって置換できることは公知である。これは、非ヒトCDRをヒトFRおよび/またはFc/pFc'領域に共有結合で連結して機能的抗体を生成する、「ヒト化」抗体の開発を可能にした。

40

【0204】

別の例として、国際公開第WO92/04381号は、マウスFR領域の少なくとも一部がヒト起源のFR領域で置換されたヒト化マウスRSV抗体の生産と使用を述べている。抗原結合能力を有する無傷抗体のフラグメントを含む、この種の抗体は、しばしば「キメラ」抗体と称される。

【0205】

50

本発明によれば、「抗体」という用語は、抗体の F ( a b ' ) <sub>2</sub>、F a b、F v および F d フラグメント、F c および / または F R および / または C D R 1 および / または C D R 2 および / または軽鎖 C D R 3 領域が相同なヒトまたは非ヒト配列で置換されているキメラ抗体、F R および / または C D R 1 および / または C D R 2 および / または軽鎖 C D R 3 領域が相同なヒトまたは非ヒト配列で置換されているキメラ F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメント抗体、F R および / または C D R 1 および / または C D R 2 および / または軽鎖 C D R 3 領域が相同なヒトまたは非ヒト配列で置換されているキメラ F a b フラグメント抗体、ならびに F R および / または C D R 1 および / または C D R 2 領域が相同なヒトまたは非ヒト配列で置換されているキメラ F d フラグメント抗体も包含する。「抗体」という用語はまた、「一本鎖」抗体も含む。

10

## 【 0 2 0 6 】

腫瘍抗原に特異的に結合する非抗体タンパク質およびペプチドは、本発明に従って使用された場合、抗体を置換し得る。この種の結合物質は、例えば溶液中で固定化形態にてまたはファージディスプレイライブラリとして簡単に作製され得る縮重ペプチドライブラリによって提供され得る。同様に 1 個以上のアミノ酸を有するペプチドのコンビナトリアルライブラリを作製することが可能である。ペプチドおよび非ペプチド合成残基のライブラリも作製し得る。

## 【 0 2 0 7 】

抗体は、腫瘍抗原を発現する細胞および組織を提示するための治療標識にも連結し得る。抗体はまた、治療エフェクター部分にも連結し得る。

20

## 【 0 2 0 8 】

検出可能標識は、( i ) 検出可能なシグナルを提供する ; ( i i ) 第一もしくは第二の標識によって提供される検出可能なシグナルを修飾するように第二標識と相互作用する、例えば F R E T ( 蛍光共鳴エネルギー転移 ) ; ( i i i ) 電荷、疎水性、形状もしくは他の物理的パラメータによって移動度、例えば電気泳動移動度に影響を及ぼす、または ( i v ) 捕捉部分、例えば親和性、抗体 / 抗原もしくはイオン錯体形成を提供する、ように機能する任意の標識を包含する。蛍光標識、発光標識、発色団標識、放射性同位体標識、同位体標識、好ましくは安定な同位体標識、同重体標識、酵素標識、粒子標識、特に金属粒子標識、磁性粒子標識、ポリマー粒子標識、ビオチンなどの有機低分子、受容体のリガンドまたは細胞接着タンパク質もしくはレクチンなどの結合分子、結合物質の使用によって検出できる核酸および / またはアミノ酸残基を含む標識配列等のような構造体は、標識として適切である。検出可能標識は、非限定的に、硫酸バリウム、イオセタム酸、イオパノ酸、カルシウムイボデート、ジアトリゾ酸ナトリウム、ジアトリゾ酸メグルミン、メトリザミド、チロパノ酸ナトリウム、ならびにフッ素 - 1 8 および炭素 - 1 1 などの陽電子放射体、ヨウ素 - 1 2 3、テクネチウム - 9 9 m、ヨウ素 - 1 3 1 およびインジウム - 1 1 1 などの放射体、フッ素およびガドリニウムなどの核磁気共鳴用の核種を含む放射性診断物質を包含する。

30

## 【 0 2 0 9 】

本発明によれば、「治療エフェクター分子」という用語は、治療作用を及ぼし得る任意の分子を意味する。本発明によれば、治療エフェクター分子は、好ましくは 1 つ以上の腫瘍抗原を発現する細胞へと選択的に誘導され、抗癌剤、放射性ヨウ素標識化合物、毒素、細胞増殖抑制性または細胞溶解性薬剤等を包含する。抗癌剤は、例えばアミノグルテチミド、アザチオプリン、硫酸プレオマイシン、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、シクロスポリン、シタラビジン ( c y t a r a b i d i n e )、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビン ( d a u n o r u b i n )、ドキシソルピシン、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、メルカプトプリン、メソトレキサート、ミトタン、塩酸プロカルバジン、チオグアニン、硫酸ピンラスチンおよび硫酸ピンクリスチンを含む。他の抗癌剤は、例えば Goodman and Gilman, " The Pharmacological Basis of Therapeutics ", 8th Edition, 19

40

50

90, McGraw-Hill, Inc., 特にChapter 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi and Bruce A. Chabner))に記載されている。毒素は、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質などのタンパク質、コレラ毒素、百日咳毒素、リシン、ゲロニン、アプリン、ジフテリア外毒素またはシュードモナス (Pseudomonas) 外毒素であり得る。毒素残基はまた、コバルト-60などの高エネルギー放出放射性核種であり得る。

【0210】

「主要組織適合遺伝子複合体」または「MHC」という用語は、MHCクラスIおよびクラスIIを包含し、すべての脊椎動物に存在する遺伝子の複合体に関する。MHCタンパク質または分子は、ペプチドに結合し、T細胞受容体 (TCR) による認識のためにそれらを提示することにより、正常免疫反応におけるリンパ球と抗原提示細胞の間のシグナル伝達に關与する。MHC分子は、細胞内プロセッシング区画においてペプチドに結合し、T細胞による認識のためにこれらのペプチドを抗原提示細胞の表面に提示する。HLAとも称されるヒトMHC領域は、第6番染色体上に位置し、クラスIおよびクラスII領域を含む。本発明のすべての態様の1つの好ましい実施形態では、MHC分子はHLA分子である。

10

【0211】

本明細書で使用される「低減する」または「阻害する」は、参照試料 (例えば siRNA で処理していない試料) と比較してレベル、例えばタンパク質または mRNA のレベルの全体的な低下、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは75%以上の全体的低下を生じさせる能力を意味する。RNA またはタンパク質発現のこの低減または阻害は、標的 mRNA 切断または分解を介して起こり得る。タンパク質発現または核酸発現に関するアッセイは当分野で公知であり、例えば、タンパク質発現については ELISA、ウェスタンブロット分析、RNA についてはノーザンブロット法または RNアーゼプロテクションアッセイを含む。

20

【0212】

本発明によれば、「患者」という用語は、ヒト、非ヒト霊長動物または別の動物、特に哺乳動物、例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはマウスおよびラットなどのげっ歯動物を意味する。特に好ましい実施形態では、患者はヒトである。

【0213】

本発明によれば、「増大している」または「増大している量」という用語は、好ましくは少なくとも10%、特に少なくとも20%、少なくとも50%または少なくとも100%の増大を指す。物質の量も、試験試料では検出可能であるが参照試料中には存在しないまたは検出不能である場合、参照試料と比較して生物学的試料などの試験試料中で増大している。

30

【0214】

本発明によれば、「腫瘍」または「腫瘍疾患」という用語は、細胞の異常増殖によって形成される腫脹または病変 (新生細胞または腫瘍細胞と呼ばれる) を指す。「腫瘍細胞」とは、急速で制御されない細胞増殖によって成長し、新たな増殖を開始させた刺激が停止した後も成長し続ける異常細胞を意味する。腫瘍は、構造機構および正常組織との機能的協調の部分的または完全な欠如を示し、通常、良性、前悪性または悪性であり得る明確な組織塊を形成する。

40

【0215】

好ましくは、本発明による腫瘍疾患は、癌疾患、すなわち悪性疾患であり、腫瘍細胞は癌細胞である。好ましくは、腫瘍疾患もしくは癌疾患は、本発明に従って同定される腫瘍核酸および/もしくは腫瘍抗原が発現されるもしくは異常発現される細胞を特徴とし、ならびに/または腫瘍細胞もしくは癌細胞は、本発明に従って同定される腫瘍核酸および/もしくは腫瘍抗原の発現もしくは異常発現を特徴とする。好ましくは、腫瘍疾患、癌疾患、腫瘍細胞または癌細胞は、本発明に従って同定される腫瘍抗原をクラスI MHCと共に提示することを特徴とする。

50

## 【0216】

「異常発現」は、本発明によれば、健常個体における状態と比較して、発現が変化している、好ましくは増大していることを意味する。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%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%、少なくとも10000%またはさらにそれ以上の増加を指す。1つの実施形態では、発現は疾患組織においてのみ認められ、健常組織での発現は抑制されている。

## 【0217】

本発明による「腫瘍」という用語は、中枢神経系の腫瘍疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫を含む。本発明による「癌」という用語は、中枢神経系の癌疾患、例えば神経膠腫、特に神経膠芽腫を含む。

10

## 【0218】

「神経膠腫」という用語は、脳または脊椎で発生する腫瘍の種類に関する。これは、神経膠細胞から生じるため、神経膠腫と呼ばれる。神経膠腫の最も一般的な部位は脳である。神経膠腫は、すべての脳および中枢神経系腫瘍の約30%ならびにすべての悪性脳腫瘍の80%を占める。

## 【0219】

神経膠腫は、組織学的特徴を共有する細胞の特定の種類に従って命名されるが、必ずしもそれらを起源とするわけではない。神経膠腫の主な種類には、脳室上衣細胞腫（脳室上衣細胞）、星状細胞腫（星状細胞）（多形性神経膠芽腫は悪性星状細胞腫であり、成人において最も一般的な原発性脳腫瘍である）、乏突起神経膠腫（乏突起神経膠細胞）、脳幹神経膠腫（脳幹において発症する）、視神経神経膠腫（視神経内または視神経の周囲で発症する）、および混合性神経膠腫（例えば乏突起星状細胞腫、異なる種類の神経膠からの細胞を含む）が含まれる。

20

## 【0220】

脳神経膠腫の処置は、その位置、細胞型および悪性度に依存する。しばしば、処置は、手術、放射線療法および化学療法を用いた併用アプローチである。脊髄腫瘍は手術と放射線によって処置することができる。テモゾロミドは、脳-血液関門を有効に越えることができる化学療法剤であり、現在は悪性度の高い腫瘍の治療において使用されている。神経膠腫はまれにしか治癒可能ではない。高悪性度の神経膠腫を有する患者の予後は一般に不良であり、高齢患者に関しては特に不良である。多形性神経膠芽腫は、診断後の平均生存期間が12か月未満であるが、これは、より最近の処置で14か月まで延長されている。

30

## 【0221】

グレードIV星状細胞腫としても知られる、「多形性神経膠芽腫」（GBM）、WHO分類名「神経膠芽腫」という用語は、神経膠細胞を含む、ヒトにおける最も一般的で最も攻撃的な悪性原発性脳腫瘍であり、すべての機能性組織脳腫瘍症例の52%およびすべての頭蓋内腫瘍の20%を占める。GBMは2つの変形：巨細胞神経膠芽腫および神経膠肉腫を示す。

## 【0222】

処置は、化学療法、放射線および手術を含み得る。標準治療の放射線およびテモゾロミドでの化学療法による平均生存期間は15か月間である。処置なしでの平均生存期間は4か月半である。手術が依然として標準治療である。

40

## 【0223】

「転移」とは、癌細胞の、その最初の部位から身体の別の部分への拡大を意味する。転移の形成は非常に複雑な過程であり、原発性腫瘍からの悪性細胞の分離、細胞外マトリックスの侵襲、体腔および脈管に入るための内皮基底膜の貫入、そして次に、血液によって輸送された後、標的器官の浸潤に依存する。最後に、標的部位における新たな腫瘍、すなわち続発性腫瘍または転移性腫瘍の成長は血管新生に依存する。腫瘍転移は、しばしば原発性腫瘍が除去された後でも起こり、これは、腫瘍細胞または腫瘍成分が残存し、転移能を発現し得るからである。1つの実施形態では、本発明による「転移」という用語は、原

50

発性腫瘍および所属リンパ節系から離れた転移に関連する「遠隔転移」に関する。

【0224】

続発性または転移性腫瘍の細胞は、最初の腫瘍における細胞に類似する。これは、例えば卵巣癌が肝臓に転移した場合、続発性腫瘍は異常な肝細胞ではなく異常卵巣細胞で構成されることを意味する。肝臓における腫瘍は、その結果、肝臓癌ではなく転移性卵巣癌と呼ばれる。

【0225】

再燃または再発は、ある人が過去に罹患した状態に再び罹患する場合に起こる。例えば、患者が腫瘍疾患に罹患したことがあり、前記疾患の処置を受けて成功したが、再び前記疾患を発症した場合、前記の新たに発症した疾患は再燃または再発と見なされ得る。しかし、本発明によれば、腫瘍疾患の再燃または再発は、最初の腫瘍疾患の部位でも起こり得るが、必ずしも最初の部位で起こるとは限らない。したがって、例えば、患者が卵巣腫瘍に罹患し、処置を受けて成功したことがある場合、再燃または再発は、卵巣腫瘍の発生または卵巣とは異なる部位での腫瘍の発生であり得る。腫瘍の再燃または再発は、腫瘍が最初の腫瘍の部位とは異なる部位でならびに最初の腫瘍の部位で発生する状況も包含する。好ましくは、患者が処置を受けた最初の腫瘍は原発性腫瘍であり、最初の腫瘍の部位とは異なる部位の腫瘍は続発性または転移性腫瘍である。

【0226】

本発明によれば、生物学的試料は、体液を含む組織試料および/または細胞試料であってよく、パンチ生検を含む組織生検、および血液、気管支吸引液、痰、尿、糞便または他の体液を採取することなどの従来の方法で入手し得る。1つの実施形態では、生物学的試料は、癌に罹患している疑いがある組織から得た試料である。1つの実施形態では、生物学的試料は、腫瘍試料、例えば腫瘍から得た、腫瘍細胞を含有する試料である。本発明によれば、「生物学的試料」という用語は、加工された生物学的試料、例えば生物学的試料の画分または単離物、例えば核酸およびペプチド/タンパク質単離物も包含する。

【0227】

本発明に従って述べる医薬組成物および処置の方法は、本明細書で述べる疾患を治療的に処置するまたは予防する免疫またはワクチン接種のためにも使用し得る。本発明によれば、「免疫」または「ワクチン接種」という用語は、好ましくは抗原に対する免疫応答の増大または活性化に関する。癌への免疫効果を試験するために動物モデルを使用す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、腫瘍を生じさせ得る。癌細胞への効果（例えば腫瘍サイズの縮小）を、動物に投与した作用物質による免疫の有効性の尺度として測定し得る。

【0228】

免疫またはワクチン接種のための組成物の一部として、好ましくは本明細書で述べる1つ以上の作用物質を、免疫応答を誘導するためまたは免疫応答を増大させるために1つ以上のアジュバントと共に投与する。アジュバントは免疫応答を増強する物質である。アジュバントは、抗原貯蔵所を提供し（細胞外にまたはマクロファージ中に）、マクロファージを活性化するおよび/または特定のリンパ球を刺激することによって免疫応答を増強し得る。アジュバントは公知であり、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; 国際公開第WO96/33739号)、QS7、QS17、QS18およびQS-L1 (Soetal., Mol. Cells 7:178-186, 1997)、フロイント不完全アジュバント、フロイント完全アジュバント、ビタミンE、モンタニド、ミョウバン、CpGオリゴヌクレオチド (Kreiget al., Nature 374:546-9, 1995参照)ならびに生分解性油から調製される様々な油中水型エマルション、例えばスクアレンおよび/またはトコフェロールを包含する。好ましくは、本発明によれば、ペプチドをDQS21/MPLとの混合物中で投与する。DQS21対MPLの比率は、典型的には約1:10~10:1、好ましくは約1:5~5:1、特に約1:1である。

10

20

30

40

50

ヒトへの投与のためには、ワクチン製剤は、典型的には約  $1 \mu\text{g}$  ~ 約  $100 \mu\text{g}$  の範囲内の D Q S 2 1 および M P L を含有する。

【0229】

患者の免疫応答を刺激する他の物質も投与し得る。例えば、リンパ球へのサイトカインの調節特性により、ワクチン接種においてサイトカインを使用することが可能である。そのようなサイトカインには、例えば、ワクチンの防御作用を高めることが示されたインターロイキン12 ( I L - 1 2 ) ( S c i e n c e 2 6 8 : 1 4 3 2 - 1 4 3 4 , 1 9 9 5 参照 )、G M - C S F および I L - 1 8 が含まれる。

【0230】

免疫応答を増強し、それゆえワクチン接種において使用し得る多くの化合物が存在する。前記化合物には、B 7 - 1 および B 7 - 2 ( それぞれ C D 8 0 および C D 8 6 ) などのタンパク質または核酸の形態で提供される共刺激分子が含まれる。

【0231】

ペプチドは、それ自体公知の方法で投与し得る。1つの実施形態では、核酸をエクスピボ法によって、すなわち患者から細胞を取り出し、核酸を組み込むために前記細胞を遺伝的に修飾して、改変した細胞を患者に再導入することによって投与する。これは一般に、遺伝子の機能的コピーをインビトロで患者の細胞に導入することおよび遺伝的に改変した細胞を患者に再導入することを含む。遺伝子の機能的コピーは、遺伝的に改変した細胞において遺伝子が発現されることを可能にする調節エレメントの機能的制御下にある。トランスフェクションおよび形質導入の方法は当業者に公知である。

【0232】

本発明はまた、例えばウイルスおよび標的制御リボソームなどのベクターを使用することによってインビボで核酸を投与することも提供する。

【0233】

好ましい実施形態では、核酸を投与するためのウイルスまたはウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスおよび弱毒化ボックスウイルスを含むボックスウイルス、セムリキ森林ウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルスおよびTyウイルス様粒子から成る群より選択される。アデノウイルスおよびレトロウイルスが特に好ましい。レトロウイルスは、典型的には複製欠損である(すなわち感染性粒子を生成することができない)。

【0234】

インビトロまたはインビボで核酸を細胞に導入する方法には、核酸のリン酸カルシウム沈殿物のトランスフェクション、D E A E と結合した核酸のトランスフェクション、対象とする核酸を担持する上記ウイルスでのトランスフェクションまたは感染、リボソーム媒介トランスフェクション等が含まれる。特定の実施形態では、核酸を特定の細胞に向かわせることが好ましい。そのような実施形態では、核酸を細胞に投与するために使用される担体(例えばレトロウイルスまたはリボソーム)は、結合した標的制御分子を有し得る。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受容体に対するリガンドなどの分子を核酸担体に組み込み得るまたは核酸担体に結合し得る。好ましい抗体は、腫瘍抗原に選択的に結合する抗体を含む。リボソームを介した核酸の投与を所望する場合は、標的の制御および/または取込みを可能にするために、エンドサイトーシスに関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質をリボソーム製剤に組み込み得る。そのようなタンパク質には、特定の細胞型に特異的なキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、インターナライズされるタンパク質に対する抗体、細胞内部位を指向するタンパク質等が含まれる。

【0235】

本発明の治療的に活性な化合物は、注射または注入を含む、任意の従来経路によって投与し得る。投与は、例えば経口的、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下的または経皮的に実施し得る。好ましくは、抗体は肺エアロゾルとして治療的に投与される。アンチセンス核酸は、好ましくは徐放性静脈内投与によって投与される。

10

20

30

40

50

## 【0236】

本発明の組成物は有効量で投与される。「有効量」は、単独でまたはさらなる用量と共に所望の反応または所望の効果を達成する量を指す。特定の疾患または特定の状態の処置の場合、所望の反応は、好ましくは疾患の進行の阻止に関する。これは、疾患の進行を遅らせること、特に疾患の進行を妨げるまたは逆転させることを含む。疾患または状態の処置における所望の反応はまた、前記疾患または前記状態の発症の遅延または発症の防止であり得る。本発明によれば、癌の診断または処置は、既に形成されたまたは今後形成される癌転移の診断または処置も含み得る。本発明によれば、「処置」という用語は、治療的処置および予防的処置、すなわち予防を含む。

## 【0237】

本発明の組成物の有効量は、処置される状態、疾患の重症度、患者の年齢、生理的状态、体格および体重を含む患者の個別パラメータ、処置の期間、付随する治療の種類（存在する場合）、特定の投与経路および同様の因子に依存する。したがって、投与される本発明の組成物の用量は、そのような様々なパラメータに依存し得る。患者における反応が初期用量で不十分である場合は、より高用量（または異なる、より限局された投与経路によって達成される効果的により高い用量）を使用し得る。

## 【0238】

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治療活性物質の有効量を含有する。

## 【0239】

一般に、 $1\text{ ng} \sim 1\text{ mg}$ 、好ましくは $10\text{ ng} \sim 100\text{ }\mu\text{g}$ のペプチドの用量を製剤し、投与する。核酸（DNAおよびRNA）の投与を所望する場合は、 $1\text{ ng} \sim 0.1\text{ mg}$ の用量を製剤し、投与し得る。

## 【0240】

本発明の医薬組成物は、一般に医薬的に適合性の量でおよび医薬的に適合性の製剤中で投与される。「医薬的に適合性」という用語は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない非毒性物質を指す。この種の製剤は、通常、塩、緩衝物質、防腐剤、担体、アジュバントなどの補足的免疫増強物質、例えば CpG オリゴヌクレオチド、サイトカイン、ケモカイン、サポニン、GM-CSF および / または RNA ならびに、適切な場合は、他の治療活性化合物を含有し得る。薬剤中で使用される場合、塩は医薬的に適合性であるべきである。しかし、医薬的に適合性ではない塩も、医薬的に適合性の塩を調製するために使用してもよく、本発明に包含される。この種の薬理的および医薬的に適合性の塩には、非限定的に、以下の酸：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、コハク酸等から調製されるものが含まれる。医薬的に適合性の塩はまた、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩として、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も調製され得る。

## 【0241】

本発明の医薬組成物は、医薬的に適合性の担体を含有し得る。「担体」という用語は、適用を容易にするために活性成分に組み合わせる、天然または合成の有機または無機成分を指す。本発明によれば、「医薬的に適合性の担体」という用語は、患者への投与に適する、1つ以上の適合性の固体または液体充填剤、希釈剤または被包物質を包含する。本発明の医薬組成物の成分は、通常、所望の医薬効果を実質的に損なう相互作用が生じない成分である。

## 【0242】

本発明の医薬組成物は、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などの適切な緩衝物質を含有し得る。

## 【0243】

医薬組成物は、適切な場合は、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ルなどの適切な防腐剤も含有し得る。

## 【0244】

10

20

30

40

50

医薬組成物は、通常、均一剤形で提供され、それ自体公知の方法で調製され得る。本発明の医薬組成物は、例えばカプセル、錠剤、ロゼンジ、溶液、懸濁液、シロップ、エリキシルの形態またはエマルションの形態であり得る。

【0245】

非経口投与に適する組成物は、通常、好ましくは受容者の血液と等張である、活性化化合物の滅菌水性または非水性製剤を含む。適合性の担体および溶媒の例は、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、通常は滅菌固定油が溶液または懸濁液媒質として使用される。

【実施例】

【0246】

本明細書で使用される技術および方法は、本発明において説明されるかまたはそれ自体公知の方法および、例えば Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載されているように実施される。キットおよび試薬の使用を含むすべての方法は、特に指示されない限り製造者の情報に従って実施される。

【0247】

実施例1: COL20A1は神経膠芽腫の高度に特異的なバイオマーカーである

【0248】

神経膠芽腫に対するCOL20A1の特異性を検証するため、脂質に富む組織用の抽出キットを使用してRNAを正常組織または神経膠芽腫試料から抽出した。cDNA合成を、MMLV逆転写酵素およびランダム6量体/オリゴdTプライマーを用いて実施した。COL20A1発現を、プライマー6303 (5' - TTCACGCTCTTCAAGGACGC) および6304 (5' - TGGAAAGTCCTCGGCTGTCAAT) を使用して、定量的リアルタイムPCRを用いて分析し、HPRT (ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) をハウスキーピング遺伝子として使用して相対発現を計算した。

【0249】

この方法を、13の異なる腫瘍実体におけるCOL20A1の発現の分析のために使用する(図1)。神経膠芽腫(図1では脳腫瘍として表示)だけがCOL20A1の強い発現を示し、他のすべての腫瘍実体は、精巢癌の少数の試料を除き、COL20A1の発現を全く示さないかまたは非常に低い発現しか示さない。図2に示すように、転写産物であるCOL20A1(NM\_020882.2、NP\_065933.2)は、40000のカットオフ値を使用した場合は分析した神経膠芽腫の50%において高発現され、多くのGBM患者がCOL20A1を標的とする処置から恩恵を受けることを示唆する。転写産物の腫瘍特異性を、正常組織の大きなセット(n=65)において前記qRT-PCRプロトコルによって分析した。COL20A1は一部の成人の脳領域および脊髄において弱く発現される(図3)。これに対し、ワクチン接種および他の免疫療法アプローチの一般に認められている標的であるERBB2は、一部の脳領域を含む、いくつかの正常組織で高発現(40000より大きい相対発現)を示す(図3)。

【0250】

実施例2: 低い相同性は他のコラーゲンファミリー成員の予想される交差反応性を制限する

【0251】

ヒトCOL20A1オープンリーディングフレームは、136kDaの予測分子量を有する1284アミノ酸のタンパク質をコードする。22アミノ酸のシグナル配列が予測される。COL20A1の他のコラーゲンタンパク質との相同性をBlastによって評価し、他のコラーゲンとの全体的な相同性が低く、最も高いアラインメントスコアはコラーゲン-1(XIV)(COL14A1)およびコラーゲン-1(XII)(COL1

10

20

30

40

50

2 A 1) で認められることを示した (図 4 A)。重要な点として、COL 1 4 A 1 に関して図 4 B に示すように、COL 2 0 A 1 と他のコラーゲンとの間で同一である長いストレッチのアミノ酸は存在せず、それゆえ COL 2 0 A 1 が特異的標的化および分子の検出のために使用できることを示唆する (図 4 B)。

【 0 2 5 2 】

実施例 3 : COL 2 0 A 1 特異的配列は予測 T 細胞エピートープを含む

【 0 2 5 3 】

CD 8 + T リンパ球による COL 2 0 A 1 の標的化能力を調べるため、SYFPEITHI データベースを用いて配列上に存在する HLA - A \* 0 2 : 0 1 エピートープを予測した。COL 2 0 A 1 にユニークな 5 8 の HLA - A \* 0 2 : 0 1 エピートープが検出され (図 5)、COL 2 0 A 1 が T 細胞に基づく治療法に使用できることを示唆した。

10

【 0 2 5 4 】

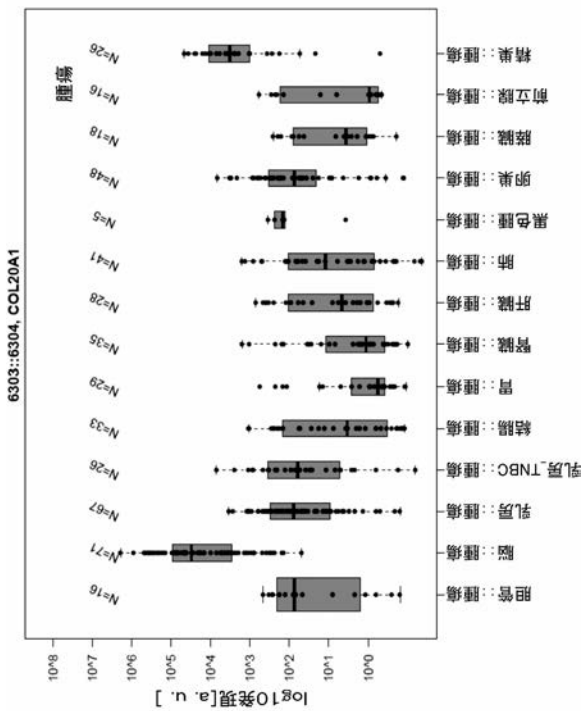
実施例 4 : COL 2 0 A 1 mRNA はヒト細胞から翻訳され得る

【 0 2 5 5 】

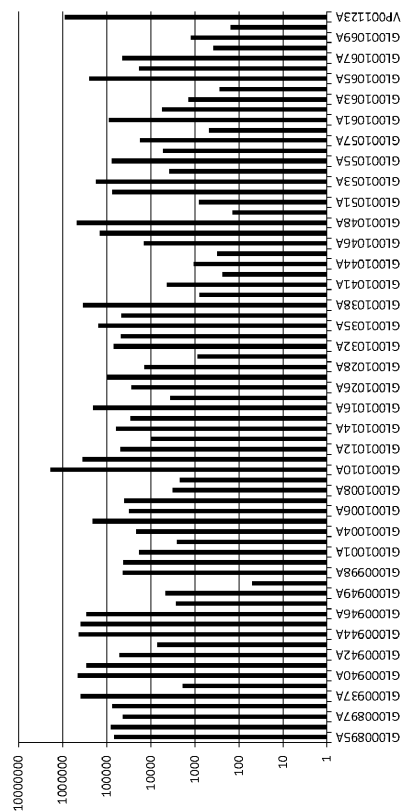
COL 2 0 A 1 をコードする組換え配列を HEK - 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトし、細胞溶解物を、市販の COL 2 0 A 1 特異的抗体 (Sigma) を用いてウェスタンブロット法によって分析した。予想された COL 2 0 A 1 サイズのバンドは、トランスフェクト細胞において検出できるが、モックトランスフェクト細胞では検出できず、COL 2 0 A 1 mRNA がヒト細胞において安定なタンパク質に翻訳され得ることを示す (図 6)。

20

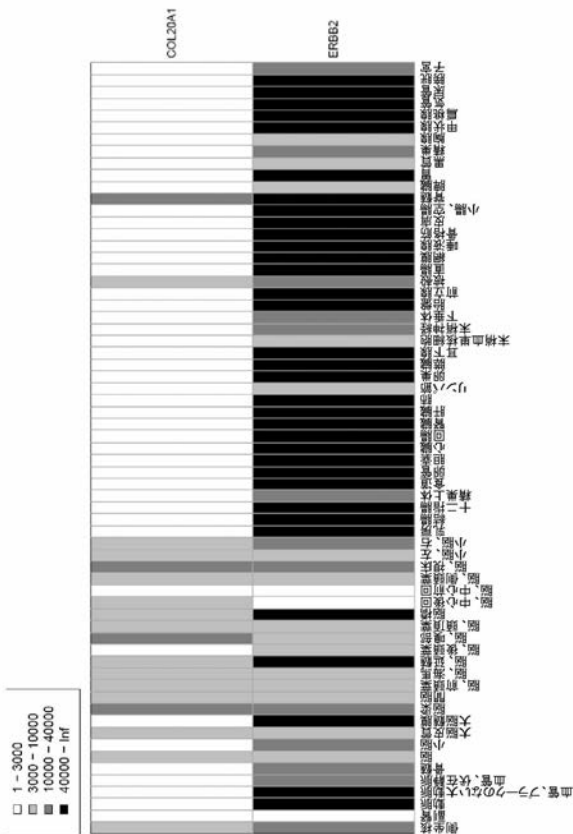
【 図 1 】



【 図 2 】



【図3】



【図4A】

選択配列	説明	最大スコア	同一性	アクセッション番号
ref NP_066933.1	コラーゲン $\alpha$ -1(XIV)鎖前駆体[ヒト]	454	35%	NP_066933.1
ref XP_005251116.1	予測:コラーゲン $\alpha$ -1(XIV)鎖 アイソフォームAX1[ヒト]	453	35%	XP_005251116.1
ref NP_542376.2	コラーゲン $\alpha$ -1(XIV)鎖の 短アイソフォーム前駆体[ヒト]	425	37%	NP_542376.2
ref XP_006715397.1	予測:コラーゲン $\alpha$ -1(XIV)鎖 アイソフォームAX1[ヒト]	424	37%	XP_006715397.1
ref NP_000085.1	コラーゲン $\alpha$ -1(VII)鎖前駆体[ヒト]	239	34%	NP_000085.1
ref XP_006715286.1	予測:コラーゲン $\alpha$ -1(XXI)鎖 アイソフォームAX6[ヒト]	150	29%	XP_006715286.1
ref NP_110447.2	コラーゲン $\alpha$ -1(XXI)鎖前駆体[ヒト]	149	29%	NP_110447.2
ref XP_006715287.1	予測:コラーゲン $\alpha$ -1(XXI)鎖 アイソフォームAX6[ヒト]	143	29%	XP_006715287.1
ref XP_006716576.1	予測:コラーゲン $\alpha$ -1(XXII)鎖 アイソフォームAX2[ヒト]	143	41%	XP_006716576.1
ref NP_690848.1	コラーゲン $\alpha$ -1(XXII)鎖前駆体[ヒト]	142	41%	NP_690848.1
ref XP_005250867.1	予測:コラーゲン $\alpha$ -1(XXII)鎖 アイソフォームAX1[ヒト]	142	41%	XP_005250867.1

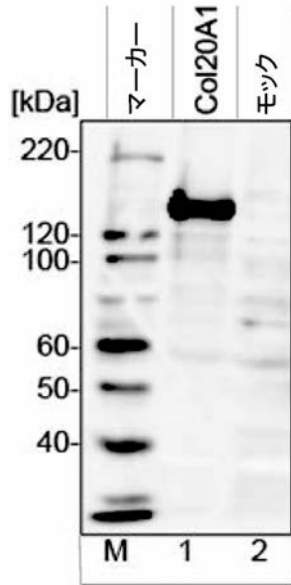
【図4B】

COL20A1	19	ATLGRHQQVAGSLLIAVLPELRLQMKHRESSESSGLVWQVREMGDSEQEVILTKTF	78
COL14A1	23	CTIVGQVAPFPLRLAYNVHSDHIGISNKAERKFGVYKLLVTFPTSRKTNQLNLQNTAT	82
COL20A1	79	KATVSGLSFSEKSYLQIFELGSGRF LLASREVEIDLRKSSLDASQRP LSGAPEPTF	138
COL14A1	83	KAIIQGIMFDQNTYVQILAVNKNKESKPAQGFRLNDRK-----	124
COL20A1	139	SHRGSFDEQASEQVLTFSQDFATFAGQ---FRCLPFAIMTFLVDSGMSHSHF	174
COL14A1	125	--DF----KFRVVDVDRGSRSESEFVKVQCPALADIVLVDGMSIGRNF	174
COL20A1	196	QQVDEFLAVIAFFETIDKVVQGLQYSGDQFQMDLNSLSTPQGLAVVRLVYKGN	255
COL14A1	175	RLVRFHLENLVAFDVGSEKTLGLAQYSGDFLEWHLNFASTDEIVAVVNLVYKGN	234
COL20A1	256	TFTGLATHVLSQNLQFAAGLEFAAKVILVDRGSDQVHTAARVLRDLGVNVAWGV	315
COL14A1	235	TLTGLALVYIFENSFPAASRKTGWSKIGLITDRGSDQDIIFSRNLRSQVLEFAIGV	294
COL20A1	316	KPADEARLILASPRDITVHSVLEFLQLAALAGLSLQCRALQSGSFFQGAFAAFALD	375
COL14A1	295	KPADVNLQEIASEPDSVTHVVAEFDLHMTVVEVSLTRTLCRVE-EQDRKIKASNAI-	352
COL20A1	376	TLPAPTSLVLSQVSSIRLSMTFAPRPHLYLIVWASRGSTPREVVVGGFAASTELM	435
COL14A1	353	TGP-PTLITSEVTRASVYVWTHARGVRYKVVYFTRGKRFDEVVVDGVSSTVLN	411
COL20A1	436	LASRTEYLVSVEPIYEGVGGELGLVTPALPFRALTLAAVTPRTVHLWTPSAGATH	495
COL14A1	412	LMSLVEYQIAVEAFPAHTASSELGFTETLALMPSADLLVDVTEKSNVDMCAVPSGG	471
COL20A1	496	YLVKCPASFGSEBEREVQVSS--FEVLLDGLGELRVDVYVQVSLGFGDSRARGTR	553
COL14A1	472	YLLVVALFDGLAGSEBMSFTSDTDLGSLNVEVYVYVYVAFSGSEKSPVYQSET	531
COL20A1	554	TPTLAFPHLGEVDVSHDARVWQEARVRLVNVTVSSQGHQTEARGNATSATL	613
COL14A1	532	TILASFSESLRISNVSSNARLWMDPTSRQINRYVYVNNADGTEINEVEV-DEITTFPL	590
COL20A1	614	GLFSSSTYYTVVTVCLVFGGSSSTLTVGRVTTKAPSPQSLMTELDGAVQLAW-AAAF	672
COL14A1	591	KSLTELEVTIATISVIDESQREPLVQVTFTEEVPAQQYLEIDVTTDFSNVTHMELAD	650
COL20A1	673	QVLYVQITVTLQSGKAREISVFNGLQVAVLQSLGHTETVITLAVYDRGASVEV--	730
COL14A1	651	EG--LHKLMLVYVGRTEEVVLEKQSDHVISLEPQTEYVESLVA LDDGSESEVVA	708
COL20A1	731	-----SLAVTPT-----VYRSPENLALASETHDGLQVQVTPFLRLVAVYAT	774
COL14A1	709	VGTTLDSFWEPTATVPTTSVTSVQVQINLVGDETTSSLRVEMDISDSVQQEKFVT	768
COL20A1	775	YARASGLGFEK-----SVVSGARSHVTLPLQATKYVLYVLSAYAGRSEAVSAPOQT	829
COL14A1	769	YMTAQG-DFEEVIGTVVWFGSQNLLKLELLEDTYKRVTVTEITDGGVSVSARNGT	826

【図5】

アミノ酸位置	配列	スコア
1008	VTLGR LAKA	21
1023	SAAFQLQML	21
1137	RGLGELAGL	21
12	CLWLWLGAT	20
26	VQASGLLRL	20
29	SGLRLAVL	20
228	QTEWD LNSL	20
307	GVNVFAVGV	20
475	LAAVPTPTV	20
521	VLLDGLPG	20
579	GAPRPVRL	20
608	ATSATLGPL	20
749	LASET PDSL	20
844	DLMVAFSLV	20
907	PLLETPREA	20
928	PLLVGLLDA	20
974	HVAVGSEKV	20
1196	TLYQLVYQA	20
1199	QLVVSQASHV	20
346	LAGLSRL	31
275	GLRPEAAKV	27
369	AAAPA DTL	26
839	SIPGFDLMV	26
1227	KLEPGTEPL	26
933	LIDAGKSL	25
1193	SLATLYQLV	25
182	FLVDG SW51	24
302	VLKDLGVNV	24
305	DLGVNVFVAV	24
435	NLARSIEYL	24
453	GVGEGIRGL	24
457	GLRGLVTTA	24
549	GIRARITL	24
52	SGLGLYLVQV	23
104	FLLARBEFV	23
197	QVKDFLAVS	23
235	SLSTKEQVL	23
325	LLASPPRDI	23

【 図 6 】



【 配列表 】

[2017534616000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/074136
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K47/48 C07K16/30 C12Q1/00 G01N33/574 A61K35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12Q G01N A61P  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, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/051276 A1 (EXTERNAUTICS S P A [IT]; GRIFANTINI RENATA [IT]; PILERI PIERO [IT]; CA) 5 May 2011 (2011-05-05) page 27, lines 3-19 page 1, lines 1-5 page 5, lines 15-17 page 24, lines 6-26; claims 1,2, 5, 7-11; figures 22,23 -----	1-22
A	WO 2011/051280 A1 (EXTERNAUTICS S P A [IT]; GRIFANTINI RENATA [IT]; PILERI PIERO [IT]; CA) 5 May 2011 (2011-05-05) claim 1 -----	1-22
A	WO 2011/051278 A1 (EXTERNAUTICS S P A [IT]; GRIFANTINI RENATA [IT]; PILERI PIERO [IT]; CA) 5 May 2011 (2011-05-05) claim 1 -----	1-22
----- -/--		
<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		Date of mailing of the international search report
16 December 2015		08/01/2016
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  Habedanck, Robert

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2015/074136

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/031122 A2 (IMPORT THERAPEUTICS INC [US]; LIANG XIAOWU [US]; MOLINA DOUGLAS [US];) 8 March 2012 (2012-03-08) claim 1  -----	1-22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/074136

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011051276 A1	05-05-2011	EP 2494351 A1 US 2013022983 A1 WO 2011051276 A1	05-09-2012 24-01-2013 05-05-2011
WO 2011051280 A1	05-05-2011	EP 2494361 A1 US 2013004955 A1 WO 2011051280 A1	05-09-2012 03-01-2013 05-05-2011
WO 2011051278 A1	05-05-2011	EP 2493916 A1 US 2012322075 A1 WO 2011051278 A1	05-09-2012 20-12-2012 05-05-2011
WO 2012031122 A2	08-03-2012	US 2013310266 A1 WO 2012031122 A2	21-11-2013 08-03-2012

## 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 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/68 (2017.01)		A 6 1 K 47/68		4 C 0 8 6
A 6 1 K 51/04 (2006.01)		A 6 1 K 51/04	3 0 0	4 C 0 8 7
A 6 1 K 51/10 (2006.01)		A 6 1 K 51/10		4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 K 38/16 (2006.01)		A 6 1 K 38/16		
A 6 1 K 35/12 (2015.01)		A 6 1 K 35/12		
A 6 1 K 35/76 (2015.01)		A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 35/17 (2015.01)		A 6 1 K 35/17	Z	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	L	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	G	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 16/18		
C 0 7 K 16/46 (2006.01)		C 0 7 K 14/705		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 0 7 K 16/46		
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	D	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	K	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 1/19		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 7/04 (2006.01)		C 1 2 N 5/10		
		C 1 2 P 21/08		
		C 1 2 N 7/04		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 515123258

トロン - トランスラショナル オンコロジー アン デア ウニヴェリジテーツメディツイン  
デア ヨハネス グーテンベルク - ウニヴェルシテート マインツ ゲマインニューツィゲ ゲー  
エムペーハー

TRON - Translationale Onkologie an der Universitaetsmedizin der Johannes Gutenberg - Universitaet Mainz gemeinnuetzige GmbH

ドイツ連邦共和国 55131 マインツ フライリグラートシュトラッセ 12

Freiligrathstr. 12 55131 Mainz Germany

(74)代理人 100110928

弁理士 速水 進治

(72)発明者 サヒン, ウグル

ドイツ連邦共和国 5 5 1 1 6 マインツ フィリップ - フォン - ツァベルン - プラッツ 1  
 (72)発明者 パレート, クラウディア  
 ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ ホッホゲザントシュトラッセ 1  
 (72)発明者 ベンダー, クリスチャン  
 ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 0 マインツ トゥルムシュトラッセ 7 9  
 (72)発明者 フォルムブロック, キルステン  
 ドイツ連邦共和国 2 2 7 6 9 ハンブルク ドゥシュヴェーク 2 1アー  
 (72)発明者 バレア ロルダン, ディアナ  
 ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 0 マインツ パウル - ゲルハルト - ヴェーク 4  
 (72)発明者 フビヒ, シュテファニー  
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 8 3 ニーアシュタイン パーターヴェーク 2 3  
 (72)発明者 ハルトマン, クリストフ  
 ドイツ連邦共和国 6 0 3 8 9 フランクフルト オーベルンハイナー シュトラッセ 5  
 Fターム(参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR72  
 QR77 QS05 QS36 QX01  
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AA95X AB01 AC14 BA01 CA24  
 CA25 CA44 CA46  
 4C076 CC27 CC41 EE41 EE59  
 4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 CA53 NA14 ZB262  
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA27 BB01 CC23 EE01 GG01 HH03 KA04  
 KA29 KB92 LL18  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26  
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 BC83 CA12 NA14 ZB26  
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	用于诊断和治疗癌症的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017534616A</a>	公开(公告)日	2017-11-24
申请号	JP2017521498	申请日	2015-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	生物科技NA耶鲁NTT高级制药门EM为主硬 特隆变压器RATIONAL肿瘤安德森Auni帆迪哲媒体寻德古腾堡海胆威赛施他特茨杰玛酒店新梓格格EM为主硬		
申请(专利权)人(译)	生物科技NA制药Eruenua有限公司 特隆 - 变压器RATIONAL肿瘤德海胆帆迪哲媒体寻德古腾堡 - 海胆维西利亚施他惠茨杰玛酒店新梓获得有限公司		
[标]发明人	サヒンウグル パレートクラウディア ベンダークリスチャン フォルムブロックキルステン バレアロルダンディアナ フビヒシュテファニー ハルトマンクリストフ		
发明人	サヒン, ウグル パレート, クラウディア ベンダー, クリスチャン フォルムブロック, キルステン バレア ロルダン, ディアナ フビヒ, シュテファニー ハルトマン, クリストフ		
IPC分类号	A61K45/00 A61K48/00 A61K31/711 A61K31/713 A61K31/7105 A61K39/395 A61K47/68 A61K51/04 A61K51/10 A61P35/00 A61K38/16 A61K35/12 A61K35/76 A61K35/17 A61K39/00 C12N15/09 C12N15 /113 C07K16/18 C07K14/705 C07K16/46 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/53 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12N7/04		
CPC分类号	A61K38/03 C07K16/30 G01N33/57484 G01N2800/52 A61K35/17 A61K48/005 C07K14/4747 C12Q1 /6886 G01N33/5011 G01N33/57407		
FI分类号	A61K45/00 A61K48/00 A61K31/711 A61K31/713 A61K31/7105 A61K39/395.T A61K47/68 A61K51/04. 300 A61K51/10 A61P35/00 A61K38/16 A61K35/12 A61K35/76 A61K35/17.Z A61K39/00.H A61K39/395. L C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.G C07K16/18 C07K14/705 C07K16/46 C12Q1/68.A G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/53.K C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12N7/04		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063 /QR35 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS05 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084 /AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085 /EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085/KB92 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087 /AA02 4C087/BB37 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045 /EA50		
代理人(译)	速水SusumuOsamu		

優先権	PCT/EP2014/072419 2014-10-20 WO
其他公开文献	JP6621473B2
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>

摘要(译)

本发明提供了一种核酸，其对于肿瘤组织，特别是对于中枢神经系统 ( CNS ) 的肿瘤 ( 例如神经胶质瘤，特别是成胶质细胞瘤 ) 是独特的，并且是用于治疗或诊断受试者的肿瘤疾病的靶标。并鉴定氨基酸序列。

(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2017-534616**  
**(P2017-534616A)**  
(43) 公表日 平成29年11月24日 (2017.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A G I K 45/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A G I K 48/00	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 31/711 (2006.01)</b>	A G I K 31/711	4 B 0 6 5
<b>A 6 1 K 31/713 (2006.01)</b>	A G I K 31/713	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 31/7105 (2006.01)</b>	A G I K 31/7105	4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-521498 (P2017-521498)	(71) 出願人	515145032
(22) 出願日	平成27年10月19日 (2015.10.19)		
(23) 翻訳文提出日	平成29年6月20日 (2017.6.20)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/074136		
(87) 国際公開番号	W02016/062059		
(87) 国際公開日	平成28年4月28日 (2016.4.28)		
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2014/072419		
(32) 優先日	平成26年10月20日 (2014.10.20)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
			バイオエヌテック エールエヌアー ファーマシューティカルズ グーエムペーハー B I O N T E C H R N A P H A R M A C E U T I C A L S G M B H ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 1 マインツ アンデア ゴルトグラーベ 1 2 5 5 1 3 1 M a i n z G e r m a n y
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の診断および処置のための方法および組成物