

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年8月30日 (30.08.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/097358 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01) A61K 35/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/053176
- (22) 国際出願日: 2007年2月21日 (21.02.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2006-045287 2006年2月22日 (22.02.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外 (TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



(54) Title: HLA-A*3303-RESTRICTED WT1 PEPTIDE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME

(54) 発明の名称: HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド、およびそれを含む医薬組成物

(57) Abstract: Disclosed are: a peptide comprising an amino acid sequence composed of contiguous nine amino acid residues derived from a WT1 protein, wherein an amino acid residue at position 2 in the amino acid sequence is selected from the group consisting of Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser and Asp and an amino acid residue at position 9 in the amino acid sequence is Arg; a polynucleotide encoding the peptide; a pharmaceutical composition comprising the peptide; and others.

(57) 要約: 本発明は、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、該9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列の第2位のアミノ酸がAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspからなる群から選択されるものであり、第9位のアミノ酸がArgである、ペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれらを含む医薬組成物等に関する。

WO 2007/097358 A1

明 細 書

HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド、およびそれを含む医薬組成物
技術分野

[0001] 本発明は、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド、詳細には、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、該9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列の第2位のアミノ酸がAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspからなる群から選択されるものであり、第9位のアミノ酸がArgである、ペプチドに関する。さらに本発明は、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、それらを含む癌治療／予防用医薬組成物などに関する。

背景技術

[0002] WT1遺伝子(Wilms' tumor 1 gene)は、小児の腎癌であるウイルムス腫瘍の責任遺伝子として同定された遺伝子であり(非特許文献1および2)、ジンクフィンガー構造を有する転写因子である。当初、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子であるとされたが、その後の研究(非特許文献3、4、5および6)により、造血器腫瘍や固形癌においてはむしろ癌遺伝子として働くことが示された。

[0003] WT1遺伝子が多くの悪性腫瘍において高発現していることから、変異のない自己タンパク質であるWT1遺伝子産物の生体内における免疫原性の有無が検証されてきた。その結果、腫瘍細胞で高発現しているWT1遺伝子由来のタンパク質は細胞内プロセッシングにより断片化され、生じたペプチドがMHCクラスI分子と複合体を形成して細胞表面に提示されること、およびかかる複合体を認識するCTLがWT1ペプチドワクチネーションにより誘導され得ることが明らかとなった(非特許文献7、8および9)。さらに、WT1ペプチドまたはWT1 cDNAで免疫されたマウスは、移植されたWT1遺伝子発現腫瘍細胞を高い確率で拒絶するが(非特許文献7および10)、WT1遺伝子を生理的に発現している正常組織は誘導されたCTLによって傷害されないことも示された(非特許文献7)。ヒト細胞を用いたインビトロの実験において、ヒトMHCクラスI分子の1つであるHLA-A*0201分子高結合性Db126ペプチドおよびWH187ペプチド(配列番号:1におけるアミノ酸187-195、SLGEQQYSV)を用いて

HLA-A*0201を持つヒト末梢血単核球を刺激すると、WT1特異的CTLが誘導され、誘導されたCTLは内因性にWT1遺伝子を高発現している腫瘍細胞に対し特異的な傷害活性を有すること、およびかかるCTLの傷害活性はHLA-A2拘束性であることが示された(非特許文献11)。HLA-Aアレルのうち、日本人に最も多いHLA-A*2402に適合するWT1ペプチド(WT1₂₃₅;配列番号:1におけるアミノ酸235-243、CMTWNQMNL)を用いたヒト細胞でのインビトロの実験において、WT1特異的CTL(TAK-1)が誘導され(非特許文献12)、誘導されたCTLは、一部WT1遺伝子を生理的に発現している正常造血幹細胞のコロニー形成能を抑制しないことが示された(非特許文献13および14)。これらの報告から、マウスだけでなくヒトにおいてもWT1特異的CTLの誘導が可能であり、かかるCTLがWT1遺伝子を高発現する腫瘍細胞に対しては傷害活性を有するが、WT1遺伝子を生理的に発現する正常細胞には傷害活性を有さない可能性が強く示唆された(非特許文献7、10、11、12、13および14)。

[0004] WT1遺伝子産物は核内タンパク質として存在し、細胞質内でプロテアソームによってプロセッシングを受け、ペプチドに断片化される。断片化されたペプチドは、TAP(transporter associated with antigen processing)分子によって小胞体内腔へと導かれ、MHCクラスI分子と複合体を形成し、細胞表面に提示される。CTL前駆細胞がTCRを介してWT1ペプチド-MHCクラスI分子複合体を認識することによって、WT1特異的CTLが誘導され、MHCクラスI分子を介してWT1遺伝子産物を提示する腫瘍細胞に対して細胞傷害作用を発揮する(非特許文献7、8および9)。そうすると、WT1遺伝子産物を標的とした癌免疫療法において用いられるWT1ペプチドは、少なくとも生体内でMHCクラスI分子に結合する形態となる必要がある。しかし、MHCクラスI分子には多様性があり、それぞれのMHCクラスI分子に結合するWT1ペプチドのアミノ酸配列は異なるため、MHCクラスIの型別に適合するペプチドを用意する必要がある。しかしながら、現在分かっているHLA分子に拘束性のWT1ペプチドは、HLA-A*2402分子、HLA-A*0201分子、HLA-A*2601分子拘束性のもののみである(それぞれ、特許文献1、非特許文献11、および特許文献2)。日本人において、HLA-A*2402に次いで多いHLA-AアレルはHLA-A*3303である

ため、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドを見出す必要があった。

特許文献1:国際公開2003/106682号公報

特許文献2:国際公開2005/095598号公報

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

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

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

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

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

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

非特許文献7:Oka Y et al., J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):1873-80.

非特許文献8:Melief CJ et al., Immunol Rev. 1995 Jun;145:167-77.

非特許文献9:Ritz J, J Clin Oncol. 1994 Feb;12(2):237-8.

非特許文献10:Tsuboi A et al., J Clin Immunol. 2000 May;20(3):195-202.

非特許文献11:Oka Y et al., Immunogenetics. 2000 Feb;51(2):99-107.

非特許文献12:Ohminami H et al., Blood. 2000 Jan 1;95(1):286-93.

非特許文献13:Gao L et al., Blood. 2000 Apr 1;95(7):2198-203.

非特許文献14:Ohminami H et al., Blood. 2000 Jan 1;95(1):286-93.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明の解決課題は、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれらを含む癌の治療/予防用医薬組成物などを提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者は、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、該9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列の第2位のアミノ酸がAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspからなる群から選択されるものであり、第9位のアミノ酸がArgであるペプチドが、WT1特異的CTLを高い確率で誘導することを見出し、本発明を完成する

に至った。

[0007] すなわち、本発明は、

(1) WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、該9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列の第2位のアミノ酸がAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspからなる群から選択されるものであり、第9位のアミノ酸がArgである、ペプチド、

(2) アミノ酸配列が以下の群:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (配列番号:2)、

Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (配列番号:3)、

Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (配列番号:4)、および

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (配列番号:5)

から選択されるものである、(1)記載のペプチド、

(3) アミノ酸配列がSer Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (配列番号:4)である、(2)記載のペプチド、

(4) (1)記載のペプチドを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物、

(5) 有効量の(4)記載の医薬組成物をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法、

(6) (4)記載の医薬組成物を製造するための(1)記載のペプチドの使用、

(7) (1)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(8) (7)記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(9) (7)記載のポリヌクレオチドまたは(8)記載のベクターを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物、

(10) 有効量の(9)記載の医薬組成物をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法、

(11) (9)記載の医薬組成物を製造するための(7)記載のポリヌクレオチドまたは(8)記載のベクターの使用、

(12) (1)記載のペプチドにより誘導される、WT1特異的CTL、

(13) 末梢血単核球を(1)記載のペプチドの存在下で培養し、該末梢血単核球から

- WT1特異的CTLを誘導することを特徴とする、WT1特異的CTLの誘導方法、
- (14) (1)記載のペプチドを必須構成成分として含む、WT1特異的CTLを誘導するためのキット、
- (15) (1)記載のペプチドにより誘導される、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞、
- (16)未熟抗原提示細胞を(1)記載のペプチドの存在下で培養し、該未熟抗原提示細胞からWT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導することを特徴とする、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞の誘導方法、
- (17) (1)記載のペプチドを必須構成成分として含む、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導するためのキット、
- (18) (12)記載のCTLまたは(15)記載の抗原提示細胞を用いることを特徴とする、癌の診断方法、
- (19)HLA-A*3303陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定する方法であって、
- (a)WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体を該対象由来試料と反応させ;次に、
- (b)該試料に含まれる該複合体を認識するCTLの存在または量を調べる、工程を含む方法、
- (20)複合体がテトラマーの形態である、(19)記載の方法、を提供するものである。

発明の効果

[0008] 本発明により、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれらを含む癌の治療/予防用医薬組成物などが得られるので、HLA-A*3303を有する対象におけるインビボおよびインビトロでのWT1特異的CTLの誘導が可能となる。日本人の約24%が少なくとも1つのHLA-A*3303分子を有していることから、非常に広範囲の対象においてWT1特異的CTLを誘導できる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1]図1は、WT1₃₃₇を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
 [図2]図2は、WT1₃₆₄を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
 [図3]図3は、WT1₃₆₇を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
 [図4]図4は、WT1₄₀₉を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
 [図5]図5は、WT1₃₆₄を用いて誘導されたCTLの内因性WT1遺伝子発現細胞に対する細胞傷害活性を示す。
 [図6]図6は、WT1₃₆₇を用いて誘導されたCTLの内因性WT1遺伝子発現細胞に対する細胞傷害活性を示す。
 [図7]図7は、WT1₄₀₉を用いて誘導されたCTLの内因性WT1遺伝子発現細胞に対する細胞傷害活性を示す。
 [図8]図8は、WT1₃₆₇を用いて誘導されたCTLのWT1遺伝子発現細胞に対する細胞傷害活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] ヒトWT1タンパク質のアミノ酸配列を配列番号:1に示す。WT1遺伝子は、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において天然型で高発現している。また、HLA-A*3303アンカーモチーフは、第2位にAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspのいずれか、第9位にArgを有する。従って、本発明は、1の態様において、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、該9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列の第2位のアミノ酸が、好ましくはAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspからなる群から選択されるものであり、第9位のアミノ酸が、好ましくはArgである、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド(以下、WT1ペプチドともいう)に関するものである。
- [0011] 本発明のペプチドが含む該9個のアミノ酸からなるアミノ酸配列のうち好ましいものは、Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg(配列番号:2)、Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg(配列番号:3)、Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg(配列番号:4)、またはThr Ser Glu Lys Pro Phe Ser

Cys Arg(配列番号:5)であり、最も好ましいものは、Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg(配列番号:4)である。さらに、配列番号:2~5のいずれかにおいて、該9個のアミノ酸のうち1個ないし数個、好ましくは1個ないし5個のアミノ酸が別のアミノ酸に置換されたものであってもよい。また、該9個のアミノ酸および置換された別のアミノ酸のいずれかが、適宜修飾されたものであってもよい。但し、いずれの場合にも、本発明のペプチドがHLA-A*3303分子との結合能を保持していることが条件となる。

[0012] 本発明は、上述の通りHLA-A*3303拘束性を有するWT1ペプチドを得ることを目的としている。ゆえに、本発明のペプチドは、WT1タンパク質由来であって、上記9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含んでいればよい。従って、本発明のペプチドは配列番号:2~5に示すアミノ酸配列からなるペプチドそのものであってもよく、あるいは配列番号:2~5に示すアミノ酸配列を含む、WT1タンパク質またはその一部であってもよい。本発明のペプチドはまた、上記9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列のN末端および/またはC末端に、種々の物質を結合させることができる。例えば、アミノ酸、ペプチド、それらのアナログ等を結合させてもよい。本発明のペプチドにこれらの物質が結合している場合、これらの物質が例えば、生体内酵素などにより、あるいは細胞内プロセッシングなどの過程により処理され、最終的に上記9個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を生じ、HLA-A*3303分子との複合体として細胞表面に提示されることにより、CTL誘導効果を得ることができる。これらの物質は、本発明のペプチドの溶解性を調節するものであってもよく、耐プロテアーゼ作用等その安定性を向上させるものであってもよく、また例えば、所定の組織・器官に特異的に本発明のペプチドをデリバリーするようなものであってもよく、あるいはまた抗原提示細胞の取込み効率を増強させる作用などを有するものであってもよい。これらの物質はまた、CTL誘導能を増大させるもの、例えば、ヘルパーペプチドなどであってもよい。

[0013] 本発明のペプチドは、当該技術分野において通常用いられる方法またはそれらの変法を用いて合成することができる。かかる合成方法は、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York,

1976;ペプチド合成、丸善(株), 1975;ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株), 1985;医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成、広川書店, 1991などに記載されている。

- [0014] 本発明のペプチドはまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列情報に基づき、遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。かかる遺伝子工学的手法は、当業者に周知のものである。
- [0015] 本発明は、もう1つの態様において、上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物に関するものである。WT1遺伝子は、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において高発現しているため、本発明の医薬組成物を癌の治療または予防のために用いることができる。本発明の医薬組成物がHLA-A*3303陽性対象に投与されると、該医薬組成物に含まれるHLA-A*3303拘束性WT1ペプチドにより、WT1特異的CTLが誘導され、かかるCTLにより対象中の癌細胞が傷害される。
- [0016] 本発明の医薬組成物は、有効成分としての上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチド以外に、例えば、担体、賦形剤などを含んでもよい。本発明の医薬組成物に含まれるHLA-A*3303拘束性WT1ペプチドは、WT1特異的CTLを誘導することから、その誘導効率を増強させるために、本発明の医薬組成物は適当なアジュバントを含むか、あるいは適当なアジュバントと共に投与されてもよい。好ましいアジュバントとしては、例えば、完全または不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどが挙げられるがこれらに制限されない。
- [0017] 本発明の医薬組成物の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該方法は、例えば、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。本発明の医薬組成物に含まれるペプチドの量、医薬組成物の剤形、投与回数などは、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択できるが、1回あたりのペプチド投与量は、通常、0.0001mg~1000mg、好ましくは、0.00

1mg～10000mgである。

- [0018] 本発明は、別の態様において、有効量の上記医薬組成物をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。治療または予防される癌は、いずれのものであってもよく、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌を含む。
- [0019] 本発明は、なお別の態様において、上記医薬組成物を製造するためのHLA-A*3303拘束性WT1ペプチドの使用に関する。
- [0020] 本発明は、さらなる態様において、HLA-A*3303陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定する方法であって、
- (a) WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体を該対象由来試料と反応させ;次に、
 - (b) 該試料に含まれる該複合体を認識するCTLの存在または量を調べる、
- 工程を含む方法に関するものである。対象由来試料は、リンパ球が含まれている可能性があればいずれのものであってもよく、例えば、血液、リンパ液などの体液、組織などが挙げられる。WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体は、例えば、ビオチンストレプトアビジン法などの当業者に既知の方法を用いて、例えば、テトラマー、ペンタマーなどの形態にされていてもよい。かかる複合体を認識するCTLの存在または量は、当業者に既知の方法により測定することができる。本発明のこの態様において、上記複合体は標識されたものであってもよい。標識としては、蛍光標識、放射性標識などの公知のものを使用することができる。標識することで、CTLの存在または量の決定が容易かつ迅速になる。本発明のこの態様の方法を用いて、癌の診断、予後診断などが可能になる。
- [0021] 従って、本発明はまた、HLA-A*3303陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定するための、WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体を含む組成物を提供する。
- [0022] さらに、本発明は、WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体を含む、HLA

—A*3303陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定するためのキットを提供する。

[0023] 本発明は、さらなる態様において、WT1ペプチドとHLA—A*3303分子との複合体を用いて、WT1特異的CTLを得る方法であって、

(a) 試料と複合体を反応させ、

(b) 該試料中に含まれる該複合体を認識するCTLを得る、

工程を含む方法に関するものである。WT1ペプチドとHLA—A*3303分子との複合体については上述の通りである。試料は、リンパ球が含まれている可能性があればいずれのものであってもよく、例えば、血液などの対象由来試料、細胞培養液などが挙げられる。複合体を認識するCTLの取得は、例えば、FACS、MACSなど当業者に既知の方法を用いて行うことができる。得られたWT1特異的CTLを培養し、種々の癌の治療または予防に用いることも可能になる。

[0024] 従って、本発明はまた、WT1ペプチドとHLA—A*3303分子との複合体を用いて、WT1特異的CTLを得る方法により得ることのできる、WT1特異的CTLに関するものである。

[0025] さらに、本発明は、WT1ペプチドとHLA—A*3303分子との複合体を含む、WT1特異的CTLを得るためのキットに関するものである。

[0026] 本発明は、さらにもう1つの態様において上記HLA—A*3303拘束性WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチド(以下、WT1ポリヌクレオチドともいう)に関するものである。本発明のポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよい。本発明のポリヌクレオチドの塩基配列は、上記HLA—A*3303拘束性WT1ペプチドのアミノ酸配列に基づき決定できる。該ポリヌクレオチドは、例えば、DNAまたはRNA合成方法、PCR法などにより製造することができる。

[0027] 本発明は、別の態様において上記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター(以下、WT1発現ベクターともいう)に関するものである。発現ベクターの種類、上記ポリヌクレオチド配列以外で含まれる配列等は、当該発現ベクターを導入する宿主の種類、目的等に応じて適宜選択できる。本発明の発現ベクターをHLA—A*3303陽性対象に投与し、生体内においてWT1ペプチドを産生させ、WT1特異的CTLを誘導し、これ

により対象中の造血器腫瘍細胞、固形癌細胞などを傷害することで、該造血器腫瘍、固形癌の治療または予防を行うことができる。

[0028] 本発明は、さらに別の態様において上記WT1ポリヌクレオチドまたは上記WT1発現ベクターを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物に関するものである。本発明のこの態様の医薬組成物の組成、投与方法等は、上述の通りである。

[0029] 本発明は、別の態様において、有効量の上記WT1ポリヌクレオチドまたはWT1発現ベクターを含む医薬組成物をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。治療または予防される癌は、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌を含む。

[0030] 本発明は、なお別の態様において、上記WT1ポリヌクレオチドまたはWT1発現ベクターを含む医薬組成物を製造するためのWT1ポリヌクレオチドまたはWT1発現ベクターの使用に関するものである。

[0031] 本発明は、別の態様において、上記WT1発現ベクターを含有する細胞に関するものである。本発明の細胞は、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などの宿主細胞を上記発現ベクターを用いて形質転換することにより製造することができる。宿主細胞への発現ベクターの導入方法は、種々の方法を適宜選択して用いることができる。形質転換した細胞を培養し、産生されたWT1ペプチドを回収・精製することにより、本発明のペプチドを製造することもできる。

[0032] 本発明は、さらなる態様において、上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドにより誘導される、WT1特異的CTLに関するものである。本発明のCTLは、WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体を認識する。従って、本発明のCTLを用いて、HLA-A*3303陽性、かつWT1高発現腫瘍細胞を特異的に傷害することができる。

[0033] 本発明は、別の態様において、WT1特異的CTLをHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。WT1特異的CTLの投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件

に応じて適宜選択することができる。当該方法は、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。

[0034] 本発明は、別の態様において、末梢血単核球を上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドの存在下で培養し、該末梢血単核球からWT1特異的CTLを誘導することを特徴とする、WT1特異的CTLの誘導方法に関するものである。末梢血単核球が由来する対象は、HLA-A*3303陽性であればいずれであってもよい。末梢血単核球をHLA-A*3303拘束性WT1ペプチドの存在下で培養することで、末梢血単核球中のCTL前駆細胞からWT1特異的CTLが誘導される。本発明により得られたWT1特異的CTLをHLA-A*3303陽性対象に投与することで、対象の造血器腫瘍、固形癌を治療または予防することができる。

[0035] 本発明は、さらに別の態様において、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドを必須構成成分として含む、WT1特異的CTLを誘導するためのキットに関するものである。好ましくは、該キットは上記WT1特異的CTLの誘導方法に用いられる。本発明のキットは、上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドのほかに、例えば、末梢血単核球の取得手段、アジュバント、反応容器等を含んでいてもよい。一般的には、キットには取扱説明書を添付する。本発明のキットを用いて、WT1特異的CTLを効率よく誘導できる。

[0036] 本発明は、さらなる態様において、上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドにより誘導される、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞(樹状細胞など)に関するものである。本発明の抗原提示細胞を用いることで、上記WT1特異的CTLが効率よく誘導される。

[0037] 本発明は、別の態様において、上記WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。抗原提示細胞の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該方法は、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。

- [0038] 本発明は、別の態様において、未熟抗原提示細胞を上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドの存在下で培養し、該未熟抗原提示細胞からWT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞を誘導することを特徴とする、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞の誘導方法に関するものである。未熟抗原提示細胞は、未熟樹状細胞などの成熟して抗原提示細胞となり得る細胞をいう。未熟抗原提示細胞が由来する対象は、HLA-A*3303陽性であればいずれのものであってもよい。未熟抗原提示細胞は、例えば、末梢血単核球などに含まれているため、かかる細胞を上記WT1ペプチドの存在下で培養してもよい。
- [0039] 本発明は、さらに別の態様において、上記HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドを必須構成成分として含む、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞を誘導するためのキットに関するものである。好ましくは、該キットは上記抗原提示細胞の誘導方法に用いられる。本発明のキットに含まれるその他の構成成分等は上述の通りである。本発明のキットを用いて、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞を効率よく誘導できる。
- [0040] 本発明は、別の態様において、HLA-A*3303拘束性WT1ペプチドに対する抗体または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する抗体に関するものである。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであってもよい。
- [0041] 本発明は、さらなる態様において、上記WT1特異的CTL、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞、またはHLA-A*3303拘束性WT1ペプチドに対する抗体または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する抗体を用いることを特徴とする、癌の診断方法に関するものである。好ましくは、WT1特異的CTLが本発明の診断方法に用いられる。例えば、上記CTL、抗原提示細胞または抗体をHLA-A*3303陽性対象由来の試料とインキュベーションする、あるいはHLA-A*3303陽性対象に投与し、次に該CTL、抗原提示細胞または抗体の例えば、位置、部位、量等を決定することで、癌の診断が可能となる。上記CTL、抗原提示細胞または抗体は、標識されたものであってもよい。かかる標識を付すことで

、本発明の診断方法を効率よく行うことができる。

[0042] 本発明は、別の態様において、上記WT1特異的CTL、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子を介して提示する抗原提示細胞、またはHLA-A*3303拘束性WT1ペプチドに対する抗体または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する抗体を必須構成成分として含む、癌の診断用キットに関するものである。

[0043] 以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

実施例 1

[0044] WT1ペプチドの選択

NetMHC2. 0プログラム(Technical University of Denmark)を用いて、WT1タンパク質(配列番号:1)由来のペプチドから、HLA-A*3303適合アンカーモチーフ(N末端より2番目のアミノ酸がAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、またはAspであり、C末端がArgである)を有する9個のアミノ酸からなる親水性ペプチドであって、HLA-A*3303分子に対する結合親和性が高いと推測されるペプチドWT1₃₃₇、WT1₃₆₄、WT1₃₆₇ およびWT1₄₀₉ を選択した。これらのペプチドのアミノ酸配列、HLA-A*3303分子に対する結合親和性を表1に示す。

[0045] [表1]

ペプチド	配列番号: 1 における アミノ酸番号	アミノ酸配列	HLA-A*3303 分子に対する 結合親和性
WT1 ₃₃₇ (配列番号: 2)	337~345	L S H L Q M H S R	18. 827
WT1 ₃₆₄ (配列番号: 3)	364~372	F S R S D Q L K R	15. 143
WT1 ₃₆₇ (配列番号: 4)	367~375	S D Q L K R H Q R	14. 496
WT1 ₄₀₉ (配列番号: 5)	409~417	T S E K P F S C R	15. 310

[0046] B-LCL細胞の調製

HLA-A*3303陽性健常人ドナー(HLA-A*3303/0207)より採取した末梢血からFicoll-Hypaque gradient density centrifugation法により末梢血単核球(PBMC)を分離した。次に、PBMCを24ウェル細胞培養用プレートに10% FCS含有RP

MI 1640培地中約 1×10^7 個の密度で播種し、B95-8細胞(EBウイルス産生細胞)の培養上清を添加して、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で約1ヶ月間培養した。EBウイルスにより形質転換された、B細胞系腫瘍細胞であるB-LCL細胞を得た。得られたB-LCL細胞がWT1遺伝子を発現していないことを確認した。B-LCL細胞を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ WT1₃₃₇、WT1₃₆₄、WT1₃₆₇またはWT1₄₀₉と共に2時間インキュベーションすることでパルスし、次に、放射線80Gyを照射させた。得られたB-LCL細胞(以下、WT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞という)を抗原提示細胞として以下の実験に用いた。

[0047] WT1特異的CTLの誘導

PBMC(HLA-A*3303/1101) 3×10^6 個を、24ウェル細胞培養用プレートにて $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ WT1₃₃₇、WT1₃₆₄、WT1₃₆₇またはWT1₄₀₉を含む完全培地(45% RPMI、45% AMI-V培地、および10% ヒトAB血清)中、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で1週間培養し、応答細胞を得た。得られた応答細胞 2×10^6 個を、同じWT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞 1×10^6 個と完全培地中で1週間共培養した(1回目刺激)。PBMCをWT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞とさらに3回共培養し(2~4回目刺激)、その際20IU/ml(最終濃度)IL-2を、次の条件;2回目刺激:刺激開始の3日後から1日置き計2回;3回目および4回目刺激:刺激開始の翌日から1日置き計3回添加した。得られた細胞を、Negative Selection Columns Gravity Feed Kit (StemSp)を用いてCD8陽性T細胞が約80%となるよう濃縮し、次に、WT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞と共培養した(5回目刺激)。刺激開始5日後のCD8陽性T細胞(CTL)を細胞傷害活性の測定のために用いた。

[0048] CTLの細胞傷害活性

CTLの細胞傷害活性を ^{51}Cr 遊離試験を用いて測定した。CTL細胞(以下、エフェクター細胞ともいう)を、あらかじめ ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞と1:1、5:1、または10:1の比率(E/T比)となるよう培地 $200 \mu\text{l}$ に調製し、96ウェル細胞培養用プレート中、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で4時間培養した。標的細胞として、CTL誘導に用いたWT1ペプチドと同じペプチドでパルスしたB-LCL細胞(BLCL-P)、およびWT1ペプチドをパルスしていないB-LCL細胞(BLCL-NP)を用いた。培養後、遠心して上

清を回収し、液体シンチレーションカウンターを用いて、上清中に遊離した⁵¹Cr量を測定した。細胞傷害活性(%)を次の式:

$$(\text{試料上清中の}^{51}\text{Cr遊離量} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr遊離量}) / (\text{最大}^{51}\text{Cr遊離量} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr遊離量}) \times 100$$

(自然発生⁵¹Cr遊離量は、⁵¹Crを取り込ませた標的細胞のみを同様の条件で培養したときの⁵¹Cr遊離量であり、最大⁵¹Cr遊離量は、⁵¹Crを取り込ませた標的細胞を1% トリトンX-100を用いて全細胞を溶解させたときの⁵¹Cr遊離量である)

を用いて決定した。結果を図1~4に示す。図中、縦軸は特異的溶解(%)を示し、横軸はE/T比を示す。また、BLCL-Pを実線、BLCL-NPを点線で示す。WT1₃₃₇、WT1₃₆₄、WT1₃₆₇ およびWT1₄₀₉を用いて誘導されたCTLは、BLCL-NP細胞と比較して、WT1ペプチドをHLA-A*3303分子との複合体として提示しているBLCL-P細胞を特異的に傷害することが確認できた。以下で、WT1₃₆₄、WT1₃₆₇ およびWT1₄₀₉を用いて誘導されたCTLについてさらなる実験を行った。

[0049] CTLの内因性WT1遺伝子発現細胞に対する細胞傷害活性

WT1₃₆₄、WT1₃₆₇ およびWT1₄₀₉を用いて誘導されたCTLのWT1遺伝子発現腫瘍細胞TF-1細胞(HLA-A*3303陽性)に対する細胞傷害活性を上述の方法を用いて決定した。対照として、WT1遺伝子を発現しているが、HLA-A*3303陰性細胞であるK562細胞を用いた。結果を図5~7に示す。図中、縦軸は特異的溶解(%)を示し、横軸はE/T比を示す。また、TF-1を実線、K562を点線で示す。WT1₃₆₄、WT1₃₆₇ およびWT1₄₀₉を用いて誘導されたCTLが、WT1遺伝子を内因性に発現している細胞に対しても傷害活性を有することが確認できた。

[0050] 次に、WT1₃₆₇を用いて誘導されたCTLのWT1発現B-LCL細胞に対する細胞傷害活性を上述の方法を用いて決定した。WT1発現B-LCL細胞(B-LCL-WT1)は、ヒトWT1遺伝子を導入したB-LCL細胞であって、細胞内でWT1タンパク質を発現し、プロセスされて約9個のアミノ酸からなるペプチドをHLA-A*3303分子と共に提示する細胞をいう。対照として、WT1遺伝子ではないコントロール遺伝子を導入したB-LCL細胞(B-LCL-CV)を用いた。結果を図8に示す。図中、縦軸は特異的溶解(%)を示し、横軸はE/T比を示す。また、B-LCL-WT1を実線で

、B-LCL-CVを点線で示す。WT1₃₆₇を用いて誘導されたCTLは、HLA-A*3303陽性かつWT1陽性細胞のみを傷害することを確認した。

産業上の利用可能性

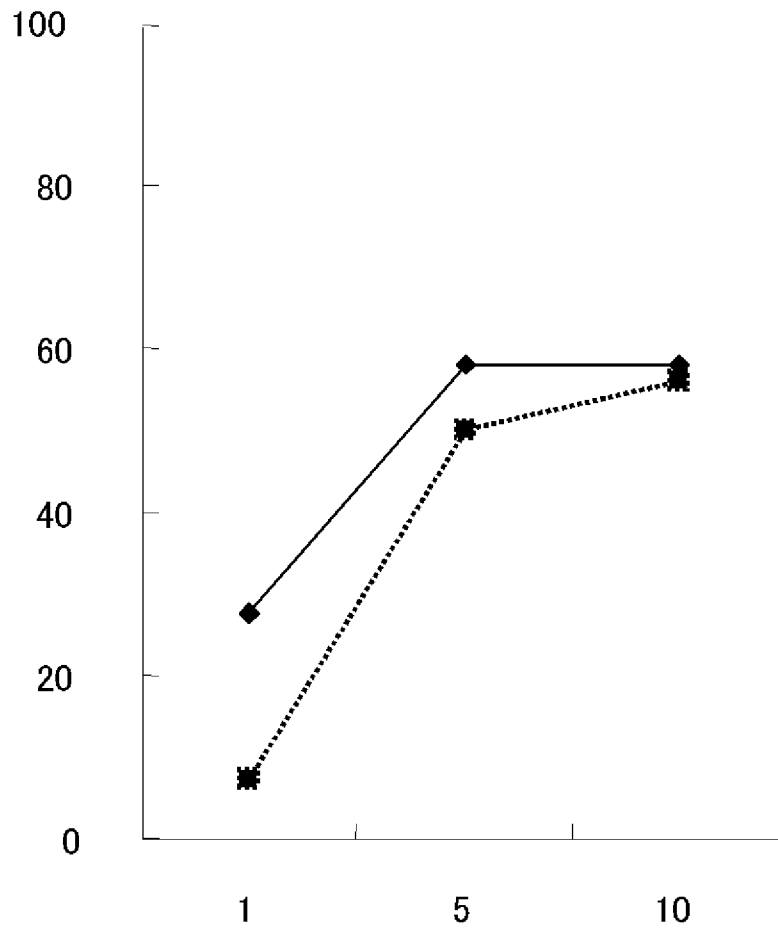
[0051] 本発明により、HLA-A*3303拘束性のWT1ペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびそれらを含む医薬組成物等が提供されるので、医薬品等の分野、例えば、WT1遺伝子を高発現している種々の造血器腫瘍、固形癌の予防薬、または治療薬の開発、製造分野において利用可能である。

請求の範囲

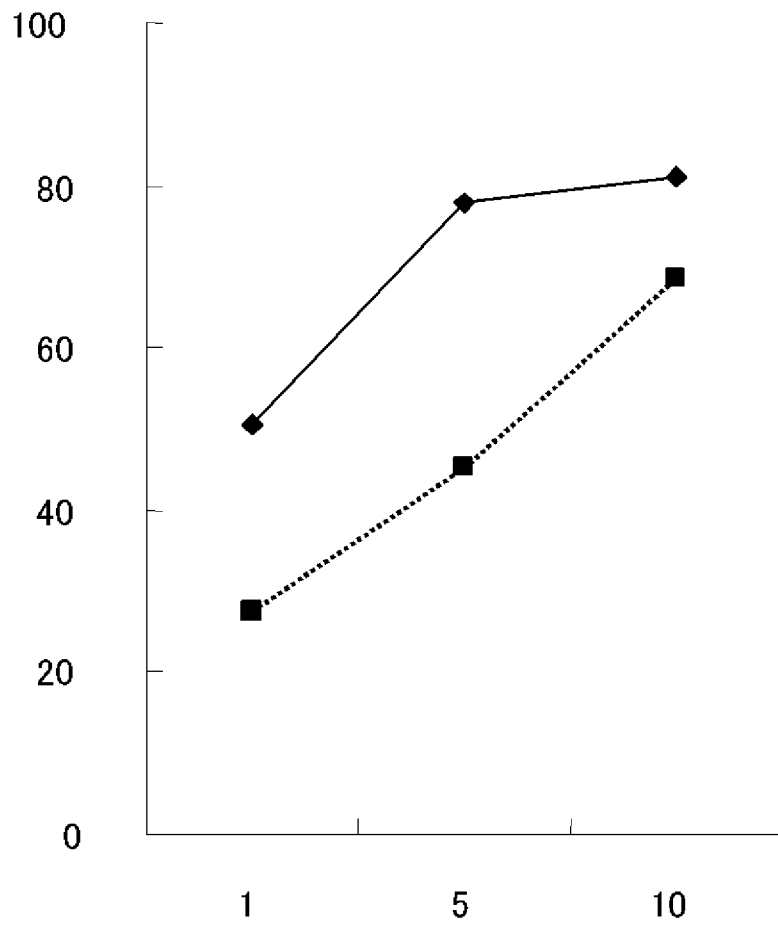
- [1] WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、該9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列の第2位のアミノ酸がAla、Ile、Leu、Val、Phe、Tyr、Ser、およびAspからなる群から選択されるものであり、第9位のアミノ酸がArgである、ペプチド。
- [2] アミノ酸配列が以下の群：
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg(配列番号:2)、
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg(配列番号:3)、
Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg(配列番号:4)、および
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg(配列番号:5)
から選択されるものである、請求項1記載のペプチド。
- [3] アミノ酸配列がSer Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg(配列番号:4)である、請求項2記載のペプチド。
- [4] 請求項1記載のペプチドを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物。
- [5] 有効量の請求項4記載の医薬組成物をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法。
- [6] 請求項4記載の医薬組成物を製造するための請求項1記載のペプチドの使用。
- [7] 請求項1記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [8] 請求項7記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [9] 請求項7記載のポリヌクレオチドまたは請求項8記載のベクターを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物。
- [10] 有効量の請求項9記載の医薬組成物をHLA-A*3303陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法。
- [11] 請求項9記載の医薬組成物を製造するための請求項7記載のポリヌクレオチドまたは請求項8記載のベクターの使用。
- [12] 請求項1記載のペプチドにより誘導される、WT1特異的CTL。
- [13] 末梢血単核球を請求項1記載のペプチドの存在下で培養し、該末梢血単核球からWT1特異的CTLを誘導することを特徴とする、WT1特異的CTLの誘導方法。

- [14] 請求項1記載のペプチドを必須構成成分として含む、WT1特異的CTLを誘導するためのキット。
- [15] 請求項1記載のペプチドにより誘導される、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞。
- [16] 未熟抗原提示細胞を請求項1記載のペプチドの存在下で培養し、該未熟抗原提示細胞からWT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導することを特徴とする、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞の誘導方法。
- [17] 請求項1記載のペプチドを必須構成成分として含む、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導するためのキット。
- [18] 請求項12記載のCTLまたは請求項15記載の抗原提示細胞を用いることを特徴とする、癌の診断方法。
- [19] HLA-A*3303陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定する方法であって、
- (a) WT1ペプチドとHLA-A*3303分子との複合体を該対象由来試料と反応させ;次に、
 - (b) 該試料に含まれる該複合体を認識するCTLの存在または量を調べる、工程を含む方法。
- [20] 複合体がテトラマーの形態である、請求項19記載の方法。

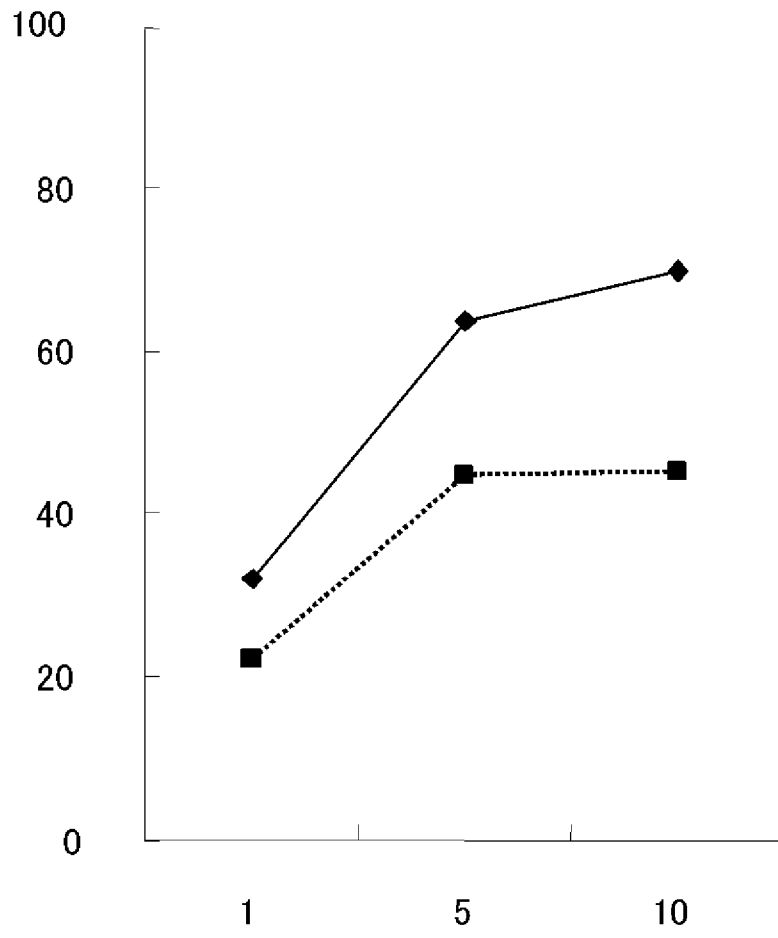
[図1]



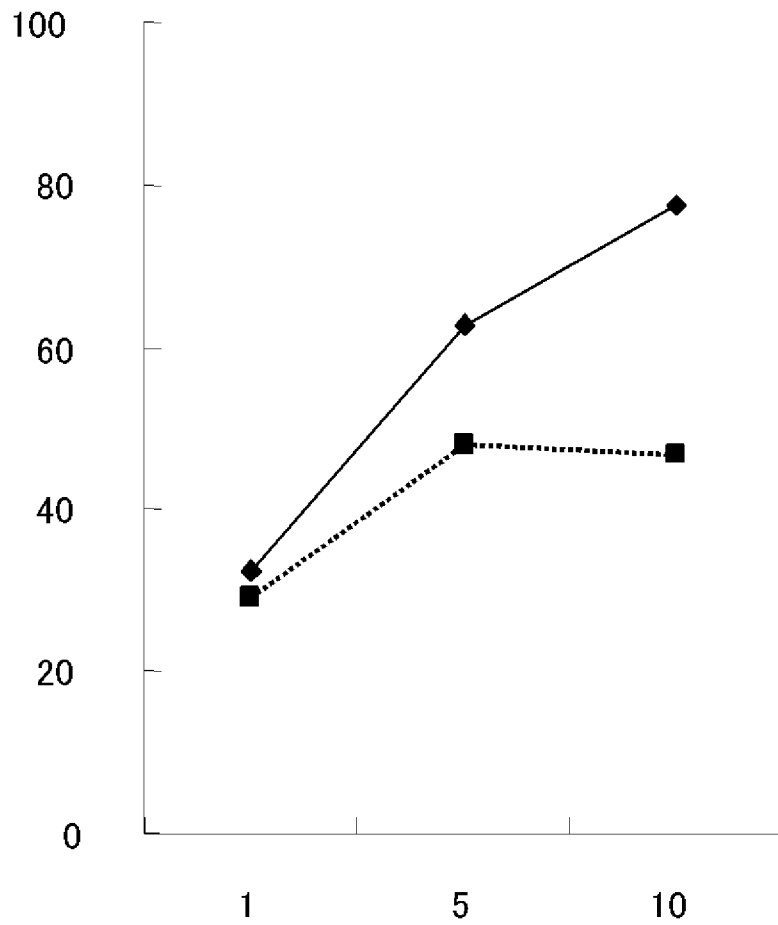
[図2]



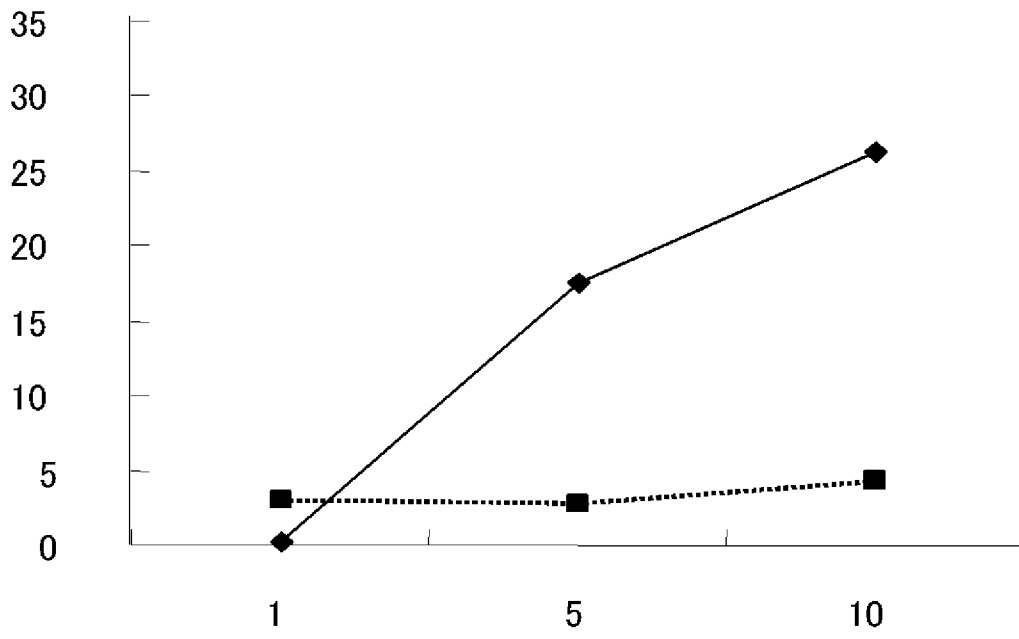
[図3]



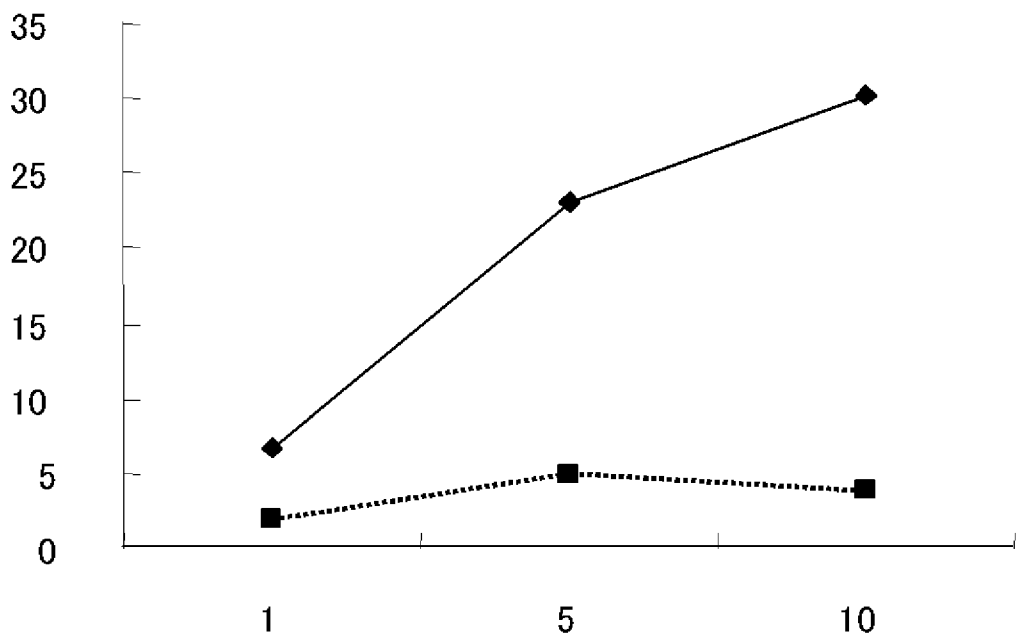
[図4]



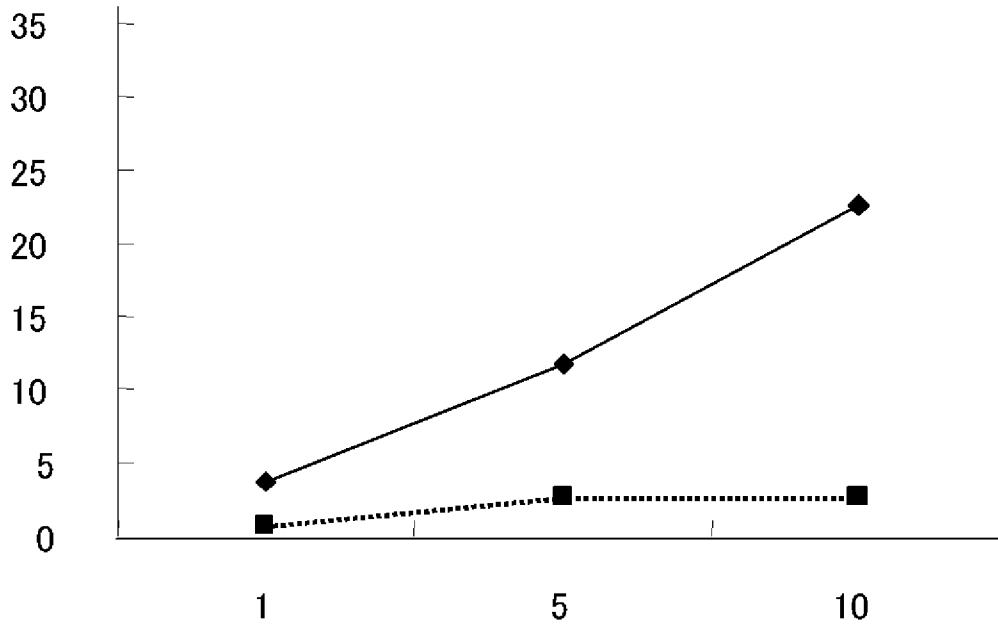
[図5]



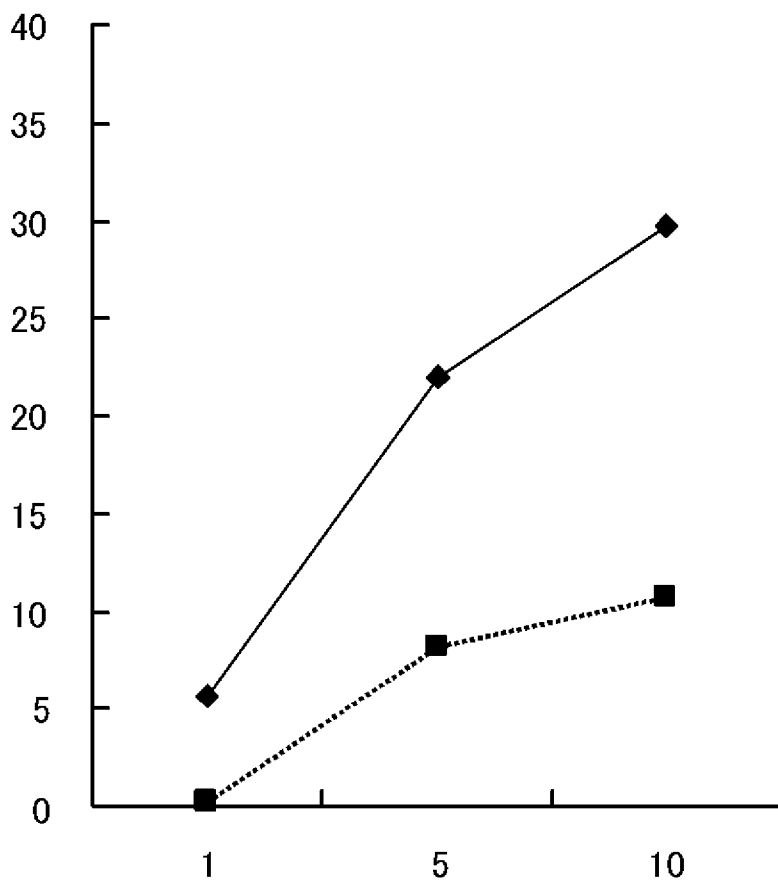
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01) i, A61K35/76(2006.01) i, A61K38/00(2006.01) i, A61K48/00(2006.01) i, A61P13/08(2006.01) i, A61P13/10(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i, A61P35/02(2006.01) i, C07K7/06(2006.01) i, 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) C12N15/09, A61K35/76, A61K38/00, A61K48/00, A61P13/08, A61P13/10, A61P35/00, A61P35/02, C07K7/06, C12N5/06, C12Q1/02, A61K35/26 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/Geneseq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2002/028414 A1 (CORIXA CORP. et al.), 11 April, 2002 (11.04.02), & JP 2004-510425 A & EP 1328287 A1 & US 2003/0082196 A1 & US 2003/0072767 A1 & US 7115272 B1 & US 7144581 B2	1, 2, 4, 6-9, 11-17, 19, 20/ 3
X/A	WO 2000/018795 A2 (CORIXA CORP. et al.), 06 April, 2000 (06.04.00), & JP 2002-525099 A & JP 2007-001984 A & EP 1117687 A2 & US 2006/0121046 A1 & US 7063854 B1	1, 2, 4, 6-9, 11-17, 19, 20/ 3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 13 April, 2007 (13.04.07)		Date of mailing of the international search report 01 May, 2007 (01.05.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053176

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2003/037060 A2 (CORIXA CORP. et al.), 08 May, 2003 (08.05.03), & JP 2005-518192 A & EP 1468014 A2 & US 2003/0039635 A1 & US 2003/0095971 A1 & US 2003/0198622 A1 & US 2003/0235557 A1 & US 2004/0126362 A1	1, 2, 4, 6-9, 11-17, 19, 20/ 3
X/A	WO 2001/025273 A2 (CORIXA CORP. et al.), 12 April, 2001 (12.04.01), (Family: none)	1, 2, 4, 6-9, 11-17, 19, 20/ 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053176

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, A61K35/26(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/053176

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

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

1. Claims Nos.: 5, 10, 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It is relevant to methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

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

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P13/08(2006.01)i, A61P13/10(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, A61K35/26(2006.01)n</p>		
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A61K35/76, A61K38/00, A61K48/00, A61P13/08, A61P13/10, A61P35/00, A61P35/02, C07K7/06, C12N5/06, C12Q1/02, A61K35/26</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN), GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq, UniProt / Geneseq</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	<p>WO 2002/028414 A1 (CORIXA CORP. et al.) 2002.04.11 & JP 2004-510425 A & EP 1328287 A1 & US 2003/0082196 A1 & US 2003/0072767 A1 & US 7115272 B1 & US 7144581 B2</p>	<p>1,2,4,6-9, 11-17,19, 20/3</p>
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	13.04.2007	国際調査報告の発送日
		01.05.2007
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B 8931
日本国特許庁 (ISA/J P)	齊藤真由美	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 5、10、18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、人の治療及び診断方法に該当する発明である。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 2000/018795 A2 (CORIXA CORP. et al.) 2000.04.06 & JP 2002-525099 A & JP 2007-001984 A & EP 1117687 A2 & US 2006/0121046 A1 & US 7063854 B1	1,2,4,6-9, 11-17,19, 20/3
X/A	WO 2003/037060 A2 (CORIXA CORP. et al.) 2003.05.08 & JP 2005-518192 A & EP 1468014 A2 & US 2003/0039635 A1 & US 2003/0095971 A1 & US 2003/0198622 A1 & US 2003/0235557 A1 & US 2004/0126362 A1	1,2,4,6-9, 11-17,19, 20/3
X/A	WO 2001/025273 A2 (CORIXA CORP. et al.) 2001.04.12 (ファミリー無し)	1,2,4,6-9, 11-17,19, 20/3