

(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2005-535299

(P2005-535299A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/00	C O 7 K 7/06	4 C O 8 4
C O 7 K 7/06	C O 7 K 14/47	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-507838 (P2004-507838)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月14日 (2003. 5. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年1月14日 (2005. 1. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/005038
 (87) 国際公開番号 W02003/100432
 (87) 国際公開日 平成15年12月4日 (2003. 12. 4)
 (31) 優先権主張番号 102 25 139.8
 (32) 優先日 平成14年5月29日 (2002. 5. 29)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

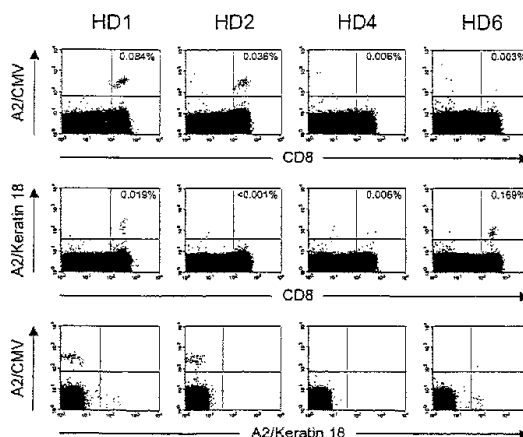
(71) 出願人 504436789
 インマティクス バイオテクノロジーズ
 ゲーエムペーハー
 ドイツ連邦共和国, 7 2 0 7 6 テュービ
 ンゲン, アオフ デア モルゲンシュテレ
 1 5 番地
 (74) 代理人 100077012
 弁理士 岩谷 龍
 (72) 発明者 ヴァインシェンク, トーニ
 ドイツ連邦共和国, 7 3 7 3 0 エスリン
 ゲン, プロヒンガーシュトラーセ 1 4 6
 番地

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応性ペプチドを同定するための方法

(57) 【要約】

本発明は、免疫反応性ペプチドを同定するための方法に関する。該方法によれば、腫瘍および相当する健康な組織の試料をまず提供し、腫瘍特異的発現プロファイルを続いて決定し、抗原性ペプチドを、腫瘍組織から単離して、解析する。次いで得られた各データをマッチさせ、ペプチドを、上記データに基づいて同定する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む免疫反応性ペプチドを同定するための方法：

- a) 腫瘍とそれに対応する健常組織の試料を準備すること、
- b) 該準備された試料について腫瘍特異的発現プロファイルを決定すること、
- c) 腫瘍組織の試料中で抗原性ペプチドを単離および解析すること、
- d) 工程 b) および c) で得られたデータをマッチングさせること、および
- e) マッチングさせたデータに基づいてペプチドを同定すること。

【請求項 2】

前記抗原性ペプチドが MHC リガンドであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法 10

【請求項 3】

工程 b) が、マイクロアレイ解析および/または逆転写 - ポリメラーゼ連鎖反応によって実施されることを特徴とする、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 c) の解析が、質量分析によって実施されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

工程 c) において、候補の抗原性ペプチドが、適切なデータベースを用いた発現プロファイルに基づいて予測されること、およびペプチドについて質量分析計によって測定されることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

工程 c) の後に、末梢白血球、好ましくは T リンパ球の反応性が、単離された抗原性ペプチドに対して試験される更なる工程が実施されることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

反応性試験が、白血球によって合成されたサイトカイン mRNA および/または - インターフェロン mRNA の測定によって実施されることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 c) の後、特異的 T リンパ球の存在が検出される更なる工程が実施されることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 9】

特異的 T リンパ球の検出が、抗原提示分子および抗原性ペプチドの再構成複合体で白血球を標識する方法によって実施されることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ペプチドが、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法にしたがって同定され、該同定されたペプチドが、化学的に、*in vitro* または *in vivo* にて合成される、免疫反応性ペプチドを調製するための方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法によって同定された、および/または請求項 10 に記載の方法によって調製された、免疫反応性ペプチド。 40

【請求項 12】

請求項 11 に記載の 1 つまたはそれ以上のペプチドを含む、医薬組成物。

【請求項 13】

腫瘍疾患の治療のための、請求項 11 に記載のペプチドの使用。

【請求項 14】

腫瘍疾患の治療のための医薬を調製するための、請求項 11 に記載のペプチドの使用。

【請求項 15】

腫瘍疾患の治療経過を評価するための、請求項 11 に記載のペプチドの使用。 50

【請求項 16】

抗体を調製するための、請求項 11 に記載のペプチドの使用。

【請求項 17】

請求項 11 に記載のペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 19】

請求項 11 に記載のペプチドを生産する、請求項 17 に記載の核酸分子によって遺伝的に改変された細胞。

【請求項 20】

a) 請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法を実施すること、
b) 該同定された免疫反応性ペプチドを調製すること、および
c) 該調製した免疫反応性ペプチドを製剤化すること、
の工程を含むワクチンを調製する方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫反応性ペプチドを同定するための方法、免疫反応性ペプチドを調製するための方法、およびそれによって同定/調製された免疫反応性ペプチドに関する。

【背景技術】

20

【0002】

そのようなペプチドは、例えば、腫瘍関連疾患の免疫療法で使用される。腫瘍細胞が免疫系によって排除される場合、免疫系の成分による腫瘍関連抗原 (TAA) の同定がきわめて重要な役割を果たす。この機構は、腫瘍細胞と正常細胞との間に質的または量的な差違が存在するという事実に基づいている。抗腫瘍応答を誘導するためには、腫瘍細胞は、腫瘍の排除に十分である免疫応答を誘導する抗原を発現しなければならない。

【0003】

特に、CD8 を発現する細胞傷害性 T リンパ球 (以下 CTL) が、腫瘍の拒絶に関与している。細胞傷害性 T 細胞によるそのような免疫応答を誘導するためには、外来タンパク質/ペプチドが T 細胞に提示されなければならない。抗原は、細胞表面上で MHC 分子によって提示された場合にのみ、T 細胞によってペプチド断片として認識される。これらの MHC (主要組織適合性複合体) 分子は、通常、細胞内でペプチドに結合してペプチドを細胞表面に輸送する、ペプチドレセプターである。ペプチドと MHC 分子のこの複合体は T 細胞によって認識される。ヒト MHC 分子はまた、ヒト白血球抗原 (HLA) とも呼ばれる。

30

【0004】

過去に、T 細胞に基づく抗原特異的免疫療法が癌の治療によい結果をもたらすことが証明されている。

【0005】

腫瘍に対する特異的 CTL 応答の誘導は、腫瘍関連抗原 (TAA) に由来する MHC クラス II リガンドの同定に依存している。そのような TAA は、例えば、変異した遺伝子の産物として、完全に悪性細胞中にだけ存在しうる。他の重要な腫瘍関連抗原のクラスは精巢癌抗原のような組織特異的構造物であり、腫瘍関連抗原の第三のクラスは腫瘍にて過剰発現されるタンパク質である。

40

【0006】

腫瘍ワクチンの開始点を提示する TAA を同定およびその特性を決定するための方法は、一方で、患者由来の CTL または抗体の使用に基づいている。この免疫学的アプローチは、認識されたペプチドの遺伝子発現アプローチまたは質量分析 (MS) 補助シーケンシングのいずれかと組み合わせられる (van der Bruggen ら, 1991, 「ヒトの黒色腫上の細胞傷害性 T リンパ球によって認識される抗原をコードしている遺伝子

50

(A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma)」、*Science* 254:1643-1647、および Coxら、1994、「5つの黒色腫特異的ヒト細胞傷害性T細胞株によって認識されるペプチドの同定(Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines.)」*Science* 264:716-719を参照のこと)。腫瘍および相当する正常組織の比較転写プロファイリングに基づく、TAAの同定のための方法としては、例えば、ハイブリダイゼーションおよびDNAマクロアレイ技術の使用がある。

【0007】

Celissら、1994、「初代培養物および合成ペプチドエピトープを用いた、正常なヒトにおける抗腫瘍細胞傷害性Tリンパ球の誘導(Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes.)」、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2105-2109では、選択された腫瘍関連抗原由来MHCクラスIリガンドの予想を利用し、これらのリガンドを、次の段階でT細胞エピトープとして確認する方法が適用された。

10

【0008】

患者由来のT細胞に基づくアプローチの欠点は、大規模な培養技術とそれらが既存のT細胞の頻度を制限することである。

【0009】

当該分野で公知の別のT細胞に依存しないアプローチは、エピトープ予測および複合体ペプチド混合液中での予想ペプチドに対するスクリーニングを組み合わせたものであり、ペプチドを高感度キャピラリー液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)によって同定できる(*Schirleら*、2000、「新規T細胞非依存アプローチによる、腫瘍関連MHCクラスIリガンドの同定(Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell independent approach)」*Eur. J. Immunol.* 30:2216-2225を参照のこと)。

20

【0010】

DNAマイクロアレイ技術は、腫瘍及び対応する自己の正常組織との比較発現プロファイリングを用いた新規なアプローチを提供する。*Youngら*、2001、「腎臓上皮新生物の発現プロファイリング：腫瘍分類および診断用分子マーカーの探索のための方法(Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers.)」*Am. J. Pathol.* 158:1639-1651は、この技術を用いることによって、個々の腫瘍試料から多数の腫瘍関連抗原を同定することができることを開示している。過剰発現されたかまたは選択的に発現されたタンパク質に由来するMHC-Iリガンドは、腫瘍の特異的CTL認識についての可能性のある標的を提供する。*Mathiasenら*、2001、「mRNA発現プロファイリングによって同定された腫瘍関連抗原は、保護的抗腫瘍免疫を誘導する(Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity.)」*Eur. J. Immunol.* 31:1239-1246は、マウスモデルで、発現解析をエピトープ予測と組み合わせることによって、良好なワクチンを調製することができることを示した。

30

40

【0011】

しかしながら、欠点として、ごく限られた標的遺伝子についてのエピトープ予測が多数の候補ペプチドを同定することになり、その大多数は実際にはMHC分子によっては提示されておらず、したがって、CTL応答を誘導しないことである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、本発明の目的は、免疫反応性ペプチドの選択的かつ簡単な同定のための新規な方法を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明にしたがって、この目的は、以下の、

- (a) 腫瘍とそれに対応する健常組織の試料を準備すること、
 - (b) 上記準備された試料について腫瘍特異的発現プロファイルを決定すること、
 - (c) 腫瘍組織の試料中で抗原性ペプチドを単離および解析すること、
 - (d) 工程(b)および(c)で得られたデータをマッチングすること、および
 - (e) マッチングさせたデータに基づいてペプチドを同定すること、
- を含む、免疫反応性ペプチドを同定するための方法によって達成される。

【0014】

本発明者らは、発現解析を、単離され解析された抗原性腫瘍ペプチドと組み合わせることによって、個々のワクチンについての特異的な候補を同定することができることを明らかにした。

【0015】

抗原性ペプチドを単離し、それらを腫瘍組織の遺伝子発現プロファイルとマッチングさせることによって、膨大な数の可能性のある免疫反応性ペプチドが得られることを避けることができる。それどころか逆に、実際にMHC分子によって提示される、免疫反応性ペプチドとして好適である、特異的ペプチドが同定される。

【0016】

本発明の方法を用いれば、特異的免疫応答を誘導するためのワクチンとして使用することのできる、患者特異的ペプチドをそれぞれ同定することができる、つまり、ペプチドを正確に患者にマッチさせることができるのである。

【0017】

例えば、工業研究所は、患者の試料を受領した後に、体系的および効果的にこの方法を実施でき、適切な免疫反応性ペプチドを同定した後に、上記ペプチド配列の管理を医療機関へ任せ、次いで医療機関が、上記ペプチドを合成し投与することができる。あるいは、研究所が、それぞれの患者に適切なペプチドの同定ならびに生産を実施することもできる。

【0018】

したがって、この新規な方法は、単なるサービスの範囲内に留まらず、同定された免疫反応性ペプチドの供給との組み合わせにも適用することができる。

【0019】

好ましい実施形態では、工程(c)で単離されたペプチドはMHCリガンドである。

【0020】

MHC分子に結合するペプチドのみが、細胞性免疫応答を誘導することができる。例えば、腫瘍の過剰発現された遺伝子に由来するがMHC分子には結合しないペプチドは、CTL免疫応答を誘導しない。したがって、例えばエピトープ予測でのみ同定されたペプチドが、必ずしも全て免疫応答性というわけではない。

【0021】

さらに好ましい実施形態では、工程(b)はマイクロアレイ解析および/または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって実施される。

【0022】

マイクロアレイ解析を用いて、腫瘍組織の発現プロファイルが、特定のDNAチップまたは遺伝子チップを用いることによって、対応する正常組織と比較され、選択的に発現された遺伝子あるいは過剰発現された遺伝子が同定される。この方法は、当該分野でよく知られており、例えば、Schenara, 1995, 「相補DNAマイクロアレイでの遺伝子発現パターンの定量的モニタリング(Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray)」Science 270: 467-470にて開示されている。

【0023】

10

20

30

40

50

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（以下RT-PCR）を利用して、遺伝子発現を定量することができる。

【0024】

この目的のために、cDNAを、例えば腫瘍細胞から単離したRNAから合成し、このcDNAを続いてPCRの鋳型として使用する。この方法においては、増幅されたDNAに基づいて、どの遺伝子がどのような強度で転写されたかを比較することができる。

【0025】

好ましい実施形態では、工程(c)は質量分析によって実施される。

【0026】

この技術を用いて、各ペプチドを、高い性能で、正確かつ効果的に同定することができる。例えば、Schirleら、2000、「新規T細胞非依存アプローチによる、腫瘍関連MHCクラスIリガンドの同定(Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell independent approach)」Eur. J. Immunol. 30: 2216 - 2225には、腫瘍組織に由来するペプチドを同定するための、質量分析の使用が記載されている。

10

【0027】

また他の実施形態では、工程(c)で、候補の抗原性ペプチドが、適切なデータベースを用いて発現プロファイルに基づいて予想され、質量分析によって上記予想された抗原が測定される。

【0028】

候補の抗原の予測のためにデータベースを使用し、得られたデータを用いることは、例えば、Schirleら、2001、「コンピュータアルゴリズムを、実験アプローチと組み合わせることにより、定義された抗原に由来するT細胞エピトープの迅速かつ的確な同定が可能になる(Combining computer algorithms with experimental approaches permits rapid and accurate identification of T cell epitopes from defined antigens)」J. Immunol. Methods, 257: 1 - 16にて開示されている。データベースの例は、例えば、<http://www.syfpeithi.de>および<http://www.paproc.de>に見ることができる。

20

【0029】

また方法の更なる好ましい実施形態では、工程(c)の後に、末梢白血球、好ましくはT白血球の単離された抗原性ペプチドに対する反応性が試験される更なる工程が続く。

30

【0030】

好ましい実施形態では、単離された抗原性ペプチドに対する末梢白血球の応答性が、白血球によって合成された - インターフェロンmRNAおよび/またはサイトカインmRNAの測定によって試験される。

【0031】

- インターフェロンmRNAまたはサイトカインmRNAを検出することによって、白血球の、好ましくはTリンパ球の、抗原性ペプチドに対する特異的な反応性を正確に証明することができる。いずれの物質も、対応する抗原性ペプチドによるそれらの活性化の後に、活性化されたTリンパ球によって分泌される。

40

【0032】

この追加の工程によって、すでに同定されたペプチドの候補を、より正確に同定することができる。

【0033】

この方法のまた別の好ましい実施形態では、工程(c)の後に、Tリンパ球の存在を検出する更なる工程が実施される。

【0034】

この方法を用いて、単離され同定されたペプチドに対して指向するTリンパ球がどの程度患者の中に以前から存在しているかを特異的に検出することができる。この工程を実施することによって、それらに対するTリンパ球が患者の中に以前から存在しているペプチ

50

ドのみをワクチンとして利用することができる。次いでペプチドを、これらの特異的Ｔリンパ球を活性化するために使用することができる。

【 0 0 3 5 】

さらに好ましい方法では、特異的な既存のＴリンパ球の検出は、抗原提示分子と抗原性ペプチドの再構築複合体を用いて白血球を標識することによって実施される。

【 0 0 3 6 】

この方法では、テトラマー技術と呼ばれるものが使用される。そのような再構築複合体（テトラマー（tetramers））を作成する方法、およびこれらを利用する方法は、例えば、Altmanら、1996、「抗原特異的Ｔリンパ球の表現型解析(Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes)」、Science 274:94-96にて開示されている。

10

【 0 0 3 7 】

本発明はさらに、本発明の方法によって同定され、調製された免疫反応性ペプチドに関する。

【 0 0 3 8 】

同定の後、これらのペプチドを、それぞれの患者について選択的および特異的に調製することができる。

【 0 0 3 9 】

本発明はさらに、本発明の方法によって同定および/または調製された1つまたはそれ以上のペプチドを含む薬学的組成物に関する。

20

【 0 0 4 0 】

上記組成物は、例えば、非経口で、例えば皮下、皮内または筋肉内投与することができる、また経口で投与することもできる。その際、ペプチドは、薬理的に許容可能な担体、好ましくは水性担体中に溶解または懸濁させられ、組成物にはさらに、添加物、例えば、緩衝液、結合剤などを含むことができる。ペプチドはまた、免疫刺激物質、例えばサイトカイン類とともに投与することもできる。この種の組成物において使用することができる添加物の多数の記載は、例えば、A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3. Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Pressに見ることができる。

30

【 0 0 4 1 】

本発明にしたがって、ペプチドを、腫瘍疾患の治療のため、および腫瘍疾患の治療するための医薬を調製するために、使用することができる。

【 0 0 4 2 】

治療される腫瘍疾患としては、腎臓癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、精巣癌および/または皮膚癌を挙げることができる。腫瘍疾患のリストは、単に例示であり、使用の範囲を制限するものではない。

【 0 0 4 3 】

ペプチドはさらに、腫瘍疾患の治療経過を評価するために使用することができる。

【 0 0 4 4 】

ペプチドはまた、他の免疫処置または療法にて治療をモニターするために使用することができる。この方法においては、本発明のペプチドは、治療方法だけでなく、診断方法でも使用することができる。

40

【 0 0 4 5 】

更なる実施形態では、ペプチドは、抗原を作成するために使用される。

【 0 0 4 6 】

ポリクローナル抗体は、一般的な方法で、ペプチドの注入による動物の免疫と、それに続く免疫グロブリンの精製によって得ることができる。

【 0 0 4 7 】

モノクローナル抗体は、例えばMethods Enzymol. (1986), 12

50

1, Hybridoma technology and monoclonal antibodies に記載されているような、標準的な手順にしたがって作成することができる。

【0048】

更なる態様では、本発明は、本発明の方法を用いて単離されたペプチドをコードする核酸分子にも関する。

【0049】

上記核酸分子は、DNA または RNA 分子であり、同様に腫瘍の免疫療法に使用することができる。

【0050】

本発明にしたがって、核酸分子をベクター中に提供することができる。

【0051】

本発明はさらに、核酸分子の方法によって遺伝的に改変された細胞に関し、そのような細胞は、本発明にしたがって同定されたペプチドを生産する。

【0052】

本発明はさらに、免疫反応性ペプチドを調製するための方法に関する。これにより、開示された方法に従ってペプチドが同定され、同定されたペプチドは、化学的に、in vitro または in vivo で合成される。

【0053】

ペプチドは、例えば、当該分野で公知の Merrifield の方法によって、アミノ酸の化学結合によって調製することができる (Merrifield RB, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 を参照のこと)。

【0054】

ペプチドは、in vitro にて、例えば無細胞系で、および細胞を用いて in vivo で調製することができる。

【0055】

本発明の好ましい実施形態は、以下の工程、

- a) 開示された方法を実施すること、
 - b) 同定された免疫反応性ペプチドを調製すること、および
 - c) 上記調製された免疫反応性ペプチドを製剤化すること、
- を含む、ワクチンの調製方法である。

【0056】

上記の特徴、さらには以下で説明される特徴は、特定の各場合の組み合わせのみではなく、本発明の範囲から逸脱することなく、他の組み合わせで、またはそれらを単独で使用できることが理解されるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0057】

本発明の実施形態は、以下の図および実施例で表示され、説明される。

【実施例】

【0058】

患者試料

腎細胞癌が組織学的に確認された患者の試料を、テュービンゲン大学の泌尿器科から得た。いずれの患者も、手術前治療を受けていなかった。患者1 (以下 RCC01 と表記) は、以下の HLA 型、HLA - A*02 A*68 B*18 B*44 を、患者2 (以下 RCC13 と表記) は、HLA - A*02 A*24 B*07 B*40 を有していた。

【0059】

MHC クラス I 結合ペプチドの単離

ショック冷凍 (shock-frozen) した腫瘍試料は、Schirle, M. らの記載「新規 T 細胞 - 非依存アプローチによる、腫瘍関連 MHC クラス I リガンドの同定

10

20

30

40

50

(Identification of tumor-associated MHC-class I ligands by a novel T cell-independent approach)」2000,European Journal of Immunology,30:2216-2225に従い処理した。ペプチドは、クラスIHLAに特異的なモノクローナル抗体W6/32、又は、HLA-A2に特異的なモノクローナル抗体BB7.2を用いて標準的な手順により単離された。これらの抗体の生産方法と使用方法は、Barnstable, C.J.らの「グループA赤血球、HLAおよび他のヒト細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の生産 - 遺伝的解析のための新規ツール(Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes,HLA and other human cell surface antigens-New tools for genetic analysis.)」1978,Cell,14:9-20、及び、Parham, P.及びBrodsky F.M.の「BB7.2の部分精製および特性。HLA-A2およびHLA-A28の変異体に対する特異性を持つ細胞傷害性モノクローナル抗体(Partial purification and some properties of BB7.2.A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28)」1981,Hum.Immunol.,3:277-299による。

10

20

30

40

50

【0060】

質量分析

患者RCC01の腫瘍組織由来のペプチドは、逆相HPLC(SMART-system, μ RPC C2/C18 SC 2.1/19, Amersham Pharmacia Biotech)により分離され、フラクションはnanoESI MSを用いて分析された。これに際し、手順はSchirle, M.等の報告に記載されている方法で実施した(Identification of tumor-associated MHC-class I ligand by a novel T cell-independent approach, 2000,European Journal of Immunology, 30:2216-2225)。

【0061】

ペプチドを患者RCC13の腫瘍組織から、少し変更を加えて、上記のように、オンラインキャピラリーLC-MSによって同定した。約100 μ lの試料容量をロードし、脱塩し、300 μ m \times 5mmのC18 μ -プレカラム上で予め濃縮した(LCパッキング)。気密性100 μ lのシリンジ(1710 RNR, Hamilton)を備えたシリンジポンプ(PHD 2000、ハーバード アパラタス社(Harvard Apparatus, Inc.))により、2 μ l/分で溶媒および試料を供給した。ペプチドの分離のために、予め濃縮したカラムを、75 μ m \times 250mmのC-18(LCパッキング)カラムに一つで切り替えた。その後TEEピース(ZTLC, Valco)および300 μ m \times 150mmのC-18カラムのプレカラムを用いて、12 μ l/分の流速をおよそ300nl/分まで減少させ、70分間の25%~60%のBによる二液グラジエント溶出を実施した。

【0062】

ブランクランを常時実施して、確実に本系に残余ペプチドを含めないようにした。オンライン断片化を上述のように実施して、断片スペクトルを手動で解析した。

【0063】

データベース検索(NCBInr, EST)を、MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)を用いて行った。

【0064】

RNAの調製

正常組織および悪性腎臓組織の一部を解剖し、ショック凍結し、液体窒素下で、乳鉢および乳棒によって細かく粉碎し、TRIZOL(ライフ テクノロジーズ)中のロータリーホモジナイザー(ハイドルフ インストゥルメンツ)でホモジナイズした。トータルRNAを取扱説明書にしたがって調製し、その後、RNeasy(キアゲン)で浄化した。ヒト組織由来のトータルRNAは商業的に入手した(Human total RNA Master Panel II、クオンテック)。

【0065】

高密度オリゴヌクレオチドマイクロ-アレイ解析

スーパースクリプトRT II逆転写酵素(ライフ テクノロジーズ)を用いて、二本

鎖DNAを、40 μ gのトータルRNAから合成した。プライマー（ユーロジェンテック）を、アフィメトリックスのマニュアルによって作成した。in vitro転写を、Bio Array（登録商標）High Yield（登録商標）RNA Transcription Labeling Kit（エンゾ ダイアゴノスティクス社（ENZO Diagnostics, Inc.））を用いて実施し、続いて、断片化およびハイブリダイゼーションを、取扱説明書（アフィメトリックス）にしたがって、アフィメトリックス Hu Gene FL 遺伝子チップに対して、ストレプトアビジン - フィコエリスリンおよびビオチン化抗ストレプトアビジン抗体を用いて実施した。アフィメトリックス Gene Array Scanner を使用し、データを、Microarray Analysis Suite 4.0 Software で解析した。

10

【0066】

リアルタイムRT-PCR

マイクロアレイ解析のために作成したcDNAを、定量PCR解析に使用した。

【0067】

各遺伝子を、ABI PRISM 7700 配列検出システム（アプライド バイオシステムズ）上で、SYBR Green 化学反応を用いて、二重で走らせた（40 サイクル、95 \times 15 秒間、60 \times 1 分間）。試料を別々に2~3回解析した。プライマー（MWG - バイオテック）をイントロンに隣接するように選択し、PCR効率をすべてのプライマー対について試験し、これがほぼ1に近いことを発見した。

【0068】

PCR産物を精製のために3%アガロースゲル上で解析し、TOPO TA Cloning Kit（インビトロジェン）を用いてpCR4-TOPOベクター内にクローニングした後に配列を確認した。データ解析には、比較定量のためにデルタC_T法を含めた。

20

【0069】

レーザー微量組織採取法

包埋した凍結組織標本を6 μ mの厚さに切断し、70%エタノール中に移して約15分間おいた。スライドを、Mayer's ヘマトキシリン（メルク）中で90秒間インキュベートし、水中でリンスし、70%エタノール中で1分間、95%エタノール中で1分間、1%アルコール性エオシンY（シグマ）中で30秒間、95%エタノール中で2 \times 2分間、100%エタノール中で2 \times 2分間、最後にキシレン中で2 \times 2分間インキュベートした。15分間風乾させた後、スライドを乾燥条件下で保存した。正常な悪性上皮管状細胞および癌細胞を、PixCell II LCMシステム（アラクチュラス エンジニアリング（Arcturus Engineering））を用いて、レーザー微量組織採取法（Laser Capture Microdissection（LCM））によって単離した。トータルRNAを、400 μ lのTRIzol中で抽出した。

30

【0070】

PBMC、テトラマーの生産およびフローサイトメトリー

血清学的にCMV陽性と分類された、2人の健常なドナー（HD1およびHD2）からの末梢血単核細胞（以下PBMC）を、勾配遠心分離（Ficollute H）および凍結によって単離した。

40

【0071】

HLA-A*0201テトラマー複合体を、Altmanら, 1996, 「抗原特異的Tリンパ球の表現型解析（Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.）」Science 274:94-96によって記載されているように、以下のように生産した。リフォールディングのために使用したHLA-A2結合ペプチドは、ケラチン18由来のALLNIKVKL、およびpp65 HCMVA由来のNLVPMVATVであった。テトラマーは、ビオチン化モノマーをストレプトアビジン-PEまたはストレプトアビジン-APCと混合して作製し、2~3 \times 10⁶個の細胞を、両方のテトラマーと共に、4にて30分間インキュベートした：PBS 0.01%、NaN₃ 2mM、EDTA 50%及び子ウシ血清中、それぞれ10 μ g/mlのモノマー濃度。次いで、モ

50

ノクローナル抗体抗 - C D 4 - F I T C (コールター - イムノテック (C o u l t e r - I m m u n o t e c h)) および抗 C D 8 - P e r C P (ベクトン ディッキンソン) を 2 0 分間かけて加えた。3 回洗浄した後、試料を、F A C S 緩衝液、1 % ホルムアルデヒド中で固定した。四色解析を、F A C S c a l i b u r サイトメーター (ベクトン ディッキンソン) 上で実施した。

【 0 0 7 2 】

結果

2 つの腎細胞癌の腫瘍および対応する正常組織において、およそ 7 0 0 0 個の遺伝子の発現を解析した。4 0 0 から 5 0 0 個の間の遺伝子が、腫瘍において過剰発現されているか、または選択的に発現されていることを発見した。7 0 個の遺伝子が、両方の患者の腫瘍中で過剰発現されていた。患者 1 では、2 6 8 個の過剰発現されている遺伝子と、1 2 9 個の独占的に発現されている遺伝子が発見された。過剰発現されている遺伝子のほとんどが、癌関連、すなわち腫瘍遺伝子、腫瘍抑制遺伝子または C C N D 1、C A 9、セレブロシドスルホトランスフェラーゼおよび副甲状腺ホルモン様ホルモンのような、癌において過剰発現されることがすでに記載されている遺伝子いずれかである。がん関連脂肪分化関連タンパク質 (A D F P) またはアジポフィリンは、過剰発現の程度が二番目に高かった。さらにこのタンパク質は、他の器官の正常組織に比べて、腫瘍組織中で、高度に過剰発現されていることが示され、このことは正常な腎臓組織との比較においてのみではなかった。

10

【 0 0 7 3 】

マイクロアレイ解析によって得られたデータを検証するために、選択された遺伝子の発現を、定量 P C R によって解析した。図 1 に、R T - P C R による選択された遺伝子の発現解析を示している。R T - P C R を、マイクロアレイ解析のために作製したものと同じ c D N A を用いて実施した。コピー数は、1 8 S r R N A と比例し、各患者の正常組織 (= 1) に対して標準化した。黒棒は、患者 R C C 0 1 の腫瘍組織中の数に相当し、白棒は、正常組織の数を表し、しま模様のある灰色棒は、患者 R C C 1 3 の腫瘍組織中の数を表す。

20

【 0 0 7 4 】

マイクロアレイによって証明されたアジポフィリン (A D F P) およびサイクリン D 1 (C C N D 1) の過剰発現を定量 P C R によって確認できることが示された。さらに、e t s - 1 (E T S 1) は正常および腫瘍組織の両方において同程度発現されることが明らかである。さらに、両方の技術によって検出された相対的な発現レベルは、おおよそ同程度であった。

30

【 0 0 7 5 】

例えば、アジポフィリンは、定量 P C R の方法によって測定された 1 8 . 1 と比較して、マイクロアレイによって証明されるように、患者 R C C 0 0 1 の腫瘍組織上では 2 9 . 1 倍過剰発現されていた (図 1 を参照のこと) 。患者 R C C 1 3 については、マイクロアレイ解析によつては 1 1 . 4 倍、そして定量 P C R によつては 6 . 7 倍であることが明らかにされた (図 1 を参照のこと) 。ガレクチン 2 (L G A L S 2) は患者 R C C 0 1 にて過剰発現されており、ケラチン 1 8 (K R T 1 8) は患者 R C C 1 3 で過剰発現されていた。マイクロアレイと定量 P C R の間の一致における例外は、患者 R C C 1 3 での、K I A A 0 3 6 7 と m e t 原癌遺伝子 (M E T) の過剰発現であった。

40

【 0 0 7 6 】

M H C クラス I リガンドの同定

合計 8 5 個のリガンドが腫瘍組織から得られた。これらは、H L A - サブタイプ H L A - A * 0 2、H L A - A * 6 8、H L A - B * 1 8 または H L A - B * 4 4 に結合した。H L A - A * 0 2 に結合するペプチドは、対立遺伝子特異的ペプチドモチーフ (2 位にロイシン、バリン、イソロイシン、アラニン、メチオニン、C - 末端にロイシン、バリン、イソロイシンまたはアラニン) を反映した。ほとんどのリガンドが豊富に発現されているハウスキーピングタンパク質由来のものであるが、腫瘍関連性が報告されたタンパク質由

50

来のリガンドも検出することができ、例えば、met - 原癌遺伝子由来の Y V D P V I T S I、ケラチン18由来の A L L N I K V K L、およびアジポフィリン由来の S V A S T I T G Vも検出できた。

【0077】

H L A - A * 68リガンドは、そのアンカーアミノ酸である2位のスレオニン、イソロイシン、バリン、アラニンまたはロイシンと、C - 末端のアルギニンまたはリジンによって同定された。アジポフィリンに由来する2つの他のリガンドが、H L A - A * 68提示ペプチド、M T S A L P I I Q KおよびM A G D I Y S V F Rの中から発見された。2位にグルタミン酸を持つリガンドはH L A - B * 44とした。なぜなら、H L A - B * 18のペプチドモチーフが未知であるので、これらの2つのH L A - B分子のリガンド間の区別は不可能であるからである。

10

【0078】

マイクロアレイデータと、単離したリガンドとの比較により、M H Cリガンドの供給源として、10個の過剰発現されている遺伝子が示された。それらは、アジポフィリン、K I A A 0 3 6 7、S E C 1 4 様 1、B細胞転座遺伝子1、アルドラーゼA、サイクリンD 1、アネキシンA 4、カテニン 1、ガレクチン2およびL M P 2である。これらのうち、K I A A 0 3 6 7、アルドラーゼAおよびカテニン 1の3つは、S E R E Xデータベース中にも含まれていた。

【0079】

最も興味深いリガンドは、患者R C C 1 3から同定された。これは、D E A D / H - b o xポリペプチド3 (D D X 3)と比較して1ヌクレオチドのシフトがある“読み枠”によってコードされる (A L A A V V T E V)。A L A A V V T E Vは、D D X 3のコーディング鎖のヌクレオチド3 1 7 ~ 3 4 3によってコードされ、一方、ヌクレオチド3 1 6 ~ 3 4 2は、D D X 3タンパク質のG I G S R G D R Sをコードしている。

20

【0080】

正常なC D 8 + T細胞レパートリー中の特異的T細胞の検出

6個のH L A - A 2陽性の腎細胞癌患者由来のP B M Cは、4つの関連ペプチド：アジポフィリン、ケラチン18、K I A A 0 3 6 7およびmet - 原癌遺伝子からのH L A - A * 0 2拘束リガンドに対する反応について試験した。この際、非常に感度の良い定量P C Tアッセイを行って、ペプチドでの7日間のi n v i t r oでの感作の後のC D 8 + T細胞による - インターフェロン - m R N Aの生産を検出した。散発的な応答が、met - 原癌遺伝子またはケラチン18またはアジポフィリンペプチドでの刺激の後に見られた。

30

【0081】

腫瘍患者および健常な個体のP B M Cの、H L A - A * 0 2 0 1テトラマーでの染色は、アジポフィリン、ケラチン18またはmet - 原癌遺伝子いずれかによる再構築したテトラマーを用いて実施された。

【0082】

図2は、ケラチン18特異的Tリンパ球の検出を示している。この目的のために、4人の健常なH L A - A * 0 2ドナー (H D 1、2、4、6)からのP B M Cを、H L A - A 2 / ケラチン18 - P Eテトラマー、H L A - A 2 / C M V - A P Cテトラマー、C D 8 - P r e C PおよびC D 4 - F I T Cで同時に染色した。ドットプロットは、 1×10^6 個のP B M Cについての3つの別々の実験の1つによる試料を示している。プロットには、C D 8 + C D 4 - 集団のうちのテトラマー + 細胞の割合が示されている。

40

【0083】

思いがけなく、ケラチン18に特異的なC D 8 + Tリンパ球の有意な集団 (C D 8 + T細胞の0.02%から0.2%の間) が、22人の健康な個体のうち4人で見られた。この集団は、C M Vテトラマーでは染色されず、このことは、ケラチン18テトラマーの結合が特異的であることを示している。

【0084】

50

まとめると、ケラチン18 - ペプチドに特異的なCD8⁺ Tリンパ球が、ヒトT細胞レポトリー内に含まれると結論づけることができる。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】図1は、選択された遺伝子の定量RT-PCRによる発現解析を示している。

【図2】図2は、ケラチン18特異的CD8⁺ Tリンパ球の検出を示している。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

<120> Method for Identifying immunoreactive Peptides

<130> 4648P103WO 10

<140> PCT/EP 03/05038

<141> 2003-05-14

<150> 10225139.8, DE

<151> 2002-05-29

<160> 8 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens 30

<400> 1

Ala Leu Leu Asn Ile Lys Val Lys Leu

1 5

<210> 2 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 3

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile

1 5

20

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

30

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 5

Met Thr Ser Ala Leu Pro Ile Ile Gln Lys

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 6

Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val Phe Arg

1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 7

Ala Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Val

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

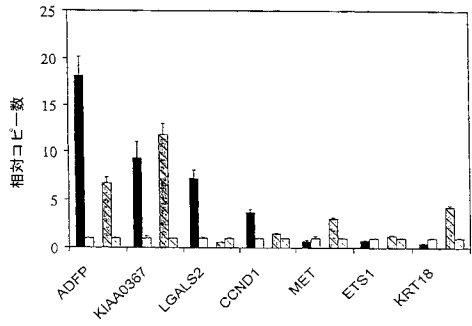
<400> 8

Gly Ile Gly Ser Arg Gly Asp Arg Ser

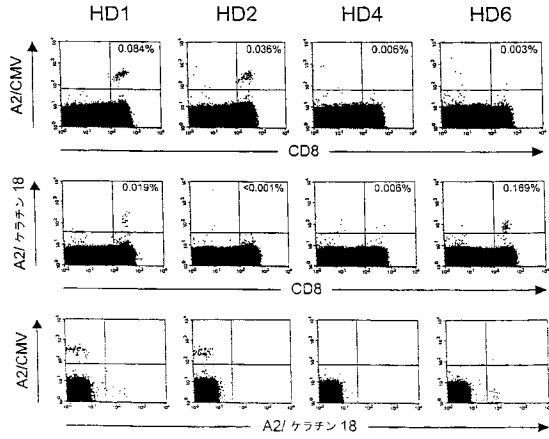
1 5

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/05038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	G01N33/68 A61K38/00	G01N33/574 A61K39/00
	C07K7/06	C12N15/00
		C12N5/10
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)		
IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WEINSCHENK TONI ET AL: "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines" CANCER RESEARCH, vol. 62, no. 20, 15 October 2002 (2002-10-15), pages 5818-5827, XP002266492 ISSN: 0008-5472 figure 1; table 2	1-9
P,X	page 5820, column 2; figure 3A; tables 1-3 ----- -/-	10-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 claim 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
23 March 2004		15 APR 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3116		Authorized officer Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/05038

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHULTZE JOACHIM L ET AL: "From cancer genomics to cancer immunotherapy: Toward second-generation tumor antigens" TRENDS IN IMMUNOLOGY, vol. 22, no. 9, September 2001 (2001-09), pages 516-523, XP004301120 ISSN: 1471-4906 abstract; figure 2 ---	1-9
X	SCHIRLE MARKUS ET AL: "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 30, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 2216-2225, XP002246625 ISSN: 0014-2980 cited in the application abstract page 2219 -page 2221 ---	1-9
A	MATHIASSEN SUSANNE ET AL: "Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 31, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 1239-1246, XP002266493 ISSN: 0014-2980 cited in the application abstract; table 2 ---	1-9
A	WO 99 19349 A (HOPE CITY) 22 April 1999 (1999-04-22) page 13 ---	1
E	WO 03 102023 A (IMMATIC BIOTECHNOLOGIES GMBH ;STEVANOVIC STEFAN (DE); WEINSCHENK) 11 December 2003 (2003-12-11) table 1 ---	10-20
A	RAE FIONA K ET AL: "Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 88, no. 5, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 726-732, XP002274523 ISSN: 0020-7136 abstract; tables 1-3 ---	10-20
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/05038

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RENKVIST NICOLINA ET AL: "A listing of human tumor antigens recognized by T cells" CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, vol. 50, no. 1, March 2001 (2001-03), pages 3-15, XP002274524 ISSN: 0340-7004 tables 1-5	10-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/05038 - ISR

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

See supplemental sheet further information PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

See supplemental sheet

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.:

1-9 and 10-20 (in part)
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/05038 - ISR

BOX I.2

The current claims 10-20 (in part; invention 10) relate to immunoreactive peptides each characterized by a desirable attribute or property, namely the fact that they are identified by the method as per one of the claims 1 to 9.

The claims therefore encompass all immunoreactive peptides that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (PCT Article 5) only for immunoreactive peptides (invention 10) of this type. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Regardless of the above, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the immunoreactive peptides in terms of the result which is to be achieved. This lack of clarity too is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that relate to invention 10.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

BOX II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: 1-9

method for identifying immunoreactive peptides combining the determination of the tumor-specific expression profile and the isolation and analysis of antigenic peptides (MHC ligands).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/05038 - ISR

2. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide ALLNIKVKL (SEQ ID No. 1), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

3. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide NLVPMVATV (SEQ ID No. 2), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

4. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide YVDPVITSI (SEQ ID No. 3), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

5. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide SVASTITGV (SEQ ID No. 4), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

6. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide MTSALPIIQK (SEQ ID No. 5), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

7. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide MAGDIYSVFR (SEQ ID No. 6), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/05038 - ISR

8. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide ALAAVVTEV (SEQ ID No. 7), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

9. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptide GIGSRGDRS (SEQ ID No. 8), its preparation, pharmaceutical compositions containing the same, its use, vectors comprising the corresponding nucleic acid molecule, cells that produce the peptide, and method for producing a vaccine with the thus identified peptide.

10. Claims: 10-20 (in part)

immunoreactive peptides identified by this method (insofar as they are not characterised by a chemical structure (inventions 2-9)), pharmaceutical compositions containing the same, methods for producing the same, their use, vectors comprising their corresponding nucleic acid molecules, cells that produce the peptides and method for producing vaccines with the thus identified immunoreactive peptides.

The applicant is advised that the claims related to invention 10 are pure *desiderata* claims which lack all the technical features of the immunoreactive peptides. Consequently, no meaningful search for this invention can be carried out.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/05038

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9919349	A	22-04-1999	US 6156317 A	05-12-2000
			AU 7481498 A	03-05-1999
			CA 2271784 A1	22-05-1998
			CA 2308118 A1	22-04-1999
			EP 0946592 A2	06-10-1999
			EP 1023319 A1	02-08-2000
			JP 2001519181 T	23-10-2001
			US 6074645 A	13-06-2000
			WO 9821233 A2	22-05-1998
			WO 9919349 A1	22-04-1999
			US 2003118602 A1	26-06-2003
			US 2003190328 A1	09-10-2003
			US 6251399 B1	26-06-2001
			US 6562345 B1	13-05-2003
US 2003224980 A1	04-12-2003			
WO 03102023	A	11-12-2003	DE 10225144 A1	18-12-2003
			WO 03102023 A1	11-12-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/05038

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHULTZE JOACHIM L ET AL: "From cancer genomics to cancer immunotherapy: Toward second-generation tumor antigens" TRENDS IN IMMUNOLOGY, Bd. 22, Nr. 9, September 2001 (2001-09), Seiten 516-523, XP004301120 ISSN: 1471-4906 Zusammenfassung; Abbildung 2	1-9
X	SCHIRLE MARKUS ET AL: "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, Bd. 30, Nr. 8, August 2000 (2000-08), Seiten 2216-2225, XP002246625 ISSN: 0014-2980 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2219 -Seite 2221	1-9
A	MATHIASSEN SUSANNE ET AL: "Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 31, Nr. 4, April 2001 (2001-04), Seiten 1239-1246, XP002266493 ISSN: 0014-2980 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Tabelle 2	1-9
A	WO 99 19349 A (HOPE CITY) 22. April 1999 (1999-04-22) Seite 13	1
E	WO 03 102023 A (IMMATIC BIOTECHNOLOGIES GMBH ;STEVANOVIC STEFAN (DE); WEINSCHENK) 11. Dezember 2003 (2003-12-11) Tabelle 1	10-20
A	RAE FIONA K ET AL: "Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 88, Nr. 5, 1. Dezember 2000 (2000-12-01), Seiten 726-732, XP002274523 ISSN: 0020-7136 Zusammenfassung; Tabellen 1-3	10-20
	-/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/05038

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	RENKVIST NICOLINA ET AL: "A listing of human tumor antigens recognized by T cells" CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, Bd. 50, Nr. 1, März 2001 (2001-03), Seiten 3-15, XP002274524 ISSN: 0340-7004 Tabellen 1-5 -----	10-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/05038

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)	
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:	
1. <input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)	
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:	
siehe Zusatzblatt	
1. <input type="checkbox"/>	Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. <input type="checkbox"/>	Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____ 1-9 und 10-20 (teilweise)
4. <input type="checkbox"/>	Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs <input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.	
<input checked="" type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.	

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 03 /05038

WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 10-20 (teilweise ; erfingung 10) beziehen sich auf Immunoreaktive Peptide, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich identifiziert mittels dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Immoreaktive Peptide, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung kein Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für solcher Immunoreaktive Peptide (Erfindung 10) liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Immunoreaktive Peptiden über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde kein Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche sich auf Erfindung 10 beziehen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 03 /05038

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: Ansprüche 1-9

Verfahren zur Identifizierung von immunreaktiven Peptiden woein Bestimmung des tumorspezifischen Expressionsprofils einerseits, und Isolation und Analyse von antigenen Peptiden (MHC Liganden) andererseits, kombiniert wurden.

2. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunreaktives Peptid ALLNIKVKL (Seq Id N 1), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid.

3. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunreaktives Peptid NLVPMVATV (Seq Id N 2), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid.

4. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunreaktives Peptid YVDPVITSI (Seq Id N 3), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid

5. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunreaktives Peptid SVASTITGV (Seq Id N 4), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid

6. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunreaktives Peptid MTSALPIIQK (Seq Id N 5), seine

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 03 /05038

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid

7. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunoreaktives Peptid MAGDIYSVFR (Seq Id N 6), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid

8. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunoreaktives Peptid ALAAVVTEV (Seq Id N 7), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid

9. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunoreaktives Peptid GIGSRGDRS (Seq Id N 8), seine Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen davon, seine Verwendung, Vektoren umfassend das entsprechende Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes mit dem identifizierten Peptid

10. Ansprüche: Ansprüche 10-20 (teilweise)

Immunoreaktive Peptide identifiziert mittels dieses Verfahrens (insoweit sie nicht gekennzeichnet sind mittels einer chemischer Struktur (Erfindungen 2-9)), pharmazeutische Zusammensetzungen davon, Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung, Vektoren umfassend deren entsprechenden Nukleinsäuremolekül, Zellen, die das Peptid produzieren, und Verfahren zur Herstellung von Impfstoffe mit den identifizierten immunoreaktive Peptiden.

Die Anmelder wird darauf hingewiesen daß die Ansprüche betreffend Erfindung 10 reine "desideratum"-Ansprüche sind, die alle technische Merkmale der immunoreaktive Peptide ermangeln. Infolgedessen, kann keine sinnvolle Recherche für diese Erfindung durchgeführt werden.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/05038

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9919349 A	22-04-1999	US 6156317 A	05-12-2000
		AU 7481498 A	03-05-1999
		CA 2271784 A1	22-05-1998
		CA 2308118 A1	22-04-1999
		EP 0946592 A2	06-10-1999
		EP 1023319 A1	02-08-2000
		JP 2001519181 T	23-10-2001
		US 6074645 A	13-06-2000
		WO 9821233 A2	22-05-1998
		WO 9919349 A1	22-04-1999
		US 2003118602 A1	26-06-2003
		US 2003190328 A1	09-10-2003
		US 6251399 B1	26-06-2001
		US 6562345 B1	13-05-2003
		US 2003224980 A1	04-12-2003
WO 03102023 A	11-12-2003	DE 10225144 A1	18-12-2003
		WO 03102023 A1	11-12-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 27/62	V
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 27/62	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/574	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 37/00	A 6 1 K 37/02	

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

(72) 発明者 ランメンゼー, ハンス, ゲオルク

ドイツ連邦共和国, 7 2 0 7 0 テュービンゲン - ウンターイエシゲン, ソンマーハルデ 3 番地

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA36 CA02 HA14
 4B063 QA01 QA05 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR82 QS25 QS33
 QS34
 4B065 AA90Y AB01 BA01 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA23 BA44 CA18 NA14 ZB262
 4C085 AA03 BB11 DD62 EE01
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA15 CA40 DA86 EA20 EA50 FA71

专利名称(译)	鉴定免疫反应性肽的方法		
公开(公告)号	JP2005535299A	公开(公告)日	2005-11-24
申请号	JP2004507838	申请日	2003-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	在马焦散Biotechnologies公司大门的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	在马焦散生物技术有限公司		
[标]发明人	ヴァインシエンクトーニ ランメンゼーハンスゲオルク		
发明人	ヴァインシエンク, トーニ ランメンゼー, ハンス, ゲオルク		
IPC分类号	G01N27/62 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/00 A61P35/00 C07K7/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/04 C12Q1/48 C12Q1/68 C40B30/04 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K39/0011 A61P35/00 C07K14/4748 C40B30/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61P35/00 C07K7/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/04 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N27/62.V G01N33/53.Y G01N33/574.A G01N37/00.102 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/CA02 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	10225139 2002-05-29 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定免疫反应性肽的方法。根据所述方法，首先制备由肿瘤和相应的健康组织组成的样品，随后确定肿瘤特异性表达谱，并从肿瘤组织中分离抗原肽并进行分析。然后，对已经获得的各个数据进行匹配，并根据所述匹配数据来鉴定肽。

