

(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2009-532664  
(P2009-532664A)

(43) 公表日 平成21年9月10日(2009.9.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 1
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z N A Z	2 G O 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-557475 (P2008-557475)  
 (86) (22) 出願日 平成19年2月27日 (2007. 2. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月27日 (2008.10. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/062920  
 (87) 国際公開番号 W02007/101227  
 (87) 国際公開日 平成19年9月7日 (2007. 9. 7)  
 (31) 優先権主張番号 60/777, 534  
 (32) 優先日 平成18年2月27日 (2006. 2. 27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508259467  
 アリゾナ・ボード・オブ・リージェンツ・  
 フォー・アンド・オン・ビハーフ・オブ・  
 アリゾナ・ステイト・ユニバーシティ  
 ARIZONA BOARD OF RE  
 GENTS FOR AND ON BE  
 HALF OF ARIZONA STA  
 TE UNIVERSITY  
 アメリカ合衆国85281アリゾナ州テン  
 ペ、サウス・ミル・アベニュー699番ス  
 ウィート601  
 (74) 代理人 100068526  
 弁理士 田村 恭生  
 (74) 代理人 100100158  
 弁理士 鮫島 睦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療のためのノボペプチドの同定および使用

(57) 【要約】

事前に発癌性であると同定されない腫瘍遺伝子中のフレームシフトミューテーションの存在によって同定されたノボペプチドに関する組成物が開示される。該開示されたペプチドを癌の治療のための該開示された方法に用いることができる。

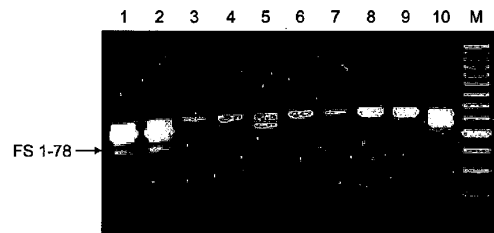


FIG.1a

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a. インフォマティクス、ゲノミクス、プロテオミクス、または免疫学的スクリーニングによりノボペプチドを同定し;および

b. 該ノボペプチドが腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答を誘導することを決定する:

ことを特徴とする、抗癌免疫応答をもたらすノボペプチドを同定する方法。

## 【請求項 2】

正常細胞に対して腫瘍細胞中で選択的に発現されたノボペプチドを検出するために癌ゲノムおよび発現データベースを用いて、工程a)の該ノボペプチドを同定する、請求項1に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

該ノボペプチドをもたらすDNAおよび/またはRNA中の変化を検出するために核酸シーケンシング方法を用いて、工程a)の該ノボペプチドを同定する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

該腫瘍細胞表面上にあるノボペプチドを検出するために質量分析を用いて工程a)の該ノボペプチドを同定する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 5】

該ノボペプチドに対する反応性を検出するためにヒト癌患者血清または動物腫瘍モデル血清の免疫アッセイを用いて、工程b)の該ノボペプチドを同定する、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

該ノボペプチドに対する反応性を検出するためにヒト癌患者末梢血単核細胞(PBMC)または動物腫瘍モデル(PBMC)の免疫アッセイを用いて、工程b)の該ノボペプチドを同定する請求項1に記載の方法。

## 【請求項 7】

該免疫アッセイが細胞溶解的アッセイである、請求項6に記載の方法。

## 【請求項 8】

該細胞溶解的アッセイが<sup>51</sup>Cr遊離アッセイである、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

該免疫アッセイが該ペプチドに対する応答におけるサイトカイン産生を測定する、請求項6に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

該免疫アッセイがELISPOT、ELISA、および細胞内サイトカイン染色からなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 11】

該免疫アッセイがノボペプチド特異的T細胞を同定するために二量体、三量体または四量体抗体を使用する、請求項6に記載の方法。

## 【請求項 12】

予防的または治療的癌モデルにおいて、ヒトノボペプチドの非ヒト動物ホモログを該非ヒト動物に投与し; および癌の該動物モデルにおいて該ノボペプチドの該抗癌作用を測定することにより、該ノボペプチドの該抗癌免疫応答をさらに決定する、請求項1に記載の方法。

40

## 【請求項 13】

ヒト細胞を該ノボペプチドに曝露して、ヒト癌細胞および正常細胞に対する該曝露された細胞の反応性を決定し、ここで正常細胞と比較してヒト癌細胞に対してより強い反応性は癌特異的免疫応答を示す、腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答の該誘導をさらに同定するための、請求項2~10および12のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 14】

請求項1~13のいずれか1つに記載の方法により同定されたノボペプチドまたはノボペ

50

プチドをコードする核酸を含む癌ワクチン。

【請求項 15】

該ワクチンを、遺伝子ワクチン、ウイルスベクターとして、あるいはペプチドもしくはタンパク質または糖などの別の担体との融合ペプチドとして、遺伝子銃により送達する、請求項14に記載の予防的癌ワクチン。

【請求項 16】

イヌ、ネコ、モルモット、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウマ、ウシ、サル、チンパンジーまたは他の非ヒト霊長類からなる群から選択される非ヒト動物に癌を予防するために投与される、請求項14に記載の予防的ワクチン。

【請求項 17】

治療的癌ワクチンとして投与される、請求項14に記載のワクチン組成物。

【請求項 18】

非ヒト動物で治療的癌ワクチンとして投与される請求項14に記載のワクチン組成物。

【請求項 19】

a. インフォマティクスによりノボペプチドを同定し(正常に対する腫瘍のオッズ比);  
 b. 候補DNAまたはRNAをシーケンシングし;  
 c. 腫瘍細胞および正常細胞のMHC Iから溶出したペプチドについて質量分析を行い、および腫瘍細胞により発現されるペプチドを検出し; および  
 d. 該ノボペプチドペプチドに対して反応性であるT細胞が、MHC I マッチした腫瘍細胞と反応するが正常細胞とはしないかどうかを決定する;  
 ことを含む、癌に対する保護的な免疫応答を誘導するノボペプチドを同定する方法。

【請求項 20】

さらに、腫瘍MHC Iから溶出した該ペプチドを該ヒトプロテオームからの全ての可能性あるノボペプチドのデータベースと比較することを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

さらに該ノボペプチドに対して産生された抗体が、該ノボペプチドを発現する腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 22】

a. インフォマティクスによりノボペプチドを同定し(正常に対する腫瘍のオッズ比);  
 b. 候補DNAまたはRNAをシーケンシングし;  
 c. 腫瘍細胞および正常細胞のMHC Iから溶出したペプチドについて質量分析を行い、および腫瘍細胞により発現されるペプチドを検出し; および  
 d. 該ノボペプチドに対して産生された抗体が、該ノボペプチドを発現する腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定する;  
 ことを特徴とする、癌に対する保護的な免疫応答を誘導するノボペプチドを同定する方法。

【請求項 23】

腫瘍細胞を入手し、該細胞からRNAを抽出し、およびフレームシフトについてアッセイすることを特徴とする、腫瘍特異的な抗原についてのスクリーニング方法。

【請求項 24】

該腫瘍特異的な抗原がペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項 25】

該腫瘍特異的な抗原源が腫瘍形成と関係がない遺伝子である、請求項1に記載の方法。

【請求項 26】

該腫瘍特異的な抗原が、該遺伝子のバスターンダーフレームシフトに起因する、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

該腫瘍細胞が、リンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、およ

10

20

30

40

50

び肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択された癌細胞に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

ノボペプチドを含み、該ノボペプチドは腫瘍-特異抗原であり、および該抗原は非発癌性遺伝子のフレームシフトミューテーションに由来する、癌のためのワクチン。

10

【請求項29】

該ノボペプチドが配列番号:2に記載の配列を含む、請求項28に記載のワクチン。

【請求項30】

該ノボペプチドが配列番号:4に記載の配列を含む、請求項28に記載のワクチン。

【請求項31】

該ノボペプチドが配列番号:6に記載の配列を含む、請求項28に記載のワクチン。

【請求項32】

該ノボペプチドが該SMC1遺伝子のフレームシフトを含む、請求項28に記載のワクチン。

【請求項33】

該ノボペプチドが配列番号:8に記載の配列を含む、請求項32に記載のワクチン。

20

【請求項34】

該癌がリンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される、請求項28に記載のワクチン。

【請求項35】

対象に請求項28に記載のワクチンを投与することを特徴とする、癌の治療方法。

30

【請求項36】

該癌が、リンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される請求項35に記載の方法。

40

【請求項37】

該対象が哺乳類である、請求項35に記載の方法。

【請求項38】

該哺乳類がヒト、チンパンジー、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、モルモット、およびマウスからなる群から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

そのリスクのある対象に請求項28に記載のワクチンを投与することを特徴とする、癌の予防方法。

【請求項40】

該癌がリンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白

50

血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

該対象が哺乳類である、請求項39に記載の方法。

【請求項42】

該哺乳類がヒト、チンパンジー、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、モルモット、およびマウスからなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

該抗原が、

a. インフォマティクス、ゲノミクス、プロテオミクス、または免疫学的スクリーニングによりノボペプチドを同定し；および

b. 該ノボペプチドが腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答を誘導することを決定する；

ことを含む工程により同定されたノボペプチドである、腫瘍特異的な抗原に対する治療的抗体。

【請求項44】

請求項43に記載の抗体による治療処置。

【請求項45】

該ノボペプチドが配列番号:2に記載の配列を含む、請求項43に記載の治療処置。

【請求項46】

該ノボペプチドが配列番号:4に記載の配列を含む、請求項43に記載の治療処置。

【請求項47】

該ノボペプチドが配列番号:6に記載の配列を含む、請求項43に記載の治療処置。

【請求項48】

該ノボペプチドが該SMC1遺伝子のフレームシフトを含む、請求項43に記載の治療処置。

【請求項49】

該ノボペプチドが配列番号:8に記載の配列を含む、請求項48に記載の治療処置。

【請求項50】

該癌がリンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AJDS-related リンパ腫sまたは肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される、請求項43に記載の治療処置。

【請求項51】

対象に請求項43に記載の抗体を投与することを特徴とする癌の治療方法。

【請求項52】

該癌がリンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌

10

20

30

40

50

、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

該対象が哺乳類である、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

該哺乳類がヒト、チンパンジー、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、モルモット、およびマウスからなる群から選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

その必要がある対象に組成物を投与することを特徴とする癌の治療方法であって、該組成物は腫瘍特異的な抗原を含み、および該腫瘍特異的な抗原はノボペプチドである方法。

10

【請求項56】

該ノボペプチドが配列番号:2に記載の配列を含む、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

該ノボペプチドが配列番号:4に記載の配列を含む、請求項55に記載の方法。

【請求項58】

該ノボペプチドが配列番号:6に記載の配列を含む、請求項55に記載の方法。

【請求項59】

該ノボペプチドが該SMC1遺伝子のフレームシフトを含む、請求項55に記載の方法。

【請求項60】

該ノボペプチドが配列番号:8に記載の配列を含む、請求項55に記載の方法。

20

【請求項61】

該癌がリンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌(たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、大腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される、請求項55に記載の方法。

【請求項62】

該対象が哺乳類である請求項55に記載の方法。

30

【請求項63】

該哺乳類がヒト、チンパンジー、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、モルモット、およびマウスからなる群から選択される請求項62に記載の方法。

【請求項64】

組成物をそのリスクある対象に投与することを特徴とする癌の予防方法であって、該組成物は腫瘍特異的な抗原を含み、および該腫瘍特異的な抗原はパイスタンダーフレームシフトミューテーションである方法。

【請求項65】

腫瘍細胞を入手し、該細胞からRNAを抽出し、およびフレームシフトについてアッセイすることを含み、ここで該フレームシフトの存在は腫瘍が悪性であることを示す、腫瘍-特異抗原についてのスクリーニングを特徴とする、腫瘍を悪性と診断する方法。

40

【請求項66】

推定上の治療薬をフレームシフトミューテーションを含むノボペプチドと接触させ、その際該ノボペプチドと結合するものが治療薬であると認定することを特徴とする、癌治療薬のスクリーニングの方法。

【請求項67】

組織サンプルを入手して、ノボペプチドに対する免疫応答の存在についてスクリーニングし、該ノボペプチドはフレームシフトミューテーションを含むことを特徴とする、癌である個体を診断する方法。

50

## 【請求項68】

該免疫応答は抗体応答である、請求項67に記載の方法。

## 【請求項69】

該免疫応答がT細胞応答である、請求項67に記載の方法。

## 【請求項70】

該T細胞応答がCD8 T細胞応答である、請求項69に記載の方法。

## 【請求項71】

該T細胞応答がCD4 T細胞応答である、請求項69に記載の方法。

## 【請求項72】

該T細胞応答がT制御性細胞応答である、請求項69に記載の方法。

10

## 【請求項73】

該フレームシフトミューテーションが配列番号:2に記載の配列を含むことを特徴とする、請求項67に記載の方法。

## 【請求項74】

該フレームシフトミューテーションが配列番号:4に記載の配列を含むことを特徴とする、請求項67に記載の方法。

## 【請求項75】

該フレームシフトミューテーションが配列番号:6に記載の配列を含むことを特徴とする、請求項67に記載の方法。

## 【請求項76】

該フレームシフトミューテーションが該SMC1遺伝子のフレームシフトである、請求項67に記載の方法。

20

## 【請求項77】

該フレームシフトミューテーションが配列番号:8に記載の配列を含むことを特徴とする、請求項67に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、米国仮出願第60/777,534号(2006年2月27日出願、参照することによりそのすべては本明細書に組み込まれる)の利益を主張する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

背景技術

米国で2004年においては2.4百万以上の新しい癌ケースが診断され、1百万以上が皮膚癌であると見通しが見積もられている。それらの皮膚癌患者の、~96,000が、最も致死性の皮膚癌、メラノーマ(新たに診断された癌の4%)と診断される。その上、メラノーマの発生率は他のどの癌よりも速く増加を続けている。全癌の90~95%という確率的性質は、誰でも癌が発生するリスクがあることを意味する。米国において、男性の癌発生の生涯リスクは50%であり、一方、女性は33%の可能性である(ACS、2004)。年間死亡率~563,700/年である癌は、米国において2番目に多い死亡原因である。

40

## 【0003】

癌に対するワクチン接種は癌の治療、時には予防のために提案され、また多数の研究努力が様々な癌ワクチン接種法の調査に捧げられてきた。確実におよび予想通りに、寛容を克服し、かつ自己免疫を誘導することなしに腫瘍細胞に対する免疫応答を発動させることができるワクチン組成物および治療方法を見つけるという目的は、いまだとらえどころのないままであった。それにもかかわらず、癌細胞が該免疫システムにより認識されることができるタンパク質を発現することは明らかであり、さまざまな種類の腫瘍細胞調製物をワクチン接種したマウスは腫瘍攻撃から保護を示すということが実証されている。腫瘍細胞中でまたは腫瘍細胞によって発現される抗原は、「腫瘍関連抗原」(「TAA」)と称される。特定のTAAは非癌性細胞で発現しうるかまたは発現せず;非癌性細胞で発現されない

50

か、またはまれにしか発現されないTAA、または非癌性細胞におけるその発現が、癌細胞におけるものと比べて十分に減少するものは、そのワクチン接種により誘導される免疫応答が、癌細胞に対して合理的に特異的であって、それは、「腫瘍特異抗原」(「TSA」)と称される。

#### 【0004】

該過去20年に渡り、多くの研究室が先在する腫瘍に対する患者の免疫システムを変えることを目標とした多くの技術を発明してきた(Berzofsky et al., 2004)。これらは全細胞、ペプチド、遺伝子操作された腫瘍細胞、熱ショックタンパク質またはアポトーシス腫瘍細胞の使用を含み、該ホストの免疫システムを刺激して癌細胞の特徴的な抗原に応答させる。ほぼ間違いなく、癌ワクチン接種に対する最も的確なアプローチは、既知かつ定義済みのTAAを含むワクチン製剤を使用することである。なぜならこれは特異性を最大限に生かすものだからである。機能的にTAAを自己および非自己に分類することができる。自己TAAは、その発現は選択された正常組織または過剰発現したタンパク質に限られる、非変異遺伝子に由来する。今までに同定されたTAAのほとんどはこの自己クラスに属するが、このような抗原に関連する2つの大きい潜在的な問題：自己免疫および寛容がある。非自己TAAは、癌細胞により独占的に発現され、および腫瘍特異的な抗原(TSA)と考えることができる。TSAは、外因的に(例えばウイルス関連腫瘍のウイルスタンパク質に由来するもの)または内因的に由来することができる。ミューテーション由来TSAは、点変異、転座、およびエキソンのスプライシング誤りから生じうる。自己TAAとは違って、TSAは自己免疫および寛容のリスクをもたらさない。

10

20

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題と課題を解決するための手段】

#### 【0005】

##### 要旨

予防的および/または治療的癌ワクチンの含有物のための候補抗原を同定し免疫学的にスクリーニングするための方法が開示される。さらに抗原の全般的なクラス(本明細書においてノボペプチドと称される)ならびにその2個の特定のサブセット、非MSノボペプチドおよびFS-ノボペプチドが開示される。癌の診断、予防および治療において使用するための、ノボペプチド、腫瘍に特有の独自のナンセンスタンパク質(nonsense protein)に関連する、方法および組成物が開示される。また、癌に対する免疫応答を誘発するためにノボペプチドを使用する方法が開示される。1個以上のノボペプチド構成成分を有するワクチンが開示され、これは予防的にまたは既存の癌細胞に対する治療処置に使用される。

30

#### 【0006】

##### 詳細な説明

本発明の化合物、組成物、記事、装置、および/または方法が開示され記載される前に、それらは、特に断りがない限り特定の合成方法または特定の組み換えバイオテクノロジー方法に限定されるものでなく、または特に断りがない限り特定の試薬に限定されるものでなくは、当然ながら変えることができるものと理解される。また本明細書で使用される専門用語は特定の実施態様のみを記載することを目的とし、限定することを意図するものではないと理解される。

40

#### 【0007】

##### A. 定義

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される、単数形「a」「an」および「the」は、文脈から明確な指示がない限り複数形の指示対象を含む。従って、例えば、「医薬担体」との言及は、2個以上のそのような担体の混合などを含む。

#### 【0008】

本明細書において、範囲は「約」1つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして表される。そのような範囲が表されているとき、別の実施態様は、該1つの特定の値からおよび/またはもう1つの特定の値までを含む。同様に、先に「約」を使用することにより値が近似として表されている場合、それは該特定の値は別の実施態様を

50

構成することが理解される。各範囲の端点は他方の端点に関して共に重要であり、およびもう1つの端点から独立することがさらに理解される。本明細書で開示される多くの値があり、および各値は該値自体に加えて、その特定の値の「約」としてまた本明細書において開示されることがまた理解される。例えば、該値「10」が開示されたならば、その時「約10」もまた開示される。値が開示されたとき、「該値以下」、「該値以上」および値の間の可能な範囲もまた、当業者によって適切に理解されるように開示されたときまた理解される。例えば、該値「10」が開示されたならば、「10以下」ならびに「10以上」もまた開示される。本出願を通してデータが多く異なる形式で提供され、このデータは、終点と始点を示し、および該データ点のいずれかの組み合わせについて及ぶとまた理解される。例えば、特定のデータ点「10」と特定のデータ点15が開示された場合、と理解される。10と15に、より大きい、以上、より小さい、以下、および等しい、ならびに10と15の間も開示されたときみなされる。

【0009】

本明細書および続く請求項において、多くの用語への言及がなされ、それらは以下の意味を持つと定義される：

【0010】

「任意の」または「任意に」は、その後に記載される事象または環境は起こっても起こらなくてもよく、および該説明は該事象または環境が起こった場合とそれが起こらなかった場合を含むことを意味する。

【0011】

本出願を通して、さまざまな刊行物が参照される。これらの刊行物に開示されるそのすべては、参照することにより、これに関連する技術の状況をより十分に記載するために、本出願に組み込まれる。開示された引例はまた、該引例に依存している文章に論じられているそれらに含まれる資料について、個々におよび特に参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0012】

B. ノボペプチドおよびノボペプチド関連ミューテーションおよびバリエーションのスクリーニング方法

本明細書で開示される方法および組成物は、本明細書においてノボペプチドと称され、癌ワクチンの候補として有用である、TSAのクラスに部分的に関連し、これを含む。本明細書において、「ノボペプチド」は、少なくとも8個で40個を超えないアミノ酸を有するポリペプチドを含み、そのアミノ酸配列はノボペプチド核酸配列の全てまたは一部によりコード化されるTSAを意味する。従って、例えば、「ノボペプチド」は8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35もしくは40アミノ酸またはその間いずれかの数のアミノ酸残基数を有するTSAを含むことができる。「ノボペプチド核酸配列」は、ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションによって、非癌性の参照配列から作られることができる核酸配列を意味する。「ノボペプチド」は、生成または入手された方法、天然に存在するか、操作され、インビトロ翻訳により生成され、合成されまたは当該技術分野における当業者に既知のポリペプチドを生成する多くの他の方法で生成されたかどうかに関わらず、いずれのそのようなポリペプチドを含む。「ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーション」は1個以上の点変異、フレームシフトミューテーション、イン-フレーム挿入もしくは欠失、転座、不適当なスプライシング、転写後の事象、バリエーション、または非癌性の参照配列からの核酸配列の他の変化の1つまたは他の組み合わせを意味し、遺伝性かどうかに関わらず、その影響は、該非癌性の参照配列のそれとは異なるために、したがってコードされたアミノ酸配列またはポリペプチドの組成物を引き起こすことである；「ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーション」は、これらに制限されないが、翻訳誤り、スプライシング誤りまたはRNAレベルで起こるほかの事象の結果として生じる非癌性の参照配列からの逸脱を明確に含む。「非癌性の参照配列」は、目的の生物の非癌性細胞で生じる核酸配列を意味しかつ含み、そこで発現されるかどうかに関わらない。用語「癌性細胞」および「癌細胞」は、癌性、前癌性、ディ

10

20

30

40

50

スプラジック (dysplagic)、または正常細胞を腫瘍細胞に形質変換する特徴の他の変化を示すいずれかの細胞を意味しかつ含み、悪性か否か、直ちに発癌性であるか否かに関わらない。癌の個体発生は概して、細胞的事象の遷移を伴い、予防的であれまたは治療的であれ、その治療は、その遷移の可能な限り早い段階で適用されることが最適であることが認識されるであろう。本明細書で開示される方法および組成物は、それらが癌として診断可能である時点まで進行した状態だけでなく、免疫学的に正常細胞と区別できるように細胞によるノボペプチドの発現に関連するありとあらゆる状態に適用することを意図する。「腫瘍細胞」は腫瘍から得られた、または腫瘍に関連する細胞を意味する。「非癌性細胞」は、癌細胞または腫瘍細胞でない、いずれの細胞を意味して含む。概して、ノボペプチドは天然に存在するアミノ酸を含む直鎖ポリペプチド配列である；しかし、「ノボペプチド」はまた、非癌性の参照配列のノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションの結果として、癌細胞によって発現されることができ他のポリペプチドを含み、これは、DNAまたはRNA中で発生し、天然に存在するアミノ酸と異なる1個以上のアミノ酸を含むか否か、翻訳後的に改変されたか否か、および1個以上の他の部分に結合または関連するか否かに関わらない。「FS-ノボペプチド」は、その配列は非癌性の参照配列のそれとは、1個以上のノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーション（ここで該ミューテーションまたはバリエーションはフレームシフトミューテーションまたはバリエーションである）に起因する点で異なる、ノボペプチドである。非MSノボペプチドは、ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションによってマイクロサテライト配列ではない非癌性の参照配列から生成されたノボペプチド核酸配列によりコードされたノボペプチドである。

10

20

30

40

50

#### 【0013】

遺伝子の配列を決定する必要なくフレームシフトを同定するために開発されたある興味ある技術は、ハイスループット固相タンパク質トランケーションテスト (HTS-PTT) である (Gite et al., 2003)。しかしながら、この方法の問題は、使用者は1または2、3個の候補タンパク質を最初に念頭に置く必要があり、遺伝子機能またはメカニズムについての知識を必要とする問題を再びもたらす。代わりに、本発明方法においては、ハイスループットシーケンシング能力およびパイオインフォマティクスを使用して、FS癌ワクチン候補を同定した。先の方法論と対照的に、本明細書で開示される方法は、1) 遺伝子機能または免疫学的メカニズムについての知識を必要としない、2) 系統的で、ハイスループットに従う、および3) 全ての型の癌に汎用できる。これら3個の特性の全てを有する他の方法はない。その上、メラノーママウスモデルにおける試験により、これらのノボペプチドが効果的な治療的ワクチンおよび予防的ワクチンであることを確認する。

#### 【0014】

最も調査が少なくかつ潜在的に最も有用なTSAのサブクラスは、ほぼ間違いなくフレームシフト (FS) によってもたらされるそれである。正常細胞から癌細胞への形質転換への結果の1つは、DNA複製およびRNAプロセッシングは間違いが起こりやすくなる一方、DNA修復が堅固さか低下することである。これは、1または2個（または3の倍数でない他のもの）の新しい塩基が遺伝子に挿入されたまたは遺伝子から除去されたFSミューテーションまたは変異体の頻度の増加を引き起こす。このようなミューテーションがタンパク質のコード領域に発生すると、読み枠中に生じたシフトは、それらの機能を失った不完全な (truncated) 遺伝子の合成を引き起こす。平均して少なくともFS変異体の20%は、9個以上のアミノ酸の新しいペプチドをコードする。T細胞への提示のためにMHC Iポケットに結合するためには~9アミノ酸は必要とされるため(例えば、8、9、10または11残基)、該FS変異体の多くが提示されることができであろう。短いFS変異体でさえ、野生型とFS配列の融合によって、新しい9-残基ペプチドを呈することと見なされるであろう。その上、これらのナンセンスタンパク質は、非常に免疫原性である傾向があり、腫瘍細胞で支配的に（独占的でないとしても）発現する傾向があるので、FS-由来抗原は理想的なワクチン候補である。フレームシフトに加えて、3個の倍数である核酸配列の挿入または欠失は、インフレーム欠失または挿入を生み出すであろう。これらはまた、該接合点は新しいペプチド配列であ

るので、ノボペプチドの生成をもたらす。

【0015】

腫瘍形成に関して、フレームシフトによって生み出されるかあるいは他のメカニズムによるかを考慮して変異タンパク質の2個のクラスがあり、： 第一のクラス「発癌性-関連変異体」は腫瘍形成または進行を生じるかまたはこれらに寄与するものである。第二のクラス「バースタンダー変異体」は、腫瘍形成に関与しないが、該細胞の機構が非効率的に作動しているために単にたまたま変化したものである。ワクチン開発の観点から、両者はワクチン候補として有望である。これまでの研究は特定のケースにおけるFSを探し、「バースタンダー変異体」を無視してきた。例えば、FSは遺伝性非腺腫性大腸癌 (HNPCC) において探され見つけられた。これらの癌は、遺伝性または後天性のDNAミスマッチ修復機構における欠陥により引き起こされる。従って、ヌクレオチド反復配列を持つ遺伝子におけるFSを探することは、潜在的に豊富なFS抗原源であることを示す (Linnebacher et al., 2001; Saeterdal et al., 2001)。しかしながら、これは、癌の特定の型に適応する非常に特定のなケースであり、従って、癌ワクチン発見に対して汎用できる方法ではない。別の例では、研究者は思いがけなくも、正常gp75 タンパク質の別の読み枠の翻訳に由来する腫瘍特異的な九量体ペプチド抗原を発見した (Wang et al., 1996)。この九量体は腫瘍浸潤性リンパ球細胞系、TIL586によって認識され、それが実際に抗原性であることを示された。しかしながら、該ペプチドが生物学的にワクチンとして有用かどうかを示す後の試験は無い。いずれにしても、癌ワクチン候補を同定するための真剣な努力はなく、幸運に頼っている。最近になって、2つの特定のフレームシフトペプチドが、T細胞アッセイの使用において特許され(米国特許第6/759,046号)、いくつかの他の可能性あるマイクロサテライト関連FSペプチドが開示された。しかしながら、特許第6/759,046号では、該ペプチドは、既知の癌遺伝子内のフレームシフトと腫瘍との間の因果関係の仮定に基づいた発癌性タンパク質に由来した。さらに、該マイクロサテライトの下流に生じる同定されたフレームシフトがインフォマティクスの発見されており、それは、腫瘍中の該特定のFSで同定されたヒトのためのワクチン治療に有用であり、また大腸癌に大変成り易いおよびこれらのFSを産生しやすい遺伝性疾患の患者において予防的に (prophylacally) 有用であると記載されている。この技術は、癌遺伝子中で反復する特定のマイクロサテライトの下流のフレームシフト変異体を予測するために公開されたヒトゲノム配列を使用することから成り、DNA修復欠陥を有すると知られる遺伝性癌を有するヒトにおいてこれらを予防的に使用する可能性を提案してはいるが、教示はしていない。これらのペプチドが有効なワクチン構成成分であることを決定する方法を評価するための開示された方法は無かった。特定の有効性の測定セット無しに予測されたペプチドからワクチン構成成分へと進むことができない。想定される該ペプチド抗原はフレームシフトのみであり、およびマイクロサテライトで生じるフレームシフトに限られた。対照的に、ノボペプチドを発見しおよび検証するための方法が本明細書で開示され、これらは、フレームシフトペプチドに限られず、またマイクロサテライトに限られない。

【0016】

本明細書で、腫瘍特異的な抗原についてのスクリーニングの方法が開示され、これは腫瘍細胞を入手し、該細胞からRNAを抽出し、およびフレームシフトについてアッセイすることを含む。該腫瘍特異的な抗原はペプチドまたはタンパク質であることができることが理解され、本明細書において意図される。

【0017】

予防的癌ワクチンのための構成成分を同定する方法が開示され、これは、： インフォマティクス、ゲノミクス、プロテオミクス または免疫学的スクリーニングによりノボペプチド同定し；腫瘍と正常細胞を区別する該ノボペプチドに対する免疫応答を検出することを含む。そのように同定された該ノボペプチドを、一次免疫応答を誘発するために用いることができる。

【0018】

抗癌免疫応答をもたらすノボペプチドを同定する方法が本明細書で開示され、これはイ

10

20

30

40

50

ンフォマティクス、ゲノミクス、プロテオミクス、または免疫学的スクリーニングによりノボペプチドを同定し;および該ノボペプチドが腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答を誘導することを決定することを含む。該方法の該ノボペプチドは、本明細書で開示されるいずれかの方法によって同定できると理解される。従って、例えば、正常細胞に対して腫瘍細胞中で選択的に発現されたノボペプチドを検出するために癌ゲノムおよび発現データベースを用いて該ノボペプチドを同定する方法が本明細書で開示される。別法として、該ノボペプチドをもたらすDNAおよび/またはRNA中の変化を検出するために核酸シーケンシング方法を用いて、該ノボペプチドを同定する方法が開示される。また、該腫瘍細胞表面上にあるノボペプチドを検出するために質量分析を用いて該ノボペプチドを同定する方法が開示される。

10

**【0019】**

T細胞応答を測定することができる免疫測定法が、該開示された方法に用いることができることが本明細書において理解され意図される。従って、例えば、抗癌免疫応答をもたらすノボペプチドを同定する方法が本明細書に開示され、これは免疫応答を誘導するノボペプチドを決定することを含み、該ノボペプチドを、該ノボペプチドに対する反応性を検出するためにヒト癌患者血清または動物腫瘍モデル血清の免疫アッセイを用いて同定する。また、該ノボペプチドに対する反応性を検出するためにヒト癌患者末梢血単核細胞(PBMC)または動物腫瘍モデル(PBMC)の免疫アッセイを用いて該ノボペプチドを同定する、mar e方法が開示される。上記のように、該免疫アッセイは、T細胞活性を測定する当該技術分野において既知のいずれのアッセイであることもできる。従って、例えば、該免疫アッセイは、細胞溶解的アッセイ(例えば51Cr遊離アッセイ)または該ペプチドに対する応答におけるサイトカイン産生測定することができるアッセイ(例えばELISPOT、ELISA、および細胞内サイトカイン染色)であることができる。従って、該免疫アッセイがELISPOT、ELISA、および細胞内サイトカイン染色からなる群から選択される方法が本明細書で開示される。またノボペプチドに対して特異的なT細胞に結合することによってT細胞活性を同定するために、抗体を用いることができる。例えば、MHCクラスIおよびII 四量体、二量体、および三量体を用いて、ノボペプチド特異的T細胞をマークすることができる。

20

**【0020】**

また、癌に対する保護的な免疫応答を誘導するノボペプチドを同定する方法が開示され、これはインフォマティクスによってノボペプチドを同定し(正常に対する腫瘍のオッズ比);候補DNAまたはRNAをシーケンシングし;腫瘍細胞および正常細胞のMHC Iから溶出したペプチドについて質量分析を行い、および腫瘍細胞により発現されるペプチドを検出し;および該ノボペプチドペプチドに対して反応性であるT細胞が、MHC I マッチした腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することからなる。更なる工程がノボペプチドを同定するために必要とされることが理解される。従って、さらに腫瘍MHC Iから溶出した該ペプチドを該ヒトプロテオームからの全ての可能性あるノボペプチドのデータベースと比較することを含む方法が本明細書で開示される。ノボペプチドに対する抗体応答はまた、治療的方法においても望ましいものであることがまた理解される。従って、癌に対する保護的な免疫応答を誘導する該ノボペプチドを同定する方法が本明細書で開示され、これはさらに、該ノボペプチドに対して産生された抗体が、該ノボペプチドを発現する腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを含む。また、癌に対する保護的な免疫応答を誘導する該ノボペプチド同定する方法が開示され、これはインフォマティクスによりノボペプチドを同定し(正常に対する腫瘍のオッズ比);候補DNAまたはRNAをシーケンシングし;腫瘍細胞および正常細胞のMHC Iから溶出したペプチドについて質量分析を行い、および腫瘍細胞により発現されるペプチドを検出し;および該ノボペプチドに対して産生された抗体が、該ノボペプチドを発現する腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを含む。

30

40

**【0021】**

抗癌免疫応答を生じるノボペプチドを同定する該開示された方法は、癌に対する免疫応答を生じるのに有用であるペプチドを生成するであろうことが理解され、本明細書におい

50

て意図される。従って、該本明細書で開示される方法より同定されたノボペプチドおよび具体的に解明されたそれらを、単独でまたは他のペプチドまたは既知の抗癌剤と組み合わせ、癌を治療または予防するための治療的または予防的薬剤として用いることができる。従って、例えば、該開示された方法は、抗癌ワクチンを開発するために使用されることができるノボペプチドを同定することができる。従って、癌ワクチンが本明細書で開示され、これは、本明細書で開示されるノボペプチドを同定する方法いずれかによって同定されたノボペプチドまたはノボペプチドをコードする核酸を含む。そのようなワクチンは、当該技術分野において既知の方法によって、例えば、これらに限定されないが、遺伝子銃によって、遺伝子ワクチン、ウイルスベクターとして、またはペプチドもしくは別の担体（例えばタンパク質、糖またはオイル:水エマルジョン）とのペプチド融合として、送達されることができることが理解され、本明細書において意図される。

10

**【0022】**

該開示された予防的および治療的ワクチンは、ヒトおよび非ヒト対象への投与に適する。従って、癌を予防するために、イヌ、ネコ、モルモット、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウマ、ウシ、サル、チンパンジーまたは他の非ヒト霊長類から成る群から選択される非ヒト動物に投与される予防的ワクチンが本明細書で開示される。

**【0023】**

従って、癌に対する保護的な免疫応答を誘導する該ノボペプチドを同定する方法が本明細書で開示され、これはノボペプチドをインフォマティクスによって同定し(正常に対する腫瘍のオッズ比); 候補DNAまたはRNAをシーケンシングし; 腫瘍細胞および正常細胞のMHC Iから溶出したペプチドについて質量分析を行い、および腫瘍細胞により発現されるペプチドを検出し; および該ノボペプチドペプチドに対して反応性であるT細胞が、MHC I マッチした腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを含む。更なる工程がノボペプチドを同定するために必要とされうると理解される。従って、さらに腫瘍MHC Iから溶出した該ペプチドを該ヒトプロテオームからの全ての可能性あるノボペプチドのデータベースと比較することを含む方法が本明細書で開示される。ノボペプチドに対する抗体応答も治療的方法において望まれうることであることとまた理解される。従って、癌に対する保護的な免疫応答を誘導する該ノボペプチドを同定する方法が本明細書で開示され、これはさらに、該ノボペプチドに対して産生された抗体が、該ノボペプチドを発現する腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを含む。また、癌に対する保護的な免疫応答を誘導するノボペプチドを同定する方法が開示され、これはインフォマティクスによりノボペプチドを同定し(正常に対する腫瘍のオッズ比)、; 候補DNAまたはRNAをシーケンシングし; 腫瘍細胞および正常細胞のMHC Iから溶出したペプチドについて質量分析を行い、および腫瘍細胞により発現される該ペプチドを検出し; および該ノボペプチドに対して産生された抗体が、該ノボペプチドを発現する腫瘍細胞と反応するが正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを含む。

20

30

**【0024】**

該開示された方法はまた動物モデルと併せて用いることができる。従って、抗癌免疫応答をもたらすノボペプチドを同定する方法が本明細書で開示され、これは、インフォマティクス、ゲノミクス、プロテオミクス、または免疫学的スクリーニングによりノボペプチドを同定し; および該ノボペプチドが腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答を誘導することを決定し、ここで該ノボペプチドの該抗癌免疫応答は予防的または治療的癌モデルにおいて非ヒト動物にヒトノボペプチドの該非ヒト動物ホモログを投与することによってさらに決定され; および癌の該動物モデルにおいて該ノボペプチドの該抗癌作用を測定することを含む。

40

**【0025】**

該開示されたいずれの方法も、腫瘍細胞に限られる(すなわち、正常細胞に存在しない、または低レベルのみ存在する)免疫応答の見分けおよび同定によって、利益を受けることが理解され、本明細書において意図される。従って、腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答の該誘導をさらに同定するための方法が本明細書で開示され、ここでヒト細胞を該

50

ノボペプチドに曝露して、そしてヒト癌細胞および正常細胞に対する、該曝露された細胞の反応性を決定する（正常細胞と比較してヒト癌細胞に対してより強い反応性は癌特異的免疫応答を示す）。

【0026】

腫瘍特異抗原は多くの入手源から由来することができる。これまでの方法を超えた本発明の方法の利点は、腫瘍形成(すなわち癌)を伴う前に、遺伝子において腫瘍特異的な抗原を同定することである。例えば、1つの腫瘍特異的な抗原源は、遺伝子のフレームシフトである。該遺伝子は発癌性または非発癌性であることができる。癌遺伝子が起源であるフレームシフトは、「発癌性-関連フレームシフト」であり、対して、非発癌性腫瘍遺伝子に由来するフレームシフトは、「パイスタンダーフレームシフト」である。従って、例えば、腫瘍特異的な抗原であって、該抗原が該遺伝子源内のパイスタンダーフレームシフトの結果であることが本明細書において特に意図される。

10

【0027】

ノボペプチドワクチン抗原を同定するための該方法は、2個の主な作業課題を含む。第1は、下記で「ノボペプチド同定スクリーニング」と称され、1個以上の癌細胞型で発現される可能性がありおよび/または発現されることが実験的に決定されたノボペプチドおよび/またはノボペプチド核酸配列を同定することを伴う。第2の作業課題は、下記で「ノボペプチド免疫学的スクリーニング」と称され、ワクチンの構成成分としての適合性について各候補ノボペプチドを評価するために、そのように同定された該ノボペプチド、またはそのように同定された該ノボペプチド核酸配列によってコードされたノボペプチドの免疫学的スクリーニングを伴う。

20

【0028】

本明細書に開示されおよび下記の試験により検証された本発明の根底にある重要で新規な見識は、癌細胞で発現されおよび非癌性細胞では最小限に発現されるかまたは発現されない抗原は癌遺伝子、特にまたは独占的にマイクロサテライト配列を含むそれらに由来するという、広く抱かれてきた仮定は精査に耐えられないことである。実際は、癌細胞は多くのノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションを受けた遺伝子を発現することができ、該細胞による1個以上の非MSノボペプチドまたは他の非癌性遺伝子関連ノボペプチドの該発現をもたらす。

【0029】

1つの態様において該ノボペプチド同定スクリーニングは、癌細胞において発現されるかまたは発現されることが予測されるノボペプチドの同定に関連する。これは多くの方法、例えば本明細書で開示される実施例に記載の方法によって達成することができる。該方法は本明細書に記載の該アプローチ（これは例としてのみ提供され本発明の範囲を制限するものでない）に及び、さらに実験的に既定の細胞型で発現されると決定され、または発現されると予測され、および/または既定の特性を示す、ペプチド、ペプチド配列、および/またはペプチドをコードする核酸配列を同定するための当該技術分野において当業者に既知の他の方法にまで及び。

30

【0030】

該ノボペプチド同定スクリーニングを行うための1つの方法には、候補ノボペプチド配列、および/またはノボペプチド核酸配列のライブラリーを、既知のゲノム配列もしくはサブシーケンスから、またはcDNA、mRNA、EST、タンパク質もしくはペプチド配列、核酸もしくはペプチドマイクロアレイデータ、またはいずれの非癌性の参照配列もコードする配列が決定または推測されうるいずれの他のデータからバイオインフォマティクス的に作成することも含まれる。少なくとも1つの非癌性の参照配列をそのようなデータから抽出する。上記の一般性を制限することなく単なる例として、そのようなデータから非癌性の参照配列を抽出する1つの方法は、利用可能な配列データから既知の遺伝子またはオープンリーディングフレームに対応する該DNAまたはRNA配列を抽出することである。多くのノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションはRNAプロセッシングおよび/または翻訳のレベルで生じる事象の結果であるため、RNA配列は候補ノボペプチドの同定の

40

50

ための別の重要な配列データ源である。理想的には、そのように抽出された非癌性の参照配列は、変異および断片化および/または組み替えられてノボペプチド核酸配列を形成するとき、癌細胞で発現する可能性がある配列である；しかしながら、ノボペプチド同定はある程度は試行錯誤であり、そのように抽出された非癌性の参照配列の全てが理想的とは限らない。それにもかかわらず、非癌性の参照配列選択は、適当な状況で、配列の発現の可能性を評価するための当該技術分野の当業者に既知のいずれかの方法により、例えば単なる例としては、既知のプロモーターおよび/または他の調節エレメントに関して問題の配列の位置 (locus) を考慮すること、および/または問題の配列とワクチンが望まれている型の癌細胞で発現することが知られている遺伝子との関係を考慮することによって、最適化されることができる。該配列データから抽出された各非癌性の参照配列から、ノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションを適用し、該ノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションによって影響され、かつ該所望の長さのノボペプチドに対応する長さを有する1個以上のサブシーケンスを抽出することによって、1個以上のノボペプチド核酸配列を作成する。ゲノミック、プロテオミクスまたは他の同様のデータから候補ノボペプチド配列を同定する多くの他の方法は、当該技術分野の当業者に明らかである。候補ノボペプチド配列のライブラリーをいったん作成すれば、物理的なノボペプチドを、特定の配列から物理的なポリペプチドを合成しまたは生成するための当該技術分野の当業者に既知の多くの方法 (単なる例としてFMOC合成、インビトロ翻訳、および遺伝的に操作された細菌性、ファージまたは酵母発現系を含むがこれに限定されるものではない) のいずれかによってそこから容易に作成することができる。

10

20

#### 【0031】

様々な腫瘍サンプルおよび正常組織からのDNAまたはcDNAの配列を含む巨大な公共のデータベースが存在する。該NCI ESTデータベースは現在のところ、41百万エントリーより多くを含む。The Cancer Genome Atlas Projectは、別の腫瘍細胞配列データ源である。腫瘍データベースの配列と非癌性の参照配列オープンリーディングフレームとの比較のより、推定上の挿入、欠失、スプライシング誤り、およびノボペプチドの翻訳および発現を引き起こすことができる他のパリエーションが明らかになる。

#### 【0032】

1つの態様における本発明は、フレームシフトミューテーションまたはパリエーションから生じる配列を同定するために腫瘍データベースからのEST配列を非腫瘍関連ESTデータベースからのEST配列と比較することによって達成される、癌細胞で発現する可能性があり、非癌性細胞では無いノボペプチドを同定する作業課題に関連している。EST配列は特に有用であり、なぜならそれらは発現されると知られている配列を示し、RNAレベルで生じるパリエーション (これは対応するDNA配列では明らかにならない) をとらえるためである。この実施態様において、可能性あるフレームシフトした配列の全ては該非腫瘍ESTデータベースから作成され、ついで該腫瘍ESTデータベースを、そのように作成した該フレームシフトした配列とマッチする配列について検索した。次いで、該シフトしていない非癌性の参照配列が該非腫瘍ESTデータベースに現れる回数と比較して、フレームシフトした配列の各々が該腫瘍ESTデータベースに現れる回数を考慮して、該腫瘍ESTデータベースで見つかったマッチする配列を選択するためにランク付けした。両データベースは多くの研究者による多くの試験からのデータについての貯蔵であるため極めて重複していて、それぞれ腫瘍および非腫瘍細胞での妥当な発現サンプルを示す。考慮すべき別のファクターは、該腫瘍ESTデータベースで見つけられたフレームシフトをもたらす挿入または欠失のサイズである。3個以下のヌクレオチドの挿入または欠失は、配列決定の誤りに起因する有意な可能性を有するが、より長い挿入または欠失、特に複数の源から蓄積された複数のESTに現れるそれらは、腫瘍細胞で実際に発現される真のノボペプチドを示す可能性が高い。ここで記載されるバイオインフォマティクスアプローチはまた、複数の腫瘍型で発現されるノボペプチドを選択するのに有用な情報を提供することが留意される。

30

40

#### 【0033】

腫瘍細胞で発現されるノボペプチドを同定するための別の方法は、細胞からRNA抽出し

50

て精製するための、および該RNAの配列を決定するための当該技術分野の当業者によく知られたいずれかの該方法を用いて、腫瘍細胞からRNAを抽出し、そのように抽出したRNAをシーケンシングすることを伴う。本明細書記載の該バイオインフォマティクス予測方法に基づいて発生すると予測されたフレームシフト変異体について、ヒト腫瘍細胞系における遺伝子のシーケンシングにおいて興味深い知見は、大抵のフレームシフトした配列は統計的に予測されたよりも短い長さで終わることである。3個の終止コドンがあるため、終止コドンは平均して3/20アミノ酸毎に約1回発生することが予測されるが、多くの即時終止が認められ、20アミノ酸より長いフレームシフト変異体は、まれにしか遭遇しなかった。

#### 【0034】

また、既知のまたは疑わしい癌細胞を含むサンプルから物理的な形でノボペプチドを抽出し、そのように抽出したノボペプチドを同定することを含む、ノボペプチド同定スクリーニングを行う方法が本明細書で開示される。1個以上の細胞内または細胞上に存在することができるノボペプチドを抽出することができる様々な方法が存在する(概してしかし必ずしも限らないが、他の細胞タンパク質およびペプチドを含む該サンプルに存在することができる他の物質と共に)。いくつかのそのような方法が当該技術分野の当業者に知られていて、選択された溶媒またはバッファーでの洗浄、酸溶出、超音波処理、およびMHCに対する親和性を有する他の化学物質との拮抗によるMHCからの溶出を単なる例として含むがこれらに限定されない。選択された該方法により該サンプルの細胞の表面にある抗原を抽出することができる。癌細胞によって発現されたノボペプチドはそのように表示される可能性があるため、MHCで表示された抗原を選択的に抽出する方法は特に有用である。ノボペプチドを含む抽出物がいったん得られたら、不均質なサンプルからのペプチドを抽出しシーケンシングするための当該技術分野の当業者に既知の該方法によって、そこに含まれる該ノボペプチドを特徴づけることができ、それらの配列を決定することができる。一般に用いられる方法には、クロマトグラフおよび/または電気泳動の方法によるサンプル分離、続いてそのように分離した画分の特徴づけ(これはエドマン分解などのシーケンシング方法または質量分析によるものであり得る)があるがこれに制限されるものではない。抗体または他のプローブを用いる特定の配列の同定のための他の方法が存在し、ELISAおよびマイクロアレイ分析があるがこれに限定されるものではない。本発明により可能にされた特に有用でこれまで実行不可能であったアプローチは、液体クロマトグラフィおよび質量分析(LC-MS/MS)によるノボペプチドの分離および同定である。ノボペプチドがワクチンのための標的として最も効果的であるためには、それは該腫瘍細胞の外側に提示されるべきである。該腫瘍のT細胞死滅のために、該ペプチドはMHC分子との関連で提示される必要がある。抗腫瘍抗体結合のために、該ノボペプチドは何らかの形で該表面上で利用可能である必要がある。質量分析は、ペプチドの特定の配列の直接的な検出を可能とする。MSによるノボペプチドの同定はこれまで可能でなかった。1つにはノボペプチドに対応するピークを分離(resolve)するのに十分な分解(resolution)を有する質量分析計は最近になってやっと利用可能となったためであり、さらに、より重要なことには、MSによるノボペプチドの同定はノボペプチド配列のデータベースおよび対応する質量を必要とし、本発明の目的のために本発明者の指示において作られるまでそのようなデータベースは存在しなかったためである。このようなデータベースは、本明細書で開示されたことを行うための、または当業者に公知のいずれかの方法によって候補ノボペプチド核酸配列のセットを集め、ノボペプチドが溶出されている腫瘍細胞に存在しているMHC型に配列が結合する能力またはそれにおいて配列が掲示される能力を予測するためのソフトウェア(例えば、単なる例として、BIMASおよび/またはSYFPEITHI)を用いて各配列を解析して、これらのMHC型において掲示されることが可能な好ましい9-マー配列またはサブシーケンスを同定することによって作成されうる。そのように決定された各好ましい9-マー配列に対応するスペクトルを、ペプチド配列からスペクトルを作成し、そのように作成した該スペクトルを実測のスペクトルと比較して、そのよう比較からペプチド配列がいずれの該実測スペクトルに対応するかどうかを評価するのに適したソフトウェア(例えば単なる

10

20

30

40

50

例として、Spectrum Mill) を用いて作成し、LC-MS/MSによって測定したスペクトルと比較した。ノボペプチドは低レベルで存在し、提示される配列は1つのみであり得るので、最近まで質量分析の感度は、それらを検出するのに充分高くはなかった。ここに記載される方法は、候補ノボペプチドの同定のために、および記載される別の方法の1つによる同定を裏付けまたは検証するためのスクリーンとしての両方で使用されることができるとは、留意すべきことである。

#### 【0035】

ヒトは非近交系である一方実験室マウスはそうではないため、特にヒト癌に関しては、有望なHLA適合性について、候補ノボペプチドのバイオインフォマティクススクリーニングを行うことは有用である。ヒト使用用のワクチンとしての特定のノボペプチドの有効性は、ある程度はそれを投与された該ヒト患者に存在する該HLA型によって表示される該ノボペプチドの能力に依存することが理解され本明細書において意図される。ワクチン候補ノボペプチドが所定のHLA型によって表示される可能性ある能力について、当該技術分野の当業者に知られたアルゴリズム、例えば記載されるものを用いて評価することができる。特定のヒト患者のワクチン接種のために、該ワクチンは、好ましくは、該患者の細胞内で発現されるHLA型の少なくとも1つと結合する高い可能性有すると予測される1個以上のノボペプチドを含むべきである。ヒトにおける非個別的な使用を意図したワクチンのために、1つのペプチドが2個以上のMHC分子によって提示されることは珍しくなく、それによって、所望レベルの集団適用範囲 (population coverage) に要される異なるノボペプチドの数は減ることに留意して、該ワクチンは、該標的集団中の高いパーセンテージの個体が該ワクチンで示された少なくとも1つの該HLA型を有するのに十分な多くの選択されたHLA型の毎に1個以上のノボペプチドを含むべきである。特定のノボペプチドが発現されるまたは発現されることが予測される該特定の腫瘍型、それらの腫瘍型が該標的集団で現れる頻度、それらの腫瘍型のための効果的な治療または予防の発見の緊急性 (いくつかの癌については効果的な治療が存在すること、および癌型は診断後の平均余命および影響の重症度に関して異なることに留意する)、およびワクチンの設計に重要であると見なされる他のクライテリアを考慮することはまた、有用である。これは、複数の腫瘍で発現され、より一般に生じ、効果的なワクチンの必要性がより緊急であり、または他のクライテリアを満たす、さらなる試験をするノボペプチドについての優先的な選択を可能にする。

#### 【0036】

また、ノボペプチド同定スクリーニングを行う方法が開示され、これは、標的とされる型の腫瘍細胞中の特定のノボペプチドの該RNA発現レベルを、1個以上の非癌性細胞型中の同一のノボペプチドの該RNA発現レベルと比較することを含む。これはRNA発現レベルについて評価するための当該技術分野の当業者に既知の方法 (例えばこれらに制限されず単なる例として、マイクロアレイ発現分析、逆転写酵素PCR、およびSAGE分析) によって達成することができる。ワクチン中の含有物のためには、腫瘍細胞においては高度に発現され、非癌性細胞では最小限に発現されるか発現されないノボペプチドが好ましい。効果的なワクチンのためには、該ノボペプチドは標的とされた腫瘍で発現されなければならない、理想的には非癌性細胞では発現せず、さらに非癌性細胞中に対して腫瘍中で極めて異なって発現されるノボペプチドもあれば、そうでないものもあるので、RNA発現レベルスクリーニングはワクチン製剤中の含有物のためのノボペプチドの選択を最適化するのに有用である。

#### 【0037】

ノボペプチド免疫学的スクリーニングを行う方法が本明細書で開示される。例えば、特定のノボペプチドに対するB細胞応答の存在についての免疫学的にスクリーニングするための方法が本明細書で開示され、その方法は、ノボペプチドを発現すると予測されるタイプの癌細胞を有する個体からの血清サンプル中のノボペプチドに対して反応性を有する抗体が存在するかどうか、そして、そのような癌を有さない1個以上の個体から得られた血清中にそのような反応性抗体が存在しないかあるいは所定の力価以下で存在するのかわかっていることについてアッセイすることからなる。所定のノボペプチドに対する抗体反応性の血清中の存在

10

20

30

40

50

を、該ノボペプチドを固体表面に吸着し、血清を適用し、洗浄した後、該ノボペプチドに結合したままの抗体を検出するELISAアッセイによって検出して定量化する。天然に存在する腫瘍上に表示された変異体抗原に対する最初の免疫応答は、抑圧と免疫応答の開始に必要とされる該共制御 (co-regulatory) シグナルの欠如に起因する寛容化である; これは動物モデルにおいて明らかに実証され、おそらくヒトにおけるケースである。しかしながら、少なくともいくつかの個体において、腫瘍進行過程の終わりに強い免疫応答が生じた。従って、候補ノボペプチドに対する血清抗体反応性は、たとえ問題の癌型を有する1または2、3の個体のみの該血清で検出されたとしても、該ノボペプチドがその癌型中で発現される有力な証拠である。

【0038】

従って、1つの態様において、特定のノボペプチドに対するT細胞応答についての免疫学的なスクリーニング方法が本明細書で開示され、これは、MHCまたはHLA中で表示される該ノボペプチドに対して特異的なT細胞レセプターを有する細胞傷害性Tリンパ球 (「CTL」) を最初に準備することを含む。ついでこれらのCTLを、(1) 癌細胞、および(2) 非癌性細胞に対する各々の反応性について試験し、各々該CTLが特異的である該MHCまたはHLAのそれにマッチするMHCまたはHLA型を有する。

【0039】

ノボペプチドのスクリーニングのための別の方法は、評価される該ノボペプチドで免疫化し、腫瘍細胞による攻撃において、または腫瘍を持っているまたは持つ傾向にある動物において、該免疫化が予防的にまたは治療的に効果的な免疫応答を生成するのに効果的であるかどうかを観察することによって、適当な動物モデルにおいて試験することを伴う。該応答を、例えば、非免疫化したコントロールと比較して、長期に渡って腫瘍体積を測定すること、または生存率を評価することによって評価することができる。実施例1にこれらの方法を説明する。

【0040】

先の議論において記載された該スクリーニング方法のいずれか1個以上を用いて、非癌性細胞中と比較して腫瘍中に広まっているノボペプチドを同定することができる。腫瘍および非癌性細胞のパネルのスクリーニングによって、特定の腫瘍型ならびに全ての腫瘍中のノボペプチドの頻度を確立することが可能である。さらに、該既知の頻度のHLA型に対するノボペプチドをスクリーニングすることによって、該抗原に対して応答する集団 (population) のパーセンテージを確立することができる。

【0041】

すでに記載したように、本発明が対象とする第2の作業課題は、該ノボペプチド同定スクリーニングまたは別法によって同定された該候補ノボペプチドのノボペプチド免疫学的スクリーニングを行うことである。該ノボペプチド免疫学的スクリーニングの該目的は、治療的または予防的ワクチン中の含有物のための所定の候補ノボペプチドの適合性を決定することである。先の段落で開示された方法を用いることによって、またはワクチン構成成分としての生体分子の有望な有効性および安全性を決定しまたは評価するための該当該技術分野の当業者に既知の方法のいずれかによって、単独でまたは組み合わせて、およびいずれかの適当な順番で、該ノボペプチド免疫学的スクリーニングを行うことができる。

1つの実施態様において、該ノボペプチド免疫学的スクリーニングは、該ノボペプチドに対するT細胞マダー (madder) 反応性は、独占的にまたは偏って癌細胞と反応するが、正常細胞とは反応しないかどうかを決定することを伴う。B-細胞応答に関しては、ノボペプチド免疫学的スクリーニングは、該ノボペプチドに対する抗体が特異的に腫瘍細胞に対して反応しおよび正常細胞に対しては反応しないかどうかを決定することを伴う。ノボペプチドは変化された核酸配列に由来するため、ノボペプチドは本質的に相対的に非癌性細胞で発現しそうにない。ノボペプチドワクチン抗原は非癌性細胞で発現されないことが明らかに好ましい。なぜならそのような発現は既存の寛容の可能性を暗示するためであり、およびワクチンは非癌性細胞に対する免疫応答を生じないことが好ましいためである。しかし、望ましくない副作用を生じる治療でさえ治療的に有用であり得るので、非癌性細胞

10

20

30

40

50

胞において非発現であることの優先性は厳格でない。

【0042】

腫瘍細胞に対する免疫応答を上昇させるために投与すべき予防的および/または治療的ワクチンの製剤化に有用な方法および組成物が本明細書で開示される。本発明は、ノボペプチドに基づくワクチンの組成物およびその投与方法まで及ぶ。ノボペプチドに基づくワクチンは、当該技術分野の当業者に知られたいずれかの方法で調製することができ投与することができ、適当な担体に溶解または懸濁したノボペプチドを含むワクチンを調製し、それを1回または既定の間隔でワクチン接種すべき該動物またはヒト患者に投与する、非常に単純な方法が含まれる。しかしながら、より良い成功は他の方法によって行われることができ、および特定のアプローチは遺伝子銃法を用いた遺伝的免疫化を伴い、これは、下記の実施例で説明されるように、該ワクチンを、該所望のノボペプチドをコードする直鎖発現エレメントの形態で投与する。ワクチンの該組成物は、ノボペプチドおよび他の構成成分の両方を含むことができる。複数の異なるノボペプチドの含有物は与えられる免疫保護のレベルを改善することができ、更なる腫瘍型に対する免疫保護を与えることによつてである；単一ノボペプチドは、複数の腫瘍型に対して免疫保護を与えること認められるが、標的腫瘍型のレパートリーは、更なるノボペプチドの含有によって広げることができる。複数のノボペプチドの該含有物は、ヒトにおける投与を対象としたワクチンにおいて特に有用である。該ワクチン中の少なくとも1つのノボペプチドは、既定の該標的集団のパーセンテージの各個体に存在する少なくとも1つのHLA型によって表示されることができ、これを保証するのに十分な多くの選択されたノボペプチドを含む必要があるからである。例えば、2個以上のノボペプチドを単一物に融合することができる。ノボペプチドに基づくワクチンは、与えられる該免疫保護を改善するまたは他の該ワクチン製剤の有効性および/または安全性を改善するための、当該技術分野の当業者によく知られた他の構成成分（単なる例としてアジュバントおよびハプテン担体を含むがこれに限定されるものではない）を含むことができる。

10

20

【0043】

実験を、一般的な予防的癌ワクチンおよび治療的癌ワクチンを創る実行可能性を直接に評価するために行った。既存のドグマとは対照的に、これらの実験の結果は、異なる腫瘍型に渡っておよび異なるMHC背景において交差防御（cross-protect）するノボペプチドワクチンで予防的に免疫化することができることを示す。これらの結果は、癌ワクチンは個別化される必要はなく；ヒトMHCの大部分をカバーする、定義づけられた一連の腫瘍特異抗原（ノボペプチド）を含むことができ；そして薬物またはワクチンの製剤化を可能とするのに十分な個別化サンプルを得ることができるよう個体で腫瘍が進行する（この時点で戦いはほとんど失われている）まで治療を遅らせる必要性を避けることを示す。

30

【0044】

本発明の腫瘍特異的な抗原（ノボペプチド）は、いずれかの既知の腫瘍細胞に由来することができる。従って、腫瘍特異抗原のためのスクリーニング方法が本明細書において意図され、ここで該腫瘍細胞は、リンパ腫（ホジキンズおよび非ホジキンズ）、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択された癌細胞に由来する。ノボペプチド源はいずれかの腫瘍型からであることができ、いくつかのノボペプチドは多種多様の腫瘍に適用できる；プールされた場合は、そのようなノボペプチドの適当な選択は、一般的な予防的ワクチンを生じさせることができる。

40

【0045】

該開示されたアプローチの長所は、それが癌への見識を提供したことである。例えば、

50

単離された11マーフレームシフトペプチドの1つ(FS6-21mut)は、ハンチンチン相互作用タンパク質(HIP1)の領域とホモロジーを有することが認められ、そのレベルはハンチントン病患者の疾病進行と確実に関連がある(Kerr, 2002)。興味深いことに、この疾患は有意に低い癌の発生率と関連することを示す多くの研究がある(Sorenson et al., 1999)。

【0046】

### C. 組成物

癌細胞に関連するノボペプチドが提供される。該開示された構成成分を使用して、該開示された組成物ならびに本明細書で開示される該方法内で用いるための該組成物自体を調製することができる。これらのおよび他の物質は本明細書で開示され、これらの物質の組み合わせ、サブセット、相互作用、群などが開示されるとき、これらの化合物の様々な個々のおよび集合的な組み合わせならびに置換の各々について特定して記載はしていないが、各々は明確に意図され、本明細書に記載されると理解される。例えば、特定のノボペプチドまたはノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーション(例えば、FSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1) SMC1が開示され議論され、および多くの分子(該FSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1を含む)にすることができる多くの改変が議論されているならば、特にそれとは反対に指示がされていない限り、FSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1の各々および全ての組み合わせおよび置換、および可能な改変が明確に意図される。従って、一組の分子A、B、およびC、ならびに一組の分子D、E、およびFが開示され、さらにそれらの組み合わせ分子の例A-Dは開示されるならば、たとえ各々が個別に列挙されていない場合であっても、各々の個別および集団的な組み合わせA-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E、およびC-Fが開示されっていると判断される。同様に、いずれかのサブセットまたはこれらの組み合わせもまた開示される。従って、例えば、A-E、B-F、およびC-Eのサブグループは開示されていると判断される。これらに制限されないが該開示された組成物を作成する方法および使用する方法の工程を含む、本出願のすべての態様にこの概念を適応する。従って、行われることができる様々な更なる工程がある場合、これらの更なる工程の各々は、該開示された方法のいずれか特定の実施態様または実施態様の組み合わせと共に行うことができると理解される。

10

20

30

40

【0047】

該開示されたスクリーニング方法を癌に関連するノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションを同定するために用いることができる。該開示されたノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションは癌細胞で非癌性細胞と比較して異なって発現される。ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションは試験した癌の全てで発生するため、該ノボペプチドは治療的ワクチンのための基礎を提供する。従って、1個以上のノボペプチドを含む癌のためのワクチンが本明細書で開示され、該ノボペプチドはノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションに由来し、かつ該ノボペプチドを該開示されたスクリーニング方法を介してまたは他の方法によって同定する。特にノボペプチドが本明細書で開示され、該ノボペプチドは該SMC1遺伝子のフレームシフトに関連する。癌性組織のみに存在することが同定されたフレームシフトミューテーションペプチドが本明細書で開示される。例えば該配列リスト中のペプチドのリストを参照。特に腫瘍特異的な抗原が本明細書で開示され、該抗原は配列番号: 2、4、6、および8に記載のペプチドである。本明細書で開示される該ペプチドをコードすることができる多くのヌクレオチド配列が存在することが理解される。例えば、配列番号: 2、4、および6に記載の該ペプチドをコードするヌクレオチドの1つの例は、それぞれ配列番号: 1、3、および5の該ヌクレオチド配列である。該開示されたペプチドをコードする各々および全てのヌクレオチド配列が理解され本明細書において意図される。

40

【0048】

該配列リストの該ノボペプチドは本発明のスクリーニング方法によって非正常(例えば、癌性)組織にのみ存在することが示されたため、開示されたノボペプチドの各々を、対象における抗ノボペプチド抗体の存在を検出するための試薬として用いることができる。従って、さらに下記に記載するように、該ノボペプチドは対象における非正常(例えば、

50

癌性)組織の存在を検出する方法に有用性を有する。

【0049】

該ノボペプチド関連ミューテイションまたはバリエーションは、正常または非癌性組織と比較して癌性組織でより高いレベルで存在しおよび/または発現されるため、該ノボペプチド関連ミューテイションまたはバリエーション自体を、薬物または抗体治療のための標的、ならびに該ノボペプチド関連ミューテイションまたはバリエーションの存在を理由に、癌のリスクある対象を同定する方法の基礎として用いることができる。従って、これに関する開示は、ノボペプチドまたはFS-ノボペプチドまたは非MSノボペプチドに対する抗体にまで及ぶ。該抗体は本明細書で開示されるノボペプチドのいずれかに対して特異的であることができると理解される。例えば、該抗体は該SMC1遺伝子のフレームシフトミュータントを対象にすることができる。該開示は、これに関して、単なる例としてだが、配列番号：2、4、6または8に記載の該配列を含むノボペプチドに対する抗体にまで及ぶ。該抗体を、単独でまたは別の組成物の構成成分として投与することができる。従って、本明細書で開示される該腫瘍特異抗原に対して特異的な抗体を含む組成物が本明細書で開示される。腫瘍細胞における該ノボペプチドまたはノボペプチド関連ミューテイションまたはバリエーションの存在に起因して、癌を治療または予防するために本発明のワクチンを用いることができる。別法として、該ミューテイションは正常細胞では発生しないため、それはまた予防的ワクチンとして用いることができる。従って、該腫瘍中の該ペプチドの該頻度に該集団 (population) の該MHC I の該頻度をかけることによって、それらが該集団の10%以上に特定の腫瘍または腫瘍の群に対する保護を提供すると予測されるように、該上記構成成分で作られた予防的ワクチンを含む組成物が本明細書で開示される。

10

20

【0050】

従って、その必要がある対象に本明細書で開示される該ワクチンを投与することを含む、癌を治療する方法が本明細書で開示される。また、そのリスクある対象に本明細書で開示される該ワクチンを投与することを含む、癌を予防する方法が本明細書で開示される。該開示されたワクチンは、全ての癌中の開示された腫瘍特異的な抗原の存在に起因して、癌を治療するために用いることができる。癌を治療または予防するためのワクチン接種が理解されおよび本明細書において意図され、該癌はリンパ腫(ホジキンズおよび非ホジキンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌(たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される。

30

【0051】

本明細書で開示される該抗体を、結合を増大し、更なる免疫応答を誘発し、または該標的抗原の近くに(例えば該フレームシフトミューテイションを発現する細胞に)毒性作用を送達するために、他の薬剤、分子または化合物と組み合わせることができる。そのような組み合わせは、該融合コンストラクトの形成、免疫複合体または当該技術分野において知られた他の組み合わせ基盤(platform)から生じることができると理解される。従って、本明細書で開示される該抗体は、毒素(例えばジフテリア毒素、リシン毒素、破傷風トキソイド、ボツリヌス毒素または他の毒素)と、抗体-毒素融合を形成する融合コンストラクトとして、組み合わせることができる。例えば、該抗体-毒素融合コンストラクトはジフテリア毒素に融合した該開示された抗体を含むことができる。該開示された毒素(例えば破傷風およびジフテリア)は、以前の該毒素への曝露からの該抗体応答を避けるためにトランケーションミュータントを含むことができることが、本明細書において理解される。例えば、ジフテリア毒素はトランケーションミュータントジフテリア毒素を含むこと

40

50

ができ、ここで該毒素は該ジフテリア毒素の該C末端の145-152アミノ酸トランケーションを含むと理解される。

【0052】

1. 配列シミラリティー

本明細書において議論される用語ホモロジー、シミラリティー、および同一性は互いに交換できると理解される。従って、例えば、該単語ホモロジーの使用が2個の非天然配列の間で使用される場合、これは必ずしもこれらの2個の配列の間の進化的関係を示しているのではなく、むしろ、それらの核酸配列の間の該シミラリティーまたは関連性を見ていると理解される。2個の進化的に関連した分子の間のホモロジーを決定するための多くの方法は、配列シミラリティーを測定する目的で、いずれか2個以上の核酸またはタンパク質に、それらが進化的に関連するかしないかに関わらず、日常的に適用されている。

10

【0053】

概して、本明細書で該開示される遺伝子およびタンパク質の、既知の変異体および誘導体または現れうるそれらを定義する1つの方法は、該変異体および誘導体を特定の既知の配列の対するホモロジーに関して定義することを介すると理解される。本明細書で開示される特定の配列のこの同一性はまた、本明細書の他の箇所でも議論される。概して、本明細書で開示される遺伝子およびタンパク質の変異体は、該規定の配列または該天然(native)配列に対して、概して少なくとも、約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%ホモロジーを有する。当該技術分野の当業者は、2個のタンパク質または核酸(例えば遺伝子)の該ホモロジーを決定する方法を容易に理解する。例えば、2個の配列を該ホモロジーが最高値であるように並べた後に該ホモロジーを算出することができる。

20

【0054】

ホモロジーを算出する別の方法は、公開されたアルゴリズムによって行うことができる。比較についての最適な配列のアラインメントを、Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)のローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443 (1970)の該ホモロジーアラインメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988)のシミラリティーについての検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行によって(GAP, BESTFIT, FASTA, およびTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI))、または検査によって、行うことができる。

30

【0055】

核酸についてホモロジーは、当該技術分野の当業者に既知の該方法(例えばZuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989、少なくとも核酸アラインメントに関連する資料については、引用することで本明細書に組み込まれる、に開示されるアルゴリズムを含むがこれに限定されない)によって決定することができる。いずれの該方法も概して用いることができ、場合によってはこれらの様々な方法の結果は異なりうるが、該当業者は同一性がこれらの方法の少なくとも1つで認められれば該配列は、該規定の同一性を有すると言え、および本明細書で開示されることを理解することが理解される。

40

【0056】

例えば、本明細書で使用されるとき、別の配列に対して特定のホモロジー%を有すると列挙された配列は、上記のいずれか1個以上の計算方法によって算出した該列挙されたホモロジーを有する配列を意味する。例えば、第1配列が該Zuker計算方法を用いて第2配列に対して80%ホモロジーを有すると算出された場合、たとえもう1つの計算方法によって算出したとき第1配列が第2配列に対して80%ホモロジーを有さなくても、本明細書で定義されるとおり第1配列は第2配列に対して80%ホモロジーを有する。別の例として、該Zuker計算方法および該PearsonおよびLipman計算方法の両方を用いて、第1配列が第2

50

配列に対して80%ホモロジーを有すると算出された場合、たとえ該SmithおよびWaterman計算方法、該NeedlemanおよびWunsch計算方法、該Jaeger計算方法またはいずれか別の計算方法によって算出したときに、第1配列が第2配列に対して80%ホモロジーを有さない場合であっても、本明細書で定義されるとおり第1配列は第2配列に対して80%ホモロジーを有する。さらに別の例として、計算方法のそれぞれを用いて第1配列が第2配列に対して80%ホモロジーを有すると算出されたとき(実際には異なる計算方法はしばしば異なる算出ホモロジーパーセンテージを生じるが)、本明細書で定義されるとおり、第1配列は第2配列に対して80%ホモロジーを有する。

【0057】

## 2. 核酸

本明細書で開示される様々な核酸に基づく分子が存在し、例えばFSI-78mut、FS6-21mut、FS SMC1、またはそのフラグメントをコードする核酸、ならびに様々な機能的な核酸がある。該開示された核酸は、例えば、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体(substitute)で構成される。これらのおよび他の分子の非限定的な例が本明細書において議論される。例えばベクターが細胞内で発現される時、該発現されたmRNAは、概してA、C、G、およびUから構成されることが理解される。該開示はこれに関して、本明細書に記載の該核酸配列、およびそれによく似たまたは相同の、ありとあらゆる他の核酸にまで及び、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体またはその組み合わせの全体または一部に含まれるかに関わらず、および複合体(conjugate)または他の分子もしくは部分に結合しているか否かに関わらない。ヌクレオチドおよび関連分子。同様に例えば、アンチセンス分子が細胞または細胞環境に例えば外因性の送達を介して導入される場合、アンチセンス分子は細胞の環境内でのアンチセンス分子の該分解を減らすヌクレオチド類縁体で構成されることが有利であることが理解される。

【0058】

### a) ヌクレオチドおよび関連分子

ヌクレオチドは塩基部分、糖部分およびリン酸部分を含む分子である。ヌクレオチドはそれらのリン酸部分と糖部分を介してインターヌクレオチド結合を形成して結合することができる。ヌクレオチドの塩基部分は、アデニン-9-イル(A)、シトシン-1-イル(C)、グアニン-9-イル(G)、ウラシル-1-イル(U)、およびチミン-1-イル(T)であることが出来る。ヌクレオチドの糖部分は、リボースまたはデオキシリボースである。ヌクレオチドのリン酸部分は五価のリン酸である。ヌクレオチドの非制限的な例は、3'-AMP(3'-アデノシンモノリン酸)または5'-GMP(5'-グアノシンモノリン酸)である。当該技術分野において利用可能で、本明細書において利用可能な多種類のこれらのタイプの分子がある。

【0059】

ヌクレオチド類縁体は塩基、糖またはリン酸部分にいくつかのタイプの改変を含むヌクレオチドである。ヌクレオチドの改変は当該技術分野においてよく知られていて、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、および2-アミノアデニン、ならびに糖またはリン酸部分での改変が含まれる。当該技術分野において利用可能で本明細書において利用可能な多種のこれらのタイプの分子がある。

【0060】

ヌクレオチド置換体はヌクレオチドと同様の機能的な特性を有する分子であるが、リン酸部分を含まない、例えばペプチド核酸(PNA)である。ヌクレオチド置換体はワトソン-クリックまたはフーグステーンの様式で核酸を認識する分子であるが、それはリン酸部分以外の部分を介して結合する。適当な標的核酸と相互作用するとき、ヌクレオチド置換体は二重らせん型構造に適合することが出来る。当該技術分野において利用可能で本明細書において利用可能な多種のこれらのタイプの分子がある。

【0061】

例えば細胞の取り込みを強化するために、他のタイプの分子(複合体)をヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体に結合することもまた可能である。複合体は該ヌクレオチドまた

10

20

30

40

50

はヌクレオチド類縁体と化学的に結合することが出来る。そのような複合体には、これらに限定されないが、脂質部分（例えばコレステロール部分）が含まれる（Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556）。当該技術分野において利用可能で本明細書において利用可能な多種のこれらのタイプの分子がある。

#### 【0062】

ワトソン-クリック相互作用は、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体の該ワトソン-クリック面（face）との少なくとも1つの相互作用である。ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体の該ワトソン-クリック面には、プリンベースのヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体の該C2、N1、およびC6位置、およびピリミジンベースのヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体またはヌクレオチド置換体の該C2、N3、C4位置が含まれる。

10

#### 【0063】

フーグスティーン相互作用は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体の該フーグスティーン面（face）で起こる該相互作用であり、それは二本鎖DNAの該主溝で曝されている。該フーグスティーン面には、プリンヌクレオチドの該N7位置および該C6位置で反応性基（NH<sub>2</sub>またはO）が含まれる。

#### 【0064】

##### b) 配列

本明細書で開示される該タンパク質および/またはペプチド分子（単なる例としてFSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1を含むがこれに限定されるものではない）または本明細書で開示されるいずれかの該核酸（単なる例としてFSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1の全てまたは一部をコードするそれらを含むがこれに限定されるものではない）に関連する様々な配列が存在する。該開示はこれに関して、ヒトにおけるおよび特異免疫を示す他の種（哺乳類、魚、および鳥を含むがこれに限定されるものではない）における、これらの遺伝子類縁体、ならびに他のこれらの遺伝子のアレル、およびスプライス変異体および他のタイプの変異体にまで及ぶ。様々な先行の該配列は、現在のところ知られている範囲で、様々なタンパク質および遺伝子データベース（ジェンバンクを含め）にて利用可能である。本出願時にジェンバンクで利用可能なそのような配列は、それらの全てならびにそこに含まれる個体サブシーケンスに関して、引用することで本明細書に組み入れられる。ジェンバンクには<http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi> でアクセスすることができる。当該技術分野の当業者は配列不一致および相違を解決するため、および特定の配列に関する該組成物および方法を他の関連配列に調整するための方法を理解する。プライマーおよび/またはプローブを、本明細書で開示され及び当該技術分野において知られた該情報を与えられた所定の配列のために設計することができる。

20

30

#### 【0065】

##### 3. ペプチド

##### a) タンパク質変異体

本明細書において議論されるように、該FSI-78mut、FS6-21mutおよびFS SMC1タンパク質の多くの変異体が存在することが既知であり、本発明に含まれる。該既知の機能的なFSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1変異体に加えて、また、該開示された方法および組成物において機能する該FSI-78mut、FS6-21mut、およびFS SMC1タンパク質の誘導体が存在する。タンパク質およびペプチド変異体および誘導体は十分に当該技術分野の当業者理解され、およびアミノ酸配列改変を伴うことができる。例えば、アミノ酸配列改変は、概して3個のクラス：置換の、挿入のまたは欠失の変異体の1個以上に分類される。挿入にはアミノおよび/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内（intrasequence）挿入が含まれる。挿入は通常はアミノまたはカルボキシル末端融合のそれらと比較してより小さい挿入で、例えばおおよそ1～10残基である。欠失は該タンパク質配列から1個以上のアミノ酸残基を除去することが特徴である。該タンパク質をコードする該DNA中のヌクレオチドの部位特異的変異によって該変異体をコードするDNAを生成し、およびその後組み換え細胞培養で該DNAを発現することによって、または特

40

50

定の配列を有するタンパク質またはペプチドを作成または入手するための当該技術分野の当業者に既知のいずれかの方法によって、これらの変異体を調製することができる。既知の配列を有するDNA中の既定の部位で置換ミューテーションを作成するための技術はよく知られており、例えばM13プライマー突然変異生成およびPCR突然変異生成である。アミノ酸置換は概して単一残基であるが、一度に多くの異なる位置で発生することができ；挿入は通常おおよそ1~10アミノ酸残基であり；および欠失は約1~30残基に及ぶ。置換、欠失、挿入またはその組み合わせを、最終コンストラクトに達するために、組み合わせることができる。該変異体をコードするDNAへのミューテーションは、読み枠の外に該配列を配置してはならず、2次mRNA構造を生じうる相補領域を創らないことが好ましい。置換型の変異体は、少なくとも1つの残基を除去し、および異なる残基をその場所に挿入したそれらである。そのような置換は概して該下記のテーブル6および7に従って生じ、および同類置換と称される。

10

【0066】

テーブル6:アミノ酸略語

【表1】

アミノ酸	略語
アラニン	AlaA
アロイソロイシン	AlIe
アルギニン	ArgR
アスパラギン	AsnN
アスパラギン酸	AspD
システイン	CysC
グルタミン酸	GluE
グルタミン	GlnK
グリシン	GlyG
ヒスチジン	HisH
イソロイシン	IleI
ロイシン	LeuL
リジン	LysK
フェニルアラニン	PheF
プロリン	ProP
ピログルタミン酸 p	Glu
セリン	SerS
スレオニン	ThrT
チロシン	TyrY
トリプトファン	TrpW
バリン	ValV

20

30

【表 2】

テーブル7: アミノ酸置換	
オリジナル残基	代表的な同類置換、他のものが当該技術分野において知られる。
Alaser	
Arglys, gln	
Asngln; his	
Aspglu	
Cysser	
Glnasn, lys	
Gluasp	
Glypro	
Hisasn;gln	
Ileleu; val	
Leuile; val	
Lysarg; gln;	
MetLeu; ile	
Phemet; leu; tyr	
Serthr	
Thrser	
Trptyr	
Tyrtrp; phe	
Valile; leu	

10

20

## 【0067】

免疫原性の融合タンパク質誘導体（例えば該実施例に記載のそれら）は、該標的配列に免疫原性を与えるために、インビトロでの架橋結合によって、または該融合をコードするDNAで形質転換した組み換え細胞培養によって、十分に大きいポリペプチドを融合することによって調製される。例えば、該FSノボペプチドを担体（例えばタンパク質または糖）と融合することができる。ハプテンまたは他の担体と融合、複合（conjugating）または別のそれを結合する方法による、ペプチドの該免疫原性の特性を改善するための方法は、免疫学の技術分野において当業者に充分知られている。

30

## 【0068】

1つのアミノ酸残基を生物学的におよび/または化学的に同様であるもう一つのもので置き換えることは、当該技術分野の当業者に同類置換として知られている。上記の一般性を制限することなく、例のみとして、テーブル2に示される該置換は、同類置換である。同類置換には、当該技術分野における当業者によって同類と見なされる置換が含まれ、およびこれらに制限されないが、該BLOSUM 62行列においてゼロ以上のログオッズスコアを有するか、または一般的な用法で他の置換行列において相対的に高いログオッズスコアを有する置換が含まれる。例えば、同類置換は1つの疎水性残基をもう一つのものに、または1つの極性残基をもう一つのものに置き換えることを伴う。該置換には、例えば、Gly、Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg;およびPhe、Tyrのような組み合わせが含まれる。明確に開示された各々の配列のそのような同類置換された（conservatively substituted）パリエーションは、本明細書で開示される該ポリペプチドの範囲内に含まれる。

40

## 【0069】

機能または免疫学的同一性における実質的な変化は、テーブル7のものよりも同類性（conservative）が低い置換を選択すること、すなわち、(a) 置換のエリアにおけるポリペプチド骨格の構造（例えばシートまたはヘリックス構造のような）(b) 標的部位の分子の電荷または疎水性、または(c) 側鎖のかさを維持することへのそれらの影響においてより有意に異なる残基を選択することによって作り出される。一般的に該タンパク質特性に最も大きな変化を生み出すことが期待される置換は、以下のものである；(a) 親水性残基、

50

例えばセリルまたはトレオニルを、疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バシルまたはアラニルに代わって(またはこれらによって)置換する; (b) システインまたはプロリンを、いずれかの他の残基に代わって(またはこれらによって)置換する; (c) 陽性側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニルまたはヒスチジルを、陰性残基、例えばグルタミルまたはアスパルチルに代わって(またはこれらによって)置換する; または(d) かさ高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンを、側鎖を有さないもの、例えばグリシンに代わって(またはこれらによって)置換し、この場合(e) 硫酸化および/またはグリコシル化のための部位数を増加することによる。

【0070】

例えば、1つのアミノ酸残基を生物学的におよび/または化学的に同様であるもう一つのもので置き換えることは、同類置換として当該技術分野の当業者に知られている。例えば、同類置換は、1つの疎水性残基をもう一つのもので、または1つの極性残基をもう一つのもので置き換えることである。該置換には、組み合わせ(例えばGly、Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg; およびPhe、Tyrなど)が含まれる。各々明確に開示された配列のそのように同類置換されたバリエーションは本明細書において提供されるモザイクポリペプチドの範囲内に含まれる。

10

【0071】

置換型または欠失型突然変異生成を用いて、N-グリコシル化(Asn-X-Thr/Ser)またはO-グリコシル化(SerまたはThr)のための部位を挿入することができる。システインまたは他の不安定な残基の欠失もまた望ましい。可能性あるタンパク質分解部位(例えばArg)の欠失または置換は、例えば該塩基性残基の1つの除去、または1つをグルタミルまたはヒスチジル残基での置換によって、達成される。

20

【0072】

特定の翻訳後の誘導体化は、該発現されたポリペプチドに対する組み換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミルおよびアスパラギン残基は、しばしば翻訳後に該対応するグルタミルおよびアスパルチル残基に脱アミド化される。別法として、これらの残基は弱酸性条件下で脱アミド化される。他の翻訳後の改変には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の該o-アミノ基のメチル化(T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983])、N-末端アミンのアセチル化、および、場合によっては、C末端カルボキシルのアミド化が含まれる。

30

【0073】

本明細書において該開示されたタンパク質の変異体および導体を定義するための1つの方法は、特定の既知の配列に対するホモロジー/同一性に関して該変異体および誘導体を定義することによると理解される。例えば、配列番号:1は、FSI-78mutの特定の配列を説明し、および配列番号:2は、FSI-78mut ペプチドの特定の配列を説明する。該規定の配列に対して、少なくとも70%または75%または80%または85%または90%または95%ホモロジーを有する、これらのおよび本明細書において開示された他のタンパク質の変異体が特に開示される。当該技術分野の当業者は、容易に2個のタンパク質の該ホモロジーを決定する方法を理解する。例えば、該ホモロジーがその最高値になるように2個の配列を並べた後、該ホモロジーを算出することができる。

40

【0074】

ホモロジーを算出する別の方法を公開されたアルゴリズムによって行うことができる。比較のための配列の最適なアラインメントは、Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)の該ローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970)の該ホモロジーアラインメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444 (1988)のシミュラリティーについての検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行によって(GAP, BESTFIT, FASTA, および TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package, Gene

50

tics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI))、または検査によって行いうる。

【0075】

同一のタイプのホモロジーは核酸について例えばZuker, M. Science 244:48-52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989 (これは、少なくとも核酸アラインメントに関する資料について引用することで本明細書に組み込まれる)において開示された該アルゴリズムによって得ることができる。

【0076】

同類 (conservative) ミューテーションおよびホモロジーの記載は、いずれかの組み合わせを含むことができると理解され、例えば該変異体が同類ミューテーションである特定の配列に対して少なくとも70%ホモロジーを有する実施態様である。

10

【0077】

本明細書がさまざまなタンパク質およびタンパク質配列について論じるとき、それらのタンパク質配列をコードすることができる核酸もまた開示されると理解される。これは特定のタンパク質配列に関連する全ての同義 (degenerate) 配列、すなわち1つの特定のタンパク質配列をコードする配列を有する全ての核酸、ならびに該開示された該タンパク質配列の変異体および誘導体をコードする全ての核酸 (同義核酸を含め) を含む。従って、特定の核酸配列の各々が本明細書において記載されていなくとも、各および全ての配列は、該開示されたタンパク質配列を介して、事実上、本明細書において開示され記載されると理解される。例えば、配列番号:2に記載のタンパク質配列をコードすることができる多くの核酸配列の1つが配列番号:1に記載される。さらに、配列番号:1の開示された同類誘導体もまた開示される。特定のDNA配列が生物内でそのタンパク質をコードすることを表すアミノ酸配列は無くとも、開示されたタンパク質の特定の変異体が本明細書で開示されるならば、そのタンパク質をコードする該既知の核酸配列もまた既知であり、本明細書において開示され、記載されているものと理解される。

20

【0078】

該開示された組成物に組み込むことができる多くのアミノ酸およびペプチド類縁体が存在することが理解される。例えば、多くのD アミノ酸または異なる機能的な置換基を有するアミノ酸が存在し、テーブル6およびテーブル7に示される該アミノ酸がある。天然に存在するペプチドの逆の立体異性体は開示され、ならびにペプチド類縁体の立体異性体も開示される。選択した該アミノ酸を持ったtRNA分子をチャージすることによって、また、例えばアンバーコドンを利用してペプチド鎖に該類縁体アミノ酸を部位特異的な方法で挿入する遺伝子コンストラクトを操作することによって、これらのアミノ酸は容易にポリペプチド鎖に組み込むことができる (Thorson et al., Methods in Molec. Biol. 77:43-73 (1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3:348-354 (1992); Ibba, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13:197-216 (1995), Cahill et al., TIBS, 14(10):400-403 (1989); Benner, TIB Tech, 12:158-163 (1994); Ibba and Hennecke, Biotechnology, 12:678-682 (1994) 少なくともアミノ酸類縁体に関する資料について引用することでその全ては本明細書に組み込まれる)。

30

40

【0079】

ペプチドに似ているが、天然のペプチド結合によって結合しない、分子を生成することができる。例えば、アミノ酸またはアミノ酸類縁体のための結合には、 $\text{CH}_2\text{NH--}$ 、 $\text{--CH}_2\text{S--}$ 、 $\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$ 、 $\text{--CH=CH--}$  (シスおよびトランス)、 $\text{--COCH}_2\text{--}$ 、 $\text{--CH(OH)CH}_2\text{--}$ 、および $\text{--CHH}_2\text{SO--}$  (これらおよび他のものは、Spatola, A. F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (general review); Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp. 463-468; Hudson, D. et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185 (1979) ( $\text{--CH}_2\text{NH--}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{--}$ ); Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249 (1986) ( $\text{--CH H}_2\text{--S}$ ); Hann J. Chem.

50

Soc Perkin Trans. 1307-314 (1982) (--CH--CH--, シスおよびトランス); Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980) (--COCH<sub>2</sub>--); Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533 (1982) (--COCH<sub>2</sub>--); Szelke et al. European Appln, EP 45665 CA (1982): 97:39405 (1982) (--CH(OH)CH<sub>2</sub>--); Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404 (1983) (--C(OH)CH<sub>2</sub>--); および Hruby Life Sci 31 :189-199 (1982) (--CH<sub>2</sub>-S--)に見られ; これらの各々は、引用されることで本明細書に組み込まれる。)が含まれる。特に好ましい非ペプチド結合は、--CH<sub>2</sub>NH--である。ペプチド類縁体は該結合原子間に複数の原子を有することができ、例えばb-アラニン、g-アミノ酪酸などが理解される。

#### 【0080】

アミノ酸類縁体および類縁体およびペプチド類縁体は、しばしば強化されたまたは所望の特性、例えば、より経済的な生成、より優れた化学安定性)強化された薬理学的特性(半減期、吸収、作用強度、有効性など)、変化した特異性(例えば生物活性の広域性)、減少した抗原性などを有する。

#### 【0081】

より安定なペプチドを生成するためにD-アミノ酸を用いることができる。なぜならD-アミノ酸はペプチダーゼなどによって認識されないからである。コンセンサス配列の1個以上のアミノ酸を同一タイプのD-アミノ酸で系統的に置換すること(例えばL-リジンの代わりにD-リジン)は、より安定なペプチドを生成するために用いることができる。システイン残基を用いて、環化させ、または2個以上のペプチドを共に結合させることができる。これはペプチドを特定のコンフォメーションに拘束するのに有益であり得る(Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61 :387 (1992)、参照することによって本明細書に組み込まれる)。

#### 【0082】

##### D. 該組成物を用いる方法

##### 1. 癌を予防または治療する方法

該開示された組成物を制御できない細胞増殖が生じるいずれかの疾病(例えば癌)に対する治療または予防のために用いることができる。該ノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションは、本明細書で開示されるいずれかのノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションであることができることが理解され、本明細書において意図される。従って、癌を治療する方法が本明細書で開示され、これはその必要がある対象に組成物を投与することを含み、ここで該組成物はノボペプチド、FS-ノボペプチド、非MSノボペプチド、FS-ノボペプチドでもある非MSノボペプチド、および/または前記のいずれかの組み合わせを含む。従って、例えば、該ノボペプチド関連ミューテーションまたはパリエーションは該SMC1遺伝子のフレームシフトであることができる。該フレームシフトはペプチドであることができることがまた理解される。従って、単なる例としておよび上記の一般性を制限することなく、癌を治療する方法が本明細書で開示され、これはその必要がある対象にノボペプチドを含む組成物投与することを含み、該ノボペプチドは、配列番号: 2、4、6または8に記載の該配列を含む。

#### 【0083】

1つの態様において本発明は、例えば、本明細書においてノボペプチドワクチン抗原と称されるノボペプチドを含め、予防的または治療的癌ワクチン中の含有物に適するノボペプチドの同定に関する。「ノボペプチドワクチン抗原」は、適当に構成された予防的または治療的ワクチンで投与されたとき、少なくとも1つの個体における少なくとも1つの癌細胞型に対して、液性、細胞性または両方であり得るかなりの免疫応答を促進する能力があるノボペプチドである。

#### 【0084】

試験を行い、一般的な予防的癌ワクチンおよび治療的癌ワクチンを作る実行可能性を直接に評価した。既存のドグマと対照的に、これらの試験の結果は、異なる腫瘍型に渡っておよび異なるMHC背景中で交差防御するノボペプチドワクチンによって予防的に免疫化す

10

20

30

40

50

ることができることを示す。これらの結果は、癌ワクチンは個別化される必要はなく；ヒトMHCの大部分をカバーする、定義づけられた一連の腫瘍特異抗原（ノボペプチド）を含むことができ；および薬物またはワクチンの製剤化を可能とするのに十分な個別化サンプルを得ることができるように個体で腫瘍が進行する（この時点で戦いはほとんど失われている）まで治療を遅らせるという必要性を避けることを示す。

#### 【0085】

本発明の該有用性は、説得力をもって動物モデルにて実証され、本明細書で開示され、およびヒト臨床試験の必要なしに実証されることができる選択された本発明の態様は、他の本明細書で開示される試験において実験的に確認された。本発明は、ヒトおよびマウス癌、および同様に、特異免疫のメカニズムを有する他の全ての生物（特に全ての哺乳類、ならびに鳥および魚を含む）の癌に適用できる。本発明は、ヒト癌に予防的および治療的介入を提供するだけでなく、癌が死亡の主要原因である、その獣医学的適用、特にコンパニオンアニマル（例えばイヌおよびネコ）にも、高い潜在的な意義がある。該イヌゲノム配列決定は完了しているため、本明細書で開示される本発明は、イヌ癌に容易に適用することができる。

10

#### 【0086】

癌の基礎にある該基礎的な免疫学の理解において、有意な進化が過去10年であったが、今までのところ、誰も確実におよび一貫して、腫瘍破壊を誘導し、または患者生存を改善することができる癌ワクチンを生成した者はいない(Lewis, 2004; Leaf, 2004)。該科学文献は、他者により調査された様々な癌ワクチン接種方法を開示し、各々理想的でないことを証明する。今日までの個別化癌ワクチン研究の大部分は、患者自身の腫瘍から調製した不明確な全腫瘍-細胞抽出物の使用に集中してきた。メラノーマにおける自己ワクチンを用いた試験は、原理上は、免疫的な介入は特定の抗腫瘍免疫応答を強化することができ、いくつかのケースでは退行を媒介さえすることができることを示したが、このアプローチは下記を含む困難な問題を示す (1)自己免疫を生じる可能性；(2) TAAの希釈（抗原の大部分は「正常」であるため）；(3) 特異性の弱化（免疫療法の最も興味そそる独自の特徴の1つ）；(4) 該ワクチンを作るために十分な大きさの腫瘍を持つ患者への依存性（初期の治療を不可能にする）；および(5) 各患者のための個別化ワクチンの特注調製の必要性。

20

#### 【0087】

癌ワクチン接種への別のアプローチは、既知で定義づけされたTAAからなるワクチン製剤を使用することである。これは特異性を最大化し、抗原希釈の該問題を取り除くためである。今まで、様々な手段を用いて数百のヒトTAAが同定され、および免疫療法に適するTAAを選択するためのクライテリアが存在する。機能的には、TAAは自己および非自己に分類されうる。自己TAAは非変異型遺伝子に由来し、その発現は特定の組織にまたは過剰発現されたタンパク質に限られる。今まで同定され試験されたほとんどのTAAは自己抗原である。そのような抗原に関連する潜在的な問題には、自己免疫および寛容がある。実際的には、これは自己TAAの使用を非重要臓器（例えば生殖器）に制限する。先在する自己抗原に対する免疫寛容はまた問題である。なぜなら、それが所望の抗腫瘍免疫応答を抑制するだけでなく、起こりうる免疫回避のメカニズムとして最近になって現れてきたためである。

30

40

#### 【0088】

全てのまたは大抵のTSAは非自己抗原であり、および外因的に（例えば、ウイルス関連腫瘍のウイルスタンパク質に由来するもの、egヒトパピローマウイルス）または内因的に由来することができる。該後者のサブクラスには、以前に該免疫システムに提示されえなかった非変異タンパク質（いくつかの胚抗原または免疫学的特権抗原）、ならびに腫瘍のミューテーションの結果として生じる変異タンパク質が含まれる。ミューテーション由来TSAは点変異、フレームシフトミューテーション、転座、不適当なスプライシング、および転写後の事象などの事象から生じうる。TSAは癌ワクチンとして自己TAAに勝る優れた利点を有する。なぜなら、それらは自己免疫および全身性（systemic）寛容の該問題を避ける

50

からである。マウスモデルにおいて、TSAは、自己TAAと比較してより容易に高い結合力のT細胞応答を生じることが示した。

【0089】

原理上は、ワクチン接種を予防的にまたは治療的に用いることができる。実際問題として、治療的ワクチン接種手法はいくつかの困難な問題に直面し、概して、それら早期の見込みを実現することができなかつた。確定された腫瘍中で細胞により提示された多くのまたは大抵の抗原は、該免疫システムによって自己として認識される。腫瘍増殖が診断を可能にするのに十分に進行するまでに、腫瘍細胞が該免疫システムが非自己として認識することができる変異型抗原を表示する限りで、免疫応答に必要な該共制御危険シグナル (co-regulatory danger signal) を欠くときは、該変異型抗原に対する免疫寛容が、該免疫システムへのそれらの段階的な曝露のために起こる。最近の研究のより、共刺激 (co-stimulatory) シグナルを欠くときは、寛容は腫瘍によって発現された異種抗原に対してさえ誘導されることが示された。MHC発現はしばしば、確定された腫瘍細胞において下方制御されまたは損なわれていて、非自己抗原の表示は減り、および該減少したMHC発現は、治療的免疫化手法がMHC中に認識できる非自己抗原を表示する細胞を殺すのに効果的であるの限りでは当然ながら選択される。(用語「MHC」は、一般的な意味で本明細書において使用され、MHC、HLA、および機能の少なくとも1つが、細胞の表面上に内因性または外因性の抗原またはそのフラグメントを表示することである他のものを含むことを意図する。特定のMHCクラスへの言及がなされている場合、その言及は、HLAまたは他のそのようなものの対応するクラスを含む)。最終に、照射腫瘍細胞、腫瘍細胞溶解物または腫瘍-由来熱ショックタンパク質 (HSP)での免疫化は、同一の腫瘍による攻撃のみに対して保護し、; それは異なる腫瘍による攻撃に対しては保護せず; 1つの腫瘍に由来するワクチンは、別ものに対して保護しなかつたことが複数のグループによって示された。これらの知見は、癌免疫学の分野でほとんど一般的に支持された仮定を導いたが、本明細書で開示される実験的証拠によって、癌ワクチン個別化される必要があることは反証された。患者から腫瘍を受け、その腫瘍からHSPまたは抽出物を単離し、腫瘍由来HSPまたは抽出物を患者-特定のワクチンとして戻す技術に基づく会社が存在する。このアプローチの実行する早期臨床試験は見込みを示したが、それは高額で、および全ての癌患者がワクチンを作るのに十分な腫瘍を有するとは限らない。この手法を用いたAntigenics, Inc.による最近の第3相試験は、有効性の欠如から終了した。

【0090】

癌の予防的な治療としての予防的ワクチン接種についての基本的な問題は、各生物の各腫瘍は独自の免疫学的特性を示すという仮定、および複数の腫瘍型に対してまたは単一腫瘍型の複数の変異体に対してすら、実施可能な幅の保護を提供することができる予防的ワクチンはないという該当然の前提である。該問題はワクチンはそれを受ける該生物に対して個別化される必要性あるとの仮定により悪化される。一方、基礎的な論点は、これに関して、2個以上の型の癌の間に共通して作られるノボペプチドが存在し、およびこれらを、予防的ワクチンの製剤化のために用いることができることである。該挑戦はそのようなノボペプチドを見つける系統的な方法を開発することであり; このような方法が本明細書で開示される。

【0091】

本明細書で開示される該ペプチドを、ペプチドとしてまたは核酸によってコードされて対象に投与することができる。従って、例えば、癌を治療する方法が本明細書で開示され、これはその必要がある対象に組成物を投与することを含み、ここで該組成物は腫瘍特異的な抗原を含み、および該腫瘍特異的な抗原はノボペプチド、FS-ノボペプチド、非MSノボペプチド、FS-ノボペプチドでもある非MSノボペプチド、および/または前記のいずれかの組み合わせであり、および該腫瘍特異的な抗原が配列番号: 1、3または5に記載の核酸によりコードされたペプチドである。本明細書で開示される該ノボペプチドをコードする該核酸を本明細書で開示されるいずれかの遺伝子送達システム (例えば遺伝子銃、ウイルスベクターまたはプラスミド) によって供与することができる。

## 【0092】

「治療」は疾病または病気の影響を減らす方法を意味する。治療はまた、該疾病または病気自体を現在の症状よりも減少させる方法を意味する。該治療は自然なレベルからの減少であり、これに限られないが、該疾病、病気または該疾病もしくは病気の症状の完全な除去でありうる。例えば、癌の影響を減少するための開示された方法は、同一の対象の自然なレベルまたはコントロール対象と比較して該疾病を有する対象における該疾病（例えば腫瘍サイズ）の1個以上の症状に10%の減少がある場合、治療であると見なされる。従って、該減少は、自然なまたはコントロールレベルと比較した、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%またはその間のいずれかの量の減少であることができる。治療は疾病または癌の進行のいずれかの減少を意味することもまた本明細書において理解されおよび意図される。従って、例えば、コントロール対象または該治療前の同一の対象の腫瘍増殖速度に対して、該腫瘍増殖速度に10%の減少があった場合、癌の影響を減少する方法は治療であると見なされる。該減少は、自然のまたはコントロールレベルと比較した、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%またはその間のいずれかの量の減少であることができると理解される。

10

## 【0093】

「阻害する」、「阻害している」および「阻害」は、活性、応答、病気、疾病または他の生物学的なパラメータを減少することを意味する。これは、これらに限られないが該活性、応答、病気または疾病の完全な除去を含むことができる。これはまた、例えば、該自然のまたはコントロールレベルと比較して該活性、応答、病気または疾病における10%の減少を含みうる。従って、該減少は、自然のまたはコントロールレベルと比較して10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%またはその間のいずれかの量の減少であることができる。

20

## 【0094】

該開示された方法をいずれかの癌の治療または阻害のために用いることができる。従って、癌を治療、予防または阻害する方法が本明細書で開示され、該癌は、リンパ腫(ホジキンスおよび非ホジキンス)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌（たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される。

30

## 【0095】

癌を発生するリスクのある対象を同定する本発明の方法に加えて、癌を発生するリスクのある対象の同定を、当該技術分野において既知のいずれかの方法によって達成することができることが理解される。従って、例えば、既知の発癌物質への曝露、癌に関連する行動の活動(例えば肺癌についての喫煙)または所定の癌に対する遺伝学的素因によって、リスクある対象を同定することができる。特にそのリスクある対象において癌を予防する方法が本明細書で開示され、該対象は遺伝学的スクリーニングによって同定される。本明細書で開示される該フレームシフトペプチドは癌に関連するため、該フレームシフトの存在を、癌を発生するリスクのある対象を同定するために用いることができる。従って、癌を発生するリスクある対象を同定する方法が本明細書で開示され、これは該対象から組織サンプルを入手し、該抗体を該組織サンプルと接触させることを含み、ここで、抗体結合は該対象が癌のリスクがあることを表す。

40

## 【0096】

本明細書で開示される化合物はまた、前癌状態（たとえば子宮頸および肛門異形成、他の異形成、重度の異形成、過形成、異型過形成、および新生物）の該治療のために使用されうる。

50

## 【0097】

該開示された方法を、その必要があるまたは本明細書で開示されるいずれかの疾病になるリスクある対象を治療または保護するために用いることができる。本明細書で開示される「対象」は特異免疫を表示することができるいずれかの動物（例えば鳥、魚、および哺乳類）を意味する。従って、例えば、いずれかの該開示された方法での使用についての対象は、ヒト、チンパンジー（または他の非ヒト霊長類）、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ラット、モルモット、およびマウスであることができる。

## 【0098】

本発明の重要な利点は、本明細書で開示される実施例よって実証されるように、単一ノボペプチドによるワクチン接種は、複数の腫瘍型に対しておよび無関係の個体において免疫保護を与えることができることが示されたことである。特に、これまでの全細胞ワクチン研究は1つの腫瘍細胞系での免疫化は別のものに対して交差防御しないことを言及しており、それに基づいて広く支持されてきたドグマをふまえると、これは極めて新規な結果である。ここで示される結果は、腫瘍は共通の抗原を有するが、MHCにおける交差防御的なペプチドの濃度は、全細胞ワクチン中ではT細胞を活性化するほど十分高くない；言い換えれば、抗原希釈のために全細胞ワクチン手法は失敗するという理由から、細胞溶解物または照射腫瘍による免疫化は交差防御を示さないことを認めることによって、該全細胞ワクチン研究と調和する。1または2、3個のノボペプチドによるプレワクチン接種は、該免疫システムをこれらの抗原に集中させて、保護を与える。この実験的知見は、複数の腫瘍型によって共通して発現されるノボペプチドは、それらの腫瘍型に対する免疫保護を与える予防的ワクチン接種を支えることができるという、大変重要な結果を導く。これは重要な概念的、実験的、および実用的なブレークスルーである。本発明は一般に複数の腫瘍型間に発現されるノボペプチドを発見し評価するための効果的で系統的な方法を提供することが留意される。

## 【0099】

ある場合では、ヒト腫瘍で作られたノボペプチドは、動物腫瘍モデル（例えばマウスまたはイヌ）で作られたそれと同一であるまたは非常に似ている。例えば、下記の1-78および6-21ノボペプチドは、そこに記載されるようにマウス腫瘍で見つめられたが、所定のヒト腫瘍中でもまた同定された。下記のSMC1ノボペプチドは、もともとはヒトデータベースの検索によって発見されたが、マウス腫瘍中でもまた発現される。ノボペプチドがヒトおよびマウス腫瘍の両方で認められる場合、ヒトでの腫瘍ワクチン抗原としての該ノボペプチドの該潜在的な有効性の重要な証拠は、マウスを免疫化して、適当な腫瘍系で攻撃することによって得ることができる。別法として、高発癌マウスを該ノボペプチドによりワクチン接種して、腫瘍化および/または腫瘍進行が減少するかまたは排除されるかを決定することができる。

## 【0100】

腫瘍特異的な抗原に対する治療的抗体が本明細書で開示され、ここで該抗原は、インフォマティクス、ゲノミクス、プロテオミクス、または免疫学的スクリーニングによりノボペプチドを同定し；および該ノボペプチドが腫瘍細胞と正常細胞を区別する免疫応答を誘導することを決定することを含む該工程によって同定されたノボペプチドである。該ノボペプチドは腫瘍特異的な抗原であることができることが理解され本明細書において意図される。従って、例えば、該ノボペプチドは、配列番号：2、3、6に記載の該配列を含むことができる。同様に、該ノボペプチドは、該SMC1遺伝子のフレームシフトを含むことができる。従って、例えば、該ノボペプチドは配列番号：8に記載の該配列を含むことができる。該開示された治療的抗体を単独でまたは別の薬剤と組み合わせて、治療処置として用いることができることがまた理解される。本明細書で開示される該治療処置を癌を治療するために用いることができることもまた本明細書において意図される。言い換えれば、癌を治療する方法が本明細書で開示され、これは対象に本明細書で開示されたまたは本明細書で開示された方法によって同定された治療的抗体を投与することを含む。従って、例えば、治療処置の方法が本明細書で開示され、該癌は、リンパ腫(ホジキンズおよび非ホジ

10

20

30

40

50

キンズ)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、白血病、骨髄性白血病、癌、固形組織の癌、扁平上皮癌、該口、咽喉、喉頭、および肺の扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経膠腫、高悪性度神経膠腫、芽細胞腫、神経芽細胞腫、形質細胞腫、組織球腫、メラノーマ、アデノーマ、低酸素腫瘍、骨髄腫、AIDS関連リンパ腫または肉腫、転移性癌、菌状息肉腫、膀胱癌、脳腫瘍、神経系癌、肺癌(たとえば小細胞肺癌および非小細胞肺癌)、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肝癌、結腸癌、子宮頸癌、子宮頸癌、乳房癌、および上皮癌、腎臓の癌、尿生殖器癌、食道癌、頭頸部癌、大腸癌、造血癌、および精巣癌からなる癌の群から選択される。

#### 【0101】

##### 2. 該組成物を試験ツールとして用いる方法

該組成物を、例えばコンビナトリアルケミストリープロトコルまたは他のスクリーニングプロトコルの標的として、腫瘍増殖の阻害および癌の治療に関連する所望の機能的な特性を有する分子を単離するために用いることができる。従って、癌治療剤または予防剤のためのスクリーニング方法が本明細書で開示され、これは該候補治療剤または予防剤をノボペプチドと接触させることからなり、該ノボペプチドに結合する候補治療剤または予防の候補物質が治療剤または予防剤として更に評価するために選択される。

10

#### 【0102】

該開示された組成物はまた、癌などの疾病に関する診断ツールとして用いることができる。例えば、該開示された方法は、細胞増殖が癌性であるかを決定するために用いることができる。従って、腫瘍または他の増殖を癌性または前癌性と診断する方法が本明細書で開示され、これは腫瘍細胞を入手し、該細胞からRNAを抽出し、およびノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションについてアッセイすることを含む、ノボペプチドについてのスクリーニングを含み、ここで、ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションの存在は、該腫瘍が癌性または潜在的に癌性であることを表す。また、癌である個体を診断する方法が開示され、これは、組織サンプルを入手し、ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションの存在についてスクリーニングすることを含む。該組織は該対象に存在するいずれかの組織であることができると理解される。例えば、該組織は、血液、唾液、皮膚、または組織生検からの細胞であることができる。該開示された組織は、当該技術分野において既知の方法(例えば、肺洗浄、静脈出血、組織生検または粘膜組織の拭き取り)によって入手することができることとまた理解される。従って、例えば、該サンプルが血液である診断する方法が本明細書で開示される。該方法は、癌に関連すると同定されたノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションの存在を決定することを含むことができる。別法として、該方法は、ノボペプチドに対する免疫応答の存在についてのスクリーニングを含むことができる。該免疫応答は抗体または細胞媒介性免疫応答であり得ると理解される。従って、例えば、該免疫応答は、T細胞免疫応答、例えばCD8 T細胞免疫応答(例えば、細胞溶解的殺傷またはサイトカイン分泌)またはCD4 T細胞免疫応答(サイトカイン分泌)であり得る。該免疫応答の存在を決定するために、既知の免疫学的手段を用いることができることが本明細書において特に意図される。例えば、抗体免疫応答は、ELISA、ELISPOTまたは凝集アッセイによって測定することができる。T細胞免疫応答は、例えば、ELISA、ELISPOT、四量体染色、細胞内サイトカイン染色またはクロム遊離アッセイによ

20

30

40

#### 【0103】

本明細書で開示される方法によって同定された該ノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションは、発癌性となる他の非発癌性遺伝子をもたらすと理解される。例えば、該SMC1遺伝子は発癌性でない;しかしながら、本明細書で開示するように該SMC1遺伝子のフレームシフトは発癌性である。本明細書で開示される腫瘍細胞中のノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションを検出する該方法は該SMC1遺伝子中のフレームシフトを示し、フレームシフトミュータントは発癌性である。従って、癌遺伝子を同定する方法が本明細書で開示されることが理解され、これはこれまでは癌に関連しなかった遺伝子においてノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションを検出することを含む

50

。

## 【 0 1 0 4 】

## E . 組成物の製造方法

本明細書で開示される組成物および開示された方法を実行するのに必要な組成物は、特に断りがなければ、その特定の試薬または化合物について当業者に公知のいずれの方法を用いても製造されうる。

## 【 0 1 0 5 】

## 1 . 核酸の合成

例えば、プライマーとして用いられるべきオリゴヌクレオチドのような核酸は、標準的な化学合成法を用いて製造されうるか、または酵素法もしくはいずれの他の公知の方法を用いても製造されうる。このような方法は、標準的な酵素消化に続くヌクレオチド断片の単離（例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) Chapters 5, 6を参照せよ）から、例えば、ミリゲン(Milligen)またはベックマンシステム1プラスDNA合成装置(Beckman System 1Plus DNA synthesizer)（例えば、ミリゲン - バイオサーチ、パーリントン、MAのモデル8700自動合成装置またはABIモデル380B）を用いたシアノエチルホスホラミダイト法による純粋な合成法までの範囲にわたってもよい。オリゴヌクレオチドの製造に有用な合成法はまた、Ikuta et al., *Ann. Rev. Biochem.* 53:323-356 (1984)（ホスホトリエステルおよび亜リン酸 - トリエステル法）、およびNarang et al., *Methods Enzymol.* 65:610-620 (1980)（ホスホトリエステル法）にも記載されている。タンパク質核酸分子は、例えば、Nielsen et al., *Bioconjug. Chem.* 5:3-7 (1994)に記載されている公知の方法を用いて製造されうる。

10

20

## 【 0 1 0 6 】

## 2 . ペプチド合成

開示されたタンパク質、例えばSEQ ID NO : 23を製造する一つの方法は、タンパク質化学の技術によって2つ以上のペプチドまたはポリペプチドを連結することである。例えば、ペプチドまたはポリペプチドは、Fmoc（9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル）またはBoc（tert - ブチルオキシカルボニル）（アプライドバイオシステムズ社、フォスターシティ、CA）化学を用いた現在利用可能な実験装置を用いて化学的に合成されうる。当業者は、開示されたタンパク質に対応するペプチドまたはポリペプチドが、例えば、標準的な化学反応によって合成されうることを容易に認識しうる。例えば、ペプチドまたはポリペプチドは合成され、その合成樹脂から開裂され得ないが、ペプチドまたはタンパク質の他の断片は合成され、続いて樹脂から開裂され、それによって、他の断片において機能的にブロックされた末端基を露出しうる。ペプチド縮合反応によって、これらの2つの断片は、それぞれそのカルボキシルおよびアミノ末端でペプチド結合によって共有結合して、抗体またはその断片を形成しうる（Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M and Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY）（これは、少なくともペプチド合成に関する物質について本明細書で引用される）。あるいは、ペプチドまたはポリペプチドは、本明細書に記載されるように、独立してインビボで合成される。一旦単離されると、これらの独立したペプチドまたはポリペプチドは、類似のペプチド縮合反応によって結合されて、ペプチドまたはその断片を形成しうる。

30

40

## 【 0 1 0 7 】

例えば、クローン化または合成ペプチドセグメントの酵素的連結は、比較的短いペプチド断片を結合させて、より大きなペプチド断片、ポリペプチドまたは全タンパク質ドメインを生成する（Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991)）。あるいは、合成ペプチドの天然の化学的連結を利用して、より短いペプチド断片から大きなペプチドまたはポリペプチドを合成的に構築しうる。この方法は、2つの段階の化学反応からなる（Dawson et al. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266:776-779 (1994)）。第一段階は、非保護合成ペプチド - チオエステルを、アミノ末端Cys残

50

基を含む別の非保護ペプチドセグメントと化学選択的に反応させて、最初の共有結合生成物としてチオエステル連結中間体を得る。反応条件における変化なしに、この中間体は、自発的で急速な分子内反応を受けて、連結部位で天然のペプチド結合を形成する (Baggio lini M et al. (1992) FEBS Lett. 307:97-101; Clark-Lewis I et al., J.Biol.Chem., 269:16075 (1994); Clark-Lewis I et al., Biochemistry, 30:3128 (1991); Rajarathna m K et al., Biochemistry 33:6623-30 (1994))。

#### 【 0 1 0 8 】

あるいは、化学的連結の結果としてペプチドセグメント間で形成された結合が非天然 (非ペプチド) 結合である場合、非保護ペプチドセグメントは化学的に連結される (Schnol zer, M et al. Science, 256:221 (1992))。この技術は、タンパク質ドメインの類縁体、並びに十分な生物学的活性を有する大量の比較的純粋なタンパク質を合成するのに用いられてきた (deLisle Milton RC et al., Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, New York, pp. 257-267 (1992))。

10

#### 【 0 1 0 9 】

##### F . 抗体

##### 1 . 抗体の概略

用語「抗体」は広義で本明細書に用いられ、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む。インタクト免疫グロブリン分子 (intact immunoglobulin molecule) に加えて、用語「抗体」には、腫瘍増殖が阻害されるように F S 1 - 7 8 m u t、F S 6 - 2 1 m u t、および F S S M C 1 と相互作用する能力が選択される限り、これらの免疫グロブリン分子の断片またはポリマー、並びにヒト免疫グロブリン分子もしくはヒト化免疫グロブリン分子またはその断片もまた含まれる。抗体は、本明細書に記載されるインビトロアッセイを用いて、または類似の方法によってその目的の活性について試験され、その後、そのインビボ治療活性および / または予防活性は、公知の臨床試験法に従って試験されうる。

20

#### 【 0 1 1 0 】

本明細書に用いられるように、用語「抗体」には、これらに限らないが、いずれのクラスの全免疫グロブリン (すなわち、インタクト抗体) も含まれる。天然の抗体は、通常、2つの同一の軽 (L) 鎖および2つの同一の重 (H) 鎖を含むヘテロ四量体の糖タンパク質である。典型的には、各軽鎖は、一つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結しているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変化する。各々の重鎖および軽鎖はまた、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は一方の端に可変領域 (V (H)) を有し、続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の端に可変領域 (V (L))、他方の端に定常ドメインを有し; 軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと並んでおり、軽鎖可変領域は重鎖の可変領域と並んでいる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖可変領域間で界面を形成すると考えられる。いずれの脊椎動物種からの抗体の軽鎖も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明らかに別個の型 (カッパ (k) およびラムダ (l) と呼ばれる) のうちの一つに割り当てられうる。その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列により、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てられうる。5つの主要なクラスのヒト免疫グロブリン: I g A、I g D、I g E、I g G および I g M が存在し、これらの中にはサブクラス (アイソタイプ)、例えば、I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3、および I g G - 4; I g A - 1 および I g A - 2 にさらに分割されるものもありうる。当業者は、マウスについての比較可能なクラスを認識している。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。

30

40

#### 【 0 1 1 1 】

用語「可変」は、抗体間で配列が異なる可変領域の特定部分を記載するのに本明細書で用いられ、その特定の抗原についての各々の特定の抗体の結合および特異性に用いられる。しかしながら、可変性は通常、抗体の可変領域を通して均等に分布していない。それは、典型的には、軽鎖および重鎖可変領域における相補性決定領域 (C D R) または超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変領域のより高度に保存された部分

50

は、フレームワーク (FR) と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変領域の各々には、3つのCDRにつながったb-シート配置を主として取り入れる4つのFR領域が含まれ、それはb-シート構造につながったループを形成し、ある場合にはb-シート構造の一部を形成する。各鎖におけるCDRはFR領域にごく接近してまとめられ、他の鎖からのCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat E. A. et al., 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、国立衛生研究所、ベテスダ、Md. (1987)を参照せよ)。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接関与していないが、様々なエフェクター機能、例えば抗体依存性の細胞傷害性における抗体の関与を示す。

#### 【0112】

本明細書で用いられるように、用語「抗体またはその断片」には、二重抗原(dual antigen)もしくは多重抗原(multiple antigen)またはエピトープ特異性を有するキメラ抗体およびハイブリッド抗体、並びに断片、例えばF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、sFv、scFvなど、例えばハイブリッド断片が含まれる。したがって、その特異的な抗原に結合する能力を保持する抗体の断片が提供される。例えば、FS1-78mut、FS6-21mut、FS SMC1結合活性を維持する抗体の断片が、用語「抗体またはその断片」の意味の中に含まれる。このような抗体および断片は当該技術分野で公知の技術によって製造されてもよく、実施例で説明された方法、並びに一般的な抗体の製造方法、および特異性と活性についての一般的な抗体のスクリーニング方法に従って、特異性および活性についてスクリーニングされてもよい (Harlow and Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)を参照せよ)。

#### 【0113】

また「抗体またはその断片」の意味の中には、例えば、米国特許番号4,704,692 (本明細書によってその内容が引用される)に記載されているように、抗体断片および抗原結合タンパク質 (単鎖の抗体) の複合体(conjugate)も含まれる。

#### 【0114】

抗体または抗体断片の活性が、改変されていない抗体または抗体断片と比べて著しく変更されまたは損なわれていないのであれば、他の配列に結合しようといまいと、断片にはまた、挿入、欠失、置換、または特定の領域もしくは特定のアミノ酸残基の他の選択された改変も含まれうる。これらの改変によって、いくつかの追加の特性、例えばジスルフィド結合することができるアミノ酸の除去/付加、その生物寿命(bio-longevity)の増大、その分泌特性の変更などが提供されうる。いずれの場合においても、抗体または抗体断片は、生理活性特性、例えばその同族の抗原への特異的結合を有していなければならない。抗体または抗体断片の機能領域または活性領域は、タンパク質の特定領域の変異生成に続いて、発現および発現ポリペプチドの試験によって同定されうる。このような方法は当業者に容易に理解され、抗体または抗体断片をコードする核酸の部位特異的変異が含まれうる (Zoller, MJ. Curr. Opin. Biotechnol. 3:348-354, 1992)。

#### 【0115】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体をいい、すなわち、抗体分子の小さなサブセットにおいて存在しうる天然に生じうる突然変異を除いては、該集団の中の個々の抗体は同一である。本明細書のモノクローナル抗体には、特に「キメラ」抗体が含まれ、目的のアンタゴニスト活性を示すのであれば、重鎖および/または軽鎖の部分は、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応の配列と同一または相同であるが、該鎖の残りの部分は、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、並びにこのような抗体の断片における対応の配列と同一または相同である (米国特許番号4,816,567およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)を参照せよ)。

#### 【0116】

開示されたモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を製造するいずれの方法を用いても製造されうる。例えば、開示されたモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, N

10

20

30

40

50

ature, 256:495 (1975)に記載されているように、ハイブリドーマ法を用いて製造されうる。ハイブリドーマ法において、マウスまたは他の適当な宿主動物は、典型的には、免疫剤(immunizing agent)に特異的に結合する抗体を生成するかまたは生成することができるリンパ球を誘発する免疫剤で免疫化される。あるいは、リンパ球は、例えば、本明細書に記載される HIV Env - CD4 - 共受容体複合体を用いて、インビトロで免疫化されうる。

#### 【0117】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA法、例えば米国特許番号4,816,567 (Cabilly et al.)に記載されているものによっても製造されうる。開示されたモノクローナル抗体をコードするDNAは、通常の方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)容易に単離および配列決定されうる。抗体または活性な抗体断片のライブラリはまた、例えば、パートンらへの米国特許番号5,804,440およびバルバス(Barbas)らへの米国特許番号6,096,441に記載されているように、ファージディスプレイ法を用いても生成およびスクリーニングされうる。

10

#### 【0118】

インビトロ法はまた、一価抗体の製造にも適している。抗体を消化して、その断片、特に、Fab断片を製造することは、当該技術分野で公知の通常の方法を用いて達成される。例えば、消化はパインを用いて行われうる。パイン消化の例は、1994年12月22日に公開されたWO 94/29348および米国特許番号4,342,566に記載されている。抗体のパイン消化は、典型的には、単一の抗原結合部位、および残りのFc断片をそれぞれ有する、Fab断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生じる。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有する断片を生じ、さらに抗原を架橋結合することができる。

20

#### 【0119】

本明細書で用いられるように、用語「抗体」とは、ヒト抗体および/またはヒト化抗体をもいう。多くの非ヒト抗体(例えば、マウス、ラット、またはウサギ由来のもの)は、本来、ヒトにおいて抗原性を示し、そのため、ヒトに投与された場合に望ましくない免疫応答を起こしうる。したがって、本方法におけるヒト抗体またはヒト化抗体の使用は、ヒトに投与された抗体が望ましくない免疫応答を引き起こす可能性を減らすのに役立つ。

30

#### 【0120】

##### 2. ヒト抗体

開示されたヒト抗体は、いずれの技術を用いても製造されうる。ヒトモノクローナル抗体の製造についての技術の例には、コールら(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985)およびベルナー(Boerner)ら(J. Immunol., 147(1):86-95, 1991)によって記載されたものが含まれる。ヒト抗体(およびその断片)はまた、ファージディスプレイライブラリを用いても製造されうる(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol, 227:381, 1991; Marks et al., J Mol. Biol, 222:581, 1991)。

#### 【0121】

開示されたヒト抗体はまた、遺伝子組換え動物からも得られうる。例えば、免疫化に回答して、十分な量のヒト抗体を生じることができる遺伝子導入変異マウスが記載されている(例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl Acad. Sci USA, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)を参照せよ)。具体的には、これらのキメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖連結領域(J(H))遺伝子のホモ接合型欠失によって、内在的な抗体産生の完全な阻害がもたらされ、ヒト生殖系抗体遺伝子アレイのこのような生殖細胞系変異マウスへの導入の成功によって、抗原チャレンジ(antigen challenge)におけるヒト抗体の産生がもたらされる。目的の活性を有する抗体は、本明細書に記載される Env - CD4 - 共受容体複合体を用いて選択される。

40

#### 【0122】

50

### 3. ヒト化抗体

抗体ヒト化技術は、一般に、抗体分子の一つ以上のポリペプチド鎖をコードするDNA配列を操作する組換えDNA技術の使用に関わる。したがって、ヒト化型の非ヒト抗体（またはその断片）は、ヒト（レシピエント）抗体のフレームワークの中に組み込まれた非ヒト（ドナー）抗体からの抗原結合部位の一部を含む、キメラ抗体もしくは抗体鎖（またはその断片、例えばFv、Fab、Fab'、もしくは抗体の他の抗原結合部分）である。

#### 【0123】

ヒト化抗体を製造するため、レシピエント（ヒト）抗体分子の一つ以上の相補性決定領域（CDR）からの残基は、目的の抗原結合特性（例えば、標的抗原についての特定のレベルの特異性および親和性）を有することが知られているドナー（非ヒト）抗体分子の一つ以上のCDRからの残基によって置換される。いくつかの例において、ヒト抗体のFvフレームワーク（FR）残基は、対応の非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、移入されたCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基も含みうる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその中に導入された一つ以上のアミノ酸残基を有する。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基あるいはいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体における類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。ヒト化抗体は、一般に、抗体定常部（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト抗体のものを含む（Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988), and Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)）。

#### 【0124】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、ヒト化抗体は、ヒト抗体の対応の配列をげっ歯類CDRもしくはCDR配列に置換することによって、ウィンターおよび共同研究者の方法に従って製造されうる（Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)）。ヒト化抗体を製造するために用いられうる方法は、米国特許番号4,816,567（キャビリー(Cabilly)ら）、米国特許番号5,565,332（ホーゲンボーム(Hoogenboom)ら）、米国特許番号5,721,367（ケイら）、米国特許番号5,837,243（デオら）、米国特許番号5,939,598（クチャラパティ(Kucherlapati)ら）、米国特許番号6,130,364（ヤコボビッツ(Jakobovits)ら）、および米国特許番号6,180,377（モーガンら）にもまた記載されている。

#### 【0125】

### 4. 抗体の投与

抗体の投与は、本明細書に開示されるようになされうる。抗体送達(antibody delivery)のための核酸アプローチもまた存在する。患者または対象自身の細胞が核酸を取り入れ、コードされた抗体または抗体断片を生じ、分泌するように、広くは中和抗体(neutralizing antibody)および抗体断片もまた、抗体または抗体断片をコードする核酸製剤（例えば、DNAまたはRNA）として、患者または対象に投与されうる。核酸の送達は、例えば、本明細書に開示されるいずれの手段によってもなされうる。

#### 【0126】

G. 開示された組成物を用いたスクリーニング/コンビナトリアルケミストリーによって同定された組成物

開示された組成物は、いずれのコンビナトリアル技術についての標的としても用いられ、目的の方法で開示された組成物と相互作用する分子または巨大分子を同定しうる。SEQ ID NO: 2、4、6、および8あるいはその部分に開示された組成物がコンビナトリアルまたはスクリーニングプロトコールにおける標的として用いられる、コンビナトリアル技術またはスクリーニング技術を通して同定される組成物もまた開示される。

#### 【0127】

10

20

30

40

50

コンビナトリアル技術またはスクリーニング法において開示された組成物を用いた場合に、標的分子の機能の阻害または刺激のような特定の望ましい特性を有する分子（例えば巨大分子）が同定されることが理解される。開示された組成物を用いた場合に同定および単離された分子もまた開示される。

**【0128】**

コンビナトリアルケミストリーには、これらに限らないが、典型的には反復工程において、小分子または別の巨大分子と結合することができる小分子または巨大分子を単離するすべての方法が含まれる。タンパク質、オリゴヌクレオチド、および糖は、巨大分子の例である。例えば、所定の機能、触媒作用またはリガンド結合を有するオリゴヌクレオチド分子は、いわゆる「インビトロジェネティクス」において、ランダムなオリゴヌクレオチドの複合体混合物から単離されうる（Szostak, TIBS 19:89, 1992）。ランダムおよび限定された配列を有する分子の大きなプールを合成し、その複合体混合物、例えば、100ヌクレオチドRNA（100  $\mu$ g）における約 $10^{15}$ 個の個々の配列を、いくつかの選択および濃縮工程に付す。カラムにおけるリガンドに結合した分子のアフィニティークロマトグラフィーおよびPCR増幅の反復サイクルを通して、エリントンおよびスゾスタック（Szostak）（1990）は、 $10^{10}$ 個中、1個のRNA分子が小分子色素に結合するようにフォールドすると推定した。このようなりガンド結合の性質を有するDNA分子が、同様に単離されている（Ellington and Szostak, 1992; Bock et al, 1992）。類似の目的に向けた技術が、当業者に公知の小さな有機分子、タンパク質、抗体および他の巨大分子のために存在する。小さな有機ライブラリ、オリゴヌクレオチド、または抗体に基づくかどうかにかかわらず、目的の活性のための分子セットのスクリーニングは、広くコンビナトリアルケミストリーと呼ばれる。コンビナトリアル技術は、分子間の結合相互作用を限定し、特定の結合活性を有する分子（巨大分子が核酸である場合はしばしばアプタマーと呼ばれる）を単離するのに特に適している。

**【0129】**

新規活性(de novo activity)または改変された活性を有するタンパク質を単離するための多数の方法が存在する。例えば、ファージディスプレイライブラリは、特定の標的に相互作用する多数のペプチドを単離するのに用いられている。（例えば、少なくともファージディスプレイに関する物質およびコンビナトリアルケミストリーに関する方法について本明細書で引用される米国特許番号6,031,071; 5,824,520; 5,596,079; および5,565,332を参照せよ）

**【0130】**

所定の機能を有するタンパク質の単離方法が、ロバーツおよびスゾスタックによって記載されている（Roberts R. W. and Szostak J.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23)12997-302 (1997)）。このコンビナトリアルケミストリー法は、タンパク質の機能的な力および核酸の遺伝的な力とつながっている。ピューロマイシン分子がRNA分子の3'末端に共有結合するRNA分子が生成される。この改変されたRNA分子のインビトロ翻訳によって、翻訳されるべきRNAによってコードされる正しいタンパク質がもたらされる。また、ピューロマイシン（伸長されることができないペプチジルアクセプター）の結合のため、伸長しているペプチド鎖は、RNAに結合したピューロマイシンに結合している。したがって、該タンパク質分子は、それをコードする遺伝物質に結合している。現在、機能性ペプチドを単離するために、標準のインビトロ選択手順がなされうる。一旦ペプチド機能についての選択手順が完了すると、選択された機能性ペプチドをコードする核酸を増幅するために、従来の核酸の操作方法が遂行される。遺伝物質の増幅後、新たなRNAが3'末端でのピューロマイシンとともに転写され、新たなペプチドが翻訳され、別の機能の選択ラウンドが行われる。したがって、核酸の選択技術と同様に、タンパク質の選択が反復して行われうる。翻訳されるペプチドは、ピューロマイシンに結合したRNAの配列によって制御される。この配列は、最適な翻訳（すなわち、終始コドンがないなど）のために改変されたランダム配列からのいずれであってもよく、または、それは公知のペプチドの改善もしくは変更された機能を探すための公知のRNA分子の変性配列(degenerat

10

20

30

40

50

e sequence)であってもよい。核酸の増幅およびインビトロ翻訳についての条件は当業者に周知であり、好ましくは、ロバーツおよびスゾスタック (Roberts R.W. and Szostak J.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23)12997-302 (1997)) のように行われる。

【0131】

ペプチドを単離するためにデザインされたコンビナトリアル法についての別の方法は、コーエンら (Cohen B.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(24): 14272-7 (1998)) に記載されている。この方法は、ツーハイブリッド法を利用および修正している。酵母ツーハイブリッドシステムは、タンパク質間相互作用の検出および分析に有用である。最初に出芽酵母において記載されたツーハイブリッドシステムは、興味深いタンパク質に特異的な新たな調節分子を同定するための強力な分子遺伝学の技術である (Fields and Song, Nature 340:245-6 (1989))。コーエンらは、選択の分子を結合する合成または改変されたペプチド配列間の新規相互作用が同定されうるように、この技術を修正した。この型の技術の利点は、細胞内環境において選択がなされることである。該方法は、酸性活性化ドメインに結合したペプチド分子のライブラリを利用する。選択のペプチドは、例えば、Gal4のような転写活性化タンパク質のDNA結合ドメインに結合したFS1-78mutである。この型のシステムにおいてツーハイブリッド法を行うことによって、FS1-78mutを結合する分子が同定されうる。

【0132】

様々なコンビナトリアルライブラリと併用して、当業者に周知の方法を用いて、目的の標的と結合または相互作用する小分子または巨大分子を単離および評価しうる。これらの化合物の相対的な結合親和性が比較され、当業者に周知である競合的結合の調査を用いて最適な化合物が同定されうる。

【0133】

コンビナトリアルライブラリを作成し、コンビナトリアルライブラリをスクリーニングして、目的の標的を結合する分子を単離する技術は、当業者に周知である。代表的な技術および方法は、これらに限らないが、米国特許 5,084,824、5,288,514、5,449,754、5,506,337、5,539,083、5,545,568、5,556,762、5,565,324、5,565,332、5,573,905、5,618,825、5,619,680、5,627,210、5,646,285、5,663,046、5,670,326、5,677,195、5,683,899、5,688,696、5,688,997、5,698,685、5,712,146、5,721,099、5,723,598、5,741,713、5,792,431、5,807,683、5,807,754、5,821,130、5,831,014、5,834,195、5,834,318、5,834,588、5,840,500、5,847,150、5,856,107、5,856,496、5,859,190、5,864,010、5,874,443、5,877,214、5,880,972、5,886,126、5,886,127、5,891,737、5,916,899、5,919,955、5,925,527、5,939,268、5,942,387、5,945,070、5,948,696、5,958,702、5,958,792、5,962,337、5,965,719、5,972,719、5,976,894、5,980,704、5,985,356、5,999,086、6,001,579、6,004,617、6,008,321、6,017,768、6,025,371、6,030,917、6,040,193、6,045,671、6,045,755、6,060,596、および6,061,636において見つけることができる。

【0134】

コンビナトリアルライブラリは、多数の異なる合成技術を用いて、様々な分子から作成されうる。例えば、ライブラリには、縮合2,4-ピリミジンジオン類 (米国特許 6,025,371)、ジヒドロベンゾピラン類 (米国特許 6,017,768および5,821,130)、アミドアルコール類 (米国特許 5,976,894)、ヒドロキシ-アミノ酸アミド類 (米国特許 5,972,719)、糖類 (米国特許 5,965,719)、

1, 4 - ベンゾジアゼピン - 2, 5 - ジオン類 (米国特許 5, 962, 337)、環状化合物類 (米国特許 5, 958, 792)、ピアリアルアミノ酸アミド類 (米国特許 5, 948, 696)、チオフェン類 (米国特許 5, 942, 387)、三環系テトラヒドロキノリン類 (米国特許 5, 925, 527)、ベンゾフラン類 (米国特許 5, 919, 955)、イソキノリン類 (米国特許 5, 916, 899)、ヒダントインおよびチオヒダントイン (米国特許 5, 859, 190)、インドール類 (米国特許 5, 856, 496)、イミダゾール - ピリド - インドールおよびイミダゾール - ピリド - ベンゾチオフェン類 (米国特許 5, 856, 107)、置換 2 - メチレン - 2, 3 - ジヒドロチアゾール類 (米国特許 5, 847, 150)、キノリン類 (米国特許 5, 840, 500)、PNA (米国特許 5, 831, 014)、タグ含有 (containing tag) (米国特許 5, 721, 099)、ポリケチド類 (米国特許 5, 712, 146)、モルホリノ - サブユニット類 (米国特許 5, 698, 685 および 5, 506, 337)、スルファミド類 (米国特許 5, 618, 825)、並びにベンゾジアゼピン類 (米国特許 5, 288, 514) が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0135】

##### H. 細胞への組成物の送達

本発明の成果は、腫瘍細胞に対する免疫応答を上昇させるために投与されるべき予防および/または治療ワクチンの製剤化に有用な方法および組成物を供給することである。本発明は、ノボペプチドベースのワクチンの組成物およびその投与方法に及ぶ。ノボペプチドベースのワクチンは、当業者によく知られているいずれの方法、例えば適当な担体中で溶解または懸濁されたノボペプチド (novopeptide) を含むワクチンを製造し、それを一度または所定の間隔で、ワクチン接種されるべき動物またはヒトの患者に投与する非常に簡単なアプローチで製造および投与されうる。しかしながら、他の方法によっても成功することができ、特定のアプローチは遺伝子銃の技術を用いた遺伝子免疫 (genetic immunization) を必要とし、この場合、以下の実験 2 および 3 において説明されるように、目的のノボペプチドをコードする直鎖発現エレメントの形態でワクチンが投与される。ワクチンの組成物には、ノボペプチドおよび他の成分が含まれうる。可能であれば、以下の実験 4 によって説明されるように与えられる免疫保護のレベルを改善する際、および別の腫瘍型に対する免疫保護を与えることによって、多数の別個のノボペプチドの含有が有用であることが分かり；実験 3 で説明されるように、単一のノボペプチドが一つより多くの腫瘍型に対して免疫保護を与えることが分かりうるが、追加のノボペプチドの含有によって、標的腫瘍型のレパートリーが拡張されうる。多数のノボペプチドの含有は、ヒトにおける投与が意図されるワクチンにおいて特に有用である。なぜなら、ワクチンにおける少なくとも一つのノボペプチドが、所定の割合の標的集団で各々に存在している少なくとも一つの HLA 型によって揭示されることができるようにするのに十分なノボペプチドの数および選択を含める必要があるからである。2 つ以上のノボペプチドは単一の存在物の中に融合されてもよく；これはワクチンデザインの領域における標準的な慣行である。ノボペプチドベースのワクチンには、与えられる免疫保護を改善するか、またはワクチン製剤の有効性および/または安全性を改善するために、当業者によく知られている他の成分、例えば、これらに限らないが、ほんの一例として、添加剤およびハプテン担体が含まれうる。

#### 【0136】

インビトロまたはインビボで、核酸を細胞に送達するのに用いられうる多数の組成物および方法が存在する。これらの方法および組成物は、主として 2 つの種類：ウイルスベースの送達系および非ウイルスベースの送達系に分類されうる。例えば、核酸は、多数の直接的な送達系、例えば、電気穿孔、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドを通して、または細胞もしくは担体 (例えばカチオン性リポソーム) 中の遺伝物質の伝達によって送達されうる。形質移入に適した方法、例えばウイルスベクター、化学的な形質移入体、または物理的力学的な方法、例えば電気穿孔および DNA の直接拡散は、例えば、Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990); and Wolff, J. A. Nature, 352, 815-818

、(1991)に記載されている。このような方法は当該技術分野で周知であり、本明細書に記載された組成物および方法とともに使用するのに容易に適応可能である。特定の場合において、該方法は、大きなDNA分子を用いて特異的に機能するために修正される。さらに、これらの方法は、担体のターゲティング特性を用いることによって、特定の疾患および細胞集団を標的とするのに用いられる。

#### 【0137】

##### 1. 核酸ベースの送達系

移入ベクターは、遺伝子を細胞内に運搬するのに用いられるいずれのヌクレオチド構造(例えば、プラスミド)であってもよく、または遺伝子を運搬する一般的な戦略の一部として、例えば、組換えレトロウイルスもしくはアデノウイルスの一部としてもよい(Ram et al. *Cancer Res.* 53:83-88, (1993))。 10

#### 【0138】

本明細書で用いられるように、プラスミドまたはウイルスベクターは、開示された核酸、例えばFS1-78mutを分解せずに細胞内に輸送し、それが送達される細胞において遺伝子の発現を生じるプロモーターを含む薬剤である。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、エイズウイルス、神経栄養性ウイルス(neuronal trophic virus)、シンドビスおよび他のRNAウイルス、例えばHIV骨格を有するこれらのウイルスである。ベクターとしての使用に適合させるこれらのウイルスの特性を共有するいずれのウイルスファミリーもまた好ましい。レトロウイルスには、マウスのマロニー白血病ウイルス(Maloney Leukemia virus), MMLV、およびベクターとしてMMLVの目的の特性を発現するレトロウイルスが含まれる。レトロウイルスベクターは、より大きな遺伝的負荷量(genetic payload)、すなわち導入遺伝子またはマーカー遺伝子を、他のウイルスベクターよりも運ぶことができ、このため、これは通常用いられるベクターである。しかしながら、これらは非増殖性細胞においては有用でない。アデノウイルスベクターは比較的安定でかつ作用しやすく、高力価を有し、エアゾール製剤において送達され、非分裂細胞に移入しうる。ポックスウイルスベクターは大きく、遺伝子を挿入するためのいくつかの部位を有し、これらは熱安定性で、室温で保存されうる。好ましい態様は、宿主生物の免疫応答を抑制するように組換えられており、ウイルス抗原によって誘発されるウイルスベクターである。この型の好ましいベクターは、インターロイキン8または10についてのコード領域を運ぶ。 20 30

#### 【0139】

ウイルスベクターは、遺伝子を細胞内に導入する化学的または物理的手法よりも、高い処理能力(遺伝子を導入する能力)を有することができる。典型的には、ウイルスベクターには、非構造的初期遺伝子、構造的後期遺伝子、RNAポリメラーゼIII転写産物、複製およびキャプシド形成に必要な末端逆位配列、並びにウイルスゲノムの転写および複製を制御するプロモーターが含まれる。ベクターとして組換えられる場合、ウイルスは、典型的には、除去される一つ以上の初期遺伝子を有しており、その除去されるウイルスDNAの代わりに、遺伝子または遺伝子/プロモーターカセットがウイルスゲノムの中に挿入される。この型のコンストラクト(construct)は、約8kbの外來遺伝物質まで運ぶことができる。除去される初期遺伝子の必要な機能は、典型的には、トランスで(in trans)初期遺伝子の遺伝子産物を発現するために改変されている細胞株によって供給される。 40

#### 【0140】

##### a) レトロウイルスベクター

レトロウイルスは、いずれの型、亜科、属、または親和性も含む、レトロウイルス科のウイルスファミリーに属する動物ウイルスである。レトロウイルスベクターは、一般に、本明細書に引用されるVerma, I.M., *Retroviral vectors for gene transfer. In Microbiology-1985, American Society for Microbiology, pp. 229-232, Washington, (1985)*に記載されている。遺伝子治療用レトロウイルスベクターを用いるための方法の例は、米国特許番号4,868,116および4,980,286; PCT出願WO 90/02 50

806 および WO 89/07136 ; 並びにマリガン (Science 260:926-932 (1993)) に記載されており ; それらの記載は本明細書に引用される。

【0141】

レトロウイルスは、本質的には、その中に核酸の積荷を詰めているパッケージである。核酸の積荷はそれと一緒にパッケージングシグナルを運び、それによって、複製された娘分子がパッケージコート(package coat)の中に効率良く詰められるようになる。パッケージングシグナルに加えて、複製、および複製されたウイルスのパッケージングのために、シスで(in cis)必要な多数の分子が存在する。典型的には、レトロウイルスのゲノムには、タンパク質コートの生成に關与する gag、pol、および env 遺伝子が含まれる。標的細胞に移されるべきなのは、典型的には外来 DNA に置き換えられる、gag、pol、および env 遺伝子である。レトロウイルスベクターには、典型的には、パッケージコートの中に組み込まれるためのパッケージングシグナル、gag 転写単位の開始のシグナルを伝達する配列、逆転写に必要な要素(例えば逆転写の tRNA プライマーを結合するプライマー結合部位)、DNA 合成の間に RNA 鎖のスイッチ(switch)を導く末端反復配列、DNA 合成の第二鎖の合成のためのプライミング部位として役立つプリンに富む配列 5' から 3' LTR、および挿入するための DNA 状態のレトロウイルスを宿主ゲノムに挿入することができる LTR の末端近くの特定配列が含まれる。gag、pol、および env 遺伝子の除去によって、約 8 kb の外来配列をウイルスゲノムに挿入することが可能となり、逆転写されるようになり、複製されると、新たなレトロウイルス粒子の中に詰められる。この量の核酸は、各転写物の大きさにもよるが、1個から多数個の遺伝子を送達するのに十分である。挿入時に、他の遺伝子とともに陽性(positive)または陰性(negative)が選択できるマーカーが含まれるのが好ましい。

10

20

【0142】

大部分のレトロウイルスベクターにおいて、複製機構およびパッケージングタンパク質は除去されているので(gag、pol、および env)、ベクターは、典型的には、それらをパッケージング細胞株の中に入れることによって生成される。パッケージング細胞株は、複製およびパッケージング機構を含むが、いずれのパッケージングシグナルも欠けているレトロウイルスで形質移入または形質転換されている細胞株である。選択の DNA を運ぶベクターがこれらの細胞株の中に形質移入される場合、ヘルパー細胞によってシスで与えられる機構によって、興味深い遺伝子を含むベクターは複製され、新たなレトロウイルス粒子の中に詰められる。必要なシグナルが欠けているので、該機構のためのゲノムは詰められていない。

30

【0143】

b) アデノウイルスベクター

複製欠損アデノウイルスの構造が記載されている (Berkner et al., J. Virology 61:1213-1220 (1987); Massie et al., Mol. Cell. Biol. 6:2872-2883 (1986); Haj-Ahmad et al., J. Virology 51:261-271 A (1986); Davidson et al., J. Virology 61:1226-1239 (1987); Zhang 「Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis」 BioTechniques 15:868-872 (1993))。ベクターとしてのこれらのウイルスの使用の利点は、これらが他の細胞株に広がることのできる程度に限定されていることである。なぜなら、これらは最初の感染細胞の中で複製しうるが、新たな感染性ウイルス粒子を形成し得ないからである。組換えアデノウイルスは、気道上皮、肝細胞、血管内皮、CNS 実質(CNS parenchyma)および多数の他の組織部位への直接的なインピボ送達の後、高効率の遺伝子導入を達成することが示されている (Morsy, J. Clin. Invest. 92:1580-1586 (1993); Kirshenbaum, J. Clin. Invest. 92:381-387 (1993); Roessler, J. Clin. Invest. 92:1085-1092 (1993); Moullier, Nature Genetics 4:154-159 (1993); La Salle, Science 259:988-990 (1993); Gomez-Foix, J. Biol. Chem. 267:25129-25134 (1992); Rich, Human Gene Therapy 4:461-476 (1993); Zabner, Nature Genetics 6:75-83 (1994); Guzman, Circulation Research 73:1201-1207 (1993); Bout, Human Gene Therapy 5:3-10 (1994); Zabner, Cell 75:207-216 (1993);

40

50

Caillaud, Eur. J. Neuroscience 5:1287-1291 (1993); and Ragot, J. Gen. Virology 74:501-507 (1993) )。組換えアデノウイルスは、特定の細胞表面受容体に結合することによって遺伝子導入を達成し、その後、該ウイルスは、野生型または複製欠損アデノウイルスと同じ方法で、受容体依存性エンドサイトーシスによって内部移行される (Chardonn et al. and Dales, Virology 40:462-477 (1970); Brown and Burlingham, J. Virology 12:386-396 (1973); Svensson and Persson, J. Virology 55:442-449 (1985); Seth, et al., J. Virol. 51 :650-655 (1984); Seth, et al., Mol. Cell. Biol. 4:1528-1533 (1984) ); Varga et al., J. Virology 65:6061-6070 (1991); Wickham et al., Cell 73:309-319 (1993) )。

【 0 1 4 4 】

ウイルスベクターは、除去される E 1 遺伝子を有しているアデノウイルスに基づくものであってもよく、これらのパイロンは、ヒト 2 9 3 細胞株のような細胞株において生成される。別の好ましい態様において、E 1 および E 3 遺伝子は、アデノウイルスゲノムから除去される。

【 0 1 4 5 】

c ) アデノ随伴ウイルスベクター

別の型のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) に基づいている。この不完全パルボウイルスは、多くの細胞型に感染することができ、ヒトに対して非病原性であるので、好ましいベクターである。A A V 型ベクターは、約 4 ~ 5 k b を運ぶことができ、野生型 A A V は 1 9 番染色体の中に安定して挿入されることが知られている。この部位特異的な組み込み特性を含むベクターが好ましい。この型のベクターの特に好ましい態様は、アビジェン (Avigen) ( サンフランシスコ、C A ) によって製造される P 4 . 1 C ベクターであり、これはヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、H S V - t k、および / またはマーカー遺伝子、例えば緑色蛍光タンパク質、G F P をコードする遺伝子を含みうる。

【 0 1 4 6 】

別の型の A A V ウイルスにおいて、A A V は、異種遺伝子に動作的に (operably) リンクした細胞特異的発現を誘導するプロモーターを含む少なくとも一つのカセットに隣接している一対の末端逆位配列 ( I T R ) を含む。この文脈において、異種とは、A A V または B 1 9 パルボウイルス由来でないいずれのヌクレオチド配列または遺伝子もいう。

【 0 1 4 7 】

典型的には、A A V および B 1 9 コード領域は欠失されており、それによって安全な非細胞傷害性ベクターがもたらされる。A A V I T R またはその改変は、感染性および部位特異的な組み込みを与えるが、細胞傷害性を与えず、プロモーターは細胞特異的発現を誘導する。米国特許番号 6 , 2 6 1 , 8 3 4 は、A A V ベクターに関する物質について、本明細書で引用される。

【 0 1 4 8 】

したがって、開示されたベクターは、実質的な毒性なしに哺乳類染色体の中への組み込みが可能な D N A 分子を提供する。

【 0 1 4 9 】

ウイルスおよびレトロウイルスに挿入された遺伝子は、通常、目的の遺伝子産物の発現を制御するのに役立つプロモーター、および / またはエンハンサーを含む。プロモーターは、一般に、転写開始部位についての位置が比較的固定されている場合に機能する D N A の配列である。プロモーターには、R N A ポリメラーゼと転写因子の基本的な相互作用に必要な中核的要素が含まれ、上流要素および応答要素が含まれうる。

【 0 1 5 0 】

d ) 大きな負荷量 (payload) のウイルスベクター

大きなヒトヘルペスウイルスを用いた分子遺伝学実験によって、ヘルペスウイルスへの感染が可能な細胞において、大きな異種 D N A 断片がクローン化され、増殖され、確立されうる方法が提供されている ( Sun et al., Nature Genetics 8: 33-41, 1994; Cotter a

10

20

30

40

50

nd Robertson, . Curr Opin Mol Ther 5: 633-644, 1999)。これらの大きなDNAウイルス(ヘルペスシンプレックスウイルス(HSV)およびエプスタイン・バーウイルス(EBV))は、>150kbのヒト異種DNAの断片を特定の細胞に送達する潜在能力を有する。EBV組換え体は、エピソームDNAとして、感染されたB細胞において大きなDNA断片を維持しうる。個々のクローンは遺伝的に安定に見える330kbまでヒトゲノム挿入物を運び、これらのエピソームの維持は、EBVの感染の間、構成的に発現される特定のEBV核タンパク質、EBNA1を必要とする。また、これらのベクターは、形質移入のために用いられてもよく、この場合、大量のタンパク質がインビトロで一時的に生成されうる。ヘルペスウイルス単位複製配列システムもまた、>220kbのDNA断片を詰め、エピソームとしてDNAを安定に維持しうる細胞に感染するのに用いられている。

10

## 【0151】

他の有用なシステムには、例えば、複製および宿主限定非複製ワクシニアウイルスベクター(host-restricted non-replicating vaccinia virus vector)が含まれる。

## 【0152】

## 2. 非核酸ベースのシステム

開示された組成物は、様々な方法で標的細胞に送達されうる。例えば、該組成物は、電気穿孔法を通して、またはリポフェクションを通して、またはリン酸カルシウム沈殿を通して送達されうる。選択される送達機序は、標的とする細胞の型に一部依存し、送達が、例えばインビボまたはインビトロで起こるかどうかに一部依存する。

20

## 【0153】

したがって、該組成物には、開示されたFS1-78mut、FS6-21mut、FSSMC1に加えて、ベクター、例えば、リポソームのような脂質、例えばカチオン性リポソーム(例えば、DOTMA、DOPE、DC-コレステロール)またはアニオン性リポソームが含まれうる。必要であれば、リポソームにはさらに、特定細胞のターゲティングを促進するタンパク質が含まれうる。化合物およびカチオン性リポソームを含む組成物の投与は、標的器官への求心性血管(blood afferent)に投与されるか、または気道の標的細胞への気道に吸入されうる。リポソームに関しては、例えば、Brigham et al. Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1:95-100 (1989); Feigner et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:7413-7417 (1987); U.S. Pat. No.4,897,355を参照せよ。さらに、該化合物は、特定の細胞型、例えばマクロファージを標的としうるマイクロカプセルの成分として投与されうるか、あるいは、マイクロカプセルからの化合物の拡散または化合物の送達が、特定の速度または用量についてデザインされる。

30

## 【0154】

対象の細胞への外来性DNAの投与および取り込み(すなわち、遺伝子の導入または移入)が含まれる上記の方法において、細胞への該組成物の送達は、様々なメカニズムを通して行われうる。一例として、市販品として入手可能なリポソーム製剤、例えばリポフェクシン、リポフェクタミン(ギブコBRL社(GIBCO-BRL, Inc.))、ゲーサーズバーグ、MD)、スーパーフェクト(SUPERFECT)(キアゲン社、ヒルデン、ドイツ)およびトランスフェクタム(TRANSFECTAM)(プロメガバイオテック社(Promega Biotec, Inc.))、マディソン、WI)、並びに当該技術分野で標準的な方法に従って開発された他のリポソームを用いて、リポソーム経路で送達されうる。また、開示された核酸またはベクターは、電気穿孔法によってインビボで送達され、そのための技術は、ジェネトロニクス社(Genetronics, Inc.)(サンディエゴ、CA)から利用でき、並びにソノポレーション装置(SONOPORATION machine)(ImaRxファーマシューティカル社、トゥーソン、AZ)が用いられてもよい。

40

## 【0155】

該物質は、溶液、懸濁液中にあってもよい(例えば、微粒子、リポソーム、または細胞に取り込まれていてもよい)。これらは、抗体、受容体、または受容体リガンドによって、特定の細胞型を標的としうる。以下の引用文献は、腫瘍組織のための特定のタンパク質

50

を標的とするこの技術の使用の例である (Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., *Br. J. Cancer*, 58:700-703, (1988); Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9, (1993); Battelli, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, (1992); Pieters and McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80, (1992); および Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol*, 42:2062-2065, (1991) )。これらの技術は様々な他の特定の細胞型について用いられる。「ステルス (stealth)」のようなベヒクルおよび他の抗体複合リポソーム (antibody conjugated liposome) (例えば、大腸癌を標的とする脂質媒介薬物 (lipid mediated drug))、細胞特異的リガンドを通じた DNA の受容体媒介ターゲティング (receptor mediated targeting)、リンパ球誘導性腫瘍ターゲティング (lymphocyte directed tumor targeting)、並びにインピボでのマウス神経膠腫細胞の高度に特異的な治療上のレトロウイルスターゲティング。以下の引用文献は、腫瘍組織のための特定のタンパク質を標的とするこの技術の使用の例である (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220, (1989); and Litzinger and Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187, (1992) )。一般に、受容体は、構成性またはリガンド誘導性のエンドサイトーシスの経路に参与している。クラスリン被覆ピットにおけるこれらの受容体クラスターは、クラスリン被覆小胞によって細胞に入り、受容体が仕分けされている酸性化したエンドソームを通過し、次いで細胞表面へ再利用されて細胞内部に蓄えられるようになるか、またはリソソームで分解される。内部移行の経路は、様々な機能、例えば栄養摂取、活性化タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルスおよび毒素の日和見性の侵入 (opportunistic entry)、リガンドの解離および分解、並びに受容体レベルの制御に役立つ。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの型、リガンドの価数 (ligand valency)、およびリガンド濃度に応じて、一つより多くの細胞内経路に従う。受容体依存性エンドサイトーシスの分子機構および細胞機構が概説されている (Brown and Greene, *DNA and Cell Biology* 10:6, 399-409 (1991) )。

#### 【 0 1 5 6 】

宿主細胞ゲノムに組み込まれるべきである、細胞に送達される核酸は、典型的には、組み込み配列 (integration sequence) を含む。特にウイルスベースのシステムが用いられる場合、これらの配列はしばしばウイルス関連配列である。送達系に含まれる核酸が宿主ゲノムに組み込まれるように、これらのウイルスの組み込みシステムもまた、送達の非核酸ベースのシステム、例えばリポソームを用いて、送達されるべき核酸に取り込まれる。

#### 【 0 1 5 7 】

宿主ゲノムへの組み込みのための他の一般的な技術には、例えば、宿主ゲノムとの相同性組換えを促進するためにデザインされたシステムが含まれる。典型的には、宿主細胞ゲノムの中で標的配列と十分な相同性を有する (ベクター核酸と標的核酸の間で組換えが起こる) 配列であって、発現されるべき核酸に隣接する配列にこれらのシステムは依存し、それによって、核酸が送達されて宿主ゲノムに組み込まれることとなる。相同性組換えを促進するために必要なこれらのシステムおよび方法は、当業者に公知である。

#### 【 0 1 5 8 】

### 3. インピボ / エキソピボ

上記のように、該組成物は、医薬的に許容される担体中で投与され、当該技術分野で周知の様々なメカニズム (例えば、ネイキッド DNA (naked DNA) の取り込み、リポソーム融合、遺伝子銃による DNA の筋肉内注射、エンドサイトーシスなど) によって、インピボおよび / またはエキソピボで対象の細胞に送達される。

#### 【 0 1 5 9 】

エキソピボ法が用いられる場合、当該技術分野で周知の標準プロトコールに従って、細胞または組織は除去され、生体外で維持される。該組成物は、いずれの遺伝子導入機構、例えば、リン酸カルシウム媒介遺伝子送達 (calcium phosphate mediated gene delivery)、電気穿孔法、微量注入法またはタンパク質リポソームによっても、細胞内に導入され

うる。次いで、該遺伝子導入細胞を（例えば、医薬的に許容される担体中で）注入するか、または細胞もしくは組織型についての標準的な方法により、対象にホモトピー的に(homotopically)移植して戻してもよい。様々な細胞の対象への移植または注入についての標準的な方法は公知である。

#### 【0160】

##### I. 発現系

細胞に送達される核酸には、典型的には、発現制御系が含まれる。例えば、ウイルスおよびレトロウイルスシステムにおける挿入遺伝子には、通常、目的の遺伝子産物の発現を制御するのに役立つプロモーター、および/またはエンハンサーが含まれる。プロモーターは、一般に、転写開始部位についての位置が比較的固定されている場合に機能するDNAの配列である。プロモーターには、RNAポリメラーゼと転写因子の基本的な相互作用に必要な中核的要素が含まれ、上流要素および応答要素が含まれる。

10

#### 【0161】

##### 1. ウイルスのプロモーターおよびエンハンサー

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの転写を制御する好ましいプロモーターは、様々な供給源、例えば、ポリオーマ、サルウイルス40(SV40)、アデノウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはサイトメガロウイルスのようなウイルスのゲノムから、または異種哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーターから得られる。SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、通常、SV40制限酵素断片として得られ、それはまたSV40ウイルスの複製起点も含む(Fiers et al., Nature, 273: 113 (1978))。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、通常、HindIII E 制限酵素断片として得られる(Greenway, P.J. et al., Gene 18: 355-360 (1982))。もちろん、宿主細胞または近縁種からのプロモーターもまた、本明細書で有用である。

20

#### 【0162】

一般に、エンハンサーとは、転写開始部位からの距離が固定されずに機能し、5' (Lamins, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci 78: 993 (1981))または3' (Lusky, M.L., et al., Mol. Cell Bio. 3: 1108 (1983))から転写単位までにあるDNAの配列をいう。さらに、エンハンサーはイントロンの中(Banerji, J.L. et al., Cell 33: 729 (1983))並びにコード配列自身の中(Osborne, T.F., et al., Mol. Cell Bio. 4: 1293 (1984))にある。これらは通常、10から300bpの間の長さであり、シスで機能する。エンハンサーは、近くのプロモーターから転写を増大させるために機能する。エンハンサーはまた、転写の制御を媒介する応答要素もしばしば含む。プロモーターはまた、転写の制御を媒介する応答要素も含みうる。エンハンサーは、しばしば遺伝子発現の制御を決定する。現在、多くのエンハンサー配列が哺乳類遺伝子から知られているが(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、胎児タンパク質およびインスリン)、典型的には、一般的な発現については真核細胞ウイルスからのエンハンサーが用いられる。好ましい例は、複製起点の外側(late side)上のSV40エンハンサー(bp 100~270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の外側上のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーである。

30

40

#### 【0163】

プロモーターおよび/またはエンハンサーは、光またはその機能を引き起こす特定の化学的事象によって特異的に活性化される。システムは、試薬、例えばテトラサイクリンおよびデキサメタゾンによって制御される。照射、例えばガンマ照射への暴露、またはアルキル化化学療法薬によって、ウイルスベクター遺伝子発現を亢進させる方法もまた存在する。

#### 【0164】

特定の態様において、プロモーターおよび/またはエンハンサー領域は、構成的プロモーターおよび/またはエンハンサーとして作用して、転写されるべき転写単位の領域の発現を最大にしうる。たとえ特定の時間に特定の型の細胞においてのみ発現されるとしても

50

、特定のコンストラクトにおいて、プロモーターおよび/またはエンハンサー領域はすべての真核細胞型において活性化している。この型の好ましいプロモーターは、CMVプロモーターである(650塩基)。他の好ましいプロモーターは、SV40プロモーター、サイトメガロウイルス(完全長プロモーター)、およびレトロウイルスベクターLTFである。

#### 【0165】

すべての特定の調節エレメントがクローン化され、特定の細胞型、例えばメラノーマ細胞において選択的に発現される発現ベクターを構築するのに用いられることが示されている。グリア線維酸性タンパク質(GFAP)プロモーターは、グリア細胞由来の細胞において遺伝子を選択的に発現するのに用いられている。

10

#### 【0166】

真核生物の宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは有核細胞)において用いられる発現ベクターはまた、mRNA発現に影響を及ぼしうる転写の終結に必要な特定の配列も含みうる。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするmRNAの非翻訳部分において、ポリアデニル化セグメントとして転写される。3'非翻訳領域はまた、転写終結部位も含みうる。また転写単位が、ポリアデニル化領域も含むのが好ましい。この領域の一つの利点は、転写された単位がmRNAのようにプロセッシングおよび輸送される可能性を増大させることである。発現コンストラクトにおけるポリアデニル化シグナルの同定および使用は、十分に確立されている。相同なポリアデニル化シグナルが導入遺伝子のコンストラクトにおいて用いられるのが好ましい。特定の転写単位において、ポリア

20

#### 【0167】

##### 2. マーカー

ウイルスベクターには、マーカー生成物(marker product)をコードする核酸配列が含まれうる。このマーカー生成物は、遺伝子が細胞に送達され、一旦送達されると遺伝子が発現されているかどうかを決定するのに用いられる。好ましいマーカー遺伝子は、大腸菌lacZ遺伝子であり、それはβ-ガラクトシダーゼ、および緑色蛍光タンパク質をコードする。

30

#### 【0168】

いくつかの態様において、マーカーは選択可能なマーカーでありうる。哺乳類細胞のための適当な選択可能なマーカーの例は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、チミジンキナーゼ、ネオマイシン、ネオマイシン類似体G418、ハイグロマイシン(hydromycin)、およびピューロマイシンである。このような選択可能なマーカーが哺乳類宿主細胞の中に成功して導入された場合、選択圧下に置かれれば、形質転換された哺乳類宿主細胞は生存しうる。2つの広く用いられる別個のカテゴリの選択的な型(selective regime)が存在する。第一のカテゴリは、細胞の代謝、および栄養添加培地(supplemented media)から独立して成長する能力が欠けている変異細胞株の使用に基づいている。2つの例は: CHO DHFR細胞およびマウスLTK細胞である。これらの細胞は、チミジンまたはヒポキサンチンのような栄養の添加なしに成長する能力が欠けている。これらの細胞は、完全なヌクレオチド合成経路に必要な特定の遺伝子が欠けているので、栄養添加培地中で不足しているヌクレオチドが提供されなければ、これらは生存し得ない。培地を補う別法は、インタクトなDHFRまたはTK遺伝子を、それぞれの遺伝子が欠けている細胞に導入することであり、そのため、その成長要件(growth requirement)を変化させる。DHFRまたはTK遺伝子で形質転換されなかった個々の細胞は、非栄養添加培地中で生存することはできない。

40

#### 【0169】

第二のカテゴリは、いずれの細胞型でも用いられる選択スキームを指す優性選択(dom

50

inant selection)であり、変異細胞株の使用を必要としない。これらのスキームは、典型的には、宿主細胞の成長を抑える薬物を使用する。新規遺伝子を有するこれらの細胞は、薬物耐性を伝えるタンパク質を発現し、選択から生き延びる。このような優性選択の例は、薬物ネオマイシン (Southern P. and Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982))、ミコフェノール酸 (Mulligan, R.C. and Berg, P. Science 209: 1422 (1980)) またはハイグロマイシン (Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)) を使用する。その3つの例は、それぞれ適当な薬物 G 4 1 8 もしくはネオマイシン (ジェネテシン)、x g p t (ミコフェノール酸) またはハイグロマイシンへの抵抗性を伝える真核生物制御下で、細菌遺伝子を用いる。他には、ネオマイシン類似体 G 4 1 8 およびピューロマイシン (puramycin) が含まれる。

10

#### 【0170】

##### J. 医薬担体 / 医薬品の送達

上記のように、該組成物はまた、医薬的に許容される担体中、インビボでも投与される。「医薬的に許容される」とは、生物学的にまたは他の点で望ましくない物質ではない物質を意味し、すなわち、該物質は、いずれの望ましくない生物学的効果を引き起こさず、またはそれが含まれる医薬組成物のいずれの他の成分とも有害な形で相互作用せず、核酸またはベクターとともに対象に投与される。担体は、当業者に周知であるように、本来、活性成分のいずれの分解も最小化し、対象におけるいずれの有害な副作用も最小化するために選択される。

#### 【0171】

該組成物は、経口、非経口 (例えば、静脈内)、筋肉内注射、腹腔内注射、経皮、体外、局所など、例えば局所的な鼻腔内投与または吸入薬による投与によって投与される。本明細書で用いられるように、「局所的な鼻腔内投与」とは、一つまたは両方の鼻孔を通して鼻および鼻腔に該組成物を送達することを意味し、噴霧機構もしくは液滴機構による送達、または核酸もしくはベクターのエアゾール化を通じた送達が含まれる。吸入薬による該組成物の投与は、噴霧または液滴機構による送達を経て、鼻または口を通して行われる。送達はまた、挿管により呼吸器系 (例えば、肺) のいずれの領域にも直接行われる。必要な該組成物の正確な量は、患者の種、年齢、体重および全身状態、治療されるべきアレルギー性障害の重症度、用いられる特定の核酸またはベクター、その投与方法などに応じて、患者ごとに変化する。したがって、組成物ごとに正確な量を特定することは不可能である。しかしながら、適当な量は、本明細書の記載から与えられる通常の実験法のみを用いて、当業者によって決定される。

20

30

#### 【0172】

該組成物の非経口投与は、用いられる場合、一般に、注射の特徴を有する。注射液は、溶液もしくは懸濁液として、注射前に液体中の懸濁溶液を調製するための固形、または乳濁液として、通常の状態に調製される。つい最近修正された非経口投与のためのアプローチは、一定の投与量が維持されるように、徐放または持続放出システムの使用を伴う。例えば、本明細書に引用される米国特許番号 3, 610, 795 を参照せよ。

#### 【0173】

該物質は、溶液、懸濁液中にあってもよい (例えば、微粒子、リポソーム、または細胞に取り込まれていてもよい)。これらは、抗体、受容体、または受容体リガンドによって特定の細胞型を標的としうる。以下の引用文献は、腫瘍組織のための特定のタンパク質を標的とするこの技術の使用の例である (Senter, et al., Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et al., Br. J. Cancer, 58:700-703, (1988); Senter, et al., Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, et al., Cancer Immunol. Immunother., 35:421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); および Roffler, et al., Biochem. Pharmacol., 42:2062-2065, (1991))。「ステルス」のようなベヒクルおよび他の抗体複合リポソーム (例えば、大腸癌を標的とする脂質媒介薬物)、細胞特異的リガンドを通じた DNA の受容体媒介ターゲティング、リンパ球誘導性腫瘍ターゲティング、並

40

50

びにインビボでのマウスの神経膠腫細胞の高度に特異的な治療上のレトロウイルスターゲティング。以下の引用文献は、腫瘍組織のための特定のタンパク質を標的とするこの技術の使用の例である (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220, (1989); and Litzinger and Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187, (1992))。一般に、受容体は、構成性またはリガンド誘導性のエンドサイトーシスの経路に参与している。クラスリン被覆ピットにおけるこれらの受容体クラスターは、クラスリン被覆小胞によって細胞に入り、受容体が仕分けされている酸性化したエンドソームを通過し、次いで細胞表面へ再利用されて細胞内部に蓄えられるようになるか、またはリソソームで分解される。内部移行の経路は、様々な機能、例えば栄養摂取、活性化タンパク質の除去、巨大分子のクリアランス、ウイルスおよび毒素の日和見性の侵入、リガンドの解離および分解、並びに受容体レベルの制御に役立つ。多くの受容体は、細胞型、受容体濃度、リガンドの型、リガンドの価数、およびリガンド濃度に応じて、一つより多くの細胞内経路に従う。受容体依存性エンドサイトーシスの分子機構および細胞機構が概説されている (Brown and Greene, *DNA and Cell Biology* 10:6, 399-409 (1991))。

10

#### 【0174】

##### 1. 医薬的に許容される担体

該組成物、例えば抗体は、医薬的に許容される担体と併用して治療的に用いられうる。

#### 【0175】

適当な担体およびその製剤は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的には、製剤を等張にするために、適当な量の医薬的に許容される塩が製剤中で用いられる。医薬的に許容される担体の例には、これらに限らないが、生理食塩水、リンゲル液およびデキストロス溶液が含まれる。溶液のpHは、好ましくは約5~約8、より好ましくは約7~約7.5である。さらなる担体には、持続放出製剤、例えば該抗体を含む固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックス(semipermeable matrix)が含まれ、そのマトリックスは、成形品(shaped article)、例えば、膜、リボソームまたは微粒子の形態である。例えば、投与経路および投与されるべき組成物の濃度に依存している特定の担体がより好ましいことは、当業者にとって明らかである。

20

#### 【0176】

医薬担体は、当業者にとって公知である。これらは、最も典型的には、ヒトへの薬物の投与のための標準的な担体、例えば、無菌水、生理食塩水、および生理学的pHでの緩衝液のような溶液である。該組成物は、筋肉内または皮下に投与されうる。他の化合物は、当業者に用いられる標準的な方法に従って投与される。

30

#### 【0177】

医薬組成物には、選択の分子に加えて、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、防腐剤、界面活性剤などが含まれうる。また医薬組成物には、一つ以上の活性成分、例えば抗菌剤、抗炎症剤、麻酔薬なども含まれうる。

#### 【0178】

医薬組成物は、局所または全身的治療が望まれるかどうかによって、および治療されるべき領域によって、多数の方法で投与されうる。投与は、局所(例えば眼、腔、直腸、鼻腔内)、経口、吸入、または非経口、例えば静脈内点滴、皮下、腹腔内または筋肉内注射にしてもよい。ここで開示された抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、または経皮に投与されうる。

40

#### 【0179】

非経口投与のための製剤には、無菌水溶液もしくは無菌非水溶液、懸濁液、および乳濁液が含まれる。非水溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(例えばオリーブ油)、および注射用有機エステル類(例えばオレイン酸エチル)である。水性担体には、水、アルコール溶液/水溶液、乳濁液または懸濁液、例えば生理食塩水および緩衝液(buffered media)が含まれる。非経口ベヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロス(Ringer's dextrose)、デキストロスおよび塩化ナトリウ

50

ム、乳酸加リンガー液(lactated Ringer's)、または固定油が含まれる。静脈内ベヒクルには、液および栄養補給液、電解質補給液(例えばリンガーのデキストロースに基づくもの)などが含まれる。また防腐剤および他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤、および不活性ガスなども存在しうる。

【0180】

局所投与のための製剤には、軟膏剤、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐剤、スプレー、液体および散剤が含まれうる。通常の医薬担体、水性、粉末もしくは油性基剤、増粘剤などは、必要でありうるかまたは望ましい。

【0181】

経口投与のための組成物には、散剤もしくは顆粒剤、水溶媒もしくは非水溶媒中の懸濁液もしくは溶液、カプセル剤、サシット(小袋)、または錠剤が含まれる。増粘剤、香料、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤は望ましい。

10

【0182】

該組成物のいくつかは、無機酸類、例えば塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、およびリン酸、並びに有機酸類、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸との反応によって、あるいは無機塩基類、例えば水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、および有機塩基類、例えばモノ、ジ、トリアルキルおよびアリアルアミン類および置換エタノールアミン類との反応によって形成される、医薬的に許容される酸もしくは塩基付加塩として投与される可能性がある。

20

【0183】

2. 治療上および予防的使用

該組成物を投与するための有効な用量および計画は経験的に決定され、このような決定をすることは当該技術分野の技術の範囲内である。該組成物の投与のための用量範囲は、症状/障害にもたらされる目的の効果を生じるのに十分大きなものである。投与量は、有害な副作用、例えば望ましくない交差反応、アナフィラキシー反応などを引き起こすほど多いべきではない。一般に、投与量は、患者における年齢、症状、性別および疾患の程度、投与経路、あるいは投与計画に他の薬物が含まれるかどうかで変化し、当業者によって決定されうる。投与量は、いずれの反対指示(counterindication)の場合であっても、それぞれの医師によって調整されうる。投与量は変化してもよく、1日または数日間、1日1回以上の用量の投与で投与されうる。所定の種類の医薬品の適当な投与量については、文献で手引きを見つかることができる。例えば、抗体についての適当な用量を選択する際の手引きは、抗体の治療上の使用についての文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389で見つかることができる。単独で用いられる抗体の典型的な毎日の用量は、上述の要因に応じて、1日あたり約1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 100  $\text{mg}/\text{kg}$  (体重)までの範囲またはそれ以上にわたってもよい。

30

【0184】

癌を治療、阻害、または予防するために、開示された組成物、例えばワクチンまたは抗体を投与した後、その効果は、当業者に周知の様々な方法で評価されうる。例えば、該組成物が腫瘍増殖を減少させるか、または腫瘍の大きさがさらに増大するのを予防することを見れば、当業者は、本明細書で開示された組成物、例えばワクチンまたは抗体が、患者における癌の治療、阻害、または予防に有効であることを理解する。

40

【0185】

K. キット

本明細書で開示された方法を実施するのに用いられうる試薬を引き出すキットが本明細書で開示される。本明細書で論じられるか、または開示された方法の慣行において必要もしくは有益であると理解されるいずれの試薬もしくは試薬の組合せも、該キットに含まれうる。例えば、該キットには、本方法の特定の態様において論じられた増幅反応を行うた

50

めのプライマー、並びに意図されるプライマーを使用するのに必要な緩衝液および酵素が含まれる。例えば、SEQ ID No: 2、4、および8に示されるペプチドを含む、患者の後天性前立腺癌(acquiring prostate cancer)の危険性を評価するためのキットを開示する。

#### 【0186】

本願を通じて、様々な刊行物が引用される。本発明の属する最先端技術をさらに十分に記載するために、これらの刊行物の開示は、その全体が本明細書によって本願に引用される。開示された引用文献もまた、引用文献が依拠される本文中で論じられたそれらに含まれる物質について、個別かつ具体的に本明細書で引用される。

#### 【0187】

本発明の範囲または精神からはずれることなく、本発明において様々な修正および変化がなされうることが、当業者にとって明らかである。本発明の他の態様は、本明細書に開示された発明の明細書および慣行を考察すれば、当業者にとって明らかである。上記の特許請求の範囲に示されている本発明の真の範囲内および精神で、本明細書および実施例が単なる例として考慮されることが意図される。

#### 【実施例】

#### 【0188】

##### L. 実施例

下記の実施例は、当該技術分野の当業者に、本明細書において主張される化合物、組成物、記事、装置および/または方法を行いおよび評価する方法の完全な開示および説明を提供するために示され、これは単に典型例であることが意図され、該開示を制限することを意図するものではない。数(例えば量、温度など)に関して正確さを確保する努力がなされたが、いくつかの誤りおよび異常は説明されるべきである。別に断らない限り、割合は重量による割合であり、温度は であるかまたは大気温度であり、および圧力は大気またはその近くである。

#### 【0189】

##### 1. 実施例1: ノボペプチドの同定

##### a) フレームシフトの頻度

癌ワクチンを構成するために、腫瘍細胞で発現するが非癌性細胞では発現しない十分な数のノボペプチドを同定するために配列決定されなければならないコード配列の量を決定するためには、腫瘍中のノボペプチド関連ミューテーションまたはバリエーションの頻度を決定することが最初に必要である。この頻度を評価するために、マウスメラノーマ細胞系、B16-F10で発現される550個の遺伝子のC末端600bpを配列決定した。インビトロ-由来FSがインビボで発現されることを確認するために、全身的に細胞を注入した後のB16肺転移からRNAを抽出し、cDNAを生成し、RT-PCRシーケンシングにより該FSを確認した(図1)。

#### 【0190】

3個のFSを単離し、FSはおおよそ遺伝子の600bpの183セグメントにつき1個の頻度で発生することを示している(図2)。FS 1-78を該正常参照配列に対するフレームシフトとして同定した。別のフレームシフトペプチド6-21もまた同定され、また3個のアミノ酸挿入であった。FS 1-78の親タンパク質はジンクフィンガータンパク質であるが、396bpの欠失の結果、終止までの代替したフレームにおいて11個のアミノ酸ノボペプチドの発現を生じた。テーブル1に同定した配列が示される。下線のアミノ酸は、H-2 Db (C57BL6 マウス)およびH-2 Kd (Balb/c マウス)により提示されると予想されるペプチドを含む。大文字のアミノ酸はプライマリーフレーム(primary frame)を示し、小文字のアミノ酸はフレームシフト残基を示す。プライマリーおよび代替したフレームの融合は、しばしば抗原性ペプチドを形成する(例えばbcr-abl 融合)。図2aにFS 1-78のPCR増幅が示される。矢印はFS 1-78のバンドを示し; 他のバンドは、野生型アレルである。

レーン1: B16/F1 腫瘍細胞; レーン2: B16/F10 腫瘍細胞; レーン3: 正常心臓; レーン4: 正常腸; レーン5: 正常腎臓; レーン6: 正常肝臓; レーン7: 正常肺; レーン8: 正常骨格筋; レーン9: 正常皮膚; レーン10: 正常脾臓; レーンM: 分子量マーカー。図2bに正

10

20

30

40

50

常組織からのRNAに対する、マウス腫瘍における6-21フレームシフトの発生の分析が示される。矢印は6-21 FSのバンドを示す。レーンは、図2aの通りである。FS 1-78 発現は腫瘍細胞にて検出されるが、試験した非癌性細胞のいずれにおいても検出されないことは注目される。

【表3】

テーブル1

遺伝子名	FSミューテーション	ネオペプチド配列
1-78	396bp 欠失	...RMQPQASAnhcqllkvmva*
6-21	95bp 欠失	...AVLLMCLYQpwmckeyrll*
3-83	3 aa 挿入	...GTEDsrdSDDALL.....

下線のアミノ酸は、H-2 Db (C57BL6 マウス)およびH-2 Kd (Balb/c マウス)により提示されると予想されるペプチドを含む。大文字で表示されるアミノ酸は、プライマリーフレームを示し、小文字で表示されるアミノ酸はFSを示す。

【0191】

b) 腫瘍進行に対する免疫保護

上記の同定したFS 1-78ノボペプチドを遺伝子リニア発現エレメント (genetic linear expression element) (LEE)として、図3に示されるように、(Sykes, K. F., and S. A. Johnston (1999) Nat Biotechnol 17:355)に記載の方法に従って、化学的に合成した。各LEEは、哺乳類のプロモーター、強い細胞内プロセッシングのためのユビキチン遺伝子(Ub)を含むフラグメント、および転写および翻訳のターミネーターを含むフラグメントを含む。該2つのフラグメントをフレームシフト配列、ここではFS 1-78を介して結合する。ついでC57BL6マウスを遺伝子銃法を用いてFS 1-78 LEEコンストラクトおよびプラスミド発現GM-CSFで遺伝学的に免疫化した (1 μgのpGM-CSF)。マウスを2週間後に同一のFS 1-78LEEおよびpGM-CSFで追加免疫し、ついで追加免疫1週間後に1 × 10<sup>5</sup> B16 F10メラノーマ腫瘍細胞で曝露した。図4に示されるように、コントロールの空 (empty) LEEを投与したマウスと比較して、および免疫化を受けなかったそれらと比較して、腫瘍増殖は顕著に遅延し、最高投与量(3.2 ng)にて、すでに遅延が生じた後に、腫瘍体積が減少した。

【0192】

c) 単一FS-ノボペプチドによる交差防御 (Cross-protection)

1つの腫瘍型に基づいて同定した単一FS-ノボペプチドによる免疫化は、異なるマウス系における異なる腫瘍型に対して免疫保護であり、このような免疫化のための手順を開示する。本明細書で開示される、複数の腫瘍型に共通するノボペプチドによる免疫化は、交差防御を生じることができ、個別化ワクチンが処方化され、調製されおよび投与されるより前に、患者が腫瘍を発生する必要を除去する。Balb/c マウスを上記のC57BL6 マウスと同一の方法により、FS 1-78 LEE (3.2ng) + pGM-CSF (1 μg) で免疫化し、2週間後に同一の該遺伝子ワクチンで追加免疫した。追加免疫1週間後に、マウスを1 × 10<sup>4</sup>4T1乳房腫瘍細胞で曝露した。4T1曝露から17日後に腫瘍は増殖し始めた。図5に示されるように、FS 1-78ネオペプチドで予防的免疫化したBalb/cマウスは、pGM-CSFプラスミド単独で免疫化したコントロールと4T1腫瘍では認められない別のノボペプチド(6-21 Mut)で免疫化したコントロールの両方と比較して、4T1腫瘍増殖を有意に遅延し減少した。

【0193】

d) 複数のノボペプチドを組み合わせるにより、癌に対する免疫保護を与えることができる。

複数のノボペプチドを組み合わせたワクチンは、癌に対する免疫保護を与えることに大変有効であることができる。本明細書において、マウスを、1-78と6-21ノボペプチドの組み合わせを含むワクチンを用いてワクチン接種した。B16腫瘍細胞による曝露において、大抵のワクチン接種したマウスは腫瘍増殖から完全に保護された。図6は1-78および6-21ペプチドの、それら単独で、および単一ワクチンとしてプールした場合での相対的な保護を比較する。組み合わせワクチンを受けた群のマウスの80%が15日で生存しており、その後も試験終了まで生存しており見かけは健康そうであった。この試験により、ノボペプチ

10

20

30

40

50

ドのプーリング (pooling) が単一ペプチドによる免疫化以上の増加した保護を提供することができることが実証される。

【0194】

e) ノボペプチドのバイオインフォマティクス分析と同定

候補ノボペプチド核酸配列 (癌細胞により発現されるが非癌性細胞によってされない) を、腫瘍データベースデータをゲノムデータと比較するバイオインフォマティクス分析により同定し予測することができ、これを行った方法を開示する。腫瘍から得られた配列と正常ESTライブラリーデータベースの比較によるフレームシフトのバイオインフォマティクス分析によって、FS-ノボペプチド候補を同定した。ついで、正確なFSペプチド配列を、フレームシフト領域のDNAシーケンシング、および非癌性の参照配列との比較によって確認した。数個の腫瘍特異的な変異体は、DNAレベルでコードされないが、該腫瘍で主であるRNAスプライシング変異体を含むことは注目に値する。テーブル2aにバイオインフォマティクス比較により予測され、DNA配列分析により検証されたフレームシフト配列が示され、これらの配列は表示の番号の腫瘍ESTに存在しているが非癌性ESTには存在しないことが示される。可能性あるノボペプチドのバイオインフォマティクス同定を以下のように行った: NCBI ESTデータベースを、NCI ESTデータベースから得られた情報を用いてスクリーニングし、各NCBI ESTを3セット (腫瘍EST、正常EST、および腫瘍もしくは正常に分類するための情報が不十分なEST) の1つに分類した。後者を廃棄した。ついで、BLASTを用いて、NCBIデータベース中の各ヒト参照配列を、正常ESTセットと腫瘍ESTセットの両方とアラインメントし、少なくとも100塩基対のフレームシフトしたおよびフレームシフトしないヒットの数と85%配列同一性をカウントした。更なるスクリーニングのために候補を同定するために、少なくとも10塩基対のインデル (挿入欠失) に起因する各FS変異体配列について、オッズ比を計算した。該オッズ比は、腫瘍および正常細胞における非変異体野生型配列の発現と比較した、腫瘍および正常細胞におけるFS変異体の相対発現の指標を提供する。腫瘍細胞における野生型に対するFS変異体の比 (「腫瘍細胞変異体比」) を、野生型配列についての腫瘍ESTデータベースの検索において得られた配列マッチ数に対する、FS変異体配列についての腫瘍ESTデータベースの検索において得られた配列マッチ数の比として、計算した。正常細胞における野生型に対するFS変異体の比 (「正常細胞変異体比」) を、野生型配列についての正常ESTデータベースの検索において得られた配列マッチ数に対する、FS変異体配列についての正常ESTデータベースの検索において得られた配列マッチ数の比として、計算した。この比の計算において、オッズ比の計算においてゼロ除算を避けるために、マッチ数がゼロであるならば、前者の数を任意に1に設定した; ゼロと1の差は配列アラインメントおよびアラインメントパラメーターの設定に伴う不確定性の範囲内にあると思われるので、この近似は妥当と考えられた。オッズ比を正常細胞変異体比に対する腫瘍細胞変異体比の比として計算し、比が2.0を上回るFS変異体配列を更なる試験のために選定した。テーブル2bに、腫瘍細胞対正常細胞におけるFS変異体のRNA発現比を測定して、発現差違を確認した、6つのFS変異体配列が示される。テーブル2cに上記のように計算され高オッズ比を有するFS変異体が示され; CIAPIN1およびSTYXL1について、RNA発現比は2.6Xおよび2.0Xであるとそれぞれ測定され; BCL2L12およびDNPEPにおいて、腫瘍細胞におけるRNA発現は正常細胞におけるそれを超えることを、PCRおよび電気泳動ゲルバンド強度の検査によって確認し; ならびにBCL2L12、DNPEP、およびSTYXL1について腫瘍細胞における発現をRNA抽出とシーケンシングによって検証した。テーブル2dに、FS変異体または親野生型配列についての配列マッチは該腫瘍ESTデータベースにおいて認められたが、該正常ESTデータベースにおいては、配列マッチは認められなかった、FS変異体配列が示され; これによってオッズ比の計算ができなくなったが、正常細胞における明らかな非発現は所望の特性である。発現した時に、非常に短いFS変異体配列は結果としてFS変異体と近接するシフトしない配列との融合を示すペプチドを生じるため、それはそれでもなお有意であることに留意せよ。テーブル2eに正常ESTデータベースに対するFS変異体配列についての配列マッチの数がゼロであったFS変異体配列が示され; オッズ比を計算するためにこの数は任意に1に設定した。配列C7orf24およびZWILCHについて測定され

10

20

30

40

50

たRNA発現比はそれぞれ、3.6Xおよび10.4Xであり；DYRK4、HNRPUL1、MAP3K10、PPP4C、およびRIPK2において、腫瘍細胞におけるRNA発現が正常細胞におけるそれを超えることをPCRおよび電気泳動ゲルバンド強度の検査によって確認し；ならびにDYRK4、HNRPUL1、RIPK2、およびZWILCHについて、腫瘍細胞におけるFS変異体の発現をRNA抽出およびシーケンシングによって確認した。テーブル2fに計算されたオッズ比が2.0未満であるが、腫瘍化に關与する可能性があるFS変異体配列が示され；腫瘍細胞におけるBCL2L13およびDTYMKのRNA発現が正常細胞におけるそれを超えることPCRおよび電気泳動ゲルバンド強度の検査によって確認し、ならびに腫瘍細胞におけるDTYMKの発現をRNA抽出およびシーケンシングにより確認した。FS変異体が予測され、オッズ比が示されるように計算されたが、その変異体は10bp未満のインデルから生じ、その差が配列決定の誤りに起因する可能性が高まった遺伝子が、テーブル2gに示される。

10

【表4】

テーブル2a

遺伝子名	FS ミューテーション	EST 分析	ネオペプチド配列	配列番号
RIPK2	154bp 欠失	腫瘍: 6/16 正常: 0/8	...HIHTPLLDrklnilmigh*	9
DTYMK	91bp 欠失	腫瘍: 3/86 正常: 0/30	...SANRWEQVifp*	10
6-21	95bp 欠失	腫瘍: NA 正常: NA	...LLMCQCQLYQpwmckeyrll	11
DYRK4	61bp 欠失	腫瘍: 4/10 正常: 0/11	...EQLACIMEipkvfiki*	12
MTCH2	68bp 欠失	腫瘍: 5/88 正常: 0/63	...SYSQAVTGscwwmpslpnivy ldrlvhatkrgeyepk*	13
FTH1	62bp 挿入	腫瘍: 17/2157 正常: 0/243	...ASYVYLSMivtatclwgsiv*	14

20

【表5】

テーブル2b

受入 ID	遺伝子名	FS ペプチド	RNA 比
NM_006306	SMC1L1	GCCGIYCHEEPQREDSSI (配列番号: 15)	98X
NM_015336	HIP14	PWMCKKYRLL (配列番号: 16)	4X
XM_044434	KIAA1458	NPCQLLKPMVA (配列番号: 17) SCWWMPSELLPNIVLDRLLVHATKRGEYEPK	6.3X
NM_014342	MTCH2	(配列番号: 18)	2.2X
NM_006833	COPS6	RGPL (配列番号: 19)	9.75X
NM_000314	PTEN		41X

30

【表 6】

テーブル 2c  
受入 ID

受入 ID	遺伝子名	FS ペプチド	オッズ比
NM_001745	CAMLG	VHICISYFTTCVHGIIQIFSQE (配列番号: 20)	2.50
NM_001014438	CARS	GSVHTSRWEKGDVLLWANRL (配列番号: 21)	2.86
NM_020313	CIAPIN1	SAHKESSFDIICQV (配列番号: 22)	2.22
NM_006716	DBF4	SS	4.09
NM_017996	DET1	TRHLLKSMSTRAARQQRTYCRDTEKSCPMAMT SGQ (配列番号: 23)	2.67
NM_012100	DNPEP	GWLQ (配列番号: 24)	2.36
NM_006705	GADD45G	LRGQGG (配列番号: 25)	2.38
NM_000849	GSTM3	LLTMIEANGWM (配列番号: 26)	3.82
NM_201612	IKIP	CGRNLKLSWNN (配列番号: 27)	15.43
NM_001012634	IL32	HQAIERFYDKMLQNQDVDR (配列番号: 28)	4.63
NM_015416	LETMD1	ESLEPGHASHILPASSLVETSFEDSYNCDSPGTGG FGKAGDWPADCSGSKIGLLSPWPEFYAYW (配列 番号: 29)	3.08
NM_002405	MFNG	GPTLWSPTAPRNTATQLCPARWLLSSTPSWPVG LGSAMWMTMTM (配列番号: 30)	2.47
NM_198883	MTX1	KYNADYDLSARQGADTLAFMSLLEKLLPVL (配列 番号: 31)	3.08
NM_152298, NM_002482	NASP	SNH	3.65
NM_006985	NPIP	SRSQLGMAVIFLFTPR (配列番号: 32)	2.11
NM_153681	PIGP	KNLKGSRVC (配列番号: 33)	3.69
NM_018845	RAG1AP1	KLR	2.29
NM_015014	RBM34	GKRSSEC (配列番号: 34)	11.08
NM_183400	RNF14	AICSMQALRQPMGRTPWQRGPVCLDAIS (配列 番号: 35)	11.73
NM_016211	SEC31A	PSEWLE (配列番号: 36)	2.33
NM_001009939	SEPT5-	VENQAHCDFVKLRLNMLIRTHMHDLDVTCDVHVE NYRAHCICQMTSKLTQDSRMESPIPLPLPTPDAE T (配列番号: 37)	2.63
NM_005827	SLC35B1	WWIVPGAGSMLPVLSPWVWSPAIQHYSLSSTTQ LRSLVNPASQSQSCSLG (配列番号: 38)	9.45
NM_003473	STAM	GVILKYVKN (配列番号: 39)	2.14
NM_003763	STX16	A	2.70
NM_016086	STYXL1	GTGCISAIPH (配列番号: 40)	7.27
NM_032026	TATDN1	VYDYRWKSTRQ (配列番号: 41)	3.63
NM_001001563	TIMM50	DHRAHQPLSPRPSAGTVLPATLHARFGAHRRL AS (配列番号: 42)	2.92
NM_100486	WAC	MEDKHSSDASSLLPQNILSQTSRHNDRDYRLPRA ETHSSSTPVQHPKPVVHPTATPSTVPSSPFTLQS DHQPKKSFANGASTLSKLPTPTSSVPAQKTERK (配列番号: 43)	2.70
NM_024061	ZNF655	GHTSPPSHHPDS (配列番号: 44)	2.09

10

20

30

【表 7】

テーブル 2d  
受入 ID

受入 ID	遺伝子名	FS ペプチド
NM_212533, NM_001606, NM_172027	ABCA2	E
NM_001033055	ABTB1	VLCLLVWARGAGTLPSGQWSPLRGQHLRW (配列番号: 45)
NM_001707	AIPL1	VIFHFRTMKCDEERTVIDDSRQVGQPMHIIIGNMFKLEVV EILLTSMRVHEVAEFWCDTI (配列番号: 46)
NM_004328	BCL7B	GQSLAMLSRLVNSWPQAVPRP (配列番号: 47)
	BCS1L	LES

40

【表 8】

XM_043653	BEXL1	PLTEASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKGAHS (配列番号: 48)	
NM_139343	BIN1	LRKGPPVPPPKHTPSKEVKQEQLSLFEDTFVPEISVTP SQPAEASEVAGGTQPAAGAQEPGETAASEAAS (配列番号: 49)	
NM_015412	C3orf17	G	
NM_001009186	CCT6A	QIQHPTASLIAKVATAQDDITGDGTTSNVLIIGELLKQADLYI SE (配列番号: 50)	
NM_134445	CD99L2	QPWDHTNHHNK (配列番号: 51)	
NM_033488	CDC2L1	SVCTSPNDERGLQRQSESQPLESQPASAAAGAVRVGRR PEASKRRENGRKGPVRLTGHQRQREEDQLGRVLSRIR LRF (配列番号: 52)	10
NM_001005271, NM_001005273	CHD3	EMGEEGGGRTGNH (配列番号: 53)	
NM_017828	COMMD4	VRPSTVSMANPCPVNCSSWGCPKSTRPACAAVMRRSKA PCRSTCGSAAYA (配列番号: 54)	
NM_032179	CPSF3L	SCLD (配列番号: 55)	
NM_004715	CTDP1	KWTTTSLEKAATTATARRGGLRSRRRSPSPGSQGPAGSG RSGHLRPARGARQGAGGPEATRGS (配列番号: 56)	
NM_001930	DHPS	AERGRRLRCLHQHSPGV (配列番号: 57)	
NM_182908	DHRS2	FHGNESLWKNFKEHHQLQRIGESDCAGIVSFLCSPDAS YVNGENIAGYSTRL (配列番号: 58)	
NM_021931	DHX35	HDLSSQRLQGE (配列番号: 59)	
NM_001009894	DKFZp434N2 030	ISHTFGLD (配列番号: 60)	20
NM_032378	EEF1D	AQAPGPPAAPAETTVSSSSGLPVWKWRTRVCVAWYRSC SRPSPSWRPG (配列番号: 61)	
NM_024311	ET	RRVTEEQCLLP (配列番号: 62)	
NM_023109	FGFR1	CIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFLARDIHHIDYY (配列番号: 63)	
NM_001001662	FLJ16636	KDVGEPFLPLA (配列番号: 64)	
NM_024578	FLJ22709	VSLTGRGSPGRASRQKI (配列番号: 65)	
NM_005087, NM_001013439	FXR1	GKRCD (配列番号: 66)	
NM_002106	H2AFZ	VGI	
NM_014056	HIGD1A	VFGDSPALSPRLECSGRISAHCSLCLLGSSDSPTSAS (配列番号: 67)	30
NM_003529	HIST1H3A	R	
NM_153490	KRT13	GPGPSR (配列番号: 68)	
NM_019016	KRT24	ATPTWK (配列番号: 69)	
NM_015848	KRT2B	TLLQEQGKTQVRQNLPLFEQYINNLRRQLDNIVGERGRL DS (配列番号: 70)	
NM_002272	KRT4	ESWYQTKYEELQITAGRHGDDLNTKQEIIEINRMIQRLR SEIDHVKKQCANLQAAIADAEQRGEMALKDAKNKLE (配列番号: 71)	
NM_153486	LDHD	GRRLR (配列番号: 72)	
XM_060417	LOC127295	LARMCVPTLLLTLNLRARLVRKREELSNVLAAMKKATAKGD (配列番号: 73)	
XM_497978	LOC132391	RVRHGVVRGPGHRDSRGSGRNGRHPEREGDHAKPERPP GLLPQQ (配列番号: 74)	40
XM_211339	LOC284120	LLSFCCPGWSSVA (配列番号: 75)	
XM_208312	LOC285296	LDDSIVKLVSPGSALPRIFGLSPESLSADH (配列番号: 76)	
XM_293903	LOC345630	IVEERKMHWSPRTWVSLGNQFMERRESRFRKEMTKLSTE (配列番号: 77)	
XM_370672	LOC387830	TVKHPVCV (配列番号: 78)	
XM_495875	LOC390183	FHVNHVKRSRVPLSVGDHTNSS (配列番号: 79)	
XM_372840	LOC391209	LARMCVPTLLLTLNLRARLVRKREELSNVLAAMKKATAKGD (配列番号: 80)	

【表 9】

XM_497922	LOC391538	RCVLKIGEHTPSALAIMENAKCSGPLCQYLPAEWHCAHR GA (配列番号: 81)	
XM_496658	LOC440976	GGGGRAERPAGLAGVQQGTGWVSVLKPPALLPQLRSKV KRLIRF (配列番号: 82)	
XM_497335	LOC441632	AKQVLLGRKVVVVRCEGINISGNFYTKQVEVPRFPPQADE HQLLPRLPLPGPQPHLLADRARYAAPQDQARPGRSRGGP QGV (配列番号: 83)	
XM_497347	LOC441641	GNFYRNKLYLAFLRKRMTNPSRGPYHFRAPSRIFWRT VRGMLPHKTKRGQAALDRLKVFDPPTT (配列番号: 84)	
XM_497605	LOC441836	VGDEAQSQRGILTLKYPIEHGIVTTPSTTSCAWPRRSTRC C (配列番号: 85)	10
XM_029323	LOC90133	QAPRL (配列番号: 86)	
NM_138779	LOC93081	GTCWRKWHRKCKLPIKSTGLRRQIIPWQ (配列番号: 87)	
NM_002383	MAZ	GFTTAAYLRIHAVKDHGLQAPRADRILCKLCSVHCKTPAQ LAGHMQTHLGGAAPVPGDAPQPQPTC (配列番号: 88)	
NM_174923	MGC31967	REEMSTQWLPTYVPIPPSCHKFKPKNSQNHCSPHL (配列 番号: 89)	
NM_182523	MGC61571	YFLSSIRFISTF (配列番号: 90)	
NM_025259	MSH5	RNPQQMPL (配列番号: 91)	
NM_002485	NBN	V	
NM_001001716	NFKBIB	RHCTWL (配列番号: 92)	
NM_020729	ODF2L	WRIFLH (配列番号: 93)	
NM_001007157	PHF14	GLADS (配列番号: 94)	20
NM_015937	PIGT	EFSSQLWTLKEGAEVAPGQ (配列番号: 95)	
NM_007221	PMF1	SPLLHWDGSAWSPPALWWTVCETGLQLGGVQVTTGEE GGNL (配列番号: 96)	
NM_001017431	RBM3	VVVKDRETQRSRGFGFITFTNPDLWMVRSVWIMQASL LGEPEEVALGPMGVAATL (配列番号: 97)	
NM_015725	RDH8	LFLWLSSQALTLRPCTTSGTSSISQPPGSCFAPWDRTHRT WFRPLSTSSARLDHPCADRPTSATRR (配列番号: 98)	
NM_194452	RNF121	IW	
NM_001005	RPS3	KLVGNSQKECGVS (配列番号: 99)	
NM_058192	RPUSD1	GVSGVGGVLVVEGKLRHRATKMLLGHPEHQGRAGNKH SCVLNSTPCSLSASHLTQGPCWLLTDSLGVWLAAILQDR APPWPCPHQW (配列番号: 100)	
NM_207521	RTN4	MDLKEQPGNTISAGQEDFPSVLLETAASL (配列番号: 101)	30
NM_173073	SLC35C2	RAALVLVLLIAGGLFMFTYK (配列番号: 102)	
NM_130849	SLC39A4	VRMARGGAALGRELSRGAEQGR (配列番号: 103)	
NM_003096	SNRPG	KKLNNGRRHVQGILRGDFPFMNLVIDECVEMATSGQQNNI GMVVIRGNSIIMLEALERV (配列番号: 104)	
NM_014748	SNX17	VGLAPLP (配列番号: 105)	
NM_013403	STRN4	MLLRRRGTPSSPCARTTTAFVPWPSTTASRLCSPPPRTA RSSSGTCRRRSRPRRMRR (配列番号: 106)	
NM_006521	TFE3	RGLQDPCHVVIFFIEGLAAAAANAGPGAGAGEA (配列 番号: 107)	
NM_003299	TRA1	AWTRFAMRA (配列番号: 108)	
NM_176880	TRA16	VHRALRLSTRL (配列番号: 109)	40
NM_173500	TTBK2	GTKTCEAEPGAVVRAVHQQPQEAAGQHRGGTGSSGLGA EKHAGPGGGPQEQTMRMKSTSAQQRMNL (配列番号: 110)	
NM_018299	UBE2W	SCLLVKIFLFILMFIAMVISVYPF (配列番号: 111)	
NM_018206	VPS35	SLIIIKRYGHF (配列番号: 112)	
NM_001006612, NM_001006614	WBP5	A	
NM_017528	WBSCR22	K	
NM_001033518, NM_001033519	WIPI-2	TRYGRCVHCREIVLQQPSGHRQP (配列番号: 113)	
XM_374912	XRRA1	EDRKRGCCPTSSSLPISLRVRLS (配列番号: 114)	

【表 10】

テーブル 2e

受入 ID	遺伝子名	FS ペプチド	比
NM_001033054	AIPL1	HTGVYPILSRSLRQMAQKDPTEWHVHTCGLANMF AYHTLGYEDLDELQKEPQLVFIELLQ (配列番号: 115)	3.00
NM_005787	ALG3	TQRLTGRPTWPR (配列番号: 116)	2.79
NM_001002857	ANXA2	VWMRSPLSTF (配列番号: 117)	4.12
NM_175073	APTX	SLRKRQRTLAWKHTGRERDQATVIL (配列番号: 118)	4.92
NM_005174	ATP5C1	CHQETKVHQKHPENYQVYENGSGSKICPS (配列番 号: 119)	2.62
NM_001003785	ATP5H	IFFFFGIHLGSIFILWHGNLQRIK (配列番号: 120)	2.57
NM_004047	ATP6V0B	GS	2.13
NM_080598	BAT1	GCCFFWWSVYQEG (配列番号: 121)	2.12
NM_013980	BNIP1	SNQASWRKANLTCKIAIDNLEKAELLQGGDLLRQRP PKRAWPRHPVPSLRASWGSAG (配列番号: 122)	5.33
NM_018045	BSDC1	G	2.38
NM_001032363	C1orf151	ESW	4.47
NM_014145	C20orf30	APSCCQATSAGGQTGPFQC (配列番号: 123)	6.25
NM_004649	C21orf33	DPGAPEPWRG (配列番号: 124)	2.31
NM_005768	C3F	AERE (配列番号: 125)	3.00
NM_024051	C7orf24	ARRG (配列番号: 126)	5.00
NM_018491	CBWD1	VIQRLLC (配列番号: 127)	3.04
NM_018246	CCDC25	GKNCDSGEESK (配列番号: 128)	3.00
NM_001782	CD72	RPRG (配列番号: 129)	5.83
NM_006319	CDIPT	AACWTLMDTLLALLIKEPGLGPCWTC (配列番号: 130)	2.11
NM_024300	CHCHD7	CRSCSTF (配列番号: 131)	6.55
NM_001009566	CLSTN1	GERRE (配列番号: 132)	3.79
NM_199442	COPE	RDSIVAELDREMSRSVDVTNTTFLMAASIYLDQNP DAALRALHQGDSLE (配列番号: 133)	3.30
NM_032589	DSCR8	LQTLEIKKVL (配列番号: 134)	7.00
NM_020185	DUSP22	DKTFQRKY (配列番号: 135)	5.00
NM_003845	DYRK4	IPKVFLKI (配列番号: 136)	7.33
NM_001967	EIF4A2	DPKGNSTWRLYGSLSLHWWNKCSK (配列 番号: 137)	5.62
NM_019002	ETAA16	KKFECNFRSYEYRNYL (配列番号: 138)	3.00
NM_032231	FAM96A	VGNLHF (配列番号: 139)	4.26
NM_005687	FARSLB	NI	5.28
NM_001031704	FLJ20211	GCQPDHGAGAWAACVP (配列番号: 140)	2.00
NM_001018677	FNTA	S	2.64
NM_013393	FTSJ2	IPALLASCLG (配列番号: 141)	2.22
NM_203504	G3BP2	EL	2.82
NM_004127	GPS1	SCRTHPTPSLRAAWSPQPWTRPGWRPRGRRRC (配列番号: 142)	6.31
NM_012203	GRHPR	AVRWSSGTRMSPSLPRS (配列番号: 143)	17.27
NM_147149	GSTM4	LPYLIDGAHKITQSNAILCYIARKHNLCGETEEEEKIRV DILENQAMDVSNQLARVCYSPDFEKL (配列番号: 144)	2.41
NM_000853	GSTT1	VWPSCST (配列番号: 145)	6.32
NM_145871	GSTZ1	LAIIYELEMRPTPRLLPQDPKCRASVRMISDLIAGGI QPLQ (配列番号: 146)	7.31
NM_000858	GUK1	GR	2.68
NM_000187	HGD	GTA	3.33
NM_003537	HIST1H3B	RW	2.15

【表 1 1】

NM_001002032	HN1	GEGDIHENVDTDLPGLGQSEEKPVPAAPVPSVPVAP APVPSRRNPPGGKSSLVLG (配列番号: 147)	45.29	
NM_144733	HNRPUL1	MPWTILPGRNSTIPKSSNKTSQATRGDHWKWS SRPIVQK (配列番号: 148)	2.40	
NM_016371	HSD17B7	MIKKWLYVICVEDHVSEIRLYISKWDHA (配列番 号: 149)	2.77	
NM_144981	IMMP1L	CQWVMFG (配列番号: 150)	2.00	
NM_024710	ISOC2	EHDGPPRPGAAGPCGGGRLLLTQPGGPAGGSGP HETEWCLPLHQRRRAHSAACGRCRPPPVGDPETH QGAPRQRRTAGPLRPELPPPL (配列番号: 151)	8.85	
NM_005886	KATNB1	A	3.50	10
XM_371877	KIAA0960	RKAQRYTGQ (配列番号: 152)	5.00	
NM_138787	LOC119710	DLLLLPGVEQDVSTSIPIPCIPFVAQPPTCEVKPKPS VKRMDKQTEELGDEVQLFSLDEEFDYDNVMLTSKF SPAIEINIKELCKQQRKDTSPDLEKSCD (配列 番号: 153)	5.25	
XM_059341	LOC129293	GSSLL (配列番号: 154)	2.50	
NM_001031744	LOC158160	MIKKWLYVICVEDHVSEIRPYISKWDHA (配列 番号: 155)	3.64	
NM_174928	LOC221143	VPSWKNRQNSLE (配列番号: 156)	4.44	
XM_290671	LOC339047	CKTWHSWV (配列番号: 157)	4.36	
NM_001005920	LOC339123	VSACPSVPGHSRPCWARPLSPLPAPAEVPGPVLPR QVAGFVWQSGPAEHRQHLLLPQSGLALPGVCGA AAAPPGPLPGQ (配列番号: 158)	6.67	20
XM_292085	LOC341457	MPSTASPWAASPLSCLQTSFQRQQETFML (配列 番号: 159)	7.66	
XM_495885	LOC440055	YVYQSQYCGFLQPEQNCHPREEGMEFMVLAQKF (配列番号: 160)	6.32	
XM_352159	LOC440341	CKTWHSWV (配列番号: 161)	2.55	
NM_002446	MAP3K10	RMLGPRPPRAARFR (配列番号: 162)	4.80	
NM_181514	MRPL21	G	2.86	
NM_145330	MRPL33	KNILVRMVSEAGTGFCFNTKRNRLREKLTLLHYDPV VKQRVLFVEKKIRSL (配列番号: 163)	17.50	
NM_012333	MYCBP	SVGSLI (配列番号: 164)	3.78	
NM_012225	NUBP2	R	7.14	
NM_000430	PAFAH1B1	MKN	2.17	30
NM_001003891	PCQAP	RGCHEESWCGTQ (配列番号: 165)	5.60	
NM_020992	PDLIM1	I	2.77	
NM_002677	PMP2	EVGVGLPPGKWLAWPNLT (配列番号: 166)	4.50	
NM_174930	PMS2L5	LFQL (配列番号: 167)	2.12	
NM_006243	PPP2R5A	KLYCSF (配列番号: 168)	2.00	
NM_180977	PPP2R5D	LFLIH (配列番号: 169)	3.11	
NM_002720	PPP4C	RCAATSMDNSMTSKSCSE (配列番号: 170)	3.81	
NM_032864	PRPF38A	RNAMY (配列番号: 171)	4.44	
NM_002767	PRPSAP2	ENKSTNSRVCEGKRCFHHPNCFEGREHHHGGAPD HGVCN (配列番号: 172)	7.38	
NM_021222	PRUNE	K	2.77	
NM_003579	RAD54L	DA	2.43	
NM_005493	RANBP9	AKFVSYCGASNTRRSGRCQFWATFRV (配列 番号: 173)	3.00	40
NM_006743	RBM3	VSGWSSDPCGSCRQVCSGNQRRWLWGPWAWWSQ LL (配列番号: 174)	3.81	
NM_181471	RFC2	GH	3.28	
NM_003821	RIPK2	RKLNILMLLGH (配列番号: 175)	4.80	
NM_001016	RPS12	YVYQSQYCGFLQPEQNCHPREEGMEFMVLAQKF (配列番号: 176)	6.21	
NM_007008	RTN4	GFVFAPR (配列番号: 177)	6.68	

## 【表 1 2】

NM_005888	SLC25A3	YSCEFGSAKYALCGFGGVLSCGLTHTAVVPLDLV (配列番号: 178)	2.38	
NM_003136	SRP54	VCY	3.38	
NM_139276	STAT3	FIDAVWK (配列番号: 179)	2.31	
NM_003195	TCEA2	RLSPSVSHSICRRQQFGV (配列番号: 180)	4.00	
NM_144582	TEX261	D	2.14	
NM_005727	TSPAN1	VCETQLHRLMTKSPLAFDTRPWDSQTLTLLWTPLGSG FCLTFPGGGLGQGGHEGLSLPKTQTPVPHSVLLHP PPHLHC (配列番号: 181)	4.91	
NM_018943	TUBA8	MRECISVHVGQAGV (配列番号: 182)	2.85	
NM_145345	UBXD5	EDEVDMLSGCGSEERRSQSLPAMAA (配列番号: 183)	3.67	10
NM_005153	USP10	DKNIRELSLVSMKSLNPVTLCREPPATVFQAH (配 列番号: 184)	2.07	
NM_022170	WBSCR1	GFRDDFLGGRGSRPGDRRTGPPMGSRFRDGPPL RGSNMDFREPTTEERAQRPLQLKPRTVATPLNQV ANPNSAIFGGARPREEVVQKEQE (配列番号: 185)	2.55	
NM_024699	ZFAND1	IFFHLCVMIVQEYF (配列番号: 186)	2.81	
NM_017975	ZWILCH	CPAEIK (配列番号: 187)	4.42	

## 【表 1 3】

## テーブル 2f

受入 ID	遺伝子名	機能	FS ペプチド	
NM_015367	BCL2L13	アポトーシス	QFWCLWFCYDKCFWN (配列番号: 188)	
NM_012145	DTYMK	キナーゼ	IFP	
NM_152255	PSMA7	ETC	RYTQSNRRPFGISALIVGFDFDGTPLRYQT DPSGTYHAWKANAIGRGAKSVREFLEKNYT DEAIETDDLTIKLVIKALLEVVQSGGKNIELAV MRRDQSLKILNPEEIEKYVAEIEKEKEENEKK KQKKAS (配列番号: 189)	
NM_024572	GALNT14	ETC	KYGPSHTPSRSSRRSCACQSSPCSLAPQW FLSFARMEMTDSNGPKLVPTSST (配列番号 : 190)	
NM_003089	SNRP70	ETC	RPGPGP (配列番号: 191)	

20

【表 1 4】

テーブル 2g

受入	定義	オッズ比	FS ペプチド	
XP_060328.1~11	予測された: 60S 酸性と類似	53.19148936	VSELACIYSASFCTTMR	(配列番号: 192)
NP_001772.1~67	GD69 抗原 (p60、初期 T 細胞	48	VQANTHSQCHQTAMFLH	(配列番号: 193)
NP_001022.1~13	リボソームのタンパク質 S28 [ホモ	41.66666667	ALRTGLATRGNATLFL	(配列番号: 194)
XP_060328.1~51	予測された: 60S 酸性 リボソームのタンパク質 P2 と類似	33.65384615	WNSWTTRADPSSAM	(配列番号: 195)
NP_000995.1~62	[ホモ サピエンス]	22.47191011	ATSTLGASSAM	(配列番号: 196)
NP_001025172.1~16	リボソームのタンパク質 S29 アイソフォーム 2	20.69536424	VLASLPVYLLVGL	(配列番号: 197)
XP_497649.1~13	予測された: コフィリンと類似	18.675	VLALVVSQTGTV	(配列番号: 198)
NP_000080.2~1080	アルファ 2 型 I コラーゲン [ホモ	16	VSDGVIKGVQRHEGA	(配列番号: 199)
XP_170597.1~16	予測された: ATP シンターゼ, H+ と類似	14.36538462	VHQGPCWPPWSPWPSWT	(配列番号: 200)
NP_005167.1~74	輸送、マウス 乳房の	14.14285714	SRCKRWL	(配列番号: 201)
NP_001559.1~45	腫瘍 統合 (integration)	13.52173913	WAASPLSCLQTRSQRQQK	(配列番号: 202)
NP_001002032.1~20	血液学および神経学	12.8	IFVL	(配列番号: 203)

【表 1 5】

NP_722550.1~286	レチクロン (reticulon) 4 アイソフォーム B [ホモ	12.5	LQVDVGIYLCWCLV	(配列番号: 204)
NP_001017430.1~47	RNA 結合モチーフ タンパク質 3 カルネキシン前駆体	12.48920863	VLVSSPSPTQSMLQLP	(配列番号: 205)
NP_001737.1~18	[ホモ サピエンス]	11.66666667	MLRLMMDMMMM	(配列番号: 206)
NP_008939.1~112	レチクロン (reticulon) 4 アイソフォーム G [ホモ	10.71428571	LQVDVGIYLCWCLV	(配列番号: 207)
NP_001017430.1~48	RNA 結合モチーフ タンパク質 3	10.70503597	LVSSPSPTQSMLQLP	(配列番号: 208)
NP_954654.1~144	ヌクレオホスミン (nucleophosmin) 1	10.28337875	LEVVARFHRKK	(配列番号: 209)
NP_997001.1~48	アイソフォーム 2 [ホモ 基本転写因子 11H,	10.2	WLMSSRSEWVN	(配列番号: 210)
NP_002801.1~36	プロテアソーム 26S 非ATP アーゼ サブユニット 4	10.11570248	VIQRPAATLRTTWALSHW	(配列番号: 211)
NP_004252.2~93	15 kDa セレノタンパク質 アイソフォーム 1	10.0952381	LMTVKC	(配列番号: 212)
XP_371019.1~12	予測された: リボソームと類似	10	VDENWEGSLKSKLC	(配列番号: 213)

【 0 1 9 5】

f) RNA 発現

図7に、腫瘍細胞におけるノボペプチドのRNA発現レベルと非癌性細胞におけるそれを比較することによる、癌ワクチン構成成分として予測された候補ノボペプチドの有用性の可能性を評価するための方法の実施例が示される。図7aに3つの異なるヒト腫瘍細胞系からのBCL2L13 cDNAのFS変異体の増幅が実証され、正常組織から得られたcDNAにはない。PCRプライマーをそれらがBCL2L13 FS領域に隣接するように設計し、矢印によって示された253bpのFSを増幅した。該図の左半分は、3個の異なるヒト腫瘍cDNA調製の増幅である。図7のレーンラベルは以下のとおりである。レーンM、100bp 分子量マーカー; レーン1、MCF-7 ヒト乳房癌細胞系; SW480 ヒト大腸癌細胞系; DU-145、ヒト前立腺癌細胞系; レーンTA SW480細胞系からのベータアクチン。ゲルの右側: レーンNA、正常大腸からのベータアクチン; レーンNL、正常肺; NB、正常乳房; NC 正常大腸。

## 【 0 1 9 6 】

図7bおよび7cに、さらに、STYXL1およびHNRPU1と称されるフレームシフトした遺伝子からのcDNAの増幅の2個の実施例が示される。該アガロースゲルは腫瘍細胞に存在するが正常肺、乳房および大腸からのcDNAには存在しない、ノボペプチドをコードするフレームシフトを示す。PCRを、7aのように、しかし予測される該フレームシフトに隣接するプライマーにより行った。矢印は各図のFSバンドを示す。レーンは図7aと同一である。

## 【 0 1 9 7 】

定量的PCR測定により、別のフレームシフト変異体、SMC-1の過剰発現が示された。SMC-1遺伝子中のFSに対して特異的なPCRプライマーを用いて、SMC-1 FSの相対発現について、4個の新鮮なヒト膵臓腫瘍サンプルからのcDNAを試験した。SMC-1 FS cDNAのレベルを、同一患者の正常膵臓から増幅したSMC-1 cDNAと比較した。テーブル3により、4個中3個の膵臓腫瘍は該正常野生型配列と比較してFS SMC-1を過剰発現することが示される。

テーブル3

サンプル	相対発現レベル	
	FS	WT
膵臓-C	2.69	0.094
膵臓-E	30.7	0.852
膵臓-F	1.15	0.26
膵臓-G	0.512	0.696

## 【 0 1 9 8 】

g) 質量分析によるノボペプチドの同定およびMHCに表示される可能性があるサブシーケンスの同定

本明細書において、腫瘍細胞によって実際に発現されたノボペプチドを質量分析により同定することができることが示され、そのようにするための方法を開示し、さらにMHCに表示される可能性のあるサブシーケンスを同定するための方法を説明し開示する。ペプチドを、100mMのクエン酸に30秒間、またはリン酸緩衝生理食塩水に4時間に曝露することによって、腫瘍細胞の表面から溶出し、あるいはペプチドを、細胞表面HLA分子から、目的のHLA分子に対する高い親和性を有するビオチン化ペプチドと競争させる。フレームシフトしたペプチド配列のデータベースを、上記のようにバイオインフォマティクスの予測した配列から作成して、LC-MS/MSを使用して、溶出したサンプルに実際に存在するノボペプチドを分析使用によって同定できるようにした。該ペプチド配列データベースを使用して、MCF-7乳房腫瘍細胞HLA-A\*0201、-B\*18/44および-Cw\*05から溶出したペプチドについて、Spectrum Millを用いて、LC-MS/MSから得られたスペクトルを検索した。該HLA型を、目的の腫瘍細胞について上記のように決定した。思いがけなく、FSデータベースのいくつかの配列にマッチした溶出のLC-MS/MS分析から、8-10アミノ酸より長いペプチドを同定した。これらのより長いペプチドをMHCクラスI結合アルゴリズム、BIMASおよびSYFPEITHIを用いて分析し、下記のテーブル4a-4eに示されるように、複数のHLAクラスI分子と結合することができる好ましい9-マー配列を同定した。該アルゴリズムは結合についてのペプチドをスコア化する異なる方法を使用する。該アルゴリズムは相補的であることもあるが、そうでないこともしばしばある。150を超えるBIMAS値および20を超えるSYFPEITHI値は、ペプチドがMHCと細胞内に結合する、および細胞表面に輸送される最高の機会である。

## 【表16】

テーブル4a: MCF-7 腫瘍細胞から溶出された親配列 #1: VIKSLQSWYLRLVI

HLA	SEQ	BIMASS	SYFPEITHI
A*0201	SLQSWYLRL ( 配列番号 : 214)	32	23
A*1101	KSLQSWYLR ( 配列番号 : 215)	.036	21

テーブル4b: MCF-7 腫瘍細胞から溶出された親配列 #2: FLSPMSGLLSTTQGSACTGIHRTS

HLA	SEQ	BIMAS	SYFPEITHI
A*0201	FLSPMSGLL ( 配列番号 : 216)	12.7	23
A*1101	QSACTGIHR ( 配列番号 : 217)	0.008	23
A*6801	QSACTGIHR	45	20

テーブル4c: MCF-7 腫瘍細胞から溶出された親配列 #3: PSPQETEFPGGWRPILDVGKIS

HLA	SEQ	BIMAS	SYFPEITHI
A*0201	GVVRPILDV ( 配列番号 : 218)	13	21
A*0301	VVRPILDVG ( 配列番号 : 219)	0.405	20
B*0702	GPGVVRPIL ( 配列番号 : 220)	120	23
B*2705	VRPILDVGK ( 配列番号 : 221)	2000	23
B*5101	RPILDVGKI ( 配列番号 : 222)	200	24
B*5102	RPILDVGKI	2640	NA

テーブル4d: MCF-7 腫瘍細胞から溶出された親配列 #4: GQDCYRVPVTE

HLA マッチなし			
-----------	--	--	--

テーブル4e: MCF-7 腫瘍細胞から溶出された親配列 #5 : AGLGTKLAAEGLAPN

HLA	SEQ	BIMAS	SYFPEITHI
A*0301	KLAAEGLAP ( 配列番号 : 223)	0.120	23
B*0801	GTKLAAEGL ( 配列番号 : 224)	4.0	22

## 【0199】

関連LC-MS/MS試験として、BCL2L13遺伝子のFSであるとバイオインフォマティクスの予測された9-マーペプチドを、上記の方法を用いるMCF-7乳房腫瘍細胞溶出試験からのLC-MS/MS スペクトルで同定した。このペプチドの配列はCLWFCYDKCであり、該HLA-A\*0201結合モチーフに適合する。

## 【0200】

h) ノボペプチドに対する抗体反応性

特定の腫瘍細胞型に関連するFSデータベースのノボペプチドを同定することができる。該FSデータベースのFS配列にマッチした8-10 アミノ酸より長いペプチド (MHC 溶出について予期されるサイズ) が得られたことが認められた。概して8-10アミノ酸より長いペプチドは抗体についてのエピトープを形成する。防御的または治療的抗体はFSに対してワクチン接種後に生成されうるという現在の教示に従って、異なる腫瘍型を持つ患者から採取した血清を、予測されたノボペプチドとの反応性について標準的なELISA法よりアッセイした。図8にFSペプチド配列に対する血清中の抗体反応性を有する23中1名の癌患者が示される。この知見は該ノボペプチドによるワクチン接種における抗腫瘍抗体応答を誘発するノボペプチドを明らかにする。反応性の血清は矢印より示される。

## 【0201】

i) CTLを介する免疫学的スクリーニング

図9に予測されたノボペプチドの有望な免疫保護性をCTLアッセイを介する免疫学的スクリーニングによりアッセイすることができることが示され、それをするための1つの方法が開示される。四角印で示されるように、上記のノボペプチド6-21に対して活性化されたCTLは6-21ペプチドをパルスしたMHC一致腫瘍細胞を殺すことができたが、パルスしなかったSW480腫瘍細胞ではなかった。SW480腫瘍細胞は6-21ノボペプチドを内因的に発現しないため、該細胞はペプチドパルシングを必要とした。これは、当該技術分野の当業者がする

ことができるであろう標準的な<sup>51</sup>Cr遊離アッセイである。

【0202】

j) 抗体応答

予測されたノボペプチドは、遺伝子ワクチン接種による強い抗体応答を誘発する。この応答のアッセイのための方法が示される。マウスを、6-21ノボペプチドをコードする遺伝子ワクチンで上記のように免疫化した。血清を該マウスから入手し、B16腫瘍細胞と共にインキュベートした。ノボペプチド6-21に対して特異的な抗体は、特異的にB16マウス腫瘍細胞を結合したが、免疫前血清は結合しなかったことが示された。

【0203】

k) 治療的保護

ノボペプチドはまた治療的および予防的保護を与えることができる。マウスに該B16腫瘍細胞を注入し、ついで1日後に遺伝子ワクチンとして該1-78+6-21ノボペプチドで免疫化した。図11に示されるように、両ペプチドを受けた該動物は、該コントロール動物と比較して保護されたが、この保護は、より低い生存率により示されるように(該マウスの3分の1が生存した(三角印)、図6に示される予防的免疫化の80%生存と比較して)、予防的ワクチン接種のように強くない。

【0204】

1) 腫瘍細胞のHLA-分類

該標的集団であまり表されない1個または少数のHLA型でのみ表示されることが出来る候補ノボペプチドは、該標的集団のより大きい部分で共有される複数のHLA型に表示されることが出来るそれらに比べて、あまり好ましくない。ここで、目的の腫瘍標的をHLA分類し、結果はテーブル5に示されるとおりであり、その後、バイオインフォマティクスの同定した候補ノボペプチドを、MHCクラスI結合アルゴリズム、BIMASおよびSYFPEITHIを用いてスクリーニングして、該目的の該腫瘍に存在するMHC型上に最も表示されることが出来る該ノボペプチド配列を決定することができる。上記のLC-MS/MS同定およびシーケンシングのために、この情報を使用して該HLA型を決定した。

テーブル5: ヒト腫瘍細胞系のMHCクラスI 同一性

腫瘍細胞系	組織学的タイプ	HLA型
MCF-7	乳房(上皮腺癌(adenocarcinoma))	A*02/02、B*18/44、Cw*05/05
SW480	大腸(腺癌)	A*02/24、B*07/15、Cw*07/07
A549	肺(癌)	A*25/30、B*18/44、Cw*12/16
Panc-1	膵臓(類上皮癌)	A*02/11、B*38/38、Cw*12/12
DU-145	前立腺(癌)	A*03/33、B*50/57、Cw*06/06

2. 実施例2

【0205】

該公共のデータベースで同定されたヒトおよびマウスの全腫瘍で生じたノボペプチド関連ミューテーションを同定した。これはフレームシフト含み、および該フレームシフトした遺伝子は該SMC1遺伝子をコードし、正常野生型配列: NGSKSNVMDALSFVMGEKIAN (配列番号: 7)と比較して、該配列NGSGCSGVYCHEEPQGEDSSV (配列番号: 8)を有する。ヒト癌cDNA配列の正常組織と比較したインフォマティクス分析により、該フレームシフトが認められた。公共のデータベースを使用した。該SMC1遺伝子のホモログにおいて、該同一FSの存在をマウス乳房およびメラノーマ腫瘍系において、これらの腫瘍系からのcDNAのシーケンシングによって決定した。該FSの存在について、31のヒト腫瘍ライブラリーを試験した。配列決定された全30において、SMC1における該FSは、全ての肺、乳房およびメラノーマサンプルに現れるが正常サンプルにはないとして同定された。この相関関係は、このミューテーションが発癌性であることを示す。このフレームシフトミューテーションは、単独でまたは組み合わせて、治療的または予防的な癌に対するワクチンの構成成分または全部として使用することができる。それはまた、初期の癌を検出するために診断的に用いること

10

20

30

40

50

ができる。このミューテーションは新しい抗癌剤標的である癌遺伝子を作り出す。該FSを該マウス腫瘍モデルにおけるワクチンとしての治療的価値について試験した。該B16メラノーマ系をマウスに接種した。1日後、該マウスを該FSをコードする遺伝子ワクチンでワクチン接種した。治療的効果は認められなかった。しかしながら、該17aa FSは、マウスB16 MHCクラスI分子 (MHCI) との結合は乏しいと予測される。従って、エピトープ-強化変異体を、MHCI結合の改善のために公共のプログラムに基づいて作成した。これらのマウスが治療的にワクチン接種されたとき、好ましい効果があった。従って、該FSはヒトおよびマウス腫瘍に特異的に存在し、エピトープがマウスについて強化されたときは、治療的である。エピトープ強化はヒト腫瘍に必須でない。

【0206】

本明細書で開示するワクチン構成成分を製造するための方法の実施例は、下記の通りである：

(a) 該NCIデータベースおよび/またはCancer Genome Atlasからのデータを検索し、分析して、腫瘍の該cDNA (RNA)において、または腫瘍の該ゲノムDNAにおいて、正常配列のcDNA (RNA)またはDNAでは希であるかまたは存在しない変異体を検出する。

(b) cDNA中の変異体またはDNA中のミューテーションの存在を、腫瘍細胞および正常細胞の該cDNAまたは該DNAのシーケンシング、および該2つの比較により確認する。腫瘍および正常細胞cDNAおよびDNAのパネルを使用して、正常細胞中に対する腫瘍中での該ミューテーションまたはパリエーションの頻度の最初の見積もりを得る。

(c) RNAを腫瘍および正常細胞から抽出し、該ノボペプチドをコードする該RNAに対する該正常メッセンジャーRNAの相対発現をPCRにより測定する。該DNAで認められたミューテーションについては、そのミューテーションのmRNAが該腫瘍に存在しない場合、該対応するノボペプチドは追跡しない。RNA中の変異体については、該変異体RNAが、腫瘍中で正常細胞とほとんど同一のレベルで存在する場合、該対応するノボペプチドは追跡しない。

(d) この時点で残っている候補を、該腫瘍細胞の表面上のノボペプチドとして存在するが正常細胞ではないことについて、質量分析によりスクリーニングする。好ましくは、酸溶出または該培地 (medium) を集めるためのバッファー中でのインキュベーションによりペプチドを溶出することである。該MHCIを結合しているペプチドは、より特異的なプロトコルにより溶出することができる一方、これらは該ワクチンにより生成された抗腫瘍抗体の標的でありうる非MHCI ペプチドを失いうる。該質量分析からのクロマトグラフを本明細書に記載する可能性あるフレームシフトノボペプチドの該独自のデータベースと比較する。候補ノボペプチドを質量分析シーケンシングより確認する。9アミノ酸より長いノボペプチドを発見した場合は、該MHCI溶出ペプチドを、該特定の腫瘍細胞の該HLAを結合すると予測されるネステッドペプチド配列の存在について、特に分析する。

(e) 該候補ノボペプチド配列またはそのネステッドサブシーケンスを予測されたヒトMHCI分子への結合についてスクリーニングする。共通のMHCIに堅固に結合すると予測されたそれらは、希なMHCIに弱く結合するまたは強く結合すると予測されたそれらと比べて、相対的により高いスコアを受ける。

(f) 相対的に高スコアを受けたそれらのペプチドについて、マウス腫瘍細胞を、該ノボペプチドをコードする該RNAの存在についてのPCRまたはシーケンシングにより、アクセスする。マウス腫瘍に存在する場合、マウスを該ノボペプチドでワクチン接種し、腫瘍細胞で曝露し、該ペプチドが保護的であるかどうかを決定する。

(g) 並行して、該高スコア化の候補を、ヒト腫瘍におけるそれらの存在についてスクリーニングする。多くの同一の型の腫瘍ならびに多くの異なる腫瘍を、RNAのPCRまたはシーケンシングによってスクリーニングし、患者における全体的な頻度を決定した。並行して、多くの細胞型および多くの正常対象からの細胞型を、RNAをコードする該ノボペプチドの存在について、同一の方法で、スクリーニングした。正常RNAにおいて大変希であるか、または大変低レベルであり、かつ、1つの型の腫瘍の少なくとも10%において、または全ての腫瘍型の10%において、高レベルで存在するノボペプチド変異体は該最終スクリーニングに進む。

10

20

30

40

50

(h) 最後のスクリーニング定義は、該候補が予防的ワクチンに有用かどうかを決定することである。ヒト対象のワクチンテストが許可されまたは妥当となる前に、この工程はほとんど確実に必要とされる。該最初のスクリーニングはT細胞反応性についてである。該関連性あるMHC Iを持つヒトからのT細胞は該試験ノボペプチドにより活性化される。そのようなT細胞集団を作成したら、それらを該対応するMHC I型を有するヒト腫瘍細胞と反応させる。これらの腫瘍細胞が殺されるかまたは増殖が阻害されたとき、それは、これらの腫瘍細胞は該ノボペプチドを提示していて、該ワクチンの影響を受けやすいことを確認する。この同一のT細胞プレパレーションをまた、該同一のMHC Iの正常細胞のパネルに対して反応させる。該ノボペプチド活性化したT細胞によりこれらの細胞が殺されずまたは増殖を阻害されなかったときは、それは、このノボペプチドが癌ワクチンのための検証された候補であることを確認する。

10

(i) 抗体スクリーニングについて、該方法はより簡便である。抗体は、該試験ノボペプチドに対して生成されるであろう。この抗体を腫瘍細胞に対して反応させ、それが該表面に結合するかどうか決定する。それが結合したならば、これは、該腫瘍が該抗体の影響を受け易いことを示す。上記の通り、該同一の抗体はヒト正常細胞のパネルに対して反応されるであろう。抗体特異結合を誘発するノボペプチドは予防的癌ワクチンの構成成分として検証される。

【 0 2 0 7 】

#### M. 引用文献

Berzofsky, J., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I., Ahlers, J., Janik, J. & Morris, J. (2004) Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.*:113, pp. 1515-1525

20

Gite, S., Lim, M., Carlson, R., Olejnik, J., Zehnauer, B. & Rothschild, K. (2003) A high-throughput nonisotopic protein truncation test. *Nature Biotechnology* : 21, pp. 194-197

Kerr, C. (2002) Huntington's disease provides cancer clues. *The Lancet. Oncology* : 3, 518

30

Leaf, C. (2004) Why we're losing the war on cancer. *Fortune*: 149, p. 76

Lewis, J. (2004) Therapeutic cancer vaccines: using unique antigens. *PNAS*: August 2004, 1-4

Linnebacher, M., Gebert, J., Rudy, W., Woerner, S., Yuan, Y., Bork, P. & von Knobel Doeberitz, M. (2001) Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer*. 93, 6-11

Saeterdal, I., Bjorheim, J., Lislud, K., Gjertsen, M., Bukholm, I., Olsen, O., Nesland, J., Eriksen, J., Moller, M., Lindblom, A., & Gaudernack, G. (2001) Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *PNAS*: 98, 13255-13260

40

Sorensen, S. A., Fenger, K. & Olsen, J. (1999) Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease. *Cancer*: 86, 1342-1346

Sykes, K. F., and S. A. Johnston. (1999) Linear expression elements: a rapid, in vivo, method to screen for gene functions. *Nat Biotechnol* 17:355.

50

Wang, R., Parkhurst, M., Kawakami, Y., Robbins, P. & Rosenberg, S. A. (1996) Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *The Journal of Experimental Medicine*: 183, 1131-1140  
【0208】

図面の簡単な説明

添付の図面は組み込まれ本明細書の一部を構成し、いくつかの実施態様を説明し、そしてその説明と共に開示された組成物および方法を説明する。

【図面の簡単な説明】

【0209】

【図1】図1はマウスメラノーマモデル B16F10を用いた腫瘍細胞におけるフレームシフト頻度を決定する方法を示す。A. cDNAを、培養細胞からのRNAより生成した。それを、RT-PCRシーケンシングによって直接的に配列決定した。B. インビトロ由来FSミューテイションのインビボ確認。該FSがインビボで発現したことを確認するために、細胞全身の注入の後、B16肺転移からRNAを抽出した。cDNAを生成して、該FSをRT-PCRシーケンシングにより確認した。

10

【0210】

【図2】図2aおよび2bはそれぞれ、FS1-78およびFS6-21のPCR増幅を示す。矢印はFSバンドを表す；他のバンドは野生型アレルである。レーン1：B16/F1 腫瘍細胞；レーン2：B16/F10 腫瘍細胞；レーン3：正常心臓；レーン4：正常腸；レーン5：正常腎臓；レーン6：正常肝臓；レーン7：正常肺；レーン8：正常骨格筋；レーン9：正常皮膚；レーン10：正常脾臓；レーンM：分子量マーカー。

20

【0211】

【図3】図3は直鎖発現エレメント (linear expression element) 作成 (LEE) を示す。各LEEは哺乳類のプロモーター (青)、良好な細胞内プロセッシングのためのユビキチン遺伝子 (黄色) を含むフラグメント、転写および翻訳のターミネーターを含むフラグメント (赤) からなる。該2つのフラグメントはフレームシフト配列 (緑) を介して結合する。

【0212】

【図4】図4は、C57B6マウスのFS 1-78 ネオペプチドによる予防的免疫化がB16F10腫瘍増殖を遅らせることを示す。C57B6マウスを、該増加量のLEE発現FS 1-78 ペプチドおよびpGM-CSF (1 µg) で免疫化した。一次免疫化したマウスを2週間後に追加免疫した。該追加免疫1週間後、マウスを0日 (矢印) に、 $1 \times 10^5$  B16F10メラノーマ腫瘍細胞で曝露した。

30

【0213】

【図5】図5は、Balb/c マウスのFS 1-78 ネオペプチドによる予防的免疫化は、4T1腫瘍増殖を遅らせることを示す。Balb/c マウスをFS 1-78 LEE (3.2ng) + pGM-CSF (1 µg) で免疫化し、2週間後に同一の遺伝子ワクチンで追加免疫した。該追加免疫1週間後、マウスを $5 \times 10^4$  4T1乳房腫瘍細胞で曝露した。4T1曝露17日後に、腫瘍は増殖を始めた。コントロールはpGM-CSF プラスミド単独である。6-21-Mutは、4T1腫瘍では認められない別のフレームシフトである。

【0214】

【図6】図6はフレームシフトペプチド-コード遺伝子ワクチンでの予防的ワクチン接種に対する応答の該生存率曲線を示す。8日に、マウスを、FS6-21mut ペプチド配列 (四角)、FS1-78mut ペプチド配列 (十字)、両者の組み合わせ (三角)、または無関係なペプチド配列 (菱形) で免疫化した。腫瘍細胞を0日に注入した。

40

【0215】

【図7】図7a、7bおよび7cは、予測された候補ノボペプチドの癌ワクチン構成成分としての見込みある有用性を評価するための方法の実施例を示し、これは、腫瘍細胞における該ノボペプチドのRNA発現レベルと非癌性細胞におけるそれとを比較することによる。図7aは3個の異なるヒト腫瘍細胞系からのBCL2L13 cDNAにおけるFSの増幅を示し、これは正常組織から得られたcDNAにはない。PCRプライマーをそれらが該BCL2L13 FS領域に隣接して、該矢印より示される253bpのFSを増幅するように設計した。該図の左半分は、3個の異なる

50

るヒト腫瘍cDNA調製の増幅である。図7中のレーンラベルは以下のとおりである。レーンM、100bp 分子量マーカー；レーン1、MCF-7 ヒト乳房癌細胞系；SW480 ヒト大腸癌細胞系；DU-145、ヒト前立腺癌細胞系；レーンTA SW480 細胞系からのベータアクチン。ゲルの右側：レーンNA、正常大腸からのベータアクチン；レーンNL、正常肺；NB、正常乳房；NC 正常大腸。図7bおよび7cは更に2つの実施例、STYXL1およびHNRPUL1と称されるフレームシフトした遺伝子からのcDNAの増幅を示す。該アガロースゲルは、ノボペプチドをコードするフレームシフトは腫瘍細胞に存在するが、正常肺、乳房および大腸からのcDNAには存在しないことを示す。7aと同様にPCRを行ったが、予測されるフレームシフトに隣接するプライマーを伴った。矢印は各図中の該FSバンドを示す。レーンは図7aと同一である。

【0216】

【図8】図8は、ワクチン接種後にFSに対する防御的または治療的抗体が作られうることを示し、異なる腫瘍型を持つ患者から採取した血清を予測されたノボペプチドとの反応性について標準的なELISA法によりアッセイした。図8の棒グラフは、血清中にFSノボペプチド配列に対する抗体反応性を持つ23の内の1人の癌患者を示す。反応性の血清が矢印によって示される。

【0217】

【図9】図9は予測されたノボペプチドの有望な免疫保護を、CTLアッセイを介する免疫学的スクリーニングにより、アッセイすることができることを示し、およびそのようにするための1つの方法を開示する。上記のノボペプチド6-21に対して活性化されたCTLは、6-21ノボペプチドでパルスされたMHC一致腫瘍細胞を殺すことができたが、該四角印で示されるように、パルスされなかったSW480 腫瘍細胞を殺さなかった。SW480 腫瘍細胞は6-21ノボペプチドを内因的に発現しないため、該細胞はペプチドパルシングを必要とした。

【0218】

【図10】図10は免疫蛍光法を示し、これは、B16腫瘍系は該FS6-21mutおよびFSI-78mut フレームシフトペプチドを提示していて、4T1乳房腫瘍系は該1-78 ペプチドを提示していることを示す。

【0219】

【図11】図11は、フレームシフトペプチド-コード配列による治療的ワクチン接種に対する応答の動物生存率曲線を示す。0日に、マウスに $10^5$ 腫瘍細胞を注入した。1日後、マウスを、FS6-21mutペプチド配列(四角)、FSI-78mut ペプチド配列(十字)、両者の組み合わせ(三角)または無関係なペプチド配列(菱形)でワクチン接種した。

【0220】

【図12】図12aおよび12bは、SMC-1におけるフレームシフトミューテーションまたはバリエーションに関連するノボペプチドで治療的ワクチン接種を受けているマウスにおける腫瘍攻撃後にわたる、腫瘍進行および生存を示す。

10

20

30

【 図 1 a 】

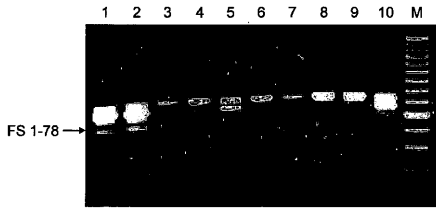


FIG.1a

【 図 1 b 】

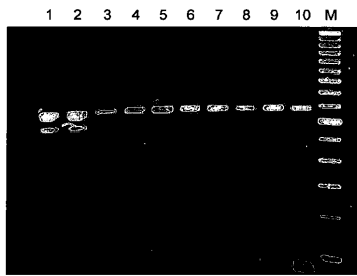


FIG.1b

【 図 2 】

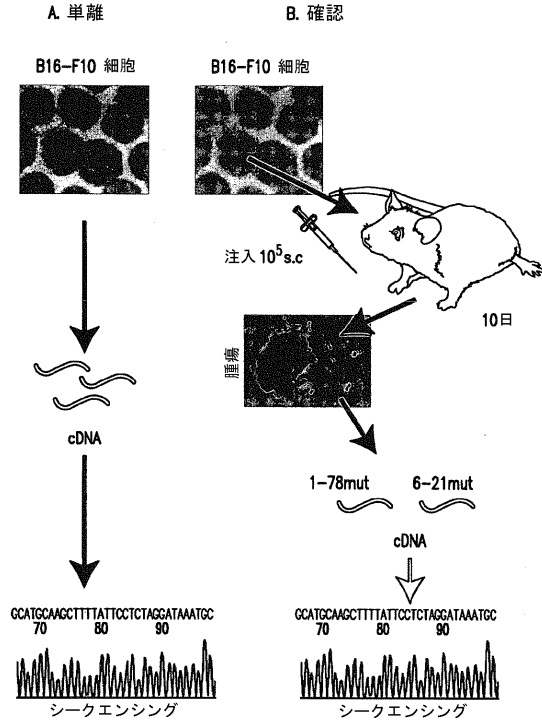


FIG.2

【 図 3 】

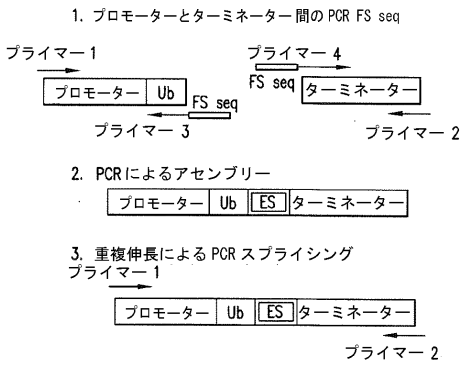


FIG.3

【 図 4 】

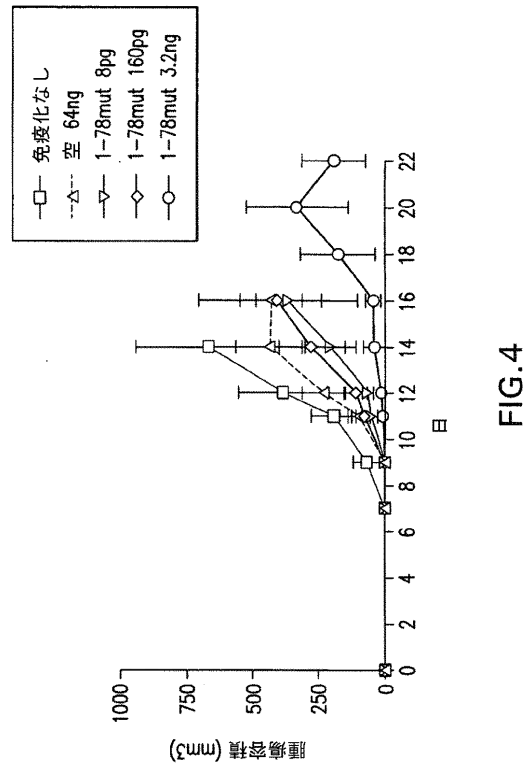


FIG.4

【 図 5 】

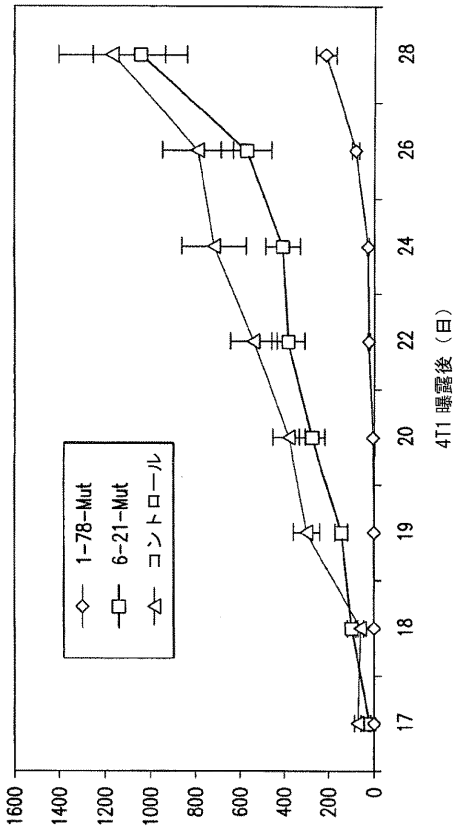


FIG.5

【 図 6 】

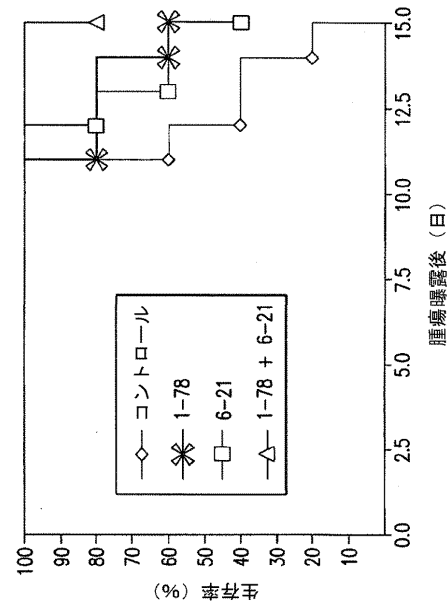


FIG.6

【 図 7 a 】

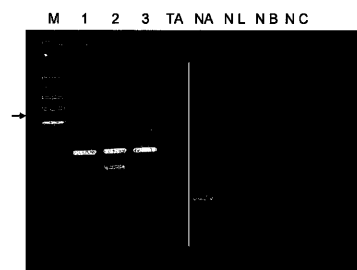


FIG.7a

【 図 7 c 】

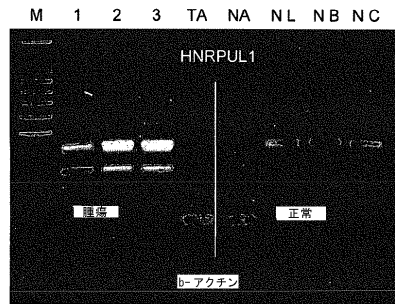


FIG.7c

【 図 7 b 】

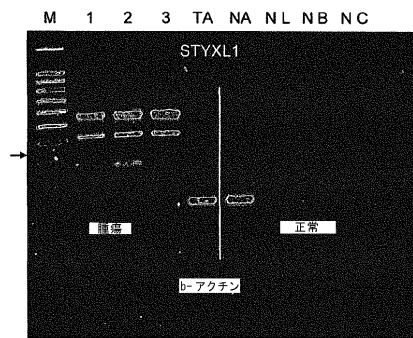


FIG.7b

【 図 8 】

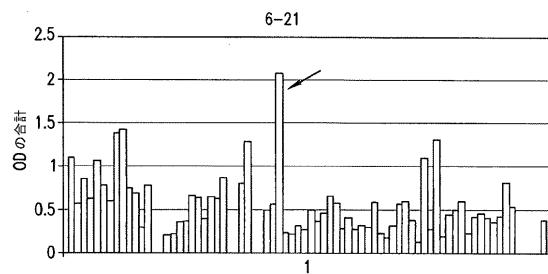


FIG.8

【 図 9 】

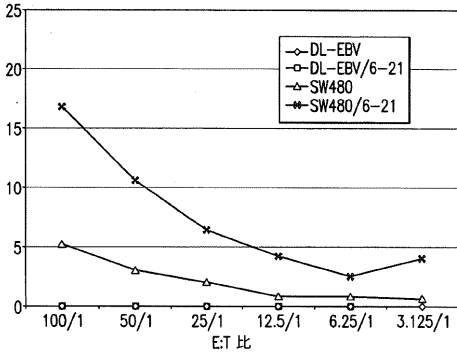


FIG.9

【 図 10 】

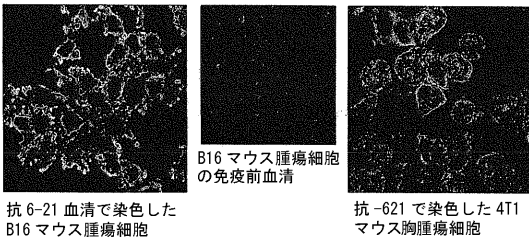
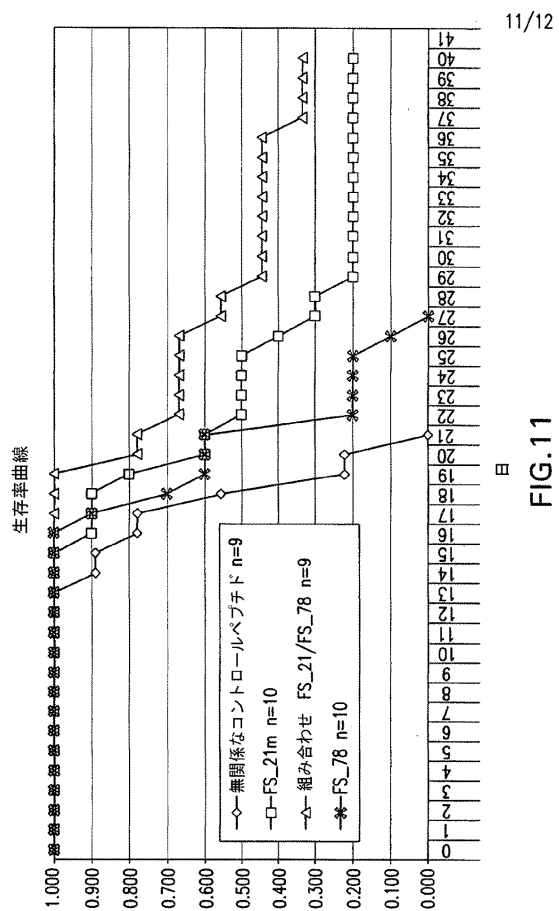


FIG.10

【 図 11 】



11/12

FIG.11

【 図 12 a 】

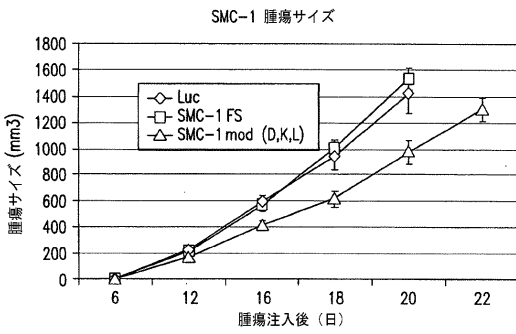


FIG.12a

【 図 12 b 】

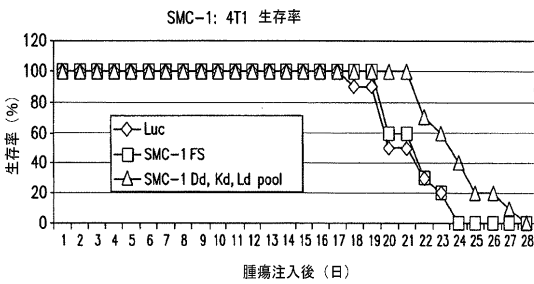


FIG.12b

【手続補正書】

【提出日】平成20年10月27日(2008.10.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2009532664000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/62920

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00; C12Q 1/68 (2008.04) USPC - 424/185.1; 435/6 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) USPC - 424/185.1; 435/6  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) WEST, Google Scholar: "tumor associated antigen," detection, MALDI-TOF, cancer, genome, expression databases, "cancer genome databases", "cancer expression databases"		
<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 -- Y	US 2005/0244421 A1 (STRITTMATTER et al) 3 Nov 2005 (03.11.2005); para [0002], [0042], [0059], [0074], [0087], [0101], [0277], [0288], [0303], [0304], [0308]	1, 3, 5-11 and 13 ----- 2, 4 and 12
Y	SCHULTZE et al. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. TRENDS In Immunology Sep 2001, 22(9):518-523; Abstract, pg 518, Box 1, col 2, ln 2-6; p 519, Fig 2	2 and 4
Y	US 5,601,989 A (CHEEVER et al) 31 May 1997 (31.05.1997); col 3, ln 45-50; col 7, ln 29-42; col 17, ln 55-61	12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 10 April 2008 (10.04.2008)		Date of mailing of the international search report <b>16 MAY 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/62920

**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.:  
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:
  
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:

This PCT application (PCT/US2007/62920) contains the following inventions or group of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under the PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional fees must be paid.

Group I: Claims 1-13 drawn to a method of identifying a novo-peptide that produce an anti-cancer immune response.

Group II: Claims 19-22 drawn to a method of identifying a novo-peptide that induces a protective immune response to a cancer.

Group III: Claims 23 and 65 drawn to a method of screening for a tumor specific antigen.

Group IV: Claims 28, 34-42 drawn to a product vaccine for a cancer and the method of treating and preventing a cancer comprising administration of that vaccine.

Species I: Claim 29 drawn to a novo-peptide comprises the sequence set forth in SEQ ID No.2.

Species II: Claim 30 drawn to a novo-peptide comprises the sequence set forth in SEQ ID No.4.

Species III: Claim 31 drawn to a novo-peptide comprises the sequence set forth in SEQ ID No.8.

Species IV: Claims 32-33 drawn to a novo-peptide comprises a frame-shift of the SMCI gene comprising SEQ ID No. 8.

-----continued in 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:  
1-13

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	A	4 C 0 8 5
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D	
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/15	Z	
<b>G 0 1 N 27/62 (2006.01)</b>	G 0 1 N	27/62	V	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, 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

(74) 代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(72) 発明者 スティーブン・エイ・ジョンストン

アメリカ合衆国 8 5 2 8 4 アリゾナ州テンペ、サウス・ドーシー・レイン 8 6 0 6 番

(72) 発明者 ダグ・レイク

アメリカ合衆国 8 5 2 0 5 アリゾナ州メーサ、イースト・フォックス・サークル 3 9 3 0 番

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA12 LA08

2G045 AA35 CB02 DA13 DA36 FB03 JA01

4B024 AA12 CA04 CA20 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ52 QR08 QR62 QS25 QS34

4C084 AA02 AA03 AA13 BA35 MA66 NA14 ZB092 ZB262

4C085 AA03 BB01 BB11 CC21 EE01 GG04

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009532664A5</a>	公开(公告)日	2010-07-08
申请号	JP2008557475	申请日	2007-02-27
申请(专利权)人(译)	亚利桑那州局摄政四和上Bihafu中亚利桑那州立大学		
[标]发明人	スティーブンエイジョンストン ダグレイク		
发明人	スティーブン・エイ・ジョンストン ダグ・レイク		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/50 A61K48/00 A61P35/00 A61K39/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/15 G01N27/62 C12N15/09		
CPC分类号	C07K19/00 A61K39/0011 C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/136 G01N33/5011 G01N33/5047		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/50.ZNA.Z A61K48/00 A61P35/00 A61K39/00.H C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N27/62.V C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G041/LA08 2G045/AA35 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/JA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA35 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/GG04		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	60/777534 2006-02-27 US		
其他公开文献	JP2009532664A		

#### 摘要(译)

公开了通过在先前未鉴定为致癌的癌基因中存在移码突变而鉴定的新肽的组合物。所公开的肽可用于所公开的治疗癌症的方法中。