(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年7 月27 日 (27.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/077941 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *C12N 5/06* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/300764

(22) 国際出願日: 2006 年1 月19 日 (19.01.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-012092 2005 年1 月19 日 (19.01.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田２丁目１５番４５号 Tokyo (JP). 株式会社ＧＢＳ研究所 (INSTITUTE OF GENE AND BRAIN SCIENCE) [JP/JP]; 〒1600015 東京都新宿区大京町２３番地３ 四谷オーキッドビル４階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 戸田 正博 (TODA, Masahiro) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 植田 良 (UEDA, Ryo) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 塚田 晃三 (TSUKADA, Kozo) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 一色国際特許業務法人 (ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋２丁目１２番７号 労金新橋ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** CANCER VACCINE

(54) 発明の名称: 癌ワクチン

(57) **Abstract:** Tumor immunity can be efficiently induced by administering tumor patients, as a vaccine, a partial peptide of SOX6 having any of SEQ ID NOS: 1 to 3, or antigen presenting cells, such as dendritic cells presenting an antigen derived from the peptide, or cytotoxic T cells having been stimulated by the antigen presenting cells.

(57) 要約: 配列番号１～３のいずれかを有するＳＯＸ６の部分ペプチドや、そのペプチド由来の抗原を提示した樹状細胞などの抗原提示細胞や、この抗原提示細胞によって刺激された細胞障害性Ｔ細胞をワクチンとして、腫瘍患者に投与することにより、腫瘍免疫を効率的に誘導できる。

WO 2006/077941 A1

明 細 書

癌ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、癌ワクチンに関する。

背景技術

[0002] 近年、腫瘍免疫学において、免疫細胞による腫瘍抗原認識機構がかなり解明されてきた。それによると、まず、抗原提示細胞である樹状細胞(dendritic cells またはDC)は、細胞内で、腫瘍が発現するタンパク質を分解する際に生じた8～10個のアミノ酸からなる抗原ペプチドを、主要組織適合性抗原複合体(major histocompatibility complex またはMHC;ヒトでは、human leukocyte antigen またはHLA)と共に細胞表面に提示する。細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte またはCTL)は、樹状細胞表面のHLAクラスIに結合した抗原ペプチドを認識し、活性化・増殖し、腫瘍内に侵入し、抗原ペプチドが由来するタンパク質を有する腫瘍細胞に対し細胞障害を生じる(Arch.Surg. (1990) 126: 200～205)。

[0003] この機構を利用して、腫瘍の治療方法として癌ワクチンが開発されてきた。例えば、腫瘍特異的タンパク質由来の抗原ペプチドを細胞表面に提示する樹状細胞をin vitroで作製し、増殖させ、腫瘍患者に投与したり、その樹状細胞によって教育された細胞障害性T細胞を投与したりすることにより、腫瘍患者の体内で腫瘍免疫を誘導させる。あるいは、腫瘍特異的タンパク質を腫瘍患者に投与し、患者の体内で、腫瘍免疫機構の全過程を誘導させるのである(Science (1991) 254: 1643－1647; Exp.Med. (1996) 183: 1185－1192; J.Immunol. (1999) 163: 4994－5004; Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1995) 92: 432－436; Science (1995) 269: 1281－1284; J.Exp.Med. (1997) 186: 785－793)。

[0004] メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン－2を静脈内投与することにより、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている(Nature Medicine (1998) 4: 321)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、腫瘍免疫を効率的に誘導することのできる腫瘍特異的タンパク質は、一部の腫瘍において、ほんの少数の例が知られているだけである。

[0006] そこで、本発明は、腫瘍免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激されたT細胞、およびこれらのペプチドや細胞を利用した癌ワクチン、及びそれらを用いた腫瘍患者の治療方法を提供することを目的としてなされた。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、転写因子であるSOX6が、グリオーマに発現していることを既に見いだしていたが(Ueda et al., Oncogene 23, 1420-1427, 2004)、他の腫瘍においても発現していることを見出した(実施例2参照)。この知見に基づき、SOX6の様々な部分ペプチドに対し、HLAクラスI拘束性に細胞障害性T細胞に認識されるかどうか調べたところ、樹状細胞に添加したとき、効率よく細胞障害性T細胞によって認識されるいくつかの部分ペプチドを同定することができ、本発明の完成に至った。

[0008] 本発明にかかるペプチドは、配列番号1～3のいずれかの配列を有する。これらのペプチドを提示した抗原提示細胞、及びこの抗原提示細胞によって誘導され、SOX6を発現する細胞を認識するT細胞も、本発明の技術的範囲に属する。このT細胞は細胞障害性T細胞であることが好ましく、SOX6を発現する細胞は、グリオーマ、肝癌細胞、肺癌細胞、膵癌細胞、食道癌細胞、メラノーマ細胞、前立腺癌細胞、乳癌細胞、腎癌細胞、または白血病細胞であることが好ましい。

[0009] さらに、本発明にかかる癌ワクチンは、配列番号1～3から選択される一つ以上のペプチド、上記抗原提示細胞、上記T細胞のうち、少なくとも一つを含有する。この癌ワクチンは、SOX6を発現する癌細胞に対する癌ワクチンであり、特に細胞グリオーマ、肝癌、肺癌、膵癌、食道癌、メラノーマ、前立腺癌、乳癌、腎癌、または白血病に対する癌ワクチンであることが好ましい。

[0010] 本発明にかかる腫瘍治療方法は、ヒト及びヒト以外の脊椎動物に対しこの癌ワクチンを用いることを特徴とする。

[0011] －関連文献とのクロスリファレンス－

なお、本出願は、2005年1月19日出願の日本国出願番号特願2005－12092の優先権の利益を主張し、これを引用することにより本明細書に含める。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明における実施例において、HLA－A24と結合することが予想されたSOX6由来のペプチドを添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性T細胞（エフェクター細胞）を、それらHLA－A24結合性のSOX6由来のペプチドを提示した樹状細胞をターゲットとして共培養した時に、放出されるIFN-γを測定した結果を表すグラフである。

[図2A]本発明における実施例において、定量的RT－PCTによるSOX6の発現解析の結果を示した図である。

[図2B]本発明における実施例において、ウエスタン・ブロッティングによるSOX6の発現解析の結果を示した図である。

[図3]本発明における実施例において、HLA－A24と結合することが予想されたSOX6由来のペプチドを添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性T細胞（エフェクター細胞）を、HLA－A24及びSOX6を発現するグリオーマ細胞（KNS－81）をターゲットとして共培養した時に、放出されるIFN-γを測定した結果を表すグラフである。

[図4]本発明における実施例において、HLA－A2402の健常人末梢血から単離され、SOX6由来のペプチドSOX6－504及びSOX6－628を添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性T細胞（CTL：エフェクター細胞）に対し、CIR－A2402、CIR－A2402－SOX6、Marcus、SF126、KNS－42、HepG2、PC9をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解率を示したグラフである。

[図5]本発明における実施例において、HLA－A2402のグリオーマ患者末梢血から単離され、SOX6由来のペプチドSOX6－504及びSOX6－628を添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性T細胞（CTL：エフェクター細胞）に対し、CIR－A2402、CIR－A2402－SOX6、Marcus、SF126、KNS－42をターゲッ

ト細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解率を示したグラフである。

[図6]本発明における実施例において、HLA－A2402の健常人末梢血から単離され、SOX6由来のペプチドSOX6－504(A)またはSOX6－628(B)を添加された樹状細胞との共培養により誘導された細胞障害性T細胞(CTL:エフェクター細胞)に対し、(A)Marcus、CIR－A2402(SOX6－504)、CIR－A2402(CMV)、CIR－A2402または(B)Marcus、CIR－A2402(SOX6－628)、CIR－A2402(CMV)、CIR－A2402をターゲット細胞として共培養した時に算出した、ターゲット細胞の特異的溶解率を示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0014] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0015] ＝＝HLAクラスIと結合性が高いペプチドのスクリーニング＝＝

ウエブサイト上のデータベースであるBioInformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) のHLA Peptide Binding predictions Program を用い、SOX6遺伝子がコード

するアミノ酸配列から、HLAクラスIと結合性が高い、9～10アミノ酸残基のペプチド配列を特定した。日本人のHLAクラスIのタイプは、HLA－A2とHLA－A24が多く、これらで日本人全体の約80％をカバーする。なお、日本人に多いHLA－Aの遺伝子型として、HLA－A2はA0201及びA0206、HLA－A24はA2402が挙げられ、本明細書では、細胞の遺伝子型としてA0201、A2402と記載した場合、記載したアレルを少なくとも一つ有することを意味する。

[0016] ここでは、A24に対する結合性についてスクリーニングした。表1に、このスクリーニングによって得られたスコアの高いペプチド配列の例を示す。

[0017] [表１]

HLAタイプ	長さ	名前	配列	スコア	配列番号
A24	9	SOX－504	RFENLGPQL	72	1
	9	SOX－628	PYYEEQARL	24	2
	10	SOX－360	SYNHKQIEQL	300	3
	10	SOX－539	KAMNGSAAKL	13.2	5

[0018] これらのペプチドを実際に合成し、抗原として抗原提示細胞である樹状細胞表面に投与したとき、HLAクラスI分子に結合することにより細胞表面に提示され、細胞障害性T細胞に認識されることで特異的な細胞障害性T細胞を誘導できるペプチドを同定するため、樹状細胞と共培養された細胞障害性T細胞のヒト・グリオーマ細胞に対する反応性を調べた。その結果、配列番号1～3のペプチドを細胞表面に提示する樹状細胞が効率よく細胞障害性T細胞を刺激し、また各ペプチドの刺激により樹立された細胞障害性T細胞がSOX6を発現するグリオーマ細胞を効率よく認識することが明らかになった。

[0019] 以下の実施例には、これらの実験結果を示すことにより、配列番号1～3のペプチドを抗原提示細胞に添加すると、それらのペプチドがHLA上に提示され、共培養したT細胞を刺激することにより抗原特異的なT細胞を誘導し、この抗原特異的なT細胞はSOX6を発現するグリオーマ細胞と反応するか、またはSOX6を発現する細胞に対し細胞障害性を有することを示す。このことから、配列番号1～3のペプチド、そのペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞、及びその抗原提示細胞の刺激によって樹立された細胞障害性T細胞は、グリオーマに対する癌ワクチンとして有用であることがわかる。

[0020] ＝＝癌ワクチンの投与方法＝＝

現在、癌ワクチンとして、腫瘍特異的癌抗原、癌抗原提示抗原提示細胞、または癌抗原反応性細胞障害性T細胞を腫瘍患者に投与する方法が開発されている。本発明においては、SOX6の部分ペプチドを用いているので、治療（予防も含まれる）対象となる腫瘍は、SOX6が発現している腫瘍であれば何でもよく、特にSOX6を高レベルに発現しているグリオーマ、肝癌、肺癌、膵癌、食道癌、メラノーマ、前立腺癌、乳癌、腎癌、または白血病も治療対象の一つとなる。主な治療対象は、こうした腫瘍を有するヒト患者であるが、腫瘍を有するヒト以外の脊椎動物でもかまわない。

[0021] 治療対象となる腫瘍を有する患者に対し投与する癌ワクチンは、腫瘍特異的癌抗原となりうる配列番号1～3をもつペプチドを含有してもよい。この場合、あらかじめ患者のHLAクラスIのタイプを調べ、それに適したペプチドを用いる。ここでは、患者のHLAクラスIタイプがA24である場合に、配列番号1～3のペプチドを投与する。投与するペプチドは、一種類であっても複数種類であってもよい。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与などが考えられ、特に限定されることはない。また、投与する際には、免疫誘導能を高めるアジュバントなどとともにペプチドを投与してもよい。また、投与されるペプチドは、生体内で分解されにくくするような修飾が施されていてもよい。

[0022] また、上記癌ワクチンは、配列番号1～3を有するペプチドを提示した抗原提示細胞を含有してもよい。ここで、細胞表面に提示されているペプチドは、配列番号1～3を有するペプチドそのものでもよく、糖やリン酸などで修飾されてもよい。抗原提示細胞としては、樹状細胞の他にマクロファージ、B細胞等が考えられるが、抗原提示能の高さなどから、樹状細胞が好ましい。以下、樹状細胞の単離方法の例を記述する。

[0023] まず、脊椎動物個体の末梢血から単核球を単離する。この単核球は、治療対象となる個体自身から分離することが好ましいが、他の個体から単離してもよい。また、この単核球はCD14陽性であることが好ましい。単離した単核球を、GM-CSF とIL-4で7 日前後培養すると、未熟な樹状細胞に分化誘導することができる。このようにして分化誘導された樹状細胞は、抗原提示分子であるMHC分子を高発現している。この未熟な樹状細胞のHLAクラスIタイプを調べ、A24である場合は、配列番号1～3

のペプチドを添加する。添加するのは、人工合成ペプチドに限らず、ペプチドを発現させた細胞の抽出物(extractやlysate)や精製物などでもよい。こうして得られた抗原提示樹状細胞を、腫瘍を有する個体に投与する。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、リンパ節内投与などが考えられ、特に限定されることはないが、生理的な樹状細胞の抗原提示が、樹状細胞投与部位の所属リンパ節にて行なわれることを考えると、リンパ節内への直接投与が好ましい。

[0024] また、上記癌ワクチンは、配列番号1～3由来のペプチドを提示した抗原提示細胞の刺激によって樹立されたT細胞を含有してもよい。配列番号1～3由来のペプチドを提示した抗原提示細胞に対し、T細胞を共培養し、抗原提示細胞で刺激する。このようにして樹立されたT細胞を腫瘍を有する個体に投与してもよい。ここでのT細胞は、細胞障害性T細胞が好ましいが、ヘルパーT細胞等でもよい。投与部位に関しては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、腫瘍内投与などが考えられ、特に限定されることはないが、細胞障害性T細胞の場合、抗原を発現する細胞を直接攻撃できるため、腫瘍内投与が好ましい。

実施例

[0025] ＜実施例1＞抗原を提示した樹状細胞による細胞障害性T細胞の活性化

＝＝実験初日＝＝

HLAクラス1のタイプがA24(遺伝子型はA2402)の健常人末梢血から、以下のように単核球を分離した。まず、ヘパリン5mlで洗浄したシリンジで、末梢血を50ml採血した。等量のLymphoprep (Fresenius kabi Norge AS, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) を転倒混和し、遠心(20℃、2000 rpm、35分間 、ブレーキなし)し、中間層を吸引して採取した。これにPBSを加えて再混濁し、遠心(20℃、2000 rpm、10分間)する操作を3回繰り返して、得られた単核球を洗浄した。

[0026] この単核球を初代細胞培養用培養皿(FALCON MULTIWELL PRIMARIA 24 well)に$5x10^6$個/ウエルの密度で播種し、37℃、5%CO_2存在下で4時間培養した。培養液はAIM-V(GIBCO)とRPMI-1640を1:1に混合したもの(基本培養液)を用いた。培養皿の底面に接着した細胞を回収し、$4x10^5$個/ウエルの密度で新しい24ウエルの培養皿に播種し、GM-CSF(10ng/ml), IL-4(1ng/ml)添加した基本培養液を用いて、37

℃、5%CO_2存在下で7日間培養し、樹状細胞を分化させた。

[0027] ＝＝実験7日目＝＝

培養7日目に分化した樹状細胞を抗原提示細胞(antigen presenting cells;APCs)として用いた。得られた樹状細胞をirradiate (60Gy)したのち、合成・精製したペプチド(配列番号1～3及び5のSOX6由来のペプチド)を10μM添加し、37℃、5%CO_2存在下で2時間培養して細胞に結合させ、PBSで2回洗浄し、刺激細胞(stimulator cells)とした。なお、コントロールとして、SOX6由来のペプチドのかわりにサイトメガロウィルス(CMV)由来のペプチド(配列番号4:QYDPVAALFF、Provenzano et al., Transfusion 43, pp1567-1574参照)を用いた実験を行った。

[0028] 一方、この日(培養7日目当日)、実験15日目に樹状細胞を得るために、初日と同じ操作で単核球を培養した。

[0029] その過程で、単核球を4時間培養後、培養皿に接着せず、培養上清に浮遊している細胞を回収し、$1x10^7$個の細胞に対しIMag anti-human CD8 particules -DM (BD Biosciences社)100μlを、4℃、30分間反応させた。磁石を用いてCD8陽性細胞を吸着・回収し、応答細胞(responder cells)とした。

[0030] このようにして得られた応答細胞$2x10^5$個を、上記刺激細胞のウエルに添加し、共培養した。なお、培養液として、IL-1α(10 unit/ml), IL-2(20 unit/ml), IL-4(1 ng/ml), IL-6(125 unit/ml), IL-12(1 ng/ml)を添加した基本培養液を用いた。

[0031] ＝＝実験15日目＝＝

培養7日目から培養し、分化させた樹状細胞を用いて、上記と同様の操作で刺激細胞を調整した。

また、培養7日目より刺激細胞と共培養した応答細胞を回収し、新たに調整した刺激細胞と、同様に共培養した。ただし、培養液は培養7日目に用いた上記培養液においてIL－12を含まない培養液を用いた。

なお、実験22日目に樹状細胞を得るための単核球の培養を、同様にして、新たに始めておいた。

[0032] ＝＝実験22日目＝＝

実験15日目と同様に、刺激細胞と共培養を続けている応答細胞を回収し、新たに

調整した刺激細胞と共培養した。

なお、樹状細胞を得るための単核球の培養を始めたが、24ウエルの培養皿ではなく、96ウエルの培養皿を用い、$4x10^4$個／ウエルに調整して播種し、培養した。

[0033] ＝＝実験29日目＝＝

96ウエルで培養した単核球を用いて分化誘導した樹状細胞に、0μM、0．1μM、1μM、10μMの各濃度のSOX6由来のペプチドあるいは0μM、0．1μM、1μM、10μMの各濃度のCMV由来のペプチドを添加して、37℃、5%CO_2存在下で2時間培養して細胞に結合させ、PBSで2回洗浄し、ターゲット細胞として用いた。

共培養を続けている応答細胞を回収し、エフェクター細胞として$2x10^4$個に調整した細胞を、こうして新たに調整したターゲット細胞のウエルに添加し、共培養した。

[0034] ＝＝実験31日目＝＝

上記共培養から培養上清を回収し、以下のようにIFN-γELISAを行った。

[0035] 前日に、一次抗体(anti-human IFN-γ monoclonal Ab, Endogen)を0．5μg／mlにPBSで希釈し、98ウエル・プレート(Nunc Maxisorp)に1ウエルあたり100μlを添加し、4℃で一晩放置してプレートをコートした。実験当日、1ウエルあたり300μlの5%FCS含有PBSで室温1時間処理し、ブロッキングした。ウエルを0．2%Tween－20含有PBSで3回洗浄した後、共培養から回収した培養上清50μlを添加し、ビオチン化2次抗体(Endogen、5%FCS含有PBSで0．5mg／mlに調整したもの)を50μl添加し、室温で2時間放置した。ウエルを0．2%Tween－20含有PBSで3回洗浄した後、ストレプトアビジン結合HRP (ExtraAvidine peroxidase conjugate, SIGMA E-2886、5%FCS含有PBSで4000倍希釈したもの)を100μl添加し、室温で30分放置した。ウエルを0．2%Tween－20含有PBSで3回洗浄した後、TMBを基質にして発色させた(TMBは、TMB tablet 1錠をDMSO1mlに溶解しリン酸クエン酸バッファー9mlを加えて調整した)。25μlの1N H_2SO_4を添加し、反応を停止した。プレートリーダーで450nmの吸光度を測定し、既知の濃度のIFN-γで予め作製した標準曲線からIFN-γの濃度を算出し、結果を図1に示した。

[0036] ＝＝結果＝＝

HLA－A24に結合し得ると予想されたSOX6由来ペプチド(表1参照)のうち、SO

X6－360、SOX6－504、およびSOX6－628を添加された樹状細胞との共培養により刺激された細胞障害性T細胞（エフェクター細胞）は、各々の抗原ペプチドを提示した樹状細胞をターゲットとして共培養した時、様々なコントロールに比して、IFN-γ放出量が増加した（図1）。このことは、SOX6ペプチドに由来するペプチド（SOX6－360、SOX6－504、およびSOX6－628）を抗原提示細胞に添加すると、それらのペプチドを提示する抗原提示細胞が得られ、得られた抗原提示細胞によってT細胞を刺激することにより各ペプチドを特異的に認識するT細胞が誘導されたことを示す。

[0037] ＜実施例2＞SOX6由来ペプチドによる刺激によって樹立された細胞障害性T細胞のSOX6発現細胞に対する反応性

[1]SOX6の発現解析

SOX6を発現している細胞を明らかにすることにより、具体的にどのような細胞が、本発明の方法の対象となるかを調べた。

[0038] ＝＝RT－PCRによる解析＝＝

ヒト正常組織（成人脳及び精巣、及びヒト胎児脳）、グリオーマ細胞株（GI－1、U87、及びT98G）、患者から単離されたグリオーマ組織（グリオブラストーマ組織、及びアストロサイトーマ組織）、ヒト腫瘍細胞株（888mel、928mel、586mel、LK2、PC9、LU99、RERF－LC－MA、TE8、PK56、PK1、PC3、MDA231、RCC6、RCC8、KU7、及びMolt4）におけるSOX6のmRNAの発現を定量的PCRにより解析した。

[0039] RNAを単離する材料としての細胞は、以下のように入手した。まず、グリオーマ細胞株SF126とMarcusはHealth Science Research Resources Bank (Osaka, Japan)から購入した。U-87-MG とT98G (glioma), GI-1 (gliosarcoma), 888mel, 928mel と586mel (melanoma) Molt4 (leukemia and lymphoma), PC9, LU99, LK2, RERF-LC-MA (lung cancer), RCC6 and RCC8 (renal cell cancer), TE8 (esophageal cancer), PK1 と PK59 (pancreas cancer) 、MDA231 (breast cancer) は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より購入した。また、グリオーマ組織は、慶應義塾大学倫理委員会承認(No. 12-21-2)の説明文に対して同意の得られた手術患者の腫瘍検体より得た。こ

れらの細胞株、または組織から、RNeasy(キアゲン社)を用いて全RNAを単離した。また、ヒト正常組織の全RNAはCLONTECH Laboratories, Inc.より購入した。これらの全RNAに対し、AMV Reverse transcriptase XL (Takara Bio Inc.,Ohtsu,Japan)及びオリゴdTプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。

[0040] これらのcDNAに対し、以下のように定量的PCRを行い、SOX6のmRNAの発現について検討した。SOX6に対するプライマーは

forward primer, 5'-GATGCCATCAACTCCACAGC-3'(配列番号6)

reverse primer, 5'-GCTGCAGAGCCATTCATTGC-3'(配列番号7)

を用い、内部コントロールとしてのβ-actinに対するプライマーは

forward primer, 5'-GGCACCCAGCACAATGAAG-3'(配列番号8)

reverse primer, 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'(配列番号9)

を用いた。定量的PCRの条件は95℃10分、その後、変性を95℃で30秒, アニーリングを60℃で1分の過程を50サイクル行い、最後に伸長反応を72℃で1分間行った。結果を図2Aに示した。なお、各組織でのSOX6の発現量は、それぞれの組織におけるβアクチンの発現量で標準化した。

[0041] ==ウエスタン・ブロッティングによる解析==

次に、タンパク質レベルでのSOX6の発現をウエスタン・ブロッティングによって調べた。まず、上記と同様にして得られた細胞を回収し、破砕バッファー(最終濃度20mM HEPES、最終濃度0.25Mショ糖を純水950mlに加え、PH 7.5に調整した)と共にDounce型ホモジナイザーにいれ、氷上にて細胞を破砕した。破砕液を1000gで7分間遠心し、上清を破棄し、核や未破砕細胞を含む沈殿を回収した。この沈殿に、SDSゲル用ローディングバッファーを加えて溶解し、電気泳動用サンプルとした。これらのサンプルを、SDS-PAGEを用い、各レーンに20μgずつ泳動した。メンブレンにトランスファーし、10μg/mlに調製した抗SOX6抗体(CHEMICON社)によってSOX6タンパク質を認識し、AP結合ヤギ抗ウサギIgG (Fc) 抗体 (2000倍希釈、Cappel, Aurora, Ohio)を反応させた後、Nitro blue tetrazolium (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)の混合液にて発色させた。結果を図2Bに示した。

[0042] ＝＝結果＝＝

SOX6は、これまでに発現が報告された、ヒト胎児脳、成人精巣、グリオーマ細胞株、グリオーマ組織のみならず、メラノーマ、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、扁平上皮肺癌、食道癌、膵癌、前立腺癌、乳癌、腎癌、慢性骨髄性白血病、T細胞性白血病由来の細胞株においても、発現が検出された。(図2A)。

[0043] 一方、正常組織におけるSOX6タンパク質の発現は、精巣以外では検出されなかった(図2B)。更に、SOX6は、グリオーマ細胞株(Marcus、U87、KNS-42、SF126)だけでなく、肺癌細胞株(PC9)、肝細胞癌株(HepG2)、膵臓癌株(Panc-1)においては、タンパク質レベルでも発現が検出された。

[0044] 以上より、SOX6は、ヒト成人正常組織においては精巣しか発現が検出されないものの、腫瘍細胞においては、広く発現が検出された。このことは、SOX6由来のペプチドを用いた癌ワクチンが、グリオーマだけでなく、多種の腫瘍に効果があることを示している。さらに、正常組織では、ほとんど発現が検出されないため、この癌ワクチンは副作用が少ないと考えられる。

[0045] [2]エフェクター細胞から放出されるIFN-γ量による、SOX6発現細胞に対する反応性の評価

＝＝実験29日目＝＝

この日まで、実施例1と同様にしてエフェクター細胞を調整した。なお、単核球を得る健常人のHLAクラス1のタイプをA24(遺伝子型はA2402)とし、添加したペプチドとして配列番号1～3のペプチドを用い、コントロールのペプチドとしてCMV由来のペプチド(配列番号4:QYDPVAALFF)を用いた。

[0046] 一方、マイトマイシン(200pg/ml)を添加した培養液(AIM-V(GIBCO)とRPMI-1640を1:1に混合したもの)を用い、37℃、5%CO_2存在下で、ヒト・グリオーマ細胞KNS－81(HLA－A24とSOX6が共に発現しており、HLA－A2は発現していない細胞)を60分間培養したのち、5回PBSで洗浄した後、96ウエルの培養皿(COSTER 3595-96 well)に、5x10^3個／ウエルに調整し、ターゲット細胞として播種した。

[0047] このターゲット細胞に対し、エフェクター細胞を0個(グラフでは、エフェクター細胞:ターゲット細胞(E/T ratio)=0)、5x10^4個(E/T ratio=10)、1x10^5個(E/T ratio=20)、2

x10^5個(E/T ratio=40)のそれぞれを加え、共培養した。

[0048] なお、コントロールとして、ヒト・グリオーマ細胞KNS－81の代わりに、CIR－24細胞(HLA－A24が発現しており、SOX6は発現していない細胞)とグリオーマ細胞U87(HLA－A2とSOX6が共に発現しており、HLA－A24は発現していない細胞)を用いて、実験を行った。

[0049] ＝＝実験31日目＝＝

上記共培養から培養上清を回収し、IFN-γ ELISAを行った。図3に結果を示す。

[0050] ＝＝結果＝＝

SOX6由来の部分ペプチド(SOX6－504、およびSOX6－628)を用いて誘導された細胞障害性T細胞(エフェクター細胞)は、ターゲット細胞であるグリオーマ細胞(KNS－81)に反応して、コントロールに比して細胞数比依存的にIFN-γ放出量の増加を示した(図3)。このことは、SOX6－504またはSOX6－628を提示している抗原提示細胞を用いて刺激することにより樹立したT細胞は、SOX6とHLA－24を発現しているグリオーマ細胞(KNS－81)を特異的に認識し得ることを示す。樹立したT細胞はU87(HLA－A201とSOX6が共に発現しているがHLA－A24は発現していない細胞)に反応しないことから、これらのSOX6特異的T細胞はHLA－A24拘束性に抗原を認識することが示された。

[0051] [3]エフェクター細胞の細胞傷害活性による、SOX6発現細胞に対する反応性の評価

＝＝実験28日目＝＝

この日まで、実施例1と同様にしてエフェクター細胞を調整した。なお、単核球を得る人のHLAクラス1のタイプをA24(A2402)とし、添加したペプチドとして配列番号1及び2のペプチドを用いた。なお、本実施例では、単核球を得るための末梢血には、健常人末梢血(結果は図4)だけでなく、グリオーマ患者末梢血(結果は図5)も用いた。

[0052] ターゲット細胞として、HLA－A，B欠損ヒトB細胞株CIRにHLA－A2402のcDNAを導入したCIR－A2402、CIR－A24株にSOX6遺伝子を導入したCIR－A2402－SOX6、CIRにHLA－A0201のcDNAとSOX6遺伝子を導入したCIR－A02

01－SOX6、HLA－A24とSOX6を共に発現しているグリオーマ細胞(Marcus、SF126、KNS－42)、HLA－A24とSOX6を共に発現している他の癌細胞(肝細胞癌由来HepG2、肺癌由来PC9)を準備した。なお、CIR－A2402－SOX6細胞及びCIR－A0201－SOX6細胞でSOX6が発現していることは、上記ウエスタン・ブロッティングによって確認した(図2B)。

[0053] これらの細胞$5X10^6$個に対して500μlのFetal Bovine Serum(FBS)、^{51}Cr(1．85MBq／50μl)を50μl添加し、37℃、5%CO2下で60分振蕩培養した。その後洗浄を3回行い、$5x10^3$／100μlに調整して96穴プレート(COSTER 3595-96 well)の各ウエルに100μlずつ添加した。

[0054] この^{51}Crでラベルしたターゲット細胞に対し、ウエルあたり、エフェクター細胞を$3x10^5$個(E/T ratio=60)、$1．5x10^5$個(E/T ratio=30)、$7．5X10^4$個(E/T ratio=15)のそれぞれを加え、37℃、5%CO_2存在下で4時間培養した。

[0055] 各ウエルのcpm(cpm experimental release)を計測し、特異的溶解率(Percentage of specific lysis)を以下の式から算出した。

特異的溶解率= (cpm－csr)/(cmr－csr) x100

(なお、csr(cpm spontaneous release)はエフェクター細胞を含まない培地を添加したウエルのcpmであり、cmr(cpm maximal release)はエフェクター細胞を含まない0．1% Triton Xを添加したウエルのcpmである。)

[0056] ＝＝結果＝＝

CIR－A24－SOX6、グリオーマ細胞由来Marcus、グリオーマ細胞由来SF126、グリオーマ細胞由来KNS－42、肝癌由来HepG2、肺癌由来PC9は、HLA－A24とSOX6を発現している細胞である。図4(健常人由来の末梢血リンパ球からCTLを誘導した場合)及び図5(グリオーマ患者由来の末梢血リンパ球からCTLを誘導した場合)に示したように、SOX6－504またはSOX6－628を添加され樹状細胞との共培養により刺激された細胞障害性T細胞(エフェクター細胞)であるCTL(SOX6－504)とCTL(SOX6－628)は、これらのHLA－A24とSOX6を発現している細胞をE/T ratio依存性に溶解した。

[0057] 一方、SOX6を発現しているがHLA－A24を発現していない細胞CIR－A0201

－SOX6や、HLA－A24を発現しているがSOX6を発現していない細胞CIR－A2402に対する溶解性が低いことから、CTL（SOX6－504）とCTL（SOX6－628）は、HLA拘束性にSOX6を発現する細胞を広く、特異的に傷害し得ることが示された。

[0058] [4]エフェクター細胞のターゲット細胞に対する特異性

SOX6由来のペプチドの刺激により樹立したエフェクター細胞の、SOX6と無関係なペプチドを表面に有する細胞に対する細胞障害活性を調べることにより、エフェクター細胞のターゲット細胞に対する特異性を調べた。

[0059] 基本的には、実施例2と同様に実験を行ったが、ターゲット細胞として、

(1)HLA-A24とSOX6が共に発現しているグリオーマ細胞株Marcus

(2)HLA-A24を発現していてSOX6を発現していないCIR-A2402に、配列番号1を有するペプチドSOX6-504を結合させたCIR-A2402（SOX6-504）または配列番号2を有するペプチドSOX6-628を結合させたCIR-A2402（SOX6-628）

(3)非特異的細胞障害を測定するためのコントロールとして、CIR-A2402に対し、CMV由来の無関係なペプチド（配列番号4）を結合させたCIR-A2402（CMV）

(4)無処理のCIR-A2402

を用いた。実施例3－1に記載の手順にて、上記細胞を^{51}Crでラベルし、$5x10^{3}$／100μlに調整して96穴プレートの各ウエルに100μlずつ添加した。

[0060] エフェクター細胞として、ペプチドSOX6-504の刺激により樹立したCTL（SOX6-504）とペプチドSOX6-628の刺激により樹立したCTL（SOX6-628）を準備した。エフェクター細胞はウエルあたり$1x10^{5}$個（ET ratio＝20:1を、96穴プレート上のターゲット細胞に添加した。これらを37℃、5%CO_2存在下で4時間培養後、各ウエルの cpm (cpm experimental release)を計測し、特異的溶解率（Percentage of specific lysis)を上記式から算出した。図6に結果を示す。

[0061] CTL（SOX6-504）及びCTL（SOX6-628）は、HLA-A24とSOX6が共に発現しているMarcusや、SOX6由来のペプチドSOX6-504またはSOX6-628を結合させたCIR-A2402に対する溶解率は、無関係なペプチドであるペプチドを結合させたCIR-A2402や無処理のCIR-A2402に対する溶解率に比べて高かった。このことから、CTL（SOX6-504）及びCTL（SOX6-628）は、それぞれSOX6-504及び

SOX6-628を提示した細胞に対し、特異的に細胞障害を起こすことが示された。

[0062] このように、本実施例では、SOX6由来のペプチドで誘導されたエフェクター細胞のターゲット細胞に対する特異性が高いことが示され、従って、SOX6由来のペプチドが癌ワクチンとして用いられた時、副作用が低いと考えられる。

[0063] ＜結論＞

以上より、SOX6に由来する配列1～3を有するペプチドを用いて、それらの抗原ペプチドを提示した抗原提示細胞を作製することができ、さらに、その抗原提示細胞によって刺激することにより、各ペプチドのみならずSOX6を発現した細胞を認識する、特異的T細胞が誘導される。

産業上の利用可能性

[0064] 本発明によって、腫瘍免疫を効率的に誘導できるペプチド、そのペプチドを含有する組成物、そのペプチドを提示した抗原提示細胞、この抗原提示細胞によって刺激されたT細胞、およびこれらのペプチドや細胞を利用した癌ワクチン、及びそれらを用いた腫瘍患者の治療方法を提供することが可能になった。

請求の範囲

[1] 配列番号1～3のいずれかの配列を有するペプチド

[2] 配列番号1～3のいずれかの配列を有するペプチドを提示した抗原提示細胞。

[3] 樹状細胞であることを特徴とする請求項2の抗原提示細胞

[4] 請求項2または3に記載の抗原提示細胞によって誘導され、SOX6を発現する細胞を認識するT細胞。

[5] 細胞障害性T細胞であることを特徴とする請求項4のT細胞。

[6] SOX6を発現する細胞がグリオーマであることを特徴とする請求項4のT細胞。

[7] SOX6を発現する細胞が肝癌細胞、肺癌細胞、膵癌細胞、食道癌細胞、メラノーマ、前立腺癌細胞、乳癌細胞、腎癌細胞、または白血病細胞であることを特徴とする請求項4のT細胞。

[8] SOX6を発現する細胞が肝癌細胞、肺癌細胞、または膵癌細胞であることを特徴とする請求項4のT細胞。

[9] 配列番号1～3から選択される一つ以上のペプチドを含有する癌ワクチン。

[10] 請求項2または3に記載の抗原提示細胞を含有する癌ワクチン。

[11] 請求項4～8のいずれかに記載のT細胞を含有する癌ワクチン。

[12] SOX6を発現する癌細胞に対する癌ワクチンであることを特徴とする請求項9～11のいずれかに記載の癌ワクチン。

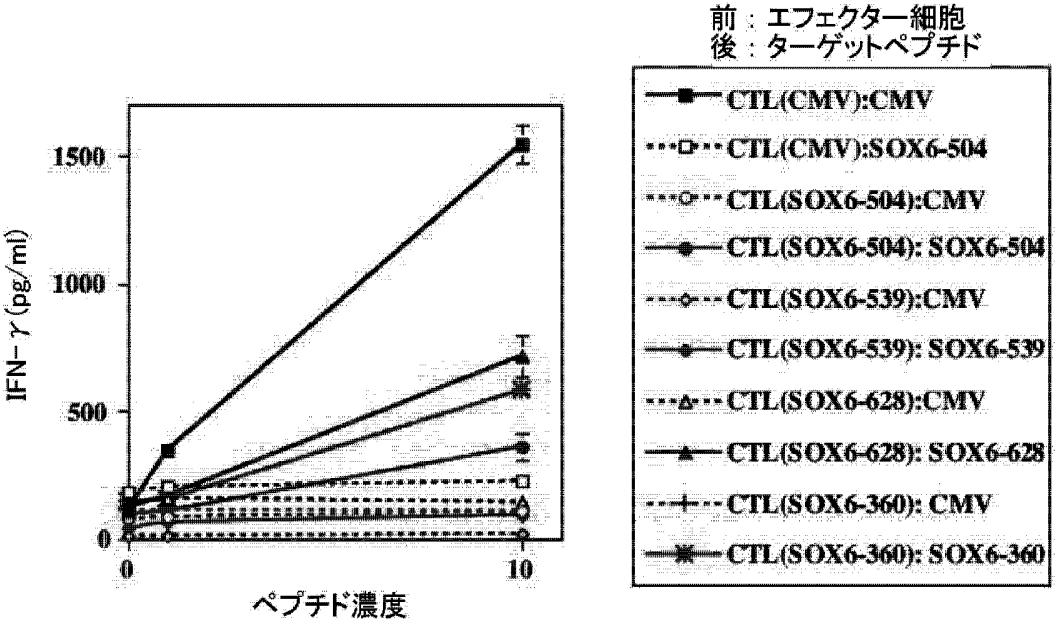
[13] グリオーマに対する癌ワクチンであることを特徴とする請求項9～11のいずれかに記載の癌ワクチン。

[14] 肝癌、肺癌、膵癌、食道癌、メラノーマ、前立腺癌、乳癌、腎癌、または白血病に対する癌ワクチンであることを特徴とする請求項9～11のいずれかに記載の癌ワクチン。

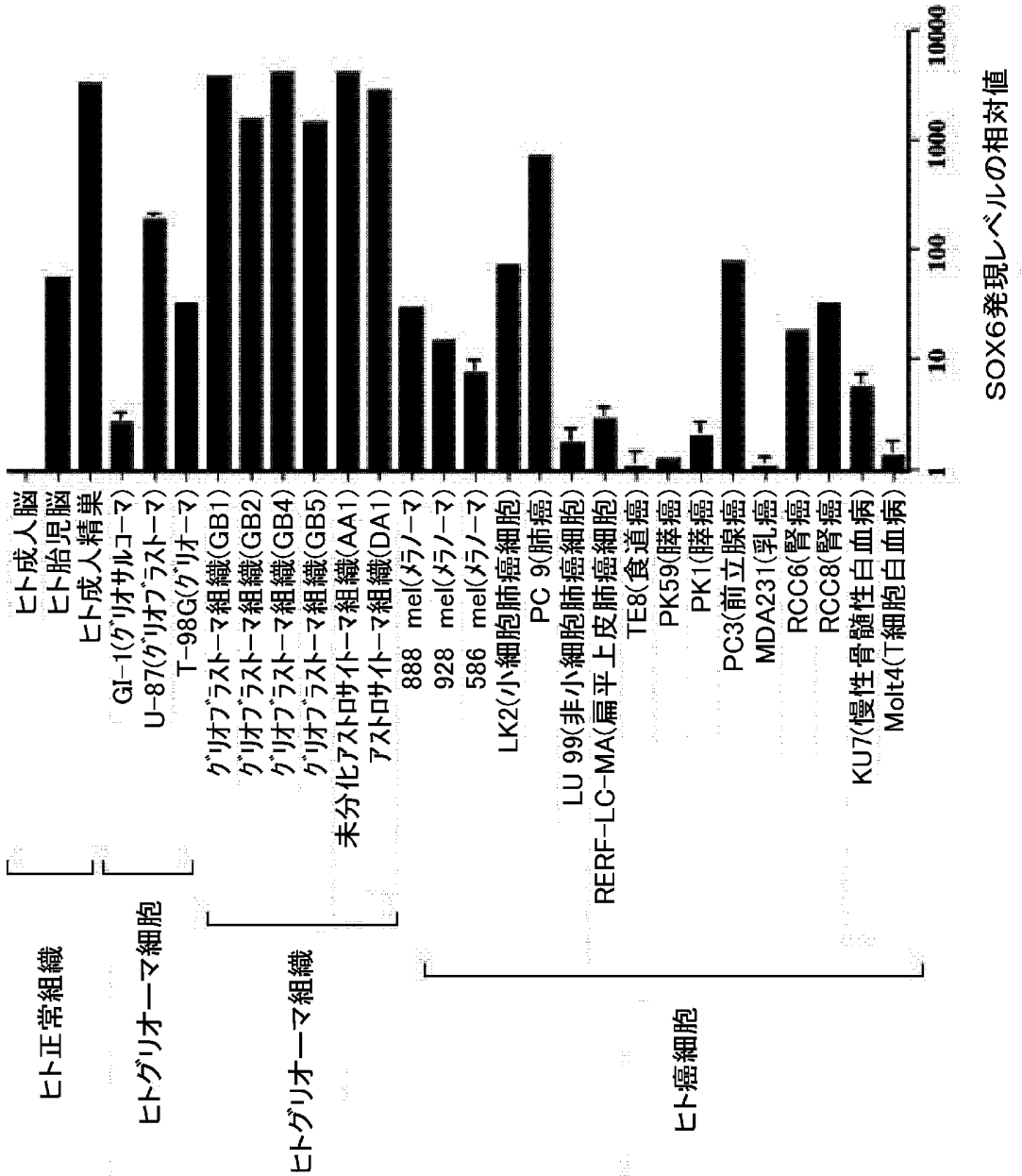
[15] 肝癌、肺癌、または膵癌に対する癌ワクチンであることを特徴とする請求項9～11のいずれかに記載の癌ワクチン。

[16] ヒト以外の脊椎動物に対し、請求項9～15のいずれかに記載の癌ワクチンを用いた腫瘍の治療方法。

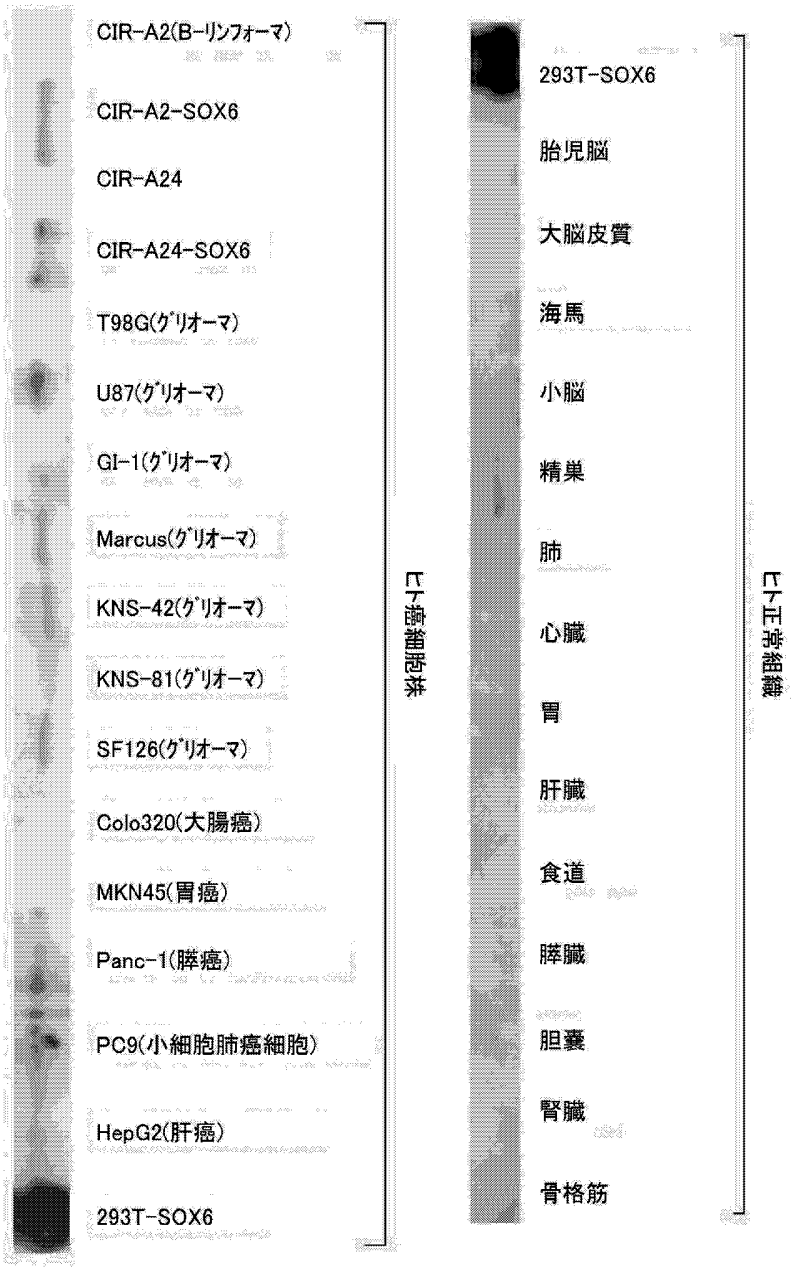
[図1]


前：エフェクター細胞
後：ターゲットペプチド
CTL(CMV):CMV
CTL(CMV):SOX6-504
CTL(SOX6-504):CMV
CTL(SOX6-504): SOX6-504
CTL(SOX6-539):CMV
CTL(SOX6-539): SOX6-539
CTL(SOX6-628):CMV
CTL(SOX6-628): SOX6-628
CTL(SOX6-360): CMV
CTL(SOX6-360): SOX6-360
IFN-γ (pg/ml)
1500
1000
500
0
0
10
ペプチド濃度

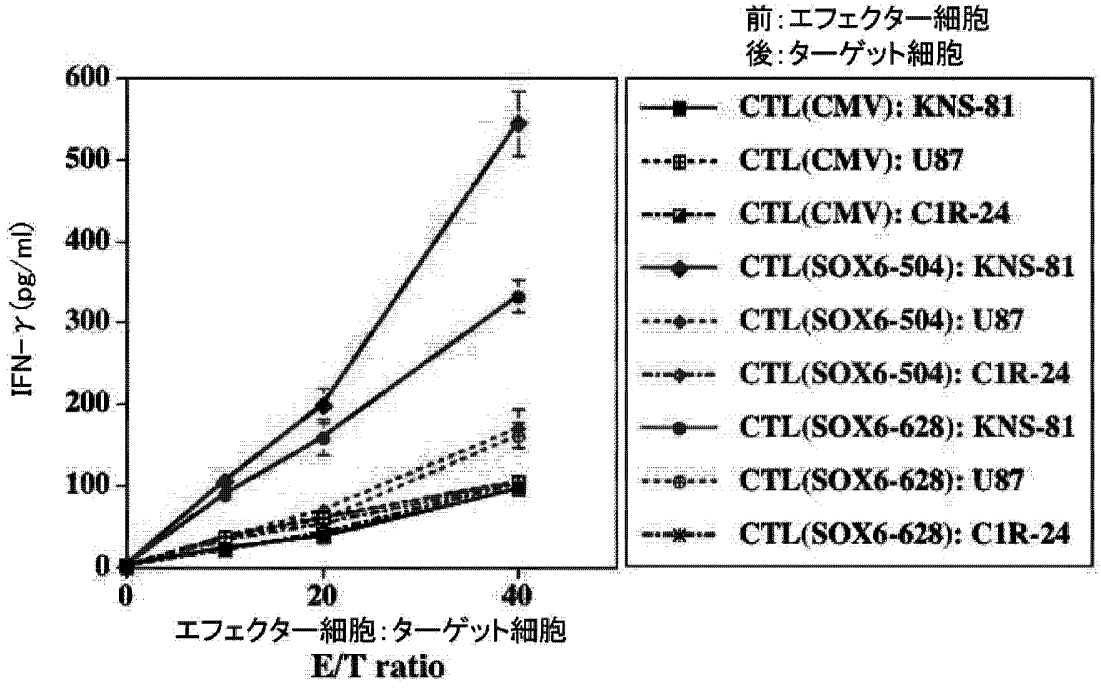
[図2A]


ヒト正常組織
ヒト成人脳
ヒト胎児脳
ヒト成人精巣
ヒトグリオーマ細胞
GI-1(グリオサルコーマ)
U-87(グリオブラストーマ)
T-98G(グリオーマ)
ヒトグリオーマ組織
グリオブラストーマ組織(GB1)
グリオブラストーマ組織(GB2)
グリオブラストーマ組織(GB4)
グリオブラストーマ組織(GB5)
未分化アストロサイトーマ組織(AA1)
アストロサイトーマ組織(DA1)
ヒト癌細胞
888 mel(メラノーマ)
928 mel(メラノーマ)
586 mel(メラノーマ)
LK2(小細胞肺癌細胞)
PC 9(肺癌)
LU 99(非小細胞肺癌細胞)
RERF-LC-MA(扁平上皮肺癌細胞)
TE8(食道癌)
PK59(膵癌)
PK1(膵癌)
PC3(前立腺癌)
MDA231(乳癌)
RCC6(腎癌)
RCC8(腎癌)
KU7(慢性骨髄性白血病)
Molt4(T細胞白血病)
1
10
100
1000
10000
SOX6発現レベルの相対値

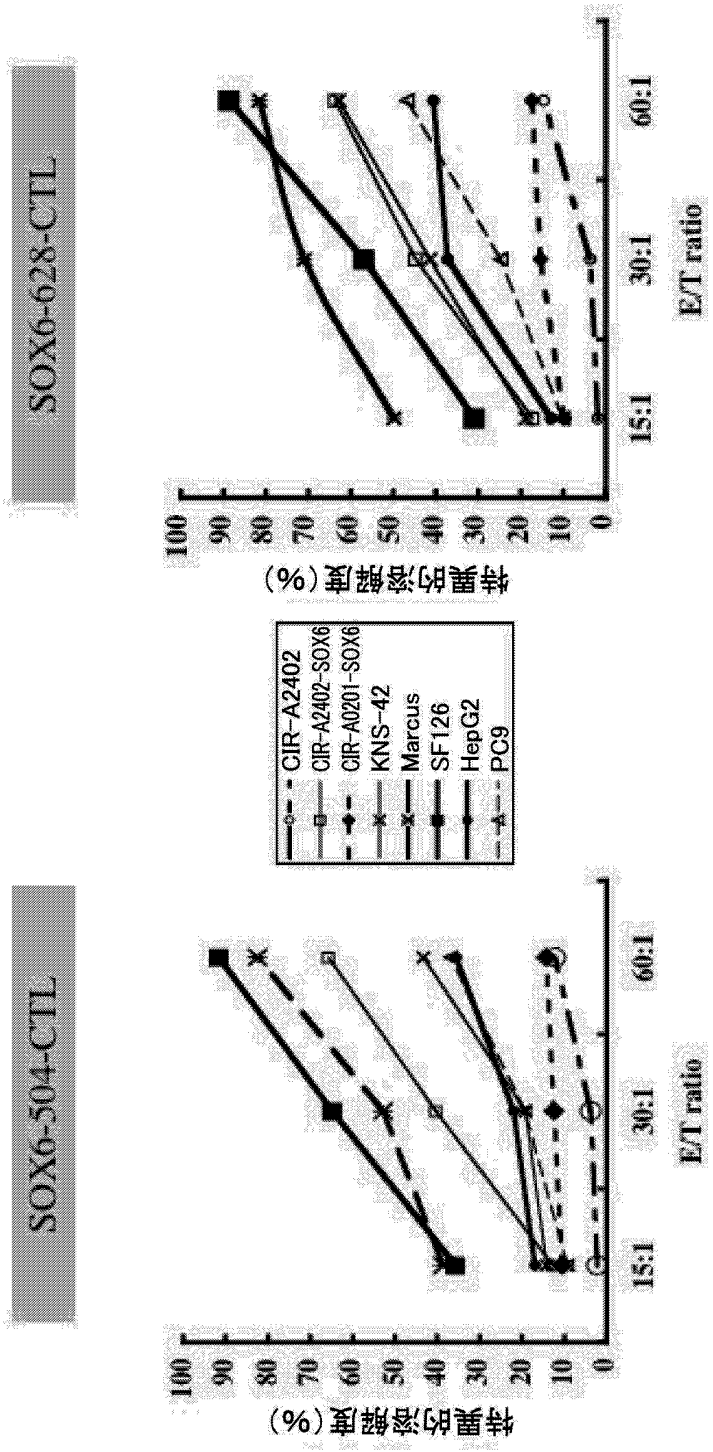
[図2B]


CIR-A2(B-リンフォーマ)
CIR-A2-SOX6
CIR-A24
CIR-A24-SOX6
T98G(グリオーマ)
U87(グリオーマ)
GI-1(グリオーマ)
Marcus(グリオーマ)
KNS-42(グリオーマ)
KNS-81(グリオーマ)
SF126(グリオーマ)
Colo320(大腸癌)
MKN45(胃癌)
Panc-1(膵癌)
PC9(小細胞肺癌細胞)
HepG2(肝癌)
293T-SOX6
ヒト癌細胞株
293T-SOX6
胎児脳
大脳皮質
海馬
小脳
精巣
肺
心臓
胃
肝臓
食道
膵臓
胆嚢
腎臓
骨格筋
ヒト正常組織

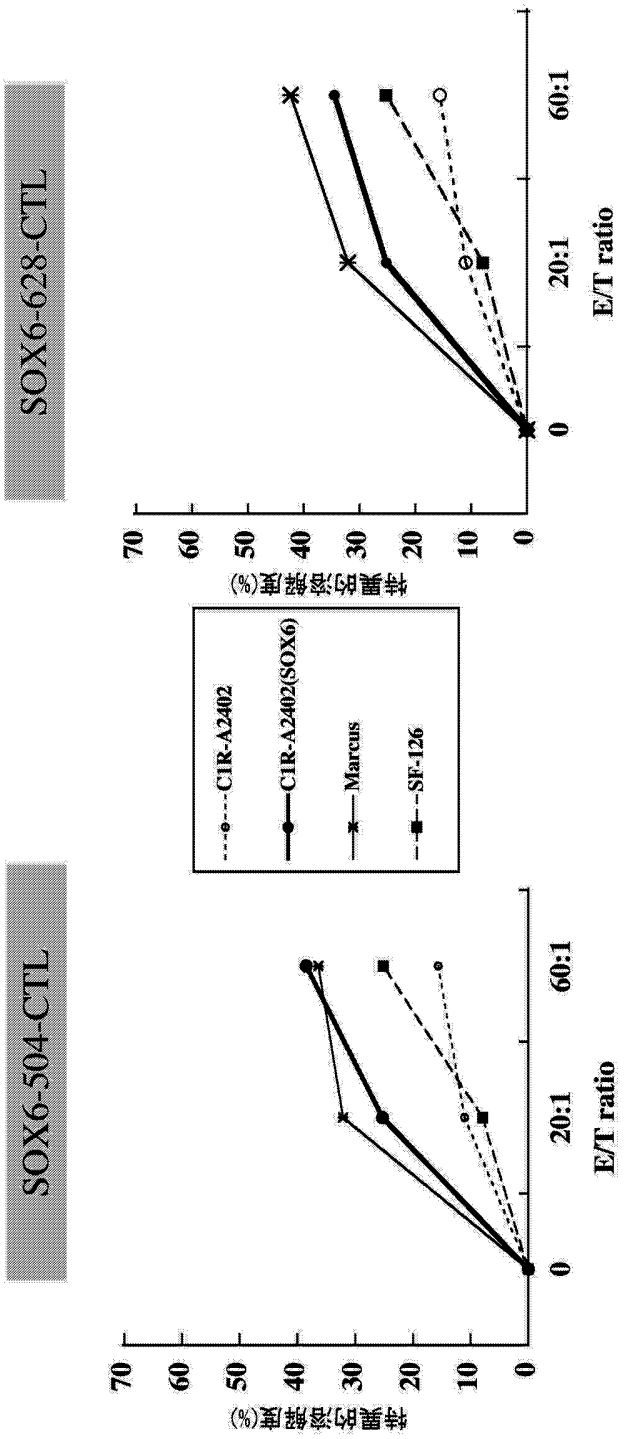
[図3]


前:エフェクター細胞
後:ターゲット細胞
CTL(CMV): KNS-81
CTL(CMV): U87
CTL(CMV): C1R-24
CTL(SOX6-504): KNS-81
CTL(SOX6-504): U87
CTL(SOX6-504): C1R-24
CTL(SOX6-628): KNS-81
CTL(SOX6-628): U87
CTL(SOX6-628): C1R-24
IFN-γ (pg/ml)
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
エフェクター細胞:ターゲット細胞
E/T ratio

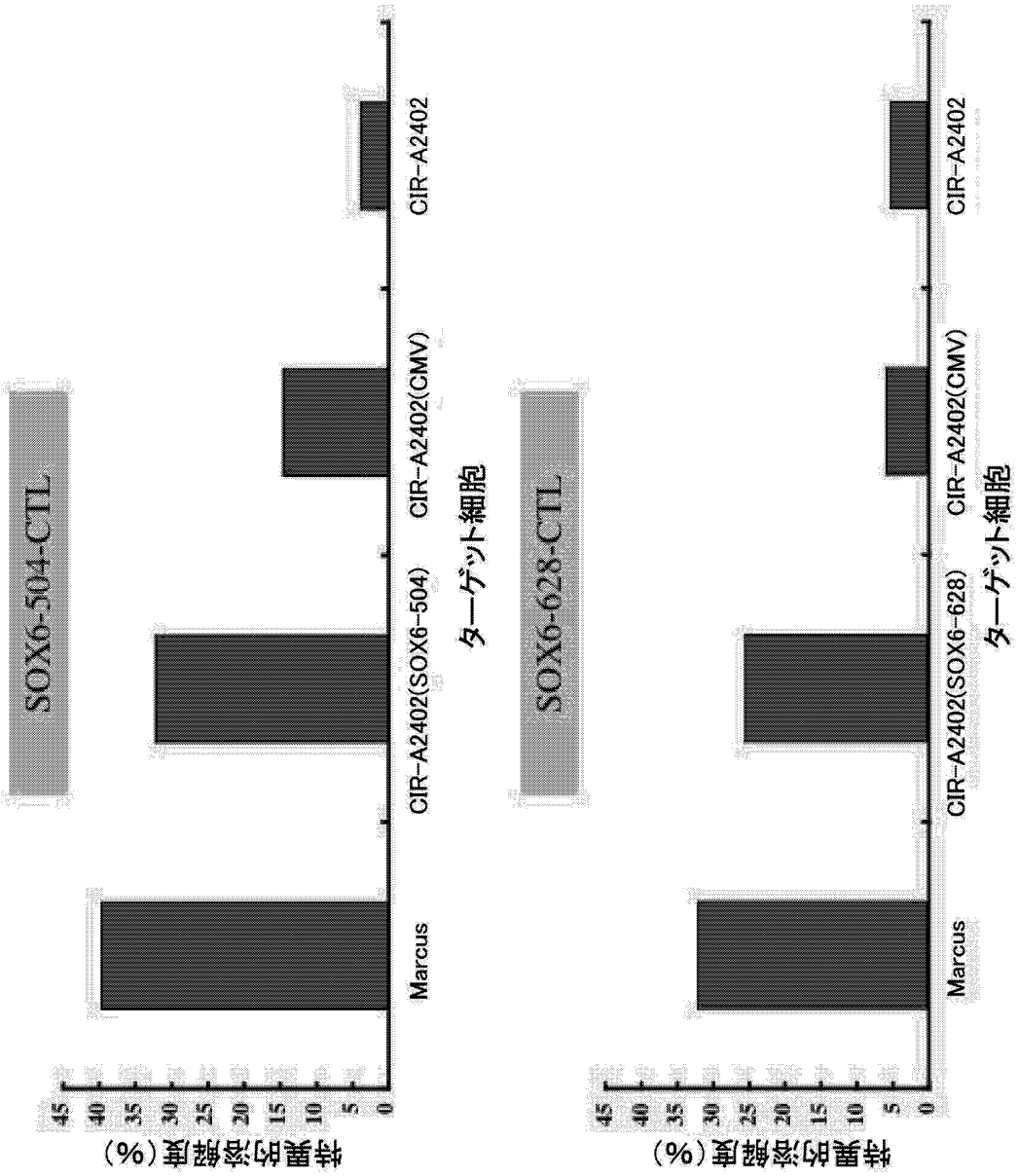
[図4]


SOX6-628-CTL
SOX6-504-CTL
特異的溶解度(%)
E/T ratio
15:1
30:1
60:1
CIR-A2402
CIR-A2402-SOX6
CIR-A0201-SOX6
KNS-42
Marcus
SF126
HepG2
PC9

[図5]


SOX6-504-CTL
SOX6-628-CTL
特異的溶解度(%)
E/T ratio
0
10
20
30
40
50
60
70
20:1
60:1
C1R-A2402
C1R-A2402(SOX6)
Marcus
SF-126

[図6]


SOX6-504-CTL
特異的溶解度(%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Marcus
CIR-A2402(SOX6-504)
CIR-A2402(CMV)
CIR-A2402
ターゲット細胞
SOX6-628-CTL
特異的溶解度(%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Marcus
CIR-A2402(SOX6-628)
CIR-A2402(CMV)
CIR-A2402
ターゲット細胞

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/300764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K7/06(2006.01), ***A61K39/00***(2006.01), ***A61P35/00***(2006.01), ***C12N5/06***(2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K7/06(2006.01), ***A61K39/00***(2006.01), ***C12N5/06***(2006.01)

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)
CA/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/112829 A (GENENTECH, INC.), 29 December, 2004 (29.12.04), Fig. 123 & CA 2524567 A	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 February, 2006 (01.02.06)	14 February, 2006 (14.02.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３００７６４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　***C07K7/06*** (2006.01)，***A61K39/00*** (2006.01)，***A61P35/00*** (2006.01)，***C12N5/06*** (2006.01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　***C07K7/06*** (2006.01)，***A61K39/00*** (2006.01)，***C12N5/06*** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ＣＡ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＴＥＣＨＡＢＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ａ	ＷＯ　２００４／１１２８２９　Ａ（GENENTECH,INC.）２００４．１２．２９，ＦＩＧＵＲＥ１２３　＆　ＣＡ　２５２４５６７　Ａ	１－１６

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０１．０２．２００６	１４．０２．２００６

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	８６１５
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	内藤　伸一 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		