(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
2010 年 9 月 23 日(23.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/107116 A1

(51) 国際特許分類:
*C12N 15/09* (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
*A61K 38/00* (2006.01) *C12N 5/07* (2010.01)
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/054852

(22) 国際出願日: 2010 年 3 月 19 日(19.03.2010)

(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 2009-068656 2009 年 3 月 19 日(19.03.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町４－１－８ Saitama (JP). 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目２９１番地 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鳥越俊彦 (TORIGOE, Toshihiko) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 廣橋良彦 (HIROHASHI, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 中津川宗秀 (NAKATSUGAWA, Munehide) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 佐藤昇志(SATOH, Noriyuki) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 高橋あかり (TAKAHASHI, Akari) [JP/JP]; 〒0600819 北海道札幌市北区北１９条西１１丁目独立行政法人科学技術振興機構 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 葛和清司(KUZUWA, Kiyoshi); 〒1620067 東京都新宿区富久町８番２１号 Ｔ＆Ｔビル 葛和国際特許事務所 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: HLA-A24-BINDING CANCER ANTIGEN PEPTIDE DERIVED FROM SOX2

(54) 発明の名称 : ＳＯＸ２由来のＨＬＡ－Ａ２４結合性癌抗原ペプチド

(57) **Abstract**: Disclosed are: a peptide capable of inducing a cytotoxic T cell that targets cancer cells, wherein the peptide comprises an amino acid sequence derived from a polypeptide encoded by Sox2 gene or an amino acid sequence produced by deleting, substituting or adding one or several amino acid residues in the aforementioned amino acid sequence and can be presented as an antigen in conjunction with HLA-A24; a CTL induced by the peptide; a pharmaceutical composition containing the peptide and/or the CTL; and use of the peptide for the induction of a CTL.

(57) 要約: 本発明は、癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞を誘導しうるペプチドであって、該ペプチドが、Ｓｏｘ２遺伝子によってコードされるポリペプチド由来のアミノ酸配列からなるか、またはそのアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されているアミノ酸配列からなり、かつＨＬＡ－Ａ２４によって抗原提示される、前記ペプチド、該ペプチドによって誘導されたＣＴＬ、該ペプチドおよび／または該ＣＴＬを含有する医薬組成物に関する。さらに本発明は、前記ペプチドのＣＴＬ誘導のための使用に関する。

WO 2010/107116 A1

# 明　細　書

## 発明の名称 ：

## ＳＯＸ２由来のＨＬＡ－Ａ２４結合性癌抗原ペプチド

## 技術分野

[0001] 本発明は、癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を誘導することができるペプチドに関する。

また本発明は、前記ペプチドを含む癌ワクチン及び抗癌剤に関する。

更に本発明は、癌細胞を標的とするＣＴＬを誘導するための前記ペプチドの使用、得られたＣＴＬ及び前記ＣＴＬを含む抗癌剤に関する。

## 背景技術

[0002] 近年における免疫学と分子生物学の進歩は、腫瘍免疫の進歩に多大の影響を与えている。ヒトでインフルエンザウイルス感染が起きた場合に、その感染に対して免疫が成立して感染症から離脱するという事象は以下の細胞性免疫により説明することができる。インフルエンザウイルスに感染した上皮細胞は、その細胞表面にある主要組織適合抗原複合体ＨＬＡ分子上にウイルスゲノム由来の９～１０のペプチドを提示する。このＨＬＡ－ウイルスペプチド複合体を提示する感染細胞は強烈なアロジェニック反応を惹起し、感染細胞は末梢血中に存在するＣＤ８陽性ＣＴＬにより特異的に認識され、積極的に排除される。この細胞性免疫のメカニズムは自己の細胞が腫瘍化して生じた癌細胞に対しても同様に働くと理解される。このことは、ベルギーのThierry Boonらによる悪性黒色腫からの腫瘍抗原ＭＡＧＥ遺伝子の単離により証明された（Van der Bruggen et al.、Science, 254, 1643-1647 (1991)）。

[0003] Ｔ細胞が認識する癌抗原の同定方法としては、Ｔ細胞を用いてヒト癌由来のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングする方法が既に開発されており、この方法を用いて前記のＭＡＧＥ遺伝子が単離された。それ以後、悪性黒色腫を初めとした癌細胞表面上のクラスＩ分子に提示されてＴ細胞に認識される癌由来癌抗原ペプチドが複数同定され、これらのいくつかを用いた臨床治

験が開始されており、既に一定の成果が得られている。例えば、癌患者の血清中に存在する抗体により認識される分子として食道癌より同定されたＮＹ－ＥＳＯ－１分子は、その合成ペプチドがＣＴＬの誘導能を有することが認識されている（Chen, YT. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 94, 1914-1918 (1997)及びJager, E. et al., J. Exp. Med., 187, 265-270(1998)）。

[0004] しかし、臨床的に癌の大部分を占める大腸癌、胃癌、乳癌、肺癌、膀胱癌等の上皮癌では癌抗原がほとんど同定されておらず、癌抗原を標的とした免疫療法は確立されていない。

[0005] Sex determinig Region Y-box2（Ｓｏｘ２）遺伝子は、胎生期の中枢神経に発現し、神経幹細胞の自己複製に関係する遺伝子として知られているが、悪性の神経膠腫においても多く発現していることがわかっている。M.Schmitzらの発表によって、Ｓｏｘ２のＨＬＡ－Ａ２拘束性エピトープを利用してＣＴＬ誘導を人為的に起こし、神経膠腫を排除することが可能であることが開示されている（非特許文献８）。

また、近年の研究で、癌の再発や転移の主要な原因と考えられている癌幹細胞を含む癌組織中においても、Ｓｏｘ２遺伝子が多く発現していることが示されている（非特許文献１～７）。

## 先行技術文献

## 非特許文献

[0006] 非特許文献1：中津川宗秀ほか、「癌幹細胞抗原分子としてのＳＯＸ２」、第１２回基盤的癌免疫研究会総会抄録、３９頁

非特許文献2：鳥越俊彦ら、「Survivin2Bペプチドワクチン臨床試験：From Bed to Bench」、日本臨床免疫学会会誌Ｖｏｌ．３１、Ｎｏ．４、２４４頁

非特許文献3：高橋あかりら、「乳癌と肺癌の癌幹細胞抗原ＳＯＸ２」、第８８回北海道医学大会プログラム・抄録、１７頁

非特許文献4：佐藤昇志、「ヒト癌幹細胞抗原解析と免疫応答」、第６７回日本癌学会学術総会記事、８２頁

非特許文献5：浅沼広子ら、「Basaloid乳癌は、高頻度に幹細胞マーカーを発

現している」、第６７回日本癌学会学術総会記事、１７７頁

非特許文献6：高橋あかりら、「肺癌、乳癌、肉腫における癌幹細胞抗原の探索」、第６７回日本癌学会学術総会記事、４４３頁

非特許文献7：廣橋良彦ら、「肺癌幹細胞の免疫学的評価」、第６７回日本癌学会学術総会記事、４４０頁

非特許文献8：M. Schmitz et al., British Journal of Cancer (2007) 96, 1293-1301

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、癌の免疫療法に使用しうる癌ワクチン及び抗癌剤を提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者等は、免疫学的なヒト癌拒絶が主にＣＴＬ、特にＣＤ８（＋）ＣＴＬにより担われていることに着目した。ＣＤ８（＋）ＣＴＬは癌細胞上の主要組織適合抗原複合体（ヒトではＨＬＡ）と当該ＨＬＡ上に提示された癌抗原ペプチドとからなる複合体を認識して活性化する。そして、活性化されたＣＴＬはその細胞表面上のＴ細胞抗原レセプターを介して癌細胞を認識し、これを攻撃する。したがって、癌抗原ペプチドが同定されれば、これを癌ワクチン及び抗癌剤として使用し、ＣＴＬを効率的に誘導して、癌を予防及び治療することができる。

[0009] ＳＯＸ２は遺伝子転写調節因子であり、癌細胞の中でも幹細胞様形質を有する癌幹細胞に特に発現レベルが高い。ＳＯＸ２は肺癌、腎癌等の多くの癌で発現するが、正常組織での発現は胎児性幹細胞と神経幹細胞等に限られている。

本発明者等は、種々のＳＯＸ２由来のペプチドについて癌抗原性、すなわちＣＴＬ誘導能について鋭意検討を重ねたところ、ＳＯＸ２遺伝子によりコードされる３１７個からなるアミノ酸配列内にＨＬＡ－Ａ２４結合モチーフがあり、このなかの特定のペプチドがＣＴＬを誘導することができることを

見いだした。これらの知見により、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は、癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞を誘導しうるペプチドであって、該ペプチドが、Ｓｏｘ２遺伝子によってコードされるポリペプチド由来のアミノ酸配列からなるか、またはそのアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されているアミノ酸配列からなり、かつＨＬＡ－Ａ２４によって抗原提示される、前記ペプチドに関する。

本発明はまた、ペプチドが、配列番号１、４～９および１２に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されている配列からなる、上記のペプチドに関する。

本発明はさらに、上記のペプチドにより誘導された細胞傷害性Ｔ細胞に関する。

[0011] 本発明はさらにまた、上記のペプチドをコードする、ＤＮＡに関する。

また、本発明は、上記のペプチドおよび／または上記の細胞傷害性Ｔ細胞および／または上記のＤＮＡを含む、医薬組成物に関する。

さらにまた、本発明は、医薬組成物が、癌ワクチンである、上記の医薬組成物に関する。

本発明はまた、医薬組成物が、抗癌剤である、上記の医薬組成物に関する。

本発明はさらに、医薬組成物が、ＤＮＡワクチンである、上記の医薬組成物に関する。

本発明はさらにまた、癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞を誘導するための、上記のペプチドの使用に関する。

## 発明の効果

[0012] 本発明のペプチドと１～２アミノ酸を改変した改変ペプチドは、本発明のペプチドを提示していると考えられるＨＬＡ－Ａ２４陽性ＳＯＸ２陽性の癌細胞を傷害するＣＴＬを誘導することができる。ＨＬＡ－Ａ２４の発現率は、欧米人では２０～３０％、日本人では５０％以上が陽性である。したがっ

て、本発明の癌抗原ペプチドは世界中で、さまざまな種類のＳＯＸ２陽性の悪性腫瘍に対して有用な癌ワクチン及び抗癌剤として使用することができる。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１はＳＯＸ２ポリペプチド由来ペプチドのＨＬＡ－Ａ２４結合アッセイの結果を示した図である。ポジティブコントロールとして用いたペプチドと同程度またはそれに近いＭＦＩを示したペプチドを、ＨＬＡ－Ａ２４結合性ペプチドとして同定した。

[図2]図２はＳＯＸ２＿１０９ペプチドの細胞傷害アッセイの結果を示した図である。ネガティブコントロールであるＨＩＶ由来ペプチドに対して顕著に大きな細胞傷害が検出されている。

[図3]図３はＳＯＸ２＿１０９ペプチドのＥＬＩＳＰＯＴアッセイの結果を示した図である。ネガティブコントロールであるＨＩＶ由来ペプチドでは、ＩＦＮγの放出は検出されなかったが、ＳＯＸ２＿１０９ペプチドにおいてはＩＦＮγの放出が確認された。

[0014] [図4]図４はＳＯＸ２由来ペプチドのＥＬＩＳＰＯＴアッセイの結果を示した図である。図中ｓｕｒ２Ｂはネガティブコントロールであるｓｕｒｖｉｖｉｎ２Ｂ添加群を表し、（－）はペプチド添加をしなかった群を表す。ＳＯＸ２＿５０および＿５８に反応するＣＴＬはどの患者からも誘導されず、ＳＯＸ２＿１２４および＿２１６に反応するＣＴＬは４人の患者から誘導された。

[図5]図５ａ）はＳＯＸ２由来ペプチドを抗原提示するＴ２－Ａ２４細胞に対する細胞傷害アッセイの結果を示した図であり、ｂ）はＳＯＸを強制発現したＬＨＫ２肺がん細胞と通常のＬＨＫ２細胞における細胞傷害アッセイの結果を示した図である。

## 発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明について詳細に説明する。

本発明のペプチドの同定は、以下の工程：

（１）ヒト主要組織適合抗原複合体（ＭＨＣ）クラスIであるＨＬＡ－Ａ２４の結合モチーフに対応する配列を有する、ＳＯＸ２ポリペプチド由来のペプチドを提供する工程、

（２）前記のペプチドを、ＨＬＡ－Ａ２４を発現する抗原提示細胞に添加しＨＬＡ－Ａ２４により前記ペプチドを提示している抗原提示細胞を得る工程、

（３）前記抗原提示細胞でＴ細胞を刺激してＣＴＬを誘導する工程、及び、

（４）誘導されたＣＴＬの癌細胞傷害能を測定する工程、

を含む方法により行うことができる。

[0016] 本発明のペプチドはアミノ酸数が１０と小さいので、一般的なアミノ酸の化学合成法、例えばＦｍｏｃ法により合成することができる。市販のアミノ酸合成装置を使用して合成することもできる。また、本発明のペプチドは、癌細胞の内部に発現しているＳＯＸ２ポリペプチドに由来するので、癌患者の癌細胞から文献（Suzuki, K.ら, J. Immunol., 163, 2783-2791 (1999)）に記載の方法にしたがい細胞表面ＨＬＡ結合ペプチドを単離して、該当するペプチドを得ることもできる。

[0017] 本発明のペプチドには、上記のペプチドの１または複数のアミノ酸を随意に改変したものが含まれる。改変ペプチドもまた、ＨＬＡ－Ａ２４によってＳＯＸ２ポリペプチド由来ペプチドを抗原提示した細胞を傷害するＣＴＬ誘導を起こすことが可能である。

[0018] 本発明のペプチドによって、癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞を誘導することができる。誘導するために使用するＨＬＡ－Ａ２４を発現する細胞は、癌患者から採取したものでもよいが、非ＨＬＡ－Ａ２４発現細胞に、ＨＬＡ－Ａ２４をコードする遺伝子を導入して作成してもよい。

[0019] 本発明のペプチドとしては、ＳＯＸ２ポリペプチド由来のペプチドであって、ＨＬＡ－Ａ２４によって抗原提示した細胞を傷害するＣＴＬを誘導することができるものであれば何でもよく、ＨＬＡ－Ａ２４とある程度の結合親和性を有するという点で、好ましくは配列番号１、４～９および１１で表さ

れるペプチドである。

[0020] 本発明のペプチドをコードするＤＮＡも、本発明に含まれる。本発明のペプチドをコードするＤＮＡは、転写、翻訳を受けた際に、本発明のペプチドを産生するものであれば何でもよいが、好ましくは、Ｓｏｘ２遺伝子配列のうち、本発明のペプチド部分をコードする配列と同じ配列を有するＤＮＡである。

[0021] 本発明のペプチドまたはＤＮＡを医薬組成物として使用する場合、本発明のペプチドまたはＤＮＡは、それ自身で又は補助剤と共に使用することができ、更に医薬的に許容しうる担体を適宜含有させることができる。補助剤としては、免疫応答の強化を目的とするアジュバント、例えばフロイドの不完全（完全）アジュバント、アルミニウムアジュバント、ウィルスエンベロープベクター等が挙げられる。

医薬的に許容しうる担体としては、例えばＰＢＳ、蒸留水等の希釈剤、生理食塩水等が挙げられる。

[0022] 医薬組成物として使用されるＤＮＡには、ＤＮＡ単体のほかに、本発明のＤＮＡを組み込んだベクターコンストラクトも含まれる。ベクターとしては、本発明のＤＮＡを医薬組成物として作用させることができるものであれば何でもよく、当該技術分野において周知の技術によって、医薬組成物の形態や目的に適したベクターが適宜採用され得る。ベクターとしては、これに限定されるものではないが、例えばプラスミドベクター、センダイウィルス、レトロウィルス、ワクシニアウィルス、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、ヘルペスウィルス、インフルエンザウィルスなどに由来するウィルスベクターなどが挙げられる。

[0023] 本発明の医薬組成物は、癌ワクチン、抗癌剤またはＤＮＡワクチンなどの形態で使用することができる。本発明の癌ワクチン、抗癌剤またはＤＮＡワクチンは、当該技術分野において周知の方法により、液剤、油剤、エマルジョン、ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤、錠剤、顆粒剤、固形剤等の形態にすることができる。

本発明の癌ワクチン及び抗癌剤は、その使用形態に応じて経口、非経口又は経皮投与することができる。例えば、静注投与、筋注投与、皮下投与、皮内投与等が挙げられる。投与量は、通常、患者の体重、疾患の性質及び状態に依存して変化するが、成人に使用する場合、１日あたり最大で５～１０ｍｇである。例えば、成人癌患者に皮下注射により使用する場合、1週間あたり０．１～１０ｍｇであり、好ましくは１００～１０００μｇである。

[0024] また、本発明のペプチドを使用して得られたＣＴＬは癌細胞を標的とするので、これを抗癌剤として使用することができる。この場合、前記の本発明のペプチドを含む抗癌剤と同様に、適宜医薬的に許容しうる担体を含み、かつ種々の形態をとることができる。本発明のＣＴＬを含む抗癌剤は、本発明のペプチドを含む癌ワクチン及び抗癌剤と同様に非経口投与することができる。

本発明の癌ワクチン、抗癌剤およびＤＮＡワクチンを適用しうる癌は、本発明のペプチドをＨＬＡ－Ａ２４により提示している癌細胞からなる癌、例えば上皮癌である。上皮癌としては、肺癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、膵癌、前立腺癌、乳癌等が挙げられる。

[0025] また、本発明のペプチドを、癌細胞を標的とするＣＴＬを誘導するために使用することができる。誘導は、例えば文献（Nabeta, Y.ら, Jpn. J. Cancer Res, 91, 616-621 (2000)）に記載の方法にしたがい行うことができる。

具体的には以下の工程：

（１）ＨＬＡ－Ａ２４を発現している細胞を提供する工程、

（２）前記細胞に本発明のペプチドを添加して、ＨＬＡ－Ａ２４上に提示させる工程

（３）前記ペプチドをＨＬＡ－Ａ２４により提示している細胞でＴ細胞を刺激し、前記Ｔ細胞を癌細胞標的ＣＴＬへ誘導する工程、

を含む方法を使用することができる。

ＨＬＡ－Ａ２４を発現する細胞は癌患者から採取したものでもよいが、非ＨＬＡ－Ａ２４発現細胞に、ＨＬＡ－Ａ２４をコードする遺伝子を導入して

作成してもよい。

## 実施例

[0026] 以下の実施例は本発明について、さらに具体的に説明するものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。当業者として通常の知識および技術を有するものは、本発明の精神を逸脱しない範囲で、下記実施例で示された態様に多様な改変を行うことができるが、かかる改変された態様も本発明に含まれる。

[0027] 実施例１

Ｓｏｘ２由来ペプチドのＨＬＡ－Ａ２４ペプチド結合アッセイ

Ｓｏｘ２のアミノ酸配列は、配列番号１６に示されている。ＨＬＡ－Ａ２４に結合するペプチドは、２番目のアミノ酸がチロシン、トリプトファン、フェニルアラニンまたはメチオニンであり、Ｃ末端のアミノ酸がロイシン、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニンまたはメチオニンであることが知られている。Ｓｏｘ２のアミノ酸配列に含まれる配列のうち、このＨＬＡ－Ａ２４結合モチーフを有する９から１１アミノ酸配列を選択し、以下のペプチドを計１３種類合成した。

[0028] ＳＯＸ２＿１：ＭＹＮＭＭＥＴＥＬ（配列番号１）

ＳＯＸ２＿５０：ＶＷＳＲＧＱＲＲＫＭ（配列番号２）

ＳＯＸ２＿５８：ＫＭＡＱＥＮＰＫＭ（配列番号３）

ＳＯＸ２＿８９：ＰＦＩＤＥＡＫＲＬ（配列番号４）

ＳＯＸ２＿１０９：ＫＹＲＰＲＲＫＴＫＴＬ（配列番号５）

ＳＯＸ２＿１１９：ＬＭＫＫＤＫＹＴＬ（配列番号６）

ＳＯＸ２＿１２４：ＫＹＴＬＰＧＧＬＬ（配列番号７）

ＳＯＸ２＿１６５：ＧＷＳＮＧＳＹＳＭ（配列番号８）

ＳＯＸ２＿１７０：ＳＹＳＭＭＱＤＱＬ（配列番号９）

ＳＯＸ２＿１９６：ＰＭＨＲＹＤＶＳＡＬ（配列番号１０）

ＳＯＸ２＿２０９：ＳＭＴＳＳＱＴＹＭ（配列番号１１）

ＳＯＸ２＿２１６：ＹＭＮＧＳＰＴＹＳＭ（配列番号１２）

ＳＯＸ２＿２２６：ＳＹＳＱＱＧＴＰＧＭ（配列番号１３）

[0029] Ｔ２－Ａ２４細胞はヒトリンパ芽球様細胞Ｔ２細胞にＨＬＡ－Ａ２４０２遺伝子を導入して発現させた細胞株である。この細胞の細胞表面には低レベルのＨＬＡ－Ａ２４分子が発現しており、ＨＬＡ－Ａ２４特異的モノクローナル抗体とフローサイトメーターを用いて検出することができる。発現レベルは平均蛍光強度(ＭＦＩ)として定量化される。この細胞に試験管内で合成ペプチドを添加すると、添加したペプチドがＨＬＡ－Ａ２４分子と結合する場合、結合親和性と相関して細胞表面ＨＬＡ－Ａ２４発現レベルが増加する。この実験系を用いて、本発明のＳＯＸ２由来癌抗原ペプチドのＨＬＡ－Ａ２４結合親和性を解析した。

[0030] Ｔ２－Ａ２４細胞を、２６℃で一晩培養した。その後細胞をＰＢＳで洗浄し、ＳＯＸ２由来の合成ペプチド、ポジティブコントロールとしてヒト免疫不全ウィルス由来のペプチドであるＨＩＶペプチド（配列番号１４）、エプスタインーバーウィルス由来のペプチドであるＥＢＶペプチド（配列番号１５）、およびネガティブコントロールとして卵白アルブミン由来のペプチドであるＳＬ８ペプチド（配列番号１７）を加えて、２６℃で３時間共培養した。温度を３７℃にしてさらに２．５時間共培養した後、遠心分離して上清を除き、細胞を単離した。単離した細胞にＨＬＡ－Ａ２４抗体（Ｃ７７０９Ａ２．６）を加え、４℃で１時間静置し、その後ＰＢＳで洗浄した。２次抗体として蛍光標識抗マウスＩｇＧ＋ＩｇＭ抗体を加え、４℃で３０分静置した後、１％ホルマリンを加えて細胞を固定した。固定した細胞を、フローサイトメーター（BD FACS Calibur）にて、ＦＩＴＣ蛍光強度を計測した。

[0031] 結果は図１に示されている。ポジティブコントロールと同等以上か、それに近い蛍光強度を示した８個のＳＯＸ２ペプチドを、ＨＬＡ－Ａ２４結合性ペプチドと判定した。

[0032] 実施例２

ＣＴＬ誘導

インフォームドコンセントを得たＨＬＡ－Ａ２４陽性肺がん患者あるいは

ＨＬＡ－Ａ２４陽性健常者の末梢血５０ｍｌから、フィコール・コンレイ密度勾配中で遠心することにより、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を分離、回収した。続いてＣＤ８　ＭＡＣＳ　ｂｅａｄｓを用いて、ＰＢＭＣよりＣＤ８陽性リンパ球とＣＤ８陰性リンパ球に分離した。

９６ウェルプレートで２０００００個／ウェルのＣＤ８陰性リンパ球と上記ＨＬＡ－Ａ２４結合性ＳＯＸ２ペプチドをそれぞれ混ぜ、室温で２時間静置後、１００Ｇｙ分放射線処理した。処理した細胞を２０Ｕ／ｍｌのＩＬ－２（武田薬品工業）、１０００００個／ウェルのＣＤ８陽性リンパ球と共培養し、ＣＤ８陽性リンパ球刺激を週１回行い、計３回刺激してＣＴＬを誘導した。誘導したＣＴＬのペプチド特異的反応性を細胞傷害アッセイあるいはＥＬＩＳＰＯＴアッセイにて評価した。

[0033] 実施例３

細胞傷害アッセイ

Ｔ２Ａ２４に$Cr^{51}$を加え、ＲＰＭＩ培地中で、３７℃で１時間培養して放射線標識した後、ＲＰＭＩ培地で4回洗浄した。Ｃｒ標識したＴ２Ａ２４にＳＯＸ２ペプチドあるいはコントロールペプチド（ＨＩＶペプチド）を混ぜ、室温で１時間静置した。ＳＯＸ２ペプチドあるいはコントロールペプチドをパルスした２０００個／ウェルのＴ２Ａ２４と、実施例２にて誘導した１４０００個／ウェルのＣＤ８陽性リンパ球をＲＰＭＩ培地中で、３７℃で４時間共培養した。その後上清を回収し、ガンマカウンターにてガンマ線量を測定した。

[0034] またＲＰＭＩ培地のみとペプチドパルスＴ２Ａ２４を培養した場合の線量を自然放出（ＳＰＲ）、細胞溶解液（２％のＮＰ４０）とペプチドパルスＴ２Ａ２４を培養した場合の線量を最大放出（ＭＸＲ）とし、細胞障害活性を（測定値－ＳＰＲ）／（ＭＸＲ－ＳＰＲ）×１００として算出した。

その結果、ＳＯＸ２＿１０９ペプチドをパルスしたＴ２Ａ２４に対して特異的に障害するＣＴＬを検出した。結果を図２に示す。コントロールペプチドであるＨＩＶ由来ペプチドでは、傷害細胞由来の放射線がほとんど検出さ

れないのに対して、ＳＯＸ２＿１０９ペプチドでは多く検出された。

[0035] 実施例４

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ

実験はHuman IFNγ ELISPOT set (BD)を使用して行った。ＥＬＩＳＰＯＴプレートに抗ＩＦＮγ抗体を４℃で一晩静置してコートした。Ｔ２Ａ２４にＳＯＸ２ペプチドあるいはコントロールペプチド(ＨＩＶペプチド)をそれぞれ加え、室温１時間静置した。５００００個のペプチドパルスしたＴ２Ａ２４と、実施例２にて誘導した１００００個のＣＴＬを抗ＩＦＮγ抗体をコートしたプレートで、３７℃で一晩共培養した。１×ＰＢＳと０．０５％のＴｗｅｅｎ２０で洗浄後、ビオチン標識抗ＩＦＮγ抗体を加え、室温で２時間静置した。１×ＰＢＳと０．０５％のＴｗｅｅｎ２０で洗浄後、ＨＲＰ標識ストレプトアビジンを加え、室温で１時間静置した。１×ＰＢＳと０．０５％のＴｗｅｅｎ２０で洗浄後、発色試薬を加え、スポット数を測定した。

[0036] 結果を図３に示す。ＳＯＸ２＿１０９ペプチドをパルスしたＴ２Ａ２４に対して特異的に反応するＣＴＬを検出した。コントロールペプチドであるＨＩＶ由来ペプチドでは、Ｔ細胞からのＩＦＮγの放出が検出されなかったが、ＳＯＸ２＿１０９ペプチドでは多くのＩＦＮγが放出されたことが確認できる。

[0037] 実施例５

各ＳＯＸ２由来ペプチドの細胞傷害性Ｔ細胞誘導能比較

ＨＬＡ－Ａ２４０２陽性の肺がん患者６人由来の末梢血を使用した。全ての患者からインフォームドコンセントを取得している。ＰＢＭＣｓを、Lymphoprep（登録商標）（Nycomed社、オスロ、ノルウェー）で、常法の密度勾配遠心分離法により分離した。

[0038] （１）ＣＴＬ誘導

上記で分離したＰＢＭＣｓを、１×１０$^{7}$ＰＢＭＣｓ／ウェルとなるように播種し、１０％のプールヒトＡＢ血清を含むＡＩＭ培地（ライフテクノロジーズ社）で培養した。ｐｃＤＮＡ３．１　ｐｌａｓｍｉｄ（Invitrogen）に

ＳＯＸ２全長をコードするｃＤＮＡを挿入し、これをマンノース被覆リポソームに包埋した（ＯＭＬ－ＳＯＸ２、株式会社バイオメッドコアにて作製）。１日目に、ＯＭＬ－ＳＯＸ２を０．１μｇ／ｍＬまたは１μｇ／ｍＬの濃度でパルスし、５０ＵのＩＬ－２を添加して１週間培養した。その後エンザイムリンクトエリスポット（以下、「ＥＬＩＳＰＯＴ」という）アッセイによりＳＯＸ２由来ペプチド特異的ＣＴＬｓを検出した。

[0039] （２）ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ

前記ＳＯＸ２由来ペプチドに対するＣＴＬｓの特異性を、既に報告されている方法（Tsuruma, Tら、J. Transl. Med., 6:24(2008)）に従って、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより判定した。まずマルチスクリーン９６ウェルプレート（ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ州）に、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍＬの抗ＩＦＮγ捕捉抗体（Beckton Dickinson Biosciences）を１００μＬ／ウェルで添加し、４℃で一晩無菌的に静置してコートした。プレートを２００μＬ／ウェルで一回洗浄し、１０％ヒト血清入りＡＩＭ－Ｖ培地２００μＬ／ウェルを用いて室温で２時間ブロッキングした。抗原提示細胞として、ＨＬＡ－Ａ２４を発現するＣ１Ｒリンパ腫の亜細胞株Ｃ１Ｒ－Ａ２４細胞を１０μｇ／ｍＬの前記各ＳＯＸ２ペプチドおよびネガティブコントロールとしてｓｕｒｖｉｖｉｎ２Ｂペプチドでパルスしたものを用いた。その後、５×１０$^{3}$個のＣＴＬｓを、５×１０$^{4}$個の抗原提示細胞Ｃ１Ｒ－Ａ２４細胞と共培養した。３７℃、５％$CO_2$で２４時間培養後、ＰＢＳでウェルを５回洗浄し、ビオチン化抗ヒトＩＦＮ－γ抗体および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合アビジンとともにインキュベートした。形成されたＩＦＮγスポットをKS ELISPOT（Carl Zeiss）を用いてカウントした。

[0040] 結果を図４に示す。表中の数字は計測されたスポット数を表している。ネガティブコントロールであるｓｕｒ２Ｂおよび（－）のいずれか数値の高い方の１．３倍以上のスポット数が計測されたものを陽性と判定した。表の下には各ペプチドに対して陽性を示した患者数を表している。ＳＯＸ２＿５０および＿５８に反応するＣＴＬはどの患者からも誘導されず、最も抗原性が

低いペプチドであると考えられる。それに対し、ＳＯＸ２＿１２４および＿２１６に反応するＣＴＬは４人の患者から誘導され、最も抗原性の高いペプチドであると考えられる。

[0041] 実施例６

細胞傷害アッセイ

（１）ＳＯＸ２由来ペプチドを抗原提示する細胞に対する傷害性

実施例５における患者Ａの末梢血リンパ球からＣＤ８陽性Ｔ細胞を実施例２と同様に分離し、その他の単核球細胞にはフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）を添加して芽球化させた。芽球化させた単核球細胞に放射線を照射し、前記ＳＯＸ２由来ペプチド１３種の混合物を１０μｇ／ｍＬの濃度で添加し、ＩＬ－２を５０単位添加して、ＣＤ８陽性Ｔ細胞とともに混合培養した。同様のペプチド刺激を１週間毎に３回行い、３回目の刺激から５日後に、Ｔ２－Ａ２４細胞、ＳＯＸ２ペプチド１３種の混合物を添加したＴ２－Ａ２４細胞（Ｔ２－Ａ２４－ＳＯＸ２）およびネガティブコントロールとしてヒト赤芽球様白血病細胞（Ｋ５６２）を標的として細胞傷害アッセイを行った。

[0042] 細胞傷害アッセイによる細胞傷害性計測は、$^{51}$Ｃｒ放出アッセイによって行った。標的細胞を１００μＣｉの$^{51}$Ｃｒで、３７℃で１時間標識し、ＲＰＭＩ１６４０培地で３回洗浄した。その後$^{51}$Ｃｒで標識した標的細胞を、エフェクター細胞とともに、様々なエフェクター／標的比率（Ｅ／Ｔ率）で、３７℃で６時間、Ｖ底の９６ウェルマイクロタイタープレートでインキュベートした。その後、上清を採集し、ガンマカウンターで放射能を計測した。%特異的細胞溶解（細胞傷害活性）は、実施例３と同様に計算した。

結果を図５ａ）に示す。ＳＯＸ２由来ペプチドと混合培養したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ＳＯＸ２由来ペプチドを添加したＴ２－Ａ２４細胞を特異的に傷害した。

[0043] （２）ＳＯＸ２発現細胞に対する傷害性

（１）と同様に、ＨＬＡ－Ａ２４陽性ＬＨＫ２肺がん細胞およびＳＯＸ２遺伝子導入ＬＨＫ２細胞（ＬＨＫ２－ＳＯＸ２）を標的として、細胞傷害ア

ッセイを行った。

結果を図５ｂ）に示す。ＳＯＸ２由来ペプチドと混合培養したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ＳＯＸ２を強制発現したＬＨＫ２細胞に対して高い細胞傷害活性を示した。

## 産業上の利用可能性

[0044] 本発明に基づく癌ワクチンまたは抗癌剤は、従来の治療法では治療や予防することが困難であった癌に対する有効な治療または予防手段となりうる。本発明は医療の向上、人類の福祉に貢献する。

# 請求の範囲

[請求項1] 癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞を誘導しうるペプチドであって、該ペプチドが、Ｓｏｘ２遺伝子によってコードされるポリペプチド由来のアミノ酸配列からなるか、またはそのアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されているアミノ酸配列からなり、かつＨＬＡ－Ａ２４によって抗原提示される、前記ペプチド。

[請求項2] ペプチドが、配列番号１、４～９および１２に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されている配列からなる、請求項１に記載のペプチド。

[請求項3] 請求項１または２に記載のペプチドにより誘導された、細胞傷害性Ｔ細胞。

[請求項4] 請求項１または２に記載のペプチドをコードする、ＤＮＡ。

[請求項5] 請求項１もしくは２に記載のペプチドおよび／または請求項３に記載の細胞傷害性Ｔ細胞および／または請求項４に記載のＤＮＡを含む、医薬組成物。

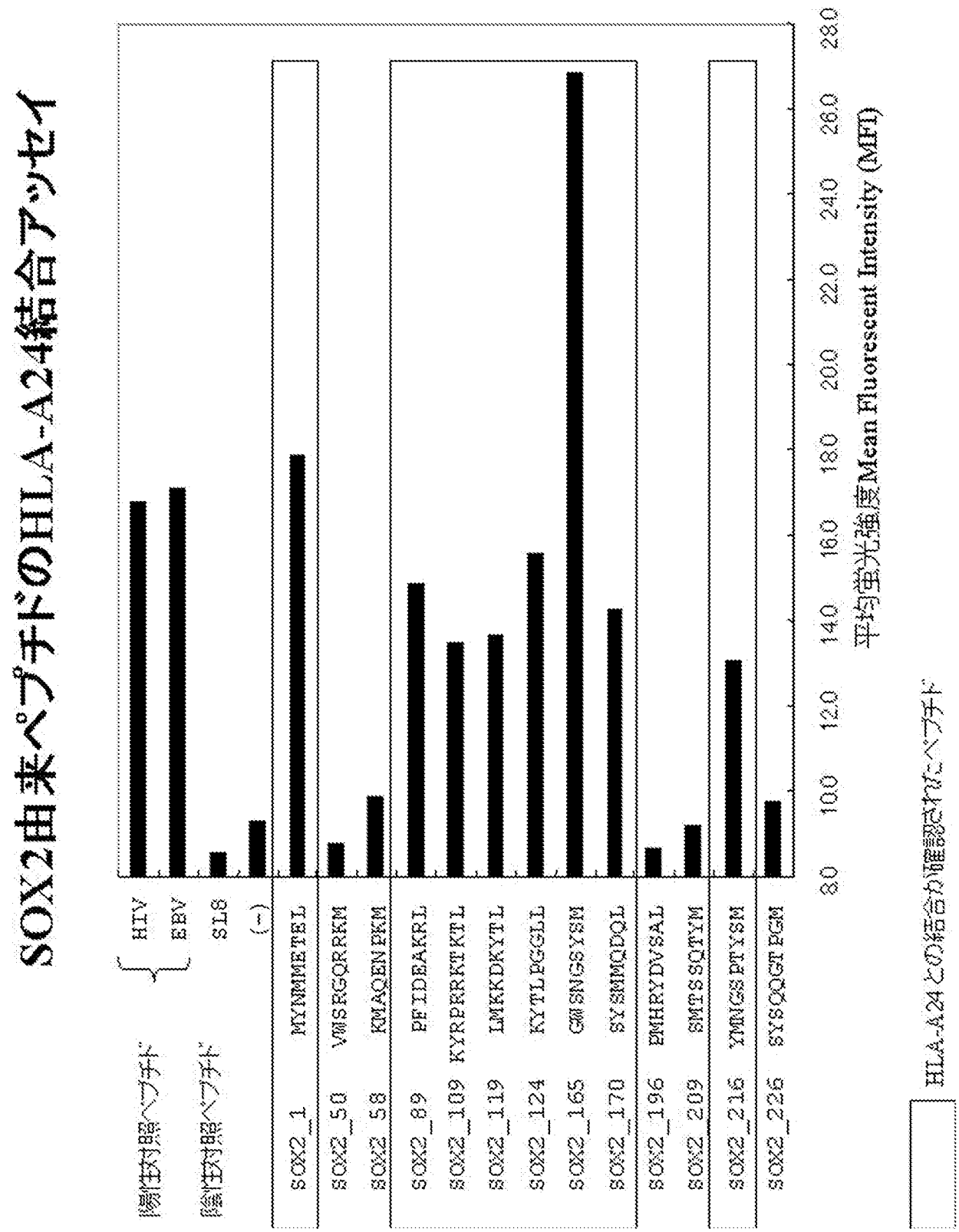
[請求項6] 医薬組成物が、癌ワクチンである、請求項５に記載の医薬組成物。

[請求項7] 医薬組成物が、抗癌剤である、請求項５に記載の医薬組成物。

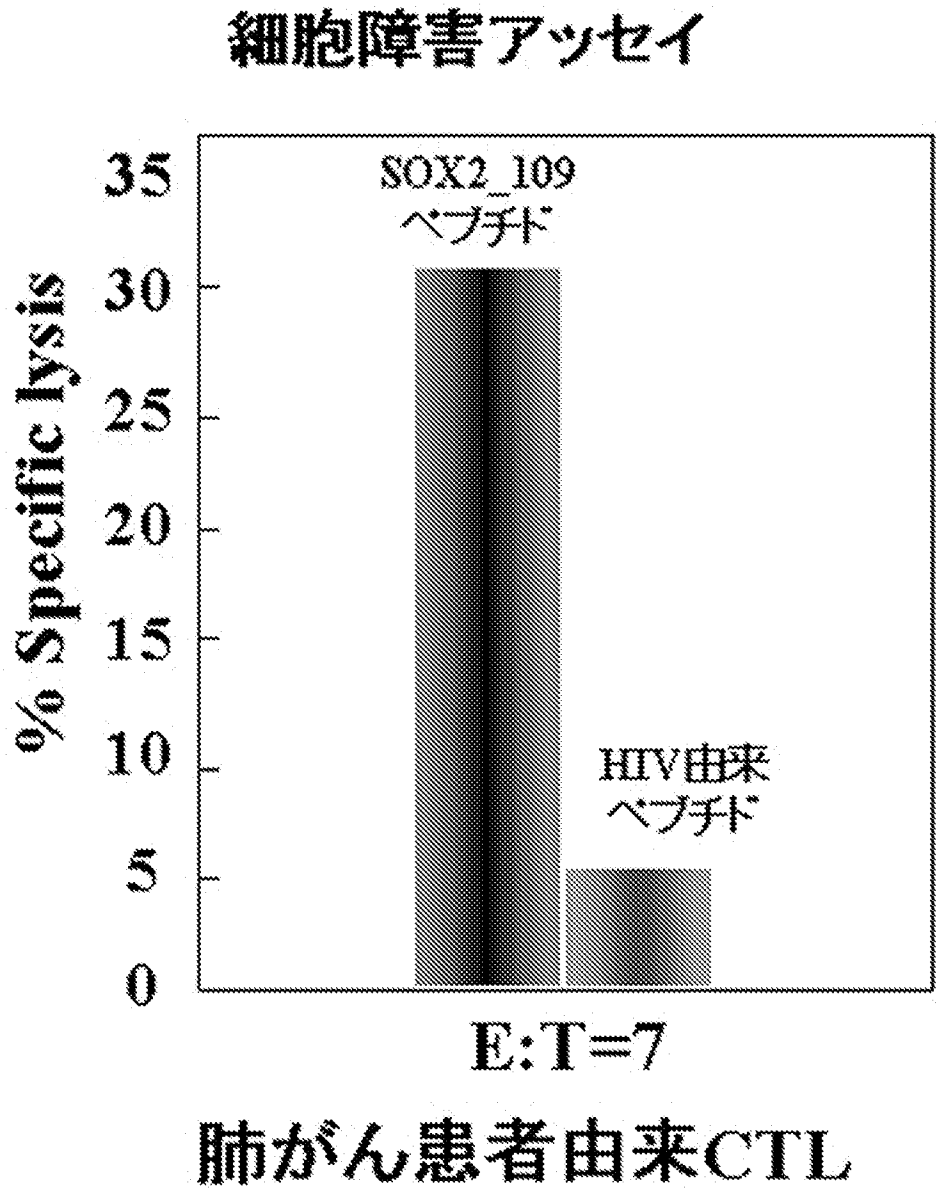
[請求項8] 医薬組成物が、ＤＮＡワクチンである、請求項５に記載の医薬組成物。

[請求項9] 癌細胞を標的とする細胞傷害性Ｔ細胞を誘導するための、請求項１または２に記載のペプチドの使用。

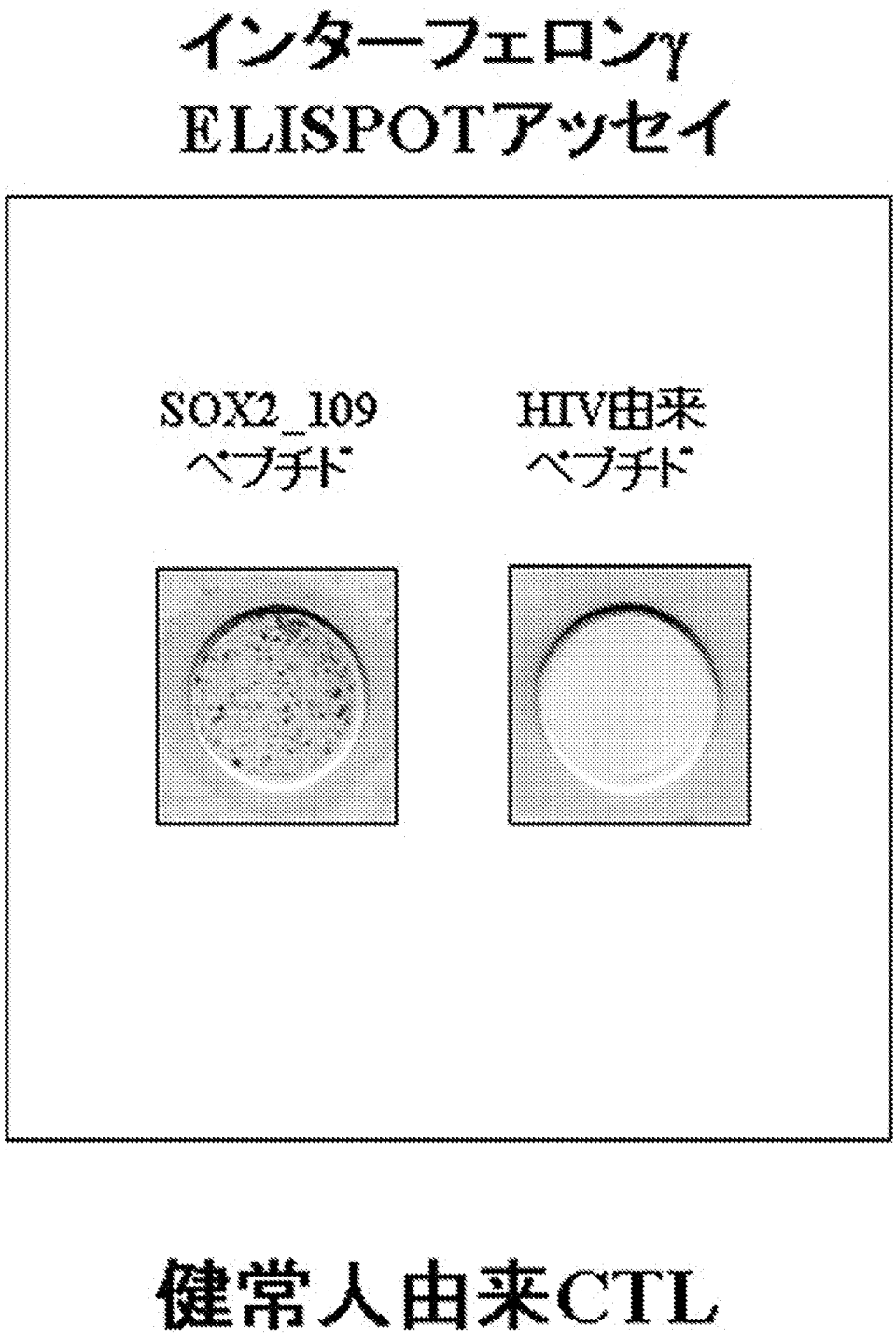
[図1]


SOX2由来ペプチドのHLA-A24結合アッセイ
陽性対照ペプチド
HTV
EBV
陰性対照ペプチド
SL8
(-)
SOX2_1 MYMMMETEL
SOX2_50 VMSRGQRRKM
SOX2_58 KMAQENPKM
SOX2_89 PFIDEAKRL
SOX2_109 KYRPRRKTKTL
SOX2_119 LMKKDKYTL
SOX2_124 KYTLPGGLL
SOX2_165 GMSNGSYSM
SOX2_170 SYSMMQDQL
SOX2_196 EMHRYDVSAL
SOX2_209 SMTSSQTYM
SOX2_216 YMMGSPTYSM
SOX2_226 SYSQQGTPGM
8.0 10.0 12.0 14.0 16.0 18.0 20.0 22.0 24.0 26.0 28.0
平均蛍光強度Mean Fluorescent Intensity (MFI)
HLA-A24との結合が確認されたペプチド

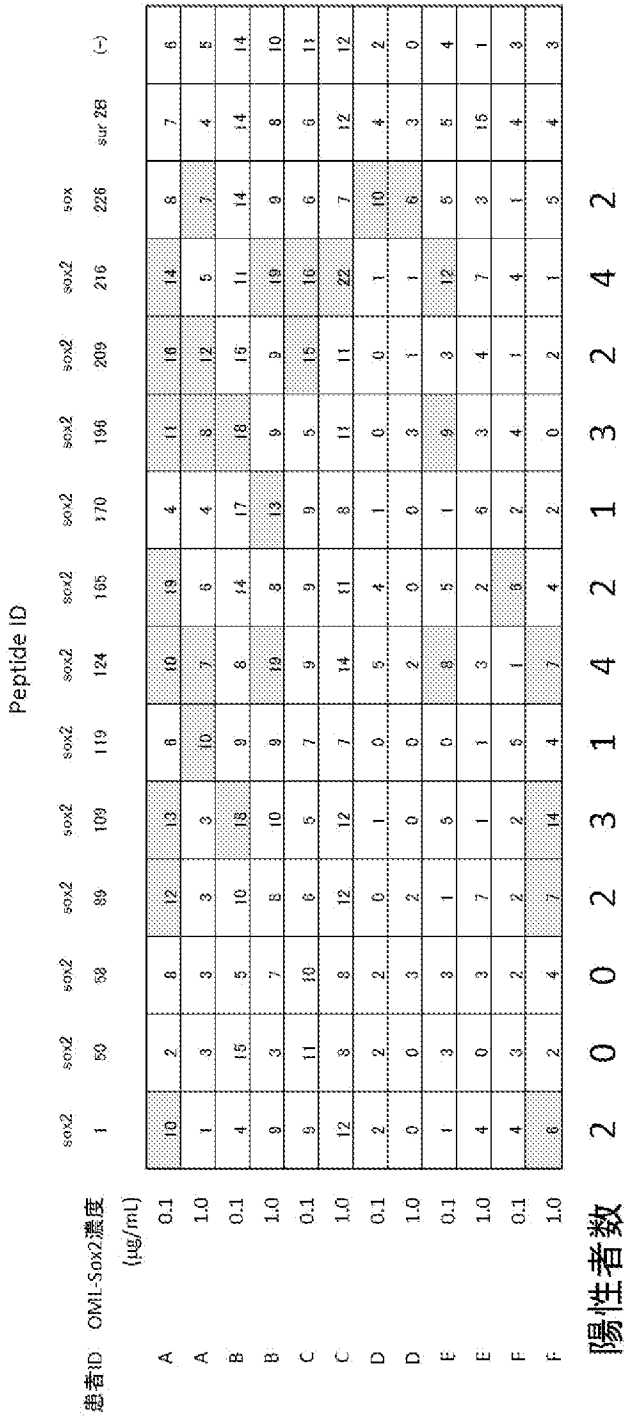
[図2]


細胞障害アッセイ
% Specific lysis
35
30
25
20
15
10
5
0
SOX2_109
ペプチド
HIV由来
ペプチド
E:T=7
肺がん患者由来CTL

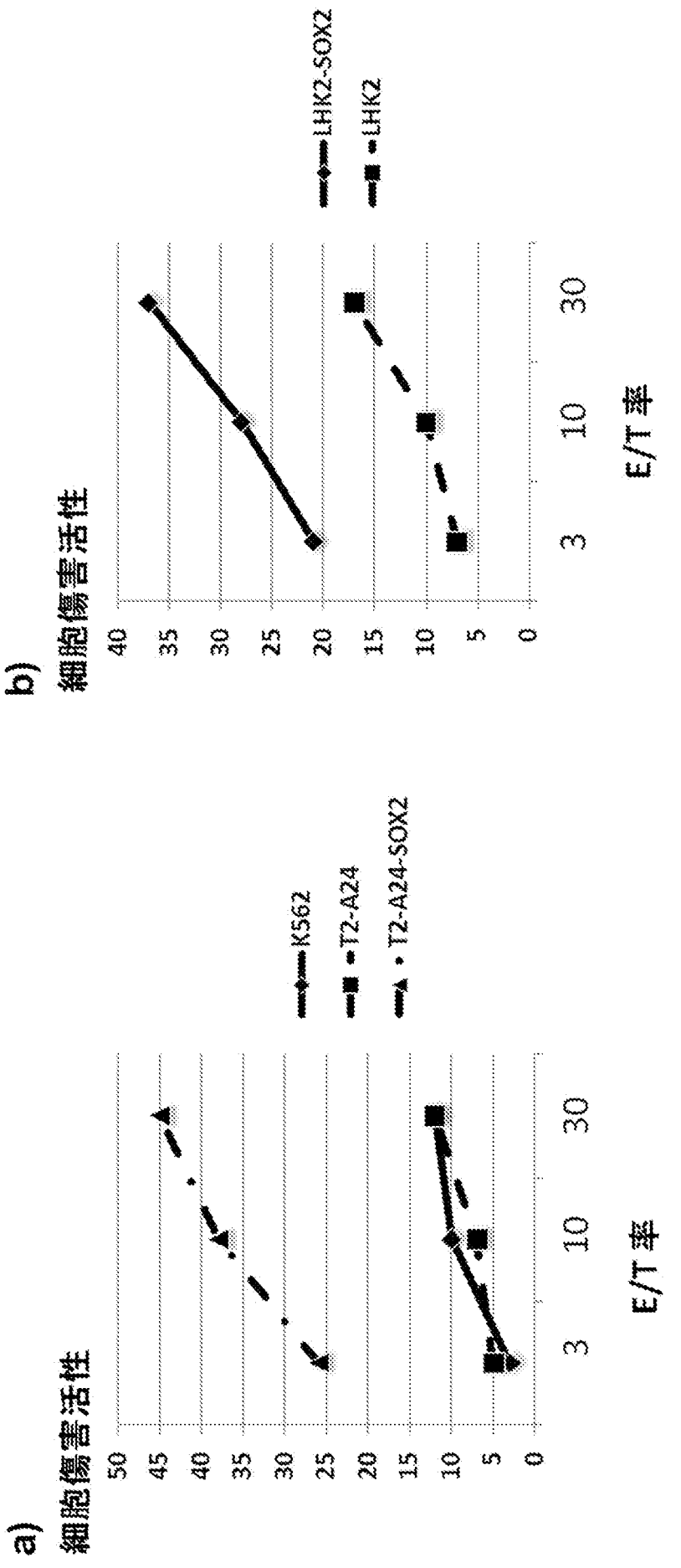
[図3]



[図4]


Peptide ID
患者ID
OM1-Sox2濃度 (μg/mL)
sox2 1
sox2 50
sox2 58
sox2 99
sox2 109
sox2 119
sox2 124
sox2 165
sox2 170
sox2 196
sox2 209
sox2 216
sox 226
sur 28
(-)
A 0.1 10 2 6 12 13 8 10 13 4 11 16 14 8 7 6
A 1.0 1 3 3 3 3 10 7 6 4 8 12 5 7 4 5
B 0.1 4 15 5 10 18 9 8 14 17 18 15 11 14 14 14
B 1.0 9 3 7 8 10 9 10 8 13 9 9 19 9 8 10
C 0.1 9 11 10 6 5 7 9 9 9 5 15 16 6 6 11
C 1.0 12 8 8 12 12 7 14 11 8 11 11 22 7 12 12
D 0.1 2 2 2 0 1 0 5 4 1 0 1 1 10 4 2
D 1.0 0 0 3 2 0 0 2 0 0 3 1 1 6 3 0
E 0.1 1 3 3 1 5 0 8 5 1 9 3 12 5 5 4
E 1.0 4 0 3 7 1 1 3 2 6 3 4 7 3 15 1
F 0.1 4 3 2 2 2 5 1 6 2 4 1 4 1 4 3
F 1.0 6 2 4 7 14 4 7 4 2 0 2 1 5 4 3
陽性者数 2 0 0 2 3 1 4 2 1 3 2 4 2

[図5]


a)
細胞傷害活性
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
3
10
30
E/T 率
K562
T2-A24
T2-A24-SOX2
b)
細胞傷害活性
40
35
30
25
20
15
10
5
0
3
10
30
E/T 率
LHK2-SOX2
LHK2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/054852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
*C12N15/09*(2006.01)i, *A61K38/00*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07K7/06*(2006.01)i, *C12N5/07*(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A61K38/00, A61P35/00, C07K7/06, C12N5/07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---|---|---|---|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2010 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2010 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2010 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CAplus/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | Munehide NAKATSUGAWA et al., "Gan Kansaibo Kogen Bunshi Toshite no SOX2", Society for Fundamental Cancer Immunology Sokai Shoroku, (2008), vol.12th, page 39, entire text | 1-9 |
| Y | Yoshihiko HIROHASHI et al., "Gan Kansaibo o Hyoteki to suru Men'eki Ryoho", Japan Society of Immunology & Allergology in Otolaryngology, (Jan.2009), vol.27th, page 75, entire text | 1-9 |
| Y | JP 2008-44848 A (Kurume University), 28 February 2008 (28.02.2008), entire text (particularly, paragraphs [0008], [0013]) & WO 2006/059529 A1 | 1-9 |

☒ 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 |
|---|---|
| 20 April, 2010 (20.04.10) | 27 April, 2010 (27.04.10) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office<br>Facsimile No. | Authorized officer<br>Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/JP2010/054852

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | SCHMITZ, M. et al., "Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy", Brt. J. Cancer, (2007), Vol.96, pp.1293-1301, entire text | 1-9 |
| A | SCHMITZ, M. et al., "Corrigendum, Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy", Brt. J. Cancer, (2007), Vol.96, p.1928, entire text | 1-9 |
| A | WO 2001/053349 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH), 26 July 2001 (26.07.2001), entire text & US 2004/0126808 A1 & EP 1259545 A | 1-9 |

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５４８５２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i

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.　C12N15/09, A61K38/00, A61P35/00, C07K7/06, C12N5/07

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

| | |
|---|---|
| 日本国実用新案公報 | １９２２－１９９６年 |
| 日本国公開実用新案公報 | １９７１－２０１０年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２０１０年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２０１０年 |

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）

MEDLINE/CAplus/REGISTRY/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
UniProt/GeneSeq

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 | 関連する請求項の番号 |
|---|---|---|
| Y | 中津川宗秀ら, "がん幹細胞抗原分子としてのSOX2", 基盤的癌免疫研究会総会抄録, (2008), Vol.12th, p.39, 全文 | 1-9 |
| Y | 廣橋良彦ら, "がん幹細胞を標的とする免疫療法", 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, （Jan.2009）, Vol.27th, p.75, 全文 | 1-9 |
| Y | JP 2008-44848 A (学校法人 久留米大学) 2008.02.28, 全文(特に段落【0008】,【0013】参照) & WO 2006/059529 A1 | 1-9 |

☑　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<br>２０．０４．２０１０ | 国際調査報告の発送日<br>２７．０４．２０１０ |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）<br>郵便番号１００－８９１５<br>東京都千代田区霞が関三丁目４番３号 | 特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３３３４<br>佐藤　巌<br>電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８ |

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求項の番号 |
|---|---|---|
| A | SCHMITZ, M. et al., "Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy", Brt. J. Cancer, (2007), Vol.96, pp.1293-1301, 全文 | 1-9 |
| A | SCHMITZ, M. et al., "Corrigendum, Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy", Brt. J. Cancer, (2007), Vol.96, p.1928, 全文 | 1-9 |
| A | WO 2001/053349 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 2001.07.26, 全文 & US 2004/0126808 A1 & EP 1259545 A | 1-9 |