(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2010-533735
(P2010-533735A)
(43)公表日　平成22年10月28日(2010.10.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/82	(2006.01)	C07K	14/82	ZNA	4B065
C12N 5/0784	(2010.01)	C12N	5/00	202M	4C085
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	E	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 21 頁）

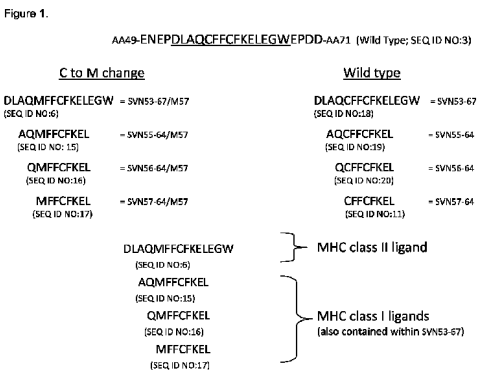
(21)出願番号　特願2010-517190 (P2010-517190)
(86)(22)出願日　平成20年7月18日 (2008.7.18)
(85)翻訳文提出日　平成22年3月16日 (2010.3.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/070496
(87)国際公開番号　WO2009/012460
(87)国際公開日　平成21年1月22日 (2009.1.22)
(31)優先権主張番号　60/961,206
(32)優先日　平成19年7月19日 (2007.7.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504206056
ヘルス　リサーチ　インコーポレイテッド
ＨＥＡＬＴＨ　ＲＥＳＥＡＲＣＨ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　１４２６３　バッファロー　エルム　アンド　カールトン　ストリーツ
(74)代理人　110000475
特許業務法人みのり特許事務所
(72)発明者　シーシールスキー，マイケル
アメリカ合衆国、ニューヨーク州　１４１２７、オーチャード　パーク、サイレント　メドウ　レーン（番地なし）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌ワクチンとしてのサバイビンペプチド

(57)【要約】
サバイビン発現癌を治療するための組成物と方法を提供する。前記組成物は、改良されたMHC-I結合特性を有するサバイビンペプチド模倣物のペプチドを含む。前記方法は、個体に、当該個体においてサバイビン発現癌細胞の増殖の抑制をもたらすために、改良されたMHC-I結合特性を有するサバイビンペプチド模倣物を投与することを含む。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号４(ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD)のペプチド、あるいはそのフラグメントを含むこと、
前記フラグメントは、配列番号４の９個以上の隣接アミノ酸を有すること、および前記フラグメントは配列番号５(QMFFCF)の配列を有すること
を特徴とする組成物。
【請求項２】
前記ペプチドが、配列番号６、配列番号１５、配列番号１６および配列番号１７からなる配列のグループから選択される配列で構成されることを特徴とする、請求項１に記載のペプチド。
【請求項３】
前記ペプチドが、配列番号６(DLAQMFFCFKELEGW)の配列で構成されることを特徴とする、請求項１に記載のペプチド。
【請求項４】
前記ペプチドが免疫原性のキャリアタンパク質と複合化していることを特徴とする、請求項１に記載のペプチド。
【請求項５】
前記組成物がさらに前記ペプチドとインキュベートされた樹状細胞を含むことを特徴とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
免疫賦活剤をさらに含むことを特徴とする、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
癌を有すると診断されたまたは疑われる個体において、癌細胞の増殖を抑制するための方法であって、
前記癌細胞がサバイビンを発現すること、前記方法が請求項１に記載の組成物を前記個体に投与することを含むこと、前記癌細胞の増殖が前記投与後に抑制されること
を特徴とする方法。
【請求項８】
前記個体が神経膠腫と診断されていることを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記個体がリンパ腫と診断されていることを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記ペプチドが免疫原性のキャリアタンパク質と複合化していることを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
前記ペプチドが、配列番号６の配列で構成されることを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
前記組成物中のペプチドが、前記ペプチドを取り込んだ樹状細胞内に存在することを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
前記癌細胞が腫瘍内に存在することを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項１４】
前記組成物が前記腫瘍の切除後に投与されることを特徴とする、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記組成物の投与が前記個体においてサバイビンに対する細胞性免疫応答を刺激することを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項１６】

実質的に精製された哺乳類の樹状細胞の集団であって、前記樹状細胞は、請求項１に記載のペプチドが前記樹状細胞によって取り込まれるように、当該ペプチドとインキュベートされていることを特徴とする、樹状細胞の集団。

【請求項１７】

前記ペプチドが配列番号６の配列で構成されることを特徴とする、請求項１６に記載の樹状細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は一般に癌ワクチンに関し、より詳しくは癌ワクチンとして使用するための修飾されたサバイビン(survivin)ペプチドに関する。

【背景技術】

【０００２】

サバイビンは、アポトーシスタンパク質(IAP)ファミリーの抑制物質に属する16.5kDaの細胞内タンパク質である。サバイビンは細胞分裂を調節する紡錘体装置と協調して働く。それは、細胞周期のG2/M期の間に特定の細胞で発現され、細胞周期進行のこの期の間に紡錘体微小管形成中心に結合する [Zhao J, et al. (2000) J Cell Sci, 113:4363-71; Li F, et al. (1998) Nature, 396:580-4; Fortugno P, et al. (2002) J Cell Sci, 115:575-85]。サバイビンは、直接的にアポトーシスを阻害する、特定のカスパーゼの機能を調節することも明らかにされている[Tamm I, et al. (1998) Cancer Res, 58:5215-20; Conway et al. (2000) Blood 95:1435-42; Shin S, et al. (2001) Biochemistry, 40:1117-23]。加えて、サバイビンは、細胞周期進行を可能にする、サイクリンD/cdk4複合体を抑制する [Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle, 1(5):322-6]。このように、サバイビンは、細胞周期を調節するため、およびアポトーシス細胞死を抑制するため、複数の異なる細胞部位で重要な役割を果たす。

【０００３】

サバイビンは、多くの癌細胞で細胞周期のG(2)/M期の間に過剰発現し、今日までに同定された最も特異的な癌抗原の一つである。それは腫瘍の大部分で発現し、正常な成人組織ではまれにしか検出できない[Overwijk WW, et al. (1998) J Exp Med, 188:277-86; Adida C, et al. (1998) Am J Pathol 152:43-49]。サバイビンは、場合によっては、造血成長因子によって刺激されたCD34(+)造血幹および前駆細胞内で発現されるが、一般的にはこれらの細胞の表面に表れない[Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle. 1(5):322-6]。

【０００４】

多くの他の癌に加えて、サバイビン発現は、予後不良に関連する悪性神経膠腫で一般に発現する [Kajiwara Y, et al. (2003) Cancer 97:1077-1083; Sasaki T, (2002) Acta Neuropathol (Berl) 104:105-109; Chakravarti A, et al. (2002) J Clin Oncol, 20:1063-8]。サバイビンは、多くの異なる種類の癌によって発現されるため、結果的に、腫瘍ワクチンターゲットとしてのその使用は、抗癌ワクチン療法のために大きな意味を有する。しかしながら、従来の研究は、腫瘍チャレンジ(challenge)後に投与された際に有効なサバイビンペプチドを同定していない。さらに、ヒトでのサバイビンペプチドの潜在的有効性について利用できるデータはほとんどない。それゆえ、抗-サバイビン癌免疫療法として使用するための強い細胞性免疫応答を誘発できるサバイビンペプチドに対するニーズがなお存在している。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Zhao J, et al. (2000) J Cell Sci, 113:4363-71

【非特許文献２】Li F, et al. (1998) Nature, 396:580-4

【非特許文献３】Fortugno P, et al. (2002) J Cell Sci, 115:575-85

【非特許文献４】Tamm I, et al. (1998) Cancer Res, 58:5215-20
【非特許文献５】Conway et al. (2000) Blood 95:1435-42
【非特許文献６】Shin S, et al. (2001) Biochemistry, 40:1117-23
【非特許文献７】Fukuda S, Pelus LM. (2002) Cell Cycle, 1(5):322-6
【非特許文献８】Overwijk WW, et al. (1998) J Exp Med, 188:277-86
【非特許文献９】Adida C, et al. (1998) Am J Pathol 152:43-49
【非特許文献１０】Kajiwara Y, et al. (2003) Cancer 97:1077-1083
【非特許文献１１】Sasaki T, (2002) Acta Neuropathol (Berl) 104:105-109
【非特許文献１２】Chakravarti A, et al. (2002) J Clin Oncol, 20:1063-8

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明は、サバイビンを発現する癌を治療するための組成物および方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

前記組成物は、野生型サバイビンタンパク質配列のアミノ酸位置５７でシステインがメチオニンに変化したサバイビンペプチド模倣物を含む。前記ペプチドは９～２３個のアミノ酸長からなり、配列番号４の配列(ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD)もしくはそのフラグメントを有する。ここで、前記フラグメントは配列番号４の少なくとも９個の隣接するアミノ酸を含み、および前記フラグメントは配列番号５(QMFFCF)の配列も含む。前記ペプチドは、野生型サバイビン配列を有するペプチドによって誘発された細胞性免疫応答と比べて、サバイビン発現ヒト癌細胞に対するより優れたヒト細胞性免疫応答を刺激する能力がある。前記ペプチドは、神経膠腫のマウスモデルにおいて、生存期間を延長することも実証されている。

【０００８】

本発明の方法は、サバイビン発現癌を有すると診断されたもしくは疑われる個体に、当該癌の増殖が抑制されるように、本発明のペプチドを含有する組成物を投与することを含む。

また、本発明のペプチドが負荷された哺乳類の樹状細胞の、実質的に精製された集団も提供する。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】図１は、本発明で利用される野生型ペプチド配列と改変ペプチド配列の概要である。

【図２】図２は、MHCクラスI(HLA-A*0201)エピトープを示す野生型および改変ペプチド配列の図示的な比較である（ボックス内に示す）。本発明の全てのペプチドに共通する配列(QMFFCF)はサバイビン-53-67/57M内でイタリック体で表示されている。

【図３】図３は、サバイビンペプチド結合アッセイから得られたインビトロの試験データを示すグラフである。

【図４】図４は、サバイビンアミノ酸５３～６７に基づく改変ペプチドを利用したGL261マウスモデルにおける頭蓋内の生存研究から得られたデータを示すグラフである。前記ペプチドは、ペプチド負荷樹状細胞(DC)ワクチンを使用してまたはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)複合体として投与された。

【図５】図５は、本発明の方法によって治療されたマウス（右パネル）およびネガティブコントロールマウス（左パネル）の磁気共鳴画像法分析の写真である。

【図６】図６Ａ、６Ｂおよび６Ｃは、サバイビンペプチドのHLA-A*0201結合特性の分析から得られたデータを示すグラフである。図６Ａおよび６Ｂに要約されたデータを得るために、サバイビンペプチドエピトープは、MHCクラスIペプチド競合置換分析に使用された。IC50は、蛍光標識された既知のヒトMHCクラスIリガンド(HPV18-27)を置換するために要求されるサバイビンペプチドの50%阻害濃度を示す。ポジティブコントロールペプチド(Flu

& gp100)は、既知の免疫原性MHCクラスIリガンドを示す。データは、三通りのサンプルの平均蛍光±S.E.M.を示す。図６Ｃは、野生型および改変サバイビンペプチドエピトープの特異的HLA-A*0201五量体結合に関するデータを示すグラフである。

【図７】図７は、ヒト神経膠腫の標本から得られたサバイビンmRNAのRT-PCR増幅の電気泳動分離の写真である。RNAはヒト神経膠腫の細胞溶解物から単離され、RT-PCRを使用して増幅された。予期されたサイズのサバイビンバンドは、11/12サンプルにおいてもコントロール(M)でも大量に検出された。コントロールバンドはサバイビンcDNAのPCRに由来する。

【図８】図８は、同種異系ミスマッチU87神経膠腫でチャレンジ(曝露)されたサバイビン-負荷自己樹状細胞による生体外のＴ細胞刺激から得られたデータを示すグラフである(HLA-A*03Ｔ細胞 vs HLA-A*02神経膠腫；非自己-ミスマッチ)。

【図９】図９は、同種異系U87神経膠腫でチャレンジされたサバイビン-負荷自己樹状細胞による生体外のＴ細胞刺激から得られたデータを示すグラフである(HLA-A*02；非自己-マッチ)。

【図１０】図１０は、同種異系U87神経膠腫でチャレンジされたサバイビン-負荷自己樹状細胞による生体外のＴ細胞刺激が実施された第二のケースを示すグラフである(HLA-A*02；非自己-マッチ)。

【図１１】図１１は、自己神経膠腫でチャレンジされたサバイビン-負荷自己樹状細胞による生体外のＴ細胞刺激から得られたデータを示すグラフである(HLA-A*03, HLA-A*29；自己)。

【図１２】図１２は、同種異系DS-GBM神経膠腫でチャレンジされたサバイビン-負荷自己樹状細胞による生体外のＴ細胞刺激から得られたデータを示すグラフである(HLA-A*03；非自己-マッチ)。

【図１３】図１３は、自己CNSリンパ腫でチャレンジされたサバイビン-負荷自己樹状細胞による生体外のＴ細胞刺激から得られたデータを示すグラフである(HLA-A*2901, HLA-A*3002；自己)。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

本発明は、サバイビンを発現する癌細胞の増殖を抑制するための組成物および方法を提供する。本発明の組成物は、サバイビン発現癌細胞を有する腫瘍の増殖を抑制することができる強い抗腫瘍性細胞性免疫を誘発するサバイビンペプチド模倣物を含む。本発明の方法は、サバイビン発現癌を有すると診断されたまたは疑われる個体に、前記個体において前記サバイビン発現癌細胞の増殖を抑制するために有効な量で、本発明のペプチド模倣物を投与することを含む。ここで使用される増殖の抑制とは、現存する腫瘍のサイズの縮小を含み得る。

【００１１】

本発明の方法は、サバイビン発現癌細胞に対する細胞性免疫応答を刺激する。細胞性免疫の発生に関連して、頑強な細胞性免疫応答は一般に、CD8+Ｔ細胞応答(細胞傷害性Ｔ細胞またはCTL)を誘発できる、MHCクラスI分子と結合されて抗原提示細胞(APC)の表面に提示されるべきペプチドエピトープを要求すると考えられている。それ自体を持続するために、CTL免疫応答は、サイトカイン分泌性CD4+Ｔ細胞(ヘルパーＴ細胞)への、MHCクラスII分子と結合されたペプチドエピトープの提示を通じてサポートされることが望ましい。いくつかのサバイビンペプチドがCTL応答を誘発することが示されてきたが、アミノ酸番号５３～６７のサバイビンの領域から生存可能なペプチドワクチン候補を提供しようとする試みは、おそらくHLA*0201結合能の欠乏が原因で、失敗してきた[Bachinsky MM, et al. (2005) Cancer Immun. 22;5:6]。

【００１２】

本発明は、野生型サバイビン配列に由来するペプチドを提供することによって、これらのおよび他の制限を克服する。前記ペプチドは、MHC I結合特性を向上させる改変アミノ酸配列を含むので、サバイビン発現癌細胞に対するヒトCTL応答を誘発する際、当該ペプ

チドは野生型ペプチドより効果的である。

【００１３】

ヒトおよびマウスのサバイビン蛋白の完全なアミノ酸配列は、配列番号１および配列番号２として、それぞれ与えられる。ヒトおよびマウスの配列は、アミノ酸３１と７１の間の相同性が100%である。

【００１４】

本発明で提供されるペプチドは、 全長サバイビンのフラグメントである。フラグメントは９～２３個のアミノ酸サイズで変動可能である。配列番号３(ENEPDLAQCFFCFKELEGWEPDD)は、野生型サバイビンアミノ酸４９～７１からなる。

本発明の９～２３アミノ酸ペプチドはそれぞれ、野生型サバイビンタンパク質配列のアミノ酸５７位でシステインがメチオニンに変化している(Ｃ→Ｍ)。

配列番号４(ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD)は、全長サバイビンのアミノ酸５７位がＣからＭに変化している点を別にすれば、野生型サバイビンアミノ酸４９～７１からなる２３個のアミノ酸からなるペプチドである(Ｃ→Ｍ変化は、配列番号４のアミノ酸番号９に存在する)。本発明のペプチドは、アミノ酸９～２３個の間の全整数を含む、配列番号４の９～２３個の隣接アミノ酸で構成されることができ、前記ペプチドは全長サバイビンのアミノ酸５７位でＣ→Ｍ変化を含む。本発明のペプチドはそれぞれ、配列番号５で示されるコア配列(QMFFCF)も含む。

前記ペプチド用にここで使用される代表的なサバイビンペプチドおよび命名は図１に示される。

【００１５】

本発明によってもたらされるペプチドのいくつかの限定されない例は、図２にも描写され、配列番号５の前記コアエピトープ配列は、より長い適切なペプチド配列(図２の右に示されるペプチドにおいて、ボックスで囲われている)との関連で、ボックス内に・且つイタリック体で表示される。従って、イタリック体で表示されたコア配列を含むボックス内の配列のそれぞれは、本発明の範囲内に含まれるペプチドの配列である。

【００１６】

一実施形態において、本発明のペプチドは、配列番号６からなる(DLAQMFFCFKELEGW)。このペプチドは、そのほかに“SVN53-67/M57”、“サバイビンM57”および“M57”と称される。SVN53-67/M57は、ヒトMHC Ｉ分子と結合するためのエピトープ、およびCD4+ヘルパーＴ細胞応答を誘発する、ヒトMHC ＩＩ分子と結合する能力があるエピトープを含む。

【００１７】

特定の理論によって拘束されることを意図しないが、本発明のペプチド内のＣ→Ｍ変化は、ヒトの免疫系へのMHC Ｉ結合エピトープの提示を向上させ、一つには、MHC Ｉへのより効率的な固着を経て、結果的に、前記ペプチド、MHC Ｉ分子および場合によりＴ細胞レセプター間でのより長い結合期間をもたらし、それゆえ、より頑強な免疫応答をもたらすと考えられる。より短いペプチドは、MHC Ｉと独占的に結合できる。より長いペプチド(例えばアミノ酸15個の SVN53-67/M57など)は、MHCクラスＩに加えて、MHCクラスＩＩと結合するためにデザインされる。

【００１８】

我々は、SVN53-67/M57におけるＣ→Ｍアミノ酸置換が、野生型配列と比較してHLA-A*0201に対するインサイツ結合アッセイにおいて、MHC Ｉ結合を約７３倍増加することを実証する（図２および図６Ｃに要約する）。我々は、Ｃ→Ｍ変化を有するペプチドが、脳癌のマウスモデルにおいて、CD8+CTLを効率的に刺激するため、CD4+Ｔ細胞由来のサイトカインサポートを刺激するため、生存時間を増加するため（および潜在的に神経膠腫に治癒をもたらす）ために使用できること、そのほかに、ヒト神経膠腫およびCNSリンパ腫標本に対する強い生体外-溶解性応答を誘発するために使用できることも特定した。それゆえ、本発明のペプチドは、処理ペプチドのエピトープとMHC-Ｉアンカー残基の間の会合を付随して改良するために、ヒトにインビボでワクチンとして使用された際、サバイビン-発現癌細胞に対する増強されたMHC-Ｉ結合および改良されたCTL活性を誘発する方法において使

用できることが予期される。

【００１９】

SVN53-67ペプチド(Ｃ→Ｍ変化の有無にかかわらず)は、まとめると大きな患者集団を意味する多数のMHCクラスIおよびII分子に結合することが予期される(表１)。

【表１】

表1

MHCクラスI		MHCクラスII
HLA-A*0201	HLA-B*08	HLA-DRB1*0301 (DR17)
HLA-A*03	HLA-B*1501 (B62)	HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4)
HLA-A*1101	HLA-B*1510	
HLA-A*2402	HLA-B*18	HLA-DRB1*0701
HLA-A*2402	HLA-B*2705	HLA-DRB1*1501 (DR2b)
HLA-A*26	HLA-B*2709	
HLA-A*6801	HLA-B*3901	
HLA-B*0702	HLA-B*4402	
HLA-B*08	HLA-B*5101	
HLA-B*1402		

【００２０】

本発明のペプチドは、当業者に既知の任意の技術によってまたは今後開発される技術によって調製されることができる。例えば、前記ペプチドは、固相合成技術を使用して調製することができる［Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 15:2149-2154 (1963); M. Bodanszky et al., (1976) Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed.; Kent and Clark-Lewis in Synthetic Peptides in Biology and Medicine, p. 295-358, eds. Alitalo, K., et al. Science Publishers, (Amsterdam, 1985)］。下記文献に記載されているように、溶液法によるペプチドの合成が使用されてもよい［The Proteins, Vol. II, 3d Ed., p. 105-237, Neurath, H., et al., Eds., Academic Press, New York, N.Y. (1976)］。合成されたペプチドは、調製用の高速液体クロマトグラフィーまたは当該技術分野において利用できる他の匹敵する技術によって実質的に精製されてもよい。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸組成分析用技術によって確認することができる。

【００２１】

本発明のペプチドは、免疫反応を増強するために、適切な免疫賦活剤とともに処方されてもよい。適切な免疫賦活剤としては、ミネラル塩（水酸化アルミニウムおよびアルミニウムやカルシウムのリン酸塩のゲルが挙げられる）、オイルエマルジョンおよび界面活性剤をベースとする製剤、サポニン、AS02[SBAS2](水中油型エマルジョン)、モンタニド(Montanide)ISA-51およびISA-720、粒子状免疫賦活剤（ビロソームが挙げられる）、AS04、MPLとの[SBAS4]Al塩、ISCOMS(サポニンと脂質の構造複合体)、ポリラクチド コ-グリコリド(PLG)、天然および合成の微生物誘導体、類脂質性免疫賦活剤OM-174(リピドＡ誘導体)、合成オリゴヌクレオチド含有免疫賦活性CpGモチーフ、改質細菌性毒素、内在性のヒト免疫調節物質（hGM-CSFおよびhIL-12、hIL-15、hIL-17、hIL-21が挙げられる）、イミュダプチン(Immudaptin)および、不活性な媒体(金粒子が挙げられる)が挙げられるが、これに限定されない。前記ペプチドは、既知の技術に従って、標準的な薬学的に容認できるキャリアーと前記ペプチドを併用することによって調製される従来の剤形にて投与することができる。薬学的に容認できるキャリアーの例は、以下に見受けられる：Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005) 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins.

【００２２】
一実施形態において、本発明のペプチドは、免疫原性のキャリアタンパク質と複合化(包合)されてもよい。好適なキャリアとして、アメリカカブトガニ・ヘモシアニン(LPH)、カブトガニ・ヘモシアニン(TTH)、およびウシ血清アルブミン(BSA)、破傷風トキソイドおよびジフテリア毒素、DHBcAg、ポリリボトール・リボシルリン酸(PRP)、PncPD11、およびナノ粒子製剤が挙げられるがこれに限定されない。
【００２３】
一実施形態において、好適な免疫原性のキャリアタンパク質はキーホールリンペット・ヘモシアニン(KLH)である。
【００２４】
本発明のペプチドは、ペプチドを負荷した樹状細胞として投与されてもよい。したがって、前記方法は、樹状細胞がペプチドを取り込んで、ペプチド内に存在するMHCエピトープの提示を促進するペプチド負荷樹状細胞となるように、本発明のペプチドとインキュベートされた樹状細胞を、個体に投与することを含む。この目的に用いられる樹状細胞は、前記ペプチドとのインキュベーション後にそれらが送達される個体から単離されても良く、あるいは非自己-マッチド(matched)個体から得られてもよい。したがって、本発明は哺乳類樹状細胞の実質的に精製された集団を含む組成物も提供し、ここで、前記樹状細胞は、樹状細胞がペプチドを取り込むように、本発明のペプチドとインキュベートされている。
【００２５】
本発明の組成物を個体に導入するために、当業者に既知の様々な方法を使用することが出来る。これらの方法として、頭蓋内、くも膜下腔内、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経口および鼻腔内のルートが挙げられるが、これに限定されない。
【００２６】
本発明の方法で用いられる特定の投与計画の形態と性状は、投与ルートや、個体のサイズや疾患の段階といった他の周知の変数によって決定されるであろうことが、当業者に認識されるであろう。明細書中に提示された判断基準とデータに基づいて、当業者は任意の特定の個体に対する、サバイビン発現癌細胞の増殖の抑制に効果的なペプチド量を決定できる。一般に、投与されるペプチドの量はマイクログラムからミリグラムの量に及ぶと考えられる。
【００２７】
本発明の方法は、従来の抗癌治療と併せて実施されることができる。そのような治療として、化学療法、外科的処置および放射線療法が挙げられるが、これに限定されない。本発明の組成物は、そのような抗癌治療の前に、同時に、または後に投与されることができる。
【００２８】
以下の実施例は説明のために記載され、本発明を限定することを意図しない。
【実施例１】
【００２９】
本実施例は、SYFPEITHI分析によってMHCクラスI分子に結合することが予測される選択されたサバイビンペプチド・エピトープのインビトロ分析を提供する（表２）。ポジティブコントロール・ペプチド(OVA-258)は、強いポテンシャル結合を示すスコアを伴う既知の免疫原性MHCクラスIリガンドを表す。下線のアミノ酸残基は、MHC Iのアンカーポジションを表す。
【００３０】

【表２】

表2

予想される**H-2K^b**結合位置	エピトープ	スコア
OVA-258	ＳＩＩＮＦＥＫＬ（配列番号 7）	25
SVN-9	ＡＷＱＰＦＬＫＤ（配列番号 8）	12
SVN-18	ＲＩＳＴＦＫＮＷ（配列番号 9）	13
SVN-39	ＡＥＡＧＦＩＨＣ（配列番号 10）	12
SVN-57-64	ＣＦＦＣＦＫＥＬ（配列番号 11）	20
SVN-57-64/M57	ＭＦＦＣＦＫＥＬ（配列番号 17）	20
SVN-82	ＳＧＣＡＦＬＳＶ（配列番号 12）	18
SVN-L82	ＬＧＣＡＦＬＳＶ（配列番号 13）	18
SVN-97	ＴＬＧＥＦＬＫＬ（配列番号 14）	22

【００３１】

ペプチド結合アッセイに関するインビトロの試験データは、図３に示される。図３に示されるデータを得るために、サバイビンペプチド・エピトープは既存のMHCクラスIペプチド結合アッセイにおいて使用された。図３の平均蛍光は、H2-K^{b}へのSVNペプチドの結合を表す。表面MHCクラスI分子の発現が欠損しているマウスRMA-S細胞の表面上のH2-K^{b}分子の増加は、インビトロにおける実際のサバイビンペプチド結合を決定するために使用された。図３に示されたデータは、37℃での100μMペプチドの結合を表す。ネガティブコントロールはMHCクラスIに結合しない無関係のペプチドである。データは、三通りのサンプルの平均蛍光±S.E.Mを表す。

【００３２】

図３に示されるデータから分かるように、コンピューター解析は、MHC結合強度に対する改変ペプチド配列の影響を確実に予測するのに不十分である。特に、SVN_{97-104}は現在臨床試験中のペプチドであるが、表２のデータが、SVN_{97-104}は野生型や変異のSVN 57-64ペプチドよりも強い結合を示すはずであることを示しているにもかかわらず、SVN 57-64wtより少ない結合を示し、且つSVN 57-64/M57よりかなり少ない。さらに、アミノ酸に対する他の変化も、結合を高めるかもしれないが、我々は、コンピュータ解析が野生型配列に比べて改善されたMHC保持を予測するにもかかわらず、アミノ酸のアンカーポジション57、59および64に対する変化(57C>L、59F>Yおよび64L>Vの変化を含む)が、前記ペプチドに対する免疫応答を改善しないことを特定した。加えて、我々は、サバイビンアミノ酸位置82でのSからMへの変化を含むサバイビン・ノナペプチドの分析からも明らかなように、MHCクラスI第一アンカーポジションにおけるアミノ酸に対するメチオニンの単なる置換が、頭蓋内神経膠腫のマウスモデルにおいて必ずしも生存性の向上をもたらさないことも特定した。

【実施例２】

【００３３】

本実施例は、頭蓋内神経膠腫のマウスモデルの治療における本発明の方法の有効性を実証する。

【００３４】

サバイビンを発現する癌細胞に対する免疫応答を誘発する本発明のペプチドの能力を評価するために、我々は神経膠腫に対するワクチン有効性をテストするために利用できる最も厳密なモデルであると信じられているものを使用した。これに関連して、皮下腫瘍で得

られた結果が頭蓋内の有効性にそれほど反映されないことから、特に癌ワクチンを用いて頭蓋内腫瘍の増殖を抑制するのは非常に困難であることが広く知られている。複数のM57ベースのペプチド・ストラテジーに応答する頭蓋内腫瘍の増殖抑制は、本発明の有効な抗腫瘍効果をサポートする。

【００３５】

特別の定めのない限り、本実施例にて提示されたデータは、同系のGL261-C57BL/6マウス頭蓋内神経膠腫モデルを使用して作成された。脳内GL261神経膠腫モデルは、狭いサバイバル・ウィンドウ(survival window)、高い初期生存および一貫性のある再現性によって特徴付けられる。

【００３６】

以下の物質および方法が、本実施例にて提示されるデータを得るために利用された。

【００３７】

株化細胞と培養条件

GL261マウス神経膠腫細胞は、100mmの組織培養プレート上にて、10%のウシ胎児血清、5000ユニットのペニシリン/ストレプトマイシン、50μMの2-メルカプトエタノール、25mMのHEPES、および1xの非必須アミノ酸を含有する完全ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で、37℃・5%CO_2にて、一週間に２～３回培地を変えて増殖される。DC2.4樹状細胞株は、10%ウシ胎児血清、5000ユニットのペニシリン/ストレプトマイシン、50μMの2-メルカプトエタノール、25mMのHEPES、1xの非必須アミノ酸、20ng/ml GM-CSF(ニュージャージー州、ロッキーヒルのPeproTech社)を含有するRPMI中で、2×10^6細胞/mlの密度にて培養された。GL261マウス神経膠腫細胞は、100mmの組織培養プレート上にて、10%のウシ胎児血清、5000ユニットのペニシリン/ストレプトマイシン、50μMの2-メルカプトエタノール、25mMのHEPES、および1xの非必須アミノ酸を含有する完全ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中で、37℃・5%CO_2にて、一週間に２～３回培地を変えて増殖された。

【００３８】

ペプチド

ペプチド合成は、Fmocケミストリーおよび固体サポートレジン(テキサス州、ウッドランドのSigma-Genosys社)を使用して実施された。各ペプチドは使用するまで-20℃で貯蔵され、DMSOで希釈された。卵白アルブミン(OVA)ペプチド配列「SIINFEKL」はコントロールとして使用された。

【００３９】

ペプチド負荷樹状細胞を用いたマウスの免疫化

ペプチドを負荷した樹状細胞(DC)は、前述のように培地で増殖させたDC2.4株化細胞か、あるいは収集された骨髄由来の樹状細胞(BMDC)から産生された(例えば、Ciesielski et al. Cancer Immunol Immunother. 2006 Vol. 12, pp1491-503参照)。BMDCは、安楽死させた６週齢のC57BL/6マウスの長骨から収集され、細胞は、10%ウシ胎児血清、5000Uペニシリン/ストレプトマイシン、50μM 2-メルカプトエタノール、25mM HEPES、1x非必須アミノ酸および20ng/ml GM-CSF(米国、ニュージャージー州、ロッキーヒルのPeproTech社)を含有するRPMI中で2×10^6cells/mlの密度にて培養される。48時間後、非付着性細胞は除去され、GM-CSFを含む培地が補充される。６日後、非付着性細胞はペプチド負荷のために収集される。DC2.4細胞とBMDCは40μgの各ペプチドを用いて負荷される(1ml当たり3×10^6DCを含有する個々のウェルにペプチドを添加する)。ペプチドとDCは２時間37℃にてインキュベートされ、収集され、洗浄され、そしてPBS中に再懸濁される。計1×10^6DCが皮下ルートにより各動物にワクチン接種するために一般に使用される。同じ組成物の追加免疫(ブースター)ワクチンが、生存に応じて、７日ごとに与えられる。

【００４０】

脾細胞とＴ細胞の単離

ワクチン接種されたC57BL/6マウスの脾臓組織が、エンドポイントでの屠殺後、収集された。細胞は、無菌の鉗子を用いてマウスの脾臓から裂かれ、70μmのフィルター(BD Falcon社)を通される。脾細胞は、10%ウシ胎児血清、IL-2(10 units/ml)およびIL-7 (1 ng/m

l)を含有するDMEMで培養される。培地は２日目と７日目に補充される。Ｔ細胞を単離するために、脾細胞は、５分間遠心分離され、沈渣はRBC溶解緩衝液(lysis buffer)(R&D Systems社)中に再懸濁される。細胞は２度洗浄され、完全RPMI培地中に再懸濁される。

【００４１】

CTLによる腫瘍細胞溶解

標的腫瘍細胞の特異的Ｔ細胞溶解のための細胞アッセイは、Live/Dead細胞媒介性細胞傷害キット(Molecular Probes-Invitrogen社)を使用して実施される。GL261細胞は、トリプシン処理され、1×10^6cells/mlにて懸濁され、その後37℃にて20分間10μlの$DiOC_{18}$標識(緑色蛍光)の添加を行う。標識化後、細胞は遠心分離され、PBS中で２度洗浄され、1×10^6cells/ml DMEMにて再懸濁される。次に、1×10^4のGL261 $DiOC_{18}$-標識標的細胞は個々の培養管に添加される。ワクチン接種された動物の脾細胞は、1:25～1:100の範囲の比にて、標的細胞に添加される(37℃・２時間)。コンディションはまた、バックグラウンドレベル、自発性(自然発症)の膜完全性の減少および最大溶解を分析するためにセットアップされる。ヨウ化プロピジウムは、細胞を標識するために（浸透細胞膜を赤に標識）、各管に添加される。細胞はペレット状であり、FACS解析のために使用される。細胞傷害性のパーセンテージは、次の式を使用して計算される。

(実験に基づくPI-$DiOC_{18}$細胞－自発性)／(最大PI-$DiOC_{18}$－自発性PI-$DiOC_{18}$)×100

最大リリースは、$DiOC_{18}$標識標的細胞の凍結融解を繰り返すことによって測定される。自発性リリースは、エフェクター細胞の不在下でPI-$DiOC_{18}$細胞をインキュベートすることによって測定される。データはFCSエクスプレス・ソフトウェアを用いて解析される。解析は、エフェクター細胞に由来するいかなるバックグラウンドも除去するために、GL261細胞上のゲーティングに基づく。

【００４２】

脳内GL261腫瘍細胞注入および生存率分析

オスのC57BL/6マウスは、ケタミン(80mg/kg)およびキシラジン(20mg/kg)の腹腔内(i.p.)注射で麻酔され、定位的ヘッドフレーム(カリフォルニア州、タハンガのDavid Kopf Instruments社)内に固定される。正中頭皮切開が行われ、十字縫合が確認される。定位座標が深部前頭白質内への細胞の移植のために計測される(十字縫合の2.0mm側方)。穿頭孔はこのポイントに穿孔され、1×10^5GL261細胞が、５μlのDMEM中に懸濁され、固定25-ゲージカニューレ付きのハミルトンシリンジを通じて、硬膜に対して3.0mmの深さで注入される。注入は、2.5μl/minで行われる。針は取り除かれ、切開を縫合した。カプラン・マイヤー生存プロットが描かれ、生存期間中央値が全てのグループに対して決定される。生存率の差異は、logrank Mantel-Cox法を使用して有意性を評価される。

【００４３】

マウスの頭蓋内神経膠腫モデルにおける生存研究に基づく結果の概略は、表３に示される。

【表３】

表3

ペプチド配列	結果
DLAQMFFCFKELEGW (SVN53-67/57M) （配列番号6）	DCワクチン＝平均生存期間53日 100日生存者:2/8
DLAQMFFCFKELEGW (SVN53-67/57M) （配列番号6）	KLHワクチン＝平均生存期間51日 100日生存者:1/8
AQMFFCFKEL (SVN55-64/57M) （配列番号15）	DCワクチン＝平均生存期間43日
QMFFCFKEL (SVN56-64/57M) （配列番号16）	DCワクチン＝平均生存期間40日
MFFCFKEL (SVN57-64/57M) （配列番号17）	DCワクチン＝平均生存期間29日
DLAQCFFCFKELEGW (SVN53-67) （配列番号18）	DCワクチン＝平均生存期間57日 100日生存者:2/8
CFFCFKEL (SVN57-64) （配列番号11）	DCワクチン＝平均生存期間25日

【００４４】

図４は、脳内GL261神経膠腫移植片を有するC57BL6マウスの生存時間を示す頭蓋内生存研究から得られたデータの図式的な概要を示す。図４に示されるデータを得るために、マウスは1×10^5GL261細胞を頭蓋内に移植され、サバイビンペプチドDCワクチンで治療された。C57BL/6マウスは、SVN57-64系改変ペプチドかまたはOVA258-265ペプチドを負荷したDC2.4細胞、および、フロイント不完全アジュバント(IFA)中の100ugのSVN 53-67/M57-KLHペプチド＋100ngのGM-CSFの直接皮下注射で免疫された。ワクチン接種は腫瘍細胞移植後４日目に始まり、治療状況をシミュレートするために７日ごとに繰り返された(追加免疫された)。生存時間はカプラン・マイヤー法にしたがってプロットされた。長期生存者は、高磁界強度MRIによって腫瘍がないことが確認された。

【００４５】

表３および図４から分かるように、ペプチドSVN57-64/M57 DC ワクチンはGL261-C57BL/6神経膠腫モデルにおいて野生型ペプチドを適度に上回り生存期間を増大する。重要なことに、SVN53-67/M57とSVN53-67(野生型)の双方が、DCワクチンとして使用された際、40日以上に渡ってマウスに100%生存率を与える。SVN53-67/M57はKLHワクチンとしてもテストされ、51日の平均生存期間をもたらした。

【００４６】

図５は、図４に示される生存曲線のマウスから得られた代表的な磁気共鳴画像を示す。通常は、左のパネルのコントロールマウスの脳に示されるように、致死性の腫瘍が１８日までに発生する。SVN53-67/M57 ペプチドワクチンを受けたマウスは、４０日の時点でまだ腫瘍がなかった。小さな針路と残存した瘢痕組織がワクチン接種したマウス画像の左前頭半球に観察されるかもしれない。

【００４７】

このように、本実施例は、本発明のペプチドは生存を高める能力があり、治療の可能性があることを、臨床的に関連する神経膠腫のマウスモデルにおいて実証する。

【実施例３】

【００４８】

本実施例は、野生型ペプチドと比べて本発明のペプチドの増強されたMHCクラスI結合を実証し、また、本発明の方法が、サバイビンを発現するヒト癌細胞に対して（非-神経膠腫癌細胞に対して、を含む）増強された細胞性免疫応答を誘発できることも実証する。

【００４９】

特定の理論に拘束されることは意図しないが、M57変化がマウスH-2Kb分子に対して、アンカーポジションに位置していないことから、SVN53-67/M57とSVN53-67は、C57BL/6マウスにおいて類似した生存特性を示すと考えられる。そのため、両方のペプチドはマウスにおいて同程度にH-2Kb(マウスのMHCクラスI対応物)と結合するであろう。SVN53-67/M57が、警告されたヒトエピトープを含有するにもかかわらず、マウスにおいて野生型免疫原性応答を保持するという観察は、それが効果のあるペプチド模倣物であるということ(そのようなアミノ酸変化がＴ細胞レセプターとの相互作用の破壊に起因して免疫にネガティブに影響することが予期される得るという事実にもかかわらず)、およびSVN53-67/M57がワクチンとして使用される際、Ｃ→Ｍ変化が有害作用を与えないことを意味する。しかしながら、57ＣのＭへの変化が、野生型ペプチドを、それがヒトMHC Ｉとの改良された相互作用を促進する配列を含むように変化させるので、本発明のペプチドは、ヒトへの投与において、増大したポテンシャルを示すことが予期される。これは野生型およびM57ペプチド(図６Ａ－Ｃ)の異なるMHCクラスI結合特性によってサポートされる。競合的ペプチド結合アッセイによって決定されるように、SVN53-67/M57は野生型SVN53-67(図６Ａ－Ｂ)より約１２倍強くHLA-A*0201に結合する。さらに、サバイビン/MHCクラスI-特異的五量体を利用すると、コアペプチドSVN56-64/M57は野生型SVN56-64より約７３倍強くHLA-A*0201に結合する(図６Ｃ)。まとめると、これはＣ→Ｍ変化が野生型サバイビン配列と比べてMHCクラスI分子に対するペプチド模倣物の増強された親和性を導くことを示す。このように、ＣをＭに変化させることは、野生型配列を上回るMHCクラスI結合における著明な改善を引き起こす。この改善は、自己の癌細胞に対する増強されたCTL活性化をもたらすことが予期される。したがって、野生型ペプチドと比べて、SVN53-67/M57が同種異系HLA-マッチドヒト神経膠腫(図９－１０)、自己ヒト神経膠腫(図１１－１２)および自己ヒトリンパ腫細胞(図１３)に対するCTL媒介性死滅において３～５倍の増加を生じさせることは注目に値し、本発明の方法が、野生型配列を有するペプチドによって誘導されるものより有意に改良された細胞性免疫応答を誘発できることを実証している。さらに、図１３のデータは、本発明の方法が、神経膠腫以外のヒト癌細胞に対する細胞性免疫応答を誘発できることを実証する。このように、当該方法は、サバイビンを発現する全てのタイプの癌細胞に対する広い適用性を有することが予期される。

【実施例４】

【００５０】

本実施例は、ヒトU87神経膠芽腫またはヒトリンパ腫細胞でチャレンジされたサバイビン-負荷自己ヒト樹状細胞を用いた生体外のＴ細胞刺激を実証する。これらのチャレンジから得られたデータは図８－１３に示される。

【００５１】

図８－１３に示されたデータを得るために、標的細胞の特異的Ｔ細胞溶解のCTLアッセイが、フローサイトメトリーを使用する生/死(Live/Dead)細胞媒介性細胞傷害法を使用して行われた。患者由来の末梢血単球細胞(PBMC)はGM-CSFおよびIL-4の存在下にて生体外でDCへと培養された。未熟DCへの分化の５～６日後、特異的ペプチドが、刺激して成熟DCを発達させるために、CD-40Lとともに添加された。成熟後に追加の自己PBMCが添加され、CTL'sへ発達させられた。１０日後、細胞は除去され、CTL'sの細胞殺傷能力を評価するために、培養中の自己もしくは同種異系のヒト神経膠腫細胞と混合された。CTLは、３７℃にて２時間、５：１～４０：１の範囲の比にて標的神経膠腫細胞に添加された。解析は、エフェクター細胞由来のバックグラウンドを除くために、標識された神経膠腫細胞のゲーティングに基づいている。最大細胞傷害性(Max.)は、エタノール処理標的細胞を使用してシミュレートされた。自発性細胞傷害性(Spont.)は、エフェクター細胞の不存在下でインキュベートされた標的細胞を表す。Fluとgp100ペプチド刺激は、追加の刺激コントロールを

表す。データは三通りのサンプルの特異的溶解平均パーセント±S.E.M.を表す。

【００５２】

図１３に示されるデータは、自己CNSリンパ腫細胞(自己もしくは同種異系の神経膠腫ではなく)に対するCTLsの効果が解析されたことを除いては、図９－１２と基本的に同じ方法で得られた。

【００５３】

図９－１２に示すデータは、非自己-マッチドもしくは自己の神経膠腫に対する強い細胞性免疫応答の誘発における本発明のペプチドの有効性を実証する。それゆえ、本発明の方法は、個体に施された際、同様の応答を誘発することが予期される。重要なことに、強い細胞性免疫応答は自己のCNSリンパ腫細胞に対しても発生し(図１３)、本発明のペプチドが神経膠芽腫細胞のみに対して細胞性応答を誘発する能力を有するだけではないことを実証している。

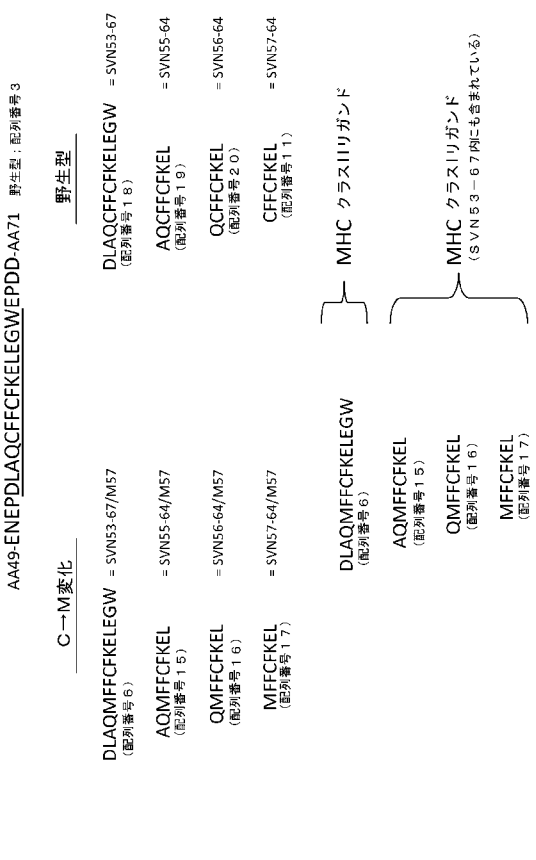
【００５４】

このように、上述のデータに基づいて、本発明の方法が個体において任意のタイプのサバイビン発現癌細胞に対して効率的な細胞性免疫応答を誘発し、したがってそのような癌細胞の増殖を抑制することが予期される。

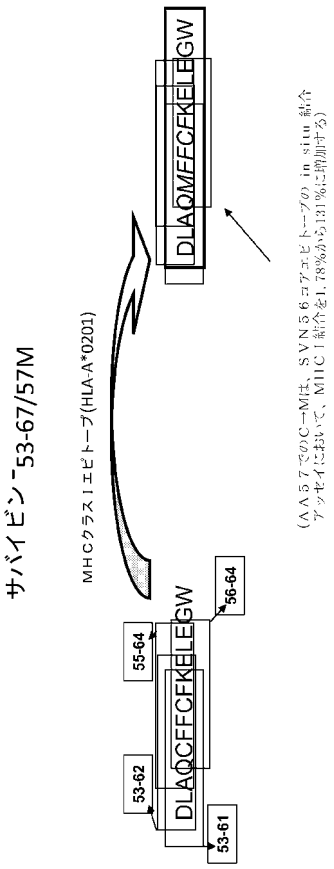
【００５５】

本発明は特定の実施形態を通して説明されてきた。しかしながら、組成物、方法および装置への通例の変更は当業者に明らかであり、そのような変更は本発明の範囲内で保護されることが意図される。

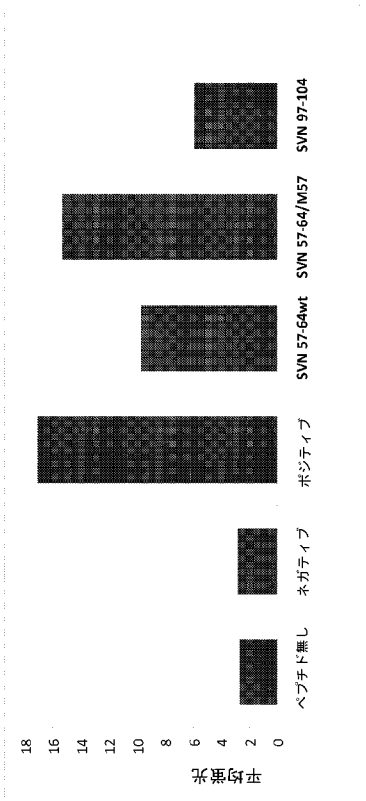
【図１】



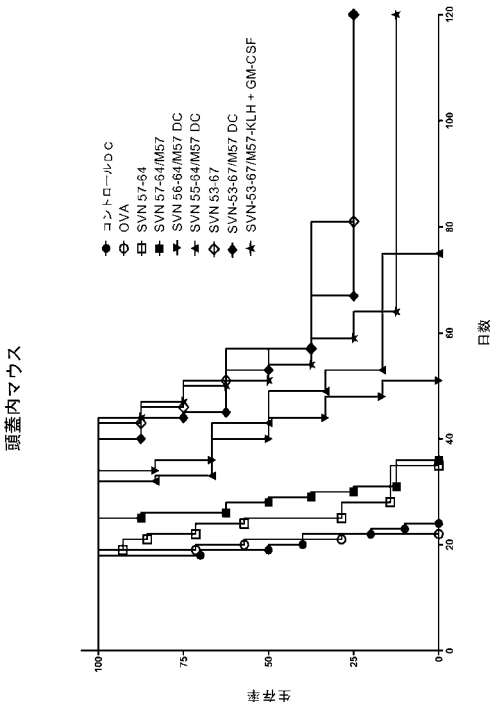
【図２】



【図３】



【図４】



【図５】

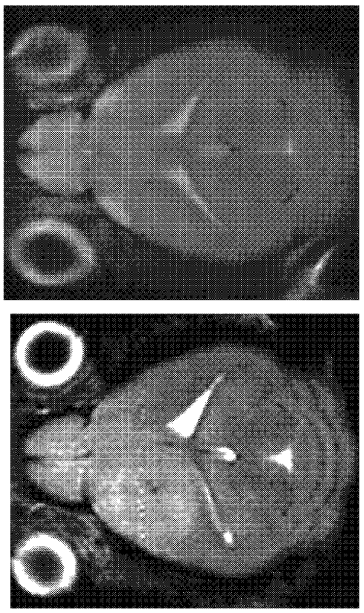
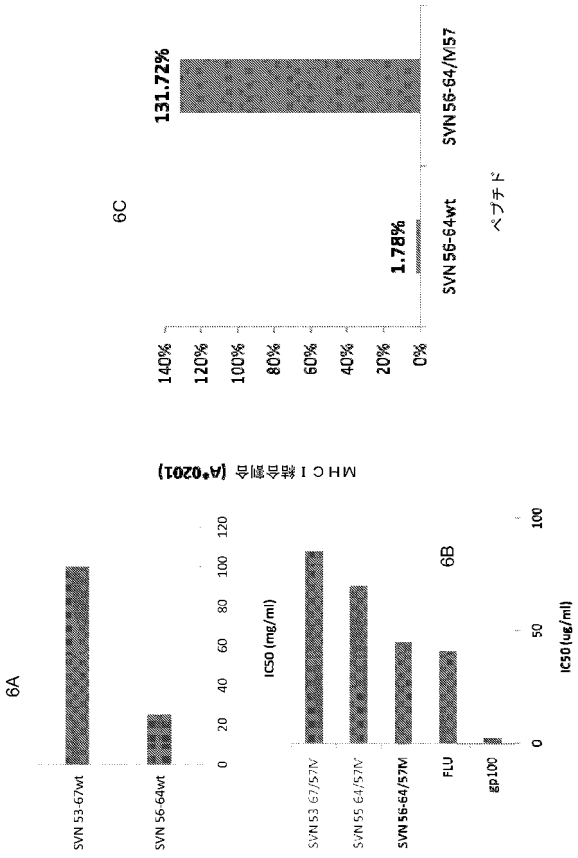


Figure 5.

【図６】



【図７】

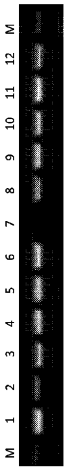
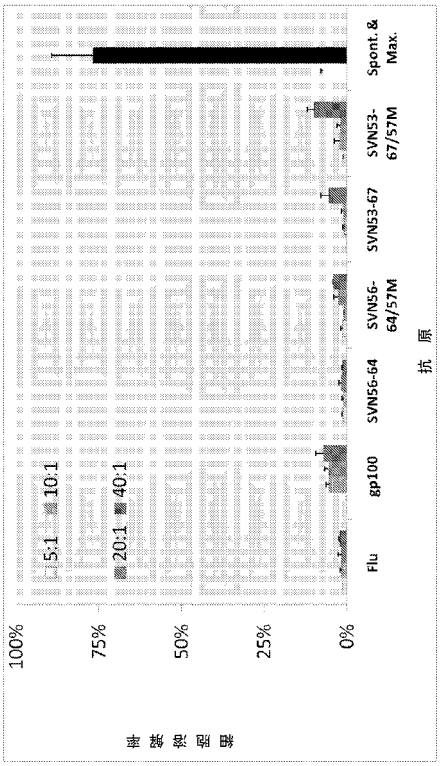
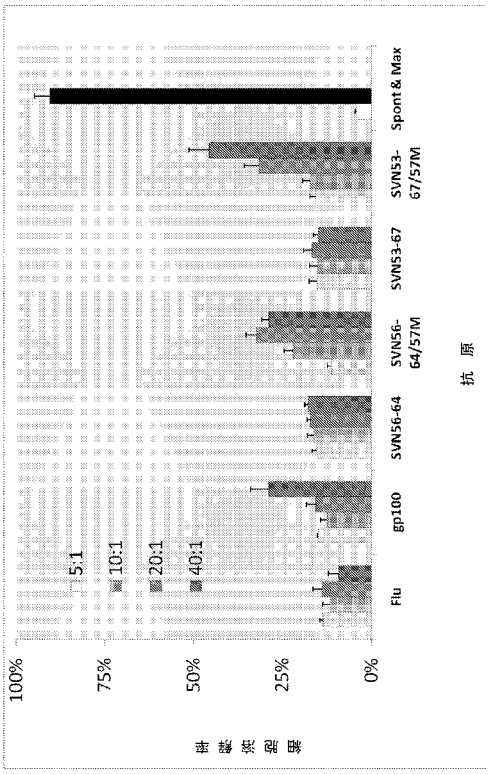


Figure 7.

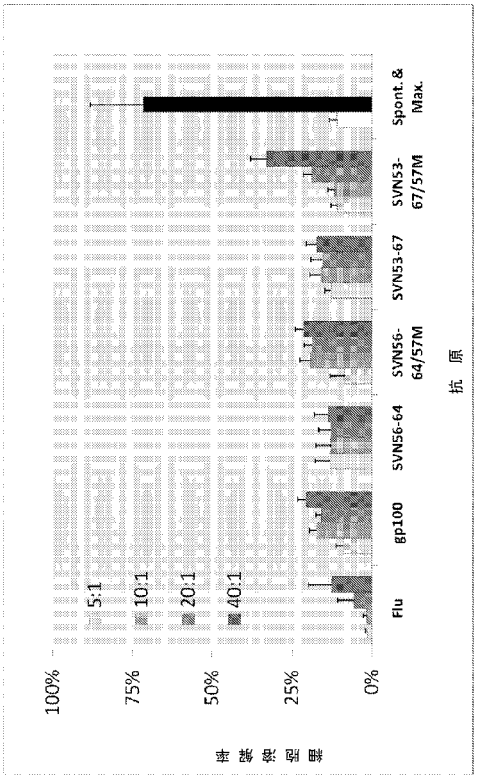
【図８】



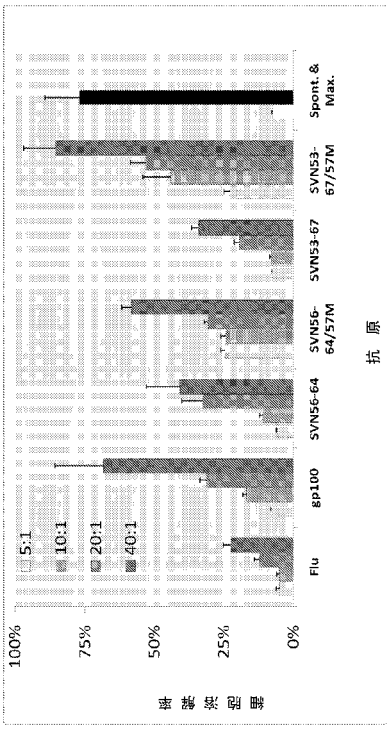
【図９】



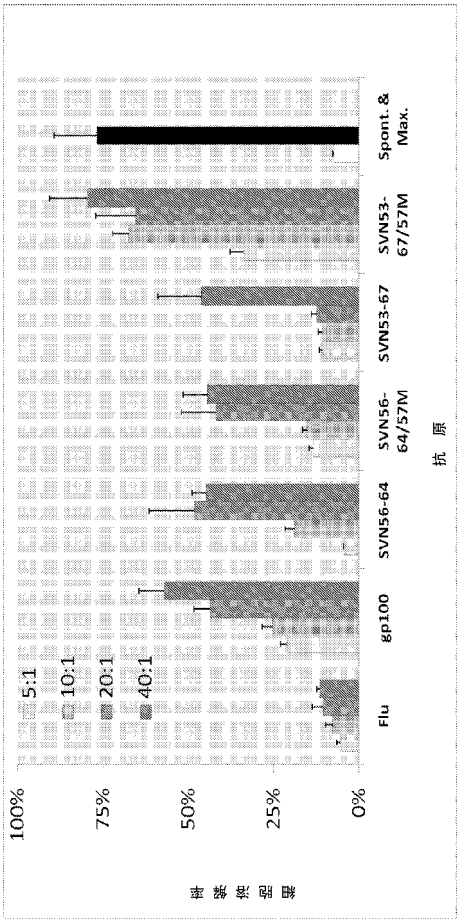
【図１０】



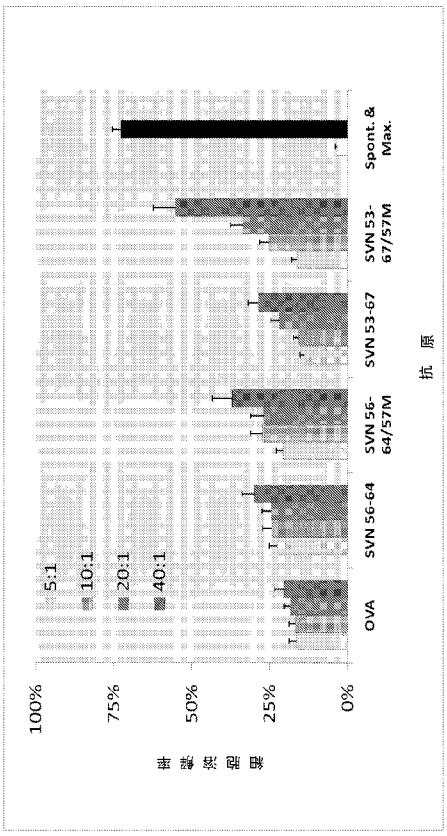
【図１１】


5:1
10:1
20:1
40:1
100%
75%
50%
25%
0%
溶菌活性率
Flu
gp100
SVN56-64
SVN56-64/57M
SVN53-67
SVN53-67/57M
Spont. & Max.
抗原

【図１２】


5:1
10:1
20:1
40:1
100%
75%
50%
25%
0%
溶菌活性率
Flu
gp100
SVN56-64
SVN56-64/57M
SVN53-67
SVN53-67/57M
Spont. & Max.
抗原

【図１３】


5:1
10:1
20:1
40:1
100%
75%
50%
25%
0%
溶菌活性率
OVA
SVN 56-64
SVN 56-64/57M
SVN 53-67
SVN 53-67/57M
Spont. & Max.
抗原

【配列表】
2010533735000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/70496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 38/00; A61K 39/00 (2008.04)
USPC - 530/300; 424/185.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - A61K 38/00; A61K 39/00 (2008.04)
USPC - 530/300; 424/185.1; 530/326, 530/328, 530/329; 424/193.1; 514/2, 514/13, 514/14, 514/15, 514/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC(8) - A61K 38/00; A61K 39/00 (2008.04) - see keyword below
USPC - 530/300; 424/185.1; 530/326, 530/328, 530/329; 424/193.1; 514/2, 514/13, 514/14, 514/15, 514/17 - see keyword below

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google; Search terms: survivin, vaccine, fragment, contiguous, peptide, amino acid, immunogenic, protein carrier, dendritic cell, adjuvant, cancer, glioma, lymphoma, purified, taken up, administered, vaccine, identical, similarity; SEQ ID NOs:4, 5, 6, 15, 16, and 17

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2007/0104689 A1 (GILLIES et al.) 10 May 2007 (10.05.2007), entire document especially para [0002], [0004], [0005], [0006], [0007], [0008], [0013], [0015], [0018], [0019], [0021], [0030], [0035], [0034], [0048], [0102], [0103], [0124], [0158], [0169], [0170], [0184], [0186], and [0187]; Fig. 3	1-8 and 10-17 ———— 9
Y	US 2006/0073159 A1 (VONDERHEIDE et al.) 06 April 2006 (06.04.2006), para [0022], [0041], [0042], and [0068]	9

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

* 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
26 October 2008 (26.10.2008)	07 NOV 2008
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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/70496

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material
   - [x] a sequence listing
   - [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material
   - [ ] on paper
   - [x] in electronic form

   c. time of filing/furnishing
   - [x] contained in the international application as filed
   - [x] filed together with the international application in electronic form
   - [ ] furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

(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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 フェンスターメイカー，ロバート，エイ．
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 １４１２７、オーチャード パーク、アパートメント ナンバー７、カントリーサイド レーン ３１０

Ｆターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AC20 BD39 CA45
4C085 AA03 BB01 BB11 CC32 EE06 FF13
4H045 AA10 AA20 AA30 BA42 CA41 DA86 EA31 FA33