

(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2010-533866

(P2010-533866A)

(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)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-517084 (P2010-517084)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月11日 (2008. 7. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年3月15日 (2010. 3. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/069807
 (87) 国際公開番号 W02009/012156
 (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 60/959, 726
 (32) 優先日 平成19年7月13日 (2007. 7. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/003, 499
 (32) 優先日 平成19年11月16日 (2007. 11. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ゴドウスキー, ポール ジェー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 10, ヒルズバラ, オレンジ コート
 25

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌、炎症性疾患及び自己免疫疾患の治療及び診断方法

(57) 【要約】

腫瘍関連マクロファージの活性を標的とした治療を伴う癌の治療方法が提供される。腫瘍関連マクロファージ及び脂肪組織マクロファージを用いた治療を伴う癌、炎症性疾患及び自己免疫疾患の治療方法もまた提供される。

【選択図】 図 1 7

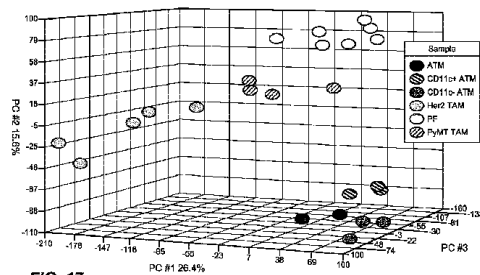


FIG. 17

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞試料中の炎症関連組織マクロファージ（IRTM）を同定する方法であって、細胞試料を、少なくとも1つのマクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第1の薬剤及び少なくとも1つの樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第2の薬剤と接触させ、少なくとも1つの第1の薬剤及び少なくとも1つの第2の薬剤の両方に認識される細胞の存在を決定することを含む、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が、抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が同じ分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記分子が、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3より多い異なる特異性を有する抗体及び記載される抗体の抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項4に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記マクロファージに特異的な細胞表面マーカーが、F4/80である、請求項1の方法。

【請求項 7】

前記樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーが、CD11cである、請求項1の方法。

【請求項 8】

前記IRTMが腫瘍関連マクロファージ（TAM）である、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記IRTMが脂肪組織マクロファージ（ATM）である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び少なくとも1つの第2の薬剤の両方に認識される細胞の存在を決定することが、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取、磁気細胞分離、アフィニティークロマトグラフィ、FISH及び免疫顕微鏡法から選択される方法の少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞試料が腫瘍試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

TAM又はATMを細胞の混合物から単離する方法であって、(a)細胞試料を、少なくとも1つのマクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第1の薬剤及び少なくとも1つの樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第2の薬剤と接触させ、(b)少なくとも1つの第1の薬剤及び少なくとも1つの第2の薬剤の両方に認識される細胞を単離することを含む、方法。

40

【請求項 13】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が、抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項12に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が同じ分子である、請求項12に記載の方法。

【請求項 16】

前記分子が、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3より多い異なる特異性を有する抗体及び記載される抗体の抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記マクロファージに特異的な細胞表面マーカーが、F4/80である、請求項12の方法。

【請求項 18】

前記樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーが、CD11cである、請求項12の方法。

【請求項 19】

前記単離するステップが、FACS、アフィニティークロマトグラフィ、及び磁気細胞分離の少なくとも1つを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 20】

対象の増殖性疾患を診断する方法であって、対象におけるTAMの存在及び/又は活性を決定することを含む、方法。

【請求項 21】

前記決定するステップが、少なくとも1つのマクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第1の薬剤及び少なくとも1つの樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第2の薬剤と接触させ、少なくとも1つの第1の薬剤及び少なくとも1つの第2の薬剤の両方に認識される細胞の存在を決定することを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記増殖性疾患が乳癌である、請求項20に記載の方法。

【請求項 23】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項21に記載の方法。

【請求項 24】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が、抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項21に記載の方法。

【請求項 25】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び/又は少なくとも1つの第2の薬剤が同じ分子である、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

前記分子が、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3より多い異なる特異性を有する抗体及び記載される抗体の抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記マクロファージに特異的な細胞表面マーカーが、F4/80である、請求項21の方法。

【請求項 28】

前記樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーが、CD11cである、請求項21の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも1つの第1の薬剤及び少なくとも1つの第2の薬剤の両方に認識される細胞の存在を決定することが、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取、磁気細胞分離、アフィニティークロマトグラフィ、FISH及び免疫顕微鏡法から選択される方法の少なくとも1つを含む、請求項21に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

対象における腫瘍を段階分けする方法であって、対象における TAM の存在及び / 又は活性を決定することを含む、方法。

【請求項 31】

前記決定するステップが、少なくとも 1 つのマクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第 1 の薬剤及び少なくとも 1 つの樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する第 2 の薬剤と接触させ、少なくとも 1 つの第 1 の薬剤及び少なくとも 1 つの第 2 の薬剤の両方に認識される細胞の存在を決定することを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記増殖性疾患が乳癌である、請求項 30 に記載の方法。

10

【請求項 33】

前記少なくとも 1 つの第 1 の薬剤及び / 又は少なくとも 1 つの第 2 の薬剤が、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

前記少なくとも 1 つの第 1 の薬剤及び / 又は少なくとも 1 つの第 2 の薬剤が、抗体又はその抗原結合フラグメントである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

前記少なくとも 1 つの第 1 の薬剤及び / 又は少なくとも 1 つの第 2 の薬剤が同じ分子である、請求項 34 に記載の方法。

20

【請求項 36】

前記分子が、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3 より多い異なる特異性を有する抗体及び記載される抗体の抗原結合フラグメントからなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記マクロファージに特異的な細胞表面マーカーが、F4/80 である、請求項 31 の方法。

【請求項 38】

前記樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーが、CD11c である、請求項 31 の方法。

30

【請求項 39】

前記少なくとも 1 つの第 1 の薬剤及び少なくとも 1 つの第 2 の薬剤の両方に認識される細胞の存在を決定することが、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取、磁気細胞分離、アフィニティークロマトグラフィ、FISH 及び免疫顕微鏡法から選択される方法の少なくとも 1 つを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 40】

前記決定するステップが、対象から得られた細胞の試料を、集団的に、特異的に TAM に発現する 2 又はそれ以上の細胞表面受容体を認識する 1 又は複数の薬剤と接触させ、1 又は複数の薬剤に認識された細胞を同定することを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 41】

TAM の生存度又は活性を調節することを含む、対象における腫瘍を治療する方法。

40

【請求項 42】

TAM の生存度又は活性の調節が、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料からの TAM の選択的除去を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

TAM の選択的除去が、(a) 前記集団又は試料と TAM 結合剤と接触させ、(b) 前記 TAM 結合剤に特異的に結合する細胞を前記集団又は試料から選択的に除去することを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記 TAM 結合剤が少なくとも 1 つの抗体を含み、前記選択的に除去するステップが抗

50

体媒介クリアランス、プロテインAクロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、FACS及び磁気細胞分離から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

TAMの生存度及び活性の調節が、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料中のTAMを選択的に死滅させることを含む、請求項41に記載の方法。

【請求項46】

TAMの選択的な死滅が、(a)前記集団又は試料とTAM結合剤と接触させ、(b)前記TAM結合剤に特異的に結合する細胞を前記集団又は試料から選択的に死滅させることを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記TAM結合剤が、少なくとも1つの抗体を含み、前記選択的に死滅させるステップが補体媒介性細胞障害性である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記TAM結合剤が、少なくとも1つの抗体を含み、前記選択的に死滅させるステップが抗体にコンジュゲートした細胞障害性分子に媒介される、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

TAMの生存度又は活性の調節が、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料中のTAMの活性を阻害することを含む、請求項41に記載の方法。

【請求項50】

TAMの活性の阻害が、前記集団又は試料における一又は複数のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害を含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記TAM分泌サイトカインがTGFである、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

一又は複数のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害が、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤の投与を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項53】

前記TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤が、サイトカイン/ケモカインの活性を阻害する抗体又はその抗原結合フラグメント、サイトカイン又はケモカインに特異的な受容体又は小分子から選択される、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

一又は複数のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害が、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストの投与を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項55】

前記対象がヒト被験者である、請求項41ないし54の何れか一項に記載される方法。

【請求項56】

化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害剤、抗炎症剤及び増殖阻害剤からなる群から選択される1又は複数の付加的な治療剤の同時投与又は連続投与をさらに含む、請求項43、44及び46-55の何れか一項に記載の方法。

【請求項57】

TAMの生存度又は活性を調節することを含む、対象の自己免疫疾患を治療する方法。

【請求項58】

TAMの生存度又は活性の調節がTAMの活性の刺激を含む、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

TAMの活性の刺激が、TAMアゴニスト及びTAM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストからなる群から選択される1又は複数の化合物の投与を含む、請求項58に記載

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 60】

TAMの活性の刺激が、FoxP3⁺CD4⁺制御T細胞、IL10⁺CD4⁺制御T細胞及び炎症性TH₁₇細胞の少なくとも一つの誘導を生じる、請求項59に記載の方法。

【請求項 61】

対象がヒト被験者である、請求項57ないし60の何れか一項に記載の方法。

【請求項 62】

化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害剤、抗炎症剤及び増殖阻害剤からなる群から選択される1又は複数の付加的な治療剤の同時投与又は連続投与をさらに含む、請求項59ないし61の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 63】

TAMの生存度又は活性を調節することを含む、対象の免疫寛容導入を阻害する方法。

【請求項 64】

TAMの生存度又は活性の調節が、TAMの選択的除去を含む、請求項63に記載の方法。

【請求項 65】

TAMの選択的除去が、(a) TAM結合剤を投与し、(b)前記TAM結合剤に特異的に結合する細胞を前記集団又は試料から選択的に除去することを含む、請求項64に記載の方法。

20

【請求項 66】

前記TAM結合剤が少なくとも一つの抗体を含み、前記選択的に除去するステップが抗体媒介クリアランスである、請求項65に記載の方法。

【請求項 67】

TAMの生存度及び活性の調節が、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料中のTAMを選択的に死滅させることを含む、請求項63に記載の方法。

【請求項 68】

TAMの選択的な死滅が、(a) TAM結合剤を投与し、(b)前記TAM結合剤に特異的に結合する細胞を選択的に死滅させることを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項 69】

前記TAM結合剤が、少なくとも一つの抗体を含み、前記選択的に死滅させるステップが補体媒介性細胞障害である、請求項68に記載の方法。

30

【請求項 70】

前記TAM結合剤が、少なくとも一つの抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、前記選択的に死滅させるステップが抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートした細胞障害性分子に媒介される、請求項68に記載の方法。

【請求項 71】

TAMの生存度又は活性の調節が、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料中のTAMの活性を阻害することを含む、請求項41に記載の方法。

【請求項 72】

TAMの活性の阻害が、一又は複数のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害を含む、請求項71に記載の方法。

40

【請求項 73】

前記TAM分泌サイトカインがTGFである、請求項72に記載の方法。

【請求項 74】

一又は複数のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害が、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤の投与を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項 75】

前記TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤が、サイトカイン/ケモカインの活性

50

を阻害する抗体又はその抗原結合フラグメント、サイトカイン又はケモカインに特異的な受容体又は小分子から選択される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

一又は複数の T A M 分泌サイトカイン又は T A M 分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害が、 T A M 分泌サイトカイン / ケモカインのアntagニストの投与を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記対象がヒト被験者である、請求項 6 3 ないし 7 6 の何れか一項に記載される方法。

【請求項 7 8】

化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害剤、抗炎症剤及び増殖阻害剤からなる群から選択される 1 又は複数の付加的な治療剤の同時投与又は連続投与をさらに含む、請求項 6 3 ないし 7 7 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 7 9】

F o x P 3 + C D 4 + 制御 T 細胞、 I L 1 0 + C D 4 + T r 1 細胞及び炎症性 T H _{1 7} 細胞の少なくとも一つの成長及び / 又は増殖を選択的に誘導する方法であって、 T A M を n a i v e T 細胞に投与する、もしくは正常な細胞増殖に適した条件下で n a i v e T 細胞を T A M に暴露させることを含む、方法。

【請求項 8 0】

T A M アゴニスト及び T A M - 分泌サイトカイン / ケモカインのアゴニストからなる群から選択される一つ以上の化合物を投与することをさらに含む、請求項 7 9 に記載の方法。

20

【請求項 8 1】

誘導された F o x P 3 + C D 4 + 制御 T 細胞、 I L 1 0 + C D 4 + T r 1 細胞及び / 又は炎症性 T H _{1 7} 細胞を単離することをさらに含む、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

I R T M の生存度又は活性を調節することを含む、対象における炎症性疾患を治療する方法。

【請求項 8 3】

I R T M の生存度又は活性の調節が、 I R T M の活性を刺激することを含む、請求項 8 2 に記載の方法。

30

【請求項 8 4】

I R T M の活性を刺激することが、 I R T M アゴニスト及び I R T M 分泌サイトカイン / ケモカインのアゴニストからなる群から選択される 1 又は複数の化合物の投与を含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

I R T M の活性を刺激することが、 F o x P 3 + C D 4 + 制御 T 細胞、 I L 1 0 + C D 4 + 制御 T 細胞及び炎症性 T H _{1 7} 細胞の少なくとも一つの誘導を生じる、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記対象がヒト被験者である、請求項 8 2 ないし 8 5 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 8 7】

サイトカイン、ケモカイン、細胞障害剤、抗炎症剤及び免疫抑制剤からなる群から選択される 1 又は複数の付加的な治療剤の同時投与又は連続投与をさらに含む、請求項 8 3 ないし 8 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

I R T M の生存度又は活性の調節が、 I R T M の選択的除去を含む、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 9】

I R T M の選択的除去が、 (a) I R T M 結合剤を投与し、 (b) 前記 I R T M 結合剤に特異的に結合する細胞を選択的に除去することを含む、請求項 8 8 に記載の方法。

50

【請求項 90】

前記 I R T M 結合剤が、少なくとも 1 つの抗体を含み、前記選択的に除去するステップが抗体媒介クリアランスである、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

I R T M の生存度又は活性の調節が、I R T M の選択的死滅を含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 92】

I R T M の選択的死滅が、(a) I R T M 結合剤を投与し、(b) 前記 I R T M 結合剤に特異的に結合する細胞を選択的に死滅させることを含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記 I R T M 結合剤が、少なくとも 1 つの抗体を含み、前記選択的に死滅させるステップが補体媒介性細胞障害である、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記 I R T M 結合剤が、少なくとも 1 つの抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、前記選択的に死滅させるステップが抗体又はその抗原結合フラグメントにコンジュゲートした細胞障害性分子に媒介される、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 95】

I R T M の生存度又は活性の調節が、I R T M の活性を阻害することを含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 96】

I R T M の活性の阻害が、一又は複数の I R T M 分泌サイトカイン又は I R T M 分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害を含む、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記 I R T M 分泌サイトカインが T G F である、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

一又は複数の I R T M 分泌サイトカイン又は I R T M 分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害が、I R T M 分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤の投与を含む、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 99】

前記 I R T M 分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤が、サイトカイン/ケモカインの活性を阻害する抗体又はその抗原結合フラグメント、サイトカイン又はケモカインに特異的な受容体又は小分子から選択される、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

一又は複数の I R T M 分泌サイトカイン又は I R T M 分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害が、I R T M 分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストの投与を含む、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 101】

前記 I R T M が T A M 及び A T M から選択される、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 102】

前記対象がヒト被験者である、請求項 82 ないし 101 の何れか一項に記載される方法。

【請求項 103】

サイトカイン、ケモカイン、細胞障害剤、抗炎症剤及び免疫抑制剤からなる群から選択される 1 又は複数の付加的な治療剤の同時投与又は連続投与をさらに含む、請求項 82 ないし 101 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 104】

F o x P 3 + C D 4 + 制御 T 細胞、I L 1 0 + C D 4 + T r 1 細胞及び/又は炎症性 T H 1 7 細胞の少なくとも一つの成長及び/又は増殖を選択的に誘導する方法であって、正常な細胞増殖に適した条件下で n a i v e T 細胞を T A M 及び/又は A T M に暴露させることを含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項105】

TAMアゴニスト、ATMアゴニスト、TAM-分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニスト及びATM-分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストからなる群から選択される1又は複数の化合物を投与することをさらに含む、請求項104に記載の方法。

【請求項106】

誘導されたFoxP3⁺CD4⁺制御T細胞、IL10⁺CD4⁺Tr1細胞又は炎症性TH₁₇細胞を単離することをさらに含む、請求項104に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(関連出願)

本出願は、37CFR1.53(b)(1)の下の非仮出願であり、35USC119(e)の下で、2007年7月13日に出願された仮出願番号第60/959,726号及び2007年11月16日に出願された仮出願番号第61/003499号の優先権を主張し、その内容は本願明細書に援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は腫瘍増殖の分野に関する。本発明は、腫瘍関連マクロファージの活性及び特徴、並びに癌及び腫瘍増殖の診断及び治療のためのこの使用に関する。本発明は、自己免疫及び炎症性疾患を治療するための免疫学及び腫瘍関連マクロファージ及び脂肪組織マクロファージの活性及び特徴の使用にも関する。

【0003】

(背景)

心疾患に次いで、悪性腫瘍(癌)は米国の主要な死因である。癌は、腫瘍質量を形成するために増殖する正常組織に由来される異常又は腫瘍性の細胞数の増加、これらの腫瘍性の腫瘍細胞の隣接組織の浸潤、及び最終的に血液又はリンパ系を経て局部リンパ節まで、及び転移と呼ばれるプロセスにより遠い部位まで広がる悪性細胞の生成によって特徴づけられる。癌性の状態では、細胞は正常細胞が増殖しない条件下で増殖する。癌は、異なる侵襲性及び悪性度の程度によって特徴づけられる多種多様な形で現れる。

【0004】

ヒト腫瘍には、悪性及び非悪性細胞が含まれる。この後者カテゴリは、間質の繊維芽細胞、内皮細胞及び白血球を含む。腫瘍関連マクロファージ(「TAM」)は、大部分の固形腫瘍における白血球の浸透物の顕著な成分である。いくつかの場合では、TAMは全腫瘍質量の最高50%を含むことができる(Kelly等、1988; O'Sullivan and Lewis 1994; Leek等、1994; Bingle等、2002)。乳癌及び他のヒト腫瘍のマクロファージ浸透物の高水準は、予後不良と相関していた。乳癌のマウスのモデルの分析は、TAMが腫瘍の増殖及び転移を促進するという見解を裏づける。例えば、乳癌の遺伝モデルにおけるTAM分化の抑制は腫瘍発達の速度を減少させ、肺の転移形成を激減させる(Lin等、2001)。

TAMがヒト乳癌の増殖に寄与するという提唱された機構は、血管新生因子(例えば血管内皮増殖因子)の産生によるものである; TAMの高水準は乳房腫瘍内で増加した血管密度と相関していた(Leek等、1996; Lin等、2006)。TAMを含む骨髄系造血細胞は、直接的に血管新生因子を分泌することによって、又は間接的に細胞間マトリックス分解プロテアーゼを産生することによって、血管新生を刺激することが示され、次々に隔絶された血管由来の因子を放出する(Lewis, C.E. & Pollard, J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 66:605-612 (2006); 及びNaldini, A. & Carraro, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:3-8 (2005)においてレビューされる)。骨髄系細胞系統の中で、腫瘍をもったマウスの脾臓から単離されるCD11b⁺Gr1⁺始原細胞は、腫瘍細胞を同時注入された場合、血管新生を促進し(Yang, L.等、Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor

10

20

30

40

50

angiogenesis. *Cancer Cell* 6:409-21 (2004)を参照)、腫瘍浸潤性マクロファージ数は、ヒト腫瘍の予後不良と相関がある。(Balkwill等、in Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7 (2005)においてレビューされる)。しかしながら、他の研究では、マクロファージはマウスの実験腫瘍の増殖を阻害し、抗癌治療としての可能性を示唆した。Kohchi, C.等、Utilization of macrophages in anticancer therapy: the macrophage network theory. *Anticancer Res* 24:3311-20 (2004)参照。

TAMは、血管新生を促進することに加えて、炎症の促進、マトリックス・リモデリング、腫瘍細胞浸潤、血管内異物侵入及び遠い部位におけるシーディングによって腫瘍成長にも寄与している可能性が示唆された(Lewis等、2000; Lewis and Pollard 2006; Pollard 2004; Hiratsuka等、2002; Lin等、2001; Sica等、2006)。

TAMは、腫瘍に由来するケモカインによって悪質組織へと補充される循環単核細胞に由来する。単核細胞は、用途の広さ及び可塑性によって区別されて及び、特異的な微小環境によって、種々の活性化段階でマクロファージに分化することができる。これらの活性化範囲は、2つの異なる極性状態、M1及びM2に操作上定められる。これらの状態がインビトロで定められたのに対して、組織マクロファージがM1及びM2の連続体として存在することが考えられる。炎症誘発性刺激及びI型サイトカインに偏った環境において、単核細胞は、炎症誘発性サイトカインを高水準で発現するM1マクロファージに分化して、Th1免疫応答を促進し、細胞内寄生体への抵抗を媒介する。逆にいえば、II型サイトカイン(すなわちIL-4及びIL-13)が優勢である環境は、M2又は「栄養」マクロファージの生成を促進する。M2マクロファージは、免疫調節性であり、組織修復及びリモデリングを促進する。

【0005】

腫瘍の樹状細胞(DC)の成熟を阻害すると考えられているIL-6、CSF-1、IL-10及びTGF等の特定のサイトカインを分泌することにより、「栄養」M2としてのTAMは、耐性を誘導するという間接的な役割を有することが提唱された(Mantovani等、2002; Pollard 2004)。DCは、免疫応答を誘導及び制御する能力を有する専門の抗原提示細胞であって、通常組織の抗原捕捉の後に成熟する。それらはMHCII発現及び共刺激分子を上方制御して、流入領域リンパ節へ移動し、強力なT細胞応答を誘導することができる。非炎症性条件下で(すなわち腫瘍組織において)抗原を捕捉するDCは、完全には成熟しておらず、したがって抗原提示が正常に機能しない。これらの未発達又は半成熟したDCは、共刺激タンパク質を低レベルでしか発現せず、免疫寛容原性反応を強化する調節Tリンパ球を潜在的に産生する(Steinman等、2003)。

調節T細胞のいくつかのサブセットは、出現部位、表現型マーカーの発現及び抑制性機構に基づいて定められた。特に十分に特徴づけられたサブセットは、自然に発生する胸腺由来CD4+CD25+調節T細胞である。この種の細胞は、FoxP3及びGITRを高水準で発現し、細胞接触依存性のメカニズムによる免疫抑制を媒介する。第2のCD4+サブセット(Tr1細胞)は、末梢組織において誘導され、IL-10及び/又はTGFの分泌を経て、接触非依存性の免疫抑制を媒介する。腫瘍の免疫応答の阻害における調節T細胞の重要性を裏づける証拠が増加している。いくつかの報告は、固形腫瘍における多くの調節FoxP3+CD4+T細胞(Leong等、2006; Liyanage等、2002)及びIL-10+CD4+Tr1細胞(Marshall等、2004; Seo等、2001)の存在を実証する。さらに、ヒト乳癌試料における高いレベルのFoxP3+CD4+T細胞は、減少した全体の生残率と相関する(Curiel等、2004; Bates等、2006)。

腫瘍浸透物におけるT細胞の存在及び血管新生因子を産生するための潜在性にもかかわらず、腫瘍成長及び発達における役割は、不明なままである。TAMの生物学的機能及びそれらが産生する因子の発見及び理解へのニーズが存在する。以下の開示のレビューにより明らかのように、本発明はこれら及び他のニーズに対処するものである。

【0006】

(発明の開示)

一実施態様において、本発明は、試料中の炎症関連組織マクロファージ (IRTM) を同定する方法であって、IRTM結合剤と試料を接触させること及びIRTM結合剤が関連する一つ以上の細胞の存在を決定することを含む方法を提供する。一つの態様では、試料は組織試料である。別の態様において、試料はヒトである。別の態様において、IRTM結合剤は抗体又はその抗原結合性フラグメントである。別の態様において、IRTMは腫瘍関連マクロファージ (TAM) である。別の態様において、IRTMは脂肪組織マクロファージ (ATM) である。

もう一つの実施態様では、本発明は、試料中の炎症関連組織マクロファージ (IRTM) を同定する方法であって、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第一の剤及び樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第二の剤と試料を接触させること、及び少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤によって認識される細胞の存在を決定することを含む方法を提供する。一つの態様では、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な表面マーカーに結合する。そのような別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、抗体又はその抗原結合性フラグメントである。別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤は、同じ分子である。別の態様において、分子は二重特異性抗体、三重特異性抗体、3以上の異なる特異性を有する抗体、及び記載された抗体の抗原結合性フラグメントからなる群から選択される。別の態様において、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーは、F4/80である。別の態様において、樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーは、CD11cである。もう一つの態様において、少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤によって認識される細胞の存在を決定することは、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取、磁気細胞分離、アフニティークロマトグラフィ、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション及び免疫顕微鏡法からなる群から選択される少なくとも一つの方法を有する。別の態様において、細胞試料は腫瘍試料である。別の態様において、IRTMはTAMである。別の態様において、IRTMはATMである。

もう一つの実施態様において、本発明は細胞の混合物からTAMを単離する方法であって、(a)マクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第一の剤及び樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第二の剤を細胞試料と接触させること、及び(b)少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤によって認識される細胞を単離することを含む方法を提供する。一つの態様では、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーに特異的に結合する。別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、抗体又はその抗原結合性フラグメントである。別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤は、同じ分子である。そのような別の態様において、分子は、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3以上の異なる特異性を有する抗体及び記載された抗体の抗原結合性フラグメントからなる群から選択される。別の態様において、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーは、F4/80である。別の態様において、樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーは、CD11cである。別の態様において、単離するステップは、蛍光標識細胞分取、アフニティークロマトグラフィ及び磁気細胞分離の少なくとも一つを含む。

【0007】

もう一つの実施態様では、本発明は、被検者における増殖性の疾患を診断する方法を提供し、被験者におけるTAMの存在及び/又は活性を決定することを含む。一つの態様では、決定するステップは、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第一の剤及び樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第二の剤と被検者から得た細胞試料を接触させること、及び少なくと

10

20

30

40

50

も一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤によって認識される細胞を同定することを含む。別の態様において、増殖性の疾患は、乳癌である。別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な表面マーカーに特異的に結合する。そのような態様において、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、抗体又はその抗原結合性フラグメントである。そのような別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤は、同じ分子である。そのような別の態様において、分子は、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3以上の異なる特異性を有する抗体及び記載された抗体の抗原結合性フラグメントからなる群から選択される。そのような別の態様において、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーは、F4/80である。そのような別の態様において、樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーは、CD11cである。そのような別の態様において、同定するステップは、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取、磁気細胞分離、アフィニティークロマトグラフィ、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション及び免疫顕微鏡法からなる群から選択される少なくとも一つの方法を含む。

10

もう一つの実施態様では、本発明は被検者における腫瘍を段階分けする方法を提供し、被検者におけるTAMの存在及び/又は活性を決定することを含む。一つの態様では、決定するステップは、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第一の剤及び樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーを特異的に認識する少なくとも一つの第二の剤と被検者から得た細胞試料を接触させること、及び少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤によって認識される細胞を同定することを含む。別の態様において、腫瘍は乳癌腫瘍である。別の態様においては少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、マクロファージに特異的な細胞表面マーカー又は樹状細胞に特異的な表面マーカーに特異的に結合する。そのような別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び/又は少なくとも一つの第二の剤は、抗体又はその抗原結合性フラグメントである。そのような別の態様において、少なくとも一つの第一の剤及び少なくとも一つの第二の剤は、同じ分子である。そのような別の態様において、分子は、二重特異性抗体、三重特異性抗体、3以上の異なる特異性を有する抗体及び記載された抗体の抗原結合性フラグメントからなる群から選択される。別の態様において、マクロファージに特異的な細胞表面マーカーは、F4/80である。別の態様において、樹状細胞に特異的な細胞表面マーカーは、CD11cである。そのような別の態様において、同定するステップは、免疫組織化学、蛍光標識細胞分取、磁気細胞分離、アフィニティークロマトグラフィ、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション及び免疫顕微鏡法からなる群から選択される少なくとも一つの方法を含む。

20

30

【0008】

もう一つの実施態様では、本発明は対象の腫瘍を治療する方法を提供し、TAMの生存度又は活性を調節することを含む。一つの態様では、TAMの生存度又は活性を調節することは、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料からTAMの選択的除去を含む。そのような態様において、TAMの選択的除去は、(a) TAM結合剤と集団又は試料とを接触させること及び(b) 集団又は試料からTAM結合剤に特異的に結合するそれらの細胞を選択的に取り除くことを含む。そのような別の態様において、TAM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的除去ステップは、抗体媒介性クリアランス、プロテインAクロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、蛍光標識細胞分取及び磁気細胞分離から選択される。別の態様においては、TAMの生存度又は活性を調節することは、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料中のTAMを選択的に死滅させることを含む。そのような態様において、TAMを選択的に死滅させることは、(a) TAM結合剤と集団又は試料とを接触させること及び(b) 集団又は試料から、TAM結合剤に特異的に結合するそれらの細胞を選択的に死滅させることを含む。そのような別の態様において、TAM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的除去ステップは補体媒介性細胞障害性である。そのような別の態様において、TAM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的除去ステップは抗体に結合した細胞障害性分子によって媒介される。別の態様において、TAMの生存度又は活性を調節

40

50

することは、腫瘍細胞集団又は腫瘍試料中でTAMの活性を抑制することを含む。そのような態様において、TAMの活性の抑制は、集団又は試料における一つ以上のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性を抑制することを含む。そのような別の態様において、TAM分泌サイトカインは、TGFである。そのような別の態様において、一つ以上のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の抑制は、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤の投与を含む。そのような別の態様において、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤は、抗体又は抗原結合性フラグメント(サイトカイン又はケモカインに特異的な受容体、又はサイトカイン/ケモカインの活性を抑制する小分子から選択される。もう一つの態様において、一つ以上のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害は、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストの投与を含む。別の態様においては、対象は、ヒト被験者である。別の態様において、方法は、化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害剤、抗炎症剤及び増殖阻害剤からなる群から選択される一つ以上の付加的な治療薬剤の同時投与又は経時的投与を更に含む。

もう一つの実施態様では、本発明は対象の自己免疫不全を治療する方法を提供し、TAMの生存度又は活性を調節することを含む。一つの態様では、TAMの生存度又は活性の調節は、TAM活性の刺激を含む。そのような態様において、TAM活性の刺激は、TAMアゴニスト及びTAM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストからなる群から選択される一つ以上の化合物を投与することを含む。そのような別の態様において、TAM活性の刺激により、FoxP3⁺CD4⁺調節T細胞、IL-10⁺CD4⁺調節T細胞及び炎症性TH17細胞の少なくとも一つが誘導される。別の態様においては、対象はヒト被験者である。別の態様において、方法は、サイトカイン、ケモカイン、細胞障害性剤及び免疫抑制剤からなる群から選択される一つ以上の付加的な治療薬剤の同時投与又は経時的投与を更に含む。

【0009】

もう一つの実施態様では、本発明は対象の免疫寛容導入を阻害する方法を提供し、TAMの生存度又は活性を調節することを含む。一つの態様では、TAMの生存度又は活性の調節は、TAMの選択的除去を含む。そのような態様において、TAMの選択的除去は、(a) TAM結合剤の投与及び(b) TAM結合剤に特異的に結合するそれらの細胞の選択的除去を含む。別の態様において、TAM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的除去ステップは抗体媒介性クリアランスである。もう一つの態様において、TAMの生存度又は活性の調節は、選択的なTAMの死滅を含む。そのような態様において、選択的なTAMの死滅は、(a) TAM結合剤の投与及び(b) TAM結合剤に特異的に結合するそれらの細胞の選択的な死滅を含む。そのような別の態様において、TAM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的除去ステップは補体媒介性細胞障害性である。そのような別の態様において、TAM結合剤は少なくとも一つの抗体又は抗原結合性フラグメントを含み、選択的除去ステップは抗体又は抗原結合性フラグメントに結合した細胞障害性分子によって媒介される。もう一つの態様において、TAMの生存度又は活性の調節は、TAM活性の抑制を含む。そのような態様において、TAM活性の抑制は、一つ以上のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害を含む。そのような態様において、TAM分泌サイトカインは、TGFである。別の態様において、一つ以上のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の抑制は、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤の投与を含む。そのような態様において、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤は、抗体又は抗原結合性フラグメント、サイトカイン又はケモカインに特異的な受容体、又はサイトカイン/ケモカインの活性を抑制する小分子から選択される。もう一つの態様において、一つ以上のTAM分泌サイトカイン又はTAM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害は、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストの投与を含む。別の態様においては、対象はヒト被験者である。別の態様においては、方法は、サイトカイン、ケモカイン、細胞障害性剤、抗炎症剤及び免疫抑制剤からなる群から選択される一つ以上の付加的な治療薬剤の同時投与又は経時的投与を更に含

10

20

30

40

50

む。

【0010】

もう一つの実施態様では、本発明は、FoxP3⁺CD4⁺調節T細胞、IL-10⁺CD4⁺Tr1細胞又は炎症性TH17細胞の成長及び/又は増殖を選択的に誘導する方法であって、正常な細胞発育に適切な条件下で、naive T細胞にIRTMを投与すること、又はIRTMにnaive T細胞を暴露することを含む方法を提供する。一つの態様では、IRTMは、TAMである。別の態様において、IRTMは、ATMである。一つの方法では、方法は、TAM及び/又はATMアゴニスト及びTAMのアゴニスト及び/又はATM分泌サイトカイン/ケモカインから選択される一つ以上の化合物を投与することを更に含む。別の態様においては、方法は、誘導されたFoxP3⁺CD4⁺調節T細胞、IL-10⁺CD4⁺Tr1細胞又は炎症性TH17細胞を単離することを更に含む。

10

もう一つの実施態様では、本発明は対象の炎症性疾患を治療する方法を提供し、IRTMの生存度又は活性を調節することを含む。一つの態様では、IRTMの生存度又は活性の調節は、IRTM活性の刺激を含む。もう一つの態様において、IRTM活性を刺激することは、IRTMアゴニスト及びIRTM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストからなる群から選択される一つ以上の化合物を投与することを含む。別の態様において、IRTM活性の刺激は、少なくとも一つのFoxP3⁺CD4⁺調節T細胞、IL-10⁺CD4⁺Tr1細胞又は炎症性TH17細胞を誘導する。別の態様においては、対象はヒト被験者である。別の態様においては、方法は、サイトカイン、ケモカイン、細胞障害剤、抗炎症及び免疫抑制剤からなる群から選択される一つ以上の付加的な治療薬剤の同時投与又は経時的投与を更に含む。もう一つの態様において、IRTMの生存度又は活性の調節は、IRTMの選択的除去を含む。別の態様において、IRTMの選択的除去は、(a) IRTM結合剤の投与及び(b) IRTM結合剤に特異的に結合するそれらの細胞の選択的除去を含む。別の態様において、IRTM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的除去ステップは抗体媒介性クリアランスである。もう一つの態様において、IRTMの生存度又は活性の調節は、選択的なIRTMの死滅を含む。もう一つの態様において、選択的なIRTMの死滅は、(a) IRTM結合剤の投与及び(b) IRTM結合剤へ選択的に結合するそれらの細胞の特異的な死滅を含む。別の態様においては、IRTM結合剤は少なくとも一つの抗体を含み、選択的死滅ステップは補体媒介性細胞障害性である。別の態様においては、IRTM結合剤は少なくとも一つの抗体又は抗原結合性フラグメントを含み、選択的死滅ステップは抗体又は抗原結合性フラグメントに結合した細胞障害性分子に媒介される。もう一つの態様において、IRTM生存度又は活性の調節は、IRTM活性の調節を含む。もう一つの態様において、IRTM活性の阻害は、一つ以上のIRTM分泌サイトカイン又はIRTM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害を含む。IN他の態様、IRTM分泌サイトカインは、TGFである。もう一つの態様において、一つ以上のIRTM分泌サイトカイン又はIRTM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害は、IRTM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤の投与を含む。別の態様において、IRTM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤は、抗体又は抗原結合性フラグメント、サイトカイン又はケモカインに特異的な受容体、又はサイトカイン/ケモカインの活性を抑制する小分子から選択される。もう一つの態様において、一つ以上のIRTM分泌サイトカイン又はIRTM分泌ケモカインの分泌又は活性の阻害は、IRTM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストの投与を含む。別の態様において、IRTMはTAM及びATMから選択される。別の態様において、対象は、ヒト被験者である。別の態様において、方法は、サイトカイン、ケモカイン、細胞障害剤、抗炎症及び免疫抑制剤からなる群から選択される一つ以上の付加的な治療薬剤の同時投与又は経時的投与を更に含む。

20

30

40

もう一つの実施態様では、本発明は、FoxP3⁺CD4⁺調節T細胞、IL-10⁺CD4⁺Tr1細胞及び/又は炎症性TH17細胞の成長及び/又は増殖を選択的に誘導する方法であって、正常な細胞成長に適切な条件下でTAM及び/又はATMにnaive T細胞を暴露することを含む方法を提供する。一つの態様では、方法は、TAMアゴニ

50

スト、ATMアゴニスト、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニスト及びATM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストから選択される一つ以上の化合物の投与を更に含む。別の態様においては、方法は、誘導されたFoxP3⁺CD4⁺調節T細胞、IL-10⁺CD4⁺Tr1細胞又は炎症性TH17細胞を単離することを更に含む。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】実施例1にて説明したように、図1A-1Hは、腫瘍試料の免疫組織化学的分析の結果を表す。図1Aは、顕著な白血球浸潤を示している腫瘍組織の抗CD45抗体染色を表す。図1Bは、マクロファージを同定するために、腫瘍組織の抗F4/80抗体染色を表す。図1Cは、T細胞を同定するために、腫瘍組織の抗CD3抗体染色を表す。図1Dは、CD45⁺リンパ性腫瘍浸潤物中の免疫細胞の相対比率を示しているグラフである。図1Eは、NK1.1⁺DX5⁺CD11b⁺腫瘍の骨髓性浸潤物中の免疫細胞の相対比率を示しているグラフである。図1Fは、内皮細胞と比較して腫瘍組織のTAMの局在を示すために抗F4/80及び抗CD31抗体で染色した腫瘍試料を表す。図1Gは、内皮細胞と比較して腫瘍組織の好中球の局在を示すために抗Ly-6G及び抗CD31抗体で染色した腫瘍試料を表す。図1Hは、内皮細胞と比較して腫瘍組織の炎症性単核細胞(MoIF)の局在を示すために抗Ly-6C及び抗CD31抗体で染色した腫瘍試料を表す。図1F-1Hのデータは、2-3回の反復及び6-7の個々の腫瘍を表す。

10

【図2】図2A-2Cは、MMTV-PyMT腫瘍の白血球構成を評価しているFACS分析の結果を視覚的に表す。全3つの図において、FVBコントロール試料は白で示し、PyMT^{tg}試料はストライプで示している。図2Aは、PyMT-誘導腫瘍における末梢血単核細胞(PBMC)の総数が、腫瘍がないコントロールFVBマウス試料と比較して2.3倍増加したことを示している。図2Bは、腫瘍を有していないコントロールFVBマウスと比較した、腫瘍を有するマウスにおけるCD11b⁺骨髓性PBMC(NK1.1⁺DX5⁺)細胞の増加を示す。図2Cは、好中球の増加を示す：コントロールマウスと比較したPyMT腫瘍マウスの単核細胞比。記号「*」はデータがp<0.05で有意だったことを示す；記号「**」はデータがp<0.01で有意なことを示した。

20

【図3】図3A-3Eは、TAMがマクロファージ及び樹状細胞の特徴を有することを示している、実施例2Aに記載される実験の結果を表す。図3Aは、bmDC(白いバー)、腹腔マクロファージ(黒いバー)及びPyMT^{tg}由来TAM(ストライプのバー)のCD11c mRNA発現量を示す遺伝子発現解析の結果を表す(最も左のパネル)。図3Aもまた、TAMがCD11c及びF4/80を高水準で発現することを示すFACS分析の結果を表しているのに対して、bmDC又は腹腔マクロファージはCD11c又はF4/80のどちらかを発現する(右の3枚のパネル)。図3B-3Cは、PyMT^{tg}由来腫瘍の凍結切片(図3B)又はインビトロで60時間培養された単離されたF4/80⁺TAM(図3C)が樹状細胞マーカーCD11cを発現していることを示す免疫組織化学的分析の結果を表す。図3Dは、bmDC(白いバー)、腹腔マクロファージ(ストライプのバー)及びPyMT^{tg}由来TAM(点状のバー)のCD207 mRNA発現量の遺伝子発現解析を表す(最も左のパネル)。図3Dもまた、CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁺TAMがランゲリン(CD207)を発現することを示すFACS分析の結果を表す。図3Dのデータは、4つの実験を代表している。図3Eは、bmDC(白いバー)、腹腔マクロファージ(ストライプのバー)及びPyMT^{tg}由来TAM(点状のバー)のTGFRI、Runx3及びIRF-8の発現量を示すリアルタイムPCR実験の結果を表す。

30

40

【図4】図4A-4Cは、腫瘍のないFVBマウスと比較して、PyMT^{tg}マウスの腋窩流入腫瘍及び上腕リンパ節の免疫細胞構成を示している、実施例2Aに記載される実験の結果を表す。図4Aは、CD11b⁺細胞数の上昇が腫瘍を含むマウスのリンパ節において同定されたことを視覚的に示す。図4Bは、CD11c及びF4/80を同時発現しているCD11b⁺細胞数の増加が腫瘍を含むマウスのリンパ節において同定されたことを示しているFACSの結果を示す。図4Cは、TAMの形態がマクロファージよりもb

50

mDCの形態に近いことを示している顕微鏡写真を表す。

【図5】実施例2Aに記載されているように、図5A-5Cは、TAM、腹腔マクロファージ及びbmDCにおいて発現する遺伝子のマイクロアレイ解析の結果を表す。図5Aは、それらの3つの細胞集団において発現する遺伝子のヒートマップ像を示す、白い彩色は相対的発現の最小レベルを示し、黒い彩色は相対的発現の最大レベルを示し、灰色は相対的発現が1であることを示している。図5BはTAM、腹腔マクロファージ及びbmDCの遺伝子発現プロファイリングの統計PC解析を示しており、TAM及び腹腔マクロファージの密接な関係（左パネル）及び分析された個々の主成分の重要性の程度の画像視覚化を示している（右パネル）。図5Cは、PyMT^{t8}由来TAM及びHer2^{t8}由来TAMの遺伝子発現プロファイリングの統計PC解析の結果を表しており、他の組織マクロファージ（腹腔マクロファージ及び脾臓マクロファージ及びクッパー細胞）と比較したTAMの固有の遺伝子プロファイル（左パネル）及び分析された個々の主成分の重要性の程度の画像視覚化を示している（右パネル）。図5B及び5Cのデータは、個々に単離された集団の3-5のmRNA標本を平均している。

10

【図6】実施例2Bに記載されているように、図6A-6Cは、MHCII及び共刺激因子CD80、CD83及びCD86のTAM表面発現を評価しているいくつかのFACS解析を示す。図6Aは、MHCII、CD80、CD83及びCD86のTAM発現のFACS結果を表す。図6Bは、MHCII、CD80、CD83及びCD86の腹腔マクロファージ発現のFACS結果を表す。図6Cは、MHCII、CD80、CD83及びCD86のbmDC発現のFACS結果を表す。

20

【図7】実施例3に記載されているように、図7A-7Bは、TAM対腹腔マクロファージのケモカイン及びサイトカイン発現のマイクロアレイ解析の結果を表す。図7Aは、両方の細胞集団のケモカインCCL2、CXCL10、CCL3、CCL5及びKCの発現量を示す。図7Bは、両方の細胞集団のサイトカインIL-1、IL-1、TNF、IL-10及びIL-6の発現量を示す。図7Cは、bmDC（白いバー）、腹腔マクロファージ（点状のバー）、PyMT^{t8}由来されたTAM（軽いストライプのバー）及び腫瘍細胞（重いストライプのバー）のTGF- β 1の発現量を示すリアルタイムRT-PCR実験の結果を表す。示されるデータは、3-5の独立実験の平均である。

【図8】実施例4に記載されているように、図8A-8Cは、naiveT細胞に対するTAMの効果の評価しているFACS解析の結果を表す。図8Aは、TAM、腹腔マクロファージ又はbmDCで刺激されたnaiveT細胞培養によって産生されたサイトカインIL-10、IL-4、IL-2及びIL-17の相対量を視覚的に示す。図8Bは、TAM-活性化T細胞がIL-10及びIL-17を産生することを示しているFACS結果を表す。図8Cは、TAM-刺激CD4⁺T細胞からサイトカイン分泌がTAMによるTGF- β 1分泌に依存していたことを示す免疫染色実験の結果を視覚的に表す。

30

【図9】図9A-9Dは、TAMによるFoxP3⁺調節T細胞の誘導を研究するための、実施例4に記載されているFACS解析の結果を表す。図9Aは、TAM又はbmDCのいずれかで処理された培養におけるFoxP3⁺T細胞誘導の相違を示しているFACS解析を表す。図9Bは、TAM-誘導FoxP3⁺T細胞におけるTGF-RIIの封入の効果を示しているFACS解析の結果を表す。図9Cは、調節T細胞のためのマーカーとしてTAM-誘導FoxP3⁺T細胞上のGITRの存在を評価しているFACS解析の結果を表す。図9Dは、TAM誘導FoxP3⁺T細胞における、末梢性誘導された調節T細胞に対するマーカーとしてのCD103の発現を評価しているFACS解析の結果を表す。

40

【図10】実施例4に記載されているように、図10A-10Dは、TAMが、先に存在するFoxP3⁺T細胞のクローン増殖を刺激することとは対照的に、FoxP3⁺T細胞を誘導したことを確認するための実験の結果を表す。図10Aは、本願明細書において用いられるnaiveCD4⁺T細胞の調節におけるFoxP3⁺T細胞の量を評価しているFACS解析の結果を表す。図10Bは、CFSE標識naiveCD4⁺T細胞に対するbmDC、TAM及び腹腔マクロファージの刺激能を分析している実験の結果を示

50

す。図10Cは、脾細胞全体におけるFoxP3⁺T細胞のプールを評価しているFACS解析の結果を表す(図10C)。図10Dは、精製されたCD103⁺CD25⁺CD69⁺T細胞(図10D)からの単離及びTAMでの再処理におけるFoxP3⁺T細胞のプールを評価しているFACS解析の結果を表す。

【図11】実施例5に記載されているように、図11A-11Cは、PyMTマウス(図11A)対コントロール・マウス(図11B)のIL-10⁺及びFoxP3⁺調節T細胞の生体内での発生率を評価している実験の結果を表す。図11Cは、PyMTマウス(ストライプのバー及び黒丸)対コントロール・マウス(白いバー及び円)の腫瘍流入領域リンパ節(最も左の2枚のパネル)、脾臓(中心及び中心の右パネル)及び腫瘍(右端パネル)において見いだされるFoxP3⁺CD4⁺T細胞の相対量及び/又は絶対数を視覚的に示す。

【図12】実施例6に記載されているように、図12A-Gは、脂肪組織マクロファージ(ATM)について行われる実験の結果を表す。図12Aは、CD11b⁺細胞の内容を示しているFACS解析の結果を表す。データは、20の個体の脂肪組織単離物を表わす。図12Bは、F4/80⁺ATMのCD11c、MHCII及びCD86の発現を示しているFACS解析の結果を表す。データは、いくつかの異なる実験からの14(CD11c)又は5(MHCII又はCD86)の個体の脂肪組織単離物を表わす。図12Cは、HFDの下で保持された雄のC57BI/6マウスの精巢上体脂肪に由来する単細胞ATM懸濁液におけるCD14、ICOSL及びTIM3発現を示しているFACS解析の結果を表す。データは、いくつかの異なる実験からの5の個体の脂肪組織単離物を表わす。図12Dは、TAMにおけるCD14、ICOSL及びTIM3発現を示しているFACS解析の結果を表す。データは、いくつかの異なる実験からの5つの個体の脂肪組織単離物を表わす。図12Eは、精巢上体脂肪組織(ストライプのバー)、C57BI/6野生型腹腔マクロファージ(白いバー)又は痩せた組織マクロファージ(点状のバー)に由来するATMのサイトカイン・プロファイルを表す。データは、2つの実験からの6匹のマウスを表わす。図12Fは、TAM(白いバー)及びATM(ストライプのバー)におけるTGF- β 1及びTGF- β RIの発現量のリアルタイムRT-PCR解析の結果を表す。データは1-3の実験からの8つのTAM及び3つのATMの個体のRNAプローブ、又は4つの個体の単離したマクロファージのプールを表わす。図12Gは、H&Eで染色された新たに単離されたATM、TAM及び腹腔マクロファージの形態を示す。

【図13】実施例7に記載されているように、図13A-Jは、脂肪組織、リンパ節組織及び精製されたATMのFoxP3⁺調節T細胞を誘導するための能力を試験した実験の結果を示す。図13Aは、ATM(左のパネル)、痩せた脂肪マクロファージ(LTM)(真ん中のパネル)又は腹腔マクロファージ(右パネル)で活性化されたCD4⁺T細胞におけるFoxP3発現のFACS解析の結果を表す。示されるデータは、2個体のマウスを一つの実験で表す。図13Bは、組換えTGF- β RII-Fcで補充されたT細胞培養におけるTAMによるFoxP3誘導に対するTGF- β の影響のFACS解析の結果を表す。示されるデータは、一つの実験における2個体のマウスを表す。図13C及び13Dは、雄のDb/Dbマウス及び年齢がマッチしたC57BI/6マウスの精巢上体脂肪(図13C)又は脾臓組織(図13D)におけるCD4⁺T細胞中のFoxP3⁺T調節細胞の相対量を評価しているFACS解析の結果を示す。示されるデータは、一つの実験における4個体のマウスを表す。図13Eは、ATM-活性化T細胞によるサイトカイン産生を評価している実験の結果を表す。白いバーは腹腔マクロファージで処理されたT細胞に対応し、黒いバーはATMで処理されたT細胞に対応する。示されるデータは、それぞれ2匹のマウスを用いた2回の実験を表す。図13Fは、TAMによって活性化されたT細胞集団におけるTr1及びTH17細胞の存在を評価しているFACS解析の結果を表す。示されるデータは、それぞれ2匹のマウスを用いた2回の実験を表す。図13G-Hは、PMA/イオノマイシンで刺激された、高脂肪食を給仕されたC57BI/6マウス(図13G)又は野生型C57BI/6マウス(図13H)における腫瘍流入領域リンパ節のCD4⁺T細胞の集団を評価している実験の結果を表しており、肥満マウスにお

10

20

30

40

50

けるIL-10⁺Tr1及びTH17T細胞の顕著な集団の存在を示している。図13I及び13Jは、年齢がマッチしたコントロールFVBマウス(白い丸)又は雄のHFD肥満のC57BL/6マウス(黒い丸)の脂肪組織(図13I)又は流入領域リンパ節組織(図13J)におけるFoxP3⁺CD4⁺T細胞の割合を評価した実験結果を表す棒グラフを示す。**は、実験がp=0.01であることを示す。

【図14】図14A-Fは、選択された免疫細胞及び腫瘍細胞集団の遺伝子発現プロファイルを表す。図14A-C及びEは、野生型FVBマウス及びb6D.Cマウスからの腫瘍細胞、PyMT⁺由来TAM、腹腔マクロファージにおけるサイトカイン(図14A)、サイトカイン受容体(図14B)、ケモカイン(図14C)及びケモカイン受容体(図14E)の差次的な発現のヒートマップ・プロファイルを表す。図14Dは、腹腔マクロファージ(白いバー)又はPyMT⁺由来TAM(ストライプのバー)におけるCCCL2、CCCL3、CCCL5及びCXCL10の差次的な発現を確認するための実験結果を示す。*は、p<0.01を示す。図14Fは、b6D.C(白いバー)、腹腔マクロファージ(ストライプのバー)及びPyMT⁺由来TAM(点状のバー)におけるCCR6遺伝子発現のリアルタイムRT-PCR解析の結果を表す。それぞれの図において、データは、3-5の独立した試料、又は3-5の独立した実験の平均値の遺伝子プロファイリングを示す。図14A-C及びEにおいて、最も低い発現量は濃い灰色で、発現で最も高いレベルは薄い灰色によって示される；白い正方形は、その特定の解析のためのデータが利用可能でなかったことを示す。

【図15】図15A-Bは、野生型FVBマウス及びb6D.Cマウスの腫瘍細胞、PyMT⁺由来TAM、腹腔マクロファージにおけるM1(図15A)及びM2(図15B)マーカー遺伝子mRNAの差次的な発現のヒートマップ・プロファイルを表す。データは、3-5の独立した試料の遺伝子プロファイリング結果を示す。最も低い発現量は濃い灰色で、最も高いレベルの発現は薄い灰色によって示される；白い正方形は、その特定の解析のためのデータが利用可能でなかったことを示す。

【図16】図16A-Bは、特定の免疫細胞集団によって活性化されるnaive T細胞のサイトカイン及びケモカイン・プロファイルを示している実験の結果を表す。図16Aは、b6D.C(白いバー)、FVBマウスの腹腔マクロファージ(ストライプのバー)又はTAM(点状のバー)によって刺激されるnaive T細胞におけるTNF、IL-5、IL-13及びCCCL3発現を示す。図16Bは、C57BL/6マウス(白いバー)又はATMの腹腔マクロファージ(ストライプのバー)によって刺激されるnaive T細胞のTNF、IL-5及びIL-13発現を示す。

【図17】図17は、特定の免疫細胞集団の遺伝子発現プロファイリングの統計PC解析の結果を表す。左パネルは、ATM、CD11c⁻ATM及びCD11c⁺ATMが類似した遺伝子発現プロファイルを有するが、PyMT⁺TAM、Her2⁺TAM及び腹腔マクロファージ(「PF」)とは異なる遺伝子発現プロファイルを有することを証明するグラフを示す。

【図18】実施例8に記載されているように、図18は、CD11c⁻ATM(白いバー)又はCD11c⁺ATM(ストライプのバー)のサイトカイン/ケモカイン・プロファイルを表す。*は、実験がp=0.05であることを示す；**は、実験がp=0.01であることを示す。

【図19】実施例8に記載されているように、図19A及び19Bは、CD11c⁻ATM(白いバー)又はCD11c⁺ATM(ストライプのバー)によって活性化されたT細胞のサイトカイン/ケモカイン・プロファイルを表す。

【図20】実施例9に記載されているように、図20Aは、CD11c⁺ATM(ストライプのバー)と比較して、CD11c⁻ATMが有意に高いCD209a、CD209b及びCD209cコード化mRNAレベルを有すること(白いバー)を証明しているグラフを示す。実施例9に記載されているように、図20Bは、非肥満性雄C57BL/6マウス(8週間目)又は肥満雄のC57BL/6マウス(24週齢、HFD20週間)の精巢上体脂肪組織に由来したATMにおけるCD209b/SIGN-R1及びCD11c

10

20

30

40

50

の F A C S 解析を表す。データは、4 - 6 の独立した A T M 単離物の個々に単離された集団の 3 つのアレイの平均値を表す。* は、 $p < 0.05$ を示す； ** は、 $p < 0.01$ を示す。

【 0 0 1 2 】

(詳細な説明)

定義

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、特定の組成物又は生物学的システムに限定されるものではなく、もちろん変更されてもよいことを理解されたい。また、本明細書中で用いられる用語は具体的な実施態様を記載する目的のためだけであって、制限することを目的とするものではないと理解されたい。本明細書で用いられる及び添付の特許請求の範囲中の単数形「 a 」、 「 a n 」 及び 「 t h e 」 は、明らかな記載がない限り複数形も含まれる。例えば、したがって、「分子」を指す言葉は場合によって該分子の 2 以上の組合せなどを包含する。

用語「炎症関連組織マクロファージ」又は「 I R T M 」 は、本願明細書において用いられる場合、炎症及び一つ以上の疾病状態に関連した単核細胞に由来される免疫細胞のクラスを意味する。 I R T M の例は、腫瘍関連マクロファージ及び脂肪組織マクロファージを含むが、これに限定されるものではない。ある実施態様では、 I R T M は、実験的自己免疫脳脊髄炎 (E A E) の中枢神経系において見いだされるマクロファージ及び肺胞マクロファージを含むが、これに限定されるものではない。

用語「 I R T M 結合タンパク質」は、本願明細書において用いられる場合、それが I R T M に特異的に結合する分子を意味する。 I R T M 結合タンパク質は、 I R T M に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、融合タンパク及び受容体分子を含むが、これに限定されるものではない。このような結合は、例えば、 I R T M 細胞表面のタンパク質に、又は他の I R T M 細胞表面分子に対するものであってもよい。

用語「腫瘍関連マクロファージ」又は「 T A M 」 は、本願明細書において用いられる場合、腫瘍と関連している免疫浸潤物において見つかる単核細胞に由来する細胞を意味する。

ここに示されるように、 T A M は特定のマクロファージ細胞表面マーカー及び特定の樹状細胞表面マーカーの両方を発現する。

用語「 T A M 結合タンパク質」は、本願明細書において用いられる場合、 T A M に特異的に結合する分子を意味する。 T A M 結合タンパク質は、 T A M に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、融合タンパク及び受容体分子を含むが、これに限定されるものではない。このような結合は、例えば、 T A M 細胞表面のタンパク質に、又は他の T A M 細胞表面分子に対するものであってもよい。

用語「脂肪組織マクロファージ」又は「 A T M 」 は、本願明細書において用いられる場合、肥満対象の脂肪組織と関連している免疫浸潤物において見つかる単核細胞に由来する細胞を意味する。ここに示されるように、 A T M は特定のマクロファージ細胞表面マーカー及び特定の樹状細胞表面マーカーの両方を発現する。

用語「 A T M 結合タンパク質」は、本願明細書において用いられる場合、 A T M に特異的に結合する分子を意味する。 A T M 結合タンパク質、 A T M に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、融合タンパク及び受容体分子を含むが、これに限定されるものではない。このような結合は、例えば、 A T M 細胞表面のタンパク質に、又は他の A T M 細胞表面分子に対するものであってもよい。

略語「 M f 」 及び 「 M 」 は、本願明細書において用いられる場合、マクロファージを

意味する。略語「p M f」及び「p M」は、腹腔マクロファージを意味する。

【0013】

用語「アンタゴニスト」は、本願明細書において用いられる場合、受容体の場合には一つ以上のリガンドへの結合を、又は、リガンドの場合には一つ以上の受容体への結合を含む、本発明のタンパク質の活性を中和、ブロック、阻害、廃止、還元又は干渉することが可能な分子を意味する。アンタゴニストは、抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及び類似体を含む。アンタゴニストは、タンパク質に特異的に結合する本発明のタンパク質の小分子インヒビター及び融合タンパク、受容体分子及び誘導体も含み、それによりその標的、タンパク質のアンタゴニスト変異体、本発明のタンパク質のアンチセンス分子、RNAアプタマー及び本発明のタンパク質に対するリボザイムへの結合を隔絶する。

「ブロック」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物学的活性度を阻害又は減少させるものである。特定のブロック抗体又は、ンタゴニスト抗体は、実質的又は完全に抗原の生物学的活性を阻害する。

用語「IRTMアンタゴニスト」は本願明細書において用いられる場合、IRTMに結合し、IRTMの生物学的活性を阻害又は実質的に減少させる分子を意味する。IRTMアンタゴニストの例は、制限されるものではないが、抗体、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、小分子、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及びその類似体を含む。本発明の一実施態様において、IRTMアンタゴニストは、抗体、特にヒトIRTMに結合する抗IRTM細胞表面マーカー抗体である。

用語「TAMアンタゴニスト」は、本願明細書において用いられる場合、TAMに結合し、TAMの生物学的活性を阻害又は実質的に減少させる分子を意味する。TAMアンタゴニストの例は、制限されるものではないが、抗体、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、小分子、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及びその類似体を含む。

本発明の一実施態様において、TAMアンタゴニストは、抗体、特にヒトTAMに結合する抗TAM細胞表面マーカー抗体である。

用語「ATMアンタゴニスト」は、本願明細書において用いられる場合、ATMに結合し、ATMの生物学的活性を阻害又は実質的に減少させる分子を意味する。

ATMアンタゴニストの例は、制限されるものではないが、抗体、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、小分子、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及びその類似体を含む。本発明の一実施態様において、TAMアンタゴニストは、抗体、特にヒトATMに結合する抗ATM細胞表面マーカー抗体である。

【0014】

用語「F4/80アンタゴニスト」は本願明細書において用いられる場合、F4/80に結合し、F4/80の生物学的活性を阻害又は実質的に減少させる分子を意味する。

F4/80アンタゴニストの例は、制限されるものではないが、抗体、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、小分子、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及びその類似体を含む。本発明の一実施態様において、F4/80アンタゴニストは、抗体、特にヒトF4/80に結合する抗F4/80の抗体である。

用語「CD11cアンタゴニスト」は、本願明細書において用いられる場合、CD11cに結合し、CD11cの生物学的活性を阻害又は実質的に減少させる分子を意味する。CD11cアンタゴニストの例は、制限されるものではないが、抗体、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、小分子、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及び

その類似体を含む。本発明の一実施態様において、CD11cアンタゴニストは、抗体、特にヒトCD11cに結合する抗CD11c抗体である。

用語「ランゲリンアンタゴニスト」は本願明細書において用いられる場合、ランゲリン、（好ましくはヒトランゲリン）に結合し、ランゲリンの生物学的活性を阻害又は実質的に減少させる分子を意味する。ランゲリンアンタゴニストの例は、制限されるものではないが、抗体、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、小分子、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及びその類似体を含む。本発明の一実施態様において、ランゲリンアンタゴニストは、抗体、特に細胞内ヒトランゲリンに結合する抗ランゲリン抗体である。

10

本発明の他の一実施態様において、ランゲリンアンタゴニストは、ヒトランゲリンに結合する小分子である。

【0015】

用語「アゴニスト」は、受容体の場合には一つ以上のリガンドへの結合を、又はリガンドの場合には一つ以上の受容体への結合を含む、本発明のタンパク質の活性を刺激、活性化又は増強することが可能な分子を意味する。アゴニストは、抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳調節配列、及び類似体を含む。アゴニストは、タンパク質に特異的に結合する本発明のタンパク質の小分子アクチベーター及び融合タンパク、受容体分子及び誘導體も含み、タンパク質の活性、例えばその標的、タンパク質のアゴニスト変異体、本発明のタンパク質のインヒビターに対するアンチセンス分子、本発明のタンパク質のインヒビターに特異的なRNAアプタマー及び本発明のタンパク質のインヒビターに対するリボザイムへの結合を増強する。

20

用語「IRTMアゴニスト」は、例えば、一つ以上のIRTM受容体へ結合し、IRTM活性を刺激すること、又は一つ以上のIRTMインヒビターへ結合し、IRTMとインヒビターの相互作用を阻害することによって、IRTMの活性を刺激、活性化、又は増強することが可能な分子を意味する。

アゴニストは、IRTMインヒビターに対する抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、小分子、融合タンパク、受容体分子及びその誘導體、アンチセンス分子、RNAアプタマー及びリボザイムを含むが、これに限定されるものではない。

30

用語「TAMアゴニスト」は、一つ以上のTAM受容体へ結合し、TAM活性を刺激すること、又は一つ以上のTAMインヒビターへ結合し、TAMとインヒビターの相互作用を阻害することによって、TAMの活性を刺激、活性化、又は増強することが可能な分子を意味する。アゴニストは、TAMインヒビターに対する抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、小分子、融合タンパク、受容体分子及びその誘導體、アンチセンス分子、RNAアプタマー及びリボザイムを含むが、これに限定されるものではない。

40

用語「ATMアゴニスト」は、一つ以上のATM受容体へ結合し、ATM活性を刺激すること、又は一つ以上のATMインヒビターへ結合し、ATMとインヒビターの相互作用を阻害することによって、ATMの活性を刺激、活性化、又は増強することが可能な分子を意味する。アゴニストは、ATMインヒビターに対する抗体又はその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、グリコプロテイン、糖ペプチド、グリコリピド、多糖、オリゴ糖、生物有機化学分子、ペプチド模倣薬、薬剤及びその代謝物、小分子、融合タンパク、受容体分子及びその誘導體、アンチセンス分子、RNAアプタマー及びリボザイムを含むが、これに限定されるものではない。

【0016】

50

「天然配列」ポリペプチドは、天然由来の対応するポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでなる。よって、天然配列ポリペプチドは任意の哺乳動物からの天然に生じるポリペプチドのアミノ酸配列を有し得る。このような天然配列ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、あるいは組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列」ポリペプチドという用語は特にポリペプチドの天然に生じる切断型又は分泌型（例えば細胞外ドメイン配列）、ポリペプチドの天然に生じる変異体型（例えば、選択的スプライシング型）及び天然に生じる対立遺伝子変異体を包含する。

「ポリペプチド鎖」は、その各ドメインが、非共有的相互作用又はジスルフィド結合とは対照的にペプチド結合（一又は複数）によって他のドメイン（一又は複数）に連結しているポリペプチドである。

ポリペプチド「変異体」は対応する天然配列ポリペプチドと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変異体には、例えば一又は複数のアミノ酸（天然に生じるアミノ酸及び/又は天然に生じないアミノ酸）残基が、ポリペプチドのN末端及び/又はC末端に付加され、又は欠失されたポリペプチドが含まれる。通常は、変異体は天然配列ポリペプチドと少なくともおよそ80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくともおよそ90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくともおよそ95%のアミノ酸配列同一性を有する。また、変異体には、典型的には生物学的に活性な天然配列のポリペプチド断片（例えば、サブ配列、切断型など）が含まれる。

【0017】

本明細書中の「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとして、選択した配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較プログラムALIGN-2を使用することによって以下に記載のように得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、米国著作権事務所、ワシントンD.C.、20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録され、ジェネンテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから好適に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、例えばデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0018】

ここでの目的のために、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率 X/Y の100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0019】

本明細書中で用いる「タンパク質変異体」なる用語は、上記の変異体及び/又は一又は

10

20

30

40

50

複数のアミノ酸突然変異を天然のタンパク質配列に含むタンパク質を指す。場合によって、一又は複数のアミノ酸突然変異にはアミノ酸置換(一又は複数)が含まれる。本発明での使用のためのタンパク質及びその変異体は当分野で公知の様々な方法によって調製される。タンパク質のアミノ酸配列変異体はタンパク質DNAの突然変異によって調製される。このような変異体には、タンパク質のアミノ酸配列内の残基の例えば欠失、挿入又は置換が含まれる。欠失、挿入及び置換の何かを組み合わせ、所望の活性を有する最終コンストラクトに達成してもよい。変異体をコードするDNA中に作製される突然変異は、リーディングフレーム外の配列におくべきでなく、好ましくは二次的mRNA構造を生産しうる相補的な領域を作製しないであろう。欧州特許第75444号A。

【0020】

場合によって、タンパク質変異体は、天然のタンパク質をコードするDNAのヌクレオチド部位特異的突然変異誘発又はファージディスプレイ技術によって、変異体をコードするDNAを産生し、その後組換え細胞培養物中でDNAを発現することによって調節する。

アミノ酸配列変化を導入するための部位は予め決定されているが、突然変異自体は予め決定する必要はない。例えば、ある部位での突然変異のパフォーマンスを最適化するために、ランダムな突然変異誘発を標的コドン又は標的領域で行い、発現されたタンパク質変異体を所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングしてもよい。公知の配列を有するDNAの所定の部位に置換突然変異を作製する技術は、周知の、例えば部位特異的突然変異誘発である。本明細書中に記述されるタンパク質変異体の調製は、PCT出願国際公開第00/63380号に記載のものなどのファージディスプレイ技術によって達成される。

このようなクローンが選択されたあと、変異したタンパク質領域は取り除かれ、タンパク質産生のために好適なベクター、一般に好適な宿主の形質転換に用いられうる種類の発現ベクターに組み込まれてもよい。

アミノ酸配列欠失は、一般に1~30の残基、場合によって1~10の残基、場合によって1~5の残基以下に変動し、一般的に隣接する。

【0021】

アミノ酸配列の挿入には、1残基から基本的に制限しない長さのポリペプチドのアミノ末端及び/又はカルボキシル末端の融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。配列内挿入(すなわち天然のタンパク質配列内の挿入)は、一般におよそ1~10の残基、場合によって1~5、又は場合によって1~3に変動しうる。末端挿入の例は、組換え宿主からの分泌を促すためのN末端への、宿主細胞に異種性であるか相同的であるかにかかわらずシグナル配列の融合などである。

更なるタンパク質変異体は、天然のタンパク質内の少なくとも一のアミノ酸残基が取り除かれているもの及び、異なる残基がその位置に挿入されているものである。このような置換は、表1に示すものを考慮してなされうる。また、本明細書において記述されるように、タンパク質変異体は非天然のアミノ酸を含んでなってもよい。

アミノ酸はその側鎖の性質の類似性に依りて分類される(Biochemistry, 第2版., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)中のA. L. Lehninger):

非極性: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

荷電のない極性: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

酸性: Asp (D), Glu (E)

塩基性: Lys (K), Arg (R), His (H)

あるいは、天然に存在する残基は共通の側鎖性質に基づいてグループに分類されてもよい。

疎水性: ノルロイシン、Met, Ala, Val, Leu, Ile;

中性の親水性: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

10

20

30

40

50

酸性：A s p、G l u；
 塩基性：H i s、L y s、A r g；
 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o；
 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【 0 0 2 2 】

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノロイシン	Leu
Leu (L)	ノロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノロイシン	Leu

10

20

30

40

【 0 0 2 3 】

「天然に生じるアミノ酸残基」（すなわち遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基）は、アラニン（A l a）；アルギニン（A r g）；アスパラギン（A s n）；アスパラギン酸（A s p）；システイン（C y s）；グルタミン（G l n）；グルタミン酸（G l u）；グリシン（G l y）；ヒスチジン（H i s）；イソロイシン（I l e）；ロイシン（L e u）；リジン（L y s）；メチオニン（M e t）；フェニルアラニン（P h e）；プロリン（P r o）；セリン（S e r）；スレオニン（T h r）；トリプトファン（T r p）；チロシン（T y r）；及び、バリン（V a l）からなる群から選択されうる。「非天然に生じるアミノ酸残基」は、上記に挙げる天然に生じるアミノ酸残基以外の、ポリ

50

ペプチド鎖内の隣接したアミノ酸残基（一又は複数）を共有結合することができる残基を指す。非天然に生じるアミノ酸残基の例には、例えば、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン及び、例えば、Ellman等 Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)及び米国公開特許第20030108885号及び同第20030082575号に記載されるものなどの他のアミノ酸残基類似体が含まれる。簡単に言うと、これらの手順は、RNAのインビトロ又はインビボの転写及び翻訳が続く非天然に生じるアミノ酸残基によるサブレッサー tRNAの活性化を伴う。例として、米国公開特許第20030108885号及び同第20030082575号；Noren等 Science 244:182 (1989)；及び、上掲のEllman等を参照。

【0024】

「単離された」ポリペプチドは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分は、ポリペプチドの診断又は治療への使用を妨害しうる物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。ある実施態様では、ポリペプチドは、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、95重量%のポリペプチドより多くなるほど、又は99重量%より多くなるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度にまで、あるいは(3)クーマシーブルー又は銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分な程度にまで精製される。ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離されたポリペプチドには、組換え細胞内にインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一の精製工程により調製される。

【0025】

「抗体」という用語は最も広義に使用され、モノクローナル抗体（完全長又は無傷のモノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多価抗体、少なくとも2つのインタクト抗体から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片（以下を参照）を具体的に包含する。

特に断らない限りは、本明細書全体を通して「多価抗体」という表現は3又はそれ以上の抗原結合部位を含む抗体を指すために使用される。多価抗体は典型的には3又はそれ以上の抗原結合部位を持つように遺伝子操作されたもので、一般には天然配列IgM又はIgA抗体ではない。

「抗体断片」は、一般には無傷の抗体の抗原結合を含み、よって抗原に結合する能力を保持している無傷の抗体の一部のみを含む。本定義に包含される抗体断片の例には、(i)VL、CL、VH及びCH1ドメインを持つFab断片；(ii)CH1ドメインのC末端に一又は複数のシステイン残基を持つFab断片であるFab'断片；(iii)VH及びCH1ドメインを持つFd断片；(iv)CH1ドメインのC末端に一又は複数のシステイン残基とVH及びCH1ドメインを持つFd'断片；(v)抗体の単一アームのVL及びVHドメインを持つFv断片；(vi)VHドメインからなるdAb断片(Ward等, Nature 341, 544-546 (1989))；(vii)単離されたCDR領域；(viii)ヒンジ領域がジスルフィド架橋によって結合された2つのFab'断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(ix)単鎖抗体分子（例えば単鎖Fv；scFv）(Bird等, Science 242:423-426 (1988))；及びHuston等, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))；(x)同一のポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン(VL)に結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む、2つの抗原結合部位を持つ「ダイアボディー(diabodies)」(例えば、欧州特許公報第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)；(xi)相補的軽鎖ポリペプチドと共に一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む「線形抗体」(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)；及び米国特許第5641870号)が含まれる。

【0026】

10

20

30

40

50

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる天然に生じる突然変異等の可能性のある突然変異を除いて、同一である。したがって、「モノクローナル」なる修飾語は、別の抗体の混合ではない抗体の性質を示す。モノクローナル抗体は非常に特異的で、単一抗原に対するものである。ある実施態様では、モノクローナル抗体は、一般に、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を包含しており、この場合の標的に結合するポリペプチドは、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスによって得られたものである。例えば、このような選択プロセスは、複数のクローン、例えばハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールからの、独特のクローンの選択であり得る。選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的に対する親和性を向上させる、標的結合配列をヒト化する、細胞培養液中でのその産生を向上させる、インビボでのその免疫原性を低減する、多特異性抗体を作製する等が可能であること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。一般に異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、1の抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、通常他の免疫グロブリンによって汚染されない点で有利である。

「モノクローナル」との修飾詞は、ほぼ均一な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作ることができ、それらの技術には例えばハイブリドーマ法(例えば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975); Hongo等, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988); Hammerling等: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)、ファージディスプレイ法(例えば、Clarkson等, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)参照)、及びヒト免疫グロブリン座位又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全部を有する動物においてヒト又はヒト様抗体を産生する技術(例えば、WO1998/24893; WO1996/34096; WO1996/33735; WO1991/10741; Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann等, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 及び同第5,661,016号; Marks等, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992); Longerg等, *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); 及びLongerg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995))が含まれる。

【0027】

ここに記載のモノクローナル抗体は、特に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種から由来するか、特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である一方、鎖の残りが、他の種から由来するか、他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である「キメラ」抗体、並びにそれらが所望の生物活性を示す限りはそのような抗体の断片を含む(米国特許第4,816,567号; 及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域からの残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び能力を有する

非ヒト霊長類のような非ヒト種の高頻度可変領域からの残基(ドナー抗体)によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRsがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部をまた含む。更なる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986) ; Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988);及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照のこと。また例として、Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); 及び米国特許第 6,982,321号及び同第7,087,409号を参照。また、van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)も参照のこと。抗原刺激に应答して抗体を産生するように修飾されているが、その内在性遺伝子座が無効になっているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウスに抗原を投与することによってヒト抗体を調製することができる(例として、XENOMOUSE^{T M}技術に関する米国特許第6075181号及び同第6150584号を参照)。また、例えば、ヒトのB細胞ハイブリドーマ技術によって生成したヒト抗体に関するLi等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)も参照のこと。

【0028】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここで開示されたヒト抗体を製造するための何れかの技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。ヒト抗体は、当該分野で知られている様々な技術を使用することによって生産することが可能である。一実施態様では、ヒト抗体はファージライブラリーから選択され、ここでファージライブラリーがヒト抗体を発現する(Vaughan等, *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets等, *PNAS, (USA)* 95:6157-6162(1998); Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。また、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウス中に導入することにより産生することができる。暴露時に、遺伝子再構成、アセンブリ及び抗体レパートリーを含む、あらゆる点でヒトに見られるものと密接に類似しているヒト抗体の産生が観察される。このアプローチ法は、例えば米国特許第5545807号;第5545806号;第5569825号;第5625126号;第5633425号;第5661016号、及び次の科学文献: Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg等, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison等, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)に記載されている。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原に対して抗体を生産するヒトBリンパ球の不活化によって調製されてもよい(そのようなBリンパ球は、個体から回収されてもよいし、インビトロで免疫化されていてもよい)。例えば、Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss. p.77(1985); Boerner等, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95(1991); 及び米国特許第5750373号を参照のこと。

【0029】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布

していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。例えば、高頻度可変領域は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つのHVRを含み; VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。天然の抗体では、H3及びL3は6つのHVRのうちで最も高い多様性を示す、特にH3は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすように思われる。例として、Xu等(2000) Immunity 13:37-45; Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ)のJohnson and Wu(2003)を参照。実際、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が無い状態で安定である。Hamers-Casterman等(1993) Nature 363:446-448; Sheriff等(1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736。

【0030】

多数のHVRの描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbMHVRは、カバットHVRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」HVRは、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これらHVRのそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	AbM	Chothia	接触
L1	L24 - L34	L24 - L34	L26 - L32	L30 - L36
L2	L50 - L56	L50 - L56	L50 - L52	L46 - L55
L3	L89 - L97	L89 - L97	L91 - L96	L89 - L96
H1	H31 - H35B	H26 - H35B	H26 - H32	H30 - H35B
(カバット番号付け)				
H1	H31 - H35	H26 - H35	H26 - H32	H30 - H35
(Chothia番号付け)				
H2	H50 - H65	H50 - H58	H53 - H55	H47 - H58
H3	H95 - H102	H95 - H102	H96 - H101	H93 - H101

【0031】

HVRは、次のような「拡大HVR」を含むことができる、即ち、VLの24 - 36又は24 - 34(L1)、46 - 56又は50 - 56(L2)及び89 - 97又は89 - 96(L3)と、VHの26 - 35(H1)、50 - 65又は49 - 65(H2)及び93 - 102、94 - 102、又は95 - 102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、Kabat等、上掲に従って番号を付した。

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0032】

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ

酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、上掲のKabat等の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82b及び82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

本明細書及び特許請求の範囲すべてにわたって、一般的に、可変ドメインの残基を指す場合にはカバット番号付けシステムを用いる(およそ、軽鎖の残基1-107と重鎖の残基1-113)(例として、Kabat等, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。一般的に、イムノグロブリン重鎖定常領域内の残基を指す場合には、「EU番号付けシステム」又は「EUインデックス」を用いる(EUインデックスはKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において報告されており、出典明記によって本明細書中に特別に組み込まれる)。本明細書中で特に述べない限り、抗体の可変ドメイン内の残基の数の参照は、カバット番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する。本明細書中で特に述べない限り、抗体の定常ドメイン内の残基の数の参照は、EU番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する(例として、米国特許仮出願第60/640323号、EU番号付けについての図を参照)。

【0033】

イムノグロブリンの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(イムノグロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。イムノグロブリンには5つの主要なクラスがある: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、更にそれらは、IgG1(非A及びAアロタイプを含む)、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。イムノグロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、一般に、例えばAbbas等 Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)に記載されている。抗体は、抗体と一又は複数の他のタンパク質ないしペプチドとの共有的不いしは非共有結合によって形成される大きな融合分子の一部であってもよい。

【0034】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

「Fc領域」なる用語は、インタクト抗体のパパイン消化によって生成されうる免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Fc領域は天然配列Fc領域又は変異形Fc領域であってもよい。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトIgG重鎖Fc領域はおよそCys226の位置又はおよそPro230からの位置のアミノ酸残基からFc領域のカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてのK447残基が除去された抗体群、K447残基が除去されていない抗体群、及びK447残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含みうる。免疫グロブリンのFc領域は一般に、CH2ドメインとCH3ドメインの2つの定常ドメインを含み、場合によってはCH4ドメインを含む。

【0035】

10

20

30

40

50

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明記によって本明細書中に特別に援用される上掲のKabat等のE Uインデックスのものである。「KabatのE Uインデックス」はヒトI g G 1 E U抗体の残基番号を指す。

本明細書中の「F c領域鎖」は、F c領域の2つのポリペプチド鎖の1つを意味する。

ヒトI g G F c領域の「C H 2ドメイン」(「C g 2」ドメインとも呼ばれる)は、通常、約231位のアミノ酸残基から約340位のアミノ酸残基まで延びている。C H 2ドメインは、別のドメインと親密な対にならないという点で独特である。代わりに、2つのN結合分岐炭水化物鎖が、無傷の天然IgG分子の2つのC H 2ドメインの間に挿入される。炭水化物はドメイン-ドメイン対の代替物を提供し、C H 2ドメインの安定化を助けることができる。BurtonによるMolec. Immunol. 22:161-206 (1985)を参照のこと。ここで、C H 2ドメインは天然配列のC H 2ドメイン又は変異体C H 2ドメインとすることができる。

「C H 3ドメイン」は、F c領域におけるC末端からC H 2ドメインまでの範囲(つまり、I g Gの約341位のアミノ酸から約447位のアミノ酸)を含む。ここでは、C H 3領域は、天然配列のC H 3ドメインか、又は変異体C H 3ドメイン(例えば、その一鎖に「突出部(protruberance)」が導入され、それに対応して他の鎖に「空洞」が導入されたC H 3ドメイン: 出典明記によって特別に本明細書中に援用される米国特許第5821333号参照)とすることができる。このような変異体C H 3ドメインを使用して本明細書に開示する多重特異性(例えば二重特異性)抗体をつくることができる。

【0036】

「ヒンジ領域」は、通常、ヒトI g G 1の約G l u 2 1 6又は約C y s 2 2 6から約P r o 2 3 0まで延びていると定義される(Burton, Molec. Immunol. 22:161-206, 1985)。他のI g Gタイプのヒンジ領域は、同じ位置に内部重鎖S-S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することによりIgG1と整列させることができる。本明細書のヒンジ領域は、天然配列のヒンジ領域か、又は変異体ヒンジ領域とすることができる。変異体ヒンジ領域の2つのポリペプチド鎖は、通常、1つのポリペプチド鎖につき少なくとも1つのシステイン残基を保持しており、よって2つの変異体ヒンジ領域のポリペプチド鎖は2つの鎖の間にジスルフィド結合を形成することができる。本発明の好ましいヒンジ領域は、天然配列のヒンジ領域、例えば天然配列のヒトI g G 1ヒンジ領域である。

「機能的F c領域」は、天然配列F c領域の少なくとも1つの「作動体機能」を有する。例示的「作動体機能」には、C 1 q結合、補体依存性細胞障害作用(C D C)、F cレセプター結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(A D C C)、食作用、細胞表面レセプター(例えばB細胞レセプター; B C R)の下方制御などが含まれる。そのような作動体機能は、通常、F c領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、そのような抗体の作動体機能を評価するための当技術分野で既知の様々なアッセイを使用して評価される。

「天然配列のF c領域」は、天然に見出されるF c領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒトF c領域は、天然配列のヒトI g G 1 F c領域(非A-及びA-アロタイプ);天然配列のヒトI g G 2 F c領域;天然配列のヒトI g G 3 F c領域;及び天然配列のヒトI g G 4 F c領域;並びに、これらの自然に生じる変異体が含まれる。

【0037】

「変異体F c領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾により、天然配列のF c領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。ある実施態様では、変異体F c領域は、天然配列のF c領域もしくは親ポリペプチドのF c領域と比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列のF c領域又は親のポリペプチドのF c領域におよそ1からおよそ10のアミノ酸置換、好ましくはおよそ1からおよそ5のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体F c領域は、典型的には、天然配列のF c領域及び/又は親ポリペプチドのF c領域と、例えば少なくともおよそ80%の同一性を有するか、又は少なく

ともおよそ90%の配列同一性を、又は少なくともおよそ95%の配列又はそれ以上の同一性を有するものである。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害(CDC); Fcレセプター結合性; 抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC); 貪食作用; 細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション; 及びB細胞活性化が含まれる。

【0038】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcRs)と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。ある実施態様では、その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれるが、PBMCとNK細胞が一般的に好まれる。エフェクター細胞はその天然源、例えば本明細書中に記載の血液又はPBMCから単離してもよい。

【0039】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。いくつかの実施態様では、FcRは天然ヒトFcRである。いくつかの実施態様では、FcRは、IgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRIIレセプターには、FcRIIA(「活性型レセプター」)及びFcRIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(例としてDaeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)を参照)。FcRsに関しては、例えばRavetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRsはここでの「FcR」という言葉によって包含される。

また、「Fcレセプター」又は「FcR」なる用語には、母性IgGの胎児への移送(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) Kim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))と、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う新生児性レセプターFcRnも含まれる。FcRnへの結合の測定方法は公知である(例としてGhetie and Ward, *Immunol. Today* 18: 592-8

10

20

30

40

50

(1997); Ghetie等, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton等, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); 国際公開第2004/92219号 (Hinton等)を参照)。

インビボでのヒトFcRnへの結合とヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又は変異形Fc領域を有するポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。国際公開公報2000/42072 (Presta) にFcRへの結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。例としてShields等, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)も参照のこと。

【0040】

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラス)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体(変異形Fc領域を有するポリペプチド)は、米特許第6194551号B1及び国際公開第1999/51642号に記載される。また例としてIdusogie等 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)も参照のこと。

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。一実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、*Bio/Technology*, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Schier他、*Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton他、*J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson他、*J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins他、*J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0041】

ここでの「可動(フレキシブル)リンカー」とはペプチド結合によって結合した2又はそれ以上のアミノ酸残基を含むペプチドを意味し、それによって結合された(例えば2つのFd領域のような)2つのポリペプチドに対してより大なる回転自由度を提供する。そのような回転自由度により、可動リンカーによって結合された2又はそれ以上の抗原結合部位がそれぞれより効率的に標的抗原(一又は複数)に接近できるようになる。適切な可動リンカーペプチド配列の例には、gly-ser、gly-ser-gly-ser、ala-ser、及びgly-gly-gly-serが含まれる。

「二量体化ドメイン」は少なくとも2つのアミノ酸残基(一般にはシステイン残基)又は少なくとも2つのペプチド又はポリペプチド(これは同じか異なったアミノ酸配列を持ちうる)の結合(association)によって形成される。ペプチド又はポリペプチドは共有的及び/又は非共有的結合(一又は複数)によって互いに相互作用しうる。ここでの二量体化ドメインの例には、Fc領域; ヒンジ領域; CH3ドメイン; CH4ドメイン; CH1-CL対; 出典明示によりここに取り込まれる米国特許第5821333号に記載されたような、遺伝子操作された「ノブ(knob)」及び/又は「隆起(protruberance)」を持つ「インターフェース」; ロイシンジッパー(例えば、jun/fosロイシンジッパー、Kostelney等, *J. Immunol.*, 148:1547-1553 (1992)を参照; 又は酵母GCN4ロイシンジッパー); イソロイシンジッパー; レセプター二量体対(例えばインターロイキン-8レセプター(IL-8R); 及びインテグリンヘテロ二量体、例えばLFA-1及びGP111b/IIIIa)、又はその二量体化領域(一又は複数); 二量体リガンドポリペプチド(例えば、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、インターロイキン-8(IL-8)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、PDGFメンバー、及び脳

由来神経栄養因子(BDNF); Arakawa等, J. Biol. Chem. 269(45): 27833-27839 (1994)及びRadziejewski等 Biochem. 32(48): 1350 (1993)を参照)、又はその二量体化領域(一又は複数); ジスルフィド結合を形成可能なシステイン残基対; ペプチド又はポリペプチドの間にジスルフィド結合が形成可能なようにそれぞれが少なくとも一つのシステイン残基(例えば約1、2又は3から約10のシステイン残基)を有するペプチド又はポリペプチドの対(以下、「合成ヒンジ」); 及び抗体可変ドメインが含まれる。ここでの最も好適な二量体化ドメインはFc領域又はヒンジ領域である。

【0042】

抗体の「機能的抗原結合部位」は標的抗原に結合可能なものである。抗原結合部位の抗原結合親和性は、抗原結合部位が由来する親抗体と必ずしも同じほどは強くはないが、抗原に結合する能力は、抗原に結合する抗体を評価するために知られている既知の様々な方法の何れか一つを使用して測定できるものでなければならない。更に、この多価抗体の抗原結合部位の各々の抗原結合親和性は定量的に同じである必要はない。この多量体抗体に対して、機能的抗原結合部位の数は超遠心分離分析法を使用して評価することができる。この分析法によれば、多量体抗体に対する標的抗原の異なった比を組み合わせ、複合体の平均分子量を、機能的結合部位の異なった数を仮定して算定する。これらの理論値を、機能的結合部位の数を評価するために得られた実際の実権値と比較する。

指定された抗体の「生物学的特性」を有する抗体は同じ抗原に結合する他の抗体とは区別されるその抗体の生物学的特性の一又は複数を保有するものである。

対象の抗体が結合する抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載のものなどの常套的な交差遮断(cross-blocking)アッセイを行ってもよい。

【0043】

一又は複数の更なる治療薬と「組み合わせた」投与とは、同時(同時期)及び/又は任意の順序での連続した投与を含む。

治療のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜用及び農場用動物、動物園、スポーツ、又は愛玩動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタなどを含む。典型的には、哺乳動物はヒトである。

「疾患」は本発明の分子による治療によって利益を得る任意の症状である。これには、哺乳動物が問題とする疾患に罹らしめる病理学的症状を含む、慢性及び急性の疾患ないし疾病が含まれる。疾患は、細胞増殖性疾患、血管形成性疾患および炎症性疾患、血管形成性疾患、および免疫疾患(自己免疫不全を含むがこれに限定されない)を含む。

【0044】

「細胞増殖性疾患」及び「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖および/または肥大を伴う疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

「炎症性疾患」および「免疫疾患」なる用語は、異常な免疫機構および/または異常なサイトカイン・シグナル伝達(例えば、異常なインターフェロン・シグナル伝達)によって生じる疾患を指すかまたは記載する。炎症性疾患と免疫疾患の例は、自己免疫疾患、免疫不全症候群および過敏症を含むが、これに限定されるものではない。

「炎症性疾患」なる用語は、炎症性の状態に基づくかまたは関連した疾患又は病状を指す。炎症性疾患は、自己免疫疾患、高血糖疾患及びヒトインスリン耐性と関連する疾患を含むが、これに限定されるものではない。

【0045】

「自己免疫疾患」なる用語は、個体自身の組織から生じ、該組織に対する非悪性疾患又は障害である。自己免疫疾患は典型的には免疫系に破壊された自己反応性免疫細胞不全によって特徴付けられる: 自己反応性リンパ球は、過剰発現する、生存促進アポトーシス因子の活性を増加させる、又はアポトーシス促進因子の発現又は活性を減少させることが同定されている。本明細書において、自己免疫疾患は、悪性のまたはガン疾患または病状、特にB細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ球性白血病(CL

L)、有毛細胞白血病と慢性骨髄芽球性白血病を除外する。自己免疫疾患又は障害の例には、これらに限るものではないが、炎症反応、例えば乾癬及び皮膚炎(例えばアトピー性皮膚炎)を含む炎症性皮膚病；全身性強皮症及び硬化症；炎症性腸疾患(例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎)に関連した反応；呼吸困難症候群(成人性呼吸困難症候群；ARDSを含む)；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；アレルギー病状、例えば湿疹及び喘息及びT細胞の浸潤に関連した他の病状及び慢性炎症反応；アテローム性動脈硬化症；白血球付着欠損症；リウマチ様関節炎；全身性エリテマトーデス(SLE)(ループス腎炎、皮膚狼瘡を含むがこれに限らず)；真性糖尿病(例えば、I型真性糖尿病又はインスリン依存性真性糖尿病)；多発性硬化症；レノー症候群；自己免疫甲状腺炎；橋本甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；若年発症糖尿病；及び結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽種症及び血管炎に典型的に見出されるTリンパ球及びサイトカインにより媒介される急性及び遅延高血圧に関連した免疫反応；悪性貧血(アジソン病)；白血球血管外遊出に関連した疾患；中枢神経系(CNS)炎症障害；多臓器傷害症候群；溶血性貧血(限定するものではないが、クリオグロブリン血症又はクームズ陽性貧血)；重症筋無力症；抗原-抗体複合体媒介性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランベルト-イートン筋無力症候群；類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ライター病；スティフマン症候群；ベーチェット疾患；巨細胞動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性神経障害；免疫血小板減少性紫斑病(ITP)又は自己免疫血小板減少病等が含まれる。

10

20

【0046】

「高血糖性疾患」なる用語は、糖尿病と関連した疾患/障害を含むがこれに限定されるものではなく、高血糖障害によって生じる高脂血症と肥満を含むがこれに限定されるものではない。

「インスリン耐性と関連する疾患」なる用語は、インスリン耐性、多嚢胞性卵巣症候群、冠状動脈疾患および末梢血管疾患を含むが、これに限定されるものではない。

【0047】

「有効量」又は「治療的有效量」という用語は、哺乳類の疾病や疾患の治療のために有効な薬剤の量に相当する。癌の場合は、有効量の薬剤により、癌細胞の数を減少させ；腫瘍の大きさを小さくし；癌細胞の周辺器官への浸潤を阻害(すなわち、ある程度に遅く、典型的には止める)し；腫瘍の転移を阻害(すなわち、ある程度に遅く、典型的には止める)し；腫瘍の成長をある程度阻害し；腫瘍の治療を可能にする；及び/又は疾患に関連する一又は複数の症状をある程度和らげることが可能である。ある程度、薬剤は、成長を妨げ及び/又は現存の癌細胞を殺すことが可能で、細胞分裂停止性及び/又は細胞障害性である。癌治療に対しては、インビボにおける効力は、例えば生存期間、病状の進行時間(TTP)、応答速度(RR)、応答期間、及び/又は生活の質の測定により測定される。大腸腺腫の場合、治療的有效量の薬剤により、例えば、腺腫細胞数の減少；腺腫サイズの減少；腺腫数の減少；腺腫の成長のある程度の阻害；及び/又は本疾患に関係する一又は複数の症状のある程度の軽減しうる。

30

「治療」は、治療的処置及び予防的又は防止的な処置を指す。治療を必要とするものには、既に疾患を有するもの、並びに予防すべき疾患があるものが含まれる。本発明のある実施態様では、治療は、腫瘍増殖の抑制、又は自己免疫疾患の抑制を指してもよい。

40

本発明のポリペプチドに関して「生物学的活性」及び「生物学上活性な」なる用語は、標的に特異的に結合して細胞の応答、例えば増殖、移動などを調節する分子の能力を指す。また、細胞性応答には、レセプターによって媒介されるもの、例えば限定するものではないが、移動及び/又は増殖が含まれる。ここでは「調節する」なる用語には促進及び阻害が含まれる。

【0048】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節されない細胞増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は記述する。癌の例には、限定するものではないが、カルチノーマ、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病又はリンパ性悪性腫瘍が含まれる。このよ

50

うな癌のより具体的な例には、腎臓又は腎性癌、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肺癌、例として小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、扁平細胞癌(例えば上皮の扁平細胞癌)、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肝癌、膀胱癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃(gastric、stomach)癌、消化管間質腫瘍(GIST)、脾癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、莢膜細胞腫、男化腫瘍、肝細胞癌、非ホジキンリンパ腫を含む血液悪性腫瘍(NHL)、多発性骨髄腫及び急性の血液系悪性腫瘍、子宮内膜ないし子宮カルチノーマ、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛膜癌、唾液腺カルチノーマ、外陰部癌、甲状腺癌、食道カルチノーマ、肝癌、肛門部のカルチノーマ、陰茎カルチノーマ、上咽頭癌、喉頭のカルチノーマ、カポシ肉腫、メラノーマ、皮膚カルチノーマ、シュワン腫、乏突起細胞腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉種、平滑筋肉腫、尿路カルチノーマ、甲状腺カルチノーマ、ウィルムス腫瘍、並びにB細胞リンパ腫(例えば低グレード/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL); 小リンパ球性(SL)NHL; 中間グレード/濾胞性NHL; 中間グレード広汎性NHL; 高グレード免疫芽細胞NHL; 高グレードリンパ芽球NHL; 高グレード小型非分割細胞NHL; 巨大腫瘤病変(bulky disease)NHL; マントル細胞リンパ腫; エイズ関連のリンパ腫; 及び、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症); 慢性リンパ球性白血病(CLL); 急性リンパ芽球性白血病(ALL); 線毛細胞白血病; 慢性骨髄芽球性白血病; 及び、移植後のリンパ増殖性疾患(PTLD)、並びに母斑症、浮腫(脳腫瘍と関係しているものなど)及びメイグス症候群と関係している異常な血管性増殖が含まれる。本明細書中で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性のいずれであっても、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖、及びすべての前癌性及び癌性の細胞及び組織を指す。

【0049】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、At 211、I 131、I 125、Y 90、Re 186、Re 188、Sm 153、Bi 212、P 32及びLuの放射性同位体)、化学治療薬、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素を含むように意図されている。

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞の増殖をインビトロ及び/又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期で細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス(ピンクリスチン及びピンブラスチン)、タキソール(登録商標)、及びトポII阻害剤、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

【0050】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤; プスルファン、インブロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類; ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類; アルトレートアミン(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphaoramid)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類; アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン); デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標)); ラパチョーネ; ラパコール; コルヒチン;

ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT-11(イ
 リノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン(scopole
 ctin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1
 065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィ
 ロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニボシド；クリプトフィシン(特
 くにクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合
 成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロピン；パンクラチス
 タチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlor
 naphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファ
 ミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベン
 ビチン(novembichin)、フェネスチリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustin
 e)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマス
 タード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)
 、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物
 質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケ
 アマイシン 1I及びカリケアマイシン I1(例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:1
 83-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイ
 シン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質
 発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシ
 ン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カ
 ラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマ
 イシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6-ジアゾ-
 5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルホリノ-ドキ
 ソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、ドキシ
 ソルピシンHCIRIボソーム注射剤(DOXIL(登録商標))及びデオキシドキシソルピシンを含む)
 、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マ
 イトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノ
 ガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィ
 ロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシ
 ン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)
 、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例
 えばメトトレキセート、ゲムシタピン(gemcitabine)(GEMZAR(登録商標))、テガフル(teg
 afur)(UFTORAL(登録商標))、カペシタピン(capecitabine)(XELODA(登録商標))、エポチ
 ロン(epothilone)、及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテ
 リン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセ
 ート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラピン(fludarabine)、6-メルカプ
 トプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、ア
 ザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラピン、
 ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジ
 ン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ド
 ロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)
 ；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャ
 ー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミ
 ドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベスト
 ラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；
 デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；
 エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エトグルシド(et
 oglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイ
 タンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(a
 nsamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamo

10

20

30

40

50

l) ; ニトラクリン(nitracrine) ; ペントスタチン ; フェナメット(phenamet) ; ピラルピシン ; ロソキサントロン ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; P S K (登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサラン(razoxane) ; リゾキシシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム(spirogermanium) ; テニユアゾン酸(tenuazonic acid) ; トリアジコン(triaziquone) ; 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin) A、ロリジン(roridine) A及びアングイジン(anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標)) ; ダカーバジン ; マンノムスチン(mannomustine) ; ミトブロニトール ; ミトラクトール(mitolactol) ; ピポブロマン(pipobroman) ; ガシトシン(gacytosine) ; アラビノシド(「A r a - C」) ; チオテパ ; タキソイド類、例えばパクリタキセル(TAXOL(登録商標))、パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(ABRAXANE™)、及びドキシセタキセル(TAXOTERE(登録商標)) ; クロランブシル ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン ; ビンブラスタン(VELBAN(登録商標)) ; プラチナ ; エトポシド(V P - 1 6) ; イホスファミド ; マイトキサントロン ; ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標)) ; オキサリプラチン ; ロイコボビン(leucovovin) ; ビノレルピン(N A V E L B I N E (登録商標)) ; ノバントロン(novantrone) ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロナート(ibandronate) ; トポイソメラーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0 ; ジフルオロメチロールニチン(D M F O) ; レチノイン酸のようなレチノイド ; 上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体 ; 並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びブレドニソロン併用療法の略称であるC H O P、及び5-F U及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATIN™)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

【 0 0 5 1 】

またこの定義に含まれるものには、癌の増殖を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター(S E R M)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)(EVISTA(登録商標))、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(FARESTON(登録商標)) ; 抗プロゲステロン ; エストロゲンレセプター下方調節剤(ERD) ; 卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば酢酸リュープロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン(tripterelin) ; その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド ; 並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(MEGASE(登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、フォルメスタニー(formestane)、ファドロゾール、ボロゾール(RIVISOR(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))、及びアナストロゾール(ARIMIDEX(登録商標))である。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロネ酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロネ酸/ゾレドロネート(ZOMETAX(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロネ酸(AREDIA(登録商標))、チルドロネ酸(SKELID(登録商標))、又はリセドロネ酸(ACTONEL(登録商標))、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1, 3-ジオキサランヌクレオシドシトシン類似体) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばP K C-、R a f、及びH-R a s、及び上皮増殖因子レセプター(E G F - R) ; THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワ

クチン；トポイソメラーゼ1阻害剤(例えばLURTOTECAN(登録商標))；r m R H(例えばABA RELIX(登録商標))；ラパチニブ(lapatinib ditosylate)(GW572016としても知られる E r b B - 2 及び E G F R 二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)；セレコシブ(celecoxib)などの C O X - 2 阻害剤(CELEBREX(登録商標))；4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾル-1-イル)ベンゼンスルホンアミド；及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0052】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)のような糖タンパク質ホルモン；肝増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-及び-；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチビン；血管内皮増殖因子(例えばVEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E)；胎盤由来の増殖因子(PLGF)；血小板由来成長因子(PDGF、例えばPDGFA、PDGFB、PDGFC、PDGFD)；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；神経成長因子、例えばNGF-；血小板増殖因子；TGF-及びTGF-のようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、例えばインターフェロン-、-、-；コロニー刺激因子(CSF)、例えばマクロファージ-CSF(M-CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；及び顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-30のインターロイキン(IL)；セクレトグロビン/ウテログロビン；オンコスタチンM(OSM)；TNF-又はTNF-などの腫瘍壊死因子；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合は、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0053】

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比較して腫瘍細胞に対する細胞障害性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, :375-382, 615th Meeting, Belfast (1986)、及びStella等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」、Directed Drug Delivery, Borhardt等(編), 247-267項, Humana Press (1985)参照。本発明のプロドラッグは、限定するものではないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、-ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定はないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害性剤の例には、前記の化学療法剤が含まれる。

【0054】

「血管新生因子又は薬剤」は、血管の発達を刺激する、例えば、血管新生、血管内皮細

胞増殖、血管及び/又は脈管形成の安定性を促進する増殖因子である。例えば、血管新生因子には、限定するものではないが、例えば、VEGF及びVEGFファミリーのメンバー、PLGF、PDGFファミリー、線維芽細胞増殖因子ファミリー(FGF)、TIEリガンド(アンジオポイエチン)、エフリン、ANGPTL3、ANGPTL4などが含まれる。また、創傷治癒を促す因子、例として、成長ホルモン、インスリン様成長因子-I(IGF-I)、VIGF、上皮細胞増殖因子(EGF)、CTGF、及びそのファミリーのメンバー、及びTGF- β 及びTGF- β が含まれる。例としてKlagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini等, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)(例えば、血管新生因子を列挙する表1); 及びSato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)を参照。 10

「抗血管新生剤」又は「血管新生インヒビター」は、小分子量物質、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、単離されたタンパク質、組換えタンパク質、抗体、又はこれらのコンジュゲートないし融合タンパク質を指し、直接又は間接的に、血管新生、脈管形成又は望ましくない血管透過を阻害するものである。例えば、抗血管新生剤は、上記に定義するように、血管新生剤に対する抗体又は他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体、VEGFレセプターに対する抗体、VEGFレセプターシグナル伝達を遮断する小分子(例えばPTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248(リンゴ酸スニチニブ)、AMG706)である。また抗血管新生剤には、天然の血管新生インヒビター、例えばアンジオスタチン、エンドスタチンなどが含まれる。例としてKlagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)(例えば、悪性メラノーマの抗血管新生療法を列挙する表3); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini等, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)(例えば、抗血管新生因子を列挙する表2); 及び、Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)(例えば、臨床試験で用いられる抗血管新生剤を挙げる表1)を参照。 20

【0055】

本明細書中で用いる「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書において治療される哺乳動物の免疫系を抑制するか又は隠すために作用する物質を指し、炎症を調製することを含む。これには、限定するものではないが、サイトカイン産生を抑制する物質、自己抗原発現を下方制御又は抑制する物質、又は、MHC抗原をマスキングする物質が含まれる。このような薬剤の例には、2-アミノ-6-アリル-5-置換ピリミジン(米国特許第4665077号を参照); 非ステロイド性抗炎症薬(NSAID); ガンシクロビル、タクロリムス、糖質コルチコイド、例として、コルチゾール又はアルドステロン、抗炎症剤、例として、シクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リポキシゲナーゼインヒビター又はロイコトリエンレセプターアンタゴニスト; プリンアンタゴニスト、例として、アザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル(MMF); アルキル化剤、例として、シクロホスファミド; プロモクリプチン; ダナゾール; ダブソン; グルタルアルデヒド(MHC抗原をマスキングするもの、米国特許第4120649号に記載); MHC抗原及びMHC断片に対する抗イディオタイプ抗体; シクロスポリンA; ステロイド、例として、副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質コルチコイド類似体、例えばプレドニゾン、メチルプレドニゾン及びデキサメサゾン; ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター、例えばメトトレキセート(経口又は皮下); ヒドロキシクロロキン; スルファサラジン; レフルノミド; サイトカインないしはサイトカインレセプター抗体、例えば抗インターフェロン- α 、 β 又は γ 抗体、抗腫瘍壊死因子- α 抗体(インフリキシマブ又はアダリムマブ)、抗TNF- α イムノアドヘシン(エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子- α 抗体、抗インターロイキン2抗体及び抗IL-2レセプター抗体; 抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体; 抗L3T4抗体; 異種性の抗リンパ球グロブリン; パン-T抗体、好ましくは抗CD3又は抗CD4/CD4a抗体; LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日に発行の国際公開第1990/08187号); ストレプトキナー 30 40 50

ゼ；TGF- β ；ストレプトドルナーゼ；宿主のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；デオキシスペルグアリン；ラパマイシン；T細胞レセプター(Cohen等、米国特許第5114721号)；T細胞レセプター断片(Offner等、Science, 251: 430-432 (1991)；国際公開第1990/11294号；laneway, Nature, 341: 482 (1989)；及び国際公開第1991/01133号)；及び、T細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)、例えばT10B9が含まれる。

「非ステロイド系抗炎症薬」又は「NSAID」の例は、アセチルサリチル酸、イブプロフェン、ナプロキセン、インドメタシン、スリダク、トルメチン、これらの塩類及び誘導体などが含まれる。

【0056】

ここで使用される「標識」なる語句は、ポリペプチドに直接的に又は間接的に抱合した検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自体が検出可能(例えば、放射性標識又は蛍光標識)であり得、あるいは酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変化を触媒しうる。

「単離された」核酸分子は、同定され、ポリペプチド核酸の天然源に通常付随している少なくとも一の汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常発現する細胞に含まれる核酸分子を含む。

【0057】

本発明の方法

本発明は、IRTM、特にTAM及びATMの特定の新規な特性及び活性を同定し、これは治療目的のための本発明の方法を用いて有効に用いられる。慢性炎症は、例えば癌、II型糖尿病及びアテローム性動脈硬化など異なる疾病原因の起源を有する多くの疾患の共通の特徴である。最近、マクロファージはこれらの疾患の発病学に直接関係していることが示された(Mantovani et al., Immunol. Today 13:265-70, 1992; Pollard, Nat. Rev. Cancer 4: 71-8, 2004; Arkan et al., Nat. Med. 11: 191-8, 2005; Lumeng et al., J. Clin Invest. 117: 175-84, 2007; Liang et al., Circ. Res. 100: 1546-55, 2007; Choudhury, Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2 (6): 309-15, 2005)。腫瘍の機能を理解するために、ヒト浸透乳管癌の多くの側面を再現するPyMT^{ts}モデルにおいてTAMを特徴づけるための実験が行われた(Lin et al., Am J. Pathol 163: 2113-26, 2003)。他の炎症性疾患(II型糖尿病及びインシュリン耐性を含むがこれに限られない)における機能を理解するために、慢性的な高脂肪食を給餌されたマウスからのATMを特徴づけるための実験が行われた。

ここに示され、公知技術として知られるように、TAMは腫瘍免疫細胞浸潤において共通に見いだされる。高レベルのTAMは、ヒト腫瘍の予後不良と相関しており、乳癌の遺伝モデルにおけるTAM分化の抑制は腫瘍発達及び転移の速度を減少させることを示した(Lin et al., 2001)。TAMがVEGFのような血管新生の因子を産生し、それにより腫瘍の血管系を増大することによって腫瘍増殖に寄与することが提唱された(Leek等、1996; Lin等、2006)。他にも、TAMが腫瘍におけるプロフェッショナル抗原提示細胞(例えば樹状細胞)の成熟を阻害する特定のサイトカインを分泌することにより耐性を誘導し、免疫系に異常な腫瘍細胞を提示する細胞の能力を弱めることにおいて間接的な役割を有することにより、腫瘍に対する効果的免疫応答が上昇しないことが示唆された(Mantovani等、2002; Pollard et al., 2003)。

ここに、上記の活性に加えて、TAMが2つの特異的なCD4⁺T制御細胞サブセット：FoxP3⁺T制御細胞及びIL-10⁺Tr1細胞を誘導することが示される。naive T細胞とのTAMのインキュベーションは、それらの細胞型から産生されると思われるサイトカインの産生及びIL-10⁺Tr1及びFoxP3⁺T制御細胞の増殖を誘導したが、naive T細胞とのbMDcのインキュベーションは同じ効果を有しなかつ

10

20

30

40

50

た。TAMによるこの誘導は、培養のTGF- β の混入によって抑制され、TGF- β がTAM-誘導性のそれらの細胞型の誘導にとって重要なことを示唆した。これらの制御T細胞サブセットの上昇したレベルは、固形腫瘍及び減少した全乳癌生残率と相関していた (Leong et al., 2006; Liyanage et al., 2002; Marshall et al., 2004; Seo et al., 2001; Curiel et al., 2004; 及びBates et al., 2006) TAMはインビトロで炎症性TH17細胞を誘導することもまた示され、腫瘍を有しているPyMT⁺の流入領域リンパ節において観察される増加した数のTH17細胞と相関した。TAMはIL-17⁺T細胞を誘導する能力においてbMDc又は腹腔マクロファージと類似していたのに対して、他の型のマクロファージはいずれも制御及び炎症誘発性T細胞サブセットを誘導できなかった。TAMによってインビトロで誘導されるT細胞のプロファイルは、乳腫瘍を有している動物において増大されるT細胞の型と同一だった。本発明は、腫瘍増殖及び活性の開始、進行又は重症度を調節するために、インビトロ及びインビボにおけるIL-10⁺Tr1及びFoxP3⁺制御T細胞及び炎症性TH17細胞のTAM-媒介性誘導を調節する方法を提供する。本発明は、TAMの存在、量及び/又は活性を検出することによって、腫瘍形成、進行の検出する、及び/又は腫瘍の段階づける方法も提供する。

【0058】

齧歯動物と同様にヒトにおいて、肥満は、脂肪組織マクロファージ(ATM)の増加した浸潤と関連している。肥満は、心臓血管疾患、糖尿病、腎臓疾患及びある種の癌と関連していた (Flegal et al., JAMA 298(17): 2028-37, 2007). 肥満は、対象のインシュリン耐性及びII型糖尿病の発達の素因となる慢性炎症とも関連している。いくつかの最近の研究は、ATMが、脂肪細胞におけるインシュリン作用をブロックでき、全身性インシュリン耐性の誘因として提唱されている炎症性サイトカインを産生することを証明した (Weisberg et al., J. Clin. Invest. 112: 1796-808, 2003; Arkan et al., Nat. Med. 11: 191-8, 2005; Neels and Olefsky, J. Clin. Invest. 116: 33-5, 2006; Lumeng et al., J. Clin. Invest. 117: 175-84, 2007)。ここで、TAMの様に、ATMが2つの特異的なCD4⁺T制御細胞サブセット: FoxP3⁺T制御細胞及びIL-10⁺Tr1細胞を誘導すること、及び炎症性TH17細胞を誘導することが示される。

正常なシステムにおいて、制御T細胞は、通常のT細胞を抑制し、活性を下方制御することによって免疫寛容導入を誘導する際に重要な役割を演じる。制御T細胞は種々の実験的な自己免疫疾患設定において治療的であることを示した (Suri-Payer and Fritzsching, Springer Semin. Immun. (2006) 28:3-16を参照)。免疫不全、特に炎症性及び自己免疫疾患のような特定の疾患において選択的に制御T細胞(このような細胞が治療的価値を有する)を誘導する能力は、明確な治療的価値を有する。本発明は、TAM又はATMの存在又は活性を調節することによってIL-10⁺Tr1及びFoxP3⁺制御T細胞誘導を開始及び/又は刺激する方法も提供し、この方法は炎症性及び自己免疫疾患の開始、進行又は重症度を調節するために用いられてもよい。

TH17細胞も、腫瘍及び脂肪組織の流入領域リンパ節において高いレベルで存在する。癌又はII型糖尿病の病理学におけるTH17細胞の役割は、まだ明確でない。他の炎症誘発性メディエータ(例えばTNF- α 、IL-1 β 及びIL-6)の発現を誘導することによって、IL-17は間接的に腫瘍増殖を促進しているかもしれない。IL-17は、TNF- α がNF- κ Bを活性化するように、腫瘍に対する生存促進及び血管新生の因子として、直接作用するかもしれない (Lin, and Karin, J Clin Invest 117 (5): 1175-83, 2007; Takahashi, et al., Immunol Lett 98 (2): 189-93, 2005; Numasaki et al., J Immunol 175 (9): 6177-89, 2005)。興味深いことに、コントロール・マクロファージでなく、ATM及びTAMがインビトロで制御T及びTH17細胞を誘導し、これらの集団の両方とも腫瘍をもったマウス及び肥満マウスにおいて増加する。これらのデータは、炎症誘発性及び抗炎症性メカニズムが共存し、慢性炎症の状態に導かれることを再び強調する。このような慢性炎症は、TAM又はATMの存在又は活性を調節することによって調節される可能性がある。

【0059】

10

20

30

40

50

ここに記載されている研究は、TAM及びATMのさらなる特徴を提供する。例えば、TAMは、サイトカイン/ケモカイン産生及び細胞表面マーカーに関して腹腔マクロファージ及びbmDCの特定の特性を有することが示された。ここに示されるように、TAMはマクロファージ・マーカーであるF4/80と、樹状細胞マーカーであるランゲリン及びCD11cを発現する。ATMは、マクロファージ・マーカーであるF4/80と、樹状細胞マーカーであるCD11cを発現する。さらにまた、各々のTAM及びATMはケモカイン、サイトカイン、ケモカイン受容体及びサイトカイン受容体の異なるサブセットを発現し(図14A-C及びEを参照)、それはTAM又はATMの存在及び/又は活性のマーカーとして個々に又は集合的に用いることができる。本発明は、TAM及び/又はATMマーカーを検出するために一つ以上の試薬を集団又は試料と接触させ、残りの集団又は試料から選択的にTAM及び/又はATMを分離することによって、細胞の集団又は細胞を含む試料からTAM及び/又はATMを同定/検出及び単離する方法を提供する。

本発明は、TAM及び/又はATMを調節する方法も提供する。例えば、TAM及び/又はATMの活性もしくは機能は、TAM及び/又はATMを選択的に取り除く又は死滅させることによって抑制される可能性がある。これを達成する方法は、TAM及び/又はATM-結合剤で特異的にTAM及び/又はATMを標的にして(すなわち、マクロファージ特異的かつDC特異的な細胞表面マーカーを同時に有する細胞だけを標的とすることによって)、集団から特異的に標的とされた細胞を選択的に取り除くことである。例えば、特異的にF4/80及びCD11cを認識する二重特異性抗体又はその断片は、例えばプロテインAクロマトグラフィ又はFACS、アフィニティークロマトグラフィ及び磁気細胞選別を含むがこれに限られない公知技術の抗体捕捉及び分離の他の方法によって、特異的にTAM及び/又はATMを結合し、残りの細胞集団/試料からTAM及び/又はATMを分離するために用いられる可能性がある。他の方法では、特異的にTAM及び/又はATMを標的にすることができ(すなわち、マクロファージ特異的かつDC特異的な細胞表面マーカーを同時に有する細胞だけを標的とすることによって)、集団から特異的に標的とされた細胞を選択的に死滅させることができる。例えば、上記の通りの同じ二重特異性抗体(又はその断片)のシナリオは用いられ得るが、抗体はさらに細胞障害性分子と融合されていてもよく、抗体のエフェクタ機能はそれ自体で抗体と結合するTAM及び/又はATMのクリアランス及び滅失を誘発するのに十分であってもよい。二重特異性又は多重特異性抗体を用いる必要はない;

【0060】

当業者は、同じゴールが、TAM及び/又はATMと関連する細胞の混合物から選択的に除く手段を提供する二個以上別々の抗体又はその断片、又は他の結合分子を用いても達成し得ると認識している。このような選択のための適切なTAMおよび/またはATM細胞表面マーカーは、例えば、図14B及び14Eにおいて見いだされ、I型IL-1R、IL4R、IL-13R; IL-17R; TGFRII; CCR6; 及びCX3CR1を含むがこれに限定されるものではなく、それぞれTAM対ATMで差別的な発現を示す。

本発明は、TAMおよび/またはATM機能を特異的に抑制することによってTAMおよび/またはATMを調節する方法をも提供する。例えば、サイトカイン又はケモカインなどの一つ以上の細胞メッセンジャーの分泌によってTAMおよび/またはATMは、特定のその効果及び活性を媒介する可能性がある(すなわち、ここに示されるようなTGF活性を必要とする特定の制御T細胞又は炎症性T細胞のTAM-媒介誘導)。特異的に分泌を阻害又はブロックする、及び/又は環境からTAMおよび/またはATMによって通常分泌される一つ以上の細胞メッセンジャーを取り除くことは、TAMおよび/またはATMの効果及び活性を抑制する効果を有する。このような阻害は、例えばTAM及び/又はATMサイトカイン/ケモカイン結合剤(抗細胞メッセンジャー抗体又はその断片(例えば抗TGF抗体)及び小分子を含むがこれに限らない)を投与することによってでもよい。TAM又はATMによって発現されるケモカイン及びサイトカインは、14A及び14C図に示されるサイトカイン及びケモカインを含むが、これに限定されるものでは

ない。

本発明は、特定の免疫細胞を選択的に産生及び／又は単離する方法を提供する。ここに示されるように、TAM及びATMはマクロファージ及び樹状細胞の両方の特定の特性を有する分化した免疫細胞である。TAMは、腫瘍の免疫浸潤物のごく一部であり、取得することは難しかった。特定の樹状細胞及び特定のマクロファージの細胞表面マーカーの発現に基づいてTAMを単離するための本発明の方法は、調査又は治療的な用途のための、混合された細胞集団からTAMを得る有用な方法を提供する。同様に、特定の樹状細胞及び特定のマクロファージの細胞表面マーカーの発現に基づいてATMを単離するための本発明の方法は、調査又は治療的な用途のための混合された細胞集団からATMを得る有用な方法を提供する。TAM及びATMは、細胞型間で異なる細胞表面マーカーの組合せに基づいた単離又は精製により別々に単離又は精製されてもよいことは当業者によって認められている。限定しない一つの例としては、TAMはIL-4Rを発現するがATMはしない。他の例として、TAM及びATMにおいて特異に発現されるそれらのサイトカイン受容体及びケモカイン受容体を含むが、これに限定されるものではない(図14B及び14Eを参照)。本発明は、TAM又はATMで培養を刺激することによってnaive T細胞培養から選択的にIL-10⁺CD4⁺Tr1細胞、FoxP3⁺CD4⁺T制御細胞および／またはTH17細胞を誘導する方法を提供する。多くのこれらの3つのT細胞型を再現的に産生しうることは、治療的及び調査に有用である。

【0061】

上で記載されている剤の一つ以上を含んでいる組成物(すなわち、IRTM-ターゲッティング剤(すなわちTAM-ターゲッティング剤又はATM-ターゲッティング剤)及び／又はIRTM細胞メッセンジャー-ターゲッティング剤(すなわちTAM細胞メッセンジャー-ターゲッティング剤又はATM細胞メッセンジャー-ターゲッティング剤)が提供される本発明は、特異的にIRTMを標的とする一つ以上の剤(すなわちTAM-又はATM-ターゲッティング剤及び／又はTAM又はATMによって分泌される細胞メッセンジャー)だけでなく一つ以上の化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制因子、細胞障害性剤又は増殖阻害剤を含む組合せ治療方法及び組成物を提供する。これらの組合せ治療は、腫瘍の血管新生及び増殖を抑制でき、及び／又は炎症性又は自己免疫疾患を治療できる。組合せ治療は、同時又は経時的に投与されてもよい。

さらに、キットが提供される。このようなキットは、ここに記載されている一つ以上の組成物又は組合せ治療を含んでもよく、さらにこのような治療を必要とする対象に適切な投薬を測定及び／又は投与するための手段を含んでもよく、選択的に更に使用説明書を含んでもよい。

【0062】

診断方法

本発明は、細胞増殖性の疾患、血管新生疾患及び炎症性、血管新生性及び免疫性疾患(自己免疫不全を含むがこれに限らず)を診断するための方法及び組成物をも提供する。本発明の特定の実施態様において、本発明の方法は、試験及び基準細胞集団に存在するTAM又はATMのレベルを比較する。公知技術のタンパク質及び核酸の検出システムと組み合わせたマクロファージ及び樹状細胞とTAM及び／又はATMを区別するTAM及びATMの表面マーカーに関するここに開示される情報は、存在の検出及び異なる細胞集団/試料に存在する相対量の比較を可能にする。

試験細胞集団は、いかなる数の細胞、つまり一つ以上の細胞であってもよく、インヴィトロ、インビボ又はエクスピボで提供されてもよい。ある実施態様では、試験試料(例えば腫瘍細胞集団)にできる限り類似した基準細胞集団中の細胞は組織型に由来する。いくつかの実施態様において、基準細胞集団は試験細胞集団と同じ対象に由来し、例えば試験細胞集団の起源の領域に由来される。いくつかの実施態様において、基準細胞集団は試験細胞集団と同じ組織型に由来したが、異なる時間(例えば、試験細胞集団より早い時間)にその対象から採取された。いくつかの実施態様において、一連の基準細胞集団試料は、対象から一定の時間間隔で採取される(例えば、毎日、毎週、毎月又は毎年)。本発明の

一実施態様において、基準細胞集団は複数の細胞に由来する。例えば基準細胞集団は、TAMのデータベース及び/又は前に試験された細胞からのATM発現パターンであってもよい。

【0063】

タンパク質及び核酸検出方法

本発明のタンパク質の存在、活性又は量を検出することは、公知技術の方法を用いて容易に行うことができる。発現は、タンパク質レベルで、すなわちポリペチドのレベルを測定することによって測定することができる。このような方法はその分野でよく知られており、例えば、タンパク質に対する抗体に基づくイムノアッセイを含む。被覆細胞集団のタンパク質配列の一つ以上の発現量が、基準細胞集団からの一つ以上の細胞の配列の発現量と比較することができる。細胞の試験及びコントロール群の配列の発現は、核酸配列の発現と比較するためのその分野で認識されている方法を用いて比較することができる。例えば、発現は、米国特許番号5,871,697及びShimkets et al., Nat. Biotechnol. 17:798-803において記載されるように、GENECALLING™法を用いて比較することができる。本発明の特定の実施態様において、1、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、20以上、25以上のタンパク質配列の発現は、測定される。

例えばはヘテロジニアス又はホモジニアスな位相において実行される競合的結合アッセイ、直接的または間接的なサンドイッチ・アッセイ及び免疫沈降アッセイなど、その分野で知られる様々なアッセイ技術を用いてもよい(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158)。アッセイにおいて用いられる抗体又はその抗原結合性フラグメントは、検出可能な成分で標識化され得る。検出可能な成分は、直接又は間接的に検出可能なシグナルを産生可能であるべきである。例えば、検出可能な成分は、ラジオアイソトープ(たとえば3H、14C、32P、35S又は125I)、蛍光又は化学発光化合物(たとえばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン)又は酵素(たとえばアルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又はワサビペルオキシダーゼ)であってもよい。検出可能な成分に抗体を融合するための当分野で周知の方法が使用されてもよく、Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981);及びNygren, J. Histochem. And Cytochem., 30:407 (1982)に記載されているそれらの方法を含む。

核酸検出技術もまた当分野において周知であり、ある実施態様において、一つ以上のTAM及び/又はATM細胞表面マーカー又は他のTAM及び/又はATM-特異的分子のmRNAの存在を評価し、細胞試料が取り出された細胞集団におけるTAM及び/又はATMの存在又は量を決定するために用いられてもよい。ある実施態様では、少なくとも2つの異なるTAMおよび/またはATM細胞表面マーカーをコード化しているmRNAの存在又は量が評価される。核酸の存在、量又は活性を評価するために用いることができる組換えDNA技術で当分野において共通に知られる方法は、例えばAusubel等、eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY及びKriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記載されている。

選択的に、差次的に発現された配列の試験細胞集団及び基準細胞集団間の比較は、発現がパラメータ又は測定されるコンディションには依存しないコントロール核酸に対しても行われる。試験及び基準核酸におけるコントロール核酸の発現量は、比較された集団のシグナルレベルを標準化するために用いることができる。適切なコントロール核酸は、当業者によって容易に決定されることができる。

【0064】

診断又はマーカー・セット

また、本発明は、TAM及び/又はATMを同定するためのマーカーセットを提供する。

。

10

20

30

40

50

ある実施態様では、これらのマーカーセットは、TAM及び/又はATMの存在を評価するためのキットとして提供される。例えば、マーカーセットには、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、12以上、13以上、14以上、15以上、20以上、又はすべての分子セットが含まれる。前記分子は、細胞内タンパク質、分泌タンパク質又はTAM及び/又はATMの細胞表面マーカーをコードする核酸であり、F4/80、CD11c及びランゲリンを含むがこれに限定されるものではない。本発明の一実施態様では、一以上のそのようなタンパク質を検出する抗体が提供される。ここに示されるように、TAM及びATMがマクロファージ及び樹状細胞の細胞表面マーカーの両方を発現しており、TAM及び/又はATMを検出するためマーカーセットはマクロファージ・マーカー及び樹状細胞マーカーを含んでもよい。樹状細胞マーカーは一般にTAM、ATM及び樹状細胞を単独で検出するために用いることができ、マクロファージ・マーカーは一般的にTAM、ATM及びマクロファージを単独で検出するために用いられることは認識されている。

10

【0065】

治療上の用途

本発明によれば、TAM及び/又はATMアゴニスト、TAM及び/又はATMアンタゴニスト、TAM-結合剤、ATM-結合剤、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニスト、ATM分泌サイトカインのアゴニスト、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニスト、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニスト、TAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤及びATM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤（化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生の剤、免疫抑制因子、細胞障害性剤及び増殖阻害剤を含むがこれに限られない）を含むモジュレーターの組合せ単独又は互いの組み合わせ、もしくはその他の治療薬との組み合わせが、細胞増殖性の疾患、血管新生性疾患及び炎症性、血管新生性及び免疫性疾患（自己免疫不全を含むがこれに限られない）のような様々な条件を治療するために用いることができることが考えられる。一実施態様において、TAM生存度、存在又は活性のモジュレーターは、癌細胞又は腫瘍増殖の阻害において用いられる。本発明の特定の実施態様において、TAM-結合剤、TAMアンタゴニスト、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニスト及び/又はTAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤は、増殖性の疾患を処理するために、例えば、癌細胞又は腫瘍の増殖を阻害又は腫瘍の転移を阻害するために用いられる。ここに記載される組み合わせ治療と題するセクションを参照。治療される腫瘍性疾患の例は用語「癌」及び「癌性の」として記載されるものを含むが、これに限定されるものではない。もう一つの実施態様では、TAM生存度、存在又は活性のモジュレーターは、免疫疾患（自己免疫疾患を含むがこれに限定されない）の治療において用いられる。本発明の特定の実施態様において、TAMアゴニスト、TAM-結合剤、TAM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストおよび/またはTAM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤がTAM存在を刺激するために用いられ、増殖および/または活性は、TAM-誘導増殖及びnaive T細胞集団からのIL-10⁺CD4⁺Tr1細胞及びFoxP3⁺CD4⁺制御T細胞への分化を刺激することによって自己免疫疾患を治療するために用いられる。治療される自己免疫不全の例は、用語「自己免疫疾患」として記載されるものを含むが、これに限定されるものではない。もう一つの実施態様では、ATMの生存度、存在又は活性のモジュレーターは、炎症性疾患（高血糖性疾患及びインシュリン耐性疾患を含むがこれに限定されない）の阻害に用いられる。本発明の特定の実施態様において、ATM-結合剤、ATMアンタゴニスト、ATM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニスト及び/又はATM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤は、炎症性疾患（高血糖性疾患及びインシュリン耐性疾患を含むがこれに限定されない）の阻害に用いられる。

20

30

40

【0066】

併用療法

上記のように、本発明は、TAM結合剤、ATM結合剤、TAMアゴニスト、ATMアゴニスト、TAMアンタゴニスト、ATMアンタゴニスト、TAM分泌サイトカイン/ケ

50

モカイン結合剤、A T M分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤、T A M分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニスト、A T M分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニスト、T A M分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニスト又はA T M分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストが他の治療法と組み合わせる併用療法を提供する。例えば、T A M結合剤は、例えば増殖性の疾患又は自己免疫疾患を治療するために、本発明の異なる剤、アゴニスト又はアンタゴニストと組み合わせる投与することができる。別の例として、A T M結合剤は、炎症性疾患（例えば、高血糖性疾患又はインシュリン耐性疾患を含むがこれに限定されない）を治療するために、本発明の異なる剤、アゴニスト又はアンタゴニストと組み合わせる投与することができる。ある実施態様では、付加的な剤（例えば化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害性剤、消炎性及び増殖阻害剤が使用されてもよい。本発明の薬剤、アゴニスト及びアンタゴニストは、連続的に、又はそれらの目的のために効果的である他の剤と組み合わせる、同じ組成物又は別の組成物として投与することができる。代替的又は付加的に、本発明の多重アンタゴニスト、薬剤及び/又はアゴニストを投与することができる。

10

本発明のアゴニスト、アンタゴニストおよび/または薬剤の投与は、例えば一つの組成物として、又は同じもしくは異なる投与ルートを用いて二個以上異なる組成物として同時に行うことができる。代替的又は付加的に、投与は、いかなる順番でも、経時的に行うことができる。ある実施態様では、分から日、週、月まで変動する間隔が、二個以上の組成物の投与において示され得る。しかしながら、本発明の異なるアゴニスト、アンタゴニスト又は薬剤の同時投与又は投与もまた考えられる。

20

本発明のアゴニスト、アンタゴニスト又は薬剤と組み合わせる投与される治療剤の有効量は、医師又は獣医の裁量である。治療される症状を最大限管理するために用量投与及び調節がなされる。用量は、さらに、使用される治療薬の種類及び治療される特定の患者などの因子に依存するであろう。ある実施態様では、いくつかの分子（例えばいくつかのアンタゴニスト）の組合せは、単一の分子の有効性を増強する。「増強」なる用語は、その一般的又は認可された用量での治療薬の有効性の改善を意味する。本明細書中の「製薬的組成物」と題したセクションを参照。

特定の本発明の態様において、本発明のT A M及び/又はA T M結合剤、T A M及び/又はA T Mアンタゴニスト、T A M及び/又はA T M分泌サイトカイン/ケモカイン及びT A Mのアゴニスト及び/又はA T M分泌結合剤との組合せ腫瘍治療のために有用な他の治療剤は、他の癌治療（例えば手術、放射線治療（例えば、放射性物質の照射又は投与を含む）、化学療法、ここに一覧が示され、当分野で周知の抗癌剤又はその組合せを用いた治療）を含む。代替的又は付加的に、ここに開示される同じもの又は二以上の抗原に結合する二個以上の抗体は、患者に同時投与することができる。時に、患者へ一以上のサイトカインを投与することは、有益であり得る。

30

【0067】

化学療法剤

特定の態様において、本発明は、有効量のT A Mのアンタゴニスト、T A M結合剤、T A M分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニスト及び/又はT A M分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤と一又は複数の化学療法剤を、癌に罹りやすい患者又は癌と診断された患者に投与することによって、腫瘍増殖又は癌細胞の増殖を遮断する又は低減する方法を提供する。様々な化学療法剤が本発明の併用治療方法で用いられてもよい。考慮する化学療法剤の例示的及び非限定的リストを本明細書中の用語「化学療法剤」のセクションに示す。

40

当業者によって理解されるように、化学療法剤の適切な用量は、一般的に、化学療法剤が単独ないしは他の化学療法剤と組み合わせる投与される臨床治療に既に用いられる用量の程度であろう。用量の変更はおそらく治療する症状に応じて行うであろう。治療を行う医師は、個々の被検体ごとに適当な用量を決定し得る。

【0068】

抗体

50

本発明の抗体には、本発明のタンパク質の抗体、及び本発明のタンパク質の抗体の抗体断片が含まれる。本発明のポリペプチドないしタンパク質には、限定するものではないが、TAM細胞表面マーカー（図14B及び14Eに記載されるF4/80、CD11c及びTAMによって発現されるサイトカイン及びケモカイン受容体を含むがこれに限定されない）及びTAMサイトカイン又はケモカイン（図14A及び14Cに記載されるTGF及び例えばTAMによって発現されるサイトカイン及びケモカインを含むがこれに限定されない）が含まれる。特定の態様において、本発明のポリペプチド又はタンパク質は、TAM細胞表面マーカー（図14B及び14Eに記載されるF4/80、CD11c及びTAMによって発現されるサイトカイン及びケモカイン受容体を含むがこれに限定されない）及びTAMサイトカイン又はケモカイン（図14A及び14Cに記載されるTGF及び例えばTAMによって発現されるサイトカイン及びケモカインを含むがこれに限定されない）を特異的に結合する抗体である。

本発明の抗体は、抗血管新生剤又は血管新生インヒビターである抗体、骨髄性細胞減少剤である抗体、抗癌剤である抗体又はここに記載されている他の抗体を更に含む。例示的な抗体には、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、断片、多重特異性、ヘテロコンジュゲート、多価性、エフェクター機能有する抗体などが含まれる。

【0069】

ポリクローナル抗体

本発明の抗体はポリクローナル抗体を含みうる。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に公知である。例えば本発明の抗体に対するポリクローナル抗体は、関連する抗原とアジュバントを一又は複数回皮下（s.c.）又は腹腔内（i.p.）注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導體形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介する抱合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する抱合）、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、SOC12、又はR及びR1が異なるアルキル基であるR1N=C=NRへ、関連する抗原をコンジュゲートさせるために有用である。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100µg又は5µg（それぞれウサギ又はマウスの場合）を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、本発明の分子、免疫原性コンジュゲート、又は誘導體に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。典型的には、動物を、同じ抗原であるが異なるタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なる架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートにより追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0070】

モノクローナル抗体

本明細書中に記載の抗原に対するモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスター又はマカクザルを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次いで、リンパ球をポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press

10

20

30

40

50

s, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を典型的には含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

典型的な骨髄腫細胞は、効率的に融合するものであって、選択された抗体産生細胞によって安定したハイレベル抗体作成を裏づけて、及び、培地(例えばHAT培地)から感受性である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、メリーランド、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、興味がある標的に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。このような技術及びアッセイは当分野で公知である。例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性な抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

【0071】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的なイムノグロブリン精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。また、モノクローナル抗体は、米国特許第4816567号に記載のもののような組み換えDNA法によって作製されうる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、常法を用いて(例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外ではイムノグロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体の組み換え産生を以下に詳細に記載する。

他の実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の

10

20

30

40

50

生成 (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)) を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

また、DNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン (C H 及び C L) のコード配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号 ; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾することができる。

典型的には、前記の非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の変域ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【 0 0 7 2 】

ヒト化及びヒト抗体

本発明の抗体はヒト化抗体又はヒト抗体を含みうる。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」変域ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター (Winter) 及び共同研究者 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986) ; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988) ; Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類 C D R 又は C D R 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト変域ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号) である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの C D R 残基及び場合によっては幾つかの F R 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト変域ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の変域ドメインの配列を、既知のヒト変域ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク (F R) として受け入れる (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993) ; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992) ; Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、典型的な方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を凶解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R 残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、C D R 残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

あるいは、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物 (例えば、マウス) を

10

20

30

40

50

作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993);及びDuchosal等、Nature 355:258 (1992)を参照。また、ヒト抗体はファージディスプレイライブラリからも得られる(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan等、Nature Biotech 14:309 (1996))。

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む当分野で公知の様々な技術を用いて産生することができる(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる(例えば、Johnson, K S. and Chiswell, D J., Cur Opin in Struct Biol 3:564-571 (1993)においてレビューされる)。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、例えばMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、又は、Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)に記載の技術に基本的に従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照また、Cole等及びBoerner等の技術はヒトモノクローナル抗体の調製に有用である(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBoerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991))。また、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

【0073】

抗体フラグメント

また、抗体断片も本発明に包含される。抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan et al., Science, 229:81(1985)を参照)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。例えば、抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')₂断片を形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。国際公開93/16185号；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照Fv及びscFvは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である；従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照。また、抗体断片は、

10

20

30

40

50

例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

【0074】

多重特異性抗体(例えば二重特異性)

また、本発明の抗体には、例えば、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する多重特異性抗体が含まれる。このような分子は通常2つの抗原を結合するだけであるが(すなわち二重特異性抗体、BsAb)、本明細書中で用いられる場合には三重特異性抗体などの更なる特異性を有する抗体がこの表現に包含される。BsAbの例には、腫瘍細胞抗原に対する一アームと細胞障害トリガー分子に対するもう一つのアームを有するもの、例えば抗FcRI/抗CD15、抗p185HER2/FcRIII(CD16)、抗CD3/抗悪性B細胞(1D10)、抗CD3/抗p185HER2、抗CD3/抗p97、抗CD3/抗腎臓細胞カルチノーマ、抗CD3/抗OVCA3、抗CD3/LD1(抗大腸カルチノーマ)、抗CD3/抗メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗EGFレセプター/抗CD3、抗CD3/抗CAMA1、抗CD3/抗CD19、抗CD3/MOV18、抗神経細胞付着分子(NCAM)/抗CD3、抗葉酸剤結合タンパク質(FBP)/抗CD3、抗パンカルチノーマ結合抗原(AMOC-31)/抗CD3;腫瘍抗原に特異的に結合する一アームと毒素に結合する一アームを有するBsAb、例として抗サポリン/抗Id-1、抗CD22/抗サポリン、抗CD7/抗サポリン、抗CD38/抗サポリン、抗CEA/抗リシンA鎖、抗インターフェロン-(IFN-)/抗ハイブリドマイディオタイプ、抗CEA/抗ピンカルカロイド;酵素活性化プロドラッグを転換するためのBsAb、例として抗CD30/抗アルカリホスファターゼ(マイトマイシンアルコールへのマイトマイシンリン酸塩プロドラッグの変換を触媒する);線維素溶解剤として用いられうるBsAb、例として抗フィブリン/抗組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、抗フィブリン/抗ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性化因子(uPA);細胞表面レセプターに免疫複合体をターゲティングするためのBsAb、例として抗低密度リポタンパク質(LDL)/抗Fcレセプター(例えばFcRI、FcRII又はFcRIII);感染症の治療に用いるためのBsAb、例として、抗CD3/抗単純ヘルペスウイルス(HSV)、抗T細胞レセプター:CD3複合体/抗インフルエンザ、抗FcR/抗HIV;インビトロ又はインビボで腫瘍を検出するためのBsAb、例えば抗CEA/抗EOTUBE、抗CEA/抗DPTA、抗p185HER2/抗ハプテン;ワクチンのアジュバントとしてのBsAb;そして、診断用ツールとしてのBsAb、例として抗ウサギIgG/抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)/抗ホルモン、抗ソマトスタチン/抗物質P、抗HRP/抗FITC、抗CEA/抗 α -ガラクトシダーゼが含まれる。

三重特異性抗体の例には、抗CD3/抗CD4/抗CD37、抗CD3/抗CD5/抗CD37及び抗CD3/抗CD8/抗CD37が含まれる。特定の本発明の態様において、二重特異性抗体の一つは、マクロファージ特異的な細胞マーカーに結合してもよく、もう一方は樹状細胞特異的な細胞マーカーに結合してもよい。ある実施態様では、このような抗体は、マクロファージ特異的な細胞マーカー及び樹状細胞特異的な細胞マーカーの両方を有する細胞に対して、どちらか一方のマーカーだけを有する細胞に対してよりきつく結合する。

二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)として調製されてもよい。二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-

10

20

30

40

50

3659 (1991)において開示されている。

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含むイムノグロブリン重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される3つのポリペプチド鎖の等しくない比率が抗体の最適な収率をもたらす態様において、3つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな(フレキシビリティ)が与えられる。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率があまり影響がないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

この手法の一実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照。

【0075】

国際公開第96/27011号に記載された他の手法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体の定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた当分野において周知である。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)は、無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(ab')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF(ab')₂断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F(ab')₂-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF(ab')₂-チオールに再変換し、他のF(ab')₂-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。最近の進歩により、大腸菌からのF(ab')₂-SH断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の製造を記述している。各F(ab')₂断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びErB2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。

Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体の F a b ' 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V L)に重鎖可変ドメイン(V H)を結合してなる。従って、一つの断片のV H及びV Lドメインは他の断片の相補的V L及びV Hドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v (s F v)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照。

10

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等、J. Immunol. 147: 60 (1991)。

【0076】

ヘテロコンジュゲート抗体

二重特異性抗体には、本発明の抗体である架橋された又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。このような二重特異性抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞をターゲティングすること(米国特許第4676980号)、そしてH I V 感染の治療のため(国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及び欧州特許第03089号)が考えられている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋結合方法を用いて作られてもよい。好適な架橋剤は当分野で公知であり、多くの架橋技術とともに、米国特許第4676980号に開示されている。

20

【0077】

多価抗体

本発明の抗体には多価抗体が含まれる。多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(I g M クラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはF c 領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はF c 領域と、F c 領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はV D 1 - (X 1) n - V D 2 - (X 2) n - F c を有し、ここでV D 1 は第1の可変ドメインであり、V D 2 は第2の可変ドメインであり、F c はF c 領域のポリペプチド鎖の一つであり、X 1 及びX 2 はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：V H - C H 1 - 柔軟なリンカー - V H - C H 1 - F c 領域鎖；又はV H - C H 1 - V H - C H 1 - F c 領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはC L ドメインを更に有する。多価抗体は、同じもの抗原に対する多重結合部位、又は二以上の抗原に対する結合部位を有し得る。

30

40

【0078】

エフェクター機能エンジニアリング

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌を治療する際の抗体の有効性を向上させることは望ましい。例えば、システイン残基をF c 領域に導入し、それによ

50

り、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性(ADCC)を有する可能性がある。Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等、Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように設計して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等、Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4)のFc領域のエピトープを意味する。

10

【0079】

イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)とコンジュゲートしている本明細書中に記載の抗体を含むイムノコンジュゲートに関する。種々の放射性核種は、放射性コンジュゲート抗体の産生に利用可能である。例には、限定するものではないが ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re が含まれる。

20

このようなイムノコンジュゲートの生成に有用な化学療法薬は上記した。例えば、BCNU、ストレプトゾイシン、ピンクリスチン、5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)など(本明細書中の「化学療法薬」の定義も参照のこと)が本発明の抗体ないしその断片にコンジュゲートされうる。

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体ないしその断片を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、限定するものではないが ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 、 ^{111}In 及びLuの放射性同位体などが含まれる。コンジュゲートが診断用を使用される場合、それはシンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 又は ^{123}I 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、MRIとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

30

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 又は ^{123}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 及び ^{111}In は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、例として「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

40

【0080】

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(*Aleurites fordii*)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテ

50

ン、フィトラッカ・アメリカーナ(*Phytolaca americana*)プロテイン(P A P I、P A P I I及びP A P - S)、モモルディカ・キャランティア(*momordica charantia*)インヒビター、クルシン(*curcin*)、クロチン、サパオナリア(*sapaonaria*)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(*gelonin*)、マイトゲリン(*mitogellin*)、レストリクトシン(*restrictocin*)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(*tricothecenes*)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照。

抗体と細胞障害性剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオナート(S P D P)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、イミノチオラン(I T)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートH C L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p - アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン - 2, 6 - ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、*Science* 238: 1098 (1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素 - 14 標識1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレン - トリアミン五酢酸(M X - D T P A)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照。リンカーは細胞中の細胞障害性剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari et al., *Cancer Research* 52:127 131 (1992); 米国特許第5208020号)。

別法として、抗V E G F及び/又は本発明の抗体の抗たんぱく質と細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

ある実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体 - レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、抗体及び核酸分解性の活性を有する化合物(例えば、リボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ(例えばデオキシリボヌクレアーゼ; D n アーゼ)の間で形成される。

【0081】

メイタンシン及びメイタンシノイド

本発明は、一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている本発明の抗体をさらに提供する。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ*Maytenus serrata*から単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC - 3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号; 同4248870号; 同4256746号; 同4260608号; 同4265814号; 同4294757号; 同4307016号; 同4308268号; 同4308269号; 同4309428号; 同4313946号; 同4315929号; 同4317821号; 同4322348号; 同4331598号; 同4361650号; 同4364866号; 同4424219号; 同4450254号; 同4362663号; 及び同4371533号に開示されている。

本発明の抗体は、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子にコンジュゲートすることができる。1分子の毒素/抗体は、ネイキッド抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。一実施態様では、メイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

10

【0082】

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。典型的なカップリング剤には、ジスルフィド結合を提供するためのN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978])が含まれる。

20

30

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0083】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子とコンジュゲートした本発明の抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、1I、2I、3I、N-アセチル-1I、PSAG及びI1(Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉

40

50

酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0084】

他の抗体修飾

本明細書において抗体の他の修飾が意図される。例えば、抗体は、様々な非タンパク質性ポリマーの一つ、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのコポリマーに連結されうる。また、抗体は、例えば、コアセルベーション技術によって又は界面重合法(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタキレート)マイクロカプセル)によって調製されるマイクロカプセルに、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)に、又はマイクロエマルジョンに内包されうる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示される。

10

【0085】

リポソーム及びナノ粒子

本発明のポリペプチドはリポソームとして処方することができる。例えば本発明の抗体はイムノリポソームとして処方することができる。抗体を含有するリポソームは、例えば Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。一般的に、製剤とリポソームの使用は当業者に公知である。

20

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等、J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。

30

場合によっては、化学療法剤(ドキシソルビジンなど)はリポソーム内に包含される。Gabizon等、J. National Cancer Inst.81(19)1484 (1989)を参照。

【0086】

本発明のポリペプチドに対する共有的修飾

本発明のポリペプチド、例えば本発明のタンパク質、本発明のタンパク質の抗体、ポリペプチドアンタゴニスト断片、融合分子(例えば免疫融合分子)などの共有結合による修飾は本発明の範囲内に包含される。それらは、適当であれば、化学合成により、又は抗体の酵素的又はポリペプチドの化学的切断によりなされうる。他の種類のポリペプチドの共有的修飾は、選択される側鎖又はN末端ないしはC末端残基と反応可能な有機誘導体化剤とポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を反応させることによって、又は、修飾アミノ酸ないしは非天然のアミノ酸を発達するポリペプチド鎖に組み込むことによって、分子内に導入される。例えばEllman等、Meth. Enzym. 202:301-336 (1991); Noren等、Science 244:182 (1989); 及び、米国公開特許第20030108885号及び同第20030082575号。

40

最も一般的には、システニル残基は、 α -ハロアセタート(及び対応するアミン)、例えば、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドと反応し、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイン残基もまたプロモトリフルオロアセトン; α -プロモ- β - (5-イミドゾイル)プロピオン酸;クロロアセチルホスフェート;N-アルキルマレイミド類;3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド;メチル-2-ピリジルジスルフィド;p-クロロ水銀安息香酸;2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール;又はク

50

ロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

ヒスチジル残基は、pH 5 . 5 - 7 . 0 でジエチルピロカルボナートとの反応によって誘導体化されるが、この薬剤はヒスチジル側鎖に対して比較的特異的である。パラ-プロモフェナシルプロミドもまた有用である；この反応は、典型的にはpH 6 . 0 で0 . 1 M のカコジル酸ナトリウム中で行われる。

リジニル及びアミノ末端残基はコハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応させられる。これらの試薬を用いた誘導体形成は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。

- アミノ含有残基を誘導体化する他の適当な試薬には、イミドエステル、例えば、メチルピコリンイミデート、リン酸ピリドキサル、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O - メチルイソ尿素、2 , 4 - ペンタンジオン、及びグリオキシレートを用いたトランスアミナーゼにより触媒される反応である。

アルギニル残基は—あるいは幾つかの従来の試薬との反応によって修飾され、とりわけ、フェニルグリオキサール、2 , 3 - ブタンジオン、1 , 2 - シクロヘキサジオン及びニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpKaのために反応がアルカリ性条件下で行われることを必要とする。更に、これらの試薬はリジンの基並びにアルギニン - アミノ基と反応しうる。

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基内へのスペクトル標識の導入に特に興味をもって、なされる。最も一般的には、N - アセチルイミジゾールとテトラニトロメタンを使用して、それぞれがO - アセチルチロシル種と3 - ニトロ誘導体を形成する。チロシル残基はラジオイムノアッセイでの使用のための標識化タンパク質を調製するために125I又は131Iを用いてヨウ素化される。

【0087】

カルボキシル側基（アスパルチル又はグルタミル）がカルボジイミド（R - N = C = N - R'）（ここで、RとR'は異なったアルキル基である）、例えば、1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル - 4 - エチル）カルボジイミド又は1 - エチル - 3 - （4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルペンチル）カルボジイミドとの反応によって選択的に修飾される。更に、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミニル残基へ変換される。

グルタミニル及びアスパラギニル残基は、それぞれ対応するグルタミル及びアスパルチル残基へしばしば脱アミド化される。これらの残基は中性又は塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化形態は本発明の範囲内に入る。

その他の修飾には、プロリンとリジンのヒドロキシル化、セリル又はス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、及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化(T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79-86頁 (1983))、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。

他のタイプの共有的修飾は本発明のポリペプチドに対してグリコシドを化学的又は酵素的にカップリングさせることを含む。これらの手順は、それらがN - 又はO - 結合グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞中でのポリペプチドの生産を必要としない点で有利である。用いられるカップリング態様に応じて、糖（類）は、（a）アルギニンとヒスチジンに、（b）遊離のカルボキシル基に、（c）遊離のスルフヒドリル基、例えばシステインのものに、（d）セリン、スレオニン又はヒドロキシプロリンのもののような遊離のヒドロキシル基に、（e）フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンのような芳香族残基、又は（f）グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は1987年9月11日公開の国際公開第87/05330号並びにAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

本発明のポリペプチドに存在するあらゆる炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的になすことができる。化学的脱グリコシル化には、ポリペプチドを化合物トリフルオロメタ

ンスルホン酸、又は等価化合物に暴露することを必要とする。この処理により、ポリペプチドをインタクトなままにしながら、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除く殆どの又は全ての糖の切断が生じる。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin,等、Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987)及びEdge等、Anal. Biochem., 118:131 (1981)により記載されている例えば抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等、Meth. Enzymol. 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成できる。

本発明のポリペプチドの共有結合的修飾の他のタイプは、ポリペプチドを、種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。

【0088】

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明のポリペプチドは直ぐに得られる技術と材料を使用して組換え的に製造することができる。

本発明のポリペプチド、例えば本発明のタンパク質、本発明のタンパク質の抗体、例えば抗VEGF抗体の組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター内に挿入される。本発明のポリペプチドをコードするDNAは、従来の手順を用いて容易に単離して配列決定される。例えば、モノクローナル抗体をコードするDNAは、例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチドプローブを用いて単離し、配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には一般に、限定するものではないが、シグナル配列、複製起点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終末配列の一又は複数が含まれる。

【0089】

シグナル配列成分

本発明のポリペプチドは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、典型的にはシグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても産生される。典型的に選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。天然ポリペプチドシグナル配列を認識せずプロセッシングしない原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppあるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母の分泌に関しては、天然シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクイペロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含む)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第90/13646号に記載されているシグナルにより置換されうる。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。このような前駆体領域のDNAは、本発明のポリペプチドをコードするDNAに読み枠を一致させて結合される。

【0090】

複製開始点成分

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、この配列はクローニングベクターにおいて、宿主染色体DNAとは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。そのような配列は様々な細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2µプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始

10

20

30

40

50

点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である(SV40開始点が典型的には初期プロモーターを有しているため用いられる)。

【0091】

選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含みうる。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシラス菌に対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのよ

10

うな、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。選択技術の一例においては、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換されるこれらの細胞は、抗薬物性を付与し、選択療法を生存するタンパク質を生産する。このような優性選択の例としては、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸又はハイグロマイシンが使用される。

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することのできるもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、典型的には、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等である。

例えば、DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR活性に欠陥のあるチャニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞である。

20

あるいは、本発明のポリペプチドをコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地における細胞増殖により選択することができる。米国特許第4965199号を参照。

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979))。trp1遺伝子は、例えば、ATCC第44076号あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。酵母宿主細胞ゲノムにtrp1破壊が存在することは、トリプトファンの不在下における成長による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2欠陥酵母株(ATCC20622あるいは38626)は、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

30

また、1.6µmの円形プラスミドpKD1由来のベクターは、クルイヴェロマイシス(Kluyveromyces)酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え子ウシのキモシンの大量生産のための発現系がK.ラクティス(lactis)に対して報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株からの、組換えによる成熟したヒト血清アルブミンを分泌する安定した複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

40

【0092】

プロモーター成分

通常、発現及びクローニングベクターは、宿主生体により認識され、本発明のポリペプチドをコードする核酸に作用可能に結合するプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、phoAプロモーター、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロ

50

モーターも好適である。細菌系で使用するプロモーターもまた本発明のポリペプチドをコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。事実上、全ての真核生物の遺伝子は、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に位置するAT富化領域を有する。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCAAT領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるAATAAA配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターは、成長条件によって転写が制御される更なる利点を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母の発現に用いられる好適なベクターとプロモーターは欧州特許第73657号に更に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に好適に用いられる。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの本発明のポリペプチドの転写は、例えば、ポリオマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び典型的にはサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、ヒートショックプロモーターによって、提供されるこのようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。

ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主でDNAを発現する系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変更例は米国特許第4601978号に開示されている。

また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞におけるヒトインターフェロンcDNAの発現について、Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)を参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0093】

エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明のポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。哺乳動物の遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン)。典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物のプロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)もまた参照。エンハンサーは、ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、典型的にはプロモーターから5'位に位置している。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、本発明のポリペプチドをコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示した発現ベクターを参照。

【 0 0 9 5 】

宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクターに本発明のポリペプチドをコードするDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンズ及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びB・リチエフォルミス(Licheniformis)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710に開示されたバシリ・リチエニフォルミス41P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。典型的には大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC31446)であるが、他の大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31537)及び大腸菌W3110(ATCC27325)のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、本発明のポリペプチドをコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能で、ここで使用でき、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ；クルイペロマイセス宿主、例えばK・ラクティス、K・フラギリス(ATCC12424)、K・ブルガリカス(ATCC16045)、K・ウィッケラマイ(ATCC24178)、K・ワルチイ(ATCC56500)、K・ドロソフィラルム(ATCC36906)、K・サーモトレランス、及びK・マルキシアナス；ヤローウィア(欧州特許第402226号)；ピチア・パストリス(欧州特許第183070号)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア(欧州特許第244234号)；アカパンカビ；シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス；及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリポクラジウム、及びコウジカビ属(Aspergillus)宿主、例えば偽巢性コウジ菌(A. nidulans)及びクロカビ(A. niger)が使用できる。

本発明のグリコシル化ポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドブレタ・フルギペルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンピクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニカNPVのL-1変異体とボンピクス・モリNPVのBm-5株が公に利用でき、このようなウイルスは本発明においてここに記載したウイルスとして使用でき、特にスポドブレタ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)細胞のトランスフェクションに使用できる。綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することもできる。

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になった。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651

10

20

30

40

50

); ヒト胚腎臓株 (293 又は懸濁培養での成長のためにサブクローン化された 293 細胞、Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞 (BHK、ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Ur laub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザルの腎細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2); イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2、HB 8065); マウス乳房腫瘍 (MMT060562、ATTC CCL51); TRI細胞 (Mother et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; ヒト肝癌株 (Hep G2) である。宿主細胞は、本発明のポリペプチド生産のための上述した発現又はクローニングベクターで形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適当に修飾された常套的栄養培地で培養する。

【0096】

宿主細胞の培養

本発明のポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地、例えばハム (Ham) の F10 (Sigma)、最小必須培地 ((MEM)、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコの改良イーグル培地 ((DMEM)、Sigma) が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第 4767704号; 同 4657866号; 同 4927762号; 同 4560655号; 又は同 5122469号; 国際公開第 90/03430; 国際公開第 87/00195; 又は米国特許再発行第 30985号に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子 (例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類 (例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー (例えば HEPES)、ヌクレオチド (例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質 (例えば、ゲンタマイシン^{T M}薬)、微量元素 (最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)、及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0097】

ポリペプチド精製

本発明のポリペプチドないしタンパク質は被検体から採取されうる。組換え技術を用いる場合、本発明のポリペプチドは、細胞内に、細胞膜周辺腔に、又は培地に直接分泌されうる。本発明のポリペプチドは、培養培地又は宿主細胞溶解物から回収されてもよい。膜結合である場合、適切な清浄液 (例えばトリトン-X100) を用いるか、又は酵素の切断によって膜から放出されうる。本発明のポリペプチドの発現に用いられる細胞は、様々な物理的又は化学的手段、例として、凍結-解凍循環、超音波処理、物理的な破壊又は細胞溶解剤によって破壊されうる。

適切なタンパク質精製手順の例は以下の手順である: イオン交換カラムによる分画; エタノール沈殿; 逆相 HPLC; 二酸化ケイ素によるクロマトグラフィ、ヘパリン SEPHAROSE^{T M} によるクロマトグラフィ、陰イオン又陽イオン交換樹脂 (例えばポリアスパラギン酸カラム、DEAEなど) によるクロマトグラフィ; 等電点電気泳動; SDS-PAGE; 硫酸アンモニウム沈殿; 例えば、セファデックス G-75 を用いたゲル濾過; IgG などの混入物を除去するためのプロテイン A セファロースカラム; 及び、本発明のポリペプチドのエピトープタグ付加形態を結合するための金属キレートカラム。タンパク

質精製に様々な方法が用いられてもよく、このような方法は当分野で公知であり、例えば Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982) の実施例に記述される。選択される精製工程(一又は複数)は、例えば、使用する生産プロセス及び生産される本発明の特定のポリペプチドの性質に依存するであろう。

例えば、細胞から調製される V E G F 組成物は、例えば、ヒドロキシラパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィ、及び典型的な親和性技術であるアフィニティークロマトグラフィを用いて精製されうる。アフィニティリガンドとしてのプロテイン A の適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリン F c 領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト 1、 2、又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983))。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨されている (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C H 3 ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば上記のものも回収する抗体に依存して利用可能である。また、大腸菌の周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載している Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) も参照のこと。

【 0 0 9 8 】

薬剂的組成物

本発明の薬剂的製剤 (T A M 及び / 又は A T M 結合剤又は T A M 及び / 又は A T M 分泌細胞メッセンジャー結合剤) とその組み合わせ及び本発明に関して用いられる本明細書中に記載のものは、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより (Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed.[1980])、凍結乾燥又は水溶液の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料 (例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；及び m - クレゾール)；低分子量 (約 10 残基未満) のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；E D T A 等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体 (例えば、Z n - タンパク質複合体)；及び / 又は T W E E NTM、P L U R O N I C STM 又はポリエチレングリコール (P E G) 等の非イオン性界面活性剤を含む。

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ - (メタクリル酸メチル) マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系 (例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ - 粒子及びナノカプセル) に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed.[1980] に開示されている。

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

10

20

30

40

50

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明のポリペプチドを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOSITTM（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフィア）、及びポリ-D-()-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、37の水分に曝露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。例として、高分子電解質被覆によるカプセルを記載している米国特許第6699501号も参照。

10

20

30

40

50

【0099】

さらに、本発明の薬剤（例えばTAMアゴニスト、TAMアンタゴニスト又はTAMサイトカイン/ケモカイン分泌のアゴニスト又はアンタゴニスト）が遺伝子治療によって被検体に導入されうることを考慮する。遺伝子治療は、被検体への核酸の投与によって行われる治療を指す。遺伝子治療適用において、例えば欠損した遺伝子の置換のために、遺伝子を細胞に導入して、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成する。「遺伝子治療」には、永続的な効果が単一の治療によって達成される従来の遺伝子治療と遺伝子治療薬の投与の両方が含まれ、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回の投与又は繰り返し投与を伴う。アンチセンスRNA及びDNAはインビボのある遺伝子の発現を遮断するための治療剤として用いられる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞膜による取り込みに制限されて細胞内濃度が低くなるが、インヒビターとして働く細胞内に移入することができることが既に報告されている(Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986))。オリゴヌクレオチドは、例えば負に荷電するホスホジエステル基を非荷電基に置換することによって修飾して、それらの取り込みを上げることができる。遺伝子治療の方法の一般的な概念については、例として、Goldspiel等、Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan and Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993);及びMay TIBTECH 11:155-215 (1993)を参照。用いられうる組換えDNA技術の当分野で公知の共通の方法は、Ausubel等、eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記述される。

核酸を生細胞に導入するために利用可能な様々な技術がある。技術は、核酸がインビトロ又はインビボで意図した宿主の細胞の培養細胞にトランスファーされるかどうかによって異なる。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸のトランスファーに好適な技術には、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などが含まれる。

一般に好適なインビボ遺伝子導入技術には、ウイルス(一般的にレトロウイルス)ベクターによる形質移入及び、ウイルスコートタンパク質-リポソーム媒介性形質移入が含まれる(Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993))。例えば、インビボ核酸導入技術には、ウイルスベクター(例えばアデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス又は、アデノ関連ウイルス)及び脂質ベースのシステム(遺

伝子の脂質媒介トランスファーに有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPE及びDC-Cholである)が含まれる。遺伝子治療にウイルスベクターを使用する例は、Clowes等、J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem等、Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); Grossman and Wilson Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993); Bout等、Human Gene Therapy 5:3-10 (1994); Rosenfeld等、Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld等、Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli等、J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993);及びWalsh等、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993)に見られる。

ある場合では、標的細胞を標的とする薬剤、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターのリガンドなどを核酸供給源に供給することが望ましい。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスに関する細胞表面膜タンパク質と結合するタンパク質は、例えばある種類の細胞に向性があるキャプシドタンパク質又はその断片、細胞周期への内部移行を行うタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし、細胞内半減期を亢進するタンパク質のターゲティングのため及び/又はこれらの取り込みを容易にするために用いられうる。レセプター媒介性エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987);及びWagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)に記載される。遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコルの概要については、Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992)を参照。

【0100】

用量及び投与

本発明の薬剤(TAM及び/又はATM結合剤、TAM及び/又はATMアゴニスト、TAM及び/又はATMアンタゴニスト、TAM及び/又はATM分泌サイトカイン/ケモカイン結合剤、TAM及び/又はATM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニスト、TAM及び/又はATM-分泌サイトカイン/ケモカインアンタゴニスト)は、ヒト患者に、周知の方法、例えば、ボラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路、及び/又は皮下投与などにより投与される。

ある実施態様では、本発明の治療は本発明の組成物と一又は複数の治療剤(例えば化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害剤及び増殖阻害剤)との併用投与を含む。本発明は、同じ抗原に対する複数の抗体又は本発明の異なるタンパク質に対する複数の抗体の投与を考慮する。一実施態様では、異なる化学療法剤の混合物が、本発明の組成物と投与される。併用投与は、別々の製剤又は単一の製薬的製剤による同時投与、及び/又はいずれかの順序での連続投与が含まれる。一実施態様では、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間がある。

疾患の予防又は治療のために、本発明の薬剤の好適な用量は、上記に定義した治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及びインヒビターへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。インヒビターは一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。併用療法投与計画では、本発明の組成物は治療的有効量又は治療的相乗作用量で投与される。本明細書中で用いられるように、治療的有効量は、本発明の組成物の投与及び/又はVEGFアンタゴニスト及び一又は複数の他の治療剤の同時投与により標的とする疾患又は症状が減少又は阻害される量である。薬剤の組み合わせの投与効果は付加的であってもよい。一実施態様では、投与の結果は相乗効果である。治療的相乗作用量は、特定の疾患に関係する状態又は症状を相乗作用的に又は有意に減少ないし除去するために必要な、本発明の組成物及び一又は複数の他の治療剤、例えば化学療法剤又は抗癌剤の量である。

疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 50 \text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1 \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$)のVEGFアンタゴニスト又は骨髄性細胞減少剤、化学療法剤、又は抗癌剤が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 約 100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上の

10

20

30

40

50

範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。しかしながら他の用量処方があるかもしれない。典型的には、臨床医は、必要とされる生物学的な効果が生じる用量(一又は複数)が達成されるまで本発明の分子(一又は複数)を投与するであろう。本発明の治療の経過は従来の技術及びアッセイにより用意にモニターされる。

例えば、血管新生インヒビター、例えばアバスタチン(登録商標)(Genentech)などの抗 V E G F 抗体の調製及び投与計画は製造者の指示に従って用いられても、当業者によって経験的に決定されてもよい。他の例では、このような化学療法剤の調製及び投与計画は製造者の指示に従って用いられても、当業者によって経験的に決定されてもよい。化学療法剤の調製及び投与計画は Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992) にも記載される。

10

【0101】

治療の有効性

本発明の治療の有効性は、いくつかの態様において、当分野で周知の様々なエンドポイントにより測定することができる。一実施態様において、TAMに基づく治療の有効性は、腫瘍性又は非腫瘍性疾患を評価する際に用いられる様々なエンドポイントを用いて測定されてもよい。例えば、癌治療は、限定するものではないが、腫瘍再発、腫瘍重量ないしサイズの収縮、進行時間、生存期間、進行がない生存、全体の応答速度、応答の継続期間、生活の質、タンパク質の発現及び/又は活性などで評価されてもよい。本明細書に記載の薬剤は腫瘍の血管及び浸潤を標的とし、腫瘍性細胞自体を標的とする必要はないので、抗癌剤の特定のクラスを示し、それゆえに薬剤に対する臨床応答の特定の測定と定義を必要としうる。例えば、二次元分析において50%より大きい腫瘍の収縮は応答を示す標準のカットオフである。しかし、本発明のインヒビターは原発性腫瘍を収縮することなく転移の拡がりを阻害するか、又は単に腫瘍抑制(tumouristatic)効果を及ぼしうる。したがって、例えば血管新生の血漿又は尿路マーカーの測定及び放射線画像法による応答の測定などの、治療の有効性を決定する手法が用いられうる。

20

他の実施態様において、本発明の治療の有効性は、自己免疫不全を評価する際に共通に用いられる様々なエンドポイントを用いて測定されてもよい。例えば、自己免疫疾患の治療は、限定するものではないが、疾患の第1又は第2の特徴の減少又は停止、腫瘍増殖停止時間、生存期間、無増悪生存期間、全奏効率、応答の持続期間、生活の質、タンパク質の発現及び/又は活性などで評価されてもよい。同じ論理は、本発明の治療が対処することを目的とされる特定の疾患を評価するために、当業者によって共通に用いられるエンドポイントを用いて本発明の治療の有効性を測定するために適用されてもよい。

30

【0102】

製造品

本発明の他の実施態様では、上記の疾病の治療又は診断に有用な材料を具備する製造品が提供される。該製造品は容器、ラベル及びパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。一実施態様では、容器は、症状を治療するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。一実施態様において、組成物の少なくとも一つの活性剤は、TAM及び/又はATM結合剤又はTAM及び/又はATM-サイトカイン/ケモカイン結合剤である。もう一つの実施態様では、組成物の少なくとも一つの活性剤は、TAM及び/又はATMアゴニスト又は少なくとも一つのTAM及び/又はATM分泌サイトカイン/ケモカインのアゴニストである。もう一つの実施態様では、組成物の少なくとも一つの活性剤はTAM及び/又はATMアンタゴニスト又は少なくとも一つのTAM及び/又はATM分泌サイトカイン/ケモカインのアンタゴニストである。ある実施態様では、組成物は、限定されないが、化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制剤、細胞障害性剤及び増殖阻害剤を含む第二の活性分子を少なくとも更に含む。容器に添付又は付属するラベルは、組成物

40

50

が選択した症状の治療に使用されることを示す。さらに製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第二の容器を更に具備してもよい。本発明の製造品には、更なる活性剤、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0103】

本明細書に記載の実施例及び実施態様は例示的な目的のためだけであって、その見地への様々な修飾又は変更が当業者に示唆され、本出願の精神及び権限内及び添付の特許請求の範囲内に包含されるものであることは理解されるであろう。本明細書は、当業者による本発明の実施を十分可能にするものであると考えられる。本明細書で引用したすべての出版物、特許及び特許出願は、あらゆる目的のためにその全体が出典明記によって援用される。

10

【0104】

(実施例)

実施例1：骨髄性浸潤物の構成及び局在

MMTV - PyMTに誘導された乳腺腫瘍の免疫浸潤物の構成及び局在は、免疫組織化学によって評価された。フレンド白血病ウイルスB系統(「FVB」)に感受性の野生型マウスが購入され(Charles River)、FVBを背景とするMMTV . PyMT^{t/g}又はMMTV . Her2^{t/g}腫瘍を含むマウスが病原体を含まない施設において交配された。MMTV . PyMT^{t/g}マウスからの腫瘍は、OCT溶液において包埋され、凍結された。凍結切片は、5ミクロン切片に切られて、室温で乾燥し、標準手順を用いて氷冷アセトンで固定した。内因性のペルオキシダーゼは、37℃で60分間のグルコースオキシダーゼを用いて消光された。切片はPBSでリンスされ、内因性のアビジン及びビオチンは製造業者の指示に従ってAvidin Biotin Blocking Kit (Vector)を用いてブロックした。切片は、室温で30分間の3%BSA/PBS中の10%ウサギ血清でブロックされ、室温で60分間ブロッキング血清に希釈された適当な抗体と共にインキューベートした。また、ネガティブコントロールとしてラットIgG2bを用いた。切片は、TBSTでリンスされ、室温で30分間、適当なビオチン化二次抗体と共にインキューベートした。切片は、標準手順に従って作成された。ラット抗CD45(LCA)抗体はPharmingenから得られ、ウサギ抗CD3抗体はDAKOから得られ、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG及びビオチン化ウサギ抗ラットIgGはVectorから得られ、ラット抗F4/80抗体はSerotecから得られた。

20

30

腫瘍試料は、白血球を検出するために、最初に抗CD45抗体で処理された。図1Aに示されているように、顕著な白血球の浸潤が腫瘍及びストローマの中で同定された。更に浸潤物の構成を解明するために、試料は、マクロファージ及びT細胞のマーカーとしてそれぞれ抗F4/80の抗体又は抗CD3抗体で処理された。抗F4/80抗体処理で観察される染色パターンは、抗CD45抗体処理で観察されたのと類似しており、CD45⁺白血球の主要部がマクロファージであったことを示している(図1Aと図1Bとの比較)。CD3⁺細胞が腫瘍浸潤物中に観察されたのに対して、それらはF4/80^{high}マクロファージよりも優勢でなかった(図1Bと図1Cとの比較)。

40

結果は、フローサイトメトリによって確認及び伸長された。簡潔には、腫瘍は、切り分けられ、37℃で15分間コラゲナーゼI、IV及びDNA分解酵素(Gibco及びSigma)で消化した。用意をされた腫瘍細胞試料は、抗CD11b、抗GR-1、抗Nk1.1、抗DX5、抗MHCI、抗CD11c、抗F4/80及び抗PD-L1(Pharmingen、Serotec及びeBioscience)を含む異なる骨髄性のサブセットに特異的な蛍光性標識化された抗体で処理された。全ての細胞は、標準技術を用いて、染色の前に適当な血清又は精製されたIgGでブロックされ、死細胞を除外するためにヨウ化プロビジウムでも染色された。解析は、FACSCalibur又はLSRIIを用いて行われた(共にBecton Dickinson)。

【0105】

50

リンパ系の腫瘍浸潤物において支配的な細胞型は、 $CD11b^+$ 細胞であった(図1Dを参照)。 $8.4 \pm 1.8\%$ の $NK1.1^+DX5^+CD11b^+$ 骨髄性浸潤物が観察された。それらの骨髄性細胞の大多数は、 $Gr-1^+F4/80^{high}$ マクロファージ($77.9 \pm 11.3\%$)であった。残りの $CD11b^+$ 細胞の、 $11.5 \pm 4.3\%$ が $Gr-1^+F4/80^{low}$ 常在組織単核細胞(Mo^R^T)、 $1.1 \pm 0.5\%$ が $Gr-1^+$ 炎症性単核細胞(Mo^I^F)及び $9.5 \pm 4.3\%$ が $Gr-1^+$ 好中球であった(図1Eを参照)。腫瘍を有する宿主は共通して白血球増多症を示すことが報告された(Serafini et al., 2004)。したがって、MMTV-PyMTマウスの末梢白血球組成は、上記の通りにFACS解析によってもまた評価された。腫瘍を有していないコントロールFVBマウス($4.2 \pm 1.1 \times 10^6$)と比較して、MMTV-PyMT誘導腫瘍を有するマウスでは末梢血単核細胞(「PBMC」)($9.7 \pm 3.2 \times 10^6$)数の2.3倍の増加が観察された(図2A)。この観察された腫瘍を有するマウスにおける全白血球の増加は、腫瘍を有していないコントロール・マウスの発生率($19.1 \pm 5.5\%$)と比較して、 $CD11b^+$ 骨髄性細胞($70.1 \pm 15.1\%$)の頻度の増加が伴っていた(図2B)。並んで、 $CD11b^+$ 細胞の増加した頻度を伴った全PBMCの増加により、腫瘍を有するマウスの末梢骨髄性細胞の8.5倍の増加が生じた。この増加は、主に好中球の12.5倍の増殖によるものであり($6.0 \pm 1.5 \times 10^6 / mL$ 対コントロール・マウスにおける $0.5 \pm 0.2 \times 10^6 / mL$)、 Mo^I^F 及び Mo^R^T はそれぞれ5倍($0.5 \pm 0.2 \times 10^6 / mL$ 対 $0.1 \pm 0.04 \times 10^6 / mL$)及び2.5倍($0.5 \pm 0.2 \times 10^6 / mL$ 対 $0.2 \pm 0.1 \times 10^6 / mL$)だけ増大した。血中の単核細胞に対する好中球の比は、コントロール動物において観察されたのと比較してもわずかに増大された(図2C)。

増殖する腫瘍において、脈管形成の程度は不均一であり、低い酸素分圧領域は共通で、多くの場合壊死と関連している。更に腫瘍における骨髄性細胞の役割を理解するために、免疫蛍光染色が、PyMT^{tg}腫瘍の維管束系に対して Mo^I^F 、好中球及び腫瘍関連マクロファージ(「TAM」)を局所化するために用いられた。10-14週齢のMMTV-PyMT^{tg}マウスからの腫瘍は、OC T溶液中に包埋され、瞬間凍結された。OC T凍結された腫瘍組織は、標準手順を用いてF4/80(Serotec)、Ly-6C(Pharmingen)又はLy-6G(Pharmingen)(それぞれ、TAM、 Mo^I^F 又は好中球を同定するため)、及び内皮マーカ-CD31(Pharmingen)(組織の血管を視覚化するため)に特異的な抗体で染色された(実施例1を参照)。結果は、図1F-Hに示す。像は、 $F4/80^+$ TAMが内皮細胞及び腫瘍の壊死性領域に接近して局在していることを示す(図1Fを参照)。同様に、好中球は、内皮細胞の付近、及び腫瘍の壊死性領域において検出された(図1Gを参照)。対照的に、 Mo^I^F は、ほぼ完全に腫瘍の壊死性領域の中又は付近に局在していた(図1Hを参照)。

単核細胞が腫瘍の低酸素領域に移動し、マクロファージに分化することは、以前に示唆されていた(Yamashiro et al., 1994; Murdoch et al., 2004)。低酸素状態に反応して、TAMが低酸素誘導因子HIF-1 α 及びHIF-2 α の発現を上方制御することは公知であり、それによりTAMの血管新生性、代謝性及び食細胞性活性が変わる(Mantovani et al., 2006; Lewis and Murdoch, 2005)。特に、低酸素条件のインビトロで培養された Mo^I^F 及び Mo^I^F 由来マクロファージは、 Mo^R^T 及び Mo^R^T 由来マクロファージより非常に高いレベルのVEGF-Aを分泌した(データ未掲載)。

【0106】

実施例2：TAMの特性評価

A. TAMは、 $CD11c$ 及びランゲリンを発現し、プロフェッショナル抗原提供細胞の特徴を示す。

マクロファージ及び樹状細胞(「DC」)は、抗原を捕獲し、T細胞にそれらを示す能力を有する。よりよくT細胞応答の調節におけるTAMの役割を理解するために、腫瘍内の抗原提示と関連している遺伝子の発現が評価された。通常は骨髄性又はDC細胞に発現されるマーカ-の免疫組織化学的解析は、実施例1に記載されている方法に従って、T A

10

20

30

40

50

Mについて行われた。ラット抗F4/80抗体はSerotecから得られ、ラット抗CD11b抗体はeBioscienceから得られ、ラット抗CD11c抗体はPharmingenから得られた。抗ヒトランゲリン(CD207)の免疫組織化学は実施例1に記載されているように一般的に行われたが、組織切片は、脱ろうされ、後の20分間のクールダウンを伴う20分間の99のLab Vision's PT Moduleを用いる纏フクールダウンを伴う99、20分間のLab VisionのPT Moduleを用いてTarget Retrievalバッファ(pH 6.0、Dako Cytomation)中で抗原賦活化された。ヤギ抗ランゲリンはR&D Systemsから得られ、ビオチン化ウサギ抗ヤギIgGはVector Labsから得られた。

2、3の例外を除いて、大多数の組織常在性マクロファージ(例えば腹腔マクロファージ)は、CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁻細胞であり、骨髄性DC(例えば骨髄由来DC)は、CD11b⁺CD11c⁺細胞であって、F4/80の発現を欠いている。驚くべきことに、PyMT由来腫瘍からのCD11b⁺TAMは細胞表面にF4/80だけでなく、CD11cを高水準で発現することが観察された(図3A)。同様の結果が、MMTV-HER2^{tg}マウスから単離されたTAMにおいて観察された(データ未掲載)。PyMT^{tg}マウスからのOCT凍結された腫瘍の組織学は、TAMがF4/80及びCD11c(図3B)を共発現していることを示しており、更にインビトロで60時間培養された単離TAMの免疫蛍光研究によって確認された(図3C)。同様に驚くべきことに、PyMT^{tg}マウスからのTAMは、主にランゲルハンスDC(LhDC)によって発現されることが知られていたタンパク質であるC型レクチンランゲリンをも発現していた(Kissenpfennig and Milissen, Trends Immunol 27: 132-9, 2006; Kaplan et al., Immunity 23: 611-20, 2005)(図3D)。

マウス及びヒト・ランゲルハンスDC(LhDC)の発達はTGF- β 1シグナリングに依存しているので(Borkowski et al., J Exp Med 184: 2417-22, 1996; Jaksits et al., J Immunol 163: 4869-77, 1999)、このサイトカインの発現はTAMにおいて調査された。実際、bmDC(ct = 1.0 \pm 0.06)及び腹腔マクロファージ(ct = 39.9 \pm 1.6)において観察される量と比較して、TAMはTGF- β 1をコード化するmRNAを高レベルで発現していた(ct = 707.3 \pm 47.3)。TAMが、LhDC発達及びTGF- β 1シグナル伝達カスケードに関係する2転写因子であるRunx3(TAM: ct = 9.8 \pm 1.1; bmDC: ct = 1.0 \pm 0.06; 腹腔マクロファージ: ct = 1.02 \pm 0.05)及びIRF-8(TAM: ct = 7.9 \pm 0.6; bmDC: ct = 1.0 \pm 0.06; 腹腔マクロファージ: ct = 0.98 \pm 0.05)コード化mRNAを比較的より高いレベルで発現していることが観察された(図3E)(Woolf et al., Dev Biol 303: 703-14, 2007;; Schiavoni et al., Blood 103: 2221-8, 2004)。Runx3はCD11cの発現を制御することが示され、Runx3.KO及びIRF-8.KOマウスはLhDCsの生成に欠陥がある(Borkowski et al., J Exp Med 184: 2417-22, 1996)。総合すると、データは、観察されたTAMの生物学に対してTGF- β 1が重要な因子であることを示唆している。

プロフェッショナルな抗原提示細胞が、免疫反応を開始するために流入領域リンパ節に移動することは公知である。したがって、PyMT^{tg}マウスの腋窩流入腫瘍及び上腕リンパ節の免疫細胞組成は、実施例1に記載されているように、腫瘍を有していないFVBマウスのコントロール・リンパ節と比較してFACS解析を用いて評価された。CD11b⁺細胞数の上昇(図4A)と、F4/80及びCD11cを発現しているCD11b⁺細胞数の上昇(図4B)が、腫瘍を含んでいるマウスのリンパ節において同定された。このデータの解釈は、TAMが他の免疫細胞に対して腫瘍抗原を示すために流入領域リンパ節へ移動するかもしれないということには限定されない。

【0107】

比較全ゲノム・マイクロアレイ解析は、FVBコントロール・マウスのTAM及び腹腔マクロファージ及び骨髄由来樹状細胞(「bmDC」)間の相違を更に調査するために行われた。簡潔には、1マイクログラムのトータルRNAは、Low RNA Input

10

20

30

40

50

Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent) を用いて二本鎖 cDNA に変換された。cRNA は、T7 RNA ポリメラーゼを用いて cDNA から合成され、同時にシアニン 3 - 又はシアニン 5 - で標識化された CTP を取り込んだ。標識化された cRNA は、アフィニティ樹脂カラム (RNeasy Mini Kit, Qiagen) で精製され、260 nm の吸光度を測定することによって定量化された。染料の取り込みは、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) を用いて、シアニン 3 - 及びシアニン 5 - 標識化 CTP の吸光度を測定することによって決定された。750 ng のシアニン 3 標識化 cRNA 及び 750 ng のシアニン 5 標識化 cRNA は、断片化バッファ中で 30 分間、60 のインキュベーションにより断片化された (In situ Hybridization Kit - Plus; Agilent)。断片化は、LiCl 及びリチウム・ラウリル硫酸塩を含むハイブリダイゼーション・バッファの添加によって終了された。試料は、60 で 17 時間マイクロアレイにハイブリダイズされた。アレイは、SSC バッファで洗浄され、アセトニトリルで乾燥した。アレイは Microarray Scanner を用いてスキャンされた (Agilent)。

未分化の bmDC は、150 ng/mL のマウス IL-4 及び 20 ng/mL のマウス GM-CSF (R&D Biosystems) を添加された RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich) 中で 5×10^5 細胞/mL で 5% CO₂、37 で 6 日間培養された赤血球を減少する骨髓細胞から作製された。一日おきに培地の半分は取り除かれ、GM-CSF 及び IL-4 が添加された新しい RPMI 1640 と交換された。6 日目に、CD11b⁺CD11c⁺ 細胞は FACS 選別によって単離された。F4/80^{high} 腹腔マクロファージは、PBS/EDTA で腹膜透析から得られた単細胞溶液から FACS 選別された。10-14 週間目の MMTV-PyMT^{tg} マウスからの腫瘍は、37 で 15 分間、コラゲナーゼ I、IV 及び DNA 分解酵素 (Gibco 及び Sigma) で消化された。腫瘍関連 F4/80^{high} マクロファージ (TAM) は抗 F4/80 PE 及び抗 PE MicroBeads を用いた磁気細胞分離によって濃縮された (Miltenyi Biotech)。選別された細胞の精製度はフローサイトメトリによって確認され、磁気細胞選別によって精製された細胞は 95% 以上、フローサイトメトリによって精製された細胞は 98% 以上であった。全ての細胞は、染色の前に適切な血清又は精製された IgG の 10-20% を用いてブロックされた。FACS 選別は、Vantage 又は Aria ソーター (Becton Dickinson) で PI 除外により行われた。階層的クラスタ分割及び主成分分析 (PCA) は、Agilent Whole Mouse Genome (WMG) 又は M1A (マクロファージ・サブセットの比較) Oligo Microarray log₂ 比率データ (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) に対して Partek (登録商標) Genomic SuiteTM ソフトウェア、バージョン 6.3 (Partek Inc., St. Louis, MO) を用いて行われた。ユークリッド距離は、行又は列間の相違点、クラスタ間の距離を算出する平均連結法及び階層的クラスタ分割における「2-Pass」クラスタリング方法を測定するために用いられた。PCA において、分散マトリックスは共分散であり、固有ベクトルは標準化される。Partek Batch Remover は、PCA のデータ視覚化上のマウス系統差異の効果を取り除くために用いられた。Agilent log₂ 比率の発現値は、強度プロット線の z-スコアに変換された。

それらの 3 つの細胞型の発現遺伝子のヒートマップ像は、TAM が腹腔マクロファージ及び bmDC とは異なることを示している (図 5 A)。データは、3 つの異なる遺伝子発現プロファイルの関係を推定するために、三次元主成分分析 (「PCA」) によって、統計学的にも調べられた。集団のクラスタリングは TAM が両方のコントロール群とは異なることを示したが、TAM は bmDC よりも腹腔マクロファージと関連があるようであった (図 5 B)。図 5 C は、TAM が、腹腔マクロファージ、脾臓マクロファージ及びクッパー細胞などの他のマクロファージとは区別可能であることを示している。TAM の形態は、腹腔マクロファージ及び bmDC の形態と比較された (図 4 C)。TAM 及び bmDC は、多くの液胞と共に散在する大きい細胞原形質及び小さい核を有してい

る大細胞であった。対照的に、腹腔マクロファージは、サイズがとても小さく、液胞を欠くホモログな細胞原形質及び大核を有していた。したがって、TAMは、腹腔マクロファージとは顕著に異なるが、bmDCと類似しているように見えた。

【0108】

B： 免疫寛容原性抗原提供細胞のTAM表示特徴

上記のPyMTtgマウスから単離されたTAMのbmDCに対する形態学的類似点及び腹腔マクロファージに対する相違点を仮定すると、特にPyMT腫瘍から単離されたTAMが抗原提供細胞として作用するかどうか判断するために、これらの細胞型間の分子的類似点及び相違点の更なる解析が行われた。MHCII、共刺激分子CD80及びCD86及びCD83（成熟DCのマーカー）の発現は、上記のようにFACS解析によってTAM、bmDC及び腹腔マクロファージにおいて測定された。特に、腹腔マクロファージがMHCIIの適度なレベルを発現するだけだったのに対して、TAMは半成熟したbmDCに観察されるのと同様に高レベルでMHCIIを発現した（図6A-Cの最も左のパネルの比較）。TAMは、CD80又はCD83のいずれをもほとんど発現せず、CD86の適度な量を発現した。休止期の腹腔マクロファージはCD80及びCD83を低レベルで発現し、CD86を高レベルで発現したが、bmDC（未分化及び半成熟のDCの不均一な集団）は、CD80、CD83及びCD86を低レベルから適度なレベルで発現した（図6A-C）。

10

【0109】

実施例3：TAM ケモカイン及びサイトカインプロファイル

抗腫瘍免疫応答と同様にどのようにTAMが腫瘍成長及び進行に影響するかを更に理解するために、TAMのサイトカイン及びケモカイン・プロファイルが評価された。遺伝子の選択されたセットについて、実施例2に記載されるように、マイクロアレイ解析が行われた：ケモカインCCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL17、CXCL1、CXCL9、CXCL10、CXCL16及びKC及びサイトカインIL-1（IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1RA、TNF、TGF β 及びLT α ）。腹腔マクロファージ及びTAMは、異なるケモカイン及びサイトカイン・プロファイルを示した（表2及び図7Aを参照）。TAMは、例えばbmDCと比較して、特定のケモカイン（CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL17、CXCL1、CXCL9、CXCL10、CXCL16及びKC（表2及び図7Aを参照））をコード化するmRNAをより多く産生した。このようなケモカインの発現は、単核細胞、未分化のDC、NK細胞及びT細胞のような腫瘍において典型的に見出される種々のリンパ球を誘因するであろう。TAMにおけるIL-1 α 、IL-1 β 、IL-1残気、TNF α 及びLT α コード化mRNAの強化されたレベルは、bmDCと比較して検出された（データ未掲載）。

20

30

表2：bmDCと比較したTAMにおけるケモカインmRNA発現

ケモカイン	発現	標的細胞
CCL2/MCP-1	12.4	単核細胞, メモリーT細胞 (CD8), 未分化DC
CCL3/MIP-1a	37.9	単核細胞, NK細胞, メモリーT細胞 (TH1), 未分化DC
CCL4/MIP-1b	183.3	TH1
CCL5/RANTES	5.0	TH1, NK細胞, 未分化DC
CCL7/MCP-3	15.2	単核細胞
CCL8/MCP-2	5.1	単核細胞
CCL17/TARC	4.0	TH2, 制御T細胞
CXCL1/MIP-2*	5.5	単核細胞, NK細胞
CXCL9/MIG	5.6	TH1
CXCL10/IP-10	103.0	TH1, 単核細胞, 活性化T細胞 (TH1, TH2)
KC	6.2	好中球
CXCL16*	13.3	T細胞

10

20

* 膜貫通タンパク質 ; 切断された (shedded) 形は、スカベンジャー受容体として作用する【0110】

腫瘍細胞、腹腔マクロファージ及びbmDCと比較したTAMの遺伝子発現のヒートマップ解析もまた行われた。トータルRNAは、製造業者の説明書に従ってRNeasyミニ・キット (Qiagen) を用いて精製された。RNAの質はAgilent 2100 Bioanalyzer上でTotal RNA Pico Assayを用いて評価され、Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kitは蛍光cRNAプローブ (Agilent) を用意するために用いられた。Agilent Mouse M1Aマイクロアレイは、遺伝子発現を評価するために用いられた。それぞれの細胞型のための6つの反復試験試料はCy5で標識化され、Universal Mouse Reference (Stratagene) はCy3で標識化された。750ngの標識化Cy5及びCy3プローブは、30分間断片化され、両方のプローブはそれぞれのチップ上にロードされた。オーバーナイトハイブリダイゼーションは60で行われ、スライドは6xSSC及び0.1xSSC中でその後洗浄され、その後アセチル・ニトリル乾燥工程が続いた。マイクロアレイは、100に設定されたスキャナ感度でスキャンされた。

30

40

結果は、TAMが炎症性サイトカイン (IL-1、IL-1、TNF及びLT) 及び抗炎症性サイトカイン (IL-1RA、IL-10及びTGF-1) をコード化するmRNAを上昇したレベルで発現したが、IL-6、TGF-2又はTGF-3をコード化するmRNAを低いレベルで発現したことを示した (図14A)。これらの解析は、TAMがIL-4R、IL-10R、IL-10R、IL-13R、IL-17R、TGF-R1及びTGF-R2の上昇したレベルの固有のサイトカイン受容体発現パターンを示すことをも見いだした (図14B)。TAMは、多くの炎症性ケモカイン (CCL2、CCL12、CCL3、CCL4、CCL7、CCL12、CXCL1、CXCL2、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL14及びCXCL16) をコード化するmRNAも高いレベルで発現した (図14C)。CCL2の発現が腹腔マクロファージの発現 (2.7 ± 1.0 ng/ml 対 3.9 ± 0.9 ng/ml) と類似して

50

いたのに対して、精製されたTAMはCCL3 ($1.1 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージの検知されない量)、CCL5 ($1.8 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージの検知されない量)及びCXCL10 ($5.5 \pm 1.3 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージの $1.3 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$)を高レベルで分泌した(図14D)。この異なるケモカイン・プロファイルは、TAMが腫瘍へ能動的に白血球を補充することを示唆した。TAMはCCR6、CXCR4及びCX3CR1、TGF- β 1によって誘導されることが公知のケモカイン受容体(Chen, S. et al., Immunology 114: 565-74, 2005; Yang, D., et al., J Immunol 163: 1737-41, 1999; Chen, S., J Neuroimmunol 133: 46-55, 2002)、及びCCR2、CCR12及びCCR5をコードするmRNAを上昇したレベルで発現した(図14E)。リアルタイムRT-PCRは、TAMにおいて上昇したCCR6 mRNAレベルの存在を確認した(TAM: $\text{ct} = 467.8 \pm 332.0$; bMD C: $\text{ct} = 1.0 \pm 0.6$; peritoneal macrophages: $\text{ct} = 6.4 \pm 6.1$)(図14F)。

TAMにおいて観察される、この異なるケモカイン及びサイトカインのmRNAプロファイルが発現タンパク質レベルにおいても存在するかどうかを試験するために、TAMは上記の通りにPyMTtgマウスから精製され、特定のサイトカイン及びケモカイン・タンパク質の産生は腹腔マクロファージのタンパク質発現と比較して21時間の培養後に評価された。FACS解析は、実施例1に記載されているようにして行われた。TAM及び腹腔マクロファージは、37%及び5%CO₂、RPMI1640培地において $2 \times 10^6 / \text{mL}$ の濃度で、フィブロネクチン・コーティング付き丸底96ウェルプレートで21時間培養された。上清に分泌されるサイトカインは、Luminesx解析によって検出された。リアルタイムRT-PCR解析もまた行われた。選別された免疫細胞のRNAは、RNeasyキット(Qiagen)を用いて単離され、DNaseI(Sigma)で消化された。細胞のトータルRNAは、逆転写され、製造業者の説明書に従って7700 Sequence Detection System(Applied Biosystems)を用いて、三通りでリアルタイムTaqMan PCRによって分析された。発現遺伝子の任意の発現単位は、ハウスキーピング遺伝子GAPDHのその倍数発現として求められた。それぞれの遺伝子に対するプライマーは、標準プロトコルに従ってエキソン/イントロンの境界上に設計され、Applied Biosystemsから得られた。

【0111】

結果は、図7Bに示す。TAM及び腹腔マクロファージが両方ともIL-10を適度なレベルで分泌したのに対して(TAMにおいて $0.81 \pm 0.13 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて $0.69 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$)、TAMはTNF- α を相対的に高レベルで(TAMにおいて $0.57 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて 0.08 ± 0.01)、IL-6を超低レベルで(TAMにおいて $3.5 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて $48.5 \pm 12.7 \text{ ng/ml}$)産生した。さらに、TAMはIL-1をわずかに低いレベルで分泌したが(TAMにおいて $0.05 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて $0.05 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$)、IL-1は有意に上昇したレベルで分泌された($0.12 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$ 対 $0.05 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$)。

ケモカイン解析は、ほとんどの場合、上記のマイクロアレイ解析によって観察されたTAMプロファイルを明確に裏づけた。TAMは、CCL3(TAMにおいて $1.1 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ 、腹腔マクロファージにおいて検知されない);CCL5(TAMにおいて $1.8 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ 、腹腔マクロファージにおいて検知されない);及びCXCL10(TAMにおいて $5.5 \pm 1.3 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて $1.3 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$)のmRNAを高レベルで発現した(図7B)KcmRNAの発現が減少された(TAMにおいて $6.4 \pm 0.7 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて $18.6 \pm 6.9 \text{ ng/ml}$)のに対して、TAMにおけるCCL2 mRNAの発現は腹腔マクロファージのそれと類似していた(TAMにおいて $2.7 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$ 対腹腔マクロファージにおいて $3.7 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$)(図7B)。PyMT^{tg}由来

10
20
30
40
50

TAM、腹腔マクロファージ、bmDC及び腫瘍細胞におけるTGF- β 1発現のリアルタイムPCR解析は、TAMがそのサイトカインを最も高く発現することを示した(図7C)。IL-6の超低レベルの発現とTGF- β 、IL-10及びTNF- α の適度な発現の組合せは、TAMが免疫抑制性特性を有していることを示唆する。さらにまた、観察されたTAMケモカイン・プロファイルは、TAMが多種多様なケモカインを分泌することによって腫瘍において観察される白血球浸潤を調節しうることを示唆する。

文献に認識されたM1/M2パラダイム(Mantovani et al., Trends Immunol 25 (12): 677-86, 2004; Gordon, Nat Rev Immunol 3 (1): 23-35, 2003を参照)は、そのマクロファージが典型的な炎症性条件(IFN- γ /LPS)又は選択的に活性化された条件(IL-4/IL-13)のいずれかにおいて、固有の機能特性を有する分化したサブセット(それぞれM1、M2)に分化することを示唆する。典型的なM1マクロファージが炎症反応を裏づけることが提唱されたのに対し、M2マクロファージは抑制性IL-10及びTGF- β の豊富な微小環境の発達を刺激する。文献は、TAMを「選択的に活性化された」M2マクロファージとして分類した(Mantovani et al., Trends Immunol 23: 549-55, 2002; Sica et al., Eur J Cancer 42: 717-27, 2006)。M1又はM2表現型のいずれかに関連した分子のmRNA発現プロファイル分子のヒートマップ解析により、TAMは、中性腹腔マクロファージと比較すると特定のM2関連分子(Scarb, MR1、CD14、CD163、Fizz1、IL-1RII及びIL-1RA)の高いmRNAレベルを発現するが、他のM2関連分子(Mgl1、Mgl2、ScaraA、MR2、FcRII、Arg1、Ym1、CCL17、CCL22及びCCL24)の発現を欠いており、更に、M1関連分子(IL-1、FcRIa、FcRIIb、FcRIIIa、CCL2、CCL3、CXCL9、CXCL10、CXCL11及びCXCL16)の高いmRNAレベルを発現することが見いだされた(図15A-B)。これらの観察されたサイトカイン及びケモカイン・プロファイルは、TAMが抑制性サイトカインを分泌するにもかかわらず、M2マクロファージとは異なることを証明している。TAMは、多くの炎症性M1特徴(例えばTNF α 及びIL-1の産生及びFcR1、FcRIIb及びFcRIIIaの発現)を示す。TAMは、例えばNK細胞に走化性の多くの炎症性「M1」CC及びCXCKケモカインを分泌したが、TH2又はT調節細胞を誘引する古典的なM2ケモカインCCL17、CCL22及びCCL24は分泌しなかった。

【0112】

実施例4：インビトロにおけるT細胞に対するTAMの作用

TAMの上記の特性がT細胞とのTAM相互作用を反映するかどうか調査するために、naive T細胞増殖及びサイトカイン分泌を誘導するTAMの能力が腹腔マクロファージ及びbmDCのT細胞誘導活性と比較して評価された。PyMT^{t/g}腫瘍モデルがヒト転移性乳癌発達の多くの態様を模倣するにもかかわらず、それはもまたFVBの背景を必要とし、抗原特異性T細胞の研究の実施を難しくする。その代わりに、選択された免疫細胞及びCFSE標識化CD4⁺T細胞のインビトロでの共培養が行われた。naive CD4⁺T細胞は、FVBマウスの脾臓及び末梢リンパ節から調製された。単個細胞浮遊液は、CD25⁺、CD69⁺及びCD103⁺細胞が減少されたMACSであった(eBioscience及びMiltenyi Biotech)。ネガティブ画分中のCD4⁺T細胞は、CD4-MicroBeads(Miltenyi Biotech)で濃縮され、CD62L⁺CD45Rb^{high}CD25⁻CD69⁻CD103⁻naive CD4⁺T細胞は、FACS選別により単離された(eBioscience又はPharmingenから全ての抗体)。TAM、腹腔マクロファージ又はbmDCによって誘導されるT細胞増殖は、0.5 μ g/mLの抗CD3抗体と1 \times 10⁵ naive T細胞を用いて2 \times 10⁴のTAM、腹腔マクロファージ又はbmDCを培養することによって調査された。細胞は、5%CO₂、37°Cでフィブロネクチン・コーティング付き丸底96ウェルで培養された。5日間の培養後、細胞上清は、標準手順を用いたELISAアッセイによるサイトカイン解析のために-80°Cで凍結された。GM-CSF、G-CSF、MIP-1、MCP-1、RANTES、IP-10、KC、IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、

10

20

30

40

50

IL-13、IL-17、IFN 及び TNF は、製造業者の説明書に従って、Linco complex kit (Linco) を用いて培養液上清中で検出された。T細胞増殖は、FACSによって調べられた。CSFEの希釈の測定値は、TAMがプロフェッショナル抗原提示細胞腹腔マクロファージ及びbmDC (示されないデータ) によって誘導されるそれらと同等のレベルでT細胞増殖を誘導することを示した。bmDCとは対照的に、TAM-感作T細胞はIL-10 (TAM-感作細胞において $2.5 \pm 0.4 \text{ ng/mL}$ 対bmDC-感作細胞において検知されない) 及びIFN (TAM-感作細胞において $5.6 \pm 1.2 \text{ ng/mL}$ 対bmDC-感作細胞において $0.2 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$) を高水準で分泌し、IL-2 (TAM-感作細胞において $0.3 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$ 対bmDC-感作細胞において $5.4 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$) を超低レベルで分泌し、IL-4 (TAM-感作細胞において検知されない対bmDC-感作細胞において $0.2 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$) を分泌しなかった (図8A)。naive CD4⁺ T細胞においてTAMがIL-4を誘導できないことは、1:1の比率でより劇的であり、bmDCによる非常に高いIL-4の誘導 ($2.7 \pm 0.2 \text{ ng/mL}$) と比較して、TAM初回抗原刺激ではIL-4の誘導の完全に近い欠如を示した ($0.2 \pm 0.02 \text{ ng/mL}$) (図8A)。TAM又はbmDCで刺激されたT細胞は、同程度のIL-5、IL-13及びTNFを発現した (データ未掲載)。TAMによって活性化されたCD4⁺ T細胞からのサイトカイン分泌パターンは、TAMがIL-10 + Tr1 T細胞を誘導することを示唆した。TAMもまたIL-17を高レベルで誘導した (bmDC-感作T細胞において $0.7 \pm 0.1 \text{ ng/mL}$ 対TAM-感作T細胞において $1.6 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$) (図8A、右パネル)。

【0113】

それらのT細胞サイトカインがT細胞によって分泌されたことを確認するために、TAM及び他の免疫細胞活性化CD4⁺ T細胞培養 (上記の通りの) は固定され、それぞれの主要サイトカインについて細胞内染色された。簡潔には、TAM、腹腔マクロファージ又はbmDCと共に5日間培養されたT細胞は、 50 ng/mL のPMA及び 750 ng/mL のイオノマイシンで6時間、最後の4時間は $5 \mu\text{g/mL}$ Brefeldin Aを添加して再刺激し、そしてプロッキング試薬及びCD4について表面染色された。細胞は固定され、製造業者の説明書に従ってFast Immune (登録商標) CD4 Intracellular Cytokine Detection Kit (BD) を用いてIL-4、IL-10及びIL-17の細胞内発現について染色された。FACS解析は、実施例1に記載されているように行われた。図8Bに示すように、TAM-感作CD4⁺ T細胞はIL-10及びIL-17を高レベルで、IL-2を低下したレベルで分泌し、この分泌はTAMによるTGF分泌に依存していた。組換えTGF RIの添加によるTGFの中和によって、IL-10 ($27.4 \pm 22.1\%$) 及びIL-17 ($79.4 \pm 9.9\%$) の発現の減少及びIL-2分泌の $259.9 \pm 68.0\%$ の増加が生じた (図8C)。このデータは、上記の所見とともに、TAMがそれらの培養においてIL-10 + Tr1及びIL-17 + CD4⁺ T細胞を誘導しているであろうことを確認した。

TAMが少なくとも一つの特定の調節T細胞サブセットを誘導するであろうことが証明されたので、TAMもまたFoxP3⁺ 調節T細胞を誘導しうるかどうかを決定するために実験が行われた。FoxP3誘導を評価するために、 2×10^4 のTAM、又は、bmDCは、 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C でフィブロネクチン・コーティング付き丸底96穴プレートで、 1×10^5 naive CDSE⁺ T細胞 (CD25⁻ CD69⁻ CD103⁻ CD4⁺ 5Rb^{high} CD62L^{high}) であってFoxP3ネガティブ ($0.3\% \text{ FoxP3}^+$) 及び $0.002 \mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗体と共に培養された。5日間後に、CD4⁺ T細胞による細胞内FoxP3発現はマウス及びラットFoxP3 (eBioscience) に特異的な結合抗体を用いて、製造業者の説明書に従って分析された。結果は、図9に示す。bmDC活性化CD4⁺ T細胞とは対照的に、TAMを処理された培養中の $3.3 \pm 0.9\% \text{ FoxP3}^+$ T細胞の存在によって証明されたように、TAM活性化は調節T細胞

の誘導を支持したのに、b m D Cを処理された培養は $0.8 \pm 0.5\%$ のF o x P 3 + T細胞を示すだけだった(図9 Aを参照)。組換えT G F R I IでのT G F の中和によりT A M処理されたT細胞においてほぼ80% F o x P 3の発現がF o x P 3 + T細胞において $0.7 \pm 0.2\%$ に減少したことから、T A Mで活性化されるT細胞におけるF o x P 3の誘導はT A MによるT G F の産生にも依存していた(図9 B)。

T A M - 誘導F o x P 3 + T細胞が制御能力を有することを確認するために、細胞は自然発生のF o x P 3 + 調節T細胞において発現されることが公知のタンパク質について染色された。他のC D 4 + T細胞と比較して、F o x P 3 + 調節T細胞でG I T Rが高レベルで発現されることが公知だった(McHugh et al., Immunity 16: 311-23, 2002)。T A M - 誘導T細胞もまた高レベルのG I T R発現をしており(図9 C)、それらの細胞が制御能力を有するF o x P 3 + T細胞であることを示唆した。同様に、T A M誘導F o x P 3 + T細胞(およそ6.3%、図9 Dを参照)はC D 1 0 3(インビボで末梢性 - 誘導制御T細胞に発現することが知られているマーカー)を低レベルで発現しており、T A M - 誘導F o x P 3 + T細胞が制御特性を有する制御T細胞であることを示唆する。T A Mが、単離の後でn a i v e T細胞のプールに残っているわずかなF o x P 3 + T細胞の増殖を刺激するだけであるのに対して、F o x P 3 + T細胞を誘導したことを確認するために(0.3%、図10 Aを参照)、C D 4 + T細胞プールにおいて $8.7 \pm 0.2\%$ F o x P 3 + 細胞を含む脾細胞が同じ条件の下で刺激された。図10 Cに示すように、F o x P 3 + T細胞のプールは $2.2 \pm 1.5\%$ に減少しており、T A Mが直接F o x P 3 + 制御C D 4 + T細胞を誘導しうることを示唆した。実験は脾細胞の代わりにT制御細胞を用いて繰り返され、結果は同じであった(図10 Dと10 Cとの比較)。n a i v e C D 4 + T細胞に対する異なる抗原提示細胞の刺激能もまた評価された。図10 Bに示すように、各々のb m D C、T A M及び腹腔マクロファージは、同程度にC F S E標識化n a i v e C D 4 + T細胞を刺激することができた。したがって、T A MによるF o x P 3 + T細胞の誘導は、他の抗原提示細胞と比較してT A MによるT細胞誘導の一般的な増加によるものではない。

【0114】

実施例5：インビボでのT細胞に対するT A Mの作用

前の実施例の組み合わせられたデータは、T A MがインビボでI L - 1 0 + 及びF o x P 3 + 制御T細胞、さらにI L - 1 7 + T H I L - 1 7のC D 4 + T細胞を誘導することを示唆した。このような細胞集団を誘導するインビボでの関連性を評価するために、インビボでのそれらの細胞サブセットの存在及び局在が決定された。P y M T ^t ^g マウスの腋窩及び上腕リンパ節の単個細胞浮遊液は、標準技術を用いて調製された。上述したように、細胞懸濁液は6時間刺激され、C D 4、I L - 4、I L - 1 0及びI L - 1 7に特異的な抗体で染色された。インビボにおけるデータと十分に一致して、I L - 4 - 及びI L - 1 0 + C D 4 + T r 1細胞はインビボで検出され、I L - 1 7 + C D 4 + T細胞(図11 A)も同様に検出された。これらのサイトカインの有意な発現は、年齢を合わせたコントロールF V Bマウスに由来する腋窩及び上腕リンパ節のC D 4 + T細胞では検出されなかった(図11 B)。興味深いことに、全てのサイトカイン産生C D 4 + T細胞は、調査されたサイトカインの一つだけを発現した(すなわち、I L - 1 0又はI L - 1 7のいずれかであって、両方ではない)。

腫瘍モデル・マウス対F V Bマウスにおけるインビボでの制御F o x P 3 + C D 4 + T細胞の発生率の頻度もまた調査された。F o x P 3 + C D 4 + T細胞における有意な増加は、F V Bコントロールと比較して、P y M T ^t ^g マウスの腫瘍 - 流入腋窩及び上腕リンパ節において観察された($8.6 \pm 0.9\%$ 対 $6.3 \pm 1.2\%$ 、 $p = 0.033$) (図11 C)。F o x P 3 + C D 4 + T細胞における有意な増加は、F V Bコントロールと比較して、P y M T ^t ^g マウスの脾臓において観察された($12.3 \pm 5.4\%$ 対 $7.6 \pm 0.5\%$ 、 $p = 0.027$) (図11 C)。F o x P 3 + C D 4 + T r e g細胞の高い頻度は、P y M T ^t ^g マウスの腫瘍において観察された($19.0 \pm 7.8\%$) (図11 C)。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

実施例 6 : T A M は脂肪組織マクロファージに対する類似性を示す

上記の研究により T A M が行うことが示されたが、F 4 / 8 0 + 脂肪組織マクロファージ (A T M) が C D 1 1 c 発現を場合によっては得ることができると最近報告された (L u m e n g e t a l . , J C l i n I n v e s t 1 1 7 : 1 7 5 - 8 4 , 2 0 0 7) 。糖尿病のような特定の疾患が軽度であるが、慢性炎症と関連していることから (N e e l s a n d O l e f s k y , J C l i n I n v e s t 1 1 6 : 3 3 - 5 , 2 0 0 6) 、上記の結果は T A M が腫瘍生物学に寄与することを示唆しているが、T A M 及び A T M 細胞集団の比較は、A T M がこの慢性炎症に寄与するかどうかをより理解するために行われた。

食餌誘発性肥満の C 5 7 B I / 6 雄マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y) は、6 週齢から 6 0 k c a l % 脂肪からなる高脂肪食 (H F D) を 2 0 週間供給されることによってインスリン耐性となった。d B / d B マウス、若い又は年齢が合ったコントロール・マウス (1 0 k c a l % 脂肪からなる標準食事を供給した) もまた得られた。腋窩の及び上腕の腫瘍流入及び鼠蹊部脂質流入領域リンパ節の赤血球溶解した単個細胞浮遊液は、F A C S 解析のために用いられた。簡潔に、n a i v e C D 4 + T 細胞は、F V B 又は C 5 7 B I / 6 コントロール・マウスの脾臓、末梢及び腸間膜のリンパ節の赤血球溶解された単細胞懸濁液から調製された。細胞は、最初 M A C S が減少した C D 2 5 + 、C D 6 9 + 及び C D 1 0 3 + 細胞であり、C D 4 - M i c r o b e a d s (M i l t e n y i B i o t e c h) で濃縮された。最終的に、C D 6 2 L + C D 4 5 R b h i g h C D 2 5 C D 6 9 = C D 1 0 3 = n a i v e C D 4 + T 細胞は、F A C S 選別によって単離された。F A C S 及び R T - P C R 実験は、前の実施例にて説明したように行われた。顕微鏡法研究は、標準技術を用いて、遠心によって組織サンプルから集められる新たに単離された A T M 、T A M 及び腹腔マクロファージについて行われ、ヘマトキシリン - エオジン染色法で染色された。

結果は、図 1 2 に示す。5 ヶ月間の高脂肪食を給餌された雄 C 5 7 B I / 6 マウスは、年齢が合ったコントロール・マウスのように、精巢上体脂肪組織の骨髓性細胞において高い比率を示した (H F D : 3 5 . 9 ± 6 . 7 % (図 1 2 A) ; 年齢が合ったコントロール・マウス : 3 2 . 9 ± 7 . 1 % (データ未掲載)) 。2 ヶ月齢の雄 C 5 7 B I / 6 マウスは、しかしながら、精巢上体脂肪組織の C D 1 1 b + 細胞の有意に低い比率を示した (1 5 . 5 ± 1 1 . 0 % 、n = 4 (データ未掲載)) 。以前の所見を確認すると (L u m e n g e t a l . , J C l i n I n v e s t 1 1 7 : 1 7 5 - 8 4 , 2 0 0 7) 、脂肪組織の F 4 / 8 0 + A T M の 3 2 . 9 ± 6 . 7 % もまた C D 1 1 c を発現することが判明したが (図 1 2 B) 、普通食を給餌された年齢が合ったマウス又は 2 ヶ月齢のマウスの精巢上体脂肪組織から単離されたマクロファージはごくわずかな C D 1 1 c 発現しか示さなかった (データ未掲載) 。更に、A T M は M H C I I を高レベルで、C D 8 6 を低レベルで発現することが見いだされ、T A M の所見と類似していた (図 1 2 B)) 。上の調査において同定されたさらなる T A M 表面マーカーは、A T M 集団において試験された。A T M 及び T A M は C D 1 4 の類似した発現量を有しているが、I C O S L 及び T I M 3 の発現を欠如していることが判明し、その両方は T A M において中程度から強度の発現を示した (図 1 2 C と 1 2 D との比較) 。

特に、2 0 週間の高脂肪食を給餌された雄 C 5 7 B I / 6 マウスから精製された A T M のサイトカイン及びケモカイン・プロファイルは、T A M のそれと類似していた。これらの特定の A T M は I L - 1 0 を高レベルで発現し (0 . 8 4 ± 0 . 0 1 n g / m l 対腹腔マクロファージにおいて観察された 0 . 4 7 ± 0 . 1 8 n g / m l) 、I L - 6 を中間レベルで発現し (1 0 . 9 ± 7 . 9 n g / m l 対腹腔マクロファージにおいて観察される 3 8 . 1 ± 3 0 . 6 n g / m l) 、T N F を低レベルで発現した (0 . 1 3 ± 0 . 0 4 n g / m l 対腹腔マクロファージの 0 . 1 3 ± 0 . 0 6 n g / m l) (図 1 2 E) 。A T M は、高レベルの C C L 2 (5 . 9 ± 1 . 8 n g / m l 対腹腔マクロファージにおいて観察された 4 . 3 ± 2 . 7 n g / m l) 及び C X C L 1 0 (2 3 . 5 ± 8 . 1 n g / m l 対腹腔マクロファージにおいて観察された 2 8 . 7 ± 1 6 . 5 n g / m l) 、低レベルの C C L 3 (0 . 9 7 ± 0 . 5 7 n g / m l 対腹腔マクロファージの検知されない量) 及

10

20

30

40

50

び C C L 5 (0.2 ± 0.2 ng / ml 対腹腔マクロファージにおいて検出できない) を分泌することも見いだされた (図 1 2 E を参照) 。さらに、A T M は、同様のレベルの T G F β 1、及びわずかに低いレベルの T G F β R 1 を発現した (T A M と比較して 3 . 6 倍少ないが、腹腔マクロファージより 4 . 9 倍多い) (図 1 2 F) 。しかしながら、T A M に対する明確な対照として、A T M は R u n x 3 又は I R F - 8 を発現せず (データ未掲載) 、それは A T M におけるランゲリン発現の欠如と相関する。更なる顕微鏡法研究は、A T M 及び T A M の形態が互いに類似しているが、腹腔マクロファージ形態とは異なることを示唆した (図 1 2 G) 。T A M 及び A T M の両方は大きく、小さい核及び大きい空胞のある細胞原形質 (図 1 2 G を参照) を有している。

結果は、F 4 / 8 0 $^{+}$ C D 1 1 c $^{+}$ マクロファージが特殊な微小環境に制限される異なる免疫細胞サブセットでないことを示し、炎症を起こした組織に存在するマクロファージの新規な亜集団を特徴づけた。更に、このマクロファージ亜集団は、それ自体で、異なるサイトカイン発現及び細胞表面マーカー発現を有している少なくとも 2 つの亜型から成る。

【 0 1 1 6 】

実施例 7 : C D 4 $^{+}$ T 細胞に対する A T M の作用

上の実施例は、T A M が F o x P 3 $^{+}$ 制御 T 細胞を誘導しうることを証明した (図 1 0 A を参照) 。同様の実験は、F o x P 3 $^{+}$ C D 4 $^{+}$ T 細胞が肥満の高脂肪食 (H F D) 給餌マウスにおいて増大されたかどうか、更に、A T M が F o x P 3 $^{+}$ 制御 T 細胞を同様に誘導可能であるかどうかを決定するために行われた。

n a i v e F o x P 3 $^{+}$ C D 4 $^{+}$ T 細胞は、それぞれの組織及び抗 C D 3 で活性化された。肥満マウスからの 1×10^4 の脂肪組織マクロファージ (A T M) は、 0.002 μ g / m L 抗 C D 3 (B D Bioscience) 及び 5×10^4 n a i v e C D 4 $^{+}$ T 細胞と共に丸底 9 6 穴プレートに蒔かれ、 200 μ L の最終的な量で培養された L (3 7 、 5 % C O $_2$ で完全 R P M I 1 6 4 0) 。5 日間後に、C D 4 $^{+}$ T 細胞は、採取され、F o x P 3 発現について分析された。

A T M が F o x P 3 $^{+}$ 制御 T 細胞を誘導するかどうかを決定するために、 2×10^4 の C D 1 1 c $^{+}$ A T M、腹腔マクロファージ又は痩せた脂肪組織マクロファージ (L T M) は 1×10^5 n a i v e F o x P 3 $^{+}$ C D 4 $^{+}$ T 細胞及び 0.002 μ g / m l の抗 C D 3 と共に 5 日間培養された。細胞は、その後固定されて F o x P 3 について染色されるか、培養液上清は採取され、I L - 2、I L - 4、I L - 1 0 及び I L - 1 7 の存在を試験された。ヒートマップ解析は、実施例 3 に記載されているように行われた。C C L 2、C C L 3、C C L 5 及び C X C L 1 0 の差次的な発現を確認するために、野生型 F V B マウス又は P y M T t g 由来 T A M からの腹腔マクロファージは、更なる刺激を伴わずに 2×10^6 / m l の濃度で培養された。上清に分泌されるケモカインは、2 1 時間後に分析された。リアルタイム R T - P C R は、実施例 3 に記載されているように行われた。インターロイキン測定値は、実施例 4 に記載されているように行われた。

腫瘍における免疫浸潤と同様に、肥満 H F D マウスからの精巣上体脂肪組織は年齢が合ったコントロールと比較して、かなりより高い割合の F o x P 3 $^{+}$ C D 4 $^{+}$ T 細胞を含んだ (18.5 ± 6.2 % 対コントロールの 7.9 ± 3.7 % ; 図 1 3 I を参照) 。さらにまた、肥満 H F D マウスからの脂肪流入領域リンパ節は、年齢が合ったコントロールと比較して、かなりより高いレベルの F o x P 3 $^{+}$ C D 4 $^{+}$ T 細胞を含んだ (17.2 ± 3.3 % 対コントロールの 13.4 ± 0.6 % ; 図 1 3 J を参照) 。

【 0 1 1 7 】

図 1 3 A に示すように、腹腔マクロファージ又は痩せた脂肪組織マクロファージ以外の C D 1 1 c $^{+}$ A T M は、F o x P 3 $^{+}$ 制御 T 細胞を誘導し得た (活性化 n a i v e T 細胞の 8.3 ± 1.7 % ; 左パネルと、中心及び右パネルとの比較) 。このインビトロでのデータは、インビボ・データによって更に裏づけられた。腫瘍を有するマウスにおいて観察されるように、増加したレベルの F o x P 3 $^{+}$ 制御 T 細胞が肥満 D b / D b マウスの脾臓 (23.6 ± 1.6 % 対コントロールにおいて 14.4 ± 1.6 %) 及び精巣上体脂肪

10

20

30

40

50

組織 ($24.9 \pm 6.2\%$ 対コントロールの $8.5 \pm 1.3\%$) $CD4^+$ T細胞において検出され (13C 図及び 13D)、ATM は出現率が増加することが知られている。ATM が制御 T細胞の分化にとって重要なことが前に示されたサイトカインである TGF- β 1 を発現することは公知であるので、このサイトカインの ATM の FoxP3 $^+$ 細胞誘導に対する影響が評価された。アッセイへの TGF-RII-Fc の取り込みによる TGF の遮断は、 $CD11c^+$ ATM によってほぼ完全に FoxP3 $^+$ T細胞の誘導を抑制した (活性化 naive T細胞の $2.2 \pm 0.1\%$) (図 13B)。

T細胞の他の型を誘導する $CD11c^+$ ATM の能力もまた評価された。図 13E に示すように、 $CD11c^+$ ATM 活性化 naive T細胞は、FoxP3 $^+$ 制御 T細胞集団を含まれるだけでなく、Tr1 及び TH17 サイトカイン・プロファイルを示した。特に、 $CD11c^+$ ATM 活性化 naive T細胞は、IL-10 を高レベルで分泌し (0.5 ± 0.1 ng/ml 対腹腔マクロファージで活性化された T細胞における 0.6 ± 0.15 ng/ml)、超低レベルの IL-2 (0.02 ± 0.01 ng/ml 対腹腔マクロファージで活性化された T細胞の 0.1 ± 0.04 ng/ml) 及び IL-4 (0.1 ± 0.03 ng/ml 対腹腔マクロファージで活性化された T細胞における 0.1 ± 0.03 ng/ml) を分泌した。更に、ATM は T細胞において発現される IL-17 を高レベルで誘導した (1.6 ± 0.6 ng/ml 対腹腔マクロファージで活性化された T細胞における 3.4 ± 0.2 ng/ml)。ATM-誘導 T細胞培養試料の FACS 解析は、ATM が naive T細胞培養から Tr1 及び TH17 T細胞への誘導を刺激することを確認した (図 13F)。さらに、 $CD11c^+$ ATM で刺激された naive T細胞は、TNF- α 、IL-5 及び IL-13 の有意な量を分泌した (図 16B)。PyMT $^+$ マウスについての上記の実験の結果への類似性において、増大したレベルの IL-10 ($1.0 \pm 0.2\%$ 対コントロールにおける $0.3 \pm 0.1\%$) 及び IL-17 ($0.6 \pm 0.2\%$ 対コントロールにおける $0.3 \pm 0.1\%$) の産生細胞は、コントロール・マウスと比較して高脂肪食を給餌された肥満マウスの脂肪流入領域リンパ節において検出された (13G 図及び 13H)。 $CD11c^+$ ATM 及び $CD11c^+$ TAM は炎症性条件下で同様に機能するようだったにもかかわらず、PCA 解析は、ATM 及び TAM が組織マクロファージ中の異なる細胞集団であることを明らかにした (図 17)。

TAM が、反対の文献報告にもかかわらず、標準的な M1 又は M2 マクロファージ・カテゴリーに適合しないことは、上記実施例に示した (実施例 3 を参照)。文献は ATM が M1 表現型を表示することを示唆した (Lumeng et al., J Clin Invest 117: 175-84, 2007)。事実、ここで示される結果は ATM が IL-10、TGF- β 1 及び IL-1RA を分泌することを示唆し、M2 表現型の典型的な特徴である Mgl1、Mgl2、CD14 及び CD163 を発現する。これらの結果も、ATM が抑制性制御 T細胞及び炎症性 TH17 細胞の産生を誘導することを明瞭示し、TAM と同様に、ATM が M1 及び M2 マクロファージ・クラスの特性に及んでいる。

【0118】

実施例 8: $CD11c^+$ ATM 及び $CD11c^-$ ATM 間の機能的相違

実施例 3 に示すように、TAM は特徴的なサイトカイン発現プロファイルを示す。 $CD11c^-$ 及び $CD11c^+$ ATM のサイトカイン発現プロファイルが調べられた。 $CD11c^+$ 及び $CD11c^-$ ATM は、上記の通りに食餌誘発性肥満の C57BI/6 雄マウスからの精製され、それぞれの細胞集団における特定のサイトカイン及びケモカイン・タンパク質の産生は 21 時間の培養後に評価された。FACS 解析は、実施例 1 に記載されているように行われた。ATM は、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で RPMI 1640 培地において 2×10^6 / mL の濃度で、21 時間フィブロネクチン・コーティング付き丸底 96 ウェルプレートにおいて培養された。上清中に分泌されるサイトカインは、ルミネックス解析によって検出された。結果は、図 18 に記載される。 $CD11c^-$ ATM は、 $CD11c^+$ ATM と比較して、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、IL-6、IL-10、TNF- α 及び G-CSF のより高い発現量を示した。しかしながら、 $CD11c^+$ ATM は、 $CD11c^-$ ATM より高い VEGF の発現量を示した。M-CSF、IL-1

b、MIG/CXCL9、MIP-2/CXCL2、RANTES及びKC/CXCL1レベルはCD11c⁻ATM及びCD11c⁺ATMの間で同程度であり、CD11c⁻ATMもCD11c⁺ATMもIL-1a又はeotaxinを発現しなかった(データ未掲載)。異なるサイトカイン発現プロファイルに基づいて、このデータは、CD11⁻ATM及びCD11⁺ATMがおそらく異なる生理機能を有する異なる細胞集団であることを更に示している。

実施例4に記載されているように、TAMは、naive T細胞集団からFoxP3⁺T細胞を誘導する。CD11c⁻ATM及びCD11c⁺ATMのT細胞-感作潜在性を調査するために、 1×10^4 CD11c⁻又はCD11c⁺ATMは、200 μ Lの最終量で0.5 μ g/mL抗CD3及び 5×10^4 naive CD4⁺T細胞と共に丸底96穴プレートで培養された。ATM及びnaive T細胞の生存を促進するために、96穴プレートは、あらかじめ組換えマウスのフィブロネクチンでコーティングされるか、組換えヒトIL-2が培養に添加された。5日間後に、上清は採取され、解析まで-80で保存された。上清のサイトカイン及びケモカインは、サイトカインELISAによって、解凍された上清中に後に検出された(Lincoplex(登録商標)キット(Linco)、製造業者の説明書)。CD4 naive T細胞のサイトカイン産生の評価のために、流入領域リンパ節の単個細胞浮遊液又は培養細胞は、最後の4時間はBrefeldin Aを添加して、6時間のPMA/イオノマイシンで再刺激された。染色の前に、細胞は適切な血清又は精製されたIgGでブロックされた。収集はPI除外(表面染色)を含み、FACS Calibur又はLSRIIで行われ(Becton Dickinson)、JoFloソフトウェア(Tree Star)で解析された。

結果は、図19A及び19Bに表される。CD11c⁻ATMは、非刺激T細胞と比較して、IL-4、TNF、CCL5、IFN及びIL-17発現の軽度の増加及びIL-13、IL-10及びIL-5発現の非常に大きな増加(IL-6発現は25倍以上の増加)をT細胞に誘導した。CD11c⁺ATMは、非刺激T細胞と比較して、IL-4、IL-13、IL-10、TNF、CCL5及びIFN発現のわずかな増加、及びIL-17及びIL-6発現のより大きい増加(IL-6発現は30倍以上の増加)をT細胞に誘導した。CD11c⁻ATMを誘導されたT細胞及びCD11c⁺ATMを誘導されたT細胞間のサイトカイン/ケモカイン発現量パターンの比較により、CD11c⁺ATM-誘導細胞よりも、CD11c⁻ATM誘導細胞が実質的により増大したIL-10及びIL-13の発現、同程度のIL-4、TNF、CCL5及びIFNの発現及びより少ないIL-17及びIL-6の発現を示すことが証明された(図19A及び19Bを参照)。この結果は、CD11c⁻ATM及びCD11c⁺ATMが異なる生理機能を有する2つの異なる細胞集団であることを更に証明する。

【0119】

実施例9：ATMによるTh1対Th2細胞の誘導

樹状細胞がTh1又はTh2細胞に分化するためにCD4⁺T細胞を活性化する方法は、その表面にあるC型レクチン分子のnaive CD4⁺T細胞との相互作用によるものである。例えばSIGN-R1及びDC-SIGNなどの特定のC-typeレクチンは、Th2細胞の誘導に偏っている(Wieland et al., *Microbes Infect.* (2007) 9:134-41; Soilleux et al., *J. Pathol.* (2006) 209: 182-9; Bergman et al., *J. Exp. Med.* (2004) 200: 979-90; Ryan et al., *J. Immunol.* (2002) 169: 5638-48;及び't Hart and van Kooyk, *Trends Immunol.* (2004) 7: 353-359)。ATMがマクロファージ及び樹状細胞の両方の特徴を有していることから、ATMによるこれら特定のC型レクチンの発現が調査された。簡潔には、CD11c⁺ATM及びCD11c⁻ATM細胞集団のDC-SIGN(CD209a)、SIGN-R1(CD209b)及びSIGN-R2(CD209c)のmRNA発現のマイクロアレイ解析は、実施例2に記載されているように、マイクロアレイ解析を用いて行われた。ATM細胞の混合集団におけるSIGN-R1タンパク質発現のFACS解析は、実施例1に記載されるプロトコルに従って行われた。

CD11c⁻ATM及びCD11c⁺ATMについての様々なC型レクチンのmRNA

発現のマイクロアレイ解析は、 $CD11c^+ATM$ よりも $CD11c^-ATM$ がDC-SIGN、SIGN-R1及びSIGN-R2 mRNAを有意に多く発現することを明らかにした(図20Aを参照)。発現タンパク質に関するFACS調査は、正常な食事を給餌された8-週齢の正常BI6マウス(すなわち、非肥満性マウス)のリンパ節から得られた免疫細胞が有意な数のSIGN-R1を発現する $CD11^-$ 細胞を含むことを示した(図20B、左パネル)。しかしながら、高脂肪食を24週間給餌されたBI6マウス(すなわち肥満マウス)からの試料は、10%未満がSIGN-R1を発現する $CD11c^+$ 細胞を実質的により多く含んだ(図20B、右パネル)。同時に、このデータは、HFDを給餌されたマウスにおいて炎症性ATM($CD11c^+DC-SIGN^-$)細胞集団は増加し、抗炎症性ATM($CD11c^-DC-SIGN^+$)細胞集団は減少することを示唆する。

【0120】

実施例10：異なるATM集団によるT-細胞感作

$CD11c^-ATM$ 及び $CD11c^+ATM$ のT細胞-感作潜在性は、 1×10^4 $CD11c^-$ 及び $CD11c^+ATM$ を200 μ Lの最終量で0.5 μ g/mL抗CD3及び 5×10^4 naive $CD4^+$ T細胞と共に丸底96穴プレートで培養することにより調査された。ATM及びnaive T細胞の生存を促進するために、96穴プレートは、あらかじめ組換えマウスのフィブロネクチンでコーティングされるか、組換えヒトIL-2が培養に添加されてもよい。SIGN-R1シグナリングは、10 μ g/mL抗SIGN-R1又は10 μ g/mL組換えヒトICAM-3の添加によってブロックされる。5日間の増殖の後、培養液上清は、採取され、解析まで-80 で保存される。上清のサイトカイン及びケモカインは、前の実施例に記載されているように、サイトカインELISAによって、解凍された上清において検出することができる(すなわち、製造業者の説明書につきLincoplex(登録商標)キットを用いる)。

【0121】

まとめると、これらの実験は、TAMがプロフェッショナル免疫寛容原性APCの表現型を示し、 $IL-10^+Tr1$ 、 $FoxP3^+$ 制御T細胞及び $TH17$ T細胞を誘導できることを示す。TAMはATMの特定の表現型及び機能的類似性を共有しており、多様な炎症性条件の下で、組織マクロファージがTAMに類似した特徴を得る(が、際立った特徴を保持する)ことを示唆する。ATM及びTAM間の共通性は、マウス及びヒトにおける肥満と発癌との間に観察される相互関係(Yakar et al., *Endocrinology* 147(12): 5826-34, 2006; Calle et al., *N Engl J Med* 348(17): 1625-38, 2003)、及び乳癌(Wolf et al., *Lancet Oncol.* 6(2): 103-11, 2005)の10-20%上昇するリスクと2型糖尿病との相互関係を説明するのに役立つ。両方の疾患において、軽度であるが慢性的な炎症には患部組織のマクロファージの顕著な蓄積が付随し(Balkwill and Mantovani, *Lancet*, 357(9255): 539-45, 2001; Neels and Olefsky, *J Clin Invest* 116: 33-5, 2006)、研究は慢性炎症及び腫瘍発達のいずれか(Mantovani et al., *Immunol Today* 13: 265-70, 1992; Pollard, *Nat Rev Cancer* 4: 71-8, 2004)、又はインシュリン耐性(Kamei et al., *J Biol Chem* 281: 26602-14, 2006; Weisberg et al., *J Clin Invest* 116(1): 115-24, 2006; Arkan et al., *Nat Med* 11: 191-8, 2005)に伴う増加した数の組織マクロファージに関連していた。同様に、 $CD11c^+F4/80^+$ 骨髄性DCの存在は、他の慢性炎症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)において記載されていた(Ponomarev et al., *J Neurosci Res* 81: 374-89, 2005; Fischer and Reichmann, *J Immunol* 166: 2717-26, 2001; Miller et al., *Ann N Y Acad Sci* 1103: 179-91, 2007)。示された免疫細胞が樹状細胞であると著者が述べているにもかかわらず、上記実施例からの結果からみて、それらは活性化マクロファージのようであった。更に、軽度であるが持続性の炎症を有する肺組織において見いだされる常在組織マクロファージのサブセットである肺胞マクロファージは、 $CD11c$ を発現することもまた見いだされた(Padilla et al., *J Immunol* 174(12): 8097-105, 2005; Fulton et al., *Infect Immun* 72(4): 2101-10, 2004)。F4/80発現がそれらの肺胞マクロファージにまだ示されなかったにもか

かわらず、肺胞の微小環境は炎症誘発性及び抗炎症性サイトカインが豊富であり、前の実験からの結果からみて、組織常在性マクロファージのこの特殊なサブセットの分化を誘導しているかもしれない。

【 0 1 2 2 】

(文献の部分的なリスト)

- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M.: IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11: 191-8, 2005
- Bailey, S. L., Schreiner, B., McMahon, E. J., and Miller, S. D.: CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* 8: 172-80, 2007 10
- Balkwill, F., Mantovani, A.: Inflammation and cancer: back to Virchow ?, *Lancet* 2001, 357(9255): 539-45
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., and Banham, A. H.: Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24: 5373-80, 2006
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K.: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-8, 2006 20
- Beyer, M. and Schultze, J. L.: Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108: 804-11, 2006
- Bingle, L., Brown, N. J., and Lewis, C. E.: The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196: 254-65, 2002
- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G., and Udey, M. C.: A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184: 2417-22, 1996
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M. J.: Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults, *N Engl J Med* 2003, 348(17): 1625-38 30
- Chen, S., Luo, D., Streit, W. J., and Harrison, J. K.: TGF-beta1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. *J Neuroimmunol* 133: 46-55, 2002
- Chen, S., Tuttle, D. L., Oshier, J. T., Knot, H. J., Streit, W. J., Goodenow, M. M., and Harrison, J. K.: Transforming growth factor-beta1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1alpha-stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1 entry in human monocyte-derived macrophages. *Immunology* 114: 565-74, 2005 40
- Chen, X., Baumel, M., Mannel, D. N., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J.: Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 179: 154-61, 2007
- Cho, H. J., Shashkin, P., Gleissner, C. A., Dunson, D., Jain, N., Lee, J. K., Miller, Y., and Ley, K.: Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics* 29: 149-60, 2007
- Choudhury, R. P., Lee, J. M., Greaves, D. R.: Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005, 2 (6): 309-15
- Cua, D. J. and Kastelein, R. A.: TGF-beta, a 'double agent' in the immune pathol 50

ogy war. *Nat Immunol* 7: 557-9, 2006

Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., and Zou, W.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10: 942-9, 2004

Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R., and Pulendran, B.: Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8: 1086-94, 2007

Fain, J. N., Tichansky, D. S., and Madan, A. K.: Transforming growth factor beta 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism* 54: 1546-51, 2005

Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negraneanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S., and Groner, Y.: Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *Embo J* 23: 969-79, 2004

Fischer, H. G. and Reichmann, G.: Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166: 2717-26, 2001

Flegal, K. M., Graubard, B. I., Williamson, D. F., Gail, M. H.: Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *Jama* 2007, 298(17): 2028-37

Fulton, S. A., Reba, S. M., Pai, R. K., Pennini, M., Torres, M., Harding, C. V., Boom, W. H.: Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun* 2004, 72(4): 2101-10

Gordon, S.: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003, 3(1): 23-35

Hardy, C. L. and Balducci, L.: Hemopoietic alterations of cancer. *Am J Med Sci* 290: 196-205, 1985

Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J. C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G. F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G. K., Niesner, U., de la Rosa, M., Schmidt, C. A., Brauer, R., Buer, J., Scheffold, A., and Hamann, A.: Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 199: 303-13, 2004

Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shiple, J. M., Senior, R. M., and Shibuya, M.: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2: 289-300, 2002

Jaksits, S., Kriehuber, E., Charbonnier, A. S., Rappersberger, K., Stingl, G., and Maurer, D.: CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J Immunol* 163: 4869-77, 1999

Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kawatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R., and Kadowaki, T.: Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281: 26602-14, 2006

Kaplan, D. H., Jenison, M. C., Saeland, S., Shlomchik, W. D., and Shlomchik, M. J.: Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23: 611-20, 2005

10

20

30

40

50

- Karin, M.: Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441: 431-6, 2006
- Kelly, P. M., Davison, R. S., Bliss, E., and McGee, J. O.: Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer* 57: 174-7, 1988
- Kissenpfennig, A. and Malissen, B.: Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol* 27: 132-9, 2006
- Lee, J. H., Yu, H. H., Wang, L. C., Yang, Y. H., Lin, Y. T., and Chiang, B. L.: The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 148: 53-63, 2007 10
- Leek, R. D., Harris, A. L., and Lewis, C. E.: Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 56: 423-35, 1994
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A.: Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13031-6, 2002
- Leong, P. P., Mohammad, R., Ibrahim, N., Ithnin, H., Abdullah, M., Davis, W. C., and Seow, H. F.: Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett* 102: 229-36, 2006 20
- Lewis, C. E. and Pollard, J. W.: Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66: 605-12, 2006
- Lewis, J. S., Landers, R. J., Underwood, J. C., Harris, A. L., and Lewis, C. E.: Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 192: 150-8, 2000
- Lewis, C. and Murdoch, C.: Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 167: 627-35, 2005
- Liang, C. P., Han, S., Senokuchi, T., and Tall, A. R.: The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. *Circ Res* 100: 1546-55, 2007
- Lin, E. Y., Jones, J. G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K. D., Muller, W. J., and Pollard, J. W.: Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* 163: 2113-26, 2003 30
- Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., and Pollard, J. W.: Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193: 727-40, 2001
- Lin, E. Y. and Pollard, J. W.: Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90: 2053-8, 2004
- Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N., and Pollard, J. W.: Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66: 11238-46, 2006 40
- Lin, W. W. and Karin, M.: A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117: 1175-83, 2007
- Liyanaage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Lindehan, D. C.: Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169: 2756-61, 2002
- Luhn, K., Simmons, C. P., Moran, E., Dung, N. T., Chau, T. N., Quyen, N. T., Thao, T. T., Van Ngoc, T., Dung, N. M., Wills, B., Farrar, J., McMichael, A. J., 50

- Dong, T., and Rowland-Jones, S.: Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med* 204: 979-85, 2007
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R.: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-84, 2007
- Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H., and Jonuleit, H.: Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80: 477-83, 2002
- Mantovani, A.: Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* 71: 5-16, 1994
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L.: The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13: 265-70, 1992 10
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A.: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549-55, 2002
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M.: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol* 2004, 25 (12): 677-86
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A.: Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 23: 315-22, 2006 20
- Marshall, N. A., Christie, L. E., Munro, L. R., Culligan, D. J., Johnston, P. W., Barker, R. N., and Vickers, M. A.: Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 103: 1755-62, 2004
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., Byrne, M. C.: CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16: 311-23, 2002
- Miller, S. D., McMahon, E. J., Schreiner, B., and Bailey, S. L.: Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 1103: 179-91, 2007 30
- Murdoch, C., Giannoudis, A., Lewis, C. E.: Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104(8): 2224-34, 2001
- Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C. E.: Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104: 2224-34, 2004
- Neels, J. G. and Olefsky, J. M.: Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 116: 33-5, 2006
- Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M. T., Kolls, J. K., and Sasaki, H.: IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 175: 6177-89, 2005 40
- O'Sullivan, C. and Lewis, C. E.: Tumour-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. *J Pathol* 172: 229-35, 1994
- Padilla, J., Daley, E., Chow, A., Robinson, K., Parthasarathi, K., McKenzie, A. N., Tschernig, T., Kurup, V. P., Donaldson, D. D., Grunig, G.: IL-13 regulates the immune response to inhaled antigens, *J Immunol* 2005, 174(12): 8097-105 Pollard, J. W.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4: 71-8, 2004 50

- Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., and Dittel, B. N.: Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81: 374-89, 2005
- Rad, R., Brenner, L., Bauer, S., Schwendy, S., Layland, L., da Costa, C. P., Reindl, W., Dossumbekova, A., Friedrich, M., Saur, D., Wagner, H., Schmid, R. M., and Prinz, C.: CD25⁺/Foxp3⁺ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology* 131: 525-37, 2006
- Raes, G., Brys, L., Dahal, B. K., Brandt, J., Grooten, J., Brombacher, F., Vanham, G., Noel, W., Bogaert, P., Boonefaes, T., Kindt, A., Van den Bergh, R., Leenen, P. J., De Baetselier, P., and Ghassabeh, G. H.: Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 77: 321-7, 2005
- Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh Gh, G.: Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71: 597-602, 2002
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K.: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212: 28-50, 2006
- Sadhu, C., Ting, H. J., Lipsky, B., Hensley, K., Garcia-Martinez, L. F., Simon, S. I., and Staunton, D. E.: CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J Leukoc Biol* 81: 1395-403, 2007
- Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P., and Bronte, V.: Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 53: 64-72, 2004
- Schiavoni, G., Mattei, F., Borghi, P., Sestili, P., Venditti, M., Morse, H. C., 3rd, Belardelli, F., and Gabriele, L.: ICSBP is critically involved in the normal development and trafficking of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Blood* 103: 2221-8, 2004
- Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M., and Tokura, Y.: Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* 103: 449-57, 2001
- Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P., and Bronte, V.: Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 53: 64-72, 2004
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., and Allavena, P.: Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42: 717-27, 2006
- Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C.: Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711, 2003
- Takahashi, H., Numasaki, M., Lotze, M. T., and Sasaki, H.: Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* 98: 189-93, 2005
- Tsunemi, S., Iwasaki, T., Imado, T., Higasa, S., Kakishita, E., Shirasaka, T., and Sano, H.: Relationship of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *Aids* 19: 879-86, 2005
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecq, S., and Saeland, S.: Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules.

Immunity 12: 71-81, 2000

Wan, Y. Y. and Flavell, R. A.: The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 212: 114-30, 2006

Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., and Murphy, K. M.: Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24: 677-88, 2006

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-808, 2003

Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L., Ferrante, A. W., Jr.: CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006, 116(1): 115-24

Wolf, I., Sadetzki, S., Catane, R., Karasik, A., Kaufman, B.: Diabetes mellitus and breast cancer 2005, 6(2): 103-11

Woolf, E., Brenner, O., Goldenberg, D., Levanon, D., and Groner, Y.: Runx3 regulates dendritic epidermal T cell development. *Dev Biol* 303: 703-14, 2007

Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J. F., Goswami, S., Stanley, E. R., Segall, J. E., Pollard, J. W., and Condeelis, J.: Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 67: 2649-56, 2007

Xu, D., Fu, J., Jin, L., Zhang, H., Zhou, C., Zou, Z., Zhao, J. M., Zhang, B., Shi, M., Ding, X., Tang, Z., Fu, Y. X., and Wang, F. S.: Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 177: 739-47, 2006

Yakar, S., Nunez, N. P., Pennisi, P., Brodt, P., Sun, H., Fallavollita, L., Zhao, H., Scavo, L., Novosyadlyy, R., Kurshan, N., Stannard, B., East-Palmer, J., Smith, N. C., Perkins, S. N., Fuchs-Young, R., Barrett, J. C., Hursting, S. D., LeRoith, D.: Increased tumor growth in mice with diet-induced obesity: impact of ovarian hormones. *Endocrinology* 2006, 147(12): 5826-34

Yamashiro, S., Takeya, M., Nishi, T., Kuratsu, J., Yoshimura, T., Ushio, Y., Takahashi, K.: Tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte-derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. *Am J Pathol* 145: 856-67, 1994

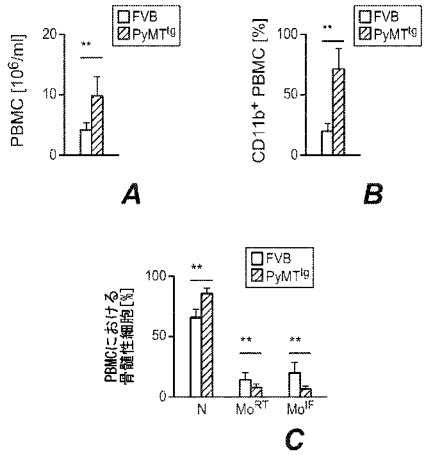
Yang, D., Howard, O. M., Chen, Q., and Oppenheim, J. J.: Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol* 163: 1737-41, 1999

10

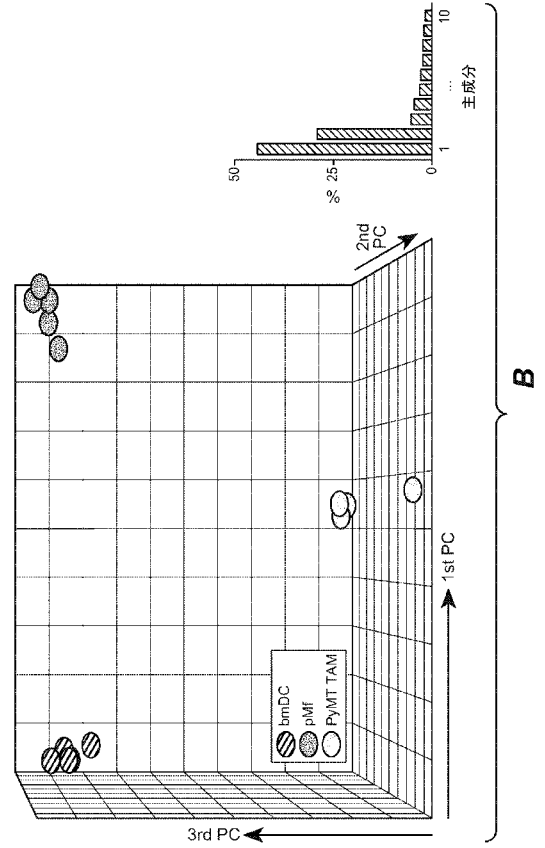
20

30

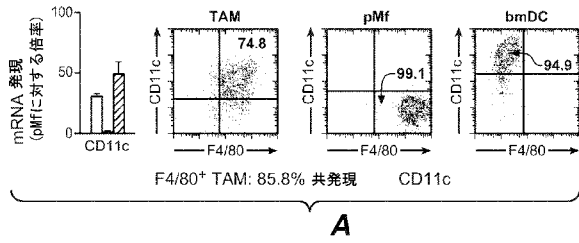
【 図 2 】



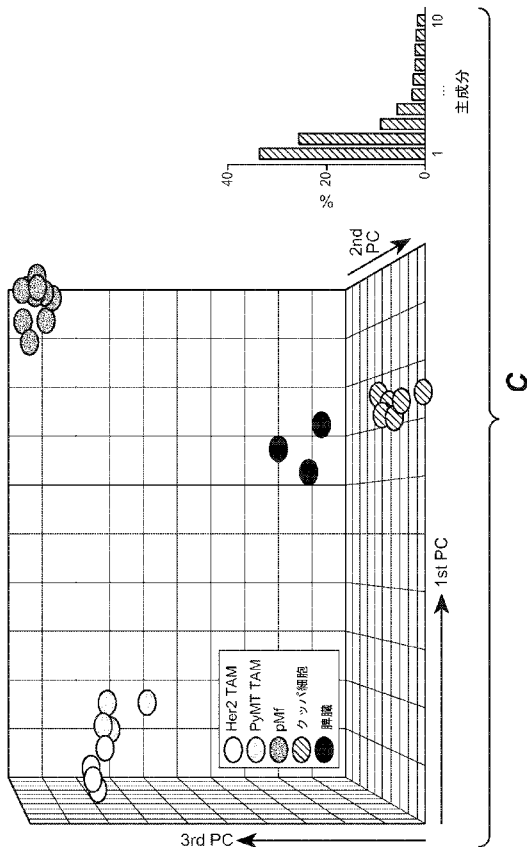
【 図 5 - 2 】



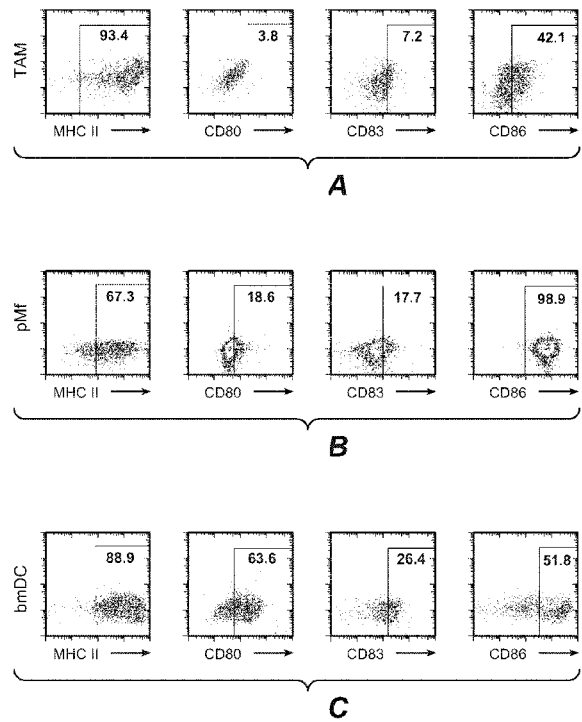
【 図 3 - 1 】



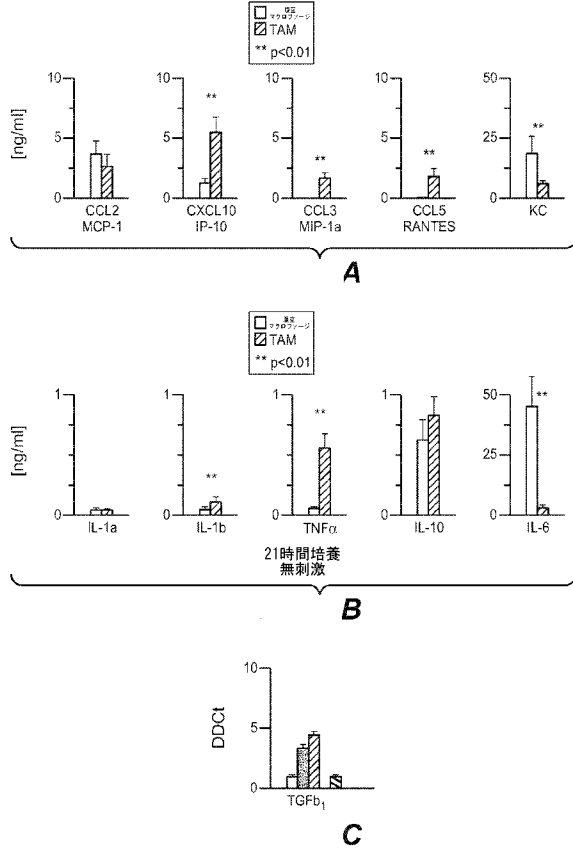
【 図 5 - 3 】



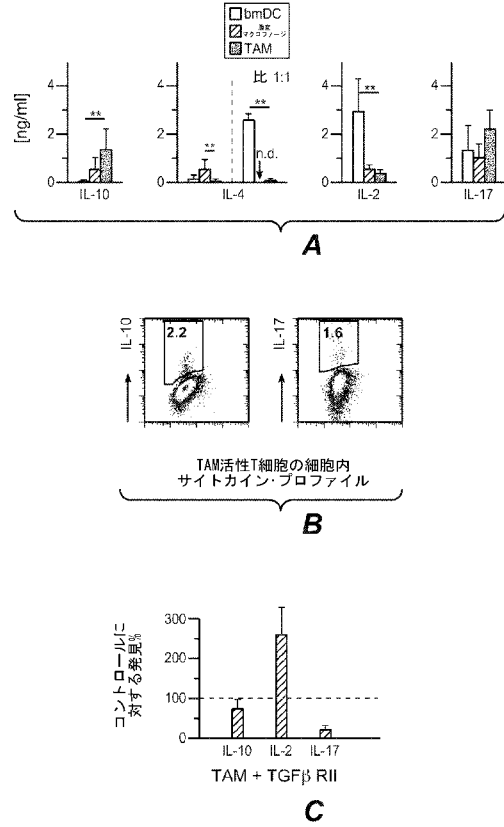
【 図 6 】



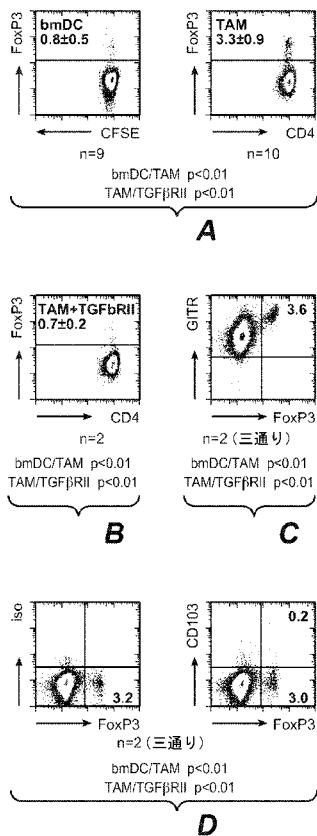
【 図 7 】



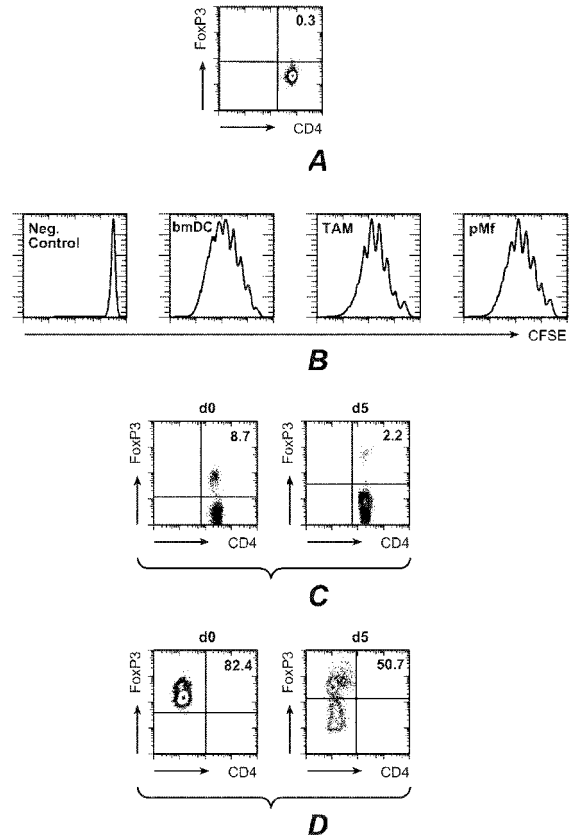
【 図 8 】



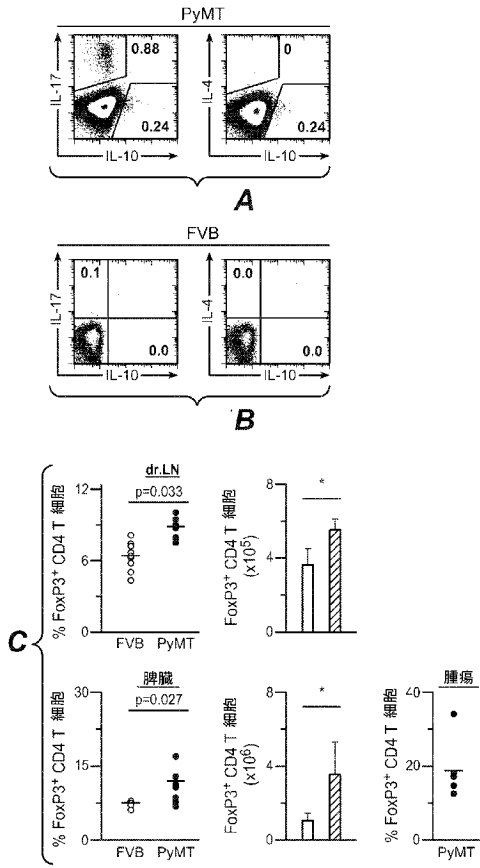
【 図 9 】



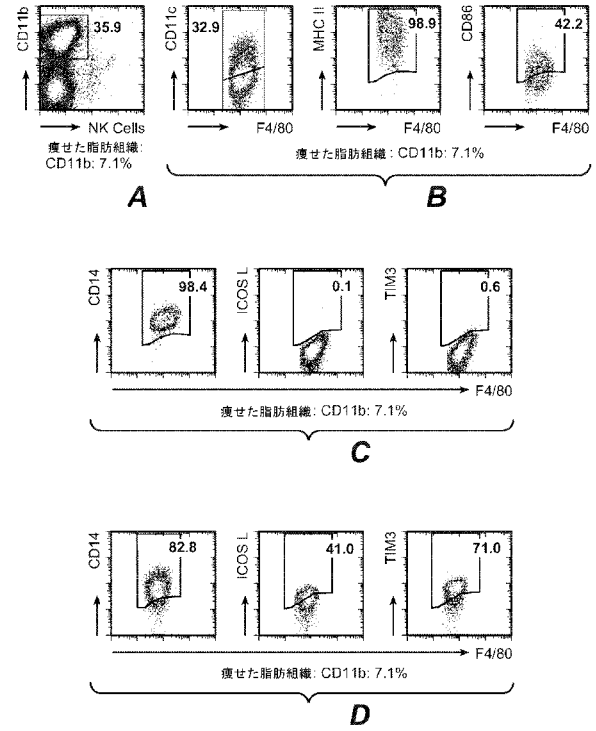
【 図 10 】



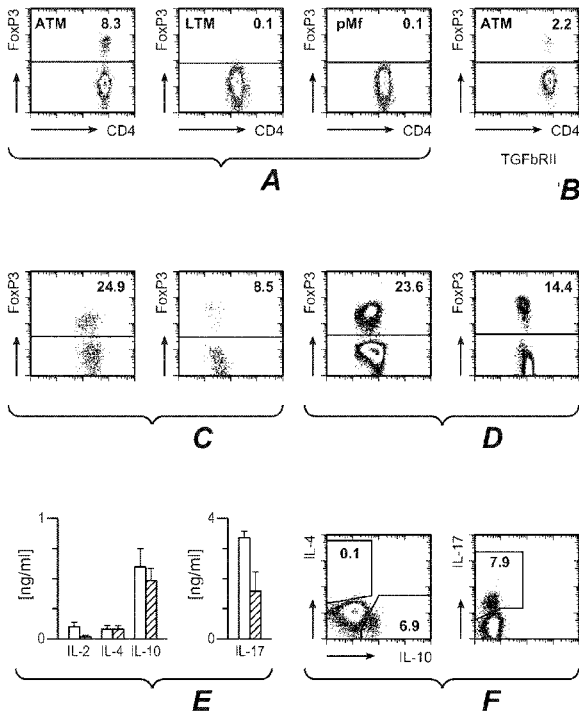
【 図 1 1 】



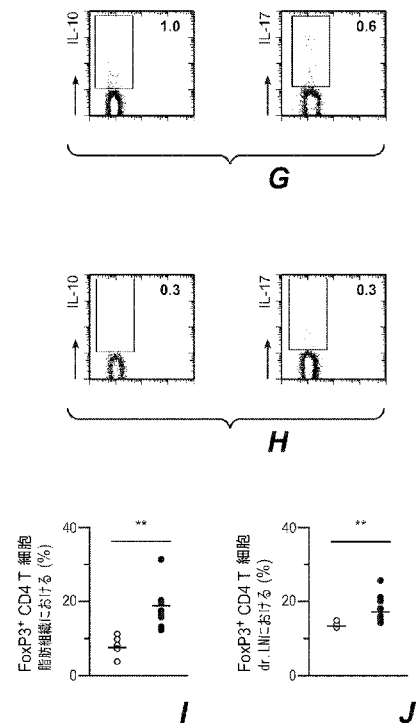
【 図 1 2 - 1 】



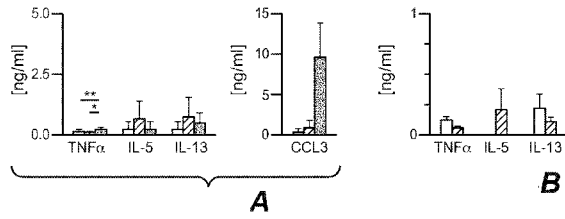
【 図 1 3 - 1 】



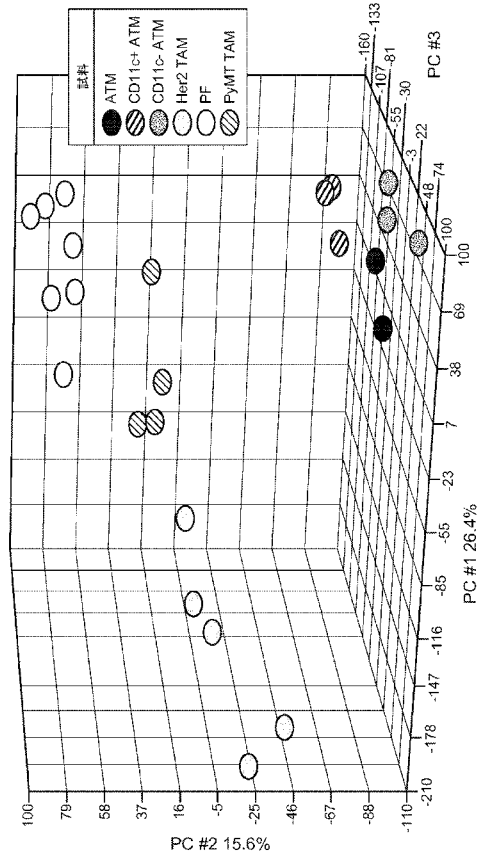
【 図 1 3 - 2 】



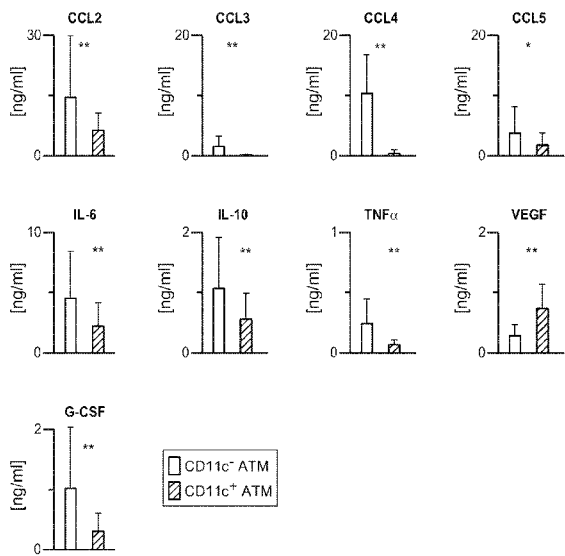
【 図 1 6 】



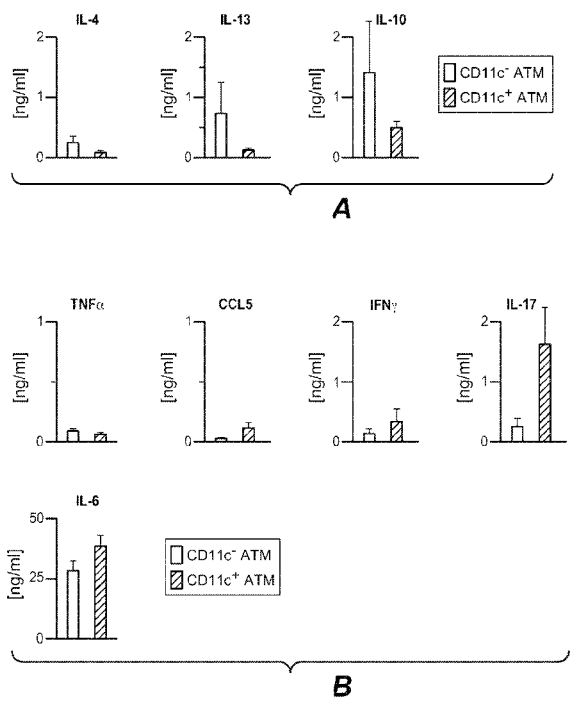
【 図 1 7 】



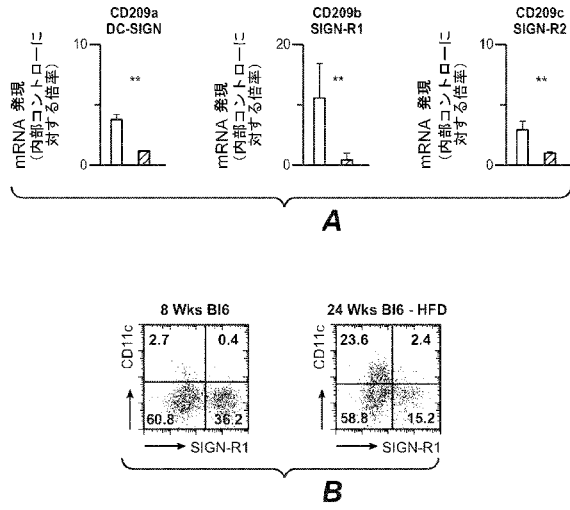
【 図 1 8 】



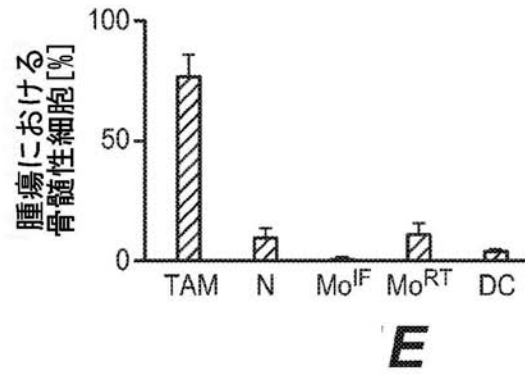
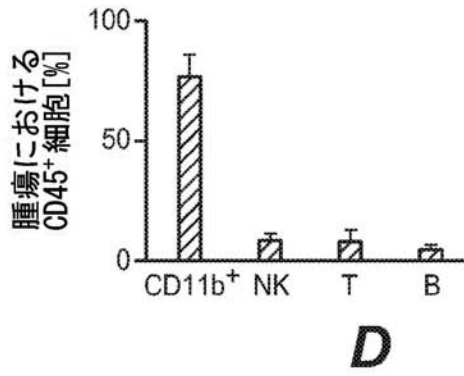
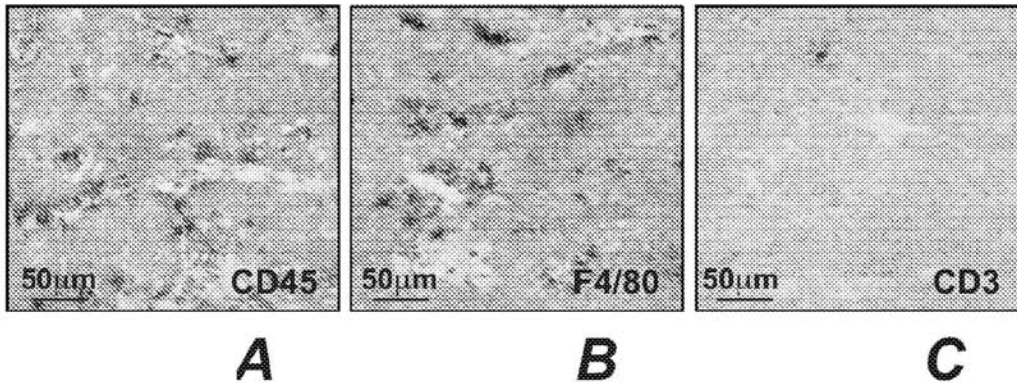
【 図 1 9 】



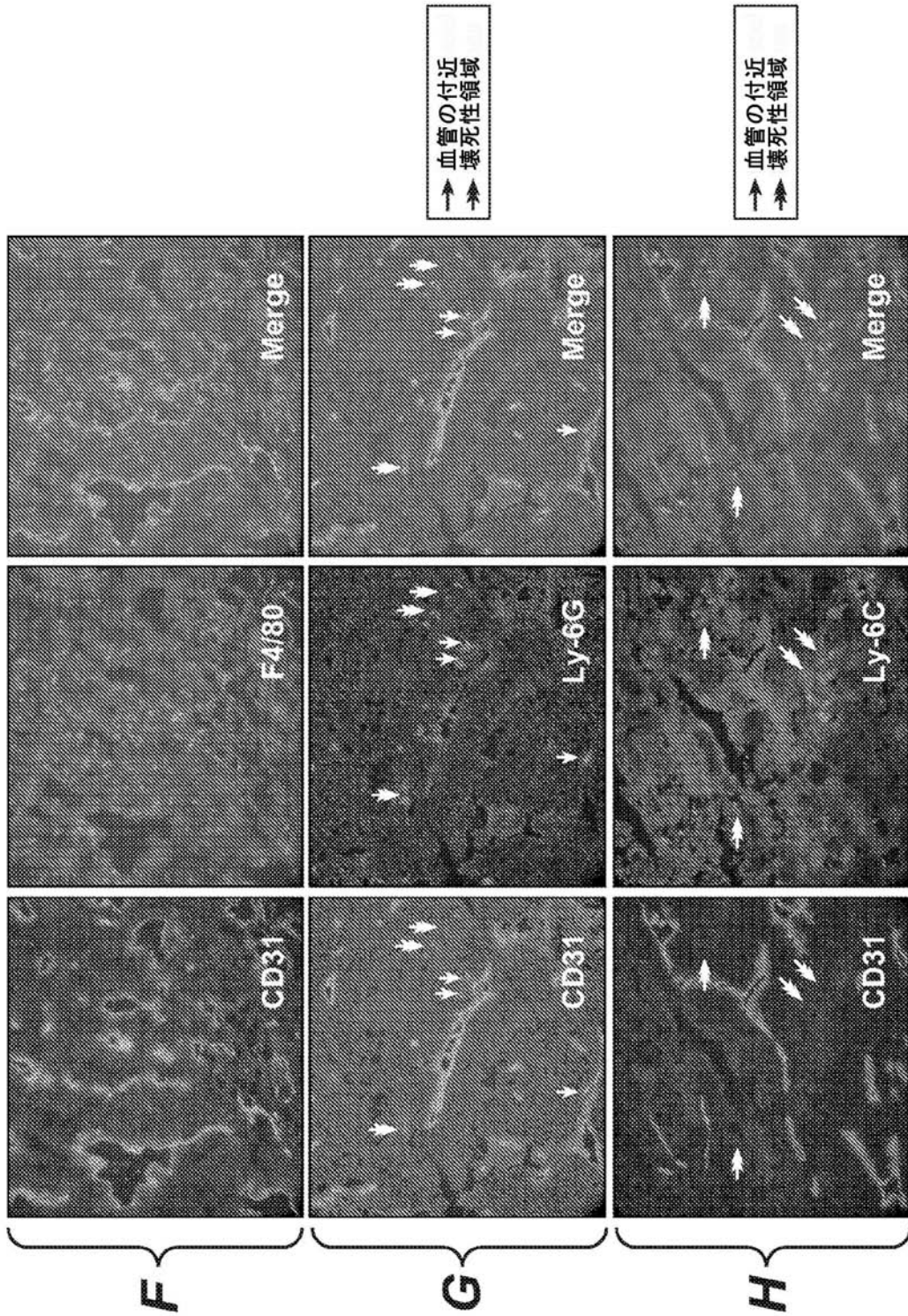
【 図 2 0 】



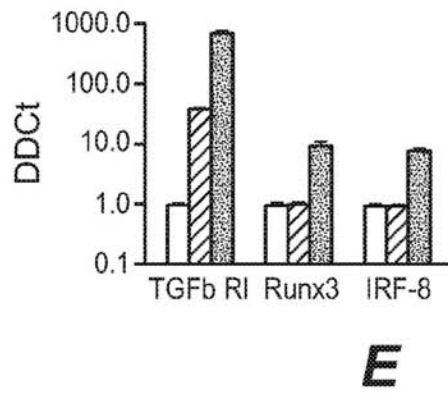
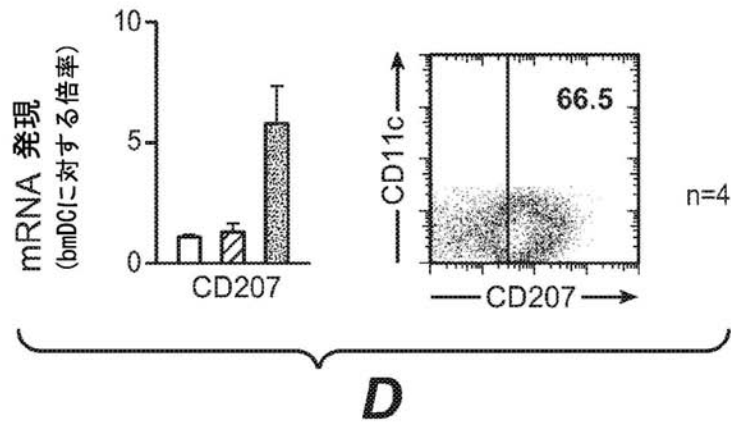
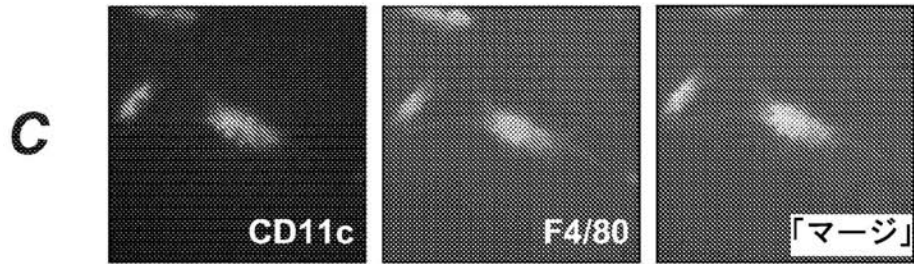
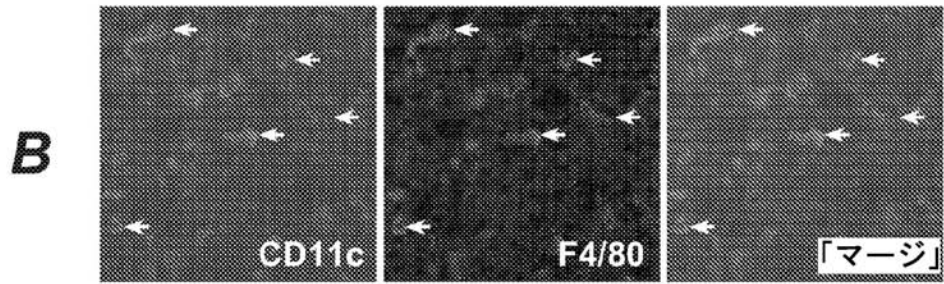
【 図 1 - 1 】



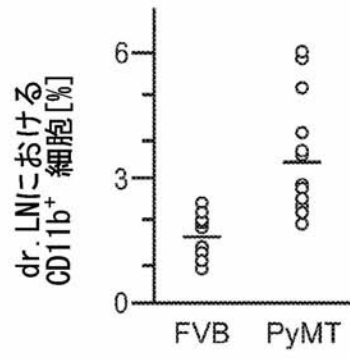
【 図 1 - 2 】



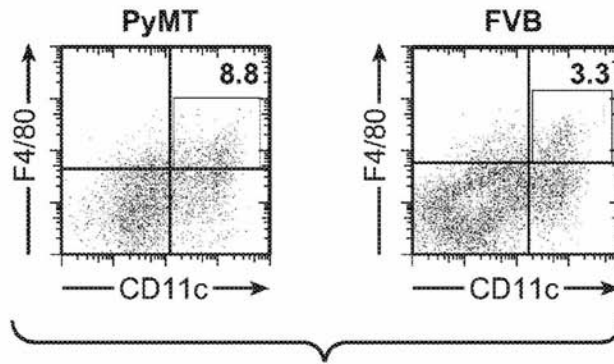
【図 3 - 2】



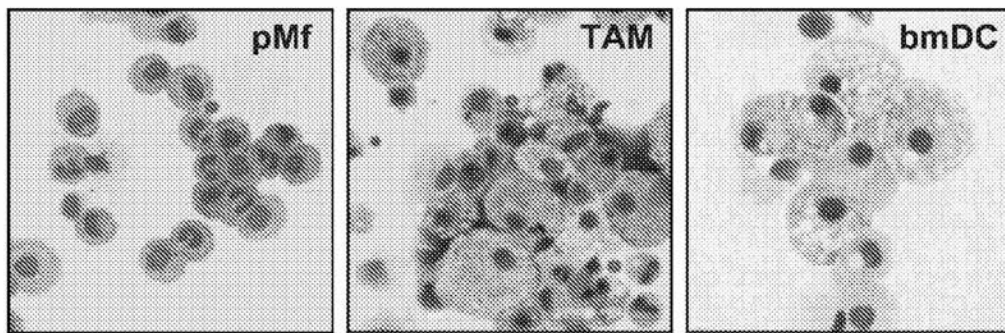
【 図 4 】



A

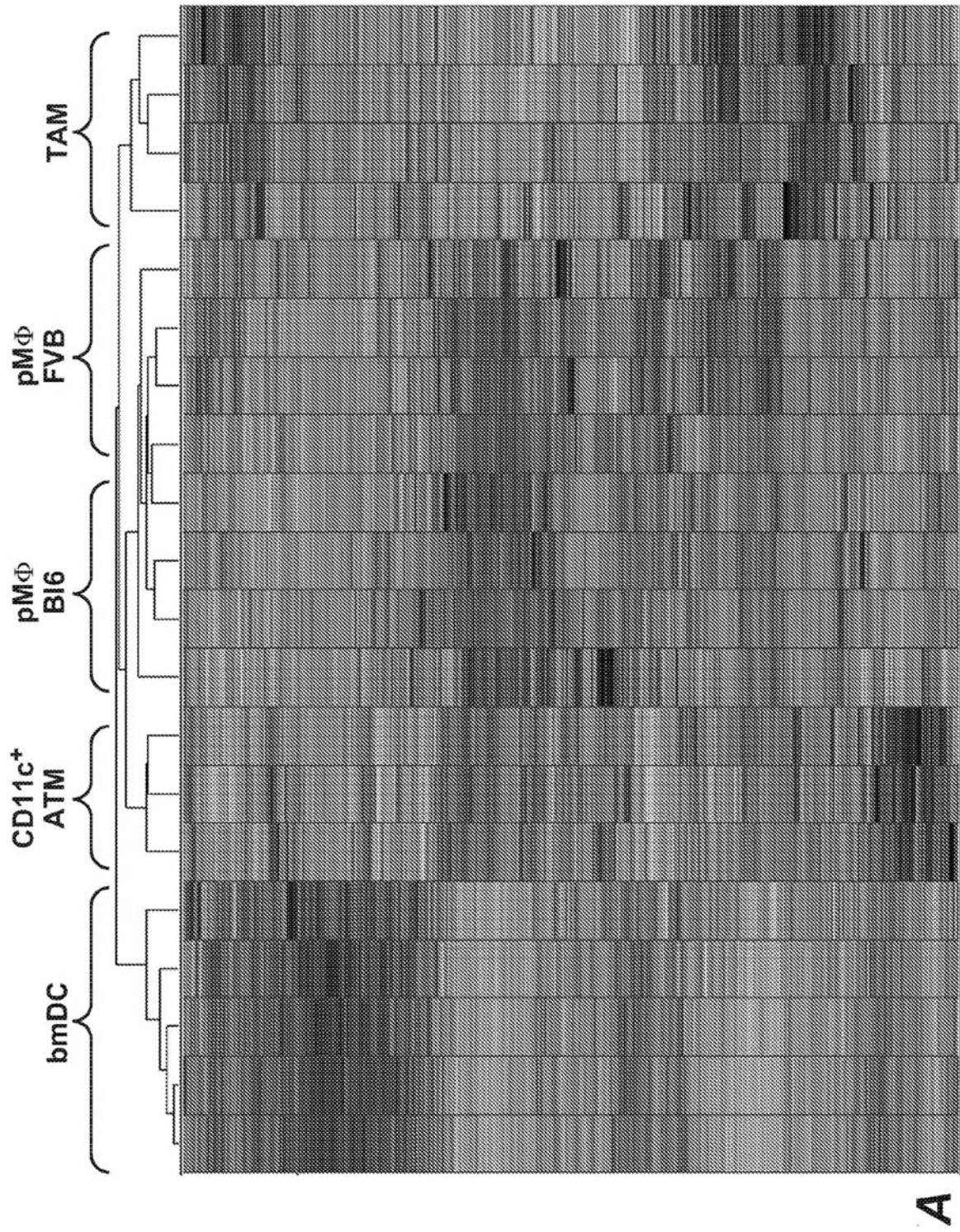


B

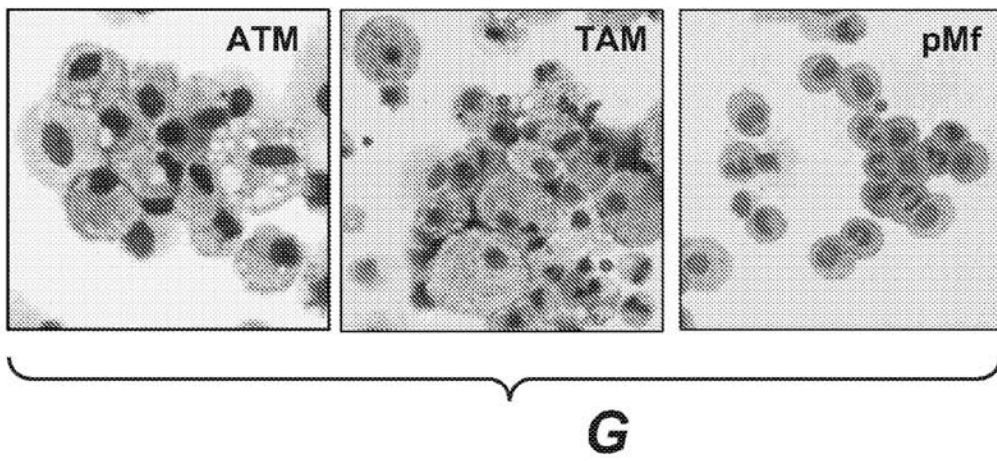
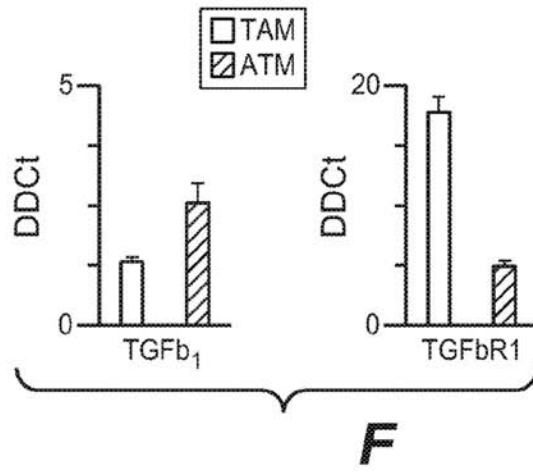
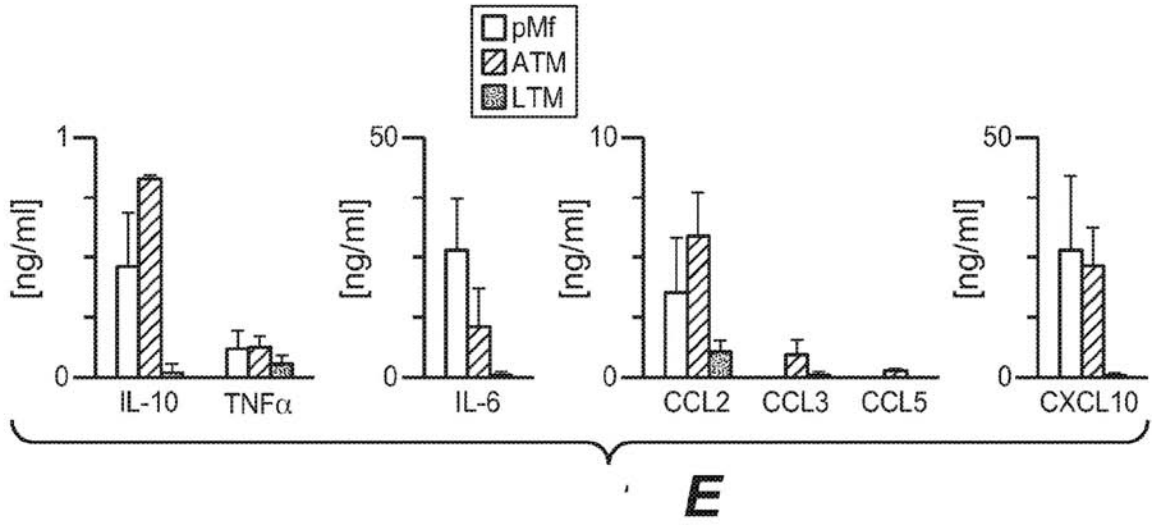


C

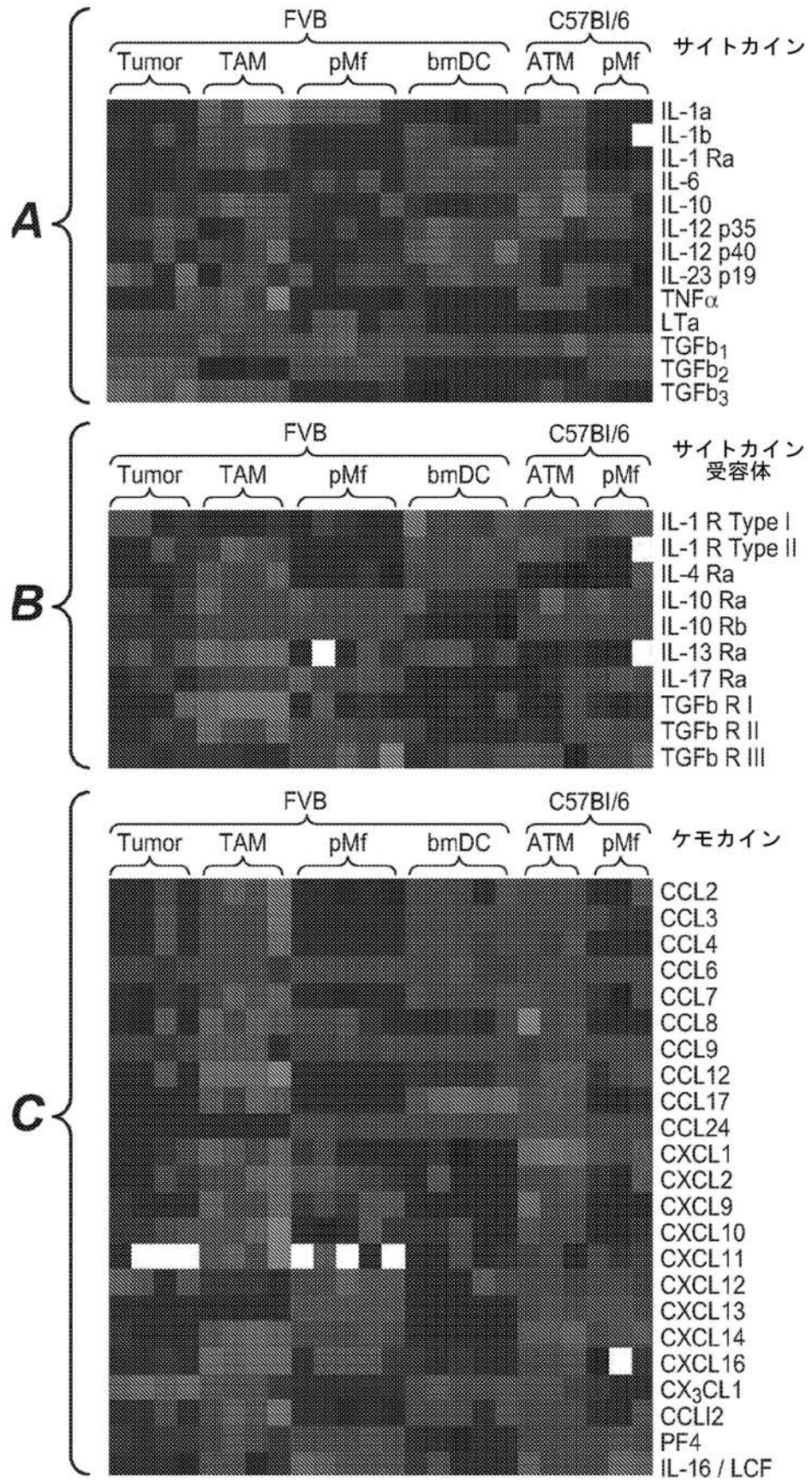
【 図 5 - 1 】



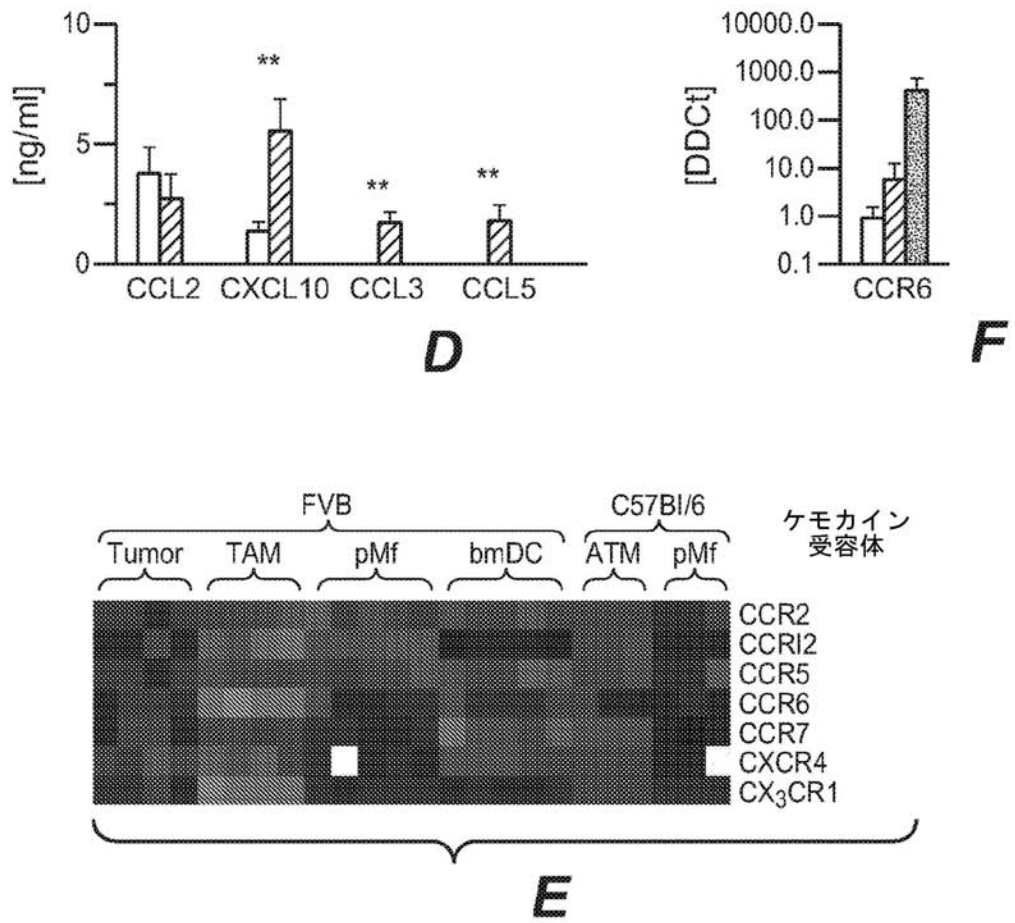
【 図 1 2 - 2 】



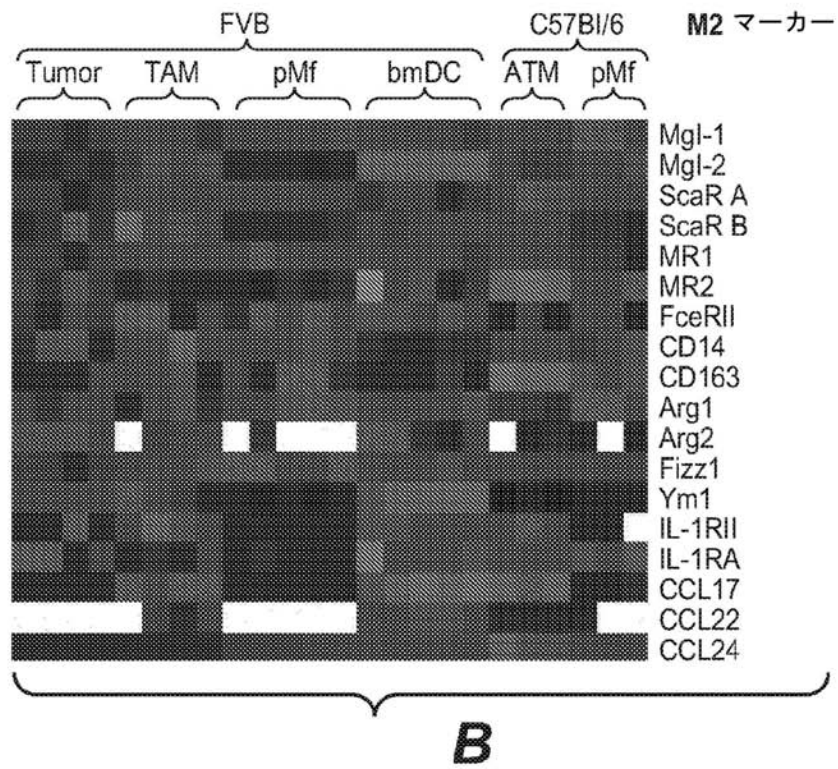
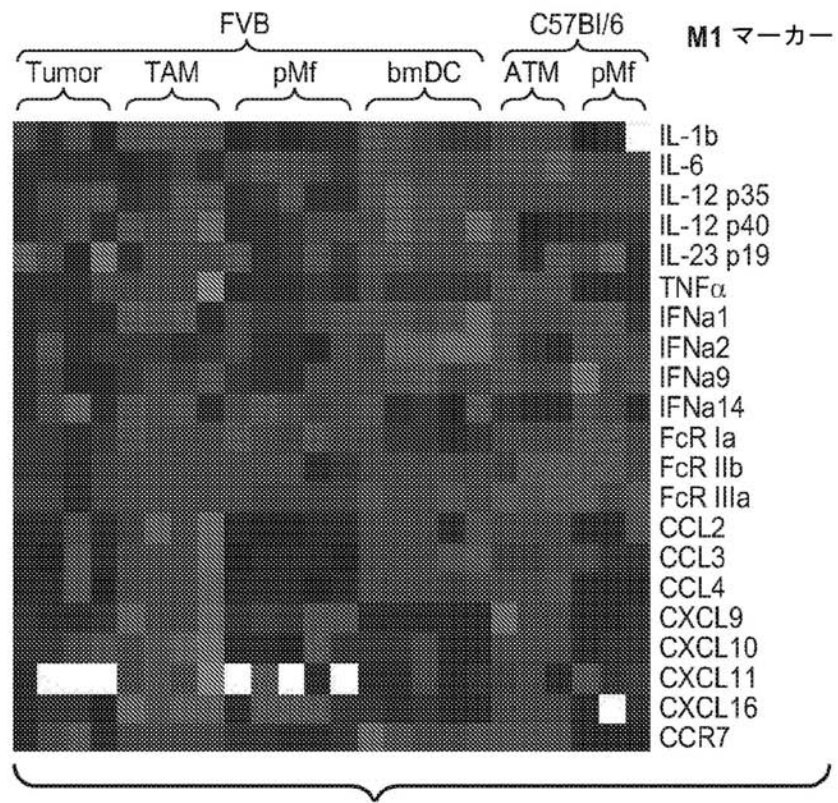
【 図 1 4 - 1 】



【 図 1 4 - 2 】



【 図 1 5 】



【 配 列 表 】

2010533866000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/069807		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P29/00 A61P35/00 G01N33/569 G01N33/574 A61K39/00		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRUNDY MARTIN A ET AL: "NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo." CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY : CII AUG 2007, vol. 56, no. 8, December 2006 (2006-12), pages 1153-1161, XP002508526 ISSN: 0340-7004 figure 1; materials and methods published online 08-12-2006 ----- -/--	1-8,10, 12-19, 25-26, 35-36, 41-56, 63-78, 82, 88-103
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> 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		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 2 June 2009		Date of mailing of the international search report 06/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Behrens, Ralf

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/069807

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>APOLLONI E ET AL: "Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 DEC 2000, vol. 165, no. 12, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 6723-6730, XP002508527 ISSN: 0022-1767 abstract; p.6725 col.1; table 1</p>	<p>1-8, 10-56, 63-78, 82, 88-103</p>
X	<p>PETERS WENDY ET AL: "CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 JUN 2004, vol. 172, no. 12, 15 June 2004 (2004-06-15), pages 7647-7653, XP002508528 ISSN: 0022-1767 p.7650; figure 6; p.7652 col.2 par.2</p>	<p>1-8,10, 12-19, 25-26, 35-36</p>
X	<p>LUMENG CAREY N ET AL: "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION JAN 2007, vol. 117, no. 1, January 2007 (2007-01), pages 175-184, XP002508529 ISSN: 0021-9738 abstract; figures 1,2,8; p.175 col.2 last par.</p>	<p>1-8,10, 12-19, 25-26, 35-36, 82, 88-103</p>
X,P	<p>DUPRÉ SALLY A ET AL: "The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci." INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY OCT 2007, vol. 88, no. 5, October 2007 (2007-10), pages 351-360, XP002508530 ISSN: 0959-9673 abstract</p>	<p>1-3,6-8, 10, 12-14, 17-19</p>
A	<p>LIN YINLING ET AL: "Myeloid marker expression on antiviral CD8+ T cells following an acute virus infection." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY OCT 2003, vol. 33, no. 10, October 2003 (2003-10), pages 2736-2743, XP002508531 ISSN: 0014-2980 introduction</p>	<p>1-8, 10-40</p>

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2008/069807

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI XINGYA ET AL: "Phenotypic and immunoregulatory characteristics of monocytic iris cells." IMMUNOLOGY APR 2006, vol. 117, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 566-575, XP002508532 ISSN: 0019-2805 abstract; p.570	1-8, 10-40
X	SICA ET AL: "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 42, no. 6, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 717-727, XP025104455 ISSN: 0959-8049 p.721 col.2; figure 4; p.723	41-56, 63-79, 81,104, 106
X	DUFF ET AL: "Analysis of Gene Expression in the Tumor-Associated Macrophage" JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH, ACADEMIC PRESS INC., SAN DIEGO, CA, US, vol. 142, no. 1, 27 June 2007 (2007-06-27), pages 119-128, XP022208408 ISSN: 0022-4804 abstract; table 1A; p.123 col.2	41-56, 63-78
X	MANTOVANI A ET AL: "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 25, no. 12, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 677-686, XP004628806 ISSN: 1471-4906 figures 1 & 3; p.684 col.1 first par.	41-56, 63-78
X	CURIEL TYLER J ET AL: "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." NATURE MEDICINE SEP 2004, vol. 10, no. 9, September 2004 (2004-09), pages 942-949, XP002523105 ISSN: 1078-8956 abstract; p.946; discussion	79,81, 104,106

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2008/069807

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ZEYDA M ET AL: "Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production." INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY, vol. 31, no. 9, 26 June 2007 (2007-06-26), pages 1420-1428, XP002523106 ISSN: 0307-0565 abstract; introduction; p.1421 col.1 first par.</p>	82, 88-103
X	<p>NEELS JAAP G ET AL: "Inflamed fat: what starts the fire?" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 116, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 33-35, XP002523107 ISSN: 0021-9738 cited in the application p.34 col.3 par.2; figure 1; p.35 col.1 par.2</p>	82, 88-103

International Application No. PCT/US2008/069807

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 80, 83-87, 105

For claims 80, 83-87 and 105 the non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that a meaningful search could not be carried out (Article 17(2)(a)(ii) PCT). The description does not provide a clear and sufficient disclosure in the sense of Articles 5 and 6 PCT for any such claimed compound.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/069807**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.: 80, 83-87, 105
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:
1-7, 10 (all in part), 8, 11 (entirely), 12-19 (all in part), 20-56
63-106 (entirely)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest 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.

International Application No. PCT/US2008 /069807

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 10 (all in part), 8, 11 (entirely), 12-19 (all in part), 20-40 (entirely)

Methods of identification of macrophages according to claims 1, 20-21, 30-31, wherein the macrophage is a TAM (tumour-associated macrophage).

2. claims: 1-7, 10 (all in part), 9 (entirely), 12-19 (all in part)

Methods of identification of macrophages according to claims 1 and 12, wherein the macrophage is an ATM (adipose tissue macrophage).

3. claims: 41-56, 63-78 (entirely)

Method of treating a tumour, including inhibition of tolerance towards tumours, in a subject according to claims 41 and 63.

4. claims: 57-62 (entirely)

Method of treating an autoimmune disorder according to claim 57.

5. claims: 79-81, 104-106 (entirely)

A method for selectively inducing growth and/or proliferation of at least one of FoxP3+ CD4+ T regulatory cells, IL-10+ CD4+ Tr1 cells, and / or inflammatory TH17 cells according to claim 104.

6. claims: 82-103 (entirely)

Method of treating an inflammatory disorder according to claim 82.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G 0 1 N 33/533 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	V
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/533	
	G 0 1 N 33/574	Z

(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 ヨアキム, レーマン

スイス国 シーエイチ - 4 0 5 3 パーゼル, グンデルディンガーシュトラッセ 8 7

(72) 発明者 コルマム, ガネシュ エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 3, サン マテオ, ロバータ ドライヴ 1 7 8 8

F ターム(参考) 4C084 AA20 NA14 ZA36 ZB07 ZB11 ZB26 ZB27 ZC35

4C085 AA13 AA14 DD62 DD63 EE01 GG01

专利名称(译)	治疗和诊断癌症，炎症疾病和自身免疫性疾病的方法		
公开(公告)号	JP2010533866A	公开(公告)日	2010-10-28
申请号	JP2010517084	申请日	2008-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ゴドウスキーポールジェー ヨアキムレーマン コルマムガネシュエー		
发明人	ゴドウスキー, ポール ジェー. ヨアキム, レーマン コルマム, ガネシュ エー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 A61K45/00 A61K45/06 A61P37/00 A61P29/00 A61P35/02 A61P3/10 A61P9/10 G01N33/533 G01N33/574		
CPC分类号	A61P3/10 A61P9/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/06 G01N33/5055 G01N33/57415		
FI分类号	G01N33/53.K A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61K45/00 A61K45/06 A61P37/00 A61P29/00 A61P35/02 A61P3/10 A61P9/10 G01N33/53.V G01N33/53.D G01N33/533 G01N33/574.Z		
F-TERM分类号	4C084/AA20 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01		
优先权	60/959726 2007-07-13 US 61/003499 2007-11-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用靶向肿瘤相关巨噬细胞活性的疗法治疗癌症的方法。还提供了使用与肿瘤相关的巨噬细胞和脂肪组织巨噬细胞的疗法来治疗癌症，炎症和自身免疫性疾病的方法。

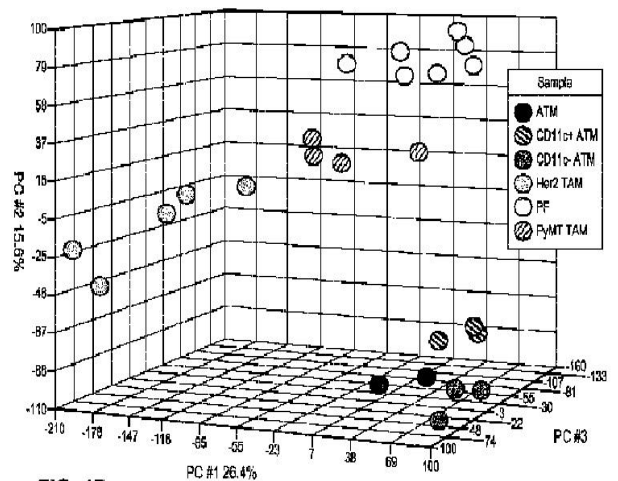


FIG. 17