(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2015-530359
(P2015-530359A)
(43)公表日　平成27年10月15日(2015.10.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B024
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAC	4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C085
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 101 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-521668 (P2015-521668)
(86)(22)出願日　平成25年7月3日 (2013.7.3)
(85)翻訳文提出日　平成27年3月6日 (2015.3.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/049368
(87)国際公開番号　WO2014/011489
(87)国際公開日　平成26年1月16日 (2014.1.16)
(31)優先権主張番号　61/669,967
(32)優先日　平成24年7月10日 (2012.7.10)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/702,916
(32)優先日　平成24年9月19日 (2012.9.19)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500039463
ボード・オブ・リージエンツ，ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国、テキサス・７８７０１、オーステイン、ウエスト・セブンス・ストリート・２０１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　モルドレム，　ジェフリー
アメリカ合衆国　テキサス　７７０３０，ヒューストン，　ホルコム　ブールバード　１５１５，　ユニット　０９００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】がんおよび自己免疫疾患の診断および治療に使用するためのモノクローナル抗体

(57)【要約】
本明細書には、がん細胞表面上におけるＨＬＡ提示との関連で、ＨＬＡ－Ａ２拘束性ペプチドＰＲ－１を認識する抗体の配列が記載されている。がんおよび免疫関連疾患の診断および処置におけるこれらの抗体の使用も提供される。さらにまたさらなる実施形態では、自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、上記のとおりの抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該自己免疫疾患は、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ‐ストラウス症候群または全身性小血管血管炎であり得る。

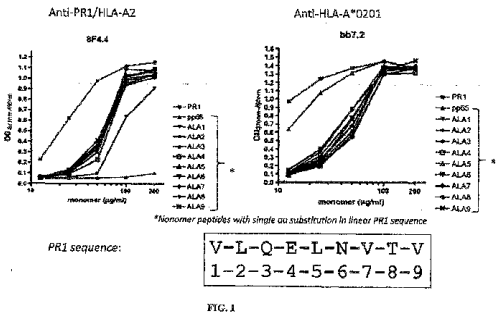


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＨＬＡ－Ａ２受容体に結合されるとＶＬＱＥＬＮＶＴＶ（配列番号４５）に結合する単離および精製された抗体であって、配列番号３、４および５を含む重鎖ＣＤＲと、配列番号８、９および１０を含む軽鎖ＣＤＲとを有する、単離および精製された抗体。
【請求項２】
マウス抗体である、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
一本鎖抗体または二重特異性抗体である、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
非抗体ペプチドまたはポリペプチドセグメントに融合されている、請求項１に記載の抗体。
【請求項５】
診断試薬に連結されている、請求項１に記載の抗体。
【請求項６】
前記診断試薬が、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬である、請求項５に記載の抗体。
【請求項７】
治療試薬に連結されている、請求項１に記載の抗体。
【請求項８】
前記治療試薬が、サイトカイン、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子である、請求項７に記載の抗体。
【請求項９】
ヒト化抗体である、請求項１に記載の抗体。
【請求項１０】
前記ヒト化抗体が、配列番号３８および３６または配列番号４０および３６ならびに配列番号４０および４２の軽鎖／重鎖配列を有する、請求項１に記載の抗体。
【請求項１１】
配列番号８、９および１０によってコードされる軽鎖ＣＤＲをコードする、核酸。
【請求項１２】
配列番号７または配列番号１２をコードする、請求項１１に記載の核酸。
【請求項１３】
配列番号２３または配列番号２５をコードする、請求項１１に記載の核酸。
【請求項１４】
前記軽鎖ＣＤＲをコードする前記核酸の５’側に位置するプロモーター配列をさらに含む、請求項１１に記載の核酸。
【請求項１５】
前記プロモーターが真核細胞内で活性である、請求項１４に記載の核酸。
【請求項１６】
前記プロモーターが原核細胞内で活性である、請求項１４に記載の核酸。
【請求項１７】
複製可能なベクター内に配置されている、請求項１１に記載の核酸。
【請求項１８】
前記複製可能なベクターが非ウイルスベクターである、請求項１７に記載の核酸。
【請求項１９】
前記複製可能なベクターがウイルスベクターである、請求項１７に記載の核酸。
【請求項２０】
前記ＣＤＲコードセグメント間に位置するリンカーコードセグメントをさらに含む、請求項１１に記載の核酸。

【請求項２１】
前記リンカーコードセグメントの１つ以上が、ヘリックス－ターン－ヘリックスモチーフをコードする、請求項２０に記載の核酸。
【請求項２２】
配列番号３、４および５の配列を含むＣＤＲを含む重鎖コードセグメントを含み、配列番号８、９および１０の配列を含むＣＤＲを含む軽鎖コードセグメントを含む、人工抗体。
【請求項２３】
前記ＣＤＲが合成リンカーによって連結されている、請求項２２に記載の人工抗体。
【請求項２４】
前記重鎖が非抗体ペプチドまたはポリペプチドセグメントに融合されている、請求項２２に記載の人工抗体。
【請求項２５】
診断試薬に連結されている、請求項２２に記載の人工抗体。
【請求項２６】
前記診断試薬が、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬である、請求項２５に記載の人工抗体。
【請求項２７】
治療試薬に連結されている、請求項２２に記載の人工抗体。
【請求項２８】
前記治療試薬が、サイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、好中球エラスターゼ、プロテイナーゼ３、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子である、請求項２７に記載の人工抗体。
【請求項２９】
前記軽鎖が配列番号７、配列番号１２、配列番号２３もしくは配列番号２５を含み、および／または前記重鎖が配列番号３６もしくは配列番号４２を含む、請求項２２に記載の人工抗体。
【請求項３０】
抗体を作製する方法であって、（ａ）（ｉ）配列番号３、４および５に示されるＣＤＲを含む重鎖をコードする核酸配列、および（ｉｉ）配列番号８、９および１０に示されるＣＤＲを含む軽鎖をコードする核酸配列を宿主細胞に導入すること；ならびに（ｂ）該軽鎖および重鎖の発現を支援する条件下で該宿主細胞を培養することを含む、方法。
【請求項３１】
前記抗体を単離することをさらに含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記抗体を診断剤または治療剤に連結する工程をさらに含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
異常細胞を含有すると疑われるサンプル中の異常細胞を検出する方法であって、該サンプルと、請求項１に記載の抗体または請求項２２に記載の人工抗体とを接触させることを含む、方法。
【請求項３４】
前記抗体または人工抗体が診断剤にコンジュゲートされている、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記診断剤が、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
二次結合剤を使用して、前記抗体または人工抗体を検出する、請求項３３に記載の方法。
【請求項３７】
前記二次結合剤が抗Ｆｃ受容体抗体である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】

前記サンプルが、（ａ）頭頸部、脳、食道、乳房、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、大腸、直腸、卵巣、子宮、子宮頸部、前立腺、睾丸もしくは皮膚組織由来の腫瘍組織、または（ｂ）体液、例えば血液、リンパ液、尿、骨髄穿刺液もしくは乳頭吸引液である、請求項３３に記載の方法。
【請求項３９】
前記サンプルが切除腫瘍床に由来する、請求項３３に記載の方法。
【請求項４０】
検出の存在、非存在または程度に基づいて処置決定をすることをさらに含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項４１】
前記処置決定が、ＰＲ－１ベースのペプチドワクチンで前記被験体を処置することを含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
原発性がん細胞、転移性がん細胞または骨髄異形成細胞を検出する、請求項３３に記載の方法。
【請求項４３】
がんを有する被験体を処置する方法であって、請求項１に記載の抗体または請求項２２に記載の人工抗体を該被験体に投与することを含む、方法。
【請求項４４】
前記抗体または人工抗体が治療剤にコンジュゲートされている、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記がんが固形腫瘍である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記固形腫瘍が、頭頸部腫瘍、脳腫瘍、食道腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍および胃腫瘍、小腸腫瘍、大腸腫瘍、直腸腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍、睾丸腫瘍または皮膚腫瘍である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記がんが血液がんである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４８】
前記血液腫瘍が白血病またはリンパ腫である、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記治療剤が、サイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子である、請求項４４に記載の方法。
【請求項５０】
第２の抗がん療法を前記被験体に提供することをさらに含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項５１】
前記第２の抗がん療法が、遺伝子治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、毒素療法または手術である、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記抗体または人工抗体を前記被験体に複数回投与する、請求項４３に記載の方法。
【請求項５３】
前記がんが、再発性がんまたは転移性がんである、請求項４３に記載の方法。
【請求項５４】
自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、請求項１に記載の抗体または請求項２２に記載の人工抗体を前記被験体に投与することを含む、方法。
【請求項５５】
前記自己免疫疾患が、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ‐ストラウス症候群または全身性小血管血管炎である、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】
前記抗体または人工抗体が治療剤にコンジュゲートされている、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
前記治療剤が、毒素またはアポトーシス誘導剤である、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
第２の抗自己免疫療法を前記被験体に提供することをさらに含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５９】
前記第２の抗自己免疫療法が抗炎症剤である、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記抗体を前記被験体に複数回投与する、請求項５４に記載の方法。
【請求項６１】
ＨＬＡ－Ａ２がん細胞の補体媒介性細胞傷害を誘導する方法であって、該がん細胞と、請求項１に記載の抗体または請求項２２に記載の人工抗体とを接触させることを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本願は、２０１２年７月１０日に出願された米国仮特許出願第６１／６６９，９６７号、および２０１２年９月１９日に出願された米国仮特許出願第６１／７０２，９１６号の利益を主張し、双方の出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
本発明は、国立がん研究所／国立衛生研究所によって授与されたＰ５０ＣＡ１００６３２の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明について一定の権利を有する。
【０００３】
１．発明の分野
本発明は、一般に、がんおよび免疫療法の分野に関する。より具体的には、それは、がんおよび自己免疫疾患の処置および予防のための免疫診断抗体および免疫治療抗体に関する。
【０００４】
２．関連分野の説明
免疫系は、長い間、がんの制御に関連するとされてきたが、ヒトがんにおける特異的かつ有効な免疫応答の証拠を欠いていた。慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）では、同種骨髄移植（ＢＭＴ）またはインターフェロン－α２ｂ（ＩＦＮ－α２ｂ）療法により完全寛解がもたらされるが、疾病制御の機構は知られておらず、それには、免疫抗白血病応答が関与し得る。
【０００５】
当技術分野における証拠に基づいて、リンパ球は抗白血病効果の媒介で役割を果たすと考えられる。研究により、同種ドナーのリンパ球注入（ＤＬＩ）を使用して同種ＢＭＴ後の骨髄性白血病の再発が処置されることが証明されている（Ｇｉｒａｌｔ ａｎｄ Ｋｏｌｂ，１９９６；Ｋｏｌｂ ａｎｄ Ｈｏｌｌｅｒ，１９９７；Ｋｏｌｂら、１９９５；Ｋｏｌｂら、１９９６；Ａｎｔｉｎ，１９９３）。元の骨髄（ＢＭ）ドナー由来のリンパ球の輸注により、慢性期（ＣＰ）の慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）患者の約７０％～８０％で血液学的応答および細胞遺伝学的応答の両方が誘導される（Ｋｏｌｂら、１９９６，Ｋｏｌｂ ａｎｄ Ｈｏｌｌｅｒ，１９９７）。ＡＭＬのためのＤＬＩ後の寛解は、一般に、慢性期ＣＭＬで得た寛解ほど永続的ではなく、免疫応答の発生速度をしのぐ急速な腫瘍

成長速度を反映し得る。さらに、骨髄性形態の白血病に罹患したほとんどの患者は、関連する移植片対白血病（ＧＶＬ）効果により患者が治癒する同種骨髄移植で処置することができない限り、この疾患で死亡する。しかしながら、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）および移植関連毒性によってこの処置が制限される。ＧＶＬはＧＨＶＤと分離可能であり、白血病関連抗原への免疫応答のターゲティングにより、ＧＶＨＤを発症することなくＧＶＬを患者に導入することが可能であると考えられる。

【０００６】

したがって、より多くの抗原（すなわち、白血病抗原または他のがんに対する抗原）を測定することができる場合、および多数の最も強力な抗原特異的細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を得ることができる場合、ワクチンの標的または養子免疫療法で使用するための特異的Ｔ細胞の生成のための標的としての抗原を使用して、白血病特異的療法、乳がん特異的療法などを開発可能であろう。

【０００７】

白血病関連抗原としてＰＲ１（プロテイナーゼ３（Ｐ３）由来のＨＬＡＡ２．１拘束性九量体）およびエラスターゼが同定された（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、２０００；Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９６；Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９７；Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９９；Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、２００３（それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。ＰＲ１が白血病関連抗原であるという所見は、Ｂｕｒｃｈｅｒｔら（２００２）およびＳｃｈｅｉｂｅｎｂｏｇｅｎら（２００２）によって個別に確認された。ＰＲ１特異的なＣＴＬは、正常骨髄細胞ではなくＡＭＬ、ＣＭＬおよびＭＤＳ細胞を死滅させる。最近の第Ｉ／ＩＩ相ワクチン試験では、ＡＭＬ、ＣＭＬおよびＭＤＳを有する患者にＰＲ１ペプチドが投与され、ＰＲ１特異的なＣＴＬ免疫が患者の４７％で誘発され、臨床（ｃｌｉｎｃｉａｌ）応答が２６％で観察された。したがって、この抗原は、抗がん免疫応答をさらに調査するための、および新たな治療剤を開発するための興味深いプラットフォームを提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Ｇｉｒａｌｔ ａｎｄ Ｋｏｌｂ, Ｃｕｒｒ. Ｏｐｉｎ. Ｏｎｃｏｌ., ８：９６－１０２, １９９６

【非特許文献２】Ｋｏｌｂ ａｎｄ Ｈｏｌｌｅｒ, Ｃｕｒｒ. Ｏｐｉｎ. Ｏｎｃｏｌ., ９：１３９－１４５, １９９７

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００９】

したがって、本発明によれば、ＨＬＡ－Ａ２受容体に結合されるとＶＬＱＥＬＮＶＴＶ（配列番号４５）に結合する単離および精製された抗体であって、配列番号３、４および５を含む重鎖ＣＤＲと、配列番号８、９および１０を含む軽鎖ＣＤＲとを有する単離および精製された抗体が提供される。該抗体は、マウス抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、非抗体ペプチドもしくはポリペプチドセグメントに融合されているもの、診断試薬（例えば、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬）に連結されているもの、治療試薬（例えば、サイトカイン、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子）に連結されているもの、ヒト化抗体または上記のものの組み合わせであり得る。該二重特異性抗体は、配列番号４５に対する結合親和性に加えて、Ｂ細胞（ＣＤ１９、ＣＤ２０）、ＮＫ細胞、食細胞（ＣＤ１６）または単球（ＣＤ１４）に対する結合親和性を有し得る。特定のヒト化抗体は、配列番号３８および３６または配列番号４０および３６ならびに配列番号４０および４２の軽鎖／重鎖配列を有し得る。

【００１０】

別の実施形態では、配列番号８、９および１０によってコードされる軽鎖ＣＤＲをコー

ドする核酸が提供される。該核酸は、配列番号７もしくは配列番号１２をコードし得るか、または配列番号２３もしくは配列番号２５をコードし得る。該核酸は、該軽鎖ＣＤＲをコードする該核酸の５’側に位置するプロモーター配列、例えば真核細胞または原核細胞内で活性であるものをさらに含み得る。該核酸は、複製可能なベクター、例えば非ウイルスベクターまたはウイルスベクター内に配置され得る。該核酸は、前記ＣＤＲコードセグメント間に配置されるリンカーコードセグメント、例えばヘリックスーターンーヘリックスモチーフをコードするものをさらに含み得る。

【００１１】

また別の実施形態では、配列番号３、４および５の配列を含むＣＤＲを含む重鎖コードセグメントを含み、配列番号８、９および１０の配列を含むＣＤＲを含む軽鎖コードセグメントを含む人工抗体が提供される。該ＣＤＲは、合成リンカーによって連結され得る。該重鎖は、非抗体ペプチドまたはポリペプチドセグメントに融合され得る。該抗体は、診断試薬、例えばフルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬に連結され得る。該抗体は、治療試薬、例えばサイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、好中球エラスターゼ、プロテイナーゼ３、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子に連結され得る。該軽鎖は、配列番号７、配列番号１２、配列番号２３もしくは配列番号２５を含み得、および／または該重鎖は、配列番号３６もしくは配列番号４２を含む。

【００１２】

さらにまた別の実施形態では、抗体を作製する方法であって、（ａ）（ｉ）配列番号３、４および５に示されるＣＤＲを含む重鎖をコードする核酸配列、および（ｉｉ）配列番号８、９および１０に示されるＣＤＲを含む軽鎖をコードする核酸配列を宿主細胞に導入すること；ならびに（ｂ）前記軽鎖および重鎖の発現を支援する条件下で前記宿主細胞を培養することを含む方法が提供される。該方法は、前記抗体を単離することをさらに含み得る。該方法は、前記抗体を診断剤または治療剤に連結する工程をさらに含み得る。

【００１３】

さらなる実施形態では、異常細胞を含有すると疑われるサンプル中の異常細胞を検出する方法であって、前記サンプルと、上記のとおりの抗体または人工抗体とを接触させることを含む方法が提供される。該抗体または人工抗体は、診断剤（例えば、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬）にコンジュゲートされ得る。該抗体または人工抗体は、二次結合剤、例えば抗Ｆｃ受容体抗体を使用して検出され得る。該サンプルは、（ａ）頭頸部、脳、食道、乳房、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、大腸、直腸、卵巣、子宮、子宮頸部、前立腺、睾丸もしくは皮膚組織由来の腫瘍組織、または（ｂ）体液、例えば血液、リンパ液、尿、骨髄穿刺液もしくは乳頭吸引液であり得る。該サンプルは、切除腫瘍床に由来し得る。該方法は、検出の存在、非存在または程度に基づいて処置決定をすること、例えば、ＰＲ－１ベースのペプチドワクチンで前記被験体を処置する決定をすることをさらに含み得る。該方法は、原発性がん細胞、転移性がん細胞または骨髄異形成細胞を検出し得る。

【００１４】

またさらなる実施形態では、がんを有する被験体を処置する方法であって、上記のとおりの抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該抗体または人工抗体は、治療剤にコンジュゲートされ得る。該がんは、固形腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、脳腫瘍、食道腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍および胃腫瘍、小腸腫瘍、大腸腫瘍、直腸腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍、睾丸腫瘍または皮膚腫瘍であり得る。該がんは、血液がん、例えば白血病またはリンパ腫であり得る。該治療剤は、サイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子であり得る。該方法は、第２の抗がん療法、例えば遺伝子治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、毒素療法または手術を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該抗体または人工抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。該がんは、再発性がんまたは転移性がんであり得る。該抗

体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【００１５】

さらにまたさらなる実施形態では、自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、上記のとおりの抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該自己免疫疾患は、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ‐ストラウス症候群または全身性小血管血管炎であり得る。該抗体または人工抗体は、治療剤、例えば毒素またはアポトーシス誘導剤にコンジュゲートされ得る。該方法は、第２の抗自己免疫療法を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該第２の抗自己免疫療法は、抗炎症剤であり得る。該抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【００１６】

ＨＬＡ－Ａ２がん細胞の補体媒介性細胞傷害を誘導する方法であって、前記がん細胞と、上記のとおりの抗体または人工抗体とを接触させることを含む方法も提供される。

【００１７】

本発明の別の実施形態は、異常細胞を含有すると疑われるサンプル中の異常細胞を検出する方法であって、前記サンプルと、上記のとおりの抗体または人工抗体とを接触させることを含む方法を提供する。該抗体または人工抗体は、診断剤、例えばフルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬にコンジュゲートされ得る。該抗体または人工抗体は、二次結合剤、例えば抗Ｆｃ受容体抗体を使用して検出され得る。該サンプルは、（ａ）頭頸部、脳、食道、乳房、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、大腸、直腸、卵巣、子宮、子宮頸部、前立腺、睾丸もしくは皮膚組織由来の腫瘍組織、または（ｂ）体液、例えば血液、リンパ液、尿、骨髄穿刺液もしくは乳頭吸引液であり得る。該サンプルは、切除腫瘍床に由来し得る。該方法は、検出の存在、非存在または程度に基づいて処置決定をすること、例えば、ＰＲ－１ベースのペプチドワクチンで前記被験体を処置する決定をすることをさらに含み得る。該方法は、原発性がん細胞、転移性がん細胞または骨髄異形成細胞を検出し得る。

【００１８】

さらに別の実施形態では、がんを有する被験体を処置する方法であって、上記のとおりの抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該抗体または人工抗体は、治療剤、例えばサイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Ｆｃ断片、ＴＬＲアゴニスト、ＣｐＧ含有分子または免疫共刺激分子にコンジュゲートされ得る。該がんは、固形腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、脳腫瘍、食道腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍および胃腫瘍、小腸腫瘍、大腸腫瘍、直腸腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍、睾丸腫瘍または皮膚腫瘍であり得る。あるいは、該がんは、血液がん、例えば白血病またはリンパ腫であり得る。該がんは、再発性がんまたは転移性がんであり得る。該方法は、第２の抗がん療法、例えば遺伝子治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、毒素療法または手術を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該抗体または人工抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【００１９】

またさらなる実施形態では、自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、上記のとおりの抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該自己免疫疾患は、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ‐ストラウス症候群または全身性小血管血管炎であり得る。該抗体または人工抗体は、治療剤、例えば毒素またはアポトーシス誘導剤にコンジュゲートされ得る。該方法は、第２の抗自己免疫療法、例えば抗炎症剤を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【００２０】

さらなる方法は、（ｉ）骨髄異形成疾患を有する被験体に上記抗体または人工抗体を投与することを含む、前記被験体を処置すること；および（ｉｉ）ＨＬＡ－Ａ２がん細胞と、上記抗体または人工抗体とを接触させることを含む、前記がん細胞の補体媒介性細胞傷害を誘導することを含む。

【００２１】
Ｈｕ１－８Ｆ４およびＨｕ２－８Ｆ４は、それぞれＨｕ８Ｆ４－１およびＨｕ８Ｆ４－２を指す。加えて、本文書における用語「Ｈｕ８Ｆ４」は、一般に、８Ｆ４（Ｈｕ８Ｆ４－１およびＨｕ８Ｆ４－２）の両方のヒト化形態を指す。
【００２２】
本明細書で使用される場合、「ａ」または「ａｎ」は、１つ以上を意味し得る。特許請求の範囲で使用されるように、文言「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と組み合わせて使用される場合、文言「ａ」または「ａｎ」は、１つまたは複数を意味し得る。本明細書で使用される場合、「別の」は、少なくとも第２またはそれより多くを意味し得る。
【００２３】
本発明の他の目的および特徴は、以下の詳細な記載から明らかとなる。しかしながら、この詳細な記載から本発明の精神および範囲内で様々な変更および修正が当業者に明らかとなるため、本発明の好ましい実施形態を示す一方で、詳細な記載および特定の実施例を、例示のみを目的として示すことが理解されるべきである。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに証明するために含まれる。本発明を、本明細書に提示される特定の実施形態の詳細な記載と組み合わせて１つ以上のこれらの図面を参照することによってより深く理解することができる。
【００２５】
【図１】ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２に対する８Ｆ４の特異性。ＰＲ１または単一アミノ酸修飾ＰＲ１類似体を負荷した組換えペプチド／ＨＬＡ－Ａ２モノマーによるＥＬＩＳＡ。最適な８Ｆ４結合に必須のＰＲ１配列内のアミノ酸位置を決定するために、ＰＲ１内にアラニン置換（ＡＬＡ１～ＡＬＡ９）を含有するペプチドを負荷したＨＬＡ－Ａ２モノマーを、漸増濃度でマイクロタイターウェルにコーティングした。次いで、一定濃度の８Ｆ４または対照抗体ｂｂ７．２（ＨＬＡ－Ａ＊０２０１対立遺伝子特異的マウスＩｇＧ２ａモノクローナル抗体）と共に、ウェルをインキュベートした。ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス抗体を使用してＥＬＩＳＡによって、結合を測定した。８Ｆ４は、ＰＲ１を負荷したＨＬＡ－Ａ２およびほとんどのＰＲ１類似体に結合したが、ＡＬＡ１類似体（ペプチドの１位のバリンをアラニンで置換したもの）に対する結合は有意に少なく、対照ペプチドｐｐ６５／ＨＬＡ－Ａ２には結合しなかった。対照抗体ｂｂ７．２は、ＰＲ１およびｐｐ６５を負荷したＨＬＡ－Ａ２に等しく十分に結合した。
【００２６】
【図２】ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２に対する８Ｆ４モノクローナル抗体の親和性。ＢＩＡｃｏｒｅ３０００を使用して表面プラズモン共鳴によって、８Ｆ４およびｂｂ７．２抗体へのペプチド／ＨＬＡ－Ａ２の結合の親和性測定を実行した。試験抗体を抗マウス抗体コーティング表面上に捕捉した。分析物のペプチド／ＨＬＡ－Ａ２を１００ｎＭに希釈し、抗体コーティング表面に対する結合について二連で試験した。ランニング緩衝液としてＰＢＳ、０．００５％Ｔｗｅｅｎ－２０、０．１ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、ｐＨ７．４を使用して、分析を２５℃で実施した。結合親和性を求めるために、（オレンジ色の直線として図中に示されている）一次速度モデルに対して実験データをフィッティングし、続いて、８Ｆ４およびｂｂ７．２のK_Dを決定した。
【００２７】
【図３】ＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬに対する８Ｆ４の特異性。８Ｆ４および細胞表面抗体を用いた、白血病および正常ＰＢＭＣのマルチパラメータフローサイトメトリー。ａｑｕａを使用して、ＡＭＬ患者および正常ドナー由来のＰＢＭＣを生細胞にゲーティングをかけ、次いで、（ＡＬＥＸＡ　Ｆｌｕｏｒ６４７をコンジュゲートした）８Ｆ４、（ＦＩＴＣをコンジュゲートした）ｂｂ７．２および表面表現型抗体を用いて、ＣＤ１３およびＣＤ３３について染色し、フローサイトメトリーによって分析した。以下のゲーティング戦略を使用した：最初に、ＣＤ１３およびＣＤ３３発現についてａｑｕａによる生細胞を分析し

、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（８Ｆ４）発現および全ＨＬＡ－Ａ２発現（ｂｂ７．２）について二重陽性細胞を分析した。ＨＬＡ－Ａ２陰性ＡＭＬ対照細胞を使用して、陰性象限のゲーティングを確立した。

【００２８】

【図４】８Ｆ４抗体は、ＡＭＬの補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導する。標的細胞を洗浄し、細胞５×１０^{5}個／ｍｌの濃度で１０－ＲＰＭＩ／ＨＥＰＥＳに再懸濁した。２０マイクロリットル（μｌ）の抗体および１００μｌの細胞を混合し、９６ウェルプレート中で３７℃に加温し、次いで、２０μｌの氷冷標準ウサギ補体（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ，Ｏｎｔａｒｉｏ，Ｃａｎａｄａ）を添加し、３７℃で９０分間インキュベートした。Ｃｙｔｏ－Ｔｏｘ　Ｇｌｏ細胞傷害アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、細胞傷害を決定した。抗体特異的ＣＤＣ（ＡＢ－ＣＤＣ）を以下のように計算した：ＡＢ－ＣＤＣ＝（（$L_{C+AB}-L_{C-AB}$）／（$L_{max}-L_{S}$））×１００％（式中、L_{C+AB}は、補体＋抗体の存在下における標的細胞溶解であり、L_{T+C}は、補体のみの存在下における溶解であり、製造業者の指示にしたがって、細胞傷害剤ジギトニンを細胞に添加する前後に、L_{spont}およびL_{max}を測定した）。（図４Ａ）２０μｇの８Ｆ４と共にインキュベートすることにより、ＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬ患者から採取したＰＢＭＣおよび白血球除去法（ＬＰ）による細胞の補体依存性細胞傷害が誘導されたが、ＨＬＡ－Ａ２陰性ＡＭＬ由来のＰＢＭＣまたはＨＬＡ－Ａ２＋正常ドナー由来のＰＢＭＣの対照サンプルは溶解されなかった。（図４Ｂ）ＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬの８Ｆ４媒介性溶解は抗体用量依存的であったのに対して、アイソタイプ対照抗体（ＩｇＧ２ａマウス抗ＫＬＨ）およびヒト静脈内免疫グロブリン（市販のＩＶＩＧ）は、ＡＭＬの溶解を示さなかった。

【００２９】

【図５】正常ＰＢＭＣではなくＡＭＬに対する８Ｆ４の特異性。ＰＲ１およびＨＬＡ－Ａ２についての、ＡＭＬ、ＰＢＭＣおよびＴ２細胞の表面染色。抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２抗体（８Ｆ４）－ａｌｅｘａ－６４７（赤色）および抗ＨＬＡ－Ａ２－ＦＩＴＣコンジュゲート（緑色）で細胞を染色し、１％パラホルムアルデヒドで固定し、次いで、共焦点顕微鏡検査を使用して研究した。陽性対照としてＰＲ１ペプチド（２０μｇ／ｍｌ）をＴ２細胞にパルスし、陰性対照ペプチドとしてＣＭＶペプチドｐｐ６５（２０μｇ／ｍｌ）をパルスした。ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現は、ＡＭＬおよびＰＲ１パルスＴ２細胞の細胞表面上では明白であるが、ＨＬＡ－Ａ２＋ＰＢＭＣまたはｐｐ６５パルスＴ２細胞上ではその証拠がない。Ｄａｐｉ（青色）を核染色に使用した。

【００３０】

【図６】８Ｆ４抗体は、インビボモデルにおけるＡＭＬの生着を防止する。原発性ＨＬＡ－Ａ２＋白血病細胞（１０^{6}個）を洗浄し、ＰＢＳ（１００μｌ）に再懸濁し、８Ｆ４またはアイソタイプ対照抗体（２０μｇ）と混合し、２００ｃＧｙ照射ＨＬＡ－Ａ２＋トランスジェニックＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに静脈内注射した。２週間後、マウスを屠殺し、解剖し、組織をホモジナイズし、ヒトおよびマウス細胞表面マーカーを用いてフローサイトメトリーによって、白血病細胞の存在について分析した。マウス骨髄（ＢＭ）から単離した細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。対照（ＰＢＳ処置）動物、およびＡＭＬ細胞＋８Ｆ４（ＡＭＬ＋８Ｆ４抗体）を投与した実験動物では、ヒト白血病細胞がＢＭ中で示されなかった。対照的に、ＡＭＬ細胞＋対照抗体（ＡＭＬ＋アイソタイプ対照）を投与した動物では、注入したＡＭＬと同じ表現型を有するヒトＣＤ３３＋ＣＤ４５＋細胞が骨髄中で示された。

【００３１】

【図７】抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２抗体を得るための免疫戦略。ＭＨＣクラスＩ分子の概略図。ＭＨＣクラスは、重鎖およびβ２ミクログロブリン鎖からなる。ペプチド抗原は、鎖のα１およびα２ヘリックスドメインが隣接するＭＨＣ－Ｉの溝に結合する。

【００３２】

【図８Ａ】８Ｆ４抗体は、ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ異種移植モデルにおけるヒトＡＭＬの生着を防止する。原発性ＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬ細胞（１０^{6}個）を洗浄し、ＰＢＳ（２５０μ

１）に再懸濁し、２０μｇの８Ｆ４またはアイソタイプ対照抗体と混合し、亜致死照射（２００ｃＧｙ）ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ　ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに静脈内注射した。示されている時点において、組織化学（図８Ａ）およびフローサイトメトリー（図８Ｂ）によって、白血病の存在について末梢血、骨髄および組織を分析した。ＡＭＬ非移植の照射マウスおよびＡＭＬ細胞前移植の照射マウスをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。（図８Ａ）ＡＭＬ細胞に加えて８Ｆ４を注射した後の実験マウス（左のパネル）、ＡＭＬ細胞に加えてアイソタイプ対照抗体を注射した後の実験マウス（ｉｓｏ、中央のパネル）、およびＡＭＬ非移植の対照マウス（右のパネル）の組織におけるＡＭＬ浸潤。（図８Ｂ）非移植対照マウスおよび実験８Ｆ４処置マウスの骨髄（上の２つのパネル）および末梢血（下の２つのパネル）では、ＡＭＬ細胞（前移植を示す、左のパネル）は検出されなかった。アイソタイプマッチ対照抗体（ｉｓｏ）と混合したＡＭＬ細胞を投与したマウスでは、ＡＭＬ移植の２または４週間後にＡＭＬ１およびＡＭＬ５の生着が示された。マウス細胞特異的マーカー（ｍＣＤ４５）、３～６つのヒトマーカー（ＣＤ４５、ＣＤ１３、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＨＬＡ－ＤＲ）およびＬｉｖｅ／Ｄｅａｄ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ａｑｕａ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む拡張パネルを、ＡＭＬ生着のフローサイトメトリー分析に使用した。すべてのプロットは、ｍＣＤ４５＿生細胞を示す。

【図８Ｂ】８Ｆ４抗体は、ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ異種移植モデルにおけるヒトＡＭＬの生着を防止する。原発性ＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬ細胞（10^6個）を洗浄し、ＰＢＳ（２５０μｌ）に再懸濁し、２０μｇの８Ｆ４またはアイソタイプ対照抗体と混合し、亜致死照射（２００ｃＧｙ）ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ　ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに静脈内注射した。示されている時点において、組織化学（図８Ａ）およびフローサイトメトリー（図８Ｂ）によって、白血病の存在について末梢血、骨髄および組織を分析した。ＡＭＬ非移植の照射マウスおよびＡＭＬ細胞前移植の照射マウスをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。（図８Ａ）ＡＭＬ細胞に加えて８Ｆ４を注射した後の実験マウス（左のパネル）、ＡＭＬ細胞に加えてアイソタイプ対照抗体を注射した後の実験マウス（ｉｓｏ、中央のパネル）、およびＡＭＬ非移植の対照マウス（右のパネル）の組織におけるＡＭＬ浸潤。（図８Ｂ）非移植対照マウスおよび実験８Ｆ４処置マウスの骨髄（上の２つのパネル）および末梢血（下の２つのパネル）では、ＡＭＬ細胞（前移植を示す、左のパネル）は検出されなかった。アイソタイプマッチ対照抗体（ｉｓｏ）と混合したＡＭＬ細胞を投与したマウスでは、ＡＭＬ移植の２または４週間後にＡＭＬ１およびＡＭＬ５の生着が示された。マウス細胞特異的マーカー（ｍＣＤ４５）、３～６つのヒトマーカー（ＣＤ４５、ＣＤ１３、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＨＬＡ－ＤＲ）およびＬｉｖｅ／Ｄｅａｄ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ａｑｕａ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む拡張パネルを、ＡＭＬ生着のフローサイトメトリー分析に使用した。すべてのプロットは、ｍＣＤ４５＿生細胞を示す。

【００３３】

【図９】保存されたＰＲ１配列がＨＬＡ－Ａ２を発現するマウスの造血細胞上で発現しているため、８Ｆ４は、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＮＯＤ／ＳＣＩＤにおいて一過性（２１日間）好中球減少症を誘導する。２００μｇ（１０ｍｇ／ｋｇ）の８Ｆ４またはアイソタイプ対照ＡｂをＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ　ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに注射した。これらの動物では、内因性ＰＲ１を提示することが示された。９日後、骨髄細胞を採取し、マウス抗原に対するｍＡｂ（Ｂ２２０－ＰＥ、Ｇｒ－１－ＰＢ、ＣＤ１１ｂ－ＡＰＣ、Ｆ４／８０－ＰＥ－Ｃｙ７、ＣＤ３－ＦＩＴＣおよびＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ａｑｕａ）で染色し、フローサイトメトリーによって検査した。（図９Ａ）骨髄（左のパネル）の分散プロファイルでは、顆粒球の減少が明白であった。８Ｆ４処置動物の骨髄では、Ｇｒ－１ｌｏ未成熟好中球が存在していたが、Ｇｒ－１ｈｉ成熟好中球はより少数であった（中央のパネル）。加えて、８Ｆ４処置動物では、単球（ＳＳＣｌｏ　ＣＤ１１ｂ＋；右のパネルの右下ゲート）が減少していた。（図９Ｂ）ＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ　ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスでは、８Ｆ４（５ｍｇ／ｋｇ）の静脈内注射により、循環成熟顆粒球、マクロファージおよび単球の絶対数が一過性に減少した。処置の３週間後において、すべての集団が依然として存在している。図９Ａに示されているゲートを使用して、各細胞型の

頻度を生細胞の割合として決定した。エラーバーは、ｎ＝動物２匹／群の標準偏差である。３回のうちの１回の代表的な実験を示す。（図９Ｃ）２００μｇ（１０ｍｇ／ｋｇ）の８Ｆ４を注射した７日後のＨＬＡ－Ａ２　Ｔｇ　ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓または脳では、有意な病理学的変化の証拠がなかった。２匹のマウス由来の代表的な組織のＨ＆Ｅ切片を示す。

【００３４】

【図１０】ヒトＣＤ３４＋細胞が富化された臍帯血をＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに移植した後において、８Ｆ４は、確立したヒト造血細胞の一過性白血球減少症を誘導する。Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ１０７７を使用して新鮮ＨＬＡ－Ａ２＋臍帯血（ＣＢ）単位（５０～１５０ｍｌ）をフィコール処理し（ｆｉｃｏｌｌｅｄ）、ＰＢＳで洗浄し、次いで、ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ（ｐＨ７．２）／１ｍＭ　ＥＤＴＡ中０．５％ＨＳＡ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）で洗浄した。10^8個の細胞を３００ｍｌのＭＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、１００ｍｌのＣＤ３４　Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）と混合し、４℃で３０分間インキュベートし、洗浄した。２本のＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を使用することによって、磁気ビーズで標識した$CD34^+$細胞を精製した。カラムから$CD34^+$細胞を溶出し、計数し、照射（４００ｒａｄ）ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに静脈内注射した（細胞１～２．５×10^6個／マウス）。対照マウスＣＢ１～５には、ＣＢ細胞を投与しなかった。（図１０Ａ）移植の４週間後から開始して、マウスから末梢血を毎週または隔週で採取し、マウスＣＤ４５、ヒトＣＤ４５およびＨＬＡマーカーを用い、ＦＡＣＳを使用することによって、臍帯血の生着をモニタリングした。移植の９～１２週間後、１週間の注射間隔で、２０μｇ（１ｍｇ／ｋｇ）の８Ｆ４をマウスに２回静脈内注射した（点線矢印）。（図１０Ｂ）２回目の８Ｆ４注射の４週間後、マウスを屠殺した。上記のように、ヒト細胞の生着について、血液、脾臓および骨髄を分析した。

【００３５】

【図１１】ｐＣｈ８Ｆ４、ｐＨｕ８Ｆ４－１、ｐＨｕ８Ｆ４－２およびｐＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡ（共に発現ベクター）の概略構造。上部のＳａｌＩ部位から時計回りに進んで、プラスミドは、抗体重鎖遺伝子の転写を開始させるヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）主要前初期プロモーター／エンハンサー（ＣＭＶプロモーター）から始まる重鎖転写単位を含有する。ＣＭＶプロモーターがあり、それに続いてＶＨエキソンと、ヒトガンマ－１重鎖定常領域（イントロンが介在してＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３エキソンを含む）を含有するゲノム配列があり、そしてＣＨ３エキソンの後ろにポリアデニル化部位がある。重鎖遺伝子配列の後ろから軽鎖転写単位がＣＭＶプロモーターで始まり、それに続いてＶＬエキソンと、ヒトカッパ鎖定常領域エキソン（ＣＬ）（その前にイントロンの一部がある）を含有するゲノム配列があり、そしてＣＬエキソンの後ろにポリアデニル化部位がある。軽鎖遺伝子に続いて、ＳＶ４０初期プロモーター（ＳＶ４０プロモーター）、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（ｇｐｔ）があり、そしてＳＶ４０ポリアデニル化部位（ＳＶ４０ポリ（Ａ）部位）を含有するセグメントがある。最後に、プラスミドは、細菌複製起点（ｐＵＣ　ｏｒｉ）およびベーターラクタマーゼ遺伝子（β－ラクタマーゼ）を含むプラスミドｐＵＣ１９の一部を含有する。

【００３６】

【図１２】８Ｆ４　ＶＨ、ヒト化８Ｆ４（Ｈｕ８Ｆ４）ＶＨおよびヒトアクセプターＵ９６２８２　ＶＨのアミノ酸配列のアラインメント。アミノ酸残基を１文字表記で示す。配列の上の数字は、Ｋａｂａｔら（１９９１）による位置を示す。Ｋａｂａｔら、（１９９１）によって定義されるＣＤＲ配列に下線が付されている。図中では、Ｕ９６２８２　ＶＨのＣＤＲ残基が省略されている。

【００３７】

【図１３】８Ｆ４　ＶＬ、２バージョンのヒト化８Ｆ４　ＶＬ（Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１およびＶＬ２）およびヒトアクセプターＡＹ０４３１４６　ＶＬのアミノ酸配列のアラインメント。アミノ酸残基を１文字表記で示す。配列の上の数字は、Ｋａｂａｔら（１９９１）による位置を示す。Ｋａｂａｔら、（１９９１）によって定義されるＣＤＲ配列に下線が

付されている。Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１の下線付残基は、ＣＤＲと接触すると予測されたものであり、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１のこの位置では、対応するマウス残基を保持した。図中では、ＡＹ０４３１４６　ＶＬのＣＤＲ残基が省略されている。

【００３８】

【図１４】精製８Ｆ４抗体のＳＤＳ　ＰＡＧＥ分析。還元条件下の４～２０％ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル上で抗体（各５μｇ）を泳動した。ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＳｅｅＢｌｕｅＰｌｕｓ２　Ｐｒｅｓｔａｉｎｅｄ　Ｓｔａｎｄａｒｄ（Ｃａｔ＃ＬＣ５９２５）を分子量標準として使用した（レーン１、７および８）。サンプル：８Ｆ４．３．３（レーン２）、８Ｆ４－４（レーン３）、Ｃｈ８Ｆ４（レーン４）、Ｈｕ８Ｆ４－１（レーン５）、Ｈｕ８Ｆ４－２ロット９／９／１０（レーン６）、Ｈｕ８Ｆ４－２ロット１／２３／１１（レーン９）およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡ（レーン１０）。

【００３９】

【図１５】ＰＲ－１／ＨＬＡ－Ａ２に対するＣｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡの結合のＥＬＩＳＡ分析。ＰＲ－１／ＨＬＡ－Ａ２に対する結合について、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ－２－ＡＡを様々な濃度（１μｇ／ｍｌから開始して３倍系列希釈）で試験した。

【００４０】

【図１６】Ｈｕ８Ｆ４結合の特異性および作用機序。（図１６Ａ）特異性アッセイ。（図１６Ｂ）親和性アッセイ。（図１６Ｃ）ＣＤＣアッセイ。

【００４１】

【図１７】Ｈｕ８Ｆ４による処置は、確立したＡＭＬを排除する。アッセイにより、抗体処置の３週間前に投与したＡＭＬ移植片の生着率を測定する。

【００４２】

【図１８】８Ｆ４は、可逆的汎血球減少症を引き起こす：ＳＣＩＤマウスにおける正常造血前駆細胞に対する効果。

【００４３】

【図１９】８Ｆ４は、可逆的汎血球減少症を引き起こす：免疫適格マウスにおける正常血液細胞に対する効果。

【００４４】

【図２０】８Ｆ４は乳がん腫瘍の成長を遅延させ、生存を延長させる。（図２０Ａ）２３１　ＢｒＣＡ異種移植腫瘍における腫瘍関連好中球。（図２０Ｂ）原発性腫瘍モデル。（図２０Ｃ）転移性腫瘍モデル。

【００４５】

【図２１】固形腫瘍細胞系は、ＮＥおよびＰ３を取り込む。固形腫瘍の代表的な細胞系を、（図２１Ａ）ＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）または（図２１Ｂ）Ｐ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共にインキュベートし、次いで透過処理し、抗ＮＥまたは抗Ｐ３　Ａｂで染色した。データは、２回の独立した実験の三連のウェルから、ＮＥまたはＰ３の取り込みが非パルス細胞と対比して平均６ＳＥＭ倍増加していることを表している。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、乳癌；ＭＩＡ　ＰａＣａ－２、膵臓癌；Ｍｅｌ６２４およびＭｅｌ５２６、黒色腫；ＯＶＣＡＲ３、卵巣腺癌；ＳＷ－６２０、結腸腺癌。

【００４６】

【図２２】乳がんは、Ｐ３を内因的に発現しない。（図２２Ａ）乳がん細胞系および（図２２Ｂ）原発性乳がん組織からｍＲＮＡを抽出した。Ｐ３プライマーを使用してＲＴ－ＰＣＲ実施し、それは、乳がん細胞系および原発性乳がんでは、Ｐ３　ｍＲＮＡ発現が欠如していることを示している。ＪｕｒｋａｔおよびＨＬ－６０白血病細胞系をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。外科切除時点で患者から得られた腫瘍に対してＬＣＭを実施することによって、患者組織由来の原発性乳がん細胞（サンプル乳房１～３）を得た。マンマグロビン－１（ＭＧＢ－１）を使用して、乳がん細胞の分析を確認した。β－アクチンおよびＧＡＰＤＨをローディング対照として使用した。（図２２Ｃ）免疫ブロットは、５つの異なる乳がん細胞系由来のＷＣＬでは、Ｐ３タンパク質が欠如しているこ

とを実証している。２０ｍｇのタンパク質をゲルにロードした。精製Ｐ３（５ｍｇ）を陽性対照として使用し、ＧＡＰＤＨをローディング対照として使用した。（図２２Ｄ）患者乳がん組織（乳房３）にＰ３が存在しないことを示す免疫組織化学。左のパネル、低分化癌と混合好中球を示すＨ＆Ｅ切片（元の倍率３２００）。右のパネル、Ｐ３の免疫組織化学的染色は、混合好中球におけるＰ３の染色が陽性（茶色）であることを示すが、乳がん細胞では示されない。挿入図（元の倍率３４００）は、好中球を貪食するまれな腫瘍細胞を示す。画像は両方とも同じ患者から撮影したものであり、５つの組織の代表的なものである。矢頭は好中球を示す。

【００４７】

【図２３】Ｐ３は乳がん細胞系によって取り込まれ、リソソーム区画に局在する。（図２３Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＣＦ－７およびＭＣＦ－７－ＨＥＲ１８細胞系を可溶性Ｐ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に１時間、４時間および２４時間インキュベートし、次いで、抗Ｐ３　Ａｂで細胞内染色した。三連の実験群についてＭＦＩを測定し、非パルス細胞のＭＦＩに対して正規化した。非パルス細胞と対比したＭＦＩの増加倍率をｙ軸上にプロットする。データは平均６ＳＥＭであり、２回の独立した実験の代表的なものである。（図２３Ｂ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を漸増用量の可溶性Ｐ３またはＯＶＡ（ｏｖａ）と共にインキュベートし、それぞれ抗Ｐ３または抗ＯＶＡ　Ａｂを使用してフローサイトメトリーによって、Ｐ３またはＯＶＡの細胞内取り込みについて分析した。データは、二連の実験からの平均６ＳＥＭである。（図２３Ｃ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を可溶性Ｐ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に培養し、次いで、Ｐ３（赤色）およびＬＡＭＰ－２（緑色）について細胞内染色した。オーバーレイ画像（黄色）によって示されているように、共焦点顕微鏡画像は、Ｐ３が、取り込みの４時間後にリソソーム区画に局在することを実証している。ＤＡＰＩの使用により、核は青色に見える。スケールバー、５ｍｍ。

【００４８】

【図２４－１】Ｐ３の取り込みならびにＰ３およびＮＥの交差提示は、ＰＲ１－ＣＴＬおよび抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２による死滅化に対する乳がんの感受性を増加させる。（図２４Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がん細胞を可溶性Ｐ３、照射ＰＭＮまたはＰＢＭＣと共に４時間インキュベートした。細胞を透過処理し、抗Ｐ３　Ａｂで染色し、フローサイトメトリーによって分析した。細胞関連の取り込みについて、フローサイトメトリーで認められた光散乱により、ＰＢＭＣ、ＰＭＮおよびＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞間で明確な差異が示された。ＰＢＭＣおよびＰＭＮのみをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊ｐ、０．０５）。データは、二連の実験からの平均６ＳＥＭである。（図２４Ｂ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がん細胞を、漸増時点で（ａｔ　ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ　ｔｉｍｅ　ｐｏｉｎｔｓ）可溶性Ｐ３またはＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に培養し、次いで、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現について分析した。二連の実験から、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２のＭＦＩは、非パルス細胞と対比して平均６ＳＥＭ倍増加していることが示されている。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊ｐ＝０．０１、＊＊ｐ，０．０００１）。（図２４Ｃ～Ｄ）ＮＥまたはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）および抗原（Ａｇ）提示阻害剤ブレフェルジンＡまたはラクタシスチンを含有する媒体中で、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を２４時間培養した。次いで、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現について、細胞を分析した。代表的な実験の二連のウェルから、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２のＭＦＩの平均６ＳＥＭを示す。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊ｐ，０．０１、＊＊ｐ，０．０００１）。（図２４Ｅ）Ｐ３またはＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）を含有する媒体中で、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を一晩培養し、カルセイン－ＡＭを負荷し、次いで、ＰＲ１－ＣＴＬと共に４時間共培養した。放出されたカルセイン－ＡＭを測定することによって、細胞傷害を決定した。ＮＥパルスまたはＰ３パルス細胞は、非パルスＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞と対比して高い死滅化を示す。ＰＲ１パルスＴ２細胞および非パルスＴ２細胞をそれぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウ

ェルからの平均６ＳＥＭである。（図２４Ｆ）ＭＤＡＭＢ－２３１細胞をＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）またはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に２４時間培養した。次いで、細胞を抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（８Ｆ４）Ａｂと共に６０分間インキュベートし、次いで、補体を添加した。カルセイン－ＡＭの放出を使用して補体依存性細胞傷害を測定し、８Ｆ４　ＡｂによるＮＥパルスまたはＰ３パルスＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の特異的死滅化を示す。細胞傷害データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均６ＳＥＭである。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、対応のないｔ検定を実施した（＊ｐ，０．０５）。

【図２４－２】Ｐ３の取り込みならびにＰ３およびＮＥの交差提示は、ＰＲ１－ＣＴＬおよび抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２による死滅化に対する乳がんの感受性を増加させる。（図２４Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がん細胞を可溶性Ｐ３、照射ＰＭＮまたはＰＢＭＣと共に４時間インキュベートした。細胞を透過処理し、抗Ｐ３　Ａｂで染色し、フローサイトメトリーによって分析した。細胞関連の取り込みについて、フローサイトメトリーで認められた光散乱により、ＰＢＭＣ、ＰＭＮおよびＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞間で明確な差異が示された。ＰＢＭＣおよびＰＭＮのみをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊ｐ、０．０５）。データは、二連の実験からの平均６ＳＥＭである。（図２４Ｂ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がん細胞を、漸増時点で（ａｔ　ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ　ｔｉｍｅ　ｐｏｉｎｔｓ）可溶性Ｐ３またはＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に培養し、次いで、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現について分析した。二連の実験から、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２のＭＦＩは、非パルス細胞と対比して平均６ＳＥＭ倍増加していることが示されている。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊ｐ＝０．０１、＊＊ｐ，０．０００１）。（図２４Ｃ～Ｄ）ＮＥまたはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）および抗原（Ａｇ）提示阻害剤ブレフェルジンＡまたはラクタシスチンを含有する媒体中で、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を２４時間培養した。次いで、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現について、細胞を分析した。代表的な実験の二連のウェルから、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２のＭＦＩの平均６ＳＥＭを示す。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊ｐ，０．０１、＊＊ｐ，０．０００１）。（図２４Ｅ）Ｐ３またはＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）を含有する媒体中で、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を一晩培養し、カルセイン－ＡＭを負荷し、次いで、ＰＲ１－ＣＴＬと共に４時間共培養した。放出されたカルセイン－ＡＭを測定することによって、細胞傷害を決定した。ＮＥパルスまたはＰ３パルス細胞は、非パルスＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞と対比して高い死滅化を示す。ＰＲ１パルスＴ２細胞および非パルスＴ２細胞をそれぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均６ＳＥＭである。（図２４Ｆ）ＭＤＡＭＢ－２３１細胞をＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）またはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に２４時間培養した。次いで、細胞を抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（８Ｆ４）Ａｂと共に６０分間インキュベートし、次いで、補体を添加した。カルセイン－ＡＭの放出を使用して補体依存性細胞傷害を測定し、８Ｆ４　ＡｂによるＮＥパルスまたはＰ３パルスＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の特異的死滅化を示す。細胞傷害データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均６ＳＥＭである。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、対応のないｔ検定を実施した（＊ｐ，０．０５）。

【００４９】

【図２５】乳がんおよび黒色腫患者では、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２およびＰＲ１－ＣＴＬが検出される。（図２５Ａ）抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（８Ｆ４）－６４７（赤色）および抗ＣＫ７）－ＦＩＴＣ（緑色）で切除ＨＬＡ－Ａ２＋患者乳がん組織（乳房１および４）を染色し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡検査を使用してイメージングした。８Ｆ４とＣＫ７による共染色によって示されているように、乳がん細胞ではＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２が発現しているようである。ＤＡＰＩ（青色）を使用して、細胞核を染色した。（図２５Ｂ）抗ＣＤ４５－６４７（赤色）（左のパネル）または抗ＣＫ７－ＦＩＴＣ（緑色）および８Ｆ４－６４７（赤色）（右のパネル）で切除ＨＬＡ－Ａ２＋乳がん組織由来の連続切片を染色し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡検査を使用してイメージングした。最小の白血球

（ＣＤ４５２）を有する領域では、乳がん細胞（８Ｆ４＋／ＣＫ７＋）によってＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２が発現されており、それにより、乳がん細胞によるＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現が裏付けられる。ＤＡＰＩ（青色）を使用して、細胞核を染色した。（図２５Ｃ）箱髭図は、乳がん（ｎ＝１１）、黒色腫（ｎ＝７）を有するＨＬＡ－Ａ２＋患者および健常（ｎ＝９）ＨＬＡ－Ａ２＋ドナー由来の末梢血におけるＰＲ１－ＣＴＬを示す。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、マン－ホイットニーＵ検定を実施した（＊ｐ，０．０５）。（図２５Ｄ）８Ｆ４－６４７（赤色）および抗ＭＩＴＦ－ＦＩＴＣ（緑色）で切除ＨＬＡ－Ａ２＋（黒色腫１）およびＨＬＡ－Ａ２２（黒色腫２）患者組織を染色し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡検査を使用してイメージングした。８Ｆ４とＭＩＴＦによる共染色によって示されているように、ＨＬＡ－Ａ２＋黒色腫サンプル（黒色腫１）ではＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２が発現しているようである。ＤＡＰＩ（青色）を使用して、細胞核を染色した。スケールバー、２０ｍｍ。

【００５０】

【図２６－１】黒色腫細胞によるＰ３およびＮＥの交差提示は、ＰＲ１－ＣＴＬに対する感受性を増加させる。（図２６Ａ）原発性黒色腫患者サンプルにおけるＮＥ（茶色）およびＭＩＴＦ（ピンク色）の二重染色または（図２６Ｂ）原発性黒色腫患者サンプルにおけるＰ３（茶色）およびＭＩＴＦ（ピンク色）の二重染色は、黒色腫では、ＮＥおよびＰ３が欠如していることを示している。画像は、元の倍率３１００で撮影したものである。挿入図（元の倍率３４００）は、分散したＮＥまたはＰ３陽性細胞を示しており、これらは炎症細胞である可能性が高い。（図２６Ｃ）黒色腫細胞系では、ＮＥおよびＰ３が存在しないことを示すウエスタンブロット。Ｕ－９３７白血病細胞系をＮＥおよびＰ３の陽性対照として使用した。チューブリンをローディング対照として使用した。Ｍ＝分子量（ｍ．ｗ．）マーカー。（図２６Ｄ～Ｅ）５２６　ＨＬＡ－Ａ２＋黒色腫細胞系を漸増時点で可溶性ＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）またはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に培養し、次いで、（図２６Ｄ）ＮＥおよびＰ３の取り込みならびに（図２６Ｅ）交差提示（すなわち、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現）について分析した。非パルス細胞と対比した、ＮＥまたはＰ３（図２６Ｄ）またはＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（図２６Ｅ）のＭＦＩの増加倍率をｙ軸上に示す。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊＊ｐ＝０．０００１、＊ｐ，０．０５）。データは、二連の実験からの平均６ＳＥＭを表す。（Ｆ）カルセイン－ＡＭ細胞傷害アッセイは、ＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）およびＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）を２４時間パルスした５２６　ＨＬＡ－Ａ２＋黒色腫細胞系のＰＲ１－ＣＴＬによる死滅化を、非パルス（Ｕｎｐ）Ｍｅｌ５２６と対比して示す。非パルス（Ｔ２　Ｕｎｐ）およびＰＲ１パルス（Ｔ２　ＰＲ１）Ｔ２細胞をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均６ＳＥＭである。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、対応のないｔ検定を実施した（＊ｐ，０．０５）。

【図２６－２】黒色腫細胞によるＰ３およびＮＥの交差提示は、ＰＲ１－ＣＴＬに対する感受性を増加させる。（図２６Ａ）原発性黒色腫患者サンプルにおけるＮＥ（茶色）およびＭＩＴＦ（ピンク色）の二重染色または（図２６Ｂ）原発性黒色腫患者サンプルにおけるＰ３（茶色）およびＭＩＴＦ（ピンク色）の二重染色は、黒色腫では、ＮＥおよびＰ３が欠如していることを示している。画像は、元の倍率３１００で撮影したものである。挿入図（元の倍率３４００）は、分散したＮＥまたはＰ３陽性細胞を示しており、これらは炎症細胞である可能性が高い。（図２６Ｃ）黒色腫細胞系では、ＮＥおよびＰ３が存在しないことを示すウエスタンブロット。Ｕ－９３７白血病細胞系をＮＥおよびＰ３の陽性対照として使用した。チューブリンをローディング対照として使用した。Ｍ＝分子量（ｍ．ｗ．）マーカー。（図２６Ｄ～Ｅ）５２６　ＨＬＡ－Ａ２＋黒色腫細胞系を漸増時点で可溶性ＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）またはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に培養し、次いで、（図２６Ｄ）ＮＥおよびＰ３の取り込みならびに（図２６Ｅ）交差提示（すなわち、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現）について分析した。非パルス細胞と対比した、ＮＥまたはＰ３（図２６Ｄ）またはＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（図２６Ｅ）のＭＦＩの増加倍率をｙ軸上に示す。Ｐ

ｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、ＡＮＯＶＡとそれに続いてテューキー検定を実施した（＊＊ｐ＝０．０００１、＊ｐ，０．０５）。データは、二連の実験からの平均６ＳＥＭを表す。（Ｆ）カルセイン－ＡＭ細胞傷害アッセイは、ＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）およびＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）を２４時間パルスした５２６　ＨＬＡ－Ａ２＋黒色腫細胞系のＰＲ１－ＣＴＬによる死滅化を、非パルス（Ｕｎｐ）Ｍｅｌ５２６と対比して示す。非パルス（Ｔ２　Ｕｎｐ）およびＰＲ１パルス（Ｔ２　ＰＲ１）Ｔ２細胞をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均６ＳＥＭである。Ｐｒｉｓｍ５．０ソフトウェアを使用して、対応のないｔ検定を実施した（＊ｐ，０．０５）。

【発明を実施するための形態】

【００５１】

例示的な実施形態の説明

ＰＲ－１自己ペプチド（ＶＬＱＥＬＮＶＴＶ；配列番号４５）は、白血病細胞膜で発現されるＨＬＡ－Ａ＊０２０１においてＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）によって認識されることが示されており、ＰＲ１特異的ＣＴＬは骨髄性白血病細胞を特異的に溶解するが、正常骨髄細胞を溶解しない。ＡＭＬ、ＣＭＬおよびＭＤＳを有するＨＬＡ－Ａ２＋患者にＰＲ１ペプチドをワクチン接種することにより、患者の５８％でＰＲ－１－ＣＴＬ免疫が誘導され、患者６６人中１３人（２０％）で客観的臨床応答が誘導された。これらの結果は有望であるが、高全身腫瘍組織量は依然として、ワクチン接種の成功を妨げる障害である。

【００５２】

ＰＲ１ペプチドは、骨髄性白血病細胞の表面上においてのみ十分な量で発現しており、正常骨髄細胞上では発現していないので、本発明者らは、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１にターゲティングされる抗体であって、骨髄性白血病を有する患者を治療的に処置するのに使用され得るか、またはどの患者が、ＰＲ１ベースの免疫療法、例えばワクチンもしくは養子Ｔ細胞移植に対して感受性であり得るかを同定するのに使用され得る抗体を開発しようとした。ＨＬＡ－Ａ２＋は、最も一般的に発現されているＨＬＡ対立遺伝子であるので（一般的な白人集団の４０％）、Ｔ細胞エピトープに関する抗体ベースの治療法は新規なものであり、幅広く適用され得る。組換えＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーで免疫適格ＢＡＬＢ／ｃマウスを免疫することによって、複合ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１エピトープに対する特異性を有するＩｇＧ２ａカッパモノクローナル抗体（８Ｆ４）を得た。８Ｆ４抗体は、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に対する高い親和性（K_D＝９．９ナノモル濃度）を有することが示され、ＰＲ１パルスＴ２標的細胞のみを認識し、対照ペプチドパルス細胞を認識しないことが示された。ＦＡＣＳおよび共焦点顕微鏡検査の両方を使用したところ、８Ｆ４はＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬに結合して該細胞を標識するが、正常ＨＬＡ－Ａ２＋末梢血細胞には結合しない。

【００５３】

加えて、８Ｆ４は、ＨＬＡ－Ａ２＋原発性ヒト白血病の用量依存的な補体媒介性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導したが、正常骨髄細胞では誘導しなかった。重要なことに、８Ｆ４抗体は、動物への養子移植時に１回だけ抗体に曝露するＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＮＯＤ／ＳＣＩＤ動物モデルにおけるヒトＡＭＬの生着を特異的に防止した。加えて、乳がん細胞では、Ｐ３およびＮＥが発現していないという事実にもかかわらず、８Ｆ４は乳がん腫瘍の成長を遅延させ、生存を延長させた。総合すると、これらの結果は、重要なＴ細胞標的抗原である細胞膜結合ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１エピトープに対する特異性を有する抗体の作製が、ヒト白血病および固形腫瘍を特異的にターゲティングおよび排除することを示している。

【００５４】

Ｉ．定義

語句「単離された」または「生物学的に純粋な」は、材料であって、その天然の状態で見出されるとおり該材料に通常付随する成分を、実質的にまたは本質的に含まない材料を

指す。したがって、本発明によって単離されたペプチドは、好ましくは、そのインサイチュ環境でペプチドと通常会合した材料を含まない。

【００５５】

「主要組織適合性複合体」または「ＭＨＣ」は、生理学的免疫応答を担う細胞相互作用の制御で役割を果たす遺伝子のクラスターである。ヒトでは、ＭＨＣ複合体は、ＨＬＡ複合体としても公知である。ＭＨＣ複合体およびＨＬＡ複合体の詳細な説明については、Ｐａｕｌ，１９９３を参照のこと。

【００５６】

「ヒト白血球抗原」または「ＨＬＡ」は、ヒトクラスＩまたはクラスＩＩ主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）タンパク質である（例えば、Ｓｔｉｔｅｓ，１９９４を参照のこと）。

【００５７】

本明細書で使用される場合、「ＨＬＡスーパータイプ（ｓｕｐｅｒｔｙｐｅ）またはファミリー」は、共有するペプチド結合特異性に基づいて分類されたＨＬＡ分子セットを記載する。特定のアミノ酸モチーフを保有するペプチドに対していくらか類似の結合親和性を共有するＨＬＡクラスＩ分子を、ＨＬＡスーパータイプに分類する。ＨＬＡスーパーファミリー、ＨＬＡスーパータイプファミリー、ＨＬＡファミリーおよびＨＬＡ　ｘｘ様スーパータイプ分子（ｘｘは、特定のＨＬＡ型を示す）という用語は、同義語である。

【００５８】

用語「モチーフ」は、特定のＨＬＡ分子によって認識される、定義された長さのペプチド、通常、クラスＩ　ＨＬＡモチーフについては約８～１３アミノ酸のペプチドおよびクラスＩＩ　ＨＬＡモチーフについては約６～約２５アミノ酸のペプチド中の残基パターンを指す。ペプチドモチーフは、典型的には、各ヒトＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる各タンパク質で異なり、一次および二次アンカー残基のパターンが異なる。

【００５９】

「異常細胞」は、非定型的な成長、非定型的な部位における典型的な成長、または非定型的な標的に対する典型的な作用を含む、その細胞型に典型的な特徴を有すると考えられる任意の細胞である。このような細胞としては、がん細胞、良性過形成もしくは形成異常細胞、炎症細胞または自己免疫細胞が挙げられる。

【００６０】

ＩＩ．ＰＲ－１およびＨＬＡ拘束

Ａ．ＰＲ－１

ＰＲ－１自己ペプチド（ＶＬＱＥＬＮＶＴＶ；配列番号４５）は、その両方が白血病で異常発現しているプロテイナーゼ３（Ｐ３）および好中球エラスターゼ（ＮＥ）に由来する。それは、白血病細胞膜で発現されるＨＬＡ－Ａ＊０２０１においてＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）によって認識されることが示されている。ＰＲ１特異的ＣＴＬは、骨髄性白血病（急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）および骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）を含む）細胞を特異的に溶解するが、正常骨髄細胞を溶解しない。以前に、本発明者らは、モンタニドＩＳＡ－５１中のＰＲ－１ペプチドおよびＧＭ－ＣＳＦにより、ＡＭＬ、ＣＭＬおよびＭＤＳを有するＨＬＡ－Ａ２＋患者をＰＲ－１ワクチン接種することにより、患者の５８％でＰＲ－１－ＣＴＬ免疫が誘導され、患者６６人中１３人（２０％）で客観的臨床応答が誘導されたことを示した。

【００６１】

Ｂ．ＨＬＡ－Ａ２

ヒト白血球抗原系（ＨＬＡ）は、ヒトにおける主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）の名称である。この超遺伝子座（ｓｕｐｅｒｌｏｃｕｓ）は、ヒトにおける免疫系機能に関係する多数の遺伝子を含有する。この遺伝子群は第６染色体上に存在し、細胞表面抗原提示タンパク質および多くの他の遺伝子をコードする。特定の遺伝子によってコードされるこれらのタンパク質は、臓器移植における因子として歴史的に発見された結果、抗原としても公知である。主要ＨＬＡ抗原は、免疫機能に必須の因子である。様々なクラスが様々な機

能を有する。

【００６２】

ＨＬＡクラスＩ抗原（Ａ、ＢおよびＣ）は、細胞内由来のペプチドを提示する（存在する場合には、ウイルスペプチドを含む）。これらのペプチドは、リソソーム（ｌｙｓｏｚｏｍｅ）で分解される消化タンパク質から産生される。ペプチドは、一般に、約９アミノ酸長の小さなポリマーである。外来抗原は、細胞を破壊するキラーＴ細胞（ＣＤ８$^{+}$細胞とも称される）を誘引する。ＨＬＡクラスＩＩ抗原（ＤＲ、ＤＰおよびＤＱ）は、細胞外由来の抗原をＴリンパ球に提示する。これらの特定の抗原はＴヘルパー細胞の複製を刺激し、次いで、これらのＴヘルパー細胞が抗体産生Ｂ細胞を刺激し、サプレッサーＴ細胞によって自己抗原が抑制される。

【００６３】

ＨＬＡ－Ａ２（Ａ２）は、ＨＬＡ－Ａ「Ａ」血清型グループ内のヒト白血球抗原血清型である。血清型により、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１、＊０２０２、＊０２０３、＊０２０６および＊０２０７遺伝子産物を含む多くのＨＬＡ－Ａ＊０２対立遺伝子の遺伝子産物が同定される。Ａ＊０２は全世界で共通だが、Ａ＊０２０１は、北アジアおよび北米で高頻度である。Ａ２は最も多様な血清型であり、東アフリカおよび南西アジアで多様性を示す。北アジアにおけるＡ＊０２０１の頻度は高いが、その多様性は、Ａ＊０２０１、あまり一般的ではないアジアバリアント（ｖａｒｉａｎｔ）Ａ＊０２０３、Ａ＊０２０６に限定される。

【００６４】

血清型は、ＨＬＡ－Ａ　α鎖のα^{2}サブセットの抗体認識によって決定される。Ａ２の場合、α「Ａ」鎖はＨＬＡ－Ａ＊０２対立遺伝子群によってコードされ、β鎖はＢ２Ｍ遺伝子座によってコードされる。Ａ２およびＡ＊０２は、意味の点ではほぼ同義である。Ａ２は、他の場所よりも北アジアおよび北米で一般的であり、いくつかの長いハプロタイプの一部である。

【００６５】

ＩＩＩ．抗体

本発明は、ＨＬＡ－Ａ２提示との関連では、ＰＲ１に結合する抗体の生成および使用に関する。抗体は、特定の標的または一連の抗原性で関係する標的に「特異的に結合」することができる。本明細書で使用される場合、抗体は、抗体の可変領域に対する結合に基づいて、抗原性で区別可能な分子と識別される場合に、抗原に「特異的に結合」することができるといわれる。このような相互作用は、化合物のクラスが関与する非特異的結合とは対照的に、化学構造とは無関係である（例えば、ニトロセルロースに対するタンパク質の結合など）。特に、本発明の抗体は、近縁分子にさえ結合不可能であるか、または実質的に結合不可能であるように、「高度に特異的な結合」を示し得る。

【００６６】

モノクローナル抗体は、米国特許第４，１９６，２６５号（参照により本明細書に組み込まれる）に例示されているものなどの周知技術を使用して容易に調製され得る。典型的には、技術は、最初に、免疫応答を提供するのに十分な様式で選択抗原（例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド）によって適切な動物を免疫することを含む。マウスおよびラットなどの齧歯類は、好ましい動物である。次いで、免疫動物由来の脾臓細胞を不死骨髄腫細胞の細胞と融合させる。次いで、成功した融合体を、適切な抗体の産生についてスクリーニングする。

【００６７】

一実施形態では、抗体分子は、例えばｍＡｂのタンパク質分解切断によって生成される断片（例えば、（Ｆ（ａｂ’）、Ｆ（ａｂ’）２）、または例えば組換え手段によって生成可能な一本鎖免疫グロブリンを含む。このような抗体誘導体は一価である。一実施形態では、このような断片を互いに組み合わせることもできるし、または他の抗体断片もしくは受容体リガンドと組み合わせて「キメラ」結合分子を形成することもできる。重要なことに、このようなキメラ分子は、同じ分子の異なるエピトープに結合することができる置

換基を含有してもよいし、または活性化プロテインＣエピトープおよび「非活性化プロテインＣ」エピトープに結合することができるものでもよい。

【００６８】

抗体またはその断片が治療目的のものである場合、任意の免疫応答を弱めるためにそれらを「ヒト化」することが望ましい場合がある。このようなヒト化抗体は、インビトロまたはインビボの文脈で研究され得る。例えば、抗体の免疫原性部分を、対応するが非免疫原性である部分で置き換えることによって、ヒト化抗体を生成し得る（すなわち、キメラ抗体）。ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／Ｕ．Ｓ．８６／０２２６９号；欧州特許出願第１８４，１８７号；欧州特許出願第１７１，４９６号；欧州特許出願第１７３，４９４号；ＰＣＴ出願第ＷＯ８６／０１５３３号；欧州特許出願第１２５，０２３号；Ｓｕｎら、（１９８７）；Ｗｏｏｄら、（１９８５）；およびＳｈａｗら、（１９８８）（これらの参考文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる）。「ヒト化」キメラ抗体の一般的な総説は、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（１９８５（これも、参照により本明細書に組み込まれる）によって提供されている。あるいは、ＣＤＲまたはＣＥＡの置換によって、「ヒト化」抗体を生成し得る。Ｊｏｎｅｓら、（１９８６）；Ｖｅｒｈｏｅｙａｎら、（１９８８）；Ｂｅｉｄｌｅｒら、（１９８８）（これらの参考文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる）。

【００６９】

Ａ．バリアント

以下は、改変されたタンパク質を作製するための、タンパク質のアミノ酸の変更に基づいた考察である。このような変化の作製では、アミノ酸のハイドロパシーインデックスを考慮することができる。タンパク質上の相互作用的生物学的機能の付与におけるアミノ酸のハイドロパシーインデックスの重要性は当技術分野で一般に理解されている（Ｋｙｔｅ　ａｎｄ　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ，１９８２）。アミノ酸の相対ハイドロパシー性が、得られたタンパク質の二次構造に寄与すること、言い換えると、タンパク質の他の分子（例えば、酵素、基質、受容体、ＤＮＡ、抗体、および抗原など）との相互作用を定義することが認められている。

【００７０】

親水性に基づいて類似のアミノ酸の置換を有効に行うことができることも当技術分野で理解されている。米国特許第４，５５４，１０１号（参照により本明細書に組み込まれる）は、タンパク質の最大局所平均親水性は、その隣接アミノ酸の親水性に支配されているため、タンパク質の生物学的性質と相関すると述べている。米国特許第４，５５４，１０１号に詳細が記載されているように、アミノ酸残基に以下の親水性値が割り当てられている。塩基性アミノ酸：アルギニン（＋３．０）、リジン（＋３．０）、およびヒスチジン（－０．５）；酸性アミノ酸：アスパラギン酸（＋３．０±１）、グルタミン酸（＋３．０±１）、アスパラギン（＋０．２）、およびグルタミン（＋０．２）；親水性非イオン性アミノ酸：セリン（＋０．３）、アスパラギン（＋０．２）、グルタミン（＋０．２）、およびトレオニン（－０．４）、硫黄含有アミノ酸：システイン（－１．０）およびメチオニン（－１．３）；疎水性非芳香族アミノ酸：バリン（－１．５）、ロイシン（－１．８）、イソロイシン（－１．８）、プロリン（－０．５±１）、アラニン（－０．５）、およびグリシン（０）；疎水性芳香族アミノ酸：トリプトファン（－３．４）、フェニルアラニン（－２．５）、およびチロシン（－２．３）。

【００７１】

アミノ酸を類似の親水性を有する別のアミノ酸に代えて置換して、生物学的または免疫学的に改変されたタンパク質を産生することができることが理解される。このような変更では、親水性値が±２以内のアミノ酸の置換が好ましく、±１以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、±０．５以内のアミノ酸の置換がさらにより特別に好ましい。

【００７２】

上で概説したように、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性（例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、およびサイズなど）に基づく。様々な上記特徴

を考慮した置換の例は当業者に周知であり、アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンが含まれる。

【００７３】

本発明はまた、抗体の多数の天然の性質を有するが、特徴が変化および／または改良されたポリペプチドの調製のためのペプチド模倣物を使用することができる（例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，１９９３を参照のこと）。ペプチド模倣物の使用の背後にある基礎となる論理的根拠は、タンパク質のペプチド骨格が主に抗体および抗原の分子相互作用などの分子相互作用を容易にするような方法でアミノ酸側鎖を配向するように存在することである。これらの原理を、上で概説した原理と組み合わせて使用して、抗体の多数の天然の性質を有するが、特徴が変化し、さらに改良された第２世代の分子を操作することができる。

【００７４】

本発明はさらに、挿入バリアントまたは欠失バリアントなどの配列バリアントを用い得ることが意図される。欠失バリアントは、天然タンパク質の１つ以上の残基を欠く。挿入変異体（ｍｕｔａｎｔ）は、典型的には、ポリペプチドの非末端点における物質の付加を含む。また、配列が上記判定基準（生物学的活性の維持を含む）を満たす限り、挿入配列バリアントはＮ末端またはＣ末端アミノ酸を含んでもよく、基本的には本明細書に開示される配列の１つに記載されているものでもよいと理解されよう。

【００７５】

本発明はまた、アイソタイプ改変を意図する。以下で議論するように、抗体８Ｆ４はＩｇＧ２ａ－κであると決定した。異なるアイソタイプを有するようにＦｃ領域を改変することによって、異なる機能を達成し得る。例えば、ＩｇＧ１に変化させることによって抗体依存性細胞傷害を増加させ得、クラスＡにスイッチすることによって組織分布を改善し得、クラスＭにスイッチすることによって結合価を改善し得る。

【００７６】

標準的な分子生物学的技術による発現、またはポリペプチドの化学合成を含む当業者に公知の任意の技術によって、改変抗体を作製し得る。組換え発現方法は、本文書の他の場所で取り扱う。

【００７７】

Ｂ．一本鎖抗体

一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域が短い（通常は、セリン、グリシン）リンカーによって共に連結された融合物である。定常領域の除去およびリンカーペプチドの導入にもかかわらず、このキメラ分子は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。右の画像は、この改変が通例として特異性を変化させない仕組みを示している。歴史的には、単一ペプチドとして抗原結合ドメインを発現させるのに非常に便利なファージディスプレイを容易にするために、これらの分子が作られた。あるいは、ハイブリドーマ由来のサブクローニングされた重鎖および軽鎖から、ｓｃＦｖを直接作り得る。一本鎖可変断片は、完全抗体分子で見出される定常Ｆｃ領域を欠くので、共通の結合部位（例えば、プロテインＡ／Ｇ）を抗体の精製に使用する。プロテインＬはカッパ軽鎖の可変領域と相互作用するので、多くの場合、プロテインＬを使用してこれらの断片を精製／固定化し得る。

【００７８】

可動性リンカーは、一般に、ヘリックスおよびターン促進アミノ酸残基、例えばアラニン（ａｌａｉｎｅ）、セリンおよびグリシンから構成される。しかしながら、他の残基も同様に機能し得る。Ｔａｎｇら、（１９９６）は、タンパク質リンカーライブラリーから、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）に合ったリンカーを迅速に選択する手段としてファージディスプレイを使用した。可変組成の１８アミノ酸のポリペプチドをコードするセグメントによって、重鎖および軽鎖可変ドメインの遺伝子を連結したランダムリンカーライブラリーを構築した。ｓｃＦｖレパートリー（約５×１０^{6}個の異なるメンバー）を線状ファージ上にディスプレイし、ハプテンによる親和性選択に供した。選択したバリアント集団は結合

活性の有意な増加を示したが、かなりの配列多様性を保持していた。続いて、１０５４個の個々のバリアントをスクリーニングすることにより、可溶性形態で効率的に産生された触媒活性ｓｃＦｖを得た。配列分析により、選択したつなぎ鎖（ｔｅｔｈｅｒ）のわずかな共通特徴として、リンカー（V_HＣ末端の後ろの２残基）のプロリンが保存的であること、ならびに他の位置ではアルギニンおよびプロリンが豊富であることが明らかになった。

【００７９】

本発明の組換え抗体はまた、受容体の二量体化または多量体化を可能にする配列または部分を含み得る。このような配列としては、Ｊ鎖と共同して多量体の形成を可能にするＩｇＡ由来のものが挙げられる。別の多量体化ドメインは、Ｇａｌ４二量体化ドメインである。他の実施形態では、２つの抗体の組み合わせを可能にする作用物質（ａｇｅｎｔ）、例えばビオチン／アビジンを用いて鎖を改変し得る。

【００８０】

別の実施形態では、非ペプチドリンカーまたは化学的単位を使用して受容体軽鎖および重鎖を連結することによって、一本鎖抗体を作り得る。一般に、軽鎖および重鎖を別個の細胞で産生し、精製し、続いて適切な方法で互いに連結する（すなわち、適切な化学的架橋を介して、重鎖のＮ末端を軽鎖のＣ末端に結合する）。

【００８１】

架橋試薬は、２つの異なる分子、例えば安定剤および凝固剤の官能基を結び付ける分子架橋を形成するのに使用される。しかしながら、異なる類似体から構成される同一の類似体または異種複合体の二量体または多量体が作られ得ることが意図される。２つの異なる化合物を段階的に連結するために、望ましくないホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性架橋リンカーを使用し得る。表３は、いくつかの架橋リンカーを示す。

表３－ヘテロ二官能性架橋リンカー

【表３－１】

リンカー	反応性	利点および用途	スペーサーアームの長さ＼架橋後
SMPT	第一級アミン スルフヒドリル	・より大きな安定性	11.2 A
SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	・チオール化 ・切断可能な架橋	6.8 A
LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	・拡張スペーサーアーム	15.6 A
スルホ-LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	・拡張スペーサーアーム ・水溶性	15.6 A
SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	・・安定マレイミド反応基 ・・酵素-抗体コンジュゲーション ・・ハプテン-キャリアタンパク質コンジュゲーション	11.6 A
スルホ-SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	・・安定マレイミド反応基 ・水溶性 ・・酵素-抗体コンジュゲーション	11.6 A
MBS	第一級アミン スルフヒドリル	・・酵素-抗体コンジュゲーション ・ハプテン-キャリアタンパク質コンジュゲーション	9.9 A
スルホ-MBS	第一級アミン スルフヒドリル	・水溶性	9.9 A
SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	・・酵素-抗体コンジュゲーション	10.6 A
スルホ-SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	・水溶性	10.6 A

【表３－２】

リンカー	反応性	利点および用途	スペーサーアームの長さ＼架橋後
SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	‥拡張スペーサーアーム ‥酵素-抗体コンジュゲーション	14.5 A
スルホ-SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	‥拡張スペーサーアーム ・水溶性	14.5 A
EDC/スルホ-NHS	第一級アミン カルボキシル基	・ハプテン-キャリアコンジュゲーション	0
ABH	非選択性炭水化物	・糖基と反応する	11.9 A

【００８２】

例示的なヘテロ二官能性架橋リンカーは、２つの反応性基を含有する：一方は、第一級アミン基（例えば、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）と反応するものであり、他方は、チオール基（例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応するものである。第一級アミン反応性基を介して、架橋剤は、一方のタンパク質（例えば、選択された抗体または断片）のリジン残基（複数可）と反応し得、チオール反応性基を介して、第１のタンパク質に結合した架橋剤は、他方のタンパク質（例えば、選択剤）のシステイン残基（遊離スルヒドリル基）と反応する。

【００８３】

血中で適度の安定性を有する架橋剤を用いることが好ましい。ターゲティング剤および治療剤／予防剤にコンジュゲートするのに上手く用いられ得る多数の種類のジスルフィド結合含有リンカーが公知である。立体障害されるジスルフィド結合を含有するリンカーは、より大きなインビボ安定性をもたらして、作用部位に到達する前にターゲティングペプチドが放出されるのを防ぐことが判明し得る。したがって、これらのリンカーは、連結剤の一群である。

【００８４】

別の架橋試薬はＳＭＰＴであり、これは、隣接するベンゼン環およびメチル基によって「立体障害される」ジスルフィド結合を含有する二官能性の架橋リンカーである。ジスルフィド結合の立体障害は、組織および血中に存在し得るチオラートアニオン、例えばグルタチオンによる攻撃から結合を保護する機能を果たし、それにより、結合した作用物質が標的部位に送達される前にコンジュゲートがデカップリングされるのを防ぐのに役立つと考えられている。

【００８５】

ＳＭＰＴ架橋試薬は、他の多くの公知の架橋試薬のように、システインのＳＨまたは第一級アミン（例えば、リジンのイプシロンアミノ基）などの官能基を架橋する能力を与える。別の可能な種類の架橋剤としては、開裂可能なジスルフィド結合を含有するヘテロ二官能性光反応性フェニルアジド、例えばスルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド（ｓａｌｉｃｙｌａｍｉｄｏ））エチル－１，３’－ジチオプロピオナートが挙げられる。Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミジル基は第一級アミノ基と反応し、フェニルアジドは（光分解されると）任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【００８６】

障害（ｈｉｎｄｅｒｅｄ）架橋リンカーに加えて、非ヒンダードリンカーも本明細書に

したがって用いられ得る。保護ジスルフィドを含有または生成しないと考えられる他の有用な架橋リンカーとしては、ＳＡＴＡ、ＳＰＤＰおよび２－イミノチオランが挙げられる（Ｗａｗｒｚｙｎｃｚａｋ＆Ｔｈｏｒｐｅ，１９８７）。このような架橋リンカーの使用は、当技術分野で十分に理解されている。別の実施形態は、可動性リンカーの使用を含む。

【００８７】

米国特許第４，６８０，３３８号には、リガンドとアミン含有ポリマーおよび／またはタンパク質とのコンジュゲートを生成するのに、特にキレート剤、薬物、酵素、および検出可能な標識などとの抗体コンジュゲートを形成するのに有用な二官能性リンカーが記載されている。米国特許第５，１４１，６４８号および米国特許第５，５６３，２５０号には、様々な穏やかな条件下で切断可能な不安定結合を含有する切断可能なコンジュゲートが開示されている。切断が活性剤の放出をもたらすリンカーに目的の作用物質を直接結合し得る点で、このリンカーは特に有用である。特定の使用は、遊離アミノ基または遊離スルフヒドリル基をタンパク質、例えば抗体または薬物に付加することを含む。

【００８８】

米国特許第５，８５６，４５６号には、ポリペプチド成分を結合して融合タンパク質、例えば一本鎖抗体を作製するのに使用するためのペプチドリンカーが提供されている。リンカーは最大約５０アミノ酸長であり、少なくとも１つの存在する荷電アミノ酸（好ましくは、アルギニンまたはリジン）とそれに続くプロリンを含有し、より大きな安定性および低凝集を特徴とする。米国特許第５，８８０，２７０号には、様々な免疫診断および分離技術で有用なアミノオキシ含有リンカーが開示されている。

【００８９】

Ｃ．精製

特定の実施形態では、本発明の抗体を精製することができる。本明細書で使用される場合、用語「精製された」は、他の成分から単離可能であり、このタンパク質をその天然に得ることができる状態と比較して任意の程度で精製される組成物を指すことを意図する。したがって、精製されたタンパク質はまた、それが天然に存在し得る環境から遊離されたタンパク質を指す。用語「実質的に精製された」を使用する場合、この用語は、タンパク質またはペプチドが組成物の主成分を形成する（例えば、組成物中のタンパク質の約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％以上を構成する）組成物を指す。

【００９０】

タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、ポリペプチド画分および非ポリペプチド画分への細胞環境のあるレベルの粗分画を含む。他のタンパク質からポリペプチドが分離されると、目的のポリペプチドを、部分的または完全な精製（または均一になるまでの精製）を達成するためのクロマトグラフィ技術および電気泳動技術を使用してさらに精製することができる。純粋なペプチド調製物に特に適合した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィ、排除クロマトグラフィ；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；等電点電気泳動である。他のタンパク質精製方法には、硫酸アンモニウム、ＰＥＧ、および抗体などを使用したまたは熱変性による沈殿およびその後の遠心分離；ゲル濾過、逆相、ハイドロキシアパタイト、およびアフィニティクロマトグラフィ；ならびにこのような技術および他の技術との組み合わせが含まれる。

【００９１】

本発明の抗体の精製では、原核生物または真核生物の発現系でポリペプチドを発現させ、変性条件を使用してタンパク質を抽出することが望ましい場合がある。ポリペプチドを、ポリペプチドのタグ付部分に結合するアフィニティカラムを使用して他の細胞成分から精製することができる。当技術分野で一般に公知であるように、様々な精製工程の実施順序を変更し得るか、特定の工程を省略して、依然として実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に適切な方法をもたらすことができると考えられる。

【００９２】

一般的に、抗体のＦｃ部分に結合する作用物質（すなわち、プロテインＡ）を用いて、完全抗体を分画する。あるいは、抗原を使用して、精製するのと同時に適切な抗体を選択し得る。このような方法は、カラム、フィルターまたはビーズなどの支持体に結合した選択剤を利用することが多い。抗体を支持体に結合し、混入物資を除去し（例えば、洗い流し）、条件（塩、熱など）を適用することによって抗体を放出させる。

【００９３】

本開示に照らして、タンパク質またはペプチドの精製度の様々な定量方法が当業者に公知である。これらには、例えば、活性画分の比活性の決定、またはＳＤＳ／ＰＡＧＥ分析による画分内のポリペプチド量の評価が含まれる。画分の純度の別の評価方法は、画分の比活性を計算すること、これを最初の抽出物の比活性と比較すること、およびそれにより純度を計算することである。活性量を示すために使用される実際の単位は、勿論、精製を追跡するために選択された特定のアッセイ技術および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうかに依存する。

【００９４】

ポリペプチドの移動は、ＳＤＳ／ＰＡＧＥ条件が異なれば時折有意に変化し得ることが公知である（Ｃａｐａｌｄｉら、１９７７）。したがって、異なる電気泳動条件下では、精製または部分精製された発現産物の見かけ上の分子量が変化し得ることが認識される。

【００９５】

Ｄ．抗体と治療剤または診断剤とのコンジュゲーション

一実施形態では、本発明の抗体は、疾患の診断および治療で使用するための様々な試薬に連結され得る。様々な周知の化学反応および作用物質（これらのいくつかは、本文書の他の場所に記載される）を使用して、連結を実施し得る。

【００９６】

１．診断試薬

多くの診断剤／イメージング剤が、それらをタンパク質（抗体を含む）に結合するための方法と同様に当技術分野で公知である（例えば、米国特許第５，０２１，２３６号；米国特許第４，９３８，９４８号；および米国特許第４，４７２，５０９号（これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。使用されるイメージング部分は、常磁性イオン、放射性同位体、蛍光色素、ＮＭＲで検出可能な物質およびＸ線イメージング剤であり得る。

【００９７】

常磁性イオンの場合、例として、クロム（ＩＩＩ）、マンガン（ＩＩ）、鉄（ＩＩＩ）、鉄（ＩＩ）、コバルト（ＩＩ）、ニッケル（ＩＩ）、銅（ＩＩ）、ネオジム（ＩＩＩ）、サマリウム（ＩＩＩ）、イッテルビウム（ＩＩＩ）、ガドリニウム（ＩＩＩ）、バナジウム（ＩＩ）、テルビウム（ＩＩＩ）、ジスプロシウム（ＩＩＩ）、ホルミウム（ＩＩＩ）および／またはエルビウム（ＩＩＩ）などのイオンを挙げることができ、ガドリニウムが特に好ましい。Ｘ線イメージングなどの他の状況で有用なイオンとしては、限定されないが、ランタン（ＩＩＩ）、金（ＩＩＩ）、鉛（ＩＩ）および特にビスマス（ＩＩＩ）が挙げられる。

【００９８】

治療用途および／または診断用途のための放射性同位体の場合、アスタチン^{211}、^{14}炭素、^{51}クロム、^{36}塩素、^{57}コバルト、^{58}コバルト、銅^{67}、^{152}Ｅｕ、ガリウム^{67}、^{3}水素、ヨウ素^{123}、ヨウ素^{125}、ヨウ素^{131}、インジウム^{111}、^{59}鉄、^{32}リン、レニウム^{186}、レニウム^{188}、^{75}セレン、^{35}硫黄、テクネチウム^{99m}および／またはイットリウム^{90}を挙げることができる。^{125}Ｉは、多くの場合、特定の実施形態における使用に好ましく、テクネチウム^{99m}および／またはインジウム^{111}も、多くの場合、その低エネルギーおよび長期検出適合性により好ましい。本発明の放射性標識受容体は、当技術分野で周知の方法にしたがって生成され得る。例えば、ヨウ化ナトリウムおよび／もしくはヨウ化カリウム、ならびに化学酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウムまたは酵素酸化剤、例えばラクトペルオキシダーゼと接触させること

によって、受容体をヨウ素化し得る。リガンド交換法によって、例えば、第１スズ溶液で過テクネチウム酸塩を還元し、還元したテクネチウムをＳｅｐｈａｄｅｘカラム上にキレート化し、抗体をこのカラムにアプライすることによって、本発明によるＴｃＲをテクネチウム^{99m}で標識し得る。あるいは、例えば、過テクネチウム酸塩、還元剤、例えば$SnCl_2$、緩衝液、例えばフタル酸ナトリウム－カリウム溶液および抗体をインキュベートすることによって、直接標識技術を使用し得る。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合させるのに使用されることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）である。

【００９９】

コンジュゲートとしての使用が意図される蛍光標識には、Ａｌｅｘａ３５０、Ａｌｅｘａ４３０、ＡＭＣＡ、ＢＯＤＩＰＹ６３０／６５０、ＢＯＤＩＰＹ６５０／６６５、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ、ＢＯＤＩＰＹ－Ｒ６Ｇ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＭＲ、ＢＯＤＩＰＹ－ＴＲＸ、カスケードブルー、Ｃｙ３、Ｃｙ５、６－ＦＡＭ、フルオレセインイソチオシアネート、ＨＥＸ、６－ＪＯＥ、オレゴングリーン４８８、オレゴングリーン５００、オレゴングリーン５１４、パシフィックブルー、ＲＥＧ、ローダミングリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ＲＯＸ、ＴＡＭＲＡ、ＴＥＴ、テトラメチルローダミンおよび／またはテキサスレッドがある。

【０１００】

２．治療試薬

本発明の抗体に連結される多種多様な治療剤。例えば、上で議論した放射性同位体は、診断関連では有用だが、治療剤（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｃ　ａｇｅｎｔｓ）としても使用され得る。化学療薬もまた抗体にコンジュゲートされ得、それらとしては、シスプラチン（ＣＤＤＰ）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ｐｌｉｃｏｍｙｃｉｎ）、マイトマイシン、エトポシド（ＶＰ１６）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｅｎ）、ナベルビン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、５－フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチンおよびメトトレキサートが挙げられる。

【０１０１】

別のクラスの治療剤は、毒素である。コレラ毒素、ボツリヌス毒素、百日咳毒素、リシンＡ鎖およびＢ鎖ならびに他の天然または合成毒素が意図される。

【０１０２】

サイトカインおよびリンホカインは、本発明のＴｃＲにカップリングされ得るさらに別のクラスの治療剤であり、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－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＮＦα、ＩＦＮβおよびＩＦＮγが挙げられる。

【０１０３】

他の実施形態では、抗体にコンジュゲートされ得る治療剤として、抗炎症剤が意図される。抗炎症薬としては、ＮＳＡＩＤ、ステロイド、ラパマイシン、インフリキシマブおよびｏｎｔａｋが挙げられる。免疫抑制剤としては、ＦＫ－５０６およびシクロスポリンＡが挙げられる。

【０１０４】

ＴＬＲアゴニストは、抗体に、例えば、その分子のＦｃ部分を介して連結され得る。ＴＬＲアゴニストは、免疫系を刺激するか、またはこれを「オンにする」化合物である。ＴＬＲ９についての天然のアゴニストは、細菌およびウイルスに共通のＤＮＡ成分である。ＴＬＲ７および８についての天然のアゴニストは、ウイルスに見出されるＲＮＡのパター

ンである。ＴＬＲ７、８および９は、それらの天然のＤＮＡおよびＲＮＡアゴニストを認識した後、それぞれ、防御免疫応答の異なるカスケードを開始する。ＴＬＲアゴニストとしては、オリゴデオキシヌクレオチド、ヒアルロン酸断片、イミキモド、ラベンダスチンＣ、脂質Ａ、ロロキシビン（ｌｏｒｏｘｉｂｉｎｅ）、ＬＰＳ、モノホスホリル脂質Ａ（ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌ　ｌｉｐｄａ　Ａ）、ミリスチシン、レシキモド、Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍフラジェリン、ＨＫＬＭ、ＰＡＭ３ＣＳＫ４およびポリＩ：Ｃが挙げられる。つ

【０１０５】

ＩＶ．核酸および発現

Ａ．抗体をコードする核酸

本発明の一態様では、抗体の重鎖および軽鎖、可変ドメインおよび定常ドメインの様々な部分をコードする核酸が提供される。核酸セグメントは、ゲノムＤＮＡ、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、または合成ＤＮＡに由来し得る。発現ベクターへの組み込みが望ましい場合、核酸は、天然のイントロンまたは別の遺伝子由来のイントロンならびに他の非コード（例えば、調節）領域およびコード領域（例えば、リンカー）も含み得る。本明細書で使用される場合、用語「ｃＤＮＡ」は、テンプレートとして伝令ＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を使用して調製したＤＮＡを指すことを意図する。ゲノムＤＮＡまたはゲノムの非プロセシングまたは部分プロセシングＲＮＡテンプレートから重合したＤＮＡと対照的なｃＤＮＡを使用することの利点は、ｃＤＮＡは主に対応するタンパク質のコード配列を含むという点である。

【０１０６】

用語「組換え体」を、ポリペプチドまたは特定のポリペプチド名と共に使用することができ、一般に、インビトロで操作されているかこのような分子の複製産物である核酸分子から産生されたポリペプチドを指す。組換えベクターおよび単離された核酸セグメントには、抗体コード領域自体、基本的コード領域が選択的に変化しているか改変されたコード領域が多様に含まれ得るか、または、これらは、非抗体領域が含まれるより大きなポリペプチドをコードすることができる。

【０１０７】

本明細書で使用される場合、「核酸」には、一本鎖および二本鎖分子、ならびにＤＮＡ、ＲＮＡ、化学的に改変された核酸、および核酸類似体が含まれる。本発明の範囲内に含まれる核酸が、約１０、約２０、約３０、約４０、約５０、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１１０、約１２０、約１３０、約１４０、約１５０、約１６０、約１７０、約１８０、約１９０、約２００、約２１０、約２２０、約２３０、約２４０、約２５０、約２７５、約３００、約３２５、約３５０、約３７５、約４００、約４２５、約４５０、約４７５、約５００、約５２５、約５５０、約５７５、約６００、約６２５、約６５０、約６７５、約７００、約７２５、約７５０、約７７５、約８００、約８２５、約８５０、約８７５、約９００、約９２５、約９５０、約９７５、約１０００、約１１００、約１２００、約１３００、約１４００、約１５００、約１７５０、約２０００、約２２５０、約２５００またはそれより長いヌクレオチド残基長であり得ることが意図される。

【０１０８】

配列番号３、５、７、１５、１９、２３（重鎖ＣＤＲ１、２および３；軽鎖ＣＤＲ１および２、３／ＪＫ）、および配列番号９または２５（これらは、重鎖ＣＤＲと、それぞれ重鎖ＣＤＲ１、２および３の上流に隣接するフレームワーク領域１、２および３とを含む）および配列番号２４（これは、軽鎖ＣＤＲと、それぞれ軽鎖ＣＤＲ１、２および３の上流に隣接するフレームワーク領域１、２および３とを含む）などの適切なアミノ酸配列をコードする任意の核酸配列によって、抗体がコードされ得ることが意図される。正規化されたコドン表（表４）を使用した所望のアミノ酸配列をコードする核酸の設計および産生は当業者に周知である。特定の実施形態では、各アミノ酸をコードするために選択されたコドンを、目的の宿主細胞中の核酸発現を最適化するように改変することができる。用語「機能的に等価なコドン」は、本明細書で、アルギニンまたはセリンについての６つのコ

ドンなどの同一アミノ酸をコードするコドンを指すため、および生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンを指すためにも使用される。宿主細胞の様々な種についてのコドン選択性（ｃｏｄｏｎ　ｐｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）は当技術分野で周知である。ヒトでの使用が好ましいコドンは、当業者に周知である（Ｗａｄａら、１９９０）。他の生物についてのコドン選択性も当業者に周知である（Ｗａｄａら、１９９０（その全体が参照により本明細書に含まれる））。

表４－コドン表

【表４】

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

【０１０９】

Ｂ．核酸発現

原核生物および／または真核生物ベースの系を使用して、核酸配列またはその同族（ｃｏｇｎａｔｅ）ポリペプチド、タンパク質、およびペプチドを産生することができる。本発明は、ＰＲ－１／ＨＬＡ－Ａ２に結合する抗体を産生するためのこのような発現系の使用を意図する。強力な発現技術１つは、昆虫細胞／バキュロウイルス系を使用する。米国特許第５，８７１，９８６号および米国特許第４，８７９，２３６号（両方とも参照により本明細書に組み込まれる）などに記載され、例えば、ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ（登録商標）のＭａｘＢａｃ２．０（登録商標）およびＣＬＯＮＴＥＣＨ（登録商標）のＢＡＣＰＡＣＫ（商標）ＢＡＣＵＬＯＶＩＲＵＳ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＳＹＳＴＥＭという名称で購入することができる昆虫細胞／バキュロウイルス系は、異種核酸セグメントからタンパク質を高レベルで発現することができる。

【０１１０】

加えて、市販され、広く一般に利用可能な多数の他の発現系が存在する。このような系の一例は、合成エクジソン誘導受容体またはそのｐＥＴ発現系、大腸菌発現系を含むＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ（登録商標）のＣＯＭＰＬＥＴＥ　ＣＯＮＴＲＯＬ　Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍである。誘導発現系の別の例は、ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ（登録商標）から市販されているＴ－ＲＥＸ（商標）（テトラサイクリン調節発現）系を含む誘導発現系（全長ＣＭＶプロモーターを使用する哺乳動物誘導発現系）である。ＩＮＶＩＴＲＯＧＥＮ（登録商標）はまた、メチロトローフ酵母であるＰｉｃｈｉａ　ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ中での組換えタンパク質の高レベル産生のために設計されたＰｉｃｈｉａ　ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ発現系と称される酵母発現系を提供する。当業者は、核酸配列またはその同族ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドを産生するために発現構築物などのベクターをどのようにして発現させるかを理解している。

【０１１１】

１．ウイルスベクターおよび送達

発現ベクターを細胞に導入することができる多数の方法が存在する。ウイルスは、核酸によってコードされるタンパク質産物を発現させるための強力なツールを提供する。したがって、本発明の特定の実施形態では、発現ベクターは、ウイルスまたはウイルスゲノム由来の操作ベクターを含む。受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定かつ有効に発現する特定のウイルスの能力のために、ウイルスは外来遺伝子を哺乳動物細胞に導入するための魅力的な候補となっている（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８；Ｎｉｃｏｌａｓ　ａｎｄ　Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎ，１９８８；Ｂａｉｃｈｗａｌ　ａｎｄ　Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６；Ｔｅｍｉｎ，１９８６）。遺伝子ベクターとして使用された最初のウイルスは、ＤＮＡウイルス（パポバウイルス（サルウイルス４０、ウシ乳頭腫ウイルス、およびポリオーマ）（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８；Ｂａｉｃｈｗａｌ　ａｎｄ　Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６）およびアデノウイルス（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８；Ｂａｉｃｈｗａｌ　ａｎｄ　Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６）が含まれる）であった。

【０１１２】

アデノウイルスベクター。核酸の特定の送達方法は、アデノウイルス発現ベクターの使用を含む。アデノウイルスベクターはゲノムＤＮＡへの組み込み能力が低いことが公知であるが、この特徴はこれらのベクターによって提供される遺伝子導入効率の高さによって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」は、（ａ）構築物のパッケージングを補助し、（ｂ）組織またはその中にクローン化された細胞特異的構築物を最終的に発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物が含まれることを意味する。遺伝子組織化またはアデノウイルス（３６ｋｂの線状二本鎖ＤＮＡウイルス）の知識により、アデノウイルスＤＮＡの大片を７ｋｂまでの外来配列で置換することが可能である（Ｇｒｕｎｈａｕｓ　ａｎｄ　Ｈｏｒｗｉｔｚ，１９９２）。

【０１１３】

ＡＡＶベクター。アデノウイルス補助トランスフェクションを使用して、核酸を細胞に導入することができる。アデノウイルス結合系（ｃｏｕｐｌｅｄ　ｓｙｓｔｅｍ）を使用した細胞系でトランスフェクション効率の増加が報告されている（Ｋｅｌｌｅｈｅｒ　ａｎｄ　Ｖｏｓ，１９９４；Ｃｏｔｔｅｎら、１９９２；Ｃｕｒｉｅｌ，１９９４）。アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、本発明のワクチンで使用するための魅力的なベクター系である（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，１９９２）。ＡＡＶは、宿主への感染範囲が広い（Ｔｒａｔｓｃｈｉｎら、１９８４；Ｌａｕｇｈｌｉｎら、１９８６；Ｌｅｂｋｏｗｓｋｉら、１９８８；ＭｃＬａｕｇｈｌｉｎら、１９８８）。ｒＡＡＶベクターの生成および使用に関する詳細は、米国特許第５，１３９，９４１号および米国特許第４，７９７，３６８号（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１１４】

レトロウイルスベクター。レトロウイルスは、その遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大

量の外来遺伝物質を導入し、広範な種および細胞型に感染し、特定の細胞系にパッケージングされる能力により、ワクチンにおける遺伝子送達ベクターとして有望である（Ｍｉｌｌｅｒ，１９９２）。

【０１１５】

レトロウイルスベクターを構築するために、核酸（例えば、目的の抗原をコードする核酸）を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して複製欠損ウイルスを産生する。ビリオンを産生させるために、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ遺伝子を含むがＬＴＲおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞系を構築する（Ｍａｎｎら、１９８３）。レトロウイルスＬＴＲおよびパッケージング配列と共にｃＤＮＡを含む組換えプラスミドを（例えば、リン酸カルシウム沈殿によって）特定の細胞系に導入した場合、パッケージング配列により組換えプラスミドのＲＮＡ転写物がウイルス粒子にパッケージングされ、その後培養培地に分泌される（Ｎｉｃｏｌａｓ ａｎｄ Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎ，１９８８；Ｔｅｍｉｎ，１９８６；Ｍａｎｎら、１９８３）。次いで、組換えレトロウイルスを含む培地を回収し、必要に応じて濃縮して遺伝子導入に使用する。レトロウイルスベクターは、広範な様々な細胞型に感染することができる。しかしながら、組み込みおよび安定な発現には、宿主細胞の分裂を必要とする（Ｐａｓｋｉｎｄら、１９７５）。

【０１１６】

レンチウイルスは、一般的なレトロウイルス遺伝子（ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ）に加えて、調節機能または構造機能を有する他の遺伝子を含む複雑なレトロウイルスである。レンチウイルスベクターは、当技術分野で周知である（例えば、Ｎａｌｄｉｎｉら、１９９６；Ｚｕｆｆｅｒｅｙら、１９９７；Ｂｌｏｍｅｒら、１９９７；米国特許第６，０１３，５１６号および米国特許第５，９９４，１３６号を参照のこと）。レンチウイルスのいくつかの例としては、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２）およびサル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）が挙げられる。ＨＩＶビルレンス遺伝子の弱毒化を増強してベクターを生物学的に安全にすること（例えば、遺伝子ｅｎｖ、ｖｉｆ、ｖｐｒ、ｖｐｕ、およびｎｅｆを欠失させる）によって、レンチウイルスベクターを作製した。

【０１１７】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、インビボおよびエクスビボでの遺伝子導入ならびに核酸配列の発現の両方に使用することができる。例えば、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルスであって、適切な宿主細胞をパッケージング機能（すなわち、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ、ならびにｒｅｖおよびｔａｔ）を有する２つ以上のベクターでトランスフェクトするレンチウイルスは、米国特許第５，９９４，１３６号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。特定の細胞型の受容体へのターゲティングのための抗体または特定のリガンドとのエンベロープタンパク質の結合によって組換えウイルスをターゲティングすることができる。特定の標的細胞上の受容体のリガンドをコードする別の遺伝子と共に、目的の配列（調節領域を含む）をウイルスベクターに挿入することにより、例えば、ベクターは、この時点で標的特異的である。

【０１１８】

他のウイルスベクター。他のウイルスベクターを、本発明においてワクチン構築物として使用することができる。ワクシニアウイルス（Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８；Ｂａｉｃｈｗａｌ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６；Ｃｏｕｐａｒら、１９８８）、シンドビスウイルス、サイトメガロウイルス、および単純ヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターを使用することができる。これらは、様々な哺乳動物細胞に魅力的ないくつかの特徴を付与する（Ｆｒｉｅｄｍａｎｎ，１９８９；Ｒｉｄｇｅｗａｙ，１９８８；Ｂａｉｃｈｗａｌ ａｎｄ Ｓｕｇｄｅｎ，１９８６；Ｃｏｕｐａｒら、１９８８；Ｈｏｒｗｉｃｈら、１９９０）。レンチウイルスもワクチンベクターとして調査されている（ＶａｎｄｅｎＤｒｉｅｓｓｃｈｅら、２００２）。

【０１１９】

改変ウイルスを使用した送達。送達すべき核酸を、特異的結合リガンドを発現するように操作した感染性ウイルス内に含ませることができる。したがって、ウイルス粒子は、標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、細胞に内容物を送達する。ウイルスエンベロープへのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的な改変に基づいて、レトロウイルスベクターが特異的ターゲティングを可能とするように設計された新規のアプローチを開発した。この改変により、シアロ糖タンパク質受容体を介して肝細胞に特異的に感染させることができる。

【０１２０】

レトロウイルスエンベロープタンパク質に対するおよび特定の細胞受容体に対するビオチン化抗体を使用した組換えレトロウイルスの別のターゲティングアプローチを設計した。抗体を、ストレプトアビジンの使用によってビオチン成分を介してカップリングした（Ｒｏｕｘら、１９８９）。主要組織適合性複合体クラスＩ抗原およびクラスＩＩ抗原に対する抗体を使用して、表面抗原を有する様々なヒト細胞のインビトロでのエコトロピックウイルスによる感染が証明された（Ｒｏｕｘら、１９８９）。

【０１２１】

２．非ウイルス核酸送達

本発明の組成物を発現させるための適切な非ウイルス核酸送達方法は、本明細書に記載されているか当業者公知であるとおり、核酸（例えば、ＤＮＡ）をオルガネラ、細胞、組織、または生物に導入することができる事実上任意の方法が含まれると考えられる。このような方法としては、注射（米国特許第５，９９４，６２４号、米国特許第５，９８１，２７４号、米国特許第５，９４５，１００号、米国特許第５，７８０，４４８号、米国特許第５，７３６，５２４号、米国特許第５，７０２，９３２号、米国特許第５，６５６，６１０号、米国特許第５，５８９，４６６号、および米国特許第５，５８０，８５９号（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる））（微量注入（（Ｈａｒｌａｎｄ ａｎｄ Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，１９８５；米国特許第５，７８９，２１５号（参照により本明細書に組み込まれる））が含まれる）；エレクトロポレーション（米国特許第５，３８４，２５３号（参照により本明細書に組み込まれる））；リン酸カルシウム沈殿（Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ Ｖａｎ Ｄｅｒ Ｅｂ，１９７３；Ｃｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｍａ，１９８７；Ｒｉｐｐｅら、１９９０）；ＤＥＡＥ－デキストラン使用後のポリエチレングリコールの使用（Ｇｏｐａｌ，１９８５）；直接音波負荷（ｄｉｒｅｃｔ ｓｏｎｉｃ ｌｏａｄｉｎｇ）（Ｆｅｃｈｈｅｉｍｅｒら、１９８７）；リポソーム媒介トランスフェクション（Ｎｉｃｏｌａｕ ａｎｄ Ｓｅｎｅ，１９８２；Ｆｒａｌｅｙら、１９７９；Ｎｉｃｏｌａｕら、１９８７；Ｗｏｎｇら、１９８０；Ｋａｎｅｄａら、１９８９；Ｋａｔｏら、１９９１）；微粒子銃（ＰＣＴ出願第ＷＯ９４／０９６９９号およびＰＣＴ出願第ＷＯ９５／０６１２８号；米国特許第５，６１０，０４２号；米国特許第５，３２２，７８３号、米国特許第５，５６３，０５５号、米国特許第５，５５０，３１８号、米国特許第５，５３８，８７７号、および米国特許第５，５３８，８８０号（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）；炭化ケイ素繊維との撹拌（Ｋａｅｐｐｌｅｒら、１９９０；米国特許第５，３０２，５２３号および米国特許第５，４６４，７６５号（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）；またはプロトプラストのＰＥＧ媒介トランスフェクション（Ｏｍｉｒｕｌｌｅｈら、１９９３；米国特許第４，６８４，６１１号および米国特許第４，９５２，５００号（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる）；乾燥／阻害媒介ＤＮＡ取り込み（Ｐｏｔｒｙｋｕｓら、１９８５）などによるＤＮＡの直接送達が挙げられるが、これらに限定されない。これらなどの技術の適用によって、オルガネラ（複数可）、細胞（複数可）、組織（複数可）、または生物（複数可）を、安定または一過性に形質転換することができる。

【０１２２】

Ｖ．がんまたは過形成障害もしくは異形成障害の診断用の抗体

本発明の一実施形態では、白血病（例えば、ＡＭＬ、ＣＭＬ、ＭＤＳ）および骨髄異形成障害などのがんを診断する方法が提供される。骨髄異形成（ＭＤＳ）は、骨髄が正常に

機能せず、不十分な数の正常血液細胞を産生する障害群を指す。ＭＤＳは、赤血球、血小板および白血球を含む任意の、そして時にはすべての種類の血液細胞の産生に影響を与える（血球減少症）。小児骨髄異形成の約５０％は、５種類のＭＤＳに分類され得る：不応性貧血、環状鉄芽球を伴う不応性貧血、過剰芽球を伴う不応性貧血、形質転換で過剰芽球を伴う不応性貧血、および慢性骨髄単球性白血病。典型的には、残りの５０％は孤立性か、または複合血球減少症、例えば貧血、白血球減少症および／もしくは血小板減少症（低血小板数）を呈する。ＭＤＳは慢性だが、患者の約３０パーセントでは進行して急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）になる。

【０１２３】

本発明による診断では、固形腫瘍がんも意図される。このようながんは、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、骨がん、精巣がん、子宮頚がん、消化管がん、リンパ腫、肺における前新形成病変、結腸がん、黒色腫および膀胱がん。良性過剰増殖性疾患（ｂｅｎｉｇｎ　ｈｙｐｅｒｐｒｏｌｉｆｅｒｔａｔｉｖｅ　ｄｉｓｅａｓｅ）を含む他の過形成疾患、新形成疾患および異形成疾患も、本明細書に記載される診断手順の範囲である。

【０１２４】

Ａ．診断試薬の投与

診断試薬の投与は当技術分野で周知であり、達成すべき診断に応じて変化する。例えば、１つ以上の別個の腫瘍塊をイメージングしようとする場合、局所（ｌｏｃａｌ）投与または局所（ｒｅｇｉｏｎａｌ）投与（例えば、腫瘍血管系、局所リンパ系または局所動脈もしくは静脈）が利用され得る（ｍｙ　ｂｅ　ｕｔｉｌｉｚｅｄ）。あるいは、局所にまたは全身に診断試薬を提供し得る。四肢全体もしくは生物のイメージングを望む場合、公知の特定の腫瘍塊が同定された場合、または転移が疑われる場合、これが選択の経路であり得る。

【０１２５】

Ｂ．注射用組成物および製剤

本発明による医薬品の１つの送達方法は全身性である。しかしながら、あるいは、米国特許第５，５４３，１５８号；米国特許第５，６４１，５１５号、および米国特許第５，３９９，３６３号（それぞれ、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる）に記載されているように、本明細書に開示される医薬組成物を、非経口、静脈内、皮内、筋肉内、経皮、またはさらに腹腔内に投与することができる。

【０１２６】

医薬品の注射を、薬剤が注射に必要なニードルの特定のゲージを通過することができる限り、シリンジまたは溶液の注射のために使用される任意の他の方法によって行うことができる。溶液保持のためのアンプルチャンバーを画定するノズルおよび溶液をノズルから送達部位に押し出すためのエネルギーデバイスを有する新規のニードルレス注射システムが記載されている（米国特許第５，８４６，２３３号）。所定量の溶液の任意の深さへの正確な複数の注射が可能な遺伝子治療で使用するためのシリンジシステムも記載されている（米国特許第５，８４６，２２５号）。

【０１２７】

遊離塩基（ｆｒｅｅ　ｂａｓｅ）または薬理学的に許容され得る塩としての活性化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中に調製することができる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物ならびにオイル中に分散液を調製することもできる。通常の保存および使用条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を防止するための防腐剤を含む。注射用に適切な薬学的形態としては、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる（米国特許第５，４６６，４６８号（その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる））。すべての場合において、形態は、無菌であるべきであり、容易に注射できる程度まで流動性でなければならない。製造および保存条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の夾雑作用に対して保護されなければならない

。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、その適切な混合物、および／または植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。様々な抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、およびチロメサールなど）によって微生物作用を予防することができる。多くの場合、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含めることが好ましい。吸収を遅延させる作用物質（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の注射用組成物における使用によって該組成物を長期間吸収させることができる。

【０１２８】

水溶液での非経口投与のために、例えば、必要な場合溶液を適切に緩衝化し、最初に液体希釈物を十分な食塩水またはグルコースで等張にする。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、および腹腔内投与に特に適切である。これに関して、使用することができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に公知である。例えば、１投与量を１ｍｌの等張ＮａＣｌ溶液に溶解し、１０００ｍｌの皮下注入液に添加するか提案された注入部位に注射することができる（例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」１５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ｐａｇｅｓ １０３５－１０３８ ａｎｄ １５７０－１５８０を参照のこと）。処置を受ける被験体の状態に応じて、いくつかの投与量のバリエーションが必然的に存在する。投与を担う者は、任意の事象で、個々の被験体に適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与のために、調製物は、ＦＤＡ Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ ｓｔａｎｄａｒｄｓが要求する無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の基準を満たすべきである。

【０１２９】

上に列挙した様々な他の成分と共に適切な溶媒中に必要量の活性化合物を組み込み、必要な場合その後濾過滅菌を行うことによって滅菌注射液を調製する。一般に、基礎分散媒および上に列挙したもの由来の必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルへの様々な滅菌有効成分の組み込みによって分散液を調製する。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分の粉末＋予め濾過滅菌したその溶液由来の任意のさらなる所望の成分が得られる真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【０１３０】

本明細書に開示される組成物を、中性または塩形態で製剤化することができる。薬学的に許容され得る塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成）および無機酸（例えば、塩酸またはリン酸など）または有機酸（酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）で形成された酸付加塩が挙げられる。遊離のカルボキシル基で形成された塩はまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄など）および有機塩基（イソプロピルアミン、トリエチルアミン、ヒスチジン、およびプロカインなど）に由来し得る。製剤化の際、溶液を、投与製剤に適合する様式および治療有効量などで投与する。製剤を、注射液および薬物放出カプセルなどの様々な剤形で容易に投与する。

【０１３１】

本明細書で使用される場合、「キャリア」としては、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、バッファ、キャリア溶液、懸濁液、ならびにコロイドなどが含まれる。薬学的活性物質のためのこのような媒体および作用物質の使用は当技術分野で周知である。任意の従来の媒体または作用物質が有効成分に適合しない範囲を除いて、治療組成物におけるその使用が意図される。補助的有効成分を、組成物に組み込むこともできる。

【０１３２】

語句「薬学的に許容され得る」または「薬理学的に許容され得る」は、ヒトに投与した場合にアレルギー反応または類似の望ましくない反応を起こさない分子実体（ｍｏｌｅｃ

ｕｌａｒ　ｅｎｔｉｔｙ）および組成物を指す。有効成分としてタンパク質を含む水性組成物の調製は、当技術分野で十分に理解されている。典型的には、このような組成物を、注射剤（液体溶液または懸濁液のいずれか）として調製し、注射前に液体の溶液または懸濁液にするのに適切な固体形態を調製することもできる。

【０１３３】

ＶＩ．治療方法

Ａ．がんおよび過形成／異形成／新形成疾患

本発明の抗体を、がんを含む過形成／異形成／新形成疾患／状態を処置する方法で使用することができる。本発明のペプチドを使用して処置することを意図する疾患／状態の種類として、ＡＭＬ、ＭＤＳ、およびＣＭＬならびに骨髄異形成などの白血病が挙げられるが、これらに限定されない。他の種類のがんとして、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、骨がん、精巣がん、子宮頸がん、消化管がん、リンパ腫、肺の前新形成病変、結腸がん、黒色腫、膀胱がん、および任意の他の新形成疾患を挙げることができる。

【０１３４】

本発明の方法および組成物を使用して、細胞を死滅させるため、細胞の成長を阻害するため、転移を阻害するため、腫瘍／組織サイズ、腫瘍細胞負荷を減少させるため、または別様に腫瘍細胞の悪性表現型を逆転もしくは軽減するために、一般には、過形成／新形成／がん細胞を、通常は薬学的に（ｐｈａｒｍａｃｅｔｉｃａｌｌｙ）許容され得る緩衝液またはキャリア中に分散させた治療化合物、例えばポリペプチド、または本発明の抗体をコードする発現構築物と接触させる（上記診断剤の議論を参照のこと）。当然ながら、投与経路は、病変の位置および性質により変化し、例えば、皮内、経皮、非経口、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、皮膚、気管内、腹腔内、腫瘍内、灌流、洗浄（ｌａｖａｇｅ）、直接注射および経口の投与および処方が挙げられる。がんの処置または診断に関して議論される製剤および投与経路はいずれも、新形成疾患および状態に関して用いられ得る。患者の体外で腫瘍細胞を処置／形質導入するエクスビボの実施形態（明確に、またはより大きな細胞集団の一部として）も意図される。

【０１３５】

孤立腫瘍、固形腫瘍、接触腫瘍の場合、腫瘍内注射または腫瘍脈血管系への注射が特に意図される。局所（ｌｏｃａｌ）投与、局所（ｒｅｇｉｏｎａｌ）投与または全身投与も適切であり得る。４ｃｍ超の腫瘍の場合、投与すべき容量は、約４～１０ｍｌである一方、４ｃｍ未満の腫瘍の場合、約１～３ｍｌの容量を使用する。単回用量として送達される複数回の注射は、約０．１～約０．５ｍｌの容量を含む。約１ｃｍ間隔をあけて腫瘍に複数回の注射を行うことによって、ウイルス粒子を有利に接触させ得る。

【０１３６】

外科的介入の場合、手術時および／またはその後に本発明を使用して、残存疾患または転移疾患を処置し得る。例えば、抗体を含む製剤を切除腫瘍床に注射または灌流し得る。例えば、手術部位にカテーテルを埋め込んだままにしておくことによって、切除後に灌流を継続し得る。周期的な術後処置も想定される。

【０１３７】

適切な場合、例えば、腫瘍を切除して微視的残存疾患を排除するために腫瘍床を処置する場合、継続投与も適用し得る。シリンジまたはカテーテル法（ｃａｔｈｅｒｉｚａｔｉｏｎ）による送達が好ましい。このような継続灌流を、処置開始後約１～２時間から約２～６時間、約６～１２時間、約１２～２４時間、約１～２日間、約１～２週間またはそれより長い期間にわたって行い得る。一般に、継続灌流による治療組成物の用量は、単回または複数回の注射によって投与される用量と同等であり、灌流が行われる期間にわたって調整される。四肢灌流を使用して、特に黒色腫および肉腫の処置において本発明の治療組成物を投与し得ることがさらに意図される。

【０１３８】

処置計画も同様に変化し得、多くの場合、腫瘍型、腫瘍位置、疾患進行、ならびに患者

の健康および年齢に依存し得る。明らかに、特定の腫瘍型にはより積極的な処置が必要である一方、同時に、特定の患者はより負担のあるプロトコールに耐えることができない。臨床医は、治療製剤の公知の有効性および毒性（存在する場合）に基づいて、最適にこのような決定を行う。

【０１３９】

特定の実施形態では、処置される腫瘍は、少なくとも最初は切除可能でなくてもよい。処置により、周辺部分の縮小のため、または特に特定の浸潤性部分の消失によって腫瘍の切除可能性を増大させ得る。処置後、切除が可能になり得る。切除後のさらなる処置は、腫瘍部位における微視的残存疾患を排除するのに役立つ。

【０１４０】

原発性腫瘍または切除後腫瘍床のための典型的な処置過程は、複数回投与を含む。典型的な原発性腫瘍処置は、２週間の期間にわたって６回の投与を適用することを含む。２週間の計画を、１回、２回、３回、４回、５回または６回またはそれより多く繰り返し得る。処置過程中、計画投与を完了する必要性を再評価し得る。

【０１４１】

Ｂ．併用療法

第２の抗がん剤を含める場合、併用療法を使用することが有利な場合もある。「抗がん」剤は、例えば、がん細胞の死滅化、がん細胞のアポトーシスの誘導、がん細胞の成長速度の減少、転移の発生率または数の減少、腫瘍サイズの減少、腫瘍成長の阻害、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給の減少、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答の促進、がん進行の防止もしくは阻害、またはがんを有する被験体の寿命の延長によって、被験体のがんに負の影響を与えることができる。抗がん剤としては、生物学的薬剤（生物療法）、化学療法薬、および放射線療法薬が挙げられる。より一般に、本発明による治療と共に、これらの他の組成物を、細胞の死滅化または細胞増殖の阻害に有効な組み合わせた量で提供することになる。この方法は、細胞と両方の薬剤とを同時に接触させることを含み得る。細胞と、両薬剤を含む単一の組成物もしくは薬理学的製剤とを接触させること、または細胞と、２つの異なる組成物もしくは製剤とを同時に接触させることによってこれを行うことができる。

【０１４２】

あるいは、抗体療法を、数分から数週間の範囲の間隔で他の薬剤処置の前または後に行うことができる。他の薬剤および抗体を個別に細胞に適用する実施形態では、一般に、薬剤および発現構築物が細胞に対して依然として有利な組み合わせ効果を発揮することができるように、確実に各送達時間の間で有意な期間途切れないようにする。このような例では、細胞と両モダリティとを互いに約１２～２４時間以内、より好ましくは互いに約６～１２時間以内接触させることができることが意図される。しかしながら、いくつかの状況では、それぞれの投与の間に数日（２、３、４、５、６、または７日）から数週間（１、２、３、４、５、６、７、または８週間）が経過する場合、処置期間を有意に延長することが望ましい場合がある。

【０１４３】

様々な組み合わせが用いられ得る；例えば、（コンジュゲートした治療剤の有無にかかわらず）抗体療法は「Ａ」であり、二次抗がん療法は「Ｂ」である：

Ａ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ｂ／Ａ　Ａ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ｂ／Ｂ

Ｂ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ａ／Ｂ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ａ

Ｂ／Ａ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ａ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ａ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ａ／Ａ　Ａ／Ａ／Ｂ／Ａ

【０１４４】

患者への本発明の治療剤の投与は、存在する場合には抗体処置の毒性を考慮して、その特定の二次療法を行うための一般的なプロトコールに従う。処置サイクルは必要な場合繰

り返されると予想される。様々な標準治療および外科的介入を、記載されるがん療法と組み合わせて適用し得ることも意図される。

【０１４５】

１．化学療法

がん療法には、化学物質および照射ベースの処置の両方を使用した様々な併用療法も含まれる。併用化学療法薬としては、例えば、シスプラチン（ＣＤＤＰ）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン（ｐｌｉｃｏｍｙｃｉｎ）、マイトマイシン、エトポシド（ＶＰ１６）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｅｎ）、ナベルビン、ファルネシル－タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、５－フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびメトトレキセート、テモゾロミド（Ｔｅｍａｚｏｌｏｍｉｄｅ）（ＤＴＩＣの水性形態）、または上記の任意の類似体もしくは誘導バリアントが挙げられる。化学療法と生物学的療法との組み合わせは、生化学療法として公知である。本発明は、がんの処置もしくは予防に関して、用いられ得るかまたは当技術分野で公知の任意の化学療法薬を意図する。

【０１４６】

２．放射線療法

ＤＮＡ損傷を引き起こし、かつ広範に使用されている他の因子としては、γ線、Ｘ線、および／または腫瘍細胞への放射性同位体の定方向送達として一般的に知られているものが挙げられる。マイクロ波およびＵＶ照射などの他の形態のＤＮＡ損傷因子も意図される。すべてのこれらの因子は、ＤＮＡ、ＤＮＡの前駆体、ＤＮＡの複製および修復、および染色体のアセンブリおよび維持に対して広範な損傷を与える可能性が最も高い。Ｘ線の線量範囲は、長期間（３～４週間）のための５０～２００レントゲンの日線量から２０００～６０００レントゲンの単回線量の範囲である。放射性同位体の照射線量範囲は、広範に変化し、同位体の半減期、放出した照射の強度および型、ならびに新形成細胞による取り込みに依存する。

【０１４７】

用語「接触」および「曝露」は、細胞に適用する場合、治療構築物および化学療法薬または放射性療法薬を標的細胞に送達させるか、または標的細胞と直接近位に置くことによる方法を記載するために本明細書で使用する。細胞の死滅化または静止を達成するために、両薬剤を、細胞を死滅させるか細胞の分裂を防止するのに有効な組み合せ量で細胞に送達する。

【０１４８】

３．免疫療法

一般に、免疫療法は、がん細胞を標的として破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上の一部のマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体は単独で治療エフェクターとして役立ち得るか、または細胞の死滅を実質的にもたらす他の細胞を動員し得る。抗体は薬物または毒素（化学療法薬、放射性核種、リシンＡ鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）にコンジュゲートすることもできるし、単にターゲティング剤として機能することもできる。あるいは、エフェクターは、直接または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性Ｔ細胞およびＮＫ細胞が含まれる。治療方法の組み合わせ（すなわち、直接細胞傷害活性およびホルチリン（Ｆｏｒｔｉｌｉｎ）の阻害または減少）により、がん処置において治療上の利益が得られることになる。

【０１４９】

免疫療法を、併用療法の一部として使用することもできる。併用療法の一般的アプローチを以下で議論する。免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、ターゲティングの影響を受けやすい（すなわち、大多数の他の細胞上に存在しない）一部のマーカーを保有しなければ

ならない。多数の腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれかは本発明の状況でのターゲティングに適切であり得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、癌胎児性抗原、前立腺特異的抗原、泌尿器腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ（ｐ９７）、ｇｐ６８、ＴＡＧ－７２、ＨＭＦＧ、シアリルルイス抗原、ＭｕｃＡ、ＭｕｃＢ、ＰＬＡＰ、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、ｅｒｂＢ、およびｐ１５５が挙げられる。免疫療法の別の態様は、免疫刺激効果を有する抗がん効果についてのものである。免疫刺激分子も存在し、それにはＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１２、ＧＭ－ＣＳＦ、γ－ＩＦＮなどのサイトカイン、ＭＩＰ－１、ＭＣＰ－１、ＩＬ－８などのケモカイン、ならびにＦＬＴ３リガンドなどの成長因子が含まれる。タンパク質として免疫刺激分子を組み合わせることにより、またはｍｄａ－７などの腫瘍サプレッサーと遺伝子送達を併用することにより、抗腫瘍効果が増強されることが示されている（Ｊｕら、２０００）。

【０１５０】

以前に議論されているように、現在研究中または使用されている免疫療法の例は、免疫アジュバント（例えば、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｂｏｖｉｓ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物）（米国特許第５，８０１，００５号；米国特許第５，７３９，１６９号；Ｈｕｉ ａｎｄ Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ，１９９８；Ｃｈｒｉｓｔｏｄｏｕｌｉｄｅｓら、１９９８）、サイトカイン療法（例えば、インターフェロンおよび；ＩＬ－１、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＴＮＦ）（Ｂｕｋｏｗｓｋｉら、１９９８；Ｄａｖｉｄｓｏｎら、１９９８；Ｈｅｌｌｓｔｒａｎｄら、１９９８）、遺伝子治療（例えば、ＴＮＦ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ｐ５３）（Ｑｉｎら、１９９８；Ａｕｓｔｉｎ－Ｗａｒｄ ａｎｄ Ｖｉｌｌａｓｅｃａ，１９９８；米国特許第５，８３０，８８０号および米国特許第５，８４６，９４５号）、およびモノクローナル抗体（例えば、抗ガングリオシドＧＭ２、抗ＨＥＲ－２、抗ｐｌ８５）（Ｐｉｅｔｒａｓら、１９９８；Ｈａｎｉｂｕｃｈｉら、１９９８；米国特許第５，８２４，３１１号）である。ハーセプチン（トラスツズマブ）は、ＨＥＲ２－ｎｅｕ受容体を遮断するキメラ（マウス－ヒト）モノクローナル抗体である。これは、抗腫瘍活性を有し、悪性腫瘍の処置での使用が承認されている（Ｄｉｌｌｍａｎ，１９９９）。ハーセプチンおよび化学療法を使用したがんの併用療法は、個別の療法よりも有効であることが示されている。したがって、１つ以上の抗がん療法を、本明細書に記載される腫瘍関連ＨＬＡ拘束性ペプチド療法と共に使用することができることが意図される。

【０１５１】

養子免疫療法。養子免疫療法では、患者の循環リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球をインビトロで単離し、ＩＬ－２などのリンホカインで活性化し、または腫瘍壊死のための遺伝子を形質導入し、再投与する（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇら、１９８８；１９８９）。これを達成するために、本明細書に記載されるアジュバント組み込み抗原性ペプチド組成物と組み合わせて、免疫学的有効量の活性化リンパ球を動物またはヒト患者に投与する。活性化リンパ球は、血液または腫瘍サンプルからより早く単離し、インビトロで活性化（または「拡大」）した患者自身の細胞であることが最も好ましい。この免疫療法の形態により、いくつかの症例では黒色腫および腎癌の寛解が生じるが、応答者の割合は応答しない者と比較して少なかった。

【０１５２】

受動免疫療法。がんの受動免疫療法のための多数の異なるアプローチが存在する。これらは、概して以下のように分類し得る。抗体のみの注射：毒素または化学療法薬とカップリングした抗体の注射：放射性同位体とカップリングした抗体の注射：抗イディオタイプ抗体の注射：および、最後に、骨髄中の腫瘍細胞の浄化（ｐｕｒｇｉｎｇ）。

【０１５３】

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体は患者が副作用をほとんど起こさないか全く起こさないため、受動免疫療法で使用する。しかしながら、その適用は希少性によりいくらか制限され、これまでのところ病変内のみに投与されている。ガングリオシド抗原に対するヒトモノクローナル抗体が、皮膚再発性黒色腫に罹患した患者に病変内投与されている（

Ｉｒｉｅ＆Ｍｏｒｔｏｎ，１９８６）。毎日または毎週の病変内注射後に１０人の患者のうち６人で寛解が認められた。別の研究では、２つのヒトモノクローナル抗体の病変内注射では中程度の成功が達成された（Ｉｒｉｅら、１９８９）。可能な治療抗体としては、抗ＴＮＦ、抗ＣＤ２５、抗ＣＤ３、抗ＣＤ２０、ＣＴＬＡ－４－ＩＧおよび抗ＣＤ２８が挙げられる。

【０１５４】

２つの異なる抗原に対して指向する２つ以上のモノクローナル抗体、またはさらに複数の抗原特異性を有する抗体を投与することが好ましい場合がある。処置プロトコールは、Ｂａｊｏｒｉｎら、（１９８８）によって記載されているリンホカインまたは他の免疫エンハンサーの投与も含み得る。ヒトモノクローナル抗体の開発は、本明細書の他の場所にさらに詳細が記載されている。

【０１５５】

４．遺伝子治療

さらに別の実施形態では、二次処置は、腫瘍関連ＨＬＡ拘束性ペプチドの投与前、投与後、または投与と同時に治療ポリヌクレオチドを投与する遺伝子治療である。以下の遺伝子産物の１つをコードする第２のベクターと併せた腫瘍関連ＨＬＡ拘束性ペプチドをコードするベクターの送達により、標的組織に対して複合的な抗過剰増殖効果が得られる。あるいは、両遺伝子をコードする単一のベクターを使用することができる。様々なタンパク質が本発明に包含され、これらのいくつかを以下に記載する。本発明と組み合わせたいくつかの形態の遺伝子治療のためにターゲティングすることができる様々な遺伝子が当業者に公知であり、がんに関与する任意の遺伝子を含み得る。

【０１５６】

細胞増殖の誘導因子。細胞増殖を誘導するタンパク質は、機能に応じて様々なカテゴリーにさらに分類される。これらの全タンパク質の共通点は、細胞増殖を調節する能力である。例えば、ＰＤＧＦの一形態であるｓｉｓ癌遺伝子は、分泌成長因子である。癌遺伝子は成長因子をコードする遺伝子から稀に生じ、現在、ｓｉｓは唯一公知の天然に存在する腫瘍形成性成長因子である。本発明の一実施形態では、細胞増殖の特定の誘導因子に指向するアンチセンスｍＲＮＡを使用して細胞増殖の誘導因子の発現を防止することが意図される。

【０１５７】

タンパク質ＦＭＳ、ＥｒｂＡ、ＥｒｂＢ、およびｎｅｕは、成長因子受容体である。これらの受容体の変異により、調製可能な機能が喪失する。例えば、Ｎｅｕ受容体タンパク質の膜貫通ドメインに影響を与える点変異により、ｎｅｕ癌遺伝子が得られる。ｅｒｂＡ癌遺伝子は、甲状腺ホルモンの細胞内受容体に由来する。修飾された腫瘍形成性ＥｒｂＡ受容体は、内因性甲状腺ホルモン受容体と競合して制御されない成長を引き起こすと考えられている。

【０１５８】

最も大きな癌遺伝子のクラスは、シグナル伝達タンパク質（例えば、Ｓｒｃ、Ａｂｌ、およびＲａｓ）を含む。タンパク質Ｓｒｃは細胞質タンパク質－チロシンキナーゼであり、ある場合には、癌原遺伝子から癌遺伝子へのその形質転換はチロシン残基５２７の変異を介して起こる。対照的に、ＧＴＰアーゼタンパク質ｒａｓの癌原遺伝子から癌遺伝子への形質転換は、１つの例では、配列中のアミノ酸１２でのバリンからグリシンへの変異に起因し、これによりｒａｓ　ＧＴＰアーゼ活性が減少する。タンパク質Ｊｕｎ、Ｆｏｓ、およびＭｙｃは、転写因子として核機能に対してその効果を直接発揮するタンパク質である。

【０１５９】

細胞増殖の阻害因子。腫瘍抑制癌遺伝子は、過剰な細胞増殖を阻害するように機能する。これらの遺伝子の不活化によってその阻害活性が破壊され、調節されない増殖がもたらされる。最も一般的な腫瘍サプレッサーは、Ｒｂ、ｐ５３、ｐ２１およびｐ１６である。本発明に従って使用することができる他の遺伝子としては、ＡＰＣ、ＤＣＣ、ＮＦ－１、

ＮＦ－２、ＷＴ－１、ＭＥＮ－Ｉ、ＭＥＮ－ＩＩ、ｚａｃｌ、ｐ７３、ＶＨＬ、Ｃ－ＣＡＭ、ＭＭＡＣ１／ＰＴＥＮ、ＤＢＣＣＲ－１、ＦＣＣ、ｒｓｋ－３、ｐ２７、ｐ２７／ｐ１６融合物、ｐ２１／ｐ２７融合物が挙げられる。

【０１６０】

プログラム細胞死の調節因子。アポトーシス（すなわち、プログラム細胞死）は、正常な胚発生、成体組織の恒常性の維持、および発癌の抑制に必須の過程である（Ｋｅｒｒら、１９７２）。Ｂｃｌ－２タンパク質ファミリーおよびＩＣＥ様プロテアーゼは、他の系におけるアポトーシスの重要な調節因子およびエフェクターであることが証明されている。濾胞性リンパ腫に関連して発見されたＢｃｌ－２タンパク質は、アポトーシスの制御および様々なアポトーシス刺激に応答した細胞生存の増強で重要な役割を果たす（Ｂａｋｈｓｈｉら、１９８５；Ｃｌｅａｒｙ ａｎｄ Ｓｋｌａｒ，１９８５；Ｃｌｅａｒｙら、１９８６；Ｔｓｕｊｉｍｏｔｏら、１９８５；Ｔｓｕｊｉｍｏｔｏ ａｎｄ Ｃｒｏｃｅ，１９８６）。進化的に保存されたＢｃｌ－２タンパク質は、現在、死アゴニストまたは死アンタゴニストとして分類することができる関連タンパク質ファミリーのメンバーであると認識されている。

【０１６１】

その発見に続き、Ｂｃｌ－２は様々な刺激によって誘発される細胞死を抑制するように作用することが示された。また、現在、共通の構造および配列の相同性を共有するＢｃｌ－２細胞死調節タンパク質ファミリーが存在することが明らかである。これらの異なるファミリーメンバーは、Ｂｃｌ－２に対する類似の機能を有する（例えば、Bcl_{XL}、Bcl_{W}、Bcl_{S}、Ｍｃｌ－１、Ａ１、Ｂｆｌ－１）か、Ｂｃｌ－２機能を妨害して細胞死を促進する（例えば、Ｂａｘ、Ｂａｋ、Ｂｉｋ、Ｂｉｍ、Ｂｉｄ、Ｂａｄ、Ｈａｒａｋｉｒｉ）ことが示されている。

【０１６２】

５．手術

がんを有するヒトの約６０％がいくつかの種類の手術を受け、それらとしては、予防的手術、診断または病期分類のための手術、治癒切除、および姑息的手術が挙げられる。治癒切除は、本発明の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法、および／または代替療法などの他の療法と併せて使用することができるがん処置である。

【０１６３】

治癒切除は、がん組織の全部または一部を物理的に除去、摘出、および／または破壊する切除を含む。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を指す。腫瘍切除に加えて、手術による処置としては、レーザー手術、凍結手術、電気外科手術、および顕微鏡制御手術（モース氏手術）が挙げられる。表在がん、前がん、または付随する正常組織量の除去と併せて本発明を使用することができることがさらに意図される。

【０１６４】

すべてのがん細胞、がん組織、または腫瘍の一部の切除の際、体内に空洞が形成され得る。さらなる抗がん療法を使用したこの領域の灌流、直接注射、または局所投与によって処置を行うことができる。このような処置を、例えば、１、２、３、４、５、６、または７日毎、１、２、３、４、および５週間毎、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２カ月毎に繰り返すことができる。これらの処置は、投与量も変化させることができる。

【０１６５】

Ｃ．自己免疫疾患（Ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ）

本発明はまた、本発明の抗体を使用する自己免疫疾患の処置を意図する。ＰＲ１は、骨髄系の自己タンパク質に由来する。ウェゲナー肉芽腫症では、ＰＲ１を含有するプロテイナーゼ３（Ｐｒ３）が自己免疫攻撃の標的である。小血管血管炎では、ミエロペルオキシダーゼ（ＭＰＯ）が標的抗原であり（Ｆｒａｎｓｓｅｎら、１９９６；Ｂｒｏｕｗｅｒら、１９９４；Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９６）、これらの疾患を有する患者において、Ｔ

細胞免疫および抗体免疫の両方の証拠がある。ウェゲナー肉芽腫症は、Ｐｒ３に対する特異性を有する細胞質抗好中球細胞質抗体（ｃＡＮＣＡ）の産生を伴うが（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９７）、顕微鏡的多発血管炎およびチャーグ－ストラウス症候群は、ＭＰＯに対する特異性を有する核周囲ＡＮＣＡ（ｐＡＮＣＡ）を伴う（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９９；Ｓａｖａｇｅら、１９９９）。このように、ＰＲ１の免疫細胞認識を阻害することは、自己免疫疾患の治療法となり得る。

【０１６６】

したがって、他の自己抗体（例えば、プロテイナーゼ３に対するｐＡＮＣＡ）の作用を中和するために、本発明の抗体は、自己免疫疾患を患っている被験体に投与される。あるいは、「二重特異性」になるように、すなわち、２つの抗原（一方はＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２であり、他方はＤＥＣ－２０５、ＬＯＸ－１、ＲＡＧＥのような樹状細胞表面抗原である）に対する免疫学的特異性を有するように抗体を操作し、それにより、樹状細胞の抗原提示機能を遮断する。

【０１６７】

１．血管炎

血管炎は、血管壁の炎症によって引き起こされる過程であり、様々な障害をもたらす。血管炎に関する認められている分類システムは登場していないが、関与する血管のサイズまたは種類によって大血管血管炎、中血管血管炎または小血管血管炎と分類され得る。小血管血管炎は、動脈（すなわち、細動脈、細静脈および毛細血管）よりも小さな血管に影響を与える血管炎と定義される；しかしながら、小血管血管炎には、中サイズの動脈も関与し得る。抗好中球細胞質抗体（ＡＮＣＡ）関連血管炎は、小血管血管炎の最も一般的な原因であり、顕微鏡的多発血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ－ストラウス症候群および特定種の薬物誘発性血管炎が挙げられる。

【０１６８】

ウェゲナー肉芽腫症。ウェゲナー肉芽腫症は、上気道（鼻、副鼻腔、耳）、肺および腎臓における血管の炎症を引き起こす珍しい障害である。全症例のほぼ半分で生じる関節炎（関節の炎症）によって、多くの他の身体領域も影響を受け得る。目および皮膚も影響を受け得る。原因は不明であるが、ウェゲナー肉芽腫症は自己免疫障害であると考えられており、リウマチ性疾患の１つに分類されることが多い。上気道および下気道ならびに腎臓において、破壊性病変が発症する。腎臓では、これらの病変は、血尿（尿中の血液）および腎不全をもたらし得る糸球体腎炎を引き起こす。それは、３０～５０歳で最も頻繁に生じ、男性は、女性の２倍の頻度で罹患する。それは子供では珍しいが、３カ月齢の乳児に認められたことがある。腎疾患が急速に進行して、初期診断の数カ月以内に腎不全が生じ得る。未処置の場合、ウェゲナー肉芽腫症を有する全患者の９０％超において、腎不全および死に至る。

【０１６９】

初期症候としては、疲労、倦怠感、発熱、ならびに鼻および副鼻腔周囲の不快感を挙げることができる。副鼻腔炎または耳感染症などの上気道感染症は、ウェゲナー肉芽腫の診断に先立つことが多い。他の上気道症候としては、鼻血、疼痛、および鼻開口部周囲の痛みが挙げられる。明らかな原因のない持続性発熱（原因未確定の発熱－ＦＵＯ）が、初期症候であり得る。寝汗は、発熱を伴い得る。食欲不振および体重減少が一般的である。皮膚病変は一般的であるが、この疾患に関連する特徴的病変は１つではない。腎疾患は、ウェゲナー肉芽腫症の確定診断を行うのに必要である。尿が血性であり得、多くの場合、赤色尿または黒色尿（ｓｍｏｋｙ　ｕｒｉｎｅ）として最初に現れる。症候がない場合があるが、検査室の試験によって容易に診断される。かなりの数の患者において目の問題が生じ、その範囲は、軽度の結膜炎から眼球および眼球周囲組織の重度の炎症に及び得る。さらなる症候としては、衰弱、食欲不振、体重減少、血性鼻漏、副鼻腔疼痛、副鼻腔炎、鼻開口部内およびその周囲の病変、咳、喀血、血痰、息切れ、喘鳴、胸痛、尿中の血液、発疹および関節痛が挙げられる。

【０１７０】

開胸肺生検、上気道生検、鼻粘膜生検、経気管生検を伴う気管支鏡検査、腎生検、尿検査、胸部ｘ線、骨髄吸引、（自己抗体の）血液試験を含み得る異常組織の生検を行うことによってなされる診断。処置は、罹患者の９０％超において長期寛解をもたらし得るコルチコステロイド、シクロホスファミド、メトトレキサートまたはアザチオプリンを含む。

【０１７１】

チャーグ－ストラウス症候群。アレルギー性肉芽腫症としても公知のチャーグ－ストラウス症候群（ＣＳＳ）は、全身性血管炎の一形態である。ＣＳＳは結節性多発動脈炎に類似するが、豊富な好酸球によりこの疾患と区別される。ほとんどのＣＳＳ患者は、新たなまたは増加した重度の喘息（喘息は、ＣＳＳの重要な特徴の１つである）の病歴を有する中年である。喘息の症候は、血管炎の発症のずっと前に始まり得る。他の初期症候としては、鼻ポリープやアレルギー性鼻炎が挙げられる。この疾患は好酸球増加症に移行することが多く、その数は６０％に達する。疾患の次の相は顕性の血管炎であり、皮膚、肺、神経、腎臓および他の器官を障害し得る。末梢神経障害は特に消耗性であり得、四肢の疼痛、麻痺または刺痛（神経障害／多発性単神経炎）が挙げられる。治療法の出現前は、ＣＳＳは、致命的な疾患であることが多かった。患者の大半が、制御されない流行性疾患で死亡した。

【０１７２】

ＣＳＳの原因は不明だが、それは多因子性のようなものである。遺伝的因子は存在し得るが、ＣＳＳは、同じ家族の２人において極めてまれに認められる。したがって、環境因子および感染が原因である可能性が高いが、この決定的な証拠はない。診断（Ｄｉａｇｎｏｓ）は、症候および徴候、臓器障害のパターン、ならびに血液試験の特定の異常（特に、好酸球増加症）の存在の特定の組み合わせによって実施される。詳細な患者の病歴および身体検査に加えて、診断を支援するために、血液試験、胸部Ｘ線および他の種類のイメージング研究、神経伝導試験、ならびに組織生検（肺、皮膚または神経）が実施され得る。ＣＳＳ患者として分類されるには、患者は、以下の６つの判定基準の少なくとも４つを有するべきである：１）喘息；２）好酸球増加症［１０％超の鑑別ＷＢＣ計算］；３）単神経障害；４）胸部Ｘ線で一過性肺浸潤；５）副鼻腔異常；および６）生検が、血管外好酸球を伴う血管を含有すること。

【０１７３】

ＣＳＳは、通常、プレドニゾンに応答する。最初は、高用量の経口プレドニゾンを使用するが、最初の１カ月程後に、この高用量のプレドニゾンをその後数カ月にわたって徐々に漸減させる。プレドニゾンに加えて、アザチオプリン、セルセプト、メトトレキサートまたはシクロホスファミドなどの他の免疫抑制薬が使用され得る。重度の疾患を有する患者、または他の処置に非応答性の者にとっては、高用量の静脈内ステロイドが有用であり得る。適切な治療により、症候が迅速に消散し始めて、心臓および腎臓の機能が徐々に改善し、末梢神経障害に起因する痛みが改善する。患者の応答および疾患の継続に応じて、治療は１～２年間継続し得る。

【０１７４】

２．クローン病

クローン病の症候には、腸の炎症、ならびに腸狭窄およびフィステルの発症が含まれ；これらの症候はニューロパチーを伴うことが多い。典型的には、５－アミノサリチル酸類（例えば、メサラミン）またはコルチコステロイドのような抗炎症薬が処方されるが、常に有効という訳ではない（Ｖ．Ａ．Ｂｏｔｏｍａｎら、１９９８に概説されている）。シクロスポリンによる免疫抑制は、コルチコステロイドに抵抗性または不耐性の患者にとって有益であることがある（Ｂｒｙｎｓｋｏｖら、１９８９）。

【０１７５】

それにもかかわらず、最終的には、患者の９０％において外科的矯正が必要となり；５０％が結腸切除を受ける（Ｌｅｉｐｅｒら、１９９８；Ｍａｋｏｗｉｅｃら、１９９８）。術後の再発率は高く、５０％が５年以内にさらなる手術を必要とする（Ｌｅｉｐｅｒら、１９９８；Ｂｅｓｎａｒｄら、１９９８）。

【０１７６】
クローン病の病因についての１つの仮説は、遺伝的感受性および環境因子（例えば、喫煙）に恐らく起因する腸粘膜関門の不全により、細菌抗原および食物抗原を含む、腸管腔に由来する抗原に免疫系が曝されるというものである（例えば、Ｓｏｄｅｒｈｏｌｍら、１９９９；Ｈｏｌｌａｎｄｅｒら、１９８６；Ｈｏｌｌａｎｄｅｒ，１９９２）。別の仮説は、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒａｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ、異常な大腸菌、またはパラミクソウイルスのような病原体による持続性の腸感染が、免疫応答を刺激するか；あるいは、正常な腸内細菌叢ならびにそれらが産生する代謝物および毒素のような遍在性の抗原に対する調節不全の免疫応答に、症候が起因するというものである（Ｓａｒｔｏｒ，１９９７）。血清中のＩｇＡ型およびＩｇＧ型の抗Ｓａｃｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ抗体（ＡＳＣＡ）の存在が、小児クローン病を高度に診断することが見出された（Ｒｕｅｍｍｅｌｅら、１９９８；Ｈｏｆｆｅｎｂｅｒｇら、１９９９）。

【０１７７】
クローン病において、調節不全の免疫応答は、細胞媒介免疫病理に傾いている（Ｍｕｒｃｈ，１９９８）。しかしながら、シクロスポリン、タクロリムス、およびメサラミンのような免疫抑制薬が、コルチコステロイド抵抗性のクローン病例を処置するために使用されているが、成功率は様々である（Ｂｒｙｎｓｋｏｖら、１９８９；Ｆｅｌｌｅｒｍａｎら、１９９８）。

【０１７８】
クローン病の診断および処置のためのツールを開発する最近の努力は、サイトカインの中心的な役割に焦点を当てている（Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ，１９９８；ｖａｎ　Ｈｏｇｅｚａｎｄ＆Ｖｅｒｓｐａｇｅｔ，１９９８）。サイトカインは、細胞間相互作用、細胞間コミュニケーション、または他の細胞の挙動に対して特異的な効果を有する、低分子の分泌型のタンパク質または因子（５～２０ｋＤ）である。サイトカインは、リンパ球、特に、T_H1リンパ球およびT_H2リンパ球、単球、腸マクロファージ、顆粒球、上皮細胞、ならびに線維芽細胞により産生される（Ｒｏｇｌｅｒ＆Ａｎｄｕｓ，１９９８；Ｇａｌｌｅｙ＆Ｗｅｂｓｔｅｒ，１９９６に概説されている）。一部のサイトカインは炎症促進性であり（例えば、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１（αおよびβ）、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、または白血病抑制因子もしくはＬＩＦ）；他のサイトカインは抗炎症性である（例えば、ＩＬ－１受容体アンタゴニスト、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、およびＴＧＦ－β）。しかしながら、特定の炎症状態の下では、それらの効果のオーバーラップおよび機能的重複性が存在し得る。

【０１７９】
活動性のクローン病例においては、上昇した濃度のＴＮＦ－αおよびＩＬ－６が血液循環内へ分泌され、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１、ＩＬ－６、およびＩＬ－８が、粘膜細胞により局所的に過剰産生される（Ｆｕｎａｋｏｓｈｉら、１９９８）。これらのサイトカインは、骨の発達、造血、ならびに肝臓機能、甲状腺機能、および精神神経機能を含む、生理学的な系に対して広範囲にわたる効果を有し得る。また、炎症促進性のＩＬ－１βが優位なＩＬ－１β／ＩＬ－１ｒａ比率の不均衡が、クローン病を有する患者において観察されている（Ｒｏｇｌｅｒ＆Ａｎｄｕｓ，１９９８；Ｓａｉｋｉら、１９９８；Ｄｉｏｎｎｅら、１９９８；しかし、Ｓ．Ｋｕｂｏｙａｍａ，１９９８を参照のこと）。ある研究は、大便サンプル中のサイトカインプロファイルが、クローン病についての有用な診断ツールとなり得ることを示唆した（Ｓａｉｋｉら、１９９８）。

【０１８０】
クローン病のために提唱されている処置には、様々なサイトカインアンタゴニスト（例えば、ＩＬ－１ｒａ）、阻害剤（例えば、ＩＬ－１β変換酵素の阻害剤および抗酸化薬）、ならびに抗サイトカイン抗体（Ｒｏｇｌｅｒ　ａｎｄ　Ａｎｄｕｓ，１９９８；ｖａｎ　Ｈｏｇｅｚａｎｄ＆Ｖｅｒｓｐａｇｅｔ，１９９８；Ｒｅｉｍｕｎｄら、１９９８；Ｎ．Ｌｕｇｅｒｉｎｇら、１９９８；ＭｃＡｌｉｎｄｏｎら、１９９８）の使用が含まれる

。特に、ＴＮＦ－αに対するモノクローナル抗体は、クローン病の処置において試みられ、ある程度の成功を収めている（Ｔａｒｇａｎら、１９９７；Ｓｔａｃｋら、１９９７；ｖａｎ　Ｄｕｌｌｅｍｅｎら、１９９５）。これらの化合物は、本発明の化合物との併用療法で使用することができる。

【０１８１】

クローン病の処置のための別のアプローチは、炎症応答を誘発し得る細菌集団を少なくとも部分的に根絶すること、および非病原性集団で置き換えることに焦点を当てている。例えば、米国特許第５，５９９，７９５号は、ヒト患者におけるクローン病の予防および処置の方法を開示している。その方法は、既存の細菌叢を殺菌除去し、正常なヒトから採取された、異なる、選択された、よく特徴決定された細菌で置き換えるための、少なくとも１種の抗生物質および少なくとも１種の抗真菌剤により腸管を無菌化することを対象とするものであった。Ｂｏｒｏｄｙは、既存の腸内細菌叢を洗浄により少なくとも部分的に除去し、疾患スクリーニングを受けたヒトドナーに由来する便の接種により、またはＢａｃｔｅｒｏｉｄｅｓおよび大腸菌種を含む組成物により導入される新たな細菌集団で置き換えることにより、クローン病を処置する方法を教示した（米国特許第５，４４３，８２６号）。しかしながら、診断および／または処置を向けることができるクローン病の原因は未だ不明である。

【０１８２】

３．関節リウマチ

ＲＡの正確な病因は依然として不明であるが、自己免疫的な側面を有することが明らかである。滑膜線維芽細胞の増殖および関節端の関節表面へのそれらの付着を含む、関節疾患の最初の兆候は、滑膜表層に出現する（Ｌｉｐｓｋｙ，１９９８）。その後、マクロファージ、Ｔ細胞、および他の炎症細胞が関節へと動員され、そこで、それらは、骨および軟骨の破壊をもたらす慢性後遺症に寄与するサイトカインのインターロイキン－１（ＩＬ－１）、ならびに炎症において役割を果たす腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）を含む、多数のメディエーターを産生する（Ｄｉｎａｒｅｌｌｏ，１９９８；Ｂｕｒｇｅｒ＆Ｄａｙｅｒ，１９９５；ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｅｒｇ，２００１）。血漿中のＩＬ－１の濃度は、健常個体よりＲＡを有する患者において有意に高く、注目すべきことに、血漿ＩＬ－１レベルがＲＡ疾患の活動性と相関する（Ｅａｓｔｇａｔｅら、１９８８）。さらに、滑液ＩＬ－１レベルは、ＲＡの様々なＸ線写真の特色および組織学的特色と相関する（Ｋａｈｌｅら、１９９２；Ｒｏｏｎｅｙら、１９９０）。

【０１８３】

正常な関節において、これらおよび他の炎症促進性サイトカインの効果は、多様な抗炎症性サイトカインおよび調節因子によりバランスが保たれている（Ｂｕｒｇｅｒ＆Ｄａｙｅｒ，１９９５）。このサイトカインバランスの意義は、一日を通して周期的な発熱を有する若年性ＲＡ患者において例示される（Ｐｒｉｅｕｒら、１９８７）。各発熱ピークの後、ＩＬ－１の効果を阻止する因子が、血清中および尿中に見出される。この因子は、単離され、クローニングされ、ＩＬ－１遺伝子ファミリーのメンバー、ＩＬ－１受容体アンタゴニスト（ＩＬ－１ｒａ）として同定されている（Ｈａｎｎｕｍら、１９９０）。ＩＬ－１ｒａは、その名称が示す通り、Ｉ型ＩＬ－１受容体との結合に関してＩＬ－１と競合し、結果として、ＩＬ－１の効果を阻止する天然の受容体アンタゴニストである（Ａｒｅｎｄら、１９９８）。ＩＬ－１を効果的に阻止するためには１０～１００倍過剰のＩＬ－１ｒａが必要とされ得る；しかしながら、ＲＡを有する患者から単離された滑膜細胞は、ＩＬ－１の効果を妨げるのに十分なＩＬ－１ｒａを産生しないようである（Ｆｉｒｅｓｔｅｉｎら、１９９４；Ｆｕｊｉｋａｗａら、１９９５）。

【０１８４】

４．全身性エリテマトーデス

全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）は、組織損傷をもたらす自己抗体および免疫複合体の組織内の沈着を特徴とする自己免疫リウマチ性疾患である（Ｋｏｔｚｉｎ，１９９６６）。ＭＳおよび１型糖尿病のような自己免疫疾患とは対照的に、ＳＬＥには、潜在的に、

複数の臓器系が直接関与しており、その臨床徴候は多様で可変性である（Ｋｏｔｚｉｎ＆Ｏ’Ｄｅｌｌ，１９９５により概説されている）。例えば、主として皮疹および関節痛を示し、自然緩解を明らかに示し、薬物治療をほとんど必要としなくてもよい患者も存在する。スペクトルのもう一端には、高用量のステロイド、およびシクロホスファミドのような細胞傷害性薬物による治療を必要とする重度かつ進行性の腎臓障害を明らかに示す患者がいる（Ｋｏｔｚｉｎ，１９９６）。

【０１８５】

ＳＬＥの血清学的な顕著な特徴および利用可能な一次診断テストは、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓ－ＤＮＡ）、およびクロマチンのような細胞核の構成要素に対するＩｇＧ抗体の血清レベルの上昇である。これらの自己抗体の中で、ＩｇＧ型抗ｄｓＤＮＡ抗体は、ループス糸球体腎炎（ＧＮ）の発症において主要な役割を果たす（Ｈａｈｎ＆Ｔｓａｏ，１９９３；Ｏｈｎｉｓｈｉら、１９９４）。糸球体腎炎は、腎臓の血液を浄化する糸球体の毛細管壁が、糸球体基底膜の上皮側の癒着により肥厚化する重篤な状態である。疾患は、慢性かつ進行性であることが多く、最終的には腎不全をもたらし得る。

【０１８６】

これらの自己免疫疾患において自己抗体が誘導される機序は、不確かなままである。診断および／または処置を向けることができるＳＬＥの原因は未知であるため、処置は、基礎をなす原因ではなく、例えば、マクロライド系抗生物質による、免疫応答の抑制に向けられている（例えば、米国特許第４，８４３，０９２号）。

【０１８７】

５．若年性関節リウマチ

小児における最も有病率の高い関節炎の型を表す用語である若年性関節リウマチ（ＪＲＡ）とは、慢性炎症および滑膜の肥厚を特徴とする疾病ファミリーに適用される。この用語は、欧州において、若年性慢性関節炎および／または若年性特発性関節炎と称される疾病のファミリーとオーバーラップするが、完全には同義ではない。

【０１８８】

Ｊａｒｖｉｓ（１９９８）および他（Ａｒｅｎｄ，２００１）は、成人および小児におけるリウマチ様疾患の病原が、自然免疫と獲得免疫との間の複雑な相互作用を含むことを提唱した。この複雑さが、疾患の病原解明の困難さの中核をなしている。

【０１８９】

自然免疫系および獲得免疫系は、いずれも、複数の細胞型、多数の細胞表面タンパク質および分泌型タンパク質、ならびにポジティブフィードバックおよびネガティブフィードバックの相互に連絡するネットワークを使用している（Ｌｏら、１９９９）。さらに、思想的には分離可能であるが、免疫系の自然ウィングおよび獲得ウィングは、機能的に交差しており（Ｆｅａｒｏｎ＆Ｌｏｃｋｓｌｅｙ，１９９６）、これらの交差点において起こる病理学的イベントは、成人型および小児型の慢性関節炎の病原についての本発明者らの理解に高度に関連している可能性がある（Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎ，ら、２００１）。

【０１９０】

多関節ＪＲＡは、手の小関節を含む複数の関節（４箇所以上）における炎症および滑膜増殖を特徴とする明確な臨床亜型である（Ｊａｒｖｉｓ，２００２）。ＪＲＡのこの亜型は、その複数の関節障害、および経時的に急速に進行するその能力の両方のため、重度となり得る。臨床的に明確ではあるが、多関節ＪＲＡは均質ではなく、患者は、疾患の徴候、発症年齢、予後、および治療的応答に関して異なっている。これらの違いは、この疾患において起こり得る免疫攻撃および炎症攻撃の性質における変動の範囲を反映する可能性が極めて高い（Ｊａｒｖｉｓ，１９９８）。

【０１９１】

６．シェーグレン症候群

原発性シェーグレン症候群（ＳＳ）は、中年の女性に主に影響を与えるが（男女比１：９）、小児を含むすべての年齢において認めることができる、慢性の、進行の遅い、全身

性の自己免疫疾患である（Ｊｏｎｓｓｏｎら、２００２）。それは、ＣＤ４＋リンパ球、ＣＤ８＋リンパ球、およびＢ細胞を含む単核細胞が浸潤する、外分泌腺のリンパ球浸潤および破壊を特徴とする（Ｊｏｎｓｓｏｎら、２００２）。さらに、腺外（全身性）徴候が、患者の３分の１に認められる（Ｊｏｎｓｓｏｎら、２００１）。

【０１９２】

腺へのリンパ球浸潤は、進行性の特色であり（Ｊｏｎｓｓｏｎら、１９９３）、広範な場合、器官の大部分を置き換え得る。興味深いことに、一部の患者における腺浸潤物は、（異所性胚中心と称される）唾液腺内の異所性リンパ様微細構造物に密接に類似している（Ｓａｌｏｍｏｎｓｓｏｎら、２００２；Ｘａｎｔｈｏｕ＆Ｐｏｌｉｈｒｏｎｉｓ，２００１）。ＳＳにおいて、異所性ＧＣとは、濾胞性樹状細胞および活性化された内皮細胞のネットワークを含む、増殖性細胞のＴ細胞およびＢ細胞の凝集物として定義される。標的組織内に形成されたＧＣ様構造物は、自己抗体（抗Ｒｏ／ＳＳＡおよび抗Ｌａ／ＳＳＢ）の産生を含む機能的特性も描写する（Ｓａｌｏｍｏｎｓｓｏｎ＆，Ｊｏｎｓｓｏｎ，２００３）。

【０１９３】

ＲＡのような他の全身性自己免疫疾患においては、異所性ＧＣのための必須の因子が同定されている。ＧＣを有するリウマチ様滑膜組織は、ケモカインＣＸＣＬ１３、ＣＣＬ２１、およびリンホトキシン（ＬＴ）－βを産生することが示された（濾胞中心および外套帯Ｂ細胞に検出された）。これらの被検体の多変数回帰分析は、ＣＸＣＬ１３およびＬＴ－βを、リウマチ様滑膜炎におけるＧＣを予測する孤立性のサイトカインとして同定した（Ｗｅｙａｎｄ＆Ｇｏｒｏｎｚｙ，２００３）。最近、ＳＳにおいて、唾液腺内のＣＸＣＬ１３およびＣＸＣＲ５が、Ｂ細胞およびＴ細胞を動員し、したがって、リンパ系新生および異所性ＧＣ形成に寄与することにより、炎症過程において重要な役割を果たしていることが示された（Ｓａｌｏｍｏｎｓｓｏｎ＆Ｌａｒｓｓｏｎ，２００２）。

【０１９４】

７．乾癬

乾癬は、米国の人口の２～２．６％または５８０～７５０万人に影響を与えている鱗屑および炎症の慢性皮膚疾患である。この疾患は、すべての年齢群において起こるが、主として成人に影響を与える。それは男女にほぼ等しく現れる。皮膚細胞が、皮膚表面下の起源から急速に生じ、それが成熟する機会を得る前に表面に積み重なる場合に、乾癬が起こる。通常、（代謝回転とも呼ばれる）この移動には、約１ヵ月かかるが、乾癬においては、わずか数日でそれが起こり得る。典型的な型では、乾癬は、銀色の鱗屑により覆われた厚い赤色の（炎症を起こした）皮膚の斑をもたらす。プラークと称されることもある、これらの斑は、通常、痒みまたは痛みを伴う。それらは、肘、膝、脚の他の部分、頭皮、下背部、顔面、手掌、および足の裏に起こることが最も多いが、身体上のいかなる場所の皮膚にも起こり得る。この疾患は、指の爪、足の爪、ならびに性器および口内の軟部組織にも影響を与えることがある。影響を受けた関節の周囲の皮膚に亀裂が入ることは珍しくないが、乾癬を有するおよそ１００万人が、関節炎の症候を生ずる関節の炎症を経験する。この状態は、乾癬性関節炎と称される。

【０１９５】

乾癬は、特に、Ｔ細胞が関与する、免疫系により駆動される皮膚障害である。乾癬では、Ｔ細胞が誤作用し、他の免疫応答を誘発するほどに高活性となり、炎症および皮膚細胞の急速な代謝回転をもたらす。症例の約３分の１に、乾癬の家族歴が存在する。研究者は、乾癬により影響を受けた多数の家族を研究し、疾患と関係のある遺伝子を同定した。乾癬を有する人々は、皮膚が悪化し、次いで、改善する時があることに気づき得る。再燃を引き起こし得る条件には、感染症、ストレス、および皮膚を乾燥させる気候の変化が含まれる。高血圧に対して処方されるリチウムおよびベータブロッカーを含む、特定の医薬も、突発を誘発するかまたは疾患を悪化させることがある。

【０１９６】

８．多発性硬化症

多発性硬化症（ＭＳ）は、毎年米国だけで数十万人、そして世界中では数百万人を苦しめている深刻な健康問題であり続けている。それは、中枢神経系（脳および脊髄）の最も一般的な疾患の１つである。ＭＳは、脱髄またはミエリン鞘の消失に関連する炎症状態である。ミエリンは神経を絶縁する脂肪物質であり、神経がある地点から別の地点にインパルスを伝達することを可能にする絶縁体として作用する。ＭＳでは、ミエリンの消失は、神経が電気インパルスを脳にまたは脳から伝導する能力の崩壊を伴い、これが様々なＭＳ症候、例えば視力、筋協調、強度、感覚、発話および嚥下、膀胱の制御、性的能力ならびに認知機能の障害をもたらす。ミエリンが消失したプラークまたは病変は、硬化した瘢痕様領域のように見える。これらの瘢痕は脳および脊髄の様々な領域に様々な時点で現れるので、用語「多発性」硬化症は、文字通り多くの瘢痕を意味する。

【０１９７】

現在のところ、ＭＳの決定的な診断を提供する単一の検査室の試験、症候または身体的な所見はない。厄介なことに、ＭＳの症候は、多種多様な他の疾患、例えば急性播種性脳脊髄炎、ライム病、ＨＩＶ関連脊髄症、ＨＴＬＶ－Ｉ関連脊髄症、神経梅毒、進行性多巣性白質脳症、全身性エリテマトーデス、結節性多発動脈炎、シェーグレン症候群、ベーチェット病、サルコイドーシス、腫瘍随伴症候群、亜急性脊髄連合変性症、亜急性脊髄視神経障害、副腎脊髄ニューロパチー、脊髄小脳症候群、遺伝性痙性対麻痺／原発性側索硬化症、脳卒中、腫瘍、動静脈奇形、くも膜嚢腫、アーノルド－キアリ奇形および頸椎症と容易に混同され得る。したがって、ＭＳと一致する所見を示し、さらに他の原因を除外する手順によって、ＭＳの診断を行われなければならない。

【０１９８】

一般に、ＭＳの診断は２つの判定基準に依拠する。第１に、少なくとも１カ月間隔で２回の攻撃がなければならない。増悪、再燃、または再発としても公知の攻撃は、少なくとも２４時間継続する１つ以上のＭＳ症候が突然出現するか、または悪化することである。第２に、中枢神経系のミエリン鞘に対する複数の損傷領域が存在しなければならない。鞘に対する損傷は複数の時点で生じていなければならず、脱髄または類似の神経学的症候を引き起こし得る任意の他の疾患によって引き起こされたものであってはならない。現在のところ、ＭＲＩ（磁気共鳴映像法）は、脳をイメージングして、ＭＳによって引き起こされるプラークまたは瘢痕の存在を検出するする好ましい方法である。

【０１９９】

しかしながら、ＭＲＩのみに基づいて、ＭＳの診断を行うことはできない。他の疾患は、ＭＳによって引き起こされるものに似た同程度の脳内病変を引き起こし得る。さらに、ＭＲＩによる脳病変の外観は、異なる患者では全く異質性である場合があり、いくつかでは脳腫瘍または脊髄腫瘍に似てさえいる。加えて、確定ＭＳを有する少数の患者はＭＲＩでいかなる脳内病変も示さないので、通常のＭＲＩスキャンではＭＳの診断が除外されない。これらの個体は、ＭＲＩによって検出され得ない脊髄病変または病変（ｓｐｉｎａｌ ｃｏｒｄ ｌｅｓｉｏｎｓ ｏｒ ｌｅｓｉｏｎｓ）を有することが多い。その結果、詳細な臨床検査には、患者の病歴および機能試験も含まれることが重要である。これは、精神的、感情的および言語的な機能、運動および協調、視力、バランス、ならびに五感機能を包含すべきである。症候が最初に始まった人の性別、出生地、家族歴および年齢も重要な検討事項である。誘発電位（中枢神経系の伝導時間の遅延を明らかにし得る電気診断検査）、脳脊髄液（オリゴクローナルバンドと称されるクローン的に広がった免疫グロブリン遺伝子の存在の探索）、および血液（他の原因を除外するため）を含む他の試験は、特定の場合に必要とされ得る。

【０２００】

Ｄ．併用療法

上記免疫障害のための併用療法も意図される。このような治療法としては、抗炎症薬および免疫抑制剤などの標準的な治療法を本発明の治療方法と併用するものが挙げられよう。このような標準的な治療法は、被験体において疾患を引き起こす免疫細胞に負の影響を与えることができるか、またはこのような疾患の症候を緩和することになる。この方法は

、細胞または被験体と両薬剤とを同時に接触させることを含み得る。これは、両薬剤を含む単一の組成物もしくは薬理学的製剤を用いて、または２つの別個の組成物もしくは製剤を同時に用いて達成され得る。あるいは、抗体療法は、数分間～数週間の範囲の間隔で他の薬剤処置に先行してもよいし、またはその後に続いてもよい。

【０２０１】

様々な組み合わせが用いられ得る；例えば、（コンジュゲートした治療剤の有無にかかわらず）抗体療法は「Ａ」であり、二次免疫疾患療法は「Ｂ」である：

Ａ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ｂ／Ａ　Ａ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ｂ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ｂ／Ｂ

Ｂ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ａ／Ｂ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ｂ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ｂ／Ａ／Ａ

Ｂ／Ａ／Ｂ／Ａ　Ｂ／Ａ／Ａ／Ｂ　Ａ／Ａ／Ａ／Ｂ　Ｂ／Ａ／Ａ／Ａ　Ａ／Ｂ／Ａ／Ａ　Ａ／Ａ／Ｂ／Ａ

【０２０２】

患者への本発明の治療剤の投与は、存在する場合には抗体治療の毒性を考慮して、その特定の二次療法を行うための一般的なプロトコールに従う。処置サイクルは必要な場合繰り返されると予想される。様々な標準治療および外科的介入を、記載される治療法と組み合わせて適用し得ることも意図される。

【実施例】

【０２０３】

ＶＩＩ．実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。当業者であれば、以下の実施例に開示される技術が、本発明の実施において十分に機能することが本発明者によって発見された技術の代表的なものであり、その実施のための好ましい様式を構成すると見なし得ると認識するはずである。しかしながら、当業者であれば、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、開示される特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、依然として同様または類似の結果が得られることを認識するはずである。

実施例１：方法

【０２０４】

抗体の生成。複合ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１エピトープに対する抗体を得るために、本発明者らは、皮下（ＳＱ）および腹腔内（ＩＰ）経路を介して組換えＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーでＢＡＬＢ／ｃマウスを２週間間隔で３回免疫した。免疫した動物から脾細胞を単離し、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を使用してＢ細胞をＨＧＰＲＴ陰性不死化骨髄腫細胞と融合させた。次いで、ｐｐ６５／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーおよびＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーを用いてハイブリドーマ細胞を選択し、単一細胞クローニングのために９６ウェルプレートに入れた。

【０２０５】

抗体のスクリーニングおよび特性決定。ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーを用いてＥＬＩＳＡによってモノクローナル細胞系（約２０，０００個）をスクリーニングして、陽性抗体分泌ハイブリドーマを同定した。ＥＬＩＳＡによって、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に対する特異性を有する８Ｆ４ハイブリドーマを同定し、アイソタイプ特異的抗体および免疫グロブリン軽鎖抗体を使用して特性決定した。

【０２０６】

抗体のクローニング、配列分析および結合研究。ハイブリドーマｃＤＮＡから８Ｆ４重鎖をクローニングし、一次配列を得た。ＨＬＡ－Ａ＊０２０１重鎖＋β－２ミクログロブリンを用いて、それぞれＰ１～Ｐ９の位置にＡｌａ置換を含有する改変ＰＲ１ペプチドをフォールディングすることによって、エピトープマッピングを実施した。固定化８Ｆ４および漸増濃度の可溶性ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１を用いてＢｉａｃｏｒｅ機器の表面プラズモン共鳴によって、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に対する８Ｆ４の結合親和性を

決定した。ＦＡＣＳ分析および共焦点イメージングを利用して、正常細胞および異常細胞に対する８Ｆ４の結合を研究した。

【０２０７】

抗体の活性。ＡＭＬに対する８Ｆ４の結合が細胞溶解を引き起こすかを決定するために、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイおよび補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイを実施した。８Ｆ４　ＣＤＣ媒介性溶解に対して感受性であることが示された患者材料由来のＡＭＬ細胞を、８Ｆ４またはアイソタイプ対照の存在下または非存在下でインキュベートし、次いで、照射（２００ｃＧｙ）免疫不全ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに移植した。２週間の時点で動物を屠殺し、ＦＡＣＳによって脾細胞および骨髄を分析した。

【０２０８】

全ＲＮＡの単離。ｍｉｎｅｌｕｔカラムを含むＱｉａｇｅｎ　ＲＮＡ　ｅａｓｙキットを使用した。ＲＮＡローディング緩衝液を以下のように作製した：１μｌのエチジウムブロマイド（ＥｔＢｒ）（１０ｍｇ／ｍｌ）を１００μｌの１×ＴＡＥ、ＲＮＡｓｅフリーH_2O中の１０×ＤＮＡローディング色素、１％アガロース（キット中）に添加する。指示は以下のとおりである。「ハイブリドーマ細胞または１～５×10^6個の生細胞のバイアルを凍結する。活性培養物が利用可能である場合、工程４として、１５ｍｌコニカルチューブ中で１～５×10^6個の生細胞をペレット化し、工程５に進む。凍結細胞のみが利用可能である場合、１バイアルのハイブリドーマ細胞を３７℃で解凍し、解凍直後に水浴から取り出し、穏やかに混合する。７０％エタノールでバイアルを拭き、ネジ山に触れないように注意しながら蓋を回して取り外す。バイアルの内容物を、１５ｍｌの完全培地を含有する１５ｍｌコニカルチューブに移す。１００×ｇ（低速Ｓｏｒｖａｌｌ遠心分離機の場合は約１，０００ｒｐｍ）で５分間遠心分離する。スピン中は、ｂ－メルカプトエタノールを小アリコートのＲＬＴ緩衝液に添加する。１０ｍｌピペットを用いて、細胞からすべての培地を慎重に除去する。Ｑｉａｓｈｒｅｄｄｅｒを使用してＲＬＴ緩衝液中の細胞ペレットを溶解し、ＲＮＡ単離用のＱｉａｇｅｎプロトコールに従う。開始の細胞量に応じて、２×の１５μｌのＲＮＡｓｅフリーｄH_2Oを用いて、ｍｉｎｅｌｕｔカラムからＲＮＡを溶出する（６ウェルの場合、１×１３μｌを用いて溶出する）。手順後、ＲＮＡがＩＣＥ上に残っているはずである。１μｇ／ｍｌ　ＥｔＢｒを含有する１％アガロースミニゲルを注ぎ、１５分間の凝固時間中にＲＮＡを定量する。上記と同じＲＮＡｓｅフリーH_2Oをブランクとして使用し、分光光度計を使用して、２μｌのＲＮＡを定量する。ＲＮＡ濃度を計算する：（A_{260}）（４０）－μｇ／ｍｌ。Ａ２６０／２８０比は１．６超である必要がある。総容量１０μｌの１×ＲＮＡローディング緩衝液中の１％アガロースミニゲル上で１ｕｇを泳動することによって、ＲＮＡの品質を検査する。ゲルに約１インチ泳動する。フォトドキュメンテーションシステムでゲルを分析する。高品質なＲＮＡのバンドパターンは、区別可能な２８ｓおよび１８ｓリボソームＲＮＡのバンドが２：１の理想的な強度比になることを特徴とする。１：１の比は許容可能であり得る；しかしながら、バンドがないかまたはゲル下端のスメア（ｓｍｅａｒ）は、ＲＮＡの分解を示しており、このＲＮＡを使用すべきでないことを示す。」

【０２０９】

ハイブリドーマ由来の再構成Ｉｇ可変領域（Ｖ）遺伝子の単離および配列分析。Ｖ重鎖（ＶＨ）遺伝子およびＶ軽鎖（ＶＬ）遺伝子からＤＮＡ配列を得るために、ヒト重鎖定常領域プライマーまたは軽鎖定常領域プライマーと組み合わせて、ｃＤＮＡ末端の迅速増幅（ＲＡＣＥ）ＰＣＲを使用した。ＢＤ　Ｓｍａｒｔ　ＴＭ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ増幅キット（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて、それに添付の指示にしたがって、５’ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ増幅を実施した。ＰＦＵ　ｕｌｔｒａ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ＵｎｉｖｅｒｓｌａプライマーＡミックス（ＵＰＭ）およびヒトＩｇＧ　Ｈ＆Ｌ定常領域用の遺伝子特異的プライマー（ＧＳＰ）を利用した。

【０２１０】

５’ＲＡＣＥ　ＰＣＲ産物のクローニングおよびＤＮＡ配列決定では、ＴＯＰＯクロー

ニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）およびゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用した。ＩｇＧ　Ｌの場合、８つのコロニーをｍｉｎｉｐｒｅｐのために単離（ｉｓｌａｔｅｄ）し、ＥｃｏＲＩ消化によってスクリーニングした。Ｍ１３ｒｅｖおよびＴ７プライマーを用いて、６つの陽性クローンを配列決定した。ＩｇＧの場合、８つのコロニーをｍｉｎｉｐｒｅｐのために単離し、ＥｃｏＲＩ消化によってスクリーニングした。Ｍ１３ｒｅｖおよびＴ７プライマーを用いて、６つの陽性クローンを配列決定した。

実施例２：結果

【０２１１】

抗体の生成。複合ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１エピトープに対する抗体を得るために、本発明者らは、皮下（ＳＱ）および腹腔内（ＩＰ）経路を介して組換えＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーでＢＡＬＢ／ｃマウスを２週間間隔で３回免疫した。免疫した動物から脾細胞を単離し、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を使用してＢ細胞をＨＧＰＲＴ陰性不死化骨髄腫細胞と融合させた。次いで、ｐｐ６５／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーおよびＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーを用いてハイブリドーマ細胞を選択し、単一細胞クローニングのために９６ウェルプレートに入れた。

【０２１２】

抗体のスクリーニングおよび特性決定。ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１モノマーを用いてＥＬＩＳＡによってモノクローナル細胞系をスクリーニングして、陽性抗体分泌ハイブリドーマを同定した。ほぼ２，０００個のハイブリドーマをスクリーニングし、ＥＬＩＳＡによって、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に対する特異性を有する８Ｆ４と呼ばれるハイブリドーマを同定した。アイソタイプ特異的抗体および免疫グロブリン軽鎖抗体を使用して、８Ｆ４ハイブリドーマを特性決定したところ、単一のＩｇＧ２ａ－κ　ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１特異的抗体を分泌することが示された。

【０２１３】

抗体結合評価。ＨＬＡ－Ａ＊０２０１重鎖＋β２ミクログロブリンを用いて、それぞれＰ１～Ｐ９の位置にＡｌａ置換を含有する改変ＰＲ１ペプチドをフォールディングすることによって、エピトープマッピングを実施した。すべてのアミノ酸位置の改変により結合が破壊されたが、Ｐ１が８Ｆ４結合に最重要であるであることが判明した（図１）。図２に示されているように、固定化８Ｆ４および漸増濃度の可溶性ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１を用いてＢｉａｃｏｒｅ機器の表面プラズモン共鳴によって、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に対する８Ｆ４の結合親和性を決定した。ＨＬＡ－Ａ＊０２０１上の区別可能な対立遺伝子特異的部位を認識する市販のＢＢ７．２マウスモノクローナル抗体のK_D１６２ｎＭと比較して、８Ｆ４のK_Dは９．９ｎＭである。共焦点顕微鏡検査を使用したところ、８Ｆ４の直接蛍光コンジュゲートは、（ＨＬＡ－Ａ＊０２０１を発現する）ＰＲ１ペプチドパルスＴ２細胞にのみ結合し、無関係なｐｐ６５をパルスしたＴ２細胞またはパルスしていないＴ２細胞には結合しなかった。総合すると、複合ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１に対する８Ｆ４の特異性および８Ｆ４の高結合親和性が確認された。ＦＡＣＳ分析および共焦点イメージング（同様に、８Ｆ４、ＦＩＴＣ－コンジュゲートＢＢ７．２抗ＨＬＡ－Ａ＊０２０１抗体、およびＤＡＰＩを用いる）の両方を使用して、８Ｆ４は、ＡＭＬを有するＨＬＡ－Ａ２＋患者由来の循環芽球に結合するが、ＨＬＡ－Ａ２＋健常ドナー由来のＰＢＭＣおよびＨＬＡ－Ａ２陰性ＡＭＬ芽球には結合しないことが示された（図３および５）。

【０２１４】

マウス８Ｆ４可変領域遺伝子のクローニングおよび配列決定。７．５％CO_2インキュベーター内で、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ；ＨｙＣｌｏｎｅ）および１ｍＭピルビン酸ナトリウムを含有するＲＰＭＩ－１６４０培地（ＨｙＣｌｏｎｅ，Ｌｏｇａｎ，ＵＴ）中、マウス８Ｆ４ハイブリドーマ細胞を３７℃で成長させた。ＴＲＩｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用して供給業者のプロトコールにしたがって、約10^7個のハイブリドーマ細胞から全ＲＮＡを抽出した。ＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ増幅キット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を使

用して供給業者のプロトコールにしたがって、オリゴｄＴプライマーによる（ｏｌｉｇｏ　ｄＴ－ｐｒｉｍｅｄ）ｃＤＮＡを合成した。マウスγ－２ａおよびκ鎖定常領域にそれぞれアニーリングする３’プライマーと、５’プライマーとしてＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ増幅キットで提供されるユニバーサルプライマーＡミックスまたはネスティッドユニバーサルプライマーＡとを使用して、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）によるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって、８Ｆ４の重鎖および軽鎖の可変領域ｃＤＮＡを増幅した。重鎖可変領域（ＶＨ）のＰＣＲ増幅のために、３’プライマーは、配列５’－ＧＣＣＡＧＴＧＧＡＴＡＧＡＣＣＧＡＴＧＧ－３’（配列番号４６）を有する。軽鎖可変領域（ＶＬ）のＰＣＲ増幅のために、３’プライマーは、配列５’－ＧＡＴＧＧＡＴＡＣＡＧＴＴＧＧＴＧＣＡＧＣ－３’（配列番号４７）を有する。配列決定のために、増幅したＶＨおよびＶＬ　ｃＤＮＡをｐＣＲ４Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングした。可変領域のＤＮＡ配列決定をＴｏｃｏｒｅ（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）で行った。いくつかの重鎖および軽鎖クローンを配列決定し、典型的なマウス重鎖および軽鎖可変領域に相同な固有の配列を同定した。８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬの推定アミノ酸配列と一緒に、コンセンサスｃＤＮＡ配列をそれぞれ図１および２に示す。成熟８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列では、独自の特徴は認められなかった。

【０２１５】

キメラ８Ｆ４　ＩｇＧ１／κ抗体の構築。テンプレートとして８Ｆ４　ＶＨ　ｃＤＮＡ、５’プライマーとして５’－ＧＣＡＡＣＴＡＧＴＡＣＣＡＣＣＡＴＧＡＡＣＴＴＣＧＧＧＣＴＣＡＧＣ－３’（配列番号４８；ＳｐｅＩ部位に下線が付されている）、および３’プライマーとして５’－ＣＧＡＡＡＧＣＴＴＧＡＡＧＴＴＡＧＧＡＣＴＣＡＣＣＴＧＣＡＧＡＧＡＧＡＧＴＧＡＣＣＡＧＡＧ－３’（配列番号４９；ＨｉｎｄＩＩＩ部位に下線が付されている）を使用してＰＣＲによって、スプライスドナーシグナルおよび適切なフランキング制限酵素部位を含むエキソンとして、８Ｆ４　ＶＨをコードする遺伝子を作製した。同様に、テンプレートとして８Ｆ４　ＶＬ　ｃＤＮＡ、５’プライマーとして５’－ＧＣＡＧＣＴＡＧＣＡＣＣＡＣＣＡＴＧＧＡＧＴＣＡＣＡＧＡＴＴＣＡＧ－３’（配列番号５０；ＮｈｅＩ部位に下線が付されている）、および３’プライマーとして５’－ＣＧＡＧＡＡＴＴＣＴＴＴＧＧＡＴＴＣＴＡＣＴＴＡＣＧＴＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡＧＣＴＴＧＧＴＧ－３’（配列番号５１；ＥｃｏＲＩ部位に下線が付されている）を使用してＰＣＲによって、スプライスドナーシグナルおよび適切なフランキング制限酵素部位を含むエキソンとして、８Ｆ４　ＶＬをコードする遺伝子を作製した。８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬエキソンのスプライスドナーシグナルは、それぞれマウス生殖系列ＪＨ３およびＪκ１配列に由来していた。ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ＩＩ　Ｋｉｔ（Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ，Ｂｅｔｈｌｅｈｅｍ，ＰＡ）を使用してＰＣＲ増幅断片をゲル精製し、配列確認のためにｐＣＲ４Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングした。ＳｐｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ（ＶＨの場合）またはＮｈｅＩおよびＥｃｏＲＩ（ＶＬの場合）を用いて、正しいＶ断片を消化し、ゲル精製し、キメラ８Ｆ４　ＩｇＧ１／κ抗体の生成のために、ヒトγ－１およびκ定常領域を有する哺乳動物発現ベクターにクローニングした。得られた発現ベクターｐＣｈ８Ｆ４の概略構造を図１１に示す。

【０２１６】

ヒト化８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬ遺伝子の作製。以下のように、ヒト化８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬアミノ酸配列の設計を行った。最初に、ＪＮ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓの独自アルゴリズムを使用して、８Ｆ４可変領域の三次元分子モデルを構築した。次に、この分子モデルを使用して、ＣＤＲ構造の形成に重要なフレームワークアミノ酸残基を同定した。並行して、それぞれ８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬと高い相同性を有するｃＤＮＡ由来ヒトＶＨおよびＶＬアミノ酸配列を選択した。最後に、ＣＤＲ構造を維持するのに重要なフレームワークアミノ酸残基と共に、ＣＤＲ配列を、８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬから、対応する選択したヒトフレームワーク配列に移植した。

【０２１７】
ＧｅｎＢａｎｋデータベース内で、８Ｆ４　ＶＨフレームワークに相同なヒトＶＨ配列を検索し、ヒトＵ９６２８２　ｃＤＮＡ（Ｕ９６２８２　ＶＨ）（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号；Ｒａｓｓｅｎｔｉ　ａｎｄ　Ｋｉｐｐｓ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８５：１４３５，１９９７）によってコードされるＶＨ配列をヒト化用のアクセプターとして選択した。最初に、８Ｆ４　ＶＨのＣＤＲ配列をＵ９６２８２　ＶＨの対応する位置に移植した。ヒトフレームワークアミノ酸の置換は、ＣＤＲ構造を維持するのに必要であるとは予測されなかった。得られたヒト化ＶＨ（Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨ）のアミノ酸配列を、８Ｆ４およびＵ９６２８２　ＶＨの配列と共に図１２に示す。

【０２１８】
８Ｆ４　ＶＬフレームワーク配列との相同性検索に基づいて、ＡＹ０４３１４６　ｃＤＮＡ（ＡＹ０４３１４６　ＶＬ）（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号；Ｇｈｉｏｔｔｏら、２００１年６月２９日にＧｅｎＢａｎｋに寄託）によってコードされるヒトＶκ領域をヒト化用のアクセプターとして選択した。最初に、８Ｆ４　ＶＬのＣＤＲ配列をＡＹ０４３１４６　ＶＬの対応する位置に移植した。次に、フレームワークの７０位（８Ｆ４可変領域の三次元モデルの分析により、ＣＤＲとの接触が示された場所）において、マウス８Ｆ４　ＶＬ由来のアミノ酸残基で、対応するヒト残基を置換した。得られたヒト化ＶＬ（Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１）のアミノ酸配列を、８Ｆ４およびＡＹ０４３１４６　ＶＬの配列と共に図１３に示す。

【０２１９】
マウス８Ｆ４　ＶＬの７０位のＶａｌは、ＣＤＲ構造の形成に重要なフレームワーク位置に位置するが、８Ｆ４可変領域の分子モデルの詳細な分析により、抗原結合親和性を失わずに、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１の７０位のアミノ酸残基を、ＡＹ０４３１４６　ＶＬの対応するヒト残基Ａｓｐで置き換え得る可能性が示唆された。ヒト化８Ｆ４抗体の潜在的免疫原性をさらに低減するために、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１の７０位のＶａｌをＡｓｐで置き換えた第２のヒト化ＶＬ（Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ２）を設計した。Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ２のアミノ酸配列を図１３に示す。

【０２２０】
シグナルペプチドと、スプライスドナーシグナルと、哺乳動物発現ベクターにその後クローニングするのに適切な制限酵素部位とを含むエキソンとして、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨをコードする遺伝子を設計した。Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨエキソンのスプライスドナーシグナルは、ヒト生殖系列ＪＨ３配列に由来していた。ヒト化Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨエキソンのシグナルペプチド配列は、対応するマウス８Ｆ４　ＶＨ配列に由来していた。

【０２２１】
シグナルペプチドと、スプライスドナーシグナルと、哺乳動物発現ベクターにその後クローニングするのに適切な制限酵素部位とを含むエキソンとして、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１およびＶＬ２をコードする各遺伝子を設計した。Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１およびＶＬ２エキソンのスプライスドナーシグナルは、ヒト生殖系列Ｊκ４配列に由来していた。ヒト化Ｈｕ８Ｆ４　ＶＬ１およびＶＬ２エキソンのシグナルペプチド配列は、対応するマウス８Ｆ４　ＶＬ配列に由来していた。

【０２２２】
機密非開示契約の下で，ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　ＵＳＡ（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）がＨｕ８Ｆ４　ＶＨ、ＶＬ１およびＶＬ２遺伝子を構築した。ＳｐｅＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ（ＶＨの場合）またはＮｈｅＩおよびＥｃｏＲＩ（ＶＬの場合）による消化後、ヒトＩｇＧ１／κ形態で生成するために、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨ、ＶＬ１およびＶＬ２遺伝子を、哺乳動物発現ベクター中の対応する部位にサブクローニングした。得られた発現ベクターｐＨｕ８Ｆ４－１は、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬ１を含有するヒト化８Ｆ４　ＩｇＧ１／κ抗体（Ｈｕ８Ｆ４－１）を発現する。同様に、ｐＨｕ８Ｆ４－２は、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬ２を含有するヒト化８Ｆ４　ＩｇＧ１／κ抗体（Ｈｕ８Ｆ４－２）を発現する。ｐＨｕ８Ｆ４－１およびｐＨｕ８Ｆ４－２の概略構造を図１１に示す。Ｈｕ８Ｆ４

ＶＨ、ＶＬ１およびＶＬ２遺伝子のヌクレオチド配列を、推定アミノ酸配列と共に、それぞれ配列番号２０／２１、２２／２３および２４／２５として示す。

【０２２３】

また、ＩｇＧ１－ＡＡと称されるバリアントヒトＩｇＧ１／κ形態を生成するために、Ｈｕ８Ｆ４　ＶＨおよびＶＬ２遺伝子を別の哺乳動物発現ベクターにクローニングした。ＩｇＧ１－ＡＡ形態は、γ－１重鎖に２つのアミノ酸置換（２３４位におけるＬｅｕからＡｌａ、および２３５位におけるＬｅｕからＡｌａ）を有し（Ｅｕ付番；Ｋａｂａｔら、１９９１）、その結果、Ｆｃγ受容体に対する結合が大幅に減少する（米国特許第６，４９１，９１６号）。得られたプラスミドｐＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡの概略構造を図１１に示す。

【０２２４】

キメラおよびヒト化８Ｆ４　ＩｇＧ１／κ抗体を産生するＮＳ０安定トランスフェクタントの作製。Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡＩｇＧ１／κ抗体を安定的に産生する細胞系を得るために、それぞれ発現ベクターｐＣｈ８Ｆ４、ｐＨｕ８Ｆ４－１、ｐＨｕ８Ｆ４－２およびｐＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡを、マウス骨髄腫細胞系ＮＳ０（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ，Ｓａｌｉｓｂｕｒｙ，Ｗｉｌｔｓｈｉｒｅ，ＵＫ）の染色体に導入した。７．５％CO_2インキュベーター内で、１０％ＦＢＳを含有するＤＭＥ培地中、ＮＳ０細胞を３７℃で成長させた。Ｂｅｂｂｉｎｇｔｏｎら、（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１６９－１７５，１９９２）に記載されているように、エレクトロポレーションによって、ＮＳ０への安定トランスフェクションを行った。トランスフェクションの前に、ＦｓｐＩを使用して各発現ベクターを線状化した。２０μｇの線状化プラスミドで約10^7個の細胞をトランスフェクトし、１０％ＦＢＳを含有するＤＭＥ培地中に懸濁し、いくつかの９６ウェルプレートにプレーティングした。４８時間後、選択培地（１０％ＦＢＳ、ＨＴ培地補充物（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、０．２５ｍｇ／ｍｌキサンチンおよび１μｇ／ｍｌミコフェノール酸を含有するＤＭＥ培地）をアプライした。選択開始の約１０日後、抗体産生について培養上清をアッセイした。

【０２２５】

サンドイッチＥＬＩＳＡによって、キメラおよびヒト化８Ｆ４　ＩｇＧ１／κ抗体の発現を測定した。典型的な実験において、１００μｌ／ウェルの１／２０００希釈ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃγ鎖特異的ポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ）のＰＢＳ溶液でＥＬＩＳＡプレートを４℃で一晩コーティングし、洗浄緩衝液（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）で洗浄し、３００μｌ／ウェルのブロッキング緩衝液（２％スキムミルクおよび０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）を用いて室温で０．５時間ブロッキングした。洗浄緩衝液で洗浄した後、ＥＬＩＳＡ緩衝液（１％スキムミルクおよび０．０２５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）で適切に希釈したサンプルを１ウェル当たり１００μｌ、ＥＬＩＳＡプレートにアプライした。適切なヒト化ＩｇＧ１／κ抗体を標準として使用した。ＥＬＩＳＡプレートを室温で１時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、１００μｌ／ウェルの１／２０００希釈ＨＲＰコンジュゲートヤギ抗ヒトκ鎖ポリクローナル抗体（ＳｏｕｔｈｅｒｎＢｉｏｔｅｃｈ）を使用して、結合した抗体を検出した。室温で０．５時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、１００μｌ／ウェルのＡＢＴＳ基質（ｂｉｏＷＯＲＬＤ，Ｄｕｂｌｉｎ，ＯＨ）を添加することによって、発色を実施した。１００μｌ／ウェルの２％シュウ酸を添加することによって、発色を停止した。吸光度を４０５ｎｍで読み取った。高レベルのＣｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡ抗体を産生するＮＳ０安定トランスフェクタント（それぞれＮＳ０－Ｃｈ８Ｆ４　１－Ｇ８、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－１　１－Ｄ２、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２　１－Ｆ５およびＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２－ＡＡ　１Ｄ３）を、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して無血清培地での成長に適合させた。ＰＣＲマイコプラズマ検出セット（Ｔａｋａｒａ　Ｂｉｏ　ＵＳＡ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いて試験することにより、ＮＳ０－Ｃｈ８Ｆ４　１－Ｇ８、ＮＳ０－Ｈｕ８

Ｆ４－１　１－Ｄ２、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２　１－Ｆ５およびＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２－ＡＡ　１Ｄ３は、マイコプラズマの存在について陰性であったことが示された。

【０２２６】

ＮＳ０－Ｃｈ８Ｆ４　１－Ｇ８、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－１　１－Ｄ２、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２　１－Ｆ５およびＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２－ＡＡ　１Ｄ３で産生された重鎖および軽鎖の確実性を、ｃＤＮＡ配列決定によって確認した。ＴＲＩｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して細胞から全ＲＮＡを抽出し、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　ＲＴ－ＰＣＲ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して供給業者のプロトコールにしたがって、オリゴｄＴプライマーによるｃＤＮＡを合成した。プライマーとしてＣＭＶ２およびＪＮＴ０９８（図１１）ならびにＰｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼを使用してＰＣＲによって、γ－１重鎖のコード領域を増幅した。ＰＣＲ断片をゲル精製し、配列番号２６および２８～３０に示されているＣＭＶ２、ＪＮＴ０８２、ＪＮＴ０９７およびＪＮＴ０９８をプライマーとして用いて配列決定した。同様に、ＣＭＶ２およびＪＮＴ０２６（配列番号２６および２７）を使用して、κ軽鎖のコード領域を増幅した。プライマーとしてＣＭＶ２およびＪＮＴ０２６を用いて、ゲル精製ＤＮＡ断片を配列決定した。それぞれＣｈ８Ｆ４重鎖、Ｃｈ８Ｆ４軽鎖、Ｈｕ８Ｆ４－１重鎖、Ｈｕ８Ｆ４－１軽鎖、Ｈｕ８Ｆ４－２重鎖、Ｈｕ８Ｆ４－２軽鎖、Ｈｕ８Ｆ４－２－ＡＡ重鎖およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡ軽鎖のコード領域の得られたヌクレオチド配列は、ｐＣｈ８Ｆ４、ｐＨｕ８Ｆ４－１、ｐＨｕ８Ｆ４－２またはｐＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡベクターの対応する配列（配列番号３１／３２、３３／３４、３５／３６、３７／３８、３９／４０および４１／４２）と完全に一致した。

【０２２７】

８Ｆ４－４、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡ抗体の精製。１０％ＦＢＳを含有するＲＰＭＩ培地（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中でハイブリドーマ８Ｆ４－４（Ｄｒ．Ｍｏｌｌｄｒｅｍによる提供）を培養し、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ中での成長に適合させた。ローラーボトル内で、Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ中、８Ｆ４－４、ＮＳ０－Ｃｈ８Ｆ４　１－Ｇ８、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－１　１－Ｄ２、ＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２　１－Ｆ５およびＮＳ０－Ｈｕ８Ｆ４－２－ＡＡ　１Ｄ３細胞を約10^6／ｍｌの密度まで成長させ、ＳＦＭ４ＭＡｂ培地（ＨｙＣｌｏｎｅ）に溶解した６０ｍｇ／ｍｌのＵｌｔｒａｆｉｌｔｅｒｅｄ　Ｓｏｙ　Ｈｙｄｒｏｌｙｓａｔｅ（Ｉｒｖｉｎｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｓａｎｔａ　Ａｎａ，ＣＡ）を１／１０容量与え、細胞生存率が５０％未満になるまでさらに成長させた。遠心分離および濾過の後、培養上清をプロテイン－Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（ＨｉＴｒａｐ　ＭＡＢＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）にロードした。ＰＢＳでカラムを洗浄してから、０．１Ｍグリシン－ＨＣｌ（ｐＨ３．０）で抗体を溶出した。１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８）で中和した後、溶出した抗体の緩衝液を透析によってＰＢＳに交換した。２８０ｎｍの吸光度を測定することによって、抗体濃度を決定した（１ｍｇ／ｍｌ＝１．４ＯＤ）。各バッチの８Ｆ４－４、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡの精製および収量を表５に要約する。

表５

【表５】

抗体	ロット	収量
8F4-4	1/27/11	1 L培養物から 30 mg
Ch8F4	8/10/10	500 mL培養物から7 mg
Hu8F4-1	9/8/10	1 L培養物から6.5 mg
Hu8F4-2	9/9/10	1 L培養物から11 mg
Hu8F4-2	1/23/11	1 L培養物から21 mg
Hu8F4-2-AA	3/15/11	500 mL培養物から10 mg

８Ｆ４－４、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡの様々な精製ロットおよび収量。

【０２２８】

標準的な手順にしたがってＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、精製８Ｆ４－４、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡを特性決定した。還元条件下における分析により、各抗体は、分子量約５０ｋＤａの重鎖および分子量約２５ｋＤａの軽鎖から構成されることが示された（図１４）。各抗体の純度は、９５％超であるようであった。

【０２２９】

ＣｈＦ４およびＨｕ８Ｆ４抗体の特性決定。ＰＲ１ペプチド（ＶＬＱＥＬＮＶＴＶ（配列番号４５））とＨＬＡ－Ａ２との複合体（ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２）を使用してＥＬＩＳＡによって、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡの抗原結合を調べた。最初に、１００μｌ／ウェルの５μｇ／ｍｌストレプトアビジン（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）ＰＢＳ溶液でＥＬＩＳＡプレートをコーティングした。洗浄緩衝液（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）でウェルを洗浄し、ブロッキング緩衝液でブロッキングした後、５０μｌ／ウェルの２μｇ／ｍｌビオチン化ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（Ｄｒ．Ｍｏｌｌｄｒｅｍにより提供されたもの）を添加した。室温で３０分間インキュベートした後、洗浄緩衝液でＥＬＩＳＡプレートを洗浄した。ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２に結合させるために、１μｇ／ｍｌから開始してＥＬＩＳＡ緩衝液で３倍系列希釈した、Ｃｈ８Ｆ４、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡ抗体を添加した。ＥＬＩＳＡプレートを室温で１時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、１００μｌ／ウェルの１／２０００希釈ＨＲＰコンジュゲートヤギ抗ヒトκ鎖ポリクローナル抗体を使用して、結合した抗体を検出した。室温で３０分間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、１００μｌ／ウェルのＡＢＴＳ基質を添加することによって、発色を実施した。１００μｌ／ウェルの２％シュウ酸を添加することによって、発色を停止した。吸光度を４０５ｎｍで読み取った。データを図１５に示す。ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を使用して計算したEC_{50}値は、Ｃｈ８Ｆ４が０．０５４μｇ／ｍｌであり、Ｈｕ８Ｆ４－１が０．０５０μｇ／ｍｌであり、Ｈｕ８Ｆ４－２が０．０７μｇ／ｍｌであり、Ｈｕ８Ｆ４－２－ＡＡが０．０７μｇ／ｍｌであった。この結果は、Ｈｕ８Ｆ４－１、Ｈｕ８Ｆ４－２およびＨｕ８Ｆ４－２－ＡＡがすべて、マウス８Ｆ４抗体の抗原結合親和性を保持することを示している。

【０２３０】

標的細胞に対する抗体の作用。ＡＭＬに対する８Ｆ４の結合が細胞溶解を引き起こすかを決定するために、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイおよび補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイを実施した。ＨＬＡ－Ａ２陰性ＡＭＬやＨＬＡ－Ａ２＋健常ドナー対照ＰＢＭＣではなくＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬの８Ｆ４によるＣＤＣ媒介性溶解は、抗体用量依存的であることが示された（図４）。８Ｆ４ ＣＤＣ媒介性溶解に対して感受性であることが示された患者材料由来のＡＭＬ細胞を、８Ｆ４またはアイソタイプ対照の存在下ま

たは非存在下でインキュベートし、次いで、照射（２００ｃＧｙ）免疫不全ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスに移植した。２週間の時点で動物を屠殺し、ＦＡＣＳによって脾細胞および骨髄を分析した。剖検では、ＩｇＧ２ａアイソタイプ対照処置動物においてのみ、ＡＭＬが同定されたが、８Ｆ４処置動物では同定されなかった（図６）。８Ｆ４のみを投与したマウスでは、アイソタイプ処置マウスと比較して明らかな毒性はなかった。全体として、これらのデータは、８Ｆ４モノクローナル抗体が：（１）高親和性で、複合ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ＊０２０１エピトープに特異的に結合し；（２）骨髄性白血病を含むヒト細胞表面上の、ＰＲ１ペプチドが占有しているＨＬＡ－Ａ＊０２０１分子に特異的に結合し、これを同定するのに使用することができ；（３）補体の存在下でＨＬＡ－Ａ２＋ＡＭＬの特異的溶解を引き起こし；（４）免疫不全マウスモデルにおけるＡＭＬ生着を防止することができるという結論を裏付けている。

【０２３１】

腫瘍生着の防止。ＡＭＬ細胞に加えて８Ｆ４を注射した後の実験マウスの組織におけるＡＭＬ浸潤を測定し、図８Ａ～Ｂに示す。非移植対照および実験８Ｆ４処置マウスの骨髄および末梢血では、ＡＭＬ細胞は検出されなかった。アイソタイプマッチ対照抗体（ｉｓｏ）と混合したＡＭＬ細胞を投与したマウスは、ＡＭＬ移植の２または４週間後にＡＭＬ１およびＡＭＬ５の生着を示した。マウス細胞特異的マーカー（ｍＣＤ４５）、３～６つのヒトマーカー（ＣＤ４５、ＣＤ１３、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＨＬＡ－ＤＲ）およびＬｉｖｅ／Ｄｅａｄ Ｆｉｘａｂｌｅ Ａｑｕａ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む拡張パネルを、ＡＭＬ生着のフローサイトメトリー分析に使用した。すべてのプロットは、ｍＣＤ４５－生細胞を示す。

【０２３２】

８Ｆ４は、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＮＯＤ／ＳＣＩＤにおいて一過性好中球減少症を誘導する。内因性ＰＲ１を提示することが示されたＨＬＡ－Ａ２ Ｔｇ ＮＯＤ／ＳＣＩＤに８Ｆ４または対照Ａｂを注射した。骨髄細胞を採取し、マウス抗原に対するｍＡｂで染色した。骨髄の分散プロファイルでは、顆粒球の減少が明白であった（図９Ａ；左のパネル）。８Ｆ４処置マウスの骨髄では、Ｇｒ－１ｌｏ未成熟好中球は存在していたが、Ｇｒ－１ｈｉ成熟好中球はより少数であった（図９Ａ；中央のパネル）。加えて、８Ｆ４処置動物では、単球（ＳＳＣｌｏ ＣＤ１１ｂ＋；図９Ａ；右のパネルの右下ゲート）が減少していた。ＨＬＡ－Ａ２ Ｔｇ ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスでは、８Ｆ４の静脈内注射により、循環成熟顆粒球、マクロファージおよび単球の絶対数の一過性減少を誘導した（図９Ｂ）。処置の３週間後において、すべての集団が依然として生き残っている。２００μｇ（１０ｍｇ／ｋｇ）の８Ｆ４を注射した７日後のＨＬＡ－Ａ２ Ｔｇ ＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓または脳では、有意な病理学的変化の証拠がなかった（図９Ｃ）。

【０２３３】

８Ｆ４は、確立したヒト造血細胞の一過性白血球減少症を誘導する。マウス由来の末梢血を利用して臍帯血移植をモニタリングし、移植の９～１２週間後に８Ｆ４をマウスに注射した。続いて、マウスを屠殺し、ヒト細胞の生着について血液、脾臓および骨髄を分析した（図１０Ｂ）。認められるように、抗体注射は、移植細胞の％生着を一過性に低下させる（図１０Ａ）。

【０２３４】

ヒトＡＭＬに対するヒト化８Ｆ４抗体の結合特異性、親和性および活性。Ｈｕ８Ｆ４の結合特異性を特性決定するために、本発明者らはＦＡＣＳベースのアッセイを行って、Ｈｕ８Ｆ４がＰＲ１をパルスしたＴ２細胞のみに結合し（図１６Ａ）、ｐｐ６５をパルスしたＴ２細胞には結合しないことを示した。Ｈｕ８Ｆ４の結合親和性を特性決定するために、本発明者らはＥＬＩＳＡを使用して、２つの形態のヒト化抗体（Ｈｕ８Ｆ４－１（Ｈｕ１）およびＨｕ８Ｆ４－２（Ｈｕ２））の結合を、マウス８Ｆ４およびアイソタイプ対照（ｒｈＩｇＧ１）と比較した。本発明者らは、組換えＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２モノマーでコーティングしたプレートを使用して抗体を捕捉し、光学密度（ＯＤ）によって結合画分を

決定する比色アッセイにおいて抗ヒト抗体を使用した。図１６Ｂに示されているように、Ｈｕ１およびＨｕ２は、それぞれ７．７および７．８ｎＭのK_Dを示し、これはマウス８Ｆ４（K_D＝９．９ｎＭ）と類似していた。したがって、２つのヒト化抗体は、親マウス抗体と比較して同一のリガンド特異性および結合親和性を有する。このデータは、前臨床動物モデルにおける活性のスペクトルを決定するさらなる実験において、Ｈｕ８Ｆ４抗体を使用することの生化学的な正当性を立証している。

【０２３５】

Ｈｕ８Ｆ４の潜在的な作用機序を取り扱うために、本発明者らは、ウサギ補体の存在下においてＨｕ８Ｆ４またはアイソタイプ対照抗体（ＩｇＧ１）で、ＰＲ１をパルスしたＴ２標的細胞を処理し、標準的なアッセイを使用して補体媒介性溶解を決定した。図１６Ｃに示されているように、Ｈｕ８Ｆ４およびキメラ８Ｆ４（ＩｇＧ１由来のヒトＦｃおよび８Ｆ４由来のマウスＦ（ａｂ）$_2$）は、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を媒介しなかった。したがって、マウス８Ｆ４（ＩｇＧ２）とは異なり、Ｈｕ８Ｆ４は、補体結合によって標的細胞を溶解しない。Ｈｕ８Ｆ４が、ＡＤＣＣ、直接アポトーシス、または有糸分裂および増殖の抑制を媒介するかを決定するために、本発明者らは、進行中の実験においてさらなる研究を行っている。

【０２３６】

次に、本発明者らはＨｕ８Ｆ４を使用して、ＮＳＧマウスにおける確立した初代ヒトＡＭＬ異種移植片を処置した。最初に、ＡＭＬを２週間にわたってマウスに生着させ、次いで、Ｈｕ８Ｆ４、Ｃｈ８Ｆ４またはアイソタイプ１ｇＧ１（１０ｍｇ／ｋｇの抗体）で２週間にわたって週３回処置した。ＢＭおよび末梢血キメリズムを処置後に分析した。図１７に示されているように、３つの異なるＡＭＬ標本を用いる３つの別個の実験は、アイソタイプ対照と比較して、Ｈｕ８Ｆ４およびＣｈ８Ｆ４によって除去されたか、または、それらの成長が有意に阻害されたかのいずれかであった。したがって、これらのデータは、Ｈｕ８Ｆ４が、処置抵抗性再発性疾患を有する患者由来の初代ヒトＡＭＬに対して非常に生物学的に活性であること、およびＮＳＧマウスは主要な補体タンパク質の発現を欠くので、Ｈｕ８Ｆ４の作用機序が補体非依存的であることを立証している。

【０２３７】

ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニック免疫適格（Ｂ６）マウスおよび免疫不全（ＮＯＤ／ｓｃｉｄ）マウスにおける８Ｆ４の生物学的安全性データ。本発明者らは、Ｈｕ８Ｆ４の前臨床試験のための３つのマウスモデルを樹立した：ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＢ６免疫適格マウス、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックＮＯＤ／ｓｃｉｄマウス、およびＮＳＧ（ＩＬ－２共通γ鎖を欠く）マウス。潜在的な毒性を決定するために、本発明者らは最初に、ＰＲ１が、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニック動物のそれぞれ５％および６％の造血幹細胞および顆粒球のＨＬＡ－Ａ２上で発現していることを示した。本発明者らは次に、高用量の８Ｆ４（１０ｍｇ／ｋｇ）の単回静脈内（ＩＶ）投与により、ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスの両方において一過性かつ完全に可逆的血球減少症が誘導されることを示した（図１８～１９）。ＣＤ３４選択ヒト臍帯血をＮＳＧマウスに生着させて長期安定なヒトキメリズムを確立しており、該ＮＳＧマウスを、Ｈｕ８Ｆ４の単回投与および複数回投与で処置して、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２＋ヒト造血幹細胞に対するｍＡｂの効果を決定する。

【０２３８】

抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２ｍＡｂであるＨ８Ｆ４は、トリプルネガティブ乳がん異種移植片の腫瘍成長を遅延させ、生存を延長させる。上記白血病の研究に加えて、本発明者らは、造血系に限定されたセリンプロテアーゼ（好中球エラスターゼ（ＮＥ）およびプロテイナーゼ３（Ｐ３））由来の９ｍｅｒのＰＲ１ペプチドも、内因性Ｐ３またはＮＥを発現しない多くの非造血系腫瘍（黒色腫、非小細胞肺がんおよび乳がんを含む）のＨＬＡ－Ａ２上で交差提示され得ることを示した（Ａｌａｔｒａｓｈら、２０１２）。トリプルネガティブ乳がん細胞系ＭＢ－ＭＤＡ－２３１（２３１細胞と称される）はＰ３およびＮＥを発現しないが、ＨＬＡ－Ａ２を発現する。しかしながら、これらの細胞は可溶性Ｐ３および

ＮＥを取り込んでＰＲ１を交差提示し、続いて、２３１細胞を８Ｆ４媒介性溶解に対して感受性にする。重要なことに、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２は、患者（トリプルネガティブ乳がん（ＴＮＢＣ）患者を含む）の生検由来の乳がん細胞上で発現している（Ａｌａｔｒａｓｈら、２０１２）。したがって、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２は乳がんの標的抗原である可能性があり、本発明者らは、８Ｆ４がＨＬＡ－Ａ２＋乳がんに対する生物学的活性を有し得ると推論した。

【０２３９】

この仮説を試験するために、本発明者らは、ＮＳＧマウスの（ａ）原発性腫瘍および（ｂ）転移性腫瘍異種移植モデルでｈ８Ｆ４の効果を研究した。原発腫瘍モデルでは、２３１　ＴＮＢＣ細胞をＮＳＧマウスの乳房脂肪体に注射し、続いて、単回用量のｈ８Ｆ４、アイソタイプ対照抗体またはＰＢＳを注射した。生物発光イメージング（ＢＬＩ）を用いて腫瘍成長を経時的にモニタリングすることができるように、ｆｆｌｕｃ遺伝子で２３１細胞をトランスフェクトした。移植の１～２日後の腫瘍部位生検をＨ＆Ｅ染色すると、好中球およびマクロファージ（これらは、Ｐ３およびＮＥを天然に発現する細胞である）による腫瘍浸潤が示された（図２０Ａ）。図２０Ｂに示されているように、ｈ８Ｆ４を投与したマウスでは、アイソタイプ対照またはＰＢＳのいずれかを投与したマウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。加えて、ｈ８Ｆ４は、対照マウスと比較して生存を延長させた（ｐ＜０．０１）。

【０２４０】

第２のモデルでは、ｆｆｌｕｃ遺伝子改変２３１細胞（2×10^5個）をＮＳＧマウスの尾静脈に注射し、７日目に、１０ｍｇ／ｋｇのｈ８Ｆ４またはアイソタイプ対照抗体をマウスに週３回投与した。未処置ＮＳＧマウスでは、静脈内（ＩＶ）注射した２３１細胞は直ぐに肺（ＢＬＩで確認）に転移し、続いて他の組織（脾臓、胃腸（ＧＩ）管および肝臓を含む）に転移する。図２０Ｃに示されているように、ｈ８Ｆ４は、２３１細胞の転移性腫瘍の成長を有意に遅延させ、アイソタイプ処置マウスと比較して生存を有意に増大させた（ｐ＝０．０００６）。これらの結果は、腫瘍関連好中球およびマクロファージ由来のＰ３およびＮＥがインビボで２３１細胞によって取り込まれると、ＰＲ１がＨＬＡ－Ａ２上に交差提示され、これが、ｈ８Ｆ４処置によってＴＮＢＣ細胞の成長が阻害される原因になることを示唆している。したがって、ｈ８Ｆ４はＴＮＢＣに対して生物学的に活性であり、本発明者らの結果は、ｈ８Ｆ４　ｍＡｂが、乳がんを含む非造血系ＨＬＡ－Ａ２＋腫瘍を処置するための治療ｍＡｂとしての潜在性を有することを強く示唆している。

実施例３：方法

【０２４１】

患者の組織、細胞および細胞培養。患者の乳がん凍結組織片は、Ｏｒｉｇｅｎｅから購入した。ＭＤＡｎｄｅｒｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ（Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）の施設内倫理委員会が承認した研究に参加するためのインフォームドコンセントを得た後に、患者および健常ドナーのサンプルを採取した。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＣＦ－７、ＭＤＡＭＢ－４５３およびＴ４７Ｄ乳がん細胞系、ならびにＳＷ－６２０（結腸直腸腺癌）、ＯＶＣＡＲ－３（卵巣腺癌）、ＭＩＡ　ＰａＣａ－２（膵臓癌）、Ｊｕｒｋａｔ（急性Ｔ細胞白血病）、Ｔ２（Ｂ細胞／Ｔ細胞ハイブリドーマ）、ＨＬ－６０（急性前骨髄球性白血病）およびＵ－９３７（組織球性白血病）細胞系は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎから入手した。ＭＣＦ－ＨＥＲ－１８細胞系は、Ｍ．－Ｃ．Ｈｕｎｇ（ＭＤ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ）によって提供された。Ｍｅｌ５２６、Ｍｅｌ６２４、ＭＴ２０１９およびＭＴ２３３３黒色腫細胞系は、Ｌ．Ｒａｄｖａｎｙｉ（ＭＤ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ）によって提供された。細胞系は、実験で使用する６カ月以内に、ＭＤ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　ＣｅｎｔｅｒにおいてＤＮＡフィンガープリントによって認証されたものである。

【０２４２】

１０％ＦＢＳ（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）および１００Ｕ／ｍｌペニ

シリン／１００ｍｇ／ｍｌストレプトマイシン（Ｃｅｌｌｇｒｏ）を補充した２．５ｍＭｌ－グルタミン（ＨｙＣｌｏｎｅ）を含むＤＭＥＭ中で、乳がん細胞を成長させた。選択剤として、Ｇ４１８（Ｌｏｎｚａ）（０．５ｍｇ／ｍｌ）をＭＣＦ－７－ＨＥＲ１８細胞培養物に添加した。白血病細胞系培養物の場合、２５ｍＭ ＨＥＰＥＳに加えてｌ－グルタミン（ＨｙＣｌｏｎｅ）を含むＲＰＭＩ１６４０をＤＭＥＭに代えて使用した。すべての細胞系を５％CO_2中、３７℃で培養した。それぞれ標準的なＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ １０７７および１１１９（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）勾配遠心分離を使用して、健常ドナーおよび患者のＰＢＭＣおよび多形核好中球（ＰＭＮ）を富化した。

【０２４３】

ＲＴ－ＰＣＲ。ＲＮＡ Ｓｔａｔ ６０キット（ＴｅｌＴｅｓｔ）を使用して、細胞系およびレーザーキャプチャーマイクロダイセクション（ＬＣＭ）サンプルから、ｍＲＮＡを抽出した。Ｇｅｎｅ Ａｍｐ ＲＮＡキット（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して、ｃＤＮＡの合成を実施した。以下のプライマーを使用した：Ｐ３、フォワードプライマー、５９－ＧＡＣＣＣＣＡＣＣＡＴＧＧＣＴＣＡＣ－３９［配列番号５２］およびリバースプライマー、５９－ＡＴＧＧＧＡＡＧＧＡＣＡＧＡＣＡＧＧＡＧ－３９［配列番号５３］；マンマグロビン－１、フォワードプライマー、５９－ＡＧＣＡＣＴＧＣＴＡＣＧＣＡＧＧＣＴＣＴ－３９［配列番号５４］およびリバースプライマー、５９－ＡＴＡＡＧＡＡＡＧＡＧＡＡＧＧＴＧＴＧＧ－３９［配列番号５５］；アクチン、フォワードプライマー、５９－ＣＣＡＧＡＧＣＡＡＧＡＧＡＧＣＴＡＴＣＣ－３９［配列番号５６］およびリバースプライマー、５９－ＣＴＧＴＧＧＴＧＧＴＧＡＡＧＣＴＧＴＡＧ－３９［配列番号５７］；ならびにＧＡＰＤＨ、フォワードプライマー、５９－ＴＡＧＡＣＧＧＧＧＡＡＧＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３９［配列番号５８］およびリバースプライマー、５９－ＡＧＧＴＣＣＡＣＣＡＣＣＣＴＧＴＴＧＣＴ－３９［配列番号５９］。９５℃で５分間変性させた後、ｉＣｙｃｌｅｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して、サンプルを３５サイクルで増幅した。サンプルを１．５％アガロースゲルで泳動した。ＧｅｌＤｏｃ２０００（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用してバンドをイメージングし、ＱｕａｎｔｉｔｙＯｎｅソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって分析した。

【０２４４】

ウエスタンブロッティング。プロテアーゼ阻害剤を含有する溶解緩衝液（１０ｍＭ／Ｌ ＨＥＰＥＳ［ｐＨ７．９］、１０ｍＭ／Ｌ ＫＣｌ、０．１ｍＭ／Ｌ ＥＧＴＡ、０．１ｍＭ／Ｌ ＥＤＴＡおよび１ｍＭ／Ｌ ＤＴＴ）に細胞ペレットを懸濁し、続いて、凍結解凍サイクルを１５分間行うことによって、全細胞溶解物（ＷＣＬ）を作製した。還元条件下の１０％ＳＤＳゲルにおける電気泳動によってＷＣＬを分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写し、５％ミルクでブロッキングし、抗ＮＥ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、抗Ｐ３（ＮｅｏＭａｒｋｅｒｓ）、抗チューブリン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）または抗ＧＡＰＤＨ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）Ａｂで染色した。化学発光をＫｏｄａｋフィルムに記録した。

【０２４５】

抗原（Ａｇ）交差提示。タンパク質取り込みを決定するために、１０ｍｇ／ｍｌのＰ３、ＮＥ（両方ともＡｔｈｅｎｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ＆Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ製）、ＥｎｄｏＧｒａｄｅ ＯＶＡ（Ｈｙｇｌｏｓ）または照射（７５００ｃＧｙ）ＰＭＮもしくはＰＢＭＣ（１：１（乳がん：照射細胞）の比）を含有する還元血清培地（０．５％ＦＢＳ）中で、細胞をパルスした。次いで、細胞を透過処理（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）し、Ａｌｅｘａ－４８８または６４７を直接コンジュゲートさせた抗Ｐ３（クローンＭＣＰＲ３－２；Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）または抗ＮＥ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。交差提示を決定するために、以前に記載されているように（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１）、蛍光コンジュゲート８Ｆ４で細胞を表面染色した。Ａｌｅｘａ－４８８または６４７キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、抗Ｐ３、抗ＮＥおよび抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２（８Ｆ４）Ａｂを直接コンジュゲートした。Ａｑｕａ ｌｉｖｅ／ｄｅａｄ ｓｔａ

ｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、生存率を評価した。すべてのフローサイトメトリー実験について、光散乱を使用して最初のゲーティングを確立し、続いてａｑｕａ　ｌｉｖｅ／ｄｅａｄ　ｓｔａｉｎを使用した。交差提示を阻害するために、細胞を、小胞体（ＥＲ）－ゴルジ順行輸送（ａｎｔｅｇｒａｄｅ）阻害剤ブレフェルジンＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）またはプロテアソーム阻害剤ラクタシスチン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）と共に共培養した（Ｆｒａｎｃｏｉｓら、２００９，Ｋｏｖａｃｓｏｖｉｃｓ－Ｂａｎｋｏｗｓｋｉ　ａｎｄ　Ｒｏｃｋ　１９９５およびＭｕｋａｉら、２００９）。

【０２４６】

３１０／２５空気対物レンズ、３６３／１．４オイル対物レンズを備えるＬｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＳＰ２　ＳＥ共焦点顕微鏡（Ｌｅｉｃａ）を使用して、細胞内Ｐ３局在を示すための共焦点イメージングを実施し、Ｌｅｉｃａ　ＬＣＳソフトウェア（バージョン２．６１）を使用して分析した。ＦＩＴＣコンジュゲートリソソーム結合膜タンパク質２（ＬＡＭＰ－２；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して、リソソームおよび後期エンドソームを染色した（Ｋｕｒｏｎｉｔａら、２００２）。Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ　ＣｙＡｎフローサイトメーター（Ｄａｋｏ）を使用して、フローサイトメトリーを実施した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）を使用して、データを分析した。

【０２４７】

免疫組織化学。凍結保存乳房腫瘍組織および黒色腫腫瘍組織（Ｏｒｉｇｅｎｅ）をホルマリン固定し、次いで、免疫組織化学のためにパラフィン包埋した。染色前に、キシレン中で組織切片を脱パラフィンし、再水和し、内因性ペルオキシダーゼ活性をクエンチした。１０％正常ウマ血清で切片をブロッキングし、次いで、一次ＷＧＭ２抗Ｐ３ｍＡｂクローン（１：１０）（Ａｂｃａｍ）または抗ＮＥ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）と共に室温で３０分間インキュベートした。抗小眼球症関連転写因子（ＭＩＴＦ）Ａｂ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で黒色腫スライドを共染色した。次いで、スライドを洗浄し、二次抗マウスＩｇＧビオチンＡｂ（１：２００）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）と共にインキュベートし、続いて、アビジン－ビオチンペルオキシダーゼ（１：１００）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）と共にインキュベートした。クロマゲン３，３９－ジアミノベンジジン（Ｄａｋｏ）を染色の可視化に使用した。すべてのスライドをヘマトキシリンで対比染色した。正常扁桃組織のＰＭＮ染色を陽性対照として使用した。一次Ａｂの除去後に、陰性対照を上記のように染色した。

【０２４８】

ペプチド特異的ＣＴＬ系。以前に記載されているように（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、２０００およびＭｏｌｌｄｒｅｍら、１９９９）、インビトロにおいて健常ＨＬＡ－Ａ２ドナー由来のＰＢＭＣをＰＲ１ペプチドで刺激することによって、ＰＲ１特異的ＣＴＬを増殖させた。簡潔に言えば、無血清ＲＰＭＩ　１６４０培地でＴ２細胞を洗浄し、２０ｍｇ／ｍｌのＰＲ１ペプチドと共に３７℃で９０分間インキュベートした。ペプチド負荷Ｔ２細胞に７５００ｃＧｙを照射し、洗浄し、１０％ヒトＡＢ血清を補充したＲＰＭＩ１６４０培地中で、新鮮な単離されたＰＢＭＣと共に１：１の比で培養した。７日目、１４日目および２１日目において、ペプチドをパルスしたＴ２細胞で培養物を再刺激し、その翌日に、２０ＩＵ／ｍｌヒトｒＩＬ－２（ＢｉｏＳｏｕｒｃｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）を添加した。

【０２４９】

細胞媒介性細胞傷害アッセイ。以前に記載されているように（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９６およびＭｏｌｌｄｒｅｍら、１９９７）、標準的な細胞傷害アッセイを使用して特異的溶解を決定した。簡潔に言えば、カルセイン－ＡＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、１０ｍｌ中１０００個の標的細胞の（細胞１．０　３　１０^{5}個／ｍｌ）を３７℃で９０分間染色し、ＲＰＭＩ１６４０で３回洗浄し、次いで、様々なＥ：Ｔ比で１０ｍｌのペプチド特異的ＣＴＬと共に共培養した。３７℃、５％ＣＯ$_{2}$における４時間のインキュ

ベーション期間後、５ｍｌのトリパンブルーを各ウェルに添加し、自動ＣｙｔｏＦｌｕｏｒ　ＩＩプレートリーダー（ＰｅｒＳｅｐｔｉｖｅ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して蛍光を測定した。以下のように、特異的細胞傷害の割合を計算した：（［蛍光$_{標的＋エフェクター}$－蛍光$_{培地}$］／［蛍光$_{標的のみ}$－蛍光$_{培地}$］）×１００。

【０２５０】

補体媒介性細胞傷害アッセイ。交差提示が乳がんの８Ｆ４感受性を増加させるかを決定するために、本発明者らは、以前に記載されているように（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１およびＰｒａｎｇら、２００５）、補体媒介性細胞傷害アッセイを実施した。ＮＥ（１０ｍｇ／ｍｌ）またはＰ３（１０ｍｇ／ｍｌ）を含有する培地中で、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を２４時間培養した。細胞をカルセイン－ＡＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共にインキュベートし、３回洗浄し、無血清ＲＰＭＩ１６４０に再懸濁した。１００万個の細胞を、漸増用量の８Ｆ４　Ａｂ（０．６２４、１．２５、２．５、５および１０ｍｇ／ｍｌ）または最終濃度１０ｍｇ／ｍｌのアイソタイプＡｂ（陰性対照）と混合し、３７℃で１０分間インキュベートした。次いで、標準ウサギ補体（５ｍｌ；Ｃｅｄａｒｌａｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を添加し、細胞を３７℃で６０分間インキュベートした。ＢＢ７．２ハイブリドーマ（抗ＨＬＡ－Ａ２の供給源）由来の上清およびジギトニン（Ｐｒｏｍｅｇａ）を陽性対照として使用した。上記のように蛍光を測定し、特異的な死滅化を計算した。

【０２５１】

ＬＣＭおよび乳房腫瘍組織からのＲＮＡ抽出。ＩＲダイオードレーザー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を備えるＡｒｃｔｕｒｕｓ　ＰｉｘＣｅｌｌレーザーキャプチャー顕微鏡を用いて、乳房腫瘍生検組織由来の乳がん細胞を単離するために、ＬＣＭを実施した。組織を切片化し（厚さ５ｍｍ）、非荷電ガラススライド上に置き、７５％エタノールおよびピロ炭酸ジエチル水で固定した。ヘマトキシリンを使用して、組織水和後に核染色した。段階的なアルコール脱水後、ＬＣＭの準備が整うまでサンプルをキシレン中に保存した。Ｈ＆Ｅ染色を使用して、マイクロダイセクションに使用する領域を特定した。出力を３０～７０ｍＷに調整したレーザー光を組織にパルスして、直径１０ｍｍを維持した。Ａｒｃｔｕｒｕｓ　Ｃａｐｓｕｒｅ　ＨＳ　ＬＣＭキャップ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）において、約５０００個の乳がん細胞を捕捉した。Ａｒｃｔｕｒｕｓ　ＰｉｃｏＰｕｒｅ　ＲＮＡ単離キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、全ＲＮＡを抽出および精製した。Ｎａｎｏ　Ｄｒｏｐ　ＮＤ－１０００分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、ＲＮＡの完全性および量を決定した。Ａｒｃｔｕｒｕｓ　ＲｉｂｏＡｍｐ　ＲＮＡ増幅キットを使用し、２ラウンドのＴ７ベースの増幅を用いてＲＮＡを増幅した。これにより、２．５ｍｇの増幅ＲＮＡが得られた。Ｒｏｃｈｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｒ　Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して製造業者の指示にしたがって、１ｍｇの増幅ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。

【０２５２】

乳がん患者のＰＲ１－ＣＴＬの染色。以下の蛍光Ａｂ：ＣＤ８アロフィコシアニン－Ｈ７（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＣＤ３　ＰＥ　Ｃｙ７（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＣＤ４パシフィックオレンジ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＰＥコンジュゲートＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２－デキストラマー（Ｉｍｍｕｄｅｘ）、および以下のパシフィックブルーコンジュゲート（ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ）系統Ａｂ：ＣＤ１４（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＣＤ１６（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）およびＣＤ１９（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を用いて、患者由来のＰＢＭＣを染色した。Ａｑｕａ　ｌｉｖｅ／ｄｅａｄ　ｓｔａｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、死細胞を排除した。４％パラホルムアルデヒドでサンプルを固定した。Ｃａｎｔｏフローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）でデータを取得し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ）を

使用して分析した。系統$^{-}$、ＣＤ４$^{-}$、ＣＤ３＋、ＣＤ８＋およびＰＲ１－デキストラマー$^{+}$であった生細胞の割合として、ＰＲ１－ＣＴＬの頻度を決定した。

【０２５３】

患者組織の共焦点イメージング。冷アセトンで凍結保存組織切片を固定した。乳がんマーカーＡｌｅｘａ－４８８コンジュゲートマウス抗サイトケラチン－７（ＣＫ７）Ａｂ（Ａｂｃａｍ）およびＡｌｅｘａ－６４７コンジュゲート８Ｆ４　Ａｂ（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１）を用いて、乳がん組織を染色した。ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現が、浸潤性白血球によるものではなく乳がん細胞によるものであることを確認するために、白血球マーカーとしてＡｌｅｘａ－６４７コンジュゲートマウス抗ＣＤ４５　Ａｂ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、乳がん組織の連続切片も染色した。ヒト扁桃組織切片（Ｏｒｉｇｅｎｅ）をＣＤ４５の陽性染色対照として使用した。黒色腫の場合、冷アセトンで組織切片を固定し、０．５％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で１５分間透過処理し、５％正常ヤギ血清（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）でブロッキングした。次いで、切片を黒色腫マーカーマウス抗ＭＩＴＦ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と共に１時間インキュベートし、ＰＢＳで洗浄し、次いで、Ａｌｅｘａ－４８８コンジュゲートヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）と共にインキュベートした。次いで、スライドを洗浄し、５％正常マウス血清（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）でブロッキングし、Ａｌｅｘａ－６４７コンジュゲート８Ｆ４　Ａｂと共にインキュベートした。ＤＡＰＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含むＰｒｏＬｏｎｇ　Ｇｏｌｄ退色防止（ａｎｔｉｆａｄｅ）試薬を添加した。３１０／２５空気対物レンズ、３６３／１．４オイル対物レンズを備えるＬｅｉｃａ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＳＰ２　ＳＥ共焦点顕微鏡を使用して、共焦点イメージングを実施した。Ｌｅｉｃａ　ＬＣＳソフトウェア（バージョン２．６１）をイメージング分析に使用した。

実施例４：結果

【０２５４】

固形腫瘍は、ＮＥおよびＰ３を取り込む。ＮＥおよびＰ３の取り込みが普遍的な現象であるかを決定するために、本発明者らは、複数の固形腫瘍細胞系を１０ｍｇ／ｍｌのＮＥまたはＰ３と共に共培養し、次いで、フローサイトメトリーを使用して細胞内取り込みについて評価した。本発明者らは、すべての腫瘍型がＮＥおよびＰ３を取り込むわけではなく、さらに取り込みの程度が様々な腫瘍型で異なることを示した（図２１）。加えて、ＮＥの取り込みは時間と共にプラトーになるようであり、Ｐ３の取り込みよりもかなり少ないが、これは取り込み機構が異なることを示しており、ＮＥの取り込みに関与し得る過程が受容体媒介性であることを示唆している。

【０２５５】

Ｐ３は乳がんに存在しない。本発明者らは、ＮＥが乳がんに存在せず、乳がん細胞によって取り込まれることを以前に示したので（Ｍｉｔｔｅｎｄｏｒｆら、２０１２）、Ｐ３の取り込みを内因性発現と区別するために、本発明者らは、ｍＲＮＡレベルおよびタンパク質レベルにおけるＰ３発現について、乳がん細胞系および原発性腫瘍組織を分析した。ＰＣＲは、乳がん細胞系ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－７－ＨＥＲ１８（ＨＥＲ１８）およびＭＤＡＭＢ－４５３がすべて、Ｐ３　ｍＲＮＡを欠くことを示している（図２２Ａ）。同様に、３つの異なる乳房腫瘍から抽出した乳がん細胞（図２２Ｂ、表６）もＰ３　ｍＲＮＡを欠く。細胞系由来のＷＣＬの免疫ブロットにより、Ｐ３タンパク質は乳がん細胞に存在しないことが確認された（図２２Ｃ）。原発性乳がんの免疫組織化学染色により、Ｐ３が乳がん組織で検出されたが、Ｐ３は乳房腫瘍内の炎症性成分に限定されており、乳房腫瘍細胞にはなかった（図２２Ｄ）。これらのデータは、Ｐ３が乳がんにあることを示す以前の報告（Ｄｅｓｍｅｄｔら、２００６）と一致するが、本発明者らのデータは、Ｐ３の供給源が乳がん細胞ではなく腫瘍内の炎症細胞であることを示唆している。

表６－ＬＣＭおよび共焦点顕微鏡検査に使用した乳房腫瘍組織および黒色腫腫瘍組織の病理学的特徴

【表６】

患者	組織学	ER/PR/HER2 の状態	TNM 病期分類	HLA-A2 の状態
乳房　1	IDC	ER2-/PR2-/HER22-	T1cNXMX	陽性
乳房　2	IDC	ER2-/PR2-/HER2+	T2N1bMX	N/D
乳房　3	IDC/ILC	ER+/HER2+	T2N1aMX	陰性
乳房　4	IDC	ER2-/HER22-	T3N0MX	陽性
黒色腫　1	結節	N/A	T3N2M1c	陽性
黒色腫　2	N/D	N/A	T3N2M1b	陰性

ＥＲ、エストロゲン受容体；ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ｎｅｕ；ＩＤＣ、浸潤性腺管癌；ＩＬＣ、浸潤性小葉癌；Ｎ／Ｄ、未決定；ＰＲ、プロゲステロン受容体；ＴＮＭ、悪性腫瘍の腫瘍／結節／転移分類。

【０２５６】

Ｐ３は、乳がん細胞によって取り込まれる。本発明者らは、Ｐ３が乳がん細胞によって内因的に発現されないことを示したので、本発明者らは、本発明者らがＮＥについて以前に示したように（Ｍｉｔｔｅｎｄｏｒｆら、２０１２）、Ｐ３が乳がん細胞によって取り込まれ得ると仮説を立てた。ＨＬＡ－Ａ２陽性細胞系ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＣＦ－７およびＨＥＲ１８を１０ｍｇのＰ３と共に共培養し、次いで１時間、４時間および２４時間の時点において、フローサイトメトリーを使用して、Ｐ３の細胞内取り込みについて分析した（図２３Ａ）。本発明者らは、３つの細胞系すべてにおいて、Ｐ３の取り込みが時間依存的に増加することを検出した。本発明者らはまた、プラトーが現れないＰ３の取り込みが用量依存的であることを実証したが、これは、Ｐ３の取り込み過程が非受容体媒介性であることを示唆している（図２３Ｂ）。Ｐ３の取り込みが、区別可能な細胞区画（Ｃｒｅｓｓｗｅｌｌら、２００５）で起こる抗原（Ａｇ）交差提示に関係するとさらに特性決定するために、本発明者らはレーザー共焦点顕微鏡検査を実施し、Ｐ３とＬＡＭＰ－２との共染色によって示されているように、取り込み後、Ｐ３がリソソーム内に局在することを示した（図２３Ｃ）。リソソーム区画への取り込みは初期の時点（１～４時間）で起こったが、抗原は、ＨＬＡクラスＩ分子上での交差提示のためにプロセシングされる（Ｂａｓｈａら、２００８）ので、それは抗原（Ａｇ）分解の初期段階の可能性がある。

【０２５７】

様々な細胞経路が、可溶性タンパク質および細胞結合タンパク質の取り込みおよびプロセシングに関与するので（これが、それらが交差提示されるかを決定し得る）（Ｂｕｒｇｄｏｒｆら、２００６）、ならびに乳がんを含む腫瘍組織中に好中球が報告されたので（Ｑｕｅｅｎら、２００５およびＪｅｎｓｅｎら、２００９）、本発明者らは、乳がん細胞による可溶性および細胞結合Ｐ３の取り込みに差異があったかを評価した。これを調べるために、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を、可溶性Ｐ３（１０ｍｇ／ｍｌ）と共に、または照射ＰＭＮもしくはＰＢＭＣと１：１の比で４時間共培養した（図２４Ａ；データは示さず）。データにより、乳がん細胞は、可溶性Ｐ３および細胞結合Ｐ３の両方を取り込み得ることが実証された。実際、細胞結合Ｐ３からの取り込みは、可溶性タンパク質の取り込みと比較してより効率的であるようであり（蛍光強度中央値［ＭＦＩ＝１２，２９２対１，３５６；ｐ，０．０５）、これは、Ｐ３と、取り込みを促進し得る他のタンパク質との結合による可能性がある。

【０２５８】

ＰＳおよびＮＥは、乳がん細胞によって交差提示される。本発明者らは、ＮＥも乳がんによって取り込まれることを示したので（Ｍｉｔｔｅｎｄｏｒｆら、２０１２）、およびＰＲ１は、好中球アズール顆粒プロテアーゼＮＥおよびＰ３の両方に由来するので、本発明者らは、ＮＥおよびＰ３が、取り込み後に乳がん細胞によって交差提示されるかを調査

した。ＨＬＡ－Ａ２$_+$ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を漸増時点で可溶性Ｐ３またはＮＥと共に共培養し、続いて、マウス抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２　Ａｂ　８Ｆ４（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１）を使用してＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現について分析した。これらのデータは、乳がん細胞が、ＮＥおよびＰ３の両方由来のＰＲ１を交差提示し得ること示している。主に２４時間の時点において、有意なＰＲ１交差提示が認められ（図２４Ｂ）、それぞれＮＥおよびＰ３と共に培養した後の乳がん細胞表面上では、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２が、パルスしていない細胞と比較して２．５倍および３．０倍増加した。細胞表面上のＨＬＡ－Ａ２発現は、有意に増加していなかった（データは示さず）。

【０２５９】

さらに、ＮＥおよびＰ３の交差提示に関与する細胞内機構を調査するために、本発明者らは、他の抗原（Ａｇ）について以前に示されたように（Ｆｒａｎｃｏｉｓら、２００９、Ｋｏｖａｃｓｏｖｉｃｓ－Ｂａｎｋｏｗｓｋｉら、１９９５およびＭｕｋａｉら、２００９）、プロテアソームおよびＥＲ／ゴルジがＮＥおよびＰ３の交差提示に関与するかを研究した。ＥＲ－ゴルジの順行性輸送を阻害するブレフェルジンＡと共に、およびプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンと共に細胞をインキュベートすると、その両方において、ＮＥまたはＰ３との共培養後にＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳がん細胞によるＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現が減少したので（図２４Ｃ、２４Ｄ）、本発明者らのデータは、ＥＲ／ゴルジおよびプロテアソームの両方がＮＥおよびＰ３の交差提示に関与することを示している。これは、プロテアソームおよびＥＲ／ゴルジがＡＰＣによるＮＥおよびＰ３の交差提示に関与することを実証する本発明者らの以前の結果と類似する（Ａｌａｔｒａｓｈら、２０１２）。

【０２６０】

ＰＲ１の交差提示は、乳がんをＰＲ１ターゲティング療法に対して感受性にする。白血病では、ＰＲ１ペプチドワクチン（Ｒｅｚｖａｎｉら、２００８）、ＰＲ１－ＣＴＬ（Ｒｅｚｖａｎｉら、２００７およびＭａら、２０１０）および抗ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２　Ａｂ（８Ｆ４）（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１）を使用して、ＰＲ１が有効にターゲティングされたので、本発明者らは、交差提示後の乳がん細胞上におけるＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現が、これらの細胞をＰＲ１－ＣＴＬおよび８Ｆ４　Ａｂによる死滅に対して感受性にするかを調査した。標準的なカルセイン－ＡＭ細胞傷害アッセイ（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９６；Ｊｉａｎｇら、１９９６）において、１０ｍｇ／ｍｌのＮＥまたはＰ３を含有する媒体中でＨＬＡ－Ａ２$_+$ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を２４時間培養し、次いで、健常ドナーの増殖したＰＲ１－ＣＴＬと共に４時間インキュベートした（図２４Ｅ）。データは、ＮＥおよびＰ３の交差提示が、ＮＥまたはＰ３のパルス後に、パルスしていないＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞と比較して、ＰＲ１－ＣＴＬによる死滅に対するＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の感受性を増加させたことを実証している。同様に、補体依存性細胞傷害アッセイで８Ｆ４　Ａｂを使用して（図２４Ｆ）（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１）、本発明者らは、ＮＥまたはＰ３の交差提示後におけるＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の死滅化が、パルスしていない細胞と比較して用量依存的であることを観察した。最大の死滅化は、最高用量の８Ｆ４　Ａｂ（１０ｍｇ／ｍｌ）で認められた。

【０２６１】

ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２およびＰＲ１－ＣＴＬは、乳がん患者で検出される。本発明者らは、培養乳がん細胞系および腫瘍組織が内因性ＮＥおよびＰ３を欠くことを示したので、ならびに本発明者らは、ＮＥおよびＰ３が乳がん細胞によって交差提示され、続いてＰＲ１ターゲティング療法に対して感受性になるというインビトロの証拠を観察したので、本発明者らは、ＰＲ１が原発性乳がん患者組織で検出され得るか、およびＰＲ１－ＣＴＬが乳がん患者由来の末梢血で検出され得るかを調査した。２つのＨＬＡ－Ａ２陽性乳がん組織のレーザー共焦点顕微鏡検査により、８Ｆ４が両方の腫瘍組織にあることが実証された（図２５Ａ）。８Ｆ４染色は、ＨＬＡ－Ａ２陰性組織には存在しなかった（データは示さず）。また、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現が、浸潤性白血球ではなく乳がん細胞によるものであることを検証するために、本発明者らは、白血球マーカーＣＤ４５を用いて乳がん組

織の連続切片を染色した。本発明者らは、８Ｆ４およびＣＫ７で共染色した乳がん組織の領域にはＣＤ４５染色が存在しないことを示したが、これは、ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現が、隣接する炎症細胞ではなく乳がん細胞によるものであったことをさらに確実にした（図２５Ｂ）。

【０２６２】

ＰＲ１－ＣＴＬが乳がん患者で検出され得るかを決定するために、本発明者らは、早期乳がん患者由来の１１個の末梢血サンプルのＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２デキストラマー染色を使用した（図２５Ｃ）。これらのＨＬＡ－Ａ２＋患者におけるＰＲ１－ＣＴＬの頻度中央値は$CD8_+$Ｔ細胞の０．０５％であり（範囲０．０２～０．２％）、健常ドナーにおけるＰＲ１－ＣＴＬの頻度（$CD8_+$細胞の１／１５，０００～１／３５０，０００）（Ｍｏｌｌｄｒｅｍら、１９９７）よりもわずかに高かった。総合すると、これらのインビボデータは、腫瘍微小環境に存在するセリンプロテアーゼＮＥおよびＰ３が乳がん細胞によって取り込まれて交差提示され得、これが、ＮＥ由来のおよびＰ３由来のエピトープＰＲ１に対する獲得免疫応答に寄与し得ることを示唆している。

【０２６３】

黒色腫患者におけるＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２およびＰＲ１－ＣＴＬ。黒色腫組織もまた、ＮＥおよびＰ３の供給源であり得る炎症細胞を有することが示されたので（Ｊｅｎｓｅｎら、２０１２）、ならびに黒色腫は免疫療法に感受性であることが公知であるので（Ｄｕｄｌｅｙら、２００２およびＳｃｈｗａｒｔｚｅｎｔｒｕｂｅｒら、２０１１）、本発明者らは次に、ＮＥおよびＰ３の交差提示が黒色腫でも検出され得るかを調査した。ＰＲ１－ＣＴＬが黒色腫でも検出されるかを決定するために、本発明者らは、黒色腫患者由来のＰＢＭＣをＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２デキストラマーで染色したところ、７人の患者全員でＰＲ１－ＣＴＬが検出され、その頻度中央値は$CD8_+$Ｔ細胞の０．０１４％（範囲、０．００５３～０．０１９％）であり（図２５Ｃ）、正常ドナー由来の血液で認められたものと類似していた。本発明者らはまた、$HLA-A2_2$（黒色腫２）黒色腫組織ではなく１つの$HLA-A2_+$（黒色腫１）でＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現を検出した（図２５Ｄ）。

【０２６４】

黒色腫によるＮＥおよびＰ３の交差提示は、ＰＲ１－ＣＴＬに対する感受性を増加させる。黒色腫がＮＥおよびＰ３を発現するかを決定するために、本発明者らは、患者から得られた黒色腫組織をＮＥおよびＰ３について染色し、ＮＥおよびＰ３が存在しないことを示した（図２６Ａ、２６Ｂ）。本発明者らはまた、４つの黒色腫細胞系（ＭＥＬ５２６、ＭＥＬ６２４、ＭＴ２０１９およびＭＴ２３３３）におけるＮＥおよびＰ３発現を分析した。ウエスタンブロット分析は、ＮＥおよびＰ３が黒色腫細胞系に存在しないことを示している（図２６Ｃ）。乳がんと同様に、本発明者らは、ＮＥおよびＰ３が$HLA-A2_+$Ｍｅｌ５２６細胞系によって取り込まれて交差提示されることを実証する（図２６Ｄ、２６Ｅ）。８Ｆ４　Ａｂは、高次構造ＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２エピトープの大部分を構成するＨＬＡ－Ａ２分子に結合するので（Ｓｅｒｇｅｅｖａら、２０１１およびＰｏｒｇａｄｏｒら、１９９７）、Ｍｅｌ５２６細胞は、ＮＥまたはＰ３との共培養前に８Ｆ４による染色を示す（データは示さず）。しかしながら、８Ｆ４による染色は、ＨＬＡ－Ａ２表面染色の増加を伴わずに、ＮＥまたはＰ３との共培養後に増加し（データは示さず）、これは、細胞表面上におけるＰＲ１／ＨＬＡ－Ａ２発現の増加を示している。さらに、ＮＥおよびＰ３の交差提示は、ＰＲ１－ＣＴＬによる死滅化に対する$HLA-A2_+$Ｍｅｌ５２６細胞系の感受性を増加させ、最高の死滅化が最高のＥ：Ｔ比で認められた（図２６Ｆ）。

【０２６５】

本明細書に開示され、特許請求の範囲に記載されているすべての組成物および／または方法を、本開示を考慮して過度に実験することなく作製および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して記載しているが、本発明の概念、精神、および範囲を逸脱することなく、本明細書に記載される組成物および／または方法ならびに該方法の工程または工程の順序を変更することができることが当業者に明らかである。より具体的には、化学的および生理学的に関与する特定の薬剤で本明細書に記載され

る薬剤を置換することができる一方で、同一または類似の結果が達成されることが明らかである。当業者に明らかであるこのような類似の置換物および改変物の全ては、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲、および概念の範囲内であると見なす。

【０２６６】

ＶＩＩＩ．参考文献

以下の参考文献は、参考文献が本明細書に示されたものを補足する例示的手順または他の詳細を提供する範囲で、特に参照により本明細書に組み込まれる。

【数１】

U.S. Patent 4,196,265
U.S. Patent 4,472,509
U.S. Patent 4,554,101
U.S. Patent 4,680,338
U.S. Patent 4,684,611
U.S. Patent 4,797,368
U.S. Patent 4,843,092
U.S. Patent 4,879,236
U.S. Patent 4,938,948
U.S. Patent 4,952,500
U.S. Patent 5,021,236
U.S. Patent 5,302,523
U.S. Patent 5,322,783
U.S. Patent 5,384,253
U.S. Patent 5,399,363
U.S. Patent 5,443,826
U.S. Patent 5,464,765
U.S. Patent 5,466,468
U.S. Patent 5,538,877
U.S. Patent 5,538,880
U.S. Patent 5,543,158
U.S. Patent 5,550,318
U.S. Patent 5,563,055
U.S. Patent 5,563,250
U.S. Patent 5,580,859
U.S. Patent 5,589,466
U.S. Patent 5,599,795
U.S. Patent 5,610,042
U.S. Patent 5,641,515
U.S. Patent 5,656,610

【数２】

U.S. Patent 5,702,932
U.S. Patent 5,736,524
U.S. Patent 5,739,169
U.S. Patent 5,780,448
U.S. Patent 5,789,215
U.S. Patent 5,801,005
U.S. Patent 5,824,311
U.S. Patent 5,830,880
U.S. Patent 5,846,233
U.S. Patent 5,846,945
U.S. Patent 5,856,456
U.S. Patent 5,871,986
U.S. Patent 5,880,270
U.S. Patent 5,945,100
U.S. Patent 5,981,274
U.S. Patent 5,994,136
U.S. Patent 5,994,624
U.S. Patent 6,013,516
Alatrash *et al.*, *J. Immunol.*, 35: 309-320, 2012
Antin, *Blood,* 82:2273-2277, 1993.
Arend *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 16:27–55, 1998.
Arend, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5):1-6, 2001.
Austin-Ward and Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998.
Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer,* Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986.
Bajorin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.
Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
Basha *et al.*, *Plos One,* 3:e3247, 2008.
Beidler *et al.*, *J. Immunol.*, 141(11):4053-4060, 1988.
Besnard *et al.*, *Gut.*, 43(5):634-638, 1998.
Blomer *et al.*, *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.
Brouwer *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.,* 98:448-453, 1994.
Brynskov *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 321(13):845-850, 1989.
Bukowski *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.

【数３】

Burchert *et al.*, *Blood*, 02:659, 2002.

Burgdorf *et al.*, *J. Immunol.*, 176:6770-6776, 2006.

Burger and Dayer, *Neurology*, 45(6S-6):S39–43, 1995.

Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.

Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.

Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21):7439-7443, 1985.

Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.

Cotten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13):6094-6098, 1992.

Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.

Cresswell *et al.*, *Immunol. Rev.*, 207:145-157, 2005.

Curiel, *Nat. Immun.*, 13(2-3):141-164, 1994.

Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.

Desmedt *et al.*, *Int. J. Cancer*, 119: 2539-2545, 2006.

Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.

Dinarello, *Int. Rev. Immunol.*, 16:457–499, 1998.

Dionne *et al.*, *Clin. Exp. Imunol.*, 112(3):435-442, 1998.

Dudley *et al.*, *Science*, 298: 850-854, 2002.

Eastgate *et al.*, *Lancet*, 2:706–709, 1988.

EP Application 125,023

EP Application 171,496

EP Application 173,494

EP Application 184,187

Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.

Fellerman *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(10):1860-1866, 1998.

Firestein *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 37:644–652, 1994.

Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

Francois *et al.*, *Blood, 114: 2632-2638, 2009.*

Franssen *et al.*, *Lancet.*, 347:116, 1996.

Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.

Fujikawa *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 54:318–320, 1995.

Funakoshi *et al.*, *Digestion*, 59(1):73-78, 1998.

Giralt and Kolb, *Curr. Opin. Oncol.*, 8:96-102, 1996.

Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

【数４】

Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Hannum *et al.*, *Nature*, 343:336–340, 1990.

Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.

Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.*, 37(4):347-353, 1998.

Hoffenberg *et al.*, *J. Pediatr.*, 134(4):447-452, 1999.

Hollander *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 105:883-885, 1986.

Hollander, *Scand. J. Gastroenterol.*, 27:721-726, 1992.

Horwich *et al. J. Virol.*, 64:642-650, 1990.

Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.

Irie *et al.*, *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.

Jarvis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10(5):459-467, 1998.

Jarvis, *Pediatr. Ann.*, 31(7):437-446, 2002.

Jensen *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 27:4709-4717, 2009.

Jensen *et al.*, *Cancer*, 118: 2476-2485, 2012.

Jiang *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 93:606-612, 1996.

Johnson *et al.*, *In*: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto *et al.* (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.

Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525, 1986.

Jonsson *et al.*, *Br. J. Rheumatol.*, 32(7):578-581 1993.

Jonsson *et al.*, *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.

Jonsson *et al.*, *Trends Immunol.*, 22(12):653-654 , 2001.

Kaeppler *et al.*, *PlanT-cell Reports*, 9:415-418, 1990.

Kahle *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731–734, 1992.

Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.

Kato *et al*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.

Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994.

Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.

Kolb and Holler, *Curr. Opin. Oncol.*, 9:139-145, 1997.

Kolb *et al.*, *Blood*, 86:2041-2050, 1995.

Kolb *et al.*, *Bone Marrow Transplant*, 17:449-452, 1996.

Kotzin, *Cell*, 85:303-306, 1996.

Kovacsovics-Bankowski and Rock, *Science, 267: 243-246, 1995.*

【数５】

Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.

Kuronita, *J. Cell Sci.,* 115:4117-4131, 2002.

Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57(1):105-32, 1982.

Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60(2):515-524, 1986.

Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8(10):3988-3996, 1988.

Leiper *et al., Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 12(1):179-199, 1998.

Lipsky, In: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci *et al.*(Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880–1888, 1998.

Lugering *et al., Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30(3):338-344, 1998.

Makowiec *et al., Z. Gastroenterol.*, 36(8):619-624, 1998.

Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.

McAlindon *et al.*, *Gut*, 42(2):214-219, 1998.

McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62(6):1963-1973, 1988.

Miller *et al.*, *Am. J. Clin. Oncol.*, 15(3):216-221, 1992.

Mittendorf *et al., Cancer Res.*, 72:3153-3162, 2012.

Molldrem *et al., Blood*, 88:2450-2457, 1996.

Molldrem *et al., Blood,* 90:2529-2534, 1997.

Molldrem *et al.*, *Cancer Res.*, 59:2675-2681, 1999.

Molldrem *et al.*, *Nat. Med.*, 6:1018-1023, 2000.

Molldrem *et al., J. Clin. Invest.*, 111:639-647, 2003.

Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.

Mukai, *et al., J. Immunol.,* 183:6561-6568, 2009.

Murch, *Nutrition*, 14:780-783, 1998.

Muzyczka, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992.

Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996.

Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.

Ohnishi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:817-830, 1994.

Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.,* 21(3):415-28, 1993.

Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.

Paul, Immunogenetics, 37(6):442-448, 1993.

Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.

Porgador *et al., Immunity* 6: 715-726, 1997.

Potrykus *et al., Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.

【数６】

Prang *et al.*, *Br. J. Cancer*, 92:342-349, 2005.

Prieur *et al.*, *Lancet.*, 2:1240–1242, 1987.

Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.

Queen *et al.*, *Cancer Res.*, 65:8896-8904, 2005.

Reimund *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 28(2):145-150, 1998.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.

Rezvani *et al.*, *Cytotherapy* 9: 245-251, 2007.

Rezvani *et al.*, *Blood*, 111:236-242, 2008.

Ridgeway, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham:Butterworth, 467-492, 1988.

Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Rogler and Andus, *World J. Surg.*, 22(4):382-389, 1998.

Rooney *et al.*, *Rheumatol. Int.*, 10:217–219, 1990.

Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.

Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.

Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.

Ruemmele *et al.*, *Gastroenterol.*, 115(4):822-829, 1998.

Saiki *et al.*, *Scand. J. Gastroenterol.*, 33(6):616-622, 1998.

Salomonsson *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 55(4):336-342, 2002.

Sartor, *Am. J. Gastroenterol.*, 92(12):5S-11S, 1997.

Savage *et al.*, *Immunity*, 10:485-492, 1999.

Scheibenbogen *et al.*, *Blood*, 100:2132-2137, 2002.

Schreiber, *Neth. J. Med.*, 53(6):S24-31, 1998.

Schwartzentruber, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 364: 2119-2127, 2011.

Sergeeva, *et al.*, *Blood*, 117: 4262-4272, 2011.

Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.

Soderholm *et al.*, *Gastroenterol.*, 117:65-72, 1999.

Stack *et al.*, *Lancet*, 349(9051):521-524, 1997.

Stites, *J. Mol. Biol.*, 235(1):27-32, 1994.

Sun *et al.*, *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.

Targan *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-1035, 1997.

Temin, *In*: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.

Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.

【数７】

Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 83(14):5214-5218, 1986.

Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.

van den Berg, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5S-2):7–16, 2001.

van Dullemen *et al.*, *Gastroenterol.*, 109(1):129-135, 1995.

VandenDriessche *et al., Blood,* 100(3) 813-822, 2002.

Wada *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18:2367-2411, 1990.

Warrington *et al.*, *Arthritis and Rheumatism*, 44:13-20, 2001.

Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wood *et al., J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.

Xanthou *et al., Arthritis Rheum.*, 44(2):408-418, 2001.

Zufferey *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875, 1997.

【図１２】

```
                  1           2           3
         123456789 0123456789 0123456789 0123456789
8F4 VH   EVQLVESGG DLVKPGGSLK LSCAASGFTF SGYGMSWVRQ
Hu8F4 VH EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF SGYGMSWVRQ
U96282 VH EVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF S-----WVRQ

         4         5         6         7
         0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
                      a
8F4 VH   TPDKRLEWVA TISSGGSYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY
Hu8F4 VH APGKGLEWVA TISSGGSYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY
U96282 VH APGKGLEWVA ---------- ------RFTI SRDNAKNSLY

                                 1               1
         8         9             0               1
         0122223456789 0123456789 000000001234567890 0123
            abc                    abcdefg
8F4 VH   LQMSSLKSEDTAM YYCARHEGGY YGSSPAWFVYWGQGTLV TLSA
Hu8F4 VH LQMNSLRAEDTAV YYCARHEGGY YGSSPAWFVYWGQGTMV TVSS
U96282 VH LQMNSLRAEDTAV YYCAR----- ----------WGQGTMV TVSS
```

FIG. 12

【図１３】

```
                  1           2           3
         123456789 0123456789 0123456789 0123456789
8F4 VL   DIVMTQSHK FMSTSVGDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK
Hu8F4 VL1 DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQDV STAVAWYQQK
Hu8F4 VL2 DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCKASQDV STAVAWYQQK
AY043146 VL DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITC------ -----WYQQK

         4         5         6         7
         0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
8F4 VL   PGQSPKLLIY STSYRYTGVP DRFTGSGSGT VFTFTINSVQ
Hu8F4 VL1 PGKAPKLLIY STSYRYTGVP SRFSGSGSGT VFTFTISSLQ
Hu8F4 VL2 PGKAPKLLIY STSYRYTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
AY043146 VL PGKAPKLLIY -------GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ

                           1
         8         9       0
         0123456789 0123456789 01234567
8F4 VL   AEDLAVYYCQ QHFITPPTFG GGTKLEIK
Hu8F4 VL1 PEDIATYYCQ QHFITPPTFG GGTKVEIK
Hu8F4 VL2 PEDIATYYCQ QHFITPPTFG GGTKVEIK
AY043146 VL PEDIATYYC- --------FG GGTKVEIK
```

FIG. 13

【図１４】

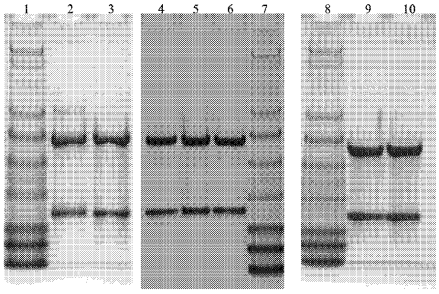
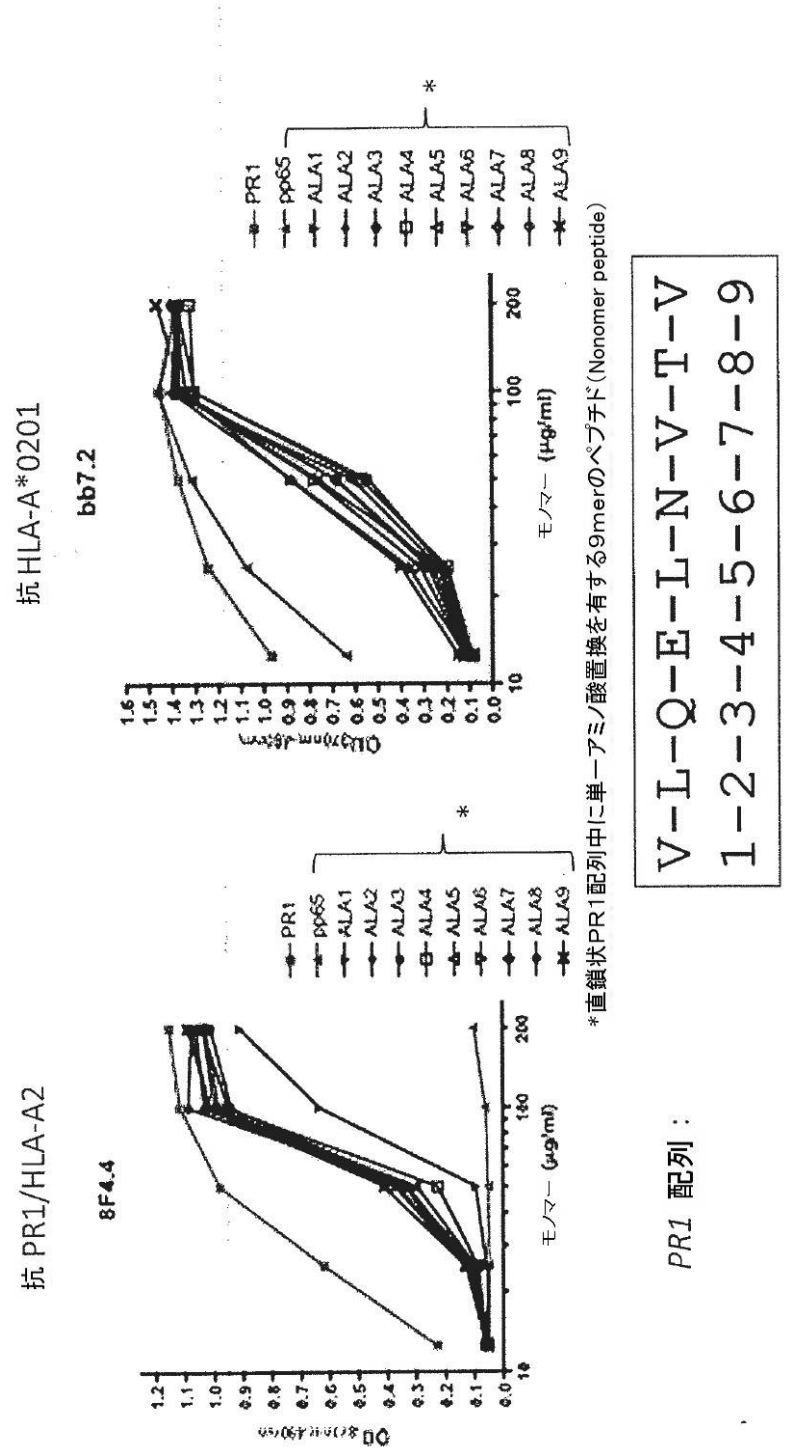


FIG. 14

【図１】



PR1 配列：

V-L-Q-E-L-N-V-T-V
1-2-3-4-5-6-7-8-9

FIG. 1

【図２】

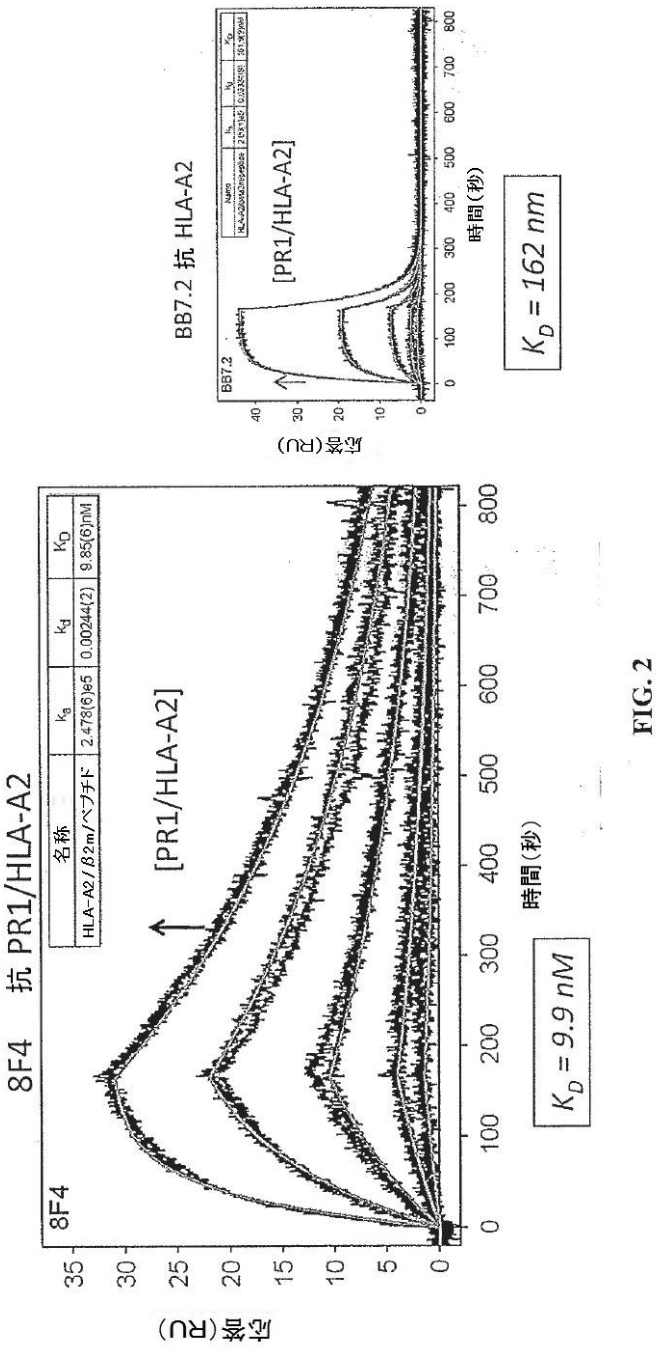

8F4 抗 PR1/HLA-A2
8F4
名称
HLA-A2/β2m/ペプチド
ka
2.473(6)e5
kd
0.00244(2)
KD
9.85(6)nM
[PR1/HLA-A2]
反応(RU)
時間(秒)
K_D = 9.9 nM
BB7.2 抗 HLA-A2
BB7.2
[PR1/HLA-A2]
反応(RU)
時間(秒)
K_D = 162 nm

FIG. 2

【図３】

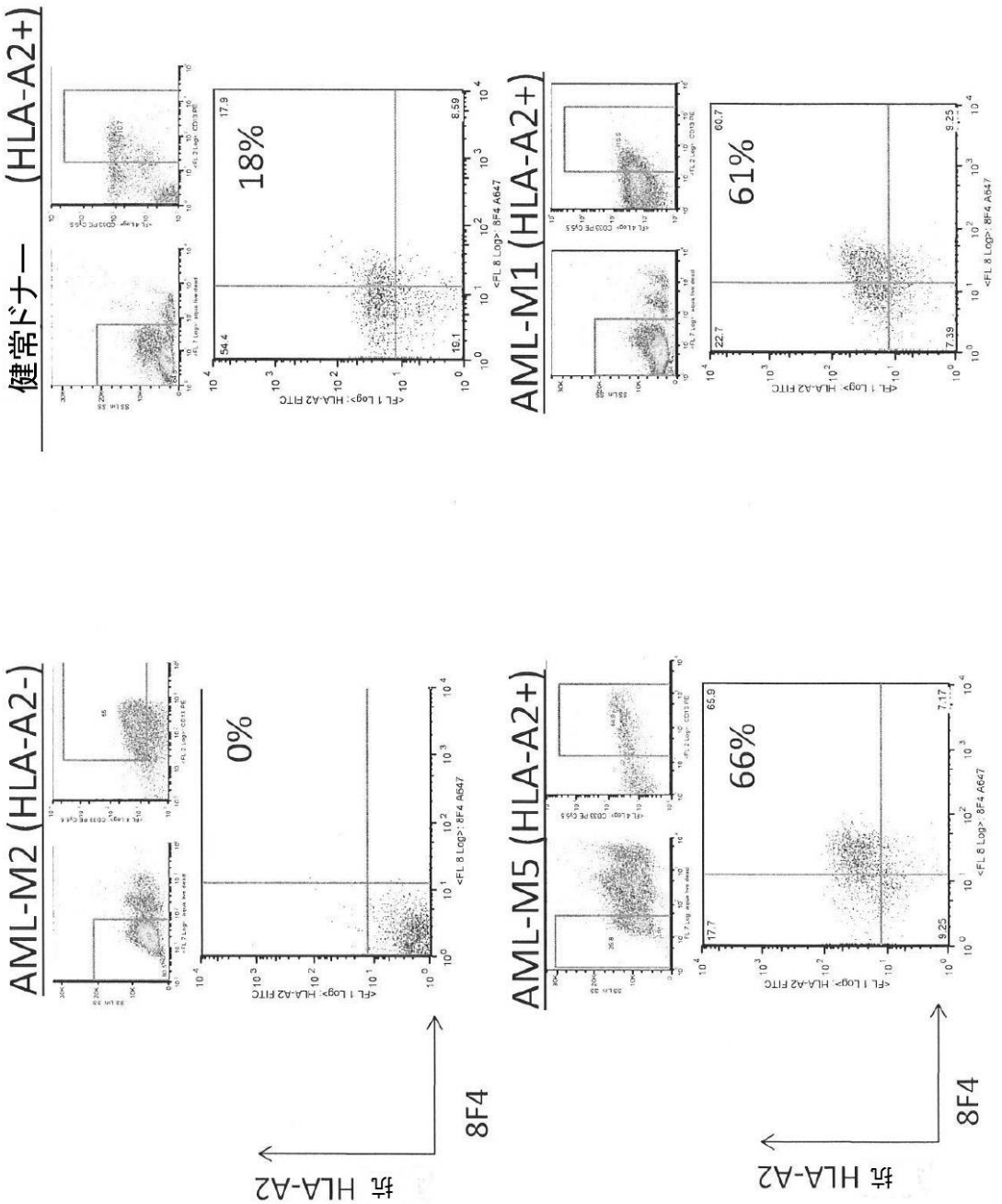

健常ドナー (HLA-A2+)
AML-M1 (HLA-A2+)
AML-M2 (HLA-A2-)
AML-M5 (HLA-A2+)
18%
61%
0%
66%
抗 HLA-A2
8F4

FIG. 3

【図４】

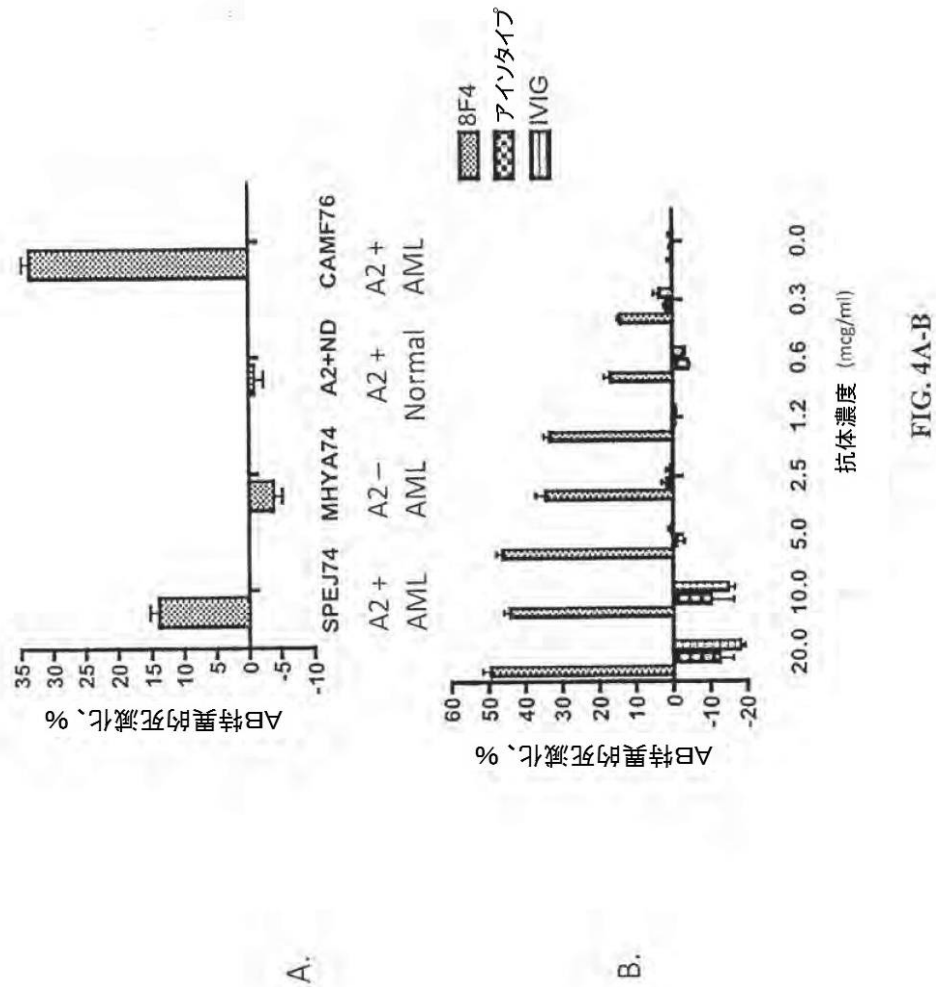

A.
AD特異的死滅化、%
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
SPEJ74
MHYA74
A2+ND
CAMF76
A2 +
AML
A2 −
AML
A2 +
Normal
A2 +
AML
B.
AD特異的死滅化、%
60
50
40
30
20
10
0
-10
-20
8F4
アイソタイプ
IVIG
20.0 10.0 5.0 2.5 1.2 0.6 0.3 0.0
抗体濃度 (mcg/ml)

FIG. 4A-B

【図５】

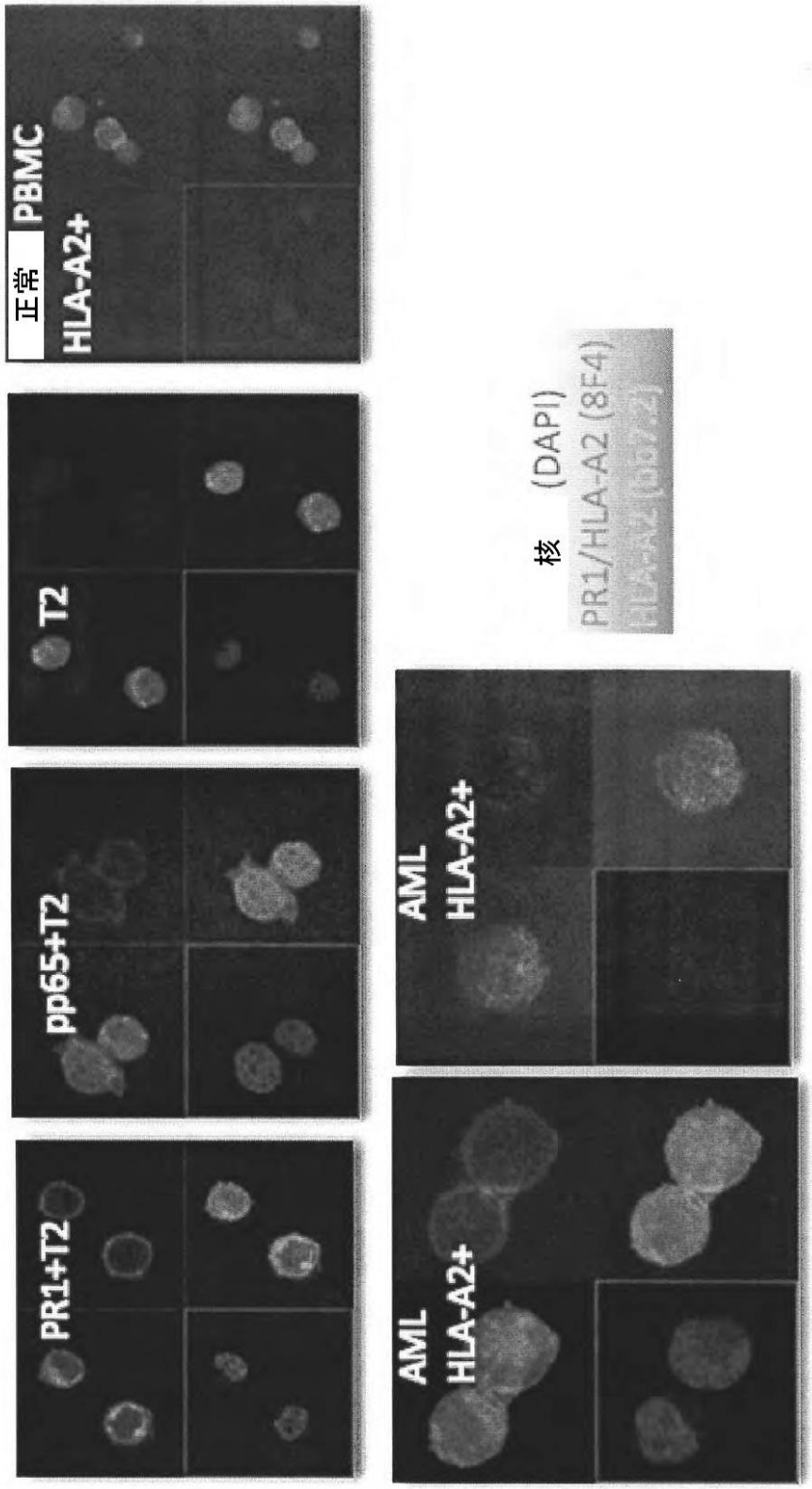

正常 PBMC
HLA-A2+
T2
pp65+T2
PR1+T2
AML
HLA-A2+
AML
HLA-A2+
核 (DAPI)
PR1/HLA-A2 (8F4)

FIG. 5

【図６】

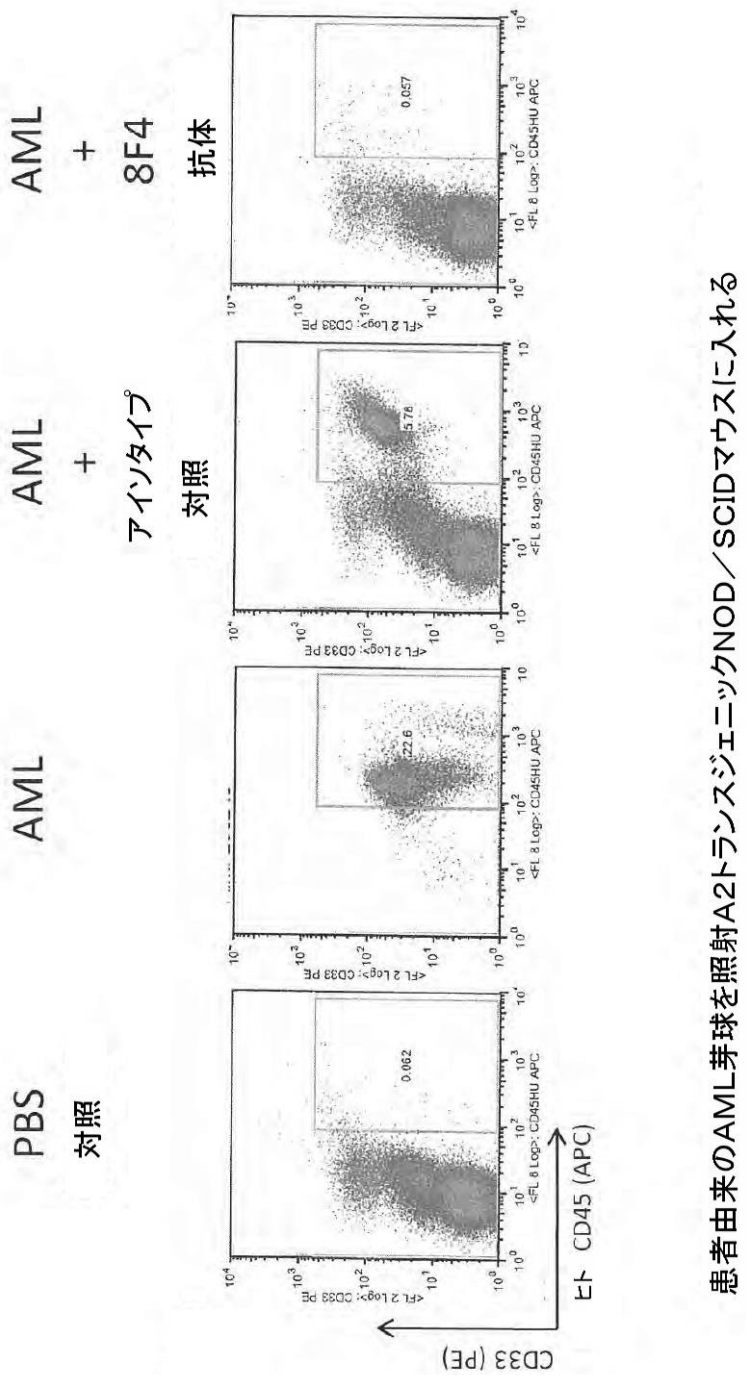

PBS
対照
AML
AML
+
アイソタイプ
対照
AML
+
8F4
抗体
骨髄
14日目
0.062
22.6
5.78
0.057
CD33 (PE)
ヒト CD45 (APC)
患者由来のAML芽球を照射A2トランスジェニックNOD／SCIDマウスに入れる

FIG. 6

【図７】

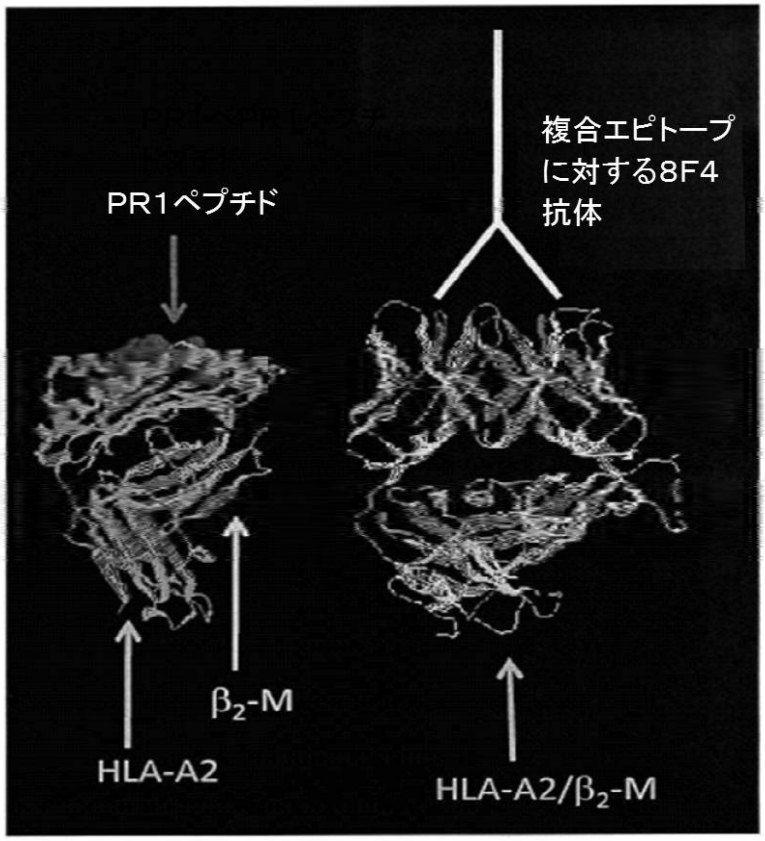


FIG. 7

【図８Ａ】

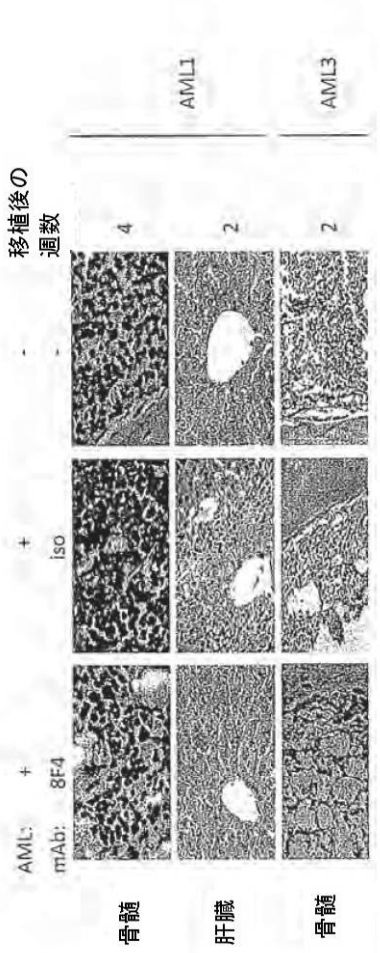


FIG. 8A

【図８Ｂ】

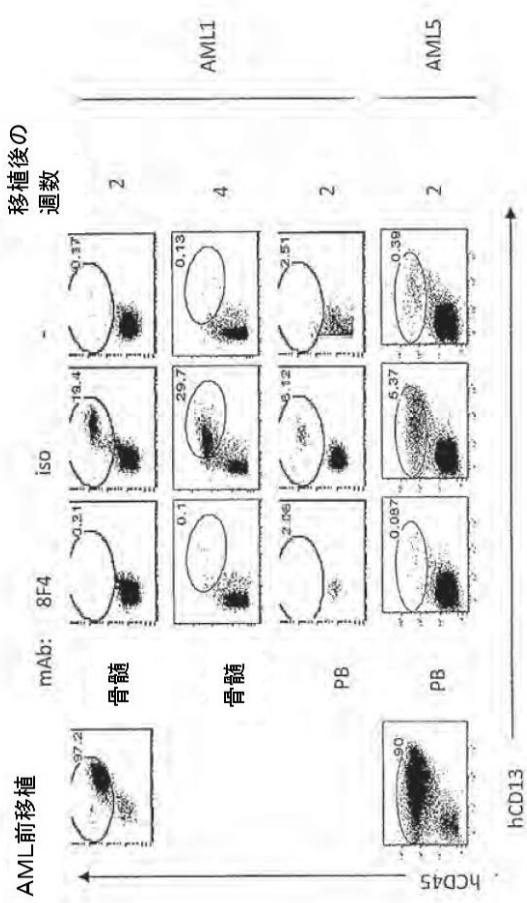

AML前移植
mAb:
8F4
iso
-
移植後の
週数
骨髄
骨髄
PB
PB
2
4
2
2
AML1
AML5
hCD45
hCD13
97.2
0.21
19.4
0.37
0.1
29.7
0.13
2.06
5.12
2.51
90
0.087
6.37
0.39

FIG. 8B

【図９】

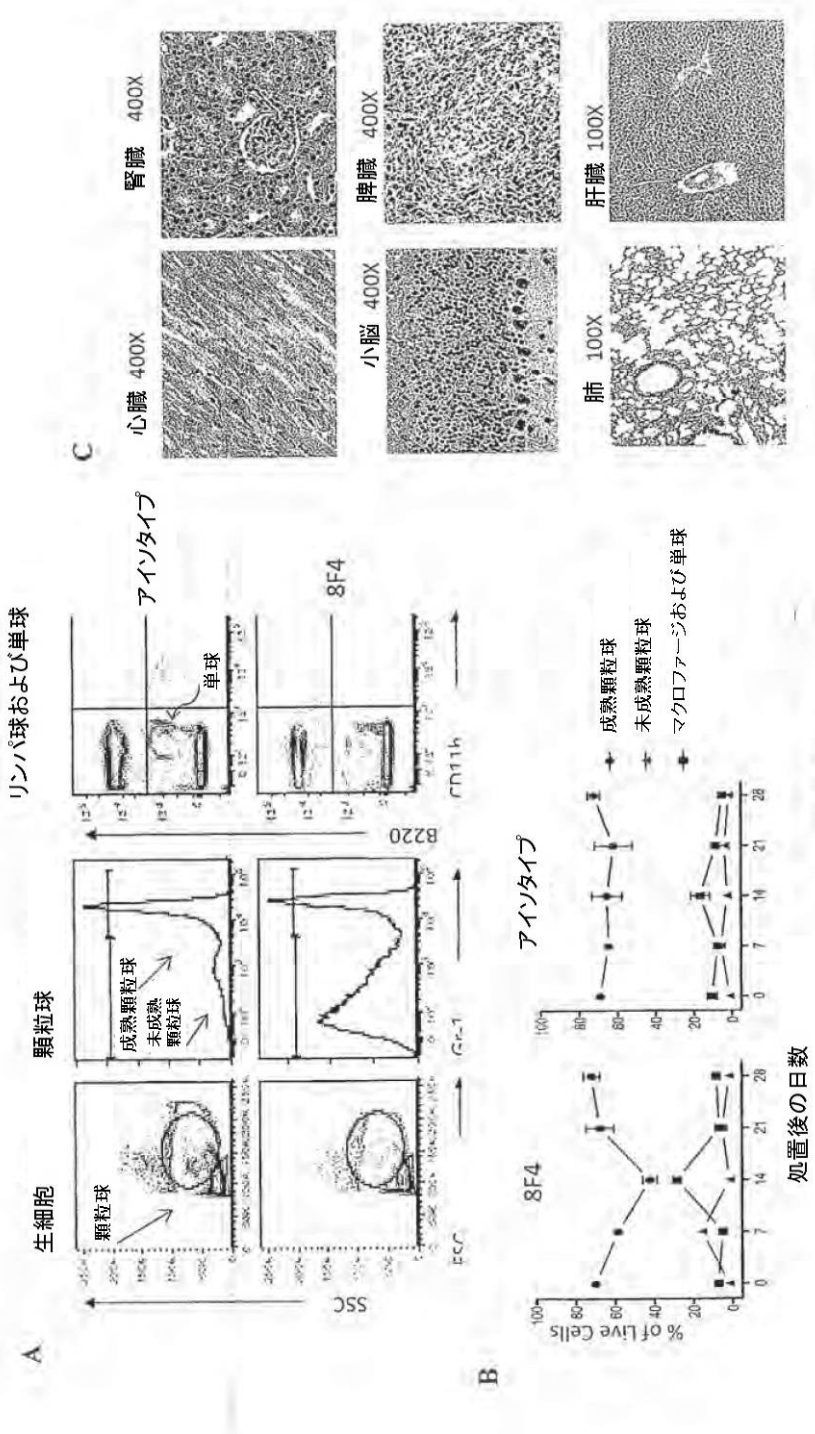

A
生細胞
顆粒球
リンパ球および単球
顆粒球
成熟顆粒球
未成熟顆粒球
アイソタイプ
単球
8F4
SSC
B220
Gr-1
CD11b
B
8F4
アイソタイプ
% of Live Cells
処置後の日数
成熟顆粒球
未成熟顆粒球
マクロファージおよび単球
C
心臓 400X
腎臓 400X
小脳 400X
脾臓 400X
肺 100X
肝臓 100X

FIG. 9A-C

【図１０】

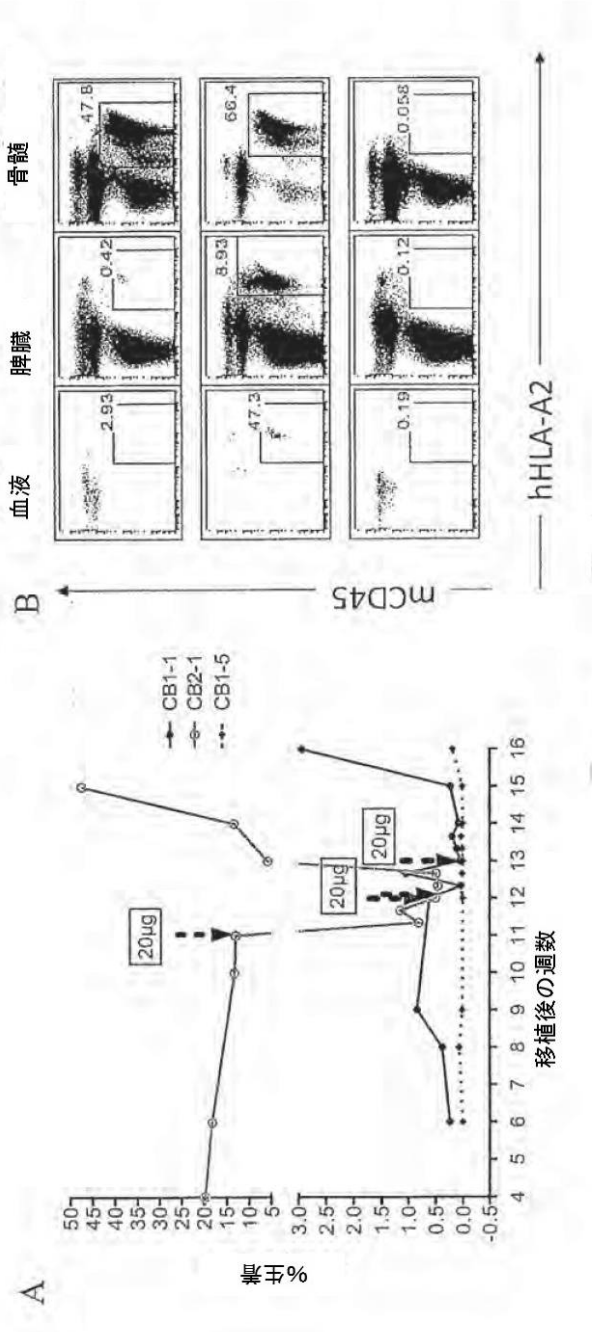

A
%生着
CB1-1
CB2-1
CB1-5
20μg
20μg
20μg
移植後の週数
B
血液
脾臓
骨髄
2.93
0.42
47.8
47.3
8.93
66.4
0.19
0.12
0.058
mCD45
hHLA-A2

FIG. 10A-B

【図１１】

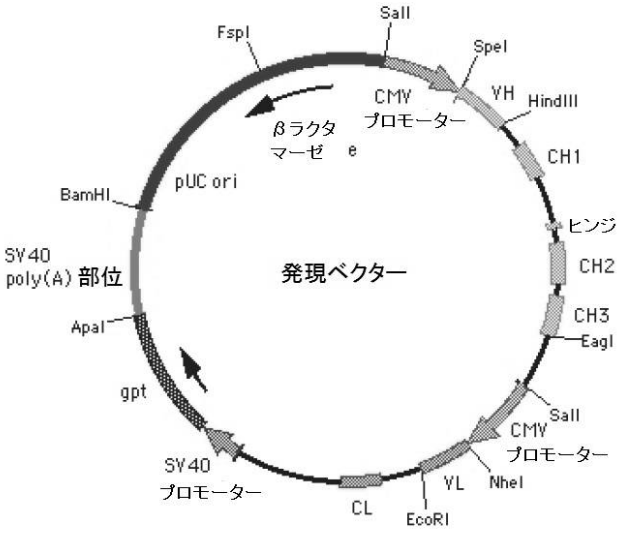

SalI
FspI
SpeI
CMV
プロモーター
VH
HindIII
βラクタ
マーゼ e
CH1
pUC ori
BamHI
ヒンジ
CH2
SV40
poly(A) 部位
発現ベクター
CH3
EagI
ApaI
SalI
gpt
CMV
プロモーター
SV40
プロモーター
VL
NheI
CL
EcoRI

FIG. 11

【図１５】

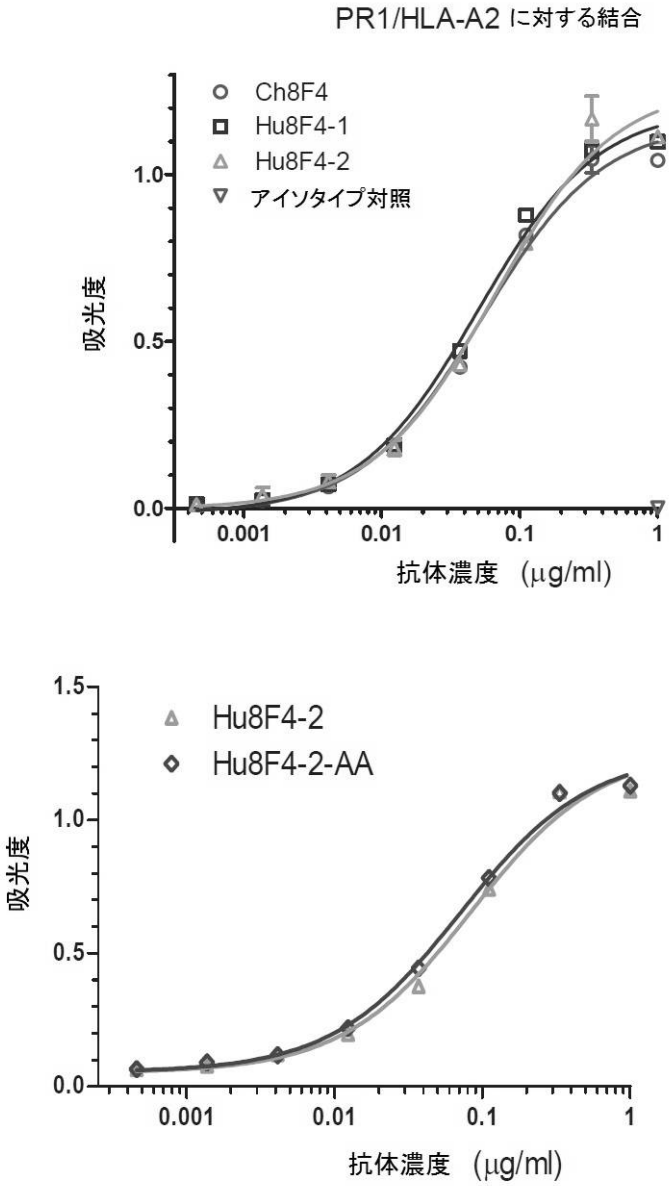
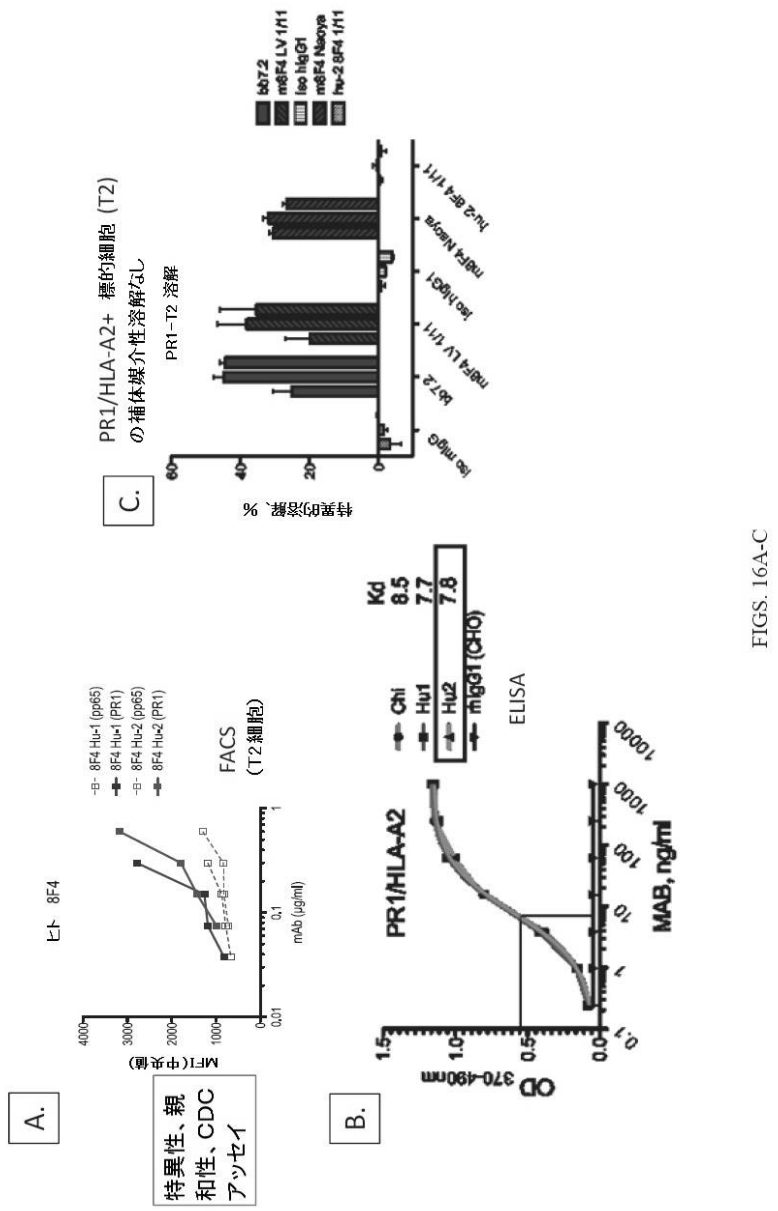

PR1/HLA-A2 に対する結合
Ch8F4
Hu8F4-1
Hu8F4-2
アイソタイプ対照
吸光度
抗体濃度 (μg/ml)
Hu8F4-2
Hu8F4-2-AA
吸光度
抗体濃度 (μg/ml)

FIG. 15

【図１６】



FIGS. 16A-C

【図１７】

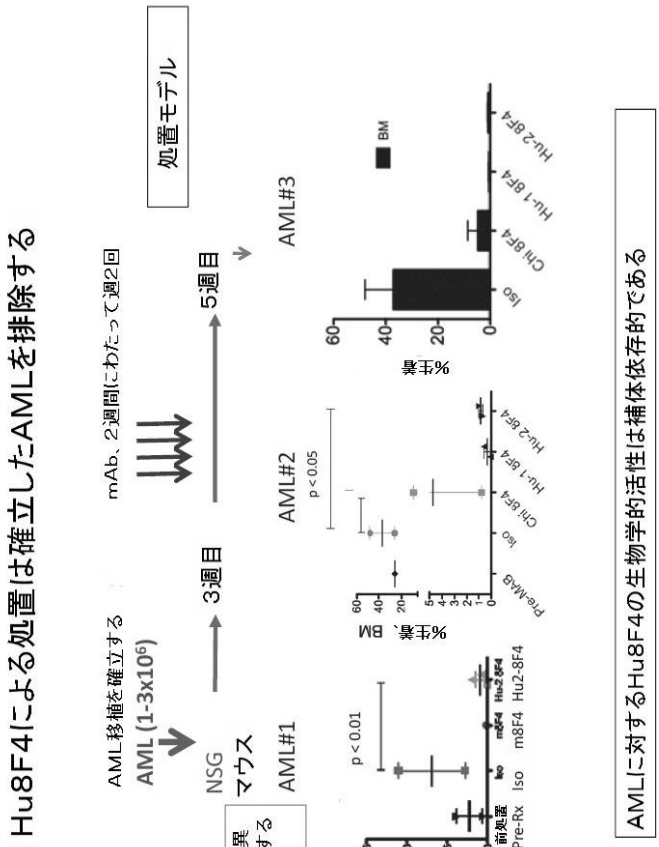


図2. Hu8F4による処置は確立したAMLを排除する
AML移植を確立する
AML (1-3x10⁶)
NSG
マウス
3週目
mAb、2週間にわたって週2回
5週目
処置モデル
AML#1
AML#2
AML#3
確立したAML異種移植片に対する生物学的活性
p < 0.01
p < 0.05
%生着、BM
%生着
前処置
Pre-Rx
Iso
m8F4
Hu2-8F4
Pre-Mab
Chi 8F4
Hu-1 8F4
Hu-2 8F4
BM
AMLに対するHu8F4の生物学的活性は補体依存的である

FIG. 17

【図１８】

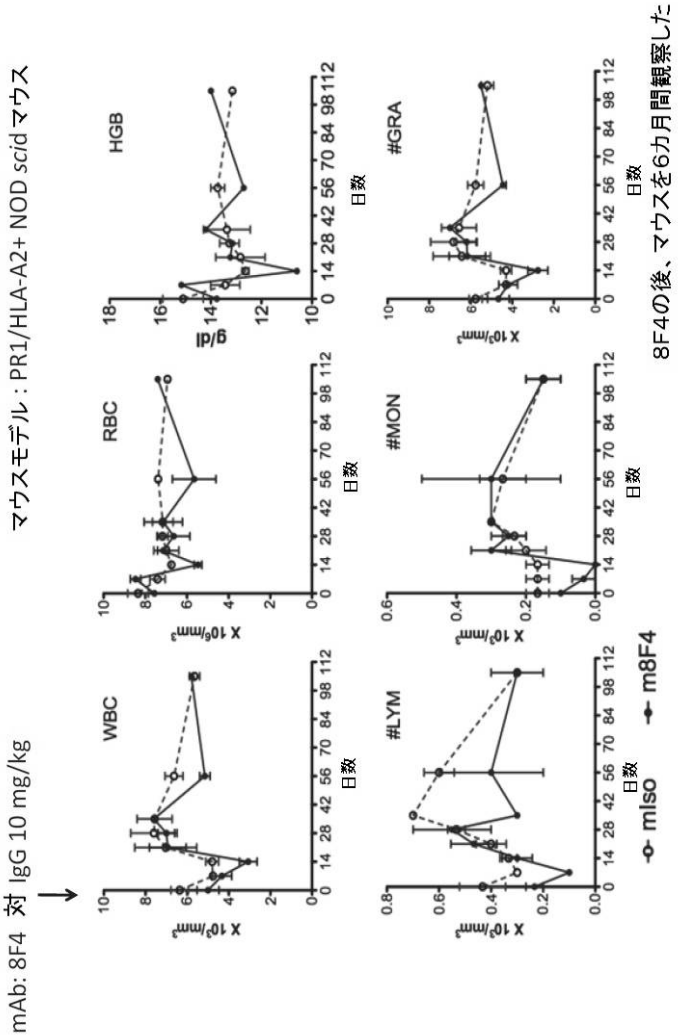
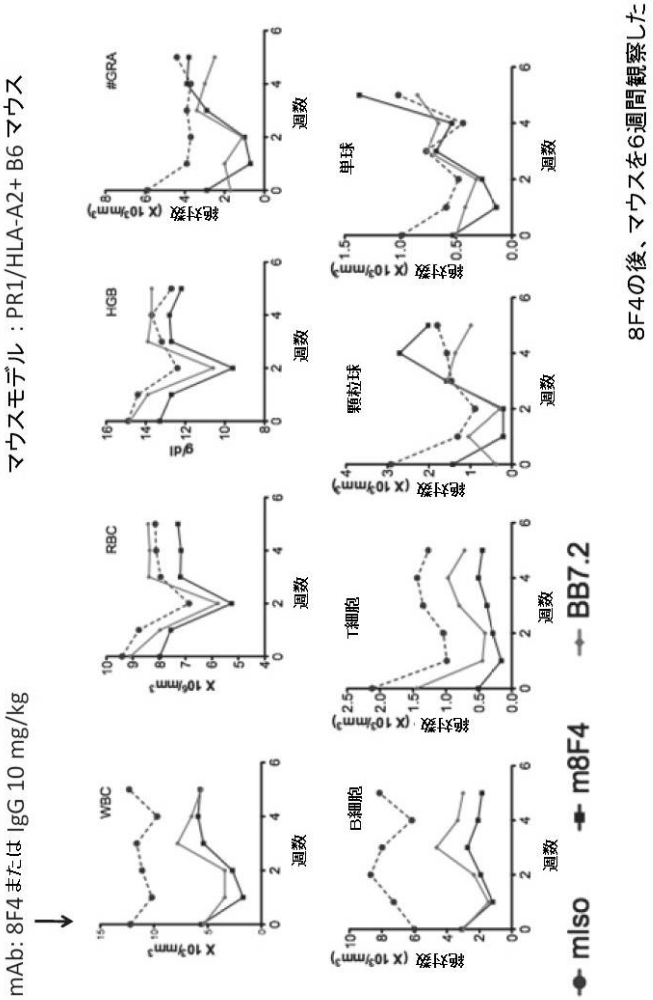

マウスモデル：PR1/HLA-A2+ NOD scid マウス
mAb: 8F4 対 IgG 10 mg/kg
WBC
RBC
HGB
#LYM
#MON
#GRA
日数
mIso
m8F4
8F4の後、マウスを6カ月間観察した

FIG. 18

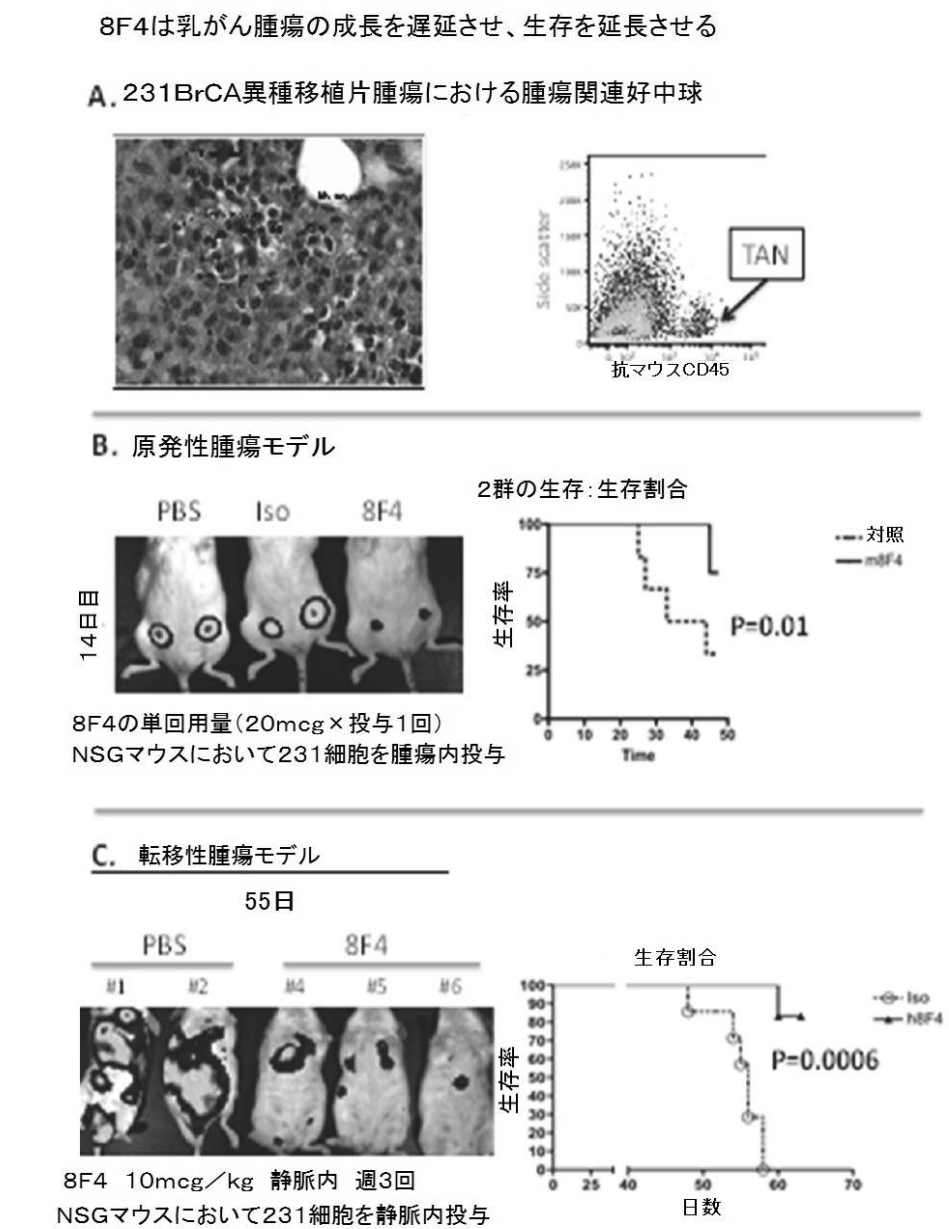
【図１９】



8F4の後、マウスを6週間観察した

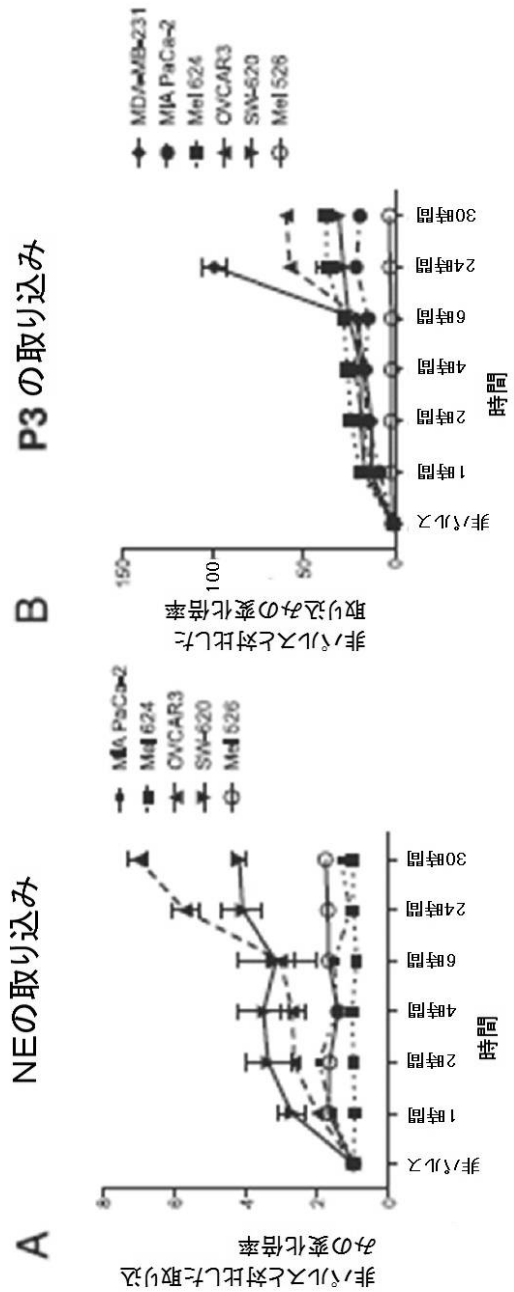
FIG. 19

【図２０】



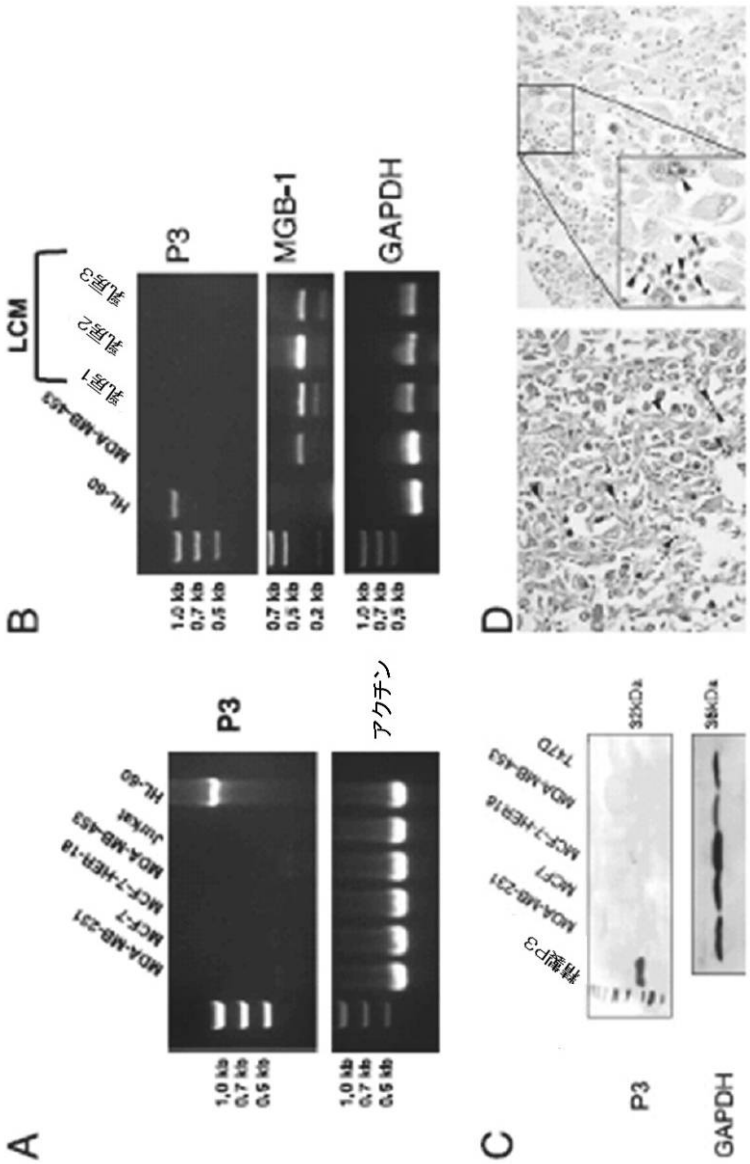
FIGS. 20A-C

【図２１】



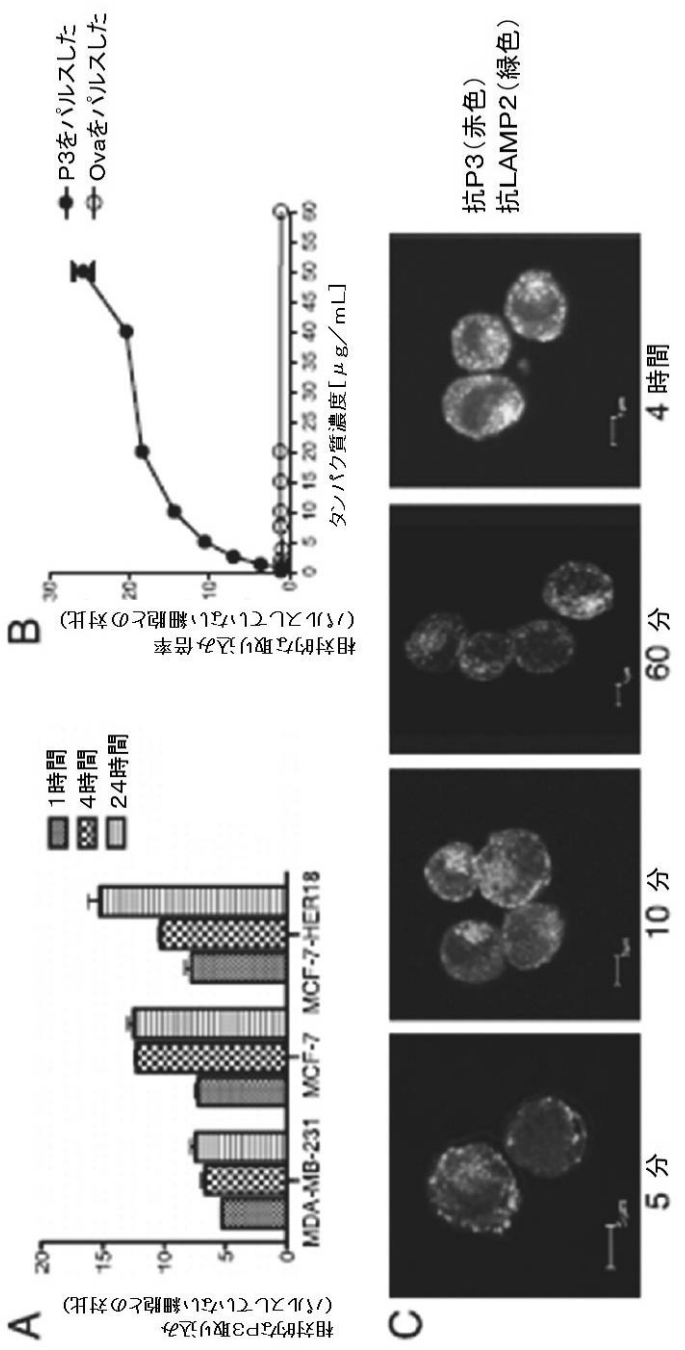
FIGS. 21A-B

【図２２】



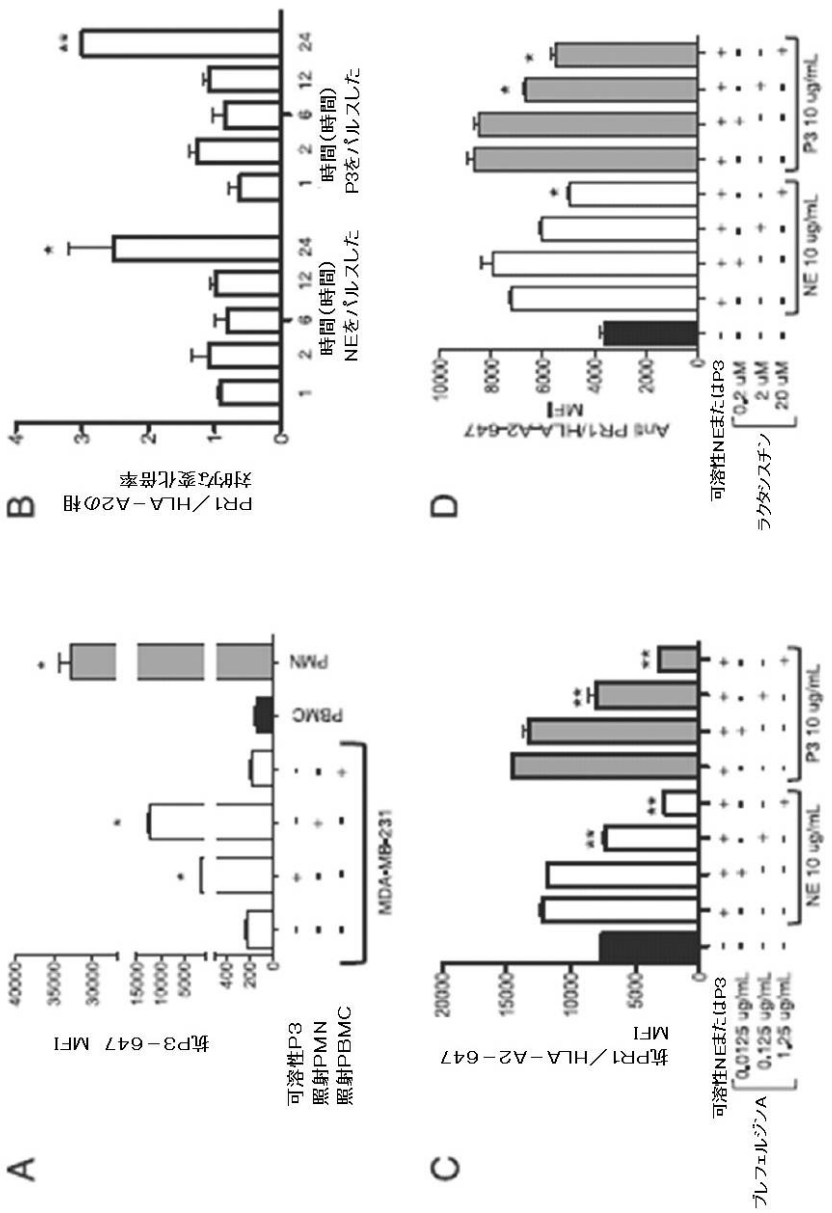
FIGS. 22A-D

【図２３】



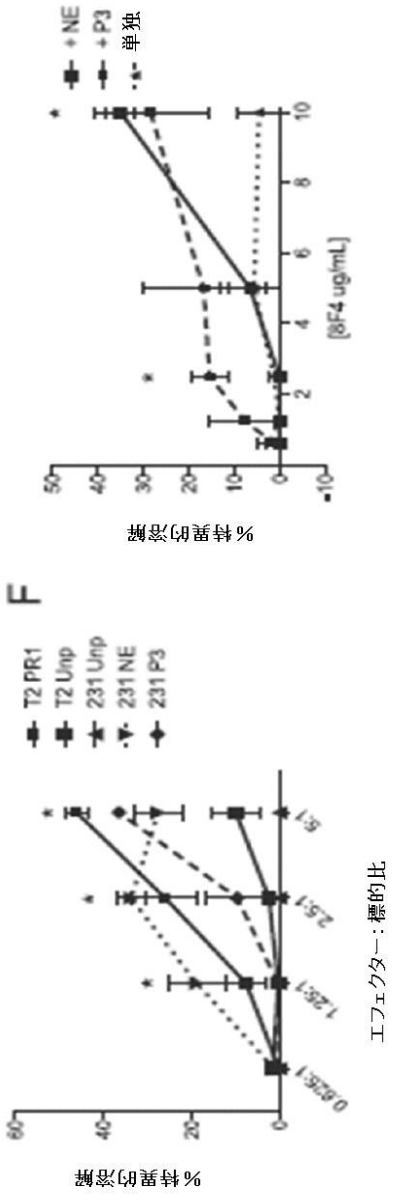
FIGS. 23A-C

【図２４－１】



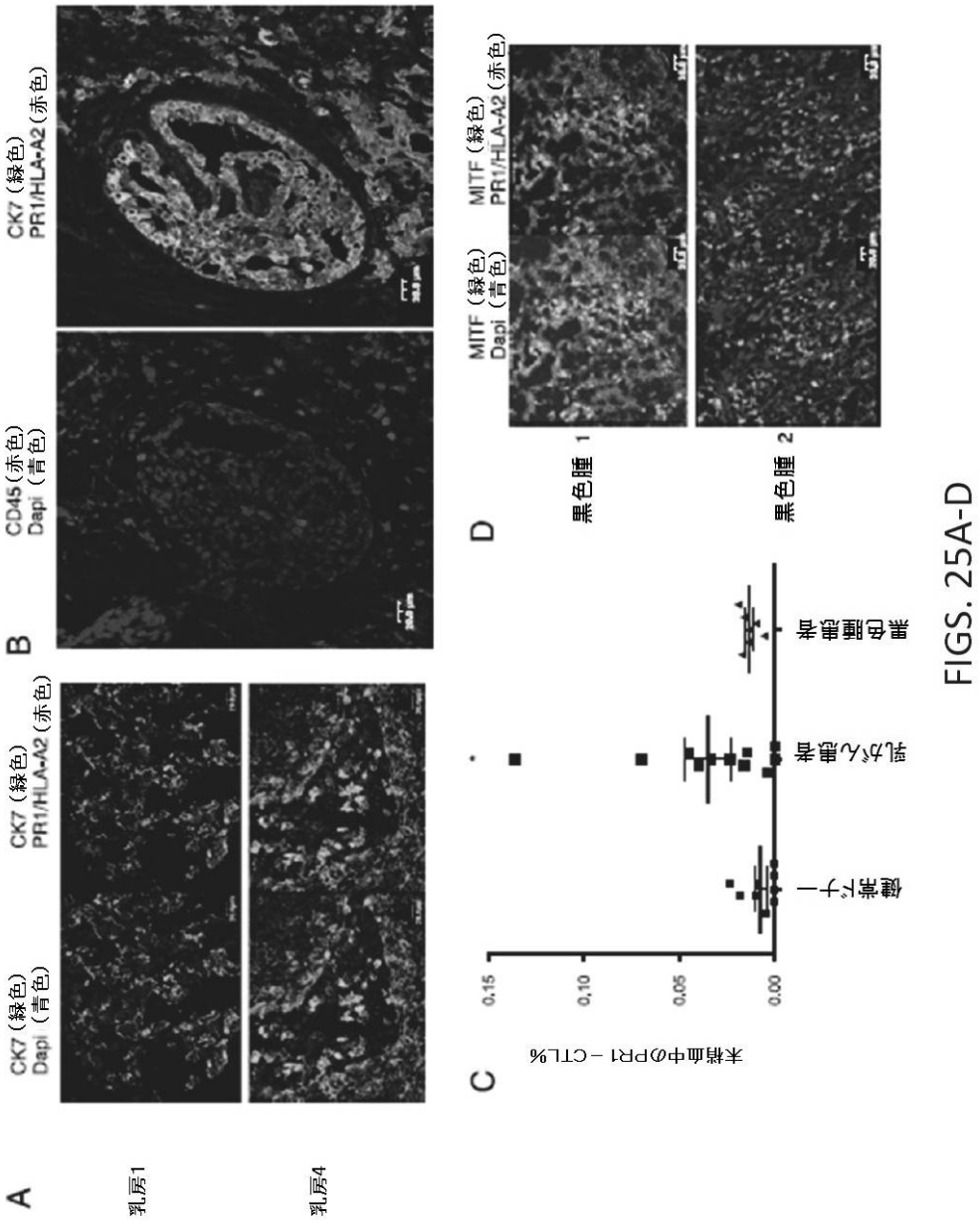
FIGS. 24A-D

【図２４－２】



FIGS. 24E-F

【図２５】

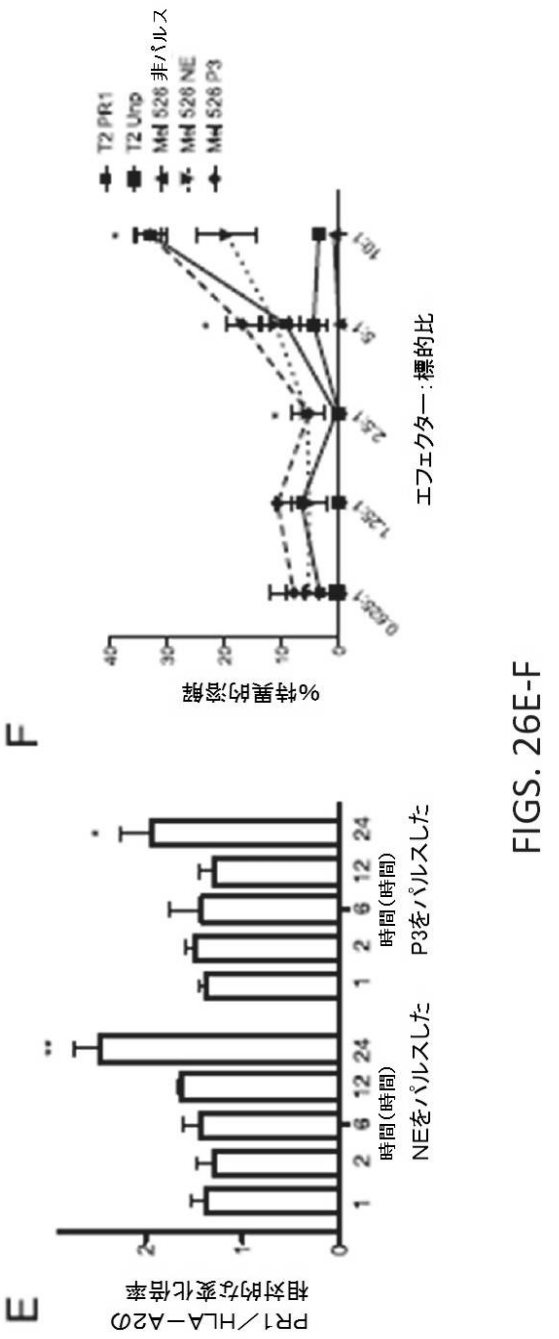


FIGS. 25A-D

【図２６－１】

FIGS. 26A-D

【図２６－２】



FIGS. 26E-F

【配列表】
2015530359000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US13/49368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395, 39/00 (2013.01)
USPC - 424/141.1, 130.1; 435/6.14
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): A61K 39/395, 39/00 (2013.01)
USPC: 424/141.1, 130.1; 435/6.14, 6.1, 4, 91.1, 89, 85, 84, 72, 41; 530/387.1, 386, 380, 350

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Proquest Dialog (Pharmaceutical & Biomedical); Google/Google Scholar; Pubmed/Pubmed central/NCBI Blast; UniProt; Search Terms Used: antibody, immunoglobulin, Human Leukocyte Antigen, HLA-A2, HLA-A*02

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0293620 A1 (MOLLDREM, JJ et al.) December 01, 2011; paragraph [0010]; Claim 1	1-61
A	US 2010/0003254 A1 (HATTORI, K et al.) January 07, 2010; abstract; paragraphs [0017], [0251], [0254]	1-61
A	US 2006/0167230 A1 (KOGA, T et al.) July 27, 2006; abstract; paragraphs [0011], [0044], [0067]	1-61
A	WO 2009/073163 A1 (GELBER, C et al.) June 11, 2009; page 67, line 17 to page 68, line 4	1-61

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 December 2013 (26.12.2013)	13 JAN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US13/49368

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1:c of the first sheet)**

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

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

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

3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	
Ａ６１Ｐ	*35/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*35/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ	
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｙ	
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/04		
Ｇ０１Ｎ	*33/532*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ｇ０１Ｎ	*33/574*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/532	Ａ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
			Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｙ	
			Ｇ０１Ｎ	33/574	Ｄ	
			Ｇ０１Ｎ	33/574	Ａ	
			Ｃ０７Ｋ	19/00		
			Ｃ１２Ｎ	5/00	１０２	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 セルジーバ, アナ
アメリカ合衆国 テキサス ７７０２５, ヒューストン, リンクウッド ドライブ ３４３１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA15 BA53 BA54 CA04 CA06 CA10 CA20 DA02
EA02 EA04 FA02 GA03 GA14 GA18 HA01 HA15
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC06 CC12 CC15 CC24 CE12 DA05
DA13 DA14
4B065 AA91X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA03 BA08 BB13 BB25
BC03 BC07 BD14 BD15 BD18 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA21 AA27 CC03 CC05 CC08 DD63 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA51 EA54 FA74 GA15 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015530359A5	公开(公告)日	2016-08-25
申请号	JP2015521668	申请日	2013-07-03
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	モルドレムジェフリー セルジーバアナ		
发明人	モルドレム, ジェフリー セルジーバ, アナ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/02 C07K16/46 C12P21/08 C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 A61P29/00 G01N33/532 G01N33/53 G01N33/574 C07K19/00 C12N5/10		
CPC分类号	A61K47/6851 A61P29/00 A61K47/6871 C07K16/2833 C07K16/30 C07K16/3061 C07K16/40 C07K2317/24 C07K2317/32 C07K2317/34 C07K2317/567 C07K2317/71 C07K2317/73 C07K2317/92 A61K39/395 A61K45/06 A61K49/0058 G01N33/57488 G01N2333/96433 A61K39/00		
FI分类号	C07K16/28 C12N15/00.ZNA.C C07K16/46 C12P21/08 C12N15/00.A A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61K39/395.L A61K39/395.Y A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P29/00 G01N33/532.A G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/574.D G01N33/574.A C07K19/00 C12N5/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA10 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC06 4B064/CC12 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/BB13 4B065/BB25 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA27 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC08 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/669967 2012-07-10 US 61/702916 2012-09-19 US		
其他公开文献	JP6336696B2 JP2015530359A		

摘要(译)

该说明书描述了在癌细胞表面上HLA呈递的背景下识别HLA-A2限制性肽PR-1的抗体的序列。还提供了这些抗体在癌症和免疫相关疾病的诊断和治疗中的用途。