

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 502025

(P2003 - 502025A)

(43)公表日 平成15年1月21日(2003.1.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	4 B 0 2 9
A 6 1 K 9/08		A 6 1 K 9/08	4 B 0 6 4
9/127		9/127	4 C 0 7 6
39/00		39/00	H 4 C 0 8 5
39/395		39/395	N 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 73数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 618331(P2000 - 618331)

(86)(22)出願日 平成12年5月15日(2000.5.15)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月16日(2001.11.16)

(86)国際出願番号 PCT/US00/13392

(87)国際公開番号 W000/069915

(87)国際公開日 平成12年11月23日(2000.11.23)

(31)優先権主張番号 60/134,419

(32)優先日 平成11年5月17日(1999.5.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/134,432

(32)優先日 平成11年5月17日(1999.5.17)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 エイブイアイ バイオファーマ, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 オレゴン 97333, コーパリス, エヌ.ダブリュー. リサーチ ウェイ 4575, スイート 200

(72)発明者 イヴァーセン, パトリック エル.
アメリカ合衆国 オレゴン 97330, コーパリス, エヌ.ダブリュー.フェア オークス プレイス 5902

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 h c G ワクチンを用いた癌の処置のための併用アプローチ

(57)【要約】

本発明は、被験体へのヒト抗 h C G モノクローナル抗体および/または h C G 免疫原性ペプチドワクチンの投与、その後のそれぞれ h C G - C T G P 1 6、h C G - C T P 2 1 および h C G - C T P 3 7 に対する患者の免疫応答のモニタリング、および h C G 免疫原性ペプチドに対する検出可能な免疫応答に従った予防接種レジメンの調節による癌の免疫療法のための改良された方法に関する。本発明はさらに、h C G 免疫原性ペプチドのイムノアッセイのためのデバイス、方法およびキットに関する。

。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 hCG-CTP37の21マーのN末端フラグメント(hCG-CTP21、配列番号4)と特異的に免疫反応性である、ヒトモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1に記載の抗体であって、該抗体が、ヒト患者における注射に適した形態で溶液中に含まれている、抗体。

【請求項3】 請求項1に記載の抗体であって、該抗体が、hCG-CTP37の16マーのC末端フラグメント(hCG-CTP16、配列番号6)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体と組み合わせられ、そしてヒト患者における注射に適した溶液中に含まれている、抗体。

【請求項4】 請求項1に記載の抗体であって、該抗体が、静脈内投与される場合に、固形腫瘍部位でのリポソームの壊死巣分離を可能にするに十分にリポソームの血液循環時間を延長するために有効なポリエチレングリコールシェルでコーティングされたリポソームに包括されている、抗体。

【請求項5】 hCGに対する免疫応答を分類するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a)それぞれ、hCG-CTP16(配列番号6)、hCG-CTP21(配列番号4)およびhCG-CTP37(配列番号2)に対する第一の患者のhCG抗体レベル、第二の患者のhCG抗体レベルおよび全体の患者のhCG抗体レベルを測定する工程、ならびに

(b)第一の抗体および第二の抗体の該測定されたレベルに依存して、以下の4つの群：

(i)第一の抗体も、第二の抗体も、全体の抗hCG-CTP37抗体も検出不可能である患者(非抗体応答動物)；

(ii)全体の抗hCG-CTP37抗体は検出可能であるが、一方、第一の抗体も第二の抗体も検出不可能である患者(弱い抗体応答動物)；

(iii)第一の抗体の検出可能なレベルを有するが、第二の抗体の検出可能なレベルを有する患者(CTP16のみの抗体応答動物)；ならびに

(iv)第一の抗体および第二の抗体の両方の検出可能なレベルを有する患者

(C T P 1 6 および C T P 2 1 抗体応答動物)

のうちの1つに該患者を分類する工程、
を包含する、方法。

【請求項6】 h C G に対する免疫応答をモニターするための診断デバイス
であって、該デバイスが、以下：

(a) h C G - C T P 3 7 の 1 6 マーの C 末端フラグメント (h C G - C T P
1 6 、 配列番号 6) ；

(b) h C G - C T P 3 7 の 2 1 マーの N 末端フラグメント (h C G - C T P
2 1 、 配列番号 4) ；

(c) h C G - C T P 3 7 ペプチド (配列番号 2) ； ならびに

(d) 検出可能なレポーターで、フラグメント (a) 、 (b) および (c) と
免疫反応性であるヒト抗体を標識するための試薬手段、
を備える、デバイス。

【請求項7】 請求項6に記載のデバイスであって、該デバイスが、フラグ
メント (a) 、 (b) および (c) が付着する固相基板をさらに備え、そして前
記試薬手段が、レポーター標識化抗ヒト免疫グロブリン抗体を含む、デバイス。

【請求項8】 h C G に対する免疫応答をモニターする方法であって、該方
法が、以下の工程：

(a) 固相に結合した固相試薬である、 1 6 マーの C 末端フラグメント (h C
G - C T P 1 6 、 配列番号 6) 、 h C G - C T P 3 7 の 2 1 マーの N 末端フラグ
メント (h C G - C T P 2 1 、 配列番号 4) 、 および h C G - C T P 3 7 (配列
番号 2) と体液サンプルとを、該3つのペプチドと特異的に免疫反応性であるレ
ポーター標識化抗体の存在下で、反応させる工程； ならびに

(b) 固体支持体に結合したレポーター標識化抗体の量から、該3つの体液抗
体のレベルを決定する工程、
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、ヒト抗hCGモノクローナル抗体および/またはhCG免疫原性ペプチドワクチンを投与することにより、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の産生に關与する癌のインビボでの免疫療法のための方法に關する。さらに本発明は、患者の処置レジメンをモニタリングし、そして調節するための方法およびデバイスに關する。このことは、hCGの37マーのC末端フラグメント(hCG-C_{TP37})およびその免疫原性フラグメントに対する免疫応答の評価の結果に基づいている。

【0002】

(参考文献)

Abbas、AKら編、Cellular and Molecular Immunology、第3版、WB Saunders Co.、394-405(1997)

Acevedoら、Cancer 69:1829-1842(1992)

Acevedoら、Cancer Detect. Prev. 1(補遺):447-287(1987)

Braunstein, GD, IMMUNODIAGNOSIS OF CANCER、Herberman, RBおよびMercer, DW編、Marcel Dekker, Inc., New York、673-701頁(1990)

Dirnhofera、Hum Pathol Apr;29(4):377-82(1998)

Fiddes, J.C.およびGoodman, H.M.、Nature、281:351-356(1979)

Fiddes, J.C.およびGoodman, H.M.、Nature、286:684-687(1980)

Fife, KおよびBower, M, Br. J. Cancer 73:131

7 - 1322 (1996)

Hudson, D., J. Org. Chem. 53: 617 - 624 (1988)

Lee, A. C. J.ら、Mol. Immunol., 17: 749 (1980)

Leeら、Mol. Immunol. 17: 749 - 756 (1980)

Triozzi PLおよびStevens VC、Oncol Rep 6 (1): 7 - 17、1999

Triozzi PLら、Clin Cancer Res 3 (12 Pt 1): 2355 - 62、1997。

【0003】

(発明の背景)

予防接種は疾患の兆候を減らし、感染性因子の水平伝達を防ぎ、疾患死亡率を減らすための免疫系を準備させるのための手段である。被験体の免疫系が、外来抗原に対する免疫応答を産生しているということが周知である。また、他の場所で作られた抗体を投与することにより、動物に免疫を与えることも公知である（即ち、受動免疫）。

【0004】

標準的なワクチンは、免疫応答が望まれる炭水化物、ペプチド、ポリペプチドおよびグリコシル化ポリペプチドの投与を含む（能動免疫）。ワクチン投与の代案は、1以上のペプチドまたはポリペプチドに対する予め形成された抗体の投与を含んでいる（受動免疫）。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、慣用的な技術により容易に産生されるが、最近まで、安全な抗体組成物の産生および精製は、比較的成本および時間の掛かることであった。

【0005】

歴史的に、ヒトの処置に受動免疫手順を用いることは非常に制限されてきた。これらの制限は、抗体産生のコストおよびこれらの抗体の長期の投与の必要性のために、癌の様な慢性疾患の処置において最も明らかである。免疫原が、その被験体の免疫系によって通常認識されない可溶性タンパク質または内因性タンパク

質である場合には、さらに難しくなってくる。

【0006】

理論的には、宿主は癌に対する免疫応答を増すとしても、ある種の癌は、宿主の免疫系による攻撃に対して高い抵抗性を示す。この抵抗性は、癌細胞に対する通常の免疫応答を邪魔するという癌の能力に起因すると考えられている。この能力により、癌細胞は成長し、増殖する。

【0007】

通常、絨毛性ゴナドトロピン（CG）（例えば、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG））はヒト胎盤および胚盤胞の細胞によって分泌される。しかし、多くのヒト癌は発癌過程の幾つかの時点においてhCGを産生および保持および/または分泌する。hCGは様々なヒト癌細胞株の膜中（Acevedoら、1992）および癌患者の血清中（Braustein、1990）において検出される。実際に、hCGの -サブユニットのC末端ペプチド（CTP）は、様々な種類の癌によって高度に発現されており、この構成物による免疫化は臨床前の研究において抗腫瘍活性を示す（Acevedoら、1992；Acevedoら、1987）。

【0008】

例えば、hCGおよび/またはそのサブユニットが、ヒト肺癌細胞によって作られることや、hCGポリペプチドまたはその一部分が、腫瘍細胞に対するオートクリン増殖プロモーターとして働くといったことが示されてきている（例えば、Riveraら、1989を参照のこと）。さらなる参考文献はまた、腫瘍産生動物における抗hCG抗体の活発な産生は、hCGワクチンの投与によるものでありうるということを記載している（例えば、米国特許第5,762,931号および米国特許第4,780,312号を参照のこと）。

【0009】

癌細胞の増殖する能力に關与する幾つかの生物学的な活性は、以下のものを含むhCGに歸する；（1）腫瘍アネルギー（腫瘍に対する免疫応答の欠如）との關連、（2）腫瘍血液供給の増強、および、（3）多くの癌細胞にとって、hCGは増殖刺激因子として作用するという知見。

【0010】

疫学的な調査は、ヒト肺癌が、しばしばホルモン（主に、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG））の合成に関連していることを示している。hCGおよびそのサブユニットの循環レベルの増加は、しばしば、悪性疾患の生化学的マーカーとして用いられる。そして、hCGレベルの減少は、ヒト肺腫瘍における首尾良い外科手術のためのマーカーとして用いられる。遊離の α -hCGおよび/または腫瘍に結合した β -hCGは、生殖細胞腫瘍を有する大部分の患者に加えて、膀胱癌、膵臓癌、頸部癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、食道癌、乳癌、胃癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮癌、頸部癌、および子宮内膜癌においても検出される（例えば、Dirnhoferrら、1998；Triozzi PLおよびStevens VC、1999）。hCGおよびその他の性腺刺激ホルモンはまた、カポージー肉腫に関連している（KS, Fife, KおよびBower, M、1996）。

【0011】

結腸直腸癌は、最初の診断から5年以内に罹患した人の約半数を殺傷し、そして、約17人に1人のアメリカ人が、生涯の間に結腸直腸癌を発生する疾患である。転移の進行した結腸直腸癌の大部分の患者にとっては、外科的な介入は選択可能ではない。フルオロウラシル（5-FU）およびロイコボリンを用いた初期段階での化学療法が、第III期にある結腸癌患者にとって標準的な治療方法になる（NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 264:1444-1450、1990；Goldberg RMおよびErlichman C. Oncology 12: 59-63、1998）。5-FU難治性の進行性結腸直腸癌患者に対する治療は現在イリノテカン（irinotecan）である（Van Cutsem EおよびBlijham GH. Semin Oncol 26:13-20、1999ならびにCunningham Dら、Lancet 352:1413-1418、1998）。進行した結腸直腸癌の処置法に対する多くの新しいアプローチは、以下を含む：（a）オキサプラチン（oxaplat

in)、カペシタビン (capecitabine)、ウラシル/テガファー (tegafur) (UFT) のような新薬 (Punt CJ., Cancer 1998; 15: 679-689、1998); (b) モノクローナル抗体 17-1A を用いた受動免疫療法 (Punt CJ., 1998); および (c) 1 以上の癌関連抗原を用いた能動特異的免疫療法 (ASI) に対する幾つかのアプローチ (Goydos JSら、J Sur Res 1996; 63: 298-304 および Vermorken、JBら、Lancet 1999; 353: 345-350)。

【0012】

Stevens に対するオハイオ州の幾つかの特許 (例えば、米国特許第 4, 767, 842 号、同第 4, 855, 285 号、同第 5, 817, 753 号および同第 5, 698, 201 号) は、特に本明細書中で参考として援用されているように、宿主による hCG 抗体に対する産生に基づいた抗癌戦略としての hCG / 破傷風トキソイド改変ペプチドの使用を開示する。

【0013】

様々な研究努力が hCG を発現する癌の処置方法の改良に払われているが、CG 発現性腫瘍を有する癌患者において、循環する CG および細胞結合性 CG レベルを減らすか、または排除するための効率良いかつ安全な方法が必要とされている。

【0014】

(発明の要旨)

従って、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) またはその免疫原性エピトープを発現する癌の免疫療法のための方法を供給することが、本発明の一般的な目的である。

【0015】

本発明は、被験体 (特に、ヒト癌患者) に対して、癌の広がりおよび / または進行を減らし、広がるのを防ぐための手段として、hCG 免疫原性ペプチドワクチン組成物を投与することによって、hCG に対する免疫応答を誘発するための方法に関連している。

【0016】

本発明はまた、単独またはhCG-CTP37のC末端の16マーのフラグメント(hCG-CTP16、配列番号6)と特異的に免疫反応性である、ヒトモノクローナル抗体との組み合わせで、hCG-CTP37のN末端の21マーのフラグメント(hCG-CTP21、配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体組成物に関する。

【0017】

そのようなヒトモノクローナル抗体組成物は、ヒト患者における注射に適した溶液中で調製されうるし、そして、受動免疫療法(特に癌の免疫療法)において有用でありうる。

【0018】

1つの局面において、本発明は、少なくとも4~6週間、約25~500mgの用量で、1週間あたり1~2回、ヒトモノクローナル抗体組成物を投与することによる、癌の免疫療法のための方法を提供している。

【0019】

関連する局面において、ヒトモノクローナル抗体組成物は、適切なキャリアタンパク質へと誘導体化されたhCG免疫原性ペプチドワクチンと共にまたは連続して投与される。あるアプローチにおいて、ペプチドワクチンはhCG-CTP37(配列番号2)であり、これは単独あるいはhCG「ループ」ペプチド(配列番号9)と組み合わせで用いられる。

【0020】

別の局面において、本発明は、hCG-CTP16(配列番号6)、hCG-CTP21(配列番号4)およびhCG-CTP37(配列番号2)に特異的な、患者の抗hCG抗体のレベルをそれぞれ測定することにより、患者におけるhCGへの免疫応答を分類し、そして、相対的な抗体レベルに依存して、次に述べる4つの群のうちの1つに患者を分類するための方法を提供している。:(1)抗CTP16も抗CTP21抗体も全体の抗hCG-CTP37抗体のいずれも検出不可能である患者(非抗体応答動物);(2)全体の抗hCG-CTP37抗体は検出可能であるが、第一の抗体も第二の抗体も検出不可能である患者(弱

い抗体応答動物) ; (3) 第一の抗体の検出可能なレベルを有するが、第二の抗体の検出不可能なレベルを有する患者 (C T P 1 6 のみの抗体応答動物) ; ならびに (4) 第一の抗体および第二の抗体の両方の検出可能なレベルを有する患者 (C T P 1 6 および C T P 2 1 抗体応答動物) 。

【 0 0 2 1 】

本発明は、さらに、患者の状態の無視できる改善によって証拠付けられているように、1回の投与につき少なくとも1mgのペプチドのhCG-CTP37ワクチン用量に対して応答できない癌患者集団の処置方法の改良をも提供する。アッセイは、典型的には、始めの予防接種後9と15週の間で行われる。そして、もし、患者の測定された抗hCG-CTP21抗体のレベルが検出不可能であるか、あるいは、抗hCG-CTP21抗体のレベルより本質的に低い場合には、さらに次のうちの1つ以上から選択されるの予防接種レジメンによって患者を処置する：(i) 始めの投与時よりも多い用量でのhCG-CTP37を連続的かつ間隔をあけた投与；(i i) 患者あたり、投与につき1mg未満のCTP37ペプチドに対応する用量でのhCG-CTP37の連続的かつ間隔をあけた投与；(i i i) hCG-CTP37 (配列番号2) ワクチンと組み合わせた適切なキャリアへと誘導体化されたhCGループペプチド (配列番号9) から構成されるプロモーターワクチンの連続的かつ間隔をあけた投与；(i v) 適切なキャリアへと誘導体化されたhCGループペプチド (配列番号9) から構成されるプロモーターワクチンの連続的かつ間隔をあけた投与、その後の患者あたり、投与につき1mg未満のCTP37ペプチドの後者のワクチンの用量でのhCG-CTP37 (配列番号2) の連続的かつ間隔をあけた投与；(v) 適切なキャリアへと誘導体化されたhCG-CTP21 (配列番号4) から構成されるCTP37N末端ペプチドワクチンの連続的かつ間隔をあけた投与；(v i) 少なくとも1～2週間に一度の、hCG-CTP21 (配列番号4) に対し特異的に免疫反応性を示すヒトモノクローナル抗体の連続的かつ間隔をあけた投与；(v i i) 少なくとも1～2週間に一度、hCG-CTP16 (配列番号6) に特異的な免疫反応性を持つヒトモノクローナル抗体と共に、hCG-CTP21 (配列番号4) に特異的な免疫反応性を持つヒトモノクローナル抗体の、連続的かつ間隔をあけ

た投与；ならびに(viii)hCG-CTP21(配列番号4)に特異的な免疫反応性を持つヒトモノクローナル抗体と組み合わせたhCG-CTP37ワクチンの、連続的かつ間隔をあけた投与。

【0022】

この実施形態の関連する局面において、本発明は、ペプチドおよび検出可能なレポーターに対して免疫反応性であるヒト抗体をラベルする試薬手段と共に、hCG-CTP16ペプチド、hCG-CTP21ペプチドおよびhCG-CTP37ペプチドを含むhCGに対する免疫応答モニタリングのための診断デバイスおよび方法を提供する。

【0023】

本発明のこれらおよび他の目的ならびに特徴は、本発明の以下の詳細な説明を添付の図面と組み合わせて読むと、より完全に理解される。

【0024】

(発明の詳細な説明)

I. 定義

「hCGペプチド」、「hCG免疫原性ペプチド」または「hCGエピトープ」という用語は、全体のhCGタンパク質のアミノ酸配列の一部(しかし、すべてではない)と同じアミノ酸配列をもつhCGペプチドを意味しており、そして、このペプチドは全体のhCGタンパク質の持つ生物学的機能または活性のうちの少なくとも一つ、例えば、全長hCGタンパク質の免疫学的活性を保持したフラグメントを持っている。

【0025】

「hCG免疫原性ペプチド」または「hCG免疫原性 - サブユニットペプチド」あるいは「そのフラグメント」という用語は、本明細書中で用いられる場合、それぞれ、hCGまたはhCGの - サブユニット由来のアミノ酸配列のことであり、これらは、被験体に投与されたときに細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答を誘発することができる。

【0026】

hCG免疫原性ペプチドに関連する「抗原性前駆体」または「前駆体」という

術語は、本明細書中で使用される場合、被験体によりhCG免疫原性ペプチドへとプロセスされうるhCGペプチドのことである。

【0027】

本明細書中で使用される場合、「hCG C末端ペプチド」または「hCG CTP37」は、hCGの C-サブユニットのC末端の37アミノ酸のことであり（「CTP37マー」、図2A、配列番号2）、ネイティブの配列、あるいはその改変体またはアナログ（これは、等価な生物学的活性を有する）として示されている。

【0028】

幾つかの場合、hCG CTPはN末端に付加的なメチオニンを持つ（「CTP38マー」と言われる、図2B、配列番号3）。

【0029】

「ループ」ペプチドという術語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの C-サブユニットの38～57アミノ酸（図2H、配列番号9）のことを意味する。ここで、この38～57アミノ酸は、ネイティブ配列、あるいはその改変体またはアナログ（これは、等価な生物学的活性を有する）の形においては、ジスルフィド架橋によって連結されている。

【0030】

「16マー」または「C末端エピトープ」という術語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの C-サブユニットの130～145アミノ酸（図2E、配列番号6）のことを意味しており、ネイティブの配列、あるいはその改変体またはアナログ（これは、等価な生物学的活性を有する）として示されている。

【0031】

「17マー」という術語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの C-サブユニットの130～145アミノ酸（図2F、配列番号7）を意味しており、キャリアタンパク質への誘導体化の目的のために、付加されたC末端システインを有する。

【0032】

「21マー」または「N末端エピトープ」という術語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの -サブユニットの110～130アミノ酸(図2C、配列番号4)のことを意味しており、ネイティブの配列、あるいはその改変体またはアナログ(これは、等価な生物学的活性を有する)として示されている。

【0033】

本明細書中でhCG免疫原性ペプチドまたはエピトープに関連して用いられているように、「非ネイティブ」という術語は、エピトープのアミノ酸配列が、ネイティブのものに見られるのと同じhCG免疫原性エピトープのアミノ酸配列と一つ以上のアミノ酸まで異なることを意味する。

【0034】

「非ネイティブ」のアミノ酸配列は、一つ以上の「保存的な」もしくは「非保存的な」アミノ酸置換、アミノ酸挿入または欠失を含むか、あるいは、ある場合には、ペプチドのN末端またはC末端に付加アミノ酸を有し得る、改変体のアミノ酸配列を有するhCG免疫原性エピトープを含み得る。そのような「非ネイティブの」hCG免疫原性ペプチドは、それが由来したネイティブのペプチドの生物学的活性(免疫原性)を保持している。

【0035】

「ペプチドキャリアータンパク質結合体」という術語は、「キャリアータンパク質へと誘導体化されたペプチド」という術語と互換的に用いられており、そして、免疫原性を高めるためのキャリアータンパク質に連結しているhCG免疫原性ペプチドをいう。

【0036】

本明細書中において用いられているような「hCG免疫原性ペプチドワクチン」または「hCGペプチドワクチン」という術語は、本明細書中でhCG-CTP16(配列番号6)およびhCG-CTP21(配列番号4)で例証されているように、適切なキャリアー分子へと誘導体化されたhCG免疫原性ペプチドをいう。

【0037】

本明細書中において用いられているような「hCGワクチン」または「ワクチン」という術語は、適切なキャリアー分子、hCG-CTP37（配列番号2）および/または1つ以上のより受動的に投与された抗hCGヒトモノクローナル抗体へと誘導体化されたhCG免疫原性ペプチド、をいう。

【0038】

本明細書中において用いられているような「免疫応答」という術語は、hCG免疫原性エピトープまたは細胞傷害性T細胞応答のような細胞性免疫応答に対する抗体の産生のような体液性免疫応答をいう。

【0039】

本明細書中において用いられているような「免疫担当 (immunocompetent) 被験体」という術語は、免疫原性エピトープにさらされた免疫応答細胞を有する被験体をいい、これは、免疫原性エピトープに対する細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答をマウントすることが可能である。

【0040】

本明細書中においてhCGペプチドに関連して用いられているような免疫原性「エピトープ」あるいは「抗原決定基」という術語は、B細胞媒介性および/またはT細胞媒介性のhCGに対する免疫応答を産生するhCGアミノ酸配列の一部をいう。エピトープは独特であることが好ましい；すなわち、特異的hCGエピトープに対して生じる免疫応答は、他の抗原との交叉反応性をほとんどまたはまったく示さない。

【0041】

「機能的に等価」という術語は、本明細書中に記載されており、そして配列番号2、4、6および9で表される、ネイティブ配列のhCG免疫原性ペプチドと等価な生物学的活性を有する、hCG免疫原性ペプチドについてのアミノ酸配列を意味する。関連する生物学的活性は、免疫学的活性、すなわちhCG免疫原性ペプチドワクチンを投与された被験体における免疫応答を誘発する能力である。

【0042】

アミノ酸残基は、本明細書中で、標準的な一文字表記で表される：A、アラニン；C、システイン；D、アスパラギン酸；E、グルタミン酸；F、フェニルア

ラニン；G、グリシン；H、ヒスチジン；I、イソロイシン；K、リシン；L、ロイシン；M、メチオニン；N、アスパラギン；P、プロリン；Q、グルタミン；R、アルギニン；S、セリン；T、スレオニン；V、バリン；W、トリプトファン；Y、チロシン。

【0043】

本明細書中で用いられているような「能動免疫」という術語は、被験体の免疫応答細胞による免疫応答を誘導するためのhCGペプチドワクチンの使用を意味している。

【0044】

本明細書中で用いられているような「投与」という術語は、hCG免疫原性ペプチドワクチンと接触して、被験体の免疫応答細胞を生み出すことを意味している。たいていの場合、そのような「投与」は、hCG免疫原性ペプチドワクチン組成物の、被験体への皮下注射または筋肉内注射のいずれかにより行われる。

【0045】

本明細書中で用いられているような「受動免疫」という術語は免疫アプローチのように抗体を被験体に直接投与することを意味している。

【0046】

本明細書中で用いられているような「アジュバント」という術語は、ワクチンが投与された被験体の全免疫応答を上昇しうる物質のことである（すなわち、非特異的な免疫刺激物質として作用することによる）。アジュバントはまた、より迅速に免疫応答を誘発するために用いられうる。

【0047】

本明細書中において用いられているような「連続的に間隔をあけた投与」という術語は、初期投与、それに続く初期投与に従う、様々な時間間隔における1以上の「ブースター」投与を含むhCG免疫原性ペプチドワクチン処置レジメンをいう。「ブースター」投与は、規則的に間隔をあけたものであることもあるし、そうでないこともありうる。

【0048】

本明細書中で用いられているような「ヒト患者における注射に適した溶液」

ヒト患者における注射に適切な形態で」および「薬学的に受容可能」という術語は互換的に用いられ得、そして生理学的な悪影響を産生せずにヒト被験体に投与され得るキャリアー、希釈剤および試薬を含む組成物をいう。

【0049】

本明細書中で用いられているような「処置する」、「処置」および「治療」という術語は、治療法、予防療法 (prophylactic therapy) および予防療法 (preventative therapy) をいう。

【0050】

本明細書中で用いられているような「用量」という術語は、患者に投与された抗hCGヒトモノクローナル抗体またはhCG免疫原性ペプチドワクチンの量をいう。以下に記載のように、この量は、被験体、免疫原およびアジュバントの存在により変化する。

【0051】

癌の処置と関連して、本明細書中で用いられるような「処置効力の可能性」という術語は、hCG免疫原性ペプチドに対する免疫応答、腫瘍の大きさ、および患者の生存時間を含む様々な臨床の終点の評価により決定されたような、所定の処置戦略の潜在的な有効性をいう。

【0052】

本明細書中で用いられているように、「ワクチン応答に失敗する」という術語は、一般的に、患者がhCG CTP37またはその免疫原性エピトープに対して、検出された免疫応答を有さないことを意味している。

【0053】

本明細書中で用いられているように、「体液」という術語は、尿、唾液、血漿、血液、髄液および他の生物学的起源のサンプルを含む被験体から得られた様々な種類のサンプル型をいう。

【0054】

本明細書中で用いられているように、hCG免疫原性ペプチドに対する免疫応答のイムノアッセイに関連して、「分析」という術語は、定性的 (ポジティブ/ネガティブ) または定量的のいずれかである評価でありうる。

【0055】

(I I . 癌およびhCG)

悪性腫瘍は、被験体によって外来物として認識されるような蛋白抗原を発現し得、そして、免疫サーベイランスは、腫瘍のいくつかの型の増殖および広がりを制限し得るが、免疫系は、被験体を、致死性のヒト癌から効果的に保護しない。

【0056】

このような腫瘍は、迅速な増殖および広がりのために、免疫系を壊し得、および/または腫瘍細胞は、免疫破壊を回避しうる。提唱されたこのような回避機構は、以下を含むがこれらに限定されない：(1)細胞傷害性Tリンパ球(CTL)による認識に必要とされる、クラスI MHCを伴うプロセスされた腫瘍ペプチド抗原のわずかな複合体、あるいは複合体形成に至らない腫瘍細胞の表面上のクラスI MHC抗原の下方調節、(2)腫瘍細胞によるクラスII MHC分子のほとんどない発現あるいはまったくない発現に起因して、CTLの活性化が欠如すること、(3)CD4+ヘルパーT細胞の活性化のための二次シグナルを供給する、同時刺激性細胞表面マーカーの欠如、ならびに(4)fas-リガンドのように、抗腫瘍応答を抑制する、腫瘍細胞により産生される因子(Abbas, Akら、1997)。

【0057】

研究者らはまた、ある種のポリペプチドは、ヒトおよびその他の哺乳動物の両方の補助因子であり、および/またはヒトおよびその他の哺乳動物の両方における新生物形成細胞により分泌されると決定した。そのような補助因子は、ホルモン、特に絨毛性ゴナドトロピン(CG)に対する、生化学的、生物学的、および免疫学的な類似性を持っている。その表面において、ある癌腫は、CGあるいは免疫学的類似物質を発散している。それによって、表面的に被験体に内在する物質から形成されているらしく、従って比較的非免疫原性である表面を、被験体の免疫系に提示する。

【0058】

遊離の hCG (100 μ g/ml を超える) は、生殖細胞腫瘍を有する大部分の患者に加えて、膀胱癌患者(47%)、膵臓癌患者(32%)および頸部

癌患者(30%)において検出されてきている。腫瘍結合性 hCGは結腸直腸癌(52%)、肺癌(34%)、膵臓癌(31%)食道癌(28%)、乳癌(24%)および膀胱癌(21%)において検出されてきている(Braunstein, 1990)。さらに、免疫組織化学的な検出は、およそ8~19%の胃癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮癌、頸部癌および子宮内膜癌が報告されている(Braunstein, 1990)。

【0059】

悪性癌の効果的な処置は、新生物形成細胞のさらなる広がりを防ぎ、死亡率を減らすことを妨げているに違いない。すなわち、疾患を患っている患者の生存時間を、増加させているのである。現在の処置方法は、免疫系の非特異的な刺激、受動免疫療法、ならびに単独または化学療法および/または放射線療法と組み合わせた、殺された腫瘍細胞または腫瘍細胞抗原、ポリペプチドまたはそのフラグメントを用いたワクチン投与を含む。

【0060】

活性免疫研究は、hCG/破傷風トキソイド改変ポリペプチドは、ラットに、CG様の物質に結合する毒性の強いラット乳腺癌腫R3230ACの腫瘍細胞の注射に対する保護を与えていることを示してきている。受動免疫はまた、Lewis肺癌腫瘍、マウスにおけるウイルス誘導性白血病および肉腫腫瘍に対する保護を生じる(例えば、米国特許第5,698,201号を参照のこと)。

【0061】

アジュバントとして、CRL1005(Optivax; Vaxel Inc, Norcross, GA)と共に、筋肉内注射される、単独あるいはhCG「ループ」ペプチドと組み合わせたhCGのC末端ペプチドは、転移性癌患者における早いフェーズの臨床試験において評価されてきた。測定可能な抗hCG抗体産生は研究に帰着した。しかし、抗癌活性の評価は、研究の構成要素ではなかった(Triozzi PLおよびStevens VC, Oncol Rep 6(1):7-17, 1999; Triozzi PLら, Clin Cancer Res 3(12 Pt 1)2355-62, 1997)。

【0062】

(I I I . 受動免疫療法のためのヒトモノクローナル抗体)

A . ヒトモノクローナル抗体の産生

インビボ治療のための抗体の価値および能力は、当該分野で長い間認識されつづけてきた。ひとつのアプローチが、抗抗体免疫応答を避けるために患者により簡単には外来物質であると「認識されない」、ヒトあるいは「ヒト化された」モノクローナル抗体の発展を経験してきた。いくつかの場合において、ヒトB細胞ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の使用は、様々な疾患状態の処置において潜在能力を秘めている。しかし、多くのネイティブヒト腫瘍抗原は、ヒトにおいては免疫原性ではなく、従って、ヒト抗原に対する抗体を産生するヒトB細胞を単離するのはむずかしいことでありうる。

【 0 0 6 3 】

キメラの、あるいは「ヒト化された」抗体は、マウスおよびヒト抗体遺伝子フラグメントの位置から遺伝子操作され、そしてアセンブルされている。そのようなキメラおよびヒト化された抗体は、変わりつつある量のマウス抗体タンパク質配列を保持している。したがって、これは、患者に投与されたとき、ヒト抗マウス免疫応答を引き起こしうる。

【 0 0 6 4 】

組換えDNAアプローチは、ヒトC[H]領域および非ヒト(例えば、マウス)抗原結合領域(可変領域)を持つキメラ抗体の産生に焦点を当てている。これらのキメラ抗体は、一般的に所望の抗体の可変領域および/または定常領域をクローニングし、所望の可変および定常領域を持つ、機能的なキメラ抗体のすべてあるいは一部をコードしている単一の構築物にクローニングされた配列を結合させ、構築物を抗体を発現できる細胞に導入し、そしてキメラ抗体を安定して発現している細胞を選択する事により産生される。

【 0 0 6 5 】

ヒト化された形の非ヒト(例えば、マウス)抗体は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントである(例えば、F_v、F_ab、F_ab'、F_(a b')₂あるいは他の抗原結合配列領域)。ヒト化された抗体は、ヒト抗体の相補的決定領域(CDR)由来の残基が、マウス、ラットまたはウサ

ギのような非ヒト種のCDR由来の残基と置換されるヒト抗体を含む。たいていの場合、ヒト化抗体は、すべてあるいは本質的に全てのCDR領域が非ヒト起源であるような可変領域ドメインを含む。いくつかの例として、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置換されている。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である(例えば、Jonesら、1986; Riechmanら、1988; Verhoeyenら、1988を参照のこと)。本発明の方法における有用性を見出すために、ヒト化された抗体は、ペプチド抗原に対する高い親和性、および他の有利な生物学的性質を維持していなければならない。

【0066】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを用いて産生され得る(HoogenboomおよびWinter、1991; Marksら、1991)。

【0067】

繊維状のファージディスプレイベクターあるいは「ファージミド」は、種々の新しい免疫学的特性を持つモノクローナル抗体のラージライブラリーの効率良い調製を可能にするということが繰り返し示されてきている。繊維状ファージのコートタンパク質の膜アンカードメインは、ファージ複製のアセンブリ段階の間の遺伝子産物および遺伝子と関連している。そして、コンビナトリアルライブラリからの抗体のクローニングおよび発現に用いられてきている(例えば、Kangら、1991を参照のこと)。この技術は、相補的なヒト抗体を提供し、この抗体は、「ヒト化」抗体において見出されるような齧歯類起源のフレームワークまたはCDR残基を有さない。

【0068】

ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法は、一般に、(1)抗体Vドメイン遺伝子を、線維状バクテリオファージの大コートタンパク質遺伝子または小コートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングする工程、(2)アセンブルしたヘテロダイマー抗体分子を発現させる工程であって、その結果、機能的抗体フラグメントを、ファージ粒子の表面上に提示させる、工程、(

3) 免疫アフィニティー技術を使用してその表面発現ファージ粒子を単離する工程を包含し、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子を選択をする(例えば、Hoogenboom、HRら、1998; 米国特許第5,804,440号を参照のこと)。

【0069】

免疫されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーを構築し得、そして異なるアレイの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体を、ファージディスプレイを使用して単離し得る(Marks、1991; Griffithsら、1993)。

【0070】

ファージディスプレイによって得られたヒト抗体の親和性は、より高い親和性の抗体を選択するために、この重鎖および軽鎖のV領域遺伝子を、免疫されていないドナーから得たVドメイン遺伝子の天然に存在する改変体のレパートリーで連続的に置換することによって改善され得る(例えば、GriffithsおよびDuncan、1998; Aujameら、1997)。ファージディスプレイによって得られたヒト抗体の多様性もまた、重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子をシャッフリングすることによって(Kangら、1991)、クローン化した重鎖遺伝子のCDR3領域を変更することによって(Barbasら、1992)、ならびにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってライブラリー内にランダム変異を導入することによって(Gramら、1992)、増加され得る。

【0071】

あるいは、免疫に際して、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の完全なレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物(例えば、異種マウス(xenomice))を生成することが、現在可能である。このアプローチにおいて、ヒト重鎖Ig遺伝子および軽鎖Ig遺伝子の両方の大きいフラグメントを、マウス生殖系列に挿入し、抗原特異的な完全なヒト抗体の広範なレパートリーを産生し得るマウス株を作製されている。

【0072】

この異種マウスは、ヒト重鎖(h mu)およびヒトK軽鎖(h K)を発現

するB細胞、またはh muおよびマウス (m) 軽鎖を発現するB細胞を産生する。これらのマウスは、多様な成体様レパートリーを有する有意なレベルの完全ヒト抗体を産生し、抗原での免疫に際して、抗原特異的な完全ヒトモノクローナル抗体を生成する(例えば、Jakobovitsら、1995; Jakobovits、1995を参照のこと)。

【0073】

このような異種マウス由来のヒトモノクローナル抗体は、ヒトにおける補体結合のための正確なIg重鎖(IgG1)を有していないかもしれない。このような場合、異種マウスハイブリドーマ由来のこの抗体をコードするmRNAを使用して、IgG1重鎖のcDNAが挿入されているcDNAを獲得し得る。次いで、このカセットを、当業者によって慣用的に使用されている手順を使用して、発現ベクターに挿入し得、そして続いて、トランスジェニックヤギの作製に使用する。トランスジェニックヤギを作製し、ここで、誘導性プロモーターが、このコードされるタンパク質がヤギの乳汁に分泌されるように、このタンパク質の発現を誘発し得る。この手順は、大量のヒトモノクローナル抗体の比較的低費用での産生を可能にする。

【0074】

好ましいアプローチにおいて、本発明の抗hCG免疫原性ペプチド抗体は、ヒト抗体を含み、これは、上記のように、異種マウス技術、およびその後のIgG重鎖置換を使用して産生され、クローン化されて、そしてトランスジェニックヤギ中で発現される。

【0075】

(B. ヒトモノクローナル抗体を含む治療組成物)

従って、本発明は、癌の免疫治療を実施するために有用な治療組成物を意図する。

【0076】

hCG CTP37のエピトープと特異的に免疫反応性である1以上の異なるヒトモノクローナル抗体を含む治療組成物、および本発明の免疫治療方法においてのその組成物の使用を、本明細書中に記載する。好ましいヒトモノクローナル

抗体としては、抗hCG-CTP16（配列番号6）および抗hCG-CTP21（配列番号4）が挙げられる。

【0077】

ヒトモノクローナル抗体の治療有効量は、所望の効果を達成するように、すなわち、患者の血清中または腫瘍細胞上に存在するhCGを中和して、それによって、患者の血清中または腫瘍細胞上の検出可能なhCGの量を減少するか、またはhCGを取り除くように算出される量である。このような減少は、患者の生存時間の増加と相関する。

【0078】

本発明の治療組成物は、hCG CTP37のエピトープと特異的に免疫反応性である少なくとも1種のヒトモノクローナル抗体と一緒に、生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤を含み、これらの抗体は、活性成分として溶解または分散され、従来慣行に従って処方される。

【0079】

注射または注入のための治療組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクル中の抗体の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態を取り得、そして懸濁剤、安定化剤および/または分散剤のような成分を含み得る。あるいは、組成物は、乾燥形態であり得、適切な滅菌液体で使用前に再構成される。

【0080】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、注射または経時的な緩やかな注入によって、非経口的に投与され得る。多くの場合、本発明のヒトモノクローナル抗体を含む治療組成物は、静脈内投与されるが、しかし、他の送達手段も意図される。例えば、本発明のヒトモノクローナル抗体は、静脈内、腹腔内、筋内、皮下、腫瘍内に注射され得るか；または経皮的または蠕動手段によって投与され得る。

【0081】

抗体投与のための適切なレジメンは可変性であるが、初回投与、それに続く引き続く投与による1回以上の間隔を置いた繰返し用量によって代表される。本発明の処置方法において、抗hCG抗体は、hCG免疫原性ペプチドワクチンと一緒にまたは連続的に投与され得る。

【0082】

本発明の方法における使用のための抗体の治療有効量は、代表的に、患者において検出可能なhCGの量を減少するに十分な薬学的に受容可能な組成物中の抗体の量である。

【0083】

投薬量は、約25mg/患者/投与～約500mg患者/投与で変化し得、ここで、平均的患者は70kgである。一般に、抗hCG抗体は、4～6週間の期間で1週間あたり1～2回投与される。しかし、いくつかの場合において、このような抗体の投与は、不定期で継続され得る。抗体処置の期間は、さらに以下に議論されるように、hCG-CTP16、hCG-CTP21およびhCG-CTP37に対する患者の免疫応答に基づいて、hCG免疫原性ペプチドワクチン投与と共に評価される。

【0084】

本発明の免疫治療方法が、hCG免疫原性ペプチドワクチンと共にでの、hCGと特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体の投与を含む場合、ヒトモノクローナル抗体の用量は、hCG免疫原性ペプチドの免疫アッセイの結果に基づいて調整され得ることが理解され、この免疫アッセイは、初回のhCGワクチン投与の約9～15週間後に開始して行われる。

【0085】

より詳細には、hCG-CTP37の16マーのC末端フラグメント(hCG-CTP16、配列番号6)、hCG-CTP37の21マーのN末端フラグメント(hCG-CTP21、配列番号4)およびhCG-CTP37ペプチド全体(配列番号2)に対する患者抗体のレベルを、種々の時間でモニターする。hCG-CTP37ヒトモノクローナル抗体の受動投与のための投薬レジメンは、必要とされる場合、hCGペプチドワクチン投薬レジメンと組み合わせて調整され、患者の体液中のhCG-CTP16(配列番号6)およびhCG-CTP21(配列番号4)の両方に対する、検出される抗体を生じる。

【0086】

好ましくは、hCGワクチンの投与は、hCG-CTP37(配列番号2)、

hCG-CTP16(配列番号6)およびhCG-CTP21(配列番号4)に対するあるレベルの検出される抗体を生じる。さらにより好ましくは、このhCGペプチドワクチン投与は、hCG-CTP16(配列番号6)およびhCG-CTP21(配列番号4)の両方に対するあるレベルの検出される抗体を生じ、ここで、この両ペプチドに対する免疫応答は、類似の程度である。

【0087】

(IV. ワクチンとしてのhCG免疫原性ポリペプチド)

(A. hCG免疫原性エピトープ)

「hCG免疫原性エピトープ」または「hCG抗原性エピトープ」は、hCGに対する免疫応答を誘発する、任意のアミノ酸配列またはアミノ酸配列の組み合わせである。

【0088】

1つの好ましい実施形態において、hCGワクチンは、hCGのサブユニットのC末端ペプチド(CTP37、配列番号2)を含み、これは、単独で、または1以上のさらなる免疫原性hCGペプチドと組み合わせて、および/あるいは1以上の抗hCG抗体の受動投与と一緒に、被験体に投与される。

【0089】

本発明の方法における使用のための好ましい免疫原性エピトープは、hCGのサブユニットのC末端37アミノ酸(CTP37)、およびそれから誘導されるペプチドであり、これらは、単独であるか、またはhCGのサブユニットのアミノ酸38~57(「ループ」ペプチド)と組み合わせられる。

【0090】

hCGのサブユニットの「ループ」ペプチドは、ヒト黄体化ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)および甲状腺刺激ホルモン(TSH)のその対応する領域に実質的に類似する。従って、「ループ」ペプチドまたはこれらのアナログは、CTP37ペプチド、それらのアナログ、またはCTP37ペプチドから誘導されるペプチドと組み合わせて投与される。

【0091】

「ループ」ペプチドおよびCTP37ペプチドの組み合わせ投与は、以下のよ

うに達成され得る：(1)この2つのペプチドを、化学連結するかまたは直列に合成し、その後、適切なキャリアタンパク質への誘導体化し得るか；(2)両方のペプチドを、最初に互いに化学連結することなく、同じキャリアに化学的に誘導体化し得るか；(3)この2つのペプチドを別々のキャリアに誘導体化し得、そして2つの得られた結合体の混合物を、処置する被験体に投与し得るか；あるいは(4)この2つのペプチドを別々のキャリアに誘導体化し得、そしてこの2つの得られた結合体を、処置される被験体に別々に投与し得る。

【0092】

本明細書中に記載のhCGワクチンは、本発明の方法において使用され、hCG-CTP37の2以上のエピトープに対して免疫応答を生じ得る、hCGワクチンの型の代表である。一般に、このペプチド抗原のサイズは、少なくともhCGの1以上の免疫原性エピトープを含むに十分大きくあるべきである。本発明の開示によって予測される最も小さい有用な免疫原性エピトープまたはフラグメントは、一般に、ほぼ約8個連続するアミノ酸残基長であり、約8～約40以上のアミノ酸程度が好ましい。

【0093】

hCGのカルボキシ末端37アミノ酸内の2つの主要なエピトープである、N末端21アミノ酸エピトープ(CTP21)およびC末端16アミノ酸エピトープ(CTP16)が存在する(CTP16; Berger Pら、Mol and Cell Endocrinol 125:33-43, 1996)。図2A、2Cおよび2Eは、それぞれ、CTP37、CTP21およびCTP16のアミノ酸配列を示す。hCG予防接種戦略は、CTP37、CTP21およびCTP16の1以上の投与を包含し得る。しかし、研究によって、CTP16エピトープに対する免疫応答が免疫優性であることが示されており、従って、CTP37の単独またはCTP21と組み合わせでの投与が好ましい。

【0094】

一般に、hCG免疫原性ペプチドワクチンの初回投与は、少なくとも1mgのhCG-CTP37からなる。hCG免疫原性ペプチドワクチンまたは受動投与される抗hCG抗体の追加すなわち「ブースター」投与は、通常、以下の1以上

の継続的な間隔を空けた投与で、癌患者に提供される：(i) 初回投与において提供されるよりも多い用量のCTP37ワクチン(配列番号2)；(ii) 1.0mg/患者/投与未満のCTP37ペプチドに対応する用量のCTP37ワクチン；(iii) hCG-CTP37ワクチンとの組み合わせでの、適切なキャリアに誘導体化されたhCGループペプチド(配列番号9)から構成されるプロモーターワクチン；(iv) 適切なキャリアに誘導体化されたhCGループペプチド(配列番号9)から構成されるプロモーターワクチン、その後の1.0mg/患者/投与未満のCTP37ペプチドのワクチン用量での、hCG-CTP37ワクチンの継続的な間隔を空けた投与；(v) 適切なキャリアタンパク質に誘導体化されたhCG-CTP21(配列番号4)から構成されるペプチドワクチン；(vi) hCG-CTP37の21マーのN末端フラグメント(hCG-CTP21、配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体の、1~2週間毎に少なくとも1用量の受動投与；(vii) hCG-CTP16(配列番号6)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体との組合せでのhCG-CTP21(配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体の、1~2週間毎に少なくとも1用量の受動投与；および(viii) hCG-CTP21(配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体との組合せでの、hCG-CTP37ワクチン(配列番号2)の継続的な間隔を空けた投与。

【0095】

1つのアプローチにおいて、hCGワクチンのCTP37成分の量は、1.0mg未満であり、好ましくは、0.5mgである。関連する局面において、CTP37ワクチンが「ループ」ワクチンと一緒に患者に投与される場合、hCGワクチンのCTP37成分の量は、1.0mg未満であり、好ましくは、0.5mgであり、そして「ループ」ワクチンの量は、CTP37ペプチドの量と等しいか、またはそれより多い。

【0096】

全ての場合において、hCG免疫原性ペプチドは、キャリア分子(例えば、タンパク質)に結合体化される。一般的に、各hCG免疫原性ペプチドは、キャリ

アタンパク質に別々に結合体化される。1より多い結合体化hCG免疫原性ペプチドが、所定の患者に対する処置レジメンに含まれる場合、このhCGペプチドワクチンは、同じ時点または異なる時点で患者に投与され得る。多くの場合において、結合体化hCG免疫原性ペプチドは、継続的な間隔を空けた投与と一緒に投与される。

【0097】

(B. hCGペプチドワクチンの調製)

種々のhCGポリペプチド鎖は、組換えDNA技術を介して、宿主細胞(例えば、細菌、酵母および培養哺乳動物細胞)において発現されている(例えば、Fiddes, J. C. およびGoodman, H. M. 1979、ならびにFiddes, J. C. およびGoodman, H. M. 1980を参照のこと; これらの文献は、それぞれ、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のサブユニットおよびサブユニットのクローニングを記載する)。

【0098】

hCGのサブユニットのアミノ酸配列は、GenBank登録番号180437として入手可能であり、そして本明細書中で配列番号1として示され、この配列を使用して、本発明の方法における使用のためのペプチドを選択した。

【0099】

hCG免疫原性ペプチドは、Fmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)化学(本質的には、D. Hudson, 1988に記載される)またはBoc(tert-ブチルオキシカルボニル)化学のいずれかを使用して化学合成された。アミノ酸合成のための技術は、現在入手可能な実験装置(例えば、Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)を用いて、当業者に慣用的に使用される。合成後、ペプチドは、一般に、HPLCによって精製され、そしてペプチドの完全性および確実性は、エドマン分解、その後の従来の配列決定分析または質量分光分析(例えば、インタクトなペプチドのNMR分析)によって決定される。各々の合成ペプチドの免疫原性は、hCG CTP37抗体を有することが既知の被験体から採取した体液(例えば、血清または血漿)中の抗体との免疫反応性を決定するための、種々のインビト

口免疫アッセイによって個々に決定される。

【0100】

(C. 改変体すなわち改変されたhCG免疫原性ペプチド)

多くの場合において、本発明の方法において使用されるhCG免疫原性ペプチドは、ネイティブhCG免疫原性ペプチドと同じ配列を有する。しかし、いくつかの場合において、hCG免疫原性ペプチドは、改変体hCGペプチドである。

【0101】

アミノ酸のいくつかの置換は、そのフラグメントの免疫原性特性に影響を及ぼすことなく可能である。

【0102】

標準的な置換クラスは、共通の側鎖特性および天然中の相同タンパク質における最も高い頻度の置換に基づく6つのクラスであり、例えば、標準Dayhoff頻度交換マトリクス(Dayhoff)によって決定される。これらのクラスは、クラスI: Cys; クラスII: Ser、Thr、Pro、Hyp、AraおよびGly(小さい脂肪族側鎖およびOH基側鎖を提示する); クラスIII: Asn、Asp、GluおよびGln(水素結合を形成し得る中性側鎖および負に荷電した側鎖を提示する); クラスIV: His、ArgおよびLys(塩基性の極性側鎖を提示する); クラスV: Ile、ValおよびLeu(分枝脂肪族側鎖を提示する)ならびにMet; およびクラスVI: Phe、TyrおよびTrp(芳香族側鎖を提示する)である。さらに、各グループは、関連するアミノ酸アナログ(例えば、クラスIVのオルニチン、ホモアルギニン、Nメチルリジン、ジメチルリジンまたはトリメチルリジン、ならびにグループVIのハロゲン化チロシン)を含み得る。さらに、これらのクラスは、L型およびD型の立体異性体を含み得るが、Lアミノ酸が置換に好ましい。

【0103】

一旦アミノ酸の置換または改変が作製されると、この改変体hCG免疫原性ペプチドは、インビトロ免疫アッセイにおいて免疫原性についてスクリーニングされる。

【0104】

本明細書中に記載のhCG免疫原性ペプチドのアミノ酸配列は、このペプチドまたはポリペプチドが、適切な生物学的活性（例えば、免疫原性）を維持する限り、さらなる残基（例えば、さらなるN末端アミノ酸またはC末端アミノ酸）を含み得、そしてなお依然として、本明細書中に開示される配列のうちの1つと本質的に同じである。

【0105】

hCG免疫原性ペプチドのアミノ酸は、等価的分子またはさらに改善された分子を作製するような様式で変化され得る。この生物学的活性を規定するものは、このhCGペプチドの免疫原性である。特定のアミノ酸配列置換が、アミノ酸配列およびそれをコードする核酸配列において作製され得、より大きな生物学的有用性または活性（免疫原性）を有するhCGペプチドの発現を生じる。いくつかの場合において、このような変化は、等価な生物学的有用性および活性を維持しながら他の利点（例えば、安定性またはより所望の薬理学的特性）を提供する。

【0106】

このような変化の作製において、アミノ酸の疎水性親水性（*hydropathic*）指数が考慮され得る。特定のアミノ酸は、類似の疎水性親水性の指数またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換され得、そして生物学的機能的に等価なタンパク質をなお獲得し得る（*Kyte*および*Doonittle*、1982）。このようは変化の作製において、疎水性親水性指数が+/-2のアミノ酸置換が好ましく、疎水性親水性指数が+/-1のアミノ酸置換が特に好ましく、そして疎水性親水性指数が+/-0.5のアミノ酸置換がより特に好ましい。類似のアミノ酸の置換は、疎水性に基づいて効果的に作製され得ることもまた、当該分野において理解される（米国特許第4,554,101号）。このような変化において、疎水性値が+/-2のアミノ酸置換が好ましく、疎水性値が+/-1のアミノ酸置換が特に好ましく、そして疎水性値が+/-0.5のアミノ酸置換がさらにより特に好ましい。

【0107】

本発明の方法における使用のための改変体hCG免疫原性ペプチドは、患者に対する投与のために改良された性質を有し得るが、このようなペプチドは、本明

細書中に記載されるネイティブな配列のhCG免疫原性ペプチドの免疫原性を保持する。

【0108】

(V. 抗hCG免疫応答を産生するための処置レジメン)

(A. インビボ投与)

hCGワクチンのインビボ投与は、アジュバントまたは接種部位に免疫系細胞を補充する能力を有する他の物質の存在下での接種によって達成され得る。hCG免疫原性ワクチンは、単独またはhCG-CTP37の16マーのC末端フラグメントと特異的に免疫反応性である、受動投与されるヒトモノクローナル抗体(例えば、hCG-CTP16、配列番号6; および/またはhCG-CTP21、配列番号4)と組み合わせて投与され得る。

【0109】

本発明の方法において、防御免疫が所望される被験体の免疫応答細胞が、単独、またはhCG-CTP37のエピトープと特異的に免疫反応性である、1つ以上のヒトモノクローナル抗体と組み合わせて、hCG免疫原性ペプチドワクチンに暴露される。防御免疫は、被験体における循環hCGまたは腫瘍関連hCGの量の減少をもたらすことによって、このような暴露後に達成され得る。抗体媒介性免疫応答および細胞媒介性免疫応答の両方は、hCGワクチンの抗癌活性に寄与し得る。

【0110】

本発明の方法において、hCG免疫原性ペプチドワクチンおよび/またはヒトモノクローナル抗体は、投薬処方に適合する様式および免疫原性であり、そして治療的に有効な量で投与される。投与されるべき量は、処置されるべき被験体に依存する(例えば、ペプチドワクチンに応答するための個々の免疫系の能力を含む)。

【0111】

一般的に、本発明の免疫療法の方法は、すでに癌を有する被験体に適用可能である。これは、被験体が、癌の関連型を診断する、当業者に利用される1つ以上の基準によって、癌を有すると診断されていることを意味する。このような基準

のうちの1つは、癌が、癌細胞の表面上のhCGの発現によって特徴付けられ、いくつかの場合においては、患者の血漿および/または他の体液における循環hCGの存在によってさらに特徴付けられることである。癌の例示的な型としては、シスプラチンを用いた処置に無反応性である(refractile)、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、肺癌および精巣癌が挙げられる。

【0112】

いくつかの場合において、本発明の免疫療法の方法は、癌を発生するか、または1つ以上の診断基準が癌を発症し得ることを示す高い危険性にある被験体に適用可能である。

【0113】

手術、放射線療法および化学療法は、現在、癌の処置のための主な方法である。抗hCG CTP37ヒトモノクローナル抗体を用いた受動免疫および/またはhCGペプチドワクチンベースの処置が、このような他の癌治療と組み合わせられ得ることが意図される。本明細書中に記載される方法が、手術、放射線療法および化学療法のいずれか1つを用いた共同かつ付加的な様式で相互作用することが認識される。いくつかの場合において、癌を処置するための改良された方法が、従来の癌処置(例えば、抗hCG CTP37ヒトモノクローナル抗体の投与および/またはhCGペプチドワクチンの投与による受動免疫と一緒に化学療法または放射線療法)を組み合わせる。

【0114】

(B. hCGペプチドワクチン組成物)

本発明は、hCGのサブユニットのC末端ペプチド(これ自体では、実質的に非免疫原性であるペプチド)に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。これは、被験体への投与の前に、ペプチドをキャリア分子に結合体化することによって果たされる。

【0115】

本発明の方法において、適切なキャリア分子(例えば、タンパク質)に誘導体化される1つ以上のhCG免疫原性ペプチドの免疫学的に有効な量が、hCG免疫原性ペプチドまたは患者の状態において改善を生じるに効果的な様式でキャリ

ア分子に結合体化されたペプチドから構成されるワクチンの、首尾良い、時間をおいた投与によって、癌患者に投与される。

【0116】

好ましい実施形態において、hCG免疫原性ペプチドは、当業者に公知の多くのキャリア分子のうちの1つに結合される。キャリアタンパク質は、被験体の免疫系に十分な大きさでなければならず、外来性質を認識し、そしてそれに対する抗体を発生するために投与される。

【0117】

いくつかの場合において、キャリア分子は、hCG免疫原性ペプチドに直接結合される。他の場合においては、キャリア分子とhCG免疫原性ペプチドとの間に挿入されたリンカー分子が存在する。

【0118】

1つの例示的な実施形態において、結合反応は、ペプチドの遊離のスルフヒドリル基を必要とする。このような場合において、N末端システイン残基が、ペプチドが合成される場合に、ペプチドに付加される。例えば、CTP17（配列番号7）は、hCGサブユニットペプチド（CTP16（配列番号6））と同じ配列、およびキャリア分子に対するCTP16の結合を容易にする、付加されたN末端システイン残基を有する。

【0119】

例示的な実施形態において、伝統的なスクシンイミド化学が使用されて、キャリアタンパク質にペプチドを連結する。このようなペプチド：キャリアタンパク質結合体を調製するための方法は、一般的に、当業者に公知であり、そしてこのような方法のための試薬は、市販されている（例えば、Sigma Chemical Co. から）。一般的に、約5～30のペプチド分子が、1つのキャリアタンパク質分子につき結合体化される。

【0120】

例示的なキャリアタンパク質としては、例えば、キーホールリンペットヘモシアン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）、フラゲリン、インフルエンザサブユニットタンパク質、破傷風トキソイド（TT）、ジフテリアトキソイド

(DT)、コレラトキソイド(CT)、種々の細菌性熱ショックタンパク質、グルタチオンレダクターゼ(GST)または天然のタンパク質(例えば、チログロブリンなど)のようなタンパク質が挙げられる。当業者は、適切なキャリア分子を容易に選択し得る。

【0121】

好ましい実施形態において、hCG免疫原性ペプチドは、ジフテリア毒素(DT)に結合体化される。

【0122】

いくつかの場合において、キャリア分子は、Ficoll 70またはFicoll 400(スクロースおよびエピクロロヒドリンの合成コポリマー)のような非タンパク質、Dextran T70のようなポリグルコースである。

【0123】

結合体化の程度は、患者の状態に関連した、いくつかまたはすべてのhCG効果を中和するに十分なレベルで、癌患者による免疫応答を誘導するに十分でなければならない。これが、ペプチド、キャリア分子および患者に依存して変化することが認識される。

【0124】

本発明は、上記のようなhCGワクチン組成物を提供し、ここで、各々のhCG免疫原性ペプチドは、同じまたは異なるキャリアタンパク質に結合される。

【0125】

hCGワクチン組成物は、選択されたキャリア分子に結合された、同じまたは異なるhCG免疫原性ペプチドの、単一または複数のコピーを含み得る。本実施形態の1つの局面において、hCGワクチン組成物は、ポリペプチドに連続して組み合わせられ、そして同じキャリアに結合された隣接配列を有するか、または有さない、異なるhCG免疫原性ペプチドを含み得る。あるいは、hCG免疫原性ペプチドは、ペプチドとして、同じまたは異なるキャリアに個別に結合され得、そして得られたhCG免疫原性ペプチド-キャリア結合体は、共に混合されて1つの組成物を形成し得るか、または同時もしくは異なって、個々に投与され得る。

【0126】

例えば、hCG免疫原性ペプチドは、Lee A.C.J.,ら、1980の方法によって、ジフテリアトキシソイド(DT)1分子あたり約15~20のペプチド分子を使用して、システインの(cysteiny l)側鎖を介して、ジフテリアトキシソイド(DT)キャリアタンパク質に共有結合され得る。

【0127】

一般に、誘導体化hCGペプチドワクチン組成物は、ビヒクルとともに投与される。ビヒクルの目的は、ワクチン調製物を乳化することである。多数のビヒクルが、当業者に公知であり、そして効果的な乳化剤として機能する任意のビヒクルは、本発明の方法における有用性を見出す。投与のための好ましい1つのビヒクルは、スクアランおよび/またはスクアレンとのマンニドモノオレアート(mannide monooleate)の混合物を含む。スクアレンは、本発明のワクチンにおける使用のためのスクアランに好ましく、そして好ましくは、マンニドモノオレアートの容積によって、部分あたりのスクアレンおよび/またはスクアランの比は、約4:1~約20:1である。

【0128】

hCGワクチンの投与から生じた免疫応答の規模をさらに増加させるために、免疫学的アジュバントが、ワクチン処方物に含まれる。当業者に公知の例示的なアジュバントとしては、水/油乳濁液、非イオン性コポリマーアジュバント(例えば、CRL 1005(Optivax; Vaxcel Inc., Norcross, GA)、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、アルミニウムの水性懸濁液、および水酸化マグネシウム、細菌性内毒素、ポリヌクレオチド、高分子電解質、脂肪親和性アジュバント、ならびに合成ムラミルジペプチド(norMDP)アナログが挙げられる。患者への投与のためのhCGワクチン組成物への含有のための好ましいアジュバントは、norMDPアナログ(例えば、N-アセチル-nor-ムラミル(murany l)-L-アラニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-ムラミル(murany l)-(6-0-ステアロイル)-L-アラニル-D-イソグルタミン、およびN-グリコール-ムラミル(murany l)-L- Abu-D-イソグルタミン(Ciba-Geigy

L t d .)) である。たいていの場合、ペプチド結合体に関連したアジュバントの質量比は、約1 : 2 ~ 1 : 20である。好ましい実施形態において、ペプチド結合体に関連したアジュバントの質量比は、約1 : 10である。hCGワクチンのアジュバント成分が、その結合体でhCG免疫原性エピトープに対する免疫応答を最適化するために変化され得ることが認識される。

【0129】

投与の直前に、hCG免疫原性ペプチドキャリアタンパク質結合体およびアジュバントが、適切な溶媒に溶解され、そして乳化剤またはビヒクルが添加される。例えば、hCG免疫原性ペプチドキャリアタンパク質の結合体組成物が、norMDPと共に、そしてスクアレン/マンニドモノオレアート乳化剤をさらに含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)に溶解されたDTに結合体化したCTP37ペプチドを含み得る。

【0130】

本発明の免疫原性プロテイナーゼ組成物における使用のための、適切な薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に周知である。このようなキャリアとしては、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、または被験体へのhCGワクチン導入に適した任意の生理学的に適合性の媒体が挙げられる。

【0131】

当業者に公知の多数の薬物送達機構が利用されて、本発明のhCG免疫原性ペプチドを投与し得る。徐放性調製物は、ポリマーの使用によって達成されて、本発明の方法においてペプチドまたは抗体を複合体化するか、または吸収し得る。制御された送達は、高分子(例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはプロタミンスルフェート)を使用して果たされ得、その濃度は、ペプチドワクチンの放出速度を変更し得る。

【0132】

いくつかの場合において、hCGペプチドは、例えば、ポリステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ乳酸またはエチレンビニルアセテートコポリマーから構成されるポリマー粒子に取り込まれ得る。あるいは、hCGペプチドワクチンは

、当業者に一般的に公知の方法を使用して、マイクロカプセル、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、ナノカプセルまたはマクロエマルジョンに包括され得る。

【0133】

(C. 処置レジメン)

本発明のhCGワクチンは、皮内(ID)注射、筋肉内(IM)注射、皮下(SC)注射、静脈内(IV)注射、腹腔内(IP)注射および腫瘍周囲(peritumoral)注射を含むがこれらに限定されない経路によって投与され得る。投与の好ましい経路は、皮下(SC)注射である。

【0134】

本発明の癌の処置方法において、患者は、薬学的に受容可能な組成物中の適切なキャリア分子に誘導体化された、2.0mg未満のhCG-CTP37(配列番号2)、そして好ましくは、1.0mg未満のhCG-CTP37の初期投与を受ける。いくつかの場合において、初期ワクチンは、2.0mg未満のhCG-「ループ」ペプチド(配列番号9)とともに、2.0mg未満のhCG-CTP37(配列番号2)の組み合わせを含む。ここで、各々のhCG免疫原性ペプチドは、適切なキャリア分子に別々に誘導体化される。1つの好ましい実施形態において、患者は、0.5mgのhCG「ループ」ペプチド(配列番号9)とともに、0.5mgのhCG-CTP37(配列番号2)の組み合わせから構成される初期ワクチンを受ける。

【0135】

初期ワクチン後の9週と15週との間の期間の後、hCG-CTP37の16マーのC末端フラグメント、hCG-CTP37の21マーのN末端フラグメントおよびhCG-CTP37に対する患者の抗体レベルは、イムノアッセイにおいて評価される。このイムノアッセイは、抗癌処置の前、抗癌処置の間および抗癌処置の後に、一定の間隔をおいて繰り返され得る。

【0136】

イムノアッセイの結果に依存して、hCGワクチンの処置レジメンは、hCGに対する免疫応答を最適化するために調整され得る。好ましい投薬レジメンは、

hCG-CTP37の16マーのC末端ペプチドフラグメントおよびhCG-CTP37の21マーのN末端ペプチドフラグメントの両方に対する患者の免疫応答は、両方のペプチドに対する免疫応答の類似の規模で生じ、これは、初期ワクチン投与後9週始めから15週に検出可能である。

【0137】

CTP21（配列番号4）に対する免疫応答が検出可能であり、そしてより好ましくは、CTP21に対する検出された免疫応答が、CTP16（配列番号6）に対する免疫応答と類似の規模であることが好ましい。「類似の規模」とは、CTP21およびCTP16に対する検出された免疫応答が、50%より多く異ならず、好ましくは、20%より多く異なることを意味する。換言すれば、CTP21（配列番号4）に対する免疫応答は、CTP16（配列番号6）に対する免疫応答よりも実質的に低くない。

【0138】

hCGに対する患者の免疫応答は、以下のように分類され得る：

(1) 血漿中に検出可能な抗CTP37抗体を有さない患者（非抗体応答動物）；(2) 全体の抗hCG-CTP37抗体は検出可能であるが、抗CTP16抗体も抗CTP21抗体も検出不可能である患者（弱い抗体応答動物）；(3) 血漿中に、検出可能な抗CTP37抗体および抗CTP16抗体を有するが、検出可能な抗CTP21抗体を有さない患者（CTP16のみの抗体応答動物）；ならびに(4) 血漿中に、検出可能な抗CTP37抗体、抗CTP16抗体および抗CTP21抗体を有する患者（CTP16およびCTP21抗体応答動物）。

【0139】

イムノアッセイ後、群(1)、(2)、(3)における患者、および群(4)における患者（ここでCTP21のN末端フラグメントに特異的な抗体レベルが、hCG-CTP37のCTP16のC末端フラグメントに特異的な抗体レベルよりも実質的に低い）は、1つ以上の以下：(i) 初期投与において提供される用量よりも多い用量での、hCG-CTP37（配列番号2）ワクチンの連続的な間隔をあけた投与；(ii) 1mg未満のCTP37ペプチド/患者/投与に

対応する用量での、hCG-CTP37（配列番号2）ワクチンの連続的な間隔をあけた投与；（iii）hCG-CTP37（配列番号2）ワクチンと組み合わせた、適切なキャリアに誘導体化されたhCGループペプチド（配列番号9）から構成されるプロモーターワクチンの連続的な間隔をあけた投与；（iv）適切なキャリアに誘導体化されたhCGループペプチド（配列番号9）から構成されるプロモーターワクチンの連続的な間隔をあけた投与、続いて1mg未満のCTP37ペプチド/患者/投与の後半のワクチンの用量での、hCG-CTP37（配列番号2）ワクチンの連続的な間隔をあけた投与；（v）適切なキャリアタンパク質に誘導体化されたhCG-CTP21（配列番号4）から構成されるCTP37のN末端ペプチドワクチンの連続的な間隔をあけた投与；（vi）1～2週間毎に少なくとも1度の、hCG-CTP21（配列番号4）と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体の連続的な間隔をあけた投与（vii）1～2週間毎に少なくとも1度の、hCG-CTP16（配列番号6）と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体と一緒に、hCG-CTP21（配列番号4）と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体の連続的な間隔をあけた投与；ならびに（viii）hCG-CTP21（配列番号4）と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体と組み合わせた、hCG-CTP37ワクチンの連続的な間隔をあけた投与、から選択される予防接種レジメンで処置され得る。

【0140】

イムノアッセイ後、群（4）における患者（ここでCTP21のN末端フラグメントに特異的な抗体レベルが、hCG-CTP37のCTP16のC末端フラグメントに特異的な抗体レベルと規模が類似する）は、上記の（i）～（viii）の1つ以上から選択される予防接種レジメンでまた処置され得る。

【0141】

好ましくは、hCGワクチンの投与は、hCG-CTP37（配列番号2）、hCG-CTP16（配列番号6）およびhCG-CTP21（配列番号4）に対する検出された抗体のレベルを生じる。さらにより好ましくは、hCGペプチドワクチン投与は、hCG-CTP16（配列番号6）およびhCG-CTP2

1 (配列番号4) の両方に対する検出された抗体のレベルを生じ、ここで、両方のペプチドに対する免疫応答は、規模が類似する。

【0142】

上記の処置レジメンが、例示的な目的のために示され、そして処置レジメンが、上記のように、hCGに対する患者の免疫応答に依存して、必要に応じて調整されることが理解される。本発明の1つの局面は、hCG-CTP37、hCG-CTP21およびhCG-CTP16に対する免疫応答の間欠性のモニタリング、ならびにこのようなモニタリングの結果に基づいた処置レジメンにおける対応する調整に関する。

【0143】

(D. 用量範囲)

本発明の前に、癌の処置のためのhCG免疫原性ペプチド結合体の初期投与は、一般的に、適切なキャリアタンパク質に誘導体化された少なくとも1.0mgのhCG免疫原性ペプチドを含んだ。実施例1に示された研究結果は、このような用量が、処置の下で大多数の患者において、hCG-CTP37のC末端エピトープ(CTP16、配列番号6)およびhCG-CTP37のN末端エピトープ(CTP21、配列番号4)の両方に対する免疫応答を生じず、従って、結腸直腸癌のための有効な処置レジメンではないかもしれないことを示唆する。

【0144】

実施例1にさらに示されるように、hCG-CTP37のC末端エピトープ(CTP16、配列番号6)およびhCG-CTP37のN末端エピトープ(CTP21、配列番号4)の両方に対する免疫応答を示した、フェーズIIの臨床試験における患者は、有意に増加した生存時間を有した。

【0145】

本発明は、CTP37のC末端エピトープ(CTP16、配列番号6)およびCTP37のN末端エピトープ(CTP21、配列番号4)の両方に対する免疫応答を生じる癌の処置のための方法に関する。これは、(1)単独または「ループ」ペプチド(配列番号9)の量と組み合わせた、1.0mg未満のhCG-CTP37(配列番号2)ペプチド/患者/投与(各々は、適切なキャリア分子に

誘導体化される) ; (2) 適切なキャリアに誘導体化されたhCGループペプチド(配列番号9)、その後の1.0mg未満のhCG-CTP37(配列番号2)ペプチド/患者/投与 ; (3) 適切なキャリアタンパク質に誘導体化されたhCG-CTP21(配列番号4)ペプチドワクチン ; (4) 1~2週間毎に少なくとも1度投与される、hCG-CTP21(配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体 ; (5) 1~2週間毎に少なくとも1度投与される、hCG-CTP16(配列番号6)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体と一緒に、hCG-CTP21(配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体 ; ならびに(6) hCG-CTP21(配列番号4)と特異的に免疫反応性であるヒトモノクローナル抗体と組み合わせた、hCG-CTP37ワクチン(配列番号2)の1つ以上の投与によって果たされ得る。

【0146】

1つの好ましい実施形態において、適切なキャリア分子に誘導体化された0.5mgのCTP37(配列番号2)は、単独または「ループ」ペプチド(配列番号9)の量と組み合わせて投与される。代表的には、所定の患者に投与される「ループ」ペプチド(配列番号9)の量は、CTP37(配列番号2)の量に等しいか、またはCTP37(配列番号2)の量よりも多い。例えば、CTP37ワクチンが、「ループ」ワクチンとともに投与される場合、ワクチンのCTP37成分の量は、一般的に、1.0mg未満、好ましくは、0.5mgであり、そして患者に投与される「ループ」ワクチンの量は、CTP37(配列番号2)の量に等しいか、またはCTP37(配列番号2)の量よりも多い。本実施形態のさらなる局面において、25~500mgの抗hCG-CTP21ヒトモノクローナル抗体および/または抗hCG-CTP16ヒトモノクローナル抗体はまた、好ましくは1週間あたり約1~2回患者に投与される。

【0147】

抗hCG-CTP21ヒトモノクローナル抗体および/または抗hCG-CTP16ヒトモノクローナル抗体の、処置レジメンおよび/または量における、CTP37(配列番号2)+「ループ」ペプチド(配列番号9)の量またはCTP

37 (配列番号2) - 「ループ」ペプチド (配列番号9) の量は、処置の下での患者の体液における抗CTP37抗体、抗CTP16抗体および抗CTP21抗体についてのイムノアッセイの結果に基づいて、連続的投与の前に改変され得る。

【0148】

好ましい処置レジメンは、CTP37、CTP16およびCTP21に対する検出可能な免疫応答を生じ、この応答は、実施例1においてさらに詳述されるように、結腸直腸癌患者における増加した生存時間と相関する。

【0149】

(VI. hCGに対する免疫応答の評価)

hCGワクチンの投与の有効性の決定に有用な臨床の終点は、以下への免疫応答の評価：hCG-CT37 (配列番号2)、hCG-CTP16 (配列番号16)、hCG-CTP21 (配列番号4)、腫瘍のサイズの決定および患者の生存時間 (例えば、週単位で) の決定を含む。

【0150】

1つの局面において、本発明は、例えば、hCGワクチンの投与後の9~15週間の、癌患者におけるhCGに対する免疫応答の分類手段を提供する。この分類手段は、以下に対する抗体のレベルを測定することによる：CTP37のC末端フラグメント、hCG-CTP16 (配列番号6)、CTP37のN末端フラグメント、hCG-CTP21 (配列番号4)、およびCTP37。続いて患者を、hCG-CTP16、hCG-CTP21およびhCG-CTP37に対する免疫応答に基づいて、以下の4つの群の1群に分類する：(1) 血漿中に検出可能な抗CTP37抗体を有さない患者 (非抗体応答動物)；(2) 抗hCG-CTP37抗体の総計は検出可能であるが、抗CTP16抗体も抗CTP21抗体も、検出可能でない患者 (弱い応答動物)；(3) 血漿中に検出可能な抗CTP37抗体および抗CTP16抗体を有するが、抗CTP21抗体は検出可能でない患者 (CTP16のみの抗体応答動物)；および(4) 血漿中に検出可能な抗CTP37抗体、抗CTP16抗体および抗CTP21抗体を有する患者 (CTP16およびCTP21抗体応答動物)。

【0151】

本発明は、hCGに対する免疫応答のモニタリング用の診断デバイスを含む。このデバイスは、以下を含み：hCG-CTP37のC末端フラグメントのアミノ酸配列を有するペプチド（hCG-CTP、配列番号6）、hCG-CTP37のN末端フラグメントのアミノ酸配列を有するペプチド（hCG-CTP21、配列番号4）およびヒト抗体を標識するのに有効な試薬（例えば、レポーター標識抗ヒト免疫グロブリン抗体）、ペプチドに免疫反応性であるヒト抗体を検出する。

【0152】

このような診断デバイスは、免疫学の当業者に一般的に公知であり、そして種々の被験体の体液中の抗体を分析するために、日常的に使用される。

【0153】

いくつかの場合、このデバイスは、hCGペプチドが付着される固相基板を含む。

【0154】

本発明はさらに、以下の工程を行うことによるhCGに対する免疫応答のモニタリング方法を含む：以下の(1)(2)および(3)のアミノ酸配列を有するペプチドと体液サンプルを反応させる工程；(1)hCG-CTP37のC末端フラグメント（hCG-CTP16、配列番号6）、(2)hCG-CTP37のN末端フラグメント（hCG-CTP21、配列番号4）および(3)hCG-CTP37（配列番号2）、および各ペプチドと免疫反応性であるサンプルにおける抗体を検出する工程。このアッセイは定量的であり、従って、各抗体のレベルを比較し、各ペプチドに対する免疫応答の相対的な大きさを決定するために使用されることが好ましい。

【0155】

本発明の方法は、イムノアッセイ（例えば、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫沈降、ウエスタンブロット、ドットブロット、FACS分析および当該分野で公知の他の方法に、一般的に適用可能である。

【0156】

1つの好ましい実施形態において、イムノアッセイは、固体支持体上に固定化されたhCGペプチド抗原、例えば、ELISAアッセイを含む。

【0157】

イムノアッセイは、キットによって例示されたキットフォーマットに容易に適用作れ得ることが理解される。このキットは、以下を含む：(A)固体支持体に結合した以下の(1)、(2)、および(3)のアミノ酸配列を有する1以上のペプチド：(1)hCG-CTP37のC末端フラグメント(hCG-CTP16、配列番号6)；(2)hCG-CTP37のN末端フラグメント(hCG-CTP21、配列番号4)；および(3)hCG-CTP37(配列番号2)；(B)被験体からサンプルを収集する手段；および(C)アッセイが行われる反応容器。このキットはまた、標識手段、指標反応酵素および基質、ならびに任意の溶液、緩衝液、またはイムノアッセイに必要な他の要素を含み得る。

【0158】

本明細書中に列挙されたすべての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が具体的に、かつ個別に参考として援用されることを示すように、本明細書中で参考として援用される。

【0159】

明確な理解のための例示および例の目的で、先の発明をある程度まで記載したが、添付の請求項の精神および範囲から逸脱することなく、特定の変化および改変がなされ得ることが、本発明の教示の点から当業者に容易に理解される。

【0160】

以下の実施例は、本発明を例示するが、本発明を決して限定することを意図しない。

【0161】

(実施例1)

無作為化フェーズII臨床試験において、77人の患者に、低用量または高用量のワクチンレジメンのいずれかを割り当てた。原発性腫瘍の治療的切除術を受けた適切な患者は、任意の人種、いずれかの性別、18歳の年齢より上である

患者であり、そして、転移性の結腸または直腸の腺癌の組織学的診断を受けた。試験の設計は、付随する化学療法を除いた。プロトコルは、皮内皮膚試験 (intra dermal skin tests) によって測定される1以上の共通のリコール抗原 (破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、ツベルクリン、カンジダ (Candida)、トリコフィトン (trichophyton)) に対する遅延性型過敏症についてのポジティブな試験を必要とする。ジフテリアトキソイドに対する即時型過敏性についてネガティブであると試験されたすべての患者は、予防接種の前に皮内皮膚試験によって抗原をリコールした。すべての患者は、0、1または2のSWOG (Southwest Oncology Group) パフォーマンススコアを示した。

【0162】

ワクチンは、4 : 1 (v : v) の比でスクアレン : マンニッド (mannide) オレイン酸塩ビヒクルのハンドメイドエマルジョンとして調製された。このエマルジョンは、滅菌生理食塩水に溶解した20 : 1 (w : w) の比のCTP37ジフテリアトキソイド結合物 (DTの25分子合成CTP37ペプチド / 10⁵ DaのDT) 対ノルムラニルジペプチドアジュバントを用いて処方される。インキュベーション容積は、0.5 mg用量については0.4 ml、1.0 mg用量については0.8 ml、そして2.0 mg用量については1.6 mlであった (結合体重量に基づいて)。36人の患者を、0日、28日、70日、および16週目で、0.5 mgのワクチンからなる低用量レジメンに入れた。高用量レジメンの41人の患者は、2.0 mgのワクチンを、0日目に、続いて、28日、70日、および16週目に1.0 mgを受容する。ワクチンを筋肉内に投与した。

【0163】

hCG - CTP37 (配列番号2、図2A) は、少なくとも以下の2つのエピトープを含むことが公知である : エピトープ (配列番号5、図2D) を含むN末端領域 (CTP21、配列番号4、図2C) およびエピトープ (配列番号8、図2G) を含むC末端領域 (CTP16、配列番号6、図2E)。

【0164】

評価された臨床的な終点としては、hCG-CTP37のN末端フラグメント、hCG-CTP21(配列番号4);hCG-CTP37のC末端フラグメント、hCH-CTP16(配列番号6);および完全CTP37ペプチド(配列番号2)に対する免疫応答、腫瘍サイズおよび患者の生存時間の決定が挙げられた。

【0165】

抗hCG抗体のレベルを、上記(Jones Wら、Lancet 1:1295-1298、1998)のように、免疫後に一定の間隔をおいて収集された血清の異なる希釈に対する¹²⁵I標識hCGの結合を決定することによって測定した。希釈されていない血清に結合した¹²⁵I-hCGの量(ナノモル/リットル)として結果を報告する。

【0166】

抗DT抗体についての患者血清の分析のために、標準的な固相での間接的な酵素結合免疫ソルベント検定法(ELISA)を用いた。簡単には、96ウェルのマイクロタイタープレートを、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中1μg/mlの濃度で、精製DT(Pasteur Merieux Connaught、Toronto, Ontario, Canada)でコーティングした。患者の抗血清の連続する2倍希釈物を、PBS/1%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1% Tween-20中でウェルに添加し、そして1時間室温でインキュベートした。PBS/1% Tween-20でウェルを洗浄した後、ヤギ抗ヒトIgA、IgG、IgM-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合物(HRP結合物、Kierkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)の45分間の添加が続いた。PBS/1% Tween-20(2度)および滅菌水(2度)を用いたウェルの洗浄後に、プレートを発色団(ABTS, Kierkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)の添加によって、15分間展開し、続いて405nm吸光度を分析した。すべての患者のサンプルからの結果を、直線の滴定範囲内で生じる選択された希釈(1/32000)の光学密度として報告する。

【0167】

hCG-CTP16 (配列番号6) およびhCG-CTP21 (配列番号4) を高速液体クロマトグラフィーによる精製によって、95%より高い純度で合成した (Peptide Express, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA)。GMP産生によりhCG-CTP37を得た (Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, CA, USA)。十分な抗hCG抗体力価を有する患者抗血清を、競合ELISAを使用してCTP37、CTP21およびCTP16への結合についてアッセイした。競合ELISAの前に、競合ELISAのための最適な抗原コーティング濃度および最適な抗血清希釈を、間接的ELISAによって各抗血清について決定した。1.0、0.50、0.25および0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のCTP37でコーティングされたELISAプレートを、PBS中1%BSAでブロックした。1/1000~1/60,000の範囲のいくつかの抗血清希釈物をプレートに添加した。結合した抗体を、抗ヒトHRP結合体で検出した。抗血清濃度に対する光学密度の直線状の応答を産生した抗原コーティング濃度を、競合ELISAに使用した。競合ELISAを、変更を有して他の箇所に記載の方法に従っておこなった (Chang SPら、J Immunol. 128:702-705, 1982)。簡単には、各抗血清について予め決定された濃度で、プレートをPBS中で一晩、CTP37と共にインキュベートし、次いで1%BSA/PBSでブロックした。次に、予め決定された希釈で抗血清を、種々の濃度のCTP37、CTP21またはCTP16と共にプレインキュベートし、次いで60 μl の各抗血清-ペプチド混合物を、CTP37でコーティングされたプレートの各ウェルに添加した。HRP結合化ヒト免疫グロブリンを使用し、プレートに結合した遊離の (競合しない (not competed away)) 抗体の量を決定した。結合した割合を、同じプレート上での抗血清標準シリーズ (競合するペプチドを含まない) に対する405 nmでのサンプルの光学密度を比較することによって算出した。各ペプチド濃度についての2度の反復値を平均し、そして結合%対 Log_{10} [ペプチド競合物 (competitor)] としてプロットし、次いでGraphPad PRI

SM™ソフトウェア (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) を使用して、1位置の競合方程式にフィットした。Microsoft Excel および GraphPad PRISM™ソフトウェアを、統計分析 (Kaplan-Meier 曲線を含む) に使用し、生存を比較するために生存およびログランク (log-rank) 試験を示した。0.05以下のP値を有意であると見なした。

【0168】

hCG に対する免疫応答を、予防接種の開始後 0 ~ 24 週間の患者の血清において測定した。有意な hCG 抗体産生を、予防接種プロトコルの 12 週目までに観察した (図3)。

【0169】

抗 hCG CTP 37 抗体力価は用量に依存した (2.0 mg の最初の用量のワクチンが 0.5 mg 用量のレジメンよりも、より大きな力価を生じたように (図3))。最も大きな腫瘍面積は、低用量を受けた患者において顕著に増大しなかったが、高用量レジメンにおいて腫瘍の増大を観察し、そして2つの用量レジメンの間で平均腫瘍面積は顕著に異なった ($p < 0.05$ 、図4)。従って、CTP 37 に対する免疫応答は、平均の最も大きな腫瘍サイズに相関しなかった。さらに、患者の中間の生存時間は、低用量の群については 39.9 週間であり、そして高用量の群については 32.4 週間であった。抗体 / 最も大きい腫瘍面積比は、指数関数的に時間に伴い増加した (図5)。

【0170】

ワクチンはまた、種々の抗原 (PHA、CTP - 37、CTP - 37 - KI、CT および - hCG) に対する PBMC 増殖応答によって決定されるような細胞媒介性免疫応答を産生することが示された。1、0.1 または 0.01 $\mu\text{g} / \text{well}$ でマイトジェンを添加した (図6 に示されるデータは、1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度からのデータである)。PHA 刺激指標は、4 より大きかった。従って、図6は、これらのデータポイントを補正しない。PHA についての補正值は、正常で 7.9 ; 患者1で 14.7 ; および患者2で 28.19 であった。この方法はさらに、Triozziら、1997 に記載される。

【0171】

CTP-37に対する抗体応答は、患者の生存と関連したが、しかしDT抗体力価は、高用量の群および低用量の群のいずれについても患者の生存と関連しなかった。

【0172】

発見の根底にあるメカニズムは、特許請求される発明の一部ではないが、特定のhCGサブユニットエピトープに対する抗体応答は、薬物動学的メカニズム(hCGの増強された除去)および/または薬力学的メカニズム(レセプターに結合するhCGとの干渉)を介して作用し得ることを、この結果は示唆する。CTP37のCTP16ペプチドまたはCTP21ペプチドのいずれかを用いた競合アッセイにおいて、CTP37で免疫された患者から採取された血清サンプルの評価は、CTP21に対する免疫応答に比較して、CTP16に対するより大きな免疫応答を示し、このことは、CTP16がヒトにおいて免疫優性であることを示唆する。

【0173】

CTP37-DTの筋内注入を受けた患者の免疫応答は、以下の4群に分かれた：(1)第1抗体および第1抗体がない患者であって、そしてまた総抗hCG-CTP37抗体も検出可能でない(非抗体応答動物)；(2)総抗hCG-CTP37抗体は検出可能であるが、その第1抗体および第2抗体が検出可能でない患者(弱い抗体応答動物)；(3)検出可能なレベルの第1抗体を有するが、検出不可能なレベルの第2抗体を有する患者(CTP16のみの抗体応答動物)；および(4)検出可能なレベルの第1抗体および第2抗体の両方を有する患者(CTP16およびCTP21抗体応答動物)(表1)。

【0174】

(表1. 4つの抗体応答部分集団の患者の特徴)

【0175】

【表1】

群	患者	検出された抗 CTP37 抗体	検出された抗 CTP16 抗体	検出された抗 CTP21 抗体	血清 hCG	hCG 抗体 (nM)
1	21	いいえ	いいえ	いいえ	3.5±2.9	0±0
2	20	はい	いいえ	いいえ	5.3±3.4	2.4±1.4
3	20	はい	はい	いいえ	7.5±15.7	36.6±51.5
4	15	はい	はい	はい	3.6±3.5	30.0±23.6

4つの抗体応答群の各々における患者の生存曲線は、図7に示される。これらの生存曲線は、互いに有意に異なることが見出された ($p = 0.0019$)。抗hCG抗体を有さない21人の患者についての中間生存時間は16.4週間であり、弱い抗体力価応答群を含む20人の患者においては、29.6週間であり、CTP16エピトープのみを認識する20人の患者においては34.8週間であり、そしてCTP16およびCTP21の両方に対して応答する15人の患者においては64.6週間であった。以下に、表2に要約する。

【0176】

(表2. フェーズIIの臨床試験におけるCTP37に対する免疫応答)

【0177】

【表2】

群	群内の患者	生存時間 (週)
1	21/73	16.4
2	20/73	29.6
3	20/73	34.8
4	15/73	64.6

さらに、CTP16およびCTP21の両方に対する検出された免疫応答を有する患者についての増加した生存時間は、高用量および低用量処置群の両方についての増加した生存時間に予言的である。

【0178】

CTPワクチン37におけるCTP16およびCTP21エピトープの両方を認識する抗体を有する(「2つのエピトープ応答」)患者についての生存利益は

、患者の全体の免疫状態の一般的な測定に関連しない。表1に示されるように、4つの群の間の、平均血清IgGレベルにおける有意な差は存在しなかった。さらに、CTP37ペプチドワクチンの投与の前の皮膚試験において、応答したりコール抗体の数もリコール抗原の応答の大きさにおける差は存在しなかった。さらに、平均抗hCG抗体力価における有意な差は、CTP16のみの応答動物群、とCTP16およびCTP21応答動物群との比較において観察されなかった。

【0179】

患者が2つのエピトープ応答を発達する場合に生存時間が増加することを、本明細書中で示される結果は実証する。2つのエピトープ応答動物の中間の生存時間は65週間であり、それはイリノテカン(irinotecan)で処置した患者と比較して、より長い生存の持続を表す。両方のCTP37エピトープに対する抗体を発達し得る患者における全体の抗hCG力価は、CTP16エピトープに対する応答のみを発達し得る患者の力価に比較して有意に異ならなかった(表1)。しかし、中間の生存時間は、1つのエピトープ群に比較した場合、2つのエピトープ応答動物において、ほぼ2倍の長さであった。-hCGに対する免疫応答の定性的性質は、ワクチンの効果を決定する際に役割を果たし得ることを、これらの結果は示す。さらに、-hCGに対する抗体応答が、患者の生存と直接関連するという仮説を、これらの結果は指示する。

【0180】

(実施例2)

ウサギをCTP37で免疫し、そしてCTP16およびCTP21に対する免疫応答を測定した。競合イムノアッセイにおいてCTP21に対する免疫応答に比較して、CTP16に対するより大きな応答を検出した。ヒトと同様に、CTP16はウサギにおいて免疫優性であることを、このことは示唆する(表3)。

【0181】

ウサギが、hCG「ループ」ペプチド単独で免疫された場合、競合アッセイにおいてCTP16に対する免疫応答を検出したが、CTPに対する応答は検出されなかった。そしてウサギをCTP37およびループペプチドで免疫した場合、競

合アッセイにおいてCTP16およびCTP21の両方に対する免疫応答を検出した。CTP37およびhCG「ループ」ペプチドワクチンの組み合わせられた投与後、CTP16に対する免疫応答は、免疫優性であるようではなかった。

【0182】

(表3. エピトープマッピングおよび生体中和 (bionutralization¹⁾))

【0183】

【表3】

抗原	ウサギ #	ペプチド競合者		生体中和	
		CTP21	CTP16	MUT	シセプター
CTP37	4162	+	++	+++	-
	4164	++	+	++	+
	77 M	-	+	-	-
	63 H	-	++	-	N.D. ³
	3989	-	+++	アロ効果 ²	N.D.
[L-7 ⁰	4157	-	++	+++	++
	4160	-	+++	+++	++
[L-7 ⁰ + CTP37 の組み合わせ	4165	++	+	+	N.D.
	4166	++	+	+++	N.D.
	4169	+	++	++	N.D.
	4173	++	+	++	N.D.

CTP37および「ループ」ペプチドの同時投与が (CTP37単独での投与よりも)、CTP21に対する増強された免疫応答およびCTP16およびCTP21の両方に対する類似の大きさの免疫応答を生じることを、CTP37ペプチドワクチンおよびhCG「ループ」ワクチンの組み合わせられた投与についてのこれらの免疫化研究からの結果は示す。「ループ」ペプチドは、ブースターワクチンとして効率的であり得、hCG-CTP16およびhCG-CTP21に対する1以上のより釣り合いのとれた免疫応答を生じ得ることを、このことは示唆する。

¹ += ED50 > 1000 ng ; ++ = ED50 = < 250 ng ; +++ ED50 < 10 ng

²プロ効果 = 非抗血清コントロールよりも大きいhCG応答

³N.D. = 行っていない

(表4. 配列の表)

【0184】

【表4】

説明	配列番号	図
Gen Bank 登録番号180437由来のhCG βサブユニット	1	1
hCG-CTP37の配列: TCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (hCGのβサブユニットの残基109-145)	2	2A
hCG-CTP38 MTCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (hCG + N末端Metのβサブユニットの残基109-145)	3	2B
N末端エペーチド, CTP21: CDDPRFQDSSSSKAPPPSLPS (hCGのβサブユニットのCTPの残基110-130)	4	2C
CTP21内のエペーチド: DDPRFQDS (hCGのβサブユニットの残基111-118に対応する82-91のアミノ酸)	5	2D
C末端エペーチド, CTP16: SPSRLPGPSDTPILPQ (hCGのβサブユニットのCTPの残基130-145)	6	2E
N末端に付加されたC末端エペーチド, CTP-17: CSPSRLPGPSDTPILP	7	2F
CTP16/CTP17内のエペーチド: RLPGPSDTPILP (hCGのβサブユニットの残基137-145に対応する)	8	2G
hCG βサブユニットのN末端にCTP MTR VLQ GVL PAL PQV VC (残基38と57との間にはS-S結合を有するβサブユニットの残基38-57)	9	2H

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、配列番号1で表されるGen Bank登録番号180437で提供されるようなヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のサブユニットのアミノ酸配列を示している。

【図2A】

図2Aは、hCGのサブユニットの残基109~145(C末端ペプチド、CTP、配列番号2)を示す。

【図2B】

図2Bは、付加されたN末端メチオニンを有するhCGのC末端ペプチド(C

TP、配列番号3)を示す。

【図2C】

図2Cは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基110~130(C末端エピトープ、CTP-21、配列番号4)を示す。

【図2D】

図2Dは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基111~118(CTP21内部のエピトープ、配列番号5)を示す。

【図2E】

図2Eは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基130~145(N末端エピトープ、CTP-16、配列番号6)を示す。

【図2F】

図2Fは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基130~145(付加されたN末端のCを有するN末端エピトープ、CTP-17、配列番号7)

【図2G】

図2Gは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基133~145(CTP-16内部のエピトープ、配列番号8)を示す。

【図2H】

図2Hは、hCGのサブユニットのアミノ酸38~57(「ループ」ペプチド(配列番号9))を示す。

【図3】

図3は、hCGのC末端ペプチドを持つ予防接種の開始後0~24週を超えたフェーズIIの臨床試験の結腸直腸癌患者の血清中に検出された抗-hCG抗体のレベルの平均値を示している。患者は、「高い」または「少ない」用量のhCGのいずれかを受けた。高い用量群(白丸)は、はじめに2.0mgのCTP37-DTの注射、および3あるいは4週目のいずれかに1.0mgのCTP37-DTのブースター注射、そして、その後3ヶ月ごとに1.0mgのCTP37-DTのブースターを受けた。その後、低い用量群(黒丸)は、はじめに0.5mgのCTP37-DT注射、および3あるいは4週目のいずれかに0.5mgのCTP37-DTのブースター注射、そしてその後3ヶ月ごとにCTP3

7 - D Tのブースターを受けた。

【図4】

図4は、上記図3に記載されるような、フェーズII臨床試験の、低い用量群（黒丸）および高い用量群（白丸）における結腸直腸癌患者について、CTP37を用いた予防接種の開始後0～24週を超えた、最も広い腫瘍領域（ cm^2 ）を示す。

【図5】


図5は、上記図3に記載されるような、CTP37を用いた予防接種の開始後、0～24週を超えたフェーズII臨床試験における結腸直腸癌患者についての、血清抗CTP37抗体レベルと腫瘍領域（ cm^2 ）との間の関係を示す。

【図6】


図6は、正常な非免疫被験体の場合に比べ、（上述の図3に記載されたフェーズII臨床試験の拡張されたプロトコールにおける）CTP37で免疫された二人の結腸直腸癌患者の細胞仲介性免疫応答を示している。様々な抗原（PHA、CTP-37、CTP-37-KI、DTおよび-hCG）に対するPBMC増殖応答が示されている。

【図7】


図7は、CTP37で免疫された結腸直腸癌患者の、生存時間に対する生存の割合を示しており、（図3に上述されたフェーズII臨床試験の拡張されたプロトコールにおける）、そして、次のように特徴付けられている：（1）血漿中に検出可能な抗CTP37抗体を有さない患者（黒菱形）；（2）血漿中に低いレベルの検出可能な抗CTP37抗体を有する患者であって、その結果、CTP16対CTP21に対する抗体の相対的レベルが、決定されない患者（白三角）；（3）検出可能な抗CTP37抗体および抗CTP16抗体を有するが、血漿中に検出可能な抗CTP21抗体を有さない患者（黒四角）；ならびに（4）血漿中に、検出可能な抗CTP37、抗CTP16および抗CTP21抗体を有する患者（白丸）。

【 1】


1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT
 61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPPV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC
 121 GGPKDHPLTC DDPRFQDSSS SKAPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

Fig. 1【 2 A】


TCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

Fig. 2A【 2 B】


MTCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

Fig. 2B【 2 C】


CDDPRFQDSSSSKAPPSLPS

Fig. 2C【 2 D】


DDPRFQDS

Fig. 2D【 2 E】


SPSRLPGPSDTPILPQ

Fig. 2E【 2 F】

CSPSRLPGPSDTPILP

Fig. 2F【 2 G】

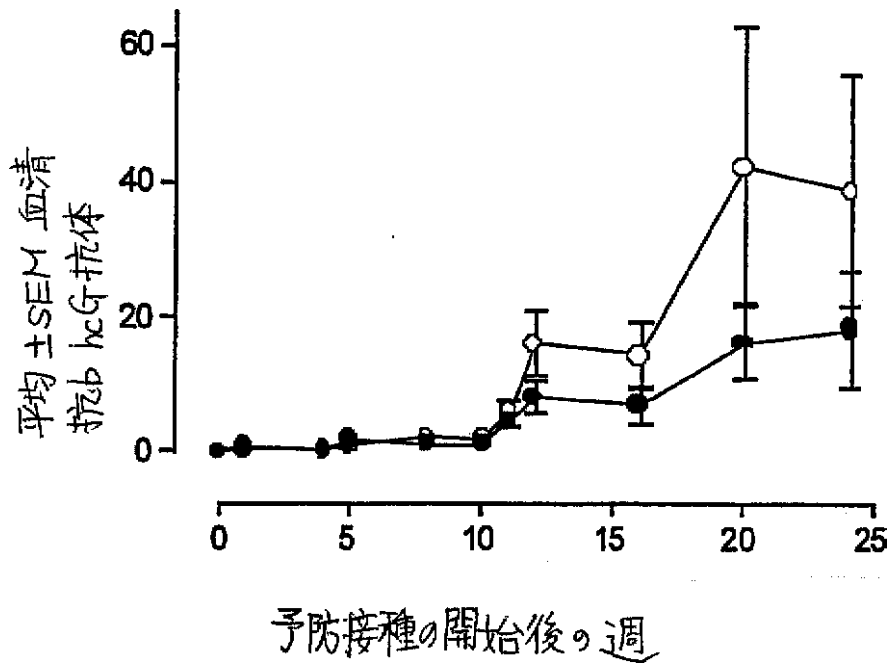
RLPGPSDTPILP

Fig. 2G【 2 H】

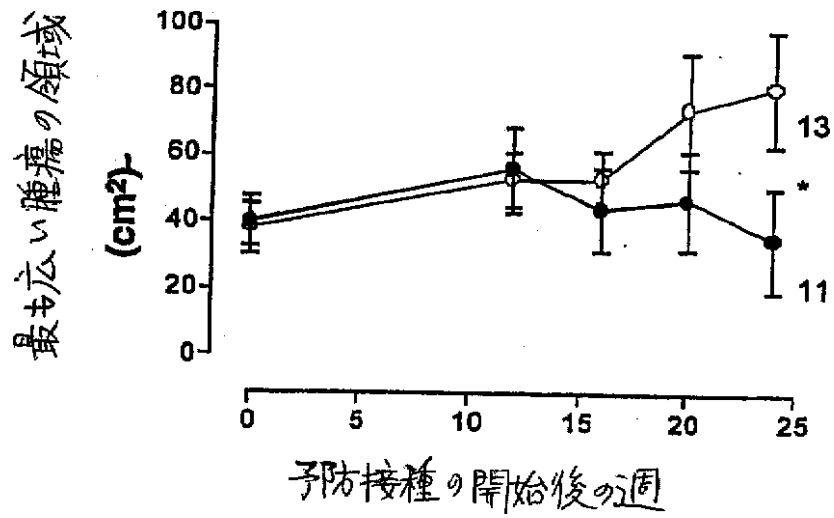
CTPMTRVLQGVLPALPQVVC

Fig. 2H

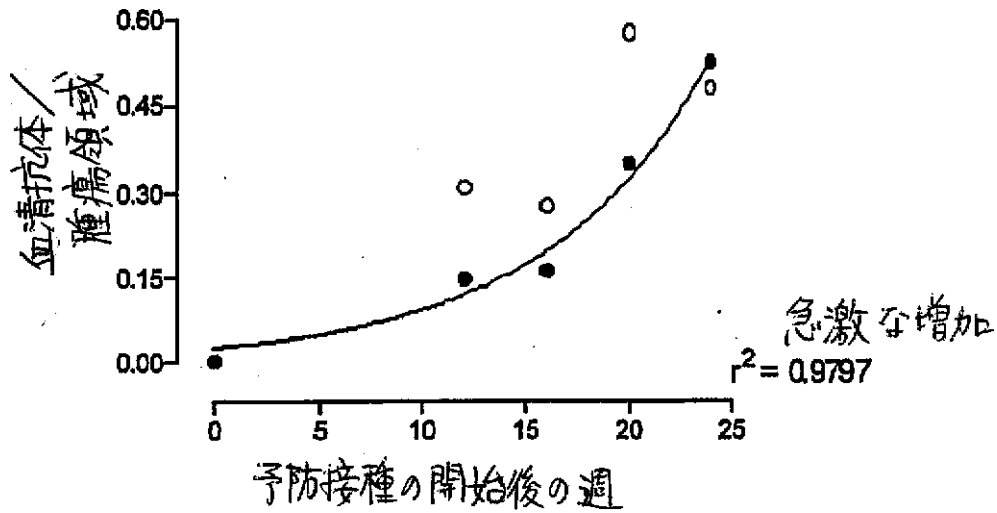
【図3】



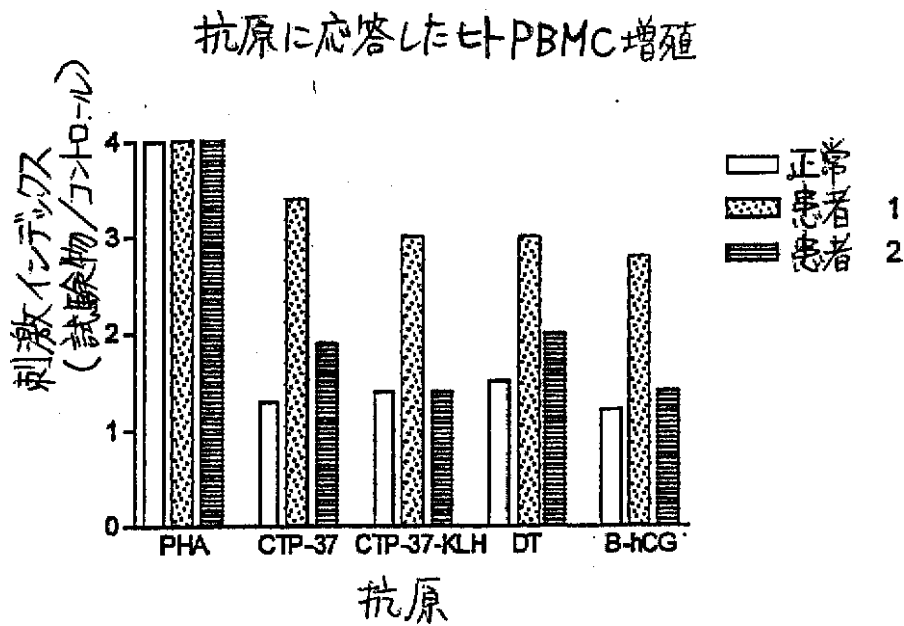
【図4】



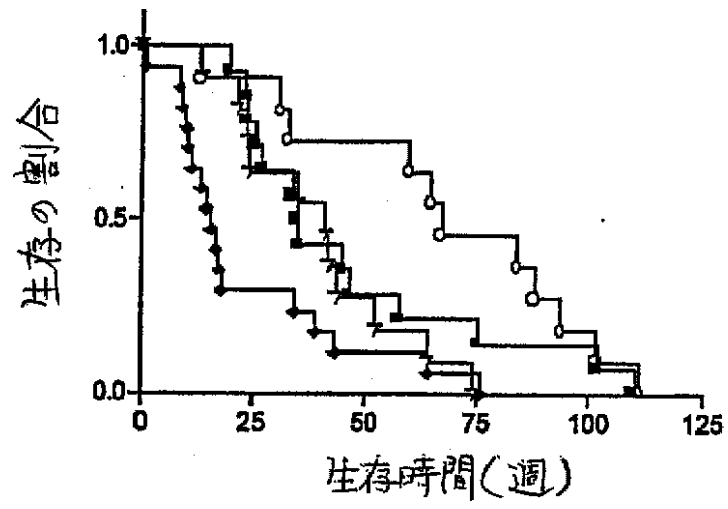
【図5】



【図6】



【図7】



【手続補正書】

【提出日】平成13年12月6日(2001.12.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

「ループ」ペプチドという用語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの -サブユニットの58~77アミノ酸(図2H、配列番号9)のことを意味する。ここで、このアミノ酸58および77は、ネイティブ配列、あるいはその改変体またはアナログ(これは、等価な生物学的活性を有する)の形においては、ジスルフィド架橋によって連結されている。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

「16マー」または「C末端エピトープ」という用語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの -サブユニットの150~165アミノ酸(図2E、配列番号6)のことを意味しており、ネイティブの配列、あるいはその改変体またはアナログ(これは、等価な生物学的活性を有する)として示されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

「17マー」という術語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの -サブユニットの150~165アミノ酸(図2F、配列番号7)を意味しており、キャリアタンパク質への誘導体化の目的のために、付加されたC末端システインを有する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

「21マー」または「N末端エピトープ」という術語は、本明細書中でhCGに参照して用いられているように、hCGの -サブユニットの130~150アミノ酸(図2C、配列番号4)のことを意味しており、ネイティブの配列、あるいはその改変体またはアナログ(これは、等価な生物学的活性を有する)として示されている。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0184

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0184】

【表4】

説明	配列番号	図
GenBank登録番号180437由来のhCGβサブユニット	1	1
hCG-CTP37ペプチド: TCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (hCGのβサブユニットの残基129-165)	2	2A
hCG-CTP38ペプチド: MTCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (hCG+N末端metのβサブユニットの残基129-165)	3	2B
N末端エピトープ、CTP21: CDDPRFQDSSSSKAPPSLPS (hCGのβサブユニットのCTPの残基130-150)	4	2C
CTP21内のエピトープ: DDPRFQDS (hCGのβサブユニットの残基131-138に対応する8マアのペプチド)	5	2D
C末端エピトープ、CTP16: SPSRLPGPSDTPILPQ (hCGのβサブユニットのCTPの残基150-165)	6	2E
N末端Cを付加されたC末端エピトープ、CTP-17: CSPSRLPGPSDTPILP	7	2F
CTP16/CTP17内のエピトープ: RLPGPSDTPILP (hCGのβサブユニットの残基153-165に対応する)	8	2G
hCGβサブユニットループペプチド CTP MTR VLQ GVL PAL PQV VC (残基58と77との間にはS-S結合を有するβサブユニットの残基58-77)	9	2H

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2A

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2A】

図2Aは、hCGのサブユニットの残基129～165（C末端ペプチド、CTP、配列番号2）を示す。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2C

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2C】

図2Cは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基130～150（C末端エピトープ、CTP-21、配列番号4）を示す。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2D

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2D】

図2Dは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基131~138(CTP21内部のエピトープ、配列番号5)を示す。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2E

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2E】

図2Eは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基150~165(N末端エピトープ、CTP-16、配列番号6)を示す。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2F

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2F】

図2Fは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基150~165(付加されたN末端のCを有するN末端エピトープ、CTP-17、配列番号7)を示す。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2G

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2G】

図2Gは、hCGのサブユニットのアミノ酸配列の残基153～165(C
TP-16内部のエピトープ、配列番号8)を示す。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2H

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2H】

図2Hは、hCGのサブユニットのアミノ酸58～77(「ループ」ペプチ
ド(配列番号9))を示す。

【手続補正13】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図1】

```
1 MEMFQGLLLL LLLSMGGTWA SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT
61 MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR DVRFESIRLP GCPRGVNPVV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC
121 GGPKDHPLTC DDPREFQDSS SKAPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ
```

【手続補正14】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2A

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2A】

TCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

【手続補正15】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 B

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 B】

MTCDDPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

【手続補正16】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 C

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 C】

CDDPRFQDSSSSKAPPPSLPS

【手続補正17】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 D

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 D】

DDPRFQDS

【手続補正18】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 E

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 E】

SPSRLPGPSDTPILPQ

【手続補正19】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 F

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 F】

CSPSRLPGPSDTPILPQ

【手続補正20】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 G

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 G】

RLPGPSDTPILPQ

【手続補正21】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2 H

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2 H】

CPTMTRVLQGVLPALPQVVC

【手続補正22】

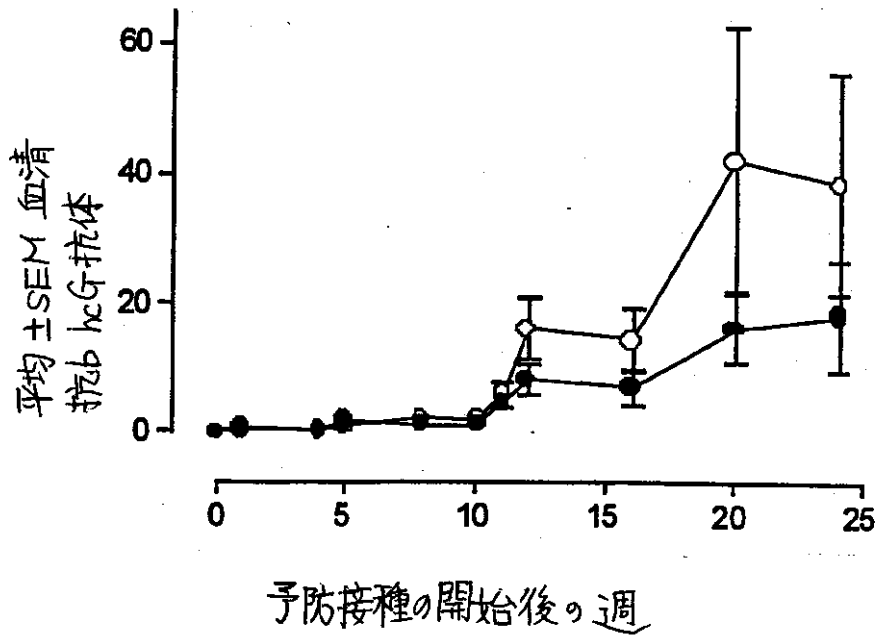
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図3】



【手続補正23】

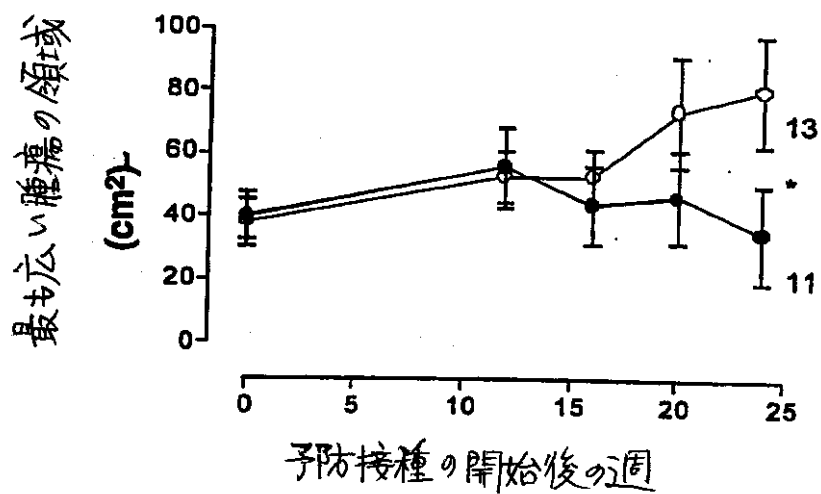
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図4】



【手続補正24】

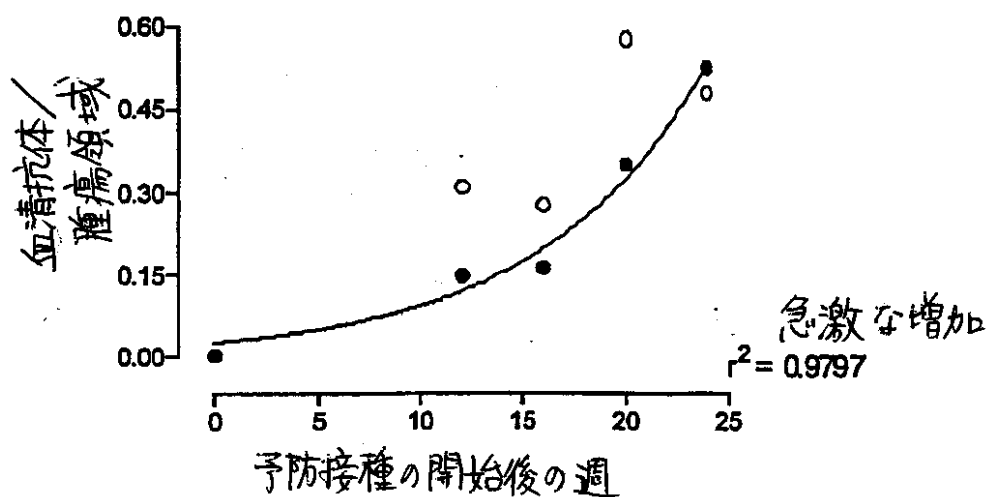
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図5】



【手続補正25】

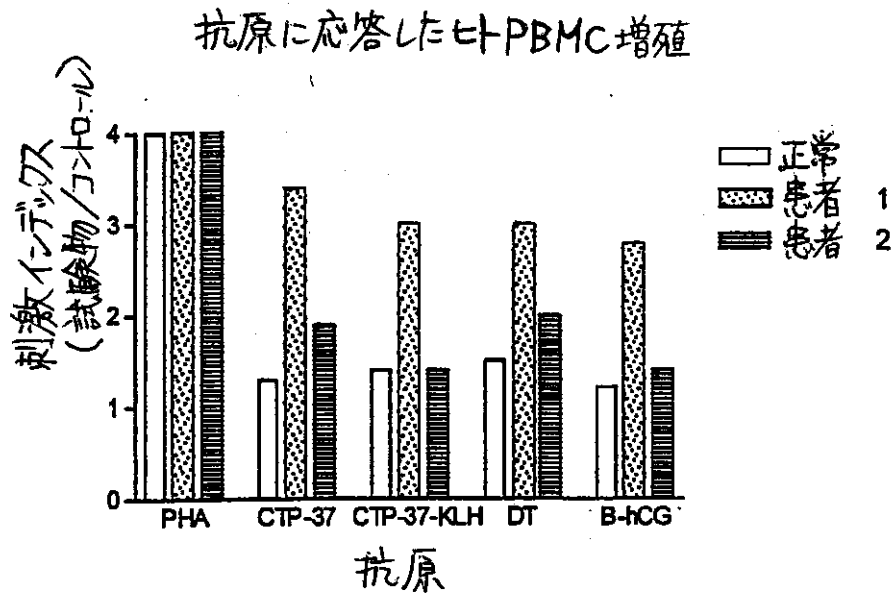
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図6】



【手続補正26】

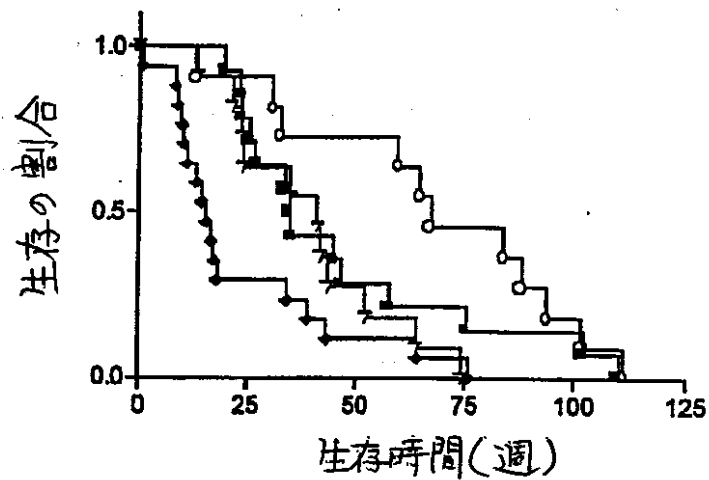
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/13392
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/26 A61K39/395 A61K38/24 G01N33/76		
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 7 C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TRIOZZI P L ET AL: "Effects of a beta-human chorionic gonadotropin subunit immunogen administered in aqueous solution with a novel nonionic block copolymer adjuvant in patients with advanced cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH, (1997). 3 (12 PT. 1), PP. 2355-62. JOURNAL CODE: C2H. ISSN: 1078-0432., XP000941669 The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, 410 West 10th Ave, Columbus, Ohio 43210, USA. cited in the application the whole document --- -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 January 2001		Date of mailing of the international search report 24. 01. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Menessier, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/13392

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TALWAR G P: "Vaccines for control of fertility and hormone-dependent cancers." IMMUNOLOGY AND CELL BIOLOGY, (1997 APR) 75 (2) 184-9. , XP000944872 page 184 page 186-188 ---	1-25
A	SNYDER, LAURA L. ET AL: "Synthetic hormone/growth factor subunit vaccine with application to antifertility and cancer" PHARM. BIOTECHNOL. (1995), 6(VACCINE DESIGN), 907-30 , XP000944649 the whole document ---	1-25
A	DIRNHOFER S ET AL: "THE MOLECULAR BASIS FOR EPITOPES ON THE FREE BETA-SUBUNIT OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPHIN (HCG), ITS CARBOXYL-TERMINAL PEPTIDE AND THE HCGBETA-CORE FRAGMENT" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, 68, BRISTOL, vol. 141, no. 1, 1 April 1994 (1994-04-01), pages 153-162, XP000609254 ISSN: 0022-0795 the whole document -----	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/13392**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 5-19 and 22 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the antibody/vaccine.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
A 6 1 K 47/34		A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/26		C 0 7 K 16/26	
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	F
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	B
	33/574		D
		33/574	A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , A U , C A , J P , K R		
Fターム(参考)	4B029 AA07 AA21 BB15 BB17 CC08 FA12 4B064 AG27 CA10 CA20 DA01 DA13 4C076 AA11 AA19 BB11 BB13 CC06 EE23H FF21 FF31 FF68 4C085 AA03 AA14 BB08 CC27 DD88 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72		

专利名称(译)	hcG疫苗联合治疗癌症的方法		
公开(公告)号	JP2003502025A	公开(公告)日	2003-01-21
申请号	JP2000618331	申请日	2000-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	AVI生物制药公司		
申请(专利权)人(译)	Eibuiai生物制药公司		
[标]发明人	イヴァーセンパトリックエル		
发明人	イヴァーセン, パトリック エル.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K9/08 A61K9/127 A61K39/00 A61K39/395 A61K47/34 A61P35/00 C07K16/26 C07K16/30 C12M1/34 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/545 C07K16/26 C07K16/30 C07K2317/21 C07K2317/34		
FI分类号	C12P21/08 A61K9/08 A61K9/127 A61K39/00.H A61K39/395.N A61K47/34 A61P35/00 C07K16/26 C12M1/34.F G01N33/53.B G01N33/53.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC08 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/AA11 4C076/AA19 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/CC06 4C076/EE23H 4C076/FF21 4C076/FF31 4C076/FF68 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BB08 4C085/CC27 4C085/DD88 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	60/134419 1999-05-17 US 60/134432 1999-05-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了向受试者施用抗hCG单克隆抗体和/或hCG免疫原性肽疫苗，随后分别监测患者对hCG-CTGP16，hCG-CTP21和hCG-CTP37的免疫应答以及hCG免疫。本发明涉及通过根据对基因肽的可检测的免疫反应调节疫苗接种方案来改进的用于癌症免疫疗法的方法。本发明进一步涉及用于hCG免疫原性肽的免疫测定的装置，方法和试剂盒。

患者	患者	hCG-CTP37 抗体	hCG-CTP16 抗体	hCG-CTP21 抗体	血清 hCG	hCG 抗体 (nM)
1	21	1142	1142	1142	3.5±2.9	0±0
2	20	1211	1142	1142	5.3±3.4	2.4±1.4
3	20	1211	1211	1142	7.5±15.7	36.6±51.5
4	15	1211	1211	1211	3.6±3.5	30.0±23.6