

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-239682

(P2014-239682A)

(43) 公開日 平成26年12月25日(2014.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 5 0
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 4

審査請求 有 請求項の数 41 O L (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-126312 (P2014-126312)
 (22) 出願日 平成26年6月19日 (2014. 6. 19)
 (62) 分割の表示 特願2009-543277 (P2009-543277) の分割
 原出願日 平成19年12月21日 (2007.12.21)
 (31) 優先権主張番号 60/876, 863
 (32) 優先日 平成18年12月22日 (2006.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トゥエルフス フロ
 ア
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

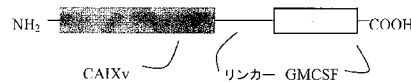
(54) 【発明の名称】 新規TAA変種に基づく新たな融合分子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌予後を支援する方法の提供。

【解決手段】 新規の炭酸脱水酵素(CAIX)核酸およびペプチド配列、ならびにCAIX抗原マーカーを発現する癌細胞に特異的に向けられる免疫応答を誘発する免疫原性抗癌剤(例えば、ワクチンおよびキメラ分子)を含む、関連する方法および組成物。新規CAIX変種および関連する組成物は、タンパク質ワクチン接種、DNAワクチン接種、および養子免疫治療が含まれるが、これらに限定されない多種多様な治療法において有用である。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO:1またはその一部を含むポリペプチドであって、該一部が、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸を含み、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリペプチド。

【請求項2】

(a)SEQ ID NO:2;

(b)SEQ ID NO:1を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列;ならびに

(c)(a)または(b)の断片を含むポリヌクレオチド配列であって、該断片が、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸をコードし、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリヌクレオチド配列、
 からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離されたまたは組換え型の核酸。

10

【請求項3】

癌予後を支援する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a)癌と診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規CAIX変種がある場合は、発現された新規CAIX変種を定量して、定量された新規CAIX変種の発現データを作成する工程であって、

該発現された新規CAIX変種が、

SEQ ID NO:1、

残基M33、G121、およびS374の1つもしくは複数を含むSEQ ID NO:1の一部、または新規CAIX変種もしくはその一部をコードする核酸
 を含む、工程;ならびに

20

(b)定量された新規CAIX変種の発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程

【請求項4】

癌が腎明細胞癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】

癌が子宮頸癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項6】

癌が膀胱癌を含む、請求項3記載の方法。

30

【請求項7】

癌が低酸素誘導性癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項8】

新規CAIX変種をコードする核酸がmRNAを含む、請求項3記載の方法。

【請求項9】

発現されたCAIXが免疫組織化学染色によって定量される、請求項3記載の方法。

【請求項10】

試料が、腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、請求項3記載の方法

40

【請求項11】

定量されたCAIXの発現データがコンピュータ可読型である、請求項3記載の方法。

【請求項12】

(b)が、

少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程;ならびに

コンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力との間のクロウズネスオブフィット(closeness-of-fit)を決定するアルゴリズムを実行する工程であって、該入力が癌患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程を含む、請求項11記載の方法。

50

【請求項 1 3】

癌予後を支援する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) CAIXを発現する癌であると診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規CAIX変種ポリペプチドがある場合は、発現された新規CAIX変種ポリペプチドを定量して、定量されたCAIXポリペプチドの発現データを作成する工程であって、該試料が腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、工程；ならびに定量された新規CAIX変種ポリペプチドの発現データと、癌予後の確率を相関付ける工程であって、85%の定量パーセントが被験体の予後を層別化する、工程。

【請求項 1 4】

発現されたCAIXポリペプチドが免疫組織化学染色によって定量され、定量パーセントが陽性染色パーセントを含む、請求項13記載の方法。

10

【請求項 1 5】

被験体が転移性の腎明細胞癌、子宮頸癌、膀胱癌、または低酸素誘導性癌と診断された時に、85%よりも高い定量パーセントが、85%またはそれより低い定量パーセントよりも、良好な被験体予後と相関する、請求項13記載の方法。

【請求項 1 6】

定量されたCAIXの発現データがコンピュータ可読型であり、かつ

(b)が、

少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程、および

20

コンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力との間のクロウズネスオブフィットを決定するアルゴリズムを実行して、定量されたCAIXの発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程であって、該入力が発患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程

を含む、

請求項13記載の方法。

【請求項 1 7】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)と結合された、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む構築物であって、新規CAIX変種の一部は残基M33、G121、および/またはS374の1つまたは複数を含む、構築物。

30

【請求項 1 8】

新規CAIX変種の一部が少なくとも20個の連続したアミノ酸を含む、請求項17記載の構築物。

【請求項 1 9】

GM-CSFがヒトGM-CSFである、請求項17記載の構築物。

【請求項 2 0】

新規CAIX変種およびGM-CSFが融合タンパク質の成分である、請求項17記載の構築物。

【請求項 2 1】

新規CAIX変種およびGM-CSFが、長さが2~約20アミノ酸のペプチドリンカーによって接続されている、請求項17記載の構築物。

40

【請求項 2 2】

ペプチドリンカーが-Arg-Arg-または-lys-leu-である、請求項21記載の構築物。

【請求項 2 3】

請求項17記載の構築物および薬学的に許容される希釈剤または賦形剤を含む、組成物。

【請求項 2 4】

アジュバントをさらに含む、請求項23記載の組成物。

【請求項 2 5】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む融合タンパク質をコードする、核酸。

50

- 【請求項 26】
発現カセット内に存在する、請求項25記載の核酸。
- 【請求項 27】
ベクター内に存在する、請求項25記載の核酸。
- 【請求項 28】
請求項25の核酸でトランスフェクトされた、宿主細胞。
- 【請求項 29】
抗腫瘍ワクチンを生成する方法であって、以下の工程を含む方法：
請求項25記載の核酸を含む核酸でトランスフェクトされた細胞がCAIX-GM-CSF融合タンパク質を発現する条件下で、該細胞を培養する工程、および
該融合タンパク質を回収する工程。
- 【請求項 30】
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)と結合された、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む構築物を用いて、免疫系の細胞を活性化する工程を含む、CAIX抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、該新規CAIX変種の一部が残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含み、かつそれによる該活性化が新規CAIX変種に対する免疫応答を生じさせる、方法。
- 【請求項 31】
活性化する工程が、抗原提示細胞と構築物とを接触させることを含む、請求項30記載の方法。
- 【請求項 32】
活性化する工程が、構築物を哺乳動物に注射することを含む、請求項31記載の方法。
- 【請求項 33】
新規CAIX変種を保有する形質転換細胞の増殖または成長を阻害する方法であって、以下の工程を含む方法：
免疫細胞を哺乳動物宿主から取り出す工程；
該免疫細胞と、SEQ ID NO:1の新規CAIX変種、または残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含むその断片を含むタンパク質とを接触させることによって、該免疫細胞を活性化する工程であって、該新規CAIX変種またはその断片が、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはその断片に取り付けられている、工程；
任意で、活性化された細胞を増やす工程、および
該活性化された細胞を、新規CAIX変種を保有する形質転換細胞を含有する生物に注入する工程。
- 【請求項 34】
免疫細胞を取り出す工程が、哺乳動物宿主から末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を得ることを含む、請求項33記載の方法。
- 【請求項 35】
注入する工程が、活性化された細胞を、免疫細胞が取り出された宿主に注入することを含む、請求項33記載の方法。
- 【請求項 36】
免疫細胞が、樹状細胞、抗原提示細胞、Bリンパ球、T細胞、および腫瘍浸潤性リンパ球からなる群より選択される、請求項33記載の方法。
- 【請求項 37】
CAIXの発現変化を特徴とする癌を有する個体を治療する方法であって、以下の工程を含む方法：
(a)顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた新規CAIX変種を含む、感作に有効な量のキメラ融合タンパク質を用いて、抗原提示細胞をインビトロで感作させる工程であって、該新規CAIX変種が、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸の断片を含みかつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、工程；ならびに

10

20

30

40

50

(b) 治療的有効量の感作された抗原提示細胞を、該癌または転移を有する個体に投与する工程。

【請求項 38】

抗原提示細胞が、個体にとって自己に由来するものであるか、またはMHCが一致する同種異系の樹状細胞である、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

感作させる工程が、末梢血リンパ球、単球、線維芽細胞、TIL、および樹状細胞からなる群より選択される細胞と、キメラ融合タンパク質とを接触させることを含む、請求項37記載の方法。

【請求項 40】

感作させる工程が、樹状細胞またはRCCを、キメラ融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトすることを含む、請求項37記載の方法。

【請求項 41】

ポリペプチドリンカーを有するCAIXv-サイトカイン融合タンパク質をコードする核酸を含む、ベクター遺伝子送達システム。

【請求項 42】

サイトカインがIL-2、インターフェロン、またはインターフェロンである、請求項41記載のシステム。

【請求項 43】

サイトカインがGM-CSFである、請求項41記載のシステム。

【請求項 44】

ベクターがウイルスベクターシステムであり、ウイルスベクターが、AAVベクターシステム、アデノウイルスベクターシステム、レトロウイルスベクターシステム、レンチウイルスベクターシステム、シミアンウイルス40ベクターシステム、およびバキュロウイルスベクターシステムである、請求項41記載のシステム。

【請求項 45】

ベクターが非ウイルスベクターシステムである、請求項41記載のシステム。

【請求項 46】

脂質遺伝子送達システムまたはポリマー遺伝子送達システムである、請求項41記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2006年12月22日に出願された米国特許仮出願第60/876,863号に基づいて優先権を主張する。米国特許仮出願第60/876,863号はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、概して、腫瘍学および腫瘍関連抗原に関する。さらに具体的には、本発明は、新規の炭酸脱水酵素IX(CAIX)の核酸配列およびペプチド配列ならびに関連する組成物および方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

毎年、約39,000人の米国人が腎細胞癌(RCC)に罹患し、推定13,000人が腎細胞癌により死亡している。RCC患者の約1/3が診察時に進行疾患を有し、局在性疾患を有する患者の1/3が最終的には転移性疾患に進行する。最近、RCC治療法がかなり進歩し、RCC治療法に研究の取り組みが集中的になされてきた。転移性RCCは、化学療法および放射線療法などの従来の治療法に対して耐性があるために治療が難しく、(少なくとも一部は、高い浸潤性

10

20

30

40

50

および転移能のために)残存する癌細胞の根絶に有効な免疫応答を誘発する大きな障害となっている。

【0004】

最近、RCCの分子病態のより良い理解が進んだことから、免疫療法および遺伝子療法を含む、いくつかの新規の薬剤および手法が開発されており、RCC患者による臨床試験において適用されている。しかしながら、この方面でのかなりの研究の取り組みにもかかわらず進行期RCC患者の治療は中程度であり、患者の大多数は、最終的には、この疾患のために死亡した。転移性RCC患者の長期生存率は依然として10~20%しかない。

【0005】

細胞傷害性T細胞が翻訳後修飾エピトープを認識する能力は数年間にわたって認められてきたが、治療の利益となる免疫応答を生じさせる標的化手法において、この観察を利用したものはほとんどなかった。従って、癌免疫療法の成功は腫瘍関連抗原(TAA)の特定に集中していた。理想的なことに、腫瘍関連抗原(TAA)は癌細胞にだけ発現し、正常成人組織では発現しない。

10

【0006】

例示的なTAAは、CO₂と炭酸水素の相互変換を触媒することによって低酸素の間に細胞内および細胞外のpHを調節する膜貫通酵素である、炭酸脱水酵素IX(CAIX)である。この細胞表面タンパク質は腫瘍形成および腫瘍進行にも関与している場合があり、細胞増殖の調節、恐らく細胞接着の調節において役割を果たしていると考えられている。

【0007】

臨床転帰と相関関係のある、または潜在的に侵襲性のある疾患を有する患者を特定する新たなマーカー、例えば、本明細書において提供される新規CAIX変種は、RCCの診断および管理を劇的に改善することができる。従って、本願は、新規のcDNA配列およびアミノ酸配列を有するCAIX変種を提供する。これらの配列は、これまでに報告されたCAIX配列(例えば、NCBI遺伝子/タンパク質データベースおよびUniProtKB/Swiss-Protタンパク質データベースにある配列)とは異なる。さらに、本発明は、この新たに特定されたCAIX変種に基づく融合/キメラ分子(例えば、GMCSF-CAIXv)および抗体を提供する。CAIXvの核酸、ポリペプチド、および関連する構築物は、癌の治療および診断において有用である。

20

【発明の概要】

【0008】

第1の局面において、SEQ ID NO:1またはその一部を含むポリペプチドであって、一部は、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸を含み、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリペプチドが提供される。また、(a)SEQ ID NO:2;(b)SEQ ID NO:1を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列;および(c)(a)または(b)の断片を含むポリヌクレオチド配列であって、前記断片が、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸をコードし、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリヌクレオチド配列からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離されたまたは組換え型の核酸も提供される。

30

【0009】

本発明のさらなる態様は、癌予後を支援する方法を提供する。この方法は、(a)癌と診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規CAIX変種がある場合は、発現された新規CAIX変種を定量して、定量された新規CAIX変種の発現データを作成する工程であって、前記発現された新規CAIX変種が、SEQ ID NO:1、残基M33、G121、およびS374の1つもしくは複数を含むSEQ ID NO:1の一部、または新規CAIX変種もしくはその一部をコードする核酸を含む、工程;ならびに(b)定量された新規CAIX変種の発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程を含む。本発明の方法を用いて予後を決定することができる癌には、腎明細胞癌、子宮頸癌、膀胱癌、および低酸素誘導性癌が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0010】

本発明のさらなる態様において、癌予後を支援する方法は、(a)CAIXを発現する癌と診

50

断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規CAIX変種ポリペプチドがある場合は、発現された新規CAIX変種ポリペプチドを定量して、定量されたCAIXポリペプチドの発現データを作成する工程であって、前記試料が、腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、工程、ならびに(b)定量された新規CAIX変種ポリペプチドの発現データと、癌予後の確率を相関付ける工程であって、85%の定量パーセントが被験体の予後を層別化する、工程を含む。任意で、定量されたCAIXの発現データはコンピュータ可読型であり、(b)は、少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程;およびコンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力とのクローズネスオブフィット(closeness-of-fit)を決定するアルゴリズムを実行して、定量されたCAIXの発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程であって、前記入力は、癌患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程を含む。

10

【0011】

本発明はまた、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)または他の免疫エフェクターもしくはサイトカインと結合された、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む構築物であって、前記新規CAIX変種の一部は残基M33、G121および/またはS374の1つまたは複数を含む、構築物も提供する。任意で、構築物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、および/またはアジュバントを有する組成物の一部である。従って、本発明のCAIXvは、CAIXタンパク質に関して置換D33M、D121G、またはN364Sを含有する。

【0012】

20

さらなる局面において、本発明は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはサイトカインもしくは免疫エフェクターに取り付けられた、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む融合タンパク質をコードする核酸を提供する。ここで、新規CAIX変種の一部は残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む。任意で、核酸は、発現カセットとして、またはベクター内に提供される。本発明はまた、前記核酸でトランスフェクトされた宿主細胞も含む。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、サイトカイン-CAIX融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされた細胞が融合タンパク質を発現する条件下で、前記細胞を培養する工程、および前記融合タンパク質を回収する工程を含む、抗腫瘍ワクチンを生成する方法を提供する。

30

【0014】

さらなる局面において、本発明は、CAIX抗原に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。この方法は、サイトカイン(例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)または他の免疫エフェクターと結合された、新規CAIX変種の一部(この一部は、SEQ ID NO:1の残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む)を含む構築物を用いて、免疫系の細胞を活性化する工程であって、それによる該活性化が新規CAIX変種に対する免疫応答を生じさせる、工程を含む。活性化する工程は、抗原提示細胞と前記構築物を接触させることを含んでもよい。または、免疫系細胞の活性化は、構築物を動物(例えば、哺乳動物)に注入することによって達成されてもよい。

40

【0015】

前記の任意の態様において使用するのに適したサイトカインは、哺乳動物(好ましくは、ヒト)サイトカインである。哺乳動物サイトカインには、インターフェロン(IFN)(例えば、IFN- α 、IFN- γ)、インターロイキン1~20(例えば、IL-2、IL-4、IL-6)、ならびにTNFからなる群より選択されるサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。下記でGM-CSFを用いて大まかに例示されるように、このようなサイトカインは構築物および方法において使用できることが意図される。

【0016】

本発明のさらなる態様において、新規CAIX変種を保有する形質転換細胞の増殖または成長を阻害する方法が提供される。この方法は、免疫細胞を哺乳動物宿主から取り出す、ま

50

たは得る工程;前記免疫細胞と、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1、または残基M33、G121、およびS374の1つもしくは複数を含むその一部)を含むタンパク質を接触させることによって、前記免疫細胞を活性化する工程であって、新規CAIX変種またはその断片が、サイトカイン(例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはその断片)に取り付けられている、工程;任意で、活性化された細胞を増やす工程;ならびに活性化された細胞を、新規CAIX変種を保有する形質転換細胞を含有する生物に注入する工程を含み、それによって、形質転換細胞の成長を阻害する。免疫細胞は、例えば、哺乳動物宿主からの末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)でもよい。任意で、このように得られ、活性化された免疫細胞は、供給源である宿主に注入し戻されてもよい。本発明の方法において使用することができる免疫細胞には、樹状細胞、抗原提示細胞、Bリンパ球、T細胞、および腫瘍浸潤性リンパ球が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0017】

本発明のさらなる態様は、CAIXまたはCAIXvの発現変化を特徴とする癌を有する個体を治療する方法を提供する。この方法は、(a)顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)または他のサイトカインに取り付けられた新規CAIX変種を含む、感作に有効な量のキメラ融合タンパク質を用いて、抗原提示細胞をインビトロで感作させる工程であって、前記新規CAIX変種が、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸からなり、かつ残基M33、G121、およびS374の1つもしくは複数を含む断片を含む、工程;および(b)治療的有効量の感作された抗原提示細胞を、前記癌または転移を有する個体に投与する工程を含む。抗原提示細胞は、個体にとって自己に由来するものでもよく、またはMHCが一致する同種異系の樹状細胞である。多数の任意の細胞(例えば、末梢血リンパ球、単球、線維芽細胞、TIL、および/または樹状細胞)とキメラ融合タンパク質を接触させることによる、前記の細胞。好ましい態様において、感作する工程は、樹状細胞またはRC Cを、キメラ融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトすることを含む。CAIXv細胞表面タンパク質は腫瘍形成および腫瘍進行に関与し、細胞増殖の調節、恐らく細胞接着の調節に関与していると考えられている。CAIXおよびCAIXvは、多くの癌において見られる状態である低酸素によって誘導され、従って、本発明の方法は全ての腫瘍を標的とすることができる。

20

【0018】

CAIXおよびCAIXvは、多くの癌において見られる状態である低酸素によって誘導されるので、本発明の方法は全ての腫瘍(例えば、全ての固形腫瘍)を標的とすることができる。前記のいずれかのある態様では、癌は、子宮頸癌、膀胱癌、または腎臓癌である。

30

【0019】

別の局面において、本発明は、CAIXvポリペプチドに特異的な抗体を提供する。これらの抗体は、典型的には、少なくとも 10^{-5} M、より好ましくは、少なくとも 10^{-6} Mまたは 10^{-7} MのCAIXvに対する親和性を有する。一部のさらなる態様において、これらの抗体は、残基M33、G121、およびS374の1個、2個、または3個を含む、SEQ ID NO:1の一部に結合する。好ましくは、これらの抗体は、SEQ ID NO:3のヒトCAIXタンパク質またはBuiらへの米国特許出願第10/511,465号および関連するPCT出願PCT/US2003/11561に開示されたものと比較して、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含むCAIXvへの結合において選択的である。例えば、抗体は、SEQ ID NO:3の配列を有するCAIXタンパク質または特定の位置にある別のアミノ酸配列と比較して、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含むCAIXvへの結合において選択的でもよい。選択的な抗体の相対的な結合親和性は、少なくとも5倍または10倍異なってもよい。これらの抗体はまた、本発明の方法において用いられることが意図される。

40

【0020】

本発明のこれらの特徴および様々なさらなる特徴は、以下の開示を検討すれば明らかになると考えられる。

[本発明1001]

SEQ ID NO:1またはその一部を含むポリペプチドであって、該一部が、SEQ ID NO:1の少

50

なくとも20個の連続したアミノ酸を含み、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリペプチド。

[本発明1002]

(a)SEQ ID NO:2;

(b)SEQ ID NO:1を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列;ならびに

(c)(a)または(b)の断片を含むポリヌクレオチド配列であって、該断片が、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸をコードし、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離されたまたは組換え型の核酸。

10

[本発明1003]

癌予後を支援する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a)癌と診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規CAIX変種がある場合は、発現された新規CAIX変種を定量して、定量された新規CAIX変種の発現データを作成する工程であって、

該発現された新規CAIX変種が、

SEQ ID NO:1、

残基M33、G121、およびS374の1つもしくは複数を含むSEQ ID NO:1の一部、または新規CAIX変種もしくはその一部をコードする核酸
を含む、工程;ならびに

20

(b)定量された新規CAIX変種の発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程

[本発明1004]

癌が腎明細胞癌を含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

癌が子宮頸癌を含む、本発明1003の方法。

[本発明1006]

癌が膀胱癌を含む、本発明1003の方法。

[本発明1007]

癌が低酸素誘導性癌を含む、本発明1003の方法。

30

[本発明1008]

新規CAIX変種をコードする核酸がmRNAを含む、本発明1003の方法。

[本発明1009]

発現されたCAIXが免疫組織化学染色によって定量される、本発明1003の方法。

[本発明1010]

試料が、腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、本発明1003の方法

[本発明1011]

定量されたCAIXの発現データがコンピュータ可読型である、本発明1003の方法。

[本発明1012]

40

(b)が、

少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程;ならびに

コンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力との間のクロウズネスオブフィット(closeness-of-fit)を決定するアルゴリズムを実行する工程であって、該入力が癌患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

癌予後を支援する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a) CAIXを発現する癌であると診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存

50

在する、発現された新規CAIX変種ポリペプチドがある場合は、発現された新規CAIX変種ポリペプチドを定量して、定量されたCAIXポリペプチドの発現データを作成する工程であって、該試料が腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、工程；ならびに定量された新規CAIX変種ポリペプチドの発現データと、癌予後の確率を相関付ける工程であって、85%の定量パーセントが被験体の予後を層別化する、工程。

[本発明1014]

発現されたCAIXポリペプチドが免疫組織化学染色によって定量され、定量パーセントが陽性染色パーセントを含む、本発明1013の方法。

[本発明1015]

被験体が転移性の腎明細胞癌、子宮頸癌、膀胱癌、または低酸素誘導性癌と診断された時に、85%よりも高い定量パーセントが、85%またはそれより低い定量パーセントよりも、良好な被験体予後と相関する、本発明1013の方法。

[本発明1016]

定量されたCAIXの発現データがコンピュータ可読型であり、かつ

(b)が、

少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程、および

コンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力との間のクロウズネスオブフィットを決定するアルゴリズムを実行して、定量されたCAIXの発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程であって、該入力が発患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程

を含む、

本発明1013の方法。

[本発明1017]

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)と結合された、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む構築物であって、新規CAIX変種の一部は残基M33、G121、および/またはS374の1つまたは複数を含む、構築物。

[本発明1018]

新規CAIX変種の一部が少なくとも20個の連続したアミノ酸を含む、本発明1017の構築物。

[本発明1019]

GM-CSFがヒトGM-CSFである、本発明1017の構築物。

[本発明1020]

新規CAIX変種およびGM-CSFが融合タンパク質の成分である、本発明1017の構築物。

[本発明1021]

新規CAIX変種およびGM-CSFが、長さが2~約20アミノ酸のペプチドリinkerによって接続されている、本発明1017の構築物。

[本発明1022]

ペプチドリinkerが-Arg-Arg-または-lys-leu-である、本発明1021の構築物。

[本発明1023]

本発明1017の構築物および薬学的に許容される希釈剤または賦形剤を含む、組成物。

[本発明1024]

アジュバントをさらに含む、本発明1023の組成物。

[本発明1025]

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む融合タンパク質をコードする、核酸。

[本発明1026]

発現カセット内に存在する、本発明1025の核酸。

[本発明1027]

10

20

30

40

50

ベクター内に存在する、本発明1025の核酸。

[本発明1028]

本発明1025の核酸でトランスフェクトされた、宿主細胞。

[本発明1029]

抗腫瘍ワクチンを生成する方法であって、以下の工程を含む方法：

本発明1025の核酸を含む核酸でトランスフェクトされた細胞がCAIX-GM-CSF融合タンパク質を発現する条件下で、該細胞を培養する工程、および

該融合タンパク質を回収する工程。

[本発明1030]

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)と結合された、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む構築物を用いて、免疫系の細胞を活性化する工程を含む、CAIX抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、該新規CAIX変種の一部が残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含み、かつそれによる該活性化が新規CAIX変種に対する免疫応答を生じさせる、方法。

[本発明1031]

活性化する工程が、抗原提示細胞と構築物とを接触させることを含む、本発明1030の方法。

[本発明1032]

活性化する工程が、構築物を哺乳動物に注射することを含む、本発明1031の方法。

[本発明1033]

新規CAIX変種を保有する形質転換細胞の増殖または成長を阻害する方法であって、以下の工程を含む方法：

免疫細胞を哺乳動物宿主から取り出す工程；

該免疫細胞と、SEQ ID NO:1の新規CAIX変種、または残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含むその断片を含むタンパク質とを接触させることによって、該免疫細胞を活性化する工程であって、該新規CAIX変種またはその断片が、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはその断片に取り付けられている、工程；

任意で、活性化された細胞を増やす工程、および

該活性化された細胞を、新規CAIX変種を保有する形質転換細胞を含有する生物に注入する工程。

[本発明1034]

免疫細胞を取り出す工程が、哺乳動物宿主から末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を得ることを含む、本発明1033の方法。

[本発明1035]

注入する工程が、活性化された細胞を、免疫細胞が取り出された宿主に注入することを含む、本発明1033の方法。

[本発明1036]

免疫細胞が、樹状細胞、抗原提示細胞、Bリンパ球、T細胞、および腫瘍浸潤性リンパ球からなる群より選択される、本発明1033の方法。

[本発明1037]

CAIXの発現変化を特徴とする癌を有する個体を治療する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a)顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた新規CAIX変種を含む、感作に有効な量のキメラ融合タンパク質を用いて、抗原提示細胞をインビトロで感作させる工程であって、該新規CAIX変種が、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸の断片を含みかつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、工程；ならびに

(b)治療的有効量の感作された抗原提示細胞を、該癌または転移を有する個体に投与する工程。

[本発明1038]

10

20

30

40

50

抗原提示細胞が、個体にとって自己に由来するものであるか、またはMHCが一致する同種異系の樹状細胞である、本発明1037の方法。

[本発明1039]

感作させる工程が、末梢血リンパ球、単球、線維芽細胞、TIL、および樹状細胞からなる群より選択される細胞と、キメラ融合タンパク質とを接触させることを含む、本発明1037の方法。

[本発明1040]

感作させる工程が、樹状細胞またはRCCを、キメラ融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトすることを含む、本発明1037の方法。

[本発明1041]

ポリペプチドリンカーを有するCAIXv-サイトカイン融合タンパク質をコードする核酸を含む、ベクター遺伝子送達システム。

[本発明1042]

サイトカインがIL-2、インターフェロン、またはインターフェロンである、本発明1041のシステム。

[本発明1043]

サイトカインがGMCSFである、本発明1041のシステム。

[本発明1044]

ベクターがウイルスベクターシステムであり、ウイルスベクターが、AAVベクターシステム、アデノウイルスベクターシステム、レトロウイルスベクターシステム、レンチウイルスベクターシステム、シミアンウイルス40ベクターシステム、およびバキュロウイルスベクターシステムである、本発明1041のシステム。

[本発明1045]

ベクターが非ウイルスベクターシステムである、本発明1041のシステム。

[本発明1046]

脂質遺伝子送達システムまたはポリマー遺伝子送達システムである、本発明1041のシステム。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明のCAIXv構築物の模式図。この図は、N末端CAIXvとカルボキシ末端GMCSFポリペプチドがリンカーを介して連結していることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

従って、本願は、新規のcDNA配列およびアミノ酸配列を有するCAIX変種を提供する。これらの配列は、これまでに報告されたCAIX配列(例えば、NCBI遺伝子/タンパク質データベースおよびUniProtKB/Swiss-Protタンパク質データベースにある配列)とは異なる。これらの配列は、ヒト患者から得られた新鮮な腎臓細胞に由来する。さらに、本発明は、この新たに特定されたCAIX変種に基づく融合/キメラ分子(例えば、GMCSF-CAIXv)を提供する。本発明はまた、癌の治療および診断において有用な、CAIXvの核酸、ポリペプチド、および関連する構築物も提供する。

【0023】

本発明は、腎細胞癌、子宮頸癌、および膀胱癌を治療する新規の手法を提供する。特に、本発明は、CAIXv腎臓癌特異的抗原に取り付けられた顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むキメラ分子が、腎臓細胞癌に対する免疫応答を惹起する極めて有効な「ワクチン」を提供するという発見に関係している。このキメラ分子は、従来のワクチンとして、または養子免疫療法において使用することができる。GM-CSF-CAIXv融合タンパク質をコードする核酸は、裸のDNAワクチンとして、または養子免疫療法において細胞をトランスフェクトするために使用することができる。

【0024】

10

20

30

40

50

従って、1つの態様において、本発明は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)または他のサイトカインもしくは免疫エフェクターに取り付けられたCAIXvポリペプチドを含む構築物を提供する。GM-CSFは、好ましくは、ヒトGM-CSF、またはその生物学的に活性な断片および/もしくは変異体である。同様に、CAIXvポリペプチドは、好ましくは、ヒトCAIXvポリペプチドである。特に好ましい態様において、CAIXvポリペプチドは、GM-CSFに(直接、またはリンカーを介して)共有結合により取り付けられている。適切なリンカーは、-Lys-Leu-をコードするヌクレオチド配列AAGCTTによってコードされる。特に好ましい態様において、CAIXvおよびGM-CSFは、(化学的に構築された、または組換えにより発現された)融合タンパク質の成分である。このような融合タンパク質において、CAIXvポリペプチドおよびGM-CSFは直接接続しているか、またはより好ましくは、長さが2~約50、より好ましくは、約2~約20、最も好ましくは、約2~約10アミノ酸のペプチドリンカーによって接続されている。好ましいペプチドリンカーの1つが-Lys-Leu-である。特に好ましい構築物は、SEQ ID NO:1のCAIXvを有する。

10

【0025】

前記の任意の態様において使用するのに適したサイトカインは、哺乳動物(好ましくは、ヒト)サイトカインである。哺乳動物サイトカインには、インターフェロン(IFN)(例えば、IFN- α 、IFN- γ)、インターロイキン1~20(例えば、IL-2、IL-4、IL-6)、およびTNFからなる群より選択されるサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。下記でGM-CSFを用いて大まかに例示されるように、このようなサイトカインは構築物および方法において使用できることが意図される。従って、ある態様において、下記の構築物のGM-CSFは、インターフェロン(IFN)(例えば、IFN- α 、IFN- γ)、インターロイキン1~20(例えば、IL-2、IL-4、IL-6)、およびTNFからなる群より選択されるサイトカインと取り替えられる。ある態様において、1つまたは複数のサイトカインがCAIXvと融合される。

20

【0026】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載のキメラ分子および薬学的に許容される希釈剤または賦形剤を含む組成物を提供する。

【0027】

本発明はまた、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられたCAIXv腎臓癌特異的ポリペプチドまたは抗原を含む融合タンパク質をコードする核酸(例えば、DNAまたはRNA)も提供する。CAIXvは、CAIXvの抗原性断片または癌特異的エピトープでもよい。同様に、GM-CSFは、好ましくは、ヒトGM-CSFまたはその生物学的に活性な断片である。1つの好ましい態様において、核酸は、CAIXvおよびGM-CSFが直接接続しているか、またはより好ましくは、長さが2~約50、より好ましくは、約2~約20、最も好ましくは、約2~約10アミノ酸のペプチドリンカーによって接続された融合タンパク質をコードする。ある態様では、核酸は、好ましくは、-Arg-Arg-のリンカーをコードする。好ましい核酸の1つは、SEQ ID NO:2の核酸である。ある好ましい態様では、核酸は、SEQ ID NO:1のポリペプチドをコードする核酸である。核酸は、好ましくは、発現カセット内にあり、ある態様では、核酸はベクター(例えば、パキユロウイルスベクター)に存在する。

30

【0028】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸の1つまたは複数でトランスフェクトされた宿主細胞も提供する。宿主細胞は、好ましくは、真核細胞、最も好ましくは、昆虫細胞である。

40

【0029】

本発明はまた、抗腫瘍ワクチンを生成する方法も提供する。この方法は、好ましくは、キメラGM-CSF-CAIXvキメラ分子をコードする核酸がCAIXv-GM-CSF融合タンパク質を発現する条件下で、前記核酸でトランスフェクトされた細胞を培養する工程、および前記融合タンパク質を回収する工程を伴う。また、細胞は、好ましくは、真核細胞であり、より好ましくは、昆虫(例えば、SF9)細胞である。

【0030】

別の態様において、本発明は、CAIXv腎臓癌特異的抗原、および/またはCAIXv腎臓癌特

50

異的抗原を示す細胞、および/またはCAIXv抗原を発現する任意の癌細胞、および/またはCAIXv抗原と交差反応する抗原に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。この方法は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた腎臓癌特異的抗原(CAIXv)を含む構築物を用いて、免疫系の細胞を活性化する工程であって、それによる該活性化がCAIXv抗原に対する免疫応答を生じさせる、工程を伴う。ある態様において、活性化する工程は、抗原提示細胞(例えば、単球または樹状細胞)と構築物(キメラ分子)を接触させることを含む。ある特定の態様において、活性化される細胞は、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)または腫瘍浸潤性リンパ球などである。活性化する工程はまた、末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)と構築物を接触させることを伴ってもよい。前記接触はインビボで行われてもよく、エクスビボ(例えば、インビトロ)で行われてもよい。様々な態様において、活性化する工程は、抗原提示細胞(APC)に、CAIXvを含むポリペプチドを添加することを含む。活性化はまた、細胞(例えば、PBL、APC、TIL、腎細胞癌腫瘍細胞など)を、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトすることを含んでもよい。この方法は、細胞(例えば、細胞傷害性Tリンパ球)を哺乳動物に注入し戻すことをさらに含んでもよい。

10

【0031】

さらに別の態様において、本発明は、形質転換(例えば、新生)腎臓細胞の増殖または成長を阻害する方法を提供する。この方法は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた腎臓癌特異的抗原(CAIXv)を含む構築物を用いて、免疫系の細胞を活性化する工程であって、それによる該活性化がCAIXv抗原に対する免疫応答を生じさせ、免疫応答が形質転換腎臓癌細胞の成長または増殖を阻害する、工程を伴う。好ましい態様において、形質転換腎臓癌細胞は、腎細胞癌細胞(例えば、固形腫瘍、分散した腫瘍、または転移腫瘍の中にある腎細胞癌細胞)である。活性化する工程は、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)と構築物を接触させることを含んでもよい。活性化される細胞には、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)などが含まれてもよいが、これらに限定されない。ある特定の態様において、活性化する工程は、以下:GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を含むポリペプチド、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質でパルスされた(pulsed)樹状細胞、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質をコードする核酸を含む遺伝子療法構築物(例えば、アデノウイルス、ガットレス(gutless)-アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、シミアンウイルス40など)、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を発現する樹状細胞、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を発現する腫瘍細胞(例えば、RCC)、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を発現する線維芽細胞、GM-CSF-CAIXvの裸のDNA、GM-CSF-CAIXvポリペプチドをコードする核酸を含有する、またはGM-CSF-CAIXvポリペプチドをコードする核酸と複合体化したトランスフェクション試薬(例えば、カチオン性脂質、デンドリマー、リポソームなど)の1つまたは複数を、哺乳動物に注入する工程(または他の方法で投与する工程)を含んでもよい。特に好ましい態様において、活性化する工程は、単離された樹状細胞/PMBCを活性化する工程を含む。別の態様において、活性化する工程は、(インビボまたはエクスビボで)末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)と前記構築物とを接触させることを含む。末梢血細胞および/または樹状細胞および/または単球は、好ましくは、被験体に注入される。

20

30

40

【0032】

本発明はまた、CAIXv抗原を保有する形質転換腎臓癌細胞(RCC)の増殖または成長を阻害する方法を提供する。この方法は、免疫細胞を哺乳動物宿主から取り出す工程、免疫細胞と、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはその断片に取り付けられた腎臓癌特異的抗原(CAIXv)を含むタンパク質とを接触させることによって、免疫細胞を活性化する工程、任意で、活性化された細胞を増やす工程、および活性化された細胞を、CAIXvを保有する形質転換腎臓癌細胞を含有する生物に注入する工程を伴う。ある特定の態様において、活性化する工程は、細胞と、以下:GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を含むポリペプチド、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質でパルスされた樹状細胞、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質をコードする核酸を含む遺伝子療法構築物(例えば、アデノウイルス、ガットレス-アデ

50

ノウイルス、レトロウイルス、ランチウイルス(lantivirus)、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、シミアンウイルス40など)、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を発現する樹状細胞、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を発現する腫瘍細胞(例えば、RCC)、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質を発現する線維芽細胞、GM-CSF-CAIXvの裸のDNA、GM-CSF-CAIXvポリペプチドをコードする核酸を含有するかまたはGM-CSF-CAIXvポリペプチドをコードする核酸と複合体化したトランスフェクション試薬(例えば、カチオン性脂質、デンドリマー、リボソームなど)、の1つまたは複数と接触させることを含む。特に好ましい態様において、活性化する工程は、単離された樹状細胞/PMBCを活性化する工程を含む。別の態様において、活性化する工程は、(インビボまたはエクスピボで)末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)と前記構築物とを接触させることを含む。末梢血細胞および/または樹状細胞および/または単球は、好ましくは、被験体に注入される。取り出す工程は、哺乳動物宿主から末梢血リンパ球、および/または単球、および/または樹状細胞を単離および培養する工程を含んでもよい。注入する工程は、培養細胞または培養細胞を用いて作製された活性化された細胞を、免疫細胞が取り出された宿主に注入する工程を伴ってもよい。

10

【0033】

さらに別の態様において、本発明は、腎臓細胞癌を有する個体を治療する方法を提供する。この方法は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた腎臓細胞癌特異的抗原(CAIXv)を含む、感作に有効な量のキメラ融合タンパク質を用いて、抗原提示細胞(例えば、PBMC、樹状細胞など)をインビトロで感作させる工程、および治療的有効量の感作された抗原提示細胞を、前記腎臓細胞癌または転移を有する個体に投与する工程を伴う。特に好ましい態様において、抗原提示細胞は、個体にとって自己に由来する抗原提示細胞であるか、MHCが一致する同種異系の抗原提示細胞である。ある特定の態様において、感作させる工程は、末梢血リンパ球または単球または樹状細胞と、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質とを接触させることを伴う。ある特定の態様において、感作させる工程は、PBL、TIL、単球、樹状細胞とCAIXv-GM-CSFポリペプチドを接触させること、および/または樹状細胞、APC、RCC、線維芽細胞を、キメラ融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトすることを伴う。

20

【0034】

本発明のある態様において、患者または被験体は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、およびウシからなる群より選択される哺乳動物である。

30

【0035】

定義

特に定めのない限り、本明細書において使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者により一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および材料に類似する、または均等な任意の方法および材料を本発明の試験のための実施において使用することができるが、好ましい材料および方法を本明細書において説明する。本発明を説明およびクレームする際に、以下の専門用語が下記の定義に従って用いられる。

【0036】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する「a」、「an」、および「the」の単数形は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り複数の指示物を含む。従って、例えば、「1つの表面」についての言及は2つまたはそれ以上の表面の組み合わせを含み、「細菌」についての言及は細菌の混合物を含む。

40

【0037】

「炭酸脱水酵素IX」および「CAIX」という用語は、本明細書において、「CA9」、「MN」、「G250」と同義であるとみなされる。G250抗原は配列決定されており、HeLa細胞において最初に特定された腫瘍関連抗原であるMN/CAIX抗原と相同であることがデータベース分析によって明らかにされている(Pastorek et al. (1994)「Cloning and characterization of MN, a human tumor associated protein with a domain homologous to ca

50

rbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment」, Oncogene 9:2877-2888、およびOosterwijk et al. (1996) 「Molecular characterization of the renal cell carcinoma associated antigen G250」, Proc Amer Assoc Cancer Res 37:461)。この抗原(MN/CAIX/CA9/G250)は、見かけの分子量が54/58kDaの原形質膜糖タンパク質であり、いくつかのタイプの悪性腫瘍、例えば、子宮頸癌および卵巣癌(Liao et al. et al. (1994) 「Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas」, Am J Pathol 145:598-609)、腎臓癌(Oosterwijk et al. (1986) 「Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens」, Am J Pathol 123:301-309)、結腸直腸癌(Saamio et al. (1997) 「Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation」, Am J Pathol 153:279-285)、食道癌(Turner et al. (1997) 「MN antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic esophagus: a clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker」, Human Pathol 28:740-744)、膀胱癌(Uemura et al. (1997) 「Expression of tumor-associated antigen MN/G250 in urologic carcinoma: potential therapeutic target」, J Urol (Suppl) 157:377)において検出可能であるが、消化管以外の正常組織では検出されない。このことから、CAIXタンパク質が腫瘍形成能と関連していることが分かる。配列分析から、この遺伝子(MN/CAIX/CA9/G250)は炭酸脱水酵素(CA)ファミリーの新規のメンバーであることが証明されており、MN/CADUG250は唯一の腫瘍関連CAアイソザイムであるとみなされている。例えば、2001年10月2日にZavadaらに発行された、「MN遺伝子およびタンパク質(MN GENE AND PROTEIN)」という発明の名称の米国特許第6,297,051号を参照されたい。米国特許第6,297,051号は、全ての目的のためにその全体が参照により組み入れられる。

10

20

30

40

50

【0038】

炭酸脱水酵素IX(CAIX)は、ほとんどのRCCの分子署名(molecular signature)として用いられる、高発現の細胞表面腫瘍関連抗原である。従って、CAIXは、CAIXを標的とする治療介入および診断法を開発するための魅力的なバイオマーカーである。Buiらへの米国特許出願第10/511,465号および関連するPCT出願PCT/US2003/11561は、その全体が参照により本明細書に組み入れられ、RCC疾患の進行および生存に関連する分子マーカーとしてCAIXを使用する方法を提供する。この分子バイオマーカーの発現レベルは、その免疫化学的染色特性によって反映され、治療に対する応答、臨床要因、病理学的特徴、および生存と相関関係があった。さらに、Belldegrunらへの米国特許出願第09/783,708号もまたその全体が参照により本明細書に組み入れられ、CAIXまたはCAIXと交差反応する抗原を発現する癌を治療する(例えば、症状の緩和)方法について述べている。

【0039】

NCBI遺伝子/タンパク質データベースにおいて報告されている(および世界中の研究室で用いられている)CAIXのcDNA配列およびアミノ酸配列は、細胞培養系において増殖させた癌細胞株から得られた。対照的に、本明細書において提供される新規CAIX変種は、RT-PCRおよび配列分析を介して、RCC腫瘍患者の組織から直接特定された。驚いたことに、組織から得られたCAIX配列は、細胞培養系から得られ、他の研究室において報告されたCAIX配列とは異なる。特に、本発明者らは、NCBI遺伝子/タンパク質データベースおよびUniProt KB/Swiss-Protタンパク質配列データベースそれぞれに報告された全てのCAIXアミノ酸配列とは異なるアミノ酸が2個または3個あることを見出した。従って、本明細書において提供される新規のCAIX配列は、インサイチュで存在する(例えば、CAIXを発現する癌組織に存在する)タンパク質を反映しており、CAIX発現癌を有する患者、例えば、転移性RCC患者における治療転帰の特定、改善、および管理に使用することができる新規のバイオマーカーを提供する。

【0040】

新規のCAIXv配列は以下の通りである。

(表1) CAIXタンパク質配列 (SEQ ID NO:1):

MAPLCPSPWLPLLIPAPAPGLTVQLLSLLLLMPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPL
 GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPG
 GPQEPQNNHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFQSPVDIRPQLAAFCPALRPL
 ELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLPPGLEMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHT
 VEGHRFPAEIHVVHLSTAFARVDEALGRPGGLAVLAAFLLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIA
 EEGSETQVPGLDISALLPSDFSRYPQYEGSLTTPPCAQGVIVTVFNQTVMLSAKQLHTLS
 DTLWGPGD SRLQLSFRATQPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDILALVF
 GLLFAVTSVAFLVQMRQHRRGTKGGVSYRPAEVAETGA

10

(表2) CAIXv cDNA配列 (SEQ ID NO:2):

ATGGCTCCCCTGTGCCCCAGCCCCTGGCTCCCTCTGTTGATCCCGGCCCTGCTCCAGGCC
 TCACTGTGCAACTGCTGCTGCTACTGCTGCTTCTGATGCCTGTCCATCCCCAGAGGTTGCC
 CCGGATGCAGGAGGATTCCCCCTTGGGAGGAGGCTCTTCTGGGGAAGATGACCCACTGG
 GCGAGGAGGATCTGCCAGTGAAGAGGATTCGCCCAGAGAGGAGGATCCACCCGGAGA
 GGAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGAAGTTAAGC
 CTAAATCAGAAGAAGAGGGCTCCCTGAAGTTAGAGGATCTACCTACCGTTGAGGCTCCT
 GGAGGTCCTCAAGAACCCCAAGAATAATGCCACAGGGACAAAGAAGGGGATGACCAGA
 GTCATTGGCGCTATGGAGGCGACCCGCCCTGGCCCCGGGTGTCCCCAGCCTGCGCGGGCC
 GCTTCCAGTCCCCGGTGGATATCCGCCCCAGCTCGCCGCCTTCTGCCCGCCCTGCGCC
 CCCTGGAACCTCTGGGCTTCCAGCTCCCAGGCTCCCAGAACTGCGCCTGCGCAACAATG
 GCCACAGTGTGCAACTGACCTGCCTCCTGGGCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCAGGCGG
 GAGTACCGGGCTCTGCAGCTGCATCTGCACTGGGGGCTGCAGGTCGTCCGGGCTCGGA
 GCACACTGTGGAAGGCCACCGTTTCCCTGCCGAGATCCACGTGGTTCACCTCAGCACCGC
 CTTTGCCAGAGTTGACGAGGCCTTGGGGCGCCGGGAGGCCTGGCCGTGTTGGCCGCCTT
 TCTGGAGGAGGGCCCGAAGAAAACAGTGCCTATGAGCAGTTGCTGTCTCGCTTGGGAAG
 AAATCGCTGAGGAAGGCTCAGAGACTCAGGTCCAGGACTGGACATATCTGCACTCCTG
 CCCTCTGACTTCAGCCGCTACTTCCAATATGAGGGGTCTCTGACTACACCGCCCTGTGCC
 CAGGGTGTCTGACTGTGTTTAACCAGACAGTAATGCTGAGTGCTAAGCAGCTCCAC
 ACCCTCTCTGACACCCTGTGGGGACCCGGTACTCTCGGCTACAACCTGAGCTTCCGAGCG
 ACGCAGCCTTTGAATGGCGAGTGATTGAGGCCTCCTTCCCTGCTGGAGTGGACAGCAGT
 CCTCGGGCTGCTGAGCCAGTCCAGCTGAATTCCTGCCTGGCTGCTGGTGACATTCTAGCC
 CTGGTTTTTGGCCTCCTTTTGTGTCACCAGCGTCGCGTTTCTTGTGCAGATGAGAAGGC
 AGCACAGAAGGGGAACCAAGGGGGTGTGAGCTACCGCCAGCAGAGGTAGCCGAGAC
 TGGAGCCTAG

20

30

【0041】

「CAIX変種」または「CAIXv」という用語は、SEQ ID NO:1のポリペプチド、または前記ポリペプチドの一部、またはその一部を指す。ここで、一部は、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸を含み、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む。ある態様において、前記ポリペプチドは、SEQ ID NO:1の完全ポリペプチド配列を含む。他の態様において、一部は、少なくとも20個、30個、40個、50個、60個、70個、100個、200個、または300個の連続したアミノ酸を含む。ある態様において、一部は、残基M33、G121、およびS374を含む。

40

【0042】

CAIXv-GM-CSF構築物またはGM-CSF-CAIXv構築物は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子に取り付けられたCAIX変種を含むキメラ分子を指す。この取り付けは、(直接的なまたはリンカーを介した)化学結合でもよく、キメラ分子は、(組換えにより発現された、または2個の本分子の縮合によって組み立てられた)融合タンパク質でもよい。従って、「CAIXv-GM-CSF」または「GM-CSF-CAIXv」という表記は、CAIXvおよびGM-CSFが末端または内部に取り付けられている態様を含み、CAIXvがGM-CSFのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかに取り付けられていることを意図する。さらに、CAIXv-GMCSFという用語は、CAIXvタンパク質または抗原を保有する腎細胞癌を特異的標的とする抗体によって認識されるエピトープを保持しているCAIXv断片を含むキメラ分子を含んでもよい。同様に

50

、この用語は、GM-CSFの断片を含むキメラ分子を含んでもよい。ここで、GM-CSFは、ネイティブGM-CSFの生物学的活性を保持している(例えば、ネイティブGM-CSFを認識する受容体によって認識される、および/または同様の分裂促進活性を示すなど)。ある態様において、GM-CSFはヒトGM-CSFである。前記のCAIXvポリペプチドは、本発明の方法および構築物において使用することができる。

【0043】

「CAIXv核酸」という用語は、CAIXvポリペプチドをコードする核酸を指す。1つの態様において、CAIXv核酸配列はSEQ ID NO:2である。CAIXv核酸は、(a)SEQ ID NO:2、(b)SEQ ID NO:1を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および(c)(a)または(b)の断片であって、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸をコードし、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む断片を含むポリヌクレオチド配列からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列でもよく、(a)SEQ ID NO:2、(b)SEQ ID NO:1を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および(c)(a)または(b)の断片であって、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸をコードし、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む断片を含むポリヌクレオチド配列からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含んでもよい。前記のCAIXv核酸は、本発明の方法および構築物において使用するのに適している。

10

【0044】

「腎細胞癌」または「RCC」は腎実質の癌腫を指す。RCCはまた、しばしば、腎臓癌、「副腎腫」、または腎腺癌とも特定される。4つの主要なタイプの腎細胞癌、すなわち、明細胞型、顆粒細胞型、顆粒細胞型と明細胞型の混合型、および紡錘細胞型がある。

20

【0045】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸重合体を指すために本明細書において同義に用いられる。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、糖タンパク質ならびに非糖タンパク質を含む。

【0046】

「核酸」または「オリゴヌクレオチド」という用語または本明細書における文法上の相当語句は、共有結合している少なくとも2個のヌクレオチドを指す。本発明の核酸は、好ましくは、一本鎖または二本鎖であり、一般的に、ホスホジエステル結合を含有するが、下記で概要を述べたように、場合によっては、他の骨格を有することのある核酸類似体が含まれる。他の骨格は、例えば、ホスホルアミド(Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10): 1925)およびその中の参考文献; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35: 3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470、および Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419)、ホスホロチオエート(Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 1437および米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート(Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321)、O-メチルホホロアミダイト結合(Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Pressを参照されたい)、ならびにペプチド核酸の骨格および結合(Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380: 207を参照されたい)を含む。他の類似体核酸には、正の骨格(positive backbone)を有する核酸(Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; 非イオン骨格を有する核酸(米国特許第5,386,023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号、および同第4,469,863号; Angew. (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13: 1597; Chapters 2 and 3, *ASC Symposium Series* 580, 「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:

30

40

50

395; Jeffs et al. (1994) J. Biomolecular NMR 34: 17; Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996)), ならびに米国特許第5,235,033号および同第5,034,506号、ならびにChapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cookに記載の核酸を含む、非リボース骨格を有する核酸が含まれる。1つまたは複数の炭素環式糖を含有する核酸も核酸の定義に含まれる(Jenkins et al. (1995), Chem. Soc. Rev. pp169-176を参照されたい)。いくつかの核酸類似体は、Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 35頁に記載されている。リボース-リン酸骨格のこれらの改変は、標識などの付加部分の付加を容易にするために、または生理学的環境におけるこのような分子の安定性を高め、半減期を延ばすために行われてもよい。

【0047】

「免疫細胞」という用語は、免疫応答に直接または間接的に関与することができる細胞を指す。免疫細胞には、T細胞、B細胞、樹状細胞、細胞傷害性T細胞、腫瘍浸潤性リンパ球などが含まれるが、これらに限定されない。

【0048】

本明細書で使用する、(例えば、細胞を活性化する、または免疫応答を活性化するというように)「活性化する」という用語は、構築物との接触によるような直接的な活性化、または抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)を介した構築物もしくは抗原性断片との接触によるような間接的な活性化を含む。

【0049】

「融合タンパク質」は、2つまたはそれ以上のポリペプチドを、あるポリペプチドのアミノ末端と別のポリペプチドのカルボキシル末端との間に形成されるペプチド結合を介して接続することによって形成されるポリペプチドを指す。融合タンパク質は、構成ポリペプチドの化学結合によって形成されてもよく、1本の連続した融合タンパク質をコードする核酸配列から1本のポリペプチドとして発現されてもよい。単鎖融合タンパク質は、1本の連続したポリペプチド骨格を有する融合タンパク質である。

【0050】

融合タンパク質に関して用いられる「スペーサー」または「リンカー」は、融合タンパク質を構成するタンパク質を接続するペプチドを指す。一般的に、スペーサーは、タンパク質を接続する、またはタンパク質間のある程度の最小距離もしくは他の空間関係を保つ以外は、特定の生物学的活性を有さない。しかしながら、スペーサーの構成アミノ酸は、分子のフォールディング、実効電荷、または疎水性などの分子の何らかの特性に影響を及ぼすように選択されてもよい。

【0051】

化学的に結合されたキメラ分子に関して用いられる「スペーサー」または「リンカー」は、化学的に結合されたキメラ分子の構成分子を連結/接続する任意の分子を指す。

【0052】

「抗体」は、リガンドとの特異的結合に関与することができる、少なくとも1つの免疫グロブリン遺伝子または少なくとも1つの免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされるポリペプチドを指す。この用語は天然型ならびに断片および誘導体を含む。本明細書で使用する用語の範囲内にある断片は、標的分子、例えば、宿主細胞タンパク質に特異的に結合することができる限り、様々なペプチダーゼによる消化によって生成される断片、例えば、Fab、Fab'、およびF(ab)'₂断片、化学的解離、化学的切断、および組換えによって生成される断片を含む。例えば、ファージディスプレイによって生成される組換え断片のように、代表的な組換え断片には、単鎖FabおよびscFv(「単鎖可変領域」)断片が含まれる。この用語の範囲内にある誘導体は、種間キメラおよびヒト化抗体を含む、配列が改変されているが標的分子と特異的に結合することができる抗体(またはその断片)を含む。本明細書で使用するように、抗体は、ネイティブBリンパ球、ハイブリドーマ、組換え発現システムの細胞培養物からの採取、ファージディスプレイなどを含む任意の公知の技法によって生成することができる。

【0053】

10

20

30

40

50

従って、抗体は、免疫グロブリン遺伝子からのフレームワーク領域、または抗原を特異的に結合し、認識するその断片を含む。認められている免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、および α 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、 κ または λ のいずれかとして分類される。重鎖は、 γ 、 μ 、 δ 、 ϵ 、または α として分類され、これらは順に、それぞれ、免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを規定する。典型的には、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性および親和性において最も重要である。

【0054】

例示的な免疫グロブリン(抗体)の構造単位は四量体を構成する。それぞれの四量体は同じ2対のポリペプチド鎖から構成され、それぞれの対には1本の「軽」鎖(約25kD)および1本の「重」鎖(約50~70kD)がある。それぞれの鎖のN末端は、主に抗原認識を担う約100~110またはそれ以上のアミノ酸からなる可変領域を規定する。可変領域軽鎖(V_L)および可変領域重鎖(V_H)という用語は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖を指す。

10

【0055】

抗体は、例えば、インタクトな免疫グロブリン、または様々なペプチダーゼによる消化によって生成された多数の十分に特徴付けられた断片として存在する。従って、例えば、ペプシンは、抗体を、ヒンジ領域にあるジスルフィド結合より下で消化して、Fabの二量体である $F(ab)'_2$ を生じさせる。Fabそれ自体は、ジスルフィド結合によって軽鎖が V_H-C_H1 と結合したものである。ヒンジ領域にあるジスルフィド結合を分解する穏やかな条件下で $F(ab)'_2$ を還元し、それによって、 $F(ab)'_2$ 二量体をFab'単量体に変えることができる。Fab'単量体は本質的にFabであり、ヒンジ領域の一部を有する(Fundamental Immunology, Paul ed., 3d ed., 1993を参照されたい)。インタクトな抗体の消化の点から様々な抗体断片が定義されているが、当業者であれば、このような断片は化学的にまたは組換えDNA法を用いて新規合成できることを理解すると考えられる。従って、本明細書で使用する抗体という用語は、抗体全体を改変することによって生成された抗体断片、または組換えDNA法を用いて新規合成された抗体断片(例えば、単鎖Fv)もしくはファージディスプレイライブラリーを用いて特定された抗体断片も含む(例えば、McCafferty et al., Nature 348:52-554 (1990)を参照されたい)。

20

【0056】

従って、抗体という用語は、ミニボディ(minibody)、ダイアボディ(diabody)、およびトリアボディ(triabody)なども含む。ダイアボディは、高い結合力および特異性を有する、生体分子特異的な二価の小さな抗体断片である。優れた特異性および迅速な血液クリアランスのために、ダイアボディの高い信号雑音比は典型的に良好であり、このために、特異的抗原の診断的および治療的な標的化の潜在能力が高い(Sundaresan et al., J Nucl Med 44:1962-9 (2003)。さらに、これらの抗体は、必要に応じて、小さな単鎖Fvから、様々なアイソフォームを有するインタクトなIgGまで異なるタイプの抗体断片として操作することができるので有利である(Wu & Senter, Nat. Biotechnol. 23:1137-1146 (2005))。ある態様において、抗体断片はダイアボディの一部である。本発明による使用のための例示的なダイアボディには、本明細書においてKS41、KS49、KS83、KS89と指定されるものが含まれる。

30

40

【0057】

抗体、例えば、組換え抗体、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体を調製するためには、当技術分野において公知の多くの技法を使用することができる(例えば、Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988);およびGoding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986)を参照されたい)。関心対象の抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は細胞からクローニングすることができる。例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、組換えモノク

50

ローナル抗体を生成するのに使用することができる。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子もハイブリドーマまたはプラズマ細胞から作製することができる。重鎖遺伝子産物および軽鎖遺伝子産物をランダムに組み合わせることによって、抗原特異性の異なる抗体の大きなプールが作製される(例えば、Kuby, Immunology (3rd ed. 1997)を参照されたい)。単鎖抗体または組換え抗体を生成するための技法(米国特許第4,946,778号、米国特許第4,816,567号)を、本発明のポリペプチドに対する抗体を生成するように適合させることができる。また、ヒト化抗体またはヒト抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは他の生物、例えば、他の哺乳動物を使用することができる(例えば、米国特許第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996);およびLonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参照されたい)。または、選択された抗原に特異的に結合する抗体およびヘテロマーFab断片を特定するために、ファージディスプレイ技術を使用することができる(例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)を参照されたい)。抗体はまた、二重特異性、すなわち、2種類の抗原を認識できるようにすることができる(例えば、W093/08829, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991);およびSuresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)を参照されたい)。抗体はまた、ヘテロ結合体(heteroconjugate)、例えば、共有結合した2つの抗体でもよく、免疫毒素(例えば、米国特許第4,676,980号、W091/00360;W092/200373;およびEP03089)を参照されたい)でもよい。

10

20

30

40

50

【0058】

非ヒト抗体をヒト化または霊長類化(primatizing)する方法は当技術分野において周知である。一般的に、ヒト化抗体には、非ヒトの供給源から1つまたは複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、輸入(import)残基と呼ばれることが多い。輸入残基は、典型的には、輸入可変ドメインから選ばれる。ヒト化は、本質的には、Winterおよび共同研究者の方法(例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536(1988);およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596(1992)を参照されたい)に従って、ヒト抗体の対応する配列に対してげっ歯類のCDRまたはCDR配列を置換することによって行うことができる。従って、このようなヒト化免疫グロブリンは、インタクテナヒト可変ドメインより実質的に小さな配列が非ヒト種に由来する対応する配列で置換されているキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、一部のCDR残基、場合によっては一部のFR残基がげっ歯類抗体の類似部位に由来する残基で置換されているヒト抗体である。

【0059】

「キメラ抗体」は、(a)抗原結合部位(可変領域)が、異なるかまたは変化したクラス、エフェクター機能、および/もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新たな特性を付与する完全に異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬物などに連結するように、定常領域またはその一部が変化、置換、または交換されている、抗体分子、あるいは(b)可変領域またはその一部が、抗原特異性が異なるまたは変化した可変領域を用いて変化、置換、または交換されている、抗体分子である。

【0060】

抗体に「特異的に(もしくは選択的に)結合する」または「特異的に(もしくは選択的に)免疫反応する」という句は、タンパク質またはペプチドについて言及している場合、タンパク質が存在すること、多くの場合、タンパク質および他の生物学的因子の不均一集団の中にタンパク質が存在することを決定する結合反応を指す。従って、指定されたイムノアッセイ条件下で、明記された抗体は、ある特定のタンパク質に、バックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10~100倍超で結合する。このような条件

下で抗体に特異的に結合するには、ある特定のタンパク質に対する特異性について選択された抗体が必要である。例えば、ポリクローナル抗体は、選択された抗原と特異的に免疫反応し、他のタンパク質とは免疫反応しないポリクローナル抗体のみを得るように選択することができる。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を差し引くことによって達成することができる。ある特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために、様々なイムノアッセイ形式を使用することができる。例えば、タンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために、固相ELISAイムノアッセイが日常的に用いられる(特異免疫反応性を求めるのに使用することができるイムノアッセイ形式および条件の説明については、例えば、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)を参照されたい)。

10

【0061】

「予後」は、疾患状態の起こりそうな転帰に関する予測、症例の内容および症状、患者の疾患状態のモニタリング、疾患の再発についての患者のモニタリングにより示される疾患からの回復に関する見通しの決定、ならびに/または患者に好ましい治療法の決定を指す。

【0062】

「定量パーセント」は、CAIX発現が陽性の試料(例えば、標的組織または細胞試料、例えば、腎臓腫瘍に由来する試料、転移性病巣に由来する転移性病巣からの試料および/またはなど)のパーセントを含む、CAIX発現スコアを指す。好ましい態様において、試料の定量パーセントは、染色の程度または染色パーセント(例えば、試料中の、CAIXなどの染色が陽性の細胞のパーセント)を含むCAIX発現スコアを指す。ある特定の態様では、染色強度および最大染色強度の染色のパーセントなどの他の要因も特定の試料のCAIX発現スコアに含まれる。例えば、下記の実施例に例示されるように、分析された組織アレイからのCAIXスコア情報のサバイバルツリー(survival tree)分析から、85%の染色パーセントが、患者生存を層別化するのに理想的なカットオフであることが特定された。強度に関係なく、>85%の染色パーセントを高CAIX染色とみなしたのに対して、85%の染色パーセントを低CAIX染色とみなした。

20

【0063】

前記のように、本発明者らは、RCC患者組織からの試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、クローニング法、および配列分析を用いて、新規のcDNA配列およびアミノ酸配列を有するCAIX変種を特定した。新規CAIX変種(または本明細書において「変異体CAIX」と呼ばれる)の核酸配列およびタンパク質配列は、これまでに報告されたCAIX配列(例えば、NCBI遺伝子/タンパク質データベースおよびUniProtKB/Swiss-Protタンパク質データベースにある配列)とは異なる。さらに、この新たに特定されたCAIX変種に基づいて、融合/キメラ分子(GMCSF-CAIX)が構築された。この構築物は、初期の実験結果に基づいて、ならびにGMCSF遺伝子/ワクチン療法がRCCにおいて臨床抗腫瘍活性を有すると示されたことに基づいて、腎臓癌を標的とするワクチン療法に少なくとも最初は用いられるはずである。

30

【0064】

癌を標的とするワクチン療法

前記のように、RCC患者組織からの新規のcDNA配列およびアミノ酸配列(ならびに以前に報告された配列とは完全に異なる配列)を有するCAIX変種が本発明において提供される。数ある利点の中でも、新規のCAIX配列は、細胞表面上にCAIXを発現する様々な癌を標的とする、より効果的なワクチンを作製するのに使用することができる。

40

【0065】

例えば、腎臓癌を標的とするワクチン療法の研究プログラムの一環として、新たに特定されたCAIX変種に基づく融合/キメラ分子(GMCSF-CAIX)が構築された。この手法の原理は、初期の実験結果、ならびにサイトカイン-遺伝子療法/ワクチン療法が臨床試験において抗腫瘍活性を有すると以前に示されたことに基づいている。新規のヒトRCC CAIX変種は、CAIXに基づくワクチンの抗癌効力を大幅に高めるために、強力なサイトカインであるGMCSFと組み合わせられた。

50

【0066】

本発明は、GMCSF-CAIXv融合分子ならびにGMCSF-CAIXvアデノウイルスベクター遺伝子送達システムを提供する。好ましい態様では、本発明者らの研究室において以前に報告されたGFP含有padTrack-CMVシャトルベクターと交換するために、GMCSF-CAIXvの本構築においてpAd-CMVシャトルベクターが用いられた。さらに、持効/徐放技術と組み合わせたナノテクノロジープラットフォームを用いて、GMCSF-CAIXv融合分子を、例えば、樹状細胞において、さらに長期間発現させることができる。

【0067】

腎細胞癌の治療

RCC生物学におけるCAIXのよく認識された重要性を考慮すれば、本明細書において提供される新規のcDNA配列/アミノ酸配列を有するCAIX変種は、抗癌効力を増強する新しく特異的な戦略を開発するための、ならびにRCC疾患進行および生存に対する、新たな標的を提供する。新規のCAIXvタンパク質およびこれに対するモノクローナル抗体は両方とも、CAIXv発現癌の治療剤および診断剤として開発されてもよい。新規CAIX変種はまた、CAIXによって調節されるシグナル伝達経路を標的とする戦略においても使用することができる。

【0068】

予後の方法

新規CAIX変種はまた、癌組織におけるCAIXの相対的な発現レベルを評価するための予後バイオマーカーおよび経路署名(pathway signature)としても有用である。例えば、CAIXは、免疫組織化学的分析、RT-PCR、およびウエスタンブロットからのデータの収集を介して、RCC患者の評価において用いられている。前記のデータは、自己由来の正常腎臓組織において測定された発現レベルまたは対照組織の正常発現レベルと比較された。本発明の新規CAIX変種は改善された予後バイオマーカーを提供し、腎細胞癌(RCC)に加えて様々なCAIX発現癌に罹患した患者の予後情報を得るために、Buiらへの米国特許出願第10/511,465号および関連するPCT出願PCT/US2003/11561に記載の方法において使用することが可能である。前記方法は、CAIXを定量する工程を含む。本発明の方法はまた、臨床転帰を確実に予測することに加えて、数ある治療コースの中でもアジュバント免疫療法および/またはCAIX標的化療法を必要とする高リスク患者をより良く特定するのに使用することが可能である。

【0069】

キメラ構築物

前記のように、本発明は、新規CAIX変種またはCAIXvもしくはCAIXと交差反応する抗原を発現する任意のタイプの癌(例えば、腎細胞癌、子宮頸癌、膀胱癌、低酸素誘導性癌など)を治療する(例えば、症状の緩和)新規の手法を提供する。本発明の1つの態様において、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられた新規CAIX変種を含むキメラ分子が提供される。キメラ分子は(例えば、ワクチン接種によって)患者に投与されてもよく、これにより抗原提示細胞(例えば、樹状細胞)が活性化される。次いで、CAIXv抗原がHLAクラスI上に提示されることで、CAIX特異的細胞傷害性T細胞が活性化され、次いで、CAIX陽性癌細胞を溶解することができる。さらに、またはその代わりに、CAIXvペプチドはHLAクラスII細胞上に提示され、これによりCAIX特異的Tヘルパー細胞が活性化され、次いで、CTLの殺傷活性を活性化または維持する。

【0070】

キメラ構築物の調製および投与に関する詳細は、例えば、Belldegrunらへの米国特許出願第09/783,708号において見つけることができる。米国特許出願第09/783,708号の内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0071】

本発明は、腎細胞癌または特にCAIXvを含むCAIXを発現する任意のタイプの癌を治療する(例えば、症状の緩和)新規の手法を提供する。特に、本発明は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)に取り付けられたCAIXvを含むキメラ分子を利用する。1つの態様において、GM-CSFはSEQ ID NO:4の配列を有する。特定の理論に拘束されるつもりは

10

20

30

40

50

ないが、このキメラ分子は2つの形式の活性をもたらすと考えられている。キメラCAIXv-GM-CSF分子を用いた進行腎細胞癌患者へのワクチン接種は、患者の最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)の活性化をもたらす。樹状細胞は、例えば、GM-CSF受容体を介して、GM-CSFを取り込み、取り付けられているCAIXvは、GM-CSFに取り付けられていることで共輸送される。樹状細胞はCAIXvを処理し、HLAクラスI上でCAIXvペプチドを提示し、次いで、HLAクラスIはCAIXv特異的細胞傷害性T細胞(CD3⁺CD8⁺)を活性化し、次いで、CAIXv特異的細胞傷害性T細胞(CD3⁺CD8⁺)はCAIXv陽性腎臓癌細胞を溶解することができる。さらに、またはその代わりに、CAIXvペプチドはHLAクラスII細胞上で提示され、HLAクラスII細胞はCAIXv特異的Tヘルパー細胞を活性化し、次いで、CAIXv特異的Tヘルパー細胞はCTLの殺傷活性を活性化または維持する。

10

【0072】

ある特定の態様では、CAIXv-GM-CSF構築物をコードする核酸を「裸のDNA」ワクチンとして投与することができる。この手法では、生物/患者には、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする核酸が注射、例えば、筋肉内注射される。核酸は、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質の生成につながる生物内で発現され、次いで、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質は、前記のように抗腎細胞癌免疫応答を誘発する。

【0073】

別の態様において、キメラCAIXv-GM-CSF分子は養子免疫治療において使用することができる。この場合、キメラ分子(融合タンパク質)またはキメラ分子をコードする核酸は、エクスピボでリンパ球(例えば、T細胞)を活性化するのに用いられる。活性化されたリンパ球は、任意で、エクスピボで増やされ、次いで、被験体(患者)に再注入される。被験体(患者)において、活性化されたリンパ球は、CAIXv陽性腫瘍細胞(例えば、腎臓細胞腫瘍または子宮頸癌細胞)を特異的に攻撃し、溶解する。

20

【0074】

特に好ましい態様において、本発明は、以下の製剤の1つまたは複数を利用する：

1. GM-CSF(例えば、SEQ ID NO:4のGM-CSFポリペプチド)およびCAIXvポリペプチドの融合タンパク質を含むポリペプチド、
2. 融合タンパク質としてGM-CSFおよびCAIXvを含むポリペプチドでパルスされた樹状細胞または他の細胞、
3. GM-CSFおよびCAIXvの融合タンパク質をコードする核酸を含む、「遺伝子療法」ベクター(例えば、アデノウイルス、ガットレス-アデノウイルス、レトロウイルス、ランチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、シミアンウイルス40など)、
4. GM-CSFおよびCAIXvの融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされた樹状細胞(例えば、組換えウイルス、プラスミドDNAトランスフェクションなどを介して)、
5. GM-CSFおよびCAIXvの融合タンパク質をコードする核酸を含む腫瘍細胞(例えば、RCC細胞)、
6. GM-CSFおよびCAIXvの融合タンパク質をコードする核酸(例えば「裸のDNA」)、ならびに
7. トランスフェクション剤(例えば、DMRIE/DOPE脂質、デンドリマーなど)と複合体化した、GM-CSFおよびCAIXvの融合タンパク質をコードする核酸。

30

【0075】

これらの製剤はそれぞれ、生物(例えば、CAIXv、またはCAIXv抗原と交差反応性の抗原を発現する癌を有する哺乳動物)に直接投与されてもよく、養子免疫治療の状況において使用されてもよい。後者の手法では、養子免疫治療は、好ましくは、末梢血に由来する細胞(例えば、末梢血リンパ球(PBL))または腫瘍に由来する細胞(例えば、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL))を利用する。製剤が投与されると、PBMCまたはTILの培養物の中にある、CAIXvを標的とする細胞傷害性T細胞が活性化および増殖される。CAIXvを標的とするCTLが患者に注入されると、CAIXvに対する免疫応答が発生し、維持される。

40

【0076】

前記で特定された製剤はまた、「インピボ」ワクチン接種のために哺乳動物に直接投与することもできる。従って、例えば、GM-CSF-CAIXvポリペプチドまたはこのようなポリペ

50

プチドをコードする核酸は「従来の」ワクチンとして生物に投与することができる。しかしながら、前記で特定された他の免疫原性製剤もまたインビボで高い活性があり、「ワクチン」として生物に「直接」投与することもできる。従って、例えば、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質でパルスされた樹状細胞、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされた樹状細胞または他の細胞、GM-CSF-CAIXvポリペプチドをコードする遺伝子療法ベクターは全て、CAIXvに対する細胞傷害性T細胞の集団を誘導および維持する生物に投与することができる。

【0077】

CAIXv-GM-CSFキメラ分子は、例えば、インビボでワクチンとしてまたは養子免疫療法において用いられた場合、腎細胞癌に特異的に向けられた非常に力強い免疫応答を誘導することができる。この手法は、腎臓新生細胞が拡散していても(例えば、運動性の転移細胞)、(例えば、固形腫瘍のように)凝集していても、腎臓新生細胞の死または阻害をもたらす。これらの方法は、他の薬剤(例えば、サイトカインまたは薬物などの免疫調節剤または細胞傷害剤)の投与を伴ってもよい。

10

【0078】

本発明の方法は、完全な腫瘍消失(例えば、「治癒」)が価値のあることを示す必要がないと認められる。腫瘍の成長速度および/または転移細胞もしくは他の新生細胞の増殖のわずかな減少でも、生活の質および/または生存期間の改善と臨床的に関連し得る。もちろん、高い効力が観察されれば、本発明の方法は、特に、他の治療法(例えば、外科手術、化学療法、インターロイキン療法、TGF またはIL-10アンチセンス療法など)と併用された時には、かなりの程度または完全な程度の寛解を提供し得ると予想される。

20

【0079】

I. CAIXv-GM-CSFキメラ分子およびその発現

本発明は、腎臓腫瘍細胞に標的化された細胞性免疫応答を誘導するために、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF/GM-CSF)に取り付けられたCAIXv腎臓癌特異的抗原を含むキメラ分子を利用する。キメラ分子において、自然の状態では別々に存在する2種類またはそれ以上の分子と一緒に接続されて、その構成分子全ての望ましい機能を有する1つの分子を形成する。この場合、構成分子はそれぞれCAIXvおよびGM-CSFである。CAIXvは、(例えば、T細胞に)提示され、それにより細胞を活性化および増殖し、CAIXvまたはCAIXv抗原を保有する腫瘍細胞に対する細胞傷害性細胞(例えば、細胞傷害性Tリンパ球、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)など)を形成するエピトープを提供する。GM-CSFは、免疫系の成分(例えば、単球、樹状細胞、NK、PMN、PBMCなど)を刺激するように働き、かつ結合されているCAIXvまたはCAIXv抗原の樹状細胞による取り込みを媒介するように働く。さらに、特に、養子免疫療法では、GM-CSFはアジュバントとしても働くことができる。

30

【0080】

GM-CSFへのCAIXvの取り付けは直接的(例えば、共有結合)でもよく、間接的(例えば、リンカーを介した取り付け)でもよい。さらに、CAIXvおよびGM-CSFタンパク質はタンパク質の化学修飾によって取り付けられてもよく、組換え融合タンパク質として発現されてもよい。個々の成分およびキメラ分を生成する詳細な方法は下記で提供される。

【0081】

CAIXvの核酸配列は本明細書において開示される。GM-CSF(例えば、ヒトGM-CSF)の核酸配列は当業者に周知である(例えば、GenBankアクセッション番号E02287を参照されたい)。

40

【0082】

この配列情報を使用すると、当業者に周知の標準的な方法を用いて、CAIXv、GM-CSF、またはキメラCAIXv-GM-CSFをコードする核酸を生成することができる。例えば、核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写に基づく増幅システム(transcription-based amplification system)(TAS)、自己維持配列複製システム(self-sustained sequence replication system)(SSR)などのインビトロ方法によってクローニングまたは増幅させてもよい。多種多様なクローニング法およびインビトロ増幅法が当業者に周知

50

である。

【0083】

当業者を多くのクローニング演習に導くのに十分なこれらの技法および説明書の例が、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al (1989) Molecular Cloning--A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook et al.); Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.の合弁事業, (1994 Supplement) (Ausubel); Cashion et al., 米国特許第5,017,478号、およびCarr, 欧州特許第0,246,864号において見られる。

10

【0084】

当業者をインビトロ増幅法に導くのに十分な技法の例が、Berger, Sambrook, and Ausubel, as well as Mullis et al., (1987) 米国特許第4,683,202号; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem., 35: 1826; Landegren et al., (1988) Science, 241. 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology, 8: 291-294; Wu and Wallace, (1989) Gene, 4: 560;およびBarringer et al. (1990) Gene, 89: 117において見られる。

20

【0085】

CAIXv-GMCSF構築物のCAIXv分子およびGM-CSF分子を任意の順番で一緒に接続してもよい。従って、CAIXvを、GM-CSFのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに接続することができる。これらの分子が化学的に結合される場合、末端と末端をくっつけて接続される必要はなく、任意の便利な末端部位または内部部位に取り付けることができる。

【0086】

CAIXvおよびGM-CSFは、当業者に周知の多数の手段のいずれでも取り付けられてもよい。典型的には、CAIXvおよびGM-CSFは、直接またはリンカー(スペーサー)を介して結合される。両分子はポリペプチドであるので、1つの態様では、GM-CSFとCAIXvの間にペプチドスペーサーを任意で含有する単鎖融合タンパク質として、キメラ分子を組換え発現させることが好ましい。

30

【0087】

分子を化学的に結合させる手段は当業者に周知である。ポリペプチドは、典型的には、様々な官能基、例えば、カルボン酸(COOH)基または遊離アミン(-NH₂)基を含有し、これらの官能基は、エフェクター分子上の適切な官能基がエフェクターに結合する反応に利用可能である。

【0088】

本明細書で使用する「リンカー」は、CAIXvをGM-CSFに接続するのに用いられる分子である。好ましい態様において、リンカーは、CAIXvおよびGM-CSFの両方と共有結合を形成することができる。適切なリンカーは当業者に周知であり、直鎖もしくは分岐鎖の炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、またはペプチドリナーを含むが、これらに限定されない。ある特定の態様において、リンカーは、CAIXvおよび/またはGM-CSFを構成するアミノ酸に、その側鎖を介して(例えば、システインとのジスルフィド結合を介して)接続されてもよい。しかしながら、好ましい態様において、リンカーは、末端アミノ酸の炭素アミノ基およびカルボキシル基に接続される。リンカーは、一方の官能基がCAIXv上の置換基と反応し、別の官能基がGM-CSF上の置換基と反応する、二官能性でもよい。または、CAIXvおよび/またはGM-CSFは「単官能性」リンカーと反応するように誘導体化されてもよい(ペプチド上に反応基を作る手順については、例えば、米国特許第4,671,958号および同第4,659,839号を参照されたい)。

40

50

【0089】

特に好ましい態様において、本発明のキメラ分子は融合タンパク質である。融合タンパク質は、標準的な化学ペプチド合成技術を用いて化学合成されてもよく、より好ましくは、組換え発現されてもよい。両分子が比較的短い場合、キメラ分子は1本の連続したポリペプチドとして合成することができる。配列のC末端アミノ酸が不溶性支持体に取り付けられ、その後に、配列中の残りのアミノ酸が連続して付加される固相合成が、本発明のポリペプチドを化学合成するのに好ましい方法である。固相合成のための技法は、Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963)、およびStewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, 111 (1984)に記載されている。

10

【0090】

最も好ましい態様において、本発明のキメラ融合タンパク質は組換えDNA法を用いて合成される。一般的に、これは、融合タンパク質をコードするDNA配列を作り、このDNAを発現カセットの特定のプロモーターの制御下に配置し、宿主内でタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を単離し、必要に応じて、タンパク質を再生することを伴う。

【0091】

従って、1つの態様において、本発明は、以下の配列 (SEQ ID NO : 7) のhGMCSFとhCAIXvの融合をコードする核酸を提供する。
(hGMCSF)-(リンカー)-(CAIXv):

20

ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCC
 CGCTCGCCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCG
 GCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCA
 TCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCCTGGAGCTGTACA
 AGCAGGGCCTGCGGGGAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGC
 CACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGCAACCCAGACTATCACC
 TTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTTCATCCCCTTTGACTGCTGG
 GAGCCAGTCCAGGAG

10

AAGCTT

ATGGCTCCCCTGTGCCCCAGCCCCTGGCTCCCTCTGTTGATCCCGGCCCTGCTCCAGGCC
 TCACTGTGCAACTGCTGCTGTCACTGCTGCTTCTGATGCCTGTCCATCCCCAGAGGTTGCC
 CCGGATGCAGGAGGATTCCCCCTTGGGAGGAGGCTCTTCTGGGGAAGATGACCCACTGG
 GCGAGGAGGATCTGCCAGTGAAGAGGATTCGCCAGAGAGGAGGATCCACCCGGAGA
 GGAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGAAGTTAAGC
 CTAAATCAGAAGAAGAGGGCTCCCTGAAGTTAGAGGATCTACCTACCGTTGAGGCTCCT
 GGAGGTCCTCAAGAACCAGAAATAATGCCACAGGGACAAAGAAGGGGATGACCAGA
 GTCATTGGCGCTATGGAGGCGACCCGCCCTGGCCCCGGGTGTCCCCAGCCTGCGCGGGCC
 GCTTCCAGTCCCCGGTGGATATCCGCCCCAGCTCGCCGCTTCTGCCCGGCCCTGCGCC
 CCCTGGAACCTCTGGGCTTCCAGCTCCCGCCGCTCCAGAACTGCGCCTGCGCAACAATG
 GCCACAGTGTGCAACTGACCCTGCCTCCTGGGCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCGGGCGG
 GAGTACCGGGCTCTGCAGCTGCATCTGCACTGGGGGGCTGCAGGTCGTCCGGGCTCGGA
 GCACACTGTGGAAGGCCACCGTTTCCCTGCCGAGATCCACGTGGTTCACCTCAGCACCGC
 CTTTGCCAGAGTTGACGAGGCCTTGGGGCGCCGGGAGGCCTGGCCGTGTTGGCCGCCTT
 TCTGGAGGAGGGCCCCGAAGAAAACAGTGCCTATGAGCAGTTGCTGTCTCGCTTGAAG
 AAATCGCTGAGGAAGGCTCAGAGACTCAGGTCACAGGACTGGACATATCTGCACTCCTG
 CCCTCTGACTTCAGCCGCTACTTCCAATATGAGGGGTCTCTGACTACACCCGCCCTGTGCC
 CAGGGTGTCTGACTGTGTTTAAACCAGACAGTAATGCTGAGTGCTAAGCAGCTCCAC
 ACCCTCTCTGACACCTGTGGGGACCCGGTGACTCTCGGCTACAACCTGAGCTTCCGAGCG
 ACGCAGCCTTTGAATGGGCGAGTGATTGAGGCCTCCTTCCCTGCTGGAGTGGACAGCAGT
 CCTCGGGCTGCTGAGCCAGTCCAGCTGAATTCCTGCCTGGCTGCTGGTGACATTCTAGCC
 CTGGTTTTTGGCCTCCTTTTGTGCTGTCACCAGCGTCGCGTTCCTTGTGCAGATGAGAAGGC
 AGCACAGAAGGGGAACCAAGGGGGTGTGAGCTACCGCCCAGCAGAGGTAGCCGAGAC
 TGGAGCCTAG

20

30

【 0 0 9 2 】

別の態様において、本発明は、ポリペプチドリンカー(例えば、-Lys-Leu-)によって接
 続された、ヒトGMCSFタンパク質配列およびCAIXvタンパク質配列の融合タンパク質をコー
 ドする核酸配列(SEQ ID NO: 8)を提供する。

hGMCSF

MWLQSLLLLGTVAC SISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLS
 RDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLK
 GPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQTITFESFKENLKDFLLVIPFD
 CWEPVQE

40

リンカー(例えば、-Lys-Leu-)

CAIXvタンパク質

MAPLCPSPWLPPLLIPAPAPGLTVQLLLSLLLLMPVHPQRLPRMQED
 SPLGGGSSGEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGE
 EDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPGGPQEPQNNHRDKEGDD
 QSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFQSPVDIRPQLAAFCPALRPLEL
 LGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLPPGLEMALGPGREYRALQLHL
 HWGAAGRPGSEHTVEGHRFP AEIHVVHLSTAFARVDEALGRPGLL
 AVLAFLLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPS
 DFSRYFQYEGSLTTPPCAQGVIVTWFNQTVMLSAKQLHTLSDTLW
 GPGDSRLQLSFRATQPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCL
 AAGDILALVFGLLFAVTSVAFLVQMRRQHRRGTKGGVSYRPAEV
 AETGA

10

【0093】

本発明の融合タンパク質(GM-CSF-CAIXv)をコードするDNAは、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限、またはNarang et al Meth. Enzymol.68: 90-99 (1979)のホスホトリエステル法;Brown et al., Meth. Enzymol.68: 109-151 (1979)のホスホジエステル法;Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859-1862 (1981)のジエチルホスホルアミダイト法;および米国特許第4,458,066号の固体支持体法などの方法による直接化学合成を含む、任意の適切な方法によって調製されてもよい。

【0094】

化学合成によって一本鎖オリゴヌクレオチドが生成される。これは、相補配列とのハイブリダイゼーションによって、または一本鎖を鋳型として用いるDNAポリメラーゼによる重合によって、二本鎖DNAに変換されてもよい。当業者であれば、DNAの化学合成は約100塩基の配列に限定されるが、さらに長い配列は短い配列を連結することによって入手できることを認めるだろう。

20

【0095】

または、部分配列がクローニングされてもよく、適切な制限酵素を用いて適切な部分配列が切断されてもよい。次いで、望ましいDNA配列を生成するために断片が連結されてもよい。

【0096】

好ましい態様において、本発明の融合タンパク質をコードするDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などのDNA増幅法を使用している。

30

【0097】

核酸構築物は、CAIXvをコードする核酸とGM-CSFをコードする核酸との間にリンカー(gcggcg)を有してもよい。リンカー配列は、GM-CSFおよびCAIXvを、好ましい態様では各ドメインが二次構造および三次構造に適切に折り畳まれるのを確実にするのに十分な距離分だけ分離するのに用いられる。好ましいペプチドリンカー配列は柔軟性のある伸びたコンホメーションをとり、機能的なGM-CSFドメインおよびCAIXvドメインと相互作用することができる秩序正しい二次構造を生じる性質を示さない。柔軟性のあるタンパク質領域にある代表的なアミノ酸には、Gly、Asn、およびSerが含まれる。Gly、Asn、およびSerを含有するアミノ酸配列の実質的に任意の順列が、リンカー配列の上記の基準を満たすと予想される。リンカー配列には、ThrおよびAlaなどの他のほぼ中性のアミノ酸も使用することができる。従って、GM-CSFおよびCAIXvのリンカーとして有用なアミノ酸配列には、米国特許第5,108,910号において用いられるGly₄SerGly₅Serリンカー(SEQ ID NO:5)、または(Ala Gly Ser)残基が4回連続したものの(SEQ ID NO:6)などが含まれる。リンカーとして使用することができるさらに他のアミノ酸配列は、Maratea et al. (1985), Gene 40: 39-46; Murphy et al. (1986) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 8258-62;米国特許第4,935,233号;および米国特許第4,751,180号において開示される。

40

【0098】

ペプチドリンカー配列の長さは、融合タンパク質の生物学的活性に大きな影響を及ぼさなければ変化してもよい。本発明の好ましい態様の1つでは、機能的タンパク質ドメインを適切に分離するために、約2アミノ酸のペプチドリンカー配列長が用いられるが、それ

50

より長いリンカー配列も使用することができる。リンカー配列は長さが1~50アミノ酸でもよい。本発明の最も好ましい局面において、リンカー配列は長さが約1~20アミノ酸である。本明細書において開示される特定の態様において、リンカー配列は約2~約15アミノ酸であり、有利には、約2~約10アミノ酸である。本発明の融合タンパク質において、ペプチドリンカー配列は必ずしも必要であるとは限らない。

【0099】

一般的に、スペーサーは、タンパク質を接続するかまたはタンパク質間のある程度の最小距離もしくは他の空間関係を保つ以外は、特定の生物学的活性を有さない。しかしながら、スペーサーの構成アミノ酸は、フォールディング、実効電荷、または疎水性などの分子の何らかの特性に影響を及ぼすように選択されてもよい。

10

【0100】

CAIXv、GM-CSF、またはCAIXv-GM-CSF融合タンパク質を組換え発現させることが望ましい場合、望ましいタンパク質をコードする核酸配列は、典型的には、適切な転写調節エレメントまたは翻訳調節エレメントに機能的に連結される。調節エレメントには、典型的には、転写プロモーター、転写を制御する任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列が含まれる。複製起点によって通常付与される宿主内での複製能力、および形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子が、さらに組み込まれてもよい。

【0101】

融合タンパク質をコードする核酸配列は、大腸菌(*E. coli*)および他の細菌宿主を含む様々な宿主細胞、ならびに真核宿主細胞において発現させることができる。真核宿主細胞には、酵母、昆虫細胞(例えば、SF9細胞)、ならびに他の様々な真核細胞、例えば、COS、CHO、およびHeLa細胞株、ならびに骨髄腫細胞株が含まれるが、これらに限定されない。組換えタンパク質遺伝子は、各宿主に適した発現制御配列に機能的に連結される。大腸菌の場合、これは、T7、trp、またはプロモーターなどのプロモーター、リボソーム結合部位、好ましくは、転写終結シグナルを含む。真核細胞の場合、制御配列は、プロモーター、好ましくは、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウイルスなどに由来するエンハンサー、およびポリアデニル化配列を含み、スプライスドナー配列およびスプライスアクセプター配列を含んでもよい。特に好ましい態様の1つでは、GM-CSF-CAIXv融合遺伝子は、ポリヘドリン遺伝子座に基づくパキウロウイルス導入ベクター(例えば、PharMingenから入手可能なpVL1393)に挿入され、昆虫細胞(例えば、SF9細胞)において発現される。

20

30

【0102】

遺伝暗号の重複性(redundancy)を考慮すれば、本発明の核酸を用いる任意の態様において、タンパク質をコードする核酸の配列は、当業者に公知のように、細菌、ヒト細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞における発現、またはインビトロ翻訳のために、任意で、最適化することが可能である。

【0103】

本発明のプラスミドは、大腸菌の場合、塩化カルシウム形質転換、哺乳動物細胞の場合、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションなどの周知の方法によって、選択された宿主細胞に導入させることが可能である。プラスミドにより形質転換された細胞は、プラスミドが含有する遺伝子、例えば、amp、gpt、neo、およびhyg遺伝子によって付与される抗生物質耐性によって選択することが可能である。

40

【0104】

組換え融合タンパク質は、発現されると、硫安沈殿、hisタグ捕捉、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該技術分野の標準的な手順に従って精製することが可能である(概要については、R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N. Y. (1990)を参照されたい)。薬学的に使用するためには、均一性が少なくとも約90~95%の実質的に純粋な組成物が好ましく、98~99%またはそれ以上の均一性が最も好ましい。所望に応じて部分的に精製または

50

均一になるまで精製すれば、その後ポリペプチドを治療に使用してもよい。

【0105】

当業者であれば、化学合成、生物学的発現、または精製の後に、CAIXv、GM-CSF、またはGM-CSF-CAIXvタンパク質は、ポリペプチドのネイティブなコンホメーションとは異なるコンホメーションを有し得ることを認めるだろう。この場合、ポリペプチドを変性および還元し、次いで、ポリペプチドを好ましいコンホメーションに再び折り畳む必要がある。タンパク質を変性および還元し、再折り畳みを誘導する方法は当業者に周知である(Debinski et al. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan, (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; および Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270を参照されたい)。Debinskiらは、例えば、グアニジン-DTE中での封入体タンパク質の変性および還元について述べている。次いで、タンパク質は、酸化型グルタチオンおよびL-アルギニンを含有する酸化還元緩衝液中で再び折り畳まれる。

10

【0106】

当業者であれば、生物学的活性を減らすことなく、GM-CSF、CAIXv、またはGM-CSF-CAIXvタンパク質に改変を加えることができることを認めるだろう。クローニング、発現、または融合タンパク質への構成分子の組み込みを容易にするために、いくつかの改変が加えられることがある。このような改変は当業者に周知であり、例えば、開始部位を設けるためにアミノ末端に付加されるメチオニン、あるいは都合のよい位置にある制限部位もしくは終結コドンを作るために一方の末端に配置される付加アミノ酸、または精製を簡単にするために一方の末端に配置される付加アミノ酸、例えば、ポリヒスチジンタグ配列を含む。

20

【0107】

II. インビボでのタンパク質ワクチン接種

免疫原性組成物(例えば、ワクチン)が、好ましくは、本発明のCAIXv-GM-CSF融合タンパク質から調製される。ワクチンを含む免疫原性組成物は、注射液、液体の溶液、懸濁液、またはエマルジョンとして調製されてもよい。活性のある免疫原性成分は、免疫原性成分と適合する薬学的に許容される賦形剤と混合することができる。このような賦形剤は当業者に周知であり、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびその組み合わせを含むが、これらに限定されない。免疫原性組成物およびワクチンは、補助物質、例えば、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、または免疫原性組成物およびワクチンの有効性を増強するアジュバントをさらに含有してもよい。

30

【0108】

免疫原性CAIXv-GM-CSF組成物は、皮下注射、静脈内注射、皮内注射、腫瘍内注射、または筋肉内注射によって非経口投与されてもよい。または、本発明に従って形成された免疫原性組成物は、粘膜表面で免疫応答を惹起するようなやり方で処方および送達されてもよい。従って、免疫原性組成物は、例えば、鼻経路もしくは経口(胃内)経路によって、粘膜表面に投与されてもよい。または、坐剤および経口製剤を含む他の投与形式が望ましい場合がある。坐剤の場合、結合剤および担体には、例えば、ポリアルカレングリコールまたはトリグリセリドが含まれてもよい。このような坐剤を、約0.5~約10%、好ましくは約1~2%の活性免疫原性成分を含有する混合物から形成してもよい。経口製剤は、薬学的グレードのサッカリン、セルロース、および炭酸マグネシウムなどの通常用いられる担体を含んでもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、持効性製剤または散剤の形をとってもよく、約1~95%の活性成分、好ましくは、約20~約75%を含有する。

40

【0109】

免疫原性調製物およびワクチンは、投与製剤と適合するやり方で、および治療において有効であり、免疫原性があり、かつ防御をする量で投与される。投与される量は、例えば、個体の免疫系が抗体を合成する能力、必要に応じて、細胞性免疫応答を生じさせる能力を含む、治療しようとする被験体によって決まる。投与に必要なとされる厳密な活性成分量は医師の判断によって決まる。しかしながら、適切な投与量範囲は当業者によって容易に

50

決定することが可能であり、ワクチン接種1回あたり活性成分がマイクログラム～ミリグラムのオーダーでもよい。本発明の抗原性調製物は、有効量を1回または複数回投与することによって投与することができる。本発明の組成物の有効量は、投与1回あたり0.01～1,000マイクログラム/ml、より好ましくは、投与1回あたり0.1～500マイクログラム/ml、最も好ましくは、投与1回あたり10～300マイクログラム/mlでもよい。

【0110】

初回投与および追加免疫投与に適したレジメも変更可能であるが、初回投与とそれに続く追加免疫投与を含んでもよい。投与量は投与経路にも依存し、宿主の大きさによって異なる。

【0111】

本発明による免疫原性組成物中の活性成分(キメラタンパク質)の濃度は、一般的に、約1～95%である。

【0112】

抗原をアジュバントと同時に投与すれば、免疫原性を大幅に改善することができる。キメラ分子のGM-CSF成分はそれ自体がアジュバントとして働くことができるが、他のアジュバントも使用することができる。アジュバントは抗原の免疫原性を増強するが、それ自体で免疫原性があるとは限らない。アジュバントは、抗原を投与部位の位置的に近い場所に保って、抗原が免疫系細胞にゆっくりと持続的に放出されるのを容易にするデポー作用を生じさせることによって働いてもよい。アジュバントはまた、免疫系細胞を抗原デポーに引きつけ、免疫応答を誘発するように、このような細胞を刺激してもよい。

【0113】

免疫賦活剤またはアジュバントは、宿主免疫応答、例えば、ワクチンに対する宿主免疫応答を改善するために何年も用いられてきた。通常、リポ多糖などの内因性アジュバントは、ワクチンとして用いられる死菌または弱毒化細菌の成分である。外因性アジュバントは、宿主免疫応答を増強するために処方される免疫調節剤である。従って、非経口送達された抗原に対する免疫応答を増強するアジュバントが特定されてきた。しかしながら、これらのアジュバントの一部は毒性があり、望ましくない副作用の原因となることがあり、このためにヒトおよび多くの動物において使用するのに適していない。実際には、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム(ひとまとめにしてアラムと一般に呼ばれている)だけがヒト用および獣医学用ワクチンのアジュバントとして日常的に用いられている。アラムがジフテリア破傷風トキソイドに対する抗体応答を高める効力は確立しており、HBsAgワクチンのアジュバントとしてアラムが用いられている。

【0114】

多種多様な外因性アジュバントが抗原に対する強力な免疫応答を誘発することができる。これらには、膜タンパク質抗原と複合体化したサポニン(免疫刺激複合体)、pluronicポリマーと鉱油、不活化マイコバクテリアを含む鉱油、フロイント不完全アジュバント、ムラミルジペプチド(MDP)およびリポ多糖(LPS)ならびにリポDなどの細菌産物、およびリポソームが含まれる。

【0115】

体液性免疫応答(HIR)および細胞性免疫(CMI)を効率的に誘導するために、免疫原はアジュバントに溶解して乳化されることが多い。多くのアジュバントは毒性があり、肉芽腫、急性炎症および慢性炎症(フロイント完全アジュバント、FCA)、細胞溶解(サポニンおよびPluronicポリマー)、ならびに発熱、関節炎および前部ブドウ膜炎(LPSおよびMDP)を誘導する。FCAは優れたアジュバントであり、研究において広く用いられているが、毒性のためにヒト用および獣医学用ワクチンにおいて使用するのに許可されていない。

【0116】

III. インピボでのDNAワクチン接種

ある好ましい態様では、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする核酸がDNAワクチンに組み込まれる。抗原性タンパク質をコードする、直接注射されたDNAが防御免疫応答を誘発する能力は、非常に多くの実験系において証明されている(例えば、Conry et al. (1

10

20

30

40

50

994) *Cancer Res.*, 54: 1164-1168; Cox et al. (1993) *Virology*, 67: 5664-5667; Davis et al. (1993) *Hum. Mole. Genet.*, 2: 1847-1851; Sedegah et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 9866-9870; Montgomery et al. (1993) *DNA Cell Biol.*, 12: 777-783; Ulmer et al. (1993) *Science*, 259: 1745-1749; Wang et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 4156-4160; Xiang et al. (1994) *Virology*, 199: 132-140などを参照されたい。

【0117】

抗原性タンパク質をコードするDNAを直接注射して防御免疫応答を誘発するワクチン接種は、細胞性応答および体液性応答の両方を生じることが多い。さらに、マウスでは、様々な抗原をコードするDNAに対する、再現性のある免疫応答が、本質的に動物が生きている間続くと報告されている(例えば、Yankauckas et al. (1993) *DNA Cell Biol.*, 12: 771-776を参照されたい)。

【0118】

前記のように、DNAワクチンは当業者に公知である(米国特許第5,589,466号および同第5,593,971号、PCT/US90/01515、PCT/US93/02338、PCT/US93/048131、PCT/US94/00899、およびこれらの中で引用されている優先権出願を参照されたい)。これらの出願に記載の送達プロトコールに加えて、代替のDNA送達法が米国特許第4,945,050号および同第5,036,006号に記載されている。

【0119】

DNAワクチン技術を使用すると、遺伝子発現に必要とされる調節エレメントに機能的に連結されたCAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする配列を含むプラスミド(または他のベクター)DNAが、個体(例えば、ヒト患者、非ヒト哺乳動物など)に投与される。個体の細胞は、投与されたDNAを取り込み、コード配列は発現される。このように生成された抗原は免疫応答の標的になる。本発明の場合、キメラ分子の抗原成分に向けられる免疫応答は、個体の腎臓細胞癌に予防上または治療上の利益を提供する。

【0120】

本発明のワクチンは、物質を組織に投与する数種類の装置を含む様々な技法によって投与されてもよい。公表された文献には、DNAワクチン技術の局面について述べたいくつかの総論が載っており、この技術を用いて得られた多くの結果報告の一部が引用されている(例えば、McDonnell and Askari (1996) *New Engl. J. Med.* 334(1): 42-45; Robinson (1995) *Can. Med. Assoc. J.* 152(10): 1629-1632; Fynan et al. (1995) *Int. J. Immunopharmac.* 17(2): 79-83; Pardoll and Beckerleg (1995) *Immunity* 3: 165-169;およびSpohner et al. (1995) *Gene Therapy* 2: 173-180を参照されたい)。

【0121】

本発明によれば、CAIXv-GM-CSFコード配列はプラスミド(または他のベクター)に挿入され、次いで、プラスミド(または他のベクター)はワクチン組成物において用いられる。好ましい態様において、CAIXv-GM-CSFコード配列は、真核細胞における構築物の発現に必要とされる調節エレメントに機能的に連結される。DNA発現用の調節エレメントには、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルが含まれるが、これらに限定されない。さらに、Kozak領域などの他のエレメントもまた遺伝子構築物に含まれてもよい。開始シグナルおよび終結シグナルは調節エレメントであり、コード配列の一部とみなされることが多いが、必ずしもコード配列の一部とみなされとは限らない。好ましい態様において、本発明の遺伝子構築物のコード配列は、機能的な開始シグナルおよび終結シグナルを含む。

【0122】

本発明を実施するのに有用な、特に、ヒト用遺伝子ワクチンの生成において有用なプロモーターの例には、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)プロモーター、例えば、HIV長末端反復配列(LTR)プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、ALVプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、例えば、CMV前初期(immediate early)プロモーター、エプスタインバーウイルス(EBV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、なら

10

20

30

40

50

びにヒト遺伝子、例えば、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、およびヒトメタロチオネイン(metalothionein)に由来するプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0123】

本発明を実施するのに有用な、特に、ヒト用遺伝子ワクチンの生成において有用なポリアデニル化シグナルの例には、SV40ポリアデニル化シグナルおよびLTRポリアデニル化シグナルが含まれるが、これらに限定されない。特に、SV40ポリアデニル化シグナルと呼ばれる、pCEP4プラスミド(Invitrogen, San Diego, Calif.)内のSV40ポリアデニル化シグナルを使用することができる。

【0124】

DNA発現に必要とされる調節エレメントに加えて、他のエレメントもDNA分子に含めることができる。このようなさらなるエレメントにはエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ならびにウイルスエンハンサー、例えば、CMV、RSV、およびEBVに由来するエンハンサーを含むが、これらに限定されない群より選択されてもよい。

【0125】

本発明は、腎臓細胞癌に対する免疫応答を誘導するために、個体の細胞に遺伝物質を導入する方法に関する。この方法は、発現に必要とされる調節エレメントに機能的に連結されたCAIXv-GM-CSF融合タンパク質コード配列を含むDNAを、前記個体の組織に投与する工程を含む。DNAは、アジュバント、またはDNAの取り込みを促進する能力を有するかもしくは免疫系細胞を接種部位に動員する能力を有する他の物質の存在下で、投与することができる。好ましい態様において、DNA転写単位それ自体は、宿主細胞によって提供される転写因子またはDNA転写単位によって提供される転写因子によって宿主細胞内で発現されることが理解されるはずである。DNA転写単位は、免疫応答を刺激するのに役立つタンパク質、例えば、サイトカイン、アジュバントとして役立つタンパク質、および受容体として働くタンパク質をコードする核酸を含んでもよい。

【0126】

本発明の核酸に基づくワクチンを含有するベクターは、当技術分野において公知の方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション(リソソーム融合)、遺伝子銃の使用、またはDNAベクター輸送体によって望ましい宿主に導入することができる(例えば、Wu et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 963-967; Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem. 263: 14621-14624を参照されたい)。被験体は、筋肉内に、鼻腔内に、腹腔内に、皮下に、皮内に、局所に接種されてもよく、遺伝子銃によって接種されてもよい。

【0127】

被験体はまた粘膜経路によって接種されてもよい。DNA転写単位は、洗浄、DNAを含有する点鼻薬、吸入剤、坐剤を含む様々な方法によって、またはマイクロスフェアに包まれたDNAによって粘膜表面に投与することが可能である。例えば、DNA転写単位は呼吸器粘膜表面、例えば、気管に投与されてもよく、舌または粘膜を含む任意の表面上に投与されてもよい。

【0128】

DNA転写単位は、好ましくは、DNAの取り込みおよび発現を促進するように働く媒体、すなわち、アジュバントの中に入れて投与される。好ましくは、薬学的に許容される不活性媒体が、DNA転写単位を被験体に導入するためのアジュバントとして適している。適切なアジュバントの一例がアラム(アルミナゲル)であるが、食塩水でも許容される。可能性のある他のアジュバントには、有機分子、例えば、スクアリン(squaline)、イスコム(iscom)、有機油および有機脂肪が含まれる。

【0129】

本発明のCAIXv-GM-CSF核酸と共に免疫エフェクターを同時発現させ、それによって、免

10

20

30

40

50

疫エフェクターは、抗原に対する免疫応答を増強させることができる。免疫エフェクターをコードする核酸は、適切なDNAプロモーターに機能的に連結された別々のDNA転写単位で投与されてもよい。または、免疫エフェクターは、1つまたは複数のDNAプロモーターに機能的に連結された、CAIXv-GM-CSF構築物をコードする核酸を含むDNA転写単位に含まれてもよい。他の態様は、1つまたは複数のプロモーターに機能的に連結された、このような2つまたはそれ以上の免疫エフェクターを含有する。核酸は、キメラタンパク質および免疫エフェクターの両方をコードする1本の連続した重合体からなってもよく、キメラ分子および免疫エフェクターをそれぞれ個々にコードする独立した核酸セグメントからなってもよい。後者の場合、核酸は1つのベクターに挿入されてもよく、独立した核酸セグメントが別々のベクターに配置されてもよい。免疫エフェクターをコードする核酸およびキメラ分子をコードする核酸は同じDNAプロモーターに機能的に連結されてもよく、別々のDNAプロモーターに機能的に連結されてもよい。このような免疫エフェクターを加えることは当該技術分野において公知である。または、可溶性免疫エフェクタータンパク質(サイトカイン、モノカイン、インターフェロンなど)がCAIXv-GM-CSF DNAと共に被験体に直接投与されてもよい。

10

20

30

40

50

【0130】

免疫エフェクターの例には、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、インターフェロン-T、インターフェロン- δ 、腫瘍壊死因子- α 、腫瘍壊死因子- β 、インターロイキン-2、インターロイキン-6、インターロイキン-7、インターロイキン-12、インターロイキン-15、B7-1 T細胞補助刺激分子、B7-2 T細胞補助刺激分子、免疫細胞接着分子(ICAM)-1、T細胞補助刺激分子、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、およびその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0131】

遺伝子構築物は細胞に取り込まれた時に、機能的な染色体外分子として細胞に残ってもよく、および/または細胞の染色体DNAに組み込まれてもよい。DNAは、別々の遺伝物質として残る細胞、例えば、プラスミドの形で残る細胞に導入されてもよい。または、染色体に組み込むことができる線状DNAが細胞に導入されてもよい。DNAを細胞に導入する時に、染色体へのDNA組み込みを促進する試薬が添加されてもよい。組み込みを促進するのに有用なDNA配列もまたDNA分子に含まれてもよい。または、RNAが細胞に投与されてもよい。セントロメア、テロメア、および複製起点を含む線状ミニ染色体として遺伝子構築物を提供することも意図される。遺伝子構築物は、細胞内で存在する、弱毒化した生きた微生物または組換え微生物ベクターの中の遺伝物質の一部のままでよい。遺伝子構築物は、遺伝物質が細胞染色体に組み込まれるか、または染色体外に残る、組換えウイルスワクチンゲノムの一部でもよい。

【0132】

遺伝子構築物を染色体外に維持し、細胞内で複数の構築物コピーを生成するために、遺伝子構築物には哺乳動物複製起点が設けられてもよい。従って、例えば、Invitrogen(San Diego, Calif.)のプラスミドpCEP4およびpREP4は、エプスタイン-バーウイルス複製起点、および組み込みを起こすことなく高コピーエピソーム複製を生じさせる核抗原EBNA-1コード領域を含有する。

【0133】

何らかの理由で、遺伝子構築物を受け取った細胞を排除することが望ましい場合、細胞破壊の標的として役立つさらなるエレメントを付加することができる。発現可能な形のヘルペスチミジンキナーゼ(tk)遺伝子が遺伝子構築物に含まれてもよい。薬物ガンシクロビル(gancyclovir)が個体に投与されてもよく、この薬物は、tkを産生する任意の細胞の選択的死滅を引き起こし、従って、CAIXv-GM-CSF核酸構築物を有する細胞を選択的に破壊する手段を提供する。

【0134】

タンパク質産生を最大にするために、構築物が投与される細胞内での遺伝子発現に適し

た調節配列が選択されてもよい。さらに、細胞内で最も効率的に転写されるコドンが選択されてもよい。当業者であれば、細胞内で機能するDNA構築物を生成することができる。

【0135】

投薬の濃度は、好ましくは、有効な免疫応答を提供するのに十分な濃度である。投与される組換えベクターの投与量は、当業者に周知のように、使用される製剤の特性、例えば、そのインビボ血漿半減期、製剤中の組換えベクターの濃度、投与経路、投薬の部位および速度、被験体の臨床耐性などによって決まる。一連の接種において異なる投与量が用いられてもよい。医師は初回接種を投与し、次いで、比較的少ない用量の組換えベクターまたは他の追加抗原を用いて追加免疫を行ってもよい。

【0136】

好ましい用量範囲は、約30マイクログラム～約1mg DNAであり、より好ましくは、約50マイクログラム～500マイクログラムである。プラスミド発現および接種が最適化されるように、さらに低い用量が用いられてもよい。青少年または小児とは対照的に、成人の投与量が異なってもよい。好ましくは、接種の後に追加免疫が行われる。

【0137】

IV. 養子免疫治療

養子免疫治療は、免疫細胞が、腫瘍細胞に対する特異免疫を直接的または間接的に媒介することを目的として(すなわち、腫瘍細胞に対する免疫応答を開始することを目的として)宿主に投与される、癌または感染症を治療する治療手法を指す。好ましい態様において、免疫応答は、腫瘍および/または転移性細胞の成長および/または増殖の阻害をもたらす、最も好ましくは、新生細胞の死および/または吸収をもたらす。免疫細胞は異なる生物/宿主に由来してもよく(外因性免疫細胞)、被験体生物から得られた細胞(自己免疫細胞)でもよい。

【0138】

免疫細胞は、典型的には、ある特定の抗原(この場合ではCAIXv)によってインビトロで活性化され、任意で、増やされ、次いで、供給源である生物(例えば、患者)に再注入される。養子免疫治療を行う方法は当業者に周知である(例えば、米国特許第5,081,029号、同第5,985,270号、同第5,830,464号、同第5,776,451号、同第5,229,115号、同第690,915号などを参照されたい)。

【0139】

好ましい態様において、本発明は、例えば、前記のような、非常に多くの養子免疫治療法を意図する。1つの態様において、樹状細胞(例えば、患者から単離された樹状細胞または自己樹状細胞)がCAIXvまたはCAIXv-GM-CSFキメラ分子でパルスされ、次いで、被験体に注射し戻され、被験体においてインビボで免疫細胞に提示し、免疫細胞を活性化する。さらに、またはその代わりに、樹状細胞は、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされ、次いで、患者に再導入されてもよい。

【0140】

別の態様において、改変されたマクロファージまたは樹状細胞(抗原提示細胞)が、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質でパルスされるかまたはCAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトされ、次いで、培養されている末梢血リンパ球またはTILを刺激してCAIXv標的化CTLを活性化するのに用いられ、その後CAIXv標的化CTLは患者に注入される。

【0141】

同様に、線維芽細胞および他のAPCまたは腫瘍細胞(例えば、RCC)が、CAIXv-GM-CSFを発現する核酸でトランスフェクトされ、腫瘍細胞またはPBLをエクスピボで活性化してCAIXvに対するCTLを生成するのに用いられ、その後CAIXvに対するCTLを患者に注入することができる。

【0142】

同様に、CAIXvに対するCTLを生成するために、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする核酸を含有するかまたはCAIXv-GM-CSF融合タンパク質をコードする核酸と複合体化した

10

20

30

40

50

、遺伝子療法ベクター(例えば、アデノウイルス、ガットレス-アデノウイルス、レトロウイルス、ランチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスなど)、カチオン性脂質、リポソーム、デンドリマーなどを含むが、これらに限定されない、様々な「トランスフェクション剤」が、PBLまたは腫瘍細胞(例えば、RCC)にエクスピボ投与される。

【0143】

特に好ましい態様の1つでは、CAIXv抗原またはCAIXvと交差反応する抗原を発現する腫瘍に対して有効な市販ワクチンを提供するために、CAIXv-GM-CSFタンパク質を発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞(例えば、RCC細胞)が用いられる。

【0144】

本明細書において提供される開示を使用すると、CAIXv-GM-CSFポリペプチドまたはCAIXv-GM-CSF核酸を利用する他の治療法を容易に開発することができる。 10

【0145】

前記のように、1つの態様において、免疫細胞は、末梢血リンパ球またはTIL(例えば、腫瘍/腫瘍懸濁液に由来する)から得られる。インビトロ活性化に用いられるリンパ球には、Tリンパ球、様々な抗原提示細胞(例えば、単球、樹状細胞、B細胞など)などが含まれるが、これらに限定されない。活性化は、CAIXv抗原(またはその断片)を、例えば、HLAクラスI分子上および/またはHLAクラスII分子上に提示する抗原提示細胞と本発明のキメラ分子とを接触させることを伴い得り、かつ/または細胞(例えば、Tリンパ球)とキメラ分子とを直接接触させることを伴い得る。抗原提示細胞(APC)にはマクロファージ、樹状細胞、およびB細胞が含まれるが、これに限定されず、好ましくは、Inaba et al., (1992) J. Exp. Med. 176: 1693-1702に記載のように、ヒト末梢血または骨髄に由来する幹細胞および前駆細胞からインビトロで生成することによって得られる。 20

【0146】

免疫細胞の活性化は多くの形をとってもよい。これらには、培養されている末梢血リンパ球(PBL)または腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)にキメラ分子を直接添加すること、培養されている抗原提示細胞(例えば、単球、樹状細胞など)にキメラ分子を添加すること、抗原提示細胞またはPBLをGM-CSF-CAIXvキメラ融合タンパク質コード核酸でトランスフェクトすることなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0147】

APCは、当該技術分野において公知の様々な方法のいずれでも得ることができる。好ましい局面において、ヒト血液ドナーから得られたヒトマクロファージおよび/または樹状細胞が用いられる。一例として、以下のようにPBL(例えば、T細胞)を得ることができるが、これに限定されるわけではない。 30

【0148】

約200mlのヘパリン添加静脈血を静脈穿刺によって採取し、PBLをFicoll-hypaque勾配遠心分離法によって単離し、ドナーのリンパ球数に応じて約 $1 \sim 5 \times 10^8$ PBLを得る。PBLをリン酸緩衝食塩水で洗浄し、プールした熱失活正常ヒト血清を10%含有するRPMI1640培地に溶解して約 2×10^5 /mlで懸濁する。この培地は「完全培地」と呼ばれる。

【0149】

同様に、他の細胞(例えば、単核細胞)を、Ficoll-Hypaque勾配遠心分離法によって患者(好ましくは、治療しようとする患者)の末梢血から単離し、患者自身の血清または他のAB+ヒト血清で予めコーティングした組織培養皿に播種する。細胞を37°Cで1時間インキュベートし、次いで、ピペッティングによって非付着細胞を取り除く。皿に残っている付着細胞に、1mM EDTAを含む冷(4°C)リン酸緩衝食塩水を添加し、皿を室温で15分間放置する。細胞を採取し、RPMI緩衝液で洗浄し、RPMI緩衝液に懸濁する。マクロファージ-コロニー刺激因子(M-CSF)と37°Cでインキュベートすることによって、多数のマクロファージを得ることができる。Inaba et al. (1992) J. Exp. Med. 176: 1693-1702に詳述されるように、顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF)とインキュベートすることによって、より好ましくは、本発明のCAIXv-GM-CSFキメラ分子と、任意で、IL-4とインキュベートすることによって、多数の樹状細胞を得ることができる。 40

【0150】

細胞(例えば、APC)とキメラ分子を接触させる/インキュベートすることによって、細胞が感作される。ある態様において、感作は、APCと、キメラ分子に非共有結合している熱ショックタンパク質(hsp)を接触させることによって強めることができる。養子免疫療法の分野において、抗原性分子に非共有結合しているhspがAPC感作を強めることができると証明されている(例えば、米国特許第5,885,270号を参照されたい)。

【0151】

1つの好ましい態様において、例えば、本明細書の実施例に記載のように、CAIXv-GM-CSF融合タンパク質(と任意のIL-4)が患者PBMCにエクスピボで添加され、次いで、37℃で7日間培養される。培養物は、例えば、CAIXvを示す自己腎臓腫瘍細胞に対して抗腫瘍活性を示すまで4~5サイクル、IL-2および融合タンパク質で毎週、再刺激される。次いで、CTLは患者に再注入される。

10

【0152】

再注入のために、細胞は3回洗浄され、患者への注射に便利な濃度(例えば、 1×10^7 /ml)で、生理学的培地、好ましくは、滅菌した生理学的培地に再懸濁される。次いで、細胞懸濁液は、例えば、滅菌した110メッシュに通して濾過され、Fenwallトランスファーパック(transfer pack)に入れられる。細胞試料は、菌類、好気性細菌および嫌気性細菌、ならびにマイコプラズマを含む微生物が存在するかどうか試験される。特異免疫の誘導を証明するために、細胞試料は任意で免疫学的試験用に残される。

20

【0153】

好ましい態様では、免疫療法において使用する前に、刺激されたリンパ球は、CAIXvを保有する腫瘍細胞に対する細胞性免疫反応性について試験される。PBL/TILは、本発明のキメラ分子で刺激された後に、T細胞マーカーおよびB細胞マーカーの細胞表面発現について、T細胞抗原およびB細胞抗原に対するフルオレセイン結合モノクローナル抗体を用いた免疫蛍光分析によって試験することが可能である。CD4抗原およびCD8抗原などの公知のT細胞マーカーが発現していると、活性化されたリンパ球がT細胞と同一であることが確かめられる。

【0154】

次いで、活性化された細胞(例えば、活性化T細胞)は、任意で、CAIXvに対する反応性について試験される。これは、特異的な細胞性免疫をアッセイする、当技術分野において公知のいくつかの技法のいずれでも達成することができる。例えば、細胞傷害性アッセイは、刺激されたT細胞が、CAIXvまたはCAIXv抗原を保有する腫瘍細胞を死滅させる能力をインビトロで測定し、マーカーを含有するCAIXv保有腫瘍細胞(例えば、 ^{51}Cr 標識細胞)をリンパ球とインキュベートし、溶解の際の ^{51}Cr の放出を測定することによって達成することができる。このようなアッセイは記載されている(例えば、Zarling et al. (1986) J. Immunol. 136: 4669を参照されたい)。活性化PBLはまた、刺激後の ^3H -チミジンの取り込みによって示されるような増殖能力を測定することによって、および/または外因性IL-2の非存在下で、刺激の際にIL-2もしくはインターフェロンなどのリンホカインを生成する能力を測定することによって、Tヘルパー細胞活性についても試験することが可能である。白血球接着阻害アッセイ(Thomson, D. M. P. (ed.), 1982, Assessment of Immune Status by the Leukocyte Adherence Inhibition Test, Academic Press, New York)などの当該技術分野において公知の特異的な細胞性免疫の他のアッセイも使用することができる。

30

40

【0155】

活性化細胞の接種は、好ましくは、全身投与によるものである。細胞は、中心静脈カテーテルを介して、または大きな末梢静脈に入れて静脈内投与することが可能である。他の投与方法(例えば、動脈への直接注入)は本発明の範囲内である。最初に、約 1×10^8 個の細胞が注入され、その後の数時間にわたって残りが注入される。あるレジメでは、患者には、任意で、適切な投与量の生物学的応答調節物質が追加投与されてもよい。生物学的応答調節物質には、サイトカインIFN- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、TNFまたは他のサイトカイン増殖因子、アンチセンスTGF β 、アンチセンスIL-10などが含まれるが、これらに限

50

定されない。従って、一部の患者では、組換えヒトIL-2が用いられることがあり、T細胞注入から8時間ごとに静脈内に注入される。IL-2の注射は、好ましくは、癌患者において以前に用いられたように(Rosenberg et al. (1985) N. Engl. J. Med. 313: 1485)、10,000~100,000単位/kg体重の用量で行われる。IL-2注入は、患者が忍容性を示すのであれば、活性化T細胞の注入後、数日間続けられてもよい。

【0156】

接種による治療、例えば、活性化T細胞の接種による治療は、単独で、または他の治療法と共に使用することが可能である。他の治療法には、(前記に記載のように)IL-2の投与、他の化学療法(例えば、ドキシルピシン(doxirubicin)、ピンブラスチン、ピンクリスチンなど)の投与、放射線療法、外科手術などが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0157】

前記のように、細胞は、任意で、培養で増やされてもよい。この増殖は、本発明のCAIXv-GM-CSF構築物とIL-2を用いてもしくは用いずに、または本発明のCAIXv-GM-CSF構築物を用いて、T細胞を繰り返し刺激することによって達成されてもよく、IL-2のみを含有する培地中で増殖させることによって達成されてもよい。T細胞を培養する他の方法(例えば、他のリンホカイン、増殖因子、または他の生理活性分子を用いて)もまた本発明の範囲内である。例えば、T細胞上のTp67抗原またはTp44抗原を認識する抗体またはその誘導体分子は、活性化T細胞の増殖を増強することが示されており(Ledbetter et al. (1985) J. Immunol. 135: 2331)、インビトロ活性化の間に増殖を高めるのに使用されてもよい。インターフェロンは、細胞傷害性T細胞の発生を増強することが見出されており(Zarling et al. (1978) Immunol. 121: 2002)、インビトロ活性化の間に、CAIXvを保有する癌細胞に対する細胞傷害性T細胞の発生を増強するのに使用されてもよい。

20

【0158】

前記で提供された説明は、PBLの単離、活性化、増殖のための様々な方法について詳述している。しかしながら、本発明は、様々な形をしたCAIXv-GM-CSF構築物の使用、ならびにこれらのバリエーションを適応させるための前記の方法への変更および順応を提供する。従って、CAIXv-GM-CSF構築物を利用する様々な養子免疫治療手法の変更は本発明の範囲内である。

【0159】

V. 全身療法または養子免疫治療のための遺伝子導入

養子免疫治療における活性化のためにキメラGM-CSF-CAIXvキメラタンパク質を使用することに加えて、細胞(例えば、APC、PBL、線維芽細胞、TIL、またはRCC腫瘍細胞)を、キメラ分子を発現するベクターでトランスフェクトし、養子免疫治療および/またはワクチン療法に使用することができる。

30

【0160】

1つの好ましい態様において、GM-CSF-CAIXvキメラ融合タンパク質をコードする核酸は、インビトロおよび/またはインビボで細胞(例えば、ヒト細胞または他の哺乳動物細胞)をトランスフェクトする能力のある遺伝子療法ベクターにクローニングされる。

【0161】

インビボ、エクスピボ、およびインビトロで核酸を細胞に導入するために、いくつかの手法が用いられている。これらには、脂質またはリポソームに基づく遺伝子送達(WO96/18372;WO93/24640;Mannino and Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691;Rose 米国特許第5,279,833号;WO91/06309;およびFelgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 7413-7414)、ならびにレトロウイルスゲノムの一部として治療用ポリヌクレオチド配列を有する複製欠損レトロウイルスベクターが含まれる(例えば、Miller et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:4239 (1990); Kolberg (1992) J. NIH Res. 4: 43、およびCornetta et al. (1991) Hum. Gene Ther. 2: 215を参照されたい)。

40

【0162】

遺伝子療法手順の概説については、例えば、Anderson, Science (1992) 256: 808-813; Nabel and Felgner (1993) TIBTECH 11: 211-217; Mitani and Caskey (1993) TIBTECH

50

11: 162-166; Mulligan (1993) *Science*, 926-932; Dillon (1993) *TIBTECH* 11: 167-175; Miller (1992) *Nature* 357: 455-460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36; Kremer and Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1) 31-44; Haddada et al. (1995) in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Doerfler and Bohm (eds) Springer-Verlag, Heidelberg Germany; および Yu et al., (1994) *Gene Therapy*, 1: 13-26を参照されたい。

【 0 1 6 3 】

広く用いられているレトロウイルスベクターには、マウス白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全症ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、アルファウイルス、およびその組み合わせに基づくレトロウイルスベクターが含まれる(例えば、Buchscher et al. (1992) *J. Virol.* 66(5)2731-2739; Johann et al. (1992) *J. Virol.* 66 (5): 1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., (1990) *Virology* 176:58-59; Wilson et al (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal et al., PCT/US94/05700、ならびにRosenburg and Fauci (1993) in *Fundamental Immunology*, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York およびその中の参考文献、ならびに Yu et al. (1994) *Gene Therapy*, 前記; 米国特許第 6,008,535号などを参照されたい)。

【 0 1 6 4 】

ベクターは、任意で、ベクター宿主域を、ベクターに対応するレトロウイルスが感染しない細胞まで拡大するようにシュードタイピングされる。例えば、造血幹細胞に感染することができる VSV-G シュードタイピング HIV ベクターを構築するために、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質(VSV-G)が用いられている(Naldini et al. (1996) *Science* 272:263、および Akkina et al. (1996) *J. Virol* 70:2581)。

【 0 1 6 5 】

例えば、核酸およびペプチドのインビトロ生成において、ならびにインビボおよびエクスピボでの遺伝子療法手順において、細胞を標的核酸によって形質導入するためにアデノ随伴ウイルス(AAV)に基づくベクターも用いられる。AAVベクターの概要については、West et al. (1987) *Virology* 160:38-47; Carter et al. (1989) 米国特許第4,797,368号; Carter et al. WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94: 1351を参照されたい。組換えAAVベクターの構築は、Lebkowski, 米国特許第5,173,414号; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11): 3251-3260; Tratschin, et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 6466-6470; McLaughlin et al. (1988) and Samulski et al. (1989) *J. Virol.*, 63:03822-3828を含む、多くの刊行物に記載されている。rAAVによって形質転換することができる細胞株には、Lebkowski et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996に記載の細胞株が含まれる。他の適切なウイルスベクターには、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、およびワクシニアウイルスが含まれる。

【 0 1 6 6 】

ウイルスベクターに加えて、多数の非ウイルストランスフェクション法を利用することができる。このような方法には、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポソーム、カチオン性脂質複合体、水-油エマルジョン、ポリエチレンイミン、およびデンドリマーが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 6 7 】

リポソームは1965年に細胞膜のモデルとして初めて述べられ、物質を細胞に送達するのに急速に適用された。リポソームは、カチオン性リポソームまたはpH感受性リポソームとして分類される元となった2つの機構のうちの1つによってDNAを捕捉する。カチオン性リポソームは、負に荷電したDNAと相互作用して、安定した複合体を形成する正に荷電したリポソームである。カチオン性リポソームは、典型的には、正に荷電した脂質およびコリ

10

20

30

40

50

ピド(co-lipid)からなる。一般に用いられるコリピドには、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)またはジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)が含まれる。コリピドはヘルパー脂質とも呼ばれ、ほとんどの場合、リポソーム複合体の安定化に必要とされる。様々な正に荷電した脂質製剤が市販されており、多くの他の正に荷電した脂質製剤が開発中である。一番よく挙げられるカチオン性脂質のうちの2つがリポフェクタミンおよびリポフェクチンである。リポフェクチンは、培養細胞に遺伝子を送達することが1987年にPhil Felgnerによって最初に報告された市販のカチオン性脂質である。リポフェクチンは、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N-N-N-トリメチルアンモニウムクロライド(DOTMA)およびDOPEの混合物である。

【0168】

DNAとリポフェクチンまたはリポフェクタミンは自発的に相互作用して、充填効率(load ing efficiency)が100%の複合体を形成する。言い換えると、十分な脂質が利用可能であれば、DNAの本質的に全てが脂質と複合体を形成する。DNA分子の負電荷はDOTMAの正電荷基と相互作用すると想定されている。これらの複合体の形成において用いられる脂質:DNAの比および脂質総濃度は効率的な遺伝子導入に極めて重要であり、用途によって異なる。リポフェクチンは、線状DNA、プラスミドDNA、およびRNAを様々な培養細胞に送達するのに用いられてきた。リポフェクチンは導入直後に、インビボで遺伝子を送達するのに使用できることが示された。リポフェクチン-DNA複合体が静脈内投与された後に、肺および肝臓は両方とも、これらの複合体を取り込む著しい親和性、およびトランスジーンの発現を示した。これらの複合体の他の組織への注射は様々な結果を出し、大部分は、肺または肝臓へのリポフェクチンを介した遺伝子導入より非常に効率が低かった。

【0169】

pH感受性の、すなわち負に荷電したリポソームはDNAと複合体化するのではなく、DNAを捕捉する。DNAと脂質は両方とも同じ電荷を持つので、複合体形成ではなく反発が起こる。それにもかかわらず、一部のDNAは、これらのリポソームの水性内部になんとか入ろうとする。ある場合では、これらのリポソームは低pHによって不安定になり、それゆえpH感受性と名付けられた。今まで、カチオン性リポソームは、インビボおよびインビトロでの遺伝子送達において、pH感受性リポソームより非常に効率が高かった。pH感受性リポソームは、インビボDNA送達においてカチオン性対応物より効率が非常に高くなる可能性があり、毒性を下げ、血清タンパク質からの妨害を減らすことで、効率を高めることができるはずである。

【0170】

別の手法では、DNAと複合体化したデンドリマーが、細胞をトランスフェクトするのに用いられてきた。このようなデンドリマーには、「スターバースト(starburst)」デンドリマーおよび様々なデンドリマーポリカチオンが含まれるが、これらに限定されない。

【0171】

デンドリマーポリカチオンは、三次元の非常に規則正しいオリゴマー化合物および/またはポリマー化合物である。典型的には、これらのオリゴマー化合物および/またはポリマー化合物は、オリゴマーおよび/またはポリマーを付加し、正に荷電した外面を設ける反復反応シーケンスによって、コア分子上または指定の開始剤上に形成される。これらのデンドリマーは、PCT/US83/02052、および米国特許第4,507,466号、同第4,558,120号、同第4,568,737号、同第4,587,329号、同第4,631,337号、同第4,694,064号、同第4,713,975号、同第4,737,550号、同第4,871,779号、同第4,857,599号に開示されるように調製されてもよい。

【0172】

典型的には、デンドリマーポリカチオンは、ポリマーが付加されたコア分子を含む。ポリマーは、正電荷を獲得することができる末端基を含むオリゴマーでもよく、正電荷を獲得することができる末端基を含むポリマーでもよい。適切なコア分子は、コア分子とオリゴマーおよび/またはポリマーの結合に利用することができる少なくとも2つの反応残基を含む。反応残基の例は、特に、ヒドロキシル、エステル、アミノ、イミノ、イミド、ハラ

10

20

30

40

50

イド、カルボキシル、カルボキシハライド、マレイミド、ジチオピリジル、およびスルフヒドリルである。好ましいコア分子は、特に、アンモニア、tris-(2-アミノエチル)アミン、リジン、オルニチン、ペントエリスリトール、およびエチレンジアミンである。これらの残基の組み合わせもまた他の反応残基と同様に適している。

【0173】

本発明の dendritic polymer cation の調製に適したオリゴマーおよびポリマーは、身体によく受け入れられる、薬学的に許容されるオリゴマーおよび/またはポリマーである。これらの例は、特に、 α 、 ω -エチレン性不飽和カルボン酸のアルキルエステルまたは α 、 ω -エチレン性不飽和アミドと、アルキレンポリアミンまたはポリアルキレンポリアミンの反応から得られるポリアミドアミンである。メチルアクリレートおよびエチレンジアミンが好ましい。ポリマーは、好ましくは、コア分子に共有結合している。

10

【0174】

オリゴマーおよび/またはポリマーに取り付けられ得る末端基は、正電荷を獲得できるはずである。これらの例は、アゾール、ならびに第1級、第2級、第3級、および第4級の脂肪族および芳香族のアミンおよびアゾールであり、これらは、SまたはO、グアニジウム、およびその組み合わせで置換されてもよい。末端カチオン基は、好ましくは、オリゴマーおよび/またはポリマーに共有結合することによって取り付けられる。好ましい末端カチオン基はアミンおよびグアニジウムである。しかしながら、他の末端カチオン基も利用することができる。末端カチオン基は、オリゴマーおよび/またはポリマーの全ての末端基のうち約10~100%の割合で、より好ましくは約50~100%の割合で存在してもよい。

20

【0175】

dendritic polymer cation はまた、カチオン性基以外に0~約90%の末端反応残基を含んでもよい。末端カチオン基以外の適切な末端反応残基は、特に、ヒドロキシル、シアノ、カルボキシル、スルフヒドリル、アミド、およびチオエーテル、およびその組み合わせである。しかしながら、他の末端反応残基も利用することができる。

【0176】

dendritic polymer cation は、一般的におよび好ましくは、ポリヌクレオチドと非共有結合する。これにより、組成物は細胞に送達されたら、容易に解離または解体することが可能になる。本明細書における使用に適した代表的な dendritic polymer cation の分子量は、約2,000~1,000,000Da、より好ましくは、約5,000~500,000Daである。しかしながら、他の分子量も適している。好ましい dendritic polymer cation の流体力学的半径(hydrodynamic radius)は約11~60 nm であり、より好ましくは、約15~55 nm である。しかしながら、他のサイズも適している。dendritic polymer の調製方法および遺伝子療法における dendritic polymer の使用方法は当業者に周知であり、例えば、米国特許第5,661,025号に詳述されている。

30

【0177】

適宜、2つまたはそれ以上のタイプのベクターを一緒に使用することができる。例えば、プラスミドベクターがリポソームと共に用いられてもよい。非ウイルスベクターの場合、核酸を、当技術分野において公知の任意の適切な手段によって非ウイルスベクターに組み込んでもよい。プラスミドの場合、これは、典型的には、構築物を適切な制限部位に連結することを伴う。リポソーム、水-油エマルジョン、ポリエチレンアミン、および dendritic polymer などのベクターの場合、ベクターおよび構築物を、当技術分野において公知の適切な条件下で混合することによって結合してもよい。

40

【0178】

VI. GM-CSF-CAIXv と他の薬剤の投与

様々な態様において、GM-CSF-CAIXv 融合タンパク質または GM-CSF-CAIXv 融合タンパク質をコードする核酸は、他の薬剤と共に投与することが可能である。このような薬剤には、様々な化学療法剤(例えば、ドキシルビシンおよび誘導体、タキソールおよび誘導体、ビンブラスチン、ピンクリスチン、カンプトテシン誘導体など)、様々なサイトカイン(例えば、IL-2、IL-7、IL-12、IFN など)、様々な細胞毒(例えば、シュードモナス属(Pseudomonas

50

as)エキソトキシンおよび誘導体、ジフテリア毒素および誘導体、リシンおよび誘導体、アブリンおよび誘導体、チミジンキナーゼおよび誘導体)、アンチセンス分子(例えば、アンチセンスIL-10、TGF- β など)、様々な増殖因子/受容体に対する抗体(例えば、抗VEGF、抗EGFR、抗IL-8、抗FGFなど)などが含まれるが、これらに限定されない。本発明の方法はまた外科手術および/または放射線療法の補助として使用することも可能である。

【0179】

VII.キット

ポリペプチド抗原(GM-CSF-CAIXvポリペプチド)を用いたワクチン接種、および/またはDNAワクチン接種、および/または養子免疫治療に有用な材料/試薬を備える、本発明のキットが提供される。GM-CSF-CAIXvポリペプチドワクチン接種に最適なキットは、好ましくは、GM-CSF-CAIXvキメラ分子を含有する容器を備える。この分子は、溶液の状態、懸濁液の状態、または散剤(例えば、凍結乾燥された散剤)として提供されてもよい。GM-CSF-CAIXvは、適切な薬学的に許容される賦形剤および/またはアジュバントと共に、例えば、単位剤形の中に入れられてもよい。

10

【0180】

同様に、GM-CSF-CAIXvポリペプチドをコードする構築物のDNAワクチン接種に最適なキットは、好ましくは、GM-CSF-CAIXv核酸(例えば、DNA)を含有する容器を備える。ポリペプチドと同様に、核酸は、溶液の状態、懸濁液の状態、または散剤(例えば、凍結乾燥された散剤)として提供されてもよい。GM-CSF-CAIXv核酸は、適切な薬学的に許容される賦形剤および/または促進剤(facilitating agent)と共に、例えば、単位剤形の中に入れられてもよい。キットは、被験体(例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物)への核酸の送達を容易にする試薬および/または装置をさらに含んでもよい。

20

【0181】

養子免疫治療に最適なキットは、典型的には、前記のキメラGM-CSF-CAIXvポリペプチドを含有する容器を備える。キットは、任意で、細胞のエキソピボトランスフェクション用の、GM-CSF-CAIXv融合タンパク質をコードする核酸(例えば、ベクター)を備えてもよい。このようなキットはまた、任意で、様々な細胞株(例えば、RCC)および/または活性化細胞の増殖を容易にする試薬(例えば、IL-2)を備えてもよい。

【0182】

キットは、任意で、本発明の方法を実施するためのさらなる試薬(例えば、緩衝液、薬物、サイトカイン、細胞/細胞株、細胞培地など)および/または装置(例えば、注射器、バイオリスティック装置など)を備えてもよい。

30

【0183】

さらに、キットは、本発明の方法を実施するための指示(すなわち、プロトコール)を収めた説明書を備えてもよい。従って、代表的な説明書は、腎臓細胞癌治療におけるワクチン、DNAワクチン、または養子免疫療法薬剤としての、GM-CSF-CAIXvキメラ分子(またはこれをコードする核酸)の使用を開示する。説明書は、典型的には、筆記または印刷されたものを含むが、これらに限定されない。このような指示を保存し、エンドユーザーに伝えることができる任意の媒体が本発明によって意図される。このような媒体には、電子保存媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CDROM)などが含まれるが、これらに限定されない。このような媒体は、このような説明書を提供するインターネットサイトへのアドレスを含んでもよい。

40

【0184】

さらなる特徴

本明細書において提供される新規CAIX変種はまた、さらなる研究、診断、および治療の目的に使用することができる。CAIXvの特異的プロロッカーおよび/またはCAIXvの高親和性アゴニストを新規治療剤として開発することができる。さらに、ナノテクノロジープラットフォームを用いて、さらに強力かつ特異的な、GMCSF-CAIXvに基づく療法(例えば、RCCを標的とする療法)を実現することができる。

【0185】

50

以前に報告されていない新規のCAIXv cDNA配列/アミノ酸配列は、RCCの新規の機構およびシグナル伝達経路に、大きな予後能力および治療能力、ならびにRCCおよび他のCAIXv発現癌を標的とする新しい薬理学的薬剤および戦略の開発に関する有望な可能性を与える。

【0186】

明瞭さおよび理解のために、前述の発明はある程度詳細に説明されたが、本開示を読めば、本発明の真の範囲から逸脱することなく、形および詳細に様々な変化を加えることができることは当業者に明らかであると考えられる。例えば、前記の技法および器具は全て様々な組み合わせで使用することができる。本願において引用された刊行物、特許、特許出願、および/または他の文書は全てその全体が、それぞれ個々の刊行物、特許、特許出願、および/または他の文書が全ての目的のために参照により組み入れられるように個々に示されるのと同じ程度で、全ての目的のために本開示と矛盾しない程度に、参照により組み入れられる。

【0187】

SEQUENCE LISTING

Sequence ID No: 1 human CAIXv full sequence

MAPLCPSWLPLLIPAPAPGLTVQLLSLLLLMPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPL
 GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPG
 GPQEPQNNAHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFRQSPVDIRPQLAAFCPALRPL
 ELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLPPGLEMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHT
 VEGHRFP AEIHVVHLSTAFARVDEALGRPGGLAVLAAFLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIA
 EEGSETQVPGLDISALLPSDFSRFYQYEGSLTPPCAQGVWTVFNQTVMLSAKQLHTLS
 DTLWGP GDSRLQLSFRATQPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDILALVF
 GLLFAVTSVAFLVQMRRQHRRGKGGVSYRPAEVAETGA

10

SEQ ID NO:2: human CAIXv nucleic acid sequence Table 2: CAIXv cDNA Sequence (SEQ
 ID NO:2):

ATGGCTCCCCTGTGCCCCAGCCCCTGGCTCCCTCTGTTGATCCCGGCCCTGCTCC
 AGGCCTCACTGTGCAACTGCTGCTGCTGCTGCTTCTGATGCCTGTCCATCCCC
 AGAGGTTGCCCCGGATGCAGGAGGATTCCCCCTGGGAGGAGGCTCTTCTGGGG
 AAGATGACCCACTGGGCGAGGAGGATCTGCCAGTGAAGAGGATTCCGCCAGAG
 AGGAGGATCCACCCGGAGAGGAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGGAG
 AGGAGGATCTACCTGAAGTTAAGCCTAAATCAGAAGAAGAGGGCTCCCTGAAGT
 TAGAGGATCTACCTACCGTTGAGGCTCCTGGAGGTCCTCAAGAACCCCAAGAATA
 ATGCCACAGGGACAAAGAAGGGGATGACCAGAGTCATTGGCGCTATGGAGGCG
 ACCCGCCCTGGCCCCGGGTGTCCCCAGCCTGCGCGGGCCGCTTCCAGTCCCCGGT
 GGATATCCGCCCCAGCTCGCCGCCTTCTGCCGGCCCTGCGCCCCCTGGAACTC
 CTGGGCTTCCAGTCCCAGCCTCCAGAACTGCGCCTGCGCAACAATGGCCACA
 GTGTGCAACTGACCCTGCCTCCTGGGCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCGGGCGGGA
 GTACCGGGCTCTGCAGCTGCATCTGCACTGGGGGGCTGCAGGTCGTCGGGCTCG
 GAGCACACTGTGGAAGGCCACCGTTTCCCTGCCGAGATCCACGTGGTTCACCTCA
 GCACCGCCTTTGCCAGAGTTGACGAGGCCTTGGGGCGCCCGGGAGGCCTGGCCG
 TGTTGGCCGCCTTTCTGGAGGAGGGCCCGGAAGAAAACAGTGCCTATGAGCAGT
 TGCTGTCTCGCTTGAAGAAATCGCTGAGGAAGGCTCAGAGACTCAGGTCCCAG
 GACTGGACATATCTGCACTCCTGCCCTCTGACTTCAGCCGCTACTTCCAATATGA
 GGGGTCTCTGACTACACCGCCCTGTGCCAGGGTGTGATCTGGACTGTGTTTAAAC
 CAGACAGTAATGCTGAGTGCTAAGCAGCTCCACACCCTCTCTGACACCCTGTGGG
 GACCCGGTGACTCTCGGCTACAACTGAGCTTCCGAGCGACGCAGCCTTTGAATGG
 GCGAGTGATTGAGGCCTCCTCCCTGCTGGAGTGGACAGCAGTCCTCGGGCTGCT
 GAGCCAGTCCAGCTGAATTCCTGCCTGGCTGCTGGTGACATTCTAGCCCTGGTTT
 TTGGCCTCCTTTTTGCTGTCACCAGCGTCGCGTTCCTTGTGCAGATGAGAAGGCA
 GCACAGAAGGGGAACCAAAGGGGGTGTGAGCTACCGCCAGCAGAGGTAGCCG
 AACTGGAGCCTAG

20

30

40

Sequence ID No:3

NCBI
 LOCUS BC014950 1639 bp mRNA linear PRI 15-JUL-2006
 DEFINITION Homo sapiens carbonic anhydrase IX, mRNA (cDNA clone MGC:22967 IMAGE:4865275), complete cds.
 ACCESSION BC014950
 VERSION BC014950.1 GI:15928967

Human CAIX amino acid sequence

1 maplcpspw1 pllipapapg ltvqllls11 llmpvhpqrl prmqedsplg ggssgeddpl
 61 geedlpseed spreedppge edlpgeedlp geedlpevkp kseeegskl edlptveapg
 121 dpqepqnnah rdkegddqsh wryggdppwp rvspacagrfspsvdirpql aafcpalrpl
 181 ellgfglppl pelrlrnng svqltlppgl emalgpgrey ralqlhlhwg aagrpgseht
 241 veghrfpaei hvvhlstafa rvdealgrpg glavlaafle egpeensaye qlsrleeia
 301 eegsetqvpg ldisallpsd fsryfyegs lttppcaqgv iwtvfnqvm lsakqlhtls
 361 dtlwpggdsr lqlnfratqp lngrvieasf pagvdsspra aepvqlnscl aagdila1vf
 421 gllfavtsva flvqmrrqhr rgtkkgvsyr paevaetga

10

Sequence ID No. 4:

LOCUS AAI13925 144 aa linear PRI 29-JUN-2006
 DEFINITION Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) [Homo sapiens].
 ACCESSION AAI13925
 VERSION AAI13925.1 GI:109731225
 DBSOURCE accession [BC113924.1](#)

20

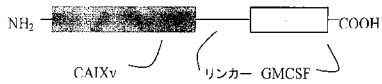
human GMCSF amino acid sequence

1 mwlqsl111lg tvacsisapa rpspstqpw ehvnaiqear rllnlsrdta aemnetvevi
 61 semfdlqept clqtrlelyk qglrgsltkl kgpltmash ykqhcpptpe tscatqtitf
 121 esfkenlkdf llvipfdcwe pvqe

Strausberg, R.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002)

30

【 図 1 】



【 配列表 】

2014239682000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年7月18日(2014.7.18)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

SEQ ID NO:1またはその一部を含むポリペプチドであって、該一部が、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸を含み、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリペプチド。

【 請求項 2 】

(a)SEQ ID NO:2;

(b)SEQ ID NO:1を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列;ならびに

(c)(a)または(b)の断片を含むポリヌクレオチド配列であって、該断片が、SEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸をコードし、かつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、ポリヌクレオチド配列、
 からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を含む、単離されたまたは組換え型の核酸。

【 請求項 3 】

癌予後を支援する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a)癌と診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規

CAIX変種がある場合は、発現された新規CAIX変種を定量して、定量された新規CAIX変種の発現データを作成する工程であって、

該発現された新規CAIX変種が、

SEQ ID NO:1、

残基M33、G121、およびS374の1つもしくは複数を含むSEQ ID NO:1の一部、または新規CAIX変種もしくはその一部をコードする核酸

を含む、工程;ならびに

(b) 定量された新規CAIX変種の発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程

。

【請求項4】

癌が腎明細胞癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】

癌が子宮頸癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項6】

癌が膀胱癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項7】

癌が低酸素誘導性癌を含む、請求項3記載の方法。

【請求項8】

新規CAIX変種をコードする核酸がmRNAを含む、請求項3記載の方法。

【請求項9】

発現されたCAIXが免疫組織化学染色によって定量される、請求項3記載の方法。

【請求項10】

試料が、腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、請求項3記載の方法

。

【請求項11】

定量されたCAIXの発現データがコンピュータ可読型である、請求項3記載の方法。

【請求項12】

(b)が、

少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程;ならびに

コンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力との間のクローズネスオブフィット(closeness-of-fit)を決定するアルゴリズムを実行する工程であって、該入力が癌患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程を含む、請求項11記載の方法。

【請求項13】

癌予後を支援する方法であって、以下の工程を含む方法:

(a) CAIXを発現する癌であると診断された被験体に由来する1つまたは複数の試料に存在する、発現された新規CAIX変種ポリペプチドがある場合は、発現された新規CAIX変種ポリペプチドを定量して、定量されたCAIXポリペプチドの発現データを作成する工程であって、該試料が腫瘍および/または腫瘍に由来する転移性病巣に由来する、工程;ならびに

定量された新規CAIX変種ポリペプチドの発現データと、癌予後の確率を相関付ける工程であって、85%の定量パーセントが被験体の予後を層別化する、工程。

【請求項14】

発現されたCAIXポリペプチドが免疫組織化学染色によって定量され、定量パーセントが陽性染色パーセントを含む、請求項13記載の方法。

【請求項15】

被験体が転移性の腎明細胞癌、子宮頸癌、膀胱癌、または低酸素誘導性癌と診断された時に、85%よりも高い定量パーセントが、85%またはそれよりも低い定量パーセントよりも、良好な被験体予後と相関する、請求項13記載の方法。

【請求項16】

定量されたCAIXの発現データがコンピュータ可読型であり、かつ

(b)が、

少なくとも1つのデータベースを含むプログラム可能なコンピュータを操作する工程、および

コンピュータ可読の定量されたCAIXの発現データとデータベース入力との間のクロウズネスオブフィットを決定するアルゴリズムを実行して、定量されたCAIXの発現データと、被験体の癌予後の確率を相関付ける工程であって、該入力がかん患者集団の臨床データおよび/または病理学的データに対応する、工程

を含む、

請求項13記載の方法。

【請求項17】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはサイトカインと任意で結合された、新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含む構築物であって、新規CAIX変種の一部は残基M33、G121、および/またはS374の1つまたは複数を含む、構築物。

【請求項18】

新規CAIX変種の一部が少なくとも20個の連続したアミノ酸を含む、請求項17記載の構築物。

【請求項19】

GM-CSFまたはサイトカインがヒトGM-CSF、インターロイキン2、インターロイキン12、インターフェロン、またはインターフェロンである、請求項17記載の構築物。

【請求項20】

新規CAIX変種およびGM-CSFまたはサイトカインが融合タンパク質の成分である、請求項17記載の構築物。

【請求項21】

新規CAIX変種およびGM-CSFまたはサイトカインが、長さが2~約20アミノ酸のペプチドリンカーによって接続されている、請求項17記載の構築物。

【請求項22】

ペプチドリンカーが-Arg-Arg-または-lys-leu-である、請求項21記載の構築物。

【請求項23】

請求項17記載の構築物および薬学的に許容される希釈剤または賦形剤を含む、組成物。

【請求項24】

アジュバントをさらに含む、請求項23記載の組成物。

【請求項25】

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはサイトカインに任意で取り付けられた、残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む新規CAIX変種(SEQ ID NO:1)の一部を含むタンパク質をコードする、核酸。

【請求項26】

発現カセット内に存在する、請求項25記載の核酸。

【請求項27】

ベクター内に存在する、請求項25記載の核酸。

【請求項28】

請求項25の核酸を発現する、宿主細胞。

【請求項29】

末梢血リンパ球または腫瘍浸潤性リンパ球である、請求項28記載の宿主細胞。

【請求項30】

樹状細胞、抗原提示細胞、Bリンパ球、T細胞、および腫瘍浸潤性リンパ球からなる群より選択される免疫細胞である、請求項28記載の宿主細胞。

【請求項31】

抗腫瘍ワクチンを生成する方法であって、以下の工程を含む方法:

請求項25記載の核酸を含む核酸を発現する細胞がCAIX変種タンパク質を発現する条件下

で、該細胞を培養する工程、および
該タンパク質を回収する工程。

【請求項32】

抗原提示細胞を感作させる方法であって、以下の工程を含む方法：

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはサイトカインに任意で取り付けられた新規CAIX変種を含む、感作に有効な量のタンパク質と、該細胞を接触させる工程であって、該新規CAIX変種が、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸の断片を含みかつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、工程。

【請求項33】

抗原提示細胞が、末梢血リンパ球、単球、線維芽細胞、TIL、および樹状細胞からなる群より選択される、請求項32記載の方法。

【請求項34】

請求項32記載の方法により産生される、抗原提示細胞。

【請求項35】

ポリペプチドリンカーを有するCAIXv-サイトカイン融合タンパク質をコードする核酸を含む、ベクター遺伝子送達システム。

【請求項36】

サイトカインがIL-2、IL-12、インターフェロン、またはインターフェロンである、請求項35記載のシステム。

【請求項37】

サイトカインがGM-CSFである、請求項35記載のシステム。

【請求項38】

ベクターがウイルスベクターシステムであり、ウイルスベクターが、AAVベクターシステム、アデノウイルスベクターシステム、レトロウイルスベクターシステム、レンチウイルスベクターシステム、シミアンウイルス40ベクターシステム、およびバキュロウイルスベクターシステムである、請求項35記載のシステム。

【請求項39】

ベクターが非ウイルスベクターシステムである、請求項35記載のシステム。

【請求項40】

脂質遺伝子送達システムまたはポリマー遺伝子送達システムである、請求項35記載のシステム。

【請求項41】

CAIXvが、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:1の少なくとも20個の連続したアミノ酸の断片を含みかつ残基M33、G121、およびS374の1つまたは複数を含む、請求項35記載のシステム

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N	33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 6 F	19/20 (2011.01)	G 0 6 F 19/20	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P	13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K	35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K	35/23 (2006.01)	A 6 1 K 35/23	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 K	35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z
A 6 1 K	35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リ ゼンファ

アメリカ合衆国 カルフォルニア州 ロサンゼルス クローバー アベニュー 1 1 4 1 3

(72)発明者 ベルデグラン アリエ エス.

アメリカ合衆国 カルフォルニア州 ロサンゼルス ストラータ ヴェッキア ロード 8 1 1

F ターム(参考) 2G045 BB24 CB01 DA14 DA36 DA78 FA03 FA16

4B024 AA01 BA36 CA07 CA10 CA11 DA02 EA02 GA11 HA01 HA17

4B050 CC01 CC05 DD11 LL01

4B063	QA01	QA18	QA19	QQ02	QQ42	QQ52	QR32	QR35	QR40	QR59
	QR63	QR72	QS05	QS34	QS36	QS38				
4B064	AG31	BJ12	CA10	CA19	CA21	CC24	DA01			
4B065	AA90X	AA90Y	AB01	AC14	BA02	CA24	CA45			
4C084	AA02	AA07	AA13	BA01	BA08	BA23	BA41	BA44	DA19	DA22
	DA24	DC50	MA66	NA14	ZA811	ZB091	ZB261			
4C085	AA38	EE06	FF24							
4C087	AA01	AA02	BB37	BB41	BB63	BB65	BC83	DA19	DA20	MA66
	NA14	ZA81	ZB09	ZB26						
4H045	AA11	AA20	AA30	BA41	CA40	CA41	DA50	DA86	EA31	FA74

专利名称(译)	基于新型TAA变体的新融合分子		
公开(公告)号	JP2014239682A	公开(公告)日	2014-12-25
申请号	JP2014126312	申请日	2014-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	リゼンファ ベルデグランアリエエス		
发明人	リゼンファ ベルデグランアリエエス.		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/10 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 C07K19/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 G06F19/20 A61P35/00 A61P35/04 A61K38/00 A61K48/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P13/10 A61K39/39 A61K35/12 A61K35/23 A61P37/04 A61K38/21 A61K35/14 A61K35/76		
CPC分类号	A61K38/193 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/04 C07K14/535 C07K2319/75 C12N9/88 C12N9/96 C12N15/62 C12Y402/01001 G01N33/57411 G01N33/57438 G01N2333/988 A61K39/0011 A61K39/001154 A61K45/06 A61K2039/5154 A61K2039/5156 A61K2039/5158 A61K2039/55522 C12N5/0634 C12N15/63 C12N2501/22 C12N2501/2302 C12N2501/24 C12N2501/70		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N9/10 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68.A C07K19/00 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G06F19/20 A61P35/00 A61P35/04 A61K37/02 A61K48/00 A61P13/12 A61P15/00 A61P13/10 A61K39/39 A61K35/12 A61K35/23 A61P37/04 A61K37/66.G A61K35/14.Z A61K35/76 A61K35/15.A A61K38/00 A61K38/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12N15/19 C12N15/27 C12N15/60 C12N15/62.Z C12N15/86.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FA03 2G045/FA16 4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/CA07 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR59 4B063/QR63 4B063/QR72 4B063/QS05 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B064/AG31 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA21 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/DA19 4C084/DA22 4C084/DA24 4C084/DC50 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZB091 4C084/ZB261 4C085/AA38 4C085/EE06 4C085/FF24 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB41 4C087/BB63 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/DA19 4C087/DA20 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA81 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关		
优先权	60/876863 2006-12-22 US		

摘要(译)

要解决的问题：提供支持癌症预后的方法。种类编号：A1新型碳酸酐酶（CAIX）核酸和肽序列，以及免疫原性抗癌剂（例如疫苗和嵌合分子），可引发针对表达CAIX抗原标记的癌细胞的免疫应答。相关方法和组成包括。新的CAIX变体和相关组合物可用于多种治疗方式，包括但不限于蛋白质疫苗接种，DNA疫苗接种和过继免疫疗法。[选型图]图1

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開

特開2014

(P2014

(43) 公開日 平成26年12月25日 (20

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (特)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C12N 9/10 (2006.01)	C12N 9/10	4 B O 2 4
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4 B O 5 0
C12Q 1/48 (2006.01)	C12Q 1/48	4 B O 6 3
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	4 B O 6 4
	審査請求 有 請求項の数 41 O L (全 52 頁) 最終	

(21) 出願番号	特願2014-126312 (P2014-126312)	(71) 出願人	506115514
(22) 出願日	平成26年6月18日 (2014.6.18)		
(62) 分割の表示	特願2009-543277 (P2009-543277) の分割	(74) 代理人	弁理士 清水 初志
原出願日	平成18年12月21日 (2007.12.21)		
(31) 優先権主張番号	60/876, 863	(74) 代理人	弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成18年12月22日 (2008.12.22)	(74) 代理人	弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 刑部 俊
			最終頁