

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514000**(P2005-514000A)**

(43) 公表日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B 0 5 0
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 7
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-569065 (P2002-569065)	(71) 出願人	591026333
(86) (22) 出願日	平成14年2月12日 (2002. 2. 12)		リサーチ ディベロップメント ファンデーション
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月3日 (2003. 10. 3)		RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004195		アメリカ合衆国, 89703 ネバダ, カ
(87) 国際公開番号	W02002/069886		ーソン シティ, ノース ディヴィジョン ストリート 402番地
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002. 9. 12)	(74) 代理人	100080115
(31) 優先権主張番号	60/268, 402		弁理士 五十嵐 和壽
(32) 優先日	平成13年2月12日 (2001. 2. 12)	(74) 代理人	100071478
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐田 守雄
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 修飾蛋白質、デザイナー毒素、及びそれらをつくる方法

(57) 【要約】

本発明は蛋白質性化合物の抗原性を低下させつつ、その化合物の生物学的活性を維持する方法、及び生物学的活性を有しているがその抗原性が低下されている組成物に関するものである。これらの方法及び組成物はそうした化合物及び組成物を必要としている個体に対してかなりの利点を有している。さらに、切断されているか、あるいは低下された高毒性を有している修飾された毒素化合物も含まれる。そうしたデザイナー毒素は特に免疫毒素として治療用、診断用、及び予防的利点を有している。これらの免疫毒素を用いる癌治療の方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列識別番号：1の毒素以外の組み換え体ゲロニン毒素において、配列識別番号：1のアミノ酸残基110-210として定義されるコア毒素領域を含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 2】

請求項1記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域に加えて、配列識別番号：1の少なくとも連続する10個のアミノ酸残基を含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 3】

請求項2記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域に加えて、配列識別番号：1の少なくとも連続する20個のアミノ酸残基を含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

10

【請求項 4】

請求項3記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域に加えて、配列識別番号：1の少なくとも連続する30個のアミノ酸残基を含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5】

請求項4記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域に加えて、配列識別番号：1の少なくとも連続する50個のアミノ酸残基を含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

20

【請求項 6】

請求項1記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域からのアミノ酸以外の、配列識別番号：1の少なくとも10個のアミノ酸が欠失していることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 7】

請求項1記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域からのアミノ酸以外の、配列識別番号：1の少なくとも20個のアミノ酸が欠失していることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 8】

請求項1記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域からのアミノ酸以外の、配列識別番号：1の少なくとも30個のアミノ酸が欠失していることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

30

【請求項 9】

請求項1記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域からのアミノ酸以外の、配列識別番号：1の少なくとも5個のアミノ酸が置換されていることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 10】

請求項9記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域からのアミノ酸以外の、配列識別番号：1の少なくとも10個のアミノ酸が置換されていることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

40

【請求項 11】

請求項10記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記コア毒素領域からのアミノ酸以外の、配列識別番号：1の少なくとも20個のアミノ酸が置換されていることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 12】

請求項1記載の組み換え体ゲロニン毒素と第2のポリペプチドで構成されていることを特徴とする蛋白質性化合物。

【請求項 13】

上記第2のポリペプチドが上記組み換え体ゲロニン毒素に結合されていることを特徴と

50

する請求項12記載の蛋白質性化合物。

【請求項14】

上記第2のポリペプチドが上記組み換え体ゲロニン毒素にリンカーによって結合されていることを特徴とする請求項13記載の蛋白質性化合物。

【請求項15】

上記第2のポリペプチドと上記組み換え体ゲロニン毒素が融合蛋白質を形成していることを特徴とする請求項12記載の蛋白質性化合物。

【請求項16】

上記第2のポリペプチドが抗体であることを特徴とする請求項12記載の蛋白質性化合物。

10

【請求項17】

上記抗体が抗原結合領域を含んでいることを特徴とする請求項16記載の蛋白質性化合物。

【請求項18】

上記抗体が腫瘍抗原に対するものであることを特徴とする請求項16記載の蛋白質性化合物。

【請求項19】

上記第2のポリペプチドが酵素活性を有していることを特徴とする請求項12記載の蛋白質性化合物。

【請求項20】

20

a) 抗体を用いて酵素内の1つ以上の抗原性領域を識別するステップと、
b) 上記酵素から1つ以上の抗原性領域を取り除くことで修飾された酵素を形成するステップと、そして
c) 上記修飾された酵素が酵素活性を有していることを判定するステップ
で構成されるプロセスによってつくられる修飾された酵素。

【請求項21】

上記判定ステップが上記修飾された酵素の酵素活性を評価するステップを含んでいることを特徴とする請求項20記載の修飾された酵素。

【請求項22】

さらに、1つ以上の抗原性領域が置換されて、上記置換された1つ又は複数の領域より抗原性が低いアミノ酸領域を含んでいることを特徴とする請求項20記載の修飾された酵素。

30

【請求項23】

請求項22記載の修飾された酵素において、抗原性がより低い1つ又は複数の領域が相同領域に関する蛋白質データベース検索で識別されることを特徴とする酵素。

【請求項24】

上記データベースがヒトの蛋白質データベースであることを特徴とする請求項23記載の修飾された酵素。

【請求項25】

上記抗原性領域がヒトに対して抗原性を示すことを特徴とする請求項20記載の修飾された酵素。

40

【請求項26】

上記抗体がポリクローナルであることを特徴とする請求項20記載の修飾された酵素。

【請求項27】

上記ポリクローナル抗体がヒトからのものであることを特徴とする請求項26記載の修飾された酵素。

【請求項28】

上記酵素が植物毒素であることを特徴とする請求項20記載の修飾された酵素。

【請求項29】

上記植物毒素がゲロニンであることを特徴とする請求項28記載の修飾された酵素。

50

【請求項 30】

さらに、第2のポリペプチドを上記修飾された酵素に取り付けるステップを含んでいることを特徴とする請求項20記載の修飾された酵素。

【請求項 31】

上記第2のポリペプチドが上記修飾された酵素に接合されていることを特徴とする請求項30記載の修飾された酵素。

【請求項 32】

上記第2のポリペプチドと上記修飾された酵素が融合蛋白質を形成していることを特徴とする請求項30記載の修飾された酵素。

【請求項 33】

上記第2のポリペプチドが抗体であることを特徴とする請求項30記載の酵素。

【請求項 34】

上記第2のポリペプチドが毒素であることを特徴とする請求項30記載の酵素。

【請求項 35】

上記第2のポリペプチドが第2の酵素であることを特徴とする請求項30記載の酵素。

【請求項 36】

上記第2のポリペプチドがアポトーシスを促進することを特徴とする請求項30記載の酵素。

【請求項 37】

抗原性が低められた修飾蛋白質を発生させる方法において、

- a) 第1の個体に投与したい蛋白質を選択するステップと、
 - b) 上記第1の個体か上記第1の個体と同じ種の第2の個体のいずれかからの抗血清を用いて、上記第1の個体で抗原性を示す蛋白質の領域を識別するステップと、
 - c) 上記識別された領域が欠失している修飾蛋白質を発生させるステップと、そして
 - d) 上記修飾蛋白質の抗原性が低下していることを確認するステップ
- で構成される方法。

【請求項 38】

請求項37記載の方法において、さらに

- d) ヒト蛋白質データベースをスクリーニングして、上記蛋白質の抗原性領域に対して相同性を有するより抗原性の低い領域を識別するステップと、
 - e) 上記抗原性領域を抗原性がより低い識別された領域の全体あるいはその一部と置換して、修飾蛋白質を形成させるステップ
- を含んでいることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項 39】

上記置換ステップが上記修飾蛋白質をコードする核酸分子を用いて遺伝子組み換え的に行なわれることを特徴とする請求項38記載の方法。

【請求項 40】

上記修飾蛋白質が上記識別された領域を取り除くことによって発生させられることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項 41】

上記欠失領域が少なくとも5つのアミノ酸残基で構成されていることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項 42】

上記欠失領域が少なくとも10のアミノ酸残基で構成されていることを特徴とする請求項41記載の方法。

【請求項 43】

上記欠失領域が少なくとも15のアミノ酸残基で構成されていることを特徴とする請求項42記載の方法。

【請求項 44】

上記欠失領域が少なくとも20のアミノ酸残基で構成されていることを特徴とする請求項43

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 4 5】

上記欠失領域が少なくとも25のアミノ酸残基で構成されていることを特徴とする請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

上記欠失抗原性領域が除去されるのと同数のアミノ酸残基で置換されることを特徴とする請求項40記載の方法。

【請求項 4 7】

上記領域がELISAアッセイで識別されることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項 4 8】

上記固体が哺乳動物であることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項 4 9】

上記哺乳動物がヒトであることを特徴とする請求項48記載の方法。

【請求項 5 0】

上記置換されたアミノ酸を含む組み換え体ゲロニン毒素と比較してヒトでの抗原性がより低いアミノ酸で置換された抗原性領域1、2、3又は4のうちの1つ以上からの少なくとも3つのアミノ酸を有するヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 1】

抗原性領域1からの少なくとも3つのアミノ酸が置換されていることを特徴とする請求項50記載のヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 2】

抗原性領域2からの少なくとも3つのアミノ酸が置換されていることを特徴とする請求項50記載のヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 3】

抗原性領域3からの少なくとも3つのアミノ酸が置換されていることを特徴とする請求項50記載のヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 4】

抗原性領域4からの少なくとも3つのアミノ酸が置換されていることを特徴とする請求項50記載のヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 5】

少なくとも2つの抗原性領域からの少なくとも3つのアミノ酸が置換されていることを特徴とする請求項50記載のヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 6】

抗原性領域1－4の1つ又は複数からの少なくとも6つのアミノ酸が置換されていることを特徴とする請求項50記載のヒト化された組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 7】

a) 哺乳動物において抗原性を示すゲロニン毒素の少なくとも1つの領域を識別するステップと、

b) 上記抗原性領域の少なくとも一部を上記哺乳動物でより低い抗原性を示す領域で置換するステップ

を含むプロセスでつくられる組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 8】

請求項57記載の組み換え体ゲロニン毒素において、ステップa)で識別される上記抗原性領域が組み換え体ゲロニン毒素であることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 5 9】

請求項57記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記プロセスがさらに、上記識別された抗原性領域を哺乳動物のアミノ酸配列と比較して、それによって上記哺乳動物内で抗原性がより低い領域を識別するステップを含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項 6 0】

10

20

30

40

50

請求項57記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記プロセスが上記哺乳動物内で抗原性のより低い領域を識別するステップを含んでいることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項61】

請求項60記載の組み換え体ゲロニン毒素において、上記哺乳動物がヒトであることを特徴とする組み換え体ゲロニン毒素。

【請求項62】

癌細胞を殺す方法において、上記細胞に対してゲロニンのコア毒素領域と上記癌細胞と特異的に標的とする1本鎖抗体で構成される免疫毒素を有効量だけ投与するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項63】

上記免疫毒素が配列識別番号：1であることを特徴とする請求項62記載の方法。

【請求項64】

上記抗体が腫瘍抗原を標的とすることを特徴とする請求項62記載の方法。

【請求項65】

上記抗体がマウス抗体であることを特徴とする請求項62記載の方法。

【請求項66】

上記癌細胞が黒色腫細胞であることを特徴とする請求項62記載の方法。

【請求項67】

上記抗体が9.2.27あるいはZME-018で構成されていることを特徴とする請求項66記載の方法。

【請求項68】

上記免疫毒素がscfvMEL-2018又はscfvMEL-2025であることを特徴とする請求項66記載の方法。

【請求項69】

上記細胞が患者の体内にあることを特徴とする請求項62記載の方法。

【請求項70】

上記免疫毒素が薬剤的に許容される組成物内にあることを特徴とする請求項69記載の方法。

【請求項71】

上記免疫毒素が上記細胞に対して、上記癌細胞に上記免疫毒素を発現させることができる発現構成体を投与することによって提供されることを特徴とする請求項62記載の方法。

【請求項72】

上記発現構成体がウイルス性ベクターであることを特徴とする請求項71記載の方法。

【請求項73】

上記ウイルス性ベクターがアデノウイルス・ベクター、アデノ関連ウイルス・ベクター、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、あるいはワクチニア・ウイルスであることを特徴とする請求項72記載の方法。

【請求項74】

患者の癌を治療する方法において、上記患者に対して、ゲロニンのコア毒素領域と癌細胞を特異的に標的とする1本鎖抗体で構成される免疫毒素を含む組成物を有効な量だけ投与するステップを含む方法。

【請求項75】

上記癌が前立腺、肺、脳、皮膚、肝臓、乳房、リンパ腺、胃、精巣、卵巣、脾臓、骨、骨髓、頭部及び首、子宮頸部、食道、眼、胆嚢、腎臓、副腎、心臓、結腸、及び血液の癌であることを特徴とする請求項74記載の方法。

【請求項76】

上記免疫毒素が配列識別番号：1を含んでいることを特徴とする請求項74記載の方法。

【請求項77】

上記抗体が黒色腫瘍細胞を標的とすることを特徴とする請求項74記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 78】

上記免疫毒素がscfvMEL-2018又はscfvMEL-2025であることを特徴とする請求項77記載の方法。

【請求項 79】

患者の癌を治療する方法において、上記患者に対して請求項50記載のヒト化組み換え体ゲロニン毒素を含む組成物を有効量投与するステップを含む方法。

【請求項 80】

上記組成物がさらに抗体を含んでいることを特徴とする請求項79記載の方法。

【請求項 81】

上記抗体がヒト化されていることを特徴とする請求項80記載の方法。

10

【請求項 82】

上記抗体が1本鎖抗体であることを特徴とする請求項80記載の方法。

【請求項 83】

上記抗体が癌細胞上の抗原と結合することを特徴とする請求項80記載の方法。

【請求項 84】

上記癌細胞が骨、脳、乳房、子宮頸部、結腸、神経膠腫、歯茎、頭部及び首、腎臓、白血病、肝臓、肺、黒色腫瘍、卵巣、前立腺、胃、あるいは舌細胞であることを特徴とする請求項83記載の方法。

【請求項 85】

上記癌が黒色腫細胞であることを特徴とする請求項84記載の方法。

20

【請求項 86】

上記1本鎖抗体が9.2.27又はZME-018であることを特徴とする請求項82記載の方法。

【請求項 87】

請求項79記載の方法において、上記患者に対して化学療法、放射線療法、遺伝子治療、あるいは第2の免疫療法を実施するステップを含んでいることを特徴とする請求項79記載の方法。

【請求項 88】

さらに、上記患者からの前癌あるいは癌性病変、あるいは腫瘍を切除するステップを含んでいることを特徴とする請求項79記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的には分子生物学及び毒物学に関するものである。より具体的には、本発明はより短い、及び/又は抗原性が低いポリペプチドである修飾蛋白質を発生させるための方法と、そうしたポリペプチドを含む組成物を発生させる方法に関するものである。より短めで抗原性がより低い植物毒素ゲロニンについて本明細書で述べる。そうした修飾蛋白質は、例えば免疫毒素として治療用及び診断用に使用される。

【背景技術】

【0002】

ペプチド、ポリペプチド及び蛋白質は予防上、診断上、及び治療上、多数の利点を有している。しかしながら、1つの欠点はそうした蛋白質性化合物はそれらの利点を受けることを希望している個人において、それら化合物に対する免疫反応を誘発してしまうことである。それら化合物に対する免疫反応はその利用を通じて達成されえる利点を減少させるか、あるいはまったくなくしてしまう場合がある。したがって、ホスト内で免疫反応を誘発することによりその有効性を損なう可能性のある化合物において、その抗原性あるいは免疫原性を低下させることが、一般的な願望である。

40

【0003】

蛋白質の1つの特定のタイプである、モノクローナル抗体は、予防上、診断上、及び治療上の利点のために、多くの研究や開発の的となってきた。種々の細胞表面抗体を認識する非常に特異的な免疫毒素について、過去20年にわたって開発と検査が行われてきた。

50

免疫毒素の魅力的な特徴は、この効力のある物質が細胞毒性を誘発するために、的確な細胞内区画へ順調に運ばれるために非常にわずかな分子しか必要としないことである。免疫毒素は、例えばサポニン、アブリン、リシンA鎖（RTA）、シュードモナス外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、及びゲロニンなどの種々の毒素を含有し、構成されてきた。

【0004】

一般的に、免疫毒素の *in vivo* における使用に関連する問題として、毛細血管漏出症候群の原因となる血管損傷、細網内皮系統による毒素部分の認識が原因の標的間違い、標的抗原発現の不均一性、及び約14日間という限られた治療時間帯になる抗毒素抗体の開発が含まれる。抗毒素及び非共役抗体の開発はまた、抗腫瘍効果の徴候があるにもかかわらず、患者の再治療を妨げる可能性がある。患者における免疫毒素の長期使用は、同様の問題を引き起こした。RTA及びPEを含有する免疫結合体は、患者において高い免疫抗原性を示すことが明らかになった。さらに、免疫毒素構成物（約30kDa）におけるこれら蛋白質のサイズは、固形腫瘍への免疫結合体の効果的侵入を妨げると推測される。例えばRTAのようなI型蛋白質の構造的修飾は、ほとんどの場合、失敗に終わった（Munishkin et al、1995年）。いくつかのアミノ酸を修飾する多数のRTA突然変異体が生成された。1995年に、WoolらはRTAの45種類の単アミノ酸欠失について説明した。本来のRTAと比較して、それら欠失変異体の相対的な生物活性について調査がなされなかったが、これらのうち8つの単アミノ酸欠失のみが、生物活性を有することが明らかにされた。興味深いことに、RTAを調査する研究は、例えばRTAが例としてゲロニンのような他の毒素と相同な配列を30%しか有していないため、効果が限られる。

10

20

【0005】

モノクローナル抗体（MAb）に基づく治療の特異的な適用は、伝統的にヒトの癌の診断や治療において見られた。しかしながら、それら物質の臨床上的使用については、このアプローチに関連する欠点、例えば抗原発現の不均一性、1つには抗体のサイズによる固形腫瘍への腫瘍侵入の困難さ、及び抗体の抗原性のために成果が限られた（Roselliら、1993年；Berkower、1996年；Pullyblandら、1997年；Panchagnulaら、1997年；Panchalら、1998年）。これらの問題を回避するために、マウス：ヒト・キメラ、完全なるヒトの抗体、又は従来の抗体構造をより小さくより簡素な（1本鎖の）フォーマットで、独自構造の抗原結合部を有する新形態抗体断片に再構成するために多数の分子アプローチが適用された（Birdら、1988年；Kipriyanovら、1994年；Owensら、1994年；McCartneyら、1995年；Wornら、1998年）。1本鎖抗体（scfv、sfv）は、親の免疫グロブリン（IgG）の結合特性を保持しており、設計された柔軟なペプチド・リンカーによって連結される抗体 V_L 及び V_H 領域で構成される（Welsら、1992年；Kuruczら、1993年）。さらに、scFvsは、より小さなサイズで腫瘍組織の侵入の改善、薬物動態学の改善、静脈内に投与されたマウス抗体で観察される免疫原性の減少を可能にするため、現在のところ、scFvsはその従来のMAbあるいはFab断片に関連する臨床上的あるいは診断上の適用において好まれるだろう。

30

【0006】

正常組織と比較するとメラノーマ細胞において高いレベルで発現するいくつかの標的抗原のうち、メラノーマ細胞株及び未使用の腫瘍サンプルの大部分において発見されるのは、高分子量の糖蛋白質（gp240）の表面領域である（Kantorら、1982年）。この抗原の異なるエピトープを認識する2つのマウス抗体（9.2.27及びZME-018指定）は、前もって単離され、記載された（Morganら、1981年；Wilsonら、1981年）。マウス・モノクローナル抗体ZME-018はメラノーマに対して高い特異性を有し、種々の正常組織に対する反作用は最小限に抑えられ、さらなる研究のために前途有望な候補となる。メラノーマ内で損傷の場所を突き止めるために、本抗体の能力を調査する臨床試験は、転移性腫瘍内での選択的集中を実証した。（Maceyら、1988年；Koizumiら、1988年）。

40

【0007】

腫瘍標的治療用薬剤の開発成功は、ある程度、治療用薬剤の部位特異的な運搬や、運搬された薬剤の生物活性にも依存している。モノクローナル抗体は、そうでなければ無差別になる、例えば毒素、放射性核種、成長因子などの細胞毒性物質に対する選択性を授ける

50

ために用いられた (Williamsら、1990年 ; Rowlinson-Buszaら、1992年 ; Wahl、1994年) 。このような分子の1つは、リシンA鎖 (RTA) に類似した作用の効力と構造を持つが、改良された安定性と毒性の減少を特徴とする29-kDaリボソーム不活性植物毒素のゲロニンである (Stripeら、1992年 ; Rosenblumら、1995年) 。我々の研究室のこれまでの研究では、植物毒素ゲロニンと種々の抗体の多数の化学結合物の生物学的特性を識別し、調査してきた (Boyleら、1995年 ; Xuら、1996年 ; Rosenblumら、1999年) 。これまでの研究において、抗体ZME-018は精製したゲロニンと化学的に結合し、この免疫結合体は、組織培養内及びヒト腫瘍異種移植片モデル内の両方において、抗原陽性メラノーマ細胞に対する特有の細胞傷害を示した (Rosenblumら、1991年 ; Mujooら、1995年) 。しかしながら、この構成物は、一般的に免疫毒素のように、ヒトの患者に抗原性の内在する問題を有する。

10

【0008】

免疫毒素の副作用とこれらの問題を軽減するためになされる進歩の限界を考えると、病気や状態の治療用、予防用、診断用に使用される抗原性の低い蛋白質、ポリペプチド、及びペプチドの開発が継続的に必要となる。毒素分子における抗原配列の交換は、例えば毒素などの非抗体ポリペプチドに関する1つのコンセプトである。本コンセプトを用いて、マウスの免疫グロブリン断片領域とヒト/マウス・キメラ分子を作成するヒト免疫グロブリン断片領域との交換は成功したが、一方で、同じコンセプトが他の分子、とりわけ植物源からの毒素や酵素に適用されず、また、本明細書に記載された方法の使用によってうまく適用されることは一度もなかった。

【発明の開示】

20

【発明の概要】

【0009】

本発明は、非修飾または天然の蛋白質以上の利点を有する修飾蛋白質を形成するために修飾される蛋白質性化合物を作成する方法に関するものである。また、本発明はこれらの方法から生成される化合物も含む。

【0010】

本発明のいくつかの実施の形態において、天然ゲロニン配列に対して変更が加えられた組み換え型ゲロニン毒素を提供する。前記組み換え型ゲロニン毒素は、参考のために本明細書に添付する米国特許No.5,631,348号明細書に開示され、GenBank受入番号L12243により提供される天然ゲロニン蛋白質配列 (配列識別番号1参照) と比較して、アミノ酸を交換または除去させることがある。前記組み換え型ゲロニン毒素または本発明は、配列識別番号1のアミノ酸のすべてを有しないが、いくつかの実施の形態においては、配列識別番号1のアミノ酸残基110-210として定義される中心的毒素領域から構成される。本発明の他の化合物は、中心的毒素領域とは別に配列識別番号1の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100かそれ以上連続的なアミノ酸残基を有することに加えて、中心的毒素領域を有する組み換え型ゲロニン毒素を含む。本発明の化合物はまた配列識別番号1の連続するアミノ酸残基を含む多数の領域を含むと考えられる。例えば、ある化合物は、中心的毒素領域の後で、配列識別番号1の中心的毒素領域と20の連続的アミノ酸残基の前に、配列識別番号1の10の連続的アミノ酸残基に加えて、中心的毒素領域を含む可能性がある。

40

【0011】

また、本発明の組み換え型ゲロニン毒素は、天然の配列に対して切断されたゲロニン毒素を含み、前記毒素は配列識別番号1の少なくとも5、10、20、30、40、50かそれ以上のアミノ酸を欠損していることを特徴とする。本発明のいくつかの実施の形態において、前記毒素は中心的毒素領域を含むが、中心的毒素領域外のどこかにアミノ酸を逃している。欠損に加えて、本発明の組み換え型ゲロニン毒素は、除去されたアミノ酸の代わりに1つのアミノ酸を有することがある。例えば、ゲロニン蛋白質配列内の位置7のグリシン残基は非グリシン・アミノ酸残基または修飾アミノ酸と交換されることがある。もし位置7のグリシン残基が除去されるだけであれば、配列識別番号1の位置8のアラニンは、位置7になるが、アミノ酸の位置が1つの位置によって変えられるだけで、交換とはみなされな

50

い。少なくとも、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100かそれ以上のアミノ酸が交換されると考えられる。

【0012】

本発明のさらなる実施の形態において、組み換え型ゲロニン毒素は第2ポリペプチドに付着することがある。いくつかの例において、第2ポリペプチドは特定の細胞タイプ（例えば癌細胞や病原体感染細胞のような特定の遺伝子型、あるいは表現型を有する細胞を含む）、体の部分、または他の特定の位置を標的に、ゲロニン毒素を向かわせる役目を果たす。したがって、本発明の蛋白性化合物は、例えば修飾ゲロニン毒素のような組み換え型ゲロニン毒素と第2ポリペプチドの両方を有する化合物を含む。いくつかの実施の形態においては、この2つのポリペプチドが互いに結合し、一方、他の実施の形態においては、このポリペプチドは融合蛋白質を作成するために、遺伝子工学による組み換えが行われる。結合化合物は、リンカーにより互いに付着する。本発明の修飾蛋白質は、付加的なポリペプチド組成物を含み、そのすべてまたはそのいくつかは互いに共役結合することがあると考えられる。

10

【0013】

本発明は、2つ以上のポリペプチドの実体は1つの単独の化合物として存在する多ポリペプチド化合物に関するものである。このように、修飾蛋白質は第2、第3、第4、第5、第6またはそれ以上のポリペプチドに付着する。代わりに、2つかそれ以上の修飾蛋白質は単独の蛋白性化合物として表される。本発明のいくつかの実施の形態において、第2ポリペプチドは、例えば抗原結合領域を有する抗体などの、1つの抗体である。抗体は、腫瘍抗原、腫瘍遺伝子産物、細胞受容体、あるいは多ポリペプチド化合物を突き止めるその他化合物に対して向けられると考えられる。本明細書で開示するように、第2ポリペプチドは、酵素、サイトカイン、細胞毒性分子、成長因子、リガンドまたはレセプター、あるいは細胞成長の特徴を修飾することが可能ないずれかの分子でありうる。

20

【0014】

本発明における他の組成物として修飾酵素が挙げられるが、この酵素は以下のプロセス：a)抗体を使用する酵素において、1つ以上の抗原性領域を特定するプロセス；b)前記酵素から1つ以上の抗原性領域を除去し、修飾酵素を形成するプロセス；そして、c)前記修飾酵素が酵素活性を持つことを決定するプロセスにより作成された酵素を含む。酵素は、細胞内において特有の化学反応を触媒する生物学的存在であり、蛋白質あるいは核酸分子である。しかしながら、酵素に関して論じられるいずれの方法においても、一般的にポリペプチドに適用されると考えられる。抗原性領域は、特有の有機体の抗体あるいはT細胞レセプターにより明確に認識されるポリペプチドの領域である。領域は1つの種において抗原性があるが、別の種においてはなため、化合物の抗原性が特有の有機体に関連する特徴であることが理解される。抗原性領域の一部であるアミノ酸の除去に加えて、2つ以上の抗原性領域からのアミノ酸は本発明の酵素から除かれると考えられる。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20かそれ以上の抗原性領域のすべて、またはそれらの一部よりのアミノ酸は、ポリペプチドから除去される。いくつかの場合において、その除去された領域がそれより抗原性の低い領域と交換される。もちろん当然のことながら、抗原性領域の側面に位置するアミノ酸は、例えば利便性の目的のために、また除去される。したがって、抗原性領域の片側あるいは両側の側面に位置する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20かそれ以上のアミノ酸が除去され、交換されることになる。

30

40

【0015】

1つあるいは複数の抗原性の低い領域は、抗原性領域に相同の、あるいはそれとの共通点をいくつか持つ領域の蛋白質データベース検索を行うことにより識別される。抗原性領域が識別されると、この配列が修飾蛋白質に関して低い抗原性が望ましい有機体の周知の蛋白質配列を識別するために使用される。したがって、ヒト蛋白質データベースは、ヒトには低い抗原性が望ましい蛋白質の抗原性領域の残基に同一、あるいはそれに類似の多数

50

の残基を有するヒト蛋白質配列を見つけるために用いられる。それらが同一ではないが類似の化学的特性を共有していれば、残基はもう1つの残基に類似している。このような関係は当業者によく知られたことである。

【0016】

いくつかの実施の形態において、抗体は抗原性領域を識別するために用いられる。抗体はポリクロナールであると考えられる。抗体の有機体の源は、修飾蛋白質が低い抗原性であることが望まれる有機体と同じ種である。したがって、もし酵素や蛋白質がヒトに望ましいように抗原性が低ければ、抗原性領域を識別するために、あるいは修飾蛋白質が非修飾蛋白質（天然または省略のない組み換え型）よりも抗原性が低いかどうかを決定するために、ヒト抗体を使用することは、いくつかの実施の形態において望ましい。より好ましい実施の形態において、修飾酵素または蛋白質に関して、非修飾酵素または蛋白質と修飾酵素または蛋白質の抗原性を比較することにより、抗原性が減少したか、あるいは、低下したかを判断する；つまりこれは、i)修飾蛋白質に露出前、あるいはそれを投与する前の被験者からサンプルを入手し、修飾蛋白質及びそれと同一の蛋白質の非修飾版を比較するためにサンプルを使用する、または、ii)修飾蛋白質に露出後、あるいはそれを投与した後の被験者からサンプルを入手し、修飾蛋白質及びそれと同一の蛋白質の非修飾版を比較するためにサンプルを使用することにより、達成されうる。サンプルは、例えば血液（血清）のような体液を含め、抗体あるいは免疫細胞を有する化合物である。本サンプルは、例えばELISAのような免疫検出法を導入するために使用される。サンプルを提供する被験者はこれまでに非修飾蛋白質に露出されることがないことが好ましいが、被験者は非修飾蛋白質に関して特定の実験を受けたことがないことが考えられる。いくつかの実施の形態において、サンプルがモノクローナル抗体ハイブリドーマからの培養地であることが適当である。

10

20

【0017】

本発明のその他の特徴において、修飾蛋白質あるいは酵素の活性有無の決定は、例えば酵素活性などの活性のために修飾化合物を分析することにより達成される。

【0018】

どの酵素も本発明の方法により修飾される。酵素は、加水分解酵素（例えば、デアミナーゼ、エステラーゼ、グリコシダーゼ、リパーゼ、ヌクレアーゼ、ペプチダーゼ、ホスファターゼ、ホスホジエステラーゼ、及びプロテイナーゼ）；異性化酵素（例えば、エピメラーゼ、ムターゼ、及びラセマーゼ）；リガーゼまたはシンセターゼ（例えば、アシル-CoAシンセターゼ、アミノアシル-tRNAシンセターゼ、及びカルボキシラーゼ）；リアーゼ（例えば、アルドラーゼ、脱炭酸酵素、脱水酵素、及びヌクレオチド・シクラーゼ）；酸化還元酵素（例えば、デヒドロゲナーゼ、ジオキシゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ、モノオキシゲナーゼ、ニトロゲナーゼ、酸化酵素、及び還元酵素）；及び、転移酵素（例えば、アシルトランスフェラーゼ、アミノトランスフェラーゼ、糖転移酵素、キナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、ホスホリラーゼ、及びスルホトランスフェラーゼ）である。具体的な実施の形態において、酵素は毒素として分類されるが、細胞、組織、有機体にとっての毒性を意味する。特に、本発明の一部として考えられることは、毒素は例えばゲロニンのような植物により生成される。これまで論じてきたとおり、本発明の修飾ゲロニン・ポリペプチドのような修飾酵素は付加的なポリペプチドに付着する。当然のことながら、修飾ゲロニンに関する実施の形態のいくつかは修飾酵素に適用されるし、その逆もまた同様である。

30

40

【0019】

また、本発明は、抗原性、場合によっては特に被験者に対する抗原性を低下させた修飾蛋白質を生成する方法に関するものである。いくつかの実施の形態において、この方法は：a)第1被験者に対して投与を希望する蛋白質を選択する；b)第1被験者または第1被験者と同じ種である第2被験者のどちらか一方からの抗血清を使用する第1被験者において、抗原性のある蛋白質の領域を識別する；c)識別領域がない修飾蛋白質を生成する；d)修飾蛋白質が抗原性を低下させたことを確認する、以上の4ステップを含む。これまでに論

50

じてきたように、この最後のステップは、例えばこれまでに修飾蛋白質の非修飾版に露出されたことのない個人からの、あるいは修飾蛋白質に対する免疫反応の低下が望まれる個人からの血清などのサンプルを使用することで達成される。

【0020】

さらに、修飾蛋白質を生成する方法は、ヒト蛋白質の抗原性領域に相同する抗原性の低い領域を識別するために、ヒト蛋白質データベースをスクリーニングするステップと、修飾蛋白質を形成するために抗原性の低い識別領域のすべてまたは一部とその抗原性領域を交換するステップを含む。大量のヒト蛋白質データベースのスクリーニングは、必須ではないが、することが望ましい。したがって、もしある抗原性領域と相同の、あるいは同一の残基を有する特定のヒト蛋白質の配列について、ヒト蛋白質データベースのスクリーニングとは無関係に知っている場合、この方法は本発明の目的に含まれるだろう。例えば、抗原性の低下が望まれるマウス酵素のヒト同属体の配列について知っている場合もあるかもしれない。マウス蛋白質の領域をヒト配列からの残基と交換することは、本発明に関することである。本発明の方法及び組成物には、ポリペプチドのアミノ酸残基の交換、削除、及び/又は修飾が含まれる。交換される残基は、残りのアミノ酸の順番と数の両方を残基が交換されたポリペプチドと同様にする。残基は保守的な、または非保守的な残基と交換される。削除された残基は、残りのアミノ酸の順番を乱さないが、ポリペプチドの残基の数を1つまでに減少させる。修飾された残基は、化学的に変更が加えられたものであり、この変化はポリペプチド内の残りのアミノ酸の順番や数を変更するものではない。

10

【0021】

いくつかの実施の形態において、修飾蛋白質または酵素を完成させるために組み替え核酸技術を使用する方法を含む。したがって、修飾が望まれる酵素のためのcDNA配列は、抗原性領域をコードする核酸配列が抗原性の低い領域をコードする核酸配列と交換されるといような操作が行われる。あるいは、修飾蛋白質は識別領域を除去することにより生成される。除去される領域は、不在と考えられる。不在領域は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100かそれ以上のアミノ酸残基を含む。さらに、修飾蛋白質は、除去あるいは交換された2つ以上の抗原性領域を有し、また、その領域の側面に位置するアミノ酸は除去あるいは交換される。不在抗原性領域は除去される同数のアミノ酸残基に交換されると考えられる。

20

30

【0022】

本発明の方法において、抗原性領域を識別するか、またはELISAアッセイを使用して修飾蛋白質を判断する。被験者は、例えばヒトなどの哺乳動物である。

【0023】

本発明の他の組成物には、交換されたアミノ酸を有する組み換え型ゲロニン毒素よりもヒトにおいて抗原性の低いアミノ酸と交換された抗原性領域1、2、3、または4の1つ以上からの少なくとも3つのアミノ酸を持つヒト化組み換え型ゲロニン毒素が含まれる。ゲロニン毒素の抗原性領域は他の所で説明する。抗原性領域1、2、3、及び/又は4からの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、75、100かそれ以上のアミノ酸が、交換、削除または修飾されると考えられる。少なくとも2、3、または4つの抗原性領域からのアミノ酸は操作される可能性がある。

40

【0024】

本発明のさらなる実施の形態において、組み換え型ゲロニン毒素は：a)哺乳動物において抗原性を示すゲロニン毒素の少なくとも1つの領域を識別；b)少なくとも一部の抗原性領域を哺乳動物で抗原性の低い領域と交換、を含むプロセスにより作成される。ゲロニン毒素は、すなわちin vitroにて操作された核酸配列から得られる組み換え型である。また、このプロセスには、識別抗原性領域と哺乳動物のアミノ酸配列との比較が含まれており、それにより前記哺乳動物における抗原性の低い領域が識別されるか、あるいはそれが哺乳動物における抗原性の低い領域を識別する。いくつかの実施の形態において、前記哺乳

50

動物はヒトである。これまで述べてきたように、本明細書において開示した方法と組成物のいくつかは本明細書において説明した他の方法あるいは組成物に適用することがある。

【0025】

また、本発明は本発明の組成物を使用する治療方法に関するものである。前記組成物は、本発明の毒素により達成される特定の細胞や組織を殺し、除去するという形になる病気の治療において使用される。1つの組成物あるいは方法に関して論じた実施の形態は、本発明の他のどの組成物または方法にも適用することがある。

【0026】

いくつかの実施の形態において、例えばその中心的毒素領域のようなゲロニン毒素のすべてまたは一部と、前記免疫毒素を特定細胞に用いる抗体のすべてまたは一部を含む、癌細胞あるいは腫瘍細胞に効果的な量の免疫毒素を与えることにより前記細胞を殺す方法がある。『効果的な量』とは、対象とする目的を達成する量を表す。癌細胞あるいは腫瘍細胞を殺す方法の場合、癌細胞あるいは腫瘍細胞を殺すことを達成するための量である。本発明の他の方法において、ゲロニンの中心的毒素領域、および癌細胞を明確に標的にする一本鎖抗体から構成される免疫毒素よりなる効果的な量の化合物を、患者に投与することにより、患者の癌を治療するための方法を含む。治療に関する『効果的な量』とは、被験者に治療による恩恵を与えることを表す。本明細書の全体にわたって使用される「治療による恩恵」という語は、被験者の治療法に関して、その被験者の健康を促進し、あるいはそれを高めるものを表す。癌（同様に他の状況にも適用されるが）という状況において、前癌状態、癌、および高増殖性の病気の治療を含め、治療による恩恵は、以下の例：被害者の延命、この病気の腫瘍性発達の減少または遅延、高増殖性の低下、腫瘍増殖の縮小、転移の遅延、癌細胞または腫瘍細胞増殖率の減少、および患者の健康状態に起因すると考えられる患者の痛みの減少などを含む。

【0027】

本発明のいくつかの実施の形態において、前記毒素はゲロニンである。さらなる実施の形態において、前記免疫毒素は配列識別番号1のアミノ酸配列のすべてまたは一部を含む。前記免疫毒素は、いくつかの実施の形態において省略のない配列を含むが、省略のないゲロニン蛋白質配列よりも少ないアミノ酸を含む。さらに、前記毒素はヒト化され、本明細書において開示、あるいは記述された毒素または構成物のいずれかであると考えられる。

【0028】

さらなる実施の形態において、前記免疫毒素の抗体はヒト化され、及び/又は一本鎖抗体である。本発明の方法において、抗体は、省略形であるが特有の向標性が可能な限り前記免疫毒素を標的癌細胞に向ける。いくつかの実施の形態において、前記抗体（抗体断片を含む）は前記標的細胞の表面にある抗原を明確に標的にする（すなわち、拘束する）。より具体的な実施の形態において、前記抗体は腫瘍抗原を標的にする。前記抗体は、具体的にマウス、ウサギ、ラット、ヤギ、またはサルの抗体と考えられるが、いかなる哺乳動物の抗体もありえる。前記抗体は、異なる種のものであるが、本発明あるいは当業者に知られている他の方法によってヒト化されることがある。前記抗体が一本鎖抗体である場合、メラノーマ細胞に向けられる抗体である9.2.27あるいはZME-018を含むことがある。具体的な例としては、前記免疫毒素は、本明細書で述べたscfvMEL-2018またはscfvMEL-2025（配列識別番号11）である。

【0029】

標的とされる癌細胞は、前立腺、肺、脳、皮膚、肝臓、胸、リンパ、胃、精巣、卵巣、脾臓、骨、骨髄、頭頸部、子宮頸管、食道、目、胆嚢、腎臓、副腎、心臓、大腸、または血液からの細胞である。さらに、癌患者は上記に示したような臓器/組織からの、あるいはその内部の癌を持つことがある。本発明の実施の形態において、癌細胞はメラノーマ細胞である。癌細胞あるいは腫瘍細胞は患者にあると考えられる。いくつかの実施の形態において、患者には、例えば治療などの特定の望ましい結果を達成するために必要な量を示す効果的な量の治療用組成物が投与されるだろう。例えば、癌という状況の中で、望まし

い結果は癌細胞または腫瘍細胞を殺すことである。

【0030】

前記免疫毒素は薬剂的あるいは薬理的に条件を満たす組成物の中に含まれることがある。また、治療処方計画の一部として、患者は例えば化学療法、放射線治療法、遺伝子治療、外科手術、または他の免疫療法などの他の抗癌治療を受けることもある。

【0031】

さらなる実施の形態において、前記免疫毒素はそれをコードする核酸配列を含み、それを発現することが可能である発現構成を与えることにより、細胞または患者に提供される。いくつかの実施の形態において、前記発現構成物は、アデノウイルス・ベクター、アデノ随伴ウイルス・ベクター、肝炎ウイルス、ヘルペス・ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、またはワクシニア・ウイルスを含むがこれに限定されるものではない、ウイルス・ベクターである。

10

【0032】

請求項及び/又は明細書において用語"comprising (構成する)"と共に使われる単語"a"または"an"の使用は、"one(1つ)"を意味するかもしれないが、"one or more(1つ以上)"、"at least one (少なくとも1つ)"、"one or more than one (2つ以上)"の意味とも一致する。

【0033】

本発明の他の目的、特徴、利点は以下に述べる記述より明らかになるであろう。しかしながら、当然、本発明の具体的な実施の形態を示す際に、本発明の精神やその範囲内での種々の変化および修飾はこの詳細な説明から当業者に明らかであるため、詳細な説明や具体例は図によってのみ示される。

20

【具体的な実施の形態の説明】

【0034】

抗原性を低めた蛋白質及びポリペプチドは免疫システムを持つ生物体に投与される組成物としてきわめて大きな利点を提供することができる。そのような蛋白質及びポリペプチドをデザイン及び製造する方法が本明細書で述べられ、その結果生じる分子についても述べられる。特定の酵素の酵素活性を保持しながら、前記蛋白質の酵素活性から利点を得る可能性のある個体の抗原性は低下させることも望ましいので、酵素は上記の方法のための特に興味深い候補である。リボソーム 不活化蛋白質 (RIPs) はそうした蛋白質の1例である。従って、本発明によるいくつかの実施の形態で、ゲロニンなどの植物毒素を含んでいる核酸及びポリペプチドの組成物が提供される。蛋白質をデザインして、標的分子など別のポリペプチドと結合する1つのポリペプチドの毒素機能を提供することができる。これらのデザイナー毒素は広範な適用を有している。

30

【0035】

I. 蛋白質性化合物

いくつかの実施の形態で、本発明は天然または野生型の蛋白質に関連した修飾された蛋白質性分子を含んでいる新規な組成物に関するものである。いくつかの実施の形態で、その蛋白質化合物はアミノ酸残基を欠失させられている；他の実施の形態では、蛋白質性化合物のアミノ酸残基は置換されており、さらに別の実施の形態では、蛋白質化合物内のアミノ酸残基は欠失と置換の両方を受けている。さらに、1つの蛋白質性化合物は2つ以上のポリペプチド物質を含んでいるアミノ酸分子を含んでいてもよい。本明細書で用いられるように、『蛋白質性分子』、『蛋白質性組成物』、『蛋白質性化合物』、『蛋白質鎖』、あるいは『蛋白質物質』は一般に約200を超えるアミノ酸から成る蛋白質、または1つの遺伝子から翻訳された完全長の内生的配列；約100を超えるアミノ酸から成るポリペプチド；及び/又は約3から約100のアミノ酸から成るペプチドを意味する。上に述べられたすべての『蛋白質性』という用語は本明細書で交換可能に用いられることがある。さらに、これらの用語は融合蛋白質あるいは蛋白質結合物に適用しても差し支えない。

40

【0036】

いくつかの実施の形態で、少なくとも1つの蛋白質性分子の量は、およそ、または少な

50

くとも、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1750、2000、2250、2500またはそれ以上のアミノ分子残基、及びそこに誘導可能ないずれの範囲でもよい。本発明による化合物は配列識別番号：1及び/又は配列識別番号：11の連続するアミノ酸を上記の数含んでいてもよい。適切な場合には、配列識別番号：1に関する実施の形態は配列識別番号：11を含む本明細書で述べられる他のいずれのアミノ酸配列に関して用いられてもよく、その逆も可能であると考えられる。

【0037】

従って、『蛋白質性組成物』という用語は天然に合成される蛋白質のうち20の共通アミノ酸の少なくとも1つ、あるいは下の表1に示されるアミノ酸などの少なくとも1つの修飾または異常アミノ酸で構成されるアミノ分子配列を含んでいる。

【0038】

【表1】

修飾された非正常蛋白質			
Abbr.	Amino Acid	Abbr.	Amino Acid
Aad	2-Aminoadipic acid	EtAsn	N-Ethylasparagine
Baad	3- Aminoadipic acid	Hyl	Hydroxylysine
Bala	β -alanine, β -Amino-propionic acid	AHyl	allo-Hydroxylysine
Abbr.	Amino Acid	Abbr.	Amino Acid
Abu	2-Aminobutyric acid	3Hyp	3-Hydroxyproline
4Abu	4- Aminobutyric acid, piperidinic acid	4Hyp	4-Hydroxyproline
Acp	6-Aminocaproic acid	Ide	Isodesmosine
Ahe	2-Aminoheptanoic acid	AlIe	allo-Isoleucine
Aib	2-Aminoisobutyric acid	MeGly	N-Methylglycine, sarcosine
Baib	3-Aminoisobutyric acid	MeIle	N-Methylisoleucine
Apm	2-Aminopimelic acid	MeLys	6-N-Methyllysine
Dbu	2,4-Diaminobutyric acid	MeVal	N-Methylvaline
Des	Desmosine	Nva	Norvaline
Dpm	2,2'-Diaminopimelic acid	Nle	Norleucine
Dpr	2,3-Diaminopropionic acid	Orn	Ornithine
EtGly	N-Ethylglycine		

本明細書で用いられるように、『アミノ分子』とは本技術分野の当業者に周知であるように、アミノ酸、アミノ酸誘導体、またはアミノ酸ミミックのいずれをも意味する。いくつかの実施の形態で、蛋白質性分子の残基は連続しており、いずれの非アミノ分子もアミノ分子残基の配列を妨害することはない。その他の実施の形態で、前記配列は1つ以上の非アミノ分子成分で構成されてもよい。特定の実施の形態で、前記蛋白質性分子の残基の配列は1つ以上の非アミノ分子成分によって妨害されることがある。

【0039】

1. 機能的側面

本発明は修飾蛋白質に関するものであり、修飾蛋白質は非修飾蛋白質に匹敵する機能的活性を示し、さらに修飾蛋白質は抗原性がより低く、及び/又は副作用の誘発がより少なく、及び/又はより良好あるいは長期にわたる効力を有するなど、個体において非修飾蛋白質に勝るその他の利点を有していることから、特に個体に治療上の利点を与える修飾蛋白質に関するものである。従って、本適用が『修飾蛋白質』の機能または活性に関するものであるとき、このことが、例えば、1つの蛋白質は、1) 非修飾蛋白質と同じ活性を示すか、または同じ特異性を有するが、異なるレベルの活性を有することがある、そして、2) 非修飾蛋白質に勝る別の利点を持つ、などを含んでいることが当業者であれば理解できるであろう。活性の判定は、特に蛋白質の活性に関して、当業者に周知の評価法を用いて達成してもよく、比較の目的のためには、例えば、修飾または非修飾蛋白質のいずれかの天然及び/又は遺伝子組み換えしたものを利用してよい。

10

【0040】

2. 修飾蛋白質

本発明による修飾蛋白質はアミノ酸の欠失及び/又は置換を有していてもよく；従って、欠失を有する蛋白質、置換を有する蛋白質、及び欠失と置換を有する蛋白質が修飾蛋白質である。いくつかの実施の形態で、これらの修飾蛋白質は、例えば、融合修飾蛋白質または、例えば、リンカーを持つ修飾蛋白質のような挿入あるいは付加アミノ酸などをさらに含んでいてもよい。『修飾欠失蛋白質』は天然蛋白質の1つ以上の残基を欠失しているが、その天然蛋白質の特異性及び/又は活性は有している。『修飾欠失蛋白質』は低下した免疫原性または抗原性を持つこともある。修飾欠失蛋白質の1例は、少なくとも1つの抗原性領域、即ち、修飾蛋白質が投与される生物体の種類のような、特定の生物体において抗原性があると判定される蛋白質の領域、から欠失したアミノ酸残基を有する修飾欠失蛋白質である。

20

【0041】

置換型または代替型変異体は通例その蛋白質内の1つ以上の部位で1個のアミノ酸が別のアミノ酸と交換されることを含んでおり、そのポリペプチドの1つ以上の性質の調節、特にその免疫原性／抗原性の低下、個体におけるすべての副作用の低下、またはその効力の増加のためにデザインされてもよい。この種の置換は好ましくは同類的であり、即ち1個のアミノ酸は類似の形状及び電荷のアミノ酸で置換される。同類置換は本技術分野で周知であり、例えば：アラニンをセリンに；アルギニンをリシンに；アスパラギンをグルタミンまたはヒスチジンに；アスパラギン酸塩をグルタミン酸塩に；システインをセリンに；グルタミンをアスパラギンに；グルタミン酸塩をアスパラギン酸塩に；グリシンをプロリンに；ヒスチジンをアスパラギンまたはグルタミンに；イソロイシンをロイシンまたはバリンに；ロイシンをバリンまたはイソロイシンに；リシンをアルギニンに；メチオニンをロイシンまたはイソロイシンに；フェニルアラニンをチロシン、ロイシン、またはメチオニンに；セリンをスレオニンに；スレオニンをセリンに；トリプトファンをチロシンに；チロシンをトリプトファンまたはフェニルアラニンに；そして、バリンをイソロイシンまたはロイシンに；などの置換がある。ポリペプチドの抗原性領域は抗原性がより低い領域で置換され；抗原性がより低い領域は天然蛋白質内の対応する残基と同一の残基を含んでおり、しかもいくつかの同類置換及び／または非同類置換を含んでいることもある。

30

40

【0042】

欠失あるいは置換に加えて、修飾蛋白質は、通例前記ポリペプチド内の少なくとも1つの残基の付加を含んでいる残基の挿入を有することがある。これは標的ペプチドまたはポリペプチドあるいは単にただ1個の残基の挿入などでもよい。融合蛋白質と呼ばれる末端付加について下に述べる。

『生物学的機能的同等物』は本技術分野で周知であり、本明細書でさらに詳細に定義される。つまり、蛋白質の生物学的活性が維持されるとすれば、天然ポリペプチドのアミノ酸と同一または機能的に同等なアミノ酸を約70%から約80%の間、約81%から約90%の間、またはさらに約91%から約99%の間の範囲で有する配列などである。修飾蛋

50

白質はそれに対応する天然蛋白質と生物学的機能的に同等であろう。

【0043】

アミノ酸及び核酸配列が付加的なN-またはC-末端アミノ酸あるいは5'または3'配列のような付加的な残基を含んでいてもよく、しかも、本明細書で開示される配列の1つで示されるように、その配列が上に示された基準を満たす限りは、蛋白質の発現に関わる部位での生物学的蛋白質活性の維持などを本質的に含んでいることも理解されるであろう。末端配列の付加は、例えば、コード領域の5'または3'部分のいずれかに隣接する種々の非コード配列を含んでいるか、または遺伝子内に生じることが知られている種々の内部配列、即ちイントロンを含んでいる場合がある核酸配列に特に適用される。

【0044】

以下の説明は同等物あるいは改良された第2世代の分子を作り出すための蛋白質のアミノ酸を変化させることに基づいている。例えば、いくつかのアミノ酸は、例えば、基質分子への結合部位などの構造と相互作用的に結合する能力を測定可能なほど損失させずに、蛋白質構造内の他のアミノ酸で置換してもよい。蛋白質の生物学的機能的活性を規定するのはその蛋白質の相互作用能力と性質であるので、いくつかのアミノ酸置換は蛋白質配列内及びその基礎になるDNAコード配列内で行われ、それにもかかわらず類似の性質を持つ蛋白質を生じさせる。従って、以下で述べられるように、それらの生物学的有用性または活性を測定可能なほど損失させることなく、種々の変化は遺伝子のDNA配列内で行なわれると本発明者は考えるものである。表1は特定のアミノ酸をコードするコドンを示す。蛋白質性分子は、もし以下の『相同性基準』のひとつを満たすならば、第2の蛋白質性分子 20 に対して『相同性』を有するか、または『相同的』であるとみなされる：1) その蛋白質性分子の少なくとも30%が第2の蛋白質性分子と同じ部位で配列同一性を有する；2) 第2の蛋白質性分子と同じ部位で若干の配列同一性があり、非同一残基においては、本明細書で述べられているように、それらの少なくとも30%は第2の蛋白質性分子に関して同類的差異である；3) 蛋白質性分子の少なくとも30%が第2の蛋白質性分子と配列同一性を有するが、同一残基間に非同一残基のギャップがある。本明細書で用いられているように、『相同的』という用語は、分子全体の代わりに、蛋白質性分子の1つの領域に対して同様に適用してもよい。もし『相同性』または『相同的』という用語が、例えば、『50%の相同性』または『50%相同的』など数字によって限定されるならば、相同性の基準は、1 30)、2)、及び3)に関して、『少なくとも30%』から『少なくとも50%』に変更される。従って、2個の蛋白質性分子または蛋白質性分子の一部の間には少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、あるいはそれ以上の相同性があり得ると考えられる。

【0045】

そのような変更を行うにあたって、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮されよう。蛋白質に相互作用的生物学的機能を与える上で疎水性親水性アミノ酸指標の重要性が本技術分野では一般に理解されている(Kyte & Doolittle, 1982)。アミノ酸の相対的疎水性親水性特性はその結果生じる蛋白質の2次構造に寄与し、続いて、例えば、酵素、基質、レセプタ、DNA、抗体、抗原やその他の分子と蛋白質の相互作用を規定することが認められている。 40

【0046】

類似のアミノ酸の置換は親水性を基礎にして効果的につくられることも本技術分野で理解されている。引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第4,554,101号明細書には、蛋白質の最大局所平均親水性はその隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるので、その蛋白質の生物学的性質と相互関係があると述べている。米国特許第4,554,101号明細書に詳述されているように、以下の親水性価がアミノ酸残基に割り当てられている；アルギニン(+3.0)；リシン(+3.0)；アスパラギン酸塩(+3.0±1)；グルタミン酸塩(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；スレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシ 50

ン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; トリプトファン (-3.4) 。

【0047】

アミノ酸は類似の親水性価を有する別のアミノ酸で置換され、さらに生物学的に同等及び免疫学的に同等な蛋白質をつくりだすことが理解されている。そのような変換において、親水性価が±2以内のアミノ酸置換が好ましく、±1以内のアミノ酸置換は特に好ましく、±0.5以内のアミノ酸置換はより一層好ましい。

【0048】

上に概説されたように、一般にアミノ酸置換は、例えば、その疎水性、親水性、電荷、大きさなどアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性に基づいている。前述の種々の性質を考慮した典型的な置換は当業者に十分周知であり：アルギニン及びリシン；グルタミン酸塩及びアスパラギン酸塩；セリン及びスレオニン；グルタミン及びアスパラギン；そして、バリン、ロイシン、及びイソロイシン；などがある。

【0049】

表2に本明細書に述べられている本発明の方法によって修飾される蛋白質とポリペプチドのリストを示す。非ヒト・ポリペプチドは特にヒトにおいてその抗原性を低下させるための本発明による方法の標的と考えられている。治療上の価値を有する非ヒト蛋白質は本発明の範囲内にあると考えられる。本明細書で述べられるその他すべての蛋白質またはポリペプチドは本発明の方法に従って修飾されてもさしつかえない。

【0050】

【表2】

蛋白質属	蛋白質亜属	蛋白質種	蛋白質亜種
1) Toxins	リボソーム抑制蛋白質		
		Gelonin	
		Ricin A Chain	
		Pseudomonas Exotoxin	
		Diphtheria Toxin	
		Mitogillin	
		Saporin	
2) Cytokines/Growth Factors	Interleukins	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19	
	TNF		
	LT		
	Interferons	IFN α , IFN β , IFN γ	
	コロニー刺激因子	GM-CSF, G-CSF, M-CSF, CSF	

	LIF		
	繊維芽成長因子	bFGF, FGF, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-18, FGF-20, FGF, 23	
	VEGF		
3) Enzymes	Oxidoreductases		
	Transferases	Transferring one-carbon groups	Methyltransferases
			Carboxyl and carbamoyltransferases
			Amidinotransferases
		Transferring aldehyde or ketone residues	
		Acyltransferases	Acyltransferases
			Aminoacyltransferases
		Glycosyltransferases	Hexosyltransferases
		Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups	
		Transferring nitrogenous groups	Transaminases
			Oximinotransferases
		Transferring phosphorous-containing groups	Phosphotransferases
			Diphosphotransferases
			Nucleotidyltransferases
		Transferring sulfur-containing groups	Sulfur-transferases
			Sulfotransferases
			CoA-transferases
		Transferring selenium-containing groups	
	Hydrolases	Acting on ester bonds	
		Glycosylases	
		Acting on ether bonds	
		Acting on peptide bonds (peptide hydrolases)	
		Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds	

10

20

30

40

【0051】

本発明による修飾されたポリペプチドをつくるための別の実施の形態はペプチド・ミメティックの利用である。ミメティックは蛋白質の二次構造の要素を模倣した、ペプチドを含んでいる分子であり、例えば、Johnson (1993) を参照されたい。ペプチド・ミメティ

50

ック利用の背後にある根本的理由は、蛋白質のペプチド・バックボーンが抗体や抗原などの分子的相互作用を促進するようなやり方でアミノ酸側鎖を配向するために主として存在することである。ペプチド・ミメティックは天然の分子に似た分子の相互作用を許容すると予想される。これらの原理は、上に概説された原理と共に、天然蛋白質の自然な性質の多くを持ちながら、改変され、場合によっては改良された性質も有する第2世代の修飾蛋白質分子を遺伝子操作でつくるために用いることができる。

【0052】

3. 多重ポリペプチド蛋白質性化合物

本発明は、2個以上のポリペプチドからのアミノ酸配列を含んでいる蛋白質性化合物に関するものである。蛋白質性化合物あるいは分子は、例えば、抗体の抗原結合領域を持つ修飾された毒素を含んでいる場合もある。多重ポリペプチド蛋白質性化合物は2個以上の蛋白質が互いに化学的に結合しているか、または同じ核酸分子によってコードされる2個以上のポリペプチドの融合蛋白質でもよい。1つの毒素及び活性を持つ1つの第2のポリペプチドを含んでいる融合あるいは結合蛋白質は『二重毒素』と呼ばれることがある。従って、多重ポリペプチド蛋白質性化合物は第1のポリペプチドの全体または一部及び第2のポリペプチドの全体または一部、第3のポリペプチド、第4のポリペプチド、第5のポリペプチド、第6のポリペプチド、第7のポリペプチド、第8のポリペプチド、第9のポリペプチド、第10のポリペプチド、あるいはそれ以上のポリペプチドで構成されてもよい。

10

【0053】

デザイナー毒素自体は一般に、細胞表面に結合あるいは特定の細胞内部に取り入れられる能力を持たない。従って、これらの作用物は、特定の標的細胞に結合し、一旦結合すると効果的に細胞内部に取り入れられる能力のある作用物／蛋白質への化学的結合または融合のいずれかを必要とする。表3は、特に特定の細胞の種類または組織体の一部分のような特定の場所へ遺伝子操作された蛋白質性分子を標的にすることに関する実施の形態において、本発明による毒素に結合または融合される蛋白質及びポリペプチドのリストを示している。本発明はさらに毒素分子の全体または一部を表2に挙げられたいずれでもよい蛋白質の全体または一部に付加することを含んでいる。本発明はこれら表2及び表3に提供された例を含んでいるとみなされる。

20

【0054】

30

【表 3】

属	亜属	種	亜種
1) Antibodies	Polyclonal		
	Monoclonal	non-recombinant	
		recombinant	
			chimeric
			single chain
			diabody
			multimeric
2) Cytokines/ Lymphokines/ Growth Factors	Interleukins	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19	
	EGF		
	Colony Stimulating Factors (CSF)	GM-CSF, G-CSF, M-CSF	
3) Small Chemical That Bind Cell Surface and Are Internalized	Nicotine		
	ATP		
	Amino Acids		
	Dopamine		

10

20

		Acting on acid anhydrides	
		Acting on carbon-carbon bonds.	
		Acting on halide bonds	
		Acting on phosphorus-nitrogen bonds.	
		Acting on sulfur-nitrogen bonds	
		Acting on carbon-phosphorus bonds	
		Acting on sulfur-sulfur bonds	
	Lyases	Carbon-carbon lyases.	
		Carbon-oxygen lyases	
		Carbon-nitrogen lyases	
		Carbon-sulfur lyases	
		Carbon-halide lyases	
		Phosphorus-oxygen lyases	
	Isomerases	Racemases and epimerases	
		Cis-trans-isomerases	
		Intramolecular oxidoreductases	
		Intramolecular transferases (mutases)	
		Phosphotransferases (phosphomutases)	
	Ligases	Forming carbon-oxygen bonds	
		Forming carbon-sulfur bonds	
		Forming carbon-nitrogen bonds.	
		Forming carbon-carbon bonds	
		Forming phosphoric ester bonds	

10

20

30

40

50

【0055】

a：融合蛋白質

特別な種類の挿入変異体は融合蛋白質である。この分子は一般的には第2のポリペプチドの全部あるいは一部とN-あるいはC-末端で結合されている天然分子の全体あるいはかなりの部分を有している。例えば、融合は通常異種ホスト内の1つの蛋白質の組み換え体発現を可能とするために他の種からのリーダー配列を用いる。別の有益な融合には融合蛋白質を標的としたり、あるいはその精製を行いやすくするために抗体エピトープあるいはそ

の他のタグなどの免疫学的に活性のある領域の付加を内容とする場合もある。6xHis及びGST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）をタグとして用いることは良く知られている。融合接合部あるいはその近くに切断サイトを導入すると、精製後の外来ポリペプチドの除去が容易になる。その他の有益な融合としては、ヒドロラーゼなど酵素からの活性サイトなどの機能性領域、グリコシル化領域、細胞標的信号あるいは膜横断領域などの結合などがある。

【0056】

本発明の1つの実施の形態として免疫毒素が特に考えられる。1つの免疫毒素は1つの抗体の少なくとも一部と毒素分子の一部で構成される細胞毒性化合物である。上記抗体及び毒素は相互に融合あるいは接合されていてもよい。免疫毒素については以下により詳細に述べる。 10

【0057】

b：接合蛋白質

本発明はさらに一般的にはモノクローナル・タイプの翻訳された蛋白質、ポリペプチド、及びペプチドなど、少なくとも1つの作用剤と結合して1つの抗体接合体を形成している接合ポリペプチドを提供する。診断用薬品あるいは治療用薬品としての抗体分子の有効性を増大させるために、通常は少なくとも1つの望ましい分子あるいは成分を接合、共有結合、あるいは複合化させる。そうした分子あるいは成分は、少なくとも1つのエフェクタあるいはレポータ分子である。エフェクタ分子は例えば細胞毒性作用など、望ましい活性を有している。抗体に取り付けられたフェクタ分子の非限定的実例としては毒素、抗腫瘍剤、治療用酵素、放射ラベル・ヌクレオチド、抗ウイルス剤、キレート化剤、成長作用因子、そしてオリゴ又はポリ・ヌクレオチドなどである。対照的に、レポータ分子はアッセイを用いて検出できるいずれかの成分として定義される。抗体に接合されたレポータ分子の非限定的実例としては酵素、放射性ラベル物質、ハプテン類、蛍光ラベル、燐光性分子、化学蛍光性分子、発色団、蛍光分子、光親和性分子、着色粒子あるいはビオチンなどのリガンドなどである。 20

【0058】

十分な選択性、特異性、あるいは親和性を有するいずれの抗体も抗体接合体のベースとして用いることができる。そうした性質は当業者に公知の通常の免疫学的スクリーニング法を用いて評価できる。標準的な抗原結合サイトに加えて、抗体分子内の生物学的活性分子に結合するためのサイトは、病原体、B細胞超抗原、T細胞共レセプタCD4、及びHIV-1エンベロープと結合できる種々の領域にあるサイトなどである（Sasso et al., 1989; Shoriki et al., 1991; Silvermann et al., 1995; Cleary et al., 1994; Lenert et al., 1990; Berberian et al., 1993; Kreier et al., 1991）。さらに、可変領域が抗体自己結合に関与しており（Kang et al., 1988）、そして抗抗体によって認識されるエピトープ（イディオトープ）を含んでいる（Kohler et al., 1989）。 30

【0059】

抗体接合体のいくつかの例としては抗体が検出可能なラベルに結合されている接合体がある。『検出可能なラベル』とはそれらの特殊な機能性及び/又は化学的特性によって検出することができる化合物あるいは元素を意味しており、それを用いることで、それらが取り付けられる抗体の検出が可能となり、望ましい場合、さらに定量を行なうこともできる。もうひとつのそうした例は細胞毒性あるいは抗細胞性作用剤に結合された抗体で構成される接合体の形成であり、『免疫毒素』と命名することができる。 40

【0060】

抗体接合体は診断用薬品として使用することができる。抗体診断は一般的には2つのクラスに分類され、1つは種々の免疫アッセイにおけるようにin vitroでの診断において用いられるものであり、もう1つは通常『抗体指向画像形成』として知られるin vivo診断手順である。

【0061】

多くの適切な画像形成剤が抗体に対してそれらを取り付ける方法として知られている（ 50

例えば、米国特許No.5,021,236; No. 4,938,948;及びNo.4,472,509号明細書参照。それらは引用によって本明細書に組み込まれる)。用いられる画像形成用成分は常磁性体イオン、放射性同位元素、蛍光色素、NMR-検出可能物質、X線画像形成である。

【0062】

常磁性体イオンの場合、クロム(III)、マンガン(III)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジミウム(III)、サマリウム(III)、イットルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ディスプロシウム(III)、ホルミウム(III)及び/又はエルビウム(III)などのイオンを挙げることができ、ガドリニウムが特に好ましい。X線画像形成など他の目的で有益なイオンはランタニウム(III)、金(III)、鉛(II)、特にビスマス(III)などであるが、その他のものも利用

10

【0063】

治療用及び/又は診断用目的のための放射性同位元素の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロミウム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレンウム、³⁵イオウ、テクニシウム^{99m}、及び/又はイットリウム⁹⁰である。いくつかの実施の形態では¹²⁵Iが使用に適する場合が多く、テクニシウム^{99m}及び/又はインジウム¹¹¹も長距離検出に関してエネルギーが低くて好適であるので好ましい場合がしばしばある。本発明による放射性ラベル・モノクローナル抗体はこの技術分野で周知の方法でつくることができる。例えば、モノクローナル抗体をヨウ化ナトリウム及び/又はカリウムと次亜鉛素酸ナトリウムなどの化学酸化剤、あるいはラクトペロキシダーゼなどの酵素性酸化剤と接触させてヨウ化することができる。本発明によるモノクローナル抗体は、例えば、ペルテクネートを第一スズ溶液で還元して、還元されたテクネチウムをセファデックス・カラム上でキレート化して、その抗体をこのカラムに適用することによりリガンド交換プロセスによってテクネチウム^{99m}でラベルすることができる。あるいは、例えば、ペルテクネート、 SnCl_2 などの還元剤、ナトリウム・カリウム・フタレート溶液などの緩衝液、そして上記抗体を培養するなどの直接ラベリング手法を用いることもできる。金属イオンとして存在している放射性同位元素を抗体に結合させるのによく用いられる中間官能基はジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)あるいはエチレン・ジアミンテトラ酢酸(EDTA)である。

20

30

【0064】

接合体としての使用が考えられる蛍光ラベルにはAlexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODITY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FMA、フルオレセイン・イソチオシアネート、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renographin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、及び/又はTexas Redなどがある。

【0065】

本発明で想定されているもう1つのタイプの抗体接合体はin vitroでの使用が主に意図されているもので、抗体は発色基質との接触で着色された生成物を発生させる二次結合リガンド及び/又は酵素(酵素タグ)に結合されている。これに適した酵素にはアルカリ性ホスファターゼ、(ホースラディッシュ)水素ペロキシダーゼ、あるいはグルコース・オキシダーゼがある。好ましい二次結合リガンドはビオチン及び/又はアビジン及びストレプトアビジン化合物である。こうしたラベルの使用は当業者にはよく知られており、例えば米国特許第3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149及び4,366,241号各明細書に述べられており、これらは参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0066】

さらにもう1つの分子の抗体に対するサイト固有取り付けの方法は抗体をハプテンを主体とした親和性ラベルと反応させる方法である。基本的に、ハプテン主体親和性ラベルは

50

抗原結合サイトでアミノ酸と反応して、それによってこのサイトを破壊し、特異的な抗原反応を阻止する。しかしながら、これは、抗体接合によって抗原結合のロスをもたらすので、好適ではない。

【0067】

アジド基を含む分子も低強度の紫外線によって発生される反応性ニトレン中間体を通じて蛋白質に対する共有結合を形成するのに用いることができる (Potter & Haley, 1983)。特に、プリン・ヌクレオチドの2-及び8-アジド類似物が粗蛋白質抽出物におけるヌクレオチド結合蛋白質を識別するためのサイト指向フォトプローブとして用いられている (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-及び8-アジド・ヌクレオチドは精製された蛋白質のヌクレオチド結合領域をマップするためにも用いられており (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; 及び Dholakia et al., 1989)、抗体結合剤としても用いることができる。

【0068】

抗体をその接合体成分に取り付ける、あるいは接合させるためのいくつかの方法が知られている。いくつかの取り付け方法では、例えば、ジエチレントリアミンペンタ酢酸無水物 (DTPA)、エチレントリアミンテトラ酢酸、N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド、及び/又はテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコウリル-3などの有機キレート化剤を利用した金属キレート錯体が抗体に取り付けられて用いられている (米国特許第4,472,509及び4,938,948号明細書参照。それぞれ引用により本明細書に組み入れられる)。モノクローナル抗体はグルタルアルデヒドあるいはペリオデートなどの結合剤の存在下でも酵素と反応させることができる。フルオレセイン・マーカ-との接合体はこれらの結合剤の存在下で、イソチオシアネートとの反応によって調製することができる。米国特許第4,938,948号明細書において、乳房腫瘍の画像形成がモノクローナル抗体を用いて行なわれており、検出可能な画像形成成分がメチル-p-ヒドロキシベンジイミデートあるいはN-サクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを用いて抗体に結合されている。

【0069】

他の実施の形態で、抗体結合サイトを変質させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域内でスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導が考えられている。この方法でつくられる抗体接合体は改良された寿命、特異性、そして感作性を示すことが開示されている (米国特許第5,196,066号明細書。引用により組み入れられる)。レポータあるいはエフェクタ分子がFc領域の炭化水素残基に接合されるエフェクタあるいはレポータ分子のサイト固有取り付けも文献に開示されている (O'Shannessy et al., 1987)。この方式は現在臨床テスト段階にある診断的及び治療的に有望な抗体をつくりだすことが報告されている。

【0070】

i: リンカー／結合剤

免疫毒素が接合されているようなものなど、多重ペプチドあるいはポリペプチドは選択的に切断可能なリンカーあるいはアミノ酸配列など生物学的に解放可能な結合によって結びつけることができる。例えば、腫瘍環境内に優先的に配置されそれとの反応性を示す酵素に対する切断サイトを含むペプチド・リンカーが考えられる。そうしたペプチド・リンカーの例示的な形態としては、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンプイン、ファクターIXa、ファクターXa、あるいはコラゲナーゼ、ジェラチナーゼ、またはストロメリシンなどのメタラプトテイナーゼによって切断されるものである。あるいはペプチド又はポリペプチドを補助剤に結合させることもできる。

【0071】

選択的に切断可能なリンカー、合成リンカー、あるいはその他のアミノ酸配列などのアミノ酸を用いて蛋白質性成分を分離することもできる。さらに、毒素成分を標的作用剤に接合させるためにうまく用いることができるいろいろなタイプのジスルフィド結合含有リンカーが知られているが、いくつかのリンカーは一般的に薬学的特性及び能力の違いから

他のリンカーと比較してより好ましい。例えば、立体的に込み合ったジスルフィド結合を含むリンカーはin vivoでの安定性がより大きく、従って作用サイトに結合するために毒素成分が解放されるのを防ぐところから、より好ましい。さらに、ゲロニン及びリシンの脱グリコシル化A鎖を含む多数の毒素成分のいずれかを使用することによって本発明のいくつかの効果が実現される。

【0072】

一般的なガイドラインとして、免疫毒素での使用に適したいずれの生化学的クロス・リンカーも本発明との関連で用いることができ、さらに別のリンカーも考えることができる。

【0073】

クロスリンク剤は2つの異なった分子、たとえば安定剤と凝固剤の官能基を結びつける分子ブリッジを形成するのに用いられている。2つの異なった蛋白質を段階的に結合させるためには、望ましくないホモポリマー形成をなくすヘテロ二機能クロスリンカーを用いることができる。

【0074】

クロスリンカーを本発明の修飾蛋白質分子と共に用いることができると考えられる。二機能性クロスリンク剤は親和性基材の調製、多様な構造の修飾や安定化、結合サイトの識別、そして構造研究などのいろいろな目的のために広範に用いられている。本発明においては、そうしたクロスリンカーはポリペプチドを安定させたり、それを、例えば上記修飾蛋白質の向標的能力あるいは全体的な有効性を改善することで治療剤としてより有効なものにするために用いることができる。クロスリンカーはジスルフィド、酸感作性リンカーその他のように切断することもできる。2つの同一の官能基を有しているホモ二機能性剤は同じ及び異なった巨大分子間、あるいは巨大分子のサブユニット間のクロスリンク及びポリペプチドの結合相手の特定の結合サイトに対する結合において非常に有効であることが分かっている。ヘテロ二機能性剤は2つの異なった官能基を含んでいる。2つの異なった官能基のそれぞれ異なった反応性を利用することで、クロスリンクを選択的かつ連続的に制御することができる。二機能性剤は、アミノ、スルヒドリル、グアニジノ、インドール、カルボキシル特異基などその官能基の特異性によって分類することができる。これらのうち、遊離アミノ基に対する作用剤はそれが市販されていること、合成の簡単さ、そしてそれらを適用するさいの反応条件が比較的温和であることなどからよく利用されている。ヘテロ二機能性クロスリンク剤の大部分は一次アミン反応基及びチオール反応性基を含んでいる。

【0075】

リポソームにリガンドをクロスリンクさせるための方法の実例は米国特許第5,603,872及び米国特許第5,401,511号明細書に開示されており、これらは引用によって本明細書に組み込まれる。種々のリガンドはアミン残基のクロスリンクを通じてリポソーム表面に共有結合させることができる。リポソーム、特にそれぞれホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むマイクロエマルジョン化リポソーム(MEL)及び大型単層リポソーム(LUVET)などの多層性小胞(MLV)あるいは単層性小胞がすでに確立された手順でつくられている。リポソームにPEを挿入すると、リポソーム表面上にクロスリンク用の活性機能性残基、一次アミンが提供される。表皮成長因子(EGF)などのリガンドがPE-リポソームとうまく結合されている。リガンドはそのリポソーム表面で個別のサイトと共有結合される。これらのサイトの数と表面密度はリポソーム製剤とそのリポソームのタイプによって決まる。リポソームの表面は非共有結合のためのサイトも有している。リガンド及びリポソームの共有結合接合体を形成するために、クロスリンカー剤の有効性と生体適合性についての研究が行なわれている。クロスリンカー剤としてはグルタルアルデヒド(GAD)、二機能性オキシラン(OXR)、エチレン・グリコール・ジグリシル・エーテル(EGDE)、及び水溶性カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)などがある。クロスリンクの複雑な化学的性質の研究を通じて、認識物質のアミン残基とリポソームとの結合の機序が明らかにされている。

10

20

30

40

50

【0076】

別の例で、ヘテロ二機能性クロスリンク剤及びクロスリンク剤の利用方法が述べられている（米国特許第5,889,155号明細書参照。引用によりその全体を本明細書に組み入れられる）。クロスリンカー剤は求核ヒドラジド残基を求電子的マレイミド残基と結合させて、1つの例では、アルデヒドの遊離チオールへの結合を可能にしている。上記クロスリンカー剤は種々の官能基をクロスリンクさせるように修飾することができ、従って、ポリペプチド及び糖類をクロスリンクするのに有効である。表4は本発明で有効と考えられるいくつかのヘテロ二機能性クロスリンカーを示している。

【0077】

【表4】

異種二機能クロスリンカー			
リンカー	反応対象	利点と応用分野	スパーアーム長さ／ クロスリンク後
SMPT	Primary amines Sulphydryls	· Greater stability	11.2 Å
SPDP	Primary amines Sulphydryls	· Thiolation · Cleavable cross-linking	6.8 Å
LC-SPDP	Primary amines Sulphydryls	· Extended spacer arm	15.6 Å
Sulfo-LC-SPDP	Primary amines Sulphydryls	· Extended spacer arm · Water-soluble	15.6 Å
SMCC	Primary amines Sulphydryls	· Stable maleimide reactive group · Enzyme-antibody conjugation · Hapten-carrier protein conjugation	11.6 Å
Sulfo-SMCC	Primary amines Sulphydryls	· Stable maleimide reactive group · Water-soluble · Enzyme-antibody conjugation	11.6 Å
MBS	Primary amines Sulphydryls	· Enzyme-antibody conjugation · Hapten-carrier protein conjugation	9.9 Å
Sulfo-MBS	Primary amines Sulphydryls	· Water-soluble	9.9 Å
SIAB	Primary amines Sulphydryls	· Enzyme-antibody conjugation	10.6 Å
Sulfo-SIAB	Primary amines Sulphydryls	· Water-soluble	10.6 Å
SMPB	Primary amines Sulphydryls	· Extended spacer arm · Enzyme-antibody conjugation	14.5 Å
Sulfo-SMPB	Primary amines Sulphydryls	· Extended spacer arm · Water-soluble	14.5 Å
EDC/Sulfo-NHS	Primary amines Carboxyl groups	· Hapten-Carrier conjugation	0
ABH	Carbohydrates Nonselective	· Reacts with sugar groups	11.9 Å

ゲロニンなど特定のポリペプチドが所与のクロスリンク剤に敏感に反応する残基をその

10

20

30

40

50

天然配列に含んでいない場合、一次配列において同類遺伝子または合成アミノ酸の変換が利用される。

【0078】

4. 蛋白質の精製

本発明による実施の形態のいくつかは組み換え体蛋白質に関するものであるが、本発明は修飾蛋白質及び組み換え体蛋白質などの蛋白質を精製するための方法及びプロセスにも関するものである。一般にこれらの技術は、1つのレベルにおいて、ポリペプチド及び非ポリペプチド画分に対する細胞環境の粗分画を含んでいる。ポリペプチドを他の蛋白質から分離した後、当該ポリペプチドをクロマトグラフィ及び電気泳動技術を用いてさらに精製し、部分的または完全な精製（あるいは均一性のための精製）を達成してもよい。純粋なペプチドをつくるために特に好適な分析法はイオン交換クロマトグラフィ、排除クロマトグラフィ；ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法；等電点電気泳動法である。ペプチド精製の特に効率的な方法は高速蛋白質液体クロマトグラフィあるいはHPLCである。また、そのような技術が実行される条件は精製される分子の、機能的活性のような、特性に影響を与えることがある。

10

【0079】

本発明によるいくつかの態様は精製に関するものであり、特定の実施の形態はコードされた蛋白質またはペプチドの実質的な精製に関するものである。本明細書で用いられる『精製された蛋白質またはペプチド』とは、蛋白質またはペプチドがその天然に得られる状態に対していずれの程度であれ精製されている、他の組成物から分離可能な組成物を意味することが意図されている。従って、精製された蛋白質またはペプチドとは、それが自然に生じた環境に制約されない蛋白質またはペプチドも意味している。『実質的に精製された』蛋白質またはペプチドを意味している。

20

【0080】

一般に、『精製された』とは、種々の他の成分を取り除くため分画にかけられ、組成物はその発現された生物学的活性を実質的に保持している蛋白質またはペプチドの組成物を指す。『実質的に精製された』という用語が使われるとき、この用語は、その組成物内の蛋白質が約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.2%、約99.4%、約99.6%、約99.8%、約99.9%、あるいはそれ以上などで構成され、その蛋白質またはペプチドがその組成物の主成分を形成する組成物を意味する。

30

【0081】

蛋白質またはペプチドの精製の程度を定量化するための種々の方法は本発明の開示に照らして当業者に周知であろう。これらには、例えば、活性のある画分の特異的活性を判定すること、またはSDS/PAGE分析によって画分内のポリペプチドの量を評価することなどがある。画分の純度を評価するための好ましい方法はその画分の特異的活性を算出し、それを最初の抽出物の特異的活性と比較し、そして純度の程度を算出することであり、本明細書では『一倍の精製度』という形で評価する。活性量を表すために用いられる実際の単位は、当然のことながら、精製後に選択される特定の評価技術、及び発現した蛋白質またはペプチドが検知可能な活性を示すか否かに依存するであろう。

40

【0082】

蛋白質の精製に用いるために好適な種々の技術は当業者に十分周知であろう。これらには、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体、その他による沈殿、あるいは遠心分離後の熱変性；イオン交換、ゲルろ過、逆相、ヒドロキシルアパタイト、及び親和性クロマトグラフィ；等電点電気泳動法；ゲル電気泳動法；そしてこれら及び他の技術を組み合わせたものなどがある。本技術分野で一般に知られているとおり、種々の精製ステップを行う順序は変更され、あるいはいくつかのステップは省略されることがあり、それでもなお実質的に精製された蛋白質またはペプチドをつくるために好適な方法であると考えられる。

【0083】

蛋白質またはペプチドは常にそれらの最も精製された状態で提供されるという一般的な

50

必要性はない。実際、実質的により精製されていない生成物がいくつかの実施の形態で有用性を持っていると考えられる。部分的な精製をより少ない精製ステップの組み合わせを使うことによって、または同一の一般的な精製法の異なる形式を利用することによって実施してもよい。例えば、HPLC装置を利用して行われる陽イオン交換コラム・クロマトグラフィは低圧クロマトグラフィ・システムを使った同じ技術よりも一般により大きな精製度をもたらす。相対的に精製度が低いことを示す方法がたんぱく質生成物の全体としての回収、あるいは発現した蛋白質の活性の維持において利点を有することがある。

ポリペプチドの泳動はSDS/PAGEの異なる条件によって変化し、時に著しく変化することが知られている (Capaldi et al., 1977)。従って、異なる電気泳動条件下で、全体または一部が精製された発現生成物の見かけの分子量が異なることが理解されるであろう。

10

【0084】

ペプチド・タグを本発明による方法及び組成物と組み合わせて使用することも考えられる。タグは2個のポリペプチド間の相互作用を利用する。その相互作用に関連するポリペプチドのひとつの一部がタグとして利用される。例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) の結合領域はタグとして使うことができ、グルタチオン・ビーズがそのGSTタグを含んでいる化合物を濃縮するために用いられることが可能である。抗体またはT細胞レセプタによって認識されるアミノ酸領域であるエピトープ・タグを用いてもよい。そのタグは修飾蛋白質をコードする核酸断片に動作可能に結合する核酸断片によってコードされてもよく、融合蛋白質はその核酸分子によってコードされる。他の好適な融合蛋白質はβ-ガラクトシダーゼ、ユビキチン、ヘキサヒスチジン (6xHis)などを有する融合蛋白質である。

20

【0085】

5. 抗体

いくつかの実施の形態で、本発明は抗体に関するものである。例えば、モノクローナル、単鎖、あるいはヒト化された抗体の全体または一部が修飾されたゲロニン毒素のような別の蛋白質性化合物に化学的に結合または遺伝子組み換えによって融合されることがある。あるいは、本発明による別の態様は、天然型の蛋白質性化合物よりも免疫原性が低い蛋白質性化合物をデザイン及び/又はつくるために特定の抗原または抗原性領域に対する免疫応答、即ち抗体の応答を認識することに関する。上に詳述されたように、完全長蛋白質に対してつくられる抗体に加えて、抗体は野生型及び突然変異エピトープなどのエピトープ・コア領域を含んでいるより小さなコンストラクトに応答してつくられることもある。エピトープとは抗原決定基である。抗原とは抗体あるいはT細胞レセプタによって特異的に認識されるすべての物質である。免疫原とは特異的な免疫応答を誘発する抗原である。

30

【0086】

本明細書で用いられるように、『抗体』という用語は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEなどいずれの免疫結合剤でも広範に意味するよう意図されている。一般に、IgG及び/又はIgMは生理学的状態において最も普通に見られる抗体であり、研究室の環境で最も容易につくられるため、好ましい。

【0087】

モノクローナル抗体 (mAb) は、例えば、再現性、大量生産などいくつかの利点を有することが認められており、それらの利用は一般に好ましい。従って、本発明はヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギ、そして、ニワトリ由来のモノクローナル抗体を提供する。

40

【0088】

『抗体』という用語は、抗原結合領域を持つ抗体に類似したすべての分子を指すために用いられ、Fab'、Fab、F(ab')₂、単一領域抗体 (DABs)、Fv、scFv (単鎖Fv)、などの抗体断片を含んでいる。種々の抗体に基づいたコンストラクト及び断片の生成と利用のための技術は本技術分野でよく知られている。抗体を生成し、特徴付ける手段も本技術分野で十分周知である (例えば、Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988参照; 引用によって本明細書に組み込まれる)。

50

【0089】

モノクローナル抗体 (mAb) をつくる方法は一般にポリクローナル抗体をつくる方法にならって始まる。簡潔に言えば、ポリクローナル抗体は、本発明に従った免疫原ポリペプチド組成物で動物を免疫化し、その免疫化された動物から血清を回収することによってつくることができる。あるいは、本発明によるいくつかの実施の形態で、血清は特定の抗原に暴露された可能性のある個人から回収される。特定の抗原への暴露は労働環境内で生じることがあり、そのような個人は職業上特定の抗原に暴露され、ペプチド、ポリペプチド、または蛋白質に対するポリクローナル抗体をつくる。本発明のいくつかの実施の形態で、職業上暴露された個人からのポリクローナル血清は免疫検出法によってゲロニン毒素内の抗原性領域を識別するために用いられる。

10

【0090】

広範囲の動物種が抗血清の生産のために用いられる。通例、抗血清の生産に用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、あるいはヤギである。ウサギの血液量は比較的多いため、ポリクローナル抗体生産にウサギが好んで選択される。

【0091】

本技術分野で十分周知のとおり、所与の組成物はその免疫原性が異なっている。従って、ホストの免疫システムを増強することがしばしば必要であり、ペプチドまたはポリペプチド免疫原を担体に結合することによって達成できる場合がある。典型的で好ましい担体はキーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) 及びウシ血清アルブミン (BSA) である。オボアルブミン、マウス血清アルブミンあるいはウサギ血清アルブミンなどその他のアルブミンも担体として用いられる。ポリペプチドを担体蛋白質に接合する手段は本技術分野でよく知られており、グルタルアルデヒド、*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシニミド・エステル、カルボジイミド、及びビス-ビアゾ化ベンジジンなどがある。

20

【0092】

これも本技術分野で周知のとおり、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる免疫応答の非特異的促進剤の利用によって増強させることができる。好適な分子アジュバントは、サイトカイン、毒素、または合成組成物などすべての許容できる免疫刺激性化合物などである。

利用可能なアジュバントは、IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -インターフェロン、G MCSP、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDP及びnor-MDPなどのMDP化合物、CGP (MTP-PE)、脂質A、及びモノホスホリル脂質A (MPL) などである。バクテリア、MPL、ジミコール酸トレハロース (TDM) から抽出した3つの成分及び2%スクワレン/Tween 80エマルジョン内の細胞壁骨格 (CWS) を含んでいるRIBIも考えられる。MHC抗体が用いられても差し支えない。典型的で、しばしば好ましいアジュバントは完全フロイント・アジュバント (結核菌の死菌を含んでいる免疫反応の非特異的促進剤)、非完全フロイント・アジュバント、及び水酸化アルミニウム・アジュバントなどがある。

30

【0093】

アジュバントに加えて、T細胞免疫を上方制御すること、または抑制細胞活性を下方制御することを示している生物反応修飾物質 (BRM) を同時投与することが望ましい。そうしたBRMには、シメチジン (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ)、 γ -インターフェロン、IL-2、またはIL-12などのサイトカイン、あるいはB-7など免疫ヘルパー機能に関係する蛋白質をコードする遺伝子などがある。

40

【0094】

ポリクローナル抗体の生成に使われる免疫原組成物の量は免疫原の性質、そして免疫化に用いられる動物によって異なる。その免疫原を投与するために種々の経路を用いることができる (皮下、筋肉内、皮内、静脈内、及び、腹腔内)。ポリクローナル抗体の生成は免疫化後種々の時点での免疫化された動物のサンプル用血液によってモニターすることができる。

【0095】

50

第2の追加免疫注射を行ってもよい。追加免疫及び力価のプロセスは適切な力価が達成されるまで繰り返される。望ましいレベルの免疫原性が得られたら、免疫化された動物から採血し、その血清を単離及び貯蔵し、及び/又はその動物を用いてmAbを生成させることができる。

【0096】

mAbは、引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第4,196,265号明細書に例示された技術など公知の技術の利用を通じて容易に生成することができる。通例、この技術は適当な動物を、野生型であれ、突然変異型組成物であれ、例えば、全体または一部が精製されたポリペプチド、ペプチド、または領域など選択された免疫原組成物で免疫化することを含んでいる。その免疫化する組成物は抗体生成細胞を刺激するために有効な方法で投与される。 10

【0097】

mAbは、もし望ましければ、ろ過、遠心分離、及びHPLCあるいは親和性クロマトグラフィなど種々のクロマトグラフィ法を用いてさらに精製してもよい。本発明によるモノクローナル抗体の断片は、ペプシンまたはパパインのような酵素での消化などを含んでいる方法、及び/又は化学的還元によるジスルフィド結合の切断によって生成されたモノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、本発明によって達成されるモノクローナル抗体断片を自動ペプチド合成機を使って合成することができる。

【0098】

分子クローニング法を使ってmAbを生成することも考えられる。このためには、組み合わせ免疫グロブリン・ファージミド・ライブラリを免疫化した動物の脾臓から単離したRNAから生成し、適切な抗体を発現するファージミドがその抗原及びコントロール細胞を発現する細胞を用いてパニングすることによって選択される。この方法が従来のハイブリドーマ技術に勝る利点は、約 10^4 倍の抗体がたった1回で生成され、スクリーニングされること、そして適切な抗体を見つける機会をさらに増加させるH及びL鎖の組み合わせによって新たな特異性が生み出されることである。 20

【0099】

ヒト化されたモノクローナル抗体は、もとの抗原特異性を保持したまま、不変領域及び/又は可変領域フレームワーク配列をヒトの配列で置き換える遺伝子組み換え技術を使って修飾される動物由来の抗体である。そうした抗体は通例ヒト抗原に対して特異性を持つげっ歯類の抗体に由来する。この方法は異種由来の抗体に対するホストの応答を減少させ、ヒトのエフェクタ機能の選択を可能にする。 30

【0100】

『ヒト化された』抗体、そして、ヒト不変領域及び/又は可変領域、二重特異性抗体、組み換え体及び遺伝子操作された抗体とその断片を含んでいるマウス、ラット、あるいは他の種からのキメラ抗体も考慮される。ヒト化された免疫グロブリンをつくる方法は当業者に周知である。例えば、米国特許第5,693,762号明細書には、1つ以上の相補性決定領域(CDR)を有するヒト化された免疫グロブリン、及びその組成物を作るための方法を開示している。無処置の抗体に結合させたとき、そのヒト化された免疫グロブリンはヒトの体内で実質的に非免疫原であり、エピトープを含んでいる蛋白質やその他の化合物など、抗原に対するドナーの免疫グロブリンと同じ親和性を実質的に保持する。本技術分野におけるその他の教示の例は、米国特許第6,054,297、5,861,155、及び6,020,192号明細書などであり、引用によってすべてが具体的に本明細書に組み込まれる。患者の疾病に対する『特別注文』の抗体を開発する方法が同様に知られており、そうした特別注文の抗体も考慮される。 40

【0101】

6. 免疫検出法

述べられたとおり、いくつかの実施の形態で、本発明はポリペプチド及びペプチドの抗原領域など生物学的成分を結合、精製、除去、定量化、及び/又は検出する免疫検出法に関するものである。本発明による免疫検出法は、特に標的個体内のペプチド、ポリペプチ 50

ド、または蛋白質の免疫原性あるいは抗原性を低下させることにおいて治療上の意味を持つペプチド、ポリペプチド、または蛋白質の抗原領域を識別するために用いることができる。

【0102】

免疫検出法には、その他いくつかの方法が当業者に周知であるが、酵素結合免疫吸着検定 (ELISA)、放射免疫測定 (RIA)、免疫放射分析アッセイ、蛍光免疫アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、及びウエスタン・ブロット法などがある。種々の有益な免疫検出法のステップが、それぞれ引用によって本明細書に組み込まれる、例えば、Doolittle MH and Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B et al., 1993; De Jager R et al., 1993; and Nakamura et al., 1987などの科学文献に述べられている。

10

【0103】

一般に、免疫結合法は蛋白質、ペプチド、及び/又はポリペプチドを含んでいると推定されるサンプルを得ること、そのサンプルを本発明に従って、場合によっては免疫複合体を形成させるのに効果的な条件下で、第1のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に接触させることなどを含んでいる。

【0104】

これらの方法は、オルガネラ、細胞、組織、または生物体のサンプルからの蛋白質、ポリペプチド、及び/又はペプチドを精製する方法などを含んでいる。これらの例で、抗体はサンプルから抗原性蛋白質、ポリペプチド、及び/又はペプチド成分を除去する。その抗体は好ましくは、カラム・マトリクスの形状など固形の担体に結合され、蛋白質、ポリペプチド、及び/又はペプチド抗原性成分を含んでいると推定されるサンプルはその固定された抗体に適用される。望ましくない成分はカラムから洗い流され、免疫複合化された抗原が固定された抗体に抽出される。

20

【0105】

免疫結合法は、サンプル内の抗原成分の量を検出し、定量化するための方法及び結合プロセスの間に形成されるすべての免疫複合体の検出及び定量化なども含んでいる。ここでは、抗原または抗原性領域を含んでいると推定されるサンプルを入手し、そのサンプルをその抗原または抗原性領域に対する抗体に接触させ、その後、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出し、定量化する。

【0106】

抗原の検出に関して、分析される生物学的サンプルは、例えば、組織切片または標本、均一化された組織抽出物、細胞、オルガネラ、分離及び/又は精製された形状の上記抗体を含んでいる組成物のすべて、あるいは血液及び/又は血清など、前記細胞または組織に接触した生物学的体液のすべてなどの抗原または抗原性領域を含んでいると推定されるいずれのサンプルであってもよい。

30

【0107】

抗体にその選択されたサンプルを効果的な条件下で免疫複合体 (一次免疫複合体) の形成に十分な時間接触させることは、一般に、単にその抗体組成物をそのサンプルに添加し、その抗体が免疫複合体を形成、即ち存在するいずれかの抗原に結合するために十分な時間だけその混合物を培養するという問題である。この後、組織切片、ELISAプレート、ドット・ブロットあるいはウエスタン・ブロットなどの抗体組成物サンプルは一般に洗浄され、非特異的結合抗体種のすべてを取り除き、一次免疫複体内に特異的に結合する抗体のみが検出される。

40

【0108】

一般に、免疫複合体形成の検出は本技術分野で公知であり、多くの方法の適用を通じて達成することができる。これらの方法は一般に、放射性、蛍光性、生物学的、及び酵素性のタグのいずれでもよいラベルあるいはマーカーの検出に基づいている。そうしたラベルの利用に関する米国特許は、米国特許第3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149及び4,366,241などがあり、それぞれが引用によって本明細書に組み込まれる。当然のことながら、本技術分野で周知のとおり、第2の抗体及び/又はビオ

50

チン/アビジン・リガンド結合配列など第2の結合リガンドの利用を通じてさらに別の利点を見出すことも可能である。

【0109】

検出に用いられる抗体自体は検出可能なラベルに結合することができ、このラベルを単に検出し、それによって組成物内の一次免疫複合体の量の判定が可能になる。あるいは、その一次免疫複合体内で結合される一次抗体はその抗体に対する結合親和性を有する第2の結合リガンドを用いて検出される。これらの事例で、第2の結合リガンドは検出可能なラベルに結合することができる。第2の結合リガンド自体は多くの場合抗体であり、従って『二次』抗体と称することができる。一次免疫複合体はラベルされた二次結合リガンドまたは抗体に効果的な条件下で、二次免疫複合体の形成に十分な時間だけ接触させられる。その二次免疫複合体はその後一般に洗浄され、非特異的結合ラベルされた二次抗体またはリガンドを取り除かれ、その結果、二次免疫複合体内に残ったラベルが検出される。

10

【0110】

別の方法には2つのステップから成る方法による一次免疫複合体の検出などがある。抗体に結合親和性を有する、抗体など第2の結合リガンドを用いて、上に述べられたような二次免疫複合体を形成する。洗浄後、その二次免疫複合体を第3の結合リガンド、または第2の抗体に結合親和性を有する抗体に効果的な条件下で免疫複合体の形成に十分な時間接触させる（三次免疫複合体）。第3のリガンドまたは抗体は検出可能なラベルに結合され、従って、形成される三次免疫複合体の検出が可能になる。このシステムは、望ましい場合、シグナル増幅を提供することができる。

20

【0111】

Charles Cantorによってデザインされた免疫検出の1つの方法は2つの異なる抗体を用いている。第1ステップのビオチン化、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を使って1つまたは複数の標的抗原を検出し、その後第2ステップの抗体が使われ、複合化されたビオチンに取り付けられたビオチンを検出する。その方法で、テストされるサンプルは先ず第1ステップの抗体を含んでいる溶液中で培養される。もし標的抗原が存在すると、抗体のいくつかは抗原と結合し、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。その抗体/抗原複合体はその後ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチン化DNA、及び/又は相補的ビオチン化DNAの溶液内での連続した培養によって増幅され、それぞれのステップで付加的なビオチン・サイトを抗体/抗原複合体に付加する。その増幅ステップは適切なレベルの増幅が達成されるまで繰り返され、その時点でサンプルはビオチンに対する第2ステップの抗体を含んでいる溶液内で培養される。この第2ステップ抗体は、例えば、色原体基質を使った組織酵素学によって抗体/抗原複合体の存在を検出するために用いることができる酵素でラベルされる。適切な増幅によって、肉眼で見ることのできる接合体がつかられる。

30

【0112】

免疫検出の別に知られている方法は免疫PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を利用する。PCR法はビオチン化DNAでの培養まではCantor法と同様であるが、ストレプトアビジン及びビオチン化DNA培養を多数回用いる代わりに、DNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体の複合体をその抗体を放出させる低pHまたは高食塩緩衝液で洗浄する。その後、得られた洗浄溶液を使って適切に制御しながら好適なプライマでPCR反応を行う。少なくとも理論上は、PCRの極めて大きな増幅能力と特異性を利用してたった1つの抗原分子でも検出することができる。

40

【0113】

a. ELISA

上に詳述されたように、免疫アッセイはその最も単純及び/又は直接的な意味において、結合アッセイである。いくつかの好ましい免疫アッセイは本技術分野で公知である種々のタイプの酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及び/又は放射免疫測定である。組織切片を用いる免疫組織化学的検出も特に有益である。しかしながら、検出はそうした技術に限定されず、及び/又はウエスタン・ブロット、ドット・ブロット、FACS分析、及び/又はそ

50

の他の方法も用いられることが容易に理解されるであろう。

【0114】

1つの例示的なELISAで、抗体はポリスチレン・マイクロタイター・プレートのウェルなど、蛋白質親和性を示す選択された表面上に固定される。その後、臨床的サンプルなど、その抗原を含んでいると推定されるテスト用組成物をそのウェルに付加する。非特異的結合免疫複合体を除去するための結合及び/又は洗浄の後、その結合抗原を検出することができる。検出は一般に検出可能なラベルに結合された別の抗体の付加によって達成される。このタイプのELISAは単純な『サンドイッチELISA』である。第2の抗体を付加し、その第2の抗体に結合親和性を有する第3の抗体を付加し、第3の抗体に検出可能なラベルを結合させることによって検出を達成することもできる。

10

【0115】

別の例示的なELISAで、抗原を含んでいることが推定されるサンプルはウェル表面に固定され、及び/又はその後抗体に接触させられる。非特異的結合免疫複合体を除去するための結合及び/又は洗浄の後、その結合抗体が検出される。最初の抗体が検出可能なラベルに結合する場所で、免疫複合体を直接検出することができる。また、第1の抗体に結合親和性を有する第2の抗体を使って、第2の抗体に検出可能なラベルを結合させることによって免疫複合体を検出することができる。

【0116】

抗原が固定されている別のELISAには検出の際の抗体競合の利用などがある。このELISAでは、抗原に対するラベルされた抗体がウェルに添加され、結合可能にされ、及び/又はそのラベルを利用して検出される。その後、未知のサンプル内の抗体の量が、被覆されたウェルで培養する間、そのサンプルを抗原に対するラベルされた抗体と混合することによって判定される。サンプル内の抗原の存在はウェルに結合可能な抗原に対する抗体の量を減らす役割を果たし、従って、最終的なシグナルを減少させる。これは、ラベルされていない抗体が抗原で被覆されたウェルに結合し、ラベルされた抗体に結合可能な抗原の量も減らすような未知のサンプル内で抗原に対する抗体を検出するためにも適切である。

20

【0117】

用いられる構成に関わらず、ELISAの各方法は、被覆、培養と結合、非特異的結合種を取り除くための洗浄、そして結合された免疫複合体の検出などいくつかの特徴を共有している。これらについては以下に述べられる。

30

【0118】

抗原または抗体のいずれかでプレートを被覆する際、一般にそのプレートのウェルをその抗原または抗体の溶液で一晩あるいは所定の時間のいずれかで培養する。その後、そのプレートのウェルを洗浄し、不完全に吸収された物質を取り除く。そして、ウェルの残っている利用可能な表面すべてがテスト用抗血清に関して抗原的に中性な非特異的蛋白質で『被覆』される。これらはウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、あるいは粉乳の溶液などである。その被覆は固定表面上の非特異的吸着部位の障害を可能にし、その結果その表面上の抗血清の非特異的結合によって生じるバックグラウンドを減少させる。

【0119】

ELISAでは、直接の手順よりも二次または三次の検出手段を用いる方が恐らくより慣習的である。従って、蛋白質または抗体をウェルに結合させ、バックグラウンドを減少させるため非反応性物質で被覆し、そして非結合物質を取り除くために洗浄した後、その固定した表面は免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするために効果的な条件下で、テストされる生物学的サンプルと接触させられる。その後、免疫複合体の検出にはラベルされた二次結合リガンドまたは抗体、及びラベルされた三次抗体または第3の結合リガンドと結合した二次結合リガンドまたは抗体が必要とされる。

40

【0120】

『免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするために効果的な条件下』とは、その条件が好ましくは、BSA、ウシ・ガンマグロブリン（BGG）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）/Tweenなどの溶液でその抗原及び/又は抗体を希釈することなどを含んだ意味である。

50

これらの付加される作用剤も非特異的バックグラウンドの減少を促す傾向がある。

【0121】

『適切な』条件とは、効果的な結合を可能にするのに十分な温度または時間で培養が行われることも意味している。培養のステップは通常約1時間から2時間、4時間、あるいはその程度であり、温度は好ましくは約25℃から約27℃、または一晩の場合、4℃あるいはその程度である。

【0122】

ELISAにおけるすべての培養ステップの後、接触させられた表面は非複合体物質を取り除くため洗浄される。洗浄手順の1つの例はPBS/Tweenなどの溶液またはホウ酸塩緩衝液での洗浄などである。テスト用サンプルと本来の結合物質の間での特異的免疫複合体の形成、そして引き続いての洗浄の後、ごくわずかな量の免疫複合体の産出であっても判定することができる。 10

【0123】

検出手段を提供するため、第2または第3の抗体は検出を可能にさせる結合されたラベルを有する。これは適切な色原体基質で培養すると発色を生じさせる酵素でもよい。従って、例えば、第1及び第2の免疫複合体をウレアーゼ、グルコース・オキシダーゼ、アルカリ・ホスファターゼまたはハイドロジェン・ペルオキシダーゼ結合抗体と、さらに免疫複合体形成の進展に好ましい時間と条件下で接触または培養することが望ましい（例えば、PBS/TweenなどPBSを含んでいる溶液中で室温で2時間培養）。 20

【0124】

ラベルされた抗体での培養と、非結合物質を取り除くため引き続いての洗浄の後、ラベルの量が、酵素ラベルのようなペルオキシダーゼの場合に、例えば、尿素などの色原性基質、またはプロモクレゾール・パープル、または2,2'-アジノ-ジ(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS)、またはH₂O₂での培養によって定量化される。その後、定量化は、例えば、可視スペクトル分光光度計を使って、生成された色の程度を測定することによって達成される。

【0125】

b. 免疫組織化学

本発明による抗体は免疫組織化学 (IHC) による研究のためにつくられた、新鮮かつ冷凍された、及び/又は、ホルマリンで固定され、パラフィン包埋された組織塊と結合させて用いることもできる。例えば、免疫組織化学は本発明による特定の免疫毒素の評価に用いることができる。これらの粒子状標本から組織塊を作る方法は種々の予後因子の今までのIHC研究に用いられて成功を収めており、及び/又は当業者によく知られている (Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990)。 30

簡潔に述べると、小さなプラスチック・カプセル内のリン酸緩衝生理食塩水で室温で50 ngの『粉碎された』冷凍組織を再水和し；遠心分離によってその粒子をペレット化し；それらを粘性包埋媒体 (OCT) 内で再懸濁し；そのカプセルを反転させ、及び/又は遠心分離によって再度ペレット化し；-70℃のイソペンタン内で急速冷凍し；そのプラスチック・カプセルを切断及び/又は組織の冷凍シリンダーを取り除き；その組織シリンダーを低温保持装置ミクロトーム・チャック上に固定し；及び/又は25から50枚の連続した切片に切り分けることによって冷凍切片をつくることができる。 40

【0126】

永久切片は、プラスチック製微量遠心管チューブ内での50mgサンプルの再水和；ペレット化；10%ホルマリンで4時間固定する再懸濁；洗浄/ペレット化；温かい2.5%寒天での再懸濁；ペレット化；寒天を硬化させるため氷水内で冷却；チューブから組織/寒天塊を除去；パラフィン内の塊をろ過及び/又は包埋；及び/又は50枚の連続した永久切片に切り分けるなど同様の方法によってつくることができる。

【0127】

II. 核酸分子

A. 天然蛋白質または修飾蛋白質をコードするポリヌクレオチド

本発明は、ゲノムDNA全体から遊離し、蛋白質またはポリペプチドの全体または一部を発現することができる、細胞から分離可能な、ポリヌクレオチドに関するものである。そのポリヌクレオチドは修飾蛋白質をコードするために操作された天然蛋白質をコードすることができる。あるいは、そのポリヌクレオチドは修飾蛋白質をコードするか、または修飾蛋白質と共に融合蛋白質をつくるために用いられるポリヌクレオチドをコードすることができる。例えば、1つのポリヌクレオチドは、腫瘍抗原などの標的ポリペプチドに共有結合で取り付けられた修飾ゲロニン・ポリペプチドなど多数の成分をコードすることができる。単一のポリヌクレオチド分子は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の異なるポリペプチド（全体または一部）をコードできると考えられる。表2に開示されたいずれのポリペプチド、蛋白質、またはペプチドもその開示された発明の一部として遺伝子組み替えによって生成することができる。さらに、表2の蛋白質性化合物のいずれも表2または本明細書で開示される1つ以上の他のポリペプチドで同一の核酸分子上でコードされ、融合蛋白質がつくられる。組み換え体蛋白質は発現している細胞から精製され、活性蛋白質を産生することができる。従って、本発明による実施の形態は、配列識別番号：1の全体または一部をコードする核酸の利用を含んでいる。そうした核酸はゲロニン・ポリペプチドをコードするcDNA配列に対応する配列識別番号：2の全体または一部を含んでいる（GenBank 登録番号L12243）。従って、本明細書で述べられる核酸に関するいずれの方法と組成物も配列識別番号：2に関して適用することができる。

10

【0128】

本明細書で用いられるように、『DNA断片』とは、特定種のゲノムDNA全体を離れて単離されているDNA分子を意味する。従って、ポリペプチドをコードするDNA断片とは、野生型、多型、または変異型ポリペプチドをコードする配列を含んでいるが、哺乳動物あるいはヒト・ゲノムDNA全体からは離れて単離され、または精製されるDNA断片である。『DNA断片』という用語に含まれるのは、1つまたは複数のポリペプチド、ポリペプチドよりも小さなDNA断片、及び、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、その他などの組み換え体ベクターである。

20

【0129】

本適用法で用いられるように、『ポリヌクレオチド』とはゲノム核酸全体を離れて単離された核酸分子を指す。従って、『天然ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド』とは哺乳動物あるいはヒト・ゲノムDNA全体から離れて単離または精製される野生型または多型ポリペプチドをコードする配列を含んでいるDNA断片である。従って、例えば、本適用がゲロニン・ポリヌクレオチドによってコードされるゲロニン、『天然ゲロニン・ポリペプチド』、または『修飾されたゲロニン・ポリペプチド』の機能あるいは活性に関するとき、そのポリヌクレオチドはRIPとして酵素活性を有する分子をコードするポリヌクレオチドを意味する。

30

【0130】

『cDNA』とはメッセンジャーRNA（mRNA）をテンプレートとして用いてつくられるDNAを指すことが意図されている。cDNAを使うことの利点は、ゲノムDNA、あるいはゲノム性、非一、または一部加工処理された、RNAテンプレートから重合されたDNAとは逆に、本来cDNAは対応する蛋白質のコード配列を含んでいることである。非コード領域が最適な発現のために必要とされる場合、あるいは、イントロンなど非コード領域がアンチセンス戦略内で標的にされる場合などゲノム配列の全体または一部が好ましい場合があり得る。

40

【0131】

所与の種から得られる特定のポリペプチドが、わずかに異なる拡散配列を有しながらも、同じ蛋白質をコードする天然の変異体によって代表されることがある（上の表1参照）。

【0132】

同様に、単離または精製された野生型、多型、または変異型ポリペプチド遺伝子を含んでいるポリペプチドは野生型、多型、または変異型ポリペプチドをコードする配列、及び、いくつかの態様で、他の自然発生する遺伝子または蛋白質をコードする配列から離れて

50

実質的に単離される調節配列を含んでいるDNA断片を指している。この点で、『遺伝子』という用語は、機能性蛋白質、ポリペプチド、またはペプチドをコードする構成単位を意味することを単純化するために用いられる。当業者によって理解されるように、この機能上の用語には、蛋白質、ポリペプチド、領域、ペプチド、融合蛋白質、及び突然変異体を発現する、もしくは発現するのに適合したゲノム配列、cDNA配列、及びより小さな組み換え遺伝子断片などがある。天然または修飾ポリペプチドの全体あるいは一部をコードする核酸は、約、少なくとも、または多くとも、以下の長さのポリペプチドの全体あるいは一部をコードする連続した核酸を含むことができる： 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1095、1100、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、9000、10000、またはそれ以上のヌクレオチド、ヌクレオシド、及び塩基対。連続する残基のそうした長さは配列識別番号：2-10など、本明細書で述べられた、あるいは検討されたいずれの核酸配列にも適用することができる。

【0133】

特定の実施の形態で、本発明は、そのアミノ酸配列内に天然ポリペプチドに一致または本質的に対応する隣接するアミノ酸配列を含んでいる野生型、多型、あるいは修飾ポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列を組み込んでいる単離されたDNA断片及び組み換え体ベクターに関するものである。従って、単離されたDNA断片及びDNA断片を含んでいるベクターは、例えば、天然ゲロニン・ポリペプチドのリボソーム不活化活性及び特異性を有するが、異なるアミノ酸を持つ、修飾されたゲロニン・ポリペプチドをコードすることができる。『組み換え体』という用語はポリペプチドまたは特定のポリペプチドの名称と共に用いることができ、これは一般にin vitroで操作された、あるいはそうした分子の複製された生成物である核酸分子からつくられたポリペプチドを指している。

【0134】

他の実施の形態で、本発明は、そのアミノ酸内にポリペプチドに一致または本質的に対応する隣接するアミノ酸配列を含んでいるポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列を組み込んでいる単離されたDNA断片及び組み換え体ベクターに関するものである。

【0135】

本発明で用いられる核酸断片は、コードしている配列自体の長さに関わらず、プロモータ、ポリアデニル化シグナル、付加的な制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコーディング断片、などその他の核酸配列と結合することができ、それらの全長は相当に異なる。従って、殆どあらゆる長さの核酸断片を使用することができると考えられるが、その全長は好ましくは生成の容易さ及び意図される組み換え体DNAプロトコルの使用によって制限される。

【0136】

本発明による核酸コンストラクトはいずれの原料から得られたものでもよい完全長ポリペプチドをコードし、または、例えば、切断されたゲロニン・ポリペプチドなどのポリペプチドの切断型をコードし、そのコード領域の転写物はその切断型を代表する。あるいは、核酸配列は完全長ポリペプチド配列を付加的な非相同コード配列でコードし、例えば、ポリペプチドの精製、移動、分泌、翻訳後修飾、あるいは標的化または効力などの治療上の利点を可能にすることができる。上に述べられたように、タグまたは他の非相溶性ポリペプチドは修飾されたポリペプチドをコードする配列に付加されることがあり、その場合『非相位的』とは修飾されたポリペプチドと同一でないポリペプチドを指している。

【0137】

非限定的な例において、毒素ゲロニンなど、特定の遺伝子と同一または相補的なヌクレ

オチドの隣接するストレッチを含んでいる1つ以上の核酸コンストラクトが生成される。イースト酵母人工染色体など核酸コンストラクトの出現が本技術分野における当業者に周知であることを考慮すれば、1つの核酸コンストラクトは長さが少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、30000、50000、100,000、250,000、500,000、750,000から少なくとも1,000,000ヌクレオチドであり、染色体のサイズ以内のより大きなサイズ（すべての中間的な長さで中間的な範囲を含む）でもよい。『中間的な長さ』と『中間的な範囲』は、本明細書で用いられるように、引用された数値を含んでいるか、またはその間のすべての長さあるいは範囲を意味することは容易に理解されるであろう（すなわち、そうした数値を含んでおり、及びその間のすべての整数）。 10

【0138】

本発明で用いられるDNA断片は、例えば、修飾されたゲロニン毒素など生物学的機能が同等の修飾されたポリペプチド及びペプチドを含んでいる。そのような配列は、核酸配列内で自然に生じ、そこでその蛋白質がコードされることが知られているコドンの重複及び機能的同等性の結果として引き起こされる場合がある。あるいは、機能的に同等な蛋白質またはペプチドは、蛋白質構造内の変化が変更されたアミノ酸の性質の研究に基づいて遺伝子操作される組み換え体DNA技術の適用を通じて生成されることがある。ヒトによってデザインされた変更は特定部位の突然変異生成技術の適用を通じて、例えば、その蛋白質の抗原性に改良を採り入れ、その蛋白質が与えられる個体に対するin vivoでの蛋白質の毒性効果を減少させ、あるいはその蛋白質に関するすべての治療効果を増加させて、導入することができる。 20

【0139】

1. ベクター

天然及び修飾ポリペプチドはベクターに含まれている核酸分子によってコードされることがある。『ベクター』という用語は、核酸配列が複製されることが可能な細胞内への導入のためその核酸配列が挿入される担体核酸分子を指すために用いられる。核酸配列は、ベクターが導入される細胞が外来性であるか、またはその配列がその細胞内の配列と相同であるが、その配列が通常見られない宿主細胞核酸内の位置にあるという意味で『外因性』であり得る。ベクターにはプラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、及び植物ウイルス）、及び人工染色体などがある（例えば、YAC）。本分野の技術の1つは、双方とも引用によって本明細書に組み込まれるSambrook et al., 1989及びAusubel et al., 1996に述べられている標準的な組み換え体技術を通じてベクターを構築するために非常に有益である。修飾されたゲロニンなど修飾ポリペプチドをコードすることに加えて、ベクターはタグまたは向標分子など非修飾ポリペプチド配列をコードすることができる。そうした融合蛋白質をコードする有用なベクターにはpINベクター（Inouye et al., 1985）、ヒスチジンのストレッチをコードするベクター、及びpGEXベクターなどがあり、後の精製及び分離または切断のためのグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）可溶性融合蛋白質の生成に用いられる。向標分子とは修飾されたポリペプチドを特定の器官、組織、細胞、あるいは個体の身体その他の部位に向標する分子である。 30 40

【0140】

『発現ベクター』という用語は、転写される能力のある遺伝子生成物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含んでいるベクターを指す。いくつかの場合において、RNA分子はその後蛋白質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。他の場合において、これらの配列は、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生成においては翻訳されない。発現ベクターは種々の『コントロール配列』を含むことができ、コントロール配列とは、特定の宿主生物体内の操作可能に結合したコード配列の転写及び恐らくは翻訳のために必要な核酸配列を指している。転写及び翻訳を制御するコントロール配列に加えて、ベクター及び発現ベクターは、その他の機能を果たし、そして以下に述べられるような核酸配列を含むことができる。 40

【0141】

a. プロモータ及びエンハンサ

『プロモータ』とは、転写の開始及び速度が制御される核酸配列の1つの領域であるコントロール配列である。プロモータは、RNAポリメラーゼ及びその他の転写因子など調節蛋白質及び分子が結合することができる遺伝子要素を含んでいてもよい。『操作可能に位置した』、『操作可能に結合した』、『制御下にある』『転写の制御下にある』とは、プロモータがその配列の転写開始及び/又は発現を制御するために核酸配列に関して正しい機能的な位置及び/又は配向にあることを意味する。プロモータは『エンハンサ』と共に使われても、使われなくてもよく、エンハンサとは核酸配列の転写活性に関するシス作用調節配列を指す。

10

【0142】

プロモータはコード断片及び/又はエクソンの上流に位置する5'非コード配列の単離によって得られ、遺伝子または配列と自然に結合することができるものである。そうしたプロモータは『内因性』と称することができる。同様に、エンハンサはその核酸配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列と自然に結合することができるものである。また、いくつかの利点が組み換え体または異種由来のプロモータの制御下でコード核酸断片を位置決めすることによって得られ、異種由来のプロモータとは、通常その自然環境下では核酸配列と結合しないプロモータを指す。組み換え体または異種由来のエンハンサも、通常その自然環境下では核酸配列と結合しないエンハンサを指す。そうしたプロモータあるいはエンハンサは他の遺伝子のプロモータまたはエンハンサ、及び他の原核動物、ウイルス、または真核生物の細胞から単離されたプロモータまたはエンハンサ、及び『自然発生』しない、すなわち、異なる転写制御領域の異なる成分、及び/又は発現を変化させる突然変異体を含んでいるプロモータまたはエンハンサなどである。プロモータ及びエンハンサの核酸配列を合成することに加えて、配列は、本明細書で開示される組成物に関連して、PCR^Tなど組み換え体クローニング及び/又は核酸増幅技術を用いて生成されることが可能である（米国特許第4,683,202号明細書、米国特許第5,928,906号明細書参照、それぞれは引用によって本明細書に組み込まれる）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体、その他の非核オルガネラ内の配列の転写及び/又は発現を制御するコントロール配列が考えられる。

20

【0143】

当然のことながら、発現のために選択された細胞の種類、オルガネラ、及び生物体のDNA断片の発現を効果的に制御するプロモータ及び/又はエンハンサを用いることが重要であろう。分子生物学の分野の当業者であれば、例えば、引用によって本明細書に組み込まれるSambrook et al. (1989)を参照して蛋白質発現のためのプロモータ、エンハンサ、及び細胞のタイプの組み合わせの利用を通常周知している。用いられるプロモータは導入されたDNA断片の高レベルな発現を制御する適切な条件下で構成性、組織特異的、誘導性、及び/又は有用であり、組み換え体蛋白質及び/又はペプチドの大量生産に好適である。そのプロモータは異種由来または内因性でもよい。

30

【0144】

表5は、本発明の文脈において、1つの遺伝子の発現を制御するために用いられるいくつかの成分/プロモータを列挙している。本表は発現の促進に関するすべての可能な要素を網羅することは意図されておらず、単に、その例示だけのためのものである。表6は特異的な刺激に応答して活性化され得る核酸配列の領域である誘導性成分の例を示す。

40

【0145】

【表 5】

プロモータ及び/又はエンハンサー	
プロモータ/エンハンサー	引用文献
Immunoglobulin Heavy Chain	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> , 1990
Immunoglobulin Light Chain	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T-Cell Receptor	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> , 1990
HLA DQ α and/or DQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β -Interferon	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
Interleukin-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
Interleukin-2 Receptor	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC Class II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989

10

20

MHC Class II HLA-DRA	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β -Actin	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> , 1989
Muscle Creatine Kinase (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
Prealbumin (Transthyretin)	Costa <i>et al.</i> , 1988
Elastase I	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
Metallothionein (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
Collagenase	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
Albumin	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α -Fetoprotein	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
γ -Globin	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β -Globin	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987; Treisman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
c-HA-ras	Trimble and Hozumi, 1987
Insulin	Edlund <i>et al.</i> , 1985
Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α_1 -Antitrypsin	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) Histone	Hwang <i>et al.</i> , 1990
Mouse and/or Type I Collagen	Ripe <i>et al.</i> , 1989
Glucose-Regulated Proteins (GRP94 and GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
Rat Growth Hormone	Larsen <i>et al.</i> , 1986
Human Serum Amyloid A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
Troponin I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
Duchenne Muscular Dystrophy	Klamut <i>et al.</i> , 1990

10

20

30

SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
Polyoma	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
Retroviruses	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
Papilloma Virus	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987
Hepatitis B Virus	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
Human Immunodeficiency Virus	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
Cytomegalovirus (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
Gibbon Ape Leukemia Virus	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

20

【 0 1 4 6 】

【表 6】

誘発可能要素		
要素	誘発因子	引用文献
MT II	Phorbol Ester (TPA) Heavy metals	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV (mouse mammary tumor virus)	Glucocorticoids	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β -Interferon	poly(rI)x poly(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Collagenase	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
Stromelysin	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Murine MX Gene	Interferon, Newcastle Disease Virus	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 Gene	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α -2-Macroglobulin	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Vimentin	Serum	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC Class I Gene H-2kb	Interferon	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, SV40 Large T Antigen	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Proliferin	Phorbol Ester-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
Tumor Necrosis Factor	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Thyroid Stimulating Hormone α Gene	Thyroid Hormone	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

【0147】

組織特異的な成分またはプロモータの同一性、そしてそれらの活性を特徴づけるための評価法は当業者に周知である。そうした領域の例には、ヒト LIMK2 遺伝子 (Nomoto *et al.*, 1999)、ソマトスタチン・レセプタ 2 遺伝子 (Kraus *et al.*, 1998)、マウス精巣上体レチノイン酸結合遺伝子 (Lareyre *et al.*, 1999)、ヒト CD4 (Zhao-Emonet *et al.*, 1998)、マウス・アルファ 2 (XI) コラーゲン (Tsumaki, *et al.*, 1998)、DIA ドーパミン・レセプタ遺伝子 (Lee, *et al.*, 1997)、インシュリン様成長因子 II (Wu *et al.*, 1997)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendro *et al.*, 1996) などがある。

40

【0148】

b. 開始シグナル及び内部リボソーム結合部位

特異的な開始シグナルもコード配列の効率的な翻訳に必要な場合がある。これらのシグナルには ATG 開始コドンまたは隣接する配列などがある。ATG 開始コドンなど、外因性の翻

50

訳コントロール・シグナルが提供される必要がある。当業者であれば、これについて判定し、必要なシグナルを提供することが容易にできよう。開始コドンは挿入断片全体の翻訳を確実にするため望まれるコード配列のリーディング・フレームと『イン・フレーム』でなければならない。外因性の翻訳コントロール・シグナル及び開始コドンは天然あるいは合成のいずれでもよい。発現の効率は適切な転写エンハンサ成分の封入によって増強されることが可能である。

【0149】

本発明によるいくつかの実施の形態で、内部リボソーム侵入部位 (IRES) 成分を用いて多重遺伝子またはポリシストロン性のメッセージがつくられる。IRES成分は5'メチル化キャップ依存性翻訳のリボソーム・スキャン・モデルを回避することが可能で、内部部位で翻訳を開始する (Pelletier and Sonenberg, 1988)。ピコルナ・ウイルス族 (ポリオ及び脳心筋炎) の2つのメンバーからのIRES成分 (Pelletier and Sonenberg, 1988)、そして、哺乳動物メッセージからの1つのIRESについて記述されている (Macejak and Sarnow, 1991)。IRES成分は非相同性オープン・リーディング・フレームに結合されることが可能である。多重オープン・リーディング・フレームは同時に転写され、それぞれが1つのIRESによって分離され、ポリシストロン性メッセージをつくりだす。IRES成分によって、各オープン・リーディング・フレームは効率的な翻訳のためにリボソームに接近可能である。多重遺伝子は単一のプロモータ/エンハンサを使って効率的に発現させられ、単一のメッセージを転写することができる (米国特許第5,925,565及び5,935,819号明細書参照、引用によって本明細書に組み込まれる)。

10

20

【0150】

c. 多重クローニング部位

ベクターは、そのベクターを消化する標準的な組み換え体技術と共に用いることができるいずれかの多重制限酵素部位を含んでいる核酸領域である多重クローニング部位 (MCS) を含むことができる (Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997参照、引用によって本明細書に組み込まれる)。『制限酵素消化』とは、核酸分子内の特定の位置のみで機能する酵素での核酸分子の酵素的切断を指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そうした酵素の利用は当業者に広く理解されている。しばしば、ベクターは、外因性の配列がそのベクターに結合できるようにMCS内で切断を行う制限酵素を用いて線状化あるいは断片化される。『ライゲーション』とは、互いに隣接しているか、または隣接していない2個の核酸断片の間にリン酸ジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素及びライゲーション反応に関する技術は組み換え体技術の分野の当業者に十分周知である。

30

【0151】

d. スプライシング部位

多くの転写された真核生物RNA分子はRNAスプライシングをうけ、一次転写物からイントロンが取り除かれる。ゲノム真核生物配列を含んでいるベクターは、蛋白質発現のための転写物の適切なプロセッシングを確実にするためドナー及び/又は受容体スプライシング部位を必要とする (Chandler et al., 1997参照、引用によって本明細書に組み込まれる)。

40

【0152】

e. 終結シグナル

本発明によるベクターまたはコンストラクトは一般に少なくともひとつの終結シグナルを含んでいる。『終結シグナル』または『ターミネータ』はRNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的終結に関連するDNA配列から成る。従って、いくつかの実施の形態でRNA転写物の生成を終わらせる終結シグナルが検討される。ターミネータは望ましいメッセージ・レベルを達成するためin vivoで必要であろう。

【0153】

真核生物系において、ターミネータ領域は、ポリアデニル化部位を露出するように新たな転写物の部位特異的な切断を許容する特異的DNA配列も含んでいる。これは分化した内

50

因性ポリメラーゼをシグナルし、約200 A残基 (polyA) のストレッチをその転写物の3'末端に付加する。このpolyA尾部で修飾されたRNA分子はより安定的なようであり、より効率的に翻訳される。従って、真核生物に関する他の実施の形態で、ターミネータはそのRNAの切断のためのシグナルを含んでいることが好ましく、そのターミネータ・シグナルはメッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。そのターミネータ及び/又はポリアデニル化部位成分はメッセージ・レベルを増強し、及び/又はそのカセットから他の配列への読み合わせを最小化する役割を果たすことができる。

【0154】

本発明での利用のために検討されるターミネータは、例えば、SV4ターミネータのようなウシ成長ホルモン・ターミネータあるいはウイルス性ターミネータ配列などの遺伝子の終結配列など本明細書で述べられ、または当業者に周知のすべての知られている転写のターミネータなどを含んでいる、いくつかの実施の形態で、その終結シグナルは、配列の切断が原因などによる、転写または翻訳可能な配列の欠失でもよい。 10

【0155】

f. ポリアデニル化シグナル

発現、特に真核生物の発現において、転写の適切なポリアデニル化を実施するためのポリアデニル化シグナルなどが通例含まれる。ポリアデニル化シグナルの性質は本発明の実施を成功させるため非常に重要であるとは考えられておらず、及び/又はそうしたいずれの配列が用いられてもよい。好ましい実施の形態には、便利で、及び/又は種々の標的細胞内でうまく機能することが知られているSV40ポリアデニル化シグナル及び/又はウシ成長ホルモン・ポリアデニル化シグナルなどがある。ポリアデニル化は転写物の安定性を増加させ、または細胞質輸送を促進することができる。 20

【0156】

g. 複製起点

ベクターを宿主細胞内で増殖させるため、ベクターは複製が開始される特定の核酸配列である複製サイトの1つ以上の起点（しばしば『ori』と称される）を含んでいる。また、宿主細胞が酵母菌の場合は、自己複製配列（ARS）を用いることができる。

【0157】

h. 選択及びスクリーニング可能なマーカー

本発明によるいくつかの実施の形態で、本発明による核酸コンストラクトを含んでいる細胞は発現ベクターにマーカーを封入することによってin vitroまたはin vivoで識別することができる。そうしたマーカーはその細胞に識別可能な変化をもたらし、発現ベクターを含んでいる細胞の簡便な識別を可能にするであろう。一般に、選択可能なマーカーとは選択を可能にする性質を付与するマーカーである。正の選択可能なマーカーはマーカーの存在がその選択を可能にし、一方、負の選択可能なマーカーはその存在がその選択を妨げるマーカーである。正の選択可能なマーカーの1例は薬剤耐性マーカーである。薬剤選択マーカーの封入は形質転換体のクローニング及び識別を助け、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、及びヒスチジノールに耐性を付与する遺伝子は有用な選択可能マーカーである。実施条件に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、GFPのようにスクリーニング可能なマーカーなど、その原理が比色分析であるその他の種類のマーカーも考えられる。あるいは、単純ヘルペス・ウイルス・チミジン・キナーゼ、(tk) またはクロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ (CAT) などスクリーニング可能な酵素を用いることができる。当業者であれば、恐らくFACS分析と共に、免疫マーカーを用いるやり方にも精通しているであろう。用いられるマーカーは、遺伝子生成物をコードする核酸と同時に発現されることが可能な限り、重要であるとは考えられていない。選択及びスクリーニング可能なマーカーのさらに別の例は当業者によく知られている。 30 40

【0158】

2. ホスト細胞

本明細書で用いられるように、『細胞』、『細胞株』、及び『細胞培養物』という用語 50

は交換可能に用いられる。これらの用語の全部が、次に続くあらゆる世代であるそれらの子孫も含んでいる。意図的または偶然の突然変異のためにすべての子孫が同一であるとは限らない。非相同性核酸配列を発現するという文脈の中で、『ホスト細胞』とは原核生物または真核生物細胞を指し、ベクターを複製及び/又はベクターによってコードされる非相同性遺伝子を発現する能力がある形質転換可能ないずれの生物体なども含んでいる。ホスト細胞はベクターの宿主として用いることができ、実際に用いられてきた。ホスト細胞は、修飾された蛋白質をコードする配列など外因性の核酸がホスト細胞内に伝達あるいは導入されるプロセスを意味する、『形質転換(transfected)』または『形質転換(transformed)』されることがある。形質転換された細胞には一次対象細胞及びその子孫などがある。

10

【0159】

ホスト細胞は、望まれる結果がベクターの複製か、またはベクターにコードされた核酸配列の一部または全体の発現かによって、酵母菌細胞、昆虫細胞、及び哺乳動物細胞などの原核生物または真核生物細胞に由来することができる。数多くの細胞株または細胞培養物がホスト細胞として利用可能であり、生体培養物及び遺伝物質のアーカイブとして役割を果たす機関であるAmerican Type Culture Collection (ATCC)を通じてそれらを入手することができる(www.atcc.org)。適切なホストは、当業者であればベクターのバックボーン及び望まれる結果に基づいて判定することができる。例えば、プラスミドまたはコスミドは多くのベクターの複製のために原核生物ホスト細胞への導入が可能である。ベクターの複製及び/又は発現のためにホスト細胞として用いられる細菌性細胞には、DH5α、JM 109、及び、KC8、そしてSURE^R Competent Cells及びSOLOPACKTM Gold Cells (STRATAGENE^R La Jolla) など多数の市販されている細菌性ホストなどがある。あるいは、大腸菌LE392などの細菌性細胞がファージ・ウイルスのためのホスト細胞として用いられてもよい。適切な酵母菌細胞には、サッカロミセス・セロヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、及び、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) などがある。

20

【0160】

ベクターの複製及び/又は発現のための真核生物ホスト細胞の例は、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、及び、PC12などである。種々の細胞タイプ及び生物体からの多くのホスト細胞が利用可能であり、当業者には公知であろう。同様にウイルス・ベクターは、特にそのベクターの複製または発現を許容する原核または真核生物ホスト細胞のいずれかと共に用いられることが可能である。

30

【0161】

いくつかのベクターは原核及び真核生物細胞内の両方で複製及び/又は発現されることを可能にするコントロール配列を用いることができる。当業者であれば、上に述べられたすべてのホスト細胞を培養し、それらを維持してベクターの複製を可能にする条件をさらに理解するであろう。また、ベクターの大量生産、そしてベクター及び同種のポリペプチド、蛋白質またはペプチドによってコードされる核酸の生産を可能にする技術及び条件も理解され、知られている。

【0162】

3. 発現系

上に述べられた少なくとも一部またはすべての組成物から成る数多くの発現系が存在する。原核及び/又は真核生物に基づく系が、核酸配列、またはその同種のポリペプチド、蛋白質またはペプチドを生成するため本発明による利用に用いられることが可能である。そのような多くの系が市販用に広く利用可能である。

40

【0163】

昆虫細胞/バキュロウイルス系は、いずれも引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第5,871,986号明細書及び第4,879,236号明細書で述べられ、例えば、INVITROGEN^R社からMAXBAC^R 2.0、及びCLONTECH^R社からBACPACKTM BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEMの製品名で購入可能な、非相同性核酸断片の高レベルな蛋白質発現を生じさせることができる

50

。

【0164】

本発明による開示された発現系に加えて、その他の発現系の例には、合成エクジソン誘導性レセプタを含んでいるSTRATAGENE[®]社のCOMPLETE CONTROL[™] Inducible Mammalian Expression System、及び、大腸菌発現系である同社のpET Expression Systemなどがある。誘導性発現系の別の例は、完全長CMVプロモータを用いる誘導性哺乳動物発現系であるT-R EX[™]（テトラサイクリン調節発現）系がINVITROGEN[®]社から利用可能である。INVITROGEN[®]社はメチロトーフ酵母菌であるピチア・メタノリカ（*Pichia methanolica*）内で組み換え体蛋白質を高レベルで生成するためにデザインされた*Pichia methanolica* Expression Systemという名称の酵母菌発現系も提供している。当業者であれば、核酸配列またはその同種のポリペプチド、蛋白質またはペプチドを生成するため発現コンストラクトなどのベクターを発現させるやり方を周知しているであろう。

10

【0165】

4. ウイルス・ベクター

発現ベクターが細胞内に導入される数多くの方法がある。本発明によるいくつかの実施の形態で、発現ベクターはウイルス、またはウイルスのゲノムに由来する遺伝子操作されたベクターを含んでいる。レセプタに媒介された飲食作用(endocytosis)を通じて細胞に侵入し、宿主細胞のゲノムに合体してウイルスの遺伝子を安定的、効率的に発現させる一部のウイルスの能力は、ウイルスを異種由来の遺伝子を哺乳動物細胞内に送り込むための魅力的な候補者にしてきた（Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986）。遺伝子ベクターとして使われた最初のウイルスは、パポーウイルス（サル・ウイルス40、ウシ乳頭腫ウイルス、及びポリオーマウイルス）（Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986）、及びアデノウイルス（Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986）を含んでいるDNAウイルスであった。これらは異種由来のDNA配列に対して比較的低い能力を持ち、限定的な宿主・スペクトルを有している。さらに、複製を許容する細胞内におけるそれらの腫瘍形成の潜在能力及び細胞病理学的効果は安全性の懸念を高める。それらのウイルスは異種由来の遺伝物質を8 kbまでしか収容できないが、種々の細胞株及び実験用動物にうまく導入されることが可能である（Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986）。

20

【0166】

レトロウイルスは、感染した細胞内でそのRNAを二本鎖DNAに変換させる能力によって特徴づけられる一本鎖RNAウイルス群である。他のウイルス・ベクターは本発明において発現コンストラクトとして用いることができる。ワクシニア・ウイルス（Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988）、アデノ関連ウイルス（AAV）（Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Hermonat and Muzyoska, 1984）、及びヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターを用いてもよい。それらのウイルスは種々の哺乳動物細胞に対するいくつかの魅力的な特徴を提供する（Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990）。

30

【0167】

B. 核酸検出

デザイナー毒素及び修飾蛋白質発現の検出においての利用に加えて、本明細書に開示されている核酸配列ポリペプチド及び/又はペプチドにはそれ以外の多様な利用法がある。例えば、それらは核酸ハイブリダイゼーションを含む実施の形態においてプローブあるいはプライマーとして利用することができる。修飾された蛋白質あるいはデザイナー毒素をコードする核酸の検出は本発明の範囲内に含まれている。

40

【0168】

1. ハイブリダイゼーション

13から100ヌクレオチド、好ましくは17から100ヌクレオチド、そして本発明のいくつかの実施形態では最大1-2キロ塩基あるいはそれ以上の長さのプローブを用いると、安定

50

性と選択性の両方を兼ね備えた二重分子の形成が可能になる。得られるハイブリッド分子の安定性及び/又は選択性を増大させるためには、通常は、長さで20塩基以上の連続した範囲に相補的な配列を有する分子が好ましい。通常、人は20-30ヌクレオチド、あるいは望ましい場合はそれ以上の長さの、1つ以上の相補性配列を有するハイブリダイゼーション用の核酸分子を設計することを好む。そうしたフラグメントは、例えば、化学的手段によってそのフラグメントを直接合成したり、あるいは選択された配列を組み換え体ベクターに導入して組み換え体を生産することによって簡単に調製することができる。

【0169】

従って、本発明によるヌクレオチド配列はそれらの能力をしてDNA及び/またはRNAの相補的広がりをもつ複合分子を選択的に形成したり、あるいはサンプルからのDNA又はRNAを増幅させるためのプライマーを提供させるために用いることができる。構想されている応用によって、標的に配列に対するプローブあるいはプライマーの異なった程度の選択性を達成するために異なったハイブリダイゼーション条件を用いたいと思うであろう。

【0170】

高度の選択性を必要とする応用例の場合、人は通常ハイブリッドを形成するために比較的厳しい条件を用いることを希望するであろう。例えば、約50℃から約70℃の温度で、約0.02Mから約0.10M NaClでもたらされるような比較的低濃度の塩及び/または高温条件である。こうした厳しい条件ではプローブあるいはプライマーとテンプレートあるいは標的ストランドの間の不一致がある場合ほとんど許容しないので、特定の遺伝子を単離したり、特定のmRNA転写体を検出するのに特に適している。一般的には、ホルムアミドの添加料を加えることで条件をより厳しくすることができる。

【0171】

たとえば、サイト指定突然変異誘発など一定の応用例の場合、厳格さが低めの条件の方が好ましい。これらの条件下では、ハイブリダイズするストランドの配列が完全に相補的でなくてもハイブリダイゼーションは起きる場合があるが、1つあるいは複数の位置で不一致が存在する。塩濃度をより高くするか及び/又は温度を低くすることによって条件の厳格さをより低くすることができる。例えば、約0.1-0.25MのNaClと約37℃から約55℃の温度で中間程度の厳格さの条件を提供することができ、約0.15Mから約0.9Mの塩と、約20℃から約55℃の温度でより低い厳格さの条件を提供することができる。ハイブリダイゼーション条件は望ましい結果に応じて容易に操作することができる。

【0172】

別の実施の形態で、例えば、50mM トリス HCl (pH8.3)、75mM KCl、3 mM MgCl₂、1.0mM ジチオスレイトル、約20℃-約37℃の温度でハイブリダイゼーションを起こさせることができる。用いられるその他のハイブリダイゼーション条件としては、約40℃-約72℃の温度で、10mM トリス塩酸 (pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂などある。

【0173】

いくつかの実施の形態で、本発明による定義された配列の核酸をラベルなどハイブリダイゼーションを判定するための適切な手段と組み合わせて用いるのが好適であろう。この技術領域では広範な種々のインジケータ手段が知られており、例えば、蛍光性、放射性、酵素性、あるいはアビジン/ビオチンなど検出され得るその他のリガンドなどがその例である。好ましい実施の形態においては、放射性あるいはその他の環境的に望ましくない試薬に代えて、アルカリ性ホスファターゼ、あるいはペロキシダーゼなどの蛍光性ラベルあるいは酵素タグを用いることが望ましいであろう。酵素タグの場合、視覚的あるいは分光光度測定で検出可能な検出手段を提供したり、サンプルをふくむ相補的な核酸との固有のハイブリダイゼーションを識別するために用いることができる比色分析インジケータ担体が知られている。

【0174】

一般的に、ここで述べられているプローブあるいはプライマーは、PCRTMにおけるように、対応する遺伝子の発現を検出するための溶液ハイブリダイゼーション、あるいは固相を用いた実施例で使われる試薬として有益であろう。固相を用いる実施の形態においては

、テストDNA（あるいはRNA）は選択された基質あるいは表面に吸着、あるいはその他の形態で固着される。この固定された1本鎖核酸は次に望ましい条件下で選択されたプローブとハイブリダイゼーションされる。選択される条件はそれぞれの具体的な状況（例えば、G+C含量、標的核酸のタイプ、核酸供給源、ハイブリダイゼーション・プローブのサイズなど）に依存する。特定の適用例に対するハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は当業者には周知である。非固有結合プローブ分子を除去するためにハイブリダイズされた分子を洗浄した後、結合したラベルの量を判定することで、ハイブリダイゼーションを検出し、及び/又は定量する。代表的な固相ハイブリダイゼーション方法は米国特許第5,843,663、5,900,481及び5,919,626号明細書に開示されている。本発明を実施する際に用いることができるその他のハイブリダイゼーション方法は、米国特許第5,849,481、5,849,486及び5,851,772号明細書に開示されている。明細書のこの部分に示されているこれら、及びその他の引例の該当する部分は引用によって本明細書に組み込まれる。

10

【0175】

2. 核酸の増幅

増幅用テンプレートとして用いられる核酸は標準的な技術で細胞、組織あるいはその他のサンプルから分離することができる（Sambrook et al., 1989）。いくつかの実施の形態で、分析はテンプレート核酸を実質的に精製せずに細胞、組織ホモジェネートあるいは生物流体サンプル全部を用いて行なわれる。核酸はゲノム性DNAでも、全細胞RNAであってもよい。RNAが用いられる場合、そのRNAを最初に相補性DNAに転換させることが望ましい場合もある。

20

【0176】

ここで用いられている『プライマー』という用語は、テンプレート依存プロセスで初期の核酸の合成を開始させることができるすべての核酸を含んで意味している。標準的に、長さが10-20、及び/又は30程度の塩基対であるオリゴヌクレオチドであるが、それより長い配列を用いることもできる。プライマーは2本鎖、あるいは1本鎖のいずれの形状でも提供することができるが、1本鎖の方が好ましい。

【0177】

配列識別番号：1あるいはその他の配列識別番号に対応する核酸に選択的にハイブリダイズするように設計されたプライマーの対を選択的ハイブリダイゼーションを可能にする条件下でテンプレート核酸に接触させる。望ましい適用例に応じて、そのプライマーに完全に相補的な配列に対するハイブリダイゼーションだけを可能にするような高度に厳格なハイブリダイゼーション条件を選択することもできる。他の実施の形態においては、プライマー配列との間で1つあるいは2つの不一致を含むような核酸の増幅を可能にするようなやや低い厳格さでのハイブリダイゼーションを行なうこともできる。一度ハイブリダイズされると、テンプレート・プライマー複合体はテンプレート依存核酸合成を促進する1つ以上の酵素と接触させられる。十分な量の増幅生成物がつくりだされるまで、『サイクル』と呼ばれる複数回の増幅が行なわれる。

30

【0178】

増幅生成物は検出、定量が可能である。いくつかの応用例では、検出は視覚的な手段を用いて行なわれる。あるいは、検出には化学蛍光、組み込まれた放射性あるいは蛍光性ラベルの放射性シンチグラフィ、あるいは電氣的及び/又は熱的インパルス信号を用いたシステム（Affymax technology, Bellus, 1994）などを介した間接的識別ステップを含んでいる場合もある。

40

【0179】

任意のテンプレート・サンプル内に存在しているオリゴヌクレオチド配列を増幅させるために多数のテンプレート依存プロセスを用いることができる。最も良く知られている増幅方法の1つはポリメラーゼ鎖反応（PCRTMと称される）で、これは米国特許第4,683,195、4,683,202及び4,800,159号明細書、及びInnis et al., 1998に詳細に述べられており、これらの文献は引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0180】

50

増幅されたmRNAの量を定量するために逆転写酵素PCRTM増幅手順を用いることもできる。cDNAにRNAを逆転写する方法は周知である(Sambrook et al., 1989参照)。逆転写のためのもう1つの方法は熱安定性DNAポリメラーゼを用いる方法である。これらの方法はW0 90/07641に述べられている。ポリメラーゼ鎖反応法はこの技術領域で周知である。RT-PCRの代表的な方法は米国特許第5,882,864号明細書に述べられている。

【0181】

別の増幅方法は欧州特許出願第320,308号公報に開示されているリガーゼ鎖反応("LCR")で、この特許は引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。米国特許第4,883,750号明細書もプローブ対を標的配列に結合させるためのLCRに似た方法について述べている。PCRTMに基づく方法と米国特許第5,912,148号明細書に開示されているオリゴヌクレチド・リガーゼ・アッセイ(OLA)も用いることができる。 10

【0182】

本発明の実施のために用いることができる標的核酸配列を増幅させるその他の方法は米国特許第5,843,650、5,846,709、5,846,783、5,849,546、5,849,497、5,849,547、5,858,652、5,866,366、5,916,776、5,922,574、5,928,905、5,928,906、5,932,451、5,935,825、5,939,291及び5,942,391号各明細書、英国特許出願第2 202 328及びPCT出願第PCT/US89/01025公報において開示されており、これらは引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0183】

PCT出願第PCT/US87/00880公報に述べられているQベータ・レプリカーゼも本発明での増幅方法として用いることができる。この方法においては、標的の領域に相補的な領域を有するRNAの複製配列をRNAポリメラーゼの存在下でサンプルに加える。このポリメラーゼは上記複製配列だけをコピーするので、検出することができる。 20

【0184】

制限サイトの1つのストランドにヌクレオチド5'-[アルファーチオ]-トリホスフェートを含んでいる標的分子の増幅を達成するために制限エンドヌクレアーゼとリガーゼが用いられる定温増幅法も、本発明の核酸増幅において有効である可能性があり(Walker et al., 1992)。米国特許第5,916,779号明細書に開示されているストランド置換増幅(SDA)もストランド置換及び合成、つまりニック・トランスレーションを複数ステップ含み核酸の定温増幅を実行するための別の方法である。 30

【0185】

別の核酸増幅手順は核酸配列に基づく増幅(NASBA)及び3SR(Kwoh et al., 1989; PCT Application W0 88/10315、参照により全体を本明細書に組み込み)を含む転写ベース増幅システム(TAS)などがある。欧州特許出願第329 822は1本鎖RNA("ssRNA")、ssDNA、及び2本鎖DNA(dsDNA)を循環方式に合成する増幅プロセスを含む核酸増幅プロセスを開示している。

【0186】

PCT出願W0 89/06700(参照によってその全体を本明細書に組み込み)はプロモータ領域／プライマー配列を標的1本鎖DNA("ssDNA")にハイブリダイズさせ、その後にその配列のRNAコピーが多数転写される核酸増幅方式を開示している。この方式は循環方式ではなく、従って新しいテンプレートが結果として得られるRNA転写体からつくりだされることはない。その他の増幅方法には"RACE"及び"片側PCR"(Frohman, 1990; Ohara et al., 1989)などがある。 40

【0187】

3. 核酸の検出

いずれかの増幅に続いて、テンプレートからの増幅生成物及び/又は過剰プライマーを分離するのが望ましい。1つの実施の形態で、増幅生成物は標準的な方法に基づくアガロース、アガロース-アクリルアミド、あるいはポリアクリルアミド・ゲル電気泳動によって分離される(Sambrook et al., 1989)。分離された増幅生成物は切断して、ゲルから溶離させ、さらに操作される。低融点アガロース・ゲルを用いて、分離されたバンドをそ 50

のゲルを加熱し、さらに核酸を抽出することで除去することができる。

【0188】

核酸の分離は先行技術で周知のクロマトグラフィ技術で行なうこともできる。本発明の実施において用いることができるクロマトグラフィは多くの種類があり、吸着、分割、イオン交換、ヒドロキシルアパタイト、分子ふるい、逆相、カラム、紙、薄層、及びガス・クロマトグラフィ及びHPLCなどである。

【0189】

いくつかの実施の形態で、増幅生成物が視覚化される。代表的な視覚化方法は、臭化エチジウムによるゲルの染色、及び紫外線によるバンドの視覚化などのステップを含んでいる。あるいは、増幅生成物が放射性あるいは蛍光性ラベル化されたヌクレオチドと一体的にラベルされている場合、分離された増幅生成物をx線フィルムに露出させたり、あるいは適切な励起スペクトル下で視覚化することができる。 10

【0190】

1つの実施の形態で、増幅生成物の分離に続いて、ラベルされた核酸プローブを増幅されたマーカー配列と接触させる。このプローブは好ましくはクロモフォルに接合されているが、放射性物質でラベルされていてもよい。別の実施の形態で、プローブは抗体、ビオチンなどの結合パートナー、あるいは検出可能な成分を含む別の結合パートナーに接合される。

【0191】

1つの特殊な実施の形態で、サザン・ブロッティング及びラベルされたプローブによるハイブリダイゼーションによって検出が行なわれる。サザン・ブロッティングに関連する技術については当業者に周知である (Sambrook et al., 1989参照)。上に述べたことの1例は引用により本明細書に組み込まれる米国特許第5,279,721号明細書に述べられているが、特許は自動電気泳動及び核酸の移送のための装置と方法を開示している。この装置はゲルの外部的操作なしで電気泳動及びブロッティングを可能にするものであり、本発明による方法を実行するのに理想的に適している。 20

【0192】

本発明の実施において用いることができる他の核酸検出のためのその他の方法は、米国特許第5,840,873、5,843,640、5,843,651、5,846,708、5,846,717、5,846,726、5,846,729、5,849,487、5,853,990、5,853,992、5,853,993、5,856,092、5,861,244、5,863,732、5,863,753、5,866,331、5,905,024、5,910,407、5,912,124、5,912,125、5,919,630、5,925,517、5,928,862、5,928,869、5,929,227、5,932,413及び5,935,791号各明細書に開示されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる。 30

【0193】

4. その他のアッセイ

例えば、ゲノム性DNA、cDNA、及び/又はRNAサンプルにおける突然変異を検出するために、遺伝子スクリーニングのためのその他の方法を本発明の範囲内で用いることができる。ポイント突然変異を検出するために用いられる方法は、変性勾配ゲル電気泳動 ("DGGE")、制限フラグメント長多型分析 ("RFLP")、化学的あるいは酵素による切断方法、PCR^T (上記参照) によって増幅された標的領域の直接スクリーニング、1本鎖配座多型分析 ("SSCP")、及びその他の方法がこの技術領域で知られている。 40

【0194】

ポイント突然変異をスクリーニングするための1つの方法は、RNA/DNA又はRNA/RNAヘテロ二本鎖における塩基対不一致のRNase切断に基づいている。ここで用いられる場合、『不一致』という用語は、2本鎖RNA/RNA、RNA/DNA、あるいはDNA/DNA分子において1つ以上の対を形成していない、あるいは誤って対を形成している領域と定義される。この定義は、挿入/欠失突然変異による不一致、あるいは1つ又は複数の塩基ポイント突然変異による不一致を含んでいる。

【0195】

米国特許第4,946,773号明細書はDNAあるいはRNAテスト・サンプルをアニーリングする 50

ステップと、その後で行なわれるRNaseによる核酸複合体の処理を含むRNase不一致アッセイについて述べている。不一致を検出するために、サイズによって電気泳動に分離したRNase処理の1本鎖生成物を、同様に処理した比較対照の2本鎖構成物と比較する。比較対照の2本鎖構成物ではみられないより小さなフラグメント（切断生成物）を含むサンプルをポジティブとしてスコアする。

【0196】

他の研究者等は不一致アッセイにおけるRNase Iの使用について述べている。不一致検出のためのRNaseの使用はPromega Biotech社の文献に述べられている。Promega社はRNaseを含むキットを市販しており、伝えられるところではこのキットは4つの知られている不一致のうちの3つを切断する。他の者は単一塩基不一致の検出のためにMutS蛋白質あるいはその他のDNA修繕酵素を使用することについて述べている。

10

【0197】

欠失、挿入あるいは置換突然変異を検出するために本発明の実施において用いることができるその他の方法は米国特許第5,849,483、5,851,770、5,866,337、5,925,525及び5,928,870号各明細書に述べられており、これらはそれぞれ引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0198】

C. 遺伝子導入の方法

本発明による組成物を発現させるために核酸導入に適した方法は、核酸（例えば、ウイルス及び非ウイルス・ベクターを含むDNA）を本明細書で述べられているような、あるいは当業者に周知の細胞小器官、細胞、組織あるいは器官に送り込むことができるほとんどすべての方法が含まれると考えられる。そうした方法としては、微量注入（Harlan and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号明細書、引用によって本明細書に組み込み）を含む注入などのDNAの直接的導入（米国特許第5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466及び5,580,859号各明細書、それぞれ引用によって本明細書に組み込み）；エレクトロポレーション（米国特許第5,384,253号明細書、引用によって本明細書に組み込み）；リン酸カルシウム沈殿（Graham and Vander Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990）；DEAE-デキストランを使用し、その後でポリエチレン・グリコールを使用する方法（Gopal, 1985）；直接音響負荷（Fechheimer et al., 1987）；リボソーム媒介トランスフェクション（Nicolau and Senne, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al, 1980; Kaneda et al., 1989, Kato et al., 1991）；微量照射体の集中的照射（PCT出願第W094/09699及び95/06128号公報、米国特許第5,610,042；5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877及び5,538,880号各明細書参照。引用によって本明細書に組み込み）；シリコン・カーバイド繊維による攪拌（Kaeppler et al., 1990; 米国特許第5,302,523及び5,464,765号明細書、それぞれ引用によって本明細書に組み込み）；アグロバクテリア媒介形質転換（米国特許第5,591,616及び5,563,055号明細書、それぞれ引用によって本明細書に組み込み）；あるいはプロトプラストのPEG媒介形質転換（米国特許第4,684,611及び4,952,500号明細書、それぞれ引用によって本明細書に組み込み）；あるいは乾燥／抑制媒介DNA摂取（Potrykus et al., 1985）などによるものがあり、これ以外にもある。こうした技術を適用することで、細胞小器官、細胞、組織あるいは器官を安定的、あるいは一次的に形質転換させることができる。

20

30

40

【0199】

III. リボソーム非活性化蛋白質

リボソーム抑制毒素(RIT)は真核生物における蛋白質合成の抑制因子である。これらの蛋白質の酵素的領域は、それらが細胞内コンパートメントに入りこむと、触媒的にリボソームを非活性化させることができる細胞毒性n-グリコシダーゼとして作用する。このことは28SrRNAの位置4324でアデニンのn-グリコシド結合を切断することで行われ、それによって見かけ上延伸因子用の結合サイトを破壊することによってリボソームを不可逆的に非活性化させる。バクテリアから分離されたRITは高級植物でも広く分布している。植物に

50

においては2つのタイプがあり、タイプI毒素はリポソーム抑制作用を有する単一ポリペプチド鎖を有しており、タイプIIはジスルフィド結合によって細胞結合特性を有するB鎖に結合されている、タイプI蛋白質と類似したA鎖を有している。タイプI RITの例はゲロニン、ドデカンドリン、トリコサンチン、プリオジン、トリコキリン、ミラビリス抗ウイルス蛋白質、バーレイ・リポソーム非活性化蛋白質 (BRIP)、ヤマゴボウ抗ウイルス蛋白質 (RAP)、サポニン、ルフィン、そしてモモルディンである。タイプII毒素にはリシンとアブリンがある。毒素はここに述べられているポリペプチドのいずれかと接合されたり、あるいはそれらとの融合蛋白質として発現される。あるいは、本発明による修飾毒素は化学治療剤あるいは向標的剤など小型の分子に接合される場合もある。

【0200】

10

A. 免疫毒素

本発明による毒素は細胞阻害性治療剤の成分としての使用に特に適している。これらの細胞阻害剤は第2の成分の特殊は結合能力によってその毒素成分が向かわせられる特定の細胞タイプを選択的に除去するために *in vivo* で使用することができる。細胞阻害剤を形成するためには、本発明による修飾された毒素をキメラ性及びCDR移植抗体を含むモノクローナル抗体と、抗体領域／フラグメント (例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、1本鎖抗体、及びFvあるいは単一可変領域) などに接合することができる。毒素を含む免疫接合体は免疫毒素と表現される。免疫毒素は免疫接合体より融合蛋白質を含んでいる場合の方が多い。

【0201】

20

遊離のシスチン残基を含む遺伝子的に操作されたモノクローナル抗体に接合され修飾毒素は本発明に含まれる。例えば、Fab'とF(ab')₂断片は本発明において有用で、W089/00999号公報に開示されており、引用によって本願発明に組み込まれる。

あるいは、修飾毒素をヒト化されたあるいはヒトに遺伝子操作した抗体に接合あるいは融合させることもできる。こうしたヒト化抗体はマウス抗体可変領域から構成することができる。

【0202】

1. 抗体領域

免疫グロブリン・ファミリーの多数のメンバーから得た領域が本発明の範囲に含まれる。Fc領域などのエフェクタ分子と結合するものを含む、抗体中和領域など、特定の抗体からの両方の可変領域が本発明の範囲内含まれる。IgGs、IgMs、あるいはIgAsなどの可変領域など抗体固有コード領域を、抗体中和領域あるいは上に述べた治療用化合物の1つと組み合わせ、毒素などの別の分子とともに用いることができる。

30

【0203】

さらに別の実施の形態で、1つの遺伝子は1本鎖抗体を含んで構成されている場合がある。1本鎖抗体をつくる方法はこの技術分野の当業者には周知である。当業者は、そうした方法に関しては米国特許第5,359,046号明細書 (参照により本明細書に組み入れ) を参照されたい。1本鎖抗体は短いペプチド・リンカーを用いて重い鎖と軽い鎖の可変領域を融合させ、それによって単一の分子上での抗原結合サイトを再構成することによってつくられる。

40

【0204】

1つの可変領域のC末端が15-25アミノ酸ペプチド又はリンカーを介して他のN末端につながっている1本鎖抗体可変フラグメント (scFvs) が、抗原結合あるいはその結合の固有性を重大に破壊せずに開発されている (Bedzyk et al., 1990; Chaudhary et al., 1990)。これらのFvsは天然の抗体の重い鎖及び軽い鎖に存在している定常的な領域 (Fc) を欠いている。1本鎖抗体を用いた免疫毒素は米国特許第6,099,842号明細書に述べられており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0205】

オンコジーン、腫瘍関連抗原、サイトカイン、成長因子、ホルモン、酵素、転写因子そしてレセプタなど広範な分子に対する抗体が考えられている。さらに血清、血管形成因子

50

(VEGE/VPE; β FGF; α FGF; その他)、凝集因子、そして血管形成に必要な内皮抗原 (例えば、V3インテグリン) などに向けられた分泌抗体も考えられる。特に考えられているのは形質転換性成長因子、線維芽細胞成長因子、そして血小板誘導成長因子 (PDGF)、そしてPDGFファミリー・メンバーなどの成長因子である。

【0206】

本発明はさらにその細胞を識別するための細胞表面マーカーを発現するものなど、抗原固有配列の使用を通じて特定の病原に向かったり、あるいは特定の細胞タイプを標的とするなどの組成物を実現する。こうした細胞表現マーカーの例としては、CD4あるいはCD8などの腫瘍結合抗原あるいは細胞タイプ固有マーカーがある。

【0207】

免疫毒素の一部として本発明で用いられる抗体はいずれの抗原にも向かわせることができる。抗原は1つの生物、1つの細胞タイプ、1つの疾病あるいは状態、あるいは1つの病原体に対して特性を示す。抗原の例としては、細部表面細胞蛋白質、例えば腫瘍関連抗原、ウイルス性蛋白質、微生物蛋白質、翻訳後修飾あるいは炭水化物、そしてレセプタなどがある。一般的な腫瘍マーカーには癌胎児性抗原、前立腺固有抗原、泌尿器固有抗原、胎児抗原、チロシナーゼ (p97)、gp68、TAG-72、HMFG、シアリル・ルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、エストロゲン・レセプタ、ラミニン・レセプタ、erb B及びp155などがある。標的とすることができるその他の抗原はEGF及びVEGE、TIE-1及び-2、CD-33、CD38、CD-20、CD-52、GP-240、Lym-1、MMO-2、そしてMMP-9などがある。

【0208】

B. その他の向標的成分

リガンド・レセプタ相互作用を含む蛋白質間の相互作用を媒介する蛋白質の1つの領域の使用が本発明において想定されている。この領域は蛋白質間相互作用の抑制因子あるいは競合因子、さらには特異性向標的モチーフとして用いることも可能であろう。その結果、本発明は体の特定の部位、器官、組織、あるいは細胞に毒素あるいはその他の治療用あるいは診断用ポリペプチドをリクルートするための向標的成分の利用もその範囲内に含むものである。本発明の組成物が向標的モチーフを通じて特定の領域に到達すると、その毒素あるいはその他のポリペプチドが機能を発揮する。

【0209】

向標的成分は蛋白質間相互作用を利用する。それには、レポータトリガンド; レセプタとレセプタ; ポリマー性複合体; 転写ファクター; キナーゼと下流標的; 酵素と基質間など蛋白質同士の相互作用を含んでいる。例えば、リガンド結合領域はリガンドとその同系レセプタ間の蛋白質間相互作用を媒介する。その結果、この領域は外来性リガンド結合を抑制あるいはそれと競合したり、ゲロニン毒素など治療用ポリペプチドに遺伝子操作で取り付けられたリガンド結合領域を認識するレポータを発現するより特異的な細胞タイプに向かわせるために用いることができる。

【0210】

リガンド結合領域の例としては、VEGF/VPF; β FGF; α FGF; 凝集因子、そして血管形成に必要な内皮抗原 (例えばV3インテグリン); 形質転換性成長因子としての成長因子、繊維芽成長因子、コロニー刺激因子、Kitリガンド (KL)、flk-2/flt-3、及び血小板誘導成長因子 (PDGE) 及びPDGFファミリー・メンバー; そしてとりわけMHC分子などの細胞表面レセプタに結合するリガンドなどがある。

【0211】

最も広範に特徴づけが行なわれているリガンドはアジアノオロソムコイド (ASOR) (Wu and Wu, 1987) 及びトランスフェリン (Wagner et al., 1990)。最近、ASORと同じレセプタを認識する合成ネオグリコプロテインが遺伝子伝達媒体として用いられており (Ferkol et al., 1993; Petales et al., 1994)、そして内皮成長因子 (EGF) も扁平上皮乳頭腫細胞に遺伝子を提供するために用いられている (Myers, EP0 0273085)。

【0212】

他の実施の形態で、Nicolau et al., (1987) はリポソームに組み込まれたガラクトース

10

20

30

40

50

末端アシアンガングリオシドであるラクトシルーセラミドを用いて、肝細胞によるインシュリン遺伝子摂取の増大について観察した。前立腺組織への媒介された導入のためのレセプタとして、ヒト前立腺特異抗原 (Watt et al., 1986) を用いることもできる。

【0213】

さらに別の実施の形態で、化合物をその表面に特定の炭水化物を発現している細胞に間接的に結合させるためにレクチン分子を用いることができる。

【0214】

1. サイトカイン

毒素など、治療用ポリペプチドに遺伝子操作で結合することが考えられる別の種類の化合物は、インターロイキン1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、 β -インターフェロン、 α -インターフェロン、 γ -インターフェロン、アンギオスタチン、スロンボスポンディン、エンドスタチン、METH-1、METH-2、Flk2/Flt3リガンド、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、及び腫瘍壊死因子 (TNF) などのインターロイキンとサイトカインなどである。

【0215】

2. 成長因子

本発明の他の実施の形態で、成長因子あるいはリガンドを治療剤と複合化することができる。例としては、TIE、腫瘍関連フィブロネクチン・アイソフォーム、散乱因子、肝細胞成長因子、繊維芽成長因子、血小板因子 (PF4)、PDGF、KITリガンド (KL)、コロニー刺激因子 (CSF)、LIF、そしてTIMPなどに結合するVEGF/VPF、FGF、TGF β 、リガンドなどである。

【0216】

3. 細胞増殖の誘発因子

修飾ゲロニン毒素など本発明の修飾蛋白質との組み合わせで用いることができる別のグループの蛋白質は細胞増殖を誘発する蛋白質である。いくつかの実施の形態で、上記毒素が細胞増殖誘発因子を不活性化できるリボザイムに遺伝子操作で結合され、別の実施の形態では、上記毒素はその誘発因子自体に結合される。あるいは、毒素を細胞増殖誘発因子を認識する抗体に取り付けることもできる。

【0217】

これらの蛋白質すべての共通項は細胞増殖を調節する能力を有していることである。例えば、PDGFの1形態であるsisオンコジーンは分泌成長因子である。オンコジーンは成長因子をコードする遺伝子から発生することはまれにしかなく、そして、現在の時点では、sisだけが唯一の自然発生オンコジーン性成長因子である。本発明の1つの実施の形態で、細胞増殖の特定の誘発因子に向けられた抗センスmRNAが細胞増殖誘発因子の発現を阻止するために用いられる。

【0218】

FMS、ErbA、ErbBそしてneu蛋白質は成長因子レセプタである。これらのレセプタに突然変異を起こさせると、調節機能が失われる。例えば、Neuレセプタ蛋白質の膜横断領域に影響を及ぼすポイント突然変異はneuオンコジーンをもたらす。erbAオンコジーンは甲状腺ホルモンに対して細胞内レセプタから誘発される。修飾されたオンコジーン性ErbAレセプタは内発性甲状腺ホルモン・レセプタと競合して、制御が外れた成長を引き起こすと考えられる。

【0219】

最も大きなタイプのオンコジーンは信号形質導入蛋白質 (例えば、Scr、Abl、及びRas) などである。蛋白質Srcは細胞質蛋白質シロシン・キナーゼで、プロトオンコジーンからオンコジーンへのその形質転換は、いくつかの場合、チロシン残基527での突然変異を介して起きる。対照的に、GTPase蛋白質rasのプロトオンコジーンからオンコジーンへの形質転換は、1つの例で、その配列のアミノ酸12でのヴァリンからグリシンへの突然変異によって起き、ras GTPase活性の低下をもたらす。

【0220】

蛋白質Jun、Fos及びMycは転写因子としての核機能に直接影響を及ぼす蛋白質である。

【0221】

4. 細胞増殖抑制因子

腫瘍抑制因子は過剰な細胞増殖を抑制する機能を発揮する。これらの遺伝子が不活性化されるとその抑制作用が失われ、調節できない増殖が起きる。突然変異体腫瘍抑制因子、あるいは野生種腫瘍抑制因子を認識する抗体に毒素を取り付ける可能性が考えられる。あるいは、1つの毒素をその腫瘍抑制因子全体あるいは一部に結合させることも可能である。腫瘍抑制因子p53、p16及びC-CAMについて以下に述べる。

【0222】

高レベルの突然変異体p53は化学的腫瘍形成、紫外線、あるいはいくつかのウイルスで形質転換された多くの細胞で見いだされる。p53遺伝子は広範なヒトの腫瘍で突然変異による非活性化の標的となることが多く、通常のヒトの癌において最も頻繁に突然変異される遺伝子であることがすでに証拠付けられている。ヒトNSCLC(Hollstein et al., 1991)及びその他の広範な腫瘍で、50%以上が突然変異されている。 10

【0223】

p53遺伝子は大型T抗原及びE1Bなどのホスト蛋白質と錯体を形成することができる393アミノ酸燐蛋白質をコードする。この蛋白質は通常の組織及び細胞で見出されるが、その濃度は形質転換蛋白質あるいは腫瘍組織で見いだされる量に比較すると極わずかである。

【0224】

野生種p53は多くの細胞タイプにおいて重要な成長調節因子である。ミスセンス変異はp53遺伝子には通常見られ、オンコジーンの形質転換能力に重要な役割を果たしている。ポイント突然変異で促進される1つの遺伝子変化が腫瘍形成性p53をつくりだす場合がある。しかしながら、他のオンコジーンと違って、p53ポイント突然変異は少なくとも30の異なったコドンで起き、同型接合体に還元されることなく細胞表現形における変化を引き起こす優勢対立遺伝子をつくり出すことが知られている。さらに、これら多くの優勢ネガティブ対立遺伝子の多くが生物において許容されており、生殖細胞系に送られているようである。種々の突然変異体対立遺伝子は軽度の機能障害性から強力な浸透性優勢ネガティブ対立遺伝子までの範囲にわたっているようである(Weinberg, 1991)。 20

【0225】

別の細胞増殖抑制因子はp16である。真核性細胞サイクルの主要な遷移はサイクリン依存キナーゼ、あるいはCDKによって引き起こされる。1つのCDK、サイクリン依存キナーゼ4(CDK4)は、G₁を通じて細胞サイクル過程を調節する。この酵素の活性は後期G₁でRbをホスホリル化することかも知れない。CDK4の作用は活性化サブユニット、D-タイプ・サイクリンによって制御され、p16^{INK4}は生化学的に、CDK4に特異的に結合してその作用を抑制し、従ってRbホスホリル化を調節する蛋白質であると特徴づけられている(Serrano et al., 1993; Serrano et al., 1995)。p16^{INK4}蛋白質はCDK4抑制因子(Serrano, 1993)であるから、この遺伝子の欠失はCDK4の活性を増強し、Rb蛋白質のホスホリル化をもたらす。p16はCDK4の作用を規制することも知られている。 30

【0226】

p16^{INK4}蛋白質はp16^B、p19、p21^{WAF1}、及びp27^{KIP1}も含むCDK抑制性蛋白質の新しいタイプに属している。p16^{INK4}遺伝子は多くの腫瘍タイプでしばしば欠失が認められるクロモソームである9p21にマップする。p16^{INK4}の同型接合性欠失及び突然変異はヒト腫瘍細胞株においてしばしば観察される。この事実は、p16^{INK4}遺伝子が腫瘍抑制因子遺伝子であることを示唆している。しかしながら、こうした解釈は、p16^{INK4}遺伝子の変質の頻度が一次非培養腫瘍においては、培養された細胞株よりずっと低いという観察結果と矛盾している(Caldas et al., 1994; Cheng et al., 1994; Hussunssian et al., 1994; Kamb et al., 1994; Mori et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Nobori et al., 1995; Orloff et al., 1994; Apap et al., 1995)。プラスミド発現ベクターによるトランスフェクションによる野生タイプp16^{INK4}機能の回復はいくつかのヒト癌細胞株によるコロニー形成を減少させた(Okamoto, 1994; Arap, 1995)。 40

【0227】

本発明によって用いることができるその他の遺伝子はRb、APC、mda-7、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-1、MEN-II、zac1、p73、VHL、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合体、p21/p27融合体、抗トロンボニン性遺伝子（例えば、COX-1、TEPI）、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、EIA、p300、血管形成に関与する遺伝子（例えば、VEGF、FGF、トロンボスポンディン、BAI-1、GDAIF、あるいはそれらのレセプタ）及びMCCなどである。

【0228】

5. プログラムされた細胞死の調節因子

アポトーシス、あるいはプログラムされた細胞死は通常の胎児成長、成人の組織におけるホメオスタシスの維持、そして腫瘍形成抑制のために不可欠なプロセスである（Kerr et al., 1972）。Bcl-2ファミリーの蛋白質とICE状プロテアーゼはその他の系におけるアポトーシスの重要な調節因子であると同時にエフェクタであることが示されている。濾胞性リンパ腫との関連で発見されたBcl蛋白質はアポトーシスの制御と種々のアポトーシス性刺激に対応した細胞生残増強において顕著な役割を果たしている（Bakhshi et al., 1985; Cleary and Sklar, 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto and Croce, 1986）。進化上保存されているBcl-2蛋白質は現在では関連蛋白質のメンバーであると認められており、死作用因子あるいは死拮抗因子として分類することができる。

【0229】

Apo2リガンド（Apo2L、TRAILとも呼ばれる）は腫瘍壊死因子（TNF）サイトカイン・ファミリーのメンバーである。TRAILは多くのタイプの癌細胞で急速なアポトーシスを起こすが、正常な細胞に対しては毒性は示さない。TRAIL mRNAはさまざまな組織で発生する。ほとんどの正常な細胞はTRAIL細胞障害性作用に対して抵抗性を有しているようであり、このことはTRAILによるアポトーシス誘発から護ることができるメカニズムの存在を示唆している。デス・レセプタ4（DR4）と呼ばれるTRAILに関して最初に述べられたレセプタは細胞質『死領域』を有しており、DR4はTRAILによって運ばれるアポトーシス信号を発信する。TRAILに結合するさらに別のレセプタが確認されている。DR5と呼ばれる1つのレセプタは、細胞質死領域を含んでおり、DR4とほぼ同様のアポトーシスを信号は発信する。DR4とDR5 mRNAは多くの組織及び腫瘍細胞株で発現される。最近、Dcr1及びDcr2など、TRAILがDR4及びDR5を通じてアポトーシスを誘発するのを妨げるおとりレセプタが確認されている。これらのおとりレセプタは従って細胞表面で直接プロアポトーシスサイトカインに対する感受性を規制する新しいメカニズムを示している。通常の組織でこれらの抑制性レセプタが優先的に発現されることは、TRAILが通常の細胞には害を及ぼさずに癌細胞でアポトーシスを誘発する抗癌剤として有益である可能性を示唆している（Marters et al., 1999）。

【0230】

その発見に続いて、Bcl-2が種々の刺激で引き起こされる細胞死を抑制する機能を有していることが示された。また、現在では、共通の構造を有すると同時に配列類似性も有するBcl-2細胞死規制蛋白質のファミリーが存在していることも明らかになっている。これらの異なったファミリーはBcl-2と類似した機能を有しているか（例えば、Bcl_{XL}、Bcl_W、Bcl_S、Mcl-1、Al、Bfl-1）、あるいはBcl-2機能にさからって細胞死を促進するか（例えば、Bax、Bak、Bim、Bid、Bad_L、Harakiriなど）のいずれかであることも示されている。TRAILを含むこれらのポリペプチドのいずれも、あるいはアポトーシスを誘発するか促進する他のいずれのポリペプチドも毒素に遺伝子操作で結合させることができ、あるいはこれらのポリペプチドを認識する抗体を毒素に取り付けることが可能であると考えられる。

【0231】

IV. 修飾蛋白質及びデザイナー毒素をつくる方法

本発明は蛋白質の抗原性領域を識別する方法、抗原性がより低い領域を識別する方法、

天然の蛋白質と同等の活性を有するより抗原性の低い蛋白質をつくる方法、そして抗原性及び活性を評価し、判定する方法をその範囲に含むものである。

【0232】

A. 抗原性領域

前のいくつかのセクションで抗体と、抗体検出方法について一般的な検討を行なった。

『抗原性領域』という用語は、抗体あるいはT-細胞レセプタによって特異的に認識される部分を指している。『より抗原性が低い』とは、蛋白質、あるいは1つの蛋白質の1つの領域がより低い抗体反応を示すこと、あるいはより少数の抗体（ポリクローナル）によって認識されること、あるいはさらに1つの抗体との結合関係が減少することを意味している。

10

【0233】

抗原性とは特定の生物に対するものである。本発明の実施例の多くで、その生物とはヒトであるが、抗原性は他の哺乳動物、例えばサル、ゴリラ、ウシ、ウサギ、マウス、ヒツジ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギなど、及び鳥類やその他の免疫反応を示す生物との関連でも論議することは可能である。

【0234】

本発明のいくつかの実施の形態において、ポリクローナル血清が特定の蛋白質における抗原性領域を識別するために、前に述べた免疫検出方法と組み合わせて用いられている。ポリクローナル血清は特定の蛋白質に職業的に被爆されていると思われる作業員、特定の蛋白質や生物に対する抗体の存在を伴う、あるいはそれによって引き起こされる状態、あるいは疾病を有していると疑われる、あるいは診断される患者、特定の蛋白質や生物に対する抗体の存在を伴う状態や疾病で治療を受けたことがある患者、そして無作為な個体などを含む種々の供給源から回収することができる。

20

【0235】

B. データベース

本発明のいくつかの実施の形態で、特定の蛋白質における推定抗原性領域が識別された後、蛋白質データベースが用いられる。そして1つの領域がその領域に対してより低い免疫応答が望まれる生物からの蛋白質配列を含んだデータベースとの比較が行なわれる。そうした多数のデータベースはGenBank、GenPept、SwissProt、PIR、PRF、PDBなどを含めて、商業的あるいは公共的にも利用することができ、それはらすべてNational Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)で利用することができる。

30

【0236】

C. 抗原性領域の除去及び/又は置換

抗原性領域が識別されたら、それを除去して、一部切断された蛋白質をつくることができる。あるいは、その領域をより抗原性が低いと思われる領域と置換することができる。

【0237】

その領域を除去するためには、ポリペプチドをプロテイナーゼで切断するか、あるいはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを操作してその抗原性領域を取り除くことができる。また、その領域は制限酵素あるいはDNAaseなどの通常の組み換えDNA技術を用いてそのポリヌクレオチドから除去することができる。

40

【0238】

この領域は代替アミノ酸で置換することもできる。『置換』とは、特定の位置のアミノ酸が異なったアミノ酸残基あるいは修飾アミノ酸によって置き換えられていることを意味する。これはいろいろな方法で行なうことができる。この領域を最初に除去して、次に代替領域をポリヌクレオチド又はポリペプチド内に組み込むことができる。組み換えDNA技術を用いて、特定のコード領域を当業者に周知のポリヌクレオチド内に組み込むこともできる。あるいは、抗原領域をサイト固有突然変異発生技術を用いて突然変異させることも可能である。

【0239】

50

修飾蛋白質をつくりやすくするためか、あるいは、抗原性の低下、その蛋白質の安定性の増強、その蛋白質の活性の増強、その蛋白質の活性の低下などいずれかの方法でその蛋白質を改良する目的で、抗原領域のいずれかの側に側鎖しているアミノ酸を除去したり、置換することができる。さらに、抗原性領域、側鎖領域、あるいはその両方から複数のアミノ酸を除去したり置換したりすることができる。正確に言えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000あるいはそれ以上のアミノ酸を除去したり置換したりすることができる。

【0240】

修飾された蛋白質の抗原性あるいは活性を判定するためのアッセイを、例えば免疫検出方法について述べた箇所でも述べられており、それらは当業者には周知である。特定の蛋白質に対する適切な評価方法はその蛋白質によって変わるであろう。酵素アッセイは、例えば、1つの酵素の活性を評価するのに適切であろう。当業者であれば、天然の蛋白質との比較で修飾された蛋白質の活性を評価することができるであろう。上に述べたように、修飾された蛋白質は別のポリペプチド、ペプチド、あるいは蛋白質に取りつけ（接合、あるいは融合）られる。当業者であれば、ポリペプチド成分の1つあるいは複数の活性に基づいて本発明によるいずれの修飾された接合又は融合蛋白質も評価できるであろう。

【0241】

V. 組み合わせ療法

本発明によるいずれの治療用組成物もその有効性を増大するためには、これらの組成物を特定の疾病又は状態を治療するのに有効なその他の作用剤と組み合わせることが望ましいであろう。微生物病原、AIDS、自己免疫疾患、癌を含む高増殖性不全、白血病、関節炎、炎症性疾患、心臓血管疾病あるいは状態、病原菌による疾病及び状態、あるいは糖尿病など、広範な疾病あるいは状態の治療が考えられる。AIDS、癌、及びその他の高増殖性不全は特に向いていると考えられる。修飾蛋白質を含む組成物をA、二次作用剤をBとして、以下に示すような治療法の種々の組み合わせが想定される。

A/B/A、B/A/B、B/B/A、A/A/B、A/B/B、B/A/A、A/B/B/B、B/A/B/B、B/B/B/A、B/B/A/B、A/A/B/B、A/B/A/B、A/B/B/A、B/B/A/A、B/A/B/A、B/A/A/B、A/A/A/B、B/A/A/A、A/B/A/A、A/A/B/A

【0242】

A. 高増殖性疾患の治療

高増殖性疾患には癌などがあり、抗癌剤や外科的手術などさまざまな治療法がある。抗癌剤は、例えば癌細胞を殺したり、癌細胞内でアポトーシスを誘発させたり、癌細胞の成長速度を低めたり、転移の発生あるいはその数を減少させたり、腫瘍のサイズを小さくしたり、腫瘍の成長を抑制したり、腫瘍あるいは癌細胞に対する血液の供給を減少させたり、癌細胞あるいは腫瘍に対する免疫応答を促進したり、癌の進行を阻止あるいは抑制したり、あるいは癌をもつ個体の寿命を長くしたりなど、癌に対してネガティブな影響を及ぼすことができる。

【0243】

抗癌剤は生物学的作用剤、化学治療剤、あるいは放射性治療剤などがある。より一般的には、これら他の組成物はその細胞を殺したり、あるいはその増殖を抑制するのに有効な量の組み合わせ量で提供される。このプロセスはそれらの細胞を発現構成物及び作用剤及

び複数の因子と同時に接触させるステップを含んでいる。このことは、その細胞を療法の作用剤を含む1つの組成物あるいは医薬品製剤に接触させたり、あるいはその細胞を2つの異なった組成物や医薬品と同時に接触させたりすることによって行なわれる。後者の場合、一方の組成物が発現構成物を含んでおり、他方が第二の作用剤を含んでいる。

【0244】

化学療法や放射線治療剤に対する腫瘍細胞の抵抗は臨床腫瘍学における大きな問題となっている。現在の癌研究の1つのゴールは化学及び放射線療法を遺伝子治療と組み合わせてその有効性を改善する方法を見つけることである。例えば、ヘルペス・シンプレックス・チミジン・キナーゼ (HS-tK) 遺伝子は、レトロウイルス・ベクター系で脳腫瘍に導入されると、抗ウイルス剤ガンシクロビルに対する感受性を誘発させる (Culver et al., 1992)。本発明においては、修飾された蛋白質による治療を、同様に、その他のアポトーシスあるいは細胞サイクル調節剤に加えて、化学治療、放射線治療、免疫治療あるいはその他の生物学的介入と組み合わせて用いることが想定されている。

【0245】

あるいはまた、遺伝子治療あるいは修飾蛋白質の蛋白質投与を他の薬品による治療の前、あるいは後に、数分から数週間の時間的感覚をおいて実施してもよい。他の薬品や発現構成体を細胞に個別に適用する実施の形態においては、その薬品と発現構成体はその細胞に対して有利に組み合わせられた効果を発揮するために、それぞれの投与の間にそれほどの長い期間を置かないようにするであろう。そうした場合、両方の投与形態の間に置かれる時間的間隔は12-24時間、より好ましくは約6-12時間以内であろう。しかしながら、いくつかの状況では、有効な治療を行なうために、その時間的間隔を延長する場合があります、その場合それぞれの投与の間に数日 (2、3、4、5、6又は7) から数週間 (1、2、3、4、5、6、7、あるいは8週間) に及ぶ。

【0246】

患者に対する本発明の治療用発現構成体の投与は、ベクターの毒性があれば、それを考慮に入れて化学療法剤を投与するのと同じ一般的手順に従って行なわれる。治療サイクルは必要に応じて繰り返されることが予想される。上に述べた高増殖性細胞治療と組み合わせて、種々の標準的な治療や外科的両方を適用することも考えられる。

【0247】

a. 化学療法

癌治療は化学及び放射線の両方の治療法のさまざまな組み合わせを含んでいる。組み合わせ化学療法は、例えば、シスプラチン (CDDP)、カルボプラチン、プロカルボジン、メクロレタミン、シクロホスファミン、カンプトセチン、イフォスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロスレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドクソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン、ミトマイシン、エトポシド (VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン・レセプタ結合剤、タキソール、ゲムシタビエン、ナヴェルビン、ファルネシル-蛋白質トランスフェラーゼ抑制剤、トランスプラチニウム、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、及びメトトレキセート、テマゾロミド (DTICの水溶液形態)、あるいは上に述べたものの類似物、あるいはそれらの誘導体。生物学的治療と化学療法の組み合わせは生化学療法として知られている。

【0248】

本発明のいくつかの実施の形態で、化学療法剤を毒素分子などの修飾蛋白質に遺伝子操作で取り付けることが考えられる。

【0249】

b. 放射線治療

DNA損傷を引き起こし、広範に使われている他の作用因子としては、一般的に γ -光線、X線、及び/又は腫瘍細胞への放射性同位元素の直接導入として知られているものである。短波あるいは紫外線照射などその他の形態のDNA損傷因子も想定されている。これらの作用因子のすべてはDNA、DNA前駆体、DNAの複製及び補修、そしてクロモソ

10

20

30

40

50

ームの集合及び保持に広範な影響を及ぼす可能性が高い。X線の用量は長期間（3－4週間）の場合50－200レントゲン、一回の照射であれば2000－6000レントゲンである。放射性同位元素の場合の用量範囲は非常に幅広く、その同位元素の半減期、放射される放射線の強度とタイプ、そして腫瘍細胞による摂取量に依存する。

【0250】

『接触させる』及び『露出させる』という用語は、細胞にあてはめた場合、本明細書では治療用構成体及び化学療法又は放射線療法剤が標的細胞に導入され、あるいは標的細胞に直接並べて配置されることを意味する。細胞を殺すか静止状態にするには、両方の作用剤をその細胞を殺すか、あるいはそれが分割するのを防ぐのに有効な量だけ細胞に導入する。

10

【0251】

c. 免疫治療

免疫療法は、一般的には癌細胞を標的としてそれを破壊するための免疫エフェクタ細胞及び分子の使用に基づいている。免疫エフェクタは、例えば、腫瘍細胞の表面上での一定のマーカーに対する抗体である。その抗体だけでも治療のエフェクタとして機能する場合もあるが、実際に細胞致死を起こすためには他の細胞を利用する場合もある。特許請求されている組成物に関して上に述べたように、交代も薬品（化学治療剤、放射核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）に接合することができ、単に向標的剤として機能を果たす場合もある。あるいは、エフェクタは腫瘍細胞標的と直接的、あるいは間接的に相互作用する表面分子を有するリンパ球であってもよい。種々のエフェクタ細胞は細胞阻害性T細胞及びNK細胞を含んでいる。治療形態の組み合わせ、つまり、細胞阻害作用と免疫活性化の組み合わせも癌の治療においては治療効果をもたらす可能性があり、従って、免疫療法を本発明のいずれかの治療用組成物と組み合わせて用いることも考えられる。例えば、2つの異なった免疫毒素を個体に投与したり、1つの免疫毒素を別の免疫治療化合物と組み合わせて癌などの疾病の治療に用いることも可能である。

20

【0252】

免疫療法の1つの実施形態で、腫瘍細胞は標的に向かい易い、つまり他の細胞のほとんどでは存在しない何らかのマーカーを有している必要がある。多くの腫瘍マーカーが存在しており、それらのいずれも上に述べたような本発明においては標的に向かわせるのに適している。免疫療法のその他の実施形態はアポトーシス促進効果を免疫刺激効果と組み合わせる方法である。しかしながら、IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマーIFNなどのサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8などのケモカイン、そしてFLT3リガンドなどの成長因子などその他の免疫刺激性分子も存在している。免疫刺激性分子を蛋白質としてであれ、あるいは腫瘍に向けられた免疫毒素との組み合わせで使うにせよ、抗腫瘍効果を増強してくれる可能性がある。

30

【0253】

前にも述べたように、現在研究中あるいはすでに用いられている免疫療法の実例は免疫補助剤（例えば、Mycrobacterium bovis、Plasmodium falciparum、ジニトロクロロベンゼン及び芳香性化合物）（米国特許第5,801,005号明細書；米国特許第5,739,169号明細書；Hui and Hashimoto, 1998；Christodoulides et al., 1998）、サイトカイン療法（例えば、インターフェロン、 α 、 β 、 γ 、IL-1、GM-CSF及びTNF）（Bukowski et al., 1998；Davidson et al., 1998；Hellstrand et al., 1998）、遺伝子治療（例えば、TNF、IL-1、IL-2、p53）（Qin et al., 1998；Austin-Ward and Vallasca, 1998；米国特許第5,830,880及び米国特許第5,846,945号明細書）そしてモノクローナル抗体（例えば、抗ガングリシドGM2、抗HER-2、抗p185）（Pietras et al., 1998, Hanibuchi et al., 1998, 米国特許第5,824,311号明細書）などである。ヘルセプチン（トランスツズマブ）はHER-2-neuレセプタをブロックするキメラ性（マウス－ヒト）モノクローナル抗体である。それは、抗腫瘍活性を有しており、悪性腫瘍の治療での使用の承認を受けている（Dillman, 1999）。

40

【0254】

50

i. 受動的免疫療法

癌の受動的免疫療法には多数の異なる方法が存在する。それらは広い観点から以下のように分類される。抗体だけの注入、毒素や化学治療剤に結合された抗体の注入、放射性同位元素に結合された抗体の注入、抗イディオタイプ抗体の注入、そして、最後に、骨髄の腫瘍細胞のパージング。

【0255】

好ましくは、受動的免疫療法においてはヒトのモノクローナル抗体が用いられるが、それはそれらが患者でほとんど、あるいはまったく副作用を起こさないからである。しかしながら、その応用は、それらが乏しいことと、病変箇所でも局所的にしか投与できないことからある程度限られたものとなっている。ガングリオシド抗原に対するヒト・モノクローナル抗体は皮膚反復性黒色腫の患者に病変内投与されている (Irie and Morton, 1986)。1日1回、あるいは1週間に1回病変内注入を行った後、10名の患者のうち7名の患者で退縮が認められた。他の研究で、2つのヒト・モノクローナル抗体の病変内注入によって、中程度の成功が得られた (Trie et al., 1989)。

10

【0256】

2つの異なる抗原に向けられた複数のモノクローナル抗体を投与するか、あるいは複数の抗原特異性を有する抗体を投与することが有利な場合もある。処理手順はbajorin et al (1988)が述べているようなリンパ球あるいはその他の免疫エンハンサの投与を含む場合もある。ヒト・モノクローナル抗体の開発については本明細書の別の箇所で詳細に延べてある。

20

【0257】

ii. 能動的免疫療法

能動的免疫療法においては、抗原性ペプチド、ポリペプチドあるいは蛋白質、あるいは同質又は異質遺伝子型腫瘍細胞組成物又は『ワクチン』が、通常は、異なるバクテリア性補助剤と共に投与される (Ravindranath & Morton, 1991; Morton & Ravindrahath, 1996; Morton et al., 1992; Mitchel et al., 1990; Mitchel t al., 1993)。黒色腫の免疫療法においては、高IgM抗体反応を示す患者は、その反応が低い患者と比較すると生残率が高い傾向が認められる (Morton et al., 1992)。IgM抗体は一過性抗体であることが多く、抗ガングリオシドあるいは抗炭水化物抗体だけが例外であるようである。

【0258】

30

iii. 養子免疫療法

養子免疫療法においては、患者の体内を循環しているリンパ球、あるいは腫瘍浸潤リンパ球をin vitroで単離して、IL-2で活性化させるか、あるいは腫瘍壊死の遺伝子を形質導入して、再投与する (Rosenberg et al., 1988; 1989)。これを達成するためには、動物あるいはヒトの患者に対して、免疫学的に有効な量の活性化されたリンパ球を本明細書に述べられている補助剤を組み込んだ抗原性ペプチド組成物と組み合わせて投与する。活性化されたリンパ球は最も好ましくは血液あるいは腫瘍サンプルから事前に分離され、in vitroで活性化 (あるいは拡張)されたその患者自身の細胞である。この形態の免疫療法はいくつかの例で黒色腫や腎臓腫瘍の退縮をもたらしたが、反応を示した患者の数は、反応を示さなかった患者と比較すると少なかった。

40

【0259】

d. 遺伝子

さらに別の実施の形態で、二次的治療として遺伝子治療が行われ、この例では治療用ポリペプチドが修飾ポリペプチドあるいは修飾ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与するより前、あるいは後、あるいはそれと同時に投与される。あるいは、2つの異なる治療用ポリペプチド分子をコードする1つのベクターを用いる場合もある。本発明では種々の蛋白質の利用が考えられており、それらの一部については上に述べた。例えば、癌細胞に対する野生種腫瘍抑制因子を提供するために遺伝子療法を用いることができる。

【0260】

50

e. 手術

癌患者の約60%は何らかの手術を受け、それには予防的、診断的あるいはステージング、治療的及び一時的目的のための手術などである。治療的手術は、本発明の治療、化学治療、放射線治療、ホルモン治療、遺伝子療法、免疫療法及び/又はその他の代替療法と組み合わせる用いられる癌療法である。

【0261】

治療的手術には切開が含まれ、癌組織の全部あるいは一部を物理的に除去、切除、あるいは破壊する。腫瘍切除は腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを意味している。腫瘍切除に加えて、手術による治療にはレーザー手術、冷凍手術、電子手術、顕微鏡制御手術（Mohs手術）などがある。さらに、本発明を表層癌、前癌、あるいは同じ量の正常組織の除去と組み合わせる用いられることも考えられる。 10

【0262】

癌細胞、組織、あるいは腫瘍の一部を切除すると、体に空洞が形成される。その治療は灌流、直接注入、あるいは追加的抗癌療法の局所的適用などによって行われる。そうした治療は、例えば、1、2、3、4、5、6、7日毎に1回、あるいは1、2、3、4および5週間に1回、あるいは1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、あるいは12ヶ月毎に1回の割合で繰り返される場合もある。これらの治療は用量を変えて行われる場合もある。

【0263】

f. その他の作用剤

治療の有効性を増大するためにその他の作用剤を本発明と組み合わせる用いられることも考えられる。これらの作用剤には免疫調整剤、細胞表面レセプタ及びGAP結合のアップレギュレーションをもたらす作用剤、細胞増殖抑制及び分化剤、細胞接着の抑制剤、アポトーシス誘発因子に対する高増殖性細胞の感受性を増強する作用剤、あるいはその他の生物製剤などである。免疫調節剤には腫瘍壊死因子；インターフェロン・アルファ、ベータ、及びガンマ；IL-2及びその他のサイトカイン；F42K及びその他のサイトカイン類似物；あるいはMIP-1、MIP-1ベータ、MCP-1、PANTES、及びその他のケモカインなどである。さらに、Fas/Fasリガンド、DR4あるいはDR5/TRAIL(Apo-2リガンド)などそのリガンドの細胞表面レセプタのアップレギュレーションが高増殖性細胞に対するオートクリンあるいはパラクリン効果を確立することで本発明の抗癌能力をさらに増強することも考えられる。GAP結合の数を増やすことで細胞内信号発生を増大させると、隣接する高増殖性細胞群に対する抗高増殖性効果が増大することが考えられる。1つの実施の形態で、細胞成長抑制あるいは分化剤を本発明と組み合わせる用いて、これらの治療の抗高増殖性効果を向上させることもできる。細胞接着の抑制剤も本発明の有効性を向上させると考えられる。細胞接着抑制剤の実例は、病巣接着キナーゼ（FAK）抑制剤及びロバスタチンである。抗体c225など、アポトーシスに対する高増殖性細胞の感受性を増大させるその他の作用剤を本発明と組み合わせる用いて、治療効果を向上させることも考えられる。 30

【0264】

細胞阻害性化学療法剤の導入後、癌治療において多くの前進があった。しかしながら、化学療法の結果の1つは薬品抵抗性表現型が形成／獲得されたこと、及び複数の薬品抵抗性の形成が示されるようになったことである。薬品抵抗の形成はそうした腫瘍の治療における重大な障害となっており、従って、遺伝子治療など別の方式を開発するはっきりしたニーズが存在している。 40

【0265】

多数の研究者による研究が、TRAILに対して抵抗性を示す腫瘍細胞は薬品／サイトカインが毒性を示すレベル以下の濃度で投与することで感作化させることができ、感作化された腫瘍細胞はTRAILによってほとんど殺される（Bonavida et al., 1999; Bonavida et al., 2000; Gliniak et al., 1999; Keane et al., 1999）。さらに、CPT-11あるいはドクソルビシンなどの化学療法剤をTRAILと組み合わせると、抗腫瘍活性が増強され、アポトーシスが增大する。これらの効果の一部はTRAILあるいは同系レセプタのアップレギュレ 50

ーションによって媒介されている可能性があり、その他は媒介されていない。

【0266】

化学療法、放射線治療あるいは生物療法と組み合わせて用いるためのもう1つの形態の療法は患者の組織を（最大106°Fまでの）高温に露出させる手順である加温療法である。局所的、領域的、あるいは全身的加温療法の実施においては外部的あるいは内部的加熱装置が用いられる。局所的加温療法は腫瘍など、小さな領域に熱を適用する。熱は身体外の装置から腫瘍に向けた高周波によって外部的に発生させることができる。内部的な熱は細い加熱ワイヤあるいは温水を満たした中空チューブ、埋め込み短波アンテナ、あるいは無線周波数電極などの無菌プローブを用いて発生させる。

【0267】

領域療法のためには患者の器官あるいは手足を加熱するが、これは磁石など高いエネルギーを発生させる装置を用いて行われる。あるいは、患者の血液の一部を取り出して、加熱してから内部的に加熱される領域に戻す方法も考えられる。癌が体全体に広がっている場合は、全身加熱を実施することも考えられる。温水毛布、加熱ロウ、誘導性コイル、あるいは加熱室もこの目的のために用いることができる。

【0268】

ホルモン療法も本発明と組み合わせたり、上に述べたその他の癌療法と組み合わせることができる。ホルモンの使用は乳癌、前立腺癌、卵巣癌、あるいは子宮頸部癌などある種の癌の治療で、テストステロンあるいはエストロゲンなどのある種のホルモンの効果を低下させたり、あるいは阻止するために用いることができる。この治療は1つの治療方式として、あるいは転移の可能性を低下させるために、少なくとも1つの他の療法と組み合わせる用いられることが多い。

【0269】

B. ウイルス病原体

もちろん、本発明による組成物及び方法はウイルス性病原の治療と診断にも適用できる。例えば、本発明をHIV感染で起こされるAIDSの治療に用いることが考えられる。従って、本発明は従来の療法と組み合わせることができる。一部のそうした療法について以下に述べる。

【0270】

1. AZT

AIDS治療のための良く知られた伝統的な療法はゾビドブジン（Burroughs WellcomeからのAZTTM）の使用を含んでいる。これはHIV逆転写酵素を抑制することでHIV複製を阻止するジデオキシボヌクレオシドとして知られる1つのタイプのヌクレオシド類似物である。抗AIDS薬ジドブジン（AZTとしても知られている）も一定の状況で、Burger et al.(1993)が述べているように、リファンピンと組み合わせる用いることができる。

【0271】

ここで述べられている組成物及び方法はウイルス複製を抑制するように設計されたAZT及び/又はプロテアーゼ抑制剤など、他の形態の療法と組み合わせる白血球を望ましいレベルに維持させることで特に有効性を発揮する。この方法では、患者において抗ウイルス治療が効果を示すために一定の時間が必要である。

【0272】

2. HAART

新しい組み合わせ薬剤療法はHIV感染患者の治療において有望な結果を示している。強力な抗HIV薬品と組み合わせた治療は『高活性抗レトロウイルス治療』（HAART）と呼ばれており、HIV病の4つの段階すべてで、HIVに感染された人々において、より優れた臨床効果、より長い生存期間、そして生活の質の向上をもたらしている。HAARTの実例としては2つのヌクレオシド類似物（AZT/ddI、d4T/ddI、AZT/ddC、AZT/3TC、あるいはd4T/3TC）と組み合わせたプロテアーゼ抑制剤（indinavir、nelfinavir、ritonavir、ritonavir/saquinavir、あるいはsaquinavir）などである。

【0273】

VI. 医薬品組成物及び投与経路

本発明は（融合蛋白質を含む）修飾蛋白質をコードする核酸分子、及び他の蛋白質性化合物あるいは小型分子に接合できる修飾蛋白質の利用を想定している。いくつかの実施の形態においては、医薬品組成物が個体に投与される。本発明の別の実施形態は有効な量の水性組成物を投与するステップを含んでいる。本発明の別の実施の形態で、免疫毒素としての修飾ゲロニンが特に想定されている。そうした組成物は通常、薬学的に許容できる基質あるいは水性媒体に溶解、あるいは分散される。さらに、そうした化合物は治療される疾病や状態に応じてその他の治療と組み合わせて実施することもできる。AIDSの治療はHAARTあるいはAZT、又はその両方の投与を含む場合があり、癌の治療は手術や、化学療法、放射線療法、免疫療法、あるいはホルモンなどと併用される場合もある。

10

【0274】

A. 投与経路

当業者であればin vivo及びex vivo状況で遺伝子導入をどのように行なうかはよく知っているであろう。ウイルス性ベクターとしては、通常、ウイルス・ベクター株が用意される。ウイルスの種類と達成される力価に基づいて、 $1-100$ 、 $10-50$ 、 $100-1000$ 、あるいは最大 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 個の感染性ウイルス粒子を患者に投与する。相対的な摂取効率を比較してリポソーム及びその他の非ウイルス性製剤にも同様の数字を適用することができる。薬学的に許容される組成物の製剤について以下に述べる。

【0275】

20

『薬剂的に許容される』あるいは『薬学的に許容される』という用語は、動物、ヒトなどに投与された場合に悪影響を及ぼす、あるいは対立的、その他の望ましくない反応を起こさない分子構成あるいは組成物を指している。ここで用いられる場合、『薬剂的に許容される基質』とは溶剤、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗黴剤、等張及び吸収遅延剤などのすべて、あるいはその一部を含んでいる。薬剂的に活性のある物質のためにこうした媒体あるいは作用剤を用いることはこの技術分野では良く知られている。活性成分と共存性がない従来の媒体や作用剤を除いて、治療剤でのその利用が考えられる。他の抗癌剤など補助的な活性成分もそうした組成物に組み込むことができる。

【0276】

静脈あるいは筋肉内注射用のものなど、全身的投与用に調製された化合物に加えて、薬剂的に受け入れ可能な他の形態は、例えば、経口投与のための錠剤又はその他の固形製剤；ゆっくり放出されるカプセル；及びクリーム、ロケーション、うがい薬、吸入剤など現在用いられているその他の形状である。

30

【0277】

本発明による活性化合物は、例えば、静脈、筋肉内、胸郭内、皮下、あるいは腹膜内経路などを介しての注射用に製剤化されたものなど、全身的投与のために製剤化することができる。MHCクラス1分子の発現を増大させる1つ、あるいは複数の化合物を含む水性組成物の調製は本開示に照らせば、当業者には自明であろう。通常、そうした組成物は液体溶液か懸濁液のいずれかの形態の注射剤；注射前に液体を加えて溶液や懸濁液をつくるのに適した固形状；そしてそれらの製剤をエマルジョン化することもできる。

40

【0278】

遊離塩基あるいは薬学的に許容される塩などの活性化合物の溶液をヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水で調製することもできる。グリセロール、液体ポリエチレン・グリコール、及びそれらの混合物及びオイルで分散剤を調製することも可能である。通常の保管及び使用条件下では、これらの製剤は微生物の成長を防ぐための保存剤を含んでいる。

【0279】

注射としての使用に適した薬剤形状は滅菌水溶液あるいは分散剤、セサミ・オイル、ピーナッツ・オイル、あるいは水性プロピレン・グリコールを含む製剤；そして無菌注射用溶液あるいは分散液用の無菌パウダーなどである。すべての場合に、その形態は無菌でな

50

ければならず、容易に注射できる程度の流動性を有していなければならない。さらに製造、保管中に安定状態を保たねばならず、細菌や黴などの微生物の汚染作用から護られていなければならない。

【0280】

上記活性化化合物は中性あるいは塩形状で製剤化することができる。薬剂的に許容される塩は酸添加塩（蛋白質の遊離アミノ基で形成される）などであり、例えば、塩酸あるいはリン酸などの無機塩、あるいは酢酸、オキサール酸、タルタル酸、そしてマンデル酸などの有機酸を用いて形成される。遊離カルボキシルで形成される塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、あるいは鉄水酸化物などの無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導する

10

【0281】

基質も、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、ピロピレン・グリコール、及び液体ポリエチレン・グリコールなど）、それらの適切な混合物、さらには植物油を含んだ溶媒、分散媒であってもよい。例えば、レシチンなどのコーティング剤を用いて、分散媒の場合は適切な粒径を保持し、あるいは界面活性剤を用いて適切な流動性を保持することができる。微生物作用の防御は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの種々の抗菌剤、あるいは抗黴剤を用いて達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば砂糖や塩化ナトリウムなどを含んでい

20

【0282】

無菌注射液は必要な量の活性化化合物を必要に応じて上に挙げたようなその他の成分と共に適切な溶媒に組み込んで、ろ過滅菌することで調製することができる。一般的に、分散剤は種々の滅菌された活性成分を基本分散媒と上に述べたもののうち必要な他の成分を含んだ無菌媒体に組み入れることで調製される。無菌注射液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥及び冷凍乾燥法であって、活性成分と事前に滅菌ろ過されたその溶液からさらに望ましい成分を含んだ粉末がつくられる。

【0283】

一部のケースでは、本発明による治療用製剤はクリームやローションなど局所的適用に適した形状でつくることが可能である。これらの形状は皮膚に例えば種々の肉腫など関連した疾病の治療に用いられる。

30

【0284】

本発明による治療用組成物の投与は、そのルールを通じて標的組織に届けることが可能であれば、いずれの一般的なルートを紹介してでもよい。本発明がウイルス性ベクターである場合、最初に考慮しなければならないのはそのベクターによって担持される異種配列のために望ましい場所である。投与経路は経口、鼻腔、舌下、直腸、子宮、あるいは局所などのいずれであってもよい。例えば、黒色腫あるいはAIDS関連皮膚状態、あるいは皮膚状態の治療に有益な異種遺伝子がウイルス・ベクターによって担持されている場合、局所的投与が特に望ましいであろう。あるいは、同所、皮膚内、皮下、筋肉内、腹膜内、あるいは

40

【0285】

一部の実施の形態の場合、患者に対して治療用組成物を継続的に供給するのが望ましい場合もある。静脈あるいは鼻腔内経路の場合、これはドリップ方式で達成できる。局所的な適用の場合、反復的適用が用いられる。種々の方式場合、一定の期間、限定的ではある

50

が一定量の治療用薬剤を提供する遅延放出製剤を用いることも可能であろう。内部的適用の場合、例えば、異種核酸部分を担持したウイルス・ベクターを用いて問題の領域を継続的に灌流させるのが好ましい場合もある。これは、いくつかのケースでは手術後のカテーテル措置を行ない、その後で、治療用薬剤を継続的に投与することによって達成できるであろう。灌流の期間は特定の患者及び状況に対する医師の判断に基づいて選択されるであろうが、その時間は約1時間から2時間、2－6時間、約6－10時間、約10－24時間、そして約1－2日間、約1－2週間、あるいはそれ以上に及ぶ場合もある。一般的に、継続的灌流を介しての治療用組成物の用量は単一あるいは複数回の注射による場合の用量と同じであり、注入が行われる期間によって調節される。しかしながら、灌流の場合は用量がより高いことと考えられている。

10

【0286】

水溶液で全身投与を行なう場合、その溶液を必要であれば緩衝すべきであり、希釈液は最初に十分な量の食塩水あるいはグルコースで等張状態にしておく必要がある。これらの特殊な水溶液は静脈内、筋肉内、皮下、そして腹膜内投与に特に適している。これとの関連で、用いることができる無菌水性媒体は本開示に照らせば、当業者には容易に分かるであろう。例えば、1回分の用量を1 mLの等張性NaCl溶液に溶解して、1000 mLのハイパーダーモクリシス液に加えるか、あるいは適切な注入箇所に注射する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990参照）。治療を受ける個体の状態に基づいて用量の変更は必然的に起きるであろう。投与に責任を有する人は、いずれの場合でも、それぞれの個体に応じて適切な用量を決めるであろう。

20

【0287】

治療用組成物の有効量は意図された目的に基づいて判定される。『単位用量』あるいは『用量』とは個体で使用するのに適した物理的個別単位を示しており、それぞれの単位は、その投与、つまり適切な経路と治療方式に関連して上に述べた望ましい反応を起こすと計算された所定の量の治療用組成物を含んでいる。措置回数と単位用量の両方に基づいて、投与されるべき量は望ましい保護効果に依存している。

【0288】

治療用組成物の正確な量は医師の判断と、それぞれの個人の特殊な事情に依存している。用量に影響を及ぼす要因はその患者の身体的、臨床的状态、投与の経路、治療の意図された目標（症状の緩和か治癒か）、及び特定の治療用物質の強度、安定性、そして毒性などである。

30

【0289】

製剤化されると、溶液は治療的に効果的な量で、用量方式に合致した形態で投与される。この製剤は上に述べたような注射液タイプなど、種々の用量形態で簡単に投与することができるが、薬品放出カプセルなども用いることができる。

【0290】

ここで用いられる場合、*in vitro*投与とは培養中の細胞など、動物から取り出した細胞上で行なわれる操作を指している。*ex vivo*投与とは、*in vitro*で操作されて、生きている動物に後で投与される細胞を指している。*in vivo*投与とは、動物の体内で行なわれるすべての操作を含んでいる。

40

【0291】

本発明のいくつかの実施形態では、上記組成物は*in vitro*、*ex vivo*、あるいは*in vivo*のいずれでも投与することができる。*in vitro*実施形態においては、修飾蛋白質をコードする発現構成体を宿主細胞に形質導入することも可能である。その場合、標準的な細胞は*in vitro*分析か、あるいは*in vivo*投与に用いられる。

【0292】

米国特許第4,690,915号明細書と5,199,942号明細書（いずれも参照によって本明細書に組み込まれる）は血液単核細胞と骨髄細胞を治療的目的で使用するための*ex vivo*操作の方法について開示している。

【0293】

50

本発明による組成物の *in vivo* 投与も考えられる。その例は、膀胱内への膀胱ないカテーテル措置を通じて本発明の形質導入組成物を投与することによる膀胱上皮の形質導入 (Bass, 1995)、及びカテーテルを通じて門脈を介しての適切な形質導入組成物を浸潤させることによる肝細胞の形質導入である (Bao, 1996)。その他の例としては、即効性形質導入組成物を腫瘍に直接投入することと、肺細胞の形質導入を起こさせるための形質導入組成物の鼻腔か気管支を通じての吸入 (Dong, 1996) である。

【0294】

本発明による組成物は静脈内、皮膚内、動脈内、腹膜内、病変部位内、頭蓋内、関節内、前立腺内、肺内、気管支内、鼻腔内、硝子体内、腔内、直腸内、腫瘍内、粘膜内、腹膜内、皮下、小胞内、粘膜、心嚢内、経口、局所、局部に、及び/又はエアロゾルの利用、

10

【0295】

B. 脂質組成物

いくつかの実施の形態において、本発明は特許請求されているポリヌクレオチドあるいはポリペプチドと結合した1つ、あるいは複数の脂質を含む新規組成物に関係している。脂質とは水には不溶性の特徴を有し、有機溶媒を用いて抽出可能な物質である。本明細書に具体的に述べられているもの以外の化合物も当業者は分かっているであろうし、本発明による組成物と方法の範囲内に含まれる。

【0296】

脂質は天然のものもあれば、合成されたもの（人によって設計、生産されたもの）もある。しかしながら、脂質は通常、生物学的な物質である。生物学的脂質はこの技術分野ではよく知られており、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン類、リソリピッド、グリコスフィンゴリピッド、グルコリピッド、サルファタイド、エーテル及びエーテル結合脂肪酸を有する脂質、そしてポリマー可能な脂質、及びそれらの組み合わせである。

20

【0297】

1. 脂質タイプ

中性脂肪はグリセロール及び脂肪酸を含んでいる場合がある。代表的なグリセロールは炭素原子を3つ含んだアルコールである。脂肪酸は一般的には炭素鎖で構成されており、その末端に酸性成分（例えば、カルボン酸）を有している分子である。この脂肪酸の炭素鎖がどのような長さであってもよいが、その長さは約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30あるいはそれ以上の炭素原子、あるいは可能ないずれの長さであってもよい。しかしながら、好ましい範囲は脂肪酸の鎖部分の炭素原子数が約14から約24、そして炭素原子数が約16から約18であることがこの実施の形態では特に好ましい。いくつかの実施の形態では、脂肪酸炭素鎖は奇数の炭素原子を含んでいる場合もあり、別の実施の形態では偶数の炭素原子数が好ましい場合もある。炭素鎖内に1つの結合だけを含んでいる脂肪酸は飽和されている状態にあると表現され、少なくとも1つの二重結合をその炭素鎖に含んでいる脂肪酸を不飽和という。

30

40

【0298】

特殊な脂肪酸はリノレン酸、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、アラキド酸、パリミトール酸、アラキドン酸、リシノール酸、ツバクロステル酸、ラクトバシル酸などを含んでいる。1つ以上の脂肪酸の酸性基はグリセロールの1つ以上の水酸基と共有結合されている。従って、モノグリセリドはグリセロールと1つの脂肪酸を含んでおり、ジグリセリドは1つのグリセロールと2つの脂肪酸を含んでおり、そしてトリグリセリドはグリセロールと3つの脂肪酸を含んでいる。

【0299】

リン脂質は通常、グリセロールあるいはスフィンゴシン成分のいずれか、両親媒性化合物をつくりだすためのイオン性リン酸基、そして1つ以上の脂肪酸を含んでいる。リン脂

50

質のタイプは、例えば、リン酸基がジグリセリドの第一の炭素に結合しているホスホグリセリド、そしてリン酸基がスフィンゴシン・アミノ・アルコールにエステル化されているスフィンゴ・リン脂質（例えば、スフィンゴミエリン）などである。スフィンゴ・リン脂質の別の例はスルファチドで、これは両親媒性の分子を構成しているイオン性スルフェート基を含んでいる。リン脂質はもちろん、例えば、リン酸基に取り付けられたアルコールなど、さらに別の化学基も含んでいる。そうしたアルコール基の例としては、セリン、エタノールアミン、クロリン、グリセロール、そしてイノシトールなどがある。従って、特殊なホスホグリセリドはホスファチジル・セリン、ホスファチジル・エタノールアミン、ホスファチジル・コリン、ホスファチジル・グリセロール、あるいはホスファチジル・イノシトールである。その他のリン脂質はホスファチド酸、あるいはジアセチルリン酸である、1つの実施形態で、ホスファチジルコリンはジオレオイルホスファチジルコリン（a.k. aカルジオジリピン）、エッグ・ホスファチジルコリン、ジパルミトイル・ホスファチジルコリン、モノミニストイル・ホスファチジルコリン、モノパルミトール・ホスファチジルコリン、モノステアロイル・ホスファチジルコリン、モノオレオイル・ホスファチジルコリン、ジブトロイル・ホスファチジルコリン、ジバレロイル・ホスファチジルコリン、ジカプロイル・ホスファチジルコリン、ジヘプタノイル・ホスファチジルコリン、ジカプリオイル・ホスファチジルコリン、あるいはジステアロイル・ホスファチジルコリンなどである。

【0300】

糖脂質はスフィンゴ・リン脂質に関連しているが、スフィンゴシンの一次水酸基に取り付けられたリン酸基以外の糖質基を含んでいる。セレブロシドと呼ばれるタイプの糖脂質は一次水酸基に取り付けられた1つの糖基（グルコースまたはガラクトース）を含んでいる。糖脂質の別の例はガングリオシド（例えばモノシアロガングリオシド、GM1）で、これは約2、約3、約4、約5、約6、約7程度の糖基を含んでおり、この糖基は側鎖であってもよく、一次水酸基にとりつけられている。別の実施の形態で、上記糖脂質はセラミド（例えばラクトシルセラミド）である。

【0301】

ステロイドはフェナンスレンの4構成要素環状誘導体である。ステロイドは細胞、組織、及び生物体内で規制機能を有していることが多く、例えば、プロゲスタジェン（例えばプロゲステロン）、グルココリコイド（例えばコルチソル）、ミネラルコルチコイド（例えばアルドステロン）、アンドロゲン（例えばテストステロン）、及びエストロゲン（例えばエストロン）ファミリーのホルモン及び関連物質を含んでいることが多い。コレステロールはステロイドの別の例で、通常、規制機能よりは構造的な要素としての役割を果たしている。ビタミンDもステロールの1例で、腸からのカルシウム吸収に関係している。

【0302】

テルペンは1つ以上の5炭素イソプレネ基を含む脂質である。テルペンは種々の生物学的機能を有しており、例えば、ビタミンA、共酵素Q、それにカロテノイド（例えば、リコペン及びβ-カロチン）を含んでいる。

【0303】

2. 荷電及び中性脂質組成物

いくつかの実施の形態で、組成物の脂質成分は荷電されておらず、あるいは一時的な電荷を有していない。1つの実施の形態で、1つの組成物の脂質成分は1つ以上の中性脂質を含んでいる。別の実施形態で、1つの組成物の脂質成分は基本的にリン脂質やコレステロールなどの陽イオン性脂質及び陰イオン性脂質を含んでいない。別の実施形態で、非荷電あるいは無電荷脂質組成物はその約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、あるいは約100%が荷電されていない、基本的に無電荷脂質であるか、あるいは正電荷と負電荷が等数の脂質混合物である。

【0304】

別の実施形態で、脂質組成物が荷電されている場合もある。例えば、荷電リン脂質は本発明による脂質組成物を調製するために用いることができ、全体として正電荷あるいは負

電荷を有している。非限定的例で、ジアセチル・ホスフェートを用いてその脂質組成物に負電荷をもたらすことができ、ステアシルアミンを用いてその脂質組成物に正電荷をもたらすことができる。

【0305】

3. 脂質をつくる

脂質は天然の素材、市販材料から得たり、化学的に合成することができ、この技術分野の当業者には周知であろう。例えば、リン脂質は卵や大豆フォスファチジルコリン、脳ホスファチド酸、脳及び植物ホスファチジルイノシトル、心臓カルジオリピン、及び植物又はバクテリア性ホスファチジルエタノールアミンからつくることができる。別の例で、本発明での使用に適した脂質を市販の素材から得ることもできる。例えば、ジミリスチル・ホスファチジルコリン (DMPC) はSigma Chemical Co.から、ジセチル・ホスフェート (DCP) はK&K Laboratories (Plainview, NY)から、コレステロール (Chol) はCalbiochem-Berhingから、ジミリスチル・ホスファチジルグリセロール (DMPG) 及びその他の脂質はAvanti Polar Lipids Inc. (Birmingham, Ala)からそれぞれ市販されている。いくつかの実施の形態で、クロロホルムあるいはクロロホルム/メタノール内に溶かした脂質溶液を約-20℃の温度で保存することができる。クロロホルムの方がメタノールより蒸発性が強いので、それを唯一の溶媒として用いる方が好ましい。

10

【0306】

4. 脂質組成物の構造

脂質と結合した化合物は脂質を含んだ溶液に分散させたり、脂質と共に溶解したり、脂質と共に乳化したり、脂質と混合したり、脂質と組み合わせたり、脂質に共有結合させたり、脂質内に懸濁液として含めたり、あるいはその他の方法で脂質と結合させることができる。本発明による脂質及び脂質関連組成物はいずれの特定の構造にも限定されない。例えば、それらは単に溶液に分散されて、サイズや形状が不均一な団粒を形成しているかもしれないし、ミセレスなどの場合のように二層構造をしている場合もあり、あるいは『崩壊した』構造を有している場合もある。別の非限定的例で、リポフェクタミン (Gibco BRL) あるいはSuperfect(Qiagen)複合体も考えられる。

20

【0307】

いくつかの実施の形態で、脂質組成物は、薬品、糖、蛋白質、核酸あるいはその他の本明細書に開示されている、あるいは当業者に周知の物質等の特別な脂質、資質タイプ又は非脂質化合物を含んでいる場合もあり、その割合は、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、約20%、約21%、約22%、約23%、約24%、約25%、約26%、約27%、約28%、約29%、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約41%、約42%、約43%、約44%、約45%、約46%、約47%、約48%、約49%、約50%、約51%、約52%、約53%、約54%、約55%、約56%、約57%、約58%、約59%、約60%、約61%、約62%、約63%、約64%、約65%、約66%、約67%、約68%、約69%、約70%、約71%、約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%程度であってもよい。1つの非限定的例では、脂質組成物は約10%—約20%の中性脂質と、約33%—約34%のセレブロシド、そして約1%のコレステロールを含んでいる。別の非限定的実施例で、リポソームは約4%—約12%のテルペン類を含んでおり、ミセルの約1%はリコペンであり、リポソームの約3%—11%はその他のテルペン類、約10%—約35%のホスファチジル・コリン、そして約1%の薬品を含んでいる。従って、本発明の脂質組成物はどんな脂質、脂質タイプ、あるいは他の組成物を、どんな組み合わせをどんな割合で含んでいてもよい。

30

40

【0308】

50

a. エマルジョン

脂質はエマルジョンに含まれていてもよい。脂質エマルジョンは機械的な攪拌や、乳化剤を少量加えても相互に溶解しない2つ以上の脂質のほぼ永続的に不均一な脂質混合物である。脂質エマルジョンを調製し、追加的な成分を添加する方法はこの技術分野では周知である（例えば、Modern Pharmaceuticals, 1990参照。引用により本明細書に組み入れ）。

【0309】

例えば、1つ以上の脂質をエタノールあるいはクロロホルム、あるいはその他の適切な有機溶媒に加えて、手かあるいは機械的な方法で攪拌する。そして溶媒をその混合物から蒸発させると、乾燥した脂質のグレーズが得られる。この脂質をリン酸緩衝食塩水などの水性媒体に再懸濁させると、エマルジョンができる。乳化した脂質をより均一なサイズ分布にするためには、その混合物を通常の超音波技術で超音波処理してもよいし、さらに、微小流動体化（例えば、Microfluidizer, Newton, Massを使用）し、及び/又は押出装置（Lipex Biomembrane, Vancouver, Canada）を用いて、高圧（例えば600psi程度）下で押出処理することもできる。

10

【0310】

b. ミセル

脂質はミセル状態の場合もある。ミセルは脂質化合物の団粒クラスターで、通常は脂質単層構造をしており、この技術分野の当業者の周知のミセル調製手順を用いて調製することができる（例えば、Canfield et al., 1990; El-Gorab et al., 1973; Colloidal Surfactant, 1963; 及びCatalysis in Micellar and Macromolecular Systems, 1975参照。それぞれ引用により、本明細書に組み入れ）。例えば、1つ以上の脂質を有機溶媒に入れて、溶媒を蒸発させ、その脂質を水性媒体に再懸濁させ、超音波処理し、そして遠心分離にかける。

20

【0311】

5. リポソーム

特殊な実施の形態で、脂質はリポソームで構成されている。『リポソーム』とは閉じ込められた脂質二層体及び団粒の発生によって形成される種々の単層あるいは多層脂質粒子を含むものを総称する。リポソームは通常リン酸脂質、そして通常は水性組成物を含む内部媒体で構成される二層薄膜を有する小胞構造を有するものとして特徴付けることができる。

30

【0312】

多層リポソームは水性媒体によって分離された多重脂質層を有している。それらはリン酸脂質を含む脂質を過剰な水性溶液に懸濁すると自発的に形成される。この脂質成分は閉鎖構造が形成される前に自己再配置され、脂質二層間に水と溶解した溶質をつつみこむ（Ghosh and Bachhawat, 1991）。親油性領域を有する1つ又は複数の親油性分子がその脂質二層に溶解していたり、結合している場合もある。

【0313】

特殊な実施の形態で、脂質及び/又は修飾蛋白質あるいは修飾蛋白質をコードするポリヌクレオチドを、例えば、そのリポソームと組成物の両方に結合した結合分子を介してリポソームに取り付けられたリポソームの脂質二層で隔離されたそのリポソームの水性内部空間に閉じ込めることなども可能である。

40

【0314】

a. リポソームをつくる

本発明で用いられるリポソームは当業者に周知のいろいろな方法でつくることができる。

【0315】

例えば、例えば中性リン脂質ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)などのリン脂質(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)を第3ブタノールに溶解する。この脂質を次にポリヌクレチドあるいはポリペプチド及び/またはその他の成分と混合する。ツイーン20をその脂質混合物に添加して、ツイーン20の割合がその組成物重量の約5%程度になるよ

50

うにする。過剰な第3ブタノールをこの混合物に加えて、第3ブタノールの量が少なくとも95%となるようにする。その混合物を攪拌して、乾燥した氷/アセトン槽内で凍らせて、一昼夜凍結乾燥する。凍結乾燥された製剤を-20℃で保存し、最大3ヶ月間保存することができる。必要な場合に、凍結乾燥されたリポソームを0.9%食塩水内で再懸濁させる。その化合物をカプセル化するためにツイーン20を用いて得られた粒子の平均直径は約0.7-約1.0μm程度である。

【0316】

あるいは、コンテナ内、例えばガラス製ナシ型フラスコ内で脂質を溶媒に混合してリポソームをつくることができる。そのコンテナは予想されるリポソーム懸濁液の体積の10倍以上の体積を有している必要がある。回転蒸発装置を用いて、溶媒を陰圧下で40℃の温度で除去する。溶媒は通常、リポソームの望ましい体積に応じて、約5分から2時間の範囲で除去される。この組成物はさらにデシケータ内で真空下で乾燥される。乾燥された脂質は通常は、時間が経つと劣化する傾向があるので、1週間程度で廃棄される。

10

【0317】

乾燥された脂質はすべての脂質膜が懸濁されるまで、無菌で発熱物質を含まない水中で25-50mMのリン脂質で水和化される。この水性リポソームをその後、アリコットに分けて、それぞれビンに入れて、親油化され、真空下で密封される。

【0318】

別の方法で、リポソームは他の周知の実験室手順（例えば、Bangham et al., 1965; Gredoriadis, 1979; Deamer and Uster 1983, Szoka and Papahadjopoulos, 1978参照。それぞれ、引用により本明細書に組み入れ）で調製することができる。これらの方法は水性物資を包み込む能力と、それぞれの水性スペース：脂質比率において異なっている。

20

【0319】

上に述べたような手順でつくられた乾燥された脂質、あるいは冷凍乾燥されたリポソームを脱水和化して、抑制性ペプチドの溶液に再懸濁させて適切な溶媒、例えばDPBSで適切な濃度に希釈させることができる。この混合物を次に攪拌ミキサー内で激しく攪拌する。ホルモン、薬品、核酸構成物などカプセル化されていない追加化合物は29,000 x gの遠心分離で除去され、リポソーム性ペレットを洗浄する。洗浄されたリポソームを適当な総リン脂質濃度、例えば、約50-200mMで再懸濁させる。カプセル化された追加的物質あるいは活性作用剤は標準的な方法で判定することができる。リポソーム製剤内にカプセル化された追加的物質あるいは活性作用剤の量の判定後に、そのリポソームを適切な濃度に希釈して、使用時まで4℃の温度で保存することができる。リポソームを含む医薬品組成物は通常、水や食塩水などの無菌で、薬学的に許容される基質や希釈剤を含んでいる。

30

【0320】

リポソームのサイズは合成方法によって変化する。本発明のリポソームはいろいろなサイズを持つことができる。いくつかの実施の形態では、リポソームは、その外径が例えば約100nm、約90nm、約80nm、約70nm、約60nm、あるいは約50nm以下である場合もある。そうしたリポソームの調製においては、本明細書に述べられている、あるいはこの技術分野の当業者に周知のいかなる方法を用いてもよい。リポソーム調製のさらに別の例は米国特許第4,728,578、4,728,575、4,737,323、4,533,254、4,162,282、4,310,505及び4,921,706号各明細書；国際出願PCT/US85/01161及びPCT/US89/05040公報；英国出願GB2193095A公報；Mayer et al., 1986；Hope et al., 1985；Mayhew et al., 1987；Mayhew et al., 1984；Cheng et al., 1987；そしてLiposome Technology, 1984に開示されており、これらはそれぞれ引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0321】

水溶液内に懸濁されたリポソームは通常は球形小胞の形状をしており、1つ以上の脂質二層分子の同心円的層を有している。各層は、Xを親水性成分、Yを親油性成分としてXYで示される分子の並列な列で構成されている。水性懸濁液の場合、上記同心的層は親水性成分が水相と接触を保ち、親油性領域が自己結合的傾向を維持するように配置されている。例えば、水相がリポソームを伴う状態と伴わない状態の両方の状態で存在している場合、

50

脂質分子は薄層と呼ばれるXY-YX構成の二層を形成する。複数の脂質分子の親水性及び親油性部分が相互に結合すると団粒が形成される。これらの団粒のサイズと形状は溶媒の性質とその溶液内での他の化合物の存在など多くの異なった事情に依存している。

【0322】

脂質製剤の製造は(I)逆相蒸発、(II)脱水-再水和、(III)洗剤透析、そして(IV)薄膜水和化の後にリポソーム性混合物を連続的に押出加工しながら超音波処理することで行なわれることが多い。1つの実施形態で、いくつかの実施の形態でリポソームを調製するために考えられている方法は加熱超音波処理と、孔サイズが徐々に小さくなるフィルター又は膜を通じて脂質を連続的に押出加工をすることで、小さな、安定したリポソーム構造が形成される。この方法で構造的に安定した、最大の活性を有する適切で均一なサイズのリポソーム性/治療用化合物あるいはリポソームだけがつくられる。こうした技術はこの技術分野の当業者には周知である（例えば、Martin,1990全体を参照）。 10

【0323】

一度製造されると、脂質は循環されると毒性を示したり（例えば、化学治療において）、あるいは変化し易い（例えば核酸）などの治療量化合物をカプセル化するために用いることができる。リポソームによるカプセル化はそうした化合物に対して毒性の低下と血清半減期の延長という結果をもたらしている（Gabizon et al., 1990）。

【0324】

多数の疾病治療において、特に高増殖性疾患を治療するための治療法において、従来の治療法を強化したり、あるいは新しい治療法を確立するために脂質に基づく遺伝子伝達治療法式を用いている。リポソーム製剤における進歩はin vivoでの遺伝子伝達の効率を改善し（Templeton et al., 1997）、そしてこれらの方法を用いてリポソームをつくるのが考えられている。核酸伝達のためのリポソームに基づく製剤をつくる他の方法も開示されている（WO 99/198933）。 20

【0325】

別のリポソーム製剤で、溶媒希釈マイクロキャリア（SDMC）と呼ばれる両親媒性小胞が特定の分子の脂質小胞の二層への一体化を可能にしている（米国特許第5,879,703号明細書）。SDMCを用いてリポ多糖類、ポリペプチド、核酸などを導入することができる。もちろん、当業者であれば、本発明において望ましいリポソームを得るために、リポソーム調製のためのその他の方法も用いることができるであろう。 30

【0326】

b. リポソームを標的に向かわせる

本発明の化合物をリポソームと組み合わせることでその生物学的分散及びその他の性質を改善することができる。例えば、リポソーム媒介核酸伝達及びin vitroでの外来DNAの発現は大きな成功を収めている（Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., Nicolau et al., 1987）。培養したヒヨコ胚、HeLa及び肝臓癌細胞でのリポソーム媒介伝達及び外来DNA発現の実行可能性も報告されている（Wong et al., 1980）。ラットで静脈注射後にリポソーム媒介遺伝子伝達も成功している（Nicolau et al., 1987）。

【0327】

リポソーム組成物が組織に導入するための追加的物質を含むことも考えられる。例えば、本発明のいくつかの実施の形態で、脂質あるいはリポソームを血液凝固性ウイルス(HVJ)と結合することができる。これは細胞膜との融合を容易にして、リポソームにカプセル化されたDNAの細胞侵入を促進する（Kaneda et al., 1989）。別の事例で、脂質あるいはリポソームは核非ヒストン・クロモソーム性蛋白質(HMG-1)を錯体化したり、それとの結合に用いることができる(Kato et al., 1991)。さらに別の実施の形態で、脂質を錯体化したり、HVJ及びHMG-1との結合に用いることもできる。 40

【0328】

標的を定めた伝達は、これらのリポソームの、本発明のいずれの開示された化合物を大量に伝達する能力を損なわずにリガンドを付加することで達成される。これは特定の細胞、組織、及び器官に対する伝達を可能にすると考えられる。リガンドに基づく伝達システ 50

ムの向標的特性は異なった細胞タイプでのリガンド・レセプタの分配に基づく。向標的リガンドは脂質錯体と非共有結合されている場合もあるし、共有結合されている場合もあり、種々の方法でリポソームに接合することができる。

【0329】

リポソームにリガンドをクロスリンクする方法の例は米国特許第5,603,872号明細書及び米国特許5,401,511号明細書に述べられており、これらの広報はそれぞれ引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。アミン残基のクロスリンクを通じて、リポソーム表面に種々のリガンドを共有結合で結合させることができる。リポソーム、特にそれぞれホスファチジルエタノールアミン (PE) を含む多層小胞 (MLV) あるいは微少乳化リポソーム (MEL) などの単層小胞、そして大型単層リポソーム (LUVET) がすでに確立した手順でつくられている。リポソームにPEを含まれるとクロスリンク目的のための活性機能性残基である一次アミンがリポソーム表面に提供される。表皮成長因子 (EGF) などのリガンドがPE-リポソームとうまく結合されている。リガンドはリポソーム表面の個々のサイトと共有結合で結合されている。これらのサイトの数と表面密度はリポソーム製剤とそのリポソームのタイプによって決まる。リポソーム表面は非共有結合のためのサイトも有している。リガンドとリポソームの共有結合接合体を形成するために、クロスリンク剤の有効性と生物学的共存性についての研究が行われている。クロスリンク剤にはグルタルアルデヒド (GAD)、二機能性オキシラン (OXR)、エチレン・グリコール・ジグリシル・エーテル (EGDE)、そして水溶性カルボジイミド、好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) などがある。クロスリンクの複雑な化学的過程を通じて、認識物質のアミン残基とリポソームの結合が行われれる。

10

20

【0330】

i. 向標的リガンド

向標的リガンドは複合体の疎水性部分に固着させるか、あるいはその複合体の親水性部分の反応性末端残基に取り付けることができる。向標的リガンドは反応基、例えば親水性ポリマーの遠位末端上に結合させることでリポソームに取り付けることができる。好ましい反応基はアミノ基、カルボキシル基、ヒドラジド基、そしてチオール基などである。親水性ポリマーへの向標的リガンドの結合は、当業者に周知の有機化学の標準的な方法で結合することができる。いくつかの実施の形態では、向標的リガンドの総濃度は0.01-約10%モル程度である。

30

【0331】

向標的リガンドは標的とされる領域の特徴的な成分に対して特異性を示すどんなリガンドであってもよい。好ましい向標的リガンドはポリクローナル又はモノクローナル抗体、抗体フラグメント、あるいはキメラ性抗体、酵素、あるいはホルモン、単一、オリゴ、及び多糖類などの糖類 (Heath et al., (1986)) などである。例えば、ジシアロガングリオシドGD2は、神経芽細胞腫、黒色腫、小細胞肺腫瘍、神経膠腫、そしてある種の肉腫などの神経外胚葉オリジン腫瘍と確認された腫瘍抗原である (Cheresh et al., 1986, Schulz et al., 1984)。抗ジシアロガングリオシドGD2モノクローナル抗体を含有するリポソームを用いて、腫瘍抗原を発現する細胞にリポソームを向かわせるのを助ける試みが行われている (Montaldo et al., 1999; Pagnan et al. 1999)。別の非限定的例で、乳房及び婦人科の癌抗原特異性抗体が、米国特許第5,939,277号明細書に開示されており、この資料は引用によって本明細書に組み込まれる。別の非限定的例で、前立腺癌特異性抗体が米国特許第6,107,090号明細書に開示されており、この特許は引用によって本明細書の組み込まれる。従って、本明細書に開示されている抗体、あるいは当業者に周知の抗体を用いて、本発明の組成物及び方法と組み合わせて、特定の組織と細胞タイプに向かわせることが考えられる。本発明のいくつかの実施の形態で、考えられている向標的リガンドはインテグリン、プロテオグリカン、グリコプロテイン、レセプタあるいはトランスポータと相互作用する。適切なリガンドは、腫瘍など、標的器官の細胞、あるいは局所的病態の結果として循環に露出される標的器官の構造に対して特異性を示すものであればいずれのリガンドでもよい。

40

50

【0332】

本発明のいくつかの実施の形態では、細胞の形質導入を増強するため、標的細胞の形質導入を増強するため、あるいは望ましくない細胞の形質導入を制限するために、抗体あるいは環状ペプチド向標的成分（リガンド）が脂質複合体と結合される。そうした方法はこの技術分野では周知である。例えば、さらに哺乳動物の中樞神経系の細胞だけに特異的に向かうリポソームが開示されている（米国特許第5,786,214号明細書。引用により本明細書に組み込み）。このリポソームは主としてN-グルタルホスファチジルエタノールアミン、コレステロール、及びオレイン酸で構成されており、神経グリアに固有性を示すモノクローナル抗体はそのリポソームに接合されている。モノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントを用いて、例えば、脳、心臓、肺、肝臓など動物における特定の細胞、組織、あるいは器官に目標を定めて導入するために用いることが考えられる。

10

【0333】

さらに、レセプター媒介伝達及び/又は脂質又はリポソームで構成される小胞で構成される向標的小胞を用いて標的細胞に化合物を導入することもできる。これらは標的細胞において発生するレセプター媒介エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的摂取を利用して、種々のレセプターの細胞タイプ特異性分配を考慮に入れれば、こうした伝達方法は本発明に対してさらに特異性を付与してくれる。

【0334】

従って、本発明のいくつかの実施形態では、標的細胞群で特異的に発現されるレセプターに対応するようにリガンドが選択される。本発明による化合物の細胞特性伝達及び/又は向標的小胞はリポソームと組み合わせられた特異結合リガンドを含んでいる場合もある。伝達される化合物はリポソーム内に収容されており、特異結合リガンドはリポソーム膜に機能的に組み込まれる。リポソームは従って、標的細胞のレセプターに特異的に結合して、その内容物を細胞に伝達する。こうしたシステムは、例えば、EGFレセプターのアップレギュレーションを示す細胞へのレセプター媒介核酸伝達において、表皮成長因子（EGF）が用いられているシステムにおいて効果を発揮する。

20

【0335】

いくつかの実施の形態で、レセプター媒介伝達及び/又は向標的小胞は細胞レセプター固有リガンド及び結合剤を含んでいる。他は、それに対して伝達されるべき修飾蛋白質あるいは修飾蛋白質をコードするポリヌクレオチドが遺伝子操作で取り付けられた細胞レセプター特異性リガンドを含んでいる。例えば、レセプター媒介遺伝子伝達のためにいくつかのリガンドが用いられており（Wu and Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, EOP 0273085）、これはこの技術の操作性を確立したものである。別の実施例で、別の哺乳動物細胞タイプにおける特異的伝達についても述べられている（Wu and Wu, 1993; 引用によって本明細書に組み込まれる）。

30

【0336】

別の実施の形態で、特異性結合リガンドは細胞特性結合を指令する1つ以上の脂質あるいは糖蛋白質を含んでいる。例えば、1つのガラクトース末端アシアलगングリシドであるラクトシルセラミドがリポソームに組み込まれており、肝臓癌によるインシュリン遺伝子の摂取の増大をもたらすことが観察されている（Nicolau et al., 1987）。末端ガラクトシル残基を含むアシアログリコプロテイン、アシアロフェツインも肝臓にリポソームを向かわせることが示されている（Spanjer and Scherphof, 1983; Hara et al., 1996）。糖マンノシル、フコシル、あるいはNアセチル・グルコースアミンは、ポリペプチドの骨格に結合されると、高親和性マンノース・レセプターと結合する（米国特許第5,432,260号明細書参照。引用によってその全体を本明細書に組み込み）。本発明による上記細胞あるいは組織特異性形質転換構成物を同様の方法で標的細胞あるいは組織に導入することができる。

40

【0337】

他の例で、ラクトシル・セラミド、及びアポリポプロテインE3(ApoE)などのLDLレセプター関連蛋白質を標的とするペプチドがリポソームを肝臓に向かわせる上で有効であること

50

が示されている (Spanjer and Scherphof, 1983; W098/0748)。

【0338】

葉酸塩及び葉酸塩レセプタも細胞向標的のために有益であることが開示されている (米国特許第5,871,727号明細書)。この例では、ビタミン葉酸塩が複合体に結合されている。この葉酸塩レセプタはそのリガンドに対して高い親和性を示し、肺、乳房、及び脳腫瘍を含むいくつかの悪性細胞株の表面で過剰発現される。メトトレキセートなどの抗葉酸塩も向標的リガンドとして用いられている。トランスフェリン媒介伝達システムはトランスフェリン・レセプタを発現する幅広い増殖細胞に向かう傾向を有している (Gilliland et al., 1980)。

【0339】

10

c. リポソーム/核酸の組み合わせ

リポソーム組成物が細胞あるいは組織固有核酸を含んでいる場合、この技術が本発明において適用性を有していると考えられる。いくつかの実施の形態において、脂質に基づく非ウイルス性製剤がウイルス遺伝子治療に代わる可能性を有している。多くの細胞培養研究が脂質を主体とした非ウイルス遺伝子伝達の資料を提供しているが、脂質を主体とする製剤の全身的な遺伝子伝達についてのデータは限られている。非ウイルス脂質主体遺伝子伝達の重大な制約は、その非ウイルス性伝達媒体を含む陽イオン性脂質の毒性である。リポソームの *in vivo* 毒性は *in vitro* と *in vivo* の遺伝子伝達結果の違いについて部分的な説明を提供している。こうした矛盾するデータに関与している別の要因は、血清蛋白質が存在している場合と不在の場合のリポソームの安定性の違いである。リポソームと血清蛋白質との間の相互作用はリポソームの安定性に対して劇的な影響を及ぼす (Yang and Huang, 1997)。陽イオン性リポソームは負の電荷を有する血清蛋白質を引き寄せて、それと結合する。血清蛋白質で被覆されたリポソームはマクロファージに溶けてしまうか、あるいは取り込まれて、循環系から除去されてしまう。現在の *in vivo* でのリポソーム伝達方法は循環系における陽イオン性脂質に関連した毒性と安定性に関する問題を避けるために、エアロゾル化、皮下注射、皮膚内注射、腫瘍内注射、あるいは頭蓋内注射を用いている。リポソームと血漿蛋白質との相互作用は *in vitro* での効果 (Felgner et al., 1987) と *in vivo* 遺伝子伝達 (Zhu et al., 1993; Philip et al., 1993; Solodin et al., 1995; Liu et al., 1995; Thierry et al., 1995; Tsukamoto et al., 1995; Aksentijevich et al., 1996) との違いに大きく関与している。

20

30

【0340】

ウイルス性粒子を細胞固有マーカーを持たない細胞に向かわせる例示的な方法が開示されている (米国特許第5,849,718号明細書)。この方法では、例えば、抗体Aが腫瘍に対する特異性は有しているが、正常な心臓及び肺組織に対しては特異性を持たず、抗体Bは腫瘍に対しても、正常な肝細胞に対しても特異性を有している場合がある。抗体Aあるいは抗体Bだけを使用して、抗増殖性核酸を腫瘍に導入しようとする、心臓と肺、あるいは肝細胞に望ましくない障害が及ぶ可能性がある。しかしながら、抗体Aと抗体Bを一緒に用いて、より改善された細胞向標的を行うことができる。従って、抗体Aは抗増殖性核酸をコードする遺伝子と結合し、レセプタ媒介摂取システムを介して腫瘍及び心臓と肺組織に導入される。しかしながら、その遺伝子はそれらが必要な転写因子を欠いているので、これらの細胞では転写されない。抗体Bは上記抗増殖性核酸の転写に必要な転写因子をコードする通常の活性遺伝子と結合して、腫瘍及び肝細胞に導入される。従って、心臓及び肺細胞では、不活性抗増殖性核酸だけが導入されるが、転写されない、悪影響は発生しない。肝細胞では、転写因子をコードする遺伝子は導入、転写されるが、そこには抗増殖性核酸遺伝子が存在しないので、何の影響も起さない。しかしながら、腫瘍においては、両方の遺伝子が導入され、そして転写因子がその抗増殖性核酸の転写を起こさせて、腫瘍特異性毒性効果をもたらす。

40

【0341】

抗増殖性疾患を治療のために遺伝子伝達用に向標的リガンドを付加すると、その遺伝子生成物が非向標的システムと比較してより毒性が強くなる遺伝子伝達が可能になる。伝達

50

できるより毒性の強い遺伝子の例としては、Bax及びBak及びウイルスから誘導されるプロアポトシス遺伝子、そしてアデノウイルスE4orf4及び大腸菌プリン・ヌクレオシド・ホスホリラーゼのような他の病原体、プロドラッグ6-メチルプリンを毒性のあるプリン6-メチルプリンに変えるいわゆる『自殺遺伝子』である。プロドラッグ治療で用いられる自殺遺伝子のその他の実例は大腸菌シトシン・デアミラーゼ遺伝子とHSVチミジン・キナーゼ遺伝子である。

【0342】

in vitroで組み換え体あるいは修飾されたウイルスを発生させるために、非向標的あるいは向標的脂質複合体を用いることも可能である。例えば、2つ以上のプラスミドを用いて、レトロウイルス配列と治療用遺伝子を抗増殖性細胞に導入することも可能であろう。血漿からin transで提供されるレトロウイルス性蛋白質は第2の治療用遺伝子担持血漿のパッケージングを可能にしてくれるであろう。形質導入された細胞は従って、治療用遺伝子を含んだ非増殖性レトロウイルスを生産するためのサイトとなる。これらのレトロウイルスは近くの影響に感染することができるであろう。治療用遺伝子のプロモータは誘発可能性あるいは組織固有である場合と、そうでない場合の両方がある。

10

【0343】

同様に、トランスフェクトされた核酸は複製能力を有し、アデノウイルスElaあるいはE2b領域の全部、あるいは一部を欠いているが、Ela及び/又はElb領域からの転写を行わせる組織特異あるいは誘発可能なプロモータを1つ以上有しているアデノウイルス・ゲノムなどのウイルス性ゲノムを一定の条件下で複製するDNAを示す。この複製性、あるいは条件的複製性核酸は腫瘍抑制遺伝子あるいは抗オンコジーンなどの追加的な治療用遺伝子を含んでいる場合と、含んでいない場合がある。

20

【0344】

d. 脂質の投与

患者に投与される脂質組成物（例えば、リポソーム修飾蛋白質あるいは修飾蛋白質をコードするポリヌクレオチド）の実際の用量は医師により、体重、症状の程度、その患者の特異体質及び投与経路に基づいて決められる。これらのことを考慮に入れば、特定の固体及び/又は治療コースに対する脂質組成物の用量は簡単に決めることができるであろう。

。

【0345】

（実施例）

以下の実施例は本発明の特定の実施の形態を説明するために示されるものである。なお当業者であれば、以下の実施例で開示されている本発明者によって発見された技術は本発明の実施によく適合しており、その実施の態様を構成していると考えられることは理解できるであろう。しかしながら、当業者であればここに示されている具体的な実施の形態に多くの変更を加え、それでも本発明の精神と範囲を逸脱せずに同様の結果を得られることができるであろう。

30

【実施例1】

【0346】

配列欠失に関する研究

組み換え体ゲロニン（配列識別番号：2）をコードするヌクレオチドをテンプレートとして用いてこれらの毒素をつくった。rGelの配列分析と構造モデル化を行ったところ、ひだのついたシート、ベータ・コイル、及びヘアピン・ループにその分子がかなり組み込まれていることが示された。これらの研究によれば、アミノ酸200-270（C末端）はそのB鎖に対するRTAのドッキング・ポートのそれと類似した結合ポケットに折り込まれているようである。rGelはB鎖を有していないから、この『ドッキング・ポート』はその毒素の退化した部分であると考えられ、この蛋白質の生物学的活性には不必要であるのかもしれない。

40

【0347】

図3Aと3B及び表7に示すようなC末端とN末端からrGelをコードするcDNA分子の配

50

列欠失突然変異体をつくって、CFR1901-CFR1905と命名した。予備的な研究で、構成物CFR 1904、1905、2001、2007、及び2024はウサギ網状赤血球溶解アッセイ（RRLA）で検出可能な活性を示してた。これらの構成物は、『活性』毒性分子（Munishikin et al., 1995）の範囲にあると考えられるCRF 1888と比較して 10^5 - 10^3 倍低かった。

【0348】

CFR1901

アミノ酸1-46が欠失しているCFR 1901をつくるために、CFR 1888の精製cDNA 1 μ gをpX2ベクター（最初はpET-22、Novagen, Inc.に基づいて作成されたもの）に入れたものを50単位の制限エンドヌクレアーゼNco I及びSma I(Boeringer-Mannheim)で消化した。5' Nco Iサイトのオーバーハング・フラグメントを1単位のMung Beanヌクレアーゼ（New England Biolabs）を加えて鈍化させ、30°Cの温度で0.5時間培養した。Mung Beanヌクレアーゼを取り除くために、Qiagen PCR精製キットを用いた。得られたDNAを3'鈍化SmaIサイトとライゲーションして、環化した。

【0349】

CFR 1902

Nco I及びCla I制限エンドヌクレアーゼでCFR 1888を消化した。再ライゲーションをおこなう前にそれを鈍化させるために3'オーバーハング上でKlenow酵素（New England Biolabs）を用いて正しい読取フレームを維持するためにそれら末端を満たした。

【0350】

蛋白質を発現させるために、50ngの血漿DNAを50 μ lのBL21(DE3)pLysS強力大腸菌ホスト細胞(Novagen, Inc.,)に形質転換させた。個々のコロニーを取り出して、Ampicillin(Sigma Chemical Co.)200 μ g/mlを含むLuria Broth 100ml内に入れて37°Cで振動させながら成長させ、OD₆₀₀を0.6-0.8とした。そしてIPTG（Boeringer-Manheim）をその培養体に加えて、0.1mM最終濃度で組み換え体蛋白質を誘発させた。この培養体をさらに2時間37°Cの温度で培養してから、遠心分離で生成物を取り出した。

【0351】

【表 7】

名称	指定	説明及び又はアミノ酸欠失	アミノ酸置換/付加	その他の機能的付加
1888	CFR 1888	none	C-terminus KDPE change to KDEL	none
KS	CFR 1901	CFR 1888 minus AA 1-46	none	none
KC	CFR 1902	CFR 1888 minus AA 1-67	none	none
KB	CFR 1903	CFR 1888 minus AA 198-251	Additional LAAA before AA 251	none
SB	CFR 1904	CFR 1888 minus AA 1-46 and 198-251	Additional LAAA before AA 252	none
CB	CFR 1905	CFR 1888 minus AA 1-67 and 198-251	Additional LAAA before AA 253	none
3825	CFR 2018	CFR 1888 minus AA 104-111	AA 43 = K,C; Additional L after AA 164	none
	CFR 2018	CFR 1888 replaced AA 252-257	VDKDPKA	none
N10	CFR 2001	CFR 2018 minus AA 1-9	none	none
N43	CFR 2007	CFR 2018 minus AA 43-70	none	none
N87	CFR 2015	CFR 2018 minus AA 87-107	none	none
N4389	CFR 2024	CFR 2018 minus AA 43-70 and 89-109	none	none
N100130	CFR 2005	CFR 2018 minus AA 100-109 and 130-155	none	none
C211	CFR 2004	CFR 2018 minus AA 194-223 and 235-252	none	none
3825-Y1	CFR 2019	CFR 2018 minus AA 202-252	FQMVTIDQLKPKIALLLKFKV	none
3825-Y2	CFR 2020	CFR 2018 replaced AA 28-43	NQWDGTQHGVELRQQ	none
3825-Y3	CFR 2021	CFR 2018 replaced AA 73-89	IYIMGTQERNEKLFYR	none
3825-Y4	CFR 2022	CFR 2018 replaced AA 187-196	EENETTCYMG	none
4389-Y1	CFR 2025	CFR 2024 replaced AA 153-203	FQMVTIDQLKPKIALLLKFKV	none
4389-Y2	CFR 2026	CFR 2024 replaced AA 28-42	NQWDGTQHGVELRQQ	none
4389-Y3	CFR 2027	CFR 2024 replaced AA 45-60	IYIMGTQERNEKLFYR	none
4389-Y4	CFR 2028	CFR 2024 replaced AA 138-147	EENETTCYMG	none
3825-Y1.2	CFR 2029	CFR 2019 replaced AA 28-43	NQWDGTQHGVELRQQ	none
3825-Y1.3	CFR 2030	CFR 2019 replaced AA 73-89	IYIMGTQERNEKLFYR	none
3825-Y1.4	CFR 2031	CFR 2019 replaced AA 187-196	EENETTCYMG	none
3825-Y2.3	CFR 2032	CFR 2020 replaced AA 73-89	IYIMGTQERNEKLFYR	none
3825-Y2.4	CFR 2033	CFR 2020 replaced AA 187-196	EENETTCYMG	none
3825-Y2.3.4	CFR 2034	CFR 2032 replaced AA 187-196	EENETTCYMG	none
3825-Y1.2.3.4	CFR 2035	CFR 2034 replaced AA 202-251	FQMVTIDQLKPKIALLLKFKV	none

【実施例 2】

【0352】

抗原性線形ペプチド領域のマッピング

rGel分子上の抗原性領域についてはこれまで文献に示されていない。rGel分子の抗原性領域は炭水化物かあるいはその分子のペプチド配列に依存している場合がある。バクテリアでつくられる組み換え体rGelは蛋白質グリコシル化を含んでおらず、従って、rGelに向けられた抗体はその分子上でペプチド領域を認識しなければならない。

【0353】

10

20

30

40

50

rGel上の抗原性領域を識別するために、先ずヒト・ポリクローナル抗体を組み換え体ゲロニンに職業的に露出されている実験室作業員の血清から単離した。それら実験室作業員から得られた血清をrGelで被覆した96ウェルELISAプレートに加えた。そのプレートを抗ヒト抗体を用いて処理して、ヒト抗ゲロニン抗体の存在を確認した。3名の作業員のうちの2名から採取した血清は比較対照のヒト血清と比較してかなりの抗体力価を示した(図1)。次に、これら2名の作業員からの血清の20mlを入手して、rGelを含むAffi-gel親和性樹脂を用いた親和性クロマトグラフィでポリクローナル性・ヒト抗ゲロニン抗体を得た。

【0354】

rGel分子の全長にわたって広がっている10個のペプチドを合成して、96ウェル・プレートを被覆した。ヒト抗ゲロニン抗体溶液をそのプレートに加えて反応させ、ELISAを用いてペプチド被覆ウェルに接着した結合ヒト抗体の存在をアセスした。図2に示すように、23-53(領域1)、72-89(領域2)、181-198(領域3)、そして223-252(領域4)に広がるペプチドで、上記ポリクローナル抗体のかかなりの反応性が得られた。ゲロニンに対するヒト・ポリクローナル抗体によって特異的に識別されるこれらの抗原性領域を欠失するために、デザイナー毒素CFR-200102024を設計した。

【実施例3】

【0355】

抗原配列のヒト配列による置換

ゲロニン分子の4つの特異性抗原領域(アミノ酸205-257、23-42、71-88、及び189-204)を識別するために、ヒト抗ゲロニン抗体を用いて得られた抗原性領域に関する情報を利用して、ヒト/植物キメラ性分子を設計した。これらの配列をGenQuest/BLASTデータベースを用いてさらに分析して、すでに知られているヒト蛋白質との相同性を調べた。この研究でさらに考えられたことは、『ヒト』相同性配列を識別するだけでなく、得られたハイブリッド分子の酵素性(n-グリコシド性)機能が保持されるように設計された毒素分子内にそうした配列を配置することであった。

【0356】

デザイナー毒素への挿入の候補となる4つの配列をデータベースから識別して、アミノ酸変更のベースとして用いた(表8)。領域1に対するヒト相同性配列は、亜鉛結合領域に対する血液蛋白質であるヒトKELL蛋白質に対する高い相同性(40%)を有している。興味深いことに、天然のゲロニンの初期の研究はその分子は亜鉛と結合することができることを示唆しているが(Speti et al., 1986)、これらの研究は確認されていない。領域4(アミノ酸189-204)の分析は、ヒトCFAH蛋白質に対する同一性(40%)を示し、これはヒト肝臓機能において共同因子としての役割を果たしているように見える。領域2(アミノ酸23-42)相同性研究は、ヒトUTR0蛋白質に対して44%の相同性を示し、細胞性血漿膜の細胞骨格固着において1つの役割を果たしているように思われる。

【0357】

【表 8】

ヒト相同性置換

5	<u>Y1 (205-257)</u> (Original) (Humanized)	GKLSFQIRTSANGMFSEAVELEERANGKYYVVTAVDQVKPKIALLKFLKDP GKL-FQMVT-----IDQLKPKIALLKFFVK-----
10	<u>Y2 (23-42)</u> (Original) (Humanized)	ELRVKLKPEGNSHGIPLLRKK ELRVKNQWDGTQHGVEL-RQQ
15	<u>Y3 (71-88)</u> (Original) (Humanized)	SVYVVGYYQVRNRSYFFKD SIYIMGIQERNEKLFYR-
20	<u>Y4 (189-204)</u> (Original) (Humanized)	QRIRPANNTISLENKW QRIRENETTCYMGKW

10

20

30

【0358】

抗原性サイトの修飾及び欠失を含むデザイナー毒素を領域3でさらに修飾して、ヒトKELL蛋白質との同一性を100%にした。KELL配列を側鎖しているデザイナー分子のアミノ酸も、全長KELL蛋白質の配列と非常に類似するように調節した。領域3の置換のために設計された最終的配列を表8に示す。表9はヒト相同性蛋白質を含む全長蛋白質に関するGen Bank配列相同性調査の結果を示している。

40

【0359】

我々の長鎖の結果は、最初のテンプレートとして組み換え体ゲロニンを用いて、独特の欠失を設計、構成、及びテストすることができることを明確に示している。

【0360】

【表 9】

Y-1, Y-2, Y-3, Y-4 と命名された、確認されたゲロニン抗原性配列に関する
置換代替性ペプチドの分析

Y 1 置換 Protein #	説 明	同一性 (%)	配 列
P33186 RPIG_GELMU	Gelonium Multiflorum	100	VELERANGKKYYVTAVDQVKPK
P23339 RIPS_PHYAM	Phytolacca Americana	47	VELERANGKKYYVTAVDQVKPK
Q03464 RIPA_PHYAM	Phytolacca Americana	47	LELKNADGKWKVLRVDEIKP
P10297 RPC_PHYAM	Phytolacca Americana	47	LELKNANGSKWVLRVDDIEP
P10978 POLX_TOBAC	Nicotiana Tabacum	40	LELVDSAGAKWVLRVDEIKP
Q05234 VG27_BPML5	Mycobacteriophage L5	50	MEIESMGGNKYFVTFIDDAARK
P23276 KELL_HUMAN	Homo Sapiens	40	VELEGVNGERFNLTTGDQ
P21278 GB11_MOUSE	Mus Musculus	38	LEQRRAGQKLFQMVTIDQLK
			EFQLSDSAKYYLTDVDRI
Query= LRVKLKPEGNSHGIPLLRKK			
Y 2 置換 Protein #	説 明	同一性 (%)	配 列
P33186 RPIG_GELMU	Gelonium Multiflorum	100	LRVKLKPEGNSHGIPLLRKK
P24475 RIP3_GELMU	Gelonium Multiflorum	89	LRVKTKPEGNSHGIPSLRK
P09053 AVTA_ECOLI	Escherichia Coli	60	LKLDALGNQHGIPLV
Q06194 FA8_MOUSE	Mus Musculus	47	LSLRPHGNSHISIGANEK
P39138 ARG1_BACSU	Bacillus Subtilis	50	LETSPSGNTHGMPL

10

20

30

40

P10305	ENPP_BPT3	Bacteriophage T3	61	LRVRVKPTGTSEG
P43254	COP1_ARATH	Arabidopsis Thaliana	50	KVEGKAQGSSHGLP
P46939	UTRO_HUMAN	Homo Sapiens	44	RVKNQWDGTQHGVELRQQ

Query= SVYVVG YQVRNRSYFFKD

Y 3 置換

Protein #	説明	同一性 (%)	配列
P33186	RPG_GELMU	100	SVYVVG YQVRNRSYFFKD
P29339	RIP2_MOMBA	61	NVYVVA YRTRDVS YFFKE
Q00465	RIPA_LUFCY	50	NVYTMGYLVNSTSYFFNE
P24478	RIPS_TRIKI	50	NVYVMGYRAGDTSYFFNE
P02879	RICI_RICCO	56	NAYVVG YRAGNSAYFF
P28590	ABRC_ABRPR	44	NAYVVA YRAGSQSYFLRD
P23368	MAOM_HUMAN	37	IYTMGIQERNEKLFYR
P36758	VL2_HP V34	44	SLYVVP RKRKRLSYFFAD
Q05143	COX1_PROWI	50	MYVVG LDDIDTRAYF

Y 4 置換

Protein #	説明	同一性 (%)	配列
P33186	RPG_GELMU	100	FQQRIRPANNTISLENKW
P37874	YGBB_BACSU	41	FQQRIRPANNTISLENKW
P34652	CALX_CAEEL	31	GQEKIPPAHSSVCLLDKW
P34110	VP35_YEAST	39	KGKWRPKISNPAFKGKW
	Saccharomyces Cerevisiae		LQQTPLVESVTVLSLKW

10

20

30

40

Q07009	CAN2_RAT	Rattus Norvegicus	33	KLIRIRNPWGQVEWTGKW
P37329	MODA_ECOLI	Escherichia Coli	50	QIEAGAPADLFISADQKW
P14336	POLG_TBEVM	Tick-borne Encephalitis Virus	83	VREDVVCYGGAWSLEEKW
P08603	CFAH_HUMAN	Homo Sapiens	40	GGFRISEENETTCYMGKW
P17632	MBHL_RHOGE	Rhodocyclus Gelatinosus	29	LVANIRAGDTATANVEKW

10

20

30

40

【実施例 4】

【0361】

デザイナー・ゲロニン毒素

以下の箇所は、以上の実施例で述べられた方法を用いて構成されたゲロニン毒素について述べるものである。

【0362】

欠失毒素

50

CFR1888

我々の最初の組み換え体ゲロニン・テンプレートから開始して、最初のKDPEからのC末端を修飾してKDELにして、細胞内リボソーム・コンパートメントに対する蛋白質の細胞内トラッキングをよりやり易くした。

【0363】

CFR1901-1905（表7及び図3A参照）

CFR1888をテンプレートとして用いて、N及び/又はC末端から得た一連の配列欠失突然変異体を発生して、生物学的活性に影響を及ぼさずに欠失された分子の部分を判定した。図3Aに示されるように、個々の欠失1901、1902、及び1903は不活性することが示された。しかしながら、単一の欠失を組み合わせると（CFR1904とCFR1905）、生物学的活性が確立された（図3A）。

10

【0364】

CFR2018

CFR1888をテンプレートとして用いることによって、やや小さめの分子をつくり、そしてC末端にアラニン残基を付加してバクテリア・ホスト内での生産中にin vivoでの安定性を改良するために、蛋白質を表7に示すようにさらに修飾した。

【0365】

抗原性研究に基づく毒素

分子上の抗原性領域をゲロニン分子上に広がる線形ペプチドを用いてマップした。図1に示すように、ヒト・ポリクローナル抗ゲロニン抗血清はその分子上に4つの異なった高原性領域を明らかにした。領域1はアミノ酸205-207を含んでおり、領域2はアミノ酸23-24で構成され、領域3はアミノ酸71-88を含んでおり、そして領域4はアミノ酸89-204で構成されている。

20

【0366】

CFR2001-2024

図3Bに示すように、6つの欠失突然変異体を観察された抗原性領域に基づいてつくった。3つの蛋白質は生物学的活性を示し、3つの蛋白質は不活性であった。

【0367】

CFR2019-2042

ヒト／植物キメラ性分子をつくる置換研究。4つの抗原性領域を配列分析のためにGenBankを提出した。上に述べた4つの抗原性領域に基づいて、ヒト相同性配列を探すために、スイスプロット蛋白質配列研究を行った。

30

ヒト相同性配列

領域1（アミノ酸205-257）はヒト血族蛋白質KELL(P23276)の配列にマップすることが分かっている。この蛋白質の配列に対する40%同一性及び65%ポジティブ性が見出されている。

【0368】

領域2（アミノ酸23-42）はヒトUTRO蛋白質（P46939）との44%同一性を有していることが見出された。

【0369】

40

領域3（アミノ酸71-88）に関しては、この配列はヒト蛋白質MAOM(P23368)に対する37%の同一性と68%のポジティブ性を示した。この蛋白質を表8に示す。

【0370】

領域配列4（189-204）に関しては、ヒト蛋白質CFAH(P08603)で40%の同一性が認められた。

【0371】

これらの4つの抗原性領域に対応するヒト・キメラ性配列をこれらのデータ（表8）からつくりだした。これらの配列は植物蛋白質内の抗原性領域に対するヒト非高原性置換を示している。

【0372】

50

CFR2019-2024

CFR2019と2024をテンプレートとして使用することで、多数の新しいデザイナー蛋白質を発生させ、CFR2019-2014と命名した（表7）。これらの蛋白質はその分子上の1、2、3及び4領域のヒト・キメラ性相同体による置換を示している。これらのデザイナー毒素のうちのいくつか（CFR2018、2019、2024、及び2025）を50kDa tagを含むバクテリア内で発現させて、精製し、相同体にした。上記tagに対するポリクローナル抗血清を用いてウェスタン分析を行った。

【0373】

2019、2024及び2025分子は開始テンプレート2018蛋白質と比較してサイズが減少していた。ウェスタン分析はSDS-PAGE上で各毒素分子を均等に付加した抗tag抗体とほぼ同じ反応性も示す。ウェスタン・プロットを天然CFR1888分子に対する抗体を用いて再プローブした。しかしながら、ウェスタン・プロットに示されるように、2018蛋白質に対して優れた反応性があり、2019及び2025デザイナー毒素に対してはこのポリクローナル抗血清の反応性は認められず、2024デザイナー毒素に対しては軽度の反応性しか認められなかった。このことは、特殊な欠失（CFR2024）あるいは抗原性領域（CFR2019）の置換、あるいは抗原性領域（CFR2025）の欠失及び置換の組み合わせによって、ウイルス的に親分子に対する抗体が認識できなくされた、従って抗原性特性を有する新しい毒素分子をつくることのできた。

【0374】

CFR2143-2146

蛋白質CFR1888及びCFR2018の最適機能特性を組み込むために、このシリーズのハイブリッド分子を設計した。

【0375】

CFR2247-2458

タイプI毒素の両方のn-グリコシド性機能をBAX及びグランザイムBなどの選択されたアポトーシス促進性ヒト分子を組み合わせ、一連の分子を開発する。ゲロニン成分の機能的活性とBAX及びグランザイムBの活性に対するこれらの分子の評価を行った。これらは細胞を含まない蛋白質合成の抑制に関しての評価も行われる。

【0376】

評価はまず、このシリーズの分子で、細胞におけるBAXの発現に関して行われる。これは、免疫沈降やウェスタン・ブロッティングなどの免疫アッセイで、抗ユニバーサルBax 6A7などのBAX抗体を用いて行うことができる。Bax発現を確認した後、細胞の成長可能性について測定する。これはホタル・ルシフェラーゼ構成物を用いる方法を含めて、多数の方法で行うことができる。これを行うために、ホタル・ルシフェラーゼ（Luc）構造遺伝子を保有する哺乳動物発現ベクターpGL3(Promega)をBAX及びBAX融合蛋白質をコードするプラスミドと共に哺乳動物細胞株にトランスフェクトさせることができる。20mlの細胞抽出物を用いた液体シンチレーション・カウンティングによってルシフェラーゼ活性を測定することができる。細胞存続性は、テストされた構成物の相対的ルシフェラーゼ活性と指定された比較対照プラスミドと比較して測定される。

【0377】

グランザイムBポリペプチドのすべて、あるいは一部を含むハイブリッドを、L-グルタミル-2-ナフチルアミド（Bachem, Philadelphia, PA）の加水分解後、2-ナフチルアミンの蛍光測定を用いてその酵素活性を評価する。アミダーゼ活性を、340nmで観察される蛍光励起及び415nmで観察される蛍光放射（いずれも5nmバンドパス）を用いるPerkin-Elmer 650-10M分光蛍光計で、緩衝液A（0.3M NaCl、0.1M HEPES、1M NaOH、1mM Na₂ EDTA 0.05M (v/v) Triton x-100でpHを7.0に調製）中の1.00mM L-グルタミル-2-ナフチルアミドを用いて21°Cで測定する。酵素溶液の小さな画分を基質溶液に加えて、蛍光放出の増強を10-40分測定する。あるいは、BAADT(N-a-t-ブトキシカルボニル-L-アラニル-L-アスパルチル-チオベンジルエステル)を基質として用いて継続比色アッセイでグランザイムB活性を判定する。カラム画分の分析のために、1-50µlを(CH₃)₂50に1M (v/v) 10mM BAA

DTを溶かしたもの、及び(CH₃)₂SOに1M (v/v) 11nM ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (Sigma) と共に21℃で緩衝液Aに加えて、吸収増加率を405nmでThermomaxプレート・リーダー (Molecular Devices Inc., Palo Alto, CA) で測定する。吸収増大率を酵素量に転換する。

【0378】

実施例5のための材料と方法

材料

抗体ZME-018をコードするcDNAをNovagen (Madison, WI)及びInvitrogen Corp. (Carlsbad, CA)からのキットを用いてマウス抗体を発現するハイブリドーマ細胞から得たハイブリドーマRNAから増幅された。PCR試薬をFisher Scientific (Pittsburgh, PA)から入手して、分子性生物酵素はBoehringer Mannheim (Indianapolis, IN)あるいはNew England Biolabs (Beverly, MA)から購入した。バクテリア株とpEtバクテリア発現プラスミドはNovagen (Madison, WI)から入手し、成長用培地はDifco Laboratories (Detroit, MI)から入手した。他のすべての化学物質と試薬はFisher ScientificあるいはSigma Chemical Co. (St. Louis, MO) からのものであった。金属親和性樹脂 (Talon) はClontech Laboratories (Palo Alto, CA)から入手した。他のクロマトグラフィ樹脂及び材料はPharmacia Biotech (Piscataway, NJ)から入手した。組織培養試薬はGIBCO BRL (Gaithersburg, MD)からのものであった。

10

【0379】

抗体ZME-018のVH及びVL領域のクローニング

抗体AME-018(IgG2A)を発現するマウス・ハイブリドーマFMT112P2からのメッセンジャーRNAを、Invitrogen Fast Trackキットを用いて単離し、特定の条件下でInvitrogen Copy Kitを用いてcDNAに転写した。抗体の軽い、及び重い鎖可変領域の増幅をマウスIg-プライマー・セットを有するNovagen Ig-prime キットを用いて行った。軽鎖増幅に関するPCRプロファイルは以下のとおりであった。94℃ x 1分を30サイクル、60℃ x 1分、72℃ x 1分、そして最後に72℃で5分間の培養。重鎖反応については、アニーリング温度を60℃ではなく50℃にしたことを除いては、同じ条件を用いた。この手順を用いて増幅されたDNAはその後、さらに精製せずにInvitrogen T/Aクローニング・ベクターpCR IIにクローンして、大腸菌XL1-Blueに形質転換し、そして青-白スクリーニング手順を用いて識別した。ポジティブ・クローン (軽鎖及び重鎖ライブラリからそれぞれ5つづつ) を、T7及びSP6プロモーター・プライマーを用いて配列決定し、他の免疫グロブリン配列による相同性によって確認した。

20

30

【0380】

1 本鎖抗体scfvMEL及び免疫毒素scfvMEL/rGelをコードする遺伝子の構成

軽鎖及び重鎖DNAクローンをテンプレートとして用いて1本鎖抗体ZME-18を構成するために、2ステップ・スプライスオーバーラップ伸長PCR法 (Sambrook et al., 1989) を用いた。プライマーA (5'-GCTGCCCAACCAGCC ATGGCGGACATTGTGATG-3') とC (5'-GCCGGAGCC TGGCTTGC(A/C)GCCGCTGGTGGAGCCTTTGATC8A/T) CCAG-3')を用いて軽鎖配列を増幅させ、重鎖DNAはプライマーB (5'-AAGCCAGGCTCCGGCGAAGGCAGCA CCAAAGG CGAAGTGAAGGTT-3') 及びD (5'-GCCACCGCCACCACTAGTTGAG GAGACTGT-3')を用いて増幅させた。それぞれの反応のPCR特性は以下のとおりであった。94℃で1分間の変性を30サイクル、50℃で1分間のアニーリング、そして72℃で1分間の延伸、そして最後に72℃で5分間の培養。これらの反応のそれぞれの10分の1体積を組み合わせて二度目のPCRで直接使い、プライマーA及びDだけは前の反応プロファイルに従った。GeneClean II (Bio 101, Vista, CA)を用いて最終生成物を精製し、制限酵素Nco I及びSph Iを用いて消化し、T7に基づくプラスミド・ベクターpET 22bを用いて消化した。スプライスオーバーラップ延長PCR方法で、scfvMELをコードする遺伝子と組み換え体ゲロニンを抗体とゲロニンDNAをテンプレートとして用い、さらにプライマーNbsphZME (5'-GGCGGTGGCTCCGTCATGACGGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAA TTC-3')、プライマーNTXOM (5'-GGTGGCGGTGGCTCCGGTCTAGACACCGTGACG-3')、そしてプライマー XOMBAC (5'-AAGGCTCGTGTGACCTCGAGTCATTAAGC TTAGGATCTTTATC-3') (図4)を用い

40

50

て融合させた。精製されたPCR生成物をさらに精製して、前に述べたのと同様の手順で消化し、ベクターpET-32aにクローンした。配列決定されたDNAクローンを次にNovogenから入手した大腸菌株AD494(DE3)に形質転換して融合毒素を発現させた。

【0381】

大腸菌における蛋白質の発現

免疫毒素を発現させるために、バクテリア培養体を強力な抗生選択性を有する2xYT成長培地（200 μ g/mlアンピシリン、70 μ g/mlクロラムフェニコール、及び15 μ g/mlのカナマイシン）で培養して、初期対数フェーズ（ $A_{600}=0.4-0.8$ ）まで成長させた。この培養体と同じ濃度の抗生物質を含む新鮮な2xYT培養液で1：1に希釈して、発現された標的蛋白質に0.1mM IPTGを加えて、23℃で16–23時間培養した。誘発されたバクテリア性培養体をその後遠心分離にかけ、−80℃の温度で後日精製するために凍結した。

【0382】

免疫毒素／蛋白質精製

免疫毒素scFvZME-Gelを発現している誘発された培養体からの凍結したバクテリア・ペレットを室温で解凍して、1 mg/mlのリソザイムを10mM トリス塩酸、pH8.0を加えて4℃の温度で30分間かけて溶解した。バクテリア溶解物を10秒間づつ、10回細胞破断装置で超音波処理して、4℃の温度で30分間、1400rpmで遠心分離にかけた。上澄み液を移して、氷上に保存し、細胞ペレットを用いて音波処理を繰り返した。2つの溶解物から得た上澄み液を混ぜ合わせて、SS-34ロータで4℃の温度で45分間、40,000rpmで超遠心分離処理にかけた。可溶性蛋白質だけを含んでいるサンプルをろ過し（0.22 μ mポア）でろ過して、40mM トリス塩酸と1M トリス塩酸（pH8.0）で調製し、そして室温で同じ緩衝液で事前に均衡化されたtalon金属親和性カラムに入れた。負荷後、カラムを3カラム体積の負荷緩衝液で洗浄して、その後、5カラム体積分の40mM トリス塩酸、pH8.0、50mM NaCl、そして5mM イミダゾールで洗浄した。結合した蛋白質をその後、5カラム体積の、40mM トリス塩酸（pH8.0）、500mM NaCl、及び100-200mMのイミダゾールを含む緩衝液で溶出させた。免疫毒素を含む画分を混合し、定量し、20 mM トリス塩酸（pH7.2）、50mM NaClに透析させてから、エンテロキナーゼで消化して、Novagen(Madison, WI)によって確立された手順を用いて6xHisタグを取り除いた。

【0383】

ELISA及びウエスタン分析

とくに指定がない限り、すべてのELISA培養手順は室温で行われ、培養と培養の間に、すべてのウェルをELISA洗浄緩衝液（10mM トリス塩酸、pH8.0、150mM NaCl、0.2% ツイーン20）で洗浄した。96ウェル・マイクロタイタ・プレートのウェルはそれぞれ50,000gp 240-抗原－陽性A375M黒色腫細胞で被覆して、乾燥した。そして、再水和化して、3%BSAを洗浄緩衝液に溶かしたものでブロックした。プレートを培養して、精製された免疫毒素サンプル、ウサギ・抗ゲロニン・ポリクローナル抗体（100ng/ml希釈緩衝液〔BSAを1mg/mlの濃度で含んだELISA洗浄緩衝液〕）、及びペロキシダーゼ接合ヤギ抗ウサギIgG(Sigma、希釈緩衝液内に1：5000で希釈して使用)を加えた。個々のウェルを洗浄緩衝液で徹底的に洗浄して、その後、ABTS(2,2'-アジノ-ビス[3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸])を0.1Mクエン酸緩衝液（pH4.2）に溶かしたもので、培養して、405nmで信号を測定した。

【0384】

ウエスタン・プロットのために、すべての培養は特に注記がない場合、室温で1時間行われた。簡単に言うと、蛋白質をSDS-PAGEによって分離し、4℃でニトロセルロース上に一昼夜かけて40Vの電圧下で、転送緩衝液内（25mM トリス塩酸（pH7.5）、190mM グリシン、20% (v/v) HPLC-グレード・メタノール）内で転送した。フィルターを5% BSAをウエスタン・ブロッキング緩衝液（50mM トリス塩酸（pH7.5）、150mM NaCl）に溶かしたものでブロックして、その後、ウサギ抗ゲロニン・ポリクローナル抗体（ウエスタン洗浄緩衝液TBS、pH7.6、0.5% ツイーン20、濃度100ng/mL）及びペロキシダーゼ接合ヤギ抗ウサギIgG(Sigma、洗浄緩衝液内に1：10,000で希釈)と連続的に反応させた。信号をAmersham EC

L 検出システムで現像した。

【0385】

網状赤血球溶解物 in vitro 翻訳アッセイ

種々の用量の免疫毒素の投与に続いて起きる細胞を含まない蛋白質合成システム内での蛋白質への放射性ラベル (^3H) ロイシン組み込みのゲロニン誘発抑制をメーカー (Promega) の指示どおりに、これまでに述べられている手順 (Press et al., 1986) に従って実行した。

【0386】

免疫蛍光染色

抗原ポジティブ (A375 黒色腫) 細胞をポリリシンで被覆した16ウェル・チェンバー・スライド (Nunc) に1チェンバーあたり 10^4 細胞に加えて、 37°C で一昼夜、5% CO_2 雰囲気内で培養した。細胞を $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度の scfvMEL/rGel 融合蛋白質を用いて種々の時間で処理した。細胞を PBS で簡単に洗浄して、その後、細胞表面に結合した蛋白質をグリシン緩衝液 (500mM NaCl、0.1M グリシン、pH2.5) で10分間培養してストリッピングし、0.5M トリス、pH7.4を用いて5分間中性化し、PBS で簡単に洗浄してから、3.7%ホルムアルデヒド (Sigma) 内に室温で15分間固定し、次にPBSで簡単に洗浄した。細胞を0.2%トリトン X-100を含むPBS内で10分間浸透可能にし、PBSで3回洗浄してから、3%BSAを含むPBSで室温で1時間培養した。PBSで簡単に洗浄してから、細胞を0.1%ツイーン20と0.2%BSAを含むPBS内に1:500で希釈したウサギ抗scFvMELあるいはウサギ抗rGelポリクローナル抗体で、室温で1時間培養した。細胞を0.1%ツイーン20を含むPBS (PBST) 内で10分間3回洗浄して、3%BSAを含むPBSで室温で1時間ブロックして、その後、1:100に希釈したフルオレセン・イソチオシアネート (FITC) 結合抗ウサギIgG (Sigma) で洗浄した。PBSTで3回最終的な洗浄を行った後、細胞をPBS内で10分間洗浄して、封入剤に封入した。スライドを蛍光顕微鏡で分析したところ、各写真は400xの倍率で、各実験に少なくとも10のフィールドを示した。

【0387】

In vitro 細胞毒性アッセイ

ログ・フェーズ (5,000/ウェル) 抗原ポジティブ A375M 及び抗原ネガティブ Me-180 あるいは SK-OV-3 細胞単層を用い、前に述べたような結晶バイオレット染色手順 (Nishikawa et al., 1992) を用いた標準 72 時間細胞増殖アッセイを用いてサンプルの評価を行った。

【0388】

In vivo 細胞毒性研究

生後 4-6 週間の胸腺欠損 (ヌード) マウスを1つの檻に5匹ずつ分けて入れた。ログ・フェーズ A-375 ヒト黒色腫細胞 (5×10^6 細胞/マウス) を右脇腹に皮下注射して、腫瘍を形成させた。腫瘍が測定できる大きさ (約 $30-50 \text{mm}^2$) になった段階で、動物を食塩水 (比較対照) あるいは種々の濃度の scfvMel/rGel 融合体毒素を用いて連続 4 日間措置した (i.v. 尾血管)。さらに30日間、動物を観察して腫瘍を測定した。

【実施例 5】

【0389】

ゲロニンに融合された1本鎖組み換え体抗黒色腫抗体 scFvMEL/rGel 融合蛋白質の設計

ZME-018 抗体に対する可変領域遺伝子とゲロニン遺伝子 (Rosenblum et al., 1999) を抗黒色腫免疫毒素遺伝子構成のためのテンプレートとして用いた。第1のステップとして、我々は1つの方向で免疫毒素を組み立てて、抗原ポジティブ A375M 黒色腫細胞に対するその結合及び細胞阻害性についての評価を行った。上記抗体及びゲロニン・フラグメントをコードする遺伝子をPCRに基づく方法で共に結合させて、抗体-ゲロニン方向で融合体を構成した。免疫毒素遺伝子もヘキサヒスチジン配列でC末端タグされ、Novagen T-7 に基づく発現ベクター pET-32b を用いて大腸菌 AD494 (DE3) pLysS で発現された。

【0390】

10

20

30

40

50

図4は発現された免疫毒素の向きを示し、さらに、蛋白質領域の接合部のアミノ酸リンカーの配列を示している。 V_H C-末端を有する18アミノ酸フレキシブル・ペプチド・リンカー (Afthan et al., 1995) を有する蛋白質のN末端で軽鎖可変領域 (V_L) をコードさせるための抗体を構成した。ゲロニン (CFR2018) (この事例ではrGelと称す)は V_H の下流に、別のリンカーの後に位置している。我々がこの構成を選ぶのは、その抗体結合サイトが邪魔されない柔軟性を有しているからである。この融合蛋白質のN末端の毒を用いた場合、2つの蛋白質成分の最適空間方向性を提供するためにより長いペプチドが必要であり、この変種の構成は現在進行中である。この最終的な融合遺伝子 (図5) のDNA配列決定研究は、最終生成物の配列を確認し、このPCR方法を用いた場合、エラーは起きなかったことが確認された。加えて、配列決定の結果、標的遺伝子がeET-32bベクター内の正確な読取フレームに挿入されたことが確認された。

10

【0391】

この組み換え体融合毒素の細胞を含まないシステムの蛋白質合成抑制活性を遊離組み換え体ゲロニンのそれと比較したところ、我々が設計した分子の抗体フラグメントの近似性の故に、ゲロニン活性サイトの裂け目にそれほどステアリン酸集中がないことを示唆している。また、この融合構成物内には蛋白質切断サイトが存在しないので、このデータはゲロニンが必ずしもその生物学的活性を保持するためにその構成体からの切断を必要としないことを示唆している。これは生物学的活性を回復するためにその蛋白質基質からの開放を必要とする (Kim et al., 1988; O'Hara et al., 1990) リシンA鎖 (RTA) を用いた研究とは鋭い対照を示している。ゲロニンとRTAとは同じ作用メカニズムを有しているの

20

【0392】

融合蛋白質の発現と精製

融合蛋白質を含むプラスミド・ベクターpET-32bを大腸菌AD494(DE3)pLysSに形質転換して、IPTGを添加して標的蛋白質を誘発させた。コマッシー染色ゲルで示されたように、推定分子量(68kDa)の蛋白質が誘発された。この蛋白質をIMAC樹脂を用いて精製し、そして溶出物を組み換え体エンテロキナーゼ(EK)に露出させたところ、56kDaでマイグレートする最終的天然融合構成体が1つのバンドとして作りだされた。この融合構成体を抗ゲロニン抗体と抗1本鎖抗体の両方を用いるウエスタン・ブロットで検査した。56kDaでマイグレートするsfvMEL/rGel融合構成体は両方の抗体と反応し、従って、上記融合構成体での免疫反応性抗体と毒素成分の存在が示された。誘発されたバクテリア培養物からの可溶性sfvMEL/rGel免疫毒素の推定生成率は700 μ g/Lであったが、最終的に精製された収率は約200 μ g/Lであった。収率が減少した基本的な理由は、IMACが利用できる可溶性標的蛋白質のすべてを完全に捉えることができないことにあることが認められた。結合緩衝液及び条件の変更、及びIMAC捕捉のバンドを変えてもこれらの結果に対する改善は認められなかった。

30

【0393】

免疫毒素のELISA結合

精製された融合蛋白質が抗原結合能力を有していることを確認するために、この物質の結合を抗原供給源として完全な抗原ポジティブ・ヒト黒色腫細胞を用いた競合ELISA結合アッセイで、完全なIgG ZME-018ゲロニン化学接合体及びIgG ZME-018の結合と比較した (図6)。scfvMEL/rGel融合構成体は化学接合体と同様の結合親和性を有していることが分かった。この蛋白質はSK-OV-3あるいはME-180細胞に対するバックグランド・レベルで標的A375黒色腫細胞に対する特異的でかなりのELISA結合能力を有していることを示した。

40

【0394】

sfvMEL融合毒素の無細胞蛋白質合成抑制活性

毒素の生物学的活性は融合構成体に組み込まれた場合、かなり減少される場合がある。融合構成体のrGel成分のn-グリコシド活性を調べるために、この物質を単離されたウサギ

50

網状赤血球による³Hロイシン組込みを用いるin vitro蛋白質翻訳アッセイに加えた。この融合構成体と天然のrGelの抑制曲線を比較したところ、これらの2つの分子のIC₅₀値はほぼ同じであることが分かった(100pM:104pMそれぞれ)。

【0395】

免疫蛍光によるscfvMEL/rGelの結合及び内部化

投与後の異なった時点でのscfvMEL/rGelで処理されたA375-M細胞で免疫蛍光染色を行った。内部化された構成体はウサギ抗rGelあるいはウサギ抗scfvMEL抗体を用い、次にFITC-結合抗ウサギIgGを用いて検出された。scfvMEL/rGel融合蛋白質のrGel成分は処理後主に細胞質ゾルで観察され、rGelの量は時間の経過と共に増大した。さらに、scfvMEL/rGelのscFvMEL成分も細胞質ゾルで観察された。このことは、上記融合構成体がログローフェーズ細胞に露出後に効率的な細胞結合及び内部化を行うことができることを示している。

10

【0396】

免疫毒素のin vitro細胞阻害性活性

sfvMEL/rGel精製融合蛋白質と最初のZME/rGel化学構成体を抗原ポジティブ(A375)及び抗原ネガティブ(SK-OV-3)細胞株に対する特異的な細胞阻害性に関してテストした。図7に示すように、化学的につくられた構成体と融合構成体の両方とも約10nMのIC₅₀値を示した。対照的に、rGel毒素に対するIC₅₀値はほぼ200倍高かった(2,000nM程度)。抗原ネガティブSKOV-3細胞に対する免疫毒素の細胞阻害性効果はゲロニンだけの場合と同様であった。遊離ZME抗体とsfvMEL/rGel免疫毒素を同時に投与する(図8)と、予想されるように用量応答曲線に多少の変位がみられ、融合構成体の細胞阻害性の発生に関する表面抗原認識に対する依存を示している。

20

【0397】

ゼノグラフト・モデルでのsfvMEL/rGelの抗腫瘍活性

十分に成長したA-375黒色腫ゼノグラフトを有するマウスを食塩水(比較対照)、あるいはsfvMEL/rGelのいずれかで、2又は20mg/kgのいずれかの用量で4日間処理した。図9に示すように、比較対照の腫瘍サイズは実験後28日間で30から150mm²に増大した(500%の増大)。対照的に、2mg/kgで融合毒素で処理したマウスでは、腫瘍サイズがやや減少した後、約60mm²に増大した(100%の増大)。融合毒素20mg/kg用量で処理したマウスでは、処理期間中腫瘍サイズが50%減少した後、28日間にわたって最初の腫瘍サイズにゆっくりと戻った(全体としては増大なし)。マウスにおける、この計画で最大許容量(MTD)に達しないことを示唆しているこれらの用量では、免疫毒素に対する明らかな毒性効果はなかった。

30

【実施例6】

【0398】

In vitro細胞阻害性アッセイ

細胞培養方法

ヒト黒色腫細胞A375Mを10%熱不活性化ウシ胎児血清+100µm非基本アミノ酸、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸、ビタミン、そして抗生物質で補強された最低基本培地(MEM)を用いて培養した。培養された細胞を通常の手順でスクリーニングしたところ、マイコプラズマ感染はないことが確認された。

40

【0399】

細胞増殖アッセイ

細胞株を5%CO₂加湿空気培養器内で37℃の完全培地で保存した。組み換え体毒素及び免疫毒素を用いたアッセイを行うために、培養体を洗浄し、ヴェルセンを用いて細胞を切り離し、完全培地内に25x10³細胞/mlの密度で再懸濁させた。2つの100µlアリコットを96ウェル・マイクロタイタ・プレートに入れて、それらの細胞を接着させた。これによって、まばらにシードされた細胞群が得られた。24時間後、この培地を免疫毒素あるいはゲロニンのいずれかをいろいろな濃度で含んでいる培地と入れ替えた。これらの細胞を72時間培養してから、結晶バイオレット染色で相対的な細胞増殖に関する分析を行った。

【0400】

50

結晶バイオレット染色

細胞を結晶バイオレット0.5% (w/v) を含む20% (v/v) メタノールで固定・染色されたカルシウム又はマグネシウムを含むPBSで3回洗浄した。結合された染料を150 µlのSorensenクエン酸緩衝液 (0.1M クエン酸ナトリウム、pH4.2、50% (v/v) エタノール) を用いて、室温で1時間溶出させた。Bio-Tekマイクロプレート・リーダーを用いて吸収を600nmで測定した。相対的細胞増殖(RCP)は、以下の式で計算した。

【0401】

$RCP = (\text{平均吸収度 (薬品処理)}) / \text{平均吸収度 (非薬品処理)} \times 100\%$ [式1]

精製されたscfvMEL-CFR2018、scfvMEL-CFR2025、及びCFR2018のサンプルをログーフューズ (5000/ウェル) 抗原ポジティブA375細胞単層を使い、上に述べたような結晶バイオレット染色手順を用いる標準的な72時間細胞増殖アッセイで評価した。 10

【0402】

結果

図10は上に述べたA-375ヒト黒色腫細胞株の72時間成長アッセイでテストした組み換え体分子のそれぞれの細胞阻害性を示している。図に示されているように、scfvMEL-CFR2018及びscfvMEL-CFR2025融合構成体の両方とも培養中の黒色腫細胞の成長を抑止した。細胞の成長を比較対照値 (IC_{50}) の50%に抑制するのに必要な各作用剤の濃度は100nMであった。対照的に、遊離毒素 (CFR2018) による細胞成長抑制は800nM濃度、あるいは抗体融合構成体と比較して8倍強の濃度で起きた。scfvMEL抗体に対する融合による腫瘍細胞へのCFR2018毒素の抗体向標的によって細胞阻害性は8倍に増大した。さらに、CFR2018毒素と比較して、CFR2025と命名されたデザイナー毒素は、それらが抗体基質とともに腫瘍細胞に導入されると、CFR2018とほぼ同様の細胞阻害性活性を示す。 20

【0403】

本明細書に開示され、権利が請求されているすべての組成物と方法は、本開示に照らせば過重な実験を行わなくても作成、実施できる。本発明による組成物と方法は実施の形態として上に述べられたが、本発明のコンセプト、精神及び範囲から逸脱せずにここに述べられている組成物及び方法、そしてその方法のステップの順番に変更を加えることができることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的及び生理学的に関連性のある一定の作用剤をここに述べられている作用剤の代わりに用いて同じ、あるいは同様の結果が得られることも明らかであろう。すべてのそうした代替及び修飾は添付請求項に定義されている本発明の精神、範囲及びコンセプト内にあるとみなされる。 30

【0404】

(引用文献)

次に挙げる引用文献、ここに示す模範的な手法又は他の詳細な説明の補充による範囲は、本発明に組み込まれる。(下記引用文献で出願番号で示されているものは『号公報』、特許番号で示されているものは『号明細書』を省略して記す。)

EPA No. 320 308

EPA No. 329 822

EP0 0273085

GB出願No. 2,202,328

GB出願No. 2193095

PCT/US85/01161

PCT/US87/00880

PCT/US89/01025

PCT/US89/05040

米国特許第3,817,837

米国特許第3,850,752

米国特許第3,939,350

米国特許第3,996,346

米国特許第4,162,282

40

50

米国特許第4,196,265	
米国特許第4,275,149	
米国特許第4,277,437	
米国特許第4,310,505	
米国特許第4,366,241	
米国特許第4,472,509	
米国特許第4,472,509	
米国特許第4,533,254	
米国特許第4,554,101	
米国特許第4,683,195	10
米国特許第4,683,202	
米国特許第4,684,611	
米国特許第4,690,915	
米国特許第4,728,575	
米国特許第4,728,578	
米国特許第4,737,323	
米国特許第4,800,159	
米国特許第4,879,236	
米国特許第4,883,750	
米国特許第4,921,706	20
米国特許第4,938,948	
米国特許第4,938,948	
米国特許第4,946,773	
米国特許第4,952,500	
米国特許第5,021,236	
米国特許第5,196,066	
米国特許第5,199,942	
米国特許第5,279,721	
米国特許第5,302,523	
米国特許第5,322,783	30
米国特許第5,359,046	
米国特許第5,384,253	
米国特許第5,401,511	
米国特許第5,401,511	
米国特許第5,432,260	
米国特許第5,464,765	
米国特許第5,538,877	
米国特許第5,538,880	
米国特許第5,550,318	
米国特許第5,563,055	40
米国特許第5,580,859	
米国特許第5,589,466	
米国特許第5,591,616	
米国特許第5,603,872	
米国特許第5,603,872	
米国特許第5,610,042	
米国特許第5,656,610	
米国特許第5,693,762	
米国特許第5,702,932	
米国特許第5,736,524	50

米国特許第5,780,448	
米国特許第5,786,214	
米国特許第5,789,215	
米国特許第5,801,005	
米国特許第5,824,311	
米国特許第5,830,880	
米国特許第5,840,873	
米国特許第5,643,640	
米国特許第5,843,650	
米国特許第5,843,651	10
米国特許第5,843,663	
米国特許第5,846,708	
米国特許第5,840,709	
米国特許第5,846,717	
米国特許第5,846,726	
米国特許第5,846,729	
米国特許第5,846,783	
米国特許第5,846,945	
米国特許第5,849,481	
米国特許第5,849,483	20
米国特許第5,849,486	
米国特許第5,849,487	
米国特許第5,849,497	
米国特許第5,849,546	
米国特許第5,849,547	
米国特許第5,849,718	
米国特許第5,851,770	
米国特許第5,851,772	
米国特許第5,853,990	
米国特許第5,853,992	30
米国特許第5,853,993	
米国特許第5,856,092	
米国特許第5,858,652	
米国特許第5,861,155	
米国特許第5,861,244	
米国特許第5,863,732	
米国特許第5,863,753	
米国特許第5,866,331	
米国特許第5,866,337	
米国特許第5,866,366	40
米国特許第5,871,727	
米国特許第5,871,986	
米国特許第5,879,703	
米国特許第5,882,864	
米国特許第5,889,155	
米国特許第5,900,481	
米国特許第5,905,024	
米国特許第5,910,407	
米国特許第5,912,124	
米国特許第5,912,145	50

米国特許第5,912,148	
米国特許第5,916,776	
米国特許第5,916,779	
米国特許第5,919,626	
米国特許第5,919,630	
米国特許第5,922,574	
米国特許第5,925,517	
米国特許第5,925,525	
米国特許第5,925,565	
米国特許第5,928,862	10
米国特許第5,928,869	
米国特許第5,928,870	
米国特許第5,928,905	
米国特許第5,928,906	
米国特許第5,929,227	
米国特許第5,932,413	
米国特許第5,932,451	
米国特許第5,935,791	
米国特許第5,935,819	
米国特許第5,935,825	20
米国特許第5,939,277	
米国特許第5,939,291	
米国特許第5,942,391	
米国特許第5,945,100	
米国特許第5,981,274	
米国特許第5,994,624	
米国特許第6,020,192	
米国特許第6,054,297	
米国特許第6,099,842	
米国特許第6,107,090	30
W0 88/10315	
W0 89/00999	
W0 89/06700	
W0 90/07641	
W0 90/09699	
W0 95/06128	
W0 98/0748	
W0 99/18933	
Abbondanzo et al., Breast Cancer Res. Treat., 16:182(#151), 1990.	40
Adams et al., Cancer Res 1993;3:4026-34,1993.	
Aksentijevich, et al., Hum. Gene Ther., 7:1111-22, 1996.	
Alfthan et al., Protein Engineering 1995;8:725-31, 1995.	
Allred et al., Breast Cancer Res. Treat., 16:182(#149), 1990.	
Almendro et al., J Immunol., 157:5411-5421, 1996.	
Angel et al., Cell, 49:729, 1987b.	
Angel et al., Mol. Cell. Biol., 7:2256, 1987a.	
Arap et al., Cancer Res., 55:1351-1354, 1995.	
Atchison and Perry, Cell, 46:253, 1986.	
Atchison and Perry, Cell, 48:121, 1987.	50

- Atherton et al., *Biol. of Reproduction*, 32:155-171, 1985.
- Austin-Ward, Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998
- Ausubel, ed., *Current protocols in molecular biology*, New York, John Wiley & Sons, 1996. Baichwal and Sugden, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati R, ed., New York, Plenum Press, pp.117-148, 1986.
- Bajorin et al., *Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 7:A967, 1988.
- Baker, G. et al., (eds.), *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1990.
- Bakhshi et al., *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
- Baneji et al., *Cell*, 27:299, 1981. 10
- Banerji et al., *Cell*, 35:729, 1983.
- Banrgham, et al., *J. Mol. Biol.*, 13:238-252, 1965.
- Bao et al., *Him. Gene Ther.*, 7(3):355-65, 1996.
- Barrio et al., *Hybridoma* 1998;17:355-64, 1998.
- Bass et al., *Cancer Gene Ther.*, 2(2):97-104, 1995.
- Bedzyk et al., *J. Biol. Chem.*, 265:18615-20, 1990.
- Bellus, J. *Macromol. Sci. Pure Appl. Chem*, A31(1): 1355-1376, 1994.
- Berberian et al., *Science*, 261:1588-1591, 1993.
- Berkhout et al., *Cell*, 59:273, 1989.
- Berkower I., *Current Opinion in Biotechnology* 1996;7:622-28, 1996. 20
- Bird et al., *Science* 1988;242:423-26, 1988.
- Blanar et al., *EMBO J.*, 8 1139, 1989.
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Bonavida et al., *Int J Oncol*, 15:793-802, 1999.
- Bonavida et al., *Proc Nat'l Acad Sci USA*, 97:1754-9, 2000.
- Boshart et al., *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze et al., *EMBO J.*, 5:1615, 1986.
- Bourrie et al., *Eur. J. Biochem* 1986;155:1-10, 1986.
- Boyle et al., *Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology* 1995; 18:221-30, 1995. 30
- Braddock et al., *Cell*, 58:269, 1989.
- Brown et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:192(#191), 1990.
- Bukowski et al., *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62;1437, 1986.
- Burger et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:1426-31, 1993.
- Caldas et al., *Nat. Genet.*, 8:27-32, 1994.
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo et al., *Nature*, 393:77, 1983.
- Canfield et al., *Methods in Enzymology*, 189, 418-422, 1990. 40
- Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76:425, 1977.
- Carbonelli et al., *FEMS Microbiol Lett.* 177(1):75-82, 1999.
- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander et al., *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Chandler et al., *Cell*, 33:489, 1983.
- Chandler et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(8):3596-3601, 1997.
- Chang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chatterjee et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 86:9114, 1989.
- Chaudhary et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, 87:9491-4, 1990.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987. 50

- Cheng et al., *Cancer Res.*, 54:5547-5551, 1994.
- Cheng et al., *Investigative Radiology*, vol. 22, pp. 47-55, 1987.
- Cheresh et al., *Cancer Res.*, 46:5112-8, 1986.
- Choi et al., *Cell*, 53:519, 1988.
- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-43, 1985.
- Cleary et al., *J. Exp. Med.*, 164(1):315-20, 1986.
- Cleary et al., *Trends Microbiol.*, 4:131-136, 1994.
- Coccea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Cohen et al., *J. Cell Physiol.*, 5:75, 1987. 10
- Costa et al., *Mol. Cell. Bio.*, 8:81, 1988.
- Coupar et al., *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cripe et al., *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Bio.*, 9:1376, 1989.
- Culver et al., *Science*, 256:1550-1552, 1992.
- Dandolo et al., *J. Virology*, 47:55, 1983.
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- De Villiers et al., *Nature*, 312:242, 1984.
- Deamer and P. Uster, *Liposomes* (M. Ostro, ed.), Marcel Dekker, Inc., New York
pp. 27-52, 1983. 20
- Dejager et al., *J. Clin. Invest.*, 92:894-902, 1993.
- Deschamps et al., *Science*, 230:1174, 1985.
- Dholakia et al., *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Dillman *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14:5-10, 1999.
- Dong et al., *Hum. Gene Ther.*, 7(3):319-31, 1996.
- Doolittle et al., *Methods Mol. Biol.*, 109:215-37, 1999.
- Edbrooke et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edlund et al., *Science*, 230:912, 1985.
- El-Gorab et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, 306, 58-66, 1973.
- Fechheimer et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987. 30
- Felgner et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:7413-7, 1987.
- Fendler et al., *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic
Press, New York, 1975.
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Ferkol et al., *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-5, 1986.
- Fraley et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, 40
N.Y., 1990.
- Fujita et al., *Cell*, 49:357, 1987.
- Fulton et al., *Cancer Res* 1988;48:2618-25, 1988.
- Gabizon et al., *Cancer Res.*, 50(19):6371-8, 1990.
- Geiser et al., *Cancer Res* 1999;59:905-10, 1999.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using
specific receptors and ligands*, (Wu G, Wu C ed.), New York: Marcel Dekker,
pp. 87-104, 1991.
- Gilles et al., *Cell*, 33-717, 1983.
- Gilliland et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 77:4539-43, 1980. 50

- Gliniak et al., *Cancer Res.* 59:6153-8, 1999.
- Gloss et al., *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Godbout et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Goodbourn and Maniatis, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn et al., *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol*, 5:1188-1190, 1985
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973
- Greene et al., *Immunology Today*, 10:272, 1989.
- Gregoriadis, ed., *Drug Carriers In Biology And Medicine*, pp. 287-341, 1979.
- Gregoriadis, G., ed., *Liposome Technology*, vol. 1, pp. 30-35, 51-65 and 79-107 (10
CRC Press Inc., Boca Raton, FL), 1984.
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Gulbis et al., *Hum. Pathol.*, 24:1271-85, 1993.
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-5, 1998.
- Hara et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1278:51-8, 1996.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual,"
Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Haslinger and Karin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988. 20
- Heath et al., *Chem. Phys. Lipids*, 40:347, 1986.
- Hechushtan, et al., *EMBO Jour.*, 18:. 2330-2341, 1999.
- Hellstrand et al., *Acta. Oncol.*, 37(4):347-53, 1998.
- Hen et al., *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel et al., *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermonat and Muzyczka, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hirochika et al., *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Hirsch et al., *Mol., Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook et al., *Virology*, 157:211, 1987. 30
- Hollstein et al., *Science* 253:49-53, 1991.
- Hope et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 812:55-65, 1985.
- Horlick and Benfield, *Mol., Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Horwich et al., *J. Virol.* 64:642-650, 1990.
- Huang et al., *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug et al., *Mol Cell Biol.*, 8:3065, 1988.
- Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Hussussian et al., *Nature Genetics*, 15-21, 1994.
- Hwang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa et al., *Cell*, 51:251, 1987. 40
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Innis et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Inouye et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- Irie & Morton, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83:8694-8698, 1986.
- Irie et al., "Melanoma gangliosides and human monoclonal antibody,"
In: *Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy*, Metzgar & Mitchell
(eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 115-126, 1989.
- Jakobovits et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988. 50

- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson et al., *J. Virol.*, 67:438-445, 1993.
- Johnson et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaeppler et al., *Plant Cell Reports* 9:415-418, 1990.
- Kamb et al., *Nature Genetics*, 8:22-26, 1994.
- Kamb et al., *Science*, 267:436-440, 1994.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kang et al., *Science*, 240:1034-1036, 1988. 10
- Kantor et al., *Hybridoma* 1982;1:473-82, 1982.
- Karin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka et al., *Cell*, 20:393, 1980.
- Katinka et al., *Nature*, 290:720, 1981.
- Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- Keane et al., *Cancer Res.*, 59:734-41, 1999.
- Kerr et al., *Br. J. Cancer*, 26(4):239-57, 1972.
- Khatoun et al., *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- Kiledjian et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988. 20
- Kim et al., *Gene*, 1988;68:315-21.
- King et al., *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kipriyanov et al., *Molecular Immunology* 1994;31:1047-58, 1994.
- Klamut et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Koch et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kohler et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 52:104-16, 1989.
- Koizumi et al., *Japanese J of Cancer Res* 1988;79:973-81, 1988.
- Kraus et al., *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kreier et al., "Infection, Resistance and Immunity," Harper and Row, New York, 1991. 30
- Kriegler and Botchan, In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Y. Gluzman, ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler et al., *Cell*, 38:483, 1984a.
- Kriegler et al., *Cell*, 53:45, 1988.
- Kriegler et al., In: *Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes*, Van de Woude et al., eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
- Kriegler et al., In: *Gene Expression*, D. Hamer and M. Rosenberg, eds., New York: Alan R. Liss, 1983.
- Kuhl et al., *Cell*, 50:1057, 1989. 40
- Kunz et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kurucz et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1993;90: 3830-34, 1993.
- Kwoh et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lareyre et al., *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83:8283, 1986.
- Laspias et al., *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lee et al., *J Auton Nerv Syst.* 74(2-3):86-90, 1997.
- Lee et al., *Nature*, 294:228, 1981. 50

- Lee et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Lefranc et al., *Biochimie* 1990;72:639-51, 1990.
- Lenert et al., *Science*, 248:1639-1643, 1990.
- Levenson et al., *Hum Gene Ther.* 20;9(8):1233-1236, 1998.
- Levinson et al., *Nature*, 295:79, 1982.
- Lin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 270:24864-70, 1995.
- Luria et al., *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983. 10
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Macey et al., *Am J of Physiologic Imaging* 1988;3:1-6, 1988.
- Majors and Varmus, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Marsters et al., *Recent Prog Horm Res*, 54:225-34, 1999.
- Martin et al., *Nature*, 345(6277):739-743, 1990.
- Mayer et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 858, pp. 161-168, 1986.
- Mayhew et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 775, pp. 169-174, 1984.
- Mayhew et al., *Methods in Enzymology*, vol. 149, pp. 64-77, 1987.
- McCartney et al., *Protein Engineering* 1995;8:301-14, 1995.
- McNeall et al., *Gene*, 76:81, 1989. 20
- Miksicek et al., *Cell*, 46:203, 1986.
- Mitchell et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- Mitchell et al., *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-859, 1990.
- Mittelman et al., *Clin Cancer Res* 1995;1:705-13, 1995.
- Montaldo et al., *Int. J. Cancer*, 81:262-7, 1999.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau et al., *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Morgan et al., *Hybridoma* 1981;1:27-36, 1981.
- Mori et al., *Cancer Res.*, 54:3396-3397, 1994.
- Morton and Ravindranath, M. H. Current concepts concerning melanoma vaccines. 30
In *Tumor Immunology*, Dalglish AG (ed.), London: Cambridge University Press, 1-55, 1996.
- Morton et al., *Ann. Surg.*, 216:463-482, 1992.
- Muesing et al., *Cell* 48:691, 1987.
- Mujoo et al., *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1995;40:339-45, 1995.
- Munishkin et al., *J. Biol. Chem.*, 270:30581-30587, 1995.
- Nakamura et al., In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- Ng et al., *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolas and Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (eds.), Stoneham; Butterworth, pp. 493-513, 1988. 40
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nishikawa et al., *Cancer Res* 1992;52:4758-65, 1992.
- Nobri et al., *Nature*, 368:753-756, 1995.
- Nomoto et al., *Gene*, 236(2):259-271, 1999.
- Ohara et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.
- O'Hare et al., *FEBS Lett* 1990;273:200-04, 1990.
- Okamoto et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 91:11045-11049, 1994. 50

- Omirulleh et al., *Plant Mol. Biol.*, 21:415-28, 1993.
- Ondek et al., *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Orlow et al., *Cancer Res.*, 54:2848-2851, 1994.
- Omitz et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- O'Shannessy et al., *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Owens and Haley, *J. Biol. Chem.*, 259: 14843-14848, 1987.
- Owens et al., *Journal of Immunological Methods* 1994;168:149-165, 1994.
- Pagnan et al., *Int. J. Cancer*, 81:268-74, 1999.
- Palmiter et al., *Nature*, 300-611, 1982.
- Panchagnula et al., *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics* 1997;22:7-19, 1997. 10
- Panchal RG., *Biochemical Pharmacology* 1998;55:247-252, 1998.
- Pech et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988.
- Perales et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Philip et al., *J. Biol. Chem.*, 268:16087-90, 1993.
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pietras et al., *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998.
- Pinkert et al., *Genes and Dev.*, 1:268, 1987. 20
- Pinker et al., *J Immunol* 1993;150:3054-61, 1993.
- Poe et al., *J. Biol. Chem.*, 266:98-103, 1991.
- Ponta et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- Porton et al., *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.
- Potter and Haley, *Meth. in Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Press et al., *Cellular Immunology*, 1986;102:10-20, 1986.
- Pullyblank et al., *British Journal of Surgery* 1997;84:1511-17, 1997.
- Qin et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 95(24):1411-6, 1998.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983. 30
- Quinn et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.* 7:303-329, 1991.
- Redondo et al., *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Resendez Jr. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Ridgeway, In; *Vectors; A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham; Butterworth, pp. 467-492, 1988.
- Ripe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989. 40
- Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Roselli et al., *In Vivo* 1993;7:615-21, 1993.
- Rosen et al., *Cell*, 41:813, 1988.
- Rosenberg et al., *Ann. Surg.*, 210:474, 1989.
- Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Rosenblum et al., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1999;44:343-48, 1999.
- Rosenblum et al., *Clin Cancer Res* 1999;5:865-74, 1999.
- Rosenblum et al., *Journal of Interferon & Cytokine Research* 1995;15:547-55, 1995.
- Rosenblum et al., *Molecular Biotherapy* 1991;3:6-13, 1991. 50

- Rowlinson-Busza et al., *Current Opinion in Oncology* 1992;4:1142-48, 1992.
- Sakai et al., *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook et al., In; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sambrook J. Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sandhu et al., *Crit Rev Biotechnol* 1992;12:437-62, 1992.
- Sasso et al., *J. Immunol.*, 142:2778-2783, 1989.
- Satake et al., *J. Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner et al., *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988. 10
- Schulz et al., *Cancer Res.* 44:5914-5920, 1984.
- Searle et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Serrano et al., *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano et al., *Science*, 267:249-252, 1995.
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Shinoda, K. et al., *Colloidal Surfactant*, Academic Press, especially "The Formation of Micelles", Ch. 1, 1-96, 1963.
- Shorki et al., *J. Immunol.*, 146:936-940, 1991. 20
- Silvermann et al., *J. Clin. Invest.*, 96:417-426, 1995.
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Solodin et al., *Biochemistry*, 34:13537-44, 1995.
- Spalholz et al., *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Spanjer and Scherphof, *Biochem. Biophys. Acta*, 734:40-7, 1983.
- Sperti et al., *Ital. J. Biochem.*, 35:266-71, 1986.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stirpe et al., *A Journal of Biological Chemistry* 1992;255:6947-53, 1992. 30
- Stuart et al., *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Szoka et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 1978, 75:4194-4198.
- Takebe et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier et al., *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor et al., *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York, Plenum Press, pp. 149-188, 1986. 40
- Templeton et al., *Nat. Biotechnol.*, 15(7):647-52, 1997.
- Thierry et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 92:9742-6, 1995.
- Thiesan et al., *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Treisman, *Cell*, 46:567-74, 1986.
- Trimble and Hozumi, *FEBS Lett.*, 219:70-4, 1987.
- Tronche et al., *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Tronche et al., *Mol. Cell. Biol.*, 9:4759, 1989.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- Tsujimoto and Croce, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-8, 1986. 50

- Tsujimoto et al., Science, 228(4706):1440-3, 1985.
- Tsukamoto et al., Nat. Genet. 9:243-8, 1995.
- Tsumaki et al., J Biol Chem. 273(36):22861-22864, 1998.
- Tyndall et al., Nuc. Acids. Res., 9:6231, 1981.
- Vannice and Levinson, J. Virology, 62:1305, 1988.
- Vasseur et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:1068, 1980.
- Wagner et al., Science, 260:1510-1513, 1990.
- Wahl et al., Cancer 1994;73:989-92, 1994.
- Walker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:392-396, 1992.
- Wang and Calame, Cell, 47:241, 1986. 10
- Watt et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 83(2):3166-3170, 1986.
- Weber et al., Cell, 36:983, 1984.
- Weinberg, Science, 254:1138-1145, 1991.
- Weinberg et al., Mol. Cell. Biol., 8:988, 1984.
- Wels et al., Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 1992;43:1-7, 1992.
- Williams et al., Cancer Res 1990;50:974s-79s, 1990.
- Wilson et al., Int J Cancer 1981;28:293-30, 1981.
- Winoto and Baltimore, Cell, 59:649, 1989.
- Wolff et al., Ther Immunol 1995;2:137-45, 1995. 20
- Wong et al., Gene, 10:87-94, 1980.
- Wool et al., Biochem Cell Biol., 73(11-12):933-47, 1995.
- Wom et al., Biochemistry 1998;22:13120-127, 1998.
- Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993.
- Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987.
- Wu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 233(1):221-6, 1997.
- Xu et al., Leukemia 1996;10:321-26, 1996.
- Yang and Huang, Gene Therapy, 4(9):950-960, 1997.
- Yutzey et al., Mol. Cell. Biol., 9:1397, 1989.
- Zhao-Emonet et al., Biochem. Biophys. Acta., 1442(2-3):109-19, 1998. 30
- Zhu et al., Science, 261:209-11, 1993.

【図面の簡単な説明】

【0405】

以下の図面は本明細書の一部を構成し、本発明のいくつかの実施形態を示すために示されるものである。これらの図面の1つあるいは複数を個々に述べられている具体的な実施の形態に関する詳細な説明と組み合わせて参照することで、本発明をさらに理解することができるであろう。

【図1】ヒトの血清サンプルに対して抗ゲロニン抗体を用いて行なったELISAを示す図。

【図2】ヒトの抗ゲロニン抗体によって認識されたrゲロニンのエピトープを示す図。

【図3A】ゲロニン欠失構成物を示す図。ゲロニン欠失構成物の構造が示されている。 40

【図3B】ゲロニン欠失構成物を示す図。ゲロニン欠失構成物の構造が示されている。

【図4】sfvMEL/rGel融合毒素のPCRによる構成及びpET-32a誘導ベクターへのマーゲーションを図式的に示す図。

【図5】sfvMEL/rGel融合構成物（配列識別番号：10）の完全DNA配列分析を示す図。

【図6】親のZME-Gel化学接合体とsfvMEL/rGel融合構成物（sfvMEL/rGELと同じ）の比較用結合を示す図。A-375細胞に対する結合をELISA及びポリクローナル・ウサギ・抗ゲロニン・ポリクローナル抗体を用いて評価した。標的細胞に対する両方の構成物の結合はほぼ同様であったが、組み換え体融合構成物の方でやや高い結合が見られた。

【図7】抗原陽性A375ヒト黒色腫細胞上での親ZME-rGel化学接合体とsfvMEL-Gel融合体構成物のin vitroでの細胞阻害性を比較して示す図。細胞をプレートに入れていろいろな量 50

のsfvMEL-Gel融合体構成物、ZME-rGel化学接合体、及び遊離組み換え体ゲロニンで72時間処理した。両方の免疫接合体の IC_{50} 値はほぼ8nMで、組み換え体ゲロニンの IC_{50} 値は数桁高く、約 2×10^3 nMであった。

【図8】sfvMEL/rGel免疫毒素とZME抗体の競合的抑制を示す図。種々の濃度の組み換え体免疫毒素を4つ1組のログ・フェース培地でA-375ヒト黒色腫細胞に加えた。別の一連のウェルに対しては、固定された濃度のZME(50 μ g/ml)をいろいろな量のsfvMEL/rGel免疫毒素と混合して、72時間培養した。遊離ZME抗体を加えたところ、免疫毒素の細胞阻害性は3分の1に低下した。

【図9】右脇腹にかなり成長した黒色腫(A-375)を有するヌード・マウスを食塩水(比較対照)か、2mg/Kg又は20mg/Kg(総用量)のsfvMEL/rGELで連続4日間処理した(矢印)。30日間にわたって腫瘍面積を測定した。食塩で処理した比較対照腫瘍はこの期間に30から150mm²に増大した。最も低い用量で措置した腫瘍は30から60mm²に増大した。最も高い免疫毒素容量で処理した動物は最初の30mm²から腫瘍面積が広がらなかった。

【図10】scfvMEL-CFR2018(sfvMEL-CFR2018としても知られている)を、in vitro細胞阻害性アッセイで、A375-M黒色腫細胞上でscfvMEL-CFR2025と比較した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ROSENBLUM, MICHAEL G.
CHEUNG, LAWRENCE

<120> MODIFIED PROTEINS, DESIGNER TOXINS, AND METHODS OF
MAKING THEEOF

<130> CLFR:007US

<140> UNKNOWN

<141> 2002-02-12

<150> 60/268,402

<151> 2001-02-12

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 316

<212> PRT

<213> Gelonium multiflorum

<400> 1

Met Lys Gly Asn Met Lys Val Tyr Trp Ile Lys Ile Ala Val Ala Thr
1 5 10 15

Trp Phe Cys Cys Thr Thr Ile Val Leu Gly Ser Thr Ala Arg Ile Phe
20 25 30

Ser Leu Pro Thr Asn Asp Glu Glu Glu Thr Ser Lys Thr Leu Gly Leu
35 40 45

Asp Thr Val Ser Phe Ser Thr Lys Gly Ala Thr Tyr Ile Thr Tyr Val
50 55 60

Asn Phe Leu Asn Glu Leu Arg Val Lys Leu Lys Pro Glu Gly Asn Ser
65 70 75 80

His Gly Ile Pro Leu Leu Arg Lys Lys Cys Asp Asp Pro Gly Lys Cys
85 90 95

Phe Val Leu Val Ala Leu Ser Asn Asp Asn Gly Gln Leu Ala Glu Ile
100 105 110

Ala Ile Asp Val Thr Ser Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Val Arg Asn
115 120 125

Arg Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Gly Leu
130 135 140

Phe Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu Gly Ile

10

20

30

10

20

30

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gctgccaac cagccatggc ggacattgtg atg 33

<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10

<400> 4
gccggagcct ggcttgcaag ctgccgctgg tggagccttt gatcatccag 50

<210> 5
<211> 45
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
aagccaggct ccggcgaagg cagcaccaaa ggogaagtga aggtt 45

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<400> 6
gccaccgcca ccactagttg aggagactgt 30

<210> 7
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Primer

<400> 7
ggcgggtggct ccgtcatgac ggacattgtg atgaccagc ctcaaaaatt c 51

30

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

Primer

<400> 8
 ggtggcgggtg gctccgggtct agacaccgtg acg 33

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Primer 10

<400> 9
 aaggctcgtg tcgacctcga gtcattaagc tttaggatct ttatc 45

<210> 10
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1521) 20

<400> 10
 atg acg gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca 48
 Met Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
 1 5 10 15

gta gga gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg gat 96
 Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp
 20 25 30

act aat gta gcc tgg tat caa caa aaa cca ggg caa tct cct gaa cca 144
 Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Pro
 35 40 45

ctg ctt ttc tcg gca tcc tac cgt tac act gga gtc cct gat cgc ttc 192
 Leu Leu Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60 30

aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg 240
 Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
 65 70 75 80

cag tct gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat 288
 Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
 85 90 95

cct ctg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gag atc aaa ggc tcc acc 336

Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr		
			100					105					110				
agc	ggc	agc	ggc	aag	cca	ggc	tcc	ggc	gaa	ggc	agc	acc	aaa	ggc	gaa	384	
Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Glu		
		115					120					125					
gtg	aag	ggt	gag	gag	tct	gga	gga	ggc	ttg	gtg	caa	cct	gga	gga	tcc	432	
Val	Lys	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser		
		130					135					140					
atg	aaa	ctc	tcc	tgt	gtt	gtc	tct	gga	ttc	act	ttc	ggc	aat	tac	tgg	480	
Met	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Gly	Asn	Tyr	Trp		
		145				150					155				160		
atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	tct	cca	gag	aag	ggg	ctt	gag	tgg	att	gca	528	
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Ala		
				165					170						175		
gaa	att	aga	ttg	aaa	tcc	aat	aat	ttt	gca	aga	tat	tat	gcg	gag	tct	576	
Glu	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser	Asn	Asn	Phe	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser		
			180						185					190			
gtg	aaa	ggg	agg	ttc	acc	atc	tca	aga	gat	gat	tcc	aaa	agt	agt	gtc	624	
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Val		
		195					200					205					
tac	ctg	caa	atg	atc	aac	cta	aga	gct	gaa	gat	act	ggc	att	tat	tac	672	
Tyr	Leu	Gln	Met	Ile	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	Tyr		
		210				215						220					
tgt	acc	agt	tat	ggc	aac	tac	gtt	ggg	cac	tat	ttt	gac	cac	tgg	ggc	720	
Cys	Thr	Ser	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Val	Gly	His	Tyr	Phe	Asp	His	Trp	Gly		
		225				230				235					240		
caa	ggc	acc	act	ctc	acc	gtc	tcc	tca	gct	agc	ggc	ggc	ggc	ggc	tcc	768	
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
				245					250						255		
ggc	cta	gac	acc	gtg	agc	ttt	agc	act	aaa	ggc	gcc	act	tat	att	acc	816	
Gly	Leu	Asp	Thr	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Lys	Gly	Ala	Thr	Tyr	Ile	Thr		
			260					265						270			
tac	gtg	aat	ttc	ttg	aat	gag	cta	cga	gtt	aaa	ttg	aaa	ccc	gaa	ggc	864	
Tyr	Val	Asn	Phe	Leu	Asn	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly		
		275					280					285					
aac	agc	cat	gga	atc	cca	ttg	ctg	cgc	aaa	aaa	tgt	gat	gat	cct	gga	912	
Asn	Ser	His	Gly	Ile	Pro	Leu	Leu	Arg	Lys	Lys	Cys	Asp	Asp	Pro	Gly		
		290				295					300						
aag	tgt	ttc	gtt	ttg	gta	gcg	ctt	tca	aat	gac	aat	gga	cag	ttg	gcg	960	
Lys	Cys	Phe	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Gly	Gln	Leu	Ala		
		305				310				315				320			
gaa	ata	gct	ata	gat	gtt	aca	agt	gtt	tat	gtg	gtg	ggc	tat	caa	gta	1008	
Glu	Ile	Ala	Ile	Asp	Val	Thr	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Tyr	Gln	Val		

10

20

30

```

          325          330          335
aga aac aga tct tac ttc ttt aaa gat gct cca gat gct gct tac gaa 1056
Arg Asn Arg Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Tyr Glu
          340          345          350

ggc ctc ttc aaa aac aca att aaa aca aga ctt cat ttt ggc ggc agc 1104
Gly Leu Phe Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser
          355          360          365

tat ccc tog ctg gaa ggt gag aag gca tat aga gag aca aca gac ttg 1152
Tyr Pro Ser Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu
          370          375          380

ggc att gaa cca tta agg att ggc atc aag aaa ctt gat gaa aat gcg 1200
Gly Ile Glu Pro Leu Arg Ile Gly Ile Lys Lys Leu Asp Glu Asn Ala
          385          390          400

ata gac aat tat aaa cca acg gag ata gct agt tct cta ttg gtt gtt 1248
Ile Asp Asn Tyr Lys Pro Thr Glu Ile Ala Ser Ser Leu Leu Val Val
          405          410          415

att caa atg gtg tct gaa gca gct cga ttc acc ttt att gag aac caa 1296
Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Thr Phe Ile Glu Asn Gln
          420          425          430

att aga aat aac ttt caa cag aga att cgc ccg gcg aat aat aca atc 1344
Ile Arg Asn Asn Phe Gln Gln Arg Ile Arg Pro Ala Asn Asn Thr Ile
          435          440          445

agc ctt gag aat aaa tgg ggt aaa ctc tcg ttc cag atc cgg aca tca 1392
Ser Leu Glu Asn Lys Trp Gly Lys Leu Ser Phe Gln Ile Arg Thr Ser
          450          455          460

ggt gca aat gga atg ttt tcg gag gca gtt gaa ttg gaa cgt gca aat 1440
Gly Ala Asn Gly Met Phe Ser Glu Ala Val Glu Leu Glu Arg Ala Asn
          465          470          475          480

ggc aaa aaa tac tat gtc acc gca gtt gat caa gta aaa ccc aaa ata 1488
Gly Lys Lys Tyr Tyr Val Thr Ala Val Asp Gln Val Lys Pro Lys Ile
          485          490          495

gca ctc ttg aag ttc gtc gat aaa gat cct aaa taatga 1527
Ala Leu Leu Lys Phe Val Asp Lys Asp Pro Lys
          500          505

```

10

20

30

```

<210> 11
<211> 507
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

```

<400> 11
Met Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser
  1             5             10             15

```

Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp
 20 25 30
 Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Pro
 35 40 45
 Leu Leu Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr
 85 90 95
 Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr
 100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu
 115 120 125
 Val Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Tyr Trp
 145 150 155 160
 Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
 165 170 175
 Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Phe Ala Arg Tyr Tyr Ala Glu Ser
 180 185 190
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val
 195 200 205
 Tyr Leu Gln Met Ile Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Thr Ser Tyr Gly Asn Tyr Val Gly His Tyr Phe Asp His Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255
 Gly Leu Asp Thr Val Ser Phe Ser Thr Lys Gly Ala Thr Tyr Ile Thr
 260 265 270
 Tyr Val Asn Phe Leu Asn Glu Leu Arg Val Lys Leu Lys Pro Glu Gly
 275 280 285
 Asn Ser His Gly Ile Pro Leu Leu Arg Lys Lys Cys Asp Asp Pro Gly
 290 295 300
 Lys Cys Phe Val Leu Val Ala Leu Ser Asn Asp Asn Gly Gln Leu Ala
 305 310 315 320

10

20

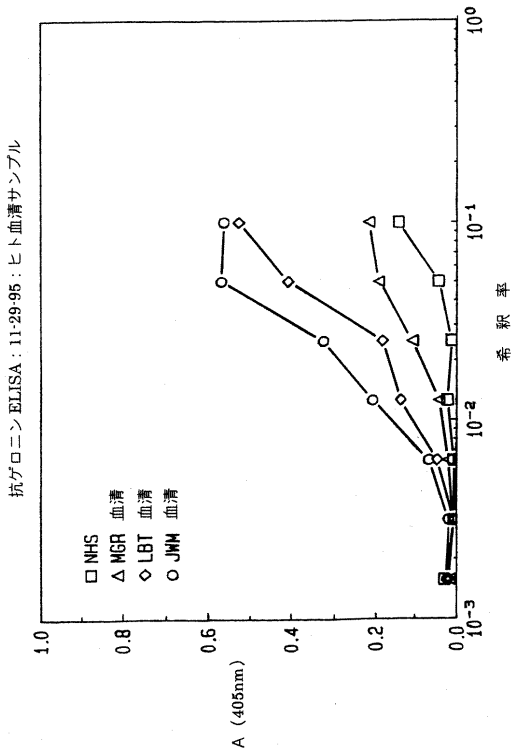
30

Glu Ile Ala Ile Asp Val Thr Ser Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Val
 325 330 335
 Arg Asn Arg Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Ala Tyr Glu
 340 345 350
 Gly Leu Phe Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu
 370 375 380
 Gly Ile Glu Pro Leu Arg Ile Gly Ile Lys Lys Leu Asp Glu Asn Ala
 385 390 395 400
 Ile Asp Asn Tyr Lys Pro Thr Glu Ile Ala Ser Ser Leu Leu Val Val
 405 410 415
 Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Thr Phe Ile Glu Asn Gln
 420 425 430
 Ile Arg Asn Asn Phe Gln Gln Arg Ile Arg Pro Ala Asn Asn Thr Ile
 435 440 445
 Ser Leu Glu Asn Lys Trp Gly Lys Leu Ser Phe Gln Ile Arg Thr Ser
 450 455 460
 Gly Ala Asn Gly Met Phe Ser Glu Ala Val Glu Leu Glu Arg Ala Asn
 465 470 475 480
 Gly Lys Lys Tyr Tyr Val Thr Ala Val Asp Gln Val Lys Pro Lys Ile
 485 490 495
 Ala Leu Leu Lys Phe Val Asp Lys Asp Pro Lys
 500 505

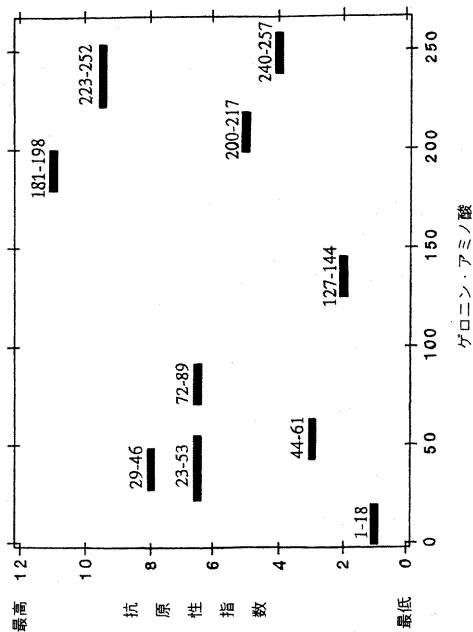
10

20

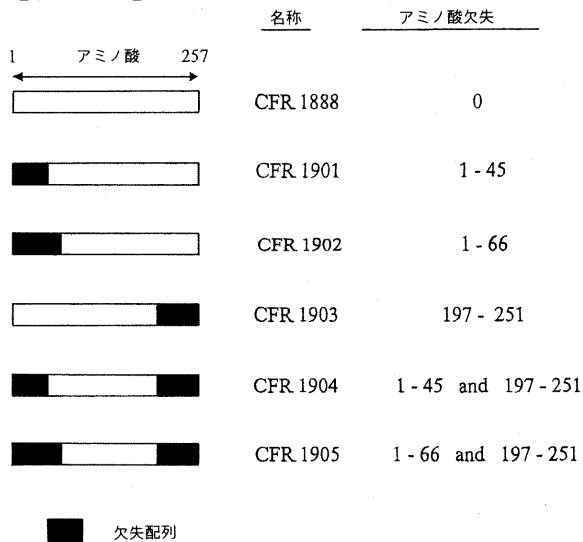
【図 1】



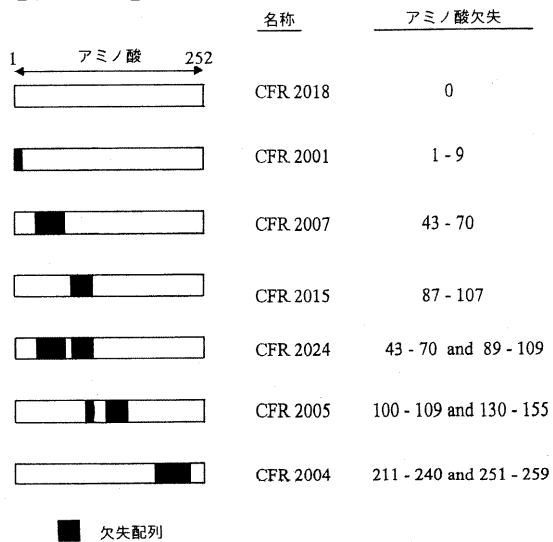
【図 2】



【図 3 A】

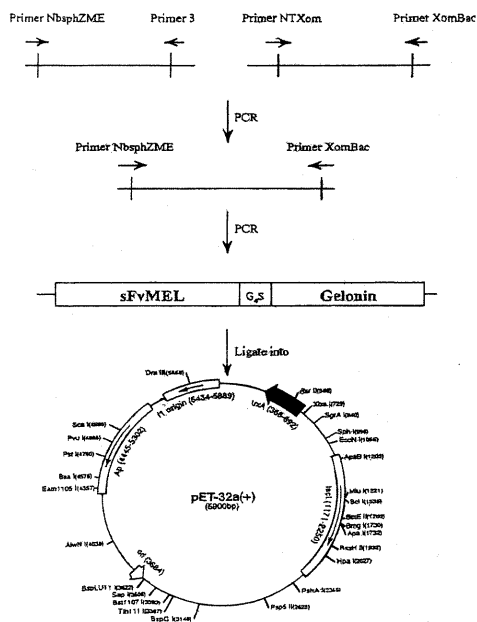


【図 3 B】



【図 4】

sFvMEL-Gelの構成



【図 5】

SCFV-MEL→

ATG ACG GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA 18
LCDR1

GAC AGG GTC AGC GTC ACC **TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG GAT ACT AAT GTA GCC** 36

TGG TAT CAA CAA AAA CCA GGG CAA TCT CCT GAA CCA CTG CTT TTC **TGC GCA TCC** 54
LCDR2

TAC CGT TAC ACT GGA GTC CCT GAT GGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT 72

TTC ACT CTC ACC ATC AGC AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAG TAT TTC **TGT** 90
LCDR3

CAG CAA TAT AAG AGC TAT CCT CTG AGC TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG ATC 108
218 Linker

AAA **GGC TCC ACC AGC GGC AGC GGT AAG CCA GGC TCC GGC GAA GGC AGC ACC AAA** 126

GGC GAA GTG AAG GTT GAG GAG TCT GGA GGA GGC TTG GTG CAA CCT GGA GGA TCC 144
HCDR1

ATG AAA CTC TCC **TGT** GTT GTC TCT GGA TTC ACT TTC GGT **AAT TAC TGG AIG AAC** 162

TGG GTC CGC CAG TCT CCA GAG AAG GGG CTT GAG TGG ATT GCA **GAA ATT AGA TTG** 180
HCDR2

AAA TCC AAT AAT TTT CCA AGA TAT TAT GCG GAG TCT GTC AAA GGC AGG TTC ACC 198

ATC TCA AGA GAT GAT TCC AAA AGT AGT GTC TAC CTG CAA ATG ATC AAC CTA AGA 216
HCDR3

GCT GAA GAT ACT GGC ATT TAT TAC **TGT** ACC AGT **TAT GGT AAC TAC GTT GGC CAC** 234

TAT TTT GAC CAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACC TCC TCA GCT AGC GGT 252
G₄S Linker Gelonin→

GGC GGT GGC TCC GGT CTA GAC ACC GTG AGC TTT AGC ACT AAA GGT GCC ACT TAT 270

ATT ACC TAC GTG AAT TTC TTG AAT GAG CTA CGA GTT AAA TTG AAA CCC GAA GGT 288

AAC AGC CAT GSA ATC CCA TTG CTG CGC AAA AAA **TGT** GAT GAT CCT GGA AAG **TGT** 306

TTC GTT TTG GTA GCG CTT TCA AAT GAC AAT GSA CAG TTG GCG GAA ATA GCT ATA 324

GAT GTT ACA AGT GTT TAT GTG GTG GGC TAT CAA GTA AGA AAC AGA TCT TAC TTC 342

TTT AAA GAT GCT CCA GAT GCT GCT TAC GAA GGC CTC TTC AAA AAC AGA ATT AAA 360

ACA AGA CTT CAT TTT GGC GGC AGC TAT CCC TCG CTG GAA GGT GAG AAG GCA TAT 378

AGA GAG ACA ACA GAC TTG GGC ATT GAA CCA TTA AGG ATT GGC ATC AAG AAA CTT 396

GAT GAA AAT GCG ATA GAC AAT TAT AAA CCA ACG GAG ATA GCT AGT TCT CTA TTG 414

GTT GTT ATT CAA ATG GTG TCT GAA GCA GCT CGA TTC ACC TTT ATT GAG AAC CAA 432

ATT AGA AAT AAC TTT CAA CAG AGA ATT CGC CCG GCG AAT AAT ACA ATC AGC CTT 450

GAG AAT AAA TGG GGT AAA CTC TCG TTC CAG ATC CGG ACA TCA GGT GCA AAT GGA 468

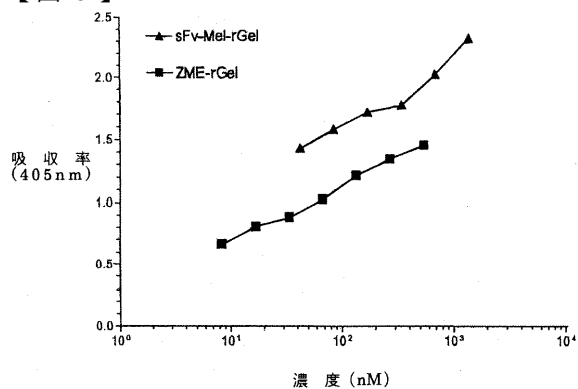
ATG TTT TCG GAC GAT GAA TTG GAA CGT GCA AAT GGC AAA AAA TAC TAT GTC 486

ACC GCA GTT GAT CAA GTA AAA CCC AAA ATA GCA CTC TTG AAG TTC GTC **GAT** AAA 504

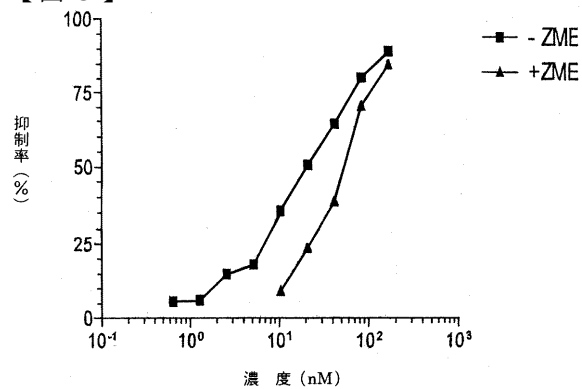
End * *

GAT CCT AAA TAA TGA

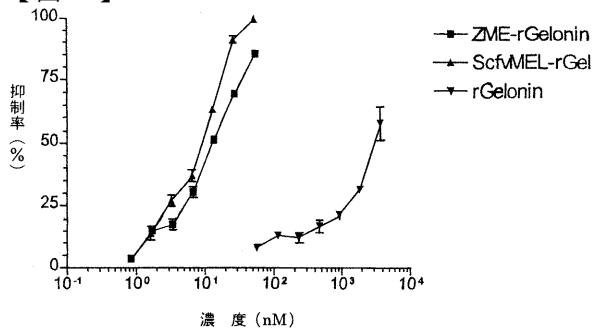
【図 6】



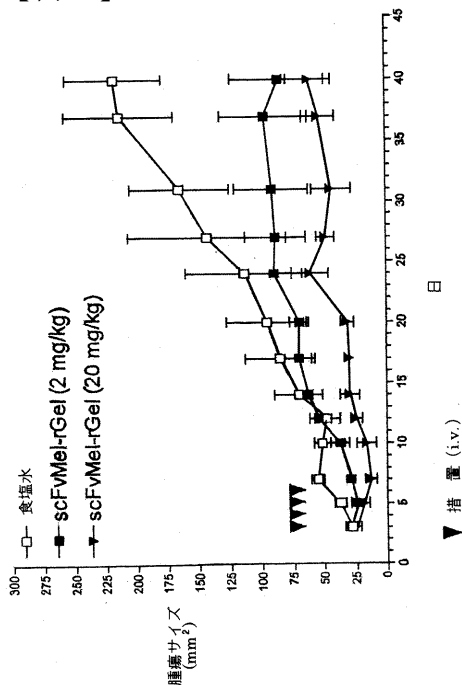
【図 8】



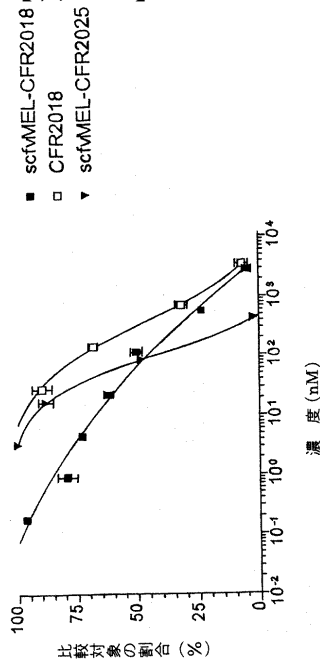
【図 7】



【図 9】



【図 10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/04195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : A61K 35/78, 38/16, 39/395; C12N 15/09, 15/29, 15/62, 15/63, 15/64												
US CL : 514/2, 12, 44; 530/350, 402; 424/178.1, 183.1, 192.1, 193.1; 435/69.1, 69.2, 69.7, 70.1												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 12, 44; 530/350, 402; 424/178.1, 183.1, 192.1, 193.1; 435/69.1, 69.2, 69.7, 70.1												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	SAJRAM et al. Structural Characterization of Gelonin: Evidence for Separate Antigenic and Cytotoxic Domains. Biochemistry and Molecular Biology International. November 1993, Vol. 31, No. 3, pages 575-581, especially pages 577-580.	20-49										
---		-----										
Y		1-8, 12-19, 50-57										
X	US 5,621,083 A (BETTER et al) 15 April 1997 (15.04.1997), column 73-column 76, column 12, line 53- column 13, line 15, column 14, line 23-column 15, line 9, column 33, line 33-column 38, line 14, column 14, line 47-column 63, line 66.	1-8, 12-1962, 64-66, 69, 70, 74, 75, 77										
---		-----										
Y		67										
Y	W0 91/16071 A1 (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 31 October 1991 (31.10.1991), abstract, page 8, line 20-page 14, line 33.	12-18, 62-67, 69, 70, 74-77										
Y	ROSCOE et al. Primate Antibody Response to Immunotoxin: Serological and Computer-Aided Analysis of Epitopes on a Truncated Form of Pseudomonas Exotoxin. Infection and Immunity. November 1994, Vol. 62, No. 11, pages 5055-5065, especially page 5055, columns 1 and 2.	20-57										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"G" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"G" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"G" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report										
22 September 2003 (22.09.2003)		09 OCT 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Anne L. Holleran Telephone No. (703) 308-0196										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/04195

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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

Remark on Protest
☐
☐

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

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/04195

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-36, 50-61, drawn to modified gelonins, modified enzymes, humanized gelonins, fusion proteins.

Group II, claim(s) 37-49, drawn to process for producing modified proteins.

Group III, claim(s) 62-70 and 74-88, drawn to methods for killing cancer cells or treating cancer patients.

Group IV, claim(s) 71-73, drawn to methods of gene therapy.

The inventions listed as Groups I - IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Groups I, II and III would be linked by the technical feature of a modified gelonin, however, modified gelonins are known in the art as evidenced by the teachings of U.S. Patent 5,621,083 (issued April 15, 1997), which provides a sequence that comprises amino acids 110-210 of SEQ ID NO: 1, but does not comprise all of SEQ ID NO: 1 (see SEQ ID NO: 2 of U.S. 5,621,083). Also, modifications of toxins by the identification of antigenic regions is taught in the art, see Sairam et al, Biochemistry and Molecular Biology International, 1993, vol. 31, pages 575-581. Thus, the technical feature of a modified gelonin is not a special technical feature that unites groups I -III. In the case of group IV, the technical feature of this group is a nucleic acid construct that encodes a gelonin and allows one to administer it to a cancer patient for expression, which is not the same technical feature as that present in groups I -III. Therefore, groups I-IV lack the same special technical feature.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Medline, Embase, Biosis, Caplus, U.S. Patent Database (EAST)
search terms: gelonin, immunotoxin, scfvml, antigenic?, zmc-018

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/02	A 6 1 P 1/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	C 0 7 K 14/415	
C 0 7 K 14/415	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 9/00	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ローゼンブラム, マイクル, ジィ.

アメリカ合衆国 77429 テキサス, シュガー ランド, ストウニ ミスト ドライブ 3127

(72)発明者 チェン, ロウレンス

アメリカ合衆国 77072 テキサス, ヒューストン, グラッドウェル ドライブ 6119

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA07 BA38 CA04 CA06 CA07 DA02 EA02 GA11
HA12 HA17
4B050 CC05 DD09 LL01
4C084 AA02 AA07 AA14 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA53 CA59
DA32 DA34 DC01 NA14 ZA012 ZA332 ZA362 ZA512 ZA592 ZA662
ZA672 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962 ZB072 ZB262 ZB272 ZC212
4C085 AA13 BB11 CC05 CC21 CC24 EE01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA05 NA13 NA14 ZA01 ZA33 ZA36
ZA51 ZA59 ZA66 ZA67 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB26
ZB27 ZC21
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 AA50 BA10 BA41 BA56 CA30 CA42
DA75 DA83 DA89 EA28 FA72 FA74

专利名称(译)	改性蛋白质，设计师毒素及其制备方法		
公开(公告)号	JP2005514000A	公开(公告)日	2005-05-19
申请号	JP2002569065	申请日	2002-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
[标]发明人	ローゼンブラムマイクルジ チェンロウレンス		
发明人	ローゼンブラム, マイクル, ジィ. チェン, ロウレンス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/16 A61P1/18 A61P5/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07K14/415 C07K14/435 C07K16/30 C07K16/40 C07K19/00 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/29 C12P21/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/415 C07K16/30 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/395.E A61P1/00 A61P1/02 A61P1/16 A61P1/18 A61P5/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 C07K14/415 C07K16/40 C07K19/00 C12N9/00 G01N33/53.D A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA38 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B050/CC05 4B050/DD09 4B050/LL01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA14 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/DA32 4C084/DA34 4C084/DC01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA672 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/CC24 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA05 4C087/NA13 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA33 4C087/ZA36 4C087/ZA51 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA67 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA50 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA56 4H045/CA30 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA83 4H045/DA89 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/268402 2001-02-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

技术领域本发明涉及维持化合物的生物学活性的同时降低蛋白质化合物的抗原性的方法和具有生物活性但抗原性降低的组合物。与需要这种化合物和组合物的个体相比，这些方法和组合物具有显著的优点。另外，还包括被切割或具有降低的巨噬细胞性的修饰的毒素化合物。这种设计毒素具有治疗，诊断和预防益处，特别是作为免疫毒素。还提供了使用这些免疫毒素的癌症治疗方法。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B 0 5 0
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	E 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 7
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁 1		

(21) 出願番号	特願2002-569065 (P2002-569065)	(71) 出願人	591026333
(86) (22) 出願日	平成14年2月12日 (2002.2.12)		リサーチ デイベロッップメント ファ
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月3日 (2003.10.3)		ーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/004195		R E S E A R C H D E V E L O P M
(87) 国際公開番号	W02002/069886		T F O U N D A T I O N
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		アメリカ合衆国, 8 9 7 0 3 ネバダ
(31) 優先権主張番号	60/268, 402		ーソン シティ, ノース デイヴィ
(32) 優先日	平成13年2月12日 (2001.2.12)		ン ストリート 4 0 2 番地
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100080115
			弁理士 五十嵐 和壽
		(74) 代理人	100071478
			弁理士 佐田 守雄
最終頁に続			