(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-532587
(P2015-532587A)
(43)公表日　平成27年11月12日(2015.11.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4B024
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/395	L	4B063
A61P 37/06	(2006.01)	A61P	35/00		4B064
A61P 31/00	(2006.01)	A61P	37/06		4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 197 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-517924 (P2015-517924)
(86)(22)出願日　平成25年6月19日 (2013.6.19)
(85)翻訳文提出日　平成27年2月19日 (2015.2.19)
(86)国際出願番号　PCT/IL2013/050527
(87)国際公開番号　WO2013/190555
(87)国際公開日　平成25年12月27日 (2013.12.27)
(31)優先権主張番号　61/662,470
(32)優先日　平成24年6月21日 (2012.6.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　506257984
コンピュゲン　エルティーディー.
イスラエル国　テルアビブ　６９５１２，ピンチャスロゼンストリート　７２
(74)代理人　100077012
弁理士　岩谷　龍
(72)発明者　コジョカル，ガド　エス.
イスラエル国　ラマトハシャロン　４７２　４８　ハセイファン　ストリート　４１／７
(72)発明者　ダッサ，リアト
イスラエル国　ヤフド　５６４７８　メナヘム　ベギン　ストリート　３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＬＳＲ抗体およびがんの治療のためのその使用

(57)【要約】
本発明は、特定のがんの免疫療法および治療に適した薬物である、ＬＳＲ分子に特異的な抗体、抗原結合フラグメント、ならびにこれらを含む複合体および／もしくは代替足場に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫分子であって、
配列番号２２９、２３５、２４２～２４３、２４５～２４９、２５８、２７４～２７８、２６４～２７２、２５１～２５６、２８０、２８７、２８４、２８５、２９０～２９２、２８７、２８８、２５９、２９５、２９７～３０２および３０６～３０７からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を含み、
該抗原結合領域が、配列番号１０のアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合するように改変されていることを特徴とする免疫分子。
【請求項２】
配列番号２２７、２２８、２２９の少なくとも１つと、配列番号２３３、２３４、２３５の少なくとも１つとを含むこと；
配列番号２４５、２４６、２４７、２４８、２４９の少なくとも１つと、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２、２５６、２８７、２８８、２４２、２４３の少なくとも１つとを含むこと；
配列番号３０３、３０４、２６１、３０６、２６２の少なくとも１つと、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９の少なくとも１つとを含むこと；
配列番号２７４、２７５、２７６、２７７、２７８の少なくとも１つと、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２の少なくとも１つとを含むこと；
配列番号２７４、２７５、２７６、２７７、２８２の少なくとも１つと、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２８０、２７１、２７２の少なくとも１つとを含むこと；
配列番号３０３、３０４、３０５、３０６、３０７の少なくとも１つと、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２、２５６、２８７、２８８、２８４、２８５の少なくとも１つとを含むこと；
配列番号２９０、２９１、３０５、３０６、２９２の少なくとも１つと、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４、２５６、２８７、２８８、２５８、２５９の少なくとも１つとを含むこと；または
配列番号３０３、３０４、３０５、３０６、３０７の少なくとも１つと、配列番号２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２の少なくとも１つとを含むこと
を特徴とする請求項１に記載の免疫分子。
【請求項３】
配列番号２２７～２２９、２３９～２４３、２５１～２９９、２６４～２７２、２８０、２８４～２８５、２８７～２８８、２９３～３０１、３０２の少なくとも１つと、
配列番号２３３～２３５、２４５～２４９、２６１～２６２、２７４～２７８、２８２、２９０～２９２、３０３～３０６、３０７の少なくとも１つとを含むことを特徴とする請求項１に記載の免疫分子。
【請求項４】
抗体フラグメントである請求項１～３のいずれかに記載の免疫分子。
【請求項５】
配列番号２３９～２４３、２４５～２４９、２５１～２５９、２６１～２６２、２６４～２７２、２７４～２７８、２８０～２８１、２８２、２８４～２８５、２８７～２８８、２９０～２９２および２９４～３０７からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を少なくとも２つ含む、請求項１～３のいずれかに記載の免疫分子。
【請求項６】
配列番号２２７、２２８、２２９、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２６１、２６２、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２８２、３０３、３０４、３０５

、３０６、３０７、２９０、２９１および２９２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を少なくとも１つ含む、請求項５に記載の免疫分子。
【請求項７】
配列番号２３３、２３４、２３５、２３９、２４０、２４１、２８７、２８８、２４２、２４３、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２８０、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、２８４、２８５、２８７、２８８、２５８および２５９からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を少なくとも１つ含む、請求項５または６に記載の免疫分子。
【請求項８】
配列番号２２０、２４４、２６０、２７３、２８１、２８９、３０８のいずれかに示すアミノ酸配列またはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含む、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子。
【請求項９】
配列番号２１８、２３８、２５０、２６３、２７９、２８３、２８６、２９３のいずれかに示すアミノ酸配列またはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含む、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子。
【請求項１０】
配列番号２２０のアミノ酸配列および配列番号２１８のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号２４４のアミノ酸配列および配列番号２３８のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号２６０のアミノ酸配列および配列番号２５９のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号２７３のアミノ酸配列および配列番号２６３のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号２８１のアミノ酸配列および配列番号２７９のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号３０８のアミノ酸配列および配列番号２８３のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号２８９のアミノ酸配列および配列番号２８６のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号３０８のアミノ酸配列および配列番号２９３のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含むこと；
配列番号２４５もしくは２４６のアミノ酸配列と、配列番号２４７もしくは２４８のアミノ酸配列と、配列番号２４９のアミノ酸配列と、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５６、２８７、２８８のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２４２もしくは２４３のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むこと；
配列番号３０３もしくは３０４のアミノ酸配列と、配列番号２６１もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号２６２のアミノ酸配列と、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５５、２５６、２５７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５８もしくは２５９のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むこと；
配列番号２７４もしくは２７５のアミノ酸配列と、配列番号２７６もしくは２７７のアミノ酸配列と、配列番号２７８のアミノ酸配列と、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２６８、２６９、２７０のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２７１もしくは２７２のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むこと；
配列番号２７４もしくは２７５のアミノ酸配列と、配列番号２７６もしくは２７７のアミ

ノ酸配列と、配列番号２８２のアミノ酸配列と、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２６８、２６９、２８０のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２７１もしくは２７２のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むこと；
配列番号３０３もしくは３０４のアミノ酸配列と、配列番号３０５もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号３０７のアミノ酸配列と、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５６、２８７、２８８のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２８４もしくは２８５のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むこと；
配列番号２９０もしくは２９１のアミノ酸配列と、配列番号３０５もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号２９２のアミノ酸配列と、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５６、２８７、２８８のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５８もしくは２５９のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むこと；または
配列番号３０３もしくは３０４のアミノ酸配列と、配列番号３０５もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号３０７のアミノ酸配列と、配列番号２９４、２９５、２９６、２９７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２９８、２９９、３００のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号３０１もしくは３０２のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含むことを特徴とする前記請求項のいずれかに記載の免疫分子。

【請求項１１】
前記請求項のいずれかに記載の免疫分子をコードするポリヌクレオチド。

【請求項１２】
配列番号２２４、２２５、２２６、２３０、２３１、２３２、２１７、２１９、およびこれらの縮重バリアントからなる群から選択される核酸配列を含む、請求項１１に記載のポリヌクレオチド。

【請求項１３】
請求項１１または１２に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項１４】
請求項１３に記載のベクターを含み、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子を発現することが可能な組換え細胞。

【請求項１５】
前記請求項のいずれかに記載の免疫分子の製造方法であって、
請求項１３に記載のベクターを細胞に導入して組換え細胞を作製すること、および
該組換え細胞から免疫分子を産生させることを含む方法。

【請求項１６】
抗体またはその抗原結合フラグメントであって、
該抗体が、配列番号１０の３０番目～１１０番目のアミノ酸に特異的に結合するが配列番号１０の他の部分には特異的に結合しない抗原結合領域を有し、
該配列番号１０の他の部分が、配列番号１０の１番目～２９番目のアミノ酸または１１１番目～２３４番目のアミノ酸を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項１７】
前記抗体が、配列番号２１５または配列番号２１６に特異的に結合するが配列番号１０の他の部分には特異的に結合しない抗原結合領域を有し、
該抗原結合領域が配列番号２１５に特異的に結合する場合、該配列番号１０の他の部分が、配列番号１０の１番目～８０番目のアミノ酸または９９番目～２３４番目のアミノ酸を含み、
該抗原結合領域が配列番号２１６に特異的に結合する場合、該配列番号１０の他の部分が、配列番号１０の１番目～１１７番目のアミノ酸または１３６番目～２３４番目のアミノ酸を含む、請求項１６に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項１８】

前記抗体が、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または霊長類化抗体である、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体またはフラグメント。

【請求項１９】

前記抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、Ｆｖフラグメント、ｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択される、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項２０】

前記抗体が、薬物、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療薬および化学療法薬から選択される治療薬と結合されており、

これらを検出するマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物または化学発光化合物である、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項２１】

前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体または抗原結合フラグメントを含む医薬組成物。

【請求項２２】

がん、免疫病態および感染症からなる群から選択される疾患をこれらの治療を必要とする対象において治療するための、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメントまたは医薬組成物の使用。

【請求項２３】

前記抗体またはフラグメントが、免疫細胞の活性を調節すること、Ｔ細胞の活性化を増加すること、Ｔ細胞の抑制を軽減すること、免疫抑制サイトカインの分泌を減少させること、炎症性サイトカインの分泌を増加させること、ＩＬ－２の分泌を増加させること、Ｔ細胞によるインターフェロン－γの産生を増強すること、がんのエピトープ拡大を促進すること、哺乳動物におけるＴ細胞応答を増強すること、Ｍ２型マクロファージを減少または除去すること、Ｍ２型マクロファージの腫瘍形成促進活性を低下させること、抗原特異的メモリー応答を増強すること、がん細胞のアポトーシスを亢進すること、がん細胞に対する細胞傷害作用または細胞増殖抑制作用を増強すること、がん細胞に対する直接殺傷を増強すること、ならびに／または補体依存性細胞傷害および／もしくは抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を誘導することを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項２４】

前記抗体またはフラグメントが、がんに対する免疫応答を増強する、請求項２３に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項２５】

前記治療を、がんの治療に有用な別の治療薬または治療法と組み合わせることを特徴とする、請求項２４に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項２６】

前記治療法が、放射線療法、凍結療法、抗体療法、化学療法、光線力学療法、外科手術、ホルモン除去療法、および慣用の薬物との併用療法の１以上を含む、請求項２５に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項２７】

前記治療薬が、細胞傷害薬、腫瘍ワクチン、抗体、ペプチド、ペプチボディ、小分子、化学療法薬、細胞傷害・細胞増殖抑制薬、免疫調節薬、インターフェロン、インターロイキン、免疫刺激薬、成長ホルモン、サイトカイン、ビタミン、無機質、アロマターゼ阻害薬、ＲＮＡｉ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬およびプロテアソーム阻害薬からなる群から選択される、請求項２５に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項２８】

治療効果を得るために１以上の増強手段と組み合わせて、該増強手段と同時にまたは連続して対象に投与され、
該１以上の増強手段が、放射線療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標準的／古典的抗がん療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標的療法、Ｔｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする治療薬、免疫刺激抗体、サイトカイン療法、がん治療ワクチンならびに養子細胞移入からなる群から選択される、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項２９】

前記標準的／古典的抗がん薬が、白金系化合物、抗がん活性を有する抗生物質、アントラサイクリン類、アントラセンジオン類、アルキル化薬、代謝拮抗薬、抗有糸分裂薬、タキサン類、タキソイド類、微小管阻害薬、ビンカアルカロイド類、葉酸拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害薬、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、アロマターゼ阻害薬、ＧｎＲｈアナログ、５α－還元酵素阻害薬およびビホスホネート類から選択される、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項３０】

前記標的療法薬が、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬、プロテアソーム阻害薬、ｍＴＯＲ経路阻害薬、ＪＡＫ２阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬（ＴＫＩ）、ＰＩ３Ｋ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害薬、セリン／トレオニンキナーゼ阻害薬、細胞内シグナル伝達阻害薬、Ｒａｓ／Ｒａｆシグナル伝達阻害薬、ＭＥＫ阻害薬、ＡＫＴ阻害薬、生存シグナル伝達タンパク質阻害薬、サイクリン依存性キナーゼ阻害薬、治療用モノクローナル抗体、ＴＲＡＩＬ経路アゴニスト、抗血管新生薬、メタロプロテイナーゼ阻害薬、カテプシン阻害薬、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体機能阻害薬、免疫複合体、抗体－薬物複合体、抗体フラグメント、二重特異性抗体およびbispecific T cell engager（ＢｉＴＥ）からなる群から選択される、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項３１】

前記抗体療法が、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、アデカツムマブ（adecatumumab）、オレゴボマブ（oregovomab）、オナルツズマブ（onartuzumab）、アポマブ（apomab）、マパツムマブ（mapatumumab）、レクサツムマブ（lexatumumab）、コナツムマブ（conatumumab）、ティガツズマブ（tigatuzumab）、カツマキソマブ（catumaxomab）、ブリナツモマブ（blinatumomab）、イブリツモマブ チウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブ ベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン（clivatuzumab tetraxetan）、ペムツモマブ（pemtumomab）、トラスツズマブ エムタンシン、ベバシズマブ、エタラシズマブ（etaracizumab）、ボロシキシマブ（volociximab）、ラムシルマブおよびアフリベルセプトから選択される、請求項２６に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。

【請求項３２】

免疫抑制細胞であるＴｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする前記治療薬が、抗有糸分裂薬、シクロホスファミド、ゲムシタビン、ミトキサントロン、フルダラビン、サリドマイド、サリドマイド誘導体、ＣＯＸ－２阻害薬、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を認識してＴｒｅｇを直接標的とする除去抗体または殺傷抗体、抗ＣＤ２５であるダクリズマブおよびバシリキシマブ、リガンド標的毒素であるデニロイキン ディフィトックス（オンタック）（ヒトＩＬ－２とジフテリア毒素との融合タンパク質）およびＬＭＢ－２（ＣＤ２５に対するｓｃＦｖと緑膿菌外毒素との融合物）、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を標的とする抗体、ＴＬＲ調節薬、アデノシン作動経路を阻害する薬物、エクトヌクレオチダーゼ阻害薬、Ａ２Ａアデノシン受容体阻害薬、ＴＧＦ－β阻害薬、ケモカイン受容体阻害薬、レチノイン酸、オールトランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）、ビタミンD_3、ホスホジエステラーゼ５阻害薬、シルデナフィル、ＲＯＳ阻害薬、ならびにニトロアスピリンから選択され

る、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。
【請求項３３】
前記免疫刺激抗体が、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ３およびＶＩＳＴＡの１以上を標的とするアンタゴニスト抗体、ならびに／またはＣＤ４０、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ２８およびＩＣＯＳの１以上を標的とするアゴニスト抗体から選択される、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。
【請求項３４】
前記がん治療ワクチンが、腫瘍抗原に対する免疫原性応答を開始するためのタンパク質またはペプチド、腫瘍抗原をコードする組換えウイルスベクターおよび組換え細菌ベクター、腫瘍抗原をコードするＤＮＡベースのワクチン、樹状細胞を標的とするタンパク質、樹状細胞ベースのワクチン、全腫瘍細胞ワクチン、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣＯＳおよび／またはＦｌｔ３リガンドを発現する遺伝子修飾腫瘍細胞、ならびに腫瘍溶解性ウイルスワクチンを包含する外因性がんワクチンから選択される、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。
【請求項３５】
前記サイトカイン療法が、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（インターフェロン－α）、ＩＦＮα－２ｂ、ＩＦＮβおよびＩＦＮγを含むサイトカインの１以上、ならびにこれらのサイトカインの様々な送達方法から選択される、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。
【請求項３６】
前記養子細胞移入療法を実施する前に、患者から得た天然の腫瘍特異的自家Ｔ細胞の増殖および腫瘍抗原特異性を付与するためのＴ細胞の遺伝子修飾から選択されるエクスビボ処理を行うことを特徴とする、請求項２８に記載の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメント、組成物または使用。
【請求項３７】
前記請求項のいずれかに記載の抗体、免疫分子または医薬組成物の使用であって、
（ａ）サイトカインのアップレギュレーション、（ｂ）Ｔ細胞増殖／拡大の増加、（ｃ）Ｔ細胞によるインターフェロン－γ産生の増加、（ｄ）ＩＬ－２分泌の増加、（ｅ）抗体応答の刺激、（ｆ）がん細胞増殖の抑制、（ｇ）抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進、（ｇ）ＣＤ４$^{+}$および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞活性化の促進、（ｉ）Ｔ細胞抑制の軽減、（ｊ）がん細胞のアポトーシスまたは溶解の軽減、（ｋ）がん細胞に対する細胞傷害作用または細胞増殖抑制作用のうちの１以上を対象において実施し、疾患の治療を行うことを特徴とする使用。
【請求項３８】
対象において疾患を診断するための診断方法であって、
該疾患が、がんおよび自己免疫疾患からなる群から選択されること、
該診断方法がエクスビボで実施されること、ならびに
該診断方法が、対象から得た組織試料と前記請求項のいずれかに記載の免疫分子または抗体とをエクスビボで接触させること、および該免疫分子または抗体との特異的結合を検出することを含むこと
を特徴とする診断方法。
【請求項３９】
対象において疾患を診断するための診断方法であって、
該疾患が、がん、自己免疫疾患および感染症からなる群から選択されること、
該診断方法がインビボで実施されること、ならびに
該診断方法が、前記請求項のいずれかに記載の免疫分子または抗体を対象に投与すること、および前記請求項のいずれかに記載の免疫分子または抗体と対象の組織との特異的結合を検出することを含むこと

を特徴とする診断方法。
【請求項４０】
前記免疫分子、抗体または医薬組成物を対象に投与する前に、請求項３８または３９に記載の診断方法を実施することを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の使用。
【請求項４１】
前記免疫分子、抗体または医薬組成物を対象に投与する前に、対象の組織のＬＳＲレベルを測定することをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の使用。
【請求項４２】
前記ＬＳＲレベルが十分な場合においてのみ、前記免疫分子、抗体または医薬組成物を対象に投与することを特徴とする、請求項４１に記載の使用。
【請求項４３】
前記ＬＳＲレベルとしてＬＳＲの発現レベルを測定することをさらに含む請求項４２に記載の使用。
【請求項４４】
前記発現レベルの測定において、対象の組織のＩＨＣ（免疫組織化学）アッセイまたは遺伝子発現アッセイを実施することを含む請求項４３に記載の使用。
【請求項４５】
前記ＩＨＣアッセイを実施する際に、発現レベルが０～３の段階評価において１以上であるかどうかを判定することを含む請求項４４に記載の使用。
【請求項４６】
前記組織が、がん細胞または免疫浸潤細胞を含む請求項４２～４５のいずれかに記載の使用。
【請求項４７】
前記組織の前記ＬＳＲレベルの測定において、
前記組織を、前記請求項のいずれかに記載の抗体または免疫分子と接触させること、および
該抗体または免疫分子との特異的結合を検出することを含む、請求項４２～４６のいずれかに記載の使用。
【請求項４８】
対象から得た組織試料を用いて疾患を診断するためのアッセイであって、
前記請求項のいずれかに記載の免疫分子または抗体と、がん、自己免疫疾患および感染症からなる群から選択される疾患を診断するための少なくとも１の試薬とを含むアッセイ。
【請求項４９】
疾患のスクリーニング、疾患の存在もしくは重症度の検出、疾患の予後の予測、疾患の進行もしくは再発のモニタリング、疾患、障害もしくは状態の治療効果および／もしくは再発の評価、疾患の治療法および／もしくは処置の選択、疾患に対する特定の治療法の最適化、疾患に対する治療のモニタリング、特定の患者もしくは亜集団に対する治療法の適合性の予測、ならびに／または患者もしくは亜集団に対する治療薬の適切な用量の決定のための、前記請求項のいずれかに記載の使用または請求項４８に記載のアッセイの使用。
【請求項５０】
前記がん、前記腫瘍浸潤免疫細胞のいずれかまたはその両方が、十分なレベルのＬＳＲを発現しており、
前記がんが、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、悪性黒色腫、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫および横紋筋肉腫、悪性黒色腫、ぶどう膜悪性黒色腫、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精嚢腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、

肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常症、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、鼻咽頭癌、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃癌、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群ならびにフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）（ただし、前記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、前記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される、前記請求項のいずれかに記載の使用。

【請求項５１】

前記がんが、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、乳房小葉癌、乳房粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、中～低分化型盲腸腺癌、高～低分化型結腸腺癌、グレード２の上行結腸管状腺癌、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性結腸腺癌、直腸腺癌、グレード３の直腸腺癌、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、中～低分化型肺扁平上皮癌、中等度によく分化した肺角化型扁平上皮細胞癌、肺大細胞腺癌、グリーソングレード７～９の前立腺腺癌、浸潤性前立腺腺癌、中分化型前立腺腺癌、漿液性乳頭状卵巣嚢胞癌、漿液性卵巣嚢胞腺癌、グレード４の星状細胞腫、多形膠芽腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、ならびに低悪性度肝細胞癌（ただし、前記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、前記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項５２】

前記乳がんが、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、および乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型からなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項５３】

前記乳がんが硬性腺癌である請求項５２に記載の使用。

【請求項５４】

前記結腸がんが、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、ならびに中分化型直腸粘液性腺癌からなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項５５】

前記肺がんが、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌および小細胞肺がんからなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項５６】

前記前立腺がんが、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺上皮内腫瘍および未分化癌からなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項５７】

前記胃がんが、中分化型胃腺癌である請求項５０に記載の使用。

【請求項５８】

前記卵巣がんが、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌および浸潤性漿液性乳頭状癌からなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項５９】

前記脳がんが、多形膠芽腫、および星状細胞腫（ただしグレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される、請求項５０に記載の使用。

【請求項６０】

前記星状細胞腫がグレード４の星状細胞腫である請求項５９に記載の使用。

【請求項６１】

前記腎臓がんが腎明細胞癌である請求項５０に記載の使用。

【請求項６２】

前記肝臓がんが肝細胞癌である請求項５０に記載の使用。
【請求項６３】
前記肝細胞癌が低悪性度肝細胞癌または線維層板状肝細胞癌である請求項６２に記載の使用。
【請求項６４】
前記血液がんが、大細胞型リンパ腫ならびに高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫からなる群から選択される請求項５０に記載の使用。
【請求項６５】
前記疾患が免疫病態であり、
該免疫病態が、自己免疫疾患、移植拒絶反応および移植片対宿主病からなる群から選択される、請求項２２～４９のいずれかに記載の使用、方法またはアッセイ。
【請求項６６】
前記自己免疫疾患が、多発性硬化症、乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎、血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少症、特発性自己免疫性溶血性貧血、赤芽球癆、シェーグレン症候群、リウマチ性疾患、結合組織疾患、炎症性リウマチ、変形性リウマチ、非関節性リウマチ、若年性関節リウマチ、尿酸性関節炎、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、クリオグロブリン血管炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、抗リン脂質症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫性多発ニューロパチー、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、１型糖尿病、アジソン病、膜性糸球体腎症、グッドパスチャー病、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血、天疱瘡、尋常性天疱瘡、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、皮膚筋炎、多発性筋炎、線維筋炎、筋硬症、セリアック病、免疫グロブリンＡ腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、関節症性乾癬、グレーブス病、グレーブス眼症、強皮症、全身性強皮症、進行性全身性強皮症、喘息、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、肝炎、慢性活動性肝炎、膠原病、強直性脊椎炎、肩関節周囲炎、結節性汎動脈炎、軟骨石灰化症、ヴェーゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性じんま疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、デビック病、小児自己免疫性溶血性貧血、難治性または慢性自己免疫性血球減少症、後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防、寒冷凝集素病、視神経脊髄炎、全身硬直症候群、歯肉炎、歯周炎、膵炎、心筋炎、脈管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎、炎症性皮膚疾患、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗合成酵素症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、ＰＡＰＡ症候群、Ｂｌａｕ症候群、痛風、成人および若年性スティル病、クリオピリン周期熱症候群、マックル・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高ＩｇＤ症候群、シュニッツラー症候群、自己免疫性網膜症、加齢黄斑変性、アテローム性動脈硬化症、慢性前立腺炎、ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択される、請求項６５に記載の使用。
【請求項６７】
前記治療を、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わせることを特徴とする請求項６５に記載の使用。
【請求項６８】
前記疾患が感染症であり、
該感染症が、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択される、請求項２２～４９のいずれかに記載の使用、方法またはアッセイ。
【請求項６９】
前記感染症が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択される、

請求項６８に記載の使用、方法またはアッセイ。
【請求項７０】
前記治療を、感染症の治療に有用な別の成分と組み合わせることを特徴とする請求項６８に記載の使用、方法またはアッセイ。
【請求項７１】
疾患に罹患している対象の治療または診断を行うための、配列番号１０に特異的に結合する抗体またはフラグメントの使用であって、
乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、硬性腺癌、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、小細胞肺がん、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺上皮内腫瘍、未分化癌、中分化型胃腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、浸潤性漿液性乳頭状癌、多形膠芽腫、星状細胞腫、グレード４の星状細胞腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、低悪性度肝細胞癌、線維層板状肝細胞癌、大細胞型リンパ腫、ならびに高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫（ただし、前記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、前記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される疾患に罹患している対象の治療または診断を行うための使用。
【請求項７２】
配列番号１０に特異的に結合する抗体またはフラグメントを含む医薬組成物であって、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、硬性腺癌、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、小細胞肺がん、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺上皮内腫瘍、未分化癌、中分化型胃腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、浸潤性漿液性乳頭状癌、多形膠芽腫、星状細胞腫、グレード４の星状細胞腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、低悪性度肝細胞癌、線維層板状肝細胞癌、大細胞型リンパ腫、ならびに高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫（ただし、前記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、前記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される疾患に罹患している対象を治療するための医薬組成物。
【請求項７３】
前記がんが、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、乳房小葉癌、乳房粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、中～低分化型盲腸腺癌、高～低分化型結腸腺癌、グレード２の上行結腸管状腺癌、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌、グレード３の直腸腺癌、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌、中分化型および中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、グリーソングレード７～９の腺癌、浸潤性腺癌、中分化型腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、グレード４の星状細胞腫、多形膠芽腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、ならびに低悪性度肝細胞癌（ただし、前記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、前記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される、請求項７１または７２に記載の使用または組成物。
【請求項７４】
前記治療を、がんの治療に有用な別の治療薬または治療法と組み合わせることを特徴とする、請求項７１～７３のいずれかに記載の使用または組成物。
【請求項７５】

前記治療法が、放射線療法、凍結療法、抗体療法、化学療法、光線力学療法、外科手術、ホルモン除去療法、および慣用の薬物との併用療法の１以上を含む、請求項７４に記載の使用または組成物。

【請求項７６】

前記治療薬が、細胞傷害薬、腫瘍ワクチン、抗体、ペプチド、ペプチボディ、小分子、化学療法薬、細胞傷害・細胞増殖抑制薬、免疫調節薬、インターフェロン、インターロイキン、免疫刺激薬、成長ホルモン、サイトカイン、ビタミン、無機質、アロマターゼ阻害薬、ＲＮＡｉ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬およびプロテアソーム阻害薬からなる群から選択される、請求項７４に記載の使用または組成物。

【請求項７７】

治療効果を得るために１以上の増強手段と組み合わせて、該増強手段と同時にまたは連続して対象に投与され、

該１以上の増強手段が、放射線療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標準的／古典的抗がん療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標的療法、Ｔｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする治療薬、免疫刺激抗体、サイトカイン療法ならびに養子細胞移入からなる群から選択される、請求項７１～７６のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項７８】

前記標準的／古典的抗がん薬が、白金系化合物、抗がん活性を有する抗生物質、アントラサイクリン類、アントラセンジオン類、アルキル化薬、代謝拮抗薬、抗有糸分裂薬、タキサン類、タキソイド類、微小管阻害薬、ビンカアルカロイド類、葉酸拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害薬、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、アロマターゼ阻害薬、ＧｎＲｈアナログ、５α－還元酵素阻害薬およびビホスホネート類から選択される、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項７９】

前記標的療法薬が、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬、プロテアソーム阻害薬、ｍＴＯＲ経路阻害薬、ＪＡＫ２阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬（ＴＫＩ）、ＰＩ３Ｋ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害薬、セリン／トレオニンキナーゼ阻害薬、細胞内シグナル伝達阻害薬、Ｒａｓ／Ｒａｆシグナル伝達阻害薬、ＭＥＫ阻害薬、ＡＫＴ阻害薬、生存シグナル伝達タンパク質阻害薬、サイクリン依存性キナーゼ阻害薬、治療用モノクローナル抗体、ＴＲＡＩＬ経路アゴニスト、抗血管新生薬、メタロプロテイナーゼ阻害薬、カテプシン阻害薬、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体機能阻害薬、免疫複合体、抗体－薬物複合体、抗体フラグメント、二重特異性抗体およびbispecific T cell engager（ＢｉＴＥ）からなる群から選択される、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項８０】

前記抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、アデカツムマブ（adecatumumab）、オレゴボマブ（oregovomab）、オナルツズマブ（onartuzumab）、アポマブ（apomab）、マパツムマブ（mapatumumab）、レクサツムマブ（lexatumumab）、コナツムマブ（conatumumab）、ティガツズマブ（tigatuzumab）、カツマキソマブ（catumaxomab）、ブリナツモマブ（blinatumomab）、イブリツモマブ チウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブ ベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン（clivatuzumab tetraxetan）、ペムツモマブ（pemtumomab）、トラスツズマブ エムタンシン、ベバシズマブ、エタラシズマブ（etaracizumab）、ボロシキシマブ（volociximab）、ラムシルマブおよびアフリベルセプトから選択される、請求項７５に記載の使用または組成物。

【請求項８１】

免疫抑制細胞であるＴｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする前記治療薬が、抗有糸分裂薬、シクロホスファミド、ゲムシタビン、ミトキサントロン、フルダラビン、サリドマイド、サリドマイド誘導体、ＣＯＸ－２阻害薬、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を認識して

Ｔｒｅｇを直接標的とする除去抗体または殺傷抗体、抗ＣＤ２５であるダクリズマブおよびバシリキシマブ、リガンド標的毒素であるデニロイキン ディフィトックス（オンタック）（ヒトＩＬ－２とジフテリア毒素との融合タンパク質）およびＬＭＢ－２（ＣＤ２５に対するｓｃＦｖと緑膿菌外毒素との融合物）、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を標的とする抗体、ＴＬＲ調節薬、アデノシン作動経路を阻害する薬物、エクトヌクレオチダーゼ阻害薬、Ａ２Ａアデノシン受容体阻害薬、ＴＧＦ－β阻害薬、ケモカイン受容体阻害薬、レチノイン酸、オールトランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）、ビタミン$Ｄ_3$、ホスホジエステラーゼ５阻害薬、シルデナフィル、ＲＯＳ阻害薬、ならびにニトロアスピリンから選択される、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項８２】

前記免疫刺激抗体が、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ３およびＶＩＳＴＡの１以上を標的とするアンタゴニスト抗体、ならびに／またはＣＤ４０、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ２８およびＩＣＯＳの１以上を標的とするアゴニスト抗体から選択される、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項８３】

前記がん治療ワクチンが、腫瘍抗原に対する免疫原性応答を開始するためのタンパク質またはペプチド、腫瘍抗原をコードする組換えウイルスベクターおよび組換え細菌ベクター、腫瘍抗原をコードするＤＮＡベースのワクチン、樹状細胞ベースのワクチンを標的とするタンパク質、全腫瘍細胞ワクチン、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣＯＳおよび／またはＦｌｔ３リガンドを発現する遺伝子修飾腫瘍細胞、ならびに腫瘍溶解性ウイルスワクチンを包含する外因性がんワクチンから選択される、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項８４】

前記サイトカイン療法が、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（インターフェロン－α）、ＩＦＮα－２ｂ、ＩＦＮβおよびＩＦＮγを含むサイトカインの１以上、ならびにこれらのサイトカインの様々な送達方法から選択される、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項８５】

前記養子細胞移入療法を実施する前に、患者から得た天然の腫瘍特異的自家Ｔ細胞の増殖および腫瘍抗原特異性を付与するためのＴ細胞の遺伝子修飾から選択されるエクスビボ処理を行うことを特徴とする、請求項７７に記載の使用または組成物。

【請求項８６】

請求項７１～８５のいずれかに記載の組成物を使用または投与するべきかどうかを判断するための診断方法であって、
請求項３８～４９のいずれかに記載の方法または使用に従って診断方法を実施することを含む方法。

【請求項８７】

前記がんが非転移性である、前記請求項のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項８８】

前記がんが浸潤性である、前記請求項のいずれかに記載の使用または組成物。

【請求項８９】

前記がんが転移性である、前記請求項のいずれかに記載の使用または組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、がんを治療するための、ＬＳＲ（lipolysis stimulated lipoprotein receptor）特異的抗体、該抗体のフラグメント、ならびにこれらを含む複合体および組成物に関する。

【背景技術】

【０００２】
ナイーブＴ細胞が活性化されて産生能を獲得するためには、抗原提示細胞（ＡＰＣ）からの２つの独立したシグナルを受け取らなければならない。第１のシグナル（シグナル１）は抗原特異的であり、Ｔ細胞抗原受容体がＡＰＣ上に提示された適切な抗原－ＭＨＣ複合体に遭遇すると発生する。免疫応答の運命は、ＡＰＣ上に発現されたリガンドと噛み合ったＴ細胞共刺激分子によって伝達される第２の抗原非依存性シグナル（シグナル２）によって決定される。この第２のシグナルは刺激性（正の共刺激）または抑制性（負の共刺激または共抑制）であり得る。共刺激シグナルがない場合や共抑制シグナルがある場合、Ｔ細胞の活性化は損なわれ中断される。これによって、抗原特異的不応答（Ｔ細胞アナジーとして知られている）が誘導されるか、あるいはＴ細胞のアポトーシス死が引き起こされる。

【０００３】
通常、共刺激分子対は、ＡＰＣ上に発現されたリガンドとＴ細胞上に発現されたそのコグネイト受容体とからなる。共刺激分子のリガンド／受容体ペアのプロトタイプはＢ７／ＣＤ２８およびＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌである。Ｂ７ファミリーは、構造的に関連した細胞表面タンパク質リガンドからなり、これらのリガンドは免疫応答に対して刺激性または抑制性のシグナルを与える。Ｂ７ファミリーのメンバーは構造的に関連しており、これらの細胞外ドメインは可変免疫グロブリンドメインまたは定常免疫グロブリンドメインを少なくとも１つ含んでいる。

【０００４】
正の共刺激シグナルおよび負の共刺激シグナルはいずれも、細胞媒介性免疫応答の制御において重要な役割を果たしており、これらのシグナルを媒介する分子は免疫調節を行うための標的として有効であることが実証されている。この知見に基づいて、共刺激分子を標的とした治療アプローチがいくつか開発されている。このような治療アプローチは、がん患者の免疫応答を作動させたり、あるいは免疫応答の停止を防ぐことによってがんの予防および治療に有用に機能することが示されており、また、自己免疫疾患、炎症性疾患、または同種移植拒絶を有する対象において、制御されていない免疫応答を停止させたり、あるいは負の共刺激（または共抑制）を介して「オフ・シグナル」を誘導することによって、自己免疫疾患、炎症性疾患、または同種移植拒絶の予防および治療に有用に機能することが示されている。

【０００５】
Ｂ７リガンドによって伝達されるシグナルを操作することによって、自己免疫疾患、炎症性疾患および移植拒絶反応を治療できる可能性があることが示されている。治療戦略としては、共刺激分子対のリガンドまたは受容体に対するモノクローナル抗体を使用したり、あるいは特定のリガンドに結合してそれを阻害しうる共刺激受容体を含む可溶性融合タンパク質を使用することによって、共刺激を阻害することが挙げられる。また、別のアプローチとしては、抑制性リガンドを含む可溶性融合タンパク質を使用することによって共抑制を誘導することが挙げられる。これらのアプローチは、少なくとも部分には、（自己免疫疾患または移植拒絶の発症の原因となる）自己反応性Ｔ細胞またはアロ反応性Ｔ細胞を最終的に除去することを目的としているが、これはおそらく、（細胞生存遺伝子を誘導する）共刺激が存在しないと、Ｔ細胞はアポトーシスの誘導を極めて受けやすくなることを利用していると考えられる。したがって、病原体に対する防御免疫系の能力を損なうことなく、共刺激シグナルを調節することができる新規の薬剤は、上述の病態の治療および予防に非常に有益である。

【０００６】
共刺激経路は腫瘍の発生に重要な役割を果たしている。興味深いことに、腫瘍は、Ｂ７－ＣＤ２８ファミリーおよびＴＮＦファミリーのメンバーの共刺激因子を抑制してＴ細胞の活性化を阻害するとともに、Ｔ細胞の抗腫瘍応答を抑制する制御性Ｔ細胞を誘引することによって、免疫破壊を回避していることが示されている（Wang (2006) Immune Suppression by Tumor Specific CD4+ Regulatory T cells in Cancer. Semin. Cancer. Biol. 1

6:73-79; Greenwald, et al. (2005) The B7 Family Revisited. Ann. Rev. Immunol. 23:515-48; Watts (2005) TNF/TNFR Family Members in Co-stimulation of T Cell Responses Ann. Rev. Immunol. 23:23-68; Sadum, et al. (2007) Immune Signatures of Murine and Human Cancers Reveal Unique Mechanisms of Tumor Escape and New Targets for Cancer Immunotherapy. Clin. Cane. Res. 13(13): 4016-4025を参照されたい）。腫瘍により発現されるこのような共刺激分子はがんバイオマーカーとして注目を集めており、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）として機能している可能性があると考えられている。さらに、共刺激経路は、腫瘍転移巣の発生時および腫瘍転移巣内でエフェクター機能が発揮される際において、Ｔ細胞依存性免疫応答を弱める免疫チェックポイントであることが同定されている。遺伝子操作がんワクチンが改良されるのに伴い、このような免疫チェックポイントが、治療効果を発揮する抗腫瘍応答をワクチンによって誘導する際の大きな障壁となっていることが明らかとなってきた。がんワクチン治療において、共刺激分子は、（ワクチン接種による）能動的がん免疫療法および（抗体を介した）受動的がん免疫療法のためのアジュバントとして使用することができ、これによって、免疫寛容を抑制しかつ免疫系を刺激するための戦略を提供することができる。

【０００７】

さらに、上記のような薬剤は、他のタイプのがん免疫療法にも有用である可能性があり、たとえば、腫瘍特異的Ｔ細胞集団を増殖させて腫瘍細胞を攻撃し破壊するように仕向ける養子免疫療法などにも有用であり得る。このような抗腫瘍応答を増強することができる薬剤は、治療薬として有効である可能性が非常に高く、腫瘍免疫療法における障壁を克服する試みにおいて有益だと考えられる。これに伴い、近年、共刺激経路のいくつかを調節する新規の薬剤が、がん免疫療法として臨床導入されている。

【０００８】

様々な共刺激タンパク質に対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストを使用した共刺激調節は、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギーおよびがんの治療戦略として広く研究されている。この分野においては、ＲＡの治療用に承認されたＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、オレンシア（登録商標））、腎臓の急性移植拒絶反応の予防用のＣＴＬＡ４－Ｉｇ変異体（ベラタセプト、Nulojix（登録商標））、悪性黒色腫の治療用に最近承認された抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ、Yervoy（登録商標））が先駆けて臨床開発されている。現在、臨床開発が進んだ段階にある他の共刺激調節因子としては、非小細胞肺がんおよび他のがんの治療用として開発中の抗ＰＤ－１抗体（BMS-936558）などが挙げられる。さらに、このような薬剤はウイルス感染症用としても臨床開発中であり、たとえば、Ｃ型肝炎の治療用として試験中の抗ＰＤ－１抗体（MDX-1106）や、肝細胞癌を有するＣ型肝炎ウイルス感染患者において臨床試験中の抗ＣＴＬＡ－４抗体CP-675,206（トレメリムマブ）などが挙げられる。

【０００９】

誘導性制御性Ｔ細胞（ｉＴｒｅｇ）の蓄積は腫瘍の多くで一般的に見られ、腫瘍組織中において免疫抑制細胞の主要なサブセットを形成している。Ｔｒｅｇは免疫抑制環境を構築して抗腫瘍免疫を制限しており、免疫監視に対抗する腫瘍のメカニズムとして主要な役割を果たしている。したがって、ｉＴｒｅｇはがん療法における重要な細胞標的であると見られている。

【００１０】

エフェクターＴ細胞応答を減弱させる機能に加えて、ｉＴｒｅｇはその表面に複数の免疫チェックポイント受容体（ＣＴＬＡ４やＰＤ－１の他にもＴＩＭ３やＬＡＧ３など）を高レベルに発現しており、これらの免疫チェックポイント受容体は、エフェクター免疫応答に対するＴｒｅｇ細胞媒介性抑制を直接的に促進する。臨床試験中の免疫チェックポイント抗体の多くは、ｉＴｒｅｇの免疫抑制活性を阻害して抗腫瘍免疫を増強するメカニズムを採用していると考えられる。実際に、イピリムマブによるＣＴＬＡ４阻害の作用機序は、エフェクターＴ細胞活性の増強およびＴｒｅｇ免疫抑制活性の阻害という２つの重要な要素からなっている。

【００１１】
ｉＴｒｅｇの機能を失わせ、かつエフェクターＴ細胞の抗腫瘍機能を回復させることを目的として、単独でも標準的療法や免疫療法との併用でも使用可能な様々な戦略が開発中である。
【００１２】
Ｂ細胞は外来抗原の認識に重要な役割を果たしており、様々なタイプの感染性因子からの防御に必要な抗体を産生する。Ｔ細胞によるＢ細胞の補助は適応免疫応答における中心的プロセスである。濾胞ヘルパーＴ（Ｔｆｈ）細胞は、Ｂ細胞の補助に特化したＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サブセットである（Crotty, Annu. Rev. Immunol. 29: 621-663, 2011においてレビューされている）。Ｔｆｈ細胞は、ＣＸＣＬ１３依存的にＴｆｈ細胞自身をリンパ節内のＢ細胞濾胞に移動させるＢ細胞ホーミングケモカイン受容体（ＣＸＣＲ５）を発現する。Ｂ細胞の補助にＴｆｈ細胞が必要であること、および抗体応答がＴ細胞依存性であることは、Ｔｆｈ細胞が様々なタイプの感染性因子に対する防御免疫や合理的なワクチン設計に非常に重要であることを示している。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
近年、がん生物学やがん療法について理解が進んでいるにもかかわらず、がん療法の成功率は未だ低い。したがって、たとえば、抗腫瘍免疫系を刺激することにより治療を行うための特異的阻害抗体などのような、がんを完治することができる新たな治療法が未だ必要とされている。
【００１４】
「阻害抗体」は、特定のタンパク質またはタンパク質上のエピトープに結合し、そのタンパク質と１つ以上の他の結合パートナーとの相互作用を阻害しうるあらゆる抗体を指す。
【課題を解決するための手段】
【００１５】
実施形態の少なくともいくつかによれば、
免疫分子であって、
配列番号２２９、２３５、２４２～２４３、２４５～２４９、２５８、２７４～２７８、２６４～２７２、２５１～２５６、２８０、２８７、２８４、２８５、２９０～２９２、２８７、２８８、２５９、２９５、２９７～３０２および３０６～３０７からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を含み、
該抗原結合領域が、配列番号１０のアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的に結合するように改変されていることを特徴とする免疫分子が提供される。
【００１６】
上記の免疫分子は、
配列番号２２７、２２８、２２９の少なくとも１つと、配列番号２３３、２３４、２３５の少なくとも１つとを含んでいてもよく；
配列番号２４５、２４６、２４７、２４８、２４９の少なくとも１つと、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２、２５６、２８７、２８８、２４２、２４３の少なくとも１つとを含んでいてもよく；
配列番号３０３、３０４、２６１、３０６、２６２の少なくとも１つと、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９の少なくとも１つとを含んでいてもよく；
配列番号２７４、２７５、２７６、２７７、２７８の少なくとも１つと、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２の少なくとも１つとを含んでいてもよく；
配列番号２７４、２７５、２７６、２７７、２８２の少なくとも１つと、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２８０、２７１、２７２の少なくとも１つ

とを含んでいてもよく；
配列番号３０３、３０４、３０５、３０６、３０７の少なくとも１つと、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２、２５６、２８７、２８８、２８４、２８５の少なくとも１つとを含んでいてもよく；
配列番号２９０、２９１、３０５、３０６、２９２の少なくとも１つと、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４、２５６、２８７、２８８、２５８、２５９の少なくとも１つとを含んでいてもよく；
配列番号３０３、３０４、３０５、３０６、３０７の少なくとも１つと、配列番号２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２の少なくとも１つとを含んでいてもよい。

さらに、上記の免疫分子は、配列番号２２７～２２９、２３９～２４３、２５１～２９９、２６４～２７２、２８０、２８４～２８５、２８７～２８８、２９３～３０１、３０２の少なくとも１つと、
配列番号２３３～２３５、２４５～２４９、２６１～２６２、２７４～２７８、２８２、２９０～２９２、３０３～３０６、３０７の少なくとも１つとを含んでいてもよい。

【００１７】

上記の免疫分子は、抗体フラグメントであってもよい。

【００１８】

上記の免疫分子は、配列番号２３９～２４３、２４５～２４９、２５１～２５９、２６１～２６２、２６４～２７２、２７４～２７８、２８０～２８１、２８２、２８４～２８５、２８７～２８８、２９０～２９２および２９４～３０７からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を少なくとも２つ含んでいてもよい。

【００１９】

上記の免疫分子は、配列番号２２７、２２８、２２９、２４５、２４６、２４７、２４８、２４９、２６１、２６２、２７４、２７５、２７６、２７７、２７８、２８２、３０３、３０４、３０５、３０６、３０７、２９０、２９１および２９２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を少なくとも１つ含んでいてもよい。

【００２０】

上記の免疫分子は、配列番号２３３、２３４、２３５、２３９、２４０、２４１、２８７、２８８、２４２、２４３、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、２５６、２５７、２５８、２５９、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２８０、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、２８４、２８５、２８７、２８８、２５８および２５９からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域を少なくとも１つ含んでいてもよい。

【００２１】

上記の免疫分子は、配列番号２２０、２４４、２６０、２７３、２８１、２８９、３０８のいずれかに示すアミノ酸配列またはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよい。

【００２２】

上記の免疫分子は、配列番号２１８、２３８、２５０、２６３、２７９、２８３、２８６、２９３のいずれかに示すアミノ酸配列またはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよい。

【００２３】

上記の免疫分子は、配列番号２２０のアミノ酸配列および配列番号２１８のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２４４のアミノ酸配列および配列番号２３８のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２６０のアミノ酸配列および配列番号２５９のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；

配列番号２７３のアミノ酸配列および配列番号２６３のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２８１のアミノ酸配列および配列番号２７９のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号３０８のアミノ酸配列および配列番号２８３のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２８９のアミノ酸配列および配列番号２８６のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号３０８のアミノ酸配列および配列番号２９３のアミノ酸配列もしくはこれらと９５％の相同性を有する配列を有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２４５もしくは２４６のアミノ酸配列と、配列番号２４７もしくは２４８のアミノ酸配列と、配列番号２４９のアミノ酸配列と、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５６、２８７、２８８のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２４２もしくは２４３のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号３０３もしくは３０４のアミノ酸配列と、配列番号２６１もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号２６２のアミノ酸配列と、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５５、２５６、２５７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５８もしくは２５９のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２７４もしくは２７５のアミノ酸配列と、配列番号２７６もしくは２７７のアミノ酸配列と、配列番号２７８のアミノ酸配列と、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２６８、２６９、２７０のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２７１もしくは２７２のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２７４もしくは２７５のアミノ酸配列と、配列番号２７６もしくは２７７のアミノ酸配列と、配列番号２８２のアミノ酸配列と、配列番号２６４、２６５、２６６、２６７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２６８、２６９、２８０のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２７１もしくは２７２のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号３０３もしくは３０４のアミノ酸配列と、配列番号３０５もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号３０７のアミノ酸配列と、配列番号２３９、２４０、２４１、２５２のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５６、２８７、２８８のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２８４もしくは２８５のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号２９０もしくは２９１のアミノ酸配列と、配列番号３０５もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号２９２のアミノ酸配列と、配列番号２５１、２５２、２５３、２５４のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５６、２８７、２８８のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２５８もしくは２５９のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよく；
配列番号３０３もしくは３０４のアミノ酸配列と、配列番号３０５もしくは３０６のアミノ酸配列と、配列番号３０７のアミノ酸配列と、配列番号２９４、２９５、２９６、２９７のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号２９８、２９９、３００のいずれかのアミノ酸配列と、配列番号３０１もしくは３０２のアミノ酸配列とを有するタンパク質を含んでいてもよい。

【００２４】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の免疫分子をコードするポリヌクレオチドが提供される。

【００２５】

上記のポリヌクレオチドは、配列番号２２４、２２５、２２６、２３０、２３１、２３

２、２１７、２１９、およびこれらの縮重バリアントからなる群から選択される核酸配列を含んでいてもよい。

【００２６】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【００２７】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記のベクターを含み、上記の免疫分子を発現することが可能な組換え細胞が提供される。

【００２８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の免疫分子の製造方法であって、
上記のベクターを細胞に導入して組換え細胞を作製すること、および
該組換え細胞から免疫分子を産生させることを含む方法が提供される。

【００２９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、抗体またはその抗原結合フラグメントであって、
該抗体が、配列番号１０の３０番目～１１０番目のアミノ酸に特異的に結合するが配列番号１０の他の部分には特異的に結合しない抗原結合領域を有し、
該配列番号１０の他の部分が、配列番号１０の１番目～２９番目のアミノ酸または１１１番目～２３４番目のアミノ酸を含む、抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【００３０】

上記の抗体は、配列番号２１５または配列番号２１６に特異的に結合するが配列番号１０の他の部分には特異的に結合しない抗原結合領域を有していてもよく、
該抗原結合領域が配列番号２１５に特異的に結合する場合、該配列番号１０の他の部分は、配列番号１０の１番目～８０番目のアミノ酸または９９番目～２３４番目のアミノ酸を含んでいてもよく、
該抗原結合領域が配列番号２１６に特異的に結合する場合、該配列番号１０の他の部分は、配列番号１０の１番目～１１７番目のアミノ酸または１３６番目～２３４番目のアミノ酸を含んでいてもよい。

【００３１】

上記の抗体は、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体のいずれであってもよい。

【００３２】

上記の抗体は、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、Ｆｖフラグメント、ｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されてもよい。

【００３３】

上記の抗体は、薬物、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療薬および化学療法薬から選択される治療薬と結合されていてもよく、
これらを検出するマーカーは、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物のいずれであってもよい。

【００３４】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の免疫分子、抗体または抗原結合フラグメントを含む医薬組成物が提供される。

【００３５】

実施形態の少なくともいくつかによれば、がん、免疫病態および感染症からなる群から選択される疾患をこれらの治療を必要とする対象において治療するための、上記の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメントまたは医薬組成物の使用が提供される。

【００３６】

上記の抗体またはフラグメントは、免疫細胞の活性を調節してもよく、Ｔ細胞の活性化

を増加してもよく、Ｔ細胞の抑制を軽減してもよく、免疫抑制サイトカインの分泌を減少してもよく、炎症性サイトカインの分泌を増加してもよく、ＩＬ－２の分泌を増加してもよく、Ｔ細胞によるインターフェロン－γの産生を増強してもよく、がんのエピトープ拡大を促進してもよく、哺乳動物におけるＴ細胞応答を増強してもよく、Ｍ２型マクロファージを減少または除去してもよく、Ｍ２型マクロファージの腫瘍形成促進活性を低下してもよく、抗原特異的メモリー応答を増強してもよく、がん細胞のアポトーシスを亢進してもよく、がん細胞に対する細胞傷害作用または細胞増殖抑制作用を増強してもよく、がん細胞に対する直接殺傷を増強してもよく、補体依存性細胞傷害および／もしくは抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を誘導してもよい。

【００３７】

上記の抗体またはフラグメントは、がんに対する免疫応答を増強してもよい。

【００３８】

上記の治療は、がんの治療に有用な別の治療薬または治療法と組み合わせてもよい。

【００３９】

上記の治療法は、放射線療法、凍結療法、抗体療法、化学療法、光線力学療法、外科手術、ホルモン除去療法、および慣用の薬物との併用療法の１以上を含んでいてもよい。

【００４０】

上記の治療薬は、細胞傷害薬、腫瘍ワクチン、抗体、ペプチド、ペプチボディ、小分子、化学療法薬、細胞傷害・細胞増殖抑制薬、免疫調節薬、インターフェロン、インターロイキン、免疫刺激薬、成長ホルモン、サイトカイン、ビタミン、無機質、アロマターゼ阻害薬、ＲＮＡｉ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬およびプロテアソーム阻害薬からなる群から選択されてもよい。

【００４１】

上記の免疫分子、抗体、抗体結合フラグメントまたは組成物は、治療効果を得るために１以上の増強手段と組み合わせて、該増強手段と同時にまたは連続して対象に投与してもよく、

該１以上の増強手段は、放射線療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標準的／古典的抗がん療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標的療法、Ｔｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする治療薬、免疫刺激抗体、サイトカイン療法、がん治療ワクチンならびに養子細胞移入からなる群から選択されてもよい。

【００４２】

上記の標準的／古典的抗がん薬は、白金系化合物、抗がん活性を有する抗生物質、アントラサイクリン類、アントラセンジオン類、アルキル化薬、代謝拮抗薬、抗有糸分裂薬、タキサン類、タキソイド類、微小管阻害薬、ビンカアルカロイド類、葉酸拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害薬、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、アロマターゼ阻害薬、ＧｎＲｈアナログ、５α－還元酵素阻害薬およびビホスホネート類から選択されてもよい。

【００４３】

上記の標的療法薬は、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬、プロテアソーム阻害薬、ｍＴＯＲ経路阻害薬、ＪＡＫ２阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬（ＴＫＩ）、ＰＩ３Ｋ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害薬、セリン／トレオニンキナーゼ阻害薬、細胞内シグナル伝達阻害薬、Ｒａｓ／Ｒａｆシグナル伝達阻害薬、ＭＥＫ阻害薬、ＡＫＴ阻害薬、生存シグナル伝達タンパク質阻害薬、サイクリン依存性キナーゼ阻害薬、治療用モノクローナル抗体、ＴＲＡＩＬ経路アゴニスト、抗血管新生薬、メタロプロテイナーゼ阻害薬、カテプシン阻害薬、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体機能阻害薬、免疫複合体、抗体－薬物複合体、抗体フラグメント、二重特異性抗体およびbispecific Ｔ cell engager（ＢｉＴＥ）からなる群から選択されてもよい。

【００４４】

上記の抗体療法は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、アデカツムマブ（adecatumumab）、オレゴボマブ（oregovomab）

、オナルツズマブ（onartuzumab）、アポマブ（apomab）、マパツムマブ（mapatumumab）、レクサツムマブ（lexatumumab）、コナツムマブ（conatumumab）、ティガツズマブ（tigatuzumab）、カツマキソマブ（catumaxomab）、ブリナツモマブ（blinatumomab）、イブリツモマブ チウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブ ベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン（clivatuzumab tetraxetan）、ペムツモマブ（pemtumomab）、トラスツズマブ エムタンシン、ベバシズマブ、エタラシズマブ（etaracizumab）、ボロシキシマブ（volociximab）、ラムシルマブおよびアフリベルセプトから選択されてもよい。

【００４５】

免疫抑制細胞であるＴｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする上記の治療薬は、抗有糸分裂薬、シクロホスファミド、ゲムシタビン、ミトキサントロン、フルダラビン、サリドマイド、サリドマイド誘導体、ＣＯＸ－２阻害薬、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を認識してＴｒｅｇを直接標的とする除去抗体または殺傷抗体、抗ＣＤ２５であるダクリズマブおよびバシリキシマブ、リガンド標的毒素であるデニロイキン ディフィトックス（オンタック）（ヒトＩＬ－２とジフテリア毒素との融合タンパク質）およびＬＭＢ－２（ＣＤ２５に対するｓｃＦｖと緑膿菌外毒素との融合物）、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を標的とする抗体、ＴＬＲ調節薬、アデノシン作動経路を阻害する薬物、エクトヌクレオチダーゼ阻害薬、Ａ２Ａアデノシン受容体阻害薬、ＴＧＦ－β阻害薬、ケモカイン受容体阻害薬、レチノイン酸、オールトランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）、ビタミンD_3、ホスホジエステラーゼ５阻害薬、シルデナフィル、ＲＯＳ阻害薬、ならびにニトロアスピリンから選択されてもよい。

【００４６】

上記の免疫刺激抗体は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ３およびＶＩＳＴＡの１以上を標的とするアンタゴニスト抗体、ならびに／またはＣＤ４０、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ２８およびＩＣＯＳの１以上を標的とするアゴニスト抗体から選択されてもよい。

【００４７】

上記のがん治療ワクチンは、腫瘍抗原に対する免疫原性応答を開始するためのタンパク質またはペプチド、腫瘍抗原をコードする組換えウイルスベクターおよび組換え細菌ベクター、腫瘍抗原をコードするＤＮＡベースのワクチン、樹状細胞を標的とするタンパク質、樹状細胞ベースのワクチン、全腫瘍細胞ワクチン、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣＯＳおよび／またはＦｌｔ３リガンドを発現する遺伝子修飾腫瘍細胞、ならびに腫瘍溶解性ウイルスワクチンを包含する外因性がんワクチンから選択されてもよい。

【００４８】

上記のサイトカイン療法は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（インターフェロン－α）、ＩＦＮα－２ｂ、ＩＦＮβおよびＩＦＮγを含むサイトカインの１以上、ならびにこれらのサイトカインの様々な送達方法から選択されてもよい。

【００４９】

上記の養子細胞移入療法を実施する前に、患者から得た天然の腫瘍特異的自家Ｔ細胞の増殖および腫瘍抗原特異性を付与するためのＴ細胞の遺伝子修飾から選択されるエクスビボ処理を行ってもよい。

【００５０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の抗体、免疫分子または医薬組成物の使用であって、

（ａ）サイトカインのアップレギュレーション、（ｂ）Ｔ細胞増殖／拡大の増加、（ｃ）Ｔ細胞によるインターフェロン－γ産生の増加、（ｄ）ＩＬ－２分泌の増加、（ｅ）抗体応答の刺激、（ｆ）がん細胞増殖の抑制、（ｇ）抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進、（ｇ）$CD4^+$および／または$CD8^+$Ｔ細胞活性化の促進、（ｉ）Ｔ細胞抑制の軽減、（ｊ）がん細胞のアポトーシスまたは溶解の軽減、（ｋ）がん細胞に対する細胞傷害作用または細

胞増殖抑制作用のうちの１以上を対象において実施し、疾患の治療を行うことを特徴とする使用が提供される。

【００５１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、対象において疾患を診断するための診断方法であって、
該疾患が、がんおよび自己免疫疾患からなる群から選択されること、
該診断方法がエクスビボで実施されること、ならびに
該診断方法が、対象から得た組織試料と上記の免疫分子または抗体とをエクスビボで接触させること、および該免疫分子または抗体との特異的結合を検出することを含むこと
を特徴とする診断方法が提供される。

【００５２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、対象において疾患を診断するための診断方法であって、
該疾患が、がん、自己免疫疾患および感染症からなる群から選択されること、
該診断方法がインビボで実施されること、ならびに
該診断方法が、上記の免疫分子または抗体を対象に投与すること、および上記の免疫分子または抗体と対象の組織との特異的結合を検出することを含むこと
を特徴とする診断方法が提供される。

【００５３】

上記の免疫分子、抗体または医薬組成物を対象に投与する前に、上記の診断方法を実施してもよい。

【００５４】

上記の使用または方法は、上記の免疫分子、抗体または医薬組成物を対象に投与する前に対象の組織のＬＳＲレベルを測定することをさらに含んでいてもよい。

【００５５】

上記のＬＳＲレベルが十分な場合においてのみ、上記の免疫分子、抗体または医薬組成物の対象への投与を行うこととしてもよい。

【００５６】

上記の使用または方法は、上記ＬＳＲレベルとしてＬＳＲの発現レベルを測定することをさらに含んでいてもよい。

【００５７】

上記の発現レベルの測定において、対象の組織のＩＨＣ（免疫組織化学）アッセイまたは遺伝子発現アッセイを実施してもよい。

【００５８】

上記のＩＨＣアッセイを実施する際に、発現レベルが０～３の段階評価において１以上であるかどうかを判定することを含んでいてもよい。

【００５９】

上記の組織は、がん細胞または免疫浸潤細胞を含んでいてもよい。

【００６０】

上記の組織の上記ＬＳＲレベルの測定において、
上記の組織を、上記の抗体または免疫分子と接触させること、および
該抗体または免疫分子との特異的結合を検出することを含んでいてもよい。

【００６１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、対象から得た組織試料を用いて疾患を診断するためのアッセイであって、
上記の免疫分子または抗体と、がん、自己免疫疾患および感染症からなる群から選択される疾患を診断するための少なくとも１の試薬とを含むアッセイが提供される。

【００６２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、疾患のスクリーニング、疾患の存在もしくは重症度の検出、疾患の予後の予測、疾患の進行もしくは再発のモニタリング、疾患、障害

もしくは状態の治療効果および／もしくは再発の評価、疾患の治療法および／もしくは処置の選択、疾患に対する特定の治療法の最適化、疾患に対する治療のモニタリング、特定の患者もしくは亜集団に対する治療法の適合性の予測、ならびに／または患者もしくは亜集団に対する治療薬の適切な用量の決定のための、上記の使用が提供される。

【００６３】

上記のがん、上記の腫瘍浸潤免疫細胞のいずれかまたはその両方は、十分なレベルのＬＳＲを発現していてもよく、

上記がんは、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、悪性黒色腫、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫および横紋筋肉腫、悪性黒色腫、ぶどう膜悪性黒色腫、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精嚢腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常症、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、鼻咽頭癌、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃癌、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群ならびにフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）（ただし、上記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、上記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択されてもよい。

【００６４】

上記のがんは、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、乳房小葉癌、乳房粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、中～低分化型盲腸腺癌、高～低分化型結腸腺癌、グレード２の上行結腸管状腺癌、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性結腸腺癌、直腸腺癌、グレード３の直腸腺癌、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、中～低分化型肺扁平上皮癌、中等度によく分化した肺角化型扁平上皮細胞癌、肺大細胞腺癌、グリーソングレード７～９の前立腺腺癌、浸潤性前立腺腺癌、中分化型前立腺腺癌、漿液性乳頭状卵巣嚢胞癌、漿液性卵巣嚢胞腺癌、グレード４の星状細胞腫、多形膠芽腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、ならびに低悪性度肝細胞癌（ただし、上記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、上記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択されてもよい。

【００６５】

上記の乳がんは、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、および乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型からなる群から選択されてもよい。

【００６６】

上記の乳がんは硬性腺癌であってもよい。

【００６７】

上記の結腸がんは、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、ならびに中分化型直腸粘液性腺癌からなる群から選択されてもよい。

【００６８】

上記の肺がんは、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌および小細胞肺がんからなる群から選択されてもよい。

【００６９】

上記の前立腺がんは、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺

上皮内腫瘍および未分化癌からなる群から選択されてもよい。
【００７０】
上記の胃がんは、中分化型胃腺癌であってもよい。
【００７１】
上記の卵巣がんは、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌および浸潤性漿液性乳頭状癌からなる群から選択されてもよい。
【００７２】
上記の脳がんは、多形膠芽腫、および星状細胞腫（ただしグレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択されてもよい。
【００７３】
上記の星状細胞腫はグレード４の星状細胞腫であってもよい。
【００７４】
上記の腎臓がんは腎明細胞癌であってもよい。
【００７５】
上記の肝臓がんは肝細胞癌であってもよい。
【００７６】
上記の肝細胞癌は、低悪性度肝細胞癌であってもよく、線維層板状肝細胞癌であってもよい。
【００７７】
上記の血液がんは、大細胞型リンパ腫ならびに高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫からなる群から選択されてもよい。
【００７８】
上記の疾患は免疫病態であってもよく、
該免疫病態は、自己免疫疾患、移植拒絶反応および移植片対宿主病からなる群から選択されてもよい。
【００７９】
上記の自己免疫疾患は、多発性硬化症、乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎、血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少症、特発性自己免疫性溶血性貧血、赤芽球癆、シェーグレン症候群、リウマチ性疾患、結合組織疾患、炎症性リウマチ、変形性リウマチ、非関節性リウマチ、若年性関節リウマチ、尿酸性関節炎、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、クリオグロブリン血管炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、抗リン脂質症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫性多発ニューロパチー、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、１型糖尿病、アジソン病、膜性糸球体腎症、グッドパスチャー病、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血、天疱瘡、尋常性天疱瘡、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、皮膚筋炎、多発性筋炎、線維筋炎、筋硬症、セリアック病、免疫グロブリンＡ腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、関節症性乾癬、グレーブス病、グレーブス眼症、強皮症、全身性強皮症、進行性全身性強皮症、喘息、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、肝炎、慢性活動性肝炎、膠原病、強直性脊椎炎、肩関節周囲炎、結節性汎動脈炎、軟骨石灰化症、ヴェーゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性じんま疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、デビック病、小児自己免疫性溶血性貧血、難治性または慢性自己免疫性血球減少症、後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防、寒冷凝集素病、視神経脊髄炎、全身硬直症候群、歯肉炎、歯周炎、膵炎、心筋炎、脈管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎、炎症性皮膚疾患、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗合成酵素症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、ＰＡＰＡ症候群、Ｂｌａｕ症候群、痛風、成人および若年性スティル病、クリオピリン周期熱症候群、マックル・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高ＩｇＤ症候群、シュニ

ッツラー症候群、自己免疫性網膜症、加齢黄斑変性、アテローム性動脈硬化症、慢性前立腺炎、ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択されてもよい。

【００８０】

上記の治療は、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わせてもよい。

【００８１】

上記の疾患は感染症であってもよく、

該感染症は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択されてもよい。

【００８２】

上記の感染症は、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択されてもよい。

【００８３】

上記の治療は、感染症の治療に有用な別の成分と組み合わせてもよい。

【００８４】

実施形態の少なくともいくつかによれば、疾患に罹患している対象の治療または診断を行うための、配列番号１０に特異的に結合する抗体またはフラグメントの使用であって、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、硬性腺癌、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、小細胞肺がん、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺上皮内腫瘍、未分化癌、中分化型胃腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、浸潤性漿液性乳頭状癌、多形膠芽腫、星状細胞腫、グレード４の星状細胞腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、低悪性度肝細胞癌、線維層板状肝細胞癌、大細胞型リンパ腫、ならびに高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫（ただし、上記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、上記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される疾患に罹患している対象の治療または診断を行うための使用が提供される。

【００８５】

実施形態の少なくともいくつかによれば、配列番号１０に特異的に結合する抗体またはフラグメントを含む医薬組成物であって、

乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、硬性腺癌、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、小細胞肺がん、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺上皮内腫瘍、未分化癌、中分化型胃腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、浸潤性漿液性乳頭状癌、多形膠芽腫、星状細胞腫、グレード４の星状細胞腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、低悪性度肝細胞癌、線維層板状肝細胞癌、大細胞型リンパ腫、ならびに高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫（ただし、上記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、上記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択される疾患に罹患している対象を治療するための医薬組成物が提供される。

【００８６】

上記のがんは、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、乳房小葉癌、乳房粘液性腺癌、乳管内癌と浸

潤性乳管癌との混合型、中～低分化型盲腸腺癌、高～低分化型結腸腺癌、グレード２の上行結腸管状腺癌、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌、グレード３の直腸腺癌、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌、中分化型および中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、グリーソングレード７～９の腺癌、浸潤性腺癌、中分化型腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、グレード４の星状細胞腫、多形膠芽腫、腎明細胞癌、肝細胞癌、ならびに低悪性度肝細胞癌（ただし、上記がんが卵巣がんである場合、卵巣顆粒膜細胞腫を除き、上記がんが脳がんである場合、グレード２の星状細胞腫を除く）からなる群から選択されてもよい。

【００８７】

上記の治療は、がんの治療に有用な別の治療薬または治療法と組み合わせてもよい。

【００８８】

上記の治療法は、放射線療法、凍結療法、抗体療法、化学療法、光線力学療法、外科手術、ホルモン除去療法、および慣用の薬物との併用療法の１以上を含んでいてもよい。

【００８９】

上記の治療薬は、細胞傷害薬、腫瘍ワクチン、抗体、ペプチド、ペプチボディ、小分子、化学療法薬、細胞傷害・細胞増殖抑制薬、免疫調節薬、インターフェロン、インターロイキン、免疫刺激薬、成長ホルモン、サイトカイン、ビタミン、無機質、アロマターゼ阻害薬、ＲＮＡｉ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬およびプロテアソーム阻害薬からなる群から選択されてもよい。

【００９０】

上記の抗体または医薬組成物は、治療効果を得るために１以上の増強手段と組み合わせて、該増強手段と同時にまたは連続して対象に投与してもよく、
該１以上の増強手段は、放射線療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標準的／古典的抗がん療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標的療法、Ｔｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする治療薬、免疫刺激抗体、サイトカイン療法ならびに養子細胞移入からなる群から選択されてもよい。

【００９１】

上記の標準的／古典的抗がん薬は、白金系化合物、抗がん活性を有する抗生物質、アントラサイクリン類、アントラセンジオン類、アルキル化薬、代謝拮抗薬、抗有糸分裂薬、タキサン類、タキソイド類、微小管阻害薬、ビンカアルカロイド類、葉酸拮抗薬、トポイソメラーゼ阻害薬、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、アロマターゼ阻害薬、ＧｎＲｈアナログ、５α－還元酵素阻害薬およびビホスホネート類から選択されてもよい。

【００９２】

上記の標的療法薬は、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬、プロテアソーム阻害薬、ｍＴＯＲ経路阻害薬、ＪＡＫ２阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬（ＴＫＩ）、ＰＩ３Ｋ阻害薬、プロテインキナーゼ阻害薬、セリン／トレオニンキナーゼ阻害薬、細胞内シグナル伝達阻害薬、Ｒａｓ／Ｒａｆシグナル伝達阻害薬、ＭＥＫ阻害薬、ＡＫＴ阻害薬、生存シグナル伝達タンパク質阻害薬、サイクリン依存性キナーゼ阻害薬、治療用モノクローナル抗体、ＴＲＡＩＬ経路アゴニスト、抗血管新生薬、メタロプロテイナーゼ阻害薬、カテプシン阻害薬、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体機能阻害薬、免疫複合体、抗体－薬物複合体、抗体フラグメント、二重特異性抗体およびbispecific Ｔ cell engager（ＢｉＴＥ）からなる群から選択されてもよい。

【００９３】

上記の抗体は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、トラスツズマブ、ペルツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、ベルツズマブ、アレムツズマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、アデカツムマブ（adecatumumab）、オレゴボマブ（oregovomab）、オナルツズマブ（onartuzumab）、アポマブ（apomab）、マパツムマブ（mapatumumab）、レクサツムマブ（lexatumumab）、コナツムマブ（conatumumab）、ティガツズマブ（tigatuzumab）、カツマキソマブ（catumaxomab）、ブリナツモマブ（blinatumomab）、イブリツ

モマブ チウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブ ベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン（clivatuzumab tetraxetan）、ペムツモマブ（pemtumomab）、トラスツズマブ エムタンシン、ベバシズマブ、エタラシズマブ（etaracizumab）、ボロシキシマブ（volociximab）、ラムシルマブおよびアフリベルセプトから選択されてもよい。

【００９４】

免疫抑制細胞であるＴｒｅｇおよび／またはＭＤＳＣを標的とする上記の治療薬は、抗有糸分裂薬、シクロホスファミド、ゲムシタビン、ミトキサントロン、フルダラビン、サリドマイド、サリドマイド誘導体、ＣＯＸ－２阻害薬、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を認識してＴｒｅｇを直接標的とする除去抗体または殺傷抗体、抗ＣＤ２５であるダクリズマブおよびバシリキシマブ、リガンド標的毒素であるデニロイキン ディフィトックス（オンタック）（ヒトＩＬ－２とジフテリア毒素との融合タンパク質）およびＬＭＢ－２（ＣＤ２５に対するｓｃＦｖと緑膿菌外毒素との融合物）、Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を標的とする抗体、ＴＬＲ調節薬、アデノシン作動経路を阻害する薬物、エクトヌクレオチダーゼ阻害薬、Ａ２Ａアデノシン受容体阻害薬、ＴＧＦ－β阻害薬、ケモカイン受容体阻害薬、レチノイン酸、オールトランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）、ビタミンD_3、ホスホジエステラーゼ５阻害薬、シルデナフィル、ＲＯＳ阻害薬、ならびにニトロアスピリンから選択されてもよい。

【００９５】

上記の免疫刺激抗体は、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤＬ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＢＴＬＡ、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ３およびＶＩＳＴＡの１以上を標的とするアンタゴニスト抗体、ならびに／またはＣＤ４０、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＣＤ２８およびＩＣＯＳの１以上を標的とするアゴニスト抗体から選択されてもよい。

【００９６】

上記のがん治療ワクチンは、腫瘍抗原に対する免疫原性応答を開始するためのタンパク質またはペプチド、腫瘍抗原をコードする組換えウイルスベクターおよび組換え細菌ベクター、腫瘍抗原をコードするＤＮＡベースのワクチン、樹状細胞ベースのワクチンを標的とするタンパク質、全腫瘍細胞ワクチン、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣＯＳおよび／またはＦｌｔ３リガンドを発現する遺伝子修飾腫瘍細胞、ならびに腫瘍溶解性ウイルスワクチンを包含する外因性がんワクチンから選択されてもよい。

【００９７】

上記のサイトカイン療法は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（インターフェロン－α）、ＩＦＮα－２ｂ、ＩＦＮβおよびＩＦＮγを含むサイトカインの１以上、ならびにこれらのサイトカインの様々な送達方法から選択されてもよい。

【００９８】

上記の養子細胞移入療法を実施する前に、患者から得た天然の腫瘍特異的自家Ｔ細胞の増殖および腫瘍抗原特異性を付与するためのＴ細胞の遺伝子修飾から選択されるエクスビボ処理を行ってもよい。

【００９９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の組成物を使用または投与するべきかどうかを判断するための診断方法であって、
上記の診断方法を実施することを含む方法が提供される。

【０１００】

上記のがんは非転移性であってもよい。

【０１０１】

上記のがんは浸潤性であってもよい。

【０１０２】

上記のがんは転移性であってもよい。

【図面の簡単な説明】

【０１０３】
【図１】安定にトランスフェクトされた組換えHEK293T細胞におけるLSR_P5a_Flag_mタンパク質（配列番号144）の発現を、抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A8592）（図１Ａ）および抗LSR抗体（Abnova、カタログNo.H00051599-B01P（図１Ｂ）；Abcam、カタログNo.ab59646（図１Ｃ）；およびSigma、カタログNo.HPA007270（図１Ｄ））を使用して検出したウエスタンブロット分析を示す。レーン1：HEK293T_pIRESpuro3；レーン2：HEK293T_pIRESpuro3_LSR_P5a_Flag。
【図２】３種の市販抗LSR抗体を使用して検出したヒトLSR_WTを示す。図２ＡではSIGMA社の抗体を使用し、図２ＢではAbcam社の抗体を使用し、図２ＣではAbnova社の抗体を使用した（表１に詳述する）。レーンNo.1は、ネガティブコントロールとして使用した、HEK293T_pIRESpuro3空ベクターをトランスフェクトした細胞を示し、レーンNo.2はHEK293T_pIRESpuro3_ヒトWT LSR_Flagをトランスフェクトした細胞を示す。
【図３】Abcam社の抗体を使用して検出したヒトLSR_skip4タンパク質を示す。レーンNo.1は、ネガティブコントロールとして使用した、HEK293T_pIRESpuro3空ベクターをトランスフェクトした細胞を示し、レーンNo.2はHEK293T_pIRESpuro3_ヒトLSR skip4_Flagをトランスフェクトした細胞を示す。
【図４】HEK293T_pIRESpuro3空ベクターをトランスフェクトした細胞の溶解物（レーン1）と比較した、HEK293T_pIRESpuro3_サルWT LSR_Flagをトランスフェクトした細胞におけるサルLSR_WTタンパク質（レーン2）の検出およびHEK293T_pIRESpuro3_サル skip4 LSR_Flagをトランスフェクトした細胞におけるLSR_skip4タンパク質（レーン3）の検出を示す。検出は抗LSR抗体（Abcam、1:4000）を使用して行った。
【図５】空ベクターをトランスフェクトしたCHO-K1細胞またはHEK293細胞の溶解物（レーン1またはレーン3）と比較した、pcDNA3.1_マウスWT LSR_Flagをトランスフェクトした CHO-K1細胞（レーン2）およびpcDNA3.1_マウスWT LSR_Flagをトランスフェクトした HEK293細胞（レーン4）におけるマウスLSR_WTタンパク質の抗flag抗体による検出を示す。
【図６】様々な細胞株におけるLSRの内因性発現を示す。（1）Caov3、（2）ES2、（3）OV-90、（4）OVCAR3、（5）SK-OV3、（6）TOV112D、（7）CaCo2、（8）HeLa、（9）Hep G2、（10）MCF-7、（11）SkBR3および（12）293T_LSR_P5a_Flagの細胞抽出物において、LSRに相当する72kDa付近のバンドが抗LSR抗体により検出された（図３Ａ）。抗GAPDH（Abcam、カタログNo.ab9484）をローディングコントロールとして使用した（図３Ｂ）。
【図７】pIRESpuro3_ヒト WT LSR_Flagが安定にトランスフェクトされたHEK293T細胞にスクランブルsiRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.D-001810-01-05）をトランスフェクトした場合（レーン1）と比較して、LSR特異的siRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.M-009672-00-0005）をトランスフェクトするとヒトWT LSR-flagタンパク質に相当する70kDa付近のバンドのシグナル強度が劇的に減少した（レーン2）。このことによって、ヒトWT LSR-flagタンパク質の異所性発現が特異的にノックダウンされたことが示された。
【図８】LSR_P5a_Flag_mの細胞内局在を示す。抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A9594）（図８Ａ）および抗LSR抗体（Abcam、カタログNo.ab59646（図８Ｂ）、Abnova、カタログNo.H00051599-B01P（図８Ｃ）およびSigma、カタログNo.HPA007270（図８Ｄ））を使用して検出されたように、LSR_P5a_Flag_m（配列番号144）は主として細胞質に局在しているが、細胞表面上にも検出することができる。
【図９】ヒトLSR WT HEK293Tトランスフェクト細胞におけるヒトLSR_WTタンパク質（配列番号11）の細胞内局在を示す共焦点顕微鏡像を示す。
【図１０】サルLSR_WT HEK293Tトランスフェクト細胞におけるサルLSR_WTタンパク質（配列番号211）の細胞内局在を示す共焦点顕微鏡像を示す。
【図１１】マウスLSR_WTトランスフェクトHEK293細胞におけるマウスLSR_WTタンパク質（配列番号31）の細胞内局在を示す共焦点顕微鏡像を示す。
【図１２】トランスフェクトHEK293T細胞におけるサルLSR skip4タンパク質（配列番号212）の細胞内局在を示す共焦点顕微鏡像を示す。

【図１３】マウスLSR_WTトランスフェクトCHO-K1細胞におけるマウスLSR_WTタンパク質（配列番号31）の細胞内局在を示す共焦点顕微鏡像を示す。 図９Ａ、図１０Ａ、図１１Ａ、図１２Ａおよび図１３Ａは、抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A9594）を使用した場合のLSRタンパク質の局在を示す。抗LSR抗体を使用した場合のLSRタンパク質の局在は、図９Ｃ（Abcam、カタログNo.ab59646）ならびに図９Ｂ、図１０Ｂ、図１１Ｂ、図１２Ｂおよび図１３Ｂ（Sigma、カタログNo.HPA007270）に示す。図９～１３中の図Ａ－１、図Ｂ－１および図Ｃ－１は、ネガティブコントロールとして使用した空ベクタートランスフェクト細胞の結果を示す。矢印は膜染色を示す。図９～１３中の図Ａ－２、図Ｂ－２および図Ｃ－２は、LSRタンパク質を発現する組換え細胞におけるヒト、サルおよびマウスのLSR_WTタンパク質の細胞内局在を分析した結果を示す。

【図１４】ヒトWT LSRタンパク質（配列番号11）、サルWT LSRタンパク質（配列番号211）、マウスWT LSRタンパク質（配列番号31）、ヒトSkip4 LSRバリアント（配列番号13）またはサルSkip4 LSRバリアント（配列番号212）を安定に発現する細胞に対する様々な濃度（1μg/mL、2.5μg/mL、5μg/mLおよび10μg/mL）の8C8モノクローナル抗体の結合性を分析した結果を示す。

【図１５】以下に詳述する様々な細胞株におけるLSRタンパク質（70kDa付近のバンドに相当）の内因性の発現を示す。レーン1および14はポジティブコントロール細胞（pIRESpuro3_ヒト WT LSR_Flagを安定にトランスフェクトしたHEK293T細胞）を示す。レーン2はSKBR3、レーン3はMCF7、レーン4はHepG2、レーン5はHela、レーン6はCaCO2、レーン7はTOV112D、レーン8はSKOV3、レーン9はOvCar3、レーン10はOV-90、レーン11はES2、レーン12はCaOV3、レーン13はHEK293T_pIRESpuro3ネガティブコントロール、レーン15はHepG2、レーン16はHepG2C3A、レーン17はHep3B、レーン18はSNU182、レーン19はSkHep1、レーン20はPLC/PRF5、レーン21はChang Liver、レーン22はHT29細胞株にそれぞれ対応する。

【図１６】内因性LSR（配列番号11）タンパク質の発現が特異的にノックダウンされたことを示すウエスタンブロットの結果を示す。

【図１７】LSR特異的siRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.M-009672-00-0005）を一時的にトランスフェクトした後に、HT29細胞（図１７Ａ）およびHepG2/C3A細胞（図１７Ｂ）をFACS分析した結果を示す。

【図１８】8C8抗体の重鎖（図１８Ａ）および軽鎖（図１８Ｂ）のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。リーダー配列はイタリック体で示し、CDR1配列、CDR2配列、CDR3配列は太字で示す。定常領域FR1、FR2、FR3およびFR4は通常のフォントで示す。

【図１９】pH9.0において抗原賦活を行ったLSR陽性細胞の切片を示す（×60）。パネルAは、2μg/mLのLSR抗体を使用してインキュベートしたスライドを示す。パネルBは、「no primary」条件でインキュベートした、パネルAに隣接する切片を示す。パネルAはLSR免疫反応性が陽性であり、抗体反応条件が適切であることが示された。これに隣接するno primary切片（パネルB）では明らかな免疫反応性は示されなかった。

【図２０】マウスIgG2a Fcに融合させたマウスLSR ECD（配列番号221）（2μg/50μL/ウェル）と、抗CD3/CD28またはCon Aで活性化したマウスT細胞との結合アッセイの結果を示す。配列番号223はポジティブコントロールとして使用したタンパク質に相当する。

【図２１】2μg、3μg、4μgもしくは5μgのビオチン標識マウスIgG2a Fc融合マウスLSR-ECD（配列番号221）または5μgのビオチン標識コントロールmIgG2aのKARPAS-299細胞に対する結合を示す。図２３Ａは、蛍光強度中央値（MFI）を示すヒストグラムを示す。図２３Ｂは、マウスIgG2a Fc融合LSR-ECD（配列番号221）のKARPAS-299細胞に対する用量依存的な結合を示す。Y軸は、様々なタンパク質濃度における、コントロールmIgG2aのMFIに対するマウスIgG2a Fc融合マウスLSR-ECD（配列番号221）のMFIの比率を示す。

【図２２】３つの独立した反復実験（EXP1、EXP2およびEXP3）において様々な刺激条件下で評価した、典型的なM1型マーカーであるINOSのmRNAレベルを示す。Y軸はmRNA発現の絶対値を示す。X軸は実施例１２において詳述した様々な刺激条件（IFNg、LPS、IFNg+LPS、IL4、TGFb、PGE2、TSNT（腫瘍上清））を示す。NSは刺激しなかったことを示す。

【図２３】３つの独立した反復実験（EXP1、EXP2およびEXP3）において様々な刺激条件下

で評価した、典型的なM2型マーカーである誘導性ALOX15のmRNAレベルを示す。Y軸はmRNA発現の絶対値を示す。X軸は実施例１２において詳述した様々な刺激条件（IFNg、LPS、IFNg+LPS、IL4、TGFb、PGE2、TSNT（腫瘍上清））を示す。NSは刺激しなかったことを示す。

【図２４】３つの独立した反復実験（EXP1、EXP2およびEXP3）において様々な刺激条件下で評価した、LSRのmRNAレベルを示す。Y軸はmRNA発現の絶対値を示す。X軸は実施例１２において詳述した様々な刺激条件（IFNg、LPS、IFNg+LPS、IL4、TGFb、PGE2、TSNT（腫瘍上清））を示す。NSは刺激しなかったことを示す。LSRのmRNAレベルはマウスLSR Taqmanプローブ（アプライドバイオシステムズ；カタログNo.Mm00660290_m1）を使用して検出した。

【図２５】抗LSRヒトIgG1抗体がLSR発現HEK293に対してCDC活性を示すことを示す。補体の存在下において、サルLSR発現HEK293細胞株（サルLSR Hek）またはGFP発現HEK293細胞株（GFP MT Hek）を、抗LSR抗体、またはアイソタイプコントロールであるhIgG1（ET901）もしくはmIgG2a（Mopc173）とともにインキュベートし、1時間後、CDC活性（%）を評価するために生存率を測定した。

【図２６】抗LSR抗体を用いた、LSRを異所性に発現するHEK293細胞のFACS染色を示す。図２６Ａは、抗LSRマウスIgG2aモノクローナル抗体8C8の結合を示し、図２６Ｂ、図２６Ｃ、図２６Ｄ、図２６Ｅ、図２６Ｆ、図２６Ｇおよび図２６Ｈは、抗LSRヒトIgG1モノクローナル抗体であるS32-03.G11、S11-01.E02、S11-01.F08、S11-04.C11、S11-04.D11、S11-04.H07、およびS11-04.H09の結合をそれぞれ示す。グラフは、サルLSRを発現するHEK293細胞（「cyno」、丸印）または空ベクターをトランスフェクトしたHEK293細胞（「MT」、四角印）に対する様々な抗体の結合のMFI値を示す。これら２種の細胞に対するIgアイソタイプコントロール（huIgG1）の結合は三角印で示す。

【図２７】HEK293T細胞上に発現されたLSRがJurkat細胞の活性化を抑制することを示す。

【図２８】CD20を発現するHEK293T細胞とは異なり、LSRを発現するHEK293T細胞は抗CD3で活性化されたJurkat細胞を抑制することを示す。

【発明を実施するための形態】

【０１０４】

実施形態の少なくともいくつかにおいて、本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、そのフラグメントおよび／もしくは複合体、ならびに／またはこれらを含む医薬組成物および／もしくは診断組成物であって、

該抗体が、ＬＳＲタンパク質に特異的に結合すること、ならびに

該抗体が、特に本明細書に記載の特定のがんの治療および／または診断のための治療薬および／または診断薬として使用できるように改変された抗体（特に、ＬＳＲによって誘導された活性を促進または抑制する抗体を包含するヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラモノクローナル抗体）であること

を特徴とする、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、そのフラグメントおよび／もしくは複合体、ならびに／またはこれらを含む医薬組成物および／もしくは診断組成物に関する。

【０１０５】

排他的な理論や単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、本発明の様々な実施形態による抗体は後述する特性の１以上を有していてもよい。このような中和抗体は、Ｔｈ２からＴｈ１へのシフトを促進してもよく、抗腫瘍免疫応答を低下させる腫瘍微小環境において誘導されたＴｈ２／Ｍ２環境側へのシフトをこの促進作用によって元に戻すことができると考えられる。したがって、該抗体は、がんを助長する免疫系成分（Ｔｈ２）を抑制しつつ、がんに対抗する免疫系成分（Ｔｈ１）を活性化してもよい。また、該抗体は、免疫共刺激（たとえばＢ７関連共刺激など）の調節に関連する活性を包含する、ＬＳＲによって誘導された活性を促進しても抑制してもよく、Ｔ細胞の活性化およびサイトカインの分泌を増加してもよく、かつ／またはがん細胞に対する直接殺傷を誘導してもよい。

【０１０６】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、そのような抗体は、ｉＴｒｅｇの蓄積およびその免疫抑制能を阻害し、かつ／またはエフェクターＴ細胞の活性を増強してもよい。
【０１０７】
本明細書において「がん」は、悪性増殖または悪性腫瘍を発生させる無秩序な異常細胞分裂を特徴とする（浸潤性または転移性の）あらゆる新生物疾患を包含すると理解される。これらの具体例は本明細書に記載されているが、これらに限定されない。
【０１０８】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、上記抗体は特定の生殖細胞系重鎖配列および生殖細胞系軽鎖配列に由来し、かつ／または特定の構造上の特徴を含む（たとえば、特定のアミノ酸配列を含むＣＤＲ領域を少なくとも１つ有する）。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる、単離された抗体、該抗体の製造方法、該抗体を含む免疫複合体および二重特異性分子、該抗体を含む医薬組成物および診断組成物、ならびに免疫複合体、代替足場および二重特異性分子を提供する。
【０１０９】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、インビトロおよびインビボで上記の抗体およびそのフラグメントを使用してＬＳＲタンパク質のいずれか１つを検出する方法に関する。
【０１１０】
実施形態の少なくともいくつかによれば、さらに本発明は、上記の抗体、そのフラグメントおよび／もしくは複合体、ならびに／またはこれらを含む医薬組成物および／もしくは診断組成物を使用して本明細書に記載のがんを治療および／または診断する方法に関する。
【０１１１】
ＬＳＲは、肝臓に見られる多量体タンパク質複合体であり、遊離脂肪酸と結合することにより構造変化を受け、それによって、ａｐｏＢおよびａｐｏＥを認識する結合部位があらわとなる。ＬＳＲ遺伝子を完全に不活性化すると、マウスの胎生致死が引き起こされる。ＬＳＲアレルの片方を欠損（ＬＳＲ$^{-/+}$）させると、血漿中トリグリセリドレベルおよびコレステロールレベルが統計的に有意に上昇した。ＬＳＲの生物学は、ヒト、ラットおよびマウスにおいて詳細に調査されている。ＬＳＲは主に肝細胞膜において発現されており、その機能として最も解明されているのは、遊離脂肪酸による活性化後にカイロミクロンのクリアランスを媒介する機能である。しかしながら、他の組織においてもＬＳＲは発現されているため、他の機能も存在すると考えられる。ＬＳＲは卵巣がん、膀胱がんなどの腫瘍組織において発現していることが示されており、これらの腫瘍において、ＬＳＲは、潜在的な腫瘍マーカーとして同定された３０個の遺伝子のうちの１つを占める。上皮細胞においてＬＳＲをノックダウンすると、タイトジャンクションの形成が影響を受け、上皮性関門機能が低下した（BMC Med Genomics. 2008; 1: 31. Diabetes. 2009 May; 58(5): 1040-1049, J Cell Sci, 15 Feb 2011 124, 548-555）。
【０１１２】
ＬＳＲタンパク質は、本願と同じ出願人が所有するＰＣＴ出願PCT/IB2012/051868（本明細書の一部を構成するものとしてこの文献の全体を援用する）において開示されている。この出願においては、マウスＬＳＲ分子のＥＣＤ配列とマウスＩｇＧ２ａとの融合タンパク質が、抗ＣＤ３、抗ＣＤ２８およびサイトカイン分泌によって誘導されたマウスＴ細胞の活性化を抑制することが実証されている。また、この融合タンパク質は、多発性硬化症マウスモデル（ＥＡＥモデル）の疾患の症状を改善するが、このことは、ＬＳＲが免疫調節において重要な役割を果たしていることを示している。上記のPCT/IB2012/051868では、治療薬および／または（インビトロ診断法およびインビボ診断法における）診断薬として有用であると考えられるＬＳＲ抗体が報告されている。具体的には、免疫活性化作用

または免疫抑制作用を有する抗体およびフラグメントが報告されており、たとえば、特にＬＳＲ抗原が発現されている状態（がん、感染症および／または免疫関連疾患など）を治療するための、ＡＤＣＣ（抗体依存性細胞傷害）活性またはＣＤＣ（補体依存性細胞傷害）活性を介して細胞を標的とする抗体または抗体フラグメントが挙げられている。

【０１１３】

本明細書において「ＬＳＲ」は、がんにおいてがん細胞上または腫瘍浸潤免疫細胞上に示差的に発現されている、配列番号１０～１８、２１、２２、３１、３２、４７～５０、６２～６９、１４３、２１１～２１２、２３７のいずれかに示すタンパク質のいずれか、配列番号９５および１０２からなる群から選択されるＬＳＲ ＩＧＶドメインに対応するアミノ酸配列、配列番号１８に示す独特な端部に対応するアミノ酸配列、これらのバリアント、これらのオーソログおよび／もしくはフラグメント、ならびに／またはこれらをコードする核酸配列を指す。

【０１１４】

ＬＳＲタンパク質は、WO2005019258；WO2005016962；WO2010105298において、免疫関連疾患の診断および治療のためのタンパク質の１つとして数多くの他のタンパク質とともに挙げられている。

【０１１５】

ＬＳＲタンパク質は、米国特許出願US20070054268において、卵巣がんおよび／もしくはその生存率、または疾患の再発の診断に使用できるタンパク質の１つとして数多く他のタンパク質とともに挙げられている。

【０１１６】

ＬＳＲタンパク質は、米国特許出願US20070154889において、悪性メラノサイトと良性メラノサイトとを識別するのに有用な、悪性黒色腫を同定するためのタンパク質の１つとして数多くの他のタンパク質とともに挙げられている。

【０１１７】

ＬＳＲタンパク質は、ＰＣＴ出願WO06133923において、乳がんの診断、予後および予測のためのタンパク質の１つとして数多くの他のタンパク質とともに挙げられている。

【０１１８】

ＬＳＲタンパク質は、ＰＣＴ出願WO06138275において、がんの診断および管理に使用される幹細胞上gene signatureを構成するタンパク質の１つとして数多くの他のタンパク質とともに挙げられている。

【０１１９】

米国特許第US7919091、US6635431、US7291709、および他の関連する特許ファミリーでは、ＬＳＲタンパク質およびＬＳＲ特異的抗体が開示されており、特に肥満および他の代謝異常の治療のためのものとして開示されている。

【０１２０】

米国特許出願第20120064100号では、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）を介した免疫系の抑制に関連する状態の治療または免疫応答の調節のためのタンパク質の１つとして、他のいくつかのタンパク質とともにＬＳＲタンパク質が開示されている。

【０１２１】

しかしながら、上記の特許および／または特許出願は、本明細書に記載の特定のＣＤＲを１つ以上含み、配列番号２１５および２１６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する１つ以上のポリペプチドに特異的に結合するが配列番号１０の他の部分には特異的に結合しない抗体（配列番号２１５のアミノ酸配列を有するポリペプチドに該抗体が結合する場合、該配列番号１０の他の部分は、配列番号１０の１番目～８０番目のアミノ酸または９９番目～２３４番目のアミノ酸を含み、配列番号２１６のアミノ酸配列を有するポリペプチドに該抗体が結合する場合、該配列番号１０の他の部分は、配列番号１０の１番目～１１７番目のアミノ酸または１３６番目～２３４番目のアミノ酸を含む）、または本明細書に記載の特定のＣＤＲを１つ以上含み、配列番号１０の３０番目～１１０番目のアミノ酸に特異的に結合するが配列番号１０の他の部分には特異的に結合しない抗体（該配

列番号１０の他の部分は、配列番号１０の１番目～２９番目のアミノ酸または１１１番目～２３４番目のアミノ酸を含む）を使用することを当業者に促すような動機付けをなんら教示も示唆も提供もしていない。

【０１２２】

さらに、上記の特許および／または特許出願は、ＬＳＲ ＥＣＤに特異的な抗体を使用して本明細書に記載のがんの治療および／または診断を行うことを当業者に促すような動機付けをなんら教示も示唆も提供もしていない。がんの治療および／または診断のためのこのような抗体の有用性については後で例示する。

【０１２３】

さらに、上記の特許および／または特許出願は、ＬＳＲ ＥＣＤに特異的な抗体を使用して本明細書に記載の免疫関連疾患の治療および／または診断を行うことを当業者に促すような動機付けをなんら教示も示唆も提供もしていない。何らかのものによって限定されることを望むものではないが、これらの抗体は、抗体依存性細胞傷害活性、補体依存性細胞傷害活性などの細胞傷害活性を免疫細胞に対して発揮し、それによって免疫細胞が除去され、免疫疾患が改善されると予想される。さらに、何らかのものによって限定されることを望むものではないが、これらの抗体は、Ｔ細胞活性化に対するＬＳＲの抑制効果を増強し、それによって免疫細胞応答が減弱され、免疫疾患が改善されると予想される。

【０１２４】

さらに、上記の特許および／または特許出願は、ＬＳＲ ＥＣＤに特異的な抗体を使用して本明細書に記載の感染症の治療および／または診断を行うことを当業者に促すような動機付けをなんら教示も示唆も提供もしていない。何らかのものによって限定されることを望むものではないが、「感染症」は、外来抗原が持続的に存在することによって引き起こされる障害、疾患および／または状態を含み、これらは該外来抗原に対する免疫応答の減弱を引き起こすが、上記の抗体は、免疫系を活性化してこのような感染因子を攻撃するのに効果的であることが予想される。このような減弱した免疫応答は、Ｔ細胞の疲弊や細胞増殖の低下およびサイトカイン産生の低下として現れうる機能低下を特徴とし、本明細書に記載の抗体を用いて抑制性経路を阻害することによって回復させることができる。

【０１２５】

本明細書において「抗体」は、モノクローナル抗体および／もしくはポリクローナル抗体、ならびに抗原結合フラグメント、代替足場、複合体および／もしくは免疫複合体のいずれかを指してもよい（さらにこれらの組み合わせであってもよい）。

【０１２６】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本明細書に記載の抗体およびフラグメントであって、

該抗体が１×１０$^{-8}$Ｍ以下のＫＤでヒトＬＳＲに結合してもよく、そのようなＫＤでヒトＬＳＲに結合することが好ましいこと、および

該抗体が、Ｂ７関連共刺激の調節、Ｔ細胞活性化の増強、Ｔ細胞抑制の軽減、サイトカイン分泌の増強、ＩＬ－２分泌の増強、Ｔ細胞によるインターフェロン－γの産生の増強、Ｔｈ１応答の増強、Ｔｈ２応答の減弱、Ｍ２型マクロファージの減少または除去、Ｍ２型マクロファージの腫瘍形成促進活性の低下、がんのエピトープ拡大の促進、Ｔ細胞活性化の抑制の減弱、哺乳動物におけるＴ細胞応答の増強、抗原特異的メモリー応答の刺激、がん細胞のアポトーシスまたは溶解の誘導、がん細胞に対する細胞傷害作用または細胞増殖抑制作用の刺激、がん細胞の直接殺傷の誘導、ならびに補体依存性細胞傷害作用および／または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害の誘導のうちの少なくとも１つの特性を示すこと

を特徴とする抗体およびフラグメントを提供する。

【０１２７】

上記抗体またはフラグメントは、がんに対する免疫応答を増強してもよい。

【０１２８】

上記抗体またはフラグメントは、制御性Ｔリンパ球（Ｔｒｅｇ）の活性を減弱してもよい。

【０１２９】
上記抗体またはフラグメントは、ｉＴｒｅｇへの分化を抑制してもよい。
【０１３０】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、および／または標的細胞に対するＣＤＣ活性もしくはＡＤＣＣ活性を有している抗体もしくは抗体フラグメントであることを特徴とする、上記の抗体およびそのフラグメントを提供する。
【０１３１】
上記の抗体およびそのフラグメントの具体例としては、免疫活性化作用または免疫抑制作用を有する抗体およびフラグメント、たとえば、ＡＤＣＣ（抗体依存性細胞傷害）活性またはＣＤＣ（補体依存性細胞傷害）活性により細胞を標的とする抗体またはフラグメントなどが挙げられる。
【０１３２】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、配列番号１０～１８、２１、２２、３１、３２、４７～５０、６２～６９、１４３、および２１１～２１２からなる群から選択されるＬＳＲタンパク質のいずれか、配列番号１２、１４、４７～５０からなる群から選択される、該タンパク質の細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列、ならびに／またはこれらのフラグメントおよび／もしくはエピトープに特異的に結合する阻害抗体を提供する。この阻害抗体は、単独または内因性抗腫瘍応答を増強する増強手段と組み合わせてがん免疫療法に特化して使用してもよく、また、このようにしてがん免疫療法に特化して使用することが好ましい。
【０１３３】
さらに、驚くべきことに、配列番号１０～１８、２１、２２、３１、３２、４７～５０、６２～６９、９５、１０２、１４３、および２１１～２１２からなる群から選択されるＬＳＲタンパク質のいずれか、配列番号１２、１４、４７～５０からなる群から選択される、該タンパク質の細胞外ドメイン、ならびに／またはこれらのフラグメントおよび／もしくはエピトープに特異的に結合する抗体は、このような抗体が特に効果的に作用する特定のがんの治療に特化して使用してもよく、また、このような特定のがんの治療に特化して使用することが好ましいことが分かった。また、本発明は、上述のような抗体と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。
【０１３４】
さらに驚くべきことに、上記の抗体は、悪性細胞、腫瘍浸潤免疫細胞（Ｔ細胞、Ｂ細胞、マクロファージ、骨髄由来抑制細胞、マスト細胞など）および／または間質腫瘍細胞にＬＳＲを発現しているがんなどの特定のがんに特に効果的であることが分かった。先に挙げた細胞のＬＳＲの発現は、標準的な治療薬による治療前に見られてもよく、治療後に誘導されてもよい。
【０１３５】
さらに、驚くべきことに、上記のＬＳＲ抗体を以下のがんのいずれか１以上の治療に使用すると、転帰を改善できることが分かった。
・乳がん、好ましくは、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、小葉癌、粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型のいずれか、好ましくは硬性腺癌；
・結腸直腸がん、好ましくは、中～低分化型盲腸腺癌、高分化型、中分化型および低分化型結腸腺癌、管状腺癌（好ましくはグレード２の上行結腸管状腺癌）、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌（好ましくはグレード３の直腸腺癌）、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌のいずれか；
・肺がん、好ましくは、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌（好ましくは中分化型扁平上皮細胞癌）、中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、小細胞肺がんのいずれか；
・前立腺がん、好ましくは、グリーソングレード５～９の腺癌、浸潤性腺癌、高悪性度前立腺上皮内腫瘍、未分化癌のいずれか；

・胃がん、好ましくは、中分化型胃腺癌；
・卵巣がん、好ましくは、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、浸潤性漿液性乳頭状癌のいずれか；
・脳がん、好ましくは、星状細胞腫（好ましくはグレード４の星状細胞腫）、多形膠芽腫のいずれか；
・腎臓がん、好ましくは腎明細胞癌；
・肝臓がん、好ましくは、肝細胞癌（好ましくは低悪性度肝細胞癌）、線維層板状肝細胞癌のいずれか；
・血液がん、好ましくは、大細胞型リンパ腫、高悪性度および低悪性度非ホジキンリンパ腫のいずれか

【０１３６】
驚くべきことに、当技術分野での報告に反して、がんの亜型である、ホジキンリンパ腫、卵巣顆粒膜細胞腫およびグレード２の星状細胞腫においては、常にではないが、ＬＳＲが十分なレベルで発現されていないことが多いことが分かっており、したがって、これらの亜型に罹患している患者は、恐らく抗ＬＳＲ抗体を用いた治療の利点を得ることができないことには注意すべきである。

【０１３７】
さらに予想外にも、乳管腺癌、浸潤性乳管癌、乳房小葉癌、乳房粘液性腺癌、乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型、中～低分化型盲腸腺癌、高～低分化型結腸腺癌、グレード２の上行結腸管状腺癌、デュークスステージＣ１の結腸腺癌、浸潤性腺癌、直腸腺癌、グレード３の直腸腺癌、中分化型直腸腺癌、中分化型直腸粘液性腺癌、高～低分化型非小細胞癌、扁平上皮細胞癌、中分化型および中～低分化型扁平上皮癌、中等度によく分化した角化型扁平上皮細胞癌、大細胞腺癌、グリーソングレード７～９の腺癌、浸潤性腺癌、中分化型腺癌、漿液性乳頭状嚢胞癌、漿液性嚢胞腺癌、グレード４の星状細胞腫、多形膠芽腫、腎明細胞癌、肝細胞癌ならびに低悪性度肝細胞癌は、これらのがん細胞におけるＬＳＲの発現レベルが顕著に高いことから、抗ＬＳＲ抗体による治療に特に感受性があることが分かった。

【０１３８】
実施形態の少なくともいくつかによれば、上記がんにおいて、上記の型または亜型のがんはいずれも別の実施形態を構成してもよく、かつ／または一実施形態または下位実施形態を構成するために組み合わせてもよい。

【０１３９】
上記がんのいずれかに関する実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の治療方法ならびに抗体および医薬組成物の使用であって、
該がんが、がん細胞上または腫瘍浸潤免疫細胞上に、配列番号１０～１８、２１、２２、３１、３２、４７～５０、６２～６９、９５、１０２、１４３、２１１～２１２に含まれるＬＳＲポリペプチド、配列番号１２、１４および４７～５０からなる群から選択される、該ポリペプチドの細胞外ドメイン、ならびに／またはこれらのフラグメント（たとえば配列番号２３７）および／もしくはエピトープを発現していることを特徴とする、治療方法ならびに抗体および医薬組成物の使用が提供される。

【０１４０】
本明細書において「これらのエピトープ」は、配列番号２１５、２１６および／または２３７に示すエピトープを指してもよいが、これらに限定されない。

【０１４１】
上記の抗体は本明細書に記載のがんの治療に使用してもよい。上記がん、上記免疫浸潤細胞のいずれかまたはその両方は、ＬＳＲを十分なレベルで発現していてもよく、該がんは本明細書に記載されているものである。「免疫浸潤細胞」とは、腫瘍または癌性細胞領域に浸潤した免疫細胞である。「ＬＳＲを十分なレベルで発現している」とは、アッセイで測定した場合に、上述のような細胞がＬＳＲタンパク質を十分に高いレベルで発現していることを意味する。たとえば、該アッセイがＩＨＣ（免疫組織化学）であり、発現が０

～３の段階（０：発現なし、１：弱い染色、２：中程度の発現、３：強発現）で測定される場合、十分なレベルのＬＳＲ発現は、１以上であってもよく、好ましくは２以上であり、より好ましくは３以上である。本明細書に記載の抗体または免疫分子をそのようなアッセイに使用してもよい。

【０１４２】

上記の抗体は、３×１０$^{-8}$Ｍ以下のＫＤ、１×１０$^{-9}$Ｍ以下のＫＤ、０．１×１０$^{-9}$Ｍ以下のＫＤ、０．０５×１０$^{-9}$Ｍ以下のＫＤ、１×１０$^{-9}$～１×１０$^{-11}$ＭのＫＤでヒトＬＳＲ抗原に結合することがより好ましい。

【０１４３】

さらに、上記の抗体および／またはその複合体は、このようながん細胞の選択的死滅を効果的に誘導し、自己免疫およびがんに関与する免疫応答を効果的に調節することが好ましい。

【０１４４】

ＬＳＲに対する抗体の結合能力を評価するための標準的なアッセイは当技術分野において公知であり、たとえば、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロットおよびＲＩＡが挙げられる。適切なアッセイは実施例において詳細に説明する。抗体の結合動態（たとえば結合アフィニティなど）も、当技術分野において公知の標準的なアッセイ（たとえばBiacore分析など）で評価することができる。

【０１４５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＳＲに結合可能な抗体から抗ＬＳＲ抗体配列を作製した後、V_H配列およびV_L配列を「組み合わせてかつ適合させて」別の抗ＬＳＲ結合分子を作製することができる。このように「組み合わせてかつ適合させて」作製した抗体のＬＳＲに対する結合性は、上記の結合アッセイ（たとえばＥＬＩＳＡなど）を使用して評価することができる。V_H鎖とV_L鎖とを組み合わせてかつ適合させる場合、特定のV_H／V_L対のV_H配列を、構造的に類似したV_H配列と置き換えることが好ましい。同様に、特定のV_H／V_L対のV_L配列を、構造的に類似したV_L配列と置き換えることが好ましい。たとえば、相同抗体から得たV_H配列およびV_L配列は、特に容易に組み合わせてかつ適合させることができる。

【０１４６】

上記抗体は、

（ａ）本明細書に記載の配列；

（ｂ）（ａ）に記載のＣＤＲアミノ酸配列において、重鎖ＣＤＲ３に存在する１００Ａ番目（Ｋａｂａｔナンバリングシステム）のセリン残基以外の、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個以上のアミノ酸が保存的に置換された配列；

（ｃ）（ａ）または（ｂ）に記載の配列と９０％以上、９５％以上、９８％以上、または９９％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列；および

（ｄ）上記アミノ酸をコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド

からなる群から選択されるＣＤＲアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【０１４７】

本明細書に記載の抗体またはフラグメントにおいて、該抗体は二重特異性であってもよく、「二重特異性」とは、Ｉｇ分子の一方の腕が本明細書に記載の標的タンパク質またはエピトープに特異的に結合することができ、Ｉｇ分子のもう一方の腕が、抗体またはフラグメントの生物学的活性を増強したり、抗体またはフラグメントの生物学的活性に指向性を持たせることが可能な別の特異性を有していることを意味する。この点において、多重特異性抗体も少なくとも二重特異性であると考えられる。さらに、上記抗体またはフラグメントは、多価の多重特異性抗体であってもよい。

【０１４８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、特異的抗体と類似した特異性および親和性を有する足場タンパク質に関する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本

発明は、１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結した足場タンパク質を含む抗原結合コンストラクトに関する。遺伝子操作されたこのような足場タンパク質は、通常、ループ領域またはそれ以外の許容される表面部位に突然変異を誘発させたランダムライブラリーを設計し、次いで、ファージディスプレイまたはその関連技術を使用して任意の標的に結合するバリアントを選択することによって得られる。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は代替足場に関し、代替足場としては、アンチカリン（anticalin）、DARPin、アルマジロリピートタンパク質、プロテインＡ、リポカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、チオレドキシン、化学的に束縛されたペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本明細書に記載のがんを治療するための治療薬およびインビボ診断薬として使用される代替足場に関する。

【０１４９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、（ａ）サイトカインのアップレギュレーション、（ｂ）Ｔ細胞増殖／拡大の増加、（ｃ）Ｔ細胞によるインターフェロン－γ産生の増加、（ｄ）ＩＬ－２分泌の増加、（ｅ）抗体応答の刺激、（ｆ）がん細胞増殖の抑制、（ｇ）抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進、（ｇ）ＣＤ４$^{+}$および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞活性化の促進、（ｉ）Ｔ細胞抑制の軽減、（ｊ）がん細胞のアポトーシスまたは溶解の軽減、および（ｋ）がん細胞に対する細胞傷害作用または細胞増殖抑制作用のうちの１以上を対象において実施する方法であって、本明細書に記載の抗体もしくは免疫分子または医薬組成物を対象に投与することを含む方法が提供される。

【０１５０】

様々な実施形態における本発明をより容易に理解するために、まず特定の用語の定義を説明する。その他の用語の定義は、発明の詳細な説明において別途記載する。

【０１５１】

本明細書において「単離された」は、天然に存在する環境とは異なる環境に置かれた目的化合物（たとえばポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指し、たとえば、ペプチドを自然界では見られない濃度にまで濃縮することなどによって自然環境から分離した目的化合物を指す。「単離された」は、目的化合物を得るために実質的に濃縮された試料中の化合物、および／または部分的もしくは実質的に精製された目的化合物を含む試料中の化合物を包含する。

【０１５２】

「免疫細胞」は、造血器由来のあらゆる細胞を指し、Ｔ細胞、Ｂ細胞、単球、樹状細胞、およびマクロファージを含むが、これらに限定されない。

【０１５３】

本明細書において「ポリペプチド」は、修飾（たとえばリン酸化またはグリコシル化）の有無にかかわらず、ある一定の長さを有するアミノ酸鎖を指す。

【０１５４】

本明細書において「共刺激ポリペプチド」または「共刺激分子」とは、Ｔ細胞上の細胞表面分子と相互作用することによって、Ｔ細胞応答を調節するポリペプチドである。

【０１５５】

本明細書において「共刺激シグナル伝達」とは、抗原特異的Ｔ細胞応答の際に、抗原提示細胞上の共刺激ポリペプチドとＴ細胞上のその受容体との相互作用により生じるシグナル伝達活性である。単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、抗原特異的Ｔ細胞応答は以下の２種類のシグナルによって媒介されると考えられている。

１）ＭＨＣに関連して提示される抗原ペプチドとＴ細胞受容体（ＴＣＲ）との連結（シグナル１）

２）種々の共刺激受容体とリガンドとが接触してペアを形成するときに伝達される抗原非依存性の第２のシグナル（シグナル２）

単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、この「第２のシグナル」は、Ｔ細胞応答のタイプ（活性化または抑制）やＴ細胞応答の強度および持続期間を決定するのに

重要な役割を果たしており、Ｂ７ファミリータンパク質などの共刺激分子からの正のシグナルと負のシグナルの両方の調節を受ける。

【０１５６】

本明細書において「Ｂ７」ポリペプチドは、Ｔ細胞を共刺激するＢ７ファミリータンパク質のメンバーを指し、このファミリーのメンバーとしては、Ｂ７－１、Ｂ７－２、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ５、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ６、Ｂ７－Ｓ３、ならびにこれらの生物学的に活性なフラグメントおよび／またはバリアントが挙げられるが、これらに限定されない。生物学的に活性なフラグメントの代表例としては、Ｔ細胞を共刺激する細胞外ドメインまたは該細胞外ドメインのフラグメントが挙げられる。

【０１５７】

本明細書において「バリアント」ポリペプチドは、対応する野生型ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、少なくとも１つのアミノ酸配列変化を含んでいる。

【０１５８】

本明細書において「保存的」アミノ酸置換とは、構造特性または化学特性が類似したアミノ酸への置換である。本明細書において「宿主細胞」は、組換えベクターの導入が可能な原核細胞および真核細胞を指す。

【０１５９】

本明細書において「端部（edge portion）」すなわち「新たな接合部（new junction）」は、野性型または公知のタンパク質では連結されていない、本発明のスプライスバリアント内の２つの部分の連結部を指す。該端部は、たとえば、バリアントの「公知のタンパク質」部分とテールとの接合により生じてもよく、かつ／または、公知のタンパク質においては隣接していなかった２つの配列部分がスプライスバリアントにおいて隣接したため、野性型の内部配列が最終的に残らなかった場合に生じてもよい。「架橋（bridge）」は上述した端部であってもよいが、ヘッドとバリアントの「公知のタンパク質」部分との接合部、テールとバリアントの「公知のタンパク質」部分との接合部、およびインサートとバリアントの「公知のタンパク質」部分との接合部をも包含しうる。

【０１６０】

実施形態のいくつかでは、テール、ヘッドまたはユニークなインサートとバリアントの「公知のタンパク質」部分との間の架橋は、少なくとも約１０個のアミノ酸を含み、実施形態のいくつかにおいては少なくとも約２０個のアミノ酸を含み、実施形態のいくつかにおいては少なくとも約３０個のアミノ酸を含み、実施形態のいくつかにおいては少なくとも約４０個のアミノ酸を含み、これらのアミノ酸において、少なくとも１個のアミノ酸がテール／ヘッド／インサートに由来し、少なくとも１個のアミノ酸がバリアントの「公知のタンパク質」部分に由来する。実施形態のいくつかにおいて、架橋は、約１０～約４０の範囲の任意の数のアミノ酸（たとえば、１０、１１、１２、１３、．．．３７、３８、３９、４０アミノ酸長またはその間の任意の数）を含んでいてもよい。

【０１６１】

架橋は、いずれの方向にも配列自体の長さを超えて伸長できないことには注意すべきであり、架橋に関して説明がなされる場合、架橋の長さは配列自体の長さを超えないと理解される。

【０１６２】

さらに、特定の場合におけるスライディングウィンドウに関して架橋を以下に説明する。たとえば、特定の場合において架橋は以下のような構成を特徴とする。（バリアント内に公知のタンパク質部分が存在しない場合）２つの端部間の架橋は、以下のように説明することができる。タンパク質の架橋部分は、長さ「ｎ」のポリペプチドを含み（ｎは少なくとも約１０アミノ酸長であり、少なくとも約２０アミノ酸長、少なくとも約３０アミノ酸長、少なくとも約４０アミノ酸長、少なくとも約５０アミノ酸長のいずれであってもよい）、該ポリペプチドには、ＸＸ（該架橋の中心に位置する２つのアミノ酸（それぞれ各端部の末端に由来））を含む少なくとも２つのアミノ酸が含まれ、該架橋の構造が、（た

とえば）４９－ｘ～４９の範囲の任意のアミノ酸番号から始まり（たとえば）５０＋（（ｎ－２）－ｘ）の任意のアミノ酸番号で終わる配列（各式中、ｘ＝０～ｎ－２）で示される（ナンバリングはタンパク質配列に基づく）。この例では、ｎが１０～５０の範囲の任意のアミノ酸長である架橋が包含されると理解されるべきである。さらに、架橋ポリペプチドは、配列自体の長さを超えて伸長することはできず、したがって、（たとえば）４９－ｘは１以上であり、（たとえば）５０＋（（ｎ－２）－ｘ）は配列の全長よりも短いと理解されるべきである。

【０１６３】

本明細書において「ワクチン」は、特定の疾患に対する免疫を向上させる生物学的製剤を指し、ワクチンには免疫応答が誘導されるがん抗原が包含される。通常、ワクチンは、免疫系を刺激するための免疫増強薬としてアジュバントを含む。本明細書において「治療ワクチン」および／または「治療ワクチン接種」は、がんを治療するために使用されるワクチンを指す。

【０１６４】

本明細書において「アジュバント」は、それ自体はいかなる特異的抗原性も有さないが、免疫系を刺激しワクチンに対する応答を増強させる薬物を指す。

【０１６５】

本明細書において「免疫」応答は、レシピエント患者体内のペプチドに対する（抗体を介した）有益な液性応答および／または（抗原特異的Ｔ細胞またはこれらの分泌物を介した）細胞性応答の発生を指す。このような応答は、免疫原の投与によって誘導された能動的応答であってもよく、抗体もしくは感作Ｔ細胞の投与によって誘導された受動的応答であってもよい。単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、細胞性免疫応答は、クラスＩまたはクラスII ＭＨＣ分子と関連したポリペプチドエピトープの提示によって惹起され、抗原特異的ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞および／またはＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞を活性化する。この応答は、さらに、単球、マクロファージ、ＮＫ細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、小膠細胞、および好酸球の活性化、好中球または他の先天性免疫の構成要素の活性化または動員を伴ってもよい。細胞媒介性免疫応答の存在は、増殖アッセイ（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）またはＣＴＬ（細胞傷害性Ｔリンパ球）アッセイによって確認することができる。免疫原の防御効果または治療効果に液性応答および細胞性応答が相対的にどの程度寄与しているのかは、免疫した同系の動物から抗体およびＴ細胞を別々に単離し、第２の対象において防御効果または治療効果を測定することにより調べることができる。

【０１６６】

「免疫原」は、（必要に応じてアジュバントとともに）哺乳動物に投与されることによって、自体に対する免疫応答を誘導することができる。

【０１６７】

本明細書において「抗体」は、完全なポリクローナル抗体、完全なモノクローナル抗体、およびこれらの抗原結合フラグメント（すなわち「抗原結合部分」）または一本鎖を包含する。さらに、「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された少なくとも２本の重鎖（Ｈ）と２本の軽鎖（Ｌ）とを含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。それぞれの重鎖は、少なくとも１つの重鎖可変領域（本明細書において$Ｖ_{Ｈ}$と略す）と重鎖定常領域とで構成されている。重鎖定常領域は、$Ｃ_{Ｈ}１$、$Ｃ_{Ｈ}２$および$Ｃ_{Ｈ}３$の３つのドメインで構成されている。それぞれの軽鎖は、少なくとも１つの軽鎖可変領域（本明細書において$Ｖ_{Ｌ}$と略す）と軽鎖定常領域とで構成されている。軽鎖定常領域は、$Ｃ_{Ｌ}$と呼ばれる１つのドメインで構成されている。$Ｖ_{Ｈ}$領域および$Ｖ_{Ｌ}$領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変領域にさらに細分することができ、超可変領域と超可変領域の間にはフレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存性の高い領域が点在している。各$Ｖ_{Ｈ}$および$Ｖ_{Ｌ}$は、３つのＣＤＲと４つのＦＲから構成されており、これらはアミノ末端からカルボキシ末端の方向に、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順で配置されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（たとえばエフェクター細胞

）や古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）などの宿主組織または宿主因子と免疫グロブリンとの結合を媒介しうる。

【０１６８】

本明細書において、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）は、抗原（たとえば、ＬＳＲ分子および／またはそのフラグメント）に特異的に結合する能力を保持する１つ以上の抗体フラグメントを指す。抗体の抗原結合能は、完全長抗体の複数のフラグメントによって発揮されることが示されている。抗体の「抗原結合部分」に包含される結合フラグメントとしては、

（ｉ）Ｆａｂフラグメント（軽鎖Ｖドメイン、重鎖Ｖドメイン、および軽鎖定常ドメイン（C_LおよびC_H1）からなる１価のフラグメント）；

（ii）Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント（ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂフラグメントを含む二価のフラグメント）；

（iii）V_HドメインおよびC_H1ドメインからなるＦｄフラグメント；

（iv）抗体の１つの腕のV_LドメインおよびV_HドメインからなるＦｖフラグメント；

（ｖ）V_HドメインからなるｄＡｂフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）；ならびに

（vi）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）

が挙げられる。さらに、Ｆｖフラグメントの２種のドメイン（V_LおよびV_H）は別々の遺伝子によってコードされているが、これらのドメインを１つのタンパク質鎖とすることが可能な合成リンカーでこれらのドメインを組換え法により連結することができ、これによって、一対のV_L領域およびV_H領域から１価の分子が形成される（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られている；たとえば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426;およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい）。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」に包含される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の慣用の技術を使用して得られ、完全な抗体と同様の方法で有用性についてスクリーニングされる。

【０１６９】

本明細書において「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指す（たとえば、ＬＳＲ以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない、ＬＳＲタンパク質に特異的に結合する単離された抗体および／またはそのフラグメント）。しかしながら、ＬＳＲタンパク質に特異的に結合する単離された抗体は、他の生物種由来のＬＳＲ分子などの他の抗原に対して交差反応性を有していてもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まないものであってもよい。

【０１７０】

本明細書において「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一の分子で構成される抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性（アフィニティ）を示す。

【０１７１】

本明細書において「ヒト抗体」は、可変領域のフレームワーク領域およびＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する抗体を包含する。さらに、この抗体が定常領域を含んでいる場合、この定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（たとえば、インビトロにおけるランダム突然変異誘発もしくは部位特異的突然変異誘発、またはインビボにおける体細胞突然変異誘発により導入された変異）を含んでいてもよい。しかしながら、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列がヒトのフレームワーク配列に移植された抗体は、本明細書の「ヒト抗体」に含まれない。

【０１７２】

「ヒトモノクローナル抗体」は、単一の結合特異性を示す抗体であって、該抗体の可変

領域のフレームワーク領域およびＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマから産生され、ハイブリドーマとしては、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを持つ非ヒトトランスジェニック動物（たとえばトランスジェニックマウス）から得られたＢ細胞と、不死化細胞とを融合させたものが挙げられる。

【０１７３】

本明細書において「組換えヒト抗体」は、組換え技術によって調製、発現、作製、または単離されたあらゆるヒト抗体を包含し、このような抗体として、たとえば、

（ａ）ヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物もしくはトランスクロモソミック動物（たとえばマウス）またはこれらの動物より調製されたハイブリドーマから単離された抗体（さらに詳しくは後述する）；

（ｂ）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞（たとえばトランスフェクトーマ）から単離された抗体；

（ｃ）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体；および

（ｄ）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングによる別のＤＮＡ配列の形成などを含む他の方法により調製、発現、作製、または単離された抗体

が挙げられる。このような組換えヒト抗体の可変領域のフレームワーク領域およびＣＤＲ領域は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。しかしながら、特定の実施形態では、このような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトＩｇ配列を導入したトランスジェニック動物を使用した場合はインビボ体細胞突然変異誘発）に付することができることから、組換え抗体のV_H領域およびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系のV_H配列およびV_L配列に由来し、かつこれらの配列に関連するものではあるが、ヒト生殖細胞系のインビボ抗体レパートリーには本来存在しない配列であってもよい。

【０１７４】

本明細書において「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体の種類（たとえばＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【０１７５】

本明細書において「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という用語は、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同じ意味で用いられる。

【０１７６】

本明細書において「ヒトＬＳＲタンパク質に特異的に結合する」抗体は、ＬＳＲタンパク質に結合する抗体を指し、好ましくは5×10^{-8}Ｍ以下のK_D、より好ましくは3×10^{-8}Ｍ以下のK_D、さらにより好ましくは1×10^{-9}Ｍ以下のK_D、さらにより好ましくは1×10^{-10}ＭのK_D、さらにより好ましくは1×10^{-11}ＭのK_D、さらにより好ましくは1×10^{-12}Ｍ以下のK_DでＬＳＲタンパク質に結合する抗体を指す。

【０１７７】

本明細書において「K_{assoc}」または「K_a」は、特定の抗体－抗原相互作用の結合速度定数を指し、本明細書において「K_{diss}」または「K_d」は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数を指す。本明細書において「K_D」は、解離定数を指し、K_aに対するK_dの比率（すなわちK_d/K_a）で得られ、モル濃度（Ｍ）で表される。抗体のK_D値は、当技術分野において十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体のK_D値を決定するための方法としては、表面プラズモン共鳴を使用した方法が好ましく、また、Biacore（登録商標）システムなどのバイオセンサシステムを使用した方法も好ましい。

【０１７８】

本明細書において、ＩｇＧ抗体の「高親和性（アフィニティ）」とは、標的抗原に対する該抗体のK_Dが10^{-8}Ｍ以下、より好ましくは10^{-9}Ｍ以下、さらに好ましくは10^{-10}Ｍ以下であることを指す。しかしながら、「高親和性」結合は抗体のアイソタイ

プよって異なりうる。たとえば、ＩｇＭアイソタイプの「高親和性」結合とは、該抗体のK_Dが10^{-7}Ｍ以下、より好ましくは10^{-8}Ｍ以下であることを指す。

【０１７９】

本明細書において「対象」または「患者」は、あらゆるヒトまたは非ヒト動物を包含する。「非ヒト動物」は、あらゆる脊椎動物、たとえば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの、哺乳動物および非哺乳動物を包含する。

【０１８０】

特定の生殖細胞系配列を有する抗体

特定の実施形態において、本発明の抗体は、特定の生殖細胞系重鎖免疫グロブリン遺伝子由来の重鎖可変領域および／または特定の生殖細胞系軽鎖免疫グロブリン遺伝子由来の軽鎖可変領域を含む。

【０１８１】

本明細書において、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子を使用した系からヒト抗体の可変領域を得た場合、該ヒト抗体は、特定の生殖細胞系配列の「産物」または「由来物」である重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含む。上記のような系として、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを目的抗原で免疫化する系、およびファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーを目的抗原を用いてスクリーニングする系が挙げられる。特定のヒト抗体がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の「産物」または「由来物」であることの同定は、該ヒト抗体のアミノ酸配列とヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列とを比較し、該ヒト抗体の配列に最も類似した配列を有する（すなわち同一性（％）が最も高い）ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を選択することによって行うことができる。

【０１８２】

特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の「産物」または「由来物」であるヒト抗体は、たとえば体細胞自然突然変異または意図的に導入された部位特異的突然変異などによって、生殖細胞系配列と比較してアミノ酸が異なっていてもよい。しかしながら、選択されたヒト抗体は、通常、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有し、かつ他の生物種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列（たとえばマウスの生殖細胞系配列）と比較したときにヒトの抗体であると同定されるアミノ酸残基を含んでいる。特定の場合においては、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％、さらには少なくとも９６％、９７％、９８％または９９％のアミノ酸配列同一性を有していてもよい。通常、特定のヒト生殖細胞系配列に由来するヒト抗体は、このヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と比較したときのアミノ酸差異が１０個以下であろう。特定の場合においては、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と比較したときのアミノ酸差異が５個以下、さらには４個以下、３個以下、２個以下、または１個以下であってもよい。

【０１８３】

相同抗体

さらに別の実施形態において、本発明の抗体は、好ましい抗ＬＳＲ抗体から単離された抗ＬＳＲアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、かつ親抗ＬＳＲ抗体の所望の機能特性を保持している。

【０１８４】

本明細書において、２つのアミノ酸配列間の相同性（homology）（％）は、２つのアミノ酸配列間の同一性（identity）（％）と同じ意味である。２つの配列間の同一性（％）は、これらの配列においてアミノ酸が一致している位置の数の関数（すなわち、相同性（％）＝一致している位置の数／位置の総数×１００）で表され、２つの配列のアライメントを最適化するために導入する必要のあるギャップの数およびギャップの長さが考慮に入

れられている。２つの配列間の配列比較および同一性（％）の決定は、以下の例示（ただしこれらに限定されない）に記載されているように、数学的アルゴリズムを使用して行うことができる。

【０１８５】

２つのアミノ酸配列間の同一性（％）は、PAM120残基質量表を使用し、ギャップ長ペナルティ＝１２、ギャップペナルティ＝４として、ALIGNプログラム（バージョン２．０）に組み込まれたE. MeyersおよびW. Miller（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）のアルゴリズムを用いて決定することができる。さらに、２つのアミノ酸配列間の同一性（％）は、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかを使用し、ギャップウェイト＝１６、１４、１２、１０、８、６、または４、ギャップ長ウェイト＝１、２、３、４、５、または６として、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（市販）に含まれるＧＡＰプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)）のアルゴリズムを用いて決定することもできる。

【０１８６】

上記に加えてまたは別法として、たとえば関連配列を同定する目的で、本発明のタンパク質配列を「クエリー配列」として使用して公共データベースを検索することもできる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J Mol. Biol. 215:403-10によるXBLASTプログラム（バージョン２．０）を使用して行うことができる。XBLASTプログラム（スコア＝５０、ワード長＝３）によりBLASTタンパク質検索を行い、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較を行う目的でギャップが挿入されたアライメントを得るためには、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のGapped BLASTを使用することができる。BLASTプログラムおよびGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム（たとえばXBLASTおよびNBLAST）の初期パラメータを使用することができる。

【０１８７】

保存的修飾を有する抗体

特定の実施形態において、本発明の抗体は、ＣＤＲ１配列、ＣＤＲ２配列およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域と、ＣＤＲ１配列、ＣＤＲ２配列およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体であって、これらのＣＤＲ配列の１つ以上が、本明細書に記載の方法を使用して単離および調製された好ましい抗ＬＳＲ抗体に基づく特定のアミノ酸配列またはこのアミノ酸配列が保存的に修飾された配列を含むこと、ならびに当該抗体が、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体の所望の機能特性を保持していることを特徴とする。

【０１８８】

実施形態のいくつかにおいて、抗ＬＳＲ抗体は、たとえば、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体のいずれであってもよい。

【０１８９】

本明細書において「保存的配列修飾」は、上記アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に顕著な影響または変化を及ぼさないアミノ酸修飾を指す。このような保存的修飾は、アミノ酸の置換、付加および欠失を包含する。修飾は、たとえば部位特異的突然変異誘発およびＰＣＲ突然変異誘発などの当技術分野において公知の標準的な技術によって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、特定のアミノ酸残基を類似した側鎖を有する別のアミノ酸残基で置換することである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当技術分野において定義されている。これらのファミリーとして、塩基性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β－分枝側鎖を有するアミノ酸（たとえば、トレオニン、バ

リン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（たとえば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体のＣＤＲ領域内の１個以上のアミノ酸残基は、同一の側鎖ファミリーに属する他のアミノ酸残基と置換することができ、このようにして改変された抗体は、本明細書に記載の機能アッセイを使用して、特定の機能（すなわち上記（ｃ）～（ｊ）に記載の機能）を保持しているかどうかを評価することができる。

【０１９０】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲと同一のエピトープに結合する抗体

別の実施形態において、本発明は、共刺激の調節およびこれに関連する機能などの所望の機能特性を有する、ヒトＬＳＲ上の好ましいエピトープに結合する抗体を提供する。所望のエピトープ特異性を有する他の抗体を選択してもよく、このような抗体は、ＬＳＲ抗原との結合において所望の抗体と交差競合する能力を有するであろう。

【０１９１】

遺伝子操作された抗体および修飾された抗体

本発明の実施形態の少なくともいくつかにおいて、出発物質としての抗ＬＳＲ抗体に由来するV_H配列および／またはV_L配列を１つ以上有する抗体を使用して、遺伝子操作により修飾抗体を作製することができ、このような修飾抗体は、出発抗体に由来する特性が改変されたものであってもよい。抗体は、片方または両方の可変領域（すなわちV_Hおよび／またはV_L）の１つ以上の残基を修飾することによって遺伝子操作することができ、たとえば１つ以上のＣＤＲ領域および／または１つ以上のフレームワーク領域の１つ以上の残基を修飾することによって抗体を遺伝子操作することができる。上記に加えてまたは別法として、たとえば抗体のエフェクター機能を改変する目的で、定常領域の残基を修飾して抗体を遺伝子操作することができる。

【０１９２】

実施可能な可変領域に対する遺伝子操作の１つとして、ＣＤＲの移植が挙げられる。抗体は、６つの重鎖および軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）に存在するアミノ酸残基を主に介して標的抗原と相互作用する。このことから、ＣＤＲのアミノ酸配列は、ＣＤＲ以外の配列よりも抗体ごとに大きく異なる。ＣＤＲ配列は抗体－抗原相互作用の大部分を担っているため、特定の天然抗体のＣＤＲ配列をこの抗体とは異なる特性を有する別の抗体のフレームワーク配列に移植した発現ベクターを構築することによって、この天然抗体が有する特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である（たとえば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033；Winterに付与された米国特許第5,225,539号；ならびにQueenらに付与された米国特許第5,530,101号；第5,585,089号；第5,693,762号；および第6,180,370号を参照されたい）。

【０１９３】

適切なフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体の遺伝子配列を含む公共ＤＮＡデータベースまたは公表されている文献から得ることができる。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系ＤＮＡ配列は、（インターネット上で利用可能な）「ＶＢａｓｅ」ヒト生殖細胞系配列データベースから得ることができ、さらに、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” J. Mol. Biol. 227:776-798; および Cox, J. P. L. et al. (1994) “A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” Eur. J Immunol. 24:827-836（これら文献の内容は本明細書の一部を構成するものとして援用される）にも記載されている。

【０１９４】

可変領域を修飾するための別の方法として、V_Hおよび／またはV_LのＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域および／またはＣＤＲ３領域のアミノ酸残基を変異させることにより、目的の抗体の１つ以上の結合特性（たとえば親和性）を向上させることが挙げられる。部位特異的突然変異誘発またはＰＣＲ突然変異誘発を実施することにより突然変異を導入することができ、また、変異導入が抗体の結合性または目的とする他の機能特性に及ぼす効果は、適切なインビトロアッセイまたはインビボアッセイで評価することができる。（上述したような）保存的修飾を導入することが好ましい。突然変異はアミノ酸の置換、付加または欠失であってもよいが、アミノ酸の置換であることが好ましい。さらに、通常、ＣＤＲ領域の１個以下、２個以下、３個以下、４個以下または５個以下の残基が改変される。

【０１９５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる遺伝子操作された抗体は、たとえば抗体の特性を向上させることなどを目的として、V_Hおよび／またはV_Lのフレームワーク残基に修飾がなされたものを含む。通常、このようなフレームワーク修飾は抗体の免疫原性を低下させる目的で行われる。たとえば、このような方法の１つとして、１個以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列へと「復帰突然変異させる」方法が挙げられる。より具体的には、体細胞突然変異を経た抗体は、この抗体が由来する生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を含んでいてもよい。このような残基は、抗体のフレームワーク配列と、この抗体が由来する生殖細胞系配列とを比較することによって同定することができる。

【０１９６】

フレームワーク領域またはＣＤＲ領域になされる修飾に加えてまたはこの別法として、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、Ｆｃ領域に修飾が加えられるように遺伝子操作してもよく、このような修飾は、通常、血清中半減期、補体結合、Ｆｃ受容体結合、および／または抗原依存性細胞傷害などの抗体の１つ以上の機能特性を改変するために行われる。さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、化学的に修飾してもよく（たとえば、１つ以上の化学成分を抗体に結合させることができる）、その糖鎖を改変するために修飾を行ってもよく、これらの場合においても抗体の１つ以上の機能特性を改変するために修飾が行われる。このような実施形態については以下で詳細に説明する。Ｆｃ領域の残基はＫａｂａｔによるＥＵインデックスに従いナンバリングする。

【０１９７】

一実施形態では、C_H1のヒンジ領域を修飾して、ヒンジ領域のシステイン残基数がたとえば増加または減少するように改変する。この方法は、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号にさらに詳細に説明されている。C_H1のヒンジ領域のシステイン残基数の改変は、たとえば軽鎖および重鎖の構築を容易にしたり、抗体の安定性を増加また減少させたりするために行われる。

【０１９８】

別の実施形態では、抗体のＦｃヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、Ｆｃ－ヒンジフラグメントのC_H2－C_H3ドメインの界面領域に１つ以上のアミノ酸突然変異を導入することによって、ブドウ球菌プロテインＡ（ＳｐＡ）に対する抗体の結合性を、ネイティブＦｃヒンジドメイン－ＳｐＡ結合よりも低下させる。この方法は、Wardらによる米国特許第6,165,745号にさらに詳細に説明されている。

【０１９９】

別の実施形態では、抗体を修飾してその生物学的半減期を増加させる。様々な方法を採用することができる。たとえば、Wardによる米国特許第6,277,375号に記載されているように、Ｔ２５２Ｌ、Ｔ２５４Ｓ、Ｔ２５６Ｆの突然変異の１つ以上を導入することができる。別法として、Prestaらによる米国特許第5,869,046号および第6,121,022号に記載されているように、ＩｇＧのＦｃ領域のC_H2ドメインの２つのループから得られたサルベージ受容体結合エピトープがC_H1領域またはC_L領域に含まれるように抗体を改変するこ

とによって、生物学的半減期を増加させることができる。

【０２００】

さらに別の実施形態では、Ｆｃ領域の少なくとも１個のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基で置換して改変することにより、抗体のエフェクター機能を改変する。たとえば、２３４番目、２３５番目、２３６番目、２３７番目、２９７番目、３１８番目、３２０番目および３２２番目のアミノ酸残基から選択される１個以上のアミノ酸を別のアミノ酸残基で置換することによって、親抗体の抗原結合能力を保持させつつ、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性を改変することができる。親和性が改変された抗体が認識するエフェクターリガンドは、たとえばＦｃ受容体または補体のＣ１成分であってもよい。この方法は、Winterらによる米国特許第5,624,821号および第5,648,260号にさらに詳細に説明されている。

【０２０１】

別の実施形態では、３２９番目、３３１番目および３２２番目のアミノ酸残基から選択される１個以上のアミノ酸を別のアミノ酸残基で置換することによって、抗体のＣ１ｑ結合性を改変させ、かつ／または抗体の補体依存性細胞傷害作用（ＣＤＣ）を低下または欠失させることができる。この方法は、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号にさらに詳細に説明されている。

【０２０２】

別の実施形態では、２３１番目および２３９番目のアミノ酸残基の１個以上を改変することによって、抗体が補体を結合する能力を改変する。この方法は、BodmerらによるＰＣＴ国際公開WO 94/29351にさらに詳細に説明されている。

【０２０３】

さらに別の実施形態では、２３８番目、２３９番目、２４８番目、２４９番目、２５２番目、２５４番目、２５５番目、２５６番目、２５８番目、２６５番目、２６７番目、２６８番目、２６９番目、２７０番目、２７２番目、２７６番目、２７８番目、２８０番目、２８３番目、２８５番目、２８６番目、２８９番目、２９０番目、２９２番目、２９３番目、２９４番目、２９５番目、２９６番目、２９８番目、３０１番目、３０３番目、３０５番目、３０７番目、３０９番目、３１２番目、３１５番目、３２０番目、３２２番目、３２４番目、３２６番目、３２７番目、３２９番目、３３０番目、３３１番目、３３３番目、３３４番目、３３５番目、３３７番目、３３８番目、３４０番目、３６０番目、３７３番目、３７６番目、３７８番目、３８２番目、３８８番目、３８９番目、３９８番目、４１４番目、４１６番目、４１９番目、４３０番目、４３４番目、４３５番目、４３７番目、４３８番目または４３９番目のアミノ酸の１個以上を修飾することによってＦｃ領域を修飾し、抗体が抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を媒介する能力を増強させ、かつ／またはＦｃγ受容体に対する抗体の親和性を増加させる。この方法は、PrestaによるＰＣＴ国際公開WO 00/42072にさらに詳細に説明されている。さらに、ヒトＩｇＧ１上のＦｃγＲＩ結合部位、ＦｃγRII結合部位、ＦｃγRIII結合部位およびＦｃＲｎ結合部位はマッピングされており、結合性を向上させたバリアントが文献に記載されている（Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照されたい）。また、２５６番目、２９０番目、２９８番目、３３３番目、３３４番目および３３９番目における特異的突然変異は、ＦｃγRIIIに対する結合性を向上させることが示されている。さらに、Ｔ２５６Ａ／Ｓ２９８Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｋ２２４ＡおよびＳ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａの多重突然変異によりＦｃγRIIIに対する結合性が向上することが示されている。さらに、Ｍ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６ＥまたはＭ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓなどの突然変異は、ＦｃＲｎに対する結合性を向上させ、抗体の循環半減期を延長させる（Chan CA and Carter PJ (2010) Nature Rev Immunol 10:301-316を参照されたい）。

【０２０４】

さらに別の実施形態では、抗体の糖鎖を改変する。たとえば、脱グリコシル化された抗体（すなわち糖鎖を持たない抗体）を作製することができる。糖鎖を改変することによっ

て、たとえば、抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。このような糖鎖の改変は、たとえば、抗体配列の１つ以上のグリコシル化部位を改変することによって行うことができる。たとえば、１個以上のアミノ酸を置換することによって、可変領域のフレームワークから１つ以上のグリコシル化部位を取り除き、その部位の糖鎖を除去することができる。このような脱グリコシル化によって、抗原に対する抗体の親和性を増加させてもよい。このような方法は、Coらによる米国特許第5,714,350号および第6,350,861号にさらに詳細に説明されている。

【０２０５】

上記に加えてまたは別法として、改変された糖鎖を有する抗体を作製することができ、たとえば、フコシル残基の数を減少させた低フコシル化抗体やバイセクティングＧｌｃＮａｃ構造を増加させた抗体などを作製することができる。このようなグリコシル化パターンの改変によって、抗体のＡＤＣＣ能が増強されることが実証されている。このような糖鎖の改変は、たとえば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって行うことができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は当技術分野において知られており、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え抗体を発現させて、改変された糖鎖を有する抗体を産生させるための宿主細胞として使用することができる。たとえば、Ｍｓ７０４細胞株、Ｍｓ７０５細胞株およびＭｓ７０９細胞株はフコシルトランスフェラーゼ（α（１，６）－フコシルトランスフェラーゼ（ＦＵＴ８））遺伝子を欠くことから、Ｍｓ７０４細胞株、Ｍｓ７０５細胞株およびＭｓ７０９細胞株において発現された抗体はその糖鎖にフコースを持たない。このようなＭｓ７０４、Ｍｓ７０５、およびＭｓ７０９ ＦＵＴ８$^{-/-}$細胞株は、２種の置換ベクターを使用してＣＨＯ／ＤＧ４４細胞のＦＵＴ８遺伝子を標的破壊することによって作製される（Yamaneらによる米国特許公開第20040110704号およびYamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照されたい）。別の例として、Hanaiらによる欧州特許第1,176,195号には、フコシルトランスフェラーゼをコードするＦＵＴ８遺伝子が機能破壊された細胞株が記載されており、この細胞株において発現された抗体は、α１，６結合に関連する酵素が減少または除去されたことによってフコシル残基の数が減少している。さらに、Hanaiらの文献には、抗体のＦｃ部分に結合するＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加する酵素の活性が低い細胞株、およびこのような酵素活性を有さない細胞株（たとえばラットミエローマ細胞株ＹＢ２／０）（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６６２）が記載されている。PrestaによるＰＣＴ国際公開WO 03/035835には、ＣＨＯ細胞株のバリアント（Ｌｅｃ１３細胞）が記載されており、この細胞株では、Ａｓｎ（２９７番目）に結合した糖鎖にフコースを付加する能力が低減されていることから、この宿主細胞において発現された抗体のフコシル残基数も低減されている（Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照されたい）。UmanaらによるＰＣＴ国際公開WO 99/54342には、糖タンパク質修飾を行うグリコシルトランスフェラーゼ（たとえば、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（ＧｎＴIII））を発現するように遺伝子操作された細胞株が記載されており、この遺伝子操作された細胞株において発現される抗体は、バイセクティングＧｌｃＮａｃ構造が増加しており、その結果、抗体のＡＤＣＣ活性が増強されている（Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照されたい）。別法として、フコシダーゼを使用して抗体のフコース残基を切断してもよい。たとえば、α－Ｌ－フコシダーゼというフコシダーゼは、抗体からフコシル残基を取り除く（Tarentino, A. L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23）。

【０２０６】

本明細書において実施可能な別の抗体修飾として、ＰＥＧ化が挙げられる。たとえば抗体の生物学的（たとえば血清中）半減期を増加させることなどを目的として、抗体をＰＥＧ化することができる。抗体をＰＥＧ化するためには、通常、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体フラグメントと結合するような条件下において、抗体またはそのフラグメントをポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（たとえばＰＥＧの反応性エステル誘導体または反応性アルデヒド誘導体など）と反応させる。ＰＥＧ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似

の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応により行うことが好ましい。本明細書において「ポリエチレングリコール」は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されるあらゆる形態のＰＥＧを包含し、たとえば、モノ（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$）アルコキシポリエチレングリコール、モノ（$Ｃ_{1}$～$Ｃ_{10}$）アリールオキシポリエチレングリコール、およびポリエチレングリコールマレイミドが挙げられる。特定の実施形態では、脱グリコシル化抗体をＰＥＧ化する。タンパク質をＰＥＧ化する方法は当技術分野において公知であり、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に使用することができる。たとえば、Nishimuraらによる欧州特許第0 154 316号およびIshikawaらによる欧州特許第0 401 384号を参照されたい。

【０２０７】

抗体の遺伝子操作方法

上述したように、本明細書に開示されている$Ｖ_{H}$配列および$Ｖ_{K}$配列を有する抗ＬＳＲ抗体の$Ｖ_{H}$配列および／もしくは$Ｖ_{L}$配列またはこれらの配列に結合した定常領域を修飾することによって、新たな抗ＬＳＲ抗体を作製することができる。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる別の一態様においては、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体の構造上の特徴を利用して、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体の少なくとも１つの機能特性（たとえばヒトＬＳＲに対する結合性など）を保持する構造的に関連した抗ＬＳＲ抗体を作製する。たとえば、上述したように、１つのＬＳＲ抗体またはその突然変異体の１つ以上ＣＤＲ領域と、公知のフレームワーク領域および／または他のＣＤＲとを組換え技術により組み合わせることによって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる遺伝子操作された別の組換え抗ＬＳＲ抗体を作製することができる。他のタイプの修飾としては上述の章に記載したものが挙げられる。上記の遺伝子操作方法における出発物質は、本明細書に記載の$Ｖ_{H}$配列および／または$Ｖ_{K}$配列の１つ以上、またはこれらのＣＤＲ領域の１つ以上である。遺伝子操作された抗体を作製するためには、本明細書に記載の$Ｖ_{H}$配列および／もしくは$Ｖ_{K}$配列の１つ以上またはこれらの配列のＣＤＲ領域の１つ以上を有する抗体を実際に調製することは必要とされない（すなわちタンパク質として発現させることは必要とされない）。このような抗体を実際に調製するのではなく、これらの配列に含まれている情報を出発物質として使用して、元の配列に由来する「第二世代」の配列を作製し、次いでこの「第二世代」の配列をタンパク質として調製および発現させる。

【０２０８】

標準的な分子生物学的技術を使用して、改変した抗体配列を調製したり発現させることができる。

【０２０９】

改変された抗体配列によってコードされる抗体は、本明細書に記載の方法および配列を使用して作製された抗ＬＳＲ抗体の機能特性のうちの１つ、いくつか、またはすべてを保持するものであることが好ましく、このような機能特性として、特定の$Ｋ_{D}$値以下でＬＳＲ抗原に結合すること、Ｂ７共刺激を調節すること、およびたとえばＬＳＲ抗原を発現している細胞などの所望の標的細胞に選択的に結合することが挙げられる。

【０２１０】

改変された抗体の機能特性は、当技術分野において使用可能かつ／または本明細書に記載の標準的なアッセイを使用して評価することができる。

【０２１１】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を遺伝子操作するための方法の特定の実施形態において、抗ＬＳＲ抗体をコードする配列の全体またはその一部に沿ってランダムまたは選択的に突然変異を導入し、その結果得られた改変抗ＬＳＲ抗体を結合活性および／または他の所望の機能特性についてスクリーニングすることができる。

【０２１２】

突然変異の導入方法は当技術分野において知られている。たとえば、ShortによるＰＣＴ国際公開WO 02/092780には、飽和突然変異誘発、合成ライゲーションアセンブリ、また

はこれらの組み合わせを使用して抗体突然変異体を作製し、次いでこの抗体をスクリーニングする方法が記載されている。別法として、LazarらによるＰＣＴ国際公開WO 03/074679には、コンピュータによるスクリーニング方法を使用して抗体の生理化学的な特性を最適化する方法が記載されている。

【０２１３】

抗体をコードする核酸分子

本発明の別の一態様は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、細胞中または細胞溶解物中に含まれていてもよく、部分的に精製された形態であっても実質的に純粋な形態であってもよい。核酸は、アルカリ／ＳＤＳ処理、ＣｓＣｌバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、当技術分野でよく知られている他の方法などの標準的な技術によって、他の細胞成分または他の汚染物質（たとえば他の細胞核酸またはタンパク質）を除去する精製工程を経た場合に「単離された」または「実質的に純粋である」と言える。F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照されたい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸は、たとえばＤＮＡであってもＲＮＡであってもよく、イントロン配列を含んでいても含んでいなくてもよい。好ましい実施形態では、核酸はｃＤＮＡ分子である。

【０２１４】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸は、標準的な分子生物学的技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（たとえば、さらに詳しくは後述するような、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスから作製されたハイブリドーマ）により発現される抗体の場合、標準的なＰＣＲ増幅またはｃＤＮＡクローン技術を使用して、該ハイブリドーマにより産生される抗体の軽鎖および重鎖をコードするｃＤＮＡを得ることができる。（たとえば、ファージディスプレイ技術を使用して）免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから抗体を得る場合は、抗体をコードする核酸を該ライブラリーから回収することができる。

【０２１５】

V_HセグメントコードするＤＮＡ断片およびV_LセグメントをコードするＤＮＡ断片を得た後、これらのＤＮＡ断片を標準的な組換えＤＮＡ技術によってさらに操作し、たとえば、これらの可変領域遺伝子を、完全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂフラグメント遺伝子またはｓｃＦｖ遺伝子に変換することができる。これらの操作では、V_LまたはV_HをコードするＤＮＡ断片は、抗体定常領域やフレキシブルリンカーなどの別のタンパク質をコードする別のＤＮＡ断片に機能可能に連結される。

【０２１６】

本明細書において「機能可能に連結する」とは、上記２種のＤＮＡ断片によりコードされるそれぞれのアミノ酸配列をインフレームに維持したまま、上記２種のＤＮＡ断片を連結させることを指す。

【０２１７】

V_H領域をコードする単離されたＤＮＡは、重鎖定常領域（C_H1、C_H2およびC_H3）をコードする別のＤＮＡ分子に機能可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野において公知であり（たとえば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）、ヒト重鎖定常領域を含むＤＮＡ断片は標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはＩｇＤの定常領域であってよいが、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４の定常領域が最も好ましい。Ｆａｂフラグメントの重鎖遺伝子は、V_HをコードするＤＮＡを、重鎖C_H1定常領域のみをコードする別のＤＮＡ分子に機能可能に連結することにより作製することができる。

【０２１８】

V_L領域をコードする単離されたＤＮＡは、軽鎖定常領域（C_L）をコードする別のＤＮＡ分子に機能可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子（Ｆａｂ軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野において公知であり（たとえば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）、ヒト軽鎖定常領域を含むＤＮＡ断片は標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域はκ定常領域またはλ定常領域であってよいが、κ定常領域が最も好ましい。

【０２１９】

ｓｃＦｖ遺伝子の作製は、V_HをコードするＤＮＡ断片およびV_LをコードするＤＮＡ断片を、フレキシブルリンカー（たとえばアミノ酸配列（$Gly_4-Ser)_3$など）をコードする別のフラグメントに機能可能に連結させ、次いで、V_H領域とV_L領域とがフレキシブルリンカーによって連結された一本の連続したタンパク質鎖としてV_H配列およびV_L配列を発現させることによって行うことができる（たとえば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照されたい）。

【０２２０】

抗ＬＳＲモノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は慣用のモノクローナル抗体方法論（たとえば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495に記載の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術など）を包含する様々な技術によって作製することができる。原則として、体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいが、モノクローナル抗体を作製するための他の技術（たとえば、Ｂリンパ球のウイルス形質転換または発がん性形質転換など）を使用することもできる。

【０２２１】

ハイブリドーマを作製するための動物系としてはマウス系が好ましい。マウスにおけるハイブリドーマの作製は十分に確立された手法である。融合に用いる免疫した脾細胞を単離するための免疫化プロトコルおよび免疫化技術は、当技術分野において知られている。融合パートナー（たとえばマウスミエローマ細胞）および融合手順も公知である。

【０２２２】

本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体は、上述のように作製したマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて作製することができる。上記の重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードするＤＮＡは、目的とする抗体を産生するマウスハイブリドーマから得ることができ、標準的な分子生物学技術を使用して、非マウス（たとえばヒト）の免疫グロブリン配列を含有するように遺伝子操作することができる。たとえば、当技術分野で公知の方法を使用してマウス可変領域をヒト定常領域に連結することによって、キメラ抗体を作製することができる（たとえば、Cabillyらに付与された米国特許第4,816,567号を参照されたい）。また、当技術分野で公知の方法を使用してマウスＣＤＲ領域をヒトフレームワークに挿入することによって、ヒト化抗体を作製することができる（たとえば、Winterに付与された米国特許第5,225,539号；ならびにQueenらに付与された米国特許第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,762号および第6,180,370号を参照されたい）。

【０２２３】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の抗体はヒトモノクローナル抗体である。ＬＳＲに対するヒトモノクローナル抗体は、マウス免疫系の代わりにヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソミックマウスを使用して作製することができる。このようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソミックマウスは、本明細書においてＨｕＭＡｂマウス（登録商標）およびＫＭマウス（登録商標）と呼ばれるマウスを包含し、本明細書においてこれらのマウスは合わせて「ヒトＩｇマウス」と呼ばれる。ＨｕＭＡｂマウス（Medarex社）は、内因性のμ鎖座およびκ鎖座を不活性化する標的突然変異を有し、再構築されていないヒト重鎖（μ鎖および

γ鎖）免疫グロブリン配列およびヒトκ軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座を含んでいる（たとえばLonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859を参照されたい）。したがって、このマウスはマウスＩｇＭまたはマウスκ鎖の発現が低下しており、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子のクラススイッチおよび体細胞突然変異を起こし、高親和性のヒトＩｇＧκモノクローナル抗体を産生する（前掲のLonberg, N. et al. (1994）に記載されており；Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546においてレビューされている）。ＨｕＭａｂマウスの作製および使用、ならびにこのマウスが持つゲノム修飾については、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6:579-591;およびFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851にさらに詳細に記載されており、これらの文献の具体的内容はその全体が本明細書の一部を構成するものとして援用される。さらに、LonbergおよびKayに付与された米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,789,650号、第5,877,397号、第5,661,016号、第5,814,318号、第5,874,299号、および第5,770,429号；Suraniらに付与された米国特許第5,545,807号；LonbergおよびKayに付与されたＰＣＴ国際公開WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884およびWO 99/45962；およびKormanらに付与されたＰＣＴ国際公開WO 01/14424も参照されたい。

【０２２４】

別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体は、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を持つマウス（たとえば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を持つマウスなど）を使用して作製することができる。本明細書において「ＫＭマウス」と呼ばれるマウスは、Ishidaらに付与されたＰＣＴ国際公開WO 02/43478に詳しく説明されている。

【０２２５】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランスジェニック動物系も当技術分野において使用することができ、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体を作製するために使用することができる。たとえば、Xenomouse（アブジェニックス社）と呼ばれる別のトランスジェニック系を使用することができ、このマウスは、たとえば、Kucherlapatiらに付与された米国特許第5,939,598号、第6,075,181号、第6,114,598号、第6,150,584号および第6,162,963号に記載されている。

【０２２６】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランスクロモソミック動物系も当技術分野において使用することができ、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体を作製するために使用することができる。たとえば、「ＴＣマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を持つマウスを使用することができ、このマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体を持つウシが当技術分野において報告されており（Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894）、このウシも、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体を作製するために使用することができる。

【０２２７】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して作製することもできる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ

法は当技術分野において確立されている。たとえば、Ladnerらに付与された米国特許第5,223,409号、第5,403,484号、および第5,571,698号；Dowerらに付与された米国特許第5,427,908号および第5,580,717号；McCaffertyらに付与された米国特許第5,969,108号および第6,172,197号；ならびにGriffithsらに付与された米国特許第5,885,793号、第6,521,404号、第6,544,731号、第6,555,313号、第6,582,915号および第6,593,081号を参照されたい。

【０２２８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒトモノクローナル抗体は、免疫化によりヒト抗体応答を惹起できるように再構築されたヒト免疫細胞を有するＳＣＩＤマウスを使用して作製することもできる。このようなマウスは、たとえば、Wilsonらに付与された米国特許第5,476,996号および第5,698,767号に記載されている。

【０２２９】

ヒトＩｇマウスの免疫化

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体を作製するためにヒトＩｇマウスを使用する場合、このマウスを、ＬＳＲ抗原および／または組換えＬＳＲもしくはＬＳＲ融合タンパク質の精製調製物または濃縮調製物で免疫することができ、このような方法は、Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851；ならびにＰＣＴ国際公開WO 98/24884およびWO 01/14424に記載されている。６～１６週齢のマウスに最初の注入を行うことが好ましい。たとえば、ＬＳＲ抗原の精製調製物または組換え調製物（５～５０μｇ）を腹腔内投与することによりヒトＩｇマウスを免疫することができる。

【０２３０】

他の研究者による様々な抗原を用いた過去の実験より、まず、完全フロイントアジュバントを加えた抗原を腹腔内（ＩＰ）投与することにより免疫し、次いで、不完全フロイントアジュバントを加えた抗原を２週間に１回腹腔内投与することにより免疫（計６回まで）すると、トランスジェニックマウスにおいて応答が確認されることが示されている。しかしながら、フロイント以外のアジュバントも効果的であることが分かっている。さらに、アジュバント非存在下の細胞は免疫原性が高いことが分かっている。後眼窩採血によって得られる血漿試料を使用して、免疫化プロトコル中に免疫応答をモニターすることができる。（後述の）ＥＬＩＳＡによって血漿をスクリーニングすることができ、抗ＬＳＲヒト免疫グロブリンの力価が十分に高いマウスを融合に使用することができる。屠殺および脾臓摘出の３日前に、抗原をマウスに静脈内投与することによりブーストを行うことができる。それぞれの抗原の免疫化につき２～３回の融合が必要であると予想される。通常、抗原それぞれに対して６～２４匹のマウスを免疫する。通常、ＨＣｏ７株およびＨＣｏ１２株を使用する。さらに、ＨＣｏ７由来導入遺伝子とＨＣｏ１２由来導入遺伝子とを交配して、２種の異なるヒト重鎖導入遺伝子（ＨＣｏ７／ＨＣｏ１２）を有する単一のマウスを作製することもできる。別法としてまたは上記に加えて、ＫＭマウス株を使用することもできる。

【０２３１】

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、免疫したマウスから脾細胞および／またはリンパ節細胞を単離し、マウスミエローマ細胞株などの適切な不死化細胞株と融合させることにより作製することができる。このようにして得られたハイブリドーマから抗原特異的抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることができる。たとえば、免疫したマウスから得られた脾リンパ球の単一細胞懸濁液と、６分の１の細胞数のP3X63-Ag8.653マウス非分泌型ミエローマ細胞（ATCC、CRL 1580）とを５０％ＰＥＧを用いて融合させることができる。平底マイクロタイタープレートに約2×10^5個の細胞を播種し、次いで、20% fetal Clone Serum、18%「653」調整培地、5% origen（IGEN）、4mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM ２－メルカプトエタノール、50単位/mLペニシリン、50mg/mLストレプトマ

イシン、50mg/mLゲンタマイシンおよび１×ＨＡＴ（Sigma；ＨＡＴは融合の２４時間後に添加する）を含む選択培地中で２週間インキュベートする。約２週間後、ＨＡＴの代わりにＨＴを添加した培地中で細胞を培養することができる。次いで、各ウェルをヒトモノクローナルＩｇＭ抗体およびＩｇＧ抗体についてＥＬＩＳＡによってスクリーニングすることができる。ハイブリドーマが広範に増殖してから、通常１０～１４日後に培地を観察することができる。抗体を分泌するハイブリドーマを再び播種して、再度スクリーニングを行い、ヒトＩｇＧがなお陽性であれば、このモノクローナル抗体を限界希釈法により少なくとも２回サブクローニングすることができる。次いで、安定なサブクローンを特性評価用の組織培養培地でインビトロ培養して少量の抗体を産生させることができる。

【０２３２】

ヒトモノクローナル抗体の精製を目的として、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用の２Ｌスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清をろ過および濃縮した後、プロテインＡセファロース（ファルマシア（ニュージャージー州ピスカタウェイ））を用いたアフィニティークロマトグラフィーに付することができる。溶出されたＩｇＧをゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで確認し、純度を確保することができる。緩衝液をＰＢＳに交換し、吸光係数１．４３を用いてＯＤ２８０で濃度を測定することができる。モノクローナル抗体は小分けし－８０℃で保存することができる。

【０２３３】

モノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの作製

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、たとえば当技術分野においてよく知られているような組換えＤＮＡ技術と遺伝子導入技術との組み合わせなどを使用して、宿主細胞であるトランスフェクトーマから作製することもできる（たとえばMorrison, S. (1985) Science 229:1202を参照されたい）。

【０２３４】

たとえば、抗体またはその抗体フラグメントを発現させることを目的として、完全長軽鎖および完全長重鎖またはそれらの一部をコードするＤＮＡを、標準的な分子生物学技術（たとえば目的の抗体を発現するハイブリドーマを使用したＰＣＲ増幅またはｃＤＮＡクローニング）によって得た後、このＤＮＡを発現ベクターに挿入して、該遺伝子を転写制御配列および翻訳制御配列に機能可能に連結させることができる。本明細書において「機能可能に連結する」とは、ベクター内の転写制御配列および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を制御するという本来の機能を発揮できるように、抗体遺伝子をベクターにライゲートすることを意味する。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用する発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入することができるが、より一般的には両方の遺伝子を同一の発現ベクターに挿入する。これらの抗体遺伝子は、標準的な方法（たとえば、抗体遺伝子フラグメントおよびベクターの相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合は平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに挿入される。本明細書に記載の抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を使用して、あらゆる抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製することができる。すなわち、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域がすでにコードされている発現ベクターに、本明細書に記載の抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を挿入し、ベクター内のC_Hセグメントに重鎖可変領域のV_Hセグメントを機能可能に連結し、かつベクター内のC_Lセグメントに軽鎖可変領域のV_Kセグメントを機能可能に連結することによって、あらゆる抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製することができる。上記に加えてまたは別法として、上記の組換え発現ベクターには、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドがコードされていてもよい。該シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち非免疫グロブリンタンパク質に由来するシグナルペプチド）であってもよい。

【０２３５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターは、上記の抗体鎖遺伝子に加えて、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保有する。「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（たとえばポリアデニル化シグナル）を包含する。このような調節配列は、たとえば、Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節配列の選択を包含する発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子によって左右されうることは当業者であれば十分に理解できるであろう。哺乳動物宿主細胞における発現に好適な調節配列としては、哺乳動物細胞においてタンパク質を高発現させるウイルスエレメント、たとえば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、アデノウイルス（たとえばアデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））、およびポリオーマに由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーが挙げられる。あるいは、ユビキチンプロモーターやβ－グロビンプロモーターなどの非ウイルス性調節配列を使用してもよい。さらに、由来の異なる様々な配列から構成される調節エレメント、たとえば、ＳＶ４０早期プロモーターに由来する配列とヒトＴ細胞白血病ウイルス１型の長い末端反復配列に由来する配列とを含むＳＲαプロモーター系（Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472）などが挙げられる。

【０２３６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターは、上記の抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、たとえば、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（たとえば複製開始点）および選択マーカー遺伝子などのさらなる配列を保有していてもよい。選択マーカー遺伝子によって、ベクターが導入された宿主細胞の選択が容易となる（たとえば、Axelらに付与された米国特許第4,399,216号、第4,634,665号、第5,179,017号を参照されたい）。たとえば、通常、選択マーカー遺伝子は、Ｇ４１８、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に付与する。好ましい選択マーカー遺伝子としては、（メトトレキサートにより選択／増幅が行われるｄｈｆｒ－宿主細胞において使用される）ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子および（Ｇ４１８選択用の）ｎｅｏ遺伝子が挙げられる。

【０２３７】

上記の軽鎖および重鎖を発現させることを目的として、上記の軽鎖および重鎖をコードする発現ベクターを標準的な技術を用いて宿主細胞にトランスフェクトする。「トランスフェクション」という用語およびこの用語の変化形は、たとえば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、ＤＥＡＥ－デキストランによるトランスフェクションなどの、原核宿主細胞または真核宿主細胞に外来性ＤＮＡを導入するために一般的に使用される様々な技術を包含する。理論上、原核宿主細胞および真核宿主細胞のいずれにおいても本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を発現させることが可能であるが、真核細胞、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞において抗体を発現させることが最も好ましく、これは、このような真核細胞、具体的には哺乳動物細胞は、原核細胞と比較して、適切に折りたたまれかつ免疫学的に活性な抗体を構築し分泌する可能性がより高いからである。抗体遺伝子を原核細胞において発現させても、活性な抗体を高収率で産生させることはできないことが報告されている（Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13）。

【０２３８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組み換え抗体を発現させるのに好ましい哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞）（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されているｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞が挙げられ、この細胞は、たとえばR. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621などに記載されているように、ＤＨＦＲ選択マーカーとともに使用される）、ＮＳＯミエローマ細胞、ＣＯＳ細胞、およびＳＰ２細胞が挙げられる。

具体的には、ＮＳＯミエローマ細胞を使用する場合、別の好ましい発現系は、WO 87/04462、WO 89/01036および欧州特許第338,841号に開示されているＧＳ遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞において抗体を発現させるのに十分な時間、より好ましくは、宿主細胞が増殖している培養培地中に抗体が分泌されるのに十分な時間にわたって宿主細胞を培養することにより抗体を作製する。抗体は標準的なタンパク質精製法を使用して培養培地から回収することができる。

【０２３９】

抗原に対する抗体の結合の特性評価

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、たとえば標準的なＥＬＩＳＡなどによって、ＬＳＲに対する結合性を評価することができる。簡単に述べると、ＰＢＳ中０．２５μｇ／ｍＬの精製ＬＳＲでマイクロタイタープレートをコーティングし、ＰＢＳ中５％ウシ血清アルブミンでブロッキングする。希釈した抗体（たとえば免疫したマウスから得た血漿を希釈したもの）を各ウェルに加え、３７℃で１～２時間インキュベートする。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼ標識第２試薬（たとえば、ヒト抗体に対しては、ヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ特異的ポリクローナル試薬）とともに３７℃で１時間インキュベートする。洗浄後、プレートをｐＮＰＰ基質（１ｍｇ／ｍＬ）で発色させ、ＯＤ４０５～６５０で分析する。最も高い力価を示したマウスを融合に使用することが好ましい。

【０２４０】

上述のようにＥＬＩＳＡアッセイを使用して、ＬＳＲ免疫原に対して陽性の反応を示すハイブリドーマをスクリーニングすることもできる。ＬＳＲと高いアビディティで結合するハイブリドーマをサブクローニングし、さらにその特性を評価する。親細胞の反応性（ＥＬＩＳＡで評価）を保持する各ハイブリドーマから１つのクローンを選択し、細胞バンクとして５～１０本のバイアル中に－１４０℃で保存するとともに、抗体精製に使用する。

【０２４１】

抗ＬＳＲ抗体を精製するために、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用の２Ｌスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清をろ過および濃縮した後、プロテインＡセファロース（ファルマシア（ニュージャージー州ピスカタウェイ））を用いたアフィニティークロマトグラフィーに付することができる。溶出されたＩｇＧをゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで確認し、純度を確保することができる。緩衝液をＰＢＳに交換し、吸光係数１．４３を用いてＯＤ２８０で濃度を測定することができる。モノクローナル抗体は小分けし－８０℃で保存することができる。

【０２４２】

選択した抗ＬＳＲモノクローナル抗体が、ユニークなエピトープに結合するかどうか確認するために、市販の試薬（ピアス（イリノイ州ロックフォード））を使用して抗体をビオチン化することができる。非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用した比較試験は、上述したような、ＬＳＲをコーティングしたＥＬＩＳＡプレートを使用して行うことができる。ビオチン化モノクローナル抗体の結合は、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼプローブで検出することができる。

【０２４３】

精製した抗体のアイソタイプを確認するために、特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を使用してアイソタイプＥＬＩＳＡを行うことができる。たとえば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを確認するために、１μｇ／ｍＬ抗ヒト免疫グロブリンでマイクロタイタープレートの各ウェルを４℃で一晩かけてコーティングすることができる。１％ＢＳＡでブロッキングした後、１μｇ／ｍＬ以下の濃度の試験モノクローナル抗体または精製アイソタイプコントロールとプレートとを環境温度において１～２時間反応させる。次いで、ヒトＩｇＧ１またはヒトＩｇＭに特異的なアルカリホスファターゼ標識プローブとウェルとを反応させることができる。上述したようにプレートを発色させて分析する。

【０２４４】
さらに、抗ＬＳＲヒトＩｇＧは、ＬＳＲ抗原との反応性についてウエスタンブロットにより試験することができる。簡単に述べると、ＬＳＲ抗原を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に付することができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロース膜に転写し、１０％ウシ胎仔血清でブロッキングし、試験モノクローナル抗体をプローブとして用いてＬＳＲ抗原を検出する。ヒトＩｇＧの結合は、抗ヒトＩｇＧアルカリホスファターゼを使用して検出することができ、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質錠剤（Sigma Chem社（ミズーリ州セントルイス））で発色させることができる。

【０２４５】
代替足場

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、特異的抗体と類似した特異性および親和性を有する足場タンパク質に関する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結した足場タンパク質を含む抗原結合コンストラクトに関する。遺伝子操作されたこのような足場タンパク質は、通常、ループ領域またはそれ以外の許容される表面部位に突然変異を誘発させたランダムライブラリーを設計し、次いで、ファージディスプレイまたはその関連技術を使用して任意の標的に結合するバリアントを選択することによって得られる。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は代替足場に関し、代替足場としては、アンチカリン（anticalin）、DARPin、アルマジロリピートタンパク質、プロテインＡ、リポカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、チオレドキシン、化学的に束縛されたペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、がん、自己免疫疾患および感染症の治療薬ならびにインビボ診断薬として使用される代替足場に関する。

【０２４６】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、さらに、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【０２４７】
本明細書において「足場タンパク質」は、免疫グロブリン（Ｉｇ）足場を包含するがこれに限定されない。免疫グロブリン（Ｉｇ）足場としては、たとえば、ＩｇＧ足場が挙げられ、免疫グロブリン（Ｉｇ）足場は、四本鎖抗体であっても二本鎖抗体であってもよく、抗体のＦｃ領域のみを含んでいてもよく、抗体の定常領域を１つ以上含んでいてもよく（この定常領域はヒト由来であっても霊長類由来であってもよい）、ヒトまたは霊長類由来の定常領域の人工キメラであってもよい。このような足場タンパク質は、１つ以上の定常領域に加えて抗原結合部位を含んでいてもよく、たとえば、足場タンパク質は完全なＩｇＧを含んでいてもよい。また、上記のような足場タンパク質は、他のタンパク質ドメイン、たとえば抗原結合部位を有するタンパク質ドメイン（たとえばエピトープ結合ドメインまたはｓｃＦｖドメインなど）と連結する能力を有するであろう。

【０２４８】
「ドメイン」は、タンパク質の他の部分から独立した三次構造を持つ折りたたまれたタンパク質構造である。通常、ドメインは、タンパク質が有する独立した様々な機能特性を担い、多くの場合、タンパク質の残りの部分および／または該ドメインの機能を損なうことなく、他のタンパク質に付加されてもよいし、タンパク質から除去されてもよいし、他のタンパク質へと移動されてもよい。「単一の抗体可変ドメイン」は、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む折りたたまれたポリペプチドドメインである。したがって、単一の抗体可変ドメインには、完全な抗体可変ドメインおよび修飾可変ドメインが包含され、たとえば、抗体可変ドメインの特徴を有さない配列によって１つ以上のループが置換された修飾可変ドメイン、切断された抗体可変ドメイン、Ｎ末端伸長またはＣ末端伸長を含む抗体可変ドメイン、ならびに少なくとも完全長ドメインの結合活性および特異性を保持する可変ドメインの折りたたみフラグメントが包含される。

【０２４９】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、Ｖ領域やＶドメインの違いとは無関係に、抗原またはエピトープに特異的に結合する抗体可変ドメイン（V_H、V_HH、V_L）を指す。免疫グロブリン単一可変ドメインは、様々な他の可変領域または可変ドメインを有する形態（たとえばホモ多量体またはヘテロ多量体）であってよく、このような他の可変領域または可変ドメインは、該免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原への結合に必要とされない（すなわち、免疫グロブリン単一可変ドメインは、さらなる可変ドメインとは無関係に抗原に結合する）。「ドメイン抗体」または「ｄＡｂ」は、抗原に結合することが可能な本明細書に記載の「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と同義である。免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインであってもよく、さらに、他の生物種由来の単一抗体可変ドメイン、たとえば、（たとえばWO 00/29004に開示されている）げっ歯類、テンジクザメおよびラクダ科のV_HH ｄＡｂなどをも包含する。ラクダ科V_HHは、軽鎖を欠いた重鎖抗体を天然に産生するラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダおよびグアナコなどの生物種に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドである。このV_HHドメインは、当技術分野において利用可能な標準的な技術によってヒト化してもよく、本発明によれば、このようなドメインも「ドメイン抗体」に包含される。本明細書において「V_H」は、ラクダ科V_HHドメインを包含する。ＮＡＲＶは、テンジクザメなどの軟骨魚類において同定された別のタイプの免疫グロブリン単一可変ドメインである。このドメインは、新規な抗原受容体可変領域（Novel Antigen Receptor variable region；一般にＶ（ＮＡＲ）またはＮＡＲＶと略される）として知られている。詳細については、MoI. Immunol. 44, 656-665 (2006)および米国特許第20050043519(A)号を参照されたい。

【０２５０】

「エピトープ結合ドメイン」は、Ｖ領域またはＶドメインの違いとは関係なく抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインを指す。エピトープ結合ドメインは、ドメイン抗体（ｄＡｂ）（たとえばヒト、ラクダ科、サメ科の免疫グロブリン単一可変ドメイン）であってもよく、ＣＴＬＡ－４（Evibody）；リポカリン；プロテインＡのＺドメイン（Affibody、SpA）、Ａドメイン（Avimer／Maxibody）などのプロテインＡ由来分子；ＧｒｏＥＩおよびＧｒｏＥＳなどの熱ショックタンパク質；トランスフェリン（trans-body）；アンキリンリピートタンパク質（DARPin）；ペプチドアプタマー；Ｃ型レクチン領域（tetranectin）；ヒトγ－クリスタリンおよびヒトユビキチン（affilin）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害薬のサソリ毒kunitz型ドメイン；アルマジロリピートタンパク質；チオレドキシン；ならびにフィブロネクチン（adnectin）からなる群から選択される足場誘導体であるドメインであってもよく、これらの足場誘導体は、天然リガンド以外のリガンドに結合するようにタンパク質工学により遺伝子操作されている。

【０２５１】

抗体のＣＤＲに相当するループを異種配列で置換することにより該抗体に様々な結合特性を付与することができる（すなわちEvibody）。詳細については、Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照されたい。リポカリンは、ステロイド、ビリン、レチノイド、脂質などの疎水性低分子を輸送する細胞外タンパクのファミリーである。リポカリンは、円錐形構造の開放端にいくつかのループを有する強固な二次構造を持ち、このループを遺伝子操作することによって様々な標的抗原に結合させることが可能となる。アンチカリン（anticalin）は、１６０～１８０個のアミノ酸で構成されており、リポカリンに由来する。詳細については、Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、米国特許第7250297(B1)号および米国特許第20070224633号を参照されたい。affibodyは、黄色ブドウ球菌のプロテインＡに由来する足場であり、抗原に結合するように遺伝子操作することができる。affibodyは、３つのヘリックスの束からなり、約５８個のアミノ酸で構成されている。affibodyを含むライブラリーは表面残基をランダム化することによって作製されている。詳細については、Protein Eng. Des. SeI. 17, 455-462 (2004)および欧州特許第1641818(A1)号を参照されたい。アビマー（avimer）は、Ａドメイン足場ファミリーに由来するマルチドメインタンパク質である。アビマーを作製する元となるド

メインは、約３５個のアミノ酸からなり、明確なジスルフィド結合構造をとっている。Ａドメインファミリーに起こる自然変異を様々に組み合わせることによって、アビマーに多様性を持たせることができる。詳細については、Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005)およびExpert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)を参照されたい。トランスフェリンは、血清中に存在する単量体の輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、改変可能な表面ループにペプチド配列を挿入することによって、様々な標的抗原に結合するように遺伝子操作することができる。遺伝子操作されたトランスフェリン足場として、trans-bodyが挙げられる。詳細については、J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)を参照されたい。

【０２５２】

アンキリンリピートタンパク質（DARPin）は、内在性膜タンパク質の細胞骨格への結合を媒介するタンパク質ファミリーであるアンキリンを元に設計されている。単一のアンキリンリピートは、２つのαヘリックスと１つのβターンとからなる３３残基のモチーフである。アンキリンリピートは、各リピートの第１αヘリックスおよびβターンの残基をランダム化することによって、様々な標的抗原に結合するように遺伝子操作することができる。モジュールの数を増やすことによって、結合面を増加させることができる（この方法はアフィニティ成熟と呼ばれる）。詳細については、J. MoI. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)、J. MoI. Biol. 369, 1015-1028 (2007)および米国特許第20040132028(A1)号を参照されたい。

【０２５３】

フィブロネクチンは、抗原に結合するように遺伝子操作することが可能な足場である。アドネクチン（adnectin）は、ヒトフィブロネクチンタイプIII（ＦＮ３）を構成する１５個の繰り返し単位の１０番目のドメインの天然アミノ酸配列を骨格とする。βサンドイッチの一端の３つのループを遺伝子操作することによって、アドネクチンに目的とする治療標的を特異的に認識させることが可能となる。詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)、米国特許第20080139791号、WO 2005056764および米国特許第6818418(B1)号を参照されたい。

【０２５４】

ペプチドアプタマーは、束縛された可変ペプチドループが活性部位に挿入された定常足場タンパク質（通常チオレドキシン（ＴｒｘＡ））からなるコンビナトリアル認識分子である。詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5. 783-797 (2005)を参照されたい。

【０２５５】

ミクロボディは、３～４個のシステイン架橋を含む２５～５０アミノ酸長の天然のマイクロタンパク質に由来し、このようなマイクロタンパク質としては、KalataBI、コノトキシンおよびknottinが挙げられる。これらのマイクロタンパク質には、マイクロタンパク質の全体的な折りたたみに影響を及ぼすことなく２５個までのアミノ酸を付加することによって遺伝子操作可能なループが存在する。遺伝子操作されたknottinドメインの詳細については、WO 2008098796を参照されたい。

【０２５６】

他のエピトープ結合ドメインとして、様々な標的抗原結合特性を遺伝子操作するための足場として使用されてきたタンパク質が挙げられる。このようなタンパク質としては、ヒトβ－クリスタリン、ヒトユビキチン（affilin）、ヒトプロテアーゼ阻害薬のkunitz型ドメイン、Ｒａｓ結合タンパク質であるＡＦ－６のＰＤＺドメイン、サソリ毒（カリブドトキシン）、Ｃ型レクチンドメイン（テトラネクチン）が挙げられ、これらは、Non-Antibody Scaffolds from Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, edited by Stefan Dubel)の第７章およびProtein Science 15:14-27 (2006)においてレビューされている。本発明のエピトープ結合ドメインは、上記の代替タンパク質ドメインのいずれに由来していてもよい。

【０２５７】

複合体または免疫複合体

本発明は、ＬＳＲ抗原およびその可溶性部分（細胞外ドメイン、一部分、バリアントなど）を含む、免疫療法に使用される複合体を包含する。たとえば、本発明は、ＬＳＲ抗原のＥＣＤが免疫グロブリンまたはそのフラグメントに結合された複合体を包含する。本発明は、ＬＳＲ抗原の活性（たとえば免疫共刺激など）を促進または抑制するための上記複合体の使用、ならびに本明細書に記載の移植片拒絶の兆候、自己免疫疾患の兆候、およびがんの兆候の治療における上記複合体の使用を意図したものである。

【０２５８】

別の態様において、本発明は、ペイロード薬物（多くの場合細胞毒性を有する）に連結された抗体（または一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）などの抗体フラグメント）からなる、たとえばがんの治療などに使用される抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）を特徴とする。該抗体はＡＤＣを標的がん細胞に結合させる。次いで、多くの場合、ＡＤＣは細胞によって取り込まれ、薬物が細胞内に放出される。ターゲティングされているため、副作用はより低く、治療域はより広いものとなる。親水性のリンカー（たとえばＰＥＧ４Ｍａｌ）は、薬物がＭＤＲ（多剤耐性）トランスポーターを介して耐性がん細胞から排出されるのを防ぐのに役立つ。

【０２５９】

別の一態様において、本発明は、細胞毒素、薬物（たとえば免疫抑制薬）、放射性毒素などの治療薬に結合させた抗ＬＳＲ抗体またはそのフラグメントを含む免疫複合体を特徴とする。本明細書において、このような複合体を「免疫複合体」と呼ぶ。１以上の細胞毒素を含む免疫複合体を「免疫毒素」と呼ぶ。細胞毒素すなわち細胞傷害薬は、細胞に有害な（たとえば細胞を死滅させるような）あらゆる薬物を包含する。このような薬物として、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、ならびにこれらのアナログまたはホモログが挙げられる。さらに上記のような治療薬として、たとえば、代謝拮抗薬（たとえばメトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化薬（たとえばメクロレタミン、チオテパ、クロラムブチル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、ならびにｃｉｓ－ジクロロジアミン白金（II）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン類（たとえば（以前はダウノマイシンと呼ばれていた）ダウノルビシンおよびドキソルビシン）、抗生物質（たとえば（以前はアクチノマイシンと呼ばれていた）ダクチノマイシン、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（ＡＭＣ））、ならびに抗有糸分裂薬（たとえばビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられる。

【０２６０】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に結合可能な他の好ましい治療用細胞毒素としては、デュオカルマイシン類、カリケアミシン類、メイタンシン類およびオーリスタチン類、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。カリケアミシン－抗体複合体の一例として、市販品（Mylotarg（登録商標）；Wyeth）が挙げられる。

【０２６１】

細胞毒素は、当技術分野において利用可能なリンカー技術を使用して、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に結合することができる。細胞毒素を抗体に結合するために使用されているリンカーとしては、ヒドラゾン類、チオエーテル類、エステル類、ジスルフィド類、およびペプチド含有リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。選択可能なリンカーとしては、たとえば、リソソーム区画内において低ｐＨ条件下で切断されやすいリンカー、およびプロテアーゼ（たとえばカテプシン類（たとえばカテプシンＢ、Ｃ、Ｄ）などの、腫瘍組織において選択的に発現されるプロテアーゼなど）により切

断されやすいリンカーが挙げられる。

【０２６２】

細胞毒素の種類、リンカーの種類、および治療薬を抗体に結合させる方法のさらなる考察については、Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P. A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091;およびSenter, P. D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.も参照されたい。

【０２６３】

さらに、本発明の抗体を放射性同位体と結合させて、細胞傷害性を有する放射性医薬品（放射性免疫複合体とも呼ぶ）を作製することもできる。診断または治療に用いることを目的として抗体に結合することが可能な放射性同位体としては、ヨウ素１３１、インジウム１１１、イットリウム９０およびルテチウム１７７が挙げられるが、これらに限定されない。放射性免疫複合体の調製方法は当技術分野において確立されている。市販されている放射性免疫複合体としては、ゼヴァリン（IDEC Pharmaceuticals）およびベキサール（Corixa Pharmaceuticals）が挙げられ、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を使用して、類似の方法により放射性免疫複合体を調製することができる。

【０２６４】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体複合体を使用して任意の生物学的応答を修飾することができ、抗体複合体の薬物成分は古典的な化学治療薬に限定されない。たとえば、薬物成分は所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質として、たとえば、アブリン、リシンＡ、緑膿菌外毒素、ジフテリア毒素などの酵素的に活性な毒素またはその活性フラグメント；腫瘍壊死因子およびインターフェロン－γなどのタンパク質；ならびに、リンホカイン、インターロイキン１（ＩＬ－１）、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、他の増殖因子などの生物学的応答調節因子が挙げられる。

【０２６５】

このような治療成分を抗体に結合するための技術はよく知られており、たとえば、Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery”, in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in Monoclonal Antibodies ‘84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), およびThorpe et al., “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。

【０２６６】

二重特異性分子

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに多重特異性抗体を包含する。多重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。別の一態様において本発明は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体またはそのフラグメントを含む二重特異性分子を特徴とする。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体またはその抗原結合部分を誘導体化するか、または別の機能分子、たとえば別のペプチドもしくはタンパク質（たとえば、別の抗体、

受容体に対するリガンドなど）と連結することによって、少なくとも２つの異なる結合部位または標的分子と結合する二重特異性分子を作製することができる。また、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を誘導体化するか、または２種以上の他の機能分子に連結することによって、３つ以上の異なる結合部位および／または標的分子と結合する多重特異性分子を作製してもよく、このような多重特異性分子も本明細書の「二重特異性分子」に包含される。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子は、抗体を１以上の他の結合分子に（たとえば、化学的結合、遺伝子融合、非共有結合性会合などにより）機能的に連結することによって作製することができ、該他の結合分子としては、たとえば、別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド、結合ミメティックなどが挙げられる。特定の実施形態では、二重特異性抗体の結合特異性の１つはＬＳＲに対するものであり、もう１つは別の抗原に対するものである。特定の実施形態では、二重特異性抗体はＬＳＲの２つの異なるエピトープに結合してもよい。二重特異性抗体は、ＬＳＲを発現している細胞に細胞傷害薬を送達するために使用してもよい。二重特異性抗体は完全長抗体または抗体フラグメントとして調製することができる。

【０２６７】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性抗体は、構造が異なる２つの標的に同時に結合することができる抗体である。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）および二重特異性抗体フラグメント（ｂｓＦａｂ）は、Ｂ細胞抗原またはＢ細胞エピトープに特異的に結合する腕を少なくとも１つと、ターゲティング可能な複合体に特異的に結合する別の腕を少なくとも１つ持つ。

【０２６８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに融合抗体タンパク質を包含し、融合抗体タンパク質とは、同じ特異性または異なる特異性を有する２種以上の一本鎖抗体または抗体フラグメントセグメントを組換え技術により連結した抗原結合分子である。分子工学を使用して様々な二重特異性融合抗体タンパク質を作製することができる。一形態においては、二重特異性融合抗体タンパク質は一価であり、たとえば、１つの抗原に対して１つの結合部位を有するｓｃＦｖと、第２の抗原に対して１つの結合部位を有するＦａｂフラグメントとからなる。別の形態においては、二重特異性融合抗体タンパク質は二価であり、たとえば、１つの抗原に対して２つの結合部位を有するＩｇＧと、第２の抗原に対して合わせて２つの結合部位を有する２つのｓｃＦｖとからなる。

【０２６９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、３つ以上の機能性抗原結合部位を持つ遺伝子操作された抗体を包含し、これには「Octopus antibody」が包含される（たとえば米国特許第2006/0025576A1号を参照されたい）。

【０２７０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、ＬＳＲと別の異なる抗原とに結合する抗原結合部位を含む「Dual Acting FAb」すなわち「ＤＡＦ」を包含する（たとえば米国特許第2008/0069820号を参照されたい）。

【０２７１】

したがって、本発明は、ＬＳＲに対する第１の結合特異性を少なくとも１つと、第２の標的エピトープに対する第２の結合特異性とを含む二重特異性分子を包含する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、第２の標的エピトープは、Ｆｃ受容体、たとえば、ヒトＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）またはヒトＦｃα受容体（ＣＤ８９）である。したがって、本発明は、ＦｃγＲ、ＦｃαＲまたはＦｃεＲを発現するエフェクター細胞（たとえば単球、マクロファージまたは多核白血球（ＰＭＮ））と、ＬＳＲを発現する標的細胞との両方に結合することができる二重特異性分子を包含する。このような二重特異性分子によって、エフェクター細胞をＬＳＲ発現細胞にターゲティングし、Ｆｃ受容体を介したエフェクター細胞活性、たとえば、ＬＳＲ発現細胞に対する食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、サイトカインの放出、スーパーオキシドアニオンの発生などを引き起こさせる。

【０２７２】
二重特異性分子が多重特異性を有する本発明の実施形態の少なくともいくつかにおいて、この二重特異性分子は、抗Ｆｃ結合特異性に加えて、第３の結合特異性をさらに有していてもよい。一実施形態において、第３の結合特異性は、抗増強因子部分（anti-enhancement factor (EF) portion）であり、抗増強因子成分とは、たとえば、細胞傷害活性に関与する表面タンパク質と結合することによって標的細胞に対する免疫応答を増強させる分子である。
【０２７３】
「抗増強因子部分（anti-enhancement factor portion）」は、任意の分子（たとえば抗原や受容体）と結合することによって、Ｆｃ受容体または標的細胞抗原と結合する決定基の作用を増強させる抗体、機能的抗体フラグメントまたはリガンドであってもよい。「抗増強因子部分」は、Ｆｃ受容体または標的細胞抗原と結合することができる。あるいは、抗増強因子部分は、第１の結合特異性および第２の結合特異性による結合対象とは異なる対象に結合することができる。たとえば、抗増強因子部分は細胞傷害性Ｔ細胞と結合することができる（たとえば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ２８、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＩＣＡＭ－１、もしくは他の免疫細胞を介して結合することができ、これによって標的細胞に対する免疫応答を増強する）。
【０２７４】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、二重特異性分子は結合特異性として少なくとも１つの抗体またはその抗体フラグメントを含み、このような抗体フラグメントとして、たとえば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、および一本鎖Ｆｖが挙げられる。また、Ladnerらによる米国特許第4,946,778号（この文献の内容は本明細書の一部を構成するものとして援用される）に記載されているように、上記の抗体は、軽鎖二量体、重鎖二量体、またはそれらの最小フラグメント（Ｆｖや一本鎖コンストラクトなど）であってもよい。
【０２７５】
一実施形態では、Ｆｃγ受容体に対する結合特異性はモノクローナル抗体によって付与され、この抗体による結合はヒト免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）によって阻害されない。本明細書において「ＩｇＧ受容体」は、第１染色体に位置する８個のγ鎖遺伝子のいずれかを指す。これらのγ鎖遺伝子は、合計１２種の膜貫通型または可溶性の受容体アイソフォームをコードし、これらの受容体アイソフォームは３つのＦｃγ受容体クラス、すなわち、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲII（ＣＤ３２）およびＦｃγＲIII（ＣＤ１６）に分類される。好ましい一実施形態において、Ｆｃγ受容体はヒト高親和性ＦｃγＲＩである。ヒトＦｃγＲＩは７２ｋＤａの分子であり、単量体のＩｇＧに対して高い親和性（10^8～$10^9 M^{-1}$）を示す。
【０２７６】
特定の好ましい抗Ｆｃγモノクローナル抗体の作製およびその特性評価については、FangerらによってＰＣＴ公開WO 88/00052および米国特許第4,954,617号に記載されており、これらの教示はその全体が本明細書の一部を構成するものとして援用される。これらの抗体は、ＦｃγＲＩ受容体、ＦｃγＲII受容体またはＦｃγＲIII受容体のエピトープに結合するが、これらのエピトープは当該受容体のＦｃγ結合部位とは異なる部位に存在するため、該抗体と該エピトープとの結合は生理的濃度のＩｇＧによって実質的に阻害されない。本発明において有用な抗ＦｃγＲＩ抗体は、具体的には、ｍＡｂ２２、ｍＡｂ３２、ｍＡｂ４４、ｍＡｂ６２およびｍＡｂ１９７である。ｍＡｂ３２を産生するハイブリドーマは、American Type Culture Collection（ＡＴＣＣ受託番号：ＨＢ９４６９）から入手可能である。別の実施形態において、抗Ｆｃγ受容体抗体はヒト化されたモノクローナル抗体２２（Ｈ２２）である。Ｈ２２抗体の作製および特性評価については、Graziano, R. F. et al. (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002およびＰＣＴ公開WO 94/10332に記載されている。Ｈ２２抗体産生細胞株はＨＡＯ２２ＣＬＩの名称でAmerican Type Culture Collectionに寄託されており、その受託番号はＣＲＬ １１１７７である。

【０２７７】
さらに別の好ましい実施形態では、Ｆｃ受容体に対する結合特異性は、たとえばＦｃα受容体（ＦｃαＲＩ（ＣＤ８９））などのヒトＩｇＡ受容体に結合する抗体によって付与され、その結合はヒト免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）によって阻害されないことが好ましい。「ＩｇＡ受容体」は、第１９染色体に位置する１つのα遺伝子の遺伝子産物（ＦｃαＲＩ）を含むものである。この遺伝子は選択的スプライシングされた５５～１１０ｋＤａの膜貫通型アイソフォームをいくつかコードすることが知られている。
【０２７８】
ＦｃαＲＩ（ＣＤ８９）は、単球／マクロファージ、好酸球および好中球に構成的に発現されているが、非エフェクター細胞集団には発現されていない。ＦｃαＲＩは、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２の両方に対して中程度の親和性（約$5\times10^{7}M^{-1}$）を有しているが、これは、Ｇ－ＣＳＦやＧＭ－ＣＳＦなどのサイトカインへの暴露により上昇する（Morton, H. C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440）。ＦｃαＲＩに特異的なモノクローナル抗体として、Ａ３、Ａ５９、Ａ６２およびＡ７７の４種が同定されており、これらはＩｇＡリガンド結合ドメイン以外の部位でＦｃαＲＩに結合することが報告されている（Monteiro, R. C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764）。
【０２７９】
ＦｃαＲＩおよびＦｃγＲＩは、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子において使用されるトリガー受容体として好ましく、この理由として、
（１）主として免疫エフェクター細胞（たとえば、単球、ＰＭＮ、マクロファージ、樹状細胞）上に発現されること；
（２）高レベル（たとえば細胞１個あたり5,000～100,000）に発現されること；
（３）細胞傷害活性（たとえば、ＡＤＣＣ、食作用）を媒介すること；
（４）これらの受容体にターゲティングされた抗原提示（自己抗原を含む）の増強を媒介すること
が挙げられる。
【０２８０】
二重特異性分子に使用される抗体としてヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子において使用することができる他の抗体として、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体が挙げられる。
【０２８１】
本発明の二重特異性分子は、当技術分野で公知の方法を使用して、結合特異性を有する構成成分同士を結合させることによって作製することができ、たとえば、抗ＦｃＲ結合特異性を有する成分と、抗ＬＳＲ結合特異性を有する成分とを結合させることによって作製することができる。たとえば、二重特異性分子を構成する結合特異性成分は、それぞれ別々に作製した後に結合させてもよい。結合特異性成分がタンパク質またはペプチドである場合、様々なカップリング剤または架橋剤を使用して共有結合によりこれらを結合させることができる。架橋剤としては、プロテインＡ、カルボジイミド、Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチル－チオアセタート（ＳＡＴＡ）、５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ）、ｏ－フェニレンジマレイミド（ｏＰＤＭ）、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）、およびスルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシラート（スルホ－ＳＭＣＣ）が挙げられる（たとえば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686；およびLiu, M A et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照されたい）。他の方法としては、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375に記載されているものが挙げられる。結合剤としてはＳＡＴＡおよびスルホ－ＳＭＣＣが好ましく、これらはいずれもピアスケミカル社（イリノイ州ロックフォード）より入手可能である。

【０２８２】
上記の結合特異性成分がいずれも抗体である場合、２本の重鎖のＣ末端ヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることによりこれらの抗体を結合させてもよい。特に好ましい実施形態では、抗体を結合させる前に、ヒンジ領域を修飾して奇数個、好ましくは１個のスルフヒドリル残基を付加する。
【０２８３】
あるいは、両方の結合特異性成分を同一ベクター内にコードし、同一宿主細胞において発現および再構築させることができる。二重特異性分子が、ｍＡｂ×ｍＡｂ融合タンパク質、ｍＡｂ×Ｆａｂ融合タンパク質、Ｆａｂ×Ｆ（ａｂ’）$_2$融合タンパク質、またはリガンド×Ｆａｂ融合タンパク質である場合、この方法は特に有用である。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子は、１つの一本鎖抗体と結合決定基とを含む一本鎖分子であってもよく、２つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であってもよい。二重特異性分子は少なくとも２つの一本鎖分子を含んでいてもよい。二重特異性分子の作製方法は、たとえば、米国特許第5,260,203号；米国特許第5,455,030号；米国特許第4,881,175号；米国特許第5,132,405号；米国特許第5,091,513号；米国特許第5,476,786号；米国特許第5,013,653号；米国特許第5,258,498号；および米国特許第5,482,858号に記載されている。
【０２８４】
多重特異性抗体を作製するための技術として、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖ペアの組換え共発現（Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、WO 93/08829、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照されたい）および「knob-in-hole」エンジニアリング（たとえば米国特許第5,731,168号を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。また、多重特異性抗体の作製は、静電ステアリング効果（electrostatic steering effect）を使用した、抗体からＦｃ－ヘテロ二量体分子を作製するための遺伝子操作（WO 2009/089004A1）；制御されたＦａｂアームの交換（Labrijn et al., PNAS 110(13):5145-50 (2013)を参照されたい）；２つ以上の抗体またはフラグメントの架橋（たとえば米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照されたい）；二重特異性抗体を作製するためのロイシンジッパーの使用（たとえばKostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照されたい）；二重特異性抗体フラグメントを作製するための「diabody」技術の使用（たとえばHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい）；一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用（たとえばGruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい）；または三重特異性抗体の作製（たとえばTutt et al. J. Immunol. 147: 60(1991)に記載されている）によって行ってもよい。
【０２８５】
特定の標的に対する二重特異性分子の結合は、たとえば、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ＦＡＣＳ分析、バイオアッセイ（たとえば増殖抑制）またはウエスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイはそれぞれ、通常、目的とする特定のタンパク質－抗体複合体の存在を、この目的複合体に特異的な標識試薬（たとえば抗体）を使用して検出する。たとえば、ＦｃＲ－抗体複合体は、たとえば、このＦｃＲ－抗体複合体を認識しこれに特異的に結合する酵素標識抗体または酵素標識抗体フラグメントを使用して検出することができる。あるいは、上記の目的複合体は、様々な他のイムノアッセイを使用して検出することもできる。たとえば、抗体を放射能で標識し、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）において使用することができる（たとえば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986（この文献は本明細書の一部を構成するものとして援用される）を参照されたい）。放射性同位体は、γカウンターもしくはシンチレーションカウンターを使用した方法、またはオートラジオグラフィによって検出することができる。
【０２８６】

抗体およびその医薬組成物の使用－がん

「治療」は治療処置および予防手段の両方を指し、本願実施例においてはがんの治療に関する。しかしながら、後述するように、抗体および医薬組成物の使用は、感染症および／または自己免疫病態の治療にも適用される。治療を必要とする対象としては、既にがんを発症している対象およびがんの予防処置がなされる対象が挙げられる。したがって、本明細書において治療対象となる哺乳動物は、がんを有すると診断されたもの、がんの素因を有するもの、がんに罹患しやすいもののいずれであってもよい。本明細書において「治療する」は、上記がん疾患、障害または状態の、予防、発症の遅延、治癒、改善、減弱、緩和、最小化、抑制、悪影響の阻止、または識別可能な症状の安定化を行うことを指す。さらに、「治療する」は上記のがんの管理を行うことを含む。「管理」は、疾患の重症度の低減、疾患のエピソード出現頻度の低減、疾患のエピソード出現期間の短縮、疾患のエピソードの重症度の低減、がん細胞の成長または増殖の遅延／抑制、少なくとも１つの症状の進行の遅延、少なくとも１つの測定可能な身体的パラメータの改善などを意味する。

【０２８７】

治療の対象となる「哺乳動物」は、哺乳動物に分類されるあらゆる動物を指し、ヒト、家畜、動物園の飼育動物、スポーツに使用される動物、愛玩動物、たとえば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどが挙げられる。哺乳動物はヒトであることが好ましい。哺乳動物は、上述した疾患、障害および状態のうちのいずれか１つを有すると診断されたヒト、または少なくとも１種のがんの素因を有するヒトであることが好ましい。

【０２８８】

「治療有効量」は、哺乳動物の疾患または障害を治療するのに効果的な本発明の薬物の量を指す。

【０２８９】

本発明の治療薬は、対象に単独で提供することができ、あるいは、薬学的に許容される担体と混合することにより医薬組成物の一部として提供することができる。

【０２９０】

また、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体、そのフラグメントおよび／もしくは複合体、ならびに／またはこれらを含む医薬組成物は、併用療法において投与すること、すなわち、他の増強手段および／または他の治療法と組み合わせて投与することができる。実施形態の少なくともいくつかによれば、抗ＬＳＲ抗体は、当技術分野において公知の標準的ながん療法（たとえば、http://www.cancer.gov/cancertopicsに記載されているようながん療法）のいずれとも組み合わせて使用することができると考えられる。

【０２９１】

たとえば、併用療法は、抗ＬＳＲ抗体、そのフラグメントおよび／もしくは複合体、ならびに／またはこれらを含む医薬組成物と、少なくとも１つの他の治療薬、免疫調節薬、化合物、免疫療法または免疫刺激法との組み合わせを含んでいてもよく、組み合わせられる薬物または治療法としては、腫瘍ワクチン；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス、イピリムマブ）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害・細胞増殖抑制薬（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法薬；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節薬；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害薬；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬；プロテアソーム阻害薬などが挙げられるが、これらに限定されない。別の例において、併用療法は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体またはＬＳＲ調節薬と、少なくとも１つの他の治療薬または免疫調節薬との組み合わせを含んでいてもよく、該抗ＬＳＲ抗体またはＬＳＲ調節薬としては、ＬＳＲ抗原の細胞外ドメインを含む可溶性ポリペプチド複合体、およびＬＳＲに結合する、ペプチド、リボザイム、アプタマー、ｓｉＲＮＡ、他の薬物などの小分子などが挙げられる。

【０２９２】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、抗ＬＳＲ抗体と組み合わせて使用することができる治療法は、抗腫瘍応答を高める増強手段である。
【０２９３】
がん免疫療法を行うことを目的として、抗ＬＳＲ阻害抗体と増強手段とを様々な方法で組み合わせることができる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、主として内因性の抗腫瘍応答を増強するように設計された増強手段と組み合わせて使用され、このような増強手段としては、たとえば、放射線療法、凍結療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標準的／古典的化学療法、抗腫瘍免疫応答を増強する標的療法、抗血管新生療法、免疫抑制細胞（Ｔｒｅｇ、ＭＤＳＣなど）を標的とする治療薬、免疫刺激抗体、サイトカイン療法、がん治療ワクチン、養子細胞移入などが挙げられる。
【０２９４】
化学療法薬や標準的な抗がん薬と組み合わせて使用することの科学的根拠としては、化学療法化合物の大部分が有する細胞傷害作用によって引き起こされたがん細胞死により腫瘍抗原レベルが上昇し、それにより抗原提示の増強および抗腫瘍免疫応答の刺激が引き起こされ（すなわちimmunogenic cell death）、その結果、抗ＬＳＲ抗体の効果が増強されることが考えられる（Zitvogelら，2008、Galluzziら，2012）。腫瘍細胞死を介して抗腫瘍応答が増強されうる他の併用療法は、放射線療法、凍結療法、外科手術およびホルモン除去である。これらのがん療法は宿主体内に腫瘍抗原の供給源を作り出す。
【０２９５】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、抗腫瘍免疫応答増強薬として抗ＬＳＲ抗体と併用される古典的化学療法薬および標準的抗がん療法薬は、白金系化合物、たとえばオキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチンなど；抗がん活性を有する抗生物質、たとえばダクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシンＣ、ミトラマイシン、アントラサイクリン類（ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシンなど）など；アントラセンジオン類、たとえばミトキサントロンなど；アルキル化薬、たとえばダカルバジン、メルファラン、シクロホスファミド、テモゾロミド、クロラムブシル、ブスルファン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア類など；代謝拮抗薬、たとえばフルオロウラシル、ラルチトレキセド、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド、ヒドロキシウレア、葉酸拮抗薬（メトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキセドなど）など；抗有糸分裂薬、たとえばポロキナーゼ阻害薬および微小管阻害薬、たとえばタキサン類およびタキソイド類（パクリタキセル、ドセタキセルなど）など；ビンカアルカロイド類、たとえばビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビンなど；トポイソメラーゼ阻害薬、たとえばエトポシド、テニポシド、アムサクリン、トポテカン、イリノテカン、カンプトテシンなど；細胞増殖抑制薬、たとえば抗エストロゲン薬（タモキシフェン、フルベストラント、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン（iodoxyfene）など）、抗アンドロゲン薬（ビカルタミド、フルタミド、ニルタミド、酢酸シプロテロンなど）、プロゲストゲン類（酢酸メゲストロールなど）、アロマターゼ阻害薬（アナストロゾール、レトロゾール、vorazole、エキセメスタンなど）など；ＧｎＲＨアナログ、たとえばリュープロレリン、ゴセレリン、ブセレリン、デガレリクスなど；ならびに５α還元酵素阻害薬、たとえばフィナステリドなどからなる群から選択されるが、これらに限定されない。
【０２９６】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、抗がん活性を有することが示されているビスホスホネート類（特にアミノビスホスホネート（ＡＢＰ））と組み合わせて使用される。ＡＢＰに関連する活性のいくつかは、先天免疫と獲得免疫の境界に位置し、かつ強力な抗腫瘍活性を有するヒトγδＴ細胞に対して発揮される。また、標的療法は、腫瘍細胞のimmunogenic deathの誘導または免疫系のエフェクター機構の作動を介して、腫瘍特異的免疫応答を刺激することができる（Galluz

zi ら, 2012、VannemanおよびDranoff, 2012）。さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体と併用される薬物は、以下のいずれかの薬物、すなわち、腫瘍特異的細胞傷害性ＣＤ８ Ｔ細胞の産生、ＮＫ細胞の腫瘍への浸潤およびＮＫ細胞媒介性細胞傷害を促進する特定の治療用モノクローナル抗体（トラスツズマブ）；ＭＨＣクラスIIの発現を増加させ、免疫抑制細胞（ＴｒｅｇおよびＭＤＳＣ）の腫瘍への浸潤を減少させ、腫瘍細胞による免疫抑制酵素ＩＤＯの発現を減少させ、かつ／またはＤＣの機能を抑制することによって、がんに対する免疫応答を促進する特定のチロシンキナーゼ阻害薬（ＴＫＩ）；ＮＫを活性化する受容体リガンドの発現をがん細胞表面上において増加させることによって、ＮＫ細胞による腫瘍細胞認識を促進させることが判明しているヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬；これとは対照的に、ＣＴＬ媒介性細胞融解またはＮＫ媒介性細胞融解に対する腫瘍細胞の感受性を増加させることが判明しているプロテアソーム阻害薬のうちのいずれかである。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん治療用の抗ＬＳＲ抗体と併用される薬物としての標的療法薬は、ヒストン脱アセチル化酵素（ＨＤＡＣ）阻害薬、たとえばボリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、ベリノスタット、モセチノスタット（mocetinostat）、abexinostat、エンチノスタット、resminostat、givinostat、quisinostat、酪酸ナトリウムなど；プロテアソーム阻害薬、たとえばボルテゾミブ、カーフィルゾミブ、ジスルフィラムなど；ｍＴＯＲ経路阻害薬、たとえばテムシロリムス、ラパマイシン、エベロリムスなど；ＰＩ３Ｋ阻害薬、たとえばペリホシン、ＣＡＬ１０１、ＰＸ－８６６、ＩＰＩ－１４５、ＢＡＹ ８０－６９４６など；Ｂ－ｒａｆ阻害薬、たとえばベムラフェニブ、ソラフェニブなど；ＪＡＫ２阻害薬、たとえばレスタウルチニブ、パクリチニブ（pacritinib）など；チロシンキナーゼ阻害薬（ＴＫＩ）、たとえばエルロチニブ、イマチニブ、スニチニブ、ラパチニブ、ゲフィチニブ、ソラフェニブ、ニロチニブ、トセラニブ、ボスチニブ、ネラチニブ、バタラニブ、レゴラフェニブ、カボザンチニブなど；他のプロテインキナーゼ阻害薬、たとえばクリゾチニブなど；セリン／トレオニンキナーゼ阻害薬、たとえばＲａｓ／Ｒａｆシグナル伝達阻害薬（ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬など）など；セリンプロテアーゼ阻害薬、たとえばマトリプターゼ、ヘプシン、ウロキナーゼなど；細胞内シグナル伝達阻害薬、たとえばチピファルニブ、ペリホシンなど；ＭＥＫキナーゼおよび／またはＡＫＴキナーゼ媒介性細胞シグナル伝達阻害薬；オーロラキナーゼ阻害薬、たとえばＡＺＤ１１５２、ＰＨ７３９３５８、ＶＸ－６８０、ＭＬＮ８０５４、Ｒ７６３、ＭＰ２３５、ＭＰ５２９、ＶＸ－５２８、ＡＸ３９４５９など；サイクリン依存性キナーゼ阻害薬、たとえばＣＤＫ２阻害薬および／またはＣＤＫ４阻害薬など；生存シグナル伝達タンパク質（Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－ＸＬなど）阻害薬、たとえばＡＢＴ－７３７など；ＨＳＰ９０阻害薬；治療用モノクローナル抗体、たとえば抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体（セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ）、抗ＥＲＢＢ２モノクローナル抗体（トラスツズマブ、ペルツズマブ）、抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（リツキシマブ、オファツムマブ、ベルツズマブなど）、他の腫瘍抗原を標的とするモノクローナル抗体（アレムツズマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、アデカツムマブ（adecatumumab）、オレゴボマブ（oregovomab）、オナルツズマブ（onartuzumab）など）；ＴＲＡＩＬ経路アゴニスト、たとえばデュラネルミン（dulanermin）（可溶性ｒｈＴＲＡＩＬ）、アポマブ（apomab）、マパツムマブ（mapatumumab）、レクサツムマブ（lexatumumab）、コナツムマブ（conatumumab）、ティガツズマブ（tigatuzumab）など；抗体フラグメント、二重特異性抗体およびbispecific T-cell engager（ＢｉＴＥ）、たとえばカツマキソマブ（catumaxomab）、ブリナツモマブ（blinatumomab）など；抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）および他の免疫複合体、たとえばイブリツモマブ チウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブ ベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、クリバツズマブテトラキセタン（clivatuzumab tetraxetan）、ペムツモマブ（pemtumomab）、トラスツズマブ エムタンシンなど；抗血管新生療法薬、たとえばベバシズマブ、エタラシズマブ（etaracizumab）、ボロシキシマブ（volociximab）、ラムシルマブ、アフリベルセプト、ソラフェニブ、スニチニブ、レゴラフェニブ、アキシチニブ、ニンテダニブ、モテサニブ、パゾパニブ、セディラ

ニブなど；メタロプロテイナーゼ阻害薬、たとえばマリマスタットなど；ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体機能阻害薬；ならびにカテプシン活性阻害薬からなる群から選択されるが、これらに限定されない。

【０２９７】

さらに、内因性抗腫瘍応答を増加させる他のがん免疫療法も、免疫系のエフェクター機構を増強することによって、抗ＬＳＲ抗体の効果を増強することができると考えられ、このようなものとして、養子Ｔ細胞療法、がん治療ワクチン、免疫抑制細胞の減少およびそれらの機能の低減、サイトカイン療法、ならびに免疫刺激抗体が挙げられる。

【０２９８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）および骨髄由来抑制細胞（ＭＤＳＣ）などの制御性免疫抑制細胞を標的とする治療薬と併用される。一般に使用される化学療法薬の多くはＴｒｅｇを非特異的な標的とし、ＴｒｅｇまたはＭＤＳＣの数を減少させたり、これらの細胞の免疫抑制能を低下させる（Facciabeneら，2012；Byrneら，2011；GabrilovichおよびNagaraj，2009）。この点において、化学療法薬のいくつかによる定期療法は、制御性細胞の調節を介することによって、免疫抑制作用よりも免疫刺激作用を発揮する。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、シクロホスファミド、ゲムシタビン、ミトキサントロン、フルダラビン、フルダラビン、ドセタキセル、パクリタキセル、サリドマイドおよびサリドマイド誘導体から選択される薬物（ただしこれらに限定されない）と併用される。

【０２９９】

さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、Ｔｒｅｇを特異的な標的とする新規薬物と併用され、このような薬物としては、

１）Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を認識することによってＴｒｅｇを直接標的とする除去抗体または殺傷抗体、たとえば、抗ＣＤ２５モノクローナル抗体であるダクリズマブ、バシリキシマブなど、

２）リガンド標的毒素、たとえば、デニロイキン ディフィトックス（オンタック）（ヒトＩＬ－２とジフテリア毒素との融合タンパク質）、ＬＭＢ－２（ＣＤ２５に対するｓｃＦｖと緑膿菌外毒素との融合物）など、

３）Ｔｒｅｇ細胞表面受容体を標的とする抗体、たとえば、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＯＸ４０、ＧＩＴＲなど

が挙げられる。

【０３００】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、Ｔｒｅｇの誘導および／またはＴｒｅｇの機能を阻害する任意の手段と併用され、このような手段としては、ＴＬＲ（toll様受容体）アゴニスト；アデノシン作動経路を阻害する薬物（たとえばエクトヌクレオチダーゼ阻害薬など）またはＡ２Ａアデノシン受容体阻害薬；ＴＧＦ－β阻害薬（たとえばfresolimumab、lerdelimumab、metelimumab、trabedersen、LY2157299、LY210976など）；ならびに腫瘍組織へのＴｒｅｇの動員の阻害（たとえば、CCR4／CCL2／CCL22経路などに対するケモカイン受容体阻害薬など）が挙げられる。

【０３０１】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、免疫抑制性の腫瘍微小環境を阻害する任意の手段と併用され、このような手段としては、免疫抑制活性を発揮するサイトカインおよび酵素に対する阻害薬、たとえばＩＤＯ（インドールアミン－２，３－ジオキシゲナーゼ）阻害薬など；免疫抑制性の微小環境を促進する抗炎症性サイトカイン（ＩＬ－１０、ＩＬ－３５、ＩＬ－４、ＩＬ－１３など）に対する阻害薬；ならびにベバシズマブ（Ｔｒｅｇを減少させ、かつＤＣへの分化を促進する）が挙げられる。

【０３０２】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、ＭＤＳＣを標的とする任意の手段と併用され、このような手段としては、ビタミンD_3またはビタミンＡ代謝産物（レチノイン酸、オールトランス型レチノイン酸（ＡＴＲＡ）など）を用いた、ＭＤＳＣから抑制機能を持たない成熟骨髄細胞への分化促進；およびＣＯＸ２阻害薬、ホスホジエステラーゼ５阻害薬（シルデナフィルなど）またはＲＯＳ阻害薬（ニトロアスピリンなど）を用いた、ＭＤＳＣの抑制活性の阻害が挙げられる。
【０３０３】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、抗腫瘍免疫応答増強薬としての免疫刺激抗体と併用される（Pardoll 2012）。
【０３０４】
免疫刺激抗体は、免疫機能を直接調節することによって、すなわち他の抑制性標的を阻害することまたは共刺激タンパク質を増強することによって、抗腫瘍免疫を促進する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、免疫チェックポイントを標的とするアンタゴニスト抗体と併用され、このような抗体としては、抗ＣＴＬＡ４モノクローナル抗体、たとえばイピリムマブ、トレメリムマブなど；抗ＰＤ－１抗体、たとえばニボルマブ（ＢＭＳ－９３６５５８／ＭＤＸ－１１０６／ＯＮＯ－４５３８）、ＡＭＰ２２４、ＣＴ－０１１、ＭＫ－３４７５など；抗ＰＤＬ－１アンタゴニスト、たとえばＢＭＳ－９３６５５９／ＭＤＸ－１１０５、ＭＥＤＩ４７３６、ＲＧ－７４４６／ＭＰＤＬ３２８０Ａなど；抗ＬＡＧ－３（ＩＭＰ－３２１など）、抗ＴＩＭ－３、抗ＢＴＬＡ、抗Ｂ７－Ｈ４、抗Ｂ７－Ｈ３、抗ＶＩＳＴＡ；免疫刺激タンパク質を標的とするアゴニスト抗体、たとえば抗ＣＤ４０モノクローナル抗体（ＣＰ－８７０，８９３、lucatumumab、ダセツズマブなど）など；抗ＣＤ１３７モノクローナル抗体、たとえばウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）、ＰＦ－０５０８２５６６など；抗ＯＸ４０モノクローナル抗体、たとえば抗ＯＸ４０など；抗ＧＩＴＲモノクローナル抗体、たとえばＴＲＸ５１８など；抗ＣＤ２７モノクローナル抗体、たとえばＣＤＸ－１１２７など；および抗ＩＣＯＳモノクローナル抗体が挙げられる。
【０３０５】
サイトカインは、免疫系細胞が互いに情報交換して協調的かつ強力であるが自己限定的な応答を標的抗原に対して惹起することを可能とする分子メッセンジャーである。サイトカインベースの治療法は、患者自身の免疫系を刺激してがんを排除することを直接の目的としたものである。がんの根絶における免疫系の利用は過去２０年間にわたって関心が高まってきており、これに伴い、がん療法の開発を目的としたサイトカインの特性評価および広大なサイトカインシグナル伝達ネットワークの活用に高度な努力が重ねられてきた。サイトカインは、腫瘍部位の免疫系エフェクター細胞および間質細胞を直接刺激し、細胞傷害性エフェクター細胞による腫瘍細胞認識を増強する。動物腫瘍モデルを用いた研究においては、サイトカインが広範囲な抗腫瘍活性を有していることが多数報告されており、これを利用したサイトカインベースのがん療法アプローチが数多く開発されてきた（LeeおよびMargolin,2011）。様々なサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（インターフェロンα）、ＩＦＮβ、ＩＦＮγなど）が、がん免疫療法のための抗腫瘍免疫応答増強薬として前臨床段階または臨床開発段階にある。
【０３０６】
いくつかのサイトカインはがん療法用として承認されており、さらに多くのものが開発中である。しかしながら、重度の副作用および不良な薬物動態特性が治療効果の妨げになることが多い。したがって、サイトカインの全身投与に加え、サイトカインの薬物動態ならびに有効性および／または毒性を改善することを目的として、様々な戦略により治療用サイトカインの送達および腫瘍部位への局在化を行うことができ、このような戦略として、抗体－サイトカイン融合分子（免疫サイトカイン）、ポリエチレングリコールとの化学結合（ＰＥＧ化）、自家腫瘍全細胞におけるサイトカインのトランスジェニック発現、Ｄ

ＮＡワクチンへのサイトカイン遺伝子の組み込み、サイトカイン遺伝子を持つ組換えウイルスベクターなどが挙げられる。免疫サイトカインの場合、腫瘍特異的抗体または抗体フラグメントにサイトカインを融合させることによって、標的への送達が可能となり、これによって、有効性および薬物動態が改善し、副作用が低減する。

【０３０７】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、抗腫瘍免疫応答増強薬としてサイトカインを使用したサイトカイン療法と併用され、このような療法としては、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（インターフェロン－α）、ＩＦＮα－２ｂ、ＩＦＮβ、ＩＦＮγなどのサイトカイン、およびこれらを用いた上述の様々な送達戦略が挙げられる。

【０３０８】

がんワクチンは、既に存在するがんに対する治療（治療ワクチン）または特定のハイリスク個体におけるがん発症の予防（予防ワクチン）を行うために使用される。がん治療ワクチンは、Ｔ細胞のプライミングを改善し、さらには抗原提示を改善することから、抗腫瘍免疫応答を増強するための治療薬として使用することができる（Mellmanら,2011；Schlom,2012）。

【０３０９】

いくつかのタイプのがん治療ワクチンが前臨床段階および臨床開発段階にある。このようながん治療ワクチンとしては、たとえば、以下のものが挙げられる。

１）全腫瘍細胞ワクチン

外科手術により採取したがん細胞を処理して免疫原性を増強し、このがん細胞を患者に注射して、腫瘍細胞の抗原に対する免疫応答を誘導する。腫瘍細胞ワクチンは、自家すなわち患者自身の腫瘍であってもよく、通常２種または３種の特性評価された任意の種類のヒト樹立腫瘍細胞株を含む同種異系であってもよい（たとえばＧＶＡＸワクチンプラットフォームなど）。

２）腫瘍抗原ワクチン

通常タンパク質またはペプチドである単一の腫瘍抗原（またはいくつかの腫瘍抗原の組み合わせ）は、免疫系をブーストするために投与される（必要に応じてアジュバントおよび／または免疫調節薬もしくは樹状細胞の誘引物質（ＧＭ－ＣＳＦなど）を併用する）。腫瘍抗原は特定の種類のがんに特異的であってもよいが、特定の患者向けに作製されるわけではない。

３）ベクターベースの腫瘍抗原ワクチンおよびＤＮＡワクチン

これらは、抗原を安定して供給することにより抗腫瘍免疫応答を刺激する方法として使用することができる。腫瘍抗原をコードするベクターは患者体内に注射された後（必要に応じてＧＭ－ＣＳＦなどの炎症促進性誘引物質または他の誘引物質を併用する）、インビボにおいて細胞に取り込まれて特定の抗原を産生し、該抗原によって所望の免疫応答が引き起こされる。一度に２種以上の腫瘍抗原をベクターにより送達して、免疫応答を増加させてもよい。さらに、組換えウイルスベクター、組換え細菌ベクターまたは組換え酵母ベクターは、自体に対する免疫応答を誘起すると考えられ、これによって全体的な免疫応答を増強してもよい。

４）腫瘍溶解性ウイルスワクチン（ＯｎｃｏＶｅｘ／Ｔ－ＶＥＣなど）

選択的にがん細胞に感染する条件複製単純ヘルペスウイルスの腫瘍内投与を行うものである。このウイルスは、ＧＭ－ＣＳＦを発現するようにさらに遺伝子操作されるが、がん細胞内で複製することによってがん細胞の溶解を引き起こすことができ、これによって新たなウイルスおよび様々な腫瘍抗原が放出され、さらにこの過程においてＧＭ－ＣＳＦが分泌される。したがって、このような腫瘍溶解性ウイルスワクチンは腫瘍微小環境においてＤＣの機能を増強し、それにより抗腫瘍免疫応答を刺激する。

５）樹状細胞ワクチン（PaluckaおよびBanchereau,2012）：

樹状細胞（ＤＣ）は、腫瘍細胞を貪食して腫瘍特異的Ｔ細胞に腫瘍抗原を提示する。こ

のアプローチでは、ＤＣはがん患者から単離された後にプライミングされ、腫瘍特異的Ｔ細胞が得られる。この目的のためにいくつかの方法を使用することができ、ＤＣに腫瘍細胞または溶解物を取り込ませたり；ＤＣに腫瘍抗原の融合タンパク質または融合ペプチドを取り込ませたり；ＤＣを標的とするモノクローナル抗体に腫瘍抗原を結合させることができる。ＤＣは、刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦなど）の存在下で処理され、エクスビボで活性化および成熟化された後、点滴により患者に戻され、がん細胞に対する免疫応答を引き起こす。樹状細胞は、刺激性サイトカイン（ＧＭ－ＣＳＦなど）を分泌するように遺伝子操作した放射線照射全腫瘍細胞を患者に注射することによって、インビボでプライミングすることもできる。また、単球を用いて類似の方法を実施することができる。Sipuleucel-T（Provenge）（進行前立腺がんの治療用として承認されたがん治療ワクチン）は、樹状細胞ワクチンの一例である。

【０３１０】

したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、がん治療ワクチンと併用される。このようながん治療ワクチンとしては、上記で説明した、全腫瘍細胞ワクチン、腫瘍抗原ワクチン、ベクターベースのワクチン、腫瘍溶解性ウイルスワクチンおよび樹状細胞ワクチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３１１】

がん免疫療法に対するアプローチの１つは、養子Ｔ細胞療法すなわち養子細胞移入（ＡＣＴ）に基づき、これは、自己由来の天然の腫瘍特異的Ｔ細胞をエクスビボで同定して増殖させ、次いで養子移入によりがん患者に戻すことによって行う（Restifoら,2012）。エクスビボで増殖させた後に点滴で患者に戻された細胞は、腫瘍へと移動し、腫瘍の破壊を媒介することができる。養子移入の前に、放射線療法および／または化学療法を行うことによって宿主の免疫を除去することができる。リンパ球除去、養子細胞移入およびＴ細胞増殖因子（ＩＬ－２など）を組み合わせることによって、腫瘍患者の腫瘍を永続的に根絶することができる。より新規のアプローチでは、正常末梢血Ｔ細胞をエクスビボで遺伝子修飾することによって、腫瘍関連抗原に対する特異性を付与する。たとえば、特に良好な抗腫瘍応答を示すＴ細胞のＴＣＲのクローンをウイルス発現ベクターに挿入し、治療を受ける患者から得られた自家Ｔ細胞に感染させることができる。別の方法として、キメラ免疫グロブリン－ＴＣＲ分子を基本的な構造とするキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）（「Ｔ－ｂｏｄｙ」としても知られている）の使用が挙げられる。ＣＡＲは、抗体様特異性を有しており、標的細胞表面上のＭＨＣ非拘束構造（細胞外の標的結合モジュール）を認識し、Ｔ細胞を活性化することができるＴＣＲ細胞内ドメイン上に移植される（Restifoら,2012、Shiら,2013）。

【０３１２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、がん免疫療法のための抗ＬＳＲ抗体は、養子細胞移入（上述の遺伝子修飾Ｔ細胞など）と併用され、それにより抗腫瘍免疫応答を増強する。

【０３１３】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＳＲ特異的抗体、ならびに／または該抗体を含む代替足場、多重特異性分子、二重特異性分子、免疫複合体および／もしくは組成物は、１つ以上の別の治療薬と共投与することができ、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物と該別の治療薬との同時作用または相乗作用によりがんを治療または予防することができる。ＬＳＲ関連治療薬と該１以上の別の治療薬は、順番に投与することも同時に投与することも可能である。該別の治療薬としては、たとえば、細胞傷害薬、放射性毒性薬および免疫抑制薬が挙げられる。医薬組成物は、（免疫複合体として）該別の薬物に結合することも、該別の薬物と別々に投与することも可能である。後者の場合（別々に投与する場合）、医薬組成物の投与は、該別の薬物の投与前、投与後、または投与と同時に行うことができ、あるいは、他の公知の治療法（たとえば抗がん療法、たとえば、放射線療法）と併用することができる。このような治療薬としては、特に、ドキソル

ビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素などの、単独で使用された場合、患者に毒性または準毒性を示すレベルにおいてのみ効果を発揮する抗新生物薬が挙げられる。シスプラチンは、１００ｍｇ／投与の用量で４週に１回静脈内投与され、アドリアマイシンは、６０～７５ｍｇ／ｍＬの用量で２１日に１回静脈内投与される。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗ＬＳＲ抗体ならびに／またはその抗原結合フラグメントおよび／または代替足場を化学療法薬と共投与することによって、異なるメカニズムでヒト腫瘍細胞に対して細胞傷害効果を発揮する２種の抗がん薬が提供される。このような共投与によって、薬物耐性の発現に起因する問題、および抗体との反応が起こらなくなる腫瘍細胞の抗原性の変化に起因する問題を解決することができる。別の実施形態では、上記の治療に加えて、ＦｃγまたはＦｃγ受容体の発現または活性を調節する（たとえば増強または抑制する）薬物で対象を治療することができ、たとえば、サイトカインで対象を治療することができる。多重特異性分子による治療中に投与することが好ましいサイトカインとしては、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）および腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）が挙げられる。

【０３１４】

標的特異的エフェクター細胞、たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物（たとえばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）に結合させたエフェクター細胞も治療薬として使用することができる。ターゲティングのためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球、単球などのヒト白血球であってよい。他の細胞としては、好酸球、ナチュラルキラー細胞、およびＩｇＧ受容体またはＩｇＡ受容体を有する他の細胞が挙げられる。所望に応じて、エフェクター細胞は治療を受ける対象から得ることができる。標的特異的エフェクター細胞は、生理学的に許容される溶液中に懸濁された細胞懸濁液として投与することができる。投与される細胞は約10^8～10^9個であってよいが、治療目的によってその数は異なるであろう。通常、上記の細胞数は、標的細胞、たとえば、ＬＳＲタンパク質を発現している腫瘍細胞に上記の細胞を局在化させ、かつ、たとえば食作用などによって細胞を破壊するのに十分な量であろう。投与経路も様々であってよい。

【０３１５】

標的特異的エフェクター細胞を用いた治療法は、標的細胞を除去するための他の技術を併用して実施することができる。たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物（たとえばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性分子）および／または該組成物に結合させたエフェクター細胞を使用した抗腫瘍療法は、化学療法と併用することができる。さらに、免疫療法を併用し、２種の異なる細胞傷害性エフェクター集団によって腫瘍細胞の拒絶を引き起こしてもよい。たとえば、抗ＦｃγＲＩまたは抗ＣＤ３に結合させた抗ＬＳＲ抗体と、ＩｇＧ受容体またはＩｇＡ受容体に特異的な結合薬とを併用してもよい。

【０３１６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子および多重特異性分子を使用して、ＦｃγＲレベルまたはエフェクター細胞上のＦｃγＲレベルを調節することもでき、これは、たとえばエフェクター細胞表面の受容体を塞いだり、除去したりすることによって行うことができる。抗Ｆｃ受容体の混合物もこの目的に使用することができる。

【０３１７】

補体と結合するＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＭの一部分などの補体結合部位を有する本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物（たとえば、ヒト抗体、代替足場、多重特異性分子、二重特異性分子および免疫複合体）は、補体の存在下でも使用することができる。一実施形態において、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる結合薬と適切なエフェクター細胞とによる、標的細胞を含む細胞集団のエクスビボ治療は、補体または補体を含む血清を添加することによって補強することができる。本

発明の実施形態の少なくともいくつかによる結合薬で覆われた標的細胞に対する食作用は、補体タンパク質を結合させることによって向上させることができる。別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかよる組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）で覆われた標的細胞を補体によって溶解することもできる。さらに別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物は補体を活性化しない。

【０３１８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物（たとえば、ヒト抗体、代替足場、多重特異性分子、二重特異性分子および免疫複合体）は補体とともに投与することもできる。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子と、血清または補体とを含む組成物が提供される。このような組成物は、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子の極めて近傍に補体を存在させることができるという点で有利である。あるいは、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子は、補体または血清とは別々に投与することができる。

【０３１９】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＳＲ抗体の「治療有効量」によって、疾患の症状の重症度の低下、疾患の症状が消失している時期の出現頻度の増加およびその持続期間の延長、寿命の延長、疾患の寛解、または疾患によって引き起こされる機能障害または身体障害の予防もしくは低減がもたらされることが好ましい。たとえば、ＬＳＲ陽性腫瘍の治療においては、「治療有効量」によって、治療を受けていない対象と比較して細胞増殖または腫瘍増殖が、少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約４０％、さらにより好ましくは少なくとも約６０％、さらにより好ましくは少なくとも約８０％抑制されることが好ましい。化合物の腫瘍に対する増殖抑制能は、ヒト腫瘍における有効性を予測することが可能な動物モデル系で評価することができる。あるいは、組成物の腫瘍に対する増殖抑制能は、化合物の抑制能を試験することにより評価することができ、このような抑制能をインビトロで分析する方法は当業者に公知である。治療有効量の治療化合物によって腫瘍の大きさを減少させることまたは対象の症状を改善することができる。

【０３２０】

当業者は、対象の大きさ、対象の症状の重症度、選択した特定の組成物、選択した投与経路などの要因に基づいて治療有効量を決定することができるであろう。

【０３２１】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、抗ＬＳＲ抗体は中和抗体として使用することができる。中和抗体（Ｎａｂ）は、特定の抗原に結合してこれを中和または抑制することによって、その抗原が有する生物学的作用を抑制することができる抗体であり、たとえば、細胞またはウイルスの受容体を阻害することにより宿主細胞へのウイルスの結合を抑制する。ＮＡｂは、特定の作用因子の生物学的作用を部分的または完全に打ち消すことができ、作用因子の活動に必要とされる重要な表面分子を阻害するか、または標的細胞の受容体への作用因子の結合を阻害することによってその効果を発揮する。

【０３２２】

本明細書において「治療薬」は、ＬＳＲポリペプチドのいずれかまたはそのエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を含み、がんの治療用に改変された、本明細書に記載のモノクローナル抗体および／もしくはポリクローナル抗体、抗原結合フラグメント、ならびに／またはこれらを含む複合体および／もしくは代替足場のいずれかである。

【０３２３】

本発明のさらなる態様によれば、上記治療薬は、疾患に伴うＴ細胞活性の抑制（たとえばがん細胞などに対するＴ細胞活性の抑制）を防ぐために使用することができる。

【０３２４】

本発明のさらなる態様によれば、上記治療薬は、たとえばＴ細胞の増殖およびサイトカインの分泌などによって示されるＴ細胞の活性化を抑制するために使用することができる

。

【０３２５】

したがって、本発明のさらなる態様によれば、対象において本明細書に記載のがんを治療するためのおよび／または対象においてＬＳＲポリペプチド媒介性免疫刺激を促進するための方法であって、上記の治療薬のいずれかおよび／または上記の治療薬のいずれかと薬学的に許容される希釈剤または担体とを含む医薬組成物の有効量を、上記の治療または促進を必要とする対象に投与することによる方法が提供される。

【０３２６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬または医薬組成物は、他の化合物または免疫療法薬と組み合わせて投与してもよい。たとえば、この併用療法は、本発明の化合物と、少なくとも１種の他の治療薬、免疫調節薬または免疫刺激療法との組み合わせを含んでいてもよく、このような他の治療薬、免疫調節薬または免疫刺激療法としては、腫瘍ワクチン、養子Ｔ細胞療法、Ｔｒｅｇ除去、抗体（たとえばベバシズマブ、アービタックスなど）、ペプチド、ペプチボディ、小分子、化学療法薬（細胞傷害・細胞増殖抑制薬など（たとえばパクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチンなど））、免疫調節薬（インターフェロンやインターロイキンなど）、免疫刺激抗体、成長ホルモン、他のサイトカイン、葉酸、ビタミン、無機質、アロマターゼ阻害薬、ＲＮＡｉ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、プロテアソーム阻害薬などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３２７】

実施形態の少なくともいくつかによれば、インビボまたはエクスビボにおいて、免疫細胞（好ましくはＴ細胞）を本発明の治療薬と接触させて、免疫応答の調節を行うことができる。治療薬と接触させるＴ細胞は、α／βＴ細胞受容体およびγ／δＴ細胞受容体などのＴ細胞受容体を発現している任意のＴ細胞であってよい。Ｔ細胞はＣＤ３を発現するあらゆる細胞を包含し、ＣＤ４およびＣＤＳをさらに発現するＴ細胞サブセットも包含する。さらに、Ｔ細胞はナイーブ細胞および記憶細胞の両方を包含し、ＣＴＬなどのエフェクター細胞も包含する。Ｔ細胞はさらにＴｈ１細胞、Ｔｃ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｃ２細胞、Ｔｈ３細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、Ｔｒｅｇ細胞、Ｔｒ１細胞などの細胞も包含する。Ｔ細胞はさらにＮＫＴ細胞および類似したユニークなＴ細胞系細胞も包含する。

【０３２８】

ＬＳＲの阻害は標準的ながん療法と組み合わせてもよい。ＬＳＲの阻害は化学療法レジメンと効果的に組み合わせてもよい。このような併用においては、投与される化学療法薬の用量を減らすことができる場合もある。このような併用の一例として、抗ＬＳＲ抗体と後期腎細胞癌治療用のテムシロリムスとの併用が挙げられる。このような併用の別の例として、抗ＬＳＲ抗体と後期腎細胞癌治療用のインターロイキン２（ＩＬ－２）との併用、および抗ＬＳＲ抗体とイピリムマブまたはBMS-936558との併用が挙げられる。ＬＳＲの阻害と化学療法とを併用することの科学的根拠としては、化学療法化合物の大部分が有する細胞傷害作用によって細胞死が引き起こされ、その結果、抗原提示経路における腫瘍抗原レベルが上昇することが考えられる。細胞死を介してＬＳＲの阻害とともに相乗作用を発揮しうる他の併用療法は、放射線療法、凍結療法、外科手術およびホルモン除去である。他の免疫調節分子を用いた他のさらなる併用療法も、がんの根絶に向けて免疫系の刺激に相乗的に寄与するであろう。これらのプロトコルは宿主体内に腫瘍抗原の供給源を作り出す。また、血管新生阻害薬をＬＳＲの阻害と組み合わせてもよい。血管新生の阻害は腫瘍細胞死を引き起こすが、それによって、宿主体内の抗原提示経路に腫瘍抗原が供給されてもよい。

【０３２９】

さらに、ＬＳＲ阻害抗体は、Ｆｃα受容体またはＦｃγ受容体を発現するエフェクター細胞を腫瘍細胞にターゲティングする二重特異性抗体と組み合わせることができる（たとえば米国特許第5,922,845号および第5,837,243号を参照されたい）。二重特異性抗体は、２つの別個の抗原をターゲティングするために使用することができる。たとえば、抗Ｆｃ

受容体／抗腫瘍抗原（たとえばＨｅｒ－２／ｎｅｕ）二重特異性抗体は、マクロファージを腫瘍部位にターゲティングするために使用されている。このようなターゲティングは腫瘍特異的応答をより効果的に活性化すると考えられる。これらの応答のうちＴ細胞が関与する応答は、ＬＳＲを阻害することによって増強されると考えられる。別法として、腫瘍抗原と樹状細胞特異的細胞表面マーカーとに結合する二重特異性抗体を使用することによって、抗原を直接ＤＣに送達してもよい。

【０３３０】

腫瘍は非常に様々なメカニズムによって宿主体内の免疫監視を回避している。これらのメカニズムの多くは、腫瘍によって発現される免疫抑制性のタンパク質を不活性化することによって打破することができると考えられる。このような免疫抑制性タンパク質としては、ＴＧＦβ（Kehrl, J. et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050）、ＩＬ－１０（Howard, M. & O'Garra, A. (1992) Immunology Today 13: 198-200）およびＦａｓリガンド（Hahne, M. et al. (1996) Science 274: 1363-1365）などが挙げられる。これらのタンパク質それぞれに対する抗体と抗ＬＳＲとを併用して、免疫抑制因子の作用を打ち消し、宿主による腫瘍免疫応答を促進してもよい。

【０３３１】

宿主免疫応答を活性化するために使用することができる別の抗体を、抗ＬＳＲと組み合わせて使用することができる。宿主免疫応答を活性化するものとして、ＤＣ機能および抗原提示を活性化する樹状細胞表面上分子が挙げられる。抗ＣＤ４０抗体は、Ｔ細胞ヘルパー活性を代用するものとして効果的に使用することができ（Ridge, J. et al. (1998) Nature 393: 474-478）、ＬＳＲ抗体と併用することができる（Ito, N. et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40）。さらに、ＯＸ－４０（Weinberg, A. et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169）、４－１ＢＢ（Melero, I. et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997)）およびＩＣＯＳ（Hutloff, A. et al. (1999) Nature 397: 262-266）などのＴ細胞共刺激分子の活性化抗体、ならびにＣＴＬＡ－４（たとえば米国特許第5,811,097号、implimumab）、ＢＴＬＡ（Watanabe, N. et al. (2003) Nat Immunol 4:670-9）、Ｂ７－Ｈ４（Sica, G L et al. (2003) Immunity 18:849-61）、ＰＤ－１などの負の共刺激分子の活性を阻害する抗体も、Ｔ細胞の活性化レベルを上昇させるために使用してもよい。骨髄移植は造血器由来の様々な腫瘍を治療するために現在使用されている。この治療の結果、移植片対宿主病が起こるが、治療上の利点は移植片対腫瘍応答から得られてもよい。ＬＳＲの阻害は、ドナーに移植された腫瘍特異的Ｔ細胞の有効性を増加させるために使用することができる。

【０３３２】

さらに、抗原特異的Ｔ細胞をエクスビボで活性化および増殖させ、これらの細胞をレシピエントに養子移入することによって、腫瘍に対する抗原特異的Ｔ細胞を得る実験的治療プロトコルがいくつか存在する（Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) Science 285: 546-51）。これらの方法も、ＣＭＶなどの感染因子に対するＴ細胞応答を活性化するために使用してもよい。抗ＬＳＲ抗体の存在下でのエクスビボ活性化は、養子移入されたＴ細胞の頻度および活性を増加させると予想されうる。

【０３３３】

ＬＳＲに対する抗体は、免疫原性因子と併用してもよく、免疫原性因子としては、癌性細胞、精製された腫瘍抗原（組換えタンパク質、組換えペプチドおよび組換え炭水化物分子を含む）、細胞、および免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞などが挙げられる（He et al (2004) J. Immunol. 173:4919-28）。使用可能な腫瘍ワクチンの例としては、結腸がん治療用のＭＵＣ１ペプチド、卵巣がん治療用のＭＵＣ－１／ＣＥＡ／ＴＲＩＣＯＭペプチド、およびサイトカインＧＭ－ＣＳＦを発現するようにトランスフェクトされた腫瘍細胞（詳しくは後述する）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３３４】

ヒトでは、いくつかの腫瘍（ＲＣＣなど）は免疫原性を呈することが示されている。Ｌ

ＳＲの阻害によりＴ細胞活性化の閾値を上昇させることによって、宿主において腫瘍応答が活性化されうると予想される。

【０３３５】

ＬＳＲの阻害は、ワクチン接種プロトコルと組み合わせた場合に最も効果的であると考えられる。腫瘍に対してワクチン接種を行うための実験的戦略が数多く考案されている（Rosenberg, S. , 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738を参照されたい；さらに、Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Editionを参照されたい）。これらの戦略のうちの１つでは、ワクチンは自家腫瘍細胞または同種異系腫瘍細胞を使用して調製される。これらの細胞ワクチンは、ＧＭ－ＣＳＦを発現するように形質導入された腫瘍細胞を用いた場合に最も効果的であることが示されている。ＧＭ－ＣＳＦは、腫瘍ワクチン接種において使用される、抗原提示の強力な賦活物質であることが示されている（Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90: 3539-43）。

【０３３６】

様々な腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンに関する研究は、いわゆる「腫瘍持異抗原」を定義するに至った（Rosenberg, ＳＡ (1999) Immunity 10: 281-7）。多くの場合、これらの腫瘍持異抗原は、腫瘍および腫瘍の発生源となる細胞において発現された分化抗原であり、このような腫瘍持異抗原としては、たとえばメラノサイト抗原ｇｐ１００、ＭＡＧＥ抗原およびＴｒｐ－２が挙げられる。より重要なことには、これらの抗原の多くは、宿主体内に存在する腫瘍特異的Ｔ細胞の標的であると見られる。ＬＳＲの阻害と、腫瘍において発現される様々なタンパク質および／またはペプチドの組換え体とを併用して、これらのタンパク質に対する免疫応答を生じさせてもよい。これらのタンパク質は、通常は、免疫系によって自己抗原として認識されているため、免疫系によって寛容されている。腫瘍抗原にはさらにタンパク質であるテロメラーゼも包含され、テロメラーゼは、染色体のテロメアの合成に必要であり、ヒトがんの８５％以上および体細胞組織のごく一部で発現されている（Kim, N et al. (1994) Science 266: 2011-2013）。（これらの体細胞組織は様々な方法によって免疫攻撃から保護してもよい）。さらに、腫瘍抗原は、体細胞突然変異によってタンパク質配列の改変や無関係な２つの配列からの融合タンパク質の生成（すなわちフィラデルフィア染色体のｂｃｒ－ａｂ１）が起こったために、がん細胞に発現された「新抗原」であってもよく、Ｂ細胞腫瘍由来のイディオタイプであってもよい。

【０３３７】

他の腫瘍ワクチンは、ヒトがんに関連するウイルス由来のタンパク質を含んでいてもよく、そのようなウイルスとして、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、肝炎ウイルス（ＨＢＶおよびＨＣＶ）ならびにカポジヘルペス肉腫ウイルス（ＫＨＳＶ）が挙げられる。ＬＳＲの阻害と併用してもよい腫瘍持異抗原の別の形態として、腫瘍組織自体から単離され精製された熱ショックタンパク質（ＨＳＰ）が挙げられる。熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞由来のタンパク質フラグメントを含んでおり、抗原提示細胞に非常に効率的に送達され、腫瘍免疫が誘導される（Suot, R & Srivastava, P (1995) Science 269:1585-1588; Tamura, Y. et al. (1997) Science 278:117-120）。

【０３３８】

樹状細胞（ＤＣ）は、抗原特異的応答のプライミングに使用することができる強力な抗原提示細胞である。ＤＣはエクスビボで作製することができ、様々なタンパク質抗原およびペプチド抗原ならびに腫瘍細胞抽出物を取り込ませることができる（Nestle, F. et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332)。ＤＣは、遺伝学的方法により形質導入を行うことによって、このような腫瘍抗原を発現させてもよい。また、ＤＣは、免疫化を行うために腫瘍細胞に直接融合される（Kugler, A. et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336）

。ワクチン接種の一方法として、ＤＣによる免疫化とＬＳＲの阻害とを効果的に組み合わせて、より強力な抗腫瘍応答を活性化してもよい。

【０３３９】

がんワクチン接種のためのアジュバントとしての、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬の使用：

腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に対する免疫化は、がんを治療および予防するための有望な方法の一つであるが、たとえば、腫瘍細胞によって発現される自己抗原に関連する寛容機構などのいくつかの困難な問題および制限を抱えている。Ｂ７．１（ＣＤ８０）およびＢ７．２（ＣＤ８６）などの共刺激分子は、動物モデルにおいて遺伝子ベースのワクチンおよび細胞ベースのワクチンの有効性を改善することが報告されており、これらの共刺激分子はアジュバントとして臨床試験中である。このようなアジュバント活性は、共刺激シグナルを増強することによって、あるいは腫瘍細胞によって発現される負の共刺激因子により伝達される抑制性シグナルを阻害することによって発揮されうる（Neighbors et al., 2008 J Immunother. ;31(7):644-55）。

【０３４０】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＳＲタンパク質のいずれかに特異的な、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、抗原結合フラグメント、これらを含む複合体ならびに／または代替足場のいずれかは、がんワクチン接種のためのアジュバントとして使用することができる。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＴＡＡに対する免疫化を改善する方法であって、ＬＳＲタンパク質のいずれかに特異的な、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、抗原結合フラグメント、これらを含む複合体ならびに／または代替足場のいずれかを有効量で患者に投与することを含む方法を提供する。

【０３４１】

免疫増強のための、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬の使用

１．がんの治療

本明細書において提供される治療薬は、通常、免疫応答を刺激する治療薬としてインビボおよびエクスビボにおいて有用である。本明細書において開示された治療薬組成物は、通常、免疫系によって免疫応答が惹起される任意の疾患もしくは障害を有する対象、またはこのような疾患もしくは障害の素因を有する対象を治療するのに有用である。本発明の治療薬によってＬＳＲ免疫シグナルが調節されることから、より強力な免疫応答を起こすことが可能となる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬は、Ｔ細胞などの免疫細胞が関与する免疫応答を刺激または増強するのに有用である。

【０３４２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬は、対象のＴ細胞を刺激するのに有効な量で対象に投与され、宿主の免疫応答を刺激または増強してがんを治療するのに有用である。

【０３４３】

２．ワクチンにおける治療薬の使用

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬は、単独または他の適切な治療と組み合わせて投与される。一実施形態において、本発明の治療薬は、上述したように、ワクチン組成物と組み合わせて、あるいはワクチン組成物の一成分として投与することができる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬は、ワクチンの投与前、投与と同時または投与後に投与することができる。一実施形態において、治療薬はワクチンの投与と同時に投与される。

【０３４４】

自己免疫疾患の治療のための、抗体および医薬組成物の使用

実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の抗体および医薬組成物は、免疫系関連疾患の治療のために使用してもよい。

【０３４５】

上記の免疫系関連状態は、本明細書に記載の、免疫関連状態、自己免疫疾患、移植拒絶反応および移植片対宿主病、ＬＳＲによって媒介される免疫共刺激が阻害もしくは促進される状態、本明細書に記載の免疫関連疾患、ならびに／または（免疫共刺激を促進もしくは阻害する）免疫療法のための状態を含んでいてもよい。

【０３４６】

上記の免疫状態は、自己免疫疾患、移植拒絶反応および移植片対宿主病から選択されてもよい。

【０３４７】

上記の治療は、免疫関連状態の治療に有用な別の成分と組み合わせてもよい。

【０３４８】

上記の成分は、コルチコステロイド、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムス、レフルノミド、これらのアナログなどの免疫抑制薬；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；ＴＮＦ－α遮断薬、ＴＮＦ－αアンタゴニストなどの生物学的薬物または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬物、非ステロイド性抗炎症薬／Ｃｏｘ－２阻害薬、ヒドロキシクロロキン、スルファサラゾピリン、金塩、エタネルセプト、インフリキシマブ、ミコフェノール酸モフェチル、バシリキシマブ、アタシセプト、リツキシマブ、シトキサン、インターフェロンβ－１ａ、インターフェロンβ－１ｂ、酢酸グラチラマー、塩酸ミトキサントロン、アナキンラ、他のバイオロジクスおよび／もしくは静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）、ＩＦＮ－β－１ａ（REBIF（登録商標）、AVONEX（登録商標）およびCINNOVEX（登録商標））およびＩＦＮ－β－１ｂ（BETASERON（登録商標））などのインターフェロン；EXTAVIA（登録商標）、BETAFERON（登録商標）、ZIFERON（登録商標）；ポリペプチドである酢酸グラチラマー（COPAXONE（登録商標））；ナタリズマブ（TYSABRI（登録商標））、細胞毒性薬であるミトキサントロン（NOVANTRONE（登録商標））、カルシニューリン阻害薬（たとえばシクロスポリンＡ、ＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシンまたはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン））；リンパ球ホーミング薬（たとえばＦＴＹ７２０またはそのアナログ）；コルチコステロイド；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドまたはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢまたはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ORENCIA（登録商標）、ベラタセプト）、ＣＤ２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激薬）、接着分子阻害薬（たとえばモノクローナル抗体）、低分子阻害薬（ＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなど）；ならびに他の免疫調節薬からなる群から選択されてもよい。

【０３４９】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した多発性硬化症の治療は、たとえば任意の公知の多発性硬化症治療薬または多発性硬化症の治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知の多発性硬化症治療薬または多発性硬化症の治療方法としては、ＩＦＮ－β－１ａ（REBIF（登録商標）、AVONEX（登録商標）およびCINNOVEX（登録商標））ならびにＩＦＮ－β－１ｂ（BETASERON（登録商標）、EXTAVIA（登録商標）、BETAFERON（登録商標）、およびZIFERON（登録商標））などのインターフェロン；ポリペプチドである酢酸グラチラマー（COPAXONE（登録商標））；ナタリズマブ（TYSABRI（登録商標））；細胞毒性薬であるミトキサントロン（NOVANTRONE（登録商標））；ならびにFampridine（AMPYRA（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。他の薬物としては、コルチコステロイド、メトトレキサート、シクロホスファミド、

アザチオプリン、静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）、イノシン、オクレリズマブ（Ｒ１５９４）、Mylinax（Caldribine）、アレムツズマブ（Campath）、ダクリズマブ（Zenapax）、Panaclar／フマル酸ジメチル（BG-12）、テリフルノミド（HMR1726）、フィンゴリモド（FTY720）、ラキニモド（ABR216062）、造血幹細胞移植、Neurovax、リツキシマブ（リツキサン）、ＢＣＧワクチン、低用量ナルトレキソン、蠕虫療法、血管形成術、静脈内ステント、および代替療法（ビタミンＤ、多価不飽和脂肪、医療用マリファナなど）が挙げられる。

【０３５０】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した関節リウマチの治療は、たとえば任意の公知の関節リウマチ治療薬または関節リウマチの治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知の関節リウマチ治療薬または関節リウマチの治療方法としては、グルココルチコイド；非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、たとえばサリチル酸塩、シクロオキシゲナーゼ－２阻害薬（イブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナク、インドメタシン、エトドラク）など；疾患修飾性抗リウマチ薬（ＤＭＡＲＤ）すなわち経口ＤＭＡＲＤ、たとえばオーラノフィン（リドーラ）、アザチオプリン（イムラン）、シクロスポリン（ジェネリック薬である、サンディミュン、Gengraf、ネオーラル）、Ｄ－ペニシラミン（Cuprimine）、ヒドロキシクロロキン（プラケニル）、注射金剤である金チオリンゴ酸ナトリウム（Myochrysine）および金チオグルコース（Solganal）、レフルノミド（アラバ）、メトトレキサート（リウマトレックス）、ミノサイクリン（ミノシン）、ブドウ球菌プロテインＡ免疫吸着（Prosorbaカラム）、スルファサラジン（アザルフィジン）など；生物学ＤＭＡＲＤ、たとえばＴＮＦ－α遮断薬（アダリムマブ（ヒュミラ）、エタネルセプト（エンブレル）、インフリキシマブ（レミケード）、ゴリムマブ（シンポニー）、セルトリズマブペゴール（シムジア）など）；他の生物学的ＤＭＡＲＤ（アナキンラ（Kineret）、リツキシマブ（リツキサン）、トシリズマブ（アクテムラ）など）；ならびにＣＤ２８阻害薬（アバタセプト（Orencia）およびベラタセプトなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５１】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用したＩＢＤの治療は、たとえば任意の公知のＩＢＤ治療薬またはＩＢＤの治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知のＩＢＤ治療薬またはＩＢＤの治療方法としては、症状を抑えるための免疫抑制薬、たとえば、プレドニゾン、メサラジン（アサコール、ペンタサ、Lialda、Aspiroなど）、アザチオプリン（イムラン）、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、ステロイド、オンダンセトロン、ＴＮＦ－α遮断薬（インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴールなど）、Orencia（アバタセプト）、ウステキヌマブ（ステラーラ（登録商標））、ブリアキヌマブ（ABT-874）、セルトリズマブペゴール（シムジア（登録商標））、ITF2357（givinostat）、ナタリズマブ（Tysabri）、フィラテグラスト（SB-683699）、レミケード（インフリキシマブ）、ベドリズマブ（MLN0002）など；他の薬物、たとえば、GSK1605786すなわちCCX282-B（Traficet-EN）、AJM300、ステラーラ（ウステキヌマブ）、セマピモド（CNI-1493）、tasocitinib（CP-690550）、ＬＭＷヘパリンＭＭＸ、ブデソニドＭＭＸ、シンポニー（ゴリムマブ）、MultiStem（登録商標）、ガーダシルＨＰＶワクチン、Epaxal Berna（ビロソームＡ型肝炎ワクチン）など；外科手術、たとえば、腸切除、狭窄形成術、一時的または永久的な人工肛門形成術、回腸造瘻術など；抗真菌薬、たとえば、ナイスタチン（広域スペクトル腸内抗真菌薬）およびイトラコナゾール（スポラノックス）またはフルコナゾール（ジフルカン）など；ならびに代替医療、プレバイオティクスおよびプロバイオティクス、大麻、蠕虫療法または豚鞭虫卵が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５２】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した乾癬の治療は、たとえば任意の公知の乾癬治療薬または乾癬の治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知の乾癬治療薬としては、軽度の疾患に通常使用される局所薬、中程度

の疾患に使用される光線療法、および重度の疾患に使用される全身性薬が挙げられるが、これらに限定されない。局所薬としては、液体入浴剤、保湿剤、鉱油およびワセリン；ならびにコールタール、ジトラノール（アントラリン）、コルチコステロイド（たとえば、デスオキシメタゾン（Topicort）、ベタメタゾン、フルオシノニドなど）、ビタミンD_3アナログ（たとえばカルシポトリオールなど）、またはレチノイドを含む軟膏およびクリームが挙げられるが、これらに限定されない。光線療法としては、日光；ならびに３１１～３１３ｎｍの波長、ソラレンおよび紫外線Ａ光線療法（ＰＵＶＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。全身性薬としては、バイオロジクス、たとえば、インターロイキンアンタゴニスト、ＴＮＦ－α遮断薬（インフリキシマブ（レミケード）、アダリムマブ（ヒュミラ）、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴールなどの抗体）、および組換えＴＮＦ－αデコイ受容体（エタネルセプト（エンブレル））など；Ｔ細胞を標的とする薬物（たとえば、エファリズマブ（Xannelim／Raptiva）、アレファセプト（Ameviv））など）および樹状細胞を標的とする薬物（たとえばエファリズマブなど）；サイトカインを標的とするモノクローナル抗体（ＭＡｂ）（抗ＩＬ－１２／ＩＬ－２３（ウステキヌマブ（商品名：ステラーラ）および抗インターロイキン１７など）；ブリアキヌマブ（ＡＢＴ－８７４）；小分子、たとえばＩＳＡ２４７など（ただしこれに限定されない）；免疫抑制薬、たとえば、メトトレキサート、シクロスポリンなど；ビタミンＡおよびレチノイド（合成ビタミンＡ）；ならびに代替療法、たとえば、食事およびライフスタイルの変更、絶食期間、低カロリー食および菜食、ビタミンＡおよびビタミンＤを豊富に含む魚油（タラ肝油など）を添加した食事、２種のオメガ３脂肪酸すなわちエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）およびドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）を豊富に含みかつビタミンＥを含む魚油、ichthyotherapy（フィッシュセラピー）、催眠療法、大麻などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５３】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した１型糖尿病の治療は、たとえば任意の公知の１型糖尿病治療薬または１型糖尿病の治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知の１型糖尿病治療薬としては、インスリン；インスリンアナログ；膵島移植；幹細胞療法（PROCHYMAL（登録商標）など）；非インスリン療法、たとえば、ＩＬ－１β阻害薬（アナキンラ（Kineret（登録商標））など）、アバタセプト（Orencia（登録商標））、Diamyd、アレファセプト（Ameviv（登録商標））、Otelixizumab、DiaPep277（Hsp60由来ペプチド）、α１－アンチトリプシン、プレドニゾン、アザチオプリン、シクロスポリン、Ｅ１－ＩＮＴ（上皮成長因子アナログおよびガストリンアナログを含む注射可能な膵島新生療法）、スタチン（ゾコール（登録商標）、Simlup（登録商標）、Simcard（登録商標）、Simvacor（登録商標）など）、シタグリプチン（ジペプチジルペプチダーゼ（ＤＰＰ－４）阻害薬）、抗ＣＤ３モノクローナル抗体（たとえばテプリズマブなど）、ＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト）、抗ＩＬ－１β（カナキヌマブ）；抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（たとえばリツキシマブなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５４】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用したぶどう膜炎の治療は、たとえば任意の公知のぶどう膜炎治療薬またはぶどう膜炎の治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知のぶどう膜炎治療薬としては、コルチコステロイド；局所毛様体筋麻痺薬、たとえばアトロピン、ホマトロピンなど；ＰＳＴＴＡ注射（酢酸トリアムシノロンの後部テノン嚢下注射）；代謝拮抗薬たとえばメトトレキサートなどの投与；ＴＮＦ－α遮断薬（インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴールなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５５】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用したシェーグレン症候群の治療は、たとえば任意の公知のシェーグレン症候群治療薬またはシェーグレン症候群の治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知のシェーグレン症候群

治療薬としては、シクロスポリン、ピロカルピン（サラジェン）およびセビメリン（エボザック）、ヒドロキシクロロキン（プラケニル）、コルチゾン（プレドニゾンなど）、アザチオプリン（イムラン）、シクロホスファミド（シトキサン）、デキサメタゾン、サリドマイド、デヒドロエピアンドロステロン、NGX267、レバミピド、FID 114657、エタネルセプト、ラプティバ、ベリムマブ、マブセラ（リツキシマブ）、アナキンラ、静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）、同種間葉系幹細胞（AlloMSC）、ならびに「Saliwell Crown」による自動神経電気刺激が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５６】

上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した全身性エリテマトーデスの治療は、たとえば任意の公知の全身性エリテマトーデス治療薬または全身性エリテマトーデスの治療方法などと組み合わせてもよい。このような公知の全身性エリテマトーデス治療薬としては、コルチコステロイド、疾患修飾性抗リウマチ薬（ＤＭＡＲＤ）（一般的に、抗マラリア薬（プラキニルなど）および免疫抑制薬（たとえばメトトレキサートおよびアザチオプリン））、ヒドロキシクロロキン、細胞傷害薬（たとえばシクロホスファミドおよびミコフェノール酸塩）、ヒドロキシクロロキン（ＨＣＱ）、ベンリスタ（ベリムマブ）、非ステロイド系抗炎症薬、プレドニゾン、セルセプト、プログラフ、アタシセプト、Lupuzor、静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）、セルセプト（ミコフェノール酸モフェチル）、Orencia、CTLA4-IgG4m（RG2077）、リツキシマブ、オクレリズマブ、エプラツズマブ、CNTO 136、Sifalimumab（MEDI-545）、A-623（以前のAMG 623）、AMG 557、Rontalizumab、paquinimod（ABR-215757）、LY2127399、CEP-33457、デヒドロエピアンドロステロン、レボチロキシン、abetimus sodium（LJP 394）、メマンチン、オピエート、ラパマイシン、腎移植、幹細胞移植が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３５７】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の治療薬および／または該治療薬を含む医薬組成物は、たとえば同種移植片もしくは異種移植片の急性拒絶もしくは慢性拒絶、炎症性疾患、または自己免疫疾患の治療または予防を目的として、あるいは寛容の誘導を目的として、単独の有効成分として投与してもよく、免疫調節レジメンで使用される他の薬物または他の抗炎症薬とともに投与してもよい。

【０３５８】

本明細書において「自己免疫疾患」は、あらゆる自己免疫疾患および慢性炎症状態を包含すると理解される。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、自己免疫疾患は、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症などの多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎、血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少症、特発性自己免疫性溶血性貧血、赤芽球癆、シェーグレン症候群、リウマチ性疾患、結合組織疾患、炎症性リウマチ、変形性リウマチ、非関節性リウマチ、若年性関節リウマチ、尿酸性関節炎、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、クリオグロブリン血管炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、抗リン脂質症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫性多発ニューロパチー、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、１型糖尿病、アジソン病、膜性糸球体腎症、グッドパスチャー病、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血、天疱瘡、尋常性天疱瘡、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、皮膚筋炎、多発性筋炎、線維筋炎、筋硬症、セリアック病、免疫グロブリンＡ腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、関節症性乾癬、グレーブス病、グレーブス眼症、強皮症、全身性強皮症、進行性全身性強皮症、喘息、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、肝炎、慢性活動性肝炎、膠原病、強直性脊椎炎、肩関節周囲炎、結節性汎動脈炎、軟骨石灰化症、ヴェーゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性じんま疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、デビック病、小児自己免疫性溶血性貧血、難治性または慢性自己免疫性血球減少症、後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子

自己抗体の産生の予防、寒冷凝集素病、視神経脊髄炎、全身硬直症候群、歯肉炎、歯周炎、膵炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹、およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗合成酵素症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、ＰＡＰＡ症候群、Ｂｌａｕ症候群、痛風、成人および若年性スティル病、クリオピリン周期熱症候群、マックル・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高ＩｇＤ症候群、シュニッツラー症候群、自己免疫性網膜症、加齢黄斑変性、アテローム性動脈硬化症、慢性前立腺炎、ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）を含む群（ただしこれらに限定されない）から選択される任意の疾患、障害または状態を包含すると理解される。

【０３５９】

自己免疫疾患は、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群を含んでもよく、これらを含むことが好ましい。

【０３６０】

本明細書において「多発性硬化症」は、多発性硬化症、良性多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症、進行再発型多発性硬化症、慢性進行型多発性硬化症、移行型／進行型多発性硬化症、急速悪化型多発性硬化症、臨床的に確実な多発性硬化症、マールブルクのバリアントとしても知られている悪性多発性硬化症、および急性多発性硬化症の１以上を包む。「多発性硬化症に関連する状態」は、たとえば、視神経脊髄炎としても知られているデビック病；急性散在性脳脊髄膜炎、急性脱髄性視神経炎、脱髄性横断性脊髄炎、ミラー・フィッシャー症候群、脳脊髄神経根障害、急性脱髄性多発ニューロパチー、腫脹性多発性硬化症、およびバロー同心円硬化症を包含していてもよい。

【０３６１】

本明細書において「関節リウマチ」は、関節リウマチ、痛風、偽痛風、若年性特発性関節炎、若年性関節リウマチ、スティル病、強直性脊椎炎、およびリウマチ性血管炎の１以上を含む。関節リウマチに関連する状態は、たとえば、変形性関節症、サルコイドーシス、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、敗血症性関節炎、ヘモクロマトーシス、肝炎、血管炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、ライム病、家族性地中海熱、回帰熱を伴う高免疫グロブリン血症Ｄ、ＴＮＦ受容体関連周期性症候群、および炎症性腸疾患に関連した腸炎性関節炎を包含していてもよい。

【０３６２】

本明細書において「ぶどう膜炎」は、ぶどう膜炎、前部ぶどう膜炎（または虹彩毛様体炎）、中間部ぶどう膜炎（扁平部炎）、後部ぶどう膜炎（または脈絡網膜炎）、および汎ぶどう膜炎の１以上を含む。

【０３６３】

本明細書において「炎症性腸疾患」は、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎（ＵＣ）、コラーゲン蓄積大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、分類不能大腸炎の１以上を含む。

【０３６４】

本明細書において「乾癬」は、乾癬；尋常性乾癬および乾癬性紅皮症（紅皮性乾癬）を含む非膿疱性乾癬；ならびに汎発性膿疱性乾癬（von Zumbuschの膿疱性乾癬）、掌蹠膿疱症（持続性掌蹠膿疱症、バーバー型膿疱性乾癬、四肢の膿疱性乾癬）、環状膿疱性乾癬、稽留性肢端皮膚炎、疱疹状膿痂疹を含む膿疱性乾癬の１以上を含む。乾癬に関連する状態は、たとえば、薬物性乾癬、間擦疹型乾癬、おむつ部乾癬、脂漏様乾癬、滴状乾癬、爪乾癬、および乾癬性関節炎を包含していてもよい。

【０３６５】

本明細書において「１型糖尿病」は、１型糖尿病、インスリン依存性糖尿病、特発性糖

尿病、若年性１型糖尿病、若年発症成人型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病、および妊娠糖尿病の１以上を含む。１型糖尿病に関連する状態は、多発ニューロパチー、単ニューロパチー、末梢性ニューロパチーおよび自律神経ニューロパチーを含むニューロパチー；ならびに眼合併症（緑内障、白内障、網膜症）を包含する。

【０３６６】

本明細書において「シェーグレン症候群」は、シェーグレン症候群、原発性シェーグレン症候群、および続発性シェーグレン症候群；ならびに、シェーグレン症候群に関連する状態（関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症などの結合組織疾患を含む）の１以上を含む。他の合併症は、肺炎、肺線維症、間質性腎炎、腎臓のフィルター周囲の組織の炎症、糸球体腎炎、尿細管性アシドーシス、手根管症候群、末梢性ニューロパチー、脳神経ニューロパチー、原発性胆汁性肝硬変（ＰＢＣ）、肝硬変、食道、胃、膵臓および肝臓の炎症（肝炎を含む）、多発性筋炎、レイノー現象、血管炎、自己免疫性甲状腺疾患、ならびにリンパ腫を包含する。

【０３６７】

本明細書において「全身性エリテマトーデス」は、全身性エリテマトーデス、円板状ループス、ループス関節炎、ループス肺炎、およびループス腎炎の１以上を含む。全身性エリテマトーデスに関連する状態は、骨関節結核；抗リン脂質抗体症候群；心膜炎、心筋炎、心内膜炎などの心臓の様々な部位の炎症；肺炎および胸膜炎；胸膜炎；胸水；慢性びまん性間質性肺疾患；肺高血圧症；肺塞栓症；肺出血；縮小肺症候群；ループス頭痛；ギラン・バレー症候群；無菌性髄膜炎；脱髄症候群；単ニューロパチー；多発性単神経炎；重症筋無力症；ミエロパチー；脳神経ニューロパチー；多発ニューロパチー；ならびに血管炎を包含する。

【０３６８】

本明細書において「免疫関連疾患（または免疫関連障害もしくは免疫関連状態）」は、自己免疫疾患、炎症性障害、および移植片移植に対する拒絶反応に関連した免疫障害（たとえば、臓器移植、同種異系幹細胞移植、自家幹細胞移植、および骨髄移植の急性拒絶および慢性拒絶、ならびに移植片対宿主病など）を含む群（ただしこれらに限定されない）から選択される任意の疾患、障害または状態を包含すると理解される。

【０３６９】

本明細書において、「炎症性障害」および／または「炎症」という用語は同じ意味で用いられ、病原体、損傷細胞、刺激原などの有害な刺激に対する免疫応答の調節異常を特徴とする炎症性異常を包含する。炎症性障害は非常に様々なヒト疾患の原因となる。炎症過程を病因とする非免疫性疾患としては、がん、アテローム性動脈硬化症および虚血性心疾患が挙げられる。炎症に関連した障害としては、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、骨盤炎症性疾患、再灌流障害、サルコイドーシス、血管炎、間質性膀胱炎、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗合成酵素症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、ＰＡＰＡ症候群、Ｂｌａｕ症候群、痛風、成人および若年性スティル病、クリオピリン周期熱症候群、マックル・ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高ＩｇＤ症候群、シュニッツラー症候群、ＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳＰ）、歯肉炎、歯周炎、肝炎、肝硬変、膵炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、および痛風性関節炎、ならびに乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患が挙げられる。

【０３７０】

感染症の治療のための、抗体および医薬組成物の使用

実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の抗体および医薬組成物は、感染症の治療のために使用してもよい。

【０３７１】

慢性感染症は、ウイルス特異的Ｔ細胞応答の様々な程度の機能障害を特徴とすることが多く、この機能障害が、宿主が病原体の持続感染を排除できない主な理由となっている。

感染の初期段階においては機能性エフェクターＴ細胞が最初に産生されるものの、感染が慢性化するのに伴い外来抗原に持続的に暴露されることによって、機能性エフェクターＴ細胞は徐々にその機能を失い、Ｔ細胞の疲弊が起こる。疲弊したＴ細胞は、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＬＡＧ３などの複数の共抑制性受容体を高レベルに発現する（Crawford et al., Curr Opin Immunol. 2009;21:179-186; Kaufmann et al., J Immunol 2009;182:5891-5897, Sharpe et al., Nat Immunol 2007;8:239-245）。疲弊したＴ細胞によるＰＤ－１の過剰発現は、ＨＩＶ、ＨＣＶおよびＨＢＶなどの慢性ウイルス感染症の患者において臨床的に観察されている（Crawford et al., Curr Opin Immunol 2009;21:179-186; Kaufmann et al., J Immunol 2009;182:5891-5897, Sharpe et al., Nat Immunol 2007;8:239-245）。この経路に関する研究は、他のウイルス、細菌、寄生虫などの他の病原体においてもいくつか行われている（Hofmeyer et al., J Biomed Biotechnol. Vol 2011, Art. ID 451694, Bhadra et al., Proc Natl Acad Sci. 2011;108(22):9196-201）。たとえば、標準的な盲腸結紮穿孔法によって誘導された敗血症モデルにおいて、ＰＤ－１経路が細菌感染の制御に関連していることが示された。このモデルのＰＤ－１欠損ノックアウトマウスは敗血症の誘導により死に至らなかった（Huang et al., PNAS 2009: 106; 6303-6308）。

【０３７２】

Ｔ細胞の疲弊は、ＰＤ－１やＣＴＬＡ－４などの共抑制経路を阻害することにより回復させることができ（Rivas et al., J Immunol. 2009 ;183:4284-91; Golden-Mason et al., J Virol. 2009;83:9122-30; Hofmeyer et al., J Biomed Biotechnol. Vol 2011, Art. ID 451694）、これによって抗ウイルス免疫機能を回復させることができる。ウイルス感染の治療における共抑制経路の阻害の有効性は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路を阻害することにより広く研究されており、アカゲザルの急性および慢性サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）感染症（Valu et al., Nature 2009; 458:206-210）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）などの慢性ウイルス感染症のマウスモデル（Barber et al., Nature. 2006;439:682-7）、およびＳＪＬ／Ｊマウスのタイラーマウス脳脊髄炎ウイルス（ＴＭＥＶ）モデル（Duncan and Miller PLoS One. 2011;6:e18548）などのいくつかの感染症動物モデルにおいて効果的であることが示された。これらのモデルにおいて、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１の阻害は、抗ウイルス応答を改善し、持続感染ウイルスの排除を促進した。さらに、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１の阻害によって体液性免疫が増加したことが血漿中の特異的抗ウイルス抗体の産生増加により示され、この体液性免疫の増加に加えて細胞性応答が改善され、血漿中ウイルス量が減少し生存率が上昇した。

【０３７３】

本明細書において「感染性障害および／または感染性疾患」ならびに／または「感染症」という用語は同じ意味で用いられ、個々の宿主生物体内における病原性生物因子の存在および／またはその増殖によって引き起こされるあらゆる障害、疾患および／または状態を包含する。本明細書において「感染症」は、臨床的に明らかな病態（すなわち特徴的な医学的兆候および／もしくは疾患の症状）を示し、かつ／またはその経過の大部分もしくは全体において無症候性である、上述の障害、疾患および／または状態を含む。さらに、本明細書において「感染症」は、外来抗原の持続感染によって引き起こされ、ひいてはＴ細胞の増殖低下およびサイトカインの産生低下により示される機能低下を特徴とするＴ細胞表現型の疲弊に至る障害、疾患および／または状態を含む。さらに、本明細書において「感染性障害および／もしくは感染性疾患」ならびに／または「感染症」は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または寄生虫感染によって引き起こされる、以下に記載の感染性障害、感染性疾患および／または感染状態のいずれをも含む。本明細書において「ウイルス感染」は、ウイルスによって引き起こされるあらゆる感染症を包含し、該ウイルスとしては、レトロウイルス科（たとえば、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２などのヒト免疫不全ウイルス；ＨＴＬＶ－III、ＬＡＶ、ＨＴＬＶ－III／ＬＡＶ、またはＨＩＶ－IIIとも呼ばれる後天性免疫不全（ＡＩＤＳ）ウイルス；およびＨＩＶ－ＬＰなどの他の単離物）；ピコルナウイルス科（たとえば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、エンテロウイル

ス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（たとえば、胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（たとえば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（たとえば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（たとえば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（たとえば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（たとえば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（たとえば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルソミクソウイルス科（たとえば、インフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（たとえば、ハンタンウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（たとえば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（Ｂ型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（アデノウイルスの大部分）；ヘルペスウイルス科（単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）１型および２型、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス）；ポックスウイルス科（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；およびイリドウイルス科（たとえばアフリカ豚コレラウイルス）；ならびに未分類ウイルス（たとえば、海綿状脳症の病原体、デルタ型肝炎の病原体（Ｂ型肝炎ウイルスの不完全サテライトであると考えられている）、非Ａ非Ｂ型肝炎の病原体（分類１：経口伝播；分類２：非経口伝播（すなわちＣ型肝炎））、ノーウォークウイルスおよびその関連ウイルス、およびアストロウイルス）、重症急性呼吸器症候群ウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０３７４】

本明細書において「真菌感染」は、真菌によって引き起こされるあらゆる感染症を包含し、該真菌としては、クリプトコックス・ネオフォルマンス（Cryptococcus neoformans）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Histoplasma capsulatum）、コクシジオイデス・イミチス（Coccidioides immitis）、ブラストミセス・デルマチチジス（Blastomyces dermatitidis）、クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）、およびカンジダ・アルビカンス（Candida albicans）を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０３７５】

本明細書において「寄生虫感染」は、寄生虫によって引き起こされるあらゆる感染症を包含し、該寄生虫としては、アメーバ類、鞭毛虫類、熱帯熱マラリア原虫、トキソプラズマ、繊毛虫類、コクシジウム類、微胞子虫類、胞子虫類などの原虫；蠕虫類、線虫類（回虫類）、条虫類（サナダムシ類）、吸虫類；節足動物；およびプリオンとして知られている異常タンパク質を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０３７６】

細菌によって引き起こされる感染性障害および／または感染性疾患は、敗血症；敗血症性ショック；副鼻腔炎；皮膚感染；肺炎；気管支炎；髄膜炎；細菌性腟症；尿路感染症（ＵＣＩ）；細菌性胃腸炎；膿痂疹および丹毒；丹毒；蜂巣炎；炭疽病；百日咳；ライム病；ブルセラ症；腸炎；急性腸炎；破傷風；ジフテリア；偽膜性大腸炎；ガス壊疽；急性食中毒；嫌気性蜂巣炎；院内感染；下痢；小児髄膜炎；旅行者下痢；出血性大腸炎；溶血性尿毒症候群；野兎病；消化性潰瘍；胃十二指腸潰瘍；レジオネラ症；ポンティアック熱；レプトスピラ症；リステリア症；らい病（ハンセン病）；結核；淋病；新生児眼炎；敗血症性関節炎；髄膜炎を含む髄膜炎菌性疾患；ウォーターハウス・フリーデリクセン症候群；緑膿菌感染症；ロッキー山紅斑熱；腸チフス性サルモネラ症；胃腸炎および小腸結腸炎を伴うサルモネラ症；細菌性赤痢；コアグラーゼ陽性ブドウ球菌感染症、すなわち、びまん性皮膚感染（膿痂疹）を含む限局性皮膚感染、深部限局性感染、急性細菌性心内膜炎、敗血症、壊死性肺炎；毒素性ショック症候群およびブドウ球菌食中毒などの中毒症；膀胱炎；子宮内膜炎；中耳炎；連鎖球菌性咽頭炎；猩紅熱；リウマチ熱；産褥熱；壊死性筋膜炎；コレラ；ペスト（腺ペストおよび肺ペストを含む）の１以上を含んでいてもよく、か

つ、ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Borrelia burgdorferi）、レジオネラ・ニューモフィラ（Legionella pneumophilia）、マイコバクテリウム属（たとえば、結核菌（M. tuberculosis）、M. アビウム（M. avium）、M. イントラセルラー（M. Intracellulare）、M. カンサシ（M. kansasii）、M. ゴルドネ（M. gordonae））、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、淋菌（Neisseria gonorrhoeae）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、リステリア・モノサイトジェネス（Listeria monocytogenes）、化膿レンサ球菌（Streptococcus pyogenes）（Ａ群レンサ球菌）、Ｂ群溶血性レンサ球菌（Streptococcus agalactiae）（Ｂ群レンサ球菌）、ストレプトコッカス（viridans群）、ストレプトコッカス・フェカリス（Streptococcus faecalis）、ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）、ストレプトコッカス（嫌気性ストレプトコッカス属）、肺炎連鎖球菌、病原性のカンピロバクター属、エンテロコッカス属、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）、炭疽菌（Bacillus antracis）、ジフテリア菌（Corynebacterium diphtheriae）、コリネバクテリウム属、豚丹毒菌（Erysipelothrix rhusiopathiae）、ウェルシュ菌（Clostridium perfringers）、破傷風菌（Clostridium tetani）、エンテロバクター・アエロゲネス（Enterobacter erogenes）、肺炎桿菌（Klebsiella pneuomiae）、パスツレラ・ムルトシダ（Pasturella multicoda）、バクテロイデス属、フソバクテリウム・ヌクレアタム（Fusobacterium nucleatum）、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Streptobacillus moniliformis）、梅毒トレポネーマ（Treponema pallidum）、フランベジアトレポネーマ（Treponema pertenue）、レプトスピラ属、およびアクチノミセス・イスラエリイ（Actinomyces israelli）から選択される細菌（ただしこれらに限定されない）によって引き起こされるあらゆる感染症を含んでいてもよい。

【０３７７】

ウイルスによって引き起こされる感染性障害および／または疾患は、後天性免疫不全（ＡＩＤＳ）、西ナイル脳炎、コロナウイルス感染症、ライノウイルス感染症、インフルエンザ、デング熱、出血熱；耳科感染症；重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）、急性熱性咽頭炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、幼児胃腸炎、伝染性単核症、バーキットリンパ腫、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、一次ＨＳＶ－１感染症（小児の歯肉口内炎、成人の扁桃炎および咽頭炎、角結膜炎）、潜在性ＨＳＶ－１感染症（口唇ヘルペス、ヘルペス）、無菌性髄膜炎、サイトメガロウイルス感染症、巨細胞性封入体症、カポジ肉腫、キャッスルマン病、原発性滲出液リンパ腫、インフルエンザ、麻疹、脳炎、後感染性脳脊髄炎、耳下腺炎、過形成上皮病変（尋常性、扁平、足底、および肛門性器疣贅、喉頭乳頭腫、ならびに疣贅状表皮発育異常症）、クループ、肺炎、細気管支炎、ポリオ、狂犬病、細気管支炎、肺炎、風疹、先天性風疹、出血熱、水痘、デング熱、エボラ感染症、エコーウイルス感染症、ＥＢＶ感染症、伝染性紅斑、フィロウイルス、フラビウイルス、手足口病、帯状疱疹ウイルス（帯状疱疹）、ヒトパピローマウイルス関連上皮病変、ラッサ熱、リンパ球性脈絡髄膜炎、パラインフルエンザウイルス感染症、パラミクソウイルス、パルボウイルスＢ１９感染症、ピコルナウイルス、ポックスウイルス感染症、ロタウイルス性下痢、風疹、麻疹、水痘、痘瘡からなる群（ただしこれらに限定されない）から選択されるが、これらに限定されない。真菌によって引き起こされる感染性障害および／または疾患としては、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫、アスペルギルス症、バシジオボルス症、ブラストミセス症、カンジダ症、慢性肺アスペルギルス症、ツボカビ症、コクシジオイデス症、コニディオボルス症、堅黒穂病（オオムギ）、クリプトコックス症、皮膚糸状菌症、皮膚糸状菌疹、皮膚糸状菌症、毛内菌症、昆虫病原糸状菌症、流行性リンパ管炎、流行性潰瘍症候群、食道カンジダ症、毛外菌症、真菌血症、ヒストプラスマ症、ロボ真菌症、Massospora cicadina菌症、真菌症、イチゴのじゃのめ病、鼓膜真菌症、パラコクシジオイデス症、病原性真菌症、ペニシリウム症、Thousand cankers disease、白癬、Zeaspora症、接合菌症を挙げることができるが、これらに限定されない。寄生虫によって引き起こされる感染性障害および／または疾患は、アカントアメーバ症、アメーバ症、回虫症、十二指腸虫症、アニキサス症、バベシア症、バランチジウム症、ア

ライグマ回虫症、ブラストシスティス症、カンディル症、シャーガス病、肝吸虫症、コクリオミイヤ症、コクシジウム症、中国肝吸虫症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症、裂頭条虫症、腎虫感染症、メジナ虫症、エキノコックス症、象皮病、蟯虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、ジアルジア症、顎口虫症、膜様条虫症、ハルザン症候群、イソスポラ症、片山熱、リーシュマニア症、リンパ管フィラリア症、マラリア、横川吸虫症、蠅蛆病、回旋糸状虫症、シラミ寄生症、原発性アメーバ性髄膜脳炎、寄生性肺炎、肺吸虫症、疥癬、住血吸虫症、睡眠病、糞線虫症、孤虫症、リノスポリジウム症、河川盲目症、条虫症（嚢虫症の原因）、トキソカラ症、トキソプラズマ症、旋毛虫症、トリコモナス症、鞭虫症、トリパノソーマ症、条虫症からなる群（ただしこれらに限定されない）から選択されるが、これらに限定されない。

【０３７８】

感染症としては、たとえば、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、伝染性単核症ウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核菌、マラリアおよび住血吸虫のいずれかによって引き起こされる疾患が好ましい。

【０３７９】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の治療薬および／または該治療薬を含む医薬組成物と、感染症の治療に有効な公知の治療薬との組み合わせの使用が提供される。

【０３８０】

本明細書に記載の治療薬および／または該治療薬を含む医薬組成物は、細菌感染の治療に使用される１以上のさらなる治療薬と組み合わせて投与することができ、該細菌感染用治療薬として、アミノグリコシド、カルバペネム、セファロスポリン、マクロライド、リンコサミド、ニトロフラン、ペニシリン、ポリペプチド、キノロン、スルホンアミド、およびテトラサイクリンなどの抗生物質；クロファジミン、シクロセリン、シクロセリン、リファブチン、リファペンチン、およびストレプトマイシンなどの（ただしこれらに限定されない）抗マイコバクテリウム薬；ならびにクロラムフェニコール、ホスホマイシン、メトロニダゾール、ムピロシン、チニダゾールなどの他の抗菌薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３８１】

本明細書に記載の治療薬および／または該治療薬を含む医薬組成物は、ウイルス感染の治療に使用される１以上のさらなる治療薬と組み合わせて投与することができ、該ウイルス感染用治療薬として、オセルタミビル（商品名タミフル）、ザナミビル（商品名リレンザ）、アルビドール（アダマンタン誘導体）（アマンタジン、リマンタジン）、ノイラミニダーゼ阻害薬（オセルタミビル、ラニナミビル、ペラミビル、ザナミビル）などの抗ウイルス薬；グアニンアナログ（アシクロビル／バラシクロビル、ガンシクロビル／バルガンシクロビル、ペンシクロビル／ファムシクロビル）およびアデニンアナログ（ビダラビン）などのプリンアナログ、ならびにウリジンアナログ（イドクスウリジン、トリフルリジン、エドクスジン）、チミンアナログ（ブリブジン）、シトシンアナログ（シタラビン）などのピリミジンアナログを含むヌクレオチドアナログ逆転写酵素阻害薬；ホスカルネット；エンテカビル、ラミブジン、テルビブジン、クレブジンなどのヌクレオシドアナログ／ＮＡＲＴＩ；アデフォビル、テノホビルなどのヌクレオチドアナログ／ＮｔＲＴＩ；シドフォビルなどの核酸阻害薬；インターフェロン、インターフェロンα－２ｂ、ペグインターフェロンα－２ａ；リバビリン／タリバビリン；ジドブジン、ラミブジン、アバカビル、ロピナビル、リトナビル、テノホビル／エムトリシタビン、エファビレンツ（これらは単独または様々な組み合わせで使用される）、ｇｐ４１（エンフビルチド）、ラルテグラビルなどの抗レトロウイルス薬；ホスアンプレナビル、ロピナビル、アタザナビルなどのプロテアーゼ阻害薬；メチサゾン；ドコサノール；ホミビルセン；トロマンタジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３８２】

本明細書に記載の治療薬および／または該治療薬を含む医薬組成物は、真菌感染の治療

に使用される１以上のさらなる治療薬と組み合わせて投与することができ、該真菌感染用治療薬として、ポリエン系抗真菌薬、イミダゾール系抗真菌薬、トリアゾール系抗真菌薬、チアゾール系抗真菌薬、アリルアミン類、エキノキャンディン類、他の抗真菌薬などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０３８３】

医薬組成物

別の態様において本発明は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬のいずれか１つまたはそれらの組み合わせを含む組成物（たとえば医薬組成物）を提供する。

【０３８４】

したがって、本発明は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬を治療有効量で含む医薬組成物を特徴とする。

【０３８５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物は、本明細書に記載のがんの治療に使用することがさらに好ましい。

【０３８６】

「治療」は治療処置および予防手段の両方を指す。治療を必要とする対象としては、既に疾患に罹患しているものおよび疾患の予防がなされるものが挙げられる。したがって、本明細書において治療を受ける哺乳動物は、疾患に罹患していると診断されたもの、疾患の素因を有するもの、疾患に対して感受性を有するもののいずれであってもよい。治療の対象となる「哺乳動物」は、哺乳動物として分類されるあらゆる動物を指し、ヒト、家畜、動物園の飼育動物、スポーツに使用される動物、愛玩動物、たとえば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどが挙げられる。哺乳動物はヒトであることが好ましい。

【０３８７】

「治療有効量」は、哺乳動物の疾患または障害を治療するのに効果的な本発明の薬剤の量を指す。

【０３８８】

本発明の治療薬は、単独で対象に提供することができ、あるいは、薬学的に許容される担体と混合することにより医薬組成物の一部として提供することができる。

【０３８９】

ある成分をレシピエント患者に投与した際にその患者が該成分を寛容することができる場合、このような成分を「薬学的に許容される担体」であると言う。本明細書において「薬学的に許容される担体」は、生理学的に許容されるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌薬、抗真菌薬、等張化剤、吸収遅延剤などを包含する。担体は、（たとえば注射または点滴による）静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、表皮投与に適していることが好ましい。

【０３９０】

このような成分としては、滅菌水、緩衝食塩水（たとえばＴｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨおよびイオン強度が挙げられ、さらに、洗浄剤および可溶化剤（たとえばポリソルベート２０、ポリソルベート８０）、酸化防止剤（たとえばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（たとえばチメロサール、ベンジルアルコール）、増量成分（たとえばラクトース、マンニトール）などの添加物も挙げることができる。以下に詳述するように、非水性溶媒または非水性ビヒクルを使用してもよい。

【０３９１】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物において使用してもよい適切な水性および非水性の担体としては、水、エタノール、ポリオール類（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、これらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性を一定に保つためには、たとえば、レシチンなどのコーティング剤を使用したり、分散液の場合は粒子径を必要な大きさに保ったり、界面活性剤を使用したりすることができる。投与経路によっては、活性化合物、すなわち、ＬＳＲタンパク質のいず

れかに特異的に結合する、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、抗原結合フラグメントならびにこれらを含む複合体および／もしくは代替足場、または二重特異性分子は、何らかの材料でコーティングすることによって、該活性化合物を失活しうる酸の作用および他の自然条件から保護してもよい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬化合物は、薬学的に許容される塩を１以上含んでいてもよい。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒性作用を付与しない塩を指す（たとえば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい）。このような塩としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの無毒な無機酸に由来するもの；および脂肪族モノカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸、芳香族スルホン酸などの無毒な有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの；およびＮ,Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒な有機アミンに由来するものが挙げられる。

【０３９２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を含んでいてもよい。薬学的に許容される酸化防止剤としては、

（１）水溶性抗酸化剤、たとえば、アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；

（２）油溶性抗酸化剤、たとえば、アスコルビルパルミタート、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、α－トコフェロールなど；および

（３）金属キレート剤、たとえば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など

が挙げられる。

【０３９３】

このような組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤などのアジュバントを含んでいてもよい。微生物の混入を確実に防ぐために、上述の滅菌処理を行い、それに加えて様々な抗菌薬および抗真菌薬（たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など）を添加してもよい。糖類、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に添加することも望ましいと考えられる。さらに、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンなどの吸収遅延剤を添加することによって、注射剤形態の医薬品を持続的に吸収させてもよい。

【０３９４】

薬学的に許容される担体としては、滅菌注射溶液または滅菌分散液を即時調製するための、滅菌水溶液または滅菌分散液、および滅菌散剤が挙げられる。薬学的活性物質のための、このような媒体および薬剤の使用は当技術分野において公知である。慣用の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物に慣用の媒体または薬剤を使用してもよい。また、補助的な活性化合物を医薬組成物に含有させることもできる。

【０３９５】

治療用組成物は、通常、製造過程および保存中において無菌かつ安定でなければならない。治療用組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高濃度の薬物に適した他の秩序構造に製剤化することができる。担体は溶媒または分散媒であってよく、溶媒または分散媒としては、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物が挙げられる。適切な流動性を一定に保つためには、たとえば、レシチンなどのコーティング剤を使用したり、分散液の場合は粒子径を必要な大きさに保ったり、界面活性剤を使用したりすることができる。多くの場合、等張化剤、たとえば、糖類、多価アル

コール（たとえばマンニトールやソルビトールなど）、または塩化ナトリウムを組成物に添加することが好ましいであろう。また、たとえばモノステアリン酸塩、ゼラチンなどの吸収遅延剤を注射用組成物に添加することによって、該注射用組成物を持続的に吸収させることができる。滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化合物と、上記の成分のうちの１つまたは上記の成分の組み合わせとを混合し、必要に応じて滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。分散液は、通常、基本的な分散媒と上記の他の成分のうち必要とされる成分とを含む滅菌ビヒクルに活性化合物を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌散剤の場合は、有効成分と所望のさらなる成分とを含む溶液をあらかじめ滅菌ろ過し、この溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、有効成分と所望のさらなる成分とを含む粉末を調製する方法が好ましい。

【０３９６】

滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化合物と、上記の成分のうちの１つまたは上記の成分の組み合わせとを混合し、必要に応じて滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。分散液は、通常、基本的な分散媒と上記の他の成分のうち必要とされる成分とを含む滅菌ビヒクルに活性化合物を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌散剤の場合は、有効成分と所望のさらなる成分とを含む溶液をあらかじめ滅菌ろ過し、この溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、有効成分と所望のさらなる成分とを含む粉末を調製する方法が好ましい。

【０３９７】

本発明の組成物は、当技術分野において公知の様々な方法の１以上を使用し、１以上の投与経路を介して投与することができる。当業者によって十分に理解されるように、投与経路および／または投与方法は所望とする効果によって異なるであろう。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療薬の好ましい投与経路としては、血管内送達（たとえば注射または点滴）、静脈内送達、筋肉内送達、皮内送達、腹腔内送達、皮下送達、脊髄送達、経口送達、経腸送達、直腸送達、肺送達（たとえば吸入）、経鼻送達、局所送達（経皮送達、頬側送達および舌下送達を含む）、膀胱内送達、硝子体内送達、腹腔内送達、経膣送達、脳内送達（たとえば脳室内送達、脳内送達、およびＣＥＤ（convection enhanced diffusion）法）、ＣＮＳ送達（たとえば髄腔内送達、脊髄周囲送達、および脊髄内送達）、非経口投与（皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、および皮内投与を含む）、経粘膜投与（たとえば舌下投与）、移植片を介した投与、他の非経口投与経路（たとえば注射または点滴などによる非経口投与経路）、ならびに当技術分野において公知の他の送達経路および／または投与形態が挙げられる。本明細書において「非経口投与」は、経腸投与および局所投与以外の、通常注射による投与方法を意味し、非経口投与には、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨下における注射および点滴が包含されるが、これらに限定されない。特定の実施形態においては、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質、治療薬または医薬組成物は、腹腔内または静脈内に投与することができる。

【０３９８】

あるいは、ＬＳＲ特異的抗体は、非経口経路以外の経路で投与することができ、たとえば、鼻腔内投与、経口投与、経膣投与、直腸投与、舌下投与、局所投与などの、局所投与経路、表皮投与経路、粘膜投与経路により投与することができる。

【０３９９】

活性化合物は、該活性化合物の急速な放出を防ぐ担体を使用して調製することができ、たとえば移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化された送達システムなどの放出制御製剤とすることができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生物分解性および生体適合性のポリマーを使用することができる。このような製剤の調製方法は、数多くが特許されており、当業者によく知られている。たとえば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【０４００】
治療用組成物は当技術分野において公知の医療器具を用いて投与することができる。たとえば、好ましい実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物は、針を備える皮下注射器で投与することができ、このような器具は、米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；または第4,596,556号に開示されている。本発明において有用な公知の移植片およびモジュールとしては、米国特許第4,487,603号（制御された速度で薬剤を供給するための、移植可能なマイクロ輸液ポンプが開示されている）；米国特許第4,486,194号（皮膚を介して薬剤を投与するための治療器具が開示されている）；米国特許第4,447,233号（正確な輸液速度で薬剤を送達するための薬剤輸液ポンプが開示されている）；米国特許第4,447,224号（連続的な薬剤送達のための、流量の変更および移植が可能な輸液装置が開示されている）；米国特許第4,439,196号（マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムが開示されている）；および米国特許第4,475,196号（浸透圧薬物送達システムが開示されている）が挙げられる。これらの特許文献は本明細書の一部を構成するものとして援用される。このような移植片、送達システムおよびモジュールとして、他にも数多くのものが当業者に知られている。

【０４０１】
特定の実施形態において、上記の抗ＬＳＲ抗体は、インビボにおいて確実に適切な分布となるように製剤化することができる。たとえば、脳血液関門（ＢＢＢ）は数多くの高親水性化合物を排除するが、（所望であれば）本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療化合物がＢＢＢを確実に通過するように、たとえば、リポソームに内包させて製剤化することができる。リポソームの製造方法については、たとえば、米国特許第4,522,811号；第5,374,548号；および第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器へ選択的に輸送される１以上の成分を含んでいてもよく、それによってターゲティングされた薬物送達を増強してもよい（たとえば、V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。ターゲティングのための典型的な成分としては、葉酸塩またはビオチン（たとえば、Lowらに付与された米国特許第5,416,016号を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；サーファクタントタンパク質Ａ受容体（Briscoe et al. (1995) Am. J Physiol. 1233:134）；ｐ１２０（Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）が挙げられ、さらに、K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい。

【０４０２】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、抗ＬＳＲ抗体は中和抗体として使用することができる。中和抗体（Ｎａｂ）は、特定の抗原に結合してこれを中和または抑制することによって、その抗原が有する生物学的作用を抑制することができる抗体であり、たとえば、細胞またはウイルスの受容体を阻害することにより宿主細胞へのウイルスの結合を抑制する。ＮＡｂは、特定の作用因子の生物学的作用を部分的または完全に打ち消すことができ、作用因子の活動に必要とされる重要な表面分子を阻害するか、または標的細胞の受容体への作用因子の結合を阻害することによってその効果を発揮する。

【０４０３】
さらに別の実施形態では、本発明の抗体と化合物（たとえば治療薬、標識、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制薬など）とを結合させた本発明の免疫複合体を使用して、このような化合物を、ＬＳＲ細胞表面受容体を有する細胞にターゲティングすることができる。したがって、本発明はさらに、エクスビボまたはインビボにおいて、（たとえば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、酵素補因子などの検出可能な標識を使用して）ＬＳＲ発現細胞の位置を特定する方法を提供する。別の方法として、免疫複合体を使用して、細胞毒素または放射性毒素をＬＳＲ抗原にターゲティングすることにより、ＬＳＲ細胞表面受容体を

有する細胞を死滅させることができる。

【０４０４】

本明細書において「薬学的に許容される担体」は、生理学的に許容されるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌薬、抗真菌薬、等張化剤、吸収遅延剤などを包含する。担体は、（たとえば注射または点滴による）静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、表皮投与に適していることが好ましい。投与経路によっては、活性化合物、すなわち、ＬＳＲ抗原の細胞外ドメイン、抗体、免疫複合体、代替足場および／または二重特異性分子を含む可溶性ポリペプチド複合体を、何らかの材料でコーティングすることによって、該活性化合物を失活しうる酸の作用および他の自然条件から該活性化合物を保護してもよい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬化合物は、薬学的に許容される塩を１以上含んでいてもよい。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒性作用を付与しない塩を指す（たとえば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい）。このような塩としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの無毒な無機酸に由来するもの；および脂肪族モノカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸、芳香族スルホン酸などの無毒な有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの；およびＮ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒な有機アミンに由来するものが挙げられる。

【０４０５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を含んでいてもよい。薬学的に許容される酸化防止剤としては、

（１）水溶性抗酸化剤、たとえば、アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；

（２）油溶性抗酸化剤、たとえば、アスコルビルパルミタート、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、α－トコフェロールなど；および

（３）金属キレート剤、たとえば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など

が挙げられる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物において使用してもよい適切な水性および非水性の担体としては、水、エタノール、ポリオール類（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、これらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性を一定に保つためには、たとえば、レシチンなどのコーティング剤を使用したり、分散液の場合は粒子径を必要な大きさに保ったり、界面活性剤を使用したりすることができる。

【０４０６】

このような組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤などのアジュバントを含んでいてもよい。微生物の混入を確実に防ぐために、上述の滅菌処理を行い、それに加えて様々な抗菌薬および抗真菌薬（たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など）を添加してもよい。糖類、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に添加することも望ましいと考えられる。さらに、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンなどの吸収遅延剤を添加することによって、注射剤形態の医薬品を持続的に吸収させてもよい。

【０４０７】

薬学的に許容される担体としては、滅菌注射溶液または滅菌分散液を即時調製するための、滅菌水溶液または滅菌分散液、および滅菌散剤が挙げられる。薬学的活性物質のための、このような媒体および薬剤の使用は当技術分野において公知である。慣用の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、本発明の実施形態の少なくともいくつか

による医薬組成物に慣用の媒体または薬剤を使用してもよい。また、補助的な活性化合物を医薬組成物に含有させることもできる。

【０４０８】

治療用組成物は、通常、製造過程および保存中において無菌かつ安定でなければならない。治療用組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高濃度の薬物に適した他の秩序構造に製剤化することができる。担体は溶媒または分散媒であってよく、溶媒または分散媒としては、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物が挙げられる。適切な流動性を一定に保つためには、たとえば、レシチンなどのコーティング剤を使用したり、分散液の場合は粒子径を必要な大きさに保ったり、界面活性剤を使用したりすることができる。多くの場合、等張化剤、たとえば、糖類、多価アルコール（たとえばマンニトールやソルビトールなど）、または塩化ナトリウムを組成物に添加することが好ましいであろう。また、たとえばモノステアリン酸塩、ゼラチンなどの吸収遅延剤を注射用組成物に添加することによって、該注射用組成物を持続的に吸収させることができる。滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化合物と、上記の成分のうちの１つまたは上記の成分の組み合わせとを混合し、必要に応じて滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。分散液は、通常、基本的な分散媒と上記の他の成分のうち必要とされる成分とを含む滅菌ビヒクルに活性化合物を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌散剤の場合は、有効成分と所望のさらなる成分とを含む溶液をあらかじめ滅菌ろ過し、この溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、有効成分と所望のさらなる成分とを含む粉末を調製する方法が好ましい。

【０４０９】

滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化合物と、上記の成分のうちの１つまたは上記の成分の組み合わせとを混合し、必要に応じて滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。分散液は、通常、基本的な分散媒と上記の他の成分のうち必要とされる成分とを含む滅菌ビヒクルに活性化合物を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌散剤の場合は、有効成分と所望のさらなる成分とを含む溶液をあらかじめ滅菌ろ過し、この溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、有効成分と所望のさらなる成分とを含む粉末を調製する方法が好ましい。

【０４１０】

単一剤形を調製するために担体材料と組み合わせられる有効成分の量は、治療対象および特定の投与方法によって異なるであろう。単一剤形を調製するために担体材料と組み合わせられる有効成分の量は、通常、治療効果をもたらす上記組成物の量であろう。有効成分の量は、通常、薬学的に許容される担体と組み合わせる場合、全体を１００％として、約０．０１％～約９９％の範囲、好ましくは約０．１％～約７０％の範囲、最も好ましくは約１％～約３０％の範囲であろう。

【０４１１】

投与計画は所望の応答（たとえば治療応答）が最適化されるように調整される。たとえば、単一のボーラスとして投与してもよく、数回分の用量に分割して一定期間にわたり投与してもよく、あるいは、治療状況に伴う緊急性に応じて用量を減少または増加させてもよい。投与を容易にするためおよび用量を均一にするために単位剤形の非経口組成物を製剤化すると特に有利である。本明細書において、単位剤形は、治療を受ける対象に単位用量を投与するのに適した物理的に別個の単位を指し、それぞれの単位は、必要とされる薬学的担体とともに所望の治療効果をもたらすように算出された所定量の活性化合物を含んでいる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる単位剤形の仕様は、（ａ）活性化合物に特有の特性および達成されるべき特定の治療効果、ならびに（ｂ）個体の感受性を治療するための上記のような活性化合物の調剤技術に固有の制限事項によって決定されかつこれらによって直接的に左右される。

【０４１２】

抗体を投与する場合、その用量は宿主の体重あたり、約０．０００１～１００ｍｇ／ｋ

ｇの範囲、より一般的には０．０１～５ｍｇ／ｋｇの範囲である。たとえば、上記の用量は、０．３ｍｇ／ｋｇ体重、１ｍｇ／ｋｇ体重、３ｍｇ／ｋｇ体重、５ｍｇ／ｋｇ体重、１０ｍｇ／ｋｇ体重のいずれであってもよく、１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲であってもよい。典型的な治療計画においては、投与を週に１回、２週に１回、３週に１回、４週に１回、月に１回、３ヶ月に１回、または３～６ヶ月に１回行う。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体の投与計画としては、

（ｉ）４週ごとに１回の投与を計６回行い、以降３ヶ月ごとに１回投与；

（ii）３週ごとに１回投与；

（iii）３ｍｇ／ｋｇ体重を１回投与後、１ｍｇ／ｋｇ体重を３週ごとに１回投与

から選択される投薬スケジュールのうちの１つを使用して、１ｍｇ／ｋｇ体重または３ｍｇ／ｋｇ体重の抗体を静脈内投与することを含むことが好ましい。

【０４１３】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する２種以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合、投与される各抗体の用量は上記の範囲内である。通常、抗体は複数回にわたって投与される。１回の投与と次の投与との間隔は、たとえば、１週間、１ヶ月、３ヶ月、１年のいずれであってもよい。標的抗原に対する抗体の患者血中レベルの測定値を指標として、投与間隔を不規則にしてもよい。いくつかの方法では、血漿中抗体濃度が約１～１０００μｇ／ｍＬとなるように用量を調整し、さらにいくつかの別の方法では血漿中抗体濃度が約２５～３００μｇ／ｍＬとなるように用量を調整する。

【０４１４】

あるいは、治療薬を徐放性製剤として投与することができ、この場合、投与頻度は上記よりも少なくなる。用量および投与頻度は、患者体内における治療薬の半減期によって異なる。通常、半減期はヒト抗体が最も長く、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体が後に続く。融合タンパク質の半減期は、融合タンパク質ごとに大きく異なりうる。用量および投与頻度は、その処置が予防目的か、治療目的かによって異なりうる。予防的な投与においては、比較的低用量を比較的長い間隔で長期間にわたり投与する。一部の患者においては、生涯にわたり処置を行う。治療目的の投与においては、疾患の進行が低下または停止するまで、好ましくは患者において疾患の症状が部分的または完全に改善されるまで、比較的高用量を比較的短い間隔で投与することが必要とされる場合がある。この後、患者に予防的な投与を行ってもよい。

【０４１５】

患者に毒性を与えることなく、特定の患者、組成物および投与方法において所望の治療効果を得るのに効果的な有効成分量とするため、本発明の医薬組成物に含まれる有効成分の実際の投与量レベルは様々であってよい。投与量レベルは、様々な薬物動態学的要因に応じて選択され、薬物動態学的要因としては、使用する本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性；投与経路；投与時期；使用する特定の化合物の排泄速度；治療期間；使用する特定の組成物と併用される他の薬物、化合物および／または材料；治療を受ける患者の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康状態および既往症；ならびに医学分野においてよく知られている同様の要因が挙げられる。

【０４１６】

非経口投与用製剤

さらなる実施形態では、本明細書に開示の組成物（ペプチドまたはポリペプチドを含む組成物を包含する）は、水溶液の形態で非経口注射により投与される。この製剤は、懸濁液であっても乳液であってもよい。通常、本発明により提供される医薬組成物は、有効量のペプチドまたはポリペプチドを含み、薬学的に許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバントおよび／または担体をさらに含んでいてもよい。このような組成物は、希釈剤；滅菌水；様々な緩衝剤成分（たとえば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨおよびイオン強度の緩衝食塩水；ならびに添加剤から選択される１以上を含んでいてもよく、該添加剤としては、洗浄剤および可溶化剤（たとえば、TWEEN 20（ポリソルベート２０）、TWEEN 80（ポリソルベート８０））、抗酸化剤（たとえば、アスコルビン酸、メ

タ重亜硫酸ナトリウム、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；アスコルビルパルミタート、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、α－トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；およびクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤）、保存剤（たとえば、チメロサール、ベンジルアルコール）ならびに増量成分（たとえばラクトース、マンニトール）が挙げられる。非水性溶媒またはビヒクルとしては、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（オリーブ油、トウモロコシ油など）、ゼラチン、および注射用有機エステル（オレイン酸エチルなど）が挙げられる。上記の製剤は、凍結乾燥または真空乾燥されていてもよく、使用の直前に再溶解／再懸濁してもよい。上記の製剤の滅菌は、たとえば、細菌捕集フィルターを通した濾過、組成物への滅菌剤の添加、組成物への放射線照射、または組成物の加熱によって行ってもよい。

【０４１７】

局所投与用製剤

本明細書に開示のＬＳＲポリペプチド、フラグメント、融合ポリペプチド、核酸およびベクターは、局所適用することができる。ペプチド製剤は局所投与しても効果を発揮しないものが多いが、特に肺、鼻、口腔（舌下、頬側）、膣、または直腸粘膜に適用すると効果を発揮する場合がある。

【０４１８】

組成物は、空気動力学的直径が約５ミクロン未満のエアロゾルまたはスプレー乾燥粉末として送達した場合、肺に送達することができ、吸入された組成物は肺上皮層を横切って血流に達する。治療薬を肺送達するために設計された様々な機械装置を使用することができ、このような装置としては、ネブライザー、定量吸入器および粉末吸入器が挙げられるが、これらに限定されず、このような装置はいずれも当業者によく知られている。市販のこのような装置の具体例としては、Ultraventネブライザー（マリンクロット社、ミズーリ州セントルイス）；Acorn IIネブライザー（Marquest Medical Products、コロラド州エングルウッド）；Ventolin定量吸入器（グラクソ社、ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク）；およびSpinhaler粉末吸入器（ファイソンズ社、マサチューセッツ州ベッドフォード）が挙げられる。Nektar、AlkermesおよびMannkindはいずれも承認下または臨床試験中の吸入型インスリン粉末調製物を含有しており、このような技術は本明細書に記載の製剤に適用できる可能性がある。

【０４１９】

粘膜投与用製剤は、通常、スプレー乾燥された薬物粉末であり、錠剤、ゲル、カプセル、懸濁液または乳液の形態としてもよい。標準的な医薬品賦形剤は製薬会社から入手可能である。経口製剤は、チューインガム、ゲルストリップ、錠剤またはロゼンジの形態であってもよい。経皮製剤として調製してもよい。経皮製剤は、通常、軟膏剤、ローション剤、スプレーまたはパッチであり、これらはいずれも標準的な技術を使用して調製することができる。経皮製剤には経皮吸収促進剤の添加が必要であろう。

【０４２０】

送達制御ポリマーマトリックス

本明細書に開示のＬＳＲポリペプチド、フラグメント、融合ポリペプチド、核酸およびベクターは、放出制御製剤の形態で投与してもよい。放出制御ポリマーデバイスは、ポリマーデバイス（棒状、円柱状、フィルム状、円盤状）を移植または注射（マイクロパーティクル状）した後、長期間にわたり薬物が全身に放出されるように製剤化してもよい。マトリックスは、マイクロスフェアなどのマイクロパーティクルの形態であってもよく、ペプチドは固体のポリマーマトリックス内またはマイクロカプセル内に分散されている。このようなマイクロパーティクルは、それぞれの材質が異なるコアとポリマーシェルとからなり、自然な状態で液体であっても固体であってもよいコアにペプチドが分散または懸濁されている。本明細書に特に記載されていない限り、マイクロパーティクル、マイクロスフェアおよびマイクロカプセルという用語は同じ意味で用いられる。別の方法として、ポ

リマーは、ナノメーター単位～４ｃｍの薄い板状またはフィルム状に流延してもよく、粉砕または他の標準的な技術により粉末にしてもよく、さらには、ヒドロゲルなどのゲルにしてもよい。非生物分解性マトリックスと生物分解性マトリックスのいずれを使用してもポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードする核酸を送達することができるが、生物分解性マトリックスを使用することが好ましい。これらのマトリックスは天然ポリマーであっても合成ポリマーであってもよいが、分解性および放出特性に優れていることから合成ポリマーが好ましい。ポリマーは所望の放出時間に基づいて選択される。直線性の放出挙動が最も有益である場合もあれば、パルス放出または「バルク放出」がより効果的である場合もある。ポリマーは、ヒドロゲル（通常、最大約９０重量％の水を吸収している）の形態であってもよく、多価イオンまたはポリマーで架橋されていてもよい。

【０４２１】

マトリックスは、溶媒留去、スプレー乾燥、溶媒抽出および当業者に公知の他の方法によって形成することができる。生体内分解性マイクロスフェアは、薬物送達用マイクロスフェアの製造のために開発された方法を使用して調製することができ、このような方法は、たとえば、Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5:13-22 (1987);Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6:275-283 (1987);およびMathiowitz, et al., J. Appl Polymer ScL, 35:755-774 (1988)に記載されている。

【０４２２】

上記のポリマーデバイスは、局所放出により移植部位または注射部位を治療するものとして製剤化することができ（通常、全身を治療する際の用量よりもはるかに少ない用量が送達される）、あるいは、全身送達を行うものとして製剤化することができる。このようなポリマーデバイスは、筋肉や脂肪中に皮下移植または皮下注射することができ、あるいは経口投与することができる。

【０４２３】

抗ＬＳＲ抗体の診断用途

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の抗体（たとえば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性分子、二重特異性分子および組成物）を使用して、ＬＳＲレベルまたは膜表面上にＬＳＲを含む細胞の濃度を検出することができ、検出されたレベルまたは濃度を特定の疾患の症状と関連付けることができる。あるいは、上記の抗体を使用してＬＳＲの機能を抑制または阻害することにより、がんの予防または改善を行うことができる。これらの方法は、ＬＳＲとこれに対応する抗体との間で複合体を形成することが可能な条件下において、試料またはコントロール試料と抗ＬＳＲ抗体と接触させることよって行うことができる。ＬＳＲと抗体との間で形成された複合体であればどのようなものでも試料中およびコントロール中において検出および比較することができる。

【０４２４】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の抗体（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子、二重特異性分子および組成物）は、まず、治療用途または診断用途に関連する結合活性についてインビトロで試験される。たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物は、フローサイトメトリーアッセイを使用して試験することができる。

【０４２５】

さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＳＲ特異的抗体（たとえば、ヒト抗体、代替足場、二重特異性分子、多重特異性分子または免疫複合体）と使用説明書とを含むキットも本発明の範囲内に含まれる。該キットは、１以上のさらなる試薬（免疫抑制性試薬、細胞傷害薬、放射性毒性薬など）、または本発明の実施形態の少なくともいくつかによる１以上のさらなるヒト抗体（たとえば、第１のヒト抗体とは異なる抗原エピトープに結合する相補活性を有するヒト抗体）をさらに含んでいてもよい。

【０４２６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を使用して、ＦｃγＲまたはＬＳＲを発現している細胞をターゲティングすることができ、これによって、たとえば、このよ

うな細胞を標識することができる。また、このようなターゲティングによって、検出可能な分子に本発明の結合薬を連結することができる。したがって、本発明は、エクスビボまたはインビトロにおいて、ＦｃγＲなどのＦｃ受容体またはＬＳＲ抗原を発現している細胞の位置を特定する方法を提供する。検出標識は、たとえば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、酵素補因子のいずれであってもよい。

【０４２７】

特定の実施形態において、本発明は、試料中のＬＳＲ抗原の存在および／もしくはＬＳＲ抗原レベルを検出する方法、またはＬＳＲ抗原の量を測定する方法を提供し、これらの方法は、抗体またはその一部とＬＳＲとの間で複合体を形成することが可能な条件下において、試料またはコントロール試料と、ＬＳＲに特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分とを接触させることを含む。次いで、形成された複合体を検出し、複合体の形成における差異を試料とコントロール試料との間で比較することによって、試料中のＬＳＲ抗原の存在を知ることができる。上述したように、本発明は特に、ＬＳＲ抗原をインビトロおよびインビボで検出するためのアッセイを包含し、このようなアッセイとしては、イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ラジオアッセイ、放射性イメージングアッセイ、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロット、ＦＡＣＳ、スロットブロット、免疫組織化学的アッセイ、当業者によく知られている他のアッセイなどが挙げられる。

【０４２８】

さらに別の実施形態では、本発明の抗体と化合物（たとえば治療薬、標識、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制薬など）とを結合させた本発明の免疫複合体を使用して、このような化合物を、ＬＳＲ細胞表面受容体を有する細胞にターゲティングすることができる。したがって、本発明はさらに、エクスビボまたはインビボにおいて、（たとえば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、酵素補因子などの検出可能な標識を使用して）ＬＳＲ発現細胞の位置を特定する方法を提供する。別の方法として、免疫複合体を使用して、細胞毒素または放射性毒素をＬＳＲ抗原にターゲティングすることにより、ＬＳＲ細胞表面受容体を有する細胞を死滅させることができる。

【０４２９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、臓器または組織をイメージングする方法であって、

（ａ）臓器または組織のイメージングを必要とする対象に標識ポリペプチドを投与すること；および

（ｂ）標識ポリペプチドが対象のどこで濃縮されているのかを決定するために標識ポリペプチドを検出すること

を含む方法を提供する。

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる標識ポリペプチドをイメージング用途に使用する場合、通常、造影剤を標識ポリペプチドに共有結合または非共有結合を介して結合させる。適切な造影剤としては、放射性核種、検出可能なタグ、発蛍光団、蛍光タンパク質、酵素タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。ポリペプチドに造影剤を結合するための他の方法は、当業者によく知られているであろう。たとえば、造影剤は部位特異的な結合を介してポリペプチドに結合させることができ、たとえば、Ｆｃ融合分子のカルボキシル末端に付加された５～７個のアルギニンを有するポリアルギニン部分などのようなペプチドリンカーに造影剤を共有結合させることができる。また、造影剤は非部位特異的結合を介してポリペプチドに直接結合させることもでき、たとえば、ポリペプチドに存在する第一級アミン基に造影剤を共有結合させることができる。非共有結合性相互作用（たとえば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、双極子－双極子結合など）を介して造影剤をタンパク質に結合することも可能であることは、当業者によって容易に理解されるであろう。

【０４３０】

特定の場合においては、放射性核種をポリペプチドに直接結合させることによって、ポリペプチドを放射性核種で放射標識する。別の特定の場合においては、ポリペプチドに結

合されたキレート剤またはキレート剤リンカーに放射性核種を結合させる。直接結合させるのに適した放射性核種としては、^{18}Ｆ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、およびこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。キレート剤とともに使用するのに適した放射性核種としては、^{47}Ｓｃ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{89}Ｓｒ、^{86}Ｙ、^{87}Ｙ、^{90}Ｙ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{117m}Ｓｎ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｂｉ、およびこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。キレート剤に結合される放射性核種としては、^{64}Ｃｕ、^{90}Ｙ、^{111}Ｉｎ、またはこれらの混合物が好ましい。適切なキレート剤としては、ＤＯＴＡ、ＢＡＤ、ＴＥＴＡ、ＤＴＰＡ、ＥＤＴＡ、ＮＴＡ、ＨＤＴＡ、これらのホスホン酸アナログ、およびこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドに放射性核種、キレート剤およびキレート剤リンカーを結合させる方法は、当業者によく知られているであろう。このような結合は簡便に行うことができ、具体的には、たとえば、ポリペプチド上の官能基のうち該ポリペプチドの機能を阻害しない位置に存在する官能基に結合することが可能であり、さらに放射性核種、キレート剤またはキレート剤リンカーとも連結することが可能な、市販の二機能性連結基（通常、ヘテロ二機能性連結基）を使用することによって簡便に行うことができる。

【０４３１】

造影剤として使用するのに適した発蛍光団または蛍光色素としては、Alexa Fluor（登録商標）色素（インビトロジェン社；カリフォルニア州カールスバッド）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、オレゴングリーン（登録商標）、ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、Cy Dye（登録商標）fluors（たとえばＣｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３２】

造影剤として使用するのに適した蛍光タンパク質としては、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質（たとえばＤｓＲｅｄ）、黄色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、およびこれらのバリアントが挙げられるが、これらに限定されない（たとえば、米国特許第6,403,374号、第6,800,733号および第7,157,566号を参照されたい）。ＧＦＰバリアントの具体例としては、enhanced GFP（EGFP）、destabilized EGFP、Doan et al., Mol. Microbiol., 55:1767-1781 (2005)に記載されているＧＦＰバリアント、Crameri et al., Nat. Biotechnol., 14:315-319 (1996)に記載されているＧＦＰバリアント、Rizzo et al., Nat. Biotechnol, 22:445 (2004)およびTsien, Annu. Rev. Biochem., 67:509 (1998)に記載されているセルリアン蛍光タンパク質、およびNagal et al., Nat. Biotechnol., 20:87-90 (2002)に記載されている黄色蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。ＤｓＲｅｄバリアントは、たとえば、Shaner et al., Nat. Biotechnol., 22:1567-1572 (2004)に記載されており、mStrawberry、mCherry、morange、mBanana、mHoneydewおよびmTangerineを含む。さらなるＤｓＲｅｄバリアントは、たとえば、Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101:16745-16749 (2004)に記載されており、mRaspberryおよびmPlumを含む。ＤｓＲｅｄバリアントとしてはさらに、Fischer et al., FEBS Lett.,577:227-232 (2004)に記載されているmRFPmars、およびFischer et al., FEBS Lett., 580:2495-2502 (2006)に記載されているmRFPrubyが挙げられる。

【０４３３】

別の実施形態において、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるポリペプチドに結合される造影剤としては、検出可能なタグ、たとえば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジンなどが挙げられる。さらなる実施形態では、造影剤は酵素タンパク質を含み、酵素タンパク質としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、キシラナーゼ、アルカリホスファターゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３４】
対象中に存在する放射性核種からの放射線放射を検出するための、当技術分野で公知の装置および方法はいずれも本発明での使用に適している。たとえば、シングルフォトンエミッションコンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）（回転型ガンマカメラを使用して単光子放出核種から放射されるγ線を検出する）、および放射性核種シンチグラフィ（シンチレーションガンマカメラを使用して、組織、臓器または身体系における放射性核種の分布を一枚の画像または一連の連続画像として得る）などの方法を本発明の放射性標識ポリペプチドから放射される放射線の検出に使用してもよい。また、対象中に存在する放射線を検出するのに適した別の技術としては、ポジトロン放射断層撮影（ＰＥＴ）が挙げられる。小型で柔軟に使える医療用の放射線検出器は、Intra-Medical LLC（カリフォルニア州サンタモニカ）によって製造されている。さらに、磁気共鳴イメージング（ＭＲＩ）または当業者に公知の他のイメージング技術も、放射性核種からの放射線放射を検出するのに適している。使用する方法や装置に関係なく、上記のような検出は、標識ポリペプチドが対象のどこで濃縮されているのかを決定することを目的としており、そのような濃縮は疾患活動性の指標となる。

【０４３５】
動物およびヒトの非侵襲的な蛍光イメージングによってもインビボ診断情報を得ることができ、このような技術は様々な臨床専門分野において使用することができる。たとえば、ＵＶ励起後に簡便に視覚的観察を行うための技術や高度な機器を使用した精巧な分光イメージングが長年にわたって開発されてきた（たとえば、Andersson-Engels et al., Phys. Med. Biol., 42:815-824 (1997)を参照されたい）。発蛍光団や蛍光タンパク質などから発せられる蛍光をインビボにおいて検出するための当技術分野で公知の装置または方法の具体的として、インビボ近赤外線蛍光（たとえばFrangioni, Curr. Opin. Chem. Biol., 7:626-634 (2003)を参照されたい）、Maestro（登録商標）インビボ蛍光イメージングシステム（Cambridge Research & Instrumentation, Inc.；マサチューセッツ州ウォーバーン）、フライングスポットスキャナーを使用したインビボ蛍光イメージング（たとえばRamanujam et al., IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 48:1034-1041 (2001)を参照されたい）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３６】
光学的応答を検出するための他の方法または装置としては、目視検査、ＣＣＤカメラ、ビデオカメラ、写真フィルム、レーザースキャン装置、蛍光光度計、フォトダイオード、量子カウンター、落射蛍光顕微鏡、走査型顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光マイクロプレートリーダー、および光電子増倍管を使用した信号増幅が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３７】
実施形態のいくつかによれば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる診断アッセイを実施するために対象（患者）から採取される試料は、体液および分泌液からなる群から選択され、体液および分泌液としては、血液、血清、尿、血漿、前立腺液、精漿、精液；皮膚、呼吸器、腸および泌尿生殖路の外分泌液；涙液、脳脊髄液、滑液、喀痰、唾液、乳汁、腹水、胸膜液、嚢胞液、乳管系分泌液（および／または洗浄液）、肺胞洗浄液、生殖器系洗浄液、身体の他の部分または身体の他の系の洗浄液；単離された細胞または組織などの、任意の臓器から得られた試料（肺組織、結腸組織、卵巣組織および／または乳房組織から選択される臓器（ただしこれらに限定されない）から得ることができる細胞または組織）；便、組織試料；ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。実施形態のいくつかにおいて、上記の試料は、インビボ細胞培養の構成物から得られた試料を包含する。診断アッセイに試料を供する前に、試料を適切な溶離液で希釈してもよい。

【０４３８】
実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載の「マーカー」は、本明細書に記載の疾患および状態のいずれか１つを有する患者（対象）から採取された試料と、本明細書に記

載の疾患も状態も有していない対象から採取された同種の試料とを比較したときに、患者試料中に示差的に存在している核酸フラグメント、ペプチドまたはポリペプチドを指す。

【０４３９】

実施形態のいくつかにおいて、「示差的に存在する」とは、本明細書に記載の疾患および状態のいずれか１つを有する患者から採取された試料と、本明細書に記載の疾患も状態も有していない患者から採取された同種の試料とを比較したときの、試料中に存在するマーカーの量的差異または質的差異を指す。たとえば、ハイブリダイゼーションおよび／またはＮＡＴに基づいたアッセイなどによって測定したときに、一方の試料中の核酸フラグメントの量がもう一方の試料とは顕著に異なる場合、核酸フラグメントは２つの試料間において示差的に存在しているといえる。また、一方の試料中のポリペプチドの量がもう一方の試料とは顕著に異なる場合、ポリペプチドは２つの試料間において示差的に存在している。特定のマーカーが一方の試料において検出可能であるが、もう一方の試料では検出できない場合、このようなマーカーは示差的に存在していると考えられることには注意すべきである。本明細書に記載されているように、比較的小さなアップレギュレーションをマーカーとして使用してもよい。当業者はマーカーのこのような相対レベルを容易に測定することができる。マーカーについては、後述の各マーカーの説明においてさらに詳しく説明する。

【０４４０】

実施形態のいくつかにおいて「診断」は、病態の存在またはその特徴を同定することを意味する。感度および特異度は診断方法によって異なる。診断アッセイの「感度」とは、試験において陽性と判定された疾患個体のパーセンテージ（「真の陽性」のパーセント）である。診断アッセイによって検出されない疾患個体を「偽陰性」という。疾患を有しておらず、診断アッセイにおいて陰性と判定された対象は「真の陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異度」は、１から偽陽性率を引いた値であり、「偽陽性」率は、疾患を有していないにもかかわらず陽性と判定された個体の割合と定義される。診断方法によっては病態の確定診断をすることができない可能性があるが、診断の手がかりとなる陽性の兆候が得られればその診断方法で足りる。

【０４４１】

本明細書において「診断」は、病態または疾患の兆候および症状から、具体的には様々な診断法の結果から、病態または疾患を同定する方法を指し、診断法としては、たとえば、個体から得られた生体試料中（たとえば、下記に定義するように、細胞中、組織中または血清中）に存在する本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸またはポリペプチドの発現量を検出することが挙げられる。さらに、本明細書において「診断」は、疾患のスクリーニング；疾患の存在もしくは重症度の検出；疾患の予後の予測；疾患の進行もしくは再発のモニタリング；疾患、障害もしくは状態の治療効果および／もしくは再発の評価；疾患の治療法および／もしくは処置の選択；疾患に対する特定の治療法の最適化；疾患に対する治療のモニタリング；特定の患者もしくは亜集団に対する治療法の適合性の予測；ならびに／または患者もしくは亜集団に対する治療薬の適切な用量の決定を包含する。診断法はインビボで行ってもよくインビトロで行ってもよい。

【０４４２】

本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現レベルの差異について言及する場合、当業者によって容易に理解されるように「定性的」は、たとえば、実施形態のいくつかでは発現の存在と非存在との比較を指し、実施形態のいくつかでは発現の一時的な制御を指し、実施形態のいくつかでは発現のタイミングを指し、実施形態のいくつかでは発現された分子への翻訳後修飾を指す。本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現レベルの差異について言及する場合、「定量的」は、実施形態のいくつかでは、当技術分野で公知の任意の手段によって決定された発現量の絶対的差異を指し、別の実施形態では統計的に有意であってもよい相対的差異を指し、実施形態のいくつかでは、全体をひとつとして観察した場合または長期間にわたり観察した場合の、発現量の差異の経時的変化を示す。

【０４４３】
実施形態のいくつかにおいて「診断する」は、疾患または症状を分類すること、疾患の重症度を決定すること、疾患の進行をモニタリングすること、疾患の転帰を予測すること、および／または回復の見込みを立てることを指す。「検出する」は上記のいずれを包含していてもよい。
【０４４４】
実施形態のいくつかにおいて、本発明による疾患の診断は、対象から得られた生体試料中の本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルを測定することによって行うことができ、測定したレベルと、疾患の素因または疾患の存在もしくは非存在とを相互に関連付けることができる。「対象から得られた生体試料」は、より詳細に後述するように、対象から物理的に採取された試料以外の試料をも包含してもよいことには注意すべきである。
【０４４５】
実施形態のいくつかでは、「レベル」は、ＲＮＡおよび／もしくはタンパク質の発現レベル、または本発明のマーカーのＤＮＡコピー数を指す。
【０４４６】
通常、対象から得られた生体試料中のマーカーのレベルは、健常個体から得られた類似試料中の同一マーカーのレベルとは異なっている（すなわち増加または減少している）（生体試料の例は本明細書に記載されている）。
【０４４７】
対象中の目的のマーカーであるＤＮＡ、ＲＮＡおよび／またはポリペプチドのレベルを測定することを目的とした対象からの生体試料の回収は、様々な公知の組織回収方法または体液回収方法を使用して行うことができる。
【０４４８】
回収方法としては、細針生検、針生検、コア針生検および外科的生検（たとえば脳生検）、ならびに洗浄が挙げられるが、これらに限定されない。使用した方法に関係なく、生検材料／試料が得られれば、マーカーレベルを測定することができ、診断を行うことができる。
【０４４９】
同一由来の正常組織における同一マーカーのレベルの測定を行うと共に、正常組織と比較したマーカーの発現上昇、増幅および／または発現低下の検出を行うことが好ましい。
【０４５０】
実施形態のいくつかにおいて、マーカーの「評価量」は、特定の疾患または状態の診断と一致する、対象から得た試料中のマーカーの量を指す。評価量は、絶対量（たとえばμｇ／ｍＬ）であっても、相対量（たとえばシグナルの相対強度）であってもよい。
【０４５１】
実施形態のいくつかでは、マーカーに対する「コントロールの量」は、マーカーの評価量と比較される任意の量であっても量範囲であってもよい。たとえば、マーカーに対するコントロールの量は、特定の疾患もしくは状態を有する患者におけるマーカーの量であってもよく、特定の疾患も状態も有さない個人におけるマーカーの量であってもよい。コントロールの量は、絶対量（たとえばμｇ／ｍＬ）であっても、相対量（たとえばシグナルの相対強度）であってもよい。
【０４５２】
実施形態のいくつかでは、「検出する」は、検出対象の存在、非存在またはその量を同定することを指す。
【０４５３】
実施形態のいくつかでは、「標識」は、分光学的方法、光化学的方法、生化学的方法、免疫化学的方法、または化学的方法によって検出可能な任意の成分または要素を包含する。たとえば、有用な標識として、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（たとえばＥＬＩＳＡにおいて一般的に使用されるような酵素）、ビオチン－ストレプトアビ

ジン、ジゴキシゲニン、抗血清またはモノクローナル抗体が入手可能なハプテンおよびタンパク質、ならびに標的と配列相補性を有する核酸分子が挙げられる。これらの標識は、多くの場合、測定可能なシグナル、たとえば、放射性シグナル、発色シグナル、蛍光シグナルなどを発生し、これらのシグナルを使用して、試料中の結合した標識の量を定量することができる。標識は、共有結合、イオン結合、ファンデルワールス結合、または水素結合を介して、プライマーまたはプローブに組み込んだり付加することができ、たとえば、放射性ヌクレオチドに組み込んだり、ストレプトアビジンによって認識されるビオチン化ヌクレオチドに組み込むことができる。標識は、直接的または間接的に検出可能であってよい。間接的な検出においては、第１の標識に第２の標識を直接または間接的に結合させてもよい。たとえば、標識は、特定の結合パートナーのリガンド（たとえば、ストレプトアビジンの結合パートナーであるビオチン）であってもよく、相補的配列の結合パートナーであり、かつ相補的配列が特異的にハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド配列であってもよい。結合パートナーは、それ自体が直接的に検出可能であってもよく、たとえば、抗体自体を蛍光分子で標識してもよい。結合パートナーは間接的に検出可能であってもよく、たとえば、相補的ヌクレオチド配列を有する核酸を分岐ＤＮＡ分子の一部として使用し、この分岐ＤＮＡ分子を別の標識核酸分子を用いたハイブリダイゼーションにより検出してもよい（たとえば、P. D. Fahrlander and A. Klausner, Bio/Technology 6:1165 (1988)を参照されたい）。シグナルの定量は、たとえば、シンチレーション計数、デンシトメトリーまたはフローサイトメトリーによって行う。

【０４５４】

イムノアッセイにおいて使用してもよく、かつイムノアッセイにおいて使用することが好ましい検出可能な標識として典型的なものとしては、磁気ビーズ、蛍光色素、放射性標識、酵素（たとえば、ＥＬＩＳＡにおいて一般的に使用される西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、および比色定量標識（金コロイド、着色ガラス、プラスチックビーズなど）などが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、試料中のマーカーは間接的なアッセイを使用して検出することができ、たとえば、マーカーに結合したマーカー特異的抗体を第２の標識抗体を使用して検出することができ、かつ／または競合アッセイもしくは阻害アッセイを使用して、たとえば、マーカーの別のエピトープに結合するモノクローナル抗体を混合物と一緒にインキュベートすることにより検出することができる。

【０４５５】

「イムノアッセイ」は、抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。イムノアッセイは、特定の抗体の特異的結合特性を利用して、抗原を単離し、ターゲティングし、かつ／または定量することを特徴とする。

【０４５６】

実施形態のいくつかにおいて、タンパク質またはペプチド（または他のエピトープ）について言及する場合、抗体に「特異的に（または選択的に）結合する」、「特異的に（または選択的に）免疫反応性を示す」または「特異的に相互作用または結合する」は、複数種のタンパク質と他のバイオロジクスとの不均一集団において特定のタンパク質の存在を決定づける結合反応を指す。したがって、選択したイムノアッセイ条件下において、特定のタンパク質に対する特定の抗体の結合は、バックグラウンド（非特異的シグナル）の少なくとも２倍であり、該抗体は、試料中に存在する他のタンパク質とは実質的にほとんど結合しない。このような条件下での抗体との特異的結合には、特定のタンパク質に対する特異性に基づいて選択された抗体を必要としてもよい。たとえば、ラット、マウス、ヒトなどの特定の生物種から得た精漿塩基性タンパク質（seminal basic protein）に対して作製したポリクローナル抗体を選択することにより、精漿塩基性タンパク質には特異的な免疫反応性を示すが、精漿塩基性タンパク質の多型バリアントやアレル以外の他のタンパク質には免疫反応性を示さないポリクローナル抗体のみを得ることができる。このような選択は、他の生物種から得た精漿塩基性タンパク質分子と交差反応する抗体を取り除くことによって行ってもよい。様々なイムノアッセイ系を使用して、特定のタンパク質に特異

的な免疫反応性を示す抗体を選択してもよい。たとえば、固相ＥＬＩＳＡイムノアッセイは、特定のタンパク質に特異的な免疫反応性を示す抗体を選択するために日常的に使用されている（特異的な免疫反応性の測定に使用することができるイムノアッセイ系およびそのアッセイ条件については、たとえば、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988)の記載を参照されたい）。通常、特異的または選択的な反応は、バックグラウンドシグナルまたはバックグラウンドノイズの少なくとも２倍、より一般的にはバックグラウンドの１０～１００倍である。

【０４５７】

別の実施形態では、本発明は、生体試料中の本発明のポリペプチドを検出する方法であって、

本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体と生体試料とを接触させること、および

これらの相互作用を検出することを含み、

該相互作用の存在と生体試料中のポリペプチドの存在とが相関していること

を特徴とする検出方法を提供する。

【０４５８】

本発明の実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載のポリペプチドは、たとえば、疾患および／または兆候的な状態を診断するためのマーカーとして使用することができるが、本明細書に記載のポリペプチドの用途はこれに限定されない。本発明のマーカーはそれぞれ単独または組み合わせて様々な用途に使用することができ、たとえば、疾患および／または兆候的な状態の、予後診断、転帰予測、スクリーニング、早期診断、進行度の判定、治療法の選択、ならびに治療のモニタリングなどに使用することができるが、用途はこれらに限定されない。

【０４５９】

上述したように、本発明のポリペプチド／ポリヌクレオチドはそれぞれ単独または組み合わせて様々な用途に使用することができ、たとえば、疾患および／または兆候的な状態の、予後診断、転帰予測、スクリーニング、早期診断、進行度の判定、治療法の選択、ならびに治療のモニタリングなどに使用することができるが、用途はこれらに限定されない。

【０４６０】

上記の組み合わせは、マーカーの任意のサブコンビネーション、および／または少なくとも１つの他のマーカー（たとえば公知のマーカー）を特徴とする組み合わせを含んでいてもよい。さらに、上記の組み合わせは、上述したように、本明細書に記載の任意のマーカーと、本明細書に記載の別のマーカー、公知の他のマーカーおよび／またはその他のマーカーとの定量値または半定量値の比を決定するために使用してもよく、この用途で使用することが好ましい。

【０４６１】

本発明の実施形態のいくつかにおいて、疾患または状態を診断するための方法、使用、装置、およびアッセイが提供される。複数のマーカーを本発明とともに使用してもよい。この複数のマーカーは、本明細書に記載のマーカーおよび／または１つ以上の公知のマーカーを含んでいてもよい。さらに、この複数のマーカーを疾患または状態と相互に関連付けることが好ましい。たとえば、このような相関付けは、複数のマーカーの各濃度を測定すること、および各マーカーの濃度をそれぞれの閾値レベルと比較することを含んでいてもよい。マーカー濃度が閾値レベルよりも高いか低い場合（マーカーおよび／または実施される診断検査によって異なる）、そのマーカー濃度は疾患または状態と相関している可能性がある。複数のマーカーの濃度が疾患または状態と相関していてもよく、このような相関関係が見られることが好ましい。

【０４６２】

あるいは、このような相関付けは、複数のマーカーの各濃度を測定すること、複数のマーカーの各濃度に基づいた単一の指標値をそれぞれ算出すること、および該指標値をそれぞれの閾値レベルと比較することを含んでいてもよい。

【０４６３】
あるいは、このような相関付けは、複数のマーカーのうち少なくとも１つのマーカーの一時的な変化を測定すること、この一時的な変化を相関付けに使用することを含んでいてもよい。
【０４６４】
あるいは、このような相関付けは、複数のマーカーのうち少なくとも「Ｘ」個のマーカーの濃度が所定の範囲を外れているかどうか、かつ／または（上述したような）閾値よりも高いか低いかを判断することを含んでいてもよい。「Ｘ」は、上記複数のマーカーのうちの１個のマーカー、複数個のマーカー、すべてのマーカーのいずれであってもよく、これとは別法としてまたはこれに加えて、あらゆるマーカーを「Ｘ」に含めるよりも、（所定の範囲および／または閾値に応じて）上記複数のマーカーのうち１個以上の特異的マーカーを疾患または状態との相関付けに使用してもよい。
【０４６５】
あるいは、このような相関付けは、２つのマーカーの濃度の比率が所定の範囲を外れているかどうか、かつ／または閾値よりも高いか低いかを判断することを含んでいてもよい。上記比率が閾値レベルよりも高いか低い場合および／または所定の範囲を外れている場合、上記比率と疾患または状態とは相関している可能性がある。
【０４６６】
上述の相関関係の２つ以上の組み合わせを、単一のパネルとともに使用してもよく、かつ／または複数のパネル間の相関付けに使用してもよい。
【０４６７】
上記の方法は、少なくとも７０％の感度および少なくとも８５％の特異度で、疾患または状態と正常な対象とを識別してもよい。本明細書において、感度は、存在するすべての陽性試料から検出された陽性（疾患を有する）試料の数に関連し、特異度は、存在するすべての陰性試料から検出された真の陰性（疾患を有さない）試料の数に関連する。上記の方法は、少なくとも８０％の感度および少なくとも９０％の特異度で、疾患または状態と正常な対象とを識別することが好ましい。上記の方法は、少なくとも９０％の感度および少なくとも９０％の特異度で、疾患または状態と正常な対象とを識別することがより好ましい。また、上記の方法は、少なくとも７０％の感度および少なくとも８５％の特異性で、疾患または状態と、該疾患または該状態の症状とよく似た症状を示す対象とを識別することがより好ましい。
【０４６８】
マーカーパネルは、当業者によく知られている様々な方法で分析してもよい。たとえば、パネルに含まれる各メンバーを、「正常」値、または特定の転帰を示す値と比較してもよい。特定の診断／予後診断は、各マーカーと正常値または特定の転帰を示す値との比較に基づいていてもよく、あるいは、マーカーの１つのサブセットのみが正常範囲を外れた場合、このサブセットを指標として特定の診断／予後診断を行ってもよい。また、診断マーカー、示差的な診断マーカー、予後マーカー、発症マーカー、疾患または状態の識別マーカーなどを、単一のアッセイまたは装置において組み合わせてもよいことも当業者にとって明らかであろう。マーカーは通常、複数の目的に使用してもよく、たとえば、異なる閾値または異なる重み付け係数をマーカーに適用することによって、マーカーを異なる複数の目的に使用してもよい。
【０４６９】
一実施形態において、マーカーを含むパネルの使用目的としては、疾患の診断；疾患が急性期である場合および／または急性期疾患が発症した場合の疾患および兆候の診断；疾患が非急性期である場合および／または非急性期疾患が発症した場合の疾患および兆候の診断；急性期状態と非急性期状態とが混在しているかどうか、または急性期疾患と非急性期疾患とが同時に発症したかどうかを示す兆候の診断；疾患の診断およびそれに続く有害転帰の予後診断；疾患の診断およびそれに続く急性期状態もしくは非急性期状態の予後診断または急性発症もしくは非急性発症の予後診断；疾患の進行の診断（たとえば、がんの

場合、疾患の進行はたとえば転移の発生または転移の再発を含んでいてもよい）が挙げられる。

【０４７０】

上記の診断は、特定の疾患と他の疾患とを識別するための鑑別診断を含んでいてもよく、該他の疾患としては、該特定の疾患と同じ症状または類似の症状を１以上有することを特徴とする疾患が含まれうる。

【０４７１】

特定の実施形態では、１以上の診断の指標または予後の指標の存在または非存在のみに基づいて、該１以上の診断の指標または予後の指標と、状態または疾患とを相互に関連付ける。別の実施形態では、診断の指標または予後の指標の閾値レベルを設定することができ、患者試料中のこれらの指標のレベルと閾値レベルとを単純に比較することができる。診断検査および／または予後検査の感度および特異度は、検査の分析「品質」以外のものによっても左右され、すなわち、異常値がどのように定義されるかによっても左右される。実際上は、通常、「正常」集団および「疾患」集団において変数値をその相対頻度に対してプロットすること、ならびに／または治療前、治療中および／もしくは治療後に対象から得られた結果を比較することによって、受信者動作特性曲線（「ＲＯＣ」曲線）を算出する。

【０４７２】

さらに、本発明は、上述したような診断方法または診断アッセイに基づくキットに関する。さらに、本発明のＬＳＲ複合体または抗体組成物（たとえば、ヒト抗体、二重特異性分子、多重特異性分子または免疫複合体）と使用説明書とを含むキットも本発明の範囲内に含まれる。該キットは、１以上のさらなる試薬（免疫抑制性試薬、細胞傷害薬、放射性毒性薬など）、または本発明の実施形態の少なくともいくつかによる１以上のさらなるヒト抗体（たとえば、第１のヒト抗体とは異なる抗原エピトープに結合する相補活性を有するヒト抗体）をさらに含んでいてもよい。

【０４７３】

イムノアッセイ

本発明の別の実施形態では、イムノアッセイを使用して、試料中のマーカーを定性的または定量的に検出および分析することができる。この方法は、マーカーに特異的に結合する抗体を提供すること；該抗体と試料とを接触させること；および試料中のマーカーに抗体が結合した複合体の存在を検出することを含む。

【０４７４】

マーカーに特異的に結合する抗体を調製するために、精製されたタンパク質マーカーを使用することができる。タンパク質マーカーに特異的に結合する抗体は、当技術分野で公知の適切な任意の方法を使用して調製することができる。

【０４７５】

抗体が提供された後、公知の様々な免疫結合アッセイのいずれかを使用してマーカーを検出および／または定量することができる。有用なアッセイとしては、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）などの酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ウエスタンブロットアッセイ、およびスロットブロットアッセイが挙げられる（たとえば、米国特許第4,366,241号；第4,376,110号；第4,517,288号；および第4,837,168号を参照されたい）。通常、対象から得られた試料は、マーカーに特異的に結合する抗体と接触させることができる。

【０４７６】

抗体を試料と接触させる前に、抗体を固相支持体に固定させて、複合体の洗浄およびそれに続く単離を容易なものとすることができる。固相支持体としては、たとえば、マイクロタイタープレート、スティック、ビーズ、またはマイクロビーズの形態の、ガラスおよびプラスチックが挙げられるが、これらに限定されない。抗体を固相支持体に付着させることもできる。

【０４７７】

抗体とともに試料をインキュベートした後、混合物を洗浄し、形成された抗体－マーカー複合体を検出することができる。複合体の検出は、洗浄後の混合物を検出試薬とともにインキュベートすることによって行うことができる。あるいは、試料中のマーカーは間接的なアッセイを使用して検出することができ、たとえば、マーカーに結合したマーカー特異的抗体を第２の標識抗体を使用して検出することができ、かつ／または競合アッセイもしくは阻害アッセイを使用して、たとえば、マーカーの別のエピトープに結合するモノクローナル抗体を混合物と一緒にインキュベートすることにより検出することができる。

【０４７８】

アッセイ全体にわたって、試薬の添加ごとにインキュベーションステップおよび／または洗浄ステップが必要となりうる。インキュベーションステップは、約５秒間～数時間の範囲から選択してもよく、約５分間～約２４時間の範囲から選択することが好ましい。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイの構成、マーカー、溶液量、濃度などに左右されるであろう。アッセイは、１０℃～４０℃などの一定の温度範囲において行うことができるが、通常、環境温度において実施されるであろう。

【０４７９】

イムノアッセイは、対象から得た試料中のマーカーの評価量を測定するために使用することができる。まず、試料中のマーカーの評価量を上記のイムノアッセイ法を使用して検出することができる。試料中にマーカーが存在する場合、上記の適切なインキュベーション条件下において、マーカーは、マーカーに特異的に結合する抗体とともに抗体－マーカー複合体を形成するであろう。抗体－マーカー複合体の量は、スタンダードと比較することによって決定してもよい。上述したように、測定値をコントロールの量および／またはコントロールシグナルと比較することが可能であれば、マーカーの評価量を絶対単位で測定する必要はない。

【０４８０】

ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）

この方法の一形態は所望の基質を沈殿させることを含み、本明細書において後述される方法では、アガロースビーズなどの沈殿可能な担体上に固相化された放射性標識抗体結合タンパク質（たとえば^{125}Ｉで標識したプロテインＡ）と特異的抗体とを使用して所望の基質を沈殿させる。沈殿ペレット中のカウント数は基質の量と比例する。

【０４８１】

ＲＩＡの別の形態では、標識した基質と、標識していない抗体結合タンパク質とを使用する。未知量の基質を含む試料を様々な量で添加する。沈殿物中の標識基質に由来するカウントの減少は、添加した試料中の基質の量に比例する。

【０４８２】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）

この方法は、マイクロタイタープレートのウェルなどの表面に、タンパク質基質を含む試料を固定すること（たとえば固定した細胞またはタンパク質溶液）を含む。酵素とカップリングさせた基質特異的抗体を添加し、基質と結合させる。次いで、抗体にカップリングさせた酵素を利用した比色反応により、抗体の存在を検出しその量を定量する。この方法において一般的に使用される酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが挙げられる。較正が適切であり、かつ反応が直線領域内にある場合、試料中に存在する基質の量は呈色の量に比例する。通常、定量精度を向上させるために標準基質を使用する。

【０４８３】

ウエスタンブロット

この方法は、アクリルアミドゲルを用いて他のタンパク質からの基質を分離し、次いで膜（たとえばナイロンまたはＰＶＤＦ）に基質を転写することを含む。次いで、基質に特異的な抗体を用いて基質の存在を検出した後、抗体結合試薬を用いて抗体を検出する。抗体結合試薬は、たとえばプロテインＡであっても他の抗体であってよい。上述したように、抗体結合試薬は放射性標識してもよく、酵素と結合させてもよい。検出はオートラジオ

グラフィ、比色反応、化学発光のいずれによって行ってもよい。この方法では、基質の定量と、アクリルアミドゲル上での電気泳動の際の泳動距離を示す膜上の相対位置からの基質の同定との両方を行うことができる。

【０４８４】

免疫組織化学分析

この方法は、基質特異的抗体を用いて、固定された細胞中の基質をインサイチューで検出することを含む。基質特異的抗体は、酵素に結合されていてもよく、発蛍光団に結合されていてもよい。検出は顕微鏡観察および主観評価による。酵素を結合させた抗体を使用する場合、比色反応が必要とされうる。

【０４８５】

蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）

この方法は、基質特異的抗体を用いて、細胞中の基質をインサイチューで検出することを含む。基質特異的抗体は発蛍光団に結合される。検出は、細胞が光線を通過する際にそれぞれの細胞から発せられる光の波長を読み取るセルソーティング装置を用いて行う。この方法では２種以上の抗体を同時に使用してもよい。

【０４８６】

放射性イメージング法

この方法は、ポジトロン放射断層撮影（ＰＥＴ）およびシングルフォトンエミッションコンピュータ断層撮影（ＳＰＥＣＴ）含むが、これらに限定されない。これらの技術はいずれも非侵襲性であり、様々な組織事象および／または組織機能を検出および／または測定するために使用することができ、たとえば、がん細胞の検出などを行うことができる。ＰＥＴとは異なり、ＳＰＥＣＴでは２種の標識を同時に使用してもよい。ＳＰＥＣＴは他にも利点をいくつか有し、たとえば、コストおよび使用可能な標識の種類の点で有利である。たとえば、米国特許第6,696,686号には、乳がんを検出するためのＳＰＥＣＴの使用が記載されており、この文献はその全体が本明細書の一部を構成するものとして援用される。

【０４８７】

セラノスティクス

セラノスティクス（theranostics）は、診断検査を使用して、疾患を診断し、診断検査の結果に応じて適切な治療計画を選択し、かつ／または診断検査の結果に応じた治療法に対する患者の応答をモニターすることを指す。セラノスティクス試験を使用することによって、患者に対して特に有益であり、副作用を起こさないと考えられる治療法を患者のために選択することができる。さらに、セラノスティクス試験は、個々の患者における治療効果の早期かつ客観的な指標を示すことができるため、治療を最小限の遅れで（必要に応じて）変更することができる。たとえば、DAKO社とジェネンテック社は共同で、乳がんの治療のためのHercepTestおよびハーセプチン（トラスツズマブ）を開発したが、これは初めてのセラノスティクス試験であり、新規の治療薬と同時に承認された。HercepTest（免疫組織化学的試験）に加えて、従来の臨床化学、イムノアッセイ、細胞に基づいた技術および核酸試験を使用した他のセラノスティクス試験も現在開発中である。PPGx社は最近ＴＰＭＴ（チオプリン－Ｓ－メチルトランスフェラーゼ）試験を上市したが、医師がこの試験を実施することにより、６－メルカプトプリン（白血病の治療において用いられる薬物）に対して致命的な副作用を起こす危険性のある患者を識別することが可能となる。さらに、Nova Molecular社は、アルツハイマー病患者のコリン様作用薬療法に対する応答を予測するための、アポリポ蛋白質Ｅ遺伝子のＳＮＰ遺伝子型決定法を先駆けて開発しており、現在、新薬の臨床試験においてこの指標を得るために広く利用されている。このように、セラノスティクス分野は、治療に対する患者の応答を予測する診断検査情報と、その特定の患者のための適切な治療の選択とが融合したものである。

【０４８８】

本明細書に記載したように、「セラノスティクス」は、たとえば本明細書に記載の癌性組織および／または免疫浸潤細胞などにおいて、対象（患者など）が十分なＬＳＲ発現レ

ベルとしてのある一定の最低限のＬＳＲレベルを持っているかどうかを最初に試験することを指してもよい。試験は、エクスビボ（対象から試料を取り出して試験を実施する）で行ってもよく、インビボで行ってもよい。

【０４８９】

上記の癌性組織および／または免疫浸潤細胞におけるＬＳＲレベルがある一定の最低限レベルであった場合、抗ＬＳＲ抗体を単独でまたは必要に応じ本明細書に記載の他の治療法と組み合わせて対象に投与してもよい。

【０４９０】

代理マーカー

代理マーカーは、研究所において検出可能かつ／または患者の身体的兆候または症状に応じて検出可能であり、臨床的意義のあるエンドポイントの代わりとして治験において使用されるマーカーである。代理マーカーは、患者の知覚、身体機能、生存率を具体的に示す直接的な尺度であり、治療法の効果を予測するものであると考えられている。代理マーカーは、患者に対する治療効果を示す目的のエンドポイント（臨床エンドポイントと呼ばれる）よりも代理マーカーの方が早期に、簡便にまたは頻回に測定可能である場合に主として使用される。理想的には、代理マーカーは生物学的に妥当性があり、疾患の進行を予測でき、標準化されたアッセイ（従来の臨床化学、イムノアッセイ、細胞に基づいた技術、核酸試験および画像診断法を含むが、これらに限定されない）によって測定可能であるべきである。

【０４９１】

補体と結合するＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＭの一部分などの補体結合部位を有する本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子、二重特異性分子および免疫複合体）は、補体の存在下でも使用することができる。一実施形態において、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる結合薬と適切なエフェクター細胞とによる、標的細胞を含む細胞集団のエクスビボ治療は、補体または補体を含む血清を添加することによって補強することができる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる結合薬で覆われた標的細胞に対する食作用は、補体タンパク質を結合させることによって向上させることができる。別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかよる組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）で覆われた標的細胞を補体によって溶解することもできる。さらに別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物は補体を活性化しない。

【０４９２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子、二重特異性分子および免疫複合体）は補体とともに投与することもできる。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子と、血清または補体とを含む組成物が提供される。このような組成物は、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子の極めて近傍に補体を存在させることができるという点で有利である。あるいは、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子は、補体または血清とは別々に投与することができる。

【０４９３】

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。以下の情報および実施例は説明を目的としたものであり、本発明をさらに限定するものとして解釈されるべきでない。図示されたすべての図、ならびに本出願において引用されたすべての引用文献、特許文献および公開特許出願の内容は、本明細書の一部を構成するものとして援用される。

【実施例】

【０４９４】

実施例１：LSRタンパク質のクローニング

Ａ．LSR_T1_P5a ORFのクローニング

以下のように、LSR_T1_P5aオープンリーディングフレーム（ORF）（配列番号154）をPCRによりクローニングして、LSR_P5aタンパク質（配列番号11）を作製した。

【０４９５】

PfuUltra II Fusion HS DNAポリメラーゼ（アジレント、カタログNo.600670）を使用して、PCR反応を以下の条件で実施した。全反応量25μL中、200_369_LSR_Kozak_NheIプライマー（配列番号147）および200-372_LSR_BamHI_Revプライマー（配列番号152）をそれぞれ0.5μL使用し、上記のpIRES_puro3_LSR_T1_P5a_Flagコンストラクト50ngをPCR反応のテンプレートとして使用した。反応条件は、98℃5分；98℃20秒→55℃30秒→72℃1.5分を35サイクル；72℃10分とした。使用したプライマーはいずれも遺伝子特異的配列、制限酵素部位およびKozak配列を含んでいた。得られたPCR産物を１％アガロースゲル上で分離した。予想されるサイズのバンドを確認した後、QIAquick（登録商標） Gel Extraction kitを使用してPCR産物を精製した。

【０４９６】

精製したPCR産物を、制限酵素NheIおよびBamHI（ニュー・イングランド・バイオラボ、米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。消化後、DNAを１％アガロースゲル上で分離した。予想されるサイズのバンドを切り出し、上記と同様にしてゲルから抽出した。pIRESpuro3ベクターを上記のNheIおよびBamHIで消化し、Antarcticホスファターゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ、米国マサチューセッツ州ベヴァリー、カタログNo.M0289L）とともに37℃で30分間インキュベートした後、上記の消化DNAをこのpIRESpuro3ベクターにライゲートし、上記のQIAquick Gel Extraction kitを使用して１％アガロースゲルから精製した。上記のライゲーション反応はT4 DNAリガーゼ（プロメガ；カタログNo.M180A）を用いて行った。

【０４９７】

得られたタグ付加コンストラクトおよびタグなしコンストラクトの配列の確認を行った（Hylabs、イスラエル国レホボト）。２つのヌクレオチドミスマッチが以下のように同定された。配列番号154の119番目の核酸がＧからＡに変化し、配列番号154の626番目の核酸がＡからＧに変化した結果、タグなしコンストラクトとして配列番号145に示す核酸配列が得られ、タグ付加コンストラクトとして配列番号146に示す核酸配列が得られた。これらの各核酸配列から、11番目のアミノ酸がＩからＭに変化したアミノ酸ミスマッチを有するポリペプチドが作製され、タグなしコンストラクトとして配列番号143に示すアミノ酸配列を有するタンパク質が得られ、タグ付加コンストラクトとして配列番号144に示すアミノ酸配列を有するタンパク質が得られた。

【０４９８】

上記の組換えプラスミドを使用して後述の安定なプールを作製した。

【０４９９】

２．LSR_WT ORFのクローニング

以下のようにして、ワンステップ部位特異的突然変異誘発PCRにより627番目のアラニンをグリシンに置換して、LSR_WTオープンリーディングフレーム（ORF）をクローニングし、LSR_WTタンパク質（配列番号154）を作製した。

【０５００】

PfuUltra II Fusion HS DNAポリメラーゼ（アジレント、カタログNo.600670）を使用して、PCR反応を以下の条件で実施した。全反応量50μL中、200_398プライマー（配列番号199）および200-399プライマー（配列番号200）をそれぞれ2.5μL使用し、上記のpIRES_puro3_LSR_T1_P5a_Flag_mコンストラクト（配列番号145）20ngをPCR反応用のテンプレートとして使用した。反応条件は、95℃3分；95℃1分→55℃1分→72℃3分を12サイクル；72℃10分とした。DpnI ２μLをPCR反応に加え、37℃で2時間インキュベートした。

【０５０１】

得られたタグ付加コンストラクトの配列の確認を行った（Hylabs、イスラエル国レホボト）。

【０５０２】

上記の組換えプラスミドを使用して後述の安定なプールを作製した。

【０５０３】

３．LSR_SKIP4 ORFのクローニング

GenWiz社（米国）において、C末端にFlagタグを付加してヒトLSR（配列番号201）のエクソン4スキッピングバリアントの全長cDNAを合成し、pUC57ベクターにクローニングした。次いで、以下のようにして、このcDNAをpRp3哺乳動物発現ベクター（pcDNA3.1）にクローニングし、発現コンストラクトを作製した。

【０５０４】

cDNAを制限酵素NheIおよびBamHIで消化し、あらかじめ同じ酵素で消化したpIRESpuro3（pRp3）哺乳動物発現ベクター（クロンテック、カタログNo.631619）にライゲートした。得られた発現コンストラクトの配列（配列番号201）を確認し、次いで後述のトランスフェクションおよび安定なプールの作製に使用した。

【０５０５】

４．マウスLSR-WT FLAGコンストラクトのクローニング

以下のようにして、C末端にFlagタグを付加してマウスWT LSR（配列番号202）の全長cDNAを合成し、GenScriptを用いてpUC57ベクターにクローニングし、哺乳動物発現ベクター（pcDNA3.1）にサブクローニングして発現コンストラクトを作製した。

【０５０６】

cDNAを制限酵素NheIおよびBamHIで消化し、あらかじめ同じ酵素で消化したpcDNA3.1+哺乳動物発現ベクターにライゲートした。得られた発現コンストラクトの配列（配列番号202）を確認し、次いで後述のトランスフェクションおよび安定なプールの作製に使用した。

【０５０７】

５．サルLSR_WT ORFのクローニング

以下のように、サルLSR_WTオープンリーディングフレーム（ORF）（配列番号203）をPCRによりクローニングして、サルLSR_WTタンパク質（配列番号203）を作製した。

【０５０８】

Go Taq DNAポリメラーゼ（プロメガ、カタログNo.M3001）を使用して、PCR反応を以下の条件で実施した。サルcDNA（Biochain、カタログNo.C8534502-Cy、C8534501-Cy）のプールを2つの異なるPCR反応のテンプレートとして使用した。いずれも全反応量50μL中、第１のPCR反応では、200_403_cLSR_Kozak_NheIプライマー（配列番号204）および200-407_cLSR_Revプライマー（配列番号205）をそれぞれ1μL使用し、第２のPCR反応では、200_404_cLSR_Flag_EcoRIプライマー（配列番号206）および200-406_cLSR_Forプライマー（配列番号207）をそれぞれ1μL使用した。

【０５０９】

反応条件は、95℃5分；95℃30秒→55℃30秒→72℃1分を40サイクル；72℃5分とした。使用したプライマーはいずれも遺伝子特異的配列、制限酵素部位およびKozak配列を含んでいた。得られたPCR産物を１％アガロースゲル上で分離した。予想されるサイズのバンドを確認した後、上述のQIAquick Gel Extraction kitを使用してそれぞれのPCR産物を精製した。精製したこれらのPCR産物をテンプレートとして使用し、Go Taq DNAポリメラーゼ（プロメガ、カタログNo.M3001）を使用して、95℃5分；95℃30秒→55℃30秒→72℃1.5分を40サイクル；72℃5分の条件でPCR反応を行った。PCR産物を１％アガロースゲルにロードし、上記と同様にして精製した。

【０５１０】

精製したPCR産物を、制限酵素NheIおよびEcoRI（ニュー・イングランド・バイオラボ、米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。消化後、DNAを１％アガロースゲル上で分離した。予想されるサイズのバンドを切り出し、上記と同様にしてゲルから抽出した。pIRESpuro3ベクターを上記のNheIおよびEcoRIで消化し、Antarcticホスファターゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ、米国マサチューセッツ州ベヴァリー、カタログNo.M0289L）とともに37℃で30分間インキュベートした後、上記の消化DNAをこのpIRESpuro3ベク

ターにライゲートし、上記のQIAquick Gel Extraction kitを使用して１％アガロースゲルから精製した。上記のライゲーション反応はT4 DNAリガーゼ（プロメガ；カタログNo.M180A）を用いて行った。

【０５１１】

得られたタグ付加コンストラクトの配列の確認を行った（Hylabs、イスラエル国レホボト）。

【０５１２】

上記の組換えプラスミドを使用して後述の安定なプールを作製した。

【０５１３】

６．サルLSR_SKIP4 ORFのクローニング

以下のように、サルLSR_skip4オープンリーディングフレーム（ORF）（配列番号208）をPCRによりクローニングして、サルLSR_skip4タンパク質（配列番号208）を作製した。

【０５１４】

Go Taq DNAポリメラーゼ（プロメガ、カタログNo.M3001）を使用して、PCR反応を以下の条件で実施した。サルcDNA（Biochain、カタログNo.C8534502-Cy、C8534501-Cy）のプールをPCR反応のテンプレートとして使用した。

【０５１５】

全反応量50μL中、200_403_cLSR_Kozak_NheIプライマー（配列番号204）および200-404_cLSR_Flag_EcoRIプライマー（配列番号206）をそれぞれ1μL使用した。

【０５１６】

反応条件は、95℃5分；95℃30秒→55℃30秒→72℃1.45分を40サイクル；72℃5分とした。使用したプライマーはいずれも遺伝子特異的配列、制限酵素部位およびKozak配列を含んでいた。得られたPCR産物を１％アガロースゲル上で分離した。予想されるサイズのバンドを確認した後、上述のQIAquick Gel Extraction kitを使用してPCR産物を精製した。精製したPCR産物を、制限酵素NheIおよびEcoRI（ニュー・イングランド・バイオラボ、米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。消化後、DNAを１％アガロースゲル上で分離した。予想されるサイズのバンドを切り出し、上記と同様にしてゲルから抽出した。pIRESpuro3ベクターを上記のNheIおよびEcoRIで消化し、Antarcticホスファターゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ、米国マサチューセッツ州ベヴァリー、カタログNo.M0289L）とともに37℃で30分間インキュベートした後、上記の消化DNAをこのpIRESpuro3ベクターにライゲートし、上記のQIAquick Gel Extraction kitを使用して１％アガロースゲルから精製した。上記のライゲーション反応はT4 DNAリガーゼ（プロメガ；カタログNo.M180A）を用いて行った。

【０５１７】

得られたタグ付加コンストラクトの配列の確認を行った（Hylabs、イスラエル国レホボト）。

【０５１８】

上記の組換えプラスミドを使用して後述の安定なプールを作製した。

【０５１９】

実施例２：LSRタンパク質を発現する組換え細胞の安定なプールの作製

１．LSR_P5a_FLAG_Mタンパク質を発現する組換えHEK293T細胞の安定なプールの作製

以下のようにして、LSR_T1_P5a_Flag_m（配列番号146）ベクタープラスミドまたはpIRESpuro3空ベクタープラスミドをHEK293T細胞に安定にトランスフェクトした。

【０５２０】

あらかじめ温めておいた完全培地2mLを含む、組織培養に適した滅菌6ウェルプレートにHEK293T（ATCC、CRL-11268）細胞を播種した。この完全培地の組成は、DMEM［ダルベッコの改変イーグル培地（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Beit Ha'Emek、カタログNo.01-055-1A））］＋10%FBS［ウシ胎仔血清（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Beit Ha'Emek、カタログNo.04-001-1A）］＋4mM L-グルタミン（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Beit Ha'Emek、カタログNo.03-020-1A）であった。

DMEM94μLで希釈したFuGENE 6試薬（ロシュ、カタログNo.11-814-443-001）6μLを使用して、1ウェルあたり500,000個の細胞にDNAコンストラクト2μgを以下のようにしてトランスフェクトした。まず、FuGENE 6試薬とDNAコンストラクトとの混合物を室温で15分間インキュベートし、次いで、形成された複合体を含む混合物を上記細胞に滴下した。37℃に保った5%CO_2インキュベーターに細胞を静置した。トランスフェクションの48時間後、選択培地（5μg/mLピューロマイシン（Sigma、カタログNo.P8833）を添加した完全培地）15mLを含む75cm^2の組織培養フラスコに細胞を移した。細胞をインキュベーターに静置し、クローン形成が観察されるまで培地を3～4日ごとに交換した。

【０５２１】

２．ヒトまたはサルのWTタンパク質またはSKIP4 LSRタンパク質を発現する安定なトランスフェクタントプールの作製

Fugene6トランスフェクション試薬（ロシュ、カタログNo.111-988-387）を使用して、上記のヒトもしくはサルLSR（配列番号154、201、203、208）のLSR pRp3コンストラクトまたはネガティブコントロールとしての空ベクター（pRp3）をHEK293T（ATCC、CRL-11268）細胞にトランスフェクトした。ピューロマイシン耐性コロニーを選択して、安定なプールの作製に使用した。マウスLSR WT（配列番号202）については、別の発現ベクターおよび別の細胞株を使用して、安定なトランスフェクタントプールを作製した（以下を参照されたい）。

【０５２２】

３．マウスWTタンパク質を発現する安定なトランスフェクタントプールの作製

WTマウスLSR-Flagタンパク質（配列番号202）を発現する安定なトランスフェクタント細胞プールは、GeneScript社（米国）において作製した。C末端にFlagタグを付加したマウスWT LSR配列（配列番号202）を合成し、pUC57ベクターにクローニングし、哺乳動物発現ベクターpcDNA3.1にサブクローニングした。得られた組換えプラスミドをCHO-K1（ATCC、カタログNo.CCL-61）細胞およびHEK293（ATCC、カタログNo.CRL-1573（登録商標））細胞にトランスフェクトした。G418を使用して安定なトランスフェクタント細胞プールをスクリーニングし、抗Flag抗体を使用してウエスタンブロットにより分析した。

【０５２３】

実施例３：発現の確認

Ａ．安定にトランスフェクトされたHEK293T細胞におけるLSR_P5a_FLAG_Mの異所性発現の分析

安定にトランスフェクトされたHEK293T細胞におけるLSR_P5a_Flag_m（配列番号144）の発現を、表１に示す抗LSR抗体および抗flag抗体を使用した、細胞溶解物のウエスタンブロット分析によって測定した。

【０５２４】

Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-Based（Gibco；13151-014）を使用して細胞をプレートから剥離し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（バイオロジカルインダストリーズ、02-023-1A）で洗浄し、1200gで5分間遠心分離した。25×コンプリートEDTAフリープロテアーゼインヒビターカクテル（ロシュ、11 873 580 001）を添加した、50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1%トリトンX-100中に細胞を再懸濁し、20秒間ボルテックスすることによって全細胞抽出を行った。4℃、20000gで20分間遠心分離後、細胞抽出物を回収し、Bradfordバイオ・ラッドプロテインアッセイ（バイオ・ラッド、カタログNo.500-0006）を使用してタンパク質濃度を測定した。同じタンパク質量をSDS-PAGE（インビトロジェン、NuPAGE 4-12% NuPAGE Bis-Tris、カタログNo.NP0335、NP0322）で分析し、ニトロセルロース膜（BA83、0.2μm、Schleicher & Schuell、カタログNo.401385）に転写した。TTBS（Biolab、カタログNo.20892323）/10%スキムミルク（Difco、カタログNo.232100）で膜をブロッキングした後、TTBS/5% BSA（Sigma-Aldrich、A4503）で本明細書（表２）に記載の濃度に希釈した本明細書（図１）に記載の一次抗体とともに4℃で16時間インキュベートした。TTBSで膜を3回洗浄後、TTBSで希釈した本明細書に記載の酵素結合二次抗体とともに室温で1時間さらにインキュベートした。ECLウエスタンブ

ロット検出試薬（GEヘルスケア、カタログNo.RPN2209）を用いて化学発光反応を行い、スーパーRX富士X-レイフィルム（カタログNo.4741008389）に膜を露光させた。

【０５２５】

図１は、抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A8592）（図１Ａ）および抗LSR抗体（Abnova、カタログNo.H00051599-B01P（図１Ｂ）；Abcam、カタログNo.ab59646（図１Ｃ）；およびSigma、カタログNo.HPA007270（図１Ｄ））を使用して予想サイズ70kDa付近のバンドとして検出された、組換えHEK293T細胞におけるLSR_P5a_Flag_mタンパク質（配列番号144）の発現を示す。

【０５２６】

Ｂ．安定にトランスフェクトされたHEK293T細胞またはCHO-K1細胞におけるヒト、サルおよびマウスのLSR_WTおよびLSR SKIP4の発現の確認

表１に示す抗LSR抗体および抗flag抗体を使用して細胞溶解物のウエスタンブロット分析を行うことにより、安定にトランスフェクトされたHEK293T細胞またはCHO-K1細胞におけるヒト、サルおよびマウスのLSR_WTおよびLSR skip4の発現を測定した。

【０５２７】

Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-Based（Gibco；13151-014）を使用して細胞をプレートから剥離し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（バイオロジカルインダストリーズ、02-023-1A）で洗浄し、1200gで5分間遠心分離した。25×コンプリートEDTAフリープロテアーゼインヒビターカクテル（ロシュ、11 873 580 001）を添加した、50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1%トリトンX-100中に細胞を再懸濁し、20秒間ボルテックスすることによって全細胞抽出を行った。4℃、20000gで20分間遠心分離後、細胞抽出物を回収し、Bradfordバイオ・ラッドプロテインアッセイ（バイオ・ラッド、カタログNo.500-0006）を使用してタンパク質濃度を測定した。同じタンパク質量をSDS-PAGE（インビトロジェン、NuPAGE 4-12% NuPAGE Bis-Tris、カタログNo.NP0335、NP0322）で分析し、ニトロセルロース膜（BA83、0.2μm、Schleicher & Schuell、カタログNo.401385）に転写した。TTBS（Biolab、カタログNo.20892323）/5%スキムミルク（Difco、カタログNo.232100）で膜をブロッキングした後、TTBS/5% BSA（Sigma-Aldrich、A4503）で本明細書（表１）に記載の濃度に希釈した本明細書（図１）に記載の一次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。TTBSで膜を3回洗浄後、TTBSで1:20,000に希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG二次抗体（Jackson、カタログNo.111-035-003）とともに室温で1時間さらにインキュベートした。ECLウエスタンブロット検出試薬（GEヘルスケア、カタログNo.RPN2209）を用いて化学発光反応を行い、スーパーRX富士X-レイフィルム（カタログNo.4741008389）に膜を露光させた。

【０５２８】

図２、図３、図４および図５は、抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A8592）（図５）および抗LSR抗体（Abcam、カタログNo.ab59646）（図２、図３、図４）を使用して予想サイズ70kDa付近のバンドとして検出された、ヒトもしくはサルLSRのLSR_WTコンストラクトもしくはLSR skip4コンストラクトをトランスフェクトした組換えHEK293T細胞またはマウスLSR WTコンストラクトをトランスフェクトしたHEK293細胞およびCHO-K1細胞におけるヒト（図２および図３）、サル（図４）およびマウス（図５）のLSR_WTタンパク質およびLSR skip4タンパク質（配列番号11、13、211、212、31）の発現を示したウエスタンブロット分析の結果である。

【０５２９】

図２は、３種の市販抗LSR抗体を使用して検出したヒトLSR_WTを示す。図２ＡではSIGMA社の抗体を使用し、図２ＢではAbcam社の抗体を使用し、図２ＣではAbnova社の抗体を使用した（表１に詳述する）。レーンNo.1は、ネガティブコントロールとして使用した、HEK293T_pIRESpuro3空ベクターをトランスフェクトした細胞を示し、レーンNo.2はHEK293T_pIRESpuro3_ヒトWT LSR_Flagをトランスフェクトした細胞を示す。

【０５３０】

図３は、Abcam社の抗体を使用して検出したヒトLSR_skip4タンパク質を示す。レーンNo

.1は、ネガティブコントロールとして使用した、HEK293T_pIRESpuro3空ベクターをトランスフェクトした細胞を示し、レーンNo.2はHEK293T_pIRESpuro3_ヒトLSR skip4_Flagをトランスフェクトした細胞を示す。

【０５３１】

図４は、空ベクター細胞溶解物（レーン1）と比較したサルLSR_WTタンパク質（レーン2）およびLSR_skip4タンパク質（レーン3）の検出を示す。

【０５３２】

図５は、関連する空ベクター細胞溶解物（レーン1およびレーン3）と比較した、CHO-K1細胞（レーン2）およびHEK293細胞（レーン4）におけるマウスLSR_WTタンパク質の抗flag抗体による検出を示す。

【０５３３】

【表１】

表 1: 一次抗体および二次抗体

抗体	適用	希釈倍率
マウス抗 FLAG-Cy3 (Sigma カタログ No.: A9594)	IF	1:200
マウス抗 FLAG-HRP (Sigma カタログ No.: A8592)	WB	1:2000
ウサギ抗 LSR (Abcam カタログ No.: ab59646)	IF WB	1:500 1:4000
ウサギ抗 LSR (Sigma カタログ No.: HPA007270)	IF WB	1:100 1:2500
マウス抗 LSR (Abnova カタログ No.: H00051599-B01P)	IF WB	1:500 1:1000
マウス抗 GAPDH (Abcam カタログ No.: ab9484)	WB	1:1000
ロバ抗ウサギ Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 711-165-152)	IF	1:200
ロバ抗マウス Dylight 549 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 715-506-150)	IF	1:100
ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗ウサギ IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 111-035-003)	WB	1:10000
ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 115-035-146)	WB	1:10000

【０５３４】

Ｃ．様々な細胞株における内因性LSRタンパク質の発現の分析

以下のようにして、様々な細胞株における内因性LSRタンパク質の発現をウエスタンブロットにより分析した。

【０５３５】

上述のように、SK-OV3（ATCC No.HTB-77）細胞抽出物、Caov3（ATCC No.HTB-75）細胞抽出物、OVCAR3（ATCC No.HTB-161）細胞抽出物、ES-2（ATCC No.CRL-1978）細胞抽出物、OV-90（ATCC No.CRL-11732）細胞抽出物、TOV112D（ATCC No.CRL-11731）細胞抽出物およびHep G2（ATCC No.HB-8065）細胞抽出物を調製した。

【０５３６】

HeLa（カタログNo.sc-2200）細胞抽出物、MCF-7（カタログNo.sc-2206）細胞抽出物、CaCo2（カタログNo.sc-2262）細胞抽出物およびSkBR3（カタログNo.sc-2218）細胞抽出物は、Santa Cruz Biotechnology社から購入した。

【０５３７】

同じタンパク質量をSDS-PAGEによって分析し、上述のニトロセルロース膜に転写した。TTBS（Biolab、カタログNo.20892323）/10%スキムミルク（Difco、カタログNo.232100）で膜をブロッキングした後、TTBS/5% BSA（Sigma-Aldrich、A4503）で本明細書（表２）に記載の濃度に希釈した抗LSR抗体（Abcam、カタログNo.ab59646）とともに4℃で16時間インキュベートした。TTBSで膜を3回洗浄後、TBSで希釈した本明細書（表２）に記載の酵素結合二次抗体とともに室温で1時間さらにインキュベートした。ECLウエスタンブロット検出試薬（GEヘルスケア、カタログNo.RPN2209）を用いて化学発光反応を行い、スーパーRX富士X-レイフィルム（カタログNo.4741008389）に膜を露光させた。

【０５３８】

図６は、様々な細胞株におけるLSRの内因性発現を示す。SK-OV3抽出物、Caov3抽出物、OVCAR3抽出物、OV-90抽出物、Hep G2抽出物、HeLa抽出物、CaCo2抽出物およびSkBR3抽出物において、LSRに相当する72kDaのバンドが抗LSR抗体により検出された（図６Ａ）。抗GAPDH（Abcam、カタログNo.ab9484）をローディングコントロールとして使用した（図６Ｂ）。

【０５３９】

【表２】

表 2: 一次抗体および二次抗体

抗体	適用	希釈倍率
マウス抗 FLAG-Cy3 (Sigma カタログ No.: A9594)	IF	1:200
マウス抗 FLAG-HRP (Sigma カタログ No.: A8592)	WB	1:2000
ウサギ抗 LSR (Abcam カタログ No.: ab59646)	IF WB	1:500 1:4000
ウサギ抗 LSR (Sigma カタログ No.: HPA007270)	IF WB	1:100 1:2500
マウス抗 LSR (Abnova カタログ No.: H00051599-B01P)	IF WB	1:500 1:1000
マウス抗 GAPDH (Abcam カタログ No.: ab9484)	WB	1:1000
ロバ抗ウサギ Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 711-165-152)	IF	1:200
ロバ抗マウス Dylight 549 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 715-506-150)	IF	1:100
ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗ウサギ IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 111-035-003)	WB	1:10000
ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. カタログ No.: 115-035-146)	WB	1:10000

【０５４０】

実施例４Ａ：siRNAによるLSRタンパク質発現のノックダウン

ヒトLSR_WT（配列番号11）タンパク質に特異的なsiRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.M-009672-00-0005）の機能の確認とその特異性のバリデーションを行うために、ヒトLSR_WT（配列番号11）を安定に発現するHEK293T細胞においてLSRタンパク質のノックダウンを行った。

【０５４１】

siRNAのトランスフェクションの24時間前に、上述の安定にトランスフェクトされたヒトLSR_WT（配列番号11）発現組換えHEK293T細胞を、10%FBS含有Opti-MEM（登録商標） I Reduced Serum Medium（Gibco、カタログNo.31985-047）2mLを含む6ウェルプレートに播

種した。オリゴマーとlipofectamine 2000トランスフェクション試薬（インビトロジェン、カタログNo.11668019）とを混合したものを以下のようにして調製し、各トランスフェクション試料に加えた。すなわち、血清を含まないOpti-MEMの最終容量が250μLとなるようにsiRNAオリゴマー100pmolとトランスフェクション試薬5μLとを混合し、次いで、この混合物をRTで20分間インキュベートし、細胞および培地を含む各ウェルに加えた。プレートを穏やかに混合して、CO_2インキュベーター内において37℃で48時間インキュベートした後、Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-Based（Gibco；13151-014）を使用して細胞をプレートから回収し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（バイオロジカルインダストリーズ、02-023-1A）で洗浄し、1200gで5分間遠心分離した。全細胞抽出およびウエスタン分析を上述のように行った。

【０５４２】

図７に示す結果では、スクランブルsiRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.D-001810-01-05）をトランスフェクトした場合（レーン1）と比較して、LSR特異的siRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.M-009672-00-0005）をトランスフェクトすると70kDa付近のバンドのシグナル強度が劇的に減少した（レーン2）。このことによって、ヒトWT LSR-flagタンパク質の異所性発現が特異的にノックダウンされたことが示された。

【０５４３】

実施例４Ｂ：内因性細胞株におけるLSRのノックダウン

LSR（配列番号11）に特異的なsiRNAを一時的にトランスフェクトすることによって、HT29細胞またはHepG2/C3A細胞におけるLSRタンパク質（配列番号11）の内因性発現をノックダウンした。Lipofectamine（登録商標）RNAiMAXトランスフェクション試薬（インビトロジェン、カタログNo.13778-150）を使用して、LSR特異的siRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.M-009672-00-0005）またはネガティブコントロールとしてのスクランブルsiRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.D-001810-01-05）を（HT29細胞に対しては）30pmol（10nM）または（HepG2/C3Aに対しては）50pmolの量で細胞にトランスフェクトした。72時間（HT29細胞）または48時間（HepG2/C3A細胞）インキュベートした後、抗LSR（配列番号11）モノクローナル抗体8C8のハイブリドーマ上清を使用したFACS、または表１に記載の市販抗LSRポリクローナル抗体を使用したウエスタンブロットによって細胞を分析した。

【０５４４】

図１６は、ウエスタンブロットによって分析した、内因性LSR（配列番号11）タンパク質の発現の特異的ノックダウンを示す。

【０５４５】

図１７は、LSR特異的siRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.M-009672-00-0005）を一時的にトランスフェクトした後に、HT29細胞（図１７Ａ）およびHepG2/C3A細胞（図１７Ｂ）をFACS分析した結果を示す。

【０５４６】

ネガティブコントロールとしてのスクランブルsiRNA（サーモサイエンティフィック、カタログNo.D-001810-01-05）をトランスフェクトした細胞（矢印２）と比較して、内因性LSR（配列番号11）タンパク質の表面発現の特異的なノックダウン（矢印１）が示された。

【０５４７】

実施例５：トランスフェクト細胞における異所性LSRタンパク質の細胞内局在の決定

Ａ．HEK293T細胞における異所性LSR_P5a_FLAG_mの細胞内局在の決定

安定にトランスフェクトされた細胞におけるLSR_P5a_Flag_mタンパク質（配列番号144）の細胞内局在を共焦点顕微鏡法によって決定した。

【０５４８】

上述の安定にトランスフェクトされたLSR_P5a_Flag_m（配列番号144）発現組換えHEK293T細胞を、ポリ－Ｌ－リシン（Sigma；カタログNo.P4832）であらかじめコーティングし

たカバースリップ上に載せた。24時間後、細胞を免疫染色し、共焦点顕微鏡法で分析した。カバースリップをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、PBS/3.7%パラホルムアルデヒド（PFA）（EMS、カタログNo.15710）/3%グルコース（Sigma、カタログNo.G5767）溶液中で15分間固定した。PBS/3mMグリシン（Sigma、カタログNo.G7126）で5分間処理してPFAをクエンチングした。PBSで5分間の洗浄を2回行った後、PBS/0.1%トリトン-X100を用いて室温で5分間処理して細胞を透過し、PBSで2回洗浄した。次いで、PBS/5%ウシ血清アルブミン（BSA）（Sigma、カタログNo.A4503）で20分間処理して非特異的領域をブロッキングした。PBS/5%BSAで希釈した本明細書に記載の各一次抗体とともにカバースリップを湿潤箱中で1時間インキュベートし、PBSで5分間の洗浄を3回行った。PBS/2.5%BSAで本明細書に記載の希釈倍率に希釈した、各一次抗体に対応する二次抗体とともにカバースリップを30分間インキュベートした。使用した抗体および希釈倍率は表２に具体的に示す。フェノールレッド非含有ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）（バイオロジカルインダストリーズ、カタログNo.02-016-1）で前洗浄した後、HBSSで1:200に希釈したWGA-Alexa 488（インビトロジェン、カタログNo.W11261）とともにカバースリップを10分間インキュベートし、HBSSで洗浄し、HBSSで1:1000に希釈したビスベンズイミドH 33258（Sigma、カタログNo.14530）中でインキュベートした。Gel Mount Aqueous medium（Sigma、カタログNo.G0918）を用いてカバースリップをスライドに載せ、共焦点顕微鏡法を使用して細胞内の蛍光生成物の存在を観察した。

【０５４９】

図８はLSR_P5a_Flag_mの細胞内局在を示す。抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A9594）（図８Ａ）および抗LSR抗体（Abcam、カタログNo.ab59646（図８Ｂ）、Abnova、カタログNo.H00051599-B01P（図８Ｃ）およびSigma、カタログNo.HPA007270（図８Ｄ））を使用して検出されたように、LSR_P5a_Flag_m（配列番号144）は主として細胞質に局在しているが、細胞表面上にも検出することができる。

【０５５０】

Ｂ．HEK293T細胞およびCHO-K1細胞におけるヒト、サルおよびマウスの異所性LSR_WTおよびLSR_SKIP4の細胞内局在の決定

安定にトランスフェクトされた細胞におけるLSR_WT（配列番号11、211、31）およびskip4タンパク質（配列番号13、212）の細胞内局在を共焦点顕微鏡法によって決定した。

【０５５１】

上述の安定にトランスフェクトされた、ヒトもしくはサルのLSR_WT（配列番号11、211）もしくはLSR_skip4（配列番号13、212）を発現する組換えHEK293T細胞またはマウスLSR_WT（配列番号31）を発現するCHO-K1細胞を、ポリ－Ｌ－リシン（Sigma；カタログNo.P4832）であらかじめコーティングしたカバースリップ上に載せた。24時間後、細胞を免疫染色し、共焦点顕微鏡法で分析した。カバースリップをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、PBS/3.7%パラホルムアルデヒド（PFA）（EMS、カタログNo.15710）/3%グルコース（Sigma、カタログNo.G5767）溶液中で15分間固定した。PBS/3mMグリシン（Sigma、カタログNo.G7126）で5分間処理してPFAをクエンチングした。PBSで5分間の洗浄を2回行った後、PBS/5%ウシ血清アルブミン（BSA）（Sigma、カタログNo.A4503）で20分間処理して非特異的領域をブロッキングした。PBS/5%BSAで希釈した本明細書に記載の各一次抗体とともにカバースリップを湿潤箱中で1時間インキュベートし、PBSで5分間の洗浄を3回行った。PBS/2.5%BSAで本明細書に記載の希釈倍率に希釈した、各一次抗体に対応する二次抗体とともにカバースリップを30分間インキュベートした。使用した抗体および希釈倍率は表１に具体的に示す。フェノールレッド非含有ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）（バイオロジカルインダストリーズ、カタログNo.02-016-1）で前洗浄した後、HBSSで1:200に希釈したWGA-Alexa 488（インビトロジェン、カタログNo.W11261）とともにカバースリップを10分間インキュベートし、HBSSで洗浄し、HBSSで1:1000に希釈したビスベンズイミドH 33258（Sigma、カタログNo.14530）中でインキュベートした。Gel Mount Aqueous medium（Sigma、カタログNo.G0918）を用いてカバースリップをスライドに載せ、共焦点顕微鏡法を使用して細胞内の蛍光生成物の存在を観察した。

【０５５２】
図９、図１０、図１１および図１２に、ヒト、サルおよびマウスのLSR_WT（配列番号11、211、31）ならびにサルLSR_skip4（配列番号212）の細胞内局在を示す。抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A9594）（図９Ａ、図１０Ａ、図１１Ａ、図１２Ａおよび図１３Ａ）および抗LSR抗体（Abcam、カタログNo.ab59646（図９Ｃ）およびSigma、カタログNo.HPA007270（図９Ｂ、図１０Ｂ、図１１Ｂ、図１２Ｂおよび図１３Ｂ））を使用して検出されたように、LSRタンパク質は主として細胞質に局在しているが、細胞表面上にも検出することができる。LSRタンパク質を発現する組換え細胞はいずれも、ネガティブコントロールとして使用した空ベクター細胞と比較した（いずれの図においてもＡ－１、Ｂ－１およびＣ－１と付番する）。矢印は膜染色を示す。

【０５５３】
抗Flag抗体（Sigma、カタログNo.A9594）（図９Ａ－２）、抗LSR抗体（Sigma、カタログNo.HPA007270、Abcam、カタログNo.ab59646）（図９Ｂ－２および図９Ｃ－２）のいずれを使用した場合においても、ヒトWT LSR（配列番号11）は主として細胞内領域に観察され、細胞膜局在を示した細胞のパーセンテージは低かった。

【０５５４】
抗flag抗体を使用した場合、サルWT LSR（配列番号211）タンパク質も主として小胞体およびゴルジ体などの細胞内領域で観察された（図１０Ａ－２）。しかしながら、サルWT LSR（配列番号211）タンパク質を発現する同じ細胞において抗LSR抗体（Sigma、カタログNo.HPA007270）を使用した場合、より顕著な膜染色が示された（図１０Ｂ－２）。興味深いことに、いずれの抗体を使用した場合も、サルSkip4 LSR-flagバリアント（配列番号212）を発現する組換え細胞における細胞表面上の発現は、サルWT LSR-flagタンパク質（配列番号211）を発現する組換え細胞と比較してより顕著であった（図１２Ａ－２および図１２Ｂ－２）。

【０５５５】
マウスWT LSR（配列番号31）タンパク質を発現する組換えHEK293細胞では、抗flag抗体を使用すると、非常に弱いものの、シグナルが示され（図１１Ａ）、特異的抗LSR抗体（Sigma、カタログNo.HPA007270）を使用すると細胞膜上に弱いシグナルが示された（図１１Ｂ）。マウスLSR-flagタンパク質（配列番号31）を発現する組換えCHO-K1細胞では、いずれの抗体を使用した場合も小胞体局在性が示された（図１３Ａおよび図１３Ｂ）。

【０５５６】
実施例６
Ａ．安定発現細胞のFACS分析によるヒトおよびサルLSRタンパク質の細胞表面発現の確認
様々なLSRタンパク質（WTおよびskip4）（配列番号11、13、211、212および31）を過剰発現する安定にトランスフェクトされたHEK293T細胞およびCHO_K1細胞を、8C8ハイブリドーマクローンを使用したフローサイトメトリー（FACS）によって分析した。図１４に示すように、LSRタンパク質（ヒトWT（配列番号11）、サルWT（配列番号211）、マウスWT（配列番号31）ならびにヒトおよびサルSkip4バリアント（配列番号13および212））を安定に発現する細胞に対する様々な濃度の8C8モノクローナル抗体の結合性は、空ベクターをトランスフェクトした細胞やコントロール培地で染色した細胞で観察されたものよりも顕著に高く、これによって、これら5種のLSRタンパク質が細胞膜上に発現することが明らかとなった。

【０５５７】
Ｂ．様々な細胞株における内因性LSRタンパク質の発現の分析
以下のようにして、様々ながん細胞株（表３に記載の卵巣、肝臓、乳房、子宮頸部および結腸に由来）における内因性LSRタンパク質の発現をウエスタンブロットにより分析した。

【０５５８】
上述のように全細胞抽出物（がん細胞株50～75μgおよび異所性発現細胞株30μg）をSDS-PAGEで分析し、ニトロセルロース膜に転写した。TTBS（Biolab、カタログNo.20892323

）/5%スキムミルク（Difco、カタログNo.232100）で膜をブロッキングした後、TTBS/5% BSA（Sigma-Aldrich、A4503）で本明細書（表１）に記載の濃度に希釈した抗LSR抗体（Abcam、カタログNo.ab59646またはSigma、カタログNo.HPA007270）とともに室温で1時間インキュベートした。TTBSで膜を3回洗浄後、TTBSで希釈した本明細書（表１）に記載の酵素結合二次抗体とともに室温で1時間さらにインキュベートした。ECLウエスタンブロット検出試薬（GEヘルスケア、カタログNo.RPN2209）を用いて化学発光反応を行い、スーパーRX富士X-レイフィルム（カタログNo.4741008389）に膜を露光させた。

【０５５９】

【表３】

表３

図15のレーンNo.	細胞株	ATCC No.	形態	由来	疾患
2	SK-BR-3	HTB-30, ATCC	上皮	乳房	腺癌
3	MCF7	HTB-22, ATCC	上皮	乳房	腺癌
5	HeLa	CCL-2, ATCC	上皮	子宮頸部	腺癌
6	Caco-2	HTB-37, ATCC	上皮	結腸	結腸直腸腺癌
22	HT-29	HTB-38, ATCC	上皮	結腸	結腸直腸腺癌
7	TOV-112D	CRL-11731, ATCC	上皮	卵巣	原発性悪性腺癌；類内膜癌
8	SK-OV-3	HTB-77, ATCC	上皮	卵巣	腺癌
9	OVCAR3	HTB-161, ATCC	上皮	卵巣	腺癌
10	OV-90	CRL-11732, ATCC	上皮	卵巣	悪性乳頭状漿液性腺癌
11	ES2	CRL-1978, ATCC	上皮	卵巣	明細胞癌
12	Caov-3	HTB-75, ATCC	上皮	卵巣	腺癌
4, 15	HepG2	HB-8065, ATCC	上皮	肝臓	肝細胞癌
16	HepG2/ C3A	CRL-10741, ATCC	上皮	肝臓	肝細胞癌
17	Hep 3B	HB-8064, ATCC	上皮	肝臓	肝細胞癌
18	SNU182	CRL-2235, ATCC	上皮	肝臓	肝細胞癌
19	SKHEP-1	HTB-52, ATCC	上皮	肝臓	腺癌
20	PLC/PRF5	CRL-8024, ATCC	上皮	肝臓	ヘパトーマ
21	Chang liver	330139, CLS	上皮	肝臓	正常

【０５６０】

図１５は、様々な細胞株におけるLSRの内因性発現を示す。LSR（予想サイズ70kDa付近）に相当するタンパク質バンドが、ポジティブコントロール細胞（レーン1および14）において観察され、さらに、いくつかの細胞株においても検出され、すなわち、肝臓がん細胞株HepB3、HepG2およびHepG2由来細胞株HepG2/C3A（レーン4、15、16、17）、乳がん細胞株SK-BR-3（レーン2）ならびに卵巣がん細胞株SKOV-3、OVCAR-3、ES-2、Caov-3（レーン8、9、10、12）においてLSRが内因性に発現していることが示された。

【０５６１】

実施例７：LSRに対するマウスモノクローナル抗体の作製

ヒトLSRタンパク質（配列番号10）の細胞外ドメインに対するマウスモノクローナル抗体は、BIOTEM社（Parc d'activite Bievre Dauphine, 885 rue Alphonse Gourju, 38140 APPRIEU, France）においてペプチド免疫化により作製した。免疫化に使用したペプチドはヒトLSRタンパク質（配列番号10）の細胞外ドメインに由来するものである。これについて以下に説明する。

【０５６２】
抗LSRモノクローナル抗体の作製を目的としたこのプロジェクトの第１段階では、LSRタンパク質（配列番号10）のECD領域に由来する２種のペプチドを使用して、3匹のBALB/cマウスを免疫化した。この２種のペプチドは、ペプチド１：配列番号10の81～98番目のアミノ酸残基に相当するKSFCRDRIADAFSPASVD（配列番号215）およびペプチド２：配列番号10の118～135番目のアミノ酸残基に相当するCQDSVRTVRVVATKQGNA（配列番号216）であった。アミノ酸の位置はオープンリーディングフレームの２番目のMetから番号を振る。
【０５６３】
このプロトコルの第２段階では、免疫化マウスから得たリンパ球とSp2/0-Ag14ミエローマ細胞とを融合させ、10枚の96ウェルマイクロタイタープレートに播種した。
【０５６４】
ヒトLSR融合タンパク質（配列番号236）、免疫化に使用した上記のペプチド（配列番号215および216）、およびヒトWT LSR-flagタンパク質発現組換えHEK293T細胞を使用したELISAによって成熟クローンをスクリーニングした。次いで、ヤギ抗マウスAlexa Fluor 488（インビトロジェン、カタログNo.A10667）を検出用二次抗体として使用した、精製モノクローナル抗体8C8によるFACS分析を行った。
【０５６５】
第３段階では、限界希釈法によるハイブリドーマのクローニングおよび安定化を行い、抗体産生および精製のためにさらに処理を行った。
【０５６６】
ハイブリドーマクローンの培養上清をELISAによって分析した。表４に示すように、ヒトLSR融合タンパク質（配列番号236）およびヒトWT LSRタンパク質過剰発現HEK293T細胞には特異的結合性を示すが、関連性のないヒトIgG1融合タンパク質およびpRp3空ベクタートランスフェクトHEK293T細胞には結合性を示さない１つのポジティブクローン（8C8）が同定された。また、このクローンは、ペプチド２（配列番号216）ではなくペプチド１（配列番号215）に結合性を示した。
【０５６７】
このポジティブクローンから精製したモノクローナル抗体（8C8）を、様々なLSRタンパク質（配列番号11、13、211、212、31）を過剰発現する種々のトランスフェクトHEK293T細胞を使用したフローサイトメトリー（FACS）によってさらに分析した。
【０５６８】
【表４】
表4:

	以下の抗原に対する吸光度:													
ハイブリドーマ	ペプチド1		ペプチド2		CGEN 15021-Fc ヒトIgG1		タンパク質 X-Fc ヒトIgG1		抗原なし		細胞 HEK293T-CGEN15022		細胞 HEK293T-pRp3	
(上清の希釈)	原液	1/10	原液	1/10	原液	1/10	原液	1/10	原液	1/10	原液	1/10	原液	1/10
8C8	1.824	2.086	0.041	0.041	1.048	1.187	0.047	0.041	0.043	0.039	0.310	0.281	0.100	0.134

【０５６９】
図１４に示した結果では、モノクローナル抗体8C8を使用して細胞表面上のLSRタンパク質の異所性発現を検出し、これをネガティブコントロールとしてのマウスIgG2a（アイソタイプコントロール）および空ベクタートランスフェクト細胞と比較することによって、モノクローナル抗体8C8の特異性およびFACS分析に対するその適合性が示された。LSRに対する8C8ハイブリドーマクローンの特異性は、上述したように、HT29結腸がん細胞の細胞表面上に発現される内因性LSRをsiRNAにより特異的にノックダウンすることによってさらに確認した。
【０５７０】

実施例８：モノクローナル抗体のシークエンシング

TRIzol（登録商標）Plus RNA Purification System（インビトロジェン、カタログNo.15596-026）の技術マニュアルに準じて、凍結したハイブリドーマ細胞からトータルRNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動でトータルRNAを分析した。SuperScript（登録商標）III First-Strand Synthesis System（インビトロジェン、カタログNo.18080-051）の技術マニュアルに準じて、アイソタイプ特異的アンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを用いて、トータルRNAからcDNAに逆転写した。次いでRT-PCRを行い、抗体の重鎖および軽鎖を増幅した。GenScript社のRACEの標準作業手順書に準じて、V_H抗体フラグメントおよびV_L抗体フラグメントを増幅した。

【０５７１】

標準的な分子クローニング法を使用して、増幅した抗体フラグメントを標準的なクローニングベクターに別々にクローニングした。適切なサイズのインサートを有するクローンを特定するために、コロニーPCRによりスクリーニングを行った。

【０５７２】

適切なサイズのV_HインサートおよびV_Lインサートを有する10個の単一コロニーを用いてシークエンシングを行った。10個の異なるクローンのV_H遺伝子およびV_L遺伝子はほぼ同一であることが分かった。

【０５７３】

以下に示すコンセンサス配列は、ハイブリドーマ8C8によって産生された抗体（8C8抗体）の配列である。8C8抗体の重鎖のDNA配列およびアミノ酸配列をそれぞれ配列番号217および218に示す。8C8抗体の軽鎖のDNA配列およびアミノ酸配列をそれぞれ配列番号219および220に示す。リーダー配列はイタリック体で示し、CDR1配列、CDR2配列、CDR3配列は太字で示す。定常領域FR1、FR2、FR3およびFR4は通常のフォントで示す。図１８Ａは、8C8抗体重鎖CDRの核酸配列およびアミノ酸配列を示す。8C8抗体重鎖のCDR1、CDR2、CDR3の核酸配列をそれぞれ配列番号224、225、226に示す。これに対応する8C8抗体重鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号227、228、229に示す。図１８Ｂは、8C8抗体軽鎖CDRの核酸配列およびアミノ酸配列を示す。8C8抗体軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3の核酸配列をそれぞれ配列番号230、231、232に示す。これに対応する8C8抗体軽鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号233、234、235に示す。

【０５７４】

配列番号217, 8C8 重鎖: DNA配列 (420 bp)

リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*ATGAACTTCGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCTGTGT*GAC
GTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCT**GGATTCACTTTCAGTAGCTATTACATGTCT**TGGGTTCGCCAGACTCCA
GAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCA**GCCATTAATAGTAATGGTGGTAGCACCTACTATCCA**
GACACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTG
CAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGCAAGA**CATGATTAC**
TACGGTAGTAGCTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

配列番号218, 8C8 重鎖: アミノ酸配列 (140 AA)

リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*MNFGLRLIFLVLVLKGVLC*DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAAS**GFTFSSYYMS**WVRQTP
EKRLELVA**AINSNGGSTYYPDTVKG**RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCAR**HDY**
YGSSFAMDYWGQGTSVTVSS

配列番号219, 8C8 軽鎖: DNA配列 (381 bp)

リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGT
GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACC
ATCAGTTGC**AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAAC**TGGTATCAGCAGAAACCA
GATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTAC**TACACATCAAGATTACACTCA**GGAGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACTATTAGCAACCTGGAACAA
GAAGATATTGCCACTTACTTTTGC**CAACAGGATAGTAAGCATCCGTGGACG**TTCGGTGGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAA

配列番号220, 8C8 軽鎖: アミノ酸配列 (127 AA)

リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*MMSSAQFLGLLLLCFQGTRC*DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC**RASQDISNYLN**WYQQKP
DGTVKLLIY**YTSRLHS**GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC**QQDSKHPWT**FGG
GTKLEIK

配列番号224, 8C8 重鎖-**CDR1** DNA配列

GGATTCACTTTCAGTAGCTATTACATGTCT

配列番号225, 8C8 重鎖-**CDR2** DNA配列

GCCATTAATAGTAATGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGC

配列番号226, 8C8 重鎖-**CDR3** DNA配列

CATGATTACTACGGTAGTAGCTTTGCTATGGACTAC

配列番号227, 8C8 重鎖 **CDR1** アミノ酸配列

GFTFSSYYMS

配列番号228, 8C8 重鎖 **CDR2** アミノ酸配列

AINSNGGSTYYPDTVKG

配列番号229, 8C8 重鎖 **CDR3** アミノ酸配列

HDYYGSSFAMDY

配列番号230, 8C8 軽鎖 **CDR1** DNA配列

AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAAC

配列番号231, 8C8 軽鎖 **CDR2** DNA配列

TACACATCAAGATTACACTCA

配列番号232, 8C8 軽鎖 **CDR3** DNA配列

CAACAGGATAGTAAGCATCCGTGGACG

配列番号233, 8C8 軽鎖 **CDR1** アミノ酸配列

RASQDISNYLN

配列番号234, 8C8 軽鎖 **CDR2** アミノ酸配列

YTSRLHS

配列番号235, 8C8 軽鎖 **CDR3** アミノ酸配列

QQDSKHPWT

【０５７５】

実施例９：LSRタンパク質のIHC分析

キャリブレーション研究

LSRの発現を評価するための適切な抗体濃度および抗原賦活法を確立するために、キャリブレーション研究を行った。

【０５７６】

LSRまたはpRp「空ベクター」を発現するHEK293T細胞株のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片（４μｍ）ならびに本明細書の表５に記載の正常肝臓、腫瘍肝臓、乳房腫瘍および卵巣腫瘍のfull-face組織切片（包埋組織全体を含む切片）を使用した。

【０５７７】

二次抗体、LSR抗体および検出試薬のバリデーションを行うため、このアッセイにおいては、ヒト結腸切片中のフォン・ヴィレブランド因子をポジティブコントロールとして検出し、さらにポジティブコントロール細胞株を使用した。「no primary」コントロール（コントロールとして、一次抗体を使用せずに反応を行う）を使用した。

【０５７８】

PT Link装置においてpH9.0 Flex+ 3-in-1抗原賦活バッファーを使用し、95℃、20分間の設定で、切片の脱パラフィン、抗原賦活、親水化を行った。抗原賦活後、切片をFlex洗浄バッファー中に10分間浸漬し、ダコAutostainer Plusにセットした。Flex+ パーオキシダーゼブロッキング試薬とともに切片を10分間インキュベートし、50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.1%Tween20、pH 7.6（TBST）中で2回リンスし、Protein Block試薬（ダコ、X0909）とともに10分間インキュベートした。

【０５７９】

ダコEnvision Flex抗体希釈液（DAKO Cytomation、カタログNo.K8006）で希釈した一次抗体とともに切片を30分間インキュベートした。LSRポリクローナル抗体は、切片ごとに6μg/mL、4μg/mLおよび2μg/mLで試験した。ネガティブコントロール切片は、6μg/mL、4μg/mLおよび2μg/mLの非免疫ウサギIgG抗体（ダコ、カタログNo.0936）またはダコEnvision Flex抗体希釈液（「no primary」コントロール）とともにインキュベートした。

【０５８０】

一次抗体とともにインキュベートした後、切片をFLEXバッファー中で2回リンスし、抗マウス/ウサギFlex+ HRPとともに20分間インキュベートし、FLEXバッファー中で2回リンスし、次いでジアミノベンジジン（DAB）基質とともに10分間インキュベートした。蒸留水でスライドをリンスすることにより発色反応を停止させた。発色後、ヘマトキシリンで切片を対比染色し、エタノールの上昇系列（90%→99%→100%）で脱水し、キシレンを3回

交換して透徹し、DePeXを用いてカバースリップをかけた。ライカDFC290カメラを備えたオリンパスBX51顕微鏡を使用して、染色した切片を分析し、適切なデジタル画像を撮影した。

【０５８１】

IHC組織マイクロアレイ（TMA）

本研究は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるLSR特異的抗体を使用して、様々な癌性組織におけるLSRの発現を測定することを目的とした。ホルマリン固定／パラフィン包埋（FFPE）切片におけるLSRの分布は免疫組織化学（IHC）を使用して試験した。

【０５８２】

本明細書の表６に記載の腫瘍および正常組織マイクロアレイ（「multi-tumour TMA」）のFFPE切片、ならびに3名のドナーから得た正常リンパ節、扁桃腺および脾臓のfull-face切片に対して、上述のポリクローナルウサギ抗体を使用した。TMAは11種の組織（表３）、すなわち、乳房、結腸、リンパ節および前立腺（それぞれ8例の腫瘍試料および2例の正常試料を含む）、胃、卵巣、脳、腎臓、肝臓および皮膚（それぞれ4例の腫瘍試料および2例の正常試料を含む）、ならびに肺（8例の非小細胞腫瘍試料、4例の小細胞腫瘍試料および4例の正常試料を含む）を含んでいた。さらなる正常組織として、リンパ節（n=3）、扁桃腺（n=3）および脾臓（n=3）の切片を薄切し、本研究で使用した（表７）。LSRを発現するHEK293T細胞株のFFPE切片（４μｍ）、「multi-tumour」TMA、ならびに正常リンパ節、扁桃腺および脾臓のfull-face切片を使用した。PT Link装置においてpH9.0 Flex+ 3-in-1抗原賦活バッファーを使用し、95℃、20分間の設定で自動的に加温および冷却しながら、切片の脱パラフィン、抗原賦活、親水化を行った。抗原賦活後、切片を蒸留水で2×5分間洗浄し、ダコAutostainer Plusにセットした。Flex+ パーオキシダーゼブロッキング試薬とともに切片を10分間インキュベートし、50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.1%Tween20、pH 7.6（TBST）中で2回リンスし、Protein Block試薬（ダコ、X0909）とともに10分間インキュベートした。ダコEnvision Flex抗体希釈液（DAKO Cytomation、カタログNo.K8006）で希釈した一次抗体とともに切片を30分間インキュベートした。6μg/mLのLSRポリクローナル抗体を反応させた。ネガティブコントロール切片は、6μg/mLの非免疫ウサギIgG抗体（ダコ、カタログNo.0936）またはダコEnvision Flex抗体希釈液（「no primary」コントロール）とともにインキュベートした。一次抗体とともにインキュベートした後、切片をFLEXバッファー中で2回リンスし、抗マウス/ウサギFlex+ HRPとともに20分間インキュベートし、FLEXバッファー中で2回リンスし、次いでジアミノベンジジン（DAB）基質とともに10分間インキュベートした。蒸留水でスライドをリンスすることにより発色反応を停止させた。発色後、ヘマトキシリンで切片を対比染色し、エタノールの上昇系列（90%→99%→100%）で脱水し、キシレンを3回交換して透徹し、DePeXを用いてカバースリップをかけた。ライカDFC290カメラを備えたオリンパスBX51顕微鏡を使用して、染色した切片を分析し、適切なデジタル画像を撮影した。切片の特異的染色強度を分析し、半定量スコアリングシステムを使用した。組織アレイにおいて最も強いLSR免疫反応性を示したコアをスコア３＋とし、３＋のコアと比較することによって他のコアにおける免疫反応性の強度にスコアをつけた。LSR免疫反応性腫瘍細胞のパーセンテージは、0～25%、25～50%、50～75%および75～100%の段階で評価し記録した。

【０５８３】

結果：

指定のポジティブコントロール組織および空ベクター細胞株においてLSRウサギポリクローナル抗体が最適化され、かつ検出されたことを以下のデータセットにより示す。アッセイ実施の内部条件および抗体のバリデーションを示すアッセイポジティブコントロールを図１９に示す。図１９（×60）は、pH9.0においてAR（抗原賦活）を行ったLSR陽性細胞の切片を示す。パネルAは、2μg/mLのLSR抗体を使用してインキュベートしたスライドを示す。パネルBは、「no primary」条件でインキュベートした、パネルAに隣接する切片を示す。パネルAはLSR免疫反応性が陽性であり、抗体反応条件が適切であることが示された。これに隣接するno primary切片（パネルB）では明らかな免疫反応性は示されなかった

。特異的な免疫反応性は、正常肝臓試料、腫瘍肝臓試料および乳房腫瘍試料のポジティブコントロール組織で検出された。LSR抗体は、２名の正常肝臓ドナーおよび１名の腫瘍ドナーにおいて細胞膜染色性および細胞質染色性を示した。

【０５８４】

特異的なLSR免疫反応性は、２例の正常肝臓試料中の肝細胞および胆管上皮において6μg/mLおよび4μg/mLの濃度で検出された。腫瘍肝臓では、LSR免疫反応性が細胞膜および細胞質に見られ、この免疫反応性は、正常肝臓試料と比較して腫瘍細胞において顕著に強かった。卵巣腫瘍（ドナーＩＤ16974）では、最も高い濃度（6μg/mL）において特異的なLSR免疫反応性が細胞膜および細胞質に見られた。4μg/mLの濃度では、この腫瘍細胞における免疫反応性は細胞質のみに見られた。ドナーＩＤ16976の試料では、6μg/mL、4μg/mLのいずれの濃度においても、腫瘍細胞における特異的な免疫反応性は細胞質のみに見られた。非特異的免疫反応性が検出されたが、上記ドナー試料のいずれにおいても最も高い濃度でしか見られなかった。

【０５８５】

pRp3空ベクター細胞では、明らかなLSR免疫反応性は検出されなかった。非特異的免疫反応性が検出された。

【０５８６】

LSR免疫反応性組織は、腫瘍の種類によって様々な染色パターンおよび様々な強度レベルを示した。しかしながら、結腸腫瘍および肝腫瘍が最も強い染色性を示したのに対し、他の腫瘍は試料全体にわたって中程度の染色性を示したことが確認された。コアの大部分は平均75～100%の免疫反応性を示した。表８はTMA分析の全体像を示す。

【０５８７】

乳房腫瘍におけるLSRの発現

乳房腫瘍セットでは、染色強度は１～２＋の範囲で変動し、そのうち２例の腫瘍がスコア２＋を示した。アレイに含まれる乳房腫瘍のうち、１コアのみが0～25%の免疫反応性を示したが、大部分は75～100%の免疫反応性を示した。スコア２＋を示した腫瘍はいずれも浸潤性乳管癌（IDC）であった。

【０５８８】

大腸がんにおけるLSRの発現

大腸コホートでは、８例の試料が中分化型腺癌性腫瘍であった。６例の試料が２＋または３＋のスコアを示し、１例の試料が最も強いレベルである３＋の免疫反応性を示し、１例の試料が０～１＋のスコアを示した。試料はいずれも75～100%の免疫反応性を示した。１例の正常試料では、上皮側に向かう粘膜上皮部分において特異的な免疫反応性が細胞質に見られたのに対し、陰窩側に向かう粘膜上皮部分においてはスコア２～３の染色性を示す細胞膜結合性の表現型が見られた。

【０５８９】

前立腺がんにおけるLSRの発現

前立腺腫瘍では、免疫反応性レベルは１～２＋の範囲で変動した。８例の腺癌コホートのうち、１例の腫瘍でスコア２＋（グリーソンスコア９）が記録され、２例の腫瘍でスコア１～２（グリーソンスコア９および７）が記録され、３例の腫瘍でスコア１＋が記録された。前立腺腫瘍はいずれもLSR免疫反応性を示すと見られた。これらのコアでは、顕著な膜表現型が腫瘍上皮内に観察された例外を除き、免疫反応性は細胞質に見られた。正常前立腺試料では、腺上皮において染色性が見られ、平滑筋領域においても時折染色性が見られ、その染色強度は＋１～＋２であった。

【０５９０】

リンパ腫におけるLSRの発現

リンパ腫試料では、染色レベルはより低く、３例のNHL（非ホジキンリンパ腫）試料でスコア１＋が示され、５例のNHL（非ホジキンリンパ腫）およびHL（ホジキンリンパ腫）試料でスコア０～１＋が示され、これらのコアは75～100%の免疫反応性を示した（HL試料はIHCスコア０～１であった）。しかしながら、１名のドナー（15052）では、ばらけた腫

瘍細胞集団においてより高い染色レベルが示された。２例の正常リンパ節試料のうちの１例の試料では、胚中心内において細胞質染色性が見られた。他の試料においては、ばらけた免疫細胞のいくつかが免疫反応性を示した。

【０５９１】

肺がんにおけるLSRの発現

肺腫瘍セットでは、１２例の腫瘍試料のうちの８例の試料が特異的なLSR免疫反応を示した。観察された染色強度および免疫反応性は、腫瘍の種類によって異なった。１例のNSCL（非小細胞肺）腺癌試料では、腫瘍はスコア２＋～３＋の強い免疫反応性を示したのに対し、２例の扁平上皮癌試料では２＋および１＋～２＋の強度スコアが示された。２例のNSCLC（非小細胞肺がん）試料では、１＋～２＋の強度レベルが示され、いずれも低～中程度分化型であった。３例の腺癌試料では、２例の試料はスコア２＋の染色強度を示したが、１例の試料は１＋の染色スコアを示したに過ぎず、この試料は低分化型であった。腫瘍の大部分は75～100%の免疫反応性を示した。小細胞癌試料のコホートでは、腫瘍細胞に明らかな免疫反応性は見られず、マクロファージと推定される細胞に免疫反応性が時折見られた。正常肺試料では、気道上皮において細胞質免疫反応性が陽性であった。肺細胞においても時折＋１～＋２の強度の免疫反応性が見られた。

【０５９２】

胃腫瘍におけるLSRの発現

胃腫瘍では、４例の腺癌試料（中程度分化型）が、腫瘍内に明らかなLSR発現を示し、各コアにおいて75～100%の免疫反応性が示された。全体を通してスコアレベルは試料によって異なり、１例の試料はスコア２＋～３＋を示し、残りの試料はスコア１＋または２＋を示した。特定の組織においては、細胞膜に関連する顕著な染色性が時折見られるとともに、さらにマクロファージと推定される浸潤細胞においても免疫反応性が見られた。正常胃組織においては、粘膜上皮において明らかな特異的細胞質免疫反応性が見られた。１名の特定のドナー（2874）では、細胞質染色性および核染色性が見られ、その染色強度は＋１～＋２であった。

【０５９３】

卵巣がんにおけるLSRの発現

卵巣癌コホートでは、腫瘍内において特異的なびまん性の細胞質免疫反応性が示され、コアは75～100%の免疫反応性を示した。染色強度は腫瘍の種類によって異なった。２例の漿液性乳頭状癌試料はそれぞれスコア０～１＋および２＋を示し、色の濃い強染色パターンを示す腫瘍細胞がいくつか見られた（ドナー13003）。顆粒膜細胞腫では比較的低いスコア（０～１＋）が示されたが、漿液性嚢胞腺癌試料では２＋の強い染色性が示されるとともに、細胞膜に関連する免疫反応性が示された（ドナー9407）。正常卵巣組織では、１例の試料のみにおいて、ある程度の特異的免疫反応性が間質領域で示され、その染色強度は＋２であった。

【０５９４】

悪性黒色腫におけるLSRの発現

皮膚悪性黒色腫では、弱い染色性（０～１＋）が示され、腫瘍細胞の25～50%に免疫反応性が見られた。この組織においては、細胞膜に関連する明らかな染色性は観察されなかった。正常皮膚では表皮内に免疫反応性は見られなかった。皮膚リンパ球のみが時折陽性に染色された。

【０５９５】

脳腫瘍におけるLSRの発現

脳腫瘍では、（グレード４の星状細胞腫の）２例の試料において腫瘍細胞の75～100%が免疫反応性を示した。具体的には、１名のドナー（ドナー9516）において核膜染色性（２＋）が示されたのに対し、ドナー13845では染色性はそれほど強くなかった（０～１＋）。グレード２の星状細胞腫を有する１名の患者はIHCスコア０を示した。腫瘍の種類と免疫反応性レベルとの間には相関性はないと考えられる。正常脳では、１例の試料が神経網内の細胞において明らかな特異的細胞質免疫反応性を示し、他にも神経線維において観察

された。

【０５９６】

腎腫瘍におけるLSRの発現

腎臓癌では、３例の明細胞腫瘍および１例の非明細胞癌がLSR免疫反応性を示した。染色強度レベルは１＋～２＋の範囲で変動し、各コアにおいて腫瘍細胞の75～100%が免疫反応性を示した。また、明細胞癌は、分化度がより低い細胞型と比較して細胞膜に特異的な辺縁染色パターンを示したことが確認された。正常腎臓試料では、集合管において特異的な細胞質染色性が見られた。

【０５９７】

肝腫瘍におけるLSRの発現

肝腫瘍では、３例の試料はいずれも腫瘍細胞に顕著な免疫反応性を示し、各コアにおいて腫瘍細胞の75～100%が染色性を示した。ドナー19115は、アレイにおいて最も強く染色されたコアであったため、スコア３＋とした（この染色強度レベルを基準として他のコアのスコアリングを行った）。また、細胞サブセットでは、周囲の腫瘍と比較して強いレベルの細胞質染色性が観察され、細胞膜に関連する免疫反応性が時折示された。正常肝臓では特異的な細胞膜免疫反応性が見られた。

【０５９８】

正常リンパ組織におけるLSRの発現

正常リンパ節、扁桃腺および脾臓のfull-face切片では、これら３種の組織セットの大部分において胚中心に細胞質染色性陽性が確認され、さらにマクロファージと推定される細胞のいくつかが免疫反応性を示した。リンパ節では、リンパ濾胞内においていくつかの細胞が細胞膜染色性を示したことが確認され、平滑筋も時折染色された。

【０５９９】

【表５】

表 5: TMA 試料の特性（キャリブレーション）

組織	ドナーID	年齢	性別	臨床診断	病理
肝実質	3323	77	女性	肺塞栓症(COD)；肺梗塞(COD)；心筋梗塞	正常肝臓切片
肝実質	14453	15	男性	脳梗塞(CoD)；心筋症；ペニシリンアレルギー	門脈路を有する正常肝臓切片
腫瘍肝臓	14826	66	女性	肝細胞癌；アルコール性肝硬変；胆嚢炎，慢性	中程度分化型肝細胞癌
腫瘍卵巣	16974	57	女性	嚢胞腺癌，卵巣；心臓病；糖尿病	嚢胞腺癌
腫瘍卵巣	16976	49	女性	嚢胞腺癌，卵巣；高血圧；糖尿病	嚢胞腺癌
乳房腫瘍	13533	73	女性	乳癌；乳管内癌；グレード 3	グレード 3 の乳管腺癌と一致する所見を認める低分化癌
乳房腫瘍	4957	86	女性	乳癌；腺癌；高血圧；平滑筋腫；関節炎；片頭痛	正常乳房組織切片
Hek293T–LSR				陽性	陽性トランスフェクト細胞
Hek293T–Prp				陰性	陰性「空ベクター」細胞株

【０６００】

【表６】

表 6: がん TMA 試料の特性

マップ ID	ドナー ID	組織	年齢	性別
1	8589	腫瘍:乳房:乳管腺癌	46	女性
2	8707	腫瘍:乳房:乳管腺癌	46	女性
3	8723	腫瘍:乳房:乳管腺癌	74	女性
4	15778	腫瘍:乳房:小葉癌	52	女性
5	3724	腫瘍:乳房:乳管腺癌	82	女性
6	2953	腫瘍:乳房:乳管腺癌	67	女性
7	9132	腫瘍:乳房:乳管腺癌	82	女性
8	9298	腫瘍:乳房:乳管腺癌	73	女性
9	5704	正常:乳房	46	女性
10	5347	正常:乳房	64	女性
11	3550	腫瘍:結腸:腺癌	61	男性
12	15767	腫瘍:大腸:腺癌	58	女性
13	4537	腸管:S状結腸腺癌;	44	女性
14	2206	腫瘍:結腸:腺癌	76	女性
15	9542	腫瘍:結腸:腺癌	73	男性
16	2893	腫瘍:結腸:腺癌	62	男性
17	15764	腫瘍:大腸:腺癌	75	女性
18	15763	腫瘍:大腸:腺癌	69	女性
19	2681	正常:結腸	54	女性
20	3121	正常:結腸	34	男性
21	15296	腫瘍:前立腺	68	男性
22	15295	腫瘍:前立腺:腺癌	71	男性
23	15301	腫瘍:前立腺:腺癌	51	男性
24	15758	腫瘍:前立腺:腺癌	74	男性
25	15745	腫瘍:前立腺:腺癌	52	男性
26	15777	腫瘍:前立腺:腺癌	68	男性
27	15755	腫瘍:前立腺:腺癌	55	男性
28	15756	腫瘍:前立腺:腺癌	68	男性
29	5678	正常:前立腺	48	男性
30	13951	正常:前立腺	37	男性
31	15052	リンパ腫	45	女性
32	15760	腫瘍:リンパ腫	72	女性
33	17549	腫瘍:リンパ腫	47	男性
34	15039	リンパ腫	47	男性
35	15034	リンパ腫	71	男性
36	15037	リンパ腫	53	女性
37	17547	リンパ腫		

38	15775	腫瘍:リンパ腫	75	女性
39	4655	正常:リンパ節	1	女性
40	10789	正常:リンパ節	58	男性
41	12053	腫瘍:肺	72	男性
42	15772	腫瘍:肺:非小細胞癌	44	男性
43	13586	腫瘍:肺	67	女性
44	2760	腫瘍:肺: 扁平上皮細胞癌	64	男性
45	9354	腫瘍:肺:腺癌	63	男性
46	3473	腫瘍:肺:腺癌	72	男性
47	2765	腫瘍:肺:腺癌	64	女性
48	4852	腫瘍:肺:腺癌	56	女性
49	10414	小細胞癌	74	男性
50	15055	腫瘍:肺:小細胞癌	52	男性
51	15054	腫瘍:肺:小細胞癌	65	男性
52	15053	腫瘍:肺:小細胞癌	52	男性
53	1311	肺:実質	36	女性
54	14	肺:実質	39	女性
55	5767	正常:肺:実質	45	男性
56	2649	正常:肺:実質	37	男性
57	14551	腫瘍:胃	83	女性
58	10656	腫瘍:胃	74	男性
59	13200	腫瘍:胃	85	男性
60	2295	腫瘍:胃	66	女性
61	13665	胃:体部	57	女性
62	2874	胃:体部	53	男性
63	12998	腫瘍:卵巣	78	女性
64	13003	腫瘍:卵巣	74	女性
65	5739	腫瘍:卵巣	48	女性
66	9407	腫瘍:卵巣	75	女性
67	4739	正常:卵巣	42	女性
68	4781	正常:卵巣	34	女性
69	15759	腫瘍:皮膚悪性黒色腫	65	男性
70	15753	腫瘍:皮膚悪性黒色腫	46	女性
71	15038	腫瘍:皮膚悪性黒色腫	41	男性
72	15343	腫瘍:皮膚悪性黒色腫	24	男性
73	13110	正常:皮膚	22	女性
74	15415	正常:皮膚	45	女性
75	15342	腫瘍:脳:多形膠芽腫	56	男性
76	9514	腫瘍:脳	17	男性
77	13845	腫瘍:脳	58	男性
78	9516	腫瘍:脳	25	女性
79	2007	正常:脳:皮質:前頭部	40	男性

80	4585	正常:脳:皮質:前頭部	85	男性
81	13266	腫瘍:腎臓	71	男性
82	14125	腫瘍:腎臓	41	男性
83	4764	腫瘍:腎臓	66	男性
84	9043	腫瘍:腎臓	45	男性
85	2874	正常:腎臓:皮質	53	男性
86	4818	正常:腎臓:皮質	52	女性
87	19115	腫瘍:肝臓		
88	15757	腫瘍:肝臓	25	男性
89	14826	腫瘍:肝臓	66	女性
90	19114	腫瘍:肝臓		
91	1991	正常:肝臓:実質	79	女性
92	3123	正常:肝臓:実質	31	男性

【０６０１】

【表７】

表 7: リンパ器官 TMA 試料の特性

組織	ID	年齢	性別	臨床診断	病理報告
リンパ節	53524	73	F	くも膜下出血(COD); 高血圧; インスリン非依存性糖尿病	リンパ球の集合体および境界明瞭な洞を有する正常組織像を示すリンパ節切片。診断:正常リンパ節
リンパ節	3217	36	M	頭蓋内出血(COD); 臓器ドナー	リンパ球の集合体および境界明瞭な洞を有する正常組織像を示すリンパ節切片。診断:正常リンパ節
リンパ節	9191	32	M	肺動脈性高血圧症および心臓欠陥	炭粉が充満したマクロファージを多数含むリンパ節。重大な病的異常は認められない。
扁桃腺	10821	17	F	扁桃腺炎, 慢性	正常扁桃腺リンパ組織の上方に位置する非異形成扁平上皮。
扁桃腺	10045	25	F	扁桃腺炎	上皮およびリンパ濾胞を含む正常扁桃腺組織。
扁桃腺	11024	6	M	扁桃腺炎, 慢性; 呼吸困難	上皮に好中球がわずかに見られる扁桃腺。
脾臓	14345	60	M	扁桃腺炎	正常脾臓。白脾髄および赤脾髄が見られる。
脾臓	13851	18	F	脳内出血(CoD); 高血圧;高脂血症; インスリン非依存性糖尿病;関節炎	正常な赤脾髄および白脾髄が見られる正常脾臓。中程度の保存状態。
脾臓	15947	53	M	頭蓋内出血(CoD); 子宮内膜症	正常脾臓

【０６０２】
【表８】
表 8: がん TMA 試料の IHC 分析

マップ ID	組織	診断	腫瘍の免疫反応性	腫瘍の免疫反応性（%）	コメント
1	腫瘍:乳房:乳管腺癌	乳管内癌と浸潤性乳管癌との混合型	1-2+	0-25	
2	腫瘍:乳房:乳管腺癌	浸潤性乳管癌	0	0	
3	腫瘍:乳房:乳管腺癌	原発性（浸潤性乳管パターン）	2+	75	
4	腫瘍:乳房:小葉癌		-	-	コア欠損
5	腫瘍:乳房:乳管腺癌		2+	75-100	
6	腫瘍:乳房:乳管腺癌	DCIS（非浸潤性乳管癌）	-	-	コア欠損
7	腫瘍:乳房:乳管腺癌	肉腫様乳管癌	-	-	コア欠損
8	腫瘍:乳房:乳管腺癌	浸潤性乳管癌	-	-	コア欠損
9	乳房	正常乳房組織	-	-	コア欠損
10	乳房	正常乳房組織	-	-	コア欠損
11	腫瘍:結腸:腺癌	分化型腺癌	2-3+	75-100	腫瘍細胞，マクロファージと推定される細胞
12	腫瘍:大腸:腺癌	中分化型	-	-	コア欠損
13	S状結腸癌	腺癌 中分化型	3+	75-100	
14	腫瘍:結腸:腺癌	浸潤性	2-3+	75-100	
15	腫瘍:結腸:腺癌	中分化型腺癌	2-3+	75-100	
16	腫瘍:結腸:腺癌	高分化型腺癌	2-3+	75-100	
17	腫瘍:大腸:腺癌	中分化型腺癌	0-1	75-100	コアの 75%は壊死性
18	腫瘍:大腸:腺癌	中分化型腺癌	2-3+	75-100	
19	結腸	正常結腸:全層			2-3 粘膜染色性 粘膜染色性
20	結腸	全層 正常結腸	-	-	コア欠損
21	腫瘍:前立腺	腺癌	-	-	コア欠損
22	腫瘍:前立腺:腺癌	腺癌 グリーソンスコア 3+3=6	1+	50-75	

23	腫瘍:前立腺:腺癌	グリーソンスコア 3+4=7	1+	0-25	
26	腫瘍:前立腺:腺癌	グリーソンスコア 4+4=8	1+	75-100	
27	腫瘍:前立腺:腺癌	グリーソンスコア 3+4=7	1-2+	0-25	
28	腫瘍:前立腺:腺癌	グリーソンスコア 4+5=9	2+	75-100	
29	前立腺	正常前立腺組織			腺上皮において 1+の細胞質染色性が見られる。時折，細胞膜にも染色性が見られ，平滑筋において 1+の染色性が見られる。
30	前立腺	正常前立腺			1+ 管腔表面において顕著な細胞膜染色性。 コアの 75%が欠損。
31	リンパ腫	大細胞型リンパ腫が浸潤したリンパ節	1+	0-25	ばらけた腫瘍細胞集団ーより色の濃い染色性(2+)
32	腫瘍:リンパ腫	低悪性度 非ホジキンリンパ腫	1+	50-75	
33	腫瘍:リンパ腫		0-1	75-100	
34	リンパ腫	高悪性度 非ホジキンリンパ腫	0-1	75-100	
35	リンパ腫	非ホジキンリンパ腫	1+	75-100	
36	リンパ腫	非ホジキンリンパ腫	1+	75-100	
37	リンパ腫		0-1	75	
38	腫瘍:リンパ腫	ホジキンリンパ腫	0-1	75	
39	リンパ節		-	-	0-1 細胞質染色性。 免疫細胞サブセット(macs)においてのみ染色性が見られる。
40	リンパ節	正常リンパ節	-	-	1-2+ 胚中心において細胞質染色性ーびまん性染色
41	腫瘍:肺	扁平上皮様の特徴をいくつか有する低分化型非小細胞癌	1-2+	75-100	
42	腫瘍:肺:非小細胞癌	低分化型 非小細胞癌	1-2+	0-25	

43	腫瘍:肺	中～低分化型 扁平上皮癌	1-2+	75-100	
44	腫瘍:肺: 扁平上皮細胞癌	中等度によく分化した 角化型扁平上皮 細胞癌	2+	75-100	
45	腫瘍:肺:腺癌	腺癌の特徴を示す 大細胞癌	2-3+	75-100	
46	腫瘍:肺:腺癌	低分化型腺癌	1+	75-100	
49	腫瘍:肺	小細胞癌	陰性	-	陰性染色
50	腫瘍:肺	小細胞癌	陰性	-	陰性染色
51	腫瘍:肺	小細胞癌	陰性	-	陰性染色
52	腫瘍:肺	小細胞癌	陰性	-	陰性染色
53	肺:実質	正常肺	-	-	1+ 気道上皮において 細胞質染色性
54	肺:実質	正常肺	-	-	終末細気管支円柱上皮 において染色性(1-2+)
55	肺:実質	正常肺	-	-	終末細気管支円柱上皮 において染色性(1-2+) マクロファージにおいて 1+の染色性
56	肺:実質	正常肺	-	-	肺胞に染色性は見られな い。マクロファージが陽性 染色を呈した(0-1+)。
57	腫瘍:胃	中分化型腺癌	2-3+	75-100	
58	腫瘍:胃	中分化型腺癌	1+	75-100	
59	腫瘍:胃	中分化型腺癌	1+	75-100	びまん性細胞質染色 マクロファージにおいて 染色性(1+)
60	腫瘍:胃	中分化型腺癌	2+	75-100	
61	胃:体部	正常胃	-	-	1+ 粘膜上皮において 細胞質染色性および 細胞膜染色性
62	胃:体部	正常胃	-	-	1-2+粘膜上皮において 細胞質染色性および 細胞膜染色性。時折，核 染色性が見られる。
63	腫瘍:卵巣	漿液性乳頭状 嚢胞癌	2+	75-100	
64	腫瘍:卵巣	浸潤性漿液性 乳頭状癌	0-1+	75-100	
65	腫瘍:卵巣	顆粒膜細胞腫	0-1	75-100	
66	腫瘍:卵巣	漿液性嚢胞腺癌	2+	75-100	

67	卵巣	正常卵巣	-	-	顆粒状上皮のばらけた細胞において時折染色性が見られた(2+)。間質領域ー陰性染色
68	卵巣	正常卵巣	-	-	染色性は認められなかった
69	腫瘍:皮膚	悪性黒色腫	0-1	N/A	PD
70	腫瘍:皮膚	高悪性度悪性黒色腫	-	-	コア欠損
71	悪性黒色腫	悪性黒色腫	0-1	25-50	
72	腫瘍:皮膚	悪性黒色腫	0	0	
73	皮膚	正常皮膚	-	-	表皮が陰性染色を呈した
74	皮膚	正常皮膚	-	-	表皮が陰性染色を呈した。皮膚リンパ球が時折陽性(1+)に染色された。
75	腫瘍:脳	多形膠芽腫	-	-	コア欠損
76	腫瘍:脳	星状細胞腫;グレード2	0	0	染色性は認められなかった
77	腫瘍:脳	多形膠芽腫;別名:グレード4星状細胞腫	0-1	75-100	
78	腫瘍:脳	星状細胞腫;グレード4	2+	75-100	
79	脳:皮質:前頭部	正常脳	-	-	0-1 神経網において細胞質染色性
80	脳:皮質:前頭部	正常脳皮質	-	-	陰性染色が見られた
81	腫瘍:腎臓	高分化型腎明細胞癌	1+	75-100	
82	腫瘍:腎臓	腎細胞癌と一致する所見を認める組織像	1+	75-100	
83	腫瘍:腎臓	腎細胞(明細胞)癌	1-2+	50-75	
84	腫瘍:腎臓	腎明細胞癌	1-2+	75-100	
85	腎臓:皮質	正常腎皮質	-	-	0-1+ 集合管において細胞質染色性
86	腎臓:皮質	正常腎皮質	-	-	2+ 集合管において細胞質染色性
87	腫瘍:肝臓	肝細胞癌	3+	75-100	
88	腫瘍:肝臓	線維層板状肝細胞癌	1+	0-25	
89	腫瘍:肝臓	低悪性度肝細胞癌	2+	75-100	
90	腫瘍:肝臓	肝細胞癌	-	-	コア欠損
91	肝臓:実質	正常肝臓	-	-	0-1 細胞質／細胞膜染色性
92	肝臓:実質	肝臓ー正常境界	-	-	0-1 細胞膜染色性

【０６０３】

LSR特異的ポリクローナル抗体を使用したTOP4（登録商標）組織マイクロアレイ研究

「Top 4」TMAは４種の組織に由来するコアから構成されていた（乳房（４例の正常組織

および26例の腫瘍組織）、大腸（４例の正常組織および26例の腫瘍組織）、肺（４例の正常組織および26例の腫瘍組織）ならびに前立腺（４例の正常組織および26例の腫瘍組織））。TMAの配置を表９に示す。HEK293T LSR細胞株のFFPE切片（４μｍ）および「Top4」multi-tumor TMAを使用した。特に記載がない限り、インキュベーションはすべて室温で行った。PT Link装置においてpH9.0 Flex+ 3-in-1抗原賦活バッファーを使用し、95℃、20分間の設定で自動的に加温および冷却しながら、切片の脱パラフィン、抗原賦活、親水化を行った。抗原賦活後、切片をFlex（TBST）バッファーで2×5分間洗浄し、ダコAutostainer Plusにセットした。Flex+ パーオキシダーゼブロッキング試薬とともに切片を10分間インキュベートし、50mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.1%Tween20、pH 7.6（TBST）中で2回リンスし、Protein Block試薬（ダコ、X0909）とともに10分間インキュベートした。ダコEnvision Flex抗体希釈液（DAKO Cytomation、カタログNo.K8006）で希釈した一次抗体とともに切片を30分間インキュベートした。6μg/mLの抗LSRポリクローナル抗体（Abcam ab169583）を反応させた。1μg/mLの抗フォン・ヴィレブランド因子（VWf）抗体を反応させた。ネガティブコントロール切片は、6μg/mLおよび1μg/mLの非免疫ウサギIgG抗体（ダコ、カタログNo.0936）またはダコEnvision Flex抗体希釈液（「no primary」コントロール）とともにインキュベートした。一次抗体とともにインキュベートした後、切片をFLEXバッファー中で2回リンスし、抗マウス/ウサギFlex+ HRPとともに20分間インキュベートし、FLEXバッファー中で2回リンスし、次いでジアミノベンジジン（DAB）基質とともに10分間インキュベートした。蒸留水でスライドをリンスすることにより発色反応を停止させた。発色後、ヘマトキシリンで切片を対比染色し、エタノールの上昇系列（90%→99%→100%）で脱水し、キシレンを3回交換して透徹し、DePeXを用いてカバースリップをかけた。ライカDFC290カメラを備えたオリンパスBX51顕微鏡を使用して、染色した切片を分析し、適切なデジタル画像を撮影した。

【０６０４】

乳房腫瘍セットでは、大部分の症例において不均一な染色強度を示し、低～中程度の免疫反応性が見られた。このコホートでは、２例の試料がスコア３～３＋の最大染色強度を示し、腫瘍細胞の50～100%が反応性を示した。14例の試料は、最大でスコア２＋の染色強度を示し、腫瘍細胞（グレード２／３）の25～100%が反応性を示した。他の10例の試料は、スコア１＋の低い染色強度を示し、これらの腫瘍試料の大部分において25～50%の反応性が示された。他の反応性腫瘍試料のいくつかでは、0～25%から75～100%の範囲で弱い染色性が示された。間質領域では免疫浸潤細胞も陽性に染色された。腫瘍の大部分は主として浸潤性乳管癌および小葉癌であり、これらのグレードは様々であった。腫瘍の種類またはグレードに特異的に起因すると考えられる免疫反応性パターンは観察されなかった。正常乳房では、腺房内において特異的な細胞質免疫反応性が見られた。

【０６０５】

本研究の大腸コホートでは、腺癌試料は１例の試料を除きいずれも免疫反応性を示した。このコホートでは、腫瘍の大部分は低分化型～高分化型であった。８例の試料では、腫瘍細胞（グレード２／３）の25～100%にスコア３＋の染色性が示された。これらの腫瘍の大部分は、はっきりとした細胞膜表現型を示す顕著な特徴を有していた。10例の試料では、腫瘍細胞（グレード２／３）の25～100%に反応性が見られ、スコア２＋の染色性が示された。６例の試料では、腫瘍は１＋と低いスコアを示し、大部分の試料は0～25%から50～75%の範囲の反応性を示した。これらの腫瘍セットにおいては、決定した染色強度スコアに相関する明らかに一貫した染色パターンが見られた。高いスコアでは顕著な膜表現型が示された。正常組織試料では、粘膜上皮および微小血管部分において特異的な免疫反応性が検出された。

【０６０６】

肺腫瘍セットでは、調査した腫瘍の大部分において特異的な免疫反応性が見られ、低～中程度の染色強度が示された。腫瘍の大部分は、腺癌由来の高～低分化細胞型非小細胞癌（NSCLC）であった。これらの腫瘍では、６例の試料がスコア２＋の最大染色強度を示し、これらのコアのほとんどにおいて腫瘍細胞の50～100%が免疫反応性を示した。18例の試

料は、腫瘍細胞の25～100%においてスコア１／１＋の弱い染色性を示した。１例の小細胞癌試料では、分析した３コアの腫瘍細胞の25～100%に弱い染色性（１＋）が示され、特異的な細胞質免疫反応性が示された。他の顕著な染色特性は血管部分で見られ、また、免疫浸潤細胞が強く染色された。正常肺組織では、細気管支上皮試料および肺胞腔内の遊離マクロファージにおいて特異的な免疫反応性が検出された。陰性染色は肺胞中隔で見られた。

【０６０７】

前立腺腫瘍セットでは、大部分の試料において特異的な染色性が見られ、腫瘍上皮において低～中程度の染色強度が示された。１例の試料では、腫瘍細胞（グリーソンスコア４＋５）の75～100%において細胞膜免疫反応性パターンを示すスコア３の最大染色強度が示された。他の７例の試料では、腫瘍細胞の25～100%にスコア２＋が示された。これら試料の大部分は、グリーソンスコア３＋４～４＋３の腫瘍巣に由来していた。また、17例の腫瘍試料では、腫瘍細胞の25～100%にスコア１／１＋の弱い染色性が示された。正常前立腺組織のいくつかの試料では、腺上皮において弱い細胞質染色性が示され、さらに時折、細胞膜染色性も示された。全体として、上皮の免疫反応性は赤みがかった色に染色されるか、陰性のいずれかであった。他の顕著な染色性は、免疫浸潤細胞と推定される細胞で見られた。

【０６０８】

【表９】

表 9: Top4 TMA の組織のアノテーション

組織	症例 ID	年齢	性別	病理
乳房	51168	40	F	正常
乳房	14784	38	F	正常
乳房	11292	53	F	正常
乳房	33349	61	F	正常
乳房	8998	45	F	浸潤性乳管癌 グレード 2/3
乳房	9100	36	F	浸潤性乳管癌 グレード 2/3
乳房	9553	53	F	浸潤性乳管癌 グレード 2
乳房	26375	87	F	浸潤性乳管癌 中分化型
乳房	36386	67	F	浸潤性乳管癌 グレード 3
乳房	41690	70	F	髄様癌 グレード 2
乳房	8980	45	F	浸潤性乳管癌 グレード 1/3
乳房	9133	42	F	浸潤性乳管癌 グレード 2
乳房	9536	44	F	浸潤性乳管癌
乳房	12281	33	F	浸潤性乳管癌 2
乳房	33139	54	F	浸潤性乳管癌 グレード III
乳房	16996	74	F	浸潤性乳管癌 グレード 1
乳房	33162	75	F	浸潤性乳管癌 グレード III
乳房	33119	43	F	浸潤性乳管癌，非浸潤性乳管癌，グレード III
乳房	12759	49	F	浸潤性乳管癌，非浸潤性乳管癌，グレード II
乳房	15537	61	F	浸潤性乳管癌 低分化型
乳房	16957	63	F	浸潤性乳管癌 線維嚢胞状変化 グレード 3/3
乳房	17916	75	F	浸潤性乳管癌
乳房	18381	37	F	浸潤性乳管癌 グレード 3/3
乳房	27813	53	F	浸潤性乳管癌 グレード 3
乳房	59919	53	F	浸潤性乳管癌 グレード II
乳房	35405	53	F	浸潤性乳管癌，乳房小葉癌，グレード 3
乳房	54741	43	F	浸潤性乳管癌と他のタイプの乳癌との混合型 グレード II
乳房	54876	51	F	浸潤性乳管癌 グレード II
乳房	55082	62	F	浸潤性乳管癌 グレード II
乳房	55238	70	F	浸潤性乳管癌および乳房小葉癌 グレード II
直腸	9533	66	M	正常
直腸	9608	53	M	正常
直腸	16049	45	M	正常
結腸	17038	49	F	正常
結腸	36317	73	F	中分化型：大腸腺癌
結腸	19746	89	M	中分化型：S状結腸腺癌
結腸	22182	63	M	中～低分化型：盲腸腺癌
結腸	25846	66	F	中～低分化型：結腸腺癌
結腸	38189	41	F	高～中分化型：結腸腺癌

結腸	41243	73	M	中分化型:結腸腺癌
直腸	52940	74	F	中分化型:直腸腺癌
結腸	53615	48	F	中分化型:下行結腸腺癌
結腸	54804	43	M	中～低分化型:大腸腺癌
直腸	55076	70	M	低分化型:直腸腺癌
結腸	55827	57	M	中分化型:大腸腺癌
結腸	9566	66	F	中分化型結腸腺癌
結腸	11960	62	F	中分化型:腺癌
直腸	44270	66	M	グレード3: 直腸腺癌
直腸	18671	65	M	中分化型:直腸腺癌
直腸	19950	64	F	中分化型:直腸腺癌
直腸	20022	53	M	中分化型:直腸腺癌
直腸	20061	62	M	中分化型:直腸粘液性腺癌
直腸	20560	58	M	中分化型:直腸腺癌
直腸	20921	75	F	中分化型:直腸腺癌
直腸	20990	84	F	中分化型:直腸腺癌
結腸	19948	71	M	グレード2:上行結腸管状腺癌
直腸	20895	25	F	中分化型直腸腺癌
結腸	22072	67	M	高分化型結腸腺癌
結腸	36274	61	F	中～低分化型大腸腺癌
結腸	42362	58	F	中分化型結腸腺癌
肺	6692	37	M	正常
肺	7892	48	M	正常
肺	7893	75	F	正常
肺	7900	75	F	正常
肺	61215	59	M	非小細胞癌:中分化型肺腺癌
肺	62743	75	M	非小細胞癌:中分化型肺腺癌
肺	30426	63	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 低分化型
肺	40222	52	M	非小細胞癌:グレード3
肺	45409	52	M	非小細胞癌:グレード3
肺	45925	62	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 中～低分化型
肺	46417	70	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 中分化型
肺	47183	68	F	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 中分化型
肺	47184	57	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 低分化型
肺	47231	78	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 中～低分化型
肺	62745	47	M	非小細胞癌:腺癌, 中～低分化型
肺	50538	56	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 角化型, 中～低分化型
肺	52835	59	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 角化型, 高～中分化型
肺	59389	65	M	非小細胞癌:乳頭状腺癌, 中～低分化型
肺	55383	58	M	非小細胞癌:大細胞癌, 低分化型
肺	57766	62	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌, 大細胞癌, 非角化型, 中～低分化型

肺	57771	61	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌，大細胞癌，非角化型，低分化型
肺	57772	59	M	非小細胞癌:扁平上皮細胞癌，角化型，中分化型
肺	59370	51	M	非小細胞癌:大細胞癌，未分化型
肺	4457	73	M	扁平上皮細胞癌:中分化型
肺	30167	57	M	非小細胞癌:腺癌，低分化型
肺	10891	56	M	非小細胞癌:低分化型
肺	12002	74	F	非小細胞癌:低分化型
肺	12047	60	F	腺癌:中～低分化型
肺	61076	69	M	非小細胞癌:低分化型肺腺癌
肺	42315	67	M	小細胞癌:未分化型肺小細胞癌
前立腺	11657	62	M	正常
前立腺	35710	63	M	正常
前立腺	35711	59	M	正常
前立腺	35707	63	M	正常
前立腺	11813	62	M	前立腺腺癌:3+4
前立腺	69088	84	M	前立腺腺癌:4+5=9
前立腺	68933	68	M	前立腺腺癌:3+4=7
前立腺	23502	56	M	前立腺腺癌:グリーソンスコア 2+3=5
前立腺	28142	52	M	前立腺腺癌:グリーソンスコア 3+3=6
前立腺	29979	64	M	前立腺腺癌:グリーソンスコア 4+3=7
前立腺	70295	67	M	前立腺腺癌:4+5=9
前立腺	21336	58	M	浸潤性前立腺腺癌
前立腺	68925	63	M	前立腺腺癌 4+3=7
前立腺	23480	60	M	前立腺腺癌 グリーソンスコア 3+3=6
前立腺	23504	55	M	前立腺腺癌 グリーソンスコア 4+4=8
前立腺	24029	67	M	前立腺腺癌 グリーソンスコア 3+4=7
前立腺	26159	61	M	前立腺腺癌 グリーソンスコア 3+4=7
前立腺	34589	59	M	前立腺腺癌 グリーソンスコア 4+3=7
前立腺	34876	74	M	前立腺腺癌 4+3=7
前立腺	69073	71	M	前立腺腺癌 4+3=7
前立腺	38248	56	M	前立腺腺癌，高悪性度前立腺上皮内腫瘍， グリーソンスコア 3+4=7
前立腺	39553	55	M	前立腺腺癌 3+4=7
前立腺	40334	67	M	前立腺腺癌 3+4=7
前立腺	68934	65	M	前立腺腺癌 4+3=7
前立腺	53065	62	M	前立腺腺癌 3+4=7
前立腺	54842	52	M	未分化型前立腺癌
前立腺	59769	65	M	前立腺腺癌 4+3=7
前立腺	69085	74	M	前立腺腺癌 4+3=7
前立腺	58979	59	M	前立腺腺癌 3+3=6
前立腺	58946	63	M	前立腺腺癌 3+3=6

【０６０９】

実施例１０：結合アッセイのためのマウス$CD4^+$T細胞刺激

B7/CD28ファミリー受容体のいくつか（たとえばCTLA4、PD-1および未知のB7-H4受容体）の発現はT細胞の活性化に依存するため、この実験では、LSRのカウンター受容体が活性化T細胞上に発現されるかどうかを試験した。この目的のため、可溶性抗CD28抗体の存在下においてプレート結合抗CD3抗体を使用して、あるいはコンカナバリンA（Con A）を使用した一般的な活性化法によって、マウス初代CD4 T細胞を活性化した。

１．コンカナバリンA（Con A）による刺激－精製したCD4$^+$T細胞を平底96ウェルプレートに１ウェルあたり2×10^{5}個播種した。Con A（3μg/mL、Sigma、カタログNo.C5275）を加え、細胞を37℃で48時間インキュベートした。

２．抗CD3+抗CD28による刺激－抗CD3を固定化するため、平底96ウェルプレートに5μg/mL抗CD3（0.5mg/mL、カタログNo.553058、BD）を１ウェルあたり75μL加え、室温で少なくとも2時間インキュベートした。ウェルをPBS200μLで3回洗浄した。2μg/mL可溶性抗CD28（eBioscience、カタログNo.16-0281-85）とともに、精製したCD4$^+$T細胞を1ウェルあたり2×10^{5}個播種して、37℃で48時間インキュベートした。

【０６１０】

結合アッセイ

Con Aまたは抗CD3/CD28で刺激したCD4$^+$T細胞1×10^{5}個を結合に使用した。マウスIgG2a Fc M:Mに融合させたマウスLSR ECD（バッチNo.35）（配列番号221）をこの結合アッセイに使用した。ポジティブコントロールとして、マウスIgG2a Fc H:Mに融合させたヒトILDR2 ECDの非グリコシル化誘導体（FcにN297A変異を有する、バッチNo.23）（配列番号223）を平行して試験した。T細胞株への結合を検出するために、上述したようにタンパク質の結合を検出した。

【０６１１】

図２０は、刺激したCD4$^+$T細胞を使用した結合アッセイの結果を示す。この結果から、マウスIgG2a Fc M:Mに融合させたマウスLSR ECD（バッチNo.35）（配列番号221）（2μg/50μL/ウェル）は、抗CD3/CD28またはCon Aで活性化したマウスT細胞には結合しないことが示された。

【０６１２】

実施例１１：ビオチン標識マウスIgG2a Fc融合マウスLSR ECDの濃度上昇系列とKARPAS-299細胞との結合

マウスIgG2a Fcに融合させたマウスLSR-ECD（配列番号221）の結合をより高いタンパク質濃度でも検出することができるかどうかについて、KARPAS-299細胞（ACC31、DSMZ）を使用して試験した。マウスIgG2a Fcに融合させたマウスLSR-ECD（配列番号221）をビオチン標識した濃度上昇系列を使用して、KARPAS-299細胞の染色を行った。

【０６１３】

様々な濃度（2μg、3μg、4μgおよび5μg）のビオチン標識マウスIgG2a Fcタンパク質融合マウスLSR-ECD（配列番号221）または5μgのビオチン標識コントロールmIgG2aとともに細胞をインキュベートした。細胞を洗浄後、ストレプトアビジン-PEを加え、結合をFACS分析で評価した。図２３Ａは、蛍光強度中央値（MFI）を示すヒストグラムを示す。図２３Ｂは、マウスIgG2a Fc融合マウスLSR-ECDを様々なタンパク質濃度としたときの、コントロールmIgG2aの結合（MFI）に対するマウスIgG2a Fc融合マウスLSR-ECD（配列番号221）の結合（MFI）の比率を示した用量依存曲線を示す。

【０６１４】

図２１に示すように、3μg/50μL/ウェルよりも高い濃度でもビオチン化マウスIgG2a Fc融合マウスLSR-ECD（配列番号221）の結合を用量依存的に検出することができた。

【０６１５】

実施例１２：M1およびM2極性化条件下のマクロファージにおけるmRNA発現レベルの評価

本研究は、マウスLSR TaqManプローブ（アプライドバイオシステムズ；カタログNo.Mm00660290_m1）を使用して、マクロファージの分化におけるmRNAレベルでのLSR mRNAの発現に対して極性化シグナル（M1型への極性化：IFNg、LPS、IFNg+LPS；M2型への極性化：IL-4、TGFb、グルココルチコイド、腫瘍上清）が及ぼす影響を評価することを目的とした。

【０６１６】
マクロファージは適応力の高い細胞であり、微小環境に由来するシグナルに応答して活性化され特徴的な極性化を経ることができる。具体的には、適応免疫系からのシグナルがマクロファージ極性化の主要決定因子となっている。より具体的には、微生物の生成物および炎症性サイトカインの誘導によって、マクロファージは古典的活性化プロファイル（M1型としても知られている）を経る。古典的活性化プロファイルは、細胞内微生物に対するマクロファージの殺傷能の増強、ならびに炎症性サイトカイン（TNF、IL-12、IL-23）および炎症促進性メディエーター（一酸化窒素および活性酸素中間体）の大量産生を特徴とする。一方、選択的に活性化されたM2型マクロファージは、IL-4/IL-13、TGF、グルココルチコイド、IL-10などの様々なシグナルによって促進され、炎症消散過程において血管新生および組織リモデリングを維持する。マクロファージの極性を持った活性化は、炎症性疾患および自己免疫疾患、ならびに腫瘍生物学に大きな影響を与える。具体的には、M1型マクロファージは病原体に対して殺傷能力を持ち、慢性炎症を起こしている組織において腫瘍を発生しやすくするのに対し、選択的に活性化されたマクロファージは、免疫制御能を有しており、創傷治癒に関与し、定着した腫瘍において組織リモデリングと腫瘍の増殖および転移を助ける血管新生とを促進する。重要なことには、マクロファージの差次的な極性化はリンパ球の活性化に重大な影響を及ぼす。M1型マクロファージは、T細胞に抗原を提示して防御免疫応答を活性化する傾向が強いが、M2型マクロファージは、免疫制御性/免疫抑制性の表現型を呈する傾向が強い。

【０６１７】
この実施例においては、マクロファージの分化におけるmRNAレベルでのLSRの発現に対して極性化シグナル（M1型への極性化：IFNg（Peprotech 315-05）、LPS（ALEXIS、ALX-581-009-L002）、IFNg+LPS；M2型への極性化：IL-4（Peprotech 214-14）、TGFb（Peprotech 100-21）、プロスタグランジンE2（Cayman Chemical 14010）、腫瘍上清）が及ぼす影響を評価した。４種の典型的な高度極性化マーカー（M1極性化マーカー（iNOSおよびCD80）ならびにM2極性化マーカー（ヒトALOX15またはマウス12/15、IL-10））の発現レベルを評価し、さらにコントロールとして１種のハウスキーピング遺伝子の発現レベルを評価した。M1遺伝子およびM2遺伝子の発現の動態は異なることが多いため、様々な時間（2時間、8時間および18時間）で細胞を極性化シグナルで処理した。biological replicate数を３として評価を行った。

【０６１８】
実験はマウスマクロファージを使用して行った。マクロファージ単離の4日前に3%（wt/vol）のチオグリコール酸培地（Difco、ミシガン州デトロイト）を500μL注射したマウスからマウス腹腔マクロファージを採取した。（接着による）精製の後、標準的な培養条件において細胞を1時間休ませてから、実験に使用した。

【０６１９】
マクロファージを刺激した後、TRIzol（インビトロジェンライフテクノロジーズ）を使用してトータルRNAを抽出し、レトロウイルス由来の逆転写酵素で逆転写し、M1およびM2極性活性化を評価するための特注の384ウェルTaqMan Low Density Arrays（LDA）LSR（アプライドバイオシステムズ；カタログNo.Mm00660290_m1）マーカーにロードするために調製した。TaqMan LDA Upgrade（アプライドバイオシステムズ）およびSDS2.1ソフトウェアを備える7900HTシステムを使用して試料を分析した。実験は、３つの独立した工程でマクロファージを調製し、二連で行った。

【０６２０】
結果：
実験系のバリデーションを行うために、典型的なM1型およびM2型マーカーの発現レベルを上述の様々な刺激下で評価した。図２２に示すように、典型的なM1型マーカーであるINOSの発現は（M1型へと極性化させる）LPS+INFγの刺激によって上昇した。図２３に示すように、典型的なM2型マーカーであるALOX15の発現は（M2型へと極性化させる）IL4および腫瘍上清の刺激によって上昇した。

【０６２１】
次いで、LSRのmRNA発現レベルを上記と同様にして様々な刺激下で様々な時間点において評価した。図２４に示すように、LSRの発現は（M2型へと極性化させる）プロスタグランジンEおよび腫瘍上清の刺激によって上昇した。プロスタグランジンE2の効果は8時間活性化した後に明確に示され、腫瘍上清の効果は18時間活性化した後に明確に示された。これらの刺激下におけるLSRの絶対発現レベルは、M2極性化条件下におけるALOX15（典型的なM2型マーカー）の発現レベルと同等であった。
【０６２２】
結論
本研究の結果から、選択的に活性化されたM2型マクロファージにおけるLSR mRNAの発現のアップレギュレーションが示された。
【０６２３】
選択的に活性化されたM2型マクロファージは、免疫制御能を有しており、創傷治癒に関与し、定着した腫瘍において組織リモデリングと腫瘍の増殖および転移を助ける血管新生とを促進する。したがって、単一の理論に拘束されることを望むものではないが、M2型へと極性化したマクロファージにおいてLSRが発現されていることから、抗LSR治療用抗体を使用して、悪性腫瘍に関連するM2型マクロファージを除去することまたはM2型マクロファージの免疫抑制機能を阻害することによって、免疫監視を増強し、がんを治療することができることが示唆される。
【０６２４】
実施例１３：がん免疫監視の調節因子としてのLSRタンパク質の役割:
１）インビボ概念実証
ａ）マウスがん同系モデル:
（ｉ）LSRタンパク質または無関係なコントロールタンパク質を過剰発現する腫瘍細胞を、遺伝的に適合するマウスに移植する。次いで、腫瘍の体積（およびマウス屠殺後の腫瘍の重量）を測定して腫瘍増殖の遅延を評価する（すなわち、LSRを過剰発現する腫瘍は、無関係なコントロールタンパク質を過剰発現する腫瘍よりも早く成長する）。腫瘍の所属リンパ節から得た免疫細胞をエクスビボ分析することによって、制御性T細胞とエフェクターT細胞の比率を評価する。
【０６２５】
（ii）単独療法としてLSRタンパク質に対する中和抗体を使用した同系腫瘍の治療
腫瘍細胞を遺伝的に同一のマウスに移植する。この担癌マウスに、LSRタンパク質に対する中和抗体を様々な用量で注射する。LSRタンパク質に特異的な中和抗体を使用した治療の結果、腫瘍の拒絶が増強する（すなわち、LSRタンパク質に対する中和抗体で治療したマウスの腫瘍は、無関係な抗体で治療したマウスの腫瘍よりも成長が遅くなる）。腫瘍の所属リンパ節から得た免疫細胞をエクスビボ分析することによって、制御性T細胞とエフェクターT細胞の比率を決定する。
【０６２６】
試験する腫瘍細胞株は様々な腫瘍由来であり、これには結腸癌、乳癌、卵巣癌、悪性黒色腫、肉腫および血液がんが含まれる。同系モデルを使用した試験はいくつかのマウス株で行われ、このようなマウス株としてはBALB/c、C57bl/6およびC3H/Hejが挙げられる。１セット目の実験において使用される移植可能な同系モデルは、主として、がん免疫療法の結果を予測できることが実証されているものである。このような同系モデルとして、それぞれBALB/cを遺伝子背景とする、B16-F10悪性黒色腫（Tihui Fu et al Cancer Res 2011; 71:5445-5454に記載された方法に準じる）、MC38結腸がん（Ngiow SF et al. Cancer Res. 2011 May 15; 71（10）:3540-51に記載された方法に準じる）、ID8卵巣がん（Krempski et al. J Immunol 2011; 186:6905-6913に記載された方法に準じる）、MCA105肉腫（Wang et al. J. Exp. Med. Vol. 208 No. 3 577-592に記載された方法に準じる）、CT26結腸癌（Ngiow SF et al. Cancer Res. 2011 May 15; 71（10）:3540-51に記載された方法に準じる）、および4T1乳癌（Takeda K et al. J Immunol. 2010 May 15;184(10):5493-

501に記載された方法に準じる）が挙げられる。

【０６２７】

（iii）同系腫瘍の確立およびLSRタンパク質に対する中和抗体と別の種類の治療方法との併用による治療

腫瘍細胞を遺伝的に同一のマウスに移植する。腫瘍を樹立した後、LSRタンパク質に対する中和抗体をマウスに様々な用量で腹腔内注射し、その際に慣用の化学療法（たとえばシクロホスファミド、Mkrtichyan et al. Eur. J immunol. 2011; 41, 2977-2986に記載された方法に準じる）と組み合わせたり、他の免疫チェックポイント阻害薬（たとえばPD1およびCTLA4、Curran et al.; Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 2; 107（9）:4275-80に記載された方法に準じる）と組み合わせたり、他の免疫調節薬（たとえば抗IL-18、Terme et al.; cancer res. 2011; 71:5393-5399に記載された方法に準じる）と組み合わせたり、がんワクチン（Hurwitz et al. Cancer Research 60, 2444-2448, May 1, 2000に記載された方法に準じる）と組み合わせたり、あるいは放射線療法（Verbrugge et al. Cancer Res 2012;72:3163-3174に記載された方法に準じる）と組み合わせる。

【０６２８】

（iv）ヒトがん異種移植片モデル:

内因性にLSRを発現するヒトがん細胞株を免疫欠損マウスに移植する。抗LSR抗体で治療したマウスの腫瘍体積と、アイソタイプが一致する無関係な抗体で治療したマウスの腫瘍体積とを比較評価する。この実験では、抗LSR抗体に毒素を結合させて（Luther N et al. Mol Cancer Ther. 2010 Apr;9(4):1039-46に記載された方法に準じる）、抗体-薬物複合体（ADC）の活性を評価しつつ、これとは別に、LSRに対するヒトIgG1またはマウスIgG2aアイソタイプ抗体でマウスを治療する（Holbrook E. Kohrt et al. J Clin Invest. 2012 March 1; 122（3）:1066-1075に記載された方法に準じる）。これらの抗体アイソタイプは抗体依存性細胞傷害（ADCC）を介した腫瘍除去を評価するために使用される。

【０６２９】

２）インビトロにおけるナチュラルキラー（NK）細胞活性の確認

ａ）結合アッセイ：

（ｉ）J Immunol 2005;174;6692-6701の記載に準じ、活性化された初代培養NK細胞に対する結合アッセイをヒトLSR ECD-FCタンパク質を用いて行う。NK細胞上にLSRのカウンター受容体が発現されていれば、LSR ECD-Fcの結合が観察される。

（ii）PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863の記載に準じ、活性化された初代培養NK細胞に対する結合アッセイをLSRタンパク質のいずれか１つに対する特異的抗体を用いて行う。NK細胞上にLSRのいずれか１つが発現されていれば、LSR特異的抗体の結合が観察される。

（iii）J Immunol 2006;176;6762-6769の記載に準じ、NK殺傷の標的細胞になりうる様々なヒトがん細胞株に対する結合アッセイをヒトLSR ECD-FCタンパク質を用いて行う。標的がん細胞上にLSRのいずれか１つのカウンター受容体が発現されていれば、LSR ECD-Fcの結合が観察される。

【０６３０】

ｂ）機能的killing assay：

（ｉ）killing assayは、過剰発現システム（LSRタンパク質のいずれか１つを過剰発現しているNK細胞または標的がん細胞）を使用して行う。PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863の記載に準じ、 NK細胞（effector；e）と放射性（S35）標識された標的がん細胞（target；t）とを様々なe:t比で共培養する。次いで、放射線放射を測定することによって、NK殺傷活性による標的細胞の溶解を評価する。標的がん細胞および／またはNK細胞株におけるLSRタンパク質のいずれか１つの過剰発現によって、NK媒介性殺傷活性がダウンレギュレートされる。

（ii）PLoS ONE; 2010; Vol. 5; p. 1-10の記載に準じ、ヒトLSR ECD-FCタンパク質の存在下においてkilling assayを行う。LSRのいずれか１つのECD-Fcを用いて処理を行うことによって、LSRとそのカウンター受容体との相互作用が阻害され、それによってLSRの抑制

活性が低下し、殺傷活性が増強される。
（iii）PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863の記載に準じ、LSRタンパク質のいずれか１つに対する中和抗体の存在下においてkilling assayを行う。LSRのいずれか１つに対する中和抗体を用いて処理を行うことによって、NK殺傷活性が増強される。
（iv）「Re-directed killing assay」は以下のように行う。PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863の記載に準じ、Fc受容体を高密度に発現する標的がん細胞を、LSRタンパク質のいずれか１つに対する活性化抗体でコーティングし、（選択したLSRタンパク質を発現する）NK細胞と接触させる。LSRのいずれか１つと活性化抗体との架橋によって、NK媒介性殺傷活性が低減される。

【０６３１】

３）インビトロにおける細胞傷害性Tリンパ球（CTL）活性の確認

ａ）悪性黒色腫細胞株におけるLSRタンパク質の発現

様々な悪性黒色腫細胞株におけるLSRの発現をフローサイトメトリーによって評価する。

【０６３２】

ｂ）機能アッセイ

機能アッセイは、MART-1（悪性黒色腫の特異的抗原）に特異的なF4 TCRを発現する初代ヒトリンパ球を使用して行う。Morgan et al, Science, 2006に記載されているように、TCRはHLA-A2+/MART1+悪性黒色腫細胞を認識する。OKT3で刺激した初代ヒトリンパ球（地域の血液銀行から入手）に、F4-TCRをコードするレトロウイルスベクターを形質導入する。次いで、この初代ヒトリンパ球をOKT3（抗CD3）で刺激し、リンパ球培地（IL-2を含む）中で培養する。前刺激したこのリンパ球を、完全長LSRを過剰発現する悪性黒色腫細胞株とともにインキュベートする。３つの異なる時間点においてサイトカイン分泌、活性化マーカー、細胞傷害性などを測定する。

【０６３３】

４）発現分析

ａ）ヒト腫瘍生検から単離した腫瘍細胞および免疫細胞におけるLSRタンパク質の発現

（ｉ）腫瘍から得た別々の細胞集団におけるLSRタンパク質の発現は、LSRタンパク質に対する特異的抗体を使用して確認する。Kryczek I. et al., J. Exp. Med.; 2006; Vol. 203; p.871-881およびCancer res. 2007; 67; 8900-8905の記載に準じて、様々な細胞集団（たとえば、腫瘍細胞、内皮、腫瘍関連マクロファージ（TAM）、ならびにDC、B細胞および様々なT細胞サブセット（CD4、CD8およびTreg））を腫瘍生検から新たに単離し、腫瘍細胞、腫瘍間質および浸潤免疫細胞におけるLSRの発現を評価する。
（ii）腫瘍から得た別々の細胞集団に対する結合アッセイは、ヒトLSR ECD-FCタンパク質を使用して行う。J. Exp. Med.; 2006; Vol. 203; p.871-881およびCancer res. 2007; 67; 8900-8905の記載に準じて、腫瘍生検によって腫瘍からの様々な細胞集団（たとえば、腫瘍細胞、内皮、腫瘍関連マクロファージ（TAM）、ならびにDC、B細胞、および様々なT細胞（CD4、CD8およびTreg））を新たに単離し、腫瘍細胞、腫瘍間質および免疫細胞における、LSRのカウンター受容体の発現を評価する。

【０６３４】

ｂ）担癌マウスの所属リンパ節および脾臓から単離された細胞におけるLSRタンパク質の発現

（ｉ）担癌C57マウスの上皮がん細胞および腫瘍の所属リンパ節から得た免疫細胞におけるLSRタンパク質の発現は、M Rocha et al., Clinical Cancer Research 1996 Vol. 2, 811-820の記載に準じて、LSRタンパク質に対する特異的抗体を使用し脾臓と比較することによって確認する。B16（悪性黒色腫）、ID8（卵巣がん）およびMC38（結腸がん）の３つの異なるタイプのがんを試験に使用して、腫瘍細胞上および腫瘍の所属リンパ節から得た免疫細胞上におけるLSRの発現を評価する。
（ii）上述のように、担癌C57マウスの上皮がんから単離した細胞および腫瘍の所属リンパ節から得た免疫細胞に対する結合アッセイをマウスLSR ECD-FCタンパク質を使用して実

施し、これらの細胞における発現を脾臓と比較することによって、腫瘍細胞上および腫瘍の所属リンパ節から得た免疫細胞上における、LSRのカウンター受容体の発現を評価する。

【０６３５】

ｃ）M2型に極性化させたマクロファージにおけるLSRタンパク質の発現

（ｉ）M2型マクロファージにおけるLSRの発現の評価は、Biswas SK, Nat. Immunol. 2010; Vol. 11; p. 889-896の記載に準じて、末梢血から単離した初代単球をマクロファージへと分化させ、「M2誘導刺激」（たとえば、IL-4、IL-10、グルココルチコイド、TGF-β）に暴露することによってマクロファージをM2型に分化させ、このM2型マクロファージにおけるLSRタンパク質の発現をLSRタンパク質に対する特異的抗体を使用して確認することによって行う。

（ii）上述のように、末梢血から初代単球を単離し、マクロファージへと分化させ、「M2誘導刺激」（たとえば、IL-4、IL-10、グルココルチコイド、TGF-β）に暴露することによってマクロファージをM2型に分化させ、このM2型マクロファージに対してヒトLSR ECD-FCタンパク質を使用した結合アッセイを実施することによって、M2型マクロファージにおける、LSRのカウンター受容体の発現を評価する。

【０６３６】

ｄ．骨髄由来抑制細胞（MDSC）におけるLSRタンパク質の発現

（i）担癌マウスから単離した初代MDSCにおけるLSRタンパク質の発現は、Int Immunopharmacol. 2009 Jul;9(7-8):937-48. Epub 2009 Apr 9の記載に準じ、LSRタンパク質に対する特異的抗体を使用して確認する。

（ii）担癌マウスから単離した初代MDSCに対する結合アッセイは、本願と同じ出願人が所有するPCT/IB2012/051868に記載のヒトLSR ECD-Fcタンパク質を使用して行う。

【０６３７】

実施例１４：LSRタンパク質に対する阻害抗体と公知の免疫チェックポイントの阻害との併用による抗腫瘍効果

免疫細胞上の抑制性受容体は、がんの免疫回避における中心的な調節因子である。このような抑制性受容体として、CTLA4、PD-1、LAG-3などの免疫チェックポイントが知られている。単一の免疫チェックポイントを阻害することによって、しばしば腫瘍へのエフェクターT細胞の浸潤が増強されるが、阻害されていない他の負の受容体においてもエフェクターT細胞がアップレギュレートされるという代償性反応も起こりうる。しかしながら、２つ以上の抑制性経路を阻害すると、T細胞がより効果的な腫瘍応答を発揮し、制御性T細胞（Treg）に対するエフェクターT細胞（Teff）の比が増加する。具体的には、このような抑制性受容体の二重阻害は動物腫瘍モデルにおいて相乗的な治療効果を発揮することが示されている（Curran et al 2010 PNAS 107:4275-4280; Woo et al 2011 Cancer Res. 72:917-927）。これらの知見を元に、抗CTLA-4阻害抗体と抗PD-1阻害抗体との併用が、転移性悪性黒色腫患者において臨床試験中である。

【０６３８】

LSRに対する阻害抗体とPD-1に対する阻害抗体との併用は、C57Bl/6を遺伝子背景とする同系がんMC38モデルにおいて試験されている（Woo et al 2011 Cancer Res. 72:917-927に記載されている）。簡単に述べると、MC38細胞（2×10^6個）をC57Bl/6マウスに皮下移植する。触知可能な腫瘍を形成したマウスに抗LSRモノクローナル抗体および／または抗PD-1モノクローナル抗体（4H2）を10mg/kgの用量で腹腔内注射する。アイソタイプコントロール抗体は、20mg/kgの用量で投与するか、あるいは抗PD-1抗体または抗LSR抗体によるそれぞれの治療に加えて10mg/kgの用量を投与する。腫瘍の体積をデジタルキャリパーで測定し、腫瘍増殖に対する効果を算出する。腫瘍増殖の抑制として示される治療効果は、２つの標的（すなわちPD-1およびLSR）それぞれに対する阻害抗体を併用することによって増強される。エフェクターT細胞（=Teff（$CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$）細胞）の頻度およびTeffとTregの比を、腫瘍所属リンパ節および非所属リンパ節において測定する。

【０６３９】

実施例１５：LSRタンパク質に対する阻害抗体とシクロホスファミド定期療法との併用による抗腫瘍効果

シクロホスファミドは、直接的な細胞傷害作用と活発に細胞分裂している細胞に対する抑制活性とを有することから、特定の充実性腫瘍およびリンパ腫に対する標準的なアルキル化化学療法薬として使用されている。高用量のシクロホスファミドによって免疫細胞が除去されうるのに対し、低用量のシクロホスファミドは、主として免疫抑制性Treg細胞の数およびその機能を低下させることによって、免疫応答を増強し、かつ抗腫瘍免疫媒介性作用を誘導することが報告されている（Brode and Cooke 2008 Crit. Rev. Immunol. 28: 109-126）。シクロホスファミド以外の古典的化学療法薬を使用した定期的な治療法も免疫刺激作用を有することが示されており、このような古典的化学療法薬として、ゲムシタビン；オキサリプラチン、シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金系化合物；ドキソルビシンなどのアントラサイクリン類；パクリタキセルおよびドセタキセルなどのタキサン類；ビンクリスチンなどの微小管阻害薬などが挙げられる。

【０６４０】

シクロホスファミドと他の免疫療法（たとえば、抗4-1BB活性化抗体、抗PD1阻害抗体など）との併用療法は相乗的な抗がん作用を示した（Kim et al. 2009 Mol Cancer Ther 8: 469-478; Mkrtichyan et al. 2011 Eur. J. Immunol. 41:2977-2986）。

【０６４１】

抗LSR阻害モノクローナル抗体は、C57BL/6を遺伝子背景とする同系B16悪性黒色腫モデルにおいてシクロホスファミドと併用することにより試験される（Kim et al. 2009 Mol Cancer Ther 8:469-478の記載に準じる）。簡単に述べると、C57BL/6マウスに4×10^5個のB16-F10悪性黒色腫細胞を皮下注射する。腫瘍を移植した当日にシクロホスファミド（150 mg/kg）を腹腔内注射により単回投与し、LSRに対する中和抗体100μgの注射を腫瘍を移植した当日から開始し5日間の間隔を置いて計5回行う。樹立した腫瘍に対する併用療法の抗腫瘍効果を評価するためには、併用療法は、腫瘍細胞の注射後5日目または10日目に開始する。腫瘍の体積をデジタルキャリパーで測定し、腫瘍増殖に対する効果を算出する。腫瘍増殖の抑制として示される治療効果は、LSRに対する阻害抗体とシクロホスファミドとの併用によって増強される。エフェクターT細胞（=Teff（$CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$）細胞）の頻度およびTeffとTregの比を、腫瘍所属リンパ節および非所属リンパ節において測定する。

【０６４２】

実施例１６：LSRタンパク質に対する阻害抗体と腫瘍細胞ワクチンとの併用による抗腫瘍効果

がん治療ワクチンは、抗腫瘍応答を増強する薬物として機能することによって、Ｔ細胞のプライミングの増強および抗原提示の増強を行うことができる。がん治療ワクチンとしては、抗原の供給源または抗原を送達するプラットフォームとして細胞全体または細胞溶解物を使用した腫瘍細胞ワクチンが挙げられる。樹状細胞（DC）ベースのワクチンは、エクスビボにおいてDCに抗原を送達することに焦点を当てている。他のがん治療ワクチンは、免疫刺激性サイトカインまたは増殖因子（たとえば、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子）またはFlt3リガンドなど）を分泌するように遺伝子修飾された腫瘍細胞からなり、免疫刺激性のインビボ環境において内因性DCに腫瘍抗原を送達することを目的としている。

【０６４３】

いくつかのインビボ研究では、免疫原性の低い腫瘍に対する免疫チェックポイントの阻害（抗CTLA-4抗体など）は、GM-CSFを形質導入した腫瘍ワクチン（Gvax）またはFlt3リガンドを形質導入した腫瘍ワクチン（Fvax）と併用した場合においてのみ強力な治療効果を示すこと（van Elsas et al 1999 J. Exp. Med. 190:355-366; Curran and Allison 2009 Cancer Res. 69:7747-7755）、および該抗体単独での使用は最も免疫原性の強いマウス腫瘍モデルにおいてのみ効果的であったことが示されている。さらに、抗CTLA4阻害抗体や抗PD-1阻害抗体などの２種の免疫療法薬の併用は、GvaxやFvaxなどのがん治療ワクチンとこのような阻害抗体との併用よりも効果的である（Curran et al 2010 PNAS 107:4275-

4280）。

【０６４４】

LSR中和抗体と腫瘍細胞ワクチンとの併用による効果は、（Curran et al 2010 PNAS 107:4275-4280の記載に準じ）抗PD-1阻害抗体の存在下または非存在下において、GMCSFまたはFlt3リガンドを分泌するように遺伝子操作した放射線照射悪性黒色腫細胞（すなわちGVAXまたはFVAX）を使用して試験する。簡単に述べると、0日目にマウスの脇腹に5×10^4個のB16-BL6細胞を皮内注射する。3日目、6日目および9日目に、100μgの抗PD-1阻害抗体（クローンRMP1-14）または抗PDL-1阻害抗体（9G2）を使用して、または使用せずに、抗LSR阻害抗体100μgを腹腔内に投与するとともに、放射線（150Gy）を照射した遺伝子修飾B16細胞（GMCSFまたはFlt3リガンドを発現）1×10^6個を反対側の脇腹に注射して治療を行う。ネガティブコントロールとしてアイソタイプIgを使用する。腫瘍の体積をデジタルキャリパーで測定し、腫瘍増殖に対する効果を算出する。腫瘍増殖の抑制として示される治療効果は、LSRに対する阻害抗体と遺伝子修飾した腫瘍細胞ワクチンとを併用することによって増強される。抗PD-1阻害抗体または抗PDL-1阻害抗体はこの効果をさらに増強する。エフェクターT細胞（=Teff（$CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$）細胞）の頻度およびTeffとTregの比を、腫瘍所属リンパ節および非所属リンパ節において測定する。

【０６４５】

実施例１７：LSRタンパク質に対する阻害抗体と放射線療法との併用による抗腫瘍効果

放射線療法は、強力な抗増殖作用および細胞死誘導作用を有することから抗がん療法として長年使用されてきた。しかしながら、最近の前臨床データおよび臨床データから、immunogenic cell deathは電離放射線の照射によって引き起こされる重要な効果のひとつでもある可能性、ならびに局所放射線療法によって抗腫瘍免疫応答の惹起および／または調節が引き起こされている可能性が示唆されている（Reits et al 2006 J. Exp. Med. 203:1259-1271）。前臨床試験では、抗4-1BB抗体の活性化などのさらなる免疫療法の非併用下または併用下における、免疫療法（CTLA4およびPD-1などの免疫チェックポイントに対する阻害抗体の使用など）と放射線療法との併用療法により治療効果が増強されることが示されている（Demaria et al 2005 Clin. Can. Res. 11:728-734; Verbruge et al 2012 Can. Res. 72:3163-3174）。

【０６４６】

抗LSR阻害抗体と放射線療法との併用は、（Demaria et al 2005 Clin. Can. Res. 11:728-734の記載に準じて）BALB/cを遺伝子背景とする同系4T1乳癌細胞株を使用して評価される。簡単に述べると、5×10^4個の4T1細胞をBALB/cマウスの脇腹に皮下注射する。腫瘍のサイズが平均直径5mm（体積：$65mm^3$）に達してから治療を開始する。各マウス群にはそれぞれ別々に、各治療法単独（抗LSRまたは放射線療法）、アイソタイプIgコントロール、抗LSRと放射線療法との併用、またはIgコントロールと放射線療法との併用による治療を施す。放射線療法は、原発腫瘍に12Gyを1回または（48時間の間隔を置いて）2回照射する。抗LSR抗体またはIgコントロールは、放射線療法の1日後、4日後および7日後に200μgを腹腔内投与する。別セットの実験において、抗PD-1モノクローナル阻害抗体（RMP1-14）および抗4-1BBモノクローナル活性化抗体（3E1）を使用する。腫瘍の体積をデジタルキャリパーで測定し、腫瘍増殖に対する効果を算出する。腫瘍増殖の抑制として示される治療効果は、LSRに対する阻害抗体と放射線療法との併用によって増強される。抗PD-1阻害抗体または抗4-1BB活性化抗体はこの効果をさらに増強する。エフェクターT細胞（=Teff（$CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$）細胞）の頻度およびTeffとTregの比を、腫瘍所属リンパ節および非所属リンパ節において測定する。

【０６４７】

実施例１８：インビトロにおけるLSR ECD-IgG融合タンパク質による、誘導性制御性T細胞（iTreg）への分化のアップレギュレーション

Tregは、腫瘍免疫の回避に寄与する免疫抑制ネットワークにおいて極めて重要な役割を果たしている。Tregへの分化に対する抗LSR抗体の阻害能を評価するために、LSR融合タンパク質とナイーブT細胞との相互作用がナイーブT細胞からiTregへの分化に影響を及ぼす

かどうかを試験した。この目的のために、mLSR ECD-マウスIgG2a融合タンパク質（配列番号221）およびhLSR ECD-ヒトIgG1融合タンパク質（配列番号222；236）を使用し、制御性T細胞への分化に対するこれらの融合タンパク質の効果を評価する。具体的には、iTreg誘導条件下でインキュベートしたときの、精製した$CD4^+CD25^+$T細胞における制御性T細胞マーカーFoxP3の発現を試験することによって評価する。

【０６４８】

T細胞の活性化は、抗原特異的であるか、あるいは抗CD3を介したポリクローナルである。Automaxを用いてソーティングすることによりマウス脾臓またはヒトPBMCからナイーブ$CD4^+$T細胞を単離する（CD4陰性細胞のソーティングとCD25陽性細胞の単離を行った後、CD62L陽性細胞のソーティングを行う）。

【０６４９】

iTreg誘導条件下（すなわち、IL-2、TGF-β、およびコントロールIgまたはLSR ECD-IgG融合タンパク質の存在下）において細胞を活性化する。培養4日目に、細胞を回収し、生存率、CD4の発現、CD25の発現およびFoxP3の発現を調べるために染色する。

【０６５０】

さらなる研究において、iTregをソーティングし、その機能性（すなわち、共培養アッセイにおいてT細胞の活性化を抑制する能力）について試験する。

【０６５１】

単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、LSR経路はiTregの誘導および分化に関連していることから、LSR-Ig融合タンパク質はCD4 T細胞からiTregへの分化を増強するものであり、このことにより、阻害モノクローナル抗体を用いてLSRをターゲティングするとiTregの蓄積およびその免疫抑制能が阻害されることが示唆される。さらに、そのような阻害抗体を使用してLSRの免疫チェックポイント活性を抑制することにより、エフェクターT細胞活性が増強される。したがって、LSR阻害抗体がエフェクターT細胞活性を増強する作用とiTregの免疫抑制活性を阻害する作用とを有することから、LSR阻害抗体を単独または増強手段と組み合わせて使用することによって、がん療法において増強された有益な効果を得ることができる。

【０６５２】

実施例１９：Thへの分化に対するLSR-Ig融合タンパク質の影響

特異的なTh誘導条件下において活性化させたマウスおよびヒトの$CD4^+$T細胞を使用して、Thへの分化に対してLSR-Ig融合タンパク質が及ぼす影響を試験する。マウスT細胞の活性化は抗原特異的またはポリクローナルである。単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、マウス細胞またはヒト細胞を使用したこれらの実験系による結果では、T細胞に対するLSRの免疫調節作用が示され、この免疫調節作用によって、抗炎症性サイトカイン（Th2由来サイトカインおよびIL-10）の分泌が促進される一方、Th1およびTh17誘導性応答（Th1およびTh17誘導条件下の炎症性サイトカインの分泌および細胞増殖）が抑制される。

【０６５３】

免疫監視を回避するために腫瘍によって利用されるメカニズムのうちの１つがTh2/M2にシフトした免疫応答の促進であることが知られている（Biswas SK, et al., 2010 Oct;11(10):889-96）。したがって、単一の仮説に拘束されることを望むものではないが、上述したLSRの免疫調節作用（すなわちTh2応答の促進およびTh1応答の抑制）を抑制する中和抗体は、がんの治療に有益であると考えられる。

【０６５４】

実施例２０：完全ヒト抗LSR抗体の作製

LSR抗原に対するヒトモノクローナル抗体の作製

マウスIgG2 Fcポリペプチドに連結されたLSR細胞外ドメインからなる融合タンパク質を標準的な組換え方法によって作製し、免疫化のための抗原として使用する。

【０６５５】

トランスジェニックHuMabマウス：

ヒト抗体遺伝子を発現するトランスジェニックHuMabマウスのHCo7株マウスを使用して、LSRに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製する。このマウス株は、Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820に記載された方法によって内因性マウスκ軽鎖遺伝子がホモ欠損しており、PCT公開WO 01/09187の実施例１に記載された方法によって内因性マウス重鎖遺伝子がホモ欠損している。さらに、このマウス株は、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に記載された方法によってヒトκ軽鎖遺伝子（KCo5）が導入されており、米国特許第5,545,806号；第5,625,825号；および第5,545,807号に記載された方法によってヒト重鎖遺伝子（HCo7）が導入されている。

【０６５６】

HuMabの免疫化：

LSRに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製する目的で、組換えLSR融合タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターをトランスフェクトした哺乳動物細胞から得られた精製組換えLSR融合タンパク質を用いて、HCo7 HuMabマウス株のマウスを免疫することができる。HuMabマウスの一般的な免疫化スキームは、Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851およびPCT公開WO 98/24884に記載されている。6～16週齢のマウスに最初の抗原の点滴を行う。組換えLSR抗原の精製調製物（5～50μg；LSR融合タンパク質を発現するトランスフェクトされた哺乳動物細胞から精製したもの）を使用して、HuMabマウスを腹腔内投与により免疫する。

【０６５７】

完全フロイントアジュバントまたはRibiアジュバントを加えた抗原を腹腔内投与することにより、トランスジェニックマウスを2回免疫し、次いで、不完全フロイントアジュバントまたはRibiアジュバントを加えた抗原を3～21日間にわたり腹腔内投与する（計11回免疫する）。免疫応答は後眼窩出血によってモニタリングする。（後述の）ELISAによって血漿をスクリーニングし、抗LSRヒト免疫グロブリンの力価が十分に高いマウスを融合に使用する。屠殺および脾臓摘出の3日前にマウスに抗原を静脈内投与することによりブーストを行う。

【０６５８】

抗LSR抗体を産生するHuMabマウスの選択：

免疫したマウスからLSR血清に結合する抗体を産生するHuMabマウスを選択するために、Fishwild, D.ら（1996）によって報告されたELISA変法を用いて、免疫したマウスを試験する。簡単に述べると、PBS中1～2μg/mLの精製した組換えLSR融合タンパク質を1ウェルあたり50μL加えて4℃で一晩インキュベートすることによりマイクロタイタープレートをコーティングし、次いで、PBS中5%BSAを1ウェルあたり200μL加えてブロッキングする。LSRで免疫したマウスから得た血漿を希釈したものを各ウェルに加え、環境温度で1～2時間インキュベートする。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトκ軽鎖ポリクローナル抗体とともに室温で1時間インキュベートする。洗浄後、プレートをpNPP基質で発色させ、OD415～650において分光光度計で分析する。最も高い抗LSR抗体力価を示したマウスを融合に使用する。下記のように融合を行い、ハイブリドーマ上清の抗LSR活性をELISAによって試験する。

【０６５９】

抗LSRヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製：

標準的なプロトコルに準じ、HuMabマウスから単離したマウス脾細胞を、PEGを使用してマウスミエローマ細胞株に融合させる。次いで、生じたハイブリドーマの抗原特異的抗体産生能をスクリーニングする。すなわち、免疫したマウスから得た脾リンパ球の単一細胞懸濁液を、50%PEG（Sigma）を使用して、４分の１の細胞数のP3X63 Ag8.6.53（ATCC CRL 1580）非分泌性マウスミエローマ細胞と融合させる。細胞を平底マイクロタイタープレートに約1×10^5個/ウェルで播種し、RPMI中origen（IGEN）、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、1×HATおよびβ-メルカプトエタノールを添加した10%ウシ胎仔血清含有選択培地中で約2週間インキュベー

トする。1～2週間後、HATをHTで置き換えた培地中で細胞を培養する。次いで、各ウェルのヒト抗LSRモノクローナルIgG抗体の産生を（上述の）ELISAによってスクリーニングする。ハイブリドーマが広範に増殖してから、通常10～14日後に培地をチェックする。抗体を分泌するハイブリドーマを再び播種して、再度スクリーニングを行い、ヒトIgGがなお陽性であれば、抗LSRモノクローナル抗体を限界希釈法により少なくとも2回サブクローニングする。次いで、安定なサブクローンを組織培養培地においてインビトロで培養し、少量の抗体を産生させ、特性評価を行う。

【０６６０】

ハイブリドーマクローンを選択して、さらなる分析を行う。

【０６６１】

所望の抗LSRヒトモノクローナル抗体の構造特性の評価：

得られた抗LSRモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするcDNA配列および軽鎖可変領域をコードするcDNA配列は、上記で得られたハイブリドーマから標準的なPCR技術を使用して得られ、標準的なDNAシークエンシング技術を使用して配列が決定される。

【０６６２】

重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が同定される。これらの配列は、公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列および重鎖配列と比較してもよく、得られた抗LSR配列の重鎖CDRおよび軽鎖CDRが同定される。

【０６６３】

抗LSRヒトモノクローナル抗体の結合特異性および結合動態の評価：

抗LSR抗体の結合親和性、結合動態、結合特異性および交差競合性をBiacore分析によって試験する。さらに、結合特異性をフローサイトメトリーによって試験する。

【０６６４】

結合親和性および結合動態

本発明に従って作製された抗LSR抗体の親和性および結合動態を、Biacore分析（Biacore AB、スウェーデン国ウプサラ）によって評価する。標準的なアミンカップリング化学およびBiacore社の提供のキットを使用して、精製された組換えヒトLSR融合タンパク質を第一級アミンを介してCM5チップ（カルボキシメチルデキストランでコーティングされたチップ）に共有結合させる。結合は、267nMの濃度の上記抗体を（BIAcore AB提供の）HBS EPバッファー中に50μL/分の流速で流すことによって測定する。抗原結合抗体の結合動態は3分間追跡し、解離動態は7分間追跡する。結合曲線および解離曲線は、BlAevaluationソフトウェア（Biacore AB）を使用して1:1ラングミュア結合モデルに適合させる。結合定数の推定に及ぼされるアビディティの影響を最小限にするため、結合相および解離相に相当する最初のセグメントのデータのみを適合に使用する。

【０６６５】

得られた抗LSR抗体のエピトープマッピング：

Biacoreを使用して、得られた種々の抗LSRヒトモノクローナル抗体（HuMAb）のエピトープ分類を決定する。得られた抗LSR抗体を使用して、これらの抗体が認識するLSR抗原上エピトープのマッピングを行う。得られた種々の抗LSR抗体をそれぞれ、同じチップ上の３つの異なる表面に8000RUまでコーティングする。各モノクローナル抗体の希釈系列を10μg/mLから作製し、Fc融合LSR（50nM）とともに1時間インキュベートする。インキュベートした複合体を、流速20μL/分で1.5分間にわたり３つの表面すべて（およびブランク面）に対して同時にインジェクトする。1.5分間の終了時に各表面からシグナルを得て、そこから適切なブランクを差し引き、複合体中のモノクローナル抗体の濃度に対してシグナルをプロットする。データの分析後、エピトープマッピングの結果に基づいて、様々な抗LSR抗体を種々のエピトープ群に分類する。該抗体の機能特性も比較する。

【０６６６】

LSRタンパク質を細胞表面に発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株を作製し、フローサイトメトリーによるLSRヒトモノクローナル抗体（HuMAb）の特異性の決定に

使用する。LSR抗原またはそのバリアントの膜貫通形態をコードする完全長cDNAを含む発現プラスミドをCHO細胞にトランスフェクトする。N末端にエピトープタグを含むトランスフェクトされたこのタンパク質を、エピトープ特異的抗体による検出に利用する。抗LSRモノクローナル抗体の結合は、10μg/mLの濃度の各rLSR抗体とともにトランスフェクト細胞をインキュベートすることによって評価する。細胞を洗浄し、FITC標識抗ヒトIgG抗体で結合を検出する。ポジティブコントロールとして、マウス抗エピトープタグ抗体を使用し、次いで標識抗マウスIgGを使用する。ネガティブコントロールとして、非特異的ヒト抗体および非特異的マウス抗体を使用する。得られたデータを使用して、LSR標的抗原に対するヒトモノクローナル抗体（HuMAb）の特異性を評価する。

【０６６７】

これらの抗体およびLSRに特異的な他の抗体は、LSR抗原が示差的に発現されているがんの治療などの上述の抗LSR関連療法に使用してもよく、かつ/または、がんおよび自己免疫疾患の治療などにおいて、LSR抗原に関連するB7免疫共刺激の調節（増強または抑制）に使用してもよい。このような使用において、上記の抗体は、たとえば、所望の標的がん細胞に対するT細胞活性による負の刺激を抑制したり、あるいはT細胞活性による正の刺激を抑制することによって、所望の抗自己免疫作用を誘導すると考えられる。

【０６６８】

抗体ライブラリーを使用したLSRに対するモノクローナル抗体の作製：

抗体または抗体フラグメント（たとえば抗原結合部位）をコードするDNAを、ファージディスプレイライブラリーなどの抗体ライブラリーから得てもよいことも、当業者によって容易に理解されるであろう。具体的には、そのようなファージは、レパートリーライブラリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（たとえばヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用することができる。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、たとえば、標識抗原や、固体表面またはビーズに結合または捕捉させた抗原などの抗原を使用して選択または同定することができる。これらの方法において使用されるファージは、通常、線維状ファージあり、線維状ファージは、組換え技術によってファージgeneIIIタンパク質またはファージgeneVIIIタンパク質に融合されたFab、Fv OE DAB（軽鎖または重鎖由来の個々のFv領域）またはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインとともにファージから発現されるfd結合ドメインおよびM13結合ドメインを含む。典型的な方法は、たとえば、欧州特許第368 684 B1号；米国特許第5,969,108号；Hoogenboom, H.R. and Chames, Immunol. Today 27:371 (2000)；Nagy et al Nat. Med. 5:801 (2002)；Huie et al, Proc. Natl. Acad. ScL USA 95:2682 (2001)；Lui et al, J. MoI. Biol. 5/5:1063 (2002)に記載されており、これらの文献は本明細書の一部を構成するものとして援用される。いくつかの文献（たとえばMarks et al, Bio/Technology 70:779-783 (1992)）には、大きなファージライブラリーを構築するための戦略として、chain shuffling、コンビナトリアル感染およびインビボ組換えによる高親和性ヒト抗体の作製が記載されている。別の実施形態では、ディスプレイプラットフォームとしてバクテリオファージの代わりにリボソームディスプレイを使用することができる（たとえば、Hanes et al, Nat. Biotechnol. 75:1287 (2000); Wilson et al, Proc. Natl. Acad. ScL USA 98:3750 (2001);またはIrving et al, J. Immunol. Methods 248:31(2001)を参照されたい）。さらに別の実施形態では、細胞表面ライブラリーをスクリーニングすることによって抗体を得ることができる（Boder et al, Proc. Natl. Acad. ScL USA 97:10701 (2000); Daugherty et al, J. Immunol. Methods 243:21 1 (2000)）。このような手法は、モノクローナル抗体を単離し次いでクローニングするための従来のハイブリドーマ技術に代わるものである。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面に該機能的抗体ドメインが提示される。たとえば、V_H領域をコードするDNA配列およびV_L領域をコードするDNA配列は、動物のcDNAライブラリー（たとえばヒトまたはマウスのリンパ系組織のcDNAライブラリー）または合成cDNAライブラリーから増幅されるか、あるいは単離される。特定の実施形態では、V_H領域をコードするDNAおよびV_L領域をコードするDNAをPCRによりscFvリンカーで連結

し、ファージミドベクター（たとえばp CANTAB 6またはpComb 3 HSS）にクローニングする。このベクターを大腸菌にエレクトロポレートし、この大腸菌にヘルパーファージを感染させる。これらの方法で使用されるファージは、通常、fdおよびM13などの線維状ファージであり、通常、組換え技術によってファージgeneIIIまたはgeneVIIIにV_H領域またはV_L領域が融合されている。目的の抗原（すなわちLSRポリペプチドまたはそのフラグメント）に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、たとえば、標識抗原や、固体表面またはビーズに結合または捕捉させた抗原などの抗原を使用して選択または同定することができる。抗体作製に使用することができるファージディスプレイ法のさらなる例としては、Brinkman et al, J. Immunol. Methods 752:41-50 (1995)；Ames et al, J. Immunol. Methods /£4:177-186 (1995)；Kettleborough et al, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994)；Persic et al, Gene 757:9-18 (1997)；Burton et al, Advances in Immunology 57:191-280 (1994)；PCT出願PCT/GB91/01 134；PCT公開WO 90/02809；WO 91/10737；WO 92/01047；WO 92/18619；WO 93/11236；WO 95/15982；WO 95/20401；ならびに米国特許第5,698,426号；第5,223,409号；第5,403,484号；第5,580,717号；第5,427,908号；第5,750,753号；第5,821,047号；第5,571,698号；第5,427,908号；第5,516,637号；第5,780,225号；第5,658,727号；第5,733,743号および第5,969,108号に開示されたものが挙げられ、これらの文献は本明細書の一部を構成するものとしてその全体が援用される。上記の文献に記載されているように、ファージを選択した後、抗体をコードする領域をファージから単離し、この領域を使用して抗体全体（ヒト抗体）や他の所望の抗原結合フラグメントを作製し、所望の宿主（哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、細菌など）において発現させることができる。

【０６６９】

実施例２１：抗LSRヒトIgG1抗体の補体依存性細胞傷害（CDC）を介した、LSR異所性発現細胞株に対するエフェクター機能活性

XOMA 031ヒトFabライブラリーからのファージディスプレイスクリーニングにより、LSRに対するヒトIgG1抗体、すなわち、S11-01.E02、S11-01.F08、S11-04.C11、S11-04.D11、S11-04.H07、S11-04.H09、およびS32-03.G11を作製した。

【０６７０】

ファージパニングの詳細：

ビオチン化LSRの調製：

溶液ベースのファージパニングの実施を容易にするため、ヒトLSR抗原（マウスIgG2a Fc領域に融合させたLSR細胞外ドメイン）およびネガティブコントロールタンパク質（「コントロール抗原」、mIgG2a Fc融合タンパク質より構成される）をビオチン化した。タンパク質はいずれもPBS500μLで1mg/mLに希釈した後、メーカーの説明書（ピアス、イリノイ州ロックフォード）に準じてSulfo-NHS-LC-Biotin kitを使用して、ビオチン：タンパク質＝3:1の比率で標識した。0.5 mL 3500 MWCO Slide-A-Lyzer cassettes（ピアス）を使用して、PBS pH 7.4に対して試料を一晩透析することにより遊離ビオチンを除去した。透析したタンパク質を-80℃で保存した。

【０６７１】

ヒト抗体ライブラリーのファージパニング：

ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズを使用して溶液中でパニング反応を行い、ビオチン化抗原を捕捉した。洗浄工程および溶出工程はすべて、磁気ビーズ（プロメガ、ウイスコンシン州マディソン）を捕捉するために磁気ラックを使用して行った。インキュベーション工程はすべて、室温においてチューブローテーター（BioExpress、ユタ州ケイズビル）上でゆるやかに混和することによって行った。表１に概要を示すようにパニング実験を行った。

【０６７２】

【表１０】

表 1: LSR に対するファージパニングに使用した抗原密度および洗浄ストリンジェンシー

パニング条件	ラウンド	抗原 (pmol)	洗浄
パニング実験 A 抗原密度一定	1	100	3×PBS-T; 3×PBS
	2	100	6×PBS-T; 6×PBS
	3	100	6×PBS-T; 6×PBS

【０６７３】

パニングのためのファージライブラリーの調製：

ファージパニング実験はいずれもXOMA031ヒトfab抗体ファージディスプレイライブラリー（XOMA Corporation、カリフォルニア州バークレー）を使用して行った。ライブラリーを50倍過剰発現する十分量のファージを、PBS中10%スキムミルク粉末（スキムミルクの最終濃度：5%）と1:1で混合し、これを1時間インキュベートすることによってブロッキングした。

【０６７４】

抗原を結合したストレプトアビジンビーズ：

各ラウンドのパニング反応を実施するため、Dynalストレプトアビジンコーティング磁気ビーズ（ライフテクノロジーズ）を100μLずつ分けて３つのアリコートとし、アリコートそれぞれをブロッキングバッファー（PBS中5%スキムミルク粉末）1mL中に懸濁し、ファージライブラリーのブロッキングと平行してインキュベートすることによってブロッキングした。上記のパニングラウンドおよび反応条件（表１）に従い、ブロッキングしたビーズのアリコート１つを一定量のビオチン化LSRと混合した。他の２つのアリコートは「除去」コントロール抗原100pmolと混合した。ビオチン標識抗原を室温で1時間かけてビーズと結合させた。ビーズをPBSで2回洗浄して遊離抗原を除去し、ブロッキングバッファー100μL中に再懸濁した。

【０６７５】

ファージライブラリーからのマウスIgG2a Fc結合物質の除去：

ファージパニングを開始する前に、LSRのFc領域に結合する不要な物質の除去が必要であった。この目的のため、ブロッキングしたファージを、コントロール抗原を結合させたビーズと混合し、1時間インキュベートした。次いで、ビーズ（およびmIgG2a Fcに結合する不要な物質と推定されるもの）を廃棄した。「除去を行った」ファージライブラリーの上清を使用して、LSR抗原に対するパニングを３ラウンド行った。

【０６７６】

Fab PPEの作製およびスクリーニング：

３ラウンド目のパニングから溶出されたファージプールを希釈し、TG1大腸菌細胞（Lucigen、ウイスコンシン州ミドルトン）に感染させて、2YTCG寒天平板に播種することにより単一コロニーを得た。

【０６７７】

大腸菌のペリプラズムに分泌されたFabタンパク質を分析のために抽出した。細胞を2500×Gで遠心分離して回収し、上清を捨て、ペレットを氷冷PPBバッファー（Teknova）75μL中に再懸濁した。抽出物を1000rpmで振盪しながら4℃で10分間インキュベートし、氷冷ddH$_2$O 225μLを加え、さらに1時間インキュベートした。得られたペリプラズム由来抽出物（PPE）を2500×Gで遠心分離して清澄化し、ELISAおよびFACS分析のためのプレートまたはチューブに別々に移した。抽出バッファーはいずれもHalt（ピアス）プロテアーゼ阻害剤を含んでいたことには注意されたい。発現されたFabを含むペリプラズム由来抽出物は、ELISAおよびFACS分析によってLSRに対する結合性について試験した。ELISAによって、LSRに結合する12個の配列特有Fabが同定された。これらのうち、７個はFACSにおいて結合性が陽性であった。FACSで結合性が陽性であったもののうち、６個を完全長ヒトIgG1抗体に再フォーマットし、精製して機能性試験を行った。機能性試験に使用した精製抗体の配

列は後述する。

【０６７８】

この機能分析は、LSR発現細胞株上に補体を結合させる能力についてLSRモノクローナル抗体を評価するための機能アッセイを確立すること、およびこのアッセイを使用してCDCエフェクター機能を有する治療用抗体候補をスクリーニングすることを目的とした。

【０６７９】

材料と方法

LSRを発現する細胞株：

カニクイザルLSR、GFP発現ベクターまたは空ベクターをそれぞれ単独で発現するHEK293T細胞を上記と同様にして作製した。トランスフェクトしたHEK293T細胞を完全培地（CM）（10%FBSおよびグルタミン－Penstrepを添加したDMEM中5μg/mLピューロマイシン）で培養した。

抗体：

本明細書の記載に従い、LSRに対するヒトIgG1抗体、すなわち、S11-01.E02（V_L：配列番号244およびV_H：配列番号238）、S11-01.F08（V_L：配列番号260およびV_H：配列番号250）、S11-04.C11（V_L：配列番号273およびV_H：配列番号263）、S11-04.D11（V_L：配列番号281およびV_H：配列番号279）、S11-04.H07（V_L：配列番号308およびV_H：配列番号283）、S11-04.H09（V_L：配列番号289およびV_H：配列番号286）ならびにS32-03.G11（V_L：配列番号308およびV_H：配列番号293）を作製した。ヒトIgG1アイソタイプコントロール（カタログNo.ET-901）はEureka Therapeutics社（米国）から購入した。ヒトLSRに対するマウスIgG2aモノクローナル抗体（8C8）はBiotem社（フランス）において作製した。マウスIgG2aアイソタイプコントロール（クローンMOPC-173（カタログNo.400224））はBiolegend社（米国）から購入した。

【０６８０】

標準化された抗体のナンバリングスキームは、Kabatら（1983）により最初に導入された。このナンバリングスキームは、抗体の構造に関する情報の入手が不可能であった時代の配列アラインメントに基づく。ChothiaおよびLesk（1987）は、抗体構造の可変ドメインを調査し、配列に基づきKabatによって示唆されたCDR-L1およびCDR-H1内の挿入および欠失（indel）の部位が構造的に正しくないことを示した。このことによって、Chothiaのナンバリングスキームが導入された。Kabatのスキーム、Chothiaのスキームはいずれも、ナンバリングは最も一般的な配列の長さに基づいており、挿入は挿入を示す文字を加えることによって示される（たとえば30a）。

【０６８１】

AbhinandanおよびMartin（2008）は、Kabatデータバンクにおいて標準的なナンバリングに付けられたアノテーションを調査し、配列の約10%において（手動で振られた）ナンバリングにエラーがあることを見出した。この分析を行うため、AbhinandanおよびMartinは、自動で信頼性の高い方法でKabatまたはChothiaのナンバリングに適用することができるソフトウェアツール（AbNum）を開発した。AbNumプログラムによって振られたナンバリングは、Kabatにおいて示されるナンバリングと比較された。差異が発見された場合、ナンバリングを手動で検証し、エラーがAbNumにあるのか、それともKabatにあるのかを決定した。ソフトウェアを何度か改良した後、AbhinandanおよびMartinは、エラーはすべてKabatに存在すると見られると結論づけた。

【０６８２】

ナンバリングを行った後、CDRを定義することができる。CDRを定義するための方法として以下の３つの方法がよく利用される。

（１）Kabatの定義（配列の可変性に基づいており、最も一般的に使用されている）；

（２）Chothiaの定義（構造のループ領域の位置に基づく）；

（３）AbMの定義（上記2つの方法の折衷法であり、Oxford Molecular's AbM antibody modelling softwareによって使用されている）

これら３つの方法の詳細はhttp://www.bioinf.org.uk/abs/に記載されている。他にも、C

DRを定義するための商標登録された方法がいくつか存在する（たとえば（4）SeqAgent（登録商標）ソフトウェアプログラム（XOMA（米国）LLC（カリフォルニア州バークレー）によって開発された。その原理はhttp://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Nomenclature/IMGT-FRCDRdefinition.htmlに記載されている。））。最も一般的に使用される上記の３つ方法を以下の表に要約する。

【０６８３】

【表１１】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (Kabat ナンバリング)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Chothia ナンバリング)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

【０６８４】

様々なCDRの定義に基づき、上記の複数種のLSR抗体について以下のCDRが定義された（各配列番号の横の括弧内の数字は、それぞれのCDRを定義するために使用した上記のCDR検出方法に対応する）。

S11-01.E02、配列番号245（1～3）、246（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号247（1～3）、248（4）、に示す軽鎖CDR2、配列番号249（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号239（3）、240（4）、241（1）、252（2）に示す重鎖CDR1、配列番号256（4）、287（2～3）、288（1）に示す重鎖CDR2、配列番号242（1～3）、243（4）に示す重鎖CDR3

S11-01.F08、配列番号303（1～3）、304（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号261（1～3）、306（4）に示す軽鎖CDR2、配列番号262（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号251（3）、252（2）、253（4）、254（1）に示す重鎖CDR1、配列番号255（2～3）、256（4）、257（1）に示す重鎖CDR2、配列番号258（1～3）、259（4）に示す重鎖CDR3

S11-04.C11、配列番号274（1～3）、275（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号276（1～3）、277（4）に示す軽鎖CDR2、配列番号278（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号264（3）、265（2）、266（4）、267（1）に示す重鎖CDR1、配列番号268（2～3）、269（4）、270（1）に示す重鎖CDR2、配列番号271（1～3）、272（4）に示す重鎖CDR3

S11-04.D11、配列番号274（1～3）、275（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号276（1～3）、277（4）に示す軽鎖CDR2、配列番号282（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号264（3）、265（2）、266（4）、267（1）に示す重鎖CDR1、配列番号268（2～3）、269（4）、280（1）に示す重鎖CDR2、配列番号271（1～3）、272（4）に示す重鎖CDR3

S11-04.H07、配列番号303（1～3）、304（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号305（1～3）、306（4）に示す軽鎖CDR2、配列番号307（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号239（3）、240（4）、241（1）、252（2）に示す重鎖CDR1、配列番号256（4）、 287（2～3）、 288（1）に示す重鎖CDR2、配列番号284（1～3）、285（4）に示す重鎖CDR3

S11-04.H09、配列番号290（1～3）、291（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号305（1～3）、306（4）に示す軽鎖CDR2、配列番号292（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号251（3）、252（2）、253（4）、254（1）に示す重鎖CDR1、配列番号256（4）、287（2～3）、288（1）に示す重鎖CDR2、配列番号258（1～3）、259（4）に示す重鎖CDR3

S32-03.G11、配列番号303（1～3）、304（4）に示す軽鎖CDR1、配列番号305（1～3）、306（4）に示す軽鎖CDR2、配列番号307（1～4）に示す軽鎖CDR3、配列番号294（3）、295（2）、296（4）、297（1）に示す重鎖CDR1、配列番号298（2～3）、299（4）、300（1）に示す重鎖CDR2、配列番号301（1～3）、302（4）に示す重鎖CDR3

【０６８５】

試薬：

精製ウサギ補体（カタログNo.CL-3441）はCedarlane laboratories社（カナダ）から購入した。CellTiter-Glo試薬はプロメガ社（米国）から購入した。

【０６８６】

細胞傷害アッセイ：

サルLSRまたはコントロールGFPを異所性に発現するHEK293に対するLSR抗体のCDC活性は、CellTiter-Glo試薬を使用して評価した。1ウェルあたり50μLの完全培地（CM）を含む96ウェル白色組織培養プレートに細胞を2.5×10^4個/ウェルの密度で播種した。細胞を2時間静置した後、抗体の2倍段階希釈系列、アイソタイプまたは培地単独をそれぞれのウェルに等容量で加えた。室温で10分間静置後、新たに再構成した補体4μLをコントロールウェル以外の各試験ウェルに加え、プレートを37℃で1時間インキュベートした。10分間かけてプレートを室温に戻し、CellTiter-Glo試薬を1ウェルあたり100μL加え、室温で10分間インキュベートした。Victor2プレートリーダー（パーキンエルマー）でルミネセンスをRLU（相対的ルミネセンス単位）として測定した。データをExcelで分析し、GraphPad Prismでプロットした。CDC（%）は以下の式により算出した。

100 －［（実験ウェルのRLU/コントロールウェルのRLU）×100］

実験は各条件につき３連で行った。示したデータは１つの実験の代表的な値である。

【０６８７】

FACS分析：

空ベクターをトランスフェクトしたHEK293またはサルLSRを発現するHEK293細胞を洗浄し、FACSバッファー（PBS（ライフテクノロジーズ）、0.5%BSA（Sigma Aldrich））中の様々な濃度のLSR抗体またはアイソタイプコントロール50μL中で細胞を4℃で60分間染色した。細胞をFACSバッファーで1回洗浄し、10μg/mLのビオチン化抗マウスIgG（GE、カタログNo.RPN1001V）またはビオチン化抗ヒトFc（Jackson、カタログNo.109-065-097）50μL中に細胞を再懸濁し、4℃で30分間静置した。細胞をFACSバッファーで洗浄し、SA-PE（Jackson、カタログNo.016-110-084）をFACSバッファーで1:100に希釈したもの50μL中に細胞を再懸濁し、30分間静置した。細胞を2回洗浄し、最終容量が100μLとなるようにFACSバッファー中に再懸濁した。試料をIntellicyt HTFCで測定した。データはFCS Express（DeNovo）で分析し、Excelにエクスポートし、GraphPad Prismでプロットした。

【０６８８】

結果

図２５に示すように、LSRヒトIgG1抗体は、LSRを異所性に発現するHEK293に対してCDC活性を示すことが示された。

【０６８９】

この実験では、HEK293T細胞上に異所性に発現されたLSRタンパク質に対する７種のヒトIgG1モノクローナル抗体の活性を単一の濃度（10μg/mL）で評価した。図２５に示すように、７種の抗体のうち６種は、LSR発現HEK293T細胞に対してCDC活性を示したのに対し、GFPコントール細胞株に対してはCDC活性を示さなかった。ネガティブコントロールであるhIgG1（ET901）およびmIgG2a（Mopc173）ならびに抗LSR抗体のうちの活性を示さなかった１種の抗体（S32-03.G11）と同様に、8C8（ヒトLSRに対するマウスIgG2aモノクローナル抗体）はこのアッセイにおいて活性を示さなかった。

【０６９０】

図２６C、図２６D、図２６E、図２６F、図２６Gおよび図２６Hに示すように、FACS染色において、CDC活性を示した６種の抗体はいずれもLSR発現細胞株に結合したが、空ベクターコントロール細胞株にはまったく結合しないか、わずかにしか結合しなかった。

図２６Ｂに示すように、特異的なCDC活性を示さなかったS32-03.G11抗体はLSR発現HEK293細胞に結合しなかった。ヒトIgG1のアイソタイプコントロールは、LSR発現細胞にも空ベクターをトランスフェクトした細胞にも結合しなかった。マウス8C8モノクローナル抗体は、LSR発現HEK293細胞に結合したが（図２６Ａ）、CDC活性を欠いていた（図２５）。

【０６９１】

ヒト抗LSR抗体のいくつかは、LSRタンパク質を発現するHEK293T細胞に対してCDC活性を示した。このアッセイは、LSRに対する機能的抗体の特性を評価するために使用できると考えられる。上記の結果から、ヒトIgG1サブクラス（補体結合活性を有することが知られている）のLSR治療用抗体が様々な作用機序を介して作用している可能性が示唆され、その１つがLSR発現がん細胞に対するCDC媒介性エフェクター機能であることが示された。

【０６９２】

実施例２２：HEK293T細胞上に発現されたLSRがJurkat細胞の活性化に及ぼす影響と、抗CD3媒介性Jurkat T細胞活性化に対する抑制の再フォーマットした抗体による低減とについて、CD69の発現により測定したインビトロ試験

天然細胞の表面に発現されたLSRタンパク質がT細胞の活性化に及ぼす影響を評価するために、LSRを過剰発現するHEK293T細胞と、プレート結合抗CD3抗体で活性化したJurkat細胞（ヒトT細胞白血病に由来）との共培養アッセイを行った。

【０６９３】

材料と方法

CD69の発現により測定した抗CD3媒介性Jurkat T細胞の活性化

１日目：

１．1×PBSで希釈した抗CD3（クローンOKT3、eBioscience、カタログNo.:16-0037-85；またはクローンUCHT1、BDバイオサイエンス、カタログNo.555329）を、指定の濃度で１ウェルあたり75μL使用して96ウェル平底プレート上に固相化した。

２．プレートをパラフィルムで覆い、4℃で一晩インキュベートした。

３．LSRもしくは（ネガティブコントロールとしての）CD20をコードするpRp3プラスミド発現コンストラクトまたは空ベクターpRp3を安定にトランスフェクトしたHEK293T細胞プールをそれぞれT75プレートに12×10^6個/ウェルの濃度で播種し、10%FBS、L-グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したDMEM培地中で湿潤インキュベーターにおいて一晩培養した。

２日目：

１．抗CD3でコーティングしたウェルを×1 PBS200μLで3回洗浄した。洗浄液は無菌環境でデカントした。最後の洗浄後、プレートに残った洗浄液を滅菌吸収紙に吸収させて除去した。

２．前日に播種したHEK293T細胞をマイトマイシンC（Sigma、M4287）で処理した。すなわち、H_2O中で新たに調製した0.5mg/mLのマイトマイシンC溶液900μLを8.1mLの増殖培地に直接加えてその最終濃度を50μg/mLとした。細胞をマイトマイシンCとともに37℃で1時間インキュベートした。

３．マイトマイシンCで処理したHEK293T細胞を1×PBS10mLで3回洗浄し、cell dissociation buffer（Gibco；カタログNo.:13151-014）2mLを加えて細胞を回収した。

４．剥離したHEK293T細胞を、10%FBS、L-グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したRPMI（Jurkat細胞用増殖培地）8mL中に再懸濁した。

５．ベックマン・コールター社のカウンターを使用して細胞を計数した後、細胞を希釈して0.5×10^6個/mLの濃度とした。

６．細胞を段階希釈し、100μL/ウェルの（上述の）Jurkat細胞用増殖培地中に指定の濃度で播種した。

７．2時間インキュベートしてHEK293T細胞を結合させた。

８．（上述の）Jurkat細胞用増殖培地中50,000個のJurkat細胞（ATCC、クローンE6-1、TIB-152）を100μL/ウェルで各ウェルに加えた。

９．細胞を湿潤インキュベーターにおいて37℃で一晩共培養した。

３日目：
１．細胞をU字底型プレートに移し、4℃、1500rpmで5分間遠心分離し、上清をデカントした。
２．抗CD69抗体（Biolegend、PE-anti human CD69、クローンFN50、カタログNo.:310906、10μg/mL、2μL/ウェル）およびFc-blocker（Miltenyi Biotec、ヒトFcRブロッキング試薬、カタログNo.:120000-442、1μL/ウェル）を、氷冷FACSバッファー（1×PBS+0.5%BSA+2mM EDTA+0.05%アジ化物）で希釈して各ウェルに加え、各ウェルの最終容量を50μLとした。
３．（気泡が入らないように）ピペッティングして各ウェルの内容物を優しく混合した。
４．プレートを氷上で30分間インキュベートした。
５．細胞をFACSバッファー200μLで1回洗浄後、プレートを4℃、1500rpmで5分遠心分離した。上清をデカントで捨てた。
６．細胞をFACSバッファー200μLに再懸濁し、FACSバッファー100μLで満たしたFACSチューブに移した。
７．Jurkat細胞におけるCD69の細胞表面発現（平均蛍光強度（MFI）または全T細胞のうちCD69を発現する細胞のパーセンテージ）をフローサイトメトリーで分析した。Jurkat細胞は前方散乱（FSC）vs側方散乱（SSC）プロット上でゲーティングした。ゲーティング操作のバリデーションは、抗CD2抗体（Biolegend、クローンRPA-2.10、カタログNo.:300206）で細胞を染色し、Jurkat T細胞を同定することにより行った。

【０６９４】

結果

CD69の発現により測定した抗CD3媒介性Jurkat T細胞活性化に対する抑制

MatおよびMethによる報告に準じて、完全長LSRタンパク質を発現するHEK293Tトランスフェクタントを、プレート結合抗CD3抗体によって活性化したJurkat T細胞と共培養した。ネガティブコントロールとして、ベクター（pRp3）のみをトランスフェクトしたHEK293T細胞を使用した。図２７に示す代表的な結果では、CD69（T細胞の活性化の初期マーカー）のアップレギュレーションの低下によって示されているように、LSR発現HEK293T細胞の存在下において抗ヒトCD3抗体の2種のクローン（OKT3またはUCHT1）でJurkat T細胞を刺激すると、ベクターのみ（pRp3）をトランスフェクトしたHEK293T細胞による影響と比較してJurkat T細胞の活性化が低下したことが示されている。このLSRの抑制効果は、1ウェルあたり50,000個のHEK293Tトランスフェクト細胞を使用した場合に最もよく検出される。図２８に類似した実験の結果を示す。この実験では、抗CD3抗体クローンUCHT1を使用し、結果はCD69を発現するJurkat細胞のパーセンテージで示した。結果は、何ら影響が認められなかったCD20タンパク質発現HEK293T細胞で得られた結果と比較した。

【０６９５】

図２７：

HEK293T細胞上に発現されたLSRはJurkat細胞の活性化を抑制する。0.25μg/mL抗CD3（OKT3クローン）（ＡおよびＢ）または2μg/mL抗CD3（UCHT1クローン）（ＣおよびＤ）であらかじめコーティングしたウェルに、LSRまたはpRp3空ベクターを発現するHEK293T細胞を１ウェルあたり25,000個（ＡおよびＣ）または50,000個（ＢおよびＤ）播種した。2時間後に１ウェルあたり50,000個のJurkat細胞を加え、一晩インキュベートすることにより共培養した。細胞のCD69の発現をフローサイトメトリーによって分析した。対照として、処理していない（すなわち抗CD3で処理していない）Jurkat細胞（UT）のCD69値を示す。50,000個のHEK293トランスフェクト細胞の存在下における、処理していないJurkat細胞と抗CD3で処理したJurkat細胞との間のCD69のΔMFI値を（Ｅ）に示す。＊（アスタリスク）は、空ベクターとの有意差を表す（$p<0.05$、Studentのt検定）。

【０６９６】

図２８：

CD20を発現するHEK293T細胞とは異なり、LSRを発現するHEK293T細胞は抗CD3で活性化されたJurkat細胞を抑制する。2μg/mL抗CD3（UCHT1クローン）であらかじめコーティング

したウェルに、LSR、CD20またはpRp3空ベクターを発現するHEK293T細胞を１ウェルあたり25,000個（Ａ）または50,000個（Ｂ）播種した。2時間後に1ウェルあたり50,000個のJurkat細胞を加え、一晩インキュベートすることにより共培養した。細胞のCD69の発現をフローサイトメトリーによって分析した。CD69を発現するJurkat細胞のパーセンテージを（Ａ）および（Ｂ）に示す。活性化細胞と活性化していない細胞との間の%CD69の差（ΔCD69%）を（Ｃ）に示す。CD69のアップレギュレーションの抑制のパーセンテージを（Ｄ）に示す。＊（アスタリスク）は、空ベクターとの有意差を表す（$p<0.05$、Studentのt検定）。

【０６９７】

これらの結果に基づくと、HEK293T細胞の細胞表面に発現された細胞表面発現形態のLSRは、Jurkat T細胞の活性化を抑制することが言える。これらの結果から、mIgG2a Fcに融合されたLSRの細胞外ドメインからなるLSR融合タンパク質を用いることにより得られた従来の知見（様々な実験条件においてT細胞の活性化に対する抑制効果が示されている）がさらに裏付けられた。

【０６９８】

CD69の発現により測定した、抗CD3媒介性Jurkat T細胞活性化に対する抑制の再フォーマットした抗体による低減

T細胞の活性化に対するLSR特異的抗体の機能的効果を評価するために、本明細書に記載の様々なLSR hIgG1抗体の存在下において、上記と同様にして共培養アッセイを行った。

【０６９９】

LSR特異的抗体の存在下または非存在下において、完全長野性型LSRタンパク質を発現するHEK293T細胞を、プレート結合抗CD3抗体によって活性化したJurkat T細胞と共培養した。Jurkat細胞増殖培地全量50μL中の最終濃度が20μg/mLとなるようにLSR特異的抗体を各ウェルに加えた。ネガティブコントロールとして、ベクター（pRp3）のみをトランスフェクトしたHEK293T細胞を使用した。ネガティブコントロール（hIgG1）の存在下で、LSR発現HEK293T細胞とJurkat T細胞とを共培養することによって、本明細書の実施例２２において示されたようにCD69の発現が抑制された。予備実験の結果では、統計的有意差に達しなかったものの、少なくとも1種のLSR hIgG1抗体（S11-04.H07）を加えるとCD69の発現強度が増加し、したがって、細胞表面に発現されたLSRタンパク質を介した抑制効果が低減されたことが示された。この結果から、この抗体（細胞表面に発現されたLSRに特異的に結合することが既に示されている抗体）が、LSRを介したT細胞抑制を中和するという機能的効果を有している可能性が示唆された。

【０７００】

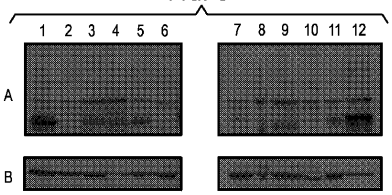
共培養アッセイにおいて中和活性が示されたにもかかわらず、試験した上記の抗体は、プレート結合融合タンパク質を使用したアッセイフォーマットにおいて、LSRによるT細胞活性化抑制に対し何ら効果を示さなかった。何らかのものによって限定されることを望むものではないが、アッセイ間におけるこの不一致は、標的の密度の差異、プレートにタンパク質を結合させたことによる立体構造異常、またはT細胞の活性化に対する融合タンパク質Fc領域の予期せぬ効果などの数多くの要因によるものと考えられる。

【０７０１】

各種疾患のための治療薬および診断方法として使用される所望の抗LSR抗体の製造および選択について、本発明を説明し、様々な実施形態を提供した。本発明において、本明細書に明記されたコンビネーションおよびサブコンビネーション以外にも、様々な実施形態を任意の適切な方法で組み合わせてもよい。本発明を以下の請求項によってさらに説明する。

【図６】

FIG. 6



【図９Ａ】

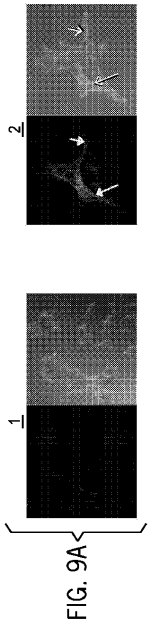


FIG. 9A

【図９Ｂ】

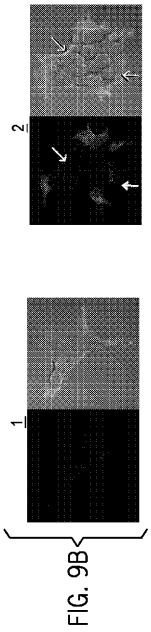


FIG. 9B

【図９Ｃ】

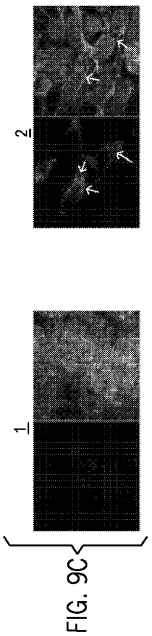


FIG. 9C

【図１０Ａ】

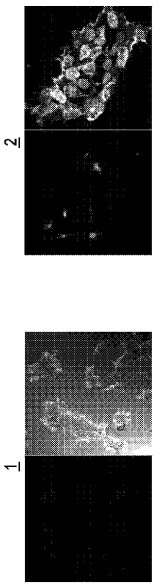


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

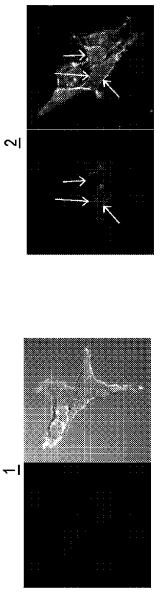


FIG. 10B

【図１１Ａ】

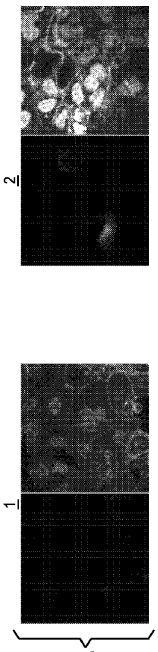


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

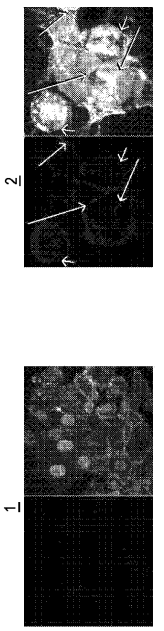


FIG. 11B

【図１２Ａ】

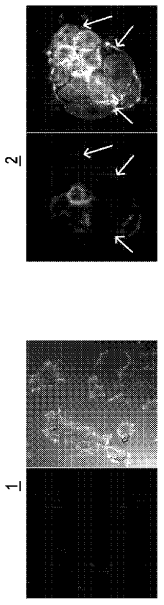


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

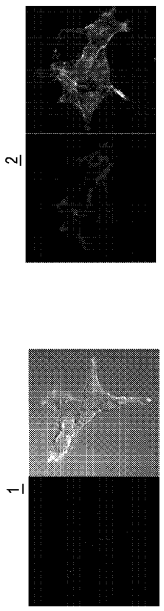


FIG. 12B

【図１３Ａ】

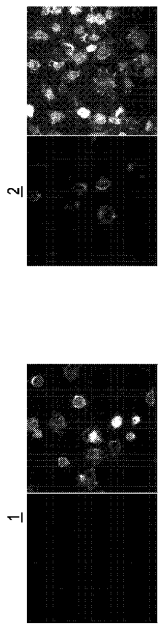


FIG. 13A

【図１３Ｂ】

FIG. 13B

【図１５】

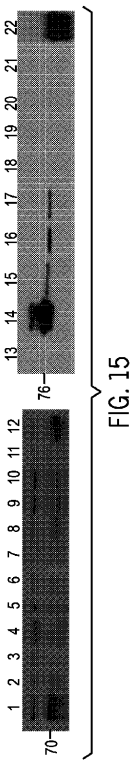


FIG. 15

【図１９Ａ】

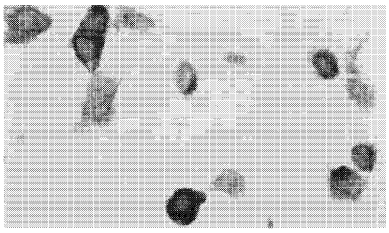


FIG. 19A

【図１９Ｂ】

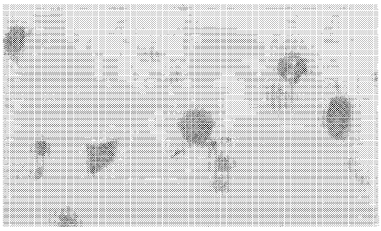


FIG. 19B

【図２２Ａ】

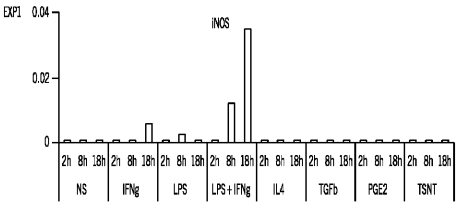


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

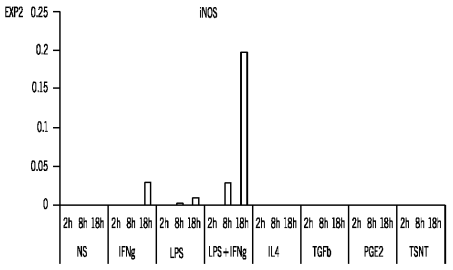


FIG. 22B

【図２２Ｃ】

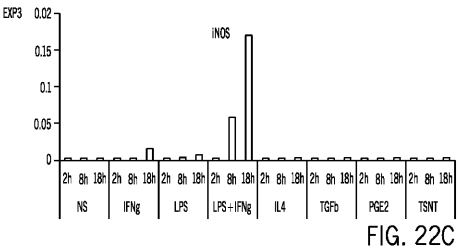


FIG. 22C

【図２３Ａ】

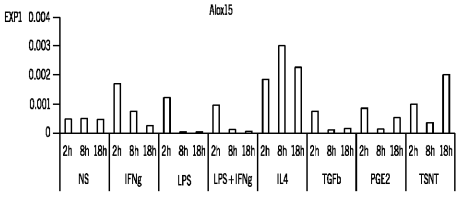


FIG. 23A

【図２３Ｂ】

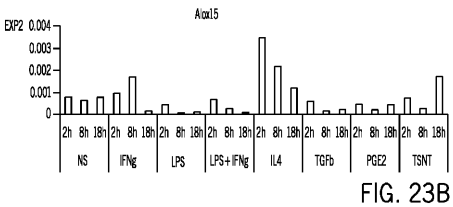


FIG. 23B

【図２３Ｃ】

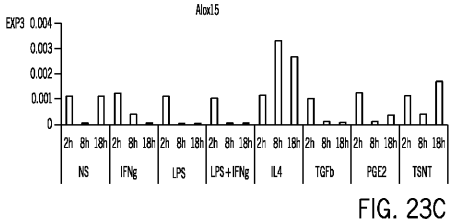


FIG. 23C

【図２４Ａ】

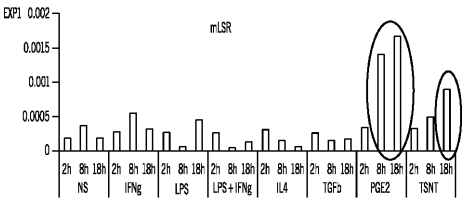


FIG. 24A

【図２４Ｂ】

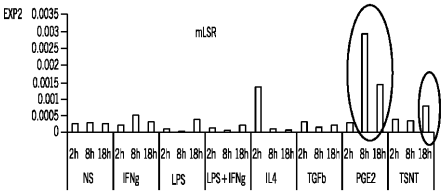


FIG. 24B

【図２４Ｃ】

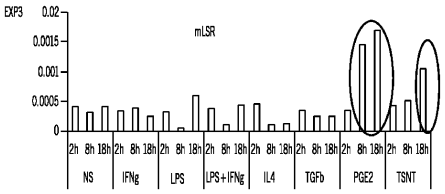


FIG. 24C

【図２６Ａ】

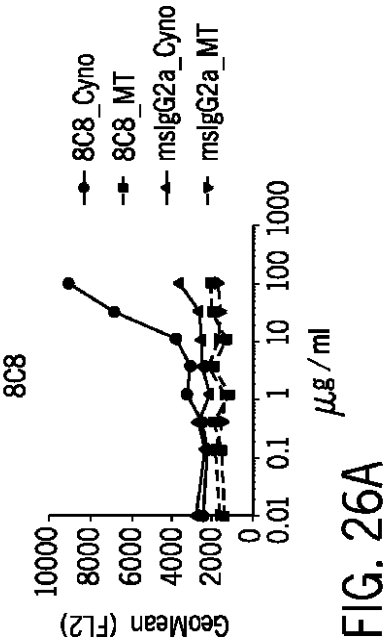


FIG. 26A

【図２６Ｂ】

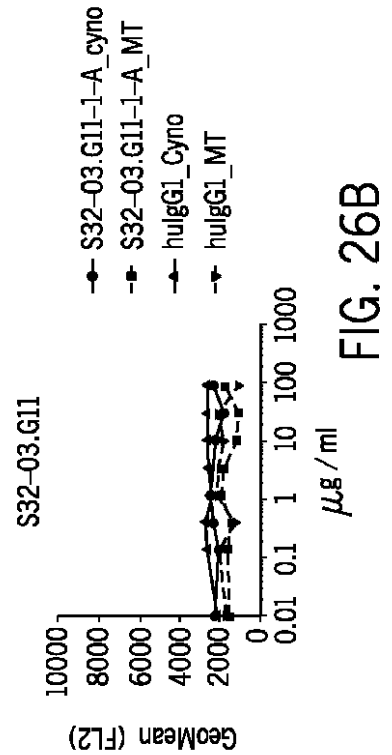


FIG. 26B

【図２６Ｃ】

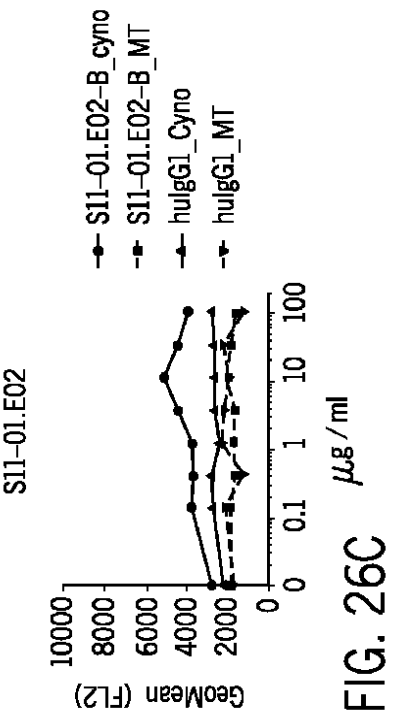


FIG. 26C

【図２６Ｄ】

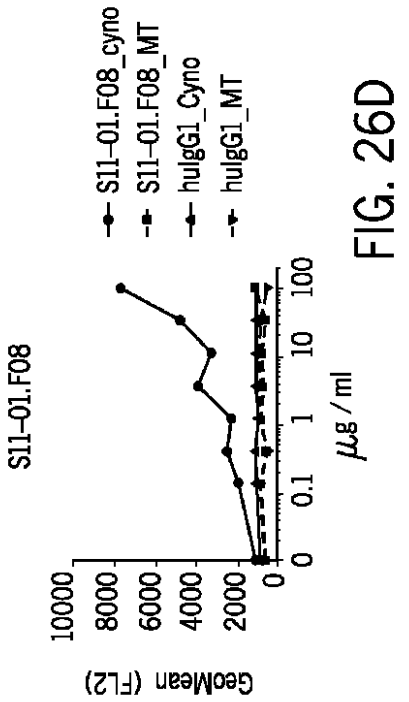


FIG. 26D

【図２６Ｅ】

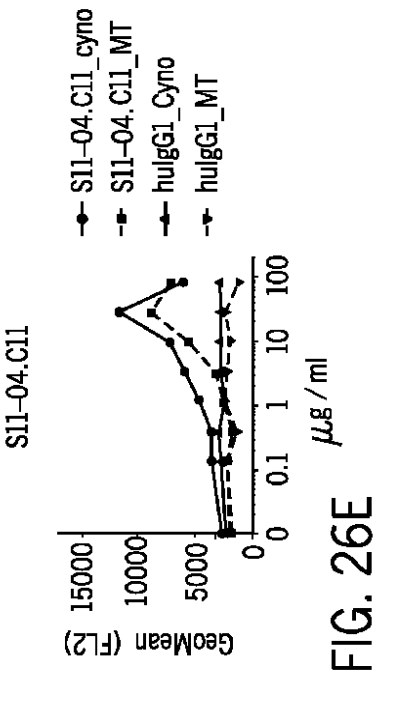


FIG. 26E

【図２６Ｆ】

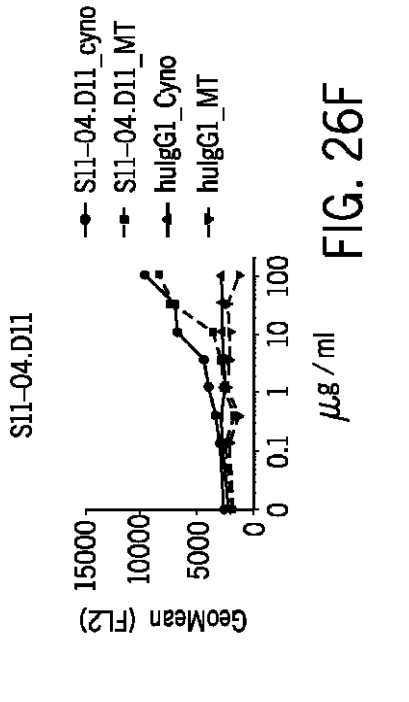


FIG. 26F

【図２６Ｇ】

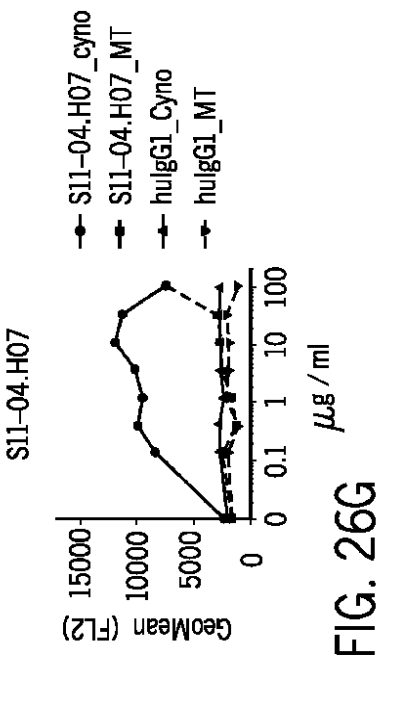


FIG. 26G

【図２６Ｈ】

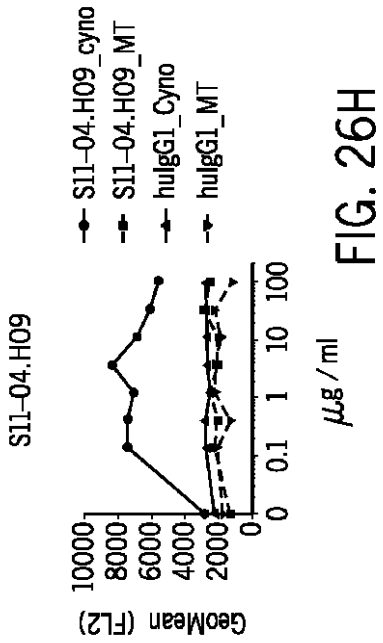


FIG. 26H

【図２７Ｅ】

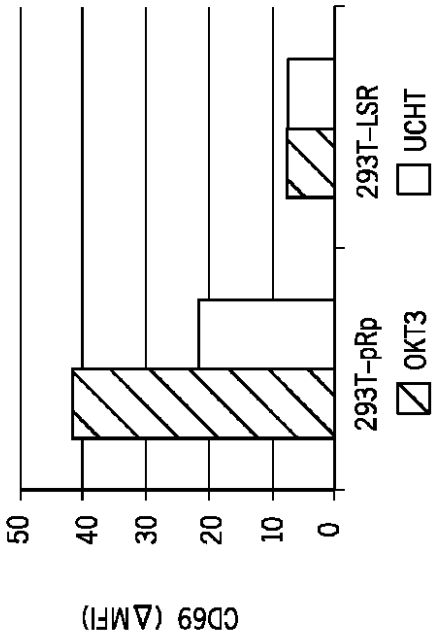
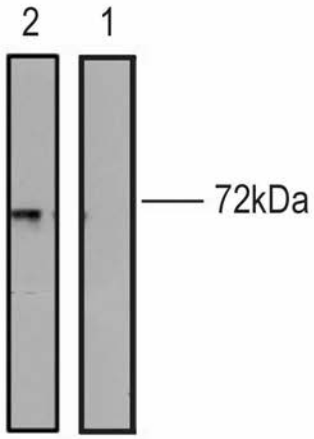


FIG. 27E

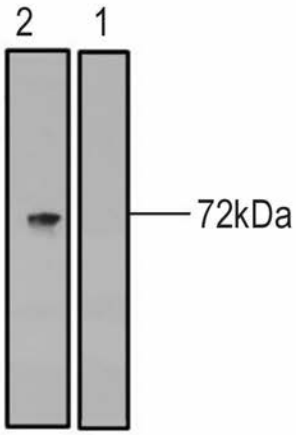
【図１】

図 1A



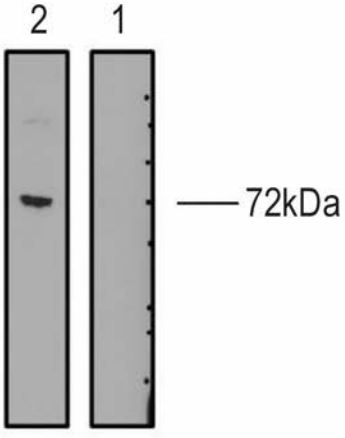
IB: 抗 FLAG

図 1B



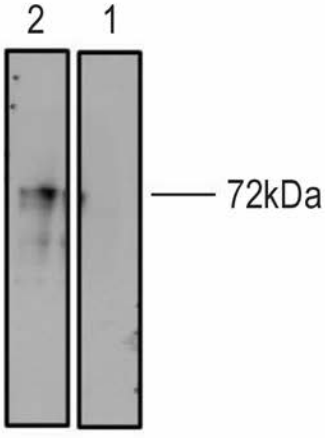
IB: 抗 LSR (Abnova)

図 1C



IB: 抗 LSR (Abcam)

図 1D



IB: 抗 LSR (Sigma)

【図２】

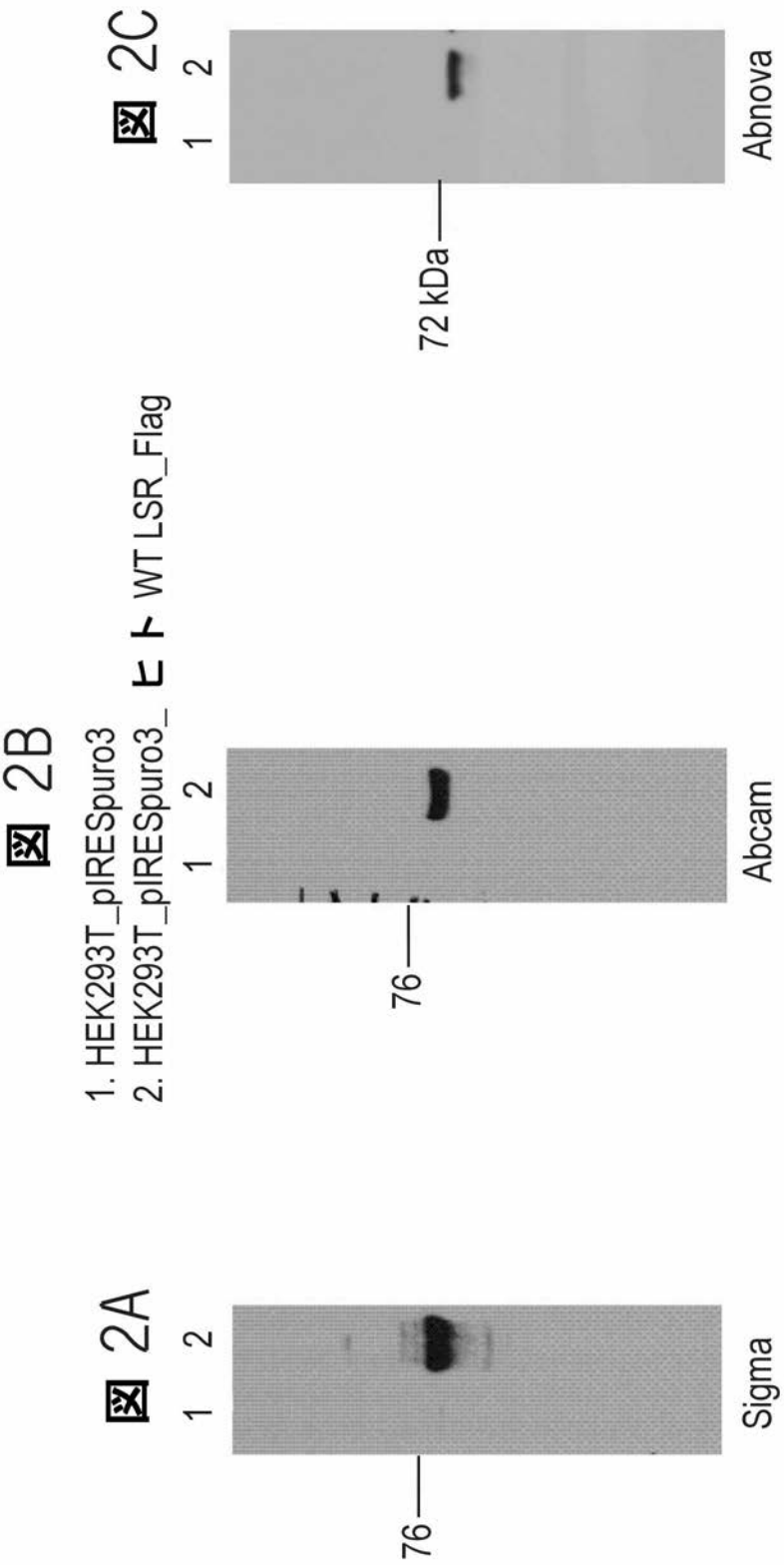
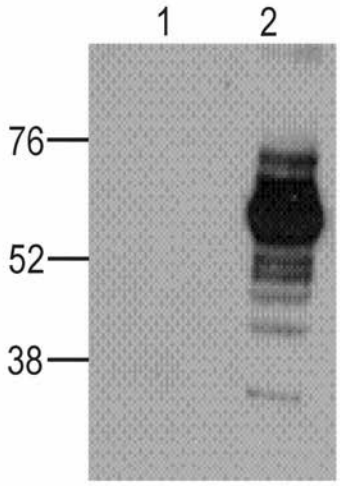


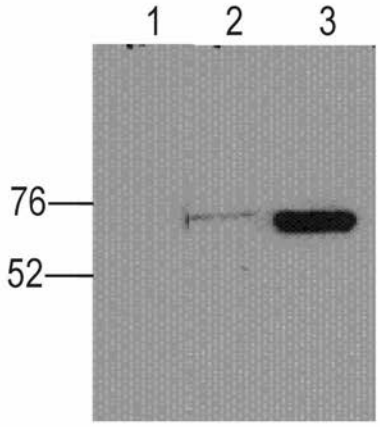
図 2A
1 2
76
Sigma
図 2B
1. HEK293T_plRESpuro3
2. HEK293T_plRESpuro3_ヒト WT LSR_Flag
1 2
76
Abcam
図 2C
1 2
72 kDa
Abnova

【図３】



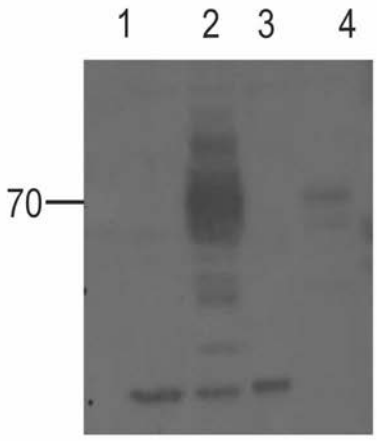
1. HEK293T_pIRESpuro3
2. HEK293T_pIRESpuro3_ヒトLSR skip4_Flag

【図４】



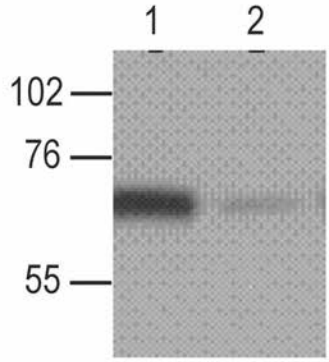
1. HEK293T_pIRESpuro3
2. HEK293T_pIRESpuro3_サルWT LSR-Flag
3. HEK293T_pIRESpuro3_サルskip4 LSR_Flag

【図５】



1. CHO-K1
2. CHO-K1_pcDNA3.1_マウス WT LSR_Flag
3. HEK293_pcDNA3.1
4. HEK293_pcDNA3.1_マウス WT LSR_Flag

【図７】



1. HEK293T_pIRESpuro3_ヒト WT LSR_Flag + スクランブル si RNA
2. HEK293T_pIRESpuro3_ヒト WT LSR_Flag+LSR si RNA

【図８】

図 8A

抗 FLAG

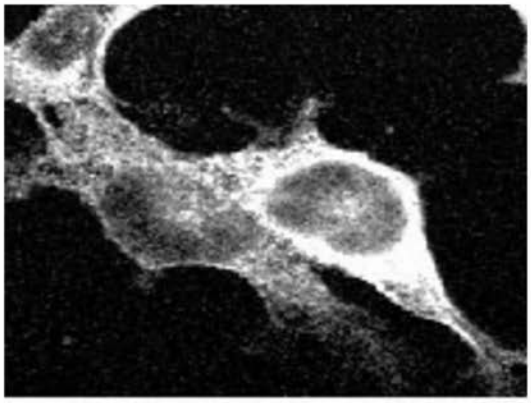


図 8B

抗 LSR (Abcam)

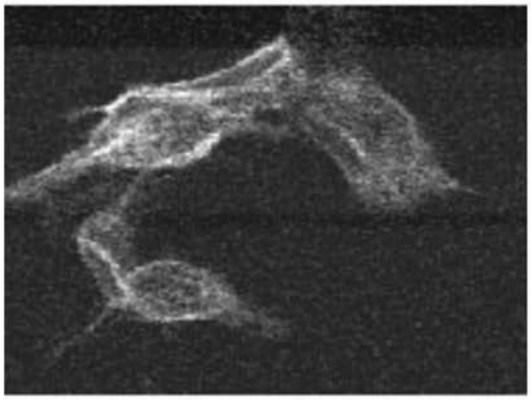


図 8C

抗 LSR (Abnova)

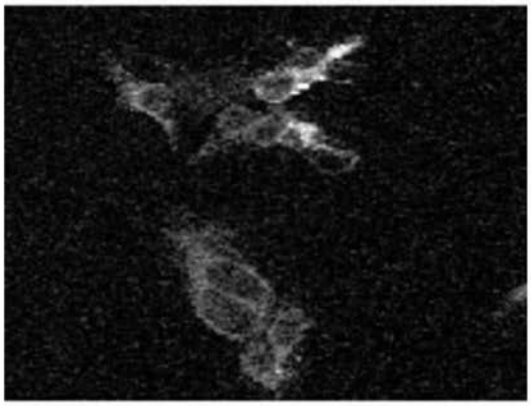
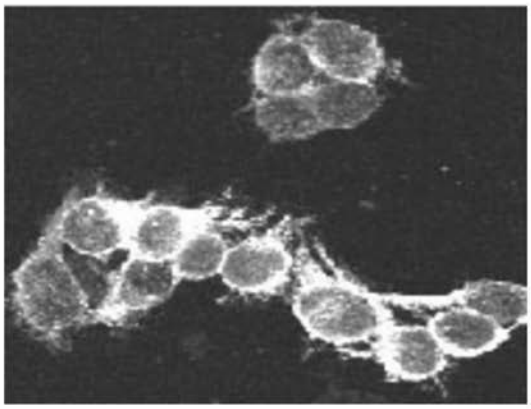
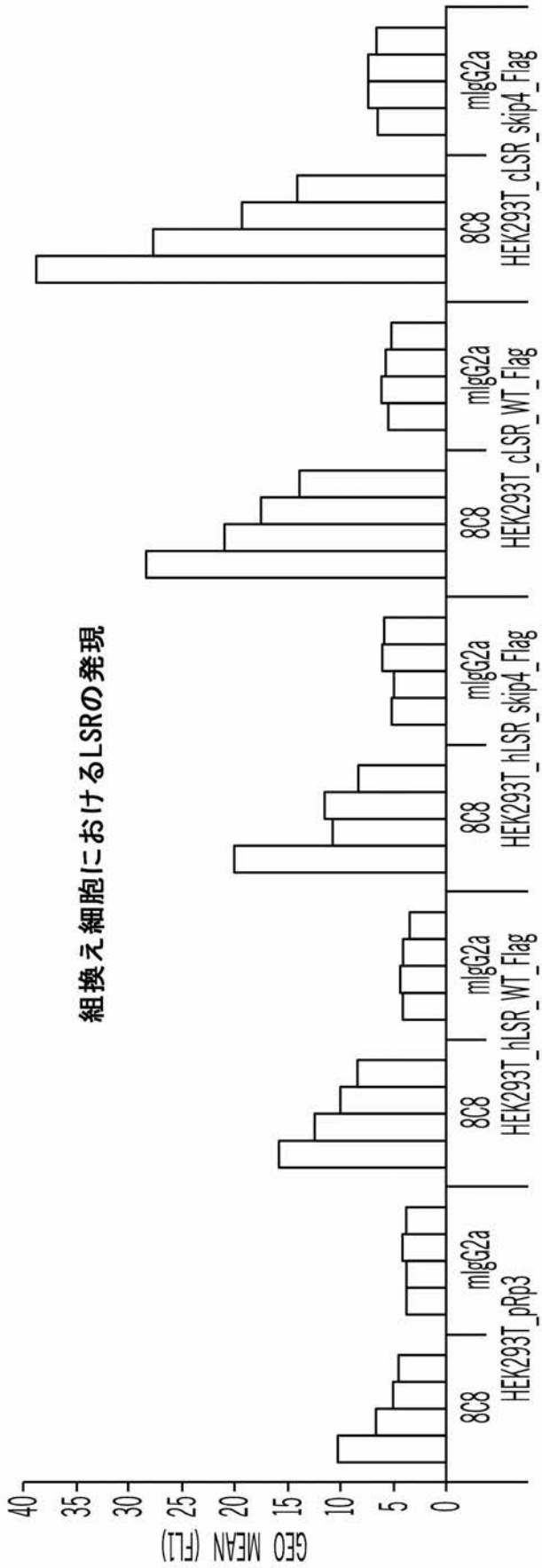


図 8D

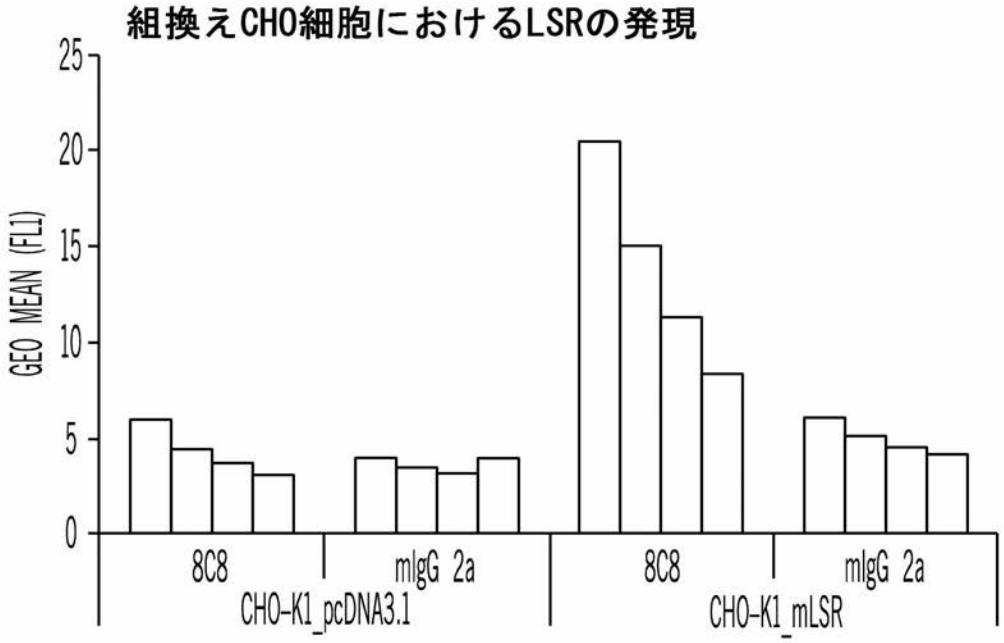
抗 LSR (Sigma)



【図１４Ａ】


組換え細胞におけるLSRの発現
GEO MEAN (FL1)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
8C8
HEK293T_pRp3
mIgG2a
8C8
HEK293T hLSR WT Flag
mIgG2a
8C8
HEK293T hLSR skip4 Flag
mIgG2a
8C8
HEK293T cLSR WT Flag
mIgG2a
8C8
HEK293T cLSR skip4 Flag
mIgG2a

【図１４Ｂ】


組換えCHO細胞におけるLSRの発現
GEO MEAN (FL1)
25
20
15
10
5
0
8C8
mIgG 2a
8C8
mIgG 2a
CHO-K1_pcDNA3.1
CHO-K1_mLSR

【図１６】

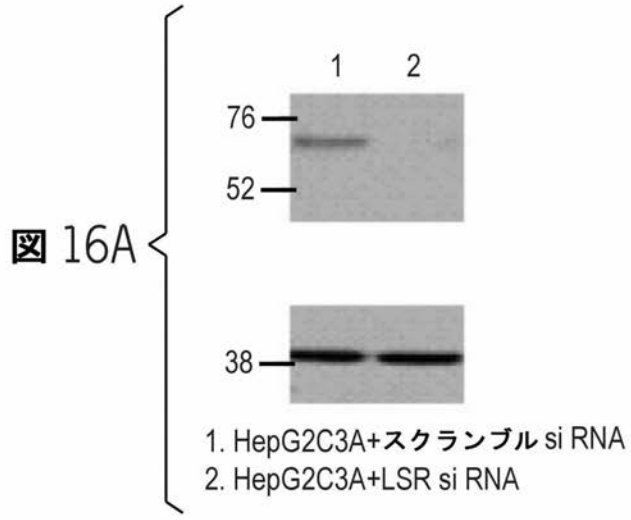


図 16A
1
2
76
52
38
1. HepG2C3A+スクランブル si RNA
2. HepG2C3A+LSR si RNA

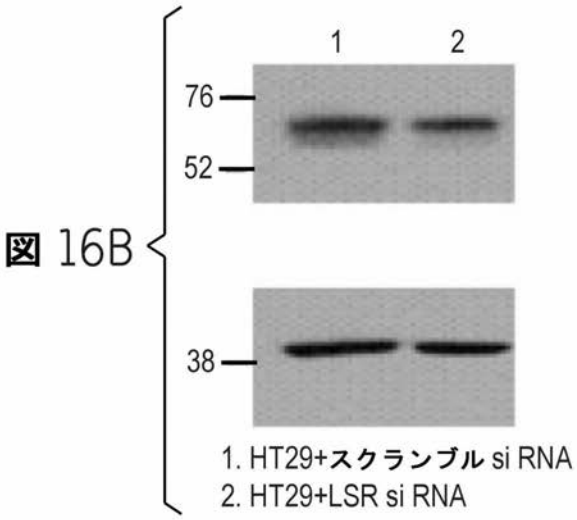


図 16B
1
2
76
52
38
1. HT29+スクランブル si RNA
2. HT29+LSR si RNA

【図１７】

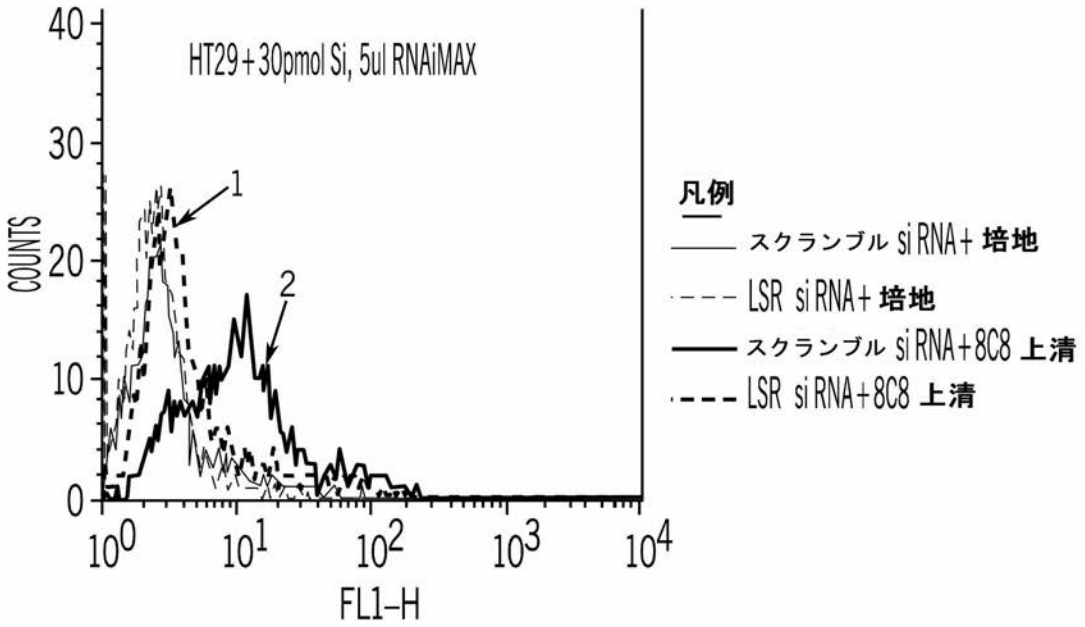


図 17A

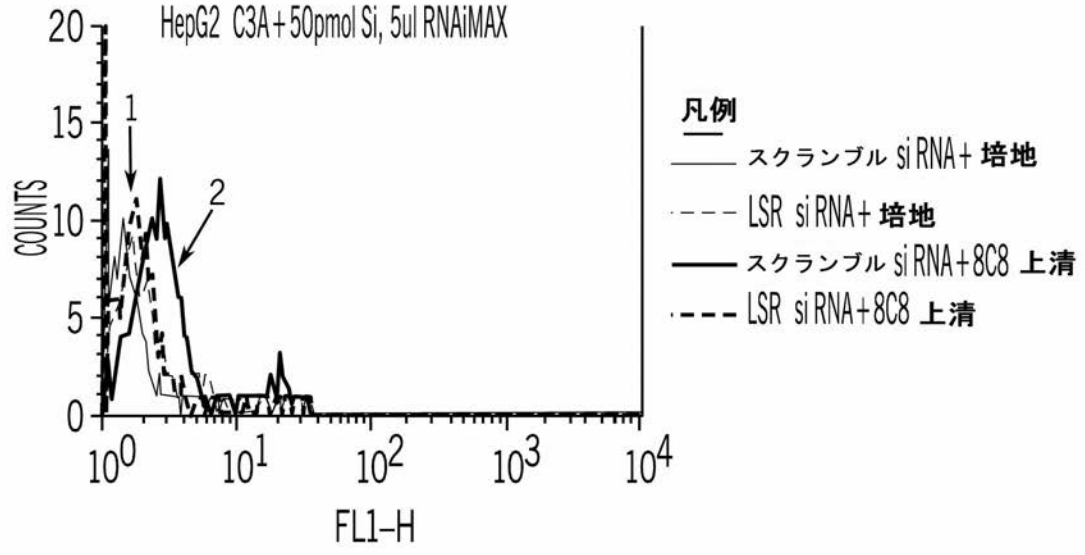


図 17B

【図１８Ａ】

配列番号 217, 8C8 **重鎖**：DNA **配列** (420 bp)
リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*ATGAACTTCGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCTGTGT*GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTTG
GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCT**GGATTCACTTTCAGTAGCTATTACATGTCT**TGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTTGG
TCGCA**GCCATTAATAGTAATGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGC**CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCT
GCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGCAAGA**CATGATTACTACGGTAGTAGCTTTGCTATGGACTAC**TGGGGTCAAGG
AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

配列番号 218, 8C8 **重鎖**：**アミノ酸配列** (140 AA)
リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*MNFGLRLIFLVLVLKGVLC*DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAAS**GFTFSSYYMS**WVRQTPEKRLELVA**AINSNGGSTYYPDTVKG**RFTISRDNAKNTLYLQMSS
LKSEDTALYYCAR**HDYYGSSFAMDY**WGQGTSVTVSS

配列番号 224, 8C8 **重鎖-CDR1** DNA
GGATTCACTTTCAGTAGCTATTACATGTCT

配列番号 225, 8C8 **重鎖-CDR2** DNA
GCCATTAATAGTAATGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGC

配列番号 226, 8C8 **重鎖-CDR3** DNA
CATGATTACTACGGTAGTAGCTTTGCTATGGACTAC

配列番号 227, 8C8 **重鎖 CDR1 アミノ酸**
GFTFSSYYMS

配列番号 228, 8C8 **重鎖 CDR2 アミノ酸**
AINSNGGSTYYPDTVKG

配列番号 229, 8C8 **重鎖 CDR3 アミノ酸**
HDYYGSSFAMDY

【図１８Ｂ】

配列番号 219, 8C8 **軽鎖**：DNA **配列** (381 bp)
リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*ATGATGTCCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGGTACCAGATGT*GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCT
GGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC**AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAAC**TGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGA
TCTAC**TACACATCAAGATTACACTCA**GGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACTATTAGCAACCTGGAACAAGA
AGATATTGCCACTTACTTTTGC**CAACAGGATAGTAAGCATCCGTGGACG**TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

配列番号 220, 8C8 **軽鎖**：**アミノ酸配列** (127 AA)
リーダー配列-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

*MMSSAQFLGLLLLCFQGTRC*DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC**RASQDISNYLN**WYQQKPDGTVKLLIY**YTSRLHS**GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT
YFC**QQDSKHPWT**FGGGTKLEIK

配列番号 230, 8C8 **軽鎖 CDR1** DNA **配列**
AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAAC

配列番号 231, 8C8 **軽鎖 CDR2** DNA **配列**
TACACATCAAGATTACACTCA

配列番号 232, 8C8 **軽鎖 CDR3** DNA **配列**
CAACAGGATAGTAAGCATCCGTGGACG

配列番号 233, 8C8 **軽鎖 CDR1 アミノ酸配列**
RASQDISNYLN

配列番号 234, 8C8 **軽鎖 CDR2 アミノ酸配列**
YTSRLHS

配列番号 235, 8C8 **軽鎖 CDR3 アミノ酸配列**
QQDSKHPWT

【図２０】

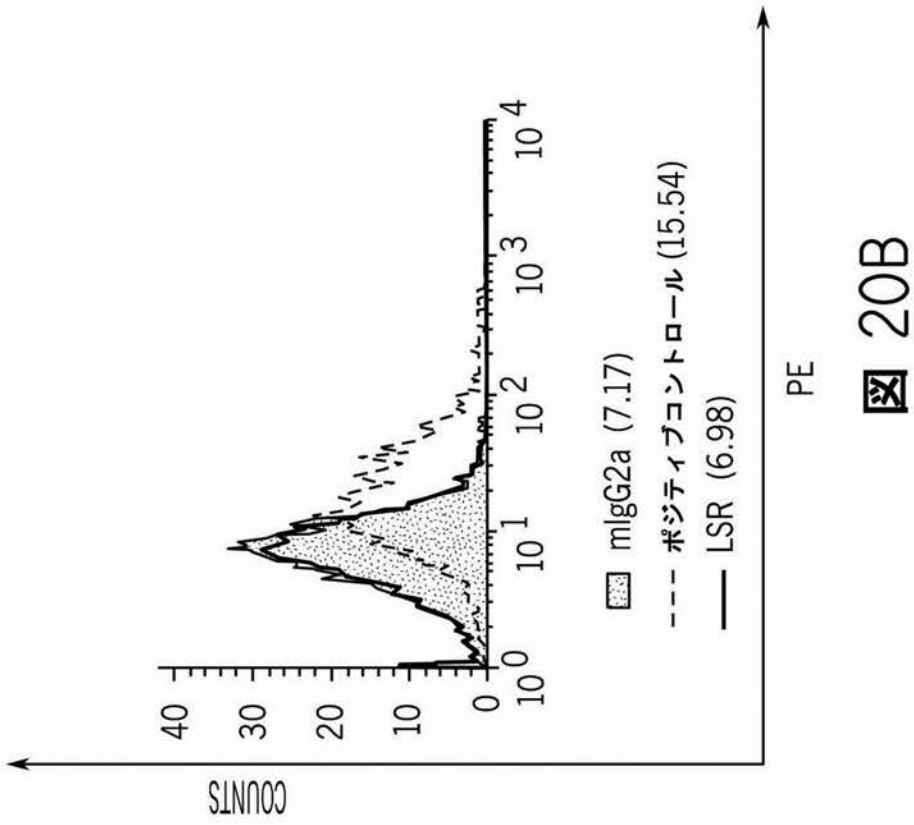


図 20B

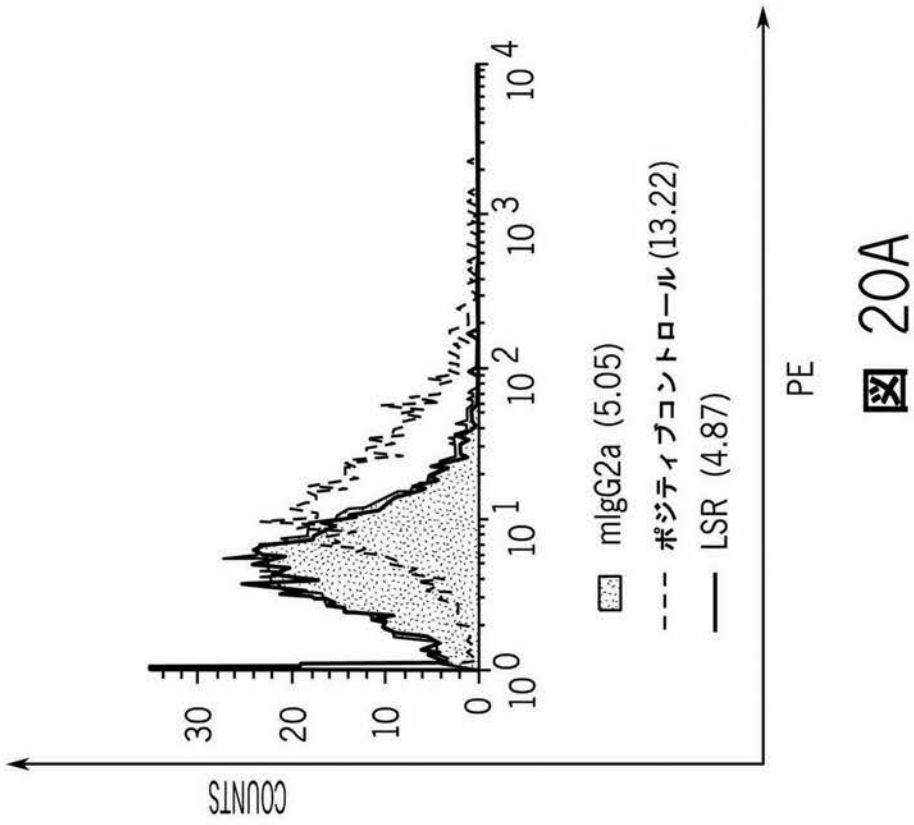
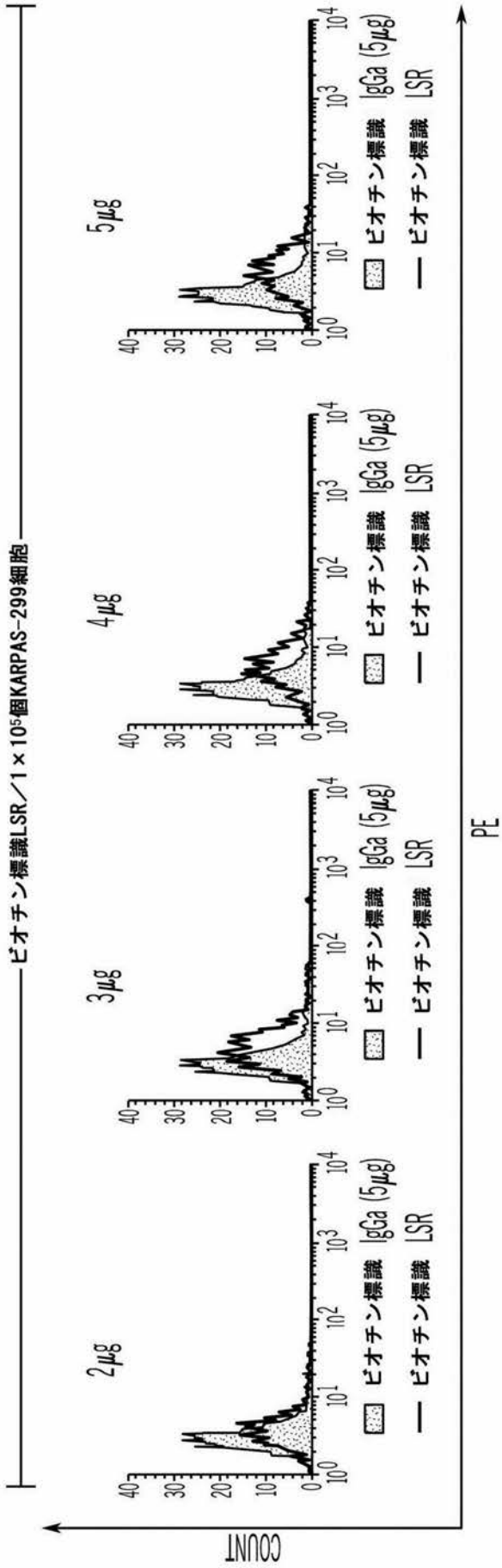
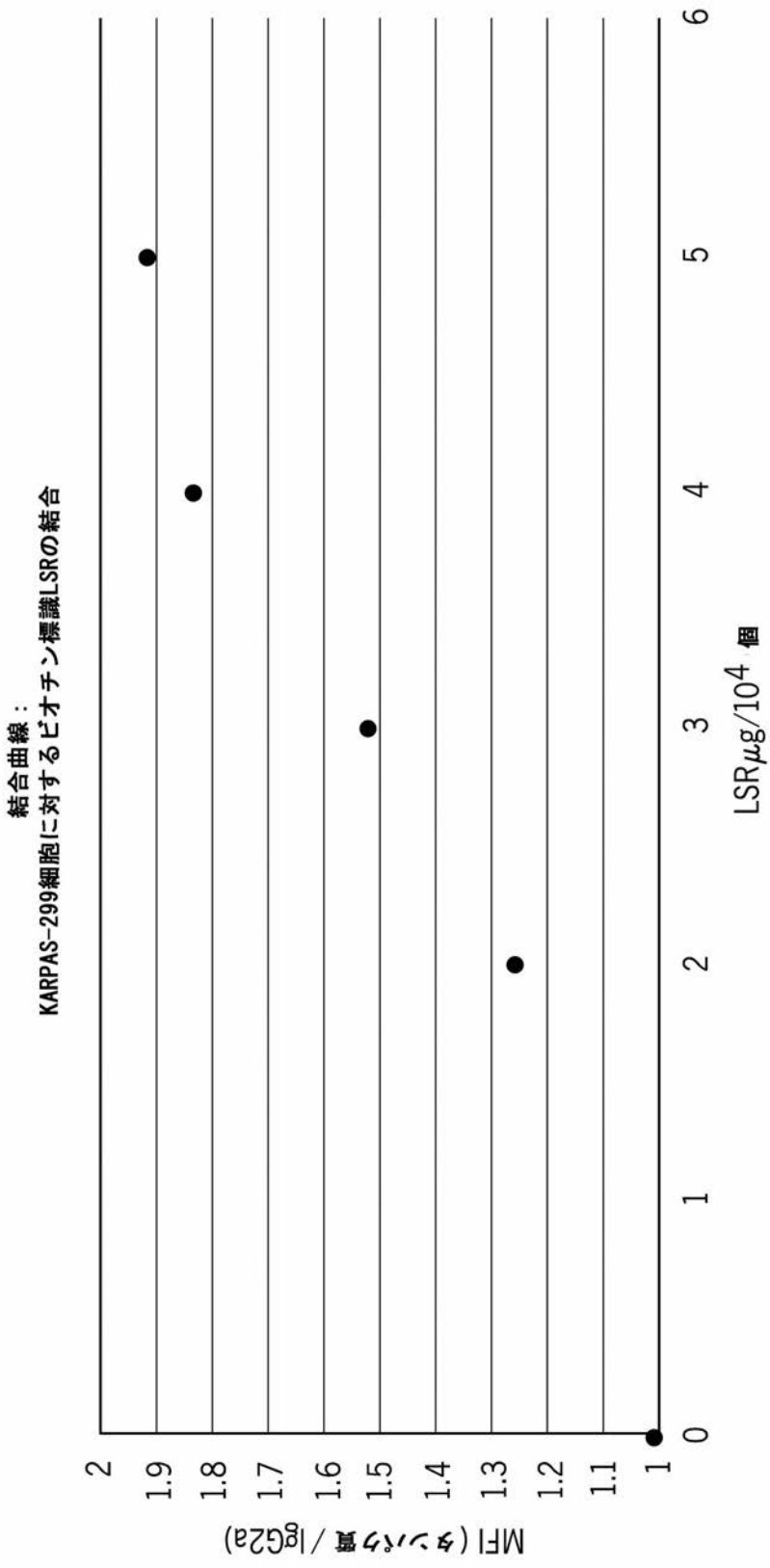


図 20A

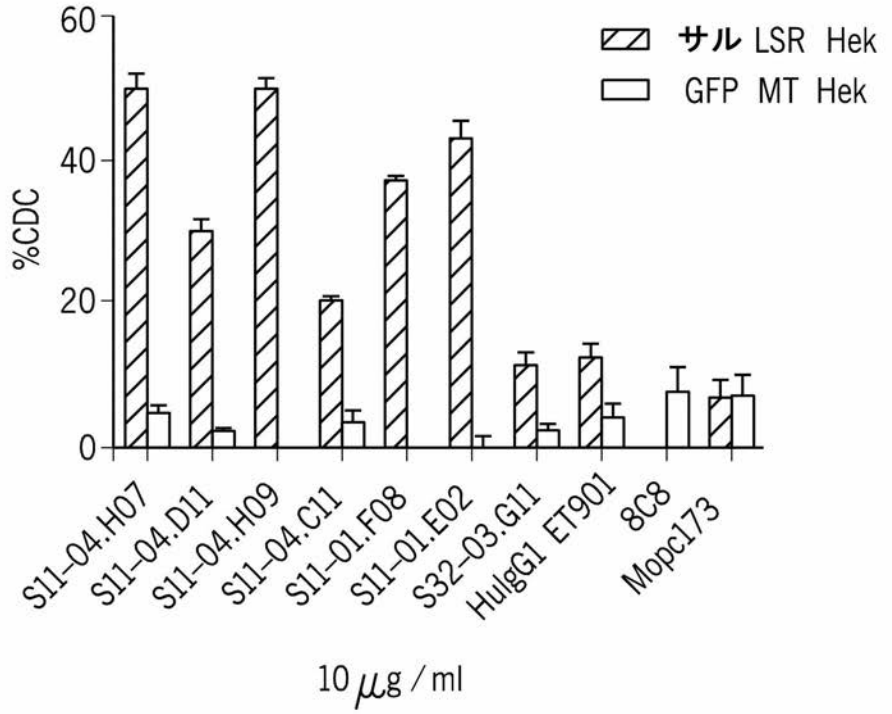
【図２１Ａ】


ビオチン標識LSR／1×10⁵個KARPAS-299細胞
COUNT
PE
2μg
3μg
4μg
5μg
ビオチン標識 IgGa (5μg)
ビオチン標識 LSR

【図２１Ｂ】


結合曲線：
KARPAS-299細胞に対するビオチン標識LSRの結合
MFI（ターゲット / IgG2a）
2
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1
0
1
2
3
4
5
6
LSRμg/10^4個

【図２５】


60
40
20
0
%CDC
サル LSR Hek
GFP MT Hek
S11-04.H07
S11-04.D11
S11-04.H09
S11-04.C11
S11-01.F08
S11-01.E02
S32-03.G11
HulgG1 ET901
8C8
Mopc173
10 μg / ml

【図２７Ａ－Ｄ】

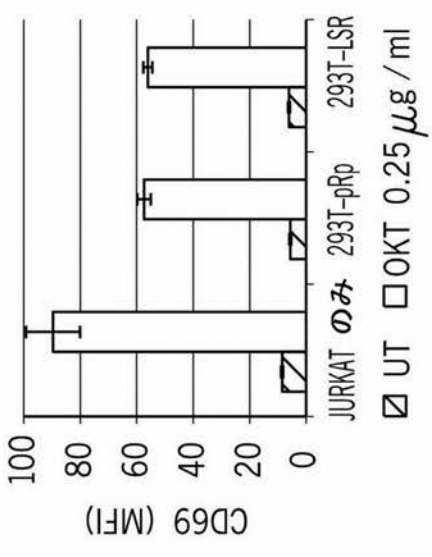


図 27A

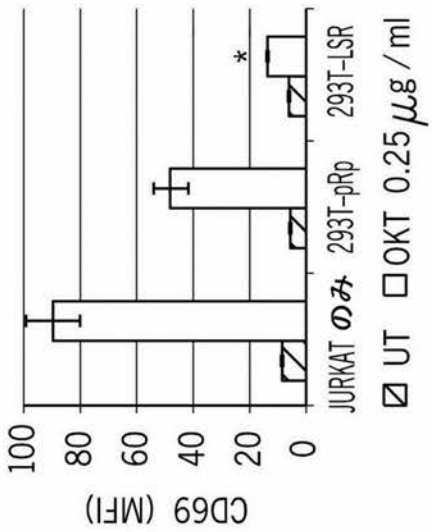


図 27B

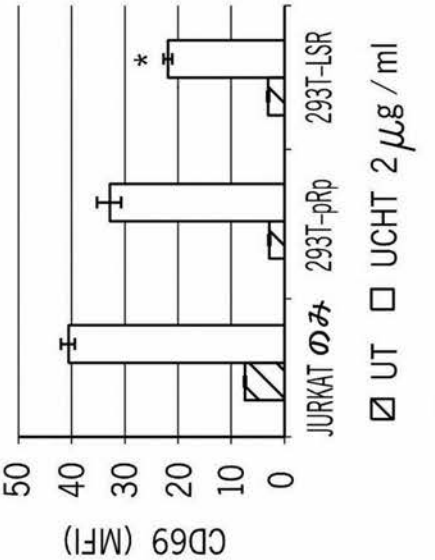


図 27C

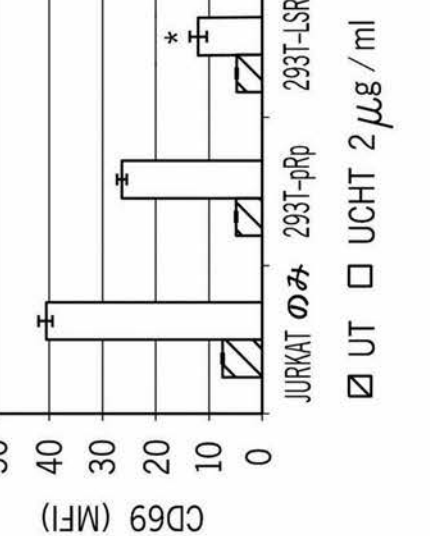


図 27D

【図２８】

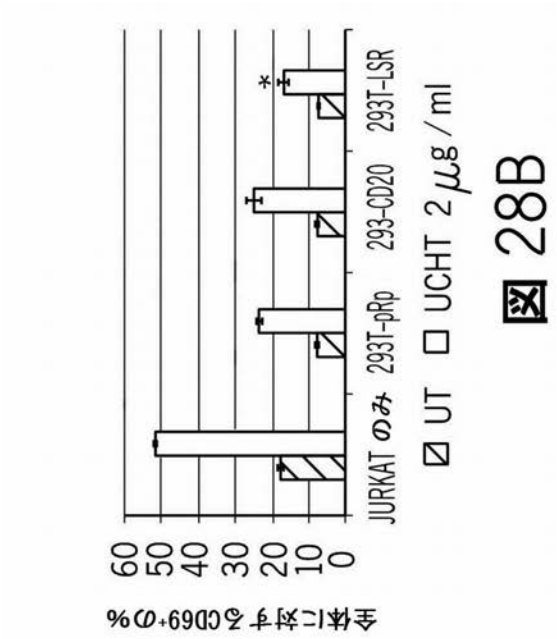


図 28B

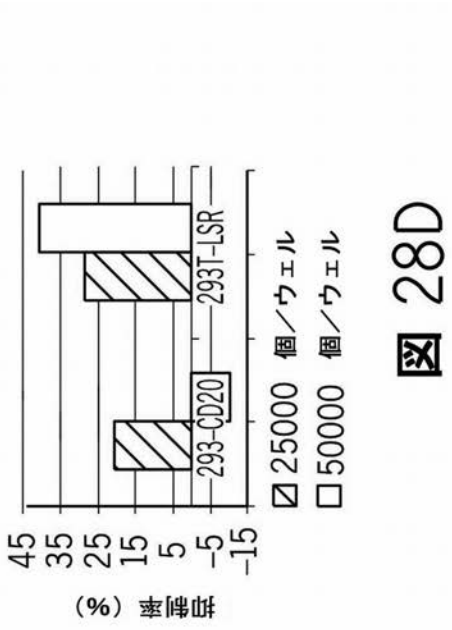


図 28D

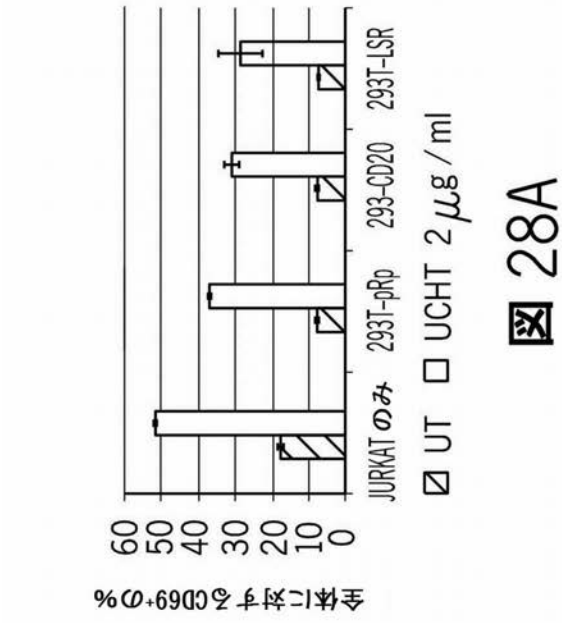


図 28A

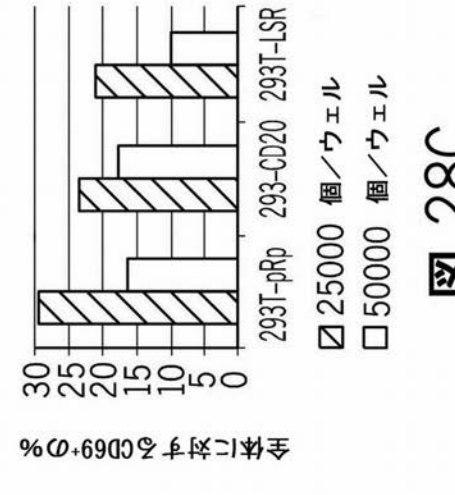


図 28C

【配列表】

2015532587000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年5月11日(2015.5.11)

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2015532587000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC (2013.01) C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 35/00, A61P 37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC (2013.01) C07K, A61K

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)
Databases consulted: THOMSON INNOVATION, CAPLUS, REGISTRY, WPI Data, Google Scholar
Search terms used: lipolysis stimulated lipoprotein receptor, lsr, immune disease, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7919091 B2 Serono Genetics Institute S.A. (Evry, FR) Institut National de la Sante Et de la Recherche Medicale (Inserm) (Paris, FR) 05 Apr 2011 (2011/04/05) example 7, figure 3, column 49 lines 41-52, fig 13, claims 1, 8-9	1-21
Y		22-89
Y	WO 2010105298 A1 BARRY SIMON [AU]; SADLON TIMOTHY JOHN [AU]; PEDERSON STEPHEN MARTIN [AU]; WILKINSON BRIDGET GABRIELLE [AU]; KRUMBIEGEL DOREEN [AU]; NICHOLSON IAN CAMERON [AU]; ZOLA HEDDY [AU 23 Sep 2010 (2010/09/23) Tables 2, 4, examples 9, 19 claims 40-44	22-89

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 Oct 2013	10 Oct 2013
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Facsimile No. 972-2-5651616	Authorized officer HOROWITZ Anat Telephone No. 972-2-5651689

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050527

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Rikke Leth-Larsen et al. Functional Heterogeneity within the CD44 High Human Breast Cancer Stem Cell–Like Compartment Reveals a Gene Signature Predictive of Distant Metastasis (2012) Mol Med 18(1): 1109–1121. Published online 2012 June 8. Retrieved from the internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3474436/pdf/12_091_leth-larsen.pdf doi: 10.2119/molmed.2012.00091 08 Jun 2012 (2012/06/08) figure 5C, page 1119 second and last column	22-89
P,X	WO 2012140627 A1 COMPUGEN LTD 18 Oct 2012 (2012/10/18) the whole document	1-89

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050527

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See extra 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050527

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet):

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

Invention/s 1	anti-LSR mouse monoclonal antibody 8C8 (SEQ ID NOs: 220 and 218, for VL and VH, respectively) light chain CDR1 depicted in SEQ ID NO.233, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NO. 234, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO. 235, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NO. 227, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NO.228, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NO. 229.	Claim/s 1-89
Invention/s 2	anti-LSR human monoclonal antibody S11-01.E02, (SEQ ID NOs: 244 and 238, for VL and VH, respectively) light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:245, 246, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:247, 248 , light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:249 , heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:239, 240, 241, 252, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:256, 287, 288, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs:242, 243.	Claim/s 1-15,18-89
Invention/s 3	anti-LSR human monoclonal antibody S11-01.F08 (SEQ ID NOs: 260 and 250, for VL and VH, respectively) light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:303, 304, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:261, 306, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:262, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:251, 252, 253, 254, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:255, 256, 257, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs:258, 259.	Claim/s 1-15,18-89
Invention/s 4	anti-LSR human monoclonal antibody S11-04.C11 (SEQ ID NOs: 273 and 263, for VL and VH, respectively) light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:274, 275, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:276, 277, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:278, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:264, 265, 266, 267, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:268, 269, 270, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs:271, 272.	Claim/s 1-15,18-89
Invention/s 5	anti-LSR human monoclonal antibody S11-04.D11 (SEQ ID NOs: 281 and 279, for VL and VH, respectively) light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:274, 275, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:276, 277, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:282, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:264, 265, 266, 267, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:268, 269, 280, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs:271, 272.	Claim/s 1-15,18-89
Invention/s 6	anti-LSR human monoclonal antibody S11-04.H07 (SEQ ID NOs: 308 and 283, for VL and VH, respectively) , light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:303, 304, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:305, 306, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:307, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:239, 240, 241, 252, heavy chain	Claim/s 1-15,18-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2013/050527

	CDR2 depicted in SEQ ID NOs:256, 287, 288, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs:284, 285.	
Invention/s 7	anti-LSR human monoclonal antibody S11-04.H09 (SEQ ID NOs: 289 and 286, for VL and VH, respectively) , light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:290, 291, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:305, 306, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:292, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:251, 252, 253, 254, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:256, 287, 288, heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs: 258, 259.	Claim/s 1-15,18-89
Invention/s 8	anti-LSR human monoclonal antibody S32-03.G11, (SEQ ID NOs: 308 and 293, for VL and VH, respectively) light chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:303, 304, light chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:305, 306, light chain CDR3 depicted in SEQ ID NO:307, heavy chain CDR1 depicted in SEQ ID NOs:294, 295, 296, 297, heavy chain CDR2 depicted in SEQ ID NOs:298 , 299 , 300 , heavy chain CDR3 depicted in SEQ ID NOs:301 , 302.	Claim/s 1-15,18-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2013/050527

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
US 7919091 B2	05 Apr 2011	AT 256146 T	15 Dec 2003
		AT 378354 T	15 Nov 2007
		AT 443721 T	15 Oct 2009
		AU 8556498 A	01 Mar 1999
		AU 745607 B2	21 Mar 2002
		AU 745607 C	29 Aug 2002
		AU 8556398 A	01 Mar 1999
		AU 754942 B2	28 Nov 2002
		CA 2274302 A1	18 Feb 1999
		CA 2298849 A1	18 Feb 1999
		DE 69820419 D1	22 Jan 2004
		DE 69820419 T2	25 Nov 2004
		DE 69838720 D1	27 Dec 2007
		DE 69838720 T2	30 Oct 2008
		DE 69841186 D1	05 Nov 2009
		DK 964870 T3	08 Mar 2004
		DK 1003783 T3	02 Jan 2008
		EP 0964870 A2	22 Dec 1999
		EP 0964870 B1	10 Dec 2003
		EP 1003783 A2	31 May 2000
		EP 1003783 B1	14 Nov 2007
		EP 1375516 A2	02 Jan 2004
		EP 1375516 A3	09 Jun 2004
		EP 1903057 A2	26 Mar 2008
		EP 1903057 A3	25 Jun 2008
		EP 1903057 B1	23 Sep 2009
		ES 2210786 T3	01 Jul 2004
		ES 2296339 T3	16 Apr 2008
		FR 2767135 A1	12 Feb 1999
		FR 2767135 B1	12 Jul 2002
		FR 2767136 A1	12 Feb 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2013/050527

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		FR 2767136 B1	27 Aug 2004
		JP 2001512492 A	21 Aug 2001
		JP 3726969 B2	14 Dec 2005
		JP 2001512746 A	28 Aug 2001
		JP 2005143508 A	09 Jun 2005
		PT 964870 E	27 Feb 2004
		PT 1003783 E	06 Dec 2007
		US 6344441 B1	05 Feb 2002
		US 6635431 B1	21 Oct 2003
		US 2002165154 A1	07 Nov 2002
		US 6946444 B2	20 Sep 2005
		US 2002151498 A1	17 Oct 2002
		US 7220722 B2	22 May 2007
		US 2004077051 A1	22 Apr 2004
		US 7291709 B2	06 Nov 2007
		US 2009263847 A1	22 Oct 2009
		US 7919091 B2	05 Apr 2011
		US 2008249009 A1	09 Oct 2008
		US 2011165166 A1	07 Jul 2011
		WO 9907736 A2	18 Feb 1999
		WO 9907736 A3	20 May 1999
		WO 9907737 A2	18 Feb 1999
		WO 9907737 A3	10 Jun 1999
WO 2010105298 A1	23 Sep 2010	AU 2010225456 A1	13 Oct 2011
		CA 2755782 A1	23 Sep 2010
		EP 2408934 A1	25 Jan 2012
		EP 2408934 A4	06 Mar 2013
		US 2012064100 A1	15 Mar 2012
		WO 2010105298 A1	23 Sep 2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2013/050527

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
WO 2012140627 A1	18 Oct 2012	WO 2012140627 A1	18 Oct 2012
		WO 2012140627 A4	31 Jan 2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ 45/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ 39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ 38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｃ２０６
Ａ６１Ｋ 48/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ 31/713	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ	
Ａ６１Ｋ 31/704	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	37/02		
Ａ６１Ｋ 31/675	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ 31/7068	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713		
Ａ６１Ｋ 31/136	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/704		
Ａ６１Ｋ 31/454	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/675		
Ａ６１Ｋ 31/519	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7068		
Ａ６１Ｋ 31/616	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/136		
Ａ６１Ｋ 49/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/454		
Ａ６１Ｐ 15/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/519		
Ａ６１Ｐ 17/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/616		
Ａ６１Ｐ 13/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/00	Ａ	
Ａ６１Ｐ 11/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00		
Ａ６１Ｐ 1/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ 1/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/10		
Ａ６１Ｐ 13/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ 35/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/18		
Ａ６１Ｐ 19/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		
Ａ６１Ｐ 5/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/08		
Ａ６１Ｐ 21/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/00		
Ａ６１Ｐ 13/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/00		
Ａ６１Ｐ 1/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ 27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ 1/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ 11/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16		
Ａ６１Ｐ 9/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ 17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/02		
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/02		
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ａ６１Ｐ 7/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ａ６１Ｐ 7/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 21/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/04		
Ａ６１Ｐ 31/20	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06		
Ａ６１Ｐ 37/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04		
Ａ６１Ｐ 11/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ 19/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/20		
Ａ６１Ｐ 9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06		
Ａ６１Ｐ 31/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/06		
Ａ６１Ｐ 31/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		

Ａ６１Ｐ 33/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04		
Ａ６１Ｐ 31/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/12		
Ａ６１Ｐ 31/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/10		
Ａ６１Ｐ 31/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/00		
Ａ６１Ｐ 33/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ａ６１Ｐ 33/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18		
Ａ６１Ｐ 35/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/06		
Ｃ１２Ｎ 5/07	*(2010.01)*	Ａ６１Ｐ	33/06		
Ｃ１２Ｎ 1/15	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/12		
Ｃ１２Ｎ 1/19	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/04		
Ｃ１２Ｎ 1/21	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	２０２	
Ｃ１２Ｎ 5/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ０７Ｋ 16/46	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ０７Ｋ 19/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｑ 1/04	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	２０１	
Ｃ０７Ｋ 16/30	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		
Ｃ１２Ｐ 21/08	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｇ０１Ｎ 33/574	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/04		
Ｇ０１Ｎ 33/48	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/30		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ｃ１２Ｑ 1/68	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574		Ａ
		Ｇ０１Ｎ	33/48		Ｐ
		Ｇ０１Ｎ	33/53		Ｙ
		Ｃ１２Ｑ	1/68		Ａ

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

(72)発明者 ロットマン，ガリト
イスラエル国 ヘルツリーヤ ４６４１２ ヤイル シュテルン ストリート ５
(72)発明者 レヴィ，オフェル
イスラエル国 エム．ピー．シムショーン モシャブ メシラト シオン ９９７７０ ハー イーラ ストリート １８２
(72)発明者 パウ，アンドリュー
アメリカ合衆国 ９４１０３ カリフォルニア州，サンフランシスコ，エーピーティー ４６７ ミッション ストリート １０４５
(72)発明者 サメアハーグリーンウォールド，シャーリー
イスラエル国 クファール サバ ４４４１９ アモン アンド タマル ストリート ５／１
(72)発明者 レヴァイン，ズリト
イスラエル国 ヘルツリーヤ ４６４２０ ハヒスタドルト ストリート ４７

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB24 CB01 CB02 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 AA12 AA13 BA45 BA53 CA04 CA06 CA07 DA02
DA06 DA20 EA03 EA04 GA05 GA11 HA15
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48
QR55 QR62 QR72 QS33 QS34 QS36 QX02

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05 DA14 DA15
4B065 AA26X AA94Y AA98X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 AA19 DA01 DA12 DA14 DA21 DA22 DA23 DA24
DB22 NA05 ZB072 ZB092 ZB212 ZB262 ZB322 ZC202 ZC412
4C085 AA03 AA13 AA14 AA21 AA25 AA26 AA27 BB41 BB43 BB50
EE01 EE03 HH20
4C086 AA01 BC22 CB06 DA14 DA17 DA35 EA10 EA16 EA17 GA07
MA02 MA04 NA05 ZB26
4C206 AA01 FA31 MA02 MA04 NA05 ZC41
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA22 EA28 EA29 EA51
EA52 FA74

专利名称(译)	LSR抗体及其用于治疗癌症的用途		
公开(公告)号	JP2015532587A	公开(公告)日	2015-11-12
申请号	JP2015517924	申请日	2013-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	卡姆普根有限公司		
申请(专利权)人(译)	计算埃尔代茶迪伊.		
[标]发明人	コジョカルガドエス ダッサリアト ロットマンガリト レヴィオフェル パウアンドリュー サメアハグリーンウォールドシャーリー レヴァインズリト		
发明人	コジョカル,ガド エス. ダッサ,リアト ロットマン,ガリト レヴィ,オフェル パウ,アンドリュー サメアハ-グリーンウォールド,シャーリー レヴァイン,ズリト		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/06 A61P31/00 A61P43/00 A61K45/00 A61K39/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/713 A61K31/704 A61K31/675 A61K31/7068 A61K31/136 A61K31/454 A61K31/519 A61K31/616 A61K49/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P13/10 A61P11/00 A61P1/18 A61P1/04 A61P13/08 A61P35/02 A61P19/00 A61P5/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P13/12 A61P1/16 A61P27/02 A61P1/02 A61P11/02 A61P9/00 A61P17/06 A61P29/00 A61P19/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P21/04 A61P3/10 A61P31/20 A61P37/08 A61P11/06 A61P19/06 A61P9/10 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/10 A61P33/00 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/06 A61P33/06 A61P33/12 A61P35/04 C12N5/07 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00 C07K16/46 C07K19/00 C12Q1/04 C07K16/30 C12P21/08 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K31/675 A61K39/39558 A61K45/06 A61K2039/507 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/06 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P33/06 A61P33/12 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/70503 C07K16/28 C07K16/2818 C07K16/2878 C07K16/30 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/55 C07K2317/734 C07K2319/30 C12N15/1138 C12N2310/14 G01N33/57492 G01N2800/24 G01N2800/26 Y02A50/412 Y02A50/423 A61K2300/00 A61K39/3955		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.N A61K39/395.L A61P35/00 A61P37/06 A61P31/00 A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61K45/00 A61K39/00.H A61K39/395.E A61K37/02 A61K48/00 A61K31/713 A61K31/704 A61K31/675 A61K31/7068 A61K31/136 A61K31/454 A61K31/519 A61K31/616 A61K49/00.A A61P15/00 A61P17/00 A61P13/10 A61P11/00 A61P1/18 A61P1/04 A61P13/08 A61P35/02 A61P19/00 A61P5/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P13/12 A61P1/16 A61P27/02 A61P1/02 A61P11/02 A61P9/00 A61P17/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P21/04 A61P3/10 A61P31/20 A61P37/08 A61P11/06 A61P19/06 A61P9/10 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/10 A61P33/00 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/06 A61P33/06 A61P33/12 A61P35/04 C12N5/00.202 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.201 C07K16/46 C07K19/00 C12Q1/04 C07K16/30 C12P21/08 G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y C12Q1/68.A		

F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/BA45 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA20 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA14 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA94Y 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/DA01 4C084/DA12 4C084/DA14 4C084/DA21 4C084/DA22 4C084/DA23 4C084/DA24 4C084/DB22 4C084/NA05 4C084/ZB072 4C084/ZB092 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC202 4C084/ZC412 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/HH20 4C086/AA01 4C086/BC22 4C086/CB06 4C086/DA14 4C086/DA17 4C086/DA35 4C086/EA10 4C086/EA16 4C086/EA17 4C086/GA07 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB26 4C206/AA01 4C206/FA31 4C206/MA02 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/ZC41 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA74
优先权	61/662470 2012-06-21 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明涉及抗体和抗原结合片段和含有它们的缀合物，和/或对LSR分子特异的替代支架，它们是用于免疫治疗和治疗特定癌症的合适药物。

(21) 出願番号	特願2015-517924 (P2015-517924)
(86) (22) 出願日	平成25年6月19日 (2013.6.19)
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月19日 (2015.2.19)
(86) 国際出願番号	PCT/IL2013/050527
(87) 国際公開番号	WO2013/190555
(87) 国際公開日	平成25年12月27日 (2013.12.27)
(31) 優先権主張番号	61/662,470
(32) 優先日	平成24年6月21日 (2012.6.21)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(71) 出願人 506257984
コンピュゲン エルティーディー.
イスラエル国 テルアビブ 69512, ピンチャスロゼンストリート 72
(74) 代理人 100077012
弁理士 岩谷 龍
(72) 発明者 コジョカル, ガド エス.
イスラエル国 ラマトハシャロン 47248 ハセイファン ストリート 41/7
(72) 発明者 ダッサ, リアト
イスラエル国 ヤフド 56478 メナヘム ベギン ストリート 3

最終頁に続く