

(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2006-522122

(P2006-522122A)

(43) 公表日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40 ZNA	4B024
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4B064
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C084
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 L	4C085
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 39/395 C	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-509211 (P2006-509211)	(71) 出願人	505334710 インネクス バイオテクノロジー イン コーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		カナダ国 ヴィ6シー 3ジー2 バンク ーバー、ピー、シー、 バラード スト リート 1400 - 400
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月31日 (2005.10.31)	(71) 出願人	505334112 イムフェロン インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/006911		アメリカ合衆国 40509 ケンタッキ ー、レキシントン、アテネ - プーン ズボロ ロード 5235
(87) 国際公開番号	W02004/078146	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(31) 優先権主張番号	60/451,980		
(32) 優先日	平成15年3月5日 (2003.3.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜貫通抗体誘導型のアポトーシス阻害

(57) 【要約】

細胞の自殺（アポトーシス）は病因と関係があり、例えばそれは、アルツハイマー病におけるニューロンの消失の主な原因である。カスパーゼ - 3 は、アポトーシスの経路と非常に関係がある。生細胞のアポトーシスを阻害するための努力において、超抗体（SAT） - 膜貫通技術を使用して、カスパーゼ酵素に対する抗体が生成されてきている。アポトーシス阻害剤として膜貫通抗体を使用する利点は、細胞中でのそれらの特異的な標的認識、及び従来のアポトーシス阻害剤と比較したそれらの低い毒性である。MTS 輸送ペプチド改変型モノクローナル抗カスパーゼ - 3 抗体は、生細胞のアクチノマイシン D 誘導型アポトーシス及びスペクトリンの切断を減らすことが示されている。これらの結果は、膜輸送ペプチドと結合した抗体が、さまざまな疾患においてアポトーシスを阻害する治療的可能性を有することを示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

正常細胞又は感染細胞の機能を調節するのに有効な化合物であって、膜輸送ペプチドと結合した抗体又はその断片を含み、前記抗体又はその断片が、(a)カスパーゼ、キナーゼ、及びホスファターゼからなる群から選択される細胞内のシグナルタンパク質、(b)未成熟ウイルスタンパク質、(c)細胞表面抗原又は細胞内腫瘍抗原、(d)DNA合成及び遺伝子発現の調節に關与する核タンパク質又は核小体タンパク質、又は(e)細胞増殖又は細胞分裂停止に關与する細胞骨格タンパク質に免疫特異的である化合物。

【請求項 2】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 3】

アポトーシスを阻害するのに有効であり、膜輸送ペプチドと結合した抗カスパーゼ抗体又はその断片を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

前記抗体が抗カスパーゼ - 3 抗体である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

前記膜輸送ペプチドが転座配列(MTS)ペプチドである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記 MTS ペプチドがカポジ肉腫の線維芽細胞成長因子、HIV-1 の TAT ペプチド、アンテナペディアホメオドメイン由来のペプチド、ヘルペスウイルスタンパク質 VP2 2、又は輸送ペプチドに内在する、請求項 5 に記載の化合物。

20

【請求項 7】

前記 MTS ペプチドがアミノ酸残基配列 AAVLLPVLLAAP (配列番号 9) を含む、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記 MTS ペプチドがアミノ酸残基配列 KGE GA AVLLPVLLAAPG (配列番号 8) を含む、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記膜輸送ペプチドが、アミノ酸残基配列：KGE GA AVLLPVLLAAPG (配列番号 8) を含む第二のペプチドと比べて低い疎水性を有し、前記膜輸送ペプチドが、前記第二のペプチドと比べて大きな内在化の増強と免疫結合力を与える、請求項 1 に記載の化合物。

30

【請求項 10】

ヒトでのアポトーシスを阻害するのに有効である医薬組成物であって、膜輸送ペプチドと結合した抗カスパーゼ抗体又はその断片を含む医薬組成物。

【請求項 11】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗体が抗カスパーゼ - 3 抗体である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記膜輸送ペプチドが膜の転座配列(MTS)ペプチドである、請求項 10 に記載の組成物。

40

【請求項 14】

前記 MTS ペプチドがアミノ酸残基配列 AAVLLPVLLAAP (配列番号 9) を含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 MTS ペプチドがアミノ酸残基配列 KGE GA AVLLPVLLAAPG (配列番号 8) を含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

ヒトの疾患を治療又は予防する方法であって、膜輸送ペプチドと結合した抗カスパーゼ

50

抗体又はその断片を含む組成物の薬理的に有効な量を、必要とする患者に投与することを含む方法。

【請求項 17】

前記疾患がアルツハイマー病、ハンチントン病、又はパーキンソン病である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

二次抗体と結合した膜輸送ペプチド又はその断片を含む、免疫複合体。

【請求項 19】

前記二次抗体がポリクローナル又はモノクローナル免疫グロブリンである、請求項 18 に記載の免疫複合体。

【請求項 20】

前記膜輸送ペプチド又はその断片が M T S 配列である、請求項 18 に記載の免疫複合体。

【請求項 21】

前記膜輸送ペプチド又はその断片が、前記二次抗体のトリプトファン残基又はヌクレオチド結合部位と共有結合している、請求項 18 に記載の免疫複合体。

【請求項 22】

前記二次抗体が、前記抗体のスルフヒドリル、アミノ酸又は炭水化物基を介して阻害物質と共有結合している、請求項 18 に記載の免疫複合体。

【請求項 23】

ヒトの疾患を治療又は予防する方法であって、
細胞表面の標的に免疫特異的である一次抗体を必要とする患者に事前投与すること、
前記一次抗体の前記標的への結合及び正常組織からの除去に十分な時間を与えること、
及び
膜輸送ペプチド又はその断片と共有結合した二次抗体であって前記一次抗体に免疫特異的である該二次抗体を投与することを含む方法。

【請求項 24】

前記一次抗体が毒素、薬剤又は放射性同位体と結合している、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記毒素が (a) リシン、アブリン、ジフテリア及びシュードモナス (P s e u d o m o n a s) 外毒素からなる群から選択されるホロタンパク質毒素、(b) 完全タンパク質毒素サブユニット、又は (b) リシン A 鎖、アブリン A 鎖、ジフテリア毒素 A 鎖、シュードモナス (P s e u d o m o n a s) 外毒素 A 及びゲロニンからなる群から選択される天然の A 鎖毒素サブユニットである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記薬剤が、ヒトの疾患を治療するのに適した化学療法剤、又は高い効力を有するがヒトにおける使用に関して許容できないほど高い毒性を有している化学療法剤である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記放射性同位体が、キレート化合物を介して抗体と結合している、又はオージェ放射性同位体である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記二次抗体が、光活性化によって前記膜輸送ペプチド又はその断片と共有結合している、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記二次抗体が毒素、薬剤又は放射性同位体と結合している、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

前記毒素が (a) リシン、アブリン、ジフテリア及びシュードモナス (P s e u d o m

10

20

30

40

50

o n a s) 外毒素からなる群から選択されるホロタンパク質毒素、(b) 完全タンパク質毒素サブユニット、又は(b) リシン A 鎖、アブリン A 鎖、ジフテリア毒素 A 鎖、シュードモナス(P s e u d o m o n a s) 外毒素 A 及びゲロニンからなる群から選択される天然に存在する A 鎖毒素サブユニットである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記薬剤が、ヒトの疾患を治療するのに適した化学療法剤、又は高い効力を有するがヒトにおける使用に関して許容できないほど高い毒性を有している化学療法剤である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記放射性同位体が、キレート化合物を介して抗体と結合している、又はオージェ放射性同位体である、請求項 29 に記載の方法。 10

【請求項 33】

前記二次抗体が、前記抗体のスルフヒドリル、アミノ酸又は炭水化物基を介して阻害物質と共有結合している、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記患者が癌、H I V 又は他のウイルスベクター、又は細菌物質に罹患している、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 35】

i n - v i t r o のスクリーニングアッセイであって、

細胞受容体又は細胞内標的に免疫特異的である一次抗体と複数の細胞を接触させるステップであって、前記一次抗体が膜輸送ペプチド又はその断片と結合しているステップ、及び 20

前記一次抗体の内在化による細胞活性のアンタゴニズム又はアゴニズムの可能性を評価するステップを含むアッセイ。

【請求項 36】

i n - v i t r o のスクリーニングアッセイであって、

細胞受容体又は細胞内標的に免疫特異的である一次抗体と複数の細胞を接触させるステップ、

膜輸送ペプチド又はその断片と結合した二次抗体を前記一次抗体と混合させるステップであって、前記二次抗体が前記一次抗体に免疫特異的であるステップ、及び 30

前記一次抗体の内在化による細胞活性のアンタゴニズム又はアゴニズムの可能性を評価するステップを含むアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は米国出願 N o . X の一部継続出願であり、これは 2002 年 5 月 29 日に出願された国内段階の国際出願 P C T / U S 0 2 / 1 6 6 5 1 号であり、これは 2001 年 5 月 29 日に出願された米国特許出願第 09 / 865, 281 号の一部継続出願であり、これは 1998 年 5 月 4 日に出願された米国特許出願第 09 / 070, 907 号の一部継続出願、現在米国特許第 6, 238, 667 号である。本出願は、2003 年 3 月 5 日に出願された米国仮出願第 60 / 451, 980 号の特典も主張する。前述の特許及び特許出願のそれぞれの開示は、参照として本明細書に組み込まれる。 40

【0002】

本発明は完全な生物学的活性ペプチド及び抗体、又はそれらの断片を含む融合タンパク質に関する。具体的には、本発明の融合タンパク質は、抗体の分子認識と免疫賦活活性、膜輸送活性、及び同種親和活性などの生物学的活性を兼ね備えている。本発明はさらに、抗体の結合性を有し、生物学的活性があるペプチドの立体配座の柔軟性を制約しその生物学的標的に関する親和性を増大させるための、ループ形成配列又は他の立体配座を与える配列の側面に位置する生物学的活性があるペプチド配列を含む、融合タンパク質に関する 50

。本発明は、プログラムされた細胞死、即ちアポトーシスの阻害における、抗体及びその結合体の使用にも関する。

【背景技術】

【0003】

抗体は疾患と闘うための「特効薬」として称賛されている。しかしながら、抗体に関してなされた期待が、決して完全に実現されているわけではない。これは部分的には、抗体は免疫防御のわずか一部分であり、T細胞が免疫防御において他の戦略を与えるという事実によるものである。しかしながら、抗体は理想的な標的及び送達デバイスである。抗体は血液中での長期の生存に適合しており、血管及び組織浸透を助ける部位を有し、先天性免疫の幾つかの防御機構と機能的に関連がある。1つのこのような機構は補体系であり、これは病原体の破壊を手助けし、免疫応答の調節と関係がある。例えば補体断片C3dは、エプスタイン-バーウイルス用の結合部位でもある、B細胞上のCR2受容体と結合する。エプスタイン-バーウイルスとCR2が結合することによって、B細胞が活性化される。蓄積された証拠によって、CR2受容体(CD19/CD20/CD81複合体)は免疫賦活的役割を有し、C3dによって活性化されることが示されている。

10

【0004】

多くの治療用途に、モノクローナル抗体が開発されてきている。例えば、モノクローナル抗体によって現在標的化されている疾患には、心臓病、癌、神経異常及び自己免疫性疾患がある。ほぼ全てのこれらの現在の治療用途は、特定のモノクローナル抗体、薬剤HERCEPTIN及びRITUXANなどの固有の治療有効性に頼るものである。大部分のモノクローナル抗体はこのような固有の治療活性を示さないので、タンパク質毒素又はそのサブユニットなどのさまざまな異なる毒性物質、癌の化学療法治療において現在使用されている薬剤、許容できないほど高い毒性のために臨床開発が進まなかった薬剤、又は放射性同位体を結合することによって、治療特性を加えることに開発は焦点を置いている。

20

【0005】

このような結合体を有効にするために、このような毒性物質を送達するモノクローナル抗体は、その標的抗原と結合し、細胞中に内在化して毒性物質を内部に運ぶことができなければならない。内部では毒性物質は、標的細胞のDNAの損傷或いはタンパク質合成又は他の代謝機能の阻害において有効である可能性がある。本来このような性質、非常に強力な免疫複合体を生み出す性質を示す抗体はわずかしかない。このように、スクリーニングアッセイが開発されてこのような抗体が試験されているが、この性質と適切な標的特異性を兼ね備える抗体はわずかしか同定されていない。

30

【0006】

抗体中への内在化能力を浸透させるための、他の手法が存在している。活性サブユニットと細胞結合サブユニットを兼ね備える完全なタンパク質毒素は、抗体との結合時に内在化を増大させるのに有効であるが、抗体の選択性を低下させ、それによって潜在的な毒性をもたらすことが多い。親油性薬剤も内在化の増大及び結合形での細胞内送達のために使用されてきているが、毒素と同様に結合体の選択性を低下させる。他の方法が透過性を上昇させるために使用されてきており、或いはマイクロインジェクションによって細胞中へのより良い進入が可能となる。これらの方法はいずれも重大な欠点を有する。例えばサポニン、細菌毒素、リン酸カルシウム、エレクトロポレーションなどによる細胞の透過性の上昇は、*ex vivo*の方法用にもみ実際に使用することができ、これらの方法は細胞に対する障害を引き起こす。マイクロインジェクションは非常に熟練した技術者を必要とし(したがってその使用は研究室での設定に限られる)、マイクロインジェクションは細胞に物理的に障害を与え、限られた適用のみを有する。何故なら、マイクロインジェクションを使用して例えば細胞の塊又は完全な組織を治療することはできず、多数の細胞を実際に注射することはできないからである。

40

【0007】

抗体を使用して免疫応答を増大させることができる方法の他の例は、Zanetti及びBonaの研究(Zanetti, M., Nature, 355: 466~477, 1

50

992; Zaghouni H.; Anderson S. A., Sperbeer K. E., Daian C. Kennedy R. C., Mayer L. 及び Bona C. A., Proc. Nat. Acad. Science USA, 92: 631~635, 1995) によって実証されている。これらの筆者は、分子生物学の方法を使用して、Ig重鎖のCDR3配列をT細胞及びB細胞抗原(エピトープ)に似た配列に置き換え、これらの改変型抗体が挿入されたものに特異的な強い免疫応答を誘導することを示している。

【0008】

抗体の生物学的性質は、抗原の全体的なアビディティ、並びに細胞膜及び核膜を浸透する能力を高めることができる。ペンタマーIgM抗体中でのように抗体の結合価を増大させることによって、抗原の結合を高める。結合価及びアビディティは、自己結合性又は同型である幾つかの抗体においても増大する(Kang, C. Y., Cheng, H. L., Rudikoff, S. 及び Kohler, H., J. Exp. Med. 165: 1332, 1987; Xiyun, A. N., Evans, S. V., Kaminski, M. J., Fillies, S. F. D., Resifield, R. A., Noughton, A. N. 及び Chapman, P. B., J. Immunol. 157: 1582~1588, 1996)。自己結合を阻害した、重鎖可変領域中のペプチドが同定された(Kang, C. Y., Brunck, T. K., Kieber-Emmons, T., Blalock, J. E. 及び Kohler, H., Science, 240: 1034~1036, 1988)。自己結合性ペプチド配列を抗体中に挿入することによって自己結合の性質を与え、抗原に関する結合価及び全体的なアビディティを増大させる。

【0009】

同様に、Rojas他、Nature Biotechnology, 16: 370~375 (1998) によって実証されたように、シグナルペプチドを抗体に加えることによって膜輸送が容易になる。Rojas他は12量体ペプチドを含む融合タンパク質を製作しており、このタンパク質が細胞膜浸透性を有することを示している。

【0010】

共通の疎水性モチーフを表すシグナルペプチド配列は、推定上のタンパク質チャンネルを介した哺乳動物小胞体(ER)及び原核生物原形質膜を通過する、大部分の細胞内分泌タンパク質の移動を仲介する。主要なモデルは、幾つかの膜タンパク質によって形成される親水性タンパク質チャンネルを介して膜を越えて、タンパク質が輸送されることを示す。真核生物では、細胞質中で新たに合成されるタンパク質は、シグナル認識粒子(SRP)及びそのER膜受容体により一般に認識されるシグナル配列によってER膜に向けられる。この標的化ステップに、ER膜を通過する、及び推定上のタンパク質チャンネルを介した細胞からのタンパク質の実際の移動が続く。シグナルペプチドは脂質と強く相互作用することもでき、細胞膜を通過する幾つかの分泌タンパク質の輸送は、タンパク質チャンネルの不在下で、脂質二重層を介して直接起こる可能性があるという提案が支持される。このようなシグナルペプチドを使用して、抗体又は他の生物学的活性がある分子の細胞への内在化を増大させることができ、これらは幾つかの特許(米国特許第5,807,746号、第6,043,339号及び第6,238,667号)の主題である。

【0011】

毒素、薬剤及びサイトカインなどの幾つかの生物学的活性がある分子用の送達デバイスとして、抗体が使用されてきている。より優れた組織浸透性及び低い「粘性」のために、しばしば抗体の断片、Fab又はscFvが好ましい。

【0012】

ペプチドなどの分子と抗体分子を結合させるために、2つの実際的な方法が存在する。1つの方法は化学的架橋を使用することであり、米国特許第09/070,907号中に記載された親和性架橋法などである。他の方法は、抗体及びペプチドをコードするDNAを含む融合遺伝子を設計すること、並びにその融合遺伝子を発現させることであり、この方法は本出願の主題である。

【0013】

抗体融合タンパク質は典型的には、大きなタンパク質の遺伝子全体又はそのようなタンパク質の生物学的機能を与えるドメインを用いて工学処理される。以前の小さなペプチド-抗体融合タンパク質は典型的には、抗体の精製又は特徴付けを容易にする目的で主に作製されていた。

【0014】

融合タンパク質を作製する方法は、例えば以下の米国特許中に記載されており、これらの関連する開示は参照として本明細書に組み込まれる：Mascarenhas他への米国特許第5,563,046号；Fell, Jr.への米国特許第5,645,835号；Murphyへの米国特許第5,668,225号；Nemazeeへの米国特許第5,698,679号；Whitlow他への米国特許第5,763,733号；Quartermous他への米国特許第5,811,265号；Chang他への米国特許第5,908,626号；Bona他への米国特許第5,969,109号；Epstein他への米国特許第6,008,319号；Seedへの米国特許第6,117,656号；Whitlow他への米国特許第6,121,424号；Ledbetter他への米国特許第6,132,992号；Houston他への米国特許第6,207,804号；及びSegalへの米国特許第6,224,870号。Ig融合タンパク質を作製する方法は、例えば「抗体の工学処理 (Antibody Engineering)」、第2版：Carl A. K. Borrebaeck、Oxford University Press、1995)中、及び「分子クローニング (Molecular Cloning)：研究室マニュアル (A Laboratory Manual)、第2版、Cold Spring Harbor Press、1989中に記載されており、これらの関連する開示は参照として本明細書に組み込まれる。

【0015】

サイトカインなどのタンパク質、毒素、酵素などの活性ドメインを主に含んでいる免疫グロブリンとの融合タンパク質、CDR (相補性決定領域)を含む免疫グロブリンの標的ドメイン、並びに抗原結合とは直接関与しないが二次的な相互作用によって高い結合親和性を与えることができる他の可変領域及びドメインとの融合タンパク質を含めた融合タンパク質は、例えば参照として本明細書に組み込まれている以下の刊行物中に記載されている：

Guo L；Wang J；Qian S；Yan X；Chen R；Meng G、「タンパク質分解に耐性がある単鎖Fv-アスパラギナーゼ融合タンパク質の構築及び構造モデル化 (Construction and structural modeling of a single-chain Fv-asparaginase fusion protein resistant to proteolysis)」Biotechnol. Bioeng.、2000年11月20日；70(4)：456-63；

Muller BH；Chevrier D；Boulain JC；Guesdon JL「分子ハイブリダイゼーションの1ステップの免疫検出法用の組換え単鎖Fv抗体断片-アルカリホスファターゼ結合体 (Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization)」J. Immunol Methods 1999年7月30日；227(1-2)：177-85；

Griep RA；van Twisk C；Kerschbaumer RJ；Harper K；Torrance L；Himmeler G；van der Wolf JM；Schots「pSKAP/S：単鎖Fvアルカリホスファターゼ融合タンパク質の生成用の発現ベクター (pSKAP/S：An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins)」Pr

10

20

30

40

50

otein Expr. Purif. 1999年6月16日(1):63~9;

Vallera DA; Panoskaltsis-Mortari A; 1C; Ramakrishnan S; Eide CR; Kreitman RJ; Nicholls PJ; Pennell C; Blazar BR「DT390抗CD3sFv、T細胞受容体のCD3部分を特異的に標的化する単鎖Fv融合免疫毒素の抗移植片対宿主疾患に対する影響(Anti-graft-versus-host disease effect of DT390-anti-CD3sFv, a single-chain Fv fusion immunotoxin specifically targeting the CD3 epsilon moiety of the T-cell receptor)」Blood 1996年9月15日; 88(6):2342~53; 10

Gupta S; Eastman J; Silski C; Ferkol T; Davis PB「単鎖Fv:受容体仲介の遺伝子送達におけるリガンド(Single chain Fv: a ligand in receptor-mediated gene delivery)」Gene Ther 2001年4月; 8(8):586~92; 及び

Goel A; Colcher D; Koo JS; Booth BJ; Pavlinkova G; Batra「ヘキサヒスチジンタグの相対的な位置は、腫瘍関連単鎖Fv構築体の結合性に影響を与える。(Relative position of the hexahistidine tag affects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct.)」Biochim Biophys Acta 2000年9月1日; 1523(1):13~20. 20

【0016】

生物学的活性を有するように設計された融合タンパク質は、完全な生物学的活性があるタンパク質由来の鎖状ペプチド配列を使用して構築することができる。しかしながら、このようなペプチドは典型的には、完全なタンパク質より低い親和性を有する。ペプチドの融合タンパク質中への取り込みは、完全な機能性タンパク質の取り込みほど厄介ではないので、完全長タンパク質と同等に優れた結合親和性を有するペプチドを含む融合タンパク質が必要とされている。 30

【0017】

本発明は、アポトーシスの阻害における抗体及びその断片の使用にも関する。細胞の自殺(アポトーシス)は、細胞分化、器官発生及び損傷細胞の除去中に、生きている生物によって有益に使用される機構である。しかしながらアポトーシスは、ある形態の病原形成と関係がある可能性もある。例えばアポトーシスは、アルツハイマー病におけるニューロンの消失及び心筋梗塞中の組織の消失の主な原因である。さらに、HIV-1感染した個体由来のTリンパ球は、同じ条件下で培養した非感染T細胞と比較して、刺激の不在下で自発的アポトーシスを経る。CD4+及びCD8+細胞の「自発的アポトーシス」は、HIV-1関連、抗イディオタイプ抗体のin-vitro添加によって加速されることが示されてきている。 40

【0018】

カスパーゼ酵素、例えばカスパーゼ-3は、アポトーシスの経路と非常に関係がある。アポトーシスを阻害するための試みにおいて、カスパーゼ作用を阻害するための幾つかの物質及び方法が提案されてきている。例えば、米国特許第6,566,338号(Weber他)は、化学療法及び放射線療法中に非癌細胞死を治療、改善、及び予防するため、並びに癌の化学療法及び放射線療法の副作用を治療及び改善するために、カスパーゼ阻害剤を一般的に使用することを提案している。米国特許第6,596,693号(Kean他)は、幾つかのジペプチドがアポトーシスの強力な阻害剤である可能性があることを報告している。米国特許第6,689,784号(Bebbington他)及び第6,620,782号(Cai他)は、アポトーシスの阻害剤として、あるクラスのカルバメ 50

ート及び置換 2 - アミノベンズアミドをそれぞれ提案している。さらに、米国特許第 6 , 4 2 6 , 4 1 3 号 (W a n n a m a k e r 他) は、インターロイキン - 1 - 転換酵素阻害剤と呼ばれるクラスのカスパーゼ阻害剤の代表的な提案である。さらに、米国特許第 6 , 2 2 8 , 6 0 3 号 (R e e d 他) は、アポトーシスの阻害剤とカスパーゼ - 3 又はカスパーゼ - 7 などのカスパーゼの特異的結合を変える物質を同定するための、スクリーニングアッセイを提案している。

【 0 0 1 9 】

カスパーゼ酵素を阻害するためのさらに他の新規な手法は、いわゆる「超抗体技術 (S A T) 」の使用に関する。例えば、「生物学的活性があるペプチドと抗体の融合タンパク質 (F u s i o n P r o t e i n s o f B i o l o g i c a l l y A c t i v e P e p t i d e s a n d A n t i b o d i e s) 」という表題の、国際公開第 0 2 / 0 9 7 0 4 1 号を参照のこと (I m m p h e r o n , I n c . 及び I n n e x u s C o r p o r a t i o n に同時譲渡) 。 S A T の 1 つの提案されている適用例は、カスパーゼ酵素に対する抗体を使用して、生細胞のアポトーシスを阻害することである。例えば、本発明の一態様は、アポトーシスと関与する酵素に免疫特異的な抗体又は抗体断片の細胞内送達を企図するものである。アポトーシス阻害剤としての膜貫通抗体の幾つかの予想される利点は、細胞中でのそれらの特異的な標的認識、及び従来のアポトーシス阻害剤と比較したそれらの低い毒性である。

10

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

20

【 0 0 2 0 】

本発明の目的は、治療的効果のためにこのような膜浸透性抗体を提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 1 】

本発明は、ペプチドドメインの生物学的活性が免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される、抗体ドメイン及びペプチドドメインを含む融合タンパク質を提供する。取り込まれるペプチドが抗体の抗原認識を低下させないように、ペプチドは抗体上の部位と共有結合している。本発明では、このことは、抗体をコードする核酸配列及びペプチドをコードする核酸配列を含む融合遺伝子を作製するステップであって、ペプチドをコードする核酸配列が抗体をコードする核酸配列内の、融合が発現されると、その結果作製された融合タンパク質は抗体及びペプチドを含み、ペプチドが抗体の抗原結合を害さない部位において抗体と結合する部位に位置するステップ、及び融合遺伝子が発現させて融合タンパク質を作製するステップを含む方法によって実施する。詳細には、融合タンパク質は、抗体をコードする遺伝子を提供するステップであって、遺伝子は突然変異して制限部位を含んでおり、制限部位は抗体の抗原結合部位をコードする遺伝子のいかなる部分からも離れて位置しているステップと、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有するペプチドをコードする D N A 配列を、抗体をコードする遺伝子の制限部位に挿入して融合遺伝子を作製するステップであって、ペプチドをコードする D N A 配列を、それが抗体をコードする遺伝子とインフレームになるように挿入するステップと、及び融合遺伝子が発現させて融合タンパク質を作製するステップによって作製することができる。

30

40

【 0 0 2 2 】

ペプチドの生物学的活性を増大させるために、ループ形成配列又は立体配座を与える配列の側面にペプチドを置くことができる。

【 0 0 2 3 】

本発明は、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有するペプチドと抗体の融合タンパク質を含む、組成物及び医薬組成物も提供する。

【 0 0 2 4 】

生物学的活性があるペプチドと抗体の融合タンパク質を作製する本発明は、自己結合を含み、リンパ球を刺激し、生物膜を通過する輸送を可能にするペプチドを含む。

50

【0025】

本発明の他の態様は、正常細胞又は感染細胞中の細胞機能を調節するための新規な化合物及び方法に関するものである。特に、このような化合物及び方法は、膜輸送ペプチドと結合した抗体又はその抗体断片の使用を伴う。抗体又はその断片は、好ましくは(a)カスパーゼ、キナーゼ、及びホスファターゼなどの細胞内のシグナルタンパク質、(b)細胞内で構築される前の未成熟ウイルスタンパク質、(c)細胞表面抗原又は細胞内腫瘍抗原、(d)DNA合成及び遺伝子発現の調節に関与する核タンパク質又は核小体タンパク質、又は(e)細胞増殖又は細胞分裂停止に関与する細胞骨格タンパク質などのタンパク質標的に免疫特異的である、すなわち抗体又はその断片は、これらを認識し高い親和性で特異的に結合する。ポリクローナル又はモノクローナル抗体を使用することができる。

10

【0026】

本発明の好ましい態様では、前述の化合物はアポトーシスを阻害するのに有効であり、膜輸送ペプチドと結合した抗カスパーゼ抗体又はその断片を含む。特に好ましい抗体は抗カスパーゼ-3抗体である。

【0027】

本発明の第二の好ましい態様では、前述の膜輸送ペプチドは転座配列(MTS)ペプチド、例えばカボジ肉腫の線維芽細胞成長因子、HIV-1のTATペプチド、アンテナペディアホメオドメイン由来ペプチド、ヘルペスウイルスタンパク質VP22、又は輸送ペプチドに内在するペプチドなどである。特に好ましいMTSペプチドは、アミノ酸残基配列AAVLLPVLAAAP(配列番号9)、ペプチド配列KGEGA AVL LPVLL 20
AAPG(配列番号8)などを含む。

20

【0028】

ヒト細胞中のアポトーシスを阻害するのに有効である医薬組成物であって、したがってヒト疾患を治療するのに有効であるとして示され、膜輸送ペプチド、例えばMTSペプチドと結合した抗カスパーゼ抗体又はその断片を含む医薬組成物も企図される。本発明の抗体-ペプチド結合体は、抗体又は抗体断片の細胞中への内在化を引き起こすことができる。

【0029】

本発明の他の態様では、疾患を治療又は予防する方法は、膜輸送ペプチド又はその断片と結合した抗カスパーゼ抗体又はその断片を含む医薬組成物を薬理的に有効な量、必要とする患者に投与することを含む。詳細に示すのは、化学的に誘導されるアポトーシスを減らす、膜輸送ペプチドと結合した改変型抗カスパーゼ抗体である。これらの結果は、このような抗体は、アルツハイマー病、ハンチントン病、又はパーキンソン病などのさまざまな疾患においてアポトーシスを阻害するための治療的可能性を有することを示唆している。

30

【0030】

本発明の前述の目的及び他の目的は、本発明の好ましい実施形態のみを示し記載する以下の詳細な説明及び図面から、当業者には容易に明らかとなるであろう。容易に理解されるように、本発明は、本発明の精神及び範囲から逸脱せずに、関連分野の技術内で変更形態が可能である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

本発明は、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有するペプチドと抗体の融合タンパク質を作製する方法を記載する。

【0032】

特に本発明は、取り込まれたペプチドが抗体の抗原認識を害さないように、ペプチドが抗体中の部位に位置する、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有するペプチドと抗体を含む融合タンパク質を提供する。本発明では、このことを、抗体をコードする核酸配列及びペプチドをコードする核酸配列を含む融合遺伝子を作製するステップであって、ペプチドをコードする核酸配列が抗体をコードする核酸

50

配列内の、融合が発現すると、その結果作製された融合タンパク質は抗体及びペプチドを含み、ペプチドが抗体の抗原結合を害さない部位において抗体と結合する部位に位置するステップ、及び融合遺伝子が発現させて融合タンパク質を作製するステップを含む方法によって実施する。詳細には、融合タンパク質は、抗体をコードする遺伝子を提供するステップであって、遺伝子は突然変異して制限部位を含んでおり、制限部位は抗体の抗原結合部位をコードする遺伝子のいかなる部分からも離れて位置しているステップと、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有するペプチドをコードするDNA配列を、抗体をコードする遺伝子の制限部位に挿入して融合遺伝子を作製するステップであって、ペプチドをコードするDNA配列を、それが抗体をコードする遺伝子とインフレームになるように挿入するステップ、及び融合遺伝子が発現させて融合タンパク質を作製するステップによって作製することができる。

10

【0033】

本発明の他の実施形態では、生物学的活性を有するペプチドは、抗体のC末端と結合することができる。本発明の他の実施形態では、ペプチドの生物学的活性を増大させるために、ループ形成配列又は立体配座を与える配列の側面にペプチドを置くことができる。

【0034】

本明細書で使用する、用語「標的部分」は、抗原結合部位を含む任意の天然又は合成タンパク質分子を指す。この用語は、完全長免疫グロブリン分子又は任意の機能的断片、完全長免疫グロブリン分子の変域ドメイン断片など、CDR領域、ScFv、Fab、F(ab)₂、或いは改変抗体擬似体又は単鎖ドメイン結合部分を含む。個々の標的部分は、膜構造上の細胞受容体などの所望の標的、例えばタンパク質、糖タンパク質、多糖又は炭水化物に従い選択する。標的部分を選択して、正常細胞又は腫瘍細胞上の細胞受容体と結合させることができる。

20

【0035】

同様に、生物学的活性を有するペプチドは、融合タンパク質の所望の機能に従い、或いは言い換えれば、標的部分が正常細胞又は腫瘍細胞などの標的に結合した後の所望の結果に従い選択する。望ましい可能性があると考えられる生物学的活性には、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性がある。

【0036】

ループ形成配列又は立体配座を制約する配列は、生物学的活性を有するペプチドのいずれかの側に置くとペプチドの立体配座の柔軟性を抑制する任意のアミノ酸配列であってよい。例には、架橋してループを形成することができる、システイン対などのアミノ酸残基を含む配列がある。立体配座を制約するタンパク質の具体例はチオレドキシシンである。立体配座を制約する部分又はループ形成部分の例は、例えば以下の米国特許：Brentへの米国特許第6,242,163号及び第6,004,746号、米国特許第6,258,550号；第6,147,189号；第6,111,069号；第6,100,044号；第6,084,066号；第5,952,465号；第5,948,887号；及びBrent他への第5,928,896号、Dove他への米国特許第6,200,759号及び第5,925,523号中、及び以下の刊行物中に見ることができる：

30

Fairlie DP; West ML; Wong AK 「タンパク質表面に対する擬似体 (Towards protein surface mimetics)」 Cur Med Chem 1998年2月；5(1)：29～62；

40

Valero ML; Camarero JA; Haack T; Mateu MG; Domingo E; Giralto E; Andreu D 「ウイルス抗原部位の原型に似た環状ペプチドモデル：剛性と柔軟性の間のバランスの発見 (Native-like cyclic peptide models of a viral antigenic site: finding a balance between rigidity and flexibility)」 J Mol Recognit 2000年1～2月；13(1)：5～13；

Gururaja TL; Narasimhamurthy S; Payan DG；

50

「ペプチドの非共有制約用の新規な人造のループ状足場構造 (A novel artificial loop scaffold for the noncovalent constraint of peptides)」Chem Biol. 2000年7月; 7(7): 515~27;

Venkatesh N; Shim SH; Balass M; Fuchs S; Katchalski-Katzir E 「ファージライブラリー由来の環状ペプチドによる、受動的に伝播する実験的自己免疫性重症筋無力症の予防 (Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by a phage library-derived cyclic peptide)」Proc Natl Acad Sci USA 2000年1月18日; 97(2): 761~6; 10

Stott K; Blackburn JM; Butler PJ; Perutz M 「グルタミン反復配列の取り込みによってタンパク質はオリゴマー化する: 神経変性疾患との関係 (Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases)」Proc Natl Acad Sci USA 1995年7月3日;

前述の刊行物はいずれも、参照として本明細書に組み込まれる。

【0037】

立体配座を制約する配列は、ヘリックス又はプリーツシートを形成する配列も含むことができる。例えば、参照として本明細書に組み込まれる以下の刊行物を参照のこと: 20

Lee KH; Benson DR; Kuczera K 「合成ペプチドの分子の動的シミュレーションにおいて観察された、ヘリックスから π ヘリックスへの変化 (Transitions from alpha to pi helix observed in molecular dynamics simulations of synthetic peptides)」Biochemistry 2000年11月14日; 39(45): 13737~47;

Dettin M; Roncon R; Simonetti M; Torinene S; Falcigno L; Paolillo L; Di Bello C 「HIV-1感染性を特異的に増大させるgp120由来合成ペプチドの合成、特徴付け及び立体配座の分析 (Synthesis, characterization and conformational analysis of gp120-derived synthetic peptides that specifically enhance HIV-1 infectivity.)」J Pept, Sci 1997年1~2月; 3(1): 15~30; 30

Chavali GB; Nagpal S; Majumdar SS; Singh O; Salunke DM 「GnRH結合ペプチド中のヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフは、プロラクチン分泌の負の調節に重要である (Helix-loop-helix motif in GnRH associated peptide is critical for negative regulation of prolactin secretion)」J Mol Biol. 1997年10月10日; 272(5): 731~40; 及び 40

Miceli R; Myszka D; Mao LI; Sathé G; Chaikien I 「示される足場としてのコイルドコイルステムループ状ミニタンパク質 (The coiled coil stem loop miniprotein as a representation scaffold)」Drug Des Discov.、1996年4月; 13(3~4): 95~105。

【0038】

Ig融合タンパク質の発現。Ig融合タンパク質は、特異性及び/又は抗体エフェクター機能を組み合わせた抗体と独特の性質に貢献する分子の接合という利点を有する。この 50

タンパク質ファミリーを生成する能力は、c-mycを抗体分子のFcに置換したときに最初に実証されたが(Neuberger M S、Williams G T及びFox R O、Nature、125:604、1984)、多くの例が現在存在している。Ab融合タンパク質は、幾つかの異なる方法で得ることができる。1つの手法では、非Ig配列を可変領域に置換し; V領域が置換された分子によって、エフェクター機能などの性質に貢献する抗体を標的化する特異性、及び改善された薬物動態が与えられる。例にはIL-2及びCD4がある。或いは非Ig配列を定常領域に置換するか、或いはこれと結合させることができる。生成する分子は本来の抗体の結合特異性を保持しているが、結合するタンパク質から特性を得る。置換の位置に応じて、異なる抗体関連のエフェクター機能及び生物学的性質が保持されるであろう。例えば、「抗体の工学処理(Antibody Engineering)」、第2版: Carl A. K. Borrebaeck、Oxford University Press、1995)を参照のこと。

【0039】

IgG融合タンパク質を構築するためのベクター。一連のベクターが現在生成されており、これによって抗体分子内での異なる位置でのタンパク質の融合が可能であり、したがって異なる性質を有する融合タンパク質の構築が容易になる。これらのベクターを使用して、分子量、価電子が異なり、異なるサブセットの抗体分子の機能性を有する分子との融合タンパク質ファミリーを生成することができる。

【0040】

融合遺伝子の構築を容易にする方法の具体例として、部位特異的突然変異導入法を使用して、ヒトIgG3重鎖遺伝子中に独特の制限酵素部位を作製した。この特定の例では、CH1エクソンの3'端、CH2エクソンの5'端のヒンジの直後、及びCH3エクソンの3'端に、制限部位を生成した。このようにして生成した制限部位は、TtgGTgをTAcGTAに置換したことによるCH1の末端のSnaBI、CAcCTGをCAgCTGに置換したことによるCH2の最初の部分のPvuII、及びAATgagをAATattに置換したことによるCH3の端のSspIであった。これらの操作によって、これらの位置に独特の平滑末端クローニング部位が与えられた。いずれの場合も、切断後にIgがコドンの最初の塩基に貢献するように、制限部位が位置していた。62アミノ酸の拡大したヒンジ領域を有するヒトIgG3を、免疫グロブリンとして使用するために選択する。存在するとき、このヒンジ領域は空間及び柔軟性を与え、これによって同時の抗原と受容体の結合を容易にするはずである。EcoRI部位もIgG3遺伝子の3'端に導入して、3'クローニング部位及びポリA付加シグナルを与えた。成長因子と共に使用するために最初は設計したが、これらの制限部位を使用して、抗体中の明確な位置に任意の新規の配列を置くことができる。さらに、これらのクローニングカセットを使用して、可変領域を容易に変えることができる。同様の技法を使用して、他の抗体遺伝子中に適切な制限部位を作製することができる。

【0041】

融合遺伝子の生成。融合タンパク質の生成中の第一ステップとして、平滑末端制限部位を所望の位置、融合させる遺伝子の5'端に導入しなければならない。正しい読み取り枠を保つために、切断後それが2塩基、コドンに貢献するように、部位が位置しなければならない。目的が完全な分子を有する融合タンパク質を作製することである場合、制限部位は通常、リーダー配列の後の位置などの、任意の翻訳後プロセシングの位置に導入する。或いは、目的がタンパク質の一部のみを使用することである場合、平滑末端部位を遺伝子の任意の位置に導入することができるが、正しい読み取り枠を保つために注意を常に払わなければならない。さらに、融合タンパク質のカルボキシル末端の翻訳後プロセシングが存在する場合、このプロセシング部位に停止コドンを導入するのが望ましいことが多い。

【0042】

融合タンパク質生成時の重大な関心は、全ての要素の生物学的活性を保つことである。抗体との融合タンパク質の生成は、抗体のドメイン構造によって容易になり、全てのク

ーニング部位は完全なドメインの直後に位置している。この形状では、免疫グロブリンの正しい折り畳みが保証されるはずである。結合タンパク質の折り畳みは、その構造及びその融合場所に依存する。構造情報が利用可能であるときはいつでも、結合タンパク質の構造の完全性を保つ位置で、融合体を生成することが望ましい。

【0043】

機能分析に十分な量のタンパク質を生成するために、培地中にタンパク質を分泌させることが望ましい。今日までに報告されている例では、構築する融合タンパク質を構築し分泌させているが、他の融合タンパク質を設計するとき、これは依然關心事である。

【0044】

重鎖又は軽鎖遺伝子的一部分として生物学的活性があるペプチドを含む、融合遺伝子を設計するための方法は、確立された抗体の工学処理プロトコル「抗体の工学処理 (Antibody Engineering)」、第2版: Carl A. K. Borrebaeck、Oxford University Press、1995、第9章、267~293ページ)を使用することができる。H又はL鎖のN末端残基又はC末端残基に、ペプチドを融合させることができる。このような融合遺伝子の発現は、典型的には哺乳動物細胞系中で行われるが、例えば細菌又は酵母菌発現系などの、他の発現系を使用することができる。

10

【0045】

本発明のペプチドは、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有する。例には免疫賦活又は免疫調節活性がある。ペプチドは例えば、サイトカインのホルモン、リガンド、又は細胞受容体の本来のリガンドに由来する結合部位であってよい。好ましい実施形態では、ペプチドはC3d領域1217~1232に由来し、約10~約16量体の範囲である。他の実施形態ではペプチドは、C3d領域1217~1232に由来する16量体ペプチドである。

20

【0046】

ペプチドは、完全長免疫グロブリン分子又は抗体の可変ドメイン断片である抗体と、結合することができる。本明細書で使用する、用語「抗体」は、抗原結合部位を含む重鎖又は軽鎖免疫グロブリン分子、或いはその任意の機能的組合せ又は断片を一般的に指す。抗体は、タンパク質、糖タンパク質、多糖又は炭水化物などの膜構造体上、及び正常細胞又は腫瘍細胞上の細胞受容体に特異的であることが好ましい。

30

【0047】

抗体中に取り込ませる免疫賦活性要素として、C3dのリガンド部位由来のペプチドを使用することには、分子アジュバントとしての予想外の有用性がある。D. Fearon 他によって (Dempsey, P. W., Allison, M. E. D., Akkara ju, S., Goodnow, C. C.、及びFearon, D. T., Science, 271: 348, 1996)、C3dは分子アジュバントとして、メンドリ卵リソザイム (HEL) との完全な融合タンパク質の一部として使用されてきている。これらの筆者は、HEL-C3d融合タンパク質が、遊離HELより10,000倍まで免疫原性が高いことを示している (国際特許公開、国際公開第96/17625号を参照のこと)。

【0048】

我々の最新の動物実験では、C3d断片由来のペプチドを使用し化学的架橋したイディオタイプワクチンを用いて、免疫原性の同様の増大が観察されている (以下の実施例を参照のこと)。C3dペプチドをイディオタイプ及び抗イディオタイプワクチンと結合させることは、これらのワクチンの免疫原性を増大させ、フロイントアジュバンドなどの強力なアジュバンドと組み合わせた、FDAによってヒトに関する使用には認められていない、KLHなどの担体分子の結合の必要性の代わりとなると考えられる。

40

【0049】

他の実施形態では、ペプチドは位置1217~1232のヒトC3d残基と相同的なヒト又は非ヒトC3d領域に由来してよく、約10~約16量体の範囲である。抗体ワクチンに対する、親和性架橋した生物学的活性があるペプチドの他の適用例には、サイトカイ

50

ン由来の活性ペプチドがある。例えば、IL1 - サイトカイン由来のナノペプチドが記載されており (Antonini 他、J. Immunol、137:3201~04、1986)、これは望ましくない副作用を誘導しない免疫賦活性を有する。本発明に従い抗体中に挿入することができる活性ペプチドの他の例には、シグナルペプチド、及び抗体の自己結合部位由来のペプチドがある。

【0050】

サイトカインのホルモン、リガンド、又は細胞受容体の本来のリガンド由来の結合部位などの、生物学的活性を有するさまざまなペプチドが知られている。

【0051】

以下の実施例1~3は、親和性架橋によって作製されるC3d/抗体複合体に関するものであるが、これらを提供して抗体と結合したC3dペプチドによって与えられる免疫応答に対する影響を示す。

【実施例1】

【0052】

抗イディオタイプワクチンの向上。3H1は、ネズミ抗イディオタイプ抗体であり (Bhattacharya - Chatterjee 他、J. Immunol、145:2758~65、1990)、これは癌胎児性抗原 (CEA) を模倣している。3H1は、フロイントの完全アジュバント中でKLH結合ワクチンとして使用すると、抗CEA抗体を動物中で誘導する。3H1は臨床第I相試験においても試験されており、この場合3H1は、治療した癌患者のほぼ半分でCEAと結合する抗体を誘導する。しかしながら、部分的には低い免疫原性のために、臨床的応答はこの試験では観察されなかった (Foon 他、J. Clin. Invest、96:334~342、1995)。

【0053】

3H1mAbは、C3d領域1217~1232由来の13量体ペプチド (配列番号1) と親和性架橋させた。アミノ酸配列はC3dペプチドに由来し、以下の配列: KNRWEDPGKQLYNVEA (配列番号1) を有する。

【0054】

BALB/cマウスに、25µgのC3d-3H1をリン酸-生理食塩水溶液に溶かしたものを筋肉内に2回免疫処置した。最後の免疫処置の7日後、マウスを失血させ、8019 (Ab1イディオタイプ)、及びCEA発現腫瘍系LS174Tとの結合に関して血清を試験した。FACSにより測定すると、C3d-3H1免疫マウス由来の血清はLS174T腫瘍細胞と結合するが、一方で対照血清 (正常なマウスの血清) は、バックグラウンド蛍光のみを示した。C3d-3H1で免疫処置したマウス由来の血清は、FITC結合ヤギ抗マウスIgGで発色させるサンドウィッチアッセイにおいて、LS174T細胞のFACSで使用した。対照は正常なマウスの血清であった。分析した細胞数は、log10単位の相対的な蛍光強度に対してプロットした。

【実施例2】

【0055】

さらに、3H1 (25マイクログラム、生理食塩水中) 又は3H1-C3d-ペプチド (親和性架橋、25マイクログラム、生理食塩水中) で3回免疫処置したマウス由来の血清も、Ab3応答性に関して試験した。マウスを出血させ、ELISAにおいて3H1のF(ab)との結合に関して血清を試験した。マウス血清の希釈物と3H1F(ab)の結合を測定することによって、裸の3H1はAb3抗体を誘導しないが、3H1-ペプチドは誘導し、親和性架橋した3H1は免疫原性を増大させたことを示した。

【0056】

本発明を実施する際に使用することができる他のC3dペプチドには、その全容が参照として本明細書に組み込まれている、Lambriis 他、「補体の第三の成分、C3の系統発生 (Phylogeny of the third component of complement, C3)」中、Erff、Aed、「補体の構造及び機能の新たな側面 (New Aspects of Complement structure

10

20

30

40

50

and function)」、Austin, R. D. Landes Co., 1994 p. 15 ~ 34 中に総説されたペプチドがある。

【実施例 3】

【0057】

マウス腫瘍イディオタイプワクチン(38C13)の増強。38C13は、38C13 B-リンパ腫腫瘍細胞系によって発現されるイディオタイプである。Levyのグループは、このイディオタイプ腫瘍ワクチンモデルを開発してきており、KLH結合38C13 Idを用いた事前免疫処置によって、マウス中での38C13腫瘍細胞による攻撃に対して防御することができることを示している(Kaminski, M. S., Kitamura, K., Maloney, D. G. 及び Levy, R., J. Lnniunol. 138: 1289, 1987)。Levyと同僚(Tao, M-H. 及び Levy, R., Nature, 362: 755 ~ 758, 1993)は、キメラ遺伝子から作製され哺乳動物細胞培養物の発酵において発現される、融合タンパク質(CSF-38C13)を使用する腫瘍防御の誘導も報告している。38C13 Idタンパク質は、C3D領域1217 ~ 1232由来の16量体アジド-ペプチドと親和性架橋させた。

10

【0058】

10匹のマウスに、50ugのC3d-38C13結合体をリン酸-生理食塩水溶液に溶かしたものを腹腔内に3回免疫処置した。3回目のワクチン接種の後、マウスを38C13腫瘍細胞で攻撃した。対照群は、この腫瘍モデル中で「ゴールドスタンダード」とみなされるQS-21に溶かした38C13-KLH(アジュバント)をワクチン接種したマウス、及びQS-21のみを注射したマウスを含んでいた。C3d-38C13結合体をワクチン接種した10匹のマウス中7匹が、腫瘍攻撃後第35日まで生存し、QS-21に溶かしたKLH-38C13をワクチン接種したマウスも同様であった。全ての対照マウスにはQS-21のみを注射し、第22日までに死亡した。

20

【0059】

C3Hマウスを、QS-21に溶かした38C13-KLH、又はQS-21無しの38C13-C3dペプチドで3回免疫処置した(50µg、腹膜内)。対照マウスにはQS-21のみを注射した。免疫処置マウス及び対照マウスは、次いで38C13腫瘍細胞で攻撃し、生存を調べた。

【0060】

実施例1~3に記載した結果は、免疫賦活性ペプチドと腫瘍抗イディオタイプ及びイディオタイプワクチン抗体の親和性による架橋によって、腫瘍に対する免疫応答を有意に増大させ、腫瘍攻撃に対して防御することができることを示す。C3d架橋ワクチンを用いるワクチン接種プロトコルは、フロイントのアジュバントなどの任意のアジュバント、又はKLH結合体を含んでおらず、この両者はヒトにおける使用に関してはFDAによって認められていない。

30

【0061】

前の実施例で使用した手順の幾つかは知られており、C3d(補体断片)の活性結合ペプチドはLambriis他、(PNAS, 82: 4235 ~ 39, 1985)によって記載されており、これはその全容が参照として本明細書に組み込まれている。

40

【0062】

以下の追加的な実施例を与えて、融合タンパク質を作製する一般的な技法を実証し、免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有する特定のペプチドを示す。

【実施例 4】

【0063】

膜移動ペプチド(MTS-ペプチド)を含む融合非Igタンパク質。例えば、Rojas, M, Donahue, J P, Tan, T. 及び Lin, Y-Z. Nature Biotech., 16: 370, 「グルタチオンS-トランスフェラーゼ-MTSペプチド(GST-MTS)発現プラスミドの構築(Construction of the

50

glutathione S-transferase-MTS peptide (GST-MTS) expression plasmids」1998を参照のこと。

【0064】

2つの異なるGST-MTS発現プラスミドを、生物学的用途に応じて、アミノ末端又はカルボキシル末端伸長部として疎水性MTSを有する、標的タンパク質又はタンパク質ドメインを生成することができるように構築した。プラスミドpGEX-3X-MTS1及びpGEX3X-MTS2を構築するために、以下の相補的オリゴヌクレオチドを合成した：

MTS1: GATCGCAGCCGTTCTTCTCCCTGTTCTTCTTGCCGCACCCGG-
CGTCGGCAAGAAGAGGGACAAGAAGAACGGCGTGGGCCCTAG (配列番号2)

10

MTS2: GATCCCCGCAGCCGTTCTTCTCCCTGTTCTTCTTGCCGCACCCTAGC-
GGGCGTCGGCAAGAAGAGGGACAAGAAGAACGGCGTGGGATTCGCTAG

(配列番号3)

【0065】

アニーリング後、二本鎖MTS1オリゴヌクレオチドとMTS2オリゴヌクレオチドを、BamHIで消化したpGEX-3X中で連結させた(Smith, D. B. 及びJohnson, K. S., 「グルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合体として大腸菌中で発現されるポリペプチドの1ステップ精製(Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase)」Gene, 67:31, 1988.)。DNA配列分析によって、それぞれのプラスミドにおいて、MTSコード配列は正確であり、GSTコード配列とインフレームであったことを確認した。

20

【0066】

GST-Grb2SH2、GST-Grb2SH2-MTS、及びGST-Stat1SH2-MTS発現プラスミドの構築。ヒトGrb2SH2ドメイン(アミノ酸残基54~164)(Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., U, W., Margolis, B., Lammers, R他、「SH2及びSH3ドメイン含有タンパク質Grb2は受容体チロシンキナーゼと結合してrasシグナル化する(The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling)」、Cell, 70:431, 1992)、又はヒトStat1SH2ドメイン(残基567~716)(Schindler, C., Fu, X.-Y., Impnoto, T., Aebersold, R., 及びDarne11, J. E. Jr., Proc. Natl Acad. Sci USA 89:7836, 1992)をコードするDNA断片を、Grb2のcDNAクローン又はStat1のcDNAクローンからPCRにより合成した。それらの5'端にBamHI部位をそれぞれ含む、PCR用に使用したプライマーは、以下のものであった：

30

40

Grb2 SH2: 5'-CCGGATCCCCGAAATGAAACCACATCCGTGGTTTTTTGGC

(配列番号4) 及び

5'-CCGGATCCCCGAGGGCCTGGACGTATGTCGGCTGCTGTGG (配列番号5).

Stat1 SH2: 5'-CCGGATCCCCAAACACCTGCTCCCTCTCTGGAATGATGGG

(配列番号6) 及び

5'-CCGGATCC-CTCTAGAGGGTGAACCTCAGACACAGAAAT (配列番号7).

50

【0067】

PCR産物はBamHIで消化し、BamHIで消化したpGEX-3X又はpGEX-3XMTS2中で連結させた。ベクター/挿入体接合部のDNA配列分析によって、GST-Grb2SH2、GST-Grb2SH2-MTS、及びGST-Stat1SH2-MTSの翻訳読み取り枠が、それぞれの発現プラスミド中で保たれたことを確認した。

【0068】

MTS融合タンパク質の発現

GST融合タンパク質の発現及び精製。適切な発現プラスミド74を含む大腸菌菌株DH5 α を、37°Cにおいて100 μ g/mlのアンプシリンを含むLBブロス中で増殖させた。GST融合タンパク質の発現は、イソプロピル、B-D-チオガラクトシド(0.5mMの最終濃度)を加えることによって誘導し、37°Cでのインキュベーションを2~3時間続けた。GST融合タンパク質は、グルタチオン-アガロース親和性クロマトグラフィーによって細菌細胞の溶解物から精製した(Smith, D. B. 及びJohnson, K. S. Gene, 67:31, 1988)、ただし超音波処理の後、グルタチオン-アガロースビーズと混合する前に、5分間2000回転での遠心分離によって細胞溶解物を除去した。タンパク質調製物はPM10膜(Amicon, Beverly, MA)を使用する限外濾過によって濃縮し、すぐに使用するために4°Cで、或いは長期の保存用に-70°Cで保存した。タンパク質濃度は、280nmにおいて分光光度計によって測定した。生物学的アッセイにおいてこれらを使用する直前に、知られている濃度の野生型GSTと比較したクーマシーブリリアントブルー染色強度を使用する、SDS-PAGEによってタンパク質濃度を確認した。GST-MTSタンパク質中のMTSのアミノ酸含有量を確認するために、(Smith, D. B. 及びJohnson, K. S. Gene 67:31, 1988)に記載されたのとほぼ同様に、プロテアーゼ因子Xaを用いてグルタチオン-アガロース結合GST-MTSIから、MTSペプチドを切断した。切り離したMTS含有ペプチドはC逆相HPLCによって精製し、(Smith, D. B. 及びJohnson, K. S. Gene 67:31, 1988)に記載されたのと同様に、質量分光分析によって特徴付けした。切り離したMTS含有ペプチドはC₁₈逆相HPLCによって精製し、(Lin, Y-Z, Yao, S, Veatch, R. A., Torgerson, R., 及びHawiger, J. J Biol. Chem. 270:14255, 1995)に記載されたのと同様に、質量分光分析によって特徴付けした。

【実施例5】

【0069】

C3d-HEL融合タンパク質(Dempsey他、Science、271:348、1996)。HEL、C3d(H. Domdey他、Proc. Natl Acad Sci USA、79:7619、1982) doqプレ-プロ-インシュリンシグナル配列(M. E. Taylor及びK. Drickamer、Biochem. J.、274、575、1991)、及び(G4S)₂連結基をコードする相補的DNAを、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅させた。エピトープタグ及び停止コドンは、オリゴヌクレオチド連結基によってコードされていた。融合タンパク質カセットはタンデム:pSG5(Statagene Cloning Systems、La Jolla、CA)中で(G4S)₂によって連結された、doqプレ-プロ-インシュリンシグナル配列、HEL、及び1~3個のC3dのコピーで構築した。HEL-C3d3カセットは、A71dベクターにサブクローニングした。プラスミドpSG.HEL、pSG.HEL.C3d、及びpSG.HEL.C3d2を、pSV2-neoと共にL細胞及びA71dにコトランスフェクトした。HEL.C3d3をCOS細胞中で一過的に発現させた。組換えタンパク質は、YL1/2抗体に関する親和性クロマトグラフィー(H. Skinner他、J. Biol. Chem.、66:14163、1991)、及びSephacryl S-200(Pharmacia)での分画化によって精製した。

【0070】

10

20

30

40

50

融合尾部は研究室規模で有用であり、経済的な回収法を使用して回収を高めるための能力を有し、これらは産業の下流プロセス用に容易にスケールアップされる。融合尾部を使用して標的タンパク質の分泌を促進することができ、酵素活性又は抗体結合に基づいて有用なアッセイタグを与えることもできる。多くの融合尾部は標的タンパク質の生物学的活性を害さず、幾つかの場合、それを安定化させることが示されてきている。それにもかかわらず、真正タンパク質の精製に関して、特異的に切断される部位が含まれることが多く、回収後に尾部の除去が可能になる。

【0071】

組換えタンパク質を回収及び精製するための融合尾部。(例えば、Ford C.、Suominen I.、Glatz C.、Protein Expr. Purif. 2 ~ 3 : 95 ~ 107、1991を参照のこと)。本発明の融合タンパク質は、粗製の細胞抽出物又は培養培地からの組換えタンパク質の効率の良い回収及び精製を促進するように開発された、融合尾部も含むことができる。これらの系では、標的タンパク質は遺伝的に改変されて、C末端又はN末端ポリペプチド尾部を含んでおり、これによって回収及び精製における特異性に関する生化学的基盤が与えられる。さまざまな特性を有する尾部が使用されてきている：

- (1) 固定された基質又は阻害剤に関する親和性を有する完全な酵素；
- (2) 免疫グロブリンG又はアルブミンとの親和性を有するペプチド結合タンパク質；
- (3) 炭水化物結合タンパク質又はドメイン；
- (4) 融合タンパク質とアビジン又はストレプトアビジンの親和性を促進するための、*in vivo* ビオチン化用のビオチン結合ドメイン；
- (5) 固定されたモノクローナル抗体との親和性を有する抗原エピトープ；
- (6) 固定金属の親和性クロマトグラフィーによる回収用のポリ(His)残基；及び
- (7) アミノ酸側鎖の性質に基づく結合特異性を有する他のポリ(アミノ酸)。

【0072】

融合尾部は研究室規模で有用であり、経済的な回収法を使用して回収を高めるための能力を有し、これらは産業の下流プロセス用に容易にスケールアップされる。融合尾部を使用して標的タンパク質の分泌を促進することができ、酵素活性又は抗体結合に基づいて有用なアッセイタグを与えることもできる。多くの融合尾部は標的タンパク質の生物学的活性を害さず、幾つかの場合、それを安定化させることが示されてきている。それにもかかわらず、真正タンパク質の精製に関して、特異的に切断される部位が含まれることが多く、回収後に尾部の除去が可能になる。

【0073】

本発明は、対応する抗原に関する抗体の特異性を変えずに抗体の生物学的活性及び免疫活性を高める、抗体-ペプチド融合タンパク質の作製を記載する。この遺伝的に改変された融合タンパク質は、特許出願第09/070,907号中に記載される化学的に改変されたキメラ抗体と似ている。詳細には本発明は、いずれも前に記載した、完全又は部分的な独立栄養性24量体ペプチド、膜輸送ペプチド(MTS)又はC3dペプチドを含む抗体融合タンパク質の作製を提供する。

【0074】

本発明は、(1)抗体及び(2)免疫賦活、膜輸送及び同種親和活性からなる群から選択される生物学的活性を有するペプチドであって、抗体の抗原結合を害さない部位で、抗体とペプチド結合によって結合したペプチドから構成される融合タンパク質を含む、組成物及び医薬組成物も提供する。

【0075】

本発明のペプチド/抗体複合体中に、任意の抗体を使用することができる。好ましい抗体は抗イディオタイプ抗体である。例えば、抗イディオタイプ抗体3H1を使用することができる(「アジュバント治療剤として胎児性癌抗原(CEA)を模倣した抗イディオタイプ抗体ワクチン(3H1)(Anti-idiotypic Antibody Vaccine (3H1) that Mimics the Carcinoembryon

10

20

30

40

50

ic Antigen (CEA) as an Adjuvant Treatment」、Foon他、Cancer Weekly、Jun. 24、1996を参照のこと)。本発明で使用することができる他の抗イデオタイプ抗体には、例えばクラミジア糖脂質外抗原に対する抗イデオタイプ抗体(米国特許第5,656,271号);メラノーマ及び小細胞癌腫の治療用の抗イデオタイプ抗体1A7(米国特許第5,612,030号);抗イデオタイプ抗体MK2-23抗メラノーマ抗体(米国特許第5,493,009号);抗イデオタイプ淋菌抗体(米国特許第5,476,784号)Pseudomonas aeruginosa抗イデオタイプ抗体(米国特許第5,233,024号);ヒトB細胞腫瘍の表面Igに対する抗体(米国特許第4,513,088号);及びモノクローナル抗体BR96(米国特許第5,491,088号)がある。ペプチドの長さに関する任意の制限は、ペプチド合成に関する実際の制約であるが、本発明の方法の実施に関する制限ではない。

10

【0076】

さらに、(その全容が参照として本明細書に組み込まれている、Kang, C. Y. Brunck, T. K., Kiever-Emmons, T., Blalick, J. E. 及びKohler, H., 「VH由来ペプチドによる自己結合タンパク質(自己抗体)の阻害(Inhibition of self-binding proteins (auto-antibodies) by a VH-derived peptide)」、Science、240:1034~1036、1988)中に開示されたペプチドなどの自己結合ペプチドを、本発明の方法で使用することができる。

20

【0077】

さらに、その全容が参照として本明細書に組み込まれている、Rojas他、「細胞膜浸透性を有するタンパク質の遺伝的改変(Genetic Engineering of proteins with cell membrane permeability)」、Nature Biotechnology、16:370~375(1988)及び「Calbiochemシグナル変換カタログ(Calbiochem Signal Transduction Catalogue)」1997/98中に開示されたペプチドなどのシグナルペプチドを、本発明の方法で使用することができる。

【0078】

米国特許第5,523,208号(その全容が参照として本明細書に組み込まれている)の開示に従い、逆水治療法性を有しペプチド内で相互親和性及び同種親和性(自己)結合を示す、ペプチドを設計することができる。

30

【0079】

本発明は、正常細胞又は感染細胞中の細胞機能を調節するための新規な化合物及び方法を企図するものである。このような化合物は、そこに結合したペプチドの細胞浸透作用によって細胞内に内在化することができる、抗体又はその断片を含む。このようなペプチドを本明細書では、「膜輸送ペプチド」などと呼ぶ。知られている膜輸送ペプチド、又はそれらの活性断片は、結合ペプチドとして使用することができる。このような抗体又はその断片は、(a)カスパーゼ、キナーゼ、及びホスファターゼなどの細胞内のシグナルタンパク質、(b)細胞内で構築される前の未成熟ピリオンタンパク質、(c)細胞表面抗原又は細胞内腫瘍抗原、(d)DNA合成及び遺伝子発現の調節に参与する核タンパク質又は核小体タンパク質、又は(e)細胞増殖又は細胞分裂停止に参与する細胞骨格タンパク質などのタンパク質標的に免疫特異的である。ポリクローナル又はモノクローナル抗体を使用することができる。このような抗体又はそれらの断片は、 10^{-9} M以上の親和性でそれらの抗原決定基と結合することが好ましい。

40

【0080】

本発明の特に好ましい化合物は、膜輸送タンパク質、又はそのペプチド断片と結合した抗カスパーゼ抗体を含む化合物である。好ましい膜輸送断片は、膜転座配列(MTS)ペプチドである。特に好ましい膜輸送ペプチドには、以下のものがある：

(1) K G E G A A V L L P V L L A A P G (配列番号8)、カボジ肉腫の線維芽細胞

50

成長因子 [K - FGF] 由来 (Rojas 他、Nature Biotechnology、16:370~375 (1988))。

(2) AAVLLPVLLAAP (配列番号9)、前述のペプチドの切断型、Lin 他、J. Biol. Chem.、271:5305 (1996) を参照のこと。

(3) RQIKIWFQNR RMKWK (配列番号10)、アンテナペディアのホメオドメイン (Ant) 由来の「ペネトラチン」(Lindberg, M. 他、Eur. J. Biochem.、270(14):3055~3063 (2003) を参照のこと)。

(4) RRMKWK (配列番号11)、ペネトラチンのC末端配列、例えば Fischer, P. 他、J. Peptide Res.、55(2):163~172 (2000) を参照のこと。 10

(5) TAT ペプチド、例えば HIV - I TAT 由来の aa 47~57 及び 48~60 (例えば Schwarze, S. 他、Trends Pharmacol. Sci.、21:45、2000; Li Y. 他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 298(3):439~449、2002; Hallbrink M. 他、Biochim. Biophys. Acta、1515(2):101~109、2001 を参照のこと)。

(6) ヘルペスウイルスタンパク質 VP22 (Elliott, G. 他、Cell、88:223 (1997))。

(7) GWTLNSAGYLLGKINLKALAAALAKKIL (配列番号12)、「トランスポルタン」、27量体ペプチド (Pooga, M. 他、FASEB J.、12:67 (1998); Lindberg, M. 他、Biochem.、40:3141~3149、2001 を参照のこと)。 20

(8) AGYLLGKINLKALAAALAKKIL (配列番号13)、N末端6残基が欠失したトランスポルタン (Soomets, U. 他、Biochim. Biophys. Acta、1467:165~176、2000 を参照のこと)。

(9) MAP と呼ばれる、Lys - Leu - Ala - Leu (KLAL) (配列番号14) (Hallbrink M. 他、Biochim. Biophys. Acta、1515(2):101~109、2001 も参照のこと)。

【0081】

本明細書で論じる、膜輸送タンパク質又はその断片と結合した抗カスパーゼ抗体を含む、アポトーシスを阻害するのに有効な医薬組成物も企図される。これらを作製するそのような融合タンパク質及び方法は、参照として本明細書に組み込まれている米国特許第09/865,281号 (Kohler 他) 中に開示されている。 30

【0082】

本発明の好ましい免疫複合体は、抗体のヌクレオチド又はトリプトファン部位仲介、又は抗体のN末端連結炭水化物仲介を含めた連結の幾つかの型の1つによって、MTS配列と結合した二次抗体を含む。本明細書で使用する「二次抗体」は、一次抗体と特異的に高い親和性で結合する、抗体又はその断片を指す。本発明に有用な二次抗体には、ネズミ又はヒトIgGに対するポリクローナル又はモノクローナル抗グロブリン、又は抗体に独立栄養性を与えるT15配列 (Kang, CY、Brunck, TK、Kieber-Emmons, T 他、「VH由来ペプチドによる自己結合抗体 (自己体) の阻害 (Inhibition of self-binding antibodies (autobodies) by a VH-derived peptide)」、Science、240:1034~6、1988) などの、新規且つ/或いは備え付けの配列を標的とする二次抗体がある。 40

【0083】

細胞表面抗原を標的とするモノクローナル抗体又は免疫複合体を事前投与又は事前注射し、標的との結合及び組織からの除去に十分な時間を与え、MTSペプチドと共有結合した二次抗体の投与を続けることによって送達を行う。一次抗体は毒素、薬剤、酵素又はア 50

イソトープなどの阻害剤と結合することができ、これによって阻害剤分子の細胞中への送達を高めることができる。M T S ペプチドと結合した二次抗体は、一次抗体を認識しこれと結合し、M T S ペプチド活性によって細胞に内在化する。このようにして、一次免疫複合体が細胞中に運ばれ、そこでその阻害作用が高まる。

【0084】

一次抗体とM T S と結合した二次抗体を混合させ、次いで細胞を露出させ、及び一次抗体を標的とする細胞活性の阻害に関して試験することによって、このような二次結合体を使用して、細胞内標的に対するモノクローナル抗体の有用性を評価することもできる。この迅速なスクリーニングでは、細胞内標的に対する多くの抗体を、アンタゴニスト又はアゴニストとしての有用性に関してスクリーニングすることができる。したがって活性を有する抗体は、*in vivo* 使用のためにM T S などの膜輸送ペプチドと直接結合させることができる。

10

【0085】

本発明の好ましい実施形態は、二次抗体及び一次抗体のトリプトファン又はヌクレオチド結合部位と結合した、化学物質又はペプチド連結基又はキレート化合物によってスルフヒドリル、アミノ酸又は炭水化物残基を介して結合した毒素、薬剤又はイソトープと結合した、M T S ペプチドを使用する。

【0086】

本発明は概略的に、*in vivo* における抗体結合体の細胞内部への送達に関する。このような抗体は潜在的に中和、抗ウイルス抗体、抗調節タンパク質抗体、又は抗腫瘍抗体であってよい。例えば、M T S ペプチドを含む抗体結合体、及び未成熟ウイルス又は病原体で最も発現されるウイルス又は他の細胞内病原体上の抗原決定基を対象とする抗体を、生きている生物に投与することによって、送達を行うことができる。このような結合体は、それが他の細胞を成熟させ感染させる機会を有する前に、高い親和性で結合し、ウイルス構築体を破壊し、ウイルスを中和する十分な機会を有する。

20

【0087】

したがって本発明は、広範囲の抗体療法の一例としての、抗ウイルス（抗H I V）療法を提供する。本発明において好ましい抗体は、以下の好ましい性質を有する：

（1）本発明の抗体は、主に細胞内で発現される抗原と結合する。これは腫瘍関連抗原（T A A）及びウイルス糖タンパク質を含む。前者は、C E A などのT A A を含む。個々の抗原決定基は細胞内形のタンパク質と主に結合することができ、一方他の抗原決定基は、主に表面上で発現される可能性がある。本発明より前に、細胞表面分子との反応性に関して、細胞内抗原を標的化する能力を有する、多くの有用な治療抗体が選択されており、選択基準は細胞内抗原との主な反応性を含むと思われる。

30

（2）細胞内標的はウイルス糖タンパク質を含む。例えば、大部分のモノクローナル抗体は、わずか数継代の細胞中を伝播するウイルスではなく多継代の細胞中を伝播するウイルスに対して産生されており；結果として、ウイルスに対する大部分のモノクローナル抗体は、新たな単離体よりも研究室用のウイルス菌株と良好に反応する。この結合の違いに関して提案されている説明は、大部分の抗体は、H I V に対する抗体と同様に、十分なグリコシル化及びウイルス糖タンパク質の折り畳みのために、わずか数継代のウイルス（及びおそらく新たに合成されたウイルス）由来のウイルス糖タンパク質上に隠れており且つ部分的に埋もれている、抗原決定基と反応するということである。これは、大部分の抗体は、過小グリコシル化又は不完全にグリコシル化した糖タンパク質を有する未成熟ピリオン又は不完全ピリオン、及び/又は完全に構築されていない未成熟ピリオン又は不完全ピリオンとより良く結合するはずであることを意味すると思われる。したがって、本来のウイルスとの限られた反応性のために、療法に有用であるとみなされない抗体は、細胞内の未成熟形への接触によって、標的化するのに有用であると思われる。

40

（3）本発明の抗体は、立体配座依存性の配列よりも、T A A 又はウイルス糖タンパク質上のアミノ酸の直線配列と結合する。このような抗体は、合成及び成熟の初期に細胞内抗原と結合する可能性がさらに高く、これは、細胞内に存在する未成熟ピリオン又は非構

50

築、糖タンパク質前駆体を含むと思われる。

(4) これらの抗体は、 10^{-9} M以上の親和性でそれらの抗原決定基と結合するはずである。

【0088】

MTS輸送ペプチド改変型モノクローナル抗カスパーゼ-3抗体は、生細胞中のアクチノマイシンD誘導型アポトーシス及びスペクトリンの切断を減らすことを、具体的な実施例によって、本明細書においてここで示す。これらの結果は、このような抗体が、さまざまな疾患においてアポトーシスを阻害する治療能力を有することを示唆する。

【実施例6】

【0089】

細胞系及び抗体。ヒトJurkat T細胞リンパ腫を、10%ウシ胎児血清及び抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン及びアンフェテリシン)を補ったRPMI 1640中で増殖させた。ウサギポリクローナル抗活性カスパーゼ-3抗体、及び抗切断型フォドリン、即ちIISペクトリンを、Cell Signaling, Inc. (Beverly, MA)から購入した。ウサギモノクローナル抗活性カスパーゼ-3抗体は、BD Pharmingen (San Diego, CA)から購入した。ウサギ抗スペクトリン抗体は、Cell Signaling (Beverly, MA)から購入した。マウスモノクローナル抗体3H1(抗CEA)は、タンパク質G親和性クロマトグラフィーによって細胞培養物上清から精製した。抗マウス及び抗ウサギHRP結合二次抗体は、Santa Cruz Biotechnologies, Inc.から購入した。ApoAlertカスパーゼ-3蛍光アッセイキットは、Clontech Laboratories, (Palo Alto, CA)から購入した。細胞死検出ELISAは、Roche Applied Science (Indianapolis, IN)から購入した。カスパーゼ阻害剤は、Enzyme Systems Products (Livermore, CA)から購入した。

10

20

【実施例7】

【0090】

抗体-ペプチド結合体の合成。MTSペプチド(KGEGAAVLLPVLLAAPG)はシグナルペプチド系膜転座配列(1)であり、Genemed合成(サンフランシスコ、CA)によって合成した。抗体をPBS(pH6.0)バッファーに対して透析し、1/10体積の200mmol/LのNaIO₄を加え、暗所中で30分間4においてインキュベートすることによって酸化した。30mMまでグリセロールを加えることによって酸化を停止させ、PBS(pH6.0)バッファーに対して30分間4でサンプルを透析した。50倍を超えるMTSペプチドを分子中に使用して、37で1時間のインキュベーションによって抗体を結合させ、次いで抗体-ペプチドをPBS(pH7.4)に対して透析した。

30

【実施例8】

【0091】

MTS結合抗活性カスパーゼ-3抗体の細胞増殖に対する影響。2.5×10⁵個のJurkat細胞を、96ウエルの培養プレートに接種した。0.5µgのMTS抗体結合体と共に6、12、18及び24時間インキュベートした後、等分試料を除去し、生存能力のある細胞は色素排除試験(トリパンブルー)を使用して計数した。

40

【実施例9】

【0092】

ELISAによる抗体内在化の試験。1ml培地で増殖させたJurkat細胞を、2µgの裸又はMTS抗体結合体と共に、0、1、3、6、12及び18時間6ウエルの培養プレート(Costar, Cambridge, MA)中でインキュベートした。細胞をスピンドウンさせ、培養物上清を新しいチューブに移し、30秒間Pellet Pestic Motor (Kontes, Vineland, NJ)によって均質化する前に、PBS(pH7.4)で細胞ペレットを2回洗浄した。全ての細胞ホモジェネート及

50

び同体積 (10 μ l) の培養物上清を、ヒツジ抗ウサギ IgG をコーティングした ELISA プレート (Falcon、Oxnard、CA) に加え、室温で2時間インキュベートした。洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ウサギ軽鎖抗体を加え、o-フェニレンジアミンを使用して抗体を目に見える状態にした。

【実施例10】

【0093】

DNA断片化。Jurkat細胞を抗体又はカスパーゼ-3阻害剤 (DEV D-fmk) で1時間予備処理し、遠心分離にかけ、アクチノマイシンD (1 μ g/ml) を含む新たな培地と共に4時間インキュベートした。処理後、Jurkat細胞を回収し、PBS (pH7.4) で洗浄し、次いで700 μ lのHLバッファー (10mMのTris-HCl、pH8.0、1mMのEDTA、0.2%のTriton X-100) 中に懸濁させ、室温で15分間インキュベートした。粗製DNA調製物を、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) で2回抽出し、0.1体積の5M NaCl及び1体積のイソプロパノールを用いて-20℃で24時間沈殿させた。回収したDNAは、TEバッファー (10mMのTris、pH8.0及び1mMのEDTA) に溶かした。同じ量のDNAを1.5%アガロースゲル上での電気泳動によって解像し、臭化エチジウムで染色した後にUV蛍光によって可視化した。DNA断片化は、細胞死検出ELISA (Roche、Indianapolis、IN) によっても検出し、わずかな改変で製造者の教示書に従いこれを行った：JB6細胞をp100プレート中で増殖させ、処理後に細胞を回収し、25 μ lの完全な細胞溶解物をそれぞれのサンプルウエルに施した。

10

20

【実施例11】

【0094】

全細胞溶解物の調製。Jurkat細胞は前項と同じ方法で処理した。処理後、Jurkat細胞を回収し、PBS (pH7.4) で2回洗浄し、次いで300 μ lのCHAPSバッファー (50mMのPIPES、pH6.5、2mMのEDTA、0.1%のCHAPS) 中に懸濁させた。サンプルを10秒間超音波処理し、4℃において15分間14,000rpmで遠心分離にかけた。上清を新しいチューブに移し、「全細胞溶解物」と呼んだ。

【実施例12】

30

【0095】

カスパーゼ-3様切断活性アッセイ。Jurkat細胞は前項と同じ方法で処理した。等しいタンパク質濃度の全細胞溶解物及びApoAlertカスパーゼ-3蛍光アッセイキットを使用して、製造者の教示書に従いカスパーゼ-3活性を分析した。スペクトルMAX GEMINIリーダー (Molecular Devices、Sunnyvale、CA) を用いて、蛍光を測定した。

【実施例13】

【0096】

ウエスタンブロット分析。Jurkat細胞は前項と同じ方法で処理した。10 μ gの全細胞溶解物を10%のSDS-PAGEゲル上で分離して、切断型スペクトリン (1:1000希釈) に対する免疫反応性タンパク質を検出した。ポンソー染色を使用して、タンパク質のニトロセルロース膜上への移動の均一性を調べた。膜は蒸留水で洗浄して過剰な染色液を除去し、Blotto (5%のミルク、10mmのTris-HCl [pH8.0]、150mMのNaCl及び0.05%のTween20) 中において2時間室温でブロッキングした。二次抗体を加える前に、膜をTBST (10mMのTris-HCl、150mMのNaCl及び0.05%のTween20) で2回洗浄し、次いでこの膜を、1:4000希釈でホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と共にインキュベートした。最終洗浄ステップは、TBSTで3回 (それぞれ5分間)、及びTBS (10mMのTris-HCl及び150mMのNaCl) で2回 (それぞれ5分間) を含んでいた。高度な化学発光検

40

50

出システム (ECL、Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ) によって、抗体のバンドを目に見える状態にした。

【0097】

結果

M T S 結合抗活性カスパーゼ - 3 抗体は、細胞増殖の阻害をほとんど示さない。最初に試験したのは、細胞に対する M T S 抗体結合体の潜在的な毒性であった。細胞の生存能力アッセイによって、M T S 抗体結合体は細胞増殖に対してほとんど影響を示さなかったことが示された (図 1)。

【0098】

M T S ペプチドは、生細胞中への抗活性カスパーゼ - 3 抗体の迅速な浸透を促進する。サンドウィッチアッセイを使用し、E L I S A を設計してウサギ I g を捕捉した。図 2 中に見られるように、M T S 結合体は、モノクローナル抗活性カスパーゼ - 3 抗体を、生細胞中へ内在化させるのを迅速に促進した。I g の移動は 1 時間以内に増大し、18 時間後に安定状態に達した。培養物中に残っていた抗体は 1 時間で減少し、18 時間で平衡状態に達したようであった。裸抗体の内在化は遅れ (3 時間で)、M T S 結合抗カスパーゼ - 3 抗体と比較して低いレベルの状態であった。

10

【0099】

ポリクローナル M T S 抗活性カスパーゼ - 3 抗体は、D N A 断片化を阻害する。M T S 結合又は裸ポリクローナル抗カスパーゼ - 3 抗体 (1 μ g / ml の最終濃度 - 1 : 64 希釈相当) を 6 ml の培養 J u r k a t 細胞に加え、1 時間プレインキュベートした。抗体は遠心分離によって洗浄除去し、アクチノマイシン D (1 μ g / ml) のみを含み抗体は含まない新たな培地を加え、細胞は 4 時間インキュベートした。5 ml の培養物を D N A 断片化用に回収した。裸 (非結合) 抗カスパーゼ - 3 ポリクローナル抗体が、アクチノマイシン D 処理による D N A ラダー化を妨げることはなかった。対照的に、M T S 結合抗カスパーゼ - 3 ポリクローナル抗体は、アクチノマイシン D によって誘導される D N A 断片化 (アポトーシス) を有意に阻害した (データ示さず)。

20

【0100】

モノクローナル M T S 抗活性カスパーゼ - 3 抗体は、D N A 断片化を妨げる。M T S 結合又は裸モノクローナル抗カスパーゼ - 3 抗体 (1 μ g / ml の最終濃度) を 6 ml の培養 J u r k a t 細胞に加え、1 時間プレインキュベートした。抗体は遠心分離によって洗浄除去し、アクチノマイシン D (1 μ g / ml) のみを含み抗体は含まない新たな培地を加え、細胞は 4 時間インキュベートした。5 ml の培養物を D N A 断片化用に回収し、残りは細胞死 E L I S A アッセイ用に保存した。M T S 結合抗体が D N A ラダー形成を抑制することを観察したが、一方裸 (非結合) 抗カスパーゼ - 3 モノクローナル抗体が、アクチノマイシン D 処理による D N A ラダー化を妨げることはなかった (データ示さず)。細胞死 E L I S A アッセイ (図 3) によって、M T S 結合抗体で細胞を予備処理すると、細胞アポトーシスの有意な減少を確認した。カスパーゼ - 3 阻害剤 (D E V D - f m k) と共にインキュベートした J u r k a t 細胞は 100% の生存能力を維持し、賦形剤 (D M S O) 処理した対照細胞は約 80% の生存能力を維持した。裸の抗カスパーゼ - 3 抗体処理群では、わずか 36% までの細胞が、4 時間後に生存能力がある状態であった。しかしながら、70% の細胞は生存能力がある状態であったので、M T S 抗カスパーゼ - 3 結合抗体処理によって、アクチノマイシン D 誘導型アポトーシスに対しては劇的に保護された (表 1 参照)。

30

40

【表 1】

表 1*

処理	生存能力があった	生存能力があった
	細胞の%、実験1	細胞の%、実験2
なし	81.6	84.4
アクチノマイシンD	18.0	24.0
裸3H1+アクチノマイシンD	24.5	N.D.
MTS-3H1+ アクチノマイシンD	28.6	N.D.
裸の抗カスパーゼ-3+ アクチノマイシンD	37.4	34.4
MTS-抗カスパーゼ-3+ アクチノマイシンD	73.8	65.7

*なし=DMSOが0. 2%未満であった細胞の培養培地 ;AD=1時間アクチノマイシンDで処理 ;
3H1=対照抗体 ; 抗カスパーゼ-3=ウサギモノクローナル抗カスパーゼ-3抗体。アポトーシスは
細胞死ELISAアッセイを使用して検出した。AD処理とカスパーゼ3阻害剤 (DEVD-fmk)
処理の間のELISAの読み取り値の差異は、生存能力100%として判断した。Exp.=実験 ;N. D. =行わず。

【0101】

MTS結合抗活性カスパーゼ-3抗体は、カスパーゼ-3活性を抑制する。Jurkat細胞を前項と同様に処理し、ネズミ抗CEA抗体を改変し対照として使用した。図4に示すように、カスパーゼ-3様切断活性はアクチノマイシンD処理によって増大し、MTS結合モノクローナル抗活性カスパーゼ-3抗体はカスパーゼ-3様切断活性を低下させ、一方MTS-3H1抗体は全く効果を示さなかった。細胞死ELISAアッセイによって、MTS結合モノクローナル抗カスパーゼ-3抗体が、有意に低いDNA断片化を示したことも確認した(データ示さず)。

【0102】

MTS抗活性カスパーゼ-3抗体はスペクトリン切断を阻害する。カスパーゼ-3の下流標的として、スペクトリンのタンパク質レベルを調べた。スペクトリンの2つの切断断片を、アクチノマイシンD処理Jurkat細胞において観察した(データ示さず)。3H1もMTS-3H1も、スペクトリンの切断を保護しなかった。裸のモノクローナル抗活性カスパーゼ抗体は、保護に対する影響をほとんど示さず ; 一方MTS結合抗活性カスパーゼ-3抗体は、カスパーゼ-3阻害剤DEVD-fmkと同様に、100kDa及び75kDa IISペクトリン断片の切断を完全に抑制した。150kDaの切断バンドは、全ての抗体予備処理細胞サンプルにおいて明らかな変化は全く示さなかった。

【0103】

結論

前述の結果は、抗カスパーゼ-3抗体は、カスパーゼ-3活性、DNA断片化、及びスペクトリン切断などのin-vitroアポトーシス関連事象を有意に阻害することができることを示す。したがって抗カスパーゼ-3抗体を使用して、さまざまな疾患におけるアポトーシスを阻害することができる。治療上使用される抗体と対照的に、げっ歯類動物モデルにおいて示されるように、従来のペプチドアポトーシス阻害剤は強い阻害を示すだけでなく、高い毒性などの悪い副作用も有する。したがって輸送膜結合抗体は、従来のアポトーシス阻害剤と比較して低い毒性を有する。したがって輸送膜(MTS)結合抗体は、特にアルツハイマー病、ハンチントン病及びパーキンソン病などの疾患の中樞神経系のアポトーシスを含めた、疾患を治療するための有望な新しい候補となる。

【0104】

本発明の組成物は、適量の活性成分を含む、単位剤形、滅菌溶液又は懸濁液、滅菌経口溶液又は懸濁液、経口溶液又は懸濁液、水中油型又は油中水型エマルジョンなどでの、ヒト及び動物への全身投与用の医薬組成物に有用である。局所施用は、軟膏、クリーム、口

10

20

30

40

50

ーション、ゼリー、スプレー、灌注剤などの形であってよい。本発明の組成物は、約1～20%、及び好ましくは約5～15%の組成の、活性成分及び担体又は賦形剤の医薬組成(重量%)で有用である。

【0105】

前述の非経口溶液又は懸濁液は経皮的に投与することができ、望むならば、さらに濃縮された徐放形を投与することができる。本発明の架橋ペプチドは、静脈内、筋肉内、腹膜内、又は局所に投与することができる。したがって、経皮投与用に徐放性物質中への活性化化合物の取り込みを行うことができる。本発明の目的に認められる医薬担体は、薬剤、宿主、又は薬剤送達デバイスを含む物質に悪影響を与えない、当分野で知られている担体である。担体は、アジュバント、例えば防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤など、及び本発明の浸透性増大物質も含むことができる。哺乳動物に関する有効な用量は、治療される被験体の年齢、体重、活性レベル又は状態などの要因によって変わる可能性がある。典型的には、本発明の化合物の有効な用量は、少なくとも1日1回懸濁液によって投与するとき、約10～500mg、好ましくは2～15mgである。投与は適切な間隔で繰り返すことができる。

10

【0106】

前述の記載及び実施例の目的は、いかなる制限も示さずに本発明の幾つかの実施形態を例示することである。本発明の組成物及び方法のさまざまな変更形態及び変形を、本発明の精神又は範囲から逸脱せずに添付の特許請求の範囲内で実施することができることは、当業者には容易に明らかであろう。本明細書に引用した全ての特許及び刊行物は、それらの全容が参照として組み込まれている。

20

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】MTS抗活性カスパーゼ-3抗体結合体で処理したJurkat細胞の、検出による生存能力を示す図である。2.5×10⁵個のJurkat細胞を、96ウエルの培養プレートに接種した。0.5μgのMTS抗体と共に6、12、18及び24時間インキュベートした後、等分試料を除去し、生存能力のある細胞は色素排除試験(トリパンブルー)を使用して計数した。

【図2】サンドウィッチELISAによる抗体内在化の検出を示す図である。ヒツジ抗ウサギ抗体を、ELISAプレート(400ng/ウエル)上にコーティングした。細胞のホモジェネート及び等体積の培養物上清を、ヒツジ抗ウサギIgGコーティングELISAプレート(Falco、Oxnard、CA)に加え、室温で2時間インキュベートした。洗浄後、HRP標識ヤギ抗ウサギ軽鎖抗体を加え、o-フェニレン-ジアミンを加えることによって抗体を目に見える状態にした。内在化した抗体と培養物中の抗体の比をプロットする。

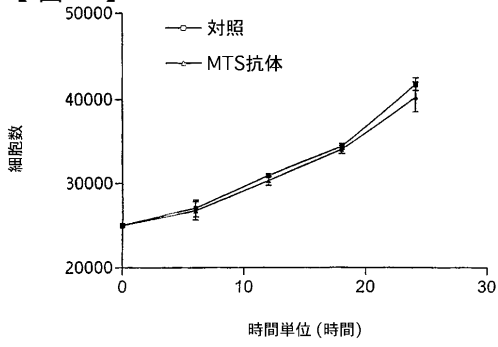
30

【図3】細胞死のELISAアッセイによって測定した、DNA断片化の程度を示す図である。MTS結合又は裸の抗カスパーゼ-3抗体(2μg/ml)を、6mlの培養したJurkat細胞に加え、1時間ブレインキュベートした。遠心分離によって抗体を洗浄し、アクチノマイシンD(1μg/ml)を含む新鮮な培地を加え、4時間インキュベートした。ラダー電気泳動によるDNA断片化の評価用に5mlの培養物を回収し；残りはELISAアッセイ用に回収した。AD=アクチノマイシンD；裸抗体=カスパーゼ-3抗体；MTS-Ab=MTS結合抗カスパーゼ-3抗体；カスパーゼ-3阻害剤=DEV D-fmk(100μM)。*、p<0.01、対照と比較したもの；#、p<0.01、裸のカスパーゼ-3抗体と比較したもの。

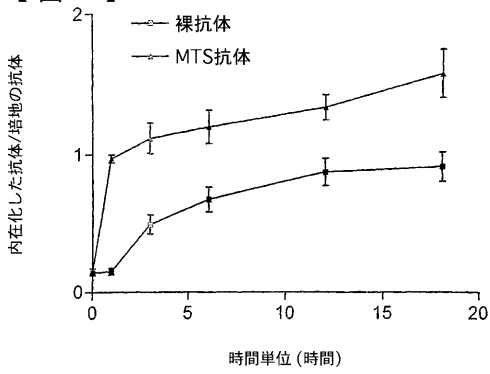
40

【図4】カスパーゼ-3様切断活性アッセイを示す図である。全細胞溶解物の等量のタンパク質を、ApoAlertカスパーゼ-3蛍光アッセイキットを使用することによってこのアッセイに施用した。*、p<0.01、対照と比較したもの；#、p<0.01、裸のカスパーゼ-3抗体と比較したもの。

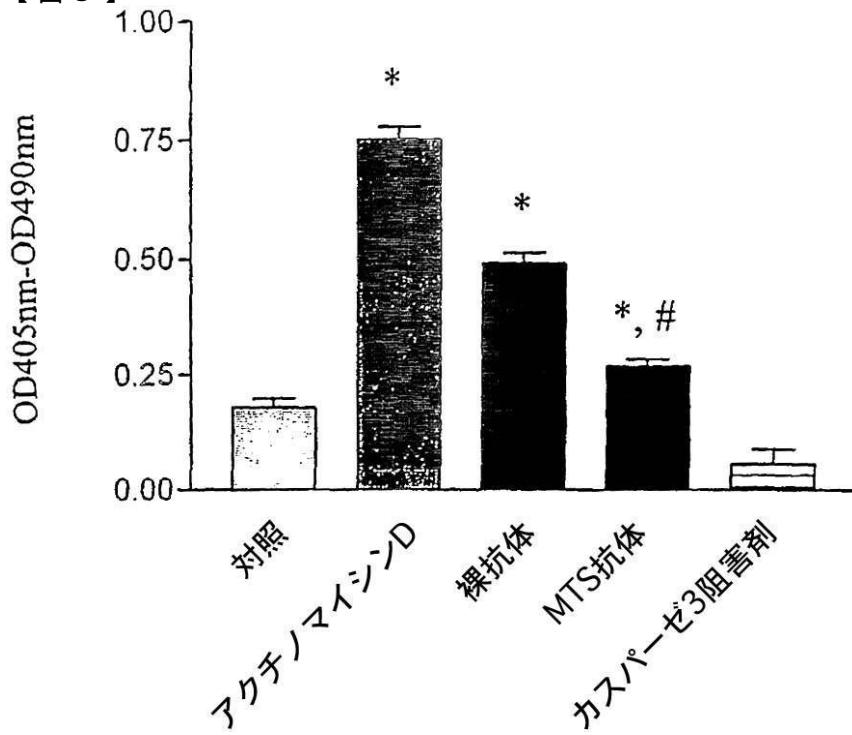
【 図 1 】

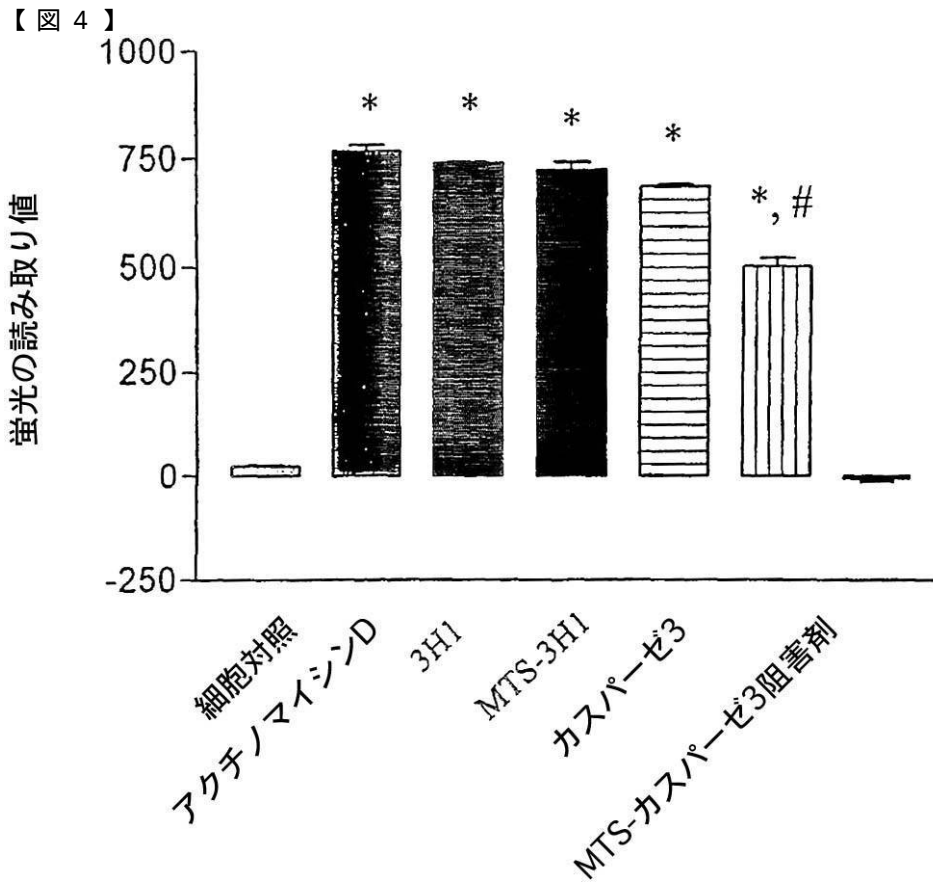


【 図 2 】



【 図 3 】





【配列表】

2006522122000001.app

【 国際調査報告 】

60600360264



1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/06911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 16/00, 16/28; A61K 39/395, 39/44, 51/10; G01N 33533, 33/541, 33/554 US CL : 530/391.1, 391.9; 424/178.1, 182.1, 183.1; 435/7.1, 7.21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/391.1, 391.9; 424/178.1, 182.1, 183.1; 435/7.1, 7.21 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) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS on STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO Y. Chemical Engineering of Cell Penetrating Antibodies J. Immunological Methods August 2001, Vol. 254, No.1-2, pages 137-145, especially abstract, Materials and Methods.	1-2, 5-6 and 8-9
Y	ROJAS M. Controlling Epidermal Growth Factor (EGF)-stimulated Ras Activation in Intact Cells by a Cell-permeable Peptide Mimicking Phosphorylated EGF Receptor J. Biol Chem 1996, Vol. 271, No. 44, pages 27456-61, especially page 27457, Figure 1.	7 and 18-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T" later documents 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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 13 July 2005 (13.07.2005)		Date of mailing of the international search report 19 NOV 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Phuong Huynh <i>[Signature]</i> Telephone No. (703) 272-1600 <i>[Signature]</i>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

31. 3. 2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/05 (2006.01)	A 6 1 K 43/00	
A 6 1 K 39/104 (2006.01)	A 6 1 K 39/05	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/104	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 P 21/08	

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

(74) 代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(74) 代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(72) 発明者 コーラー、ハインツ

アメリカ合衆国、ケンタッキー、レキシントン、アテネ - ブーンズボロ ロード 5 2 3 5

(72) 発明者 マラー、シビル

アメリカ合衆国、ケンタッキー、レキシントン、アテネ - ブーンズボロ ロード 5 2 3 5

(72) 発明者 ブラウン、トマス、エル.

アメリカ合衆国、オハイオ、ビーバークリーク、キャッスル ゲート ドライブ 4 3 9 2

(72) 発明者 チャオ、ユンフェン

アメリカ合衆国、ケンタッキー、レキシントン、レディング ロード 3 8 5、アパートメント 1 8 4

(72) 発明者 モーガン、アルトン、シー .、ジュニア

カナダ国、バンクーバー、ピー . シー .、 コマース プレース、フォーティーンズ フロア、インネクス パイオテクノロジー インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 DA06 EA04

4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01

4C084 AA02 AA12 DA32 DA34 NA14 ZB261 ZB331 ZB351 ZC551

4C085 AA05 AA13 AA14 BA10 BA19 BA43 CC24

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	跨膜抗体诱导的细胞凋亡抑制		
公开(公告)号	JP2006522122A	公开(公告)日	2006-09-28
申请号	JP2006509211	申请日	2004-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	酒店的Nexus生物技术公司 即时通讯费龙公司		
申请(专利权)人(译)	酒店的Nexus生物技术公司 Imuferon公司		
[标]发明人	コーラーハインツ マラーシビル ブラウントマスエル チャオユンフェン モーガンアルトンシージュニア		
发明人	コーラー、ハインツ マラー、シビル ブラウン、トマス、エル. チャオ、ユンフェン モーガン、アルトン、シー、ジュニア		
IPC分类号	C07K16/40 C07K14/47 C07K19/00 A61K39/395 A61K38/00 A61K51/00 A61K39/05 A61K39/104 A61P35/00 A61P31/18 A61P31/04 A61P31/12 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08 A61K A61K6/00 A61K38/10 A61K47/42 A61K47/48 A61K51/10 C07K7/08 C07K16/42 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/4266 A61K2039/505 C07K16/40 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2319/00 C07K2319/02		
FI分类号	C07K16/40.ZNA C07K14/47 C07K19/00 A61K39/395.L A61K39/395.C A61K37/02 A61K43/00 A61K39/05 A61K39/104 A61P35/00 A61P31/18 A61P31/04 A61P31/12 G01N33/53.D C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C084/AA02 4C084/AA12 4C084/DA32 4C084/DA34 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZC551 4C085/AA05 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA10 4C085/BA19 4C085/BA43 4C085/CC24 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	池田幸		
优先权	60/451980 2003-03-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

细胞自杀(细胞凋亡)与病因有关,例如它是阿尔茨海默病中神经元丢失的主要原因。Caspase-3与细胞凋亡途径密切相关。在努力抑制活细胞的凋亡,超抗体(SAT)-使用跨膜技术,对半胱天冬酶抗体已经产生。使用跨膜抗体作为凋亡抑制剂的优点是它们在细胞中的特异性靶识别和它们与常规凋亡抑制剂相比的低毒性。MTS转运肽修饰单克隆抗胱天蛋白酶-3抗体已经显示出减少的活细胞放线菌素d诱导的细胞凋亡和血影的切割。这些结果表明,与膜转运肽结合的抗体具有抑制各种疾病中细胞凋亡的治疗潜力。

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (4)
C O 7 K 16/40 (2006.01)		C O 7 K 16/40	Z N A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47 (2006.01)		C O 7 K 14/47		4 B O 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)		C O 7 K 19/00		4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	L	4 C O 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	C	4 H O 4 5
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全 31 頁) 最

(21) 出願番号	特願2006-509211 (P2006-509211)	(71) 出願人	505334710
(86) (22) 出願日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		インネクスス バイオテクノロジー
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月31日 (2005.10.31)		コーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/006911		カナダ国 ヴィクトリア 3 ジー2
(87) 国際公開番号	W02004/078146		ーバー、ピー、シー、 パワー
(87) 国際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)		リート 1 4 0 0 - 4 0 0
(31) 優先権主張番号	60/451,980	(71) 出願人	505334112
(32) 優先日	平成15年3月5日 (2003.3.5)		イムフェロン インコーポレイテ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 4 0 5 0 9 ケ
			ー、レキシントン、アテネ
			ー
			ズボロ ロード 5 2 3 5
		(74) 代理人	100066692
			弁理士 浅村 皓
		(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇