

(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2014-527398

(P2014-527398A)

(43) 公表日 平成26年10月16日(2014.10.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-517079 (P2014-517079)	(71) 出願人	513321733
(86) (22) 出願日	平成24年6月19日 (2012.6.19)		オンコファクター コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		アメリカ合衆国 ワシントン 98102
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/043080		, シアトル, イーストレイク アベニ
(87) 国際公開番号	W02012/177595		ュー イースト 1616, スイート
(87) 国際公開日	平成24年12月27日 (2012.12.27)		200
(31) 優先権主張番号	61/499, 534	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成23年6月21日 (2011.6.21)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/547, 342		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成23年10月14日 (2011.10.14)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	61/583, 033	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成24年1月4日 (2012.1.4)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんの療法および診断のための組成物および方法

(57) 【要約】

がんの療法および診断用の組成物および方法が開示されている。例えば、例示的な組成物は、1つまたは複数のがん関連抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗原提示細胞などを含む。開示された組成物は、例えば、疾患、特にがんの診断、予防および/または治療において有用である。例えば、がんの治療において使用するための、配列番号1~24のいずれか1つに記載の配列に特異的に結合する単離された抗体または抗原結合性断片が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がんの治療において使用するための、配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の配列に特異的に結合する単離された抗体または抗原結合性断片。

【請求項 2】

がんの治療において使用するための、配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載の配列を含む単離されたポリペプチド、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有するその断片もしくはバリエーション。

【請求項 3】

がんの治療において使用するための、配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列をコードするか、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列番号 1 ~ 24 に記載の配列の断片もしくはバリエーションをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 4】

がんの治療において使用するための、配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列をコードするか、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する配列番号 1 ~ 24 に記載の配列の断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

薬学的に許容される担体と、IL1f5 (配列番号 1)、CCBP2 (配列番号 2)、IL1R2 (配列番号 3)、IL1RAPL1 (配列番号 4)、IL18BP (配列番号 5)、CLEC2B (配列番号 6)、C4BPA (配列番号 7)、C4BPB (配列番号 8)、SERPINI1 (配列番号 9)、IL1RAPアイソフォーム 1 (配列番号 10)、IL1RAPアイソフォーム 2 (配列番号 11)、GPR1 (配列番号 12)、GPR4 (配列番号 13)、GPR15 (配列番号 14)、GPR32 (配列番号 15)、GPR34 (配列番号 16)、GPR183 (配列番号 17)、SERPINA4 (配列番号 18)、SERPINB5 (配列番号 19)、SEMA4B (配列番号 20)、SEMA4D (配列番号 21)、CCL14 (配列番号 22)、NKTR (配列番号 23) および SFTPD (配列番号 24) からなる群から選択される配列に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片とを含む、内毒素非含有医薬組成物。

20

30

【請求項 6】

がんを有する、またはがんを有するリスクがある患者において使用するための静脈内注射用に製剤化された医薬組成物であって、薬学的に許容される担体と、IL1f5 (配列番号 1)、CCBP2 (配列番号 2)、IL1R2 (配列番号 3)、IL1RAPL1 (配列番号 4)、IL18BP (配列番号 5)、CLEC2B (配列番号 6)、C4BPA (配列番号 7)、C4BPB (配列番号 8)、SERPINI1 (配列番号 9)、IL1RAPアイソフォーム 1 (配列番号 10)、IL1RAPアイソフォーム 2 (配列番号 11)、GPR1 (配列番号 12)、GPR4 (配列番号 13)、GPR15 (配列番号 14)、GPR32 (配列番号 15)、GPR34 (配列番号 16)、GPR183 (配列番号 17)、SERPINA4 (配列番号 18)、SERPINB5 (配列番号 19)、SEMA4B (配列番号 20)、SEMA4D (配列番号 21)、CCL14 (配列番号 22)、NKTR (配列番号 23) および SFTPD (配列番号 24) からなる群から選択される配列に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片とを含む組成物。

40

【請求項 7】

1 つまたは複数の抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項 5 または請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

1 つまたは複数の抗体またはその抗原結合性断片を含み、該 1 つまたは複数の抗体またはその抗原結合性断片のそれぞれが、IL1f5 (配列番号 1)、CCBP2 (配列番号

50

2)、IL1R2(配列番号3)、IL1RAPL1(配列番号4)、IL18BP(配列番号5)、CLEC2B(配列番号6)、C4BPA(配列番号7)、C4BPB(配列番号8)、SERPINI1(配列番号9)、IL1RAPアイソフォーム1(配列番号10)、IL1RAPアイソフォーム2(配列番号11)、GPR1(配列番号12)、GPR4(配列番号13)、GPR15(配列番号14)、GPR32(配列番号15)、GPR34(配列番号16)、GPR183(配列番号17)、SERPINA4(配列番号18)、SERPINB5(配列番号19)、SEMA4B(配列番号20)、SEMA4D(配列番号21)、CCL14(配列番号22)、NKTR(配列番号23)およびSFTPD(配列番号24)からなる群から選択される配列に特異的に結合する、請求項5から7までのいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項9】

95%が内毒素を含まない、請求項5に記載の組成物。

【請求項10】

98%が内毒素を含まない、請求項5に記載の組成物。

【請求項11】

前記単離された抗体または抗原結合性断片がモノクローナル抗体または抗原結合性断片である、請求項5または請求項6に記載の組成物。

【請求項12】

前記単離された抗体または抗原結合性断片がヒト化抗体または抗原結合性断片である、請求項5または請求項6に記載の組成物。

20

【請求項13】

前記抗体または抗原結合性断片が毒素とコンジュゲートしている、請求項5または請求項6に記載の組成物。

【請求項14】

前記毒素が、リシン毒素、アブリン毒素、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン毒素、シュードモナス外毒素、赤痢菌毒素、およびボークウィード抗ウイルスタンパク質からなる群から選択される、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記抗体または抗原結合性断片が放射性核種とコンジュゲートしたモノクローナル抗体または抗原結合性断片である、請求項5または請求項6に記載の組成物。

30

【請求項16】

前記放射性核種が、⁹⁰Y、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹Atおよび²¹²Biからなる群から選択される、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

薬学的に許容される担体と、配列番号1~24のいずれか1つの1つまたは複数の単離されたポリペプチド、もしくはそれに対して少なくとも90%の同一性を有するその断片もしくはバリエーション、または上記のポリペプチドのいずれか1つをコードする単離されたポリヌクレオチドとを含む医薬組成物。

【請求項18】

免疫賦活薬をさらに含む、請求項17に記載の医薬組成物。

40

【請求項19】

がんの治療を必要とする被験体においてがんを治療するための方法であって、該被験体に請求項1から14までのいずれか一項に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項20】

前記がんが肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんから選択される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

患者におけるがんの存在を検出するための方法であって、

(a) 該患者から生体試料を得るステップと、

50

(b) 該生体試料を、配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つのポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片と接触させるステップと、
 (c) 該試料において該抗体または抗原結合性断片に結合したポリペプチドの量を検出するステップと、
 (d) 該ポリペプチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから該患者におけるがんの存在を決定するステップと
 を含む方法。

【請求項 22】

前記がんが肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんから選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

患者におけるがんの存在を検出するための方法であって、

(a) 該患者から生体試料を得るステップと、
 (b) 該生体試料を、ポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、該ポリヌクレオチドが、配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つのポリペプチドをコードするか、またはそれに対して少なくとも 90% の同一性を有する、その断片もしくはバリエントをコードする、ステップと、
 (c) 該試料において該オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出するステップと、
 (d) 該オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから該患者における該がんの存在を決定するステップと
 を含む方法。

【請求項 24】

前記がんが肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんから選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つの配列に特異的に結合する少なくとも 1 つの単離された抗体またはその抗原結合性断片と、検出試薬とを含む診断用キットであって、該検出試薬がレポーター基を含む、診断用キット。

【請求項 26】

ポリヌクレオチドとハイブリダイズする少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む診断用キットであって、該ポリヌクレオチドが配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つのポリペプチドをコードするか、または、それに対して少なくとも 90% の同一性を有するその断片もしくはバリエントをコードする、診断用キット。

【請求項 27】

患者においてがんを治療するための方法であって、

(a) 患者の生体試料中の配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つのポリペプチドの量を検出するステップと、
 (b) 該ポリペプチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから該患者におけるがんの存在を決定するステップと、
 (c) ステップ (b) においてがんを有すると決定された被験体に請求項 1 から 14 までのいずれか一項に記載の組成物を投与するステップと
 を含む方法。

【請求項 28】

前記がんが肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんから選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

患者においてがんを治療するための方法であって、

(a) 該患者から生体試料を得るステップと、
 (b) 該生体試料を、ポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触

10

20

30

40

50

させるステップであって、該ポリヌクレオチドが配列番号 1 ~ 24 のいずれか 1 つのポリペプチドをコードするか、またはそれに対して少なくとも 90 % の同一性を有するその断片もしくはバリエーションをコードする、ステップと、

(c) 該試料において該オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出するステップと、

(d) 該オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから該患者における該がんの存在を決定するステップと、

(e) ステップ (d) においてがんを有すると決定された被験体に請求項 1 から 14 までのいずれか一項に記載の組成物を投与するステップと

を含む方法。

10

【請求項 30】

前記がんが肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんから選択される、請求項 29 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2012年1月4日出願した米国仮出願第61/583,033号、2011年10月14日出願した米国仮出願第61/547,342号および2011年6月21日出願した米国仮出願第61/499,534号の、米国特許法第119条(e) 20

20

【0002】

配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、これによって参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名称はONCF_001_03WO_ST25.txtである。テキストファイルは88KBであり、2012年6月19日に作成され、EFS-Webを介して電子的に提出されている。

【0003】

発明の背景

発明の分野

本発明は、一般に、がんの療法および診断に関する。本発明は、より具体的には、がん関連タンパク質（例えば、がん因子 (oncofactor)）に特異的に結合する抗体および抗原結合性断片を含む医薬組成物および診断用組成物に関する。本発明は、さらに、がん関連ポリヌクレオチド、ポリペプチド、発現ベクター、宿主細胞などを含む医薬組成物および診断用組成物に関する。

30

【背景技術】

【0004】

関連技術の説明

がんは、世界中の著しい健康問題である。がんの検出および療法は進歩してきたが、予防および/または治療のための普遍的に上首尾の方法は現在のところ得られていない。現行の療法は、一般に、化学療法、外科手術および/または放射線の組合せに基づき、比較的非選択的であり、多くの患者において不適切であることが判明しているままである。特に、化学療法では、多数の副作用がもたらされ、いくつかの場合には、与えることができる投与量が制限されるほど重度であり、したがって、潜在的に有効な薬物の使用が妨げられる。さらに、がんは、多くの場合、化学療法薬に対する抵抗性を生じる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

相当に研究されているにもかかわらず、多くのヒトのがんの種類の有効な診断および治

50

療には大きな障害が残ったままである。したがって、当技術分野では、そのようながんを検出し、治療するための代替的な改善された方法の必要性が残っている。本発明は、これらの必要性を満たし、さらに、他の関連する利点を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の概要

本発明の一態様によると、薬学的に許容される担体と、IL1f5（配列番号1）、CCBP2（配列番号2）、IL1R2（配列番号3）、IL1RAPL1（配列番号4）、IL18BP（配列番号5）、CLEC2B（配列番号6）、C4BPA（配列番号7）、C4BPB（配列番号8）、SERPINI1（配列番号9）、IL1RAPアイソフォーム1（配列番号10）、IL1RAPアイソフォーム2（配列番号11）、GPR1（配列番号12）、GPR4（配列番号13）、GPR15（配列番号14）、GPR32（配列番号15）、GPR34（配列番号16）、GPR183（配列番号17）、SERPINA4（配列番号18）、SERPINB5（配列番号19）、SEMA4B（配列番号20）、SEMA4D（配列番号21）、CCL14（配列番号22）、NKTR（配列番号23）およびSFTPD（配列番号24）からなる群から選択される配列に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片とを含む医薬組成物が提供される。別の態様では、薬学的に許容される担体と、IL1f5（配列番号1）、CCBP2（配列番号2）、IL1R2（配列番号3）、IL1RAPL1（配列番号4）、IL18BP（配列番号5）、CLEC2B（配列番号6）、C4BPA（配列番号7）、C4BPB（配列番号8）、SERPINI1（配列番号9）、IL1RAPアイソフォーム1（配列番号10）、IL1RAPアイソフォーム2（配列番号11）、GPR1（配列番号12）、GPR4（配列番号13）、GPR15（配列番号14）、GPR32（配列番号15）、GPR34（配列番号16）、GPR183（配列番号17）、SERPINA4（配列番号18）、SERPINB5（配列番号19）、SEMA4B（配列番号20）、SEMA4D（配列番号21）、CCL14（配列番号22）、NKTR（配列番号23）およびSFTPD（配列番号24）からなる群から選択される配列に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片とを含む、内毒素非含有医薬組成物が提供される。

10

20

30

【0007】

さらなる態様では、がんを有する、またはがんを有するリスクがある患者において使用するための静脈内注射用に製剤化された医薬組成物であって、薬学的に許容される担体と、IL1f5（配列番号1）、CCBP2（配列番号2）、IL1R2（配列番号3）、IL1RAPL1（配列番号4）、IL18BP（配列番号5）、CLEC2B（配列番号6）、C4BPA（配列番号7）、C4BPB（配列番号8）、SERPINI1（配列番号9）、IL1RAPアイソフォーム1（配列番号10）、IL1RAPアイソフォーム2（配列番号11）、GPR1（配列番号12）、GPR4（配列番号13）、GPR15（配列番号14）、GPR32（配列番号15）、GPR34（配列番号16）、GPR183（配列番号17）、SERPINA4（配列番号18）、SERPINB5（配列番号19）、SEMA4B（配列番号20）、SEMA4D（配列番号21）、CCL14（配列番号22）、NKTR（配列番号23）およびSFTPD（配列番号24）からなる群から選択される配列に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片とを含む組成物。

40

【0008】

特定の態様では、組成物は、1つまたは複数の抗体またはその抗原結合性断片を含み、前記1つまたは複数の抗体またはその抗原結合性断片のそれぞれが、IL1f5（配列番号1）、CCBP2（配列番号2）、IL1R2（配列番号3）、IL1RAPL1（配列番号4）、IL18BP（配列番号5）、CLEC2B（配列番号6）、C4BPA（配列番号7）、C4BPB（配列番号8）、SERPINI1（配列番号9）、IL1RAPアイソフォーム1（配列番号10）、IL1RAPアイソフォーム2（配列番号11

50

)、G P R 1 (配列番号12)、G P R 4 (配列番号13)、G P R 15 (配列番号14)、G P R 32 (配列番号15)、G P R 34 (配列番号16)、G P R 183 (配列番号17)、S E R P I N A 4 (配列番号18)、S E R P I N B 5 (配列番号19)、S E M A 4 B (配列番号20)、S E M A 4 D (配列番号21)、C C L 14 (配列番号22)、N K T R (配列番号23)およびS F T P D (配列番号24)からなる群から選択される配列に特異的に結合する。

【0009】

ある特定の態様では、組成物は、95%、96%、97%、98%、または99%が内毒素を含まない。

【0010】

本発明のより具体的な実施形態では、本発明の単離された抗体または抗原結合性断片は、モノクローナル抗体または抗原結合性断片である。

【0011】

本発明の別の特定の態様では、本発明の単離された抗体または抗原結合性断片は、ヒト化抗体または抗原結合性断片である。

【0012】

さらに別の特定の態様では、本発明の抗体または抗原結合性断片は、これだけに限定することなく、リシン毒素、アプリン毒素、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン毒素、シュードモナス外毒素、赤痢菌毒素、およびボークウィード抗ウイルスタンパク質を含めた毒素とコンジュゲートしている。

【0013】

別の特定の態様では、本発明の抗体または抗原結合性断片は、これだけに限定することなく、⁹⁰Y、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹Atおよび²¹²Biを含めた放射性核種とコンジュゲートしている。

【0014】

本発明の別の態様によると、薬学的に許容される担体と、配列番号1~24のいずれか1つの単離されたポリペプチド、またはそれに対して少なくとも70%、80%、90%または95%の同一性を有するその断片もしくはバリエーション、または上記のポリペプチドのいずれか1つをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む医薬組成物が提供される。当然、本発明の医薬組成物中に免疫賦活薬などの追加的な構成成分が存在してよいことが理解されよう。本発明のポリヌクレオチドを使用する実施形態に関して、ポリヌクレオチドは、例えば、発現ベクター、宿主細胞などに存在してよいことも理解されよう。

【0015】

本発明の別の態様によると、がんの治療を必要とする被験体においてがんを治療するための方法であって、被験体に本発明に記載の医薬組成物を投与するステップを含む方法が提供される。治療されるがんは、基本的に、これだけに限定することなく、肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、および皮膚がん(例えば、黒色腫)、ならびに血液がん(例えば、白血病、リンパ腫など)を含めた、本発明の配列が関連するがんの種類のものである。

【0016】

本発明は、別の態様では、がんを治療するための医薬品の製造における、配列番号1~24のいずれか1つに記載の配列に特異的に結合する単離された抗体または抗原結合性断片の使用に関する方法を提供する。

【0017】

本発明は、別の態様では、がんを治療するための医薬品の製造における、配列番号1~24のいずれか1つに記載の配列を含む単離されたポリペプチド、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有するその断片もしくはバリエーションの使用に関する方法を提供する。

【0018】

本発明は、別の態様では、がんを治療するための医薬品の製造における、配列番号1~

10

20

30

40

50

24のいずれか1つに記載のアミノ酸配列をコードする、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有する配列番号1~24に記載の配列の断片もしくはバリエーションをコードする単離されたポリヌクレオチドの使用に関する方法を提供する。

【0019】

本発明は、別の態様では、がんを治療するための医薬品の製造における、配列番号1~24のいずれか1つに記載のアミノ酸配列をコードする、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有する配列番号1~24に記載の配列の断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドの使用に関する方法を提供する。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、RNAi分子、リボザイム、または別の阻害性核酸分子である。

10

【0020】

本発明のさらに別の態様によると、患者におけるがんの存在を検出するための方法であって、(a)患者から生体試料を得るステップと、(b)生体試料を、配列番号1~24のいずれか1つのポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片と接触させるステップと、(c)試料において抗体または抗原結合性断片に結合したポリペプチドの量を検出するステップと、(d)ポリペプチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから患者におけるがんの存在を決定するステップとを含む方法が提供される。

【0021】

本発明のさらに別の態様によると、患者におけるがんの存在を検出するための方法であって、(a)患者から生体試料を得るステップと、(b)生体試料を、配列番号1~24のいずれか1つのポリペプチドをコードする、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有するその断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、(c)試料においてオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出するステップと、(d)オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから患者におけるがんの存在を決定するステップとを含む方法が提供される。

20

【0022】

さらに別の態様では、本発明は、配列番号1~24のいずれか1つの配列に特異的に結合する少なくとも1つの単離された抗体またはその抗原結合性断片と、レポーター基を含む検出試薬とを含む診断用キットを提供する。

30

【0023】

さらに別の態様では、本発明は、配列番号1~24のいずれか1つのポリペプチドをコードする、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有するその断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズする少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む診断用キットを提供する。一態様では、患者においてがんを治療するための方法であって、(a)患者の生体試料中の配列番号1~24のいずれか1つのポリペプチドの量を検出するステップと、(b)ポリペプチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから患者におけるがんの存在を決定するステップと、(c)ステップ(b)においてがんを有すると決定された被験体に請求項1から14までのいずれか一項に記載の組成物を投与するステップとを含む方法が提供される。

40

【0024】

ある特定の態様では、患者においてがんを治療するための方法であって、(a)患者から生体試料を得るステップと、(b)生体試料を、配列番号1~24のいずれか1つのポリペプチドをコードする、またはそれに対して少なくとも90%の同一性を有するその断片もしくはバリエーションをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、(c)試料においてオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出するステップと、(d)オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を所定のカットオフ値と比較し、そこから患者におけるがんの存在を決定するステップと、(e)ステップ(d)においてがんを有すると決定された被験体に請求項1から14までのいずれか一項に記載の組成物を投与するステップ

50

とを含む方法が提供される。

【 0 0 2 5 】

別の態様では、がんは肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんから選択される。これらおよび本発明の他の態様は、以下の発明の詳細な説明および添付図を参照することにより明らかになろう。本明細書において開示されている参考文献は全て、これによって、それぞれが個々に組み込まれたのと同じくその全体が参照により組み込まれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 図 1 は、代表的混合腫瘍リンパ球培養 (M T L C) アッセイの結果を示す。 R a j i B リンパ腫細胞を、 P B M C と共培養し、種々の濃度の組換え I L 1 f 5 ポリペプチドで処理した。

【 図 2 】 図 2 は、代表的 M T L C アッセイの結果を示す。 R a j i B リンパ腫細胞を、 P B M C と共培養し、種々の濃度の組換え I L 1 R A P 2 ポリペプチドで処理した。

【 図 3 】 図 3 は、代表的 M T L C アッセイの結果を示すグラフである。 R a j i B リンパ腫細胞を、 P B M C と共培養し、種々の濃度の組換え C C L 1 4 ポリペプチドで処理した。

【 図 4 】 図 4 は、代表的免疫組織化学 (I H C) アッセイの結果を示す。侵襲性管癌腫乳がん細胞における I L 1 f 5 発現は、正常な管上皮、血管および間質における I L 1 f 5 発現と比較して増加している。

【 図 5 】 図 5 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。腺癌腫結腸がん細胞における I L 1 f 5 発現は、正常な結腸組織における I L 1 f 5 発現と比較して増加している。

【 図 6 】 図 6 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。腺癌腫前立腺がん細胞における I L 1 f 5 発現は、正常な前立腺および間質における I L 1 f 5 発現と比較して増加している。

【 図 7 】 図 7 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。扁平上皮細胞癌腫、腺癌腫および乳頭状腺癌腫肺がん細胞における I L 1 f 5 発現は、正常な肺胞組織における I L 1 f 5 発現と比較して増加している。

【 図 8 】 図 8 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。侵襲性管癌腫乳がん細胞における G P R 1 8 3 発現は、正常な管上皮、血管および間質における G P R 1 8 3 発現と比較して増加している。

【 図 9 】 図 9 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。腺癌腫結腸がん細胞における G P R 1 8 3 発現は、正常な結腸組織における G P R 1 8 3 発現と比較して増加している。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。扁平上皮細胞癌腫および腺癌腫肺がん細胞における G P R 1 8 3 発現は、正常な肺胞組織における G P R 1 8 3 発現と比較して増加している。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。侵襲性管癌腫乳がん細胞における I L 1 R A P 発現は、正常な乳管上皮、血管および間質における I L 1 R A P 発現と比較して増加している。

【 図 1 2 】 図 1 2 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。肺がん細胞における I L 1 R A P 発現は、正常な肺胞における I L 1 R A P 発現と比較して増加している。

【 図 1 3 】 図 1 3 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。侵襲性管癌腫乳がん細胞における C C L 1 4 発現は、正常な乳管上皮、血管および間質における C C L 1 4 発現と比較して増加している。

【 図 1 4 】 図 1 4 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。前立腺腺癌腫における C C L 1 4 発現は、正常な前立腺および間質における C C L 1 4 発現と比較して増加している。

【 図 1 5 】 図 1 5 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。肺がん細胞における C C L 1 4 発現は、正常な肺胞における C C L 1 4 発現と比較して増加している。

【 図 1 6 】 図 1 6 は、代表的 I H C アッセイの結果を示す。侵襲性管癌腫乳がん細胞における S E M A 4 D 発現は、正常な乳管上皮、血管および間質における S E M A 4 D 発現と

10

20

30

40

50

比較して増加している。

【図 17】図 17 は、代表的 IHC アッセイの結果を示す。侵襲性管癌腫乳がん細胞における IL1R2 発現は、正常な乳管上皮、血管および間質における IL1R2 発現と比較して増加している。

【図 18】図 18 は、代表的 MTLCA アッセイの結果を示す。Raji Bリンパ腫細胞を、PBMC と共培養し、種々の濃度の組換え IL1R2 ポリペプチドで処理した。

【図 19】図 19 は、代表的 T細胞増殖アッセイの結果を示す。Raji Bリンパ腫細胞を、PBMC と共培養し、種々の濃度の組換え IL1f5 ポリペプチドで処理した。T細胞増殖に対する IL1f5 の効果を測定した。

【発明を実施するための形態】

【0027】

配列識別子の簡単な説明

配列番号 1 は、タンパク質 IL1f5 (NP__036407.1) のアミノ酸配列である。

【0028】

配列番号 2 は、タンパク質 CCBP2 (NP__001287.2) のアミノ酸配列である。

【0029】

配列番号 3 は、タンパク質 IL1R2 (NP__004624.1) のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号 4 は、タンパク質 IL1RAPL1 (NP__055086.1) のアミノ酸配列である。

【0031】

配列番号 5 は、タンパク質 IL18BP (NP__766630.2) のアミノ酸配列である。

【0032】

配列番号 6 は、タンパク質 CLEC2B (NP__005118.2) のアミノ酸配列である。

【0033】

配列番号 7 は、タンパク質 C4BPA (NP__000706.1) のアミノ酸配列である。

【0034】

配列番号 8 は、タンパク質 C4BPB (NP__000707.1) のアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号 9 は、タンパク質 SERPINI1 (NP__005016.1) のアミノ酸配列である。

【0036】

配列番号 10 は、タンパク質 IL1RAP アイソフォーム 1 (NP__002173.1) のアミノ酸配列である。

【0037】

配列番号 11 は、タンパク質 IL1RAP アイソフォーム 2 (NP__608273.1) のアミノ酸配列である。

【0038】

配列番号 12 は、タンパク質 GPR1 (NP__005270.2) のアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号 13 は、タンパク質 GPR4 (NP__005273.1) のアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

配列番号 1 4 は、タンパク質 G P R 1 5 (N P _ 0 0 5 2 8 1 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 1 5 は、タンパク質 G P R 3 2 (N P _ 0 0 1 4 9 7 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 1 6 は、タンパク質 G P R 3 4 (N P _ 0 0 5 2 9 1 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 1 7 は、タンパク質 G P R 1 8 3 (N P _ 0 0 4 9 4 2 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 1 8 は、タンパク質 S E R P I N A 4 (N P _ 0 0 6 2 0 6 . 2) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 5 】

配列番号 1 9 は、タンパク質 S E R P I N B 5 (N P _ 0 0 2 6 3 0 . 2) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 2 0 は、タンパク質 S E M A 4 B (N P _ 0 6 4 5 9 5 . 2) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 2 1 は、タンパク質 S E M A 4 D (N P _ 0 0 6 3 6 9 . 3) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号 2 2 は、タンパク質 C C L 1 4 (N P _ 1 1 6 7 3 9 . 1) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 9 】

配列番号 2 3 は、タンパク質 N K T R (N P _ 0 0 5 3 7 6 . 2) のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 0 】

配列番号 2 4 は、タンパク質 S F T P D (N P _ 0 0 3 0 1 0 . 4) のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 1 】

発明の詳細な説明

本発明は、一般に、細胞または動物に、単独で、または 1 つまたは複数の他の療法のモダリティと組み合わせて投与するための、本明細書に開示されているがん因子抗体、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、T細胞および/または他の組成物のうちの 1 つまたは複数を経験的に許容される担体中に含む医薬組成物に関する。より詳細には、本明細書に記載の通り、本発明のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列は、がん因子配列を示し、がんの検出および治療において有用な重要な標的である。したがって、本発明の例示的な態様としては、これだけに限られないが、記載されているがん因子配列および関連する結合性作用物質（例えば、抗体）の、がんの検出および/または治療における種々の使用が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

本発明の実施では、特にそれと反する指示がなければ、当技術分野の技術の範囲に入るウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学および組換え DNA 技法の従来の方法を用い、その多くは、例示のために下で説明されている。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版、1989年) ; Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (

10

20

30

40

50

1982年); DNA Cloning: A Practical Approach、I巻およびII巻(D. Glover編); Oligonucleotide Synthesis(N. Gait編、1984年); Nucleic Acid Hybridization(B. HamesおよびS. Higgins編、1985年); Transcription and Translation(B. HamesおよびS. Higgins編、1984年); Animal Cell Culture(R. Freshney編、1986年); Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning(1984年)を参照されたい。

【0053】

本明細書において引用されている全ての刊行物、特許および特許出願は、上記のものも下記のものも、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0054】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a(1つの)」、「an(1つの)」および「the(その)」は、その内容からそうでないことが明らかでない限り、複数の参照物を含む。

【0055】

抗体、その断片および他の結合性作用物質

言及した通り、一態様によると、本発明は、本明細書に開示されているがん関連配列(例えば、がん因子)に対して、またはその部分、バリエーションもしくは誘導体に対して免疫学的結合を示す抗体およびその抗原結合性断片などの結合性作用物質を含む医薬組成物を提供する。

【0056】

より詳細には、ある特定の好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、IL1f5(配列番号1)、CCBP2(配列番号2)、IL1R2(配列番号3)、IL1RAPL1(配列番号4)、IL18BP(配列番号5)、CLEC2B(配列番号6)、C4BPA(配列番号7)、C4BPB(配列番号8)、SERPINI1(配列番号9)、IL1RAPアイソフォーム1(配列番号10)、IL1RAPアイソフォーム2(配列番号11)、GPR1(配列番号12)、GPR4(配列番号13)、GPR15(配列番号14)、GPR32(配列番号15)、GPR34(配列番号16)、GPR183(配列番号17)、SERPINA4(配列番号18)、SERPINB5(配列番号19)、SEMA4B(配列番号20)、SEMA4D(配列番号21)、CCL14(配列番号22)、NKTR(配列番号23)およびSFTPD(配列番号24)からなる群から選択されるがん関連ポリペプチド配列に特異的に結合することができる抗体および/または抗原結合性断片を含む。

【0057】

抗体、またはその抗原結合性断片は、本発明のポリペプチドと検出可能なレベルで反応し(例えば、ELISAアッセイの範囲内で)、同様の条件下で無関係のポリペプチドとは検出可能に反応しない場合に、そのポリペプチドに「特異的に結合する」、「免疫学的に結合する」、および/または「免疫学的に反応性である」といわれる。免疫学的結合とは、この状況において使用される場合、一般に、免疫グロブリン分子と、その免疫グロブリンと特異的な抗原との間に生じる種類の非共有結合性の相互作用を指す。免疫学的結合性相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数(K_d)の点から表すことができ、 K_d が小さいほど親和性が大きいことが示される。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野で周知の方法を用いて数量化することができる。そのような方法の1つは、抗原結合部位/抗原複合体の形成および解離の速度を測定することを伴い、これらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に同等に影響を及ぼす幾何的パラメータに左右される。したがって、「会合速度定数」(K_{on})および「解離速度定数」(K_{off})はどちらも、濃度ならびに会合および解離の実際の速度を算出することによって決定することができる。 K_{off}/K_{on} の比により、親和性に関連しない全てのパラメータを解除することが可能になり、したがって、これは解離定数 K_d と等しい。一般に、Daviesら(1990年)Annual Rev. Biochem. 59巻: 439~473頁を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0058】

抗体の「抗原結合部位」または「結合部分」とは、抗原結合に關与する免疫グロブリン分子の一部を指す。抗原結合部位は、重(H)鎖および軽(L)鎖のN末端可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に異なるひと続きは「超可変領域」と称され、「フレームワーク領域」または「FR」として公知の、より保存された隣接しているひと続きの間に介在している。したがって、「FR」という用語は、免疫グロブリンにおいて超可変領域の間にそれと隣り合って天然に見いだされるアミノ酸配列を指す。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は、三次元空間で互いに対して配置され、抗原結合性表面を形成する。抗原結合性表面は、結合した抗原の三次元表面と相補的であり、重鎖および軽鎖のそれぞれの3つの超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」と称される。

10

【0059】

好ましい実施形態では、結合性作用物質は、抗体またはその抗原結合性断片である。抗体は、当業者に公知のさまざまな技法のいずれかによって調製することができる。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年を参照されたい。一般に、抗体は、本明細書に記載のモノクローナル抗体の生成を含めた細胞培養技法によって、または抗体遺伝子を適切な細菌細胞宿主もしくは哺乳動物細胞宿主にトランスフェクトして、組換え抗体の産生を可能にすることによって作製することができる。1つの技法では、ポリペプチドを含む免疫原を多種多様な哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギ)のいずれかに最初に注射する。このステップでは、本発明のポリペプチドは、修飾を伴わずに免疫原として機能し得る。あるいは、特に比較的短いポリペプチドについては、ポリペプチドをウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンなどの担体タンパク質とつなげると優れた免疫応答を引き出すことができる。免疫原を、好ましくは、1回または複数回の追加免疫を組み入れた所定のスケジュールに従って動物宿主に注射し、定期的に動物から採血する。次いで、ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体を、例えば、適切な固体支持体とカップリングさせたポリペプチドを使用したアフィニティークロマトグラフィーによってそのような抗血清から精製することができる。

20

【0060】

目的の抗原性ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、例えば、KohlerおよびMilstein、Eur. J. Immunol. 6巻: 511~519頁、1976年の技法およびその改良法を用いて調製することができる。簡単に述べると、これらの方法は、所望の特異性(すなわち、目的のポリペプチドとの反応性)を有する抗体を産生することができる不死細胞系統の調製を伴う。そのような細胞系統は、例えば、上記の通り免疫化した動物から得た脾臓細胞から作製することができる。次いで、脾臓細胞を、例えば、骨髄腫細胞融合パートナー、好ましくは免疫化した動物と同系のものと融合することによって不死化する。種々の融合技法を用いることができる。例えば、脾臓細胞および骨髄腫細胞を非イオン性界面活性剤と数分にわたって合わせ、次いで、ハイブリッド細胞の成長を支持するが、骨髄腫細胞の成長は支持しない選択培地に低密度でプレーティングすることができる。好ましい選択技法では、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)選択を用いる。十分な時間の後、通常約1~2週間、ハイブリッドのコロニーを観察する。単一のコロニーを選抜し、それらの培養物の上清を、ポリペプチドに対する結合活性について試験する。応答性および特異性が高いハイブリドーマが好ましい。

30

40

【0061】

モノクローナル抗体を、成長しているハイブリドーマのコロニーの上清から単離することができる。さらに、収量を増大させるために、ハイブリドーマ細胞系統をマウスなどの適切な脊椎動物宿主の腹腔内に注射することなどの種々の技法を用いることができる。次いで、モノクローナル抗体を腹水または血液から採取することができる。クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈殿、および抽出などの従来技法によって抗体から汚染物質を除去することができる。本発明のポリペプチドは、精製プロセスにおいて、例えば、アフィニ

50

ティークロマトグラフィーステップにおいて使用することができる。

【0062】

抗体分子の免疫学的結合特性を示すことができる抗原結合部位を含むいくつかの治療的に有用な分子が当技術分野で公知である。タンパク質分解酵素であるパパインにより、IgG分子が優先的に切断されていくつかの断片がもたらされ、そのうちの2つ(「F(ab)」断片)はそれぞれ、インタクトな抗原結合部位を含む共有結合したヘテロ二量体を含む。酵素ペプシンは、IgG分子を切断して、両方の抗原結合部位を含む「F(ab')₂」断片を含めたいくつかの断片をもたらすことができる。「Fv」断片は、IgM、およびまれな場合ではIgGまたはIgA免疫グロブリン分子の優先的なタンパク質分解性の切断によって作製することができる。しかし、Fv断片は、より一般的には、当技術分野で公知の組換え技法を用いて得る。Fv断片は、ネイティブな抗体分子の抗原認識および結合能力の大半を保持する抗原結合部位を含む非共有結合性V_H::V_Lヘテロ二量体を含む。Inbarら(1972年)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69巻:2659~2662頁;Hochmanら(1976年)Biochem 15巻:2706~2710頁;および Ehrlichら(1980年)Biochem 19巻:4091~4096頁。

10

【0063】

単鎖Fv(「sFv」)ポリペプチドは、V_Hコード遺伝子とV_Lコード遺伝子とがペプチドをコードするリンカーによって連結した遺伝子融合物に発現される共有結合により連結したV_H::V_Lヘテロ二量体である。Hustonら(1988年)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85巻(16号):5879~5883頁。自然に凝集するが化学的に分離される抗体のV領域由来の軽ポリペプチド鎖および重ポリペプチドを、抗原結合部位の構造に実質的に類似した三次元構造にフォールディングされるsFv分子に変換するための化学構造を見分けるためのいくつかの方法が記載されている。例えば、Hustonらの米国特許第5,091,513号および同第5,132,405号;ならびにLadnerらの米国特許第4,946,778号を参照されたい。

20

【0064】

上記の分子のそれぞれが重鎖および軽鎖のCDRセットを含み、これはそれぞれ、CDRを支持し、互いに対するCDRの空間的な関係を規定する重鎖および軽鎖のFRセットの間に介在する。本明細書で使用される場合、「CDRセット」とは、重鎖または軽鎖V領域の3つの超可変領域を指す。重鎖または軽鎖のN末端から発し、これらの領域は、それぞれ「CDR1」、「CDR2」および「CDR3」という用語で示される。したがって、抗原結合部位は、重鎖V領域および軽鎖V領域のそれぞれからのCDRセットで構成される6つのCDRを含む。単一のCDR、(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3)を含むポリペプチドは、本明細書では、「分子認識単位」と称される。いくつかの抗原-抗体複合体の結晶学的分析により、CDRのアミノ酸残基が結合した抗原と広範囲にわたる接触を形成し、最も広範囲の抗原接触は重鎖CDR3とのものであることが実証されている。したがって、分子認識単位は、主に、抗原結合部位の特異性に関与する。

30

【0065】

「FRセット」という用語は、本明細書で使用される場合、重鎖または軽鎖V領域のCDRセットのCDRの枠組みを作る4つの隣接するアミノ酸配列を指す。いくつかのFR残基は結合した抗原と接触することができるが、FR、特にCDRと直接隣り合うFR残基は、主に抗原結合部位へのV領域のフォールディングに関与する。FR内で、ある特定のアミノ残基およびある特定の構造的特徴は非常に高度に保存されている。この点について、全てのV領域配列は、およそ90アミノ酸残基の内部のジスルフィドループを含有する。V領域が結合性部位にフォールディングされると、CDRは、抗原結合性表面を形成する突出したループモチーフとして提示される。正確なCDRアミノ酸配列に関係なくある特定の「カノニカル」構造にフォールディングしたCDRループの形状に影響を及ぼすFRの保存された構造領域が存在することが一般に理解されている。さらに、ある特定のFR残基が、抗体の重鎖および軽鎖の相互作用を安定化する非共有結合性のドメイン間接触に関与することが公知である。

40

50

【0066】

非ヒト免疫グロブリンに由来する抗原結合部位を含むいくつかの「ヒト化」抗体分子が記載されており、それらとして、げっ歯類V領域およびそれらの関連するCDRがヒト定常ドメインと融合したキメラ抗体(Winterら(1991年)Nature 349巻:293~299頁;Lobuglioら(1989年)Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86巻:4220~4224頁;Shawら(1987年)J Immunol. 138巻:4534~4538頁;およびBrownら(1987年)Cancer Res. 47巻:3577~3583頁)、適切なヒト抗体定常ドメインと融合する前にヒト支持FRにグラフトしたげっ歯類CDR(Riechmannら(1988年)Nature 332巻:323~327頁;Verhoeyenら(1988年)Science 239巻:1534~1536頁;およびJonesら(1986年)Nature 321巻:522~525頁)、ならびに組換えによってベニア化したげっ歯類FRによって支持されたげっ歯類CDR(欧州特許公開第519,596号、1992年12月23日公開)が挙げられる。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントにおけるそれらの部分の持続時間および治療への適用の有効性を限定する、げっ歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫学的応答が最小限になるように設計する。

10

【0067】

本明細書で使用される場合、「ベニア化FR」および「組換えによってベニア化したFR」という用語は、例えば、げっ歯類の重鎖または軽鎖V領域由来のFR残基を、ヒトFR残基と選択的に置き換えて、ネイティブなFRポリペプチドフォールディング構造の実質的に全てを保持する抗原結合部位を含む異種分子をもたらすことを指す。ベニア化技法は、抗原結合部位のリガンド結合特性が主に抗原結合性表面内の重鎖および軽鎖のCDRセットの構造および相対的配置によって決定されることの理解に基づく。Daviesら(1990年)Ann. Rev. Biochem. 59巻:439~473頁。したがって、抗原結合特異性は、CDR構造、それらの相互作用、およびそれらとV領域ドメインの残りとの相互作用が慎重に維持される場合にのみヒト化抗体に保存され得る。ベニア化技法を使用することによって、免疫系に容易に遭遇する外面の(例えば、溶媒露出性)FR残基をヒト残基と選択的に置き換えて、弱い免疫原性、または実質的に非免疫原性のベニア化表面のいずれかを含むハイブリッド分子をもたらす。

20

【0068】

ベニア化のプロセスでは、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第4版、(U.S. Dept. of Health and Human Services、U.S. Government Printing Office、1987年)、Kabatデータベースへのアップデート、および他の利用できる米国および外国のデータベースによって収集されたヒト抗体可変ドメインについての利用可能な配列データ(核酸およびタンパク質の両方)を使用する。ヒト抗体断片およびマウス抗体断片の既知の三次元構造からV領域アミノ酸の溶媒露出度を推定することができる。マウス抗原結合部位のベニア化には2つの一般的なステップがある。最初に、目的の抗体分子の可変ドメインのFRを、上記の確認された供給源から得たヒト可変ドメインの対応するFR配列と比較する。次いで、最も相同なヒトV領域を、対応するマウスアミノ酸と残基ごとに比較する。マウスFR内のヒト対応物とは異なる残基を、当技術分野で周知の組換え技法を用いてヒト部分に存在する残基と置き換える。残基の切り換えは、少なくとも部分的に露出している(溶媒露出性)部分のみを用いて行い、V領域ドメインの三次構造に対する有意な効果を有する可能性があるアミノ酸残基、例えば、プロリン、グリシンおよび荷電アミノ酸などの置き換えには注意を働かせる。

30

40

【0069】

このように、得られた「ベニア化された」マウス抗原結合部位は、したがって、マウスCDR残基、CDRと実質的に隣り合う残基、埋もれているまたはほとんど埋もれている(非溶媒露出性)と同定された残基、重鎖ドメインと軽鎖ドメインの間の非共有結合性の接触(例えば、静電気による接触および疎水性の接触)に関与すると考えられている残基、およびCDRループの「カノニカル」三次構造に影響を及ぼすと考えられているFRの保存された構造領域由来の残基が保持されるように設計する。次いで、これらの設計基準

50

を用いて、マウス抗体分子の抗原特異性を示す組換えヒト抗体を発現させるために哺乳動物細胞をトランスフェクトするために使用することができる、マウス抗原結合部位の重鎖および軽鎖の両方のCDRを組み合わせてヒトらしいFRに入れる組換えヌクレオチド配列を調製する。

【0070】

本発明の別の実施形態では、本発明のモノクローナル抗体を1つまたは複数の治療剤とカップリングすることができる。この点について適切な作用剤としては、放射性核種、分化誘導因子、薬物、毒素、およびそれらの誘導体が挙げられる。好ましい放射性核種としては、⁹⁰Y、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、および²¹²Biが挙げられる。好ましい薬物としては、メトトレキサート、およびピリミジンおよびプリン類似体が挙げられる。好ましい分化誘導因子としては、ホルボールエステルおよび酪酸が挙げられる。好ましい毒素としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン、シュドモナス外毒素、赤痢菌毒素、およびポークウィード抗ウイルスタンパク質が挙げられる。

10

【0071】

治療剤は、適切なモノクローナル抗体と、直接的に、または間接的に（例えば、リンカー基を介して）カップリング（例えば、共有結合）させることができる。作用剤と抗体の間の直接反応は、それぞれが他方と反応することができる置換基を保有する場合に可能である。例えば、一方のアミノ基またはスルフヒドリル基などの求核基は、他方の酸無水物または酸ハロゲン化物などのカルボニル含有基と、または良好な脱離基（例えば、ハロゲン化物）を含有するアルキル基と反応することができる。

20

【0072】

あるいは、治療剤と抗体を、リンカー基を介してカップリングすることが望ましい。リンカー基は、結合能力の干渉を回避するために抗体を作用剤から隔てるスペーサーとして機能し得る。リンカー基は、作用剤または抗体上の置換基の化学的反応性を増大させ、したがって、カップリング効率を上昇させる機能も果たし得る。化学的反応性が増大することにより、そうでなければ可能ではない作用剤または作用剤上の官能基の使用も容易になる可能性がある。

【0073】

ホモ官能性およびヘテロ官能性の両方の種々の二官能性試薬または多官能性試薬（例えば、Pierce Chemical Co., Rockford, ILのカatalogに記載のものなど）を、リンカー基として使用することができることは当業者には明らかであろう。カップリングは、例えば、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基または酸化炭水化物残基を通じて実施する。そのような方法体系が記載されている多数の参考文献が存在する。例えば、Rodwellらの米国特許第4,671,958号。

30

【0074】

治療剤が、本発明の免疫コンジュゲートの抗体部分から遊離するとより強力になる場合、細胞に内部移行している間またはそのすぐ後に切断可能なリンカー基を使用することが望ましい。いくつかの異なる切断可能なリンカー基が記載されている。作用剤のこれらのリンカー基からの細胞内遊離の機構としては、ジスルフィド結合の還元による切断（例えば、Spitlerの米国特許第4,489,710号）、感光性結合の放射線照射による切断（例えば、Senterらの米国特許第4,625,014号）、誘導体化されたアミノ酸の側鎖の加水分解による切断（例えば、Kohnらの米国特許第4,638,045号）、血清補体媒介性加水分解による切断（例えば、Rodwellらの米国特許第4,671,958号）、および酸触媒加水分解による切断（例えば、Blattlerらの米国特許第4,569,789号）が挙げられる。

40

【0075】

2つ以上の作用剤を抗体とカップリングすることが望ましい。一実施形態では、多数の作用剤の分子を1つの抗体分子とカップリングする。別の実施形態では、2種類以上の作用剤を1つの抗体とカップリングすることができる。特定の実施形態にかかわらず、2つ

50

以上の作用剤との免疫コンジュゲートは、さまざまなやり方で調製することができる。例えば、2つ以上の作用剤を、抗体分子と直接カップリングすることもでき、付着のための多数の部位をもたらすリンカーを使用することもできる。あるいは、担体を使用することができる。

【0076】

担体は、直接またはリンカー基を介した共有結合を含めたさまざまなやり方で作用剤を担持してよい。適切な担体としては、アルブミンなどのタンパク質（例えば、Katoらの米国特許第4,507,234号）、アミノデキストランなどのペプチドおよび多糖（例えば、Shihらの米国特許第4,699,784号）が挙げられる。担体は、非共有結合性結合によって、または、リポソーム小胞内などへの封入によって作用剤を担持してもよい（例えば、米国特許第4,429,008号および同第4,873,088号）。放射性核種作用剤に特異的な担体としては、放射性ハロゲン化された小分子およびキレート化合物が挙げられる。例えば、米国特許第4,735,792号には、代表的な放射性ハロゲン化された小分子およびそれらの合成が開示されている。放射性核種キレートは、窒素原子および硫黄原子を、金属、または金属酸化物、放射性核種と結合するドナー原子として含有する物を含めたキレート化合物から形成することができる。例えば、Davisonらの米国特許第4,673,562号には、代表的なキレート化合物およびそれらの合成が開示されている。

10

【0077】

上記の抗体の種類およびそれを作成する手順は、例示するために提供されており、限定するものではない。これら、ならびに抗体および他の結合性作用物質を作製し、特徴付けるための多くの他の方法体系が当技術分野において公知であり確立されていること、およびこれらの方法体系を本発明に関連して用いることができることが理解されよう。

20

【0078】

ポリペプチド組成物

本発明の別の態様は、がん関連ポリペプチドを提供する。ある特定の関連する実施形態では、ポリペプチドを、例えば、がんを治療するための医薬組成物および/またはワクチン組成物に関連して使用する。

【0079】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、その従来の意味で、すなわち、アミノ酸の配列として使用される。ポリペプチドは、産物の特定の長さ限定されず、したがって、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質がこのポリペプチドの定義の範囲内に含まれ、そのような用語は、特に他の指示がなければ、本明細書では互換的に使用することができる。また、この用語は、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに当技術分野で公知の他の修飾は、天然に存在するものおよび天然に存在しないもののどちらも指さない、またはそれを排除する。ポリペプチドは、タンパク質全体であってもその部分配列であってもよい。本発明に関連して、特定の目的のポリペプチドは、エピトープ、すなわち、ポリペプチドの免疫原的性質に実質的に関与し、免疫応答を惹起することができる抗原性決定因子を含むアミノ酸部配列である。

30

40

【0080】

本発明のある特定の組成物および方法では、好ましいポリペプチドは、配列番号1~24のいずれか1つに記載のポリペプチド、または上記のポリペプチドのいずれかのバリエーションもしくは断片、例えば、それに対して少なくとも70%、80%、90%または95%の同一性を有するバリエーションもしくは断片などを含む。

【0081】

本発明のポリペプチドは、本明細書では、時には、それらのがん関連性、例えば、腫瘍試料におけるそれらの発現および/または活性のレベルの上昇などを示すものとしてがん関連タンパク質または腫瘍ポリペプチドまたはがん因子ポリペプチドと称される。したがって、ある特定の実施形態では、「がん因子」、「腫瘍ポリペプチド」または「がん関連

50

ポリペプチド」という用語は、一般に、互換的に使用され、腫瘍試料の相当な割合、例えば、本明細書において提供される代表的なアッセイを用いて決定された場合に、試験された腫瘍試料の好ましくは約20%超、より好ましくは約30%超、最も好ましくは約50%超またはそれ以上が、正常組織における発現レベルの少なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍を超えるレベルで発現され、かつ/または活性である本発明のポリペプチド配列またはそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を指す。腫瘍細胞において発現および/または活性のレベルが上昇している本発明のがん因子ポリペプチドには、下でさらに説明されている通り、診断マーカーならびに治療標的のいずれとしても特定の有用性が見いだされる。

【0082】

ある特定の実施形態では、本発明の組成物および/または方法に従って使用されるポリペプチドは免疫原性である、すなわち、イムノアッセイ（例えば、ELISAまたはT細胞刺激アッセイなど）において、がんの患者由来の抗血清および/またはT細胞と検出可能に反応する。免疫原活性に関するスクリーニングは、当業者に周知の技法を用いて実施することができる。例えば、そのようなスクリーニングは、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年に記載のものなどの方法を用いて実施することができる。例示的な一例では、ポリペプチドを、固体支持体上に固定化し、患者血清と接触させて、血清内の抗体を固定化したポリペプチドに結合させることができる。次いで、結合していない血清を除去し、結合した抗体を、例えば、¹²⁵I 標識したプロテインAを使用して検出することができる。

10

20

【0083】

当業者には理解される通り、本明細書に開示されているポリペプチドの免疫原性部分も、本発明に包含される。「免疫原性部分」とは、本明細書で使用される場合、それ自体が、ポリペプチドを認識するB細胞および/またはT細胞の表面抗原受容体と免疫学的に反応性である（すなわち、特異的に結合する）、本発明の免疫原性ポリペプチドの断片である。免疫原性部分は、一般に、Paul、Fundamental Immunology、第3版、243~247頁（Raven Press、1993年）およびそこに引用されている参考文献において要約されているものなどの周知の技法を用いて同定することができる。そのような技法は、ポリペプチドを、抗原特異的な抗体、抗血清および/またはT細胞系統またはクローンと反応する能力についてスクリーニングすることを含む。本明細書で使用される場合、抗血清および抗体は、抗原に特異的に結合する（すなわち、ELISAまたは他のイムノアッセイにおいてタンパク質と反応し、無関係のタンパク質とは検出可能に反応しない）場合に、「抗原特異的」である。そのような抗血清および抗体は、本明細書に記載の通り、および周知の技法を用いて調製することができる。

30

40

【0084】

例示的な一実施形態では、本発明のポリペプチドの免疫原性部分は、抗血清および/またはT細胞と、全長のポリペプチドの反応性を実質的に下回らないレベルで反応する（例えば、ELISAおよび/またはT細胞反応性アッセイにおいて）部分である。好ましくは、免疫原性部分の免疫原活性のレベルは、全長のポリペプチドの免疫原性の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約70%、最も好ましくは約90%超である。いくつかの場合には、好ましい免疫原性部分は、対応する全長のポリペプチドの免疫原活性のレベルを超える免疫原活性のレベルを有する、例えば、約100%超または150%以上の免疫原活性を有すると同定される。

【0085】

他の実施形態では、本発明は、配列番号1~24に記載のものなどの本明細書に記載のポリペプチド組成物の、中間の長さを全て含み、少なくとも約5個、10個、15個、20個、25個、50個、または100個の連続したアミノ酸、またはそれ以上のアミノ酸を含むポリペプチド断片を使用する。

【0086】

さらに他の実施形態では、本発明は、本明細書に記載の組成物および方法において本明

50

細書に記載のポリペプチド組成物のバリエーションを使用する。本発明に一般に包含されるポリペプチドバリエーションは、一般には、その長さに沿って、本明細書に記載のポリペプチド配列に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%またはそれ以上の同一性（下記の通り決定される）を示す。

【0087】

ポリペプチド「バリエーション」という用語は、本明細書で使用される場合、一般には、本明細書に具体的に開示されているポリペプチドとは、1つまたは複数の置換、欠失、付加および/または挿入で異なるポリペプチドである。そのようなバリエーションは、天然に存在するものであってもよく、例えば、上記の本発明のポリペプチド配列のうちの1つまたは複数

10

【0088】

多くの場合、バリエーションは保存的置換を含有する。「保存的置換」とは、アミノ酸が、同様の性質を有する別のアミノ酸に置換され、したがって、ペプチド化学の当業者により、ポリペプチドの二次構造およびヒドロパシーの性質が実質的に変化しないことが予想されるものである。上記の通り、修飾は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造に行うことができ、それにもかかわらず、望ましい特性、例えば、免疫原性を有するバリエーションまたは誘導体ポリペプチドをコードする機能分子を得ることができる。同等の、またはさらには改善された本発明のポリペプチドの免疫原性バリエーションまたは部分を創出するためにポリペプチドのアミノ酸配列を変更することが望まれる場合、当業者は、一般には、表1に記載のコードDNA配列のうちの1つまたは複数のコドンを変化させる。

20

【0089】

例えば、タンパク質の構造内で、例えば抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位などの構造との相互作用的な結合能を相当に失うことなく、ある特定のアミノ酸を他のアミノ酸で置換することができる。そのタンパク質の生物学的機能活性を定義するのはタンパク質の相互作用的な能力および性質であるので、タンパク質配列、および当然その基礎をなすDNAコード配列においてある特定のアミノ酸配列置換を行い、それにもかかわらず、同様の性質のタンパク質を得ることができる。したがって、開示された組成物のペプチド配列、または前記ペプチドをコードする対応するDNA配列において、それらの生物学的な有用性または活性を相当に失うことなく種々の変化を行うことができることが意図されている。

30

【0090】

【表 1】

表 1

アミノ酸		コドン							
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
システイン	Cys	C	UGC	UGU					
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU					
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG					10
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU					
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU					
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
リジン	Lys	K	AAA	AAG					
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
メチオニン	Met	M	AUG						20
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU					
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG					
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			30
トリプトファン	Trp	W	UGG						
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU					

【 0 0 9 1 】

そのような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数を考慮することができる。タンパク質に相互作用的生物学的機能を付与する際のヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野において一般に理解されている (KyteおよびDoolittle、1982年、参照により本明細書に組み込まれる)。アミノ酸の相対的なヒドロパシー特性は、得られたタンパク質の二次構造に寄与し、それが今度は、タンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を定義することが許容される。各アミノ酸に、その疎水性および電荷特性に基づいてヒドロパシー指数が割り当てられている (KyteおよびDoolittle、1982年)。これらの値は、イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8) ; フェニルアラニン (+2.8) ; システイン/シスチン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; アラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; トレオニン (-0.7) ; セリン (-0.8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; およびアルギニン (-4.5) である。

【0092】

ある特定のアミノ酸を、同様のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸で置換し、それにもかかわらず同様の生物活性を有するタンパク質をもたらすことができる、すなわち、それにもかかわらず生物学的機能的に同等のタンパク質を得ることができることは当技術分野で公知である。そのような変化を行う際には、好ましくはヒドロパシー指数が ± 2 の範囲内、特に好ましくは ± 1 以内、さらに特別好ましくは ± 0.5 以内であるアミノ酸を置換する。当技術分野では、同様のアミノ酸の置換を親水性に基づいて有効に行うことができることも理解されている。米国特許第4,554,101号(その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる)では、タンパク質の最大の局所的な平均の親水性は、それと隣り合うアミノ酸親水性によって支配されるので、タンパク質の生物学的性質と相関すると述べられている。

10

【0093】

米国特許第4,554,101号において詳述されている通り、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0 \pm 1)；グルタミン酸(+3.0 \pm 1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；トレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5 \pm 1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)。アミノ酸を、同様の親水性値を有する別のアミノ酸と置換し、それにもかかわらず生物学的に同等、特に、免疫学的に同等であるタンパク質を得ることが理解される。そのような変化では、好ましくは親水性値が ± 2 の範囲内、特に好ましくは ± 1 の範囲内、さらに特別好ましくは ± 0.5 の範囲内であるアミノ酸を置換する。

20

【0094】

したがって、上に概説されている通り、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどの相対的な類似性に基づく。種々の上記の特性を考慮に入れた例示的な置換は当業者には周知であり、それらとしては、アルギニンとリジン；グルタミン酸とアスパラギン酸；セリンとトレオニン；グルタミンとアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。

30

【0095】

さらに、任意のポリヌクレオチドをさらに修飾して、*in vivo*における安定性を増加させることができる。可能な修飾としては、これだけに限定されないが、5'末端および/または3'末端にフランキング配列を付加すること；骨格においてホスホジエステラーゼ連結ではなくホスホロチオエートまたは2'-O-メチルを使用すること；および/またはイノシン、キューオシン(queosine)およびワイプトシンなど伝統的でない塩基、ならびにアセチル化形態、メチル化形態、チオ化形態および他の修飾された形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンを含めることが挙げられる。

【0096】

アミノ酸置換は、さらに、残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。例えば、負に荷電したアミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ、正に荷電したアミノ酸としてはリジンおよびアルギニンが挙げられ、同様の親水性値を有する非荷電極性頭部基を伴うアミノ酸としてはロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的な変化を示す他のアミノ酸の群としては、(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr；(2) cys、ser、tyr、thr；(3) val、ile、leu、met、ala、phe；(4) lys、arg、his；および(5) phe、tyr、trp、hisが挙げられる。バリエーションは、その上、またはその代わりに、非保存的な変化を含有してよい。好ましい実施形態では

40

50

、バリエーションポリペプチドは、ネイティブな配列とは、5つ以下のアミノ酸の置換、欠失または付加によって異なる。バリエーションは、その上(その代わりに)、例えば、免疫原性、ポリペプチドの二次構造およびヒドロパシーの性質に対する影響が最小限であるアミノ酸の欠失または付加によって修飾されていてよい。

【0097】

ポリペプチドは、タンパク質のN末端に、翻訳時または翻訳後にタンパク質の転移を導くシグナル(またはリーダー)配列を含んでよい。ポリペプチドは、ポリペプチドの合成、精製もしくは同定を容易するために、またはポリペプチドと固体支持体の結合を増強するためにリンカーまたは他の配列(例えば、ポリHis)とコンジュゲートすることもできる。例えば、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域とコンジュゲートすることができる。

10

【0098】

ポリペプチド配列を比較した場合、2つの配列は、下記の通り、対応が最大になるようにアラインメントした時に2つの配列内のアミノ酸の配列が同じであれば、「同一」と言える。2つの配列間の比較は、一般には、配列類似性の局所的な領域を同定し、比較するための比較窓にわたって配列を比較することによって実施される。「比較窓」とは、本明細書で使用される場合、ある配列を同じ数の連続した位置の参照配列と、2つの配列を最適にアラインメントした後に比較することができる少なくとも約20、通常30~約75、40~約50の連続した位置のセグメントを指す。

【0099】

比較のための配列の最適なアラインメントは、Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI)内のMegalignプログラムを用いて、初期設定のパラメータを使用して行うことができる。このプログラムにより、以下の参考文献に記載のいくつかのアラインメントスキームが具体化される: Dayhoff, M.O., (1978年) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. Dayhoff, M.O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 5巻、補遺3、345~358頁; Hein J. (1990年) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, 626~645頁 Methods in Enzymology 183巻、Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G.およびSharp, P.M., CABIOS 5巻: 151~153頁(1989年); Myers, E.W.およびMuller W., CABIOS 4巻: 11~17頁(1988年); Robinson, E.D., Comb. Theor 11巻: 105頁(1971年); Saitou, N., Nei, M., Mol. Biol. Evol. 4巻: 406~425頁(1987年); Sneath, P.H.A.およびSokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973年); Wilbur, W.J.およびLipman, D.J., Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80巻: 726~730頁(1983年)。

20

30

【0100】

あるいは、比較のための配列の最適なアラインメントは、SmithおよびWaterman, Add. APL. Math 2巻: 482頁(1981年)の局所的同一性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48巻: 443頁(1970年)の同一性アラインメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻: 2444頁(1988年)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータへの実装によって(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI)内のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)、または検査によって行うことができる。

40

【0101】

50

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適したアルゴリズムの好ましい一例は、BLASTアルゴリズムおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、それぞれAltschulら、Nucl. Acids Res. 25巻：3389～3402頁(1977年)、およびAltschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～410頁(1990年)に記載されている。BLASTおよびBLAST2.0を、例えば、本明細書に記載のパラメータと一緒に使用して、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドについてパーセント配列同一性を決定することができる。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公的に入手可能である。アミノ酸配列に関しては、スコアリング行列を用いて累積スコアを算出することができる。累積的なアラインメントスコアがその最大実現値からX量減少した時、1つまたは複数のネガティブスコアリング(negative-scoring)残基アラインメントが蓄積したことに起因して累積スコアがゼロ以下になった時、またはいずれかの配列の末端に到達した時に、各方向へのワードヒット(word hit)の伸長を停止する。BLASTアルゴリズムパラメータであるW、TおよびXによりアラインメントの感度およびスピードが決定される。

10

20

30

40

50

【0102】

1つの好ましい手法では、「配列同一性の百分率」を、2つの最適にアラインメントされた配列を少なくとも20個の位置の比較の窓にわたって比較することによって決定し、ここで、比較窓内のポリペプチド配列の部分は、2つの配列を最適にアラインメントするために、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して20パーセント以下、通常5～15パーセント、または10～12パーセントの付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含んでよい。百分率は、両方の配列において同一のアミノ酸残基が見いだされる位置の数を決定してマッチする位置の数を得、マッチする位置の数を参照配列内の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で割り、結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって算出する。

【0103】

融合ポリペプチド

他の例示的な実施形態では、本発明のがん因子ポリペプチドは、本明細書に記載の多数のがん関連ポリペプチドを含む融合ポリペプチド、または少なくとも1つの本明細書に記載のがん関連ポリペプチドと、公知の腫瘍タンパク質または他の目的の非相同配列などの無関係の配列とを含む融合ポリペプチドの形態であってよい。融合パートナーは、例えば、Tヘルパーエпитープ(免疫学的融合パートナー)、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパーエпитープをもたらすことに役立つ、または、ネイティブな組換えタンパク質よりも高い収量でタンパク質を発現させることに役立つ(発現エンハンサー)。ある特定の好ましい融合パートナーは、免疫学的融合パートナーおよび発現増強性融合パートナーの両方である。他の融合パートナーは、ポリペプチドの溶解性が増加するように、またはポリペプチドを所望の細胞内区画にターゲティングすることが可能になるように選択することができる。さらに別の融合パートナーとして、ポリペプチドの精製を容易にするアフィニティータグが挙げられる。

【0104】

融合ポリペプチドは、一般に、化学的なコンジュゲーションを含めた標準の技法を用いて調製することができる。融合ポリペプチドは、発現系において組換えポリペプチドとして発現され、それにより、非融合ポリペプチドと比較して産生レベルの上昇が可能になることが好ましい。簡単に述べると、ポリペプチド構成成分をコードするDNA配列を別々に組み立て、ライゲーションして適切な発現ベクターに入れることができる。1つのポリペプチド構成成分をコードするDNA配列の3'末端を、第2のポリペプチド構成成分をコードするDNA配列の5'末端と、ペプチドリンカーを用いてまたは用いずに、配列の読み枠が一致するようにライゲーションする。これにより、両方の構成成分ポリペプチドの生物活性を保持する単一の融合ポリペプチドに翻訳することが可能になる。

【0105】

ペプチドリンカー配列を使用して、第1のポリペプチド構成成分および第2のポリペプチド構成成分を、各ポリペプチドがその二次構造および三次構造にフォールディングされることを確実にするために十分な距離を置いて分離することができる。そのようなペプチドリンカー配列は、当技術分野で周知の標準の技法を用いて融合ポリペプチドに組み込む。適切なペプチドリンカー配列は、以下の因子に基づいて選択することができる：(1)柔軟な広がったコンフォメーションをとることができること；(2)第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチド上の機能的なエピトープと相互作用することができる二次構造をとることができないこと；および(3)ポリペプチドの機能的なエピトープと反応する可能性がある疎水性残基または荷電残基が欠如していること。好ましいペプチドリンカー配列は、Gly残基、Asn残基およびSer残基を含有する。他のほぼ中性のアミノ酸、例えば、ThrおよびAlaなどもリンカー配列に用いることができる。リンカーとして有益に使用することができるアミノ酸配列としては、Marateaら、Gene 40巻：39～46頁、1985年；Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83巻：8258～8262頁、1986年；米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号に開示されているアミノ酸配列が挙げられる。リンカー配列は、一般に、1～約50アミノ酸の長さであってよい。第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、機能的ドメインを隔離し、立体的な干渉を防止するために用いることができる非必須N末端アミノ酸領域を有する場合にはリンカー配列は必要ない。

【0106】

ライゲーションしたDNA配列は、適切な転写調節エレメントまたは翻訳調節エレメントに作動可能に連結している。DNAの発現に關与する調節エレメントは、第1のポリペプチドをコードするDNA配列の5'側にのみ位置する。同様に、翻訳を終了させるために必要な終止コドンおよび転写終結シグナルは第2のポリペプチドをコードするDNA配列の3'側にのみ存在する。

【0107】

本発明のがん関連ポリペプチド(例えば、がん因子)は、種々の周知の合成技法および/または組換え技法のいずれかを用いて調製し、後者は下でさらに説明されている。一般に、約150アミノ酸未満のポリペプチド、部分および他のバリエーションは、当業者に周知の技法を用い、合成の手段によって生成することができる。例示的な一例では、そのようなポリペプチドを、成長中のアミノ酸の鎖にアミノ酸を逐次的に付加するメリフィールド固相合成法などの商業的に利用可能な固相技法のいずれかを用いて合成する。Merrifield、J. Am. Chem. Soc. 85巻：2149～2146頁、1963年を参照されたい。ポリペプチドを自動合成するための設備は、Perkin Elmer/Applied Biosystems Division (Foster City, CA)などの供給者から市販されており、製造者の説明書に従って作動させることができる。

【0108】

一般に、本発明のポリペプチド組成物(融合ポリペプチドを含む)は単離されている。「単離された」ポリペプチドとは、その元の環境から取り出されたポリペプチドである。例えば、天然に存在するタンパク質またはポリペプチドは、それが、自然系では共存している材料の一部または全部から分離されている場合に単離されている。そのようなポリペプチドは精製もされることが好ましく、例えば、少なくとも約90%純粋、より好ましくは少なくとも約95%純粋、最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。

【0109】

ポリヌクレオチド組成物

上記の通り、本発明の別の態様は、本明細書に記載のがん因子ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびに、がんを治療するためおよび検出するための医薬組成物および診断用組成物に關連したそれらの使用に関する。

【0110】

「DNA」および「ポリヌクレオチド」という用語は、単離され、特定の種の全ゲノムDNAを含まないDNA分子を指すために本明細書では基本的に互換的に使用される。「

単離された」とは、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドが他のコード配列から実質的に離れていること、およびDNA分子が、無関係のコードDNA、例えば、大きな染色体の断片または他の機能的な遺伝子またはポリペプチドコード領域などの大部分を含有しないことを意味する。当然、これは、最初に単離されたDNA分子を指し、人間の手によって後からセグメントに付加された遺伝子またはコード領域を排除しない。

【0111】

当業者には理解される通り、本発明のポリヌクレオチド組成物は、ゲノム配列、ゲノム外およびプラスミドコード配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現する、または発現するように適合させることができるより小さな工学的に操作された遺伝子セグメントを含んでよい。そのようなセグメントは、自然に単離することもでき、人間の手によって合成的に修飾することもできる。

10

【0112】

同様に当業者には理解される通り、本発明のポリヌクレオチドは一本鎖（コードまたはアンチセンス）であっても二本鎖であってもよく、また、DNA（ゲノム、cDNAまたは合成）であってもRNA分子であってもよい。RNA分子は、イントロンを含有し、1対1でDNA分子に対応するhnRNA分子、およびイントロンを含有しないmRNA分子を含んでよい。追加的なコード配列または非コード配列は本発明のポリヌクレオチド内に存在してもよいが、必ずしも存在しなくてよく、ポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持材料に連結していてもよいが、必ずしも連結していなくてもよい。

20

【0113】

ポリヌクレオチドは、ネイティブな配列（すなわち、本発明のポリペプチド/タンパク質またはその部分をコードする内在性の配列）を含んでもよく、そのような配列のバリエーションまたは誘導体、好ましくは免疫原性バリエーションまたは誘導体をコードする配列を含んでもよい。

【0114】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書において配列番号1~24に開示されているが関連ポリペプチド配列をコードする配列に対して実質的な同一性を有するポリヌクレオチドバリエーション、例えば、本明細書に記載の方法（例えば、下記の通り標準のパラメータを使用したBLAST解析）を用いて、本発明のポリヌクレオチド配列と比較して少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%以上の配列同一性を含むポリヌクレオチドバリエーションを使用する。これらの値は、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、読み枠の位置決めなどを考慮に入れることによって、対応する、2つのヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質の同一性を決定するために適切に調整することができることは当業者には理解されよう。

30

【0115】

一般には、ポリヌクレオチドバリエーションは、好ましくはバリエーションポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの免疫原性が本明細書に具体的に記載されているポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドと比較して実質的に減弱しないように、1つまたは複数の置換、付加、欠失および/または挿入を含有する。「バリエーション」という用語は、異種起源の相同な遺伝子を包含することも理解されるべきである。

40

【0116】

さらなる実施形態では、本発明は、本明細書に記載の配列の1つまたは複数と同一または相補的である、種々の長さの連続した配列のひと続きを含む、またはそれからなるポリヌクレオチド断片を提供する。例えば、本発明により、本明細書に開示されているポリペプチドをコードする配列の少なくとも約10個、15個、20個、30個、40個、50個、75個、100個、150個、200個、300個、400個、500個または1000個以上の連続したヌクレオチドならびにその間の中間の長さの全てを含むまたはそれからなるポリヌクレオチドが提供される。「中間の長さ」とは、この場合、引用された値の間の任意の長さ、例えば、16、17、18、19など；21、22、23など；30

50

、31、32など；50、51、52、53など；100、101、102、103など；150、151、152、153など；200～500；500～1,000の全ての整数を含む、などを意味することは容易に理解されよう。本明細書に記載のポリヌクレオチド配列は、一方の末端または両方の末端にネイティブな配列には見いだされない追加的なヌクレオチドによって伸長することができる。この追加的な配列は、開示されている配列のいずれかの末端または開示されている配列の両末端の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドからなっていよう。

【0117】

本発明の別の実施形態では、本明細書において提供されるポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列またはその断片、またはその相補配列と、中～高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド組成物が提供される。ハイブリダイゼーション技法は分子生物学の技術分野で周知である。例示のために、本発明のポリヌクレオチドと他のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを試験するための適切な中程度にストリンジェントな条件は、5×SSC、0.5%SDS、1.0mMのEDTA(pH 8.0)の溶液で予洗すること；50～60℃、5×SSCで一晩ハイブリダイズさせること；次いで、65℃で20分間、0.1%SDSを含有する2×SSC、0.5×SSCおよび0.2×SSCのそれぞれを用いて2回洗浄することを含む。当業者には、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液の塩含有量および/またはハイブリダイゼーションを実施する温度を変更することなどによって容易に操作することができることが理解されよう。例えば、別の実施形態では、適切な高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーションの温度を、例えば、60～65℃または65～70℃に上昇させることを除いて、上記の条件を含む。

【0118】

本発明のポリヌクレオチド、またはその断片は、コード配列それ自体の長さにかかわらず、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加的な制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどの他のDNA配列と組み合わせることができ、したがって、それらの全体的な長さは相当に変動する可能性がある。したがって、ほぼどんな長さの核酸断片でも用いることができることが意図されており、全長は調製の容易さおよび意図された組換えDNAのプロトコールにおける使用によって限定されることが好ましい。例えば、全長が約10,000塩基対、約5000塩基対、約3000塩基対、約2,000塩基対、約1,000塩基対、約500塩基対、約200塩基対、約100塩基対、約50塩基対の長さである例示的なポリヌクレオチドセグメントなど(中間の長さを全て含む)が本発明の多くの実行において有用であると考えられている。

【0119】

ポリヌクレオチド配列を比較した場合、2つの配列は、下記の通り、対応が最大になるようにアラインメントした時に2つの配列内のヌクレオチドの配列が同じであれば、「同一」と言える。2つの配列間の比較は、一般には、配列類似性の局所的な領域を同定し、比較するための比較窓にわたって配列を比較することによって実施される。「比較窓」とは、本明細書で使用される場合、ある配列を同じ数の連続した位置の参照配列と、2つの配列を最適にアラインメントした後に比較することができる少なくとも約20の、通常30～約75、40～約50の連続した位置のセグメントを指す。

【0120】

比較のための配列の最適なアラインメントは、Lasergene suite of bioinformatics software(DNASTAR, Inc.、Madison、WI)内のMegalignプログラムを用いて、初期設定のパラメータを使用して行うことができる。このプログラムにより、以下の参考文献に記載のいくつかのアラインメントスキームが具体化される: Dayhoff, M.O. (1978年) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relati

10

20

30

40

50

onships. Dayhoff, M.O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 5巻、補遺3、345~358頁; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, 626~645頁(1990年); Methods in Enzymology 183巻、Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G.およびSharp, P.M., CABIOS 5巻: 151~153頁(1989年); Myers, E.W.およびMuller W., CABIOS 4巻: 11~17頁(1988年); Robinson, E.D., Comb. Theor 11巻: 105頁(1971年); Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4巻: 406~425頁(1987年); Sneath, P.H.A.およびSokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA(1973年); Wilbur, W.J.およびLipman, D.J., Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80巻: 726~730頁(1983年)。

【0121】

あるいは、比較のための配列の最適なアラインメントは、SmithおよびWaterman, Add. APL. Math 2巻: 482頁(1981年)の局部的同一性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48巻: 443頁(1970年)の同一性アラインメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85巻: 2444頁(1988年)の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータへの実装によって(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group(GCG)、575 Science Dr., Madison, WI内のGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA)、または検査によって行うことができる。

【0122】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために適したアルゴリズムの好ましい一例は、BLASTアルゴリズムおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、それぞれAltschulら、Nucl. Acids Res. 25巻: 3389~3402頁(1977年)、およびAltschulら、J. Mol. Biol. 215巻: 403~410頁(1990年)に記載されている。BLASTおよびBLAST2.0を、例えば、本明細書に記載のパラメータと一緒に使用して、本発明のポリヌクレオチドについてパーセント配列同一性を決定することができる。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公的に入手可能である。例示的な一例では、ヌクレオチド配列について、パラメータM(マッチする残基の対に対するリワード(reward)スコア; 常に >0)およびN(ミスマッチする残基に対するペナルティスコア; 常に <0)を使用して累積スコアを算出することができる。累積的なアラインメントスコアがその最大実現値からX量減少した時、1つまたは複数のネガティブスコアリング残基アラインメントが蓄積したことに起因して累積スコアがゼロ以下になった時、または、いずれかの配列の末端に到達した時に各方向へのワードヒットの伸長を停止する。BLASTアルゴリズムパラメータであるW、TおよびXによりアラインメントの感度およびスピードが決定される。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)では、初期値としてワード長(W)11、および期待値(E)10、およびBLOSUM62スコアリング行列(HenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻: 10915頁(1989年)を参照されたい)アラインメント、(B)50、期待値(E)10、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。

【0123】

ある特定の実施形態では、「配列同一性の百分率」は、2つの最適にアラインメントされた配列を少なくとも20個の位置の比較の窓にわたって比較することによって決定し、ここで、比較窓内のポリヌクレオチド配列の部分は、2つの配列を最適にアラインメントするために、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して20パーセント以下、通常5~15パーセント、または10~12パーセントの付加または欠失(すなわち、ギャ

ップ)を含んでよい。百分率は、両方の配列において同一の核酸塩基が見いだされる位置の数を決定してマッチする位置の数を得、マッチする位置の数を参照配列内の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で割り、結果に100を掛けて配列同一性の百分率を得ることによって算出する。

【0124】

遺伝暗号の縮退の結果として、本明細書に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が多く存在することは当業者には理解されよう。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、任意のネイティブな遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を有する。それにもかかわらず、使用されるコドンが異なることに起因して変動するポリヌクレオチドは本発明により具体的に意図されている。さらに、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は本発明の範囲内に入る。対立遺伝子とは、1つまたは複数の変異、例えば、ヌクレオチドの欠失、付加および/または置換などの結果として変更された内在性遺伝子である。生じたmRNAおよびタンパク質の構造または機能は変更されてもよいが、必ずしも変更される必要はない。対立遺伝子は、標準の技法(例えば、ハイブリダイゼーション、増幅および/またはデータベース配列比較など)を用いて同定することができる。

10

【0125】

したがって、本発明の別の実施形態では、部位特異的変異誘発などの変異誘発手法を用いて、本明細書に記載のポリペプチドのバリエーションおよび/または誘導体を調製する。この手法によって、それらをコードする基礎をなすポリヌクレオチドの変異誘発を通じてポリペプチド配列内に特異的な修飾を行うことができる。これらの技法により、例えば、上記の考慮すべき事柄のうちの1つまたは複数を組み入れて、1つまたは複数のヌクレオチド配列の変化をポリヌクレオチドに導入することによって配列バリエーションを調製し、試験するための簡単な手法が提供される。

20

【0126】

部位特異的変異誘発により、所望の変異のDNA配列をコードする特異的なオリゴヌクレオチド配列、ならびに十分な数の隣り合うヌクレオチドを使用することによって変異体を作製して、交差している欠失接合の両側で安定な二重鎖が形成されるのに十分なサイズおよび配列の複雑さのプライマー配列をもたらしることが可能になる。選択されたポリヌクレオチド配列において変異を用いて、ポリヌクレオチド自体の性質を改善すること、変更すること、低下させること、修飾すること、あるいは変化させること、および/または、コードされるポリペプチドの性質、活性、組成、安定性、または一次配列を変更することができる。

30

【0127】

本発明のある特定の実施形態では、発明者らは、コードされるポリペプチドの1つまたは複数の性質、例えば、ポリペプチドワクチンの免疫原性などを変更するために、開示されたポリヌクレオチド配列の変異誘発を用いることを意図している。部位特異的変異誘発の技法は、当技術分野で周知であり、ポリペプチドのバリエーションおよびポリヌクレオチドのバリエーションの両方を創出するために広く使用されている。例えば、部位特異的変異誘発は、多くの場合、DNA分子の特定の部分を変更するために用いられる。そのような実施形態では、変更される配列の接合点の両側の約5~約10残基を伴う、一般に約14~約25ヌクレオチドほどの長さのプライマーを使用する。

40

【0128】

部位特異的変異誘発を用いて、選択されたペプチドをコードするDNAセグメントの配列バリエーションを調製することにより、潜在的に有用な種を作製する手段がもたらされ、また、これは、ペプチドの配列バリエーションおよびそれらをコードするDNA配列を得ることができる他のやり方が存在するので、限定することを意図していない。例えば、所望のペプチド配列をコードする組換えベクターを、ヒドロキシルアミンなどの変異誘発物質を使用して処理して、配列バリエーションを得ることができる。これらの方法およびプロトコールに関する特定の詳細は、その目的に関してそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる

50

Maloyら、1994年；Segal、1976年；ProkopおよびBajpai、1991年；Kuby、1994年；およびManiatisら、1982年の教示において見いだされる。

【0129】

本発明の他の実施形態では、本明細書において提供されるポリヌクレオチド配列を、例えば、被験体におけるがんの診断および/またはモニタリングにおいて使用するための核酸ハイブリダイゼーション用のプローブまたはプライマーとして有利に使用することができる。そのように、本明細書に記載の15ヌクレオチド長の連続した配列と同じ配列を有する、または、それと相補的である少なくとも約15ヌクレオチド長の連続した配列の配列領域を含むまたはそれからなる核酸セグメントの特定の有用性が見いだされることが意図されている。より長い連続した同一の配列または相補配列、例えば、約20、30、40、50、100、200、500、1000（中間の長さを全て含む）、さらには全長に至るまでの配列の同一の配列または相補配列もある特定の実施形態で使用される。

10

【0130】

そのような核酸プローブは目的の配列と特異的にハイブリダイズすることができるので、それらを、所与の試料において相補配列の存在を検出する際に使用することが可能になる。しかし、他の使用、例えば、変異体種プライマー、または他の遺伝子構築物の調製において使用するためのプライマーを調製するための配列情報の使用なども構想される。

【0131】

本明細書に記載のポリヌクレオチド配列と同一または相補的である、10～14ヌクレオチド、15～20ヌクレオチド、30ヌクレオチド、50ヌクレオチド、またはさらには100～200ヌクレオチドほど（中間の長さも含む）の連続したヌクレオチドのひと続きからなる配列領域を有するポリヌクレオチド分子が特に、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法において使用するためのハイブリダイゼーションプローブとして考えられている。これにより、遺伝子産物またはその断片を、多様な細胞型において、および種々の細菌の細胞においても分析することが可能になる。断片の全体のサイズ、ならびに相補的なひと続き（複数可）のサイズは、最終的に、特定の核酸セグメントの意図された使用または適用に左右される。一般には、ハイブリダイゼーション実施形態ではより小さな断片が使用され、この場合、連続した相補的な領域の長さは、約15～約100ヌクレオチドなど変動してよいが、検出すること望まれる相補配列の長さに応じてより大きな連続した相補的なひと続きを用いることができる。

20

30

【0132】

約15～25ヌクレオチドの長さのハイブリダイゼーションプローブを使用することにより、安定かつ選択的な二重鎖分子を形成することが可能になる。しかし、ハイブリッドの安定性および選択性を増大させ、それにより、得られる特異的なハイブリッド分子の質および程度を改善するために、15塩基の長さを超えるひと続きにわたる連続した相補配列を有する分子が一般に好ましい。一般に、15～25個の連続したヌクレオチドの、または所望の場合はさらに長い遺伝子相補的なひと続きを有する核酸分子を設計することが好ましい。

【0133】

ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書に記載の配列のいずれかの任意の部分から選択することができる。必要なのは、プローブまたはプライマーとして利用することが望まれる、全長配列を含め、それに至るまでの約15～25ヌクレオチドの長さの配列を見直すことだけである。プローブおよびプライマー配列の選択は、当技術分野において公知であり、確立されているさまざまな因子によって支配される可能性がある。

40

【0134】

小さなポリヌクレオチドセグメントまたは断片は、例えば、自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して一般に実施されるのと同様に化学的手段によって断片を直接合成することによって容易に調製することができる。また、断片は、米国特許第4,683,202（参照により本明細書に組み込まれる）のPCR（商標）技術などの核酸再生技術を適用することによって、組換え産生のために、選択された配列を組換えベクターに導入するこ

50

とによって、および分子生物学の当業者に一般に公知の他の組換えDNA技法によって得ることができる。

【0135】

本発明によるヌクレオチド配列を、目的の遺伝子全体または遺伝子断片の相補的なひと続きを有する二重鎖分子を選択的に形成するその能力に関して使用することができる。構想される適用に応じて、一般には、ハイブリダイゼーションのさまざまな条件を用いて、標的配列に対するプローブのさまざまな程度の選択性を実現することが望ましい。高い選択性が必要とされる適用については、一般には、比較的ストリンジェントな条件を使用してハイブリッドを形成すること、例えば、比較的低塩かつ/または高温の条件、例えば、約0.02M~約0.15Mの塩の塩濃度で、約50~約70の温度においてもたらされる条件などを選択することが望ましい。そのような選択的な条件では、存在する場合、プローブと鋳型または標的鎖との間のミスマッチがわずかに容認され、関連する配列を単離するために特に適している。

10

【0136】

当然、いくつかの適用、例えば、基礎をなす鋳型とハイブリダイズした変異プライマー鎖を使用して変異体を調製することが望ましい場合に関しては、一般には、ヘテロ二重鎖の形成を可能にするために、低ストリンジェントな(ストリンジェンシーが低下した)ハイブリダイゼーション条件が必要になる。これらの状況では、約20~約55にわたる温度で約0.15M~約0.9Mの塩という塩の条件を使用することが望ましい場合がある。それにより、クロスハイブリダイズする種を、対照ハイブリダイゼーションに対して正にハイブリダイズするシグナルとして容易に同定することができる。どんな場合でも、一般に、条件は、ハイブリッド二重鎖を温度の上昇と同じ様式で不安定化する機能を果たす、ホルムアミドを漸増量で添加することによってよりストリンジェントにすることができることが理解される。したがって、ハイブリダイゼーション条件は容易に操作することができ、したがって、一般に、所望の結果に応じた選択法になる。

20

【0137】

本発明の別の実施形態によると、本明細書の組成物および方法において使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むポリヌクレオチド組成物が提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、有効な標的化タンパク質合成阻害剤であることが実証されており、したがって、疾患の一因となるタンパク質の合成を阻害することによって疾患を治療することができる治療的手法がもたらされる。タンパク質合成の阻害についてのアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性はよく確立されている。例えば、ポリガラクトナーゼ(polygalacturonase)およびムスカリン2型アセチルコリン受容体の合成は、それらのそれぞれのmRNA配列を対象とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される(米国特許第5,739,119号および米国特許第5,759,829号)。さらに、核タンパク質サイクリン、多剤耐性遺伝子(MDG1)、ICAM-1、E-セレクトイン、STK-1、線条体GABA_A受容体およびヒトEGFを用いたアンチセンス阻害の例が実証されている(Jaskulskiら、Science 1988年6月10日;240巻(4858号):1544~6頁;VasanthakumarおよびAhmed、Cancer Commun. 1989年;1巻(4号):225~32頁;Perisら、Brain Res Mol Brain Res. 1998年6月15日;57巻(2号):310~20頁;米国特許第5,801,154号;米国特許第5,789,573号;米国特許第5,718,709号および米国特許第5,610,288号)。阻害し、種々の異常な細胞増殖、例えば、がんを治療するために使用することができるアンチセンス構築物も記載されている(米国特許第5,747,470号;米国特許第5,591,317号および米国特許第5,783,683号)。

30

40

【0138】

したがって、ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列またはその相補体に特異的に結合することができる任意の配列の全部または一部を含むオリゴヌクレオチド配列を提供する。一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドはDNAまたはその誘導体を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドはRNAま

50

たはその誘導体を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドはホスホロチオエート化修飾された骨格を含む修飾されたDNAである。別の実施形態では、オリゴヌクレオチド配列はペプチド核酸またはその誘導体を含む。それぞれの場合において、例示的な組成物は、本明細書に記載のポリヌクレオチドの1つまたは複数の部分と相補的な、より好ましくは実質的に相補的な、なおより好ましくは、完全に相補的な配列領域を含む。所与の遺伝子配列に特異的なアンチセンス組成物の選択は、選択された標的配列の分析および二次構造、 T_m 、結合エネルギー、および相対的な安定性の決定に基づく。アンチセンス組成物は、それらが、宿主細胞における標的mRNAとの特異的な結合を減少させるまたは妨げる二量体、ヘアピン、または他の二次構造を形成することが相対的にできないことに基づいて選択することができる。非常に好ましいmRNAの標的領域は、AUG翻訳開始コドンまたはその近くにある領域、およびmRNAの5'領域と実質的に相補的な配列である。これらの二次構造解析および標的部位選択の考察は、例えば、OLIGOプライマー解析ソフトウェアのv. 4および/またはBLASTN2.0.5アルゴリズムソフトウェアを使用して実施することができる(Altschulら、Nucleic Acids Res. 1997年、25巻(17号): 3389~402頁)。

10

【0139】

本発明の別の実施形態によると、本明細書に記載のポリヌクレオチド組成物を、腫瘍細胞における本発明の腫瘍ポリペプチドおよびタンパク質の発現を阻害するための組成物および方法において使用するためのリボザイム分子の設計および調製において使用する。リボザイムは、核酸を部位特異的に切断するRNA-タンパク質複合体である。リボザイムはエンドヌクレアーゼ活性を保有する特異的な触媒ドメインを有する(KimおよびCech、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987年12月; 84巻(24号): 8788~92頁; ForsterおよびSymons、Cell. 1987年4月24日; 49巻(2号): 211~20頁)。例えば、多数のリボザイムは、リン酸エステル転移反応を高度な特異性で加速し、多くの場合、オリゴヌクレオチド基質のいくつかのリン酸エステルのうちの1つのみを切断する(Cechら、Cell. 1981年12月; 27巻(3 Pt 2号): 487~96頁; MichelおよびWesthof、J Mol Biol. 1990年12月5日; 216巻(3号): 585~610頁; Reinhold-HurekおよびShub、Nature. 1992年5月14日; 357巻(6374号): 173~6頁)。この特異性は、化学反応の前に基質が特異的な塩基対合相互作用を介してリボザイムの内部ガイド配列(「IGS」)に結合する必要性に帰する。

20

30

【0140】

酵素性RNAは、生理的条件下で、RNAリン酸ジエステル結合の加水分解をトランスで触媒することができる(したがって、他のRNA分子を切断することができる)。一般に、酵素性核酸は、まず標的RNAに結合することによって作用する。そのような結合は、標的RNAを切断するように作用する分子の酵素性部分の極めて近傍に保持される酵素性核酸の標的結合部分を通じて起こる。したがって、酵素性核酸は、まず標的RNAを認識し、次いで、相補的な塩基対合を通じてそれに結合し、正確な部位に結合したら、酵素的に作用して標的RNAを切り離す。そのような標的RNAの戦略的な切断により、コードされるタンパク質の合成を導くその能力が破壊される。酵素性核酸は、そのRNA標的に結合し、それを切断した後、別の標的を探すためにRNAから放出され、繰り返し新しい標的に結合し、それを切断することができる。

40

【0141】

リボザイムの酵素性は、アンチセンス技術(核酸分子が核酸標的に単に結合してその翻訳を遮断する)などの多くの技術と比較して、治療的な処置に影響を及ぼすために必要なリボザイムの濃度がアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも低いので、有利である。この利点は、リボザイムの酵素的に作用する能力を反映する。したがって、単一のリボザイム分子が標的RNAの多くの分子を切断することができる。さらに、リボザイムは、標的RNAとの結合の塩基対合機構だけでなく、標的RNA切断の機構にも左右される阻害の特異性を有する高度に特異的な阻害剤である。切断部位の近くの単一のミスマッチ、または

50

塩基置換により、リボザイムの触媒活性を完全に排除することができる。アンチセンス分子における同様のミスマッチでは、それらの作用は妨げられない (Woolfら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992年8月15日; 89巻(16号): 7305~9頁)。したがって、リボザイムの作用の特異性は、同じRNA部位へのアンチセンスオリゴヌクレオチド結合の特異性を超える。

【0142】

酵素性核酸分子は、ハンマーヘッド型モチーフ、ヘアピンモチーフ、肝炎ウイルスモチーフ、グループIイントロンまたはRNA分解酵素P RNAモチーフ (RNAガイド配列に付随する) またはアカパンカビVS RNAモチーフに形成することができる。ハンマーヘッド型モチーフの例は、Rossiら Nucleic Acids Res. 1992年9月11日; 20巻(17号): 4559~65頁に記載されている。ヘアピンモチーフの例は、Hampelら (欧州特許出願公開第EP0360257号)、HampelおよびTritz、Biochemistry 1989年6月13日; 28巻(12号): 4929~33頁; Hampelら、Nucleic Acids Res. 1990年1月25日; 18巻(2号): 299~304頁および米国特許第5,631,359号に記載されている。肝炎ウイルスモチーフの例は、PerrottaおよびBeen、Biochemistry. 1992年12月1日; 31巻(47号): 11843~52頁に記載されており、RNA分解酵素Pモチーフの例は、Guerrier-Takadaら、Cell. 1983年12月; 35巻(3 Pt 2号): 849~57頁に記載されており、アカパンカビVS RNAリボザイムモチーフは、Collins (SavilleおよびCollins、Cell. 1990年5月18日; 61巻(4号): 685~96頁; SavilleおよびCollins、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88巻(19号): 8826~30頁(1991年10月1日); CollinsおよびOlive、Biochemistry 32巻(11号): 2795~9頁(1993年3月23日)に記載されており、グループIイントロンの例は、(米国特許第4,987,071号)に記載されている。本発明の酵素性核酸分子において重要なのは、標的遺伝子RNA領域のうちの一つまたは複数と相補的である特異的な基質結合部位を有すること、およびその基質結合部位内またはその周囲に、分子にRNA切断活性を与えるヌクレオチド配列を有することだけである。したがって、リボザイム構築物を本明細書で言及されている特定のモチーフに限定する必要はない。

【0143】

リボザイムは、国際特許出願公開第WO93/23569号および国際特許出願公開第WO94/02595号、それぞれが具体的に参照により本明細書に組み込まれる)に記載の通り設計し、合成して、記載の通り、in vitroおよびin vivoで試験することができる。そのようなリボザイムは、送達するために最適化することもできる。特定の例が提供されているが、必要な場合には、他の種における同等のRNA標的を利用することができることが当業者には理解されよう。

【0144】

本発明の別の実施形態では、ペプチド核酸(PNA)組成物が提供される。PNAは、核酸塩基が偽ペプチド骨格に付着しているDNA模倣物である (GoodおよびNielsen、Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997年 7巻(4号) 431~37頁)。PNAは、伝統的にRNAまたはDNAを使用しているいくつかの方法において利用することができる。多くの場合、PNA配列は、対応するRNAまたはDNA配列よりも技法における性能がよく、RNAまたはDNAに固有ではない有用性を有する。作出方法、特性、および使用方法を含めたPNAについての総説はCorey (Trends Biotechnol 15巻(6号): 224~9頁(1997年6月))により提供される。そのように、ある特定の実施形態では、ACE mRNA配列の一つまたは複数の部分と相補的なPNA配列を調製することができ、そのようなPNA組成物を使用して、ACE特異的なmRNAの翻訳を調節すること、変更すること、減少させること、または低下させ、それにより、そのようなPNA組成物が投与される宿主細胞におけるACE活性のレベルを変更することができる。

【0145】

PNAは、DNAの正常なリン酸ジエステル骨格と置き換えられた2-アミノエチル-グリシン連結を有する(Nielsenら、Science 254巻(5037号):1497~500頁(1991年12月6日);Hanveyら、Science 258巻(5087号):1481~5頁(1992年11月27日);HyrupおよびNielsen、Bioorg. Med. Chem. 4巻(1号):5~23頁(1996年1月)。この化学的性質により3つの重要な結果がもたらされる:第1に、DNAまたはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドとは対照的に、PNAは中性の分子であり、第2に、PNAはアキラルであり、立体選択的な合成を展開する必要性が回避され、第3に、PNA合成には、改変メリフィールド方法を含めた他の方法も用いられているが、固相ペプチド合成のために標準のBocプロトコールまたはFmocプロトコールが用いられる。

10

【0146】

PNA単量体または既成のオリゴマーは、PerSeptive Biosystems(Framingham, MA)から市販されている。BocプロトコールまたはFmocプロトコールのいずれかによるPNA合成は、手動または自動のプロトコールを用いる簡単なものである(Nortonら、Bioorg. Med. Chem. 3巻(4号):437~45頁(1995年4月))。手動のプロトコールは、それ自体が化学修飾されたPNAの作製または密接に関連するPNAのファミリーの同時合成に役立つ。

【0147】

ペプチド合成と同様に、特定のPNA合成の成功は、選択された配列の性質に左右される。例えば、理論的には、PNAにはヌクレオチド塩基の任意の組合せを組み入れることができるが、プリンが隣り合うことにより、生成物内の1つまたは複数の残基の欠失が導かれる可能性がある。この難しさの予想において、プリンが隣り合うPNAの作製では、非効率的に付加される可能性がある残基のカップリングを繰り返すべきであることが示唆されている。この後に、逆相高圧液体クロマトグラフィーによってPNAを精製すべきであり、これにより、ペプチドの合成の間に観察されるものと同様の生成物の収率および純度がもたらされる。

20

【0148】

所与の適用のためのPNAの修飾は、固相合成の間にアミノ酸をカップリングすること、またはカルボン酸基を含有する化合物を、露出しているN末端アミンに付着させることによって実現することができる。あるいは、PNAは、合成した後に、導入したリジンまたはシステインとカップリングすることによって修飾することができる。PNAを容易に修飾することができるにより、よりよい溶解性または特定の機能的要件について最適化することが容易になる。合成されたら、PNAおよびそれらの誘導体の同一性を質量分析によって確認することができる。PNAの修飾のいくつかの研究が行われており、利用されている(例えば、Nortonら、Bioorg Med Chem 3巻(4号):437~45頁(1995年4月);Petersenら、J Pept Sci 1巻(3号):175~83頁(1995年5~6月);Orumら、Biotechniques 19巻(3号):472~80頁(1995年9月);Footerら、Biochemistry. 1996年8月20日;35巻(33号):10673~9頁;Griffithら、Nucleic Acids Res 23巻(15号):3003~8頁(1995年8月11日);Pardridgeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92巻(12号):5592~6頁(1995年6月6日);Boffaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92巻(6号):1901~5頁(1995年3月14日);Gambacorti-Passeri niら、Blood 88巻(4号):1411~7頁(1996年8月15日);Armitageら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94巻(23号):12320~5頁(1997年11月11日);Seegerら、Biotechniques 23巻(3号):512~7頁(1997年9月))。米国特許第5,700,922号では、PNA-DNA-PNAキメラ分子、および診断、生物体内のタンパク質の調節、および治療薬に対して感受性の状態の治療におけるそれらの使用が考察されている。

30

40

【0149】

PNAのアンチセンス結合特性を特徴付ける方法は、Rose(Anal Chem 65巻(24

50

号) : 3545 ~ 9頁 (1993年12月15日) および Jensenら (Biochemistry, 1997年4月22日; 36巻 (16号) : 5072 ~ 7頁) において考察されている。Roseは、PNAとそれらの相補的なオリゴヌクレオチドの結合を決定するためにキャピラリーゲル電気泳動を使用しており、それにより相対的な結合カイネティクスおよびストイキオメトリーが測定されている。Jensenらにより、BIACore (商標) 技術を用いて同種の測定が行われた。

【0150】

記載されており、当業者に明らかになるPNAの他の適用としては、DNA鎖侵入、アンチセンス阻害、変異分析、転写のエンハンサー、核酸精製、転写的に活性な遺伝子の単離、転写因子の結合の遮断、ゲノム切断、バイオセンサー、*in situ* ハイブリダイゼーションなどにおける使用が挙げられる。

10

【0151】

ポリヌクレオチドの同定、特徴付けおよび発現

本発明のポリヌクレオチド (およびポリペプチド) 組成物は、種々のよく確立された技法のいずれかを用いて同定し、調製し、かつ/または操作することができる (一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories、Cold Spring Harbor、NY、1989年、および他の同様の参考文献を参照されたい)。

【0152】

試料中に存在する目的の標的配列を増幅するために、多くの鋳型依存性プロセスが利用可能である。最もよく知られている増幅方法の1つは、そのそれぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,800,159号に詳細に記載されているポリメラーゼ連鎖反応 (PCR (商標)) である。簡単に述べると、PCR (商標) では、標的配列の逆の相補鎖上の領域と相補的な2つのプライマー配列を調製する。過剰なデオキシヌクレオシド三リン酸を、DNAポリメラーゼ (例えば、Taqポリメラーゼ) と一緒に反応混合物に加える。標的配列が試料中に存在すれば、プライマーは標的に結合し、ポリメラーゼにより、ヌクレオチドに付加することによって標的配列に沿ってプライマーが伸長する。反応混合物の温度を上下させることにより、伸長したプライマーが標的から解離して反応産物が形成され、過剰なプライマーが標的および反応産物に結合し、プロセスが繰り返される。好ましくは、増幅されたmRNAの量を数量化するために逆転写およびPCR (商標) 増幅手順を実施することができる。ポリメラーゼ連鎖反応の方法体系は当技術分野で周知である。

20

30

【0153】

その多くがPCR (商標) 増幅技法の変形であるいくつかの他の鋳型依存性プロセスはいずれも当技術分野において容易に知ることができ、利用可能である。例示的に、いくつかのそのような方法として、リガーゼ連鎖反応 (LCRと称される)、例えば、欧州特許出願公開第320,308号および米国特許第4,883,750号に記載されている; Qベータレプリカーゼ (Qbeta Replicase)、PCT国際特許出願公開第PCT/US87/00880号に記載されている; 鎖置換増幅 (Strand Displacement Amplification) (SDA) および修復連鎖反応 (Repair Chain Reaction) (RCR)。さらに他の増幅方法は、英国特許出願第2,202,328号、およびPCT国際特許出願公開第PCT/US89/01025号に記載されている。他の核酸増幅手順としては、核酸配列に基づく増幅 (NASBA) および3SRを含めた転写に基づく増幅系 (TAS) (PCT国際特許出願公開第WO88/10315号) が挙げられる。欧州特許出願公開第329,822号には、一本鎖RNA (「ssRNA」)、ssDNA、および二本鎖DNA (dsDNA) の周期的合成を伴う核酸増幅プロセスが記載されている。PCT国際特許出願公開第WO89/06700号には、プロモーター/プライマー配列を標的一本鎖DNA (「ssDNA」) とハイブリダイズさせ、その後、配列の多くのRNAコピーを転写させることに基づく核酸配列増幅スキームが記載されている。「RACE」 (Frohman、1990年)、

40

50

および「片側PCR」(Ohara、1989年)などの他の増幅方法も当業者に周知である。

【0154】

本発明のポリヌクレオチドの増幅された部分を使用して、全長遺伝子を適切なライブラリー(例えば、腫瘍cDNAライブラリー)から周知の技法を用いて単離することができる。そのような技法では、ライブラリー(cDNAまたはゲノム)を、増幅に適した1つまたは複数のポリヌクレオチドプローブまたはプライマーを使用してスクリーニングする。ライブラリーをサイズ選択してより大きな分子を含めることが好ましい。ランダムプライムライブラリー(random primed library)も、遺伝子の5'および上流領域を同定するために好ましい。イントロンおよび伸長性5'配列を得るためにはゲノムライブラリーが好ましい。

10

【0155】

ハイブリダイゼーション技法のために、周知の技法を用いて部分配列を標識することができる(例えば、ニック翻訳または³²Pを用いた末端標識化)。次いで、一般に、細菌ライブラリーまたはバクテリオファージライブラリーを、変性させた細菌コロニー(またはファージプラークを含有する菌叢)を含有するフィルターと標識したプローブをハイブリダイズさせることによってスクリーニングする(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories、Cold Spring Harbor、NY、1989年を参照されたい)。ハイブリダイズしているコロニーまたはプラークを選抜き、増大させ、さらなる分析のためにDNAを単離する。cDNAクローンを、例えば、部分配列由来のプライマーおよびベクター由来のプライマーを使用したPCRによって分析して、追加的な配列の量を決定することができる。制限マップおよび部分配列を生成して、1つまたは複数の重複しているクローンを同定することができる。次いで、一連の欠失クローンを生成することを伴ってよい標準の技法を用いて完全な配列を決定することができる。次いで、生じた重複配列を組み立てて単一の連続した配列にすることができる。周知の技法を用いて適切な断片をライゲーションすることによって全長cDNA分子を生成することができる。

20

【0156】

当業者には理解される通り、いくつかの場合には、天然に存在しないコドンに含有する、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を作製することが有利であり得る。例えば、特定の原核生物宿主または真核生物宿主に好まれるコドンは、タンパク質の発現の速度が上昇するように、または、天然に存在する配列から生成される転写物の半減期よりも長い半減期などの望ましい特性を有する組換えRNA転写物が産生されるように選択することができる。

30

【0157】

さらに、これだけに限定されないが、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する変更を含め、種々の理由でポリペプチドコード配列を変更するために、本発明のポリヌクレオチド配列を、当技術分野で一般に公知の方法を用いて工学的に操作することができる。例えば、遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのランダムな断片化およびPCR再組立てによるDNAシャッフリングを用いて、ヌクレオチド配列を工学的に操作することができる。さらに、部位特異的変異誘発を使用して、新しい制限部位を挿入すること、グリコシル化パターンを変更すること、コドン優先性を変化させること、スプライスバリエーションを作製すること、または変異を導入することなどができる。

40

【0158】

所望のポリペプチドをコードする配列は、全体的にまたは部分的に、当技術分野で周知の化学的方法を用いて合成することができる(Caruthers、M. H.ら(1980年)Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215~223頁、Horn、T.ら(1980年)Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225~232頁を参照されたい)。あるいは、タンパク質自体は、ポリペプチドのアミノ酸配列またはその部分を合成するための化学的方法を用いて

50

作製することができる。例えば、ペプチド合成は、種々の固相技法を用いて実施することができる（Roberge, J. Y.ら（1995年）Science 269巻：202～204頁）、自動合成は、例えば、ABI 431A Peptide Synthesizer（Perkin Elmer, Palo Alto, CA）を使用して実現することができる。
【0159】

新しく合成されたペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィー（例えば、Creighton, T.（1983年）Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, N.Y.）または当技術分野において利用可能な他の匹敵する技法によって実質的に精製することができる。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析または配列決定（例えば、エドマン分解手順）によって確認することができる。さらに、ポリペプチドのアミノ酸配列またはその任意の一部を直接合成の間に変更し、かつ/または化学的方法を用いて他のタンパク質またはその任意の一部由来の配列と組み合わせ、バリエーションポリペプチドを作製することができる。

10

【0160】

所望のポリペプチドを発現させるために、ポリペプチドまたは機能的等価物をコードするヌクレオチド配列を、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有するベクターに挿入することができる。当業者に周知の方法を用いて、目的のポリペプチドをコードする配列ならびに適切な転写制御エレメントおよび翻訳制御エレメントを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、*in vitro*組換えDNA技法、合成技法、および*in vivo*遺伝子組換えが挙げられる。そのような技法は、例えば、Sambrook, J.ら（1989年）Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., およびAusubel, F. M.ら（1989年）Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載されている。

20

【0161】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、ポリヌクレオチド配列を含有させ、発現させることができる。これらとしては、これだけに限定されないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）または細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。

30

【0162】

発現ベクター内に存在する「制御エレメント」または「調節配列」は、転写および翻訳を行うために宿主細胞のタンパク質と相互作用するベクターの翻訳されない領域 - エンハンサー、プロモーター、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域 - である。そのようなエレメントは、それらの強度および特異性が変動する可能性がある。利用するベクター系および宿主に応じて、任意の数の、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを含めた適切な転写エレメントおよび翻訳エレメントを用いることができる。例えば、細菌系におけるクローニングの場合、pBLUESCRIPTファージミドのハイブリッドlacZプロモーター（Stratagene, La Jolla, Calif.）またはpSPORT1プラスミド（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）などの誘導性プロモーターを使用することができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来のプロモーターまたは哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが一般に好ましい。ポリペプチドをコードする配列の多数のコピーを含有する細胞系統を生成する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適切な選択マーカーと一緒に有利に使用することができる。

40

【0163】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルスに基づく発現系が一般に利用可能である。

50

例えば、アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、目的のポリペプチドをコードする配列を後期プロモーターと、トリパーティリーダー配列とからなるアデノウイルス転写/翻訳複合体にライゲーションすることができる。ウイルスのゲノムの非必須E1領域またはE3領域への挿入を用いて、感染した宿主細胞においてポリペプチドを発現させることができる生存可能なウイルスを得ることができる(Logan, J.およびShenk, T. (1984年) Proc. Natl. Acad. Sci. 81巻: 3655~3659頁)。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増加させることができる。

【0164】

目的のポリペプチドをコードする配列のより効率的な翻訳を実現するために特異的な開始シグナルを使用することもできる。そのようなシグナルはATG開始コドンおよび隣り合う配列を含む。ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流の配列を適切な発現ベクターに挿入する場合、追加的な転写制御シグナルまたは翻訳制御シグナルが必要な場合がある。しかし、コード配列またはその一部分のみを挿入する場合には、ATG開始コドンを含めた外因性の翻訳制御シグナルを用意すべきである。さらに、挿入断片全体が翻訳されることを確実にするために、開始コドンは正しい読み枠内に存在すべきである。外因性の翻訳エレメントおよび開始コドンは、天然および合成の両方の種々の起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に適したエンハンサー、例えば、文献(Scharf, D.ら(1994年) Results Probl. Cell Differ. 20巻: 125~162頁)に記載のものなどを含めることによって増強することができる。

【0165】

さらに、宿主細胞株は、挿入配列の発現を調節する能力または発現されたタンパク質を所望の様式でプロセッシングする能力について選択することができる。そのようなポリペプチドの修飾としては、これだけに限定されないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質付加、およびアシル化が挙げられる。「プレプロ」形態のタンパク質を切断する翻訳後プロセッシングを用いて、正しい挿入、フォールディングおよび/または機能を容易にすることもできる。そのような翻訳後活性について特定の細胞機構および特徴的なメカニズムを有するCHO、COS、HeLa、MDCK、HEK293、およびWI38などの異なる宿主細胞を選択して、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすることができる。

【0166】

組換えタンパク質の長期にわたる高収量の産生、安定発現が一般に好ましい。例えば、目的のポリヌクレオチドを安定に発現する細胞系統を、ウイルス複製開始点および/または内在性の発現エレメントおよび選択マーカー遺伝子と同じベクターまたは別々のベクター上に含有してよい発現ベクターを使用して形質転換することができる。ベクターを導入した後、細胞を強化培地で1~2日間成長させた後、選択培地に切り換えることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する抵抗性を付与することであり、選択マーカーが存在することにより、導入された配列を首尾よく発現している細胞の成長および回収が可能になる。安定に形質転換された細胞の抵抗性クローンは、その細胞型に適した組織培養物技法を用いて増殖させることができる。

【0167】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系統を回収することができる。これらとしては、これだけに限定されないが、それぞれtk⁻細胞またはaprt⁻細胞において使用することができる、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(Wigler, M.ら(1977年) Cell 11巻: 223~32頁)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(Lowy, I.ら(1990年) Cell 22巻: 817~23頁)が挙げられる。また、代謝拮抗薬、抗生物質または除草剤抵抗性を選択の基礎として用いることができる;例えば、メトトレキセートに対する抵抗性を付与するdhfr(Wigler, M.ら(1980年) Proc. Natl. Acad. Sci. 77巻: 3567~70頁);アミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する抵抗性を付与するnpt(Colbere-Ga

10

20

30

40

50

rapin, F.ら(1981年)J. Mol. Biol. 150巻:1~14頁);ならびに、それぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシニアセチルトランスフェラーゼに対する抵抗性を付与するa l sまたはp a t (Murry、上記)。追加的な選択可能な遺伝子、例えば、細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用することを可能にするt r p B、または、細胞がヒスチジンの代わりにヒスチジノール(histinol)を利用することを可能にするh i s D (Hartman, S. C.およびR. C. Mulligan(1988年)Proc. Natl. Acad. Sci. 85巻:8047~51頁)が記載されている。可視マーカーの使用は、アントシアニン、ベータグルクロニダーゼおよびその基質であるG U S、ならびにルシフェラーゼおよびその基質であるルシフェリンなどのマーカーが形質転換体を同定するためだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性または安定なタンパク質の発現の量を数量化するためにも広く使用されるのに伴って人気を得た(Rhodes, C. A.ら(1995年)Methods Mol. Biol. 55巻:121~131頁)。

10

【0168】

あるいは、所望のポリヌクレオチド配列を含有し、それを発現する宿主細胞を、当業者に公知の種々の手順によって同定することができる。これらの手順としては、これだけに限定されないが、DNA-DNAハイブリダイゼーションまたはDNA-RNAハイブリダイゼーション、および例えば核酸またはタンパク質を検出し、かつ/または数量化するための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含むタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイの技法が挙げられる。

【0169】

ポリヌクレオチド-コード産物の発現を、産物に特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用して検出し、測定するための種々のプロトコールが当技術分野で公知である。例としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化細胞選別(FACS)が挙げられる。所与のポリペプチド上の2つの非妨害性エピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を利用した2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイがいくつかの適用に好ましい場合があるが、競合結合アッセイも用いることができる。これらおよび他のアッセイは、他の場所の中でも、Hampton, R.ら(1990年;Serological Methods, a Laboratory Manual、APS Press、St Paul, Minn.)およびMaddox, D. E.ら(1983年;J. Exp. Med. 158巻:1211~1216頁)に記載されている。

20

30

【0170】

多種多様な標識およびコンジュゲーション技法が当業者に公知であり、種々の核酸およびアミノ酸のアッセイにおいて使用することができる。ポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識されたハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブを作製するための手段としては、オリゴ標識、ニック翻訳、末端標識または標識されたヌクレオチドを使用したPCR増幅が挙げられる。あるいは、配列またはその任意の部分を、mRNAプローブを作製するためにベクターにクローニングすることができる。そのようなベクターは当技術分野で公知であり、市販されており、それを用いて、T7、T3またはSP6などの適切なRNAポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドを加えることによってRNAプローブを*in vitro*で合成することができる。これらの手順は、種々の市販のキットを使用して行うことができる。用いることができる適切なレポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光、化学発光、または発色作用剤ならびに基質、補因子、阻害剤、磁気粒子などが挙げられる。

40

【0171】

目的のポリヌクレオチド配列で形質転換した宿主細胞は、タンパク質を発現させ、細胞培養物から回収するために適した条件下で培養することができる。組換え細胞によって産生されるタンパク質は、使用する配列および/またはベクターに応じて細胞内に分泌させることもでき、細胞内に含めることもできる。当業者には理解される通り、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターは、コードされるポリペプチドの原核細胞膜または真核細胞膜を通じた分泌を導くシグナル配列を含有するように設計することができる。他

50

の組換え構築物を用いて、目的のポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列とつなぐことができる。そのような精製を容易にするドメインとしては、これだけに限定されないが、固定化した金属での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュールなどの金属キレート化ペプチド、固定化した免疫グロブリンでの精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長/アフィニティー精製系で利用されるドメイン(ImmuneX Corp., Seattle, Wash.)が挙げられる。第XA因子またはエンテロキナーゼ(Invitrogen, San Diego, Calif.)に特異的なものなどの切断可能なリンカー配列を、精製ドメインとコードされるポリペプチドの間を含めることを用いて、精製を容易にすることができる。そのような発現ベクターの1つにより、目的のポリペプチドと、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位の前にある6つのヒスチジン残基をコードする核酸とを含有する融合タンパク質の発現がもたらされる。Porath, J.ら(1992年、Prot. Exp. Purif. 3巻:263~281頁)に記載の通り、ヒスチジン残基により、IMIA C(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)での精製が容易になり、一方、エンテロキナーゼ切断部位により、所望のポリペプチドを融合タンパク質から精製するための手段がもたらされる。融合タンパク質を含有するベクターに関する考察は、Kroll, D. J.ら(1993年;DNA Cell Biol. 12巻:441~453頁)において提供される。

10

20

30

40

50

【0172】

組換え作製方法に加えて、本発明のポリペプチドおよびその断片は、固相技法を用いた直接ペプチド合成によって作製することができる(Merrifield J.(1963年)J. Am. Chem. Soc. 85巻:2149~2154頁)。タンパク質合成は、手動の技法を用いてまたは自動で実施することができる。自動合成は、例えば、Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer(Perkin Elmer)を使用して実現することができる。あるいは、種々の断片を、全長の分子を作製するための化学的方法を用いて別々に、および組み合わせて化学的に合成することができる。

【0173】

T細胞組成物

本発明は、別の態様では、本明細書に開示されているがん関連ポリペプチド(例えば、がん因子)、またはそのバリエーションもしくは誘導体もしくは断片に特異的なT細胞を提供する。そのような細胞は、一般に、*in vitro*または*ex vivo*で標準の手順を用いて調製することができる。例えば、T細胞は、患者の骨髄、末梢血、または骨髄もしくは末梢血の画分から、市販の細胞分離システム、例えば、Nexell Therapeutics, Inc.(Irvine, CA;米国特許第5,240,856号;米国特許第5,215,926号;WO89/06280;WO91/16116およびWO92/07243も参照されたい)から入手可能なIsoplex(商標)Systemなどを用いて単離することができる。あるいは、T細胞は、関連するまたは無関係のヒト、非ヒト哺乳動物、細胞系統または培養物から得ることができる。

【0174】

T細胞は、がん関連ポリペプチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/またはそのようなポリペプチドを発現する抗原提示細胞(APC)を用いて刺激することができる。そのような刺激は、目的のポリペプチドに特異的なT細胞の生成を可能にするために十分な条件および時間で実施する。本発明の腫瘍ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、特異的なT細胞の生成を容易にするために、マイクロスフェアなどの送達ビクル中に存在することが好ましい。

【0175】

T細胞は、T細胞が特異的に増殖した場合、サイトカインを分泌した場合、または本発明のポリペプチドでコーティングした、もしくは本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を発現している標的細胞を死滅させた場合に、本発明のポリペプチドに対して特異的で

あるとみなされる。T細胞の特異性は、種々の標準の技法のいずれかを用いて評価することができる。例えば、クロム放出アッセイまたは増殖アッセイでは、溶解および/または増殖に関して陰性対照と比較して2倍超増加するという刺激の指数により、T細胞の特異性が示される。そのようなアッセイは、例えば、Chenら、Cancer Res. 54巻:1065~1070頁、1994年に記載の通り実施することができる。あるいは、T細胞の増殖の検出は、種々の公知の技法によって実現することができる。例えば、T細胞の増殖は、DNA合成の速度の上昇を測定すること(例えば、トリチウム標識チミジンを用いてT細胞をパルス標識化培養し、DNAに組み入れられたトリチウム標識チミジンの量を測定することによる)によって検出することができる。腫瘍ポリペプチド(100ng/ml~100μg/ml、好ましくは200ng/ml~25μg/ml)と3~7日間接触させることにより、一般には、T細胞の増殖が少なくとも2倍に増加する。上記の通り2~3時間接触させることにより、サイトカイン(例えば、TNFまたはIFN-)の放出のレベルが2倍に上昇することによりT細胞の活性化が示される標準のサイトカインアッセイを用いて測定したところT細胞が活性化されるはずである(Coliganら、Current Protocols in Immunology、1巻、Wiley Interscience(Greene 1998年)を参照されたい)。腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを発現しているAPCに応答して活性化されるT細胞はCD4⁺および/またはCD8⁺であり得る。腫瘍ポリペプチドに特異的なT細胞は標準の技法を用いて増大させることができる。ある特定の実施形態では、T細胞は患者、関連するドナーまたは無関係のドナーに由来し、刺激し、増大させた後に患者に投与する。

10

20

【0176】

治療目的で、腫瘍ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはAPCに応答して増殖するCD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞の数を、*in vitro*または*in vivo*のいずれかで増大させることができる。そのような*in vitro*でのT細胞の増殖は、さまざまなやり方で実現することができる。例えば、T細胞を、腫瘍ポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫原性部分に対応する短いペプチドに、インターロイキン2などのT細胞増殖因子、および/または腫瘍ポリペプチドを合成する刺激細胞の添加を伴って、または伴わずに、再曝露させることができる。あるいは、腫瘍ポリペプチドの存在下で増殖する1つまたは複数のT細胞の数をクローニングによって増大させることができる。細胞をクローニングするための方法は当技術分野で周知であり、限界希釈が挙げられる。

30

【0177】

T細胞受容体(TCR)は、T細胞受容体鎖および鎖と称される2つの異なる高度に可変性のポリペプチド鎖からなり、これらはジスルフィド結合によって連結している(Janeway、Travers、Walport. Immunobiology. 第4版、148~159頁 Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. 1999年)。細胞膜に不変のCD3鎖を有する/ヘテロ二量体複合体。この複合体は、MHC分子に結合した特異的な抗原性ペプチドを認識する。免疫グロブリンの多様性によく似たTCR特異性の非常な多様性は体細胞遺伝子再編成を通じて生じる。鎖遺伝子は50超の可変性セグメント(V)、2つの多様性セグメント(D)、10超の連結セグメント(J)、および2つの定常領域セグメント(C)を含有する。鎖遺伝子は、70超のVセグメント、および60超のJセグメントを含有するが、Dセグメントは含有せず、Cセグメントを1つ含有する。胸腺におけるT細胞発生の間、鎖のDからJの遺伝子再編成が起こり、その後、V遺伝子セグメントとDJの再編成が起こる。この機能的VDJエクソンは転写され、スプライスされてCとつながる。鎖に関しては、V遺伝子セグメントがJ遺伝子セグメントと再編成されて機能的なエクソンが創出され、次いでそれが転写され、スプライスされてCになる。鎖のVセグメント、Dセグメント、およびJセグメントの間、ならびに鎖のVセグメントとJセグメントの間へのPヌクレオチドおよびNヌクレオチドのランダムな付加による組換えプロセスの間には多様性はさらに増大する(Janeway、Travers、Walport. Immunobiology. 第4版、98頁および150頁。Elsevier Science Ltd/Garland Pub

40

50

lishing. 1999年)。

【0178】

本発明は、別の態様では、本明細書に開示されているがん関連ポリペプチド、またはそのバリエーションもしくは誘導体に特異的なTCRを提供する。本発明によると、本明細書に記載の腫瘍ポリペプチドを認識するT細胞受容体のアルファ鎖およびベータ鎖についてV-J接合部またはV-D-J接合部またはその一部のポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列が提供される。一般に、本発明のこの態様は、MHCとの関連で存在する腫瘍ポリペプチドを認識するまたはそれに結合するT細胞受容体に関する。好ましい実施形態では、T細胞受容体によって認識される腫瘍抗原は、本発明のポリペプチドを含む。例えば、腫瘍ペプチドに特異的なTCRをコードするcDNAは、腫瘍ポリペプチドに特異的なT細胞から、標準の分子生物学的技法および組換えDNA技法を用いて単離することができる。

10

【0179】

本発明は、腫瘍ポリペプチドを認識するまたはそれに結合する本発明のT細胞受容体と実質的に同じ機能または活性を有するT細胞受容体またはその類似体をさらに包含する。そのような受容体としては、これだけに限定されないが、受容体の断片、または本明細書において提供されるT細胞受容体の置換、付加もしくは欠失変異体が挙げられる。本発明は、本明細書において提供されるT細胞受容体と実質的に相同である、またはそれと実質的に同じ活性を保持するポリペプチドまたはペプチドも包含する。「類似体」という用語は、1つまたは複数の残基、好ましくは5残基以下、より好ましくは25残基以下が機能的に同様の残基と保存的に置換されており、本明細書に記載のT細胞受容体の機能的な面を示す、本明細書において提供されるT細胞受容体と実質的に同一のアミノ酸残基配列を有する任意のタンパク質またはポリペプチドを包含する。

20

【0180】

本発明は、本明細書に記載のポリペプチドに特異的なTCRをコードするポリヌクレオチドをトランスフェクトし、それにより、宿主細胞をポリペプチドに特異的にする、適切な哺乳動物宿主細胞、例えば、非特異的T細胞をさらに提供する。TCRの鎖および鎖は、別々の発現ベクター上に含有されてよい、あるいは、配列内リボソーム進入部位(IRES)の下流の遺伝子のキャップ非依存性翻訳のためのIRESも含有する単一の発現ベクター上に含有されてよい。ポリペプチドに特異的なTCRを発現している前記宿主細胞は、例えば、下でさらに考察されている通り、がんの養子免疫療法のために使用することができる。

30

【0181】

本発明のさらなる態様では、本明細書において列挙されているポリペプチドに特異的なクローニングされたTCRは、がんを診断するためのキットにおいて使用することができる。例えば、腫瘍に特異的なTCRの核酸配列またはその部分を、生体試料において特異的なTCRをコードする再編成された遺伝子の発現を検出するためのプローブまたはプライマーとして使用することができる。この点において、本発明は、ポリペプチドに特異的なTCRをコードするメッセンジャーRNAまたはDNAを検出するためのアッセイをさらに提供する。

40

【0182】

医薬組成物および他の組成物

本発明の医薬組成物は、一般には、細胞または動物に、単独で、または1つまたは複数の他の療法のモダリティと組み合わせて投与するための、薬学的に許容される担体中の本明細書に開示されているがん関連抗体、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、T細胞、またはTCR組成物のうちの1つまたは複数を含む。

【0183】

所望であれば、本明細書に開示されている組成物を、さらに他のタンパク質もしくはポリペプチドまたは種々の薬学的に活性な作用剤などの他の作用剤と組み合わせて投与することができることが理解されよう。実際、標的細胞または宿主組織と接触させた際に、追加的な作用剤によって有意な有害作用が引き起こされないのであれば、含めることができ

50

る他の構成成分は実質的に限定されない。したがって、組成物を、特定の例において必要とされるような種々の他の作用剤と一緒に送達することができる。そのような組成物は、宿主細胞または他の生物学的な供給源から精製することができる、あるいは、本明細書に記載の通り化学的に合成することができる。同様に、そのような組成物は、置換されたまたは誘導体化されたRNA組成物またはDNA組成物をさらに含んでよい。

【0184】

したがって、本発明の別の態様では、本明細書に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、TCR、および/またはT細胞組成物のうちの1つまたは複数と生理的に許容される担体との組合せを含む医薬組成物が提供される。

【0185】

一実施形態では、本発明は、一部、本明細書に開示されているがん関連ポリペプチドまたはがん因子に対する1つまたは複数の抗体を含む組成物を意図している。本発明の特定の実施形態では、組成物は、1つまたは複数の精製されたがん因子抗体を含み、組成物は、内毒素を実質的に含まず、凝集体の形成をほとんどまたは全く有さず、組成物の精製された単離されたポリペプチドは治療的に許容できる製剤に可溶性である。

【0186】

一実施形態では、本発明は、がん因子に対する少なくとも1つの精製された単離された抗体を有する少なくともその断片を含む組成物であって、抗体および組成物が内毒素を実質的に含まず、p抗体が凝集体の形成をほとんどまたは全く有さず、抗体が治療的に許容できる製剤に可溶性であり、組成物が、哺乳動物の炎症促進剤を実質的に含まない組成物を意図している。

【0187】

内毒素は、ある特定の細菌、一般にはグラム陰性細菌に関連する毒素であるが、内毒素は、*Listeria monocytogenes*などのグラム陽性細菌において見いだすことができる。最も蔓延している内毒素は、種々のグラム陰性細菌の外膜に見いだされ、これらの細菌の疾患を引き起こす能力の中で中心的な病原的特徴を示すリポ多糖(LPS)またはリポオリゴ糖(LOS)である。ヒトにおける少量の内毒素により、他の有害な生理作用の中でも、発熱、血圧の低下、ならびに炎症および凝固の活性化が生じる可能性がある。したがって、少量でさえもヒトにおける有害作用を引き起こされる可能性がある。多くの場合、薬物および薬品容器由来の内毒素の痕跡のほとんどまたは全てを除去することが望ましい。内毒素非含有製剤の作製には、特別な設備、専門職人が必要になる可能性があり、内毒素非含有ではない製剤の作出よりも著しく費用がかかる。

【0188】

内毒素は、当技術分野で公知の常套的な技法を用いて検出することができる。例えば、カプトガニ由来の血液を利用するLimulus Ameobocyte Ly sate アッセイは、内毒素の存在を検出するための非常に感度のよいアッセイである。この試験では、この反応を増幅する有力な酵素カスケードに起因して、非常に低いレベルのLPSによって検出可能なリムルス属溶解物の凝固が引き起こされる。内毒素は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって定量化することができる。本明細書で使用される場合、「内毒素非含有」という用語は、最大で微量(すなわち、被験体に対して有害な生理作用を有さない量)の内毒素、好ましくは検出不可能な量の内毒素を含有する組成物を指す。一実施形態では、「内毒素非含有」という用語は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%が内毒素を含まない組成物を指す。一実施形態では、「内毒素非含有」という用語は、約0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、または10内毒素単位(EU)/mlまたはEU/mg未満であってよい内毒素レベルまたは内毒素プロファイルを指す。一般には、リポ多糖(LPS)1ngは約1~10EUに対応する。

【0189】

実質的に内毒素を含まないものであるためには、内毒素レベルまたは内毒素プロファイルは、約 0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、または 10 EU/ml 未満であってよい。

【0190】

ある特定の実施形態では、本発明は、部分的に、精製された CT-1 ポリペプチド 1 mg 当たり約 50 EU/mg 未満、約 30 EU/mg 未満、約 25 EU/mg 未満、約 20 EU/mg 未満、約 15 EU/mg 未満、約 10 EU/mg 未満、約 8 EU/mg 未満、約 7 EU/mg 未満、約 6 EU/mg 未満、約 5 EU/mg 未満、約 4 EU/mg 未満、約 3 EU/mg 未満、約 2 EU/mg 未満、約 1.5 EU/mg 未満、約 1.4 EU/mg 未満、約 1.3 EU/mg 未満、約 1.2 EU/mg 未満、約 1.1 EU/mg 未満、約 1.0 EU/mg 未満、約 0.9 EU/mg 未満、約 0.8 EU/mg 未満、約 0.7 EU/mg 未満、約 0.6 EU/mg 未満、約 0.5 EU/mg 未満、約 0.4 EU/mg 未満、約 0.3 EU/mg 未満、約 0.2 EU/mg 未満、約 0.1 EU/mg 未満、またはそれよりも少ない内毒素単位の内毒素プロファイルを含むがん因子抗体を意図している。内毒素レベルまたはプロファイルは、室温 (20 ~ 25) または体温 (37) で評価することができる。

10

【0191】

本発明は、さらに、既存の抗体と比較して安定性が改善されたがん因子抗体を提供する。安定性は、一般に、分子が、そのフォールディングした活性な状態にとどまる傾向と定義することができる。天然に存在する分子は、通常、それらの代謝、多くの場合それらの代謝が速いことがそれらの体内での内因性作用機構の重要な特性であるので、安定性が限定されている。

20

【0192】

通常、そのフォールディングしたネイティブな構造にある安定なタンパク質は、プロテアーゼまたは他の機構によって分解することができない。これは、タンパク質が体内で通常排除される、安定な状態からの 2 つの重要なオフ経路に起因する。これらの 2 つは、アンフォールディングおよび凝集である。これらは通常、関連している。アンフォールディングは、フォールディングした活性な分子があまりフォールディングしていない状態に戻る経路である。凝集は、ミスフォールディングし、したがって分子が活性でない状態に不可逆的に変化した結果である。アンフォールディングと凝集のどちらによっても、タンパク質分解性の消化または他の消化に対するタンパク質の感受性が有意に増加する。本発明は、生じた実体が、本発明の方法によって作製されたものではないがん因子抗体よりも安定であるように改変したがん因子抗体のフォールディングおよびアンフォールディング経路を提供する。

30

【0193】

特定の実施形態では、本発明は、不溶性タンパク質凝集体の形成に対する安定性が増大した抗体組成物を提供する。「タンパク質凝集体」または「タンパク質凝集」は、本明細書では、もはや溶解していないタンパク質を指すために使用される。タンパク質凝集体とは、2 つ以上の個々のタンパク質分子の凝塊形成またはオリゴマー形成を指す場合があるが、そのような定義に限定されない。タンパク質凝集体とは、当技術分野で使用される場合、可溶性であっても不溶性であってもよいが、本発明の特定の実施形態の目的に関しては、タンパク質凝集体は、通常、他に特に指示がなければ、不溶性であるとみなされる。本発明によるプロセスにおいてその形成を妨げるべきである不溶性の凝集体は、基本的に、サイズが少なくとも 1 μm であるタンパク質凝集体であると理解されるが、10 μm を超える範囲にある場合もある。粒子は、例えば、PSS (Particle Sizing Systems, USA) からの粒子計数器 Accusizer 700 または LD 400 レーザカウンタを備えた Pacific Scientific HIAC Royco 液体粒子計数システム、モデル 9703 などの商業的な粒子計数器を使用して、適切な粒子計数方法によって決定することができる。USP (米国薬局方) によると、

40

50

医薬調製物の注射用量当たり、 $10\ \mu\text{m}$ を超える範囲の粒子は最大 6000 個許容され、 $25\ \mu\text{m}$ を超える範囲の粒子は最大 600 個が許容される。これは、がん因子抗体の治療用組成物を提供するための本発明に従って実現することができる。

【0194】

特定の実施形態では、1つまたは複数のがん因子抗体を含む組成物は、1回または複数回の凍結/解凍サイクル、攪拌ストレス、または非限定的な例として熱ストレス、化学的ストレス（例えば、pH、低/高塩など）、流動ストレス（例えば、狭い開口部を通る流体運動によって引き起こされるものなどの圧縮ストレス）を含めた1つまたは複数の外部からの物理的または化学的ストレスによって誘導される凝集体の形成に対する安定性が増加している。本明細書で使用される場合、「攪拌ストレス」とは、組成物に受動的または能動的に適用される任意の物理的運動を意味するものと解釈される。攪拌ストレスの非限定的な例としては、突沸、滴下、振とう、旋回、ボルテックス、デカンティング、注射、引き抜き（容器（containing）またはベッセルからシリンジ中に）などが挙げられる。本発明の組成物は、輸送および運搬の力に対して特に安定化されている。

10

【0195】

安定性が改善されたがん因子抗体は、既存の抗体よりも $2\sim 10$ 高い温度で 90% の残留活性を保持することができる。残留（すなわち、フォールディングした活性な）タンパク質の百分率は、HPLC、SDS PAGEなどの常套的な生化学的技法によって、または結合アッセイもしくは細胞から応答を引き出すことなどの活性アッセイによって測定することができる。

20

【0196】

特定の実施形態では、本発明は、本発明の方法に従って製剤化されたものではない既存の抗体と比較して、約 37 で、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間、少なくとも9時間、少なくとも10時間、少なくとも11時間、少なくとも12時間、少なくとも15時間、少なくとも18時間、少なくとも21時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間、またはそれ以上にわたって安定であるがん関連抗体を含む組成物を意図している。

【0197】

「溶解性」という用語は、本明細書において提供される作用剤の、液体溶媒に溶解し、均一の溶液を形成する性質を指す。溶解性は、一般には、溶媒の単位体積当たりの溶質の質量（溶媒 $1\ \text{kg}$ 当たりの溶質の g 数、 $1\ \text{dL}$ （ $100\ \text{mL}$ ）当たりの g 数、 mg/mL など）、容量モル濃度、重量モル濃度、モル分率または他の同様の濃度の記述のいずれかによって、濃度として表される。溶媒の量当たりの溶解させることができる溶質の最大平衡量が、温度、圧力、pH、および溶媒の性質を含めた指定の条件下での該溶質の該溶媒における溶解性である。ある特定の実施形態では、溶解性を生理的なpHで測定する。ある特定の実施形態では、溶解性を水またはPBSなどの生理的緩衝液において測定する。ある特定の実施形態では、溶解性を血液または血清などの生体液（溶媒）において測定する。ある特定の実施形態では、温度はおよそ室温（例えば、約 20 、 21 、 22 、 23 、 24 、 25 ）またはおよそ体温（ 37 ）であってよい。ある特定の実施形態では、本発明のCT-1ポリペプチドなどの作用剤は、室温（ $20\sim 25$ ）または 37 で少なくとも約 $0.1\ \text{mg/mL}$ 、 $0.2\ \text{mg/mL}$ 、 $0.3\ \text{mg/mL}$ 、 $0.4\ \text{mg/mL}$ 、 $0.5\ \text{mg/mL}$ 、 $0.6\ \text{mg/mL}$ 、 $0.7\ \text{mg/mL}$ 、 $0.8\ \text{mg/mL}$ 、 $0.9\ \text{mg/mL}$ 、 $1\ \text{mg/mL}$ 、 $2\ \text{mg/mL}$ 、 $3\ \text{mg/mL}$ 、 $4\ \text{mg/mL}$ 、 $5\ \text{mg/mL}$ 、 $6\ \text{mg/mL}$ 、 $7\ \text{mg/mL}$ 、 $8\ \text{mg/mL}$ 、 $9\ \text{mg/mL}$ 、 $10\ \text{mg/mL}$ 、 $11\ \text{mg/mL}$ 、 $12\ \text{mg/mL}$ 、 $13\ \text{mg/mL}$ 、 $14\ \text{mg/mL}$ 、 $15\ \text{mg/mL}$ 、 $16\ \text{mg/mL}$ 、 $17\ \text{mg/mL}$ 、 $18\ \text{mg/mL}$ 、 $19\ \text{mg/mL}$ 、 $20\ \text{mg/mL}$ 、 $25\ \text{mg/mL}$ 、または $30\ \text{mg/mL}$ の溶解性を有する。

30

40

【0198】

純度、溶解性および凝集の程度を含めたタンパク質の特性は、タンパク質に基づく分析的なアッセイおよび方法を用いて評価することができる。タンパク質の純度は、いくつか

50

のやり方で評価することができる。例えば、純度は、一次構造、高次構造、サイズ、電荷、疎水性、およびグリコシル化に基づいて評価することができる。一次構造を評価するための方法の例としては、N末端配列決定、C末端配列決定およびペプチド-マッピング（例えば、Allenら、Biologicals. 24巻：255～275頁、1996年）を参照されたい）が挙げられる。高次構造を評価するための方法の例としては、円偏光二色性（例えば、Kellyら、Biochim Biophys Acta. 1751巻：119～139頁、2005年を参照されたい）、蛍光分光法（例えば、Meagherら、J. Biol. Chem. 273巻：23283～23289頁、1998年を参照されたい）、FT-IR、アミド水素重水素交換カイネティクス、示差走査熱量測定、NMR分光法、コンフォメーションの影響を受けやすい抗体との免疫応答性が挙げられる。高次構造は、pH、温度、または添加される塩などの種々のパラメータに応じて評価することができる。

10

【0199】

サイズなどのタンパク質の特性を評価するための方法の例としては、分析用超遠心およびサイズ排除HPLC（SEC-HPLC、あるいは、HPLC-SEC）が挙げられ、電荷を測定するための例示的な方法としては、イオン交換クロマトグラフィーおよび等電電気泳動が挙げられる。疎水性は、例えば、逆相HPLCおよび疎水性相互作用クロマトグラフィーHPLCによって評価することができる。グリコシル化は薬物動態（例えば、クリアランス）、コンフォメーションまたは安定性、受容体との結合性、およびタンパク質機能に影響を及ぼす可能性があり、例えば、質量分析および核磁気共鳴（NMR）分光法によって評価することができる。

20

【0200】

ある特定の形態は、他の使用の中でも、純度、サイズ（例えば、サイズ均一性）または凝集の程度などのタンパク質の特性を評価するため、および/またはタンパク質を精製するためにSEC-HPLCを使用することを含む。SECとは、ゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）およびゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）も含み、溶液中の分子を、それらのサイズ、またはより詳細にはそれらの流体力学的体積、拡散係数、および/または表面性質に基づいて多孔質材料中に分離するクロマトグラフィーの方法を指す。このプロセスは、一般に、生体分子を分離するため、ならびにポリマーの分子量および分子量分布を決定するために用いられる。一般には、生体試料またはタンパク質試料（例えば、本明細書において提供され、当技術分野で公知のタンパク質の発現方法に従って作製されたタンパク質抽出物など）を、規定の固定相（多孔質材料）、好ましくは試料中のタンパク質と相互作用しない相を伴う選択されたサイズ排除カラムにローディングする。ある特定の態様では、固定相は、ガラスまたはスチールのカラム内の密集した三次元マトリックス中に充填された不活性な粒子で構成される。移動相は純水、水性緩衝液、有機溶媒、またはこれらの混合物であってよい。固定相の粒子は、一般には、ある特定のサイズを下回る分子のみが進入することが可能な小さなポアおよび/またはチャネルを有する。したがって、大きな粒子はこれらのポアおよびチャネルから排除され、それらの固定相との相互作用が限定されることにより、それらが実験の初めに「完全に排除された」ピークとして溶出される。ポアに適合することができるより小さな分子は流れている移動相から除かれ、それらが固定相のポアに固定化されている時間は、ある程度はそれらがポア内のどのくらい遠くまで浸透するかにより左右される。移動相の流れからそれらが除かれることにより、それらがカラムから溶出されるまでにかかる時間が長くなり、その結果、粒子がそれらのサイズの違いに基づいて分離される。所与のサイズ排除カラムには、分離することができる分子量の範囲がある。全体的に、上限よりも大きな分子は固定相に捕捉されず、下限よりも小さな分子は固相に完全に進入し、単一のバンドとして溶出され、範囲内の分子は、流体力学的体積などのそれらの性質によって定義される異なる速度で溶出される。医薬タンパク質を用いた実際のこれらの方法の例については、Brunerら、Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 15巻：1929～1935頁、1997年を参照されたい。

30

40

【0201】

50

臨床的適用のためのタンパク質の純度も、例えば、Anicettiら (Trends in Biotechnology. 7巻: 342~349頁、1989年) によって考察されている。タンパク質の純度を分析するためのごく最近の技法としては、限定することなく、Lab Chip GXIIという力価のハイスループットな分析、サイズ決定、およびタンパク質の純度分析を提供するタンパク質および核酸の迅速分析用の自動プラットフォームが挙げられる。ある特定の非限定的な実施形態では、タンパク質断片および抗体などの臨床グレードのタンパク質を、他の方法の中でもクロマトグラフィーの材料の組合せを少なくとも2つの直交ステップにおいて利用することによって得ることができる(例えば、Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. 308巻、SmalesおよびJames編、Humana Press Inc.、2005年を参照されたい)。

10

【0202】

ある特定の実施形態では、1つまたは複数のがん因子抗体を含む組成物は、抗体に関して、当技術分野における常套的な技法に従って測定したところ少なくとも約90%の純度を有する。診断用組成物またはある特定の治療用組成物などのある特定の実施形態では、本発明の抗体組成物は少なくとも約95%の純度を有する。治療用組成物または医薬組成物などの特定の実施形態では、本発明の抗体組成物は、少なくとも約97%または98%または99%の純度を有する。参照または研究用試薬として使用される場合などの他の実施形態では、本発明の抗体はそれよりも低い純度のものであってよく、少なくとも約70%、75%、80%、または85%の純度を有してよい。純度は、全体的に、または他のタンパク質などの選択された構成成分に関して測定することができ、例えば、タンパク質ベースの純度を測定することができる。

20

【0203】

タンパク質溶解性アッセイも包含される。そのようなアッセイは、例えば、組換え産生に最適な成長および精製条件を決定するため、緩衝液(複数可)の選択を最適化するため、および抗体の選択を最適化するために利用することができる。溶解性または凝集は、温度、pH、塩、および他の添加物の存在または不在を含めた種々のパラメータに従って評価することができる。溶解性スクリーニングアッセイの例としては、限定することなく、とりわけ、エンドポイントとして濁度または他の尺度を使用したタンパク質溶解性を測定するためのマイクロプレートに基づく方法、精製された組換えタンパク質の溶解性を分析するためのハイスループットなアッセイ(例えば、Stenvallら、Biochim Biophys Acta. 1752巻: 6~10頁、2005年を参照されたい)、in vivoにおけるタンパク質のフォールディングおよび溶解性をモニタリングし、測定するために遺伝学的なマーカータンパク質の構造的な相補性を用いるアッセイ(例えば、Wigleyら、Nature Biotechnology. 19巻: 131~136頁、2001年を参照されたい)、および、走査型電気化学顕微鏡(SECM)を使用したEscherichia coliにおける組換えタンパク質溶解性の電気化学的なスクリーニング(例えば、Nagamineら、Biotechnology and Bioengineering. 96巻: 1008~1013頁、2006年を参照されたい)が挙げられる。

30

【0204】

特定の実施形態では、本明細書の他の箇所に記載の本発明の修飾されたポリペプチドまたはその断片と薬物動態(PK)モジュレーターとを含むヒト治療用組成物が提供される。本明細書で使用される場合、「薬物動態モジュレーター」という用語は、一般に、これだけに限定することなく、半減期、溶解性、安定性、活性を含めた抗体の薬物動態パラメータがPKモジュレーターを欠く抗体と比較して増大するような抗体の修飾を指す。一実施形態では、PKモジュレーターは、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)を含めた、抗体とコンジュゲートした生体適合性ポリマーを含む。

40

【0205】

ある特定の好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、配列番号1~24のいずれか1つのがん関連ポリペプチドなどの本発明の少なくとも1つのがん関連ポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片を含む。

50

【0206】

ある特定の他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、予防的または治療的なワクチン適用において使用するための本発明の免疫原性ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド組成物を含んでよい。ワクチン調製物は、一般に、例えば、M.F. PowellおよびM.J. Newman編、「Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)」、Plenum Press (NY、1995年)に記載されている。一般に、そのような組成物は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド組成物を1つまたは複数の免疫賦活薬と組み合わせて含む。

【0207】

一実施形態では、医薬組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上のがん因子抗体またはその抗原結合性断片を含む。抗体は、同じがん因子を対象としてもよく、異なるがん因子を対象としてもよい。

10

【0208】

さらに他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、本発明の1つまたは複数のがん関連ポリヌクレオチド配列の発現を阻害するために有効なポリヌクレオチド(例えば、アンチセンス、リボザイム、RNAiまたはsiRNA配列)を含んでよい。

【0209】

本明細書に記載の医薬組成物はいずれも、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的に許容される塩を含有してよいことが明らかになる。そのような塩は、例えば、有機塩基(例えば、第一級アミン、第二級アミンおよび第三級アミンの塩ならびに塩基性アミノ酸)ならびに無機塩基(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩)を含めた薬学的に許容される無毒性の塩基から調製することができる。

20

【0210】

他の実施形態では、本発明の例示的な免疫原性組成物、例えば、ワクチン組成物は、上記のがん関連ポリペプチドのうちの1種または複数種をコードするDNAを含み、したがって、*in situ*でポリペプチドが生成される。上記の通り、ポリヌクレオチドは、当業者に公知の種々の送達系のいずれかの内部に入れて投与することができる。実際に、Rolland、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15巻:143~198頁、1998年、およびそこに引用されている参考文献に記載されているものなどの多数の遺伝子送達技法が当技術分野で周知である。適切なポリヌクレオチド発現系は、当然、患者において発現させるために必要な調節性DNA調節配列(例えば、適切なプロモーターおよび終結シグナルなど)を含有する。あるいは、細菌による送達系は、その細胞表面上でポリペプチドの免疫原性部分を発現するまたはそのようなエピトープを分泌する細菌(例えば、*Bacillus Calmette-Guerrin*など)を投与することを伴ってよい。

30

【0211】

したがって、ある特定の実施形態では、本明細書に記載の免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、発現させるために、いくつかの公知のウイルスに基づく系のいずれかを用いて適切な哺乳動物宿主細胞に導入する。例示的な一実施形態では、レトロウイルスにより、遺伝子送達系のための好都合かつ有効なプラットフォームがもたらされる。本発明のポリペプチドをコードする選択されたヌクレオチド配列を、当技術分野で公知の技法を用いてベクターに挿入し、レトロウイルス粒子にパッケージングさせることができる。次いで、組換えウイルスを単離し、被験体に送達することができる。いくつかの例示的なレトロウイルス系が記載されている(例えば、米国特許第5,219,740号; MillerおよびRosman(1989年)BioTechniques 7巻:980~990頁; Miller, A. D.(1990年)Human Gene Therapy 1巻:5~14頁; Scarpaら(1991年)Virology 180巻:849~852頁; Burnsら(1993年)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻:8033~8037頁; およびBoris-LawrieおよびTemin(1993年)Cur. Opin. Genet. Develop. 3巻:102~109頁。

40

50

【0212】

さらに、いくつかの例示的なアデノウイルスに基づく系も記載されている。宿主ゲノム内に組み込まれるレトロウイルスとは異なり、アデノウイルスは、染色体外に存続し、したがって、挿入変異誘発に伴う危険性が最小限になる (Haj-AhmadおよびGraham (1986年) *J. Virol.* 57巻: 267~274頁; Bettら (1993年) *J. Virol.* 67巻: 5911~5921頁; Mitterederら (1994年) *Human Gene Therapy* 5巻: 717~729頁; Sethら (1994年) *J. Virol.* 68巻: 933~940頁; Barrら (1994年) *Gene Therapy* 1巻: 51~58頁; Berkner, K. L. (1988年) *BioTechniques* 6巻: 616~629頁; およびRichら (1993年) *Human Gene Therapy* 4巻: 461~476頁)。

10

【0213】

ポリヌクレオチド送達のための種々のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター系も開発されてきた。AAVベクターは、当技術分野で周知の技法を用いて容易に構築することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号; 国際公開第WO92/01070号および同第WO93/03769号; Lebkowskiら (1988年) *Molec. Cell. Biol.* 8巻: 3988~3996頁; Vincentら (1990年) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992年) *Current Opinion in Biotechnology* 3巻: 533~539頁; Muzyczka, N. (1992年) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158巻: 97~129頁; Kotin, R. M. (1994年) *Human Gene Therapy* 5巻: 793~801頁; ShellingおよびSmith (1994年) *Gene Therapy* 1巻: 165~169頁; およびZhouら (1994年) *J. Exp. Med.* 179巻: 1867~1875頁を参照されたい。

20

【0214】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを遺伝子移入によって送達するために有用な追加的なウイルスベクターとしては、ワクシニアウイルスおよびトリボックスウイルスなどのウイルスのボックスファミリーに由来するウイルスベクターが挙げられる。例として、新規の分子を発現しているワクシニアウイルス組換え体を以下の通り構築することができる。まず、ポリペプチドをコードするDNAを、ワクシニアプロモーターおよび隣接しているチミジンキナーゼ (TK) をコードする配列などのワクシニアDNA配列と隣り合うように適切なベクターに挿入する。次いで、このベクターを使用して、細胞を、ワクシニアを同時感染させてトランスフェクトする。相同組換えはワクシニアプロモーターと、それに加えて目的のポリペプチドをコードする遺伝子をウイルスのゲノムに挿入するために役立つ。生じたTK⁻組換え体は、細胞を5-プロモデオキシウリジンの存在下で培養し、それに抵抗性のウイルスプラークを選び取ることによって選択することができる。

30

【0215】

ワクシニアに基づく感染/トランスフェクション系を都合よく用いて、生物体の宿主細胞において本明細書に記載の1つまたは複数のポリペプチドの誘導性の一過性の発現または同時発現をもたらすことができる。この特定の系では、まず *in vitro* において細胞にバクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体を感染させる。このポリメラーゼは、T7プロモーターを担持する鑄型のみを転写するという点で優れた特異性を示す。感染後、細胞に、T7プロモーターによって駆動される目的の1つまたは複数のポリヌクレオチドをトランスフェクトする。細胞質においてワクシニアウイルス組換え体から発現されたポリメラーゼによりトランスフェクトされたDNAがRNAに転写され、次いでこれが宿主の翻訳機構によってポリペプチドに翻訳される。この方法により、多量のRNAおよびその翻訳産物が高レベルで一過性に細胞質において産生される。例えば、Elroy-SteinおよびMoss、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87巻: 6743~6747頁 (1990年); Fuerstら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83巻: 8122~8126頁 (1986年) を参照されたい。

40

50

【0216】

あるいは、鶏痘ウイルスおよびカナリアポックスウイルスなどのアビポックスウイルスも、目的のコード配列を送達するために用いることができる。哺乳動物の病原体由来の免疫原を発現している組換えアビポックスウイルスをトリではない種に投与すると防御免疫が付与されることが公知である。アビポックス属のメンバーは感受性のトリ種においてのみ生産的に複製することができ、したがって、哺乳動物細胞では感染性ではないので、アビポックスベクターの使用はヒトおよび他の哺乳動物種において特に望ましい。組換えアビポックスウイルスを作製するための方法は当技術分野で公知であり、ワクシニアウイルスの作製に関して上で述べた通り、遺伝子組換えが用いられる。例えば、WO 91/12882；WO 89/03429；およびWO 92/03545を参照されたい。

10

【0217】

いくつかのアルファウイルスベクターのいずれも同様に、米国特許第5,843,723号；同第6,015,686号；同第6,008,035号および同第6,015,694号に記載のベクターなどが、本発明のポリヌクレオチド組成物を送達するために使用することができる。ベネズエラウマ脳炎（VEE）に基づくある特定のベクターも使用することができ、その例示的な例は、米国特許第5,505,947号および同第5,643,576号に見いだすことができる。

【0218】

さらに、Michaelら J. Biol. Chem. 268巻：6866～6869頁（1993年）およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻：6099～6103頁（1992年）に記載のアデノウイルスキメラベクターなどの分子コンジュゲートベクターも、本発明の下で遺伝子送達のために使用することができる。

20

【0219】

これらおよび他の公知のウイルスに基づく送達系に関する追加的な例示的な情報は、例えば、Fisher-Hochら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86巻：317～321頁、1989年；Flexnerら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 569巻：86～103頁、1989年；Flexnerら、Vaccine 8巻：17～21頁、1990年；米国特許第4,603,112号、同第4,769,330号、および同第5,017,487号；WO 89/01973；米国特許第4,777,127号；GB 2,200,651；EP 0,345,242；WO 91/02805；Berkner、Biotechniques 6巻：616～627頁、1988年；Rosenfeldら、Science 252巻：431～434頁、1991年；Kollsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：215～219頁、1994年；Kass-Elislerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻：11498～11502頁、1993年；Guzmanら、Circulation 88巻：2838～2848頁、1993年；およびGuzmanら、Cir. Res. 73巻：1202～1207頁、1993年に見いだすことができる。

30

【0220】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドを、標的細胞のゲノムに組み込むことができる。この組み込みは相同組換えによって特定の場所および方向に行うこともでき（遺伝子の置換え）、ランダムな非特異的な位置に組み込むこともできる（遺伝子の増加）。なおさらなる実施形態では、ポリヌクレオチドを細胞内でDNAの別々のエピソームセグメントとして安定に維持することができる。そのようなポリヌクレオチドセグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞周期とは独立した、またはそれと同期した維持および複製を可能にするために十分な配列をコードする。発現構築物が細胞に送達される様式およびポリヌクレオチドが残存する細胞内の場所は、使用される発現構築物の種類に左右される。

40

【0221】

本発明の別の実施形態では、例えばUlmerら、Science 259巻：1745～1749頁、1993年の記載およびCohen、Science 259巻：1691～1692頁、1993年による総説の通り、ポリヌクレオチドを「裸の」DNAとして投与/送達する。裸のDNAの取込みは、DNAを、細胞内に効率的に輸送される生分解性ビーズの上にコーテ

50

イングすることによって増加させることができる。

【0222】

さらに別の実施形態では、本発明の組成物を微粒子銃の手法によって送達することができ、その多くが記載されている。例示的な一例では、Gas Driven Particle Accelerator, Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) および Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI) によって製造されたものなどのデバイスを用いて実現することができ、そのいくつかの例は、米国特許第5,846,796号；同第6,010,478号；同第5,865,796号；同第5,584,807号；およびEP特許第0500799号に記載されている。この手法により、ポリヌクレオチド粒子またはポリペプチド粒子などの顕微鏡レベルの粒子の乾燥粉末製剤を、手持ちのデバイスによって生成したヘリウムガスジェット内で高速に加速し、それにより粒子を目的の標的組織内に推進させる、針を用いない送達手法が提供される。

10

【0223】

関連する実施形態では、本発明の組成物のガス駆動の針を欠く注射に有用であり得る他のデバイスおよび方法としては、Bioject, Inc. (Portland, OR) によって提供されるものが挙げられ、そのいくつかの例は、米国特許第4,790,824号；同第5,064,413号；同第5,312,335号；同第5,383,851号；同第5,399,163号；同第5,520,639号および同第5,993,412号に記載されている。

20

【0224】

別の実施形態によると、本明細書に記載の医薬組成物は、本発明の免疫原性ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、T細胞、TCR、および/またはAPC組成物に加えて、1つまたは複数の免疫賦活薬を含む。免疫賦活薬とは、基本的に、外因性の抗原に対する免疫応答（抗体および/または細胞に媒介される）を増強または強化するあらゆる物質を指す。免疫賦活薬の1つの好ましい種類は、アジュバントを含む。多くのアジュバントは、抗原を急速な異化から保護するように設計された物質、例えば、水酸化アルミニウムまたは鉱油など、および免疫応答の刺激因子、例えば、リポドA、Bordetella pertussis または Mycobacterium tuberculosis に由来するタンパク質などを含有する。ある特定のアジュバントが、例えば、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, MI)；Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ)；AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA)；水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩；カルシウム、鉄または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁剤；アシル化糖；陽イオン性誘導体化多糖または陰イオン性誘導体化多糖；ポリホスファゼン；生分解性マイクロスフェア；モノホスホリルリポドA および quil A として市販されている。GM-CSF、インターロイキン2、インターロイキン7、インターロイキン12、および他の同様の増殖因子などのサイトカインもアジュバントとして使用することができる。

30

40

【0225】

主にTh1型応答を引き出すためのある特定の好ましいアジュバントとしては、例えば、モノホスホリルリポドA、好ましくは3-脱-O-アシル化モノホスホリルリポドAとアルミニウム塩の組合せが挙げられる。MPL（登録商標）アジュバントはCorixa Corporationから入手可能である（Seattle, WA；例えば、米国特許第4,436,727号；同第4,877,611号；同第4,866,034号および同第4,912,094号を参照されたい）。CpGを含有するオリゴヌクレオチド（CpGジヌクレオチドはメチル化されていない）によっても主にTh1応答が誘導される。そのようなオリゴヌクレオチドは周知であり、例えば、WO96/02555、WO99/33488 および米国特許第6,008,200号および同第5,856,462号

50

に記載されている。免疫賦活性DNA配列も、例えば、Satoら、Science 273巻：352頁、1996年に記載されている。別の好ましいアジュバントは、Quil A、または、QS21およびQS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc.、Framingham、MA)；エステル；ジギトニン；またはGypsophilaもしくはChenopodium quinoaサポニンを含めたその誘導体などのサポニンを含む。他の好ましい製剤は、本発明のアジュバントの組合せに2つ以上のサポニン、例えば、QS21、QS7、Quil A、エステル、またはジギトニンを含む群の少なくとも2種の組合せを含む。

【0226】

あるいは、サポニン製剤は、キトサンまたは他のポリカチオンポリマー、ポリラクチドおよびポリラクチド-c-o-グリコリド粒子、ポリ-N-アセチルグルコサミンに基づくポリマーマトリックス、多糖または化学修飾された多糖で構成される粒子、リポソームおよび脂質に基づく粒子、グリセロールモノエステルで構成される粒子などで構成されるワクチンビヒクルと組み合わせることができる。サポニンをコレステロールの存在下で製剤化して、リポソームまたはISCOMなどの粒子構造を形成することもできる。さらに、サポニンは、ポリオキシエチレンエーテルまたはエステルと一緒に、非粒子溶液もしくは懸濁剤に、または小さい層状のリポソームもしくはISCOMなどの粒子構造に製剤化することができる。サポニンは、粘度を増加させるためにCarbopol (登録商標)などの賦形剤を用いて製剤化することもでき、ラクトースなどの粉末賦形剤を用いて乾燥粉末形態に製剤化することもできる。

10

20

【0227】

一実施形態では、アジュバント系は、モノホスホリルリピドAとサポニン誘導体の組合せ、例えば、WO94/00153に記載のQS21と3D-MPL (登録商標)アジュバントの組合せなど、またはWO96/33739に記載の通りQS21がコレステロールではクエンチされる場合には低反応源性組成物との組合せを含む。他の好ましい製剤は、水中油エマルジョンおよびトコフェロールを含む。QS21、3D-MPL (登録商標)アジュバントおよびトコフェロールを水中油エマルジョンで使用した別の特に好ましいアジュバント製剤は、WO95/17210に記載されている。

【0228】

別の増強アジュバント系は、CpGを含有するオリゴヌクレオチドとサポニン誘導体の組合せ、具体的にはWO00/09159に開示されているCpGとQS21の組合せを含む。製剤は水中油エマルジョンおよびトコフェロールをさらに含むことが好ましい。

30

【0229】

本発明の医薬組成物に使用するための追加的な例示的なアジュバントとしては、Montanide ISA720 (Seppic、France)、SAF (Chiron、California、United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、SBASシリーズのアジュバント (例えば、SmithKline Beecham、Rixensart、Belgiumから入手可能なSBAS-2またはSBAS-4)、Detox (Enhanzyn (登録商標)) (Corixa、Hamilton、MT)、RC-529 (Corixa、Hamilton、MT) および他のアミノアルキルグルコサミニド4-リン酸 (AGP)、例えば、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、係属中の米国特許出願第08/853,826号および同第09/074,720号に記載のものなど、およびポリオキシエチレンエーテルアジュバント、例えば、WO99/52549A1に記載のものなどが挙げられる。

40

【0230】

他の好ましいアジュバントとしては、一般式
(I) : $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$
(式中、nは1~50であり、Aは結合または-C(O)-であり、Rは C_{1-50} アルキルまたはフェニル C_{1-50} アルキルである)のアジュバント分子が挙げられる。

【0231】

50

本発明の一実施形態は、一般式 (I) (式中、n は 1 から 50 の間、好ましくは 4 ~ 24 であり、最も好ましくは 9 であり；R 構成成分は $C_{1 \sim 50}$ 、好ましくは $C_4 \sim C_{20}$ アルキルおよび最も好ましくは C_{12} アルキルであり、A は結合である) のポリオキシエチレンエーテルを含むワクチン製剤からなる。ポリオキシエチレンエーテルの濃度は、0.1 ~ 20%、好ましくは 0.1 ~ 10% の範囲内、最も好ましくは 0.1 ~ 1% の範囲内であるべきである。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-9-ステオリルエーテル (polyoxyethylene-9-stearyl ether)、ポリオキシエチレン-8-ステオリルエーテル (polyoxyethylene-8-stearyl ether)、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。ポリオキシエチレンラウリルエーテルなどのポリオキシエチレンエーテルは、Merck index (第 12 版：entry 7717) に記載されている。これらのアジュバント分子は、WO 99/52549 に記載されている。

【0232】

上記の一般式 (I) によるポリオキシエチレンエーテルは、所望であれば、別のアジュバントと組み合わせることができる。例えば、好ましいアジュバントの組合せは、係属中の UK 特許出願 GB 9820956.2 に記載の通り、CpG を伴うことが好ましい。

【0233】

本発明の別の実施形態によると、本明細書に記載の免疫原性組成物は、樹状細胞、マクロファージ、B 細胞、単球および工学的に操作して効率的な APC にすることができる他の細胞などの抗原提示細胞 (APC) を介して宿主に送達される。そのような細胞は抗原を提示する能力が増大するように、T 細胞応答の活性化および/または維持が改善されるように、それ自体が抗腫瘍作用を有するように、かつ/または受け手と免疫学的に適合する (すなわち、HLA ハプロタイプ的一致) ように遺伝子改変することができるが、必ずしもその必要はない。APC は、一般に、腫瘍組織および腫瘍周囲組織を含めた種々の生体液および臓器のいずれかから単離することができ、自己細胞であっても、同種異系細胞であっても、同系細胞であっても異種細胞であってもよい。

【0234】

当業者に公知の任意の適切な担体を本発明の医薬組成物に用いることができるが、担体の種類は、一般には、投与形式に応じて変動する。本発明の組成物は、例えば、局所投与、経口投与、経鼻投与、粘膜投与、静脈内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、皮下投与および筋肉内投与を含めた任意の適切な投与様式のために製剤化することができる。

【0235】

そのような医薬組成物内に使用するための担体は生体適合性であり、生分解性であってもよい。ある特定の実施形態では、製剤により、比較的一定のレベルの活性構成成分が放出されることが好ましい。しかし、他の実施形態では、投与されてすぐに、より急速度の放出が所望である場合がある。そのような組成物の製剤は、十分に公知の技法を用いる当業者のレベルの範囲内である。この点について有用な例示的な担体としては、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ポリアクリレート、ラテックス、デンプン、セルロース、デキストランなどの微小粒子が挙げられる。他の例示的な遅延放出型担体としては、非液体親水性コア (例えば、架橋した多糖またはオリゴ糖)、および場合によって、リン脂質などの両親媒性化合物を含む外層を含む超分子バイオベクター (biovector) が挙げられる (例えば、米国特許第 5,151,254 号および PCT 出願第 WO 94/20078 号、同第 WO/94/23701 号および同第 WO 96/06638 号を参照されたい)。持続放出製剤に含有される活性化合物の量は、移植の部位、速度および予測される放出の持続時間および治療または予防される状態の性質に左右される。

【0236】

別の例示的な実施形態では、生分解性マイクロスフェア (例えば、ポリラクテートポリグリコレート) を本発明の組成物の担体として使用する。適切な生分解性マイクロスフェアは、例えば、米国特許第 4,897,268 号；同第 5,075,109 号；同第 5,92

10

20

30

40

50

8, 647号; 同第5, 811, 128号; 同第5, 820, 883号; 同第5, 853, 763号; 同第5, 814, 344号、同第5, 407, 609号および同第5, 942, 252号において開示されている。WO/99 40934、およびそこに引用されている参考文献に記載のものなどの修飾されたB型肝炎コアタンパク質担体系も、多くの適用ために有用である。別の例示的な担体/送達系では、米国特許第5, 928, 647号に記載のものなどの、宿主においてクラスI制限細胞傷害性Tリンパ球応答を誘導することができる粒子-タンパク質複合体を含む担体を使用する。

【0237】

別の例示的な実施形態では、リン酸カルシウムコア粒子を、本発明の組成物の担体、ワクチンアジュバント、または制御放出マトリックスとして使用する。例示的なリン酸カルシウム粒子は、例えば、特許出願公開第WO/0046147号において開示されている。

10

【0238】

本発明の医薬組成物は、多くの場合、1つまたは複数の緩衝液(例えば、中性緩衝生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水)、炭水化物(例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、静菌剤、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート化剤、アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)、製剤をレシピエントの血液と等張性、低張性または弱高張性にする溶質、懸濁化剤、増粘剤および/または防腐剤をさらに含む。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化することができる。

20

【0239】

本明細書に記載の医薬組成物は、単位用量または複数回用量の容器、例えば、密閉アンプルまたはバイアルなどの中に存在してよい。そのような容器は、一般には、製剤の無菌性および安定性が使用時まで保存されるように密閉する。一般に、製剤は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクル中の懸濁剤、溶液または乳剤として貯蔵することができる。あるいは、医薬組成物は、使用する直前に滅菌された液体担体を添加することだけを要する凍結乾燥した状態で貯蔵することができる。

【0240】

本明細書に記載の特定の組成物を、例えば、経口的、非経口的、静脈内、鼻腔内、および筋肉内への投与および製剤を含めた種々の治療レジメンにおいて使用するための適切な投薬および治療レジメンの開発は当技術分野において周知であり、そのいくつかは、一般的に例示するために以下で簡単に考察されている。

30

【0241】

ある特定の適用では、本明細書に開示されている医薬組成物は、経口投与によって動物に送達することができる。そのように、これらの組成物は、不活性な希釈剤を用いて、または同化できる食用担体を用いて製剤化することもでき、硬殻ゼラチンカプセルまたは軟殻ゼラチンカプセルに封入することもでき、圧縮して錠剤にすることもでき、食事の食品に直接組み入れることもできる。

【0242】

活性化合物は、さらには、賦形剤と一緒に組み入れ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウェーハなどの形態で使用することもできる(例えば、Mathiowitzら、Nature 1997年3月27日; 386巻(6623号): 410~4頁; Hwangら、Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1998年; 15巻(3号): 243~84頁; 米国特許第5, 641, 515号; 米国特許第5, 580, 579号および米国特許第5, 792, 451号を参照されたい)。錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは、種々の追加的な構成成分、例えば、結合剤、例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチ、またはゼラチンなど; 賦形剤、例えば、リン酸二カルシウムなど; 崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸など; 滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムなど; および甘味剤、例えば、添加することができるスクロース、ラクトースまたはサッカリンなど、

40

50

または香味剤、例えば、ペパーミント、冬緑油、またはサクランボフレーバーなどのいずれかも含有してよい。単位剤形がカプセル剤である場合、上記の種類 material に加えて、液体担体を含有してよい。コーティングとして、または別のやり方で投与単位の物理的形態を改変するために種々の他の材料が存在してよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤を、シエラック、糖、またはその両方でコーティングすることができる。当然、あらゆる単位剤形の調製において使用するあらゆる材料は薬学的に純粋であり、使用される量で実質的に無毒性であるべきである。さらに、活性化合物は、持続放出調製物および製剤に組み入れることができる。

【0243】

一般には、これらの製剤は、少なくとも約 0.1% 以上の活性化合物を含有するが、活性成分（複数可）の百分率は、当然、変動し、製剤全体の重量または体積の約 1 または 2% ~ 約 60% または 70% 以上であることが都合よい。自然に、治療的に有用な各組成物の活性化合物（複数可）の量は、化合物の任意の所与の単位用量で適切な投与量が得られるように調製することができる。溶解性、生物学的利用能、生物学的な半減期、投与経路、製品の有効期間、ならびに他の薬理的な考察などの因子はそのような医薬製剤の調製の当業者によって考察され、したがって、種々の投与量および治療レジメンが望ましい可能性がある。

10

【0244】

ある特定の状況では、本明細書に開示されている医薬組成物を非経口的に、静脈内に、筋肉内に、またはさらには腹腔内に送達することが望ましい。そのような手法は、当業者に周知であり、そのいくつかは、例えば、米国特許第 5,543,158 号；米国特許第 5,641,515 号および米国特許第 5,399,363 号にさらに記載されている。ある特定の実施形態では、遊離塩基または薬理的に許容できる塩としての活性化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性物質と適切に混合した水で調製することができる。分散剤は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物ならびに油で調製することもできる。貯蔵および使用の通常条件下では、これらの調製物は、一般に、微生物の成長を妨げるために防腐剤を含有する。

20

【0245】

注射による使用のために適した例示的な医薬形態としては、滅菌された注射可能な溶液または分散を即時調製するための滅菌水溶液または分散剤および滅菌粉末が挙げられる（例えば、米国特許第 5,466,468 号を参照されたい）。

30

【0246】

一実施形態では、水溶液中に入れて非経口投与するために、溶液を、必要であれば適切に緩衝し、液体希釈剤をまず十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張性にするべきである。これらの特定の水溶液は、特に、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与および腹腔内投与に適する。これに関連して、使用することができる滅菌水媒体は本開示に照らして当業者に公知であろう。例えば、1 投与量を、等張 NaCl 溶液 1 ml に溶解させ、皮下注射液 1000 ml に添加するか、または提唱された注入部位に注射することができる（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第 15 版、1035 ~ 1038 頁および 1570 ~ 1580 頁）。治療被験体の状態に応じて投与量のいくらかの変動が必ず起こる。さらに、ヒト投与に関しては、調製物は、当然、FDA Office of Biologics standards により要求される滅菌、発熱性、および一般的な安全性および純度の基準に合うことが好ましい。

40

【0247】

本発明の別の実施形態では、本明細書に開示されている組成物は、中性の形態または塩の形態に製剤化することができる。例示的な薬学的に許容される塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基と形成される）および例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される塩が挙げられる。遊離のカルボキシル基と形成される塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、

50

トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来してもよい。製剤化する際、溶液は投与製剤と適合する様式で、治療的に有効な量で投与する。

【0248】

担体は、任意かつ全ての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤、緩衝液、担体溶液、懸濁液、コロイドなどをさらに含んでよい。そのような媒体および作用剤の薬学的に活性な物質への使用は当技術分野において周知である。活性成分と適合しない任意の従来の媒体または作用剤を除く限りでは、治療用組成物におけるその使用が意図されている。補充の活性成分も組成物に組み入れることができる。「薬学的に許容される」という句は、ヒトに投与された時にアレルギー性応答または同様の不都合な応答を生じない分子実体および組成物を指す。

10

【0249】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、鼻腔内噴霧器、吸入器、および/または他のエアロゾル送達ビヒクルによって送達することができる。遺伝子、核酸、およびペプチド組成物を経鼻エアロゾル噴霧によって肺に直接送達するための方法が、例えば、米国特許第5,756,353号および米国特許第5,804,212号に記載されている。同様に、鼻腔内微小粒子樹脂 (Takenagaら、J Controlled Release 1998年3月2日; 52巻(1~2号): 81~7頁) およびリゾホスファチジル-グリセロール化合物 (米国特許第5,725,871号) を使用した薬物の送達も製薬技術分野で周知である。同様に、ポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene) 支持マトリックスの形態の例示的な経粘膜薬物送達が米国特許第5,780,045号に記載されている。

20

【0250】

ある特定の実施形態では、リポソーム、ナノカプセル、微小粒子、脂質粒子、小胞などが、本発明の組成物を適切な宿主細胞/生物体に導入するために使用される。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、またはナノ粒子などに封入して送達するために製剤化することができる。あるいは、本発明の組成物は、そのような担体ビヒクルの表面に、共有結合または非共有結合のいずれかによって結合させることができる。

【0251】

潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製物の形成および使用は当業者に一般的に公知である (例えば、そのそれぞれの全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる、Lasic、Trends Biotechnol 1998年7月; 16巻(7号): 307~21頁; Takakura、Nippon Rinsho 1998年3月; 56巻(3号): 691~5頁; Chandranら、Indian J Exp Biol. 1997年8月; 35巻(8号): 801~9頁; Margalit、Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1995年; 12巻(2~3号): 233~61頁; 米国特許第5,567,434号; 米国特許第5,552,157号; 米国特許第5,565,213号; 米国特許第5,738,868号および米国特許第5,795,587号を参照されたい)。

30

【0252】

リポソームは、通常他の手順によってトランスフェクトすることが難しい、T細胞懸濁物、初代培養肝細胞およびPC12細胞を含めたいくつかの細胞型に首尾よく使用されている (Renneisenら、J Biol Chem. 1990年9月25日; 265巻(27号): 16337~42頁; Mullerら、DNA Cell Biol. 1990年4月; 9巻(3号): 221~9頁)。さらに、リポソームには、ウイルスに基づく送達系に典型的であるDNA長さの制約がない。リポソームは、遺伝子、種々の薬物、放射線療法剤、酵素、ウイルス、転写因子、アロステリックなエフェクターなどを種々の培養細胞系統および動物に導入するために有効に使用されている。さらに、リポソームの使用は、全身送達後の自己免疫応答または許容されない毒性を伴わないと思われる。

40

【0253】

ある特定の実施形態では、リポソームは、水媒体中に分散し、自然発生的に多重膜同心二重層小胞 (multilamellar concentric bilayer vesicle) (多重膜小胞 (multilame

50

llar vesicle) (MLV)とも称される)を形成するリン脂質から形成される。

【0254】

あるいは、他の実施形態では、本発明は、本発明の組成物の薬学的に許容されるナノカプセル製剤を提供する。ナノカプセルは、一般に、化合物を安定に、かつ再現できるように閉じ込める(例えば、Quintanar-Guerreroら、Drug Dev Ind Pharm. 1998年12月; 24巻(12号): 1113~28頁を参照されたい)。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を回避するために、超微細粒子(およそ0.1 μ mのサイズ)を、*in vivo*で分解可能なポリマーを使用して設計することができる。そのような粒子は、例えば、Couvreurら、Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988年; 5巻(1号): 1~20頁; zur Muhlenら、Eur J Pharm Biopharm. 1998年3月; 45巻(2号): 149~55頁; Zambauxら J Controlled Release. 1998年1月2日; 50巻(1~3号): 31~40頁; および米国特許第5,145,684号に記載の通り作出することができる。

10

【0255】

がん治療方法

がん療法への免疫学的手法は、がん細胞が、異常なまたは外来の細胞および分子に対する身体の防御をしばしば逃れ得るという認識、ならびにこれらの防御が、失地を再獲得するために治療的に刺激され得るという認識に基づいている、例えば、Klein、Immunology (Wiley-Interscience、New York、1982年)中の623~648頁。種々の免疫エフェクターが腫瘍の成長を直接的または間接的に阻害できるという多数の最近の観察により、がん療法へのこの手法に対し、新たな興味もたれるようになった、例えば、Jagerら、Oncology 2001年; 60巻(1号): 1~7頁; Rennerら、Ann Hematol 2000年12月; 79巻(12号): 651~9頁。

20

【0256】

その機能が抗腫瘍細胞免疫および身体からの腫瘍細胞の排除と関連している4つの基本的な細胞型は、以下である: i) 非自己侵入細胞を同定し標識するために、血漿中に免疫グロブリンを分泌するBリンパ球; ii) 免疫グロブリン被覆された標的侵入細胞を溶解しプロセッシングすることを担う補体タンパク質を分泌する単球; iii) 腫瘍細胞の破壊のための2つの機構、抗体依存性細胞傷害およびナチュラルキリングを有するナチュラルキラーリンパ球; ならびに iv) 抗原特異的受容体をプロセッシングし、相補的マーカー分子を保有する腫瘍細胞を認識する能力を有する、Tリンパ球 (Schreiber, H., 1989年、Fundamental Immunology (編). W. E. Paul, 923~955頁)。

30

【0257】

がん免疫療法は一般に、体液性免疫応答、細胞性免疫応答またはその両方を誘導することに焦点を当てている。さらに、CD4⁺Tヘルパー細胞の誘導が、抗体または細胞傷害性CD8⁺T細胞のいずれかを二次的に誘導するために必要であることが充分確立されている。がん細胞に対して選択的なまたは理想的には特異的なポリペプチド抗原は、がんに対する免疫応答を誘導するための強力な手法を提供し、本発明の重要な態様である。

【0258】

したがって、本発明のさらなる態様では、本明細書中に記載される医薬組成物は、それを必要とする被験体、例えば、がん罹患した被験体またはがんを発症しやすい被験体に投与され得る。そのような方法では、本明細書中に記載される医薬組成物は、患者に、典型的には温血動物、好ましくはヒトに投与される。

40

【0259】

本発明の医薬組成物およびワクチンは、原発性腫瘍の外科的除去および/または放射線療法もしくは従来化学療法薬物の投与などの治療の前または後に投与され得る。上述のように、医薬組成物の投与は、静脈内、腹腔内、筋内、皮下、鼻腔内、皮膚内、肛門、腔内、局所および経口経路による投与を含む任意の適切な方法によるものであり得る。

【0260】

本発明の方法に従って治療されるがん型は、本発明のポリペプチドが関連する本質的に

50

任意の型であり得る。ある特定の例示的な実施形態では、例えば、本発明の組成物を使用して治療されるがん型は、肝がん、膵がん、肺がん、乳がん、膀胱がん、腎がん、皮膚がんおよび血液がんである。

【0261】

ある特定の実施形態では、免疫療法は能動免疫療法であり得、その治療は、免疫応答改変剤（例えば、本明細書中で提供されるポリペプチドおよびポリヌクレオチド）の投与による、腫瘍に対して反応させるための内因性宿主免疫系の *in vivo* 刺激を利用している。

【0262】

ある特定の他の実施形態では、免疫療法は受動免疫療法であり得、その治療は、抗腫瘍効果を直接的または間接的に媒介でき、インタクトな宿主免疫系に必ずしも依存しない確立された腫瘍免疫反応性（例えば、抗体またはエフェクター細胞）を有する薬剤の送達を含む。

10

【0263】

エフェクター細胞の例には、本発明中に提供されるポリペプチドを発現する、上述のようなT細胞、Tリンパ球（例えば、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球およびCD4⁺Tヘルパー腫瘍浸潤リンパ球）、キラー細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞およびリンホカイン活性化キラー細胞）、B細胞および抗原提示細胞（例えば、樹状細胞およびマクロファージ）が含まれる。本明細書中で列挙されるポリペプチドに特異的なT細胞受容体および抗体受容体は、養子免疫療法のために、クローニングされ、発現され、他のベクターまたはエフェクター細胞中に移入され得る。本明細書中に提供されるポリペプチドは、標準的な方法論を使用する受動免疫療法のための抗体または抗イディオタイプ抗体（例えば、上におよび米国特許第4,918,164号中に記載されている）を生成するためにも使用され得る。

20

【0264】

モノクローナル抗体は、検出、診断アッセイまたは療法適用における所望の選択的使用のために、種々の標識のいずれかで標識され得る（それぞれが個々に組み込まれたのと同じく、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,090,365号；米国特許第6,015,542号；米国特許第5,843,398号；米国特許第5,595,721号；および米国特許第4,708,930号中に記載されている）。各場合において、抗原の決定基部位に対する標識されたモノクローナル抗体の結合は、非正常細胞上の抗原決定基への特定の治療剤の検出または送達を知らせる。本発明のさらなる目的は、そのようなそれらの所望の選択的使用を達成するために適切に標識された特異的モノクローナル抗体を提供することである。

30

【0265】

本明細書中に記載される治療用組成物の投与の経路および頻度、ならびに投薬量は、個体毎に変動し、標準的な技法を使用して容易に確立され得る。一般に、医薬組成物およびワクチンは、注射により（例えば、皮内、筋内、静脈内もしくは皮下）、鼻腔内に（例えば、吸引により）または経口で投与され得る。好ましくは、1回と10回との間の用量が、52週間の期間にわたって投与され得る。好ましくは、1カ月の間隔で6回の用量が投与され、追加ワクチン接種が、その後周期的に与えられ得る。代替的なプロトコールが、個々の患者について適切であり得る。適切な用量は、上記のように投与された場合に抗腫瘍免疫応答を促進することが可能であり、基底（すなわち、未処置）レベルを少なくとも10~50%上回る量の、化合物である。そのような応答は、患者における抗腫瘍抗体を測定すること、または患者の腫瘍細胞を *in vitro* で殺すことが可能な細胞溶解性エフェクター細胞のワクチン依存的な生成によって、モニタリングされ得る。そのようなワクチンはまた、ワクチン接種されていない患者と比較して、ワクチン接種された患者において、改善された臨床成績（例えば、より高頻度の寛解、完全なもしくは部分的なまたはより長い疾患なしの生存）を導く免疫応答を引き起こすことが可能であるべきである。一般に、1つまたは複数のポリペプチドを含む医薬組成物およびワクチンについて、各ポ

40

50

リペプチドの量は、宿主1kg当たり、約25µg～5mgの範囲の用量で存在する。適切な用量サイズは、患者のサイズによって変動するが、典型的には約0.1mL～約5mLの範囲である。

【0266】

一般に、適切な投薬量および治療レジメンは、治療的および/または予防的利益を提供するのに十分な量で、活性化化合物(複数可)を提供する。そのような応答は、治療されていない患者と比較して、治療された患者において、改善された臨床成績(例えば、より高頻度の寛解、完全なもしくは部分的なまたはより長い疾患なしの生存)を確立することによってモニタリングされ得る。腫瘍タンパク質に対する既存の免疫応答における増加は、一般に、改善された臨床成績と相関する。そのような免疫応答は一般に、治療の前および後に患者から得られた試料を使用して実施され得る標準的な増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイまたはサイトカインアッセイを使用して、評価され得る。

10

【0267】

がんの検出および診断用の組成物、方法およびキット

本発明のがん関連配列および結合性作用物質は、がん診断用の組成物、方法およびキットとの関連でも使用され得る。

【0268】

一般に、がんは、患者から得られた生体試料(例えば、血液、血清、痰、尿および/または腫瘍生検)中の、1つまたは複数のがん関連ポリペプチドおよび/またはそのようなポリペプチド(polypeptide)をコードするポリヌクレオチドの存在に基づいて、患者において検出され得る。言い換えると、そのようなタンパク質は、がんの存在または非存在を示すためのマーカーとして使用され得る。

20

【0269】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドプライマーおよびプローブは、これもまたがんの存在または非存在を示す、がん関連タンパク質をコードするmRNAのレベルを検出するために使用され得る。一般に、がん関連配列は、腫瘍が生じた同じ型の正常組織におけるよりも、腫瘍組織において、少なくとも2倍、好ましくは3倍、より好ましくは5倍またはそれより高いレベルで存在し得る。腫瘍細胞の存在は、同じ型の正常組織における発現レベルと比較した、腫瘍組織における所定の示差的な発現レベル、例えば、2倍、5倍などの観察によって確認できるので、腫瘍が生じた組織型と異なる組織型における特定の腫瘍配列の発現レベルは、ある特定の診断実施形態では無関係である。

30

【0270】

他の示差的な発現パターンは、診断目的のために有利に利用され得る。例えば、本発明の一態様では、PBM Cなどの他の正常組織型中ではなく、腫瘍組織および同じ型の正常組織における腫瘍配列の過剰発現が、診断的に活用され得る。この場合、例えば循環からまたは腫瘍が生じた組織部位とは異なるいくつかの他の組織部位から採取された試料における転移性腫瘍細胞の存在は、例えばRT-PCR分析を使用して、試料中の腫瘍配列の発現を検出することによって、同定および/または確認され得る。多くの場合、細胞捕捉または他の同様の技法を使用して、対象の試料、例えば、PBM C中の腫瘍細胞を富化することが望ましい。

40

【0271】

試料中のポリペプチドマーカーを検出するために結合性作用物質を使用するための、当業者に公知の種々のアッセイフォーマットが存在する。例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年を参照のこと。一般に、患者におけるがんの存在または非存在は、(a)患者から得た生体試料を結合性作用物質と接触させること；(b)この試料において結合性作用物質に結合するポリペプチドのレベルを検出すること；および(c)ポリペプチドのレベルを所定のカットオフ値と比較することによって決定され得る。

【0272】

例示的な一実施形態では、このアッセイは、ポリペプチドに結合し、試料の残りの部分

50

からそのポリペプチドを除去するための、固体支持体上に固定化された結合性作用物質の使用を含む。結合したポリペプチドは次いで、レポーター基を含みかつ結合性作用物質/ポリペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を使用して検出され得る。そのような検出試薬は、例えば、ポリペプチドに特異的に結合する結合性作用物質またはこの結合性作用物質に特異的に結合する抗体もしくは他の薬剤、例えば、抗免疫グロブリン、プロテインG、プロテインAまたはレクチンを含み得る。あるいは、ポリペプチドがレポーター基で標識され、結合性作用物質を試料と共にインキュベートした後に固定化された結合性作用物質への結合が可能となる、競合アッセイが利用され得る。標識されたポリペプチドの結合性作用物質への結合を試料の成分が阻害する程度は、試料と固定化された結合性作用物質との反応性を示す。そのようなアッセイにおいて使用するのに適したポリペプチドには、結合性作用物質が結合する、上記のような全長がん関連タンパク質およびそのポリペプチド部分が含まれる。

10

【0273】

固体支持体は、腫瘍タンパク質が付着され得る、当業者に公知の任意の材料であり得る。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレート中の試験ウェルまたはニトロセルロースもしくは他の適切な膜であり得る。あるいは、支持体は、ガラス、ガラス繊維、ラテックスまたはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニルなどのプラスチック材料のような、ビーズまたはディスクであり得る。支持体はまた、例えば米国特許第5,359,681号に開示されるもののような、磁気粒子または光ファイバーセンサーであり得る。結合性作用物質は、特許文献および科学文献中に十分に記載されている当業者に公知の種々の技法を使用して、固体支持体上に固定化され得る。本発明に関連して、用語「固定化」とは、吸着などの非共有結合的会合および共有結合的付着（薬剤と支持体上の官能基との間の直接的連結であり得るか、または架橋剤による連結であり得る）の両方を指す。マイクロタイタープレート中のウェルまたは膜への吸着による固定化が好ましい。そのような場合には、吸着は、適切な緩衝液中で、適切な量の時間にわたり結合性作用物質を固体支持体と接触させることによって達成され得る。接触時間は温度によって変動するが、典型的には約1時間と約1日間との間である。一般に、プラスチックマイクロタイタープレート（例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニル）のウェルを、約10ng～約10μg、好ましくは約100ng～約1μgの範囲の量の結合性作用物質と接触させることが、適正な量の結合性作用物質を固定化するのに充分である。

20

30

【0274】

固体支持体への結合性作用物質の共有結合的付着は一般に、支持体と、結合性作用物質上のヒドロキシル基もしくはアミノ基などの官能基との両方と反応する二官能性試薬と支持体とを最初に反応させることによって達成され得る。例えば、結合性作用物質は、ベンゾキノンを使用して適切なポリマー被覆を有する支持体に共有結合的に付着され得るか、または支持体上のアルデヒド基と結合性パートナー上のアミンおよび活性水素との縮合により得る（例えば、Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook、1991年、A12～A13頁を参照のこと）。

【0275】

ある特定の実施形態では、アッセイは2抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、試料内のポリペプチドが固定化された抗体に結合できるように、固体支持体、一般的にはマイクロタイタープレートのウェル上に固定化された抗体を、試料と最初に接触させることによって実施され得る。次いで、未結合の試料が、固定化されたポリペプチド-抗体複合体から除去され、レポーター基を含む検出試薬（好ましくは、ポリペプチド上の異なる部位に結合することが可能な第2の抗体）が添加される。次いで、固体支持体に結合したままの検出試薬の量が、特定のレポーター基に適した方法を使用して決定される。

40

【0276】

より具体的には、抗体が一旦上記のように支持体上に固定化されると、支持体上の残りのタンパク質結合性部位は、典型的にはブロックされる。当業者に公知の任意の適切なブロッキング剤、例えば、ウシ血清アルブミンまたはTween 20（商標）（Sigma

50

a Chemical Co., St. Louis, MO)。次いで、固定化された抗体が試料と共にインキュベートされ、ポリペプチドが抗体に結合される。この試料は、インキュベーション前に、リン酸緩衝食塩水 (PBS) などの適切な希釈剤で希釈され得る。一般に、適切な接触時間 (すなわち、インキュベーション時間) は、結合したポリペプチドと未結合のポリペプチドとの間の平衡で達成されたものの少なくとも約 95% の、がんを有する個体から得られた試料内のポリペプチドの存在を検出するのに十分な時間の期間である。当業者は、平衡を達成するために必要な時間が、ある時間の期間にわたって生じる結合のレベルをアッセイすることによって容易に決定され得ることを認識する。室温では、約 30 分間のインキュベーション時間が、一般に充分である。

【0277】

次いで、適切な緩衝液、例えば、0.1% Tween 20 (商標) を含む PBS で固体支持体を洗浄することによって、未結合の試料が除去され得る。次いで、レポーター基を含む第 2 の抗体が、固体支持体に添加され得る。好ましいレポーター基には、上で列挙した基が含まれる。

【0278】

次いで、検出試薬が、結合したポリペプチドを検出するのに十分な量の時間にわたり、固定化された抗体 - ポリペプチド複合体と共にインキュベートされる。適切な時間の量は一般に、ある時間の期間にわたって生じる結合のレベルをアッセイすることによって決定され得る。次いで、未結合の検出試薬が除去され、結合した検出試薬が、レポーター基を使用して検出される。レポーター基を検出するために使用される方法は、レポーター基の性質に依存する。放射性基の場合、シンチレーションカウンティングまたはオートラジオグラフィー法が一般に適切である。分光学的方法が、色素、発光基および蛍光基を検出するために使用され得る。ビオチンは、異なるレポーター基 (一般的には、放射性基もしくは蛍光基または酵素) にカップリングされたアビジンを使用して検出され得る。酵素レポーター基は一般に、基質の添加 (一般的には特定の時間の期間にわたる) と、その後の反応生成物の分光学的分析または他の分析とによって、検出され得る。

【0279】

がんの存在または非存在を決定するために、固体支持体に結合したままのレポーター基から検出されたシグナルは一般に、所定のカットオフ値に対応するシグナルと比較される。一実施形態では、がんの検出のためのカットオフ値は、固定化された抗体ががんを有さない患者由来の試料と共にインキュベートされる場合に得られた平均シグナルである。一般に、所定のカットオフ値を 3 標準偏差上回るシグナルを生成する試料が、がんについて陽性であるとみなされる。代替的な一実施形態では、カットオフ値は、Sackettら、Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine, Little Brown and Co., 1985年、106~7頁の方法に従って、レシーバーオペレーター曲線を使用して決定される。簡潔に述べると、この実施形態では、カットオフ値は、診断試験結果に関する各可能なカットオフ値に対応する、真陽性率 (すなわち、感受性) および偽陽性率 (100%の特異性) の対のプロットから決定され得る。左上角に最も近いプロット上のカットオフ値 (すなわち、最も広いエリアを囲い込む値) が、最も正確なカットオフ値であり、この方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生成する試料が、陽性とみなされ得る。あるいは、カットオフ値は、プロットに沿って左にシフトして偽陽性率を最小化し得るか、または右にシフトして偽陰性率を最小化し得る。一般に、この方法によって決定されたカットオフ値より高いシグナルを生成する試料は、がんについて陽性とみなされる。

【0280】

関連の一実施形態において、アッセイは、フロースルーまたはストリップ試験フォーマットで実施され、ここで、結合性作用物質は、ニトロセルロースなどの膜上に固定化される。フロースルー試験では、試料内のポリペプチドは、試料が膜を通過する際に、固定化された結合性作用物質に結合する。第 2 の標識された結合性作用物質が次いで、第 2 の結合性作用物質を含む溶液が膜を流れて流れる際に、結合性作用物質 - ポリペプチド複合体

10

20

30

40

50

に結合する。結合した第2の結合性作用物質の検出が次いで、上記のように実施され得る。ストリップ試験フォーマットでは、結合性作用物質が結合する膜の一端が、試料を含む溶液中に浸漬される。試料は、膜に沿って、第2の結合性作用物質を含む領域を通過し、固定化された結合性作用物質のエリアまで移動する。固定化された抗体のエリアにおける第2の結合性作用物質の濃縮は、がんの存在を示す。典型的には、その部位での第2の結合性作用物質の濃縮は、視覚的に読み取られ得る線などのパターンを生成する。そのようなパターンの非存在は、陰性の結果を示す。一般に、膜上に固定化される結合性作用物質の量は、上述のフォーマットにおいて、2抗体サンドイッチアッセイにおいて陽性シグナルを生成するのに十分なポリペプチドレベルを生体試料が含む場合に視覚的に識別可能なパターンを生成するように選択される。そのようなアッセイでの使用に好ましい結合性作用物質は、抗体およびその抗原結合性断片である。好ましくは、膜上に固定化される抗体の量は、約25 ng ~ 約1 μgの範囲であり、より好ましくは、約50 ng ~ 約500 ngの範囲である。そのような試験は典型的に、非常に少量の生体試料を用いて実施され得る。

10

20

30

40

50

【0281】

当然、本発明の腫瘍タンパク質または結合性作用物質との使用に適した多数の他のアッセイプロトコールが存在する。上の記載は、例示のみを意図している。例えば、上記プロトコールは、生体試料中の腫瘍ポリペプチドに結合する抗体を検出するためにそのようなポリペプチドを使用するように容易に改変され得ることは、当業者に明らかである。そのような腫瘍タンパク質特異的抗体の検出は、がんの存在と相関し得る。

【0282】

がんはまた、またはあるいは、生体試料中の本発明のがん関連タンパク質と特異的に反応するT細胞の存在に基づいて検出され得る。ある特定の方法では、患者から単離されたCD4⁺および/またはCD8⁺ T細胞を含む生体試料は、腫瘍ポリペプチド、そのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/またはそのようなポリペプチドの少なくとも免疫原性部分を発現するAPCと共にインキュベートされ、T細胞の特異的活性化の存在または非存在が検出される。適切な生体試料には、単離されたT細胞が含まれるがこれに限定されない。例えば、T細胞は、慣用技法によって（例えば、末梢血リンパ球のFicoll/Hypaque密度勾配遠心分離によって）、患者から単離され得る。T細胞は、ポリペプチド（例えば、5 ~ 25 μg/ml）と共に、37 °Cで2 ~ 9日間（典型的には4日間）、*in vitro*でインキュベートされ得る。別のアリコートのT細胞試料を、対照として機能するように、腫瘍ポリペプチドの非存在下でインキュベートすることが望まれ得る。CD4⁺ T細胞について、活性化は、T細胞の増殖を評価することによって好ましくは検出される。CD8⁺ T細胞について、活性化は、細胞溶解活性を評価することによって好ましくは検出される。無疾患患者におけるよりも少なくとも2倍大きい増殖レベルおよび/または少なくとも20%大きい細胞溶解活性レベルは、患者におけるがんの存在を示す。

【0283】

上記のように、がんはまた、またはあるいは、生体試料中の本発明のがん関連タンパク質をコードするmRNAのレベルに基づいて検出され得る。例えば、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーが、生体試料由来の腫瘍cDNAの一部を増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）ベースのアッセイにおいて使用され得、ここで、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーが、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的である（すなわち、そのようなポリヌクレオチドにハイブリダイズする）。増幅されたcDNAは次いで、ゲル電気泳動などの当技術分野で周知の技法を使用して、分離および検出される。

【0284】

同様に、がん関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブは、生体試料中のがん関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドの存在を検出するために、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用さ

れ得る。

【0285】

アッセイ条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするために、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、少なくとも10ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長である本発明のがん関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドの一部に対し、少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%の同一性を有するオリゴヌクレオチド配列を含むべきである。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、上で規定したような、中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書中に記載されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。本明細書中に記載される診断方法において有用に使用され得るオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、好ましくは、少なくとも10~40ヌクレオチド長である。一実施形態では、オリゴヌクレオチドプライマーは、本明細書中に開示された配列を有するDNA分子の、少なくとも10連続するヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15連続するヌクレオチドを含む。PCRベースのアッセイおよびハイブリダイゼーションアッセイの両方のための技法は、当技術分野で周知である(例えば、Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51巻: 263頁、1987年; Erlich編、PCR Technology、Stockton Press、NY、1989年を参照のこと)。

10

【0286】

1つのアッセイはRT-PCRを使用し、このPCRは、逆転写と併せて適用される。典型的には、RNAが、生検組織などの生体試料から抽出され、逆転写されてcDNA分子が生じる。少なくとも1つの特異的プライマーを使用するPCR増幅は、例えばゲル電気泳動を使用して分離および可視化され得るcDNA分子を生成する。試験患者およびがん罹患していない個体から採取した生体試料に対して増幅が実施され得る。増幅反応は、2桁にわたるcDNAのいくつかの希釈物に対して実施され得る。非がん性試料の同じ希釈物と比較した、試験患者試料のいくつかの希釈物における発現の2倍以上の増加が、典型的に陽性とみなされる。

20

【0287】

本発明の別の態様では、細胞捕捉技術が、腫瘍抗原を発現している転移性細胞の検出のためのより高感度のツールを提供するために、例えばリアルタイムPCRと併せて使用され得る。生体試料、例えば、骨髓試料、末梢血および小針吸引試料中のがん細胞の検出は、がん患者における診断および予後のために望ましい。

30

【0288】

表面細胞マーカーに対する特異的モノクローナル抗体またはテトラマー抗体複合体で被覆された免疫磁気ビーズが、試料中のがん細胞を最初に富化するためまたは陽性選択するために使用され得る。Dynabeads(登録商標)Epithelial Enrich(Dynal Biotech、Oslo、Norway)、StemSep(商標)(StemCell Technologies、Inc.、Vancouver、BC)およびRosetteSep(StemCell Technologies)を含む種々の市販のキットが使用され得る。当業者は、他の方法論およびキットもまた、所望の細胞集団を富化するためまたは陽性選択するために使用され得ることを認識する。Dynabeads(登録商標)Epithelial Enrichは、正常なおよび新生物性の上皮組織上で発現される2つの糖タンパク質膜抗原に特異的なmAbで被覆された磁気ビーズを含む。被覆されたビーズが試料に添加され得、次いで試料が磁石に適用され、それによりビーズに結合した細胞が捕捉される。不要な細胞は洗浄して除かれ、磁気により単離された細胞がビーズから溶出され、さらなる分析において使用される。

40

【0289】

RosetteSepは、血液試料から細胞を直接富化するために使用され得、種々の不要な細胞を標的化し、試料中に存在する赤血球(RBC)上のグリコホリンAにそれらを架橋してロゼットを形成する、テトラマー抗体のカクテルからなる。Ficollで遠

50

心分離する場合、標的化された細胞は、遊離 R B C と共にペレット化する。枯渇カクテル中の抗体の組合せは、どの細胞が除去され、その結果としてどの細胞が回収されるかを決定する。利用可能な抗体には以下が含まれるがこれらに限定されない：C D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 8、C D 1 0、C D 1 1 b、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 4、C D 2 5、C D 2 9、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 6、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 5、C D 4 5 R A、C D 4 5 R O、C D 5 6、C D 6 6 B、C D 6 6 e、H L A - D R、I g E および T C R 。

【0290】

さらに、腫瘍抗原に特異的な m A b が、同様の様式で生成され使用され得ることが、本発明において企図される。例えば、腫瘍特異的細胞表面抗原に結合する m A b は、磁気ビーズにコンジュゲートされ得るか、またはテトラマー抗体複合体に製剤化され得、試料から転移性腫瘍細胞を富化または陽性選択するために使用され得る。試料が一旦富化または陽性選択されると、細胞は溶解され得、R N A が単離され得る。次いで、R N A は、本明細書中に記載されるようなリアルタイム P C R アッセイにおいて、腫瘍特異的プライマーを使用する R T - P C R 分析に供され得る。細胞の富化または選択された集団が他の方法（例えば、i n s i t u ハイブリダイゼーションまたはフローサイトメトリー）によって分析され得ることを、当業者は認識する。

10

【0291】

別の実施形態では、本明細書中に記載される組成物は、がんの進行についてのマーカーとして使用され得る。この実施形態では、がんの診断のための上記アッセイは経時的に実施され得、反応性ポリペプチド（複数可）またはポリヌクレオチド（複数可）のレベルにおける変化が評価され得る。例えば、これらのアッセイは、6 カ月～1 年の期間にわたり、2 4～7 2 時間毎に実施され得、必要に応じてその後も実施され得る。一般に、がんは、検出されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが時間と共に増加する患者において、進行中である。対照的に、反応性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが、一定のままであるかまたは時間と共に減少するかのいずれかである場合、がんは進行中ではない。

20

【0292】

ある特定の i n v i v o 診断アッセイが、腫瘍に対して直接実施され得る。1 つのそのようなアッセイは、腫瘍細胞を結合性作用物質と接触させることを含む。結合した結合性作用物質が次いで、直接的にまたはレポーター基を介して間接的に検出され得る。そのような結合性作用物質は、組織学的適用においても使用され得る。あるいは、ポリヌクレオチドプローブが、そのような適用において使用され得る。

30

【0293】

上述のように、感度を改善するために、複数の腫瘍タンパク質マーカーが、所与の試料内でアッセイされ得る。本明細書中に提供される異なるタンパク質に特異的な結合性作用物質が、単一のアッセイ内で組み合わせられ得ることは明らかである。さらに、複数のプライマーまたはプローブが、同時に使用され得る。腫瘍タンパク質マーカーの選択は、最適な感度を生じる組合せを決定するための慣用実験に基づき得る。さらに、またはあるいは、本明細書中に提供される腫瘍タンパク質に関するアッセイは、他の公知の腫瘍抗原に関するアッセイと組み合わせられ得る。

40

【0294】

本発明はさらに、上記診断方法のいずれかにおいて使用するためのキットを提供する。そのようなキットは、診断アッセイを実施するのに必要な 2 以上の成分を典型的に含む。成分は、化合物、試薬、容器および/または装置であり得る。例えば、キット内の 1 つの容器は、腫瘍タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片を含み得る。そのような抗体または断片は、上記のように支持体材料に付着して提供され得る。1 つまたは複数のさらなる容器は、アッセイにおいて使用される、試薬または緩衝液などの要素を同封し得る。そのようなキットはまた、またはあるいは、抗体結合の直接的または間接的な検出に適したレポーター基を含む、上記検出試薬を含み得る。

50

【0295】

あるいは、キットは、生体試料中の腫瘍タンパク質をコードするmRNAのレベルを検出するために設計され得る。そのようなキットは一般に、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、上記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプロンプまたはプライマーを含む。そのようなオリゴヌクレオチドは、例えばPCRまたはハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用され得る。そのようなキット内に存在し得るさらなる成分には、腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドの検出を容易にするための、第2のオリゴヌクレオチドおよび/または診断試薬あるいは容器が含まれる。

【0296】

薬物候補に関するスクリーニングアッセイ

薬物候補に関するスクリーニングアッセイは、本発明のがん関連ポリペプチドに結合するもしくは本発明のがん関連ポリペプチドと複合体化する化合物、またはこれらのポリペプチドと他の細胞タンパク質との相互作用を他の方法で妨害する化合物を同定するために設計され得る。そのようなスクリーニングアッセイには、そのアッセイを小分子薬物候補を同定するのに特に適したものにす、化学物質ライブラリーのハイスループットスクリーニングになじみやすいアッセイが含まれる。企図される小分子には、合成の有機または無機の化合物が含まれ、これには、ペプチド、好ましくは可溶性ペプチド、(ポリ)ペプチド-免疫グロブリン融合物、ならびに特に、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびに抗体断片、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、ならびにそのような抗体または断片のキメラバージョンまたはヒト化バージョン、ならびにヒト抗体および抗体断片が含まれるがこれらに限定されない抗体が含まれる。これらのアッセイは、当技術分野で充分特徴付けられた、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイおよび細胞ベースのアッセイを含む種々のフォーマットで実施され得る。2つの成分を相互作用させるのに十分な条件下でおよび2つの成分を相互作用させるのに十分な時間にわたり、薬物候補を本発明のポリペプチドと接触させることを求めるといって、全てのアッセイは共通している。

10

20

【0297】

結合アッセイでは、この相互作用は結合であり、形成された複合体は、反応混合物中で単離または検出され得る。特定の一実施形態では、本発明のポリペプチド、または薬物候補は、共有結合的付着または非共有結合的付着によって、固相上、例えばマイクロタイタープレート上に固定化される。非共有結合的付着は一般に、固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し、乾燥させることによって達成される。あるいは、固定化された抗体、例えば、固定化されるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体が、固体表面にそれをアンカリングするために使用され得る。このアッセイは、検出可能な標識によって標識され得る固定化されていない成分を、固定化された成分、例えばアンカリングされた成分を含む被覆された表面に添加することによって実施される。反応が完了したとき、反応していない成分が、例えば洗浄によって除去され、固体表面上にアンカリングされた複合体が検出される。元々固定化されていなかった成分が検出可能な標識を保有する場合、表面上に固定化された標識の検出は、複合体化が生じたことを示す。元々固定化されていなかった成分が標識を保有しない場合、複合体化は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識された抗体を使用して、検出され得る。

30

40

【0298】

以下の実施例は、例示として提供され、限定として提供されるわけではない。

【実施例】

【0299】

(実施例1)

がん因子に対する抗体の生成および特徴付け

【0300】

上記のように、本発明は、ある特定の態様では、IL1f5(配列番号1)、CCBP2(配列番号2)、IL1R2(配列番号3)、IL1RAPL1(配列番号4)、IL

50

18BP (配列番号5)、CLEC2B (配列番号6)、C4BPA (配列番号7)、C4BPB (配列番号8)、SERPINI1 (配列番号9)、IL1RAPアイソフォーム1 (配列番号10)、IL1RAPアイソフォーム2 (配列番号11)、GPR1 (配列番号12)、GPR4 (配列番号13)、GPR15 (配列番号14)、GPR32 (配列番号15)、GPR34 (配列番号16)、GPR183 (配列番号17)、SERPINA4 (配列番号18)、SERPINB5 (配列番号19)、SEMA4B (配列番号20)、SEMA4D (配列番号21)、CCL14 (配列番号22)、NKTR (配列番号23) およびSFTPD (配列番号24) からなる群から選択されるがん因子配列に特異的に結合する単離された抗体およびその抗原結合性断片を含む医薬組成物に関する。そのような組成物は、本明細書中の一般開示に従って、および以下に示される例示的な実施例をさらに考慮して、作製および使用され得る。

10

【0301】

a. 細胞系統における発現の特徴付け

がん因子配列のベースライン発現を、細胞系統：IM-9 (B細胞リンパ腫)、4T1 (乳がん癌腫)、C1498 (急性骨髄性白血病) およびTRAMP-C2 (前立腺癌腫) を含む代表的細胞系統において、RT-PCRによって特徴付ける。

【0302】

リアルタイムPCR (Gibsonら、Genome Research 6巻：995~1001頁、1996年；Heidら、Genome Research 6巻：986~994頁、1996年を参照のこと) は、増幅の間にPCR産物蓄積のレベルを評価する技法である。この技法は、複数の試料におけるmRNAレベルの定量的評価を可能にする。簡潔に述べると、1つの例示的な手法では、mRNAが、腫瘍組織および正常組織から抽出され、cDNAが、標準的な技法を使用して調製される。リアルタイムPCRは、例えば、Perkin Elmer / Applied Biosystems (Foster City, CA) 7700 Prism機器を使用して実施される。一致するプライマーおよび蛍光プローブが、例えば、Perkin Elmer / Applied Biosystems (Foster City, CA) が提供するプライマーエクスプレスプログラムを使用して、目的の遺伝子について設計される。プライマーおよびプローブの最適な濃度は、当業者によって最初に決定され、対照 (例えば - アクチン) プライマーおよびプローブは、例えばPerkin Elmer / Applied Biosystems (Foster City, CA) から市販で入手される。試料中の特異的RNAの量を定量するために、典型的に、目的の遺伝子を含むプラスミドを使用して検量線を生成する。アッセイにおいて使用された最初のcDNA濃度に関する、リアルタイムPCRにおいて決定されたCt値を使用して、検量線を生成する。目的の遺伝子の $10 \sim 10^6$ コピーの範囲の標準的希釈が、一般には充分である。さらに、対照配列について検量線を生成する。これにより、組織試料の最初のRNA含量の、対照の量に対する比較目的のための標準化が可能になる。

20

30

【0303】

代替的なリアルタイムPCR手順は、以下のように実施され得る：定量的リアルタイムPCRで使用される第1鎖cDNAを、Superscript Reverse Transcriptase (RT) (例えば、Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD) を使用して、DNase I (例えば、Amplification Grade, Gibco BRL Life Technology, Gaithersburg, MD) で最初に処理した20 μ gの総RNAから合成する。リアルタイムPCRを、例えば、GeneAmp (商標) 5700配列検出システム (PE Biosystems, Foster City, CA) を用いて実施する。5700システムは、二本鎖DNA中にのみインターカレートする蛍光色素SYBR (商標) グリーンと、遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーのセットとを使用する。蛍光の増加を、全増幅プロセスの間モニタリングする。プライマーの最適濃度を、チェッカーボード手法を使用して決定し、腫瘍由来のcDNAのプールを、このプロセスで使用する。PCR反応を、2.5 μ lのSYBRグリーン緩衝液、2 μ l

40

50

の c D N A 鋳型ならびに目的の遺伝子に対するフォワードプライマーおよびリバースプライマー各 2 . 5 μ l を含む、2 5 μ l の体積で実施する。R T 反応に使用した c D N A を、目的の各遺伝子についておよそ 1 : 1 0 希釈し、 β -アクトリン対照について 1 : 1 0 0 希釈する。試料中の特異的 c D N A (およびしたがって最初の m R N A) の量を定量するために、検量線を、目的の遺伝子を含むプラスミド D N A を使用して、各ランについて生成する。検量線を、アッセイにおいて使用した最初の c D N A 濃度に関する、リアルタイム P C R において決定された C t 値を使用して生成する。目的の遺伝子の 2 0 ~ 2 \times 1 0 ⁶ コピーの範囲の標準的希釈を、この目的のために使用する。さらに、2 0 0 f g ~ 2 0 0 0 f g の範囲の β -アクトリンについて検量線を生成する。これにより、組織試料の最初の R N A 含量の、 β -アクトリンの量に対する比較目的のための標準化が可能になる。試験した組織の各群についての平均コピー数を、一定量の β -アクトリンに対して正規化し、各遺伝子で見られた過剰発現レベルの評価を可能にする。

10

【 0 3 0 4 】

b . 発現によって変動する細胞系統の生成

ベースラインが低い / 陰性である細胞系統について、コード配列を、適切なベクター、例えば、レトロウイルス発現ベクター p M X s - I P 中にクローニングし、そのベクターを使用して細胞系統を形質導入することによって、がん因子ポリペプチドを異所的に過剰発現させる。このベクターはピューロマイシン耐性カセットをコードするので、陽性に形質導入された細胞系統をピューロマイシンで選択し、過剰発現を R T - P C R により確認する。

20

【 0 3 0 5 】

ベースラインが陽性である細胞系統について、がん関連ポリペプチドの発現を、R N A i を用いてノックダウンする。がん因子配列を標的化する s h R N A 構築物を、H u S H ベクター (O r i g e n e , R o c k v i l l e , M D) 中にクローニングし、s h R N A 形質導入を介して標的細胞に送達する。がん関連配列のノックダウンを、R T - P C R によって確認する。

【 0 3 0 6 】

c . 細胞の増殖および形態に対する効果の特徴付け

がん因子配列 (複数可) の発現について陽性または陰性の細胞系統を、等しい密度でプレートし、7 日間にわたり毎日カウントする。同時に、細胞を、がん因子タンパク質発現によって変動する形態変化について観察する。

30

【 0 3 0 7 】

d . 抗体結合の特徴付け

がん因子タンパク質配列を標的化する抗体を、ウエスタンブロットティングによって結合について特徴付ける。発現について陽性または陰性の細胞の溶解物を、S D S - P A G E ゲル上で泳動し、抗体でブロットティングする。がん因子タンパク質が分泌タンパク質である場合、このタンパク質を発現する細胞から上清を収集し、タンパク質をトリクロロ酢酸で沈殿させ、S D S - P A G E 上で泳動し、抗体でウエスタンブロットティングする。タンパク質が細胞表面に結合している場合、抗体結合は、フローサイトメトリーによって確認してもよい。標的発現について陽性の細胞を、抗体で染色し、次いで、適切な二次抗体 (一次抗体の定常領域に対して特異的であり、蛍光タンパク質にコンジュゲートされている) で対比染色する。次いで、抗体結合を、サイトメーターの蛍光チャンネルで可視化する。

40

【 0 3 0 8 】

e . 抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイ

がん因子配列の発現について陽性または陰性の標的細胞系統に、細胞内エステラーゼによって切断され、細胞の細胞質ゾル内に保持される C a l c e i n - A M 試薬 (B e c k t o n D i c k i n s o n , S p a r k s , M D) をロードする。細胞を、がん因子タンパク質に特異的な抗体またはアイソタイプ対照と共にインキュベートする。次いで、細胞を、F i c o l l 勾配によって単離された健康な成人ボランティア由来のヒト P B M C と共に、変動する比率で混合する。4 時間のインキュベーション後、上清を収集し、時間

50

分解蛍光を、細胞溶解およびしたがってADCCについての読み取りとして測定する。

【0309】

f. 補体依存性細胞傷害(CDC)アッセイ

がん因子タンパク質の発現について陽性または陰性の標的細胞系統に、細胞内エステラーゼによって切断され、細胞の細胞質ゾル内に保持されるCalcein AM試薬をロードする。細胞を、がん因子タンパク質に特異的な抗体またはアイソタイプ対照と共にインキュベートする。次いで、細胞を、健康な成人ボランティア由来の新鮮なヒト血清の変動する希釈物と混合する。4時間のインキュベーション後、上清を収集し、時間分解蛍光を、細胞溶解およびしたがってCDCについての読み取りとして測定する。

【0310】

g. 混合リンパ球反応

がん因子タンパク質の発現について陽性または陰性のRaji Bリンパ腫細胞を、増殖および活性化を阻害するために、マイトマイシンC(mitomycin-C)で処理する。次いで、Raji B細胞を、Ficol1密度勾配によって健康な成人ボランティアの全血から単離された末梢血単核球(PBMC)と共にインキュベートする。混合細胞培養物を、種々の長さの時間にわたり、変動する細胞比率と一緒にインキュベートする。

【0311】

サイトカイン分析：混合培養物から上清を収集し、バルク混合リンパ球培養物によるサイトカイン放出を、市販のELISA試薬によって評価する。試験するサイトカインには、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN、TNFおよびTGFが含まれる。さらに、特定の細胞集団によって放出されたサイトカインを、系列(linage)マーカー染色と併せて細胞内サイトカイン染色によって評価し、フローサイトメトリーによって評価する。特定の細胞集団は以下のように規定する：Th1 T細胞：CD3+、CD4+、Tbet+、CD8-、CD19-、CD11b-；Th2 T細胞：CD3+、CD4+、GATA3+、CD19-、CD11b-、Treg T細胞：CD3+、CD4+、Foxp3+、CD19-、CD11b-；Th17 T細胞：CD3+、CD4+、CD8-、ROR T+、CD19-、CD11b-；CD8 T細胞：CD3+、CD4-、CD8+、CD19-、CD11b-、B細胞：CD3-、CD19+、CD11b-、樹状細胞：CD3-、CD19-、CD11b+、CD11c+；マクロファージ：CD3-、CD19-、CD11b+、CD11c-；NK細胞：アシアロ-GM1+、CD3-、CD19-およびCD11b-。

【0312】

活性化マーカー発現：さらに、同じ時点において、細胞を混合培養物から収集し、系列マーカーについて染色し、フローサイトメトリーによって免疫活性化マーカーの上方制御について評価する。活性化マーカーには、(T細胞について)：CD25、CD44、CD69およびCD154；(B細胞を含む抗原提示細胞について)：CD40、CD80、CD86、MHCI；および(NK細胞について)：CD69およびCD161、が含まれる。

【0313】

応答性PBMCの増殖：PBMC集団を、Raji B細胞とのインキュベーションの前に、CFSEを用いてPBMCを染色することによって評価する。共培養後の種々の時点で、PBMCの増殖を、表面マーカーによって描写されるような、特定の集団におけるCFSEの希釈によって評価する。Raji B細胞と共培養していない染色されたPBMCを、陰性対照として使用する。

【0314】

細胞傷害活性アッセイ：がん因子タンパク質の発現について陽性または陰性のRaji B細胞を、PBMCと共に6日間インキュベートする。引き続き、PBMC/Raji B共培養物を、Calcein-AM試薬をロードした新鮮なRaji B細胞に添加する。4時間のインキュベーション後、上清を収集し、時間分解蛍光を、Raji B細胞の溶解についての読み取りとして測定する。

10

20

30

40

50

【0315】

これは、ADCCアッセイと類似しているが、これらのアッセイでは、がん因子タンパク質発現 Raji B細胞を、抗体の非存在下で数日間PBM Cを活性化するようにさせ、ADCCアッセイでは、新鮮なPBM Cを、抗体と一緒にがん因子タンパク質発現細胞(Raji B、4T1、C1498またはTRAMP-C2)に添加し、細胞溶解をほんの数時間後に測定する。

【0316】

抗体との混合リンパ球反応：混合リンパ球反応のアッセイを、がん因子タンパク質に特異的に結合する抗体の存在下で反復する。抗体ががん因子タンパク質媒介性の表現型を逆転させる能力を評価する。

10

【0317】

h. 原発性腫瘍における発現の特徴付け

ウエスタンブロット(上記のような)によってがん因子タンパク質に結合する抗体を使用して、原発性ヒト腫瘍上のがん因子タンパク質の発現を特徴付ける。腫瘍(肝臓、膵臓、乳房、肺、膀胱、前立腺が含まれるがこれらに限定されない)のスペクトルおよび一致する正常組織由来のコア試料を、抗体で染色する。抗体染色の程度は、好ましくは有資格の病理学者が評価する。

【0318】

(実施例2)

がん因子によるPBM Cの活性化は、腫瘍細胞の特異的溶解を増加させる

20

【0319】

腫瘍細胞溶解方法

末梢血単核球(PBM C)を、Ficoll Hypaque勾配分離によって、健康なドナーから静脈穿刺によって得た全血から単離した。Raji Bリンパ腫細胞をマイトマイシンCで処理して、DNAを架橋し、複製を防止した。混合腫瘍リンパ球培養(MTLC)を実施した；種々の濃度の組換えがん因子(表2を参照のこと)と共に、PBM Cを10:1の比率でRaji細胞と共に6日間共培養した。PBM Cを、6日間の共培養期間の間に活性化して、Raji細胞を特異的に認識し、PBM C CD8+Tリンパ球集団を刺激して、Raji細胞を特異的に溶解した。

【0320】

30

6日目に、新鮮なRaji細胞を、蛍光カルセイン色素Calcein AMで標識し、予め活性化したPBM Cと共に4.5時間インキュベートした。Raji細胞のCD8+T細胞溶解を、上清中へのCalcein AM放出によって検出し、蛍光光度計を使用してこれを定量した。特異的溶解を、混合腫瘍リンパ球培養物からのCalcein AM放出対総溶解を達成するためにTriton X-100で処理したRaji細胞からのCalcein AM放出の比率として、自発的Calcein AM放出についての補正後に計算した。

特異的溶解 = (MTLC - PBM C単独) / (Triton - PBM C単独)

【0321】

40

Calcein AMの自発的放出について対照をとるために、Raji細胞に、Calcein AMをロードしたが、4.5時間の溶解期にわたりPBM Cと共にインキュベートしなかった。非特異的溶解について対照をとるために、PBM Cを、Raji細胞なしで、および平行して非特異的活性化を誘導するフィトヘマグルチニン(PHA)ありで、最初の6日間にわたり培養した。これらのPBM Cを、カルセインをロードしたRaji細胞に、4.5時間の溶解期にわたり添加した。

【0322】

【表 2】

表 2

がん因子	組換えがん因子濃度
IL1f5	0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml
IL1RAP2	0.2 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml
CCL14	0.5 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml
IL1R2	0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml

10

【0323】

IL1f5 腫瘍細胞溶解実験の結果

図 1 は、R a j i B リンパ腫細胞および組換え I L 1 f 5 ポリペプチドと共に培養した P B M C を含む M T L C が、I L 1 f 5 なしで培養した M T L C と比較して、R a j i B リンパ腫細胞溶解の用量依存的低下を示すことを示す。これらの結果は、I L 1 f 5 が免疫応答を阻害することが可能であることを示している。非特異的溶解について対照をとるために、P B M C を、R a j i B リンパ腫細胞の非存在下で I L 1 f 5 と共に最初の 6 日間にわたり培養し、次いで、カルセインをロードした R a j i 細胞に、4.5 時間の溶解期間にわたり添加した。

20

【0324】

IL1RAP2 腫瘍細胞溶解実験の結果

図 2 は、R a j i B リンパ腫細胞および組換え I L 1 R A P 2 ポリペプチドと共に培養した P B M C を含む M T L C が、I L 1 R A P 2 なしで培養した M T L C と比較して、R a j i B リンパ腫細胞溶解の用量依存的低下を示すことを示す。これらの結果は、I L 1 R A P 2 が免疫応答を阻害することが可能であることを示している。

【0325】

CCL14 腫瘍細胞溶解実験の結果

図 3 は、R a j i B リンパ腫細胞および組換え C C L 1 4 ポリペプチドと共に培養した P B M C を含む M T L C が、C C L 1 4 なしで培養した M T L C と比較して、R a j i B リンパ腫細胞溶解の用量依存的低下を示すことを示す。これらの結果は、C C L 1 4 が免疫応答を阻害することが可能であることを示している。

30

【0326】

IL1R2 腫瘍細胞溶解実験の結果

図 18 は、R a j i B リンパ腫細胞および組換え I L 1 R 2 ポリペプチドと共に培養した P B M C を含む M T L C が、I L 1 R 2 なしで培養した M T L C と比較して、R a j i B リンパ腫細胞溶解の用量依存的低下を示すことを示す。これらの結果は、I L 1 R 2 が免疫応答を阻害することが可能であることを示している。

【0327】

(実施例 3)

がん因子免疫組織化学

40

【0328】

免疫組織化学法

個々のがん因子の発現を、腫瘍組織および一致する正常対照組織において、免疫組織化学染色によって評価した。個々のがん因子に特異的な抗体を、種々の力価測定で試験して、最小の背景および最大のシグナル検出を生じる希釈または濃度を同定した。個々のがん因子を発現しない陰性細胞系統、例えば H E K 2 9 3 T 細胞、ならびにがん因子を一過的にトランスフェクトした陽性細胞系統、例えば、I L 1 f 5 または G P R 1 8 3 をトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞を染色することによって、抗体特異性を検証した。トランスフェクトされた H E K 2 9 3 T 細胞におけるがん因子発現を、q P C R およびウエスタンブロットによって検証した。最終抗体染色希釈または濃度を、表 3 中に示す

50

【0329】

使用した一次抗体を、表3中に示す。主要な検出システムは、フクシア色の沈着物を生じる、Vector Red基質キット(SK-5100)と共にVector抗ウサギ二次(BA-1000)およびVector ABC-APキット(AK-5000)からなった。陰性対照は、一次抗体の非存在下で隣接切片に対して免疫組織化学手順全体を実施することからなった。組織を、陽性対照抗体(CD31およびビメンチン)でも染色して、組織抗原が保存されており、免疫組織化学分析を行えることを確実にした。スライドは病理学者が解釈し、各抗体を、特異的シグナルの存在および背景のレベルについて評価した。染色強度を、0~4のスケール(0=陰性、1=紅潮、2=かすか、3=中程度、4=強い)で記録した。染色したスライドを、Nikon顕微鏡に連結したDVC 1310Cデジタルカメラで画像化した。画像を、Adobe Photoshopを用いてTIFFファイルとして保存した。

10

【0330】

染色した生体試料は、5つのがん：乳房、肺、結腸、膵臓および前立腺、のそれぞれ由来の、40の腫瘍組織および10の正常対照組織からなった。試料を、同じ臓器由来の10の正常対照組織と共に、腫瘍生検由来の1mmのコア試料からなる組織マイクロアレイとしてマウントした。

【0331】

【表3】

20

表3

がん因子	一次抗体	最終抗体濃度/希釈
IL1f5	Sigma Aldrich #HPA034542	1:50の最終希釈
GPR183	Lifespan #LS-A46	10 µg/mLの最終濃度
IL1RAP	Genetex #GTX-104513	20 µg/mLの最終濃度
CCL14	Santa Cruz #28388	2 µg/mLの最終濃度
SEMA4D	Sigma Aldrich #HPA015662	1:100の最終希釈
IL1R2	Sigma Aldrich #HPA027598	1:50の最終希釈

30

【0332】

40

IL1f5 IHCの結果

対照と比較して増加したIL1f5抗体染色が、乳がん、結腸がん、肺がんおよび前立腺がん由来の腫瘍試料において観察された。代表的画像を図4~7に示す。IL1f5染色は、乳がんにおいて最も強かったが、結腸がん、肺がんおよび前立腺がんにおいても強かった。さらに、平均病理スコアの比較は、より高い臨床グレードを有する(正常な細胞形態からのより大きい相違を示す)乳房腫瘍試料が、IL1f5の過剰発現と相関することを示した。グレード3のがんからの平均スコアは3.45であったが、グレード2のはスコア2.31であり、非がん性組織はスコア1.12であった。

【0333】

GPR183 IHCの結果

50

対照と比較して増加したGPR183抗体染色が、乳がん、結腸がんおよび肺がん由来の腫瘍試料において観察された。代表的画像を図8～10に示す。GPR183染色は、乳がんにおいて最も強かったが、結腸がんおよび肺がんにおいても強かった。さらに、平均病理スコアの比較は、より高い臨床グレードを有する（正常な細胞形態からのより大きい相違を示す）乳房腫瘍試料が、GPR183の過剰発現と相関することを示した。グレード3のがんからの平均スコアは2.32であったが、グレード2のがんはスコア1.65であり、非がん性組織はスコア1.17であった。

【0334】

IL1RAP IHCの結果

対照と比較して増加したIL1RAP抗体染色が、乳がんおよび肺がん由来の腫瘍試料において観察された。代表的画像を図11～12に示す。IL1f5染色は、乳がんにおいて最も強かったが、肺がんにおいても強かった。悪性乳房細胞についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての1.22と比較して、3.44であった。肺腫瘍についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての1.88と比較して、2.89であった。

10

【0335】

CCL14 IHCの結果

対照と比較して増加したCCL14抗体染色が、乳がん、前立腺がんおよび肺がん由来の腫瘍試料において観察された。代表的画像を図13～15に示す。CCL14染色は、乳がんにおいて最も強かったが、前立腺および肺がんにおいても強かった。悪性乳房細胞についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての1.25と比較して、2.61であった。悪性前立腺細胞についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての0.19と比較して、1.51であった。肺腫瘍についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての0.60と比較して、1.86であった。

20

【0336】

SEMA4D IHCの結果

対照と比較して増加したSEMA4D抗体染色が、乳がん由来の腫瘍試料において観察された。代表的画像を図16に示す。SEMA4D染色は乳がんにおいて強かった。悪性乳房細胞についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての2.29と比較して、2.92であった。

30

【0337】

IL1R2 IHCの結果

対照と比較して増加したIL1R2抗体染色が、乳がん由来の腫瘍試料において観察された。代表的画像を図17に示す。IL1R2染色は乳がんにおいて強かった。悪性乳房細胞についての平均IHCスコアは、非がん性細胞についての1.5と比較して、2.25であった。

【0338】

（実施例4）

がん因子の存在下でのT細胞増殖

【0339】

方法

末梢血単核球(PBMC)を、Ficoll Hypaque勾配分離によって、健康なドナーから静脈穿刺によって得た全血から単離し、カルボキシフルオレセインジアセテート(carboxyfluorescein diacetate)(CFSE)で標識した。Raji Bリンパ腫細胞を、マイトマイシンCで処理して、DNAを架橋し、複製を防止した。次いで、混合腫瘍リンパ球培養(MTLC)を、変動する濃度の組換えIL1f5と共に10:1の比率でPBMCおよびRajiを6日間共培養することによって準備した。この時間の間、PBMC集団由来のTリンパ球を活性化し、クローン性分裂させる。

40

【0340】

CFSEは、膜不透過性色素である。1細胞当たりのCFSEの量は、各連続的な細胞

50

分裂によって半分に低下し、細胞分裂の回数は、フローサイトメリーによって、CFSE染色の強度をモニタリングすることによって追跡され得る。T細胞を、抗CD3-PE (E Bioscience 抗CD3-PE カタログ番号17-0036-42) による陽性染色によって同定した。細胞分裂の回数を、CFSE染色の強度を休止T細胞と比較することによって分析した。CFSE染色のレベルが検出限界を下回った時点で、T細胞が完全に分裂したと規定した。データを、Accuri C6フローサイトメーターで収集し、FCSEXPRESSで分析した。IL1f5による非特異的活性化について対照をとるために、PBMCを、Raji細胞の非存在下でIL1f5と共に培養した。

【0341】

IL1f5 IHCの結果

Raji Bリンパ腫細胞および組換えIL1f5ポリペプチドと共に培養したPBMCを含むMTLCは、IL1f5およびPBMCなしで培養したMTLC対照と比較して、T細胞増殖の用量依存的低下を生じた。これらの結果(図19)は、IL1f5が、T細胞増殖を減少させることによって、免疫応答を阻害することが可能であることを示している。

【0342】

本発明の特定の実施形態を例示目的のために本明細書中に記載してきたが、種々の改変が、本発明の精神および範囲から逸脱することなしになされ得ることが、上述から理解されよう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲による場合を除き限定されない。

10

20

【図1】

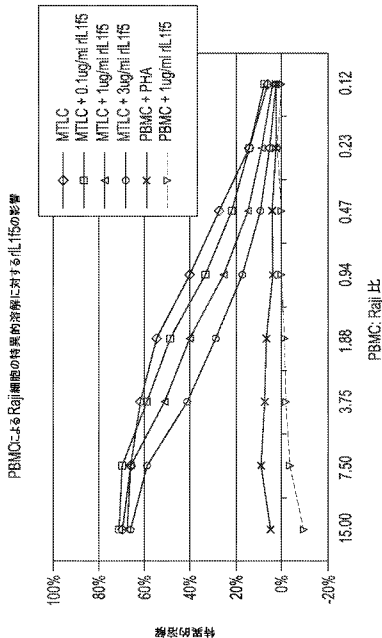


FIG. 1

【図2】

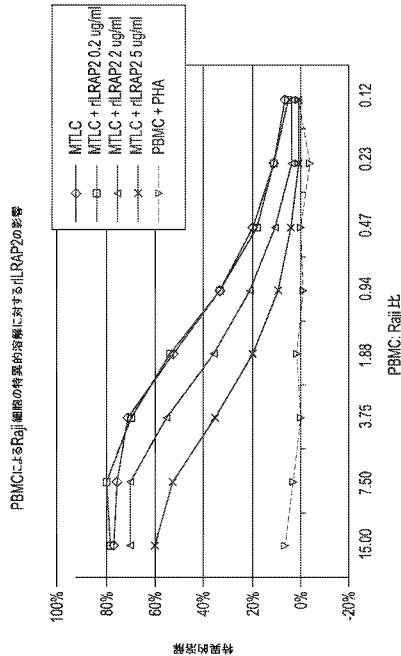


FIG. 2

【 図 3 】

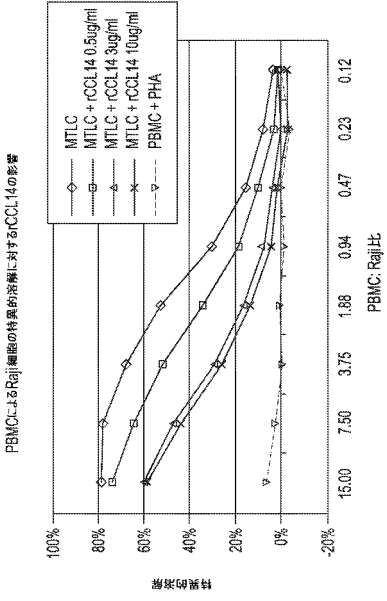


FIG. 3

【 図 18 】

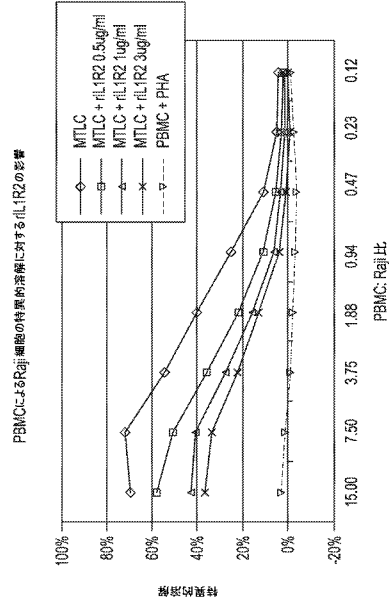


FIG. 18

【 図 19 】

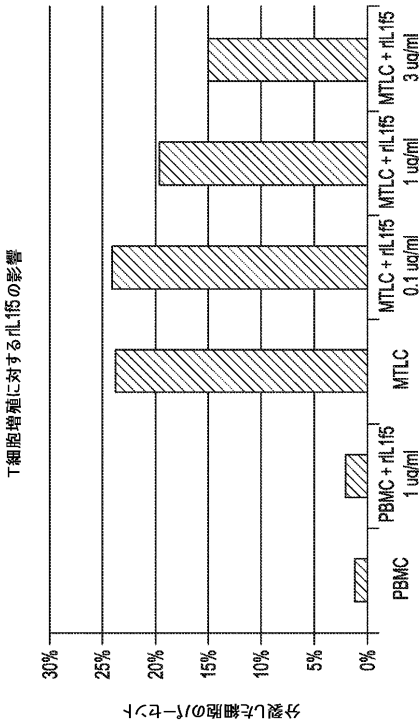
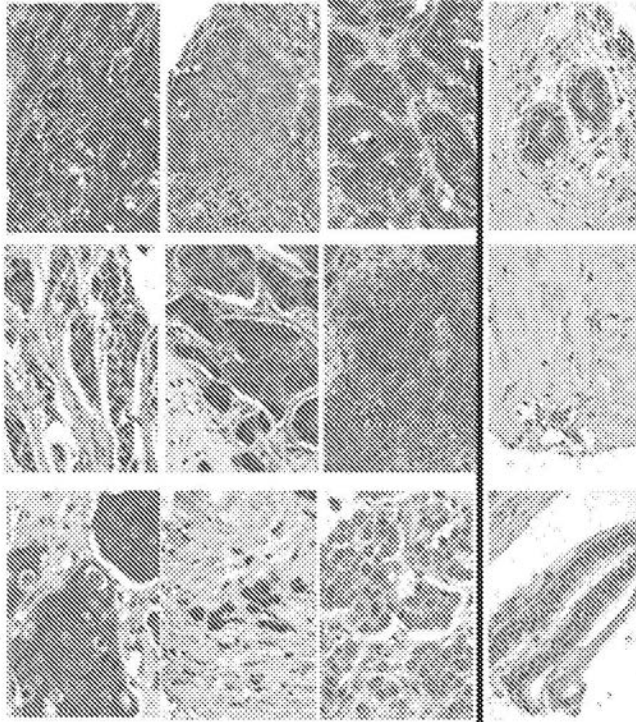


FIG. 19

【 図 4 】

乳がん - IL1f5



侵襲性管癌腫

正常な管上皮、血管
および間質

FIG. 4

【 図 5 】

結腸がん - IL1f5

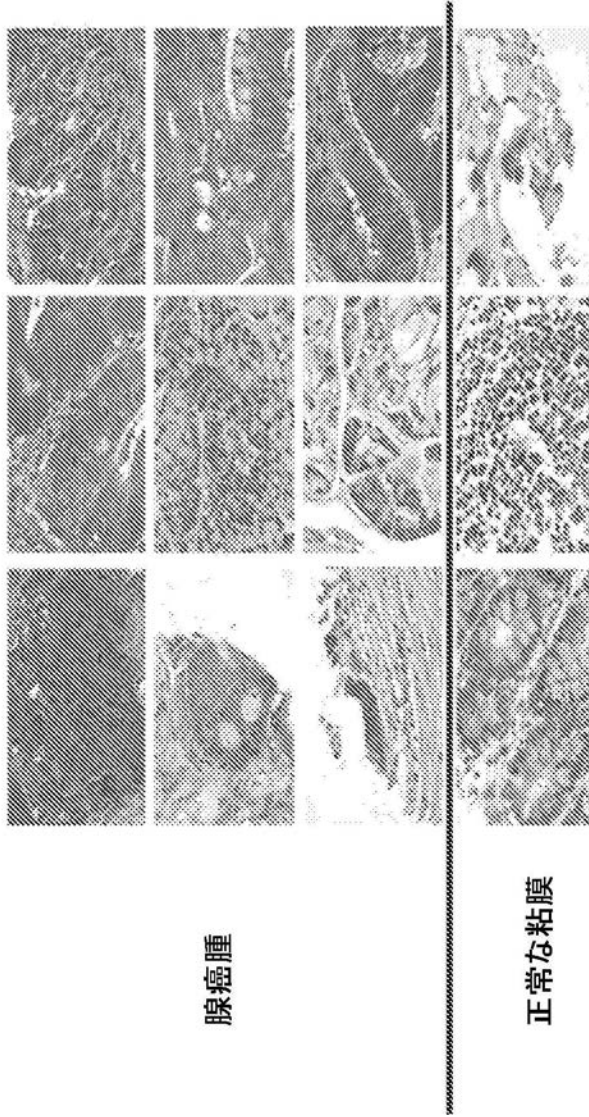
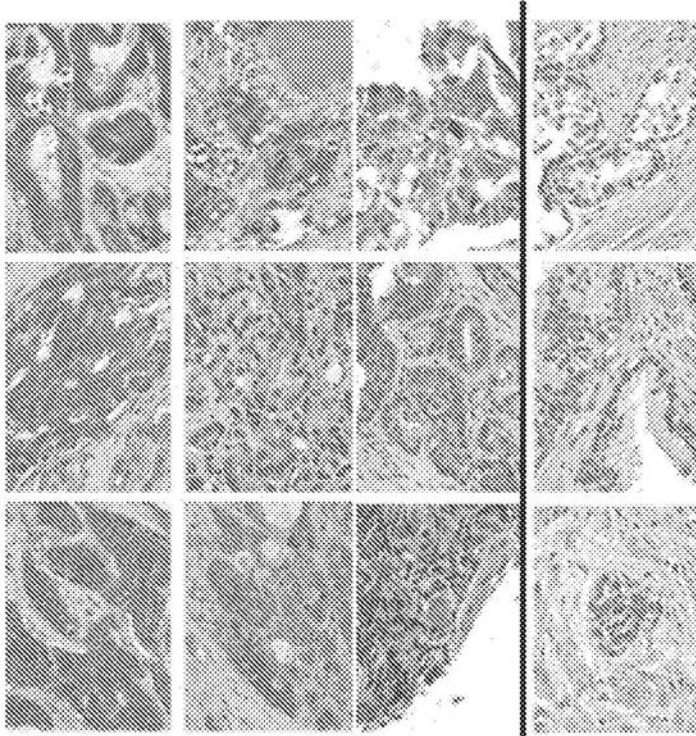


FIG. 5

【 図 6 】

前立腺がん - IL1f5



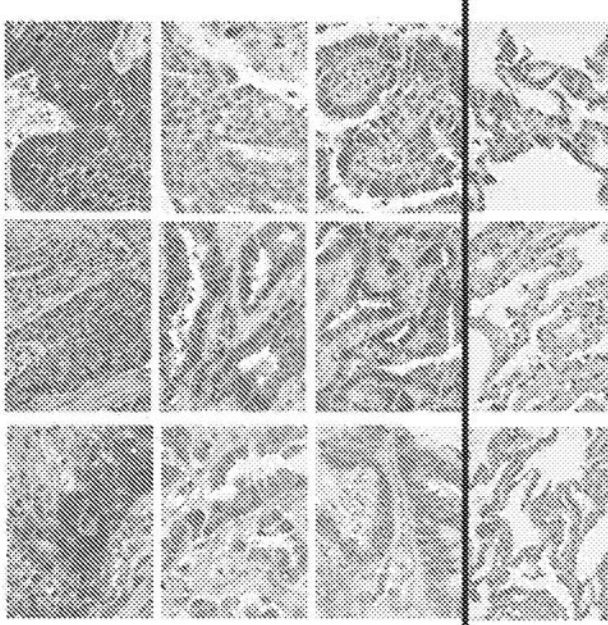
腺癌腫

正常な腺および間質

FIG. 6

【 図 7 】

肺がん - IL1f5



扁平上皮細胞癌腫

腺癌腫

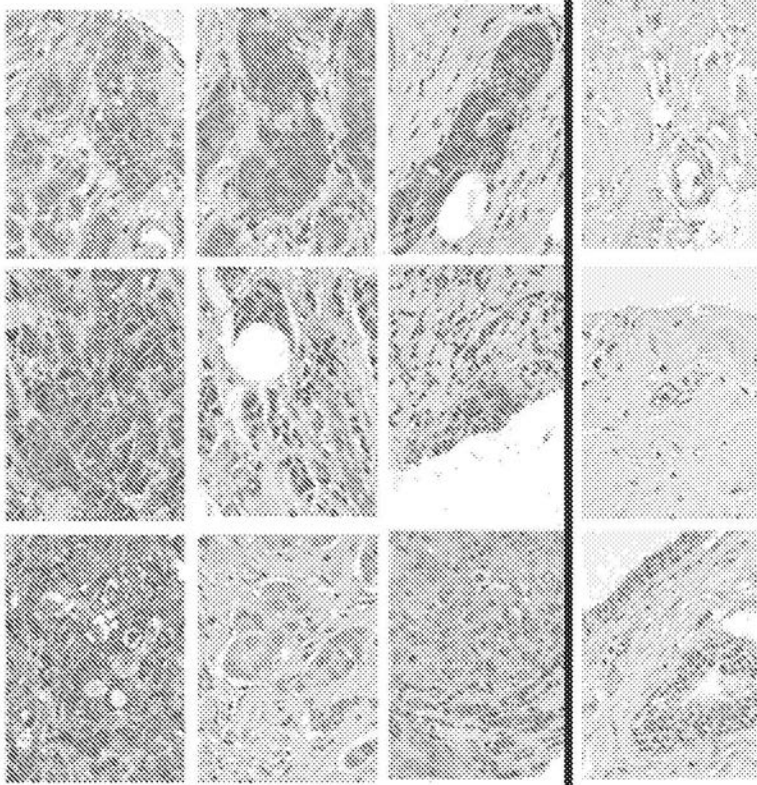
乳頭状腺癌腫

正常な肺胞

FIG. 7

【 図 8 】

乳がん - GPR183



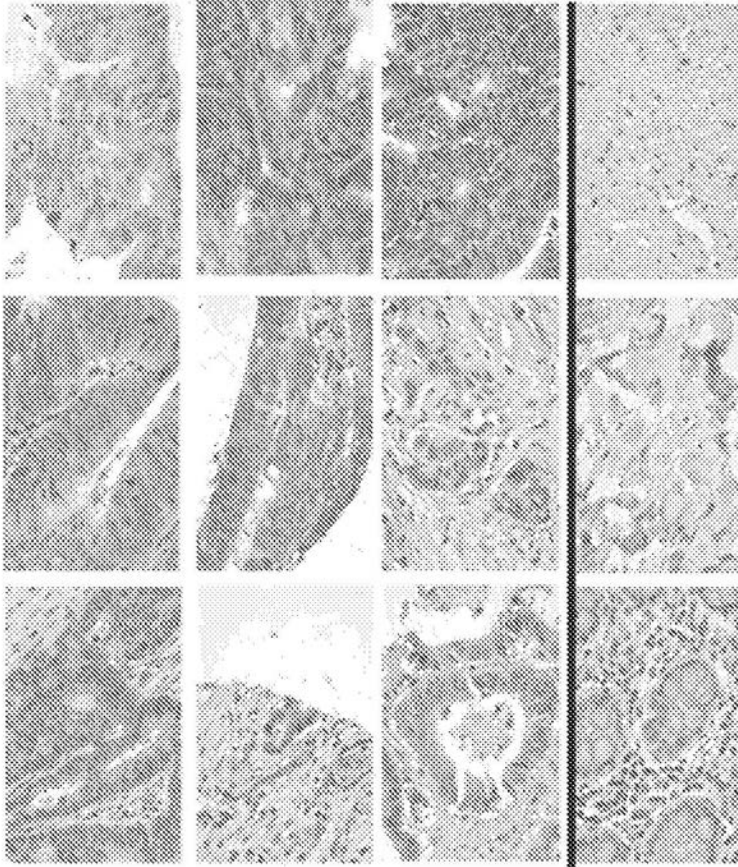
侵襲性管癌腫

正常な管上皮、血管および間質

FIG. 8

【 図 9 】

結腸がん - GPR183



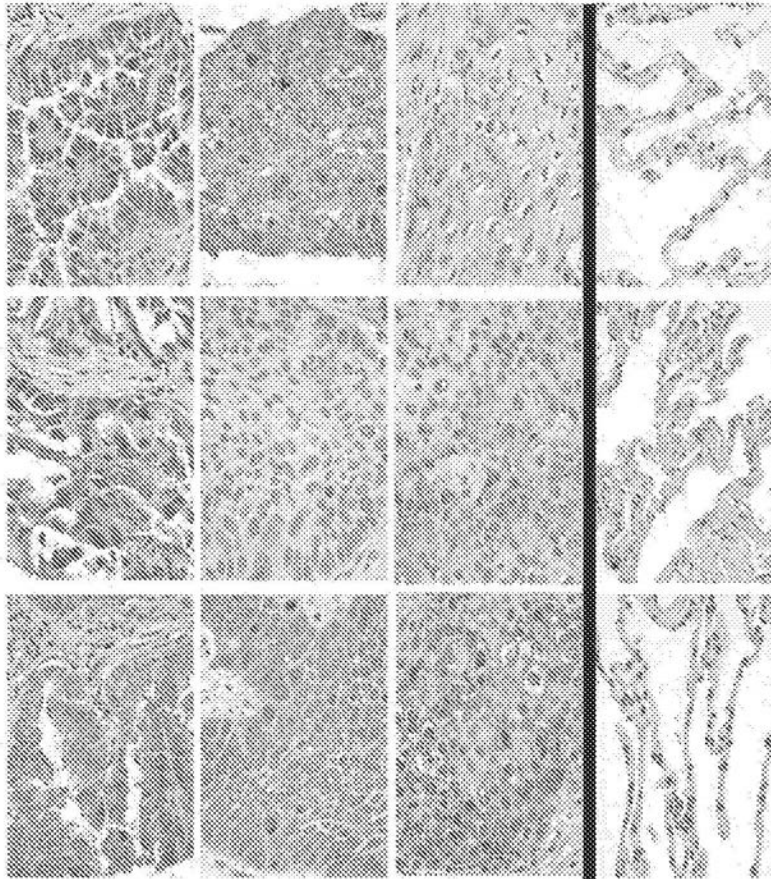
腺癌腫

正常な結腸組織

FIG. 9

【図 10】

肺がん - GPR183



腺癌腫

扁平上皮細胞癌腫

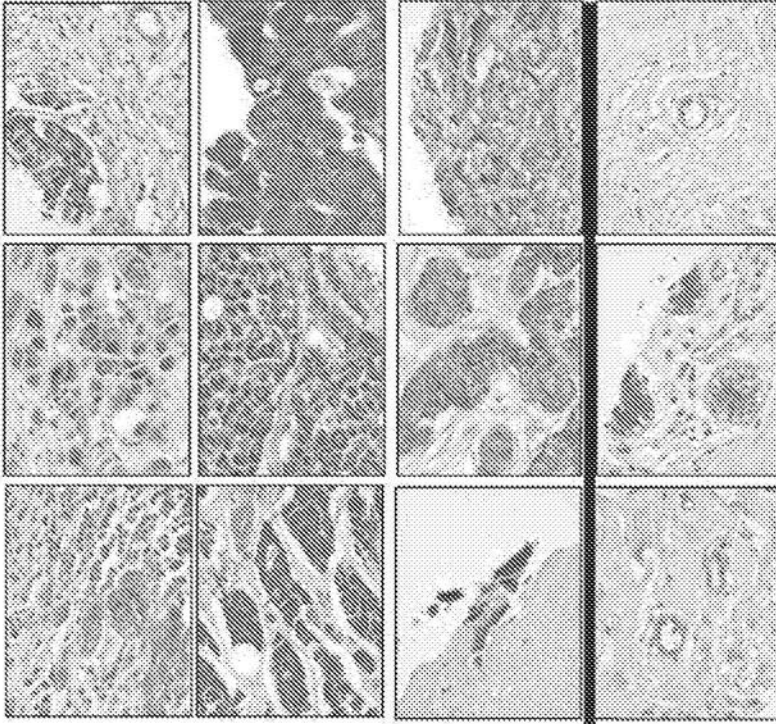
扁平上皮細胞癌腫

正常な肺胞

FIG. 10

乳がん - IL1RAP

【 図 1 1 】



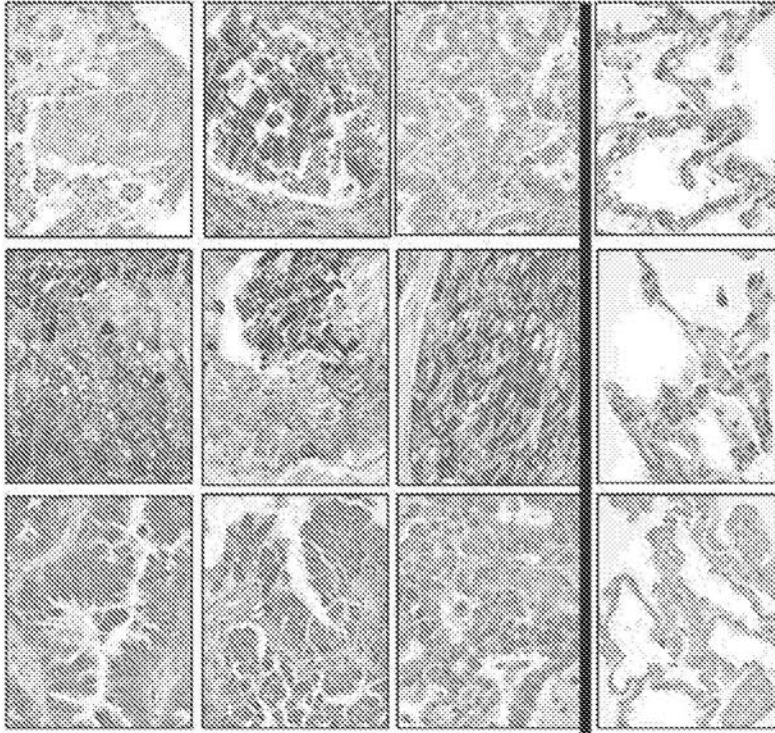
侵襲性管癌腫

正常な管上皮、血管および間質

FIG. 11

【 図 1 2 】

肺がん - IL1RAP



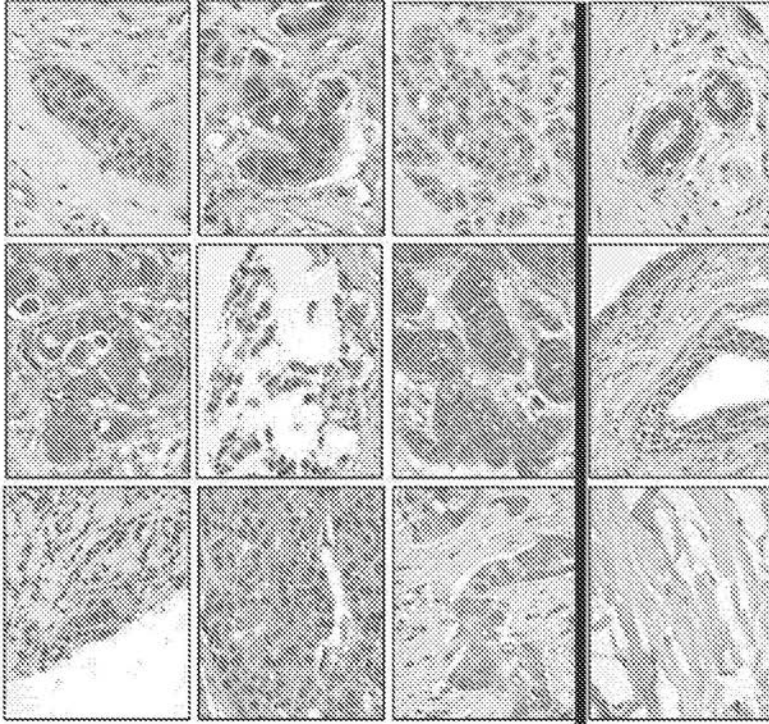
肺がん

正常な肺胞

FIG. 12

【 図 1 3 】

乳がん - CCL14



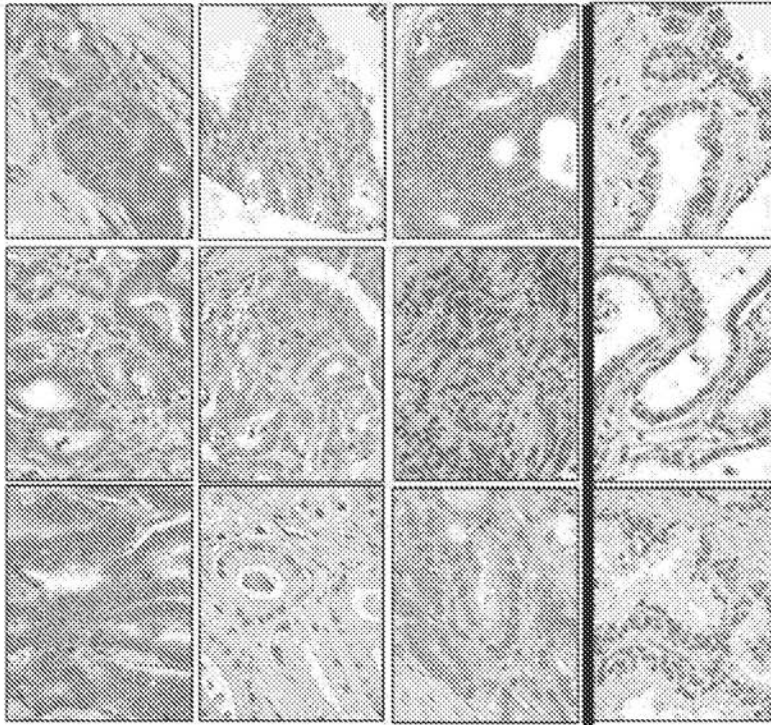
侵襲性管癌腫

正常な管上皮、血管および間質

FIG. 13

【 図 14 】

前立腺がん - CCL14



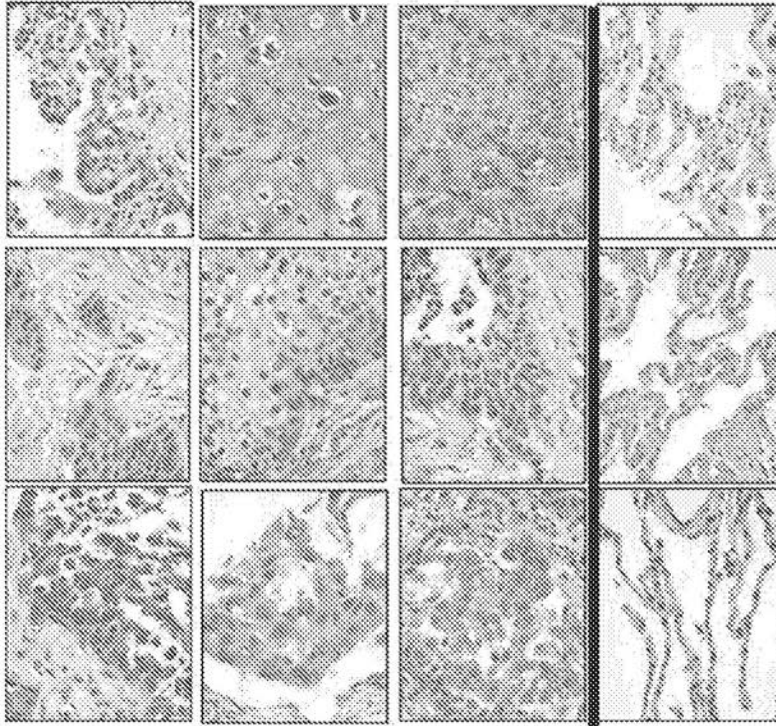
腺癌腫

正常な腺および間質

FIG. 14

【 図 1 5 】

肺がん - CCL14



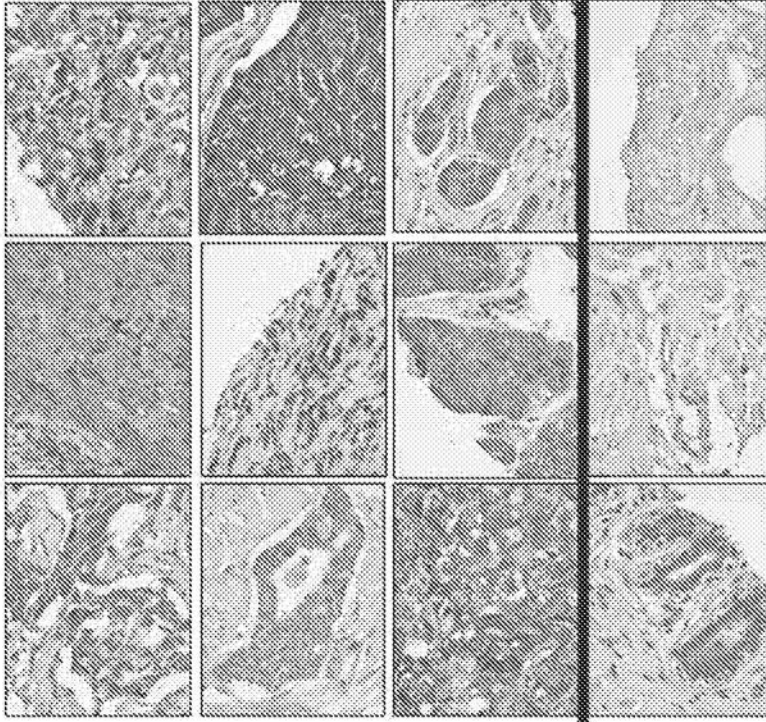
肺がん

正常な肺胞

FIG. 15

【 図 16 】

乳がん - SEMA4D



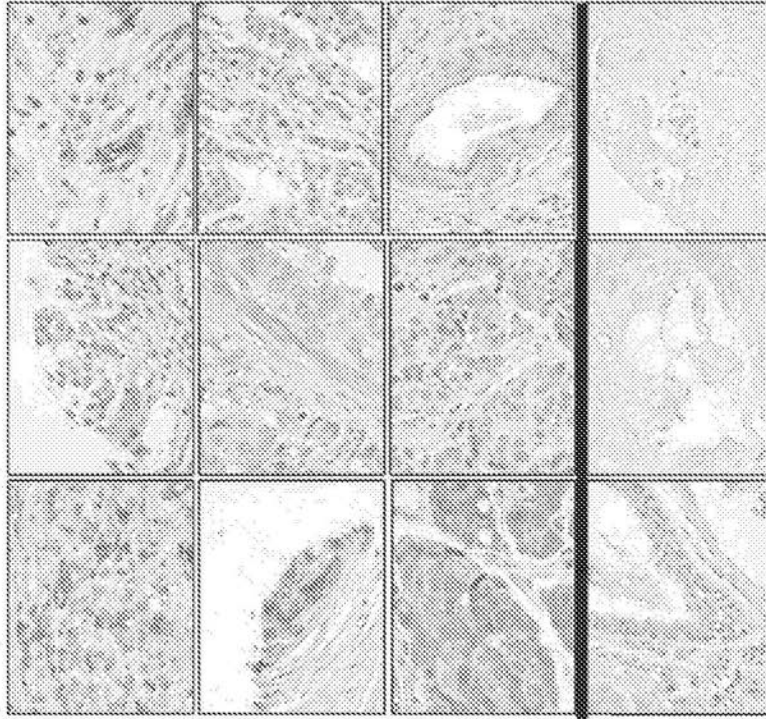
侵襲性管癌腫

正常な管上皮、血管および間質

FIG. 16

【 図 17 】

乳がん - L1R2



侵襲性管癌腫

正常な管上皮、血管および間質

FIG. 17

【 配列表 】

2014527398000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2012/043080
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/20 A61K38/19 G01N33/50 A61K39/395 ADD.		
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) A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/187122 A1 (SIMS JOHN E [US]) 12 December 2002 (2002-12-12) page 17, left-hand column, paragraph 202 - right-hand column, paragraph 205	2
X	US 5 945 310 A (YOUNG PETER RONALD [US] ET AL) 31 August 1999 (1999-08-31) column 14, last paragraph - column 15, line 20	2
X	WO 02/00690 A2 (GENENTECH INC [US]; BAKER KEVIN P [US]; FERRARA NAPOLEONE [US]; GERBER) 3 January 2002 (2002-01-03) claims 20, 23, 27, 29, 30; sequence 316	1-30
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "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
20 July 2012		26. 11. 2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lechner, Oskar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/043080

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A. JOHNSTON ET AL: "IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: A Novel IL-1 Family Signaling System That Is Active in Psoriasis and Promotes Keratinocyte Antimicrobial Peptide Expression", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 186, no. 4, 17 January 2011 (2011-01-17), pages 2613-2622, XP055033275, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1003162 the whole document	1-30
A	MULERO J J ET AL: "Organization of the human interleukin -1 receptor antagonist gene IL1HV1", IMMUNOGENETICS, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 51, 1 May 2000 (2000-05-01), pages 425-428, XP002217818, ISSN: 0093-7711, DOI: 10.1007/S002510050640 the whole document	1-30
A	WO 2007/034465 A2 (TRINITY COLLEGE DUBLIN [IE]; MILLS KINGSTON [IE]; LYNCH MARINA [IE]; C) 29 March 2007 (2007-03-29) paragraph [0188] paragraph [0219]	1-30
A,P	HAL BLUMBERG ET AL: "Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 204, no. 11, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 20071029-2603, XP007911379, ISSN: 0022-1007	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/043080**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:
1-30(partially)

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 Application No. PCT/ US2012/ 043080

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-30(partially)

Use of IL1F5 (=IL36RN, IL-1-delta, IL1HY1, IL-36RA, FIL1 delta, IL1RP3, PSORP, MGC29840, IL-1RP) protein (according to SeqID 1) , polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of cancer

2-6. claims: 1-30(partially)

Use of CCBP2 (SeqID 2) / IL1R2 (SeqID 3) / IL1RAPL1 (SeqID 4) / IL18BP (SeqID 5) / CLEC2B (SeqID 6) protein, polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of cancer.

7-9. claims: 1-30(partially)

Use of Serpin I1 (SeqID 9) / Serpin A4 (SeqID 18) / Serpin B5 (SeqID 19) protein, polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of cancer.

10. claims: 1-30(partially)

Use of IL1RAP isoform 1 (SeqID 10) or 2 (SeqID 11) protein, polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of cancer.

11-16. claims: 1-30(partially)

Use of GPR1 (SeqID 12) / GPR4 (SeqID 13) / GPR15 (SeqID 14) / GPR32 (SeqID 15) / GPR34 (SeqID 16) / GPR183 (SeqID 17) protein, polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of cancer.

17. claims: 1-30(partially)

Use of Sema 4B (SeqID 20) or Sema 4D (SeqID 21) protein, polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of cancer.

18-20. claims: 1-30(partially)

Use of CCL14 (SeqID 22) / NKTR (SeqID 23) / SFTPD (SeqID 24) protein, polynucleotides, complementary oligonucleotides or Ab thereto for use in the treatment and diagnosis of

International Application No. PCT/ US2012/ 043080

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/043080

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002187122 A1	12-12-2002	US 2002187122 A1	12-12-2002
		US 2005058625 A1	17-03-2005
US 5945310 A	31-08-1999	CA 2221866 A1	19-11-1998
		EP 0879889 A2	25-11-1998
		JP 11000177 A	06-01-1999
		JP 2000083688 A	28-03-2000
		US 5945310 A	31-08-1999
WO 0200690 A2	03-01-2002	CA 2412211 A1	03-01-2002
		EP 1309620 A2	14-05-2003
		JP 2004506413 A	04-03-2004
		WO 0200690 A2	03-01-2002
WO 2007034465 A2	29-03-2007	NONE	

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 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
		G 0 1 N	33/53	M

(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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, KM, 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, 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, VN, ZA

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウォレン, サラ エレン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2, シアトル, イーストレイク アベニュー イースト 1 6 1 6, アpartment 2 0 6

(72)発明者 ワイズマン, カール

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2, シアトル, イーストレイク アベニュー イースト 1 6 1 6, スイート 2 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA04 DA01 DA02 DA05 DA12 EA01 EA02
EA03 EA04 FA02 FA10 GA11 HA03 HA11
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25
QS36 QX02
4C084 AA19 NA05 ZB092
4C085 AA14 AA27 CC23 DD62 EE01 EE03 EE05
4H045 AA11 AA30 CA41 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014527398A5	公开(公告)日	2015-07-30
申请号	JP2014517079	申请日	2012-06-19
申请(专利权)人(译)	ONCO因素总公司		
[标]发明人	ウォレンサラエレン ワイズマンカール		
发明人	ウォレン, サラ エレン ワイズマン, カール		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12Q1/68 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2866 A61K38/1793 A61K39/3955 A61K45/06 A61K2039/505 C07K16/18 C07K16/245 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/574		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12Q1/68.A A61K39/395.N A61K39/395.L A61K45/00 A61P35/00 G01N33/574.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZB092 4C085/AA14 4C085/AA27 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE05 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/499534 2011-06-21 US 61/547342 2011-10-14 US 61/583033 2012-01-04 US		
其他公开文献	JP2014527398A		

摘要(译)

披露了用于治疗 and 诊断癌症的组合物和方法。例如，说明性组合物包含一种或多种癌症相关抗体，多肽，多核苷酸，抗原呈递细胞等。所公开的组合物可用于例如诊断，预防和/或治疗疾病，特别是癌症。