

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-530359

(P2015-530359A)

(43) 公表日 平成27年10月15日(2015.10.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B024
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAC	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B065
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C085
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-521668 (P2015-521668)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月3日(2013.7.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年3月6日(2015.3.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/049368
 (87) 国際公開番号 WO2014/011489
 (87) 国際公開日 平成26年1月16日(2014.1.16)
 (31) 優先権主張番号 61/669,967
 (32) 優先日 平成24年7月10日(2012.7.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/702,916
 (32) 優先日 平成24年9月19日(2012.9.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

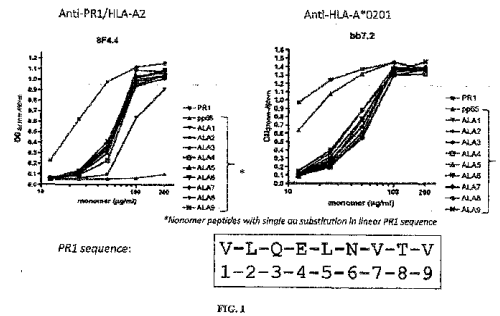
(71) 出願人 500039463
 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国、テキサス・78701、
 オースティン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 モルドレム, ジェフリー
 アメリカ合衆国 テキサス 77030,
 ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515, ユニット 0900

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんおよび自己免疫疾患の診断および治療に使用するためのモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本明細書には、がん細胞表面上におけるHLA提示との関連で、HLA-A2拘束性ペプチドPR-1を認識する抗体の配列が記載されている。がんおよび免疫関連疾患の診断および処置におけるこれらの抗体の使用も提供される。さらにまたさらなる実施形態では、自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、上記のとおり抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該自己免疫疾患は、ウェゲナー肉芽腫症、チャージ ストラウス症候群または全身性小血管血管炎であり得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H L A - A 2 受容体に結合されると V L Q E L N V T V (配列番号 4 5) に結合する単離および精製された抗体であって、配列番号 3、4 および 5 を含む重鎖 C D R と、配列番号 8、9 および 10 を含む軽鎖 C D R とを有する、単離および精製された抗体。

【請求項 2】

マウス抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

一本鎖抗体または二重特異性抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

非抗体ペプチドまたはポリペプチドセグメントに融合されている、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

診断試薬に連結されている、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記診断試薬が、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

治療試薬に連結されている、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記治療試薬が、サイトカイン、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体 F c 断片、T L R アゴニスト、C p G 含有分子または免疫共刺激分子である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

ヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記ヒト化抗体が、配列番号 3 8 および 3 6 または配列番号 4 0 および 3 6 ならびに配列番号 4 0 および 4 2 の軽鎖 / 重鎖配列を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

配列番号 8、9 および 10 によってコードされる軽鎖 C D R をコードする、核酸。

【請求項 12】

配列番号 7 または配列番号 1 2 をコードする、請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 13】

配列番号 2 3 または配列番号 2 5 をコードする、請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 14】

前記軽鎖 C D R をコードする前記核酸の 5 ' 側に位置するプロモーター配列をさらに含む、請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 15】

前記プロモーターが真核細胞内で活性である、請求項 14 に記載の核酸。

【請求項 16】

前記プロモーターが原核細胞内で活性である、請求項 14 に記載の核酸。

【請求項 17】

複製可能なベクター内に配置されている、請求項 11 に記載の核酸。

【請求項 18】

前記複製可能なベクターが非ウイルスベクターである、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 19】

前記複製可能なベクターがウイルスベクターである、請求項 17 に記載の核酸。

【請求項 20】

前記 C D R コードセグメント間に位置するリンカーコードセグメントをさらに含む、請求項 11 に記載の核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

前記リンカーコードセグメントの1つ以上が、ヘリックス - ターン - ヘリックスモチーフをコードする、請求項 2 0 に記載の核酸。

【請求項 2 2】

配列番号 3、4 および 5 の配列を含む C D R を含む重鎖コードセグメントを含み、配列番号 8、9 および 1 0 の配列を含む C D R を含む軽鎖コードセグメントを含む、人工抗体。

【請求項 2 3】

前記 C D R が合成リンカーによって連結されている、請求項 2 2 に記載の人工抗体。

【請求項 2 4】

前記重鎖が非抗体ペプチドまたはポリペプチドセグメントに融合されている、請求項 2 2 に記載の人工抗体。

【請求項 2 5】

診断試薬に連結されている、請求項 2 2 に記載の人工抗体。

【請求項 2 6】

前記診断試薬が、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬である、請求項 2 5 に記載の人工抗体。

【請求項 2 7】

治療試薬に連結されている、請求項 2 2 に記載の人工抗体。

【請求項 2 8】

前記治療試薬が、サイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体 F c 断片、好中球エラスターゼ、プロテイナーゼ 3、T L R アゴニスト、C p G 含有分子または免疫共刺激分子である、請求項 2 7 に記載の人工抗体。

【請求項 2 9】

前記軽鎖が配列番号 7、配列番号 1 2、配列番号 2 3 もしくは配列番号 2 5 を含み、および / または前記重鎖が配列番号 3 6 もしくは配列番号 4 2 を含む、請求項 2 2 に記載の人工抗体。

【請求項 3 0】

抗体を作製する方法であって、(a) (i) 配列番号 3、4 および 5 に示される C D R を含む重鎖をコードする核酸配列、および (i i) 配列番号 8、9 および 1 0 に示される C D R を含む軽鎖をコードする核酸配列を宿主細胞に導入すること ; ならびに (b) 該軽鎖および重鎖の発現を支援する条件下で該宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 3 1】

前記抗体を単離することをさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記抗体を診断剤または治療剤に連結する工程をさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

異常細胞を含有すると疑われるサンプル中の異常細胞を検出する方法であって、該サンプルと、請求項 1 に記載の抗体または請求項 2 2 に記載の人工抗体とを接触させることを含む、方法。

【請求項 3 4】

前記抗体または人工抗体が診断剤にコンジュゲートされている、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記診断剤が、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

二次結合剤を使用して、前記抗体または人工抗体を検出する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記二次結合剤が抗 F c 受容体抗体である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

10

20

30

40

50

前記サンプルが、(a)頭頸部、脳、食道、乳房、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、大腸、直腸、卵巣、子宮、子宮頸部、前立腺、睾丸もしくは皮膚組織由来の腫瘍組織、または(b)体液、例えば血液、リンパ液、尿、骨髄穿刺液もしくは乳頭吸引液である、請求項33に記載の方法。

【請求項39】

前記サンプルが切除腫瘍床に由来する、請求項33に記載の方法。

【請求項40】

検出の存在、非存在または程度に基づいて処置決定をすることをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項41】

前記処置決定が、PR-1ベースのペプチドワクチンで前記被験体を処置することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

原発性がん細胞、転移性がん細胞または骨髄異形成細胞を検出する、請求項33に記載の方法。

【請求項43】

がんを有する被験体を処置する方法であって、請求項1に記載の抗体または請求項22に記載の人工抗体を該被験体に投与することを含む、方法。

【請求項44】

前記抗体または人工抗体が治療剤にコンジュゲートされている、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記がんが固形腫瘍である、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記固形腫瘍が、頭頸部腫瘍、脳腫瘍、食道腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍および胃腫瘍、小腸腫瘍、大腸腫瘍、直腸腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍、睾丸腫瘍または皮膚腫瘍である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記がんが血液がんである、請求項43に記載の方法。

【請求項48】

前記血液腫瘍が白血病またはリンパ腫である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記治療剤が、サイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Fc断片、TLRアゴニスト、CpG含有分子または免疫共刺激分子である、請求項44に記載の方法。

【請求項50】

第2の抗がん療法を前記被験体に提供することをさらに含む、請求項43に記載の方法。

【請求項51】

前記第2の抗がん療法が、遺伝子治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、毒素療法または手術である、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記抗体または人工抗体を前記被験体に複数回投与する、請求項43に記載の方法。

【請求項53】

前記がんが、再発性がんまたは転移性がんである、請求項43に記載の方法。

【請求項54】

自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、請求項1に記載の抗体または請求項22に記載の人工抗体を前記被験体に投与することを含む、方法。

【請求項55】

前記自己免疫疾患が、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ ストラウス症候群または全身性小血管血管炎である、請求項54に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 6】

前記抗体または人工抗体が治療剤にコンジュゲートされている、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記治療剤が、毒素またはアポトーシス誘導剤である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

第 2 の抗自己免疫療法を前記被験体に提供することをさらに含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記第 2 の抗自己免疫療法が抗炎症剤である、請求項 5 8 に記載の方法。

10

【請求項 6 0】

前記抗体を前記被験体に複数回投与する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 1】

H L A - A 2 がん細胞の補体媒介性細胞傷害を誘導する方法であって、該がん細胞と、請求項 1 に記載の抗体または請求項 2 2 に記載の人工抗体とを接触させることを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2012年7月10日に提出された米国仮特許出願第61/669,967号、および2012年9月19日に提出された米国仮特許出願第61/702,916号の利益を主張し、双方の出願の全体の内容は、本明細書中に参考として援用される。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

本発明は、国立がん研究所/国立衛生研究所によって授与されたP50CA100632の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明について一定の権利を有する。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、一般に、がんおよび免疫療法の分野に関する。より具体的には、それは、がんおよび自己免疫疾患の処置および予防のための免疫診断抗体および免疫治療抗体に関する。

30

【0004】

2. 関連分野の説明

免疫系は、長い間、がんの制御に関連するとされてきたが、ヒトがんにおける特異的かつ有効な免疫応答の証拠を欠いていた。慢性骨髄性白血病(CML)では、同種骨髄移植(BMT)またはインターフェロン-2b(IFN-2b)療法により完全寛解がもたらされるが、疾病制御の機構は知られておらず、それには、免疫抗白血病応答が関与し得る。

40

【0005】

当技術分野における証拠に基づいて、リンパ球は抗白血病効果の媒介で役割を果たすと考えられる。研究により、同種ドナーのリンパ球注入(DLI)を使用して同種BMT後の骨髄性白血病の再発が処置されることが証明されている(Giralt and Kolb, 1996; Kolb and Holler, 1997; Kolbら, 1995; Kolbら, 1996; Antin, 1993)。元の骨髄(BM)ドナー由来のリンパ球の輸注により、慢性期(CP)の慢性骨髄性白血病(CML)患者の約70%~80%で血液学的応答および細胞遺伝学的応答の両方が誘導される(Kolbら, 1996, Kolb and Holler, 1997)。AMLのためのDLI後の寛解は、一般に、慢性期CMLで得た寛解ほど永続的ではなく、免疫応答の発生速度をしのぐ急速な腫瘍

50

成長速度を反映し得る。さらに、骨髄性形態の白血病に罹患したほとんどの患者は、関連する移植片対白血病（GVL）効果により患者が治癒する同種骨髄移植で処置することができない限り、この疾患で死亡する。しかしながら、移植片対宿主病（GVHD）および移植関連毒性によってこの処置が制限される。GVLはGVHDと分離可能であり、白血病関連抗原への免疫応答のターゲティングにより、GVHDを発症することなくGVLを患者に導入することが可能であると考えられる。

【0006】

したがって、より多くの抗原（すなわち、白血病抗原または他のがんに対する抗原）を測定することができる場合、および多数の最も強力な抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を得ることができる場合、ワクチンの標的または養子免疫療法で使用するための特異的T細胞の生成のための標的としての抗原を使用して、白血病特異的療法、乳がん特異的療法などを開発可能であろう。

10

【0007】

白血病関連抗原としてPR1（プロテイナーゼ3（P3）由来のHLA A2.1拘束性九量体）およびエラスターゼが同定された（Molldremら、2000；Molldremら、1996；Molldremら、1997；Molldremら、1999；Molldremら、2003（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））。PR1が白血病関連抗原であるという所見は、Burchertら（2002）およびScheibenbogenら（2002）によって個別に確認された。PR1特異的なCTLは、正常骨髄細胞ではなくAML、CMLおよびMDS細胞を死滅させる。最近の第I/I相ワクチン試験では、AML、CMLおよびMDSを有する患者にPR1ペプチドが投与され、PR1特異的なCTL免疫が患者の47%で誘発され、臨床（clinical）応答が26%で観察された。したがって、この抗原は、抗がん免疫応答をさらに調査するための、および新たな治療剤を開発するための興味深いプラットフォームを提供する。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Giralt and Kolb, Curr. Opin. Oncol., 8:96-102, 1996

30

【非特許文献2】Kolb and Holler, Curr. Opin. Oncol., 9:139-145, 1997

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

したがって、本発明によれば、HLA-A2受容体に結合されるとVLQELNVTV（配列番号45）に結合する単離および精製された抗体であって、配列番号3、4および5を含む重鎖CDRと、配列番号8、9および10を含む軽鎖CDRとを有する単離および精製された抗体が提供される。該抗体は、マウス抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、非抗体ペプチドもしくはポリペプチドセグメントに融合されているもの、診断試薬（例えば、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬）に連結されているもの、治療試薬（例えば、サイトカイン、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体Fc断片、TLRアゴニスト、CpG含有分子または免疫共刺激分子）に連結されているもの、ヒト化抗体または上記のもの組み合わせであり得る。該二重特異性抗体は、配列番号45に対する結合親和性に加えて、B細胞（CD19、CD20）、NK細胞、食細胞（CD16）または単球（CD14）に対する結合親和性を有し得る。特定のヒト化抗体は、配列番号38および36または配列番号40および36ならびに配列番号40および42の軽鎖/重鎖配列を有し得る。

40

【0010】

別の実施形態では、配列番号8、9および10によってコードされる軽鎖CDRをコー

50

ドする核酸が提供される。該核酸は、配列番号 7 もしくは配列番号 12 をコードし得るか、または配列番号 23 もしくは配列番号 25 をコードし得る。該核酸は、該軽鎖 CDR をコードする該核酸の 5' 側に位置するプロモーター配列、例えば真核細胞または原核細胞内で活性であるものをさらに含み得る。該核酸は、複製可能なベクター、例えば非ウイルスベクターまたはウイルスベクター内に配置され得る。該核酸は、前記 CDR コードセグメント間に配置されるリンカーコードセグメント、例えばヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフをコードするものをさらに含み得る。

【0011】

また別の実施形態では、配列番号 3、4 および 5 の配列を含む CDR を含む重鎖コードセグメントを含み、配列番号 8、9 および 10 の配列を含む CDR を含む軽鎖コードセグメントを含む人工抗体が提供される。該 CDR は、合成リンカーによって連結され得る。該重鎖は、非抗体ペプチドまたはポリペプチドセグメントに融合され得る。該抗体は、診断試薬、例えばフルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬に連結され得る。該抗体は、治療試薬、例えばサイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体 Fc 断片、好中球エラスターゼ、プロテイナーゼ 3、TLR アゴニスト、CpG 含有分子または免疫共刺激分子に連結され得る。該軽鎖は、配列番号 7、配列番号 12、配列番号 23 もしくは配列番号 25 を含み得、および/または該重鎖は、配列番号 36 もしくは配列番号 42 を含む。

10

【0012】

さらにまた別の実施形態では、抗体を作製する方法であって、(a)(i) 配列番号 3、4 および 5 に示される CDR を含む重鎖をコードする核酸配列、および (ii) 配列番号 8、9 および 10 に示される CDR を含む軽鎖をコードする核酸配列を宿主細胞に導入すること；ならびに (b) 前記軽鎖および重鎖の発現を支援する条件下で前記宿主細胞を培養することを含む方法が提供される。該方法は、前記抗体を単離することをさらに含み得る。該方法は、前記抗体を診断剤または治療剤に連結する工程をさらに含み得る。

20

【0013】

さらなる実施形態では、異常細胞を含有すると疑われるサンプル中の異常細胞を検出する方法であって、前記サンプルと、上記のとおり抗体または人工抗体とを接触させることを含む方法が提供される。該抗体または人工抗体は、診断剤（例えば、フルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬）にコンジュゲートされ得る。該抗体または人工抗体は、二次結合剤、例えば抗 Fc 受容体抗体を使用して検出され得る。該サンプルは、(a) 頭頸部、脳、食道、乳房、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、大腸、直腸、卵巣、子宮、子宮頸部、前立腺、睾丸もしくは皮膚組織由来の腫瘍組織、または (b) 体液、例えば血液、リンパ液、尿、骨髓穿刺液もしくは乳頭吸引液であり得る。該サンプルは、切除腫瘍床に由来し得る。該方法は、検出の存在、非存在または程度に基づいて処置決定をすること、例えば、PR-1 ベースのペプチドワクチンで前記被験体を処置する決定をすることをさらに含み得る。該方法は、原発性がん細胞、転移性がん細胞または骨髓異形成細胞を検出し得る。

30

【0014】

またさらなる実施形態では、がんを有する被験体を処置する方法であって、上記のとおり抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該抗体または人工抗体は、治療剤にコンジュゲートされ得る。該がんは、固形腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、脳腫瘍、食道腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍および胃腫瘍、小腸腫瘍、大腸腫瘍、直腸腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍、睾丸腫瘍または皮膚腫瘍であり得る。該がんは、血液がん、例えば白血病またはリンパ腫であり得る。該治療剤は、サイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体 Fc 断片、TLR アゴニスト、CpG 含有分子または免疫共刺激分子であり得る。該方法は、第 2 の抗がん療法、例えば遺伝子治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、毒素療法または手術を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該抗体または人工抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。該がんは、再発性がんまたは転移性がんであり得る。該抗

40

50

体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【0015】

さらにまたさらなる実施形態では、自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、上記のとおり抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該自己免疫疾患は、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ ストラウス症候群または全身性小血管血管炎であり得る。該抗体または人工抗体は、治療剤、例えば毒素またはアポトーシス誘導剤にコンジュゲートされ得る。該方法は、第2の抗自己免疫療法を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該第2の抗自己免疫療法は、抗炎症剤であり得る。該抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【0016】

H L A - A 2 がん細胞の補体媒介性細胞傷害を誘導する方法であって、前記がん細胞と、上記のとおり抗体または人工抗体とを接触させることを含む方法も提供される。

【0017】

本発明の別の実施形態は、異常細胞を含有すると疑われるサンプル中の異常細胞を検出する方法であって、前記サンプルと、上記のとおり抗体または人工抗体とを接触させることを含む方法を提供する。該抗体または人工抗体は、診断剤、例えばフルオロフォア、発色団、色素、放射性同位体、化学発光分子、常磁性イオンまたはスピントラッピング試薬にコンジュゲートされ得る。該抗体または人工抗体は、二次結合剤、例えば抗 F c 受容体抗体を使用して検出され得る。該サンプルは、(a) 頭頸部、脳、食道、乳房、肺、肝臓、脾臓、胃、小腸、大腸、直腸、卵巣、子宮、子宮頸部、前立腺、睾丸もしくは皮膚組織由来の腫瘍組織、または(b) 体液、例えば血液、リンパ液、尿、骨髓穿刺液もしくは乳頭吸引液であり得る。該サンプルは、切除腫瘍床に由来し得る。該方法は、検出の存在、非存在または程度に基づいて処置決定をすること、例えば、P R - 1 ベースのペプチドワクチンで前記被験体を処置する決定をすることをさらに含み得る。該方法は、原発性がん細胞、転移性がん細胞または骨髓異形成細胞を検出し得る。

【0018】

さらに別の実施形態では、がんを有する被験体を処置する方法であって、上記のとおり抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該抗体または人工抗体は、治療剤、例えばサイトカイン、毒素、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン、抗体 F c 断片、T L R アゴニスト、C p G 含有分子または免疫共刺激分子にコンジュゲートされ得る。該がんは、固形腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、脳腫瘍、食道腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍および胃腫瘍、小腸腫瘍、大腸腫瘍、直腸腫瘍、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、子宮頸部腫瘍、前立腺腫瘍、睾丸腫瘍または皮膚腫瘍であり得る。あるいは、該がんは、血液がん、例えば白血病またはリンパ腫であり得る。該がんは、再発性がんまたは転移性がんであり得る。該方法は、第2の抗がん療法、例えば遺伝子治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、毒素療法または手術を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該抗体または人工抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【0019】

またさらなる実施形態では、自己免疫疾患を有する被験体を処置する方法であって、上記のとおり抗体または人工抗体を前記被験体に投与することを含む方法が提供される。該自己免疫疾患は、ウェゲナー肉芽腫症、チャーグ ストラウス症候群または全身性小血管血管炎であり得る。該抗体または人工抗体は、治療剤、例えば毒素またはアポトーシス誘導剤にコンジュゲートされ得る。該方法は、第2の抗自己免疫療法、例えば抗炎症剤を前記被験体に提供することをさらに含み得る。該抗体は、前記被験体に複数回投与され得る。

【0020】

さらなる方法は、(i) 骨髓異形成疾患を有する被験体に上記抗体または人工抗体を投与することを含む、前記被験体を処置すること；および(i i) H L A - A 2 がん細胞と、上記抗体または人工抗体とを接触させることを含む、前記がん細胞の補体媒介性細胞傷害を誘導することを含む。

10

20

30

40

50

【0021】

Hu1-8F4およびHu2-8F4は、それぞれHu8F4-1およびHu8F4-2を指す。加えて、本文書における用語「Hu8F4」は、一般に、8F4(Hu8F4-1およびHu8F4-2)の両方のヒト化形態を指す。

【0022】

本明細書で使用される場合、「a」または「an」は、1つ以上を意味し得る。特許請求の範囲で使用されるように、文言「含む(comprising)」と組み合わせて使用される場合、文言「a」または「an」は、1つまたは複数を意味し得る。本明細書で使用される場合、「別の」は、少なくとも第2またはそれより多くを意味し得る。

【0023】

本発明の他の目的および特徴は、以下の詳細な記載から明らかとなる。しかしながら、この詳細な記載から本発明の精神および範囲内で様々な変更および修正が当業者に明らかとなるため、本発明の好ましい実施形態を示す一方で、詳細な記載および特定の実施例を、例示のみを目的として示すことが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0024】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに証明するために含まれる。本発明を、本明細書に提示される特定の実施形態の詳細な記載と組み合わせて1つ以上のこれらの図面を参照することによってより深く理解することができる。

【0025】

【図1】PR1/HLA-A2に対する8F4の特異性。PR1または単一アミノ酸修飾PR1類似体を負荷した組換えペプチド/HLA-A2モノマーによるELISA。最適な8F4結合に必須のPR1配列内のアミノ酸位置を決定するために、PR1内にアラニン置換(ALA1~ALA9)を含有するペプチドを負荷したHLA-A2モノマーを、漸増濃度でマイクロタイターウェルにコーティングした。次いで、一定濃度の8F4または対照抗体bb7.2(HLA-A*0201対立遺伝子特異的マウスIgG2aモノクローナル抗体)と共に、ウェルをインキュベートした。ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス抗体を使用してELISAによって、結合を測定した。8F4は、PR1を負荷したHLA-A2およびほとんどのPR1類似体に結合したが、ALA1類似体(ペプチドの1位のバリンをアラニンで置換したもの)に対する結合は有意に少なく、対照ペプチドpp65/HLA-A2には結合しなかった。対照抗体bb7.2は、PR1およびpp65を負荷したHLA-A2に等しく十分に結合した。

【0026】

【図2】PR1/HLA-A2に対する8F4モノクローナル抗体の親和性。BIAcore3000を使用して表面プラズモン共鳴によって、8F4およびbb7.2抗体へのペプチド/HLA-A2の結合の親和性測定を実行した。試験抗体を抗マウス抗体コーティング表面上に捕捉した。分析物のペプチド/HLA-A2を100nMに希釈し、抗体コーティング表面に対する結合について二連で試験した。ランニング緩衝液としてPBS、0.005%Tween-20、0.1mg/ml BSA、pH7.4を使用して、分析を25℃で実施した。結合親和性を求めるために、(オレンジ色の直線として図中に示されている)一次速度モデルに対して実験データをフィッティングし、続いて、8F4およびbb7.2の K_D を決定した。

【0027】

【図3】HLA-A2+AMLに対する8F4の特異性。8F4および細胞表面抗体を用いた、白血病および正常PBMCのマルチパラメータフローサイトメトリー。aquaを使用して、AML患者および正常ドナー由来のPBMCを生細胞にゲーティングをかけ、次いで、(ALEXA Fluor 647をコンジュゲートした)8F4、(FITCをコンジュゲートした)bb7.2および表面表現型抗体を用いて、CD13およびCD33について染色し、フローサイトメトリーによって分析した。以下のゲーティング戦略を使用した：最初に、CD13およびCD33発現についてaquaによる生細胞を分析し

10

20

30

40

50

、PR1/HLA-A2(8F4)発現および全HLA-A2発現(bb7.2)について二重陽性細胞を分析した。HLA-A2陰性AML対照細胞を使用して、陰性象限のゲーティングを確立した。

【0028】

【図4】8F4抗体は、AMLの補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導する。標的細胞を洗浄し、細胞 5×10^5 個/mlの濃度で10-RPMI/HEPESに再懸濁した。20マイクロリットル(μ l)の抗体および100 μ lの細胞を混合し、96ウェルプレート中で37℃に加熱し、次いで、20 μ lの氷冷標準ウサギ補体(Cedarlane, Ontario, Canada)を添加し、37℃で90分間インキュベートした。Cytotox Glo細胞傷害アッセイ(Promega)を使用して、細胞傷害を決定した。抗体特異的CDC(AB-CDC)を以下のように計算した： $AB-CDC = ((L_{C+AB} - L_{C-AB}) / (L_{max} - L_s)) \times 100\%$ (式中、 L_{C+AB} は、補体+抗体の存在下における標的細胞溶解であり、 L_{T+C} は、補体のみ存在下における溶解であり、製造業者の指示にしたがって、細胞傷害剤ジギトニンを細胞に添加する前後に、 L_{spon} および L_{max} を測定した)。(図4A)20 μ gの8F4と共にインキュベートすることにより、HLA-A2+AML患者から採取したPBMCおよび白血球除去法(LP)による細胞の補体依存性細胞傷害が誘導されたが、HLA-A2陰性AML由来のPBMCまたはHLA-A2+正常ドナー由来のPBMCの対照サンプルは溶解されなかった。(図4B)HLA-A2+AMLの8F4媒介性溶解は抗体用量依存的であったのに対して、アイソタイプ対照抗体(IgG2aマウス抗KLH)およびヒト静脈内免疫グロブリン(市販のIVIg)は、AMLの溶解を示さなかった。

10

20

【0029】

【図5】正常PBMCではなくAMLに対する8F4の特異性。PR1およびHLA-A2についての、AML、PBMCおよびT2細胞の表面染色。抗PR1/HLA-A2抗体(8F4)-alexa-647(赤色)および抗HLA-A2-FITCコンジュゲート(緑色)で細胞を染色し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、次いで、共焦点顕微鏡検査を使用して研究した。陽性対照としてPR1ペプチド(20 μ g/ml)をT2細胞にパルスし、陰性対照ペプチドとしてCMVペプチドpp65(20 μ g/ml)をパルスした。PR1/HLA-A2発現は、AMLおよびPR1パルスT2細胞の細胞表面上では明白であるが、HLA-A2+PBMCまたはpp65パルスT2細胞上ではその証拠がない。Dapi(青色)を核染色に使用した。

30

【0030】

【図6】8F4抗体は、インビボモデルにおけるAMLの生着を防止する。原発性HLA-A2+白血病細胞(10^6 個)を洗浄し、PBS(100 μ l)に再懸濁し、8F4またはアイソタイプ対照抗体(20 μ g)と混合し、200cGy照射HLA-A2+トランスジェニックNOD/SCIDマウスに静脈内注射した。2週間後、マウスを屠殺し、解剖し、組織をホモジナイズし、ヒトおよびマウス細胞表面マーカーを用いてフローサイトメトリーによって、白血病細胞の存在について分析した。マウス骨髄(BM)から単離した細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。対照(PBS処置)動物、およびAML細胞+8F4(AML+8F4抗体)を投与した実験動物では、ヒト白血病細胞がBM中で示されなかった。対照的に、AML細胞+対照抗体(AML+アイソタイプ対照)を投与した動物では、注入したAMLと同じ表現型を有するヒトCD33+CD45+細胞が骨髄中で示された。

40

【0031】

【図7】抗PR1/HLA-A2抗体を得るための免疫戦略。MHCクラスI分子の概略図。MHCクラスIは、重鎖および β 2ミクログロブリン鎖からなる。ペプチド抗原は、鎖の1および2ヘリックスドメインが隣接するMHC-Iの溝に結合する。

【0032】

【図8A】8F4抗体は、HLA-A2 Tg異種移植モデルにおけるヒトAMLの生着を防止する。原発性HLA-A2+AML細胞(10^6 個)を洗浄し、PBS(250 μ

50

1) に再懸濁し、 $20\ \mu\text{g}$ の8F4またはアイソタイプ対照抗体と混合し、垂致死照射 ($200\ \text{cGy}$) HLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスに静脈内注射した。示されている時点において、組織化学(図8A)およびフローサイトメトリー(図8B)によって、白血病の存在について末梢血、骨髄および組織を分析した。AML非移植の照射マウスおよびAML細胞前移植の照射マウスをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。(図8A)AML細胞に加えて8F4を注射した後の実験マウス(左のパネル)、AML細胞に加えてアイソタイプ対照抗体を注射した後の実験マウス(iso、中央のパネル)、およびAML非移植の対照マウス(右のパネル)の組織におけるAML浸潤。(図8B)非移植対照マウスおよび実験8F4処置マウスの骨髄(上の2つのパネル)および末梢血(下の2つのパネル)では、AML細胞(前移植を示す、左のパネル)は検出されなかった。アイソタイプマッチ対照抗体(iso)と混合したAML細胞を投与したマウスでは、AML移植の2または4週間後にAML1およびAML5の生着が示された。マウス細胞特異的マーカー(mCD45)、3~6つのヒトマーカー(CD45、CD13、CD33、CD34、CD38、HLA-DR)およびLive/Dead Fixable Aqua (Invitrogen)を含む拡張パネルを、AML生着のフローサイトメトリー分析に使用した。すべてのプロットは、mCD45⁺生細胞を示す。

【図8B】8F4抗体は、HLA-A2 Tg異種移植モデルにおけるヒトAMLの生着を防止する。原発性HLA-A2+AML細胞(10^6 個)を洗浄し、PBS($250\ \mu\text{l}$)に再懸濁し、 $20\ \mu\text{g}$ の8F4またはアイソタイプ対照抗体と混合し、垂致死照射 ($200\ \text{cGy}$) HLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスに静脈内注射した。示されている時点において、組織化学(図8A)およびフローサイトメトリー(図8B)によって、白血病の存在について末梢血、骨髄および組織を分析した。AML非移植の照射マウスおよびAML細胞前移植の照射マウスをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。(図8A)AML細胞に加えて8F4を注射した後の実験マウス(左のパネル)、AML細胞に加えてアイソタイプ対照抗体を注射した後の実験マウス(iso、中央のパネル)、およびAML非移植の対照マウス(右のパネル)の組織におけるAML浸潤。(図8B)非移植対照マウスおよび実験8F4処置マウスの骨髄(上の2つのパネル)および末梢血(下の2つのパネル)では、AML細胞(前移植を示す、左のパネル)は検出されなかった。アイソタイプマッチ対照抗体(iso)と混合したAML細胞を投与したマウスでは、AML移植の2または4週間後にAML1およびAML5の生着が示された。マウス細胞特異的マーカー(mCD45)、3~6つのヒトマーカー(CD45、CD13、CD33、CD34、CD38、HLA-DR)およびLive/Dead Fixable Aqua (Invitrogen)を含む拡張パネルを、AML生着のフローサイトメトリー分析に使用した。すべてのプロットは、mCD45⁺生細胞を示す。

【0033】

【図9】保存されたPR1配列がHLA-A2を発現するマウスの造血細胞上で発現しているため、8F4は、HLA-A2トランスジェニックNOD/SCIDにおいて一過性(21日間)好中球減少症を誘導する。 $200\ \mu\text{g}$ ($10\ \text{mg}/\text{kg}$)の8F4またはアイソタイプ対照AbをHLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスに注射した。これらの動物では、内因性PR1を提示することが示された。9日後、骨髄細胞を採取し、マウス抗原に対するmAb(B220-PE、Gr-1-PB、CD11b-APC、F4/80-PE-Cy7、CD3-FITCおよびLIVE/DEAD Fixable Aqua)で染色し、フローサイトメトリーによって検査した。(図9A)骨髄(左のパネル)の分散プロファイルでは、顆粒球の減少が明白であった。8F4処置動物の骨髄では、Gr-1^{lo}未成熟好中球が存在していたが、Gr-1^{hi}成熟好中球はより少数であった(中央のパネル)。加えて、8F4処置動物では、単球(SSC10⁺CD11b⁺;右のパネルの右下ゲート)が減少していた。(図9B)HLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスでは、8F4($5\ \text{mg}/\text{kg}$)の静脈内注射により、循環成熟顆粒球、マクロファージおよび単球の絶対数が一過性に減少した。処置の3週間後において、すべての集団が依然として存在している。図9Aに示されているゲートを使用して、各細胞型の

10

20

30

40

50

頻度を生細胞の割合として決定した。エラーバーは、 $n =$ 動物2匹/群の標準偏差である。3回のうちの1回の代表的な実験を示す。(図9C) 200 μ g (10 mg/kg) の8F4を注射した7日後のHLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスの肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓または脳では、有意な病理学的変化の証拠がなかった。2匹のマウス由来の代表的な組織のH&E切片を示す。

【0034】

【図10】ヒトCD34+細胞が富化された臍帯血をNOD/SCIDマウスに移植した後において、8F4は、確立したヒト造血細胞の一過性白血球減少症を誘導する。Histopaque 1077を使用して新鮮HLA-A2+臍帯血(CB)単位(50~150 ml)をフィコール処理(ficollled)、PBSで洗浄し、次いで、CliniMACS緩衝液(PBS (pH 7.2) / 1mM EDTA中0.5% HSA, Miltenyi)で洗浄した。10⁸個の細胞を300 mlのMACS緩衝液に再懸濁し、100 mlのCD34 Microbeads (Miltenyi)と混合し、4で30分間インキュベートし、洗浄した。2本のLSカラム(Miltenyi)を使用することによって、磁気ビーズで標識したCD34⁺細胞を精製した。カラムからCD34⁺細胞を溶出し、計数し、照射(400 rad) NOD/SCIDマウスに静脈内注射した(細胞1~2.5 \times 10⁶個/マウス)。対照マウスCB1~5には、CB細胞を投与しなかった。(図10A)移植の4週間後から開始して、マウスから末梢血を毎週または隔週で採取し、マウスCD45、ヒトCD45およびHLAマーカーを用い、FACSを使用することによって、臍帯血の生着をモニタリングした。移植の9~12週間後、1週間の注射間隔で、20 μ g (1 mg/kg)の8F4をマウスに2回静脈内注射した(点線矢印)。(図10B)2回目の8F4注射の4週間後、マウスを屠殺した。上記のように、ヒト細胞の生着について、血液、脾臓および骨髄を分析した。

【0035】

【図11】pCh8F4、pHu8F4-1、pHu8F4-2およびpHu8F4-2-AA(共に発現ベクター)の概略構造。上部のSalI部位から時計回りに進んで、プラスミドは、抗体重鎖遺伝子の転写を開始させるヒトサイトメガロウイルス(CMV)主要前初期プロモーター/エンハンサー(CMVプロモーター)から始まる重鎖転写単位を含有する。CMVプロモーターがあり、それに続いてVHエキソンと、ヒトガンマ-1重鎖定常領域(イントロンが介在してCH1、ヒンジ、CH2およびCH3エキソンを含む)を含有するゲノム配列があり、そしてCH3エキソンの後ろにポリアデニル化部位がある。重鎖遺伝子配列の後ろから軽鎖転写単位がCMVプロモーターで始まり、それに続いてVLエキソンと、ヒトカッパ鎖定常領域エキソン(CL)(その前にイントロンの一部がある)を含有するゲノム配列があり、そしてCLEキソンの後ろにポリアデニル化部位がある。軽鎖遺伝子に続いて、SV40初期プロモーター(SV40プロモーター)、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(gpt)があり、そしてSV40ポリアデニル化部位(SV40ポリ(A)部位)を含有するセグメントがある。最後に、プラスミドは、細菌複製起点(pUC ori)およびベータ-ラクタマーゼ遺伝子(-ラクタマーゼ)を含むプラスミドpUC19の一部を含有する。

【0036】

【図12】8F4 VH、ヒト化8F4(Hu8F4)VHおよびヒトアクセプターU96282 VHのアミノ酸配列のアラインメント。アミノ酸残基を1文字表記で示す。配列の上の数字は、Kabataら(1991)による位置を示す。Kabataら、(1991)によって定義されるCDR配列に下線が付されている。図中では、U96282 VHのCDR残基が省略されている。

【0037】

【図13】8F4 VL、2バージョンのヒト化8F4 VL(Hu8F4 VL1およびVL2)およびヒトアクセプターAY043146 VLのアミノ酸配列のアラインメント。アミノ酸残基を1文字表記で示す。配列の上の数字は、Kabataら(1991)による位置を示す。Kabataら、(1991)によって定義されるCDR配列に下線が

10

20

30

40

50

付されている。Hu8F4 VL1の下線付残基は、CDRと接触すると予測されたものであり、Hu8F4 VL1のこの位置では、対応するマウス残基を保持した。図中では、AY043146 VLのCDR残基が省略されている。

【0038】

【図14】精製8F4抗体のSDS PAGE分析。還元条件下の4~20%SDS PAGEゲル上で抗体(各5 μ g)を泳動した。InvitrogenのSeeBluePlus2 Prestained Standard (Cat# LC5925)を分子量標準として使用した(レーン1、7および8)。サンプル:8F4.3.3(レーン2)、8F4-4(レーン3)、Ch8F4(レーン4)、Hu8F4-1(レーン5)、Hu8F4-2ロット9/9/10(レーン6)、Hu8F4-2ロット1/23/11(レーン9)およびHu8F4-2-AA(レーン10)。

10

【0039】

【図15】PR-1/HLA-A2に対するCh8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2およびHu8F4-2-AAの結合のELISA分析。PR-1/HLA-A2に対する結合について、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2およびHu8F4-2-AAを様々な濃度(1 μ g/mlから開始して3倍系列希釈)で試験した。

【0040】

【図16】Hu8F4結合の特異性および作用機序。(図16A)特異性アッセイ。(図16B)親和性アッセイ。(図16C)CDCアッセイ。

20

【0041】

【図17】Hu8F4による処置は、確立したAMLを排除する。アッセイにより、抗体処置の3週間前に投与したAML移植片の生着率を測定する。

【0042】

【図18】8F4は、可逆的汎血球減少症を引き起こす:SCIDマウスにおける正常造血前駆細胞に対する効果。

【0043】

【図19】8F4は、可逆的汎血球減少症を引き起こす:免疫適格マウスにおける正常血液細胞に対する効果。

【0044】

【図20】8F4は乳がん腫瘍の成長を遅延させ、生存を延長させる。(図20A)231 BrCA異種移植腫瘍における腫瘍関連好中球。(図20B)原発性腫瘍モデル。(図20C)転移性腫瘍モデル。

30

【0045】

【図21】固形腫瘍細胞系は、NEおよびP3を取り込む。固形腫瘍の代表的な細胞系を、(図21A)NE(10mg/ml)または(図21B)P3(10mg/ml)と共にインキュベートし、次いで透過処理し、抗NEまたは抗P3 Abで染色した。データは、2回の独立した実験の三連のウェルから、NEまたはP3の取り込みが非パルス細胞と対比して平均6SEM倍増加していることを表している。MDA-MB-231、乳癌;MIA PaCa-2、膵臓癌;Mel624およびMel526、黒色腫;OVCA R3、卵巣腺癌;SW-620、結腸腺癌。

40

【0046】

【図22】乳がんは、P3を内因的に発現しない。(図22A)乳がん細胞系および(図22B)原発性乳がん組織からmRNAを抽出した。P3プライマーを使用してRT-PCR実施し、それは、乳がん細胞系および原発性乳がんでは、P3 mRNA発現が欠如していることを示している。JurkatおよびHL-60白血病細胞系をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。外科切除時点で患者から得られた腫瘍に対してLCMを実施することによって、患者組織由来の原発性乳がん細胞(サンプル乳房1~3)を得た。マンマグロビン-1(MGB-1)を使用して、乳がん細胞の分析を確認した。-アクチンおよびGAPDHをローディング対照として使用した。(図22C)免疫プロットは、5つの異なる乳がん細胞系由来のWCLでは、P3タンパク質が欠如しているこ

50

とを実証している。20 mgのタンパク質をゲルにロードした。精製P3 (5 mg)を陽性対照として使用し、GAPDHをローディング対照として使用した。(図22D)患者乳がん組織(乳房3)にP3が存在しないことを示す免疫組織化学。左のパネル、低分化癌と混合好中球を示すH&E切片(元の倍率3200)。右のパネル、P3の免疫組織化学的染色は、混合好中球におけるP3の染色が陽性(茶色)であることを示すが、乳がん細胞では示されない。挿入図(元の倍率3400)は、好中球を貪食するまれな腫瘍細胞を示す。画像は両方とも同じ患者から撮影したものであり、5つの組織の代表的なものである。矢頭は好中球を示す。

【0047】

【図23】P3は乳がん細胞系によって取り込まれ、リソソーム区画に局在する。(図23A)MDA-MB-231、MCF-7およびMCF-7-HER18細胞系を可溶性P3 (10 mg/ml)と共に1時間、4時間および24時間インキュベートし、次いで、抗P3 Abで細胞内染色した。三連の実験群についてMFIを測定し、非パルス細胞のMFIに対して正規化した。非パルス細胞と対比したMFIの増加倍率をy軸上にプロットする。データは平均6 SEMであり、2回の独立した実験の代表的なものである。(図23B)MDA-MB-231細胞を漸増用量の可溶性P3またはOVA (ova)と共にインキュベートし、それぞれ抗P3または抗OVA Abを使用してフローサイトメトリーによって、P3またはOVAの細胞内取り込みについて分析した。データは、二連の実験からの平均6 SEMである。(図23C)MDA-MB-231細胞を可溶性P3 (10 mg/ml)と共に培養し、次いで、P3 (赤色)およびLAMP-2 (緑色)について細胞内染色した。オーバーレイ画像(黄色)によって示されているように、共焦点顕微鏡画像は、P3が、取り込みの4時間後にリソソーム区画に局在することを実証している。DAPIの使用により、核は青色に見える。スケールバー、5 mm。

【0048】

【図24-1】P3の取り込みならびにP3およびNEの交差提示は、PR1-CTLおよび抗PR1/HLA-A2による死滅化に対する乳がんの感受性を増加させる。(図24A)MDA-MB-231乳がん細胞を可溶性P3、照射PMNまたはPBMCと共に4時間インキュベートした。細胞を透過処理し、抗P3 Abで染色し、フローサイトメトリーによって分析した。細胞関連の取り込みについて、フローサイトメトリーで認められた光散乱により、PBMC、PMNおよびMDA-MB-231細胞間で明確な差異が示された。PBMCおよびPMNのみをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。Prism 5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した(*p, 0.05)。データは、二連の実験からの平均6 SEMである。(図24B)MDA-MB-231乳がん細胞を、漸増時点で(at increasing time points)可溶性P3またはNE (10 mg/ml)と共に培養し、次いで、PR1/HLA-A2発現について分析した。二連の実験から、PR1/HLA-A2のMFIは、非パルス細胞と対比して平均6 SEM倍増加していることが示されている。Prism 5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した(*p = 0.01, **p, 0.0001)。(図24C~D)NEまたはP3 (10 mg/ml)および抗原(Ag)提示阻害剤ブレフェルジンAまたはラクタシスチンを含む媒体中で、MDA-MB-231細胞を24時間培養した。次いで、PR1/HLA-A2発現について、細胞を分析した。代表的な実験の二連のウェルから、PR1/HLA-A2のMFIの平均6 SEMを示す。Prism 5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した(*p, 0.01, **p, 0.0001)。(図24E)P3またはNE (10 mg/ml)を含む媒体中で、MDA-MB-231細胞を一晩培養し、カルセイン-AMを負荷し、次いで、PR1-CTLと共に4時間共培養した。放出されたカルセイン-AMを測定することによって、細胞傷害を決定した。NEパルスまたはP3パルス細胞は、非パルスMDA-MB-231細胞と対比して高い死滅化を示す。PR1パルスT2細胞および非パルスT2細胞をそれぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウ

10

20

30

40

50

エルからの平均6SEMである。(図24F)MDAMB-231細胞をNE(10mg/ml)またはP3(10mg/ml)と共に24時間培養した。次いで、細胞を抗PR1/HLA-A2(8F4)Abと共に60分間インキュベートし、次いで、補体を添加した。カルセイン-AMの放出を使用して補体依存性細胞傷害を測定し、8F4 AbによるNEパルスまたはP3パルスMDA-MB-231細胞の特異的死滅化を示す。細胞傷害データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均6SEMである。Prism5.0ソフトウェアを使用して、対応のないt検定を実施した(*p, 0.05)。

【図24-2】P3の取り込みならびにP3およびNEの交差提示は、PR1-CTLおよび抗PR1/HLA-A2による死滅化に対する乳がんの感受性を増加させる。(図24A)MDA-MB-231乳がん細胞を可溶性P3、照射PMNまたはPBMCと共に4時間インキュベートした。細胞を透過処理し、抗P3 Abで染色し、フローサイトメトリーによって分析した。細胞関連の取り込みについて、フローサイトメトリーで認められた光散乱により、PBMC、PMNおよびMDA-MB-231細胞間で明確な差異が示された。PBMCおよびPMNのみをそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。Prism5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した(*p, 0.05)。データは、二連の実験からの平均6SEMである。(図24B)MDA-MB-231乳がん細胞を、漸増時点で(at increasing time points)可溶性P3またはNE(10mg/ml)と共に培養し、次いで、PR1/HLA-A2発現について分析した。二連の実験から、PR1/HLA-A2のMFIは、非パルス細胞と対比して平均6SEM倍増加していることが示されている。Prism5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した(*p=0.01、**p, 0.0001)。(図24C~D)NEまたはP3(10mg/ml)および抗原(Ag)提示阻害剤プレフェルジンAまたはラクタシスチンを含む媒体中で、MDA-MB-231細胞を24時間培養した。次いで、PR1/HLA-A2発現について、細胞を分析した。代表的な実験の二連のウェルから、PR1/HLA-A2のMFIの平均6SEMを示す。Prism5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した(*p, 0.01、**p, 0.0001)。(図24E)P3またはNE(10mg/ml)を含む媒体中で、MDA-MB-231細胞を一晩培養し、カルセイン-AMを負荷し、次いで、PR1-CTLと共に4時間共培養した。放出されたカルセイン-AMを測定することによって、細胞傷害を決定した。NEパルスまたはP3パルス細胞は、非パルスMDA-MB-231細胞と対比して高い死滅化を示す。PR1パルスT2細胞および非パルスT2細胞をそれぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均6SEMである。(図24F)MDAMB-231細胞をNE(10mg/ml)またはP3(10mg/ml)と共に24時間培養した。次いで、細胞を抗PR1/HLA-A2(8F4)Abと共に60分間インキュベートし、次いで、補体を添加した。カルセイン-AMの放出を使用して補体依存性細胞傷害を測定し、8F4 AbによるNEパルスまたはP3パルスMDA-MB-231細胞の特異的死滅化を示す。細胞傷害データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均6SEMである。Prism5.0ソフトウェアを使用して、対応のないt検定を実施した(*p, 0.05)。

【0049】

【図25】乳がんおよび黒色腫患者では、PR1/HLA-A2およびPR1-CTLが検出される。(図25A)抗PR1/HLA-A2(8F4)-647(赤色)および抗CK7)-FITC(緑色)で切除HLA-A2+患者乳がん組織(乳房1および4)を染色し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡検査を使用してイメージングした。8F4とCK7による共染色によって示されているように、乳がん細胞ではPR1/HLA-A2が発現しているようである。DAPI(青色)を使用して、細胞核を染色した。(図25B)抗CD45-647(赤色)(左のパネル)または抗CK7-FITC(緑色)および8F4-647(赤色)(右のパネル)で切除HLA-A2+乳がん組織由来の連続切片を染色し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡検査を使用してイメージングした。最小の白血球

10

20

30

40

50

(CD452)を有する領域では、乳がん細胞(8F4+/CK7+)によってPR1/HLA-A2が発現されており、それにより、乳がん細胞によるPR1/HLA-A2発現が裏付けられる。DAPI(青色)を使用して、細胞核を染色した。(図25C)箱髟図は、乳がん(n=11)、黒色腫(n=7)を有するHLA-A2+患者および健常(n=9)HLA-A2+ドナー由来の末梢血におけるPR1-CTLを示す。Prism5.0ソフトウェアを使用して、マン-ホイットニーU検定を実施した(*p, 0.05)。(図25D)8F4-647(赤色)および抗MITF-FITC(緑色)で切除HLA-A2+(黒色腫1)およびHLA-A22(黒色腫2)患者組織を染色し、次いで、共焦点レーザー顕微鏡検査を使用してイメージングした。8F4とMITFによる共染色によって示されているように、HLA-A2+黒色腫サンプル(黒色腫1)ではPR1/HLA-A2が発現しているようである。DAPI(青色)を使用して、細胞核を染色した。スケールバー、20mm。

【0050】

【図26-1】黒色腫細胞によるP3およびNEの交差提示は、PR1-CTLに対する感受性を増加させる。(図26A)原発性黒色腫患者サンプルにおけるNE(茶色)およびMITF(ピンク色)の二重染色または(図26B)原発性黒色腫患者サンプルにおけるP3(茶色)およびMITF(ピンク色)の二重染色は、黒色腫では、NEおよびP3が欠如していることを示している。画像は、元の倍率3100で撮影したものである。挿入図(元の倍率3400)は、分散したNEまたはP3陽性細胞を示しており、これらは炎症細胞である可能性が高い。(図26C)黒色腫細胞系では、NEおよびP3が存在しないことを示すウエスタンプロット。U-937白血病細胞系をNEおよびP3の陽性対照として使用した。チューブリンをローディング対照として使用した。M=分子量(m.w.)マーカー。(図26D~E)526 HLA-A2+黒色腫細胞系を漸増時点で可溶性NE(10mg/ml)またはP3(10mg/ml)と共に培養し、次いで、(図26D)NEおよびP3の取り込みならびに(図26E)交差提示(すなわち、PR1/HLA-A2発現)について分析した。非パルス細胞と対比した、NEまたはP3(図26D)またはPR1/HLA-A2(図26E)のMFIの増加倍率をy軸上に示す。Prism5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてテューキー検定を実施した(**p=0.0001、*p, 0.05)。データは、二連の実験からの平均6SEMを表す。(F)カルセイン-AM細胞傷害アッセイは、NE(10mg/ml)およびP3(10mg/ml)を24時間パルスした526 HLA-A2+黒色腫細胞系のPR1-CTLによる死滅化を、非パルス(Unp)Me1526と対比して示す。非パルス(T2 Unp)およびPR1パルス(T2 PR1)T2細胞をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均6SEMである。Prism5.0ソフトウェアを使用して、対応のないt検定を実施した(*p, 0.05)。

【図26-2】黒色腫細胞によるP3およびNEの交差提示は、PR1-CTLに対する感受性を増加させる。(図26A)原発性黒色腫患者サンプルにおけるNE(茶色)およびMITF(ピンク色)の二重染色または(図26B)原発性黒色腫患者サンプルにおけるP3(茶色)およびMITF(ピンク色)の二重染色は、黒色腫では、NEおよびP3が欠如していることを示している。画像は、元の倍率3100で撮影したものである。挿入図(元の倍率3400)は、分散したNEまたはP3陽性細胞を示しており、これらは炎症細胞である可能性が高い。(図26C)黒色腫細胞系では、NEおよびP3が存在しないことを示すウエスタンプロット。U-937白血病細胞系をNEおよびP3の陽性対照として使用した。チューブリンをローディング対照として使用した。M=分子量(m.w.)マーカー。(図26D~E)526 HLA-A2+黒色腫細胞系を漸増時点で可溶性NE(10mg/ml)またはP3(10mg/ml)と共に培養し、次いで、(図26D)NEおよびP3の取り込みならびに(図26E)交差提示(すなわち、PR1/HLA-A2発現)について分析した。非パルス細胞と対比した、NEまたはP3(図26D)またはPR1/HLA-A2(図26E)のMFIの増加倍率をy軸上に示す。P

10

20

30

40

50

Prism 5.0ソフトウェアを使用して、ANOVAとそれに続いてチューキー検定を実施した (** $p = 0.0001$ 、* $p < 0.05$)。データは、二連の実験からの平均6 SEMを表す。(F)カルセイン-AM細胞傷害アッセイは、NE(10 mg/ml)およびP3(10 mg/ml)を24時間パルスした526 HLA-A2+黒色腫細胞系のPR1-CTLによる死滅化を、非パルス(Unp)Me1526と対比して示す。非パルス(T2 Unp)およびPR1パルス(T2 PR1)T2細胞をそれぞれ陰性対照および陽性対照として使用した。データは、代表的な実験の二連のウェルからの平均6 SEMである。Prism 5.0ソフトウェアを使用して、対応のないt検定を実施した (* $p < 0.05$)。

【発明を実施するための形態】

10

【0051】

例示的な実施形態の説明

PR-1自己ペプチド(VLQELNVTV;配列番号45)は、白血病細胞膜で発現されるHLA-A*0201においてCD8+細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によって認識されることが示されており、PR1特異的CTLは骨髄性白血病細胞を特異的に溶解するが、正常骨髄細胞を溶解しない。AML、CMLおよびMDSを有するHLA-A2+患者にPR1ペプチドをワクチン接種することにより、患者の58%でPR1-CTL免疫が誘導され、患者66人中13人(20%)で客観的臨床応答が誘導された。これらの結果は有望であるが、高全身腫瘍組織量は依然として、ワクチン接種の成功を妨げる障害である。

20

【0052】

PR1ペプチドは、骨髄性白血病細胞の表面上においてのみ十分な量で発現しており、正常骨髄細胞上では発現していないので、本発明者らは、PR1/HLA-A*0201にターゲティングされる抗体であって、骨髄性白血病を有する患者を治療的に処置するのに使用され得るか、またはどの患者が、PR1ベースの免疫療法、例えばワクチンもしくは養子T細胞移植に対して感受性であり得るかを同定するのに使用され得る抗体を開発しようとした。HLA-A2+は、最も一般的に発現されているHLA対立遺伝子であるので(一般的な白人集団の40%)、T細胞エピトープに関する抗体ベースの治療法は新規なものであり、幅広く適用され得る。組換えPR1/HLA-A*0201モノマーで免疫適格BALB/cマウスを免疫することによって、複合PR1/HLA-A*0201

30

【0053】

加えて、8F4は、HLA-A2+原発性ヒト白血病の用量依存的な補体媒介性細胞傷害(CDC)を誘導したが、正常骨髄細胞では誘導しなかった。重要なことに、8F4抗体は、動物への養子移植時に1回だけ抗体に曝露するHLA-A2トランスジェニックNOD/SCID動物モデルにおけるヒトAMLの生着を特異的に防止した。加えて、乳がん細胞では、P3およびNEが発現していないという事実にもかかわらず、8F4は乳がん腫瘍の成長を遅延させ、生存を延長させた。総合すると、これらの結果は、重要なT細胞標的抗原である細胞膜結合PR1/HLA-A*0201エピトープに対する特異性を有する抗体の作製が、ヒト白血病および固形腫瘍を特異的にターゲティングおよび排除することを示している。

40

【0054】

I. 定義

語句「単離された」または「生物学的に純粋な」は、材料であって、その天然の状態で見出されるとおり該材料に通常付随する成分を、実質的にまたは本質的に含まない材料を

50

指す。したがって、本発明によって単離されたペプチドは、好ましくは、そのインサイチュ環境でペプチドと通常会合した材料を含まない。

【0055】

「主要組織適合性複合体」または「MHC」は、生理学的免疫応答を担う細胞相互作用の制御で役割を果たす遺伝子のクラスターである。ヒトでは、MHC複合体は、HLA複合体としても公知である。MHC複合体およびHLA複合体の詳細な説明については、Paul, 1993を参照のこと。

【0056】

「ヒト白血球抗原」または「HLA」は、ヒトクラスIまたはクラスII主要組織適合性複合体(MHC)タンパク質である(例えば、Stites, 1994を参照のこと)。

10

【0057】

本明細書で使用される場合、「HLAスーパータイプ(super type)またはファミリー」は、共有するペプチド結合特異性に基づいて分類されたHLA分子セットを記載する。特定のアミノ酸モチーフを保有するペプチドに対していくらか類似の結合親和性を共有するHLAクラスI分子を、HLAスーパータイプに分類する。HLAスーパーファミリー、HLAスーパータイプファミリー、HLAファミリーおよびHLA xx様スーパータイプ分子(xxは、特定のHLA型を示す)という用語は、同義語である。

【0058】

用語「モチーフ」は、特定のHLA分子によって認識される、定義された長さのペプチド、通常、クラスI HLAモチーフについては約8~13アミノ酸のペプチドおよびクラスII HLAモチーフについては約6~約25アミノ酸のペプチド中の残基パターンを指す。ペプチドモチーフは、典型的には、各ヒトHLA対立遺伝子によってコードされる各タンパク質で異なり、一次および二次アンカー残基のパターンが異なる。

20

【0059】

「異常細胞」は、非定型的な成長、非定型的な部位における典型的な成長、または非定型的な標的に対する典型的な作用を含む、その細胞型に典型的な特徴を有すると考えられる任意の細胞である。このような細胞としては、がん細胞、良性過形成もしくは形成異常細胞、炎症細胞または自己免疫細胞が挙げられる。

【0060】

II . PR - 1およびHLA拘束

30

A . PR - 1

PR - 1自己ペプチド(VLQELNVTV ; 配列番号45)は、その両方が白血病で異常発現しているプロテイナーゼ3(P3)および好中球エラストラーゼ(NE)に由来する。それは、白血病細胞膜で発現されるHLA - A * 0201においてCD8 + 細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によって認識されることが示されている。PR1特異的CTLは、骨髄性白血病(急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)および骨髄異形成症候群(MDS)を含む)細胞を特異的に溶解するが、正常骨髄細胞を溶解しない。以前に、本発明者らは、モンタニドISA - 51中のPR - 1ペプチドおよびGM - C

40

【0061】

B . HLA - A2

ヒト白血球抗原系(HLA)は、ヒトにおける主要組織適合性複合体(MHC)の名称である。この超遺伝子座(super locus)は、ヒトにおける免疫系機能に関係する多数の遺伝子を含む。この遺伝子群は第6染色体上に存在し、細胞表面抗原提示タンパク質および多くの他の遺伝子をコードする。特定の遺伝子によってコードされるこれらのタンパク質は、臓器移植における因子として歴史的に発見された結果、抗原としても公知である。主要HLA抗原は、免疫機能に必須の因子である。様々なクラスが様々な機

50

能を有する。

【0062】

H L AクラスI抗原（A、BおよびC）は、細胞内由来のペプチドを提示する（存在する場合には、ウイルスペプチドを含む）。これらのペプチドは、リソソーム（lysosome）で分解される消化タンパク質から産生される。ペプチドは、一般に、約9アミノ酸長の小さなポリマーである。外来抗原は、細胞を破壊するキラーT細胞（CD8⁺細胞とも称される）を誘引する。H L AクラスII抗原（DR、DPおよびDQ）は、細胞外由来の抗原をTリンパ球に提示する。これらの特定の抗原はTヘルパー細胞の複製を刺激し、次いで、これらのTヘルパー細胞が抗体産生B細胞を刺激し、サブレッサーT細胞によって自己抗原が抑制される。

10

【0063】

H L A - A 2（A2）は、H L A - A「A」血清型グループ内のヒト白血球抗原血清型である。血清型により、H L A - A * 0 2 0 1、* 0 2 0 2、* 0 2 0 3、* 0 2 0 6および* 0 2 0 7遺伝子産物を含む多くのH L A - A * 0 2対立遺伝子の遺伝子産物が同定される。A * 0 2は全世界で共通だが、A * 0 2 0 1は、北アジアおよび北米で高頻度である。A 2は最も多様な血清型であり、東アフリカおよび南西アジアで多様性を示す。北アジアにおけるA * 0 2 0 1の頻度は高いが、その多様性は、A * 0 2 0 1、あまり一般的ではないアジアバリエーション（variant）A * 0 2 0 3、A * 0 2 0 6に限定される。

20

【0064】

血清型は、H L A - A鎖の²サブセットの抗体認識によって決定される。A 2の場合、「A」鎖はH L A - A * 0 2対立遺伝子群によってコードされ、鎖はB 2 M遺伝子座によってコードされる。A 2およびA * 0 2は、意味の点ではほぼ同義である。A 2は、他の場所よりも北アジアおよび北米で一般的であり、いくつかの長いハプロタイプの一部である。

【0065】

I I I . 抗体

本発明は、H L A - A 2提示との関連では、P R 1に結合する抗体の生成および使用に関する。抗体は、特定の標的または一連の抗原性で関係する標的に「特異的に結合」することができる。本明細書で使用される場合、抗体は、抗体の可変領域に対する結合に基づいて、抗原性で区別可能な分子と識別される場合に、抗原に「特異的に結合」することができるといわれる。このような相互作用は、化合物のクラスが関与する非特異的結合とは対照的に、化学構造とは無関係である（例えば、ニトロセルロースに対するタンパク質の結合など）。特に、本発明の抗体は、近縁分子にさえ結合不可能であるか、または実質的に結合不可能であるように、「高度に特異的な結合」を示し得る。

30

【0066】

モノクローナル抗体は、米国特許第4,196,265号（参照により本明細書に組み込まれる）に例示されているものなどの周知技術を使用して容易に調製され得る。典型的には、技術は、最初に、免疫応答を提供するのに十分な様式で選択抗原（例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド）によって適切な動物を免疫することを含む。マウスおよびラットなどの齧歯類は、好ましい動物である。次いで、免疫動物由来の脾臓細胞を不死骨髄腫細胞の細胞と融合させる。次いで、成功した融合体を、適切な抗体の産生についてスクリーニングする。

40

【0067】

一実施形態では、抗体分子は、例えばm A bのタンパク質分解切断によって生成される断片（例えば、（F（a b'））、F（a b'）₂）、または例えば組換え手段によって生成可能な一本鎖免疫グロブリンを含む。このような抗体誘導体は一価である。一実施形態では、このような断片を互いに組み合わせることもできるし、または他の抗体断片もしくは受容体リガンドと組み合わせて「キメラ」結合分子を形成することもできる。重要なことに、このようなキメラ分子は、同じ分子の異なるエピトープに結合することができる置

50

換基を含有してもよいし、または活性化プロテインCエピトープおよび「非活性化プロテインC」エピトープに結合することができるものでもよい。

【0068】

抗体またはその断片が治療目的のものである場合、任意の免疫応答を弱めるためにそれらを「ヒト化」することが望ましい場合がある。このようなヒト化抗体は、インビトロまたはインビボの文脈で研究され得る。例えば、抗体の免疫原性部分を、対応するが非免疫原性である部分で置き換えることによって、ヒト化抗体を生成し得る（すなわち、キメラ抗体）。PCT出願第PCT/U.S.86/02269号；欧州特許出願第184,187号；欧州特許出願第171,496号；欧州特許出願第173,494号；PCT出願第WO86/01533号；欧州特許出願第125,023号；Sunら、(1987)；Woodら、(1985)；およびShawら、(1988)（これらの参考文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる）。「ヒト化」キメラ抗体の一般的な総説は、Morrisson(1985)（これも、参照により本明細書に組み込まれる）によって提供されている。あるいは、CDRまたはCEAの置換によって、「ヒト化」抗体を生成し得る。Jonesら、(1986)；Verhoeyanら、(1988)；Beidlerら、(1988)（これらの参考文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる）。

10

【0069】

A. バリエーション

以下は、改変されたタンパク質を作製するための、タンパク質のアミノ酸の変更に基いた考察である。このような変化の作製では、アミノ酸のハイドロパシーインデックスを考慮することができる。タンパク質上の相互作用的生物学的機能の付与におけるアミノ酸のハイドロパシーインデックスの重要性は当技術分野で一般に理解されている（Kyte and Doolittle, 1982）。アミノ酸の相対ハイドロパシー性が、得られたタンパク質の二次構造に寄与すること、言い換えると、タンパク質の他の分子（例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、および抗原など）との相互作用を定義することが認められている。

20

【0070】

親水性に基づいて類似のアミノ酸の置換を有効に行うことができることも当技術分野で理解されている。米国特許第4,554,101号（参照により本明細書に組み込まれる）は、タンパク質の最大局所平均親水性は、その隣接アミノ酸の親水性に支配されているため、タンパク質の生物学的性質と相関すると述べている。米国特許第4,554,101号に詳細が記載されているように、アミノ酸残基に以下の親水性値が割り当てられている。塩基性アミノ酸：アルギニン(+3.0)、リジン(+3.0)、およびヒスチジン(-0.5)；酸性アミノ酸：アスパラギン酸(+3.0±1)、グルタミン酸(+3.0±1)、アスパラギン(+0.2)、およびグルタミン(+0.2)；親水性非イオン性アミノ酸：セリン(+0.3)、アスパラギン(+0.2)、グルタミン(+0.2)、およびトレオニン(-0.4)、硫黄含有アミノ酸：システイン(-1.0)およびメチオニン(-1.3)；疎水性非芳香族アミノ酸：バリン(-1.5)、ロイシン(-1.8)、イソロイシン(-1.8)、プロリン(-0.5±1)、アラニン(-0.5)、およびグリシン(0)；疎水性芳香族アミノ酸：トリプトファン(-3.4)、フェニルアラニン(-2.5)、およびチロシン(-2.3)。

30

40

【0071】

アミノ酸を類似の親水性を有する別のアミノ酸に代えて置換して、生物学的または免疫学的に改変されたタンパク質を産生することができることが理解される。このような変更では、親水性値が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1以内のアミノ酸の置換が特に好ましく、±0.5以内のアミノ酸の置換がさらにより特別に好ましい。

【0072】

上で概説したように、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性（例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、およびサイズなど）に基づく。様々な上記特徴

50

を考慮した置換の例は当業者に周知であり、アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンが含まれる。

【0073】

本発明はまた、抗体の多数の天然の性質を有するが、特徴が変化および/または改良されたポリペプチドの調製のためのペプチド模倣物を使用することができる（例えば、Johnson, 1993を参照のこと）。ペプチド模倣物の使用の背後にある基礎となる論理的根拠は、タンパク質のペプチド骨格が主に抗体および抗原の分子相互作用などの分子相互作用を容易にするような方法でアミノ酸側鎖を配向するように存在することである。これらの原理を、上で概説した原理と組み合わせて使用して、抗体の多数の天然の性質を有するが、特徴が変化し、さらに改良された第2世代の分子を操作することができる。

10

【0074】

本発明はさらに、挿入バリエーションまたは欠失バリエーションなどの配列バリエーションを用い得ることが意図される。欠失バリエーションは、天然タンパク質の1つ以上の残基を欠く。挿入変異体 (mutant) は、典型的には、ポリペプチドの非末端点における物質の付加を含む。また、配列が上記判定基準（生物学的活性の維持を含む）を満たす限り、挿入配列バリエーションはN末端またはC末端アミノ酸を含んでもよく、基本的には本明細書に開示される配列の1つに記載されているものでもよいと理解されよう。

【0075】

本発明はまた、アイソタイプ改変を意図する。以下で議論するように、抗体8F4はIgG2a-であると決定した。異なるアイソタイプを有するようにFc領域を改変することによって、異なる機能を達成し得る。例えば、IgG1に変化させることによって抗体依存性細胞傷害を増加させ得、クラスAにスイッチすることによって組織分布を改善し得、クラスMにスイッチすることによって結合価を改善し得る。

20

【0076】

標準的な分子生物学的技術による発現、またはポリペプチドの化学合成を含む当業者に公知の任意の技術によって、改変抗体を作製し得る。組換え発現方法は、本文書の他の場所で取り扱う。

【0077】

B. 一本鎖抗体

一本鎖可変断片 (scFv) は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域が短い（通常は、セリン、グリシン）リンカーによって共に連結された融合物である。定常領域の除去およびリンカーペプチドの導入にもかかわらず、このキメラ分子は、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。右の画像は、この改変が通例として特異性を変化させない仕組みを示している。歴史的には、単一ペプチドとして抗原結合ドメインを発現させるのに非常に便利なファージディスプレイを容易にするために、これらの分子が作られた。あるいは、ハイブリドーマ由来のサブクローニングされた重鎖および軽鎖から、scFvを直接作り得る。一本鎖可変断片は、完全抗体分子で見出される定常Fc領域を欠くので、共通の結合部位（例えば、プロテインA/G）を抗体の精製に使用する。プロテインLはカッパ軽鎖の可変領域と相互作用するので、多くの場合、プロテインLを使用してこれらの断片を精製/固定化し得る。

30

40

【0078】

可動性リンカーは、一般に、ヘリックスおよびターン促進アミノ酸残基、例えばアラニン (alanine)、セリンおよびグリシンから構成される。しかしながら、他の残基も同様に機能し得る。Tangら、(1996)は、タンパク質リンカーライブラリーから、一本鎖抗体 (scFv) に合ったリンカーを迅速に選択する手段としてファージディスプレイを使用した。可変組成の18アミノ酸のポリペプチドをコードするセグメントによって、重鎖および軽鎖可変ドメインの遺伝子を連結したランダムリンカーライブラリーを構築した。scFvレパートリー（約 5×10^6 個の異なるメンバー）を線状ファージ上にディスプレイし、ハプテンによる親和性選択に供した。選択したバリエーション集団は結合

50

活性の有意な増加を示したが、かなりの配列多様性を保持していた。続いて、1054個の個々のバリエーションをスクリーニングすることにより、可溶性形態で効率的に産生された触媒活性 s c F v を得た。配列分析により、選択したつなぎ鎖 (t e t h e r) のわずかな共通特徴として、リンカー (V_HC 末端の後ろの 2 残基) のプロリンが保存的であること、ならびに他の位置ではアルギニンおよびプロリンが豊富であることが明らかになった。

【 0 0 7 9 】

本発明の組換え抗体はまた、受容体の二量体化または多量体化を可能にする配列または部分を含み得る。このような配列としては、J鎖と共同して多量体の形成を可能にする I g A 由来のものが挙げられる。別の多量体化ドメインは、G a l 4 二量体化ドメインである。他の実施形態では、2つの抗体の組み合わせを可能にする作用物質 (a g e n t) 、例えばビオチン / アビジンを用いて鎖を改変し得る。

10

【 0 0 8 0 】

別の実施形態では、非ペプチドリinkerまたは化学的単位を使用して受容体軽鎖および重鎖を連結することによって、一本鎖抗体を作り得る。一般に、軽鎖および重鎖を別個の細胞で産生し、精製し、続いて適切な方法で互いに連結する (すなわち、適切な化学的架橋を介して、重鎖の N 末端を軽鎖の C 末端に結合する) 。

【 0 0 8 1 】

架橋試薬は、2つの異なる分子、例えば安定剤および凝固剤の官能基を結び付ける分子架橋を形成するのに使用される。しかしながら、異なる類似体から構成される同一の類似体または異種複合体の二量体または多量体が作られ得ることが意図される。2つの異なる化合物を段階的に連結するために、望ましくないホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性架橋リンカーを使用し得る。表 3 は、いくつかの架橋リンカーを示す。

20

表 3 - ヘテロ二官能性架橋リンカー

【表 3 - 1】

リンカー	反応性	利点および用途	スペーサーアーム の長さ\架橋後
SMPT	第一級アミン スルフヒドリル	・ より大きな安定性	11.2 A
SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	・ チオール化 ・ 切断可能な架橋	6.8 A
LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	・ 拡張スペーサーアーム	15.6 A
スルホ - LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	・ 拡張スペーサーアーム ・ 水溶性	15.6 A
SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	・ 安定マレイミド反応基 ・ 酵素-抗体コンジュゲーション ・ ハプテン-キャリアタンパク質コンジュゲーション	11.6 A
スルホ - SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	・ 安定マレイミド反応基 ・ 水溶性 ・ 酵素-抗体コンジュゲーション	11.6 A
MBS	第一級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体コンジュゲーション ・ ハプテン-キャリアタンパク質コンジュゲーション	9.9 A
スルホ - MBS	第一級アミン スルフヒドリル	・ 水溶性	9.9 A
SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体コンジュゲーション	10.6 A
スルホ - SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	・ 水溶性	10.6 A

10

20

30

40

【表 3 - 2】

リンカー	反応性	利点および用途	スペーサーアームの長さ\架橋後
SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	・拡張スペーサーアーム ・酵素-抗体コンジュゲーション	14.5 A
スルホ - SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	・拡張スペーサーアーム ・水溶性	14.5 A
EDC/スル ホ-NHS	第一級アミン カルボキシル基	・ハプテン-キャリアコンジュゲーション	0
ABH	非選択性炭水化物	・糖基と反応する	11.9 A

10

【0082】

例示的なヘテロ二官能性架橋リンカーは、2つの反応性基を含有する：一方は、第一級アミン基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と反応するものであり、他方は、チオール基（例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応するものである。第一級アミン反応性基を介して、架橋剤は、一方のタンパク質（例えば、選択された抗体または断片）のリジン残基（複数可）と反応し得、チオール反応性基を介して、第1のタンパク質に結合した架橋剤は、他方のタンパク質（例えば、選択剤）のシステイン残基（遊離スルフヒドリル基）と反応する。

20

【0083】

血中で適度の安定性を有する架橋剤を用いることが好ましい。ターゲティング剤および治療剤/予防剤にコンジュゲートするのに上手く用いられ得る多数の種類のジスルフィド結合含有リンカーが公知である。立体障害されるジスルフィド結合を含有するリンカーは、より大きなインビボ安定性をもたらして、作用部位に到達する前にターゲティングペプチドが放出されるのを防ぐことが判明し得る。したがって、これらのリンカーは、連結剤の一群である。

30

【0084】

別の架橋試薬はSMP Tであり、これは、隣接するベンゼン環およびメチル基によって「立体障害される」ジスルフィド結合を含有する二官能性の架橋リンカーである。ジスルフィド結合の立体障害は、組織および血中に存在し得るチオラートアニオン、例えばグルタチオンによる攻撃から結合を保護する機能を果たし、それにより、結合した作用物質が標的部位に送達される前にコンジュゲートがデカップリングされるのを防ぐのに役立つと考えられている。

40

【0085】

SMP T架橋試薬は、他の多くの公知の架橋試薬のように、システインのSHまたは第一級アミン（例えば、リジンのイプシロンアミノ基）などの官能基を架橋する能力を与える。別の可能な種類の架橋剤としては、開裂可能なジスルフィド結合を含有するヘテロ二官能性光反応性フェニルアジド、例えばスルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド(salicylamido))エチル-1,3'-ジチオプロピオナートが挙げられる。N-ヒドロキシ-スクシンイミジル基は第一級アミノ基と反応し、フェニルアジドは(光分解されると)任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【0086】

障害(hindered)架橋リンカーに加えて、非ヒンダードリンカーも本明細書に

50

したがって用いられ得る。保護ジスルフィドを含有または生成しないと考えられる他の有用な架橋リンカーとしては、SATA、SPDPおよび2-イミノチオランが挙げられる(Wawrzynczak & Thorpe, 1987)。このような架橋リンカーの使用は、当技術分野で十分に理解されている。別の実施形態は、可動性リンカーの使用を含む。

【0087】

米国特許第4,680,338号には、リガンドとアミン含有ポリマーおよび/またはタンパク質とのコンジュゲートを生成するのに、特にキレート剤、薬物、酵素、および検出可能な標識などとの抗体コンジュゲートを形成するのに有用な二官能性リンカーが記載されている。米国特許第5,141,648号および米国特許第5,563,250号には、様々な穏やかな条件下で切断可能な不安定結合を含有する切断可能なコンジュゲートが開示されている。切断が活性剤の放出をもたらすリンカーに目的の作用物質を直接結合し得る点で、このリンカーは特に有用である。特定の使用は、遊離アミノ基または遊離スルフヒドリル基をタンパク質、例えば抗体または薬物に付加することを含む。

10

【0088】

米国特許第5,856,456号には、ポリペプチド成分を結合して融合タンパク質、例えば一本鎖抗体を作製するのに使用するためのペプチドリナーが提供されている。リンカーは最大約50アミノ酸長であり、少なくとも1つの存在する荷電アミノ酸(好ましくは、アルギニンまたはリジン)とそれに続くプロリンを含有し、より大きな安定性および低凝集を特徴とする。米国特許第5,880,270号には、様々な免疫診断および分離技術で有用なアミノオキシ含有リンカーが開示されている。

20

【0089】

C. 精製

特定の実施形態では、本発明の抗体を精製することができる。本明細書で使用される場合、用語「精製された」は、他の成分から単離可能であり、このタンパク質をその天然に得ることができる状態と比較して任意の程度で精製される組成物を指すことを意図する。したがって、精製されたタンパク質はまた、それが天然に存在し得る環境から遊離されたタンパク質を指す。用語「実質的に精製された」を使用する場合、この用語は、タンパク質またはペプチドが組成物の主成分を形成する(例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%以上を構成する)組成物を指す。

30

【0090】

タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、ポリペプチド画分および非ポリペプチド画分への細胞環境のあるレベルの粗分画を含む。他のタンパク質からポリペプチドが分離されると、目的のポリペプチドを、部分的または完全な精製(または均一になるまでの精製)を達成するためのクロマトグラフィ技術および電気泳動技術を使用してさらに精製することができる。純粋なペプチド調製物に特に適合した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィ、排除クロマトグラフィ; ポリアクリルアミドゲル電気泳動; 等電点電気泳動である。他のタンパク質精製方法には、硫酸アンモニウム、PEG、および抗体などを使用したまたは熱変性による沈殿およびその後の遠心分離; ゲル濾過、逆相、ハイドロキシアパタイト、およびアフィニティクロマトグラフィ; ならびにこのような技術および他の技術との組み合わせが含まれる。

40

【0091】

本発明の抗体の精製では、原核生物または真核生物の発現系でポリペプチドを発現させ、変性条件を使用してタンパク質を抽出することが望ましい場合がある。ポリペプチドを、ポリペプチドのタグ付部分に結合するアフィニティカラムを使用して他の細胞成分から精製することができる。当技術分野で一般に公知であるように、様々な精製工程の実施順序を変更し得るか、特定の工程を省略して、依然として実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に適切な方法をもたらすことができると考えられる。

【0092】

50

一般的に、抗体のFc部分に結合する作用物質（すなわち、プロテインA）を用いて、完全抗体を分画する。あるいは、抗原を使用して、精製すると同時に適切な抗体を選択し得る。このような方法は、カラム、フィルターまたはビーズなどの支持体に結合した選択剤を利用することが多い。抗体を支持体に結合し、混入物資を除去し（例えば、洗い流し）、条件（塩、熱など）を適用することによって抗体を放出させる。

【0093】

本開示に照らして、タンパク質またはペプチドの精製度の様々な定量方法が当業者に公知である。これらには、例えば、活性画分の比活性の決定、またはSDS/PAGE分析による画分内のポリペプチド量の評価が含まれる。画分の純度の別の評価方法は、画分の比活性を計算すること、これを最初の抽出物の比活性と比較すること、およびそれにより純度を計算することである。活性量を示すために使用される実際の単位は、勿論、精製を追跡するために選択された特定のアッセイ技術および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうかによって依存する。

10

【0094】

ポリペプチドの移動は、SDS/PAGE条件が異なれば時折有意に変化し得ることが公知である（Capaldiら、1977）。したがって、異なる電気泳動条件下では、精製または部分精製された発現産物の見かけ上の分子量が変化し得ることが認識される。

【0095】

D. 抗体と治療剤または診断剤とのコンジュゲーション

一実施形態では、本発明の抗体は、疾患の診断および治療で使用するための様々な試薬に連結され得る。様々な周知の化学反応および作用物質（これらのいくつかは、本文書の他の場所に記載される）を使用して、連結を実施し得る。

20

【0096】

1. 診断試薬

多くの診断剤/イメージング剤が、それらをタンパク質（抗体を含む）に結合するための方法と同様に当技術分野で公知である（例えば、米国特許第5,021,236号；米国特許第4,938,948号；および米国特許第4,472,509号（これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。使用されるイメージング部分は、常磁性イオン、放射性同位体、蛍光色素、NMRで検出可能な物質およびX線イメージング剤であり得る。

30

【0097】

常磁性イオンの場合、例として、クロム（III）、マンガン（II）、鉄（III）、鉄（II）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジム（III）、サマリウム（III）、イッテルビウム（III）、ガドリニウム（III）、バナジウム（II）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）および/またはエルビウム（III）などのイオンを挙げることができ、ガドリニウムが特に好ましい。X線イメージングなどの他の状況で有用なイオンとしては、限定されないが、ランタン（III）、金（III）、鉛（II）および特にビスマス（III）が挙げられる。

40

【0098】

治療用途および/または診断用途のための放射性同位体の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレン、³⁵硫黄、テクネチウム^{99m}および/またはイットリウム⁹⁰を挙げるができる。¹²⁵Iは、多くの場合、特定の実施形態における使用に好ましく、テクネチウム^{99m}および/またはインジウム¹¹¹も、多くの場合、その低エネルギーおよび長期検出適合性により好ましい。本発明の放射性標識受容体は、当技術分野で周知の方法にしたがって生成され得る。例えば、ヨウ化ナトリウムおよび/もしくはヨウ化カリウム、ならびに化学酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウムまたは酵素酸化剤、例えばラクトペルオキシダーゼと接触させること

50

によって、受容体をヨウ素化し得る。リガンド交換法によって、例えば、第1スズ溶液で過テクネチウム酸塩を還元し、還元したテクネチウムを Sephadex カラム上にキレート化し、抗体をこのカラムにアプライすることによって、本発明による TcR をテクネチウム^{99m}で標識し得る。あるいは、例えば、過テクネチウム酸塩、還元剤、例えば SnCl_2 、緩衝液、例えばフタル酸ナトリウム - カリウム溶液および抗体をインキュベートすることによって、直接標識技術を使用し得る。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合させるのに使用されることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) である。

【0099】

コンジュゲートとしての使用が意図される蛍光標識には、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630 / 650、BODIPY 650 / 665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、REG、ローダミングリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミンおよび/またはテキサスレッドがある。

【0100】

2. 治療試薬

本発明の抗体に連結される多種多様な治療剤。例えば、上で議論した放射性同位体は、診断関連では有用だが、治療剤 (therapeutic agents) としても使用され得る。化学療薬もまた抗体にコンジュゲートされ得、それらとしては、シスプラチン (CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン (plicomycin)、マイトマイシン、エトポシド (VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン (gemcitabine)、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびメトトレキサートが挙げられる。

【0101】

別のクラスの治療剤は、毒素である。コレラ毒素、ボツリヌス毒素、百日咳毒素、リシンA鎖およびB鎖ならびに他の天然または合成毒素が意図される。

【0102】

サイトカインおよびリンホカインは、本発明の TcR にカップリングされ得るさらに別のクラスの治療剤であり、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、TNF、GM-CSF、INF、IFN および IFN が挙げられる。

【0103】

他の実施形態では、抗体にコンジュゲートされ得る治療剤として、抗炎症剤が意図される。抗炎症薬としては、NSAID、ステロイド、ラバマイシン、インフリキシマブおよび ontak が挙げられる。免疫抑制剤としては、FK-506 およびシクロスポリンAが挙げられる。

【0104】

TLRアゴニストは、抗体に、例えば、その分子のFc部分を介して連結され得る。TLRアゴニストは、免疫系を刺激するか、またはこれを「オンにする」化合物である。TLR9についての天然のアゴニストは、細菌およびウイルスに共通のDNA成分である。TLR7および8についての天然のアゴニストは、ウイルスに見出されるRNAのバター

10

20

30

40

50

ンである。TLR7、8および9は、それらの天然のDNAおよびRNAアゴニストを認識した後、それぞれ、防御免疫応答の異なるカスケードを開始する。TLRアゴニストとしては、オリゴデオキシヌクレオチド、ヒアルロン酸断片、イミキモド、ラベンダスチンC、脂質A、ロロキシピン (loroxibine)、LPS、モノホスホリル脂質A (monophosphoryl lipid A)、ミリスチシン、レシキモド、Styphimuriumフラジェリン、HKLM、PAM3CSK4およびポリI:Cが挙げられる。つ

【0105】

IV. 核酸および発現

A. 抗体をコードする核酸

本発明の一態様では、抗体の重鎖および軽鎖、可変ドメインおよび定常ドメインの様々な部分をコードする核酸が提供される。核酸セグメントは、ゲノムDNA、相補DNA (cDNA)、または合成DNAに由来し得る。発現ベクターへの組み込みが望ましい場合、核酸は、天然のイントロンまたは別の遺伝子由来のイントロンならびに他の非コード (例えば、調節) 領域およびコード領域 (例えば、リンカー) も含み得る。本明細書で使用される場合、用語「cDNA」は、テンプレートとして伝令RNA (mRNA) を使用して調製したDNAを指すことを意図する。ゲノムDNAまたはゲノムの非プロセシングまたは部分プロセシングRNAテンプレートから重合したDNAと対照的なcDNAを使用することの利点は、cDNAは主に対応するタンパク質のコード配列を含むという点である。

【0106】

用語「組換え体」を、ポリペプチドまたは特定のポリペプチド名と共に使用することができ、一般に、インピット口で操作されているかこのような分子の複製産物である核酸分子から産生されたポリペプチドを指す。組換えベクターおよび単離された核酸セグメントには、抗体コード領域自体、基本的コード領域が選択的に変化しているか改変されたコード領域が多様に含まれ得るか、または、これらは、非抗体領域が含まれるより大きなポリペプチドをコードすることができる。

【0107】

本明細書で使用される場合、「核酸」には、一本鎖および二本鎖分子、ならびにDNA、RNA、化学的に改変された核酸、および核酸類似体が含まれる。本発明の範囲内に含まれる核酸が、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100、約110、約120、約130、約140、約150、約160、約170、約180、約190、約200、約210、約220、約230、約240、約250、約275、約300、約325、約350、約375、約400、約425、約450、約475、約500、約525、約550、約575、約600、約625、約650、約675、約700、約725、約750、約775、約800、約825、約850、約875、約900、約925、約950、約975、約1000、約1100、約1200、約1300、約1400、約1500、約1750、約2000、約2250、約2500またはそれより長いヌクレオチド残基長であり得ることが意図される。

【0108】

配列番号3、5、7、15、19、23 (重鎖CDR1、2および3; 軽鎖CDR1および2、3/JK)、および配列番号9または25 (これらは、重鎖CDRと、それぞれ重鎖CDR1、2および3の上流に隣接するフレームワーク領域1、2および3を含む) および配列番号24 (これは、軽鎖CDRと、それぞれ軽鎖CDR1、2および3の上流に隣接するフレームワーク領域1、2および3を含む) などの適切なアミノ酸配列をコードする任意の核酸配列によって、抗体がコードされることが意図される。正規化されたコドン表 (表4) を使用した所望のアミノ酸配列をコードする核酸の設計および産生は当業者に周知である。特定の実施形態では、各アミノ酸をコードするために選択されたコドンを、目的の宿主細胞中の核酸発現を最適化するように改変することができる。用語「機能的に等価なコドン」は、本明細書で、アルギニンまたはセリンについての6つのコ

10

20

30

40

50

ドンなどの同一アミノ酸をコードするコドンを目指すため、および生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンを目指すためにも使用される。宿主細胞の様々な種についてのコドン選択性 (codon preference) は当技術分野で周知である。ヒトでの使用が好ましいコドンは、当業者に周知である (Wadaら、1990)。他の生物についてのコドン選択性も当業者に周知である (Wadaら、1990 (その全体が参照により本明細書に含まれる))。

表 4 - コドン表

【表 4】

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					
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						
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			
トリプトファン	Trp	W	UGG						
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU					

10

20

30

【0109】

B. 核酸発現

原核生物および/または真核生物ベースの系を使用して、核酸配列またはその同族 (cognate) ポリペプチド、タンパク質、およびペプチドを産生することができる。本発明は、PR-1/HLA-A2 に結合する抗体を産生するためのこのような発現系の使用を意図する。強力な発現技術 1 つは、昆虫細胞/バキュロウイルス系を使用する。米国特許第 5,871,986 号および米国特許第 4,879,236 号 (両方とも参照により本明細書に組み込まれる) などに記載され、例えば、INVI TRO GEN (登録商標) の Max Bac 2.0 (登録商標) および CLONTECH (登録商標) の BACPA CK (商標) BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM という名称で購入することができる昆虫細胞/バキュロウイルス系は、異種核酸セグメントからタンパク質を高レベルで発現することができる。

40

【0110】

50

加えて、市販され、広く一般に利用可能な多数の他の発現系が存在する。このような系の一例は、合成エクジソン誘導受容体またはその p E T 発現系、大腸菌発現系を含む S T R A T A G E N E (登録商標)の C O M P L E T E C O N T R O L I n d u c i b l e M a m m a l i a n E x p r e s s i o n S y s t e m である。誘導発現系の別の例は、I N V I T R O G E N (登録商標)から市販されている T - R E X (商標) (テトラサイクリン調節発現)系を含む誘導発現系 (全長 C M V プロモーターを使用する哺乳動物誘導発現系) である。I N V I T R O G E N (登録商標) はまた、メチロトロフ酵母である *P i c h i a m e t h a n o l i c a* 中での組換えタンパク質の高レベル産生のために設計された *P i c h i a m e t h a n o l i c a* 発現系と称される酵母発現系を提供する。当業者は、核酸配列またはその同族ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドを産生するために発現構築物などのベクターをどのようにして発現させるかを理解している。

10

【0111】

1. ウイルスベクターおよび送達

発現ベクターを細胞に導入することができる多数の方法が存在する。ウイルスは、核酸によってコードされるタンパク質産物を発現させるための強力なツールを提供する。したがって、本発明の特定の実施形態では、発現ベクターは、ウイルスまたはウイルスゲノム由来の操作ベクターを含む。受容体媒介エンドサイトーシスを介して細胞に侵入し、宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定かつ有効に発現する特定のウイルスの能力のために、ウイルスは外来遺伝子を哺乳動物細胞に導入するための魅力的な候補となっている (R i d g e w a y , 1 9 8 8 ; N i c o l a s a n d R u b e n s t e i n , 1 9 8 8 ; B a i c h w a l a n d S u g d e n , 1 9 8 6 ; T e m i n , 1 9 8 6) 。 遺 伝 子 ベ ク タ ー と し て 使 用 さ れ た 最 初 の ウ イ ル ス は 、 D N A ウ イ ル ス (パ ボ ウ イ ル ス (サ ル ウ イ ル ス 4 0 、 ウ シ 乳 頭 腫 ウ イ ル ス 、 お よ び ポ リ オ ー マ) (R i d g e w a y , 1 9 8 8 ; B a i c h w a l a n d S u g d e n , 1 9 8 6) お よ び ア デ ノ ウ イ ル ス (R i d g e w a y , 1 9 8 8 ; B a i c h w a l a n d S u g d e n , 1 9 8 6) が 含 ま れ る) で あ っ た 。

20

【0112】

アデノウイルスベクター。核酸の特定の送達方法は、アデノウイルス発現ベクターの使用を含む。アデノウイルスベクターはゲノムDNAへの組み込み能力が低いことが公知であるが、この特徴はこれらのベクターによって提供される遺伝子導入効率の高さによって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a) 構築物のパッケージングを補助し、(b) 組織またはその中にクローン化された細胞特異的構築物を最終的に発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築物が含まれることを意味する。遺伝子組織化またはアデノウイルス (3 6 k b の 線 状 二 本 鎖 D N A ウ イ ル ス) の 知 識 に よ り 、 ア デ ノ ウ イ ル ス D N A の 大 片 を 7 k b ま で の 外 来 配 列 で 置 換 す る こ と が 可 能 で あ る (G r u n h a u s a n d H o r w i t z , 1 9 9 2) 。

30

【0113】

A A V ベ ク タ ー 。 ア デ ノ ウ イ ル ス 補 助 ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン を 使 用 し て 、 核 酸 を 細 胞 に 導 入 す る こ と が で き る 。 ア デ ノ ウ イ ル ス 結 合 系 (c o u p l e d s y s t e m) を 使 用 し た 細 胞 系 で ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 効 率 の 増 加 が 報 告 さ れ て い る (K e l l e h e r a n d V o s , 1 9 9 4 ; C o t t e n ẽ , 1 9 9 2 ; C u r i e l , 1 9 9 4) 。 ア デ ノ 随 伴 ウ イ ル ス (A A V) は 、 本 発 明 の ワ ク チ ン で 使 用 す る た め の 魅 力 的 な ベ ク タ ー 系 で あ る (M u z y c z k a , 1 9 9 2) 。 A A V は 、 宿 主 へ の 感 染 範 囲 が 広 い (T r a t s c h i n ẽ , 1 9 8 4 ; L a u g h l i n ẽ , 1 9 8 6 ; L e b k o w s k i ẽ , 1 9 8 8 ; M c L a u g h l i n ẽ , 1 9 8 8) 。 r A A V ベ ク タ ー の 生 成 お よ び 使 用 に 関 す る 詳 細 は 、 米 国 特 許 第 5 , 1 3 9 , 9 4 1 号 お よ び 米 国 特 許 第 4 , 7 9 7 , 3 6 8 号 (そ れ ぞ れ 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る) に 記 載 さ れ て い る 。

40

【0114】

レトロウイルスベクター。レトロウイルスは、その遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大

50

量の外来遺伝物質を導入し、広範な種および細胞型に感染し、特定の細胞系にパッケージングされる能力により、ワクチンにおける遺伝子送達ベクターとして有望である (Miller, 1992)。

【0115】

レトロウイルスベクターを構築するために、核酸 (例えば、目的の抗原をコードする核酸) を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して複製欠損ウイルスを産生する。ビリオンを産生させるために、gag、pol、およびenv遺伝子を含むがLTRおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞系を構築する (Mannら、1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共にcDNAを含む組換えプラスミドを (例えば、リン酸カルシウム沈殿によって) 特定の細胞系に導入した場合、パッケージング配列により組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子にパッケージングされ、その後培養培地に分泌される (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mannら、1983)。次いで、組換えレトロウイルスを含む培地を回収し、必要に応じて濃縮して遺伝子導入に使用する。レトロウイルスベクターは、広範な様々な細胞型に感染することができる。しかしながら、組み込みおよび安定な発現には、宿主細胞の分裂を必要とする (Paskindら、1975)。

10

【0116】

レンチウイルスは、一般的なレトロウイルス遺伝子 (gag、pol、およびenv) に加えて、調節機能または構造機能を有する他の遺伝子を含む複雑なレトロウイルスである。レンチウイルスベクターは、当技術分野で周知である (例えば、Naldiniら、1996; Zuffereyら、1997; Blomerら、1997; 米国特許第6,013,516号および米国特許第5,994,136号を参照のこと)。レンチウイルスのいくつかの例としては、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1、HIV-2) およびサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられる。HIVビルレンス遺伝子の弱毒化を増強してベクターを生物学的に安全にすること (例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、およびnefを欠失させる) によって、レンチウイルスベクターを作製した。

20

【0117】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、インビボおよびエクスピボでの遺伝子導入ならびに核酸配列の発現の両方に使用することができる。例えば、非分裂細胞に感染することができる組換えレンチウイルスであって、適切な宿主細胞をパッケージング機能 (すなわち、gag、pol、およびenv、ならびにrevおよびtat) を有する2つ以上のベクターでトランスフェクトするレンチウイルスは、米国特許第5,994,136号 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。特定の細胞型の受容体へのターゲティングのための抗体または特定のリガンドとのエンベロープタンパク質の結合によって組換えウイルスをターゲティングすることができる。特定の標的細胞上の受容体のリガンドをコードする別の遺伝子と共に、目的の配列 (調節領域を含む) をウイルスベクターに挿入することにより、例えば、ベクターは、この時点で標的的特異的である。

30

【0118】

他のウイルスベクター。他のウイルスベクターを、本発明においてワクチン構築物として使用することができる。ワクシニアウイルス (Ridgeway, 1988; Baic hwal and Sugden, 1986; Couparら、1988)、シンドビスウイルス、サイトメガロウイルス、および単純ヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターを使用することができる。これらは、様々な哺乳動物細胞に魅力的ないくつかの特徴を付与する (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baic hwal and Sugden, 1986; Couparら、1988; Horwichら、1990)。レンチウイルスもワクチンベクターとして調査されている (Vand enDriesscheら、2002)。

40

【0119】

50

改変ウイルスを使用した送達。送達すべき核酸を、特異的結合リガンドを発現するように操作した感染性ウイルス内に含ませることができる。したがって、ウイルス粒子は、標的細胞の同族受容体に特異的に結合し、細胞に内容物を送達する。ウイルスエンベロープへのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的な改変に基づいて、レトロウイルスベクターが特異的ターゲティングを可能とするように設計された新規のアプローチを開発した。この改変により、シアロ糖タンパク質受容体を介して肝細胞に特異的に感染させることができる。

【0120】

レトロウイルスエンベロープタンパク質に対するおよび特定の細胞受容体に対するビオチン化抗体を使用した組換えレトロウイルスの別のターゲティングアプローチを設計した。抗体を、ストレプトアビジンの使用によってビオチン成分を介してカップリングした (Rouxら、1989)。主要組織適合性複合体クラスI抗原およびクラスII抗原に対する抗体を使用して、表面抗原を有する様々なヒト細胞のインビトロでのエコトロピックウイルスによる感染が証明された (Rouxら、1989)。

【0121】

2. 非ウイルス核酸送達

本発明の組成物を発現させるための適切な非ウイルス核酸送達方法は、本明細書に記載されているか当業者公知であることあり、核酸 (例えば、DNA) をオルガネラ、細胞、組織、または生物に導入することができる事実上任意の方法が含まれると考えられる。このような方法としては、注射 (米国特許第5,994,624号、米国特許第5,981,274号、米国特許第5,945,100号、米国特許第5,780,448号、米国特許第5,736,524号、米国特許第5,702,932号、米国特許第5,656,610号、米国特許第5,589,466号、および米国特許第5,580,859号 (それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)) (微量注入 (Harland and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号 (参照により本明細書に組み込まれる)) が含まれる); エレクトロポレーション (米国特許第5,384,253号 (参照により本明細書に組み込まれる)); リン酸カルシウム沈殿 (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippeら、1990); DEAE-デキストラン使用後のポリエチレングリコールの使用 (Gopal, 1985); 直接音波負荷 (direct sonic loading) (Fechheimerら、1987); リボソーム媒介トランスフェクション (Nicolau and Sene, 1982; Fraleyら、1979; Nicolauら、1987; Wongら、1980; Kanedaら、1989; Katoら、1991); 微粒子銃 (PCT出願第WO94/09699号およびPCT出願第WO95/06128号; 米国特許第5,610,042号; 米国特許第5,322,783号、米国特許第5,563,055号、米国特許第5,550,318号、米国特許第5,538,877号、および米国特許第5,538,880号 (それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)); 炭化ケイ素繊維との攪拌 (Kaepplerら、1990; 米国特許第5,302,523号および米国特許第5,464,765号 (それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)); またはプロトプラストのPEG媒介トランスフェクション (Omirellehら、1993; 米国特許第4,684,611号および米国特許第4,952,500号 (それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)); 乾燥/阻害媒介DNA取り込み (Potrykusら、1985) などによるDNAの直接送達が挙げられるが、これらに限定されない。これらなどの技術の適用によって、オルガネラ (複数可)、細胞 (複数可)、組織 (複数可)、または生物 (複数可) を、安定または一過性に形質転換することができる。

【0122】

V. がんまたは過形成障害もしくは異形成障害の診断用の抗体

本発明の一実施形態では、白血病 (例えば、AML、CML、MDS) および骨髄異形成障害などのがんを診断する方法が提供される。骨髄異形成 (MDS) は、骨髄が正常に

10

20

30

40

50

機能せず、不十分な数の正常血液細胞を産生する障害群を指す。MDSは、赤血球、血小板および白血球を含む任意の、そして時にはすべての種類の血液細胞の産生に影響を与える（血球減少症）。小児骨髄異形成の約50%は、5種類のMDSに分類され得る：不応性貧血、環状鉄芽球を伴う不応性貧血、過剰芽球を伴う不応性貧血、形質転換で過剰芽球を伴う不応性貧血、および慢性骨髄単球性白血病。典型的には、残りの50%は孤立性が、または複合血球減少症、例えば貧血、白血球減少症および/もしくは血小板減少症（低血小板数）を呈する。MDSは慢性だが、患者の約30パーセントでは進行して急性骨髄性白血病（AML）になる。

【0123】

本発明による診断では、固形腫瘍がんも意図される。このようながんは、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、骨がん、精巣がん、子宮頸がん、消化管がん、リンパ腫、肺における前新形成病変、結腸がん、黒色腫および膀胱がん。良性過剰増殖性疾患（benign hyperproliferative disease）を含む他の過形成疾患、新形成疾患および異形成疾患も、本明細書に記載される診断手順の範囲である。

10

【0124】

A．診断試薬の投与

診断試薬の投与は当技術分野で周知であり、達成すべき診断に応じて変化する。例えば、1つ以上の別個の腫瘍塊をイメージしようとする場合、局所（local）投与または局所（regional）投与（例えば、腫瘍血管系、局所リンパ系または局所動脈もしくは静脈）が利用され得る（my be utilized）。あるいは、局所にまたは全身に診断試薬を提供し得る。四肢全体もしくは生物のイメージングを望む場合、公知の特定の腫瘍塊が同定された場合、または転移が疑われる場合、これが選択の経路であり得る。

20

【0125】

B．注射用組成物および製剤

本発明による医薬品の1つの送達方法は全身性である。しかしながら、あるいは、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（それぞれ、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる）に記載されているように、本明細書に開示される医薬組成物を、非経口、静脈内、皮内、筋肉内、経皮、またはさらに腹腔内に投与することができる。

30

【0126】

医薬品の注射を、薬剤が注射に必要なニードルの特定のゲージを通過することができる限り、シリンジまたは溶液の注射のために使用される任意の他の方法によって行うことができる。溶液保持のためのアンブルチャンパーを画定するノズルおよび溶液をノズルから送達部位に押し出すためのエネルギーデバイスを有する新規のニードルレス注射システムが記載されている（米国特許第5,846,233号）。所定量の溶液の任意の深さへの正確な複数の注射が可能な遺伝子治療で使用するためのシリンジシステムも記載されている（米国特許第5,846,225号）。

40

【0127】

遊離塩基（free base）または薬理的に許容され得る塩としての活性化化合物の溶液を、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中に調製することができる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物ならびにオイル中に分散液を調製することもできる。通常の保存および使用条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を防止するための防腐剤を含む。注射用に適切な薬学的形態としては、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる（米国特許第5,466,468号（その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる））。すべての場合において、形態は、無菌であるべきであり、容易に注射できる程度まで流動性でなければならない。製造および保存条件下で安定でなければならない、細菌および真菌などの微生物の夾雑作用に対して保護されなければならない

50

。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、その適切な混合物、および/または植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。様々な抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、およびチロメサルなど）によって微生物作用を予防することができる。多くの場合、等張剤（例えば、糖または塩化ナトリウム）を含めることが好ましい。吸収を遅延させる作用物質（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の注射用組成物における使用によって該組成物を長期間吸収させることができる。

10

【0128】

水溶液での非経口投与のために、例えば、必要な場合溶液を適切に緩衝化し、最初に液体希釈物を十分な食塩水またはグルコースで等張にする。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、および腹腔内投与に特に適切である。これに関して、使用することができる滅菌水性媒体は、本開示に照らして当業者に公知である。例えば、1投与量を1mlの等張NaCl溶液に溶解し、1000mlの皮下注入液に添加するか提案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」15th Edition, pages 1035 - 1038 and 1570 - 1580を参照のこと）。処置を受ける被験体の状態に応じて、いくつかの投与量のバリエーションが必然的に存在する。投与を担う者は、任意の事象で、個々の被験体に適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与のために、調製物は、FDA Office of Biologics standardsが要求する無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の基準を満たすべきである。

20

【0129】

上に列挙した様々な他の成分と共に適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み込み、必要な場合その後濾過滅菌を行うことによって滅菌注射液を調製する。一般に、基礎分散媒および上に列挙したものの由来の必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルへの様々な滅菌有効成分の組み込みによって分散液を調製する。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分の粉末+予め濾過滅菌したその溶液由来の任意のさらなる所望の成分が得られる真空乾燥および凍結乾燥技術である。

30

【0130】

本明細書に開示される組成物を、中性または塩形態で製剤化することができる。薬学的に許容され得る塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成）および無機酸（例えば、塩酸またはリン酸など）または有機酸（酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）で形成された酸付加塩が挙げられる。遊離のカルボキシル基で形成された塩はまた、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄など）および有機塩基（イソプロピルアミン、トリエチルアミン、ヒスチジン、およびプロカインなど）に由来し得る。製剤化の際、溶液を、投与製剤に適合する様式および治療有効量などで投与する。製剤を、注射液および薬物放出カプセルなどの様々な剤形で容易に投与する。

40

【0131】

本明細書で使用される場合、「キャリア」としては、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、バッファ、キャリア溶液、懸濁液、ならびにコロイドなどが含まれる。薬学的活性物質のためのこのような媒体および作用物質の使用は当技術分野で周知である。任意の従来の媒体または作用物質が有効成分に適合しない範囲を除いて、治療組成物におけるその使用が意図される。補助的有効成分を、組成物に組み込むこともできる。

【0132】

語句「薬学的に許容され得る」または「薬理的に許容され得る」は、ヒトに投与した場合にアレルギー反応または類似の望ましくない反応を起こさない分子実体（molec

50

ular entity) および組成物を指す。有効成分としてタンパク質を含む水性組成物の調製は、当技術分野で十分に理解されている。典型的には、このような組成物を、注射剤（液体溶液または懸濁液のいずれか）として調製し、注射前に液体の溶液または懸濁液にするのに適切な固体形態を調製することもできる。

【0133】

VI. 治療方法

A. がんおよび過形成 / 異形成 / 新形成疾患

本発明の抗体を、がんを含む過形成 / 異形成 / 新形成疾患 / 状態を処置する方法で使用することができる。本発明のペプチドを使用して処置することを意図する疾患 / 状態の種類として、AML、MDS、およびCMLならびに骨髄異形成などの白血病が挙げられるが、これらに限定されない。他の種類のがんとして、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん、骨がん、精巣がん、子宮頸がん、消化管がん、リンパ腫、肺の前新形成病変、結腸がん、黒色腫、膀胱がん、および任意の他の新形成疾患を挙げることができる。

10

【0134】

本発明の方法および組成物を使用して、細胞を死滅させるため、細胞の成長を阻害するため、転移を阻害するため、腫瘍 / 組織サイズ、腫瘍細胞負荷を減少させるため、または別様に腫瘍細胞の悪性表現型を逆転もしくは軽減するために、一般には、過形成 / 新形成 / がん細胞を、通常は薬学的に (pharmacetically) 許容され得る緩衝液またはキャリア中に分散させた治療化合物、例えばポリペプチド、または本発明の抗体をコードする発現構築物と接触させる（上記診断剤の議論を参照のこと）。当然ながら、投与経路は、病変の位置および性質により変化し、例えば、皮内、経皮、非経口、静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮下、皮膚、気管内、腹腔内、腫瘍内、灌流、洗浄 (lavage)、直接注射および経口の投与および処方が挙げられる。がんの処置または診断に関して議論される製剤および投与経路はいずれも、新形成疾患および状態に関して用いられ得る。患者の体外で腫瘍細胞を処置 / 形質導入するエクスピボの実施形態（明確に、またはより大きな細胞集団の一部として）も意図される。

20

【0135】

孤立腫瘍、固形腫瘍、接触腫瘍の場合、腫瘍内注射または腫瘍脈血管系への注射が特に意図される。局所 (local) 投与、局所 (regional) 投与または全身投与も適切であり得る。4 cm 超の腫瘍の場合、投与すべき容量は、約 4 ~ 10 ml である一方、4 cm 未満の腫瘍の場合、約 1 ~ 3 ml の容量を使用する。単回用量として送達される複数回の注射は、約 0.1 ~ 約 0.5 ml の容量を含む。約 1 cm 間隔をあけて腫瘍に複数回の注射を行うことによって、ウイルス粒子を有利に接触させ得る。

30

【0136】

外科的介入の場合、手術時および / またはその後に本発明を使用して、残存疾患または転移疾患を処置し得る。例えば、抗体を含む製剤を切除腫瘍床に注射または灌流し得る。例えば、手術部位にカテーテルを埋め込んだままにしておくことによって、切除後に灌流を継続し得る。周期的な術後処置も想定される。

40

【0137】

適切な場合、例えば、腫瘍を切除して微視的残存疾患を排除するために腫瘍床を処置する場合、継続投与も適用し得る。シリンジまたはカテーテル法 (catherization) による送達が好ましい。このような継続灌流を、処置開始後約 1 ~ 2 時間から約 2 ~ 6 時間、約 6 ~ 12 時間、約 12 ~ 24 時間、約 1 ~ 2 日間、約 1 ~ 2 週間またはそれより長い期間にわたって行い得る。一般に、継続灌流による治療組成物の用量は、単回または複数回の注射によって投与される用量と同等であり、灌流が行われる期間にわたって調整される。四肢灌流を使用して、特に黒色腫および肉腫の処置において本発明の治療組成物を投与し得ることがさらに意図される。

【0138】

処置計画も同様に变化し得、多くの場合、腫瘍型、腫瘍位置、疾患進行、ならびに患者

50

の健康および年齢に依存し得る。明らかに、特定の腫瘍型にはより積極的な処置が必要である一方、同時に、特定の患者はより負担のあるプロトコルに耐えることができない。臨床医は、治療剤の公知の有効性および毒性（存在する場合）に基づいて、最適にこのような決定を行う。

【0139】

特定の実施形態では、処置される腫瘍は、少なくとも最初は切除可能でなくてもよい。処置により、周辺部分の縮小のため、または特に特定の浸潤性部分の消失によって腫瘍の切除可能性を増大させ得る。処置後、切除が可能になり得る。切除後のさらなる処置は、腫瘍部位における微視的残存疾患を排除するのに役立つ。

【0140】

原発性腫瘍または切除後腫瘍床のための典型的な処置過程は、複数回投与を含む。典型的な原発性腫瘍処置は、2週間の期間にわたって6回の投与を適用することを含む。2週間の計画を、1回、2回、3回、4回、5回または6回またはそれより多く繰り返し得る。処置過程中、計画投与を完了する必要性を再評価し得る。

【0141】

B. 併用療法

第2の抗がん剤を含める場合、併用療法を使用することが有利な場合もある。「抗がん」剤は、例えば、がん細胞の死滅化、がん細胞のアポトーシスの誘導、がん細胞の成長速度の減少、転移の発生率または数の減少、腫瘍サイズの減少、腫瘍成長の阻害、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給の減少、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答の促進、がん進行の防止もしくは阻害、またはがんを有する被験体の寿命の延長によって、被験体のがんを負の影響を与えることができる。抗がん剤としては、生物学的薬剤（生物療法）、化学療法薬、および放射線療法薬が挙げられる。より一般に、本発明による治療と共に、これらの他の組成物を、細胞の死滅化または細胞増殖の阻害に有効な組み合わせた量で提供することになる。この方法は、細胞と両方の薬剤とを同時に接触させることを含み得る。細胞と、両薬剤を含む単一の組成物もしくは薬理的製剤とを接触させること、または細胞と、2つの異なる組成物もしくは製剤とを同時に接触させることによってこれを行うことができる。

【0142】

あるいは、抗体療法を、数分から数週間の範囲の間隔で他の薬剤処置の前または後に行うことができる。他の薬剤および抗体を個別に細胞に適用する実施形態では、一般に、薬剤および発現構築物が細胞に対して依然として有利な組み合わせ効果を発揮することができるように、確実に各送達時間の間で有意な期間途切れないようにする。このような例では、細胞と両モダリティとを互いに約12～24時間以内、より好ましくは互いに約6～12時間以内接触させることができることが意図される。しかしながら、いくつかの状況では、それぞれの投与の間に数日（2、3、4、5、6、または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8週間）が経過する場合、処置期間を有意に延長することが望ましい場合がある。

【0143】

様々な組み合わせが用いられ得る；例えば、（コンジュゲートした治療剤の有無にかかわらず）抗体療法は「A」であり、二次抗がん療法は「B」である：

- A / B / A B / A / B B / B / A A / A / B A / B / B B / A / A A / B / B / B B / A / B / B
- B / B / B / A B / B / A / B A / A / B / B A / B / A / B A / B / B / A B / B / A / A
- B / A / B / A B / A / A / B A / A / A / B B / A / A / A A / B / A / A A / A / B / A

【0144】

患者への本発明の治療剤の投与は、存在する場合には抗体処置の毒性を考慮して、その特定の二次療法を行うための一般的なプロトコルに従う。処置サイクルは必要な場合繰

10

20

30

40

50

り返されると予想される。様々な標準治療および外科的介入を、記載されるがん療法と組み合わせて適用し得ることも意図される。

【0145】

1. 化学療法

がん療法には、化学物質および照射ベースの処置の両方を使用した様々な併用療法も含まれる。併用化学療法薬としては、例えば、シスプラチン(CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソ尿素、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリコマイシン(pli-comycin)、マイトマイシン、エトポシド(VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタピン(gemcitabine)、ナベルピン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチナ、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチン、およびメトトレキサート、テモゾロミド(Temazolomide)(DTICの水性形態)、または上記の任意の類似体もしくは誘導バリエーションが挙げられる。化学療法と生物学的療法との組み合わせは、生化学療法として公知である。本発明は、がんの処置もしくは予防に関して、用いられ得るかまたは当技術分野で公知の任意の化学療法薬を意図する。

10

【0146】

2. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、かつ広範に使用されている他の因子としては、線、X線、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の定方向送達として一般的に知られているものが挙げられる。マイクロ波およびUV照射などの他の形態のDNA損傷因子も意図される。すべてのこれらの因子は、DNA、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、および染色体のアセンブリおよび維持に対して広範な損傷を与える可能性が最も高い。X線の線量範囲は、長期間(3~4週間)のための50~200レントゲンの日線量から2000~6000レントゲンの単回線量の範囲である。放射性同位体の照射線量範囲は、広範に変化し、同位体の半減期、放出した照射の強度および型、ならびに新形成細胞による取り込みに依存する。

20

【0147】

用語「接触」および「曝露」は、細胞に適用する場合、治療構築物および化学療法薬または放射性療法薬を標的細胞に送達させるか、または標的細胞と直接近位に置くことによる方法を記載するために本明細書で使用する。細胞の死滅化または静止を達成するために、両薬剤を、細胞を死滅させるか細胞の分裂を防止するのに有効な組み合わせ量で細胞に送達する。

30

【0148】

3. 免疫療法

一般に、免疫療法は、がん細胞を標的として破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上の一部のマーカに特異的な抗体であり得る。抗体は単独で治療エフェクターとして役立ち得るか、または細胞の死滅を実質的にもたらす他の細胞を動員し得る。抗体は薬物または毒素(化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など)にコンジュゲートすることもできるし、単にターゲティング剤として機能することもできる。あるいは、エフェクターは、直接または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が含まれる。治療方法の組み合わせ(すなわち、直接細胞傷害活性およびホルチリン(Fortilin)の阻害または減少)により、がん処置において治療上の利益が得られることになる。

40

【0149】

免疫療法を、併用療法の一部として使用することもできる。併用療法の一般的アプローチを以下で議論する。免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、ターゲティングの影響を受けやすい(すなわち、大多数の他の細胞上に存在しない)一部のマーカを保有しなければ

50

ならない。多数の腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれかは本発明の状況でのターゲティングに適切であり得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、癌胎児性抗原、前立腺特異的抗原、泌尿器腫瘍関連抗原、胎児抗原、チロシナーゼ (p 97)、gp 68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、Muc A、Muc B、PLAP、エストロゲン受容体、ラミニン受容体、erb B、および p 155 が挙げられる。免疫療法の別の態様は、免疫刺激効果を有する抗がん効果についてのものである。免疫刺激分子も存在し、それには IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、IFN などのサイトカイン、MIP-1、MCP-1、IL-8 などのケモカイン、ならびに FLT3 リガンドなどの成長因子が含まれる。タンパク質として免疫刺激分子を組み合わせることにより、または md a-7 などの腫瘍サプレッサーと遺伝子送達を併用することにより、抗腫瘍効果が増強

10

【0150】

以前に議論されているように、現在研究中または使用されている免疫療法の例は、免疫アジュバント (例えば、Mycobacterium bovis、Plasmodium falciparum、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物) (米国特許第 5,801,005 号; 米国特許第 5,739,169 号; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides ら, 1998)、サイトカイン療法 (例えば、インターフェロンおよび IL-1、GM-CSF、および TNF) (Bukowski ら, 1998; Davidson ら, 1998; Hellstrand ら, 1998)、遺伝子治療 (例えば、TNF、IL-1、IL-2、p 53) (Qin ら, 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 米国特許第 5,830,880 号および米国特許第 5,846,945 号)、およびモノクローナル抗体 (例えば、抗グングリオシド GM2、抗 HER-2、抗 p185) (Pietras ら, 1998; Hanibuchi ら, 1998; 米国特許第 5,824,311 号) である。ハーセプチン (トラスツズマブ) は、HER2-neu 受容体を遮断するキメラ (マウス-ヒト) モノクローナル抗体である。これは、抗腫瘍活性を有し、悪性腫瘍の処置での使用が承認されている (Dillman, 1999)。ハーセプチンおよび化学療法を使用したがんの併用療法は、個別の療法よりも有効であることが示されている。したがって、1つ以上の抗がん療法を、本明細書に記載される腫瘍関連 HLA 拘束性ペプチド療法と共に使用することができることが意図される。

20

30

【0151】

養子免疫療法。養子免疫療法では、患者の循環リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球をインビトロで単離し、IL-2 などのリンホカインで活性化し、または腫瘍壊死のための遺伝子を形質導入し、再投与する (Rosenberg ら, 1988; 1989)。これを達成するために、本明細書に記載されるアジュバント組み込み抗原性ペプチド組成物と組み合わせ、免疫学的有効量の活性化リンパ球を動物またはヒト患者に投与する。活性化リンパ球は、血液または腫瘍サンプルからより早く単離し、インビトロで活性化 (または「拡大」) した患者自身の細胞であることが最も好ましい。この免疫療法の形態により、いくつかの症例では黒色腫および腎癌の寛解が生じるが、応答者の割合は応答しない者と比較して少なかった。

40

【0152】

受動免疫療法。がんの受動免疫療法のための多数の異なるアプローチが存在する。これらは、概して以下のように分類し得る。抗体のみの注射: 毒素または化学療法薬とカップリングした抗体の注射: 放射性同位体とカップリングした抗体の注射: 抗イディオタイプ抗体の注射: および、最後に、骨髄中の腫瘍細胞の浄化 (purging)。

【0153】

好ましくは、ヒトモノクローナル抗体は患者が副作用をほとんど起こさないか全く起こさないため、受動免疫療法で使用される。しかしながら、その適用は希少性によりいくらか制限され、これまでのところ病変内のみで投与されている。グングリオシド抗原に対するヒトモノクローナル抗体が、皮膚再発性黒色腫に罹患した患者に病変内投与されている (

50

Irie & Morton, 1986)。毎日または毎週の病変内注射後に10人の患者のうち6人で寛解が認められた。別の研究では、2つのヒトモノクローナル抗体の病変内注射では中程度の成功が達成された(Irieら、1989)。可能な治療抗体としては、抗TNF、抗CD25、抗CD3、抗CD20、CTLA-4-IGおよび抗CD28が挙げられる。

【0154】

2つの異なる抗原に対して指向する2つ以上のモノクローナル抗体、またはさらに複数の抗原特異性を有する抗体を投与することが好ましい場合がある。処置プロトコールは、Bajorinら、(1988)によって記載されているリンホカインまたは他の免疫エンハンサーの投与も含み得る。ヒトモノクローナル抗体の開発は、本明細書の他の場所にさらに詳細が記載されている。

10

【0155】

4. 遺伝子治療

さらに別の実施形態では、二次処置は、腫瘍関連HLA拘束性ペプチドの投与前、投与後、または投与と同時に治療ポリヌクレオチドを投与する遺伝子治療である。以下の遺伝子産物の1つをコードする第2のベクターと併せた腫瘍関連HLA拘束性ペプチドをコードするベクターの送達により、標的組織に対して複合的な抗過剰増殖効果が得られる。あるいは、両遺伝子をコードする単一のベクターを使用することができる。様々なタンパク質が本発明に包含され、これらのいくつかを以下に記載する。本発明と組み合わせたいいくつかの形態の遺伝子治療のためにターゲティングすることができる様々な遺伝子が当業者に公知であり、がんに関与する任意の遺伝子を含み得る。

20

【0156】

細胞増殖の誘導因子。細胞増殖を誘導するタンパク質は、機能に応じて様々なカテゴリーにさらに分類される。これらの全タンパク質の共通点は、細胞増殖を調節する能力である。例えば、PDGFの一形態であるsis癌遺伝子は、分泌成長因子である。癌遺伝子は成長因子をコードする遺伝子から稀に生じ、現在、sisは唯一公知の天然に存在する腫瘍形成性成長因子である。本発明の一実施形態では、細胞増殖の特定の誘導因子に指向するアンチセンスmRNAを使用して細胞増殖の誘導因子の発現を防止することが意図される。

30

【0157】

タンパク質FMS、ErbA、ErbB、およびneuは、成長因子受容体である。これらの受容体の変異により、調製可能な機能が喪失する。例えば、Neu受容体タンパク質の膜貫通ドメインに影響を与える点変異により、neu癌遺伝子が得られる。erbA癌遺伝子は、甲状腺ホルモンの細胞内受容体に由来する。修飾された腫瘍形成性ErbA受容体は、内因性甲状腺ホルモン受容体と競合して制御されない成長を引き起こすと考えられている。

【0158】

最も大きな癌遺伝子のクラスは、シグナル伝達タンパク質(例えば、Src、Abl、およびRas)を含む。タンパク質Srcは細胞質タンパク質-チロシンキナーゼであり、ある場合には、癌原遺伝子から癌遺伝子へのその形質転換はチロシン残基527の変異を介して起こる。対照的に、GTPアーゼタンパク質rasの癌原遺伝子から癌遺伝子への形質転換は、1つの例では、配列中のアミノ酸12でのパリンからグリシンへの変異に起因し、これによりras GTPアーゼ活性が減少する。タンパク質Jun、Fos、およびMycは、転写因子として核機能に対してその効果を直接発揮するタンパク質である。

40

【0159】

細胞増殖の阻害因子。腫瘍抑制癌遺伝子は、過剰な細胞増殖を阻害するように機能する。これらの遺伝子の不活化によってその阻害活性が破壊され、調節されない増殖がもたらされる。最も一般的な腫瘍抑制剤は、Rb、p53、p21およびp16である。本発明に従って使用することができる他の遺伝子としては、APC、DCC、NF-1、

50

NF - 2、WT - 1、MEN - I、MEN - II、zac1、p73、VHL、C - CAM、MMAC1 / PTEN、DBCCR - 1、FCC、rsk - 3、p27、p27 / p16融合物、p21 / p27融合物が挙げられる。

【0160】

プログラム細胞死の調節因子。アポトーシス（すなわち、プログラム細胞死）は、正常な胚発生、成体組織の恒常性の維持、および発癌の抑制に必須の過程である（Kerrら、1972）。Bcl - 2タンパク質ファミリーおよびICE様プロテアーゼは、他の系におけるアポトーシスの重要な調節因子およびエフェクターであることが証明されている。濾胞性リンパ腫に関連して発見されたBcl - 2タンパク質は、アポトーシスの制御および様々なアポトーシス刺激に応答した細胞生存の増強で重要な役割を果たす（Bakhshira、1985；Cleary and Sklar、1985；Clearyら、1986；Tsujimotoら、1985；Tsujimoto and Croce、1986）。進化的に保存されたBcl - 2タンパク質は、現在、死アゴニストまたは死アンタゴニストとして分類することができる関連タンパク質ファミリーのメンバーであると認識されている。

10

【0161】

その発見に続き、Bcl - 2は様々な刺激によって誘発される細胞死を抑制するように作用することが示された。また、現在、共通の構造および配列の相同性を共有するBcl - 2細胞死調節タンパク質ファミリーが存在することが明らかである。これらの異なるファミリーメンバーは、Bcl - 2に対する類似の機能を有する（例えば、Bcl_{xL}、Bcl_w、Bcl_s、Mcl - 1、A1、Bfl - 1）か、Bcl - 2機能を妨害して細胞死を促進する（例えば、Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri）ことが示されている。

20

【0162】

5. 手術

がんを有するヒトの約60%がいくつかの種類の手術を受け、それらとしては、予防的手術、診断または病期分類のための手術、治癒切除、および姑息的手術が挙げられる。治癒切除は、本発明の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法、および/または代替療法などの他の療法と併せて使用することができるがん処置である。

30

【0163】

治癒切除は、がん組織の全部または一部を物理的に除去、摘出、および/または破壊する切除を含む。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を指す。腫瘍切除に加えて、手術による処置としては、レーザー手術、凍結手術、電気外科手術、および顕微鏡制御手術（モース氏手術）が挙げられる。表在がん、前がん、または付随する正常組織量の除去と併せて本発明を使用することができることがさらに意図される。

【0164】

すべてのがん細胞、がん組織、または腫瘍の一部の切除の際、体内に空洞が形成され得る。さらなる抗がん療法を使用したこの領域の灌流、直接注射、または局所投与によって処置を行うことができる。このような処置を、例えば、1、2、3、4、5、6、または7日毎、1、2、3、4、および5週間毎、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12カ月毎に繰り返すことができる。これらの処置は、投与量も変化させることができる。

40

【0165】

C. 自己免疫疾患 (Autoimmune Diseases)

本発明はまた、本発明の抗体を使用する自己免疫疾患の処置を意図する。PR1は、骨髄系の自己タンパク質に由来する。ウェゲナー肉芽腫症では、PR1を含有するプロテイナーゼ3 (Pr3) が自己免疫攻撃の標的である。小血管血管炎では、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) が標的抗原であり (Franssenら、1996；Brouwerら、1994；Moldremら、1996)、これらの疾患を有する患者において、T

50

細胞免疫および抗体免疫の両方の証拠がある。ウェゲナー肉芽腫症は、PR3に対する特異性を有する細胞質抗好中球細胞質抗体(cANCA)の産生を伴うが(Mollnesら、1997)、顕微鏡的多発血管炎およびチャグ-ストラウス症候群は、MPOに対する特異性を有する核周囲ANCA(pANCA)を伴う(Mollnesら、1999; Savagelら、1999)。このように、PR1の免疫細胞認識を阻害することは、自己免疫疾患の治療法となり得る。

【0166】

したがって、他の自己抗体(例えば、プロテイナーゼ3に対するpANCA)の作用を中和するために、本発明の抗体は、自己免疫疾患を患っている被験体に投与される。あるいは、「二重特異性」になるように、すなわち、2つの抗原(一方はPR1/HLA-A2であり、他方はDEC-205、LOX-1、RAGEのような樹状細胞表面抗原である)に対する免疫学的特異性を有するように抗体を操作し、それにより、樹状細胞の抗原提示機能を遮断する。

10

【0167】

1. 血管炎

血管炎は、血管壁の炎症によって引き起こされる過程であり、様々な障害をもたらす。血管炎に関する認められている分類システムは登場していないが、関与する血管のサイズまたは種類によって大血管血管炎、中血管血管炎または小血管血管炎と分類され得る。小血管血管炎は、動脈(すなわち、細動脈、細静脈および毛細血管)よりも小さな血管に影響を与える血管炎と定義される;しかしながら、小血管血管炎には、中サイズの動脈も関与し得る。抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎は、小血管血管炎の最も一般的な原因であり、顕微鏡的多発血管炎、ウェゲナー肉芽腫症、チャグ-ストラウス症候群および特定種の薬物誘発性血管炎が挙げられる。

20

【0168】

ウェゲナー肉芽腫症。ウェゲナー肉芽腫症は、上気道(鼻、副鼻腔、耳)、肺および腎臓における血管の炎症を引き起こす珍しい障害である。全症例のほぼ半分で生じる関節炎(関節の炎症)によって、多くの他の身体領域も影響を受け得る。目および皮膚も影響を受け得る。原因は不明であるが、ウェゲナー肉芽腫症は自己免疫障害であると考えられており、リウマチ性疾患の1つに分類されることが多い。上気道および下気道ならびに腎臓において、破壊性病変が発症する。腎臓では、これらの病変は、血尿(尿中の血液)および腎不全をもたらす系球体腎炎を引き起こす。それは、30~50歳で最も頻繁に生じ、男性は、女性の2倍の頻度で罹患する。それは子供では珍しいが、3カ月齢の乳児に認められたことがある。腎疾患が急速に進行して、初期診断の数カ月以内に腎不全が生じ得る。未処置の場合、ウェゲナー肉芽腫症を有する全患者の90%超において、腎不全および死に至る。

30

【0169】

初期症候としては、疲労、倦怠感、発熱、ならびに鼻および副鼻腔周囲の不快感を挙げることができる。副鼻腔炎または耳感染症などの上気道感染症は、ウェゲナー肉芽腫の診断に先立つことが多い。他の上気道症候としては、鼻血、疼痛、および鼻開口部周囲の痛みが挙げられる。明らかな原因のない持続性発熱(原因未確定の発熱-FUO)が、初期症候であり得る。寝汗は、発熱を伴い得る。食欲不振および体重減少が一般的である。皮膚病変は一般的であるが、この疾患に関連する特徴的病変は1つではない。腎疾患は、ウェゲナー肉芽腫症の確定診断を行うのに必要である。尿が血性であり得、多くの場合、赤色尿または黒色尿(smoky urine)として最初に現れる。症候がない場合があるが、検査室の試験によって容易に診断される。かなりの数の患者において目の問題が生じ、その範囲は、軽度の結膜炎から眼球および眼球周囲組織の重度の炎症に及び得る。さらなる症候としては、衰弱、食欲不振、体重減少、血性鼻漏、副鼻腔疼痛、副鼻腔炎、鼻開口部内およびその周囲の病変、咳、喀血、血痰、息切れ、喘鳴、胸痛、尿中の血液、発疹および関節痛が挙げられる。

40

【0170】

50

開胸肺生検、上気道生検、鼻粘膜生検、経気管生検を伴う気管支鏡検査、腎生検、尿検査、胸部X線、骨髓吸引、(自己抗体の)血液試験を含み得る異常組織の生検を行うことによつてなされる診断。処置は、罹患者の90%超において長期寛解をもたらし得るコルチコステロイド、シクロホスファミド、メトトレキサートまたはアザチオプリンを含む。

【0171】

チャージ-ストラウス症候群。アレルギー性肉芽腫症としても公知のチャージ-ストラウス症候群(CSS)は、全身性血管炎の一形態である。CSSは結節性多発動脈炎に類似するが、豊富な好酸球によりこの疾患と区別される。ほとんどのCSS患者は、新たなまたは増加した重度の喘息(喘息は、CSSの重要な特徴の1つである)の病歴を有する中年である。喘息の症候は、血管炎の発症のずっと前に始まり得る。他の初期症候としては、鼻ポリープやアレルギー性鼻炎が挙げられる。この疾患は好酸球増加症に移行することが多く、その数は60%に達する。疾患の次の相は顕性の血管炎であり、皮膚、肺、神経、腎臓および他の器官を障害し得る。末梢神経障害は特に消耗性であり得、四肢の疼痛、麻痺または刺痛(神経障害/多発性単神経炎)が挙げられる。治療法の出現前は、CSSは、致命的な疾患であることが多かった。患者の大半が、制御されない流行性疾患で死亡した。

10

【0172】

CSSの原因は不明だが、それは多因子性のようなものである。遺伝的因子は存在し得るが、CSSは、同じ家族の2人において極めてまれに認められる。したがって、環境因子および感染が原因である可能性が高いが、この決定的な証拠はない。診断(Diagnosis)は、症候および徴候、臓器障害のパターン、ならびに血液試験の特定の異常(特に、好酸球増加症)の存在の特定の組み合わせによつて実施される。詳細な患者の病歴および身体検査に加えて、診断を支援するために、血液試験、胸部X線および他の種類のイメージング研究、神経伝導試験、ならびに組織生検(肺、皮膚または神経)が実施され得る。CSS患者として分類されるには、患者は、以下の6つの判定基準の少なくとも4つを有するべきである: 1)喘息; 2)好酸球増加症[10%超の鑑別WBC計算]; 3)単神経障害; 4)胸部X線で一過性肺浸潤; 5)副鼻腔異常; および6)生検が、血管外好酸球を伴う血管を含有すること。

20

【0173】

CSSは、通常、プレドニゾンに応答する。最初は、高用量の経口プレドニゾンを使用するが、最初の1カ月程後に、この高用量のプレドニゾンをその後数カ月にわたつて徐々に漸減させる。プレドニゾンに加えて、アザチオプリン、セルセプト、メトトレキサートまたはシクロホスファミドなどの他の免疫抑制薬が使用され得る。重度の疾患を有する患者、または他の処置に非応答性の者にとっては、高用量の静脈内ステロイドが有用であり得る。適切な治療により、症候が迅速に消散し始めて、心臓および腎臓の機能が徐々に改善し、末梢神経障害に起因する痛みが改善する。患者の応答および疾患の継続に応じて、治療は1~2年間継続し得る。

30

【0174】

2. クローン病

クローン病の症候には、腸の炎症、ならびに腸狭窄およびフィステルの発症が含まれ; これらの症候はニューロパチーを伴うことが多い。典型的には、5-アミノサリチル酸類(例えば、メサラミン)またはコルチコステロイドのような抗炎症薬が処方されるが、常に有効という訳ではない(V. A. Bottomanら、1998に概説されている)。シクロスポリンによる免疫抑制は、コルチコステロイドに抵抗性または不耐性の患者にとつて有益であることがある(Brynskovら、1989)。

40

【0175】

それにもかかわらず、最終的には、患者の90%において外科的矯正が必要となり; 50%が結腸切除を受ける(Leiperら、1998; Makowiecら、1998)。術後の再発率は高く、50%が5年以内にさらなる手術を必要とする(Leiperら、1998; Besnardら、1998)。

50

【0176】

クローン病の病因についての1つの仮説は、遺伝的感受性および環境因子（例えば、喫煙）に恐らく起因する腸粘膜関門の不全により、細菌抗原および食物抗原を含む、腸管腔に由来する抗原に免疫系が曝されるといものである（例えば、Soderholmら、1999；Hollanderら、1986；Hollander, 1992）。別の仮説は、*Mycobacterium paratuberculosis*、*Listeria monocytogenes*、異常な大腸菌、またはパラミクソウイルスのような病原体による持続性の腸感染が、免疫応答を刺激するか；あるいは、正常な腸内細菌叢ならびにそれらが産生する代謝物および毒素のような遍在性の抗原に対する調節不全の免疫応答に、症候が起因するというものである（Sartor, 1997）。血清中のIgA型およびIgG型の抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA）の存在が、小児クローン病を高度に診断することが見出された（Ruemmelera, 1998；Hoffenbergerら、1999）。

10

【0177】

クローン病において、調節不全の免疫応答は、細胞媒介免疫病理に傾いている（Murch, 1998）。しかしながら、シクロスポリン、タクロリムス、およびメサラミンのような免疫抑制薬が、コルチコステロイド抵抗性のクローン病例を処置するために使用されているが、成功率は様々である（Brynskovら、1989；Fellermanら、1998）。

20

【0178】

クローン病の診断および処置のためのツールを開発する最近の努力は、サイトカインの中心的な役割に焦点を当てている（Schreiber, 1998；van Hogezand & Verspaget, 1998）。サイトカインは、細胞間相互作用、細胞間コミュニケーション、または他の細胞の挙動に対して特異的な効果を有する、低分子の分泌型のタンパク質または因子（5～20kD）である。サイトカインは、リンパ球、特に、 T_H1 リンパ球および T_H2 リンパ球、単球、腸マクロファージ、顆粒球、上皮細胞、ならびに線維芽細胞により産生される（Rogler & Andus, 1998；Galley & Webster, 1996に概説されている）。一部のサイトカインは炎症促進性であり（例えば、TNF- α 、IL-1（およびIL-1 β ）、IL-6、IL-8、IL-12、または白血病抑制因子もしくはLIF）；他のサイトカインは抗炎症性である（例えば、IL-1受容体アンタゴニスト、IL-4、IL-10、IL-11、およびTGF- β ）。しかしながら、特定の炎症状態の下では、それらの効果のオーバーラップおよび機能的重複性が存在し得る。

30

【0179】

活動性のクローン病例においては、上昇した濃度のTNF- α およびIL-6が血液循環内へ分泌され、TNF- α 、IL-1、IL-6、およびIL-8が、粘膜細胞により局所的に過剰産生される（Funakoshiら、1998）。これらのサイトカインは、骨の発達、造血、ならびに肝臓機能、甲状腺機能、および精神神経機能を含む、生理学的な系に対して広範囲にわたる効果を有し得る。また、炎症促進性のIL-1が優位なIL-1 β /IL-1 α 比率の不均衡が、クローン病を有する患者において観察されている（Rogler & Andus, 1998；Saikiら、1998；Dionneら、1998；しかし、S. Kuboyama, 1998を参照のこと）。ある研究は、大便サンプル中のサイトカインプロファイルが、クローン病についての有用な診断ツールとなり得ることを示唆した（Saikiら、1998）。

40

【0180】

クローン病のために提唱されている処置には、様々なサイトカインアンタゴニスト（例えば、IL-1 α ）、阻害剤（例えば、IL-1変換酵素の阻害剤および抗酸化薬）、ならびに抗サイトカイン抗体（Rogler and Andus, 1998；van Hogezand & Verspaget, 1998；Reimundら、1998；N. Lugerlingら、1998；McAlindonら、1998）の使用が含まれる

50

。特に、TNF- α に対するモノクローナル抗体は、クローン病の処置において試みられ、ある程度の成功を収めている (Targanら、1997; Stackら、1997; van Dullemenら、1995)。これらの化合物は、本発明の化合物との併用療法で使用することができる。

【0181】

クローン病の処置のための別のアプローチは、炎症応答を誘発し得る細菌集団を少なくとも部分的に根絶すること、および非病原性集団で置き換えることに焦点を当てている。例えば、米国特許第5,599,795号は、ヒト患者におけるクローン病の予防および処置の方法を開示している。その方法は、既存の細菌叢を殺菌除去し、正常なヒトから採取された、異なる、選択された、よく特徴決定された細菌で置き換えるための、少なくとも1種の抗生物質および少なくとも1種の抗真菌剤により腸管を無菌化することを対象とするものであった。Borodyは、既存の腸内細菌叢を洗浄により少なくとも部分的に除去し、疾患スクリーニングを受けたヒトドナーに由来する便の接種により、またはBacteroidesおよび大腸菌種を含む組成物により導入される新たな細菌集団で置き換えることにより、クローン病を処置する方法を教示した (米国特許第5,443,826号)。しかしながら、診断および/または処置を向けることができるクローン病の原因は未だ不明である。

【0182】

3. 関節リウマチ

RAの正確な病因は依然として不明であるが、自己免疫的な側面を有することが明らかである。滑膜線維芽細胞の増殖および関節端の関節表面へのそれらの付着を含む、関節疾患の最初の兆候は、滑膜表層に出現する (Lipsky, 1998)。その後、マクロファージ、T細胞、および他の炎症細胞が関節へと動員され、そこで、それらは、骨および軟骨の破壊をもたらす慢性後遺症に寄与するサイトカインのインターロイキン-1 (IL-1)、ならびに炎症において役割を果たす腫瘍壊死因子 (TNF- α) を含む、多数のメディエーターを産生する (Dinarello, 1998; Burger & Dayer, 1995; van den Berg, 2001)。血漿中のIL-1の濃度は、健常個体よりRAを有する患者において有意に高く、注目すべきことに、血漿IL-1レベルがRA疾患の活動性と相関する (Eastgateら、1988)。さらに、滑液IL-1レベルは、RAの様々なX線写真の特色および組織学的特色と相関する (Kahleら、1992; Rooneyら、1990)。

【0183】

正常な関節において、これらおよび他の炎症促進性サイトカインの効果は、多様な抗炎症性サイトカインおよび調節因子によりバランスが保たれている (Burger & Dayer, 1995)。このサイトカインバランスの意義は、一日を通して周期的な発熱を有する若年性RA患者において例示される (Priourら、1987)。各発熱ピークの後、IL-1の効果을阻止する因子が、血清中および尿中に見出される。この因子は、単離され、クローニングされ、IL-1遺伝子ファミリーのメンバー、IL-1受容体アンタゴニスト (IL-1ra) として同定されている (Hannumら、1990)。IL-1raは、その名称が示す通り、I型IL-1受容体との結合に関してIL-1と競合し、結果として、IL-1の効果을阻止する天然の受容体アンタゴニストである (Arendら、1998)。IL-1を効果的に阻止するためには10~100倍過剰のIL-1raが必要とされ得る；しかしながら、RAを有する患者から単離された滑膜細胞は、IL-1の効果을妨げるのに十分なIL-1raを産生しないようである (Firesteinら、1994; Fujikawaraら、1995)。

【0184】

4. 全身性エリテマトーデス

全身性エリテマトーデス (SLE) は、組織損傷をもたらす自己抗体および免疫複合体の組織内の沈着を特徴とする自己免疫リウマチ性疾患である (Kotzin, 1996)。MSおよび1型糖尿病のような自己免疫疾患とは対照的に、SLEには、潜在的に、

複数の臓器系が直接関与しており、その臨床徴候は多様で可変性である (K o t z i n & O ' D e l l , 1 9 9 5 により概説されている)。例えば、主として皮疹および関節痛を示し、自然緩解を明らかに示し、薬物治療をほとんど必要としなくてもよい患者も存在する。スペクトルのもう一端には、高用量のステロイド、およびシクロホスファミドのような細胞傷害性薬物による治療を必要とする重度かつ進行性の腎臓障害を明らかに示す患者がいる (K o t z i n , 1 9 9 6)。

【 0 1 8 5 】

S L E の血清学的な顕著な特徴および利用可能な一次診断テストは、二本鎖 DNA (d s DNA)、一本鎖 DNA (s s - DNA)、およびクロマチンのような細胞核の構成要素に対する I g G 抗体の血清レベルの上昇である。これらの自己抗体の中で、I g G 型抗 d s DNA 抗体は、ループス系球体腎炎 (G N) の発症において主要な役割を果たす (H a h n & T s a o , 1 9 9 3 ; O h n i s h i ら、1 9 9 4)。系球体腎炎は、腎臓の血液を浄化する系球体の毛細管壁が、系球体基底膜の上皮側の癒着により肥厚化する重篤な状態である。疾患は、慢性かつ進行性であることが多く、最終的には腎不全をもたらし得る。

10

【 0 1 8 6 】

これらの自己免疫疾患において自己抗体が誘導される機序は、不確かなままである。診断および/または処置を向けることができる S L E の原因は未知であるため、処置は、基礎をなす原因ではなく、例えば、マクロライド系抗生物質による、免疫応答の抑制に向けられている (例えば、米国特許第 4 , 8 4 3 , 0 9 2 号)。

20

【 0 1 8 7 】

5 . 若年性関節リウマチ

小児における最も有病率の高い関節炎の型を表す用語である若年性関節リウマチ (J R A) とは、慢性炎症および滑膜の肥厚を特徴とする疾病ファミリーに適用される。この用語は、欧州において、若年性慢性関節炎および/または若年性特発性関節炎と称される疾病のファミリーとオーバーラップするが、完全には同義ではない。

【 0 1 8 8 】

J a r v i s (1 9 9 8) および他 (A r e n d , 2 0 0 1) は、成人および小児におけるリウマチ様疾患の病原が、自然免疫と獲得免疫との間の複雑な相互作用を含むことを提唱した。この複雑さが、疾患の病原解明の困難さの中核をなしている。

30

【 0 1 8 9 】

自然免疫系および獲得免疫系は、いずれも、複数の細胞型、多数の細胞表面タンパク質および分泌型タンパク質、ならびにポジティブフィードバックおよびネガティブフィードバックの相互に連絡するネットワークを使用している (L o ら、1 9 9 9)。さらに、思想的には分離可能であるが、免疫系の自然ウイングおよび獲得ウイングは、機能的に交差しており (F e a r o n & L o c k s l e y , 1 9 9 6)、これらの交差点において起こる病理学的イベントは、成人型および小児型の慢性関節炎の病原についての本発明者らの理解に高度に関連している可能性がある (W a r r i n g t o n , ら、2 0 0 1)。

【 0 1 9 0 】

多関節 J R A は、手の小関節を含む複数の関節 (4 箇所以上) における炎症および滑膜増殖を特徴とする明確な臨床亜型である (J a r v i s , 2 0 0 2)。J R A のこの亜型は、その複数の関節障害、および経時的に急速に進行するその能力の両方のため、重度となり得る。臨床的に明確ではあるが、多関節 J R A は均質ではなく、患者は、疾患の徴候、発症年齢、予後、および治療的応答に関して異なっている。これらの違いは、この疾患において起こり得る免疫攻撃および炎症攻撃の性質における変動の範囲を反映する可能性が極めて高い (J a r v i s , 1 9 9 8)。

40

【 0 1 9 1 】

6 . シェーグレン症候群

原発性シェーグレン症候群 (S S) は、中年の女性に主に影響を与えるが (男女比 1 : 9)、小児を含むすべての年齢において認めることができる、慢性の、進行の遅い、全身

50

性の自己免疫疾患である (Jonssonら、2002)。それは、CD4+リンパ球、CD8+リンパ球、およびB細胞を含む単核細胞が浸潤する、外分泌腺のリンパ球浸潤および破壊を特徴とする (Jonssonら、2002)。さらに、腺外 (全身性) 徴候が、患者の3分の1に認められる (Jonssonら、2001)。

【0192】

腺へのリンパ球浸潤は、進行性の特色であり (Jonssonら、1993)、広範な場合、器官の大部分を置き換え得る。興味深いことに、一部の患者における腺浸潤物は、(異所性胚中心と称される) 唾液腺内の異所性リンパ様微細構造物に密接に類似している (Salomonssonら、2002; Xanthou & Polihronis, 2001)。SSにおいて、異所性GCとは、濾胞性樹状細胞および活性化された内皮細胞のネットワークを含む、増殖性細胞のT細胞およびB細胞の凝集物として定義される。標的組織内に形成されたGC様構造物は、自己抗体 (抗Ro/SSAおよび抗La/SSB) の産生を含む機能的特性も描写する (Salomonsson & Jonsson, 2003)。

10

【0193】

RAのような他の全身性自己免疫疾患においては、異所性GCのための必須の因子が同定されている。GCを有するリウマチ様滑膜組織は、ケモカインCXCL13、CCL21、およびリンホトキシン(LT)- を産生することが示された (濾胞中心および外套帯B細胞に検出された)。これらの被検体の多変数回帰分析は、CXCL13およびLT- を、リウマチ様滑膜炎におけるGCを予測する孤立性のサイトカインとして同定した (Weyand & Goronzy, 2003)。最近、SSにおいて、唾液腺内のCXCL13およびCXCR5が、B細胞およびT細胞を動員し、したがって、リンパ系新生および異所性GC形成に寄与することにより、炎症過程において重要な役割を果たしていることが示された (Salomonsson & Larsson, 2002)。

20

【0194】

7. 乾癬

乾癬は、米国の人口の2~2.6%または580~750万人に影響を与えている鱗屑および炎症の慢性皮膚疾患である。この疾患は、すべての年齢群において起こるが、主として成人に影響を与える。それは男女にほぼ等しく現れる。皮膚細胞が、皮膚表面下の起源から急速に生じ、それが成熟する機会を得る前に表面に積み重なる場合に、乾癬が起こる。通常、(代謝回転とも呼ばれる) この移動には、約1ヵ月かかるが、乾癬においては、わずか数日でそれが起こり得る。典型的な型では、乾癬は、銀色の鱗屑により覆われた厚い赤色の(炎症を起こした)皮膚の斑をもたらす。プラークと称されることもある、これらの斑は、通常、痒みまたは痛みを伴う。それらは、肘、膝、脚の他の部分、頭皮、下背部、顔面、手掌、および足の裏に起こることが最も多いが、身体上のいかなる場所の皮膚にも起こり得る。この疾患は、指の爪、足の爪、ならびに性器および口内の軟部組織にも影響を与えることがある。影響を受けた関節の周囲の皮膚に亀裂が入ることは珍しくないが、乾癬を有するおよそ100万人が、関節炎の症候を生ずる関節の炎症を経験する。この状態は、乾癬性関節炎と称される。

30

【0195】

乾癬は、特に、T細胞が関与する、免疫系により駆動される皮膚障害である。乾癬では、T細胞が誤作用し、他の免疫応答を誘発するほどに高活性となり、炎症および皮膚細胞の急速な代謝回転をもたらす。症例の約3分の1に、乾癬の家族歴が存在する。研究者は、乾癬により影響を受けた多数の家族を研究し、疾患と関係のある遺伝子を同定した。乾癬を有する人々は、皮膚が悪化し、次いで、改善する時があることに気づき得る。再燃を引き起こし得る条件には、感染症、ストレス、および皮膚を乾燥させる気候の変化が含まれる。高血圧に対して処方されるリチウムおよびベータブロッカーを含む、特定の医薬も、突発を誘発するかまたは疾患を悪化させることがある。

40

【0196】

8. 多発性硬化症

50

多発性硬化症（MS）は、毎年米国だけで数十万人、そして世界中では数百万人を苦しめている深刻な健康問題であり続けている。それは、中枢神経系（脳および脊髄）の最も一般的な疾患の1つである。MSは、脱髄またはミエリン鞘の消失に関連する炎症状態である。ミエリンは神経を絶縁する脂肪物質であり、神経がある地点から別の地点にインパルスを伝達することを可能にする絶縁体として作用する。MSでは、ミエリンの消失は、神経が電気インパルスを脳にまたは脳から伝導する能力の崩壊を伴い、これが様々なMS症候、例えば視力、筋協調、強度、感覚、発話および嚥下、膀胱の制御、性的能力ならびに認知機能の障害をもたらす。ミエリンが消失したプラークまたは病変は、硬化した瘢痕様領域のように見える。これらの瘢痕は脳および脊髄の様々な領域に様々な時点で現れるので、用語「多発性」硬化症は、文字通り多くの瘢痕を意味する。

10

【0197】

現在のところ、MSの決定的な診断を提供する単一の検査室の試験、症候または身体的な所見はない。厄介なことに、MSの症候は、多種多様な他の疾患、例えば急性播種性脳脊髄炎、ライム病、HIV関連脊髄症、HTLV-I関連脊髄症、神経梅毒、進行性多巣性白質脳症、全身性エリテマトーデス、結節性多発動脈炎、シェーグレン症候群、ベーチェット病、サルコイドーシス、腫瘍随伴症候群、亜急性脊髄連合変性症、亜急性脊髄視神経障害、副腎脊髄ニューロパチー、脊髄小脳症候群、遺伝性痙性対麻痺/原発性側索硬化症、脳卒中、腫瘍、動静脈奇形、くも膜嚢腫、アーノルド-キアリ奇形および頸椎症と容易に混同され得る。したがって、MSと一致する所見を示し、さらに他の原因を除外する手順によって、MSの診断を行われなければならない。

20

【0198】

一般に、MSの診断は2つの判定基準に依拠する。第1に、少なくとも1カ月間隔で2回の攻撃がなければならない。増悪、再燃、または再発としても公知の攻撃は、少なくとも24時間継続する1つ以上のMS症候が突然出現するか、または悪化することである。第2に、中枢神経系のミエリン鞘に対する複数の損傷領域が存在しなければならない。鞘に対する損傷は複数の時点で生じていなければならない。脱髄または類似の神経学的症候を引き起こし得る任意の他の疾患によって引き起こされたものであってはならない。現在のところ、MRI（磁気共鳴映像法）は、脳をイメージングして、MSによって引き起こされるプラークまたは瘢痕の存在を検出する好ましい方法である。

30

【0199】

しかしながら、MRIのみに基づいて、MSの診断を行うことはできない。他の疾患は、MSによって引き起こされるものに似た同程度の脳内病変を引き起こし得る。さらに、MRIによる脳病変の外観は、異なる患者では全く異質性である場合があり、いくつかでは脳腫瘍または脊髄腫瘍に似てさえいる。加えて、確定MSを有する少数の患者はMRIでいかなる脳内病変も示さないのので、通常MRIスキャンではMSの診断が除外されない。これらの個体は、MRIによって検出され得ない脊髄病変または病変（spinal cord lesions or lesions）を有することが多い。その結果、詳細な臨床検査には、患者の病歴および機能試験も含まれることが重要である。これは、精神的、感情的および言語的な機能、運動および協調、視力、バランス、ならびに五感機能を包含すべきである。症候が最初に始まった人の性別、出生地、家族歴および年齢も重要な検討事項である。誘発電位（中枢神経系の伝導時間の遅延を明らかにし得る電気診断検査）、脳脊髄液（オリゴクローナルバンドと称されるクローン的に広がった免疫グロブリン遺伝子の存在の探索）、および血液（他の原因を除外するため）を含む他の試験は、特定の場合に必要とされ得る。

40

【0200】

D. 併用療法

上記免疫障害のための併用療法も意図される。このような治療法としては、抗炎症薬および免疫抑制剤などの標準的な治療法を本発明の治療方法と併用するものが挙げられよう。このような標準的な治療法は、被験体において疾患を引き起こす免疫細胞に負の影響を与えることができるか、またはこのような疾患の症候を緩和することになる。この方法は

50

、細胞または被験体と両薬剤とを同時に接触させることを含み得る。これは、両薬剤を含む単一の組成物もしくは薬理的製剤を用いて、または2つの別個の組成物もしくは製剤を同時に用いて達成され得る。あるいは、抗体療法は、数分間～数週間の範囲の間隔で他の薬剤処置に先行してもよいし、またはその後にもよい。

【0201】

様々な組み合わせが用いられ得る；例えば、（コンジュゲートした治療剤の有無にかかわらず）抗体療法は「A」であり、二次免疫疾患療法は「B」である：

A / B / A B / A / B B / B / A A / A / B A / B / B B / A / A A / B / B / B B / A / B / B
 B / B / B / A B / B / A / B A / A / B / B A / B / A / B A / B / B / A
 B / B / A / A
 B / A / B / A B / A / A / B A / A / A / B B / A / A / A A / B / A / A
 A / A / B / A

10

【0202】

患者への本発明の治療剤の投与は、存在する場合には抗体治療の毒性を考慮して、その特定の二次療法を行うための一般的なプロトコルに従う。処置サイクルは必要な場合繰り返されると予想される。様々な標準治療および外科的介入を、記載される治療法と組み合わせて適用し得ることも意図される。

【実施例】

【0203】

20

V I I . 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。当業者であれば、以下の実施例に開示される技術が、本発明の実施において十分に機能することが本発明者によって発見された技術の代表的なものであり、その実施のための好ましい様式を構成すると見なし得ると認識するはずである。しかしながら、当業者であれば、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、開示される特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、依然として同様または類似の結果が得られることを認識するはずである。

実施例1：方法

【0204】

30

抗体の生成。複合PR1 / HLA - A * 0201 エピトープに対する抗体を得るために、本発明者らは、皮下（SQ）および腹腔内（IP）経路を介して組換えPR1 / HLA - A * 0201 モノマーでBALB / cマウスを2週間間隔で3回免疫した。免疫した動物から脾細胞を単離し、ポリエチレングリコール（PEG）を使用してB細胞をHGPR T陰性不死化骨髄腫細胞と融合させた。次いで、pp65 / HLA - A * 0201 モノマーおよびPR1 / HLA - A * 0201 モノマーを用いてハイブリドーマ細胞を選択し、単一細胞クローニングのために96ウェルプレートに入れた。

【0205】

40

抗体のスクリーニングおよび特性決定。PR1 / HLA - A * 0201 モノマーを用いてELISAによってモノクローナル細胞系（約20,000個）をスクリーニングして、陽性抗体分泌ハイブリドーマを同定した。ELISAによって、PR1 / HLA - A * 0201 に対する特異性を有する8F4ハイブリドーマを同定し、アイソタイプ特異的抗体および免疫グロブリン軽鎖抗体を使用して特性決定した。

【0206】

抗体のクローニング、配列分析および結合研究。ハイブリドーマcDNAから8F4重鎖をクローニングし、一次配列を得た。HLA - A * 0201 重鎖 + - 2マイクログロブリンを用いて、それぞれP1～P9の位置にAla置換を含有する改変PR1ペプチドをフォールディングすることによって、エピトープマッピングを実施した。固定化8F4および漸増濃度の可溶性PR1 / HLA - A * 0201 を用いてBiacore機器の表面プラズモン共鳴によって、PR1 / HLA - A * 0201 に対する8F4の結合親和性を

50

決定した。FACS分析および共焦点イメージングを利用して、正常細胞および異常細胞に対する8F4の結合を研究した。

【0207】

抗体の活性。AMLに対する8F4の結合が細胞溶解を引き起こすかを決定するために、抗体依存性細胞傷害(ADCC)アッセイおよび補体依存性細胞傷害(CDC)アッセイを実施した。8F4 CDC媒介性溶解に対して感受性であることが示された患者材料由来のAML細胞を、8F4またはアイソタイプ対照の存在下または非存在下でインキュベートし、次いで、照射(200cGy)免疫不全HLA-A2トランスジェニックNOD/SCIDマウスに移植した。2週間の時点で動物を屠殺し、FACSによって脾細胞および骨髄を分析した。

10

【0208】

全RNAの単離。minelutカラムを含むQiagen RNA easyキットを使用した。RNAローディング緩衝液を以下のように作製した: 1μlのエチジウムブロマイド(EtBr)(10mg/ml)を100μlの1xTAE、RNAseフリーH₂O中の10xDNAローディング色素、1%アガロース(キット中)に添加する。指示は以下のとおりである。「ハイブリドーマ細胞または1~5x10⁶個の生細胞のバイアルを凍結する。活性培養物が利用可能である場合、工程4として、15mlコニカルチューブ中で1~5x10⁶個の生細胞をペレット化し、工程5に進む。凍結細胞のみが利用可能である場合、1バイアルのハイブリドーマ細胞を37℃で解凍し、解凍直後に水浴から取り出し、穏やかに混合する。70%エタノールでバイアルを拭き、ネジ山に触れないように注意しながら蓋を回して取り外す。バイアルの内容物を、15mlの完全培地を含有する15mlコニカルチューブに移す。100xg(低速Sorvall遠心分離機の場合は約1,000rpm)で5分間遠心分離する。スピニング中は、b-メルカプトエタノールを小アリコート用のRLT緩衝液に添加する。10mlピペットを用いて、細胞からすべての培地を慎重に除去する。Qiashrredderを使用してRLT緩衝液中の細胞ペレットを溶解し、RNA単離用のQiagenプロトコルに従う。開始の細胞量に応じて、2xの15μlのRNAseフリーdH₂Oを用いて、minelutカラムからRNAを溶出する(6ウェルの場合、1x13μlを用いて溶出する)。手順後、RNAがICE上に残っているはずである。1μg/ml EtBrを含有する1%アガロースミニゲルを注ぎ、15分間の凝固時間中にRNAを定量する。上記と同じRNAseフリーH₂Oを空白として使用し、分光光度計を使用して、2μlのRNAを定量する。RNA濃度を計算する: (A₂₆₀)(40) - μg/ml。A₂₆₀/A₂₈₀比は1.6超である必要がある。総容量10μlの1xRNAローディング緩衝液中の1%アガロースミニゲル上で1ugを泳動することによって、RNAの品質を検査する。ゲルに約1インチ泳動する。フォトドキュメンテーションシステムでゲルを分析する。高品質なRNAのバンドパターンは、区別可能な28sおよび18sリボソームRNAのバンドが2:1の理想的な強度比になることを特徴とする。1:1の比は許容可能であり得る;しかしながら、バンドがないかまたはゲル下端のスミア(smear)は、RNAの分解を示しており、このRNAを使用すべきでないことを示す。」

20

30

【0209】

ハイブリドーマ由来の再構成Ig可変領域(V)遺伝子の単離および配列分析。V重鎖(VH)遺伝子およびV軽鎖(VL)遺伝子からDNA配列を得るために、ヒト重鎖定常領域プライマーまたは軽鎖定常領域プライマーと組み合わせて、cDNA末端の迅速増幅(RACE)PCRを使用した。BD Smart TM RACE cDNA増幅キット(BD Bioscience)を用いて、それに添付の指示にしたがって、5'RACE cDNA増幅を実施した。PFU ultra(Stratagene)、UniversalプライマーAミックス(UPM)およびヒトIgG H&L定常領域用の遺伝子特異的プライマー(GSP)を利用した。

40

【0210】

5'RACE PCR産物のクローニングおよびDNA配列決定では、TOPOクロー

50

ニングキット (Invitrogen) およびゲル抽出キット (Qiagen) を使用した。IgG L の場合、8つのコロニーを mini prep のために単離 (islated) し、EcoRI 消化によってスクリーニングした。M13 rev および T7 プライマーを用いて、6つの陽性クローンを配列決定した。IgG の場合、8つのコロニーを mini prep のために単離し、EcoRI 消化によってスクリーニングした。M13 rev および T7 プライマーを用いて、6つの陽性クローンを配列決定した。

実施例 2 : 結果

【0211】

抗体の生成。複合 PR1 / HLA - A * 0201 エピトープに対する抗体を得るために、本発明者らは、皮下 (SQ) および腹腔内 (IP) 経路を介して組換え PR1 / HLA - A * 0201 モノマーで BALB / c マウスを 2 週間間隔で 3 回免疫した。免疫した動物から脾細胞を単離し、ポリエチレングリコール (PEG) を使用して B 細胞を HGPR T 陰性不活化骨髄腫細胞と融合させた。次いで、pp65 / HLA - A * 0201 モノマーおよび PR1 / HLA - A * 0201 モノマーを用いてハイブリドーマ細胞を選択し、単一細胞クローニングのために 96 ウェルプレートに入れた。

10

【0212】

抗体のスクリーニングおよび特性決定。PR1 / HLA - A * 0201 モノマーを用いて ELISA によってモノクローナル細胞系をスクリーニングして、陽性抗体分泌ハイブリドーマを同定した。ほぼ 2,000 個のハイブリドーマをスクリーニングし、ELISA によって、PR1 / HLA - A * 0201 に対する特異性を有する 8F4 と呼ばれるハイブリドーマを同定した。アイソタイプ特異的抗体および免疫グロブリン軽鎖抗体を使用して、8F4 ハイブリドーマを特性決定したところ、単一の IgG2a - PR1 / HLA - A * 0201 特異的抗体を分泌することが示された。

20

【0213】

抗体結合評価。HLA - A * 0201 重鎖 + 2 ミクログロブリンを用いて、それぞれ P1 ~ P9 の位置に Ala 置換を含有する改変 PR1 ペプチドをフォールディングすることによって、エピトープマッピングを実施した。すべてのアミノ酸位置の改変により結合が破壊されたが、P1 が 8F4 結合に最重要であることが判明した (図 1)。図 2 に示されているように、固定化 8F4 および漸増濃度の可溶性 PR1 / HLA - A * 0201 を用いて Biacore 機器の表面プラズモン共鳴によって、PR1 / HLA - A * 0201 に対する 8F4 の結合親和性を決定した。HLA - A * 0201 上の区別可能な対立遺伝子特異的部位を認識する市販の BB7.2 マウスモノクローナル抗体の K_D 162 nM と比較して、8F4 の K_D は 9.9 nM である。共焦点顕微鏡検査を使用したところ、8F4 の直接蛍光コンジュゲートは、(HLA - A * 0201 を発現する) PR1 ペプチドパルス T2 細胞にのみ結合し、無関係な pp65 をパルスした T2 細胞またはパルスしていない T2 細胞には結合しなかった。総合すると、複合 PR1 / HLA - A * 0201 に対する 8F4 の特異性および 8F4 の高結合親和性が確認された。FACS 分析および共焦点イメージング (同様に、8F4、FITC - コンジュゲート BB7.2 抗 HLA - A * 0201 抗体、および DAPI を用いる) の両方を使用して、8F4 は、AML を有する HLA - A2 + 患者由来の循環芽球に結合するが、HLA - A2 + 健常ドナー由来の PBMC および HLA - A2 陰性 AML 芽球には結合しないことが示された (図 3 および 5)。

30

40

【0214】

マウス 8F4 可変領域遺伝子のクローニングおよび配列決定。7.5% CO₂ インキュベーター内で、10% ウシ胎仔血清 (FBS; HyClone) および 1 mM ビルビン酸ナトリウムを含有する RPMI - 1640 培地 (HyClone, Logan, UT) 中、マウス 8F4 ハイブリドーマ細胞を 37 °C で成長させた。TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して供給業者のプロトコールにしたがって、約 10⁷ 個のハイブリドーマ細胞から全 RNA を抽出した。SMARTer RACE cDNA 増幅キット (Clontech, Mountain View, CA) を使

50

用して供給業者のプロトコールにしたがって、オリゴd Tプライマーによる (o l i g o d T - p r i m e d) c D N A を合成した。マウス - 2 a および 鎖定常領域にそれぞれアニーリングする 3 ' プライマーと、5 ' プライマーとして S M A R T e r R A C E c D N A 増幅キットで提供されるユニバーサルプライマーAミックスまたはネステッドユニバーサルプライマーAとを使用して、P h u s i o n DNAポリメラーゼ (N e w E n g l a n d B i o l a b s , B e v e r l y , M A) によるポリメラーゼ連鎖鎖反応 (P C R) によって、8 F 4 の重鎖および軽鎖の可変領域 c D N A を増幅した。重鎖可変領域 (V H) の P C R 増幅のために、3 ' プライマーは、配列 5 ' - G C C A G T G G A T A G A C C G A T G G - 3 ' (配列番号 4 6) を有する。軽鎖可変領域 (V L) の P C R 増幅のために、3 ' プライマーは、配列 5 ' - G A T G G A T A C A G T T G G T G C A G C - 3 ' (配列番号 4 7) を有する。配列決定のために、増幅した V H および V L c D N A を p C R 4 B l u n t - T O P O ベクター (I n v i t r o g e n) にクローニングした。可変領域の DNA 配列決定を T o c o r e (M e n l o P a r k , C A) で行った。いくつかの重鎖および軽鎖クローンを配列決定し、典型的なマウス重鎖および軽鎖可変領域に相同な固有の配列を同定した。8 F 4 V H および V L の推定アミノ酸配列と一緒に、コンセンサス c D N A 配列をそれぞれ図 1 および 2 に示す。成熟 8 F 4 V H および V L のアミノ酸配列では、独自の特徴は認められなかった。

10

【 0 2 1 5 】

キメラ 8 F 4 I g G 1 / 抗体の構築。テンプレートとして 8 F 4 V H c D N A 、 5 ' プライマーとして 5 ' - G C A A C T A G T A C C A C C A T G A A C T T C G G G C T C A G C - 3 ' (配列番号 4 8 ; S p e I 部位に下線が付されている)、および 3 ' プライマーとして 5 ' - C G A A A G C T T G A A G T T A G G A C T C A C C T G C A G A G A G A G T G A C C A G A G - 3 ' (配列番号 4 9 ; H i n d I I I 部位に下線が付されている) を使用して P C R によって、スプライズドナーシグナルおよび適切なフランキング制限酵素部位を含むエキソンとして、8 F 4 V H をコードする遺伝子を作製した。同様に、テンプレートとして 8 F 4 V L c D N A 、 5 ' プライマーとして 5 ' - G C A G C T A G C A C C A C C A T G G A G T C A C A G A T T C A G - 3 ' (配列番号 5 0 ; N h e I 部位に下線が付されている)、および 3 ' プライマーとして 5 ' - C G A G A A T T C T T T G G A T T C T A C T T A C G T T T G A T T T C C A G C T T G G T G - 3 ' (配列番号 5 1 ; E c o R I 部位に下線が付されている) を使用して P C R によって、スプライズドナーシグナルおよび適切なフランキング制限酵素部位を含むエキソンとして、8 F 4 V L をコードする遺伝子を作製した。8 F 4 V H および V L エキシソンのスプライズドナーシグナルは、それぞれマウス生殖系列 J H 3 および J 1 配列に由来していた。N u c l e o S p i n E x t r a c t i o n I I K i t (M a c h e r e y - N a g e l , B e t h l e h e m , P A) を使用して P C R 増幅断片をゲル精製し、配列確認のために p C R 4 B l u n t - T O P O ベクター (I n v i t r o g e n) にクローニングした。S p e I および H i n d I I I (V H の場合) または N h e I および E c o R I (V L の場合) を用いて、正しい V 断片を消化し、ゲル精製し、キメラ 8 F 4 I g G 1 / 抗体の生成のために、ヒト - 1 および 定常領域を有する哺乳動物発現ベクターにクローニングした。得られた発現ベクター p C h 8 F 4 の概略構造を図 1 1 に示す。

20

30

40

【 0 2 1 6 】

ヒト化 8 F 4 V H および V L 遺伝子の作製。以下のように、ヒト化 8 F 4 V H および V L アミノ酸配列の設計を行った。最初に、J N B i o s c i e n c e s の独自アルゴリズムを使用して、8 F 4 可変領域の三次元分子モデルを構築した。次に、この分子モデルを使用して、C D R 構造の形成に重要なフレームワークアミノ酸残基を同定した。並行して、それぞれ 8 F 4 V H および V L と高い相同性を有する c D N A 由来ヒト V H および V L アミノ酸配列を選択した。最後に、C D R 構造を維持するのに重要なフレームワークアミノ酸残基と共に、C D R 配列を、8 F 4 V H および V L から、対応する選択したヒトフレームワーク配列に移植した。

50

【0217】

GenBankデータベース内で、8F4 VHフレームワークに相同なヒトVH配列を検索し、ヒトU96282 cDNA (U96282 VH) (GenBankアクセッション番号; R assenti and Kipp s, J. Exp. Med. 185: 1435, 1997) によってコードされるVH配列をヒト化用のアクセプターとして選択した。最初に、8F4 VHのCDR配列をU96282 VHの対応する位置に移植した。ヒトフレームワークアミノ酸の置換は、CDR構造を維持するのに必要であるとは予測されなかった。得られたヒト化VH (Hu8F4 VH) のアミノ酸配列を、8F4 およびU96282 VHの配列と共に図12に示す。

【0218】

8F4 VLフレームワーク配列との相同性検索に基づいて、AY043146 cDNA (AY043146 VL) (GenBankアクセッション番号; Ghiottoら、2001年6月29日にGenBankに寄託) によってコードされるヒトV領域をヒト化用のアクセプターとして選択した。最初に、8F4 VLのCDR配列をAY043146 VLの対応する位置に移植した。次に、フレームワークの70位(8F4可変領域の三次元モデルの分析により、CDRとの接触が示された場所)において、マウス8F4 VL由来のアミノ酸残基で、対応するヒト残基を置換した。得られたヒト化VL (Hu8F4 VL1) のアミノ酸配列を、8F4 およびAY043146 VLの配列と共に図13に示す。

【0219】

マウス8F4 VLの70位のValは、CDR構造の形成に重要なフレームワーク位置に位置するが、8F4可変領域の分子モデルの詳細な分析により、抗原結合親和性を失わずに、Hu8F4 VL1の70位のアミノ酸残基を、AY043146 VLの対応するヒト残基Aspで置き換え得る可能性が示唆された。ヒト化8F4抗体の潜在的免疫原性をさらに低減するために、Hu8F4 VL1の70位のValをAspで置き換えた第2のヒト化VL (Hu8F4 VL2) を設計した。Hu8F4 VL2のアミノ酸配列を図13に示す。

【0220】

シグナルペプチドと、スプライスドナーシグナルと、哺乳動物発現ベクターにその後クローニングするのに適切な制限酵素部位とを含むエキソンとして、Hu8F4 VHをコードする遺伝子を設計した。Hu8F4 VHエキソンのスプライスドナーシグナルは、ヒト生殖系列JH3配列に由来していた。ヒト化Hu8F4 VHエキソンのシグナルペプチド配列は、対応するマウス8F4 VH配列に由来していた。

【0221】

シグナルペプチドと、スプライスドナーシグナルと、哺乳動物発現ベクターにその後クローニングするのに適切な制限酵素部位とを含むエキソンとして、Hu8F4 VL1およびVL2をコードする各遺伝子を設計した。Hu8F4 VL1およびVL2エキソンのスプライスドナーシグナルは、ヒト生殖系列J4配列に由来していた。ヒト化Hu8F4 VL1およびVL2エキソンのシグナルペプチド配列は、対応するマウス8F4 VL配列に由来していた。

【0222】

機密非開示契約の下で、GenScript USA (Piscataway, NJ) がHu8F4 VH、VL1およびVL2遺伝子を構築した。SpeIおよびHindIII (VHの場合) またはNheIおよびEcoRI (VLの場合) による消化後、ヒトIgG1 / 形態で生成するために、Hu8F4 VH、VL1およびVL2遺伝子を、哺乳動物発現ベクター中の対応する部位にサブクローニングした。得られた発現ベクターpHu8F4-1は、Hu8F4 VHおよびVL1を含有するヒト化8F4 IgG1 / 抗体 (Hu8F4-1) を発現する。同様に、pHu8F4-2は、Hu8F4 VHおよびVL2を含有するヒト化8F4 IgG1 / 抗体 (Hu8F4-2) を発現する。pHu8F4-1およびpHu8F4-2の概略構造を図11に示す。Hu8F4

10

20

30

40

50

VH、VL1およびVL2遺伝子のヌクレオチド配列を、推定アミノ酸配列と共に、それぞれ配列番号20/21、22/23および24/25として示す。

【0223】

また、IgG1-AAと称されるパリアントヒトIgG1/形態を生成するために、Hu8F4 VHおよびVL2遺伝子を別の哺乳動物発現ベクターにクローニングした。IgG1-AA形態は、-1重鎖に2つのアミノ酸置換(234位におけるLeuからAla、および235位におけるLeuからAla)を有し(Eu付番; Kabatら、1991)、その結果、Fc受容体に対する結合が大幅に減少する(米国特許第6,491,916号)。得られたプラスミドpHu8F4-2-AAの概略構造を図11に示す。

10

【0224】

キメラおよびヒト化8F4 IgG1/抗体を産生するNS0安定トランスフェクタントの作製。Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2およびHu8F4-2-AA IgG1/抗体を安定的に産生する細胞系を得るために、それぞれ発現ベクターpCh8F4、pHu8F4-1、pHu8F4-2およびpHu8F4-2-AAを、マウス骨髄腫細胞系NS0(European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK)の染色体に導入した。7.5%CO₂インキュベーター内で、10%FBSを含有するDME培地中、NS0細胞を37で成長させた。Bebbingtonら、(Bio/Technology 10:169-175, 1992)に記載されているように、エレクトロポレーションによって、NS0への安定トランスフェクションを行った。トランスフェクションの前に、FspIを使用して各発現ベクターを線状化した。20μgの線状化プラスミドで約10⁷個の細胞をトランスフェクトし、10%FBSを含有するDME培地中に懸濁し、いくつかの96ウェルプレートにプレティングした。48時間後、選択培地(10%FBS、HT培地補充物(Sigma, St. Louis, MO)、0.25mg/mlキサンチンおよび1μg/mlミコフェノール酸を含有するDME培地)をアプライした。選択開始の約10日後、抗体産生について培養上清をアッセイした。

20

【0225】

サンドイッチELISAによって、キメラおよびヒト化8F4 IgG1/抗体の発現を測定した。典型的な実験において、100μl/ウェルの1/2000希釈ヤギ抗ヒトIgG Fc鎖特異的ポリクローナル抗体(Sigma)のPBS溶液でELISAプレートを4で一晩コーティングし、洗浄緩衝液(0.05%Tween 20を含有するPBS)で洗浄し、300μl/ウェルのブロッキング緩衝液(2%スキムミルクおよび0.05%Tween 20を含有するPBS)を用いて室温で0.5時間ブロッキングした。洗浄緩衝液で洗浄した後、ELISA緩衝液(1%スキムミルクおよび0.025%Tween 20を含有するPBS)で適切に希釈したサンプルを1ウェル当たり100μl、ELISAプレートにアプライした。適切なヒト化IgG1/抗体を標準として使用した。ELISAプレートを室温で1時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、100μl/ウェルの1/2000希釈HRPコンジュゲートヤギ抗ヒト鎖ポリクローナル抗体(Southern Biotech)を使用して、結合した抗体を検出した。室温で0.5時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、100μl/ウェルのABTS基質(bioWORLD, Dublin, OH)を添加することによって、発色を実施した。100μl/ウェルの2%シュウ酸を添加することによって、発色を停止した。吸光度を405nmで読み取った。高レベルのCh8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2およびHu8F4-2-AA抗体を産生するNS0安定トランスフェクタント(それぞれNS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5およびNS0-Hu8F4-2-AA 1D3)を、Hybridoma-SFM(Invitrogen)を使用して無血清培地での成長に適合させた。PCRマイコプラズマ検出セット(Takara Bio USA, Madison, WI)を用いて試験することにより、NS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8

30

40

50

F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5およびNS0-Hu8F4-2-AA 1D3は、マイコプラズマの存在について陰性であったことが示された。

【0226】

NS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5およびNS0-Hu8F4-2-AA 1D3で産生された重鎖および軽鎖の确实性を、cDNA配列決定によって確認した。TRIzol試薬(Invitrogen)を使用して細胞から全RNAを抽出し、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を使用して供給業者のプロトコールにしたがって、オリゴdTプライマーによるcDNAを合成した。プライマーとしてCMV2およびJNT098(図11)ならびにPhusion DNAポリメラーゼを使用してPCRによって、1重鎖のコード領域を増幅した。PCR断片をゲル精製し、配列番号26および28~30に示されているCMV2、JNT082、JNT097およびJNT098をプライマーとして用いて配列決定した。同様に、CMV2およびJNT026(配列番号26および27)を使用して、軽鎖のコード領域を増幅した。プライマーとしてCMV2およびJNT026を用いて、ゲル精製DNA断片を配列決定した。それぞれCh8F4重鎖、Ch8F4軽鎖、Hu8F4-1重鎖、Hu8F4-1軽鎖、Hu8F4-2重鎖、Hu8F4-2軽鎖、Hu8F4-2-AA重鎖およびHu8F4-2-AA軽鎖のコード領域の得られたヌクレオチド配列は、pCh8F4、pHu8F4-1、pHu8F4-2またはpHu8F4-2-AAベクターの対応する配列(配列番号31/32、33/34、35/36、37/38、39/40および41/42)と完全に一致した。

10

20

【0227】

8F4-4、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2およびHu8F4-2-AA抗体の精製。10%FBSを含有するRPMI培地(Hyclone)中でハイブリドーマ8F4-4(Dr.Moldremによる提供)を培養し、Hybridoma-SFM中での成長に適合させた。ローラボトル内で、Hybridoma-SFM中、8F4-4、NS0-Ch8F4 1-G8、NS0-Hu8F4-1 1-D2、NS0-Hu8F4-2 1-F5およびNS0-Hu8F4-2-AA 1D3細胞を約 10^6 /mlの密度まで成長させ、SFM4MAB培地(Hyclone)に溶解した60mg/mlのUltrafiltered Soy Hydrolysate(Irvine Scientific, Santa Ana, CA)を1/10容量与え、細胞生存率が50%未満になるまでさらに成長させた。遠心分離および濾過の後、培養上清をプロテイン-A Sepharoseカラム(HiTrap MAB Select Sure, GE Healthcare, Piscataway, NJ)にロードした。PBSでカラムを洗浄してから、0.1Mグリシン-HCl(pH3.0)で抗体を溶出した。1M Tris-HCl(pH8)で中和した後、溶出した抗体の緩衝液を透析によってPBSに交換した。280nmの吸光度を測定することによって、抗体濃度を決定した($1\text{mg/ml} = 1.4\text{OD}$)。各バッチの8F4-4、Ch8F4、Hu8F4-1、Hu8F4-2およびHu8F4-2-AAの精製および収量を表5に要約する。

30

表5

40

【表 5】

抗体	ロット	収量
8F4-4	1/27/11	1 L培養物から 30 mg
Ch8F4	8/10/10	500 mL培養物から7 mg
Hu8F4-1	9/8/10	1 L培養物から6.5 mg
Hu8F4-2	9/9/10	1 L培養物から11 mg
Hu8F4-2	1/23/11	1 L培養物から21 mg
Hu8F4-2-AA	3/15/11	500 mL培養物から10 mg

10

8 F 4 - 4、C h 8 F 4、H u 8 F 4 - 1、H u 8 F 4 - 2 および H u 8 F 4 - 2 - A A の様々な精製ロットおよび収量。

【0228】

標準的な手順にしたがって SDS - P A G E によって、精製 8 F 4 - 4、C h 8 F 4、H u 8 F 4 - 1、H u 8 F 4 - 2 および H u 8 F 4 - 2 - A A を特性決定した。還元条件下における分析により、各抗体は、分子量約 5 0 k D a の重鎖および分子量約 2 5 k D a の軽鎖から構成されることが示された (図 1 4)。各抗体の純度は、9 5 % 超であるようであった。

【0229】

C h 8 F 4 および H u 8 F 4 抗体の特性決定。P R 1 ペプチド (V L Q E L N V T V (配列番号 4 5)) と H L A - A 2 との複合体 (P R 1 / H L A - A 2) を使用して E L I S A によって、C h 8 F 4、H u 8 F 4 - 1、H u 8 F 4 - 2 および H u 8 F 4 - 2 - A A の抗原結合を調べた。最初に、1 0 0 μ l / ウェルの 5 μ g / m l ストレプトアビジン (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e , P A) P B S 溶液で E L I S A プレートにコーティングした。洗浄緩衝液 (0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含有する P B S) でウェルを洗浄し、ブロッキング緩衝液でブロッキングした後、5 0 μ l / ウェルの 2 μ g / m l ビオチン化 P R 1 / H L A - A 2 (D r . M o l l d r e m により提供されたもの) を添加した。室温で 3 0 分間インキュベートした後、洗浄緩衝液で E L I S A プレートを洗浄した。P R 1 / H L A - A 2 に結合させるために、1 μ g / m l から開始して E L I S A 緩衝液で 3 倍系列希釈した、C h 8 F 4、H u 8 F 4 - 1、H u 8 F 4 - 2 および H u 8 F 4 - 2 - A A 抗体を添加した。E L I S A プレートを室温で 1 時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、1 0 0 μ l / ウェルの 1 / 2 0 0 0 希釈 H R P コンジュゲートヤギ抗ヒト 鎖ポリクローナル抗体を使用して、結合した抗体を検出した。室温で 3 0 分間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄した後、1 0 0 μ l / ウェルの A B T S 基質を添加することによって、発色を実施した。1 0 0 μ l / ウェルの 2 % シュウ酸を添加することによって、発色を停止した。吸光度を 4 0 5 n m で読み取った。データを図 1 5 に示す。G r a p h P a d P r i s m (G r a p h P a d S o f t w a r e , S a n D i e g o , C A) を使用して計算した E C ₅₀ 値は、C h 8 F 4 が 0 . 0 5 4 μ g / m l であり、H u 8 F 4 - 1 が 0 . 0 5 0 μ g / m l であり、H u 8 F 4 - 2 が 0 . 0 7 μ g / m l であり、H u 8 F 4 - 2 - A A が 0 . 0 7 μ g / m l であった。この結果は、H u 8 F 4 - 1、H u 8 F 4 - 2 および H u 8 F 4 - 2 - A A がすべて、マウス 8 F 4 抗体の抗原結合親和性を保持することを示している。

20

30

40

【0230】

標的細胞に対する抗体の作用。A M L に対する 8 F 4 の結合が細胞溶解を引き起こすかを決定するために、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) アッセイおよび補体依存性細胞傷害 (C D C) アッセイを実施した。H L A - A 2 陰性 A M L や H L A - A 2 + 健常ドナー対照 P B M C ではなく H L A - A 2 + A M L の 8 F 4 による C D C 媒介性溶解は、抗体用量依存的事実であることが示された (図 4)。8 F 4 C D C 媒介性溶解に対して感受性であることが示された患者材料由来の A M L 細胞を、8 F 4 またはアイソタイプ対照の存在下

50

たは非存在下でインキュベートし、次いで、照射(200 cGy)免疫不全HLA-A2トランスジェニックNOD/SCIDマウスに移植した。2週間の時点で動物を屠殺し、FACSによって脾細胞および骨髄を分析した。剖検では、IgG2aアイソタイプ対照処置動物においてのみ、AMLが同定されたが、8F4処置動物では同定されなかった(図6)。8F4のみを投与したマウスでは、アイソタイプ処置マウスと比較して明らかな毒性はなかった。全体として、これらのデータは、8F4モノクローナル抗体が：(1)高親和性で、複合PR1/HLA-A*0201エピトープに特異的に結合し；(2)骨髄性白血病を含むヒト細胞表面上の、PR1ペプチドが占有しているHLA-A*0201分子に特異的に結合し、これを同定するのに使用することができ；(3)補体の存在下でHLA-A2+AMLの特異的溶解を引き起こし；(4)免疫不全マウスモデルにおけるAML生着を防止することができるという結論を裏付けている。

10

【0231】

腫瘍生着の防止。AML細胞に加えて8F4を注射した後の実験マウスの組織におけるAML浸潤を測定し、図8A~Bに示す。非移植対照および実験8F4処置マウスの骨髄および末梢血では、AML細胞は検出されなかった。アイソタイプマッチ対照抗体(iso)と混合したAML細胞を投与したマウスは、AML移植の2または4週間後にAML1およびAML5の生着を示した。マウス細胞特異的マーカー(mCD45)、3~6つのヒトマーカー(CD45、CD13、CD33、CD34、CD38、HLA-DR)およびLive/Dead Fixable Aqua(Invitrogen)を含む拡張パネルを、AML生着のフローサイトメトリー分析に使用した。すべてのプロットは、mCD45-生細胞を示す。

20

【0232】

8F4は、HLA-A2トランスジェニックNOD/SCIDにおいて一過性好中球減少症を誘導する。内因性PR1を提示することが示されたHLA-A2 Tg NOD/SCIDに8F4または対照Abを注射した。骨髄細胞を採取し、マウス抗原に対するmAbで染色した。骨髄の分散プロファイルでは、顆粒球の減少が明白であった(図9A；左のパネル)。8F4処置マウスの骨髄では、Gr-1lo未成熟好中球は存在していたが、Gr-1hi成熟好中球はより少数であった(図9A；中央のパネル)。加えて、8F4処置動物では、単球(SSC1o CD11b+；図9A；右のパネルの右下ゲート)が減少していた。HLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスでは、8F4の静脈内注射により、循環成熟顆粒球、マクロファージおよび単球の絶対数の一過性減少を誘導した(図9B)。処置の3週間後において、すべての集団が依然として生き残っている。200µg(10mg/kg)の8F4を注射した7日後のHLA-A2 Tg NOD/SCIDマウスの肝臓、肺、脾臓、腎臓、心臓または脳では、有意な病理学的変化の証拠がなかった(図9C)。

30

【0233】

8F4は、確立したヒト造血細胞の一過性白血球減少症を誘導する。マウス由来の末梢血を利用して臍帯血移植をモニタリングし、移植の9~12週間後に8F4をマウスに注射した。続いて、マウスを屠殺し、ヒト細胞の生着について血液、脾臓および骨髄を分析した(図10B)。認められるように、抗体注射は、移植細胞の%生着を一過性に低下させる(図10A)。

40

【0234】

ヒトAMLに対するヒト化8F4抗体の結合特異性、親和性および活性。Hu8F4の結合特異性を特性決定するために、本発明者らはFACSベースのアッセイを行って、Hu8F4がPR1をパルスしたT2細胞のみに結合し(図16A)、pp65をパルスしたT2細胞には結合しないことを示した。Hu8F4の結合親和性を特性決定するために、本発明者らはELISAを使用して、2つの形態のヒト化抗体(Hu8F4-1(Hu1)およびHu8F4-2(Hu2))の結合を、マウス8F4およびアイソタイプ対照(rhIgG1)と比較した。本発明者らは、組換えPR1/HLA-A2モノマーでコーティングしたプレートを使用して抗体を捕捉し、光学密度(OD)によって結合画分を

50

決定する比色アッセイにおいて抗ヒト抗体を使用した。図16Bに示されているように、Hu1およびHu2は、それぞれ7.7および7.8 nMの K_D を示し、これはマウス8F4 ($K_D = 9.9$ nM)と類似していた。したがって、2つのヒト化抗体は、親マウス抗体と比較して同一のリガンド特異性および結合親和性を有する。このデータは、前臨床動物モデルにおける活性のスペクトルを決定するさらなる実験において、Hu8F4抗体を使用することの生化学的な正当性を立証している。

【0235】

Hu8F4の潜在的な作用機序を取り扱うために、本発明者らは、ウサギ補体の存在下においてHu8F4またはアイソタイプ対照抗体(IgG1)で、PR1をパルスしたT2標的細胞を処理し、標準的なアッセイを使用して補体媒介性溶解を決定した。図16Cに示されているように、Hu8F4およびキメラCh8F4(IgG1由来のヒトFcおよび8F4由来のマウスF(ab)₂)は、補体依存性細胞傷害(CDC)を媒介しなかった。したがって、マウス8F4(IgG2)とは異なり、Hu8F4は、補体結合によって標的細胞を溶解しない。Hu8F4が、ADCC、直接アポトーシス、または有糸分裂および増殖の抑制を媒介するかを決定するために、本発明者らは、進行中の実験においてさらなる研究を行っている。

【0236】

次に、本発明者らはHu8F4を使用して、NSGマウスにおける確立した初代ヒトAML異種移植片を処置した。最初に、AMLを2週間にわたってマウスに生着させ、次いで、Hu8F4、Ch8F4またはアイソタイプIgG1(10 mg/kgの抗体)で2週間にわたって週3回処置した。BMおよび末梢血キメリズムを処置後に分析した。図17に示されているように、3つの異なるAML標本を用いる3つの別個の実験は、アイソタイプ対照と比較して、Hu8F4およびCh8F4によって除去されたか、または、それらの成長が有意に阻害されたかのいずれかであった。したがって、これらのデータは、Hu8F4が、処置抵抗性再発性疾患を有する患者由来の初代ヒトAMLに対して非常に生物学的に活性であること、およびNSGマウスは主要な補体タンパク質の発現を欠くので、Hu8F4の作用機序が補体非依存的であることを立証している。

【0237】

HLA-A2トランスジェニック免疫適格(B6)マウスおよび免疫不全(NOD/scid)マウスにおける8F4の生物学的安全性データ。本発明者らは、Hu8F4の前臨床試験のための3つのマウスモデルを樹立した：HLA-A2トランスジェニックB6免疫適格マウス、HLA-A2トランスジェニックNOD/scidマウス、およびNSG(IL-2共通鎖を欠く)マウス。潜在的な毒性を決定するために、本発明者らは最初に、PR1が、HLA-A2トランスジェニック動物のそれぞれ5%および6%の造血幹細胞および顆粒球のHLA-A2上で発現していることを示した。本発明者らは次に、高用量の8F4(10 mg/kg)の単回静脈内(IV)投与により、HLA-A2トランスジェニックマウスの両方において一過性かつ完全に可逆的血球減少症が誘導されることを示した(図18~19)。CD34選択ヒト臍帯血をNSGマウスに生着させて長期安定なヒトキメリズムを確立しており、該NSGマウスを、Hu8F4の単回投与および複数回投与で処置して、PR1/HLA-A2+ヒト造血幹細胞に対するmAbの効果

【0238】

抗PR1/HLA-A2 mAbであるH8F4は、トリプルネガティブ乳がん異種移植片の腫瘍成長を遅延させ、生存を延長させる。上記白血病の研究に加えて、本発明者らは、造血系に限定されたセリンプロテアーゼ(好中球エラスターゼ(NE)およびプロテイナーゼ3(P3))由来の9merのPR1ペプチドも、内因性P3またはNEを発現しない多くの非造血系腫瘍(黒色腫、非小細胞肺癌および乳がんを含む)のHLA-A2上で交差提示され得ることを示した(Alatrashら、2012)。トリプルネガティブ乳がん細胞系MB-MDA-231(231細胞と称される)はP3およびNEを発現しないが、HLA-A2を発現する。しかしながら、これらの細胞は可溶性P3および

10

20

30

40

50

NEを取り込んでPR1を交差提示し、続いて、231細胞を8F4媒介性溶解に対して感受性にする。重要なことに、PR1/HLA-A2は、患者(トリプルネガティブ乳がん(TNBC)患者を含む)の生検由来の乳がん細胞上で発現している(Alatrashら、2012)。したがって、PR1/HLA-A2は乳がんの標的抗原である可能性があり、本発明者らは、8F4がHLA-A2+乳がんに対する生物学的活性を有し得ると推論した。

【0239】

この仮説を試験するために、本発明者らは、NSGマウスの(a)原発性腫瘍および(b)転移性腫瘍異種移植モデルでh8F4の効果を研究した。原発腫瘍モデルでは、231 TNBC細胞をNSGマウスの乳房脂肪体に注射し、続いて、単回用量のh8F4、アイソタイプ対照抗体またはPBSを注射した。生物発光イメージング(BLI)を用いて腫瘍成長を経時的にモニタリングすることができるように、ffluc遺伝子で231細胞をトランスフェクトした。移植の1~2日後の腫瘍部位生検をH&E染色すると、好中球およびマクロファージ(これらは、P3およびNEを天然に発現する細胞である)による腫瘍浸潤が示された(図20A)。図20Bに示されているように、h8F4を投与したマウスでは、アイソタイプ対照またはPBSのいずれかを投与したマウスと比較して、腫瘍成長が遅延した。加えて、h8F4は、対照マウスと比較して生存を延長させた($p < 0.01$)。

10

【0240】

第2のモデルでは、ffluc遺伝子改変231細胞(2×10^5 個)をNSGマウスの尾静脈に注射し、7日目に、10mg/kgのh8F4またはアイソタイプ対照抗体をマウスに週3回投与した。未処置NSGマウスでは、静脈内(IV)注射した231細胞は直ぐに肺(BLIで確認)に転移し、続いて他の組織(脾臓、胃腸(GI)管および肝臓を含む)に転移する。図20Cに示されているように、h8F4は、231細胞の転移性腫瘍の成長を有意に遅延させ、アイソタイプ処置マウスと比較して生存を有意に増大させた($p = 0.0006$)。これらの結果は、腫瘍関連好中球およびマクロファージ由来のP3およびNEがインビボで231細胞によって取り込まれると、PR1がHLA-A2上に交差提示され、これが、h8F4処置によってTNBC細胞の成長が阻害される原因になることを示唆している。したがって、h8F4はTNBCに対して生物学的に活性であり、本発明者らの結果は、h8F4 mAbが、乳がんを含む非造血系HLA-A2+腫瘍を処置するための治療mAbとしての潜在性を有することを強く示唆している。

20

30

実施例3：方法

【0241】

患者の組織、細胞および細胞培養。患者の乳がん凍結組織片は、Origeneから購入した。MD Anderson Cancer Center (Houston, TX)の施設内倫理委員会承認した研究に参加するためのインフォームドコンセントを得た後に、患者および健常ドナーのサンプルを採取した。MDA-MB-231、MCF-7、MDAMB-453およびT47D乳がん細胞系、ならびにSW-620(結腸直腸腺癌)、OVCAR-3(卵巣腺癌)、MIA PaCa-2(膵臓癌)、Jurkat(急性T細胞白血病)、T2(B細胞/T細胞ハイブリドーマ)、HL-60(急性前骨髄球性白血病)およびU-937(組織球性白血病)細胞系は、American Type Culture Collectionから入手した。MCF-HER-18細胞系は、M.-C. Hung (MD Anderson Cancer Center)によって提供された。Mel526、Mel624、MT2019およびMT2333黒色腫細胞系は、L. Radvanyi (MD Anderson Cancer Center)によって提供された。細胞系は、実験で使用する6か月以内に、MD Anderson Cancer CenterにおいてDNAフィンガープリントによって認証されたものである。

40

【0242】

10% FBS (Gemini Bio-Products) および 100 U/ml ペニ

50

シリニン / 100 mg / ml ストレプトマイシン (Cellgro) を補充した 2.5 mM 1-グルタミン (HyClone) を含む DMEM 中で、乳がん細胞を成長させた。選択剤として、G418 (Lonza) (0.5 mg / ml) を MCF-7-HER18 細胞培養物に添加した。白血病細胞系培養物の場合、25 mM HEPES に加えて 1-グルタミン (HyClone) を含む RPMI 1640 を DMEM に代えて使用した。すべての細胞系を 5% CO₂ 中、37 °C で培養した。それぞれ標準的な Histopaque 1077 および 1119 (Sigma-Aldrich) 勾配遠心分離を使用して、健常ドナーおよび患者の PBMC および多形核好中球 (PMN) を富化した。

【0243】

RT-PCR。RNA Stat 60 キット (TelTest) を使用して、細胞系およびレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) サンプルから、mRNA を抽出した。Gene Amp RNA キット (PerkinElmer) を使用して、cDNA の合成を実施した。以下のプライマーを使用した：P3、フォワードプライマー、59-GACCCACCATGGCTCAC-39 [配列番号52] およびリバープライマー、59-ATGGGAAGGACAGACAGGAG-39 [配列番号53] ; マンマグロビン-1、フォワードプライマー、59-AGCACTGCTACGCAGGCTCT-39 [配列番号54] およびリバープライマー、59-ATAAGAAA GAGAAGGTGTGG-39 [配列番号55] ; アクチン、フォワードプライマー、59-CCAGAGCAAGAGAGCTATCC-39 [配列番号56] およびリバープライマー、59-CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-39 [配列番号57] ; ならびに GAPDH、フォワードプライマー、59-TAGACGGGAAGCTCACTGGC-39 [配列番号58] およびリバープライマー、59-AGGTCCA CCA CCT GTT GCT-39 [配列番号59]。95 °C で5分間変性させた後、iCycler (Bio-Rad) を使用して、サンプルを35サイクルで増幅した。サンプルを1.5%アガロースゲルで泳動した。GelDoc 2000 (Bio-Rad) を使用してバンドをイメージングし、Quantity One ソフトウェア (Bio-Rad) によって分析した。

【0244】

ウエスタンブロッティング。プロテアーゼ阻害剤を含有する溶解緩衝液 (10 mM / L HEPES [pH 7.9]、10 mM / L KCl、0.1 mM / L EGTA、0.1 mM / L EDTA および 1 mM / L DTT) に細胞ペレットを懸濁し、続いて、凍結解凍サイクルを15分間行うことによって、全細胞溶解物 (WCL) を作製した。還元条件下の10% SDSゲルにおける電気泳動によってWCLを分離し、ポリビニリデンジフルオリド膜に転写し、5%ミルクでブロッキングし、抗NE (Santa Cruz Biotechnology)、抗P3 (NeoMarkers)、抗チューブリン (Sigma-Aldrich) または抗GAPDH (Sigma-Aldrich) Ab で染色した。化学発光をKodakフィルムに記録した。

【0245】

抗原 (Ag) 交差提示。タンパク質取り込みを決定するために、10 mg / ml の P3、NE (両方とも Athens Research & Technology 製)、EndoGrade OVA (Hyglos) または照射 (7500 cGy) PMN もしくは PBMC (1:1 (乳がん:照射細胞) の比) を含有する還元血清培地 (0.5% FBS) 中で、細胞をパルスした。次いで、細胞を透過処理 (BD Biosciences) し、Alexa-488 または 647 を直接コンジュゲートさせた抗P3 (クローン MCP R3-2; Thermo Scientific) または抗NE (Santa Cruz Biotechnology) で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。交差提示を決定するために、以前に記載されているように (Sergeeva ら、2011)、蛍光コンジュゲート 8F4 で細胞を表面染色した。Alexa-488 または 647 キット (Invitrogen) を使用して、抗P3、抗NE および抗PR1 / HLA-A2 (8F4) Ab を直接コンジュゲートした。Aqua live / dead sta

10

20

30

40

50

in (Invitrogen) を使用して、生存率を評価した。すべてのフローサイトメトリー実験について、光散乱を使用して最初のゲーティングを確立し、続いて aqua live / dead stain を使用した。交差提示を阻害するために、細胞を、小胞体 (ER) - ゴルジ順行輸送 (antegrade) 阻害剤 プレフェルジン A (Sigma - Aldrich) または プロテアソーム阻害剤 ラクタシスチン (Sigma - Aldrich) と共に共培養した (Francois ら、2009, Kovacsovic - Bankowski and Rock 1995 および Mukai ら、2009)。

【0246】

310 / 25 空気対物レンズ、363 / 1.4 オイル対物レンズを備える Leica Microsystems SP2 SE 共焦点顕微鏡 (Leica) を使用して、細胞内 P3 局在を示すための共焦点イメージングを実施し、Leica LCS ソフトウェア (バージョン 2.61) を使用して分析した。FITC コンジュゲート リソソーム結合膜タンパク質 2 (LAMP - 2; eBioscience) を使用して、リソソームおよび後期エンドソームを染色した (Kuronita ら、2002)。Cytomation CyAn フローサイトメーター (Dako) を使用して、フローサイトメトリーを実施した。FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を使用して、データを分析した。

10

【0247】

免疫組織化学。凍結保存乳房腫瘍組織および黒色腫瘍組織 (Origene) をホルマリン固定し、次いで、免疫組織化学のためにパラフィン包埋した。染色前に、キシレン中で組織切片を脱パラフィンし、再水和し、内因性ペルオキシダーゼ活性をクエンチした。10% 正常ウマ血清で切片をブロッキングし、次いで、一次 WGM2 抗 P3mAb クローン (1:10) (Abcam) または抗 NE (Santa Cruz Biotechnology) と共に室温で 30 分間インキュベートした。抗小眼球症関連転写因子 (MITF) Ab (Thermo Scientific) で黒色腫スライドを共染色した。次いで、スライドを洗浄し、二次抗マウス IgG ビオチン Ab (1:200) (Vector Laboratories) と共にインキュベートし、続いて、アビジン - ビオチンペルオキシダーゼ (1:100) (Vector Laboratories) と共にインキュベートした。クロマゲン 3, 39 - ジアミノベンジジン (Dako) を染色の可視化に使用した。すべてのスライドをヘマトキシリンで対比染色した。正常扁桃組織の PMN 染色を陽性対照として使用した。一次 Ab の除去後に、陰性対照を上記のように染色した。

20

30

【0248】

ペプチド特異的 CTL 系。以前に記載されているように (Moldrem ら、2000 および Moldrem ら、1999)、インピトロにおいて健常 HLA - A2 ドナー由来の PBMC を PR1 ペプチドで刺激することによって、PR1 特異的 CTL を増殖させた。簡潔に言えば、無血清 RPMI 1640 培地で T2 細胞を洗浄し、20 mg / ml の PR1 ペプチドと共に 37 °C で 90 分間インキュベートした。ペプチド負荷 T2 細胞に 7500 cGy を照射し、洗浄し、10% ヒト AB 血清を補充した RPMI 1640 培地中で、新鮮な単離された PBMC と共に 1:1 の比で培養した。7 日目、14 日目および 21 日目において、ペプチドをパルスした T2 細胞で培養物を再刺激し、その翌日に、20 IU / ml ヒト rIL - 2 (BioSource International) を添加した。

40

【0249】

細胞媒介性細胞傷害アッセイ。以前に記載されているように (Moldrem ら、1996 および Moldrem ら、1997)、標準的な細胞傷害アッセイを使用して特異的溶解を決定した。簡潔に言えば、カルセイン - AM (Invitrogen) を用いて、10 ml 中 1000 個の標的細胞の (細胞 1.0 × 10⁵ 個 / ml) を 37 °C で 90 分間染色し、RPMI 1640 で 3 回洗浄し、次いで、様々な E:T 比で 10 ml のペプチド特異的 CTL と共に共培養した。37 °C、5% CO₂ における 4 時間のインキュ

50

バージョン期間後、5 ml のトリパンブルーを各ウェルに添加し、自動 C y t o F l u o r I I プレートリーダー (P e r S e p t i v e B i o s y s t e m s) を使用して蛍光を測定した。以下のように、特異的細胞傷害の割合を計算した：([蛍光標的 + エフェクター - 蛍光培地] / [蛍光標的のみ蛍光培地]) × 100。

【0250】

補体媒介性細胞傷害アッセイ。交差提示が乳がんの8F4感受性を増加させるかを決定するために、本発明者らは、以前に記載されているように (S e r g e e v a ら、2011 および P r a n g ら、2005)、補体媒介性細胞傷害アッセイを実施した。NE (10 mg / ml) または P 3 (10 mg / ml) を含有する培地中で、MDA - M B - 231 細胞を24時間培養した。細胞をカルセイン - A M (I n v i t r o g e n) と共にインキュベートし、3回洗浄し、無血清RPMI 1640に再懸濁した。100万個の細胞を、漸増用量の8F4 Ab (0.624、1.25、2.5、5 および 10 mg / ml) または最終濃度 10 mg / ml のアイソタイプ Ab (陰性対照) と混合し、37 °C で10分間インキュベートした。次いで、標準ウサギ補体 (5 ml ; C e d a r l a n e L a b o r a t o r i e s) を添加し、細胞を37 °C で60分間インキュベートした。BB7.2ハイブリドーマ (抗HLA - A 2の供給源) 由来の上清およびジギトニン (P r o m e g a) を陽性対照として使用した。上記のように蛍光を測定し、特異的な死滅化を計算した。

【0251】

LCMおよび乳房腫瘍組織からのRNA抽出。IRダイオードレーザー (L i f e T e c h n o l o g i e s , A p p l i e d B i o s y s t e m s) を備える A r c t u r u s P i x C e l l レーザーキャプチャー顕微鏡を用いて、乳房腫瘍生検組織由来の乳がん細胞を単離するために、LCMを実施した。組織を切片化し (厚さ 5 mm)、非荷電ガラススライド上に置き、75%エタノールおよびピロ炭酸ジエチル水で固定した。ヘマトキシリンを使用して、組織水和後に核染色した。段階的なアルコール脱水後、LCMの準備が整うまでサンプルをキシレン中に保存した。H&E染色を使用して、マイクロダ イセクションに使用する領域を特定した。出力を30~70mWに調整したレーザー光を組織にパルスして、直径10mmを維持した。A r c t u r u s C a p s u r e H S L C M キャップ (L i f e T e c h n o l o g i e s , A p p l i e d B i o s y s t e m s) において、約5000個の乳がん細胞を捕捉した。A r c t u r u s P i c o P u r e R N A 単離キット (L i f e T e c h n o l o g i e s , A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して、全RNAを抽出および精製した。N a n o D r o p N D - 1000 分光光度計 (T h e r m o S c i e n t i f i c) を用いて、RNAの完全性および量を決定した。A r c t u r u s R i b o A m p R N A 増幅キットを使用し、2ラウンドのT7ベースの増幅を用いてRNAを増幅した。これにより、2.5mgの増幅RNAが得られた。R o c h e T r a n s c r i p t o r F i r s t S t r a n d c D N A 合成キット (R o c h e A p p l i e d S c i e n c e) を使用して製造業者の指示にしたがって、1mgの増幅RNAからcDNAを合成した。

【0252】

乳がん患者のPR1-CTLの染色。以下の蛍光Ab：CD8アロフィコシアニン-H7 (B D B i o s c i e n c e s)、CD3 PE Cy7 (B D B i o s c i e n c e s)、CD4パシフィックオレンジ (I n v i t r o g e n)、PEコンジュゲート PR1/HLA - A 2 - デキストラマー (I m m u d e x)、および以下のパシフィックブルーコンジュゲート (c o n j u g a t e d) 系統Ab：CD14 (B D B i o s c i e n c e s)、CD16 (B D B i o s c i e n c e s) および CD19 (B i o L e g e n d) を用いて、患者由来のPBMCを染色した。A q u a l i v e / d e a d s t a i n (I n v i t r o g e n) を使用して、死細胞を排除した。4%パラホルムアルデヒドでサンプルを固定した。C a n t o フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s) でデータを取得し、F l o w J o ソフトウェア (T r e e S t a r) を

使用して分析した。系統⁻、CD4⁻、CD3⁺、CD8⁺およびPR1⁻デキストラマー⁺であった生細胞の割合として、PR1⁻CTLの頻度を決定した。

【0253】

患者組織の共焦点イメージング。冷アセトンで凍結保存組織切片を固定した。乳がんマーカーAlexa-488コンジュゲートマウス抗サイトケラチン-7 (CK7) Ab (Abcam) およびAlexa-647コンジュゲート8F4 Ab (Sergeevaら、2011)を用いて、乳がん組織を染色した。PR1/HLA-A2発現が、浸潤性白血球によるものではなく乳がん細胞によるものであることを確認するために、白血球マーカーとしてAlexa-647コンジュゲートマウス抗CD45 Ab (Invitrogen)を用いて、乳がん組織の連続切片も染色した。ヒト扁桃組織切片 (Origene)をCD45の陽性染色対照として使用した。黒色腫の場合、冷アセトンで組織切片を固定し、0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)で15分間透過処理し、5%正常ヤギ血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)でブロックした。次いで、切片を黒色腫マーカーマウス抗MITF (Thermo Scientific)と共に1時間インキュベートし、PBSで洗浄し、次いで、Alexa-488コンジュゲートヤギ抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)と共にインキュベートした。次いで、スライドを洗浄し、5%正常マウス血清 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)でブロックし、Alexa-647コンジュゲート8F4 Abと共にインキュベートした。DAPI (Invitrogen)を含むProLong Gold退色防止 (antifade) 試薬を添加した。310/25空気対物レンズ、363/1.4オイル対物レンズを備えるLeica Microsystems SP2 SE共焦点顕微鏡を使用して、共焦点イメージングを実施した。Leica LCSソフトウェア (バージョン2.61)をイメージング分析に使用した。

実施例4：結果

【0254】

固形腫瘍は、NEおよびP3を取り込む。NEおよびP3の取り込みが普遍的な現象であるかを決定するために、本発明者らは、複数の固形腫瘍細胞系を10mg/mlのNEまたはP3と共に共培養し、次いで、フローサイトメトリーを使用して細胞内取り込みについて評価した。本発明者らは、すべての腫瘍型がNEおよびP3を取り込むわけではなく、さらに取り込みの程度が様々な腫瘍型で異なることを示した (図21)。加えて、NEの取り込みは時間と共にプラトーになるようであり、P3の取り込みよりもかなり少ないが、これは取り込み機構が異なることを示しており、NEの取り込みに関与し得る過程が受容体媒介性であることを示唆している。

【0255】

P3は乳がん存在しない。本発明者らは、NEが乳がん存在せず、乳がん細胞によって取り込まれることを以前に示したので (Mittendorfら、2012)、P3の取り込みを内因性発現と区別するために、本発明者らは、mRNAレベルおよびタンパク質レベルにおけるP3発現について、乳がん細胞系および原発性腫瘍組織を分析した。PCRは、乳がん細胞系MDA-MB-231、MCF-7、MCF-7-HER18 (HER18) およびMDAMB-453がすべて、P3 mRNAを欠くことを示している (図22A)。同様に、3つの異なる乳房腫瘍から抽出した乳がん細胞 (図22B、表6)もP3 mRNAを欠く。細胞系由来のWCLの免疫プロットにより、P3タンパク質は乳がん細胞に存在しないことが確認された (図22C)。原発性乳がんの免疫組織化学染色により、P3が乳がん組織で検出されたが、P3は乳房腫瘍内の炎症性成分に限定されており、乳房腫瘍細胞にはなかった (図22D)。これらのデータは、P3が乳がんにあることを示す以前の報告 (Desmedtら、2006)と一致するが、本発明者らのデータは、P3の供給源が乳がん細胞ではなく腫瘍内の炎症細胞であることを示唆している。

10

20

30

40

50

表 6 - L C M および共焦点顕微鏡検査に使用した乳房腫瘍組織および黒色腫瘍組織の病理学的特徴

【表 6】

患者	組織学	ER/PR/HER2 の状態	TNM 病期分類	HLA-A2 の状態
乳房 1	IDC	ER2-/PR2-/HER22-	T1cNXMX	陽性
乳房 2	IDC	ER2-/PR2-/HER2+	T2N1bMX	N/D
乳房 3	IDC/ILC	ER+/HER2+	T2N1aMX	陰性
乳房 4	IDC	ER2-/HER22-	T3N0MX	陽性
黒色腫 1	結節	N/A	T3N2M1c	陽性
黒色腫 2	N/D	N/A	T3N2M1b	陰性

10

ER、エストロゲン受容体；HER2、HER2/neu；IDC、浸潤性腺管癌；ILC、浸潤性小葉癌；N/D、未決定；PR、プロゲステロン受容体；TNM、悪性腫瘍の腫瘍/結節/転移分類。

【0256】

P3は、乳がん細胞によって取り込まれる。本発明者らは、P3が乳がん細胞によって内因的に発現されないことを示したので、本発明者らは、本発明者らがNEについて以前に示したように(Mittendorfら、2012)、P3が乳がん細胞によって取り込まれ得ると仮説を立てた。HLA-A2陽性細胞系MDA-MB-231、MCF-7およびHER18を10mgのP3と共に共培養し、次いで1時間、4時間および24時間の時点において、フローサイトメトリーを使用して、P3の細胞内取り込みについて分析した(図23A)。本発明者らは、3つの細胞系すべてにおいて、P3の取り込みが時間依存的に増加することを検出した。本発明者らはまた、プラトーが現れないP3の取り込みが用量依存的であることを実証したが、これは、P3の取り込み過程が非受容体媒介性であることを示唆している(図23B)。P3の取り込みが、区別可能な細胞区画(Cresswellら、2005)で起こる抗原(Ag)交差提示に関係するとさらに特性決定するために、本発明者らはレーザー共焦点顕微鏡検査を実施し、P3とLAMP-2との共染色によって示されているように、取り込み後、P3がリソソーム内に局在することを示した(図23C)。リソソーム区画への取り込みは初期の時点(1~4時間)で起こったが、抗原は、HLAクラスI分子上での交差提示のためにプロセシングされる(Bashaら、2008)ので、それは抗原(Ag)分解の初期段階の可能性もある。

20

30

【0257】

様々な細胞経路が、可溶性タンパク質および細胞結合タンパク質の取り込みおよびプロセシングに関与するので(これが、それらが交差提示されるかを決定し得る)(Burgdorffら、2006)、ならびに乳がんを含む腫瘍組織中に好中球が報告されたので(Queenら、2005およびJensenら、2009)、本発明者らは、乳がん細胞による可溶性および細胞結合P3の取り込みに差異があったかを評価した。これを調べるために、MDA-MB-231細胞を、可溶性P3(10mg/ml)と共に、または照射PMNもしくはPBMCと1:1の比で4時間共培養した(図24A；データは示さず)。データにより、乳がん細胞は、可溶性P3および細胞結合P3の両方を取り込み得ることが実証された。実際、細胞結合P3からの取り込みは、可溶性タンパク質の取り込みと比較してより効率的であるようであり(蛍光強度中央値[MFI]=12,292対1,356；p,0.05)、これは、P3と、取り込みを促進し得る他のタンパク質との結合による可能性がある。

40

【0258】

P3およびNEは、乳がん細胞によって交差提示される。本発明者らは、NEも乳がんによって取り込まれることを示したので(Mittendorfら、2012)、およびPR1は、好中球アズール顆粒プロテアーゼNEおよびP3の両方に由来するので、本発明者らは、NEおよびP3が、取り込み後に乳がん細胞によって交差提示されるかを調査

50

した。HLA-A2+MDA-MB-231細胞を漸増時点で可溶性P3またはNEと共に共培養し、続いて、マウス抗PR1/HLA-A2 Ab 8F4 (Sergeevaら、2011)を使用してPR1/HLA-A2発現について分析した。これらのデータは、乳がん細胞が、NEおよびP3の両方由来のPR1を交差提示し得ること示している。主に24時間の時点において、有意なPR1交差提示が認められ(図24B)、それぞれNEおよびP3と共に培養した後の乳がん細胞表面上では、PR1/HLA-A2が、パルスしていない細胞と比較して2.5倍および3.0倍増加した。細胞表面上のHLA-A2発現は、有意に増加していなかった(データは示さず)。

【0259】

さらに、NEおよびP3の交差提示に關与する細胞内機構を調査するために、本発明者らは、他の抗原(Ag)について以前に示されたように(Francoisら、2009、Kovacsovics-Bankowskiら、1995およびMukaiら、2009)、プロテアソームおよびER/ゴルジがNEおよびP3の交差提示に關与するかを研究した。ER-ゴルジの順行性輸送を阻害するプレフェルジンAと共に、およびプロテアソーム阻害剤ラクタシスチンと共に細胞をインキュベートすると、その両方において、NEまたはP3との共培養後にMDA-MB-231乳がん細胞によるPR1/HLA-A2発現が減少したので(図24C、24D)、本発明者らのデータは、ER/ゴルジおよびプロテアソームの両方がNEおよびP3の交差提示に關与することを示している。これは、プロテアソームおよびER/ゴルジがAPCによるNEおよびP3の交差提示に關与することを実証する本発明者らの以前の結果と類似する(Alatrashら、2012)。

【0260】

PR1の交差提示は、乳がんをPR1ターゲティング療法に対して感受性にする。白血病では、PR1ペプチドワクチン(Rezvaniら、2008)、PR1-CTL(Rezvaniら、2007およびMaら、2010)および抗PR1/HLA-A2 Ab(8F4)(Sergeevaら、2011)を使用して、PR1が有効にターゲティングされたので、本発明者らは、交差提示後の乳がん細胞上におけるPR1/HLA-A2発現が、これらの細胞をPR1-CTLおよび8F4 Abによる死滅に対して感受性にするかを調査した。標準的なカルセイン-AM細胞傷害アッセイ(Moldremら、1996; Jiangら、1996)において、10mg/mlのNEまたはP3を含む媒体中でHLA-A2+MDA-MB-231細胞を24時間培養し、次いで、健常ドナーの増殖したPR1-CTLと共に4時間インキュベートした(図24E)。データは、NEおよびP3の交差提示が、NEまたはP3のパルス後に、パルスしていないMDA-MB-231細胞と比較して、PR1-CTLによる死滅に対するMDA-MB-231細胞の感受性を増加させたことを実証している。同様に、補体依存性細胞傷害アッセイで8F4 Abを使用して(図24F)(Sergeevaら、2011)、本発明者らは、NEまたはP3の交差提示後におけるMDA-MB-231細胞の死滅化が、パルスしていない細胞と比較して用量依存的であることを観察した。最大の死滅化は、最高用量の8F4 Ab(10mg/ml)で認められた。

【0261】

PR1/HLA-A2およびPR1-CTLは、乳がん患者で検出される。本発明者らは、培養乳がん細胞系および腫瘍組織が内因性NEおよびP3を欠くことを示したので、ならびに本発明者らは、NEおよびP3が乳がん細胞によって交差提示され、続いてPR1ターゲティング療法に対して感受性になるというインビトロの証拠を観察したので、本発明者らは、PR1が原発性乳がん患者組織で検出され得るか、およびPR1-CTLが乳がん患者由来の末梢血で検出され得るかを調査した。2つのHLA-A2陽性乳がん組織のレーザー共焦点顕微鏡検査により、8F4が両方の腫瘍組織にあることが実証された(図25A)。8F4染色は、HLA-A2陰性組織には存在しなかった(データは示さず)。また、PR1/HLA-A2発現が、浸潤性白血球ではなく乳がん細胞によるものであることを検証するために、本発明者らは、白血球マーカーCD45を用いて乳がん組

10

20

30

40

50

織の連続切片を染色した。本発明者らは、8F4およびCK7で共染色した乳がん組織の領域にはCD45染色が存在しないことを示したが、これは、PR1/HLA-A2発現が、隣接する炎症細胞ではなく乳がん細胞によるものであったことをさらに確実にした(図25B)。

【0262】

PR1-CTLが乳がん患者で検出され得るかを決定するために、本発明者らは、早期乳がん患者由来の11個の末梢血サンプルのPR1/HLA-A2デキストラマー染色を使用した(図25C)。これらのHLA-A2+患者におけるPR1-CTLの頻度中央値はCD8⁺T細胞の0.05%であり(範囲0.02~0.2%)、健常ドナーにおけるPR1-CTLの頻度(CD8⁺細胞の1/15, 000~1/350, 000)(Mollremら、1997)よりもわずかに高かった。総合すると、これらのインビボデータは、腫瘍微小環境に存在するセリンプロテアーゼNEおよびP3が乳がん細胞によって取り込まれて交差提示され得、これが、NE由来のおよびP3由来のエピトープPR1に対する獲得免疫応答に寄与し得ることを示唆している。

【0263】

黒色腫患者におけるPR1/HLA-A2およびPR1-CTL。黒色腫組織もまた、NEおよびP3の供給源であり得る炎症細胞を有することが示されたので(Jensenら、2012)、ならびに黒色腫は免疫療法に感受性であることが公知であるので(Dudleyら、2002およびSchwartzentruberら、2011)、本発明者らは次に、NEおよびP3の交差提示が黒色腫でも検出され得るかを調査した。PR1-CTLが黒色腫でも検出されるかを決定するために、本発明者らは、黒色腫患者由来のPBMCをPR1/HLA-A2デキストラマーで染色したところ、7人の患者全員でPR1-CTLが検出され、その頻度中央値はCD8⁺T細胞の0.014%(範囲、0.0053~0.019%)であり(図25C)、正常ドナー由来の血液で認められたものと類似していた。本発明者らはまた、HLA-A2₂(黒色腫2)黒色腫組織ではなく1つのHLA-A2₊(黒色腫1)でPR1/HLA-A2発現を検出した(図25D)。

【0264】

黒色腫によるNEおよびP3の交差提示は、PR1-CTLに対する感受性を増加させる。黒色腫がNEおよびP3を発現するかを決定するために、本発明者らは、患者から得られた黒色腫組織をNEおよびP3について染色し、NEおよびP3が存在しないことを示した(図26A、26B)。本発明者らはまた、4つの黒色腫細胞系(MEL526、MEL624、MT2019およびMT2333)におけるNEおよびP3発現を分析した。ウエスタンブロット分析は、NEおよびP3が黒色腫細胞系に存在しないことを示している(図26C)。乳がんと同様に、本発明者らは、NEおよびP3がHLA-A2₊MEL526細胞系によって取り込まれて交差提示されることを実証する(図26D、26E)。8F4 Abは、高次構造PR1/HLA-A2エピトープの大部分を構成するHLA-A2分子に結合するので(Sergeevaら、2011およびPorgadorら、1997)、MEL526細胞は、NEまたはP3との共培養前に8F4による染色を示す(データは示さず)。しかしながら、8F4による染色は、HLA-A2表面染色の増加を伴わずに、NEまたはP3との共培養後に増加し(データは示さず)、これは、細胞表面上におけるPR1/HLA-A2発現の増加を示している。さらに、NEおよびP3の交差提示は、PR1-CTLによる死滅化に対するHLA-A2₊MEL526細胞系の感受性を増加させ、最高の死滅化が最高のE:T比で認められた(図26F)。

【0265】

本明細書に開示され、特許請求の範囲に記載されているすべての組成物および/または方法を、本開示を考慮して過度に実験することなく作製および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい実施形態に関して記載しているが、本発明の概念、精神、および範囲を逸脱することなく、本明細書に記載される組成物および/または方法ならびに該方法の工程または工程の順序を変更することができることが当業者に明らかである。より具体的には、化学的および生理学的に關与する特定の薬剤で本明細書に記載され

10

20

30

40

50

る薬剤を置換することができる一方で、同一または類似の結果が達成されることが明らかである。当業者に明らかであるこのような類似の置換物および改変物の全ては、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲、および概念の範囲内であると見なす。

【 0 2 6 6 】

V I I I . 参考文献

以下の参考文献は、参考文献が本明細書に示されたものを補足する例示の手順または他の詳細を提供する範囲で、特に参照により本明細書に組み込まれる。

【 数 1 】

U.S. Patent 4,196,265	10
U.S. Patent 4,472,509	
U.S. Patent 4,554,101	
U.S. Patent 4,680,338	
U.S. Patent 4,684,611	
U.S. Patent 4,797,368	
U.S. Patent 4,843,092	
U.S. Patent 4,879,236	
U.S. Patent 4,938,948	20
U.S. Patent 4,952,500	
U.S. Patent 5,021,236	
U.S. Patent 5,302,523	
U.S. Patent 5,322,783	
U.S. Patent 5,384,253	
U.S. Patent 5,399,363	
U.S. Patent 5,443,826	
U.S. Patent 5,464,765	30
U.S. Patent 5,466,468	
U.S. Patent 5,538,877	
U.S. Patent 5,538,880	
U.S. Patent 5,543,158	
U.S. Patent 5,550,318	
U.S. Patent 5,563,055	
U.S. Patent 5,563,250	
U.S. Patent 5,580,859	40
U.S. Patent 5,589,466	
U.S. Patent 5,599,795	
U.S. Patent 5,610,042	
U.S. Patent 5,641,515	
U.S. Patent 5,656,610	

【数 2】

- U.S. Patent 5,702,932
- U.S. Patent 5,736,524
- U.S. Patent 5,739,169
- U.S. Patent 5,780,448
- U.S. Patent 5,789,215
- U.S. Patent 5,801,005
- U.S. Patent 5,824,311 10
- U.S. Patent 5,830,880
- U.S. Patent 5,846,233
- U.S. Patent 5,846,945
- U.S. Patent 5,856,456
- U.S. Patent 5,871,986
- U.S. Patent 5,880,270
- U.S. Patent 5,945,100
- U.S. Patent 5,981,274
- U.S. Patent 5,994,136 20
- U.S. Patent 5,994,624
- U.S. Patent 6,013,516
- Alatrash *et al.*, *J. Immunol.*, 35: 309-320, 2012
- Antin, *Blood*, 82:2273-2277, 1993.
- Arend *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 16:27-55, 1998.
- Arend, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5):1-6, 2001.
- Austin-Ward and Villaseca, *Rev. Med. Chil.*, 126(7):838-45, 1998.
- Baichwal and Sugden, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986. 30
- Bajorin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-92, 1988.
- Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
- Basha *et al.*, *Plos One*, 3:e3247, 2008.
- Beidler *et al.*, *J. Immunol.*, 141(11):4053-4060, 1988.
- Besnard *et al.*, *Gut.*, 43(5):634-638, 1998.
- Blomer *et al.*, *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.
- Brouwer *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 98:448-453, 1994. 40
- Brynskov *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 321(13):845-850, 1989.
- Bukowski *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4(10):2337-47, 1998.

【 数 3 】

- Burchert *et al.*, *Blood*, 02:659, 2002.
- Burgdorf *et al.*, *J. Immunol.*, 176:6770-6776, 2006.
- Burger and Dayer, *Neurology*, 45(6S-6):S39-43, 1995.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-37, 1998.
- Cleary and Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21):7439-7443, 1985. 10
- Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Cotten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13):6094-6098, 1992.
- Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Cresswell *et al.*, *Immunol. Rev.*, 207:145-157, 2005.
- Curiel, *Nat. Immun.*, 13(2-3):141-164, 1994.
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-98, 1998.
- Desmedt *et al.*, *Int. J. Cancer*, 119: 2539-2545, 2006.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.
- Dinarelli, *Int. Rev. Immunol.*, 16:457-499, 1998. 20
- Dionne *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 112(3):435-442, 1998.
- Dudley *et al.*, *Science*, 298: 850-854, 2002.
- Eastgate *et al.*, *Lancet*, 2:706-709, 1988.
- EP Application 125,023
- EP Application 171,496
- EP Application 173,494
- EP Application 184,187
- Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987. 30
- Fellerman *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(10):1860-1866, 1998.
- Firestein *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 37:644-652, 1994.
- Fraleley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Francois *et al.*, *Blood*, 114: 2632-2638, 2009.
- Franssen *et al.*, *Lancet*, 347:116, 1996.
- Friedmann, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Fujikawa *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 54:318-320, 1995.
- Funakoshi *et al.*, *Digestion*, 59(1):73-78, 1998. 40
- Giralt and Kolb, *Curr. Opin. Oncol.*, 8:96-102, 1996.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

【数 4】

- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Grunhaus and Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Hannum *et al.*, *Nature*, 343:336-340, 1990.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncol.*, 37(4):347-353, 1998.
- Hoffenberg *et al.*, *J. Pediatr.*, 134(4):447-452, 1999. 10
- Hollander *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 105:883-885, 1986.
- Hollander, *Scand. J. Gastroenterol.*, 27:721-726, 1992.
- Horwich *et al.* *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Hui and Hashimoto, *Infect. Immun.*, 66(11):5329-36, 1998.
- Irie *et al.*, *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.
- Jarvis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, 10(5):459-467, 1998.
- Jarvis, *Pediatr. Ann.*, 31(7):437-446, 2002.
- Jensen *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 27:4709-4717, 2009. 20
- Jensen *et al.*, *Cancer*, 118: 2476-2485, 2012.
- Jiang *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 93:606-612, 1996.
- Johnson *et al.*, In: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto *et al.* (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
- Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525, 1986.
- Jonsson *et al.*, *Br. J. Rheumatol.*, 32(7):578-581 1993.
- Jonsson *et al.*, *Oral Dis.*, 8(3):130-140, 2002.
- Jonsson *et al.*, *Trends Immunol.*, 22(12):653-654, 2001.
- Kaepler *et al.*, *Plant-cell Reports*, 9:415-418, 1990. 30
- Kahle *et al.*, *Ann. Rheum. Dis.*, 51:731-734, 1992.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994.
- Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kolb and Holler, *Curr. Opin. Oncol.*, 9:139-145, 1997.
- Kolb *et al.*, *Blood*, 86:2041-2050, 1995.
- Kolb *et al.*, *Bone Marrow Transplant*, 17:449-452, 1996. 40
- Kotzin, *Cell*, 85:303-306, 1996.
- Kovacsovics-Bankowski and Rock, *Science*, 267: 243-246, 1995.

【数 5】

- Kuboyama, *Kurume Med. J.*, 45(1):33-37, 1998.
- Kuronita, *J. Cell Sci.*, 115:4117-4131, 2002.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 57(1):105-32, 1982.
- Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60(2):515-524, 1986.
- Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8(10):3988-3996, 1988.
- Leiper *et al.*, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 12(1):179-199, 1998.
- Lipsky, In: *Harrison's principles of internal medicine*, Fauci *et al.*(Eds.), 14th Ed., NY, McGraw-Hill, 1880-1888, 1998. 10
- Lugering *et al.*, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 30(3):338-344, 1998.
- Makowiec *et al.*, *Z. Gastroenterol.*, 36(8):619-624, 1998.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- McAlindon *et al.*, *Gut*, 42(2):214-219, 1998.
- McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62(6):1963-1973, 1988.
- Miller *et al.*, *Am. J. Clin. Oncol.*, 15(3):216-221, 1992.
- Mittendorf *et al.*, *Cancer Res.*, 72:3153-3162, 2012. 20
- Molldrem *et al.*, *Blood*, 88:2450-2457, 1996.
- Molldrem *et al.*, *Blood*, 90:2529-2534, 1997.
- Molldrem *et al.*, *Cancer Res.*, 59:2675-2681, 1999.
- Molldrem *et al.*, *Nat. Med.*, 6:1018-1023, 2000.
- Molldrem *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 111:639-647, 2003.
- Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.
- Mukai, *et al.*, *J. Immunol.*, 183:6561-6568, 2009.
- Murch, *Nutrition*, 14:780-783, 1998.
- Muzyczka, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 158:97-129, 1992. 30
- Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Ohnishi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:817-830, 1994.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-28, 1993.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Paul, *Immunogenetics*, 37(6):442-448, 1993.
- Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-49, 1998. 40
- Porgador *et al.*, *Immunity* 6: 715-726, 1997.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183-188, 1985.

【数 6】

- Prang *et al.*, *Br. J. Cancer*, 92:342-349, 2005.
- Prieur *et al.*, *Lancet.*, 2:1240-1242, 1987.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Queen *et al.*, *Cancer Res.*, 65:8896-8904, 2005.
- Reimund *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 28(2):145-150, 1998.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980. 10
- Rezvani *et al.*, *Cytotherapy* 9: 245-251, 2007.
- Rezvani *et al.*, *Blood*, 111:236-242, 2008.
- Ridgeway, *In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt (Eds.), Stoneham:Butterworth, 467-492, 1988.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rogler and Andus, *World J. Surg.*, 22(4):382-389, 1998.
- Rooney *et al.*, *Rheumatol. Int.*, 10:217-219, 1990.
- Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989. 20
- Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Ruemmele *et al.*, *Gastroenterol.*, 115(4):822-829, 1998.
- Saiki *et al.*, *Scand. J. Gastroenterol.*, 33(6):616-622, 1998.
- Salomonsson *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 55(4):336-342, 2002.
- Sartor, *Am. J. Gastroenterol.*, 92(12):5S-11S, 1997.
- Savage *et al.*, *Immunity*, 10:485-492, 1999.
- Scheibenbogen *et al.*, *Blood*, 100:2132-2137, 2002.
- Schreiber, *Neth. J. Med.*, 53(6):S24-31, 1998. 30
- Schwartzentruber, *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 364: 2119-2127, 2011.
- Sergeeva, *et al.*, *Blood*, 117: 4262-4272, 2011.
- Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.
- Soderholm *et al.*, *Gastroenterol.*, 117:65-72, 1999.
- Stack *et al.*, *Lancet*, 349(9051):521-524, 1997.
- Stites, *J. Mol. Biol.*, 235(1):27-32, 1994.
- Sun *et al.*, *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
- Targan *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029-1035, 1997. 40
- Temin, *In: Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1984.

【数 7】

Tsujimoto and Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
 Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
 van den Berg, *Semin. Arthritis Rheum.*, 30(5S-2):7-16, 2001.
 van Dullemen *et al.*, *Gastroenterol.*, 109(1):129-135, 1995.
 VandenDriessche *et al.*, *Blood*, 100(3) 813-822, 2002.
 Wada *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18:2367-2411, 1990.
 Warrington *et al.*, *Arthritis and Rheumatism*, 44:13-20, 2001.
 Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
 Wood *et al.*, *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.
 Xanthou *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 44(2):408-418, 2001.
 Zufferey *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875, 1997.

10

【図 1 2】

```

123456789 0123456789 0123456789 0123456789
8F4 VH      EVQLVESGGG DIVKQGGSK LSCAASGTF SCYGMWVRQ
Hu8F4 VH    EVQLVESGGG GLVQGGSLR LSCAASGTF SCYGMWVRQ
U96282 VH   EVQLVESGGG GLVQGGSLR LSCAASGTF S----WVRQ

4          5          6          7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
8F4 VH      TPKRLEWVA TISGGSYTY PDSVKGRFTI SRDNAGNTLY
Hu8F4 VH    APGKLEWVA TISGGSYTY PDSVKGRFTI SRDNAGNTLY
U96282 VH   APGKLEWVA -----RPTI SRDNAGNTLY

8          9          1          1
0122223456789 0123456789 00000000123456789 0123
abc         abcdefg
8F4 VH      LQMSLRKSEDVAM YYCARHEGGY YGSSPAMFYWCQQTIV TLVA
Hu8F4 VH    LQMSLRRAEDVAV YYCARHEGGY YGSSPAMFYWCQQTIV TVSS
U96282 VH   LQMSLRRAEDVAV YYCAR-----WGQQTIV TVSS

```

FIG. 12

【図 1 3】

```

123456789 0123456789 0123456789 0123456789
8F4 VL      DIVMTQSHK FMSTSVGDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK
Hu8F4 VL1   DIQMTQSPS SLSASVGDV TITCKASQDV STAVAWYQQK
Hu8F4 VL2   DIQMTQSPS SLSASVGDV TITCKASQDV STAVAWYQQK
AY043146 VL DIQMTQSPS SLSASVGDV TITC-----WYQQK

4          5          6          7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
8F4 VL      FQSQPKLLIY SPSYRYTCV PDRFTCSGSGT VFTFTINSVQ
Hu8F4 VL1   FQKAPKLLIY SPSYRYTCV SRPFGSGSGT VFTFTISSLQ
Hu8F4 VL2   FQKAPKLLIY SPSYRYTCV SRPFGSGSGT DFTFTISSLQ
AY043146 VL FQKAPKLLIY -----CVP SRPFGSGSGT DFTFTISSLQ

8          9          1
0123456789 0123456789 01234567
8F4 VL      AEDLAVYYCQ QHFITDPTFC GGTKVEIK
Hu8F4 VL1   PEDIATYYCQ QHFITDPTFC GGTKVEIK
Hu8F4 VL2   PEDIATYYCQ QHFITDPTFC GGTKVEIK
AY043146 VL PEDIATYYC- -----FG GGTKVEIK

```

FIG. 13

【図 1 4】

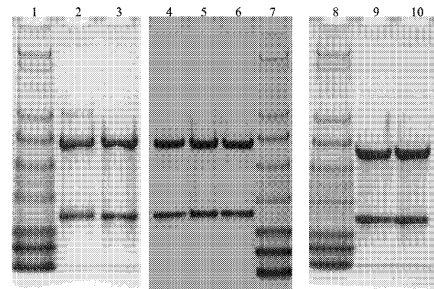
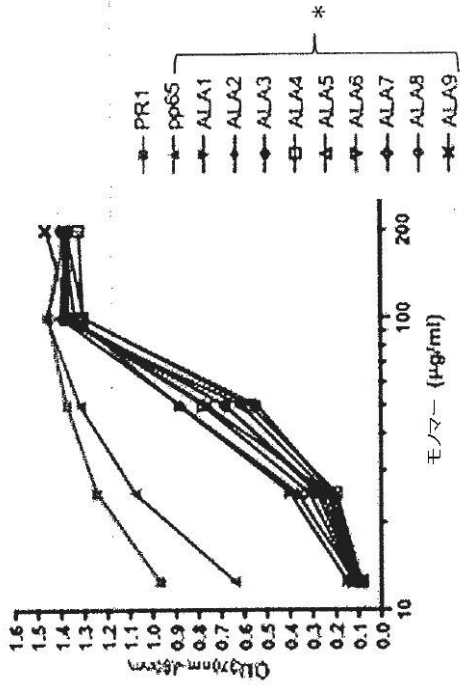


FIG. 14

【 図 1 】

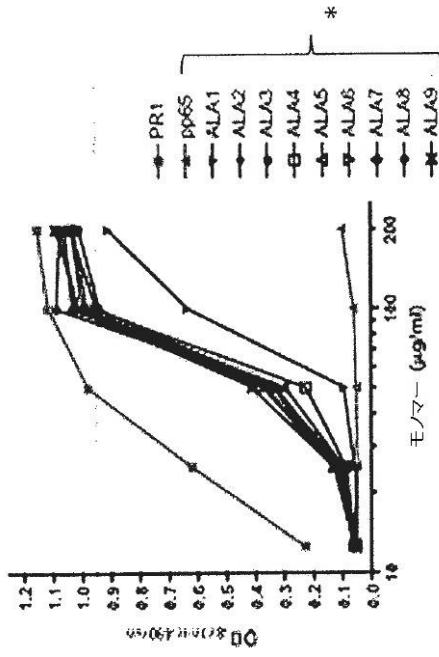
抗 HLA-A*0201

bb7.2



抗 PR1/HLA-A2

8F4.4



*直鎖状PR1配列中に単一アミノ酸置換を有する9merのペプチド (Nonamer peptide)

V-L-Q-E-L-N-V-T-V
 1-2-3-4-5-6-7-8-9

PR1 配列 :

FIG. 1

【 図 2 】

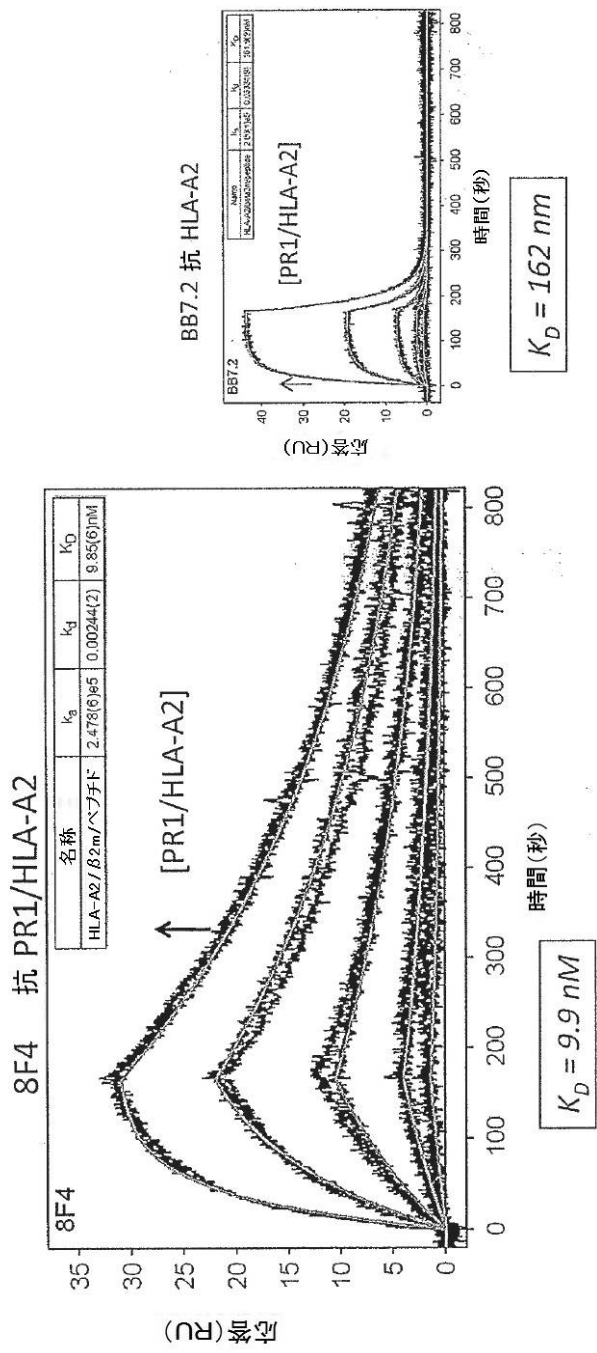


FIG. 2

【 図 3 】

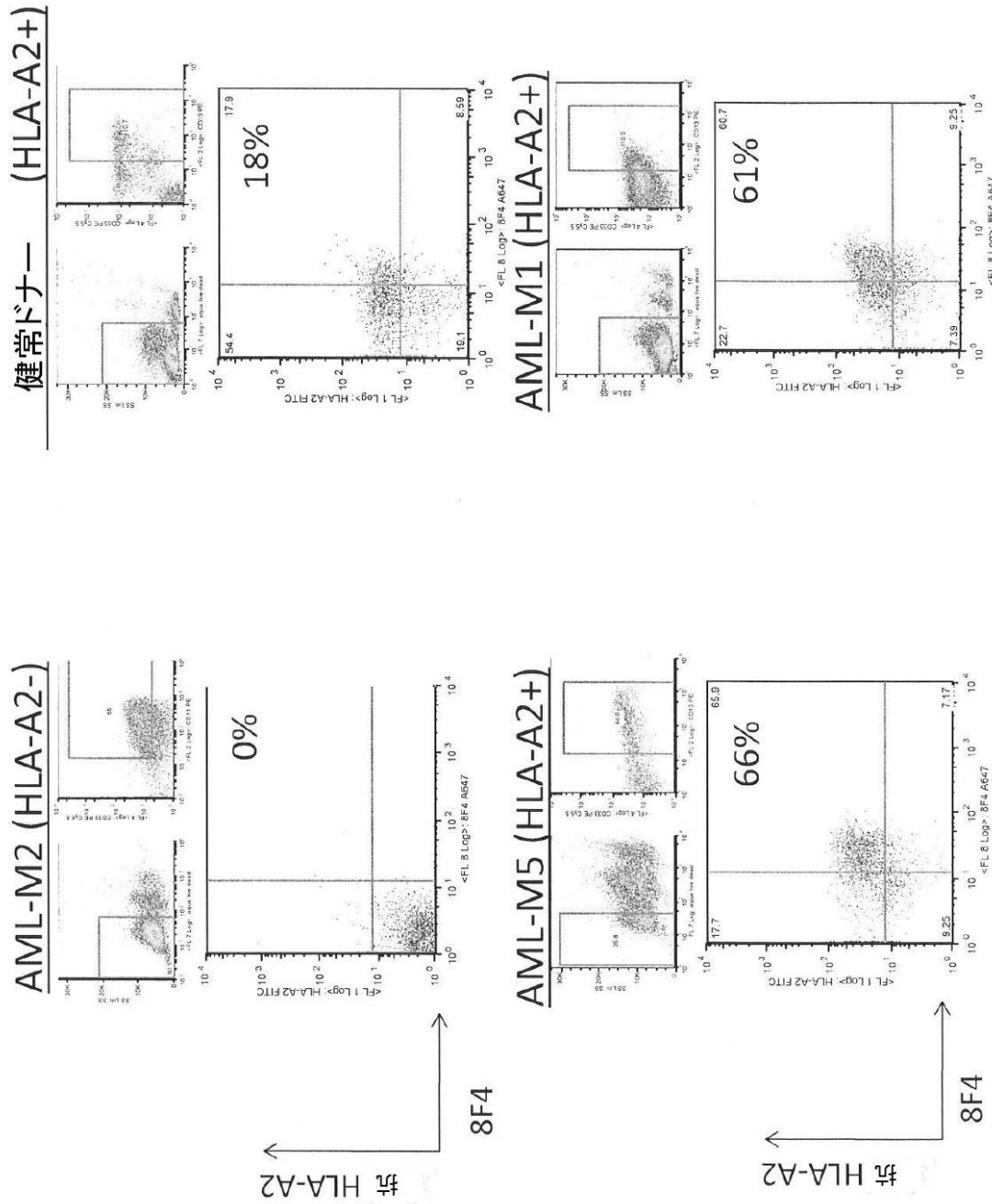


FIG. 3

【 図 4 】

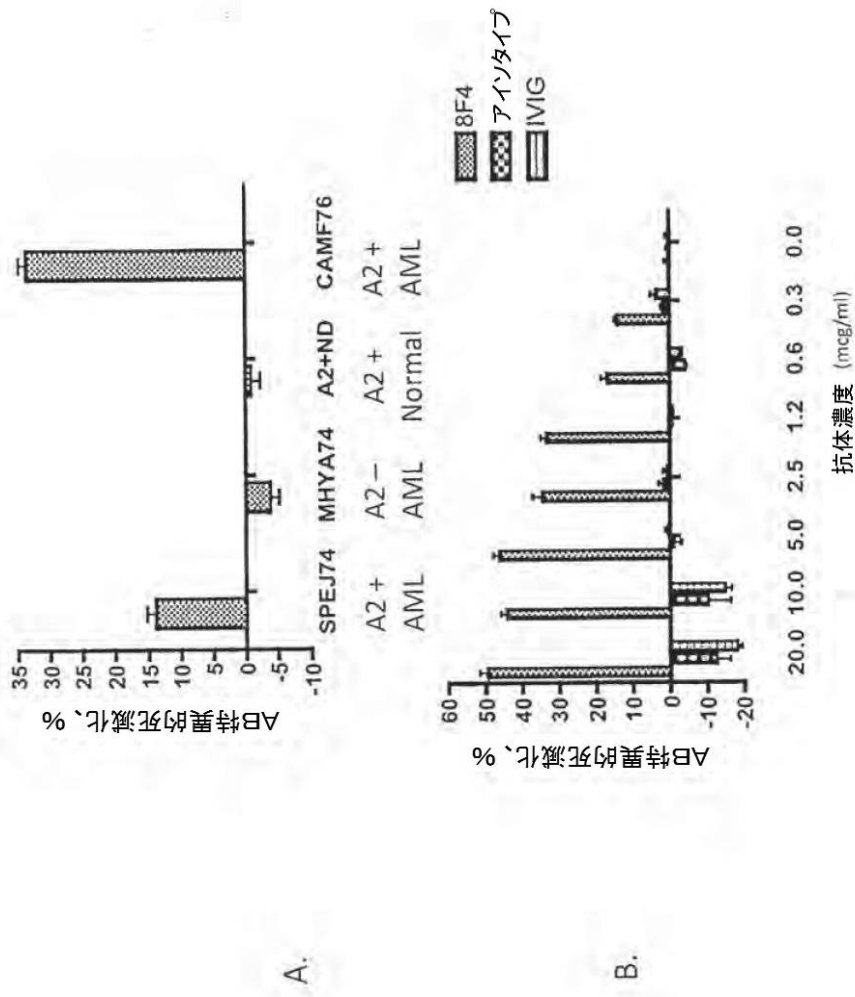


FIG. 4A-B

【 図 5 】

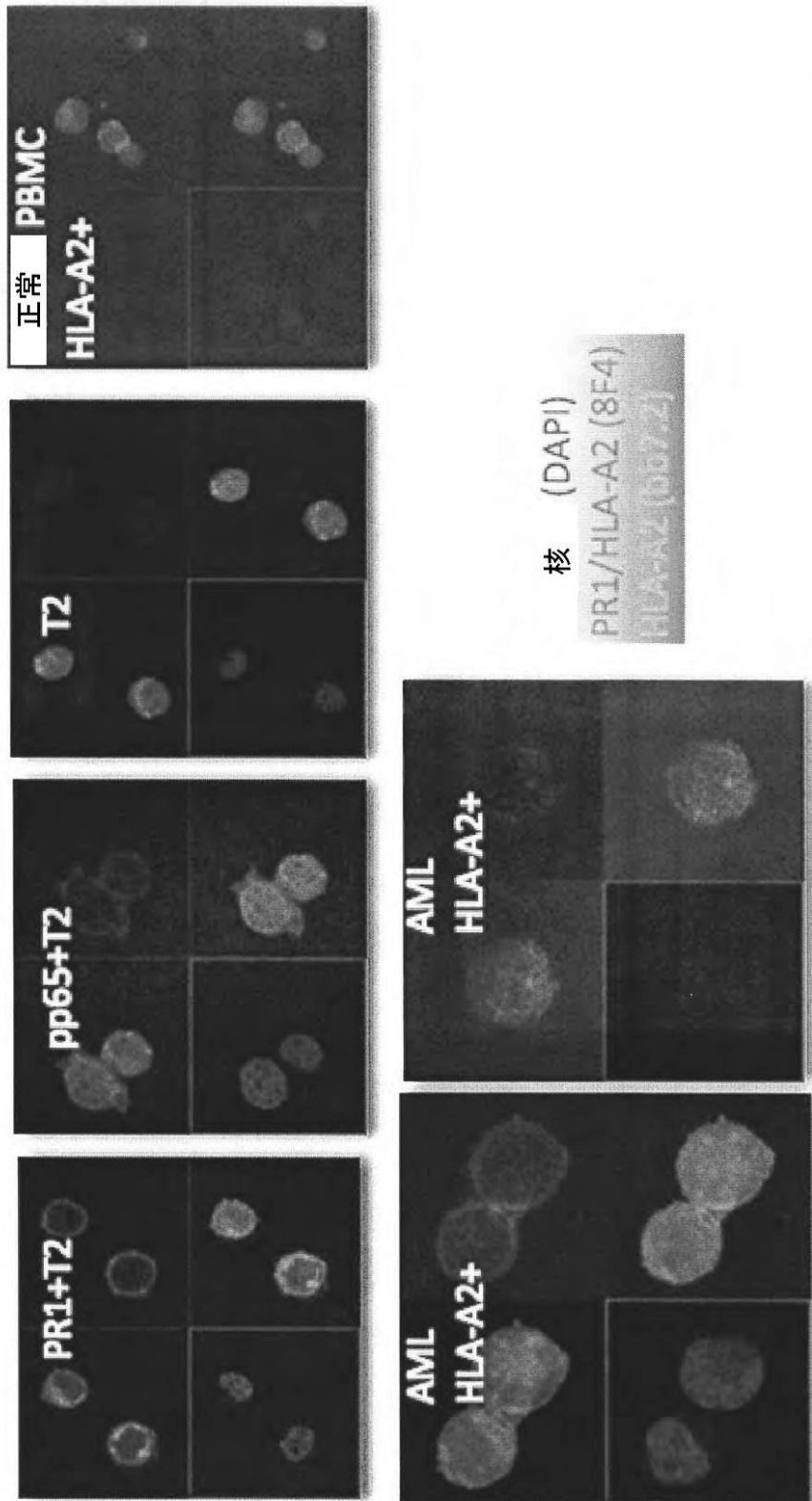
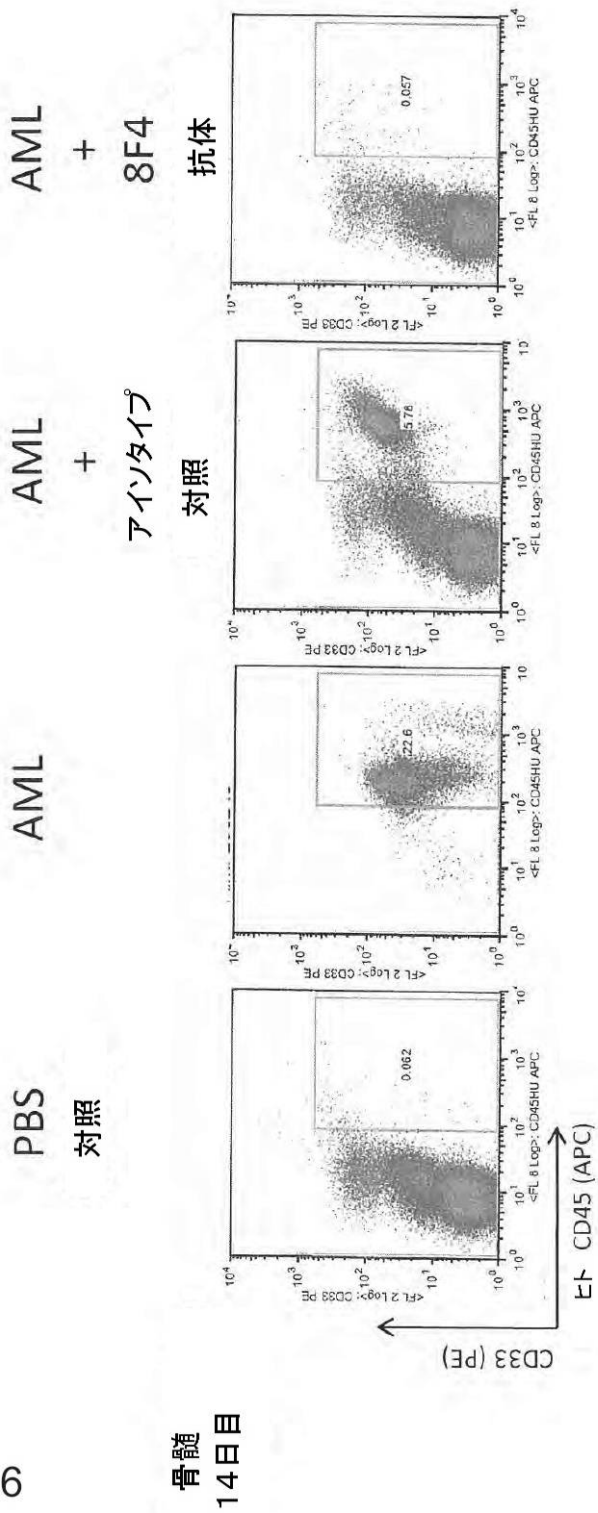


FIG. 5

【 図 6 】

FIG. 6



患者由来のAML芽球を照射A2トランスジェニックNOD/SCIDマウスに入れる

【 図 7 】

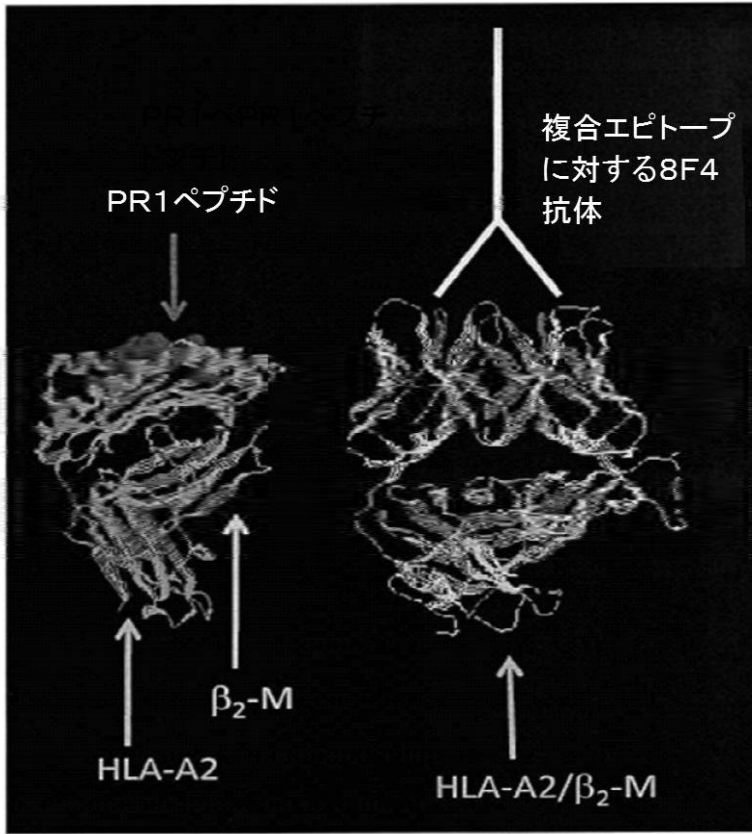


FIG. 7

【 図 8 A 】

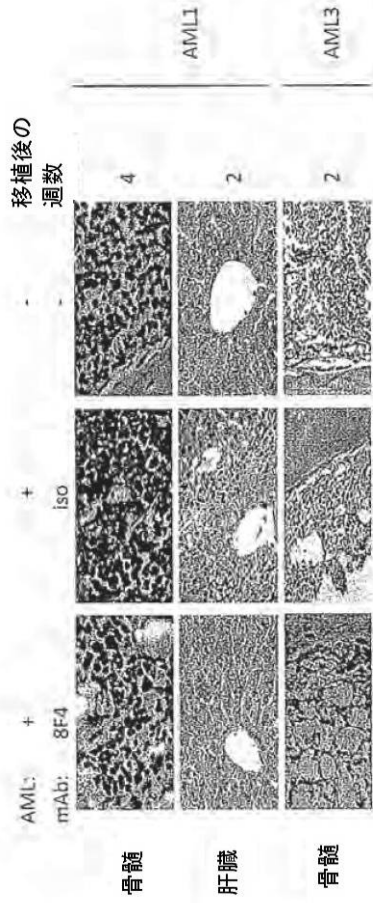


FIG. 8A

【 図 8 B 】

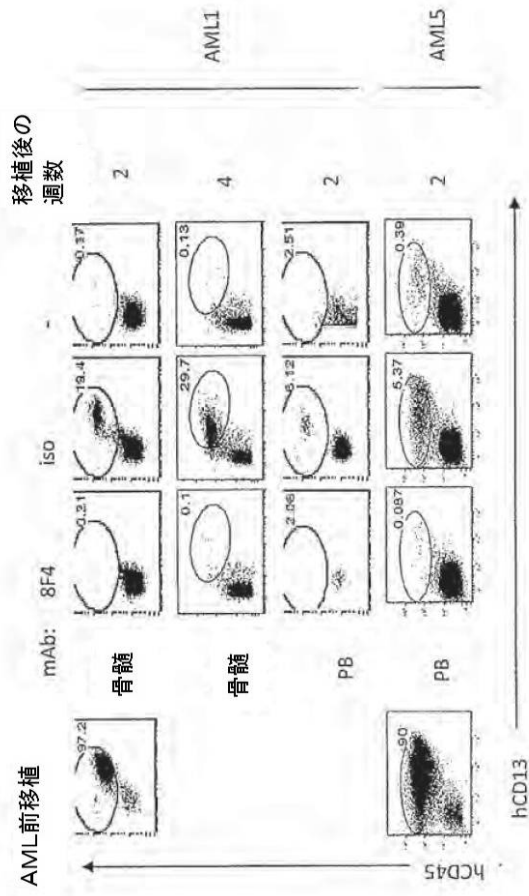


FIG. 8B

【 図 9 】

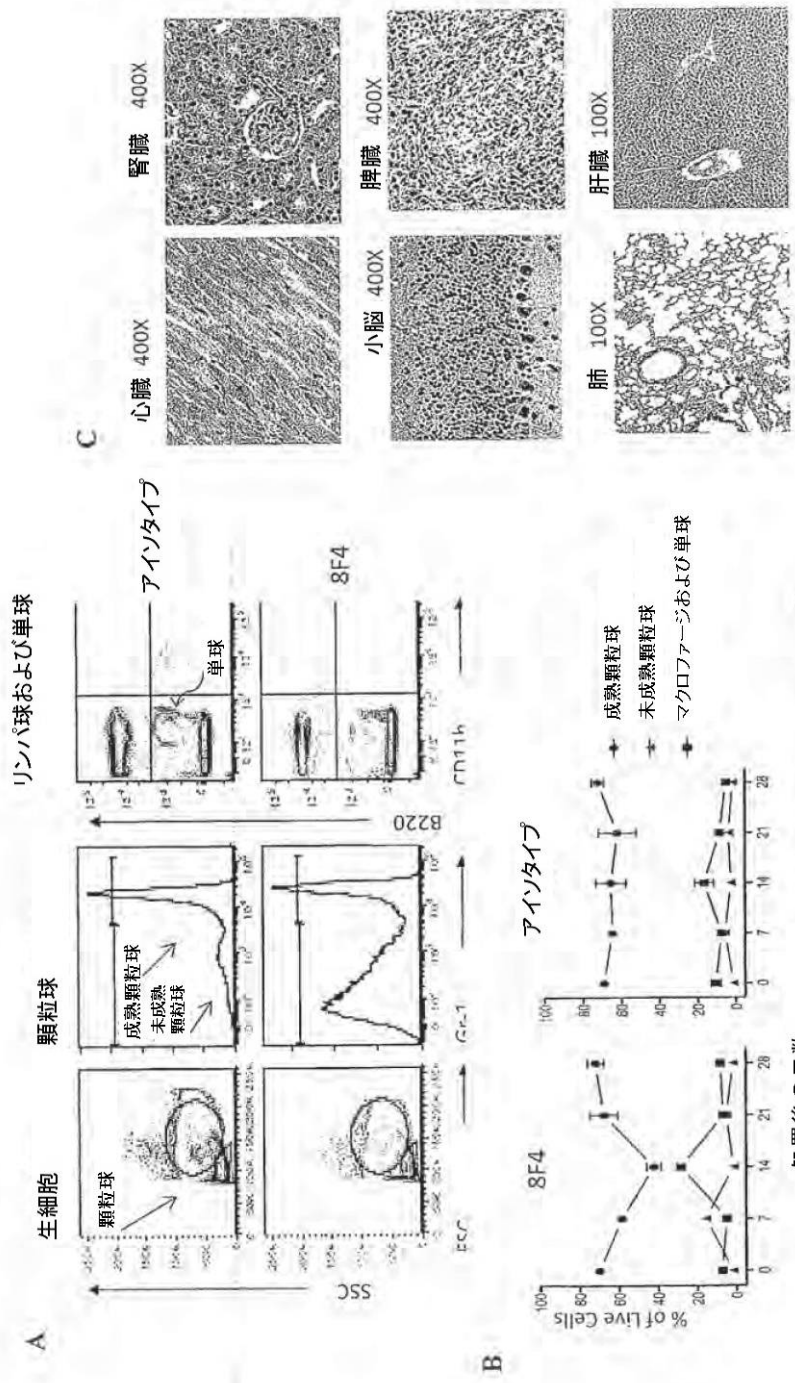


FIG. 9A-C

【 図 1 0 】

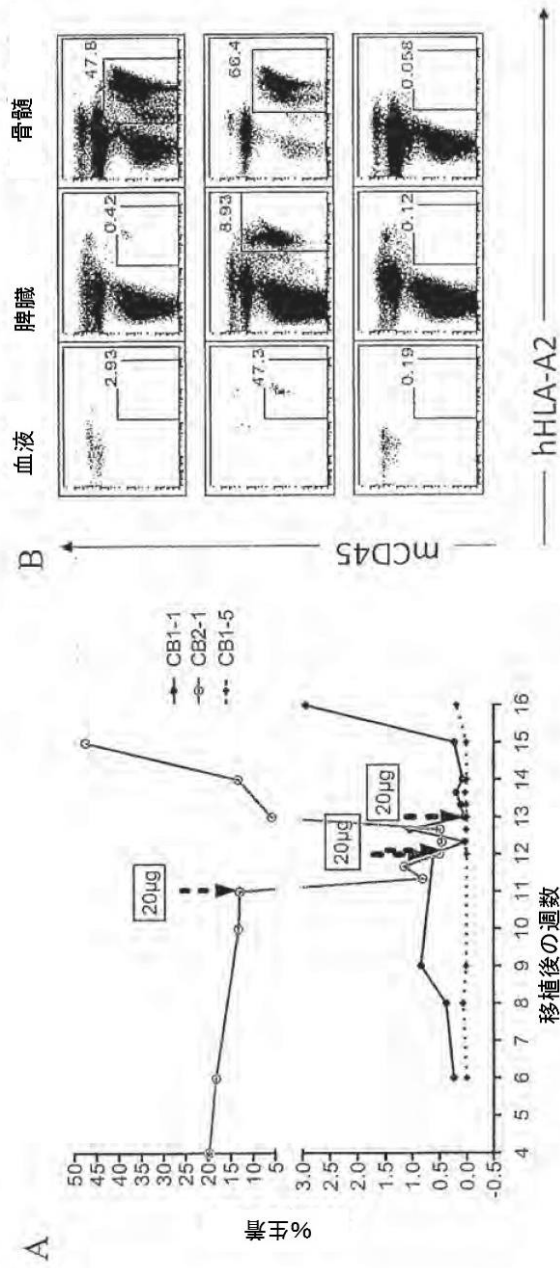


FIG. 10A-B

【 図 1 1 】

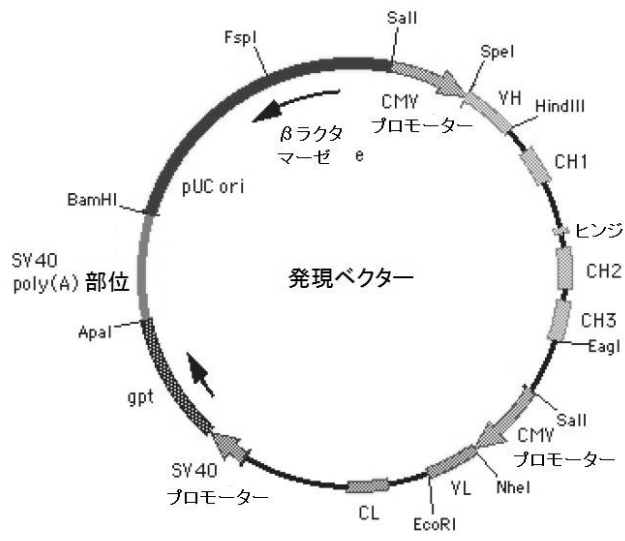


FIG. 11

【 図 1 5 】

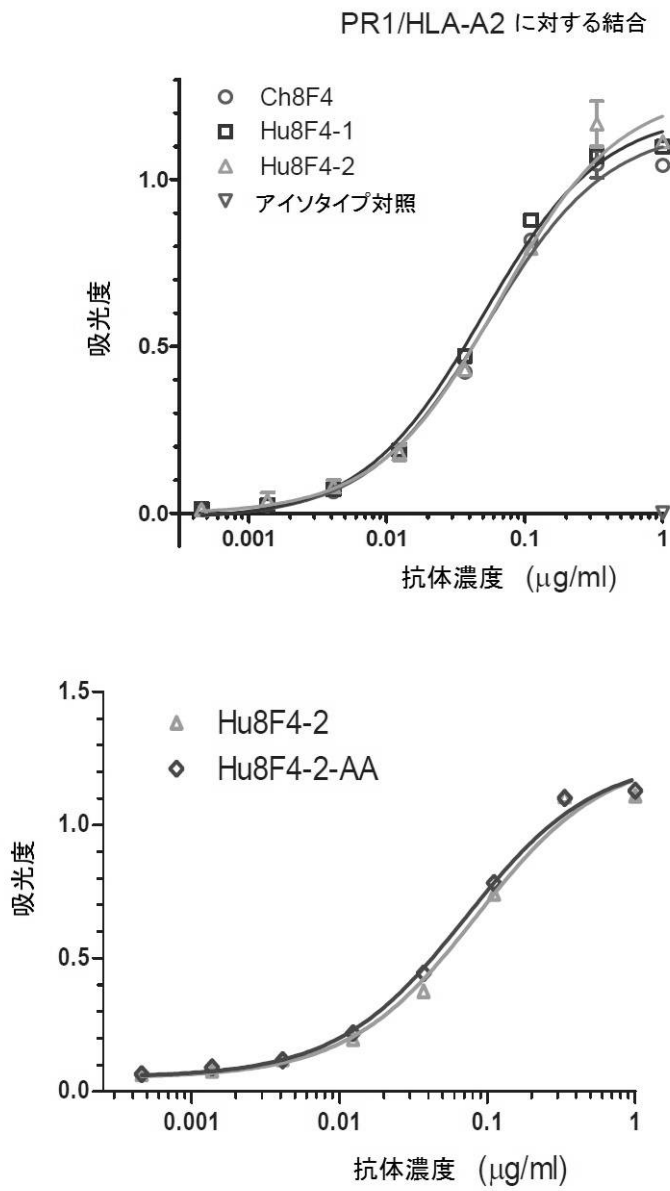
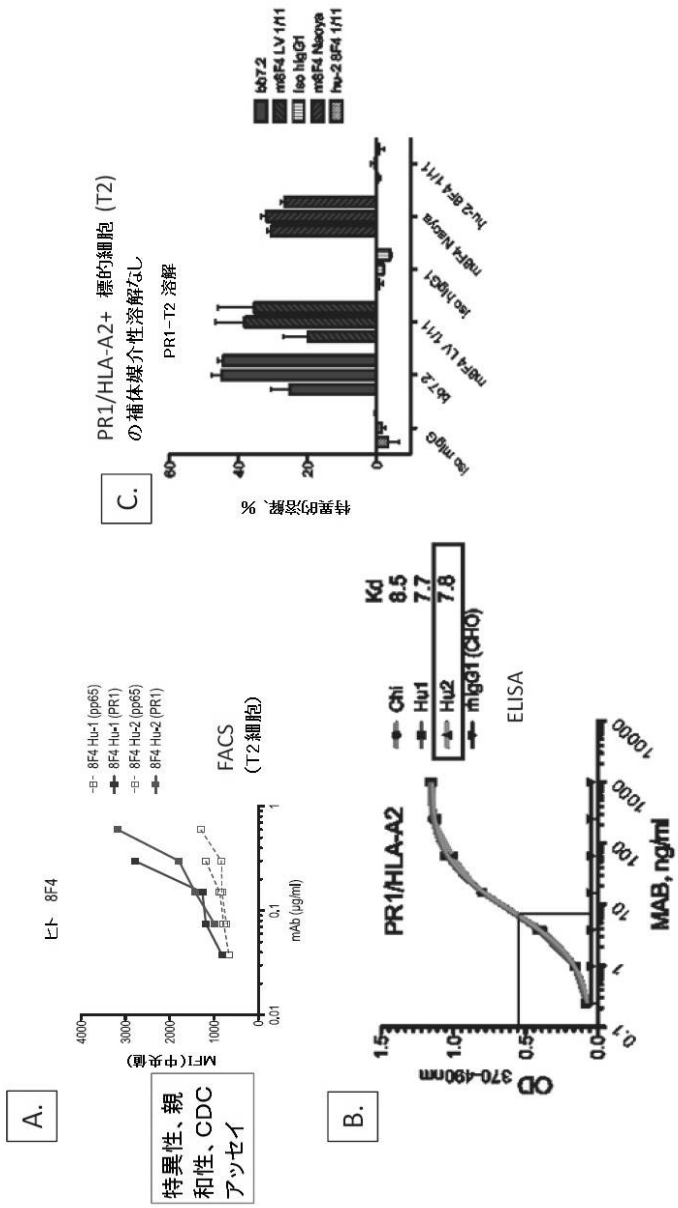


FIG. 15

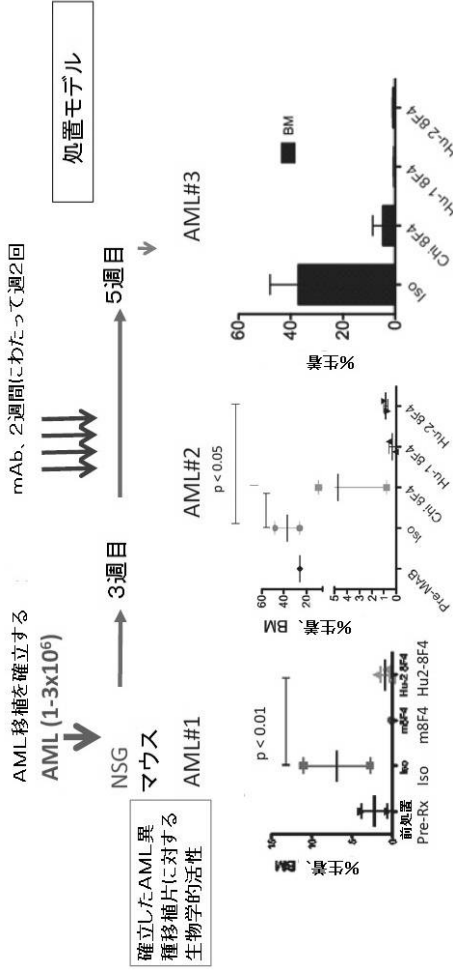
【 図 16 】



FIGS. 16A-C

【 図 1 7 】

図2. Hu8F4による処置は確立したAMLを排除する

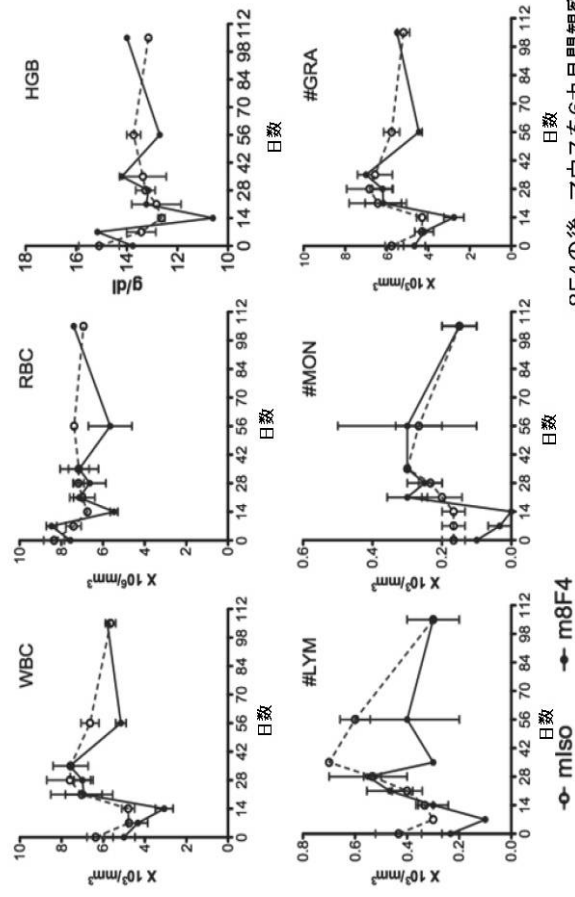


AMLに対するHu8F4の生物学的活性は補体依存的である

FIG. 17

【 図 1 8 】

mAb: 8F4 対 IgG 10 mg/kg
マウスモデル: PR1/HLA-A2+ NOD scid マウス



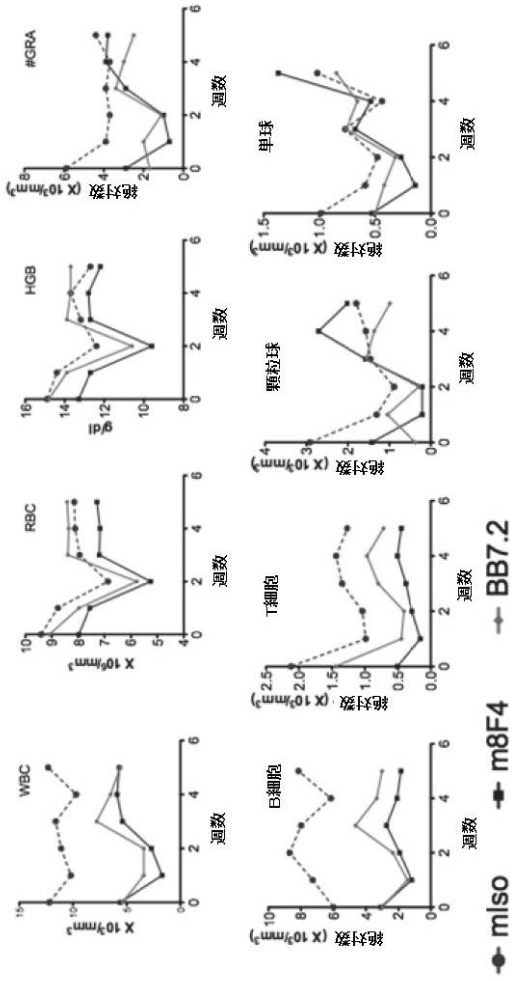
8F4の後、マウスを6カ月間観察した

FIG. 18

【 図 19 】

マウスモデル : PRI/HLA-A2+ B6 マウス

mAb: 8F4または IgG 10 mg/kg



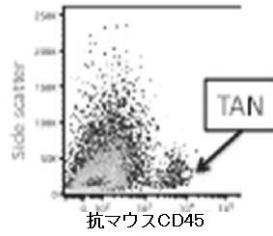
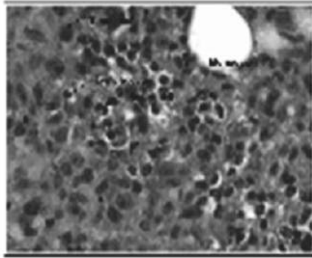
8F4の後、マウスを6週間観察した

FIG. 19

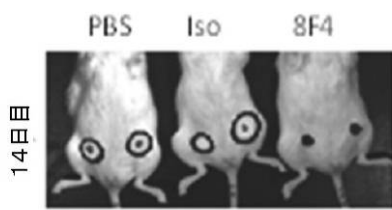
【 図 2 0 】

8F4は乳がん腫瘍の成長を遅延させ、生存を延長させる

A. 231BrCA異種移植片腫瘍における腫瘍関連好中球

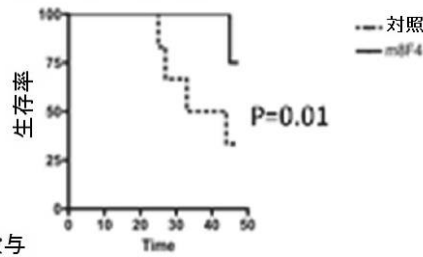


B. 原発性腫瘍モデル



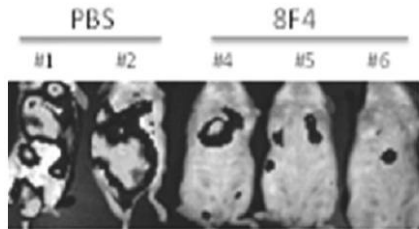
8F4の単回用量(20mcg×投与1回) NSGマウスにおいて231細胞を腫瘍内投与

2群の生存:生存割合



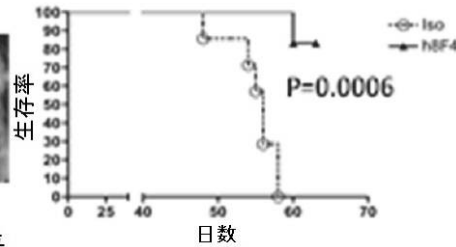
C. 転移性腫瘍モデル

55日



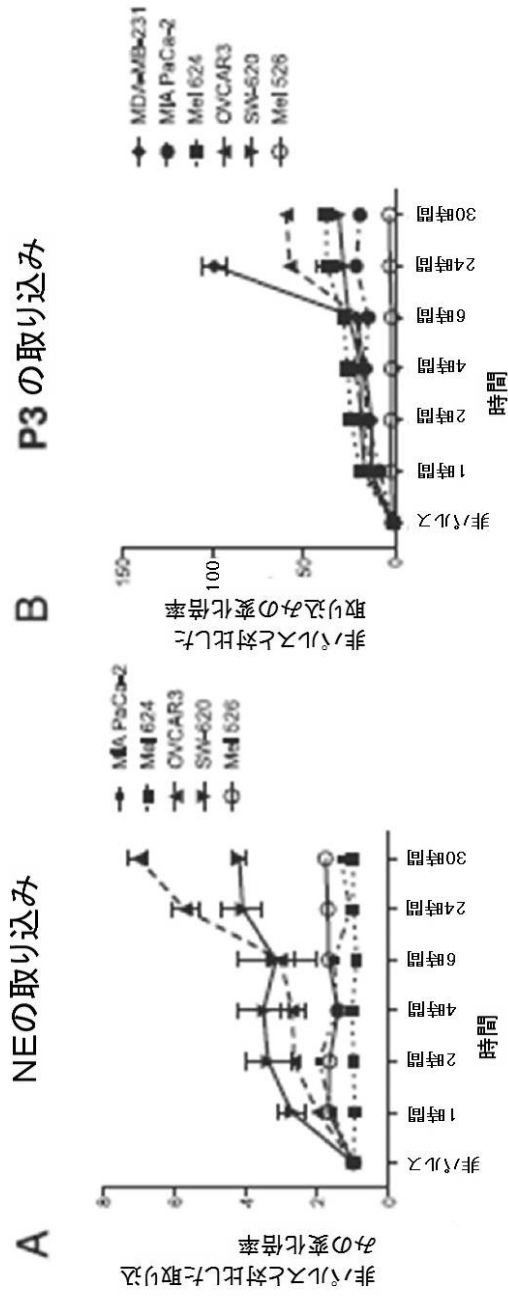
8F4 10mcg/kg 静脈内 週3回 NSGマウスにおいて231細胞を静脈内投与

生存割合



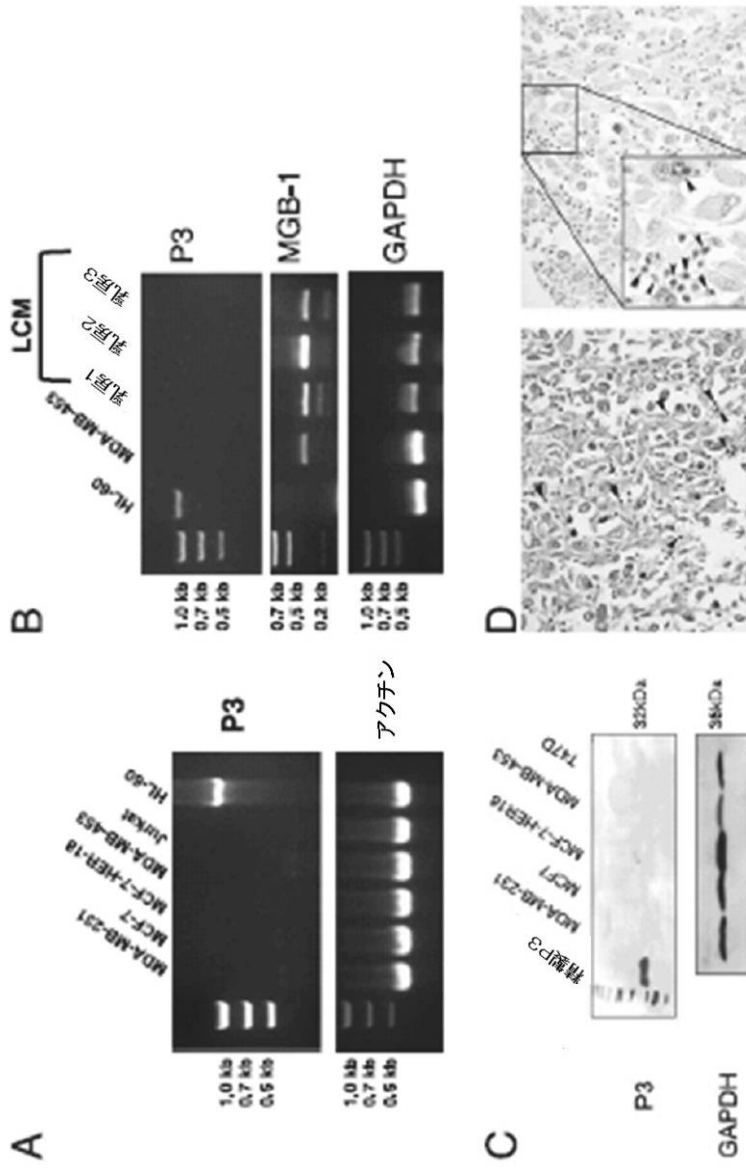
FIGS. 20A-C

【 図 2 1 】



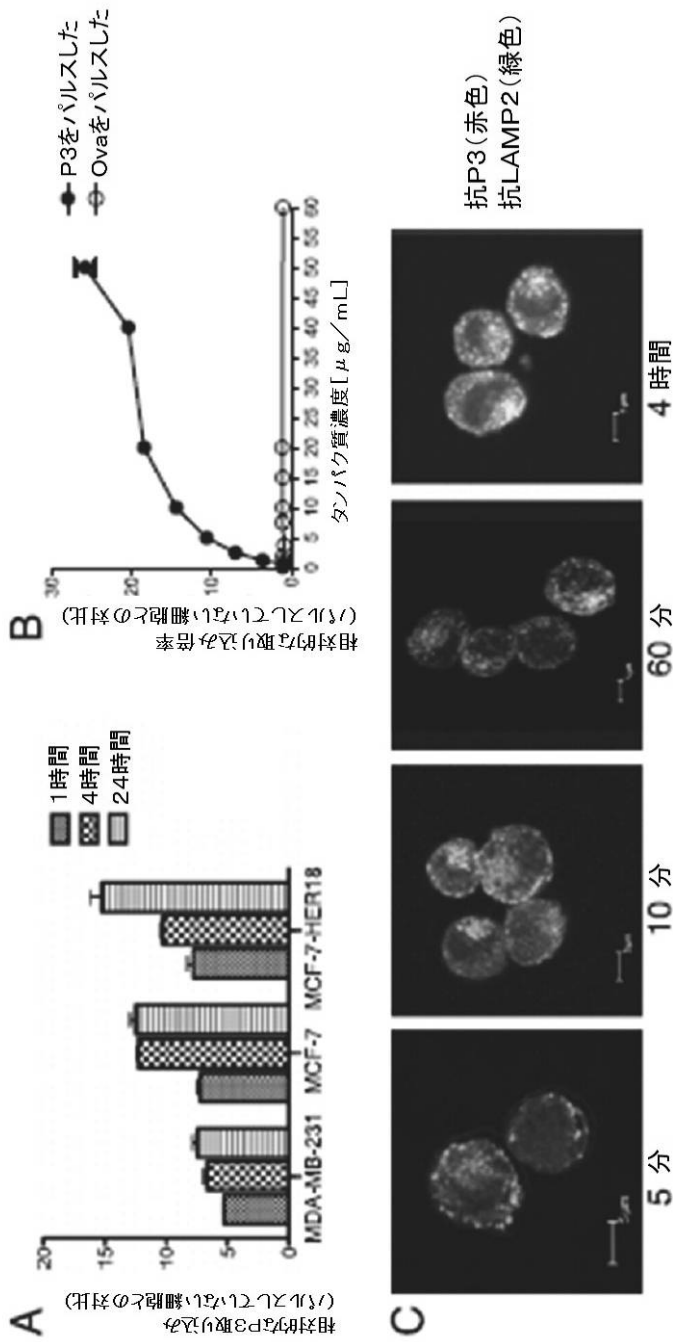
FIGS. 21A-B

【 図 2 2 】



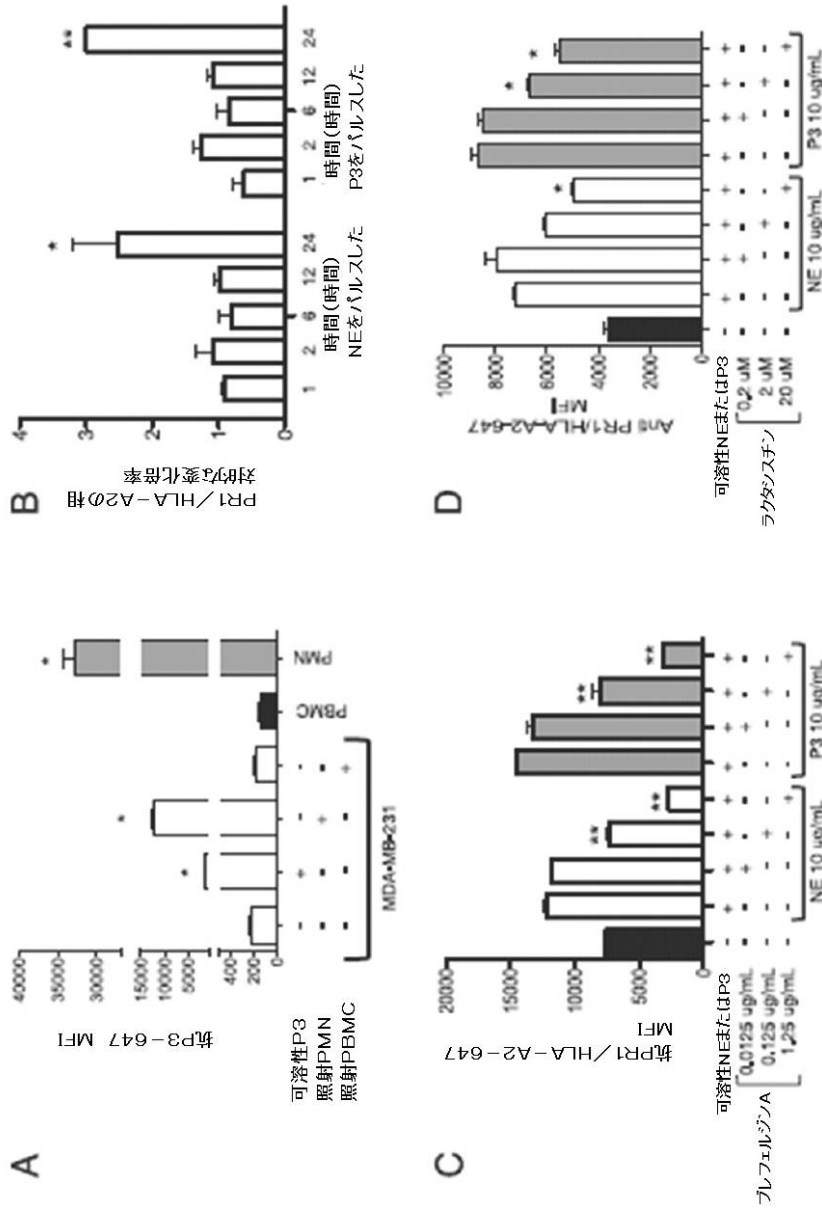
FIGS. 22A-D

【 図 2 3 】



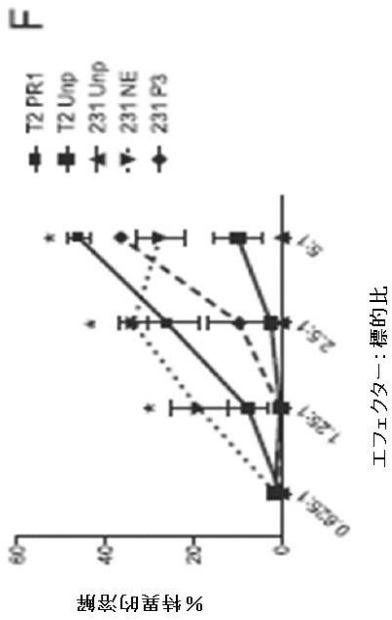
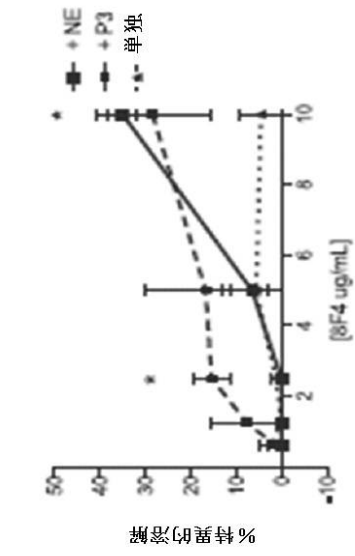
FIGS. 23A-C

【 図 2 4 - 1 】



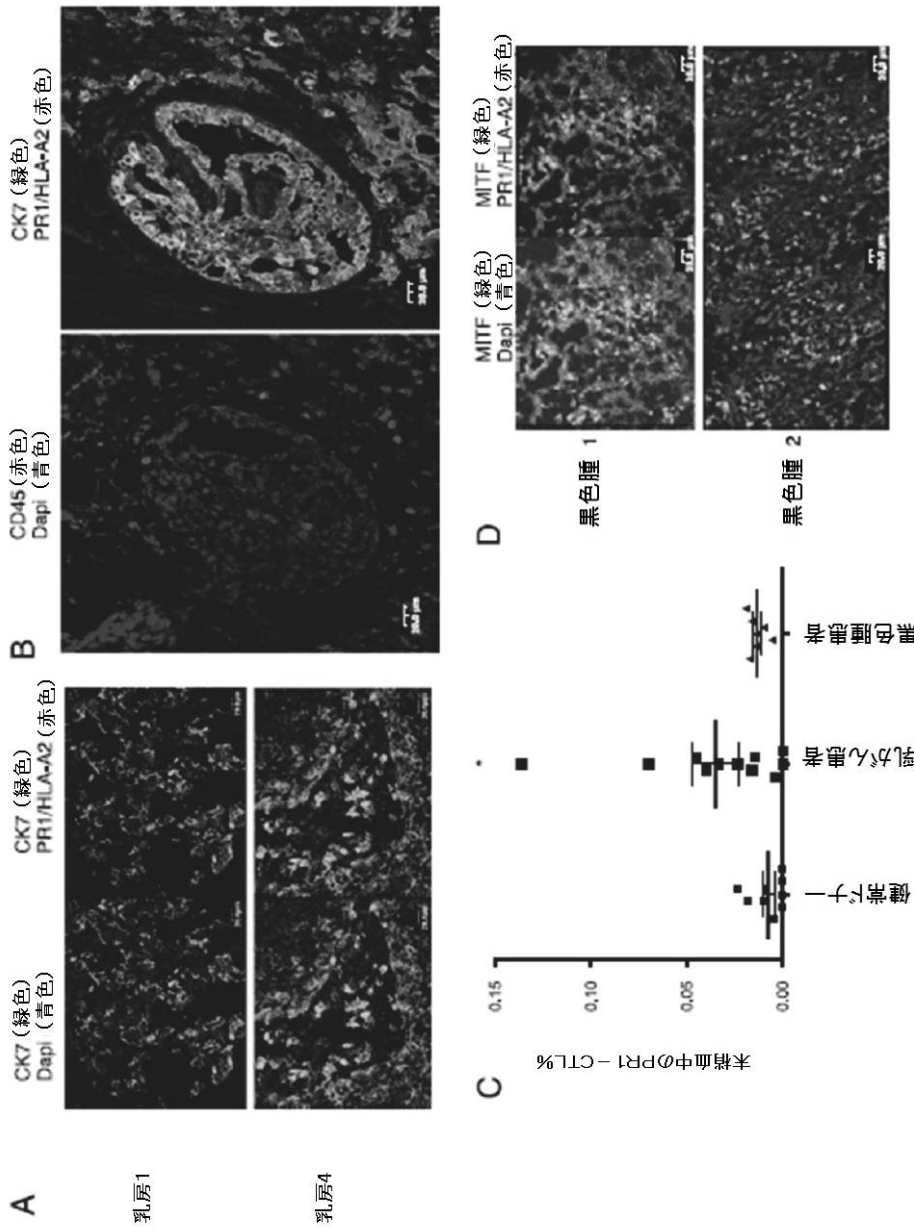
FIGS. 24A-D

【 図 2 4 - 2 】



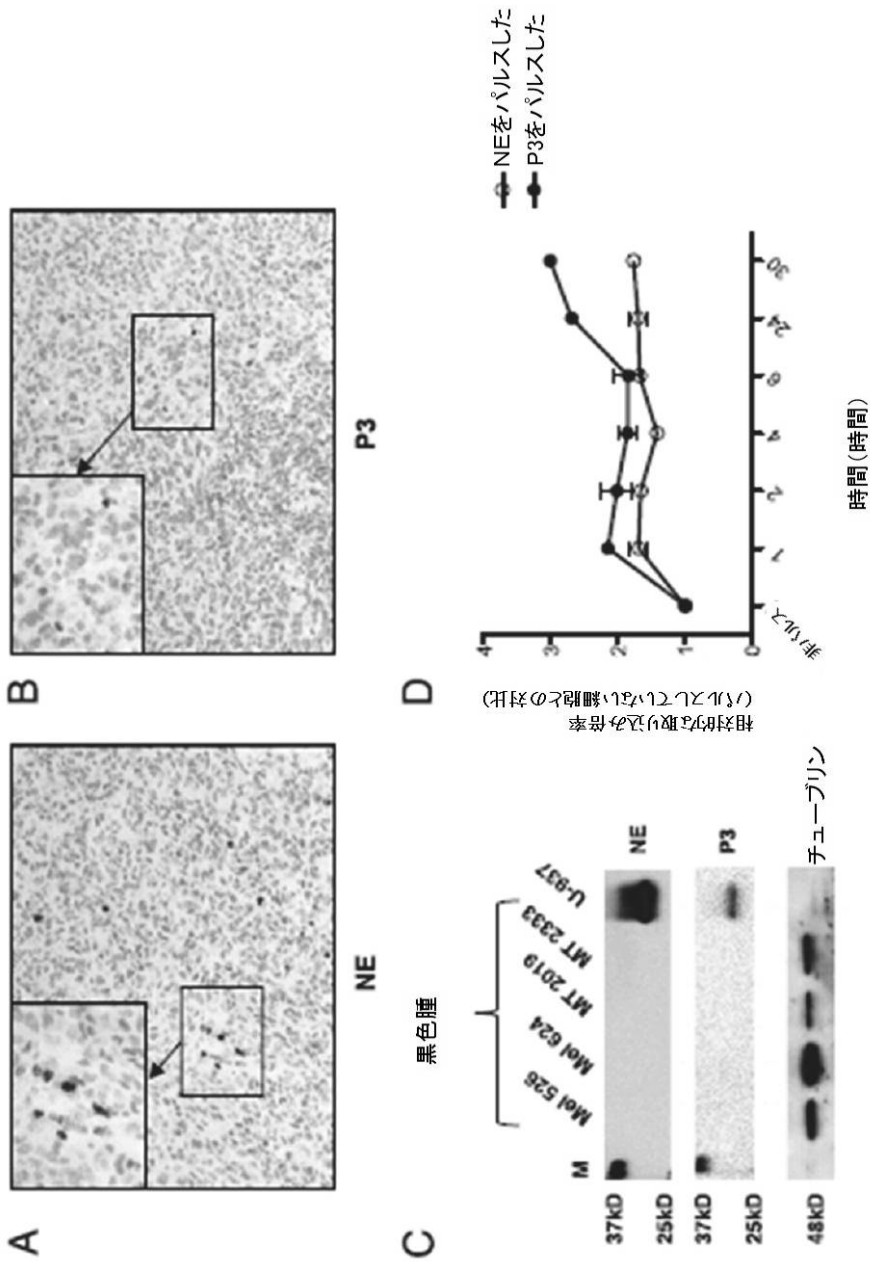
FIGS. 24E-F

【 図 2 5 】



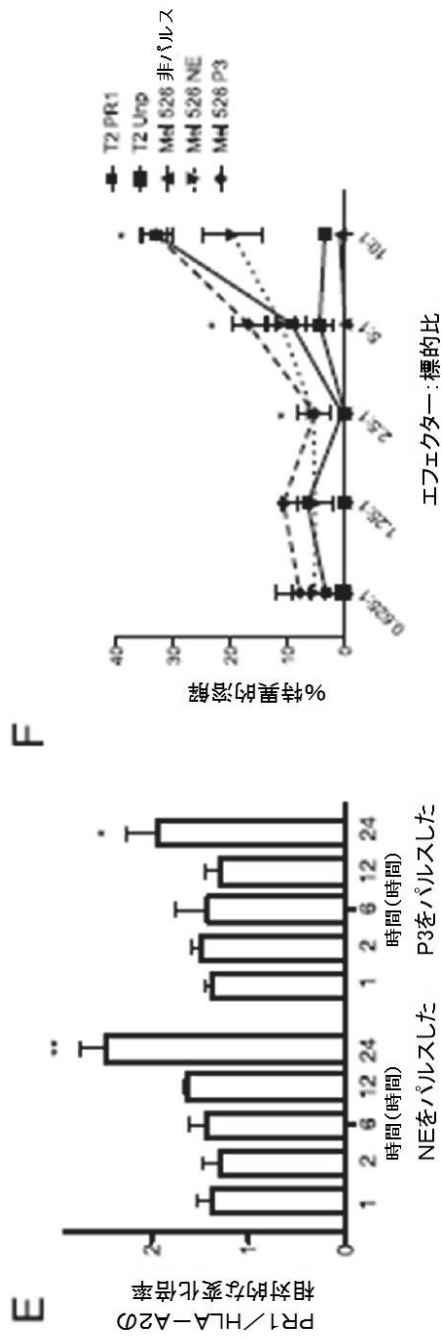
FIGS. 25A-D

【 図 2 6 - 1 】



FIGS. 26A-D

【 図 2 6 - 2 】



FIGS. 26E-F

【 配 列 表 】

2015530359000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US13/49368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395, 39/00 (2013.01) USPC - 424/141.1, 130.1; 435/6.14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/395, 39/00 (2013.01) USPC: 424/141.1, 130.1; 435/6.14, 6.1, 4, 91.1, 89, 85, 84, 72, 41; 530/387.1, 386, 380, 350 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) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Proquest Dialog (Pharmaceutical & Biomedical); Google/Google Scholar; Pubmed/Pubmed central/NCBI Blast; UniProt; Search Terms Used: antibody, immunoglobulin, Human Leukocyte Antigen, HLA-A2, HLA-A*02		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0293620 A1 (MOLLIREM, JJ et al.) December 01, 2011; paragraph [0010]; Claim 1	1-61
A	US 2010/0003254 A1 (HATTORI, K et al.) January 07, 2010; abstract; paragraphs [0017], [0251], [0254]	1-61
A	US 2006/0167230 A1 (KOGA, T et al.) July 27, 2006; abstract; paragraphs [0011], [0044], [0067]	1-61
A	WO 2009/073163 A1 (GELBER, C et al.) June 11, 2009; page 67, line 17 to page 68, line 4	1-61
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* 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 26 December 2013 (26.12.2013)		Date of mailing of the international search report 13 JAN 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US13/49368 10.01.2014
International application No.

PCT/US13/49368

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/532	A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/574	D
	G 0 1 N 33/574	A
	C 0 7 K 19/00	
	C 1 2 N 5/00	1 0 2

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

(72)発明者 セルジーバ, アナ

アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, リンクウッド ドライブ 3431

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA15 BA53 BA54 CA04 CA06 CA10 CA20 DA02
 EA02 EA04 FA02 GA03 GA14 GA18 HA01 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC06 CC12 CC15 CC24 CE12 DA05
 DA13 DA14
 4B065 AA91X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA03 BA08 BB13 BB25
 BC03 BC07 BD14 BD15 BD18 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA13 AA14 AA21 AA27 CC03 CC05 CC08 DD63 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA51 EA54 FA74 GA15 GA26

专利名称(译)	单克隆抗体，用于诊断和治疗癌症和自身免疫疾病		
公开(公告)号	JP2015530359A	公开(公告)日	2015-10-15
申请号	JP2015521668	申请日	2013-07-03
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	モルドレムジェフリー セルジーバアナ		
发明人	モルドレム, ジェフリー セルジーバ, アナ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/02 C07K16/46 C12P21/08 C12N15/09 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 A61P29/00 G01N33/532 G01N33/53 G01N33/574 C07K19/00 C12N5/10		
CPC分类号	A61K47/6851 A61P29/00 A61K47/6871 C07K16/2833 C07K16/30 C07K16/3061 C07K16/40 C07K2317 /24 C07K2317/32 C07K2317/34 C07K2317/567 C07K2317/71 C07K2317/73 C07K2317/92 A61K39 /395 A61K45/06 A61K49/0058 G01N33/57488 G01N2333/96433 A61K39/00		
FI分类号	C07K16/28 C12N15/00.ZNA.C C07K16/46 C12P21/08 C12N15/00.A A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61K39/395.L A61K39/395.Y A61P35/02 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P29 /00 G01N33/532.A G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/574.D G01N33/574.A C07K19/00 C12N5/00. 102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024 /CA10 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA14 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064 /CC06 4B064/CC12 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA03 4B065 /BA08 4B065/BB13 4B065/BB25 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA27 4C085 /CC03 4C085/CC05 4C085/CC08 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/669967 2012-07-10 US 61/702916 2012-09-19 US		
其他公开文献	JP2015530359A5 JP6336696B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

该说明书描述了在癌细胞表面上HLA呈递的背景下识别HLA-A2限制性肽PR-1的抗体的序列。还提供了这些抗体在癌症和免疫相关疾病的诊断和治疗中的用途。

(21) 出願番号	特願2015-521668 (P2015-521668)	(71) 出願人	500039463
(86) (22) 出願日	平成25年7月3日 (2013. 7. 3)		ボード・オブ・リーゼンツ, サ・ユニバ
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月6日 (2015. 3. 6)		ーシテイ・オブ・テキサス・システム
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/049368		アメリカ合衆国、テキサス・78701、
(87) 国際公開番号	WO2014/011489		オースティン、ウエスト・セブンス・スト
(87) 国際公開日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)		リート・201
(31) 優先権主張番号	61/669, 967	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成24年7月10日 (2012. 7. 10)		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	61/702, 916		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成24年9月19日 (2012. 9. 19)	(72) 発明者	モルドレム, ジェフリー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 テキサス 77030、
			ヒューストン、ホルコム プールバー
			ド 1515, ユニット 0900
			最終頁に続く